



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111153991 A

(43)申请公布日 2020.05.15

(21)申请号 202010120349.4

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2020.02.26

G01N 33/569(2006.01)

(71)申请人 北京博奥森生物技术有限公司

A61K 39/42(2006.01)

地址 101102 北京市通州区马驹桥联东U谷
西区二号院67号

A61P 31/14(2006.01)

(72)发明人 赵风强 秦李娜 吴炬 王咚咚
董兵 张凤英 邬晓乐

(74)专利代理机构 北京众合诚成知识产权代理
有限公司 11246

代理人 邹仕娟

(51)Int.Cl.

C07K 16/10(2006.01)

C07K 14/165(2006.01)

C12N 15/50(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

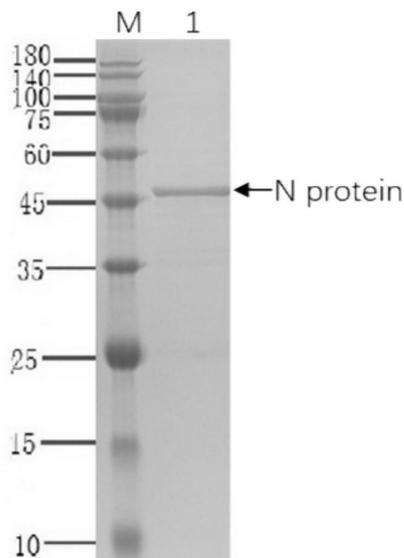
权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

一种人SARS-CoV-2单克隆抗体及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种人SARS-CoV-2单克隆抗体,其制备方法为:以SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白为免疫原,免疫BALB/c小鼠,进行小鼠脾细胞和鼠骨髓瘤细胞融合及亚克隆,再经商品化的产品SARS-CoV-2 Nucleocapsid及MERS Nucleocapsid进行大量反复筛选以及细胞株的驯化,最终成功获得可分泌高亲和力、高特异性抗SARS-CoV-2 N单克隆抗体杂交瘤细胞株,最后腹水制备及纯化,获得单克隆抗体;SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。本发明还公开了该单克隆抗体在制备SARS-CoV-2病毒检测产品中的应用,在制备抑制SARS-CoV-2病毒的药物中的应用。本发明的单克隆抗体可通过双抗体夹心法对人体咽拭子/肺部分泌物等样本中SARS-CoV-2进行检测,可应用于SARS-CoV-2检测试剂盒,适用于SARS-CoV-2病毒感染的诊断、防控,病毒的科学研究等。



1. 一种人SARS-CoV-2单克隆抗体,其特征在于:是以SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白为免疫原,免疫小鼠得到的单克隆抗体;所述SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的人SARS-CoV-2单克隆抗体,其特征在于:所述SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白是通过以下方法制备得到的:将核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示的人SARS-CoV Nucleocapsid基因插入表达载体pET28a,构建pET28a-SARS-CoV-N融合表达质粒,转化大肠杆菌,然后用IPTG诱导,纯化、复性得到SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白。

3. 权利要求1或2所述的人SARS-CoV-2单克隆抗体的制备方法,其特征在于:以SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白为免疫原,免疫BALB/c小鼠,再进行小鼠脾细胞和鼠骨髓瘤细胞融合及亚克隆,并经SARS-CoV-2Nucleocapsid及MERS Nucleocapsid特异性筛选及驯化,最终获得特异性好、效价高的单克隆细胞株,然后进行腹水制备及纯化,获得大量抗人SARS-CoV Nucleocapsid的单克隆抗体。

4. 根据权利要求3所述的人SARS-CoV-2单克隆抗体的制备方法,其特征在于:所述BALB/c小鼠选择8-12周龄的雌性小鼠;

或/和:筛选方法为ELISA法;

或/和:纯化方法为Protein A亲和纯化。

5. 权利要求1或2所述的人SARS-CoV-2单克隆抗体在制备SARS-CoV-2病毒检测产品中的应用。

6. 权利要求1或2所述的人SARS-CoV-2单克隆抗体在制备抑制SARS-CoV-2病毒的药物中的应用。

7. 权利要求1或2所述的人SARS-CoV-2单克隆抗体在制备预防或治疗由SARS-CoV-2病毒感染引起的疾病的药物制剂中的应用。

8. 一种非诊断目的的检测SARS-CoV-2病毒水平的方法,其特征在于:将待检测样品与权利要求1或2所述的人SARS-CoV-2单克隆抗体接触,检测样品与人SARS-CoV-2单克隆抗体的免疫反应。

9. 一种检测SARS-CoV-2病毒的试剂盒,包括权利要求1或2所述的人SARS-CoV-2V单克隆抗体。

10. 一种抑制SARS-CoV-2病毒的药物,包括权利要求1或2所述的人SARS-CoV-2单克隆抗体。

一种人SARS-CoV-2单克隆抗体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种人SARS-CoV-2单克隆抗体及其制备方法和应用,属于单克隆抗体制备技术领域。

