

肠道病毒 71 型 VP1 蛋白单克隆抗体的制备及初步鉴定

包林¹, 张黎², 曾晓燕², 郭喜玲², 史凤娟², 黄明明³, 梁淑仪¹, 汪华^{1*}, 焦永军^{2*}

(¹南京医科大学公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 江苏 南京 211166; ²江苏省疾病预防控制中心病原微生物研究所, 江苏 南京 210009; ³南京农业大学动物医学系, 江苏 南京 210095)

[摘要] 目的:制备肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)VP1 外壳蛋白单克隆抗体。方法:利用重组纯化的 EV71-VP1 蛋白为抗原免疫 BALB/c 鼠,按常规杂交瘤技术进行细胞融合,对阳性杂交瘤细胞进行筛选及亚克隆,获得 1 株能稳定分泌抗 EV71-VP1 抗体的杂交瘤细胞株 6F2B9,细胞体外扩大培养后的上清用 Protein G 柱纯化,超滤后用 BCA 法测其浓度,用免疫球蛋白亚类鉴定试剂盒鉴定单克隆抗体亚型,间接 ELISA 方法检测其效价和特异性,间接免疫荧光法检测其与 EV71 病毒的特异性结合能力。结果:本研究得到的抗 EV71-VP1 抗体 DSE-136,纯化后浓度为 1.9 g/L,免疫球蛋白亚类为 IgG2b,轻链属于 κ 链;间接 ELISA 检测效价为 $1:3.2 \times 10^5$;间接免疫荧光结果显示其可与 EV71 病毒特异性结合。结论:成功制备出 1 个效价高、特异性好的抗 EV71-VP1 单克隆抗体 DSE-136,为 VP1 抗原诊断、疫苗研发及其效果评价奠定了基础。

[关键词] 肠道病毒 71 型;VP1 蛋白;单克隆抗体

[中图分类号] R392.11

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)01-037-05

doi:10.7655/NYDXBNS20130108

Preparation and characterization of enterovirus 71 VP1 monoclonal antibody

Bao Lin¹, Zhang Li², Zeng Xiaoyan², Guo Xiling², Shi Fengjuan², Huang Mingming³, Liang Shuyi¹, Wang Hua^{1*}, Jiao Yongjun^{2*}

(¹Department of Epidemiology and Biostatistics, NJMU, Nanjing 211166; ²Institute of Pathogenic Microbiology, Jiangsu Centers for Disease Prevention and Control, Nanjing 210009; ³Department of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain an anti-enterovirus 71 (EV71)-VP1 monoclonal antibody, and preliminarily analyze its biological characteristics. **Methods:** Immunized the BALB/c mice with purified recombinant EV71-VP1 protein. The spleen cells were fused with mouse myeloma cells (Sp2/0). Subsequently, limited dilution method was used to screen positive hybridoma cell lines. After several times of subclone, one hybridoma cell line(6F2B9)was obtained. The supernatant of 6F2B9 was collected and purified by affinity chromatography with Protein G sepharose. The concentrations of antibodies were tested by BCA method and its subtype was identified by Ig subtype qualification kit. The titer and specificity of the McAb were detected by indirect ELISA. We used indirect immunofluorescence assay (IFA) to observe specific combination with EV71 virus. **Results:** We succeeded in selecting a hybridoma cell line secreting anti-EV71-VP1 monoclonal antibody. The McAb obtained was named DSE-136 and belonged to IgG2b, κ light chain, and its titer was $1:3.2 \times 10^5$ and could specifically bind to the surface of EV71 which was detected by IFA. **Conclusion:** We successfully obtained a mouse anti-EV71-VP1 McAb with high dilution and specificity, which has laid foundation on antigen diagnosis and vaccine research and development for EV71.

