



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113490685 A

(43) 申请公布日 2021.10.08

(21) 申请号 201980093165.9

(22) 申请日 2019.12.27

(30) 优先权数据

3869-2018 2018.12.28 CL

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CL2019/050157 2019.12.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/132774 ES 2020.07.02

(71) 申请人 智利天主教教皇大学

地址 智利圣地亚哥

(72) 发明人 A·M·卡莱伊斯帕拉

S·M·布埃纳拉米耶

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

代理人 傅宇昌

(51) Int.Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页
序列表3页 附图6页

(54) 发明名称

与人副流感病毒(PIV)的L蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分;用于检测PIV病毒的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明提出了识别人副流感病毒(PIV)的L蛋白的单克隆抗体或其片段的产生,其中所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区。本发明还提供了诊断生物学样品中的PIV感染的方法,其使用以诊断试剂盒形式的所述单克隆抗体。

1. 与人副流感病毒(PIV)的L蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分,其用于在检测所述蛋白的存在和/或定位中使用,其特征在于,所述单克隆抗体或其抗原结合部分包含:

轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:1进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:2进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:3;和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:4进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:5,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:6;或者

轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:7进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:8进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:9;和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:10进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:11,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:12,

其中所述抗体可以用作检测抗体或捕获抗体。

2. 用于检测生物学样品中的PIV病毒的方法,其特征在于,所述方法包括使所述生物学样品与根据权利要求1的与PIV的L嵌合蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分相接触,并且检测所述抗体与所述抗原的结合,由此检测所述样品中的PIV病毒。

3. 根据权利要求2的用于检测生物学样品中的PIV病毒的方法,其特征在于,所述生物学样品选自由下列各项组成的组:被PIV感染的体外细胞、鼻分泌物、鼻冲洗物、脑脊液、咽分泌物和/或支气管冲洗物或分泌物。

4. 根据权利要求2或3中任一项的根据权利要求2的用于检测生物学样品中的PIV病毒的方法,其特征在于,用于检测所述抗体与所述抗原的结合的测定法选自:ELISA、免疫荧光、免疫组织化学法、免疫组化法、流式细胞术、细胞分选仪、免疫沉淀和/或Western印迹。

5. 根据权利要求2至4中任一项的用于检测生物学样品中的PIV病毒的方法,其特征在于,根据权利要求1的抗体或其抗原结合部分与允许其检测的标记物相缀合。

6. 根据权利要求5的用于检测生物学样品中的PIV病毒的方法,其特征在于,所述抗体结合至从由下列各项组成的组中选择的标记物:荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。

7. 用于检测PIV病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含:

-根据权利要求1的与PIV的L嵌合蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分,其作为捕获抗体或检测抗体起作用,其中所述检测抗体与用于其检测的标记物相缀合;

-所述抗体所附着至的固体支持物;和

-用于检测在所述检测抗体中所包括的标记物的试剂,所述标记物例如为荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。

8. 根据权利要求7的用于检测PIV病毒的试剂盒,其特征在于,所述固体支持物为由从由下列各项组成的组中选择的化合物之一形成的膜:硝化纤维素、纤维素、聚乙烯和尼龙。

9. 根据权利要求7和8中任一项的用于定性和/或定量检测PIV病毒的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒相应于免疫组化测试、Luminex、流式细胞术、免疫荧光、放射免疫分析、Western印迹、点渍法、ELISA、免疫扩散或免疫沉淀,以用于检测PIV。

10. 根据权利要求1的与PIV的L嵌合蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分的用途,其特征在于,所述单克隆抗体或其抗原结合部分充当捕获抗体和/或检测抗体。

与人副流感病毒(PIV)的L蛋白相结合的单克隆抗体或其抗原结合部分;用于检测PIV病毒的方法和试剂盒

[0001] 说明书

[0002] 发明描述

[0003] 本发明提出了识别人副流感病毒(PIV)的L嵌合蛋白的单克隆抗体或其片段,其中所述单克隆抗体或其片段包含:轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:1进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:2进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:3,和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:4进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:5,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:6;或者轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:7进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:8进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:9,和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:10进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:11,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:12。其中所述抗体可以用作为检测抗体和/或捕获抗体。本发明还提供了诊断生物学样品中的PIV感染的方法,其使用所述单克隆抗体;以及用于检测PIV的诊断试剂盒,其包含至少一种根据上面所描述的针对PIV的单克隆抗体。

[0004] 发明背景

[0005] 人副流感病毒产生上呼吸道的传染性疾病,其表现为从普通感冒到肺炎的各种病情。喉气管支气管炎是最严重和常见的临床表现。

[0006] 这种疾病是由副粘病毒类型的病毒产生的,并且很容易从人到入或者通过经由病人的咳嗽或喷嚏而排出的液滴或小颗粒进行传播,这使得其蔓延是快速的并且成为季节性疾病流行的一部分。

[0007] 在美国,PIV是幼童中由呼吸系统疾病引起的住院的主要原因之一,占病例的2-17%,这意味着250,000次急诊室就诊和700,000次住院。在5岁以下的儿童中,1.2名儿童每年因该原因住院,而在6个月以下的儿童中这一比例更高(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5813689/>)。

[0008] 相对于其他呼吸道病毒而言,PIV具有更多变的影响,其对于3至10%的具有细支气管炎、肺炎和喉气管支气管炎病情的住院负有责任。与呼吸道合胞病毒(RSV)一样,PIV在生命的前六个月引起严重疾病。PIV感染在4至12岁达到其高峰(<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/264249/PMC2486968.pdf?sequence=1&isAllowed=y>)。

[0009] 由PIV引起的感染可以通过使用直接检测方法(即通过直接在样品中检测抗体)或者通过允许测量IgM抗体的存在或IgG滴度的增加的血清学测试来进行诊断。也采用用细胞系的测定法来在临床实验室中分离PIV。

[0010] 在分离细胞培养物中的病毒的情况下,这相应于一种特异性且灵敏的方法,然而它具有需要10-15天才能出结果的缺点,由于其缓慢,它是一种验证技术,而非初次诊断技术。在允许测量患者中IgM和IgG抗体的存在的血清学测试的情况下,这些是通用测试,其不允许特异性地测定PIV病毒感染,也不允许测定PIV的类型。存在4种类型的PIV,即1、2、3和4型,其中1和2型是通常以流行形式出现的类型。

[0011] 另外,也使用分子技术例如聚合酶链反应(PCR)来检测在该病毒中所包含的RNA的某些区段,从RNA逆转录为互补DNA开始,其中使用后者作为用于进行PCR的模板。在文献US6015664A中提出了用于通过多重PCR测定法来测定生物学样品中多种病毒感染的存在或不存在的方法。该方法包括用于检测人副流感病毒1、2和3,呼吸道合胞病毒A和B,以及流感病毒A和B的互补核酸序列的核苷酸引物以及探针。

[0012] 在文献CN102140550A中,公开了用于以一个步骤检测副流感病毒的RT-PCR试剂盒,其中所述试剂盒包含特异于副流感病毒A的引物。

[0013] 文献CN105441589A则描述了通过四重PCR来检测1、2、3和4型副流感病毒的试剂盒。该四重PCR检测试剂盒包含特异于人副流感病毒的基因引物和探针。

[0014] 还存在用于检测各种呼吸道病毒(尤其是副流感病毒)的基于免疫荧光的各种试剂盒。例如,试剂盒D3 Ultra DFA(直接荧光抗体)允许定性鉴定各种呼吸道病毒:流感病毒A、流感病毒B、呼吸道合胞病毒、腺病毒、副流感病毒1、副流感病毒2和副流感病毒3。

[0015] 基于上述背景,根本的是产生并且拥有一种用于检测副流感病毒的有效、快速且低成本的检测方法,其可以与目前所使用的诊断方法相竞争。在这种情况下,使用检测存在于该病毒中的蛋白质的单克隆抗体被认为是用于改善流感病毒检测的一种备选方案。