背景技术

[0002] 2019年12月以来,中国湖北省武汉市发现多起不明原因肺炎病例,并在短时间内迅速蔓延。2020年1月9日,科学家在电子显微镜下,观察到引起此次肺炎的病原体呈现有包膜的、具有类似日冕外形的典型冠状病毒形态。同时病原基因组测序结果显示,其核酸序列与此前发现的6种冠状病毒(如SARS、MERS等)并非完全一致。因此2020年1月12日,世界卫生组织(WHO)将该新病毒命名为:2019新型冠状病毒(2019 Novel Coronavirus, 2019-nCoV),2月11日,国际病毒分类委员会(ICTV)将新型冠状病毒命名为SARS-CoV-2。该病毒潜伏期长,传染性强,截至2020年2月18日24时,已有确诊病例74185例(其中重症病例11977例),累计治愈出院病例14376例,累计死亡病例2004例,有疑似病例5248例。累计追踪到密切接触者574418人,尚在医学观察的密切接触者135881人(信息来自国家卫生健康委员会官方网站)。全球已有25个国家和地区有确诊病例(世界卫生组织2020年2月10日),已构成国际关注的突发公共卫生事件。目前尚无特效针对性药物治疗,因此针对健康人群的预防,疑似及确诊病例的诊断,隔离,治疗工作至关重要。

[0003] 冠状病毒属于套式病毒目(Nidovirales)、冠状病毒科(Coronaviridae)、冠状病毒属(Coronavirus),是目前人类已知的RNA病毒中基因组最大的病毒,其长度为27至32kb。冠状病毒有至少4个主要结构蛋白,包括刺突蛋白(S),膜蛋白(M),包膜蛋白(E)和核衣壳(N)蛋白,这些蛋白对于病毒与细胞受体结合至关重要,都是构成病毒完成结构所必需的。其中核衣壳蛋白(N)是一种碱性磷蛋白,其中央区与病毒基因组RNA结合,形成卷曲的核衣壳螺旋,是包裹病毒遗传物质的核心结构,在感染细胞中,是表达量最高的病毒蛋白之一。

[0004] 目前对于病毒感染的实验室诊断,一般包括3种方法:以PCR技术为基础的分子诊断;以免疫学为基础的血清学检测;以体外病毒培养为基础的病原生物学诊断。由于体外病毒培养对于试验条件以及操作人员技术要求都很高,一般不作为常规诊断方法。随着近几年基因测序技术的不断革新,此次新冠肺炎疫情发生初期,科学家们就完成了病毒的基因组测序,随后多家核酸检测试剂盒就相继问世,并很快投入使用。目前新冠病毒疑似病例的实验室检测多用核酸检测(PCR),但是核酸检测的样本多为上呼吸道样本(咽拭子、痰液为主),采集过程对医护人员暴露风险极大。且实验过程较长,约4~5h,容易发生污染(即造成假阳或假阴结果)。而且由于病毒变异频繁、引物设计等原因,核酸检测方法在实际应用过程中也暴露出假阴性高、不同厂家检测结果符合率低等诸多问题。而以病毒抗原检测的诊断方法能够大大降低此风险,因为其一般采用血清作为检测样本,样本采集便捷且含毒量低,同时省去样本在实验室的复杂处理程序,15~20min即可得到检测结果,操作简单,在保护医护人员的同时也能极大缓解当前巨大的临床诊疗压力。

[0005] SARS-CoV-2病毒抗原检测试剂盒开发的关键是找到其高特异性、高亲和力的抗

体。由于单克隆抗体相比多克隆抗体,具有高度特异性的优势,可以大大提高所构建试剂盒的检测特异性和抗干扰能力。另外由于病毒包膜上的蛋白很容易发生变异,而N蛋白却相对稳定,是病毒主要的抗原部分,其抗原性较其他蛋白强。且目前还未见商品化的以SARS-CoV-2 N蛋白单克隆抗体为核心原料的诊断试剂盒。

发明内容

[0006] 针对上述现有技术,本发明提供了一种人SARS-CoV-2单克隆抗体,及其制备方法和应用。本发明利用DNA重组技术,合成了SARS-CoV Nucleocapsid全长基因,构建至原核表达载体pET28a中,通过优化发酵、纯化及复性工艺,体外获得了大量SARS-CoV Nucleocapsid蛋白;通过免疫BALB/c雌性小鼠,通过杂交瘤技术成功制备抗人SARS-CoV Nucleocapsid单克隆抗体;再经商品化的产品SARS-CoV-2 Nucleocapsid及MERS Nucleocapsid进行大量反复筛选以及细胞株的驯化,最终成功获得高亲和力、高特异性抗SARS-CoV-2 N单克隆抗体;并以此为基础开发便捷、快速的SARS-CoV-2诊断方法及其诊断试剂,为临床诊断SARS-CoV-2感染提供一种快速、准确的方法,同时也为新病毒的科学研究提供有力支持。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0008] 一种人SARS-CoV-2单克隆抗体,是以SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白为免疫原,免疫小鼠得到的单克隆抗体;所述SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0009] 所述SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白是通过以下方法制备得到的:将人SARS-CoV Nucleocapsid基因(核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示)插入表达载体pET28a,构建pET28a-SARS-CoV-N融合表达质粒,转化大肠杆菌,然后用IPTG诱导,纯化、复性得到SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白。

