



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112111007 A

(43) 申请公布日 2020.12.22

(21) 申请号 202011002612.6

G01N 33/569 (2006.01)

(22) 申请日 2020.09.22

G01N 33/543 (2006.01)

(71) 申请人 通用生物系统(安徽)有限公司

地址 239000 安徽省滁州市经济技术开发  
区祈福寺西路69号

(72) 发明人 雍金贵 张志鹏 张磊 缪连军

(74) 专利代理机构 合肥正则元起专利代理事务  
所(普通合伙) 34160

代理人 杨润 周卫

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

权利要求书3页 说明书6页

(54) 发明名称

一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的  
制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,包括如下步骤:S1多肽合成、S2免疫原制备、S3制备筛选抗原、S4动物免疫、S5细胞融合、S6筛选检测、S7稳定细胞株建立、S8单克隆抗体生产、S9抗体偶联、S10配对抗体筛选;通过选择了N蛋白两端的不同抗原表位分别合成多肽作为抗原,制备的单克隆抗体可实现直接配对,并在多肽合成的过程中,添加连接桥减少了空间位阻,使抗原表位充分暴露在载体蛋白表面,使得抗原能够快速识别,选择了重组蛋白作为检测抗原,避免了筛选得到的抗体只识别多肽抗原,不识别N蛋白的风险,并且通过检测N蛋白的含量,能够直接检测样品中是否含有新型冠状病毒。

1. 一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于:具体包括如下步骤:

1多肽合成:合成N蛋白N端15个氨基酸序列的多肽,并添加连接桥与载体蛋白结合位点,制得NP-N多肽,合成N蛋白C端aa383-aa394序列的多肽,并添加连接桥与载体蛋白结合位点,制得NP-C多肽;

2免疫原制备:马来酰亚胺活化载体蛋白匙孔血蓝蛋白后,将NP-N多肽和NP-C多肽分别与活化后的匙孔血蓝蛋白,在室温条件下,进行反应2h,制得KLH-NP-N免疫原和KLH-NP-C免疫原;

3制备筛选抗原:构建N蛋白原核表达载体,将表达载体C端添加6\*His标签,表达纯化制得NP-His筛选抗原;

4动物免疫:分别用KLH-NP-N免疫原和KLH-NP-C免疫原免疫Balb/c小鼠,每只Balb/c小鼠每次免疫100ug,免疫3次,每次间隔时间两周;

5细胞融合:第三次免疫后1周,分别取KLH-NP-N和KLH-NP-C组小鼠脾脏,将脾细胞分离成单细胞悬液,与处于对数期的小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按1:1比例混合,采用细胞融合仪进行细胞融合,融合后的KLH-NP-N和KLH-NP-C组细胞铺板至96孔细胞培养板中,添加HAT筛选试剂,培养5天后进行一次全换液;

6筛选检测:将NP-His筛选抗原包被至酶标板中,分别对KLH-NP-N、KLH-NP-C组融合后的细胞上清利用NP-His筛选抗原进行间接ELISA筛选,保留阳性克隆;

7稳定细胞株建立:对阳性克隆进行亚克隆,直至阳性检出率为100%,扩大培养并冻存保种,得到杂交瘤稳定细胞株;

8单克隆抗体生产:用无血清发酵培养上述杂交瘤稳定细胞株,收集细胞培养上清,利用Prontein A亲和纯化单克隆抗体,制得初级N蛋白单克隆抗体;

9抗体偶联:采用简易过碘酸钠法单克隆抗体与辣根过氧化物酶进行偶联,得到标记抗体;

10配对抗体筛选:将未标记的抗体包被至酶标板中作为捕获抗体,将稀释后的NP-His筛选抗原加入酶标板中,进行培养,再加入标记抗体两两进行配对检测,筛选阳性孔,得到核衣壳蛋白配对单克隆抗体对。

2. 根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于:所述的NP-N多肽序列为:MSDNGPQNQRNAPRIGGGGSC, NP-C多肽列为:PQRQKKQQTIVTLGGGGSC, NP-N多肽和活化后的匙孔血蓝蛋白的用量质量比为1:1, NP-C多肽和活化后的匙孔血蓝蛋白的用量质量比为1:1。

