

• 论 著 •

柯萨奇病毒 A16 型快速纯化和中和性单克隆抗体制备与鉴定*

刘 杨^{1,2}, 赵向绒¹, 关璐媛², 王 鑫¹, 郭春艳¹, 封 青¹, 卫晶晶³, 胡 军^{1△}, 余鹏博^{2△}

(1. 陕西省人民医院中心实验室, 陕西西安 710068; 2. 陕西省疾病预防控制中心病毒室, 陕西西安 710054; 3. 韩城疾病预防控制中心, 陕西韩城 715400)

摘要:目的 建立柯萨奇病毒 A16 型快速纯化方法, 制备中和性单抗, 并对单抗进行分析。方法 收获 CA16 培养上清液, 超滤浓缩, 氯化铯密度梯度离心纯化病毒颗粒, 透射电镜鉴定纯化产物。福尔马林灭活 CA16, 免疫 BALB/c 小鼠, 制备分泌抗 CA16 特异性单抗的杂交瘤细胞系, 用 ELISA 和中和试验分别对单抗特性进行分析。结果 初步建立 CA16 病毒氯化铯密度梯度纯化方法, 电镜显示, 病毒颗粒为二十面体立体对称球形结构, 病毒直径在 20~30 nm 间, 大小均匀。获得 2 株分泌抗 CA16 单抗的杂交瘤细胞系, 2 株单抗均为 IgG2a 亚型, Anti/CA16/5 效价为 10^3 , Anti/CA16/10 效价为 10^4 。2 株抗体的中和效价分别为 1:256 和 1:1024。结论 初步建立氯化铯密度梯度纯化 CA16 的方法, 筛选出 2 株具有中和活性的抗 CA16 单抗, 为 CA16 病毒的基础研究提供重要的原材料。

关键词:病毒纯化; 超速离心; 单克隆抗体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.015

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)14-1990-02

Purification of coxsackievirus A16 viral particles and preparation and identification of neutralizing monoclonal antibody against coxsackievirus A16*

Liu Yang^{1,2}, Zhao Xiangrong¹, Guan Luyuan², Wang Xin¹, Guo Chunyan¹,
Feng Qing¹, Wei Jingjing³, Hu Jun^{1△}, Yu Pengbo^{2△}

(1. Central Laboratory of Shaanxi Provincial People's Hospital, Shaanxi 710068, China; 2. Virological Laboratory of Shaanxi province center for disease control and prevention, Shaanxi 710054, China; 3. Hancheng center of disease control and prevention, Shaanxi 715400, China)

Abstract: Objective To establish the rapid purification of Coxsackievirus A16 using ultracentrifugation. And To prepare and identify the neutralizing monoclonal antibody against CA16. **Methods** The CA16 culture supernatant was harvested and then concentrated by 100K capsule. The concentration of CA16 was purified by cesium chloride ultracentrifugation. Purification of CA16 were identified by transmission electron microscopy. BALB/c mice were immunized with inactivated CA16. Spleen cells were harvested and fused with SP2/0 myeloma cells, hybridoma cell strain secreting mAb against CA16 were objected to screening. Characterization of the prepared mAb were analyzed by ELISA and microneutralization assay. **Results** The purified CA16 method of cesium chloride gradient ultracentrifugation was established, TEM analysis was showed that CA16 particles have icosahedral structure, the diameters of the viral particles were approximately 20—30 nm. Two hybridoma cell strains secreting mAb against CA16 were obtained, the subtypes of two mAbs were IgG2a, the binding titers of Anti/CA16/5 and Anti/CA16/10 were 10^3 and 10^4 respectively. Neutralizing titer of the two mAbs were 1:256 and 1:1024 respectively. **Conclusion** Establishment method of cesium chloride gradient ultracentrifugation was performed to purify CA16, the two mAbs with neutralizing ability to against CA16 may become application of treatment and vaccine.

