



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118440162 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 06

(21) 申请号 202410642369.6

(22) 申请日 2024.05.23

(71) 申请人 四川农业大学

地址 611130 四川省成都市温江区惠民路
211号

申请人 孙迪

(72) 发明人 孙迪 程文泽 程安春 汪铭书
刘马峰

(51) Int. Cl.

C07K 14/085 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/06 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

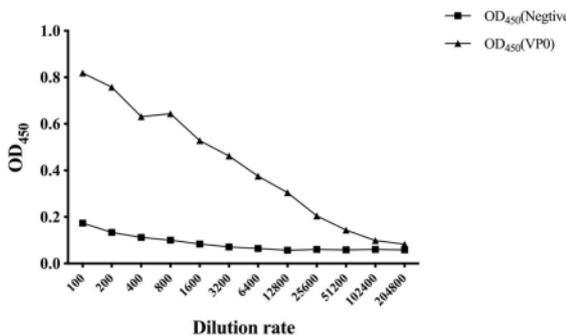
权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图4页

(54) 发明名称

一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽及其多克隆抗体的制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽及其多克隆抗体的制备方法和应用,属于生物化学和分子免疫学技术领域,该3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示,使用该多肽免疫昆明鼠制备了多克隆抗体,所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体通过VP0多肽耦联KLH作为抗原免疫获得的抗血清。本发明所述多克隆抗体制备方法简单、成本低,所得抗体效价高,能够特异性识别真核细胞中的3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白。



1. 一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽,其特征在于:所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

2. 一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体,其特征在于,所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体通过3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽作为抗原免疫获得,所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体,其特征在于:所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽与所述血蓝蛋白(KLH)通过耦联剂MBS耦联。

4. 如权利要求2所述的3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

将3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽与血蓝蛋白(KLH)耦联,得完全抗原;将所述完全抗原与快速免疫水佐剂混匀,免疫昆明鼠;采集含有3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽抗体的血清,即得抗血清。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述完全抗原与博奥龙快速免疫水佐剂等体积混匀,免疫昆明鼠,包括以下步骤:

每只小鼠免疫抗原量为20 μg ,将抗原稀释好后与等体积博奥龙快速免疫水佐剂混匀后采用腿部肌肉注射,首次免疫昆明鼠,首免3周后进行加强免疫,加强免疫次数为1次。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:所述采集含有3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽抗体的血清,包括以下步骤:

对昆明鼠采用毛细管眼眶采血的方法,收集血液后,37°C倾斜静置1 h,然后4°C静置12 h,分离得到抗血清。

7. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:还包括对3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体进行真核表达VP0蛋白的免疫印记检测。

8. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于:还包括对3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体进行病毒感染细胞中VP0蛋白的免疫印记检测。

9. 权利要求2所述多克隆抗体或权利要求3~8任一项所述制备方法所得多克隆抗体在检测3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白水平方面的应用。

一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽及其多克隆抗体的制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化学和分子免疫学技术领域,尤其涉及一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽及其多克隆抗体的制备方法和应用。

背景技术

[0002] 鸭病毒性肝炎(Duck viral hepatitis, DVH)是由鸭肝炎病毒(Duck hepatitis virus, DHV)感染雏鸭引起的一种急性、高度接触传染性疾病。该病主要侵害4周龄以内的雏鸭,主要特点是地方流行性、传播迅速、病程短和死亡率高,是危害养鸭业的主要疾病之一。病死雏鸭头部向后仰,呈“角弓反张”状,剖检可见肝脏肿大及大量出血性斑点。DHV曾经分为3个血清型,即I、II和III型。I型鸭肝炎病毒(DHV-I)现已更名为鸭甲型肝炎病毒(Duck hepatitis A virus, DHAV)。而DHAV又分为3个血清型,即1型、2型和3型,且DHAV-3在中国广泛流行,对养鸭业产生巨大危害。

