



肖琦,何后军,江宁,等.新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备及鉴定[J].江西农业大学学报,2021,43(3):660-664.
XIAO Q,HE H J,JIANG N,et al.Preparation and identification of monoclonal antibodies against nucleocapsid protein of novel coronavirus(SARS-CoV-2)[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2021,43(3):660-664.

新型冠状病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

肖琦^{1,2},何后军^{1,2*},江宁^{1,2},曾川^{1,2},顾俊^{1,2},田梦婷^{1,2},
王培霞^{1,2},于晓梦^{1,2},黄冬艳^{1,2},甘平³,唐玉新^{1,2},叶昱^{1,2*}

(1.江西农业大学 动物与科学技术学院,江西 南昌 330045;2.江西省动物疫病防控制剂工程研究中心,江西 南昌 330045;3.江西省动物疫病预防控制中心,江西 南昌 330006)

摘要:【目的】当前,新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2,SARS-CoV-2)导致的疫情在全球大流行,严重危害人类的生命健康。研究拟制备并鉴定针对 SARS-CoV-2 核衣壳蛋白(nucleocapsid,N)的单克隆抗体,为 SARS-CoV-2 新型快速检测方法的创制奠定基础。【方法】纯化原核表达的 SARS-CoV-2 N 重组蛋白并免疫 BALB/c 小鼠,经过 4 次免疫后将小鼠脾细胞与 SP2/O 骨髓瘤细胞融合,采用 ELISA 方法筛选阳性杂交瘤细胞,并通过 western blot 和间接免疫荧光试验鉴定抗体的反应性。【结果】经 3 次亚克隆,试验获得了 2 株能够稳定分泌抗原特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞株,分别命名为 2D11 和 8G6;并且制备的抗体与真核表达的 SARS-CoV-2 N 蛋白反应原性良好。【结论】研究制备的单克隆抗体能够用于 SARS-CoV-2 的检测。

关键词:新型冠状病毒;单克隆抗体;核衣壳蛋白

中图分类号:Q819;R373;R392-3 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2021)03-0660-05

Preparation and Identification of Monoclonal Antibodies Against Nucleocapsid Protein of Novel Coronavirus(SARS-CoV-2)

XIAO Qi^{1,2}, HE Houjun^{1,2*}, JIANG Ning^{1,2}, ZENG Chuan^{1,2}, GU Jun^{1,2},
TIAN Mengting^{1,2}, WANG Peixia^{1,2}, YU Xiaomeng^{1,2},
HUANG Dongyan^{1,2}, GAN Ping³, TANG Yuxin^{1,2}, YE Yu^{1,2*}

(1.College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;
2. Jiangxi Engineering Research Center for Animal Health Products, Nanchang 330045, China; 3. Animal Diseases Control and Prevention Center of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China)

Abstract: [Objective] At present, a novel emerging Coronavirus, Severe Acute Respiratory Syndrome

收稿日期:2021-03-10 修回日期:2021-04-11

基金项目:国家自然科学基金项目(32002289)和江西省科技计划项目(2018ACB21027 和 20203BBF63020)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (32002289) and the Science and Technology Project of Jiangxi Province(2018ACB21027 and 20203BBF63020)

作者简介:肖琦, orcid.org/0000-0002-5968-0042, 1981826407@qq.com; *共同第一作者; *通信作者:叶昱, 助理研究员, 博士, 主要从事病毒与免疫研究, orcid.org/0000-0002-6621-6694, yy6157832@163.com。

Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has caused an epidemic in the world, seriously threatening human life and health. To establish a basis for a rapid detection method for SARS-CoV-2, the monoclonal antibodies targeting nucleocapsid (N) gene were prepared and identified in this study. [Methods] BALB/c mice were immunized with purified SARS-CoV-2 N recombinant protein. After four times of immunization, the spleen cells of the mice were fused with SP2/0 myeloma cells. The positive hybridoma cell lines stably secreting monoclonal antibody were screened through ELISA, and the reactivity of the monoclonal antibody was further determined by western blot and indirect immunofluorescence assay. [Results] After three subclones, two hybridoma cell lines designated as 2D11 and 8G6 were obtained, and the prepared antibodies showed good reactivity with the eukaryotic expression of SARS-CoV-2 N protein. [Conclusion] The monoclonal antibody manufactured in this study can be used for SARS-CoV-2 detection.

