

登革病毒血清型 2 E 蛋白Ⅲ区单克隆抗体的制备及其诊断特异性研究

段志良^{1,2}, 周湧超², 杨澜², 陈新宇¹, 文金生², 金胜威^{1,3}

(1. 温州医科大学附属第二医院 检验科, 温州 325027; 2. 温州医科大学 基础医学院虫媒病毒研究所, 温州 325000;

3. 温州医科大学附属第二医院 麻醉与重症医学科, 温州 325027)

摘要: 本研究旨在制备抗登革病毒(dengue virus, DENV)血清型 2 (DENV2)E 蛋白Ⅲ区(envelope protein domain Ⅲ, EDⅢ)单克隆抗体(简称单抗)并研究其诊断特异性。合成编码 DENV2-EDⅢ的基因并将其克隆入原核表达质粒 pET21a; 将重组质粒转入大肠埃希菌菌株 BL21; 用重组表达的 EDⅢ免疫小鼠; 将小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 融合; 将可产生识别抗 EDⅢ单抗的杂交瘤细胞注入小鼠腹腔; 采用蛋白 G 亲和层析法从腹水中纯化单抗; 采用间接 ELISA 和间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay, IFA)评估所制备的单抗识别 DENV 血清型 1~4 (DENV1~4)的能力。本研究成功表达了 DENV2-EDⅢ, 并制备出 3 株杂交瘤细胞, 杂交瘤细胞所分泌的小鼠源性单抗既可识别 DENV2, 又可交叉识别 DENV1、DENV3 和 DENV4。

关键词: 登革病毒; E 蛋白Ⅲ区; 单克隆抗体

中图分类号: R392.33

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)02-0120-06

登革病毒(dengue virus, DENV)属于黄病毒科黄病毒属单正链 RNA 病毒^[1-3]。DENV 有 4 个血清型(DENV1~4), 均可引起轻度的登革热以及致死性的登革出血热或登革休克综合征。有报道显示, 每年约有 3.9 亿 DENV 感染者, 其中 9 600 万为有临床症状的登革热病例^[4]。近年来, 杭州、宁波等地频发 DENV 疫情, 提示此类虫媒病毒对浙江省的威胁逐渐加大^[1,5]。频繁的人员流动及不断涌现的 DENV 疫情使浙江省正面临巨大的防控压力。

在 DENV 包膜上有 2 种病毒蛋白(prM/M 和 E 蛋白), 其中 E 蛋白是中和抗体的靶抗原。E 蛋白包括 I、II、III 3 个结构域, 其中 E 蛋白Ⅲ区(envelope protein domain Ⅲ, EDⅢ)主要负责与宿主细胞表面受体结合, 介导病毒感染。有大量研究表明, 抗 EDⅢ单克隆抗体(简称单抗)除发挥中和作用外, 还与抗体依赖性增强作用和不同血清型间

交叉反应密切相关^[6-8]。本研究拟基于 DENV2-EDⅢ制备小鼠源性单抗并评估其交叉识别其他 DENV 血清型的能力, 以期为 DENV 感染的诊断或防治提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料 原核表达质粒 pET21a、大肠埃希菌菌株 DH5 α 和 BL21 由温州医科大学基础医学院虫媒病毒研究所常规保存。DENV1 (夏威夷株)、DENV2 (NGC 株)、DENV3 (H87 株)、DENV4 (H241 株)从中山大学中山医学院引进。异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)、限制性核酸内切酶 EcoR I 和 Xho I 购自 Thermo Scientific 公司。T4 连接酶购自 New England Biolabs 公司。Ni-NTA 亲和层析柱购自 Qia-gen 公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的小鼠抗组氨酸(histidine, His)单抗、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)单组分显色液、FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 单抗、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 单抗、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 重链单抗购自杭州联科生物科技股份有限公司。蛋白 G 亲和层析柱购自 Phygene 公司。弗氏完全佐剂、弗氏不完全

收稿日期: 2018-09-17

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY17C010004); 国家自然科学基金(81501363; 31870159); 温州市科技计划项目(Y20150093)

作者简介: 段志良(1976—), 女, 硕士生, 副主任技师, 主要从事虫媒病毒感染与宿主适应性免疫研究

通信作者: 金胜威(E-mail: jinshengwei69@163.com)

