DOI:10.16016/j.1000-5404.202002059

人巨细胞病毒 PP65 抗原单克隆抗体的制备及鉴定

张淑婷,田海霞,刘青青,康 行,樊卫平 030001 太原,山西医科大学微生物学与免疫学教研室

[摘要] **目的** 制备人巨细胞病毒(human cytomegalic virus, HCMV)PP65 抗原的单克隆抗体,并通过免疫组化鉴定单克隆抗体与 HCMV PP65 抗原的反应性。**方法** 诱导 PQE30-PP65 重组质粒表达 PP65 蛋白并 Ni 柱亲和层析纯化。PP65 抗原免疫 BALB/c 小鼠,将血清抗体阳性小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞(SP2/0)融合,经 HTS 筛选,扩大培养获取单克隆抗体。经 Protein A 亲和层析纯化,并通过间接 ELISA 鉴定其特异性、效价及亚型。将制备的单克隆抗体应用于临床样本的玻片免疫组化检测。**结果** 获得 8 株高特异性抗 HCMV PP65 抗原的单克隆抗体,其亚型均为 IgG1 型,轻链均为 κ 链,效价均在 1∶2 048 000 以上。其中 6 株单克隆抗体能够通过玻片免疫组化法准确鉴定 HCMV 激活性感染。**结论** 成功制备了 HCMV PP65 单克隆抗体。单抗与白细胞中 HCMV PP65 抗原反应良好。

[关键词] 人巨细胞病毒;PP65 抗原;单克隆抗体;免疫组化

[中图法分类号] R373.9;R392-33;R392.11 [文献标志码] A

Preparation and characterization of monoclonal antibodies against human cytomegalovirus PP65 antigen

ZHANG Shuting, TIAN Haixia, LIU Qingqing, KANG Xing, FAN Weiping Department of Microbiology and Immunology, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province, 030001, China

[**Abstract**] Objective To prepare monoclonal antibodies (mAbs) against human cytomegalovirus (HCMV) PP65 antigen and characterize their reactivity to HCMV PP65 antigen by immunohistochemistry. Methods The recombinant plasmid PQE30-PP65 was transformed into competent *E. coli* M15 cells to obtain the recombinant PP65 antigen, which was purified with Ni column affinity chromatography. BALB/c mice were immunized with the purified antigen, and the spleen cells of the mice were isolated and fused with myeloma cells (SP2/0). The mAbs were obtained by HTS screening and purified by protein A affinity chromatography, and their specificity, titer and subtype were identified by indirect ELISA. The performance of the mAbs in immunohistochemical detection of HCMV PP65 antigen was tested on slides of clinical samples. Results Eight highly specific mAbs against HCMV PP65 antigen were obtained. All these mAbs were identified to be IgG1 subtype containing κ light chains, with titers all above 1∶2 048 000. Six of the mAbs were shown to accurately identify an active infection of HCMV by slide immunohistochemistry. Conclusion We successfully prepared HCMV PP65 mAbs, and 6 of these mAbs have good reactivity with HCMV PP65 antigen in leukocytes.

[**Key words**] human cytomegalovirus; PP65 antigen; monoclonal antibodies; immunohistochemistry

Supported by the Special Project for Patent Exploitation and Promotion (20171009) of Shanxi Province and the Science and Technology Development Foundation (033068). Corresponding author: FAN Weiping, E-mail: fanweiping26418@126.com

[基金项目] 山西省专利推广实施资助专项(20171009);山西省科技开发基金(033068)

