



(21) 申请号 202211006438.1

(22) 申请日 2022.08.22

(83) 生物保藏信息

CGMCC No.16682 2018.10.12

CGMCC No.16683 2018.10.12

(71) 申请人 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所  
(中国动物卫生与流行病学中心哈  
尔滨分中心)

地址 150000 黑龙江省哈尔滨市南岗区马  
端街427号

(72) 发明人 郑永辉 于长清 周玉龙 张险峰  
李苏楠 王祥斌 赵瑞

(74) 专利代理机构 北京象合知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11893

专利代理师 封明艳

(51) Int.Cl.

*C07K 16/10* (2006.01)

*C12N 5/20* (2006.01)

*C12N 15/13* (2006.01)

*A61K 39/42* (2006.01)

*A61P 31/14* (2006.01)

*A61P 35/02* (2006.01)

*G01N 33/577* (2006.01)

*G01N 33/569* (2006.01)

*C12R 1/91* (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页  
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

牛白血病病毒抗体及检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及牛白血病病毒BLV P24单克隆抗体及其活性片段,其靶向牛白血病病毒的P24蛋白主要中和表位。本发明还涉及使用BLV P24单克隆抗体或其活性片段用于预防和治疗牛白血病病毒引起的牛白血病的方法和组合物,以及确定、鉴别和/或定量样品或疫苗中的牛白血病病毒BLV的方法和试剂盒。

1. 特异性结合牛白血病病毒BLV P24的中和构象表位的单克隆抗体或其活性片段,其中所述中和构象表位:(a)包含氨基酸GQKLQACAHW,或者(b)包含氨基酸GDLRSQYQN。

2. 如权利要求1所述的单克隆抗体或其活性片段,其中所述牛白血病病毒BLV P24的中和构象表位:(a)是鼠单克隆抗体P24-44-10特异性结合的表位,或者(b)是鼠单克隆抗体P24-115-5特异性结合的表位,产生所述单克隆抗体P24-44-10的杂交瘤细胞株P44保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏号为:CGMCC为NO.16682,产生单克隆抗体P24-115-5的杂交瘤细胞株菌株P115保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏号为:CGMCC NO.号为16683。

3. 如权利要求1所述的单克隆抗体或其活性片段,其中所述单克隆抗体是:(a)鼠单克隆抗体P24-44-10,或者(b)鼠单克隆抗体P24-115-5。

4. 由杂交瘤293T细胞产生的单克隆抗体P24-44-10或P24-115-5,产生所述单克隆抗体P24-44-10的杂交瘤细胞株P44保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏号为:CGMCC为NO.16682,产生所述单克隆抗体P24-115-5的杂交瘤细胞株菌株P115保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏,保藏号为:CGMCC NO.号为16683。

5. 一种离体检测生物样品中牛白血病病毒BLV的方法,包括将样品与第一抗体接触,其中所述第一抗体是权利要求1-4任一项的单克隆抗体或其活性片段,及确定牛白血病病毒BLV的存在或不存在。

6. 权利要求5的方法,其进一步包括将样品与特异性结合牛白血病病毒BLV的P24表位的第二抗体接触,其中所述第二抗体含有可检测元件或者与可检测元件缀合,其中所述与第二抗体接触在所述确定之前进行。

7. 权利要求6的方法,其中第二抗体是权利要求1-4任一项的单克隆抗体或其活性片段,其中第一抗体是单克隆抗体P24-44-10或者单克隆抗体P24-115-5之一,且第二抗体是所述单克隆抗体P24-44-10或单克隆抗体P24-115-5中的另一种。

8. 一种检测生物样品中牛白血病病毒BLV的试剂盒,其包含第一抗体,其中第一抗体是权利要求1-4任一项的单克隆抗体或抗体片段。

9. 权利要求8的试剂盒,其进一步包括特异性结合牛白血病病毒BLV的P24表位的第二抗体,其中所述第二抗体含有可检测元件或者与可检测元件缀合。

10. 权利要求9的试剂盒,其中第二抗体是权利要求1-4任一项的单克隆抗体或其活性片段,且第二抗体是所述单克隆抗体P24-44-10或单克隆抗体P24-115-5中的另一种。

## 牛白血病病毒抗体及检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种病毒抗体及病毒检测试剂盒,具体针对牛白血病病毒的抗体及检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 牛白血病病毒(bovine leukemia virus,BLV)是一种可以感染许多反刍动物的逆转录病毒。其感染的主要宿主是奶牛和绵羊,并可引起地方流行性牛白血病(enzootic bovine leukosis,EBL),主要临床症状表现为淋巴细胞恶性增生,奶牛的产奶量降低以及肉牛的进行性消瘦等。该病在欧洲、美国和日本等许多国家均有报道,给养牛业产生了较大危害。我国上世纪70年代,在上海首次发现该病后,全国许多省份均有报道。最近,Yang Y et al对我国15个省份进行牛白血病调查研究,发现BLV在临床感染比较严重,其感染可降低奶牛产奶量,对我国养牛业和奶业产生了严重危害;2015年对黑龙江省6大城市的临床检测表明,BLV呈普遍感染趋势,部分地区感染严重,感染率超过50%。值得注意的是,近期有人乳腺组织中检出BLV前病毒DNA的报道,证明人乳腺癌病例与BLV感染相关。因此,控制BLV的感染不仅对畜牧业生产有重要意义,对公共生物安全也有重要意义。目前,临床上尚无有效的用于BLV防治的疫苗。我国以及美国和日本等国家BLV的防控以检测为主,隔离淘汰病患宿主,欧盟国家以检测扑杀方式避免该病的感染传播。

