



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113087792 A

(43) 申请公布日 2021.07.09

(21) 申请号 202110634593.7

G01N 33/569 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.08

G01N 33/543 (2006.01)

(71) 申请人 西宝生物科技(上海)股份有限公司

地址 201204 上海市浦东新区中国(上海)

自由贸易试验区毕升路299弄11号502

室

(72) 发明人 张广华 刘云 陆阳 区文彩

阮月敏

(74) 专利代理机构 上海三方专利事务所(普通

合伙) 31127

代理人 吴玮

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

G12N 7/01 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

序列表4页

(54) 发明名称

一种犬瘟热病毒纳米抗体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体来说涉及一种犬瘟热病毒纳米抗体及其应用,所述犬瘟热病毒纳米抗体所述纳米抗体能与犬瘟热病毒N蛋白结合;且骨架区含有如SEQ ID NO.1所示的共同特征氨基酸序列。本发明提供一种可用于检测犬瘟热病毒的纳米抗体,所述的抗体与犬瘟热病毒具有良好的亲和性,可以极其快速地检测出血液中犬瘟热病毒或其N蛋白,同时能够使得犬瘟热病毒检测用的配对抗体的制备变得容易,所制备的试剂盒成本更低,且更易于储藏和运输;本发明的试剂盒可以灵敏检测犬瘟热病毒抗原,重复性好,结果稳定,方便快捷,纳米抗体生产成本低且易于获得。

1. 一种犬瘟热病毒纳米抗体,其特征在于,所述纳米抗体具有如SEQ ID NO 2~7任一所示的氨基酸序列,其中所述纳米抗体能与犬瘟热病毒N蛋白结合;且骨架区含有如SEQ ID NO.1所示的共同特征氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的纳米抗体,其特征在于,在抗体超变区含有共同特征氨基酸序列:I**SG,其中*表示一个随机氨基酸。

3. 一种多核苷酸,其特征在于,其编码具有权利要求1-2任一所述的纳米抗体。

4. 一种纳米抗体噬菌体,其特征在于,包括噬菌体,所述噬菌体表面展示有权利要求1-2任一所述的纳米抗体。

5. 一种特异性检测犬瘟热病毒的试剂盒,其特征在于,包括权利要求1-2任一所述的纳米抗体;或权利要求4所述的纳米抗体噬菌体。

6. 如权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还包括用于固定所述纳米抗体的固相载体。

7. 如权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还包括能与所述的纳米抗体或纳米抗体噬菌体连接的可检测标记物,所述的可检测标记物被连接于所述的纳米抗体或分离地存在于试剂盒中、犬瘟热病毒标准品、与可检测标记物相对应的底物和酶联免疫反应试剂。

8. 如权利要求1~2任一所述的一种犬瘟热病毒纳米抗体的用途,其特征在于,用于制备特异性检测犬瘟热病毒的试剂盒。

一种犬瘟热病毒纳米抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体来说涉及一种犬瘟热病毒纳米抗体及其应用。

背景技术

[0002] 自比利时布鲁塞尔自由大学的免疫学家Hamers Casterman从骆驼血液中分离出的天然缺失轻链,仅含两条重链,相比传统抗体在结构上简单许多的天然抗体后,基于一个重链可变区组成的单域抗体(VHH),因其晶体结构直径为2.5nm、长4nm,纳米抗体概念得以提出。纳米抗体一经发现,它所具有的一些独特特征便引起研究者的注意。作为一种小分子抗体,纳米抗体有很多的优点。包括:1、分子小,结构稳定,耐热性好。研究证实,将纳米抗体在37℃放置一周或在高温条件(90℃)下保存,都能保持比较好的生物活性。另外,纳米抗体在强变性剂的条件下表现出不易变性或者变性后易复性的特点,研究表明纳米抗体比常规抗体更容易储藏和运输,作为诊断试剂更具有优势。2、亲和力较高。虽然纳米抗体缺少VL,但是VHH自身的一些性质使得纳米抗体仍然保持了较高的亲和力。研究发现从免疫的单域VHH抗体库中分离出来的VHH单体具有nmol/L级的亲和力,并且特异性好;3、对人体的免疫原性弱。目前已有的抗体大都是鼠源的,作用于人体会产生人抗鼠抗体的免疫反应。Reverts等将其制备的纳米抗体反复注射小鼠后未见有针对这种单域VHH抗体的抗体产生。所以纳米抗体的免疫原性较弱,与人的生物相容性较好,可能是由于骆驼VHH基因与人VH3家族序列高度同源的原因;4、易表达、易纯化。由于纳米抗体单独能够形成完整的独立结合抗原的结构域,很容易实现可溶性表达,从而使得纳米抗体的生产比一般抗体的生产更加容易,作为诊断试剂的制备也更快、更便宜。

[0003] 另一方面,犬瘟热(Canine distemper,CD)是由CD病毒(CDV)引起食肉目中多种动物的一种急性、高度接触性传染病,发病死亡率高达90%以上。虽然近20年在易感动物中广泛接种CDV疫苗,但随着CDV不断变异,大量有关CDV弱毒疫苗免疫犬爆发CD疫情或发病的报道,目前仍是危害犬、毛皮经济动物及野生动物的重大疫病之一。CDV属于副粘病毒科麻疹病毒属,为有囊膜的不分节段的负链RNA病毒,只有一个血清型。病毒颗粒主要由核衣壳蛋白(N)、血凝蛋白(H)、融合蛋白(F)、基质膜蛋白(M)、大蛋白(L)和磷蛋白(P)组成。该病毒具有广泛的组织细胞嗜性,可感染多种细胞组织,其中亲嗜最强的是淋巴细胞和上皮细胞,严重破坏机体的细胞免疫和体液免疫,导致免疫抑制,引起其它病毒或细菌病的混合感染。因此,对CD的快速诊断,对该病的防制十分重要。