[Key words] enterovirus 71; VP1 protein; monoclonal antibody

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(1): 037-041]

[基金项目] 国家科技重大专项(2008ZX10002-001, 2009ZX10004-904);江苏省医学重点人才项目(RC2011082)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: hua@jscdc.cn; yongjunjiao@gmail.com

手足口病是 5 岁以下婴幼儿中的常见传染病,可由多种肠道病毒引起^[1],主要为肠道病毒 71 型(enterovirus 71, EV71)和柯萨奇 A 组 16 型(coxsackievirus A16, CoxA16)。与 coxA16 相比, EV71 除可引起手足口病和疱疹性咽峡炎外,尚可引起无菌性脑膜炎、脑干脑炎、神经源性肺水肿、急性迟缓性麻痹等重症病例^[2],重症病例病死率高,且留有后遗症,严重威胁患儿健康。

20 世纪 90 年代以来, EV71 病毒在亚太地区多个国家引起暴发流行^[3-4]。自 1981 年在上海始见本病,以后北京、河北、天津、福建、吉林等十几个省市均有报道。2008 年在我国安徽省阜阳市出现了手足口病暴发流行,短短数月内死亡几十例,引起了人们的恐慌。2011 年全国共报告手足口病 192 344 例,发病率为 37.01/10 万,其中重症 2 119 例,死亡 94 例。加强对 EV71 感染的防控,已成为我国传染病管理的工作目标之一。

目前,尚无成熟地、特异地针对 EV71 的免疫和治疗方案^[5-6],而 EV71 特异性单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)作为各项研究的常用工具,在 EV71 抗原诊断、特异性治疗和疫苗生产质量控制中发挥一定的作用^[7]。由于 EV71 的 VP1 外壳蛋白不仅直接决定病毒的抗原性,还是病毒特异性中和表位所在区^[8],本研究采用纯化的 EV71 病毒的 VP1 蛋白(EV71-VP1)免疫 BALB/c 小鼠,利用杂交瘤技术制备特异性鼠源抗 EV71-VP1 的 McAb,对其功能及特性做初步鉴定,以期为 EV71 的抗原诊断、疫苗研发及效果评价等打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

免疫抗原:重组纯化的 EV71-VP1 蛋白(0.9 g/L)和重组纯化的 CoxA16 病毒的 VP1 蛋白(CoxA16-VP1)(0.2 g/L)由本室制备保存;肠道病毒株:EV71、CoxA16、柯萨奇病毒 B 组 5 型(coxsackievirus B5, CoxB5)及埃可病毒 30 型(enterocytopathichumanorphanvirus 30, Echo30)肠道病毒均由本室分离鉴定保存;细胞株:小鼠 Sp2/0 细胞株、人恶性横纹肌瘤 RD 细胞株由本室保存;实验动物:SPF 级 BALB/c 鼠,雌性,6~8 周龄,购自南京医科大学动物中心。

弗氏佐剂、聚乙二醇(PEG-1000)、小鼠单克隆抗体亚类鉴定试剂盒、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG 均为美国 Sigma 公司产品;新生胎牛血清、DMEM 培养基为美国

Gibco 公司产品;其他试剂均为进口分装或国产分析纯化学试剂。AKATA 蛋白纯化仪、酶标检测仪、洗板机购自德国 Thermo Labsystems 公司;荧光标记的羊抗鼠 IgG 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物免疫与杂交瘤细胞制备

将纯化的重组 EV71-VP1 蛋白与弗氏完全佐剂按 1:1(V:V)充分乳化,免疫 5 只雌性 BALB/c 鼠,肌肉和皮下多点注射,首次剂量 50 mg/只,间隔 10 d 再次免疫,共 3 次。第 3 次免疫后 10 d,经内眦静脉采血,间接 ELISA 测定多抗血清效价,选取抗体效价最高的小鼠做融合用,融合前 3 d 腹腔注射无佐剂抗原 150 mg/只,无菌取脾,按常规杂交瘤融合技术进行细胞融合。

