



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111518203 A

(43)申请公布日 2020.08.11

(21)申请号 202010464266.7

(22)申请日 2020.05.27

(71)申请人 江苏省疾病预防控制中心(江苏省
公共卫生研究院)

地址 210009 江苏省南京市江苏路172号

(72)发明人 张黎 郑滨洋 高行素 潘红星
金鹏飞 史云凤 朱凤才

(74)专利代理机构 北京预立生科知识产权代理
有限公司 11736

代理人 朱萍 孟祥斌

(51)Int.Cl.

C07K 16/10(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

C12N 15/13(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

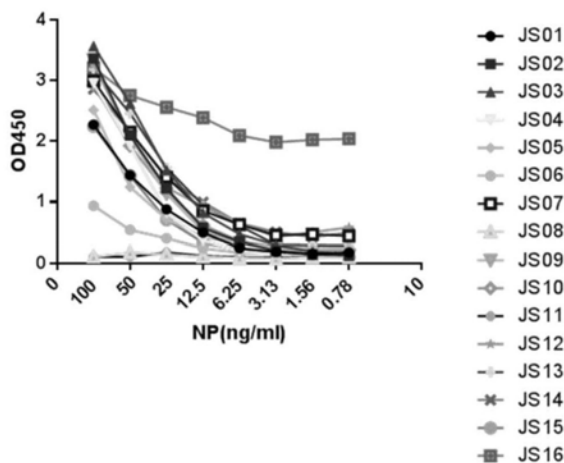
权利要求书2页 说明书13页
序列表5页 附图11页

(54)发明名称

用于新型冠状病毒检测的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了用于新型冠状病毒检测的试剂盒,所述试剂盒包含单克隆抗体,所述单克隆抗体特异性结合新型冠状病毒NP蛋白。本发明的单克隆抗体包含含有SEQ ID NO.1-3的氨基酸序列的重链可变区,以及含有SEQ ID NO.5-7的氨基酸序列的轻链可变区。本发明的单克隆抗体可用于检测新型冠状病毒的存在。



1. 分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区;及含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区;其中,重链可变区的CDR1包含SEQ ID NO.1所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;重链可变区的CDR2包含SEQ ID NO.2所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;重链可变区的CDR3包含SEQ ID NO.3所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;轻链可变区的CDR1包含SEQ ID NO.5所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;轻链可变区的CDR2包含SEQ ID NO.6所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;轻链可变区的CDR3包含SEQ ID NO.7所示或其保守修饰形式的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的单克隆抗体或其抗原结合部分,其特征在于,所述单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区包含与SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列,所述单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链可变区包含与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列。

3. 双特异性分子,其包含与第二功能性模块相连的权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合部分,该第二功能性模块具有与所述单克隆抗体或其抗原结合部分不同的结合特异性。

4. 分离的核酸分子,其编码权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合部分。

5. 包含权利要求4所述的核酸分子的表达载体。

6. 包含权利要求5所述的表达载体的宿主细胞。

7. 包含权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合部分的组合物;优选地,所述组合物还包含第二种单克隆抗体或其抗原结合部分,所述第二种单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2、轻链可变区CDR3;其中,

重链可变区CDR1含有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列;

重链可变区CDR2含有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列;

重链可变区CDR3含有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列;

轻链可变区CDR1含有SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列;

轻链可变区CDR2含有SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列;

轻链可变区CDR3含有SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列;

最优选地,所述第二种抗体包含重链可变区、轻链可变区;其中,重链可变区含有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列,轻链可变区含有SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列。

8. 根据权利要求7所述的组合物,其特征在于所述组合物还包括诊断剂,所述诊断剂包括:放射性核素、造影剂、荧光剂、化学发光剂、生物发光剂、顺磁性离子、酶和光敏诊断剂。

9. 一种检测新型冠状病毒的产品,其含有权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合部分;优选地,所述产品包括利用酶联免疫吸附法、免疫荧光检测法、放射免疫法、发光免疫测定法、胶体金免疫层析法、凝集法、免疫比浊法检测抗原抗体结合的产品;

更优选地,所述产品还包含第二种单克隆抗体或其抗原结合部分,所述第二种单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2、轻链可变区CDR3;其中,

重链可变区CDR1含有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列;

重链可变区CDR2含有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列;

重链可变区CDR3含有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列；

轻链可变区CDR1含有SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列；

轻链可变区CDR2含有SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列；

轻链可变区CDR3含有SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列；

最优选地,所述第二种抗体包含重链可变区、轻链可变区;其中,重链可变区含有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列,轻链可变区含有SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列。

10. 一种应用,其包含以下任一项所述的应用:

(1) 权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合部分在制备新型冠状病毒检测产品中的应用;

(2) 权利要求1或2所述的单克隆抗体或其抗原结合部分在制备新型冠状病毒感染诊断产品中的应用;

(3) 权利要求7或8所述的组合物在制备检测新型冠状病毒的产品中的应用。

用于新型冠状病毒检测的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于细胞免疫学、分子生物学领域,涉及用于新型冠状病毒检测的试剂盒。

背景技术

[0002] 国际病毒分类委员会将新型冠状病毒命名为SARS-CoV-2,世界卫生组织将感染此病毒引起的肺炎称为COVID-19。此病毒传染性强,传播途径广。该病毒能迅速适应人体环境,感染后在潜伏期即具有传播能力,同时还有一些无症状感染者报道,甚至在多种动物体内也检测到病毒核酸。这些因素使得对该病毒的防控变的非常复杂,而且目前没有有效治疗药物及疫苗上市。

[0003] SARS-CoV-2属于冠状病毒属,为单股正链RNA病毒,大小约30kb,与SARS-CoV相似性为79%,与蝙蝠体内分离的冠状病毒(Coronavirus,CoV)相似性最高约88%。SARS-CoV-2具有典型的冠状病毒特征,病毒包膜上有典型的棘突,形似日冕。核衣壳为螺旋对称型,主要结构蛋白是核衣壳蛋白(Nucleocapsid protein,NP),NP全长420个氨基酸。NP在病毒结构蛋白中含量最多,在宿主感染早期大量表达,且免疫原性较强,能引起宿主强烈的免疫应答。因此,NP可作为SARS-CoV-2感染血清学诊断的主要靶标抗原。

[0004] 由于特异性治疗药物及有效疫苗尚未研发成功,早期诊断成为防控疫情重要的措施,早期核酸诊断及临床诊断为确诊重要依据。虽然核酸诊断速度快,受采样的质量的影响大,存在假阳性和假阴性,影响防控措施的落实。部分无症状感染者在病程晚期核酸检测也呈阴性,单凭核酸检测很容易出现漏诊。血清学诊断是检测病原感染后机体的免疫反应,持续时间长,免疫反应稳定,且免疫反应随着病程进展呈动态变化趋势。因此,血清学诊断同样也是早期诊断和感染现状评价的重要手段。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含含CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区;及含CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区;其中,重链可变区的CDR1包含SEQ ID NO.1所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;重链可变区的CDR2包含SEQ ID NO.2所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;重链可变区的CDR3包含SEQ ID NO.3所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;轻链可变区的CDR1包含SEQ ID NO.5所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;轻链可变区的CDR2包含SEQ ID NO.6所示或其保守修饰形式的氨基酸序列;轻链可变区的CDR3包含SEQ ID NO.7所示或其保守修饰形式的氨基酸序列。

[0006] 本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分的重链可变区包含与SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列,本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分的轻链可变区包含与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列。

[0007] 本发明还提供了双特异性分子,其包含与第二功能性模块相连的前面所述的单克隆抗体或其抗原结合部分,该第二功能性模块具有与所述单克隆抗体或其抗原结合部分不同的结合特异性。

[0008] 本发明还提供了组合物,其含有本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分,或双特异性分子。

[0009] 本发明还涵盖编码本发明的单克隆抗体或其抗原结合部分的核酸分子,以及包含此类核酸的表达载体和包含此类表达载体的宿主细胞。

[0010] “抗体”指包含通过二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白。每条重链由重链可变区(本文中简写为VH)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域,CH1、CH2和CH3构成。每条轻链由轻链可变区(本文中简写为VL)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域,CL构成。VH和VL区可以进一步细分为高变性区域,称为互补决定区(CDR),其散布在更保守的区域中,称为框架区(FR)。每条VH和VL由三个CDR和四个FR构成,其从氨基端到羧基端以下列顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白对宿主组织或因子的结合,其包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0011] 术语“抗原结合部分”在用于本文时指一个或多个保留了与抗原特异性结合的能力的抗体片段。已显示抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段行使。术语抗体的“抗原结合部分”所涵盖的结合片段的实例包括(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包含通过铰链区二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) Fd片段,由VH和CH1结构域组成;(iv) Fv片段,由抗体单臂的VL和VH结构域组成;(v) dAb片段(Ward等人(1989) Nature 341:544-546),由VH结构域组成;和(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外,虽然Fv片段的两个结构域,VL和VH由分开的基因编码,但是可以使用重组方法通过合成的接头将它们连接,从而使它们能够制备成单个蛋白链,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等人(1988) Science 242:423-426;和Huston等人(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。此类单链抗体也意图涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”中。这些抗体片段可使用本领域技术人员公知的常规技术获得,可以与完整抗体相同的方式对片段筛选功用。

[0012] “分离的单克隆抗体”在用于本文时意图指基本没有具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体。此外,分离的抗体可以基本没有其它细胞材料和/或化学药品。

[0013] “单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”在用于本文时指单一分子组合物的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物展现出对特定表位的单一结合特异性和亲和力。

[0014] 同源抗体

[0015] 本发明抗体包含的重链和轻链可变区所包含的氨基酸序列与本文所述的优选抗体的氨基酸序列同源,且其中所述抗体保留了本发明抗新型冠状病毒抗体的期望的功能特性。

