

• 动物及兽医生物技术 •

一株针对 H7N9 亚型禽流感病毒血凝素蛋白茎部的单克隆抗体的表征

赵江艳^{1,2}, 朱颜笑^{1,2}, 胡娇^{1,2}, 胡增垒^{1,2,3,4}, 刘秀梵^{1,2,3,4}

1 扬州大学 农业农村部畜禽传染病学重点开放实验室, 江苏 扬州 225009

2 扬州大学 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 江苏 扬州 225009

3 扬州大学 江苏省人兽共患病学重点实验室, 江苏 扬州 225009

4 扬州大学 教育部农业与农产品安全国际联合实验室, 江苏 扬州 225009

赵江艳, 朱颜笑, 胡娇, 胡增垒, 刘秀梵. 一株针对 H7N9 亚型禽流感病毒血凝素蛋白茎部的单克隆抗体的表征. 生物工程学报, 2022, 38(1): 160-173.

ZHAO JY, ZHU YX, HU J, HU ZL, LIU XF. Characterization of a monoclonal antibody against the hemagglutinin stem of H7N9 subtype avian influenza virus. Chin J Biotech, 2022, 38(1): 160-173.

摘要: 流感病毒血凝素蛋白 (hemagglutinin, HA) 的茎部区相对保守, 是广谱疫苗、抗体与病毒检测制剂的重要靶点。前期研究获得了一株与 H7N9 亚型禽流感病毒 HA 蛋白茎部多肽 (aa 428–452) 反应的单克隆抗体 (5D3-1B5)。为系统评价其生物学特性, 本研究测定了 5D3-1B5 的抗体效价 (IgG、血凝抑制与病毒中和滴度), 鉴定了抗体识别的抗原表位与编码基因的序列及结构, 并评价了抗体与不同亚型流感病毒的交叉反应性。结果显示, 5D3-1B5 不具有针对 H7N9 病毒的血凝抑制与病毒中和活性, 但是与 HA 蛋白的反应性较强; 基于多肽的酶联免疫吸附试验与噬菌体表面展示随机多肽文库筛选的方法, 鉴定了 5D3-1B5 识别的表位是位于 HA 茎部 C 螺旋区的⁴³¹W-⁴³³Y-⁴³⁷L 基序, 且含有该表位突变的重组 H7N9 病毒失去了与抗体的反应性; 测定了抗体可变区的基因序列并定位了轻链与重链可变区的互补决定区; 抗体可变区的结构模拟与分子对接则验证了抗体与 HA 蛋白茎部 C 螺旋区的结合; 值得注意的是, 5D3-1B5 与 group 1 和 2 不同亚型的流感病毒具有广谱反应性。因此, 5D3-1B5 具有作为流感病毒广谱检测与抗体治疗制剂的应用

Received: March 2, 2021; **Accepted:** June 17, 2021

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2016YFD0501601); the Open Project Program of Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, China (R1808); Earmarked Fund For China Agriculture Research System (CARS-40); Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions, China (PAPD)

Corresponding authors: HU Zenglei. Tel: +86-514-87979040; E-mail: zengleihu@163.com

LIU Xiufan. Tel: +86-514-87991416; E-mail: xfliu@yzu.edu.cn

基金项目: 国家重点研发计划 (2016YFD0501601); 江苏省人兽共患病学重点实验室开放课题 (R1808); 现代农业产业技术体系专项资金 (CARS-40); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (PAPD)

潜力, 研究结果也为认识 H7N9 亚型禽流感病毒 HA 蛋白的抗原表位特征提供了新的信息。

关键词: 禽流感病毒; 血凝素蛋白茎部; 单克隆抗体; 抗原表位; 交叉反应性

Characterization of a monoclonal antibody against the hemagglutinin stem of H7N9 subtype avian influenza virus

ZHAO Jiangyan^{1,2}, ZHU Yanxiao^{1,2}, HU Jiao^{1,2}, HU Zenglei^{1,2,3,4}, LIU Xiufan^{1,2,3,4}

1 Key Laboratory of Animal Infectious Diseases, School of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

2 Jiangsu Co-innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Infectious Diseases and Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

3 Jiangsu Key Laboratory of Zoonosis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

4 Joint International Research Laboratory of Agriculture and Agri-Product Safety, Ministry of Education of China, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu, China

Abstract: The conserved hemagglutinin (HA) stem region of avian influenza virus (AIV) is an important target for designing broad-spectrum vaccines, therapeutic antibodies and diagnostic reagents. Previously, we obtained a monoclonal antibody (mAb) (5D3-1B5) which was reactive with the HA stem epitope (aa 428–452) of H7N9 subtype AIV. To systematically characterize the mAb, we determined the antibody titers, including the HA-binding IgG, hemagglutination-inhibition (HI) and virus neutralizing (VN) titers. In addition, the antigenic epitope recognized by the antibody as well as the sequence and structure of the antibody variable region (VR) were also determined. Moreover, we evaluated the cross-reactivity of the antibody with influenza virus strains of different subtypes. The results showed that the 5D3-1B5 antibody had undetectable HI and VN activities against H7N9 virus, whereas it exhibited strong reactivity with the HA protein. Using the peptide-based enzyme-linked immunosorbent assay and biopanning with a phage-displayed random peptide library, a motif with the core sequence (⁴³¹W-⁴³³Y-⁴³⁷L) in the C-helix domain in the HA stem was identified as the epitope recognized by 5D3-1B5. Moreover, the mAb failed to react with the mutant H7N9 virus which contains mutations in the epitope. The VR of the antibody was sequenced and the complementarity determining regions in the VR of the light and heavy chains were determined. Structural modeling and molecular docking analysis of the VR verified specific binding between the antibody and the C-helix domain of the HA stem. Notably, 5D3-1B5 showed a broad cross-reactivity with influenza virus strains of different subtypes belonging to groups 1 and 2. In conclusion, 5D3-1B5 antibody is a promising candidate in terms of the development of broad-spectrum virus diagnostic reagents and therapeutic antibodies. Our findings also provided new information for understanding the epitope characteristics of the HA protein of H7N9 subtype AIV.

Keywords: avian influenza virus; hemagglutinin stem; monoclonal antibody; antigenic epitope; cross-reactivity

A 型流感病毒是一种重要的人畜共患病原体。H1N1 和 H3N2 亚型流感病毒主要引起人的季节性流感。根据世界卫生组织的数据^[1], 季节性流感相关的呼吸道疾病每年造成数十万人死亡。此外, H5、H9 和 H7 亚型禽流感病毒 (avian influenza virus, AIV) 在家禽中广泛流行, 严重危害家禽养殖与公共卫生安全。因此, 流感病毒是人类健康与养殖业发展的重大威胁。

流感防控的最大挑战来自病毒的快速与高度变异。人的季节性流感疫苗每年都需要进行更新, 禽流感疫苗也要根据病毒的变异进行频繁的换代^[2]。流感病毒为单股负链 RNA 病毒, 基因组包含 8 个节段。病毒的 8 个基因都在不断进化, 但两个表面糖蛋白, 血凝素 (hemagglutinin, HA) 和神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 基因的变异最为显著^[3]。按照 HA 与 NA 基因的差异, 流感病毒分为 18 个 HA 亚型与 11 个 NA 亚型, 而所有的 HA 亚型基于遗传发生关系又分为 group 1 和 2 两大类^[4]。流感病毒主要通过两种机制实现快速变异: 一是抗原漂移, 即病毒基因中点突变的积累引起的抗原性改变; 二是抗原转换, 即两个或多个毒株之间基因片段的重配, 产生新的亚型^[5]。

