

# 细胞表达流感病毒抗体 CR6261 V<sub>H</sub> 与 scFv 对流感病毒感染的影响

李燕<sup>1,2</sup>, 李秀岚<sup>3</sup>, 严景华<sup>1</sup>

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国科学院研究生院, 北京 100049

3 青岛农业大学化学与药学院, 青岛 266109

**摘要:** 由于新发现的流感病毒抗体 CR6261 可以中和多种亚型的流感病毒, 而且是其 V<sub>H</sub> 区结合于流感病毒蛋白 HA 的保守区, 因此该抗体有望成为一种广谱的流感治疗性抗体而备受关注。通过构建真核表达载体 pCR6261V<sub>H</sub>、pCR6261V<sub>H</sub>-GFP、pCR6261scFv, 成功地筛选到在细胞膜上稳定表达 CR6261V<sub>H</sub>、CR6261V<sub>H</sub>-GFP 与 CR6261scFv 的单克隆细胞系。用流感病毒去感染稳定细胞系, 间隔 12 h 取上清检测病毒血凝效价。结果表明: 稳定表达 CR6261scFv 和 CR6261V<sub>H</sub>-GFP 细胞系能够降低病毒的血凝效价, 而表达 CR6261V<sub>H</sub> 细胞系的血凝效价与对照无显著差异。说明 CR6261V<sub>H</sub> 与 CR6261scFv 在细胞膜上表达能够部分抑制病毒侵染细胞。尽管更有效的抑制策略还在研究中, 但本研究将为抗流感转基因动物的育种提供新的思路。

**关键词:** 抗体 CR6261, 流感病毒, 稳定细胞系, 病毒感染抑制

## Effect of antibody CR6261 V<sub>H</sub> and scFv expression on influenza virus infection

Yan Li<sup>1,2</sup>, Xiulan Li<sup>3</sup>, and Jinghua Yan<sup>1</sup>

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3 College of Chemistry and Pharmacy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

**Abstract:** The emerging CR6261 antibody could neutralize several subtype influenza virus with high affinity, whose V<sub>H</sub> domain binds to the HA protein conserved domain. Therefore, it has drawn much attention as a potential broad-spectrum therapeutic antibody against influenza virus. In this study, we constructed the eukaryotic expression vectors pCR6261V<sub>H</sub>, pCR6261V<sub>H</sub>-GFP and pCR6261scFv and screened the monoclonal cell lines that could stably express CR6261V<sub>H</sub>, CR6261V<sub>H</sub>-GFP and CR6261scFv on the cell membrane. After influenza virus infecting the stable cell lines, the titers of viruses were tested by hemagglutination inhibition

**Received:** April 7, 2011; **Accepted:** May 12, 2011

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB504700).

**Corresponding author:** Jinghua Yan. Tel: +86-10-64807569; Fax: +86-10-64807598; E-mail: yanjh@im.ac.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB504700) 资助。

test. The result shows that the titers of viruses in CR6261scFv and CR6261V<sub>H</sub>-GFP stable expression cell lines decreased and there was no obvious discrimination between the CR6261V<sub>H</sub> expression cell line and the negative control, suggesting that CR6261V<sub>H</sub> and CR6261scFv expressing on the cell membrane could partly inhibit the virus infection. Though the effective inhibition strategy is undergoing, our research will provide new clues for the breeding of anti influenza transgenic animals.

**Keywords:** antibody CR6261, influenza virus, stable cell lines, virus infection inhibition

流感病毒曾多次引起世界大流行,每次都给社会和给人类带来巨大的灾难。1918–1919年由H1N1亚型流感病毒引起的西班牙流感大流行,其发病率为20%~40%,死亡人数达5 000万以上;1957年由H2N2亚型毒株引起的亚洲流感大流行,全世界有15亿人发病,100万人死亡;1968年由H3N2亚型毒株引起的香港流感大流行,死亡人数也达100万人;2009年的H1N1亚型流感病毒也引起了世界恐慌。因此流感病毒一直是病毒学家研究的热点。其中A型流感病毒不仅可以感染人、马和猪等哺乳动物,而且可以感染鸟类和禽类,由于基因的重组和重排以及抗原血凝素蛋白(HA)和神经氨酸酶(NA)的漂移和转变,流感病毒可以突破种间屏障实现跨种间传播<sup>[1-5]</sup>。目前有学者认为,猪是新亚型流感病毒基因重组重排的主要场所,而鸟类可以携带其传播而引起大流行<sup>[6]</sup>。高致病性禽流感致病率与禽的死亡率高达100%,仅能以消毒、隔离、大量宰杀禽畜的方法防止其蔓延;即使是低致病禽流感也给养禽业带来巨大经济损失,严重影响农业畜牧业的发展,威胁着人类的公共卫生。

HA是分布在病毒膜表面的糖蛋白,在病毒侵染细胞时起重要作用。HA蛋白的头部与细胞表面的唾液酸结合,病毒被细胞内吞。进入细胞后,HA的构象发生改变,病毒囊膜与细胞膜融合,病毒的基因组释放到细胞内。以往针对流感病毒HA的抗体其重链和轻链可变区(V<sub>H</sub>与V<sub>L</sub>)的CDR区都与HA头部结合,这个结合部位也是HA与唾液酸结合的部位,但是这个头部区是高度可变区。因此,很多抗体具有亚型特异性,不能中和多亚型的病毒<sup>[7-9]</sup>。

