



(21) 申请号 202410648775.3

G01N 33/53 (2006.01)

(22) 申请日 2024.05.23

G01N 33/577 (2006.01)

(83) 生物保藏信息

CGMCC NO.45852 2024.05.07

(71) 申请人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72) 发明人 张国中 李莹飞 赵静 赵焯

杨慧明

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限

公司 11002

专利代理师 黄爽

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体及其应用。通过序列比对,本发明选择S2蛋白上的一段保守氨基酸区域,此区域包含HR2抗原区,经原核表达出截短蛋白作为免疫原,获得了一株杂交瘤细胞株,分泌抗IBV S2蛋白的抗体,该单克隆抗体为后续IBV S2蛋白的结构和功能研究,中和抗原表位筛选与鉴定,以及IBV鉴别诊断技术和产品研发提供关键核心试剂,对于后续IBV诊断防控以及亚单位疫苗中和表位的选择具有重要的科学指导意义;同时也为IBV及冠状病毒的单克隆抗体的筛选、鉴定和制备提供一种新策略和新方法。

1. 禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体,由保藏编号为CGMCC No.45852的禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体细胞株6A9分泌产生。
2. 编码权利要求1所述抗体的核酸分子。
3. 含有权利要求2所述核酸分子的生物材料,其特征在于,所述生物材料为重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。
4. 权利要求1所述抗体在制备禽传染性支气管炎病毒检测试剂或试剂盒中的应用。
5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述禽传染性支气管炎病毒包括QX型、TW型、Mass型。
6. 权利要求1所述抗体在禽传染性支气管炎病毒亚单位疫苗表位筛选中的应用。

## 禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于动物病毒免疫学技术领域,具体地说,涉及一种禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体及其应用。

### 背景技术

[0002] 禽传染性支气管炎(Infectious Bronchitis,IB)是由传染性支气管炎病毒(Infectious Bronchitis Virus,IBV)引起的鸡一种急性,高度接触性传染病,给全世界养禽业造成巨大的经济损失。基因组全长为27.6kb,由单股正链RNA组成,IBV属于冠状病毒科, $\gamma$ 冠状病毒属,编码四种结构蛋白,分别是表面纤突蛋白(Spike Protein,S)、包膜蛋白(Envelope Protein,E)、膜蛋白(Membrane Protein,M)以及包裹基因组的核衣壳蛋白(nucleoprotein,N)。

[0003] IBV主要在上呼吸道的上皮细胞中复制,但也可感染肾脏、肠道和输卵管的上皮细胞,感染IBV的禽类表现出各种临床症状,包括啰音、鼻分泌物、流眼泪、体重增加减少和嗜睡,并伴有上呼吸道、泌尿和生殖系统障碍,导致肾炎以及输卵管发育不良,影响肉鸡体重增加以及蛋鸡的产蛋数量和蛋品质量。

[0004] IBV基因型和血清型众多,病毒表面的纤突蛋白S是机体感染IBV或者接种疫苗时被免疫细胞识别的主要抗原,在诱导B细胞和T细胞反应、刺激机体保护性免疫反应中起关键作用。在病毒入侵宿主细胞时,S蛋白在水解酶作用下裂解成S1和S2,S1蛋白含有受体结合位点,介导病毒的吸附和细胞表面受体识别,随后S2蛋白构象发生短暂改变,暴露出融合肽,介导病毒与细胞膜融合。在免疫压力作用下,且RNA基因组复制的特性,使得S1基因进化迅速,不同基因型之间血清抗体交叉保护性差,相比之下S2基因较为保守,在其他冠状病毒如SARS-COV-2感染或者疫苗接种后血清中含有相当比例的针对S2保守区域的交叉反应性中和抗体,通过外周血分离得到的单克隆抗体靶向融合肽和七肽重复序列(HR1、HR2),能阻止膜融合过程从而起到中和效果。由于靶向S2蛋白的抗体虽然不是直接影响RBD与受体结合,但也能在吸附后过程发挥阻断作用,且目前IBV关于S2蛋白和抗体的研究相对空白。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体及其应用。

[0006] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供一种禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体,由禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体细胞株6A9分泌产生。禽传染性支气管炎病毒S2蛋白单克隆抗体细胞株6A9现已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101,保藏编号CGMCC No.45852,保藏日期2024年5月7日。

