

分类号:

UDC:

密级:

学号: 416524116704

南昌大学专业学位硕士研究生
学位论文

抗 H7 亚型流感病毒单克隆抗体的制备与应用
Preparation and application of anti-H7 subtype influenza
virus monoclonal antibody

陈玲玲

培养单位(院、系): 南昌大学公共卫生学院

指导教师姓名、职称: 刘明斌 副主任医师

周剑芳 研究员

秦堃 助理研究员

专业学位种类: 医学硕士

专业领域名称: 公共卫生

论文答辩日期: 2019年6月

答辩委员会主席:

杨维

评阅人:

谭文杰

谭红吉

一、学位论文独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得南昌大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名（手写）：陈玲玲 签字日期：2019年5月31日

二、学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解南昌大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权南昌大学可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编本学位论文。同时授权北京万方数据股份有限公司和中国学术期刊（光盘版）电子杂志社将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》和《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》中全文发表，并通过网络向社会公众提供信息服务，同意按“章程”规定享受相关权益。

学位论文作者签名（手写）：陈玲玲

导师签名（手写）：[Handwritten Signature]

签字日期：2019年5月31日

签字日期：2019年5月31日

论文题目	抗H7亚型流感病毒单克隆抗体的制备与应用				
姓名	陈玲玲	学号	416524116704	论文级别	博士 <input type="checkbox"/> 硕士 <input checked="" type="checkbox"/>
院/系/所	南昌大学公共卫生学院	专业	公共卫生		
E-mail					
备注：					

公开 保密（向校学位办申请获批准为“保密”，____年__月后公开）

摘要

目的:

筛选 H7 亚型流感病毒人源单抗, 分析编码抗体的基因特点并检测其生物学功能。同时制备 H7 亚型流感病毒鼠源单抗, 建立用于快速检测 H7 亚型禽流感病毒的双抗体夹心 ELISA 方法, 为 H7N9 禽流感病毒感染的免疫治疗及快速诊断提供有力科学支撑。

方法:

采集自然感染 H7N9 禽流感患者的全血, 对外周血记忆性 B 细胞进行分选、培养和抗体基因的克隆, 通过转染表达抗体后对抗体进行纯化, 进而对抗体功能进行初步鉴定。

采用小鼠杂交瘤技术筛选 H7 亚型 HA 特异性单克隆抗体, 以此建立双抗体夹心 ELISA (DAS-ELISA) 检测 H7 亚型流感病毒, 并对其灵敏度和特异性进行了评估和鉴定。

结果:

对 9 个培养孔进行基因克隆和测序, 从 1#样本中获得 24 种 VH 胚系基因和 14 种 V_κ 胚系基因; 从 3#样本中获得 17 种 VH 胚系基因和 12 种 V_κ 胚系基因。其中 1#样本重链基因以 IGHV4-39, IGHV1-69, IGHV4-59 和 IGHV3-13 为主, 轻链基因以 IGKV1-39 为主; 3#样本重链基因以 IGHV3-9, IGHV3-7, IGHV1-69 和 IGHV1-2 为主, 而轻链基因主要以 IGKV1-5 为主。

获得 5 株全人源单克隆抗体, 其中抗体克隆 56B11-2/4 具有神经氨酸酶抑制活性, 其 IC₅₀ 约为 52.46 μg/ml; 抗体克隆 10F10-13/13 为广谱结合型抗体, 对 N9 蛋白和多种亚型 HA 蛋白均有很强的 ELISA 结合活性。

获得 12 株 H7 特异性鼠源单克隆抗体, 其中 5 株具有血凝抑制活性。根据 HI 活性选取两株单抗 2B6 和 5E9, 建立了 DAS-ELISA 法用于检测 H7 抗原。结果显示建立的 DAS-ELISA 可特异性检测 H7 亚型流感病毒, 而不与其他亚型病毒产生交叉反应。用 H7 亚型流感病毒和重组 H7 蛋白对 DAS-ELISA 的灵敏度进行了检测, 重组病毒 A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9) 最低检测限为 0.5HAU/50 μl, A/Netherlands/219/2003(H7N7) 和 A/Anhui/1/2013(H7N9) 最低检测

限为 2HAU/50 μ l; 重组 H7 蛋白可检测到的最低水平为 10ng/ml, 并呈量-效反应关系。

结论:

(1) 分别获得 1 株具有神经氨酸酶抑制活性和广谱流感结合活性人源单克隆抗体。

(2) 利用两株鼠源 H7 亚型特异性单抗建立 DAS-ELISA 方法, 对 H7 抗原的检测表现出高灵敏性和强特异性, 可用于病毒的快速检测及疫苗 HA 含量测定。

关键词: 流感病毒, 血凝素, 单抗, DAS-ELISA

ABSTRACT

Objective:

The human monoclonal antibody against H7 subtype influenza virus was prepared, and the genetic characteristics and functional activities of the antibody were analyzed. At the same time, the murine monoclonal antibody of anti-H7 subtype influenza virus was prepared, and the double antibody sandwich ELISA was used to rapidly detect the H7 subtype avian influenza virus, which provided an approach for the diagnosis and prevention of H7N9 virus.

Methods:

The blood samples of patients infected with H7N9 was collected, and the peripheral blood memory B cells were sorted, cultured and cloned. The light and heavy chain genes of the antibody were co-transfected into 293T cells, then the mAbs were screened and purified. The genetic characteristics and functional activities of fully human antibodies were initially identified.

Hybridoma preparation technology was used to fuse the spleen cells of immunized mice and myeloma cells, and H7-specific monoclonal antibodies were screened. DAS-ELISA was used to detect H7 antigen, and its sensitivity and specificity were identified.

Results:

(1) Gene cloning and sequencing of 9 cultured clones, 24 VH germline genes and 14 V κ germline genes were obtained from 1# sample, while 17 VH germline genes and 12 V κ s germline genes were obtained from 3# sample. The heavy chain genes of 1# sample are mainly IGHV4-39, IGHV1-69, IGHV4-59 and IGHV3-13, while the light chain gene was mainly IGKV1-39. The heavy chain genes of 3# sample are mainly IGHV3-9, IGHV3-7, IGHV1-69 and IGHV1-2, while the light chain gene was mainly IGKV1-5.

(2) Obtaining 5 human mAbs, wherein antibody 56B11-2/4 exhibits neuraminidase inhibition activity, and its IC₅₀ is about 52.46 μ g/ml; 10F10-13/13 is a broad-spectrum binding antibody with strong ELISA binding activity.

(3) Twelve H7-specific murine mAbs were obtained, of which 5 strains possess HI activity. A DAS-ELISA was used to detect the H7 antigen using two H7-specific mAbs named 2B6 and 5E9. The results show that the established DAS-ELISA platform only reacts with the H7 subtype influenza virus and does not react with other subtype viruses. The sensitivity of DAS-ELISA was tested with H7 subtype influenza virus and recombinant H7 protein. The detection limit for live virus was 0.5 HAU/50 μ l for A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9), 2 HAU/50 μ l for A/Netherlands/219/2003(H7N7) and A/Anhui/1/2013(H7N9), respectively. For H7 protein, it was dose-responding and the detection limit was as low as 10 ng/ml.

Conclusion:

(1) One strain human monoclonal antibody having a neuraminidase-inhibiting ability and another strain having a strong broad-spectrum binding antibody were obtained.

(2) Two strains of mouse monoclonal H7-specific mAbs were used to establish a DAS-ELISA, which showed high sensitivity and strong specificity for H7 antigen detection, and could be used for virus detection and HA vaccine quantification.

Keywords: influenza virus, hemagglutinin, mAbs, DAS-ELISA

目 录

第 1 章 引言.....	1
1.1 背景.....	1
1.2 流感病毒的病原学特征.....	1
1.3 流感的易感人群和临床特征.....	2
1.4 流感的预防与控制.....	2
1.5 流感病毒的检测手段.....	3
1.6 流感病毒单克隆抗体的研究意义.....	4
第 2 章 抗 H7 亚型流感病毒人源单克隆抗体的制备及功能鉴定.....	6
2.1 前言.....	6
2.2 实验材料.....	6
2.2.1 样本.....	6
2.2.3 细胞、菌株、质粒及蛋白.....	6
2.2.4 病毒.....	6
2.2.5 实验主要试剂.....	7
2.2.6 实验所需溶液及其配制方法.....	8
2.2.7 实验耗材与仪器.....	9
2.3 实验方法.....	9
2.3.1 H7N9 感染患者外周血 PBMC 的分离.....	9
2.3.2 H7N9 感染患者外周血 B 细胞的分选与培养.....	10
2.3.3 间接 ELISA 检测 B 细胞培养上清.....	10
2.3.4 H7N9 患者血清样本的 HI 检测.....	10
2.3.5 H7N9 患者血清多抗的 HI 检测.....	11
2.3.6 B 细胞抗体基因克隆.....	11
2.3.7 ELISA 法检测细胞上清.....	17
2.3.8 人源单克隆抗体的大量表达.....	17

2.3.9 AKTA 系统纯化抗体.....	18
2.3.10 SDS-PAGE 鉴定单抗.....	18
2.3.11 ELISA 检测单抗结合活性.....	19
2.3.12 流式细胞术检测单抗结合谱.....	19
2.3.13 血凝抑制试验.....	19
2.3.14 神经氨酸酶抑制试验.....	19
2.4 结果.....	20
2.4.1 B 细胞分选及培养结果.....	20
2.4.2 B 细胞筛选结果.....	20
2.4.3 血清样本及血清纯化多抗的 HI 实验.....	21
2.4.4 B 细胞培养上清对 H7 及 N9 的结合能力.....	21
2.4.5 第二轮 PCR 电泳图.....	22
2.4.6 B 细胞抗体基因分析.....	23
2.4.7 纯化单抗.....	23
2.4.8 SDS-PAGE 蛋白电泳.....	24
2.4.9 单抗与不同蛋白的 ELISA 结合能力.....	25
2.4.10 流式检测 10F10-13/13 抗体的广谱结合能力.....	25
2.4.11 抗体 HI 检测结果.....	25
2.4.12 抗体 NI 检测结果.....	26
2.5 讨论.....	26
第 3 章 抗 H7 亚型流感病毒抗原检测方法的建立.....	28
3.1 引言.....	28
3.2 实验材料.....	28
3.2.1 细胞、动物、蛋白.....	28
3.2.2 病毒.....	28
3.2.3 实验主要试剂与耗材.....	28
3.2.4 实验所需溶液及其配制方法.....	29
3.2.5 实验耗材与仪器.....	30
3.3 实验方法.....	30

目录

3.3.1 免疫原的制备.....	30
3.3.2 动物免疫.....	30
3.3.3 细胞融合.....	30
3.3.4 阳性克隆孔的筛选.....	31
3.3.5 亚克隆化.....	31
3.3.6 单抗的制备.....	31
3.3.7 间接 ELISA 筛选高亲和力 H7 单抗.....	32
3.3.8 H7 单抗的 HI 检测.....	32
3.3.9 DAS-ELISA 抗原检测方法的建立.....	32
3.4 结果.....	34
3.4.1 单抗筛选结果.....	34
3.4.2 捕获抗体和酶标二抗最佳稀释度.....	34
3.4.3 最低检测限的确定.....	35
3.5 讨论.....	35
第 4 章 结论与展望.....	37
4.1 结论.....	37
4.2 局限性与展望.....	37
致谢.....	39
参考文献.....	40
攻读学位期间的研究成果.....	44
综述.....	45

中英缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
BSA	Bovine serum Albumin	牛血清白蛋白
DAS-ELISA	Double antibody sandwich ELISA	双抗体夹心酶联免疫吸附测定
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
DMSO	Dimethylsulphoxide	二甲基亚砷
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FITC	Fluorescein isothiocyanate isomer	异硫氰酸荧光素
HA	Hemagglutinin	血凝素
HAU	Hemagglutinin unit	血凝素单位
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration	半数最大抑制浓度
LB	Luria-Bertani	LB 培养基
mAb	Monoclonal antibody	单克隆抗体
MDCK	Madin-Darby canine kidney	马-达二氏犬肾细胞
MOI	Multiplicity of infection	感染复数
NA	Neuraminidase	神经氨酸酶
NI	Neuraminidase inhibition	神经氨酸酶抑制
NP	Nucleocapsid protein	核壳蛋白
OD	Optical density	光密度
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell	外周血单个核细胞
PNA	Peanut agglutinin	花生凝集素
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链反应
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction	反转录聚合酶链反应
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	3,3',5,5'-四甲基联苯胺
TCID ₅₀	Half tissue culture infective dose	半数组织致死量

第 1 章 引言

1.1 背景

流感是通过呼吸道传播的具有高度传染性的疾病。流感是全人类重要的公共卫生问题，自 1918 年西班牙流感暴发以来^[1]，根据 WHO 统计在过往百年里全世界已经出现了 4 次流感大流行，导致世界性流感疫情主要是由 H1N1、H3N2、H2N2 这几种亚型毒株引起，并导致了全球 1/4 以上的人感染发病^[2-5]。流感病毒亚型种类很多，不同亚型之间可以发生基因重组，有的亚型可以跨越物种屏障并感染人类^[6-8]。2013 年初，国内首次发现新型 H7N9 禽流感病毒可感染人并致病和死亡，同时 H7N9 疫情的快速扩散和传播引起全球对流感大流行的担忧。截止 2019 年 3 月 22 日，已有 1567 例 H7N9 感染患者，其中 615 例死亡，致死率达到近 40%^[9]。现有研究结果表明，H7N9 病毒目前仅存在有限的人与人之间的传播证据，并且这种传播是不可持续的^[10]，人类主要通过暴露在活禽市场环境中接触到携带病毒的活禽和被病毒污染的物品从而感染疾病。

1.2 流感病毒的病原学特征

流感病毒可以分为三种类型，甲型流感病毒又可分为 16 个血凝素亚型（H1-H16）和 9 个神经氨酸酶亚型（N1-N9）。这两种糖蛋白位于病毒颗粒包膜外表面上并与流感的感染和传播有关。HA 可以与细胞受体结合并诱导膜融合从而引发感染，HA 受体的特异性与宿主感染范围、病毒传播力以及疾病致病力有关。HA 蛋白的水解活化是决定病毒在生物体内或者特定器官发生感染的重要因素，HA 水解产物 HA1 和 HA2 的共同作用可以使病毒感染机体并致病。流感病毒侵入宿主后可以诱导产生针对 HA 的中和抗体，而这些作用靶点可以为疫苗的设计。此外，活禽市场容易发生多种亚型之间的基因重组，从而产生抗原转变导致新的血清型的出现。甲型流感病毒最容易出现变异，基于抗原转换和抗原漂移的免疫逃逸不仅对新毒株的出现至关重要，而且与流感的流行病学研究也有紧密联系。NS1 蛋白可以通过拮抗固有免疫反应在发病机制中具有特别重

要的作用。流感具有多种自然宿主，虽然发病机制在不同物种之间极为相似，但根据病毒和宿主的不同，疾病的表现和严重程度却出现差别，因此动物实验的研究应当谨慎推广到人群上。