[0004] 迄今,已报道检测CDV的方法有病毒分离、中和试验、免疫荧光抗体技术、免疫组化、RT-PCR方法等,但这些方法存在着繁琐或重复性差等不足,难以在基层推广应用。本技术方案建立了纳米抗体(Nanobody)夹心ELISA检测方法,为CDV的快速检测提供技术支撑。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种犬瘟热病毒纳米抗体及其检测试剂盒。

[0006] 在本发明的第一方面,提供一种犬瘟热病毒纳米抗体,所述的纳米抗体具有SEQ

ID NO.2-7任一所示的氨基酸序列,其中所述纳米抗体能高亲和力特异性与犬瘟热病毒结合;且骨架区含有如SEQ ID NO.1所示的共同特征氨基酸序列。

[0007] 在一个优选例中,所述的纳米抗体中,在抗体超变区含有共同特征氨基酸序列:I**SG,其中“*”代表一个随机氨基酸。

[0008] 在本发明的另一方面,提供一种多核苷酸,其编码前面任一所述的纳米抗体。

[0009] 在本发明的另一方面,提供一种表达载体,该表达载体中含有所述的多核苷酸。

[0010] 在本发明的另一方面,提供一种宿主细胞,该宿主细胞中含有所述的表达载体或其基因组中整合有所述的多核苷酸。

[0011] 在本发明的另一方面,提供一种产生纳米抗体的方法,包括:培养所述的宿主细胞,使之表达所述的纳米抗体。

[0012] 在本发明的另一方面,提供一种纳米抗体噬菌体,其包括:噬菌体,以及展示于噬菌体表面的上述任一纳米抗体。

[0013] 在另一优选例中,所述的噬菌体是商业化噬菌体,即是常规用于进行蛋白展示的噬菌体。

[0014] 在本发明的另一方面,提供一种特异性检测犬瘟热病毒的试剂盒,包括:任一上述的纳米抗体;或所述的纳米抗体噬菌体。

[0015] 在一个优选例中,所述的试剂盒中包括:具有SEQ ID NO.2~7所示的氨基酸序列的纳米抗体,和/或表面展示有具有SEQ ID NO.2~7所示的氨基酸序列的纳米抗体的纳米抗体噬菌体;

在另一优选例中,所述试剂盒中还包括固相载体,所述的纳米抗体被固定于固相载体(如:多孔板、盖玻片、微珠、膜条等);或所述的纳米抗体噬菌体被固定于固相载体。

[0016] 在另一优选例中,所述试剂盒中还包括:

能与所述的纳米抗体或纳米抗体噬菌体连接的可检测标记物(如HRP、化学发光基团、荧光基团、胶体金颗粒、镧系元素等),所述的可检测标记物被连接于所述的纳米抗体或纳米抗体噬菌体或分离地存在于试剂盒;和/或

犬瘟热病毒标准品;和/或

与可检测标记物相对应的底物;和/或

酶联免疫反应试剂(包括但不限于:包被(缓冲)液,洗涤(缓冲)液,封闭液,固定液,终止液,显色液)。

[0017] 在本发明的另一方面,还提供所述的纳米抗体或所述纳米抗体噬菌体的用途,用于制备特异性检测犬瘟热病毒的检测试剂盒。

[0018] 在本发明的另一方面,提供一种检测(较佳地,为非诊断性地)待测样品中犬瘟热病毒存在情况的方法,通过双抗夹心酶联免疫反应法来检测待测样品中犬瘟热病毒的存在情况。

[0019] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

[0020] 发明的有益效果

本发明提供一种可用于检测犬瘟热病毒的纳米抗体,所述的抗体与犬瘟热病毒具有良好的亲和性,可以极其快速地检测出血液中犬瘟热病毒或其N蛋白;本发明制备的试剂

盒可以灵敏检测犬瘟热病毒抗原,重复性好,结果稳定,方便快捷,纳米抗体生产成本低且易于获得。

具体实施方式

[0021] 本发明经过长期的研究和试验,找到了针对犬瘟热病毒N蛋白不同表位的纳米抗体(即可用于配对检测犬瘟热病毒),所述的抗体与犬瘟热病毒具有良好的亲和性。利用所述的纳米抗体,可制备出方便、快速且准确地检测犬瘟热病毒的试剂盒。

[0022] 术语

如本文所用,所述的“纳米抗体”是指缺失轻链的重链抗体(如:来源于骆驼体内),克隆其可变区得到的单域抗体,是最小的功能性抗原结合片段,相对分子质量(Mr)为12000-15000。纳米抗体具有Mr小、稳定性强、可溶性好、易表达,免疫原性低等特点。

[0023] 如本文所用,所述的“双抗夹心法”是酶联免疫反应(ELISA)的一种,将包被抗体固定于载体,然后包被抗体与抗原反应,洗涤后再与带标记的检测抗体反应,洗涤,最后进行化学发光或酶联显色反应检测信号。双抗夹心法特别适用于具有两个或两个以上表位的抗原的检测。

