

人 5 型腺病毒六邻体蛋白单克隆抗体的制备及鉴定^{*}

潘庆军¹, 朱学芝², 叶 玲¹ (1. 广东医学院附属医院, 广东湛江 524023; 2. 广东粤海饲料集团有限公司, 广东湛江 524017)

【摘要】 目的 制备抗人 5 型腺病毒(HAdV5)六邻体(Hexon)蛋白的单克隆抗体并对其进行鉴定。**方法** 用纯化的 Hexon 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 取其脾细胞与骨髓瘤细胞融合, 经 ELISA 间接法筛选和克隆化培养, 获得 4 株分泌抗 HAdV5 的 Hexon 蛋白单克隆抗体的杂交瘤细胞。纯化获得单克隆抗体, 使用 ELISA 和 Western blot 鉴定单克隆抗体的敏感性和特异性。**结果** ELISA 和 Western blot 结果表明这 4 株单克隆抗体与 HAdV5 的 Hexon 蛋白可以特异性结合。单克隆抗体株 4A9-HRP 标记和 8D6 建立的 ELISA 夹心法具备较高灵敏度和特异性。**结论** 获得 4 株抗 HAdV5 的 Hexon 蛋白的单克隆抗体, 为 HAdV5 相关的疫苗研制和 HAdV5 感染性疾病的早期快速诊断奠定了基础。

【关键词】 5 型腺病毒; 六邻体; 单克隆抗体

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.21.001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)21-2785-03

Preparation and identification of specific monoclonal antibodies against hexon of HAdV5^{*} PAN Qing-jun¹, ZHU Xue-zhi², Ye Ling¹ (1. Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China; 2. Guangdong Feed Group Co., Ltd., Zhanjiang, Guangdong 524017, China)

【Abstract】 Objective To obtain the monoclonal antibody against hexon protein of human adenovirus type 5 (HAdV5). **Methods** BALB/c mice were immunized with purified hexon protein, and the spleen cells of the mice were isolated and fused with myeloma cells. Four hybridoma cell strains were screened by indirect ELISA and cultured, and the sensitivity and specificity were analyzed by ELISA and Western blotting test. **Results** These hybridoma cells contained specific monoclonal antibodies against hexon protein of HAdV5 as identified by ELISA and Western blot. **Conclusion** The monoclonal antibodies against hexon protein of HAdV5 with high specificity have been successfully obtained, and these antibodies could be useful in developing assays for early diagnosis of HAdV5 infection and also in vaccine development based on HAdV5 virus.

【Key words】 adenovirus type 5; hexon; monoclonal antibody

人类腺病毒是引起人类呼吸道和消化道感染的重要病原体之一, 其中腺病毒 3、5、7 型易引起儿童急性上呼吸道感染。研究发现中国华南人群中约有 77% 呈人 5 型腺病毒(HAdV5)抗体阳性^[1]。同时, HAdV5 已被广泛作为重组基因治疗和疫苗载体, 最新的数据表明全球约有 1/4 的基因治疗和疫苗载体的临床试验应用了 HAdV5 载体^[2]。在基因治疗和疫苗研制过程中, 病毒的抗原浓度是重要的质量控制指标, 开发出准确、特异的抗原浓度检测试剂是监测基因治疗及疫苗生产和研发过程最有效的方法, 对于临床 HAdV5 进行快速、特异性诊断和预防也具有重大意义^[3]。本研究通过纯化培养 HAdV5 的六邻体(Hexon)蛋白免疫小鼠, 制备其特异的单抗, 有望为 HAdV5 病毒相关的疫苗研制和 HAdV5 感染性疾病的早期快速诊断奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 BALB/c 小鼠由中山大学实验动物中心提供。HAdV5、3、40、41 型 HAdV (HAdV3、HAdV40、HAdV41) 和 Hep-2 细胞以及骨髓瘤细胞 SP2/0 为本室保存。

1.2 试剂 完全和不完全弗氏佐剂为 Sigma 公司产品, HRP 标记单抗鼠 IgG 购买自 Sigma 公司, ECL 底物化学发光检测试剂盒和 IgG 亚型诊断试剂盒购自 GIBCO 公司, 轮状病毒/腺

病毒抗原二合一检测条购自西班牙 CerTest Biotec 公司, 100×10³ 和 300×10³ 的切向流膜堆购于 Milipore 公司, DEAE-Sephadex A-50 购于 Amersham biosciences 公司。其他普通生化试剂均为国产分析纯试剂。BCA 蛋白定量试剂购自热电公司。