CR6261是近来通过噬菌体展示技术筛选出的一种中和抗体,能抵御引发H5N1型禽流感、季节

性流感和流感大流行等多种亚型的流感病毒。

CR6261能中和H1、H2、H5、H6、H8和H9亚型病毒,并且在小鼠感染H1N1与H5N1病毒3d后再注射这种抗体,小鼠仍能存活,但是它不能中和H3和H7亚型病毒<sup>[9]</sup>。Ekiert等从晶体学角度解析了CR6261抗体中和病毒的机制:CR6261的V<sub>H</sub>区和HA2的很保守的A螺旋结合,稳定了HA融合前的构象,阻止其在内吞小体低pH条件下向融合后构象的变化<sup>[10]</sup>。与以往抗体有两点不同:第一,CR6261不是结合在病毒与细胞受体作用的部位,而是与HA2中很保守的A螺旋结合;第二,CR6261抗体只有V<sub>H</sub>区与流感病毒HA发生相互作用,V<sub>L</sub>区,由于病毒HA2的Asn154残基糖基化,与病毒无任何作用。鉴于该抗体与HA保守的A螺旋结合,且抑制病毒的膜融合,因此本研究试图通过在细胞膜上表达CR6261V<sub>H</sub>或scFv,抑制病毒的膜融合过程,为抗流感家禽或家畜新品系的培育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞、菌株、质粒和病毒

人胚胎肾细胞293T,狗肾细胞MDCK为实验室保存的细胞株,在37℃、饱和湿度、5%CO<sub>2</sub>温箱中培养;细胞完全培养基为含有10%胎牛血清(FBS)的DMEM(Dulbecco's modified eagle's medium)培养基,为GIBCO产品;用于质粒转化与扩增的大肠杆菌DH5α菌株为本实验室保存;质粒pcDNA4.1与pEGFPN1为本实验室保存;反向遗传学操作系统12质粒由日本东京大学的Yoshihiro Kawaoka教授惠赠;病毒是本在本实验室利用反向

遗传操作系统 12 质粒拯救获得, HA 与 NA 为 A/Bar-headed Goose/Qinghai/1/05 (H5N1) 序列, 其余 10 质粒是 A/WSN/33 (H1N1) 序列, 命名为 WSN-QH (HA/NA)。

### 1.1.2 主要试剂

DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、dNTPs 为 TaKaRa 公司产品; 质粒提取试剂盒为北京博大泰克公司产品; 凝胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品; 转染试剂 Lipofectamine 2 000 与抗生素 Zeocin 为 INVITROGEN 公司产品; 转染试剂 PEI 为 ROCHE 公司产品; G418 抗生素 AMRESCO 公司产品; 小鼠抗 c-Myc 单克隆抗体 (Sc-40)、兔抗 GFP 多克隆抗体 (Sc-8334)、辣根过氧化物酶 (HRP) 偶联的羊抗 IgG、羊抗小鼠 IgG 为美国 Santa Cruz 生物公司产品; Western blotting 检测用 ECL 试剂盒为 AMERSHAM PHARMACIA 公司产品; 低熔点琼脂为 PROMEGA 公司产品; 所用引物由上海英骏生物技术有限公司合成; 流式细胞仪和激光共聚焦显微镜为微生物所公共仪器。

## 1.2 方法

### 1.2.1 CR6261V<sub>H</sub>与CR6261V<sub>L</sub>-linker 基因合成

从 NCBI 上得到 CR6261 的氨基酸序列, 运用 <http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html> 的软件, 反向翻译得到 CR6261V<sub>H</sub> 与 CR6261V<sub>L</sub>-linker 核苷酸序列, 由上海捷瑞生物公司合成。将合成的序列直接构建到 pMD18T 载体上, 得到克隆 pMD18T-CR6261V<sub>H</sub> 与 pMD18T-CR6261V<sub>L</sub>-linker。

### 1.2.2 重组质粒的构建

构建了 3 种带有分泌信号和跨膜区的真核表达载体 (图 1): pCR6261V<sub>H</sub>、pCR6261V<sub>H</sub>-GFP、pCR6261 scFv。CR6261V<sub>H</sub> 为抗体 CR6261 重链 V 区 1~121 位氨基酸, CR6261V<sub>L</sub> 为抗体 CR6261 轻链 V 区 1~111 位氨基酸。为了使目的蛋白能够在细胞膜上表达, 在目的基因的上游插入了分泌信号肽 (Signal peptide, SP), 在目的基因的下游插入了跨膜区 (Transmembrane domain, TM)。为了尽量不影响目的蛋白的构象, 在目的蛋白和 TM 之间插入一个柔性的铰链区 (Hinge)。