[0007] 第二方面,本发明提供编码所述抗体的核酸分子。

[0008] 第三方面,本发明提供含有所述核酸分子的生物材料,所述生物材料包括但不限于重组DNA、表达盒、转座子、质粒载体、病毒载体、工程菌或转基因细胞系。

[0009] 第四方面,本发明提供所述抗体在制备禽传染性支气管炎病毒检测试剂或试剂盒中的应用。

[0010] 所述禽传染性支气管炎病毒包括但不限于QX型、TW型、Mass型。

[0011] 第五方面,本发明提供所述抗体在禽传染性支气管炎病毒亚单位疫苗表位筛选中的应用。

[0012] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0013] 本发明通过序列比对后选择编码S2蛋白的一段保守氨基酸区域,此区域包含HR2抗原区,经原核表达出截短蛋白作为免疫原,获得了一株杂交瘤细胞株,分泌抗IBV S2蛋白的抗体,该单克隆抗体为后续IBV S2蛋白的结构和功能研究,中和抗原表位筛选与鉴定,以及IBV鉴别诊断技术和产品研发提供关键核心试剂,对于后续IBV诊断防控以及亚单位疫苗中和表位的选择具有重要的科学指导意义;同时也为IBV及冠状病毒的单克隆抗体的筛选、鉴定和制备提供一种新策略和新方法。

## 附图说明

[0014] 图1为本发明QX型、TW型和Mass型IBV的S860~1088位氨基酸序列对比图。

[0015] 图2a为本发明较佳实施例中IBV S<sub>860~1088</sub>基因PCR扩增图。

[0016] 图2b为本发明较佳实施例中载体pET-28a双酶切图。

[0017] 图2c为本发明较佳实施例中重组载体pET28a-S<sub>860~1088</sub>菌液PCR鉴定图。

[0018] 图3a为本发明较佳实施例中重组截短蛋白诱导后SDS-PAGE分析图。

[0019] 图3b为本发明较佳实施例中重组截短蛋白纯化洗脱后SDS-PAGE分析图。

[0020] 图4为本发明较佳实施例中建立IFA筛选方法的荧光图。

[0021] 图5a为本发明较佳实施例中分别是三次亚克隆后细胞单集落图。

[0022] 图5b为本发明较佳实施例中分别是三次亚克隆IFA筛选结果的荧光图。

[0023] 图6a为本发明较佳实施例中单抗6A9的腹水与不同基因型代表毒株感染CEK细胞样品的Western blot广谱反应结果。

[0024] 图6b为本发明较佳实施例中单抗6A9的腹水与不同基因型代表毒株感染CEK细胞的IFA广谱反应结果。

[0025] 图7为本发明较佳实施例中禽传染性支气管炎病毒S2蛋白截短体示意图。

[0026] 图8a为本发明较佳实施例中6A9和His抗体分别与860~1088、860~1016以及970~1088截短蛋白Western blot反应结果。

[0027] 图8b为本发明较佳实施例中6A9和his抗体分别与970~1045以及1025~1088截短蛋白Western blot反应结果。

[0028] 图9为本发明较佳实施例中不同基因型的IBV毒株的1025~1045氨基酸比对分析图。

## 具体实施方式

[0029] 本发明旨在提供一种稳定分泌抗禽传染性支气管炎病毒S2蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞株6A9和单克隆抗体的制备方法及应用。

[0030] 本发明采用如下技术方案:

[0031] (1) 据报道,人群感染SARS-COV-2后,恢复期病人血清中有针对七肽重复序列(HRs)的中和抗体,YN毒株的HR2位于860~1088位氨基酸之间,从NCBI数据库下载QX型(YN, GenBank登录号:AEJ80238.2;SD, GenBank登录号:QQL06464.1),TW型(GD, GenBank登录号:WBY69728.1),Mass型(M41, GenBank登录号:ABI26423.1) IBV的S蛋白基因组序列,且通过MegAlign软件分析后,这段区域与SD,GD,M41毒株比较都较为保守,且通过Aliview软件计算YN毒株S基因第860~1088位氨基酸序列与SD,GD和M41氨基酸序列相似度分别为97%、99%、90%。为了保留HR2完整的抗原区,以IBV-YN毒株的全长cDNA为模板,设计特异性引物,通过PCR方法将S基因860~1088位氨基酸对应的碱基序列,构建至pET-28a原核表达载体上,得到重组表达载体PET28a-S<sub>860-1088</sub>;

[0032] (2) 将步骤(1)中测序正确的表达载体pET28aa-S<sub>860-1088</sub>转化大肠杆菌BL21(DE3)后,经IPTG诱导获得重组蛋白;

[0033] (3) 大量表达蛋白,利用His亲和层析树脂纯化柱纯化出重组蛋白;

[0034] (4) 以纯化的重组蛋白作为免疫原,免疫6-8周龄Balb/c雌性小鼠,每只小鼠免疫60ug蛋白,每次免疫间隔14d,三次免疫的第7天,腹腔注射加强免疫后,利用细胞融合技术建立抗S2蛋白杂交瘤细胞库,利用IBV病毒感染鸡胚肾细胞(CEK)固定细胞板后做间接免疫荧光(IFA),建立了IFA筛选单抗的方法;

[0035] (5) 将步骤(4)杂交瘤细胞库中筛选阳性克隆株经过三次亚克隆,得到一株抗IBV S2蛋白特异性杂交瘤细胞株,命名为6A9;对获得的抗IBV S2蛋白特异性杂交瘤细胞株进行Western blot鉴定分析,结果表明该细胞株能与QX型IBV-YN、SD毒株反应,以及其他基因型如TW型,Mass型代表毒株反应;