佐剂、次黄嘌呤氨基喋呤胸腺嘧啶(hypoxanthine aminotrexate thymine, HAT)、琼脂糖凝胶 DNA 纯化回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自 Sigma 公司。RPMI 1640 培养液、FCS 购自 Gibco 公司。聚乙二醇 4000(polyethylene glycol 4000, PEG-4000)、降植烷、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)购自北京索莱宝生物科技有限公司。小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 和细胞株 Vero 购自中国科学院上海分院细胞库。5~6 周龄 BALB/c 雌性小鼠购于南京大学模式动物研究所。

1.2 方法

1.2.1 编码 DENV2-EDⅢ基因的合成及重组质粒的筛选 委托苏州金维智公司合成 DENV2(NGC 株)-EDⅢ的基因序列(经大肠埃希菌密码子优化),序列两端含限制性核酸内切酶 EcoR I 和 Xho I。对合成的基因进行双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后纯化、回收。对质粒 pET21a 进行双酶切,经琼脂糖凝胶电泳后纯化、回收。将纯化、回收的目的基因和质粒 pET21a 在 T4 连接酶作用后转入大肠埃希菌菌株 DH5 α 。通过提取质粒和双酶切琼脂糖凝胶电泳筛选阳性重组质粒。

1.2.2 DENV2-EDⅢ的表达及纯化 将阳性重组质粒转入大肠埃希菌菌株 BL21 并挑单克隆培养。(1)确定最适 IPTG 诱导浓度:经过 2 次扩大培养含阳性重组质粒的大肠埃希菌菌株 BL21(接菌比例为 1:100),得到浑浊菌液。将菌液分组,分别加不同浓度 IPTG,37℃震荡培养 8 h,采用 SDS-PAGE 确定最佳 IPTG 诱导浓度。最后通过考马斯亮蓝染色法观察蛋白条带。(2)确定 DENV2-EDⅢ存在的部位:将目的菌液于室温 11 000 $\times g$ 离心 10 min,用 10 mL 超声缓冲液重悬细菌沉淀,经超声破碎仪破碎后,室温 11 000 $\times g$ 离心 10 min。收集上清,用 PBS 重悬沉淀。采用 SDS-PAGE 确定 DENV2-EDⅢ是否存在于包涵体内。(3)纯化 DENV2-EDⅢ:用最佳 IPTG 诱导时间和浓度扩大培养大肠埃希菌菌株 BL21,以 11 000 $\times g$ 室温离心 10 min,收集细菌沉淀。超声破碎细菌,用 6 mmol/L 盐酸胍 4℃过夜重悬超声破碎产物,最后离心重悬产物。将上清与 Ni-NTA 亲和层析柱在冰上结合 1 h,后使上清缓慢流过 Ni 柱。然后根据低浓度洗脱液洗脱杂蛋白、高浓度洗脱液洗脱目的蛋白的原理依次收集不同浓度的洗脱液。采用 SDS-PAGE 初步检测是否存在与目的蛋白大小相

同的蛋白条带,且通过 Western blotting 进一步明确 DENV2-EDⅢ的表达情况。其中,聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上加小鼠抗 His 单抗(1:2 000,一抗),加 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 单抗(1:5 000,二抗)。

1.2.3 DENV2-EDⅢ免疫小鼠后血清抗 DENV2-EDⅢ单抗效价的测定 将纯化的 DENV2-EDⅢ免疫 5~6 周龄 BALB/c 小鼠(50 μ g/只)。首次免疫采用弗氏完全佐剂乳化 DENV2-EDⅢ。随后,每隔 1 周,用弗氏不完全佐剂乳化等量蛋白并免疫小鼠 2 次。末次免疫 1 周后,断尾采血。采用间接 ELISA 测定血清中抗 DENV2-EDⅢ单抗效价,其中用 DENV2-EDⅢ(50 ng/孔)包被 96 孔板 4℃过夜;首列每孔血清稀释度为 1:3,之后以 2 倍比稀释血清为一抗,37℃孵育 1 h;以 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 单抗(5%脱脂牛奶稀释,1:5 000)作为二抗,37℃孵育 1 h;采用酶标仪检测光密度[D(450 nm)]。

