利用捕获法建立筛选鸭坦布苏病毒适配单抗的表面离子共振方法

崔晓娜[1], 孙 涛[2*], 徐 彪[2], 魏 波[3], 王宏华[3], 岳志芹[2]

(1. 山东畜牧兽医职业学院, 潍坊 261061; 2. 山东出入境检验检疫局, 青岛 266002;
3. 青岛蔚蓝生物科技有限公司, 青岛 266000)

摘 要: 目的 以表面离子共振(surface plasmon resonance, SPR)系统为技术平台, 利用捕获法建立检测鸭坦布苏病毒适配单抗的 SPR 方法, 并对抗坦布苏病毒单克隆抗体的亲和力及抗原抗体结合的动力学进行研究。**方法** 将鼠抗抗体偶联于 CM5 芯片上, 采用 Kinetics 程序将 HBS 缓冲液梯度稀释的不同浓度的单克隆抗体进行捕获反应, 拟合解离曲线计算不同单抗的 K_D 值并确立检测灵敏度低限并对其他不同亚型及 5 种常见禽类病毒抗体进行特异性检测试验。**结果** 测得 3 株单抗的 K_D 值分别为 1.50×10^{-13}、1.16×10^{-11}、7.85×10^{-12}, 建立的表面离子共振方法在检测其他禽源病毒时无阳性响应信号, 坦布苏重组 E 蛋白的检测极限达 0.625 nmol/L。**结论** 该方法可用于快速筛选检测坦布苏病毒的稳定适配单抗, 并可有效获知其亲和力数据, 为大规模推广建立免疫筛查方法奠定基础。

关键词: 坦布苏病毒; 适配单抗; 表面离子共振系统

Application of the surface plasmon resonance for detecting adaptive mabs of duck Tembusu virus by capture method

CUI Xiao-Na[1], SUN Tao[2*], XU Biao[2], WEI Bo[3], WANG Hong-Hua[3], YUE Zhi-Qin[1]

(1. *Shandong Vocational Animal Science and Veterinary College, Weifang* 261061,*China*; 2. *Shandong Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao* 266002,*China*; 3. *Qingdao Vland Biotech Group, Qingdao* 266000, *China*)

ABSTRACT: Objective To establish a detection method for duck Tembusuvirsuand study affinity dynamicsbetween antigen and monoclonal antibodywith surface plasmon resonance (SPR) system as technology platform. **Method** Coupling the mouse antibody on the CM5 chip, different concentrations of monoclonal antibodies diluted by HBS buffer were reacted using Kinetics program. Fitting different dissociation curve, K_D value was calculated and detection sensitivity limit value was determined. Specificity experiment was also performed among other 5 kinds of common poultry virus antibody. **Results** K_D values of 3mabs were 1.50×10^{-13}, 1.16×10^{-11}, and 7.85×10^{-12}, respectively, no positive response signal in detecting other poultry virus.The minimum limit was 0.625 nmol/L in detecting Tembusu recombinant E protein. **Conclusion** The research showed that the method could be used for rapid screening stable mabs of the Tembusu virusand

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局基金项目(2013IK038)、青岛市公共领域支撑计划项目(12-1-3-80-jh)

Fund: Supported by the Foundation of General Administration of Quality Supervision(2013IK038) and Public Domain Support Foundation of Qingdao (12-1-3-80-jh)

*通讯作者: 孙涛, 高级兽医师, 主要研究方向为动物源性食品安全检测。E-mail: suntaosdciq@163.com

***Corresponding author:** SUN Tao, Senior Veterinarian, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: suntaosdciq@163.com

acquire affinity data effectively to establish foundation for immune screening method.

KEY WORDS: duckTembusu virus; adaptive monoclonal antibody; surface plasmon resonance