[0024] 如本文所用,所述的“包被抗体”、“第一抗体”、“捕获抗体”、与“一抗”可互换使用,都是指用于固定于固相载体上的、特异性抗犬瘟热病毒的抗体。

[0025] 如本文所用,所述的“检测抗体”、“第二抗体”、“酶标(记)抗体”与“二抗”可互换使用,都是指特异性地抗犬瘟热病毒且对应于所述试剂盒中相应的包被抗体的抗体。对于抗原犬瘟热病毒而言,相应的包被抗体和检测抗体是不同的,并且可同时结合于所述的犬瘟热病毒的不同表位(抗原决定簇)。

[0026] 如本文所用,所述的“可检测标记物”是指位于检测抗体上的,用于确定待检测样品中犬瘟热病毒的存在与否以及存在的量的标志物。如:酶、荧光标记、化学发光基团、核素、量子点、胶体金、镧系元素等。优选的,所述的标记物选自:辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酯酶(AP)、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、或葡萄糖淀粉酶、异硫氰酸荧光素、铕元素等。

[0027] 如本文所用,所述的“与可检测标记物相对应的底物”是指可被检测抗体的标记物所催化显色或发光,用于显示检测抗体与犬瘟热病毒发生结合的认识信号。优选的,所述的底物比如:用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)、ABTS;用于碱性磷酸酯酶的对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenyl phosphate,p-NPP);等等。

[0028] 犬瘟热病毒N蛋白

犬瘟热病毒N蛋白是一种已知的蛋白,其氨基酸序列和核苷酸序列都是本领域已知的。例如,其核苷酸序列如Gene ID: 1489798所示。

[0029] 生产犬瘟热病毒N蛋白的方法也是已知的。例如,通过常规的重组DNA技术(Science,1984;224:1431),可利用犬瘟热病毒N蛋白基因的多聚核苷酸序列来表达或生产重组的犬瘟热病毒N蛋白。一般来说有以下步骤:

(1).用编码犬瘟热病毒N蛋白的多核苷酸(或变体),或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞;

(2).在合适的培养基中培养的宿主细胞;

(3).从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

[0030] 上述获得的重组犬瘟热病毒蛋白可被加工成具有一定纯度的蛋白,用于配制标准品。

[0031] 抗犬瘟热病毒N蛋白的纳米抗体

本发明提供了一种纳米抗体,所述的纳米抗体筛选自驼源性天然单域重链抗体库。

[0032] 本发明所述的纳米抗体,能高亲和力特异性与犬瘟热病毒或其N蛋白结合;且骨架区含有共同特征氨基酸序列SLRLSC;更佳地,在抗体超变区含有共同特征氨基酸序列:I**SG,其中*为随机氨基酸。

[0033] 较佳地,所述的纳米抗体具有SEQ ID NO: 2-7任一所示氨基酸序列。

[0034] 本发明也包括所述的纳米抗体的变异体、衍生物和类似物,只要它们保留有氨基酸序列SLRLSC和I**SG。如本文所用,术语“变异体”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明的纳米抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽变异体、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽,而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的,或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽,或(iii)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或多肽原序列,或融合多肽)。根据本文的定义这些变异体、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

[0035] 本发明的“纳米抗体”还包括保留有氨基酸序列SLRLSC和I**SG结构、且具有特异性结合犬瘟热病毒功能的、SEQ ID NO: 2-7任一所示氨基酸序列的变异形式。这些变异形式包括(但并不限于):若干个(通常为1-20个,最佳地1-10个,还更佳如1-8个或1-5个)氨基酸的缺失、插入和/或取代,以及在C末端和/或N末端添加或缺失一个或数个(通常为20个以内,较佳地为10个以内,更佳地为5个以内)氨基酸。例如,在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。又比如,在C末端和/或N末端添加或减少一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的功能。

[0036] 本发明还提供保留有氨基酸序列SLRLSC和I**SG的、纳米抗体的类似物。这些类似物与天然纳米抗体的差别可以是氨基酸序列上的差异,也可以是不影响序列的修饰形式上的差异,或者兼而有之。这些多肽包括天然或诱导的遗传变异体。诱导变异体可以通过各种技术得到,如通过辐射或暴露于诱变剂而产生随机诱变,还可通过定点诱变法或其他已知分子生物学的技术。类似物还包括具有不同于天然L-氨基酸的残基(如D-氨基酸)的类似物,以及具有非天然存在的或合成的氨基酸(如 β 、 γ -氨基酸)的类似物。

[0037] 此外,在所述的纳米抗体的氨基端或羧基端还可添加其它基本上不影响本发明所述的纳米抗体的活性、表达量和稳定性的氨基酸序列。较佳地,这些添加的氨基酸序列有利于表达(如信号肽),有利于纯化(如 $6 \times \text{His}$ 序列),或其它可促进所述的纳米抗体的活性、表达量或稳定性的序列。

[0038] 本发明还包括编码本发明的纳米抗体或其变异体、衍生物的DNA分子。所述的DNA分子可以全部人工合成,也可用PCR扩增的方法获得。

[0039] 为了进一步提高宿主细胞的表达量,可以对本发明的纳米抗体的编码序列进行改造,例如采用宿主细胞偏好的密码子,消除不利于基因转录及翻译的序列。

[0040] 在获得了编码本发明新纳米抗体或其变异体、衍生物的DNA序列之后,将其克隆入合适的表达载体,再转入合适的宿主细胞。最后,培养转化后的宿主细胞,通过分离纯化得到本发明的新的纳米抗体。

[0041] 如本文所用,术语“载体”包括质粒、表达载体、克隆载体、病毒载体等。可选用本领域已知的各种载体。比如,选用市售的载体,然后将编码本发明新纳米抗体的核苷酸序列可操作地连于表达调控序列,可以形成表达载体。