[0003] DHAV-3作为一种微小RNA病毒,其生命周期首先是通过受体吸附于宿主细胞,并传递其RNA基因组进入细胞质中,并利用细胞自身的新陈代谢进行病毒的表达和装配从而形成新的病毒粒子,在此过程中结构蛋白发挥了巨大功能,比如可以结合细胞表面受体、维持病毒形态稳定。另外在病毒刺激机体产生体液免疫和细胞免疫的过程中结构蛋白发挥了重要作用。

[0004] 鸭作为中国重要的水禽,通过DHAV的研究可以有效缓解疫病对养鸭业的损失。VP0作为DHAV-3表面的一个重要结构蛋白,具有良好的免疫原性和宿主保护位点,通过对VP0的研究可以填补关于DHAV-3感染细胞机制的空白。由于制备DHAV-3 VP0单克隆抗体过程复杂、成本高、耗时长,严重制约了对DHAV-3的检测,且市场上检测DHAV-3 VP0抗体的缺乏,因此,制备针对DHAV-3 VP0蛋白的多克隆抗体意义重大,既能用于检测DHAV-3的感染情况,又能弥补市场上对此抗体的需求。

发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提出了一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽及其多克隆抗体的制备方法和应用,本发明制备所得3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽和3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽多克隆抗体,具有制备方法简单、成本低、效价高的特点,能够特异性结合3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供了一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽,所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0007] 本发明还提供了一种3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体,所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体通过3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽作为抗原免疫获得,所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。

[0008] 优选的,所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽与所述血蓝蛋白通过耦联剂MBS耦联。

[0009] 本发明还提供了所述的3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体的制备方法,包括以下步骤:

将3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽与血蓝蛋白(KLH)通过耦联剂MBS耦联成为完全抗原;所述完全抗原与博奥龙快速免疫水佐剂混匀,免疫昆明鼠;采集含有3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽抗体的血清,即得所述3型鸭甲型肝炎病毒VP0多克隆抗体。

[0010] 优选的,所述完全抗原,免疫昆明鼠,包括以下步骤:

每只小鼠免疫抗原量为20 μ g,将抗原稀释好后与等体积博奥龙快速免疫水佐剂混匀后采用腿部肌肉注射,首次免疫昆明鼠,首免3周后进行加强免疫,加强免疫次数为1次。

[0011] 优选的,所述采集含有鼠抗3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽抗体的血清,包括以下步骤:

对昆明鼠采用毛细管眼眶采血的方法,收集血液后,37 $^{\circ}$ C倾斜静置1h,然后4 $^{\circ}$ C静置12h,分离得到抗血清。

[0012] 优选的,得到所述抗血清后,还包括采用间接ELISA法检测抗血清的效价。

[0013] 优选的,还包括对鼠抗3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体进行真核细胞中3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白的免疫印迹检测。

[0014] 本发明还提供了所述多克隆抗体或所述制备方法制备所得多克隆抗体在检测真核细胞中3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白水平方面的应用。

[0015] 与现有技术相比,本发明具有如下优点和技术效果:

1、本发明在3型鸭甲型肝炎病毒VP0基因序列基础上,对3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白质序列的抗原性、亲水性和同源性等进行分析,预测出适合的肽段序列作为靶序列进行人工合成。

[0016] 2、对预测合成后的肽段序列与载体蛋白血蓝蛋白耦联,获得3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽-KLH耦联蛋白。

[0017] 3、用制备的3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽-KLH耦联蛋白免疫昆明鼠,并通过间接ELISA方法检测抗血清的效价,ELISA检测结果显示制备的抗血清效价在1:51200以上。

[0018] 本发明所制备的鼠抗3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽抗体能够特异性识别真核细胞中3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白,填补了关于3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白检测研究领域的空白,为3型鸭甲型肝炎病毒感染鸭的致病研究奠定了材料基础。

具体实施方式

[0019] 现详细说明本发明的多种示例性实施方式,该详细说明不应认为是对本发明的限制,而应理解为是对本发明的某些方面、特性和实施方案的更详细的描述。

[0020] 应理解本发明中所述的术语仅仅是为描述特别的实施方式,并非用于限制本发明。另外,对于本发明中的数值范围,应理解为还具体公开了该范围的上限和下限之间的每个中间值。在任何陈述值或陈述范围内的中间值以及任何其他陈述值或在所述范围内的中间值之间的每个较小的范围也包括在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括或排除在范围内。

