

• 生物技术与方法 •

## 登革病毒血清型特异单克隆抗体的制备和鉴定

刘杨<sup>1,2</sup>, 张元<sup>2,5</sup>, 魏艳秋<sup>2</sup>, 贾晓娟<sup>4</sup>, 陈启军<sup>1</sup>, 刘文军<sup>2,3</sup>, 杨利敏<sup>2</sup>

1 沈阳农业大学, 辽宁 沈阳 110866

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

3 中国科学院大学, 北京 100049

4 中国科学院微生物研究所 生物安全三级实验室, 北京 100101

5 安徽大学, 安徽 合肥 230601

刘杨, 张元, 魏艳秋, 等. 登革病毒血清型特异单克隆抗体的制备和鉴定. 生物工程学报, 2020, 36(10): 2206–2215.

Liu Y, Zhang Y, Wei YQ, et al. Development and characterization of serotype-specific monoclonal antibodies against Dengue virus NS1. Chin J Biotech, 2020, 36(10): 2206–2215.

**摘要:** 登革病毒 (Dengue virus, DENV) 是全球传播最为广泛的虫媒病毒, 由于缺乏快速鉴别感染病毒血清型的诊断技术, 导致异型交叉感染引起重症登革出血热病例居高不下。为实现免疫学方法快速鉴别诊断不同血清型 DENV 感染, 本研究采用哺乳动物细胞 293T 表达并纯化了 4 种 DENV 血清型 NS1 蛋白, 免疫小鼠后通过杂交瘤技术制备了针对 NS1 蛋白的单克隆抗体。利用酶联免疫吸附方法 (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、间接免疫荧光法 (Indirect immunofluorescence assay, IFA)、免疫斑点杂交试验 (Dot blotting) 以及蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 确认所制备的单克隆抗体能够有效识别天然病毒 NS1 以及重组 NS1 蛋白。获得的单克隆抗体包含 2 株可识别 1–4 型 DENV NS1 蛋白的通用型抗体及 3 株分别针对 DENV-1、DENV-2 和 DENV-4 的血清型特异抗体。以所制备的 DENV NS1 抗体为基础, 采用双抗体夹心 ELISA 可快速鉴别不同血清型 DENV。DENV 血清型特异单克隆抗体的制备和甄别 DENV 血清型 ELISA 方法的建立为快速鉴别感染 DENV 血清型的临床诊断奠定了基础。

**关键词:** 登革病毒, NS1 蛋白, 单克隆抗体, 血清型特异

**Received:** March 12, 2020; **Accepted:** April 9, 2020

**Supported by:** National Key Research and Development Program of China (Nos. 2018YFC1200602, 2018YFC1200502), National Key Technologies Research and Development Program of China (Nos. 2016ZX10004222-006, 2018ZX10734-404).

**Corresponding authors:** Limin Yang. Tel: +86-10-64807503; E-mail: lmyang@im.ac.cn

Wenjun Liu. Tel: +86-10-64807497; E-mail: liuwj@im.ac.cn

国家重点研发计划 (Nos. 2018YFC1200602, 2018YFC1200502), 国家科技重大专项 (Nos. 2016ZX10004222-006, 2018ZX10734-404) 资助。

网络出版时间: 2020-04-23

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.q.20200423.1117.002.html>

# Development and characterization of serotype-specific monoclonal antibodies against Dengue virus NS1

Yang Liu<sup>1,2</sup>, Yuan Zhang<sup>2,5</sup>, Yanqiu Wei<sup>2</sup>, Xiaojuan Jia<sup>4</sup>, Qijun Chen<sup>1</sup>, Weijun Liu<sup>2,3</sup>, and Limin Yang<sup>2</sup>

1 Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China

2 Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

4 The Biological Safety Level-3 (BSL-3) Laboratory of Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

5 Anhui University, Hefei 230601, Anhui, China

**Abstract:** Dengue virus (DENV) is the most widely transmitted arbovirus in the world. Due to the lack of diagnostic technology to quickly identify the virus serotypes in patients, severe dengue hemorrhagic fever cases caused by repeated infections remain high. To realize the rapid differential diagnosis of different serotypes of DENV infection by immunological methods, in this study, four DENV serotype NS1 proteins were expressed and purified in mammalian cells. Monoclonal antibodies (MAbs) against NS1 protein were obtained by hybridoma technology after immunizing BALB/c mice. Enzyme-linked immunosorbent assay, indirect immunofluorescence assay, dot blotting, and Western blotting were used to confirm the reactivity of MAbs to viral native NS1 and recombinant NS1 protein. These MAbs include not only the universal antibodies that recognize all DENV 1–4 serotype NS1, but also serotype-specific antibodies against DENV-1, DENV-2 and DENV-4. Double antibody sandwich ELISA was established based on these antibodies, which can be used to achieve rapid differential diagnosis of serotypes of DENV infection. Preparation of DENV serotype-specific MAbs and establishment of an ELISA technology for identifying DENV serotypes has laid the foundation for the rapid diagnosis of DENV clinical infection.

