



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114957454 A

(43) 申请公布日 2022.08.30

(21) 申请号 202210577795.7

G01N 33/68 (2006.01)

(22) 申请日 2022.05.25

(71) 申请人 青岛农业大学

地址 266000 山东省青岛市城阳区长城路
700号

(72) 发明人 曹志 单虎 秦志华 尹德华

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 苏士莹

(51) Int. Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

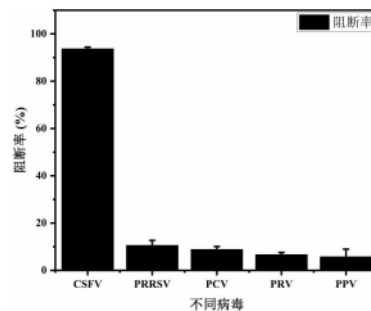
权利要求书1页 说明书9页
序列表3页 附图7页

(54) 发明名称

一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体、融合蛋白及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明提供了一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体、融合蛋白及其制备方法和应用,涉及生物技术领域。本发明所述纳米抗体的氨基酸序列如SEQ IDNO.1所示。本发明利用所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1与标记位点构建融合蛋白,利用所述融合蛋白作为一抗抗体,构建了一种检测猪血清中CSFV抗体的阻断法ELISA检测试剂盒。利用本发明所述检测试剂盒,检测方法操作简单,为后续将所述纳米抗体和所述融合蛋白应用于CSFV抗体检测的提供了关键的材料,可以简化生产工艺,降低生产成本,具有很好的市场转化前景。



1. 一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体CSFV-E2-Nb1,其特征在于,所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
2. 一种编码权利要求1所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1的核酸分子,其特征在于,核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。
3. 一种包含权利要求1所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1和标记位点的融合蛋白。
4. 根据权利要求3所述融合蛋白,其特征在于,所述标记位点包括生物素化标记位点Avitag。
5. 一种表达权利要求3或4所述融合蛋白的重组质粒,其特征在于,所述重组质粒的基础载体包括原核表达载体。
6. 权利要求3或4所述融合蛋白的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:将权利要求5所述重组质粒转入感受态细胞内,利用IPTG进行诱导表达,收集包涵体蛋白,纯化后进行所述标记位点的标记。
7. 权利要求1所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1、权利要求3或4所述融合蛋白或权利要求5所述重组质粒在制备检测猪血清中CSFV抗体的试剂中的应用。
8. 一种检测猪血清中CSFV抗体的阻断法ELISA检测试剂盒,其特征在于,包括:CSFV E2重组蛋白和权利要求3或4所述融合蛋白。
9. 根据权利要求8所述阻断法ELISA检测试剂盒,其特征在于,还包括酶标二抗和TMB显色液。
10. 根据权利要求8或9所述阻断法ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述CSFV E2重组蛋白的工作液浓度为0.5 μ g/mL;
所述融合蛋白的稀释比为1:8000。

一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体、融合蛋白及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体、融合蛋白及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 猪瘟(Classical swine fever,CSF)是由猪瘟病毒(Classical swine fever virus,CSFV)引起猪的一种高度接触性、高致死性传染病。欧美一些发达国家经过严格的净化措施宣布已经消灭了猪瘟,但是对于东亚、东南亚等一些发展中国家猪瘟仍然是养猪业的重要传染病,各国也在寻找不同将其消灭的方法。我国随着猪瘟兔化弱毒株疫苗的长期控制,现在猪瘟在我国主要以隐性感染为主,但也时有猪瘟发生的报道。

[0003] 自2018年8月3日首例非洲猪瘟(Africa swine fever,ASF)在沈阳被确诊以来,ASF已相继在我国多个省份发生。而CSF和ASF的临床症状和病理变化极其相似,会干扰彼此的诊断。根据巴西的防控经验,做好ASF的防控有利于CSF的净化,而做好CSF的免疫和防控有利于ASF的诊断和防控。加之目前ASF没有有效的疫苗和治疗措施,在此背景下,更加凸显了CSF控制和净化的重要性。应用准确快捷的能够区分野毒感染和疫苗免疫的鉴别诊断方法,通过阳性猪淘汰等手段逐步实现CSF在规模化猪场的净化是势在必行的。

[0004] 20世纪90年代,C.Hamers-Casterman等人发现骆驼科(如美洲驼、单峰骆驼等)动物体内存在一种天然缺失轻链和CH1区的抗体,被称为重链抗体。克隆其重链可变区生产的单域抗体称为VHH(Variable domain of heavy chain of heavy chain antibody),分子量小,只有约15kDa,因此也被称为纳米抗体。这是目前最小的功能抗体片段,可以独立识别抗原。与传统抗体的复杂结构相比,VHH由于体积小和结构简单,具有更好的利用优势。但是目前关于纳米抗体在CSF诊断方法中的应用却未见相关研究报道,也未有商品化产品。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体、融合蛋白及其制备方法和应用,对CSFV E2蛋白的检测特异性好,可用于生产检测试剂盒,简化生产工艺,降低生产成本,具有很好的市场转化前景。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体CSFV-E2-Nb1,所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 本发明还提供了一种编码上述纳米抗体CSFV-E2-Nb1的核酸分子,核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0009] 本发明还提供了一种包含上述纳米抗体CSFV-E2-Nb1和标记位点的融合蛋白。

[0010] 优选的,所述标记位点包括生物素化标记位点Avitag。

[0011] 本发明还提供了一种表达上述融合蛋白的重组质粒,所述重组质粒的基础载体包

括原核表达载体。

[0012] 本发明还提供了上述融合蛋白的制备方法,包括以下步骤:将上述重组质粒转入感受态细胞内,利用IPTG进行诱导表达,收集包涵体蛋白,纯化后进行所述标记位点的标记。

[0013] 本发明还提供了上述纳米抗体CSFV-E2-Nb1、上述融合蛋白或上述重组质粒在制备检测猪血清中CSFV抗体的试剂中的应用。

[0014] 本发明还提供了一种检测猪血清中CSFV抗体的阻断法ELISA检测试剂盒,包括:CSFV E2重组蛋白和上述融合蛋白。

[0015] 优选的,还包括酶标二抗和TMB显色液。

[0016] 优选的,所述CSFV E2重组蛋白的工作液浓度为0.5 μ g/mL;

[0017] 所述融合蛋白的稀释比为1:8000。

[0018] 有益效果:本发明提供了一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体CSFV-E2-Nb1,并公开了所述纳米抗体的氨基酸序列。本发明利用所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1与标记位点构建融合蛋白,利用所述融合蛋白作为一抗抗体,构建了一种检测猪血清中CSFV抗体的阻断法ELISA检测试剂盒。利用本发明所述检测试剂盒,检测方法操作简单,为后续将所述纳米抗体和所述融合蛋白应用于CSFV抗体检测的提供了关键的材料,可以简化生产工艺,降低生产成本,具有很好的市场转化前景。经实施例验证,本发明所述检测试剂盒,检测灵敏度高、特异性好,可显著提高CSF的检测灵敏度,并配合猪瘟E2亚单位疫苗,尽快实现我国CSF的净化。