1.2.4 小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 的融合 根据上述间接 ELISA 测定的 DENV2-EDⅢ蛋白免疫小鼠血清抗体效价,选效价高的小鼠制备脾细胞悬液。将脾细胞悬液与小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0 按细胞数 5:1 的比例均匀混合。加 1 mL 50%PEG-4000/RPMI 1640 培养液,37℃水浴作用 90 s。之后,加入预温的 RPMI 1640 培养液逐渐终止 PEG-4000 的融合作用。将所有细胞铺至 3~5 d 前已铺有小鼠饲养细胞的 96 孔细胞培养板进行培养。加 200 μ L/孔 HAT 选择培养液培养 2 d 左右。采用有限梯度稀释法将细胞稀释至每孔 0.5 个细胞,继续用 HAT 选择培养液培养 1 周左右。待其生长成团,取细胞上清通过以下 2 种方法检测分泌特异性抗 DENV2-EDⅢ单抗的水平,从而筛选出阳性杂交瘤细胞系。(1)间接 ELISA:一抗为杂交瘤细胞上清,做双复孔,其余步骤同上。(2)间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay, IFA):用 DENV2 感染[感染复数(multiplicity of infection, MOI)=1]事先铺到细胞爬片上的细胞株 Vero,37℃1.5 h。弃病毒液,加含血清和双抗的 RPMI 1640 培养液继续培养 24 h 后进行固定、破膜、封闭。加杂交瘤细胞上清(200 μ L,一抗)室温孵育 1 h,避光加 FITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 单抗(1:5 000,二抗)室温孵育 1 h,最后加 1 μ g/mL DAPI 溶液室温作用 4 min。

1.2.5 腹水型单抗的制备及纯化 在每只 BALB/c 小鼠腹腔内注射 0.5 mL 降植烷, 5 d 后将 1×10^6 个阳性杂交瘤细胞注入腹腔内。待小鼠腹腔充分隆起膨大后(7~10 d), 乙醚麻醉处死小鼠, 抽取腹水。以 4°C $11\,000 \times g$ 离心腹水 10 min, 将上清液用结合缓冲液(0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L Na_2HPO_4 , pH 7.0)稀释 5~10 倍, 用蛋白 G 亲和层析柱结合腹水中的 IgG。之后, 依次使用洗脱缓冲液(0.15 mol/L NaCl, 20 mmol/L Na_2HPO_4 , pH 7.0)和洗脱缓冲液(0.1 mol/L 甘氨酸, pH 3.0)洗去杂蛋白和收集目的蛋白。在目的蛋白收集液中加适量中和液(1 mol/L Tris-HCl, pH 8.5)中和收集液。采用 SDS-PAGE 和 Western blotting 验证单抗。

1.2.6 DENV2-ED III 特异性小鼠单抗对不同 DENV 血清型的检测 DENV1~4 (MOI=1) 分别于 37°C 感染细胞株 Vero 1.5 h, 弃病毒液后培养 24 h。采用 IFA 检测所制备的单抗识别 DENV 的能力。将单抗(一抗)用 5% FCS 稀释至 10 ng/ μL , 加入细胞, 其余操作同上。最后镜下观察, 根据荧光强度判断所制备的单抗识别 DENV2 及其他 DENV 血清型的能力。

2 结果

2.1 DENV2-ED III 的表达鉴定 IPTG 诱导含有重组质粒 pET21a-DENV2-ED III 的 BL21 菌液, 超声破碎细菌细胞, 分别收集沉淀(PBS 重悬)和上清用于 SDS-PAGE 和 Western blotting 检测(图 1A、图 1B)。目的蛋白主要存在于包涵体内。采用 20、30、100 和 200 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱 DENV2-ED III 可得到较纯、浓度较高的目的蛋白, 100 mmol/L 咪唑洗脱液效果最佳(图 1C)。

2.2 DENV2-ED III 免疫血清中抗体效价测定 采集 5 只未免疫小鼠和 5 只 DENV2-ED III 免疫小鼠的血清, 采用间接 ELISA 测定血清中抗 DENV2-ED III 抗体的效价。免疫小鼠血清中抗 DENV2-ED III 抗体 D(450 nm)显著高于未免疫小鼠, 其 D(450 nm)随血清稀释度的增加而缓慢降低。未免疫血清稀释后其 D(450 nm)无明显变化。免疫小鼠血清的平均抗体效价为 1:40 960。(图 2)