[0010] SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白的氨基酸序列(SEQ ID NO.1):

[0011] MSDNGPQSNQRSAPRITFGGPTDSTDNNQNGGRNGARPKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEELRFPR
GQGVPIINTNSGPDDQIGYYRRATRRVRGGDGKMKELSPRWYFYLLGTGPEASLPYGANKEGIVWVATEGALNTPKDH
IGTRPNPNNNAATVLLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRGNSRNSTPGSSRGNSPARMASGGGETALALL
LLDRLNQLKESKVSQGGQGGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKQYVNTQAFGRRGPEQTQGNFGDQDLIRQGTDYK
HWPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYHGAIKLDDKDPQFKDNVILLNKHIDAYKTFPPTEPKDKKKKT
DEAQPLPQRQKKQPTVTLPAADMDDFSRQLQNSMSGASADSTQA

[0012] 人SARS-CoV Nucleocapsid基因的核苷酸序列(SEQ ID NO.2):

[0013] atgtctgataatggacccaatcaaccaacgtagtgcccccgattacatttgggtggaccacaga
ttcaactgacaataaccagaatggaggacgcaatggggcaaggccaaaacagcgccgacccaaggtttaccaat
aatactgctgtttggttcacagctctcactcagcatggcaaggaggaacttagattcctcagggccagggcgcttc
caatcaacaccaatagtggtccagatgaccaaattggctactaccgaagagctacccgacgagttcgtggtggtga
cggcaaaatgaaagagctcagccccagatgggtacttctattacctaggaactggcccagaagcttcaacttcctac
ggcgctaacaagaaggcatcgatgggttgaactgagggagccttgaatacacccaaagaccacattggcacc
gcaatcctaataacaatgctgccaccgtgctacaacttctcaaggaacaacattgccaaaaggcttctacgcaga
gggaagcagaggcggcagtcgaagcctcttctcgtcctcctacgtagtcgcgtaattcaagaaattcaactcct

ggcagcagtaggggaaattctcctgctcgaatggctagcggaggtggtgaaactgccctcgcgctattgctgctag
acagattgaaccagcttgagagcaaagtttctggtaaaggccaacaacaagaaggccaactgtcactaagaatc
tgctgctgaggcatctaaaaagcctcgccaaaaacgtactgccacaaaacagtacaacgtcactcaagcatttggg
agacgtggtccagaacaaaccaaggaaatttcggggaccaagacctaatcagacaaggaactgattacaacatt
ggccgcaattgcacaatttgcctcaagtgcctctgcattctttggaatgtcacgcattggcatggaagtacacc
ttcgggaacatggctgacttatcatggagccattaaattggatgacaaaagatccacaattcaaagacaacgtcata
ctgctgaacaagcacattgacgcatacaaaacattcccaccaacagagcctaaaaaggacaaaaagaaaagactg
atgaagctcagcctttgccgcagagacaaaagaagcagcccactgtgactcttcttctctgctgctgcatgga
tttctccagacaacttcaaaattccatgagtggagcttctgctgattcaactcaggcataa

[0014] 所述人SARS-CoV-2单克隆抗体的制备方法:以SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白为免疫原,免疫BALB/c小鼠,再进行小鼠脾细胞和鼠骨髓瘤细胞融合及亚克隆,并经SARS-CoV-2 Nucleocapsid及MERS Nucleocapsid特异性筛选及驯化,最终获得特异性好、效价高的单克隆细胞株,然后进行腹水制备及纯化,获得大量抗人SARS-CoV Nucleocapsid的单克隆抗体。

[0015] 优选的,所述BALB/c小鼠选择8-12周龄的雌性小鼠。

[0016] 优选的,筛选方法为ELISA法(酶联免疫吸附试验)。

[0017] 优选的,纯化方法为Protein A亲和纯化。

[0018] 所述人SARS-CoV-2单克隆抗体在制备SARS-CoV-2病毒检测产品中的应用。

[0019] 所述人SARS-CoV-2单克隆抗体在制备抑制SARS-CoV-2病毒的药物中的应用。

[0020] 所述人SARS-CoV-2单克隆抗体在制备预防或治疗由SARS-CoV-2病毒感染引起的疾病的药物制剂中的应用。

[0021] 一种非诊断目的的检测SARS-CoV-2病毒水平的方法:将待检测样品与上述人SARS-CoV-2单克隆抗体接触,检测样品与人SARS-CoV-2单克隆抗体的免疫反应。所述待检测样品选自痰液、口腔/鼻咽分泌物、肺部分泌物等。

