



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118222508 A

(43) 申请公布日 2024. 06. 21

(21) 申请号 202410370123.8

(22) 申请日 2024.03.29

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO: C2022145 2022.05.25

(71) 申请人 扬州大学

地址 225009 江苏省扬州市大学南路88号

(72) 发明人 顾敏 刘秀梵 焦军 陈实

葛志闯 王晓泉 焦新安

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

专利代理师 卢亚丽

(51) Int. Cl.

C12N 5/20 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

A61K 39/42 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

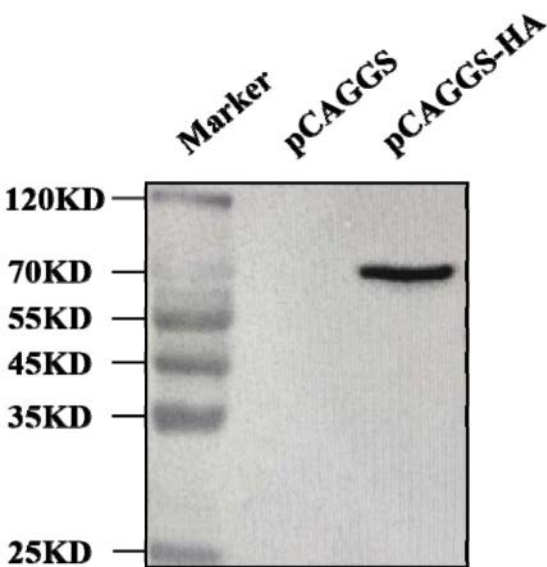
权利要求书1页 说明书9页
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

抗欧亚类禽并兼顾Pdm/09进化谱系H1亚型猪流感病毒HA蛋白的中和性单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了1株抗欧亚类禽并兼顾Pdm/09进化谱系H1亚型猪流感病毒HA蛋白的中和性单克隆抗体及其应用。所述的单克隆抗体命名为5F3,保藏编号为CCTCC NO:C2022145。该单克隆抗体靶向HA蛋白,不仅能够特异识别包含G4在内多种基因型的欧亚类禽H1N1亚型猪流感病毒,而且对于2009大流行(Pdm/09)H1N1亚型的猪流感病毒也具有良好反应性,并能结合人源和禽源H1N1亚型流感病毒,显示出针对H1亚型流感病毒的广谱作用特性。本发明的单克隆抗体经鸡胚中和试验和小鼠预防保护性试验证明,具有较强的中和活性,有望应用于H1N1亚型猪流感病毒引起的猪的疾病以及可能的人的感染的诊断和防治。



1. 杂交瘤细胞株5F3,其保藏编号为CCTCC N0:C2022145。
2. 一种抗欧亚类禽并兼顾Pdm/09进化谱系H1亚型猪流感病毒HA蛋白的中和性单克隆抗体5F3,其特征在于由权利要求1所述的杂交瘤细胞株5F3产生,单克隆抗体亚型为IgG2b, κ 型。
3. 权利要求2所述的单克隆抗体5F3在制备抗人兽共患性G4基因型H1N1猪流感病毒感染制剂中的应用。

抗欧亚类禽并兼顾Pdm/09进化谱系H1亚型猪流感病毒HA蛋白 的中和性单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域。主要涉及一株可稳定分泌具有抗欧亚类禽并兼顾Pdm/09进化谱系H1亚型猪流感病毒HA蛋白的中和性单克隆抗体的杂交瘤细胞株,同时涉及该杂交瘤细胞株所分泌的单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 猪流感病毒属于正黏病毒科的A型流感病毒属,其基因组为分8个节段的单股负链RNA,根据序列长短依次为:PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M和NS。其中,由第4个RNA节段负责编码的血凝素蛋白是病毒表面最主要的抗原糖蛋白,也是疫苗、中和抗体及诊断试剂研发的重要靶点。

[0003] 猪流感病毒感染猪可导致猪流感,是猪群常见的一种急性热性高度接触性呼吸道传染病,在世界各地均有发生和流行,严重危害养猪业的健康发展。此外,猪流感还具有重要的公共卫生意义。由于猪的呼吸道上皮同时具有 α -2,6型的人流感病毒受体和 α -2,3型的禽流感病毒受体而发挥基因“混合器”(Mixing vessel)的作用,被认为是人流感病毒和禽流感病毒发生基因重配(Reassortment)的重要场所。并且,部分猪流感病毒还可以跨越种间屏障,直接从猪传播到人,甚至能够在人际间发生有效传播。

[0004] 已知全球范围内流行的猪流感病毒包括H1N1、H1N2和H3N2等亚型,其中分布最为广泛的H1N1亚型按HA基因的遗传差异又分为经典(Classical swine,CS)H1N1、欧亚类禽(Eurasian avian-like,EA)H1N1和2009大流行(2009Pandemic,Pdm/09)H1N1等进化谱系。在我国,自2001年开始,H1N1亚型猪流感病毒就逐渐占据优势流行。尽管EAH1N1的绝对优势流行地位在2009年之后的几年曾一度被Pdm/09H1N1所取代,其仍然是当前国内猪群中主要流行的猪流感病毒。尤其值得注意的是,EA H1N1还在通过重配入Pdm/09H1N1的内部基因不断产生众多基因型(Genotype,G)。其中,基因型4(G4)EA H1N1始于2016年即在我国猪群中获得了优势流行,并具有较强的跨宿主传播潜能,同时对养猪业和公共卫生安全造成了严重威胁(Huanliang Yang,Yan Chen,Chuanling Qiao,et al.Prevalence,genetics,and transmissibility in ferrets of Eurasian avian-like H1N1 swine influenza viruses[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2016,113(2):392-397;Honglei Sun,Yihong Xiao,Jiyu Liu et al.Prevalent Eurasian avian-like H1N1 swine influenza virus with 2009pandemic viral genes facilitating human infection[J].Proc Natl Acad Sci U S A,2020,117(29):17204-17210;Fei Meng,Yan Chen,Zuchen Song,et al.Continued evolution of the Eurasian avian-like H1N1 swine influenza viruses in China[J].Sci China Life Sci,2023,66(2):269-282)。相关调查显示,我国云南省和陕西省分别在2020和2022年已出现了人感染G4基因型EA H1N1猪流感病毒的病例(李梓,赵晓南,黄维娟,等.云南省首例人感染G4基因型欧亚类禽H1N1猪流感病毒病原学特征分析[J].病毒学报,2022,38(2):290-297;秦龙,张俊君,陈斌,等.陕西省首例人感染G4

基因型欧亚类禽H1N1猪流感病毒基因特征分析[J].中华预防医学杂志,2023,57(9):1434-1439)。因此,监测和防制EA H1N1猪流感病毒尤其是其中的G4基因型,并预警有可能再次发生流行的Pdm/09H1N1病毒,对生猪养殖和人类健康均具有重要的现实意义。

[0005] 单克隆抗体是针对单一特定抗原表位、高度均质的特异性抗体,被广泛应用于传染性疾病的诊断和防治。尤其是具有中和活性的单克隆抗体,因其可以阻断病原体与靶细胞结合,在疾病预防和治疗方面更具优势。目前,缺少能够同时靶向EA H1N1和Pdm/09H1N1猪流感病毒的中和性单克隆抗体。