**Keywords:** Dengue virus, NS1 protein, monoclonal antibody, serotype-specific

登革病毒 (Dengue virus, DENV) 属于黄病毒科黄病毒属, 通过埃及伊蚊和白纹伊蚊传播, 是世界上传播最广泛的虫媒病毒之一<sup>[1-3]</sup>。病毒在热带及亚热带地区广泛流行, 据统计约 128 个国家和地区感染过 DENV, 且每年约 3.9 亿人被感染<sup>[4-5]</sup>。随着经济全球化进程的推进、旅游业规模的不断扩张以及全球气候变暖的影响, 埃及伊蚊或白纹伊蚊的宜居地不断扩大, 感染 DENV 的区域和人群数量也在逐年攀升<sup>[6]</sup>。由于缺乏理想的抗病毒药物以及疫苗, 登革热成为东南亚旅行者感染的主要疾病之一, 已经被世界卫生组织视为热带及亚热带地区的重大公共卫生问题<sup>[7-9]</sup>。

DENV 是单股正链 RNA 病毒。根据抗原性差异可分为 4 种血清型 (DENV-1、DENV-2、DENV-3、DENV-4), 其中 2 型流行最广泛<sup>[10]</sup>。初期感染 DENV 后可能引起典型登革热 (Dengue

fever, DF) 症状, 如发烧、头痛、斑丘疹和淋巴结肿大, 在免疫力良好的状态下, 通常可以治愈。在某些特殊情况下, 如二次异型感染或儿童老人免疫低下时可导致登革出血热 (Dengue hemorrhagic fever, DHF) 和登革休克综合征 (Dengue shock syndrome, DSS)<sup>[11-12]</sup>。初次感染者会对所感染的对应血清型病毒产生终身免疫力<sup>[13]</sup>, 但 DENV 存在“抗体依赖性感染增强” (Antibody-dependent enhancement, ADE) 机制, 造成早期感染过 DENV, 继发感染异种血清型病毒时更容易引起重症登革热<sup>[14-16]</sup>。并且 90% 的重症登革热受害者大都是 15 岁以下的儿童, 这给家庭和社会造成了巨大的心理和经济负担<sup>[17]</sup>。

DENV 基因组编码 3 种结构蛋白, 即包膜蛋白 (Envelope, E)、膜蛋白 (Membrane, M) 和衣壳蛋白 (Capsid, C) 以及 7 种非结构蛋白 (NS1、

NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5)。NS1 是非结构蛋白中唯一可以分泌到胞外的糖蛋白，是 DENV 重要的致病因子，在基因组复制、病毒组装以及免疫逃逸中均发挥重要作用<sup>[18]</sup>。研究证明感染后发病第一天即可在血清中检测到 NS1，因此 NS1 被用作检测 DENV 感染的最重要靶标<sup>[19]</sup>。考虑到 ADE 反应，针对二次感染患者，尽早确认所感染的病毒血清型，制定治疗方案，对于防止出现重症登革出血热具有重要意义。目前已上市的 DENV 血清学检测产品均无法区分所感染的病毒血清型，尽管荧光定量 PCR 产品可以区分，但由于能够开展荧光 PCR 检测的实验室仅局限于少数高级别医院，而登革热高发区域多处于不发达地区。免疫学检测技术，如 ELISA、胶体金免疫层析技术 (Immune colloidal gold technique, GICT) 等，具有成本低廉且便于操作的优势，因此能够区分病毒血清型的免疫学检测技术更适合当前的实际需求。

本研究采用 293T 细胞表达 1-4 型 DENV NS1 重组蛋白，经亲和层析纯化后免疫 BALB/c 小鼠，制备了多株抗 DENV-NS1 通用型及血清特异型单克隆抗体。我们首次筛选到 3 株能够特异识别单一血清型的抗体，基于这些抗体的 ELISA 方法能够有效鉴别感染 DENV 的血清型，为感染后快速确认临床治疗方案和进一步研究 NS1 的功能奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒、病毒和蛋白

白纹伊蚊细胞 C6/36 细胞、人肾上皮细胞 HEK293T 细胞、小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 细胞、真核表达载体 pcDNA3.1 质粒均由本实验室保存，4 种血清型 DENV 毒株由本实验室保存，分别为 Dengue virus 1 Nauru/West Pac/1974, P17763; Dengue virus 2 Puerto Rico/PR159-S1/1969, P12823; Dengue virus 3 Singapore/8120/1995,

Q5UB51; Dengue virus 4 Thailand/0348/1991, Q2YHF0。黄热病毒 (Yellow fever virus, YFV)、寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV)、西尼罗病毒 (West Nile virus, WNV)、蜱传脑炎病毒 (Tick-borne encephalitis virus, TBEV) 和日本脑炎病毒 (Japanese encephalitis virus, JEV) 重组 NS1 蛋白由本实验室制备并保存 (分别含有 5 个病毒 NS1 编码基因的原核表达质粒 pET-32a/YFVNS1 (GenBank:JX949181)、pET-32a/ZIKVNS1 (GenBank:KX266255.1)、pET-32a/WNVNS1 (GenBank:JX015523.1)、pET-32a/TBEVNS1 (GenBank:KJ922515)、pET-32a/JEVNS1 (GenBank:NC\_001437.1)，转化大肠杆菌 BL21(DE3)，经 IPTG 诱导表达、镍离子金属螯合亲和层析获得)。

#### 1.1.2 主要试剂

DMEM 细胞培养基、RPMI 1640 细胞培养基、胎牛血清 (Fetal bovine serum, FBS) 均为美国 Gibco 公司产品；大肠埃希菌 TOP10 感受态细胞为本实验室保存；限制性内切酶 *Not* I、*Xba* I 及 T4 DNA 连接酶购自大连宝生物工程有限公司；TMB 底物显色液、质粒大提试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒均购自北京天根生化科技有限公司；LinKine<sup>TM</sup> HRP 偶联试剂盒购自武汉艾美捷公司；96 孔酶标板购自上海源叶生物科技有限公司；Protein A 亲和层析柱、Ni-NTA His Bind Resin 购自北京全式金生物技术有限公司；辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗鼠 IgG 购自达科为生物技术有限公司；小鼠抗 6×His 标签单克隆抗体购自北京博奥瑞京科技发展有限公司；弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma 公司；Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。