[0021] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所述领域的常规技术人员通常理解的含义。虽然本发明仅描述了优选的方法和材料,但是在本发明的

实施或测试中也可以使用与本文所述相似或等同的任何方法和材料。本说明书中提到的所有文献通过引用并入,用以公开和描述与所述文献相关的方法和/或材料。在与任何并入的文献冲突时,以本说明书的内容为准。

[0022] 在不背离本发明的范围或精神的情况下,可对本发明说明书的具体实施方式做多种改进和变化,这对本领域技术人员而言是显而易见的。由本发明的说明书得到的其他实施方式对技术人员而言是显而易见的。本发明说明书和实施例仅是示例性的。

[0023] 关于本文中所使用的“包含”、“包括”、“具有”、“含有”等等,均为开放性的用语,即意指包含但不限于。

[0024] 本发明实施例中使用的药品来源:

雌性昆明鼠购自成都达硕实验动物有限公司、快速免疫水佐剂购自博奥龙生物科技有限公司。

实施例

[0025] 1 .3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白质序列分析和3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的设计及合成

对DHAV-3 VP0基因序列进行分析,可知:DHAV-3 VP0为768bp,编码256aa。

[0026] DHAV-3 VP0蛋白全长氨基酸序列SEQ ID NO .1:MDTLTKNIEDETVKIIIGSCAEKAQEAI SGLGAVESVASTNSVVATANATTTQTIPDPTDGDSTDFYSCSYEVGAQGDNISRLVHLHTGQWSTQHGVTTCLRWL ATPGCFYTVNTQPAYGQTRYFRFIRCGYHFRLLVNAPSGAAGGLMMVWMPYPYCRVLTGSYNVDASVDRRSLNLP YAILDLRTNTEIDLVIPIYVNFNRYVEITATDSVGAICVFVLGAFTHGSGTSNTVDYTLFGEMLETDLQCPRPFNDQ。

[0027] 利用不同生物信息学网站(分别为ABCPred、BcePred、BepiPred-3.0)对3型鸭甲型肝炎病毒VP0蛋白质序列的抗原性进行分析,综合筛选出一段氨基酸序列为拟合成的靶序列作抗原,SEQ ID NO.2:CRVLTGSYNVDASVDRRSL(160-178aa)。

[0028] DHAV-3 VP0多肽用高效液相色谱仪(HPLC)检测纯度,结果如图4所示,DHAV-3 VP0多肽纯度为90.737%;用质谱检测DHAV-3 VP0多肽的分子量,结果如图5所示,其分子量为2111.40Da。

[0029] 2 .DHAV-3 VP0多肽与载体蛋白钥孔血蓝蛋白(KLH)耦联

通过耦联剂MBS将5.0mg DHAV-3 VP0多肽与5.0mg载体蛋白KLH进行耦联,耦联由爱博泰克生物科技有限公司完成,获得DHAV-3 VP0多肽-KLH耦联蛋白,即完全抗原。

[0030] 3 .免疫实验动物与制备抗血清

选取雌性昆明鼠作为免疫动物,首次免疫前经昆明鼠尾尖采血(采血均在上午饲喂前),作为后续ELISA检测的对照血清。

[0031] 抗原肽以干粉形式发送且总量为5mg,使用无菌ddH₂O稀释干粉至终浓度为1mg/mL可保存至-20℃。佐剂于4℃保存,用量以每只小鼠50μL记。从免疫当天记为第1天。第1天,用生理盐水将抗原稀释到2倍最终浓度(按每针次50μL用量配制)。每只小鼠免疫抗原量为20μg,则在以ddH₂O稀释后的抗原肽基础上,每15只小鼠所需0.3mg抗原,将0.3mg抗原以生理盐水稀释,即取300μL ddH₂O稀释后的抗原,补至750μL的生理盐水,此时抗原终浓度为0.4mg/mL。充分混匀佐剂后,以体积比1:1的形式将佐剂与稀释好的抗原混匀,准备免疫。此