发明内容

[0006] 为了解决现有技术存在的问题,本发明通过杂交瘤技术制备获得了1株既能够拮抗EA H1N1又可针对Pdm/09H1N1亚型猪流感病毒、且还能够识别H1N1亚型人流感病毒和H1N1亚型禽流感病毒的单克隆抗体,该单克隆抗体特异性靶向HA蛋白、具有血凝抑制活性和中和活性,属于IgG2b亚类。该单克隆抗体的成功获得,一方面为不同进化谱系H1亚型猪流感病毒以及H1亚型人、禽流感病毒快速检测奠定了基础,另一方面也为预防可能发生的人感染H1亚型猪流感病毒提供潜在的抗病毒制剂候选物。

[0007] 本发明提供了一种能够稳定分泌抗欧亚类禽并兼顾Pdm/09进化谱系H1亚型猪流感病毒HA蛋白的中和性单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0008] 本发明中所述的单克隆抗体5F3由杂交瘤细胞株CCTCC NO:C2022145产生。

[0009] 本发明所述的单克隆抗体亚型为IgG2b、 κ 型,除了能够识别不同基因型EA H1N1和Pdm/09H1N1猪流感病毒,还能结合H1N1亚型人流感病毒和禽流感病毒。

[0010] 本发明还提供了所述的单克隆抗体5F3在制备抗人兽共患性G4基因型H1N1猪流感病毒感染制剂中的应用。

[0011] 本发明所述的单克隆抗体特异性靶向HA蛋白、具有血凝抑制活性和中和活性。

[0012] 本发明所述的单克隆抗体能够在哺乳动物模型BALB/c小鼠体内提供对EA H1N1亚型猪流感病毒感染的预防性保护。

[0013] 本发明的特点和优点在于:本发明公开了一种能够识别H1N1亚型猪流感病毒(兼顾EA H1N1和Pdm/09H1N1进化谱系)、人流感病毒和禽流感病毒的单克隆抗体5F3,由杂交瘤细胞5F3(保藏号CCTCC NO:C2022145)分泌产生,靶向病毒的表面抗原HA蛋白,具有血凝抑制活性和H1亚型结合广谱性,可用于H1亚型动物流感病毒通用的快速检测产品的进一步开发;所述单克隆抗体经鸡胚中和试验检测,对EA H1N1和Pdm/09H1N1均具有高效中和活性并且还具有良好的体内中和活性,对感染G4基因型EA H1N1猪流感病毒的BALB/c小鼠能够提供预防性作用,有望进一步应用于防治H1N1亚型猪流感病毒感染的抗病毒制剂的开发。

附图说明

[0014] 图1为HA基因进化树,其中▲表示制备HA蛋白单克隆抗体的免疫原所对应的病毒株。

[0015] 图2为制备H1亚型猪流感病毒HA蛋白单克隆抗体的小鼠免疫程序。

[0016] 图3为单克隆抗体5F3对HA蛋白真核表达质粒转染293T细胞的IFA鉴定图。

[0017] 图4为单克隆抗体5F3对HA蛋白真核表达质粒转染293T细胞的Western blot鉴定

图。

[0018] 图5为单克隆抗体5F3与不同进化谱系H1亚型猪流感病毒的中和效价。

[0019] 图6为单克隆抗体5F3与不同H1亚型流感病毒的HI效价。

[0020] 图7为单克隆抗体5F3与不同H1亚型流感病毒感染MDCK细胞的IFA反应图。

[0021] 图8为单克隆抗体5F3经纯化后的SDS-PAGE验证图。

[0022] 图9为小鼠体重变化曲线。

[0023] 图10为小鼠生存曲线。

[0024] 图11为小鼠肺脏病毒载量。

[0025] 图12为小鼠肺脏病理组织学变化。

[0026] 本发明中的杂交瘤细胞株5F3于2022年5月25日保藏于中国典型培养物保藏中心(地址:中国武汉大学),分类命名为杂交瘤细胞株5F3,保藏编号为CCTCC NO:C2022145。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。以下实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。所用材料、试剂若无特殊说明,均可从商业途径得到。下列材料均公开并保存于申请人实验室,承诺向公众提供。

[0028] H1N1亚型猪流感病毒株A/swine/Shandong/SG03/2019(SG03)、A/Swine/Jiangsu/48/2010(JS48):Kaibiao Chen,Ming Kong,Jiao Liu,et al.Rapid differential detection of subtype H1 and H3 swine influenza viruses using a TaqMan-MGB-based duplex one-step real-time RT-PCR assay[J].Arch Virol,2021,166(8):2217-2224.

[0029] 欧亚类禽H1N1亚型猪流感G4基因型病毒株A/swine/Jiangsu/HD11/2020(HD11):Min Gu,Kaibiao Chen,Zhichuang Ge,et al.Zoonotic Threat of G4 Genotype Eurasian Avian-Like Swine Influenza A(H1N1)Viruses,China,2020[J].Emerg Infect Dis,2022,28(8):1664-1668.

[0030] H1N1亚型猪流感病毒株A/swine/Jiangsu/zg14/2011(ZG14):Kaibiao Chen,Ming Kong,Jiao Liu,et al.Rapid differential detection of subtype H1 and H3 swine influenza viruses using a TaqMan-MGB-based duplex one-step real-time RT-PCR assay[J].Arch Virol,2021,166(8):2217-2224.

[0031] H1N1亚型猪流感病毒株A/swine/Jiangsu/01/2016(JS01):施丽薇.含H9N2禽流感病毒内部基因盒重组H1N1猪流感病毒对小鼠致病增强研究[D].扬州:扬州大学,2021.

[0032] H1N1亚型人流感病毒株A/California/04/2009(CA04)、H1N1亚型禽流感病毒株A/duck/Shandong/SDd11/2013(SDd11):Min Gu,Jun Jiao,Suhan Liu,et al.Monoclonal antibody targeting anovel linear epitope on nucleoprotein confers pan-reactivity to influenza A virus[J].Appl Microbiol Biotechnol,2023,107(7-8):2437-2450.

[0033] H1N2亚型禽流感病毒株A/duck/Huaian/0151/2018(180151):张鑫煜,才天宇,赵颖,等.1株鸭源H1亚型禽流感病毒的分离鉴定与全基因遗传进化分析[J].中国兽医学报,

2021, 41 (12): 2325-2332.