1 引 言

鸭源坦布苏病毒(duck Tembusu virus, DTMUV)属黄病毒科黄病毒属[1,2], 是引起国内以卵巢炎为特征的水禽新发传染性疾病的主要病原[3-5], 该病流行广泛、传播迅速, 自 2010 年首次报道以来, 病毒已在产蛋鸭、肉鸭和鹅等养殖水禽中发生感染, 并造成产蛋严重下降等经济损失[6]。过去, 因为病原不明晰, 对该病的诊断一度陷入误区。血清学跟踪表明: 在鸭群坦布苏病毒发病前后的 1 个月内, 新城疫、禽流感、减蛋综合征等疫病的抗体不升反降(免疫鸭群), 因此排除了这些常规疫病感染的可能性。姬希文[7]利用超速离心纯化的鸭坦布苏病毒奉贤株(FX2010)作为包被抗原, 建立了检测鸭坦布苏病毒血清抗体的间接 ELISA。Li[8]采用中和单克隆抗体建立的检测鸭坦布苏病毒的竞争 ELISA, 研究表明这些方法均具有良好的特异性和重复性。但在建立上述方法之前, 对配对抗体和免疫方法效率的研究仍然存在不足。生物传感器所具有的免标记、快速和高选择性等特点[9-11], 我们根据前期筛选出的坦布苏病毒单克隆抗体为基础, 利用偶联在传感器表面的鼠抗抗体来捕获相应的单抗, 检测不同类型的病原样品, 达到了快速检测未知样品中微量病毒的目的, 并为快速筛选大规模标记抗体奠定了基础。

2 材料与方法

2.1 材 料

2.1.1 试验材料

鸭坦布苏病毒 E 蛋白单克隆抗体(3H5、4G8、6B12)及重组纯化 E 蛋白由青岛蔚蓝生物有限公司制备; 新城疫(new-castle disease virus, NDV)参考强毒株 F48E9, 由中国动物卫生与流行病学研究中心提供; 传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)、禽白血病病毒(avlanleukosis virus, ALV),鸭肝炎病毒(duck hepatitis virus, DHV), 鸭肠炎病毒(duck enteritis virus, DEV)病原样品由本室保存。

2.1.2 主要试剂

鼠抗捕获试剂盒(Mouse Antibody Capture Kit BR-1008-38), 传感器芯片 CM5, 运行缓冲溶液 HBS(pH7.4) , 氨基偶联试剂: 氮-羟基琥珀酰亚胺(NHS) , 氮-乙基-氮-(二甲基氨丙基) 碳二亚胺(EDC)(美国 GE 公司)。封闭试剂为乙醇胺(Ethanolamine)、再生试剂为 10 mmol/L Glycine HCl pH1.7、牛血清白蛋白(BSA)(美国 Sigma 公司)。所有配制好的溶液在使用前经 0.22μm 的微孔滤膜过滤和超声脱气处理, 所用水为 MilliQ 去离子水, 其他试剂均为优级纯或分析纯。

2.1.3 主要仪器设备及生物学分析软件

表面离子共振系统 Biacore3000(美国 GE 公司); Biacore3000 Control Software 软件; Biaevaluation Software 评价分析软件。该系统含配合试剂处理的微流体芯片(integrated fluidic circuit , IFC), 生物分子之间的相互作用可用非免标记的分析模式被实时监控。其中一种分子被固定在半流体右旋葡聚糖传感器芯片表面, 随后另一种相互作用的分子接着被注入到表面。所有分子被注入到样品通道并被固定到芯片表面, 在 SPR 里的响应变化就被检测到, 且变化与响应水平成比例变化。

2.2 实验方法

2.2.1 鼠抗抗体的偶联

样品无需预处理, 利用 HBS 作为缓冲分析 buffer, 偶联鼠抗抗体固定于 CM5 芯片。准备 115 μLNHS、115 μL EDC 混合活化芯片表面, 偶联过量的鼠抗抗体, 用 75 μL Ethanolamine HCl 用于封闭。以上试剂平衡到室温 25 ℃左右; 将上述 3 种试剂放在样品架上, 设定加样流速为 10 μL/min, inject 方式进样, 顺序为 NHS/EDC 混合液 110 μL, 鼠抗抗体 110 μL, Ethanolamine-HCl 封闭液 60 μL。设定偶联引导模式: (immobilisation wizard)在 Surface Preparation 窗口中, 同时选择 Immobilisation 芯片 Sensor Chip: CM5 及 Amine Coupling 方法, 同时设置空白参比通道。

2.2.2 单克隆抗体的捕获条件测试

准备 0.1~0.5 μg/mL 的含坦布苏病毒的单克隆抗体的腹水样品和 30~100 nmol/L 的 E 重组蛋白抗原, 经 0.22 μm 的微孔过滤备用。在配体通道上进样 30 s(或 60 s)单抗腹水样品。同时在参比和配体通道上进