1.3 流感的易感人群和临床特征

流感的发生是病毒与宿主以及环境因素相互作用的结果，冬春季由于天气寒冷更加适合病毒的存活以及人的抵抗力相对下降，因此通常是流感的高发季节。人们普遍容易感染流感，活禽市场从业人员以及患有多种基础性疾病的人群一般是流感的高发人群^[11]。季节性流感一般攻击的多为免疫低下的人群，而流感世界大流行毒株引起的重症病例多为青壮年。流感的潜伏期很短，病毒的复制可在 2-3 天内达到高峰，从感染到发病多在一周以内，其中重症患者病情进展迅速时短时间内便可能出现死亡^[12]。病毒载量是评价流感严重程度的重要指标，细菌和病毒对呼吸道上皮细胞的协同感染可以加重疾病的严重性。初期患者可出现急起发热、咽喉肿痛、肌痛和白细胞降低等全身病毒血样症状，人体在感染流感病毒后一般多呈现为高热，呼吸道症状在热退后表现较为明显^[13]。流感重症患者容易出现在儿童和老人人群中，往往病情演变迅速，累积全身的各种重症疾病常伴有发生^[14]。

1.4 流感的预防与控制

流感流行的严重程度是病毒与宿主因素如人群的免疫状态等相互作用的结果，人们还不能仅仅根据流感病毒抗原和结构的相似性预测流行的严重性。流感由于基因特点一旦发生便极有可能导致疾病的暴发，因此加强全球流感发生动态的监测有助于及时采取各种控制和应急措施，降低流感流行对社会造成的不良影响。流感病毒具有多种自然宿主，活禽市场储存着多种多样的亚型基因，可通过重配或抗原变异产生具有感染人类能力的新毒株。具有活禽市场暴露史、家中饲养活禽和患有的一种以上的慢性病的人群更有可能感染流感^[15]，因此，在发生疫情时对活禽市场进行临时关闭以此切断传染源对降低流感的发病率和死亡率具有重要意义^[16]。

流感流行季节前对高危人群进行疫苗接种可对人群产生保护并对流感流行

起到控制作用，目前流感疫苗通常有肌肉注射灭活疫苗以及口服减毒活疫苗两种方式，可以诱导针对病毒 HA 或 NA 的免疫应答。疫苗毒株需要经常根据流行状况及时做出预测，根据流感监测状况，2018-2019 年 WHO 推荐的季节性流感疫苗是在之前的三价疫苗的基础上增加了 B 型病毒 Yamagata 系^[17]，以增强人群的抗流感能力，目前针对 H7N9 的人用疫苗还未研发出来。由于人体免疫反应的复杂性，疫苗接种引起的疾病保护作用在很大程度上仍未可知。流感病毒需要实时预测，而疫苗研发从高产疫苗株的选择到疫苗保护性效果的人群检测整个周期一般需要六个月左右，且不同亚型之间交叉保护性较低，因此对于降低流感活动有限，并不能满足目前对于流感防控的需求^[18,19]。流感 NP 蛋白是交叉保护性细胞毒性 CD8+ T 细胞的常见靶标，因此可作为通用疫苗极具希望的候选靶标。临床上使用的抗流感病毒药物如 M2 离子通道阻滞剂以及神经氨酸酶抑制剂各自通过不同的作用机理发挥抗流感作用。常用的 M2 离子通道阻滞剂如烷胺类药物作用的流感病毒种类有限且毒副作用较强，容易出现各种不良反应；神经氨酸酶抑制剂如奥司他韦是临床治疗抗击流感的第一道防线，绝大部分国家实际使用的储备并不多，在流感流行季节无法满足需求，并且已出现针对 H1N1、H5N1 等多种毒株的耐药性，因此迫切需要寻找其他不同靶标的抗病毒药物^[20-24]。

1.5 流感病毒的检测手段

目前实验室主要通过病毒培养、血清学检测、RT-PCR、ELISA 等手段检测流感病毒^[25]。病毒培养需采集发病 3 天内的咽拭子样本做鸡胚接种或者细胞培养然后分离出病毒从而进行确诊，这种方法实施过程较为耗时；血清学检测在不同实验室操作的重复性有差别；RT-PCR 技术用来检测病毒的灵敏度和特异度都很高，但对引物有极高的要求，是检测过程中最为关键的因素，并且这种方法在大样本操作过程中容易发生污染从而出现假阳性影响结果的误判。ELISA 法根据不同的原理可以用于检测病毒抗原或者血清抗体，具有快速、简单、高效等优点并且不受仪器设备和操作人员的限制，成本低，此外使用流感单抗还可鉴定出甲、乙、丙的型别，现在已研发出多种针对流感病毒的检测试剂盒^[26]，对流感病毒的临床检测和流行监测提供了有力支撑。

1.6 流感病毒单克隆抗体的研究意义

自1975年单抗技术发明以来,从最初的杂交瘤制备技术到噬菌体抗体文库技术^[27]、核糖体展示技术^[28]、EBV诱导的B细胞永生化再到B细胞体外培养^[29],单抗的制备技术不断发展和完善,并以其效价高、特异性强等优势迅速应用于医学领域的多个方面。杂交瘤技术最初是由Kohler和Milstein两位科学家发展而来^[30],通过细胞融合和杂交瘤技术获得产生特异性抗体的细胞株,能够稳定提供性质完全相同的单抗,成本低廉,可用于大规模工厂化生产,但容易产生人抗鼠抗体^[31],因此还需进一步人源化改造。噬菌体展示文库技术省时省力且筛选功能强,但产生的抗体多有自身反应性^[32]。核糖体展示技术建库相对而言更加简单、分子多样性较强,但是这种筛选系统并不是很稳定。EB病毒能够诱导B细胞永生化成为永久性细胞系,但是这种体系转化效率很低,因此抗体产量也很低。B细胞体外培养能够分离特别罕见和难以获得单克隆抗体^[33, 34]。单克隆抗体可用于医学领域的多个方面。在临床应用方面可对疾病进行早期诊断,有的单抗还可连接药物制备成用于肿瘤治疗的靶向药^[35, 36];在公共卫生监测方面可用于流行病学的监测研究;在疫苗生产方面不仅对疫苗的设计具有指导意义,还可对疫苗质量进行控制。

HA是诱导产生中和抗体的重要靶点,通常通过对HA抗体的微量中和和血凝抑制试验评价免疫前水平以及疫苗的保护作用。HA抗体在中和流感病毒方面非常有效,但此部位又频繁发生突变影响了抗体的有效性。一般HA球状头部区域容易发生变异,而茎部区域较为保守,面向茎部区域的广谱抗体能够针对多种毒株提供被动保护。NA抗体可以抑制唾液酸累积在细胞表面从而降低流感病毒的复制效率,减少病毒感染邻近细胞而间接改善疾病的严重程度。已有研究显示利用H7N9康复者血清对感染患者进行回输治疗并成功治愈的案例^[37]。针对于流感病毒目前已有大量靶向流感血凝素和神经氨酸酶的中和抗体^[38],对流感的被动免疫治疗具有重大的意义。低致病性禽流感病毒(LPAI)如H7N7、H9N2等毒株一般不引起禽类表现出明显的临床症状,在活禽中检测较为困难,然而LPAI H7N9病毒所造成的人群感染和高病死率,需要我们加强对该新型病毒的监测和控制,以及时评估其导致大流行的潜力和风险^[39]。H7N9病毒的HA、NA、PB2等多种蛋白的基因片段已发生多种适应性突变^[40-42],在传播力、致病性等方面均有变化,对人的感染威胁更大,极有可能导致流感大

流行。流感检测抗体的研发有助于活禽市场、野鸟栖息地病毒流行率的研究，便于人们及时掌握流感病毒的动态分布。现今已有多种检测抗体，如针对于 NP 的检测抗体可以对流感病毒进行分型检测^[43]以及针对 H9N2 的检测抗体^[44]，这对及时采取恰当的防控措施具有重要的流行病学意义。

第2章 抗H7亚型流感病毒人源单克隆抗体的制备及功能鉴定

2.1 前言

本研究采集自然感染 H7N9 亚型流感病毒患者全血，对其外周血记忆 B 细胞进行培养，并通过 PCR 技术获得抗体轻链和重链可变区基因，接着将轻重链基因共转染 293T 细胞，然后通过 AKTA 蛋白纯化仪纯化表达的抗体，最后对抗体功能进行初步鉴定。

2.2 实验材料

2.2.1 样本

本部分实验所使用全血样本来自于 2016 年江西省 3 名确诊的 H7N9 感染患者，样本均采集自感染后 1-2 周左右。

2.2.3 细胞、菌株、质粒及蛋白

(1) 细胞：293T 细胞、3T3 饲养细胞、MDCK 细胞由中国疾病预防控制中心病毒病所流感室提供并保存。

(2) 菌株：Trans1-T1 Phage Resistant 化学感受态细胞购自 TRAN 公司。

(3) 质粒：pIg γ 和 pIg κ 载体质粒由中国疾病预防控制中心病毒病所流感室提供并保存。

(4) 蛋白：重组 H5、H7、H10 蛋白（A/Hubei/1/2011/H5N1、A/Zhejiang/1/2013/H7N9、A/Jiangxi//346/2013/H10N8）使用昆虫杆状病毒系统表达^[45, 46]。H1、H3、H9 及 N9 蛋白购自北京义翘神州。

2.2.4 病毒

本章实验所用病毒毒株均为鸡胚扩增所得（表 2.1），且由中疾控病毒所流

感室保存，其中重组病毒通过反向遗传技术制备获得，内部六个基因来源于A/Puerto Rico/8/1934(H1N1)。所有病毒的相关操作均在二级生物安全实验室中进行。

表 2.1 实验所用毒株

病毒株	类型	亚型
A/Shanghai/1/2006	A,wt	pdmH1N1
A/HongKong/1/1968	A,wt	H3N2
A/Env/Guangdong/15188/2015	A,wt	H4N2
A/Hubei/1/2010	A,rg	H5N1
A/Env/Guangxi/2/2010	A,wt	H6N2
A/Anhui/1/2013	A,rg	H7N9
A/Hongkong/2009	A,wt	H9N2
A/Jiangxi/346/2013	A,rg	H10N8
A/Env/Jiangxi/376/2014	A,wt	H11N3
A/Env/Jiangxi/1102/2014	A,wt	H12N5
A/Env/Qinghai/166/2012	A,wt	H13N8

2.2.5 实验主要试剂

本章实验中如B细胞分选、PCR、酶切、连接、转化、转染等所用的主要试剂见表2.2。

表 2.2 实验主要试剂

试剂名称	生产商
人记忆性B细胞分选试剂盒	STEMCELL
BSA	Roche
X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent	Roche
jetPRIME kit	达科为
SuperScript III First-Strand Synthesis System	Invitrogen
HotStarTaq Plus Master Mix Kit (1000)	Qiagen
TMB 单组份显色液	solarbio
T4 DNA Ligase	NEB
限制性内切酶 (AgeI、Sall、BsiWI)	NEB

续表 2.2 实验主要试剂

试剂名称	生产商
RiboLock RNase Inhibitor	Therme
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	promega
Plasmid Miniprep Plus Purification Kit	GeneMark
Penicillin-Streptomycin	Gibco
DMSO	sigma
PBS	Hyclone
12% Bis-Tris 凝胶	英潍捷基
DMEM	Gibco
FBS	Gibco
普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
超薄 DNA 产物纯化试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司
山羊抗人 IgG 辣根酶标记	中杉金桥
无内毒素质粒大提试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司

2.2.6 实验所需溶液及其配制方法

本章实验中 B 细胞培养液和裂解液、ELISA 及蛋白纯化过程中所需的各种溶液及配制方法见表 2.3。

表 2.3 实验所需溶液及其配制方法

溶液名称	配制方法
B 细胞培养液	IL-2(20ng/ml)+CpG(1μg/ml)+IL-21(20ng/ml)+10%FBS+IMEM
B 细胞裂解液	DTT(0.1M)+Dnase-Rnase free H ₂ O + 5'-3 Prime RNase Inhibitor (40U/μl) + PBS+ RNasin(40U/μl) ^[46]
ELISA 封闭液	PBS (0.01M pH=7.4) +1%BSA
ELISA 洗液	PBS (0.01M pH=7.4) +0.05%Tween-20
ELISA 终止液	向 446ml 超纯水中加入 54ml 浓硫酸
结合液	将 23.48g PBS 缓冲液粉末溶于 2L 蒸馏水中
洗脱液	称取 7.507g 甘氨酸粉末溶于 1L 蒸馏水中, 并用浓盐酸调整 pH 至 2.7
293T 细胞培养液	DMEM+10%FBS+25mM Hepes+1×MyCO-3
MDCK 细胞感染液	MEM+1%BSA+25mM Hepes+2μg/mlTPCK-typsin

2.2.7 实验耗材与仪器

本章实验中细胞培养、PCR、血凝实验、蛋白纯化等所需的主要耗材和仪器见表2.4。

表2.4 实验耗材和仪器

名称	生厂商
96孔细胞培养板	Corning
75cm ² 细胞培养瓶	Corning
96孔酶标板	Corning
96孔V型板	Corning
NanoDrop 2000	Thermo Fisher
AKTA 蛋白纯化仪	GE
CO ₂ 细胞培养箱	Thermo Fisher
生物安全柜	NUAIRE
高速离心机	Thermo
PCR 仪	Eppendorf
蛋白电泳仪	BIO-RAD
凝胶成像仪	上海天能
pH 仪	Starter2100
显微镜	Thermo Fisher

2.3 实验方法

2.3.1 H7N9 感染患者外周血 PBMC 的分离

(1) 按照 2.5 μ l/ml 的比例向全血中加入 RosetteSep 并充分混匀，室温静置半个小时。

(2) 向 50ml 离心管中加入适量的淋巴细胞分离液；将采集的静脉血与等体积的 PBS 充分混匀，沿管壁缓缓加入分层液面上，注意保持界面清晰，2000rpm 水平离心 20min。

(3) 通过离心可以观察到管内液体可分为三层，其中在上、中层界面处有一处白色云雾状的狭窄带即主要为单个核细胞。

(4) 取一新的50ml离心管加入RPMI1640空白培养基，将吸管吸取出的单个核细胞转移至新的管中，1500rpm水平离心10min，清洗细胞一到两次。

(5) 弃去离心上清，加入冻存液，保存在液氮中。

2.3.2 H7N9感染患者外周血B细胞的分选与培养

(1) 复苏PBMC重悬至细胞数 5×10^7 以用来分选B细胞。

(2) 将分离获得的B细胞按照每孔10-20个同适量的3T3饲养细胞共培养10天左右，期间观察饲养细胞状态及B细胞增殖情况。

2.3.3 间接ELISA检测B细胞培养上清

(1) 包被：待包被的H7抗原蛋白使用PBS缓冲液稀释，以每孔50ng的量加入酶标板中，4℃过夜使抗原与板子结合充分或者37℃放置2h进行快速包被。

(2) 封闭：弃去包被液并将板子拍干，每孔加入150μl的1%BSA，37℃孵育1h。

(3) 加待检B细胞培养上清：弃去封闭液并拍干，PBST清洗6遍后，取50μl B细胞培养上清移入板中，37℃孵育1h。

(4) 二抗：弃去上清，使用PBST洗涤液清洗6遍。向各孔加入50μl按1:5000的比例稀释HRP标记的羊抗人IgG二抗，37℃放置1h。

(5) 显色：到达时间后弃去二抗，使用PBST清洗6遍，然后每孔加入100μl的TMB显色液。

(6) 终止：显色作用3min钟后，每孔加入50μl 2M的硫酸终止反应并进行读数判定结果。

2.3.4 H7N9患者血清样本的HI检测

(1) 1%火鸡红血球(1%TRBC)的配置：取约3ml的新鲜火鸡血，使用PBS清洗三遍，2000rpm离心20min，按照体积比配置1%TRBC。

(2) 4单位抗原/25 μ l的配置:先通过血凝实验测定病毒的HA滴度,按照计算所得的稀释倍数,用PBS缓冲液将病毒稀释至4HAU/25 μ l,此外,对配制好的4单位抗原还需反复进行回滴实验。