[0016] 发明描述

[0017] 本发明涉及针对人副流感病毒(以下,PIV)的L嵌合蛋白或其片段的特异性单克隆抗体。特别地,本发明相应于由杂交瘤2E11B5和4D8C6所分泌的识别人副流感病毒(PIV)的L嵌合蛋白的单克隆抗体或其片段,其中所述单克隆抗体或其片段包含:轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:1进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:2进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:3,和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:4进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:5,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:6;或者轻链可变区,其中其CDR1(CDR_{LC1})按照SEQ ID NO:7进行定义,其CDR2(CDR_{LC2})由SEQ ID NO:8进行定义,并且其CDR3(CDR_{LC3})相应于SEQ ID NO:9,和重链可变区,其中其CDR1(CDR_{HC1})按照SEQ ID NO:10进行定义,其CDR2(CDR_{HC2})相应于SEQ ID NO:11,并且其CDR3(CDR_{HC3})相应于SEQ ID NO:12。所述抗体可以用作检测抗体和/或捕获抗体。本发明还提供了诊断生物学样品中的PIV感染的方法,其使用所述单克隆抗体;以及用于检测PIV的诊断试剂盒,其包含至少一种根据上面所描述的针对PIV的单克隆抗体。

[0018] 由于该抗原不是完全保守的,该序列的部分是保守的那些,因此从保守部分的联合开始产生新的序列。因此,所述抗体识别人副流感病毒的嵌合蛋白,特别是L嵌合蛋白。

[0019] 相对于其他已经存在的检测病毒抗原的抗体和方法而言,针对L蛋白或其片段的特异性单克隆抗体具有有利的和突出的重要技术特征。首先,每种病毒都具有特异性的表面蛋白质,因此基于用于其他类型的呼吸道病毒的单克隆抗体的其他诊断技术与所建议的本发明是不可比的。相对于针对其他病毒抗原(例如针对流感病毒的PB2蛋白)而言所述抗体针对PIV的L蛋白的检测特异性显示在本申请的图1A和1B中所提供的结果之中。从这些结果可能得出结论:在本申请范围内所提供的抗体仅识别PIV的L蛋白,并且在用FLU病毒的抗原的ELISA测定法中未观察到检测信号。

[0020] 其次,作为本发明范围的一部分的抗体允许特异性地检测L蛋白或其片段,从而它们既不相互竞争抗原结合位点,也不对与其同时结合施加阻碍。另外,它们允许在包含数量

低的抗原的样品中以高灵敏度检测L蛋白或其片段。

[0021] 所建议的单克隆抗体能够检测L蛋白(一种保守的蛋白质)。检测保守的病毒蛋白质这一策略允许,作为本发明范围的一部分的抗体检测不同类型的人副流感病毒,尤其是副流感病毒1、2、3和4。

[0022] 当在本发明中提及CDR序列时,这些相应于在具有抗原检测功能的蛋白质的可变结构域中发现的短序列。本发明提出了关于由杂交瘤2E11B5和4D8C6所分泌的抗体的重链(CDR_{HC})和轻链(CDR_{LC})的CDR序列。

[0023] 所描述的单克隆抗体可以用于检测、诊断和/或测定PIV感染的测定法。可以同时使用这些抗体,以提高在其中存在数量和可用性低的抗原的临床样品中的检测灵敏度。在这方面,还提供了诊断生物学样品中的PIV感染的方法,所述方法包括使所述生物学样品与根据权利要求的针对PIV的L蛋白或其片段的单克隆抗体相接触,并且检测所述抗体与所述抗原的结合。所述生物学样品可以相应于(但不限于)被PIV感染的体外细胞、鼻分泌物、鼻冲洗物、脑脊液、咽分泌物和/或支气管冲洗物或分泌物。作为该方法的一部分,用于检测抗原-抗体结合的测定法选自:ELISA、Luminex、免疫荧光、免疫组织化学法、免疫色谱法、流式细胞术、细胞分选仪、免疫沉淀和/或Western印迹。

[0024] 本发明还包括用于检测人流感病毒的诊断试剂盒,其包含:针对PIV的L蛋白或其片段的单克隆抗体,其中所述抗体可以作为捕获抗体或检测抗体起作用,其中特别地所述检测抗体与用于其检测的标记物相缀合;所述抗体所附着至的固体支持物;和用于检测在所述检测抗体中所包括的标记物的试剂,所述标记物例如为荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。

[0025] 在本发明中,当提及捕获抗体时,这相应于与所述抗原特异性地结合的抗体。在检测抗体的情况下,这相应于在其上缀合有标记物以通过诸如下列的不同测试来进行检测的抗体:免疫色谱法测试、Luminex、流式细胞术、免疫荧光、放射免疫分析、Western印迹、点渍法、ELISA、Luminex、免疫扩散或免疫沉淀,以用于检测PIV。

[0026] 当与检测标记物相偶联时,作为本发明的一部分的抗体可以作为捕获抗体或作为检测抗体双重地起作用。所述检测标记物缀合至检测抗体,并且它可以相应于(但不限于)荧光团、生物素、放射性同位素、金属和酶。优选地,所述检测抗体与基于辣根过氧化物酶(HRP)活性检测的报道系统相缀合。

[0027] 附图描述

[0028] 图1:通过间接ELISA测定法用由杂交瘤2E11B5和4D8C6所产生的单克隆抗体来检测PIV的L嵌合蛋白。用50ng的经纯化的重组PIV L蛋白、50ng的Flu PB2蛋白(作为特异性的对照)以及20μg的没有质粒的大肠杆菌(E. coli) BL21菌株(用作特异性的对照)和3个其中过表达L蛋白的相同菌株的克隆(C1、C2和C3)的细菌裂解物来活化平板。包括没有抗原、具有一抗、具有与HRP相缀合的抗小鼠IgG(未活化)的对照孔,和没有抗原也没有一抗、仅具有抗小鼠IgG抗体(HRP)的孔,数据未在该图中显示。然后,将所述孔与以170ng的量的来自杂交瘤2F11B1的抗-L抗体(A)和以170ng的量的来自杂交瘤4D8C6的抗-L抗体(B)一起进行温育。未使用针对L蛋白的商业抗体,因为目前尚无可以在ELISA技术中使用的商业抗体。在该图中所显示的数据表示在450nm处检测的吸光度,其通过由在与由杂交瘤2F11B1和4D8C6所分泌的抗体特异性地结合的抗小鼠IgG二抗中存在的辣根过氧化物酶(HRP)所催化的底物

四甲基联苯胺向有色化合物的转化而发出。所述值相应于在至少两个独立实验中由每个样品所发出的吸光度的平均值±标准偏差。 $*P<0.05$ 和 $**P<0.01$,通过参数Student检验,其比较了PB2-Flu蛋白的结果与L-PIV的结果,和另一方面,使用单因素ANOVA检验,其比较了没有质粒的大肠杆菌BL21的裂解物与过表达L蛋白的大肠杆菌BL21的裂解物。字母ns意味着,未观察到显著差异。

[0029] 图2:测定由杂交瘤2E11B5和4D8C6所产生的单克隆抗体在检测PIV的L蛋白中的灵敏度。用1:2系列稀释物(以50ng的L蛋白开始和以0.04ng结束)来活化ELISA平板。然后,将所述孔与以170ng的量的来自杂交瘤2E11B5的抗-L抗体(A)和以170ng的量的来自杂交瘤4D8C6的抗-L抗体(B)一起进行温育。包括未活化的孔作为阴性对照。在该图中所显示的数据表示在450nm处的吸光度,其通过由在以170ng的量的来自杂交瘤2E11B5和4D8C6的抗-L抗体(A和B)中存在的辣根过氧化物酶(HRP)所催化的底物四甲基联苯胺向有色化合物的转化而发出。所述值相应于在至少两个独立实验中由每个样品所发出的吸光度的平均值±标准偏差。 $**P<0.01$ 和 $***P<0.001$,通过参数Student检验,其比较了被命名为对照的孔(没有样品)的结果与L蛋白的每一个稀释物的结果。

