

• 论 著 •

新型抗狂犬病病毒核蛋白抗体进行 RFFIT 检测效果评估*

吕新军, 马学军[△]

(中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所, 北京 102206)

摘要:目的 评价自主研发的荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体用于快速荧光灶抑制试验(RFFIT)的效果。方法 将狂犬病病毒核蛋白的一段线性表位肽与 KLH 耦联后免疫 Balb/c 小鼠制备的高效价单克隆抗体抗-RVNP-Mc1, 经浓缩、纯化、异硫氰酸荧光素(FITC)标记用于 RFFIT 检测, 以 Millipore 公司 DFA5100 为对照试剂, 对 200 例人血清进行平行 RFFIT 检测, 将结果进行统计学分析。结果 两种抗体检测结果的线性相关分析显示相关系数(r)=0.980; 两种抗体检测定性结果一致率为 96.83%, 卡方检验显示两种抗体检测定性结果差异无统计学意义($\chi^2=0.098, P>0.05$), 发生定性结果不一致的 6 例(3.00%)血清两种抗体检测结果均小于 1 IU/mL; 68 例两种抗体检测结果均小于或等于 1 IU/mL 的血清样品中有 6 例(8.82%)发生结果定性不一致, 其余样品均未发生不一致的情况。结论 使用荧光标记抗-RVNP-Mc1 与 DFA5100 进行 RFFIT 检测时结果高度一致, 荧光标记抗-RVNP-Mc1 可供 RFFIT 检测使用。

关键词: 狂犬病病毒; 核蛋白类; 抗体; 快速荧光灶抑制试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.001

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)07-0721-02

Evaluation on the effect of new type of antibody against the nucleoprotein of rabies virus used for RFFIT

Lv Xinjun, Ma Xuejun

(Institute for Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the effect of fluorescein isothiocyanate(FITC)labeled monoclonal antibody against the nucleoprotein of rabies virus used for rapid fluorescent focus inhibition test(RFFIT). **Methods** Anti-RVNP-Mc1, one strain of monoclonal antibody against the nucleoprotein of rabies virus was prepared by immunizing Balb/c mice with a piece of linear epitope peptide on the nucleoprotein of rabies virus linked with KLH molecular. Anti-RVNP-Mc1 was concentrated, purified and labeled by FITC. FITC-Anti-RVNP-Mc1 was used for RFFIT to test 200 human sera paralleled with DFA5100(Rabies Diagnostic Reagent, Millipore Company). The results were statistically analyzed. **Results** By logistic analysis, the results of RFFIT using anti-RVNP-Mc1 and DFA5100 was correlated, the correlative coefficient(r) was 0.980. The consistent rate of qualitative results(negative or positive) was 96.83%. By χ^2 test, the difference between the positive rates of RFFIT using two kinds of antibodies was not significant($\chi^2=0.098, P>0.05$). All 6(3.00%) human sera with different qualitative results were detected with values ≤ 1.0 IU/mL in RFFIT using two kinds of antibodies. 6(8.82%) among 68 human sera with values ≤ 1.0 IU/mL give out opposite qualitative results in RFFIT using two kinds of antibodies, and the other samples rise consistent qualitative results. **Conclusion** FITC-Anti-RVNP-Mc1 and DFA5100 have equivalent results in RFFIT, and Anti-RVNP-Mc1 can replace the use of DFA5100 in RFFIT.

Key words: rabies virus; nucleoproteins; antibodies; rapid fluorescent focus inhibition test

快速荧光灶抑制试验(rapid fluorescent focus inhibition test, RFFIT)是 WHO 狂犬病专家委员会推荐的抗狂犬病病毒中和抗体检测标准方法之一^[1], 2010 年版《中国药典》第 3 部也已将 RFFIT 列为抗狂犬病病毒中和抗体检测标准方法之一^[2]。RFFIT 需要通过荧光抗体试验(fluorescent antibody test, FAT)观察结果, 敏感、高效的荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体诊断试剂是 FAT 的关键因素^[3]。国内尚无获得正式批准文号的荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体诊断试剂, 进口产品价格昂贵, 进口周期长。本研究对新型荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体, 抗-RVNP-Mc1 用于 RFFIT 检测的效果进行评价, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 抗-RVNP-Mc1 是各血清型狂犬病病毒核蛋白共有的一段保守线性表位肽与 KLH 耦联后免疫 Balb/c 小鼠制备的高效价单克隆抗体, 可以识别培养细胞和动物脑组织中的

狂犬病病毒天然抗原。对抗-RVNP-Mc1 进行浓缩、纯化、异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记后摸索适宜工作浓度用于 RFFIT 检测, 以 Millipore 公司荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体产品 DFA5100 rabies diagnostic reagent 为对照试剂。

