



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109206509 A

(43)申请公布日 2019.01.15

(21)申请号 201710514485.X

A61P 31/22(2006.01)

(22)申请日 2017.06.29

(71)申请人 洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司

地址 471003 河南省洛阳市高新区华夏路

(72)发明人 田克恭 王莹

(74)专利代理机构 北京聿宏知识产权代理有限公司

公司 11372

代理人 吴大建 方莉

(51)Int.Cl.

C07K 16/08(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

A61K 39/42(2006.01)

权利要求书3页 说明书19页

序列表4页

(54)发明名称

与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的单克隆抗体及其应用

(57)摘要

本发明涉及特异性结合伪狂犬病病毒gD蛋白的鼠单克隆抗体的可变区序列,其为鼠单克隆抗体3B6的可变区序列或鼠单克隆抗体5G7的可变区序列;本发明还涉及由鼠单克隆抗体3B6可变区序列中的重链可变区序列或其保守性变异体,和/或轻链可变区序列或其保守性变异体组成的抗体,及由鼠单克隆抗体5G7可变区序列中的重链可变区序列或其保守性变异体,和/或轻链可变区序列或其保守性变异体组成的抗体。含所述抗体的ELISA检测试剂盒,克服了PRVgD蛋白与其它蛋白串联表达或融合表达后无法准确定量、预期表达效果无法验证的技术难题,解决了配制疫苗的关键问题。同时,含所述抗体的药物组合物,具有广谱性。

1. 特异性结合伪狂犬病病毒gD蛋白的可变区序列,其为鼠单克隆抗体3B6的可变区序列,所述鼠单克隆抗体3B6的可变区序列中,重链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.2经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体;轻链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.4经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体;

和/或为鼠单克隆抗体5G7的可变区序列,所述鼠单克隆抗体5G7的可变区序列中,重链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.6经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体;轻链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.8经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体。

2. 一种与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的抗体,其包括权利要求1所述的鼠单克隆抗体3B6的重链可变区氨基酸序列,和/或轻链可变区氨基酸序列;

优选地,所述抗体为单克隆抗体和/或基因工程抗体;所述基因工程抗体选自单链抗体、单链抗体片段、嵌合单克隆抗体、嵌合单克隆抗体片段、改形单克隆抗体、改形单克隆抗体片段、猪源单克隆抗体、猪源单克隆抗体片段中的一种;

进一步优选地,所述抗体为鼠单克隆抗体3B6。

3. 一种与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的抗体,其包括权利要求1所述的鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列,和/或轻链可变区氨基酸序列;

优选地,所述抗体为单克隆抗体和/或基因工程抗体;所述基因工程抗体选自单链抗体、单链抗体片段、嵌合单克隆抗体、嵌合单克隆抗体片段、改形单克隆抗体、改形单克隆抗体片段、猪源单克隆抗体、猪源单克隆抗体片段中的一种;

进一步优选地,所述抗体为鼠单克隆抗体5G7。

4. 一种药物组合物,其包括免疫量的抗体以及药学上可接受的载体;所述抗体选自权利要求2和3所述抗体,以及由所述鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列和所述鼠单克隆抗体3B6的轻链可变区氨基酸序列制备的单链抗体中的一种或多种;

优选地,所述抗体选自权利要求3所述抗体,以及由所述鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列和所述鼠单克隆抗体3B6的轻链可变区氨基酸序列制备的单链抗体中的一种或多种;

进一步优选地,所述的权利要求3所述抗体为鼠单克隆抗体5G7和/或由所述鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列制备的单链抗体;

更进一步优选地,所述药物组合物进一步含有其他病原体抗原,所述其他病原体抗原包括感染猪的病原体抗原或感染犬的病原体抗原;

其中,所述感染猪的病原体抗原选自猪瘟病毒抗原、猪圆环病毒抗原、副猪嗜血杆菌抗原、猪链球菌抗原、猪流感病毒抗原、猪传染性胸膜肺炎抗原、猪多杀性巴氏杆菌抗原、猪波氏杆菌抗原、猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原、猪霍乱沙门氏菌抗原、猪细小病毒抗原和猪乙型脑炎病毒抗原中的一种或多种;

所述感染犬的病原体抗原选自犬细小病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、犬腺病毒I型抗原、犬腺病毒II型抗原、犬钩端螺旋体抗原、犬冠状病毒抗原、犬副流感病毒抗原、狂犬病病毒抗原、犬流感病毒抗原、犬呼肠病毒抗原、犬轮状病毒抗原、犬疱疹病毒抗原、犬病毒性乳头

瘤病毒抗原、犬极细小病毒抗原、犬腮腺炎病毒抗原、犬淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒抗原和支气管败血波氏杆菌抗原中的一种或多种；优选地，所述感染犬的病原体抗原选自犬细小病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、犬冠状病毒抗原、犬副流感病毒抗原、犬腺病毒I型抗原、犬腺病毒II型抗原、犬钩端螺旋体抗原、狂犬病病毒抗原和犬流感病毒抗原中的一种或多种。

5. 一种如权利要求4所述药物组合物在制备用于预防和/或治疗伪狂犬病病毒感染相关疾病的药物中的应用；优选所述伪狂犬病病毒感染相关疾病包括猪伪狂犬病病毒经典株导致的伪狂犬病和猪伪狂犬病病毒变异株导致的伪狂犬病；进一步优选所述伪狂犬病包括猪伪狂犬病和犬伪狂犬病。

6. 一种ELISA检测试剂盒，其包括权利要求2和3所述抗体、检测试剂和伪狂犬病病毒gD蛋白标准品；

优选的所述抗体包括鼠单克隆抗体3B6和鼠单克隆抗体5G7；其中，所述鼠单克隆抗体3B6和鼠单克隆抗体5G7中的一种包被在微孔板上，另一种被标记；所述标记的标记物包括酶、荧光基团或化学发光基团；

进一步优选所述检测试剂包括与所述标记物发生颜色反应的底物；更进一步优选所述检测试剂包括酶显色试剂、荧光试剂或化学发光试剂。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒，其特征在于，包括包被鼠单克隆抗体5G7的微孔板、酶标的鼠单克隆抗体3B6、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液和伪狂犬病病毒gD蛋白标准品；

优选地，所述鼠单克隆抗体5G7的包被量为0.05-0.20 μ g/ml；所述酶标的鼠单克隆抗体3B6使用时进行1:(2000-10000)的体积稀释。

8. 一种如权利要求6或7所述的ELISA检测试剂盒在定量检测伪狂犬病病毒gD蛋白表达量中的应用；优选地，所述的伪狂犬病病毒gD蛋白表达量为伪狂犬病病毒gD蛋白的单独表达量或伪狂犬病病毒gD蛋白与其它蛋白串联表达或融合表达时的伪狂犬病病毒gD蛋白的表达量。

9. 一种利用如权利要求6或7所述的ELISA检测试剂盒定量检测伪狂犬病病毒gD蛋白表达量的方法，其包括：

步骤①将伪狂犬病病毒gD蛋白标准品用样品稀释液做一系列倍比稀释，获得标准品系列稀释液；将待检样品用样品稀释液进行1:(100-200)的体积稀释，获得待检样品稀释液；然后将标准品系列稀释液、待检样品稀释液同时按90-110 μ L/孔加入包被抗体的微孔板中，封板并置35-38 $^{\circ}$ C温育45-90min或室温孵育55-65min；

步骤②弃反应液，用洗涤液洗涤2-4次，拍干或抽干；

步骤③将稀释后的酶标抗体按90-110 μ L/孔加入后封板，并置35-38 $^{\circ}$ C温育30-45min或室温孵育40-50min；

步骤④弃反应液，用洗涤液洗涤2-4次，拍干或抽干；

步骤⑤加显色液A液、B液各45-55 μ L/孔，置35-38 $^{\circ}$ C温育8-12min或室温孵育13-17min；

步骤⑥加终止液45-55 μ L/孔，8-12min内用酶标仪读取OD_{450nm}处的吸光度值；

步骤⑦根据标准品系列稀释液的吸光度值绘制标准曲线，并根据绘制的标准曲线计算待检样品中伪狂犬病病毒gD蛋白的含量；

其中，所述标准品系列稀释液的浓度为0-800ng/mL；优选所述标准品系列稀释液的浓

度为0-400ng/mL。

10. 一种如权利要求2或3所述的抗体在进行非诊断目的的猪伪狂犬病病毒检测中的应用;优选所述抗体为权利要求3所述抗体;进一步优选所述抗体为鼠单克隆抗体5G7;和/或,

所述非诊断目的的猪伪狂犬病病毒检测包括流行病学分析、对离体组织进行检测、表位鉴定研究、定性和定量鉴别检验含猪伪狂犬病病毒抗原和其他抗原的疫苗组合物中猪伪狂犬病病毒抗原的检测。

与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的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,具体涉及与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的单克隆抗体及其应用。

背景技术

[0002] 伪狂犬病,又称Aujeszky氏病,是由疱疹病毒科(Herpesviridae)α亚科中的猪疱疹病毒I型(Suid herpesvirus 1strain,亦称伪狂犬病病毒Pseudorabies virus,PRV)所引起的猪、牛、羊、犬、猫、兔、鼠、野猪、貂、熊和狐等多种家畜、野生动物的一种以发热、奇痒(除猪外)及脑脊髓炎为主症的急性传染病。