[0030] 图3:由杂交瘤2E11B5和4D8C6所产生的抗-Flu L单克隆抗体的系列稀释测定法,其用于检测经纯化的PIV的抗原。用50ng的PIV的重组L蛋白活化ELISA平板,并且用抗-L抗体2E11B5(A)或4D8C6(B)的11个1:2系列稀释物(从3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (170ng/孔)的浓度开始)来检测抗原。数据表示为在至少两个独立实验中以一式两份的每个样品在450nm处所发出的吸光度值的平均值±标准偏差。 $*P<0.05$, $**P<0.01$,和 $***P<0.001$,通过参数Student检验,其比较了被命名为对照的孔(没有抗体2E11B5或4D8C6)的结果与所述抗体的每一个稀释物的结果。

[0031] 图4:通过Luminex测定法用由杂交瘤2E11B5和4D8C6所产生的单克隆抗体来检测在被感染的细胞中的PIV的L蛋白。用50ng的经纯化的重组PIV L蛋白、20 μg 的未感染(用作特异性的对照)和被PIV感染的MDCK细胞来活化平板。包括没有抗原、具有一抗,具有与HRP相缀合的抗小鼠IgG的对照孔(NTC)。然后,将所述孔与以50个微球/ μl 的量的来自杂交瘤2E11B5的抗-L抗体(与PIV的21区域相缀合)(其用作捕获抗体)和以4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度的与生物素相缀合的来自杂交瘤4D8C6的抗-L抗体(其用作检测抗体)一起进行温育。然后,将抗体和样品的复合物与浓度为6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的链霉抗生物素蛋白/藻红蛋白一起进行温育。在该图中所显示的数据表示平均荧光强度(MFI)。进行非参数Student检验,其比较了未感染的细胞与被PIV感染的细胞,以及重组L蛋白与阴性对照($**P<0.01$ 和 $****P<0.0001$)。

[0032] 图5:通过夹心式ELISA和夹心类型Luminex来检测在临床样品中的PIV,其中使用对于PIV的由杂交瘤2E11B5和4D8C6所分泌的单克隆抗体的组合。A)用170ng的由杂交瘤2E11B5所分泌的抗体(抗-PIV)(其作为捕获抗体起作用)来活化ELISA平板。将用对于每种病毒的捕获抗体进行活化的孔与50 μl 的具有病毒性呼吸道病情的患者的鼻咽拭子(NPS)样品一起进行温育。作为阴性对照,分析10个健康对照样品。使用16个对于PIV来说阳性的患者的样品,并且作为特异性的对照,包括3个对于流感病毒来说阳性的患者的样品(Flu+)。作为阳性对照,包括向其添加了经纯化的L-PIV蛋白的孔。为了检测被抗体2E11B5所捕获的蛋白,以1:2000的稀释度(1.8ng/ μl /孔)使用与辣根过氧化物酶相缀合的由杂交瘤4D8C6所产生的抗体。B)用50个磁性微球/ μl 来活化Luminex平板,所述磁性微球与作为捕获抗体起

作用的由杂交瘤2E11B5所分泌的抗体(抗-PIV)相缀合。将经缀合的微球与50 μ l的具有病毒性呼吸道病情的患者的鼻咽拭子(NPS)样品一起进行温育。作为阴性对照,分析8个健康对照样品。使用14个对于PIV来说阳性的患者的样品,并且作为阳性对照,包括向其添加了经纯化的L-PIV蛋白的孔。为了检测被抗体2E11B5所捕获的蛋白,以4 μ g/mL的浓度使用与生物素荧光团相缀合的由杂交瘤4D8C6所产生的抗体。将复合物(缀合有捕获抗体、抗原和检测抗体的微球)与浓度为6 μ g/mL的链霉抗生物素蛋白/藻红蛋白一起进行温育。数据显示了每个样品的在450nm处发出的吸光度(A)或MFI(B)的值的的中值(**P<0.01和***P<0.0001;通过非参数Student检验,其比较了PIV阳性患者与健康对照,和相对于作为特异性的对照进行使用的病毒。

[0033] 图6:通过间接ELISA测定法来检测L蛋白,其中使用与生物素相缀合的由杂交瘤2E11B5和4D8C6所分泌的单克隆抗体。在该图中呈现了这样的图,其中表示出了通过由辣根过氧化物酶(HRP)所催化的底物四甲基联苯胺向有色化合物的转化而发出的在450nm处的吸光度。以黑色和白色的样品分别相应于用由杂交瘤2E11B5和4D8C6所分泌的抗体的片段进行的测定法,而以灰色呈现了用由杂交瘤2E11B5和4D8C6所分泌的完整单克隆抗体进行的测定法。显示了每个样品的在450nm处发出的吸光度值的平均值(其中b等于相比于a而言p<0.0001,和d等于相比于c而言p<0.0001;通过两因素ANOVA检验,其比较了没有样品的孔与具有蛋白质、具有所有抗体的孔)。

[0034] 允许展示本发明的单克隆抗体的不同应用的实施例

[0035] 实施例1:测定编码由杂交瘤2E11B5所分泌的抗-PIV L抗体的可变区的轻链(VL)和重链(VH)的核苷酸序列

[0036] 使杂交瘤2E11B5在补充有3.7g/L碳酸氢钠和10%胎牛血清的DMEM-高葡萄糖培养基中在37 $^{\circ}$ C下在具有10%CO₂的情况下进行生长,直至700,000个细胞/mL的细胞密度。通过用Trizol化合物(Invitrogen)进行处理,获得3.5 \times 10⁶个细胞的总RNA。将0.5 μ g的RNA用于用PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒(其使用同种型特异性通用引物)通过逆转录反应来产生cDNA。按照GenScript的cDNA末端快速扩增(RACE)的标准操作程序(SOP)来扩增抗体的轻链和重链。将扩增出的抗体片段分开地克隆在标准克隆载体中。进行菌落PCR以鉴定具有有着正确大小的插入物的克隆。对于每个片段,对至少五个具有有着正确大小的插入物的菌落进行测序。比对不同克隆的序列并且提供这些克隆的共有序列。由杂交瘤2E11B5所分泌的抗体的重链和轻链的核苷酸序列分别相应于标示为SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2的序列。

[0037] 实施例2:测定编码由杂交瘤4D8C6所分泌的抗-PIV L抗体的可变区的轻链(VL)和重链(VH)的核苷酸序列

[0038] 使杂交瘤4D8C6在补充有3.7g/L碳酸氢钠和10%胎牛血清的DMEM-高葡萄糖培养基中在37 $^{\circ}$ C下在具有10%CO₂的情况下进行生长,直至700,000个细胞/mL的细胞密度。通过用Trizol化合物(Invitrogen)进行处理,获得3.5 \times 10⁶个细胞的总RNA。将0.5 μ g的RNA用于用PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒(其使用同种型特异性通用引物)通过逆转录反应来产生cDNA。按照GenScript的cDNA末端快速扩增(RACE)的标准操作程序(SOP)来扩增抗体的轻链和重链。将扩增出的抗体片段分开地克隆在标准克隆载体中。进行菌落PCR以鉴定具有有着正确大小的插入物的克隆。对于每个片段,对至少五个具有有着正

确大小的插入物的菌落进行测序。比对不同克隆的序列并且提供这些克隆的共有序列。由杂交瘤4D8C6所分泌的抗体的重链和轻链的核苷酸序列分别相应于标示为SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4的序列。

