



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111875700 A

(43) 申请公布日 2020.11.03

(21) 申请号 202010736672.4

(22) 申请日 2020.07.28

(71) 申请人 武汉华美生物工程有限公司
地址 430206 湖北省武汉市东湖开发区高新大道818号高科医疗器械园B11栋

(72) 发明人 罗绍祥 王静 张芳 舒芹
赵愿安

(74) 专利代理机构 北京众达德权知识产权代理有限公司 11570

代理人 江慧

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

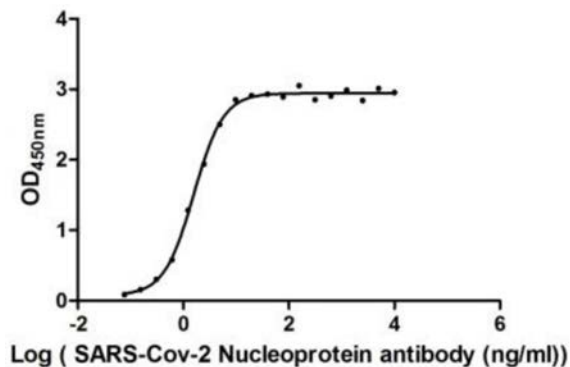
权利要求书1页 说明书8页
序列表9页 附图1页

(54) 发明名称

抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供了一种抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体,所述单链抗体能识别SARS-COV-2病毒N蛋白,所述单链抗体包括重链可变区和轻链可变区;所述重链可变区具有如SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的三个互补决定区;所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的三个互补决定区。所述单链抗体与N蛋白结合的EC50为1.339ng/ml。该抗体可以用于新冠抗体检测试剂盒的质控抗体,经胶体金试剂盒检测抗体特异性良好,检测的抗体浓度低至125ng/ml。



1. 一种抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体,其特征在于,所述单链抗体能识别SARS-COV-2病毒N蛋白,所述单链抗体包括重链可变区和轻链可变区:

所述重链可变区具有如SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的三个互补决定区;

所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的三个互补决定区。

2. 根据权利要求1所述的一种抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体,其特征在于,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

3. 根据权利要求2所述的一种抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体,其特征在于,所述单链抗体还包括所述单链抗体的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的抗体。

4. 根据权利要求2或3所述的一种抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体,其特征在于,所述单链抗体还包括所述单链抗体的N端和/或C端连接标签得到的抗体。

5. 一种编码权利要求1-4任一所述单链抗体的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子包括编码所述重链可变区的核酸分子和编码所述轻链可变区的核酸分子。

6. 根据权利要求5所述的核酸分子,其特征在于,所述编码所述重链可变区的核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示,所述编码所述轻链可变区的核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示。

7. 一种含有权利要求5-6任一所述核酸分子的生物材料,其特征在于,所述生物材料包括重组DNA、质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。

8. 一种重组抗体,其特征在于,所述重组抗体由权利要求1-4任一所述的抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体和人源Fc片段组成,所述人源Fc片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

9. 权利要求1-4任一所述的SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体以及权利要求8所述的重组抗体在制备SARS-COV-2病毒检测试剂或试剂盒中的用途。

10. 权利要求1-4任一所述的SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体以及权利要求8所述的重组抗体在制备SARS-COV-2病毒胶体金检测试剂盒的质控抗体中的用途。

抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体及其用途

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体及其用途。

背景技术

[0002] 冠状病毒隶属于冠状病毒科、冠状病毒属,是一类单链正义RNA病毒。自1937年发现首个病毒至今,共鉴定多种冠状病毒,分属于 α 、 β 、 γ 和 δ 属,其中有7种冠状病毒能感染人,分别为 α 属的HCoV-229E、HCoV-NL63和 β 属的HCoV-OC43、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV及2019年底鉴定的新型冠状病毒SARS-CoV-2。

[0003] 冠状病毒基因组依次编码棘突蛋白(Spike protein)、包膜蛋白(Envelope protein)、膜蛋白(Membrane protein)和核衣壳蛋白(Nucleocapsid)。其中,棘突蛋白(Spike protein)是冠状病毒最重要的表面膜蛋白,含有两个亚基S1和S2。其中S1主要包含有受体结合区(receptor binding domain, RBD),负责识别细胞的受体。S2含有膜融合过程所需的基本元件。Spike蛋白承担病毒与宿主细胞膜受体结合及膜融合功能,是宿主中和抗体的重要作用位点以及疫苗设计的关键靶点。SARS-CoV-2的Spike蛋白与人ACE2互作来感染人的呼吸道上皮细胞。核衣壳蛋白(Nucleocapsid)是冠状病毒中含量最丰富的蛋白。在病毒体组装过程中,N蛋白与病毒RNA结合并导致螺旋核衣壳的形成。