1.3 HAdV5 的增殖和其 Hexon 蛋白的纯化和鉴定

1.3.1 HAdV5 的增殖和分子截留 常规培养 Hep-2 细胞, 待长满瓶底面积的 80% 左右, 用 HAdV5 200~500 μL 对细胞进行 35℃ 吸附 3 h, 然后加入含 3% 血清的维持液, 待细胞病变在 95% 左右收获病毒。反复冻融 3 次释放病毒, 再 800 g 离心 30 min 去除细胞碎片, 经查询 Milipore 公司膜堆参数, 分别选取 100×10³ 和 300×10³ 的切向流膜堆对 HAdV5 进行生物大分子截留技术(即分子截留)纯化。用 CerTest Rota-Adeno Blister Test 检测试剂分别对原病毒培养液、300×10³ 滤膜上面滤液、300×10³ 滤膜下 100×10³ 滤膜上面滤液和 100×10³ 滤膜下面滤液分别进行 HAdV5 病毒检测。

1.3.2 HAdV5 的 Hexon 蛋白的纯化和鉴定 用裂解液(0.1% TritonX-100+0.1% 脱氧胆酸钠+10 mmol/L PBS)在 4℃ 裂解已获取的 HAdV5 2 h。取 DEAE-Sephadex A-50 加入 100 mL 0.01 mol/L 的 PBS 使其充分饱和, 负压除气泡后装

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81202346); 广东省自然科学基金资助项目(S2012040006216); 广东省卫生厅基金资助项目(B2012284); 广东省湛江市科技攻关项目(2012C3101028)。

柱,再用不含 NaCl 的 0.01 mol/L 的 PBS 平衡柱体。然后缓慢加入裂解后的 HAdV5 样品,分别用含 0.05、0.2、0.4 mol/L NaCl 的 0.01 mol/L 的 PBS 进行梯度洗脱。用组分收集仪分段收集洗脱的样品,用分光光度计测试洗脱组分,并以 BCA 试剂盒进行蛋白精确定量。取不同量蛋白,SDS-PAGE 分离组分后转膜,再用含 5%脱脂奶粉的稀释液稀释抗 Hexon 蛋白单抗,室温孵育 2 h,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,再加入二抗孵育 2 h,0.01 mol/L PBS 洗涤 4 次,最后用 ECL 底物化学发光检测试剂盒进行检测。

1.4 Hexon 蛋白免疫小鼠和阳性克隆的筛选 用纯化的 Hexon 蛋白与完全和不完全弗氏佐剂混合免疫 BALB/c 小鼠,共 4 次,每次间隔 2 周,免疫第 3 次后 7 d 尾静脉取血测效价。融合前 4 d,选择效价高的 BALB/c 小鼠脾内注射进行加强免疫。取小鼠的脾细胞和体外培养的骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合,以纯化的 Hexon 蛋白为抗原包被,通过 ELISA 试验,确定初筛和复筛杂交瘤细胞阳性克隆,然后采用有限稀释法,将阳性克隆连续 3 次亚克隆,最后达到单克隆,扩大培养并冻存保种。

1.5 抗 Hexon 蛋白单抗的 Western blot 分析和亚型测定 取不同量纯化 Hexon 蛋白,SDS-PAGE 分离组分后转膜,再用含 5%脱脂奶粉的稀释液稀释抗 Hexon 蛋白单抗至 2 μg/mL,室温孵育 2 h,0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次,再加入二抗孵育 2 h,0.01 mol/L PBS 洗涤 4 次,最后用 ECL 底物化学发光检测试剂盒进行检测,检测不同株单抗的特异性。用小鼠抗体亚类试剂盒检测各株抗体的亚型,按照试剂盒说明书进行。

1.6 双抗体夹心 ELISA 的建立和特异性检测 将纯化后用于包被的抗 Hexon 蛋白单抗和 HRP 标记的单抗作系列稀释,采用棋盘法确定两者最佳的工作浓度。采用正交试验和平行

试验确定封闭液、样品稀释液和酶标抗体稀释液,建立双抗体夹心 ELISA 检测方法^[4]。

用 CerTest Rota-Adeno Blister Test 检测试剂和建立的双抗体夹心 ELISA,同时对细胞培养的 HAdV3、HAdV40、HAdV41 进行检测,考核其特异性。

2 结 果

2.1 HAdV5 的增殖和分子截留纯化 选择生长状态良好的 Hep-2 细胞,用 HAdV5 对细胞进行吸附感染,之后加入维持液,48 h 后获得典型的细胞病变(图 1)。

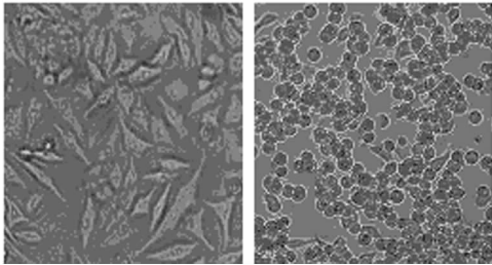


图 1 HAdV5 感染 Hep-2 细胞(400×)