[0003] BLV感染的检测可以进行病毒核酸和抗原检测以及宿主体内该病毒的抗体检测。病毒核酸检测方法主要是检测病毒在宿主体内的前病毒DNA,可以应用巢式PCR方法和荧光定量PCR方法。目前,有许多BLV前病毒核酸检测的方法的文章发表。存在的问题是,在实验室范围内应用这些检测方法尚可。而大规模样本检测,这些方法对临床技术人员的专业水平要求较高,且一旦管理控制不严格,容易造成小范围检测环境DNA污染,给检测结果准确性带来很大影响。

[0004] 市场范围内,已经成型的检测试剂盒均是应用检测宿主体内该病毒的抗体水平,尚无直接检测该病毒抗原的试剂盒,部分原因为该病毒在宿主体内是低水平复制,抗原量很低,对试剂盒研发的灵敏度要求极高。宿主体内针对BLV GP51囊膜蛋白和P24衣壳蛋白的抗体水平最高,易于临床检测。目前,BLV GP51抗体检测试剂盒已经商业化,主要是国外一些试剂公司生产研发完成,检测效果比较理想,但是检测费用价格昂贵,对于种群的长期连续性检测,需要具有一定的经济实力。国内也有简易检测BLV GP51抗体的试剂盒,对于种群的初步筛选检测有较好效果。然而对于需要达到种群净化的目标尚有一段距离。总体而言,我国国内缺乏有效的检测BLV感染的抗体检测试剂盒。需要指出的是,国内外尚无有效的、商品化的针对BLV P24蛋白的检测试剂盒。国外进口商品化GP51检测试剂盒虽然检测精准度较为理想,但如果能与高效的P24检测试剂盒配合使用,可能更有利于达到BLV感染种群净化的目的。

## 发明内容

[0005] 基于以上情况,本发明人拟研制针对BLV P24蛋白的高效抗体检测试剂盒,具体是应用大肠杆菌原核表达系统制备了P24蛋白,经体外亲和标签纯化免疫小鼠后,成功筛选制备了两株抗BLV P24蛋白的单克隆抗体,为后续该BLV抗体检测试剂盒的研发提供了良好基础。

[0006] 本发明涉及牛白血病病毒BLV P24单克隆抗体及其活性片段,其靶向牛白血病病毒的P24蛋白主要中和表位。进一步本发明还涉及使用BLV P24单克隆抗体或其活性片段用于预防和治疗牛白血病病毒引起的牛白血病的方法和组合物。以及进一步涉及确定、鉴别和/或定量样品或疫苗中的牛白血病病毒BLV的方法和试剂盒。

[0007] 基于此,一方面,本发明提供一种特异于牛白血病病毒BLV P24的主要构象表位的单克隆抗体及其活性片段即抗原结合片段(也称作抗体片段)。所述单克隆抗体或其片段特异性结合牛白血病病毒BLV P24的构象表位。所述构象表位之一是P24蛋白的全长氨基酸的中第304位至第315位,其序列为QKLQACAHW所示,相应的所述单克隆抗体是由鼠杂交瘤细胞293T细胞产生的P24-44-10。进一步由鼠杂交瘤细胞293T细胞产生的单克隆抗体为P24-115-5,识别P24蛋白表位的是全长氨基酸的中第216位至第225位,其序列为GDLRSQYQN所示,相应的所述单克隆抗体是由鼠杂交瘤293T细胞产生的另一株P24-115-5。由于所述两株单抗识别BLV P24蛋白的不同区域,因识别表位不同,两株抗体可能同时结合同一个BLV P24蛋白分子,也可能结合不同的BLV P24分子。

[0008] 进一步,本发明提供了编码所述单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸,所述核酸编码P24-44-10或P24-115-5或者其抗原结合片段。进一步,本发明提供了包含所述核酸的载体以及包含和表达所述载体的细胞。

[0009] 再一方面,本发明提供了使用P24-44-10或P24-115-5或其片段预防和治疗牛白血病的方法和组合物。进一步本发明提供一种药物组合物,其包含本发明描述的单克隆抗体及药物可接受的稀释剂或载体,所述单克隆抗体是P24-44-10或P24-115-5。进一步,所述药物组合物,包含本发明所述的抗原结合片段及药物可接受的稀释剂或载体,所述抗原结合片段是P24-44-10或P24-115-5的抗原结合片段。再进一步,所述药物组合物包含编码所述抗体或抗体片段的核酸分子及药物可接受的稀释剂或载体。进一步,所述药物组合物包含具有所述核酸的载体及药物可接受的稀释剂或载体。进一步,所述药物组合物包含表达所述载体的细胞及药物可接受的稀释剂或载体。

[0010] 进一步,本发明提供一种减少对象被牛白血病病毒感染或者降低对象中牛白血病病毒感染风险的方法。其中所述方法包括给牲畜施用治疗有效量的本发明所述单克隆抗体或其抗原结合片段、包含编码所述抗体或抗体片段的多核苷酸的核酸分子、包含所述多核苷酸的载体或者表达所述载体的细胞。所述单克隆抗体是P24-44-10或P24-115-5。

[0011] 第三方面,本发明提供使用所述单克隆抗体或其片段鉴别、表征和/或定量P24表达的方法和组合物。在本发明中,所述单克隆抗体是P24-44-10或P24-115-5,所述方法包括检测牛白血病病毒与本发明所述的单克隆抗体或其片段的结合。本发明通过结合蛋白的免疫荧光测定(IFA)、免疫组织化学测定及其它方法,包括ELISA、血凝抑制(HI)测定及病毒中和(VN)测定。