[0034] 所用的材料和试剂如下:

[0035] 实施例一

[0036] 杂交瘤细胞株5F3的获得:

[0037] 免疫原的制备:选择H1N1亚型猪流感病毒株A/swine/Shandong/SG03/2019 (SG03) 和A/Swine/Jiangsu/48/2010 (JS48) 作为免疫原,两者的HA基因核苷酸一致性仅为70.3%, 氨基酸相似性也仅为78.3%。SG03和JS48属于不同的遗传进化谱系,在HA基因进化树上分别被划分在EA H1N1和Pdm/09H1N1分支,如附图1所示。将SG03和JS48分别进行10倍系列稀释,取 10^{-6} 稀释度以0.2mL/胚的剂量接种9日龄SPF鸡胚,96h收取HA效价 ≥ 7 的鸡胚尿囊液。随后,先将尿囊液以8000r/min, 4℃离心10分钟,取上清;再将离心后的鸡胚尿囊液用 β -丙内酯按3000:1混合,并在4℃垂直震荡24h进行灭活,再置于37℃水浴2h使 β -丙内酯失活,并通过接种鸡胚确认病毒被充分灭活。将灭活的病毒以30000r/min、4℃超速离心2h后弃去上清。用4℃保存的无菌PBS缓冲液1.5mL将超速离心后的沉淀进行重悬,对纯化后病毒液的HA效价进行测定,并经0.22 μ m滤器过滤后,保存于-70℃冰箱,备用。

[0038] 动物免疫:将灭活纯化的全病毒与弗氏完全佐剂1:1混合,按6500r/min、匀浆16s计1次,共匀浆5次使其充分乳化;采用皮下多点注射的方式以150 μ L/鼠的剂量免疫6周龄BALB/c小鼠。按照2周免疫一次的间隔频率进行三次免疫,第二、三次免疫均使用弗氏不完全佐剂与病毒等体积混合,乳化均匀后,仍通过皮下多点注射对小鼠进行免疫。于融合前第3天,以腹腔注射全病毒的方式再对小鼠进行加强免疫。其中,第三次免疫后7d,取小鼠尾静脉血获得三免血清,并用血凝抑制 (HI) 试验测定血清中的抗体效价,HI滴度 $>6\log_2$ 即可进行细胞融合。为了能够获得兼顾EA H1N1和Pdm/09H1N1进化谱系猪流感病毒的单克隆抗体,本发明在动物免疫程序上进行了优化,使用分别属于EAH1N1和Pdm/09H1N1进化谱系的猪流感病毒株SG03和JS48进行交替免疫,如附图2所示。

[0039] 细胞融合:在小鼠第三次免疫后复苏小鼠骨髓瘤细胞SP2/0,待细胞状态稳定后扩大培养到合适的数量备用;融合前3d,将纯化的病毒注射300 μ L至小鼠腹腔进行冲击免疫;融合当天,将免疫小鼠通过眼球采血收集阳性血清,经脱颈处死后浸泡于75%酒精中10min再固定于解剖台上;无菌采集小鼠脾脏,去除结缔组织和脂肪后置于细胞筛网上使用2.5mL注射器的活塞进行充分研磨,将所得脾细胞悬液转移到50mL融合管中,放入5-10%CO₂、37℃培养箱中静置10-15min;同时,用HT培养基将SP2/0细胞轻轻吹下,收集到装有脾细胞的离心管中,轻轻充分混合,1000r/min低速离心10min后去除上清,手掌轻擦融合管底部使细胞分散,在37℃水浴环境中缓慢滴加1mL预热至37℃的PEG1500使二者完成融合,由慢到快滴加无抗生素无血清DMEM培养基终止融合反应;将融合管于37℃静置10min后离心弃上清,用HAT培养基重悬细胞沉淀,以100 μ L/孔的量均匀滴加至96孔细胞板中,于5-10%CO₂、37℃培养箱中培养;5d后用新鲜的HAT培养基进行半换液;7-10d后用HT培养基进行全换液;待其细胞培养上清变黄或细胞分布至孔底面积1/10以上时,可通过吸取细胞上清检测抗体来进行杂交瘤细胞的筛选。

[0040] 杂交瘤细胞的筛选:由于本发明的最初设计是想获得能够同时针对EA H1N1和Pdm/09H1N1猪流感病毒的中和性单克隆抗体,而中和性抗体大多靶向病毒的HA蛋白并且也可能同时具有血凝抑制活性。因此,本实施例是通过HI试验来筛选阳性杂交瘤细胞的,并且

是分别选择SG03(EA H1N1)和JS48(Pdm/09H1N1)两株病毒进行同步检测。当杂交瘤细胞上清同时检测出对SG03(EAH1N1)和JS48(Pdm/09H1N1)均具有较高的HI效价,即筛选到能够分泌具有同时识别EAH1N1和Pdm/09H1N1猪流感病毒HA蛋白单克隆抗体的阳性杂交瘤细胞,但所分泌抗体是否具有中和活性仍需要后续试验进行确定。

[0041] HI试验筛选的操作过程简述如下:待到融合后10d左右,当杂交瘤细胞分布至孔底面积1/10以上,准备进行杂交瘤细胞的筛选。配制1%浓度的红细胞悬液测得免疫所用病毒株SG03(EA H1N1)和JS48(Pdm/09H1N1)的HA效价后,根据HA效价配制四单位病毒备用;将96孔细胞板的细胞上清吸取25 μ L——对应移至96孔血凝板中,随后每孔加入等体积的四单位病毒,震荡混匀后置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱作用15min,取出后每孔再加入25 μ L红细胞悬液,充分混匀后室温静置10min观察结果。将在同时与SG03(EA H1N1)和JS48(Pdm/09H1N1)病毒进行的试验中,红细胞均不发生凝集且仅有一个细胞团块长势良好的细胞孔作为初筛阳性孔进行下一步的HI效价测定:取出预先加有25 μ L PBS缓冲液的96孔血凝板,将初筛阳性孔中的细胞上清吸出25 μ L加入第1孔,倍比稀释至第10孔,再每孔加入25 μ L的四单位抗原直至第11孔,震荡混匀后于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中作用15min,之后每孔加入25 μ L 1%的红细胞悬液,读取具体的HI效价。经筛选,成功获得一株可同时识别SG03(EA H1N1)和JS48(Pdm/09H1N1)且具有较高HI效价的阳性杂交瘤细胞,为5F3。杂交瘤细胞5F3上清液与SG03(EA H1N1)病毒反应的HI效价可达6log₂,与JS48(Pdm/09H1N1)病毒反应的HI效价可达5log₂。

[0042] 阳性杂交瘤细胞的有限稀释法亚克隆:将阳性杂交瘤细胞5F3孔内的细胞用适量HT培养基轻轻吹下,吸取100 μ L细胞悬液至一块新的96孔板的第1列第1孔,自上而下用HT培养基进行2倍倍比稀释,放入37 $^{\circ}$ C培养箱中稍作静置后计数,选择细胞量60-100的孔,将孔内细胞吹下后移至装有4mL HT培养基的离心管中轻轻混匀,以100 μ L/孔的量将配制的杂交瘤细胞悬液铺于96孔细胞板的第2-3列;将离心管中的培养基补足至4mL再次混匀,仍以100 μ L/孔的量铺至96孔细胞板的第4-5列;依此类推对杂交瘤细胞悬液进行稀释,再分别铺于第6-7列、8-9列、10-11列;最后将细胞板置于37 $^{\circ}$ C、含5-10% CO₂的细胞培养箱中进行培养。5d左右观察细胞生长状态,并标记好仅含有单个细胞集落的培养孔;10d左右检测各孔细胞上清中的HI抗体水平,选取抗体效价最高的单细胞孔,再次通过有限稀释法进行克隆化。经过3次重复该亚克隆操作,融合孔阳性杂交瘤细胞5F3上清针对SG03(EA H1N1)和JS48(Pdm/09H1N1)病毒的HI抗体阳性率均达到了100%。