附图说明

[0019] 图1为第一次扩增VHH,回收700bp处片段;

[0020] 图2为第一次扩增VHH,回收700bp处片段;

[0021] 图3为第二次扩增VHH,回收400bp处片段为纳米抗体片段;

[0022] 图4为转化后收集纳米抗体初始文库;

[0023] 图5为验证转化后阳性率,约为90%;

[0024] 图6为固相淘选时,第三轮淘选后富集度达到 1.3×10^3 满足筛选条件;

[0025] 图7为粗表达后,通过ELISA验证阳性克隆,选取特异性好的十个进行测序;

[0026] 图8为对测序结果进行分析合成质粒后进行表达后上清SDS-PAGE图,其中9个泳道分别代表摸索IPTG诱导浓度和时间:①0.5mM+2h、②1mM+2h、③1.5mM+2h、④0.5mM+4h、⑤1mM+4h、⑥1.5mM+4h、⑦0.5mM+6h、⑧1mM+6h、⑨1.5mM+6h;

[0027] 图9为收集菌体重悬后,破碎后的上清的SDS-PAGE结果,泳道信息同图8;

[0028] 图10为验证是否为包涵体表达SDS-PAGE结果,9个泳道分别代表:①0.5mM+4h上清、②0.5mM+4h沉淀、③1mM+4h上清、④1mM+4h沉淀、⑤1.5mM+4h上清、⑥1.5mM+4h沉淀、⑦1mM+6h沉淀、⑧阴性上清、⑨阴性沉淀;

[0029] 图11为改变条件,将其诱导为可溶性表达SDS-PAGE结果,9个泳道分别代表:①37 $^{\circ}$ C+0.1mM+6h上清、②37 $^{\circ}$ C+0.1mM+6h沉淀、③37 $^{\circ}$ C+0.3mM+6h上清、④37 $^{\circ}$ C+0.3mM+6h沉淀、⑤28 $^{\circ}$ C+0.1mM+6h上清、⑥28 $^{\circ}$ C+0.1mM+4h沉淀、⑦28 $^{\circ}$ C+0.3mM+6h上清、⑧28 $^{\circ}$ C+0.3mM+6h沉淀、⑨阴性沉淀;

[0030] 图12为包涵体蛋白纯化后SDS-PAGE结果,9个泳道分别代表:①洗脱第1mL、②洗脱

第2mL、③洗脱第3mL、④洗脱第4mL、⑤洗脱第5mL、⑥穿流液、⑦洗涤第一次10mL、⑧洗涤第二次10mL、⑨洗涤第三次10mL；

[0031] 图13为蛋白透析复性后SDS-PAGE结果,9个泳道分别代表:稀释倍数①原倍、②1/2、③1/8、④1/16、⑤1/32⑥1/64、⑦1/128、⑧1/256、⑨1/512

[0032] 图14为复性后的纳米抗体进行生物素化后,验证其特异性效果;

[0033] 图15为摸索最佳包被CSFV E2蛋白浓度和生物素化后纳米抗体的最佳稀释度,确定为最佳包被浓度为0.5 μ g/mL,生物素化后纳米抗体最佳稀释度为1:8000;

[0034] 图16为血清最佳稀释度的确定为1:20;

[0035] 图17为与商品化试剂盒进行灵敏度对比,明显高于商品化试剂盒;

[0036] 图18为验证所建立的CSFV ELISA检测方法的特异性,说明具有高度的特异性。

具体实施方式

[0037] 本发明提供了一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体CSFV-E2-Nb1,所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0038] 本发明所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1共包含123个氨基酸,该纳米抗体属于IgG的重链可变区,可以单独稳定地在体外存在,其由4个保守序列和3个互补决定区组成(Complementarity-determining region,CDR),其中CDR3含有17个氨基酸残基。

[0039] 本发明还提供所述纳米抗体CSFV-E2-Nb1的制备方法,优选包括:

[0040] (1)E2蛋白特异性纳米抗体的噬菌体展示文库构建,通过将CSFV E2蛋白免疫于羊驼体内,多次免疫后,待到目的抗体效价后,分离淋巴细胞,提取总RNA,特异性扩增VHH片段,将其双酶切后与载体相连接,电转到TG1中;

[0041] (2)E2蛋白特异性纳米抗体的淘选,通过辅助噬菌体的作用,扩大文库的库容,应用ELISA原理进行特异性纳米抗体的淘选,经过三次淘选后,进行纳米抗体的粗表达,经ELISA验证阳性克隆进行测序分析序列,得到特异性纳米抗体的基因序列。

[0042] 本发明还提供了一种编码上述纳米抗体CSFV-E2-Nb1的核酸分子,核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0043] 本发明还提供了一种包含上述纳米抗体CSFV-E2-Nb1和标记位点的融合蛋白。

[0044] 本发明所述标记位点优选包括生物素化标记位点Avitag。在本发明中,所述融合蛋白的结构,从N端至C端,优选为CSFV-E2-Nb1-Avitag。

[0045] 本发明还提供了一种表达上述融合蛋白的重组质粒,所述重组质粒的基础载体包括原核表达载体。

[0046] 本发明所述原核表达载体优选包括pET-32a载体。本发明所述重组质粒的构建方法,优选包括:将SEQ ID NO.2所示的基因序列,与pET-32a载体和Avitag相连接,组成pET-32a-Nb1-Avitag重组质粒,酶切位点为:(EcoRI/XhoI),实施例中由生物公司直接合成所述重组质粒,且合成的序列包含EcoRI酶切位点+Nb1序列+Avitag短肽序列+XhoI酶切位点,优化后的序列如SEQ ID NO.3所示:

GAATTCCAGGTTTCAGCTGCAGGAAAGCGGTGGTGGTCTGGTTCAGGC
GGGTGGTAGCCTGCGTCTGTCTTGC GCGCGGCGAGCGGTTTCACCGGTGT
TGATTACTACATCGGTTGGTTCGTCAGGTTCCGGGTAAAGAACGTGA
AGGTGTTAGCTACATCAGCAGCAGCAACGGTAGCACCTATTACACCGAT
AGCGTTAAAGGTCGTTTCACCATCAGCAACGATATCGCGAAAAACACC
GCGACCCTGCAGATGAACAGCCTGCGTCCGGGTGATACCGCGATCTAC
TACTGCGCGGCGGATCCGGCGCCGCTGGATAGCAACAGCTGGTACAGC
CTGTACTGGGGTCATGGTACCCAGGTTACCGTTTCTAGCGGTCTGAAC
GATATCTTCGAAGCGCAGAAAATCGAATGGCATGAACTCGAG, 其中下