3. 根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于:动物免疫的具体步骤如下:将KLH-NP-N免疫原和与弗氏完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合,制得第一混合液,将KLH-NP-C免疫原和弗氏完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合,制得第二混合液,用第一混合液和第二混合液分别对6周龄的Balb/c小鼠进行皮下注射,每次注射位点个数为6个,每次注射量为100μg,得到初次免疫小鼠,将KLH-NP-N免疫原和弗氏不完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合,制得第三混合液,将KLH-NP-C免疫原和弗氏不完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合,制得第四混合液,用第三混合液和第四混合液分别对初次免疫两周后的小鼠重复免疫2次,每次间隔两周。

4. 根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于:细胞融合的具体步骤如下:分别取三次免疫后1周的KLH-NP-N和KLH-NP-C组小鼠脾脏,将小鼠脾脏放入盛有5mLDMEM液的培养皿中,将脾脏夹碎,用尼龙网过滤,得到单细胞悬液,将单细胞悬液和于对数期的小鼠骨髓瘤细胞SP2/0细胞液以体积比1:1的比例混合,采用细胞融合仪进行细胞融合,融合后细胞铺板至96孔细胞培养板中,添加HAT筛选试剂,培养5天后进行一次全换液。

5. 根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于:检测筛选的具体步骤:将NP-His筛选抗原包被至酶标板中,在温度为4℃的条件下,进行过夜培养后,用pH7.4的PBST洗涤三次,加封闭液37℃封闭2个小时后弃掉封闭液37℃烘干,分别将KLH-NP-N和KLH-NP-C组融合细胞的上清液每孔100μL加入酶标板中,在温度为37℃的条件下,进行温育60min后,将质量分数为0.5%的羊抗小鼠IgG酶标二抗每孔100μL加入酶标板中,在温度为37℃的条件下,进行温育60min后,将TMB单组份显色液每孔100μL加入酶标板中,室温作用20min后,每孔加入50μL终止液,进行间接ELISA筛选,保留阳性克隆。

6. 根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于:稳定细胞株建立具体步骤如下:分别将KLH-NP-N和KLH-NP-C组阳性克隆采用有限稀释法对检测阳性的杂交瘤细胞及时进行克隆化培养,筛选阳性亚克隆,直至阳性检出率为100%,得到杂交瘤稳定细胞株。

7. 根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于:单克隆抗体生产具体步骤如下:采用无血清发酵分别培养KLH-NP-N和KLH-NP-C组杂交瘤稳定细胞株,收集细胞培养上清液,将上清液、Prontein A、pH为7.4的磷酸缓冲液进行混合后,加入层析柱中,用pH为7.4的磷酸缓冲液作为平衡液,用pH为4.0的柠檬酸溶液脱洗抗体,再用pH为9.0的Tris-HCl缓冲液调节pH值为7.0,收集抗体,得到初级N蛋白单克隆抗体。

8. 根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于:抗体偶联的具体步骤如下:

步骤A1:将5mg辣根过氧化物酶溶于1mL去离子水中,制得辣根过氧化物酶溶液,将241mg高碘酸钠溶于10mL去离子水中,制得高碘酸钠溶液,将辣根过氧化物酶溶液加入高碘酸钠溶液中,在转速为200r/min,避光的室温条件下,进行搅拌20min后,得到混合液a,将混合液a加入透析袋中,对1mM,pH值4.4的醋酸钠缓冲液,在温度为4℃的条件下,进行过夜透析,得到混合液b;

步骤A2:向步骤A1制得的混合液b加入20μL,0.2M,pH值9.5的碳酸盐缓冲液,使得醛化HRP的pH值为9.5后,分别加入6株溶解在0.01M碳酸盐缓冲液中单克隆抗体1mL,在转速为60r/min,避光的室温条件下,进行搅拌2h,制得6组混合液c1-混合液c6;

步骤A3:将4mg硼氢化钠溶于1mL去离子水中,制得硼氢化钠溶液,将硼氢化钠溶液加入混合液c1-混合液c6中,搅拌均匀后,在温度为4℃的条件下,保温2h后,装入透析袋中,在0.15M,pH值7.4的PBS缓冲液,温度为4℃的条件下,进行过夜透析,得到混合液d1-混合液d6;