[0042] 在本发明中,术语“宿主细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核宿主细胞的例子包括大肠杆菌、枯草杆菌等。用于表达纳米抗体的宿主细胞包括大肠杆菌、酵母细胞、昆虫细胞、COS细胞、CHO细胞等。较佳地,该宿主细胞是原核细胞,更佳地是大肠杆菌细胞。

[0043] 在获得转化的宿主细胞后,可在适合表达本发明纳米抗体的条件下培养该细胞,从而表达出纳米抗体;然后再分离出表达的纳米抗体。

[0044] 试剂盒

本领域技术人员均了解,一种抗原可能含有多个表位(抗原决定簇),因此,针对同一个抗原可以获得不止一个抗体,这些抗体对抗原的结合特性(如特异性等)均可能是不同的。因此,针对同一个抗原,本领域人员需要进行比较和筛选,才能找到适合于特异性结合的、效果优异的抗体。

[0045] 通常情况下,若是采用一种抗体来结合犬瘟热病毒,可能在测定过程中不可避免地发生非特异性结合;而基于双抗夹心法原理来制备检测试剂盒,采用的是结合于犬瘟热病毒抗原不同表位的双抗体,这种情况下出现非特异性结合的几率大大降低,因此结果的准确性和精密度大大提高。并且,采用两种特异性非常高的抗体来将目标抗原犬瘟热病毒吸附及定位,其定位和放大效果更好,从而使得特异性和精密度更高。且测定时仅需要很少的样品量即可。

[0046] 因此,本发明提供一种检测犬瘟热病毒的试剂盒,所述的试剂盒可用于犬瘟热病毒的特异性检测,所述的试剂盒含有:本发明所述的纳米抗体或纳米抗体噬菌体(噬菌粒)。更佳地,所述的纳米抗体结合犬瘟热病毒N蛋白的不同表位。

[0047] 在确定了本发明的试剂盒所采用的包被抗体和检测抗体后,可以采用本领域常规可用于与检测抗体结合来进行检测的各种标记物(如:酶、荧光标记、化学发光基团、核素、量子点、胶体金、镧系元素等)。本发明对所采用的标记物没有特别的限制,只要是能够与所述的检测抗体结合,且在适当处理后能够准确地指示待检测样品中犬瘟热病毒或其N蛋白的存在与否以及存在量的标记物均是可用的。例如,所述的标记物可以选自(但不限于):辣根过氧化物酶、碱性磷酸酯酶、葡萄糖氧化酶、 β -D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、或葡萄糖淀粉酶。例如,所述的检测抗体采用辣根过氧化物酶(HRP)标记。抗体标记的方法在本领域是公知的,例如用简易过碘酸钠法或者戊二醛二步法进行HRP标记抗体。

[0048] 当采用如上所示的一些酶标记物时,还需要采用一些与相应的酶结合的底物,从而可通过显色等方式来报导标记物的存在情况或者存在量。所述的底物例如(但不限于):用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)、ABTS;用于碱性磷酸酯酶的对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenyl phosphate,p-NPP)。

[0049] 为了消除假阳性和假阴性,宜在检测过程中设置质控(对照)。所述的质控品例如采用犬瘟热病毒N蛋白标准品。此外,为了获得定量结果,可以在检测过程中设置含已知浓

度的多个犬瘟热病毒N蛋白的标准品。对于标准品的设置方法可采用常规的方法。利用所述的标准品,标准曲线如下设置:用标准品的OD值检测结果为纵坐标(Y轴),标准品浓度为横坐标(X轴)绘制成犬瘟热病毒试剂盒的定量标准曲线。从而,根据待测样品检测获得的OD值,利用标准曲线可计算出待测样品中犬瘟热病毒N蛋白的浓度。

[0050] 此外,为了使本发明的试剂盒在检测时更方便,所述的试剂盒中优选的还包含其它一些辅助试剂,所述的辅助试剂是酶联免疫试验中常规使用的一些试剂,这些试剂的特性以及它们的配制方法均是本领域技术人员所熟知的。所述的试剂例如(但不限于):显色剂、洗涤液、终止液,增敏稀释液。

[0051] 所述的包被抗体被包被在固相载体上(如:多孔板、盖玻片、微珠、膜条等)。本发明对所采用的固相载体没有特别的限制,只要其能够与包被抗体相偶联(连接)即可。例如,所述的固相载体选自:微量滴定板(又称为多孔板,如96孔板)或微球。

[0052] 在本发明的一个实例中,采用的固相载体是微量滴定板(酶标板),所述的微量滴定板是一种聚苯乙烯板,规格是12×8可拆卸条板。

[0053] 由于本发明的试剂盒采用的纳米抗体对于犬瘟热病毒具有极其优异的结合特性(高特异性)。按照上述方法,只要设置已知浓度的抗原对照,制作浓度标准曲线,通过比照浓度标准曲线就可以得出待测样品中的犬瘟热病毒含量。

[0054] 本发明的主要优点在于:

(1) 首次将纳米抗体用于犬瘟热病毒的检测,使得犬瘟热病毒检测用的配对抗体的制备变得容易,所制备的试剂盒成本更低,且更易于储藏和运输。

[0055] (2) 由于本发明的试剂盒采用对犬瘟热病毒具有高亲和力,且高特异性识别犬瘟热病毒N蛋白不同表位的纳米抗体,灵敏度和准确性高。

[0056] (3) 由于采用的纳米抗体对于犬瘟热病毒具有极其优异的结合特性,因此本发明的试剂盒可以极其快速地检测出血液中犬瘟热病毒或其N蛋白。

[0057] (4) 由于纳米抗体的优点,本发明试剂盒还具有简便、稳定等特点。

[0058] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。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J. 萨姆布鲁克等编著,分子克隆实验指南,科学出版社,2002中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0059] 实施例1、犬瘟热病毒N蛋白重组表达