Keywords: SARS-CoV-2; monoclonal antibody; nucleocapsid protein

【研究意义】新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 是一种由新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引起的以咳嗽、发热和呼吸困难等为主要症状的急性和烈性传染病。2019年12月,我国率先确诊 COVID-19,并第一时间公布 SARS-CoV-2 完整的基因组序列,此后全球各国均发现类似病例,呈现大流行态势^[1]。截至2021年3月19日,全世界 SARS-CoV-2 感染病例为1.19亿,死亡病例为265万,COVID-19 已成为人类健康的重大威胁^[2-3],该病临床表现以呼吸道症状为主,少数伴有消化道症状^[4]。SARS-CoV-2 能够通过飞沫或直接接触方式传播,潜伏期一般为1~14天^[5-6]。【前人研究进展】SARS-CoV-2 属于冠状病毒 β 属成员,病毒结构特征与其他冠状病毒相似, RNA 基因组全长约为29 knt,与2003年严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 的同源性为80%。与 SARS-CoV 相比, SARS-CoV-2 的病例死亡率较低,但传播效率更高,防控难度加大。然而,当前关于 SARS-CoV-2 感染宿主的作用机制了解有限,精准诊断仍然是快速高效扑灭 COVID-19 疫情的关键措施。【本研究切入点】核衣壳蛋白 (nucleocapsid, N) 是 SARS-CoV-2 主要的结构蛋白之一^[7],处于病毒内部,感染期间表达丰度最高,在病毒的复制与免疫调节中发挥重要作用。N 蛋白具有良好的免疫原性,且相对保守稳定,其诱发产生的抗体出现时间早且持续时间长,是 SARS-CoV-2 早期检测的常用靶点^[8]。【拟解决的关键问题】制备针对 SARS-CoV-2 N 蛋白的单克隆抗体,助推基于 N 蛋白的新型诊断技术开发,为 N 蛋白在 SARS-CoV-2 致病机理中的作用研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物、细胞、质粒和菌株 6—8周龄的 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司; SP2/0 骨髓瘤细胞和 HEK-293T 由本实验室保存; N 蛋白真核表达质粒 pcDNA6B-nCoV-N-Flag 和 pcDNA6B-Flag 由山东大学王培会教授惠赠; 携带 pET28a(+)-N 的 BL21 (DE3) 菌株由广东省实验动物监测所丛锋老师惠赠。

1.1.2 主要试剂 卡那霉素、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 和透析袋均购自索莱宝公司; 包涵体溶解液和 Ni-NTA 预装重力柱购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; SDS-PAGE 试剂盒购自塞维尔生物科技有限公司; PVDF 膜由 Millipore 公司提供; 极超敏 ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 RPMI-1640 培养基购于 Gibco 公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、融合剂 (polyethylene glycol 1450, PEG 1450)、HAT 培养基补充剂 (50 \times) 及 HT 培养基补充剂 (50 \times) 均购于 SIGMA 公司; FITC 和 HRP 标记羊抗鼠 IgG 购于北京全式金生物技术有限公司; Lipofectamine 2000 和 DAPI 均购自 Thermo Fisher 公司, 单抗亚类鉴定酶即用装购自北京博奥龙免疫技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 SARS-CoV-2 N 重组蛋白的表达和纯化 将携带 pET-32a-p30 质粒的 BL21 (DE3) 菌株过夜活化

培养后,将2 mL菌液接种到200 mL LB液体培养基(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)中,2~3 h后当菌液OD值达到0.4~0.6时取出,加入终浓度为0.8 mmol/L IPTG 诱导8 h;5 000 r/min离心10 min收集诱导后的菌体,PBS洗涤2次;按10 mg/mL加入溶菌酶,充分混匀后置于37 $^{\circ}\text{C}$ 裂解1 h;裂解后的菌液预冷后加入工作浓度为1 mmol/L PMSF,置于冰水浴中超声波破碎,超声2 s间歇2 s,功率25%,温度上限25 $^{\circ}\text{C}$,总时长为1 h;4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 rpm离心10~20 min获得破碎处理的包涵体沉淀,PBS洗涤2次,包涵体溶解液充分溶解,再次4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 rpm离心10~20 min,使用0.45 μm 滤器过滤离心后的上清。参照说明书进行Ni-NTA预装重力柱亲和层析纯化,洗脱的蛋白继续透析复性并检测浓度,分装保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.2 小鼠免疫和细胞融合 免疫前3 d采集小鼠血清,作为阴性对照。将纯化的SARS-CoV-2 N重组蛋白与弗氏完全佐剂1:1乳化,首免采用颈背部皮下多点注射方式对小鼠进行免疫,剂量为150 $\mu\text{g}/\text{只}$;随后3次免疫均使用弗氏不完全佐剂乳化重组蛋白,间隔14 d免疫,剂量150 $\mu\text{g}/\text{只}$;四免后第10天测定小鼠血清抗体水平,对抗体效价最高的小鼠再次冲击免疫,剂量150 $\mu\text{g}/\text{只}$,3 d后取小鼠脾脏,分离B细胞与SP2/0骨髓瘤细胞以1:10比例混合,添加50% PEG 1450诱导融合,利用HAT培养基将融合细胞重悬后转移至铺有饲养细胞的96孔板培养。5 d后,将新鲜HAT培养基替换原孔内1/2培养基,7~10 d后全部改为HT培养基。

