

靶向新型冠状病毒棘突蛋白中独特 B 细胞抗原表位小鼠单克隆抗体的制备与应用

方权¹ 陶薇¹ 张锋² 沈立军¹ 罗永能¹ 吕建新¹

¹杭州医学院检验医学院, 杭州 310013; ²杭州医学院临床医学院, 杭州 310013

通信作者: 吕建新, Email: jxlu313@163.com; 罗永能, Email: ynl101@163.com

【摘要】 目的 制备靶向 SARS-CoV-2 棘突蛋白中独特 B 细胞抗原表位的小鼠单克隆抗体, 并用于蛋白质免疫印迹、ELISA 和免疫荧光检测 (IFA) 等多种方法。方法 利用传统的杂交瘤单克隆抗体技术, 用间接 ELISA 法筛选和有限稀释法亚克隆获得稳定的阳性单克隆杂交瘤细胞株并鉴定其亚型。选取其中 1 株 6H8 体外培养后注射于 SCID 裸鼠腹腔产生腹水, 用蛋白 A 层析柱进行亲和纯化。将纯化抗体用于蛋白质免疫印迹、ELISA 和 IFA 检测 SARS-CoV-2 棘突蛋白。结果 共获得 5 株单克隆杂交瘤细胞系, 均为 IgG2 亚型。纯化的小鼠单克隆抗体 6H8 用于蛋白质免疫印迹仅特异性地识别重组表达的 SARS-CoV-2 棘突蛋白 S1; 用于 ELISA 能检测重组表达的 SARS-CoV-2 棘突蛋白的 NTD 区, 实验孔吸光度值为 3.824; 用于 IFA 可特异性识别瞬间表达于 HEK293 细胞内的 SARS-CoV-2 棘突蛋白, 而对瞬间表达于 293T 细胞内的 SARS-CoV 棘突蛋白则无交叉反应。结论 成功制备了一株靶向 SARS-CoV-2 棘突蛋白中独特 B 细胞抗原表位的小鼠单克隆抗体, 为 SARS-CoV-2 抗原检测提供了有效工具。

【关键词】 新型冠状病毒; 棘突蛋白; B 细胞抗原表位; 单克隆抗体; 靶向蛋白

基金项目: 浙江省教育厅科研项目 (Y202045358、Y202249281); 浙江省基础公益研究计划 (LGF22C08003); 浙江省科技计划 (2022C03024)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20221129-00256

Development and application of a mouse monoclonal antibody targeting a unique B cell epitope in the SARS-CoV-2 spike protein

Fang Quan¹, Tao Wei¹, Zhang Feng², Shen Lijun¹, Luo Yongneng¹, Lyu Jianxin¹

¹School of Laboratory Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China; ²School of Clinical Medicine, Hangzhou Medical College, Hangzhou 310013, China

Corresponding author: Lyu Jianxin, Email: jxlu313@163.com; Luo Yongneng, Email: ynl101@163.com

【Abstract】 Objective To develop a mouse monoclonal antibody (mAb) targeting a unique B cell epitope in the SARS-CoV-2 spike protein, and apply it in Western blotting (WB), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescence assay (IFA). **Methods** The traditional hybridoma technology for monoclonal antibodies was employed. Stable positive hybridoma clones were obtained through screening their cell culture supernatant by indirect ELISA and subcloning by limiting dilution and then isotyped. One clone named 6H8 was chosen to be cultured *in vitro* and injected intraperitoneally into immunodeficient SCID nude mice to induce ascites. The mAb 6H8 was then purified by protein A affinity chromatography and further explored to detect the SARS-CoV-2 spike protein by WB, ELISA and IFA. **Results** Five stable hybridoma cell lines were obtained and all belonged to IgG2 isotype. In WB, the purified mAb 6H8 was able to selectively detect recombinant spike protein subunit 1 (S1) of SARS-CoV-2. In ELISA, 6H8 could sensitively detect the recombinant N terminal domain (NTD) of SARS-CoV-2 spike protein with the optical density of 3.824. Moreover, it also specifically recognized the spike protein of SARS-CoV-2 transiently expressing in transfected HEK293 cells rather than that of SARS-CoV transiently expressing in transfected 293T cells by IFA. **Conclusions** A mouse monoclonal antibody targeting a unique B cell epitope in the spike protein of SARS-CoV-2 is successfully developed. It provides a very useful tool for unique antigen detection of SARS-CoV-2.

