

分类号:

密级:



甘肃中医药大学

GANSU UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE

硕士学位论文 (专业学位)

论文题目(中文) 不同G型轮状病毒VP7蛋白表达及抗体制备和应用

论文题目(外文) The expression of VP7 proteins of different G-genotype rotaviruses and the generation and application of VP7 antibodies

研究生姓名 赵颖

学科、专业 公共卫生

研究方向 传染病防控

指导老师、职称 段招军研究员

实践老师、职称: 孙晓曼副研究员

论文工作

起止年月 2022年3月至2024年3月

论文提交日期 2024年3月

论文答辩日期 2024年5月

学位授予日期 2024年6月

目 录

中英文缩略词对照表	5
第一章 前言.....	6
1. 轮状病毒结构.....	6
2. VP7 蛋白.....	7
3. 轮状病毒基因型.....	7
4. VP7 蛋白表达.....	7
5. 轮状病毒病原学检查.....	8
6. 单克隆抗体研究.....	8
7. 课题研究路线.....	9
第二章 实验研究	10
第一节 不同 G 型轮状病毒 VP7 蛋白表达	10
1. 实验材料.....	10
2. 实验方法.....	13
3. 结果.....	17
4. 分析与讨论.....	20
5. 小结.....	23
第二节 抗轮状病毒不同 G 型 VP7 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定应用	24
1. 实验材料.....	24
2. 实验方法.....	25
3. 结果.....	31
4. 分析与讨论.....	46
5. 小结.....	47
结语.....	48
结论.....	48
不足与展望.....	48
参考文献.....	49
文献综述 A 组轮状病毒研究进展.....	53
参考文献.....	55

摘要

目的：表达和纯化人 A 组轮状病毒不同 G 型 VP7 蛋白；制备 VP7 型别特异的单克隆抗体并进行抗体功能鉴定及初步应用，为下一步不同 G 型轮状病毒特异检测方法的建立奠定基础，对不同 G 型多价轮状病毒疫苗的开发和评价具有重要意义。

方法：利用昆虫杆状病毒表达载体系统表达不同 G 型 VP7 蛋白，分别尝试了 VP7 全长序列（1—326 位氨基酸）及 78—311 位氨基酸截短体蛋白表达；通过镍柱亲和层析及凝胶过滤层析进行蛋白纯化；SDS-PAGE 及蛋白免疫印迹（Western blot, WB）进行蛋白表达验证。将纯化后的不同 G 型可溶 VP7 蛋白作为免疫原，免疫 BALB/c 雌性小鼠，利用杂交瘤细胞技术得到能够产生特异性抗体的杂交瘤细胞；通过包被纯化后的不同 G 型 VP7 蛋白及轮状病毒进行间接 ELISA 法检测，包被 VP7 多抗进行双抗体夹心 ELISA 检测，进行杂交瘤细胞株的筛选。选定的杂交瘤细胞株体外培养后注入小鼠腹腔获取腹水，借助 Protein G HP 柱从腹水中纯化单克隆抗体；通过间接 ELISA 法检测腹水效价，以及纯化后抗体与 VP7 蛋白结合的 EC₅₀ 值；WB 鉴定单克隆抗体与不同 G 型 VP7 蛋白的结合情况；通过间接免疫荧光试验（Immunofluorescence assay, IFA）检测单克隆抗体与不同基因型轮状病毒的结合情况。将纯化后的单克隆抗体作 HRP 标记，根据棋盘格法进行抗体配对，通过双抗体夹心 ELISA 进行不同 G 型轮状病毒或 VP7 蛋白的检测。

结果：利用杆状病毒表达系统成功获得人 A 组轮状病毒 G1、G2、G3、G4、G8、G9 VP7 蛋白，蛋白表达量较高、以可溶蛋白形式存在、纯度较好。利用杂交瘤细胞株筛选得到 8 株单抗：1C3 与 10F6 两株广谱单抗，6G1 与 6G2 两株 G1 特异单抗，2A11 与 14F12 两株 G4 和 G8 特异单抗，18C1 与 18E8 两株 G8 特异单抗。经抗体亚型鉴定，8 株单抗均为 IgG 型。测定单抗与相应 VP7 蛋白结合的 EC₅₀ 值，多株单抗具有较低的 EC₅₀ 值。WB 实验结果显示：1C3 单抗广谱地结合不同 G 型 VP7 蛋白，10F6 单抗只与 G8 VP7 蛋白结合比较突出，6G1 及 6G2 单抗特异结合 G1 VP7 蛋白；2A11、14F12、18C1、18E8 这 4 株单抗都与 G8 VP7 有明显的结合，2A11、14F22 单抗与 G4 VP7 蛋白有弱的结合条带；条带大小均与 SDS-PAGE 目的条带位置对应。间接免疫荧光试验结果显示：单克隆抗体 1C3 明显结合 G1/G2/G3/G8/G9 型 A 组轮状病毒，10F6 单抗也可以结合不同型别的轮状病毒，但是荧光强度没有 1C3 清晰。单克隆抗体 6G1 可以结合不同 A 组轮状病毒；6G2 单抗只识别 G1 型轮状病毒。单克隆抗体 2A11 结合 A 组轮状病毒 WHG1（基因型 G1P[3]）、SA11（基因型 G3P[2]）、G8P[8]株、G9P[8]株；14F12 及 18E8 单

抗均与 WHG1、SA11、G8P[8]株轮状病毒结合明显；18C1 单抗与 SA11、G8P[8]株轮状病毒结合明显。

结论：本研究通过昆虫杆状病毒表达系统成功表达了 G1、G2、G3、G4、G8、G9 不同基因型的轮状病毒 VP7 可溶蛋白，蛋白表达量较高、纯度较好，且实验证明 VP7 蛋白具有三聚体结构。成功制备了 2 株可以广谱结合不同 G 型轮状病毒 VP7 的单克隆抗体（1C3 和 10F6），2 株 G1 VP7 特异的单抗（6G1 和 6G2），2 株 G4 和 G8 VP7 特异的单抗（2A11 和 14F12），2 株 G8 VP7 特异单抗（18C1 和 18E8），通过 ELISA、WB、IFA 鉴定，证明 8 株单抗与相应 VP7 蛋白具有良好的结合活性。双抗体夹心 ELISA 方法初步应用得到特异检测 G1 和 G8 型 RV VP7 的抗体配对方案。

关键词：轮状病毒；VP7 蛋白；单克隆抗体；双抗体夹心 ELISA 方法

ABSTRACT

Objective: To express and purify VP7 proteins of different G genotypes of human group A rotavirus (RV); The soluble VP7 proteins were used to immunize BALB/c mice to generate specific monoclonal antibodies. It lays the foundation for establishing the specific detection of different G-genotype rotaviruses, and has great significance for the development and evaluation of multivalent vaccines with different G-genotype rotaviruses.

Method: The VP7 proteins of different G genotypes were expressed by baculovirus expression vector systems (BEVS) and purified by affinity chromatography. The full-length VP7 fragment (amino acids 1-326) and the truncated VP7 fragment (amino acids 78-311) were selected for VP7 expression, respectively. The expression of different VP7 proteins were verified by SDS-PAGE and Western blot (WB). The soluble VP7 proteins were used to immunize BALB/c female mice to generate specific monoclonal antibodies. The hybridoma cells capable of producing specific McAb were obtained by hybridoma technology. The purified G-types of VP7 proteins and culture supernatants of rotaviruses were coated on the microplate to detect the antibody binding by the indirect ELISA method. The VP7 polyclonal antibodies were coated on the microplate to further verify the antibody binding by the double-antibody sandwich ELISA. The selected hybridoma cell lines of different G-genotypes RVs were cultured and injected into the abdominal cavity to obtain ascites. The monoclonal antibodies were purified from ascites with the Protein G HP column. The titer of ascites and the EC₅₀ of the purified monoclonal antibody were calculated by indirect ELISA. The binding specificity of the monoclonal antibodies with different G-genotype VP7 proteins/RVs were identified by WB/ Immunofluorescence assay (IFA), respectively. The purified monoclonal antibodies were labeled with HRP and matched according to checkerboard method. Double-antibody sandwich ELISA was used to detect different G-type rotavirus or VP7 proteins.

Results: VP7 proteins of G1, G2, G3, G4, G8 and G9 genotypes of human group A rotaviruses were successfully obtained by baculovirus expression system, with high expression and in the form of soluble protein and pure protein. Eight monoclonal antibodies (McAbs) were generated: 1C3 and 10F6, 6G1 and 6G2, 2A11 and 14F12 (G4 and G8 specific McAbs), and 18C1 and 18E8 (G8 specific McAbs). According to the antibody subtype identification, all 8 McAbs were of IgG type. The EC₅₀ values of different purified McAbs were separately measured by indirect ELISA. Some McAbs possessed EC₅₀ of quite low value. WB results showed that 1C3 McAb binds different G VP7 proteins; 10F6 McAb binds

only to G8 VP7 protein; The 6G1 and 6G2 McAb specifically bind to the G1 VP7 protein; 2A11,14F12,14,18C1,18E8 all showed significant binding to G8 VP7, 2A11,14F22 McAb have a weak binding band with G4 VP7 protein. The molecular weight of the bands of WB all correspond to the band positions of SDS-PAGE. The results of IFA experiments showed that monoclonal antibody 1C3 obviously bound group A rotavirus WHG1 (genotype G1P [3]), DS-1 (genotype G2P [4]), SA11 (genotype G3P [2]), G8P [8] strain, G9P [8] strain, 10F6 McAb could also bind different types of rotaviruses, but the fluorescent intensity was relatively low. Monoclonal antibody 6G1 can bind different group A rotaviruses; 6G2 McAb only recognizes the G1 rotavirus of WHG1 strain. The monoclonal antibody 2A11 binds group A rotavirus WHG1 (genotype G1P [3]), SA11 (genotype G3P [2]), G8P [8] and G9P [8]; 14F12 and 18E8 bind to WHG 1, SA11, and G8P [8] RV strains; 18C1 McAb binds to SA11 and G8P [8] RVs.

Conclusion: In this study, RV VP7 proteins of G1, G2, G3, G4, G8 and G9 was successfully expressed by the baculovirus expression system. The proteins showed relatively high expression and good purity. It was preliminarily proved that the VP7 proteins possess the conformation of trimeric structure. Two monoclonal antibodies with broad binding spectrum (1C3 and 10F6), two G1 VP7 specific McAbs (6G1 and 6G2), two G4 and G8 VP7 specific McAbs (2A11 and 14F12), and two G8 VP7 specific McAbs (18C1 and 18E8) were successfully generated. All 8 McAbs presented good binding characteristics following identified by ELISA, WB, and IFA. The double-antibody sandwich ELISA methods with multiple antibodies pairing schemes were obtained to detect G1 and G8 RV VP7.

Key words: Rotavirus; VP7 protein; Monoclonal antibody; Double-antibody sandwich ELISA method

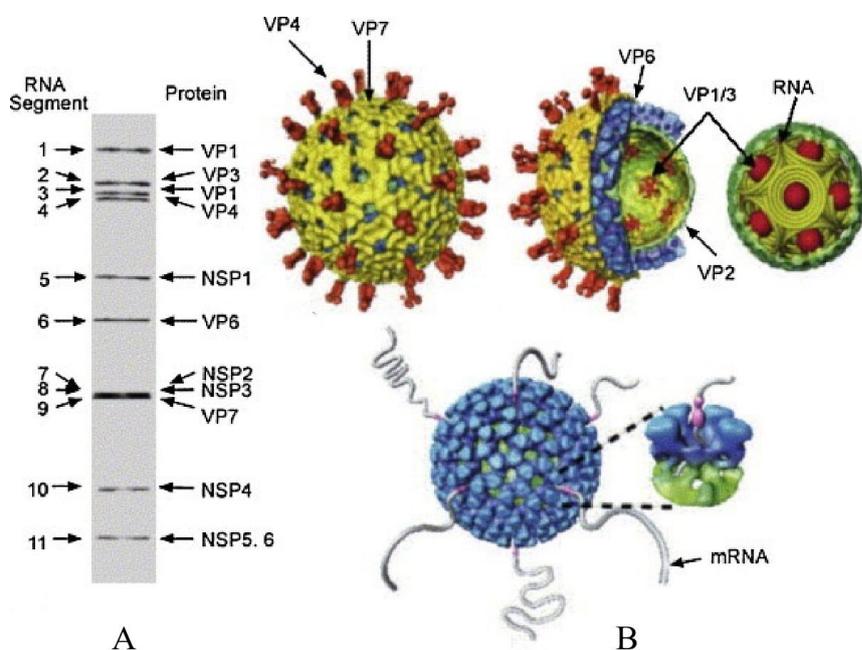
中英文缩略词对照表

英文缩写	英文全称	中文译名
AUC	Analytical Ultracentrifugation	分析超速离心
Bacmid	Baculovirus plasmid	杆状病毒质粒
DLP	double-layered particle	双层衣壳病毒颗粒
DMEM	dulbecco's minimum essential medium	达尔伯克必需基本培养基
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
HAMA	human anti-mouse antibodies	人抗鼠抗体
IFA	Immunofluorescence assay	免疫荧光试验
McAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
MoMcAb	mouse-derived monoclonal antibodies	鼠源单抗
MuMcAb	human monoclonal antibody	全人源单克隆抗体
PBS	Phosphate Buffered Saline	磷酸盐缓冲盐水
rRT-PCR	Real-time reverse transcription -polymerase chain reaction	荧光逆转录聚合酶链反应
RT-PCR	RT-polymerase chain reaction	逆转录聚合酶链反应
RV	Rotavirus	轮状病毒
scFv	single-chain antibodies	单链抗体
WB	Western blot	蛋白免疫印迹
XiMcAb	human-mouse chimeric antibodies	人鼠嵌合单抗
ZuMcAb	humanized antibody	人源化抗体

第一章 前言

1. 轮状病毒结构

澳大利亚科学家 Bishop 于 1973 首次在急性非细菌性胃肠炎患儿十二指肠粘膜上皮细胞中，通过电子显微镜发现一种新的病毒粒子^[1]，因其形态似“车轮状”，1978 年正式命名为轮状病毒（Rotavirus, RV）。轮状病毒属于呼肠孤病毒科，是无包膜双链 RNA（ds RNA）病毒^[2]。轮状病毒基因组有 11 个双链 RNA 片段，编码 12 种蛋白，包括六种结构蛋白（VP1-VP4, VP6 和 VP7）和六种非结构蛋白（NSP1-6）^[3]。轮状病毒电子显微镜下观察呈外缘光滑，表面带有短纤突，完整的轮状病毒粒子为直径 65-75nm 左右的无囊膜结构，二十面体对称，由三层同心圆状的核衣壳蛋白组成^[4-5]。VP1-VP3 组成核心蛋白，VP6 为中间层，其双层衣壳病毒颗粒（double-layered particle, DLP）因缺乏识别、结合和穿透靶细胞的能力而不具备传染性^[6]。VP7 和 VP4 组成病毒最外层衣壳，是参与病毒附着和进入细胞的重要分子。VP4 在胰蛋白酶的作用下可裂解为 VP8* 和 VP5*，从而使病毒具有感染性^[7]。根据轮状病毒不同基因大小，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳技术，依次命名为基因 1 到基因 11^[8]。轮状病毒结构及病毒基因组电泳图如下图 1-1 所示^[9]。



注：图 A 为 PAGE 凝胶显示 A 组轮状病毒基因组 11 个 dsRNA 片段；图 B 为轮状病毒三层颗粒结构图

图 1-1 轮状病毒结构图^[9]（引自 Desselberger U 作者 Rotaviruses 文章）

2. VP7 蛋白

VP7 蛋白占病毒蛋白总量的 30%。其全长包含 326 个氨基酸，分子量大小约 37kDa 左右^[2]。VP7 是轮状病毒最主要的外层衣壳蛋白以及中和抗原，具有 CTL 识别的抗原决定簇，有很好的免疫原性^[10]。VP7 是一种糖基化蛋白，包含多个糖基化位点^[11]，杆状病毒真核表达系统虽然容易得到可溶性的 VP7 蛋白，且呈现天然构象，但是存在一定的糖基化修饰，会使蛋白实际分子量比预估分子量略高。已报道的动物毒株 RRV (G3 型) VP7 蛋白结构，从位 78 到 311 位氨基酸的 VP7 片段结构清晰可见的并且呈三聚体构象^[12]。而 VP7 的主要抗原表位有 A (87—101 位氨基酸)、B (145—152 位氨基酸) 和 C (211—223 位氨基酸)^[13]，都包含在 78-311 片段内。有实验证明，这 3 个区段可产生抗轮状病毒感染的中和抗体^[14, 15]。本研究对轮状病毒 VP7 的表达，从全长 1—326 位氨基酸，以及从位 78 到 311 位氨基酸的表达尝试。

3. 轮状病毒基因型

VP7 蛋白决定着轮状病毒的 G 血清型或基因型，VP4 蛋白定义 P 型^[16]。A 组轮状病毒目前分为 42 个 G 型和 58 个 P 型^[17]。轮状病毒型别多样，不同 G 型特异性单克隆抗体制备是一大难点，在一般研究或监测中暂时无法普遍应用，解决特异性抗体制备将为 RV 不同 G 型别特异的快速检测奠定基础。在众多基因型中，目前有 18 个 G 基因型和 19 个 P 基因型感染人^[18]。全球范围内感染人的主要 RV 基因型包括 G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G8P[8]、G9P[8]等^[19]。本研究借助实验室轮状病毒监测数据库，选择在人群中流行广泛的 G1、G2、G3、G4、G8、G9 进行 VP7 蛋白表达及抗体制备研究。

4. VP7 蛋白表达

关于轮状病毒 VP7 的表达，之前有在大肠杆菌中表达 VP7 基因的研究，表明蛋白均以包涵体形式存在^[20-22]。袁力勇等人尝试在大肠杆菌中进行 VP7 基因全长表达，采用 pBV220 载体非融合表达以及 pET20b、pThioHisB 和 pGEX-KG 这 3 种表达质粒融合表达，均未检测到 VP7 表达^[23]。Wang L、Mason 等都曾指出 VP7 基因中潜在的大肠杆菌启动子序列^[24-25]，且其 C 端可能存在一种不稳定的膜锚结构^[26]，都会影响大肠杆菌中 VP7 基因的稳定表达。魏强、徐倬燊^[27-28]等人曾尝试用非复制型腺病毒载体对我国 G2 和 G3 型主要流行株 97S43 和 97S48 VP7 基因进行表达，实验证明重组腺病毒在感染的

293 细胞裂解液内均能有效地转录插入基因, 上清中并未检测出, 表明未形成分泌蛋白。何金生^[29]等人利用重组新病毒表达 G1 VP7 基因同样表明其抗原性较弱。Maeda S、郝建伟、张帅、韦永龙、张如悦^[30-34]等人均证实杆状病毒表达系统在真核表达可溶蛋白方面存在一定的优势。范晴、黄晓星^[35-36]等人均在昆虫细胞中成功表达猪和牛轮状病毒 VP7 基因, 何湘君^[37]等人采用杆状病毒-昆虫细胞表达系统对我国 1994 年北京流行的 A 组轮状病毒 G2 型地方株 CR100 的 VP7 基因进行了初步表达尝试。

5. 轮状病毒病原学检查

酶联免疫吸附试验 (ELISA) 是传统 RV 抗原检测方法, 价格低廉、操作简便, 对技术要求较低, 适合大规模应用, 同时其特异性检测可高达 90% 以上^[38]。胶体金免疫层析法检测更快速, 临床应用较广^[39-40]。病毒核酸检测灵敏性较高, 广泛应用于实验室研究, 对实验室环境、仪器及操作技术有一定的要求^[41]。实时荧光逆转录聚合酶链反应 (rRT-PCR) 可对病毒核酸进行快速定性甚至定量, 但同样对环境及操作技术要求较高。逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和巢氏 PCR 还可进一步鉴定常见的轮状病毒 G 以及 P 基因型^[39-40]。

6. 单克隆抗体研究

单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb), 指同一种抗原决定簇的细胞克隆所产生的均一性抗体^[42]。1975 年, 生物学家利用细胞融合技术, 将可在体外培养并一直增殖的小鼠骨髓瘤细胞与经过所需抗原刺激过的纯系小鼠 B 淋巴细胞融合, 产生了以杂交瘤细胞方式制备单克隆抗体的技术^[43]。随着基因技术的发展, McAb 经历了四个阶段的进展, 从鼠源性抗体容易产生人抗鼠抗体 (human anti-mouse antibodies, HAMA) 而被当作人体异源蛋白被清除^[44], 人体内稳定性差^[45-46]、易出现过敏反应^[47]等; 到以基因工程改造的人鼠嵌合单抗 (human-mouse chimeric antibodies) ^[48], 降低了单抗 HAMA 反应, 并未完全消除^[49-50]; 到第三代人源化抗体 (humanized antibody), 大幅减少鼠源序列比例, 提高人源序列比重, 尽力降低 HAMA 反应^[51]; 第四代全人源单克隆抗体 (human monoclonal antibody) 的氨基酸序列均由人源基因编码, 人体发生过敏或排斥反应的可能性最低^[52-53]。抗体片段目前多以单链抗体 (single-chain antibodies, scFv) 和抗原结合区片段 (Fab) 组成^[54]。scFv 片段 25 kDa, Fab 的分子量大小是 scFv 的 2 倍, 约 50 kDa, 轻链和重链通过二硫键连接^[55-57]。