[0012] 在本发明中,所述鉴别和/或定量BLV P24表达的方法和组合物是用于鉴别和/或

定量疫苗中的牛白血病毒免疫原性物质。所述免疫原性物质包含BLV P24蛋白或其抗原性部分,或者编码P24蛋白或其抗原性部分的核酸。进一步,所述抗原性部分包括P24的表位。在本发明中,所述免疫原性物质是包含P24的病毒。进一步,所述病毒是灭活的;更进一步,所述病毒是减毒的病毒,或所述病毒是病毒体(virosome)形式。再进一步,所述病毒是得自鸡蛋或者得自细胞培养。在本发明方案中,所述免疫原性物质是包含P24的裂解病毒(split virus)或者裂解病毒抗原性制备物。进一步,所述免疫原性物质是P24或其抗原性部分。更进一步,所述P24或其抗原性部分已经被分离。在本发明进一步的方案中,所述P24或其抗原性部分是由表达系统产生的,所述表达系统是何种表达系统,如病毒表达载体。

[0013] 第四方面,本发明提供了检测生物样品中牛白血病毒或者检测生物样品中针对牛白血病毒BLV P24的抗体的试剂盒和方法。在检测生物样品中牛白血病毒BLV的一个方案中,所述方法包括将样品与第一抗体接触,所述第一抗体是本发明所述的单克隆抗体P24-44-10或P24-115-5或其抗体片段(被称作捕获抗体)。进一步,所述方法进一步包括将样品与如本发明所述的特异性结合牛白血病毒BLV P24的第二抗体或其抗体片段接触,其中第二抗体含有或者与可检测元件缀合(被称作检测抗体)。更进一步,所述方法包括将所述生物样品与第三抗体接触,所述第三抗体是指与BLV病毒除P24蛋白之外的其他免疫原性物质结合的抗体如GP51。

[0014] 在本发明的一个具体方案中,所述试剂盒包含第一抗体及进行检测牛白血病毒的测定的说明书,所述第一抗体是本发明描述的单克隆抗体或其抗体片段。所述单克隆抗体是P24-44-10或P24-115-5。进一步,所述试剂盒进一步包含特异性结合牛白血病毒BLV P24表位的第二抗体,其中第二抗体含有或者与可检测元件缀合。所述第二抗体是P24-44-10或P24-115-5,所述第二抗体含有放射性原子,与荧光分子缀合,或者与酶缀合。更进一步,所述试剂盒含有特异性结合牛白血病毒BLV其他抗原性物质的抗体如GP51。

[0015] 本发明所述产生单克隆抗体P24-44-10的杂交瘤细胞株P44,分类学命名为鼠杂交瘤细胞株P44;保藏日期为:2018年10月12日;保藏单位为在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心藏;保藏编号:CGMCCN0.16682;保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

本发明所述产生单克隆抗体P24-115-5的杂交瘤细胞株P115,其分类学命名为鼠杂交瘤细胞株P115;保藏日期:2018年10月12日;保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;保藏号:CGMCCN0.16683;保藏地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号。

## 附图说明

[0016] 图1:BLV P24的表达与纯化,其中A.P24-GST的表达与纯化,B.P24-6×His重组蛋白的表达与纯化,M,蛋白质marker。

[0017] 图2:小鼠免疫P24蛋白后的血清抗体滴度,其中OD值大于0.2为有效血清滴度。

[0018] 图3:抗BLV P24蛋白的杂交瘤阳性株的多轮次筛选。

[0019] 图4:不同杂交瘤阳性株与BLV Gag蛋白识别与结合能力的细胞水平验证。

[0020] 图5:杂交瘤细胞分泌单克隆抗体亚型检测。

[0021] 图6:杂交瘤细胞株的单克隆筛选。

[0022] 图7:两株单克隆抗体的表位鉴定。A:45-10号单克隆抗体的表位鉴定,B:115-5号

单克隆抗体的表位鉴定。

[0023] 图8:两株单克隆抗体的特异性检测。A:44-10/115-5与BLV P24的间接免疫荧光检测,B:44-10/115-5与BVDV的间接免疫荧光检测,C:44-10/115-5与FMDV的ELISA检测。

### 具体实施方式

[0024] 本发明所用术语“抗体”是本领域公认的术语,是指结合已知抗原的分子或分子的活性片段,特别是免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有特异性结合抗原的结合位点的分子。免疫球蛋白是包含基本上由免疫球蛋白 $\kappa$ 和 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 和 $\mu$ 恒定区基因以及众多免疫球蛋白可变区基因编码的一或多个多肽的蛋白。轻链分类为 $\kappa$ 或 $\lambda$ 。重链分类为 $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$ 或 $\epsilon$ ,其进而分别定义免疫球蛋白类别IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。重链的亚类也已知。

[0025] 本发明所用关于抗体的“特异性结合”是指抗体结合其靶抗原的亲和力高于其与结构不同的抗原的结合亲和力。

[0026] 已知典型的免疫球蛋白结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一“轻链”(大约25kD)和一“重链”(大约50-70kD)。每条链的N末端定义一个大约100-110或更多个氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。术语可变轻链( $V_L$ )和可变重链( $V_H$ )分别是指这些轻链和重链。