#### 1.1.3 实验动物

6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司。

#### 1.1.4 细胞及病毒培养

复苏 C6/36 细胞，在含有 10% FBS 1640 培养

基中, 28 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待长成单层细胞后, 分别接种 4 种血清型 DENV, 吸附 1 h 后, 弃去培养基, 换至含 1% FBS RPMI 1640 培养基继续培养, 4–5 d 后细胞病变达顶峰时, 反复冻融后收集病毒液, -80 °C 保存备用。复苏 293T 细胞, 在含有 10% FBS DMEM 细胞培养基中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养至对数期。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 真核表达载体的构建与表达

DENV 的 4 种血清型 NS1 蛋白基因序列 (DENV-1, GenBank: KX452065.1; DENV-2, GenBank: KX452045; DENV-3, GenBank: AB189127.1; DENV-4, GenBank: AY858049.1), 序列经密码子优化并在 C 端加入 6×His 标签后由苏州金唯智生物科技有限公司进行人工合成。四种目的基因再经 *Not I*/*Xba I* 双酶切后克隆至具有相同酶切位点的 pcDNA3.1 载体, 构建重组表达载体。转化 TOP10 感受态细胞, 涂板后, 挑取单菌落进行菌液 PCR 及双酶切进行鉴定。将经鉴定结果为阳性的送至北京博迈德生物技术有限公司进行测序。测序结果正确的质粒采用脂质体转染法, 分别瞬时转染至对数期生长的 293T 细胞中 (Lipofectamine 2000 与质粒混合物, 2.5 μL/μg), 进行少量表达并验证, 同时设转染 pcDNA3.1 空白质粒的细胞为阴性对照。转染 48 h 后, 使用小鼠抗 6×His 标签单克隆抗体对转染的重组表达质粒进行 Western blotting 鉴定。

### 1.2.2 1–4 型 DENV 重组 NS1 蛋白的制备

将正确表达的质粒分别转染 293T 细胞进行大量表达, 以收获蛋白。细胞转染 72 h 后, 细胞破碎后 1 300 r/min 离心 10 min 去除细胞沉淀, 经 0.22 μm 滤膜过滤并使用 10 kDa 超滤浓缩管进行浓缩。通过 AKTA FPLC 蛋白层析仪先后进行镍离子金属螯合层析及 Superdex 75 分子筛层析纯化, 收集目标蛋白峰, SDS-PAGE 鉴定蛋白纯度。

### 1.2.3 小鼠免疫

纯化后的 DENV 1–4 型重组 NS1 蛋白等量混

合后作为免疫原, 以 60 μg/每只的剂量与弗氏佐剂乳化注射到 6 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠背颈部皮下多点区域, 接种 6 只小鼠。每 2 周加强免疫一次, 共免疫 4 次, 第四次免疫后 7 d, 小鼠尾尖采少量血, 通过间接 ELISA 测定免疫小鼠效价, 对抗体效价最高的小鼠进行冲击免疫, 腹腔注射免疫原, 100 μg/每只。3 d 后, 小鼠断颈处死取脾细胞。

### 1.2.4 杂交瘤细胞的融合与筛选

将脾细胞与 SP2/0 细胞以 1:5 的比例采用 PEG 法进行融合。融合后细胞用半固体培养基(含 HAT)进行筛选培养。期间通过间接 ELISA 方法对挑选的克隆进行多次筛选, 直至筛选出阳性结果。

### 1.2.5 DENV NS1 单克隆抗体制备与鉴定

将筛选到的阳性克隆细胞在 10% FBS 1640 培养基、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中大量培养。待细胞生成至对数期时进行细胞计数, 以 10<sup>6</sup>/只、0.5 mL/只的剂量腹腔注射到被石蜡致敏的小鼠中, 待小鼠腹部膨大时收获腹水。利用 Protein A 亲和层析柱纯化腹水得到单抗, SDS-PAGE 鉴定单抗纯度。

### 1.2.6 间接 ELISA

用包被液分别稀释 1–4 型重组 DENV-NS1 蛋白、黄热病毒 NS1 蛋白、寨卡病毒 NS1 蛋白、西尼罗病毒 NS1 蛋白、蜱传脑炎病毒 NS1 蛋白、日本脑炎病毒 NS1 蛋白, 使其终浓度为 2 μg/mL, 100 μL/孔, 4 °C, 过夜包被; 洗液 PBST 洗涤 3 次; 3% BSA 封闭液封闭, 200 μL/孔; 37 °C 温箱孵育 2 h; 洗液 PBST 洗涤 3 次; 一抗(抗 NS1 单抗)、阴性对照(未免疫小鼠血清), 均为 100 μL/孔, 37 °C 温箱孵育 1 h; 用洗液 PBST 洗涤 3 次; 山羊抗鼠 IgG 作为二抗(1:5 000), 100 μL/孔, 37 °C 温箱孵育 1 h; 洗液 PBST 洗涤 3 次; 显色液 TMB 100 μL/孔, 避光显色 10 min 左右, 最后每孔加入 50 μL 终止液进行终止。酶标仪读取 450 nm 处吸收值。