1.2.2 杂交瘤细胞株的筛选和单克隆化

用重组纯化的 EV71-VP1 和 CoxA16-VP1 蛋白分别包被 96 孔酶标板,免疫小鼠血清为阳性对照,Sp2/0 细胞的培养上清为阴性对照,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测杂交瘤细胞培养上清,将 EV71-VP1(+)CoxA16-VP1(-)且所测的 $D(450\text{ nm})$ 比阴性对照高 10 倍的杂交瘤细胞判为阳性,采用有限稀释法进行克隆化培养,反复 3 次后,阳性率达到 100%。最终得到 1 株能稳定分泌抗 EV71-VP1 单克隆抗体的杂交瘤细胞株 6F2B9,将细胞体外传代扩大培养,收集上清,部分细胞株冻存备用。6 个月后,将冻存的杂交瘤细胞株复苏,检测其培养上清的效价有无明显变化。

1.2.3 抗 EV71-VP1 McAb 的纯化

亲和层析法纯化 McAb。取扩大培养后收集的杂交瘤细胞株 6F2B9 的培养上清 20 ml, 23 000 r/min 离心 30 min 后,用 5 倍体积预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 Protein G 柱,取上清上样(使用 AKTA 蛋白纯化仪),速度为 1 ml/min。PBS 平衡至基线。0.1 mol/L Gly-HCl(pH2.7)洗脱抗体,分段收集洗脱峰,洗脱液用 Tris 中和至 pH7.0。将纯化后的 McAb 装入超滤管,4 000 r/min 离心 20 min 后,浓缩至 2 ml,进行 SDS-PAGE 电泳,BCA 法检测蛋白浓度。

1.2.4 McAb 特性鉴定

①亚类鉴定:采用免疫球蛋白标准亚类鉴定试剂盒,HRP 标记的羊抗鼠 IgA、IgM、IgG、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、 λ 和 κ 进行亚类鉴定,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。②抗体效价测定:间接 ELISA 检测抗体效价,用纯化的 EV71-VP1 包被 ELISA 反应孔,一抗为倍比稀释的 EV71-VP1

McAb, 二抗为羊抗鼠 IgG-HRP(1:5 000), 阴性参考为未免疫的正常 BALB/c 鼠血清, 显色 10 min 后终止, 酶标仪上读取 $D(450\text{ nm})$ 值, 以出现阳性反应的最高稀释度为抗体效价。③特异性鉴定: 根据纯化后抗体的蛋白浓度, 用间接 ELISA 预实验, 测定纯化后 EV71-VP1 McAb 饱和浓度的 $D(450\text{ nm})$ 值, 分别以纯化的 EV71-VP1、CoxA16-VP1 或灭活的 CoxB5、Echo30 病毒为包被抗原, 饱和浓度的 EV71-VP1 McAb 为一抗, 羊抗小鼠 IgG-HRP(1:5 000) 为二抗, 间接 ELISA 法测定 $D(450\text{ nm})$ 值, 设生理盐水为阴性对照。④间接免疫荧光检测 McAb 与病毒的特异性结合: 使用肠道病毒 EV71、CoxA16 分别感染 RD 细胞制备的抗原片, 以 EV71-VP1 McAb 作为一抗, 荧光标记的羊抗鼠 IgG 抗体作为二抗, 同时以正常未感染病毒的 RD 细胞为阴性对照, 荧光显微镜下观察。

2 结 果

2.1 杂交瘤细胞株的建立及稳定性评价

将融合细胞接种于 7 块 96 孔培养板培养, 融合率为 85%, 连续培养后获得 1 株阳性杂交瘤细胞株 6F2B9。液氮冻存 6 个月后复苏, 仍生长良好, 分泌抗体性能稳定(图 1), 将该单抗命名为 DSE-136。