[0022] 一种检测SARS-CoV-2病毒的试剂盒,包括上述人SARS-CoV-2单克隆抗体。

[0023] 一种抑制SARS-CoV-2病毒的药物,包括上述人SARS-CoV-2单克隆抗体。

[0024] 本发明提供了一种人SARS-CoV Nucleocapsid体外重组蛋白的表达与纯化方法,解决了天然人SARS-CoV Nucleocapsid蛋白不易获得,且体外表达产量、纯度及稳定性的问题。而且,利用人SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白免疫动物,可制备更加广谱抗SARS-CoV Nucleocapsid抗体,并通过SARS-CoV-2 Nucleocapsid及MERS Nucleocapsid特异性筛选及驯化,可制备亲和力高、特异性更好的鼠抗人SARS-CoV-2 N单克隆抗体。

[0025] 本发明的单克隆抗体可通过双抗体夹心法对人体咽拭子/肺部分泌物等样本中SARS-CoV-2进行检测,可应用于SARS-CoV-2检测试剂盒,适用于SARS-CoV-2病毒感染的诊断、防控,病毒的科学研究等。

[0026] 本发明筛选得到了可产生抗人SARS-CoV-2 N单克隆抗体的杂交瘤细胞株N6A8和杂交瘤细胞株N7A7,以及抗人SARS-CoV-2 N单克隆抗体N6A8和N7A7,该抗体对可通过双抗体夹心法对人体液中SARS-CoV-2 N浓度进行检测,具有重要的应用前景。本发明建立了人SARS-CoV-2 N蛋白检测ELISA方法,实现了检测的高灵敏度(pg级别)和特异性,可以快速、准确地测定咽拭子/肺部分泌物等样本中人SARS-CoV-2 N蛋白的含量,可为SARS-CoV-2感

染患者的早期诊断、早期治疗提供可靠的临床参考价值。

[0027] 本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义。

附图说明

[0028] 图1:重组质粒pET28a-SARS-CoV-N小样诱导表达SDS-PAGE鉴定结果,其中,M:预染蛋白Marker,泳道1-3分别为诱导后pET28a-SARS-CoV-N菌液超声后沉淀、诱导后pET28a-SARS-CoV-N菌液超声上清、诱导前pET28a-SARS-CoV-N菌液。

[0029] 图2:人SARS-CoV-N重组蛋白纯化及复性后SDS-PAGE鉴定结果,其中,M:预染蛋白Marker;泳道1:纯化及复性后人SARS-CoV-N重组蛋白。

[0030] 图3:抗人SARS-CoV-2 N蛋白单克隆抗体(N7A7)WB鉴定结果。

[0031] 图4:抗人SARS-CoV-2 N蛋白单克隆抗体(N6A8)WB鉴定结果,其中,1、重组人SARS-CoV-2 N蛋白(E.coli);2、重组人SARS-CoV N蛋白(E.coli);3、重组人MERS-CoV N蛋白(Baculovirus-Insect Cells)。

[0032] 图5:抗人SARS-CoV-2 N蛋白单克隆抗体与重组原核表达SARS-CoV-2-N、SARS-CoV-N及MERS-CoV-N蛋白抗原ELISA检测结果。

具体实施方式

[0033] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。然而,本发明的范围并不限于下述实施例。本领域的专业人员能够理解,在不背离本发明的精神和范围的前提下,可以对本发明进行各种变化和修饰。

[0034] 下述实施例中所涉及的仪器、试剂、材料等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规仪器、试剂、材料等,可通过正规商业途径获得。下述实施例中所涉及的实验方法,检测方法等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规实验方法,检测方法等。

[0035] 实施例1人SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白的制备

[0036] (1)人SARS-CoV Nucleocapsid原核表达载体的构建

[0037] 人工合成人SARS-CoV Nucleocapsid基因序列SEQ ID NO.2,将其插入至经NdeI和XhoI双酶切的原核表达质粒pET2a中,并转化至感受态大肠杆菌BL21(DE3)。0.1g/L卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆,并用终浓度为1mM IPTG进行诱导,诱导温度分别为16℃、25℃、30℃、37℃诱导,优选的是25℃诱导,200rpm振荡培养14h诱导人SARS-CoV Nucleocapsid重组蛋白表达。最后经SDS-PAGE鉴定,结果如图1所示。

[0038] (2) pET28a-SARS-CoV-N融合蛋白的表达

[0039] 将鉴定正确的pET28a-SARS-CoV-N菌种转接至含100ug/ml卡那霉素LB培养基过夜培养,次日以1:100转接到新鲜的含有100ug/ml卡那霉素的LB培养基中,于37℃、200rpm震荡培养至OD₆₀₀=0.4-0.6时,加入IPTG(终浓度为1mmol/L),温度调至25℃诱导表达14h。4℃,10000r/min离心10min收集沉淀。

[0040] (3) pET28a-SARS-CoV-N融合蛋白的纯化

[0041] A、将上述的菌体沉淀用菌体裂解Buffer A(20mM Tris-HCl(pH8.0),1mM EDTA,0.1%Triton X-100)重悬,600W功率超声破碎,10000rpm离心30min,收集上清。

[0042] B、菌体裂解上清通过Ni柱亲和层析纯化:本发明采用AKTA Pure25纯化仪对蛋白

样品进行纯化。

[0043] 装柱:取5ml Ni Sepharose excel (GE) 亲和填料转入XK 16/20Colum (GE) 色谱柱, 用5倍柱体积的结合缓冲液I (20mM Tris-HCl (pH8.0)) 平衡镍柱。