[0036] (6) 将该细胞株注入小鼠腹腔,收集腹水进行纯化,最终获得高纯度特异性的抗IBV S2单克隆抗体。

[0037] 步骤(5)中筛选到的单克隆抗体识别谱广,可应用于不同基因型的IBV病毒间接免疫荧光实验(IFA)和蛋白质印迹分析(Western blot)等免疫学检测技术和方法中,为后续IBV S2蛋白的结构和功能研究、中和抗原表位筛选与鉴定、以及IBV鉴别诊断技术和产品研发提供核心试剂。

[0038] 本发明提供一种禽传染性支气管炎病毒S2蛋白的广谱反应性单克隆抗体的制备方法:

[0039] (1) 成功筛选到一株能稳定分泌抗禽传染性支气管炎病毒单克隆抗体的杂交瘤细胞株6A9;

[0040] (2) 纯化得到一重链在50KDa,轻链在26KDa纯度理想的单抗;

[0041] (3) 通过间接ELISA方法,用纯化后的全病毒作为抗原包被ELISA板,一抗加入采集的腹水按照1:1000倍稀释,二抗是鼠抗IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgM, IgK, Igλ酶标二抗,检测到该单抗亚类为IgG2a;

[0042] (4) 6A9单克隆抗体是靶向禽传染性支气管炎病毒纤突蛋白S2亚基,且利用Western blot检测该单克隆抗体具有广谱反应性。

[0043] 进一步地,本发明提供一种禽传染性支气管炎病毒S2蛋白的广谱反应性单克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

[0044] (1) 抗原的准备:以课题组前期分离到的一株禽传染性支气管炎病毒YN株为研究

对象,克隆出S蛋白的第860~1088的基因序列至pET-28a原核表达载体上,进行表达,纯化重组蛋白;

[0045] (2) 免疫动物:选取8周龄的BALB/C小鼠3只,在每只小鼠颈背部皮下多点注射纯化蛋白0.3mL/只(约含300ug蛋白)的免疫原,连续免疫三次,每次间隔两周,最后一次加强免疫后,选取血清效价最高的小鼠脾脏进行后续的融合实验。

[0046] (3) 制备小鼠腹腔巨噬细胞作为饲养层细胞;

[0047] (4) 细胞融合:采用50%的PEG1450作融合剂进行细胞融合,具体操作:取免疫的小鼠脾脏进行研磨,用空白DMEM清洗后,离心弃去上层红细胞,第三次离心后和SP2/0混匀离心。将离心管放入40°C预热的无菌水瓶中,一分钟内加完PEG,再静置1min,五分钟内加完15ml空白的DMEM终止融合,期间缓慢摇动离心管,离心后将融合细胞铺到含有饲养层的96孔板中,第四天左右半换液成HAT培养基,第八天全换成HT补充培养基,等集落长到占孔底1/2大小,即可进行抗体检测;

[0048] (5) 建立了间接免疫荧光筛选方法:为了筛选出可与QX型毒株反应单克隆抗体,选择QX型SD株作为筛选毒株,SD毒株感染96孔板的鸡胚肾细胞,固定后用第三次免疫后的多抗血清作为一抗,再加入FITC标记的鼠源二抗孵育后通过荧光显微镜观察荧光强度。

[0049] (6) 杂交瘤细胞的选择性培养与克隆:采用常规有限稀释法对阳性孔进行克隆,换上HT完全培养基后,培养12天左右,克隆可长至占孔底面积的1/3-1/2,进行3次亚克隆,获得一株能稳定分泌抗IBVS2蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞,此时可取培养上清再次进行抗体检测(融合后抗体检测);

[0050] (7) 杂交瘤细胞的保存和复苏:经过3~4次亚克隆后,确定阳性孔的单克隆进一步扩大培养,此处选择了96微孔培养法,具体操作:将检测后阳性孔吹下均匀铺至96孔板中,只需5天左右,96孔长满后用排枪吹下,移至5ml细胞瓶中继续培养。细胞冻存液按照血清:DMEM:DMSO=5:4:1体积比,每管细胞密度约 $5 \times 10^6$ 个细胞,经过梯度降温后移至液氮中保存。复苏后快速放至37°C水浴锅中融化,离心后用完全培养基重悬,温箱中培养。

[0051] (8) 利用杂交瘤细胞注射腹腔大量生产单克隆抗体,本发明通过往Balb/c品系小鼠的腹腔注射不完全佐剂(500 $\mu$ L/只),7~10天后,将扩大培养后的6A9杂交瘤细胞腹腔注射小鼠( $10^5$ 个细胞/只),7天后当出现腹部肿大且行走困难的小鼠时,采集腹水离心后暂储存在-20°C,将腹水稀释至25600倍数后利用IFA实验检测,依旧能见荧光;

[0052] (9) 采用北京博奥龙免疫技术公司的ELISA小鼠单克隆抗体分型试剂盒鉴定单克隆抗体的亚型;