划线序列为优化后的Nb1序列,标记加黑序列为优化后的Avitag短肽序列。本发明优选基于扩增的方法,根据CSFV-E2-Nb1的序列连接Avitag短肽序列,Avitag短肽用于生物素标记。

[0047] 本发明在进行所述扩增时,优选以Nb阳性质粒为模板,通过PCR扩增纳米抗体CSFV-E2-Nb1-Avitag基因,通过核酸电泳鉴定,切取并回收400bp位置目的条带,测定DNA浓度用于后续试验。本发明优选对pET-32a及CSFV-E2-Nb1-Avitag进行与上述相同的双酶切,将酶切后的CSFV-E2-Nb1-Avitag与pET-32a载体使用T4连接酶进行连接。

[0048] 本发明还提供了上述融合蛋白的制备方法,包括以下步骤:将上述重组质粒转入感受态细胞内,利用IPTG进行诱导表达,收集包涵体蛋白,纯化后进行所述标记位点的标记。

[0049] 本发明将成功转入的阳性细胞进行IPTG诱导,其中感受态细胞优选包括BL21(DE3),本发明在进行所述IPTG诱导时,所述IPTG的诱导终浓度优选为0.3mM,诱导时间优选为6h。

[0050] 本发明在所述诱导表达后收集包涵体蛋白,优选包括:先将诱导后的菌体进行破碎,利用SDS-PAGE验证蛋白后,利用Ni柱对所表达的蛋白纯化,得到纯化后的包涵体,利用梯度尿素含量的透析液进行透析,对纯化后的蛋白复性,便于生物素化标记。本发明优选将纯化后的CSFV-E2-Nb1-Avitag进行生物素化标记,通过ELISA验证生物素化标记效果。

[0051] 本发明还提供了上述纳米抗体CSFV-E2-Nb1、上述融合蛋白或上述重组质粒在制备检测猪血清中CSFV抗体的试剂中的应用。

[0052] 本发明所述试剂优选包括阻断法ELISA检测试剂。

[0053] 本发明还提供了一种检测猪血清中CSFV抗体的阻断法ELISA检测试剂盒,包括:CSFV E2重组蛋白和上述融合蛋白。本发明所述试剂盒中优选还包括酶标二抗(HRP标记Streptavidin)和TMB显色液。且在本发明中,所述CSFV E2重组蛋白的工作液浓度优选为0.5 μ g/mL;所述融合蛋白的稀释比优选为1:8000。

[0054] 本发明还提供了阻断法ELISA检测血清中CSFV的方法,优选包括以下步骤:

[0055] (1) 将稀释到0.5 μ g/mL的CSFV E2重组蛋白包被于酶标板,经过封闭洗涤后,加入待检血清进行孵育;

[0056] (2) 洗涤后加入1:8000稀释表达的融合蛋白,孵育,洗涤后加入酶标二抗,孵育;

[0057] (3) 洗涤,加入TMB孵育15min,加入终止液显色。通过OD₄₅₀数值,判断阻断率。

[0058] 下面结合实施例对本发明提供的一种抗CSFV E2蛋白的纳米抗体、融合蛋白及其制备方法和应用进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0059] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如《分子克隆:实验室手册》(NewYork:Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件或厂商提供的条件进行。

[0060] 实施例1

[0061] CSFV E2蛋白特异性纳米抗体的筛选

[0062] 1.1羊驼免疫

[0063] 每次将2.5mL CSFV E2重组蛋白(GenBank:AY775178.2),1mg/mL与等体积201佐剂乳化后,免疫一只成年雄性羊驼,此后每隔两周免疫一次,使用同样方法共免疫5次,最后一次免疫后一周采血用于后续实验。

[0064] 最后一次免疫后一周采集血清,用ELISA方法检测羊驼血清中CSFV E2抗体效价,免疫前血清作为阴性对照。

[0065] 1.2VHH噬菌体抗体文库的构建

[0066] 1.2.1外周血淋巴细胞的分离与RNA的提取

[0067] 最后一次免疫后一周,用一次性采血管(含抗凝剂)采集20mL抗凝血,用1640培养基稀释后,使用羊驼外周血淋巴细胞分离液试剂盒进行分离。将分离得到的细胞用血细胞计数板进行计数,直接用细胞总RNA提取试剂盒进行RNA提取。

[0068] 1.2.2VHH基因片段的扩增

[0069] 首先用反转录酶以RNA为模板合成第一链cDNA,然后利用巢PCR扩增VHH基因。根据参考文献及羊驼VHH上下游序列,设计PCR引物。

[0070] 第一轮PCR扩增。以cDNA为模板,通过IgG的保守区序列进行第一轮PCR扩增,利用引物F1(SEQ ID NO.4):GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG;R1(SEQ ID NO.5):GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC,程序:反应程序:98°C10sec;55°C5sec;68°C10sec;30循环。回收PCR目标大小的产物,程序详见表1。结果如图1和图2所示,回收700bp处片段;

[0071] 第二轮PCR扩增。以第一轮PCR回收产物为模板,用VHH保守区序列扩增VHH基因片段,利用引物F2(SEQ ID NO.6):CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGR;R2(SEQ ID NO.7):CTAGTGCGCCGCTGAGGAGACGGTGACCTGGGT,程序:反应程序:98°C10sec;55°C5sec;68°C10sec;30循环。并回收PCR产物,测定回收产物的浓度用于下一步实验,回收400bp处片段为纳米抗体片段,程序详见表2。

[0072] 1.2.3VHH噬菌体展示载体的构建

[0073] 将VHH基因片段通过Pst I和Not I酶切位点克隆入pCANTAB 5E噬菌体展示载体中:系双酶切pCANTAB 5E噬菌体展示载体和VHH,用PCR产物回收试剂盒按照说明书操作步骤回收酶切产物,测定浓度,用于后续实验。用T4 DNA连接酶连接VHH片段与噬菌体展示载体用PCR产物回收试剂盒按照说明书操作步骤纯化连接产物,用无菌超纯水洗脱连接产物,测定浓度,用于后续实验。

[0074] 1.2.4连接产物转化TG1感受态细胞及噬菌体抗体文库的收获

[0075] 用Eppendorf电穿孔仪,设置参数为2.5kV,5ms,电转化感受态细胞。电击后马上取出电击杯,加入4mL 37°C预热的SOC培养基,重悬细胞并移至无菌50mL离心管中,重复上述

操作,完成剩余电击转化。

[0076] 将转化产物孵育后。留取100 μ L培养物用于文库鉴定,将剩余所有培养物均匀涂布于LB/AMP-GLU平板,37 $^{\circ}$ C培养10h。后用细胞刮刀收集菌苔,加入1/3体积的50%甘油,混匀分装,-80 $^{\circ}$ C保存。结果如图4所示,转化效果良好,单菌落均匀一致且铺满平板。