[Key words] SARS-CoV-2; Spike protein; B cell epitope; Monoclonal antibody; Targeted protein

Fund program: General Scientific Research Project of Zhejiang Provincial Education Department (Y202045358, Y202249281); Basic Scientific Research Project of Zhejiang Province (LGF22C08003); Zhejiang Provincial Scientific Project (2022C03024)

DOI: 10.3760/cma.j.cn331340-20221129-00256

冠状病毒是一类具有囊膜基因组为线性单股正链 RNA 病毒, 包括 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 等^[1], 可引起感冒样疾病或重症呼吸综合征等。冠状病毒表面棘突蛋白(spike protein, S 蛋白)是最重要的表面结构蛋白, 包含 N 端 S1 和 C 端 S2 两个功能性亚基, 与病毒的感染能力相关, 也是感染后引起宿主免疫系统产生抗体包括中和性抗体的主要靶标^[2-3]。氨基酸序列比对显示, SARS-CoV-2 表面 S 蛋白与上述其它 6 种人冠状病毒表面 S 蛋白分别具有 30%~76% 的一致性和 46%~87% 的相似性, 其中与 SARS-CoV 的 S 蛋白序列的一致性和相似性最高(分别为 76% 和 87%)。不同区域片段的同源性不同, 在同源性高的区域存在交叉免疫反应的线性 B 细胞抗原表位, 而在同源性低的区域存在独有特异性的线性 B 细胞抗原表位^[4-8]。课题组前期通过生物信息学程序分析结合实验验证的方式, 预测并确定了 SARS-CoV-2 表面 S 蛋白的 NTD 区域中包含的独有特异性免疫优势线性 B 细胞抗原表位, 并建立了检测 SARS-CoV-2 独特抗体的多肽-ELISA 方法^[9]。进一步分析显示, 其中一个独特 B 细胞抗原表位 S9 在所有 SARS-CoV-2 变异株中完全一致。本研究以包含 S9 抗原表位的人工合成多肽为免疫原接种小鼠, 制备和鉴定相应的单克隆杂交瘤细胞株及其分泌抗体, 并验证其中的单克隆抗体 6H8 在 ELISA、蛋白质免疫印迹和免疫荧光检测 (IFA) 等方法上的应用效果。

材料与方法

一、材料

人工合成多肽 S9 (LHRSYLTPGDSSSGWTAG) 及其 C 端与匙孔血蓝蛋白 (KLH) 的偶联产物由南

京金斯瑞生物科技有限公司提供, 7 种人冠状病毒的 S1 重组蛋白购自北京义翘神州生物技术有限公司, 重组蛋白 SARS-CoV-2-S-NTD 购自普健生物(武汉)科技有限公司, HEK293 细胞为本实验室前期冻存, 质粒 pCDNA3.1 和 pCDNA3.1-S(SARS-CoV-2) 质粒为本实验室前期构建, pCDNA3.1-S(SARS-CoV) 质粒购自武汉淼灵生物有限公司。

Lip2000 转染试剂购自 Biosharp 科技公司, Alexa Fluor 647 标记山羊抗小鼠 IgG、抗荧光淬灭封片液(含 DAPI)和 TMB 显色液购自上海碧云天生物技术有限公司, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠-IgG 购自杭州华安生物技术有限公司, 考马斯亮蓝染液购自上海生工生物股份有限公司, PVDF 膜购自 Bio-Rad 科技公司, OPTI-MEM 和蛋白质相对分子质量标准 Maker 购自 Thermo Fisher 科技公司, FDbio-Femto ECL Kit 试剂盒购自杭州弗德生物科技有限公司, 细胞培养孔板购自无锡耐思生命科技股份有限公司, 测定小鼠单抗 IgG 亚型的 ELISA 试剂盒购自 Southern Biotech 公司(货号 5300-05)。