[0004] 从冠状病毒的结构上看,Spike/N蛋白暴露于病毒表面,含有大量的抗原决定簇,可以产生针对病毒的保护性抗体。此外,SARS-CoV-2的核衣壳蛋白有可能诱导特异性T细胞免疫反应,对拮抗病毒感染也具有重要作用。

[0005] 单链抗体(single chain antibody fragment, scFv),是由抗体重链可变区和轻链可变区通过15~20个氨基酸的短肽(linker)连接而成。scFv单链抗体的优点:可去除非特异性反应的竞争性表面蛋白,肿瘤显象背景更加清晰性;免疫源性小,可消除人抗鼠的排斥反应;在体内循环的半衰期短,易清除,利于解毒排出;易于与毒素或酶基因连接,便于直接获得免疫毒素或酶标抗体等。目前普遍认为,针对感染性病原微生物的检测,通过双抗体夹心法检测抗原是一直以来比较推崇的检测方法,可以一定程度的弥补PCR检测过程耗时长、检测流程复杂的问题,同时能一定程度的避免抗体检测假阳性以及检测窗口期的问题。基于此,针对性的开发特异性抗体对用于SARS-CoV-2病原微生物抗原检测,对于完善检测手段、丰富检测方法,提高检测结果的准确度、灵敏度和特异性有着非常重要的帮助。

[0006] 因此,亟需开发用于针对SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体。

发明内容

[0007] 为了解决所述技术问题,本发明提供了一种抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体及其用途,可以特异性识别SARS-COV-2病毒N蛋白,所述单链抗体与N蛋白结合的EC₅₀为1.339ng/ml。该抗体可以用于新冠抗体检测试剂盒的质控抗体,经胶体金试剂盒检测抗体特异性良好,检测的抗体浓度低至125ng/ml。

[0008] 第一方面,本发明提供了抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体,所述单链抗体能识别SARS-COV-2病毒N蛋白,所述单链抗体包括重链可变区和轻链可变区:

[0009] 所述重链可变区具有如SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的三个互补决定区;

[0010] 所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的三个互补决定区。

[0011] 进一步地,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0012] 进一步地,所述单链抗体还包括所述单链抗体的氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或多个氨基酸得到的具有相同功能的抗体。

[0013] 进一步地,所述单链抗体还包括所述单链抗体的N端和/或C端连接标签得到的抗体。第二方面,本发明提供了一种编码所述单链抗体的核酸分子,所述核酸分子包括编码所述重链可变区的核酸分子和编码所述轻链可变区的核酸分子。

[0014] 进一步地,所述编码所述重链可变区的核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示,所述编码所述轻链可变区的核酸分子的核苷酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0015] 第三方面,本发明提供了一种含有所述核酸分子的生物材料,所述生物材料包括重组DNA、质粒载体、噬菌体载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。

[0016] 第四方面,本发明提供了一种重组抗体,所述重组抗体由抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体和人源Fc片段组成,所述人源Fc片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

[0017] 第五方面,本发明提供了所述的SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体以及所述的重组抗体在制备SARS-COV-2病毒试剂或试剂盒中的用途。

[0018] 第六方面,本发明提供了所述的SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体以及所述的重组抗体在制备SARS-COV-2病毒胶体金检测试剂盒的质控抗体中的用途。

[0019] 本发明实施例中的一个或多个技术方案,至少具有如下技术效果或优点:

[0020] 本发明提供的抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体可以特异性识别SARS-COV-2病毒N蛋白,所述单链抗体与N蛋白结合的EC50为1.339ng/ml。该抗体可以用于新冠抗体检测试剂盒的质控抗体,经胶体金试剂盒检测抗体特异性良好,检测的抗体浓度低至125ng/ml。

附图说明

[0021] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作一简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。

[0022] 图1是实施例2中1A6重组抗体与N蛋白结合曲线图;

[0023] 图2是1A6重组抗体应用于胶体金检测试剂盒时的灵敏度结果。

具体实施方式

[0024] 下文将结合具体实施方式和实施例,具体阐述本发明,本发明的优点和各种效果将由此更加清楚地呈现。本领域技术人员应理解,这些具体实施方式和实施例是用于说明

本发明,而非限制本发明。

[0025] 在整个说明书中,除非另有特别说明,本文使用的术语应理解为如本领域中通常所使用的含义。因此,除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域技术人员的一般理解相同的含义。若存在矛盾,本说明书优先。

[0026] 除非另有特别说明,本发明中用到的各种原材料、试剂、仪器和设备等,均可通过市场购买得到或者可通过现有方法制备得到。

[0027] 本发明实施例提供的技术方案为解决上述技术问题,总体思路如下:

[0028] N蛋白暴露于病毒表面,含有大量的抗原决定簇,可以产生针对病毒的保护性抗体,是疫苗研发和中和性抗体开发的主要抗原。同时,由于其免疫原性较强,可以在病毒体内产生大量抗体,也是开发诊断试剂盒的重要原料。