[0044] 上样:将蛋白样品经0.45 μ m滤膜过滤后准备上样,流速2ml/min;最后用5-10倍柱体积缓冲液III进行平衡。

[0045] 洗脱:分别用洗脱液I (20mM Tris-HCl (pH8.0), 20mM咪唑)、洗脱液II (20mM Tris-HCl (pH8.0), 100mM咪唑)、洗脱液III (20mM Tris-HCl (pH8.0), 250mM咪唑) 和IV (20mM Tris-HCl (pH8.0), 500mM咪唑) 进行洗脱, 分别收集不同洗脱峰。

[0046] 平衡及保存:分别用5倍柱体积的结合缓冲液I、纯化水、20%乙醇进行平衡镍柱, 并于4 $^{\circ}$ C保存。

[0047] (4) 蛋白透析复性:采用上述收集的目的峰透析至合适的缓冲液, 进行保存, 复性缓冲液为:10mM PBS (pH7.4), 最终得到可溶性的人SARS-CoV-2 N重组蛋白。

[0048] (5) SDS-PAGE鉴定

[0049] 采用SDS-PAGE对人SARS-CoV-N重组蛋白纯化及复性后的样品进行鉴定, 结果见图2。

[0050] 实施例2抗人SARS-CoV-2 N单克隆抗体的制备

[0051] (1) 动物免疫

[0052] 以纯化的人SARS-CoV-N重组蛋白为免疫原, 常规方法免疫8-12周龄BALB/c雌性小鼠, 初次用弗氏完全佐剂与抗原进行乳化, 经皮下和腹腔多点免疫, 剂量为100 μ g/只; 隔两周加强免疫一次, 共三次, 佐剂为弗氏不完全佐剂, 剂量100 μ g/只/次; 采用间接ELISA法检测小鼠尾血效价 $>1:10^4$, 融合前三天进行腹腔注射加强免疫100 μ g人SARS-CoV-2 N抗原。

[0053] (2) 细胞融合

[0054] 取免疫脾细胞与骨髓瘤细胞 (SP2/0) 按照5:1的比例混合, 1000rpm, 离心10min, 弃上清; 用RPMI-1640培养基重悬细胞, 1000rpm, 离心10min, 弃上清, 用滴管吸出残留液体, 轻击管底, 使沉淀细胞松散均匀, 至于37 $^{\circ}$ C水浴中预热, 在60s内加入预热的PEG1500 (Roche) 1ml, 然后缓慢滴加RPMI-1640培养基至20ml, 1000rpm, 离心10min, 弃上清。用含HAT培养基重悬细胞, 并分装至96孔细胞培养板, 并置于37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂培养箱内培养。

[0055] (3) 细胞筛选及单克隆化

[0056] 采用间接ELISA法筛选与人SARS-CoV-N重组蛋白特异性结合的阳性培养孔, 其具体过程为:

[0057] ①抗原酶标板的制备

[0058] 用50mM pH9.6碳酸盐缓冲液将人SARS-CoV-2 N重组蛋白稀释至2 μ g/ml, 分别加入至96孔酶标板, 100 μ l/孔, 4 $^{\circ}$ C包被过夜; 用PBST (10mM PBS (pH7.4), 0.05% Tween-80) 洗涤3-5次, 甩干后, 用封闭液 (10mM PBS (pH7.4), 5% BSA) 37 $^{\circ}$ C封闭2h后备用。

[0059] ②细胞上清ELISA检测

[0060] 分别取待筛选的96孔细胞上清100 μ l, 加入至96孔已制备的抗原酶标板, 37 $^{\circ}$ C, 孵育1h, 用PBST洗版3-5次。进一步, 在每孔中加入1:5000稀释的羊抗鼠-HRP 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C孵育45min, 用PBST洗板3-5次。最后加入底物H₂O₂-TMB ((3,3',5,5'-四甲基联苯胺)), 100 μ l/孔, 避光显色10min, 加入2M硫酸50 μ l/孔终止反应, 于酶标仪中测定450nm的吸光值。

[0061] ③细胞单克隆化

[0062] 选择ELISA检测阳性的细胞孔,采用有限稀释法分别进行细胞单克隆化,确保每个培养孔内至多含有一个杂交瘤细胞。待细胞长至培养孔1/3-1/2时再次经间接ELISA法筛选,最终确保单一细胞株可稳定分泌抗人SARS-CoV N重组蛋白的抗体。

[0063] (3) 杂交瘤细胞再筛选及单克隆化

[0064] 方法同上述(3)细胞筛选及单克隆化所述操作方法,分别将重组人SARS-CoV-2 Nucleocapsid (bs-41408P,购自北京博奥森生物技术有限公司)和重组人MERS-CoV Nucleocapsid (40068-V08B,购自北京义翘神州)包被于酶标板,采用间接法ELISA法检测上述杂交瘤细胞上清,选择与MERS-CoV Nucleocapsid无交叉,与SARS-CoV-2 Nucleocapsid反应较强的杂交瘤细胞株,并经过多轮筛选,最终获得与人SARS-CoV-2 Nucleocapsid特异性反应,亲和力高的分泌抗SARS-CoV-2 Nucleocapsid单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0065] (4) 细胞冻存