[0077] 1.2.5文库库容和多样性测定

[0078] (1)取100 μ L上一步的培养物,10倍梯度稀释后,取稀释度为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的样品,分别取100 μ L涂布于LB/AMP-GLU平板,37 $^{\circ}$ C培养8h,计数平板上的菌落,计算转化子数量。

[0079] 随机挑选20个阳性克隆接种于1mL培养基中,进行菌液鉴定,利用引物F3 (SEQ ID NO.8,5' AATACGCAAACCGCCTCTCC 3',位于pCANTAB5E载体多克隆酶切位点上游约335bp处)和R2鉴定转化子,结果如图5所示,阳性克隆率约为90%。将菌液PCR鉴定为阳性的克隆交由上海生物工程技术有限公司进行测序。将测序结果用MegAlign软件比对测序结果,鉴定文库多样性。

[0080] 实施例2 CSFV E2特异性纳米抗体的淘选

[0081] 2.1VHH噬菌体抗体文库的救援

[0082] 将构建的噬菌体展示文库进行放大,在辅助噬菌体的作用下,转化成功的质粒大量扩繁,将得到具有目标质粒的噬菌粒。将培养基接入噬菌体后,培养一段时间,将其离心,取培养基上清,用PEG/NaCl溶液进行沉淀,离心后收集沉淀,将沉淀用PBS重悬后即为得到的噬菌粒。

[0083] 2.2重组噬菌体滴度的测定

[0084] 取20 μ L救援后的噬菌体溶液,用培养基10倍梯度稀释后,取稀释度为 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 的样品,分别取100 μ L加入100 μ L数生长期的TG1细胞,混匀,37 $^{\circ}$ C静置感染15min。

[0085] 将感染不同稀释度噬菌体的TG1细胞分别均匀涂布于LB/AMP-GLU平板,37 $^{\circ}$ C培养12h。计数平板上的菌落,计算重组噬菌体滴度。

[0086] 2.3CSFV E2特异性重组噬菌体的淘选

[0087] 应用ELISA方法对特异性的噬菌粒进行筛选,具有特异性的噬菌粒会吸附在CSFV E2蛋白上,从而不会被洗掉,最后将其洗脱下来,再进行扩繁。主要步骤有:将CSFV E2蛋白包被于酶标板底部,相应的用PBS进行做对照,4 $^{\circ}$ C过夜包被后,洗涤未包被上的蛋白,加入1%BSA进行封闭,封闭完成后洗掉封闭液,分别加入救援后的文库,在孵育之后洗掉未特异性结合的噬菌粒。再用三乙胺进行洗脱,将噬菌粒洗脱后进行侵染扩繁和测定滴度。至少进行三轮淘洗,当阳性孔比阴性孔的滴度大于 1×10^3 则认为淘选完成,结果如图6所示,第三轮淘选后达到 1.3×10^3 满足筛选条件。

[0088] 2.4重组纳米抗体的诱导表达及粗提物的获取

[0089] 将第三轮淘洗测定滴度的板子,挑取48个单菌落于盛有100 μ L培养基48孔板中,当长到 OD_{600} 为0.7左右时,接种到盛有1mL培养的24孔板中,进行扩繁,当 OD_{600} 达到0.7时加入IPTG进行诱导,再培养10h。将培养物收集到1.5mL离心管中,于-80 $^{\circ}$ C冰箱反复冻融三次。离心收集上清,即为可溶性重组纳米抗体粗提物。

[0090] 2.5可溶性重组纳米抗体的ELISA检测

[0091] 为了验证粗表达的纳米抗体是否具有特异性,应用ELISA的方法进行检测。同样将蛋白包被于酶标板底部,阴性包被PBS,平行包被一组无关蛋白PRRSV GP3蛋白 (GenBank:

JQ627636.1),应用1%BSA封闭后,每孔加入粗提取的纳米抗体,孵育后洗掉未结合的,加入一抗,孵育后洗掉未结合的一抗,加入酶标二抗,孵育后洗掉未结合的酶标二抗,加入TMB显色液,孵育后加入终止液,应用酶标仪测得OD₄₅₀数值。

[0092] 2.6特异性纳米抗体的测序分析

[0093] 选择ELISA结果阳性的克隆,交由公司进行测序,用MegAlign软件比对测序结果(图7)。

[0094] 实施例3纳米抗体的表达、纯化及生物素化标记

[0095] 3.1原核表达载体pET-32a-Nb1-Avitag的构建

[0096] 3.1.1纳米抗体Nb1-Avitag融合蛋白的表达与可溶性鉴定

[0097] 由生物公司合成pET-32a-Nb1-Avitag重组质粒,其中目的基因(简称Nb1-Avitag)

[0098] (1)纳米抗体Nb1-Avitag融合蛋白的诱导表达

[0099] 将得到的重组质粒转化至感受态细胞BL21(DE3)内,进行阳性克隆的菌液PCR鉴定,将阳性克隆接于培养基,待菌液OD₆₀₀达到0.7左右后,分别加入不同浓度的IPTG进行诱导(图8)。收集诱导后的菌液离心,离心后将沉淀用PBS重悬后进行超声破碎,超声破碎后再进行离心,取上清分别保存,沉淀用1mLPBS进行重悬(图9)。后进行Nb1-Avitag融合蛋白诱导表达的SDS-PAGE分析和Nb1-Avitag重组蛋白的可溶性分析。

[0100] 图8为所筛选最优表达时间及IPTG终浓度的菌液上清SDS-PAGE结果显示,菌液上清中无蛋白表达;图9为破碎菌体后上清的SDS-PAGE结果显示上清中无目的蛋白;图10为破碎后菌体沉淀SDS-PAGE结果显示在破碎后沉淀中有目的蛋白,说明该融合蛋白表达方式为包涵体表达。图11为筛选最优表达温度、时间及诱导剂IPTG终浓度的SDS-PAGE,结果显示37℃、IPTG终浓度为0.3mM、诱导6h表达量最高。

[0101] 3.1.2Nb1-Avitag重组蛋白的纯化

[0102] SDS-PAGE分析为包涵体表达,所以应用包涵体纯化方法进行纯化。

[0103] (1)Ni-NTA柱的平衡。向空柱中加入5mL的Ni Resin,处理柱子之后,加上待纯化的样品,4℃过夜。

[0104] (2)收集穿流液,后使用配制的BufferA洗脱杂蛋白并收集液体,每次以1mL Buffer B洗脱目标蛋白,共洗脱5次,洗脱后处理柱子,以备下次使用。

