

抗甲型流感病毒 H1N1 亚型单克隆抗体制备及应用*

吴峰^{1,2}, 吕琦³, 毛茅¹, 岑瑜², 马岚²

(1. 河南大学 特种功能材料重点实验室, 河南 开封 475004;

2. 清华大学 深圳研究生院 生命与健康学部, 广东 深圳 518055;

3. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650091)

摘要: 采用快速免疫佐剂免疫小鼠, 通过杂交瘤技术获得针对甲型流感病毒 H1N1 亚型的特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株. 共获得 7 株能稳定分泌特异性抗体的细胞株. 经腹水诱生和 Protein A 亲和层析纯化的抗体用于标记荧光量子点, 并基于双抗体夹心免疫层析检测用于对甲型流感病毒 H1N1 亚型的检测. 针对甲型流感病毒 H1N1 亚型, 检出限为 3.06×10^3 TCID₅₀/L, 具有较高的灵敏度, 所制备的抗体在检测中具有良好的特异性和准确性, 可用于对甲型流感病毒 H1N1 亚型的现场快速检测.

关键词: 甲型流感病毒; H1N1; 单克隆抗体; 免疫检测

中图分类号: R 446.61 **文献标志码:** A **文章编号:** 0258-7971(2017) S1-0106-05

流感是由流感病毒引起的急性病毒性感染, 流感每年在全球范围内流行, 是严重的公共卫生问题. 根据 WHO 统计每年流感造成约 300 万至 500 万例严重疾病和约 25 万至 50 万人死亡^[1]. 流感病毒分为甲型、乙型和丙型, 甲型流感病毒常以流行形式出现, 曾多次引起世界性大流行. 乙型流感病毒引起的流行性感冒, 不会引起世界性流感大流行, 可引起局部爆发, 发病率高死亡率低. 丙型流感病毒一般不引起流行, 主要以散在形式出现. 甲型流感病毒容易发生变异, 根据其表面抗原的不同分为不同的亚型, 根据红细胞凝聚素抗原的不同分为 16 个亚型, 根据神经氨酸酶的不同分为 9 个亚型^[2].

自 2009 年甲型 H1N1 流感病毒爆发以来, 甲型 H1N1 已成为全球包括我国的主要流行病毒株, 是 WHO、FDA、OIE 等国际组织联合倡导全球共同防控的重大疫病^[3]. 甲型 H1N1 流感感染人后易发展为重症病例, 对人类健康危害极大, 因此甲型 H1N1 流感的准确诊断对于治疗和预防极其重

要. 对于甲型流感病毒不同亚型的检测, 目前已有多种方法, 基于检测标靶物的不同, 这些方法又分为病毒分离检测, 核酸检测, 抗原检测, 抗体检测等^[3-12]. 以上方法大部分对操作要求严格, 需要专业仪器与设备及专业人员操作, 检测比较耗时. 单克隆抗体因其良好的特异性, 被广泛用于各种病原体的检测, 同时也被用于流感病毒的分型检测和诊断^[12-13]; 基于单克隆抗体建立的检测方法能用于对病原体的快速准确检测, 并且操作简单, 检测成本低^[14].

为获得针对甲型 H1N1 流感病毒亚型的特异性抗体, 本研究采用快速免疫佐剂免疫方法和杂交瘤技术, 制备了抗甲型 H1N1 流感病毒特异性抗体. 并将所获得抗体基于荧光量子点标记技术和免疫层析技术开发用于甲型 H1N1 流感病毒检测的免疫层析试纸.

1 材料和方法

1.1 材料

* 收稿日期: 2016-12-09

基金项目: 国家高技术研究发展计划“863 计划”项目(2013AA032204); 广东省科技计划项目(2012B031500003); 深圳市战略性新兴产业发展专项资金(JSGG20140716144254155).

作者简介: 吴峰(1984-), 男, 四川人, 博士生, 从事纳米材料与免疫检测研究

通信作者: 马岚(1965-), 女, 云南人, 博士, 研究员, 主要从事细胞生物学及免疫学方面的研究. E-mail: malan@sz.tsinghua.edu.cn.