[0039] 实施例3:检测PIV抗原的测定法,通过间接ELISA测定法来测定PIV的抗-L单克隆抗体对于经纯化的PIV抗原的特异性

[0040] 该测定法的目的是证明由杂交瘤2E11B5和4D8C6所产生的抗体对于PIV的L蛋白的特异性。抗原的检测通过间接ELISA技术来进行,其中在37°C下用50ng的经纯化的抗原活化ELISA平板1小时。以同样的方式,用20 μ g的没有质粒的大肠杆菌BL21菌株(用作特异性的对照)和3个其中过表达L蛋白的相同菌株的克隆(C1、C2和C3)的细菌裂解物来活化平板。所包括的另一阴性对照为在单独的孔中的50ng的Flu PB2蛋白。然后,用1X磷酸盐缓冲盐水(PBS)/0.05%Tween20洗涤平板两次。之后,用1X PBS/10%胎牛血清(FBS)在37°C下封闭平板2小时。然后,重复洗涤,并接着在37°C下温育在1X PBS/10%FBS中稀释的最终浓度为3.4 μ g/mL(170ng/孔)的每种抗体(2E11B5和4D8C6)1小时(每种抗体在单独的平板中)。在温育时间过后,重复洗涤,并且向每一个所述孔添加在1X PBS/10%FBS中的以1:2000稀释度(0.5ng/ μ l/孔)的标记有辣根过氧化物酶(HRP)的抗小鼠IgG二抗,在黑暗中在环境温度(\approx 25°C)下1小时。最后,进行洗涤,并且用50 μ L的柠檬酸盐缓冲液/四甲基联苯胺(TMB,3-3'-5-5'-四甲基联苯胺,1mg/mL,Becton Dickinson)进行显色。为了终止反应,添加50 μ L的2N H₂SO₄,并且在ELISA阅读器上在450nm下读取结果。为了确定在识别一抗方面二抗的反应是特异性的并且所获得的信号不是由于二抗与病毒抗原的非特异性结合而引起的,设置其中仅使用二抗而没有一抗也没有样品的对照(未活化的孔)。用于确定一抗的反应特异于抗原的另一对照在于在未用抗原进行活化的ELISA平板(没有抗原)上使用所述抗体,或者在具有50ng的Flu PB2蛋白或没有质粒的大肠杆菌BL21菌株的裂解物的ELISA平板上使用所述抗体。结果显示,本发明的单克隆抗体能够特异性地识别50ng的经纯化的抗原,因为其不以高信号识别Flu PB2蛋白,也不识别细菌裂解物的蛋白(图1A和1B),如在3个过表达L蛋白的克隆的情况中所观察到的。未使用商业抗体来进行比较,因为市场上不存在抗副流感病毒的L的抗体,绝大多数商业化的已经进行并且是针对磷蛋白(P)、核蛋白(NP)或血凝素-神经氨酸酶(HN)的。发现了Machiko Nishio等人(2000和2011)的研究,其中产生了抗副流感病毒的L的抗体。这些抗体仅针对PIV的一种血清型即血清型2,而不针对在呼吸系统疾病中最流行的3种血清型(PIV 1、2和3),正如这些抗体的情况那样。另一方面,所发表的抗-L抗体迄今还未商业化。所有所使用的阴性对照都给出了所预期的结果(数据未在图中显示)。

[0041] 实施例4:用于测定所述单克隆抗体用于检测PIV的抗-L病毒抗原的灵敏度的测定法

[0042] 进行该测定法以测定来自杂交瘤2E11B5和4D8C6的PIV的抗-L单克隆抗体能够通过间接ELISA进行检测的最大蛋白质稀释度。为此,采用与实施例3中所描述的相同的技术。用PIV的L蛋白的11个1:2系列稀释物(从50ng的经纯化的抗原开始)来活化平板。以3.4 μ g/mL(170ng/孔)的最终浓度使用抗-L抗体2E11B5和4D8C6,并且将其稀释在1X PBS/10%FBS中。然后,添加以1:2,000的稀释度(0.5ng/ μ L/孔)的抗小鼠IgG检测抗体,并且在黑暗中在环境温度(\approx 25°C)下温育1小时。最后,进行洗涤,并且用50 μ L的柠檬酸盐缓冲液/四甲基联苯胺(TMB,3-3'-5-5'-四甲基联苯胺,1mg/mL,Becton Dickinson)进行显色。为了终止反

应,添加50 μ L的2N H₂SO₄,并且在ELISA阅读器上在450nm下读取结果。结果显示,抗-L抗体2E11B5能够检测直至390皮克(pg)的PIV的L重组嵌合蛋白(图2A)。来自杂交瘤4D8C6的抗-L抗体显示出比抗-L抗体2E11B5更高的灵敏度(图2B),因为其能够检测直至190皮克的纯蛋白质。在所有测定法中都包括使得能够排除所述两种抗体的非特异性反应的对照,其包含了样品(PIV L蛋白)外的所述测定法的所有组分(数据未在图中显示)。

[0043] 实施例5:用于通过间接ELISA来测定所述单克隆抗体用于检测PIV的病毒抗原的效能的测定法

[0044] 进行该测定法以测定允许检测病毒抗原的来自杂交瘤2E11B5和4D8C6的PIV的抗-L单克隆抗体的最大稀释度。用50ng的经纯化的抗原(L蛋白)活化ELISA平板,之后用1X PBS/10%胎牛血清(FBS)在37 $^{\circ}$ C下封闭平板2小时。以1:2稀释(从工作浓度(170ng)开始直至1X PBS/10%FBS中的第11次稀释(0.15ng))来使用抗-L抗体2E11B5和4D8C6。然后,添加以1:2,000的稀释度(0.5ng/ μ L/孔)的抗小鼠IgG检测抗体,并且在黑暗中在环境温度(\approx 25 $^{\circ}$ C)下温育1小时。最后,进行洗涤,并且用50 μ L的柠檬酸盐缓冲液/四甲基联苯胺(TMB,3-3'-5-5'-四甲基联苯胺,1mg/mL,Becton Dickinson)进行显色。为了终止反应,添加50 μ L的2N H₂SO₄,并且在ELISA阅读器上在450nm下读取结果。在图3(A和B)中观察到,这两种抗-L抗体(2E11B5和4D8C6)都可以高效能检测50ng的经纯化的抗原,因为在所有所制得的稀释度下都以高信号观察到所述抗原的检测。在该测定法中所包括的阴性对照相应于不包含样品(L蛋白)的孔,用1X PBS/10%FBS进行封闭,添加一抗(抗-L抗体2E11B5或抗-L抗体4D8C6),并且还包含与HRP相缀合的抗小鼠IgG抗体。

[0045] 实施例6:通过夹心类型Luminex技术,使用PIV的抗-L单克隆抗体,检测在被PIV感染的细胞中的PIV的L蛋白

[0046] 与在患者样品中一样,在被感染的细胞中病毒蛋白质的可用性和浓度通常是非常低的,因此想要评价在被PIV感染的细胞中目的抗原的检测(图4)。对于该测定法,进行夹心类型Luminex测定法,其中使用抗-L抗体2E11B5作为捕获抗体和抗-L抗体4D8C6作为检测抗体。将PIV的抗-L检测抗体4D8C6与生物素荧光团相缀合。用50个磁性微球(内部标记有不同强度的红色或近红外荧光团)/ μ L来活化Luminex平板,所述磁性微球与作为捕获抗体起作用的由杂交瘤2E11B5所分泌的抗体(抗-PIV)相缀合(以2.5 μ M的最终浓度)。将经缀合的微球与50 μ L的未感染和被PIV感染的MDCK细胞一起在环境温度(\approx 23 $^{\circ}$ C)下、在以400rpm的摇动下并且在黑暗中(用铝箔覆盖)温育2小时。作为阴性对照,在孔中不温育样品,和作为阳性对照,使用50ng的L蛋白。2小时后,使用手动磁力洗涤器,用100 μ L 1X PBS-0.05% Tween20进行2次洗涤(持续30秒)。为了检测被抗体2E11B5所捕获的蛋白质,使用在1X PBS-1%BSA中稀释的、以4 μ g/mL的浓度的、与生物素荧光团相缀合的由杂交瘤4D8C6所产生的抗体,其中用50 μ L温育所述孔。所述温育在黑暗中在环境温度下进行1小时,其中以400rpm进行摇动。使用手动磁力洗涤器,用100 μ L 1X PBS-0.05% Tween20再次进行2次洗涤(持续30秒)。将由缀合有捕获抗体的微球加上抗原和检测抗体所形成的复合物与50 μ L的链霉抗生素蛋白/藻红蛋白(以6 μ g/mL的最终浓度)一起进行温育。所述温育在黑暗中在环境温度下进行30分钟,其中以400rpm进行摇动。最后,再进行两个洗涤步骤,并且将所述孔与100 μ L的Sheat液体试剂(由Luminex设备所使用以便该设备读取样品的试剂)一起进行温育,在黑暗中以400rpm摇动5分钟。然后,在设备Luminex 200中读取平均荧光强度(MFI)的结果,该