1.2.3 间接ELISA方法筛选杂交瘤细胞 将纯化SARS-CoV-2 N重组蛋白包被于ELISA板,检测收集融合后第14天的杂交瘤细胞上清中的抗体效价,设空白对照。采用有限稀释法,按10倍倍比稀释($10^1\sim 10^4$),挑选长势较好、细胞团单一的阳性细胞开展亚克隆。重复3轮亚克隆获得分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞。

1.2.4 单克隆抗体的反应原性鉴定 (1)Western blot鉴定抗体的反应原性。SDS-PAGE检测纯化SARS-CoV-2 N重组蛋白,并设置空载pET28a(+)作为阴性对照,转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉封闭2 h后,以筛选细胞的上清为一抗,HRP标记羊抗鼠IgG(1:200 0)为二抗,检测单克隆抗体的反应原性。

(2)间接免疫荧光试验鉴定单抗的反应原性。将状态良好的HEK-293T铺于12孔板,待细胞融合度达80%时,通过Lipofectamine 2000转染pcDNA6B-nCoV-N-Flag至细胞,并设置pcDNA6B-Flag转染组为阴性对照。转染24 h后,弃掉细胞培养基,加入4%多聚甲醛固定细胞,PBS洗涤3次,使用预冷的无水甲醇透化处理细胞。5% BSA 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭30 min后,加入阳性杂交瘤细胞上清,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育,PBS洗涤3次,再加入FITC标记羊抗鼠IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,置于倒置荧光显微镜下观察。

1.2.5 单克隆抗体的亚型鉴定 使用小鼠单抗Ig类/亚类鉴定用酶标二抗即用套装鉴定单抗的亚型,具体步骤如下:将纯化SARS-CoV-2 N重组蛋白包被酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,每孔100 ng/100 μL 。将筛选的杂交瘤细胞培养上清加入酶标板孔中,每种单克隆抗体加16孔,每孔100 μL ,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育30 min,PBST清洗5遍;将试剂盒中的8种酶标记物各加2孔,每孔100 μL ,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育30 min,PBST清洗5遍,随后每孔加100 μL TMB显色液,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光显色20 min,直接观察酶标板孔中液体的颜色或加入终止液后用酶标仪进行读数即可判定结果。

2 结 果

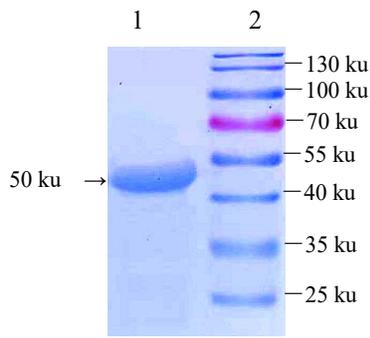
2.1 重组蛋白的纯化结果

将纯化的SARS-CoV-2 N重组蛋白样品进行SDS-PAGE分析,结果显示过柱纯化的蛋白纯度较高,在目的位置出现符合预期大小的单一条带,约为50 ku,没有明显的蛋白杂带(图1),可以用于后续免疫小鼠的抗原。

2.2 间接ELISA方法筛选杂交瘤细胞

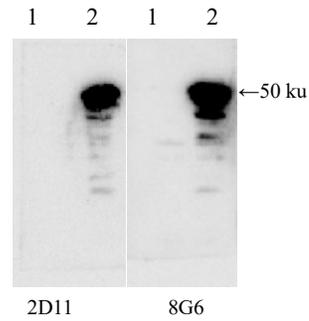
采用间接ELISA方法检测四轮免疫后小鼠的血清抗体效价,选择血清效价大于10万的小鼠冲击免疫,3 d后取脾细胞,诱导其与杂交瘤细胞发生融合。融合后的细胞通过间接ELISA技术,连续进行3轮亚