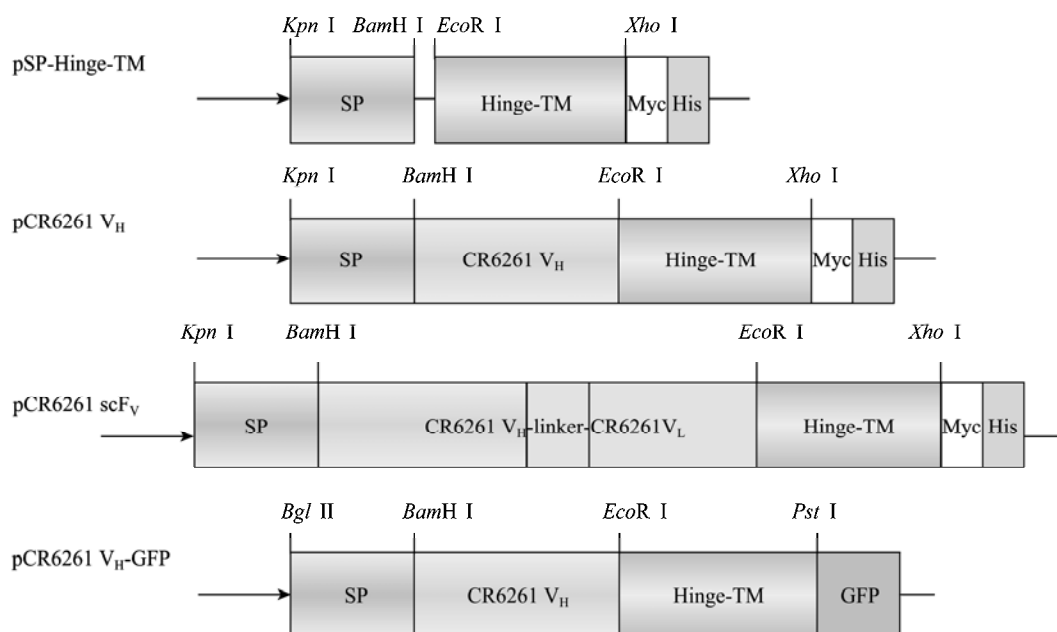


图 1 重组质粒构建示意图

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids.

质粒载体构建过程如下: 首先在载体 pcDNA 4.1 的 *Kpn* I 与 *Bam*H I 位点插入分泌信号肽 (氨基酸序列为 MGAGATGRAMDGPRLLLLLLLGVSLGGA) cDNA, 在 *Eco*R I 与 *Xho* I 位点插入铰链区 (VPRDCGCKPCICT) 和跨膜区 (LIPVYCSILAA VVVGLVAYIAFKRWNRGIL) cDNA; 获得重组质粒 pSP-Hinge-TM。然后以 pMD18T-CR6261V<sub>H</sub> 为模板, 以 F1 与 R1 为引物 PCR 扩增得到 CR6261V<sub>H</sub> 基因片段, 并插入到 pSP-Hinge-TM 质粒的 *Bam*H I 与 *Eco*R I 酶切位点中, 得到重组表达质粒 pCR6261V<sub>H</sub>。以 pMD18T-CR6261V<sub>H</sub> 和 pMD18T-CR6261V<sub>L</sub>-linker (Linker: GGGGSGGGGSGGGGS) 为模板, 分别以 F1 与 R2、F2 与 R3 为引物 PCR 扩增得到 CR6261V<sub>H</sub> 和 CR6261V<sub>L</sub>-linker, 然后通过搭桥 PCR 的方法得到目的 CR6261scFv 基因片段, 同样插入到 pSP-Hinge-TM 质粒的 *Bam*H I 与 *Eco*R I 酶切位点, 得到重组表达质粒 pCR6261scFv。以上述构建的 pCR6261V<sub>H</sub> 为模板, 以 F3 与 R4 引物, 扩增 SP-CR6261V<sub>H</sub>-Hinge-TM 基因片段, 并插入到 pEGFP-N1 载体 *Bgl* II 与 *Pst* I 位点, 获得重组质粒 pCR6261V<sub>H</sub>-GFP (所用引物见表 1)。

1.2.3 Western blotting 检测目的蛋白的表达

将 239T 细胞接种于 6 孔板中, 16~24 h 内细胞汇合度约 80% 时进行转染。转染步骤: 2 μg 质粒和 4 μL Lipofectamine 2000 分别溶于 100 μL 无

血清的 DMEM 中, 静置 5 min 后将二者混合, 再静置 20 min 后逐滴加入培养基中, 37 ℃ 培养。24 h 后收取细胞, 用 100 μL PBS 重悬细胞, 加入含 DTT 上样缓冲液, 100 ℃ 处理 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min; 进行恒压 (80 V, 30 min; 120 V, 1 h) SDS-PAGE 电泳, 恒流 (200 mA, 1.5 h) 转膜, 将蛋白样品转移到醋酸纤维膜上; 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1 h 后, 加入含一抗 (1:1 000) 的封闭液摇动 1~2 h; 用 TBST (含 0.5% Tween-20) 洗 3 次, 每次 7 min; 用含有 IgG-HRP (1:3 000) 的封闭液摇动 1 h; 用 TBST 洗 3 次, 每次 7 min; 将膜晾干, 加显色底物液于膜上, 用封口膜将膜包住放入暗盒内, 加入 X 光胶片, 进行曝光、显影和定影。

1.2.4 抗生素最佳筛选浓度的确定

将 MDCK 细胞接种于 24 孔板中, 以 24 h 后细胞的汇合度达 20% 为宜。按梯度浓度用完全培养基稀释抗生素。弃掉培养孔中的培养基, 用 PBS 洗涤细胞, 加入含抗生素的培养基, 隔 3~5 d 换一次液, 在 10~14 d 内能够杀死全部细胞的最小抗生素浓度为最佳筛选浓度。

1.2.5 稳定表达外源蛋白的真核细胞克隆的筛选

将 MDCK 细胞接种于 6 孔板中, 24 h 后细胞的汇合度约为 70% 进行转染, 方法同 1.2.3。转染 24 h 后将细胞按 1:20, 1:40, 1:80 传代, 接种于 6 cm

表 1 本研究所用的 PCR 引物  
Table 1 PCR primer used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
F1	CG <b>GGATCC</b> GAGGTGCAGCTGGTGGAG
R1	CG <b>GAATTC</b> GCTGCTCACGGTCACGGT
R2	<u>CTACCACCA</u> CCACCGCTGCTCACGGT
F2	ACCGTGAGCAGC <b>GGTGGTGGTGGTAG</b>
R3	CG <b>GAATTC</b> CAGCACGGTCAGCTTG
F3	CG <b>AGATCT</b> ACCACCATGGGGGCAGGTG
R4	TGCA <b>CTGCAG</b> CAGGATGCCCCTGTTCCAC

The enzyme restriction site is shown in bold; the nucleotide of linker is indicated with underline.