步骤A4:向混合液d1-混合液d6中加入等体的饱和硫酸铵水溶液,在温度为4℃的条件

下,静置1h后,在转速为3000r/min的条件下,进行离心,去除上清液,将底物用半饱和硫酸铵水溶液进行洗涤两次,将底物溶于0.15M,pH值7.4的PBS中,制得混合液e1-混合液e6,将混合液e1-混合液e6分别装入透析袋中,在0.15M,pH值为7.4的PB缓冲盐水进行透析,去除铵离子后,在转速为10000r/min的条件下,进行离心30min,去除沉淀物,将上清液进行冻干保存。

9.根据权利要求1所述的一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,其特征在于:配对抗体筛选的具体步骤如下:将未标记的抗体包被至酶标板中作为捕获抗体,将稀释后浓度为10ng/ml的NP-His筛选抗原加入酶标板中,在温度为37℃的条件下,孵育30min,用PBST洗涤缓冲液洗去未结合的NP-His筛选抗原,在酶标板加入HRP标记后的抗体作为检测抗体,在温度为37℃的条件下,孵育30min,用PBST洗涤缓冲液洗去未结合的标记抗体,在酶标板中加入TMB显色液,在温度为37℃的条件下,孵育5min,在酶标板中加入2M的硫酸终止液,用酶标仪测定OD450读数,选择阳性孔,得到可以形成夹心配对的核衣壳蛋白单克隆抗体。

## 一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于单克隆抗体制备技术领域,具体涉及一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法。

### 背景技术

[0002] 2019年12月以来,陆续发现了多例不明原因肺炎病例,现已证实为一种新型冠状病毒感染引起的急性呼吸道传染病。基于目前的流行病学调查,潜伏期一般为3-7天,最长不超过14天。此次疫情临床表现以发热、乏力、干咳为主要表现。少数患者伴有鼻塞、流涕、腹泻等症状。部分患者仅表现为低热、轻微乏力等,无肺炎表现,多在1周后恢复,世界卫生组织将本次引起病毒性肺炎病例的病原体命名为2019新型冠状病毒,即为SARS-CoV-2病毒,核衣壳蛋白(N蛋白)是冠状病毒中含量最丰富的蛋白质。

[0003] 现有的新型冠状病毒检测试剂盒中使用的检测抗体无法实现直接配对,且在检测抗体的制备过程中,由于抗原表位未充分暴露,使得抗原识别的速度降低,同时在制备检测抗体时,均使用冠状病毒作为抗原,而冠状病毒易与N蛋白结合,形成螺旋状核衣壳蛋白,使得检测结果准确度降低。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法。

[0005] 本发明要解决的技术问题:

[0006] 现有的新型冠状病毒检测试剂盒中使用的检测抗体无法实现直接配对,且在检测抗体的制备过程中,由于抗原表位未充分暴露,使得抗原识别的速度降低,同时在制备检测抗体时,均使用冠状病毒作为抗原,而冠状病毒易与N蛋白结合,形成螺旋状核衣壳蛋白,使得检测结果准确度降低。

[0007] 本发明的目的可以通过以下技术方案实现:

[0008] 一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法,具体包括如下步骤:

[0009] 1多肽合成:合成N蛋白N端15个氨基酸序列的多肽,并添加连接桥与载体蛋白结合位点,制得NP-N多肽,合成N蛋白C端aa383-aa394序列的多肽,并添加连接桥与载体蛋白结合位点,制得NP-C多肽;

[0010] 2免疫原制备:马来酰亚胺活化载体蛋白匙孔血蓝蛋白后,将NP-N多肽和NP-C多肽分别与活化后的匙孔血蓝蛋白,在室温条件下,进行反应2h,制得KLH-NP-N免疫原和KLH-NP-C免疫原;

[0011] 3制备筛选抗原:构建N蛋白原核表达载体,将表达载体C端添加6\*His标签,表达纯化制得NP-His筛选抗原;

[0012] 4动物免疫:分别用KLH-NP-N免疫原和KLH-NP-C免疫原免疫Balb/c小鼠,每只Balb/c小鼠每次免疫100ug,免疫3次,每次间隔时间两周;

[0013] 5细胞融合:第三次免疫后1周,分别取KLH-NP-N和KLH-NP-C组小鼠脾脏,将脾细胞

分离成单细胞悬液,与处于对数期的小鼠骨髓瘤细胞SP2/0按1:1比例混合,采用细胞融合仪进行细胞融合,融合后的KLH-NP-N和KLH-NP-C组细胞铺板至96孔细胞培养板中,添加HAT筛选试剂,培养5天后进行一次全换液;