[0016] 例如,本发明提供了分离的单克隆抗体或其抗原结合部分,其包含重链可变区和轻链可变区,其中:

[0017] (a) 所述重链可变区包含与SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列;

[0018] (b) 所述轻链可变区包含与SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列至少80%同源的氨基酸序列。

[0019] 在其它实施方式中,VH和/或VL氨基酸序列可以与上述序列具有85%、90%、95%、

96%、97%、98%或99%的同源性。VH和VL区与上述序列的VH和VL区具有高(即80%或更高)同源性的抗体可以通过诱变(例如定点诱变或PCR介导的诱变)编码氨基酸序列的核酸分子获得。

[0020] 在用于本文时,两氨基酸序列之间的百分比同源性等于两序列之间的百分比同一性。两序列间的百分比同一性为序列共有的相同位置数的函数(即%同源性=相同位置数/位置总数x 100),其中需考虑产生两序列的最优比对需要引入的缺口数和每个缺口的长度。如下述非限制性实施例所示,可以使用数学算法完成序列的比较和两序列间百分比同一性的测定。

[0021] 可以使用E.Meyers和W.Miller的算法(Comput. Appl. Biosci., 4:11-17(1988))测定两氨基酸序列间的百分比同一性,该算法已收入到ALIGN程序(版本2.0)中,其使用PAM120残基权重表,缺口长度罚分为12,缺口罚分为4。此外,可以使用Needleman和Wunsch的算法(J. Mol. Biol. 48:444-453(1970))测定两氨基酸序列间的百分比同一性,该算法已掺入到GCG软件包(可在www.gcg.com获得)中的GAP程序中,其使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,缺口权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0022] 另外/或者,本发明的蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”对公用数据库进行搜索以例如鉴定相关序列。此类搜索可以使用Altschul等人(1990) J. Mol. Biol. 215:403-10的XBLAST程序(版本2.0)进行。可以采用XBLAST程序以得分=50,词长=3进行BLAST蛋白质搜索以获得与本发明抗体分子同源的氨基酸序列。为获得用于比较的含缺口的比对结果,如Altschul等人(1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402所述使用Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用各程序(例如XBLAST和NBLAST)的缺省参数。(参见www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0023] 具有保守修饰的抗体

[0024] 在某些实施方式中,本发明的抗体包含含有CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区和含有CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区,其中这些CDR序列中的一个或多个包含基于本文所述优选抗体的特定氨基酸序列或其保守修饰,且其中所述抗体保留了本发明抗新型冠状病毒抗体的期望的功能特性。

[0025] 在用于本文时,术语“保守序列修饰”意图指氨基酸修饰不会显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特征。此类保守修饰包括氨基酸的取代、添加和缺失。修饰可以通过本领域已知的标准技术,例如定点诱变和PCR介导的优点引入到本发明的抗体中。保守氨基酸取代指氨基酸残基用具有类似侧链的氨基酸残基替换。本领域中对具有类似侧链的氨基酸残基家族已有详细说明。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β -分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此,可以用来自同一侧链家族的其它氨基酸残基替换本发明抗体CDR区中的一个或多个氨基酸残基。

[0026] 工程改造的和修饰的抗体

[0027] 本发明的抗体进一步可以使用具有一个或多个本文所公开的VH和/或VL序列的抗体作为起始材料来工程改造修饰后的抗体进行制备,其中所述修饰后的抗体可以具有与起

始抗体不同的特性。抗体可以通过修饰一个或全部两个可变区(即VH和/或VL)中,例如一个或多个CDR区中和/或一个或多个框架区中的一个或多个残基来进行工程改造。另外/或者,抗体可以通过修饰恒定区中的残基以例如改变抗体的效应器功能来进行工程改造。

[0028] 可以进行的一类可变区工程改造是CDR嫁接。抗体与靶抗原相互作用主要是通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基。因为这个原因,抗体个体间CDR中的氨基酸序列的差异比CDR外序列的大。因为CDR序列负责大部分抗体-抗原相互作用,所以有可能通过构建表达载体来表达模拟特定天然存在抗体性质的重组抗体,该表达载体包含来自特定天然存在抗体的CDR序列,其嫁接到来自具有不同特性的不同抗体的框架序列上(参见例如Riechmann,L.等人(1998)Nature 332:323-327;Jones,P.等人(1986)Nature 321:522-525;Queen,C.等人(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:10029-10033;Winter的美国专利No.5,225,539及Queen等人的美国专利Nos.5,530,101;5,585,089;5,693,762和6,180,370)。

[0029] 另一类可变区修饰是突变VH和/或VK CDR1、CDR2和/或CDR3区中的氨基酸残基以改进目的抗体的一种或多种结合特性(例如亲和力)。可以通过定点诱变或PCR介导的诱变来导入突变。优选导入(如上所述的)保守修饰。突变可以是氨基酸的取代、添加或缺失,但是优选为取代。此外,CDR区中残基变化通常不超过一个、两个、三个、四个或五个。

[0030] 本发明的工程改造的抗体包括那些VH和/或VK中框架残基进行了修饰以例如改进抗体特性的抗体。通常进行此类框架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法是“回复突变(backmutate)”一个或多个框架残基为相应的种系序列。更具体的说,发生体细胞突变的抗体可以含有与衍生该抗体的种系序列不同的框架残基。可以通过比较抗体框架序列和衍生该抗体的种系序列来鉴定此类残基。

[0031] 在框架区或CDR区中进行的修饰的另外的或可选的,可以工程改造本发明的抗体以在Fc区中包含修饰,这通常用于改变抗体的一种或多种功能特性,诸如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗体依赖性细胞的细胞毒性。此外,本发明的抗体可以进行化学修饰(例如在抗体上附着一个或多个化学模块)或者进行修饰以改变其糖基化,再次用于改变抗体的一种或多种功能特性。Fc区中残基的编号方式为Kabat的EU索引的编号方式。

[0032] 在一实施方式中,修饰CH1的铰链区以使铰链区中半胱氨酸残基的数目改变,例如增加或减少。该方法进一步记载于Bodmer等人的美国专利No.5,677,425中。改变CH1铰链区中半胱氨酸残基的数目以例如便于轻链和重链的组装或提高或降低抗体的稳定性。

[0033] 在另一实施方式中,突变抗体的Fc铰链区以缩短抗体的生物学半衰期。更具体的说,向Fc-铰链片段的CH2-CH3结构域界面区引入一个或多个氨基酸突变,从而使得抗体具有相对于天然Fc-铰链结构域SpA结合而言削弱了的葡萄球菌蛋白A(SpA)结合。该方法进一步详细记载于Ward等人的美国专利No.6,165,745中。

[0034] 在另一实施方式中,修饰抗体以延长其生物学半衰期。有多种方法是可行的。例如,如Ward的美国专利No.6,277,375中所述,引入一个或多个下述突变:T252L、T254S、T256F。或者,如Presta等人的美国专利Nos.5,869,046和6,121,022中所述,为延长生物学半衰期,抗体可以在CH1或CL区中进行改变以包含补救受体(salvage receptor)结合表位,该表位取自IgG的Fc区的CH2结构域的两个环。

[0035] 在又一实施方式中,修饰抗体的糖基化。例如可以制备无糖基化的

(aglycosylated) 抗体 (即抗体缺少糖基化)。可以改变糖基化以例如提高抗体对抗原的亲合力。此类碳水化合物修饰可以通过例如改变抗体序列中的一个或多个糖基化位点来实现。例如, 进行一个或多个氨基酸的取代以除去一个或多个可变区框架糖基化位点, 进而除去该位点的糖基化。此类无糖基化可以提高抗体对抗原的亲合力。该方法进一步详细记载于 Co 等人的美国专利 Nos. 5,714,350 和 6,350,861 中。

[0036] 本发明所设想的本文抗体的另一修饰是 PEG 化。抗体可以 PEG 化以例如延长抗体的生物学 (例如血清) 半衰期。为 PEG 化抗体, 通常在使得一个或多个 PEG 基团附着于抗体或抗体片段的条件下将抗体或其片段与聚乙二醇 (PEG), 诸如 PEG 的反应性酯或醛衍生物进行反应。优选的是, PEG 化可以通过与反应性 PEG 分子 (或类似的反应性水溶性聚合物) 的酰化反应或烷化反应进行。在用于本文时, 术语“聚乙二醇”意图包括任何形式的已经用于衍生化其它蛋白质的 PEG, 诸如单 (C1-C10) 烷氧基-或芳氧基-聚乙二醇或聚乙二醇-马来酰亚胺。在某些实施方式中, 待 PEG 化的抗体是无糖基化的抗体。PEG 化蛋白质的方法是本领域已知的, 可以用于本发明的抗体。参见例如 Nishimura 等人的 EP 0 154 316 和 Ishikawa 等人的 EP 0 401 384。

[0037] 编码本发明抗体的核酸分子

[0038] 本发明的另一方面涉及编码本发明抗体的核酸分子。核酸可以存在于完整的细胞中、存在于细胞溶胞物中、或者以部分纯化或基本纯的形式存在。当通过标准技术, 包括碱/SDS 处理、CsCl 分带 (banding)、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域众所周知的其它技术纯化除去其它细胞组分或其它污染物, 例如其它细胞核酸或蛋白质时, 核酸是“分离的”或“使得基本纯的”。参见 F. Ausubel 等人 (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York。本发明的核酸可以是例如 DNA 或 RNA, 而且可以含有或不含有内含子序列。在一优选的实施方式中, 核酸是 cDNA 分子。

[0039] 可以使用标准分子生物学技术来获得本发明的核酸。一旦获得编码 VH 和 VL 区段的 DNA 片段, 进一步通过标准重组 DNA 技术操作这些 DNA 片段, 以例如将可变区基因转变为全长抗体链基因、Fab 片段基因或 scFv 基因。在这些操作中, 将编码 VL 或 VH 的 DNA 片段可操作的连接至编码另一蛋白质, 诸如抗体恒定区或柔性接头的另一 DNA 片段。术语“可操作的连接”在用于本文时意图表示连接两 DNA 片段从而使得这两个 DNA 片段所编码的氨基酸序列保持在同一读码框中 (in-frame)。