[0053] (10) 采用南京金斯瑞公司的抗体纯化试剂盒纯化1ml腹水,浓度为1.27mg/mL。

[0054] (11) 采用Western blot和IFA检测单克隆抗体的反应性,得出该单克隆抗体可以与QX型,TW型以及Mass型传染性支气管炎病毒的代表毒株均能反应,具有良好的广谱性。

[0055] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0056] 实施例1

[0057] 1. 生物材料与试剂

[0058] 1.1 生物材料

[0059] YN毒株、SD毒株、GD毒株、M41毒株、NP2011毒株(均由中国农业大学动物医学院禽

病研究与防控综合实验室保存,毒株信息参见Zhong,Qi et al.“Pathogenicity of virulent infectious bronchitis virus isolate YN on hen ovary and oviduct.” *Veterinary microbiology* vol.193(2016):100-5.doi:10.1016/j.vetmic.2016.08.017, You,Ren rong et al.“Identification and Comparison of the Sialic Acid-Binding Domain Characteristics of Avian Coronavirus Infectious Bronchitis Virus Spike Protein.” *Journal of virology* vol.97,5(2023):e0048923.doi:10.1128/jvi.00489-23,Sun,Lu et al.“Two newly isolated GVI lineage infectious bronchitis viruses in China show unique molecular and pathogenicity characteristics.” *Infection, genetics and evolution:journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* vol.94(2021):105006.doi:10.1016/j.meegid.2021.105006),BL21 (DE3) 大肠杆菌,6~8周龄雌性Balb/c小鼠,SP2/0骨髓瘤细胞。

#### [0060] 1.2实验试剂与耗材

[0061] 胎牛血清,青链霉素,DMEM,胰酶,限制性内切酶BamHI和XhoI,同源重组酶,DNA marker 2000/5000,IPTG,BCA Protein Assay Kit,His标签蛋白纯化试剂盒,Freund's incomplete adjuvant (FIA)、Freund's complete adjuvant (FIA)、PCR产物回收试剂盒,胶回收试剂盒,质粒提取试剂盒,透析袋,聚乙二醇融合剂,HAT和HT补充物,单克隆抗体亚类检测试剂盒,FITC和HRP标记的荧光二抗,脱脂奶,96孔聚苯乙烯酶标板,细胞冻存液。

#### [0062] 2.实验方法

##### [0063] 2.1PCR扩增目的片段

[0064] 根据GenBank中已发表的禽传染性支气管炎QX型代表毒株(YN、SD)、TW型代表毒株(GD)和Mass型代表毒株(M41)的S2基因序列,选择同源性较高,且含有HR2抗原表位的第860~1088氨基酸区域,MegAlign软件对比分析结果如图1所示。设计YN引物,并在上下游引物中分别加入限制性内切酶BamHI和XhoI以及载体两侧同源臂,上游引物序列为:5'-AGCAAA TGGGTCGCGGATCCGCGCAACTTGATGCAATTC-3',下游引物序列为:5'-GGTGGTGGTGGTCTCGAGCA GTTCTTCAAGGTCTATA-3'。将各组分加入PCR管,混匀,放入PCR仪中进行扩增。反应程序:98°C2min;98°C10s,58°C5s,68°C5s,30个循环;72°C10min。反应结束后取产物进行核酸电泳分析,凝胶成像系统观察在700bp附近有条带,与预期大小相符(图2a)经切胶纯化回收。

##### [0065] 2.2载体双酶切

[0066] 载体3ug,BamHI和XhoI限制性内切酶各3μL,10X cut smart Buffer 5μL,用水补齐至50μL体系,37°C切3h,经核酸电泳,凝胶成像观察在5000bp附近有条带,与预期大小相符(图2b)。

##### [0067] 2.3转化,涂板,菌液PCR鉴定

[0068] 目的片段与线性化载体通过同源重组,37°C,15min连接转化至DH5α感受态大肠杆菌后,均匀涂布于含氨苄抗性的LB固体琼脂平板上继续培养14~16h,挑选单菌落经双酶切鉴定,后三个泳道PCR产物条带位置符合预期700bp(图2c),送至北京擎科生物技术有限公司测序,测序结果表明载体构建成功,将阳性质粒命名为pET28a-S<sub>860~1088</sub>。

##### [0069] 2.4重组蛋白的诱导表达

[0070] 将测序正确的阳性质粒转化至BL21 (DE3) 大肠杆菌中,挑选单菌落至LB液体培养

基中,220rpm培养3h,待 $OD_{600}$ 值达到0.4~0.6时,加入终浓度为0.5mM的IPTG,16°C,220rpm培养12h。

[0071] 将菌液移至离心管,10000rpm离心5min,弃上清,灭菌PBS洗两次,取适量PBS重悬细菌团块,冰上超声破碎,10000rpm离心20min,分别收集上清和沉淀,用80 $\mu$ L灭菌PBS重悬。