盘中。24 h 后加入抗生素, 根据细胞的生长状态, 3~5 d 换液 1 次并加入抗生素。约 20 d 后细胞大部分死亡, 出现有抗性的克隆, 挑取克隆, 加入的抗生素减半。

### 1.2.6 流式细胞分选与激光共聚焦荧光显微镜观察

用 PBS 洗涤 2 次稳定表达绿色荧光蛋白的细胞, 加入 0.25% 胰酶消化 7 min, 弃胰酶。加入 PBS 吹打成单个悬浮细胞, 用流式细胞仪进行分选, 收集 GFP 表达阳性的细胞继续培养, 并加入抗生素。

将细胞接种于铺有玻璃板的 12 孔板中, 24 h 后细胞汇合度约为 40%。用 PBS 洗涤细胞 2 次, 动作轻柔避免细胞漂浮, 加入 4% 多聚甲醛, 室温固定 15 min。将玻璃板从孔中取出, 倒置于滴有甘油的载玻片后, 用指甲油将玻璃片的四周封闭。在激光共聚焦扫描显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达情况。

### 1.2.7 病毒包装, 增殖与噬斑效价测定

将 293T 细胞与 MDCK 细胞按 4:1 混合, 接种于 6 cm 盘中, 16~24 h 后细胞的汇合度约为 80% 进行转染。反向遗传操作系统 12 质粒各 1  $\mu$ g 溶于生理盐水中, PEI 18  $\mu$ L 同样溶于生理盐水中, 使其终体积均为 250  $\mu$ L, 静置 5 min 后混合, 再静置 20 min 后逐滴加入到培养基中。4~6 h 后, 用 PBS 洗涤 2 次细胞, 换新鲜的完全培养基。16 h 后, 用 PBS 洗涤 2 次细胞, 换为不含血清的培养基, 并加入胰酶 (终浓度 12.5  $\mu$ g/mL)。72 h 收取上清再感染 MDCK, 3 d 后细胞可以看到明显的病变时收取上清, 冻存于 -70  $^{\circ}$ C。

噬斑实验: 将 -70  $^{\circ}$ C 保存的病毒用 DMEM 按照 1:100、1:1 000、1:10 000、1:100 000 的比例稀释, 加入到已接种了 MDCK 细胞的 12 孔板中, 此时细胞汇合度达到 100% 无细胞空隙时, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 加入含有 1% 低熔点琼脂的无酚红 DMEM (胰酶浓度 12.5  $\mu$ g/mL), 待琼脂冷却凝固后, 将 12 孔板倒置 37  $^{\circ}$ C 培养箱中培养。60~72 h 进行观察。若可以看到明显的噬斑则表明病毒拯救成功, 并数

噬斑个数。同时, 提取病毒 RNA, RT-PCR 扩增 M 基因。若可以成功扩增则表明病毒拯救成功, 测序进一步验证。

### 1.2.8 血凝效价测定

用 MOI 为 0.04 的病毒感染 MDCK 空细胞和稳定表达目的蛋白的细胞系, 分别设 3 组重复。在 12~60 h 内, 每隔 12 h 取样 1 次, 通过血凝滴度来判断目的基因所表达的蛋白对流感病毒侵染细胞的影响。血细胞凝集实验的步骤: 在 96 孔板中加入 25  $\mu$ L PBS, 在第 1 列加入 25  $\mu$ L 所取上清, 混匀, 吸取 25  $\mu$ L 混合液加入到第 2 列中, 混匀, 以此类推, 倍比稀释病毒液。稀释到倒数第 2 列时, 混匀弃掉 25  $\mu$ L 混合液。最后一列作为阴性对照, 不进行任何处理。然后, 每孔加入 25  $\mu$ L 1% 鸡红血细胞。相混后置于室温 30 min, 观察血细胞的凝集情况。将板直立, 若血红细胞呈泪滴状流下说明无病毒, 若血细胞弥散在整个孔中则有病毒, 将血细胞凝集的最高稀释度的倒数作为血凝效价。

## 2 结果

### 2.1 真核表达载体的构建

PCR 成功扩增出目的条带 CR6261V<sub>H</sub>、SP-CR6261-Hinge-TM 和 CR6261scFv, 大小分别为 360 bp、600 bp、760 bp 左右。双酶切载体与目的片段后, 连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。经菌液 PCR, 双酶切鉴定分别得到 3 个阳性克隆, 测序后序列正确无突变。双酶切鉴定图见图 2。

### 2.2 Western blotting 检测目的蛋白的表达

将 pCR6261V<sub>H</sub>、pCR6261V<sub>H</sub>-GFP、pCR6261scFv 分别转染 293T 细胞。Western blotting 检测转染 24 h 后基因的表达情况。pCR6261V<sub>H</sub> 与 pCR6261scFv 用 c-Myc 抗体检测, pCR6261V<sub>H</sub>-GFP 用 GFP 抗体检测, 同时设 GFP 作阳性对照。在转染的细胞中分别检测到约 21 kDa、47 kDa、34 kDa 的条带, 与预测的蛋白分子量符合, 说明基因可以在细胞内正常表达 (图 3)。