克隆筛选,获得了两株稳定分泌 SARS-CoV-2 N 重组蛋白抗体的杂交瘤细胞株,并命名为 2D11 和 8G6。



1: 纯化后的 N 蛋白; 2: 蛋白 marker
1: purified N protein; 2: protein marker

图 1 SARS-CoV-2 N 重组蛋白的 SDS-PAGE 检测结果
Fig.1 SDS-PAGE results of SARS-CoV-2 N recombinant protein



1: 空载蛋白; 2: SARS-CoV-2 N
1: empty protein; 2: sars-cov-2 n

图 2 单克隆抗体与 SARS-CoV-2 N 重组蛋白作用的 Western blotting 结果
Fig.2 Western blotting results of the interaction between monoclonal antibody and SARS-CoV-2 N recombinant protein

2.3 WB 鉴定单克隆抗体对 SARS-CoV-2 N 重组蛋白的反应性

应用筛选的单克隆抗体作为一抗, WB 检测其与 SARS-CoV-2 N 重组蛋白的反应性,结果显示两株单克隆抗体均能与 N 蛋白反应且载体对照组无条带(图 2)。表明筛选的细胞株 2D11 和 8G6 分泌的单克隆抗体均具有良好的反应原性。

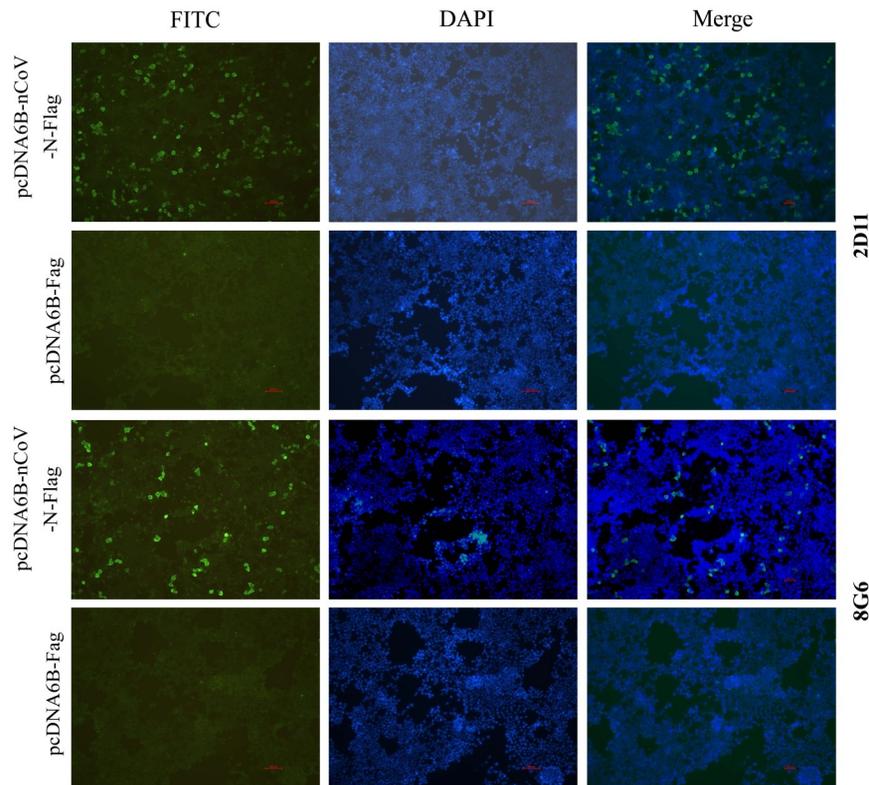


图 3 单克隆抗体 2D11 和 8G6 与 SARS-CoV-2 N 真核表达蛋白作用的间接免疫荧光试验结果
Fig.3 Indirect immunofluorescence test results of the interaction of monoclonal antibodies 2D11 and 8G6 with SARS-CoV-2 N eukaryotic expression protein

2.4 间接免疫荧光鉴定单克隆抗体对真核表达 SARS-CoV-2 N 蛋白的作用

以筛选的阳性杂交瘤细胞上清作为一抗, 检验单克隆抗体对转染真核表达载体的 HEK-293T 作用。结果如图 3 所示, pcDNA6B-nCoV-N-Flag 转染 HEK-293T 的胞浆中释放大量荧光, 而载体 pcDNA6B-

Flag 转染细胞组则没有荧光,说明细胞株 2D11 和 8G6 分泌的抗体与真核表达的 SARS-CoV-2 N 蛋白反应良好。

2.4 单克隆抗体的亚型鉴定结果

通过小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定试剂盒,明确单克隆抗体的亚型,研究证实 2D11 和 8G6 分泌的单克隆抗体亚型均为 IgG1,轻链均为 κ 型。