[0027] 抗体以全长完整的抗体或者以许多充分鉴定的通过各种肽酶或化合物消化而产生的片段而存在。本发明所述“抗体”包括嵌合的单克隆抗体,以及其活性片段。结合已知抗原的分子的活性片段例如包括分开的轻链和重链、Fab、Fab/c、Fv、Fab'和F(ab')<sub>2</sub>片段,包括Fab免疫球蛋白表达文库的产物及上述任何抗体和片段的表位结合片段。

[0028] 术语“单克隆抗体”在本领域也充分认可,是指单克隆的抗体生产细胞的产物。单克隆抗体典型是通过融合正常短存活的抗体生产B细胞与快速生长细胞如癌细胞(有时称作“永生细胞”)而产生的。所得的杂交细胞或者杂交瘤快速倍增,获得产生抗体的克隆。

[0029] 术语“片段”是指抗体或抗体链的一部分,其包含比完整的或完全的抗体或抗体链较少的氨基酸残基。片段可以通过化学或酶处理完整或完全抗体或抗体链而获得。片段也可以通过重组方式获得。举例的片段包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc和/或Fv片段。术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋白或抗体的结合抗原或与完整抗体竞争结合抗原(即特异性结合)的多肽片段。结合片段是通过重组DNA技术产生的,或者通过酶或化学裂解完整免疫球蛋白产生的。结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fabc、Fv、单链和单链抗体。

[0030] 本发明所用关于“分离的”是指不含其天然伴随的至少一些组分的生物分子。

[0031] 本发明通过如下实施例描述,所述实施例用于例证本发明。

[0032] 实施例1:质粒构建

[0033] BLV P24衣壳蛋白基因合成后,定向克隆至原核表达p-coldIII-GST载体与pet-32a-6×His载体。BLV Gag(扩增于实验室保存样本)全长基因定向克隆至真核表达载体pcDNA3.1(+)(C-末端HA标签)。P24截短基因片段与pCAGGS-载体(C-末端FLag标签)连接后,构建系列P24基因截短系列P24-1,P24-2,P24-3,P24-4,1A,1B,1C,3A,3B,3C,3D,并制备成相应的重组载体pcDNA3.1-HA,用于单克隆抗体的表位鉴定。载体构建应用Vazemy重组克隆技术完成。其中p24-1基因序列(也就是全长P24基因)和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:

1和2所示、p24-2基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:3和4所示、p24-3基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:5和6所示、p24-4基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:7和8所示、p24-5基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:9和10所示、24-1A基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:11和12所示、p24-1B基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:13和14所示、p24-1C基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:15和16所示、p24-3A基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:17和18所示、p24-3B基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:19和20所示、p24-3C基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:21和22所示、p24-3D基因序列和蛋白序列分别如序列表SEQ ID NO:23和24所示。其中需要说明的是,P24蛋白较小,因此在其N-端融合了GAG蛋白的NC部分,这样可以增加蛋白的分子量,易于体外检测,并且并不影响单克隆抗体对其序列的识别。

[0034] 实施例2:P24蛋白表达与检测及标签蛋白纯化与检测

[0035] 24-p-coldIII-GST载体转化至BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞,过夜18℃低温培养,1mM IPTG诱导,18小时后收集菌体。P24-pet-32a-6×His载体转化至BL21 (DE3) 大肠杆菌感受态细胞,30℃过夜培养,18小时后收集菌体。以上大肠杆菌菌体经超声裂解后,分别收集上清样本和沉淀样本后,进行SDS-PAGE电泳检测。Gag-pcDNA3.1-HA转染293T细胞,48小时后收集样本进行SDS-PAGE, WB检测Gag基因表达以及验证抗体识别的特异性。P24基因截短系列重组载体转染293T细胞,48小时后收集样本进行SDS-PAGE, WB检测抗体表位识别。Gag-pcDNA3.1-HA转染293T细胞,24小时后0.1% Triton打孔后,P24杂交瘤腹水孵育,进行简间接免疫荧光实验(IFA),验证单克隆抗体特异性。

[0036] P24-p-coldIII-GST重组质粒转化至BL21 (DE3) 大肠杆菌, IPTG诱导后经超声破碎,低速离心弃沉淀取上清。上清液与偶联GST标签抗体的磁珠低温过夜孵育,然后用洗脱液洗涤后用于杂交瘤的ELISA筛选(SolarBio company)。类似地,P24-pet-32a-6×His经Ni-柱纯化系统获取重组蛋白(SolarBio company),免疫小鼠以制备单克隆抗体。Gag-pcDNA3.1-HA重组质粒测序验证后,抗HA-标签HRP-标记抗体重组蛋白293T细胞内的表达。

[0037] 结果见图1:其中A.P24-GST的表达与纯化1,诱导前上清;2,诱导前沉淀;3,诱导14小时上清;4,诱导14小时沉淀;5,蛋白沉淀尿素复性纯化结果;M,蛋白质marker。B.P24-6×His重组蛋白的表达与纯化1,诱导前上清;2,诱导前沉淀;3,诱导1小时上清;4,诱导1小时沉淀;5,诱导2小时上清;6,诱导2小时沉淀;7,诱导4小时上清;8,诱导4小时沉淀;9,蛋白沉淀尿素复性纯化结果;M,蛋白质marker。该结果表明我们构建的P24蛋白基因与GST-标签和His-标签偶联的表达载体,经GST-亲和树脂与Ni柱纯化后,获得了纯度较高得的P24蛋白。

[0038] 实施例3:重组蛋白的免疫及杂交瘤细胞的制备与筛选

[0039] Ni颗粒纯化的重组P24-His蛋白,定量后免疫小鼠(腹腔注射),每只小鼠每次免疫100μg重组P24蛋白,共免疫5只小鼠。首次免疫后,4周后二次免疫,6周后三次免疫,三次免疫后采取血清检测小鼠体内P24抗体滴度,选取产生抗体滴度高的小鼠,在采取脾脏与骨髓瘤细胞Sp2/0融合之前三天,加强免疫一次。