设备通过红色激光 (621nm) 来检测微球的识别区域, 和绿色激光 (511nm) 检测检测抗体与分析物的结合。

[0047] 关于该测定法而获得的结果显示在图4中, 其中可以观察到, 通过使用来自杂交瘤 2E11B5的 (抗-L) 抗体作为捕获抗体和来自杂交瘤 4D8C6的抗体-HRP作为检测抗体的 Luminex技术, 使得能够检测在被PIV感染的细胞中的抗原 (图4), 而没有非特异性地检测未感染的细胞的抗原, 即所述抗体能够区分被感染的和未感染的样品。所有通过Luminex被检测为阳性的被感染的细胞样品为显示出高于未感染的细胞的MFI平均值两个标准偏差的MFI的那些。与在实施例7中所显示的临床样品一样, 对被感染的细胞和未感染的细胞进行处理。

[0048] 实施例7: 通过夹心式ELISA技术, 使用PIV的抗-L单克隆抗体来对被PIV感染的患者的样品进行临床诊断

[0049] 在鼻咽拭子的临床样品中病毒蛋白质的可用性和浓度通常是非常低的, 因此需要改进先前所进行的间接ELISA测定法。对于该测定法, 进行夹心式ELISA, 其中使用抗-L抗体 2E11B5作为捕获抗体和抗-L抗体4D8C6作为检测抗体。将PIV的抗-L检测抗体4D8C6与HRP相缀合。对于该测定法, 用 $3.4\mu\text{g}/\text{mL}$ ($170\text{ng}/\text{孔}$) 的在1X PBS中稀释的来自杂交瘤2E11B5的PIV的抗-L抗体在 37°C 下活化ELISA平板的孔1小时。用1X PBS-0.05% Tween20进行2次洗涤, 然后用 $200\mu\text{L}$ 的1X PBS/10% FBS在 37°C 下封闭平板1小时。再次进行洗涤, 并且在 37°C 下将每个孔与 $50\mu\text{L}$ 的按照诊断方法“D³ Ultra DFA Respiratory Virus Screening and ID Kit de DHI (Diagnostics Hibryds) USA” (常规地被称为“病毒小组 (panel viral)”) 对于PIV来说阳性的患者的鼻咽拭子一起温育1小时, 并且其如后面所描述的那样进行处理。作为对照, 包括: 1) 特异性的对照: 使用 $50\mu\text{L}$ 的通过关于抗-PIV抗体的病毒小组而诊断为具有Flu的患者的样品; 2) 阳性对照: 50ng 的重组L-PIV蛋白; 3) 阴性对照: 相应于健康对照样品。然后, 用1X PBS-0.05% Tween20进行2次相应的洗涤, 并且将每个孔与 $50\mu\text{L}$ 的与HRP相缀合的来自杂交瘤4D8C6的抗-L抗体 ($1.8\text{ng}/\mu\text{L}$ 的最终浓度) 一起在环境温度 ($\approx 25^\circ\text{C}$, 在黑暗中) 下温育1小时。接着, 再洗涤平板2次, 用 $50\mu\text{L}$ 的TMB溶液进行显色, 并且在黑暗中温育15分钟。用 $50\mu\text{L}$ 的 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ 终止反应, 并且在被认证可用于临床诊断的ELISA阅读器 (Epoch型) 上在 450nm 下进行平板的阅读。

[0050] 关于该测定法而获得的结果显示在图5A中, 其中可以观察到, 使用来自杂交瘤 2E11B5的 (抗-L) 抗体作为捕获抗体和来自杂交瘤 4D8C6的抗体-HRP作为检测抗体的夹心式ELISA技术使得能够检测在被PIV感染的患者的样品中的抗原 (图5A), 所述患者先前通过使用病毒小组在经认证的临床实验室中通过直接免疫荧光而得到确认。图5A显示了用PIV的抗-L抗体获得的结果, 其中使用43个被诊断为PIV阳性的患者的样品, 并且作为特异性的对照, 包括3个对于流感病毒来说阳性的患者的样品。作为阳性对照, 包括向其添加了经纯化的L-PIV蛋白的孔。作为阴性对照, 使用10个健康对照。结果显示, 所述抗-PIV抗体在仅检测出对于PIV来说阳性的患者, 而未检测出健康对照或被其他病毒 (Flu) 感染的患者方面是特异性的。所有通过ELISA而被检测为阳性的样品为显示出高于0.1的光密度 (OD) 的那些。

[0051] 临床样品的处理。从包含在通用运输介质 (UTM) 中的鼻咽拭子开始来获得用于所述测定法的样品。在环境温度下以 $14,000\text{rpm}$ 将样品离心4分钟。然后, 将上清液 (SN1) 与粒状沉淀分开; 将后者与 $100\mu\text{L}$ 的RIPA缓冲液 ($50\text{mM Tris-HCl pH } 8.0, 150\text{mM NaCl}, 1\% \text{NP-}$

40, 0.5%脱氧胆酸钠, 0.1%SDS, 和1X蛋白酶抑制剂混合物) 一起在4℃下温育15分钟, 其中每5分钟通过涡旋振荡进行摇动。接着在环境温度下以14,000rpm离心4分钟。在最后, 取所获得的上清液 (SN2) 并且与SN1相混合, 进行涡旋振荡。

[0052] 实施例8: 通过夹心类型Luminex技术, 使用PIV的抗-L单克隆抗体来对被PIV感染的患者的样品进行临床诊断

[0053] 与在ELISA技术中一样, 在鼻咽拭子的临床样品中病毒蛋白质的可用性和浓度通常是非常低的, 因此想要通过另一种更灵敏的技术来评价通过ELISA技术所获得的结果 (图5A)。对于该测定法, 进行夹心类型Luminex测定法, 其中使用抗-L抗体2E11B5作为捕获抗体和抗-L抗体4D8C6作为检测抗体。将PIV的抗-L检测抗体4D8C6与生物素荧光团相缀合。用50个磁性微球 (内部标记有不同强度的红色或近红外荧光团) / μL 来活化Luminex平板, 所述磁性微球与作为捕获抗体起作用的由杂交瘤2E11B5所分泌的抗体 (抗-PIV) 相缀合 (以2.5 μM 的最终浓度)。将经缀合的微球与50 μL 的具有病毒性呼吸道病情的患者的鼻咽拭子 (NPS) 样品一起在环境温度 ($\approx 23^\circ\text{C}$) 下、在以400rpm的摇动下并且在黑暗中 (用铝箔覆盖) 温育2小时。作为阴性对照, 分析8个健康对照样品。使用14个按照诊断方法“D³Ultra DFA Respiratory Virus Screening and ID Kit de DHI (Diagnostics Hibryds) USA” (常规地被称为“病毒小组”) 对于PIV来说阳性的患者的样品, 其以与上面所提及的相同方式进行处理; 并且作为阳性对照, 包括向其添加了经纯化的L-PIV蛋白 (50ng) 的孔。2小时后, 使用手动磁力洗涤器, 用100 μL 1X PBS-0.05% Tween20进行2次洗涤 (持续30秒)。为了检测被抗体2E11B5所捕获的蛋白质, 使用在1X PBS-1% BSA中稀释的、以4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度的、与生物素荧光团相缀合的由杂交瘤4D8C6所产生的抗体, 其中用50 μL 温育所述孔。所述温育在黑暗中进行, 在环境温度下进行1小时, 其中以400rpm进行摇动。使用手动磁力洗涤器, 用100 μL 1X PBS-0.05% Tween20再次进行2次洗涤 (持续30秒)。将由缀合有捕获抗体的微球加上抗原和检测抗体所形成的复合物与50 μL 的链霉抗生物素蛋白/藻红蛋白 (以6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的最终浓度) 一起进行温育。所述温育在黑暗中进行, 在环境温度下进行30分钟, 其中以400rpm进行摇动。最后, 再进行两个洗涤步骤, 并且将所述孔与100 μL 的Sheath液体试剂 (由Luminex设备所使用以便该设备读取样品的试剂) 一起进行温育, 在黑暗中以400rpm摇动5分钟。然后, 在设备Luminex 200中读取平均荧光强度 (MFI) 的结果, 该设备通过红色激光 (621nm) 来检测微球的识别区域, 和绿色激光 (511nm) 检测检测抗体与分析物的结合。