3 小 结

新现的 COVID-19 与 SARS 相比,死亡率较低,但传播效率较高。患者临床症状一般表现为发热、咳嗽和呼吸困难等;而重症病例则出现肺炎、严重急性呼吸综合征和肾衰竭,甚至死亡^[9]。从 2019 年发现至 2021 年 3 月 19 日,COVID-19 已经在全球大暴发,累计确诊人数和死亡人数分别超过 1 亿例和 200 万例,导致世界各国医疗服务体系和经济安全面临严峻的挑战。尽管多款 SARS-CoV-2 疫苗获得紧急使用授权,产能不足引发供应紧张,限制了人类群体免疫接种的规模。同时,无症状感染患者的存在进一步加大了 SARS-CoV-2 追踪的难度。因此,建立快速灵敏的检测方法对精准发现 COVID-19 病例尤为重要,以便第一时间采取隔离措施,从而有效控制疫情的扩散^[10-11]。

冠状病毒是已知最大的 RNA 病毒,属于冠状病毒科正冠状病毒亚科,根据血清型和基因组特点,正冠状病毒亚科又被分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4 个属。研究发现,新现的 SARS-CoV-2 与致人死亡的中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)和 SARS-CoV 同为 β 属冠状病毒。而基因组特征和进化分析表明,SARS-CoV-2 的基因组序列与 SARS-CoV 的同源性较近。SARS-CoV-2 的 4 种主要结构蛋白分别是刺突蛋白(spike, S)、包膜糖蛋白(envelop, E)、膜糖蛋白(membrane, M)和核衣壳蛋白(N)^[12]。其中,N 蛋白丰度最高,包裹病毒 RNA,与其形成核衣壳结构;并且含量相对稳定,是 SARS-CoV-2 IgM/IgG 抗体快速检测试纸条的理想靶标^[13]。此外,N 蛋白的功能多样,在病毒复制过程中参与 RNA 的加工,能够促进病毒复制,增强入侵细胞的能力;还可以结合应激颗粒蛋白和天然免疫信号分子,参与宿主免疫反应的调控。可以说,研究 N 蛋白的功能可以进一步揭示 SARS-CoV-2 感染与天然免疫反应之间的相互作用,对拮抗 SARS-CoV-2 创新药物的开发意义重大^[14]。

本试验成功实现了 SARS-CoV-2 N 重组蛋白的原核表达,将其作为抗原免疫小鼠后,筛选了两株分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株,经 western blot 和间接免疫荧光试验验证了制备的单克隆抗体具有针对 N 蛋白的特异性反应,为后续快速敏捷的 SARS-CoV-2 诊断方法和靶向药物的研究提供了基础。

参考文献 References:

- [1] 张西西,张怡青,李玉林,等.新型冠状病毒(SARS-CoV-2)N 蛋白 C 端重组蛋白的原核表达、纯化及应用[J].生物技术通报,2021,37(5):1-6.
ZHANG X X, ZHANG Y Q, LI Y L, et al. Prokaryotic expression, purification and application of N protein C-terminal recombinant protein in novel coronavirus(SARS-CoV-2)[J]. Biotechnology bulletin, 2021, 37(5): 1-6.
- [2] LIU W B, LIU L, KOU G M, et al. Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2.[J]. Journal of clinical microbiology, 2020, 58(6): e00461-20.
- [3] 郭德银,江佳富,宋宏彬,等.2020—2021 年度新型冠状病毒肺炎疫情发展趋势分析与应对[J].疾病监测,2020,35(12):1068-1072.
GUO D Y, JIANG J F, SONG H B, et al. Predictive analysis and countermeasures in response to COVID-19 epidemic in 2020—2021[J]. Disease surveillance, 2020, 35(12): 1068-1072.
- [4] 陆丹,魏望,沈艳丽,等.新型冠状病毒对多种生理系统的影响[J].暨南大学学报(自然科学与医学版),2021,42(1):94-103.
LU D, WEI W, SHEN Y L, et al. The impact of COVID-19 on virus physiological systems[J]. Journal of Jinan university (natural science & medicine edition), 2021, 42(1): 94-103.
- [5] ZHANG T, WU Q F, ZHANG Z G. Probable pangolin origin of SARS-CoV-2 associated with the COVID-19 outbreak[J]. Current biology, 2020, 30(8): 1346-1351.

(下转第 674 页)