[0029] 天然抗体库适合筛选各种抗原,不需要单独免疫小鼠,结合噬菌体展示技术的高通量筛选方案,可以在一周时间内筛选到识别目标蛋白的抗体。本研究用重组表达的N蛋白筛选鼠天然抗体库,获得了1株可以特异性识别N蛋白的单链抗体:

[0030] 1A6单链抗体:包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示;所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0031] 所述重链可变区具有如SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的三个互补决定区;所述轻链可变区具有如SEQ ID NO:4-SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的三个互补决定区。所述单链抗体的CDR区的氨基酸序列如下表1所示:

[0032] 表1

组别	H/L	CDR1	CDR2	CDR3
[0033] 1A6	H	GFNIKDTY (如 SEQ ID NO: 1 所示)	INPSTGYT (如 SEQ ID NO: 2 所示)	ARDALGWYFDV (如 SEQ ID NO: 3 所示)
	L	QNVGT (如 SEQ ID NO: 4 所示)	SAS (如 SEQ ID NO: 5 所示)	QQYNSYPLT (如 SEQ ID NO: 6 所示)

[0034] 因此,具有重链互补决定区CDR1-CDR3、轻链互补决定区CDR1-CDR3的单链抗体,也在本发明的保护范围之内。

[0035] 经实验验证,1A6单链抗体能够与新型冠状病毒SARS-COV-2的N蛋白特异性结合,所述单链抗体与N蛋白结合的EC50为1.339ng/ml,该抗体具有抑制病毒感染的能力。该抗体可以用于新冠抗体检测试剂盒调试,经胶体金试剂盒检测抗体特异性良好,检测的抗体浓度低至125ng/ml。

[0036] 此外,本发明还将所述单链抗体和人源Fc片段重组后获得的重组抗体;所述单链抗体或者重组抗体用于SARS-COV-2病毒的胶体金检测试剂盒,特异性强、准确度高,灵敏度高。

[0037] 下面将结合实施例及实验数据对本申请的效果进行详细说明。

[0038] 实施例1获得单链抗体

[0039] 1、构建噬菌体展示抗体库

[0040] 取一支15ml离心管,先加入与血液样本等量的分离液,小心吸取血液样本加于分离液之液面上,450-650g,离心20-30min;离心后,此时离心管中由上至下分为四层,依次为血浆层,环状乳白色淋巴细胞层,透明分离液层和红细胞层;用吸管小心吸取第二层环状乳

白色淋巴细胞层到另一15ml离心管中；向所得离心管中加入10ml清洗液，混匀细胞，250g，离心10min；离完心看上清液是否澄清，不够澄清加长离心时间；用1×PBS清洗细胞2次，加trizol裂解细胞-80℃保存。

[0041] 取-80℃保存的外周淋巴细胞裂解液在室温中融化；加入0.2ml氯仿，盖上盖子，剧烈振荡15s，室温放置2min后，于12000g、4℃离心15min；将上清小心转至另一离心管中，加入等体积异丙醇，混匀后室温放置10min；于12000g、4℃离心15min；离心后弃上清，沉淀用75%的酒精漂洗，再次于12000g、4℃离心5min；离心后弃上清，将离心管置于室温，待其干燥用无RNase的水溶解RNA；取少许溶解的RNA跑琼脂糖胶，并测定浓度，判断RNA是否降解。

[0042] 从-80℃取出总RNA于冰上融化；PCR仪上65℃5min打开RNA的二级结构；放置冰上2min；依次加入buffer和逆转录酶及引物37℃15min，98℃5min；用内参引物验证得到的cDNA；-20℃保存（-80℃长期保存）。

[0043] 配制PCR反应体系，用小鼠抗体库引物（引物序列为如表2所示），从cDNA中扩增出抗体重链和轻链可变区；PCR反应条件94℃4min，（94℃30s，54℃30s，72℃1min）25个循环，72℃4min；将PCR产物进行2%琼脂糖凝胶电泳分析，并切下约350bp左右的目的条带，用胶回收柱回收目的片段扩增产物。

[0044] 将重链和轻链回收的抗体基因，分别用PCR方法添加linker（linker核苷酸序列为5'-GGTGGAGGCGGCTCTGGTGGCGGTGGCAGTGGCGGCGGAGGTTCT-3'），跑胶回收后按照等物质量混合，加入酶切位点引物，通过PCR扩增反应（反应条件同可变区扩增），实现重链和轻链通过linker连接。