时每15只小鼠准备750 μ L佐剂,混匀抗原后共1500 μ L,此时抗原终浓度为0.2mg/mL,即每100 μ L含有20 μ g抗原。通过小鼠后腿肌肉注射免疫小鼠,每只小鼠免疫100 μ L。第21天以同样方式加强免疫一针。第35天采血进行ELISA效价测定。根据检测到抗体效价的结果判断是否需要继续加强免疫。

[0032] 二次免疫后,采集抗血清,对昆明鼠使用毛细管进行眼眶采血,大量采血后收集血液于37 $^{\circ}$ C倾斜静置1h,然后转入到4 $^{\circ}$ C冰箱中,静置12h,使其充分析出抗血清,4 $^{\circ}$ C,2500r/min离心20min,分离抗血清,分装保存于-80 $^{\circ}$ C冰箱,备用。

[0033] 4. 间接ELISA法检测抗血清的效价

包被。将纯化后的VP0蛋白用包被液(0.05mol/L碳酸盐缓冲液,PH=9.6,称取碳酸钠0.75g,碳酸氢钠1.46g,称量去离子水溶解并定容至500mL)稀释至50 μ g/mL,包被酶标板,100 μ L/孔,放于4 $^{\circ}$ C包被过夜;洗涤。使用PBST洗涤4次,每次摇晃后弃液;封闭。加入5%脱脂奶粉,300 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭1h;洗涤。使用PBST洗涤4次,每次摇晃后弃液;孵育一抗。将分离后的VP0组血清及阴性血清以不同稀释度(1:100、1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:51200、1:102400、1:204800)以100 μ L/孔加入酶标板,37 $^{\circ}$ C反应2h(每组设置4个重复);洗涤。使用PBST洗涤4次,每次摇晃后弃液;孵育二抗。用PBS将HRP-羊抗鼠IgG稀释后以100 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C反应1h(抗体稀释液为1/10浓度的封闭液);洗涤。使用PBST洗涤4次,每次摇晃后弃液;显色。加入TMB显色液100 μ L/孔,于37 $^{\circ}$ C避光显色20min(或室温避光显色30min);测定OD450。于50 μ L/孔加入2M H₂SO₄终止反应后测定OD450值;当与阴性对照血清的比值大于2.1时,计算抗体效价。

[0034] 检测结果如图6所示:DHAV-3 VP0抗血清的抗体效价为1:51200。

[0035] 5. 真核细胞中DHAV-3 VP0蛋白的免疫印迹(Western Blot)检测

按照索莱宝的SDS-PAGE配制凝胶试剂盒进行配胶,取真核表达的DHAV-3 VP0蛋白与5 \times loading buffer制样后加入垂直电泳槽的上样孔中,跑SDS-PAGE凝胶电泳,90V电泳30min,然后电压调至120V电泳2h至溴酚兰跑到离胶底部1.5cm时即可终止电泳。

[0036] SDS-PAGE电泳结束后,用湿法进行转膜,将蛋白转膜至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉进行封闭,室温封闭3h,用TBST洗膜3次,每次5min。加入一抗(制备所得鼠抗DHAV-3 VP0多肽多克隆抗体,采用不同稀释度进行稀释,稀释度分别为1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,用TBST洗膜6次;加入HRP标记的羊抗鼠IgG作为二抗进行孵育,室温孵育1h,用TBST洗膜3次;ECL发光液混合后与PVDF膜避光反应后采集荧光发光图像。显色完毕后利用标签抗体作为一抗,相同操作进行显色,确保蛋白大小一致,从而确定DHAV-3 VP0多肽抗血清可识别DHAV-3 VP0蛋白。

[0037] 结果如图7所示,条带清晰,DHAV-3 VP0抗血清特异性较好。

[0038] 收集感染DHAV-3的细胞蛋白样品,结果如图8所示,条带较清晰,DHAV-3 VP0抗血清能够特异性识别病毒感染过程中的VP0蛋白。

[0039] 以上所述的实施例仅是对本发明的优选方式进行描述,并非对本发明的范围进行限定,在不脱离本发明设计精神的前提下,本领域普通技术人员对本发明的技术方案做出的各种变形和改进,均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