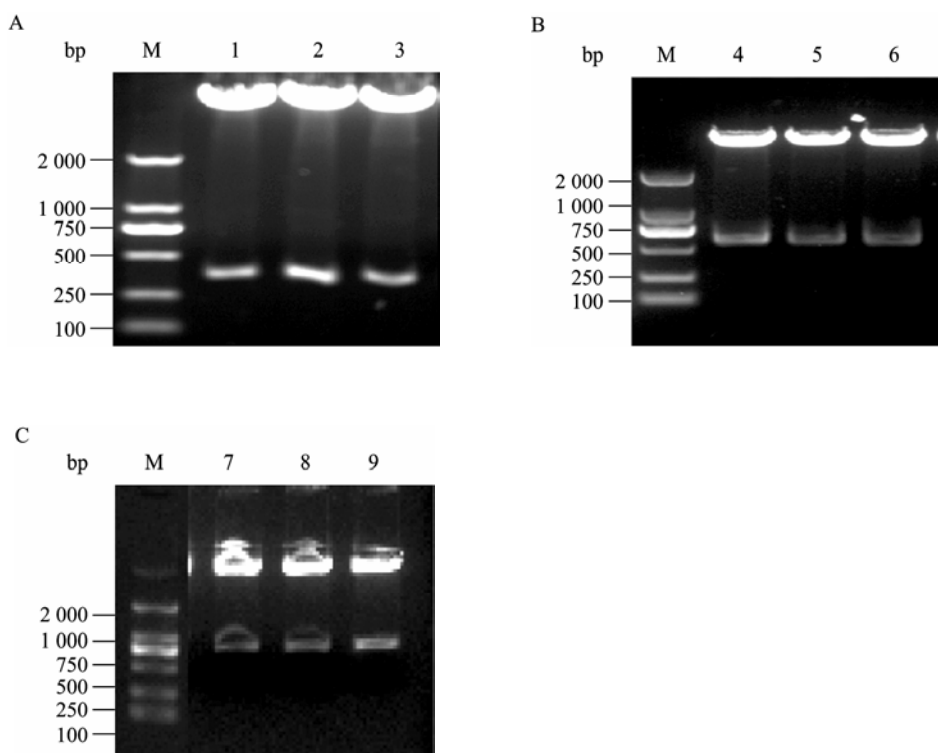


图 2 重组质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of the recombinant plasmids by enzyme digestion. (A) Recombinant plasmid pCR6261V<sub>H</sub> digested with *Bam*H I and *Eco*R I. M: marker DL2000; 1–3: three repeats. (B) Recombinant plasmid pCR6261V<sub>H</sub>-GFP digested with *Bgl* II and *Pst* I. M: marker DL2000; 4–6: three repeats. (C) Recombinant plasmid pCR6261scFv digested with *Bam*H I and *Eco*R I. M: marker DL2000; 7–9: three repeats.

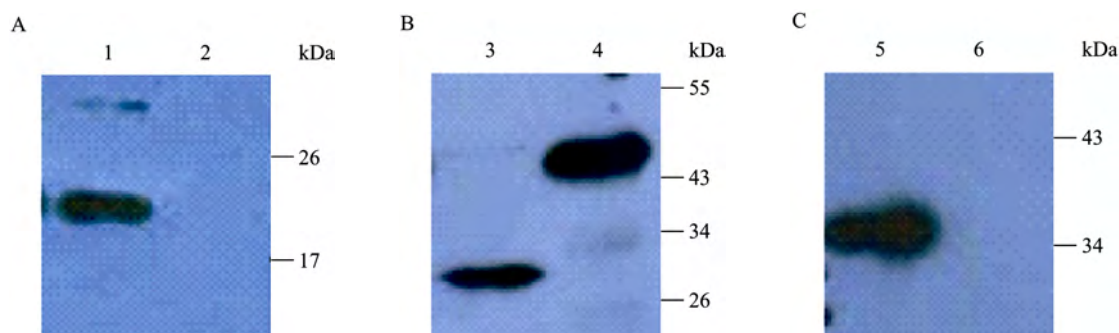


图 3 Western blotting 鉴定重组质粒的表达

Fig. 3 Western blotting identification of the recombinant plasmids expression. (A) Recombinant plasmid pCR6261V<sub>H</sub> expression. 1: CR6261V<sub>H</sub>-myc; 2: negative control; (B) Recombinant plasmid pCR6261V<sub>H</sub>-GFP expression. 3: GFP positive control; 4: CR6261V<sub>H</sub>-GFP; (C) Recombinant plasmid pCR6261scFv expression. 5: CR6261scFv-myc; 6: negative control.