[0045] 按如下体系将各试剂加入到PCR管中：

	SfiI(10U/ul)	1ul
	10xBuffer 3.1	5ul
[0046]	抗体/载体	2ug
	加水至	30ul

[0047] 在PCR仪上50℃过夜进行SfiI酶切；取出后冷却至室温，继续向体系中加入以下成分：

[0048] 10xBuffer 5uL

[0049] NotI 1ul

[0050] 加水至 50ul

[0051] 在PCR仪上37℃保温过夜进行NotI酶切；跑1.5%的琼脂糖胶切胶，用天根DNA回收试剂盒回收目的片段，分装后于-20℃冻存待用；配制反应体系，将抗体基因连入酶切后的pCANTAB5E载体。

[0052] 按下列体系配制连接体系

	载体	1.5ug
	抗体	0.5ug
[0053]	T4 连接酶	2ul
	10xbuffer	10ul
	加水至	100ul

[0054] 在PCR仪上16℃连接过夜。

[0055] 划线Minimal培养板37℃培养过夜；接种TG1单菌落至5mL2YT培养液中于37℃振荡培养过夜；次日将接种过夜培养的菌液5mL加至300mL的2YT培养液中，振荡培养至OD600达到0.4-0.5；将菌液冰浴30min后，在预冷的离心机中于4℃以4000g离心15min；用300mL预冷的灭菌去离子水于冰水中轻柔重悬沉淀，至沉淀细胞完全均匀地分散于水中；在预冷的离心机中于4℃以4000g离心15min；再依次用150mL预冷的灭菌去离子水和30mL预冷的10%的甘油（用灭菌去离子水配制）如上所述重悬细胞两次；最后将细胞重悬于1mL预冷的10%的甘油中，置于冰上立即使用或分装；冻存于-80℃中待用；向100uL感受态中加入5uL连接产物，放于冰上预冷，转入预冷后的电转杯中；调节电转仪电压2.5KV电击时间5ms，电击后，迅速加入0.9mL 2YT培养基，37℃振荡培养1.5小时；取10uL梯度稀释，涂布于SOBAG平板上，计算库容，剩余菌液涂布于10个SOBAG平板上，37℃培养过夜。

[0056] 对梯度稀释的菌落计数，计算出本次建成的抗体库的库容；从SOBAG平板上随机挑取20个克隆，用菌落PCR检测抗体基因插入载体的效率；将随机挑选的20个克隆送测序分析，检测抗体库容，抗体基因的完整性及多样性。

[0057] 2、拯救噬菌体表面展示抗体库

[0058] 将构建好的纳米抗体库以噬菌粒的形式保存在宿主菌中，在淘选过程开始前，应当先拯救文库，使其成为噬菌体展示的抗体库。具体方法如下：

[0059] 将1.5mL带E-tag标签的抗体库接种到300mL 2YT-AG培养基中，至OD_{600nm}约0.3-0.4；37℃振荡培养约1.5h至OD_{600nm}=0.5-0.6；按细菌：phage=1:5加入helper phage辅助噬菌体（M13K07），37℃振荡培养约1h；4000rpm 15℃离心15min，去除培养基；加入200mL 2YT-AK（100μg/mL Amp，50μg/mL Kan）培养基重悬细菌，37℃培养2h；10000rpm离心20min去除沉淀；上清加入40mL PEG/NaCl沉淀phage，冰浴过夜；10000rpm离心20min，去掉上清；用0.6mL 2YT培养基重悬phage，4℃备用。若需要大量制备phage，更换kan抗性的培养基以后，培养时间从两小时延长至过夜培养。获得的噬菌体经过梯度稀释，感染TG1菌，涂布SOBAG平板，通过菌落计数计算噬菌体库滴度。

[0060] 本实验利用His Bind Resin结合抗原蛋白，从噬菌体展示的抗体库中淘选抗体，具体过程如下：活化His Bind Resin：取200μL His Bind Resin于1.5mL离心管中，1000g离心1min，去掉保存溶液；加入200μL的ddH₂O清洗树脂一次，1000g离心1min，去掉上清，重复此步骤一次；加入200μL离子化缓冲液，重悬树脂，静置10min，离心去掉上清；加入200μL结合缓冲液，重悬树脂，静置10min；取40μL树脂加入1.5mL离心管中，离心去掉上清。

[0061] 4、淘选识别目的蛋白的单链抗体

[0062] 取纯化后的N蛋白10μg，加入165μL PBS中，混匀后加入装有活化后的树脂的EP管中，旋转混匀1h，1000g离心1min，去掉上清；加入200μL漂洗缓冲液，重悬树脂，1000g离心

1min, 去掉上清, 此步骤重复一次。取拯救后的噬菌体展示抗体库溶液300 μ L, 加入0.3 μ L Triton X-100, 用微量移液器轻轻混匀; 加入40 μ L未活化的树脂, 轻微旋转反应1h; 1000g离心1min, 取上清加入40 μ L已包被抗原蛋白的树脂, 轻微旋转反应2h; 1000g离心1min, 去掉上清; 加入500 μ L漂洗缓冲液(含0.1% Triton X-100), 重悬树脂, 轻微振荡漂洗5min, 1000g离心1min, 去掉上清, 此步骤重复5次;