Key words: Virus purification; ultracentrifugation; Monoclonal antibody

柯萨奇病毒 A16 型(CA16)是引起手足口病的主要病原体之一, 与另一种病原体肠道病毒 71 型相比, CA16 感染患者临床表现较轻, 所以对 CA16 的研究工作相比 EV71 较少^[1]。但是, 近年来 CA16 和 EV71 两种病原此起彼伏反复流行, 因此应对 CA16 的研究工作给与重视。此次研究在于建立 CA16 病毒纯化技术, 并制备抗 CA16 单抗, 为病毒的基础研究提供支持。现将实验报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 SP2/0 细胞为本实验保存株, CA16 和 EV71 病毒株为本实验室分离株, BALB/c 小鼠购自第四军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 病毒培养 CA16 培养参照卫生部《手足口病预防控制指南(2009 版)》。

1.2.2 病毒颗粒纯化 收获病毒上清液冻融 3 次, 3 000 r/min 离心 20 min, 收集上清用 100 K 的离心滤柱 10 倍浓缩, 依次加入重氯化铯(密度=1.45 g/mL)、轻氯化铯(密度=1.19 g/mL, 含结晶紫)、病毒浓缩液。20 000 r/min 离心 4 h。收取蓝色病毒层, 4℃条件下透析。纯化产物-70℃保存。

1.2.3 透射电镜观察病毒颗粒 滴加病毒到铜网上, 10 min 后用滤纸吸取多余样品, 滴加 2% 磷钨酸溶液负染后进行透射电镜观察。

* 基金项目:病毒性传染病病原谱流行规律及变异研究(2013ZX10004202-001-002)。 作者简介:刘杨,男,公共卫生医师,主要从事肠道病毒分子生物学和免疫机理研究。 △ 通讯作者, E-mail: hjj6562@163.com; E-mail: sxcdey@126.com。

1.2.4 单克隆抗体的制备 福尔马林灭活病毒纯化产物并免疫 BALB/c 小鼠,取鼠脾脏与 Sp2/0 细胞混合。用 ELISA 方法筛选分泌单抗的杂交瘤细胞系,建立单抗细胞株,并制备单抗腹水。

1.2.5 单克隆抗体反应特性鉴定 抗体亚类鉴定:按照 Southern biotech 公司单抗亚型鉴定试剂盒说明书进行。抗体效价测定:倍比稀释单抗腹水,进行 ELISA 检测,同时用 Sp2/0 细胞腹水作阴性对照。单抗特异性鉴定:分别将 CA16 培上清液、EV71 上清、胎牛血清、RD 细胞碎片等不同抗原包被 ELISA 板,并进行 ELISA 检测。

1.2.6 中和试验 微量中和试验参照卫生部《手足口病预防控制指南(2009 版)》。

2 结 果

2.1 氯化铯密度梯度纯化病毒 病毒纯化后,CA16 病毒带处于轻、重氯化铯梯度液之间,同时,结晶紫将病毒颗粒染成蓝色,在离心管中呈现蓝色病毒层。

2.2 透射电镜观察 CA16 病毒透射电镜显示,病毒颗粒呈 20 面体立体对称球形结构,直径大约 20~30 nm 之间,另外还有空心病毒颗粒。

2.3 单克隆抗体制备 建立了 2 株分泌抗 CA16 单抗的杂交瘤细胞系,分别命名为 Anti/CA16/05、Anti/CA16/10。

2.4 单抗特性分析 Anti/CA16/5 与 Ant/CA16/10 效价分别为 10^3 和 10^4 。两株单抗均为 IgG2a 亚型。两株单抗与 EV71、ECHO11 病毒均不产生交叉反应。微量中和试验表明,两株单抗的中和效价分别为 1:256、1:1 024。

3 讨 论

CA16 属于小核糖核酸病毒科,是引起手足口病的主要病原体,临床表现为手、足、口部疱疹等症状。大多研究认为 CA16 主要引起轻症感染,但是也有报道 CA16 患者中可出现严重的神经系统损伤^[2]。

目前对 EV71 中和线性表位报道较多^[3-4],部分抗 EV71 的单抗也被验证可用于临床检测和实验室分析等^[5],而 CA16 的抗原表位报道较少。此次研究在于纯化 CA16 病毒并制备单抗。氯化铯密度梯度离心后,在密度为 1.19 g/mL 与 1.45 g/mL 间出现病毒带,收获病毒带电镜观察显示,病毒颗粒呈 20 面体球形结构,与以往报道的 EV71 病毒颗粒形态相似^[6]。关于此次建立的纯化方法,在配制轻密度液时加入结晶紫,目的在于离心过程中病毒颗粒由最上层病毒浓缩液穿过轻密度梯度液时会被染成蓝色,离心结束后会在轻、重氯化铯梯度液之间形成蓝色带,这样便于回收病毒层。氯化铯密度梯度

纯化方法不能有效分离空心 and 实心病毒颗粒,而 Pele 等^[7]利用蔗糖密度梯度纯化可以分离这两种病毒颗粒,但用蔗糖作为离心介质时,由于蔗糖粘度系数高,因此离心力和离心时间较长。可根据不同的抗原需求选择离心介质。