### 1.2.7 间接免疫荧光试验

将 C6/36 细胞铺至 24 孔板中, 约 12 h 后细

胞密度达到 80% 后感染 1-4 型 DENV, 同时设置未感染细胞作为空白对照。待细胞出现轻微病变后, 用预冷的 ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 4% 多聚甲醛室温固定 10 min; 用 PBST 洗 3 遍; 5% BSA,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 封闭 1 h; 加入一抗 (纯化后腹水)  $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ,  $100\text{ }\mu\text{L/孔}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育 2 h; PBST 洗 3 遍; 避光加入 FITC 标记的羊抗鼠 IgG ( $1:5\ 000$ ),  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光孵育 1 h; 用 PBST 洗 3 遍后 (注意避光) 在荧光显微镜下检测。

### 1.2.8 蛋白免疫印迹试验

将制备的 1-4 型重组 DENV-NS1 蛋白经 SDS-PAGE 后转至 PVDF 膜后在含有 1% BSA、5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 2 h。制备的 DENV 单抗 ( $1:1\ 000$ ) 作为一抗  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠 IgG 作为二抗 ( $1:5\ 000$ ) 室温孵育 45 min, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 最后使用底物显色试剂盒显影。

### 1.2.9 斑点杂交试验

C6/36 细胞感染 1-4 型 DENV, 同时设置未感染细胞作为空白对照。待病变后加入裂解缓冲液收集病毒液, 并将其滴在硝酸纤维素膜上, 静置 2 min 后至 1% BSA 封闭 2 min。在含有一抗、二抗混合液 (DENV 单抗作为一抗  $1:1\ 000$ , HRP 标记山羊抗鼠 IgG 作为二抗  $1:5\ 000$ ) 中孵育 10 min, 用 TBST 洗 3 次, 每次 2 min, 最后使用底物显色试剂盒显影。

### 1.2.10 双抗体夹心 ELISA 检测感染血清

以筛选获得的通用型单抗包被酶标板, 将通用型和血清型特异单抗标记辣根过氧化物酶, 具体标记方法参照产品说明书 (LinKine<sup>TM</sup> HRP 试剂盒), 分别建立可检测 4 种血清型 DENV 和可特

异检测 DENV-1、DENV-2 和 DENV-4 的双抗体夹心 ELISA 方法。采集分别感染 4 种血清型 DENV 后 3 d 的免疫缺陷小鼠 AG129 血清以及未感染病毒的对照小鼠血清, 用 RT-PCR 鉴定阳性后, 用建立的 ELISA 方法进行鉴定。

## 2 结果与分析

### 2.1 1-4 型 DENV 重组质粒构建及表达

四种血清型的 DENV NS1 蛋白编码基因人工合成后克隆至真核载体 pcDNA3.1, 构建重组表达质粒。对构建成功的 4 种质粒 pcDNA3.1-NS1-DENV1、pcDNA3.1-NS1-DENV2、pcDNA3.1-NS1-DENV3、pcDNA3.1-NS1-DENV4 以及对照空载体 pcDNA3.1 分别转染 293T 细胞后, 对细胞总蛋白进行 Western blotting 表达验证, 结果 (图 1) 显示, 转染 4 种重组质粒的 293T 细胞在 48 kDa 处有一条特异性条带, 与 DENV 的 NS1 蛋白大小一致。然而转染空载体 pcDNA3.1 的 293T 细胞 (Control) 没有条带。表明构建的 4 种质粒均已正确表达。

### 2.2 1-4 型 DENV 重组 NS1 蛋白纯化

将 4 个正确表达质粒分别转染 293T 细胞进行大量表达后, 收集并离心得 300 mL 细胞上清, 浓缩后经亲和层析和分子筛层析纯化, 获得纯化的目的蛋白。蛋白经 SDS-PAGE (图 2) 验证, 结果显示目的蛋白在 48 kDa 有表达, 且条带单一, 与预期大小一致。

### 2.3 DENV NS1 单克隆抗体制备

小鼠脾细胞与 SP2/0 细胞融合后用半固体培养基 (含 HAT) 进行筛选培养。期间通过间接

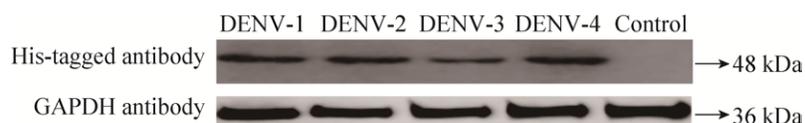


图 1 Western blotting 检测 4 种重组质粒在 293T 细胞中表达

Fig. 1 Western blotting analysis of the expression of four recombinant plasmids in 293T cells.

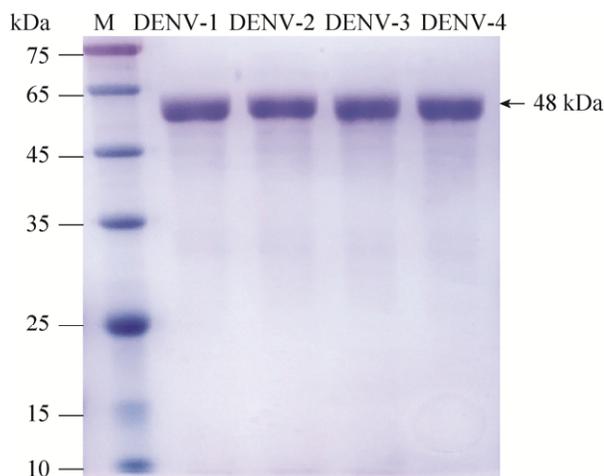


图 2 四种血清型 DENV 纯化重组 NS1 蛋白 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 2 Identification of the purified recombinant NS1 proteins of DENV 1-4 by SDS-PAGE.