[0040] 通过将编码 VH 的 DNA 可操作的连接至编码重链恒定区 (CH1、CH2 和 CH3) 的另一 DNA 分子可以将编码 VH 区的分离的 DNA 转变为全长重链基因。人重链恒定区基因的序列是本领域已知的。

[0041] 通过将编码 VL 的 DNA 可操作的连接至编码轻链恒定区 CL 的另一 DNA 分子可以将编码 VL 区的分离的 DNA 转变为全长轻链基因 (以及 Fab 轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列是本领域已知的。

[0042] 双特异性分子

[0043] 本发明包含本发明的抗新型冠状病毒抗体或其片段的双特异性分子。

[0044] 本发明的抗体或其抗原结合部分可以进行衍生化或连接至另一功能性分子上, 例如另一种肽或蛋白质 (例如受体的另一种抗体或配体) 以生成与至少两种不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。本发明的抗体事实上可以进行衍生化或连接至一个以上其它

功能性分子以生成与两个以上不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子;此类多特异性分子还意图为本文中所使用的术语“双特异性分子”所涵盖。为创建本发明的双特异性分子,可以将本发明的抗体在功能上连接(例如通过化学偶联、基因融合、非共价结合或其它方式)至一种或多种其它结合分子,诸如另一种抗体、抗体片段、肽或结合模仿物,从而产生双特异性分子。

[0045] 本发明还提供了包含前面所述的核酸分子的表达载体。

[0046] 本发明还提供了包含前面所述的表达载体的宿主细胞。

[0047] 本发明还提供了包含前面所述的单克隆抗体或其抗原结合部分的组合物。

[0048] 进一步,所述组合物还包含第二种单克隆抗体或其抗原结合部分,所述第二种单克隆抗体或其抗原结合部分包含重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2、轻链可变区CDR3;其中,

[0049] 重链可变区CDR1含有SEQ ID NO.9所示的氨基酸序列;

[0050] 重链可变区CDR2含有SEQ ID NO.10所示的氨基酸序列;

[0051] 重链可变区CDR3含有SEQ ID NO.11所示的氨基酸序列;

[0052] 轻链可变区CDR1含有SEQ ID NO.13所示的氨基酸序列;

[0053] 轻链可变区CDR2含有SEQ ID NO.14所示的氨基酸序列;

[0054] 轻链可变区CDR3含有SEQ ID NO.15所示的氨基酸序列;

[0055] 优选地,所述第二种抗体包含重链可变区、轻链可变区;其中,重链可变区含有SEQ ID NO.12所示的氨基酸序列,轻链可变区含有SEQ ID NO.16所示的氨基酸序列。

[0056] 更进一步,所述组合物还包括诊断剂。

[0057] 诊断剂

[0058] 可用于本发明的所述诊断剂包括:放射性核素、造影剂、荧光剂、化学发光剂、生物发光剂、顺磁性离子、酶和光敏诊断剂。

[0059] 放射性核素包括¹¹⁰In、¹¹¹In、¹⁷⁷Lu、¹⁸F、⁵²Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Zr、^{94m}Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、¹²⁰I、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁵⁴⁻¹⁵⁸Gd、³²F、¹¹C、¹³N、¹⁵O、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、⁵¹Mn、^{52m}Mn、⁵⁵Co、⁷²As、⁷⁵Br、⁷⁶Br、^{82m}Rb、⁸³Sr或其它 γ 发射体、 β 发射体或正电子发射体。

[0060] 顺磁性离子包括:铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镨(III)、钇(III)和铟(III)。

[0061] 荧光标记化合物包括异硫氰酸荧光素、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛和荧光胺。

[0062] 化学发光标记化合物包括鲁米诺、异鲁米诺、芳族吖啶酯、咪唑、吖啶盐和草酸酯。

[0063] 生物发光化合物包括荧光素、荧光素酶和水母发光蛋白。

[0064] 本发明提供了一种检测新型冠状病毒的产品,其含有前面所述的单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0065] 进一步,所述试剂盒还包括前面所述的第二种单克隆抗体或其抗原结合部分。

[0066] 更进一步,所述产品包括利用酶联免疫吸附法、免疫荧光检测法、放射免疫法、发光免疫测定法、胶体金免疫层析法、凝集法、免疫比浊法检测抗原抗体结合的产品。

[0067] 本发明提供了前面所述的单克隆抗体或其抗原结合部分在制备新型冠状病毒检测产品中的应用。

[0068] 本发明提供了前面所述的单克隆抗体或其抗原结合部分在制备新型冠状病毒感染诊断产品中的应用。

[0069] 本发明提供了前面所述的组合物在制备检测新型冠状病毒的产品中的应用。

附图说明

- [0070] 图1显示本发明的重组SARS-CoV2 NP蛋白的SDS-PAGE图；
[0071] 图2显示利用间接ELISA检测抗体滴度的结果图；
[0072] 图3显示利用WB检测抗体与抗原结合的结果图；
[0073] 图4显示利用SPR检测JS01的亲合活性结果图；
[0074] 图5显示利用SPR检测JS02的亲合活性结果图；
[0075] 图6显示利用SPR检测JS03的亲合活性结果图；
[0076] 图7显示利用SPR检测JS04的亲合活性结果图；
[0077] 图8显示利用SPR检测JS05的亲合活性结果图；
[0078] 图9显示利用SPR检测JS06的亲合活性结果图；
[0079] 图10显示利用SPR检测JS07的亲合活性结果图；
[0080] 图11显示利用SPR检测JS08的亲合活性结果图；
[0081] 图12显示利用SPR检测JS09的亲合活性结果图；
[0082] 图13显示利用SPR检测JS10的亲合活性结果图；
[0083] 图14显示利用SPR检测JS11的亲合活性结果图；
[0084] 图15显示利用SPR检测JS12的亲合活性结果图；
[0085] 图16显示利用SPR检测JS13的亲合活性结果图；
[0086] 图17显示利用SPR检测JS14的亲合活性结果图；
[0087] 图18显示利用SPR检测JS15的亲合活性结果图；
[0088] 图19显示利用SPR检测JS16的亲合活性结果图；
[0089] 图20显示利用双抗体夹心法检测抗体包被浓度的结果图；
[0090] 图21显示利用双抗体夹心法检测抗体检测灵敏度的结果图；
[0091] 图22显示本发明的抗原检测层析条的检测效果图。

具体实施方式

[0092] 下面通过附图和实施例进一步说明本发明。应该理解的是，本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发明要求保护的范畴。

[0093] 实施例1抗体筛选

[0094] 一、重组SARS-CoV2核蛋白(NP)表达

[0095] 1.1主要试剂

[0096] SARS-CoV2 NP基因序列(GenBank序列号:MT066176.1)以及相关引物合成和测序均由通用生物系统(安徽)有限公司完成;E.coli DH5 α ,BL21(DE3)感受态细胞购自通用生物系统(安徽)有限公司;BamHI和NotI核酸内切酶购自New England Biolabs(NEB)公司;EX Taq酶购自TaKaRa公司;HRP标记抗人Fc抗体购自Sigma公司;其他化学试剂均为国产分析纯

试剂;感染2019-nCoV患者血清由本中心收集及保存,全部为江苏病例。

[0097] 1.2原核表达质粒构建

[0098] 设计NP基因原核表达引物,上游引物带BamHI酶切位点,下游引物带NotI酶切位点。引物序列为:Cov2-NP-F:CGGGATCCTCTGATAATGGACCCCAAAATC;Cov2-NP-R:ATAAGAATGCGGCCGCAGGCCTGAGTTGAGTCAGCAC。使用EX Taq酶扩增NP基因,PCR反应程序为:94℃3min;94℃30s,58℃30s,72℃80s,共30个循环;72℃10min。PCR产物经胶回收约1300bp目的片段,然后经BamHI和NotI双酶切后连接pET28a载体,转化E.coli DH5 α 感受态细胞。次日挑选单菌落测序正确后,提质粒转化原核表达菌E.coli BL21 (DE3) 感受态细胞。

[0099] 1.3NP表达及纯化

[0100] 将NP表达菌培养至OD₆₀₀=0.6后,加入终浓度0.5mmol/L的IPTG,16℃诱导6h,收集菌体,超声破碎后离心收集包涵体。将包涵体溶于8mol/L尿素中,然后用镍柱亲和层析纯化包涵体蛋白。纯化后梯度减少尿素含量,使蛋白透析复性至PBS中,最后经SDS-PAGE检测蛋白表达及纯化效果。小量表达成功以后即上100L发酵罐进行大量发酵,发酵培养基为TB培养基(1%甘油),发酵参数为280rpm,通气比为0.5vvm(15L/min),pH控制在6.8~7.2,罐压0.06MPa~0.1MPa,发酵温度为16℃,培养24h。

[0101] SDS-PAGE结果显示:NP全长加上载体中的His tag及其他附带氨基酸,预计蛋白相对分子质量约 50×10^3 。表达菌经IPTG诱导后,发现在 50×10^3 左右出现明显的条带,与预计分子量大小一致(图1A)。包涵体溶解后,过镍柱纯化,在150mmol/L咪唑时有明显的洗脱峰。蛋白经透析复性后,经SDS-PAGE发现在同样的位置出现单一蛋白条带(图1B)。此说明NP被成功诱导表达并且纯化后纯度较高。注:图中M:蛋白Makers;1:未诱导的pET28a-NP表达菌;2:IPTG诱导后pET28a-NP重组表达菌;3:纯化后重组核衣壳蛋白。