[0072] 取诱导表达的重组蛋白上清和沉淀进行SDS-PAGE分析,加入6 $\times$ 上样缓冲液,充分混匀后金属95°C煮样10min,冰浴2min,每孔上样15 $\mu$ L,80V恒压至分离胶,120V恒压1.5小时。

[0073] 电泳完毕后,小心剥离电泳胶,经考马斯亮蓝染色1h,充分脱色至蛋白条带清晰,观察结果如图3a所示。

[0074] 结果:重组蛋白pET28a-S<sub>860~1088</sub>经诱导表达后,和空载相比较,超声裂解的沉淀在25KDa附近有一条蛋白条带,但在超声上清中则无该条带,表明重组蛋白成功表达,且为不可溶的包涵体蛋白。

[0075] 2.5重组蛋白的纯化

[0076] 确定蛋白在包涵体表达后,用8M尿素溶解后,通过His亲和层析柱纯化蛋白,最后用500mM咪唑洗脱蛋白,蛋白洗脱峰值经SDS-PAGE分析如图3b显示,由于含有尿素,通过透析袋缓缓去除,经超滤管浓缩后利用BCA试剂盒测出蛋白浓度,分装后冻存于-80°C。

[0077] 2.6免疫动物

[0078] 选择3只6~8周龄BALB/c雌性小鼠,每只小鼠免疫60 $\mu$ g纯化的重组蛋白。首次免疫抗原与弗氏完全佐剂按1:1体积比混合,经研磨震荡仪乳化至“油包水,水包油”的状态,皮下注射免疫,免疫剂量为0.2mL/只,二免三免均采用弗氏不完全佐剂,每次免疫间隔2周,一共免疫三次,经过腹腔注射加强免疫后第7天取脾脏融合。

[0079] 2.7杂交瘤细胞筛选方法的建立

[0080] 选取19~21日龄的鸡胚肾细胞,提前一天铺在96孔板中,以IBV的QX型CEK细胞适应毒株SD株作为筛选毒株,待细胞密度接近80%左右,接种病毒,24h后有明显病变后弃去维持液,用PBST轻轻洗3次,每个孔加50 $\mu$ L丙酮:乙醇=3:2混合液,置于-20中固定15min,用PBST洗涤3次,免疫血清用5%脱脂乳按照1:500倍稀释后作为一抗,37°C孵育2h。PBST洗涤3次,加入1:1000倍稀释的FITC标记的荧光二抗,每孔100 $\mu$ L,37°C孵育1h,再用PBST洗涤3次,荧光显微镜下观察荧光强度如图4所示。

[0081] 2.8杂交瘤细胞库的建立

[0082] 2.8.1饲养层细胞的制备

[0083] 融合前一天,选用6~8周龄SPF级别的空白Balb/c小鼠,眼球采血收集血清作为后续实验的阴性对照。小鼠脱颈后置于75%的酒精中浸泡5-10分钟后转移至超净台,用含有HAT的DMEM培养基冲洗腹腔3-5次获得腹腔巨噬细胞,然后均匀铺在5~6块96孔细胞培养板上,在显微镜下可以观察到圆亮的细胞。注意无菌操作,不能扎破内脏。

[0084] 2.8.2细胞融合

[0085] 提前准备状态最佳、数量合适的SP2/0细胞。取阳性小鼠脾细胞前的准备流程同上,小鼠脾脏在左胸腹部位,呈长条状。刮去表面脂肪组织,用空白DMEM培养基洗两遍。注射器反复吹打脾脏直至泛白,或者直接研磨脾脏组织,然后依次用无菌的200、100目滤网过滤后,800rpm、5min离心2~3次吸去上面一层覆盖的红细胞,脾细胞:SP2/0=10:1的比例,

混匀后加入空白DMEM培养基重悬,放在50mL圆底离心管中再次离心,彻底弃去上清。将50mL离心管放在提前预热的40°C水瓶里面,1min内加完0.9mL提前预热的PEG,先慢后快,加的同时稍倾斜顺时针转动离心管。水浴静置60s。5min内加15mL预热的空白DMEM培养基以终止融合过程,800rpm、5min弃掉上清,加入预热的HAT重悬加到铺满饲养层细胞的96孔板中继续培养。

#### [0086] 2.9杂交瘤细胞株的筛选

[0087] 换液前标记出单克隆集落的孔,第5~8天HAT半量换液,第8~10天全换液,第10~12天左右细胞已经占据整个视野,取50~100 $\mu$ L变黄的上清,利用建立的IFA筛选方法,加至提前固定好的96孔板。选择IFA检测中荧光强度较亮、细胞生长状态较好、单个克隆的阳性孔,用HAT培养基稀释阳性孔后选取约80个细胞至10mL培养基,然后加至提前铺好饲养层的96孔板继续培养。第一次亚克隆后5~8天就可以换成HT培养基。连续三次亚克隆,最终选择稳定分泌抗体的细胞株继续扩大培养,留取一部分保存在液氮中,另外一部分取腹水。三次亚克隆的单集落以及筛选过程的荧光图如图5a和图5b所示。