ELISA 方法对挑选的克隆进行多次筛选, 共筛选出 30 株阳性杂交瘤细胞株, 优选其中 5 株进行后续试验, 分别是 1A3、3E9、10D8、12C2、13B11。然后将这些阳性克隆细胞培养至对数期后注射到小鼠腹腔制备腹水。利用 Protein A 亲和层析柱对腹水进行纯化, 经 SDS-PAGE 鉴定, 结果显示, 纯化后单抗均表现为 2 条蛋白条带, 分子量大小分别为 48 kDa 和 25 kDa, 与抗体的重链和轻链大小相符合 (图 3)。

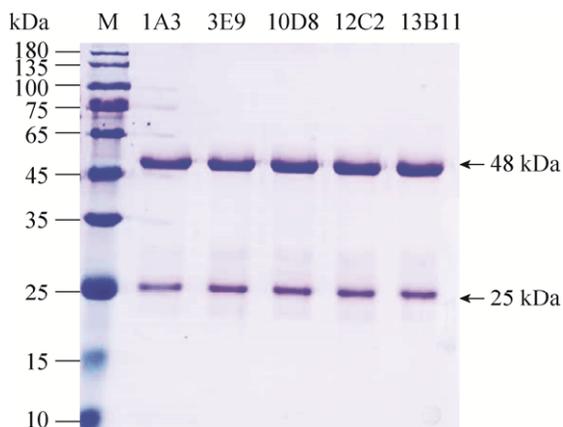


图 3 SDS-PAGE 鉴定 5 株纯化 DENV NS1 单抗

Fig. 3 Identification of five purified MAbs against DENV-NS1 by SDS-PAGE.

## 2.4 单克隆抗体效价及特异性验证

以梯度稀释的纯化抗体和未免疫小鼠血清分别作为一抗, 利用间接 ELISA 方法测定单克隆抗体效价。结果显示, 抗体 1A3 和 3E9 对 1-4 型 DENV NS1 蛋白均有较高的反应性, 抗体效价均达到 1:640 000; 抗体 12C2 只针对 DENV-1 型 NS1 蛋白有较高的反应性, 抗体效价达到 1:320 000; 抗体 13B11 只针对 DENV-2 型 NS1 蛋白有较高的反应性, 抗体效价达到 1:640 000; 抗体 10D8 只针对 DENV-4 型 NS1 蛋白有较高的反应性, 抗体效价达到 1:640 000 (图 4)。并且结果显示, 制备的单抗与其他黄病毒属病毒寨卡病毒、黄热病毒、日本脑炎病毒、蝉传脑炎病毒、西尼罗病毒 NS1 蛋白均无交叉反应, 表明制备的抗体对 DENV 具有良好的特异性。

除此之外, 通过蛋白质免疫印迹试验 (重组蛋白) (图 5) 以及蛋白免疫斑点杂交试验 (天然病毒蛋白) (图 6) 来验证单克隆抗体的特异性。结果显示, 1A3、3E9 抗体对 1-4 型 DENV 病毒蛋白均有反应, 12C2 抗体只针对 DENV-1 型病毒蛋白有特异性, 13B11 抗体只针对 DENV-2 型病毒蛋白有特异性, 10D8 抗体只针对 DENV-4 型病毒蛋白有特异性, 与间接 ELISA 试验结果一致, 证明了获得的单抗可以特异识别天然及重组靶蛋白。

## 2.5 间接免疫荧光试验

间接免疫荧光试验 (IFA) 结果显示, 制备的单抗可与感染 DENV 的 C6/36 细胞产生特异性反应, 在细胞浆中有明显的红色荧光 (图 7)。其中抗体 1A3 和 3E9 对 1-4 型 DENV 均有较高的活性; 抗体 12C2 只针对 DENV-1 型有较高的活性; 抗体 13B11 只针对 DENV-2 型有较高的活性; 抗体 10D8 只针对 DENV-4 型有较高的活性; 而未感染病毒的对照组均未出现红色荧光, 表明这 5 种单抗能够与天然病毒蛋白结合。