[0040] 图1为利用生物信息学网站ABCPred对3型鸭甲型肝炎病毒VP0氨基酸序列的抗原指数的分析结果

图2为利用生物信息学网站BcePred对3型鸭甲型肝炎病毒VP0氨基酸序列的抗原指数的分析结果

图3为利用生物信息学网站BepiPred-3.0对3型鸭甲型肝炎病毒VP0氨基酸序列的抗原指数的分析结果

图4为3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的HPLC纯度检测结果

图5为3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的质谱检测结果

图6为间接ELISA法检测的鼠抗DHAV-3 VP0血清效价

图7为应用本发明制备的鼠抗3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体检测真核表达VP0蛋白的Western Blot结果 (VP0蛋白融合HA标签,HA标签抗体为对照组)

图8为应用本发明制备的鼠抗3型鸭甲型肝炎病毒VP0多肽的多克隆抗体检测DHAV-3感染细胞中VP0蛋白的Western Blot结果。

Rank	Sequence	Start position	Score
1	FRFIRCGYHFRLLVNA	124	0.93
2	LMMVWMPYPYCRVLTG	147	0.92
3	TQTIPDPTDGGSTDDFY	51	0.91
3	DSVGGAIQVFLGAFV	210	0.91
4	LHTGQWSTQHGVTTC	85	0.88
5	QPAYGQTRYFRFIRCG	115	0.87
6	RWLATPGCFYTVNTQP	101	0.86
7	DFYSCSYEVGAQGDNI	64	0.84
7	SYNVDASVDRRSLNL	163	0.84
8	AISGLGAVESVASTNS	26	0.83
9	GSCAEKAQEAISGLGA	17	0.82
10	TVDYTLFGEMLETDLQ	233	0.80
10	LRTNTEIDLVIPIYVNF	185	0.80
10	APSGAAGGLMMVWMPY	139	0.80
11	TKNIEDETVKIIGSCA	5	0.79
11	SVASTNSVATANATT	35	0.79
11	CRVLTGSYNVDASVDR	157	0.79
12	EMLETDLQCPFPNDQ	241	0.78
12	THGSGTSNTVDYTLFG	225	0.78
12	CVFVLGAFTHGSGTSN	217	0.78
12	FYTVNTQPAYGQTRYF	109	0.78
13	VGAQGDNI SRLVHLHT	72	0.77
14	PYAILDLRTNTEIDLVI	179	0.76
15	YVEITATDSVGGAIQV	203	0.75
16	IDLVIPIYVNFRTVVEI	191	0.67
17	STQHGVTTCRLWLATP	91	0.66
18	VDRRSLNL PYAILDL	170	0.55

图 1

Average: 0.501 Minimum: 0.284 Maximum: 0.660

Predicted peptides:

No.	Start	End	Peptide	Length
1	5	79	TKNIEDETVKIIGSCAEKAQEAISGLGAVESVASTNSVATANATTTQTIPDPTDGGSTDDFYSCSYEVGAQGDNI	75
2	89	99	QWSTQHGVTTC	11
3	109	122	FYTVNTQPAYGQTR	14
4	157	175	CRVLTGSYNVDASVDRRSL	19
5	206	206	I	1
6	208	209	AT	2
7	225	231	THGSGTS	7
8	250	252	PRP	3