研制广谱流感疫苗及检测制剂是应对病毒快速、高度变异与疾病防控的有效措施。因此, 保守的病毒蛋白与表位是研制广谱抗病毒与检测制剂的首选靶点^[6-7]。HA 蛋白是病毒粒子表面最重要的抗原成分, 由高度变异的头部与保守的茎部构成^[8]。目前, 已有研究利用 HA 茎部为靶点研制了交叉反应性良好的流感疫苗与单克隆抗体 (单抗), 作为流感广谱性预防、感染治疗与检测的重要手段^[9-10]。其中, HA 茎部特异性单抗在流感病毒的广谱预防以及感染治疗中均显示出很好的应用前景^[11]。此外, 针对保守表位的抗体作为流感病毒的广谱检测制剂,

可显著提高临床上流感病毒检测的效率, 降低疫病防控成本^[12]。有研究报道, 利用流感病毒核衣壳蛋白与基质蛋白特异性单抗研制的胶体金试纸, 可检出临床样品中不同亚型的流感病毒, 显示了一定的应用前景^[13]。但是, 使用 HA 茎部单抗研制广谱型流感病毒检测制剂的研究相对较少。茎部为 HA 蛋白的非免疫优势区^[14], 关于茎部的抗原表位特征及其在流感病毒 HA 蛋白免疫应答中的作用了解得还不够深入, 限制了对 HA 茎部单抗的开发利用。

了解 HA 茎部的抗原表位对于开发广谱流感疫苗、抗体与检测制剂具有重要意义。HA 茎部由 HA1 亚单位 N 端和 C 端的一段与全部的 HA2 亚单位构成, 包含多个 α 螺旋、 β 折叠与卷曲二级结构^[15]。在酸性 pH 环境下, HA 茎部发生构象改变, 介导病毒囊膜与内体膜膜的融合, 诱导病毒的内化与脱衣壳^[16-17]。能够阻断茎部介导的膜融合的抗体可以中和流感病毒的感染性^[18]; 针对茎部其他表位的抗体可以激活抗体可结晶片段 (fragment crystallizable, Fc) 介导的免疫效应, 如抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬作用 (antibody-dependent cellular phagocytosis, ADCP) 及补体依赖性细胞毒作用 (complement-dependent cytotoxicity, CDC) 等, 清除病毒粒子或病毒感染的细胞^[11]。关于流感病毒 HA 蛋白茎部抗体的研究已取得重要进展。其中最引人注意的一类是广谱中和性抗体。单抗 CR6261 识别由 HA2 的 A 螺旋和 HA1 少量氨基酸残基组成的高度保守的表位, 能阻断 HA 构象变化介导的膜融合, 对 group 1 流感病毒具有广谱中和活性^[19]; 单抗 CR8020 识别 HA 茎部高度保守的构象表位, 能够阻断 HA 蛋白的融合构象变化与裂解活化, 对 group 2 流感病毒具有广谱

中和活性^[20]。另一类是广谱非中和抗体, 如对季节性 H1N1 亚型流感病毒和 H5N1 亚型 AIV 的 HA 蛋白有交叉反应的非中和抗体, 能够通过 ADCC 效应介导血液和呼吸道上皮细胞中病毒的清除^[21]; 不具有中和活性的单抗 41-5D06 和 07-5E01 与 group 1 和 2 的流感病毒反应, 能够激活 ADCP 效应诱导病毒的清除^[22]。但是, 针对 HA 茎部的广谱反应性抗体, 尤其是非中和单抗, 识别的抗原表位尚缺乏系统深入的研究。

我们前期用 H7N9 亚型 AIV (A/chicken/Guangdong/GD15/2016, GD15 株) 的 HA 蛋白免疫小鼠, 获得了 1 株与 HA 茎部多肽 (aa 428–452) 反应的单抗 (5D3-1B5), 提示该抗体为茎部特异性抗体。本研究对 5D3-1B5 的生物学特性、识别的抗原表位、抗体可变区基因序列与结构及其交叉反应性进行了系统的分析。研究结果为流感病毒的广谱检测与抗感染制剂研发提供了新的靶点, 并为认识 HA 茎部的抗原表位特征提供了新的信息。

1 材料与方 法

1.1 质粒、病毒和蛋白

真核表达载体 pHW2000、含有 H7N9 GD15 株 HA (裂解位点中 KRTA 被删除) 与 NA 基因及含有 H9N2 亚型 AIV 6 个内部基因的真核表达质粒^[23], 由扬州大学农业农村部畜禽传染病学重点开放实验室保存。11 种亚型 AIV 毒株由本实验室分离保存 (表 1)。H7N9 rGD15 株为野生型 GD15 株经 HA 裂解位点突变得到的减毒株^[24]。杆状病毒表达系统表达的重组 HA 蛋白^[25]由本实验室保存, 其他亚型 HA 蛋白均购自北京义翘神州生物技术有限公司 (表 2)。

1.2 抗体、多肽与细胞

单抗 5D3-1B5 与基于 HA 蛋白的短肽 (aa 428–452) 于本实验室保存; 犬肾上皮细胞系

表 1 本研究使用的 AIV 毒株

Table 1 AIV strains used in this study

AIV strains	Subtypes
A/duck/Shandong/SDd11/2013	H1N1
A/duck/Jiangsu/YZD3/2013	H3N2
A/duck/Anhui/AHd38/2014	H4N6
A/chicken/Eastern China/1404/2014	H5N1
A/chicken/Yangzhou/YJD/2014	H5N6
A/duck/Jiangsu/119/2015	H6N2
A/chicken/Guangdong/GD15/2016	H7N9
A/duck/Yangzhou/02/2005	H8N4
A/chicken/Eastern China/0923/2015	H9N2
A/duck/Jiangsu/XZD53/2014	H10N7
A/duck/Jiangsu/YZD1/2013	H11N9

表 2 本研究使用的 HA 蛋白

Table 2 The influenza HA proteins used in this study

Virus origin of the HA protein	Subtypes
A/PR/8/34	H1N1
A/Wisconsin/67/2005	H3N2
A/swine/Ontario/01911-1/99	H4N6
A/Vietnam/1194/2004	H5N1
A/chicken/Guangdong/GD15/2016	H7N9
A/Hong Kong/1073/99	H9N2
A/duck/AUS/341/1983	H15N8

(Madin-Darby canine kidney cells, MDCK) 在含有 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中培养。

1.3 主要试剂

DMEM 培养基与胎牛血清为 Gibco 公司产品; 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; Ph.D.-12™噬菌体表面展示随机多肽文库、限制性内切酶 *BsmB* I 为 NEB 产品; T4 DNA 连接酶与 FITC 标记的羊抗鼠与抗鸡 IgG 抗体购自 ThermoFisher Scientific 公司; TMB 底物显色液及 BCA 蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; 质粒提取试剂盒、转染试剂为 Qiagen 公司产品; 96 孔酶标板购自上海源叶生物科技有限公司; HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体为 Merck 公司产品; 反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。

1.4 单抗的生物学活性鉴定

1.4.1 HI 活性测定

按照标准操作流程测定抗体针对 H7N9 rGD15 株的 HI 活性^[26]。

1.4.2 病毒中和活性测定

进行微量中和试验测定抗体的病毒中和 (virus neutralizing, VN) 活性。简要流程为: 将抗体进行 2 倍倍比稀释, 然后与 100 个半数组织细胞感染剂量的 GD15 株等量混合, 在 37 °C 下孵育 1 h; 将混合物转移至 MDCK 细胞并培养 72 h; 收集培养上清液, 用血凝试验测定病毒感染。用 H7N9 灭活疫苗免疫鸡血清作为阳性对照 (56 °C 热灭活 30 min)。将完全抑制病毒感染的最高稀释度认定为抗体的 VN 效价。