[0066] 细胞冻存液:90%胎牛血清+10%DMSO,将杂交瘤细胞离心,重悬于预冷的细胞冻存液中,细胞密度为 10^7 cells/ml,1ml/支,分装至冻存管中,将冻存管放入程序降温盒中置于-80℃冰箱,次日放入液氮长期保存。

[0067] (5) 单克隆抗体制备

[0068] 本发明中,通过制备小鼠腹水法获得抗人SARS-CoV-2 N重组蛋白的单克隆抗体,具体步骤如下:

[0069] 首先将8-12周龄BALB/c雄性致敏(腹腔注射液体石蜡,0.5ml/只),2周后腹腔接种上述获得的杂交瘤细胞(需经无血清培养洗涤至少一次),接种量 10^6 cells/只,待小鼠腹部可见明显膨胀,反复抽取腹腔腹水,4000rpm,离心30min,收集上清,分装,于-20℃备用。

[0070] 实施例3抗人SARS-CoV-2 N重组蛋白的单克隆抗体纯化

[0071] (1) 单克隆抗体的纯化

[0072] 将实施例2中得到的单抗腹水通过Protein A亲和层析法进行纯化,具体步骤如下:

[0073] 基本步骤为:平衡-上样-平衡-洗脱-平衡-保存。

[0074] 平衡液:20mM PB (pH7.2) 缓冲液;

[0075] 洗脱液:0.1M pH 3.0甘氨酸-HCl缓冲液;

[0076] 中和缓冲液:1M,pH9.0,Tris-HCl缓冲液;

[0077] 保存液:20%无水乙醇。

[0078] 取3-5ml腹水,用50%饱和硫酸铵进行沉淀2h以上,10000rpm,离心20min,弃上清;沉淀用平衡液进行溶解,并用0.45 μ m滤膜过滤后,准备上样;Protein A亲和柱预先经5倍柱体积的平衡液平衡,然后以2ml/min的流速将硫酸铵沉淀的蛋白进行上样,最后再用5倍柱体积平衡液进行平衡;更换为洗脱液进行洗脱,并收集目的蛋白,然后按照抗体:中和缓冲液=20:1的体积比进行中和,得到纯化的抗人SARS-CoV-2 N重组蛋白的单克隆抗体。

[0079] 实施例4:抗体配对检测

[0080] (1) 抗体辣根过氧化物酶 (HRP) 标记

[0081] HRP标记采用高碘酸钠氧化法。标记抗体采用间接ELISA法进行效价检测,于-20℃保存备用。

[0082] (2) 抗体对筛选

[0083] 采用棋盘滴定法进行抗体配对,分别取浓度为0.3ng/ml、0.6ng/ml、1.25ng/ml、2.5ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml的人SARS-CoV-2 N重组蛋白筛选最佳配对抗体。以经验浓度200ng/孔包被24种酶标抗体,4℃过夜,PBST洗涤3-5遍,加入封闭液300μl/孔,37℃封闭2h,PBST洗涤3-5遍;加入定值人SARS-CoV-2 N重组蛋白,37℃孵育1h后PBST洗3-5遍;再分别加入1:500倍稀释的13种HRP标记抗体,37℃孵育45min,PBST洗3-5遍;加入底物TMB,37℃避光显色10min后,加入终止液2M硫酸50μl,于酶标仪中测定450nm的吸光值。结果见表1所示,确定最佳配对结果。

[0084] 表1棋盘法滴定法筛选的最优配对抗体检测结果

包被抗体	检测抗体	标准品重组 SARS-CoV-2-N 蛋白浓度 (ng/ml)								
		20	10	5	2.5	1.25	0.625	0.3125	0	
[0085]	N7A7	N6A8	2.992	2.344	1.651	0.968	0.596	0.411	0.229	0.109
	N6A8	N7A7	3.009	2.135	1.394	0.828	0.506	0.34	0.224	0.093
	N5B5	N7A7	2.633	1.823	1.094	0.636	0.446	0.295	0.212	0.133

[0086] 实施例5抗N蛋白抗体与病毒抗原特异性反应性的检测

[0087] 为了筛选对SARS病毒相关有特异性反应的抗体。为此,选择重组表达的SARS-CoV的N蛋白、重组表达的SARS-CoV-2和MERS的N蛋白进行SDS-PAGE电泳,然后进行转膜,封闭,分别与抗SARS-CoV-2的N蛋白单克隆抗体进行Western Blot,最终确定抗SARS-CoV-2的N蛋白单克隆抗体的特异性;同时用同等浓度重组表达的SARS-CoV N蛋白和重组表达的SARS-CoV-2 N蛋白分别进行包被,用实施例4中所述N6A8和N7A7两株单克隆抗体与其反应,结果表明重组表达的SARS-CoVN蛋白与重组表达的SARS-CoV-2 N蛋白结构与活性相当,且不与MERS-CoV N蛋白存在交叉,详见图3-5。