[通信作者] 樊卫平,E-mail:fanweiping26418@126.com

我国是人巨细胞病毒(human cytomegalic virus, HCMV)感染高度流行国家之一,抗体阳性率为76.7%~95.8%[1]。由于地理区域及社会经济发展的不同,HCMV的感染率也存在一定差异性,发达国家HCMV感染率相对较低,约为60%;而在经济条件较差的发展中国家感染率可达100%[2-3]。HCMV在免疫力强的宿主中通常表现为无症状感染。但在免疫功能低下的患者或孕妇中HCMV的活动性感染危害严重。胎儿感染HCMV可能出现神经性耳聋、智力发育迟缓等后遗症[4]。据估计,发达国家新生儿HCMV感染率仅为0.6%~0.7%[5-6],而发展中国家为1%~2%[6]。PP65蛋白是HCMV的被膜磷蛋白,在HCMV复制周期的早晚期均表达。不同的HCMV病毒株中,PP65基因具有高度的保守性[7]。HCMV进入宿主细胞后PP65蛋白即刻出现在细胞核,感染后期PP65蛋白重新定位到细胞质。PP65蛋白在HCMV感染后的6~24 h内可出现在外周血淋巴细胞、单核细胞、多形核白细胞及血管内皮细胞中,表明PP65蛋白是HCMV活动性感染早期诊断的一项重要指标[8]。因此,PP65抗原的检测在早期活动性HCMV感染中具有重要意义。本研究拟通过原核表达并纯化HCMV PP65重组蛋白,免疫小鼠制备相应单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb),并通过免疫组化检测鉴定单克隆抗体与患者白细胞中HCMV PP65抗原的反应性,以期为临床早期诊断HCMV激活性感染提供帮助。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒、菌株和实验动物

SP2/0小鼠骨髓瘤细胞、PQE30-PP65重组质粒为本实验室保存[9]。感受态细胞*E. coli* DH5α、*E. coli* M15购自博迈德生物技术有限公司,SPF级BALB/c小鼠,雄性,6~8周龄,购自北京维通利华实验动物技术公司。本研究获得山西医科大学医学伦理委员会审查通过(202006001)。

1.2 主要试剂

MF59佐剂购自Invivogen公司,HRP标记的山羊抗小鼠IgG(IgG-HRP)购自BBI公司,单克隆抗体亚类鉴定试剂盒购自北京博奥龙免疫技术有限公司,胎牛血清(FBS)、DMSO、HAT、HT、融合剂PEG均购自Sigma公司,蛋白Marker购自北京全式金公司,小鼠抗His标签单克隆抗体购自康维世纪生物科技有限公司。牛血清白蛋白(BSA)购自北京纽朴生物技术有限公司。HCMV感染阳性及阴性标本收集于白求恩医院检验科。

1.3 抗原制备

将PQE30-PP65重组质粒转化至*E. coli* M15感受态细胞中,加IPTG诱导表达后收集菌体,超声破碎,离心收集包涵体沉淀。8 mol/L尿素溶解包涵体,经Ni柱亲和层析纯化并收集不同浓度梯度的洗脱液,将含有目的蛋白的洗脱液进行透析,超滤离心管浓缩得到重组PP65蛋白,并经12% SDS-PAGE鉴定。

1.4 动物免疫

将PP65重组蛋白与MF59佐剂1∶1等体积混合,对BALB/c小鼠进行皮下免疫,免疫间隔为3周,每次免疫剂量为10 μg/只,共免疫3次。第3次免疫后2周检测小鼠血清抗体效价。

1.5 杂交瘤细胞的建立

选取血清抗体效价最高的1只小鼠,融合前以同样剂量冲击免疫1次。融合当天,无菌摘除小鼠脾脏制备脾细胞悬液,按5∶1的比例与SP2/0细胞混合,PEG法融合。用HAT、HT培养基培养并筛选融合细胞,有限稀释亚克隆阳性杂交瘤细胞,最终获得可稳定分泌抗PP65蛋白抗体的杂交瘤细胞株。

1.6 单克隆抗体的制备与纯化

将筛选得到的杂交瘤细胞扩大培养,以获得高滴度杂交瘤细胞。BALB/c小鼠腹腔注射无菌液体石蜡0.5 mL/只,7 d后腹腔接种杂交瘤细胞悬液,每只2×10^6个细胞。7~10 d后,收集腹水,Protein A亲和纯化,获得纯度较高的单克隆抗体,12% SDS-PAGE进行纯度分析。