1.2 待测样品 200 例待测人血清由北京市通州区潞河医院狂犬病门诊提供。待测血清样品置 4℃ 冰箱冷藏, 测定前需在室温下平衡 30 min, 然后 56℃ 水浴灭活 30 min, 取出后在室温下平衡 30 min。每次检测均设立阴性血清对照、弱阳性血清对照、强阳性血清对照、CVS-11 病毒对照、正常细胞对照。

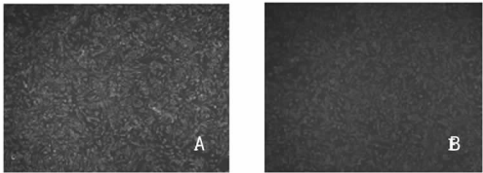
1.3 RFFIT 各要素及标准操作流程 按照参考文献[4]进行, 同一样品采用两种荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体进行平行 RFFIT 检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件进行两种荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体 RFFIT 检测值相关性分

析,拟合回归曲线,给出回归曲线方程;对两种荧光标记抗体进行 RFFIT 检测时定性检测结果中和抗体阳性率比较的 χ^2 检验,按照检验水准 $\alpha=0.05$ 分析两种抗体检测定性结果差异是否存在统计学意义。

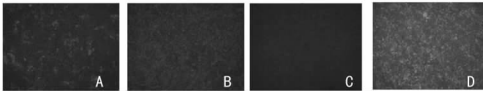
2 结 果

2.1 新型抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体主要特点 从 Genebank 中选择各基因型狂犬病病毒代表毒株核蛋白氨基酸序列,经同源性比较、二级结构分析、亲水性和疏水性分析, KISGQNTGNYKTN 是各基因型狂犬病病毒代表毒株核蛋白氨基酸序列中的保守线性肽段。KISGQNTGNYKTN 合成多肽与 KLH 耦联免疫 Balb/c 小鼠制备抗-RVNP-McI 单克隆抗体,经过浓缩、纯化、FITC 标记可在 1 : 200 稀释度有效识别 CVS-11 感染 BSR 细胞中病毒抗原,见图 1。



A 为感染 CVS-11 的 BSR 细胞;B 为正常 BSR 细胞。
图 1 FITC-抗-RVNP-McI 识别感染细胞的 CVS-11(1×200)

2.2 新型抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体在 RFFIT 检测中的表现 FITC-抗-RVNP-McI 用于 RFFIT 检测时标准品、细胞对照、病毒对照表现良好,标准品 50%分界点定位在第 5、6 孔之间,细胞对照孔内无荧光灶,病毒对照显示 CVS-11 毒种用量符合 80%感染量,见图 2。



A 为标准品第 5 孔(25% 细胞感染量);B 为标准品第 6 孔(75% 细胞感染量);C 为正常细胞对照(无荧光灶);D 为病毒对照(80% 细胞感染量)。
图 2 FITC-抗-RVNP-McI 用于 RFFIT 检测时标准品、细胞/病毒对照的表现

2.3 使用两种抗体进行的样品检测结果分析 200 例血清样品无变质、污浊等导致无法用于 RFFIT 检测的问题。使用 Millipore 公司 DFA5100 和 FITC-抗-RVNP-McI 进行平行检测。对定量检测结果进行回归分析,回归方程 $Y=0.054+0.995X$,相关系数(r)=0.980。对定性检测结果进行两样本率比较的 χ^2 检验, $\chi^2=0.098$, ($P=0.754$, $P>0.05$),使用两种抗体的阳性检出率差异无统计学意义,见表 1。

表 1 两种抗体检测结果比较

检测结果	DFA5100[n(%)]	抗-RVNP-McI[n(%)]	合计(n)
阴性	22(11.00)	24(12.00)	46
阳性	178(89.00)	176(88.00)	354
合计	200(100.00)	200(100.00)	400

68 例两种抗体检测结果均小于或等于 1 IU/mL 的样品中有 6 例(8.82%)发生结果定性不一致,其余样品未出现两种抗体检测结果定性不一致。使用 DFA5100 检测阴性标本中有 2 例使用 FITC-抗-RVNP-McI 检测阳性,对其中编号 167 的样

品在不同时间进行 10 次重复检测,使用两种抗体的阳性检出率均为 60%;使用 DFA5100 检测阳性的标本中有 4 例使用 FITC-抗-RVNP-McI 检测阴性,对其中编号 107 的样品在不同时间进行 10 次重复检测,使用两种抗体的阳性检出率均为 60%。对这 2 例样品用两种抗体的阳性检出率进行比较, χ^2 检验($\chi^2<0.001$, $P=1$, $P>0.05$),显示这种差异由操作系统引起而与使用的抗体无关。