[0040] 免疫结束后,选取血清滴度达到融合要求的小鼠,摘取免疫小鼠脾脏与Sp2/0骨髓瘤细胞在融合剂(PEG3350)作用下进行细胞融合,融合后将细胞分装96孔细胞培养板,用HAT培养基进行选择培养,用ELISA法检测克隆,经过多轮次检测,获取抗BLV P24蛋白的杂交瘤阳性克隆株。杂交瘤的筛选用制备好的P24-GST重组蛋白包被96孔板,用EILSA方法

检测杂交瘤细胞上清,按照阳性克隆标准筛选出克隆株。筛选阳性细胞株,取其上清进行抗原识别特异性检测。293T细胞转染Gag-pcDNA3.1-HA(Gag基因包含完整的BLV P24基因)后,用获取的杂交瘤细胞上清检测其能否识别真核细胞表达的BLV P24重组蛋白。

[0041] 结果见图2和图3,图2显示His标签纯化的重组P24蛋白免疫5只小鼠后,用GST-标签纯化的重组P24蛋白包被96孔板,ELISA方法检测每只小鼠体内的抗体效价。1号鼠免疫后血清抗体滴度最高,1:20万倍稀释后仍具有较高的抗体滴度。因此,进一步采用1号小鼠的脾细胞与Sp2/0骨髓瘤细胞融合制备杂交瘤。将脾细胞与Sp2/0融合后,种植于96孔板内,HAT培养基加压筛选。杂交瘤细胞培养10以后进行初次筛选。每一次筛选中抗体滴度较高的培养孔继续进行下一轮筛选,共计进行3轮筛选。如图3所示,经过多轮筛选,共获得总计14株杂交瘤阳性克隆。

[0042] 实施例4:杂交瘤细胞阳性株的单克隆筛选与腹水制备

[0043] 将以上筛选到的杂交瘤细胞阳性孔,应用终点稀释法获取单克隆细胞株,并用ELISA方法验证获得的单克隆细胞株的抗体效价。验证阳性的单克隆杂交瘤细胞株继续下游的腹水制备。在制备腹水一周前用弗氏不完全佐剂活化小鼠免疫系统,腹腔注射每只500  $\mu$ L。活化一周后腹腔注射小鼠腹腔杂交瘤细胞,每只小鼠注射 $10^6$ 杂交瘤细胞。注射10天后,每天观察小鼠腹腔,待其肿大后,即可采取腹水进行抗体效价检测。

[0044] 实施例5:单克隆抗体的活性与特异性分析

[0045] 获取的P24单克隆杂交瘤阳性株的上清,用抗体型别检测试剂盒(Sigma)鉴定其抗体类型,即IgM、IgG和IgA的类型检测。抗体经亚型鉴定后,继续进行抗体的抗原表位鉴定工作。WB方法检测以上构建的P24系列基因截短重组蛋白,确定单克隆抗体识别的表位。

[0046] 具体为在293T细胞内表达了含有全长P24基因的Gag基因,用其验证所获得的杂交瘤阳性株能否识别哺乳动物细胞内表达的BLV P24蛋白。先初步对OD值较高的10株杂交瘤细胞的上清进行了检测,如图4所示,所检测的上清均能与BLV GAG反应,表明这些这些杂交瘤细胞株分泌的抗体可能识别天然状态下的野型BLV病毒。不同杂交瘤产生的抗体对BLV P24的识别能力不同,如115号、173号、180号、55号和358号反应能力较强;而36号、248号、57号、44号和178号反应能力较弱。

[0047] 实施例6:单克隆抗体的亚型鉴定

[0048] 对以上筛选到的杂交瘤阳性株进行了初步的亚型鉴定,如图5所示,不同杂交瘤阳性株分泌的单克隆抗体型别不同。其中,44号、115号、178号和358号克隆产生的单克隆抗体类型比较单一,表明孔内的杂交瘤细胞比较单一;36号、57号、173号、180号和248号,抗体类型不统一,表明孔内细胞是不同杂交瘤细胞的混合体,且是混有含有IgM抗体的细胞孔;55号也是杂交瘤的混合体,分泌IgG1和IgG3两种亚型的单克隆抗体。44号和115号的反应结合能力较强,选择这两株杂交瘤细胞进一步进行单克隆培养。如图6所示,44-10号和115-5号抗体滴度较高,选择这3株细胞进行腹水制备,以用于后续的检测工作,

[0049] 实施例7:腹水制备与抗原表位鉴定

[0050] 1、单克隆抗体P44-10的抗体表位鉴定

[0051] 进一步制备了44-10和115-5的腹水。如图7所示,构建了一系列BLV P24基因截短表达质粒,在构建时,因为P24蛋白较小,因此在其N-端融合了GAG蛋白的NC部分,这样可以增加蛋白的分子量,易于体外检测,并且并不影响单克隆抗体对其序列的识别。融合后的蛋

