



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113980099 A

(43) 申请公布日 2022. 01. 28

(21) 申请号 202110331945.1

(22) 申请日 2021.03.29

(71) 申请人 军事科学院军事医学研究院生命组  
学研究所

地址 102206 北京市昌平区生命科学园路  
38号

(72) 发明人 于晓波 梁特 张家辉 王红叶

(74) 专利代理机构 北京领科知识产权代理事务  
所(特殊普通合伙) 11690

代理人 徐丹丹 张丹

(51) Int. Cl.

C07K 14/165 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

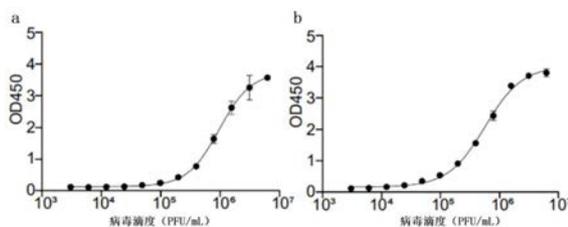
权利要求书1页 说明书7页  
序列表3页 附图2页

(54) 发明名称

新冠病毒的N抗原特定表位及其应用

(57) 摘要

本发明涉及新冠病毒SARS-CoV-2的N抗原特定表位及其应用,提供了一种多肽、包含多肽的试剂盒以及其在制备SARS-CoV-2的检测、诊断或药物筛选的产品中的应用。本发明还提供了一种SARS-CoV-2的检测方法以及药物筛选的方法。采用本发明所述的多肽设计或者筛选抗体,可以获得检测限低,特异性高、灵敏度高的优势。



1. 多肽在制备SARS-CoV-2的检测、诊断或药物筛选的产品中的应用,其特征在于,所述的多肽包含SEQ ID NO:1-15所示氨基酸中的任一个或两个以上的组合。

2. 多肽在检测SARS-CoV-2中的应用,其特征在于,所述的多肽包含SEQ ID NO:1-15所示氨基酸中的任一个或两个以上的组合。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述的多肽包含:

A) SEQ ID NO:1,以及SEQ ID NO:2和/或3;或者,

B) SEQ ID NO:1,以及SEQ ID NO:4-15中的任一种或两种以上的组合。

4. 一种多肽,其特征在于,所述的多肽包含SEQ ID NO:1-15所示氨基酸中的任一个或两个以上的组合。

5. 根据权利要求4所述的多肽,其特征在于,所述的多肽包含:

A) SEQ ID NO:1,以及SEQ ID NO:2和/或3;或者,

B) SEQ ID NO:1,以及SEQ ID NO:4-15中的任一种或两种以上的组合。

6. 一种SARS-CoV-2的检测或诊断的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒包含权利要求5所述的多肽。

7. 一种药物筛选的方法,其特征在于,所述的方法包括将权利要求4-5任一所述的多肽与待筛选样本接触。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述的方法包括:

将包含SEQ ID NO:1的多肽与待筛选样本接触,然后加入包含SEQ ID NO:2和/或3的多肽;或者,将包含SEQ ID NO:1的多肽与待筛选样本接触,然后加入包含SEQ ID NO:4-15中的任一种或两种以上的组合的多肽。

9. 一种SARS-CoV-2的检测方法,其特征在于,包含将捕获抗体与待检测样本接触,再加入检测抗体,所述的捕获抗体识别SEQ ID NO:1所示的多肽,所述的检测抗体识别SEQ ID NO:2-15任一种或两种以上的组合的多肽。

10. 根据权利要求9所述的检测方法,其特征在于,所述的检测方法包含将捕获抗体包被在载体上,封闭;加入待检测样本,孵育;加入检测抗体,孵育;加入标记抗体,孵育;终止反应。

## 新冠病毒的N抗原特定表位及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,具体涉及2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)检测、诊断和药物筛选的方法,以及多肽或针对多肽的抗体对在制备2019新型冠状病毒(SARS-CoV-2)检测、诊断和药物筛选的产品中的应用。