1.1.1 主要试剂 甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗, 购自华兰生物疫苗有限公司; Balb/c 小鼠, 购自广东省医学实验动物中心; SP2/0 骨髓瘤细胞株, 由本实验室保存种; Quick Antibody-Mouse 3W 佐剂, Clone Easy 培养基, 购自北京博奥龙免疫技术有限公司; DMEM 高糖培养基, 胎牛血清, 购自 Gibco 公司; 荧光量子点, 由本实验室合成; HAT, HT, PEG 1500, HRP 标记羊抗鼠 IgG, 牛血清蛋白 (BSA), 2-(N-吗啉基) 乙磺酸 (MES), 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基) 碳二亚胺 (EDC), N-羟基丁二酰亚胺 (NHS), 购于 Sigma 公司。硝酸纤维素膜, 玻璃纤维膜, 吸水纸, 购于 Millipore 公司。其他化学试剂均为分析纯以上级别。

1.1.2 主要设备 二氧化碳培养箱, 酶标仪, (Thermo 公司); Milli-Q 超纯水仪 (Millipore 公司); 倒置显微镜 (尼康公司); AKTA purifier (GE 公司); Biodot 喷膜仪, 裁切仪 (美国 Biodot 公司)。

1.2 方法

1.2.1 Balb/c 小鼠免疫及检测 将甲型 H1N1 流感病毒裂解疫苗用生理盐水稀释后与 Quick Antibody-Mouse 3W 佐剂混合, 后小腿肌肉注射免疫 2 只 Balb/c 小鼠, 第 14 天按同样方式加强免疫。第 21 天自小鼠尾部取血, 分离血清后采用间接 ELISA 法检测血清中抗体效价及对 H1N1 抗原的特异性。在细胞融合前 3 天, 进行脾脏加强免疫。

1.2.2 单克隆抗体细胞株的建立及抗体制备 参考文献 [15] 的方法, 将 Balb/c 小鼠脾脏细胞与对数生长期的 SP2/0 骨髓瘤细胞按 1:9 比例混合后在 50% 的 PEG 1500 作用下进行融合。融合后细胞于含 10% Clone Easy 培养基的 HAT 培养基培养, 经 HAT 和 HT 培养基筛选培养后, 采用间接 ELISA 法检测细胞培养上清中的抗体特异性。将阳性细胞通过有限稀释法进行单克隆化培养, 获得能稳定分泌抗体的单克隆细胞株。采用体内诱生法制备腹水 [16], 腹水经 Protein A 亲和层析纯化得到纯化的单克隆抗体, 并于 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液中透析后, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。抗体分装后于 -20 °C 冻存。

1.2.3 间接 ELISA 方法检测 用 0.05 mol/L pH=9.6 碳酸盐缓冲液稀释抗原后包被酶标板, 100 μL/孔, 4 °C 过夜。用 PBST 洗板 4 次后加入 200 μL 含 1% BSA 的封闭液于 37 °C 封闭 2 h。PBST 洗板 4 次。加入 100 μL 待检测的血清稀释液、细胞培养上清

液或者抗体稀释液, 37 °C 恒温箱温育 1 h。PBST 洗板 4 次。加入 100 μL HRP 标记的羊抗鼠 IgG, 37 °C 恒温箱温育 1 h。PBST 洗板 4 次, 然后经 H₂O₂-OPD 底物反应液显色 10 min, 2 mol/L 硫酸终止显色后, 用酶标仪测定 492 nm 吸光值。

1.2.4 甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸的制备 采用 EDC 偶联标记方法将甲型 H1N1 流感病毒单克隆抗体与荧光量子点偶联标记后, 与硝酸纤维素膜上包被的抗甲型 H1N1 流感病毒单克隆抗体配对, 通过双抗体夹心法原理检测甲型 H1N1 流感病毒 [14]。具体方法为: 水溶性量子点用 0.1 mol/L MES 溶液洗涤离心重悬后加入 5 mmol/L EDC 和 2 mmol/L NHS 活化反应 30 min, 活化后加入甲型 H1N1 流感病毒单克隆抗体, 37 °C 反应 3 h, 抗体氨基与量子点羧基共价结合形成稳定的肽键; 剩余的活化位点通过加入 5% BSA 封闭, 37 °C 反应 30 min; 反应完后通过离心纯化, 沉淀用 0.02 mol/L PBS 溶液重悬, 4 °C 保存。包被用抗甲型 H1N1 流感病毒单克隆抗体用 0.02 mol/L PBS 缓冲液配制为 2 mg/mL, 羊抗鼠 IgG 配制为 1 mg/mL, 然后用 XYZ3050 喷膜仪喷涂在硝酸纤维素膜上作为检测线和质控线, 37 °C 烘箱干燥 4 h 得到包被膜。将包被膜与玻璃纤维垫、吸水纸、PVC 背板组装后, 裁切为 3.5 mm 宽, 得到检测用快速检测试纸。检测时将 2 μL 量子点标记抗体与 60 μL 样品混合后滴加到上步得到的快速检测试纸的加样端, 10 min 后在 365 nm 紫外灯下观察结果。当样品中存在甲型 H1N1 流感病毒时, 病毒与量子点标记抗体结合后, 层析到检测线时会被包被的抗甲型 H1N1 流感病毒抗体捕获, 从而在检测线位置聚集。没被捕获的量子点标记抗体层析到质控线位置时会被包被的羊抗鼠 IgG 捕获, 从而在质控线位置聚集。质控线和检测线捕获的量子点在 365 nm 紫外光照射下会发出明亮的红色荧光条带。