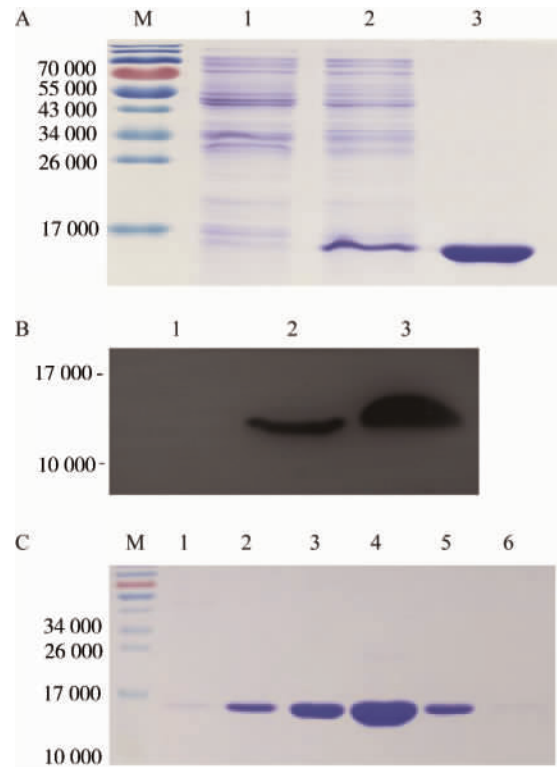


图 1 DENV2-ED III 的 SDS-PAGE 和 Western blotting 鉴定
注: A. M 为核酸相对分子质量标准, 1 为超声上清, 2 为超声沉淀, 3 为纯化的 DENV2-ED III; B. 1 为超声上清, 2 为超声沉淀, 3 为纯化的 DENV2-ED III; C. M 为核酸相对分子质量标准, 1~6 分别为 10、20、30、100、200 和 500 mmol/L 咪唑洗脱液

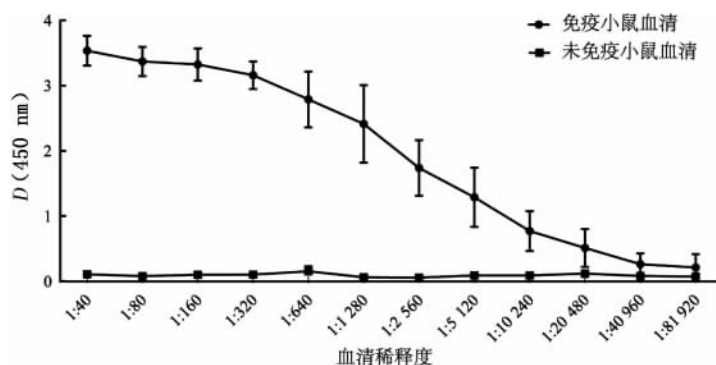


图 2 DENV2-ED III 免疫和未免疫小鼠血清中特异性抗体效价的测定

2.3 阳性杂交瘤细胞的鉴定 经 HAT 选择培养液培养后存活下来的细胞是融合成功的细胞,待其生长成团后取上清,采用 IFA 检测 DENV2-EDⅢ特异性抗体。在细胞株 Vero 中分别加入 DENV2-EDⅢ 免疫血清和不同孔杂交瘤细胞株上清,结果未被感染的细胞无绿色荧光(图 3A~图 3D)。而

DENV2 感染瘤细胞株 Vero 后再加不同血清,发现加 7 号、11 号、17 号杂交瘤细胞株上清和免疫血清的瘤细胞株 Vero 在镜下可观察到绿色荧光(图 3E~图 3H)。说明在 7 号、11 号、17 号杂交瘤细胞株上清中存在 DENV2-EDⅢ 特异性抗体,该杂交瘤细胞为阳性细胞,可用于后续生产单抗。