[0102] 二、噬菌体文库构建

[0103] 1、采集COVID-19患者恢复期外周血,从外周血中分离单个核细胞(PBMC)

[0104] 本项目于2020年2月14日,经过知情同意,从江苏省某市采集5位COVID-19确诊患者出院前外周血各20ml。5位患者为同一传播链,其中一人为武汉归来人员,经过在酒店浴室共浴感染另外3位患者,第5位患者与共浴的3位患者其中之一为同事关系。5人均非重症,经过治疗后分别与2月15日-22日出院居家隔离。使用GE的Ficoll-Paque PLUS,经密度梯度离心法,分离20ml肝素抗凝血中的单个核细胞(PBMC)。

[0105] 2、PBMC中RNA的提取和cDNA的合成

[0106] 使用QIAGEN的RNeasy Mini Kit提取PBMC细胞RNA,然后使用罗氏公司的第一链合成试剂盒(Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit,Roche,Cat No.:04896866001)将RNA反转录成cDNA。

[0107] 3、PCR扩增VK,VL和VH(EX Taq,Takara,Cat No.:DRR001A)

[0108] (1) 扩增VK&VL体系如表1所示。

[0109] 表1扩增VK&VL体系

[0110]

溶液或组分	体积(μ L)
cDNA	1
EX Buffer(10x)	5
dNTPs(10mM each)	4

P1 (10 μ M)	2
P2 (10 μ M)	2
EX Taq 1U/ μ l	0.3
dH ₂ O	35.7

[0111] (2) 扩增重链Fd段体系如表2所示。

[0112] 表2扩增重链Fd段体系

溶液或组分	体积 (μ L)
cDNA	2
EX Buffer (10x)	10
dNTPs (10mM each)	8
P1 (10 μ M)	2
P2 (10 μ M)	2
EX Taq 1U/ μ l	0.6
dH ₂ O	75.4

[0114] (3) 反应程序如表3所示。

[0115] 表3反应程序

温度	时间	循环数
94 $^{\circ}$ C	3min	
94 $^{\circ}$ C	30s	35 个循环
52 $^{\circ}$ C	1 min	
72 $^{\circ}$ C	1 min	
72 $^{\circ}$ C	10 min	

[0117] PCR产物过2%琼脂糖凝胶电泳,回收750bp左右的片段。

[0118] 4、轻链克隆(将VK和VL克隆入pComb3H载体)

[0119] VK和VL经XbaI和SacI酶切后与同样经XbaI和SacI酶切的pComb3H载体连接后,回收连接产物,然后电转XL1-Blue感受态细胞。

[0120] 电击菌液涂15cm大平皿,次日刮菌,提质粒即为轻链库。此时重组质粒为pComb3H-VK和pComb3H-VL。

[0121] 5、重链克隆(将VH基因克隆入pComb3H-VK和pComb3H-VL轻链库中)

[0122] 将轻链库pComb3-L和Fd片段分别经XhoI和SpeI双酶切,与同样经XhoI和SpeI双酶切的pComb3H-VK和pComb3H-VL连接,然后电转即得到抗体文库。

[0123] 6、抗体库的包装

[0124] (1) 从-80 $^{\circ}$ C冰箱取出抗体库,冰上融化后取1ml加入10ml A+(20 μ g/ml) 2YT培养基中,37 $^{\circ}$ C 200rpm摇1小时;

[0125] (2) 加100ml A+(100 μ g/ml), T+(20 μ g/ml) 2YT培养基,200rpm摇1小时;

[0126] (3) 加10¹²pfu的VCSM13辅助噬菌体,37 $^{\circ}$ C静置20min,200rpm摇2小时;

- [0127] (4) 加终浓度70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 卡那30 $^{\circ}\text{C}$ 200rpm摇过夜;
- [0128] (5) 次日6000rpm离心20min,倒出上清,加入4%PEG8000 (4g) 和3%NaCl (3g),混匀,置于冰上30min以上;
- [0129] (6) 分装于50ml离心管中9000rpm离心25min,弃去上清,控干,沉淀用1ml PBS重悬即为包装文库。
- [0130] 三、噬菌体文库筛选
- [0131] 1、将重组SARS-CoV2核蛋白(NP)包被于免疫管中,按50 $\mu\text{g}/\text{管}$ 包被3管,于4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜,次日用2%脱脂牛奶封闭免疫管1h。
- [0132] 2、向免疫管中加1.75ml含2%脱脂牛奶的PBS和250 μl 噬菌体文库,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇1h,再37 $^{\circ}\text{C}$ 静置1h。
- [0133] 3、倒去噬菌体文库,用PBST洗20次,每次摇5min。
- [0134] 4、用1ml pH=2.2的Gly-HCl洗脱免疫管,室温静置5min,再37 $^{\circ}\text{C}$ 摇5min,然后吸至1.5ml EP管中,加入57 μl 2M Tris中和至pH=7。
- [0135] 5、将洗脱液转移至一个新的50ml离心管中,立即加入10ml OD=1的新鲜XL1-Blue,混匀后37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育30min,加入10ml 2YT (Amp 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Tet 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。
- [0136] 6、取10 μl 菌液用来测洗脱库容量,剩下20ml培养基倒入500ml三角瓶,230rpm摇1h。
- [0137] 7、加入130ml 2YT (Amp 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Tet 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 230rpm摇1h。
- [0138] 8、加入MOI=20的辅助噬菌体,37 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育30min。
- [0139] 9、3000g 10min离心,重悬沉淀至150ml 2YT (Amp 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Tet 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 中,37 $^{\circ}\text{C}$, 230rpm摇2h。
- [0140] 10、加入110 μl 70mg/ml卡那霉素,30 $^{\circ}\text{C}$ 230rpm过夜。次日再加1/5体积的PEG-NaCl (40ml),混匀后冰浴至少1h,然后10000g 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心20min,沉淀重悬于2-3ml PBS中,瞬时离心去除杂菌,过0.45 μm 滤器后用于下一轮筛选。
- [0141] 11、重复上述筛选步骤3次,以达到对噬菌体文库富集筛选的目的。
- [0142] 12、第三轮富集完以后,挑选2*96个克隆。经IPTG诱导后,次日进行ELSA检测。
- [0143] 四、ELISA检测2*96个克隆的结合特异性
- [0144] 1、分别包被2块抗人Fab抗体(1:3000)和2块NP蛋白(2 $\mu\text{g}/\text{ml}$),于4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜。
- [0145] 2、次日用3%脱脂牛奶封闭1h,然后加入50 μl 诱导上清和50 μl 脱脂牛奶,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,PBST洗涤。
- [0146] 3、4块板均加入HRP标记的抗人Fab抗体(1:3000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h,PBST洗涤后,TMB显色。
- [0147] 经筛选共获得178株能与NP特异性结合的噬菌体抗体片段,该片段为人源的Fab段,包括轻链全长及重链的Fd段。将178个单菌落扩增后送测序,共获得159株轻重链齐全的合格序列。
- [0148] 实施例2全抗体的表达及相关功能验证
- [0149] 从获得的159株抗体中最终选定16株抗体用于全抗体的表达及相关功能验证,将此16株抗体命名为JS01~JS16。
- [0150] 其中,JS15抗体序列如下所示:

[0151] 重链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示；
[0152] 重链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示；
[0153] 重链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示；
[0154] 轻链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示；
[0155] 轻链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.6所示；
[0156] 轻链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示；
[0157] 重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示,核酸序列如SEQ ID NO.17所示;轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.8所示,核酸序列如SEQ ID NO.18所示。

[0158] JS08抗体序列如下所示:

[0159] 重链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.9所示；
[0160] 重链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.10所示；
[0161] 重链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.11所示；
[0162] 轻链可变区CDR1的氨基酸序列如SEQ ID NO.13所示；
[0163] 轻链可变区CDR2的氨基酸序列如SEQ ID NO.14所示；
[0164] 轻链可变区CDR3的氨基酸序列如SEQ ID NO.15所示。
[0165] 重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.12所示;轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO.16所示。

[0166] 1、全抗体表达

[0167] 将上述16株人源抗体,构建成IgG形式人源全分子抗体,并在293F细胞中表达,用Protein A纯化后备用。

[0168] 2、ELISA检测16株抗体与重组NP结合特异性

[0169] 将重组NP用PBS按1 μ g/ml浓度包被ELISA板,将所有抗体浓度稀释到1mg/ml,然后从1:10000开始倍比稀释,37 $^{\circ}$ C孵育30min。然后PBST洗3次,加入HRP标记的抗人IgG(1:5000),37 $^{\circ}$ C孵育30min后PBST洗3次,然后TMB显色,终止后读取OD450吸光度值。

[0170] 采用间接ELISA检测16株NP抗体的稀释滴度,阴性对照的平均OD值为0.119,标准差为0.132,因此将cutoff值定义为 $\bar{x} + 2SD = 0.383$ 。由此判断16株抗体的检测滴度为1:80000~1:1280000之间(图2)。

[0171] 3、16株抗体与纯化NP的Western Blot结果

[0172] 将1 μ g重组NP经SDS-PAGE电泳后,转印至PVDF膜中,用上述16种抗体(0.5 μ g/ml)37 $^{\circ}$ C孵育1h,用PBST洗涤3次,然后用HRP标记的抗人IgG(1:5000)孵育30min,PBST洗涤3次,然后用DAB之间在膜上显色。

[0173] WB实验结果显示16株抗体均能特异性结合重组表达的核蛋白(NP),并在50kDa处出现明显的显色带,此提示该组抗体全部为线性表位的抗体(图3)。

[0174] 4、抗体亲和活性检测

[0175] 抗体亲和力测定由Biacore T200工作站完成,具体按以下步骤进行:首先使用氨基偶联活化剂NHS和EDC以10 μ l/min 300s活化CM5芯片,然后用10mM醋酸钠缓冲液(pH5.5)将重组表达的SARS-CoV-2NP稀释到1 μ g/mL,以10 μ l/min流经芯片30s使响应值(Response units, RUs)达到600左右,最后设置10 μ l/min、420s,进样乙醇胺对芯片表面剩余活化位点进行封闭。系列稀释的抗体,在25 $^{\circ}$ C时以30 μ l/min流速依次进样,每测定一次浓度以后用pH