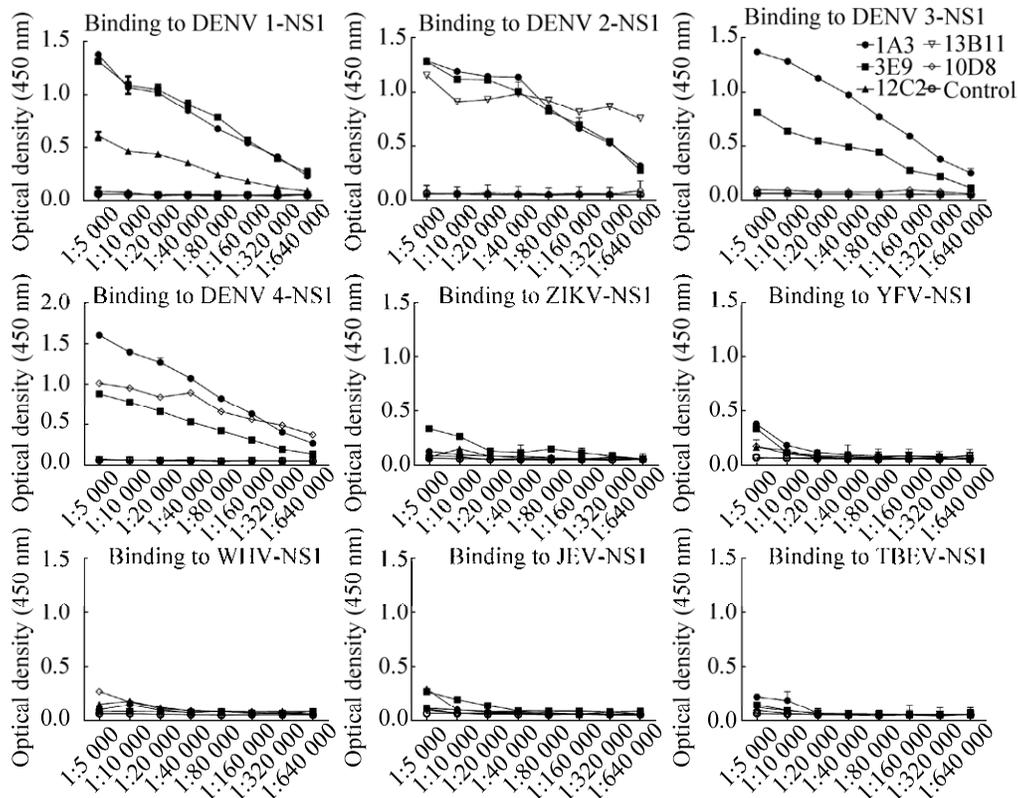


图 4 间接 ELISA 鉴定 5 株单抗特异性

Fig. 4 Binding of MAbs to diverse flavivirus rNS1 proteins determined by indirect ELISA. A variety of rNS1 of DENV 1–4, ZIKV, YFV, WNV, TBEV, JEV were coated separately, and then confirmed their response to MAbs (1A3, 3E9, 10D8, 12C2 and 13B11). These MAbs showed specificity for reactivity to DENV rNS1 only.

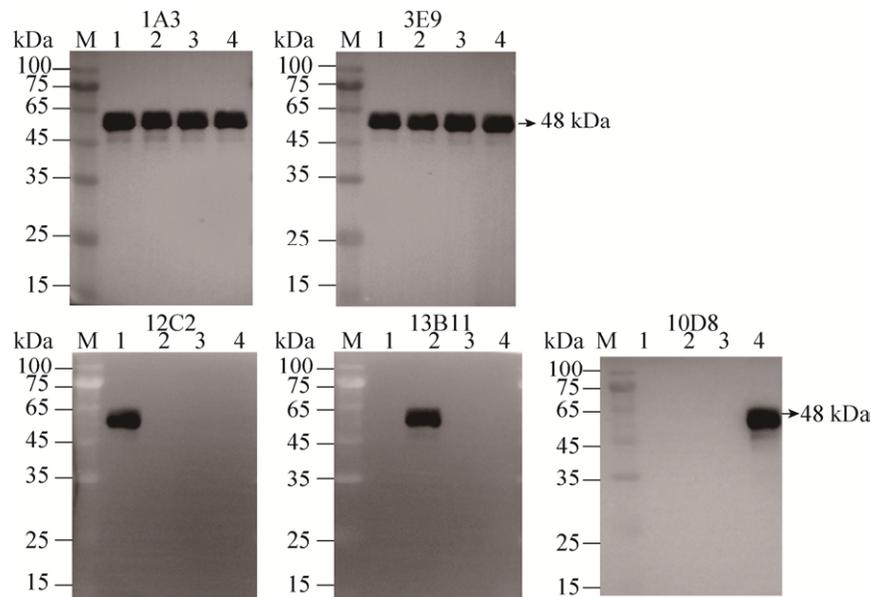


图 5 Western blotting 鉴定 4 种血清型 DENV 重组 NS1 蛋白与 5 株单抗的特异性结合

Fig. 5 Binding of MAbs to rNS1 proteins of DENV 1–4 determined by Western blotting. M: protein molecular weight marker; 1: purified rNS1 protein of DENV-1; 2: purified rNS1 protein of DENV-2; 3: purified rNS1 protein of DENV-3; 4: purified rNS1 protein of DENV-4.

Antigen Antibody	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	Negative control
1A3					
3E9					
12C2					
13B11					
10D8					

图 6 斑点杂交试验鉴定 4 种血清型 DENV 天然病毒蛋白 NS1 与 5 株单抗的特异性结合

Fig. 6 Binding of MAbs to native NS1 proteins of DENV 1–4 determined by dot blotting to determine the reactivity of five purified MAbs to supernatants from DENV-1–4-infected C6/36 cells.