[0063] 加入500 μ L漂洗缓冲液含(0.1% Tween-20), 重悬树脂, 轻微振荡漂洗5min, 1000g离心1min, 去掉上清, 此步骤重复5次; 最后一次漂洗后, 将树脂转移到新的EP管中, 1000g离心1min, 去掉上清; 加入200 μ L洗脱缓冲液, 轻微旋转洗脱20min; 1000g离心1min, 取上清, 加入5mL TG1菌液中, 37 $^{\circ}$ C感染1h; 将感染的菌液涂布SOBAG平板, 30 $^{\circ}$ C倒置培养过夜; 次日, 用2YT-AG培养基刮下平板上的菌落, 并拯救成噬菌体进行下一轮淘选。

[0064] 5、挑选识N蛋白的阳性克隆

[0065] 从SOBAG平板上随机挑取单菌落接种到96孔细菌培养板中, 每孔加入200 μ L 2YT-AG, 37 $^{\circ}$ C培养过夜; 吸取25 μ L菌液到新的细菌培养板中, 加入175 μ L 2YT-AG培养基, 37 $^{\circ}$ C培养3h; 3500rpm离心10min, 去上清, 菌沉淀重悬于200 μ L 2YT-AI (100 μ g/mL Amp, 1mM IPTG) 培养基中, 30 $^{\circ}$ C诱导过夜; 3500rpm离心10min, 上清4 $^{\circ}$ C保存备用; 将纯化的目的蛋白加入到ELISA板中, 4 $^{\circ}$ C包被过夜; 倾掉包被液后, 以PBS洗3次, 4% PBSM (PBS含4% 脱脂牛奶) 封闭1h; 以PBS洗1次后, 每孔加入50 μ L以上制备好的单链抗体上清和50 μ L 4% PBSM, 于37 $^{\circ}$ C反应1h; 用PBS和PBST各洗3次后, 每孔加入100 μ L anti-E/HRP conjugation (以4% PBSM按1:5000稀释), 37 $^{\circ}$ C保温1h; 用PBST和PBS洗涤三次, 加入100 μ L TMB底物溶液, 避光反应15min, 加入25 μ L 2mol/L H₂SO₄终止反应, 用酶标仪测定OD_{450nm}值判定目的蛋白的浓度。

[0066] 6、阳性克隆测序和序列分析

[0067] 将上述淘选得到的OD_{450nm}值较大的目的蛋白经ELISA鉴定, 将鉴定为阳性的单克隆送金开瑞测序, 测序的通用引物为S1: 5' -GACCATGATTACGCCAAGC-3', 用DNastar和Clustalw1.8分析抗体的重链与轻链可变区序列, 最终获得了1株1A6单链抗体: 包括重链可变区和轻链可变区, 所述重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示; 所述轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0068] 表2

[0069]

引物名称	引物序列(5' -3')
MHV.BACK1	ttattactcgcgcccagccggccatggccGATGTGAAGCTTCAGGAGTC (SEQ ID NO:13)
MHV.BACK2	ttattactcgcgcccagccggccatggccCAGGTGCAGCTGAAGGAGTC (SEQ ID NO:14)
MHV.BACK3	ttattactcgcgcccagccggccatggccCAGGTGCAGCTGAAGCAGTC (SEQ ID NO:15)
MHV.BACK4	ttattactcgcgcccagccggccatggccCAGGTACTCTGAAAGAGTC (SEQ ID NO:16)
MHV.BACK5	ttattactcgcgcccagccggccatggccGAGGTCCAGCTGCAACAATCT (SEQ ID NO:17)
MHV.BACK6	ttattactcgcgcccagccggccatggccGAGGTCCAGCTGCAGCAGTC (SEQ ID NO:18)
MHV.BACK7	ttattactcgcgcccagccggccatggccCAGGTCCAAGTGCAGCAGCCT (SEQ ID NO:19)
MHV.BACK8	ttattactcgcgcccagccggccatggccGAGGTGAAGCTGGTGGAGTC (SEQ ID NO:20)
MHV.BACK9	ttattactcgcgcccagccggccatggccGAGGTGAAGCTGGTGAATC (SEQ ID NO:21)
MHV.BACK10	ttattactcgcgcccagccggccatggccGATGTGAACTTGAAGTGTC (SEQ ID NO:22)
MHV.FOR1	tgaaccgcctccaccTGCAGAGACAGTGACCAGAGT (SEQ ID NO:23)
MHV.FOR2	tgaaccgcctccaccTGAGGAGACTGTGAGAGTGGT (SEQ ID NO:24)