[0014] 6筛选检测:将NP-His筛选抗原包被至酶标板中,分别对KLH-NP-N、KLH-NP-C组融合后的细胞上清利用NP-His筛选抗原进行间接ELISA筛选,保留阳性克隆;

[0015] 7稳定细胞株建立:对阳性克隆进行亚克隆,直至阳性检出率为100%,扩大培养并冻存保种,得到杂交瘤稳定细胞株;

[0016] 8单克隆抗体生产:用无血清发酵培养上述杂交瘤稳定细胞株,收集细胞培养上清,利用Prontein A亲和纯化单克隆抗体,制得初级N蛋白单克隆抗体;

[0017] 9抗体偶联:采用简易过碘酸钠法单克隆抗体与辣根过氧化物酶进行偶联,得到标记抗体;

[0018] 10配对抗体筛选:将未标记的抗体包被至酶标板中作为捕获抗体,将稀释后的NP-His筛选抗原加入酶标板中,进行培养,再加入标记抗体两两进行配对检测,筛选阳性孔,得到核衣壳蛋白配对单克隆抗体对。

[0019] 进一步,所述的NP-N多肽序列为:MSDNGPQNQRNAPRIGGGGSC, NP-C多肽列为:PQRQKKQQTVTLGGGGSC, NP-N多肽和活化后的匙孔血蓝蛋白的用量质量比为1:1, NP-C多肽和活化后的匙孔血蓝蛋白的用量质量比为1:1。

[0020] 进一步,动物免疫的具体步骤如下:将KLH-NP-N免疫原和与弗氏完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合,制得第一混合液,将KLH-NP-C免疫原和弗氏完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合,制得第二混合液,用第一混合液和第二混合液也分别对6周龄的Balb/c小鼠进行皮下注射,每次注射位点个数为6个,每次注射量为100 $\mu$ g,得到初次免疫小鼠,将KLH-NP-N免疫原和弗氏不完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合,制得第三混合液,将KLH-NP-C免疫原和弗氏不完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合,制得第四混合液,用第三混合液和第四混合液分别对初次免疫两周后的小鼠重复免疫2次,每次间隔两周。

[0021] 进一步,细胞融合的具体步骤如下:分别取三次免疫后1周的KLH-NP-N和KLH-NP-C组小鼠脾脏,将小鼠脾脏放入盛有5mLDMEM液的培养皿中,将脾脏夹碎,用尼龙网过滤,得到单细胞悬液,将单细胞悬液和于对数期的小鼠骨髓瘤细胞SP2/0细胞液以体积比1:1的比例混合,采用细胞融合仪进行细胞融合,融合后细胞铺板至96孔细胞培养板中,添加HAT筛选试剂,培养5天后进行一次全换液。

[0022] 进一步,检测筛选的具体步骤:将NP-His筛选抗原包被至酶标板中,在温度为4 $^{\circ}$ C的条件下,进行过夜培养后,用pH7.4的PBST洗涤三次,加封闭液37 $^{\circ}$ C封闭2个小时后弃掉封闭液37 $^{\circ}$ C烘干,分别将KLH-NP-N和KLH-NP-C组融合细胞的上清液每孔100 $\mu$ L加入酶标板中,在温度为37 $^{\circ}$ C的条件下,进行温育60min后,将质量分数为0.5%的羊抗小鼠IgG酶标二抗每孔100 $\mu$ L加入酶标板中,在温度为37 $^{\circ}$ C的条件下,进行温育60min后,将TMB单组份显色液每孔100 $\mu$ L加入酶标板中,室温作用20min后,每孔加入50 $\mu$ L终止液,进行间接ELISA筛选,保留阳性克隆。

[0023] 进一步,稳定细胞株建立具体步骤如下:分别将KLH-NP-N和KLH-NP-C组阳性克隆采用有限稀释法对检测阳性的杂交瘤细胞及时进行克隆化培养,筛选阳性亚克隆,直至阳性检出率为100%,得到杂交瘤稳定细胞株。