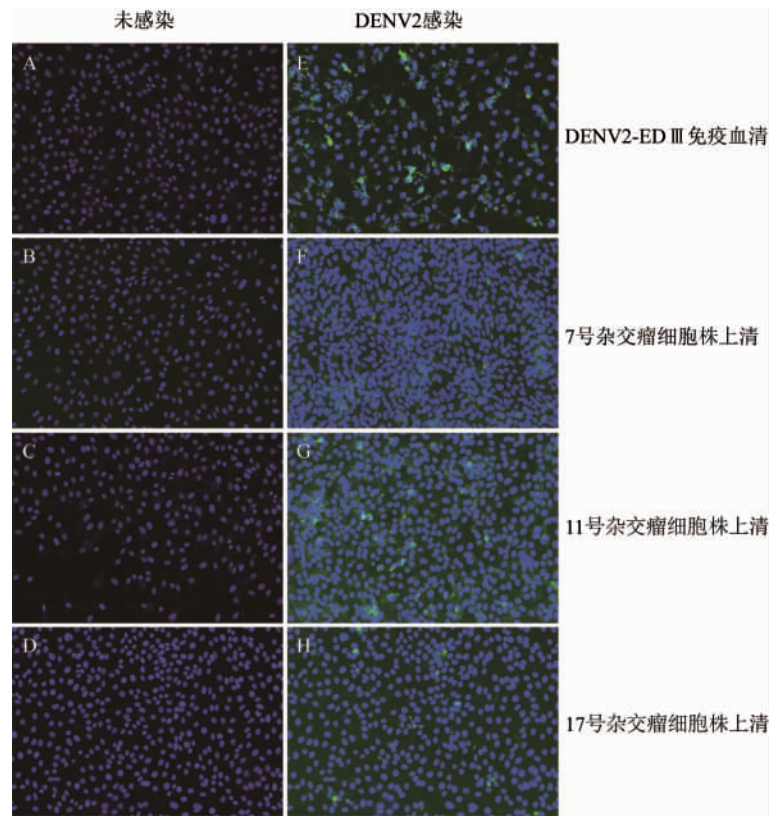


图 3 IFA 评估 DENV2-EDⅢ 免疫血清及杂交瘤细胞株上清中抗体识别 DENV2 的能力

2.4 所制备的单抗识别 DENV 血清型能力的鉴定 采用 IFA 评估 3 株单抗用于检测 DENV2 及其他 DENV 血清型感染的能力(图 4)。将 DENV2-EDⅢ 免疫血清加入 DENV1~4 感染的细胞,均可观察到绿色荧光。说明 DENV2-EDⅢ 免疫诱导的单抗可交叉识别其他 3 种 DENV 血清型。7 号、11 号、17 号单抗用于检测 DENV1~4 感染的细胞后也均出现了绿色荧光。说明 3 株单抗既能识别 DENV2,也能交叉识别 DENV1、DENV3 和 DENV4。不管加免疫血清还是加所制备的单抗,未感染的细胞中均未出现绿色荧光。说明不管是免疫血清还是所制备的单抗其识别 DENV 是特异性的。

3 讨论

登革热是一种由 DENV 引起的由蚊子传播的疾病,可威胁全球公共卫生安全,我国浙江、广东、

福建等南方地区也深受其害^[9-11]。据浙江省疾病预防控制中心的流行病学调查分析,2017 年在浙江省登革热暴发过程中,共报告了 1 229 例病例,包括 1 149 例本地疫源性病例和 80 例输入病例,大部分为 DENV2 感染^[1]。目前迫切需要能够针对 DENV2 甚至其他 DENV 血清型发挥预防保护作用的疫苗。E 蛋白是疫苗研发和病毒感染诊断中最有价值的病毒蛋白,而 EDⅢ 又是其关键区域^[6,12]。Moraes 等^[13]的研究发现,分离的 EDⅢ 在构象上发生了改变,这种改变实现了与宿主细胞膜的融合和许多抗 EDⅢ 单抗识别表位的暴露。Chiang 等^[14]研究发现,经脂质化 EDⅢ 免疫的小鼠产生了持久的中和抗体,其具有显著降低病毒血症的能力,表明脂质化 EDⅢ 具有免疫原性。此外,国内外也有许多研究是关于抗 DENV 单抗的^[15-16],但市场上尚缺少针对 DENV-EDⅢ 的单