[0003] 猪的伪狂犬病在我国广泛存在,危害严重,是制约规模化猪场生产的主要疾病之一,可引起妊娠母猪流产、死胎或木乃伊胎,仔猪出现神经症状、麻痹、特别地20周龄内感染后100%死亡率,以及大中猪呼吸道症状等。研究表明以PRVgB、gC、gD蛋白为主的亚单位疫苗能够给免疫动物特别是猪提供相应的保护,不仅能使猪免遭猪伪狂犬病的侵袭,还能使猪免受猪伪狂犬变异株所引发的伪狂犬病,特别地以三种蛋白中的两者或三者的串联表达或融合表达效果最为显著。但通过基因工程手段串联表达或融合表达后的蛋白存在的难题在于,其仅能通过常用的BCA或Bradford方法定量表达后的总蛋白含量,无法准确定量各自蛋白表达的含量,进而不能确定各蛋白是否达到预期的表达效果,导致无法追溯所配制的亚单位疫苗免疫动物后产生效果所对应的具体成分含量。

[0004] 犬也是对PRV较为敏感的动物,截止目前犬感染PRV引起的发病和死亡屡有发生。例如刘蕾等在中国畜牧兽医学会小动物医学分会第六次学术研讨会暨中国畜牧兽医学会兽医外科学分会第十八次学术研讨会上报道的“关注伪狂犬病患犬,它就在你面前”,公开了犬由于食用患有伪狂犬病的猪肉而发生伪狂犬病,并且从脑组织中扩增出了目的基因片段。犬感染PRV后潜伏期为3-6天,一旦发病,多在36小时内死亡。这一危害日趋严重,给众多养犬者、养殖业带了较大的经济损失和严重的心理创伤。因此,亟需研发一种预防和/或治疗该病的药物,该药物可用于多种患病动物,不受动物种属的限制。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术的不足提供了能够与伪狂犬病毒gD蛋白结合的抗体。含所述抗体的ELISA检测试剂盒,克服了PRVgD蛋白与其它蛋白串联表达或融合表达后无法准确定量、预期表达效果无法验证的技术难题,解决了配制疫苗的关键问题。同时,含所述抗体的药物组合物,可以不分种属地预防和/或治疗猪源、犬源所引发的伪狂犬病。

[0006] 为此,本发明第一方面提供了特异性结合伪狂犬病病毒gD蛋白的可变区序列,其为鼠单克隆抗体3B6的可变区序列,所述鼠单克隆抗体3B6的可变区序列中,重链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.2经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变体;轻链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID

NO.4所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.4经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体;

[0007] 和/或为鼠单克隆抗体5G7的可变区序列,所述鼠单克隆抗体5G7的可变区序列中,重链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.6经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体;轻链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.8经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体。

[0008] 本发明第二方面提供了一种与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的抗体,其包括如本发明第一方面所述的鼠单克隆抗体3B6的重链可变区氨基酸序列,和/或轻链可变区氨基酸序列。

[0009] 根据本发明,第二方面所述抗体为单克隆抗体和/或基因工程抗体;所述基因工程抗体选自单链抗体、单链抗体片段、嵌合单克隆抗体、嵌合单克隆抗体片段、改形单克隆抗体、改形单克隆抗体片段、猪源单克隆抗体、猪源单克隆抗体片段中的一种;在本发明的一些具体实施方式中,所述抗体为鼠单克隆抗体3B6。

[0010] 本发明第三方面提供了另一种与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的抗体,其包括如本发明第一方面所述的鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列,和/或轻链可变区氨基酸序列。

[0011] 根据本发明,第三方面所述抗体为单克隆抗体和/或基因工程抗体;所述基因工程抗体选自单链抗体、单链抗体片段、嵌合单克隆抗体、嵌合单克隆抗体片段、改形单克隆抗体、改形单克隆抗体片段、猪源单克隆抗体、猪源单克隆抗体片段中的一种;在本发明的一些具体实施方式中,所述抗体为鼠单克隆抗体5G7。

[0012] 本发明第四方面提供了一种药物组合物,其包括免疫量的抗体以及药学上可接受的载体;所述抗体选自本发明第二方面和第三方面所述抗体,以及由所述鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列和所述鼠单克隆抗体3B6的轻链可变区氨基酸序列制备的单链抗体中的一种或多种;

[0013] 优选地,所述抗体选自本发明第三方面所述抗体,以及由所述鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列和所述鼠单克隆抗体3B6的轻链可变区氨基酸序列制备的单链抗体中的一种或多种;

[0014] 进一步优选地,本发明第三方面所述抗体为鼠单克隆抗体5G7和/或由所述鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列制备的单链抗体。

[0015] 在本发明的一些实施方式中,所述药物组合物进一步含有其他病原体抗原,所述其他病原体抗原包括感染猪的病原体抗原或感染犬的病原体抗原;

[0016] 其中,所述感染猪的病原体抗原选自猪瘟病毒抗原、猪圆环病毒抗原、副猪嗜血杆菌抗原、猪链球菌抗原、猪流感病毒抗原、猪传染性胸膜肺炎抗原、猪多杀性巴氏杆菌抗原、猪波氏杆菌抗原、猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原、猪霍乱沙门氏菌抗原、猪细小病毒抗原和猪乙型脑炎病毒抗原中的一种或多种;

[0017] 所述感染犬的病原体抗原选自犬细小病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、犬腺病毒I型抗原、犬腺病毒II型抗原、犬钩端螺旋体抗原、犬冠状病毒抗原、犬副流感病毒抗原、狂犬病病毒抗原、犬流感病毒抗原、犬呼肠病毒抗原、犬轮状病毒抗原、犬疱疹病毒抗原、犬病毒性乳

头瘤病毒抗原、犬极细小病毒抗原、犬腮腺炎病毒抗原、犬淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒抗原和支气管败血波氏杆菌抗原中的一种或多种；优选地，所述感染犬的病原体抗原选自犬细小病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、犬冠状病毒抗原、犬副流感病毒抗原、犬腺病毒I型抗原、犬腺病毒II型抗原、犬钩端螺旋体抗原、狂犬病病毒抗原和犬流感病毒抗原中的一种或多种。

[0018] 本发明第五方面提供了一种如本发明第四方面所述药物组合物在制备用于预防和/或治疗伪狂犬病病毒感染相关疾病的药物中的应用；其中，所述伪狂犬病病毒感染相关疾病包括猪伪狂犬病病毒经典株导致的伪狂犬病和猪伪狂犬病病毒变异株导致的伪狂犬病；所述伪狂犬病包括猪伪狂犬病和犬伪狂犬病。

[0019] 本发明第六方面提供了一种ELISA检测试剂盒，其包括本发明第二方面和第三方面所述抗体、检测试剂和伪狂犬病病毒gD蛋白标准品。

[0020] 在本发明的一些实施方式中，所述抗体包括鼠单克隆抗体3B6和鼠单克隆抗体5G7；其中，所述鼠单克隆抗体3B6和鼠单克隆抗体5G7中的一种包被在微孔板上，另一种被标记；具体地，所述标记的标记物包括酶、荧光基团或化学发光基团。

[0021] 在本发明的另一些实施方式中，所述检测试剂包括与所述标记物发生颜色反应的底物；优选地，所述检测试剂包括酶显色试剂、荧光试剂或化学发光试剂。

[0022] 在本发明的一些具体实施方式中，所述的试剂盒包括：包被鼠单克隆抗体5G7的微孔板、酶标的鼠单克隆抗体3B6、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液和伪狂犬病病毒gD蛋白标准品。

[0023] 在本发明的一些实施方式中，所述鼠单克隆抗体5G7的包被量为0.05-0.20 μ g/ml。

[0024] 在本发明的另一些实施方式中，所述酶标的鼠单克隆抗体3B6使用时进行1：(2000-10000)的体积稀释。

[0025] 根据本发明，所述样品稀释液为磷酸盐缓冲液；所述洗涤液为含0.05% (V/V) Tween-20的磷酸盐缓冲液；所述显色液包括A液和B液，所述A液为20mg TMB中加入10mL无水乙醇后用双蒸水定容至100mL，混匀后无菌分装获得的溶液；B液为2.1g柠檬酸、2.82g无水Na₂HPO₄、0.75%的过氧化氢和0.64mL尿素用双蒸水溶解并定容至100mL，混匀后无菌分装获得的溶液；所述终止液为2M的H₂SO₄溶液。

[0026] 本发明第七方面提供了一种如本发明第六方面所述的ELISA检测试剂盒在定量检测伪狂犬病病毒gD蛋白表达量中的应用；具体地，所述的伪狂犬病病毒gD蛋白表达量为伪狂犬病病毒gD蛋白的单独表达量或伪狂犬病病毒gD蛋白与其它蛋白串联表达或融合表达时的伪狂犬病病毒gD蛋白的表达量。

[0027] 本发明第八方面提供了一种利用本发明第六方面所述ELISA检测试剂盒定量检测伪狂犬病病毒gD蛋白表达量的方法，其包括：

[0028] 步骤①将伪狂犬病病毒gD蛋白标准品用样品稀释液做一系列倍比稀释，获得标准品系列稀释液；将待检样品用样品稀释液进行1：(100-200)的体积稀释，获得待检样品稀释液；然后将标准品系列稀释液、待检样品稀释液同时按90-110 μ L/孔加入包被抗体的微孔板中，封板并置35-38 $^{\circ}$ C温育45-90min或室温孵育55-65min；

[0029] 步骤②弃反应液，用洗涤液洗涤2-4次，拍干或抽干；

[0030] 步骤③将稀释后的酶标抗体按90-110 μ L/孔加入后封板，并置35-38 $^{\circ}$ C温育30-

45min或室温孵育40-50min;

[0031] 步骤④弃反应液,用洗涤液洗涤2-4次,拍干或抽干;