图 2

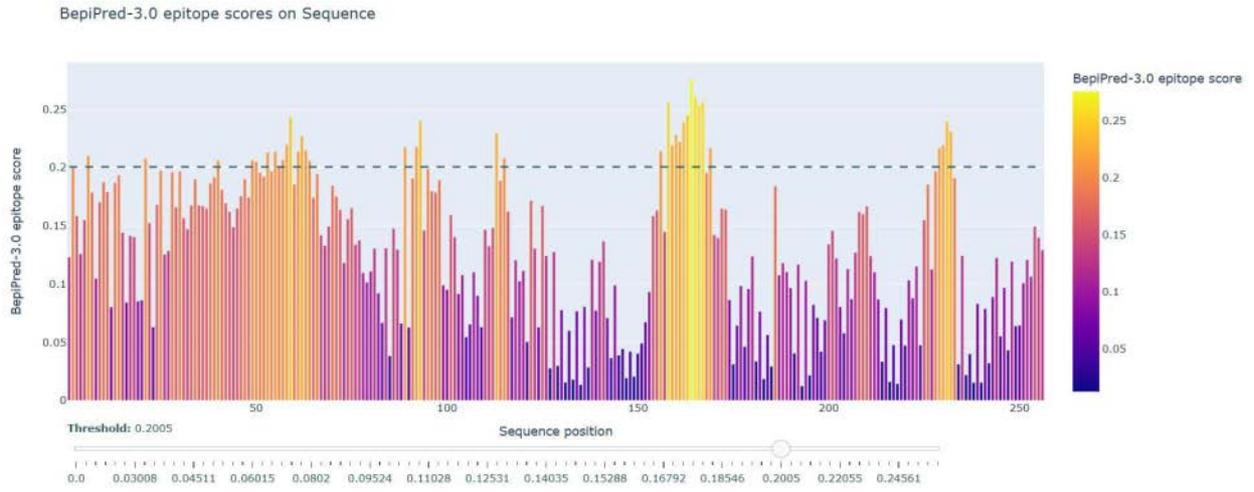


图 3

Chromatogram

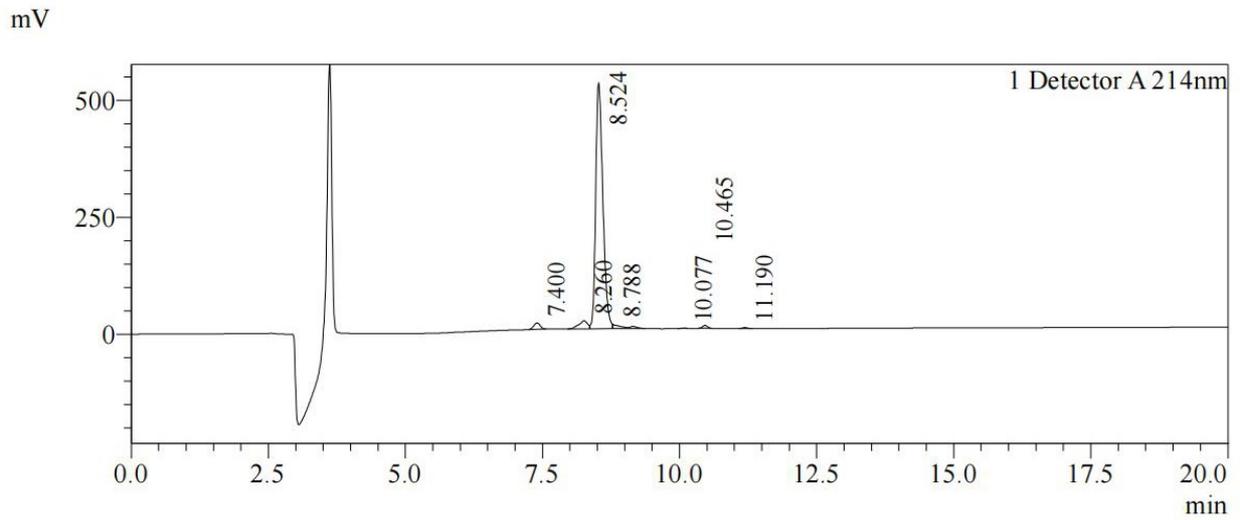