分别采用带 100×10³ 和 300×10³ 膜的膜堆管对 HAdV5 进行截留,然后用 CerTest Rota-Adeno Blister Test 试剂分别对正常细胞培养液、接种病毒的细胞培养液、接种病毒的细胞培养液进行分子截留后的样品(包括 300×10³ 滤膜上面滤液、300×10³ 滤膜下 100×10³ 滤膜上面滤液,以及 100×10³ 滤膜下面滤液)进行检测,结果见表 1。由表 1 判定,100×10³ 滤膜下和 300×10³ 滤膜上的滤液成功截留 HAdV5,该方法可用于 HAdV5 的纯化。

表 1 分子截留纯化后各样品中 HAdV5 的水平检测结果

样品	正常细胞培养液	接种病毒的细胞培养液	对接种病毒的细胞培养液进行分子截留					
			300×10 ³ 滤膜上面滤液		300×10 ³ 滤膜下 100×10 ³ 滤膜上面滤液		100×10 ³ 滤膜下面滤液	
			1 : 1 000	1 : 100 000	1 : 1 000	1 : 100 000	1 : 1 000	1 : 100 000
结果	阴性	强阳性	弱阳性	阴性	强阳性	强阳性	阴性	阴性

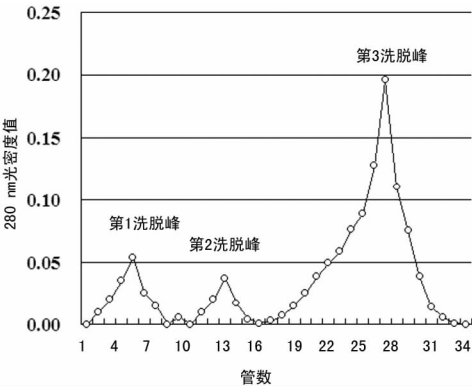


图 2 离子交换柱层析法洗脱曲线

2.2 HAdV5 的 Hexon 蛋白的纯化和鉴定 采用 DEAE-Sephadex A-50 离子交换柱层析法,用组分收集仪分段收集洗脱的样品,用分光光度计监测蛋白浓度。第 3 洗脱峰(图 2)经 SDS-PAGE 后用商品化抗 Hexon 蛋白抗体 Western blot 鉴定为 120×10³ Hexon 蛋白(图 3、4)。

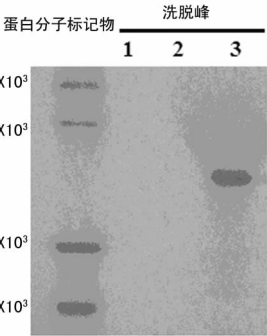


图 3 SDS-PAGE 分析各洗脱峰蛋白

2.3 Western blot 检测各株单抗的特异性 从图 5 可以看到,4 株抗体分别于 Hexon 蛋白处有单一的印迹条带。

2.4 单抗的亚型鉴定 据亚类分型试剂盒检测结果,4 株单抗亚型分别是:2C9 为 IgG1,4A9 为 IgG2a,5E2 为 IgG2a,8D6 为 IgG1。

2.5 单抗配对和夹心法 ELISA 检测 对纯化的 4 株单抗采

用棋盘滴定法进行配对检测细胞培养的 HAdv5,其中 4A9 和 8D6 可形成 ELISA 夹心法,且 4A9-HRP 标记和 8D6 ELISA 夹心法检测的灵敏度比 8D6-HRP 标记和 4A9 ELISA 夹心法高(表 2)。对细胞培养的 HAdV3、HAdV40、HAdV41 进行检测,发现 4A9-HRP 标记和 8D6 ELISA 夹心法可识别 HAdV3,而不能识别 HAdV40 和 HAdV41(表 3)。

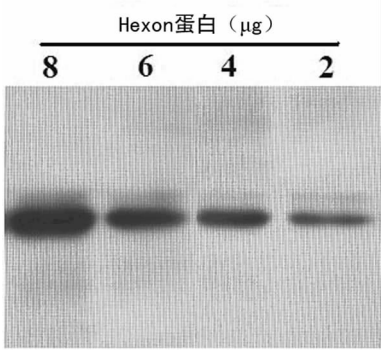


图 4 Western blot 分析纯化的 Hexon 蛋白

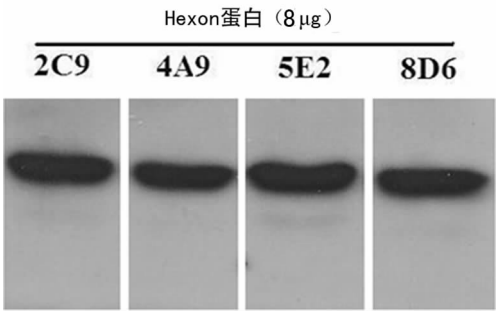


图 5 Western blot 分析 4 株单抗的特异性

表 2 ELISA 夹心法检测细胞培养 HAdV5

单抗株	4A9-HRP			8D6-HRP		
	1 : 100	1 : 1 000	1 : 5 000	1 : 100	1 : 1 000	1 : 5 000
4A9	1.136	0.217	0.051	2.437	0.824	0.162
8D6	0.981	0.073	0.032	2.215	0.614	0.057