1.7 单克隆抗体特性鉴定

1.7.1 单抗特异性鉴定 将PP65蛋白分别与BSA、SARS-RBD、MERS-RBD、ZIKA-E无关蛋白包被于同一96孔板中,用间接ELISA法测定8株单抗的特异性。

1.7.2 单抗效价测定 采用间接ELISA法,将重组PP65蛋白包被酶标板,纯化后的单克隆抗体从1∶16 000开始2倍梯度稀释,加入1∶5 000稀释的山羊抗鼠IgG酶标二抗,显色后酶标仪测定光密度值*D*(450~630)。

1.7.3 单抗亚型鉴定 单克隆抗体亚型鉴定采用间接ELISA法,将单克隆抗体免疫球蛋白亚类鉴定试剂盒中HRP标记的羊抗小鼠IgA、IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3及κ和λ链作为二抗进行检测,具体步骤按照试剂盒说明书进行。

1.8 单抗与HCMV PP65抗原反应性的免疫组化鉴定

1.8.1 样本来源及处理 HCMV感染阳性及阴性标本主要来自于白求恩医院的新生儿。黄疸的新生儿

要经过 FQ-PCR 定量患儿尿液 HCMV 核酸,同时 ELISA 检测患儿血清中 HCMV 特异 IgM。收集两种方法检测结果均阳性的患儿的凝血块,以及两种方法均阴性的患儿的凝血块,于过滤网上研磨,收集滤过的白细胞[10]。离心弃上清。白细胞用 1 mL Carnoy 固定液(甲醇∶冰乙酸=3∶1)固定,-20 ℃保存备用。

1.8.2 单抗对玻片固定的白细胞内 HCMV 抗原的鉴定 将已知阳性及阴性 HCMV 感染白细胞滴至 75%酒精预处理过的载玻片上,干燥,4%多聚甲醛固定细胞 1 h,0.5% TritonX-100 室温孵育 20 min 通透细胞,3% H_2O_2 室温避光 30 min 去除内源性过氧化物酶,5% BSA 封闭液 37 ℃封闭 30 min。处理好的待检样本玻片上滴加 1∶50 稀释的单克隆抗体,4 ℃过夜,次日洗涤后加 1∶500 稀释的羊抗鼠酶标二抗 HRP-IgG,37 ℃孵育 30 min,洗涤,DAB 显色,镜下观察。

1.8.3 8 株单抗对相同阳性及阴性标本鉴定的比较 为比较 8 株单抗对 HCMV PP65 抗原的反应性,需要制备多个相同的已知阳性及阴性标本片,而 1 份患儿凝血块研磨后得到的白细胞不够制备多个样本片,所以积攒多人份阳性及阴性白细胞,并分别混合,制备多张相同的阳性及阴性标本片。白细胞混合离心、浓缩后制片及 8 株单抗分别对阳性及阴性标本片鉴定的过程同上。

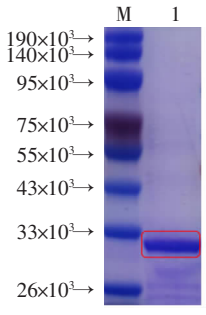
1.9 统计学分析

利用 GraphPad Prism 软件对实验数据进行分析,并通过绘制图表和文字描述相结合的方式对实验结果进行呈现。

2 结果

2.1 重组蛋白的诱导表达与纯化

重组质粒转化 *E. coli* M15,经 IPTG 诱导表达,将纯化后得到的重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析,在(26~33)×10^3 附近可见明显条带,与预期大小一致,表明纯化后获得纯度较高的目的蛋白,可用于后续实验(图 1)。