2.0的甘氨酸-盐酸再生CM5芯片,然后进行下个浓度检测。实验结束后,利用Biacore T200 Evaluation Software软件全局拟合曲线来获得结合亲和力。

[0176] 实验结果如图4-19所示,JS01-JS16可高效结合SARS-CoV-2NP蛋白,亲和活性相关参数见表4。

[0177] 表4抗体亲和力参数

抗体名称	配体偶联量	ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
JS01	102RU	2.18E+06	4.79E-04	2.20E-10
JS02	162RU	9.12E+05	5.83E-05	6.39E-11
JS03	102RU	8.97E+05	2.12E-04	2.36E-10
JS04	162RU	7.15E+04	1.91E-04	2.67E-09
JS05	162RU	5.94E+05	2.43E-04	4.09E-10
JS06	136RU	1.61E+05	0.002576	1.61E-08
JS07	110RU	1.44E+06	1.78E-04	1.24E-10
JS08	162RU	3.03E+04	5.77E-06	1.90E-10
JS09	129RU	6.89E+05	4.79E-05	6.94E-11
JS10	136RU	1.47E+06	2.99E-04	2.04E-10
JS11	110RU	1.93E+05	5.62E-05	2.92E-10
JS12	110RU	4.88E+05	7.33E-05	1.50E-10
JS13	110RU	8.05E+05	9.66E-05	1.20E-10
JS14	136RU	1.24E+06	2.21E-04	1.78E-10
JS15	110RU	7.72E+04	1.22E-04	1.58E-09
JS16	136RU	2.68E+05	4.01E-05	1.50E-10

[0179] 5、抗体配对实验

[0180] 5.1抗体包被浓度的确定

[0181] (1) 将100 μ l JS12抗体从5 μ g/ml开始倍比稀释到0.0024 μ g/ml共稀释12个稀释度,然后包被于ELISA板中。4 $^{\circ}$ C包被过夜,次日用1%BSA封闭2h,PBST洗3次。

[0182] (2) 向每个包被浓度的第一孔加入50ng的重组NP,然后倍比稀释到0.39ng/孔,共8个稀释度,37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBST洗3次。

[0183] (3) 加入1:1000稀释HRP标记的JS08,37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBST洗3次,TMB显色后读取OD450nm吸光度值。

[0184] 由图20的曲线可以看出,包被抗体的量对检测灵敏性有影响,从5 μ g/ml到0.00245 μ g/ml的包被量看来,影响不大,检测NP抗原的灵敏性看小于3.9ng/ml。因此,后续配对实验,我们均选择2 μ g/ml浓度作为抗体包被量,用1:4000作为酶标抗体的稀释度。

[0185] 5.2双抗夹心法检测NP

[0186] (1) 将16株NP抗体JS01~JS16按2 μ g/ml浓度包被ELISA板,于4 $^{\circ}$ C包被过夜,次日用1%BSA封闭2h,PBST洗3次。

[0187] (2) 加入0.1 μ g/ml重组NP蛋白,然后倍比稀释至0.78ng/ml,共8个稀释度,37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBST洗3次。

[0188] (3) 加入HRP标记的JS08(1:1000),37 $^{\circ}$ C孵育1h,PBST洗3次,TMB显色,读取OD450nm

吸光度值。

[0189] 由图21可见,酶标的JS08不能与JS06,JS11和JS08自身配对,而与其他13株NP抗体均可配对用于双抗夹心法检测NP。其中JS08与JS16配对效果最好,其检测限可达0.78ng/ml以下,其他配对抗体检测限在12.5-1.56ng/ml之间。

[0190] 6、双抗体夹心免疫层析法检测重组NP的灵敏度

[0191] 将抗JS08单抗包被在硝酸纤维素膜上形成T线,抗人IgG抗体标记至C线处。NP蛋白系列稀释后加50 μ L于样本孔中,样本孔下的结合垫上的标有色微球的JS01~JS16抗体与NP形成免疫复合物,然后通过层析作用迁移至T线处,与此处标记抗体结合固定,形成有色T线。多余的人源单抗再继续迁移至C线处,与抗人抗体结合,形成C线。以此来测定对NP的结合灵敏度。

[0192] 采用有色微球标记JS08抗体与13株抗体分别配对,制成抗原检测层析条。用2ng/ml的重组NP验证试纸条,从结果可见全部层析条均可见明显的检测T线,而质控C线也非常明显(图22)。这说明13对抗体组合均可用于检测冠状病毒的核蛋白,且检测限小于2ng/ml。

[0193] 虽然以上仅描述了本发明的具体实施方式范例,但是本领域的技术人员应当理解,这些仅是举例说明,本发明的保护范围是由所附权利要求书限定的。本领域的技术人员在不背离本发明的原理和实质的前提下,可以对这些实施方式做出多种变更或修改,但这些变更或修改均落入本发明的保护范围。

序列表

<110> 江苏省疾病预防控制中心(江苏省公共卫生研究院)

<120> 用于新型冠状病毒检测的试剂盒

<160> 18

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 2

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala

1 5

<210> 3

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 3

Ala Arg Gly Gly Trp Arg His Ser Ser Gly Trp Asp Asn Trp Tyr Phe

1 5 10 15

Asp Leu

<210> 4

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 4

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Trp Arg His Ser Ser Gly Trp Asp Asn Trp Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 5
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 6
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 6
 Ala Ala Ser
 1
 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 7
 Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Leu Leu Gly Thr
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 8
 Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

	20		25		30														
Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile				
	35						40					45							
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly				
	50					55						60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro				
65					70					75					80				
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Leu	Leu				
				85					90					95					
Gly	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys								
	100							105											

<210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 9
 Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr
 1 5
 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 10
 Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr
 1 5
 <210> 11
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 11
 Ala Arg Glu Gln Phe Ser Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Phe Asp Phe
 1 5 10 15
 <210> 12
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 12
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Glu Gln Phe Ser Gly Gly Asp Tyr Glu Gly Phe Asp Phe Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 13

Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp
1 5

<210> 14

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 14

Gly Asn Ser

1

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 15

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Trp Val
1 5 10

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 16
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Glu Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 17

<211> 375

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 17

cagggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcttgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatccta tctttggtac agcaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc gagaggggt 300
 tggcgacata gcagtggctg ggacaactgg tacttcgata tctggggccg tggcacctg 360
 gtcactgtct cctca 375

<210> 18

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 18

gagaatgtgc tcaccagtc tccatctec ctgtctgeat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagtcct gatctatget gcatecagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat tteactetca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccctcttggg cactttcggc 300
 cctgggacca aagtggatat caaa 324