二、方法

1. 小鼠单克隆杂交瘤细胞株的制备和小鼠单克隆抗体的大量制备与纯化

将 S9 多肽与 KLH 的偶联物腹腔内注射免疫 Balb/c 小鼠数次, 首次免疫剂量为 50 μg /只偶联物加弗氏完全佐剂, 间隔 2 周和 4 周后都以 25 μg /只偶联物加弗氏不完全佐剂进行免疫, 第 6 周以 25 μg /只偶联物溶于 PBS 进行终免。最后一次免疫后 1 周取有预期免疫应答的脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞融合, 培养后用间接 ELISA 法筛选分泌特异性抗体的杂交瘤细胞阳性克隆, 然后对其进行有限稀释法亚克隆获得稳定的单克隆杂交瘤细胞株, 并使用 ELISA 试剂盒鉴定其 IgG 亚型。

选取特定的单克隆杂交瘤细胞株 6H8, 体外培养后注射于 SCID 裸鼠腹腔制备腹水以产生大量抗体。将含有单克隆抗体的腹水用 Protein A 层析柱亲和纯化后获得纯化抗体, 最后稀释至 1 μg/μL 备用。

2. ELISA

分别将多肽 S9 以 1 μg/mL、100 μL/孔或重组 SARS-CoV-2-S-NTD 蛋白以 5 μg/mL、100 μL/孔作为捕获抗原包被于 96 孔板中, 4 °C 孵育过夜。用 PBST 洗板后加入 1%BSA、200 μL/孔, 于 37 °C 封闭 1 h。用 PBST 洗板 3 次后, 加入适当稀释度的小鼠杂交瘤细胞培养上清或纯化的小鼠单克隆抗体 6H8 分别作为一抗, 置于 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗板 5 次后, 加入适当稀释度的 HRP 标记的山羊抗小鼠-IgG 作为二抗, 置于 37 °C 孵育 1 h。PBST 洗板 5 次后以 100 μL/孔加入 TMB 显色底物反应 15 min, 加入 2 mol/L 硫酸终止液 50 μL 终止反应, 酶标仪于 450 nm 处, 读取各孔 OD 值。

3. 蛋白质免疫印迹

分别取 7 种人冠状病毒的 S1 重组蛋白样品各 1 μg 上样进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 随后转移至 PVDF 膜上, 用 5% BSA 摇床封闭 2 h。以小鼠单克隆杂交瘤细胞上清或纯化小鼠单克隆抗体 6H8 分别作为一抗, 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 以 HRP 标记的山羊抗小鼠-IgG 作为二抗孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min; 加入 FDbio-Femto ECL Kit 的底物, 使用 BIORAD 化学发光成像仪观察结果并拍照。

4. IFA

将 HEK293 细胞置于 DMEM 高糖培养基中 (10%FBS+1%青霉素+链霉素), 于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中培养。按照 Lip2000 转染试剂说明书将重组质粒 pCDNA3.1-S(SARS-CoV-2)、pCDNA3.1-S(SARS-CoV)和空白质粒 pCDNA3.1 分别转染进细胞中。待质粒转染后的 HEK293 细胞在爬片上密度至 70%~80%, 弃去培养液, 37 °C PBS 润洗 3 次; 加入 4%多聚甲醛固定液于 37 °C 固定 15 min, PBS 润洗 3 次; 0.2%TritonX-100 (PBS 稀释) 室温孵育 15 min, PBS 润洗 3 次; 加入含 10%山羊血清的 PBS 室温下封闭

30 min; 加入小鼠单克隆抗体 6H8 作为一抗进行孵育, 4 °C 过夜, PBS 润洗 3 次, 每次静置 5 min; 加入 Alexa Fluor 647 标记山羊抗小鼠 IgG 作为二抗, 1:500 稀释于 1%BSA (PBS 稀释) 中, 室温孵育 2 h, PBS 润洗 3 次, 每次静置 5 min; 取出细胞爬片, 添加一滴抗荧光淬灭封片液 (含 DAPI) 染色并固定爬片于载玻片上; 激光共聚焦显微镜下观察。

结 果

一、S9 的高度保守性

S9 在 SARS-CoV-2 原始株 S 蛋白中位于 244~261 位。根据氨基酸序列比较^[8], S9 在 SARS-CoV-2 不同变异株的 S 蛋白中高度保守完全一致, 但是与 SARS-CoV 的相应区段氨基酸位点有显著差异 (表 1)。