[0032] 步骤⑤加显色液A液、B液各45-55 μ L/孔,置35-38 $^{\circ}$ C温育8-12min或室温孵育13-17min;

[0033] 步骤⑥加终止液45-55 μ L/孔,8-12min内用酶标仪读取OD_{450nm}处的吸光度值;

[0034] 步骤⑦根据标准品系列稀释液的吸光度值绘制标准曲线,并根据绘制的标准曲线计算待检样品中伪狂犬病病毒gD蛋白的含量。

[0035] 在本发明的一些实施方式中,所述标准品系列稀释液的浓度为0-800ng/mL;优选所述标准品系列稀释液的浓度为0-400ng/mL

[0036] 本发明第九方面提供了一种如本发明第二方面或第三方面所述的抗体在进行非诊断目的的猪伪狂犬病病毒检测中的应用;优选所述抗体为本发明第三方面所述抗体;进一步优选所述抗体为鼠单克隆抗体5G7。

[0037] 根据本发明,所述非诊断目的的猪伪狂犬病病毒检测包括流行病学分析、对离体组织进行检测、表位鉴定研究、定性和定量鉴别检验含猪伪狂犬病病毒抗原和其他抗原的疫苗组合物中猪伪狂犬病病毒抗原的检测。

[0038] 本发明的有益效果为:含本发明所述抗体的ELISA检测试剂盒,克服了PRVgD蛋白与其它蛋白串联表达或融合表达后无法准确定量、预期表达效果无法验证的技术难题,解决了配制疫苗的关键问题。同时,含所述抗体的药物组合物,可以不分种属地预防和/或治疗猪源、犬源所引发的伪狂犬病,不仅可解决猪伪狂犬病病毒经典株导致的伪狂犬病还可解决猪伪狂犬病病毒变异株导致的伪狂犬病,具有广谱性;弥补无商品化疫苗的缺憾,可用于紧急预防和/或治疗,减少了发病率、降低了死亡率。

具体实施方式

[0039] 为使本发明容易理解,下面将详细说明本发明。

[0040] 本发明第一方面提供了特异性结合伪狂犬病病毒gD蛋白的可变区序列,其为鼠单克隆抗体3B6的可变区序列,所述鼠单克隆抗体3B6的可变区序列中,重链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.2所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.2经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体;轻链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.4所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.4经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体;

[0041] 和/或为鼠单克隆抗体5G7的可变区序列,所述鼠单克隆抗体5G7的可变区序列中,重链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.6所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.6经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体;轻链可变区氨基酸序列为:序列SEQ ID NO.8所示的氨基酸序列,或序列SEQ ID NO.8经一个或多个氨基酸添加、删除、替换或修饰获得的保守性变异体。

[0042] 本发明第二方面提供了一种与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的抗体,其包括如本发明第一方面所述的鼠单克隆抗体3B6的重链可变区氨基酸序列,和/或轻链可变区氨基酸序列。

[0043] 根据本发明,第二方面所述抗体为单克隆抗体和/或基因工程抗体;所述基因工程

抗体选自单链抗体、单链抗体片段、嵌合单克隆抗体、嵌合单克隆抗体片段、改形单克隆抗体、改形单克隆抗体片段、猪源单克隆抗体、猪源单克隆抗体片段中的一种。在本发明的一些具体实施方式中,所述抗体为鼠单克隆抗体3B6;具体地,所述鼠单克隆抗体3B6对PRVgD蛋白的ELISA效价均 $\geq 1:512000$,与PRVgD蛋白具有良好的反应性。

[0044] 本发明第三方面提供了另一种与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的抗体,其包括如本发明第一方面所述的鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列,和/或轻链可变区氨基酸序列。

[0045] 根据本发明,第三方面所述抗体为单克隆抗体和/或基因工程抗体;所述基因工程抗体选自单链抗体、单链抗体片段、嵌合单克隆抗体、嵌合单克隆抗体片段、改形单克隆抗体、改形单克隆抗体片段、猪源单克隆抗体、猪源单克隆抗体片段中的一种。在本发明的一些具体实施方式中,所述抗体为鼠单克隆抗体5G7;具体地,所述鼠单克隆抗体5G7对PRVgD蛋白的ELISA效价均 $\geq 1:1024000$,与PRVgD蛋白具有良好的反应性;与PRV不同毒株的中和效价达到 $\geq 1:1122$,有较强中和病毒的能力。

[0046] 术语“gD蛋白”又称gD糖蛋白或gp50蛋白,是伪狂犬病病毒进行感染必需的结构蛋白,是成熟的病毒粒子囊膜表面的主要糖蛋白之一。

[0047] 用语“单克隆抗体”是指获自基本上同源的抗体群的抗体,即组成该群体的抗体个体都相同,除了可能存在少量的自发突变。因此,修饰语“单克隆”是指该抗体的性质不是离散抗体的混合物。优选地,所述单克隆抗体包括单价或单链抗体、双链抗体、嵌合抗体、人源化抗体,以及上述抗体的衍生物、功能等同物和同源物,也包括抗体片段和含有抗原结合结构域的任何多肽。

[0048] 用语“抗体”应该解释为涵盖具有所需特异性的结合结构域的任意特异性结合因子。因而,这个术语涵盖了与之同源的抗体片段、衍生物、人源化抗体以及抗体的功能等同物和同源物,也包括含有抗原结合结构域的任何多肽;所述多肽可以是天然的还可以是合成产生的。抗体的实例是免疫球蛋白亚型(如IgG、IgE、IgM、IgD和IgA)及其亚型亚类;也可以是包含抗原结合结构域的片段如Fab、scFv、Fv、dAb、Fd;和双链抗体(diabodies)。融合至另一多肽的、包含抗原结合结构域的嵌合体分子或者等同物也包括在其中。嵌合抗体的克隆与表达在EP.A.0120694和EP.A.0125023中描述。

[0049] 用语“抗体”可以通过许多方式修饰,可用DNA重组技术来产生保留原来抗体特异性的其它抗体或嵌合分子。这种技术可以包括将编码抗体的免疫球蛋白可变区或互补性决定区(CDRs)的DNA引入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区。参见,EP.A.184187,GB2188638A或EP.A.239400。还可以对杂交瘤细胞或产生抗体的其它细胞进行遗传突变或其它改变,这可以改变或者不改变所产生抗体的结合特异性。

[0050] 用于本发明的“单克隆抗体”也可用杂交瘤方法制得。因为编码本发明鼠源化抗体的DNA序列可用本领域技术人员熟知的常规手段,如根据本发明公开的氨基酸序列人工合成或用PCR法扩增得到,因而也可用重组DNA方法,可用本领域熟知的各种方法将该序列连入合适的表达载体中。最后,在适合本发明抗体表达的条件下,培养转化所得的宿主细胞,然后本领域技术人员应用熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的单克隆抗体。

[0051] 抗体包含通过二硫桥连接在一起的多肽链几何体,称为轻链和重链的两条多肽主链,构成抗体的所有主要结构类别(同型物)。重链和轻链都进一步可分为称作可变区和恒

定区的一些亚区。重链包括单个可变区和三个不同的恒定区；轻链则包括单个可变区（不同于重链的可变区）和单个恒定区（不同于重链的恒定区）。重链和轻链的可变区负责抗体的结合特异性。

[0052] 用语“重链可变区”是指一种多肽，其长度为110至125个氨基酸，其氨基酸顺序相应于本发明单克隆抗体从重链N末端氨基酸开始的重链氨基酸顺序。同样，术语“轻链可变区”是指一种多肽，其长度为95至115个氨基酸，其氨基酸顺序相应于本发明单克隆抗体从轻链N末端氨基酸开始的轻链氨基酸顺序。本领域普通技术人员显然知晓，在本发明所具体公开的单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列基础上，可以通过常规基因工程和蛋白质工程方法进行一个或多个氨基酸的添加、删除、替换等修饰，获得保守性变异体，而仍能保持与伪狂犬病病毒特异性结合。本发明中的单克隆抗体还包括其活性片段或保守性变异体。

[0053] 用语“保守性变异体”是指基本上保留了其母本的特性，如基本的免疫学生物特性、结构特性、调节特性或生化特性的变异体。一般地，多肽的保守性变异体的氨基酸序列不同于母本多肽，但是差异是有限的，以使母本多肽的序列与保守性变异体的序列在总体上非常相似，并且在许多区域是相同的。保守性变异体和母本多肽氨基酸序列上的差异可以是一个或多个氨基酸残基及其任意组合的替换、添加和删除。替换或插入的氨基酸残基可由遗传密码编码，也可不由遗传密码编码。多肽的保守性变异体可以自然产生，也可以非自然产生。多肽的非自然产生的保守性变异体可通过诱变技术或直接合成而产生。

[0054] 用语“中和活性”是指中和抗体具有中和病毒的作用，其中“中和抗体”在本文以最广义使用，指的是抑制伪狂犬病病毒重复感染靶细胞的任何抗体，而不考虑实现中和的机制。因而，举例来说，可通过抑制病毒附着或粘附到细胞表面来实现中和，例如通过设计抗体，所述抗体直接结合到，或者接近于，负责病毒附着或粘附的位点；还可以通过定向到病毒体 (Virion) 表面的抗体来实现中和，其导致病毒体的聚集，可通过抑制病毒附着到靶细胞以后病毒和细胞膜融合，通过抑制胞吞作用 (endocytosis) 抑制来自受感染的子代病毒等，进一步发生中和。本发明的中和抗体不受限于实现中和的机制。