### 背景技术

[0002] 由新型冠状病毒-2(SARS-CoV-2)引起的新冠肺炎(COVID-19)已经成为一场世界性的流行病。抗体是对抗这场大流行疾病的重要材料,此外,在帮助人们研究新冠肺炎的发病机制,进行诊断检测,并开发中和SARS-CoV-2病毒活性的治疗方法方面也有重要作用。然而,抗体特异性识别和结合抗原的氨基酸序列(“表位”,“Epitopes”)对大多数新冠病毒抗体来说是未知的。

[0003] 新冠病毒(SARS-CoV-2)有四种主要的结构蛋白:刺突蛋白(Spike protein,S蛋白),核衣壳蛋白(Nucleocapsid,N蛋白),膜蛋白(Membrane protein,M蛋白),包膜蛋白(Envelope protein,E蛋白)。其中,S蛋白与在冠状病毒中含量丰富,S蛋白中RBD包含一个高度相似的核心结构和一段差异极大的受体结合基序(RBM),是识别血管紧张素转化酶2(ACE2)的主要结构,在筛选抗体,制备疫苗等等过程中发挥着至关重要的作用。N抗原作为结构蛋白,也可以用于检测或者诊断。

[0004] 目前,核酸和血清抗体检测仍然是新冠肺炎诊断的主要技术。例如,专利文献CN112409462A公开了一种SARS-CoV-2特异性抗原和SARS-COV-2免疫球蛋白的检测试剂盒,其包含S蛋白与N蛋白作为抗原进行检测,具有更低的假阳性和假阴性率。专利文献CN112485425A公开了检测唾液新型冠状病毒N-S抗原的试剂盒及其应用方法,该方法操作方便、检测周期短,易于判读。专利文献CN111999496A公开了一种SARS-CoV-2抗原抗体联合检测的试剂盒及其制备方法,其采用抗原抗体联合检测的试剂盒,该试剂盒中包含包被有S抗原的反应板。但是上述现有技术中并没有公开抗体所靶向的特定表位,对于抗体的设计只是针对全长S蛋白或者全长的N蛋白,其特异性、敏感性有限。

[0005] 因此,本申请提供了一种多肽,该多肽可以用于抗体的设计或者筛选,实现高度的特异性及敏感性,且抗体对的特异识别表位目前还未见报道。

### 发明内容

[0006] 本发明的第一方面,提供了一种多肽在制备SARS-CoV-2的检测、诊断或药物筛选的产品中的应用,所述的多肽包含SEQ ID NO:1-15所示氨基酸中的任一个或两个以上的组合。

[0007] 本发明的第二方面,提供了一种多肽在检测SARS-CoV-2中的应用,所述的多肽包含SEQ ID NO:1-15所示氨基酸中的任一个或两个以上的组合。

[0008] 优选的,所述的多肽包含:

[0009] A) SEQ ID NO:1,以及SEQ ID NO:2和/或3;或者,

[0010] B) SEQ ID NO:1,以及SEQ ID NO:4-15中的任一种或两种以上的组合。

[0011] 本发明的第三方面,提供了一种多肽,所述的多肽包含SEQ ID NO:1-15所示氨基酸中的任一个或两个以上的组合。

[0012] 优选的,所述的多肽包含:

[0013] A) SEQ ID NO:1,以及SEQ ID NO:2和/或3;或者,

[0014] B) SEQ ID NO:1,以及SEQ ID NO:4-15中的任一种或两种以上的组合。

[0015] 本发明的第四方面,提供了一种SARS-CoV-2的检测或诊断的试剂盒,所述的试剂盒包含上述的多肽。

[0016] 优选的,所述的试剂盒中还包含可以让多肽阵列式分布的基片。进一步优选的,所述的基片包括但不限于玻璃、硅片、陶瓷、云母、金属、塑料、高聚物膜等,优选为玻璃、硅片和陶瓷。

[0017] 本发明所述的多肽可以为一条氨基酸序列或者多条氨基酸序列的组合。

[0018] 本发明的第五方面,提供了一种药物筛选或验证药物功能的方法,所述的方法包括将上述的多肽与待筛选样本接触。

[0019] 优选的,所述的方法包括:

[0020] 将包含SEQ ID NO:1的多肽与待筛选样本接触,然后加入包含SEQ ID NO:2和/或3的多肽;或者,将包含SEQ ID NO:1的多肽与待筛选样本接触,然后加入包含SEQ ID NO:4-15中的任一种或两种以上的组合的多肽。