Jingping 等^[8]通过合成 CA16 的 VP1 多肽发现 VP1 上存在 6 个中和线性表位。而此次研究利用 CA16 纯化产物免疫小鼠,并成功制备了 2 株效价较高并具中和活性的单抗。

综上所述,此次研究,建立了 CA16 病毒纯化方法,同时制备出中和活性单抗,这为治疗、病毒抗原诊断试剂开发提供原材料。本研究也存在不足,透射电镜观察显示,CA16 纯化产物中还存在高密度的杂质成分,可能是细胞成分,随后将进一步优化条件以提高病毒纯度。

参考文献

- [1] 杨朝辉,尹少甫,张宗久,等.柯萨奇病毒 A 组 16 型[J].中国疫苗和免疫,2009,15(1):72-77.
- [2] Wei Xu, Chun-feng Liu, Li Yan, et al. Distribution of enteroviruses in hospitalized children with hand, foot and mouth disease and relationship between pathogens and nervous system complications [J]. Virology Journal, 2012, 9(1): 1-9.
- [3] Damian Guang Wei Foo, Sylvie Alonso, Meng Chee Phoon, et al. Identification of neutralizing linear epitopes from the VP1 capsid protein of Enterovirus 71 using synthetic peptides[J]. Virus Research, 2007, 125(1): 61-68.
- [4] Xiao Fang Lim, Qiang Jia, Wei Xin Khong, et al. Antibody against Linear Neutralizing Epitope Effective for Prophylaxis of Enterovirus 71 Infection[J]. PLoS ONE, 2012, 7(1): e2975.
- [5] Li Xu, Kao-Jean Huang, Tzong-Shiann Ho, et al. Monoclonal Antibodies for Diagnosis of Enterovirus 71[J]. Monoclonal antibodies in immunodiagnosis and immunotherapy, 2013, 32(6): 386-394.
- [6] Xiangxi Wang, Wei Peng, Jingshan Ren, et al. A sensor-adaptor mechanism for enterovirus uncoating from structures of EV71 [J]. Nature structural and molecular biology, 2012, 19(4): 424-429.
- [7] Pele Chong, Meng-Shin Guo, Fion Hsiao-Yu Lin, et al. Immunological and Biochemical Characterization of Coxsackievirus A16 Viral Particles[J]. PLoS ONE, 2012, 7(11): e49973.
- [8] Jingping Shi, Xulin Huang, Qing wei Liu, et al. Identification of conserved neutralizing linear epitopes with the VP1 protein of coxsackievirus A16[J]. Vaccine, 2013, 31(17): 2130-2136.

(收稿日期:2015-02-18)

(上接第 1989 页)

- 题分析及控制对策[J].实用心脑血管病杂志,2011,19(2):329-330.
- [3] 张贤莉,吴小瑜,林群力,等.老年脑卒中患者医院感染目标性监测的分析[J].中华医院感染学杂志,2010,20(12):1704-1705.
 - [4] 覃兰斌.256 例脑卒中患者医院感染分析及对策[J].中华医院感染学杂志,2010,20(24):3902-3904.
 - [5] 石学敏.脑血管病与中风单元[J].天津中医药,2005,22(1):1-3.
 - [6] 王麟鹏,刘慧琳.中医卒中单元的建立及初步观察结果[J].中西医结合心脑血管病杂志,2004,11(2):634-635.
 - [7] 江浩清,江文婷,杨晓蓓.卒中单元配合针刺对脑卒中治疗的成本效果研究[J].中国康复理论与实践,2010,16(7):645-647.

- [8] 王法德,聂俊英,张爱梅,等.创建中国特色的卒中单元[J].中国中医急症,2005,14(9):880-881.
- [9] 吴静.脑卒中患者医院感染临床现状及病原菌特点分析[J].中华医院感染学杂志,2013,9(23):2054-2056.
- [10] 岳伟,张雅静,李效兰.脑卒中患者医院感染的病原学分析[J].中华医院感染学杂志,2011,14(21):3059-3060.
- [11] 章泽豹.脑卒中住院患者医院感染部位分布与病原菌监测[J].中华医院感染学杂志,2010,20(7):945.
- [12] 吴小明,张美珍,姜新华.脑卒中患者医院感染病原学及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2014,24(5):1104-1106.

(收稿日期:2015-02-20)