M:蛋白分子量标准;1:纯化的重组蛋白

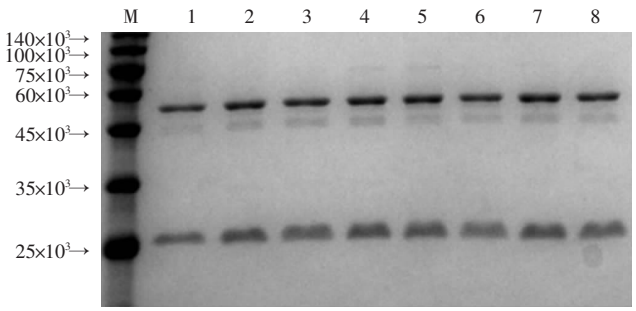
图 1 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.2 抗体的制备

以 PP65 蛋白为抗原免疫 BALB/c 小鼠,经 3 次免疫之后,小鼠的血清效价达到杂交瘤细胞融合的要求。而后选择血清效价最高的小鼠再次加强免疫,经过细胞融合,阳性杂交瘤细胞筛选以及 3 次亚克隆化后,共筛选出了 8 株抗 HCMV PP65 单克隆抗体,分别命名为 1~8 号单克隆抗体。

2.3 抗体纯度的鉴定

8 株抗体经煮沸变性后用 12%的 SDS-PAGE 检测,均可在 50×10^3 左右看到单抗的重链,在 25×10^3 附近看到单抗的轻链(图 2),无其他杂带,表明纯化的单抗纯度较高。



M:蛋白分子量标准;1:8 号抗体;2:7 号抗体;3:6 号抗体;4:5 号抗体;5:4 号抗体;6:3 号抗体;7:2 号抗体;8:1 号抗体

图 2 SDS-PAGE 分析纯化的单抗纯度

2.4 特异性的鉴定

将 8 株单抗分别与不同蛋白进行酶联免疫吸附实验,结果显示均能特异性识别 PP65 目的蛋白,而与其他蛋白的反应性较低,表现出良好的特异性(图 3)。

2.5 抗体效价的检测

用间接 ELISA 法检测纯化后 8 株单克隆抗体的效价,可见均达到 1∶2 048 000 以上(图 4)。

2.6 抗体亚类的鉴定

利用间接 ELISA 法,将亚类检测试剂盒中 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgM、IgA 及 κ 和 λ 链作为二抗对 8 株抗体进行亚类检测。经鉴定可知,8 株抗体的重链均为 IgG1 型亚类,轻链均为 κ 链。

2.7 单抗与 HCMV PP65 抗原反应性的免疫组化鉴定

单抗与单份已知 HCMV 感染阳性及阴性白细胞沉渣涂片免疫组化反应结果见图 5。与阳性标本反应可见含棕色颗粒的细胞,与阴性标本反应只有核蓝染的细胞。说明单抗能准确鉴定白细胞中 PP65 抗原的阳性与阴性。