表 3 检测细胞培养 HAdV3、HAdV40 和 HAdV41

检测方法	HAdV5		HAdV3		HAdV40		HAdV41	
	1 : 10	1 : 100	1 : 10	1 : 100	1 : 10	1 : 100	1 : 10	1 : 100
4A9-HRP 和 8D6 夹心法	2.765	2.383	0.054	0.041	0.047	0.036	0.053	0.048
Rota-Adenovirus Bliester Test	++	+	++	+	++	++	++	+

3 讨 论

本研究成功用 100 × 10³ 和 300 × 10³ 切向流膜堆对 HAdV5 进行了纯化,为应用分子截留技术纯化腺病毒提供了参考。已知 Hexon 蛋白是腺病毒的主要抗原蛋白^[5-6],含有大量的抗原决定簇,包括型特异性、型间特异性及组特异性抗原表位以及中和性表位。目前关于腺病毒天然蛋白 Hexon 的纯化方案,鲜有报道。本研究应用离子交换柱层析法获得了高纯度的人 HadV5 的 Hexon 蛋白,为其他型别的腺病毒 Hexon 蛋白的纯化提供了参考。

人腺病毒感染非常普遍,其中婴幼儿中约 5%~10% 的下呼吸道感染是由腺病毒引起的^[7-8]。目前腺病毒感染没有特效药物及疗效显著的治疗方法。因此,腺病毒疫苗的研制,特别是亚单位疫苗(如 Hexon 蛋白)的研制就显得尤为重要。用基于特异单抗建立的 ELISA 法进行疫苗抗原浓度检测,快速灵敏、稳定性好、具有可重复性,适合于疫苗生产过程及成品的检测。本研究建立的 ELISA 双单抗夹心法是以 2 株亲和力高、针对 HAdV5 Hexon 蛋白抗原的特异单抗为原料构建的。可用作 HAdV5 及其 Hexon 蛋白的定量检测,可在 HAdV5 型疫苗研发和生产过程对抗原含量进行有效监测。同时,可用于临床 HAdV5 感染的早期特异检测。

综上所述,本研究用 HAdV5 的 Hexon 蛋白免疫小鼠,制备了抗 HAdV5 的 Hexon 蛋白的单抗,而且初步证实这些抗体的特异性。本研究成果为今后基于 HAdV5 相关的疫苗研制和 HAdV5 相关的疫苗研制和 HAdV5 感染性疾病的早期快速诊断奠定了基础。

参考文献

[1] Sun CJ, Zhang YF, Feng LQ, et al. Epidemiology of ade-

novirus type 5 neutralizing antibodies in healthy people and AIDS patients in Guangzhou, southern China [J]. Vaccine, 2011, 29(22): 3837-3841.

[2] Sun C, Feng L, Zhang Y, et al. Circumventing antivector immunity by using adenovirus-infected blood cells for repeated application of adenovirus-vectored vaccines: proof of concept in rhesus macaques [J]. J Virol, 2012, 86(20): 11031-11042.

[3] 张鸿彦, 曲章义, 王鹏, 等. 腺病毒六邻体蛋白结构、功能及疫苗研究 [J]. 国际免疫学杂志, 2006, 29(2): 126-128.

[4] 张立怀, 张国中, 霍蕾, 等. 检测禽流感病毒抗原的双抗体夹心 ELISA 方法的建立 [J]. 中国医药生物技术, 2009, 4(1): 62-63.

[5] Fields BN, Knipe DM, Howley RM, et al. Thomas Shenk Adenoviridae: the viruses and their replication [M]. 3rd ed. Philadelphia, USA: Lippincott-Rave Publishers, 1996: 2111.

[6] Rux JJ, Burner RM. Type-specific epitope locations revealed by X-ray crystallographic study of adenovirus type 5 hexon [J]. Mol Ther, 2000, 1(1): 18-30.

[7] 周荣, 苏晓波, 张其威, 等. 人 3 型腺病毒广州分离株基因组的进化分析 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2007, 27(1): 14-17.

[8] 唐浏英, 刘秀云, 芦起, 等. 2004 年冬至 2005 年春引起北京地区儿童肺炎的腺病毒基因特点分析 [J]. 病毒学报, 2006, 22(4): 286-291.