### 2.3 稳定表达 CR6261V<sub>H</sub> 和 CR6261scFv 的真核细胞单克隆的筛选

在转染 pCR6261V<sub>H</sub> 和 pCR6261scFv 的 MDCK 细胞中加入 Zeocin 抗生素, 终浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$ 。在转染 pCR6261V<sub>H</sub>-GFP 和 pEGFPN1 (对照) 的 MDCK 细胞中加入 G418 抗生素, 终浓度为 2 mg/mL。3~5 d 换 1 次液, 并加入相应抗生素。在 20 d 左右时, 细胞大部分死亡, 可以看到 6 cm 培养皿底有少量的细胞。此时加入的 G418 浓度降到 1 mg/mL, Zeocin 浓度为 250  $\mu\text{g/mL}$ 。培养 7 d 左右, 挑取单克隆。用 Western blotting 检测, 6 株 pCR6261V<sub>H</sub> 单克隆细胞株有 4 株为阳性, 5 株 pCR6261V<sub>H</sub>-GFP 单克隆细胞株有 4 株为阳性 (设 GFP 为阳性对照), 6 株 pCR6261scFv 单克隆细胞株全为阳性 (图 4)。

### 2.4 流式细胞分选 pCR6261V<sub>H</sub>-GFP 与激光共聚焦荧光显微镜观察

将 pCR6261V<sub>H</sub>-GFP 转染 MDCK 细胞, 表达 CR6261V<sub>H</sub>-GFP 融合蛋白。由于 MDCK 细胞不易转染, 阳性细胞约占总细胞数的 10%, 因此, 在转染 48 h 后, 用流式细胞仪分选 GFP 阳性细胞。分选后加 G418 抗生素 (2 mg/mL) 扩大培养。

将表达 CR6261V<sub>H</sub>-EGFP 的细胞固定, 置于激光共聚焦扫描显微镜下观察: CR6261V<sub>H</sub>-EGFP 在细胞胞浆内大量表达, 同时膜上也有分布 (图 5)。

### 2.5 血凝效价测定

pEGFPN1 稳定细胞系和空 MDCK 细胞作为阴性对照。12 h、24 h、36 h、48 h、60 h 时取上清检测血凝效价。结果表明: 感染病毒后, 12 h 都检测不到血凝滴度; 与空 MDCK 细胞相比, 构建的 pCR6261V<sub>H</sub> 稳定细胞系, 病毒的平均血凝效价在 24 h 和 36 h 有差异但不甚明显; pCR6261V<sub>H</sub>-GFP 稳定细胞系在 36 h、48 h、60 h 时病毒的血凝效价降低较多, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), pCR6261scFv 稳定细胞系在 60 h 时病毒的血凝效价降低较 36 h 和 48 h 时多, 差异显著 ( $P < 0.05$ ) (图 6)。说明抗体

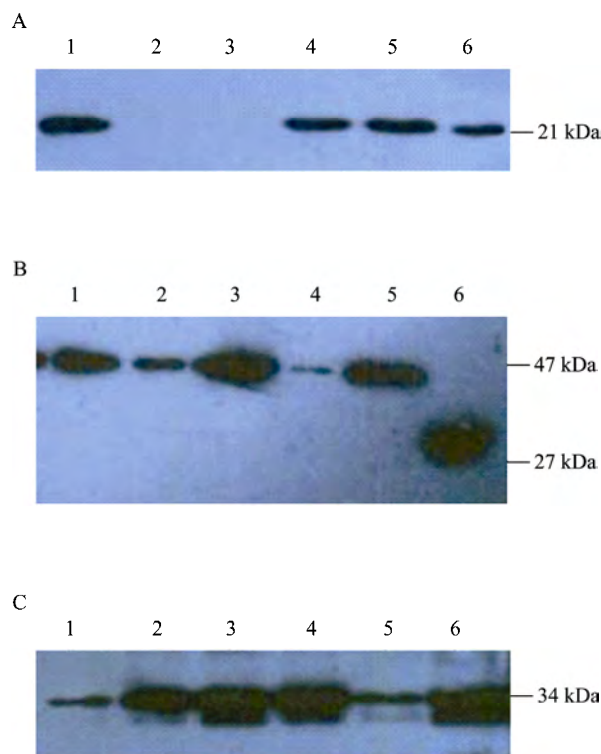


图 4 Western blotting 筛选鉴定单克隆稳定细胞系

Fig. 4 Western blotting analysis of monoclonal stable cell lines. (A) pCR6261V<sub>H</sub> monoclonal stable cell lines expression. 1, 4, 5 and 6: positive monoclonal stable cell lines; 2 and 3: negative monoclonal stable cell lines. (B) pCR6261V<sub>H</sub>-GFP monoclonal stable cell lines expression. 1, 2, 3 and 5: positive monoclonal stable cell lines; 4: negative monoclonal stable cell lines; 6: GFP positive control. (C) pCR6261scFv monoclonal stable cell lines expression. 1-6: positive monoclonal stable cell lines.

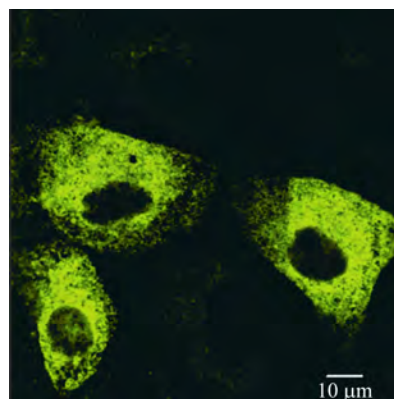


图 5 CR6261V<sub>H</sub>-GFP 蛋白在细胞中的定位

Fig. 5 Protein CR6261V<sub>H</sub>-GFP localization in MDCK cell.