1.2.5 甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸性能测试 为了评估甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸的性能, 我们分别对其检出限、特异性以及重复性进行了测试。检测标准为甲/乙型流感病毒抗原检测试剂国家参考品和禽流感病毒 H5、H9 亚型血凝抑制试验抗原。

2 结果与分析

2.1 单克隆抗体细胞株的建立及抗体制备 用

Quick Antibody-Mouse 3W 佐剂免疫 2 只 Balb/c 小鼠后,第 21 天自小鼠尾部取血,分离血清后用间接 ELISA 方法检测血清抗体滴度均在 10^{-6} ,免疫效果较好.取脾脏细胞与杂交瘤细胞融合后,接种 3 块 96 孔细胞培养板,融合率为 88.2%,经间接 ELISA 方法检测细胞培养上清,能分泌抗体的阳性孔有 133 孔,阳性率为 46.2%.经间接 ELISA 方法检测阳性孔对甲型流感亚型 H1、H3、H5、H7、H9 亚型的特异性,其中特异针对 H1 亚型的阳性孔有 26 孔,其余均存在不同程度的交叉反应.经有限稀释单克隆化培养后,获得 7 株能稳定分泌抗体的细胞株.将 7 株细胞分别制备腹水,经 Protein A 纯化得到纯化的单克隆抗体,经间接 ELISA 方法检测抗体滴度在 10^{-5} 以上,结果见表 1.与甲型流感亚型 H1、H3、H5、H7、H9 亚型无交叉反应.

2.2 甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸的制备 将 7 株抗甲型 H1N1 流感病毒单克隆抗体分别标记量子点和包被硝酸纤维素膜后,相互搭配配对检测甲型 H1N1 流感病毒,其中抗体株 1C12b 标记量子点与抗体株 2E11a 包被硝酸纤维素膜搭配检测结果最好.将其制备成快速检测试纸后,分别对其检出限、交叉反应、重复性和准确性测定进行测试.

2.2.1 最低检出限测定 将国家参考品中的最低检出限样品 S1,甲型 H1N1 (病毒滴度 9.8×10^5 TCID₅₀/L),用 0.02 mol/L PBS 缓冲液进行 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560 倍稀释后检测.检测结果见表 2.检测试纸结果见图 1.在 365 nm 紫外灯照射下,样品在 1:320 倍稀释后,试纸检测线仍然可见荧光条

表 1 腹水纯化单抗滴度检测 (OD₄₉₂)

Tab.1 Antibody titer detection (OD₄₉₂)

抗体	1:1000	1:10000	1:100000	1:1000000	1:10000000	阴性对照
1B3a	3.537 53	0.966 29	0.180 94	0.068 83	0.055 77	0.060 07
1C12b	3.940 11	1.391 29	0.364 34	0.096 66	0.053 96	0.055 61
2A5a	3.812 42	1.383 39	0.219 42	0.067 56	0.054 17	0.057 02
2E6b	4.142 09	1.685 12	0.322 71	0.093 76	0.055 11	0.053 25
2E11a	3.629 64	1.392 83	0.261 86	0.074 93	0.054 64	0.059 47
2F8c	3.770 81	1.47 77	0.258 85	0.078 75	0.060 95	0.056 51
3D4b	2.296 98	0.923 76	0.185 03	0.066 91	0.055 65	0.060 19

表 2 甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸最低检出限测定

Tab.2 Limit of detection of H1N1 fluorescence lateral flow immunoassay strips

稀释倍数	结果
PBS	-
1:2560	-
1:1280	-
1:640	-
1:320	+
1:160	+
1:80	+
1:40	+
1:20	+
1:10	+