[0054] 关于该测定法所获得的结果显示在图5B中, 其中可以观察到, 使用来自杂交瘤2E11B5的 (抗-L) 抗体作为捕获抗体和来自杂交瘤4D8C6的抗体-HRP作为检测抗体, 与通过ELISA技术所获得的一样, Luminex技术使得能够以高强度检测在被PIV感染的患者的样品中的抗原 (图5B), 所述患者先前通过使用病毒小组在经认证的临床实验室中通过直接免疫荧光而得到确认。图5B显示了用PIV的抗-L抗体获得的结果, 其中使用38个被诊断为PIV阳性的患者的样品和8个健康对照样品。此外, 还使用向其添加了经纯化的L-PIV蛋白的孔作为阳性对照。结果显示, 所述抗-PIV抗体在仅检测出对于PIV来说阳性的患者, 而未检测出对照受试者方面是特异性的。所有通过Luminex被检测为阳性的样品为显示出高于健康对照的MFI平均值两个标准偏差的MFI的那些。

[0055] 与在用患者样品的ELISA测定法中一样, 该测定法证明了PIV的来自杂交瘤2E11B5和4D8C6的抗体所具有的多面性, 因为它们能够同时与所述抗原相结合而不竞争结合位点

或相互干扰,并且检测出在鼻咽拭子样品中所述抗原的低的可用性。这些结果中最令人感兴趣的是可以检测作为嵌合蛋白的L蛋白,其是从人PIV的最流行的三种血清型(1、2和3)的三个保守片段开始在实验室中构建的。

[0056] 实施例9:用于检测在从经历感染的患者获得的临床样品中的L-PIV抗原的盲研究,其中使用PIV的抗-L单克隆抗体,其构成呼吸道病毒的多重检测试剂盒的一部分

[0057] 事先进行夹心式ELISA测定法,其中已知待评价的样品的先前诊断。在这些测定法之后,进行盲研究,其中评价大约150个鼻咽拭子样品,不知道微生物学诊断。对于该盲研究的所有测定法,进行夹心式ELISA,其中使用抗-L抗体2E11B5作为捕获抗体和抗-L抗体4D8C6作为检测抗体(与HRP相缀合)。对于所有测定法,用3.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (170ng/孔)的在1X PBS中稀释的PIV的来自杂交瘤2E11B5的抗-L抗体在37 $^{\circ}\text{C}$ 下活化ELISA平板的孔30分钟。用1X PBS-0.05%Tween20进行2次洗涤,然后用200 μL 的1X PBS/10%FBS在37 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭平板30分钟。再次进行洗涤,并且在37 $^{\circ}\text{C}$ 下将每个孔与50 μL 的患者的鼻咽拭子一起温育1小时,所述鼻咽拭子通过标准诊断方法(PCR)(常规地被称为“病毒小组”)平行地进行评价,并且如前面在实施例6中所描述的那样进行处理。作为对照,包括:1)特异性的对照:使用50 μL 的BSA蛋白(50ng);2)阳性对照:50ng的重组L-PIV蛋白;3)阴性对照:没有样品的孔和经封闭并用检测抗体进行温育的孔。然后,用1X PBS-0.05%Tween20进行2次相应的洗涤,并且将每个孔与50 μL 的与HRP相缀合的来自杂交瘤4D8C6的抗-L抗体(1.8ng/ μL 的最终浓度)一起在环境温度($\approx 25^{\circ}\text{C}$,在黑暗中)下温育30分钟。接着,再洗涤平板2次,用50 μL 的TMB溶液进行显色,并且在黑暗中温育15分钟。用50 μL 的2N H_2SO_4 终止反应,并且在被认证可用于临床诊断的ELISA阅读器(Epoch型)上在450nm下进行平板的阅读。

[0058] 结果显示在图5A中,其中观察到所述抗体检测在临床样品中的L蛋白的能力,因为它们是从嵌合蛋白开始来设计的。从7名PIV阳性患者中检测出5名,并且从这些结果开始可以测定所述抗体的诊断准确性,这显示在表1中。在该表中,观察到定义诊断准确性的两个概念,其中包括特异性,即所述抗体将阴性样品诊断为阴性而不检测假阳性的能力,和另一方面,包括灵敏度,即所述抗体将真正为阳性的那些样品诊断为阳性而不诊断假阴性的能力。在该表中所展示的结果显示了相对于标准技术(PCR)而言所述抗体的高的特异性百分比(100%)和低的灵敏度百分比(71%),而这是高的,考虑到所述抗体是针对嵌合蛋白而不是针对该病毒所表达的完整蛋白质而设计的,因为以其整体它不是保守的。

[0059] 表1.抗-PIV L抗体的诊断准确性

PIV (N=141)	通过参考技术 (PCR) 的诊断		特异性	灵敏度
	真阳性	假阳性		
[0060] 诊断测试: ELISA	5	0	100%	71%
	假阴性	真阴性		
	2	134		

[0061] 实施例10:通过间接ELISA测定法来检测L蛋白,其中使用与生物素相缀合的由杂交瘤2E11B5和4D8C6所分泌的单克隆抗体

[0062] 在该应用实施例中显示,针对PB2蛋白的特异性单克隆抗体可以通过间接ELISA来进行检测。

[0063] 为了检测L蛋白,用50 μ L的50ng L蛋白和BSA来活化ELISA平板。用在1X PBS中稀释的10%FBS来封闭特异性位点。170ng (3.4 μ g/mL)的由杂交瘤2E11B5 (抗-PIV)和4D8C6 (抗-PIV)所分泌的抗体的Fab片段,两者都事先与生物素相缀合。温育缀合有HRP的生物素结合分子(链霉抗生物素蛋白)(1:2000稀释,75ng/孔)(图6,暗灰色条:抗体2E11B5;和浅灰色条:抗体4D8C6)。实施例10:通过间接ELISA测定法来检测PIV的抗原的测定法,其中使用PIV的抗-L单克隆抗体的F(ab')₂片段

[0064] 该测定法的目的是证明对于L嵌合蛋白来说由杂交瘤2E11B5和4D8C6所产生的抗-PIV抗体的片段的检测能力。在间接ELISA测定法之前,进行每种抗-PIV抗体的IgG分子的片段化。所述片段化通过使用试剂盒“Thermo Scientific™ Pierce™ F(ab')₂ Fragment Preparation Kits”(#10381214, Thermo Scientific)来进行,其通过使用消化Fc片段的胃蛋白酶来从目的抗体上分开F(ab')₂片段和Fc,和然后进行纯化步骤以将F(ab')₂片段与经消化的Fc片段分开。在抗体片段化之后,通过用考马斯蓝染色的SDS-PAGE技术来验证经纯化的F(ab')₂级分。使用快速缀合试剂盒Lightning-Link rapid biotin type A(#370-0010, Expedeon)来将F(ab')₂级分与生物素分子相缀合。在具有所有所列试剂的情况下,通过间接ELISA技术来进行抗原的检测,其中用50ng的经纯化的L抗原在37℃下活化ELISA平板1小时。包括两个阴性对照,一个没有样品,和另一个温育具有50ng的BSA蛋白的孔。然后,用1X磷酸盐缓冲液(PBS)/0.05%Tween20洗涤平板两次。之后,用1X PBS/10%胎牛血清(FBS)在37℃下封闭平板2小时。然后,重复洗涤,并接着在37℃下温育在1X PBS/10%FBS中稀释的最终浓度为3.4 μ g/mL (170ng/孔)的与生物素相缀合的每种抗体(未分级和F(ab')₂级分)(2E11B5和4D8C6)1小时(每种抗体在单独的平板中)。在温育时间过后,重复洗涤,并且向每一个所述孔添加在1X PBS/10%FBS中的以1:2000稀释度(25ng/ μ L/孔)的标记有辣根过氧化物酶(HRP)的生物素结合蛋白(链霉抗生物素蛋白),在黑暗中在环境温度(\approx 25℃)下1小时。最后,进行洗涤,并且用50 μ L的柠檬酸盐缓冲液/四甲基联苯胺(TMB, 3-3'-5-5'-四甲基联苯胺,1mg/mL, Becton Dickinson)进行显色。为了终止反应,添加50 μ L的2N H₂SO₄,并且在ELISA阅读器上在450nm下读取结果。为了确定在识别一抗方面二抗的反应是特异性的并且所获得的信号不是由于二抗与抗原的非特异性结合而引起的,设置其中仅使用二抗而没有一抗也没有样品的对照(未活化的孔)。用于确定一抗的反应特异于抗原的另一对照在于在未用抗原进行活化的ELISA平板(没有样品)上使用所述抗体,或者在具有50ng的BSA蛋白的ELISA平板上使用所述抗体。