(4) 血清处理:按血清:受体破坏酶(RDE)=1:3的比例混合血清和RDE,37 $^{\circ}$ C水浴16-18h,然后56 $^{\circ}$ C水浴30min以破坏RDE活性,若经过处理的血清对测定的红细胞有特异性凝集,可在处理后的血清加入浓度为20%的浓的火鸡红血球,混匀后4 $^{\circ}$ C放置1h,然后1200rpm离心10min收上清。

(5) 血清与抗原混合:将待测血清从起始浓度1:10开始做倍比稀释,将25 μ l的待检血清和等体积的4单位抗原混匀后室温作用30-45min。

(6) 检测HI效价:每孔加入50 μ l配制好的1%火鸡红血球,室温静置半个小时左右后进行读数。

2.3.5 H7N9患者血清多抗的HI检测

2.3.5.1 血清多抗的制备

(1) 将患者血清进行离心处理并加入等体积的PBS充分混匀,然后过滤血清。

(2) 将Protein A柱子离心去除柱子中的储存液,然后加入600 μ l的结合缓冲液平衡柱子。

(3) 向柱子中加入400 μ l的血清,置于摇床中摇15min左右,然后离心去除废液,剩余的血清样本重复此步骤。

(4) 向柱子中加入600 μ l的结合液并离心2遍,然后向柱子中加入200 μ l的洗脱液,离心收集洗脱液至预先加入PBS的离心管中并调至中性,然后用超滤管反复离心用来浓缩抗体。

2.3.5.2 血清多抗的HI检测

患者血清纯化多抗的HI效价测定具体操作参照本章步骤2.3.4。纯化多抗无需经过RDE和20%浓的火鸡红血球即可进行HI后续操作。

2.3.6 B细胞抗体基因克隆

2.3.6.1 B细胞裂解

根据本章 2.2.6 所示溶液配制方法配制 B 细胞裂解液，选择 H7 阳性 B 细胞孔进行裂解，将裂解液收集保存在-80℃。

2.3.6.2 抗体基因扩增

(1) 引物设计与合成

巢式 PCR 引物根据抗体家族设计，所需引物均由上海生工生物公司合成，使用时将不同家族引物混合，VH 链和 Vκ链第一轮和第二轮 PCR 扩增引物参照孙颖等^[46]，具体引物序列见表 2.5 至表 2.8。

表 2.5 γ链可变区基因第一轮巢式 PCR 扩增引物

名称	序列 (5'-3')
5' L-VH 1	ACAGGTGCCCACTCCCAGGTGCAG
5' L-VH 3	AAGGTGTCCAGTGTGARGTGCAG
5' L-VH 4/6	CCCAGATGGGTCCTGTCCCAGGTGCAG
5' L-VH 5	CAAGGAGTCTGTTCCGAGGTGCAG
3' Cγ CH1	GGAAGGTGTGCACGCCGCTGGTC

表 2.6 κ链可变区基因第一轮巢式 PCR 扩增引物

名称	序列 (5'-3')
5' L Vκ 1/2	ATGAGGSTCCCYGCTCAGCTGCTGG
5' L Vκ 3	CTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAG
5' L Vκ 4	ATTTCTCTGTTGCTCTGGATCTCTG
3' Cκ 543	GTTTCTCGTAGTCTGCTTTGCTCA

表 2.7 γ链可变区基因第二轮巢式 PCR 扩增引物

名称	序列 (5'-3')
5' AgeI VH1	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGGTGCAG
5' AgeI VH1/5	CTGCAACCGGTGTACATTCCGAGGTGCAGCTGGTGCAG
5' AgeI VH3	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGGTGGAG
5' AgeI VH3-23	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAGGTGCAGCTGTTGGAG
5' AgeI VH4	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAG
5' AgeI VH 4-34	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTG

续表 2.7 γ 链可变区基因第二轮巢式 PCR 扩增引物

名称	序列 (5'-3')
5' AgeI VH 1-18	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTTTCAGCTGGTGCAG
5' AgeI VH 1-24	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTCCAGCTGGTACAG
5' AgeI VH3-33	CTGCAACCGGTGTACATTCTCAGGTGCAGCTGGTGGAG
5' AgeI VH 3-9	CTGCAACCGGTGTACATTCTGAAGTGCAGCTGGTGGAG
5' AgeI VH4-39	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGCTGCAGCTGCAGGAG
5' AgeI VH 6-1	CTGCAACCGGTGTACATTCCCAGGTACAGCTGCAGCAG
3' Sall JH 1/2/4/5	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCAG
3'Sall JH 3	TGCGAAGTCGACGCTGAAGAGACGGTGACCATTG
3'Sall JH 6	TGCGAAGTCGACGCTGAGGAGACGGTGACCGTG

表 2.8 κ 链可变区基因第二轮巢式 PCR 扩增引物

名称	序列 (5'-3')
5' AgeI V κ 1-5	CTGCAACCGGTGTACATTCTGACATCCAGATGACCCAGTC
5' AgeI V κ 1-9	TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGACATCCAGTTGACCCAGT
5' AgeI V κ 1D-43	CTGCAACCGGTGTACATTGTGCCATCCGGATGACCCAGTC
5' AgeI V κ 2-24	CTGCAACCGGTGTACATGGGGATATTGTGATGACCCAGAC
5' AgeI V κ 2-28	CTGCAACCGGTGTACATGGGGATATTGTGATGACTCAGTC
5' AgeI V κ 2-30	CTGCAACCGGTGTACATGGGGATGTTGTGATGACTCAGTC
5' Age V κ 3-11	TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACACAGT
5' Age V κ 3-15	CTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATAGTGATGACGCAGTC
5' Age V κ 3-20	TTGTGCTGCAACCGGTGTACATTCAGAAATTGTGTTGACGCAGT
5' Age V κ 4-1	CTGCAACCGGTGTACATTCGGACATCGTGATGACCCAGTC
3' BsiWI J κ 1/4	GCCACCGTACGTTTGTATYTCACCTTGGTC
3' BsiWI J κ 2	GCCACCGTACGTTTGTATCTCCAGCTTGGTC
3' BsiWI J κ 3	GCCACCGTACGTTTGTATCCACTTTGGTC
3' BsiWI J κ 5	GCCACCGTACGTTTAACTCCAGTCGTGTC

(2) RT-PCR

1)以 B 细胞裂解液中 RNA 为模板,使用 SuperScript III First-Strand Synthesis

System for RT-PCR 试剂盒进行逆转录合成 cDNA^[46]，如表 2.9 所示。

表 2.9 RT-PCR 反应体系

试剂名称	品牌	体积 (μl)
Oligo(dT) ₂₀ (50μM)	Invitrogen	1
RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen	2.5
10mM dNTP	Invitrogen	2
10xRT buffer	Invitrogen	3
25mM MgCl ₂	Invitrogen	10
RNasin® Ribonuclease Inhibitor(40U/μl)	promega	1
10% CA 630	Sigma	2.5
0.1M DTT	Invitrogen	2.5
SuperScript™ III RT (200U/μl)	Invitrogen	1.2
tRNA (50ng/μl)	Invitrogen	1
Cell Lysis buffer	—	20
DEPC H ₂ O	Eppendorf	4
Total		50.7

2) 逆转录反应条件: 42℃ 10min, 25℃ 10min, 50℃ 50min。

(3) 第一轮巢式 PCR

1) 以上述 RT-PCR 逆转录产物 cDNA 为反应模板, 按照以下反应体系和反应条件采用 HotStarTaq Plus Master Mix 试剂盒对抗体的 VH 链、Vκ 链基因进行扩增 (表 2.10 和表 2.11)。

表 2.10 第一轮巢式 PCR 反应体系

试剂名称	品牌	体积 (μl)
primer (10 μM)	生工合成	0.5+0.5
tRNA (50 ng/μl)	Invitrogen	1
DMSO	Sigma	0.5
DEPC H ₂ O	Eppendorf	5
Hotstar 2×Mix	Qiagen	12.5
cDNA from RT	—	5
Total		25

表 2.11 第一轮巢式 PCR 反应条件

反应步骤	反应温度及时间	循环数
1	95°C, 5 min	1
2	94°C, 30 s	第 2-4 步骤循环 50 次
3	57 °C for VH/Vκ, 30 s	
4	72°C, 1 min	
5	72°C, 7 min	1

(4) 第二轮巢式 PCR

1) 以第一轮巢式 PCR 的产物为反应模板, 使用 HotStarTaq Plus Master Mix 试剂盒分别扩增抗体的 VH 链、Vκ 链抗体基因, 此时引物带酶切位点便于后续酶切操作, 反应体系如下(表 2.12)。

表 2.12 第二轮巢式 PCR 反应体系

试剂名称	品牌	体积 (ul)
Primer (10 μM)	生工合成	0.5+0.5
tRNA (50 ng/μl)	Invitrogen	2
DMSO	Sigma	1
DEPC H ₂ O	Eppendorf	16
Hotstar 2×Mix	Qiagen	25
1st-PCR Product	—	5
Total		50

2) 扩增条件: 同第一轮 PCR 反应条件。

(5) 可变区基因纯化回收

1) 配制 1.5%琼脂糖电泳凝胶, 将第二轮巢式 PCR 产物进行电泳, 140V 电泳 35min 分离 DNA 片段。

2) 目的条带大小约为 400bp, 切下单一的目的 DNA 条带并按照普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的使用说明进行操作。

2.3.6.3 DNA 产物双酶切

本实验所使用的限制性核酸内切酶 AgeI、SalI、BsiWI 及其反应所需的缓冲液均购于 NEB 公司, 参照使用说明其反应体系(表 2.13、表 2.14)及反应条件如下:

表 2.13 γ 链双酶切反应体系

试剂名称	用量
AgeI-HF (20000 U/ml)	0.75 μ l
Sall-HF (20000 U/ml)	0.75 μ l
2 nd -PCR product	1 μ g
10 \times Cutsmart	5 μ l
ddH ₂ O	—
Total	50 μ l

反应条件：37 $^{\circ}$ C 酶切 13h。

表 2.14 κ 链双酶切反应体系

试剂名称	用量
AgeI-HF (20000 U/ml)	0.75 μ l
2 nd -PCR product	1 μ g
10 \times Cutsmart	5 μ l
ddH ₂ O	—
Total	50 μ l

反应条件：37 $^{\circ}$ C 反应 13h 后再加 1.5 μ l BsiWI (10000 U/ml)，55 $^{\circ}$ C 反应 13h。

(3) 产物回收

按照说明书方法酶切完成后采用超薄 DNA 产物纯化试剂盒回收酶切产物。

2.3.6.4 连接

将上述实验获得的抗体基因重链和轻链的酶切产物分别连接在 pIg γ 、pIg κ 质粒载体上，其反应体系如表 2.15。

表 2.15 酶切产物连接实验的反应体系

试剂名称	用量
T4 DNA 连接酶	1 μ l
10 \times buffer	1 μ l
DNA 酶切回收产物	30ng
载体	60ng
ddH ₂ O	—
Total	10 μ l

反应条件：37℃连接 16h。

2.3.6.5 转化

(1) 准备：提前取出感受态细胞冰浴融化；微波炉融化 LB 固体培养基并加入氨苄抗生素（终浓度为 100μg/ml）充分混匀后倒平皿。取上述产物于冰上放置 3min 以达到灭活缓冲液中的各种酶。

(2) 将 10μl 的轻链和重链连接产物分别与 50μl 的感受态细胞中混匀，冰上放置半个小时使 DNA 吸附细胞，到时间后，42℃水浴 90s，然后立刻将感受态细胞放于冰上冷却 3min。

(3) 每管加入 600μl 的 LB 液体培养基，混匀后置于 37℃，200rpm 使用摇床摇 45-60min，然后离心去上清后混匀剩下的菌体，均匀涂在 LB 平皿上，倒置平皿，37℃过夜培养 14-16h。

(4) 每个平皿选择适量的单克隆分别置于 LB 液体培养基中，37℃，200rpm 使用摇床摇 14-16h。

(5) 使用去内毒素质粒小提试剂盒提取质粒，并送往上海生工生物公司进行测序。下载测序结果并通过 IMG/QUEST 信息系统进行基因比对，以分析抗体可变区基因的特点及多样性。

2.3.6.6 转染

(1) 提前准备好 293T 细胞，取 96 孔 U 底细胞培养板，从来自同一克隆孔的轻链及重链基因表达载体中各取 100ng 分别稀释在 15μl 的 opti-MEM 空白培养基中，并在相应的培养孔中充分混匀。

(2) 按照 1μg 质粒：1-2μl 脂质体：100μl opti-MEM 的比例，使用 opti-MEM 稀释脂质体并以 15μl/孔加入各孔中。室温静置 20min。

(3) 消化 293T 细胞并使用 DMEM 稀释至 4×10^5 个细胞/ml，每孔加入 150μl 并于 37℃，5%CO₂ 孵箱中培养 72h。

2.3.7 ELISA 法检测细胞上清

检测转染细胞表达的抗体对 H7 蛋白的结合活性，具体操作步骤参照本章 2.3.3 部分。

2.3.8 人源单克隆抗体的大量表达

(1) 复苏 293T 细胞，转染前一天进行细胞传代，细胞计数并稀释至 6×10^6 个/瓶。保证细胞生长状态良好。

(2) 转染缓冲液、重链以及轻链按照 2ml: 10 μ g: 10 μ g 的比例涡旋混匀。

(3) 取出 Poly plus jetPRIME[®]Versatile DNA/siRNA 转染试剂并涡旋混匀，转染试剂与 DNA 按照 2 μ l:1 μ g 的比例加入并涡旋混匀。室温静置 15min。

(4) 取出准备好的 293T 细胞弃去上清，每瓶加入 6ml 的 opti-MEM，然后轻轻滴加转染复合物并将细胞放置在孵箱中继续培养。

(5) 于第一、二天分别补加 20-25ml Low IgG 的 DMEM 培养基，第四天收集上清用于纯化。

2.3.9 AKTA 系统纯化抗体

(1) 清洗系统：先使用抽滤后的纯水充分清洗 AKTA 系统管道，然后用纯水充满 A1 管道，结合缓冲液（PBS，0.01M pH=7.4）充满 B1 管道。

(2) 平衡柱子：将 Protein G 柱子接入管道中，先用纯水冲洗柱子然后再用结合液冲洗柱子，将柱子中的酒精置换成 PBS。

(3) 上样：将收集的细胞上清用 PBS 稀释至中性后，使用 0.22 μ m 滤器抽滤去除溶液中的杂质和气泡，并于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜循环上样。

(4) 洗脱：次日先用纯水冲洗整个管道，然后用结合缓冲液充满 A1 管道，洗脱缓冲液充满 B1 管道。将过晚上样的柱子接入管道中，先用结合液冲洗柱子直至紫外吸收峰 UV 值成一条直线，然后再用洗脱缓冲液（甘氨酸-HCl，0.1M pH=2.7）洗脱，待 UV 值出现波峰后收集洗脱下来的样品。收集的样品迅速用 0.01M PBS 稀释至中性。