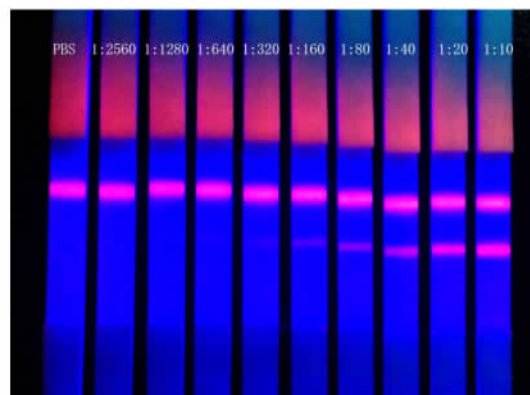


图 1 365 nm 紫外灯照射下检测最低检出限样品结果

Fig.1 Images of limit detection of tested immunoassay strips under 365nm ultraviolet light

表 3 甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸交叉反应测定

Tab.3 Cross-reactivity tests of H1N1 fluorescence lateral flow immunoassay strips

编号	样品	结果
1	甲型 H3N2	-
2	甲型 H5N1	-
3	甲型 H7N9	-
4	甲型 H9N2	-
5	乙型 Victoria	-
6	乙型 Yamagata	-
7	麻疹病毒	-
8	腮腺炎病毒	-
9	风疹病毒	-
10	水痘-带状疱疹病毒	-
11	金黄色葡萄球菌	-
12	铜绿假单胞菌	-

带,因此甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸的检出限为 3.06×10^3 TCID₅₀/L.

2.2.2 交叉反应的测定 用甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸检测甲型流感病毒不同亚型、乙型流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、水痘-带状疱疹病毒、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌,观察是否存在交叉反应,检测结果见表 3. 检测结果表明甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸与所测样品没有交叉反应,具有良好的特异性.

2.2.3 重复性和准确性测定 检测 H1N1 阳性样品,同一样品用甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸测试 20 次,试纸检测线和质控线显色均匀,检测结果无差异.检测 60 份鼻咽拭子样本,与通用甲型 RT-PCR 检测结果对照,检测结果见表 4. 30 份鼻咽拭子样本经通用甲型 RT-PCR 检测结果为阳性,经甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸测试 26 份为阳性,另外 4 份样品经鉴定为 H3N2 亚型.30 份阴性样品用两种方法检测结果无差异.

3 结 论

采用快速免疫佐剂和甲型 H1N1 流感病毒裂

解疫苗免疫小鼠,并通过杂交瘤技术获得能分泌抗体的阳性细胞株,经特异性检测,其中大部分与甲型流感病毒其它亚型存在交叉反应.经特异性筛选后获得 7 株能稳定分泌特异性抗体的针对甲型流感病毒 H1N1 亚型的杂交瘤细胞株.经腹水诱生和 Protein A 亲和层析纯化的抗体用于标记荧光量子点,并基于双抗体夹心免疫层析检测法用于对甲型流感病毒 H1N1 亚型的检测.针对甲型流感病毒 H1N1 亚型,检出限为 3.06×10^3 TCID₅₀/L,具有较高的灵敏度.所制备抗体用于免疫层析检测具有良好的特异性和准确性,可用于对甲型流感病毒 H1N1 亚型的现场快速检测.

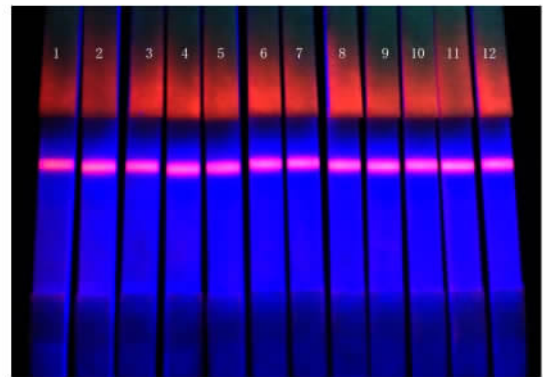


图 2 365 nm 紫外灯照射下甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸交叉反应测定结果

Fig.2 Images of cross-reactivity tests of immunoassay strips under 365 nm ultraviolet light

表 4 甲型 H1N1 流感病毒荧光量子点快速检测试纸样品检测结果

Tab.4 Sample tests using H1N1 fluorescence lateral flow immunoassay strips

样品	样品数	试纸检测结果(P/N)	RT-PCR 检测结果(P/N)
H1N1 阳性样品	26	26/0	26/0
H3N2 阳性样品	4	0/4	4/0
阴性样品	30	0/30	0/30

参考文献:

- [1] The World Health Organization. Influenza (seasonal) fact sheet 2014 [Z]. <http://www.who.int/mediacentre/factshe->