[0065] 结果显示,本发明的单克隆抗体能够特异性地识别50ng的经纯化的抗原,而不论是使用完整抗体还是其片段(图6,黑色条:抗体2E11B5;和白色条:抗体4D8C6)。

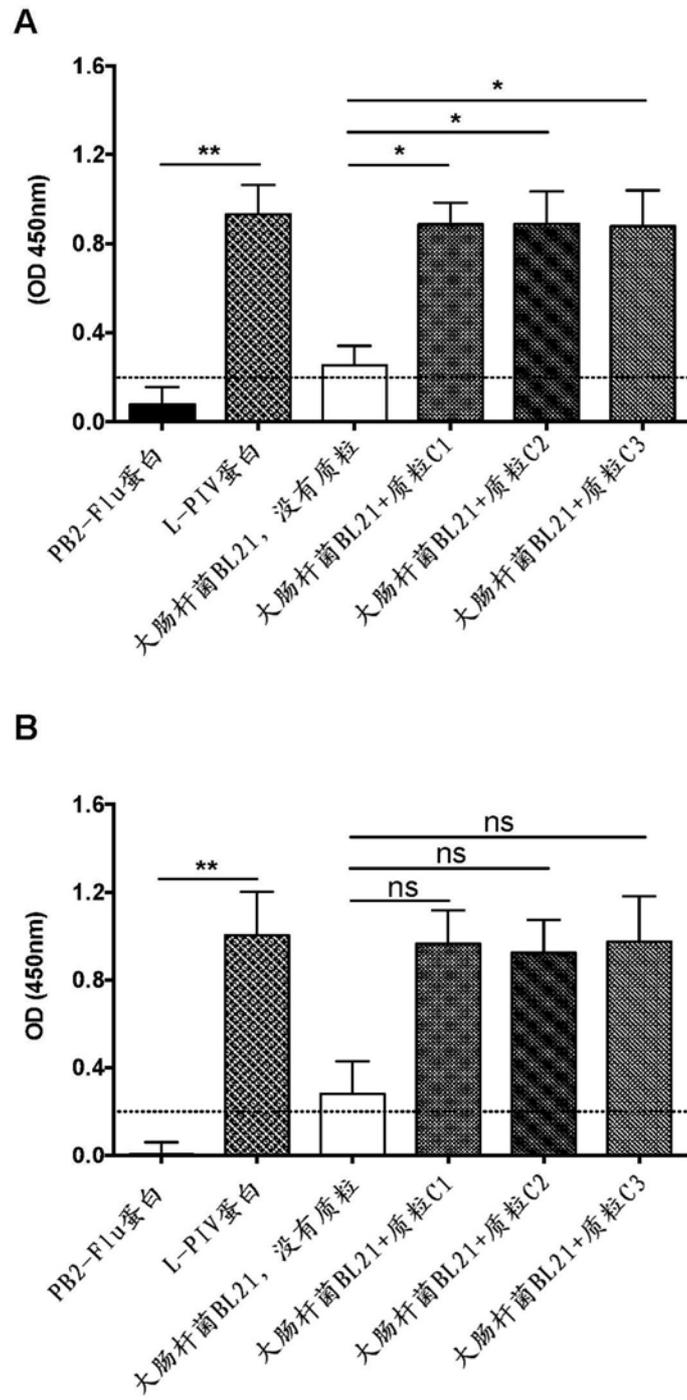


图1

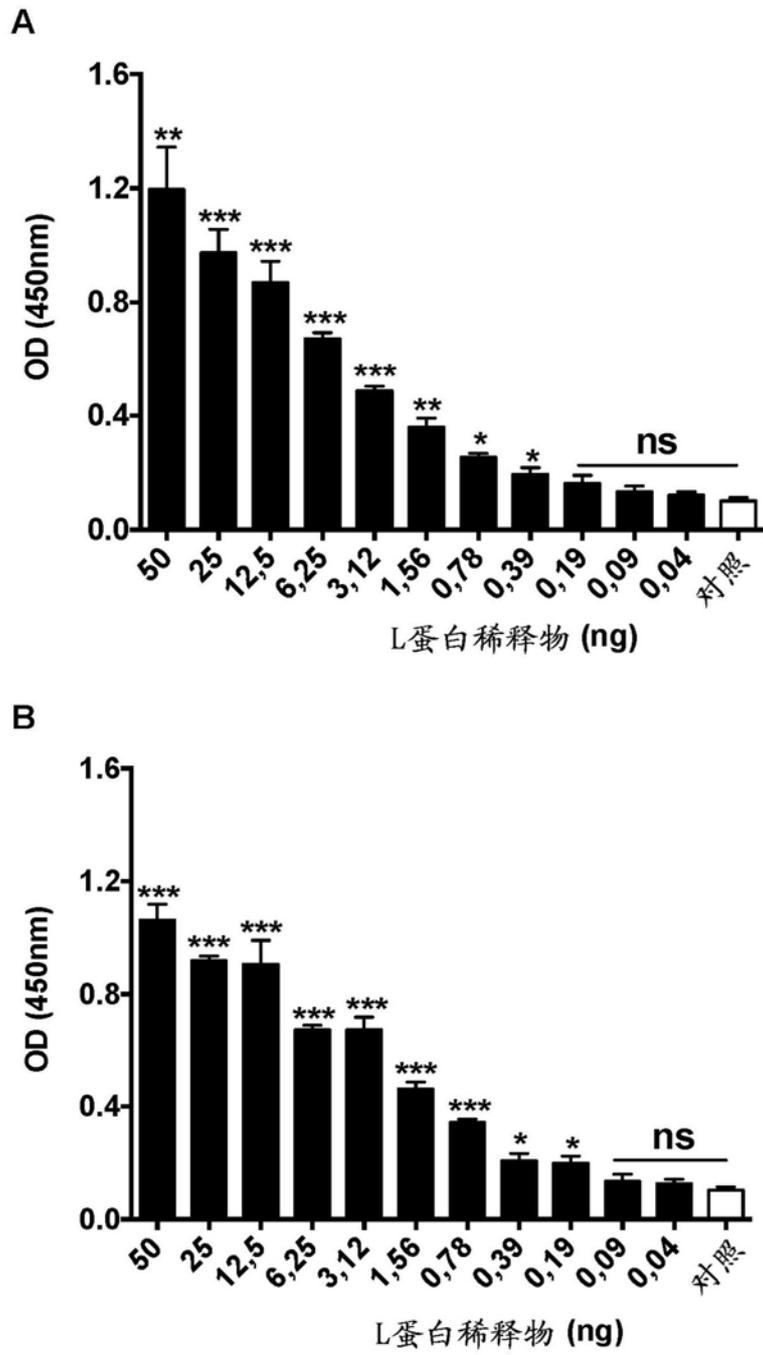


图2