7. 课题研究路线

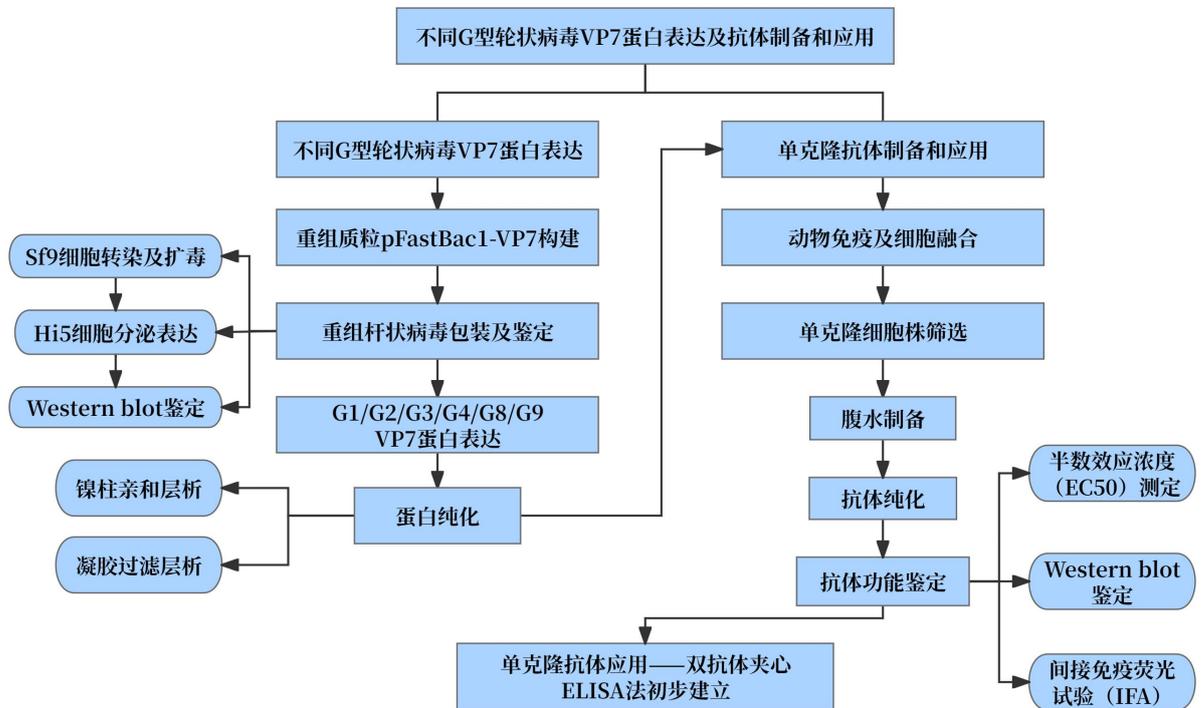


图 1-2 技术路线图

第二章 实验研究

第一节 不同 G 型轮状病毒 VP7 蛋白表达

1. 实验材料

1.1 主要生物材料

- (1) 菌株: pFastBac1 菌株为科室保存;
- (2) 克隆宿主: DH10Bac 细胞购自博迈德;
- (3) 细胞: Sf9 昆虫细胞——转染扩毒; Hi5 昆虫细胞——表达蛋白, 均为科室保存;

1.2 主要试剂及配制

- (1) 基因克隆部分相关试剂:

DH5 α Chemically Competent Cell (TSINGKE, TSC-C14);

DH10BAC 感受态细胞 (biomed/博迈德, BC112-01);

Endo-free Plasmid Mini Kit I(50) (OMEGA, D6948-01);

Trans2K[®] Plus DNA Marker (TRANS, BM111-02);

Trans15K DNA Marker (TRANS, BM161-01);

2 \times T5 Super PCR Mix (Basic) (TSINGKE, TSE008);

氨苄西林/氨苄青霉素 (Solarbio, A6920-5g);

硫酸卡那霉素 (Solarbio, K8020-10g);

硫酸庆大霉素溶液 (50mg/ml) (Solarbio, L1312-10ml);

盐酸四环素 (Solarbio, T8180-10g);

X-gal 溶液 20 mg/ml (TIANGEN/天根生化, RT119);

IPTG (Inalco, 1758-1400);

细菌培养皿 (Greiner, 628102);

三抗 LB 配制比例: 50 μ g/mL 卡那霉素, 7 μ g/mL 庆大霉素, 10 μ g/mL 四环霉素;

蓝白斑筛选比例: 100 μ g/mL X-gal, 40 μ g/mL IPTG;

- (2) 昆虫细胞培养相关试剂:

SIM HF Expression Medium (For Hi5)(Serum free) (Sino Biological/义翘神州),

MHF1-1L) ;

SIM SF Expression Medium (For SF9, SF21)(Serum free) (Sino Biological/义翘神州, MSF1-1L) ;

TransIT®-Insect Transfection Reagent (MIR6100) (Mirus , MIR 6100) ;

无血清细胞冻存液 (CELLSAVING) (easybio/柏奥易杰, C40100) ;

青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液 (100×) (Solarbio, P7630-100ml) ;

程序降温盒 12 孔 (biosharp, BS-02-CFC) ;

台盼蓝染色液 (0.4%) (Solarbio, C0040-50ml) ;

deconex® 12 BASIC 清洗剂 (Borer, 500325.00-F10W) ;

(3) VP7 蛋白纯化相关试剂:

Tris-HCl 缓冲液 (1mol/L,pH8.0,RNase free) (Leagene, NR0073) ;

0.5M EDTA (PH8.0) (Solarbio, E1170) ;

Millex33mmPES.22umSterile250/pkRUO (Merck millipore/ 默克密理博 , SLGPR33RB) ;

TNC buffer 配制: 2mM Tris-HCl, 0.1mM CaCl₂, 10mM NaCl, 蒸馏水定容, PH=8.0;

His Trap™处理: 0.05M EDTA;

His Trap™镍化: 0.1M NiSO₄ 镍溶液;

(4) SDS-PAGE 及 Western blot 相关试剂

One-Step PAGE Gel Fast Preparation Kit (Vazyme, E304-01) ;

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5X), (Beyotime/碧云天, P0015L) ;

QuickBlue 快速染胶液 (Biodragon/博奥龙, BF06152) ;

硝酸纤维素膜 NC 膜 (0.45um) 15cm*20cm (Solarbio, YA1711-15*20cm) ;

ProteinFind™ Anti-His Mouse Monoclonal Antibody (Transgen/全式金, HT501-02) ;

HRP-山羊抗兔 IgG (H+L) (Biodragon/博奥龙, BF03008) ;

HRP-山羊抗鼠 IgG (H+L) (Biodragon/博奥龙, BF03001) ;

RVA VP7 多抗 (科室制备) ;

SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo,34577) ;

甘氨酸 (Solarbio, G8200-5kg) ;

EZ Mark 自发光蛋白 Marker (李记生物, AP13L092) ;

蓝色预染蛋白质 Marker (biomed/博迈德, PM202-02) ;

低分子量蛋白质 Marker (biomed/博迈德, PM101-02) ;

5X Tirs-Glycine buffer 电泳液配比: Tris 15.1g, Glycine 94g, SDS 5.0g, 去离子水定容至 1L;

电转液配比: 48mM Tris, 39mM Glycine, 0.037% SDS, 20%甲醇;

1.3 主要仪器设备

His Trap™ (Cytiva,17-5248-02) ;

AKTA 蛋白纯化仪 (泰渡, ACHROM) ;

SDS-PAGE 电泳仪 (BIO-RAD) ;

垂直电泳槽 (伯乐公司, Mini-PROTEAN) ;

Western Blot 转膜电泳仪 (北京六一生物科技有限公司, DYCZ-40D) ;

蠕动泵 (LongerPump, BT100-2J) ;

电子显微镜 (OLYMPUS, CKX53, CKX41) ;

生物安全柜 (上海力申科学仪器有限公司, HFsafe 1200LC (A2)) ;

全温振荡器 (苏州培英实验设备有限公司, Z-C-1) ;

低温离心机 (Sigma, 2—16K) ;

家用电冰箱 (伊莱克斯, bcd-281ea) ;

紫外线消毒车 (江苏申星光电医疗器械有限公司, SX-H650 型) ;

涡旋振荡器 (SCIOLOGEX,SCI-US) ;

纯水仪 (Thermo, 24V/DC-120W) ;

PCR 仪 (eppendorf, 5333) ;

液氮罐 (中国, YDS175-216) ;

化学发光成像系统 (勤翔科学仪器有限公司, ChemiScope 6100) ;

制冰机 (松下, SIMF140BDL) ;

超声波清洗机 (德意生, 0205) ;

台式高速冷冻离心机 (SCIOLOGEX, D3024R) ;

台式恒温振荡器 (北京亚泰科隆仪器技术有限公司, THD-200D) ;

Imaging System (BIO-RAD, GelDoc Go) ;

琼脂糖水平槽 (北京六一生物科技有限公司, DYCP-33A 型) ;

2. 实验方法

2.1 克隆构建

2.1.1 RVA VP7 全长基因合成及克隆构建

根据实验室测序鉴定的人 RVA G1P[8] VP7 (RVA/Human-wt/CHN/SC19-1047/2019/G1P[8]; GenBank ID:URZ88698) /G2/G3/G4/G8/G9 VP7 基因序列, 按照昆虫细胞系统进行密码子优化后合成相应 VP7 基因片段。G2/G3/G4/G8/G9 VP7 合成 1—326 位氨基酸全长 VP7 对应的核苷酸序列, G1P[8] VP7 合成 78-311 位氨基酸对应的核苷酸序列。将基因片段连接到 pFastBac1 载体构建重组质粒 pFastBac1-VP7, C 末端序列设计带有 6 个组氨酸 His 标签用于镍柱亲和层析纯化。

2.1.2 RVA VP7 截短基因合成及克隆构建

人 A 组轮状病毒 G2/G3/G9 VP7 蛋白截短体 (78—311 位氨基酸对应的核苷酸序列) 克隆构建。根据文献报道 VP7 结构, 设计 78—311 位氨基酸片段对应核苷酸序列的上下游引物, 分别添加 Pst1、Xho1 酶切位点, 利用高保真酶进行 PCR 扩增, Pst 及 XhoI 双酶切后, 与 pFastBac1 载体连接, 连接产物进行 DH5 α 转化, 构建 G2、G3、G9 基因型 RVA VP7 截短体重组克隆。次日观察挑菌, 通过 PCR 进行菌液鉴定, 确认无误后, 提取质粒转化 DH10bac 感受态, 最后进行蓝白斑筛选到阳性 bacmid, 用于后续细胞转染实验。G2/G3/G9 VP7 蛋白截短体引物序列如下:

(1) G2VP7trF78Pst1: AAAACTGCAGatgACTTCCACTCTGTGCCTGTAC

G2VP7trRXho1his:

CCGCTCGAGttaGTGGTGATGGTGATGGTgAGACATCACTTGGATGATCTG

(2) G3VP7trF78Pst1: AAAACTGCAGatgACTTCCACTCTGTGCCTGTAC

G3VP7trRXho1his:

CCGCTCGAGttaGTGGTGATGGTGATGGTgGGACATAGCTTGCACGATCTG

(3) G9VP7trF78Pst1: AAAACTGCAGatgACTTCCACTCTGTGCCTGTAC

G9VP7trRXho1his:

CCGCTCGAGttaGTGGTGATGGTGATGGTgGGACATCACTTGCACGATCTG

DH5 α 转化具体操作如下:

(1) 取 30 μ l DH5 α 感受态细胞, 置于冰上融化, 加入鉴定无误的 pFastBac1-VP7 质粒,

轻轻混匀后，冰上静置 30min；

- (2) 42°C水浴锅中热激 45s，迅速转至冰浴，静置 2min；
- (3) 加入 500μl 不含抗生素的无菌 LB 培养基，于 37°C 200rpm 复苏 60min；
- (4) 将复苏液高速离心后弃去 600μl 上清液，留 100μl 混匀，全部涂在氨苄固体 LB 平板中；
- (5) 37°C恒温孵箱中将平板倒置，过夜培养，次日观察。

DH10bac 转化和蓝白斑筛选具体操作如下：

- (1) 将 100μl DH10 感受态细胞，置于冰上融化，加入 1μg 连接产物，轻轻混匀后在冰上静置 30min；
- (2) 42°C水浴锅中热激 45s，迅速转至冰浴，静置 2min；
- (3) 加入 900μl 不含抗生素的无菌 LB 培养基，于 37°C 200rpm 复苏 60min；
- (4) 将 IPTG 与 X-Gal 混合液（16μl IPTG+40μl X-Gal/板）用涂布珠均匀地铺在三抗 LB 平板里；
- (5) 而将复苏液分别取 10μl、20μl、40μl，梯度分别涂于加好 IPTG 与 X-Gal 混合液的三抗固体 LB 平板中；
- (6) 37°C恒温孵箱中将平板倒置过夜培养，一般两日后观察。

2.2 重组杆状病毒包装和鉴定

2.2.1 昆虫细胞培养

Sf9 昆虫细胞来自雌性草地贪夜蛾卵巢组织，是利用杆状病毒表达系统进行重组蛋白表达的合适宿主。昆虫细胞无贴壁依赖性，最适合悬浮培养，正常细胞生长状态是均匀的圆形，适合在 27°C 120rpm 恒温孵箱悬浮培养，无需 CO₂。但其静置培养时，可以半贴壁生长，本研究进行细胞转染扩毒时，选择铺板半贴壁培养。

2.2.2 重组杆状病毒包装

预先准备好悬浮培养的 Sf9 昆虫细胞，密度约 $1.5-2.5 \times 10^6$ cell/mL，铺六孔板，将其于 27°C 培养箱中放置 1h 左右，使细胞完全贴壁。将 2.1 步骤中分别得到的质量较好浓度较高的 G1、G2、G3、G4、G8、G9 基因型 RVA VP7 重组 bacmid，按说明书操作分别转染进 Sf9 昆虫细胞中。27°C 培养 5—7 天，镜下观察转染现象：早期 24h 内，细胞

直径增大约 25%—50%；中期 24—72h 内，与对照孔相比，转染孔细胞生长停止，出现颗粒状物质，即出芽的病毒颗粒，细胞囊泡化；晚期 72h 以后，细胞逐渐裂解，出现单层细胞漂浮。此时即可收毒，500 g 离心 5 min，取上清转移至干净的 EP 管中，锡箔纸包裹 4℃避光放置，这就是 P1 代病毒。如需长期保存，将成功包装的 P1 代毒液氮速冻，-80℃保存。

重组 bacmid 转染具体步骤如下：

- (1) 准备密度约 $1.5-2.5 \times 10^6$ cell/mL 的 Sf9 细胞，六孔板中半贴壁培养；
- (2) 取转染试剂 7 μ l+原始 Sf9 培养基（未添加抗生素）100 μ l，轻轻混匀，标管 1 号，静置 5min；bacmid 取 1~2 μ g+原始 Sf9 培养基（未添加抗生素）100 μ l，轻轻混匀，标管 2 号；
- (3) 将（2）步骤中的管 1 和管 2 混合，（总体积约 210 μ l）轻轻混匀，孵育 45min；
- (4) 将六孔板中的培养基用移液器吸出，每孔加 2mL 原始培养基，润洗 3 遍；
- (5) 在（3）步骤中的混合管中，加入 800 μ l 原始培养基，轻混匀后沿六孔板壁缓缓加入；
- (6) 27℃培养箱孵育 5h；
- (7) 弃去六孔板中的混合液，每孔加 2mL 培养基（混合抗青霉素、抗链霉素和抗真菌的三抗培养基）；
- (8) 27℃培养箱中孵育，隔天观察转染现象；

2.2.3 重组杆状病毒 Western Blot 鉴定

用上述 2.2.2 步骤成功包装的六种 G 型 RVA VP7 P1 代病毒，接入 Sf9 细胞逐步扩增病毒至 P3 或 P4 代。收取的 P3 代重组杆状病毒利用 Anti-his 标签抗体进行 Western Blot 验证是否成功表达。

2.3 蛋白表达纯化和鉴定

2.3.1 亲和层析柱纯化

将分别收取的 G1、G2、G3、G4、G8、G9 基因型 RVA VP7 P3 或 P4 代重组杆状病毒感染 Hi5 细胞表达蛋白，悬浮培养 1~2 天，蛋白表达量根据毒种病毒量和细胞状态不同，每次收获都有差异，一般以镜检 50%细胞病变为宜（镜检取 10 μ l 细胞培养液与

台盼蓝 1:1 混合镜下观察)。将收获的细胞样品于 4°C 8000 rpm 离心 1 h 后收取上清,并用 0.22 μm 滤器过滤,去除杂质防止堵塞层析柱。过滤好的上清液利用蠕动泵冰上结合 His Trap™ HP 亲和层析柱进行纯化。结合完蛋白上清后,分别用 TNC buffer、20 mM 咪唑、300 mM 咪唑缓冲液分别洗脱杂蛋白、非特异性结合的杂蛋白以及目的蛋白,最后将目的蛋白洗脱液分管收集,得到的样品进行电泳鉴定。层析柱洗脱完蛋白后,依次用 50mL 水、50mL 0.05M EDTA、50mL 水、10mL 0.1M NiSO₄ 镍化后 4°C 保存。最后将目的蛋白条带对应的洗脱样品,用 10 KDa 超滤管进行浓缩并换液到配制的 TNC buffer 溶液中,蛋白终体积 4mL 左右。

2.3.2 凝胶过滤层析纯化

先用纯水及配制的 TNC buffer (0.22 μm 滤器过滤)洗泵,流速 1mL/min,走平后 UV 值调零,将浓缩好的不同 VP7 蛋白样品注入 AKTA,根据预计的蛋白大小观察出峰位置及峰值,收取洗脱蛋白,取样跑蛋白胶鉴定,鉴定无误后,将蛋白洗脱液用 10 KDa 超滤管浓缩,测定蛋白浓度后分装,液氮速冻, -80°C 保存,VP7 蛋白易沉淀,避免反复冻融。AKTA 纯化完蛋白后,用大于一个柱体积的纯水量洗泵,直至 UV 值降低后,用大于一个柱体积的 20%乙醇过柱,可长期保存,延长使用期限。

2.3.3 分析型超速离心实验 (AUC)

将凝胶过滤层析纯化后的蛋白,取 400 μl (1mg/mL) 的量,交由中国科学院微生物所进行分析型超速离心鉴定。

2.3.4 Western Blot 鉴定

经过镍柱亲和层析及 AKTA 凝胶过滤层析纯化后,得到浓度更高、纯度更好的 VP7 蛋白。G1、G2、G3、G4、G8、G9 基因型 RVA VP7 蛋白均可通过 Anti-his 标签抗体进行 Western Blot 验证,证明蛋白成功表达并纯化。Western Blot 步骤如下:

(1) 制样:扩增的不同 G 型 RVA VP7 P3 代病毒液,分别吸出 50 μl 离心取上清,按比例混合 5 \times 蛋白上样缓冲液;100°C 沸水中煮沸 3—5min 后蛋白变性,4°C 10000rpm 离心 10min 减少上样杂质;

(2) SDS-PAGE:配制好 12%的聚丙烯酰胺凝胶,将蛋白样品及 Maker 分孔上样,150V 70min 跑胶;

(3) 转膜（湿转）：按三明治法逐层夹好棉垫、凝胶、NC 膜、棉垫；根据转膜仪使用说明操作，200mA 转 2h，冰浴；

(4) 封闭：5%脱脂奶粉 37°C 封闭 2h；

(5) 一抗孵育：1%脱脂奶粉按 1: 1000 稀释 Anti-his 标签抗体，4°C 过夜；

(6) 二抗孵育：1%脱脂奶粉按 1: 1000 比例稀释 HRP-山羊抗鼠二抗，37°C 孵育 1h；

(7) 成像：1: 1 混合发光液 A、B 液，置于仪器中自动曝光成像。

3. 结果

3.1 重组 bacmid 鉴定结果

G1、G2、G3、G4、G8、G9 基因型 RVA VP7 均以提取的 bacmid 为模板，通过 M13 引物进行 PCR 鉴定，重组成功的阳性克隆得到约 3000bp 目的条带（2300bp 加上目的基因片段 700 bp），未重组成功的蓝色斑点扩增得到约 300 bp 条带作为阴性对照。结果如下图 1-3-1 所示，表明均得到正确的 bacmid。