[0105] (3)对上述收集的液体样品各取100μL,进行SDS-PAGE分析,鉴定纯化效果。

[0106] 结果如图12所示,经过纯化后,杂蛋白被基本去除,目标蛋白在第3mL时为洗脱峰。

[0107] 3.1.3Nb1-Avitag的复性

[0108] 变性纯化的目的蛋白缓冲液中含有8M尿素,因此需要经过逐渐降低缓冲液中尿素浓度实现对变性纯化目的蛋白进行复性以满足后续实验要求。

[0109] 用超纯水将即用型3.5KDa的透析袋彻底清洗。

[0110] 透析缓冲液(pH8.2)配方:Tris 100mM、NaCl 100mM、EDTA·2Na 5mM、Glycine 0.5%、甘油20%、氧化型谷胱甘肽0.5mM、还原型谷胱甘肽5mM和Urea (6M、4M、2M、0M)。

[0111] 将变性纯化后的重组蛋白加入透析袋,在4℃条件下从6M尿素透析液中开始透析,每12h更换一次透析液,最后在0M尿素透析液中透析后,再在PBS中透析两次。

[0112] 结果如图13所示,经过透析蛋白复性后,对蛋白的大小以及纯度都未出现影响。

[0113] 3.2Nb1-Avitag融合蛋白的生物素化

[0114] 25 μ L生物素化体系:10 \times Biotin Ligase Buffer A(2.5 μ L,终浓度1 \times)、10 \times Biotin Ligase Buffer B(2.5 μ L,终浓度1 \times)、Biotin Ligase(0.17 μ L,终浓度6.4ng/ μ L)、透析后Nb1-Avitag(1nmol,终浓度40 μ M)和余量的ddH₂O。

[0115] 30 $^{\circ}$ C孵育60min后收样。

[0116] 3.2.1使用ELISA方法验证生物素化标记效果

[0117] 使用ELISA方法验证生物素化标记效果,将CSFV E2和无关蛋白PRRSV GP3、GP4蛋白分别包被在酶标板上。洗掉未吸附在酶标板上的蛋白,加入1%BSA进行封闭,孵育后洗掉封闭液,加入倍比稀释后生物素化的纳米抗体,孵育后洗掉未结合的,加入酶标二抗,孵育后洗掉未结合的酶标二抗,加入TMB显色液,孵育后加入终止液,酶标仪测定各孔OD₄₅₀。

[0118] 结果如图14所示,生物素标记后,将标记产物稀释至1:16000时依旧可以显示为阳性,说明生物素化效果良好。

[0119] 实施例4基于生物素化纳米抗体检测猪血清中E2蛋白抗体的阻断ELISA方法的建立

[0120] 4.1利用棋盘法摸索最佳蛋白包被浓度和纳米抗体稀释浓度

[0121] 利用棋盘法摸索最佳蛋白包被量以及纳抗稀释度,在包被时将CSFV E2蛋白稀释至0、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、4 μ g/mL,七个浓度梯度,分别做7个重复包被于酶标板。洗掉未吸附的蛋白,用1%BSA封闭,孵育后洗掉封闭液,将生物素化后的纳米抗体分别按1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:10000进行稀释,后分别加入相应的孔中。孵育后洗掉未结合的,加入酶标二抗,孵育后洗掉未结合的酶标二抗,加入TMB显色,孵育后加入终止液,利用酶标仪测定各孔OD₄₅₀。

[0122] 结果如图15所示,确定为最佳包被浓度为0.5 μ g/mL,生物素化后纳米抗体最佳稀释度为1:8000。

[0123] 4.2血清最佳稀释度的摸索

[0124] 使用确定的最佳抗原包被浓度将E2蛋白包被于ELISA板上。洗掉未吸附的蛋白,封闭后加入:不同稀释度的4份CSF阳性血清和4份阴性血清猪繁殖与呼吸综合征病毒(Porcine reproductive and respiratory syndrome virus,PRRSV)、猪圆环病毒(Porcine circovirus,PCV)、猪伪狂犬病毒(Pseudorabies virus,PRV)、猪细小病毒(Porcine parvovirus,PPV)后孵育。按上一步骤中确定的纳米抗体最佳稀释度稀释生物素化后纳米抗体,孵育洗涤后。加TMB底物显色液,孵育后加入终止液终止,读值。

[0125] 结果如图16所示,血清最佳稀释度确定为1:20。

[0126] 4.3阻断ELISA方法临界值的确定

[0127] 选取已知阴性血清确定阻断法ELISA的Cut-off值。按照之前摸索好的最佳反应条件进行,计算被检阴性血清的阻断率(PI值)。计算方式:阻断率(PI%)=(1-P/N) \times 100%,P为检测血清的OD₄₅₀值、N为阴性对照血清的OD₄₅₀值。Cut-off值=PI平均值+3 \times 方差(SD)。

[0128] 4.4敏感性评价

[0129] 选取已知阳性猪血清用已建立的ELISA方法进行检测。将确定的阳性血清稀释不同倍数,用已建立的ELISA方法和商品化试剂盒分别检测,直到阳性血清反应结果为阴性为止,对结果进行统计分析,评价所建立方法的敏感性。

[0130] 结果如图17所示,与商品化试剂盒进行灵敏度对比,明显高于商品化试剂盒。

[0131] 4.5特异性评价

[0132] 选取已知阴性猪血清用已建立的ELISA方法进行检测。对实验室保存猪繁殖与呼吸综合征病毒 (PRRSV)、猪圆环病毒 (PCV)、猪伪狂犬病毒 (PRV)、猪细小病毒 (PPV) 阳性对照血清进行检测,对结果进行统计分析,评价所建立方法的特异性。

[0133] 结果如图18所示,所建立的CSFV ELISA检测方法具有高度的特异性。

[0134] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

<210> 3

<211> 426

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

gaattccagg ttcagctgca ggaaagcggg ggtggctctgg ttcaggcggg tggtagcctg 60
cgtctgtctt gcgcggcgag cggtttcacc ggtgttgatt actacatcgg ttggttccgt 120
caggttccgg gtaaagaacg tgaaggtggt agctacatca gcagcagcaa cggtagcacc 180
tattacaccg atagcgtaa agtcgtttc accatcagca acgatatcgc gaaaaacacc 240
gcgaccctgc agatgaacag cctgcgtccg ggtgataccg cgatctacta ctgcgcggcg 300
gatccggcgc cgctggatag caacagctgg tacagcctgt actgggggtca tggtaccag 360
gttaccgttt ctagecgtct gaacgatatc ttcgaagcgc agaaaatcga atggcatgaa 420
ctcgag 426