(5) 置换与浓缩：用 30KD 的浓缩管根据要求多次进行浓缩置换，最后纯化所得抗体保存于 -80 $^{\circ}$ C。

2.3.10 SDS-PAGE 鉴定单抗

(1) 单抗处理：取 2 μ g 纯化后的单抗与 10 \times loading buffer 充分混合，水浴煮沸 10min。

(2) 蛋白电泳：向预制胶中每孔加样 15 μ l 并同时加入 marker，在 80V 电压下电泳先半个小时左右，然后调整电压为 120V 电泳一小时。

(3) 洗涤凝胶：将凝胶置于去离子水中洗涤 5min，期间换水重复多次以降低染色背景。

(4) 染色：加入适量的考马斯亮蓝染色液在水平摇床中染色半小时。

(5) 脱色：小心倒掉染色液，吸出残液，加入适量的去离子水，置水平摇床摇动 5-15min，期间换水 2-3 次左右，直至背景清亮为止。

2.3.11 ELISA 检测单抗结合活性

具体操作步骤参照第二章 2.3.3 部分。

2.3.12 流式细胞术检测单抗结合谱

(1) 提前准备 MDCK 细胞，待细胞状态良好时接种于 12 孔细胞培养板上过夜培养。

(2) 次日用感染液将病毒稀释至 MOI 为 1-2/200 μ l。弃去细胞上清然后每孔加入 200 μ l 的病毒并置于孵箱中孵育 1h，孵育完成后再补加感染液 400 μ l，放置孵箱中培养 12-14h。

(3) 消化并收集同种病毒感染的细胞，用 PBS 清洗细胞 1 遍，根据待检抗体数和空白对照、NP 鼠抗对照等分细胞，使每部分细胞量至少达到 1×10^6 个。取待检抗体用 1%BSA 稀释至 10 μ g/ml，各取 50 μ l 与细胞充分混匀，孵箱放置 1h。

(4) PBS 清洗细胞 2 遍，并加入 50 μ l 按 1:200 稀释的 FITC 标记的山羊抗人 IgG 二抗（其中 NP 鼠抗使用的是羊抗鼠 IgG 二抗），37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

(5) 孵育完成后，PBS 清洗 2 遍，并用 200 μ l PBS 重悬细胞，使用流式细胞仪进行检测。

2.3.13 血凝抑制试验

纯化获得的抗体进行血凝抑制试验，具体操作步骤参照本章内容 2.3.4 部分。其中抗原抗体混合时所用的待检抗体是从 50 μ g/ml 开始做 2 倍系列稀释，每孔加入 25 μ l，再向稀释好的抗体中加入等体积预先配置好的抗原，混匀后室温相互作用一段时间后读取结果。

2.3.14 神经氨酸酶抑制试验

(1) 包被: 用 PBS 稀释胎球蛋白 (Fetuin) 至 25 μ g/ml, 每孔 100 μ l 加入 96 孔酶标板中, 4 $^{\circ}$ C 过夜。

(2) 确定病毒用量: 用 PBST 清洗 3 遍, 用 1%BSA (含 0.5%Tween-20) 从 1:10 开始对病毒做 2 倍系列稀释。以每孔 50 μ l 的体积将稀释好的病毒转移到酶标板中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 16h。

(3)PNA-HRP 孵育: 弃去病毒并用 PBST 清洗 6 遍。用 1%BSA 将 PNA-HRP 稀释到终浓度 1 μ g/ml, 以每孔 100 μ l 加入酶标板中, 室温孵育 2h。

(4) 显色: PBST 清洗 6 遍, 每孔加入 100 μ l TMB 显色液。

(5) 终止: 室温反应 3min 后, 每孔加入 50 μ l 终止液, 并于 450nm-630nm 处进行读数。

(6) 抗体 NA 酶活检测: 固定病毒用量为 90% NA 酶活对应的病毒稀释度。将待测抗体从 100 μ g/ml 开始进行 2 倍倍比稀释, 将 50 μ l 抗体与等体积的病毒充分混合后加入酶标板中, 重复步骤 3-5。用 Graphpad 软件计算抗体的 IC₅₀。

2.4 结果

2.4.1 B 细胞分选及培养结果

本实验使用的 3 例 H7N9 感染患者的全血样本均采集自感染 1-2 周内, 并对 B 细胞分选和培养, 结果如表 2.16 所示, 3 份样本的培养结果均成功。

表 2.16 B 细胞分选及培养结果

编号	样本 ID	类型	感染与采样时间 (天)	分选 B 细胞数	B 细胞培养结果
1#	WZY	PBMC	12	1.45 \times 10 ⁵	✓
2#	JAX	PBMC	9	6 \times 10 ⁴	✓
3#	SFQ	PBMC	10	2.2 \times 10 ⁵	✓

2.4.2 B 细胞筛选结果

B 细胞培养 12 天后, 使用间接 ELISA 法检测细胞培养上清对重组 H7 及 H5 蛋白的结合能力, 结果如表 2.17 所示, 1#和 3#样本具有较多的 H7 反应性 B 细胞, 2#样本对 H7 和 H5 的反应的 B 细胞都很少, 因此本章实验中主要选择 1#

和3#样本进行研究,裂解阳性细胞孔,然后进行后续的基因克隆。

表 2.17 B 细胞筛选结果

编号	样本 ID	B 细胞培养总数 (孔)	H7 ⁺ B 细胞 (%)	H5 ⁺ /H7 ⁺ B 细胞 (%)
1#	WZY	1252	50 (3.9%)	34 (2.7%)
2#	JAX	1264	10 (0.8%)	7 (0.6%)
3#	SFQ	1244	276 (22.2%)	59 (4.7%)

2.4.3 血清样本及血清纯化多抗的 HI 实验

使用 A/Anhui/1/2013(H7N9)和 A/Guangdong/1/2014(H5N6)病毒检测 3 份血清样本的 HI 效价,可以发现 3 份血清样本对 H5N6 病毒的 HI 反应均为阴性,1#和 3#样本仅对 H7N9 病毒的 HI 反应为阳性,2#样本对两种病毒的 HI 反应均为阴性(表 2.18)。进一步分析 3 例患者的血清纯化多抗对 A/Anhui/1/2013(H7N9)病毒的 HI 效价,与血清样本直接测得的结果相近(表 2.19)。由此可以考虑先从 1#和 3#样本中挑选克隆孔进行分析。

表 2.18 血清样本的 HI 效价

编号	样本 ID	H7N9	H5N6
1#	WZY	160	<10
2#	JAX	<10	<10
3#	SFQ	40	<10

表 2.19 血清纯化多抗的 HI 效价

编号	样本 ID	H7N9
1#	WZY	80
2#	JAX	<10
3#	SFQ	20

2.4.4 B 细胞培养上清对 H7 及 N9 的结合能力

本研究从 1#样本选取 5 个克隆孔(3D5、6G2、7G10、10F10、14E6),从

3#样本选取 4 个克隆孔（49E8、55G4、56B11、56D2）进行后续分析，这 9 个克隆孔 B 细胞培养上清对 H7 及 N9 蛋白的 ELISA 结合能力见图 2.1。待测孔的 OD 值大于空白对照孔 OD 值的 5 倍以上判定为阳性。9 个克隆孔的培养上清对 N9 蛋白结合均为阴性，其中克隆号 3D5 对 H7 蛋白结合为阴性，但对 H7N9 病毒的 HI 反应呈阳性，而其余 8 个克隆孔对 H7 蛋白结合均阳性，但对 H7N9 病毒的 HI 反应呈阴性。

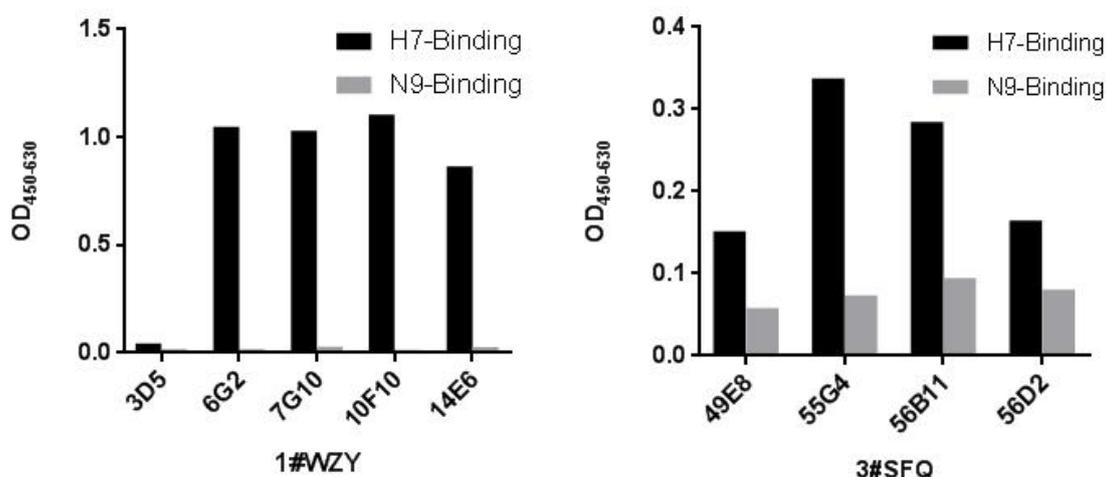


图 2.1 B 细胞培养上清对 H7 及 N9 蛋白的 ELISA 结合能力

2.4.5 第二轮 PCR 电泳图

对这 9 个克隆孔进行 RT-PCR 和两轮巢式 PCR, 分别扩增抗体的重链和轻链的可变区基因, 并对第二轮扩增产物进行电泳观察产物的扩增情况, 如图所示第二轮 PCR 扩增产物为单一的明亮的条带, 产物大小约为 400bp, 符合预期目的条带的要求 (图 2.2)。

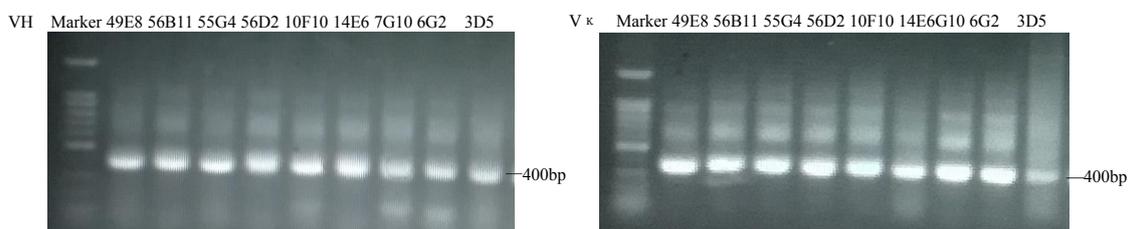


图 2.2 抗体可变区基因第二轮 PCR 扩增产物电泳图

2.4.6 B 细胞抗体基因分析

对以上9个克隆孔的基因分析可知,从1#WZY样本中获得源自24个VH胚系基因共194个测序序列,和源自14个V κ 胚系基因共57个测序序列;从3#SFQ样本中获得源自17个VH胚系基因共76个测序序列,和源自12个V κ 胚系基因共58个测序序列(图2.3)。其中1#WZY样本重链基因以IGHV4-39,IGHV1-69,IGHV4-59和IGHV3-13为主,所占百分比分别为15.46%,13.92%,10.82%和10.31%;轻链基因以IGKV1-39为主,约占47.37%。3#SFQ样本重链基因以IGHV3-9,IGHV3-7,IGHV1-69和IGHV1-2为主,所占百分比分别为19.74%,15.79%,10.53%和10.53%;轻链基因主要以IGKV1-5为主,约占31.03%。

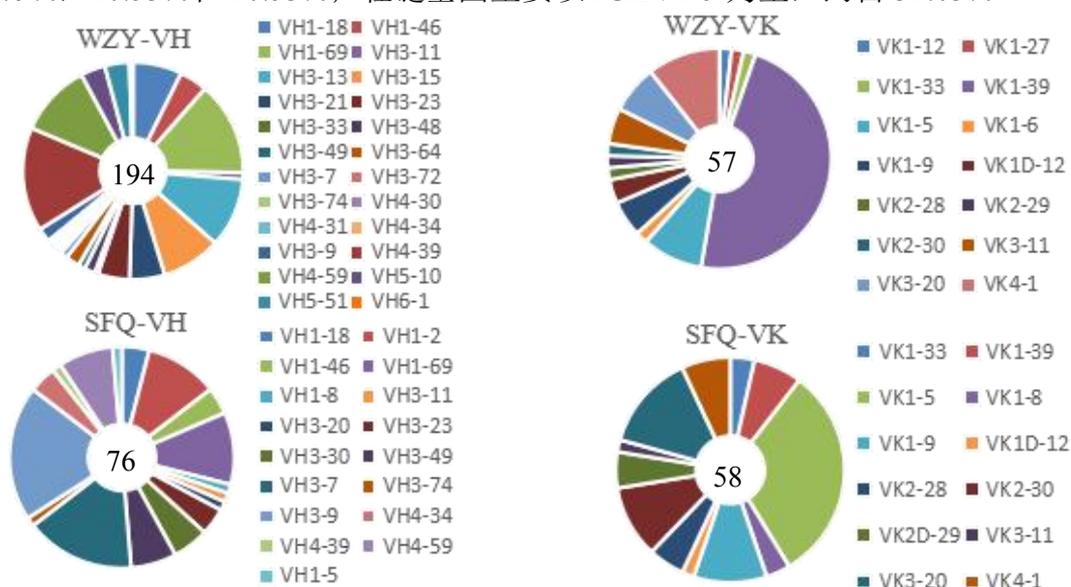


图 2.3 重链和轻链可变区片段编码基因

2.4.7 纯化单抗

共纯化了5株单抗,其中3D5-10/1、10F10-13/13来源于1#样本,14E6-18/19、14E6-20/19、56B11-2/4来源于3#样本,各株单抗轻重链基因信息及功能特点如表2.20所示。抗体的重链可变区主要用来结合抗原,具有抗原结合特异性,而本实验各株抗体的VH编码基因各不相同,VK编码基因主要以IGKV1-5*01F和IGKV1-39*01F/1D-39*01F为主。

2.20 5株单抗的重链和轻链基因信息

mAb	V	V 变异度 (%)	D	J	J 变异度 (%)	CDR
14E6-18/19	IGHV3-15*01 F	0.68	IGHD3-10*01	IGHJ6*02 F	1.61	8.10.2
	IGKV1-39*01F/1D-39*01	7.53	—	IGKJ5*01 F	0	6.3.5
14E6-20/19	IGHV3-74*01 F	0.69	IGHD3-22*01	IGHJ4*02 F	18.75	8.8.15
	IGKV1-39*01F/1D-39*01	7.53	—	IGKJ5*01 F	0	6.3.5
3D5-10/1	IGHV3-64*04 F	3.47	IGHD2-15*01	IGHJ5*02 F	5.88	8.8.17
	IGKV1-5*03 F	5.38	—	IGKJ2*02 F	8.33	6.3.9
56B11-2/4	IGHV3-9*01 F	0.69	IGHD3-22*01	IGHJ3*02 F	0	8.8.19
	IGKV1-5*01 F	7.53	—	IGKJ1*01 F	5.71	6.3.8
10F10-13/13	IGHV3-23*04 F	1.04	IGHD5-18*01	IGHJ6*02 F	16.1	8.8.16
	IGKV1-9*01 F	5.02	—	IGKJ5*01 F	0	6.3.9

注：“—”表示无此项内容。

2.4.8 SDS-PAGE 蛋白电泳

将大量转染获得的细胞上清收集后使用 AKTA 蛋白纯化仪进行纯化以获取纯度较高的单抗，通过 SDS-PAGE 蛋白电泳可以看到，抗体在电泳过程中分离成大小为 55KD 重链条带和 25KD 轻链条带，如图 2.4 所示，1 到 5 号样本分别为抗体 14E6-18/19、14E6-19/20、3D5-10/1、56B11-2/4、10F10-13/13，两条条带单一而清晰，且杂带较少，表明抗体纯度较高，可以满足后续实验要求。