[0055] 本发明第四方面提供了一种药物组合物，其包括免疫量的抗体以及药学上可接受的载体；所述抗体选自本发明第二方面和第三方面所述抗体，以及由所述鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列和所述鼠单克隆抗体3B6的轻链可变区氨基酸序列制备的单链抗体中的一种或多种；

[0056] 优选地，所述抗体选自本发明第三方面所述抗体，以及由所述鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列和所述鼠单克隆抗体3B6的轻链可变区氨基酸序列制备的单链抗体中的一种或多种；

[0057] 进一步优选地，本发明第三方面所述抗体为鼠单克隆抗体5G7和/或由所述鼠单克隆抗体5G7的重链可变区氨基酸序列和轻链可变区氨基酸序列制备的单链抗体。

[0058] 在本发明的一些实施方式中，所述药物组合物进一步含有其他病原体抗原，在针对感染伪狂犬病毒的不同动物中，与其他感染该动物的抗原共同施用，通过一步免疫同时预防和/或治疗多种病原导致的感染或疾病。

[0059] 在本发明的一些具体实施例中，所述其他病原体抗原包括感染猪的病原体抗原或感染犬的病原体抗原；

[0060] 其中,所述感染猪的病原体抗原选自猪瘟病毒抗原、猪圆环病毒抗原、副猪嗜血杆菌抗原、猪链球菌抗原、猪流感病毒抗原、猪传染性胸膜肺炎抗原、猪多杀性巴氏杆菌抗原、猪波氏杆菌抗原、猪繁殖与呼吸综合征病毒抗原、猪霍乱沙门氏菌抗原、猪细小病毒抗原和猪乙型脑炎病毒抗原中的一种或多种;

[0061] 所述感染犬的病原体抗原选自犬细小病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、犬腺病毒I型抗原、犬腺病毒II型抗原、犬钩端螺旋体抗原、犬冠状病毒抗原、犬副流感病毒抗原、狂犬病病毒抗原、犬流感病毒抗原、犬呼肠病毒抗原、犬轮状病毒抗原、犬疱疹病毒抗原、犬病毒性乳头瘤病毒抗原、犬极细小病毒抗原、犬腮腺炎病毒抗原、犬淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒抗原和支气管败血波氏杆菌抗原中的一种或多种;优选地,所述感染犬的病原体抗原选自犬细小病毒抗原、犬瘟热病毒抗原、犬冠状病毒抗原、犬副流感病毒抗原、犬腺病毒I型抗原、犬腺病毒II型抗原、犬钩端螺旋体抗原、狂犬病病毒抗原和犬流感病毒抗原中的一种或多种。

[0062] 本发明第五方面提供了一种如本发明第四方面所述药物组合物在制备用于预防和/或治疗伪狂犬病病毒感染相关疾病的药物中的应用。

[0063] 在本发明的一些实施例中,所述伪狂犬病病毒感染相关疾病包括猪伪狂犬病病毒经典株导致的伪狂犬病和猪伪狂犬病病毒变异株导致的伪狂犬病;具体地,所述伪狂犬病包括猪伪狂犬病和犬伪狂犬病。

[0064] 在本发明的一些实施方式中,所述药物组合物经肌肉注射给药。

[0065] 在本发明的另一些实施方式,所述药物组合物包括但不限于粉末剂、颗粒剂、丸剂、片剂和胶囊剂。

[0066] 用语“免疫量”当理解为“预防有效量”时,是指能够在接种的个体中足以引发免疫保护反应的量。本领域技术人员知晓,所述“预防有效量”随免疫接种的方式、时机、给药对象以及所述单克隆抗体或其片段的不同而不同,结合本领域已知的文献和教导以及相应的临床规范,本领域技术人员应当能够通过有限的试验得出所用单克隆抗体的“预防有效量”。当理解为“治疗有效量”时,是指能够对受试个体产生有效保护以及中和病毒的量。本领域技术人员知晓,所述“治疗有效量”随治疗方案、病程、治疗对象的状况以及所用单克隆抗体或其片段的不同而不同。结合本领域已知的文献和教导以及相应的临床规程,临床技术人员应当能够凭借其经验得出所用单克隆抗体的“治疗有效量”。

[0067] 用语“药学上可接受的载体”是指不刺激机体、且不阻碍使用化合物的生物学活性和特性的载体或者稀释剂。

[0068] 用语“预防和/或治疗”在涉及伪狂犬病病毒感染时是指抑制伪狂犬病病毒的复制、抑制伪狂犬病病毒的传播或防止伪狂犬病病毒在其宿主体内定居,以及减轻伪狂犬病病毒感染的疾病或病症的症状。若病毒荷载量减少、病症减轻和/或摄食量和/或生长增加,那么就可以认为所述治疗达到了治疗效果。

[0069] 用语“猪伪狂犬病”感染猪后以妊娠母猪流产、产死胎、弱胎和木乃伊胎,青年猪的呼吸道疾病,新生仔猪发热、神经症状、衰竭死亡为特征。用语“猪”是指任何属于猪科(Suidae)成员的动物,如猪。

[0070] 用语“犬伪狂犬病”感染犬后以精神不安、反应迟钝、身体某部奇痒、唾液增多、快速死亡为特征。用语“犬”是指任何属于犬科成员的动物,如犬。

[0071] 本发明第六方面提供了一种ELISA检测试剂盒,其包括有效量的本发明第二方面和第三方面所述抗体、检测试剂和伪狂犬病病毒gD蛋白标准品。

[0072] 在本发明的一些实施方式中,所述抗体包括鼠单克隆抗体3B6和鼠单克隆抗体5G7;其中,所述鼠单克隆抗体3B6和鼠单克隆抗体5G7中的一种包被在微孔板上,另一种被标记;具体地,所述标记的标记物包括酶、荧光基团或化学发光基团。

[0073] 在本发明的另一些实施方式中,所述检测试剂包括与所述标记物发生颜色反应的底物;优选地,所述检测试剂包括酶显色试剂、荧光试剂或化学发光试剂。

[0074] 在本发明的一些具体实施方式中,所述的试剂盒包括:包被鼠单克隆抗体5G7的微孔板、酶标的鼠单克隆抗体3B6、样品稀释液、洗涤液、显色液、终止液和伪狂犬病病毒gD蛋白标准品。

[0075] 在本发明的一些实施方式中,所述鼠单克隆抗体5G7的包被量为0.05-0.20 μ g/ml。

[0076] 在本发明的另一些实施方式中,所述酶标的鼠单克隆抗体3B6使用时进行1:(2000-10000)的体积稀释。

[0077] 根据本发明,所述样品稀释液为磷酸盐缓冲液;所述洗涤液为含0.05% (V/V) Tween-20的磷酸盐缓冲液;所述显色液包括A液和B液,所述A液为20mg TMB中加入10mL无水乙醇后用双蒸水定容至100mL,混匀后无菌分装获得的溶液;B液为2.1g柠檬酸、2.82g无水 Na_2HPO_4 、0.75%的过氧化氢和0.64mL尿素用双蒸水溶解并定容至100mL,混匀后无菌分装获得的溶液;所述终止液为2M的 H_2SO_4 溶液。

[0078] 本发明第七方面提供了一种如本发明第六方面所述的ELISA检测试剂盒在定量检测伪狂犬病病毒gD蛋白表达量中的应用;具体地,所述的伪狂犬病病毒gD蛋白表达量为伪狂犬病病毒gD蛋白的单独表达量或伪狂犬病病毒gD蛋白与其它蛋白串联表达或融合表达时的伪狂犬病病毒gD蛋白的表达量。

[0079] 本发明第八方面提供了一种利用本发明第六方面所述ELISA检测试剂盒定量检测伪狂犬病病毒gD蛋白表达量的方法,其具体包括:

[0080] 步骤①将伪狂犬病病毒gD蛋白标准品用样品稀释液做一系列倍比稀释,获得标准品系列稀释液;将待检样品用样品稀释液进行1:(100-200)的体积稀释,获得待检样品稀释液;

[0081] 然后将标准品系列稀释液、待检样品稀释液同时按100 μ L/孔加入微孔板中,封板并置37 $^{\circ}$ C温育45-90min或室温孵育60min;

[0082] 步骤②弃反应液,用洗涤液洗涤2-4次,拍干或抽干;

[0083] 步骤③将稀释后的酶标抗体按100 μ L/孔加入后封板并置37 $^{\circ}$ C温育30-45min或室温孵育45min;

[0084] 步骤④弃反应液,用洗涤液洗涤2-4次,拍干或抽干;

[0085] 步骤⑤加显色液A液、B液各50 μ L/孔,置37 $^{\circ}$ C温育10min或室温孵育15min;

[0086] 步骤⑥加终止液50 μ L/孔,10min内用酶标仪读取OD_{450nm}处的吸光度值;

[0087] 步骤⑦根据标准品系列稀释液的吸光度值绘制标准曲线,并根据绘制的标准曲线计算待检样品中PRVgD蛋白的含量。

[0088] 在本发明的一些实施方式中,所述标准品系列稀释液的浓度为0-800ng/mL;优选所述标准品系列稀释液的浓度为0-400ng/mL

[0089] 用语“酶标的羊抗鼠二抗”中的“酶”选自辣根过氧化酶、碱性磷酸酶和 β -D-半乳糖苷酶的任一种。

[0090] 用语“磷酸盐缓冲液”是指含有磷酸或其盐并被调至理想pH值的溶液,是生物化学研究中使用最为广泛的一种缓冲液。一般地,磷酸盐缓冲液由磷酸或磷酸盐(包括但不限于钠和钾盐)制备而成。本领域已经知道一些磷酸盐,例如磷酸二氢钠和磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和磷酸氢二钾、磷酸钠和磷酸钾。已经知道磷酸盐是以盐的水合物形式存在的。由于缓冲液的二级解离作用,缓冲的pH值范围很宽,例如约4-10的范围,优选约5-9的范围,更有选约6-8的范围,最优选约7.4。进一步优选地,所述磷酸盐缓冲液为含氯化钠和氯化钾的磷酸盐缓冲液。