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

gtcctggctg ctcttctaca agg 23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

ggtacgtgct gttgaactgt tcc 23

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagr 29

<210> 7

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

ctagtgcggc cgctgaggag acggtgacct ggg 34

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 8

aatacgcaaa cgcctctcc 20

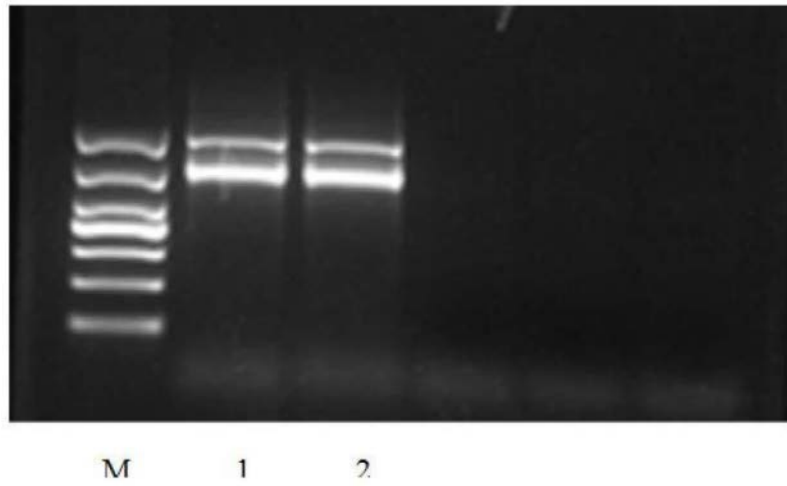


图1

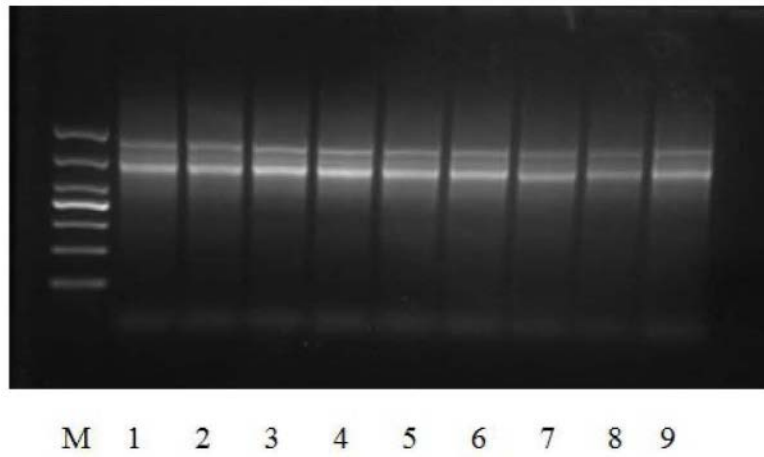


图2

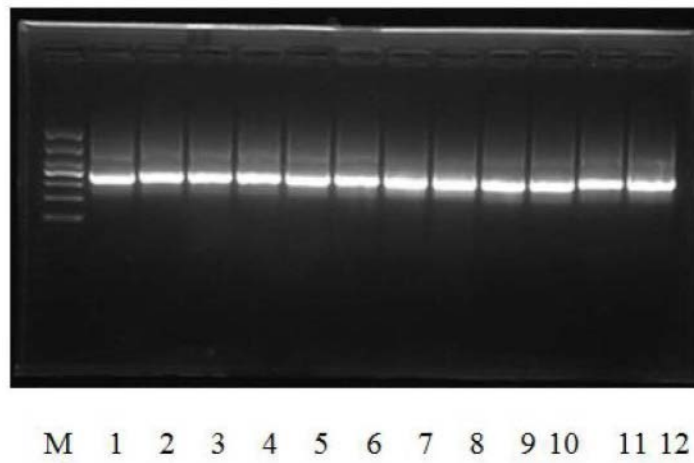


图3

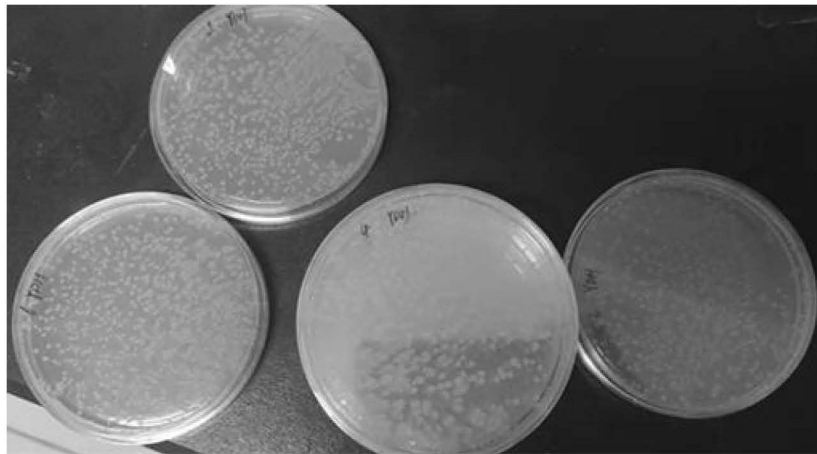


图4

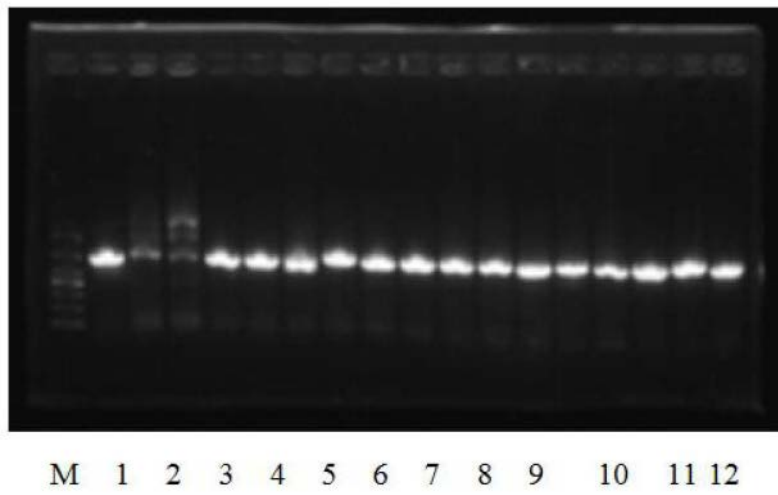


图5

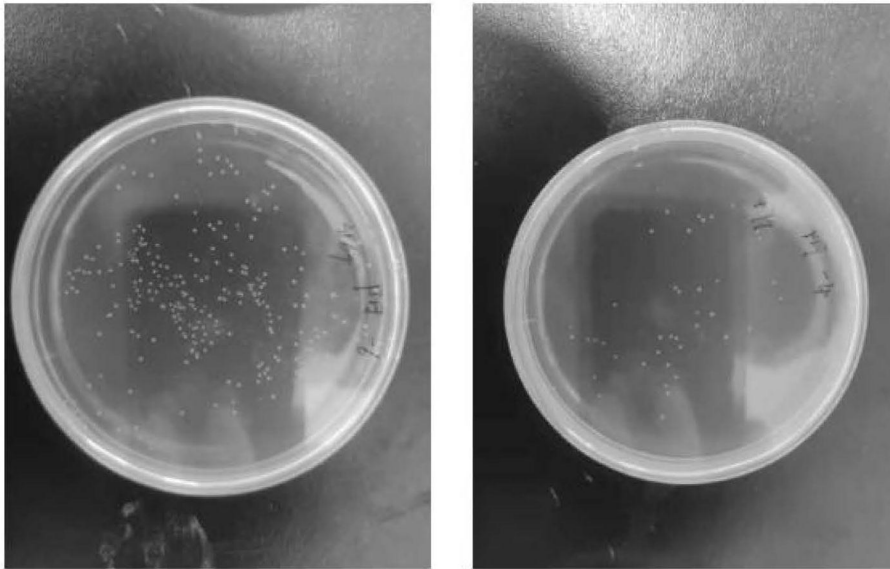


图6

P	P	P	P	P	P	N
2.0778	2.9264	3.005	2.7318	3.1596	3.1543	0.623
2.8224	2.8996	2.4571	3.1673	3.3225	2.5969	0.4448
2.8726	2.8378	3.4639	2.945	3.6164	3.607	0.549
2.6175	3.339	3.5616	3.7005	3.7277	2.9091	
3.1399	3.7046	3.4956	3.4433	3.0924	3.2984	
2.7607	3.1684	3.6244	3.6778	3.5063	3.4991	
3.2856	3.5388	3.5427	3.3345	2.8682	3.2124	
3.0135	2.9139	3.4634	2.9036	3.1149	3.0427	