[0021] 本发明的第六方面,提供了一种SARS-CoV-2的检测方法,包含将捕获抗体与待检测样本接触,再加入检测抗体,所述的捕获抗体识别SEQ ID NO:1所示的多肽,所述的检测抗体识别SEQ ID NO:2-15任一种或两种以上的组合的多肽。

[0022] 优选的,所述的检测方法包含将捕获抗体包被在载体上,封闭;加入待检测样本,孵育;加入检测抗体,孵育;加入标记抗体,孵育;终止反应。

[0023] 本发明的第七方面,提供了抗体对在制备检测或诊断SARS-CoV-2的产品中的应用,所述的抗体对包括捕获抗体和检测抗体,所述的捕获抗体识别表位包括SEQ ID NO:1所示的表位,所述的检测抗体识别表位包括a) SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的表位,和/或b) SEQ ID NO:4-15所示表位中的任一个或两个以上的组合。

[0024] 本发明的第八方面,提供了抗体对在检测SARS-CoV-2中的应用,所述的抗体对包括捕获抗体和检测抗体,所述的捕获抗体识别表位包括SEQ ID NO:1所示的表位,所述的检测抗体识别表位包括a) SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的表位,和/或b) SEQ ID NO:4-15所示表位中的任一个或两个以上的组合。

[0025] 优选的,所述的抗体对靶向SARS-CoV-2的orflab polyprotein、S glycoprotein、ORF3a protein、envelope protein、membrane glycoprotein、ORF6 protein、ORF7a protein、ORF8 protein、nucleocapsid phosphoprotein和/或ORF10 protein蛋白,具体见表1。

[0026] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的抗体对靶向SARS-CoV-2的N蛋白(NP\_828858.1)特定表位。

[0027] 表1 SARS-CoV-2冠状病毒编码的蛋白

	蛋白名称	蛋白简称	Genbank 号
	orflab polyprotein		QHD43415.1
	S glycoprotein	S	QHD43416.1
	ORF3a protein		QHD43417.1
[0028]	envelope protein	E	QHD43418.1
	membrane glycoprotein	M	QHD43419.1
	ORF6 protein		QHD43420.1
	ORF7a protein		QHD43421.1
	ORF8 protein		QHD43422.1
[0029]	nucleocapsid phosphoprotein	N	QHD43423.2
	ORF10 protein		QHI42199.1

[0030] 具体的,捕获抗体识别表位和检测抗体识别表位所包含的表位如表2所示:

[0031] 表2

抗体 ID	靶向的抗原	靶向位置	抗体识别的表位或多肽
#14	N	N-10	96-GGDGK-100 (SEQ ID NO: 1)
#12	N	N-28	276-RRGPE-280 (SEQ ID NO: 2)
		N-40	396-PAADL-400 (SEQ ID NO: 3)
#13	N	N-2	16-TFGGP-20 (SEQ ID NO: 4)
		N-9	86-YYRRA-90 (SEQ ID NO: 5)
		N-11	106-PRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI-130 (SEQ ID NO: 6)
[0032]		N-12	
		N-13	
		N-15	146-IGTRN-150 (SEQ ID NO: 7)
		N-17	166-TLPKG-170 (SEQ ID NO: 8)
		N-21	206-SPARM-210 (SEQ ID NO: 9)
		N-23	226-RLNQL-230 (SEQ ID NO: 10)
		N-28	276-RRGPE-280 (SEQ ID NO: 11)
		N-30	296-TDYKH-300 (SEQ ID NO: 12)
		N-33	326-PSGTW-330 (SEQ ID NO: 13)
[0033]		N-38	376-ADETQ-380 (SEQ ID NO: 14)
		N-40	396-PAADL-400 (SEQ ID NO: 15)

[0034] 优选的,所述的产品可以为试剂盒、芯片等等。

[0035] 本发明的第九方面,提供了抗体对识别表位或多肽作为药物靶标或治疗靶标在制备新冠病毒引发的疾病治疗药物方面的应用。

[0036] 本发明的第十方面,提供了一种抗体对,所述的抗体对包括捕获抗体和检测抗体,所述的捕获抗体识别表位包括SEQ ID NO:1所示的表位,所述的检测抗体识别表位包括a) SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3所示的表位,和/或b) SEQ ID NO:4-15所示表位中的任一个或两个以上的组合。