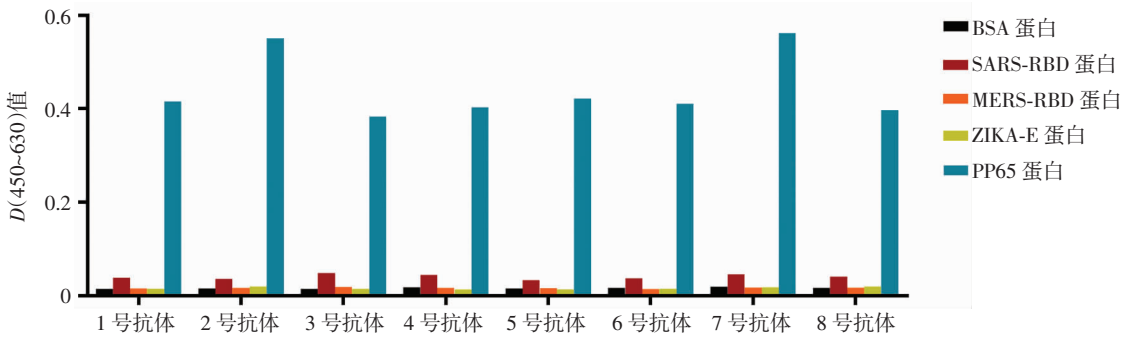


图 3　抗体与相关蛋白的交叉反应

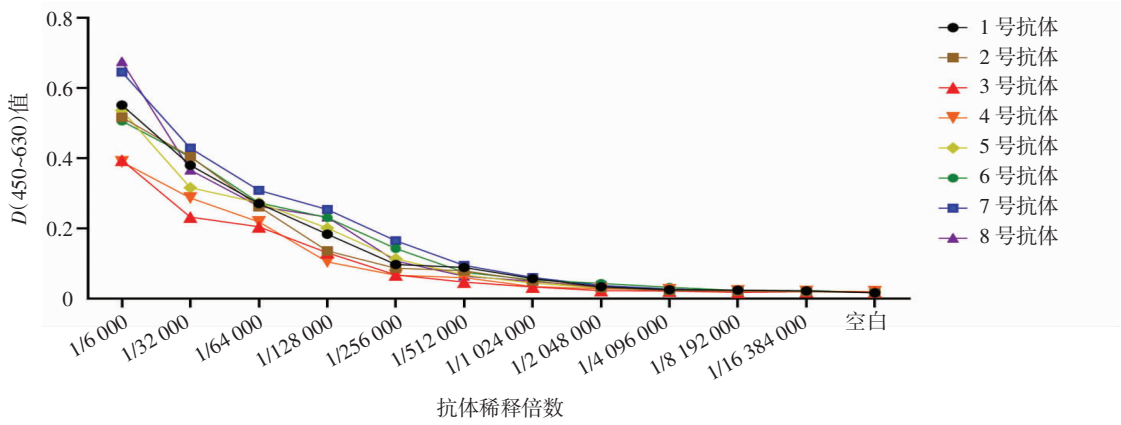