[0091] 本发明第九方面提供了一种如本发明第二方面或第三方面所述的抗体在进行非诊断目的的猪伪狂犬病病毒检测中的应用;优选所述抗体为本发明第三方面所述抗体;进一步优选所述抗体为鼠单克隆抗体5G7。

[0092] 根据本发明,所述非诊断目的的猪伪狂犬病病毒检测包括流行病学分析、对离体组织进行检测、表位鉴定研究、定性和定量鉴别检验含猪伪狂犬病病毒抗原和其他抗原的疫苗组合物中猪伪狂犬病病毒抗原的检测。

[0093] 实施例

[0094] 为使本发明更加容易理解,下面将结合实施例来进一步详细说明本发明,这些实施例仅起说明性作用,并不局限于本发明的应用范围。本发明中所使用的原料或组分若无特殊说明均可以通过商业途径或常规方法制得。

[0095] 实施例1:含猪伪狂犬病毒gD蛋白的制备及鉴定。

[0096] 1.1猪伪狂犬病毒gD蛋白的制备

[0097] 在生长良好的PK15细胞上接种PRV HN1201病毒或其不同代次的培养物(PRV HN1201株保藏号为CCTCC NO.V 201311,参见专利CN104004774A),该不同代次的培养物为5-35代以内的培养物,提取PRV基因组DNA并按专利CN104004774A制备PRVgD蛋白,经His亲和层析和分子筛纯化,参照碧云天公司的BCA蛋白浓度测定试剂盒方法测定PRVgD蛋白(简称PRVgD1)的含量为200 μ g/ml。

[0098] 1.2含PRVgD蛋白的串联表达蛋白的制备

[0099] 按专利CN105693827A分别制备PRVgD蛋白与PRVgB蛋白片段的串联表达蛋白(简称PRVgD2),经His亲和层析和分子筛纯化,参照碧云天公司的BCA蛋白浓度测定试剂盒方法进行蛋白定量,结果:PRVgD2总蛋白的含量为15 μ g/ml。

[0100] 1.3含PRVgD蛋白的融合表达蛋白的制备

[0101] 按专利CN105693827A分别制备PRVgD蛋白与PRVgB蛋白片段的融合表达蛋白(简称PRVgD3),经His亲和层析和分子筛纯化,参照碧云天公司的BCA蛋白浓度测定试剂盒方法进行蛋白定量,结果:PRVgD3总蛋白的含量为5 μ g/ml。

[0102] 但PRVgD2、PRVgD3只能测定总蛋白的含量,无法准确预测各蛋白相应的表达量,无法监测表达效果是否达到预期,导致配苗时各组分不清楚,也无法对疫苗免疫后产生效果好坏的原因进行分析。

[0103] 实施例2:猪伪狂犬病病毒gD蛋白单克隆抗体的制备、纯化及鉴定。

[0104] 2.1 PRVgD蛋白单克隆抗体的制备和纯化

[0105] 首先,将实施例1制备的PRV HN1201株病毒液(2×10^8 TCID₅₀/ml)经甲醛灭活,与弗氏佐剂等体积乳化后免疫小鼠10只,隔2周免1次,并以实施例1制备的PRVgD1包被的ELISA方法对3-7次免疫后的小鼠血清进行ELISA持续检测,结果:各组小鼠血清ELISA效价均 $\leq 1:320$,任选1只进行细胞融合,融合后阳性率为0,放弃。

[0106] 其次,将实施例1制备的PRVgD1与弗氏佐剂等体积乳化后免疫小鼠10只,隔2周免1次,以实施例1制备的PRVgD1包被的ELISA方法对3-7次免疫后的小鼠血清进行ELISA持续检测,结果:各组小鼠血清ELISA效价均 $\leq 1:640$,任选1只进行细胞融合,融合后阳性率为0,放弃。

[0107] 最后,将实施例1制备的PRV HN1201株病毒液经甲醛灭活与弗氏佐剂等体积乳化后首次免疫小鼠20只,2周后将实施例1制备的PRVgD1与弗氏佐剂等体积乳化第2次免疫,如此反复免疫3轮。免疫第2轮后,每次免后9天对20只小鼠采血并用以实施例1制备的PRVgD1包被的ELISA方法对血清持续进行ELISA检测。将小鼠血清免疫4-6次后ELISA效价有上升趋势且ELISA效价 $\geq 1:12800$ 的仅2只小鼠进行按Harlow E等(Harlow E, Lane D. Antibodies: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1998, 139-312)文献的操作方法进行细胞融合,用ELISA对其进行有限稀释法亚克隆筛选,获得6株阳性杂交瘤细胞,阳性率仅为2%。将PRV HN1201株感染的PK-15细胞包被于微孔板,经间接免疫荧光IFA评价6株阳性杂交瘤细胞上清,发现1株有非特异性吸附故舍弃,获得5株阳性杂交瘤细胞(3G1、3B6、4A5、4D9、5G7)。分别将其注入已经石蜡刺激的经产母鼠内,制备5株单克隆抗体的腹水,取混匀后的小样经ELISA、IFA评价,结果见表1。

[0108] 表1:5株单克隆抗体腹水的评价结果

[0109]

序号	杂交瘤细胞株名称	ELISA	IFA
1	3G1	1:512	1:160
2	3B6	$\geq 1:512000$	1:1600
3	4A5	1:1024	0
4	4D9	1:512	1:1600
5	5G7	$\geq 1:1024000$	1:12800

[0110] 根据表1的评价结果,选出2株在ELISA、IFA水平上均较高、与PRVgD蛋白及病毒均具有良好反应性的鼠单克隆抗体3B6、5G7。将2株的腹水用陈丹等(陈丹,孙广瑞,柳增善. 辛酸-硫酸铵联合沉淀法在单克隆抗体纯化中的应用. 安徽农业科学, 2007, 35(26): 8105, 8108)所述辛酸-硫酸铵联合沉淀法纯化,之后用SDS-PAGE凝胶电泳进行鉴定,结果:鼠单克隆抗体3B6、5G7的纯度均不低于85%;用BCA蛋白定量试剂盒分别按照说明书分别进行定量分析,结果:鼠单克隆抗体3B6、5G7的浓度分别为4.1mg/ml和5.1mg/ml。

[0111] 2.2鼠单克隆抗体3B6、5G7的亚型及可变区序列的测定

[0112] 用Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit并参照说明书对鼠单克隆抗体3B6、5G7的亚型进行鉴定。结果:鼠单克隆抗体3B6、5G7的重链亚型均为IgG2a,轻链类型均为kappa。

[0113] 根据鼠源单克隆抗体的序列特征,设计重链可变区引物序列:

[0114] P1:ACTAGTCGACATATGGAGCTRTATC

[0115] P2:CCAAAGCTTCCAGGGGCCARK

[0116] 设计轻链可变区引物序列:

[0117] P3:ACTAGTCGACATGAGTGTGCYCACTCA

[0118] P4:CCCAAGCTTGGATGGTGGGAAGAT

[0119] 按照张爱华等(张爱华,闭兰,王志友等.系列鼠抗CD分子单克隆抗体轻、重链可变区基因的克隆和序列分析.中国生物制品学杂志,2001,15(2):65-68)建立的可变区序列测定方法,通过分子克隆技术分别获得鼠单克隆抗体3B6、5G7的可变区序列,选取对应的克隆质粒送至苏州金维智生物科技有限公司进行测序。结果,鼠单克隆抗体3B6的重链可变区、轻链可变区的基因序列分别如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.3所示,由其推导的氨基酸序列分别为SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.4;鼠单克隆抗体5G7的重链可变区、轻链可变区的基因序列分别如SEQ ID NO.5、SEQ ID NO.7所示,由其推导的氨基酸序列分别为SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.8。

[0120] 2.3鼠单克隆抗体3B6、5G7特异性的鉴定

[0121] 将猪瘟病毒CSFV、猪繁殖与呼吸综合征病毒PRRSV、猪圆环病毒2型PCV2、猪细小病毒PPV、猪伪狂犬病病毒PRV及培养PRV用PK15细胞分别固定于微孔板中,将鼠单克隆抗体3B6、5G7腹水作为一抗,将荧光标记兔抗鼠二抗作为二抗,按照间接免疫荧光方法IFA进行检测,结果:鼠单克隆抗体3B6、5G7仅与PRV反应,而不与其它猪常见病及培养用细胞发生交叉反应。

[0122] 将PRVgB Δ 148~546蛋白、PRVgB蛋白(按照专利CN10563827A制备),PRVgC蛋白(由苏州金唯智生物科技有限公司直接按照专利CN104004774A所示PRVgC序列直接合成),以及实施例1制备的PRVgD1,分别包被于微孔板中,将鼠单克隆抗体3B6、5G7腹水作为一抗,将酶标羊抗鼠二抗作为二抗,按ELISA进行检测,结果:鼠单克隆抗体3B6、5G7仅与PRVgD反应,而不与PRV其它蛋白反应。

