维普资讯 http://www.cqvip.com

第15卷第1期 中国病毒学 Vol.15 No.1
2000年3月 VIROLOGICA SINICA Mar. 2000

呼吸道合胞病毒融合抑制活性单克隆抗体的鉴定及应用*

黄升海，史百芬，王明丽，张咏南，胡勇，毕克菊
（安徽医科大学微生物学教研室，合肥 230032）

摘要：用杂交瘤技术制备了抗呼吸道合胞病毒（RSV-Long 株）的单克隆抗体 F_3 细胞株。经 IFA 及 ELISA 证明，F_3 株 McAb 对 RSV 抗原特异，具中和活性及融合抑制活性，其腹水中和效价和融合抑制效价分别为 1:128 和 1:64。将 F_3 株 McAb 与商售混合单抗试剂盒进行临床诊断比较，二者阳性符合率 96.9%，阴性符合率 100%。

关键词：呼吸道合胞病毒（RSV）；单克隆抗体（McAb）；融合抑制试验；诊断
中图分类号：R373.1 **文献标识码**：A **文章编号**：1003－5125(2000)01－0034－05

RSV 是世界范围内婴幼儿下呼吸道感染、特别是婴幼儿病毒性肺炎和毛细支气管炎的重要病原[1]。目前对 RSV 感染尚无有效的防治措施，因此深入研究其结构与功能的关系，尤其是抗原性稳定的 F 蛋白（融合蛋白）的研究将更具实际意义。Beeler[2]和 West[3]等分别探讨了各株 F 蛋白单克隆抗体（McAb）的不同生物学活性和结合位点之间的关系，提出有些活性位点与三维结构相关，国内对此尚无报道，亦未见融合抑制试验。本研究建立了一株抗 RSV McAb，证明具融合抑制活性，用于检测 RSV 感染患儿鼻咽部抽吸样本（NPA）的脱落细胞，初步结果证明与混合 McAb 效果相似，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 抗 RSV McAb

用杂交瘤技术获得 4 株抗 RSV McAb，选其中 F_3 株进行 3 次连续克隆化及亚克隆培养，获得稳定分泌抗 RSV McAb 细胞株。

1.2 病毒

RSV-Long 株（A 亚型）及 R_6 武汉地方株（B 亚型）均购自湖北省医学科学院病毒所，3 株 RSV 分离株由本室自患儿咽拭子获得。

1.3 微量中和试验

将 10 倍系列稀释的 F_3 株腹水分别与等量 100 $TCID_{50}$ RSV-Long 株病毒悬液 37 ℃作用 1 h，取上述病毒-抗体混悬液每孔 0.2 mL 接种于 Hep-2 单层细胞中，每一稀释度做 3 孔，同时设立 RSV-Long 株及 Hep-2 细胞对照，24 h 后更换 2% 灭活牛血清的 DMEM 维持液。4 d 后病毒对照 CPE 达 4+ 时记录结果。按 Reed-Muench 法计算中和效价。

1.4 融合抑制试验（微孔板法）

基本操作参照 West[3]等的方法，将 Hep-2 细胞接种于 40 孔微孔培养板，长成单层后甩去营养液，用 PBS

收稿日期：1999－02－01，修回日期：1999－05－05
* 本课题为安徽省教委资助项目（95JL0079）
作者简介：黄升海，男，30 岁，硕士，讲师，主要研究方向病毒学

维普资讯 http://www.cqvip.com

洗二次。每孔接种100 $TCID_{50}$ RSV-Long株病毒0.2 mL，37℃ 1 h,甩去上清,用PBS洗二次,然后加入2%灭活牛血清DMEM作2倍系列稀释的F_3株腹水,每一稀释度均做复孔,并作相应的细胞和病毒对照。37℃ 36 h后甩去上清,用10%醋酸-福尔马林固定细胞,再用0.1%结晶紫、20%甲醇染色[4]。两人同时观察结果,以细胞对照为1+,病毒对照为4+,合胞体产生2+的稀释度作为腹水的融合抑制效价。