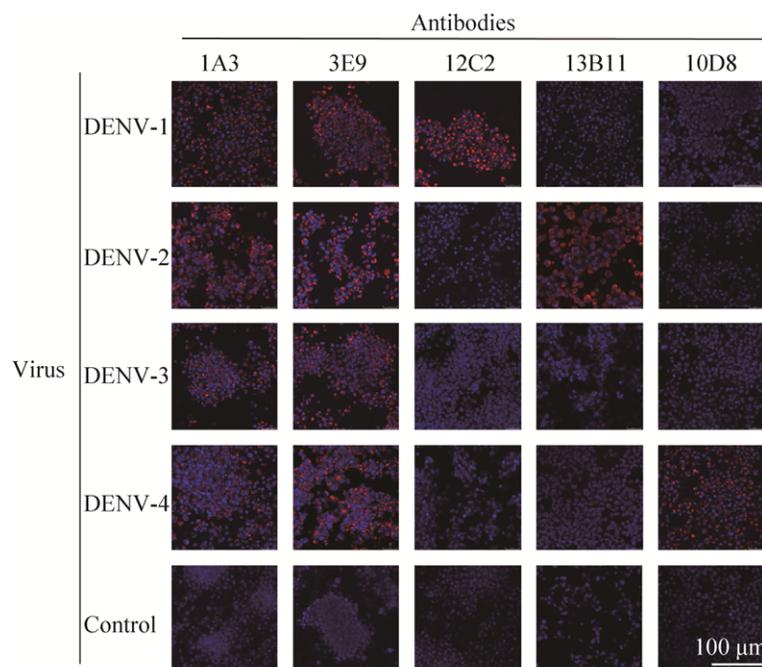


图 7 间接免疫荧光鉴定 5 株单抗与感染 1–4 型 DENV 的 C6/36 细胞的反应

Fig. 7 Indirect immunofluorescence assays of C6/36 cells infected by the DENV 1–4 with anti-NS1 MAbs. 1A3 and 3E9 exhibited reactivity to all of the DENV1–4 infected C6/36 cells, while 12C2, 13B11 and 10D8 had specific reactivity to DENV 1, DENV 2 and DENV 4, respectively.

## 2.6 双抗体夹心 ELISA 鉴别不同血清型 DENV 感染

将制备的单抗建立了可检测 DENV NS1 的通用型 (1A3 包被, 3E9 标记) 和血清型特异 (DENV-1: 1A3 包被, 12C2 标记; DENV-2: 1A3 包被, 13B11 标记; DENV-4: 1A3 包被, 10D8 标记) 双抗体夹心 ELISA 方法, 对 4 种血清型 DENV 感染血清进行了检测, 结果显示, 4 种血清型 DENV 感染血清均可以被通用型 ELISA 检出, 其他 3 种 ELISA 均可以特异检出对应的感染血清, 而未出现交叉反应 (图 8)。

## 3 讨论

目前 DENV 感染区正在不断扩大, 造成其住院率和死亡率仍在不断增加<sup>[20]</sup>, 但没有理想登革热疫苗以及抗病毒药物, 登革热感染的治疗仅是对症治疗, 所以早期的快速诊断对于降低登革出血热和登革休克综合症的发病率和死亡率具有重要作用<sup>[21-23]</sup>。目前关于 DENV 的实验室检测方法基本有 3 种: 病毒分离、核酸扩增技术以及检测 DENV 抗原或者抗体的血清学免疫检测方法。病毒分离是检测 DENV 感染最经典的诊断方法, 但该方法不仅需要专业的操作人员和实验室, 而且病毒分离的时间也较长, 因此达不到快速检测的目的。PCR 核酸扩增技术具体高灵敏和特异性, 能够有效区分不同感染病毒血清型, 但只能由少

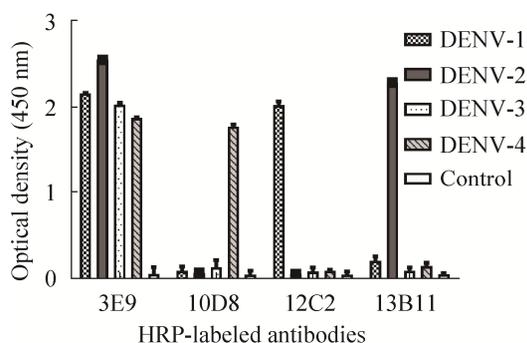


图 8 双抗体夹心 ELISA 检测不同血清型 DENV 感染  
Fig. 8 Double-antibody sandwich ELISA to detect different serotypes of DENV infection.

量高等级的具有专门仪器设备的实验室和经过培训的人员来开展, 无法满足 DENV 流行区域基础医疗的需求, 特别是在一些登革热流行资源匮乏的地区。血清学免疫检测方法较 PCR 技术相比成本低廉、检测通量高且易开展临床检测, 更适合 DENV 高发区实际情况的需求。但是目前已有的血清学免疫检测技术均无法对感染病毒的血清型进行鉴别, 考虑到二次感染患者有可能出现的重症登革热风险, 一种能够快速对患者体内感染的 DENV 的血清型进行鉴别诊断, 对治疗方案的确立及防止病患进入重症具有至关重要的意义<sup>[24]</sup>。

感染者体内 NS1 蛋白是 DENV 唯一可进入血液循环的非结构蛋白, 是早期诊断的重要指标, 也已被部分研究者用作制备疫苗的重要靶点<sup>[21,25]</sup>。在 DENV 的检测手段中基于 NS1 蛋白建立的检测方法成为关键趋势<sup>[26]</sup>。NS1 蛋白高度保守但同时也存在少量差异序列, 这使得我们通过制备针对这些差异区段的单抗, 即可获得区分不同登革热血清型的特异单抗, 为后续开发登革热血清型鉴别产品提供可能。由于 NS1 蛋白为糖蛋白, 为获得与天然病毒 NS1 蛋白更接近的重组蛋白, 本研究利用 293T 细胞表达纯化了 1-4 型 DENV-NS1, 此表达体系可使蛋白进行翻译后修饰, 即 NS1 蛋白正确折叠并进行糖基化修饰, 这样使其更加接近于天然病毒蛋白的真实形态。再利用此重组蛋白免疫小鼠制备 NS1 抗体, 得到的抗体也更易于识别天然病毒蛋白。经过细胞融合和筛选, 共得到 5 种可识别 DENV-NS1 蛋白的杂交瘤细胞株。经过间接 ELISA、IFA、DB 以及 WB 鉴定, 发现这 5 种抗体均可特异性识别 DENV NS1, 其中制备的单克隆抗体 1A3 和 3E9 可识别 DENV 1-4 型 NS1, 即 DENV 通用型抗体; 抗体 12C2 只识别 DENV-1 型 NS1, 抗体 13B11 只识别 DENV-2 型 NS1, 抗体 10D8 只识别 DENV-4 型 NS1, 即 DENV 血清型特异型抗体。基于这些抗体建立的 ELISA 方法可有效区分不同血清型 DENV 感染的阳性血清。