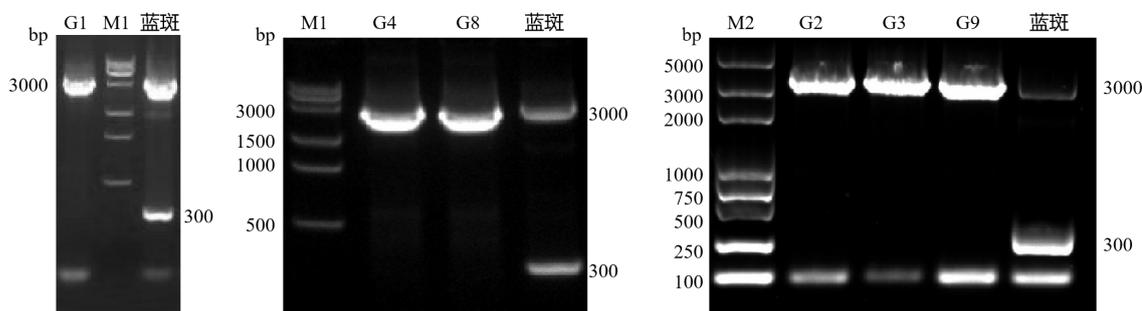


图 1-3-1 六种 G 型 RVA VP7 重组 bacmid 鉴定结果

3.2 重组杆状病毒包装和验证结果

3.2.1 昆虫细胞培养

正常培养的 Sf9 昆虫细胞形态呈均匀的圆形，重组 bacmid 转染进 Sf9 细胞后，细胞出现病变，病变后的 Sf9 细胞停止生长，细胞囊泡化，出现颗粒状物质，形态改变较为明显。如下图 1-3-2 所示。

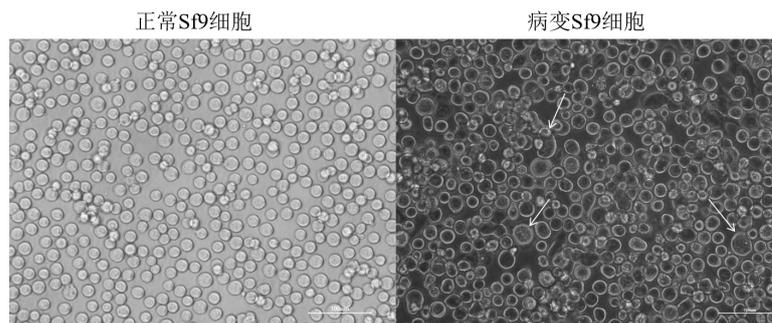


图 1-3-2 显微镜下 Sf9 细胞形态 (20×)

3.2.2 重组杆状病毒包装和鉴定结果

RVA VP7 重组杆状病毒经昆虫 Sf9 细胞扩毒至 P3 代, 如下图 1-3-3 所示, 经过 Anti-his 标签抗体进行 WB 验证, G1、G2、G3、G9 截短蛋白条带均在 30kDa 左右, G4 和 G8 全长表达蛋白条带分别在 35 和 37kDa 左右, 与预期分子量大小相符。

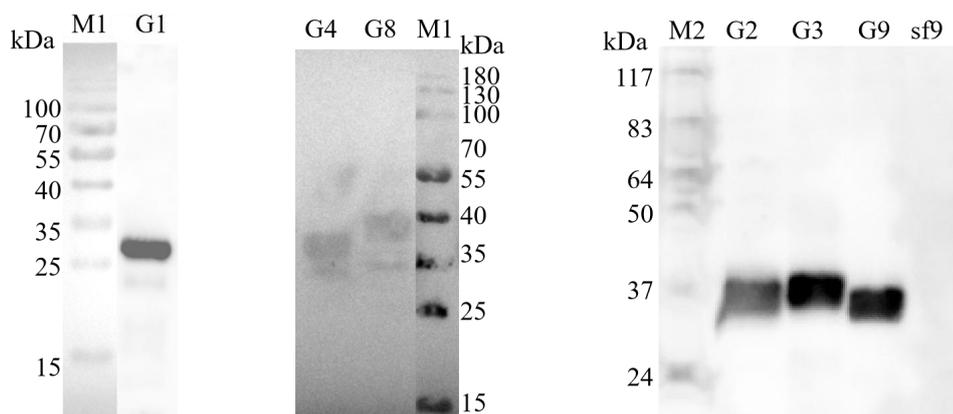


图 1-3-3 六种 G 型 RVA VP7 P3 代重组杆状病毒 Western Blot 验证

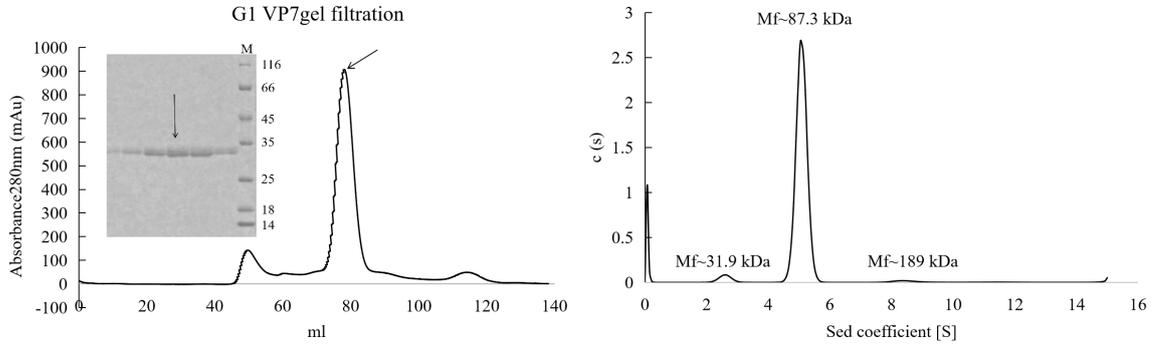
3.3 蛋白表达纯化鉴定

3.3.1 凝胶过滤层析及分析型超速离心实验鉴定

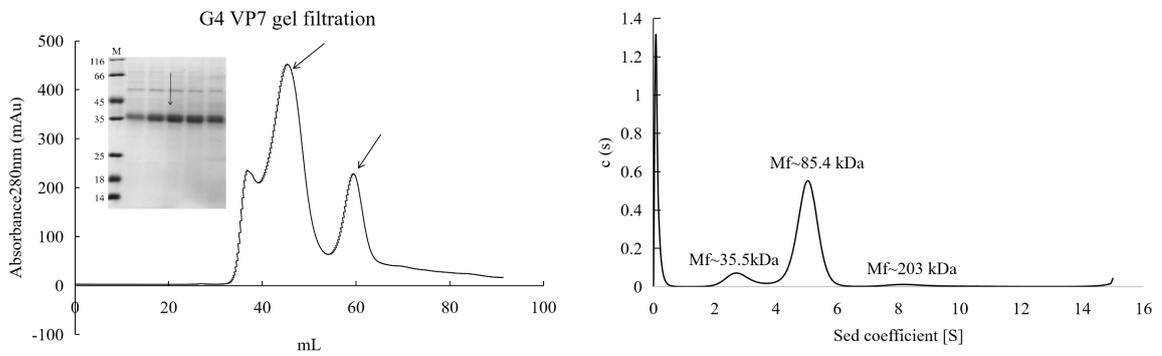
利用镍柱亲和层析初步纯化 G1、G2、G3、G4、G8、G9 基因型 RVA VP7 蛋白, 使用 20mM 咪唑溶液洗掉杂蛋白及非特异性结合蛋白, 利用 300mM 咪唑溶液洗脱目的蛋白。然后将目的蛋白洗脱液浓缩后进行凝胶过滤层析进一步进行蛋白纯化, 如下图 1-3-4 所示, 六种 G 型 VP7 蛋白凝胶过滤层析后目的蛋白峰位置出现在 78 mL~80 mL 处。出峰位置收样经 SDS-PAGE 显示目的蛋白条带与预期分子量大小相同。如 (图 A/B/C) 所示 G1、G4、G8 VP7 蛋白经分析型超速离心实验鉴定表明, G1 VP7 蛋白大部分 (~87.5%) 分子量为 87.3 kDa 左右, G4 VP7 蛋白大部分 (~63.3%) 分子量为 85.4 kDa 左右, G8 VP7

蛋白大部分 (~81.9%) 分子量为 85.0 kDa 左右, 约对应于三倍 VP7 单体的分子量, 表明 VP7 蛋白可能主要以三聚体形式存在, 与凝胶过滤层析的结果相对应。

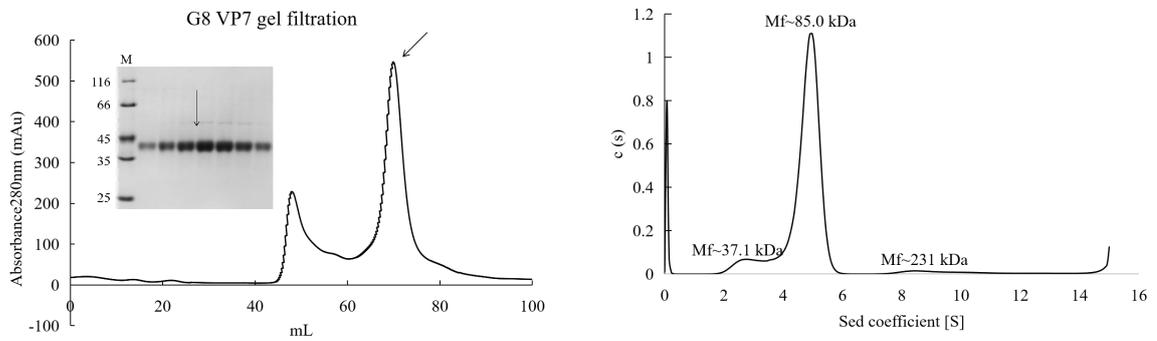
A



B



C



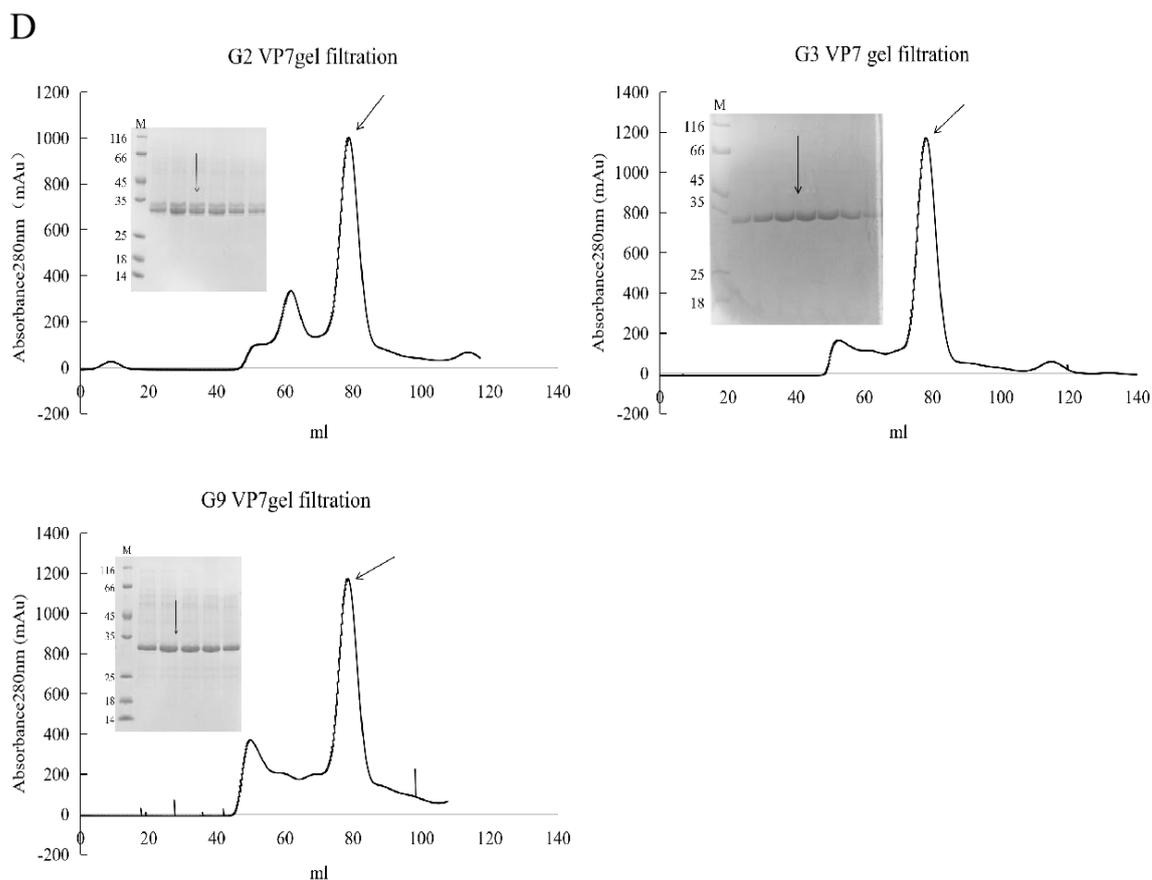


图 1-3-4 不同 G 型 RVA VP7 蛋白凝胶过滤层析及分析超速离心鉴定结果

3.3.2 蛋白纯化 Western Blot 鉴定

使用 Anti-his 标签抗体做 WB 验证，如下图 1-3-5，显示 G1、G2、G3、G4、G9 VP7 截短体蛋白在 30 kDa 处有明显清晰的条带，G8 VP7 蛋白为 VP7 全长序列对应蛋白，条带大小在 37kDa 处，与预期分子量一致。

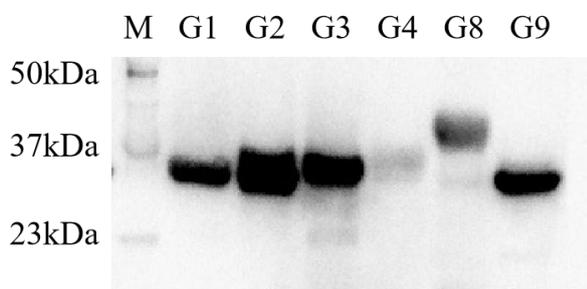


图 1-3-5 纯化后六种 G 型 RVA VP7 蛋白 Western Blot 鉴定结果

4. 分析与讨论

本章节的研究目的是利用昆虫杆状病毒表达载体系统（BEVS）成功表达人 A 组轮状病毒不同 G 型的 VP7 可溶蛋白，并以此为免疫原，为下一步动物免疫制备单克隆抗

体提供基础。

本研究通过对国内轮状病毒流行株进行基因合成、序列全长、截短等方式构建真核 pFastBac1-VP7 表达质粒，并于 C 末端序列设计带有 6 个组氨酸 His 标签用于镍柱亲和层析纯化。本实验通过将构建到 pFastBac1 质粒上的 VP7 外源基因转座到大肠杆菌 DH10Bac 中的 bacmid 中，产生重组 bacmid，通过蓝白斑筛选出重组 bacmid，提取后转染 Sf9 昆虫细胞产生可表达目的基因的重组病毒。通过显微镜观察细胞转染变化与正常对照组的区别，以及利用 His 标签抗体通过 Western Blot 可初步验证重组病毒是否能表达目的基因。验证后即可在 2~3 天的时间内通过 Hi5 细胞快速表达大量 VP7 目的蛋白，通过 His Trap 亲和层析镍柱可从 Hi5 细胞培养液中得到 VP7 目的蛋白，借助聚丙烯酰胺凝胶电泳实验可快速检测一批次的 VP7 蛋白表达情况，证明蛋白于细胞上清中大量分泌，以可溶形式存在。

本研究选择 BEVS，以杆状病毒为载体，在昆虫细胞内表达外源基因，具有安全性高，对外源基因克隆容量大，重组病毒易于筛选等特点，具有完备的翻译后加工修饰系统和高效表达外源基因的能力^[58]。本实验以 DH10Bac 作为 pFastBac1 菌株的宿主，因其包含带有微型-attTn7 靶位点的病毒质粒和辅助质粒。当 pFastBac1 表达质粒转入 DH10Bac 细胞，pFastBac1 菌株的微型 Tn7 单位和微型-attTn7 靶位点之间通过转座酶催化产生重组 bacmid。最后用去内毒素的质粒试剂盒少量提取 bacmid 即可。实验中操作要求简单，方法成熟，价格低廉，且高效，非常适于本研究 VP7 外源基因表达。

VP7 是一种 N-联低聚甘露糖糖蛋白，决定病毒的 G 血清型^[16]。到目前为止，A 组轮状病毒共有 42 个 G 型和 58 个 P 型^[17]。全球范围内感染人的主要 RV 基因型包括 G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G4P[8]、G8P[8]、G9P[8]等^[19]。其中 G1~G4 基因型是感染婴幼儿最常见的几种。所以本研究选择人群中流行较多的 G1、G2、G3、G4、G8、G9 型轮状病毒 VP7 蛋白进行可溶蛋白表达尝试。VP7 可溶蛋白的表达对轮状病毒的结构和功能研究具有重要作用。目前已解析的 VP7 蛋白结构只有猴轮状病毒 RRV，对于人群中流行的不同 G 型轮状病毒株研究较少。根据对猴轮状病毒毒株 RRV VP7 的结构研究表明，从位 78 到 311 位氨基酸的 VP7 片段结构清晰可见的并且呈三聚体构象。本实验通过印证，成功表达出纯度较好、表达量大的六种 G 型 VP7 蛋白，同时通过凝胶过滤层析表明得到可溶的 VP7 蛋白，并且在对应大约 90 kDa 位置出峰，初步表明得到的 VP7 蛋白是具有三聚体结构的。进一步经过分析超速离心显示溶液中 VP7 蛋白分子量约 87kDa，对应三聚体蛋白的分子量，证明溶液中 VP7 蛋白主要以三聚体形式存在，跟之

前结构学研究结果一致。并且有研究表明 Ca^{2+} 离子对维持 VP7 蛋白的构象起着关键作用^[59]。实验过程中同样印证了这点，VP7 蛋白在无 Ca^{2+} 离子溶液中保存极易出现沉淀并降解，后续调整为含有 Ca^{2+} 浓度为 1 mM 的 TNC buffer 后，VP7 蛋白更加稳定，以可溶形式存在。

在昆虫细胞培养产生重组病毒及蛋白表达过程中，细胞状态、生长密度，培养温度等都与重组病毒量及蛋白表达效率有着密切联系，同时 bacmid 质量也至关重要。通过 Hi5 细胞接种重组病毒进行蛋白表达时，一般 24~48h 之间为最佳收获时间，但是根据具体问题具体分析的原则，每批次的收毒时间根据毒种病毒量和细胞状态不同都会有差异。一般以镜检 50% 细胞病变为宜。在蛋白纯化过程中，均应在冰上进行，减少蛋白降解。将细胞培养液高速离心后再用 0.22 μm 滤器过滤后再过亲和层析柱，可以防止细胞碎片堵塞镍柱，并排除杂质，最大程度从实验细节上降低外界因素影响镍柱的亲和效率。

VP7 是轮状病毒主要的糖蛋白和中和抗原，分子量约 37 kDa，大约占轮状病毒粒子蛋白总量的 30%^[2]。本研究最开始根据文献做了 G1 VP7 蛋白 78—311 位氨基酸截短体蛋白表达，表达量较高且蛋白较纯，并以可溶蛋白形式存在，呈现三聚体的天然构象。为了尽量得到完整的 VP7 蛋白，后面尝试将其他型别的 VP7 都做了全长序列（1—326 位氨基酸）的蛋白表达，只有 G8 VP7 得到了较好的蛋白，蛋白量较高，与预期分子量~37 kDa 一致。G2 及 G4 VP7 蛋白也得到了全长 VP7 蛋白，但根据凝胶过滤层析结果 G4 VP7 容易形成多聚体。其他型别的全长 VP7 表达效果不甚理想，表达量低并且有很多杂蛋白。根据 G1 VP7 截短体的经验，尝试将 G2、G3、G9 VP7 构建了 78—311 位截短体蛋白进行表达，结果显示 VP7 截短体蛋白表达量较好，且蛋白纯度较高，凝胶过滤层析结果显示蛋白均以可溶形式存在，与三聚体蛋白对应的出峰位置相对应，VP7 截短体蛋白可能具有较好的天然构象；蛋白条带大小也与目标分子量一致，成功得到了不同型别 VP7 蛋白。