[0043] 实施例二

[0044] 腹水的制备:

[0045] 以腹腔注射的途径对经产BALB/c母鼠注射灭菌液体石蜡300 μ L/鼠;7d左右,将长势良好的杂交瘤细胞5F3吹下,1000rpm离心10min后弃上清,加入无菌PBS缓冲液重悬细胞,再次1000rpm离心10min后弃上清,加入适量无菌PBS对细胞进行重悬和计数,将约 1×10^6 个杂交瘤细胞注射入小鼠腹腔。约5d后每日观察小鼠状态,待其腹部出现明显膨大后用16#注射器针头采集腹水,经4000r/min离心10min后收集腹水上清,测定HI效价并适量分装,保存于-70 $^{\circ}$ C冰箱备用。

[0046] 实施例三

[0047] 单克隆抗体5F3的亚类鉴定:采用苏州博奥龙科技有限公司的小鼠单抗Ig类/亚类鉴定用ELISA试剂盒(货号:BF16001)进行鉴定。按照试剂盒说明书进行如下操作:取杂交瘤

细胞上清50 μ L用标本稀释液作1:1稀释,加至酶标板检测孔中,并同步设置阴性对照和阳性对照,37 $^{\circ}$ C温育30min;弃去板内液体,对酶标板进行5次清洗,于检测孔中分别加入IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA、Kappa (κ)、Lambda (λ) 的酶标二抗各100 μ L,37 $^{\circ}$ C孵育30min;弃去板内液体,再次清洗酶标板5遍,加入显色剂A液和B液各50 μ L,37 $^{\circ}$ C避光孵育20min;;最后每孔滴加50 μ L反应终止液,使用酶标仪读取各孔450nm波长下的OD值。

[0048] 试验结果如表1所示,杂交瘤细胞5F3株分泌的单克隆抗体5F3其重链为IgG2b亚类、轻链为 κ 型。

[0049] 表1单克隆抗体5F3的亚类鉴定

	OD (450nm)	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgM	IgA	Kappa (κ)	Lambda (λ)
[0050]	单克隆抗体 5F3	0.039	0.045	1.621	0.044	0.154	0.047	0.782	0.164
	阳性对照	0.628	0.748	0.506	0.708	0.525	0.665	0.688	0.643
	阴性对照	0.092	0.075	0.044	0.072	0.059	0.119	0.191	0.073

[0051] 实施例四

[0052] 单克隆抗体5F3的IFA检测:

[0053] 首先选取欧亚类禽H1N1亚型猪流感G4基因型病毒株A/swine/Jiangsu/HD11/2020 (HD11),将其HA基因 (GenBank登录号为OL744689.1) 连接至真核表达载体pCAGGS (购自淼灵生物,产品货号为P0165),构建表达HA蛋白的真核表达质粒pCAGGS-HA。操作步骤简述如下:使用北京君诺德生物技术有限公司的组织/细胞RNA快速提取试剂盒 (产品货号为2103) 按说明书提取HD11病毒RNA,随后加入反转录引物5' -AGCAAAGCAGG-3' (SEQ ID No.1) 进行反转录,进一步将反转录得到的cDNA通过上游引物5' -GTCTCATCATTTTGGCAAAGAATTCATGGAAGCAAGATTATTTGTATTATTCTGTGC-3' (SEQ ID No.2) 和下游引物5' -AGGGAAAAAGATCTGCTAGCTCGAGTTAAATGCATACTCTGCAATGAC-3' (SEQ ID No.3) 进行PCR扩增HA基因全长,并将PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后使用Axygen公司的DNA胶回收试剂盒 (AxyPrep DNA Gel Extraction Kit,产品货号为AP-GX-50G) 进行胶回收;同时,将空载体pCAGGS使用限制性内切酶EcoR I和Xho I于37 $^{\circ}$ C作用20min进行双酶切,并将酶切产物经电泳后进行胶回收。接下来,将胶回收所得的HA全长与线性化空载体pCAGGS使用北京全式金公司的同源重组试剂盒 (pEASY-Basic Seamless Cloning and Assembly Kit,产品货号为CU201-02) 按说明书进行连接。连接反应完成后,转化连接产物至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,将所转化平板于37 $^{\circ}$ C培养直至有单个菌落出现,挑取长势良好的单菌落置于含氨苄青霉素的LB培养液中培养12h。将培养菌液经PCR筛选为阳性者使用Axygen公司的质粒小提试剂盒 (AxyPrepTM Plasmid Miniprep Kit,产品货号为AP-MN-P-50) 按说明书提取其质粒,并将所提质粒送至南京擎科生物科技有限公司进行测序鉴定,序列正确的真核表达质粒即命名为pCAGGS-HA。

[0054] 进一步将所构建的真核表达质粒pCAGGS-HA和空载体pCAGGS分别转染293T细胞,36h后弃去细胞上清用4 $^{\circ}$ C预冷的PBS洗涤3次,再以4%多聚甲醛于4 $^{\circ}$ C固定20min;弃去固定液,待其自然挥发后,加入用PBST配制的3%牛血清白蛋白 (BSA) 溶液于室温中静置1h进行

封闭;弃去封闭液,PBST洗涤3次,每次5min;以1:300倍稀释的单克隆抗体5F3小鼠腹水作为一抗,同时将小鼠阳性血清进行1:300倍稀释后作为阳性对照,置于4℃冰箱孵育过夜;PBST清洗3次后加入1:500倍稀释的FITC标记的羊抗鼠IgG荧光二抗,避光常温摇床孵育1h,同上PBST洗涤3次后置于显微镜下观察结果。结果如附图3所示,5F3小鼠腹水(见图3A)和小鼠阳性血清(见图3C)均能使转染HA质粒的293T细胞呈现明亮的绿色荧光;而转染空载体pCAGGS并孵育5F3小鼠腹水的293T细胞则无可见荧光(见图3B)。因此,单克隆抗体5F3靶向HA蛋白且具有IFA特性,可用于IFA试验。

[0055] 实施例五

[0056] 单克隆抗体5F3的Western Blot检测:

[0057] 将实验室保存的pCAGGS-HA真核表达质粒和pCAGGS空载体分别转染293T细胞,36h后收集细胞裂解物,其中pCAGGS空载体转染的细胞样品作为阴性对照;将收取的细胞裂解物与5×SDS-PAGE上样Buffer混合,加热变性后进行电泳,转膜。转膜结束后,用5%脱脂乳溶液进行封闭,37℃孵育2h;用PBST洗涤3次,每次5min;将5F3小鼠腹水1:1000倍稀释后作为一抗,置于37℃摇床1h;同上PBST洗膜3次后,孵育用TBST作1:5000倍稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG作为二抗,37℃避光孵育1h;同上PBST洗膜3次,经超敏ECL显影,成像仪观测结果。结果如附图4所示,转染pCAGGS空载体的293T细胞样品中无条带,而转染pCAGGS-HA质粒的293T细胞样品在70kDa附近产生明显的单一反应条带,大小与HA蛋白相同,表明单克隆抗体5F3特异性针对HA蛋白。因此,5F3具有Western Blot反应特性,可用于Western Blot试验。