1.4.3 HA 蛋白的结合性测定

用酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 与间接免疫荧光试验 (indirect immunofluorescence assay, IFA) 测定 5D3-1B5 与 HA 蛋白的结合特性。ELISA 的简要流程为: 取 100 μ L 碳酸盐-碳酸氢盐缓冲液 (0.05 mol/L $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$, pH 9.6) 稀释的 HA 蛋白 (0.25 μ g/mL) 加入 96 孔酶标板, 4 °C 包被过夜; 用 PBST (含 0.05% Tween-20 的 PBS) 洗涤 3 次, 然后用 100 μ L 含 5 mg/mL BSA 的 PBST 进行封闭, 37 °C 孵育 1 h; 用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入不同浓度的单抗, 100 μ L/孔, 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μ L HRP 标记的羊抗鼠二抗 (1 : 5 000), 37 °C 孵育 1 h; PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 100 μ L 的 TMB 底物, 室温避光孵育 10 min 后, 再加入 50 μ L 的 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 最后在 450 nm 波长下读取吸光值。以 H7N9 灭活疫苗免疫鸡血清作为阳性对照, 以正常小鼠血清为阴性对照, 计算样本吸光值与阴性对照吸光值的比值, 比值 ≥ 2.1 认定为阳性反应。

IFA 的简要流程为: 将 H7N9 GD15 株以 0.1 个感染复数接种 MDCK 细胞, 24 h 后弃上清, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 以 5D3-1B5 (1 : 500、1 : 1 000、1 : 2 000、1 : 4 000 和 1 : 8 000) 为一抗, 以 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体为二抗, 用荧光显微镜观察。

1.5 单抗识别的抗原表位鉴定

1.5.1 基于多肽的 ELISA

前期研究证实了 5D3-1B5 与 H7N9 HA 茎部多肽 (aa 428–452) 的反应。为了对单抗识别的抗原表位进行更精细的定位, 将该段多肽截短, 产生重叠短肽, 测定单抗与截短多肽的反应性, 参照 1.4.3 中 ELISA 流程, 多肽包被浓度为 0.1 μ g/孔。

1.5.2 噬菌体表面展示随机多肽文库淘选

使用 Ph.D.-12TM 噬菌体表面展示随机多肽文库鉴定 5D3-1B5 识别的模拟表位。简要流程为: 将 50 μ L protein A 琼脂糖悬浮在 1 mL TBST (含 0.1% Tween-20 的 TBS) 中, 低速离心 30 s 沉淀琼脂糖, 弃去上清液; 将琼脂糖悬浮在 1 mL 封闭缓冲液 (含有 5 mg/mL BSA 的 0.1 mol/L NaHCO_3) 中, 4 °C 孵育 1 h; 同时, 将 10^{11} 空斑形成单位的噬菌体与 0.3 μ g 抗体混合, 室温孵育 20 min; 将噬菌体-抗体混合物转移至琼脂糖中, 室温孵育 15 min; 离心沉淀琼脂糖, 并用 TBST 洗涤 10 次除去未结合的噬菌体; 用 1 mL 0.2 mol/L 甘氨酸洗脱缓冲液 (0.2 mol/L 甘氨酸-HCl, pH 2.2, 1 mg/mL BSA) 重悬琼脂糖, 室温孵育 10 min, 洗脱结合的噬菌体; 将上清液转移至新的离心管中, 并用 150 μ L 1 mol/L Tris-HCl (pH 9.1) 进行中和; 取一小部分洗脱液进行噬菌体滴度的测定, 并将剩余的洗脱液在 20 mL 大肠杆菌 *Escherichia coli* ER2738 培养物中进行扩增。在连续 3 轮淘选后, 随机挑选 10 个单独的噬菌体空斑, 扩增后提取基因

组, 使用-96 gIII测序引物 (5'-CCCTCATAGTT AGCGTAACG-3') 对噬菌体插入基因片段进行测序。基于测定的核苷酸序列推导噬菌体插入的 12 肽氨基酸序列, 并用 BioEdit 软件进行比对找到 10 个噬菌体的共有序列。将 12 肽序列与 H7N9 HA 蛋白的氨基酸序列比对, 定位与单抗反应的模拟表位。

1.5.3 单抗识别表位的验证

根据噬菌体文库筛选的结果, 将模拟表位的核心氨基酸均突变为丙氨酸 (A), 用反向遗传技术构建表位突变的重组 H7N9 病毒, 命名为 rGD15-5D31B5mut。用 IFA 评价重组病毒与 5D3-1B5 的反应性, 参照 1.4.3 中 IFA 流程。

1.5.4 表位的保守性与定位分析

使用 BioEdit 软件对 H1-H17 亚型流感病毒的 HA 基因序列进行比对, 用 Weblogo 工具分析表位在不同亚型之间的保守性。此外, 使用蛋白质结构预测 Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) 在线工具, 通过同源建模的方法对 H7N9 HA 蛋白进行三维结构模拟, 使用蛋白质三维结构分析软件 PyMOL 对抗原表位在 HA 蛋白中的定位进行分析。

1.6 抗体可变区测序与生物信息学分析

1.6.1 抗体可变区基因序列的测定

提取 5D3-1B5 杂交瘤细胞的 RNA, 反转录为 cDNA, 然后用小鼠 IgG 重链可变区 (variable region of the heavy chain, VH) 和轻链可变区 (variable region of the light chain, VL) 的通用引物进行 PCR, 扩增 5D3-1B5 抗体可变区基因, 并克隆至 pMD18-T 载体, 进行序列的测定。

1.6.2 抗体序列的生物信息学分析

通过 NCBI 的免疫球蛋白可变区基因相似性比较分析工具 IGBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 对单抗序列进行同源性检索及分析; 采用 Swiss-Model、PyMOL 等对抗体可变

区的结构进行分析; 使用蛋白分子对接工具 ZDOCK (<http://zdock.umassmed.edu/>) 进行 H7N9 HA 蛋白与单抗可变区的分子对接分析。

1.7 单抗的交叉反应性分析

1.7.1 抗体与不同亚型流感病毒 HA 蛋白的反应性

用 ELISA 测定 5D3-1B5 与 group 1 的 H1N1、H5N1 和 H9N2 亚型以及 group 2 的 H3N2、H4N6、H7N9 和 H15N8 亚型流感病毒 HA 蛋白的交叉反应性。

1.7.2 抗体与不同亚型 AIV 的反应性

为了评估 5D3-1B5 与不同亚型 AIV 的反应性, 选用 group 1 的 H1N1、H5N1、H5N6、H6N2、H8N4、H9N2、H11N9 亚型与 group 2 的 H3N2、H4N6、H7N9、H10N7 亚型 AIV 感染 MDCK 细胞, 用 IFA 检测抗体与病毒感染细胞的反应性。

2 结果与分析

2.1 单抗的生物学活性

为了系统地评估抗体的生物学活性, 测定了抗体的 HI、VN、IgG 抗体滴度, 以及抗体与 HA 蛋白及 H7N9 病毒的结合特性。结果显示, 5D3-1B5 为 IgG1 亚类, 对 H7N9 病毒没有 HI 与 VN 活性, 是一株非中和性单抗 (表 3)。抗体与 H7N9 HA 蛋白的最小结合浓度在 ng 级别 (图 1A), 且 1:8 000 稀释的抗体仍然能够与 H7N9 GD15 株感染的细胞反应 (图 1B), 说明 5D3-1B5 与 H7N9 病毒的反应性强。