MHV.FOR3	tgaaccgcctccaccTGAGGAGACGGTGACTGAGGT (SEQ ID NO:25)
MHV.FOR4	tgaaccgcctccaccTGAGGAGACGGTGACCGTGGT (SEQ ID NO:26)
MKV.BACK1	tctggcgggtggcggatcgGATGTTTTGATGACCCAACT (SEQ ID NO:27)
MKV.BACK2	tctggcgggtggcggatcgGATATTGTGATGACGCAGGCT (SEQ ID NO:28)
MKV.BACK3	tctggcgggtggcggatcgGATATTGTGATAACCCAG (SEQ ID NO:29)
MKV.BACK4	tctggcgggtggcggatcgGACATTGTGCTGACCCAATCT (SEQ ID NO:30)
MKV.BACK5	tctggcgggtggcggatcgGACATTGTGATGACCCAGTCT (SEQ ID NO:31)
MKV.BACK6	tctggcgggtggcggatcgGATATTGTGCTAACTCAGTCT (SEQ ID NO:32)
MKV.BACK7	tctggcgggtggcggatcgGATATCCAGATGACTCAGTCT (SEQ ID NO:33)
MKV.BACK8	tctggcgggtggcggatcgGACATCCAGCTGACTCAGTCT (SEQ ID NO:34)
MKV.BACK9	tctggcgggtggcggatcgCAAATTGTTCTACCCAGTCT (SEQ ID NO:35)
MKV.FOR1	atgagtttttgttctgcggccgcCCGTTTCAGCTCCAGCTTG (SEQ ID NO:36)
MKV.FOR2	atgagtttttgttctgcggccgcCCGTTTATTTCAGCTTGGT (SEQ ID NO:37)
MKV.FOR3	atgagtttttgttctgcggccgcCCGTTTATTTCCTCACTTTG (SEQ ID NO:38)
MKV.FOR	atgagtttttgttctgcggccgcGGATACAGTTGGTGCAGCATC (SEQ ID NO:39)

[0070] 表2中,H表示重链,K表示轻链,M代表小鼠,V代表可变区,所述MHV是扩增重链的,MKV是扩增轻链的,back和for分别代表上下游,MHV.BACK1-MHV.BACK10中的任意一条与MHV.FOR1-MHV.FOR4中的任意一条组成一对用于扩增重链的引物对;

[0071] MKV.BACK1-MKV.BACK10中的任意一条与MKV.FOR1-MKV.FOR4中的任意一条组成一对用于扩增轻链的引物对。

[0072] 实施例2抗体表达

[0073] 1、重组表达载体的构建

[0074] 根据测序结果,用引物(所述上游引物为:5'-GCGGCCAGCCGGCCATGGCC-3',下游引物为:5'-ACCGGCGCACCTGCGGCCGC-3')扩增抗体基因;抗体基因经*Sfi*I和*Not*I双酶切,插入抗体表达载体pSecTag2A-fc载体中,用质粒抽提试剂盒提取质粒。所述pSecTag2A-fc为用pSecTag2A(Thermo Fisher,V90020)改造而得的载体,即在载体的*hind* III和*Bam*H I酶切位点中插入了人源IgG1 Fc基因片段,所述人源Fc片段的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,所述人源Fc片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:12所示。

[0075] 2、融合蛋白的表达

[0076] 转染前将所有试剂置于室温10分钟,以下操作使用6孔培养皿;将3 μ g质粒DNA稀释到250 μ L无血清的DMEM培养基,用移液枪吹吸3-4次;将5 μ L PEI试剂稀释到250 μ L无血清的DMEM培养基,用移液枪吹吸3-4次;注意:无血清的DMEM培养基是稀释液,不能使用含血清的培养基进行DNA和将稀释好的PEI转染试剂一次性全部加入到已稀释好的质粒DNA中,立即用移液枪吹吸3-4次;室温放置10-15分钟,以形成PEI-DNA复合物;转染前18-24小时进行细胞的计数并铺板,以便在转染时,使贴壁细胞的汇合度大约80%左右;弃去孔中原培养基,加入1ml新鲜的DMEM完全培养基;制备PEI-DNA复合物;将PEI-DNA混合液均匀滴入细胞培养基中,轻轻做十字运动,让PEI-DNA复合物分散均匀;培养皿放于5%CO₂,37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中,72h后收集细胞,检测蛋白表达量。按照相同的比例转化100ml细胞,纯化重组表达的抗体。取上清进行亲和层析纯化和SDS-PAGE电泳分析,纯化的重组抗体用间接竞争ELISA初步测定其活性。通过优化诱导表达条件(如宿主菌、表达载体、诱导培养时间、温度以及IPTG浓

度等),可以进一步提高目的蛋白表达量,为大量制备重组提供了途径。

[0077] 实施例3重组抗体与N蛋白结合情况

[0078] 将实施例1筛选获得的1A6单链抗体,经过实施例2表达后,获得的重组抗体与S1结合,检测抗体与S1结合的EC50值,N蛋白按照2 μ g/ml包被微孔板;检测结果如图1和表3所示。