[0058] 实施例六

[0059] 单克隆抗体5F3的中和活性检测:

[0060] 通过鸡胚中和试验测定抗体对不同进化谱系H1亚型猪流感病毒的中和活性。选取HD11(EA H1N1)和JS48(Pdm/09H1N1)这2个病毒,分别测定其鸡胚半数感染量(EID_{50})。将5F3腹水经PBS稀释100倍后再进行倍比稀释,即以1:100、1:200、1:400.....1:102400的稀释度,分别与等体积的200 EID_{50} 病毒混合均匀,37℃作用1h后再将该单抗与病毒的混合液接种9日龄SPF鸡胚,每个稀释度接3枚胚。以接种仅含有病毒液而不含有单抗的鸡胚为阳性对照,同时设立仅接种PBS的鸡胚为阴性对照。弃去24h内的死亡胚,72h后测定各稀释度血凝阳性鸡胚数,根据结果再以Reed-Muench法计算能使50%的鸡胚得到保护的腹水最大稀释倍数作为半数保护量(PD_{50}),即该单克隆抗体的中和效价。结果如附图5所示,5F3腹水对HD11(EA H1N1)病毒的中和效价高达 $10^{-4.56}$,即对腹水作1:30368稀释仍能够保护50%的接种鸡胚免受HD11(EA H1N1)病毒感染;JS48(Pdm/09H1N1)病毒的中和效价也达到 $10^{-4.19}$,即对腹水作1:15488稀释仍能够保护50%的接种鸡胚免受JS48(Pdm/09H1N1)病毒感染,表明该单克隆抗体对欧亚类禽和Pdm/09进化谱系的H1亚型猪流感病毒株均具有高效中和活性。

[0061] 实施例七

[0062] 单克隆抗体5F3的广谱性检测:

[0063] 5F3腹水与不同宿主来源、不同HA进化谱系H1亚型流感病毒的HI效价测定:

[0064] 将实验室保存的不同H1亚型动物流感病毒(如表2所示)分别配制四单位病毒,在96孔血凝板中将单克隆抗体5F3作2倍倍比稀释,该小鼠腹水稀释液与上述配好的四单位病毒在37℃温箱作用15min后,每孔加入1%的鸡红细胞悬液,室温静置15min后观察HI结果。结果如附图6所示,测定的3株不同基因型的EAH1N1猪流感病毒和2株猪或人源的Pdm/

09H1N1病毒均能够与5F3腹水发生良好的HI反应,并且禽源的1株H1N1和H1N2亚型流感病毒也能够与单克隆抗体5F3产生较高的HI滴度。因此,通过与不同H1亚型动物流感病毒的HI试验,表明单克隆抗体5F3不仅具有同时识别EA H1N1和Pdm/09H1N1猪流感病毒的特性,而且对于猪、人、禽的H1亚型流感病毒呈现良好的广谱反应性。

[0065] 表2与单克隆抗体5F3进行HI试验的H1亚型流感病毒株

毒株名称	简称	宿主来源	亚型	HA 基因进化谱系	基因型
A/swine/Jiangsu/zg14/2011	ZG14	猪	H1N1	EA H1N1	G1
A/swine/Jiangsu/HD11/2020	HD11	猪	H1N1	EA H1N1	G4
A/swine/Jiangsu/01/2016	JS01	猪	H1N1	EA H1N1	G5
[0066] A/swine/Jangsu/48/2010	JS48	猪	H1N1	Pdm/09 H1N1	/
A/California/04/2009	CA04	人	H1N1	Pdm/09 H1N1	/
A/duck/Shandong/SDd11/2013	SDd11	禽	H1N1	/	/
A/duck/Huaian/0151/2018	180151	禽	H1N2	/	/

[0067] 5F3腹水与不同H1亚型流感病毒的IFA反应性:

[0068] 除了通过上述HI试验检测单克隆抗体5F3的广谱性,还进行了IFA试验检测5F3识别不同H1亚型流感病毒的能力。选取了表2中的HD11(猪EA H1N1)、JS48(猪Pdm/09H1N1)、CA04(人Pdm/09H1N1)和180151(禽H1N2)病毒感染MDCK细胞,同时设立未感染病毒的MDCK细胞作为阴性对照。按上述IFA试验中的方法进行细胞固定、封闭后,将1:300倍稀释的5F3腹水作为一抗,4℃孵育过夜,PBST洗涤3次,每次5min;随后再加入用PBST作1:500倍稀释的FITC标记的羊抗鼠IgG荧光二抗,避光常温摇床孵育1h,PBST洗涤3次后置于荧光显微镜下观察结果。结果如附图7所示,HD11(猪EAH1N1)、JS48(猪Pdm/09H1N1)、CA04(人Pdm/09H1N1)和180151(禽H1N2)这4个病毒感染的MDCK细胞中均能够观察到明亮的绿色荧光,而阴性对照细胞无特异性荧光。因此,单克隆抗体5F3均能够与上述不同宿主来源的H1亚型动物流感病毒发生良好的IFA反应性,表明5F3具有识别H1亚型流感病毒的广谱性。

[0069] 实施例八

[0070] 单克隆抗体5F3的纯化:

[0071] 采用上海碧云天生物技术有限公司的Protein A+G Agarose(货号:P2019-2mL)试剂对获取的小鼠单克隆抗体腹水进行纯化。按照试剂说明书进行如下操作:(1)取1mL的Protein A+G Agarose装填纯化柱,然后用10倍柱体积的PBS洗涤并平衡纯化柱;(2)将待纯化的小鼠腹水以8 000rpm离心10min,取上清并用PBS作10倍稀释后进行上样至纯化柱;(3)待上述用于纯化的抗体过柱完全后,再用10倍柱体积的PBS进行洗涤,以除去未结合与非特异结合的蛋白;(4)洗涤完成后,按每mL洗脱液加入100μL中和液(1M Tris-HCl,pH8.8)的比例,预先在收集管中加入适量中和液,然后用10mL的50mM glycine,pH2.7作为洗脱液,洗脱被结合的抗体;(5)进一步用上海碧云天生物技术有限公司的BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0012)对纯化后的抗体进行浓度测定,同时通过SDS-PAGE检测纯化效果。

[0072] 经BCA法测定,纯化后的单克隆抗体5F3的浓度为1.892mg/ml。8% (Tris-Glycine 胶) 浓度SDS-PAGE结果(附图8)显示,经过Protein A+G Agarose纯化的单克隆抗体5F3在非还原状态下于约175KD处可见一条清晰条带,与小鼠IgG相对分子质量基本相当,且几乎无

杂带,提示纯度良好,可用于下一步的动物体内试验。

[0073] 实施例九

[0074] 单克隆抗体5F3在小鼠模型的预防性保护效力试验:

[0075] 为了评估单克隆抗体5F3是否能够提供一定的体内保护效果,选取BALB/c小鼠作为试验用的哺乳动物模型。将38只6周龄BALB/c小鼠以5只/组随机分为4组,分别为第1组5mg/kg剂量的抗体施用组、第2组10mg/kg剂量的抗体施用组、第3组不施用抗体的攻毒对照组,和第4组不施用抗体也不接种病毒的空白对照组。除空白对照组为5只小鼠,其他3组均包括11只小鼠(5只用于称量体重,6只用于剖检以采集肺脏)。试验的操作步骤简述如下:在施用抗体前记录每只小鼠的初始体重;分别对第1和2组小鼠按5mg/kg和10mg/kg剂量经腹腔注射单克隆抗体5F3;2h后,分别对第1、2和3组小鼠经鼻腔接种100 μ L含 2×10^6 EID₅₀的G4基因型EAH1N1猪流感病毒HD11,第4组小鼠不接种病毒但经鼻腔接种100 μ L PBS;接种完成后对试验小鼠每天称重,观察直至14d;其中,第1、2和3组在攻毒后3d和5d分别扑杀3只小鼠进行肺脏采集,一部分肺脏用于检测病毒载量,一部分肺脏用于制作病理组织切片。

[0076] 结果如附图9-12所示,不施用抗体仅接种HD11病毒的第3组小鼠在感染后5d内体重持续下降(图9)、5只小鼠全部死亡(图10);既不施用抗体也不攻毒的第4组小鼠在整个14d观察期,体重有所增长(图9)且全部存活(图10);上述结果表明试验对照组成立。在抗体施用组,5mg/kg剂量注射组的小鼠在感染后体重呈现不断降低趋势(图9)、7-9d内有3只小鼠发生死亡,最终存活率仅为40%(图10),表明5mg/kg剂量的单克隆抗体5F3并不能对病毒感染提供理想的预防性保护;10mg/kg剂量注射组的小鼠在感染后1-6d表现为体重一过性降低但7-14d体重持续增长(图9),5只小鼠均未出现死亡,保护率为100%(图9-10),表明10mg/kg剂量的单克隆抗体5F3能够对病毒感染提供良好的预防性保护。攻毒3d和5d小鼠肺脏的病毒载量结果如附图11所示,5mg/kg和10mg/kg剂量的单克隆抗体5F3均能够显著地抑制肺脏中的病毒复制,且10mg/kg剂量组的抑制作用更明显。此外,肺脏的病理切片结果(见图12)显示,相较于攻毒对照组,5mg/kg剂量组一定程度减轻了病毒感染引起的肺损伤,而10mg/kg剂量组则明显降低了病毒感染对肺组织结构的破坏和炎性反应,表明单克隆抗体5F3能够对G4基因型EA H1N1猪流感病毒提供预防性保护,有望进一步开发为抗病毒制剂。