图 4

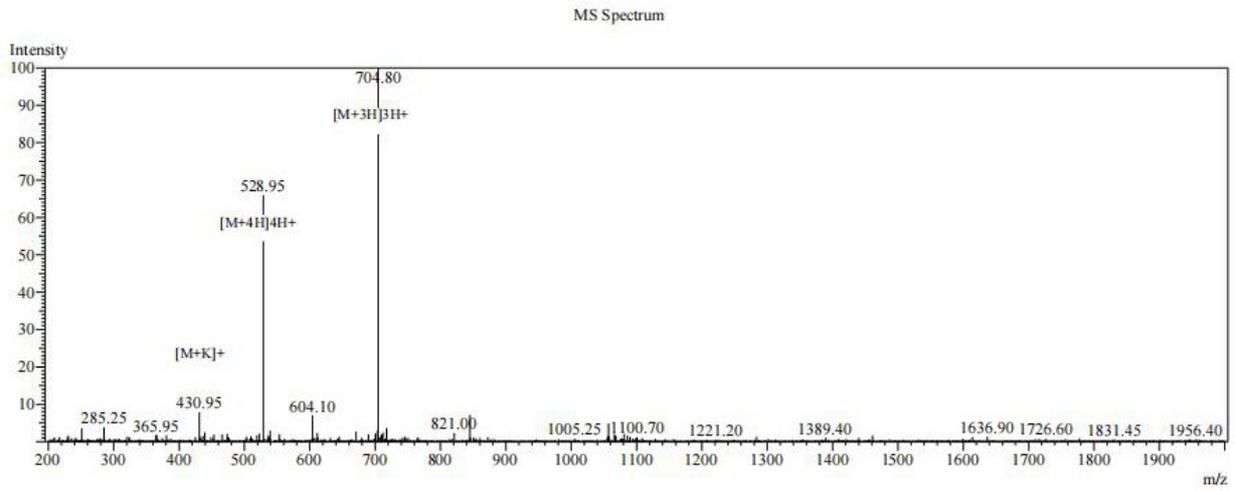


图 5

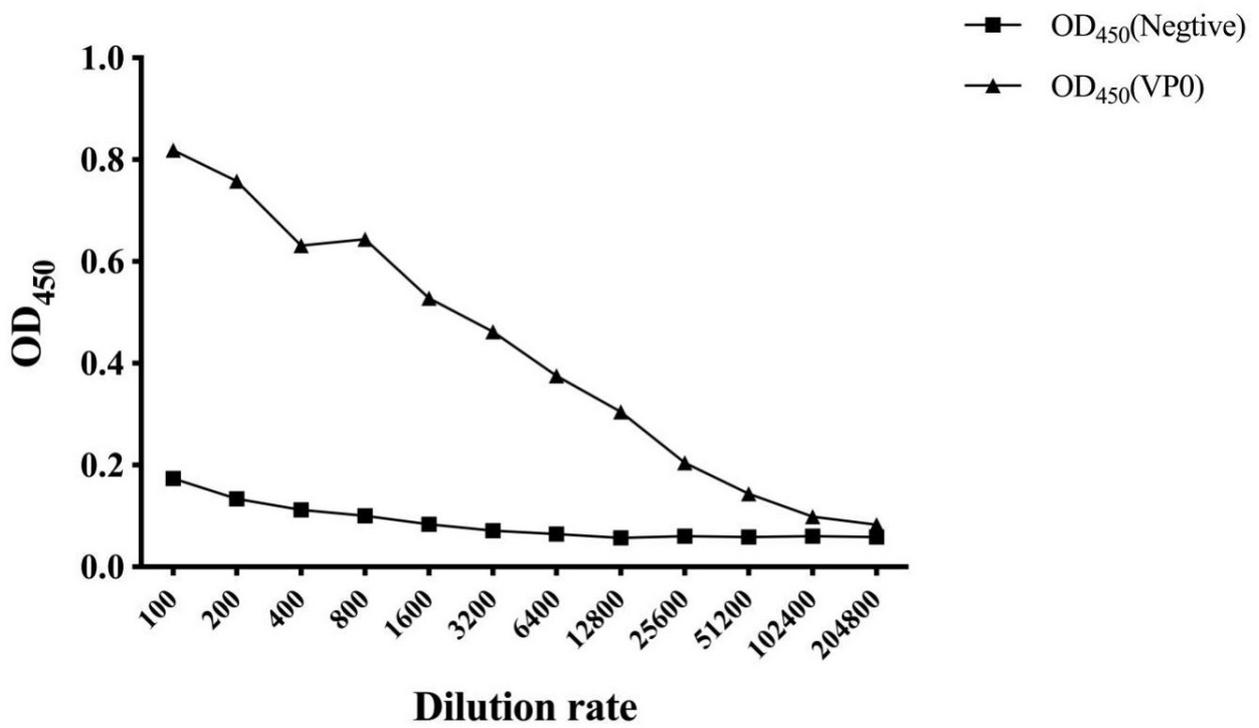