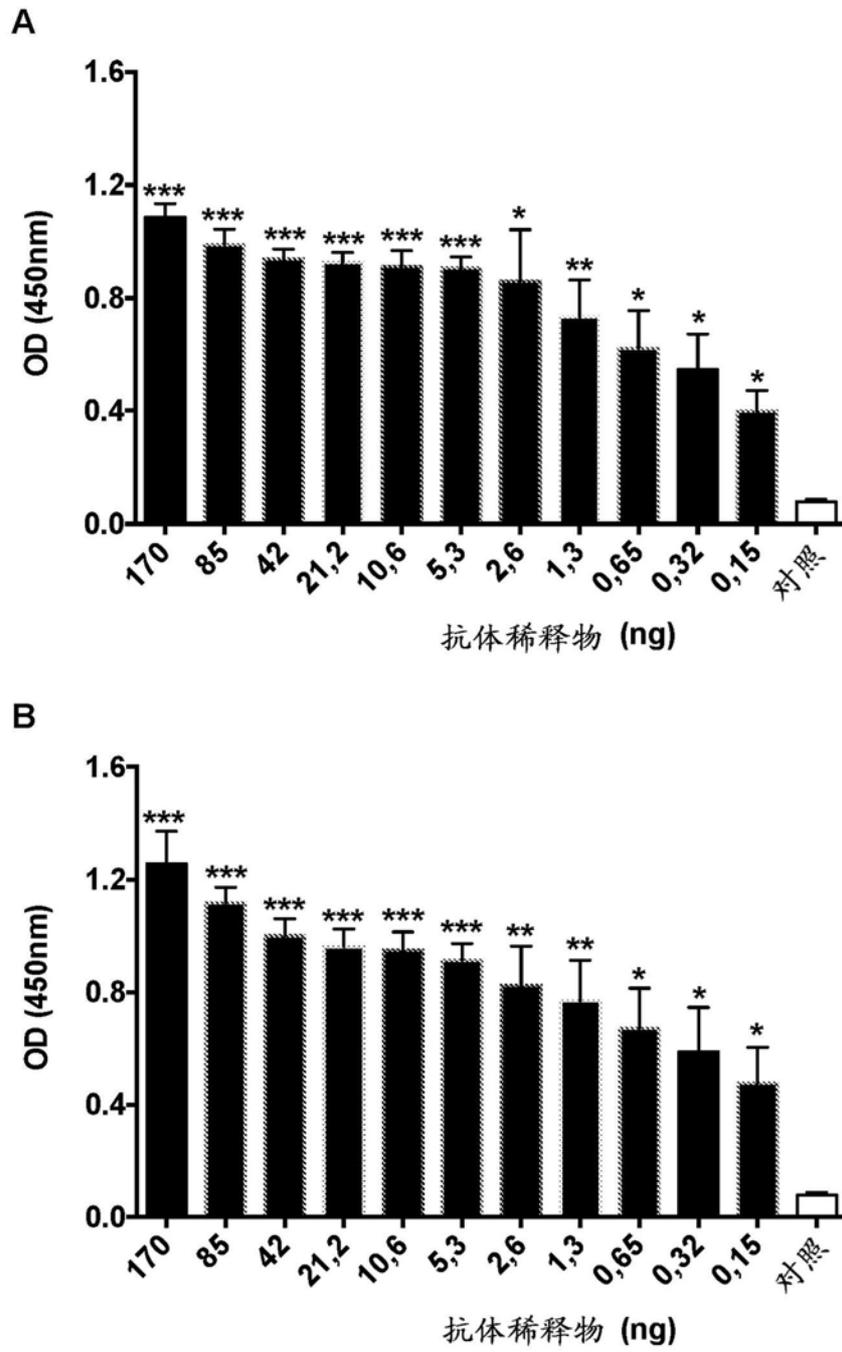


图3

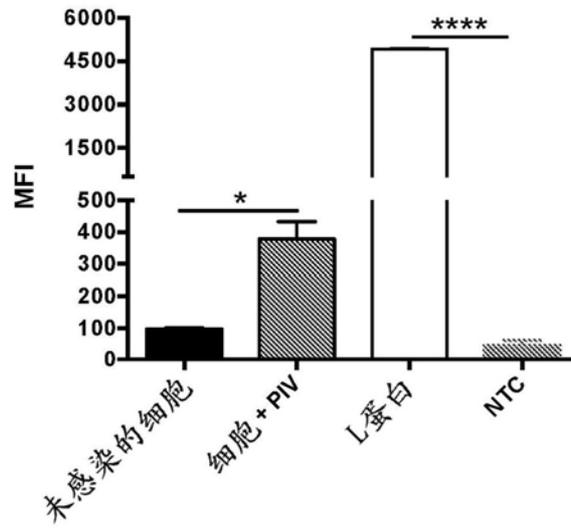


图4

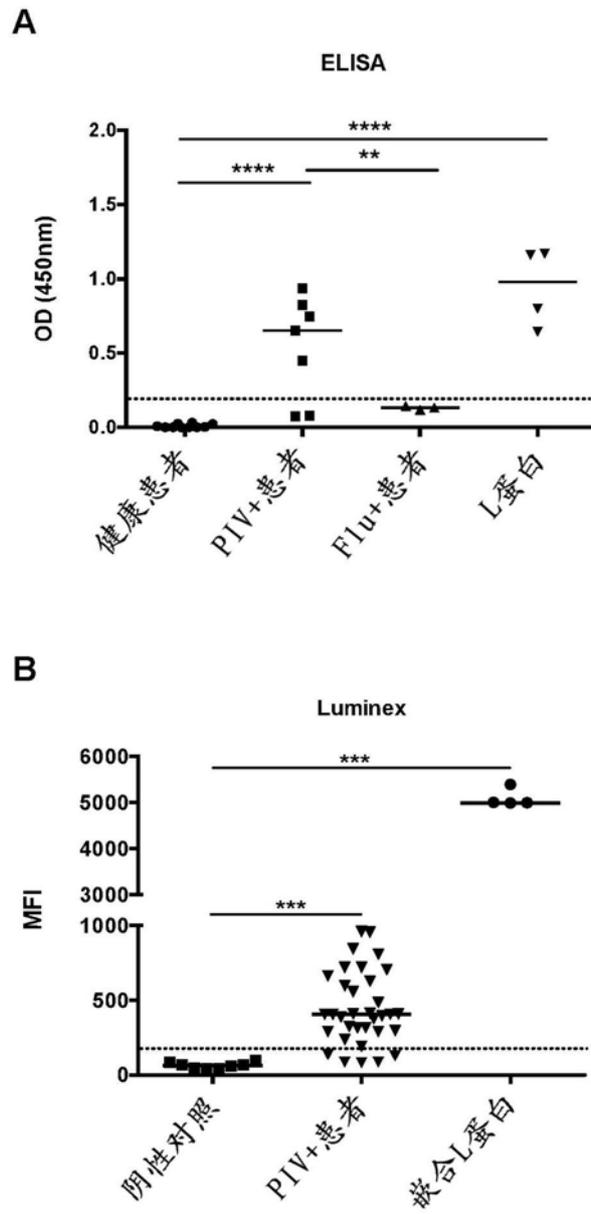


图5

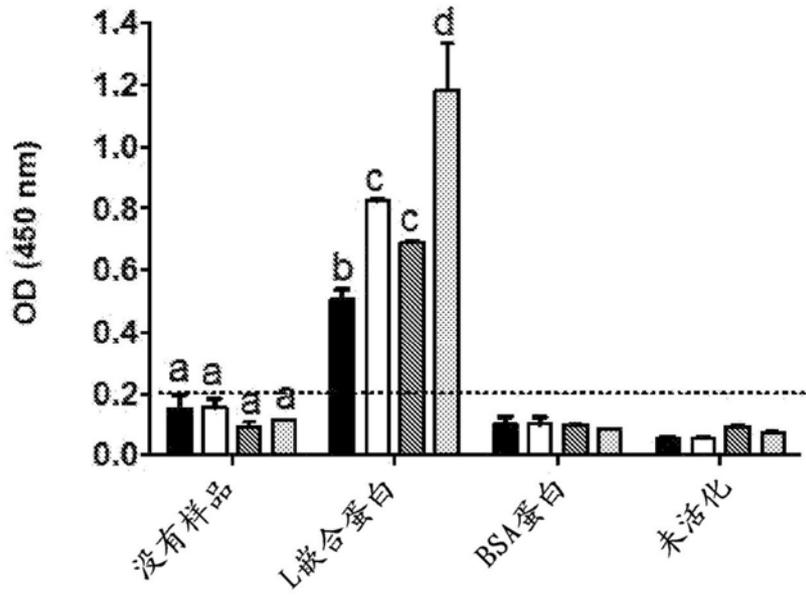


图6