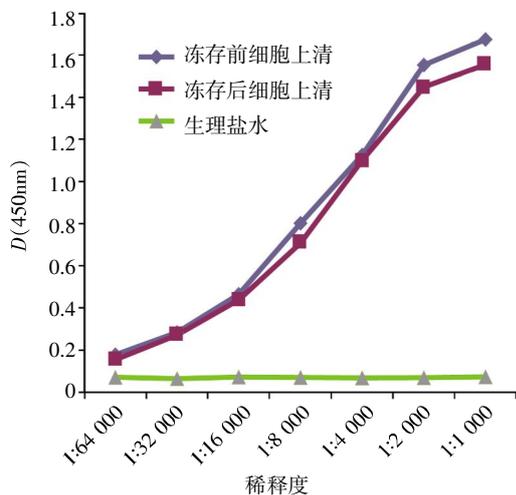


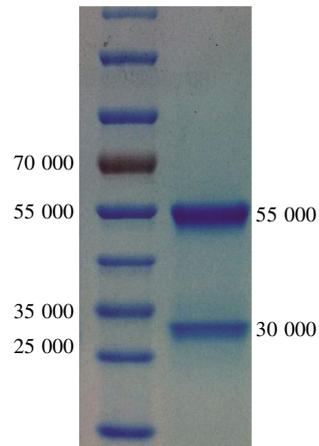
图 1 间接 ELISA 检测杂交瘤细胞株 6F2B9 液氮冻存前、冻存 6 个月后的抗体效价

Figure 1 Titer of hybridoma cell line (6F2B9) supernatant (before freezing and frozen for 6 months) by indirect ELISA

2.2 McAb 纯化

杂交瘤细胞株 6F2B9 体外扩大培养后, 收集细胞培养上清, 经纯化和超滤后, 所得 McAb DSE-136 蛋白浓度为 1.9 g/L, SDS-PAGE 显示重、轻链 2 条

蛋白带, 分子量分别为 55 000、30 000, 与预期结果相符(图 2)。



M: 蛋白 marker; 1: 纯化后 McAb DSE-136。

图 2 纯化后 McAb SDS-PAGE 电泳分析结果

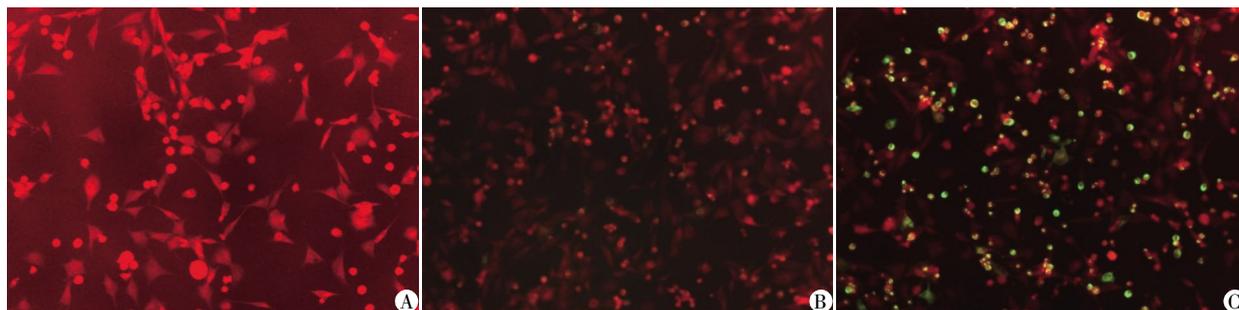
Figure 2 SDS-PAGE analysis of the purity of McAb

2.3 McAb 特性鉴定

①亚型鉴定表明, DSE-136 的重链属于 IgG2b 亚类, 轻链属于 κ 亚型。②间接 ELISA 效价测定结果显示, 按照吸光度值为阴性对照值的 2.1 倍为阳性计算, DSE-136 的效价为 $1:3.2 \times 10^5$ 。③特异性鉴定结果显示, McAb DSE-136 与 EV71-VP1 包被孔反应为阳性, 有较高的 $D(450\text{ nm})$ 值, 而与其他包被抗原 CoxA16-VP1、灭活 CoxB5 及灭活 Echo30 病毒均不反应, 其 $D(450\text{ nm})$ 值与阴性对照生理盐水相近。④间接免疫荧光测定结果显示, McAb DSE-136 仅在 EV71 病毒感染的 RD 细胞内呈现特异性绿色荧光, 而在 CoxA16 病毒感染的细胞及正常细胞内均未呈现特异性绿色荧光(图 3)。