表 3 单抗 5D3-1B5 的生物学特征

Table 3 Biological characteristics of the 5D3-1B5 antibody

mAb	Isotype	Activity of the antibody		
		ELISA	HI	VN
5D3-1B5	IgG1	2.96	Negative	Negative

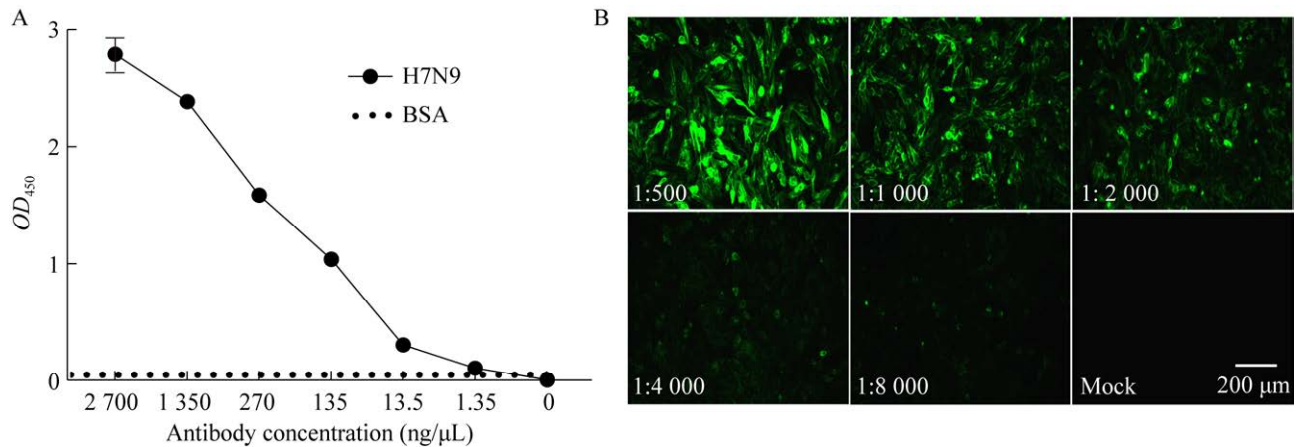


图1 5D3-1B5与H7N9 HA蛋白及病毒感染细胞的反应性

Figure 1 Reactivity of the 5D3-1B5 antibody with the H7N9 HA protein and MDCK cells infected with H7N9 subtype AIV. (A) Binding of the mAb with the HA protein. Reactivity of 5D3-1B5 at different concentrations with GD15 HA protein was determined using ELISA. Bovine serum albumin (BSA) was used as the negative control. (B) Reactivity of 5D3-1B5 with virus-infected MDCK cells. The cells were inoculated with H7N9 GD15 strain and serial dilutions of the antibody were used to detect virus infection in IFA.

2.2 单抗识别的抗原表位

2.2.1 基于多肽的ELISA

前期研究显示, 5D3-1B5与H7N9 HA蛋白第428–452位氨基酸构成的多肽反应。为了进一步鉴定抗体识别的表位, 将该段多肽截短为5个重叠的短肽(图2A)。出乎意料的是, 5D3-1B5与5个截短多肽均不反应(图2B), 提示抗体不与线性表位反应, 而可能识别空间构象表位。

2.2.2 噬菌体表面展示随机多肽文库淘选

由于5D3-1B5可能识别构象表位, 我们接着用噬菌体表面展示随机多肽文库对5D3-1B5进行抗原表位的筛淘。经过连续3轮的淘选, 选取10个与单抗反应的阳性噬菌体克隆进行测序并比对插入的12肽序列。结果显示, WQYSLTLPDVL基序在所有噬菌体克隆中的比例最高, 为共有序列, 可认定为与抗体特异

性反应的模拟表位(表4)。此外, 序列比对显示, 该基序中的3个氨基酸与GD15 HA蛋白第431位W、433位Y和437位L吻合。因此, ⁴³¹W-⁴³³Y-⁴³⁷L被鉴定为5D3-1B5识别表位的核心序列, 且该基序位于5D3-1B5反应性多肽(aa 428–452)中。

2.2.3 单抗识别表位的验证

为了验证表位淘选的结果, 将GD15 HA蛋白第431W、433Y、437L均突变为A, 拯救重组病毒, 用IFA检测单抗与重组病毒的反应性。如图3所示, 重组病毒感染细胞与H7N9抗血清反应, 说明引入的位点突变不影响病毒复制与HA蛋白的正常表达。5D3-1B5与亲本病毒rGD15株感染的细胞反应性较强, 但是与重组病毒感染的细胞不再反应。这些结果验证了噬菌体文库淘选的结果, 证明⁴³¹W-⁴³³Y-⁴³⁷L基序是5D3-1B5识别的核心表位。

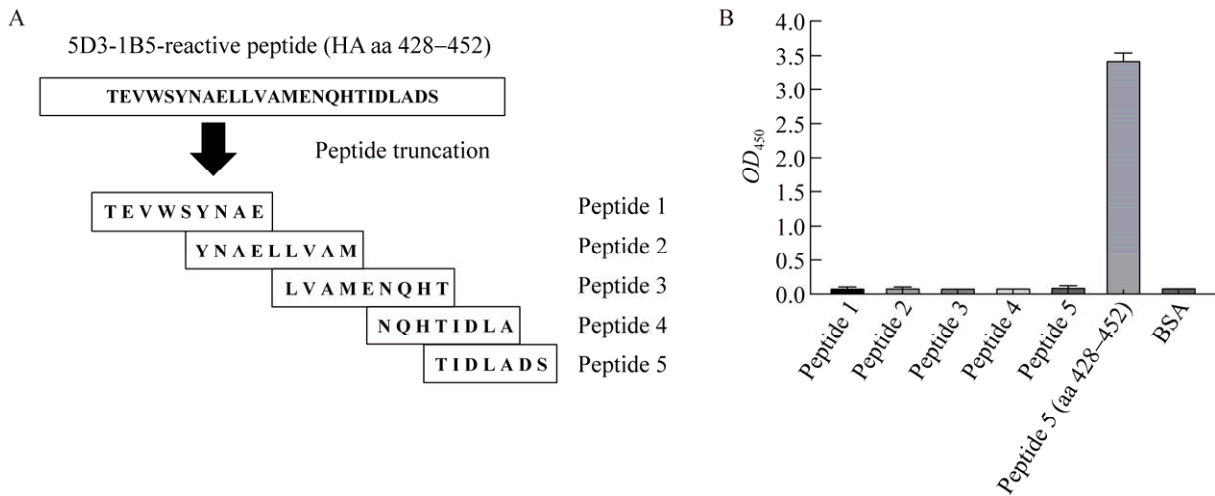


图 2 5D3-1B5 与 H7N9 HA 蛋白茎部多肽的反应性

Figure 2 Reactivity of 5D3-1B5 with the peptides derived from the H7N9 HA stem (aa 428–452). (A) Illustration of peptide truncation. The peptide (aa 428–452) reactive to 5D3-1B5 was truncated into five short overlapping peptides to perform fine mapping of the antigenic epitope. (B) Reactivity of 5D3-1B5 with the truncated peptides. Binding of the antibody with the peptides was determined by peptide-based ELISA. Bovine serum albumin (BSA) was used as the negative control.