[0024] 进一步,单克隆抗体生产具体步骤如下:采用无血清发酵分别培养KLH-NP-N和KLH-NP-C组杂交瘤稳定细胞株,收集细胞培养上清液,将上清液、PronteinA、pH为7.4的磷酸缓冲液进行混合后,加入层析柱中,用pH为7.4的磷酸缓冲液作为平衡液,用pH为4.0的柠檬酸溶液脱洗抗体,再用pH为9.0的Tris-HCl缓冲液调节pH值为7.0,收集抗体,得到初级N蛋白单克隆抗体。

[0025] 进一步,抗体偶联的具体步骤如下:

[0026] 步骤A1:将5mg辣根过氧化物酶溶于1mL去离子水中,制得辣根过氧化物酶溶液,将241mg高碘酸钠溶于10mL去离子水中,制得高碘酸钠溶液,将辣根过氧化物酶溶液加入高碘酸钠溶液中,在转速为200r/min,避光的室温条件下,进行搅拌20min后,得到混合液a,将混合液a加入透析袋中,对1mM,pH值4.4的醋酸钠缓冲液,在温度为4℃的条件下,进行过夜透析,得到混合液b;

[0027] 步骤A2:向步骤A1制得的混合液b加入20μL,0.2M,pH值9.5的碳酸盐缓冲液,使得醛化HRP的pH值为9.5后,分别加入6株溶解在0.01M碳酸盐缓冲液中单克隆抗体1mL,在转速为60r/min,避光的室温条件下,进行搅拌2h,制得6组混合液c1-混合液c6;

[0028] 步骤A3:将4mg硼氢化钠溶于1mL去离子水中,制得硼氢化钠溶液,将硼氢化钠溶液加入混合液c1-混合液c6中,搅拌均匀后,在温度为4℃的条件下,保温2h后,装入透析袋中,在0.15M,pH值7.4的PBS缓冲液,温度为4℃的条件下,进行过夜透析,得到混合液d1-混合液d6;

[0029] 步骤A4:向混合液d1-混合液d6中加入等体的饱和硫酸铵水溶液,在温度为4℃的条件下,静置1h后,在转速为3000r/min的条件下,进行离心,去除上清液,将底物用半饱和硫酸铵水溶液进行洗涤两次,将底物溶于0.15M,pH值7.4的PBS中,制得混合液e1-混合液e6,将混合液e1-混合液e6分别装入透析袋中,在0.15M,pH值为7.4的PB缓冲盐水进行透析,去除铵离子后,在转速为10000r/min的条件下,进行离心30min,去除沉淀物,将上清液进行冻干保存。

[0030] 进一步,配对抗体筛选的具体步骤如下:将未标记的抗体包被至酶标板中作为捕获抗体,将稀释后浓度为10ng/ml的NP-His筛选抗原加入酶标板中,在温度为37℃的条件下,孵育30min,用PBST洗涤缓冲液洗去未结合的NP-His筛选抗原,在酶标板加入HRP标记后的抗体作为检测抗体,在温度为37℃的条件下,孵育30min,用PBST洗涤缓冲液洗去未结合的标记抗体,在酶标板中加入TMB显色液,在温度为37℃的条件下,孵育5min,在酶标板中加入2M的硫酸终止液,用酶标仪测定OD450读数,选择阳性孔,得到可以形成夹心配对的核衣壳蛋白单克隆抗体。

[0031] 本发明的有益效果:本发明首先通过对N蛋白N端15个氨基酸序列的多肽和N蛋白C端aa383-aa394序列的多肽进行合成,并分别添加连接桥与载体蛋白结合位点,得到NP-N多肽和NP-C多肽,再将NP-N多肽和NP-C多肽分别与活化后的匙孔血蓝蛋白反应,得到KLH-NP-N免疫原和KLH-NP-C免疫原,同时构建N蛋白原核表达载体,将表达载体C端添加6\*His标签,表达纯化得到NP-His筛选抗原,分别用KLH-NP-N免疫原和KLH-NP-C免疫原为抗原对6周龄的Balb/c小鼠进行免疫,进行3次免疫后,摘取冲击免疫一周后的小鼠脾脏,制得脾脏单细胞悬浮液,并与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行细胞融合,进而对融合细胞进行培养,再对融合细胞上清进行间接ELISA筛选,保留阳性克隆后,再对阳性克隆进行亚克隆,使得阳性检出