VP7 蛋白是轮状病毒的主要糖蛋白以及中和抗原，且具有很好的免疫原性。制备得到拥有天然构象的可溶 VP7 蛋白，对研究其功能及免疫原性十分重要。已有的 VP7 结构是针对动物毒株 RRV（G3 型）的 VP7 蛋白。对人群中流行广泛的 G1、G2、G3、G9 等 VP7 的研究报道较少。本研究制备了不同 G 型的 VP7 可溶蛋白，且初步证明以三聚体形式存在。为下一步制备不同 G 型 VP7 单克隆抗体及建立不同 G 型轮状病毒的检测奠定基础，对不同 G 型多价疫苗的鉴定和开发具有重要意义。

5. 小结

本研究通过杆状病毒表达系统成功表达了 G1、G2、G3、G4、G8、G9 不同基因型轮状病毒 VP7 可溶蛋白，蛋白表达量较高、纯度较好，且初步证明 VP7 蛋白具有三聚体结构，对后续不同 G 型轮状病毒 VP7 蛋白单克隆抗体的制备及不同 G 型轮状病毒检测方法的建立奠定基础。

第二节 抗轮状病毒不同 G 型 VP7 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定应用

1. 实验材料

1.1 主要生物材料

- (1) 免疫抗原：第一节成功表达并纯化后的不同 G 型 RVA VP7 可溶蛋白；
- (2) 细胞株及病毒：MA104 恒河猴肾细胞、SF9 和 Hi5 昆虫细胞、A 组轮状病毒 WHG1（基因型 G1P[3]）、DS-1（基因型 G2P[4]）、SA11（基因型 G3P[2]）、G8P[8] 株、G9P[8] 株、H 组轮状病毒 H-J19 均为科室保存。
- (3) 动物：BALB/c 雌性小鼠；

1.2 主要试剂及配制

- (1) 细胞、病毒培养鉴定相关试剂：
 - DMEM（Thermo Fisher, C11995500BT）；
 - PBS（Thermo Fisher, C10010500CP）；
 - 胎牛血清 FBS（Sigma-Aldrich, F8687-500ML）；
 - Penicillin Streptomycin sol 100ml（Gibco, 15140122）；
 - TritonX-100（Slabio, T8200-500ml）；
 - TrypLE™ Express 酶 (1×), 无酚红（GIBCO, 12604021）；
 - 多聚甲醛溶液（4% PFA）（Leagene/雷根, DF0135）；
 - 牛血清白蛋白, 组分 VALBUMIN, BOVINE（amresco, 0332-100G）；
 - FITC-山羊抗小鼠 IgG(H+L)（Biodragon/博奥龙, BF05001）；
 - FITC-山羊抗小鼠 IgG(H+L)（Biodragon/博奥龙, BF05002）；
 - TrueBlue Peroxidase Substrate（KPL, 5510-0030）；
 - DAPI（Sigma-Aldrich, D9542-1MG）；
 - 甘油（Sigma/西格玛, G5516-500ml）；
 - 完全培养基：1% Pen Strep、10% Fetal Bovine Serum、89% DMEM 培养基；
- (2) 腹水抗体纯化相关试剂：
 - 磷酸二氢钠（Solarbio, S5830-500g）；
 - 磷酸氢二钠（Solarbio, D9790-500g）；

0.1M Glycine-HCl 缓冲液 (pH2.7) (Coolaber, SL1990-500mL) ;

Binding buffer: 20mM sodium phosphate, PH 7.0;

(3) 酶联免疫吸附试验相关试剂:

96 孔单条可拆酶标板 (Corning/康宁, 42592) ;

ELISA 包被缓冲液 (10×) (Leagene/雷根, IT0021) ;

PBS 缓冲液干粉 (效果同 P1003) (Solarbio, P1010-100*2L) ;

(232100) Skim Milk 脱脂奶粉 (BD, 232100) ;

HRP 标记试剂盒 (Biodragon/博奥龙, BF06095S-5000) ;

TMB Substrate OptEIA Set (BD, 555214) ;

ELISA 酶标板洗剂: 含 0.05% Tween-20 的 10 mM PBS 配制;

封闭液: 5%脱脂奶粉, PBST 稀释配制;

抗体稀释液: 1%脱脂奶粉;

终止液: 2 mol 磷酸;

1.3 主要仪器设备及软件分析

HiTrap™ Protein G (GE, 17040501) ;

洗板机 (BioTek, ELx508) ;

ELISA 数据采集 (Gen5 2.09 酶标仪软件) ;

ELISA 数据分析、绘图 (Excel 及 GraphPad Prism) ;

间接免疫荧光图合并 (Adobe Photoshop CS5) ;

病毒感染点计数 (Immunospot by C.T.L)

2. 实验方法

2.1 轮状病毒的培养及鉴定

2.1.1 轮状病毒培养

将生长状态良好的 MA104 细胞, 弃掉完全培养基, 用无菌 PBS 溶液清洗细胞 3 遍, 弃掉液体, 加入足够覆盖细胞的无菌 DMEM 溶液, 放置 37°C, CO₂ 浓度为 5% 的恒温孵箱内, 使细胞适应 1h; 过后加入培养瓶容量五分之一的病毒及 DMEM 混合液 (胰酶

活化终浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 放入孵箱使病毒吸附 2h, 每隔 30min 轻晃瓶身, 使病毒吸附更加均匀; 吸附 2h 后弃掉病毒液, 加入适配量 DMEM 培养基维持 (胰酶终浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 放入孵箱继续培养, 待细胞病变 80% 左右收毒, 冻融 3 次后收取病毒液, 3800rpm 离心 5min 去除细胞碎片等杂质, -80°C 冻存。

2.1.2 间接免疫荧光试验 (IFA)

将生长状态良好的 MA104 细胞, 分别感染 A 组轮状病毒 WHG1 (基因型 G1P[3])、DS-1 (基因型为 G2P[4])、SA11 (基因型为 G3P[2])、G8P[8] 株、G9P8 株, 培养箱内孵育 2 h 后弃去病毒液, 加入完全培养基继续孵育 12~14 h 后; 4% 多聚甲醛溶液常温固定细胞 15min; 0.5% TritonX-100 常温孵育 10 min, 增加细胞通透性; 配制 5% BSA 37°C 封闭 1 h; 1% BSA 配制 VP7 多克隆抗体, 4°C 过夜孵育; 最后用 1% BSA 稀释 FITC 山羊抗兔 IgG (H+L), 37°C 避光孵育 1h; 最后加入 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 DAPI 染核, 常温避光 15 min; 每个步骤之间用 PBS 清洗 3 遍。甘油封片后, 荧光显微镜观察。

2.1.3 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

间接 ELISA 法:

包被: 将收取的轮状病毒液, 100 μl /孔, 包被酶标板, 4°C 过夜孵育;

封闭: 5% 脱脂奶粉, 200 μl /孔, 37°C 孵育 1h;

一抗: RVA VP7 多抗, 用 1% 脱脂奶粉 1: 5k 稀释, 37°C 孵育 1h;

二抗: 山羊抗兔 IgG-HRP, 用 1% 脱脂奶粉 1: 5000 稀释, 37°C 孵育 30min;

显色: 酶底物溶液 A、B 以 1: 1 比例混合均匀, 50 μl /孔;

终止: 1mol 磷酸溶液, 50 μl /孔;

读值: 测 OD_{450nm} 值。

每项实验步骤之间均用 PBST 洗板 5 遍, 并拍干。H-J19 及未感染病毒的 MA104 细胞培养液作阴性对照。

2.2 G1 VP7 单克隆抗体制备

2.2.1 动物免疫

免疫抗原: 第一节成功表达并纯化后的 G1 VP7 可溶蛋白, 2mg/mL;

- 第 0 天, 初次免疫, 免疫剂量 60 μ g/只, 使用佐剂 CFA 皮下接种;
- 第 14 天, 第一次加强免疫, 免疫剂量 30 μ g/只, 使用佐剂 IFA 皮下接种;
- 第 28 天, 第二次加强免疫, 免疫剂量 30 μ g/只, 使用佐剂 IFA 皮下接种;
- 第 42 天, 第三次加强免疫, 免疫剂量 30 μ g/只, 使用佐剂 IFA 皮下接种;
- 第 50 天, 收集血清测效价;
- 第 56 天, 第四次加强免疫, 免疫剂量 30 μ g/只, 使用佐剂 IFA 皮下接种;
- 第 64 天, 冲击免疫, 免疫剂量 50 μ g/只, 不使用佐剂, 腹腔接种;

2.2.2 细胞融合

将小鼠脾脏与 Sp2/0 细胞用 PEG 法融合; 融合完的细胞在含有 HAT 的半固体培养基中进行筛选培养。具体实验步骤如下:

- (1) 将状态良好的 Sp2/0 细胞轻柔地从培养瓶上吹打下来, 放入 50ml 离心管;
- (2) 小鼠摘眼球取血, 然后拉颈处死, 放入 75% 的酒精中浸泡 5min;
- (3) 在平皿中倒入少量的无血清 IMDM, 将细胞筛及注射器内芯放入平皿中, 用剪刀和镊子取下小鼠的脾脏, 放到细胞筛上。用注射器的内芯轻轻地将脾脏充分碾碎, 将研磨好的细胞吸入装有 Sp2/0 的离心管中, 离心 1500rpm, 10min;
- (4) 用剪刀和镊子取下小鼠的胸腺, 碾碎。将碾好的细胞放入 15ml 离心管中, 再加入 2mlHAT、1mlHT, 放到培养箱中备用;
- (5) 将离心好的脾脏细胞, 倒掉上清。用无血清的 IMDM 将离心好的细胞小心轻柔地吹匀与 Sp2/0 细胞混合, Sp2/0: 脾脏细胞=1: 3~1: 10; 离心 1500rpm, 10min;
- (6) 将离心好的细胞上清尽量倒掉。拍打离心管底充分混合细胞, 将离心管放入 37 $^{\circ}$ C 温水中, 在 1 分钟内缓慢加入 1mlPEG, 加完后, 在温水中静置 1min。然后 2min 内缓慢加入 8ml 的无血清的 IMDM, 离心 1000rpm, 10min。
- (7) 倒掉上清, 加入 10ml 的血清, 小心地将细胞吹匀, 再倒入 5ml 的 Hybridoma Feeder 添加因子培养基, 之前准备好的胸腺细胞混合物 (2ml 胸腺+2mlHAT+1mlHT), 再加入 25ml 的半固体培养基, 充分混匀。然后均匀倒入 30 个细胞培养皿中。将细胞培养皿放入湿盒中, 放入培养箱中培养 11~14 天, 待到克隆长到肉眼可见的时候, 使用体视镜将克隆挑出。

2.2.3 单克隆细胞株筛选

使用 20%新生牛血清+HT+10%Hybridoma Feeder 添加因子培养基进行铺板，150ul/孔，挑克隆。对挑选的单克隆进行第一次 ELISA 筛选，阴性对照使用 Sp2/0 细胞上清，空白对照为 PBS-T-Casein，阳性对照使用小鼠阳性血清 1: 1000 稀释于 PBS-T-Casein，将得到的阳性杂交瘤细胞株，并扩大培养。而后进行第二次筛选，此次筛选方案：包被 2ug/ml 抗原，加 100ul 细胞上清，其余均与第一次筛选方案相同。

2.2.4 单克隆细胞株亚型鉴定

将筛选出来的 13 株阳性杂交瘤，使用单抗亚型鉴定试剂盒进行亚类鉴定。（以上单克隆细胞株制备由苏州博特龙免疫技术有限公司完成）

2.2.5 ELISA 结合实验

间接 ELISA 方法：包被纯化后的不同 G 型轮状病毒 VP7 蛋白以及培养的轮状病毒液，加入得到的 13 株阳性细胞株培养上清液作为待检样品，加入山羊抗鼠 IgG-HRP，检测 13 株杂交瘤细胞株与不同 G 型 VP7 蛋白及轮状病毒的结合情况。（间接 ELISA 法详细步骤可见 2.1.3）。

双夹心 ELISA 方法：包被 VP7 多抗，初步检测 13 株阳性杂交瘤细胞与不同 G 型轮状病毒 VP7 蛋白以及病毒液结合情况，进一步筛选制备单抗。

双夹心 ELISA 法具体步骤：

包被：VP7 多抗用 1×包被液稀释，以 1mg/mL 的比例 4℃过夜包被，100μl/孔；

封闭：5%脱脂奶粉，200μl/孔，37℃孵育 1h；

待检样品：将 13 株杂交瘤细胞上清液以 1: 10 的比例，用 1%脱脂奶粉稀释，100μl/孔，37℃孵育 1h；

检测抗体：山羊抗鼠 IgG-HRP，用 1%脱脂奶粉 1: 5000 稀释，37℃孵育 30min；

显色：酶底物溶液 A、B 以 1: 1 比例混合均匀，50μl/孔；

终止：2mol 磷酸溶液，50μl/孔；

读值：测 OD450nm 值并分析。

每项实验步骤之间均用 PBST 洗板 5 遍，并拍干。

2.3 G1 VP7 单克隆抗体鉴定

2.3.1 单克隆抗体腹水纯化

将单克隆抗体腹水按 1: 9 的比例, 用配制的 Binding buffer 稀释, 过柱前用 0.22 μ m 滤器将混合液过滤, 通过 HiTrap™ Protein G HP 柱对得到的单克隆抗体血清进行纯化, Binding buffer (pH=7.0) 洗涤杂蛋白, Glycine 溶液 (pH=2.7) 洗脱目的抗体。收集洗脱样品进行 SDS-PAGE 初步验证, 最后将目的抗体洗脱液用 10 KDa 超滤管浓缩, 分光光度计测定浓度, 分装液氮速冻, -80°C 保存备用。

2.3.2 单克隆抗体腹水效价测定

间接 ELISA 方法检测单克隆抗体腹水抗体效价, 包被不同 G 型的 VP7 蛋白 (1 μ g/mL), 将得到的腹水由 1:1000 的比例稀释后, 倍比稀释 16 个梯度, 最后用 HRP 标记的鼠二抗 (1: 5000) 检测。最终酶底物显色 15 分钟后, 2 mol/L 磷酸终止反应, 测定 OD450 值, 腹水的最大稀释倍数就是腹水的效价。

2.3.3 单克隆抗体半数效应浓度 (EC50) 测定

纯化后的不同 G 型 VP7 蛋白包被酶标板, 1 μ g/mL、100 μ l/孔; 将待检测的单克隆抗体稀释成 1mg/mL, 按 1:100 的比例稀释后, 倍比稀释 16 个梯度, 最后用 HRP 标记的鼠二抗 (1:5000) 检测。最终酶底物显色 15 分钟后, 2 mol/L 磷酸终止反应, 测定 OD450 值, 计算 EC50 值。

2.3.4 Western blot 鉴定 (WB)

将第一节 3.3 成功表达纯化的 6 种 G 型 VP7 蛋白, 均以 1 μ g/mL 的比例制样跑胶, 转膜后进行 WB 验证, 一抗分别为 G1 VP7 蛋白抗原制备筛选的单克隆抗体 (1: 1000), 二抗用 HRP-鼠二抗 (1: 5000)。具体操作见第一节 2.3.4 具体步骤。

2.3.5 间接免疫荧光试验 (IFA)

用 A 组轮状病毒 WHG1、DS-1、SA11、G8P[8]株以及 G9P[8]株分别感染 MA104 细胞, 未感染病毒的 MA104 细胞作阴性对照; 将 G1 VP7 蛋白抗原制备筛选的单克隆抗体用作一抗, 1% BSA 按 1: 500 比例稀释; 二抗用 FITC 标记的山羊抗鼠 IgG (1: 500)。其余部分与第二节 2.1.2 步骤同。

2.3.6 单克隆抗体中和活性检测

将 G1 VP7 单克隆抗体进行梯度倍比稀释, 然后与已用荧光斑点法确定病毒滴度的 RVA-WHG1 病毒 1:1 混合, 混合物于 37℃ 培养箱中孵育 1h, 稀释液均使用无血清的 DMEM。将共孵育后的混合物接种至 MA104 细胞的 96 孔板中, 设置病毒组 (只加入病毒, 不加入抗体组) 和空白对照组 (只加入 DMEM 培养基, 不加入病毒和抗体)。将 96 孔板置于 37℃ 孵箱继续培养 12~14 小时。将 96 孔板细胞用 PBS 洗两遍后, 用 4% 多聚甲醛固定。依次加入轮状病毒 VP7 兔多抗 (1: 500) 及山羊抗兔 IgG-HRP (1: 1000); 最后将 TrueBlue Peroxidase Substrate (20 μ l/孔) 常温避光孵育 5~10min 后拍干, 然后显微镜白光下观察, 病毒感染的斑点清晰可见。最后利用 ImmunoSpot 软件进行计数。通过斑点计数分析达到 50% 感染抑制率以上的最大稀释倍数来判定单克隆抗体的中和效价。

2.4 G4 和 G8 VP7 单克隆抗体制备、筛选和鉴定

该部分免疫抗原为第一节成功表达并纯化后的 G4 及 G8 VP7 可溶蛋白, 2mg/mL; 单克隆抗体制备、筛选以及鉴定的实验方法均与 G1 VP7 单克隆抗体实验方案相同。

2.5 单克隆抗体应用

2.5.1 单克隆抗体 HRP 标记

按照 HRP 标记试剂盒说明书所示, 将制备的 8 株单克隆抗体分别标记, 用作双抗体夹心 ELISA 方法初步尝试应用, 具体步骤如下所示:

- (1) 去除抗体中的甘油、氨基物质、EDTA 等, 本实验选择用超滤的方法将抗体缓冲液置换为 PBS;
- (2) HRP 标记试剂盒中各组分摇匀, 室温适应 10min 左右;
- (3) 准备待标记抗体 100 μ l (2mg/mL);
- (4) 加入预活化 HRP 10 μ l, 移液器反复吹打, 充分混匀;
- (5) 加入 HRP 标记启动液, 19.8 μ l, 用移液器轻轻混匀, 避免产生气泡;
- (6) 将混匀的反应液避光放置 4℃, 24h 左右;
- (7) 单支标记终止液 (冻干粉) 加入 1mL 去离子水现配成标记终止液, 取 10 μ l 加入 (6) 步骤的反应液中, 充分混匀;

- (8) 将(7)步骤的反应液 4℃放置 2h 后, 加入等体积的(即 139.8μl)标记物保存液混匀;
- (9) 分装冻存, -20℃可保存一年。

2.5.2 双抗体夹心 ELISA 方法初步检测

双抗体夹心 ELISA 方法具体步骤可见 2.2.5, 本次实验按照棋盘格法^[65-66], 分别进行广谱单抗包被, 特异单抗检测; 以及特异单抗互相配对检测的方案。将广谱单抗 1C3、10F6、VP7 多抗, 以及 G1/G4/G8 VP7 分别的特异单抗 6G1/6G2、2A11/14F12、18C1/18E8 以 1μg/mL 的比例分别包被酶标板中, 4℃过夜包被; 将不同 G 型 VP7 蛋白 (1μg/mL) 以及 WHG1 病毒液作为待检样品, 最后用 HRP 标记后的特异单抗 (1: 2000) 进行检测。

3. 结果

3.1 轮状病毒培养及鉴定

3.1.1 轮状病毒培养

未接种轮状病毒的 MA104 细胞和接种轮状病毒的 MA104 细胞形态如下图 2-3-1 所示。病毒在细胞内增值良好, 感染细胞 2~4 天后逐步出现细胞圆缩、拉网、脱落。

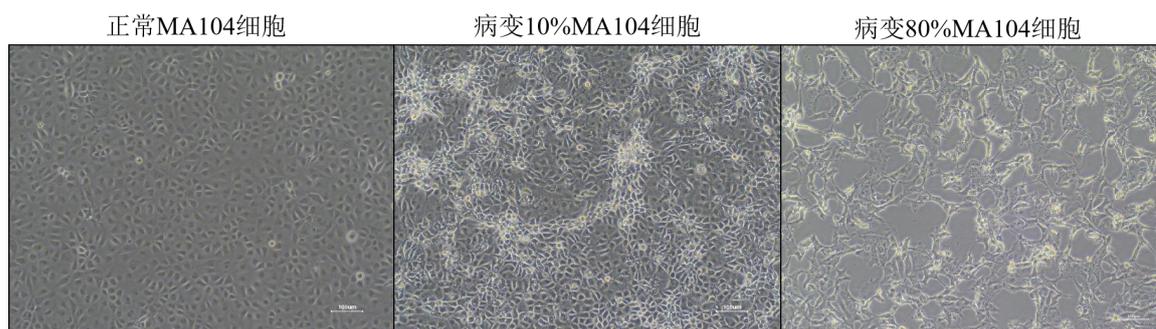


图 2-3-1 显微镜下 MA104 细胞形态结构

3.1.2 轮状病毒检测—免疫荧光试验 (IFA)