图7

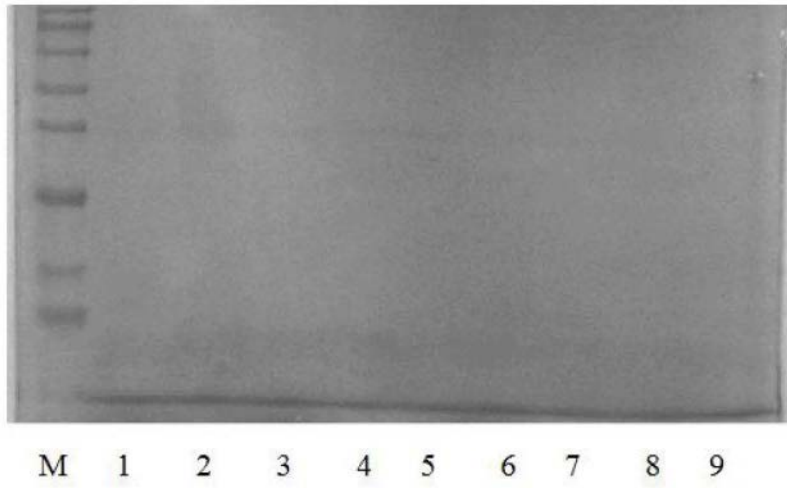


图8

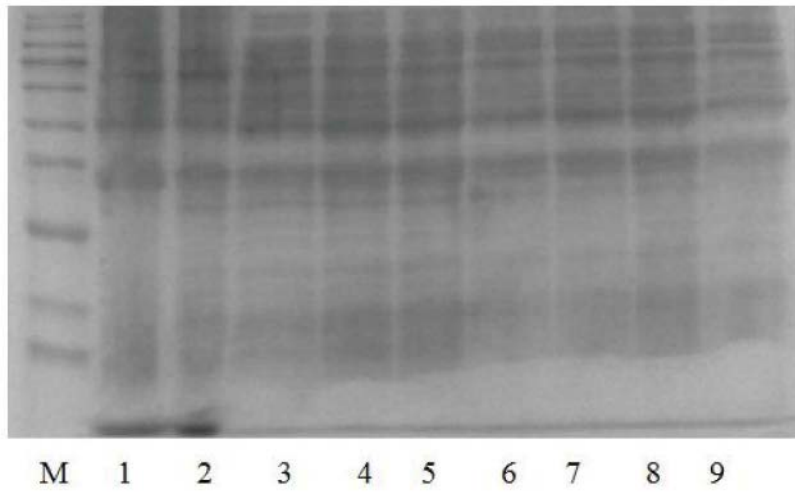


图9

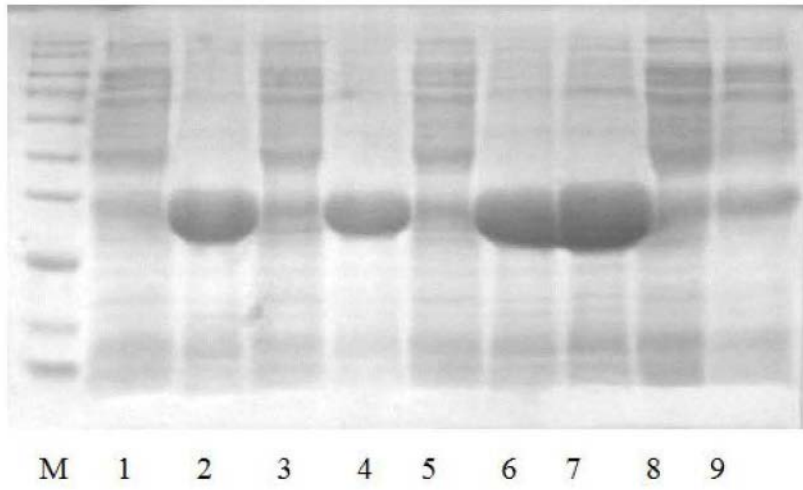


图10

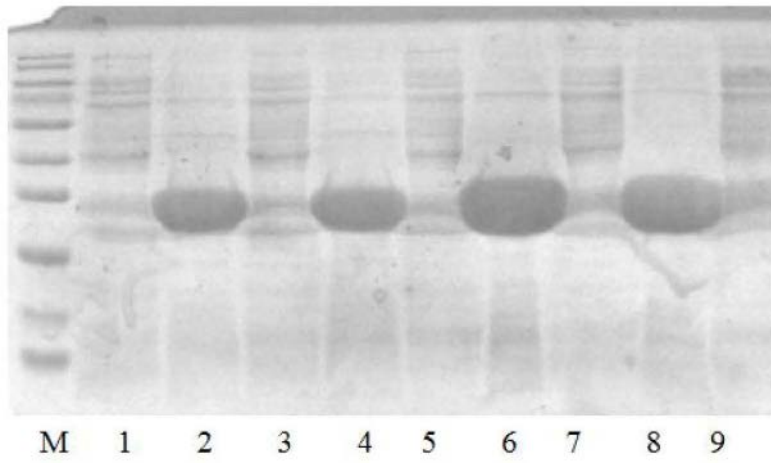


图11

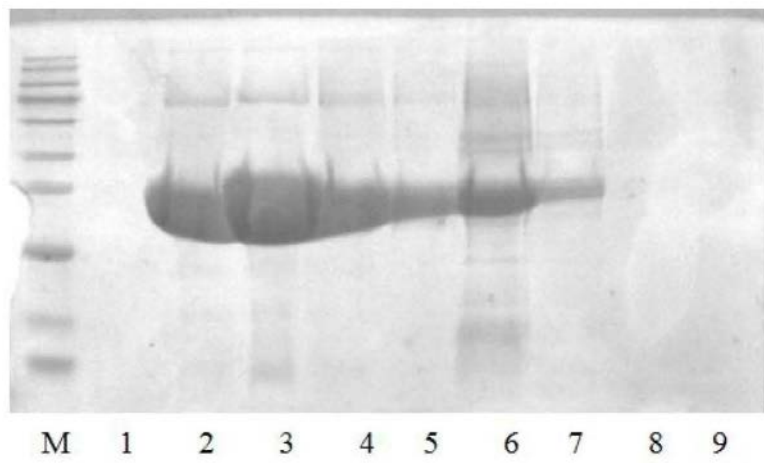


图12

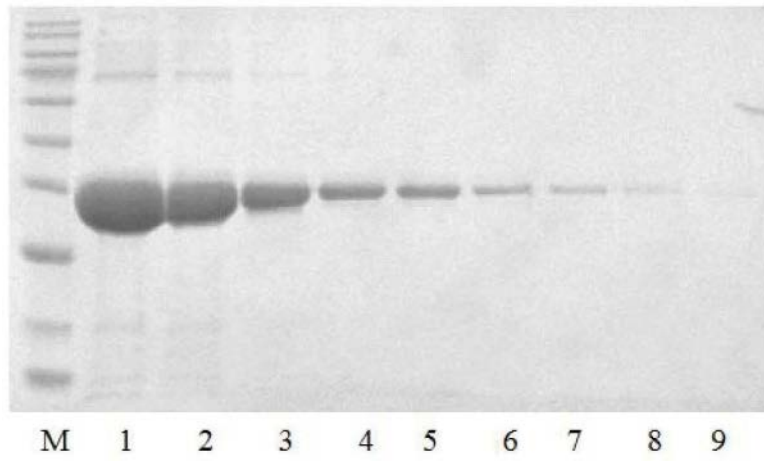