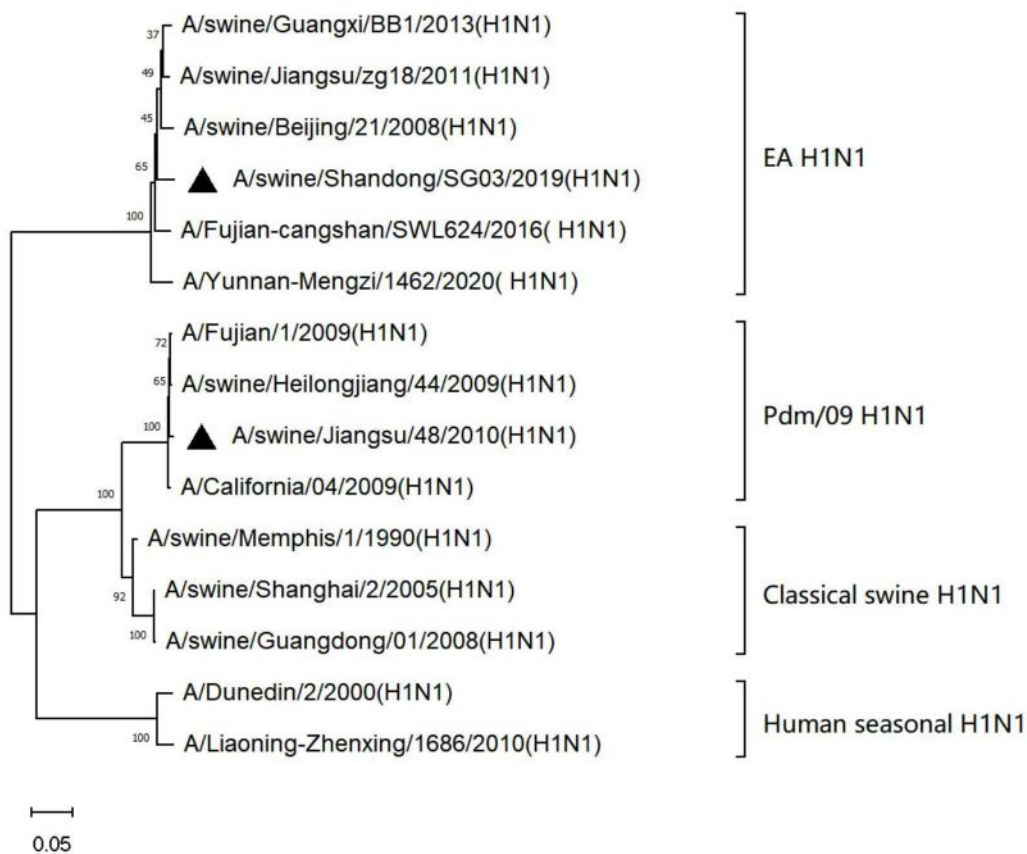


图1



图2



图3

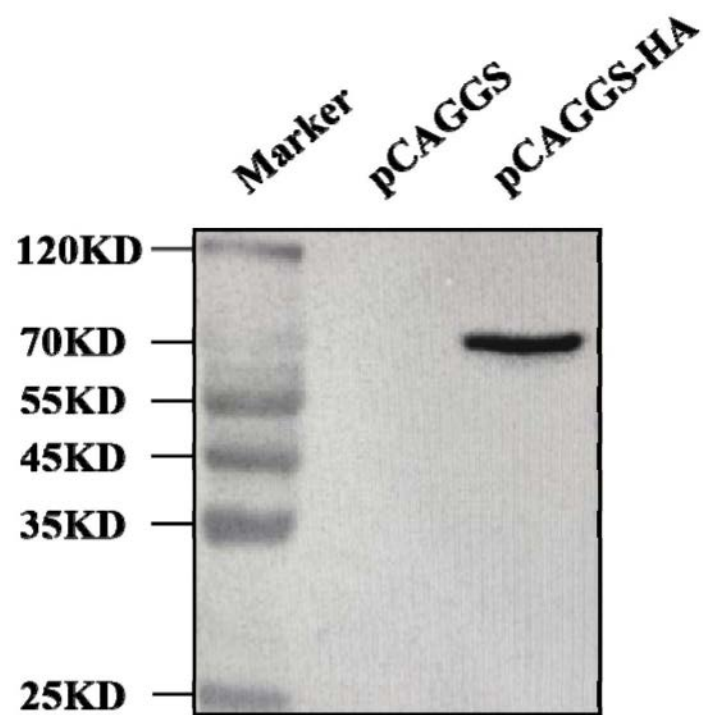


图4

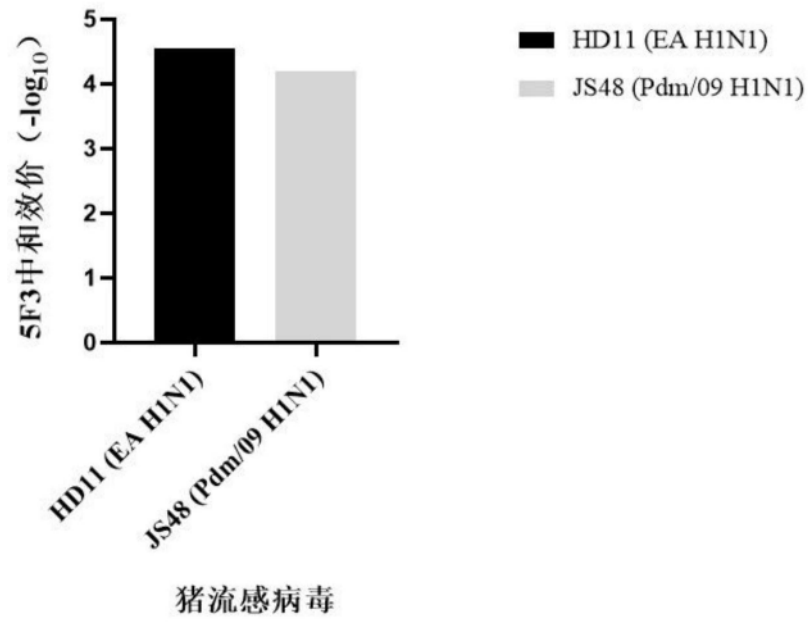


图5

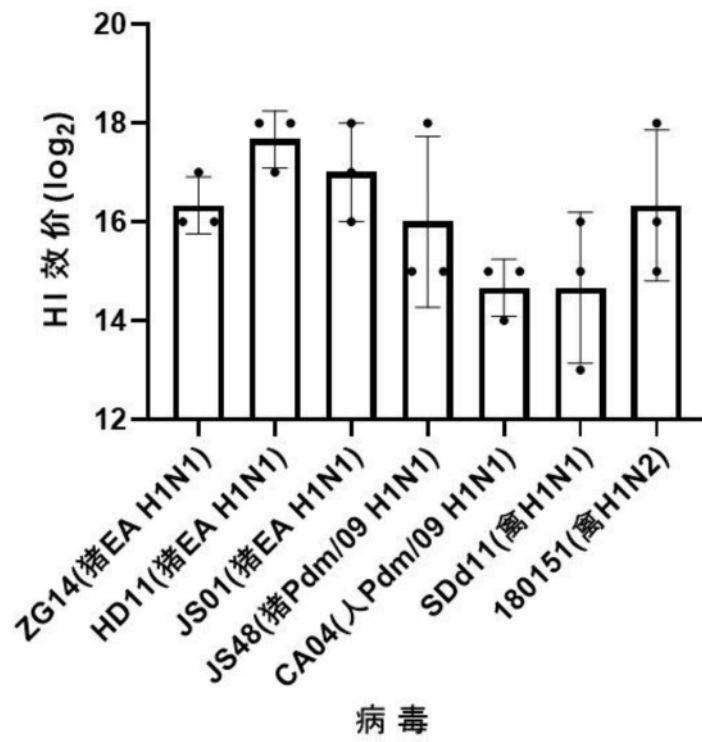
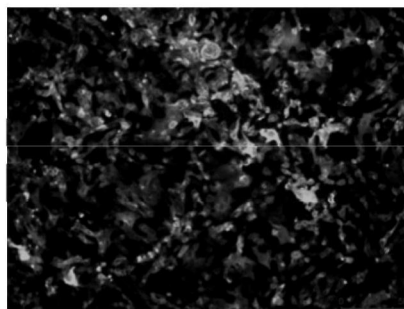
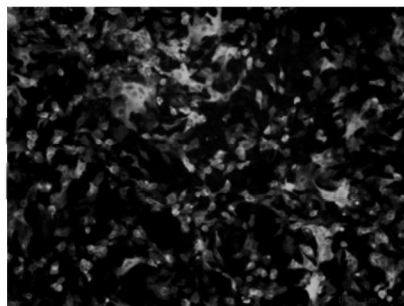


图6

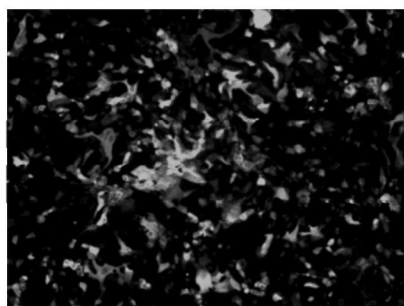
HD11
(猪EA H1N1)



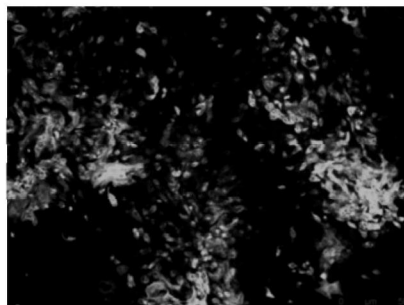
JS48
(猪Pdm/09 H1N1)



CA04
(人Pdm/09 H1N1)



180151
(禽 H1N2)