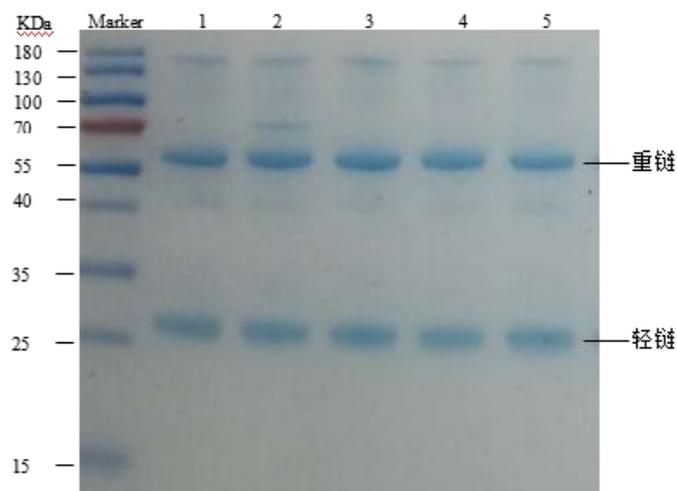


图 2.4 5 株单抗 SDS-PAGE 电泳图

2.4.9 单抗与不同蛋白的 ELISA 结合能力

用间接 ELISA 方法检测这 5 株单抗与 H1、H3、H5、H7、H9、H10、N9 蛋白的结合能力,包被蛋白用量是 50ng/well,待检抗体均从 50 μ g/ml 开始进行 2 倍稀释,分别得到各个蛋白下不同抗体的最低检测限(表 2.21)。以待检孔 OD 值大于空白对照孔的 5 倍以上判定为阳性。从下表中可知,56B11-2/4 抗体在这 7 种蛋白中对 N9 蛋白的结合能力最强,10F10-13/13 抗体对这 7 种蛋白均有很强的结合能力。

表 2.21 各个蛋白下不同抗体的最低检测限

抗体	不同蛋白下抗体的检测限 (μ g/ml)						
	H1	H3	H5	H7	H9	H10	N9
14E6-18/19	25	12.5	12.5	12.5	25	12.5	12.5
14E6-20/19	12.5	6.25	6.25	6.25	12.5	12.5	12.5
3D5-10/1	6.25	3.125	6.25	6.25	12.5	12.5	6.25
56B11-2/4	50	50	25	>50	>50	>50	3.125
10F10-13/13	0.78	0.78	0.78	1.56	1.56	1.56	1.56

2.4.10 流式检测 10F10-13/13 抗体的广谱结合能力

用流式细胞术检测 10F10-13/13 抗体对 H1N1、H3N2、H4N2、H5N1、H6N2、H7N9、H9N2、H10N8、H11N3、H12N5、H13N8 这 11 株病毒的结合能力。这 11 株病毒分别用 MOI=1-2/200 μ l 感染 MDCK,并与 10 μ g/ml 的抗体相互作用,加入二抗后使用流式细胞仪检测抗体与病毒的结合能力。结果如表 2.22 所示,抗体 10F10-13/13 可以与 H5N1 和 H6N2 结合。

表 2.22 10F10-13/13 抗体的广谱结合能力

病毒	H1N1	H3N2	H4N2	H5N1	H6N2	H7N9	H9N2	H10N8	H11N3	H12N5	H13N8
结合能力	—	—	—	++	+	—	—	—	—	—	—

注:“—”表示结合率在 5%以下;“+”表示结合率为 5%-20%;“++”表示结合率为 20%以上。

2.4.11 抗体 HI 检测结果

选择 Group 2 中的三种病毒 (H3N2、H7N9、H10N8) 对这五株单抗进行 HI 实验, 在抗体起始浓度为 $50\mu\text{g/ml}$ 的条件下, 五株单抗均不能对这三种病毒产生血凝抑制作用, 由此猜想这五株抗体并不是靶向 HA 头部的抗体。

2.4.12 抗体 NI 检测结果

采用酶联凝集素法检测 3 株抗体 (56B11-2/4、14E6-18/19、14E6-20/19) 对 A/Anhui/1/2013 (H7N9) 病毒的神经氨酸酶活性的抑制情况, 结果如图 2.5 所示。抗体 56B11-2/4 对 H7N9 病毒具有 NA 抑制活性, 其 IC_{50} 值为 $52.46\mu\text{g/ml}$, 而抗体 14E6-18/19 和 14E6-20/19 在 $100\mu\text{g/ml}$ 的用量下仍完全没有抑制作用, 因此不具有神经氨酸酶抑制活性。

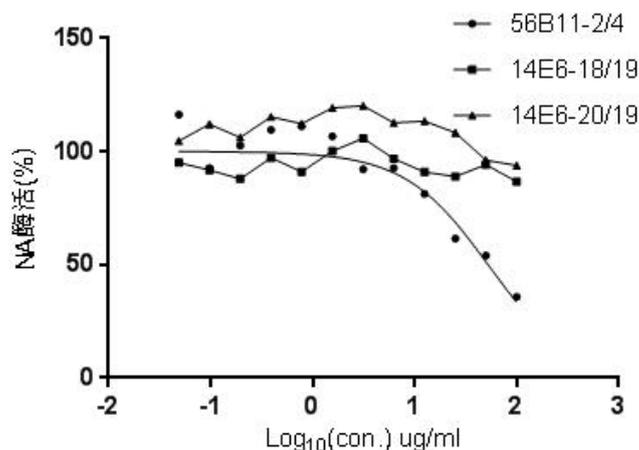


图 2.5 3 株抗体对 H7N9 病毒的 NI 活性

2.5 讨论

目前已筛选出的针对流感病毒血凝素的中和抗体多来源于自然感染和疫苗接种人群。绝大部分抗体中和病毒的亚型主要是 Group 1 病毒 (如抗体 MAb 3.1^[47]、F10^[48]、CR6261^[49]等), 而针对 Group 2 的中和抗体所占比例极小, 已筛选出的针对 Group 2 病毒的中和抗体有 CR8020^[50]、CR8043^[51]等。Group 2 中的 H3、H7、H10 亚型病毒对人类的威胁最大, H3N2 病毒曾经在 1968 年香港地区爆发并迅速蔓延, 引起世界大流行并导致全球 400 万左右的人群死亡^[52], H7N9

禽流感截止2019年3月已造成近40%的病死率^[9]，而H10N8、H7N4流感病毒也分别在2014年和2018年首次出现感染人的情况^[8, 53]，因此Group 2 HA亚型单抗制备对应对流感的暴发和流行具有重要意义。

本研究通过细胞转染及抗体的表达和纯化获得5株全人源单克隆抗体，并且分析了抗体的基因特点和生物学特性。1#和3#样本的重链基因均是以VH1-69为主，但这两份样本之间重链胚系基因种类的分布情况略有差别，轻链胚系基因的种类分布大致相近，其中占比较大的VK4-1、VK3-20、VK1-39抗体轻链编码基因在已报道的MAb 3.1、FI6^[38]、CR8020、MEDI8852^[54]等广谱中和抗体出现过。

在5株单抗中抗体56B11-2/4具有神经氨酸酶抑制活性，其IC₅₀约为52.46μg/ml。56B11-2/4编码重链的基因为VH3-9，此种基因在3#样本已克隆的孔中占据优势，但在已报道的中和抗体中这种基因几乎未曾见过，本研究中由其编码的1株抗体具有神经氨酸酶抑制活性，表明此抗体具有减少病毒复制的潜力。抗体10F10-13/13为广谱结合型抗体，对N9蛋白及多种HA蛋白均有很强的ELISA结合活性，流式细胞术显示其对H5N1和H5N6病毒表现出强结合能力。抗体10F10-13/13重链的编码基因为VH3-23，这种基因曾经在编码流感广谱中和抗体PN-SIA49和C05使用过，有文献报道此基因也出现在寨卡病毒中和抗体的编码基因中^[55]，由此可以推出VH3-23基因在产生具有中和作用的抗体上占据重要地位。

综上所述，筛选及鉴定抗流感病毒血凝素功能抗体，分析抗体编码基因特点和功能表位可对流感通用疫苗组分的设计提供科学依据，并在被动免疫治疗中具有重要实际意义。

第3章 抗H7亚型流感病毒抗原检测方法的建立

3.1 引言

本研究用超速离心初步纯化的灭活H7N9禽流感病毒免疫小鼠,通过杂交瘤技术制备H7特异性抗体,根据高亲和力选择两株单克隆抗体进行配对,建立DAS-ELISA抗原检测系统,并利用重组病毒、抗原蛋白对检测方法进行评价。

3.2 实验材料

3.2.1 细胞、动物、蛋白

- (1) 细胞: SP2/0 细胞由国家流感中心提供。
- (2) 动物: 6-8 周 SPF 级 Balb/c 小鼠。
- (3) 蛋白: 重组 H7 蛋白 A/Anhui/1/2013(H7N9)通过昆虫杆状病毒系统表达纯化。

3.2.2 病毒

本章实验所使用的病毒如表 3.1 所示,其他病毒毒株见 2.1。

表 3.1 病毒毒株名称及类型

病毒株	类型	亚型	类别
A/Sichuan/SWL1/2009	A,wt	H1N1	pdmH1N1
A/California/04/2009	A,wt	H1N1	H1N1
A/Netherlands/219/2003	A,rg	H7N7	Euro Avian
A/Guangdong/17SF003/2016	A,rg	H7N9	HP H7
B/Florida/4/2006	B	NA	Yamagata

3.2.3 实验主要试剂与耗材

本章实验中动物免疫、杂交瘤细胞培养、腹水制备与纯化、ELISA等所用的主要试剂见表3.2。

表3.2 实验主要试剂与耗材

试剂名称	生产商
磷酸盐缓冲液 (PBS)	Hyclone
牛血清白蛋白 (BSA)	Sigma
吐温-20 (Tween-20)	Sigma
弗氏完全佐剂 (CFA)	Sigma
弗氏不完全佐剂	Sigma
DMEM 培养基	Gibco
胎牛血清 (FBS)	四季青
青霉素/链霉素 (P/S)	Gibco
石蜡油	索莱宝
Hepes	Gibco
正辛酸	北京化工厂
饱和硫酸铵溶液	天威泰达
HAT	Gibco
浓盐酸	北京化工厂
浓硫酸	北京化工厂
HRP 标记试剂盒	博奥龙
乙酸乙酸钠缓冲液	天威泰达
PEG1450	Sigma

3.2.4 实验所需溶液及其配制方法

本章内容 ELISA 及纯化抗体实验所需的溶液及配制方法见第二章 2.2.6 部分，所需细胞培养基的配制方法见下表（表 3.3）。

表 3.3 实验所需溶液及其配制方法

溶液名称	配制方法
SP2/0 细胞培养基	DMEM+10%FBS+1%P/S
杂交瘤选择培养基	DMEM+20%FBS+1%P/S+1×HAT

3.2.5 实验耗材与仪器

本章内容所需实验耗材和仪器参照第二章 2.2.7 部分。

3.3 实验方法

3.3.1 免疫原的制备

(1) 将重组 H7N9 病毒 A/Anhui/1/2013 接种于 9-10 日龄 SPF 级鸡胚中，37℃ 孵育 48h。

(2) 收集尿囊液并使用β-丙内酯灭活，先低速离心去沉淀，然后 32000rpm 超速离心 90min，去上清，用冷的 PBS 重悬沉淀并 4℃ 过夜。

(3) 将重悬液加入 30%/60%的蔗糖溶液上，20000rpm 密度梯度离心 1h，分层后，取病毒悬液层，以此纯化病毒。

3.3.2 动物免疫

(1) 初次免疫：将灭活并纯化的重组 H7N9 病毒与等体积的弗氏完全佐剂混匀乳化后，对每只小鼠采用腹部皮下免疫方式。

(2) 第二、三次免疫：第一、二、三次免疫均间隔三周进行，抗原量减半，并与等体积的弗氏不完全佐剂混匀乳化后，免疫接种同上。

(3) 融合前三天需腹腔注射抗原以加强免疫。

3.3.3 细胞融合

3.3.3.1 SP2/0 细胞培养和饲养层细胞的制备

(1) 准备 SP2/0 细胞并进行细胞扩增或传代培养。

(2) 取空白小鼠处死并置于 75%的酒精浸泡消毒，收集全血上清作为空白对照备用，分装保存于-20℃冰箱。

(3) 消毒后的小鼠转移至生物安全柜中，取高压灭菌的剪刀剪开小鼠腹膜并用培养基冲洗腹腔收集腹腔冲洗液。

(4) 用培养基稀释腹腔冲洗液至合适浓度然后每孔 100ul 接种 96 孔板过夜

培养。

3.3.3.2 小鼠脾细胞的制备

(1) 取提前三天进行过冲击加强免疫的小鼠眼球摘除处死，取全血按照上述步骤制备阳性血清做为杂交瘤筛选阳性对照。

(2) 无菌操作分离脾脏并用两个载玻片的磨砂面充分碾磨脾脏，获得单个脾细胞悬液。

3.3.3.3 细胞融合

(1) 将脾细胞悬液轻轻吹打混匀离心清洗细胞一次，收集 SP2/0 细胞，用 DMEM 空白细胞培养基重悬细胞，离心清洗细胞两次。

(2) 对脾细胞和 SP2/0 细胞进行计数，按照合适比例充分混匀并离心。

(3) 弃上清并在 1min 内向管中加入 1ml 预热的 PEG1450 使脾细胞和 SP2/0 融合，随后补加预热的 DMEM 空白培养基。

(4) 离心后弃上清并加入选择培养基，接种到含饲养层细胞的培养板中。

(5) 融合后第六天换全液，第八天换全液并且观察杂交瘤细胞生长状况。

3.3.4 阳性克隆孔的筛选

当细胞状态良好且铺满孔底 1/4 面积时，按照第二章 2.3.3 部分通过间接 ELISA 筛选出细胞上清阳性的克隆孔，并进行亚克隆化。

3.3.5 亚克隆化

(1) 对于筛选阳性的细胞克隆孔，用枪头轻轻吹匀细胞并取出 50 μ l 在新的 96 孔细胞培养板中进行 2 倍系列稀释。

(2) 显微镜下对稀释的每孔进行计数，选取细胞量 60-100 的孔并稀释至 10ml 以每孔 100 μ l 加入新的 96 孔中并置于细胞培养箱中。

(3) 第 4 天显微镜下观察，将含有单个细胞集落的孔做上标记，第 10 天左右，对各孔上清进行 H7 抗原 ELISA 鉴定，选择阳性克隆孔进行扩大培养并冻存。

3.3.6 单抗的制备

3.3.6.1 腹水的制备

- (1) 提前一周向小鼠腹腔注射石蜡油刺激巨噬细胞的聚积。
- (2) 待杂交瘤细胞状态良好时收集细胞，并用无菌 PBS 清洗细胞 1-2 次，最后用适量的 PBS 重悬细胞沉淀，将杂交瘤细胞悬液注入小鼠腹腔。
- (3) 第十天左右收集腹水离心去杂质并收集上清。