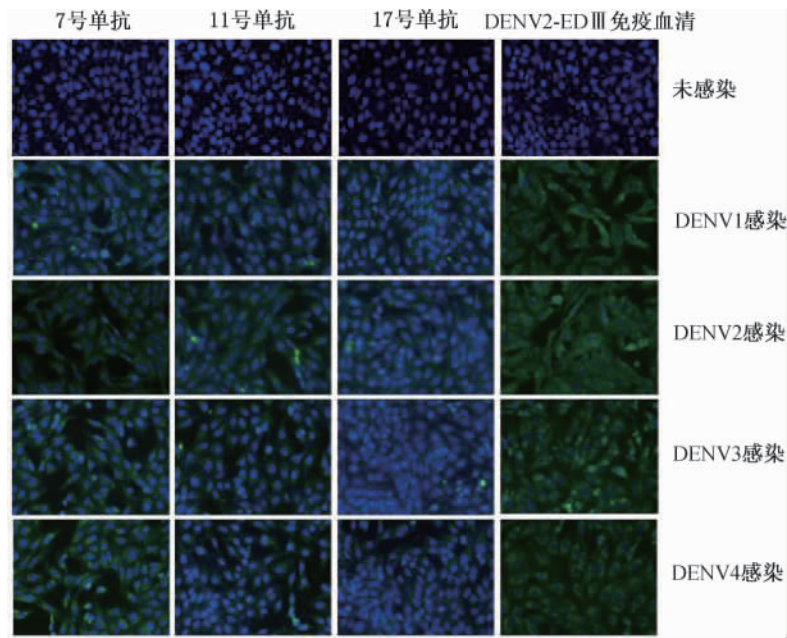


图4 IFA检测抗DENV2-EDⅢ单抗识别DENV1~4的能力

抗。本研究制备的单抗对 DENV 1~4 都具有识别能力,有利于抗 DENV 单抗多样化发展,也为后续 DENV 精准疫苗的研发及治疗性抗体药物的制备提供重要信息。

本研究在蛋白质最初表达时选取 pET21a 为载体,极大地减弱了融合蛋白对后续抗体产生和蛋白质功能等方面的影响。此外,DENV 4 种血清型之间的基因序列相似度约为 65%,用所制备的单抗检测各种 DENV 血清型感染时,抗 DENV2-EDⅢ单抗可不同程度地识别 DENV1、DENV3、DENV4。这一结果与 Poggianella 等^[17]和 Frei 等^[18]的研究相符,表明 DENV 4 种血清型之间存在交叉抗体反应。

由于 DENV 的 EDⅢ可通过与宿主细胞表面的受体结合而介导病毒感染,因此,其诱导产生的抗体具有重要的中和保护作用^[19]。在接下来的研究中,我们将基于细胞株及动物模型进一步评估这些单抗在体内外对 DENV 甚至其他黄病毒如日本脑炎病毒和寨卡病毒有无中和保护作用。

参考文献

- [1] Yan H, Ding Z, Yan J, *et al.* Epidemiological characterization of the 2017 dengue outbreak in Zhejiang, China and molecular characterization of the viruses[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8:216.
- [2] Lorono-Pino MA, Uitz-Mena A, Carrillo-Solis CM, *et al.* The use of insecticide-treated curtains for control of aedes aegypti and dengue virus transmission in "Fraccionamiento" style houses in México[J]. *J Trop Med*, 2018, 2018: 4054501.
- [3] Phanthanawiboon S, Pambudi S, Omokoko MD, *et al.* Construction of a high-yield dengue virus by replacing nonstructural proteins 3-4B without increasing virulence[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(1): 1221-1226.
- [4] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, *et al.* The global distribution and burden of dengue[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 504-507.
- [5] Luo S, Cui W, Li C, *et al.* Seroprevalence of dengue IgG antibodies in symptomatic and asymptomatic individuals three years after an outbreak in Zhejiang Province, China[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 92.
- [6] Quach QH, Ang SK, Chu JJ, *et al.* Size-dependent neutralizing activity of gold nanoparticle-based subunit vaccine against dengue virus[J]. *Acta Biomater*, 2018, 78(18): 224-235.
- [7] Ramasamy V, Arora U, Shukla R, *et al.* A tetravalent virus-like particle vaccine designed to display domain III of dengue envelope proteins induces multi-serotype neutralizing antibodies in mice and macaques which confer protection against antibody dependent enhancement in AG129 mice[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2018, 12(1): e0006191.
- [8] Kulkarni A, Bhat R, Malik M, *et al.* Neutralizing antibody response and efficacy of novel recombinant tetravalent dengue DNA vaccine comprising envelope domain III in mice[J]. *Iran J Med Sci*, 2017, 42(2): 152-160.
- [9] Chen B, Liu Q. Dengue fever in China[J]. *Lancet*, 2015, 385(9978): 1621-1622.
- [10] Sun J, Lu L, Wu H, *et al.* Epidemiological trends of dengue