一、聚合酶链式反应(PCR)扩增犬瘟热病毒N蛋白的全长基因

1、模板:感染犬瘟热病毒的犬血细胞总RNA。

[0060] 2、引物设计:犬瘟热病毒N蛋白的全长基因其中的1065bp基因,设计出用于扩增除去信号肽序列后的犬瘟热病毒基因的引物,上下游引物分别带有内切酶NdeI和XhoI的酶切位点序列。

[0061] 上游引物:5' - CATATGATAGACGACCCTGATGTAAG -3' ;

下游引物:5' - CTCGAGTTATTTGTCTCCTCCTTG -3' ; ;

3、抽提细胞总RNA,使用引物Oligo(dT)18和反转录酶,反转录为cDNA。

[0062] RT-PCR获得犬瘟热病毒N蛋白的基因(1065bp),并连接到克隆载体(pEASY-T1 simple[购自北京全式金生物技术有限公司]),菌落PCR验证后,测序结果证明克隆到的基

因序列100%与犬瘟热病毒N蛋白已知基因序列(Gene ID: 1489798)相同。

[0063] 二、原核表达质粒pET-28a-N的构建

1、犬瘟热病毒N蛋白结构的分析:除掉信号肽的犬瘟热病毒N蛋白是包含355个氨基酸残基和1对二硫键的非糖基化多肽链。

[0064] 2、内切酶NdeI和XhoI双酶切含有目的基因的克隆载体和原核表达载体pET-28a(Novagen),胶回收目的片段后使用T4连接酶连接,转化感受态细胞,涂抗生素琼脂板,经测序证明,成功构建了pET-28a-N。

[0065] 三、犬瘟热病毒N蛋白在大肠杆菌中的表达、蛋白纯化以及浓度测定

1、载体pET-28a-N在Rosseta (DE3) 菌种中诱导出了融合蛋白的理论序列是:

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMIDDPDVS IKLVEVIPSINSVCGLTFASRGASLDSEADEFFKIVDEGS
KAQGQLGWLENKDIVDIEVDAAEQFNILLASILAQIWILLAKAVTAPDTAADSEMRRWIKYTQRRRVVGEFRMNKI
WLDIVRNRIAE DLSLRRFMVALILD IKRSPGNKPRI AEMICDIDNYIVEAGLASFILTIKFGIETMYPALGLHEFS
GELTTIESLMMLYQQMGETAPYMVILENSVQNKFSAGSYPLLWSYAMGVGVELENSMGGLNFRSYPDPAYFRLGQ
EMVRRSAGKVSSALAAELGITKEEAQLVSEIASKTTEDRTIRTAGPKQSQITFLHSERTEVTNQQPPTITKRSENG
GGDK;

氨基酸数量为376,重组蛋白理论分子量为41.85KDa, MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHM为载体蛋白,HHHHHH为组氨酸标签蛋白。2、融合蛋白诱导表达的诱导条件是:

- 1) 培养基:含有100 μ g/ml氨苄青霉素的LB液体培养基;
- 2) 诱导温度:30 $^{\circ}$ C;
- 3) IPTG浓度:0.5mM;
- 4) 诱导时间:4小时。

[0066] 3、包涵体的复性

1) 蛋白诱导表达4小时后,5000rpm离心,5min。

[0067] 2) 按照裂解缓冲液:原菌液=1:4的体积比例,用缓冲液重悬菌体,加PMSF至终浓度0.5mM,超声破碎3s超、5s停,总共100循环。

[0068] 3) 12,000rpm,10min,舍上清,沉淀,按照洗涤缓冲液:原菌液=1:10的体积比例加入含有2M尿素的洗涤缓冲液,超声洗涤10分钟。

[0069] 4) 洗涤液倒入透析袋中,4 $^{\circ}$ C透析过夜,融合蛋白包涵体的复性率高达90%以上。

[0070] 4、Ni²⁺-琼脂糖凝胶亲和层析柱对透析液中的含有组氨酸标签的融合蛋白进行大量纯化,纯化的融合蛋白使用截留分子量为10KDa的Millipore超滤管对表达的融合蛋白进行浓缩,提高融合蛋白浓度,经过考马斯亮蓝结合法的检测,重组蛋白浓度高达3mg/ml。

[0071] 实施例2、噬菌体展示技术筛选犬瘟热病毒N蛋白的纳米抗体

自然界在骆驼(Camelidae)体内存在缺失轻链的重链抗体,克隆其可变区得到的单域抗体是最小的功能性抗原结合片段,相对分子质量仅为13KDa左右,称为纳米抗体(variable domain of heavy chain of heavy chain antibody, VHH),具有稳定性强、可溶性好、易表达、免疫原性低等特点。

[0072] 首先,将未经免疫的骆驼体内免疫B细胞中的纳米抗体mRNA反转录为cDNA,然后可变区克隆到噬菌粒(Phagemid,噬菌体质粒)M13K07(购自美国Stratagene公司),转化入大肠杆菌菌株XL1-Blue,最后在辅助噬菌体M13K07辅助扩增、包装下,将纳米抗体蛋白片段展