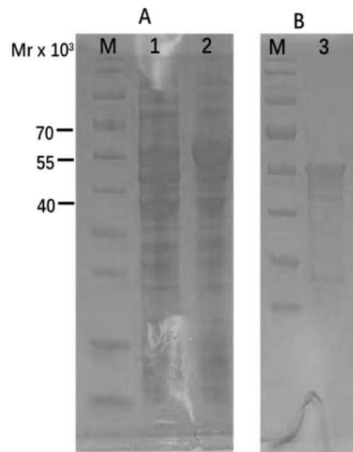


图1

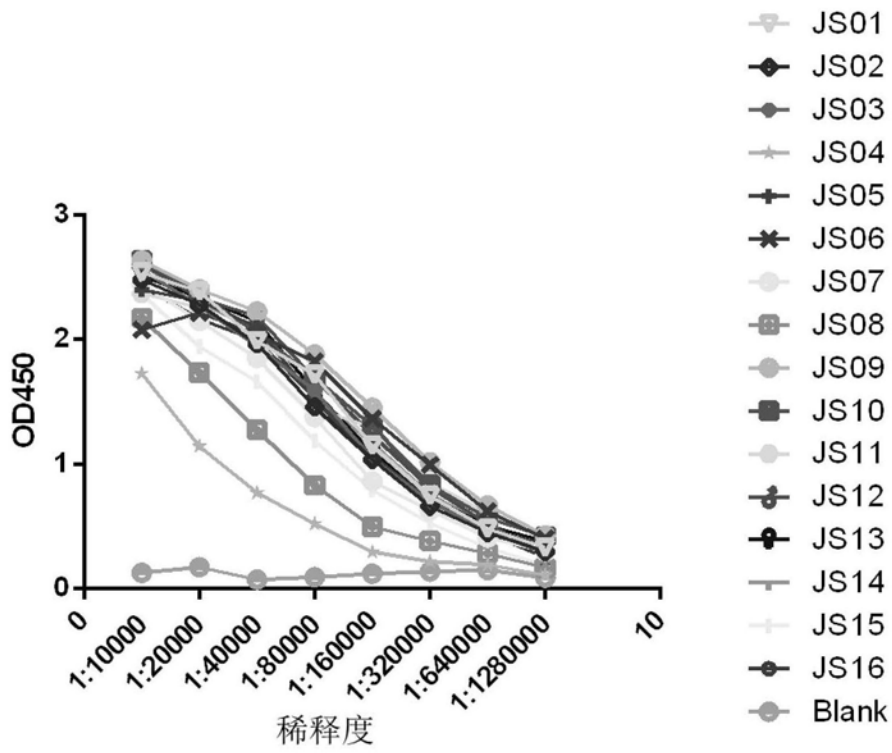


图2

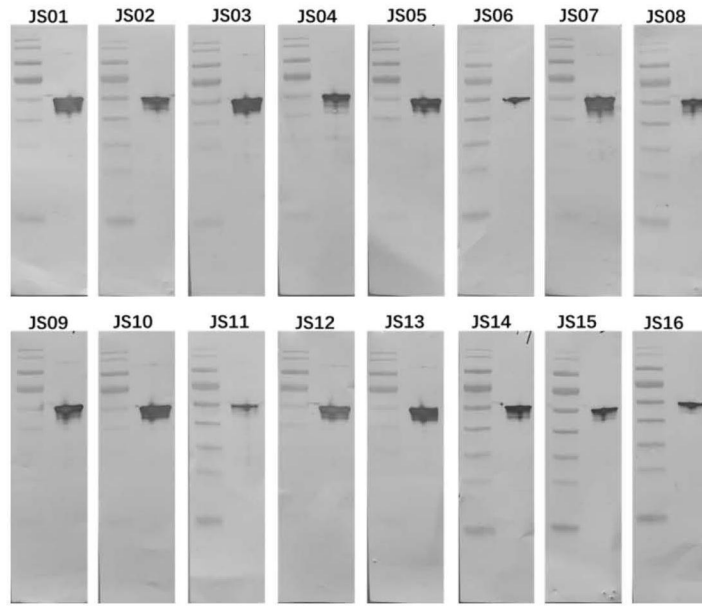


图3

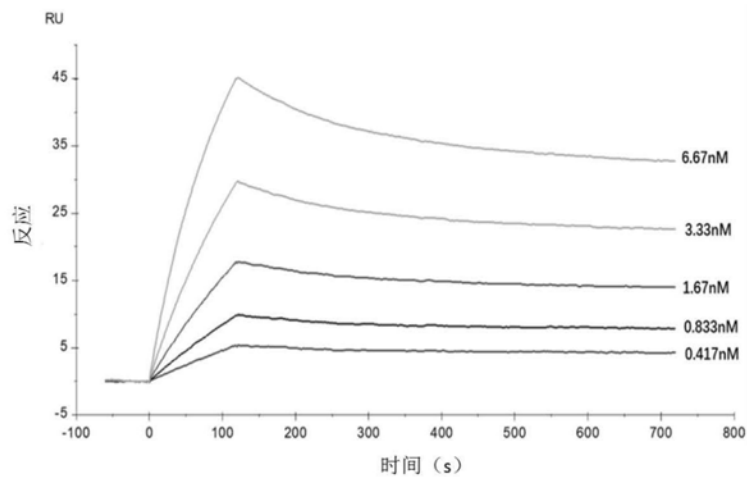


图4

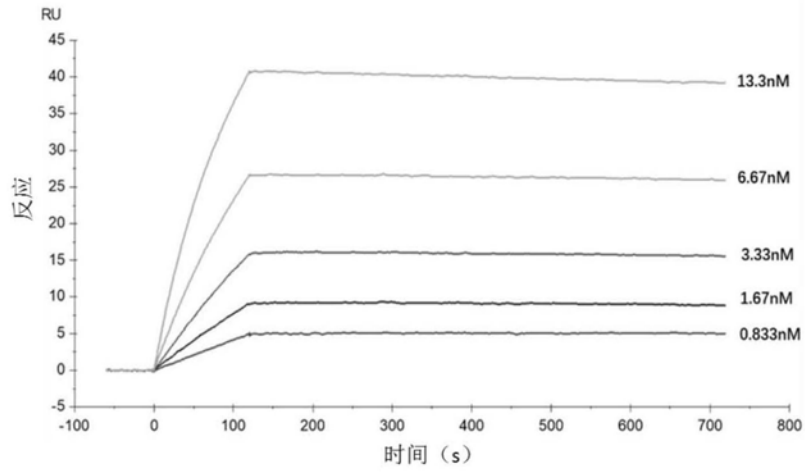


图5

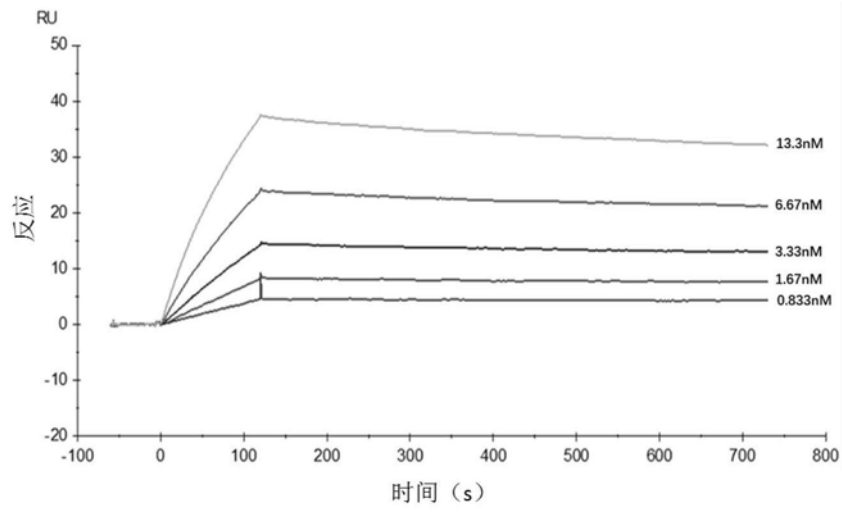


图6

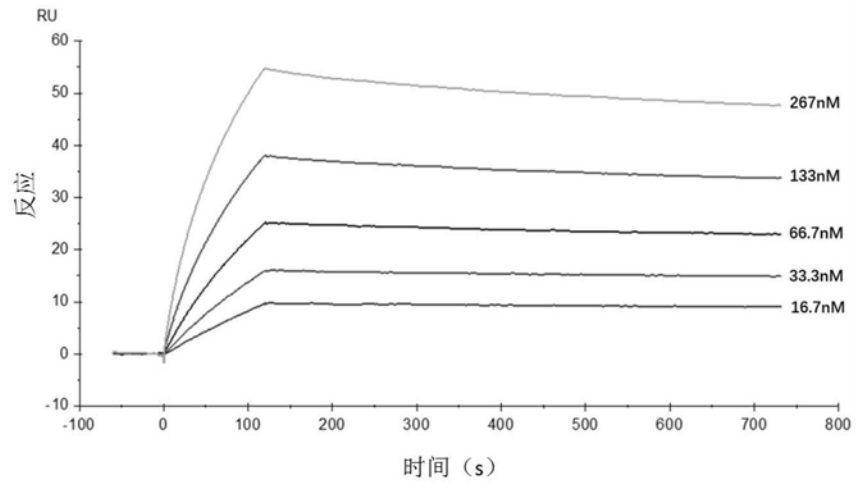


图7