3.3.6.2 单抗的纯化

(1) 辛硫酸铵沉淀法

- 1) 按照腹水与乙酸乙酸钠缓冲液 (0.06M pH=4.0) 体积比 1:3 的比例先将缓冲液加入小烧杯中，再缓慢滴加腹水，在磁力搅拌器的作用下混匀 15min。
- 2) 向小烧杯中加入适量的正辛酸 (每 1ml 腹水加 30 μ l)，搅拌半个小时后离心去沉淀。
- 3) 用注射器小心吸取上清并过滤，然后逐滴滴加等体积的饱和硫酸铵溶液，充分混匀后 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日离心后用适量的 PBS 充分溶解沉淀。
- 4) 将上述重悬液加入已通过沸水处理过的透析袋中，然后放入盛有 PBS 缓冲液的大烧杯中，于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜透析。次日收集透析袋内抗体并测量抗体浓度，分装保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。

(2) Protein G 亲和层析

具体操作方法参照第二章步骤 2.3.9 部分。其中辛硫酸铵沉淀法纯化的抗体 (未经透析) 用 PBS 稀释至中性，通过除杂质和除气泡处理后再经蠕动泵循环上样。

3.3.7 间接 ELISA 筛选高亲和力 H7 单抗

间接 ELISA 法筛选高亲和力 H7 单抗具体操作见第二章步骤 2.3.3。

3.3.8 H7 单抗的 HI 检测

H7 单抗的 HI 效价的检测具体操作见第二章步骤 2.3.4。

3.3.9 DAS-ELISA 抗原检测方法的建立

3.3.9.1 HRP 标记二抗

(1) 标记物准备：用 0.01M PBS (pH=7.4) 通过超滤管超滤以去除标记物中的甘油、叠氮钠、氨基物质、EDTA 等，并将抗体浓度调整为 2mg/ml，体积约为 100 μ l。

(2) 标记反应：向标记物中加入 10 μ l 的标记缓冲液并充分混匀，将以上混合溶液加入到活化的 HRP 管中，吹打混匀后置于室温避光反应 3h。

(3) 标记反应终止：将 1ml 去离子水加入到反应终止液干粉管中，配成反应终止液，并从中取出 1 μ l 加入以上反应液中终止反应，充分混匀后室温放置 1h。

(4) 标记物产物的保存：向标记物产物中加入等体积的标记物保存液充分混匀后至 -20 $^{\circ}$ C 保存。

3.3.9.2 捕获抗体和酶标二抗最佳工作浓度的确定

(1) 包被抗体：将纯化的单抗用碳酸盐包被缓冲液稀释至 1、2、4 μ g/ml，并包被于 96 孔酶标板中，置于 4 $^{\circ}$ C 过夜。

(2) 封闭：次日使用 1%BSA 进行封闭，37 $^{\circ}$ C 孵育 2h。

(3) 抗原：选择重组病毒 A/Anhui/1/2013(H7N9) 作为抗原。将抗原从 8HAU/50 μ l 起做 2 倍稀释，以 50 μ l/孔加入酶标板中，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

(4) 酶标二抗：使用 PBST 洗液清洗板子 6 遍。将 HRP 标记的抗体按 1:1000、1:2000 稀释，以 50 μ l/孔加入酶标板中，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。

(5) 显色：使用 PBST 洗液清洗板子 6 遍，以 100 μ l/孔加上 TMB 显色液。

(6) 终止：避光反应 3min 后每孔加入 50 μ l 的终止液，使用 Nanodrop 于 450-630nm 处读数。

3.3.9.3 DAS-ELISA 特异性检测

选择抗体最佳稀释度组合，使用不同 HA 亚型 (H1, H5, H6, H9, H11, H12 及 H13) 的甲型流感病毒以及乙型 Yamagata 系流感病毒进行特异性检测。

3.3.9.4 DAS-ELISA 灵敏度检测

采用包被抗体和酶标抗体的最佳稀释度组合，使用三组 H7 重组流感病毒 A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9) ， A/Netherlands/219/2003(H7N7) ， A/Anhui/1/2013(H7N9) 以及 H7 重组蛋白进行灵敏度检测，确定检测系统对 H7 重组病毒及蛋白的最低检测限。

3.4 结果

3.4.1 单抗筛选结果

本实验共获得 12 株 H7 特异性的单克隆抗体, 分别命名为 1B10、1F2、1H2、1G2、1G6、1G8、1A12、1E12、2B6、2C9、2D7、5E9, 其中 5 株单抗对 H7 亚型病毒的 HI 反应为阳性(表 3.4)。选取 HI 阳性的杂交瘤制备小鼠腹水并采用辛酸胺沉淀法粗提纯抗体, 以 400 μ g/ml 的起始浓度倍比稀释, 测得单抗对 不同病毒 (A/Anhui/1/2013/H7N9、A/Netherlands/219/2003/H7N7、A/California/04/2009/H1N1、A/Hongkong/2009/H3N2) 的 HI 效价。

表 3.4 单抗对不同病毒 HI 效价

mAb	H7N9	H7N7	H1N1	H3N2
2B6	≥ 1280	640	<10	<10
5E9	≥ 1280	320	<10	<10
1G6	640	640	<10	<10
1B10	640	320	<10	<10
1F2	160	160	<10	<10

3.4.2 捕获抗体和酶标二抗最佳稀释度

选取 HI 效价最高的两个单抗(2B6 和 5E9)使用 AKTA 蛋白纯化仪纯化抗体。固定病毒 A/Anhui/1/2013(H7N9)的用量为 4HAU/50 μ l, 最终确定最佳组合为选择 2B6 作为包被抗体和 5E9 作为酶标二抗。此外, 根据 P/N 值(阳性孔 OD 值/阴性孔 OD 值), 确定包被抗体的浓度为 2 μ g/ml, 酶标抗体稀释倍数为 1:1000 可以获得最佳组合, 结果见表 3.5。

表 3-5 抗体工作浓度的组合

包被浓度 (μ g/ml) 及 酶标抗体稀释倍数	1		2		4	
	1:1000	1:2000	1:1000	1:200	1:1000	1:2000
4HAU/50 μ l 时 P/N	3.9	3.2	6	4.5	3.7	2.6

3.4.3 最低检测限的确定

使用 4HAU/50 μ l 的流感病毒 H1N1, H5N1, H6N2, H9N2, H11N3, H12N5 及 H13N8 进行特异性检测。阴性对照为 NP 蛋白, 待测孔的 OD 值大于阴性孔的 2.1 倍以上可以判定为阳性。如图 3.1 显示, 此双抗体夹心 ELISA 仅与 H7 亚型流感病毒反应, 而不与其他亚型病毒反应, 特异性良好。使用重组病毒 A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9), A/Netherlands/219/2003(H7N7), A/Anhui/1/2013(H7N9) 及重组 H7 蛋白作为抗原进行灵敏度检测, 流感病毒 A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9) 最低检测限为 0.5HAU/50 μ l (图 3.1 A), A/Netherlands/219/2003(H7N7) 和 A/Anhui/1/2013(H7N9) 的最低检测限为 2HAU/50 μ l (图 3.1 B); 重组 H7 蛋白最低检测限为 10ng/ml, 呈剂量反应关系 (图 3.1 C)。

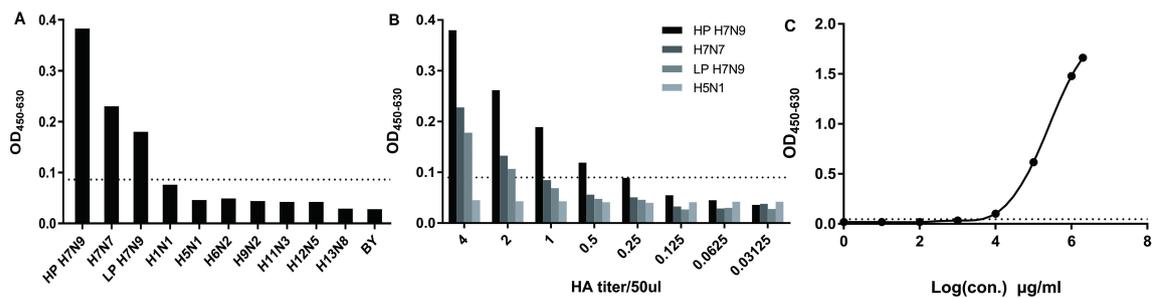


图 3.1 DAS-ELISA 的灵敏性和特异性

3.5 讨论

不同人群对流感病毒可表现出从轻症发热和咳嗽到重症肺炎等不同程度的临床表现, 一般在临床上只需要对症治疗, 而病因的诊断对治疗手段的选择可以提供参考, 采用合适的治疗药物可以提高患者的治愈率。流感监测系统是对流感活动、毒株特点以及经济负担进行监测, 当前各种实验室检测手段对流感流行频率的观察性和流行病学研究具有积极的影响, 如疫苗效果的评价。病毒分离是流感诊断的金标准, 只是需要合适的细胞培养系统; 而血清学检测则依赖于人群中的抗体滴度, 但无法区分无症状患者和有症状患者。RT-PCR 的发展对于理解流感经济负担和易感人群起到促进作用, 但在用于大样本操作时容易发生污染并出现假阳性, 因此快速、简单且有效的检测手段才能满足目前的需

求。现今快速抗原诊断已广泛用于临床并能提供比PCR更加有效的即时诊断。

本章研究根据HI活性从5株H7特异性鼠源单抗中选取了2株抗体建立了DAS-ELISA法检测H7抗原的方法。鼠抗筛选方法和抗原检测平台的建立参照于跃洋等研究,最终确定包被抗体2B6浓度为 $2\mu\text{g/ml}$ 以及酶标二抗5E9的稀释浓度为1:1000时可以得到最佳组合^[56, 57]。利用A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9), A/Netherlands/219/2003(H7N7), A/Anhui/1/2013(H7N9)这3个H7亚型毒株以及重组H7蛋白对检测方法进行了灵敏度测试,结果显示A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9)最低检测限为 $0.5\text{HAU}/50\mu\text{l}$, A/Netherlands/219/2003(H7N7)和A/Anhui/1/2013(H7N9)的最低检测限为 $2\text{HAU}/50\mu\text{l}$;重组H7蛋白最低检测限为 10ng/ml ,呈量-效反应关系。使用H1N1, H5N1, H6N2, H9N2, H11N3, H12N5及H13N8不同流感病毒进行特异性检测,结果表明此DAS-ELISA的特异性良好,仅与H7亚型流感病毒反应,而不与BY病毒以及其他HA亚型病毒反应。针对疫苗的HA定量检测需要每年更新抗血清,并且不同实验室之间重复性较差,本章内容所建立的DAS-ELISA检测手段灵敏度高,特异性强,完全能够满足对疫苗HA定量检测的要求。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

流感主要通过呼吸道传播，由于其潜伏期短且发病快从而在密切接触的人群中会出现暴发流行。有研究表明，通过加强手部卫生和流感季节佩戴口罩可以有效减少上呼吸道的感染^[58, 59]。流感病毒表面的血凝素作为重要的作用靶点，能够诱导中和抗体的产生，可以为实验室诊断和临床抗病毒治疗提供思路。

通过实验研究本课题获得了以下结论：

(1) 通过 B 细胞体外培养技术获得 5 株全人源单克隆抗体，在 5 株单抗中 56B11-2/4 具有神经氨酸酶抑制活性，其 IC₅₀ 约为 52.46μg/ml；抗体 10F10-13/13 为广谱结合型抗体，对 N9 蛋白及多种 HA 亚型蛋白均有很强的 ELISA 结合活性。

(2) 通过杂交瘤技术制备 12 株针对 H7N9 流感病毒血凝素的鼠源单克隆抗体，其中 5 株具备 HI 活性。选取两株 HI 活性最强的 H7 特异性单抗 2B6 和 5E9，建立了 DAS-ELISA 快速检测 H7 亚型禽流感病毒抗原的方法。结果显示建立的双抗体夹心 ELISA 平台仅对 H7 亚型流感病毒反应，而不与其他亚型病毒（pdmH1N1, H5N1, H6N2, H9N2, H11N3, H12N5, H13N8 及 BY）反应。用 H7 亚型流感病毒和重组 H7 蛋白对 DAS-ELISA 的灵敏度进行了检测，重组病毒 A/Guangdong/17SF003/2016(H7N9) 最低检测限为 0.5HAU/50μl，A/Netherlands/219/2003(H7N7) 和 A/Anhui/1/2013(H7N9) 的最低检测限为 2HAU/50μl；重组 H7 蛋白最低检测限为 10ng/ml，且呈剂量反应关系。此双抗体夹心 ELISA 方法对 H7 抗原的检测表现出高灵敏性和强特异性。不同于传统的病毒学检测手段，DAS-ELISA 方法以其快速、简单而有效的优势具备巨大的应用价值，可用于病毒的检测和 HA 疫苗的定量，为 H7N9 禽流感病毒的诊断和防控提供了选择。

4.2 局限性与展望

本课题在筛选人源 H7 单克隆抗体时所采用的技术路线具备一定的优势，在

筛选过程中可通过抗体基因型和表型之间呈现的相互联系探讨抗体特性及其内部规律,但也存在一定的不足。本研究所使用的 3 例 H7N9 感染患者的全血样本均采集自感染 1-2 周内,此时从外周血中已经能够分离到交叉反应性记忆 B 细胞。从 3 例患者血清的 HI 效价可以分析得出,这 3 例患者在 1-2 周内随着采集时间距感染时间的增加,HI 效价越高。HI 效价往往与抗体水平呈正相关。从 1# 和 3# 样本较难筛到针对 H7 的特异性抗体以及中和抗体,获得的大部分抗体多为广谱结合型抗体。根据免疫应答特点选择合适的免疫策略以及恰当的采血时间点,对获得高质量的人源 H7 单克隆抗体具有重要意义^[60]。

流感对人类和社会造成巨大的危害,由于流感经常发生变异并容易在抗体的选择压力下发生逃逸,这对中和抗体的研发提出了巨大的挑战。流感病毒血凝素茎部基因比较保守,较少发生突变,针对茎部的广谱中和抗体具有广阔的治疗应用价值。灵敏、特异、快速的实验室检测技术在流感监测和临床诊断中发挥着重要作用,开发具有实用价值的快检试剂盒可以提高流感病毒检测的阳性率,有助于预防和应对流感大流行。

致 谢

时间飞逝，一转眼三年的研究生的生活已接近尾声。

感谢我的硕士生导师刘明斌老师给我提供很好的学习资源和科研平台，您对科研的热情深深的影响着我。

感谢我的指导老师周剑芳老师和秦堃老师指导我的课题，两位老师严谨的学术作风是我学习的榜样。感谢两位老师锻炼了我独立解决问题的能力，感谢秦老师对我科研能力和科研思维的训练，尽心尽力的帮我修改论文并指导论文的发表，耐心解答我各种天马行空乱七八糟的问题，一直以来非常感激几位老师的悉心教导。

感谢鲁健老师、郭俊峰老师、蓝雨老师、刘丽琦老师、李梓老师在生活和学习上的关照。

感谢我的同门阮菲儿同学可以相互学习和交流；感谢于悦洋师姐和孙颖师姐给我提供的各种帮助并给予实验上的指导；感谢刘素丽师姐、蕾娜师姐、李旭师哥和孙强师哥解答我实验上的疑问。