[0123] 表明:鼠单克隆抗体3B6、5G7为PRVgD蛋白的特异性单克隆抗体。

[0124] 2.4鼠单克隆抗体3B6、5G7中和活性的测定

[0125] 按《中国兽药典》2015版所述固定病毒稀释血清法测定鼠单克隆抗体3B6、5G7的中和效价,先将鼠单克隆抗体3B6、5G7的不同稀释倍数(1:1V/V-1:2048V/V)与PK15细胞于37℃、5%CO₂条件下孵育1小时,分别加入PRV经典株Fa株与MA株(均购自中国兽药监察所),疫苗株Bartha株(购自中国兽药监察所)及变异株HN1201株病毒稀释液(均含100TCID₅₀/ml),置37℃、5%CO₂条件下培养72-120小时观察细胞病变,并计算中和效价,结果见表2。

[0126] 表2:鼠单克隆抗体3B6、5G7对PRV不同毒株的中和效价

[0127]

单克隆抗体名称	HN1201株	Fa株	MA株	Bartha株
3B6	0	0	0	0
5G7	≥1:2239	1:1698.24	1:2512	1:1122

[0128] 结果显示:鼠单克隆抗体3B6与PRV的不同毒株均无中和反应,而单克隆抗体5G7与PRV的不同毒株均具有中和反应,且中和效价≥1:1122,表明鼠单克隆抗体5G7与PRV具有良好的中和活性。可将两株单克隆抗体用于PRVgD蛋白结构解析等机理研究,如表位鉴定研究、定性和定量鉴别检验含猪伪狂犬病病毒抗原和其他抗原的疫苗组合物中猪伪狂犬病病

毒抗原的检测等。

[0129] 综上所述,根据免疫学原理及两株单克隆抗体的特性,可用两株单克隆抗体进行非诊断目的的猪伪狂犬病病毒检测中的应用,包括流行病学分析、对离体组织进行检测、表位鉴定研究、定性和定量鉴别检验含猪伪狂犬病病毒抗原和其他抗原的疫苗组合物中猪伪狂犬病病毒抗原的检测。

[0130] 实施例3:含鼠单克隆抗体5G7的药物组合物的制备及应用

[0131] 3.1鼠单克隆抗体5G7预防和治疗猪伪狂犬病的应用

[0132] 3.1.1鼠单克隆抗体5G7预防猪伪狂犬病效果评价

[0133] 筛选PRV抗原、抗体双阴性的1-3日龄仔猪30头,随机分为①-⑥6组,5头/组;筛选PRV抗原、抗体双阴性的预产母猪30头,随机分为⑦-⑫6组。其中①、③、⑤、⑦、⑨、⑪6组奇数组肌肉注射实施例2中制备的鼠单克隆抗体5G7 1ml,②、④、⑥、⑧、⑩、⑫6组偶数组肌肉注射PBS缓冲液1ml作为对照组,注射24小时后,①-②、⑦-⑧4组动物同时滴鼻接种实施例1制备的PRVHN1201株1ml ($10^{7.0}$ TCID₅₀/ml),③-④、⑨-⑩4组动物同时滴鼻接种PRV Fa株1ml ($10^{7.0}$ TCID₅₀/ml),⑤-⑥、⑪-⑫4组动物同时滴鼻接种PRV Ma株1ml ($10^{7.0}$ TCID₅₀/ml),具体见表3-4。接种后连续观察14天,通过观察仔猪临床发病情况、死亡率及采用世纪元亨PCR试剂盒监测PRV病毒排毒天数,观察母猪临床发病情况、产仔数量及其发病、存活状况,来评价鼠单克隆抗体5G7的预防猪伪狂犬病的效果,结果见表3-4。

[0134] 表3:鼠单克隆抗体5G7预防仔猪感染PRV的试验结果

对应 PRV 毒株	组别	发病情况	死亡率	排毒天数
HN1201 株	①	5/5 仔猪健活, 均未出现 PRV 的临床症状	0 (0/5)	第 4 天以后 PCR 检测均为阴性
	对照组②	4/5 出现严重神经症状、5/5 头猪连续 3 天以上体温超过 40.5℃	100% (5/5)	至第 7 天完全死亡, PCR 检测均为阳性
Fa 株	③	5/5 仔猪健活, 均未出现 PRV 的临床症状	0 (0/5)	第 3 天以后 PCR 检测均为阴性
	对照组④	3/5 出现严重神经症状、5/5 头猪连续 3 天以上体温超过 40.5℃	100% (5/5)	至第 9 天完全死亡, PCR 检测均为阳性
Ma 株	⑤	5/5 仔猪健活, 均未出现 PRV 的临床症状	0 (0/5)	第 3 天以后 PCR 检测均为阴性
	对照组⑥	3/5 出现严重神经症状、5/5 头猪连续 3 天以上体温超过 40.5℃	100% (5/5)	至第 9 天完全死亡, PCR 检测均为阳性

[0136] 表4:鼠单克隆抗体5G7预防母猪感染PRV的试验结果

[0137]

对应 PRV 毒株	组别	母猪发病情况	产仔数量及发病、存活状况
HN1201 株	⑦	5/5 母猪健活, 均未出现 PRV 的临床症状	5 只母猪分别产 15、12、14、10、9 只仔猪, 仔猪均健活且均无 PRV 临床症状及不良反应
	对照	3/5 出现严重神经症状、	1 只母猪流产, 4 只母猪共产 12

[0138]

	组⑧	5/5 头猪连续 3 天以上 体温超过 40.5℃	只死胎+16 只发病仔猪（于产后 5-9 天死亡）
Fa 株	⑨	5/5 母猪健活, 均未出现 PRV 的临床症状	5 只母猪分别产 13、11、10、12、 9 只仔猪, 仔猪均健活且均无 PRV 临床症状及不良反应
	对 照 组⑩	2/5 出现严重神经症状、 5/5 头猪连续 4 天以上 体温超过 40.5℃	1 只母猪流产, 4 只母猪共产 10 只死胎+15 只发病仔猪（于产后 7-9 天死亡）
Ma 株	⑪	5/5 母猪健活, 均未出现 PRV 的临床症状	5 只母猪分别产 15、12、14、10、 9 只仔猪, 仔猪均健活且均无 PRV 临床症状及不良反应
	对 照 组⑫	2/5 出现严重神经症状、 5/5 头猪连续 4 天以上 体温超过 40.5℃	1 只母猪流产, 4 只母猪共产 9 只死胎+17 只发病仔猪（于产后 7-9 天死亡）

[0139] 3.1.2 鼠单克隆抗体5G7治疗猪伪狂犬病效果评价

[0140] 筛选PRV抗原、抗体双阴性的1-3日龄仔猪10头,随机分为⑤、⑥2组;筛选PRV抗原、抗体双阴性的预产母猪10头,随机分为⑦、⑧2组。4组猪均分别通过滴鼻接种实施例1制备的猪伪狂犬病病毒HN1201株1ml ($10^{7.0}$ TCID₅₀/ml),接种后12小时⑤、⑦2组肌肉注射实施例2制备的鼠单克隆抗体5G7 1ml进行治疗,⑥、⑧肌肉注射PBS 1ml,注射后连续观察14天,通过观察仔猪临床发病情况、死亡率及采用世纪元亨PCR试剂盒监测PRV病毒排毒天数,观察母猪临床发病情况、产仔数量及其发病、存活状况,来评价鼠单克隆抗体5G7的治疗猪伪狂犬病的效果,结果见表5-6。

[0141] 表5:鼠单克隆抗体5G7治疗仔猪感染PRV的试验结果

[0142]

组别	发病情况	死亡率	排毒天数
⑤	5/5 仔猪健活, 均未出现 PRV 的 临床症状	0/5	第4天以后 PCR 检测均为 阴性
⑥	4/5 出现严重神经症状、5/5 头猪 连续 4 天以上体温超过 40.5℃	5/5	至第 7 天完全死亡, PCR 检测均为阳性

[0143] 表6:鼠单克隆抗体5G7治疗母猪感染PRV的试验结果

[0144]

组别	母猪发病情况	产仔数量及发病、存活状况
⑦	5/5 母猪健活, 均未出现 PRV 的临床症状	5 只母猪分别产 13、10、12、11、10 只仔猪, 仔猪均健活且均无 PRV 临床症状及不良反应
⑧	4/5 出现严重神经症状、5/5 头猪连续 3 天以上体温超过 40.5℃	5 只母猪共产 11 只死胎+19 只发病仔猪 (于产后 5-8 天死亡)

[0145] 结果表明, 鼠单克隆抗体 5G7 能够使猪减轻由 PRV 引起的临床症状, 保证母猪顺利产仔, 减少死亡率及减少排毒天数, 有很好的预防和/或治疗作用。

[0146] 3.2 鼠单克隆抗体 5G7 预防和治疗犬伪狂犬病的应用

[0147] 3.2.1 鼠单克隆抗体 5G7 预防犬伪狂犬病的应用

[0148] 筛选 PRV 抗原、抗体双阴性的 2 月龄中华田园犬 10 只, 随机分为①、②组, ①按 1ml/kg 的剂量肌肉注射实施例 2 中制备的鼠单克隆抗体 5G7, ②肌肉注射 PBS 缓冲液 1ml/kg, 注射后 24 小时 2 组动物同时滴鼻接种实施例 1 制备的 PRVHN1201 株 1ml ($10^{5.0}$ TCID₅₀/ml), 每日观察犬的临床症状, 连续观察 14 天, 通过临床发病率、发病程度、死亡率及采用 PCR 方法监测病毒排毒天数来评价鼠单克隆抗体 5G7 预防犬伪狂犬病的效果, 结果见表 7。