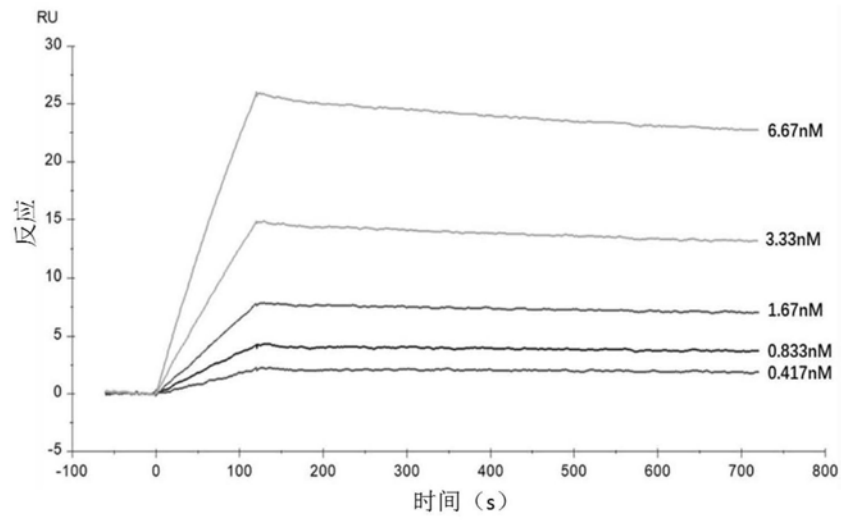


图8

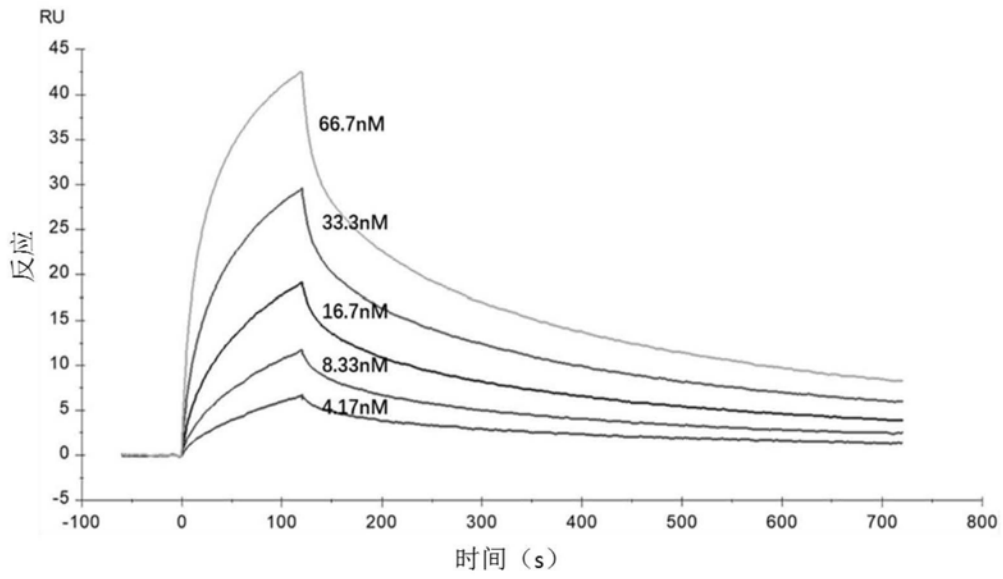


图9

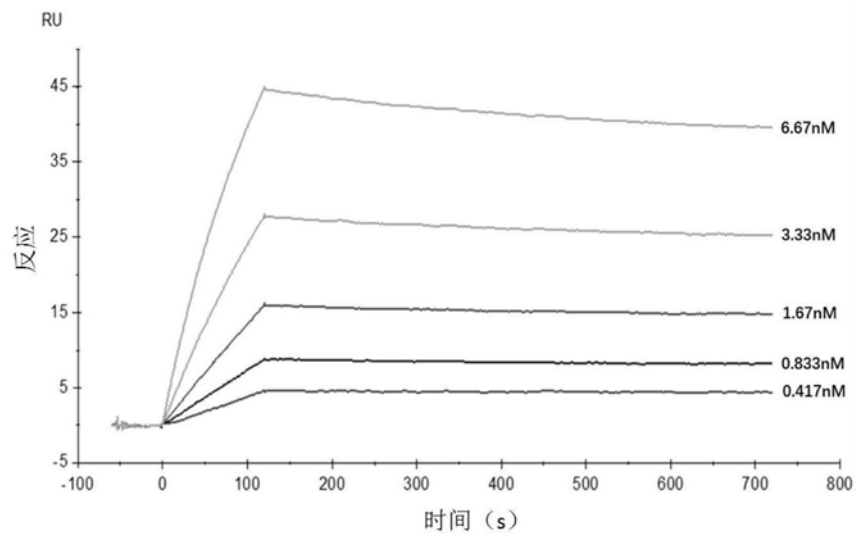


图10

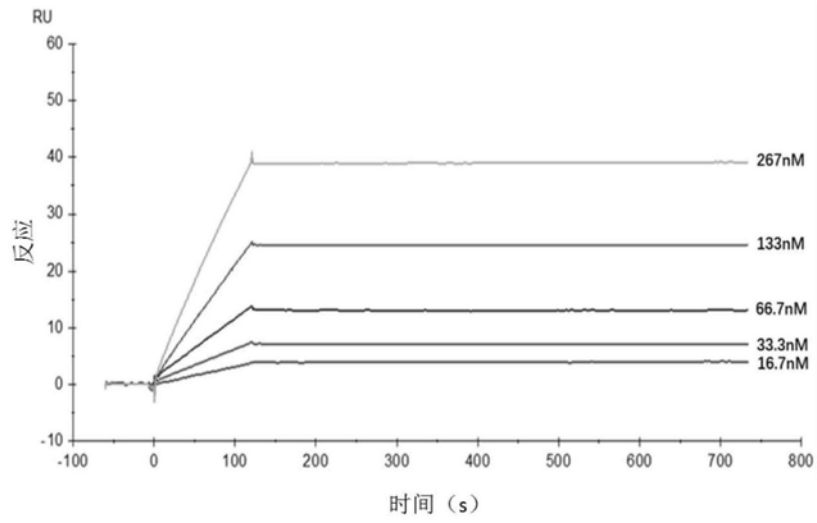


图11

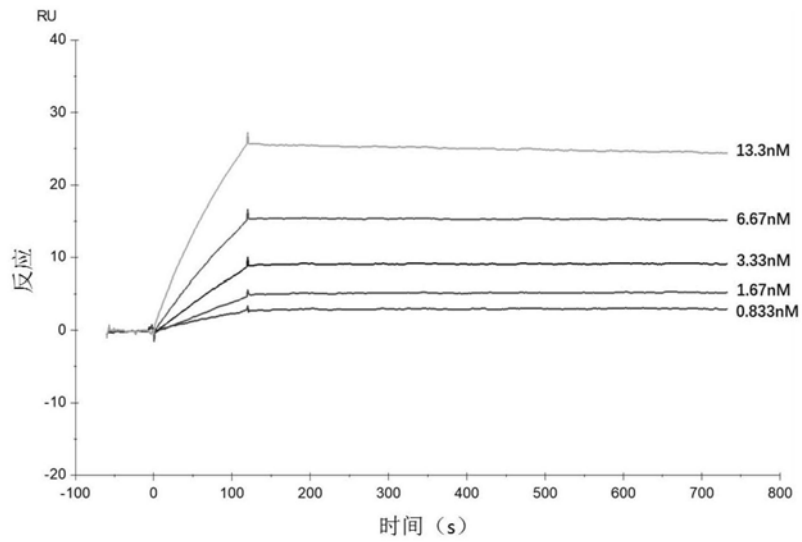


图12

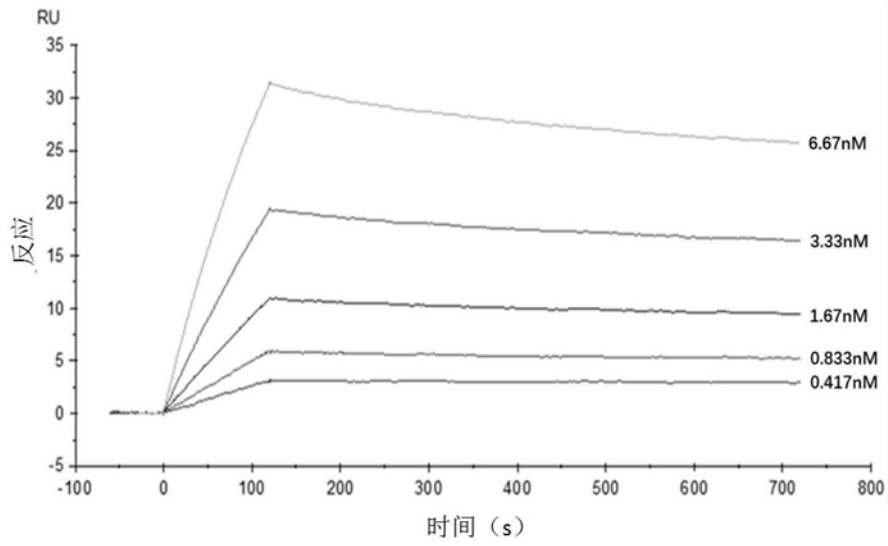


图13

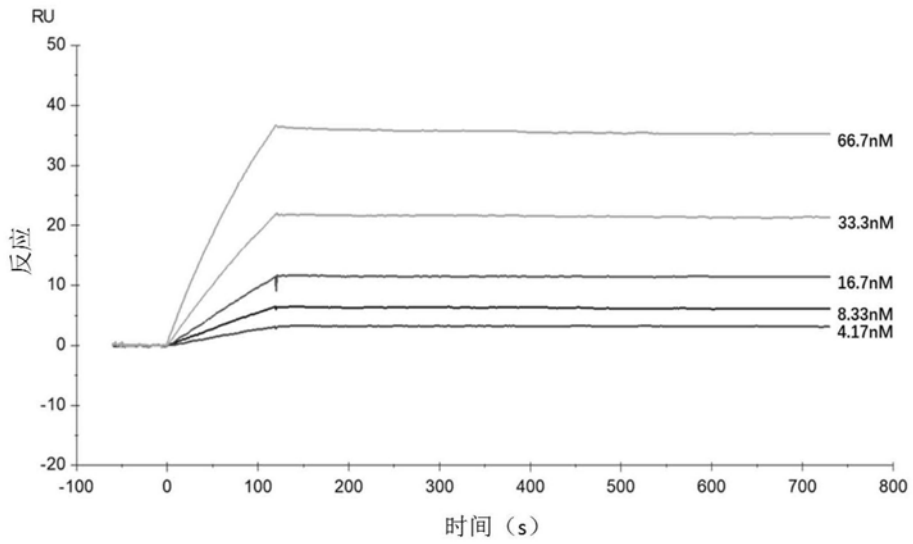


图14

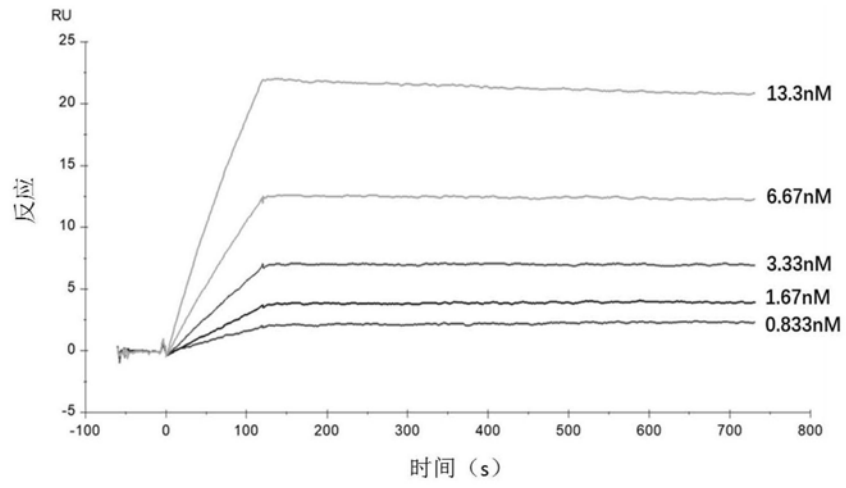