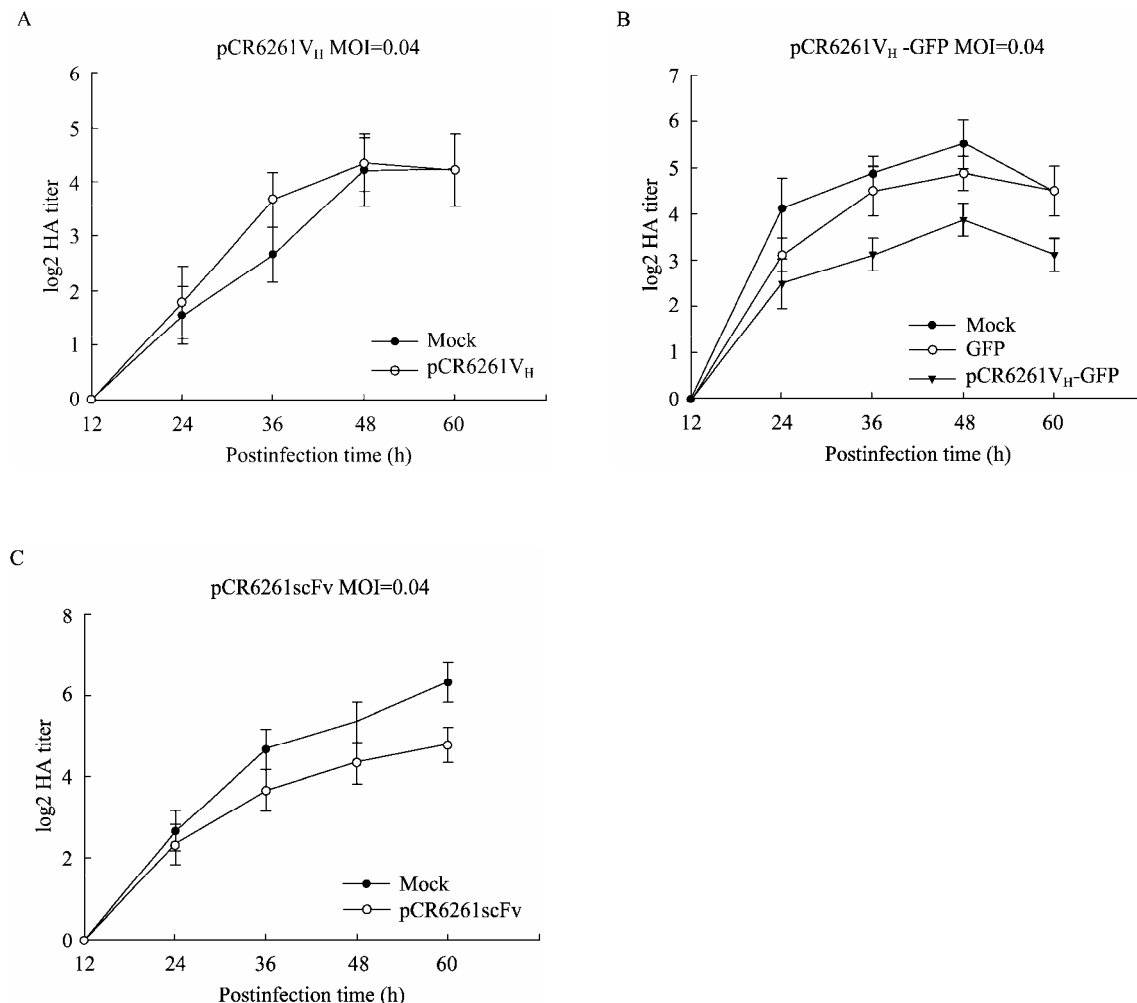


图6 病毒感染不同单克隆稳定细胞系后的血凝效价

Fig. 6 Hemagglutination test of monoclonal stable cell line after virus infection. (A) pCR6261V<sub>H</sub> monoclonal stable cell line and MDCK. (B) pCR6261V<sub>H</sub>-GFP monoclonal stable cell line, GFP polyclonal stable cell line and MDCK. (C) pCR6261scFv monoclonal stable cell line and MDCK.

CR6261V<sub>H</sub> 和 CR6261scFv 在细胞膜上稳定表达时, 对流感病毒侵染细胞有一定的抑制作用, 但抑制程度有限。

### 3 讨论

一直以来, 针对流感病毒的抗体和药物都是生物医药的热点。常用的抗流感病毒药物, 如金刚烷胺、扎那米韦和奥塞米韦, 很容易诱发出耐药株并且有较大的毒副作用<sup>[11-14]</sup>。此外, 由于流感病毒血清型众多, 变异的速度较快, 造成疫苗的制备一直

处于被动状态<sup>[7-9]</sup>。因此, 寻找一种理想的能中和多种亚型的疫苗或抗体迫在眉睫。

血凝素蛋白 (HA), 是流感病毒的 RNA4 编码的一种糖蛋白, 以三聚体的形式存在于病毒囊膜表面。HA 的变异较大, 目前有 16 个亚型, 不同亚型或同种亚型的不同分离株之间均存在明显的差异。HA 在细胞内最初合成时是以无感染能力的 HA0 存在, 随后在胰蛋白酶的作用下裂解为 HA1 和 HA2, 才能发挥作用。HA1 的头部识别和结合宿主细胞膜上的唾液酸受体, 然后通过受体介导的细胞内吞作用, 病