- in mainland China, 2005-2015[J]. *Int J Infect Dis*, 2017, 57: 86-91.
- [11] Gao Z, Zhang Y, Yang Y, *et al*. Dengue virus infections among blood donors in Guangxi of China, 2013-2014 [J]. *Transfus Med*, 2018, 28(3): 236-242.
- [12] Slon Campos JL, Poggianella M, Burrone OR. Long-term stability of antibody responses elicited by dengue virus envelope D III-based DNA vaccines[J]. *J Gen Virol*, 2018, 99(8): 1078-1085.
- [13] Moraes AH, Simonelli L, Pedotti M, *et al*. Antibody binding modulates conformational exchange in domain III of dengue virus e protein[J]. *J Virol*, 2015, 90(4): 1802-1811.
- [14] Chiang CY, Hsieh CH, Chen MY, *et al*. Recombinant lipidated dengue-4 envelope protein domain III elicits protective immunity[J]. *Vaccine*, 2014, 32(12): 1346-1353.
- [15] Al-Alimi AA, Ali SA, Al-Hassan FM, *et al*. Dengue virus type 2 (DENV2)-induced oxidative responses in monocytes from glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient and G6PD normal subjects[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2014, 8(3): e2711.
- [16] 林亚英, 丁细霞, 朱伟, 等. I 型登革病毒包膜蛋白 III 区中和抗体的制备与鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(8): 706-711.
- [17] Poggianella M, Slon Campos JL, Chan KR, *et al*. Dengue E protein domain III-based DNA immunisation induces strong antibody responses to all four viral serotypes[J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2015, 9(7): e0003947.
- [18] Frei JC, Wirchnianski AS, Govero J, *et al*. Engineered dengue virus domain III proteins elicit cross-neutralizing antibody responses in mice[J]. *J Virol*, 2018, 92(18): e01023-18.
- [19] Fahimi H, Mohammadipour M, Kashani HH, *et al*. Dengue viruses and promising envelope protein domain III-based vaccines[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018, 102(7): 2977-2996.

The development of monoclonal antibodies to envelope protein domain III of dengue virus serotype 2 and evaluation of its diagnostic specificity

DUAN Zhi-liang^{1, 2}, ZHOU Yong-chao², YANG Lan², CHEN Xin-yu¹, WEN Jin-sheng², JIN Sheng-wei^{1, 3} (1. *Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China*; 2. *Institute of Arbovirus, School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China*; 3. *Department of Anesthesia and Critical Care, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China*)

Abstract: To develop monoclonal antibodies (mAb) specific for envelope protein domain III (ED III) of dengue virus serotype 2 (DENV2) and test their diagnostic specificity, the gene encoding DENV2-ED III was synthesized and cloned into prokaryotic plasmid pET21a. The recombinant plasmid was transformed into competent *Escherichia coli* strain BL21. The recombinant DENV2-ED III was used to immunize BALB/c mice. Splenocytes from immunized mice were fused with myeloma cell line SP2/0 and hybridomas were injected into the abdomen of BALB/c mice. Murine IgG was purified from the ascites and its ability to recognize DENV serotype 1 to 4 (DENV1-4) was tested by indirect ELISA and indirect immunofluorescence assay. The results showed that DENV2-ED III was successfully expressed and mAbs produced by hybridomas could recognize DENV2 as well as 3 other DENV serotypes (DENV1, DENV3 and DENV4) cross-reactively.

Key words: dengue virus; envelope protein domain III; monoclonal antibody