表 1 SARS-CoV-2 不同变异株的 S9 抗原表位序列和 SARS-CoV 相应区段的氨基酸序列比较

株 型	抗原表位 S9 的氨基酸序列	GenBank/GISAID 序列号
SARS-CoV-2		
原始株	LHRSYLTPGDSSSGWTAG	YP_009724390 ^a
Alpha	LHRSYLTPGDSSSGWTAG	UIK22184 ^a
Beta	LHRSYLTPGDSSSGWTAG	/EPI_ISL_940877 ^b
Gamma	LHRSYLTPGDSSSGWTAG	/EPI_ISL_2777382 ^b
Delta	LHRSYLTPGDSSSGWTAG	/EPI_ISL_1663516 ^b
Epsilon	LHRSYLTPGDSSSGWTAG	/EPI_ISL_648527 ^b
Omicron	LHRSYLTPGDSSSGWTAG	/EPI_ISL_6795848 ^b
SARS-CoV		
原始株	AF_S___P___AQDIWGTS	NP_828851 ^a

注: GISAID: 全球禽流感基因共享数据库; ^a: GenBank 序列号; ^b: GISAID 序列号

二、小鼠单克隆杂交瘤细胞株的构建与鉴定

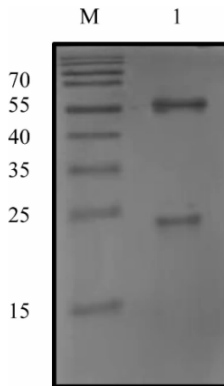
3 只 Balb/c 小鼠免疫 S9-KLH 偶联产物后经 ELISA 检测结果表明均呈现良好的免疫应答, 分离其脾细胞与 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞融合。以多肽 S9 作为包被抗原经 ELISA 初步确定了 20 株杂交瘤细胞阳性母克隆, 再以重组表达的 SARS-CoV-2-S-NTD 蛋白作为捕获抗原进行 ELISA 验证确定了 5 株阳性值较高的杂交瘤细胞株, 并确定其均为 IgG2 亚型。通过蛋白免疫印迹法对上述 5 株杂交瘤细胞培养上清与 7 种人冠状病毒 S1 重组蛋白的反应阳

性与否及程度进行了验证,结果显示其中 1 株(即 6H8)仅与 SARS-CoV-2 的 S1 重组蛋白有特异性信号,因此选定 6H8 进一步制备抗体。

三、小鼠单克隆抗体 6H8 的大量制备和纯化

将单克隆杂交瘤细胞株 6H8 培养后腹腔注射 SCID 裸鼠制备获得腹水,经 Protein A 层析柱亲和纯化后获得纯化抗体,SDS-PAGE 电泳鉴定抗体纯度,结果显示在相对分子质量为 55 000 和 25 000 处清晰可见 2 个条带(图 1)。

相对分子质量($\times 1\ 000$)



注:M:蛋白相对分子质量标准;1:纯化单抗 6H8

图 1 纯化的小鼠单克隆抗体 6H8 的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

四、小鼠单克隆抗体 6H8 用于 ELISA

将重组表达并纯化的 SARS-CoV-2-S-NTD 蛋白作为捕获抗原,小鼠单克隆抗体 6H8 作为一抗、HRP 标记的山羊抗小鼠-IgG 作为二抗进行 ELISA,实验孔和对照孔的 OD 值分别为 3.824 和 0.059,表明小鼠单克隆抗体 6H8 可以特异性地检测重组表达的 SARS-CoV-2-S-NTD 蛋白(图 2)。

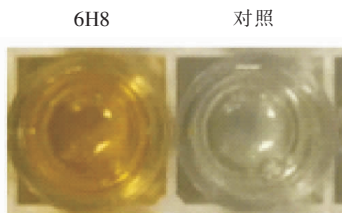


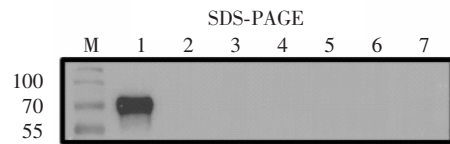
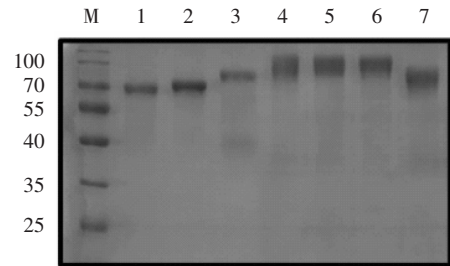
图 2 小鼠单克隆抗体 6H8 用于酶联免疫吸附试验结果