白为NC-P24的融合蛋白。共构建了一共5个蛋白,命名为P24-1,P24-2,P24-3,P24-4和P24-5,并且这五个蛋白分子量依次减小,每一个蛋白比上一个蛋白C-末端少40个氨基酸残基左右(分子量大小顺序为P24-1>P24-2>P24-3>P24-4>P24-5)。将编码P24-1,P24-2,P24-3,P24-4和P24-5五个基因的质粒(即p24-1,p24-2,p24-3,p24-4和p24-5,见实施例1)转染293T细胞,转染48小时后,收取细胞样本,进行蛋白质免疫印迹实验(western blotting, WB)。单克隆抗体只能与其识别的蛋白结合并产生信号。单克隆抗体P44-10检测这些蛋白样本。结果表明,P44-10能够与p24-1蛋白反应。因此,初步确定单克隆抗体P44-10识别的是BLV P24蛋白的C-端。在此基础上,进一步对p24-1蛋白进行再次截短表达,将其从C-末端按每10个氨基酸顺序逐步截短,命名为p24-1A,p24-1B和p24-1C。将这些基因转染239T细胞后,48小时后收取细胞样本,继续与单克隆抗体P44-10进行WB检测。结果表明,单克隆抗体P44-10能够与蛋白P24-1A和P24-1B结合,却不能与P24-1C蛋白结合,因此初步确定其识别的抗原表位区域为P24-1B的C-末端序列,即表位GQKLQCAHW。

[0052] 2、单克隆抗体P115-5的抗体表位鉴定

[0053] 参照单克隆抗体P44-10的抗体表位鉴定工作,用同样的手段与方法,对单克隆抗体P115-5识别的抗体表位进行了鉴定。将质粒p24-1,p24-2,p24-3,p24-4和p24-5转染293T细胞48小时,收取细胞样本进行WB检测。结果表明,单克隆抗体P115-5能够与蛋白P24-3结合,却不能与蛋白P24-4结合。因此,其识别的区域应该在蛋白P24-3的C-末端。对蛋白P24-3的C-末端进行了10个氨基酸左右长度的蛋白顺次截短,分别命名为P24-3A,P24-3B,P24-3C和P24-3D。结果表明,单克隆抗体P115-5能够识别蛋白P24-3C,但不能识别蛋白P24-3D,因此,将其识别的抗原表位确定为P24-3C的C-末端的蛋白序列GDLRSQYQN。

[0054] 实施例8:两株单克隆抗体的特异性检测

[0055] 为检测所获得的单克隆抗体是否具有抗原识别特异性,用牛病毒性腹泻病毒(Bovine viral diarrhea virus,BVDV)和口蹄疫病毒(Foot and mouth disease virus,FMDV)检测44-10和115-5两株单克隆抗体的特异性。如图8所示,两株单克隆抗体能够识别BLV P24蛋白,但是不能够识别细胞内BVDV病毒。ELISA检测表明,44-10和115-5两株单克隆抗体不能够识别亚洲I型、A型和O型口蹄疫病毒,证明获得的两株单克隆抗体特异性良好。如图8所示,BVDV在细胞内增殖后,BVDV特异性抗体能够识别细胞内的病毒,而本发明的两株单克隆抗体不能够识别该病毒,即在细胞内没有绿色荧光信号。类似地,用FMDV抗原检测试剂盒的检测单克隆抗体。发现本发明的两株单克隆抗体都不能够识别O型、A型和亚洲I型的口蹄疫病毒抗原,而阳性对照抗体都能够识别这些抗原,表明本发明的抗体特异性良好,与普遍流行的FMDV没有交叉反应。