免疫荧光试验结果如下图 2-3-2 显示, A 组轮状病毒 WHG1 (基因型 G1P[3])、DS-1 (基因型 G2P[4])、SA11 (基因型 G3P[2])、G8P[8]株、G9P[8]株通过 VP7 多克隆抗体检测, 均产生清晰的荧光斑点 (绿色), 并与细胞核 (蓝色) 完全对应, 未感染病毒

的 MA104 细胞中未观察到荧光。

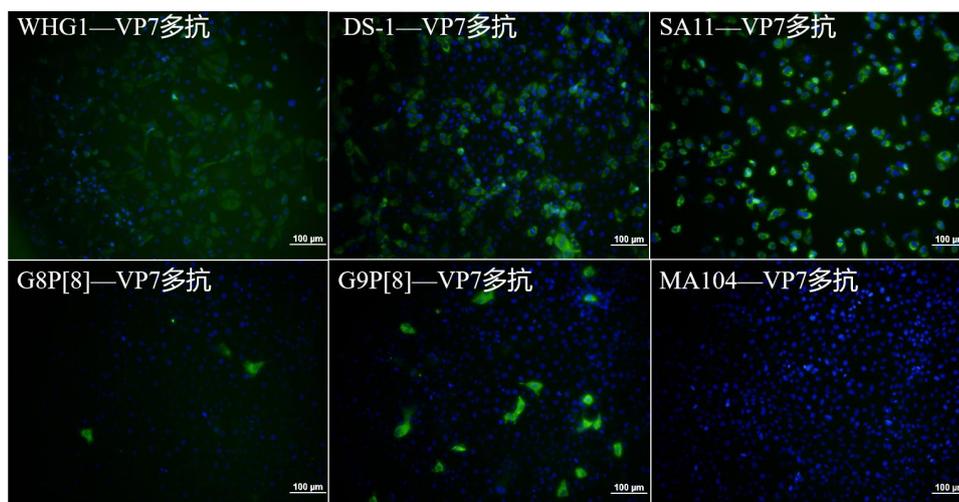


图 2-3-2 免疫荧光试验鉴定轮状病毒培养结果 (20×)

3.1.3 轮状病毒检测—酶联免疫吸附试验 (ELISA)

间接 ELISA 法进行轮状病毒鉴定, 如下图 2-3-3 所示, 培养的 A 组轮状病毒 WHG1、DS-1、SA11、G8P[8]株、G9P[8]株与 VP7 多克隆抗体结合的 OD_{450nm} 值均大于 0.2, 与 H 组轮状病毒 H-J19 及 MA104 细胞培养液阴性对照 OD_{450nm} 值小于 0.2。

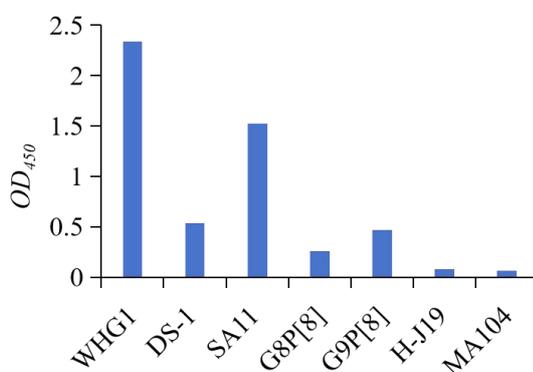


图 2-3-3 酶联免疫吸附试验鉴定轮状病毒培养结果

3.2 G1 VP7 单克隆抗体制备及鉴定

3.2.1 单克隆细胞株筛选

如下图 2-3-4, 对得到的 13 株单克隆细胞株进行 ELISA 结合检测, 结果表明 13 株杂交瘤细胞均可与 G1 VP7 蛋白特异性结合, OD_{450nm} 值都大于 0.5, 阴性对照与空白对照无结合反应。

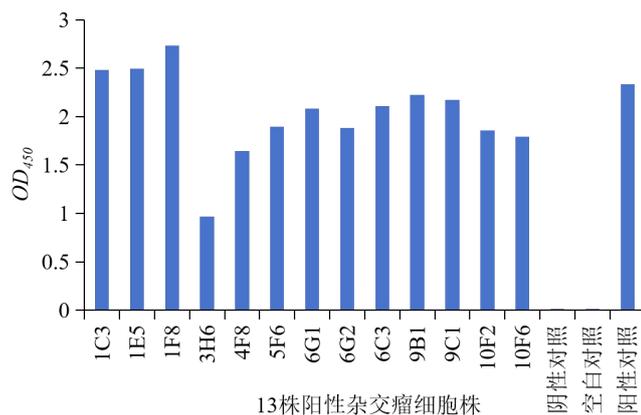


图 2-3-4 13 株阳性杂交瘤细胞株筛选结果

3.2.2 单克隆细胞株亚型鉴定

将 13 株阳性杂交瘤细胞进行亚类鉴定，如图 2-3-5，表明 13 株杂交瘤细胞产生的抗体均为 IgG1 型。

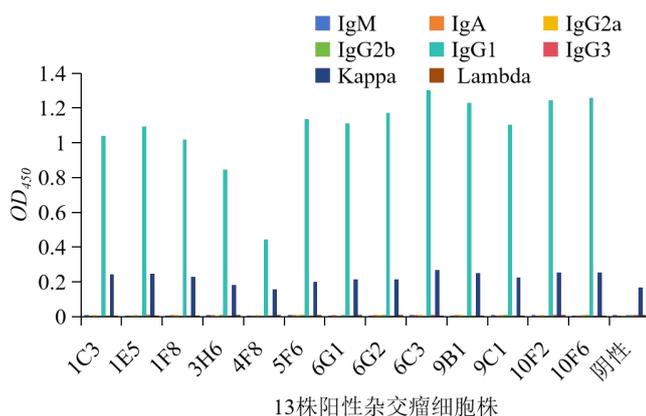
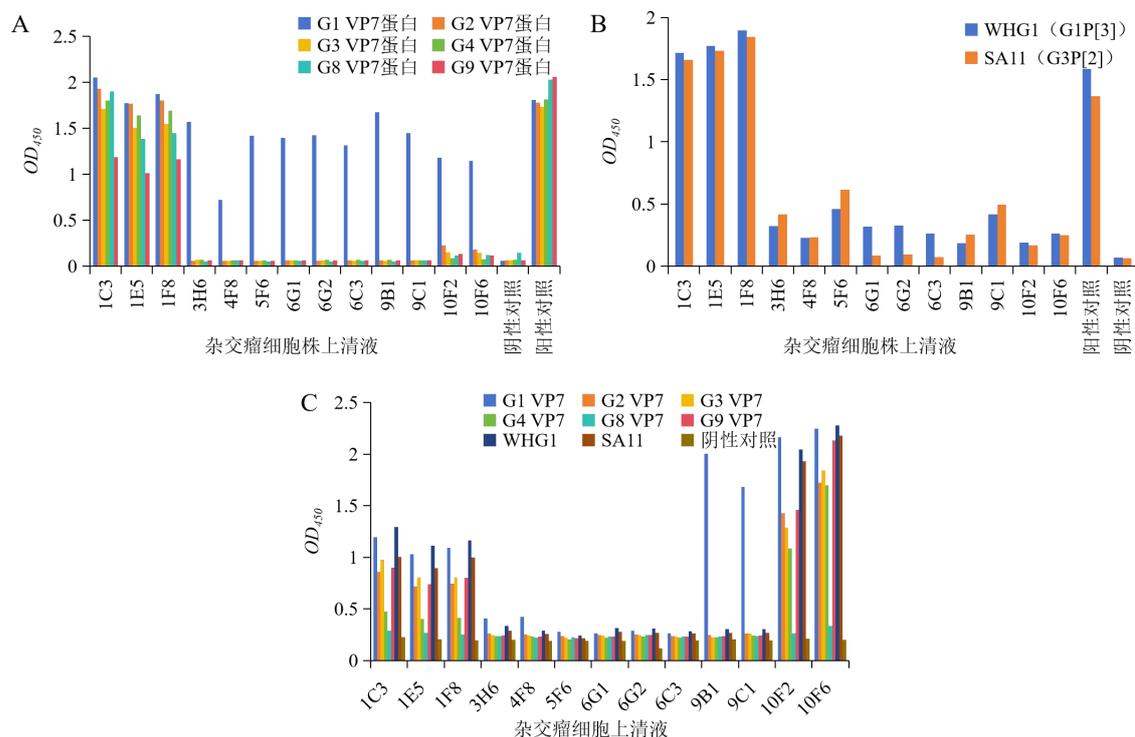


图 2-3-5 13 株阳性杂交瘤细胞株亚类鉴定结果

3.2.3 单克隆细胞株结合特征—ELISA 结合实验

间接 ELISA 法检测 13 株杂交瘤细胞株与不同 G 型 VP7 蛋白及轮状病毒液的结合情况，如下图 2-3-6（图 A）所示，3 株细胞株（1C3、1E5、1F8）广谱结合 6 种不同 G 型 VP7 蛋白，3H6 至 9C1 这 8 种细胞株显示均特异结合 G1 VP7 蛋白；图 B 结果显示 6G1、6G2 和 6C3 抗体明显特异结合 WHG1（基因型 G1P[3]），其余细胞组均与 SA11（基因型 G3P[2]）有交叉反应。双抗体夹心 ELISA 方法如图 C 所示，3 株细胞株（1C3、1E5、1F8）、2 株细胞株（10F2 和 10F6）与 6 种不同 G 型 VP7 蛋白、WHG1 和 SA11 均存在广谱结合，10F2 和 10F6 双夹心结合结果更明显。图 C 虽然 9B1 和 9C1 细胞株与 G1 VP7 蛋白有明显结合，但是综合间接 ELISA 结果，其与 SA11 有交叉反应。最终

选择 2 株结合广谱细胞株 1C3 及 10F6，2 株 G1 VP7 特异细胞株 6G1、6G2 制备单抗。



注：图 A 为间接 ELISA 法筛选杂交瘤细胞株与不同 G 型 VP7 蛋白结合；图 B 为间接 ELISA 法筛选杂交瘤细胞株与不同 G 型轮状病毒液结合；图 C 为双夹心 ELISA 法筛选杂交瘤细胞株与不同 G 型 VP7 蛋白及轮状病毒液结合；

图 2-3-6 单克隆细胞株特异性筛选结果

3.2.4 单克隆抗体腹水纯化 SDS-PAGE 鉴定

G1 VP7 蛋白抗原通过动物免疫制备抗体，筛选得到 1C3、10F6、6G1 及 6G2 细胞株制备腹水，对得到腹水进行亲和层析纯化，如下图 2-3-7 SDS-PAGE 显示，1C3、10F6、6G1 及 6G2 都有对应抗体重链的~50 kDa 和对应轻链的~25 kDa 条带。

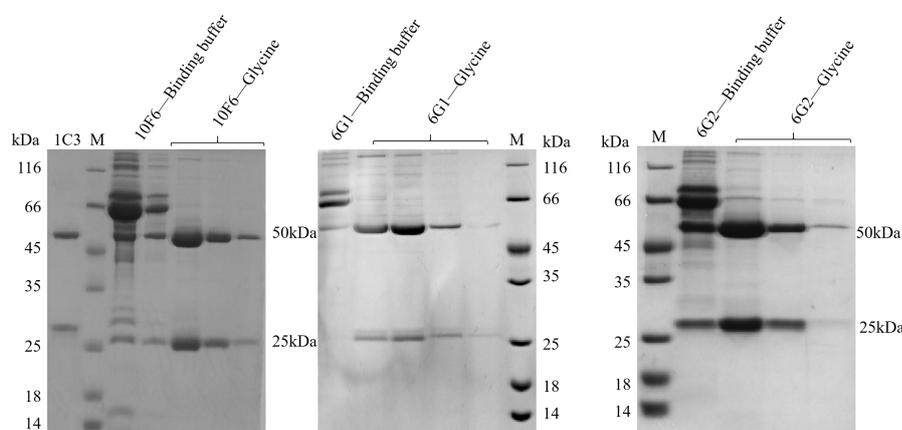


图 2-3-7 G1 VP7 单克隆抗体纯化 SDS-PAGE 鉴定结果

3.2.5 单克隆抗体腹水效价的测定

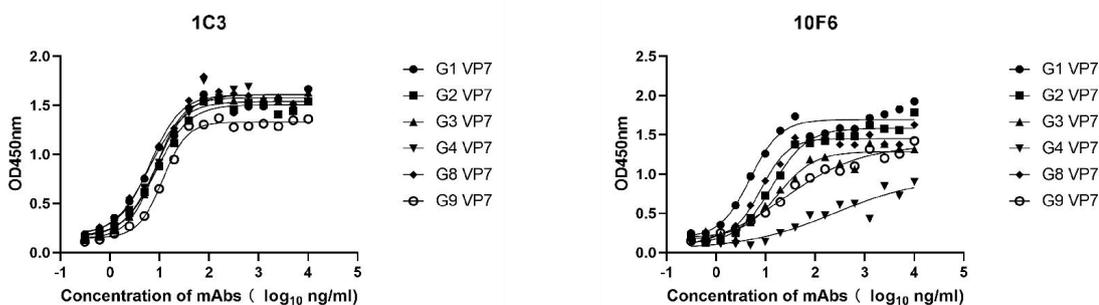
4 株纯化后单抗 1C3、10F6、6G1 及 6G2，与轮状病毒不同 G 型 VP7 蛋白的结合效价分别如下表 1 所示。1C3、10F6 腹水与 G1/G2/G3/G4/G8/G9 VP7 均结合明显，效价检测较高。6G1 及 6G2 腹水只与 G1 VP7 蛋白特异结合，效价检测分别为 $10^3 \times 2^{13}$ 、 $10^3 \times 2^{11}$ 。

表 1 4 株单克隆抗体的效价检测

VP7 蛋白	细胞株	1C3	10F6	6G1	6G2
G1 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^{16}$	$10^3 \times 2^{16}$	$10^3 \times 2^{13}$	$10^3 \times 2^{11}$
G2 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^{14}$	$10^3 \times 2^{14}$	-	-
G3 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^{14}$	$10^3 \times 2^{12}$	-	-
G4 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^{14}$	$10^3 \times 2^{11}$	-	-
G8 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^{15}$	$10^3 \times 2^{16}$	-	-
G9 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^{13}$	$10^3 \times 2^{14}$	-	-

3.2.6 单克隆抗体的半数效应浓度 (EC₅₀) 测定

包被不同 G 型 VP7 蛋白，分别检测 4 种单克隆抗体与不同 VP7 蛋白结合的情况。结果如下图 2-3-8 及表 2 显示，1C3 与 10F6 单克隆抗体可以结合不同 G 型的 VP7 蛋白，为 VP7 广谱结合单抗；6G1 与 6G2 抗体特异性结合 G1 VP7，为 G1 VP7 特异单抗。1C3 及 10F6 单克隆抗体均与 G1/G2/G3/G4/G8/G9 VP7 蛋白广谱反应，EC₅₀ 值最低至 6.03ng/mL。6G1 及 6G2 单克隆抗体只与 G1 VP7 蛋白结合明显，EC₅₀ 值分别为 9.828ng/mL、29.23ng/mL。



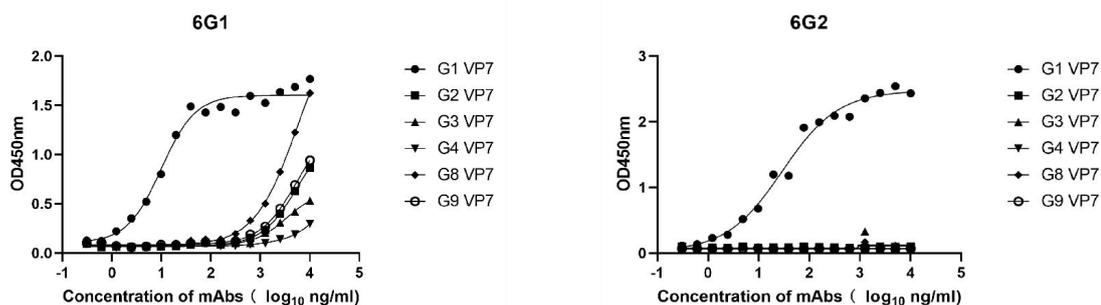


图 2-3-8 G1 VP7 单克隆抗体半数效应浓度 (EC50) 测定结果

表 2 G1 VP7 单克隆抗体半数效应浓度 (EC50) 测定结果

EC50 (ng/mL)	型别	G1 VP7	G2 VP7	G3 VP7	G4 VP7	G8 VP7	G9 VP7
1C3		6.03	8.397	8.24	8.684	6.343	11.41
10F6		4.814	13.55	17.52	237.5	8.044	22.16
6G1		9.828	5594	3428	-	5598	5556
6G2		29.23	-	-	-	-	-

3.2.7 Western blot 鉴定

将表达的不同 G 型 VP7 蛋白按 1 μ g/mL 的同比例制样, SDS-PAGE 结果如下图 2-3-9 所示, 每种 VP7 都有清晰的条带。1 μ g 相同样品进行 Western blot 鉴定 4 株单抗分别与六种 G 型 VP7 蛋白结合, 1C3 单抗可以结合不同 G 型 VP7 蛋白; 10F6 单抗只与 G8 VP7 蛋白结合明显; 6G1 及 6G2 单抗特异结合 G1 VP7 蛋白; 结合条带均与 SDS-PAGE 目的条带位置对应。如下图 2-3-10。

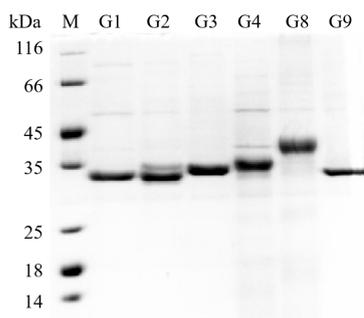


图 2-3-9 六种 G 型 VP7 蛋白 SDS-PAGE 结果 (1 μ g)

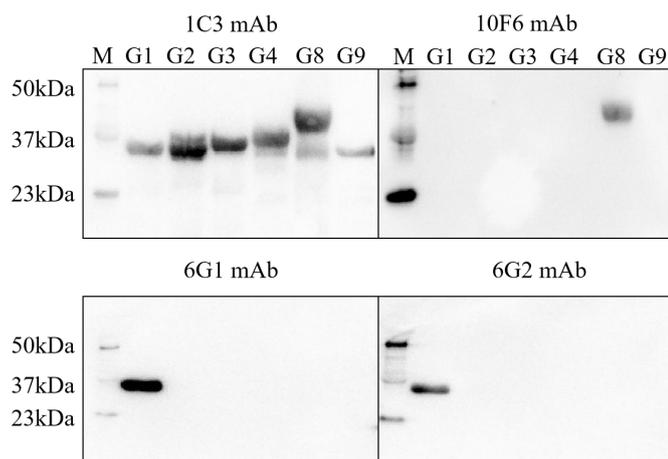
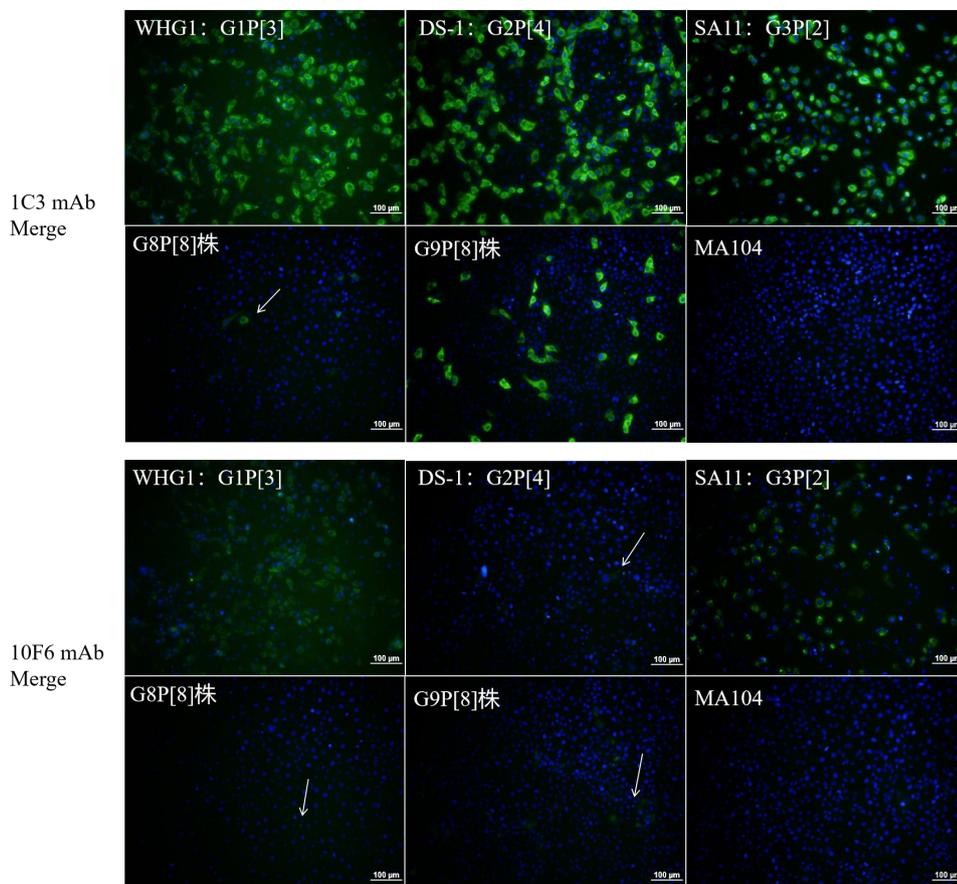