1.5 F_3株McAb的临床应用

将本室RSV分离阳性的3份患儿咽试子(NPS)抗原片保存于-20℃备用;另有9例RSV分离阴性NPS涂片(由省立医院儿科提供);37例临床诊断RSV感染患儿NPA涂片(由蚌埠医学附院儿科潘家华主任惠赠)。以双盲法用F_3株McAb和商售RSV混合McAb诊断试剂盒(购自北京解放军262医院)同时进行IFA检测,均做复片。以出现3个或3个以上荧光细胞判断为RSV感染阳性。比较二种试剂检测结果的符合率。

2 结果

2.1 F_3株抗RSV McAb的基本性状

经检测,F_3株RSV McAb为IgG1亚类。IFA及ELISA均证明其对RSV抗原(RSV-Long株、R6地方株、本室分离株)具有特异性,与麻疹病毒、腺病毒3型及7型抗原以及正常细胞均无反应。细胞培养上清及腹水效价ELISA分别为1:16和1:16 384,IFA分别为1:16和1:10 000。腹水中和效价为1:128。

2.2 融合抑制试验

将2倍系列稀释的杂交瘤腹水分别加到已吸附RSV-Long株病毒的Hep-2单层细胞中,培养36 h观察结果。Hep-2细胞对照为正常形态,排列紧密,偶见少数自然死亡细胞团,记为1+(图1a);病毒对照孔细胞出现明显肿胀、变圆,排列稀疏,并有大片细胞融合之合胞体,记为4+(图1b);1:8～1:32腹水各孔细胞与正常对照的细胞相比,见形态上稍有肿胀,并有变圆的细胞,排列也稍疏松,但未见细胞融合现象(图1c);而1:64腹水孔细胞无论从形态、肿胀程度、排列、合胞体形成来看均介于细胞对照与病毒对照之间,细胞病变强于1:32腹水孔,而明显弱于病毒对照孔,但未见大片细胞融合,记为2+(图1d)。表明F_3株腹水的融合抑制效价为1:64,能有效地抑制已感染RSV细胞的融合,即受染细胞融合被抑制。重复实验3次结果一致。

2.3 临床诊断

F_3株McAb与商售试剂盒同时检测49例临床标本,结果见表1。

表1　不同单抗检测临床标本的IFA阳性率

Table 1　The detection of IFA positive rate of clinical specimens with different monoclonal antibodies

标本 Specimens	例数 Cases	IFA阳性率(%)(n) IFA positive rate (%)(n)	
		F_3株McAb McAb of F_3 strain	商售试剂盒 Kit in market
RSV分离(+)的NPS NPS of positive isolated RSV	3	100(3)	100(3)
RSV分离(-)的NPS NPS of negative isolated RSV	9	22.2(2)	22.2(2)
临床诊断阳性的NPA NPA of positive clinical diagnosis	37	70(26)	73(27)

维普资讯 http://www.cqvip.com

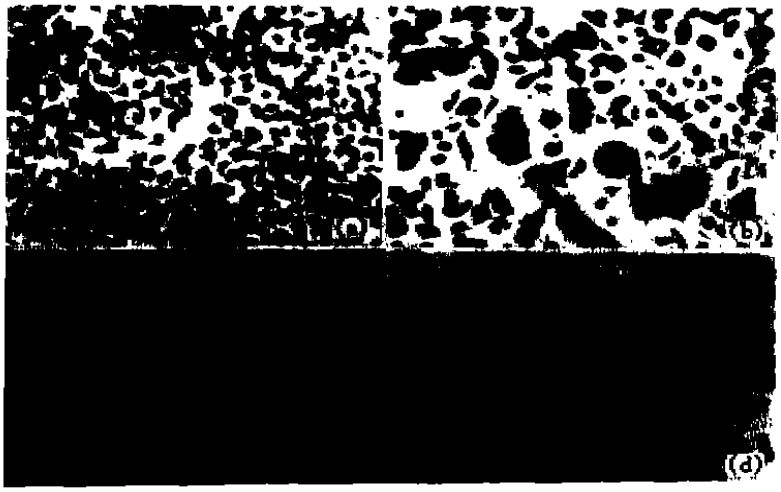

图1 F_3 株腹水的融合抑制试验

a)正常细胞对照;b)病毒对照;c)1:32 稀释的腹水;d)1:64 稀释的腹水。

Fig. 1 The detection of fusion-inhibiting with F_3 strain ascites

a)control of normal cells; b)control of virus infective cells; c)1:32 diluted ascites; d)1:64 diluted ascites