图 6

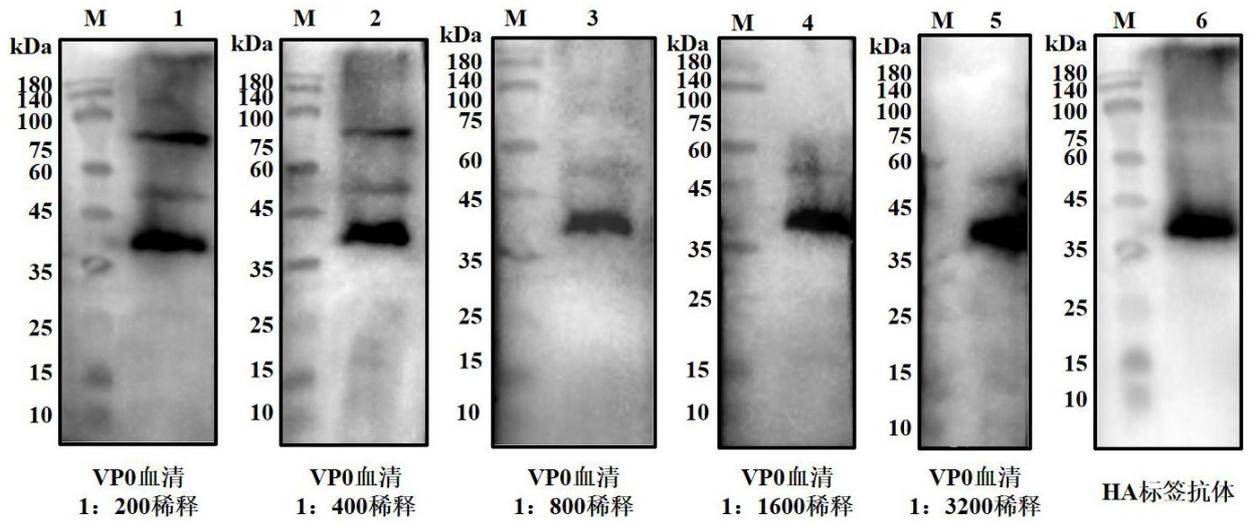


图 7

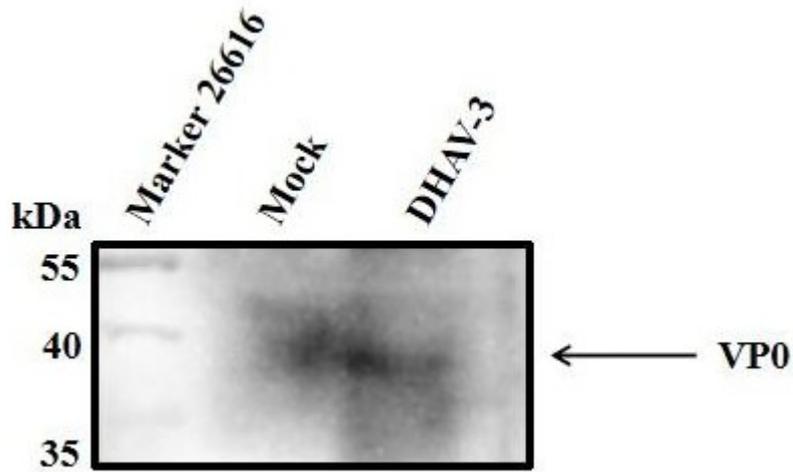


图 8