综上, 本研究总共制备了 5 株抗 DENV NS1 蛋白的单克隆抗体, 均具有较高的特异性和敏感

性。抗 DENV NS1 蛋白的单克隆抗体的成功制备不仅为后续血清型鉴别技术的研究提供材料,也为抗 DENV 药物及疫苗研发奠定了重要基础。在后续的研究中我们将利用这些单抗研制 DENV 血清型鉴别检测试纸条,用于快速甄别感染病毒血清型,以降低重症登革出血热风险。

## REFERENCES

- [1] Wilder-Smith A, Ooi EE, Vasudevan SG, et al. Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. *Curr Infect Dis Rep*, 2010, 12(3): 157–164.
- [2] Pozzetto B, Memmi M, Garraud O. Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat? *World J Virol*, 2015, 4(02): 113–123.
- [3] Whitehorn J, Farrar J. Dengue. *Br Med Bull*, 2010, 95(1): 161–173.
- [4] Wang Y, Zhang P. Recent advances in the identification of the host factors involved in dengue virus replication. *Virol Sin*, 2017, 32(01): 23–31.
- [5] Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 2013(7446): 504–507.
- [6] McArthur MA, Sztein MB, Robert E. Dengue vaccines: recent developments, ongoing challenges and current candidates. *Expert Rev Vaccine*, 2013(8): 933–953.
- [7] Tsai J, Choekphaibulkit K, Chen P, et al. Role of cognitive parameters in dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. *J Biomed Sci*, 2013, 20(1): 88.
- [8] Luo Y, Feng J, Zhou J, et al. Identification of a novel infection-enhancing epitope on dengue prM using a dengue cross-reacting monoclonal antibody. *BMC Microbiol*, 2013, 13(1): 194.
- [9] Naoko U, MRT. Dengue virus and the host innate immune response. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 1–11.
- [10] Thanachartwet V, Oer-areemitr N, Chamnanchanunt S, et al. Identification of clinical factors associated with severe dengue among Thai adults: a prospective study. *BMC Infect Dis*, 2015, 15(1): 420.
- [11] Srean G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nature reviews Immunology*, 2015, 15(12): 745–759.
- [12] Srikiatkhachorn A, Mathew A, Rothman AL. Immune-mediated cytokine storm and its role in severe dengue[J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(5): 563–574.
- [13] Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, et al. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*, 1998, 352(9132): 971–977.
- [14] Guzmán MG, Kourí G, Valdés L, et al. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Rev Panam Salud Publica*, 2002, 11(4): 223–227.
- [15] Martínez-Vega RA, Carrasquilla G, Luna E, et al. ADE and dengue vaccination. *Vaccine*, 2017, 35(32): 3910–3912.
- [16] Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, 2017, 358(6365): 929–932.
- [17] Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, et al. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet*, 2016, 16(8): 935–941.
- [18] Amorim JH, Alves RPD, Boscardin SB, et al. The dengue virus non-structural 1 protein: Risks and benefits. *Virus Res*, 2014, 181: 53–60.
- [19] Suleman M, Faryal R, Alam MM, et al. NS1 antigen: A new beam of light in the early diagnosis of dengue infection. *Asian Pacif J Trop Med*, 2016, 9(12): 1212–1214.
- [20] Torresi J, Ebert G, Pellegrini M. Vaccines licensed and in clinical trials for the prevention of dengue. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(5): 1059–1072.
- [21] Fatima A, Wang HY, Kang KR, et al. Development of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e95263.
- [22] Liu JY, Liu Y, Nie KX, et al. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nat Microbiol*, 2016, 1(9): 16087.
- [23] Gelanew T, Hunsperger E. Development and characterization of serotype-specific monoclonal antibodies against the dengue virus-4 (DENV-4) non-structural protein (NS1). *Virol J*, 2018, 15(1): 30.
- [24] Liu LT, Dalipanda T, Jagilly R, et al. Comparison of two rapid diagnostic tests during a large dengue virus serotype 3 outbreak in the Solomon Islands in 2013. *PLoS ONE*, 2018, 13(8): e0202304.
- [25] Wasik D, Mulchandani A, Yates MV. Point-of-use nanobiosensor for detection of dengue virus NS1 Antigen in adult aedes aegypti: a potential tool for improved dengue surveillance. *Anal Chem*, 2018, 90(1): 679–684.
- [26] Amorim JH, Diniz MO, Cariri FAMO, et al. Protective immunity to DENV2 after immunization with a recombinant NS1 protein using a genetically detoxified heat-labile toxin as an adjuvant. *Vaccine*, 2012, 30(5): 837–845.

(本文责编 陈宏宇)