[0037] 本发明的第十一方面,提供了一种SARS-CoV-2的检测或诊断的试剂盒,所述的试剂盒包含上述的抗体对识别表位或多肽或者上述抗体对。优选的,所述的试剂盒还包含载体、洗涤液、封闭液、标记抗体、显色液和/或终止反应液。

[0038] 进一步优选的,所述的载体可以为任何能够支撑抗原抗体反应的容器或平板。进一步优选为96孔板。

[0039] 进一步优选的,所述的洗涤液可以为PBST或包含PBST的溶液。

[0040] 进一步优选的,所述的封闭液可以为PBST和/或牛奶。进一步优选为0.2%PBST+5%脱脂牛奶。

[0041] 进一步优选的,所述的标记抗体可以为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG抗体。

[0042] 进一步优选的,所述的显色液可以为3',3',5',5',-四甲基联苯胺(TMB)。

[0043] 进一步优选的,所述的终止反应液可以为硫酸、盐酸或NaOH。

[0044] 本发明的第十二方面,提供了一种SARS-CoV-2的检测方法,包含将捕获抗体与待检测样本接触,再加入检测抗体。

[0045] 优选的,所述的检测方法包含将捕获抗体包被在载体上,封闭;加入待检测样本,孵育;加入检测抗体,孵育;加入标记抗体,孵育;终止反应。

[0046] 进一步优选的,所述的载体可以为96孔板。

[0047] 进一步优选的,所述的封闭为使用封闭液(优选为0.2%PBST+5%脱脂牛奶)30-40℃(优选为37℃)封闭。

[0048] 进一步优选的,所述的标记抗体可以为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG抗体。

[0049] 在本发明的一个具体实施方式中,所述的待检测样本可以为任何含有SARS-CoV-2蛋白(包括S蛋白、N蛋白、M蛋白或E蛋白,优选为N蛋白)样本。具体可以为人或非人动物血液、血清、细胞、组织或器官(例如鼻咽拭子、深咳痰液、肺泡灌洗液、肺组织活检标本),或者可以为人或非人动物的离体的血液、血清、细胞、组织或器官(例如鼻咽拭子、深咳痰液、肺泡灌洗液、肺组织活检标本),或者也可以为任何生活用品、建筑等等可以SARS-CoV-2附着物品,例如雪糕、肉类、海鲜、食品包装、楼梯把手、桌面等等。

[0050] 基于上述待检测样本的不同,本申请所述的SARS-CoV-2的检测方法可以为治疗目的也可以为非治疗目的。

[0051] 优选的,所述的孵育温度为30-40,进一步优选为37℃。

[0052] 优选的,所述的孵育时间为0.5-2h,进一步优选为1h。

[0053] 优选的,所述的标记抗体可以为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG抗体。

[0054] 在本发明的一个具体实施方式中,将捕获抗体包被在96孔板中,4℃过夜,清洗后在0.2%PBST+5%脱脂牛奶中37℃封闭1h;使用0.2%的PBST清洗后,加入待检测样本,37℃孵育1h;清洗后加入检测抗体,37℃下孵育1h;PBST清洗后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记

的羊抗兔IgG抗体,37℃孵育1h;PBST清洗后加入3',3',5',5',-四甲基联苯胺(TMB),然后加入终止反应液。

[0055] 优选还包括在450nm处的检测吸光度的步骤。

[0056] 本发明所述的捕获抗体或者检测抗体,可以为抗体的常规形式,或者抗原结合片段。当然也可以为单链抗体、单域抗体。可以为单克隆抗体也可以为多克隆抗体。还包含如Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、scFv、(Fab')<sub>2</sub>、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体的片段。

[0057] 本发明所述的“检测”为确定待检测样本中是否含有新型冠状病毒-2(SARS-CoV-2)或者是否含有自身抗体。

[0058] 本发明所述的“诊断”为确认个体是否因感染SARS-CoV-2而导致新冠肺炎(COVID-19)

### 附图说明

[0059] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施例,其中:

[0060] 图1:新冠病毒N抗原抗体对的抗体识别表位,其中,a为#14识别表位,b为#12识别表位,c为#13识别表位, $Z\text{-score} = (x - \mu) / \sigma$ 其中,x是观测值, $\mu$ 是该组数据的平均值, $\sigma$ 是该组数据的标准差。

[0061] 图2:ELISA法检测SARS-CoV-2重组N蛋白结果,其中,a代表配对1,b代表配对2。

[0062] 图3:ELISA法检测SARS-CoV-2病毒感染的VERO细胞培养液N蛋白结果,其中,a代表配对1,b代表配对2。

### 具体实施方式

[0063] 下面结合实施例对本发明提供的具体实施方式进行具体说明。

[0064] 本申请中使用的抗体、细胞及试剂的来源:

[0065] 抗体#12,购买自北京义翘神州科技股份有限公司(Sino Biological Inc.),货号40143-R001,抗体类型MAb,宿主Rabbit;

[0066] 抗体#13,购买自北京义翘神州科技股份有限公司(Sino Biological Inc.),货号40143-RP01,抗体类型PAb,宿主Rabbit;

[0067] 抗体#14,购买自北京义翘神州科技股份有限公司(Sino Biological Inc.),货号40143-MM05,抗体类型MAb,宿主Mouse;

[0068] 重组新冠病毒N蛋白,购买自北京义翘神州科技股份有限公司(Sino Biological, Inc),货号40588-V08B。

[0069] 实施例1确定检测SARS-CoV-2的抗体对识别表位

[0070] 依照CN202010215184.9(申请日:2020-03-24)记载的从NCBI数据中提取的SARS-CoV-2所有编码蛋白序列,设计和制备SARS-CoV-2病毒蛋白质组多肽芯片,实现对新型肺炎病毒感染患者血液中所有SARS-CoV-2病毒抗体的全景式扫描,其全部发明内容均可作为本发明的内容。

[0071] 与多肽芯片起特异性反应的抗体表位如图1所示。

[0072] 实施例2酶联免疫吸附试验检测SARS-CoV-2核衣壳蛋白

[0073] 实验步骤:将抗体#14包被到96孔板中(Corning,USA)4℃过夜,清洗后在0.2%

PBST+5%脱脂牛奶中37℃封闭1h。使用0.2%的PBST清洗后,将稀释的重组新冠病毒N蛋白或SARS-CoV-2IME-BJ01株感染2-3天后灭活的VERO细胞培养物(参考文献Esparza,Thomas J et al.“High affinity nanobodies block SARS-CoV-2spike receptor binding domain interaction with human angiotensin converting enzyme.”Scientific reportsvol.10,1 22370.22Dec.2020.)加入96孔板中,37℃孵育1h,清洗后,加入抗体#12或#13。在37℃下孵育1h后,PBST清洗。将辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔IgG抗体(CoWin Biosciences,China)加入96孔板中,37℃孵育1h,用PBST清洗后,加入3',3',5',5',-四甲基联苯胺(TMB)(CoWin Biosciences,China),加入酶联免疫吸附试验终止反应液(Solarbio,China)。短暂摇晃平板后,读出450nm处的吸光度。

[0074] 其中,捕获抗体为:#14;检测抗体为(#12,#13),代表两个抗体对(配对1:#14和#12,配对2:#14和#13)。

[0075] 统计分析:使用GraphPad Prism软件和Microsoft Excel进行统计分析

[0076] 实验结果:ELISA法检测SARS-CoV-2重组N蛋白,配对1和配对2的检测限度分别为1.425ng/mL和1.03ng/mL(图2a和图2b);ELISA法检测SARS-CoV-2病毒感染的VERO细胞培养液N蛋白检测限度LOD分别为 $1.119 \times 10^5$ PFU/mL(配对1,图3a)和 $1.615 \times 10^4$ PFU/mL(配对2,图3b)。即以抗体对(#14和#12,#14和#13)为基础的ELISA方法在临床检测SARS-CoV-2方面具有很大的潜力。

[0077] 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,在不脱离本发明方法的前提下,还可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