[0088] 给本领域技术人员提供上述实施例,以完全公开和描述如何实施和使用所主张的实施方案,而不是用于限制本文公开的范围。对于本领域技术人员而言显而易见的修饰将在所附权利要求的范围内。

序列表

<110> 北京博奥森生物技术有限公司

<120> 一种人SARS-CoV-2单克隆抗体及其制备方法和应用

<141> 2020-02-26

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 422

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 1

```

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Ser Asn Gln Arg Ser Ala Pro Arg Ile
1           5           10           15
Thr Phe Gly Gly Pro Thr Asp Ser Thr Asp Asn Asn Gln Asn Gly Gly
           20           25           30
Arg Asn Gly Ala Arg Pro Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn
           35           40           45
Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Glu
           50           55           60
Leu Arg Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Gly
65           70           75           80
Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Val Arg
           85           90           95
Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Glu Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr
           100          105          110
Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Ser Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys
           115          120          125
Glu Gly Ile Val Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys
           130          135          140
Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asn Ala Ala Thr Val Leu
145          150          155          160
Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly
           165          170          175
Ser Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg
           180          185          190
Gly Asn Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Asn Ser Pro
           195          200          205
Ala Arg Met Ala Ser Gly Gly Gly Glu Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu

```

210	215	220
Leu Asp Arg Leu Asn Gln	Leu Glu Ser Lys Val	Ser Gly Lys Gly Gln
225	230	235
Gln Gln Gln Gly Gln Thr	Val Thr Lys Lys Ser	Ala Ala Glu Ala Ser
245	250	255
Lys Lys Pro Arg Gln Lys	Arg Thr Ala Thr Lys	Gln Tyr Asn Val Thr
260	265	270
Gln Ala Phe Gly Arg Arg	Gly Pro Glu Gln Thr	Gln Gly Asn Phe Gly
275	280	285
Asp Gln Asp Leu Ile Arg	Gln Gly Thr Asp Tyr	Lys His Trp Pro Gln
290	295	300
Ile Ala Gln Phe Ala Pro	Ser Ala Ser Ala Phe	Phe Gly Met Ser Arg
305	310	315
Ile Gly Met Glu Val Thr	Pro Ser Gly Thr Trp	Leu Thr Tyr His Gly
325	330	335
Ala Ile Lys Leu Asp Asp	Lys Asp Pro Gln Phe	Lys Asp Asn Val Ile
340	345	350
Leu Leu Asn Lys His Ile	Asp Ala Tyr Lys Thr	Phe Pro Pro Thr Glu
355	360	365
Pro Lys Lys Asp Lys Lys	Lys Lys Thr Asp Glu	Ala Gln Pro Leu Pro
370	375	380
Gln Arg Gln Lys Lys Gln	Pro Thr Val Thr Leu	Leu Pro Ala Ala Asp
385	390	395
Met Asp Asp Phe Ser Arg	Gln Leu Gln Asn Ser	Met Ser Gly Ala Ser
405	410	415
Ala Asp Ser Thr Gln Ala		
420		