率为100%，得到稳定的杂交瘤细胞株，用无血清发酵培养上述杂交瘤稳定细胞株，收集细胞培养上清，并通过Prontein A亲和纯化得到初级N蛋白单克隆抗体，再将初级N蛋白单克隆抗体与辣根过氧化物酶进行偶联，得到标记抗体，对抗体进一步配对筛选得到核衣壳蛋白单克隆抗体对。通过选择了N蛋白两端的不同抗原表位分别合成多肽作为抗原，制备的单克隆抗体可实现直接配对，并在多肽合成的过程中，添加连接桥减少了空间位阻，使抗原表位充分暴露在载体蛋白表面，使得抗原能够快速识别，选择了重组蛋白作为检测抗原，避免了筛选得到的抗体只识别多肽抗原，不识别N蛋白的风险，并且通过检测N蛋白的含量，能够直接检测样品中是否含有新型冠状病毒。

### 具体实施方式

[0032] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例，都属于本发明保护的范畴。

#### [0033] 实施例

[0034] 一种新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备方法，具体包括如下步骤：

[0035] 1多肽合成：合成N蛋白N端15个氨基酸序列的多肽，并添加连接桥与载体蛋白结合位点，制得NP-N多肽，合成N蛋白C端aa383-aa394序列的多肽，并添加连接桥与载体蛋白结合位点，制得NP-C多肽；

[0036] 2免疫原制备：马来酰亚胺活化载体蛋白匙孔血蓝蛋白后，将NP-N多肽和NP-C多肽分别与活化后的匙孔血蓝蛋白，在室温条件下，进行反应2h，制得KLH-NP-N免疫原和KLH-NP-C免疫原；

[0037] 3制备筛选抗原：构建N蛋白原核表达载体，将表达载体C端添加6\*His标签，表达纯化制得NP-His筛选抗原；

[0038] 4动物免疫：将KLH-NP-N免疫原和与弗氏完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合，制得第一混合液，将KLH-NP-C免疫原和弗氏完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合，制得第二混合液，用第一混合液和第二混合液也分别对6周龄的Balb/c小鼠进行皮下注射，每次注射位点个数为6个，每次注射量为100μg，得到初次免疫小鼠，将KLH-NP-N免疫原和弗氏不完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合，制得第三混合液，将KLH-NP-C免疫原和弗氏不完全佐剂以质量比1:1的比例进行混合，制得第四混合液，用第三混合液和第四混合液分别对初次免疫两周后的小鼠重复免疫2次，每次间隔两周；

[0039] 5细胞融合：分别取三次免疫后1周的KLH-NP-N和KLH-NP-C组小鼠脾脏，将小鼠脾脏放入盛有5mLDMEM液的培养皿中，将脾脏夹碎，用尼龙网过滤，得到单细胞悬液，将单细胞悬液和于对数期的小鼠骨髓瘤细胞SP2/0细胞液以体积比1:1的比例混合，采用细胞融合仪进行细胞融合，融合后细胞铺板至96孔细胞培养板中，添加HAT筛选试剂，培养5天后进行一次全换液；

[0040] 6筛选检测：将NP-His筛选抗原包被至酶标板中，在温度为4℃的条件下，进行过夜培养后，用pH7.4的PBST洗涤三次，加封闭液37℃封闭2个小时后弃掉封闭液37℃烘干，分别将KLH-NP-N和KLH-NP-C组融合细胞的上清液每孔100μL加入酶标板中，在温度为37℃的条



件下,进行温育60min后,将质量分数为0.5%的羊抗小鼠IgG酶标二抗每孔100 $\mu$ L加入酶标板中,在温度为37 $^{\circ}$ C的条件下,进行温育60min后,将TMB单组份显色液每孔100 $\mu$ L加入酶标板中,室温作用20min后,每孔加入50 $\mu$ L终止液,进行间接ELISA筛选,保留阳性克隆;

[0041] 7稳定细胞株建立:分别将KLH-NP-N和KLH-NP-C组阳性克隆采用有限稀释法对检测阳性的杂交瘤细胞及时进行克隆化培养,筛选阳性亚克隆,直至阳性检出率为100%,得到杂交瘤稳定细胞株;