五、小鼠单克隆抗体 6H8 用于蛋白质免疫印迹检测

采用蛋白质免疫印迹法将 6H8 与 7 种人冠状病毒的 S1 重组蛋白进行反应,结果显示只有 SARS-

CoV-2 的 S1 重组蛋白呈现阳性信号,与预期相符合(图 3),表明 6H8 只特异性地靶向识别 SARS-CoV-2 S 蛋白中的独特 B 细胞抗原表位 S9,而与其它 6 种人冠状病毒 S 蛋白没有交叉反应。

相对分子质量($\times 1\ 000$)



Western 印迹试验

注:SDS-PAGE:十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳;M:蛋白相对分子质量标准;1:SARS-CoV-2 S1 蛋白;2:SARS-CoV S1 蛋白;3:MERS-CoV S1 蛋白;4:HCoV-NL63 S1 蛋白;5:HCoV-HKU1 S1 蛋白;6:HCoV-OC43 S1 蛋白;7:HCoV-229E S1 蛋白

图 3 小鼠单克隆抗体 6H8 应用于蛋白质免疫印迹检测结果

六、小鼠单克隆抗体 6H8 用于 IFA

图 4 结果显示只有转染了 pCDNA3.1-S(SARS-CoV-2)的 HEK293 细胞释放出荧光信号,说明 6H8 能特异识别 HEK293 细胞内瞬间表达的 SARS-CoV-2 S 蛋白,而转染了 pCDNA3.1-S(SARS-CoV)的 HEK293 细胞则无荧光信号,此结果与表 1 所示 SARS-CoV S 蛋白中与 S9 独特抗原表位对应区域

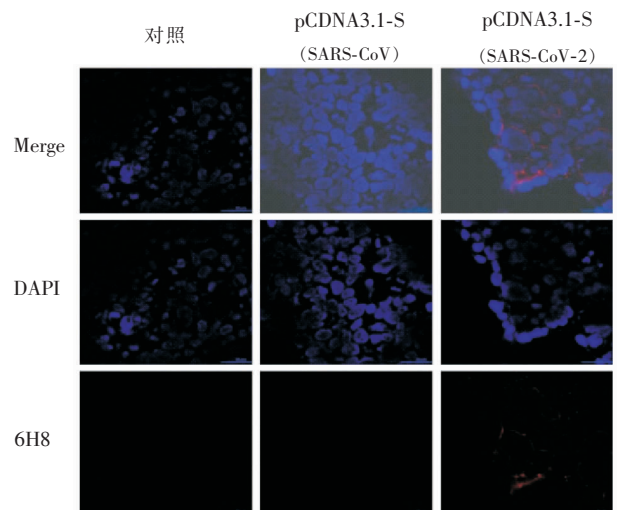


图 4 小鼠单克隆抗体 6H8 用于免疫荧光检测试验结果

的氨基酸序列不同的状况相吻合。

讨 论

目前,SARS-CoV-2 检测方法及其试剂盒有 3 类,分别针对核酸、抗体和抗原蛋白。识别 SARS-CoV-2 抗原蛋白及其抗体的免疫学检测试剂盒具有样本采集容易、处理和实验操作简单、测试时间短和适合于大样本筛查等优点。至今,国内已批准上市了 2 种 SARS-CoV-2 抗体检测试剂盒,均采用胶体金法,分别检测患者体内 IgM 和 IgG 抗体,但是在 SARS-CoV-2 感染早期检测方面具有局限性。现有 SARS-CoV-2 抗体检测试剂盒存在着无法区分其它 6 种冠状病毒尤其是 SARS-CoV 感染引发的交叉免疫反应抗体等问题^[4-6]。而国内外已批准上市 SARS-CoV-2 抗原检测试剂盒则采用胶体金法检测其核衣壳蛋白 N^[9-10],也因为与其它 6 种冠状病毒核衣壳蛋白 N 存在同源性(29%~91%的一致性和 42%~94%的相似性)可能导致假阳性^[11-12]。另外,由于核衣壳蛋白 N 位于病毒颗粒内部,必须通过裂解才能释放出来,而为了防止其降解又必须在裂解液中加入蛋白酶抑制剂,从而增加了试剂盒制作和生产成本^[9]。因此,靶向位于 SARS-CoV-2 病毒颗粒表面的 S 蛋白研制相应的抗体用于特异性抗原检测试剂盒,并进一步和 qRT-PCR 病毒核酸检测联合使用,可为 SARS-CoV-2 早发现、早治疗提供有力支持。