<210> 2

<211> 1269

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

atgtctgata atggacccca atcaaaccaa cgtagtgcc cccgcattac atttggtgga 60
cccacagatt caactgacaa taaccagaat ggaggacgca atggggcaag gccaaaacag 120
cgccgacccc aaggtttacc caataatact gcgtcttggg tcacagctct cactcagcat 180
ggcaaggagg aacttagatt cctcagagc cagggcgctc caatcaacac caatagtggg 240
ccagatgacc aaattggeta ctaccgaaga gctaccgac gagttcgtgg tggtagcggc 300
aaaatgaaag agctcagccc cagatggtac ttctattacc taggaactgg cccagaagct 360
tcacttcctt acggcgctaa caaagaaggc atcgtatggg ttgcaactga gggagccttg 420

```

aatacaccca aagaccacat tggcacccgc aatcctaata acaatgctgc caccgtgcta 480
caacttcctc aaggaacaac attgccaaaa ggcttctacg cagaggggaag cagaggcggc 540
agtcaagcct cttctcgctc ctcatcacgt agtcgcggtta attcaagaaa ttcaactcct 600
ggcagcagta ggggaaattc tctgctcga atggctagcg gaggtggtga aactgccctc 660
gcgctattgc tgctagacag attgaaccag cttgagagca aagtttctgg taaaggccaa 720
caacaacaag gccaaactgt cactaagaaa tctgctgctg aggcattctaa aaagcctcgc 780
caaaaacgta ctgccacaaa acagtacaac gtcactcaag catttgggag acgtgggtcca 840
gaacaaacc c aaggaaattt cggggacca gacctaata gacaaggaac tgattacaaa 900
cattggccgc aaattgcaca atttgetcca agtgctctg cattctttgg aatgtcacgc 960
attggcatgg aagtcacacc ttcgggaaca tggctgactt atcatggagc cattaattg 1020
gatgacaaag atccacaatt caaagacaac gtcatactgc tgaacaagca cattgacgca 1080
tacaaaacat tcccaccaac agagcctaaa aaggacaaaa agaaaaagac tgatgaagct 1140
cagcctttgc cgcagagaca aaagaagcag cccactgtga ctcttcttc tgcggctgac 1200
atggatgatt tctccagaca acttcaaaat tccatgagtg gagcttctgc tgattcaact 1260
caggcataa 1269

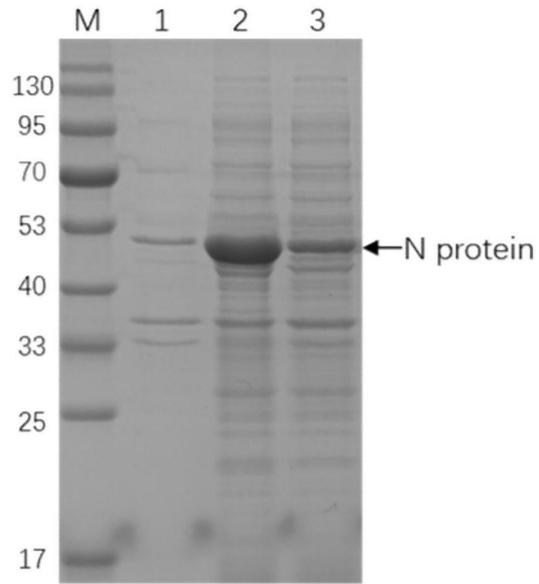


图1

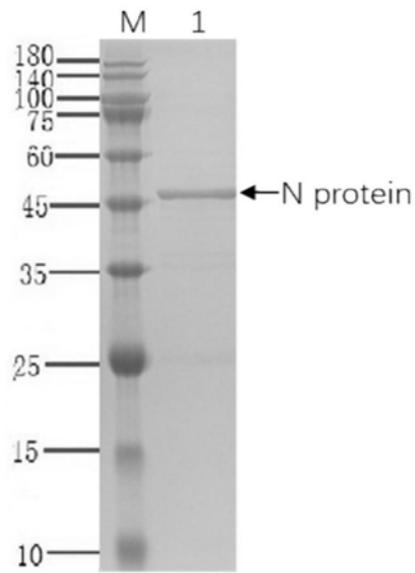


图2

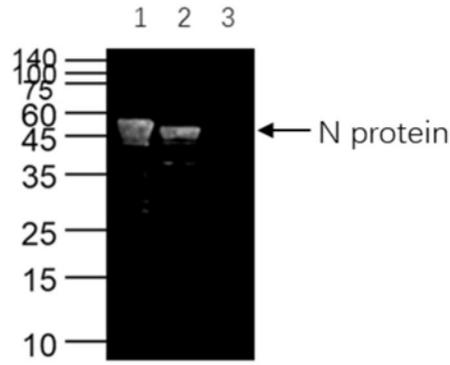


图3

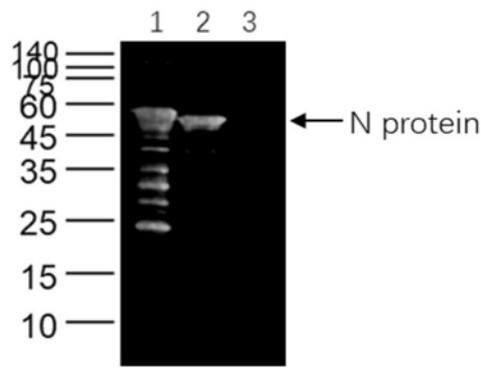


图4

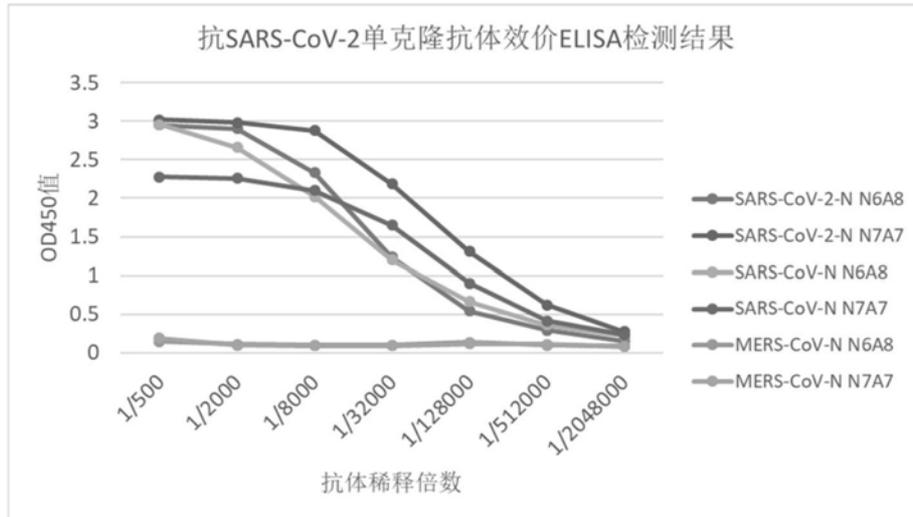


图5