图13

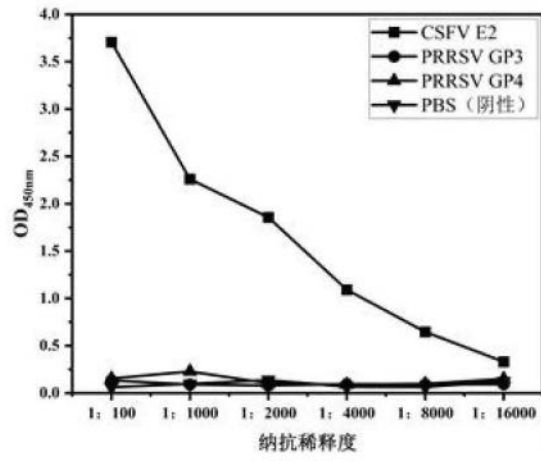


图14

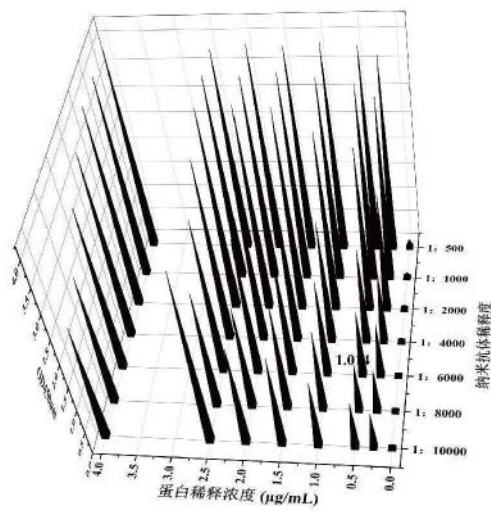


图15

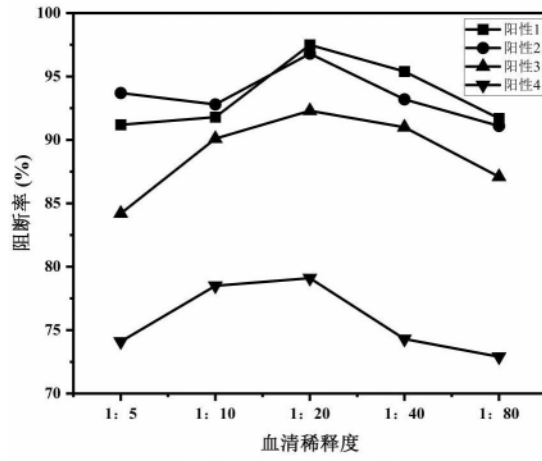


图16

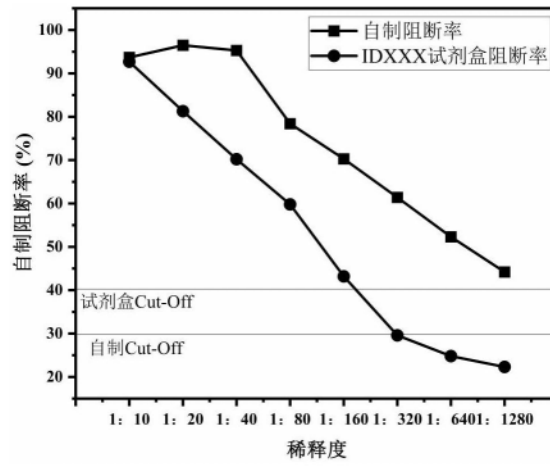


图17

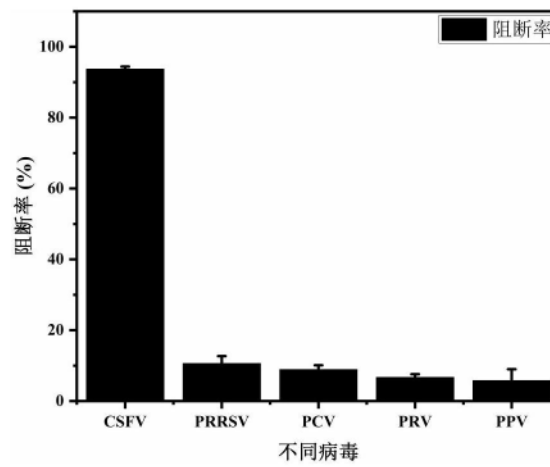


图18