3 讨 论

狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体可用于狂犬病病毒血清学分型,这是不同抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体以“鸡尾酒”配对方式组合检测多个血清型狂犬病病毒的原理^[5]。目前使用较广泛的荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白抗体产品主要基于上述原理,本研究中 DFA5100 由 3 个抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体配对,可检出已知 5 个血清型狂犬病病毒。抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体一般采用天然狂犬病病毒核蛋白抗原或表达狂犬病病毒核蛋白抗原免疫 Balb/c 小鼠制备,尚未使用合成肽免疫动物制备针对狂犬病病毒核蛋白某区段的单克隆抗体^[6-8]。本研究利用各血清型狂犬病病毒核蛋白共有保守线性区段合成肽制备可能检出多个血清型狂犬病病毒的单克隆抗体,抗-RVNP-McI,该抗体可识别感染细胞中天然狂犬病病毒核蛋白抗原,用于以 CVS-Ⅱ为攻击毒株的 RFFIT 检测中具有和 DFA5100 等同的检测效力。

狂犬病病毒核蛋白相对分子质量为 50.5×10^3 ,由 450 个氨基酸组成,其中第 64~105 位和第 201~329 位氨基酸是两个高度保守区域,后者中第 210~242 位和第 271~317 位氨基酸是更保守的区域,单克隆抗体抗原位点分析证实存在 I、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4 个抗原表位,其中 I (第 358~367 位)、Ⅳ (第 359~366 位,第 375~383 位)为线性抗原表位,Ⅱ、Ⅲ为空间构象性表位^[9-10]。采用狂犬病病毒核蛋白抗原免疫动物制备的抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体针对空间构象或线性抗原表位^[10]。采用合成肽免疫动物制备的抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体仅针对线性抗原表位。KISGQNTGNYKTN 肽段位于第 152~164 位氨基酸,是未曾报道的线性抗原表位区域,显示抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体抗原表位研究仍有拓展空间。

我国是世界第二大狂犬病流行国,每年消耗狂犬病疫苗 1 200~1 500 万人份^[11-12]。进行狂犬病预防处置效果评估需通过 RFFIT 检测血清抗狂犬病病毒中和抗体效价,国内仅少数实验室可以进行该检测。2010 年《中国药典》第 3 部的颁布实施将促使国内相关实验室及各狂犬病疫苗和免疫球蛋白生产厂家建立 RFFIT 检测体系,对荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白抗体需求将迅速增长,大量采购进口试剂不仅花费巨大,而且耗时较长。本研究推出的 FITC-抗-RVNP-McI 经研究完全能够用于 RFFIT 检测,是值得推广的荧光标记抗狂犬病病毒核蛋白单克隆抗体,拟进一步验证该抗体与其他血清型狂犬病病毒的反应特性,探讨应用该抗体检测各血清型狂犬病病毒的可行性。

参考文献

[1] World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies; First Report (WHO technical report series; 931) [R]. Geneva Switzerland; WHO, 2005.
[2] 吕新军,吴小红,李佳,等. 双重平行检验批量样品对两实验室 RFFIT 体系效能的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(4): 527-528. (下转第 725 页)

DENND1B 基因编码一种胞内信号蛋白,该蛋白是 TNF- α I 型受体(TNF- α R I)结合蛋白的结合配体,能够负调控细胞因子引起的 TNF- α R I 信号转导^[12-13]。DENND1B 蛋白表达于 DC 细胞亚群和 NK 细胞,在活化 T 细胞中表达明显上调^[14]。在哮喘过程中,一部分活化的 T 细胞发育为 TH2 细胞,DENND1B 蛋白调控 TH1-TH2 细胞因子级联反应并通过抑制 TNF- α R I 信号转导调控其他炎症信号通路。

为了了解中国儿童哮喘与 DENND1B 基因多态性的关系,本研究选取 3 个 SNP 位点进行了检测分析^[6,15]。研究结果显示,rs1775444 位点 3 组基因型及等位基因频率分布在两组间的差异有统计学意义,其中,哮喘组 TC 和 TT 基因型频率明显低于健康对照组,哮喘组 T 等位基因频率低于健康对照组;这与国外文献中报道的欧裔人群和非裔儿童中的研究结果相反,提示该位点在中国哮喘儿童中可能为保护性 SNP 位点。此外,为了进一步探讨 DENND1B 基因多态性导致儿童哮喘易感性的机制,本研究分析了哮喘儿童 rs1775444 位点基因型与血清 IgE 水平的关系,结果显示哮喘儿童该位点基因型与血清 IgE 水平无关;提示该位点多态性并未导致患者血清 IgE 差异,DENND1B 基因多态性可能通过其他途径导致儿童哮喘易感性。

目前,DENND1B 蛋白在哮喘病理、生理过程中的作用仍然知之甚少,对于 DENND1B 基因多态性与哮喘易感性的关系,尚需在更多的人群中进行重复研究以及功能基因组研究^[1,16]。本研究是对 DENND1B 基因与儿童哮喘相关性的初步调查,更多大量样本的研究,以及 SNP 位点与 RNA 转录水平、细胞因子水平的关系仍在进一步研究之中。对 DENND1B 基因研究的不断深入将为哮喘基因的确立、哮喘的预测、防治和治疗提供新的线索和途径。

参考文献

[1] Meng JF, Rosenwasser LJ. Unraveling the genetic basis of asthma and allergic diseases[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2010, 2 (4): 215-227.