[0042] 8单克隆抗体生产:采用无血清发酵分别培养KLH-NP-N和KLH-NP-C组杂交瘤稳定细胞株,收集细胞培养上清液,将上清液、Prontein A、pH为7.4的磷酸缓冲液进行混合后,加入层析柱中,用pH为7.4的磷酸缓冲液作为平衡液,用pH为4.0的柠檬酸溶液脱洗抗体,再用pH为9.0的Tris-HCl缓冲液调节pH值为7.0,收集抗体,得到初级N蛋白单克隆抗体;

[0043] 9抗体偶联:步骤A1:将5mg辣根过氧化物酶溶于1mL去离子水中,制得辣根过氧化物酶溶液,将241mg高碘酸钠溶于10mL去离子水中,制得高碘酸钠溶液,将辣根过氧化物酶溶液加入高碘酸钠溶液中,在转速为200r/min,避光的室温条件下,进行搅拌20min后,得到混合液a,将混合液a加入透析袋中,对1mM, pH值4.4的醋酸钠缓冲液,在温度为4 $^{\circ}$ C的条件下,进行过夜透析,得到混合液b;

[0044] 步骤A2:向步骤A1制得的混合液b加入20 $\mu$ L, 0.2M, pH值9.5的碳酸盐缓冲液,使得醛化HRP的pH值为9.5后,分别加入6株溶解在0.01M碳酸盐缓冲液中单克隆抗体1mL,在转速为60r/min,避光的室温条件下,进行搅拌2h,制得6组混合液c1-混合液c6;

[0045] 步骤A3:将4mg硼氢化钠溶于1mL去离子水中,制得硼氢化钠溶液,将硼氢化钠溶液加入混合液c1-混合液c6中,搅拌均匀后,在温度为4 $^{\circ}$ C的条件下,保温2h后,装入透析袋中,在0.15M, pH值7.4的PBS缓冲液,温度为4 $^{\circ}$ C的条件下,进行过夜透析,得到混合液d1-混合液d6;

[0046] 步骤A4:向混合液d1-混合液d6中加入等体的饱和硫酸铵水溶液,在温度为4 $^{\circ}$ C的条件下,静置1h后,在转速为3000r/min的条件下,进行离心,去除上清液,将底物用半饱和硫酸铵水溶液进行洗涤两次,将底物溶于0.15M, pH值7.4的PBS中,制得混合液e1-混合液e6,将混合液e1-混合液e6分别装入透析袋中,在0.15M, pH值为7.4的PB缓冲盐水进行透析,去除铵离子后,在转速为10000r/min的条件下,进行离心30min,去除沉淀物,将上清液进行冻干保存;

[0047] 10配对抗体筛选:将未标记的抗体包被至酶标板中作为捕获抗体,将稀释后浓度为10ng/ml的NP-His筛选抗原加入酶标板中,在温度为37 $^{\circ}$ C的条件下,孵育30min,用PBST洗涤缓冲液洗去未结合的NP-His筛选抗原,在酶标板加入HRP标记后的抗体作为检测抗体,在温度为37 $^{\circ}$ C的条件下,孵育30min,用PBST洗涤缓冲液洗去未结合的标记抗体,在酶标板中加入TMB显色液,在温度为37 $^{\circ}$ C的条件下,孵育5min,在酶标板中加入2M的硫酸终止液,用酶标仪测定OD450读数,选择阳性孔,记录对应的抗体对,结果如下表1所示。

[0048] 表1

[0049]	检测抗体 捕获抗体	C-Anti	C-Anti	C-Anti	N-Anti	N-Anti	N-Anti
		1-HRP	2-HRP	3-HRP	1-HRP	2-HRP	3-HRP
	N-anti1	2.013	2.197	2.156	0.078	0.104	0.087
	N-anti2	2.134	2.067	2.201	0.097	0.107	0.096
	N-anti3	1.348	1.405	1.209	0.103	0.098	0.086
	C-anti1	0.104	0.087	0.078	2.784	2.805	1.766
	C-anti2	0.113	0.127	0.098	2.785	2.912	1.587
	C-anti3	0.098	0.097	0.108	2.903	2.867	1.579

[0050] 以上内容仅仅是对本发明的构思所作的举例和说明,所属本技术领域的技术人员对所描述的具体实施例做各种各样的修改或补充或采用类似的方式替代,只要不偏离发明的构思或者超越本权利要求书所定义的范围,均应属于本发明的保护范围。