## 序列表

<110> 军事科学院军事医学研究院生命组学研究所

<120> 新冠病毒的N抗原特定表位及其应用

<130> 1

<160> 15

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

Gly Gly Asp Gly Lys

1                    5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

Arg Arg Gly Pro Glu

1                    5

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 3

Pro Ala Ala Asp Leu

1                    5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 4

Thr Phe Gly Gly Pro

1                    5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 5

Tyr Tyr Arg Arg Ala

1                    5

<210> 6

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 6

Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu

1                    5                    10                    15

Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp Gly Ile

                  20                    25

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 7

Ile Gly Thr Arg Asn

1                    5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 8

Thr Leu Pro Lys Gly

1                    5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 9

Ser Pro Ala Arg Met

1                    5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 10

Arg Leu Asn Gln Leu

1 5  
<210> 11  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 11  
Arg Arg Gly Pro Glu  
1 5  
<210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 12  
Thr Asp Tyr Lys His  
1 5  
<210> 13  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 13  
Pro Ser Gly Thr Trp  
1 5  
<210> 14  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 14  
Ala Asp Glu Thr Gln  
1 5  
<210> 15  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)  
<400> 15  
Pro Ala Ala Asp Leu  
1 5

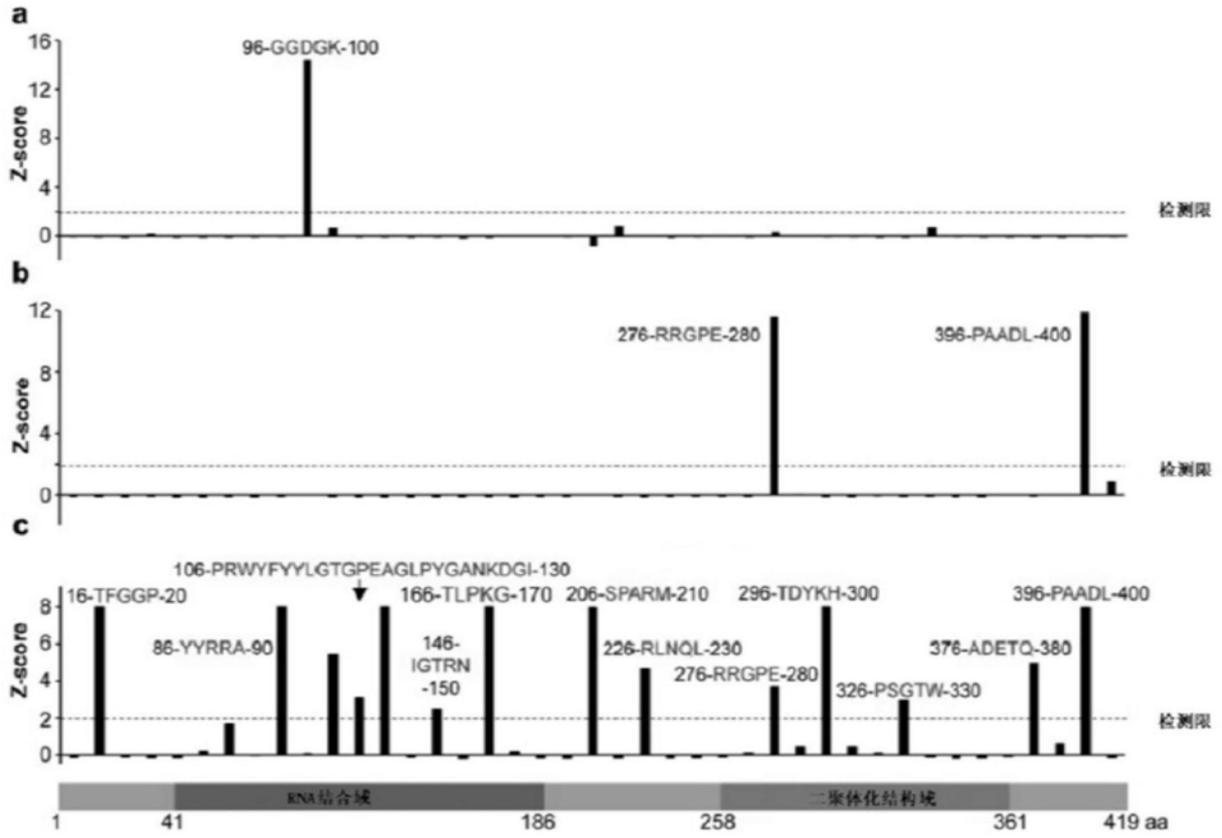


图1

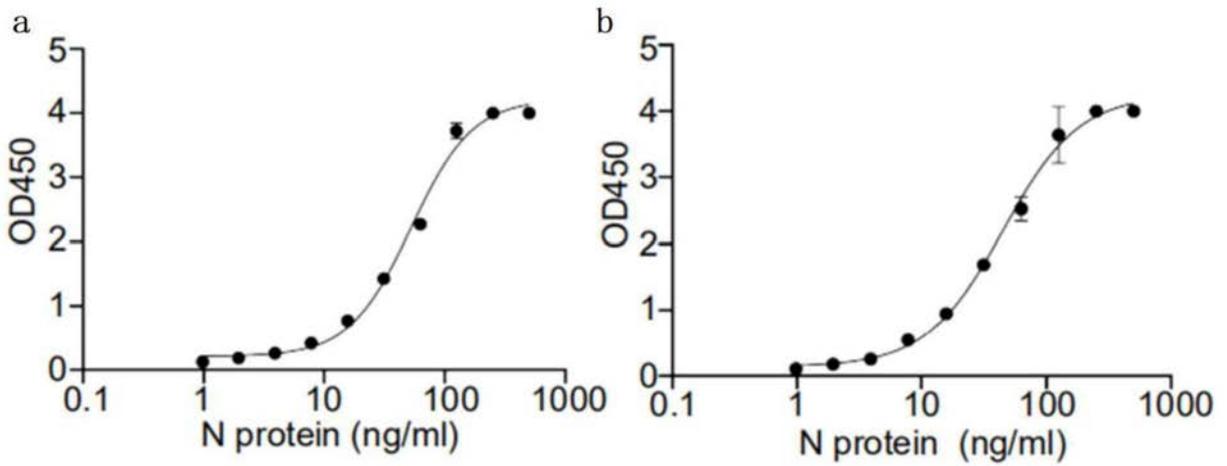


图2

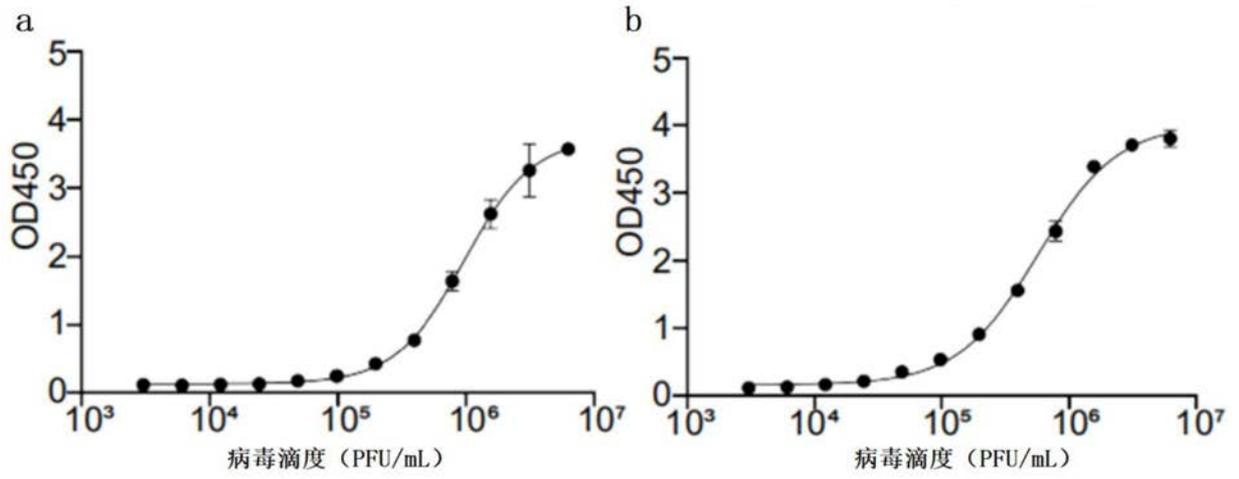


图3