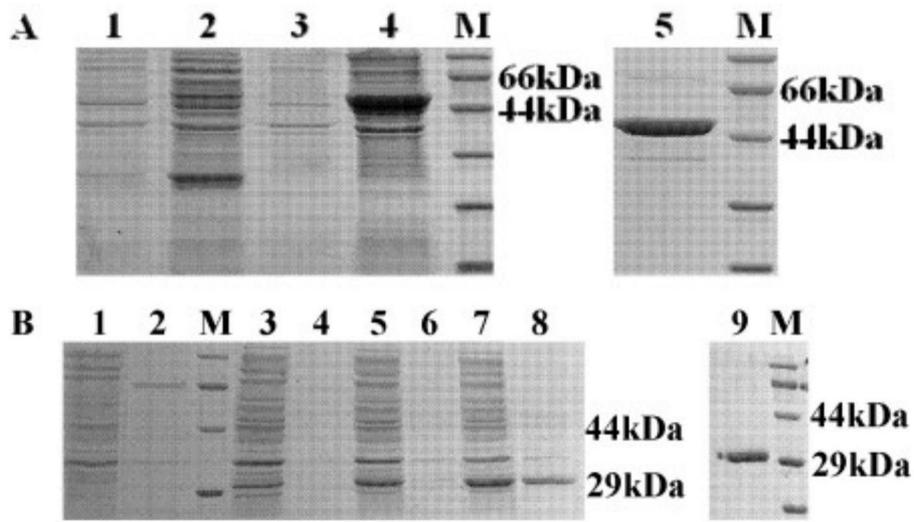


图1

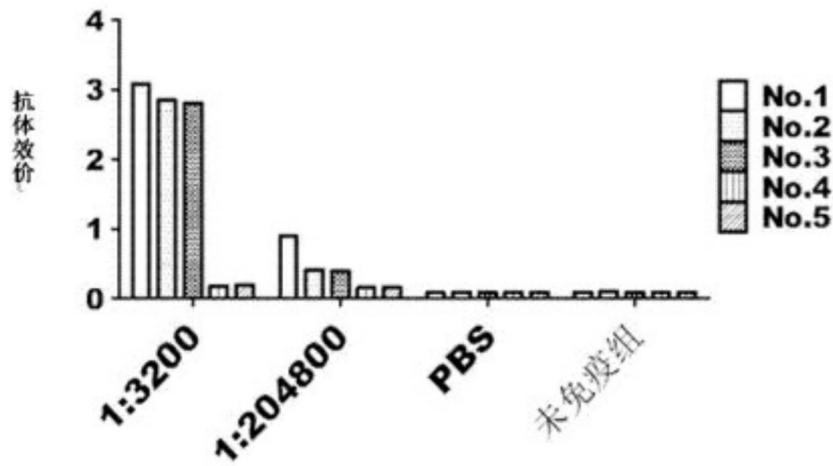


图2

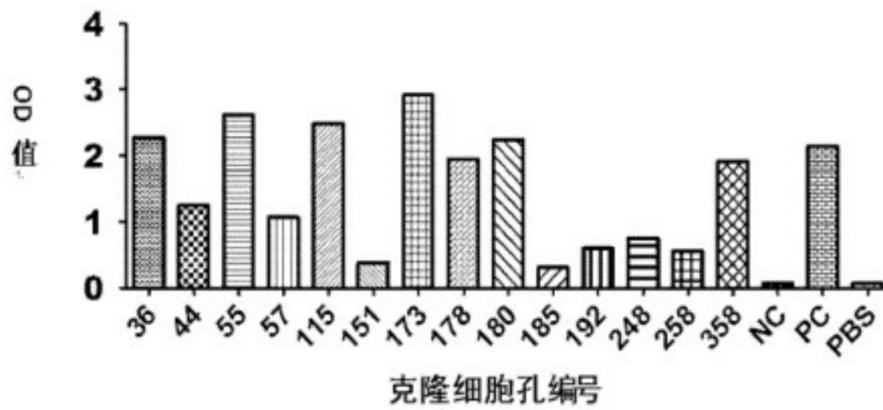


图3

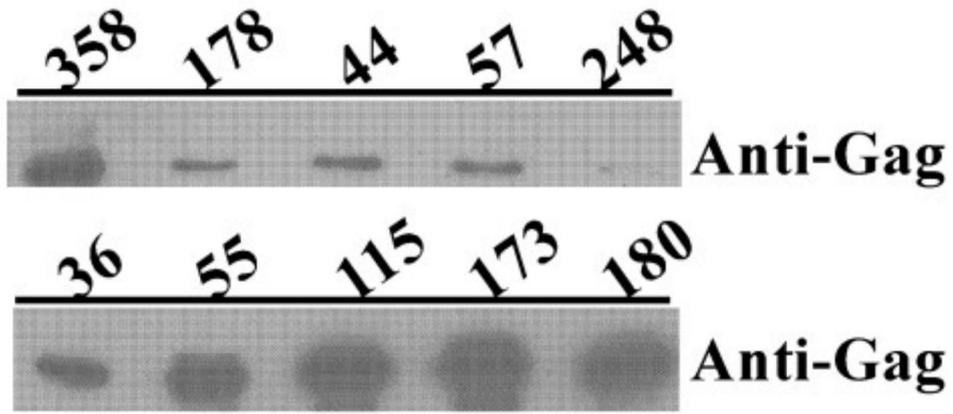


图4

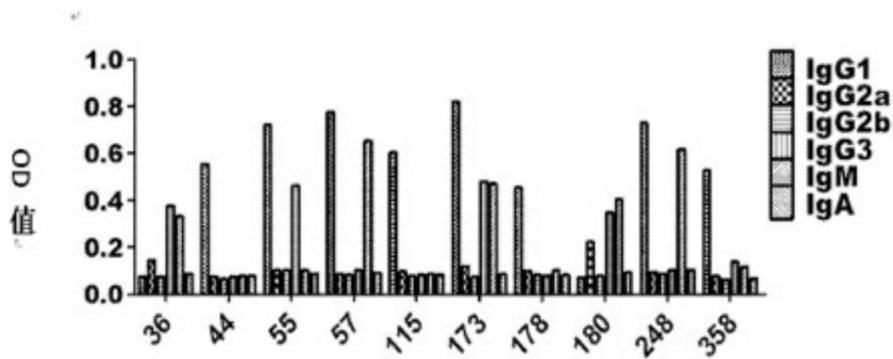


图5

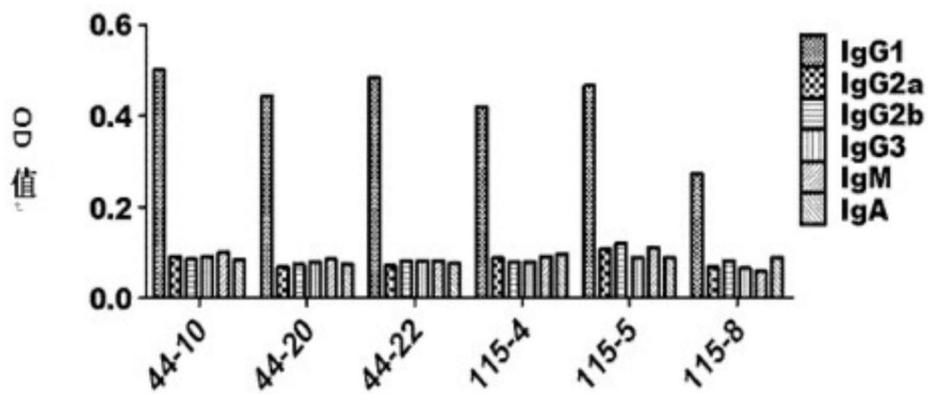
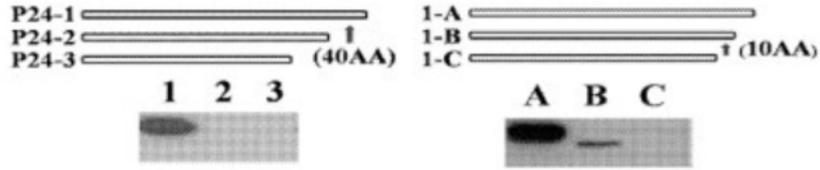
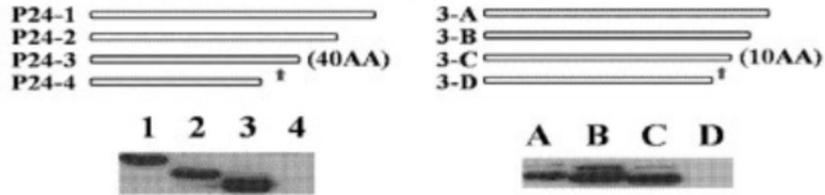