3 讨 论

EV71 为无包膜, 单股正链 RNA 病毒, 由基因编码的 4 个外壳蛋白 VP1、VP2、VP3、VP4, 组成病毒外壳。其中 VP1 蛋白具有重要的研究价值。研究表明, VP1 蛋白具有良好的抗原性和免疫原性, 是诱导机体产生 EV71 特异性抗体的有效抗原^[9-11]。在 Chen 等^[12]的研究中, 小鼠食用了含有 VP1 蛋白的转基因番茄后, 在体内产生了 EV71 特异性的抗体。Chen 等^[13]的研究发现, 将 VP1 基因重组入母鼠体内后, 母鼠可分泌含有 VP1 的乳汁, 而小鼠食用乳汁后可对 EV71 感染产生明显的保护效应。本研究选择全长 VP1 蛋白作为免疫原, 是成功制备特异性 EV71 McAb 的保证。



A:正常细胞;B:CAV16感染的RD细胞;C:EV71感染RD细胞。

图3 McAb DSE-136与EV71感染的RD细胞特异性结合免疫荧光结果($\times 400$)

Figure 3 Immunofluorescence assays used to show the specific binding of McAb DSE-136 to RD cells infected by EV71 ($\times 400$)

为了得到较高生物学活性的 McAb, 我们从以下两点对实验条件做了优化^[14]。①选择了皮下多点注射与腹腔注射相结合, 并制定了小剂量、长周期、多次化的免疫方案, 使 VP1 蛋白充分发挥了免疫原性, 并且尽量避免小鼠因注射部位皮肤感染而导致死亡。融合前 3 d 不加佐剂直接用 EV71-VP1 进行强化免疫, 其目的是促进小鼠脾脏内 B 淋巴细胞增殖能力和细胞数量达到最大。结果表明, 选择的实验动物个体、数量及其免疫方案是可行的, 免疫效果理想。②融合时间、PEG 的性能和作用时间均可影响融合效果, 最终本研究选择了美国 Sigma 公司 50% 的 PEG, 融合时间 10 min, 融合率为 85%, 达到预期效果。

本研究得到的 McAb DSE-136, 经鉴定免疫球蛋白亚类为 IgG2b, 轻链属于 κ 亚型。经间接法 ELISA 检测, 有较高的效价。间接免疫荧光结果表明, DSE-136 可识别 EV71 天然构象表位且有较强的结合能力, 而与 CoxA16 病毒无反应, 显示了其对 EV71 病毒具有较强的结合特异性。

编码 EV71-VP1 和 CoxA16-VP1 的氨基酸同源率为 67%^[15], 因此两者极有可能存在相同或相似的抗原表位。此外, Lin 等^[16]的研究发现, 在经 RT-PCR 确诊的 EV71 和 CoxA16 感染的患者发病 4 d 和 6 d 后, 本研究的血液中抗 EV71-IgG 抗体的阳性率分别为 100.0% 和 62.5%, 即两种病毒存在血清学交叉, 这就增大了得到 EV71 特异性单抗的难度。考虑到这一点, 本研究建立了有别于以往依靠单一抗原筛选阳性杂交瘤细胞株的方法, 而是将同时满足 EV71-VP1(+)/CoxA16-VP1(-) 的细胞株判为阳性再进行克隆化。在应用过程中, 此方法的确排除了部分 EV71-VP1(+)/CoxA16-VP1(+) 的克隆, 这在一定程度上保证了所得抗体的特异性。最终通过大批量筛选, 得到了针对 EV71 特有抗原表位的 McAb