毒以内吞小体的方式进入细胞；在细胞中，内吞小体的 pH 值在不断降低。在低 pH 条件下，HA1 和 HA2 之间的相互作用力发生变化，HA2 亚基上的在各亚型中都非常保守的 A 螺旋从 HA 分子内部向远侧末端的方向弹射出来，插入到内吞体膜内，拉近了病毒囊膜和内吞体膜并启动了膜融合<sup>[15-16]</sup>。有动物实验表明 CR6261 在预防和治疗 H5N1 和 H1N1 方面效果显著，更胜过奥塞米韦<sup>[17-18]</sup>。从解析的晶体结构来看，恰好是抗体 CR6261V<sub>H</sub> 区与 A 螺旋结合而阻止了膜融合<sup>[10]</sup>。

相关文献报道，一种非中和的抗 HIV gp41 的抗体，经过重新构建后带有跨膜区表达在 CD4 T 细胞膜上。改造后的抗体，在 HIV 侵染细胞时，就与病毒膜蛋白结合，显著抑制膜融合<sup>[19-20]</sup>。HIV 在侵染细胞时就发生病毒膜与细胞膜的融合，而流感病毒是在内吞小体内发生膜融合，药物不易进入，因此在细胞膜上表达针对膜融合的抗体一方面可以抑制病毒与细胞的膜融合过程，另一方面抗体可能在细胞内表达与 HA 蛋白结合，影响 HA 的转运及病毒包装。

本实验成功构建了 CR6261V<sub>H</sub> 或 CR6261scFv 稳定细胞系，在激光共聚焦显微镜下可以观察到目的蛋白表达在细胞膜上。若只有 V<sub>H</sub> 或 scFv 就可以中和病毒，那么病毒靠近细胞膜时，CR6261V<sub>H</sub> 或 CR6261scFv 就会结合 HA2 的 A 螺旋，即使被细胞内吞，在内吞小体内 HA 的构象也无法发生变化，那么病毒基因组就不能释放到细胞内，病毒的增殖受到了抑制。实验结果表明：稳定表达 CR6261scFv 和 CR6261V<sub>H</sub>-GFP 细胞系能够降低病毒的血凝效价，表达 CR6261V<sub>H</sub> 细胞系血凝效价与对照无显著差异。分析原因：一方面如果仅表达 CR6261 抗体的 V<sub>H</sub> 区，可能会影响蛋白的正确构象，降低与 HA 蛋白的亲和力；另一方面，尽管带有分泌信号肽和跨膜区但膜分布效果不明显。因此，CR6261scFv 的表达尽管对病毒有一定的抑制作用，但效果仍不理想。

## REFERENCES

- [1] Schäfer JR, Kawaoka Y, Bean WJ, et al. Origin of the pandemic 1957 H2 influenza A virus and the persistence of its possible progenitors in the avian reservoir. *Virology*, 1993, 194(2): 781-788.
- [2] Reid AH, Fanning TG, Hultin JV, et al. Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(4): 1651-1656.
- [3] Kawaoka Y, Krauss S, Webster RG. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*, 1989, 63(11): 4603-4608.
- [4] Bean WJ, Schell M, Katz J, et al. Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts. *J Virol*, 1992, 66(2): 1129-1138.
- [5] Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 2009, 459(7249): 931-939.
- [6] Liu J, Xiao H, Lei F, et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. *Science*, 2005, 309(5738): 1206.
- [7] Okuno Y, Isegawa Y, Sasao F, et al. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains. *J Virol*, 1993, 67(5): 2552-2558.
- [8] Kashyap AK, Steel J, Oner AF, et al. Combinatorial antibody libraries from survivors of the Turkish H5N1 avian influenza outbreak reveal virus neutralization strategies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(16): 5986-5991.
- [9] Throsby M, van den Brink E, Jongeneelen M, et al. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM<sup>+</sup> memory B cells. *PLoS One*, 2008, 3(12): e3942.
- [10] Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science*, 2009, 324(5924): 246-251.
- [11] Beigel J, Bray M. Current and future antiviral therapy of severe seasonal and avian influenza. *Antiviral Res*, 2008, 78(1): 91-102.
- [12] Lowen AC, Palese P. Influenza virus transmission: basic science and implications for the use of antiviral drugs

- during a pandemic. *Infect Disord Drug Targets*, 2007, 7(4): 318–328.
- [13] Kiso M, Mitamura K, Sakai-Tagawa Y, et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet*, 2004, 364(9436): 759–765.
- [14] Bright RA, Shay DK, Shu B, et al. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA*, 2006, 295(8): 891–894.
- [15] Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56(1): 365–394.
- [16] Wang XJ, Zhang WH, Wang M, et al. The molecular mechanism of enveloped virus-cell membrane fusion. *Prog Biochem Biophys*, 2004, 31(6): 482–490.
- 王晓佳, 张卫红, 汪明, 等. 囊膜病毒膜融合的分子机制. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 31(6): 482–490.
- [17] Friesen RHE, Koudstaal W, Koldijk MH, et al. New class of monoclonal antibodies against severe influenza: prophylactic and therapeutic efficacy in ferrets. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9106.
- [18] Koudstaal W, Koldijk MH, Brakenhoff JPJ, et al. Pre- and postexposure use of human monoclonal antibody against H5N1 and H1N1 influenza virus in mice: viable alternative to oseltamivir. *J Infect Dis*, 2009, 200(12): 1870–1873.
- [19] Lee SJ, Garza L, Yao J, et al. A nonneutralizing anti-HIV-1 antibody turns into a neutralizing antibody when expressed on the surface of HIV-1 susceptible cells: a new way to fight HIV. *J Immunol*, 2004, 173(7): 4618–4626.
- [20] Liu F, Kumar M, Ma Q, et al. Human single-chain antibodies inhibit replication of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2005, 21(10): 876–881.