#### [0088] 2.10单克隆抗体腹水制备

[0089] 提前一周,选取体重在22g左右的Balb/c小鼠,每只腹腔注射300~500 $\mu$ L的不完全佐剂致敏,每株单克隆抗体致敏2~3只小鼠。一周后每只小鼠腹腔注射10<sup>6</sup>个杂交瘤细胞,待小鼠腹部隆起,抽取腹水,一般偏大的小鼠采集较多,采集到的腹水低速离心去除杂质后,通过纯化试剂盒纯化抗体后分装暂存在-40°C。

#### [0090] 3.抗体反应性鉴定

##### [0091] 3.1Western blot鉴定单抗腹水与不同基因型代表毒株广谱反应性

[0092] YN、SD、GD、M41病毒分别感染鸡胚肾细胞36h后,裂解细胞后收取总蛋白样品,加入6 $\times$ 上样缓冲液,煮沸10min后,-20°C冻存备用。

[0093] 总蛋白样品进行SDS-PAGE电泳,电泳完毕后采用Bio-Rad湿转仪,恒流200mA,120min将蛋白转移至PVDF膜上,转印完毕后进行后续实验具体操作如下:

[0094] 1) 封闭:用5%脱脂乳室温封闭2h。

[0095] 2) 洗涤:用TBST洗涤3次,每次5min。

[0096] 3) 一抗:4000倍PBS稀释纯化后的抗体,37°C孵育2h或者4°C过夜,再次洗涤操作如上。

[0097] 4) 二抗:加入1:10000脱脂乳稀释的HRP标记的二抗,室温孵育1h,洗涤三次。

[0098] 5) 显影:结果如图6a所示,在YN、SD、GD、M41病毒感染CEK样品的180kDa和100kDa附近分别有S全长及S2裂解条带,而GVI型代表毒株NP2011未见明显条带。

##### [0099] 3.2IFA鉴定单抗腹水与不同基因型代表毒株广谱反应

[0100] 同前述建立的IFA筛选方法,用YN、SD、GD、M41、NP2011毒株分别感染CEK细胞,单抗用PBS按照1:3000稀释后,在荧光显微镜观察结果如图6b所示,与不同基因型的IBV毒株都有交叉反应性。

[0101] 根据上述IFA和Western blot实验结果可知,本发明的抗禽传染性支气管病毒S2蛋白单克隆抗体具有良好的广谱反应性,与目前流行的QX型(YN毒株、SD毒株),TW型(GD毒株),Mass型(M41毒株)以及逐年流行的GVI毒株IBV都可以反应。