商售 RSV 混合单抗试剂盒从 49 例临床标本中共检出 32 例阳性，F_3 株 McAb 检出 31 例阳性。商售试剂盒检出阴性的 17 例标本，F_3 株 McAb 检测亦均为阴性。阳性符合率 96.9%，阴性符合率为 100%。

3 讨论

RSV 属副粘病毒科肺炎病毒属，其包膜上的 F 蛋白可引起 RSV 的融合病变，使受染细胞-细胞融合形成合胞体，也是重要的保护性抗原。国内尚未见 RSV 融合抑制试验的报道，国外报道亦少。我们制备了 F_3 株 McAb 并摸索其融合抑制试验，证明 F_3 株 McAb 有中和活性，融合抑制试验阳性，融合抑制效价高达 1:64。据报道抗 G 蛋白的 McAb 无中和病毒作用[5-7]，Walsh[8]报道一株抗 G 蛋白的 McAb 在补体存在情况下能中和病毒。本研究中 F_3 株 McAb 在无补体存在下病毒中和效价为 1:128，且能有效地抑制已感染细胞的融合，我们认为该单抗为抗 RSV F 蛋白的 McAb，原因为：①融合抑制是抗 F 抗体本身的作用。②F、G 蛋白的空间位置很近，通过二硫键连接，抗 F 与 F 位点结合后，可能封闭了 G 蛋白的结合位点，使 RSV 不能吸附在邻近的细胞膜受体上，也不可能发生细胞融合，而是细胞融合抑制。RSV F 蛋白的抗原性比较稳定，很少变异，而 G 蛋白则有较高的亚型特异性和高度的变异性，各株 RSV 的主要差异也存在于 G 蛋白上。F 蛋白不易引起疫苗相关的免疫潜能病[9]，是有希望的疫苗候选成分，作为诊断试剂能广泛检出各株 RSV，比抗其它多肽的 McAb 优越[10]。我们的临床标本检测结果亦证明这点，且能与 RSV-Long 株、R6 地方株及不同分离株均起反应，亦证明 F_3 株 McAb 为抗 RSV F 蛋白单抗。但我们进行了数次 Western-blot 试验，未能查出 F_3 株 McAb 与相应结构蛋白的反应，可能与抗原纯化及 SDS 处理过程中破坏了构象依赖性的表位有关，

维普资讯 http://www.cqvip.com

有待进一步探讨。但在某些情况下用融合抑制活性加做其它试验鉴定 McAb 的性质有一定实用价值,而且简便。

从 RSV 被发现至今,人们一直在探索一种快速、敏感、特异的早期诊断方法。由于病毒分离、血清学方法、电镜及 PCR 技术等对 RSV 感染的诊断并非尽如人意,而 McAb 的应用为 RSV 早期诊断开辟了广阔的前景。学者们相继开展了 McAb 免疫荧光法、免疫酶法、放免法等多方面的研究,与传统多克隆抗体检测病毒抗原方法相比,McAb 检测临床标本,特异性与敏感性均较高[5,11,12]。文献报道,在整个 RSV 感染过程中融合蛋白在鼻咽分泌物中都有很高的滴度,而糖蛋白等其它蛋白含量较低且很难检测到[13];将 McAb 用于已知阳性鼻咽分泌物中 RSV 多肽的检测,亦发现仅抗融合蛋白的 McAb 能完全检出 RSV,而抗其它多肽 McAb 则较不敏感[10],因而认为作为诊断试剂,抗融合蛋白的 McAb 不可缺少。理论上讲,将几种蛋白单抗混合应用能提高诊断的敏感性,本株 McAb 为抗 RSV F 蛋白单抗,和商售试剂盒(混合单抗)比较,共检测 49 例临床标本,阳性符合率 96.9%,阴性符合率 100%,几乎与混合单抗检测结果没有差别。因此该株 McAb 有希望应用于临床标本诊断,且更加简便,制备工作量小。但尚待增加标本例数作进一步分析。