[0079] 表3

组别	EC50
1A6重组抗体	1.339ng/ml

[0081] 由图1和表3可知,1A6重组抗体与N蛋白结合的EC50分别为1.339ng/ml。

[0082] 实施例4重组抗体应用于SARS-COV-2病毒的检测

[0083] 单链抗体1A6用做SARS-COV-2病毒抗体的胶体金检测试剂盒的质控

[0084] 实施例2中纯化后的重组抗体按照32000ng/ml、8000ng/ml、2000ng/ml、500ng/ml、250ng/ml、125ng/ml、62.5ng/ml稀释,上样70 μ L到胶体金检测卡。

[0085] 单链抗体1A6用作质控抗体应用于胶体金检测试剂盒时的灵敏度结果如图2所示,由图2可知,抗体可以识别N蛋白,所有检测卡C线正常,T线随抗体梯度稀释信号减弱,表明灵敏度高,抗体特异性良好,检测的抗体浓度低至125ng/ml。

[0086] 最后,还需要说明的是,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。

[0087] 尽管已描述了本发明的优选实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例作出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明范围的所有变更和修改。

[0088] 显然,本领域的技术人员可以对本发明进行各种改动和变型而不脱离本发明的精神和范围。这样,倘若本发明的这些修改和变型属于本发明权利要求及其等同技术的范围之内,则本发明也意图包含这些改动和变型在内。

序列表

<110> 武汉华美生物工程有限公司

<120> 抗SARS-COV-2病毒N蛋白的单链抗体及其用途

<160> 39

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr

1 5

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Ala Arg Asp Ala Leu Gly Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

Gln Asn Val Gly Thr

1 5

<210> 5

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 5

Ser Ala Ser

1

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 7

Glu Val Lys Leu Lys Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr

20 25 30

Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Ala Leu Gly Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Thr

115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

Asp Val Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Phe Pro Lys Ala Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 9

<211> 354

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 9

gaggtgaagc tcaaggagtc tggggcagag cttgtgaagc caggggcctc agtcaagttg 60
 tcctgcacag cttctggett caacattaaa gacacctata tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatceta gcactggtta tactgagtac 180
 aatcagaagt tcaaggacaa ggccacattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcaactga gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagagatgca 300
 ctgggctggt acttcgatgt ctggggcgca gggactctgg tcaccgtgtc gaca 354

<210> 10

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10

gacgtcgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 gtcacctgca aggccagtca gaatgtgggt actaatgtag cctggatatca acagaaacca 120
 gggcaatttc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggate tgggacagat tteactetca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacagct atcctctcac gttcgggtgct 300
 gggaccaagc tggaaatcaa gcgc 324

<210> 11

<211> 232

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 11

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 12

<211> 696

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 12

gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 60
 gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccgg 120
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc 180
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 360

atctccaaag ccaaaggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 420
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 480
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctatagca agctcacctg ggacaagagc 600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga agagcctctc cctgtccccg ggtaaa 696

<210> 13

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 13

ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc gatgtgaagc ttcaggagtc 50

<210> 14

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 14

ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc caggtgcagc tgaaggagtc 50

<210> 15

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 15

ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc caggtgcagc tgaagcagtc 50

<210> 16

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 16

ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc caggttactc tgaagagtc 50

<210> 17

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 17

ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc gaggtccagc tgcaacaatc t 51

<210> 18

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 18
ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc gaggtccagc tgcagcagtc 50
<210> 19
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 19
ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc caggtccaac tgcagcagcc t 51
<210> 20
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 20
ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc gaggtgaagc tggaggagtc 50
<210> 21
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 21
ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc gaggtgaagc tggaggaatc 50
<210> 22
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 22
ttattactcg cggcccagcc ggccatggcc gatgtgaact tggaggatgc 50
<210> 23
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 23
tgaaccgcct ccacctgcag agacagtgac cagagt 36
<210> 24
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 24
tgaaccgcct ccacctgagg agactgtgag agtggt 36

<210> 25
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 25
tgaaccgcct ccacctgagg agacggtgac tgaggt 36
<210> 26
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 26
tgaaccgcct ccacctgagg agacggtgac cgtggt 36
<210> 27
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 27
tctggcgggtg gcggatcgga tgttttgatg acccaaact 39
<210> 28
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 28
tctggcgggtg gcggatcgga tattgtgatg acgcaggct 39
<210> 29
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 29
tctggcgggtg gcggatcgga tattgtgata acccag 36
<210> 30
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<400> 30
tctggcgggtg gcggatcgga cattgtgctg acccaatct 39
<210> 31
<211> 39
<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 31
tctggcgggtg gcggatcgga cattgtgatg acccagtct 39
<210> 32
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 32
tctggcgggtg gcggatcgga tattgtgcta actcagtct 39
<210> 33
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 33
tctggcgggtg gcggatcgga tatccagatg actcagtct 39
<210> 34
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 34
tctggcgggtg gcggatcgga catccagctg actcagtct 39
<210> 35
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 35
tctggcgggtg gcggatcgca aattgttctc acccagtct 39
<210> 36
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 36
atgagttttt gttctgcggc cgcccgtttc agctccagct tg 42
<210> 37
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<400> 37
atgagttttt gttctgcggc cgcccgtttt atttccagct tgg 44