示在噬菌体M13K07的表面,成为驼源性天然单域重链抗体库。

[0073] (一) 犬瘟热病毒N蛋白纳米抗体的筛选、富集

1) 犬瘟热病毒纳米抗体的筛选、富集—第一轮

1. 称取前述制备的重组犬瘟热病毒N蛋白44g,溶于3ml的碳酸钠-碳酸氢钠包被液(pH=9.5)中,加入容量为4 ml的Nunc-Immuno™ Maxisorp™免疫试管中,4℃过夜。

[0074] 2. Tris-HCl封闭免疫试管的未饱和的蛋白偶联位点。先用偶联液清洗免疫试管3次,尽量去除上清,加入4ml 0.1M Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0),室温静置2H,以封闭活性位点。

[0075] 3. BSA封闭潜在蛋白结合位点。4ml 5%BSA放入免疫试管中,室温缓慢摇动2H,PBS清洗3次,甩干净。

[0076] 4. 1ml噬菌体纳米抗体库液,总共1014个噬菌体加入免疫试管,室温下,混合器缓慢摇晃30分钟,然后室温静置90分钟,PBST清洗免疫试管10次,PBS清洗免疫试管10次,甩干。

[0077] 5. 噬菌体洗脱。免疫试管中加入600μl的10mMHC1,缓慢摇晃,室温30分钟,然后加入100l 0.1M Tris-HCl将pH调至7.5,加入2ml新鲜的,OD=7.0的XL1-Blue菌液,37℃静置50分钟,转移到50ml离心管中,加入5ml 2×TY,37℃摇荡30分钟。

[0078] 6. 加入1l的1011个M13K07噬菌体,37℃静置50分钟,3000g,离心5分钟,去掉上清,沉淀溶于50ml的2×TY+AMP+KAN+GLU培养基,30℃过夜。

[0079] 7. PEG4000沉淀培养基上清液中噬菌体,14000rpm离心,2ml的1×TE溶解噬菌体,滴度约为1011。

[0080] 2) 犬瘟热病毒纳米抗体的筛选、富集

第二、三、四、五轮,步骤同第一轮。

[0081] 3) ELISA检测犬瘟热病毒的纳米抗体富集度

1. 抗原包被:犬瘟热病毒N蛋白分别包被ELISA板,包被浓度为1g/ml。

[0082] 2. BSA封闭;

3. 每个ELISA孔加入109个不同富集度的纳米抗体噬菌粒,稀释到PBST中,100 l/孔,1H静置。

[0083] 4. Anti-噬菌体抗体(兔来源),稀释度1:5000,100 l/孔,37℃,1H。

[0084] 5. 羊抗兔IgG抗体(HRP),稀释度1:10000,100 l/孔,37℃,1H。

[0085] 随着一轮一轮的筛选的进行,能够特异性识犬瘟热病毒N蛋白的纳米抗体逐渐被富集。

[0086] (二) 单克隆纳米抗体菌落选取

ELISA法检测犬瘟热病毒的抗体富集度,到达平台期的第三轮筛选得到的抗体库随机选取60个纳米抗体单菌落,而到达平台期的第四轮的抗体库随机选取30个纳米抗体单菌落,分别用M13K07辅助扩增,离心后的上清液直接作为抗体溶液做ELISA,选取光度值最高的单菌落作为单克隆纳米抗体,根据单克隆纳米抗体噬菌粒(Phage-VHH)ELISA的结果,第三轮、第四轮分别挑取了20个阳性菌落测序,结果显示纳米抗体编码基因序列存在重复的现象,只有6种不同序列,分别是R-1、R-4、V-5、R-6、R-18、V-16。

[0087] (三) 序列测定与分析

1序列测定

R-1:

MAEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCVASGFLDYIAIGWFRQAPGKERTVVA AISKSGDRITYYADSAKG
RFTISRDN AKDTAYLQMDNVKTEDTG VVYCAAMRPLTKPIRTGSSWFFPVDYWGQGT LVTVSSGRY (SEQ ID
NO.2)

R-4:

MAEVQLQASGGGLVRAGGSLRLSCTAPGEIFSNYAMA WFRQAPGKERTVVA AISKSGDRITYYADSAKG
RFTISRDN AKDTAYLQMDNVKIEDTG VVYCAAMRPLTKPIRTGSSWFFPVDYWGQGT LVTVSSGRY (SEQ ID
NO.3)

V-5

MAEVQLQASGGGLVQAGGSLRLS CAASGR TVSR YAMGWLRRAPGKEREFVAA ISSSGGSTNYADSVKG
RFTISRDN AKNTVSLQMN LKPEDTGLYQCIIYHGGRVYWGQGTQVSVSSGRY (SEQ ID NO. 4)

R-6:

MAEVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCVASGR TFRSYAMA WFRQAPGKERTVVA AISKSGDRITYYADSAKG
RFTISRDN AKDTAYLQMDNVKIEDTG VYICAAMRPLTKPIRTGSSWFFPVDYWGQGT LVTVSSGRY (SEQ ID
NO.5)

V-16

MAEVQLQASGGGLVQAGGSLRLS CAASRSTLDYYAVGWFRQAPGKEREGVAY IDRSGSSWYEA AVKG
RFTISKDS AVNTVY LQMN LQPEDTAVYYCAAIRGYPTFV TSLGLYDYWGQGTQVTISSGTQVTVSSGRY (SEQ
ID NO.6)

R-18:

MAEVQLQASGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTNTY AIGWFRQAPGKERTVVA AISKSGDRITYYADSAKG
RFTISRDN AKDTAYLQMDNVKIEDTG VVYCAAMRPLTKPVRTGSSWFFPVDYWGQETQVTVSSGRY (SEQ ID
NO.7)