图 2-3-10 G1 VP7 单克隆抗体与六种 G 型 VP7 蛋白结合 Western blot 测定结果

3.2.8 间接免疫荧光试验鉴定

免疫荧光试验结果如下图 2-3-11 显示，单克隆抗体 1C3 明显结合 A 组轮状病毒 WHG1、DS-1（基因型 G2P[4]）、SA11（基因型 G3P[2]）、G8P[8]株、G9P[8]株，10F6 也可以结合不同型别的轮状病毒，可见微弱的绿色荧光围绕蓝色细胞核存在，绿色荧光斑点没有 1C3 清晰。单克隆抗体 6G1 可以结合不同 A 组轮状病毒；6G2 单抗只识别 G1 型轮状病毒 WHG1 毒株。



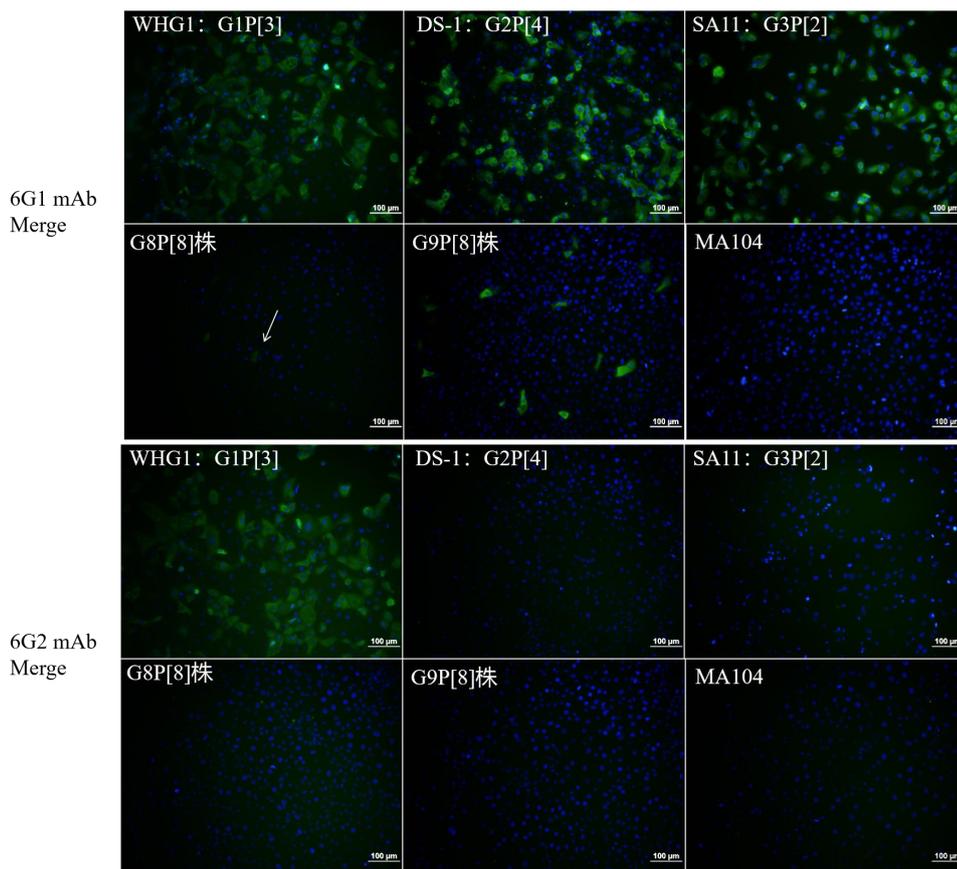


图 2-3-11 单克隆抗体与轮状病毒的 IFA 鉴定结果 (20×)

3.2.9 单克隆抗体的中和活性检测

为检测制备的 G1 VP7 单克隆抗体是否具有中和活性，将 1C3、10F6、6G1、6G2 腹水血清从 1:40 倍比稀释后，与 RVA-WHG1 病毒液混合共孵育 1h 后，接种 MA104 细胞的 96 孔板上培养，以 RVA-WHG1 为病毒对照，以未感染病毒的 MA104 细胞为空白对照，通过 ImmunoSpot 软件计数后如图 2-3-12 显示，1C3、10F6、6G1、6G2 抗体组与病毒对照组的病毒感染斑点数（图中绿色数字）没有显著减少，表明这 4 株单抗可能没有较高的中和活性。

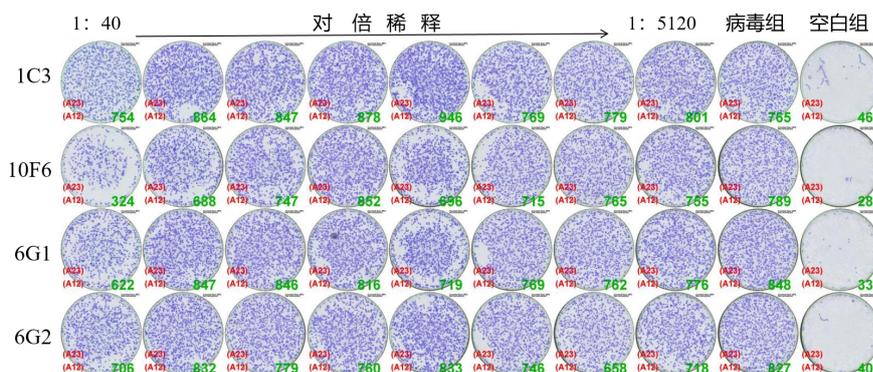


图 2-3-12 G1 VP7 单克隆抗体胞外中和检测

3.3 G4 和 G8 VP7 单克隆抗体制备及鉴定

3.3.1 单克隆细胞株筛选

如下图 2-3-13，对筛选得到的 15 株单克隆细胞株上清进行两次 ELISA 结合实验筛选，结果表明 15 株杂交瘤细胞株均可产生 G4 或 G8 VP7 抗原特异性 McAb，阴性对照与空白对照无结合反应。



图 2-3-13 15 株阳性杂交瘤细胞株筛选结果

3.3.2 单克隆细胞株亚型鉴定

将 15 株阳性杂交瘤进行亚类鉴定，如图 2-3-14，表明有 6 株杂交瘤细胞产生的抗体均为 IgG2a 型，有 2 株杂交瘤细胞产生的抗体均为 IgG2b 型，有 7 株杂交瘤细胞产生的抗体均为 IgG1 型。

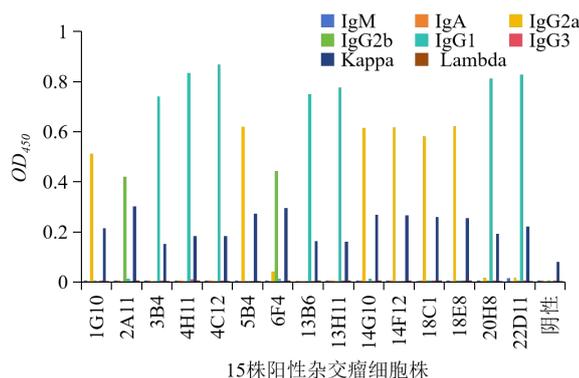
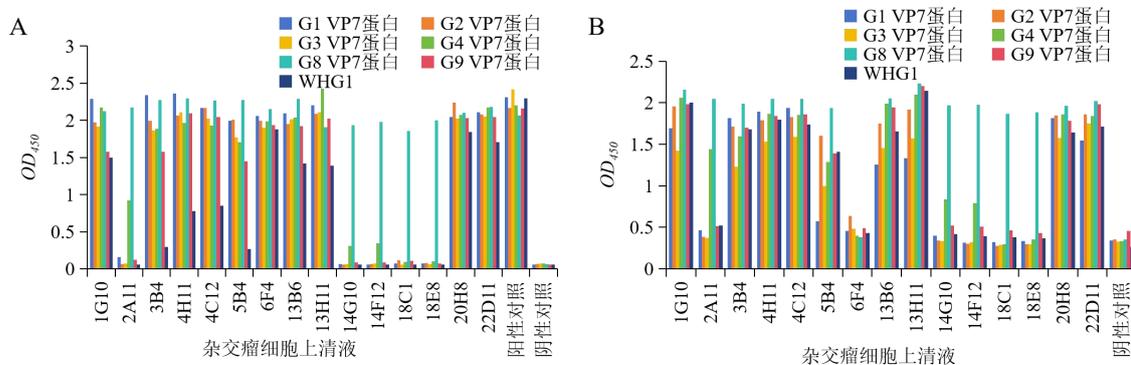


图 2-3-14 15 株阳性杂交瘤细胞株亚类鉴定结果

3.3.3 单克隆细胞株结合特征—ELISA 结合实验

间接 ELISA 法检测 15 株杂交瘤细胞株与不同 G 型 VP7 蛋白及轮状病毒培养液的结合情况，如下图 2-3-15（图 A）所示，2A11、14G10 和 14F12 特异结合 G4 和 G8 基因型 VP7 蛋白；18C1 及 18E8 特异结合 G8 基因型 VP7 蛋白；且均与 WHG1 未出现结

合。双夹心 ELISA 方法结果如下图 2-3-15 (图 B) 所示, 均与间接 ELISA 检测结果相同。最终选择 2 株 G4 和 G8 VP7 特异结合的细胞株 2A11 及 14F12, 2 株 G8 VP7 特异结合的细胞株 18C1、18E8 制备单抗。



注: 图 A 为间接 ELISA 法筛选杂交瘤细胞株与不同 G 型 VP7 蛋白及 WHG1 轮状病毒液结合; 图 B 为双夹心 ELISA 法筛选杂交瘤细胞株与不同 G 型 VP7 蛋白及 WHG1 轮状病毒液结合;

图 2-3-15 单克隆细胞株特异性筛选结果

3.3.4 单克隆抗体腹水纯化 SDS-PAGE 鉴定

G4 和 G8 VP7 蛋白抗原通过动物免疫制备抗体, 选择 4 株单克隆抗体株制备腹水, 对得到的腹水通过亲和力层析纯化, 如下图 2-3-16 所示, SDS-PAGE 显示筛选的 4 株单克隆抗体, 18C1、18E8、2A11 及 14F12 都存在对应抗体重链的~50 kDa 和对应轻链的~25 kDa 条带。

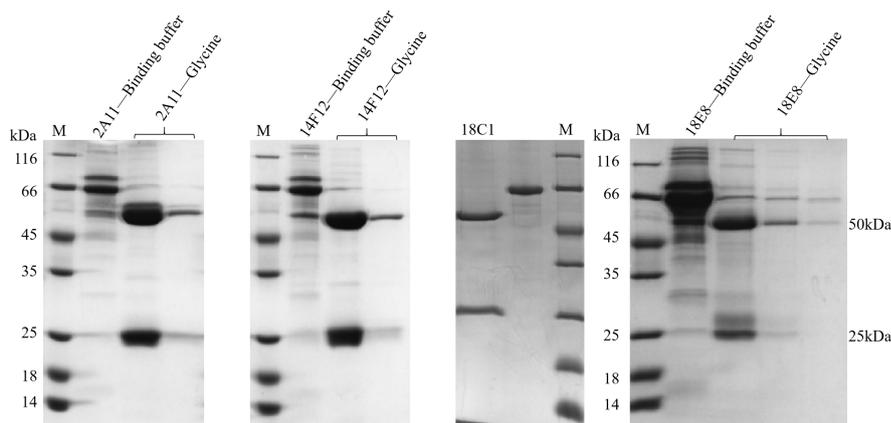


图 2-3-16 G4 和 G8 VP7 单克隆抗体纯化 SDS-PAGE 鉴定结果

3.3.5 单克隆抗体腹水效价的测定

4 株单抗腹水 2A11、14F12、18C1 以及 18E8, 与轮状病毒不同 G 型 VP7 蛋白的结合效价分别如下表 3 所示。2A11、14F12 腹水均与 G4/G8 VP7 结合良好, 效价检测分别

为 $10^3 \times 2^{10}$ 、 $10^3 \times 2^{13}$ 、 $10^3 \times 2^{11}$ 、 $10^3 \times 2^{14}$ 。18C1 及 18E8 腹水只与 G8 VP7 蛋白特异结合，效价检测分别为 $10^3 \times 2^5$ 、 $10^3 \times 2^{10}$ 。

表 3 4 株腹水型单克隆抗体效价检测结果

VP7 蛋白	细胞株	2A11	14F12	18C1	18E8
G1 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^8$	$10^3 \times 2^5$	-	-
G2 VP7 蛋白		-	-	-	-
G3 VP7 蛋白		-	-	-	-
G4 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^{10}$	$10^3 \times 2^{11}$	-	-
G8 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^{13}$	$10^3 \times 2^{14}$	$10^3 \times 2^5$	$10^3 \times 2^{10}$
G9 VP7 蛋白		$10^3 \times 2^6$	$10^3 \times 2^4$	-	-

3.3.6 单克隆抗体的半数效应浓度 (EC₅₀) 测定

间接 ELISA 方法包被不同 G 型 VP7 蛋白分别检测 4 种单克隆抗体与 VP7 蛋白结合的情况。结果如下图 2-3-17 及表 4 显示。2A11、14F12 单克隆抗体均与 G4/G8 VP7 结合良好，EC₅₀ 值分别为 174.5ng/mL、35.83ng/mL、68.28ng/mL、7.412ng/mL。18C1 及 18E8 单克隆抗体只与 G8 VP7 蛋白特异结合，EC₅₀ 值分别为 1575ng/mL、174.8ng/mL。

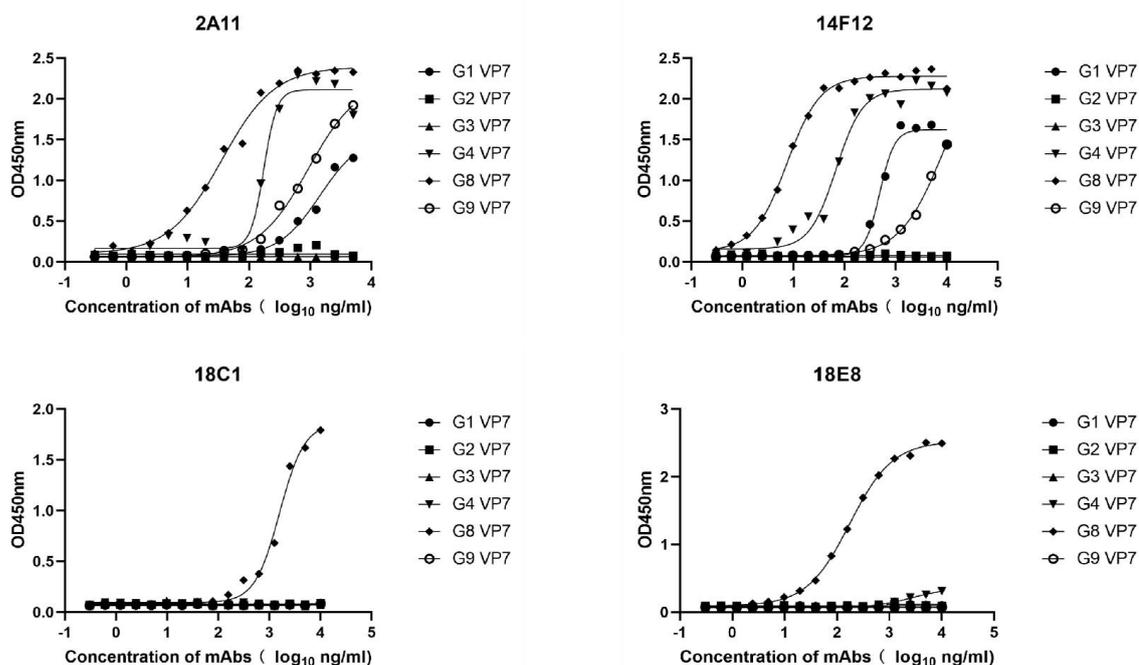
图 2-3-17 单克隆抗体半数效应浓度 (EC₅₀) 测定结果

表 4 G4 和 G8 VP7 单克隆抗体半数效应浓度 (EC₅₀) 测定结果

EC ₅₀ (ng/mL)	型别	G1 VP7	G2 VP7	G3 VP7	G4 VP7	G8 VP7	G9 VP7
2A11		1435	-	-	174.5	35.83	935.7
14F12		487.2	-	-	68.28	7.412	8474
18C1		-	-	-	-	1575	-
18E8		-	-	-	-	174.8	-

3.3.7 Western blot 鉴定

将表达的不同 G 型 VP7 蛋白按 1 μ g/mL 的同比例制样, SDS-PAGE 结果如图 2-3-9 所示。1 μ g 相同样品分别用得到的 4 株单克隆抗体进行 Western blot 鉴定抗体与六种 G 型 VP7 蛋白结合情况。如下图 2-3-18 所示, 4 株单抗都与 G8 VP7 有明显的结合, 2A11、14F22 单抗与 G4 VP7 蛋白有弱的结合条带; 18C1 单抗与 G1 VP7 蛋白有弱的结合条带; 18E8 单抗可以结合不同 G 型 VP7 蛋白, 与 G1、G2、G3 VP7 蛋白都有条带, 条带大小与 SDS-PAGE 目的条带位置对应。

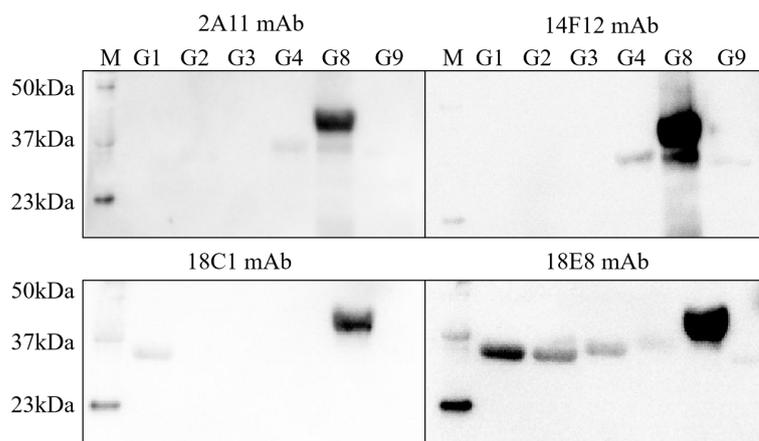


图 2-3-18 G4 和 G8 VP7 单克隆抗体与六种 G 型 VP7 蛋白结合 Western blot 测定结果

3.3.8 间接免疫荧光试验鉴定

免疫荧光试验结果如下图 2-3-19 显示, 单克隆抗体 2A11 结合 A 组轮状病毒 WHG1 (基因型 G1P[3])、SA11 (基因型 G3P[2])、G8P[8]株、G9P[8]株; 14F12 单抗与 G1、G3、G8 基因型轮状病毒结合明显; 18C1 单抗与 G3、G8 基因型结合明显; 18E8 单抗与 G1、G3、G8 基因型轮状病毒结合明显; 未感染病毒的 MA104 细胞未出现绿色荧光。