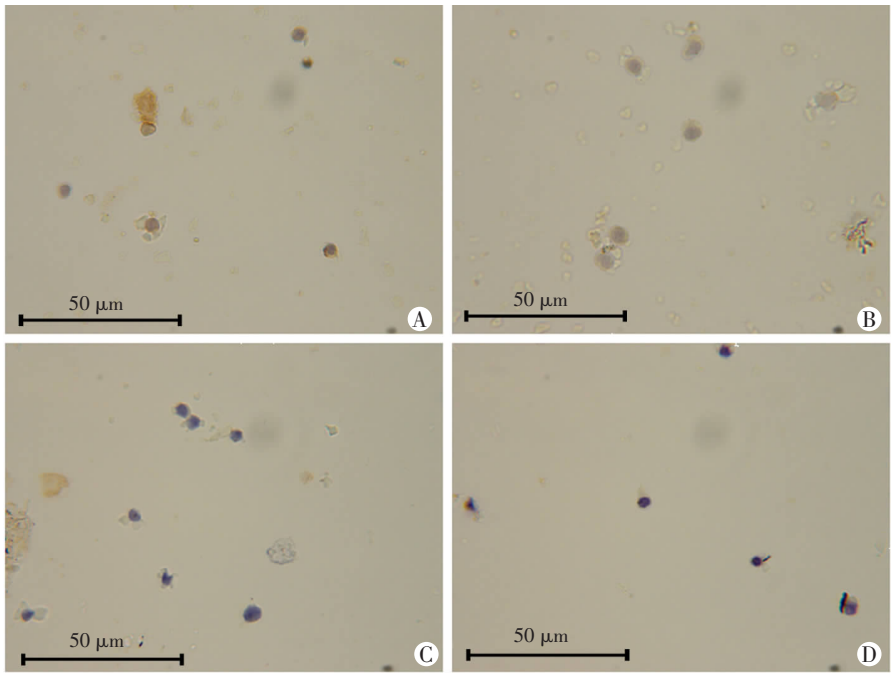
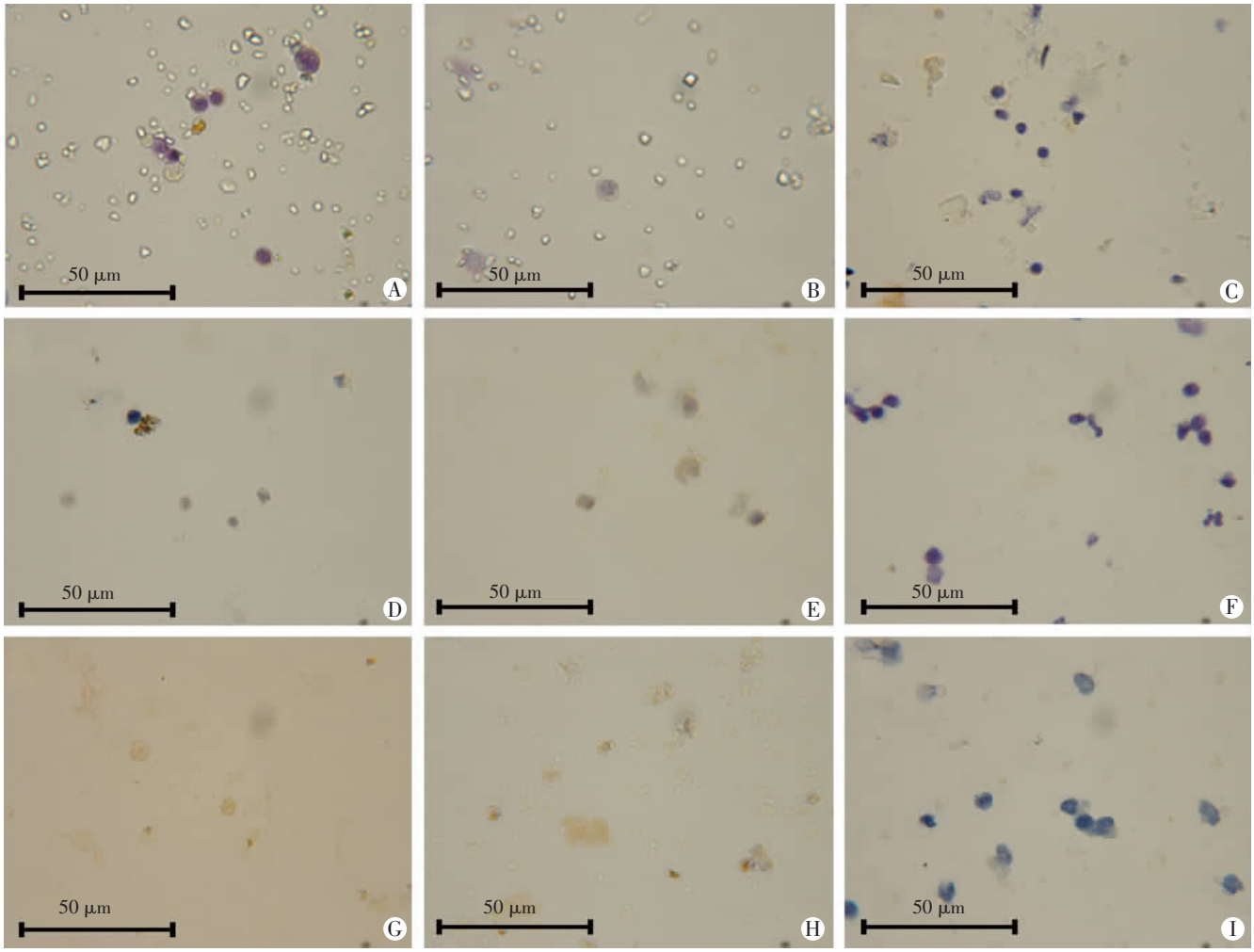