感谢南昌大学谷苗苗师姐、况丽华师姐和李振师哥。

感谢南昌大学公共卫生学院、国家流感中心和南昌市疾病预防控制中心。

感谢我亲爱的亲人和朋友给予的巨大鼓励与支持。

感谢我亲爱的室友热心帮我传达和处理学校的各种事情。

陈玲玲
2019年6月

参考文献

- [1] Johnson N P A S, Juergen M. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic[J]. *Bull Hist Med*, 2002,76(1):105-115.
- [2] Murray C J L, Lopez A D, Brian C, et al. Estimation of potential global pandemic influenza mortality on the basis of vital registry data from the 1918-20 pandemic: a quantitative analysis[J]. *Lancet*, 2006,368(9554):2211-2218.
- [3] Viboud C, Simonsen L, Fuentes R, et al. Global Mortality Impact of the 1957-1959 Influenza Pandemic[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2016,213(5):738-745.
- [4] Coleman M, Dowdle W, Pereira H, et al. THE HONG KONG/68 INFLUENZA A2 VARIANT[J]. *Lancet*, 1968,292(7583):1384-1386.
- [5] Dawood F S, Iuliano A D, Reed C, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study.[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2012,12(9):687-695.
- [6] Jong J C D, Claas E C J, Osterhaus A D M E, et al. A pandemic warning?[J]. *Nature*, 1997,389(6651):554.
- [7] Rongbao G, Bin C, Yunwen H, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *New England Journal of Medicine*, 2013,368(20):1888.
- [8] Haiying C, Hui Y, Rongbao G, et al. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study[J]. *Lancet*, 2014,383(9918):714-721.
- [9] <https://iris.wpro.who.int/bitstream/handle/10665.1/14328/AI-20190322.pdf>.
- [10] Virlogeux V, Feng L, Tsang T K, et al. Evaluation of animal-to-human and human-to-human transmission of influenza A (H7N9) virus in China, 2013-15[J]. *Sci Rep*, 2018,8(1).
- [11] Zhou L, Ren R, Ou J, et al. Risk Factors for Influenza A(H7N9) Disease in China, a Matched Case Control Study, October 2014 to April 2015[J]. *Open forum infectious diseases*, 2016,3(3):w182.
- [12] Su S, Gu M, Liu D, et al. Epidemiology, Evolution, and Pathogenesis of H7N9 Influenza Viruses in Five Epidemic Waves since 2013 in China[J]. *TRENDS IN MICROBIOLOGY*, 2017,25(9):713-728.
- [13] Hongjie Y, Cowling B J, Luzhao F, et al. Human infection with avian influenza A H7N9 virus: an assessment of clinical severity[J]. *Lancet*, 2013,382(9887):138-145.
- [14] Su S, Gu M, Liu D, et al. Epidemiology, Evolution, and Pathogenesis of H7N9 Influenza Viruses in Five Epidemic Waves since 2013 in China[J]. *Trends in Microbiology*, 2017,25(9):713.
- [15] Teng Y, Bi D H, Guo X C, et al. Contact reductions from live poultry market closures limit the epidemic of human infections with H7N9 influenza[J]. *JOURNAL OF INFECTION*, 2018,76(3):295-304.
- [16] Offeddu V, Cowling B J, Malik Peiris J S. Interventions in live poultry markets for the control of avian influenza: a systematic review.[J]. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, 2016,2.

- [17] https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2018_19_north/en/.
- [18] Houser K, Subbarao K. Influenza Vaccines: Challenges and Solutions[J]. *Cell Host & Microbe*, 2015,17(3):295-300.
- [19] Claude H. The evolving history of influenza viruses and influenza vaccines[J]. *Expert Review of Vaccines*, 2013,12(9):1085-1094.
- [20] Bao D, Li Z, Liu Q, et al. H7N9 avian influenza A virus in China: a short report on its circulation, drug resistant mutants and novel antiviral drugs[J]. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 2017,15(8).
- [21] Fry A M, Gubareva L V. Understanding influenza virus resistance to antiviral agents; early warning signs for wider community circulation[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2012,206(2):145-147.
- [22] Pielak R M, Schnell J R, Chou J J. Mechanism of drug inhibition and drug resistance of influenza A M2 channel[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009,106(18):7379-7384.
- [23] Jong M D D, Thanh T T, Huu Khanh T, et al. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection[J]. *N Engl J Med*, 2005,353(25):2667-2672.
- [24] Anne M. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza[J]. *New England Journal of Medicine*, 2009,360(10):953-956.
- [25] Amano Y, Cheng Q. Detection of influenza virus: traditional approaches and development of biosensors[J]. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2005,381(1):156-164.
- [26] Yu Y, Zhang X, Zhao B, et al. A sandwich ELISA for the detection of neuraminidase of avian influenza A(H7N9) virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2017,247:58-60.
- [27] Smith G P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface[J]. *Science*, 1985,228(4705):1315-1317.
- [28] Mattheakis L C, Bhatt R R, Dower W J. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1994,91(19):9022-9026.
- [29] Lanzavecchia A. Monoclonal antibody production by EBV transformation of B cells[J]. *Institute for Research in Biomedicine*, 2011.
- [30] KÖHLER G, MILSTEIN C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*, 1975,256.
- [31] Weiner L M. Fully human therapeutic monoclonal antibodies[J]. *Journal of Immunotherapy*, 2006,29(1):1-9.
- [32] And G P S, Petrenko V A. Phage Display[J]. *Chemical Reviews*, 1997,97(97):391-410.
- [33] Kenneth S, Lori G, Jens W, et al. Corrigendum: Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen[J]. *Nature Protocols*, 2009,4(3):372.
- [34] Tiller T, Meffre E, Yurasov S, et al. Corrigendum to ‘Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning’ [J]. *Immunol. Methods* 329 (2008) 112 - 124[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2008,329(1-2):112-124.
- [35] Buss N A, Henderson S J, Mcfarlane M, et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and

- future[J]. *Current Opinion in Pharmacology*, 2012,12(5):615-622.
- [36] Chen S, Li J, Li Q, et al. Bispecific Antibodies in Cancer Immunotherapy[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2016,12(10):2491-2500.
- [37] Wu X X, Gao H N, Wu H B, et al. Successful treatment of avian-origin influenza A (H7N9) infection using convalescent plasma[J]. *International Journal of Infectious Diseases*, 2015,41:3-5.
- [38] Davide C, Jarrod V, Gamblin S J, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins[J]. *Science*, 2011,333(6044):850-856.
- [39] Widdowson M A, Bresee J S, Jernigan D B. The Global Threat of Animal Influenza Viruses of Zoonotic Concern: Then and Now[J]. *Journal of Infectious Diseases*, 2017,216(suppl_4):S493.
- [40] Watanabe T, Watanabe S, Maher E A, et al. Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses[J]. *Trends in Microbiology*, 2014,22(11):623-631.
- [41] Mathilde R, Schrauwen E J A, Miranda D G, et al. Limited airborne transmission of H7N9 influenza A virus between ferrets[J]. *Nature*, 2013,501(7468):560.
- [42] Yang Q, Shi W, Zhang L, et al. Westward Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H7N9) Virus among Humans, China[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2018,24(6):1095-1098.
- [43] Matías-Guiu J, Guerrero M, López-Trigo J, et al. Development and evaluation of a DAS-ELISA for rapid detection of avian influenza viruses.[J]. *Avian Diseases*, 2006,50(3):325-330.
- [44] Yang J, Dai X, Chen H, et al. Development of blocking ELISA for detection of antibodies against H9N2 avian influenza viruses[J]. *Journal of Virological Methods*, 2016,229.
- [45] Wang D, Qin K, Guo J, et al. Expression of Chimeric Influenza Hemagglutinin Antigen(cH7/3)using the Baculovirus Expression System and Identification of its Biological Activities[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2015,31(5):524.
- [46] 孙颖. 来源于 H5N1 禽流感患者的广谱抗血凝素蛋白抗体筛选及其功能研究[D]. 中国疾病预防控制中心, 2018.
- [47] Wyrzucki A, Dreyfus C, Kohler I, et al. Alternative Recognition of the Conserved Stem Epitope in Influenza A Virus Hemagglutinin by a V(H)3-30-Encoded Heterosubtypic Antibody[J]. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 2014,88(12):7083-7092.
- [48] Sui J, Hwang W C, Perez S, et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009,16(3):265.
- [49] Cui W, Wang K, Ruan J S, et al. The Molecular Mechanism of Action of the CR6261-Azichromycin Combination Found through Computational Analysis[J]. *PLOS ONE*, 2012,7(5).
- [50] Ekiert D C, Friesen R H E, Gira B, et al. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses[J]. *Science*, 2011,333(6044):843-850.
- [51] Friesen R, Lee P S, Stoop E, et al. A common solution to group 2 influenza virus neutralization[J]. *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 2014,111(1):445-450.
- [52] Cockburn W C, Delon P J, Ferreira W. Origin and progress of the 1968-69 Hong Kong influenza epidemic.[J]. *Bulletin of the World Health Organization*, 1969,41(3).

- [53] Tong X C, Weng S S, Xue F, et al. Human infection of novel avian influenza A(H7N4) virus[J]. *Journal of Infection*, 2018:S337852494.
- [54] Kallewaard N L, Corti D, Collins P J, et al. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes[J]. *CELL*, 2016,166(3):596-608.
- [55] Robbiani D F, Bozzacco L, Keeffe J R, et al. Recurrent Potent Human Neutralizing Antibodies to Zika Virus in Brazil and Mexico[J]. *CELL*, 2017,169(4):597-609.
- [56] 于悦洋. H7N9 流感病毒神经氨酸酶特异性单克隆抗体的制备及其应用研究[D]. 中国疾病预防控制中心, 2017.
- [57] 于悦洋, 谢怡然, 陈迎珠, 等. 抗 H7N9 亚型流感病毒神经氨酸酶单克隆抗体的制备及初步鉴定[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2017,31(1):66-70.
- [58] Liu M B, Ou J M, Zhang L J, et al. Protective Effect of Hand-Washing and Good Hygienic Habits Against Seasonal Influenza A Case-Control Study[J]. *MEDICINE*, 2016,95(11).
- [59] Zhang L J, Peng Z B, Ou J M, et al. Protection by Face Masks against Influenza A(H1N1)pdm09 Virus on Trans-Pacific Passenger Aircraft, 2009[J]. *EMERGING INFECTIOUS DISEASES*, 2013,19(9):1403-1410.
- [60] Ellebedy A H, Jackson K J L, Kissick H T, et al. Defining antigen-specific plasmablast and memory B cell subsets in human blood after viral infection or vaccination[J]. *Nature immunology*, 2016,17(10):1226-1234.

攻读学位期间的研究成果

已发表论文

[1] **Chen L**, Ruan F, Liu M, et al. A sandwich ELISA for detecting the hemagglutinin of avian influenza A (H10N8) virus. *J Med Virol*. 2018 Dec 29. doi: 10.1002/jmv.25387.

[2] **Chen L**, Ruan F, Sun Y, et al. Establishment of sandwich ELISA for detecting the H7 subtype influenza A virus. *J Med Virol*. 2019 Jan 24. doi: 10.1002/jmv.25408.

综述

流感病毒及单克隆抗体的研究进展

陈玲玲 综述 刘明斌 审校

流感病毒是一种常见的可引起人类急性呼吸道感染的疾病。在过往百年里，已在全世界出现了 5 次流感大流行，不仅对人类健康造成重大威胁，还给社会经济造成了巨大的损失。流感可以发生在任何季节以及全球的任何区域，当前对于流感的监测网络并不完善。随着流感病毒的抗原性变异和耐药株的不断出现，寻找更有效的控制措施，已成为一个亟待解决的问题。单克隆抗体技术问世四十多年以来，在医学领域的许多方面得到了迅速发展和应用，获得了广泛的关注。目前已有大量靶向流感病毒血凝素和神经氨酸酶的单克隆抗体，对流感的被动免疫治疗、加强流感监测等方面均具有重大的意义。

关键词：流感病毒，单克隆抗体，临床应用

流感一直是全人类重要的公共健康问题。从 1918 年 H1N1 亚型引起的西班牙流感，流感的暴发和流行给人类健康和社会经济造成了巨大的经济损失。流感的潜伏期较短，全年皆可发病，但暴发和流行具有一定的季节性。人群对流感普遍易感，根据世界卫生组织统计，全球流感发病率很高，尤其是老人和儿童人群，每年由流感导致的并发症患者有 300~500 万人^[1]，其中死亡人数为可达到 1/10，而我国的疫苗接种率很低，无法有效应对流感流行，因此若不注意预防，很容易出现传染流行。由此可见抗流感病毒治疗性和诊断性单克隆抗体的研发对流感流行的准备和应对具有积极作用。

1. 流感病毒的病原学特征

甲型流感病毒的基因组是由分子量不等的 8 个节段单链 RNA 组成。流感病毒表面的血凝素（hemagglutinin, HA）蛋白是由 RNA4 节段编码，通过水解可以分为重链 HA1 和轻链 HA2。重链长约 319-326 个残基，可以与宿主细胞膜上的唾液酸受体相互结合，而轻链长约 221-222 个残基，可以协助病毒包膜与宿主细胞膜相互融合。病毒在侵入人体时由于 HA 抗原可诱导产生中和抗体并对机体产生保护作用。HA 根据抗原性不同可以分为 16 个亚型（H1-H16），并可划分为两组（group），即 group1（H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16）和

group 2 (H3, H4, H7, H10, H14, H15) [2]。神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 也是病毒表面一种重要的糖蛋白, 它是由 RNA6 节段编码, 分子量大小约 1413 个核苷酸。NA 蛋白能够水解唾液酸, 也具有免疫原性, 诱导产生的 NA 抗体不能中和病毒感染, 但能减少病毒的增殖和扩散[3]。

2. 流感病毒的致病机制和治疗药物

呼吸道是流感病毒攻击哺乳动物的主要部位, 肺泡上皮的损伤可以影响肺部气体的交换功能并引起严重甚至致命的呼吸系统并发症。婴幼儿、老年人和患有基础性疾病尤其是心血管疾病、呼吸道疾病以及糖尿病等人群更容易感染禽流感并引发各种严重并发症甚至死亡[4,5]。H7N9 流感病毒在中国已经出现了 5 波流行, 从 2013 年出现第一例 H7N9 人感染患者到 2019 年 3 月 22 日, 全球共有 1567 例实验室确诊病例, 并造成了近 40% 的死亡率[6]。猪流感的发病率很高但致死率很低, 不同禽类的流感病毒的致病性存在很大差异, 低致病禽流感病毒如 H7N7、H9N2 等可引起野鸟和家禽的无症状感染, 而高致病禽流感病毒可引起出血和水肿等全身性疾病。目前禽流感感染人类的致病机制根据现有的研究可以猜测以下几个方面: 一是流感病毒的基因组容易发生变异, 从而会对病毒的毒力效应、复制能力以及传播能力造成改变, 二是禽流感病毒感染人后可以诱导产生细胞因子风暴从而介导炎症的发生, 并与疾病各种严重的并发症相关, 三是病毒对机体内补体的过度激活会引发人体的急性肺损伤, 四是人体组织的某些部位与甲型流感病毒可能存在异嗜性抗原表位, 从而导致自身免疫性疾病[7]。

目前临床上主要的抗流感病毒药物主要为神经氨酸酶抑制剂、M2 离子通道抑制剂以及病毒融合阻断剂。神经氨酸酶抑制剂如奥司他韦、卡那米韦等主要通过阻止病毒从宿主细胞释放从而避免病毒的扩散[8][61]。而 M2 离子通道抑制剂如金刚烷胺等能够干扰病毒粒子 M2 蛋白离子通道功能, 间接的抑制了病毒复制, 或在低 PH 下间接改变血凝素结构从而发挥抗流感的作用, 不过由于副作用过大并且出现耐药目前已被禁止使用。病毒融合阻断剂如阿比多尔能够增强 HA 的稳定性, 阻止 HA 在酸性环境下转变为融合状态的 HA, 从而阻止病毒与宿主细胞的融合[9]。近年来已有针对多种药物的耐药株出现, 为抗病毒的治疗带来了挑战[10-14]