2序列分析

①各个纳米抗体氨基酸数量以及MW特性如表1。

克隆号	R-1	R-4	V-5	R-6	V-16	R-18
氨基酸数量	134	134	121	134	138	134
MW	14583	14632	12905	14599	14857	14651

表 1

[0088] ②各纳米抗体骨架区含有共同特征氨基酸序列:SLRLSC (SEQ ID NO.1)。

[0089] ③各纳米抗体超变区含有共同特征氨基酸序列:I**SG (*为随机氨基酸)。

[0090] (四) 单克隆纳米抗体的原核表达以及纯化

合成包含有内切酶NcoI、XhoI酶切位点的引物,以含有纳米抗体编码基因信息的噬菌粒(phagemid)为模板,扩增获得纳米抗体基因片段,将纳米抗体基因片段构建入pET-28a,转化Rosetta (DE3),IPTG诱导表达,表达的纳米抗体携带6×His标签蛋白,ELISA检测

全菌裂解液识别天然犬瘟热病毒的效果,选取阳性的克隆使用镍柱纯化纳米抗体,SDS-PAGE检测蛋白纯化情况,Western Blot检测抗体特异性。

[0091] 实施例3、检测犬瘟热病毒夹心ELISA法建立检测步骤:

1. 包被:用0.05M碳酸盐包被缓冲液(pH=9.6)将重组、镍柱(购自上海业力生物技术有限公司)纯化的纳米抗体R-16稀释为10.0 μ g/ml,同时做空白孔对照,空白孔中无纳米抗体,只有包被缓冲液。在每个聚苯乙烯板的反应孔中加0.1ml,4 $^{\circ}$ C过夜,弃去孔内溶液,用洗涤缓冲液200 μ l/孔在微孔振荡器上洗3次,每次1分钟。

[0092] 2. 封闭:每孔加入200 μ l 5%BSA封闭液,置37 $^{\circ}$ C孵育2小时,然后用洗涤缓冲液200 μ l/孔在微孔振荡器上洗3次,每次1分钟。

[0093] 3. 犬瘟热病毒N蛋白孵育:孵育浓度为20ng/ml,置37 $^{\circ}$ C孵育1小时,然后用洗涤缓冲液200 μ l/孔在微孔振荡器上洗4次,每次5分钟。设置阴性对照孔,用PBST代替犬瘟热病毒N蛋白孵育。

[0094] 4. 纳米抗体的孵育:分别将纳米抗体噬菌粒R-1、R-4、R-5及第四轮筛选库的浓度稀释至1010个/ml,于各反应孔中,加入0.1ml的稀释液,37 $^{\circ}$ C孵育1小时,然后用洗涤缓冲液200 μ l/孔在微孔振荡器上洗4次,每次5分钟。

[0095] 5. Rabbit Anti-M13K07的兔抗(通过纯化的M13K07噬菌体直接作为抗原免疫新西兰大耳兔,取血纯化而得)孵育:稀释10000倍,0.1ml于上述反应孔中,置37 $^{\circ}$ C孵育1小时,然后用洗涤缓冲液200 μ l/孔在微孔振荡器上洗4次,每次5分钟。

[0096] 6. HRP-Goat anti-rabbit 抗体(购自Santa Cruz公司)的孵育:稀释至0.1 μ g/ml,0.1ml于上述反应孔中,置37 $^{\circ}$ C孵育1小时,然后用洗涤缓冲液200 μ l/孔在微孔振荡器上洗4次,每次5分钟。

[0097] 7. 显色:于各反应孔中加入临时配制的TMB底物溶液0.1ml,37 $^{\circ}$ C 10~25分钟。终止反应:于各反应孔中加入2M硫酸0.05ml,之后测OD450值,OD450值若大于阴性对照孔OD450值的2倍的话,则视为阳性结果,结果见表2。

	R-1	R-4	V-5	4th
V-16	0.9313	0.8661	0.8987	0.7541
包被液	0.2831	0.3043	0.2937	0.2523

表 2

[0098] 实施例4、ELISA试剂盒特性测定

1、特异性试验

采用建立的方法对无关蛋白HCC,BSA,N蛋白及以第四轮筛选的库为阳性对照进行检测,除犬瘟热病毒N蛋白及筛选的库呈阳性反应外,其他均为阴性结果,说明应用本方法和其他无关抗原不发生交叉反应,具有良好的特异性。结果见表3。

	HCC	BSA	N	4th
V-16	0.0755	0.0743	0.5122	0.6787
包被液	0.0657	0.0706	0.0858	0.0994

表 3

[0099] 2、临床血清样本的检测

采用建立的夹心ELISA方法对临床血清样本进行检测。实验设计3组，即无关对照(5%牛奶)、阳性血清、阴性血清。血清稀释比例为1:5,10,20,40,80,160。结果显示在稀释倍数为20时，阳性血清明显高于阴性血清和无关对照，结果见表4。表明本实验建立的夹心ELISA方法具有良好的特异性和敏感性，可用于CDV临床样本的快速检测。

	5	10	20	40	80	160
5%牛奶	0.181932	0.181304	0.15329	0.164833	0.133383	0.155317
阳性血清	0.580269	0.583623	0.672013	0.646933	0.457836	0.354689
阴性血清	0.352522	0.24739	0.193925	0.217567	0.146509	0.170351

表 4

[0100] 综上所述，本发明通过表达犬瘟热病毒重组蛋白并筛选纳米抗体，筛选到可以与天然犬瘟热病毒具高亲和力的纳米抗体，同时经过配对筛选的初步实验，获得可以对临床血清样本进行特异性检测的配对纳米抗体。