样 2 min 抗原，解离 5 min，确定捕获量：如果 BL<30~50 RU，以此捕获时间和捕获浓度为合适的捕获条件。

2.2.3　单抗动力学分析及灵敏性分析

以摸索得出的捕获条件为合适的初始捕获浓度，倍比稀释单抗腹水样品，并依次进样 0.5 μmol/L 抗原及 pH3.0 的再生缓冲液 10 mmol/L Glycine HCl。获取最终该单抗的结合和解离常数 K_D 值，筛选各株单抗。同时捕获 K_D 值最小的单抗，固定上样浓度，依次进样不同浓度的抗原进行灵敏性分析。

2.2.4　特异性分析

捕获 K_D 值坦布苏病毒单克隆抗体，在 SPR 芯片表面分析不同毒株的抗原，将新城疫病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、禽白血病(ALV)、鸭病毒性肝炎(DVH)、鸭肠炎病毒(DEV)的病原材料，尿囊液及细胞培养液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤上样处理，测试反应是否是特异。

3　结果与分析

3.1　偶联信号的读取

偶联活性的稳定与否，直接关系到实验的重复性和芯片的使用寿命，因本研究涉及亲和力实验，为使实验准确，鼠抗抗体的偶联量通常控制在 50 RU 左右(见图 1)。

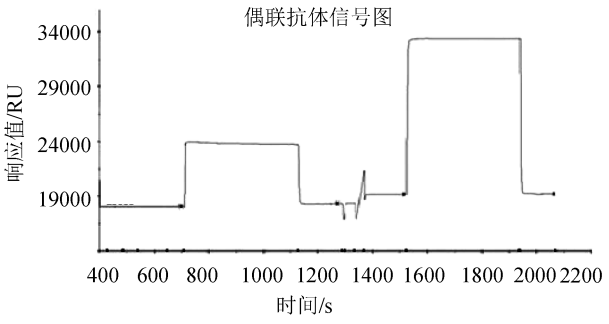


图 1　偶联抗体信号响应图

Fig. 1　Amine coupling mouse Ab response

3.2　捕获条件测试

第 1 次单抗腹水进样以 1 μmol/L 浓度进样获得捕获信号值偏大，经稀释摸索至 0.5 μmol/L，获得捕获信号值为 47.1 RU(见图 2)，处于<30~50 RU 合理区间，故以 0.5 μmol/L 为合适的初始捕获浓度。

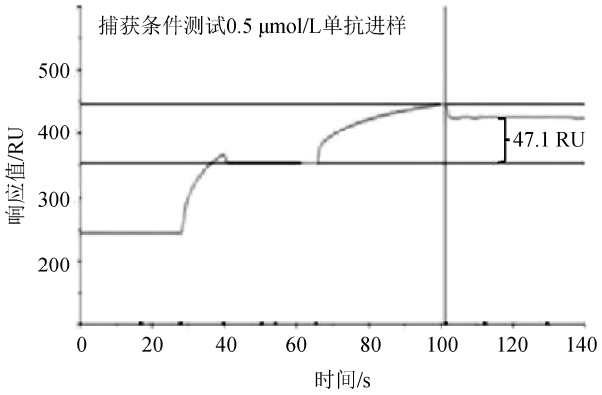


图 2　捕获反应信号响应图

Fig. 2　Capture response diagram

3.3　单克隆抗体的动力学分析及灵敏性结果

将最适初始单抗浓度(3H5、4G8、6B12)分别依次倍比稀释成 250、125、62.5、31.25、15.625、7.813 nmol/mL 并依次进样获取该单抗的 K_D 值(如表 1、图 3 所示)，并由公式测得结合速率与解离速率，便于筛选免疫反应效果更好的单抗。由公式(1)推导得出公式(2)。

$$A+B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB \qquad (1)$$

其中 A 为溶液中的待分析物由流动系统控制，AB 的浓度可由仪器直接检测响应信号 RU 得到，B 为偶联在传感芯片上的分子，相当于最大结合反应理论值 R_{max}。

表 1　3 株 DTMUV 单抗的动力学数据

Table 1　Affinity dynamics data for 3 mabs of DTMUV

动力学数据	结合速率 *K*a(1/Ms)	解离速率 *K*d(1/s)	R_{max}(RU)	KA(1/M)	结合解离常数 K_D(M)
3H5	3.04E+05	3.53E-06	2660	8.60E+10	1.16E-11
4G8	3.44E+08	5.17E-05	41.5	6.65E+12	1.50E-13
6B12	2.38E+05	1.87E-06	1860	1.27E+11	7.85E-12