参 考 文 献

[1] Selwyn BJ. The epidemiology of acute respiratory tract infection in young children: Comparison of findings from several developing countries [J]. J Infect Dis, 1990, 12:870～888

[2] Beeler JA, Coelingh KW. Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: Effect of mutation upon funsion function [J]. J Virol, 1989, 63(7):2942～2950

[3] West WH, Lounsbach GR, Bourgeois C *et al*. Biological activity, binding site and affinity of monoclonal antibodies to the fusion protein of respiratory syncytial virus [J]. J Gen Virol, 1993. 75(10):2813～2819

[4] Schinazi RF, Andere PH. D. Different *in vitro* effects of dual combinations of anti-herpes simplex virus compounds [J]. The America Journal of Medicine, 1982, 73(1A):40～47

[5] Routledge EG, McQuillin J, Samson AcR *et al*. The development of monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus and their use in diagnosis by immunofluorescence [J] J Med Virol. 1985, 15:305～320

[6] Fernie BF, Cote PJ, Genin JL. Classification of hybridomas to respiratory syncytial virus glycoprotein [J]. Proc Sec Exp Biol Med, 1982, 171:266～271

[7] Anderson LJ, Hierholzer JC, Stone YO *et al*. Identification of epitopes on respiratory syncytial virus proteins by competitive binding immunoassay [J]. J Clin Microb, 1986, 23(3):475～480

[8] Walsh EE, Hruska J. Monoclonal antibodies to respiratory syncytial virus protein: Identification of the fusion protein [J]. J Virol, 1983, 47(1):171～177

[9] Srikiatkhachorn A, Braciale JJ. Virus-specific memory and effector T lymphocytes exhibit different cytokine responses to antigens during experimental murine respiratory syncytial virus infection [J]. J Virol, 1997, 71(1):678～685

[10] Hendry RM, Godfrey E, Anderson. LJ *et al*. Quantification of respiratory syncytial virus polypeptide in nasal secretions by monoclonal antibodies [J]. J Gen Virol, 1985, 66:1705～1714

[11] Pothier P, Nicolas JC, Maur S *et al*. Monoclonal antibodies against respiratory syncytial virus and their use for rapid detection of virus in nasopharyngeal secretions [J]. J Clin Microbiol, 1985, 21(2):286～287

[12] Kim HW, Wyatt RG, Fernie BF *et al*. Respiratory syncytial virus detection by immunofluorescence in nasal secretions with monoclonal antibodies against selected surface and internal proteins [J]. J Clin Microbiol, 1983, 18:1399～1404

[13] 顾方舟、曹逸云,董德祥等译.病毒、立克次体及衣原体疾病诊断技术[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993.

维普资讯 http://www.cqvip.com

Identification and Primary Application of Fusion-Inhibiting Active Monoclonal Antibody of Respiratory Syncytial Virus

HUANG Sheng-hai, SHI Bai-fen, WANG Ming-li,
ZHANG Yong-nan, HU Yong, BI Ke-ju
(*Dept. of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei* 230032, *China*)

Abstract: Monoclonal antibody of F_3 hybridoma cell strain against RSV specific antigen was prepared by hybridoma and tested by indirect immunofluorescence and ELISA. It has neutralizing and fusion-inhibiting activity. The neutralizing titres and fusion-inhibiting titres of ascites of mice are 1:128 and 1:64 respectively. Clinical diagnosis by comparing McAb of F_3 strain with fixed McAb of commerical kit show that the positive according rate are 96.9% and negative according rate are 100%. F_3 hybridoma cell strain probably produces a monoclonal antibody against fusion-protein of RSV.

Key words: Respiratory syncytial virus; Monoclonal antibody; Fusion-inhibiting test; Clinical diagnosis