阴性对照



图7

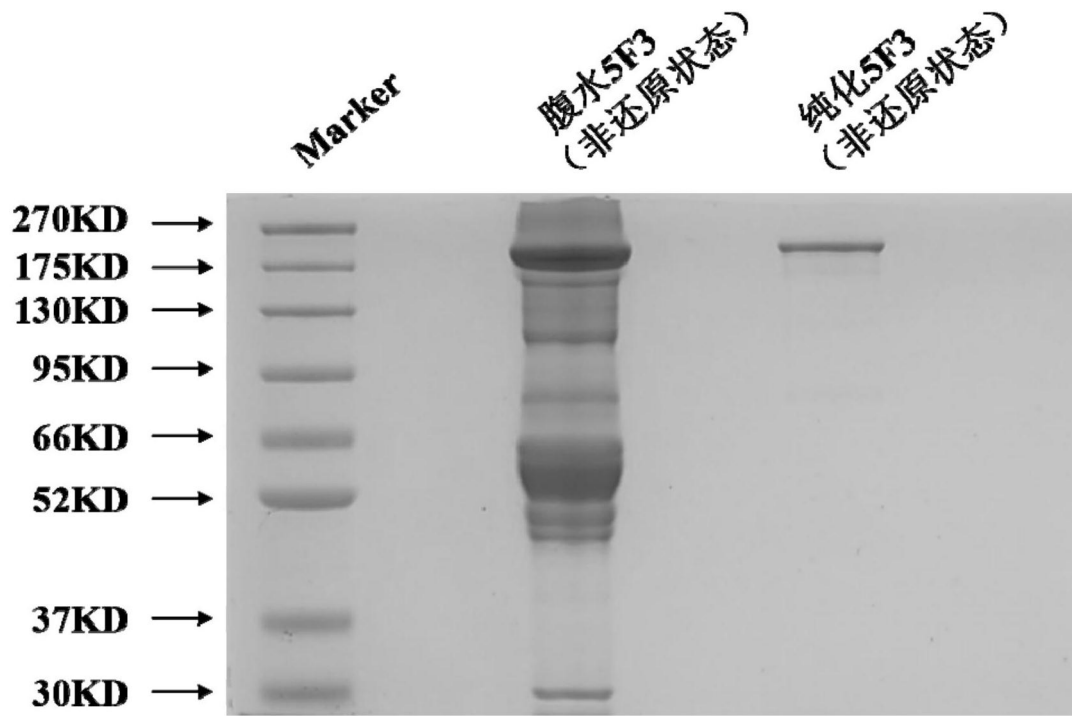


图8

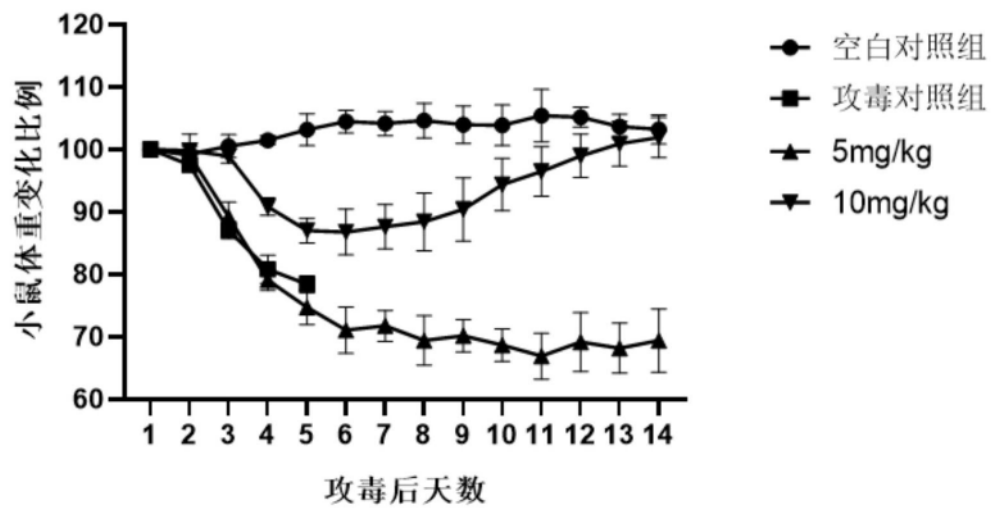


图9

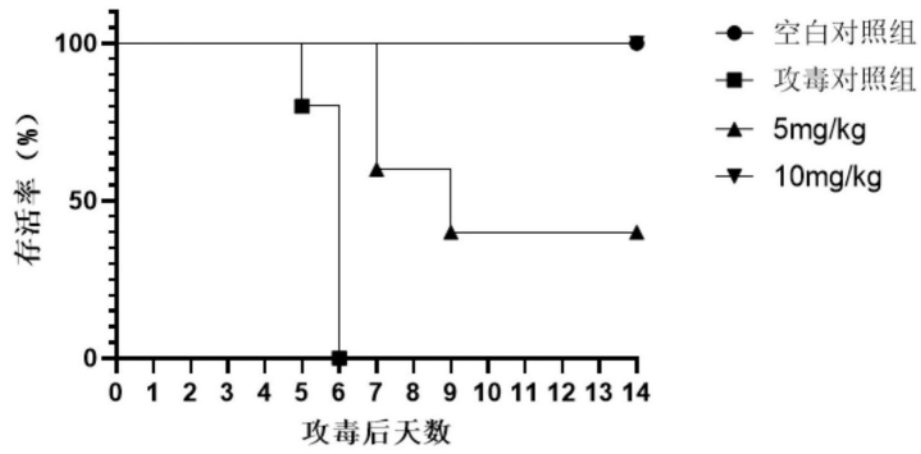


图10

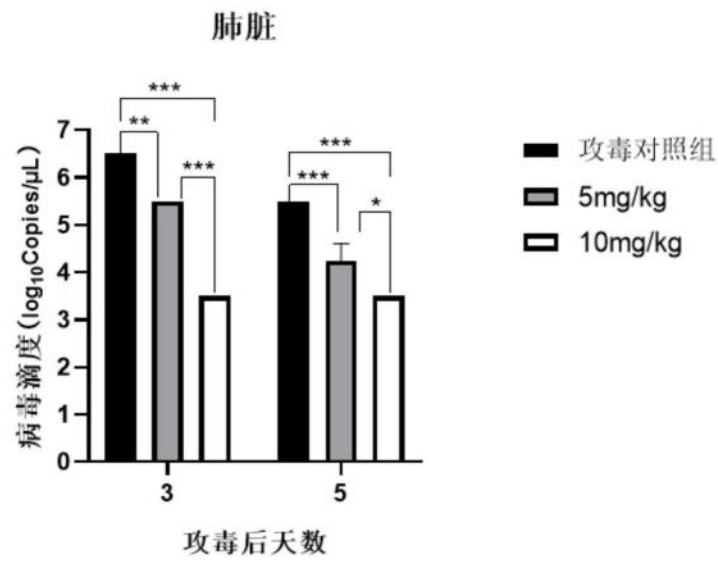


图11

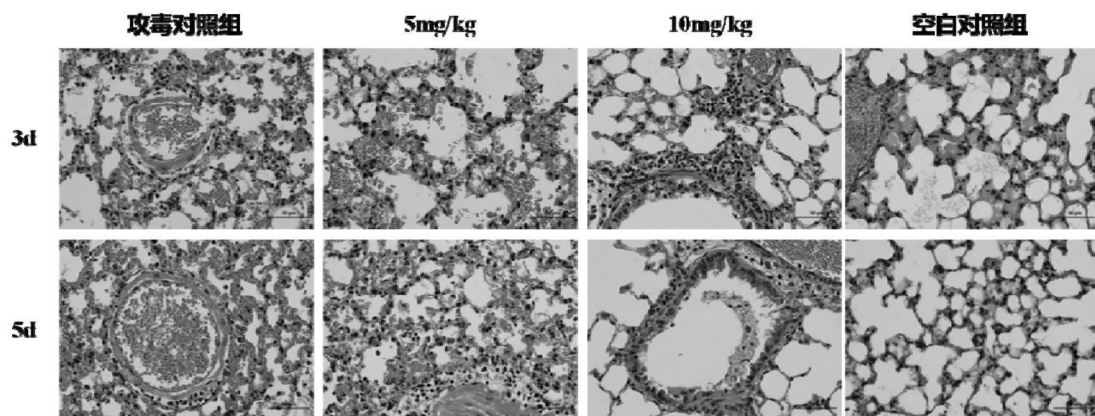


图12