针对上述 SARS-CoV-2 检测试剂盒靶标只局限于核酸和核衣壳蛋白 N 的问题,本文在前期确定了 SARS-CoV-2 S 蛋白的独有特异性免疫优势线性 B 细胞抗原表位的基础上,选择其中一个利用传统的杂交瘤技术制备获得了具有良好特异性和高抗原亲和性的单克隆抗体 6H8,经多种方法验证,可特异性识别 SARS-CoV-2 及其抗原/S 蛋白,为进一步研制灵敏特异的 SARS-CoV-2 及其抗原/S 蛋白检测试剂盒奠定了基础。该抗体及其试剂盒能将 SARS-CoV-2 及其抗原/S 蛋白与其他冠状病毒及其抗原/S 蛋白区分开来,具有重要的现实意义。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

作者贡献声明 方权: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章;陶薇: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据;张锋、沈立军: 实施研究、采集数据、获取研究经费;罗永能: 酝酿和设计实验、分析/解释数据、起草文章、指导;吕建新: 对文章的知识性内容作批评性审阅、获取研究经费、行政和技术支持、支持性贡献

参 考 文 献

- [1] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 265-269. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
- [2] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J]. *Science*, 2020, 367(6483): 1260-1263. DOI: 10.1126/science.abb2507.
- [3] Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, et al. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein[J]. *Cell*, 2020, 183(6): 1735. DOI: 10.1016/j.cell.2020.11.032.
- [4] Lv H, Wu NC, Tsang OT, et al. Cross-reactive antibody response between SARS-CoV-2 and SARS-CoV infections[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(9): 107725. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107725.
- [5] Tai W, Zhang X, He Y, et al. Identification of SARS-CoV RBD-targeting monoclonal antibodies with cross-reactive or neutralizing activity against SARS-CoV-2[J]. *Antiviral Res*, 2020, 179: 104820. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104820.
- [6] Hicks J, Klumpp-Thomas C, Kalish H, et al. Serologic cross-reactivity of SARS-CoV-2 with endemic and seasonal betacoronaviruses[J]. *J Clin Immunol*, 2021, 41(5): 906-913. DOI: 10.1007/s10875-021-00997-6.
- [7] Chi X, Yan R, Zhang J, et al. A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the spike protein of SARS-CoV-2[J]. *Science*, 2020, 369(6504): 650-655. DOI: 10.1126/science.abc6952.
- [8] 罗永能, 吕建新, 陶薇, 等. 检测新型冠状病毒 S 蛋白独特性抗体的多肽-ELISA 试剂盒[P]. 202011013647.X.
- [9] 欧卫军, 孙一品, 顾飞, 等. 一种新型冠状病毒抗原检测试纸条[P]. ZL202011463513.8.
- [10] 陈亚萍, 尹午山, 王美娜, 等. 新型冠状病毒抗原检测的方法和试剂盒[P]. ZL202111644663.3.
- [11] Grant BD, Anderson CE, Alonzo LF, et al. A SARS-CoV-2 coronavirus nucleocapsid protein antigen-detecting lateral flow assay[J]. *PLoS One*, 2021, 16(11): e0258819. DOI: 10.1371/journal.pone.0258819.
- [12] Dobaño C, Santano R, Jiménez A, et al. Immunogenicity and crossreactivity of antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: utility and limitations in seroprevalence and immunity studies[J]. *Transl Res*, 2021, 232: 60-74. DOI: 10.1016/j.trsl.2021.02.006.

(收稿日期: 2022-11-29)