##### [0102] 实施例2抗原表位的筛选



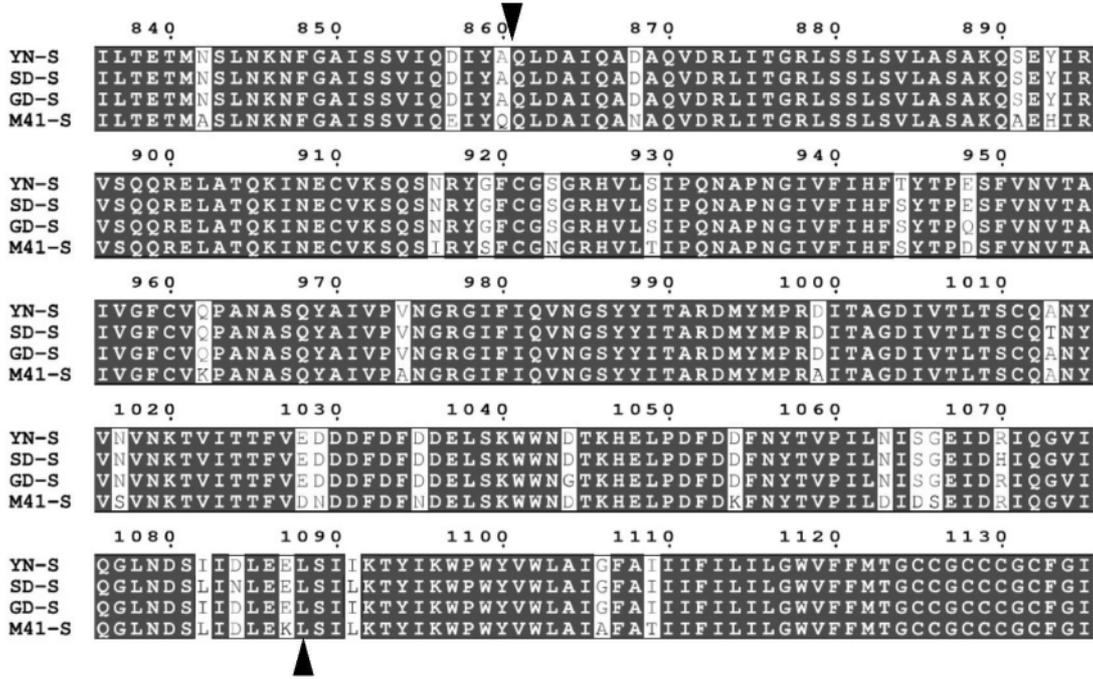


图1

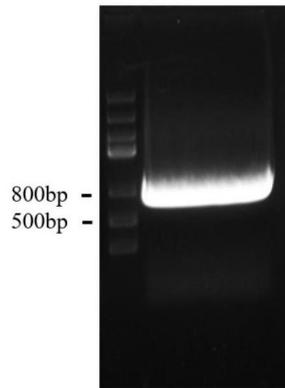


图2a

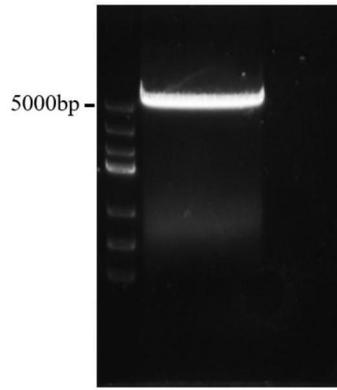


图2b

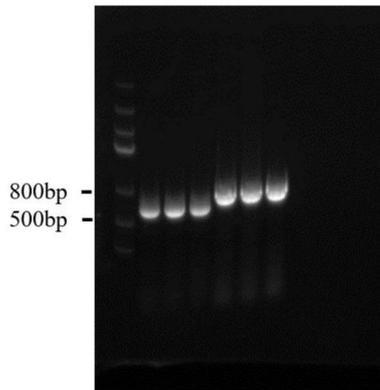


图2c

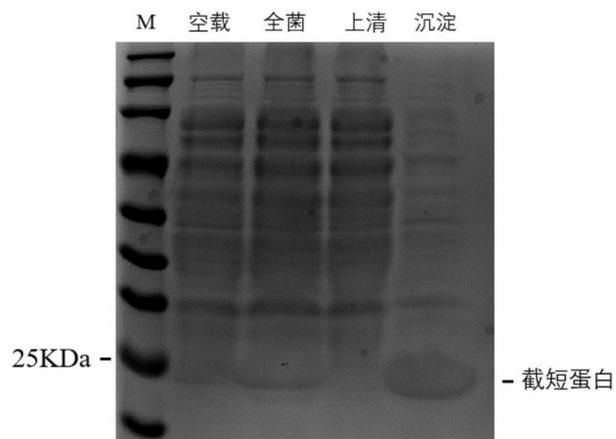


图3a

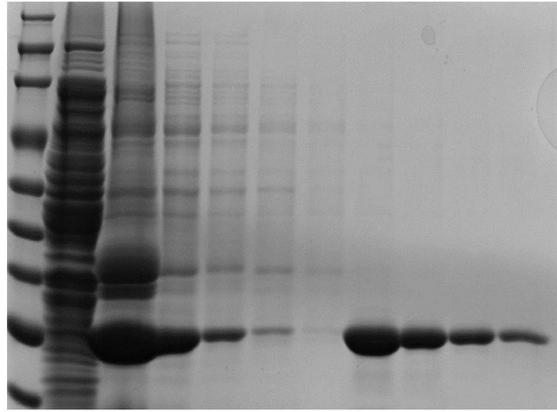


图3b

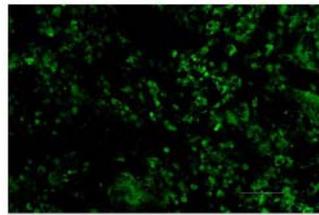