[2] Moffatt MF, Kabisch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma[J]. Nature, 2007, 448(7152): 470-473.

[3] Mathias RA, Grant AV, Rafaels N, et al. A genome-wide association study on African-ancestry populations for asthma[J]. J Aller-

gy Clin Immunol, 2010, 125(2): 336-346.

[4] Sleiman PM, Annaiah K, Imielinski M, et al. ORMDL3 variants associated with asthma susceptibility in North Americans of European ancestry[J]. J Allergy Clin Immunol, 2008, 122(6): 1225-1227.

[5] Marat AL, Mcpherson PS. Variants of DENND1B associated with asthma in children[J]. N Engl J Med, 2010, 363(10): 988-989.

[6] Sleiman PM, Flory J, Imielinski M, et al. Variants of DENND1B associated with asthma in children[J]. N Engl J Med, 2010, 362 (1): 36-44.

[7] 洪建国. 不断提高儿童支气管哮喘的诊治水平[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10): 721-723.

[8] 儿童支气管哮喘诊断与防治指南[S]. 中华儿科杂志, 2008, 46 (10): 745-753.

[9] Kumar A, Ghosh B. Genetics of asthma: a molecular biologist perspective[J]. Clin Mol Allergy, 2009, 7(1): 7.

[10] Pinto LA, Stein RT, Kabisch M. Impact of genetics in childhood asthma[J]. J Pediatr (Rio J), 2008, 84(4 Suppl): 68-75.

[11] Sleiman PM, Hakonarson H. Recent advances in the genetics and genomics of asthma and related traits[J]. Curr Opin Pediatr, 2010, 22(3): 307-312.

[12] Del VK, Miller CA. Down-regulation of DENN/MADD, a TNF receptor binding protein, correlates with neuronal cell death in Alzheimer's disease brain and hippocampal neurons[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(12): 4210-4215.

[13] Miyoshi J, Takai Y. Dual role of DENN/MADD (Rab3GEP) in neurotransmission and neuroprotection [J]. Trends Mol Med, 2004, 10(10): 476-480.

[14] Lindstedt M, Lundberg K, Borrebaeck CA. Gene family clustering identifies functionally associated subsets of human in vivo blood and tonsillar dendritic cells[J]. J Immunol, 2005, 175(8): 4839-4846.

[15] Himes BE, Lasky SJ, Wu AC, et al. Asthma-susceptibility variants identified using probands in case-control and family-based analyses[J]. BMC Med Genet, 2010, 11(6): 122.

[16] Zhang J, Pare PD, Sandford AJ. Recent advances in asthma genetics[J]. Respir Res, 2008, 9(8): 4.

(收稿日期: 2010-08-12)

(上接第 722 页)

[3] Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid reproducible test for determining rabies neutralizing antibody[J]. Bull WHO, 1973, 48(9): 535-541.

[5] King AA. Studies of the antigenic relationship of rabies and rabies-related viruses using antinucleocapsid monoclonal antibodies [J]. Guildford: University of Surrey, 1991.

[6] 严家新, 李承平, 朱家鸿, 等. 抗狂犬病病毒核蛋白荧光标记抗体的制备和初步鉴定[J]. 中国人兽共患病学报, 2000, 16(5): 59-61.

[7] 苏焱, 王继麟, 杨想平, 等. 狂犬病毒核蛋白(NP)的纯化及其免疫原性的研究[J]. 中国病毒学, 2001, 16(1): 64-67.

[8] 尹伟, 徐洁萍, 张金阳, 等. 狂犬病核蛋白在 Bac-To-Bac/AcMNPV 杆状病毒系统的表达[J]. 中国预防兽医学报, 2010, 32(2): 86-89.

[9] 俞永新. 狂犬病和狂犬病疫苗[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 93-110.

[10] Hideo G, Nobuyuki M, Hiroshi I, et al. Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus[J]. Journal of General Virology, 2000, 81(11): 119-127.

[11] 俞永新. 中国预防控制狂犬病降低发病率的思考[J]. 中国计划免疫, 2007, 4(13): 391-398.

[12] Han S, Zhong MG, Yuan TH, et al. Rabies trend in China (1990-2007) and post-exposure prophylaxis in the Guangdong province [J]. BMC Infectious Diseases, 2008, 8(19): 113.

(收稿日期: 2011-01-10)