图 4　抗体效价的检测



A:1 号抗体与阳性白细胞沉渣涂片的反应结果;B:2 号抗体与阳性白细胞沉渣涂片的反应结果;C:1 号抗体与阴性白细胞沉渣涂片的反应结果;D:2 号抗体与阴性白细胞沉渣涂片的反应结果

图 5　1 号及 2 号单抗免疫组化检测已知单份阳性及阴性样本检测结果



A:1 号抗体对阳性白细胞沉渣涂片检测的结果;B:2 号抗体对阳性白细胞沉渣涂片检测的结果;C:3 号抗体对阳性白细胞沉渣涂片检测的结果;D:4 号抗体对阳性白细胞沉渣涂片检测的结果;E:5 号抗体对阳性白细胞沉渣涂片检测的结果;F:6 号抗体对阳性白细胞沉渣涂片检测的结果;G:7 号抗体对阳性白细胞沉渣涂片检测的结果;H:8 号抗体对阳性白细胞沉渣涂片检测的结果;I:1 号抗体对阴性白细胞涂片检测结果

图 6 8 株单克隆抗体免疫组化检测已知阳性及阴性样本检测结果

为比较所得 8 株单抗与 PP65 抗原的反应性,将纯化的 8 株单抗对 24 张 HCMV 感染阳性混合白细胞沉渣涂片、10 张阴性混合涂片进行免疫组化鉴定。结果见图 6。3 号和 6 号单克隆抗体对各自的 3 张已知阳性标本检测结果均为阴性,即细胞核蓝染,胞质也未见棕色颗粒,而其余 6 株单克隆抗体检测结果均有棕色细胞。对阴性白细胞涂片检测结果显示 8 株单克隆抗体均为阴性,均未观察到棕色细胞。说明所得 8 株单抗中,3 号和 6 号单抗不能通过免疫组化鉴定白细胞中的 HCMV PP65 抗原,而其余单抗能准确鉴定 HCMV PP65 抗原阳性及阴性白细胞。

3 讨论

HCMV 在人群中感染普遍。在孕妇、新生儿、艾滋病患者、组织器官移植者以及免疫抑制剂使用者中激活性 HCMV 感染的检测非常普遍。目前 HCMV 激活性感染的检测主要依靠 ELISA 检测血清特异 IgM 和 PCR 定量检测病毒核酸。因 IgM 产生早而消失快,且 HCMV 活动性感染者常免疫力低下,不能充分产生 IgM,所以 IgM 检测的敏感性、特异性均不够理想[9];而 FQ-PCR 检测 HCMV 核酸存在敏感性过高[11]、定量标准不统一的问题。

HCMV PP65 蛋白是病毒被膜蛋白中最丰富的一种,是细胞外颗粒的主要成分,也是抗感染的免疫应答的主要靶点之一。该蛋白主要参与病毒基因调节以及改变宿主细胞的代谢[12],并对病毒的复制有重要作用。HCMV PP65 在细胞中的分布具有明显的时相性,当病毒和细胞膜融合后 PP65 会立即进入细胞核,然

后在感染后期重新定位到细胞质。PP65 蛋白在 HCMV 感染后的6~24 h 内可出现在外周血淋巴细胞、单核细胞、多形核白细胞及血管内皮细胞中,表明 PP65 蛋白是 HCMV 活动性感染早期诊断的一项重要指标[8]。因此,对 PP65 抗原的检测具有重要意义。玻片免疫组化或荧光法检测 PP65 抗原需要每个样本的白细胞固定一个玻片,镜下计数阳性细胞,虽然操作烦琐,主要适合病例少、病例不集中的情况,但依然有临床需求。本研究通过杂交瘤技术获得 8 株针对 HCMV PP65 蛋白高特异性及高亲和力的单克隆抗体,并通过对临床阳性及阴性血标本的免疫组化检测,证明其中 6 株单抗能够准确界定阳性及阴性感染。研究结果为临床 HCMV 活动性感染试剂的研发提供了原材料。

参考文献:

[1] 赵捷, 闻良珍, 张桂梅. 人巨细胞病毒蛋白 pp65 诱导特异性免疫应答的研究[J]. 医学分子生物学杂志, 2008, 5(2): 137-140. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2008.02.010.
ZHAO J, WEN L Z, ZHANG G M. Human cytomegalovirus pp65 protein induces specific immune response[J]. J Med Mol Biol, 2008, 5(2): 137-140. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2008.02.010.