图6

**A 单克隆抗体44-10 表位鉴定**



**B 单克隆抗体115-5 表位鉴定**



**C 单克隆抗体44-10 识别表位序列分析**

BLV P24 full protein sequence

MGNSPSYNPPAGISPSDWLNLLQSAQRLNPRPSPSDFDLKKNYIHWFHKTQKKPWTFTSGGPTSCP  
 PGRFGRVPLVLATLNEVLSNEGGAPGASAPEEQPPYPDP PAVLPIISEGNRRHRRAWALRELQDIKKE  
 IENKAPGSQVWIQTLRLAILQADPTPADLEQLCQYIASPVDQTAHMTSLTAAIAAAEAANTLQGFNP  
 QNGTLTQQSAQPNAGDLRSQYQNLWLQAWKNLPTRPVQPWSTIVQGPAESYVEFVNRLQISLAD  
 NLPDGVPKPEIIDSLSYANANKECQQILQGRGLVAAPVGGQKLQACAHWAPKVKQPAVL  
 C-terminus-40AA

1A-C'-40 NANKECQQILQGRGLVAAPVGGQKLQACAHWAPKVKQPAVL

1B-C'-30 NANKECQQILQGRGLVAAPVGGQKLQACAHW YES

1C-C'-20 NANKECQQILQGRGLVAAPV YES  
 NO

P44 epitope identification: GQKLQACAHW

图7

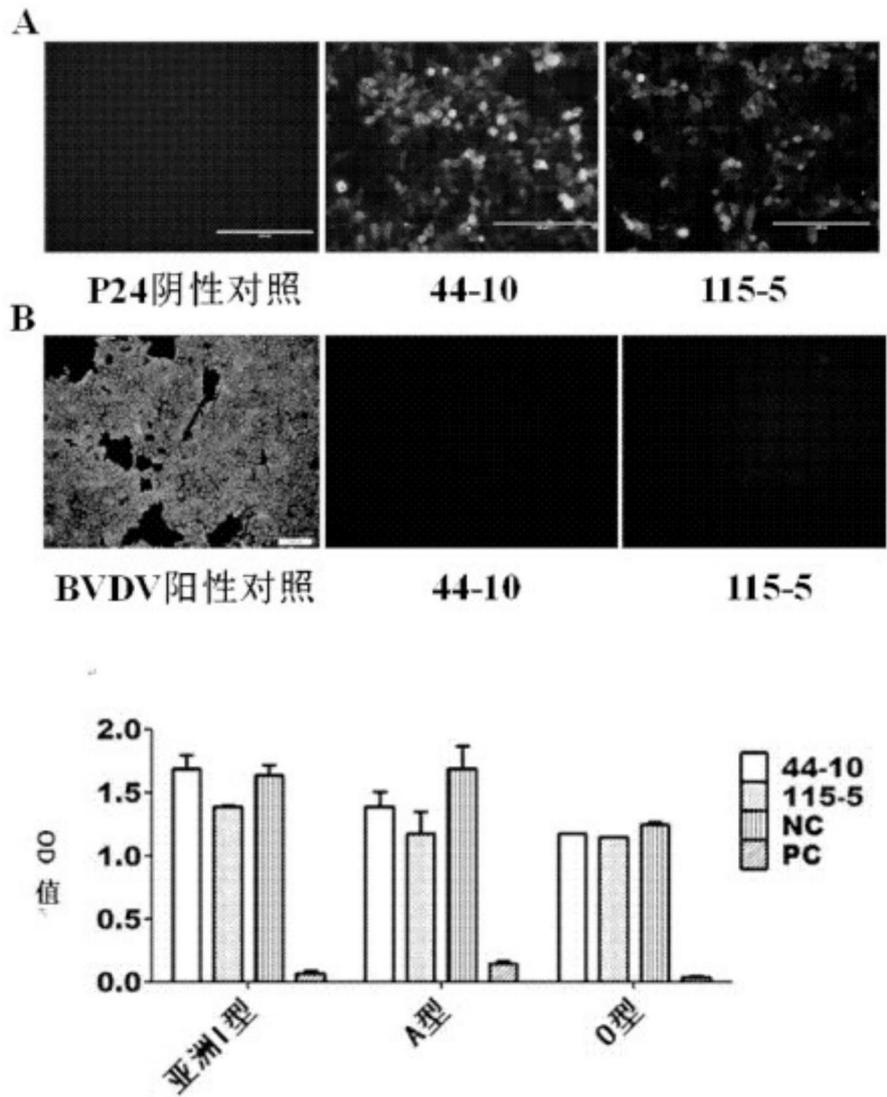


图8