[0149] 表 7: 鼠单克隆抗体 5G7 预防犬伪狂犬病的试验结果

组别	发病情况	死亡率	排毒天数
①	5/5 均正常	0/5	第 3 天以后 PCR 检测均为阴性
②	5/5 只犬出现奇痒症状、面部和腹部严重擦伤	5/5	至第 4 天完全死亡, PCR 检测均为阳性

[0151] 3.2.2 鼠单克隆抗体 5G7 治疗犬伪狂犬病的应用

[0152] 筛选 PRV 抗原、抗体双阴性的 2 月龄中华田园犬 10 只, 随机分为③、④组, 均分别通过滴鼻接种实施例 1 制备的猪伪狂犬病病毒 HN1201 株 1ml ($10^{5.0}$ TCID₅₀/ml), 接种 12 小时后③按 1ml/kg 的剂量肌肉注射实施例 2 制备的鼠单克隆抗体 5G7 进行治疗; 同时④按 1ml/kg 肌肉注射 PBS。注射后连续观察 14 天, 通过临床发病情况、死亡率及采用 PCR 方法检测鼻拭子中的病毒来监测排毒天数, 从而评价鼠单克隆抗体 5G7 治疗犬伪狂犬病病毒感染的效果, 结果见表 8。

[0153] 表 8: 鼠单克隆抗体 5G7 治疗犬感染 PRV 的试验结果

组别	发病情况	死亡率	排毒天数
③	5/5 均正常	0/5	第 3 天以后 PCR 检测均为阴性
④	5/5 只犬出现奇痒症状、面部和腹部严重擦伤	5/5	至第 4 天完全死亡, PCR 检测均为阳性

[0155] 结果表明,鼠单克隆抗体5G7能够使犬减轻由PRV引起的临床症状,减少死亡率以及减少排毒天数,具有很好的预防和/或治疗作用。

[0156] 3.3基因工程抗体的制备及应用

[0157] 按照李越等(李越.A型流感病毒单链抗体基因的克隆及抗病毒活性研究.新疆农业大学硕士学位论文,2014)建立的单链抗体制备的操作方法,用单克隆抗体5G7的重链可变区核苷酸序列、轻链可变区核苷酸序列(分别为SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.3)制备单链抗体1,用单克隆抗体5G7的重链可变区核苷酸序列、3B6的轻链可变区核苷酸序列(分别为SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.5)制备单链抗体2。按照实施例2.4分别对单链抗体1、2进行中和活性的测定,结果见表9。

[0158] 表9:单链抗体1、2对PRV不同毒株的中和效价

[0159]

抗体名称	HN1201株	Fa株	MA株	Bartha株
单链抗体1	1:1698.24	1:1122	1:1122	1:1000
单链抗体2	1:851	1:708	1:708	1:316.2

[0160] 结果显示:单链抗体1、2与PRV的不同毒株均具有中和反应,且中和效价 $\geq 1:316.2$,表明单链抗体1、2可用于制备药物组合物以预防和/或治疗PRV相关的疾病。

[0161] 综上所述,含所述抗体的药物组合物,即可预防和/或治疗猪源伪狂犬病,也可预防和/或治疗犬源伪狂犬病,即可解决PRV经典株致病,也可解决PRV变异株致病,具有广谱性,减少了发病率、降低了死亡率。

[0162] 实施例4:猪伪狂犬病病毒gD蛋白定量ELISA检测方法的建立

[0163] 4.1 PRVgD蛋白单克隆抗体配对试验

[0164] 将实施例2制备的5株单克隆抗体分别纯化后,用相同浓度 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100\mu\text{l}$ /孔分别包被于微孔板中,加入实施例1制备的PRVgD1抗原V/V 1:100稀释液后,分别与5株酶标的单克隆抗体V/V 1:2000稀释液进行配对反应,显色,酶标仪读其吸光度值 $\text{OD}_{450\text{nm}}$,结果见表10。

[0165] 表10:不同单克隆抗体组合的试验结果

包被单克隆抗体	酶标单克隆抗体				
	3G1	3B6	4A5	4D9	5G7
3G1	0.109	0.115	0.129	0.207	0.009
3B6	0.002	0.012	0.156	0.235	0.509
4A5	0.123	0.219	0.226	0.217	0.003
4D9	0.409	0.209	0.008	0.004	0.329
5G7	0.132	2.256	0.219	0.142	0.125

[0166] 采用抗体相加试验进行测定。将实施例1制备的PRVgD1包被于微孔板后用封闭液进行封闭,然后加入第一株饱和浓度的单克隆抗体与之反应,洗涤,拍干,再加入另一株饱和浓度的单克隆抗体与之反应。两株单克隆抗体反应完毕后,再加入HRP标记的羊抗鼠IgG与之反应,洗涤,显色,测定其吸光度A值。按公式 $\text{AI} = [(A_{1.2} - A_1) / A_2] \times 100\%$,分别计算单克隆抗体两两叠加的增值指数AI。其中,A1、A2分别为单抗1和2的A值,A1.2为单抗1叠加单抗2

的A值；当AI大于50%即可初步断定两种单抗对应不同的抗原结合位点。结果见表11。

[0168] 表11:单克隆抗体两两叠加的增值指数AI

第二抗体	第一抗体	
	3B6	5G7
3B6	1.8%	81.4%
5G7	68.9%	5.7%

[0170] 由表10-11可知:只有当鼠单克隆抗体5G7作为包被原、鼠单克隆抗体3B6作为酶标抗体,或当鼠单克隆抗体3B6作为包被原、鼠单克隆抗体5G7作为酶标抗体时,检测结果才有效,而其他的搭配模式所测的吸光度较低,无法完成后续准确有效的定量检测。同时验证了两株单克隆抗体针对抗原表位的异同,结果:鼠单克隆抗体3B6与5G7抗体相加指数均高于50%,表明两株单克隆抗体识别不同的抗原表位,可用于建立双抗体夹心方法。

[0171] 4.2 ELISA试剂盒的制备

[0172] 包被的微孔板1:将0.05-0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鼠单克隆抗体5G7包被于微孔板中,置2-8 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜或37 $^{\circ}\text{C}$ 包被1小时,用样品洗涤液洗2-3遍并拍干或抽干,用封闭液于37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2小时,用样品洗涤液洗2-3遍并拍干或抽干。

[0173] 酶标抗体1:用过碘酸钠法标记纯化的单克隆抗体3B6,所用酶为辣根过氧化物酶HRP或碱性磷酸酶AP,经鉴定酶标后抗体含量为2.5 mg/ml ,标记率为0.8;使用时按V/V1:4000-1:10000任一倍数稀释。

[0174] 包被的微孔板2:将0.60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 鼠单克隆抗体3B6包被于微孔板中,置2-8 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜或37 $^{\circ}\text{C}$ 包被1小时,用样品洗涤液洗2-3遍并拍干或抽干,用封闭液于37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2小时,用样品洗涤液洗2-3遍并拍干或抽干。

[0175] 酶标抗体2:用过碘酸钠法标记纯化的单克隆抗体5G7,所用酶为辣根过氧化物酶HRP或碱性磷酸酶AP,经鉴定酶标后抗体含量为2.0 mg/ml ,标记率为0.75;使用时按V/V1:4000-1:5000任一倍数稀释。

[0176] 样品稀释液:磷酸盐缓冲液。

[0177] 洗涤液:含0.05%V/V Tween-20的磷酸盐缓冲液。

[0178] 标准品:实施例1制备的PRVgD蛋白(简称PRVgD1)。

[0179] 显色液:包括A液和B液,所述A液为20 mg TMB中加入10 mL 无水乙醇后用双蒸水定容至100 mL ,混匀后无菌分装获得的溶液;B液为2.1 g 柠檬酸、2.82 g 无水 Na_2HPO_4 、0.75%的过氧化氢和0.64 mL 尿素用双蒸水溶解并定容至100 mL ,混匀后无菌分装获得的溶液。

[0180] 终止液:2M的 H_2SO_4 溶液。

[0181] 将包被的微孔板1、酶标抗体1、样品稀释液、洗涤液、标准品、显色液、终止液组装成试剂盒1;将包被的微孔板2、酶标抗体2、样品稀释液、洗涤液、标准品、显色液、终止液组装成试剂盒2。

[0182] 4.3 ELISA试剂盒检测方法的建立

[0183] 检测方法包括:①将标准品用样品稀释液稀释至800 ng/ml 之后进行2倍倍比稀释即400、200、100、50、0 ng/ml ,另将待检样品如实施例1制备的PRVgD2、PRVgD3用样品稀释液

稀释1:100-1:200;

[0184] 然后将标准品系列稀释液、待检样品稀释液同时按100 μ l/孔加入微孔板中,封板并置37 $^{\circ}$ C温育45-90分钟或室温孵育60分钟;

[0185] ②弃反应液,用洗涤液洗涤2-4次,拍干或抽干;

[0186] ③将稀释后的酶标抗体按100 μ l/孔加入后封板并置37 $^{\circ}$ C温育30-45分钟或室温孵育45分钟;

[0187] ④弃反应液,用洗涤液洗涤2-4次,拍干或抽干;

[0188] ⑤加显色液A液、B液各50 μ l/孔,置37 $^{\circ}$ C温育10分钟或室温孵育15分钟;

[0189] ⑥加终止液50 μ l/孔,10分钟内用酶标仪读吸光度值OD_{450nm};