DSE-136。

下一步, 我们计划检测该单克隆抗体的中和活性。我们将建立检测 EV71 抗原的双抗体夹心 ELISA 方法, 不仅可用于 EV71 疫苗生产过程中抗原定量检测, 还可为探索 EV71 抗原免疫学超早期诊断做出有益尝试。

[参考文献]

- [1] 周伯平. 肠道病毒 71 型手足口病 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 1
- [2] Huang CC, Lin CC, Chang YC, et al. Neurologic complications in children with enterovirus 71 infection [J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(13): 936-942
- [3] McMinn P, Lindsay K, Perera D, et al. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia [J]. *J Virol*, 2001, 75(16): 732-738
- [4] Shih SR, Ho MS, Lin KH, et al. Genetic analysis of enterovirus 71 isolated from fatal and non fatal cases of hand, foot and mouth disease during an epidemic in Taiwan, 1998 [J]. *Virus Res*, 2000, 68(2): 127-136
- [5] Zhang D, Lu J, Lu J. Enterovirus 71 vaccine: close but still far [J]. *Int J Infect Dis*, 2010, 14(9): 739-743
- [6] Lee MS, Chang LY. Development of enterovirus 71 vaccines [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2010, 9(2): 149-156
- [7] Lim XF, Jia Q, Khong WX, et al. Characterization of an isotype-dependent monoclonal antibody against linear-neutralizing epitope effective for prophylaxis of enterovirus 71 infection [J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): 29751
- [8] Miao LY, Pierce C, Gray-Johnson J, et al. Monoclonal antibodies to VP1 recognize a broad range of enteroviruses [J]. *Clin Microbiol*, 2009, 47(10): 3108-3113
- [9] Foo DG, Alonso S, Phoon MC, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides [J]. *Virus Res*, 2007, 125(1): 61-68

- [10] Meng T, Kolpe AB, Kiener TK, et al. Display of VP1 on the surface of baculovirus and its immunogenicity against heterologous human enterovirus 71 strains in mice[J]. PLoS One, 2011, 6(7):e21757
- [11] Ch'ng WC, Saw WT, Yusoff K, et al. Immunogenicity of a truncated enterovirus 71 VP1 protein fused to a Newcastle disease virus nucleocapsid protein fragment in mice [J]. Acta Virol, 2011, 55(3):227-233
- [12] Chen HL, Huang JY, Chu TW, et al. Expression of VP1 protein in the milk of transgenic mice; a potential oral vaccine protects against enterovirus 71 infection[J]. Vaccine, 2008, 26(23):2882-2889
- [13] Chen HF, Chang MH, Chiang BL, et al. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71[J]. Vaccine, 2006, 24(15):2944-2951
- [14] 詹 峰, 曾晓燕, 张 晓, 等. 抗人生长因子 15 单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 免疫与分子生物学杂志, 2011, 27(5):539-542
- [15] Oberste MS, Maher K, Kilpatrick DR, et al. Molecular evolution of the human enteroviruses; correlation of serotype with VP1 sequence and application to picornavirus classification[J]. J Virol, 1999, 73 (3):1942-1948
- [16] Lin Y, Wen K, Pan Y, et al. Cross-reactivity of anti-EV71 IgM and neutralizing antibody in series sera of patients infected with Enterovirus 71 and Coxsackievirus A 16 [J]. Immunoassay Immunochem, 2011, 32(3):233-243

[收稿日期] 2012-10-10

热烈庆祝生物医学研究杂志 (*The Journal of Biomedical Research, JBR*) 成功进入 PubMed, 自 2013 年起全文被 PubMed Central 收录, 读者可以从 PubMed 上免费下载 JBR 创刊以来的全部文献。JBR 是综合性生物医学杂志, 成功进入 PubMed 意味着 *JBR* 能够为国内作者提供国际一流的生物医学交流平台, 欢迎投稿。

主页网址: <http://www.jbr-pub.org>

投稿网址: <http://mc03.manuscriptcentral.com/jbrint>