[2] GRIFFITHS P, BARANIAK I, REEVES M. The pathogenesis of human cytomegalovirus[J]. J Pathol, 2015, 235(2): 288-297. DOI: 10.1002/path.4437.

[3] STARAS S A S, DOLLARD S C, RADFORD K W, *et al*. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994[J]. Clin Infect Dis, 2006, 43(9): 1143-1151. DOI: 10.1086/508173.

[4] DIEJOMAOH M F E, AL-AZEMI M, JIROUS J, *et al*. The aetiology and pattern of recurrent pregnancy loss[J]. J Obstet Gynaecol, 2002, 22(1): 62-67. DOI: 10.1080/01443610120101754.

[5] BIOLATTI M, DELL'OSTE V, DE ANDREA M, *et al*. The human cytomegalovirus tegument protein pp65 (pUL83): a key player in innate immune evasion[J]. New Microbiol, 2018, 41(2): 87-94.

[6] GERNA G, LILLERI D. Huma cytomegalovirus (HCMV) infection/re-infection: development of a protective HCMV vaccine[J]. New Microbiol, 2019, 42(1): 1-20.

[7] PANDE H, CAMPO K, TANAMACHI B, *et al*. Human cytomegalovirus strain Towne pp28 gene: sequence comparison to pp28 of HCMV AD169 and stable expression in Chinese hamster ovary cells[J]. Virology, 1991, 184(2): 762-767. DOI: 10.1016/0042-6822(91)90448-k.

[8] SUN Z R, CENG X S, MAO Z Q, *et al*. Diagnostic value of HCMV pp65 antigen detection by FCA for symptomatic and asymptomatic infection: compared to quantification of HCMV DNA and detection of IgM antibody in infants[J]. Med Microbiol Immunol, 2009, 198(2): 107-112. DOI: 10.1007/s00430-009-0112-y.

[9] 刘玲玲, 王亮, 李琳, 等. 人巨细胞病毒 PP65 抗原 ELISA 检测方法的建立[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(6): 545-549. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20140119.
LIU L L, WANG L, LI L, *et al*. The establishment of ELISA for HCMV-PP65 antigen[J]. Immunol J, 2014, 30(6): 545-549. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20140119.

[10] 王亮, 潘丽, 邓智毅, 等. 凝血与抗凝血中 T 细胞活性的分析[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(11): 1007-1010. DOI: 10.19405/j.cnki.issn/1000-1492.2011.03.023.
WANG L, PAN L, DENG Z Y, *et al*. A comparative analysis of T-lymphocyte activity in blood clot and anticoagulated blood[J]. Immunol J, 2014, 30(11): 1007-1010. DOI: 10.19405/j.cnki.issn/1000-1492.2011.03.023.

[11] 金艳. 人巨细胞病毒先天性感染实验室诊断的研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(3): 282-285. DOI: 10.19405/j.cnki.issn.1000-1492.2011.03.023.
JIN Y. Progress in laboratory diagnosis of congenital infection of human cytomegalovirus [J]. Acta Univ Med Anhui, 2011, 46(3): 282-285. DOI: 10.19405/j.cnki.issn.1000-1492.2011.03.023.

[12] HAKKI M, GEBALLE A P. Double-stranded RNA binding by humanCytomegalovirus pTRS1[J]. J Virol, 2005, 79(12): 7311-7318. DOI: 10.1128/jvi.79.12.7311-7318.2005.

(**收稿**:2020-02-11;**修回**:2020-03-03)
(编辑 黄 超)