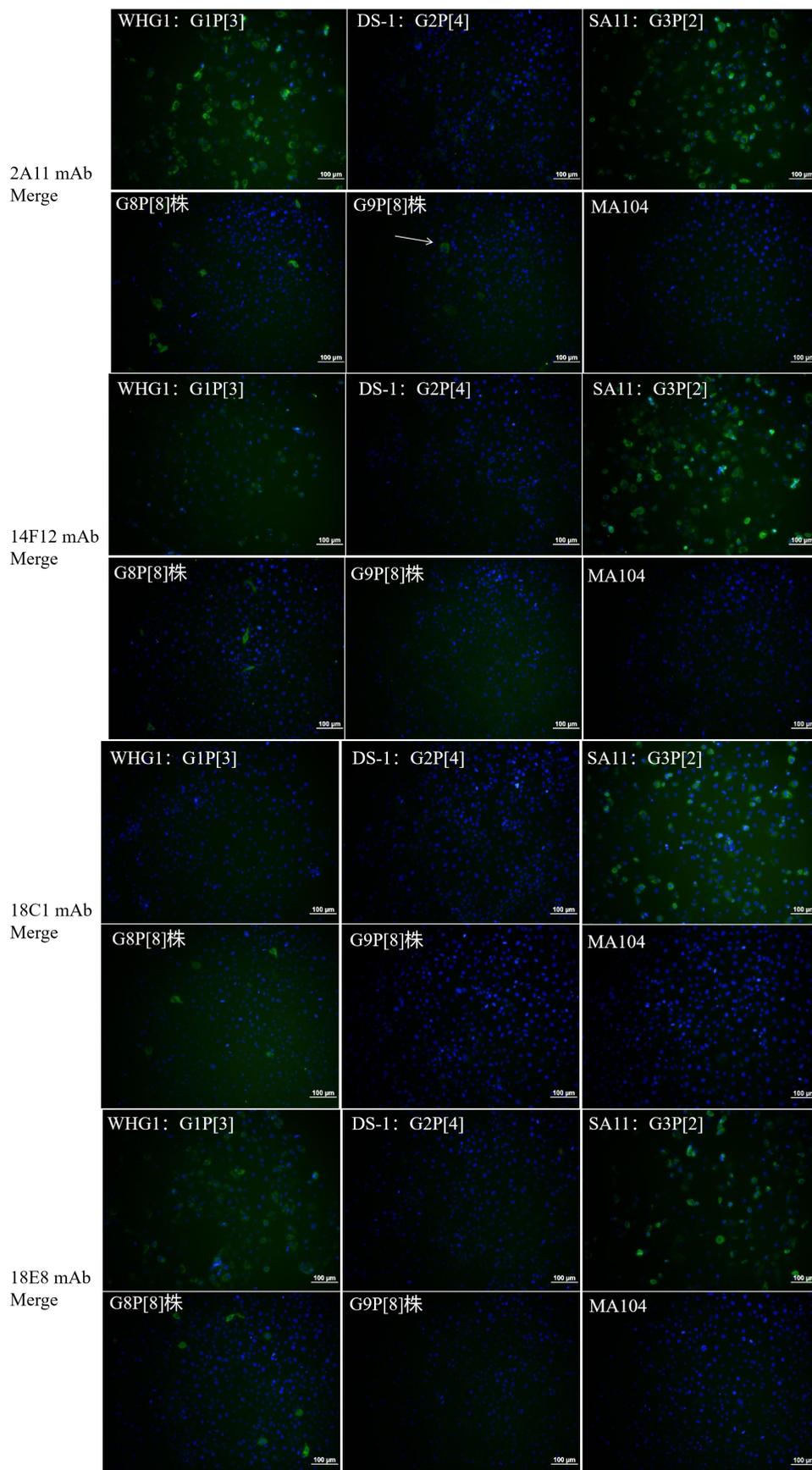


图 2-3-19 单克隆抗体与不同基因型轮状病毒的 IFA 鉴定结果 (20×)

3.3.9 单克隆抗体中和活性检测

为检测 VP7 单克隆抗体是否具有中和活性，将 2A11、14F12、18C1、18E8 单抗腹水从 1:40 倍比稀释后，同 3.2.9 步骤操作，通过 ImmunoSpot 软件计数后如图 2-3-20 显示，2A11、14F12、18C1 较病毒对照组的病毒感染斑点数（绿色数字）并未显著减少，表明这 3 株单抗没有较高的中和活性；18E8 单抗随着抗体比例增加，其病毒感染点数逐渐减少，在 1:40 稀释时可以达到~50%抑制率，表明 18E8 单抗具有较好的中和活性。

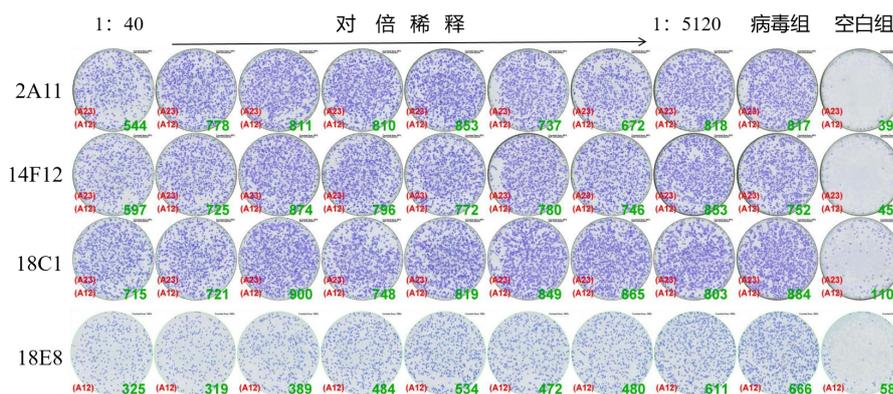


图 2-3-20 G4&G8 VP7 单克隆抗体胞外中和检测

3.4 轮状病毒检测方法尝试——双抗体夹心 ELISA 法

借助双抗体夹心 ELISA 法初步进行不同型别 VP7 蛋白和轮状病毒的检测。

G1 型轮状病毒检测。如下图 2-3-21 所示，分别包被广谱抗体 1C3/10F6，使用 G1 特异抗体（HRP-6G1/HRP-6G2）检测，结果显示，1C3: HRP-6G1、1C3: HRP-6G2、VP7 多抗: HRP-6G1，这三种配对方式均可特异检测到 WHG1 轮状病毒。使用特异性单抗 6G1 和 6G2 互相配对的方式检测 WHG1 病毒 OD450nm 值均小于 0.2，反应值较低。1C3: HRP-6G1 组合检测 WHG1 病毒 OD450nm 值较高，下一步可以用该组合继续进行 G1 特异轮状病毒检测方法建立的研究。

G8 型 VP7 检测。如下图 2-3-22 所示，分别包被广谱抗体 1C3/10F6，使用 G8 特异抗体（HRP-18C1/HRP-18E8）检测，1C3: HRP-18C1、1C3: HRP-18E8、10F6: HRP-18E8、VP7 多抗: HRP-18E8 四种配对方式均可特异结合 G8 VP7 蛋白；使用特异性单抗 18C1 和 18E8 互相配对的方式检测 G8 VP7 蛋白 OD450nm 值均小于 0.2，反应值较低。1C3: HRP-18E8 组合检测 G8 VP7 蛋白 OD450nm 值较高，下一步可以用该组合继续进行 G8 特异轮状病毒检测方法建立的研究。

本研究尚没有得到 G4 VP7 蛋白特异的抗体，但得到两株可以识别 G4 和 G8 VP7 蛋白的抗体 2A11 和 14F12。如下图 2-3-23 所示，1C3: HRP-2A11、VP7 多抗: HRP-2A11

这两种配对方案可特异识别到 G4 VP7 和 G8 VP7 蛋白，1C3: HRP-2A11 可以进行 G4 和 G8 轮状病毒检测方法建立的研究。

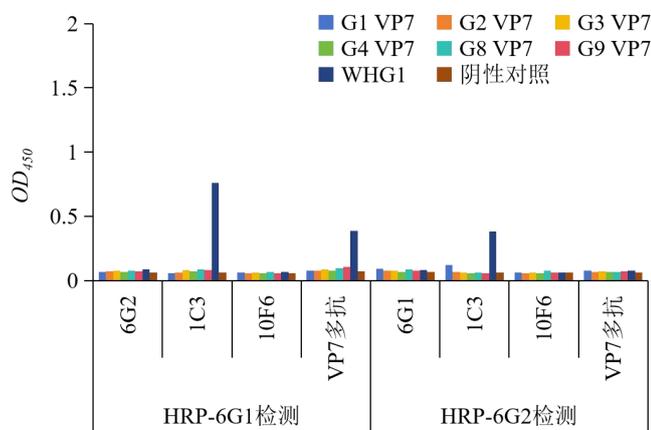


图 2-3-21 双抗体夹心 ELISA 法检测——G1 基因型

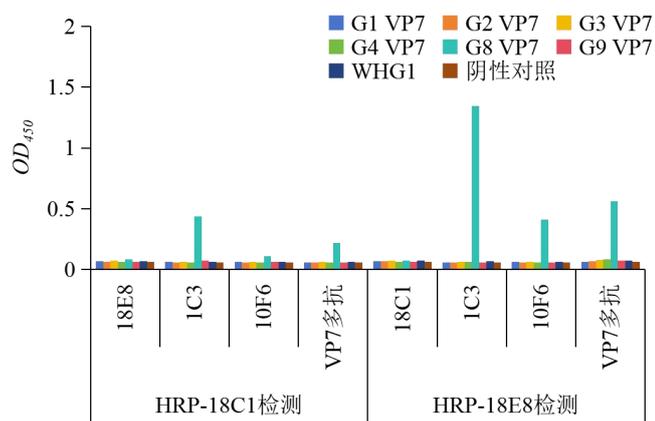


图 2-3-22 双抗体夹心 ELISA 法检测——G8 基因型

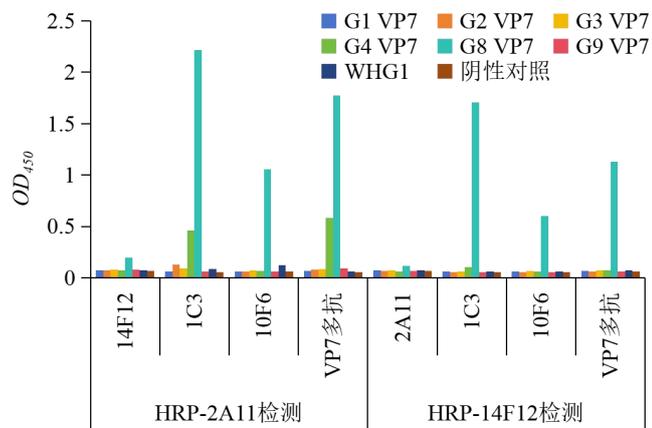


图 2-3-23 双抗体夹心 ELISA 法检测——G4 和 G8 基因型

4. 分析与讨论

单克隆抗体 (monoclonal antibody, McAb) 是由单个 B 淋巴细胞产生高度均一、只针对某一特异性抗原决定簇的抗体^[42], 较多克隆抗体来说, 单克隆抗体特异性更强, 效价更高; 同时具有纯度高、亲和力强等特点, 对生物学和免疫学等领域具有非常深远的意义。McAb 已广泛应用于酶联免疫吸附试验、免疫组化、流式细胞术等医学诊断技术^[60-61]。杂交瘤技术是 1975 年由德国的 Georges Kohler 和阿根廷的 Cesar Milstein 建立的^[62]。杂交瘤细胞既具有 B 细胞的抗体生产及分泌功能, 又具有肿瘤细胞的无限增殖功能^[63]。本实验通过杂交瘤技术, 用第一章成功表达纯化后的可溶 VP7 蛋白免疫 BALB/c 雌性小鼠, 获得分泌特异性 McAb 的 B 细胞, 经过体外融合后筛选克隆, 得到能够产生特异性 McAb 的杂交瘤细胞, 将杂交瘤细胞注射进小鼠体内, 收集腹水, 进行纯化, 获得抗体, 而后通过酶联免疫吸附、Western blot 及免疫荧光试验等进行抗体鉴定及初步应用, 从而为不同 G 型轮状病毒检测奠定基础。杂交瘤技术生产的 McAb 特异性较高, 且易于大量生产, 已成为基础生物学研究和临床医学必不可少的方法。

在单克隆抗体制备中, 保证抗体的特异性是一项重要原则。因单克隆抗体较强的特异性和高灵敏度, 对抗原进行定性甚至准确地定量分析, 也能够快速简单地检测同一种病毒的不同分型^[64]。本研究基于这点, 通过制备轮状病毒不同 G 型的蛋白抗原, 试图得到可以特异地检测轮状病毒不同分型的单克隆抗体, 从而为轮状病毒培养的检测, 以及为特异的轮状病毒不同 G 型 ELISA 检测方法的建立奠定基础。本实验用纯化后的 G1 VP7 蛋白及 G4、G8 VP7 蛋白分别作为抗原免疫小鼠, 得到多株阳性杂交瘤细胞株, 通过间接 ELISA 法直接包被纯化后的不同 G 型 VP7 蛋白及轮状病毒液, 检测阳性杂交瘤细胞株的特异结合情况, 接下来尝试通过双抗体夹心 ELISA 法进一步检测筛选, 试图得到针对各个基因型特异的单抗, 从而为后续针对不同基因型轮状病毒的检测奠定基础。实验证明, 间接 ELISA 法直接包被高纯度蛋白的方法高效、简单。可以承担初步筛选特异性抗体的任务。筛选得到共 8 株单克隆抗体, 广谱单抗两株, 分别为 1C3、10F6; G1 特异单抗两株, 分别为 6G1、6G2; G4 和 G8 特异单抗两株, 分别为 2A11、14F12; G8 特异单抗两株, 分别为 18C1、18E8。

本实验经初步筛选后将杂交瘤细胞注入小鼠, 收集腹水, 制备抗体, 通过酶联免疫吸附试验、Western blot 以及间接免疫荧光试验鉴定, 结果显示酶联免疫吸附结果表明: 通过间接 ELISA 法计算单抗与不同 G 型 VP7 蛋白的结合, 根据其 EC50 值推断 1C3 和 10F6 两株单克隆抗体针对不同 G 型轮状病毒 VP7 较为广谱; 两株 G1 基因型特异性单

抗 6G1、6G2；G4 和 G8 基因型 VP7 明显结合的 2A11、14F12 两株单抗；特异结合 G8 基因型 VP7 的 18C1、18E8 两株单抗。通过 Western blot 鉴定时，固定不同 G 型 VP7 蛋白上样量为 1 μ g，且除一抗每种单克隆抗体不同外，其余所有实验操作条件均相同的情况下进行 WB 实验，结果显示：广谱单抗 1C3 在线性表位上依旧广谱地结合不同 G 型 VP7 蛋白；10F6 单抗线性表位结合特性较差，可能与 G8 VP7 结合更为明显；6G1 与 6G2 单抗在线性表位依旧特异结合 G1 VP7 蛋白；2A11 及 14F12 单抗与 G4 及 G8 基因型结合明显；18C1 与 G8 VP7 明确结合，同时也可识别到 G1 基因型；18E8 线性表位结合较为广谱。考虑到每种抗体的实验批次不同，腹水抗体本身效价不同，可能存在实验差异。最后通过间接免疫荧光试验检测验证，几种单克隆抗体均具备较好的反应活性。同时进行了双抗体夹心 ELISA 检测方法的初步应用，得到可以特异检测的多个抗体配对方案。

综上所述，本实验表达纯化得到六种 G 型轮状病毒 VP7 蛋白抗原，成功制备了 G1、G4、G8 型别特异的单克隆抗体，以及具有广谱结合特征的单克隆抗体，并通过 ELISA、WB、IFA 等方法对抗体结合特征及特异性进行了初步的验证。为后续其他型别轮状病毒单抗制备提供了参考，为下一步轮状病毒不同 G 型特异检测奠定了基础。

5. 小结

(1) 获得了 2 株可以广谱结合不同 G 型轮状病毒 VP7 的单克隆抗体；2 株 G1 VP7 特异的单抗；2 株 G4 和 G8 VP7 特异的单抗；2 株 G8 VP7 特异单抗；经抗体亚型鉴定，8 株单抗均为 IgG 型；

(2) 通过酶联免疫吸附试验、Western blot、间接免疫荧光试验以及胞外中和检测进行单抗鉴定，证明 8 株单抗均具有良好的结合特征，18E8 单抗具有中和效果。

(3) 通过棋盘格法进行抗体配对，进行双抗体夹心 ELISA 方法的初步应用，初步得到不同 G 型特异检测的多个抗体配对方案。

结 语

结论：本研究借助杆状病毒表达载体，利用真核表达系统制备轮状病毒不同 G 型 VP7 蛋白。尝试 VP7 全长序列（1-326 位氨基酸）表达，G8 VP7 蛋白效果最好，表达量高且纯度较好，分子量大小约 37kDa 左右。G2 VP7 蛋白全长表达及截短体蛋白（78-311 位氨基酸）表达，均易形成多聚体，表达效率方面截短体优于全长蛋白表达。G3 VP7 及 G9 VP7 蛋白全长序列表达效率较差，最后采用截短体蛋白（78-311 位氨基酸）表达方案，获得 G3 及 G9 VP7 截短体蛋白制备单抗。本研究获得的蛋白均可分泌到细胞上清中，以可溶形式存在，且根据凝胶层析出峰位置及超速离心初步判断获得的 VP7 蛋白具有文献报导的三聚体结构。利用杂交瘤细胞技术制备 VP7 单克隆抗体，共筛选获得 8 种具有广谱或特异性结合特征的 VP7 单克隆抗体，其中 18E8 抗体具有较好的中和活性；初步建立特异检测 G1、G8 RV VP7 的双抗体夹心 ELISA 方法，为进一步开展不同 G 型轮状病毒特异检测方法的建立提供了基础，对不同 G 型多价轮状疫苗的开发和鉴定具有重要意义。

不足与展望：VP7 蛋白的结构及功能特点等尚未明确，有待继续深入研究；轮状病毒 G2、G3、G9 VP7 特异抗体尚在制备中；不同 G 型轮状病毒 ELISA 检测方法的建立及优化工作有待进一步完成。

参考文献

- [1] Bishop R F, Davidson G P, Holmes I H, et al. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis[J]. *The Lancet*, 1973, 302(7841): 1281-1283.
- [2] Knipe D, Howley P, Griffin D, et al. *Fields Virology, Volumes 1 and 2*[M]. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013.1347-1401
- [3] CRAWFORD S E, RAMANI S, TATE J E, et al. Rotavirus infection[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2017, 3(1): 1-16.DOI:10.1038/nrdp.2017.83
- [4] Ball L A. The universal taxonomy of viruses in theory and practice[M]//*Virus Taxonomy*. Academic Press, 2005: 3-8.
- [5] McClain B, Settembre E, Temple B R S, et al. X-ray crystal structure of the rotavirus inner capsid particle at 3.8 Å resolution[J]. *Journal of molecular biology*, 2010, 397(2): 587-599.
- [6] Rodríguez J M, Luque D. Structural insights into rotavirus entry[J]. *Physical Virology: Virus Structure and Mechanics*, 2019: 45-68. DOI: 10.1007/978-3-030-14741-9_3.
- [7] Larralde G, Li B G, Kapikian A Z, et al. Serotype-specific epitope (s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein[J]. *Journal of virology*, 1991, 65(6): 3213-3218. DOI:10.1128/jvi.65.6.3213-3218.1991
- [8] Zuckerman A J. *Principles and practice of clinical virology*[M]. John Wiley & Sons, 2009.
- [9] Desselberger U. Rotaviruses [J]. *Virus research*, 2014, 190: 75-96. DoI:/10.1016/j.virusres.2014.06.016
- [10] Dormitzer P R, Greenberg H B, Harrison S C. Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers[J]. *Virology*, 2000, 277(2): 420-428. DOI:10.1006/viro.2000.0625
- [11] Rao C D, Gowda K, Reddy B S Y. Sequence analysis of VP4 and VP7 genes of nontypeable strains identifies a new pair of outer capsid proteins representing novel P and G genotypes in bovine rotaviruses[J]. *Virology*, 2000, 276(1): 104-113.
- [12] Aoki S T, Settembre E C, Trask S D, et al. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab[J]. *Science*, 2009, 324(5933): 1444-1447. DOI:10.1126/science.1170481
- [13] Dyall-Smith M L, Lazdins I, Tregear G W, et al. Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1986, 83(10): 3465-3468. DOI:10.1073/pnas.83.10.3465
- [14] Wang L, Huang J, Nagesha H S, et al. Bacterial expression of the major antigenic regions of porcine rotavirus VP7 induces a neutralizing immune response in mice[J]. *Vaccine*, 1999, 17(20-21): 2636-2645.
- [15] Aoki S T, Settembre E C, Trask S D, et al. Structure of rotavirus outer-layer protein VP7 bound with a neutralizing Fab[J]. *Science*, 2009, 324(5933): 1444-1447.
- [16] Matthijnssens J, Ciarlet M, McDonald S M, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)[J]. *Archives of virology*, 2011, 156: 1397-1413. DOI:10.1007/s00705-011-1006-z
- [17] NCBI.Virus variation[EB/OL].[2023-05-15].[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/Database/nph-select.\[17\]cgi?cmd=database&taxid=28875](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/VirusVariation/Database/nph-select.[17]cgi?cmd=database&taxid=28875)
- [18] Li J, Wang H, Li D, et al. Infection status and circulating strains of rotaviruses in Chinese children younger than 5-years old from 2011 to 2018: systematic review and meta-analysis[J]. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2021, 17(6): 1811-1817.
- [19] 段招军,李金松,张静等.儿童轮状病毒胃肠炎免疫预防专家共识(2024年版)[J].*中国疫苗和免疫*,2024,30(01):95-126.DOI:10.19914/j.CJVI.2024018.
- [20] 丛文娟,杨继红,邓妍等.轮状病毒 WH-2 株 vp7 基因的原核表达及单克隆抗体的制备 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27 (03): 294-296. DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.005887.