图15

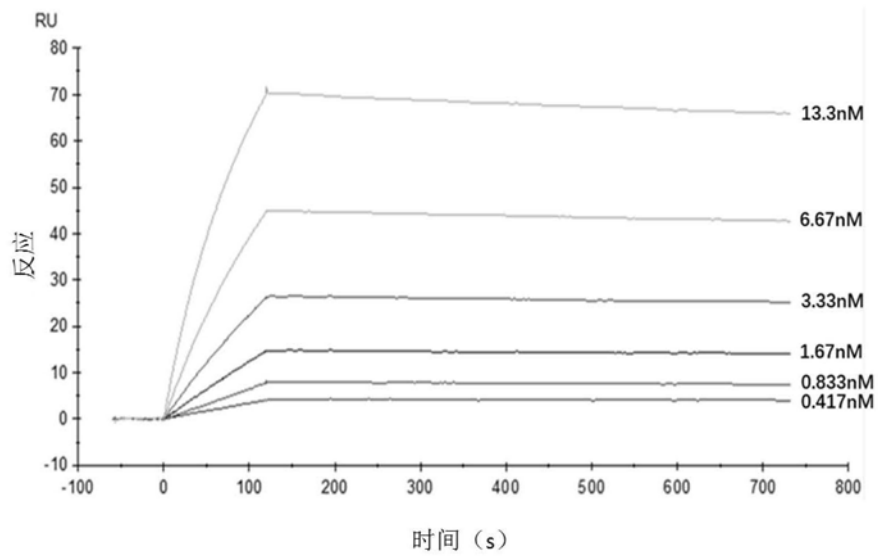


图16

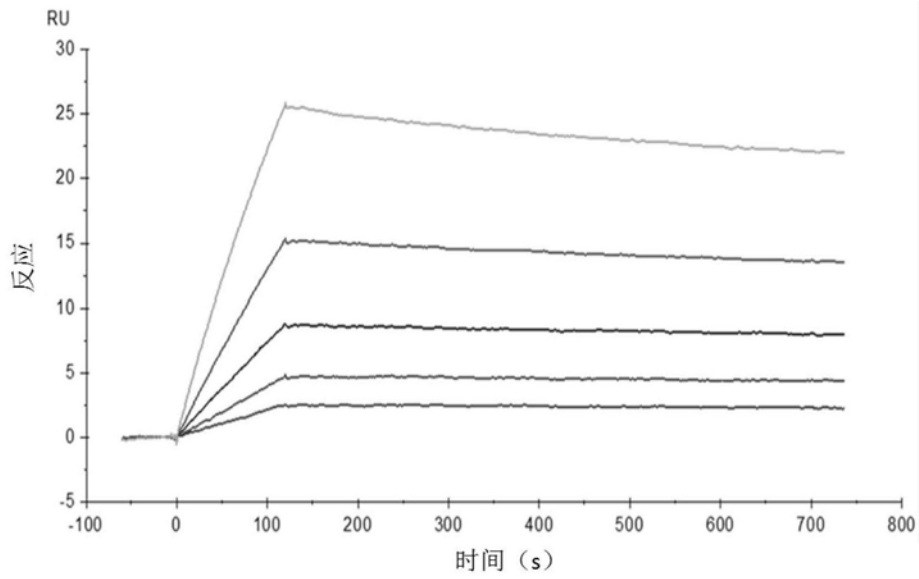


图17

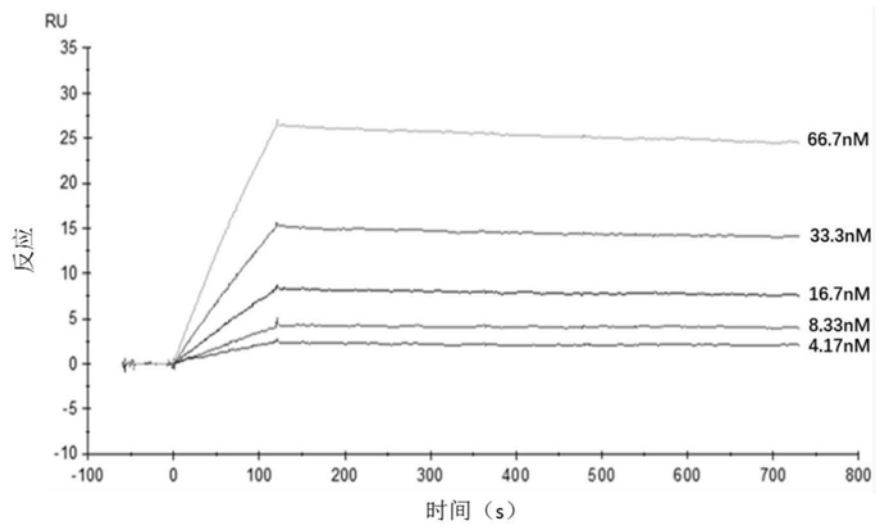


图18

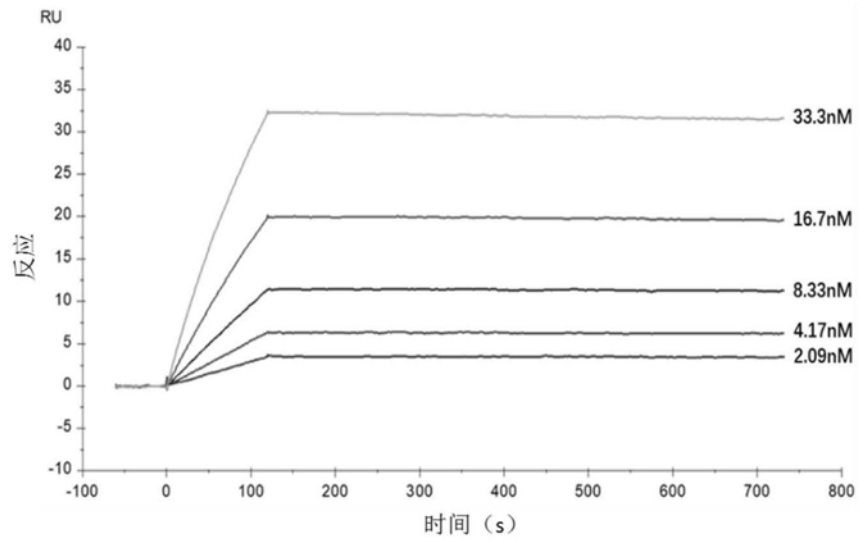


图19

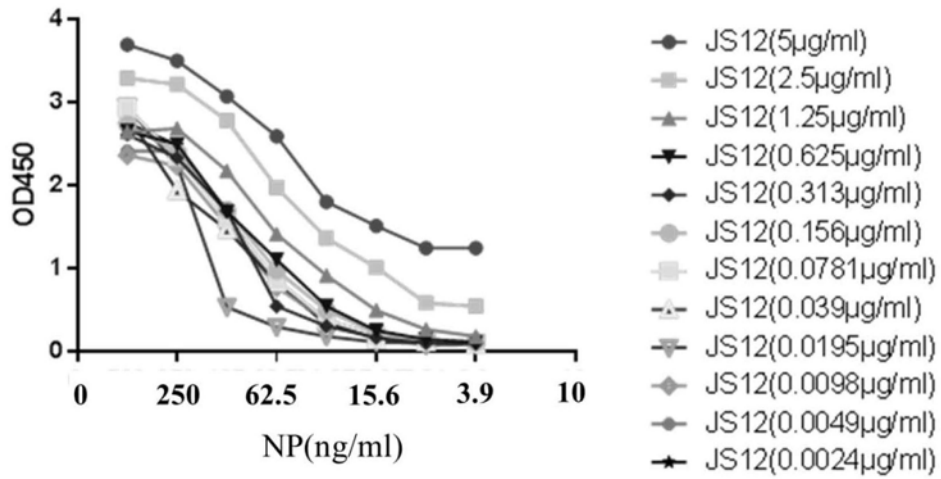


图20

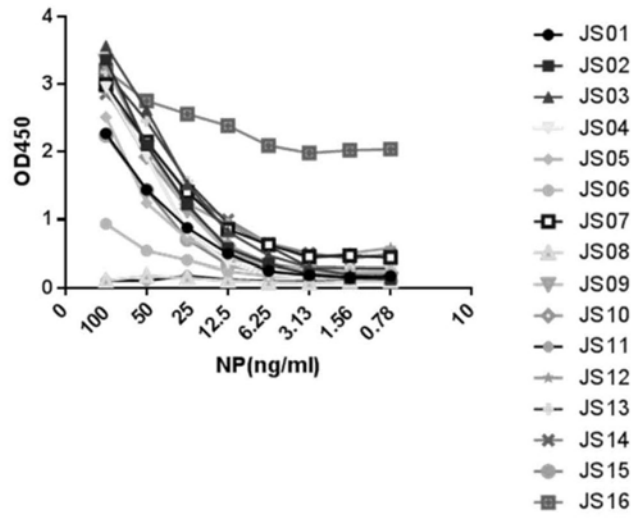


图21

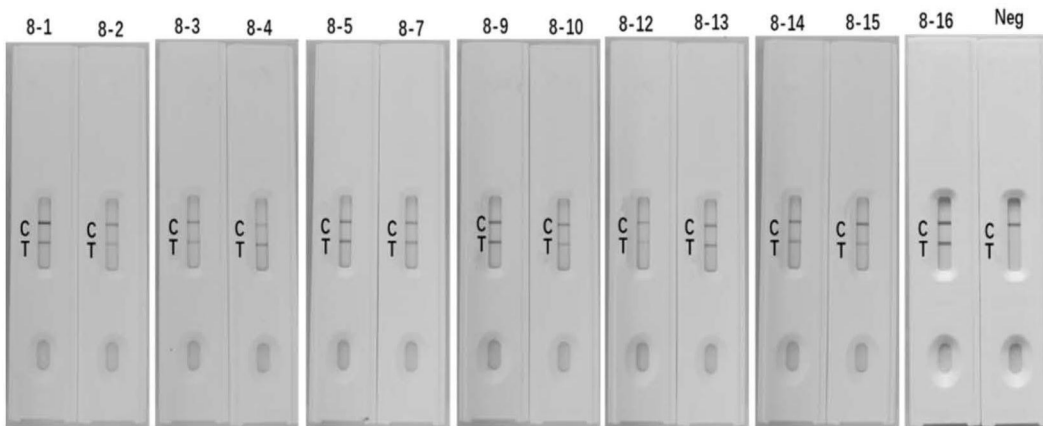


图22