表 4 单抗 5D3-1B5 识别的模拟表位

Table 4 Identification of the mimotope recognized by the 5D3-1B5 antibody

Phage clones	Mimotope recognized by 5D3-1B5
C1	SDRTWNYGNLFG
C2	AWQYSDTLPDVL
C3	AWQYSDTLPDVL
C4	AWQYSDTLPDVL
C5	AWQYSDTLPDVL
C6	GGQYSDTLPDVL
C7	NWSYYSFFNDR
C8	AWQYSDTLPDVL
C9	AWQYSDTLPDVL
C10	GWQYSDTLPDVL
Consensus	AWQYSLTLPDVL
Positions in HA	⁴³¹ W- ⁴³³ Y- ⁴³⁷ L

2.2.4 表位的保守性与定位分析

为探究单抗识别表位的保守性，使用 BioEdit 软件对 H1-H17 亚型代表毒株的 HA 基因序列进行比对，并使用 Weblogo 工具显示表位序列的变异程度。结果显示，5D3-1B5 靶向的 3 个氨基酸 431W、433Y、437L 在 H1-H17 亚型的 HA 基因中高度保守 (图 4A)。HA 蛋白

三维结构模拟显示，5D3-1B5 识别的表位位于 HA 蛋白茎部的 C 螺旋区 (图 4B)。

2.3 抗体可变区测序与生物信息学分析

2.3.1 抗体可变区基因序列的测定

为解析 5D3-1B5 抗体可变区的分子与结构特征，首先对其 VH 与 VL 基因进行扩增及测序。PCR 反应成功扩增了 VH 与 VL 基因，大小分别为 350 bp 与 320 bp (图 5A)。序列分析显示，5D3-1B5 可变区序列与已发表小鼠抗体可变区的同源性超过 95%，说明抗体序列为小鼠 IgG 序列。

2.3.2 抗体可变区的生物信息学分析

将 VH 及 VL 基因序列在 IMGT 抗体基因数据库中进行比对，对抗体可变区的互补决定区 (complementarity determining region, CDR) 与框架区 (framework region, FR) 进行定位。结果显示，VH 与 VL 均包含 4 个 FR 及 3 个 CDR (图 5B)。结构模拟显示，CDR 在 VH 与 VL 单体结构中空间距离近，且在整个可变区结构中相互环绕，共同构成 5D3-1B5 的抗原结合位点

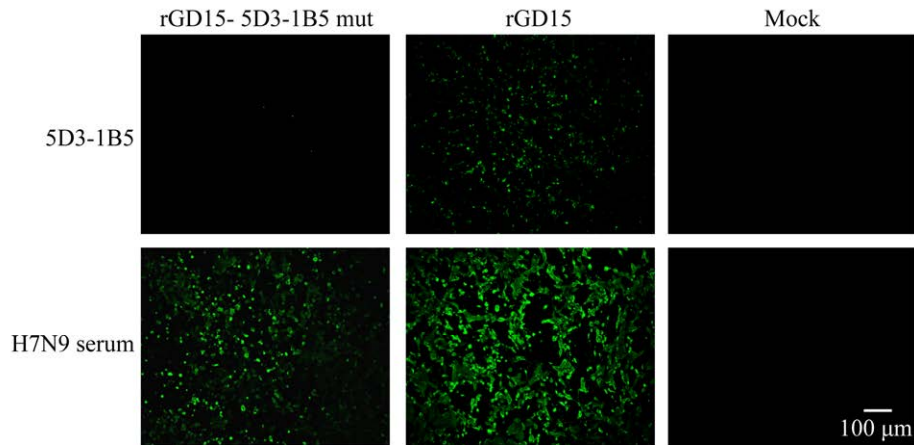


图 3 5D3-1B5 与表位突变重组 H7N9 病毒的反应性

Figure 3 Reactivity of 5D3-1B5 with the recombinant H7N9 virus carrying a mutated epitope. MDCK cells were inoculated with rGD15 or rGD15-5D31B5 mut. 5D3-1B5 and H7N9 serum were used to detect virus infection in IFA.

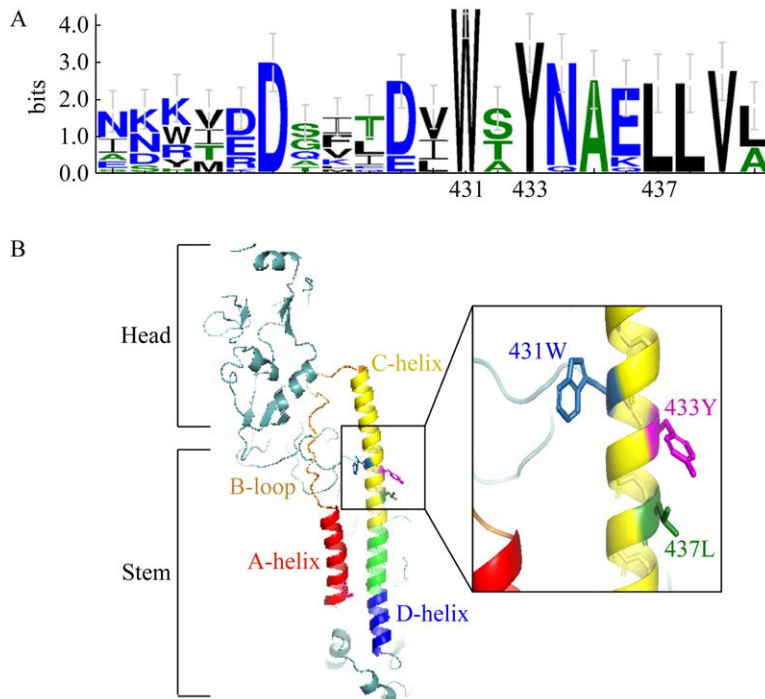


图 4 5D3-1B5 识别表位的保守性及其在 HA 蛋白中的定位

Figure 4 Conservation of the epitope recognized by 5D3-1B5 and its location in the HA protein. (A) Sequence variation of the epitope recognized by 5D3-1B5. The HA sequences of the H1–H17 subtypes were aligned using BioEdit software and variation of the epitope was illustrated using Weblogo. The size of letters correlates with the conservation of the amino acid. (B) The structure of the HA monomer shown by cartoon based on the PDB 6idd.1. The A-, C-, D-helices and the B-loop in the stem were illustrated in red, yellow, blue and orange, respectively. The identified epitope was localized in the C-helix. The epitope amino acid sites were shown in different colors (blue for 431 W, magenta for 433 Y and green for 437 L).