- [21] 秦昭恒. 猪轮状病毒 VP7 蛋白单克隆抗体制备与其抗原表位的初步鉴定[D]. 东北农业大学, 2014.
- [22] 迟延彬,陈建飞,时洪艳等. A 群猪轮状病毒 VP7 蛋白单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41 (02): 70-74.
- [23] 袁力勇,刘勇,李春宏等. 轮状病毒 VP7 基因在大肠杆菌中的表达及其免疫原性[J].生物工程学报,2001,(02):145-149.DOI:10.13345/j.cjb.2001.02.008.
- [24] Wang L, Huang J, Phelps A, et al. Periplasmic expression of part of the major rotavirus capsid protein VP7 containing all the three antigenic regions in Escherichia coli[J]. Gene, 1996, 177(1-2): 155-162.
- [25] Mason B B, Dheer S K, Hsiao C, et al. Sequence of the serotype-specific glycoprotein of the human rotavirus Wa strain and comparison with other human rotavirus serotypes[J]. Virus research, 1985, 2(4): 291-299.
- [26] Clarke M L, Lockett L J, Both G W. Membrane binding and endoplasmic reticulum retention sequences of rotavirus VP7 are distinct: Role of carboxy-terminal and other residues in membrane binding[J]. Journal of virology, 1995, 69(10): 6473-6478.
- [27] 魏强,姜秀丽,王健伟等. 人轮状病毒 G2 和 G3 型主要中和抗原 VP7 基因在重组腺病毒中的表达[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2004,(01):13-16.
- [28] 徐倏燊.我国近期轮状病毒流行株重要基因的分子特征研究.博士学位论文.北京: 中国预防医学科学院病毒所 2000.10-35.
- [29] 何金生,王健伟,温乐英等. 用重组腺病毒表达 A 组轮状病毒主要中和抗原 VP7 可获得良好的免疫学效果[J].病毒学报, 2001,(02):122-126.
- [30] MAEDA S, KAWAI T, OBINATA M, et al. Production of human α -interferon in silkworm using a baculovirus vector[J]. Nature, 1985, 315(6020): 592-594.
- [31] 郝建伟,薛春宜,曹永长. 应用杆状病毒表达系统有效表达 PEDV 纤突蛋白[J]. 山西农业科学,2022,50(5):714-719. DOI:10.3969/j.issn.1002-2481.2022.05.15.
- [32] 张帅. 杆状病毒表达系统载体优化及初步应用[D]. 河南:河南农业大学,2019.
- [33] 韦永龙,李轶女,张志芳,等. 杆状病毒表达系统及其应用进展[J]. 生物技术通报, 2010(10):1-7,14.
- [34] 张如悦,高耀荣,王建超,等. 基于昆虫细胞-杆状病毒表达系统的 SARS-CoV-2 S1 蛋白的高效表达 [J]. 中国病原生物学杂志,2023,18(1):1-5,11. DOI:10.13350/j.cjpb.230101.
- [35] 范晴,谢芝勋,刘加波等.牛轮状病毒 VP7 基因在昆虫细胞中的表达[J].中国兽医科学, 2013,43(02):159-163.DOI:10.16656/j.issn.1673-4696.2013.02.006.
- [36] 黄晓星.猪轮状病毒 VP7 蛋白在 Sf9 昆虫细胞中的表达及应用 [D].扬州大学,2019. DOI:10.27441/d.cnki.gyzdu.2019.000409.
- [37] 何湘君,钱渊,李国华等.在昆虫细胞中表达 G2 型轮状病毒地方株 VP7 基因[J].病毒学报,1998,(04):90-92.
- [38] Hung P J, Chen C C. Diagnostic accuracy of rotavirus antigen tests in children: A systematic review and meta-analysis[J]. Tropical Medicine & International Health, 2023, 28(2): 72-79.
- [39] 李兰娟,任红.传染病学 [M]. 第 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [40] 李凡,徐志凯.医学微生物学 [M]. 第 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
- [41] Shane A L, Mody R K, Crump J A, et al. 2017 Infectious Diseases Society of America clinical practice guidelines for the diagnosis and management of infectious diarrhea[J]. Clinical Infectious Diseases, 2017, 65(12): e45-e80.
- [42] 卜桐,崔乐乐,刘兆基,等. 单克隆抗体在抗病毒感染中的研究进展[J]. 现代生物医学进展,2019,19(6):1188-1192. DOI:10.13241/j.cnki.pmb.2019.06.042.
- [43] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. nature, 1975, 256(5517): 495-497.

- [44] Holliger P, Hoogenboom H. Antibodies come back from the brink[J]. *Nature biotechnology*, 1998, 16(11): 1015-1016.
- [45] Gopal A K, Press O W. Clinical applications of anti-CD20 antibodies[J]. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 1999, 134(5): 445-450.
- [46] Buss N A P S, Henderson S J, McFarlane M, et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and future[J]. *Current opinion in pharmacology*, 2012, 12(5): 615-622.
- [47] Akkina R. Humanized mice for studying human immune responses and generating human monoclonal antibodies[J]. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2(2): 10.1128/microbiolspec. aid-0003-2012.
- [48] Gorovits B, Koren E. Immunogenicity of chimeric antigen receptor T-cell therapeutics[J]. *BioDrugs*, 2019, 33(3): 275-284.
- [49] Hashimoto Y, Tada M, Iida M, et al. Generation and characterization of a human–mouse chimeric antibody against the extracellular domain of claudin-1 for cancer therapy using a mouse model[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 477(1): 91-95.
- [50] Wollina U, Tchernev G, Lotti T. Chimeric monoclonal antibody cetuximab targeting epidermal growth factor-receptor in advanced non-melanoma skin cancer[J]. *Open access Macedonian journal of medical sciences*, 2018, 6(1): 152.
- [51] Guo H, Chen H, Zhu Q, et al. A humanized monoclonal antibody targeting secreted anterior gradient 2 effectively inhibits the xenograft tumor growth[J]. *Biochemical and biophysical research communications*, 2016, 475(1): 57-63.
- [52] Safdari Y, Farajnia S, Asgharzadeh M, et al. Antibody humanization methods—a review and update[J]. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2013, 29(2): 175-186.
- [53] 罗拥政,顾蕴尔. 单克隆抗体技术及其在治疗自身免疫性疾病方面的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2017(a1). DOI:10.19613/j.cnki.1671-3141.2017.101.203.
- [54] Townsend S, Finlay W J J, Hearty S, et al. Optimizing recombinant antibody function in SPR immunosensing: The influence of antibody structural format and chip surface chemistry on assay sensitivity[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 22(2): 268-274.
- [55] Schoonjans R, Willems A, Schoonoghe S, et al. A new model for intermediate molecular weight recombinant bispecific and trispecific antibodies by efficient heterodimerization of single chain variable domains through fusion to a Fab-chain[J]. *Biomolecular engineering*, 2001, 17(6): 193-202.
- [56] Lu D, Jimenez X, Zhang H, et al. Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments[J]. *Journal of immunological methods*, 2002, 267(2): 213-226.
- [57] Nisonoff A, MM R. Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity[J]. *Archives of biochemistry and biophysics*, 1961, 93: 460-462.
- [58] 黎宏,郭清源,郭拉杨等. 昆虫细胞无血清培养的研究进展及应用[J]. *激光生物学报*, 2023, 32(03): 200-207.
- [59] Ruiz M C, Aristimuno O C, Díaz Y, et al. Intracellular disassembly of infectious rotavirus particles by depletion of Ca²⁺ sequestered in the endoplasmic reticulum at the end of virus cycle[J]. *Virus Research*, 2007, 130(1-2): 140-150. DOI: 10.1016/j.virusres.2007.06.005.
- [60] 郭鑫. 抗不同物种动物 IgG 单克隆抗体的制备及初步应用 [D]. 扬州大学, 2022. DOI:10.27441/d.cnki.gyzdu.2022.002146.
- [61] 杨文婷. 抗猪流行性腹泻病毒核衣壳蛋白单克隆抗体的制备及功能验证[D]. 中国农业科学院, 2019.
- [62] Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity[J]. *nature*, 1975, 256(5517): 495-497.
- [63] 李玉林. 分子病理学[M]. 人民卫生出版社: 2022. 11. 1118.
- [64] 徐颖. HEV ORF2 单克隆抗体的筛选及用于病毒检测的研究 [D]. 河北大

- 学,2020.DOI:10.27103/d.cnki.ghebu.2020.001296.
- [65] 刘英,朱衍志,陆俭等. A 型肉毒神经毒素双抗体夹心 ELISA 的建立及验证 [J]. 微生物学免疫学进展, 2024, 52 (01): 40-47. DOI:10.13309/j.cnki.pmi.2024.01.006.
- [66] 林彦星,翁巧玉,吴江等. 检测非洲猪瘟病毒抗原的双抗体夹心 ELISA 方法的建立 [J]. 中国兽医学报, 2024, 44 (01): 7-11. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2024.01.02.

文献综述

A 组轮状病毒研究进展

【摘要】轮状病毒 (Rotaviruses, RV) 是引起婴幼儿腹泻的最常见病毒, RV 感染是世界范围内的重大公共卫生问题。本文旨在对轮状病毒及其检测方法进行概述, 阐明轮状疫苗研制的重要性, 探索 VP7 蛋白特征, 在基于 VP6 蛋白检测 A 组轮状病毒方法的基础上, 探索不同 G 型轮状病毒检测方法的建立, 对不同 G 型多价轮状疫苗的鉴定和开发具有重要意义。

【关键词】轮状病毒; 疫苗; VP7; 检测方法

1. 轮状病毒概述

A 组轮状病毒 (Group A rotavirus, RVA) 是世界范围内引起 5 岁以下婴幼儿急性病毒性胃肠炎的主要病原^[1], 也可以感染哺乳动物及鸟类^[2], 全球范围内预估每年至少会有 215000 名婴幼儿死于轮状病毒感染^[3]。轮状病毒感染症状除腹泻、呕吐^[4]易引起脱水外, 还会引起发烧、呼吸困难等肠道外症状, 这扩大了疾病风险^[5]。在引入疫苗之前, 轮状病毒相关的胃肠炎每年导致 50 万名 5 岁以下儿童死亡^[6], 是重要的公共卫生问题。我国 A 组轮状病毒流行秋冬季多发, 有明显的季节性^[7]。及时地分析轮状病毒疾病负担数据, 评估对疫苗的需求, 进行毒株监测等, 与轮状病毒检测和鉴定技术的发展相辅相成。

轮状病毒属于呼肠孤病毒科, 是无包膜双链 RNA (ds RNA) 病毒, 可感染成熟肠上皮细胞^[8], 是引起 5 岁以下儿童病毒性胃肠炎的主要病原体, 主要通过粪-口途径传播^[9]。轮状病毒基因组有 11 个双链 RNA 片段, 编码 12 种蛋白, 包括六种结构蛋白 (VP1-VP4, VP6 和 VP7) 和六种非结构蛋白 (NSP1-6)。根据 VP6 的序列和抗原差异, 目前将轮状病毒分为 9 个组 (A-D, F-J) ^[10-12]。其中 A 组轮状病毒在人群中流行最为广泛, 是引起婴幼儿感染的最常见轮状病毒组别。

病毒粒子具有三层衣壳蛋白结构, VP1-VP3 组成核心蛋白, VP6 为中间层, 其双层衣壳病毒颗粒 (double-layered particle, DLP) 因缺乏识别、结合和穿透靶细胞的能力而不具备传染性^[13]。VP7 和 VP4 组成病毒最外层衣壳, 是参与病毒附着和进入细胞的重要分子。VP7 和 VP4 分别定义轮状病毒的 G 型和 P 型^[14]。VP4 在胰蛋白酶的作用下可裂解为 VP8*和 VP5*, 从而使病毒具有感染性^[15]。VP7 是轮状病毒的主要中和抗原, 能

够诱导产生中和抗体。

A 组轮状病毒目前分为 42 个 G 型和 58 个 P 型。其中在我国人群中流行最为广泛的有 G1、G2、G3、G8、G9 型轮状病毒和 P[8]、P[4]、P[6]型轮状病毒^[16]。VP7 蛋白决定着轮状病毒的 G 血清型，对轮状的结构和功能研究很重要。VP7 是一种糖蛋白，分子量约 37 kDa，大约占轮状病毒粒子蛋白总量的 30%^[8]。

2. 轮状病毒疫苗概述

轮状病毒胃肠炎侵害全球 <5 岁儿童，造成了较重的疾病负担。并且临床上暂无针对轮状病毒治疗的特效药物，只能借助疫苗免疫预防^[17-18]。目前这四种口服减毒活疫苗，均经过 WHO 认证，RotaTeq 疫苗（默沙东，美国）、Rotarix 疫苗（葛兰素史克，比利时）、Rotavac 疫苗（印度巴拉特生物技术公司，印度）和 Rotasiil 疫苗（印度血清研究所，印度），已在多个国家投入使用^[19-20]。截至 2020 年已有 107 个国家在其国家免疫规划中引入了 RV 疫苗 <5 岁儿童中 RVGE 病例的比例下降^[21]。根据全球轮状病毒监测情况显示，轮状病毒感染人数下降幅度与轮状病毒疫苗接种成反比^[22]。大量研究表明，美国第一代轮状疫苗 Rotashield 会增加儿童肠套叠发病风险，最终下市^[23]。新的轮状病毒疫苗（Rotarix 疫苗和 RotaTeq 疫苗）暂未发现增加肠套叠的发病风险。但这点无论是临床试验还是上市后都应密切关注。

3. 轮状病毒检测方法

目前人轮状病毒常用检测方法主要有传统 PCR 扩增、荧光定量 PCR、病毒分离鉴定、电镜技术和免疫荧光法等，病毒分离培养^[24]需要有丰富的生物实验基础和严格的实验室条件，且分离周期长；免疫电镜技术虽然检测效率高^[24-25]，但操作要求高、电镜设备昂贵，且病毒易降解、污染等原因，多用于科研，临床应用有很大的局限性。传统 PCR 扩增多用于病原检测，不适于早期诊断；RT-PCR 虽然特异性、灵敏性更高，但是容易出现健康人假阳性结果^[26]。抗原检测方法（ELISA、试纸条等）相对来说更为便捷、操作要求简单、成本更低，适合大批量检测，可广泛应用^[27]。

4. 小结

基于轮状病毒的传播及感染，RV 感染是世界范围内的重大公共卫生问题。且无特效药物治疗。对轮状病毒的了解及其检测方法的研究，对轮状病毒的快速检测和准确鉴

定对疾病诊断与及病毒防控非常重要。进一步明确疫苗研制的重要性,揭示 VP7 蛋白特性,在基于 VP6 蛋白的 A 组轮状病毒检测方法基础上,探索不同 G 型轮状病毒的检测方法建立,对不同 G 型多价轮状疫苗的开发和鉴定具有重要意义。

参考文献

- [1] WORLD HEALTH ORGANIZATION. Rotavirus vaccines: WHO position paper—January 2013[J]. 2013, 31(52):6170-6171.
- [2] CRAWFORD S E, RAMANI S, TATE J E, et al. Rotavirus infection[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2017, 3(1): 1-16.DOI:10.1038/nrdp.2017.83
- [3] TATE J E, BURTON A H, BOSCHI-PINTO C, et al. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013[J]. Clinical Infectious Diseases, 2016, 62(suppl_2): S96-S105.DOI:10.1093/cid/civ1013
- [4] HAGBOM M, ISTRATE C, ENGBLOM D, et al. Rotavirus stimulates release of serotonin (5-HT) from human enterochromaffin cells and activates brain structures involved in nausea and vomiting[J]. PLoS pathogens, 2011, 7(7): e1002115. DOI:10.1371/journal.ppat.1002115
- [5] 范佳欣,李丹地.轮状病毒肠道外感染研究进展[J].疾病监测,2021,36(08):785-788.
- [6] TATE J E, BURTON A H, BOSCHI-PINTO C, et al. 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: a systematic review and meta-analysis[J]. The Lancet infectious diseases, 2012, 12(2): 136-141. DOI:10.1016/S1473-3099(11)70253-5
- [7] 中华预防医学会.儿童轮状病毒胃肠炎免疫预防专家共识(2020版)[J].中华流行病学杂志,2021,42(1):44-57. DOI:10.3760/cma.j.cn112338-20201103-01298.
- [8] Knipe D, Howley P, Griffin D, et al. Fields Virology, Volumes 1 and 2[M]. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA, 2013.1347-1401
- [9] Tate J E, Burton A H, Boschi-Pinto C, et al. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children < 5 years of age, 2000–2013[J]. Clinical Infectious Diseases, 2016, 62(suppl_2): S96-S105. DOI: 10.1093/cid/civ1013.
- [10] MATTHIJNSSENS J, OTTO P H, CIARLET M, et al. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation[J]. Archives of virology, 2012, 157: 1177-1182. DOI:10.1007/s00705-012-1273-3
- [11] MIHALOV-KOVÁCS E, GELLÉRT Á, MARTON S, et al. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary[J]. Emerg Infect Dis. 2015;21(4):660-663. DOI:10.3201/eid2104.141370
- [12] BÁNYAI K, KEMENESI G, BUDINSKI I, et al. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2017, 48: 19-26. DOI:10.1016/j.meegid.2016.12.002
- [13] Rodríguez J M, Luque D. Structural insights into rotavirus entry[J]. Physical Virology: Virus Structure and Mechanics, 2019: 45-68. DOI: 10.1007/978-3-030-14741-9_3.
- [14] Matthijnsens J, Ciarlet M, McDonald S M, et al. Uniformity of rotavirus strain nomenclature

- proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG)[J]. Archives of virology, 2011, 156: 1397-1413. DOI:10.1007/s00705-011-1006-z
- [15] Larralde G, Li B G, Kapikian A Z, et al. Serotype-specific epitope (s) present on the VP8 subunit of rotavirus VP4 protein[J]. Journal of virology, 1991, 65(6): 3213-3218. DOI:10.1128/jvi.65.6.3213-3218.1991
- [16] 魏宇航, 李静欣, 彭蕊, 等. 2011-2019 年我国 G9P [8] 型 A 组轮状病毒腹泻住院患儿流行病学和临床特征分析[J]. 疾病监测, 2022, 37(6): 760-763. DOI: 10.3784/jbjc.202111110589
- [17] 段招军, 王华庆. 儿童轮状病毒胃肠炎免疫预防专家共识 (2020 版) [J]. 中华预防医学杂志, 2021, 55 (1):4-17.
- [18] 吕榜军, 黎明强, 覃彦香. 轮状病毒感染性腹泻流行及疫苗的研究进展[J]. 现代预防医学, 2016, 43(04):739-741.
- [19] Wang Y, Li J, Liu P, et al. The performance of licensed rotavirus vaccines and the development of a new generation of rotavirus vaccines: a review [J]. Hum Vaccin Immunother, 2020, 17 (3):880-896.
- [20] 随海田, 李静欣, 王锐等. 全球轮状病毒疫苗应用研究进展 [J]. 中国预防医学杂志, 2022, 23(08):637-640. DOI:10.16506/j.1009-6639.2022.08.014.
- [21] Girish Kumar CP, Giri S, Chawla-Sarkar M, et al. Epidemiology of rotavirus diarrhea among children less than 5 years hospitalized with acute gastroenteritis prior to rotavirus vaccine introduction in India [J]. Vaccine, 2020, 38(51):8154-8160.
- [22] Burnett E, Parashar UD, Tate JE. Global impact of rotavirus vaccination on diarrhea hospitalizations and deaths among children <5 years old: 2006—2019 [J]. J Infect Dis, 2020, 222 (10):1731-1739.
- [23] Peter G, Myers MG, National Vaccine Advisory Committee, National Vaccine Program Office. Intussusception, rotavirus, and oral vaccines: summary of a workshop [J]. Pediatrics, 2002, 110 (6):e67.
- [24] 柴萨萨, 马晓华, 赵静, 等. 一株蝙蝠轮状病毒的分离和基因组分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2023, 38(1):1-9. DOI:10.3969/j.issn.1002-2694.2022.00.181.
- [25] 高升辉, 王明雯, 李利利, 等. 人 A 组 G2P[4]型轮状病毒的分离培养和鉴定[J]. 国际病毒学杂志, 2022, 29(2):93-97. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4092.2022.02.002.
- [26] 程娟, 孙茂盛. 轮状病毒检测技术的研究进展[J]. 中国生物制品学杂志, 2009, 22(6):622-624.
- [27] 罗明, 龚成, 史玲莉等. 五种常用轮状病毒检测方法的评价及应用策略[J]. 疾病监测, 2014, 29(03):223-227. DOI: 10.3784/j.issn.1003-9961.2014.03.015