<210> 38

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 38

atgagttttt gttctgcggc cgcccgtttt attccaact ttg 43

<210> 39

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 39

atgagttttt gttctgcggc cgcgataca gttggtgcag catc 44

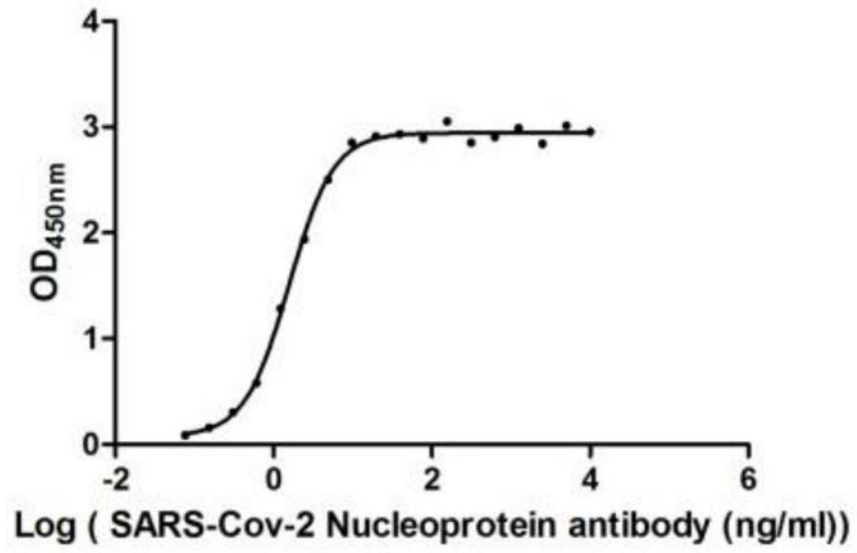


图1

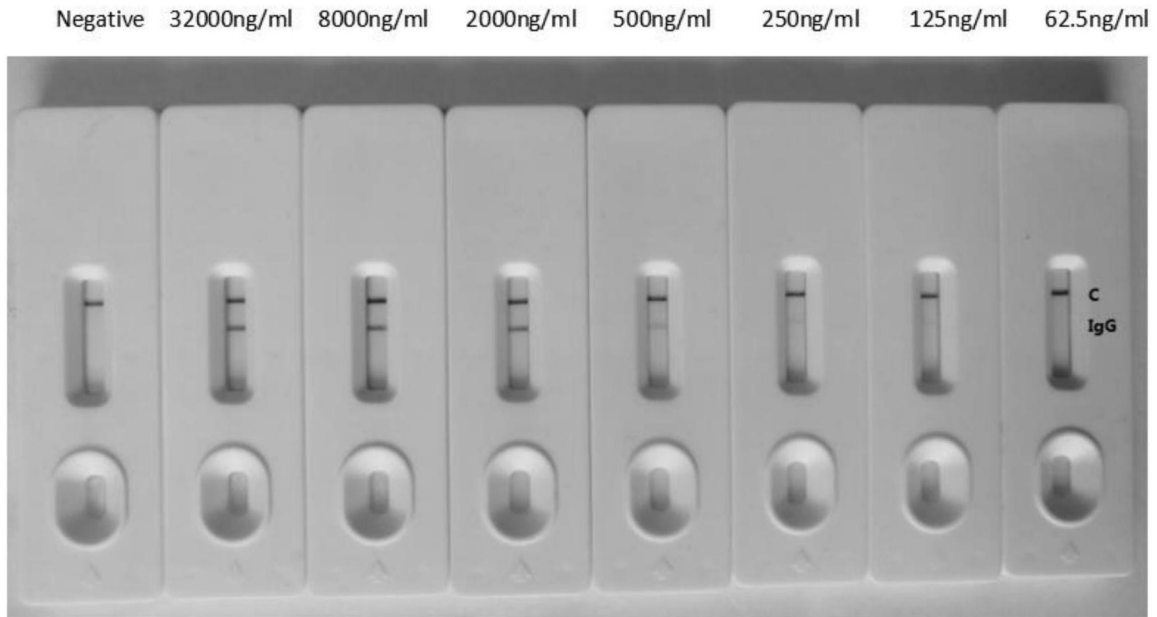


图2