[0101] 上述各种配对组合构成的一系列试剂盒极具市场价值。

[0102] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0103] 以上所述，仅为发明的具体实施方式，但本发明的保护范围不局限于此，任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内，根据本发明的技术方案和新型的构思加于等同替换或改变，都应涵盖在本发明的保护范围之内。

<213> 骆驼 (Camelidae)

<400> 3

```

Met Ala Gly Val Gly Leu Gly Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Ala Ala
1           5           10           15
Gly Gly Ser Leu Ala Leu Ser Cys Thr Ala Pro Gly Gly Ile Pro Ser
           20           25           30
Ala Thr Ala Met Ala Thr Pro Ala Gly Ala Pro Gly Leu Gly Ala Thr
           35           40           45
Val Val Ala Ala Ile Ser Leu Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala
           50           55           60
Ser Ala Leu Gly Ala Pro Thr Ile Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Thr
65           70           75           80
Ala Thr Leu Gly Met Ala Ala Val Leu Ile Gly Ala Thr Gly Val Thr
           85           90           95
Thr Cys Ala Ala Met Ala Pro Leu Thr Leu Pro Ile Ala Thr Gly Ser
           100          105          110
Ser Thr Pro Pro Pro Val Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Val Thr
           115          120          125
Val Ser Ser Gly Ala Thr
           130

```

<210> 4

<211> 121

<212> PRT

<213> 骆驼 (Camelidae)

<400> 4

```

Met Ala Gly Val Gly Leu Gly Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Ala
1           5           10           15
Gly Gly Ser Leu Ala Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ala Thr Val Ser
           20           25           30
Ala Thr Ala Met Gly Thr Leu Ala Ala Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gly
           35           40           45
Pro Val Ala Ala Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Ala Thr Ala Ala
           50           55           60
Ser Val Leu Gly Ala Pro Thr Ile Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Thr
65           70           75           80
Val Ser Leu Gly Met Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Gly Leu Thr
           85           90           95
Gly Cys Ile Ile Thr His Gly Gly Ala Val Thr Thr Gly Gly Gly Thr
           100          105          110

```

Gly Val Ser Val Ser Ser Gly Ala Thr
 115 120
 <210> 5
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> 骆驼 (Camelidae)
 <400> 5
 Met Ala Gly Val Gly Leu Gly Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Leu Ala Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Ala Thr Pro Ala
 20 25 30
 Ser Thr Ala Met Ala Thr Pro Ala Gly Ala Pro Gly Leu Gly Ala Thr
 35 40 45
 Val Val Ala Ala Ile Ser Leu Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Ala Leu Gly Ala Pro Thr Ile Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Thr
 65 70 75 80
 Ala Thr Leu Gly Met Ala Ala Val Leu Ile Gly Ala Thr Gly Val Thr
 85 90 95
 Ile Cys Ala Ala Met Ala Pro Leu Thr Leu Pro Ile Ala Thr Gly Ser
 100 105 110
 Ser Thr Pro Pro Pro Val Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Leu Val Thr
 115 120 125
 Val Ser Ser Gly Ala Thr
 130
 <210> 6
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> 骆驼 (Camelidae)
 <400> 6
 Met Ala Gly Val Gly Leu Gly Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Ala
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Leu Ala Leu Ser Cys Ala Ala Ser Ala Ser Thr Leu Ala
 20 25 30
 Thr Thr Ala Val Gly Thr Pro Ala Gly Ala Pro Gly Leu Gly Ala Gly
 35 40 45
 Gly Val Ala Thr Ile Ala Ala Ser Gly Gly Ser Ser Thr Thr Gly Ala
 50 55 60
 Ala Val Leu Gly Ala Pro Thr Ile Ser Leu Ala Ser Ala Val Ala Thr

65	70	75	80
Val Thr Leu Gly Met Ala Ala Leu Gly Pro Gly Ala Thr Ala Val Thr			
	85	90	95
Thr Cys Ala Ala Ile Ala Gly Thr Pro Thr Pro Val Thr Ser Leu Gly			
	100	105	110
Leu Thr Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Gly Val Thr Ile Ser Ser Gly			
	115	120	125
Thr Gly Val Thr Val Ser Ser Gly Ala Thr			
	130	135	
<210> 7			
<211> 134			
<212> PRT			
<213> 骆驼 (Camelidae)			
<400> 7			
Met Ala Gly Val Gly Leu Gly Ala Ser Gly Gly Gly Leu Val Gly Pro			
1	5	10	15
Gly Gly Ser Leu Ala Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Thr Pro Ala			
	20	25	30
Thr Thr Ala Ile Gly Thr Pro Ala Gly Ala Pro Gly Leu Gly Ala Thr			
	35	40	45
Val Val Ala Ala Ile Ser Leu Ser Gly Ala Ala Thr Thr Thr Ala Ala			
	50	55	60
Ser Ala Leu Gly Ala Pro Thr Ile Ser Ala Ala Ala Ala Leu Ala Thr			
65	70	75	80
Ala Thr Leu Gly Met Ala Ala Val Leu Ile Gly Ala Thr Gly Val Thr			
	85	90	95
Thr Cys Ala Ala Met Ala Pro Leu Thr Leu Pro Val Ala Thr Gly Ser			
	100	105	110
Ser Thr Pro Pro Pro Val Ala Thr Thr Gly Gly Gly Thr Gly Val Thr			
	115	120	125
Val Ser Ser Gly Ala Thr			
	130		