3. 单克隆抗体技术

单克隆抗体 (Monoclonal antibody, mAb) 技术是在 1975 年由英国科学家

Milstein 和瑞典科学家 Kohler 所发明的^[15]，它是由小鼠的骨髓瘤细胞和脾细胞相互融合后产生的特异性抗体。在随后短短的 40 年内，单克隆抗体的迅猛发展，由于其独有的特征已迅速应用于医学领域的许多方面。根据单抗的种类可以将目前的单克隆抗体分为鼠源性单抗、人鼠嵌合单抗、人源化单抗以及人源性单抗^[16]，其特点如表 1 所示。但是鼠源成分大大限制了治疗性抗体在人群中的使用，随着技术的发展，基因工程抗体不断优化和发展以更加适应临床的需要。从分子形式上又可分为五种，即全长抗体，抗原结合片段，单链单抗，单域抗体以及最小识别单位等^[17]。单抗药物主要根据人体自身的免疫系统，通过抗原抗体的特异性免疫反应从而阻断或消灭抗原达到治疗疾病的目的。随着技术的发展，出现了能够识别多个靶点的双特异性抗体如治疗腹水的卡索妥抗体以及治疗白血病的博纳吐抗体，这些新的技术手段展现了单抗药物巨大的治疗前景，为肿瘤癌症等各种疑难杂症的治疗提供了可能。

疾病新靶标的发现促进了单抗药物的发展，经过四十几年的发展，单抗药物成为生物医药行业的重要组成部分。1986 年用于治疗肾移植排斥的抗 CD3 单抗是全球首个得到批准并应用于临床的单克隆抗体^[18]。肿瘤和免疫性疾病是单抗治疗的重点领域^[19]。单克隆抗体可以与化学药物相连接，根据抗体的特异性靶向作用直接作用于肿瘤细胞。从 2010 年以来批准上市的用于癌症治疗的单抗药物大约有 20 来种，单抗药物的高效性和强特异性对于癌症的治疗发挥着重要的作用^[20-22]。此外，单克隆抗体因其强特异性、高纯度和优异的均一性，还可作为实验室的临床诊断试剂有助于疾病的早期发现^[23]。

H7N9 自暴发以来，由于其高致病性及高死亡率逐渐引起科研工作者的注意^[24]。研究人员建立了 RT-PCR、纳米荧光颗粒试纸条检测方法以及胶体金试剂检测方法以期望对流感病毒的早期监测提供技术手段^[25]。有研究证明，运用单克隆技术研究组陆续筛选到针对流感病毒不同亚型不同靶位的特异性或广谱抗体，极好的应用于流感病毒的实验室及临床诊断^[26-28]，此外对于流感疫苗的研发也有参考价值^[29-31]。如通过杂交瘤技术制备的靶向 N9 的鼠源单抗建立起来的 DAS-ELISA 具有高灵敏度，对于临床样本的检测具有巨大的应用价值^[32]。从自然感染或者疫苗接种的人体和小鼠中分离的几种具有针对多种流感病毒亚型有广谱中和活性的单克隆抗体在临床治疗方面取得了新的进展。如针对一种或多种 Group1 HA 具有广谱中和活性的 F10、CR6261 等单克隆抗体^[33,34]以及对 Group2 HA 具有广谱中和活性的 CR8020，CR8043 等^[35,36]。CR8020 可与 6 种

group 2 HA 结合,它主要通过阻止前 HA (HA0) 释放融合肽抑制细胞内膜融合并抑制 HA0 裂解成 HA1 和 HA2 防止病毒粒子成熟而发挥中和作用^[37]。对 group1 和 group2 均有广谱中和作用的单克隆抗体 MEDI8852 已在临床上证明对急性无并发症的甲型流感患者具有良好效果^[38]。除了针对于流感病毒 HA 的广谱中和抗体,已有研究组筛选出针对 M2e 的特异性单抗能够减少在小鼠间的感染^[39]。有实验证明,相对于单抗的单独用药,针对流感病毒的中和抗体同帕拉米韦联合用药能够减少小鼠肺炎的发生^[40]。

4. 展望

流感严重威胁了人们的公共健康,基因的高度变异为抗流感治疗带来了巨大的挑战。目前针对 HA 的广谱中和抗体绝大部分针对 group 1 亚型病毒的,根据对 HA 分子特征的现有理解,group 2 HA 的抗原多样性与 group 1 的抗原多样性没有明显差异,但具有广谱中和活性的 group 2 HA mAbs 却极少。Group 2 HA 中的 H3、H7 和 H10 亚型对人类健康最具威胁,其中 H3N2 亚型曾经已造成了世界大流行,而 H7N9 在国内广泛流行并造成近 40% 的死亡率。流感病毒极容易通过 HA 抗原表位突变逃避宿主的免疫应答,还有可能在基因重组中获得人传人的能力,并且神经氨酸酶抑制剂的耐药已日趋严峻,因此抗 group 2 HA (特别是 H3、H7、H10 亚型) 单克隆抗体的研发具有广阔的应用前景,对准备和应对流感大流行极为重要。不应忽略的是,对于流感病毒的不同亚型,现有的已研究出的广谱中和抗体具有不同的中和效果^[41]。此外,流感病毒极易发生变异,采用广谱中和抗体进行流感病毒的治疗时,应当警惕病毒在抗体的选择压力下发生逃逸。因此还需进一步优化和加强才能应用于实践。

表 1 单克隆抗体的种类及其特点^[42]

抗体种类	鼠源单抗	嵌合单抗	人源化单抗	全人源化单抗 ^[46]
				噬菌体抗体库技术
生产技术	使用小鼠细胞生产抗体	用人源 C 区代替鼠源 C 区 ^[43]	CDR-SDR 移植技术 ^[45]	^[47] , 核糖体展示技术 ^[48] , 转基因小鼠技术 ^[49]
鼠源比例 (%)	100	30-40	5-10	0
优点	稳定性强	减少异源性	进一步减少异源性	免疫原性小
缺点	具有免疫原性, 半衰期短, 易引起过敏反应	易诱发人抗小鼠反应 (HAMA) ^[44]	与抗原结合能力下降	制备难度大, 费用昂贵
药物	OKT3	ReoPro	Zenapax	Vectibix
首次批准日期	1986	1994	1997	2006
治疗疾病	肾移植排斥反应	心肌缺血	肾移植排斥反应	类风湿性关节炎

参考文献:

- [1] WW T, DK S, E W, et al. Influenza-Associated Hospitalizations in the United States[J]. *Jama the Journal of the American Medical Association*, 2004, 292(11): 1333-1340.
- [2] FOUCHIER R A, MUNSTER V, WALLENSTEN A, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls[J]. *J Virol*, 2005, 79(5): 2814-2822.
- [3] 郭元吉, 程小曦. 流行性感病毒及其实验技术[M]. 中国三峡出版社, 1997.
- [4] Ai J, Huang Y, Xu K, et al. Case-control study of risk factors for human infection with influenza A(H7N9) virus in Jiangsu Province, China, 2013 [J]. *Euro Surveill*. 2013, 18(26):20510.
- [5] Zhou L, Ren R, Ou J, et al. Risk Factors for Influenza A(H7N9) Disease in China, a Matched Case Control Study, October 2014 to April 2015 [J]. *Open Forum Infect Dis*. 2016, 3(3):ofw182.
- [6] WHO:http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_02_03_2018.pdf?ua=1.
- [7] 李静丽,张海祥,刘杨,等. 禽流感病毒感染人类及其致病机制研究[J]. *微生物学杂志*, 2017, 37(01):94-97.
- [8] Webster R G, Monto A S, Braciale T J, et al. Textbook of Influenza, 2nd Edition[M]. *Textbook of influenza*. 2013:31-31.
- [9] Beigel JH. Polyclonal and monoclonal antibodies for the treatment of influenza. *Curr Opin Infect Dis*. 2018 Dec;31(6):527-534. doi:10.1097/QCO.0000000000000499. PubMed PMID: 30299360.
- [10] CHENG P K, LEUNG T W, HO E C, et al. Oseltamivir- and amantadine-resistant influenza viruses A (H1N1)[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2009, 16(1): 155.
- [11] RAMIREZ-GONZALEZ J E, GONZALEZ-DURAN E, ALCANTARA-PEREZ P, et al. Oseltamivir-Resistant Pandemic (H1N1) 2009 Virus, Mexico[J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(2): 283.
- [12] BRIGHT R A, SHAY D K, SHU B, et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States[J]. *Jama the Journal of the American Medical Association*, 2006, 295(8): 891-894.
- [13] HE G, QIAO J, DONG C, et al. Amantadine-resistance among H5N1 avian influenza viruses isolated in Northern China [J]. *Antiviral Research*. 2008, 77(1): 72-76.
- [14] MOSCONA A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza[J]. *N Engl J Med*. 2009, 360(10): 953-956.
- [15] Kohler, Milstein. Continuous culture and fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *Nature*. 1975, 256:495-497.
- [16] 唐亚华, 黄红林. 单克隆抗体的研究进展[J]. *生物技术世界*, 2015:96
- [17] 许卓斌, 王旻. 抗体与抗体药物的前世今生[J]. *自然杂志*. 2016, 38(4):271-277.

- [18] Jean P. Van Wauwe, Jan R, et al. OKT3: A Monoclonal Anti-Human T Lymphocyte Antibody with Potent Mitogenic Properties. *J. Immunol.* 1980.
- [19] Buss NA, Henderson SJ, McFarlane M, Shenton JM, de Haan L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr Opin Pharmacol.* 2012, 12(5):615-22.
- [20] 王丽, 游丽娜, 皮婷, 等. 2011—2017 年 FDA 批准上市的单克隆抗体抗肿瘤药物的解析[J]. *现代药物与临床.* 2018, 10(33):2758-2762.
- [21] 张敏, 李佳, 俞德超. 靶向抗肿瘤单克隆抗体药物应用的现状和展望[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志.* 2017, 24(09):929-937.
- [22] SAWYER L A. Antibodies for the prevention and treatment of viral diseases[J]. *Antiviral Research.* 2000, 47(2): 57-77.
- [23] 孔君, 刘箐, 韩跃武, 等. 单克隆抗体制备技术的最新进展及应用前景[J]. 2011, 27(2):170-173.
- [24] Gao R, Cao B, Hu Y, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus[J]. *N Engl J Med.* 2013, 368(20):1888—1897.
- [25] Amano Y, Cheng Q. Detection of influenza virus: traditional approaches and development of biosensors, *Anal Bioanal Chem* 381 (2005) 156-64.
- [26] Ming F, Cheng Y, Ren C, et al. Development of a DAS-ELISA for detection of H9N2 avian influenza virus. *J Virol Methods.* 2018, 263:38-43.
- [27] Guo Z, Wilson JR, York IA, et al. Biosensor-based epitope mapping of antibodies targeting the hemagglutinin and neuraminidase of influenza A virus. *J Immunol Methods.* 2018, 461:23-29.
- [28] Sun Z, Shi B, Meng F, Ma R, Hu Q, Qin T, Chen S, Peng D, Liu X. Development of a Colloidal Gold-Based Immunochromatographic Strip for Rapid Detection of H7N9 Influenza Viruses. *Front Microbiol.* 2018, 31;9:2069.
- [29] Rajendran M, Sun W, Comella P, et al. An immuno-assay to quantify influenza virus hemagglutinin with correctly folded stalk domains in vaccine preparations. *PLoS One.* 2018, ;13(4):e0194830.
- [30] Byrne-Nash RT, Miller DF, Bueter KM, et al. VaxArray potency assay for rapid assessment of "pandemic" influenza vaccines. *NPJ Vaccines.* 2018, 3:43.
- [31] Pose AG, Rodríguez ER, Piñeiro MJ, et al. Quantitative ELISA sandwich for a new vaccine against avian influenza virus H5N1. *J Immunol Methods.* 2018, 459:70-75.
- [32] Y. Yu, X. Zhang, B. Zhao, Y. et al. A sandwich ELISA for the detection of neuraminidase of avian influenza A(H7N9) virus, *J Virol Methods.* 2017, 274: 58-60.
- [33] Throsby M, Van den brink E, Jongeneelen, et al. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells[J]. *PLoS One.* 2008, 3(12): e3942.
- [34] Sui J, Hwang W.C., Perez S, et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses[J]. *Nat Struct Mol Biol.* 2009, 16(3): 265-273.

- [35] Ekiert D.C., Friesen R.H., Bhabha G, et al. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses[J]. *Science*, 2011, 333(6044): 843-850.
- [36] Friesen R.H., Lee P.S., Stoop E.J., et al. A common solution to group 2 influenza virus neutralization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014, 111(1): 445.
- [37] Kannan Tharakaraman, Vidya Subramanian, David Cain, et al. Broadly neutralizing Influenza hemagglutinin stem-specific antibody CR8020 targets residues that are prone to escape due to host selection pressure. *Cell Host Microbe*. 2014; 15(5): 644-651.
- [38] Ali SO, Takas T, Nyborg A, Shoemaker K, Kallewaard NL, Chiong R, Dubovsky F, Mallory RM. Evaluation of MEDI8852, an Anti-Influenza A Monoclonal Antibody, in Treating Acute Uncomplicated Influenza. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018, 62(11):24;.
- [39] Kolpe A, Schepens B, Ye L, Staeheli P, Saelens X. Passively transferred M2e-specific monoclonal antibody reduces influenza A virus transmission in mice. *Antiviral Res*. 2018 ,158:244-254.
- [40] Hatayama K, Nosaka N, Yamada M, Yashiro M, Fujii Y, Tsukahara H, Liu K, Nishibori M, Matsukawa A, Morishima T. Combined effect of anti-high-mobility group box-1 monoclonal antibody and peramivir against influenza A virus-induced pneumonia in mice. *J Med Virol*. 2018 :3.
- [41] 李晓辉, 朱建伟, 李鹤松.具有临床应用价值的流感病毒广谱中和性抗体研究进展[J]. *中国新药杂志*.2017, 26(7):764-767.
- [42] 刘萍, 陈苗苗, 刘学荣,等.单克隆抗体的研究进展[J].*中国畜牧兽医*.2012,1(39):67-70.
- [43] Jones P.T., Dear P.D., Foote J, et al. Replacing the complementaries determining regions in a human antibody with those from a mouse. *Nature*.1986,321(6069):522-525.
- [44] Weiner, Louis M. Fully Human Therapeutic Monoclonal Antibodies[J]. *Journal of Immunotherapy*. 2006, 29(29): 1- 9.
- [45] Verhoeyen M, Milstein C, Winter G. Reshaping human antibodies: Grafting an antilysozyme activity [J]. *Science*.1988, 239: 1534- 1536.
- [46] 吴炜霖,仲人前.人源化抗体的演进发展及应用现状[J].*现代免疫学*.2009,29(04):337-340.
- [47] SMITH G.P., PETRENKO V.A.. Phage Display[J]. *Chemical Reviews*. 1997, 97(2): 391.
- [48] Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994, 91: 9022.
- [49] Lonberg N, Taylor LD, Harding FA, et al. antigen2specific human antibodies from mice comprising four distinct genetic modifications[J]. *Nature*. 1994, 368(6474): 856- 859.