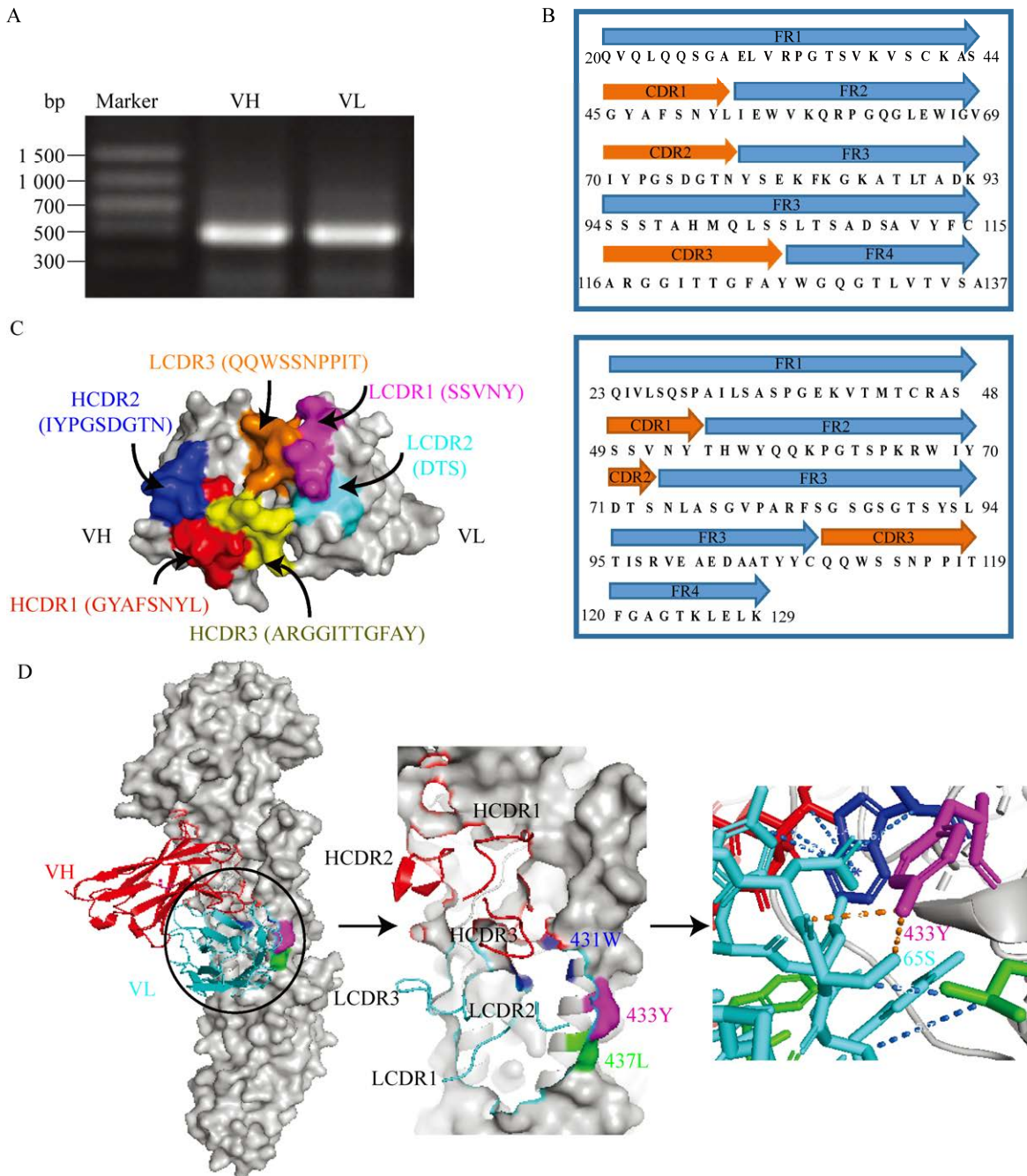


图 5 5D3-1B5 可变区序列测定及生物信息学分析

Figure 5 Sequencing and bioinformatics analysis of the VH and VL regions of 5D3-1B5. (A) PCR amplification of the VH and VL genes. (B) Identification of the CDR and FR domains of the VH and VL regions. (C) Structure modeling of the VH and VL regions of the antibody. CDR1, 2 and 3 of the VH were illustrated in red, dark blue and yellow, respectively. CDR1, 2 and 3 of the VL were shown in orange, cyan and magenta, respectively. (D) Structure modeling of HA in complex with 5D3-1B5 using ZDOCK. Left: HA was shown as surface representation in grey and the variable region was shown in cartoon with the VH in red and VL in cyan. Middle: CDR loops from the VH and VL involved in the interaction with HA were shown. Right: the interaction force of the hydrogen bond between the CDR loop and the epitope was indicated by the orange dashed line.

(抗原结合口袋) (图 5C)。使用分子对接工具 ZDOCK 分析可变区与 H7N9 HA 蛋白的对接特性, 结果显示, 5D3-1B5 的 VH 与 VL 结合 HA 茎部 C 螺旋区, 抗原表位与抗体 CDR 结合。此外, 蛋白间相互作用力分析显示, VL 的 65S 与 HA 的 433Y 存在氢键结合 (图 5D)。抗体结构与分子对接分析进一步验证了 5D3-1B5 与 H7N9 HA 茎部的特异性结合。

2.4 单抗的交叉反应性

由于 5D3-1B5 识别 HA 茎部高度保守的抗原表位, 我们用 ELISA 与 IFA 评价抗体与不同亚型流感病毒的交叉反应性。结果显示, 5D3-1B5 与 group 1 的 H1N1、H5N1 和 H9N2 亚型以及 group 2 的 H3N2、H4N6、H7N9 和 H15N8 亚型的 HA 蛋白均有较高的结合性 (图 6A), 说明单抗与 group 1 和 2 的不同亚型流感病毒有较强的交叉反应性。

用 IFA 评价 5D3-1B5 与不同亚型 AIV 感染状态下 HA 蛋白的反应性。我们发现, 5D3-1B5 与 group 1 的 H1N1、H5N1、H5N6、H8N4、H9N2 和 H11N9 亚型以及 group 2 的 H3N2、H4N6、H7N9、H10N7 亚型 AIV 感染的 MDCK 细胞均具有良好的反应性 (图 6B), 这与 ELISA 结果一致。

以上结果表明, 5D3-1B5 具有针对不同亚型流感病毒的广谱反应性, 证实其识别的表位是流感病毒 HA 蛋白的保守表位。

3 讨论

流感包括人的季节性流感、大流行流感与禽流感, 防控的最大挑战来自病毒的快速与复杂的变异^[27]。因此, 研制广谱 (或通用型) 流感治疗性单抗与病毒检测制剂对于流感的防控具有重要意义。HA 茎部在不同亚型流感病毒中高度保守, 是广谱抗病毒与检测制剂的关键靶

点^[28]。因此, 认识 HA 蛋白茎部的抗原表位特征是研制广谱单抗制剂的基础。

本研究综合利用基于多肽的 ELISA 与噬菌体表面展示随机多肽文库筛选的方法, 鉴定了一株 H7N9 亚型 AIV 特异性单抗 (5D3-1B5) 识别 HA 蛋白茎部 C 螺旋区中以 ⁴³¹W-⁴³³Y-⁴³⁷L 为核心基序的抗原表位。此外, 含有该表位突变的重组 H7N9 病毒与 5D3-1B5 失去反应性, 验证了表位鉴定的准确性。该表位为新鉴定的 H7N9 亚型 AIV HA 蛋白的抗原表位。有研究表明, 许多针对 HA 茎部表位的单抗能够阻断酸性环境下 HA 蛋白构象的改变, 抑制病毒诱导的膜融合与病毒的感染性。但是, 虽然 5D3-1B5 识别茎部 C 螺旋区的表位, 但其不具有针对 H7N9 病毒的中和活性, 提示单抗与表位的结合可能不足以阻断 HA 蛋白在酸性条件下的构象变化与病毒介导的膜融合。

序列比对显示, 5D3-1B5 识别的表位在 H1-H17 亚型流感病毒之间高度保守, 提示单抗可能对不同亚型流感病毒具有交叉反应性。单抗的广谱反应性结果显示, 5D3-1B5 具有针对 group 1 和 2 不同亚型流感病毒的交叉反应性, 其反应谱很广, 这与抗体识别表位的高度保守性相一致。5D3-1B5 的广谱反应性使其在广谱病毒检测与治疗性单抗应用方面显示了较强的优势。