图4



图5a

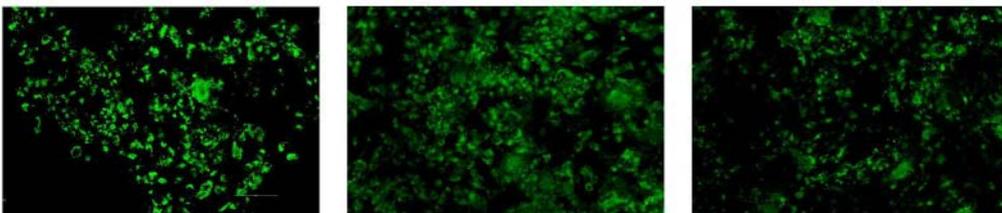


图5b

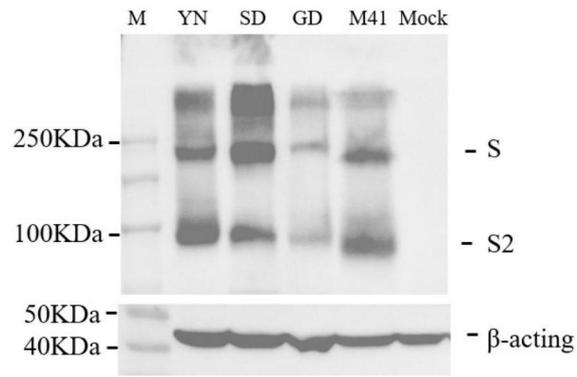


图6a

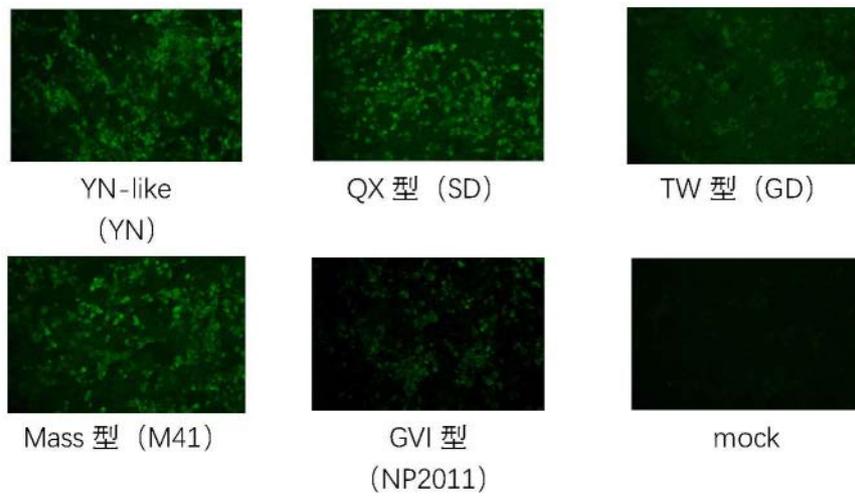


图6b

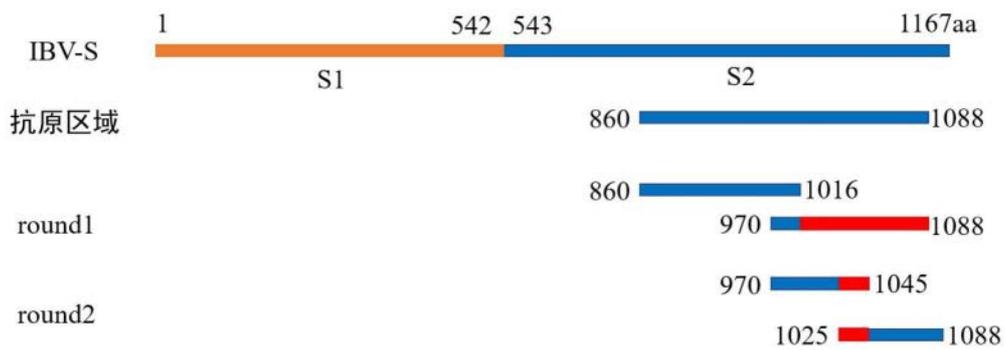


图7

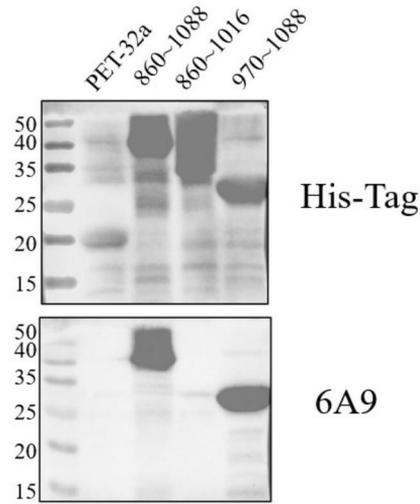


图8a

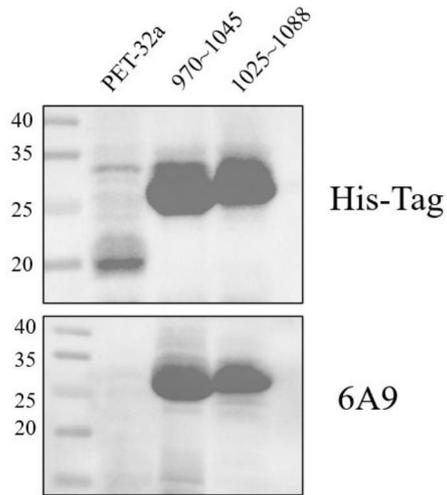


图8b

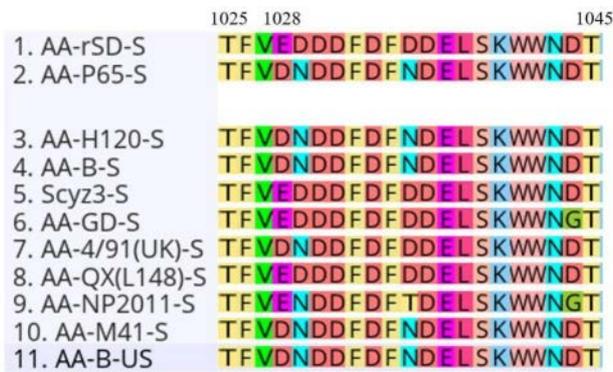


图9