[0190] ⑦根据标准品系列稀释液的吸光度值绘制标准曲线,计算待检样品中PRV gD蛋白相应的含量。

[0191] 4.4 ELISA试剂盒的优化

[0192] 将一个单克隆抗体按照0.6、0.4、0.3、0.2、0.15、0.1、0.075、0.05、0.0375、0.025、0.01875、0.0125 μ g/mL 12个梯度纵向包被微孔板;将另一抗体酶标后按照1:4000、1:5000、1:6000、1:7000、1:8000、1:10000 6个梯度稀释后,对2 μ g/mL的实施例1制备的PRVgD1进行夹心ELISA检测。选择P/N即样品值/阴性值最高孔所对应的抗体浓度,分别作为包被抗体及酶标抗体最佳工作浓度。按此试验方案分别建立以鼠单克隆抗体5G7为包被抗体与酶标抗体3B6配对的检测方法,及以鼠单克隆抗体3B6为包被抗体与酶标抗体5G7配对的检测方法,分别检测梯度稀释的gD蛋白样品,以蛋白浓度为横坐标,吸光度OD值为纵坐标,绘制曲线,计算双抗体夹心ELISA的线性范围及相关系数。选择线性范围大且相关系数高的配对方式,作为最优配对,以实现对抗原的准确检测。

[0193] 结果:试剂盒1,以鼠单克隆抗体5G7为包被抗体且包被浓度为0.05-0.20 μ g/mL,鼠单克隆抗体3B6酶标后做为酶标抗体(1:4000-1:10000)的配对方式,检测的线性范围大(0-800ng/mL)且相关系数高($\geq 99\%$);而试剂盒2,以3B6为包被抗体(0.6 μ g/ml)为包被抗体,5G7酶标后做为酶标抗体(1:4000-1:5000)的配对方式,线性范围为0-400ng/ml,相关系数为98%左右。从检测线性范围宽及节省原材料的角度,故选择试剂盒1进行后续试验。

[0194] 4.5 ELISA试剂盒的应用

[0195] 样品稀释液中分别添加实施例1制备的PRVgD1蛋白500、350、220ng/ml进行加标回收试验,按实施例4.3所述方法用试剂盒1进行重复检测各5次。结果:根据标准品系列稀释液的吸光度值绘制标准曲线为 $y=0.004x-0.0113$, $R^2=0.9988$;根据PRVgD1稀释液500、350、220ng/ml对应的OD值,计算各自的加标回收率及变异系数,结果见表12。

[0196] 表12:抗原加标回收试验结果

	PRVgD1 蛋白加标 浓度 (ng/ml)	PRVgD1 蛋白检测 浓度 (ng/ml)	变异系数 CV	回收率
[0197]	500	478.29-514.21	6.58%	95.67%-102.84%
	350	342.09-358.21	8.21%	92.84%-102.23%
	220	203.79-230.01	5.09%	92.63%-104.56%

[0198] 从表12可知,本试剂盒及方法准确度高、重复性好,可用于实际样品的检测。故对将实施例1制备的PRVgD2、PRVgD3用样品稀释液分别稀释1:100、1:200,按实施例4.3所述方法对实施例1中PRVgD2、PRVgD3进行定量检测,结果PRVgD2、PRVgD3中相应的PRVgD蛋白部分的含量分别为6.479 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.467 $\mu\text{g}/\text{ml}$,可根据该结果准确配制疫苗用于动物免疫。

[0199] 应当注意的是,以上所述的实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的任何限制。通过参照典型实施例对本发明进行了描述,但应当理解为其中所用的词语为描述性和解释性词汇,而不是限定性词汇。可以按规定在本发明权利要求的范围内对本发明作出修改,以及在不背离本发明的范围和精神内对本发明进行修订。尽管其中描述的本发明涉及特定的方法、材料和实施例,但是并不意味着本发明限于其中公开的特定例,相反,本发明可扩展至其他所有具有相同功能的方法和应用。

SEQUENCE LISTING

<110> 洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司
 <120> 与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的单克隆抗体及其应用

<130> 2017

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 357

<212> DNA

<213> 鼠单克隆抗体3B6重链可变区核苷酸序列(鼠)

<400> 1

```
gaagtacagc tggtaggagtc tgggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgagactc 60
tctctgtcag cctctggatt cactttcaat gactatgcca tgtcttgat tcgccagact 120
ccgaaaaga ggctggagtg ggtcgcaacc ataagtggag gtggtactta tacctactat 180
ccagacggtt tacagggtcg cttcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctttac 240
ctgcaaatga acactctggg gtctgcggac acggccatat attactgtgc acgacaggag 300
ggtagacttcc ctctctttga ttactggggc caaggcacca ctctcacagt ctctca 357
```

<210> 2

<211> 119

<212> PRT

<213> 鼠单克隆抗体3B6重链可变区氨基酸序列(鼠)

<400> 2

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
           20           25           30
Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
           35           40           45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Gly Leu
           50           55           60
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Thr Leu Gly Ser Ala Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
           85           90           95
Ala Arg Gln Glu Gly Asp Phe Pro Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
           100          105          110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
           115
```

<210> 3

<211> 321

<212> DNA

<213> 鼠单克隆抗体3B6轻链可变区核苷酸序列(鼠)

<400> 3

gacattgtgg tgacccagtc tcagaaattc atgtccgcat cagcaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagaca agatgtgggt actgctgtga cctggatatca acagaagcca 120
 gggcaatctc ctaaactact gatttaccgg tcatccacc ggcacactgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtgatc tgggacagat ttcactetca ccattagcaa tgtgcagtct 240
 gaagacttgg cagattatth ctgtcaacaa tatggcagtt atccgctcac gttcgggtgct 300
 gggaccaagc tggttctgaa a 321

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 鼠单克隆抗体3B6轻链可变区氨基酸酸序列(鼠)

<400> 4

Asp Ile Val Val Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Arg Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ser Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Val Leu Lys
 100 105

<210> 5

<211> 357

<212> DNA

<213> 鼠单克隆抗体5G7重链可变区核苷酸序列(鼠)

<400> 5

caggttcagg tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60
 tcctgcaagg ctactggeta cacattcagt aggtactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
 cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttctctg gaagtgggtg tactaattac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata tatcctcaa tacagtctac 240

atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagatacgcg 300
gacgtaggct atgcaatgga ctattgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357

<210> 6

<211> 119

<212> PRT

<213> 鼠单克隆抗体5G7重链可变区氨基酸序列(鼠)

<400> 6

Gln Val Gln Val Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30
Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Val Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Ile Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Tyr Ala Asp Val Gly Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 321

<212> DNA

<213> 鼠单克隆抗体5G7轻链可变区核苷酸序列(鼠)

<400> 7

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60
atcacatgtc gagcaagtga gaatattaac agtaatttag catggtatca gcagaaacag 120
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 180
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattecctca agatcaacag cctgcagtct 240
gaagatTTTTG ggagttatta ctgtcaacat ttttggggta gtccgctcac gttcgggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 鼠单克隆抗体5G7轻链可变区氨基酸序列(鼠)

<400> 8

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Asn	Ser	Asn
			20					25						30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val
		35					40						45		
Tyr	Ala	Ala	Thr	Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
		50				55						60			
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser
65					70						75				80
Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Ser	Pro	Leu
				85					90						95
Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys					
			100						105						

专利名称(译)	与伪狂犬病病毒gD蛋白结合的单克隆抗体及其应用		
公开(公告)号	CN109206509A	公开(公告)日	2019-01-15
申请号	CN2017110514485.X	申请日	2017-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛阳普莱柯万泰生物技术有限公司		
[标]发明人	田克恭 王莹		
发明人	田克恭 王莹		
IPC分类号	C07K16/08 G01N33/535 G01N33/569 G01N33/577 G01N33/68 A61K39/42 A61P31/22		
CPC分类号	C07K16/085 A61K2039/505 C07K2317/56 G01N33/535 G01N33/56994 G01N33/577 G01N33/68		
代理人(译)	方莉		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及特异性结合伪狂犬病病毒gD蛋白的鼠单克隆抗体的可变区序列，其为鼠单克隆抗体3B6的可变区序列或鼠单克隆抗体5G7的可变区序列；本发明还涉及由鼠单克隆抗体3B6可变区序列中的重链可变区序列或其保守性变异体，和/或轻链可变区序列或其保守性变异体组成的抗体，及由鼠单克隆抗体5G7可变区序列中的重链可变区序列或其保守性变异体，和/或轻链可变区序列或其保守性变异体组成的抗体。含所述抗体的ELISA检测试剂盒，克服了PRVgD蛋白与其它蛋白串联表达或融合表达后无法准确定量、预期表达效果无法验证的技术难题，解决了配制疫苗的关键问题。同时，含所述抗体的药物组合物，具有广谱性。

对应 PRV 毒株	组别	发病情况	死亡率	排毒天数
HN1201 株	①	5/5 仔猪健活，均未出现 PRV 的临床症状	0 (0/5)	第 4 天以后 PCR 检测均为阴性
	对照组②	4/5 出现严重神经症状、5/5 头猪连续 3 天以上体温超过 40.5℃	100% (5/5)	至第 7 天完全死亡，PCR 检测均为阳性
Fa 株	③	5/5 仔猪健活，均未出现 PRV 的临床症状	0 (0/5)	第 3 天以后 PCR 检测均为阴性
	对照组④	3/5 出现严重神经症状、5/5 头猪连续 3 天以上体温超过 40.5℃	100% (5/5)	至第 9 天完全死亡，PCR 检测均为阳性
Ma 株	⑤	5/5 仔猪健活，均未出现 PRV 的临床症状	0 (0/5)	第 3 天以后 PCR 检测均为阴性
	对照组⑥	3/5 出现严重神经症状、5/5 头猪连续 3 天以上体温超过 40.5℃	100% (5/5)	至第 9 天完全死亡，PCR 检测均为阳性