首先, 针对多种亚型流感病毒的广谱检测制剂能够显著提高疫病防控的效率, 降低防控成本。目前, 胶体金检测试纸是临床上广泛使用的免疫学检测试剂。有研究使用针对流感病毒内部核衣壳蛋白^[29]、基质蛋白^[30]与 M2e 的单抗^[31]制备胶体金试纸。这些抗体虽然具有较好的交叉反应性, 但是由于抗原处于病毒粒子内部, 抗体难以识别, 往往需要进行抗原释放以提高检测效率。但是, HA 蛋白是病毒粒子表面的囊膜糖蛋白, 在病毒表面的含量较高, HA 茎

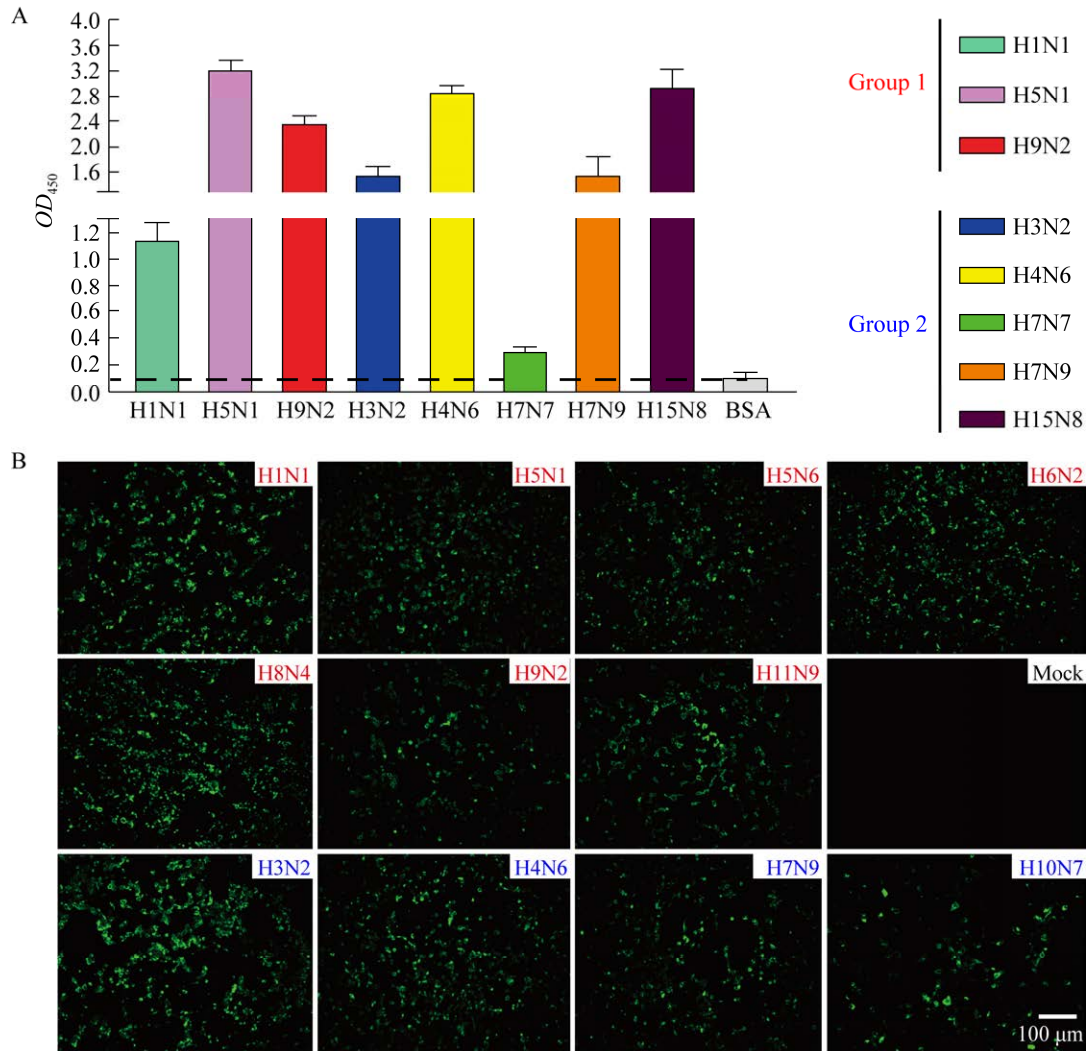


图 6 5D3-1B5 与不同亚型流感病毒的反应性

Figure 6 Reactivity of the mAb with influenza virus strains of different subtypes. (A) Reactivity of 5D3-1B5 with the HA proteins from influenza virus strains of different subtypes. Binding of the mAb with the HA proteins of groups 1 (H1N1, H5N1 and H9N2) and 2 (H3N2, H4N6, H7N9 and H15N8) was measured in ELISA. Bovine serum albumin (BSA) was used as the negative control. (B) Reactivity of 5D3-1B5 with the cells infected with AIV strains of different subtypes. MDCK cells were infected with the viruses belonging to groups 1 (H1N1, H5N1, H5N6, H8N4, H9N2 and H11N9) and 2 (H3N2, H4N6, H7N9 and H10N7). Recognition of the viruses by the mAb was tested using IFA. AIV strains of groups 1 and 2 were shown in red and blue, respectively.

部单抗容易与抗原结合，检测效率较高。因此，5D3-1B5 具有作为广谱病毒检测制剂的潜力。

其次，治疗性单抗为传染病防治提供了新的有效手段。广谱反应性单抗是临床上不同亚型流感病毒感染防治的高效手段^[32]。目前已研

制了许多广谱中和性单抗，对不同亚型流感病毒均具有较强的中和活性，在预防与感染治疗方面均有较高效力^[33]。虽然 5D3-1B5 不具有病毒中和活性，但是并不意味着不具有保护效力。研究表明，非中和抗体能够激活 Fc 依赖的免疫

效应, 如 ADCC、ADCP 和 CDC, 清除病毒粒子或病毒感染的细胞, 起到保护作用^[34]。5D3-1B5 能否激活免疫效应而对流感病毒感染起到保护作用仍需要进一步的研究。

但是, 5D3-1B5 的广谱反应性仍是对其进行优化改造的首要原因。最新的重组抗体技术使得抗体在分子水平上的改造成为可能。我们测定了 5D3-1B5 可变区的基因序列, 并通过生物信息学方法对 VH 和 VL 的 CDR 与 FR 进行定位, 为抗体改造提供了基础。未来对 5D3-1B5 可进行两个方面的改造: 1) 抗体亚类转换。鼠源抗体中, IgG2a 亚类与免疫效应细胞, 如自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞, 表面的 Fc 受体亲和力最高, 激活免疫效应的活性最强; 而 IgG1 亚类与 Fc 受体的亲和力最低, 激活免疫效应的活性最弱^[35]。因此, 可将 5D3-1B5 的抗原结合片段与 IgG2a 的 Fc 进行组合, 构建嵌合抗体, 评价抗体介导的免疫效应与保护效力。2) 人-鼠嵌合抗体。对于人的流感防治, 鼠源单抗会引起异源免疫排斥, 降低抗体治疗效果^[36]。可将 5D3-1B5 的 CDR 保留, 抗体其余部分替换为人源抗体成分, 降低免疫排斥作用。