- ets/fs211/en/.
- [2] HINSHAW V S ,AIR G M ,GIBBS A J ,et al. Antigenic and genetic - characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza - a viruses from gulls [J]. *J Virol* , 1982 ,42: 865-872.
- [3] 秦智锋 ,曾少灵 ,陈书琨 ,等. 新型甲型 H1N1(2009) 流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法的建立与评价 [C]. 中国畜牧兽医学会畜牧兽医生物技术学会暨中国免疫学会兽医免疫分会第九次学术研讨会 , 2012.
- [4] 夏骏 ,刘芳 ,王华林. 流行性感冒病毒的检测及分型方法 [J]. *国际检验医学杂志* , 2006 ,27: 534-536.
- [5] CHEN H T ,ZHANG J ,SUN D H ,et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of H9 avian influenza virus [J]. *Journal of Virological Methods* , 2008 ,151: 200-203.
- [6] ALBERINI I ,DEL TORDELLO E ,FASOLO A ,et al. Pseudoparticle neutralization is a reliable assay to measure immunity and cross-reactivity to H5N1 influenza viruses [J]. *Vaccine* , 2009 ,27: 5 998-6 003.
- [7] MOORE C ,TELLES J N ,CORDEEN S ,et al. Development and validation of a commercial real-time NASBA assay for the rapid confirmation of influenza A H5N1 virus in clinical samples [J]. *Journal of Virological Methods* , 2010 ,170: 173-176.
- [8] YANG S Y ,CHIEH J J ,WANG W C ,et al. Ultra-highly sensitive and wash-free bio-detection of H5N1 virus by immunomagnetic reduction assays [J]. *Journal of Virological Methods* , 2008 ,153: 250-252.
- [9] XIE Z ,PANG Y S ,LIU J ,et al. A multiplex RT-PCR for detection of type A influenza virus and differentiation of avian H5 ,H7 ,and H9 hemagglutinin subtypes [J]. *Molecular and Cellular Probes* , 2006 ,20: 245-9.
- [10] PAYUNGPOM S ,CHUTINIMITKUL S ,CHASINGH A ,et al. Single step multiplex real-time RT-PCR for H5N1 influenza A virus detection [J]. *Journal of Virological Methods* , 2006(131) : 143-147.
- [11] 王大燕 ,高荣保 ,李晓丹 ,等. 甲型 H1N1 流感病毒快速核酸检测技术的建立 [J]. *病毒学报* , 2009: 1-3.
- [12] 王云龙 ,周春峰 ,孙新城 ,等. 甲型 H1N1 流感病毒双抗体夹心 ELISA 检测方法的初步建立 [J]. *动物医学进展* , 2011 ,32: 37-41.
- [13] 郭春艳 ,李慧瑾 ,刘杨 ,等. H1 亚型流感病毒 HA 蛋白单克隆抗体的制备及部分特性鉴定 [J]. *细胞与分子免疫学杂志* , 2012 ,28: 177-180.
- [14] FENG W ,HANG Y ,ZHOU C ,et al. Multiplexed detection of influenza A virus subtype H5 and H9 via quantum dot-based immunoassay [J]. *Biosensors & Bioelectronics* , 2016 ,77: 464-470.
- [15] 吕琦 ,吴峰 ,林洁 ,等. 烟草花叶病毒单克隆抗体的制备和鉴定 [J]. *云南大学学报: 自然科学版* , 2013: 93-98.
- [16] 张龙翔 ,张庭芳 ,李令媛. *生化实验方法和技术* [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社 , 1997.

Preparation and application of monoclonal antibody against influenza A virus H1N1 subtype

FENG Wu^{1,2} , LYU Qi³ , MAO Mao¹ , YU Cen² , MA Lan²

(1. Key Laboratory for Special Functional Materials , Henan University , Kaifeng 475004 , China;

2. Division of Life Science & Health , Graduate School at Shenzhen , Tsinghua University , Shenzhen 518055 , China;

3. School of Life Sciences , Yunnan University , Kunming 650091 , China)

Abstract: Influenza A virus H1N1 subtype vaccine was used as immunogen together with Quick Antibody-Mouse 3W adjuvant for immunization. After hybridoma screening and specific screening , a total of 7 hybridoma cell lines secreting specific monoclonal antibodies against influenza A virus H1N1 subtype were obtained. After ascites induced and protein A affinity chromatography purification , a immunoassay strip was established with the antibodies through the integration of quantum dots labeling and sandwich lateral flow immunoassay. The limit of detection of this immunoassay strips for influenza A virus H1N1 subtype was 3.06×10^3 TCID₅₀ /L. It has high sensitivity , specificity and accuracy which can be used for rapid detection of influenza A virus H1N1 subtype.

Key words: influenza A virus; H1N1; monoclonal antibody; immunoassay