综上所述, 我们鉴定了一株 H7N9 亚型 AIV 非中和性单抗识别的 HA 茎部高度保守的抗原表位, 该表位位于茎部 C 螺旋区, 以⁴³¹W-⁴³³Y-⁴³⁷L 为核心基序; 单抗与 group 1 和 2 的不同亚型流感病毒具有广谱反应性。因此, 该单抗在广谱病毒检测制剂与治疗性单抗制剂的应用上有较好潜力, 研究结果同时加深了对 HA 茎部抗原表位特征的认识。

REFERENCES

- [1] Lancet T. Preparing for seasonal influenza. *Lancet*, 2018, 391(10117): 180.
- [2] Wei CJ, Crank MC, Shiver J, et al. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(4): 239-252.
- [3] Shi Y, Wu Y, Zhang W, et al. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12(12): 822-831.
- [4] Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem*, 2010, 285(37): 28403-28409.
- [5] Greenbaum BD, Li OT, Poon LL, et al. Viral reassortment as an information exchange between viral segments. *PNAS*, 2012, 109(9): 3341-3346.
- [6] Ren H, Zhou P. Epitope-focused vaccine design against influenza A and B viruses. *Curr Opin Immunol*, 2016, 42: 83-90.
- [7] Yamayoshi S, Kawaoka Y. Current and future influenza vaccines. *Nat Med*, 2019, 25(2): 212-220.
- [8] Wang TT, Palese P. Catching a moving target. *Science*, 2011, 333(6044): 834-835.
- [9] Fukuyama H, Shinnakasu R, Kurosaki T. Influenza vaccination strategies targeting the hemagglutinin stem region. *Immunol Rev*, 2020, 296(1): 132-141.
- [10] Padilla-Quirarte HO, Lopez-Guerrero DV, Gutierrez-Xicotencatl L, et al. Protective antibodies against influenza proteins. *Front Immunol*, 2019, 10: 1677.
- [11] DiLillo DJ, Tan GS, Palese P, et al. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus *in vivo*. *Nat Med*, 2014, 20(2): 143-151.
- [12] 艾嘉亮. 通用型禽流感病毒胶体金免疫层析诊断方法的建立[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2008. Ai JL. Development of an immunochromatographic lateral flow test strip for detection of all subtype avian influenza virus[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2008 (in Chinese).
- [13] 马水锋. 免疫胶体金技术检测禽流感病毒的研究及初步应用[D]. 扬州: 扬州大学, 2008. Ma SF. Establishment of gold immune-chromatographic assay for detection of avian influenza virus and its preliminary application[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2008 (in Chinese).
- [14] Tan HX, Jegaskanda S, Juno JA, et al. Subdominance and poor intrinsic immunogenicity limit humoral immunity targeting influenza HA stem. *J Clin Invest*, 2019, 129(2): 850-862.
- [15] Bullough PA, Hughson FM, Treharne AC, et al. Crystals of a fragment of influenza haemagglutinin in the low pH induced conformation. *J Mol Biol*, 1994, 236(4): 1262-1265.

- [16] Wiley DC, Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem*, 1987, 56(1): 365-394.
- [17] Chen J, Skehel JJ, Wiley DC. N- and C-terminal residues combine in the fusion-pH influenza hemagglutinin HA (2) subunit to form an N cap that terminates the triple-stranded coiled coil. *PNAS*, 1999, 96(16): 8967-8972.
- [18] Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science*, 2009, 324(5924): 246-251.
- [19] Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, et al. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science*, 2012, 337(6100): 1343-1348.
- [20] Ekiert DC, Friesen RH, Bhabha G, et al. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science*, 2011, 333(6044): 843-850.
- [21] Jegaskanda S, Job ER, Kramski M, et al. Cross-reactive influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity antibodies in the absence of neutralizing antibodies. *J Immunol*, 2013, 190(4): 1837-1848.
- [22] Henry Dunand CJ, Leon PE, Huang M, et al. Both neutralizing and non-neutralizing human H7N9 influenza vaccine-induced monoclonal antibodies confer protection. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(6): 800-813.
- [23] 刘东. 我国鸡群中 H7N9 亚型禽流感病毒的遗传进化及 PA-X 蛋白在高、低致病性毒株感染中的作用和机制研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- Liu D. The genetic evolution of H7N9 subtype avian influenza virus in chicken flocks in China and the effect mechanism of PA-X protein on the infection of highly/low pathogenic strains[D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2019 (in Chinese).
- [24] Hu ZL, Zhao JY, Zhao YH, et al. Hemagglutinin-specific non-neutralizing antibody is essential for protection provided by inactivated and viral-vectored H7N9 avian influenza vaccines in chickens. *Front Vet Sci*, 2019, 6: 482.
- [25] Hu Z, Zhao J, Shi L, et al. Identification of the dominant non-neutralizing epitope in the haemagglutinin of H7N9 avian influenza virus. *Virus Res*, 2021, 298: 198409.
- [26] OIE. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. 8th ed. Paris: World Organisation for Animal Health, 2019: 821-843.
- [27] Taubenberger JK, Kash JC. Influenza virus evolution, host adaptation, and pandemic formation. *Cell Host Microbe*, 2010, 7(6): 440-451.
- [28] 宋倩倩, 王文玲, 谭文杰. 针对甲型流感病毒表面蛋白的交叉保护性抗体研究进展. *国际病毒学杂志*, 2019(2): 142-144.
- Song QQ, Wang WL, Tan WJ. Research progress on antibody with cross-protection against surface proteins of influenza A. *Int J Virol*, 2019(2): 142-144 (in Chinese).
- [29] De Boer GF, Back W, Osterhaus AD. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Arch Virol*, 1990, 115(1/2): 47-61.
- [30] 余晓颖. H3N2 犬流感病毒 M1 蛋白胞内抗体的制备及活性研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2019.
- Yu XY. Preparation and activity research of the H3N2 canine influenza virus M1 protein intracellular antibody[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [31] 孙新城, 王云龙, 李玉林, 等. 甲型流感 H1N1(2009) 流感病毒 M2e 单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立. *中国病原生物学杂志*, 2015, 10(6): 508-511, 524.
- Sun XC, Wang YL, Li YL, et al. Preparation of monoclonal antibodies and establishment and development of methods to detect M2e of influenza A H1N1 influenza virus (2009). *J Pathog Biol*, 2015, 10(6): 508-511, 524 (in Chinese).
- [32] 冯道斌, 刘明斌, 张晓燕, 等. 抗 A 型流感病毒广谱中和抗体及广谱通用疫苗研究进展. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2018, 38(10): 782-789.
- Feng DB, Liu MB, Zhang XY, et al. Research progress of broad-spectrum neutralizing antibodies against influenza A virus and broad-spectrum universal vaccines. *Chin J Microbiol Immunol*, 2018, 38(10): 782-789 (in Chinese).
- [33] Corti D, Voss J, Gamblin SJ, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*, 2011, 333(6044): 850-856.
- [34] Sedova ES, Scherbinin DN, Lysenko AA, et al. Non-neutralizing antibodies directed at conservative influenza antigens. *Acta Naturae*, 2019, 11(4): 22-32.
- [35] Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models. *Blood*, 2012, 119(24): 5640-5649.
- [36] 阮菲儿. 抗 H7N9 亚型流感病毒神经氨酸酶嵌合抗体的制备及初步鉴定[D]. 南昌: 南昌大学, 2019.
- Ruan FE. Generation and preliminary characterization of chimeric antibodies against neuraminidase of H7N9 subtype influenza A virus[D]. Nanchang: Nanchang University, 2019 (in Chinese).

(本文责编 陈宏宇)