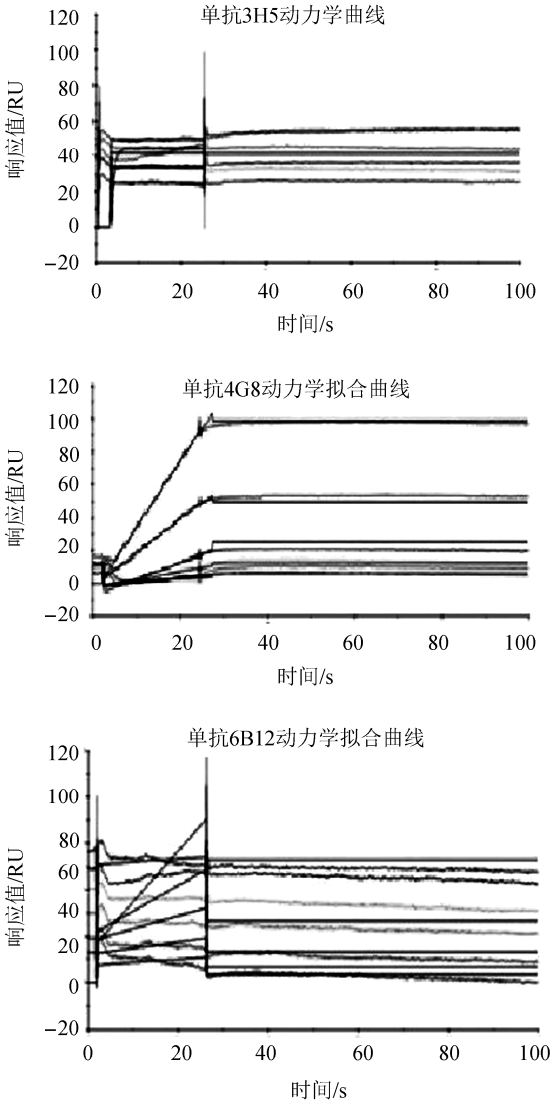


图 3 抗原抗体动力学拟合曲线

Fig. 3 Kinetics fitted curve

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a \cdot [A] \cdot [B] - k_d \cdot [AB]$$

$$\frac{dR}{dt} = k_a \cdot C \cdot [R_{max} - R] - k_d \cdot R \quad (2)$$

RU/s $M^{-1}s^{-1}$ M RU s^{-1} RU

同时利用 K_D 值最小的捕获单抗，固定抗原上样浓度(依次梯度倍比稀释成 20、10、5、2.5、1.25、0.625 nmol/L，依次进样不同浓度的抗原进行灵敏性分析。

3.4 特异性试验结果

捕获 K_D 值最小的坦布苏病毒单克隆抗体，在 SPR 芯片表面分析不同毒株的抗原，将新城疫病毒(NDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、禽白血病(ALV)、鸭病毒性肝炎(DVH)、鸭病毒性肠炎(DEV)的病原材料，尿囊液及细胞培养液经 0.22 μm 的微孔滤膜过滤上样处理，均无特异的显著的结合反应(图 5 所示)，在 SPR 分析图谱中未出现与上述亚型一致的特征峰图。

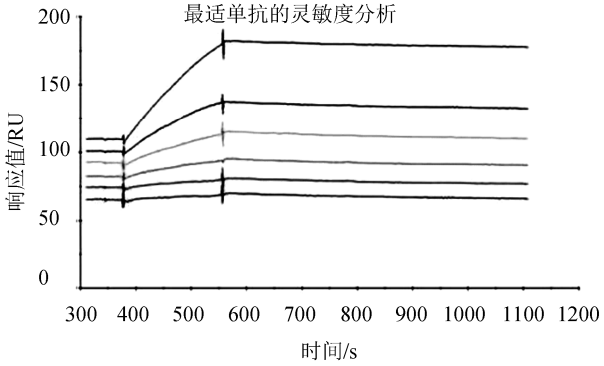


图 4 灵敏性分析

Fig. 4 Sensitive analysis

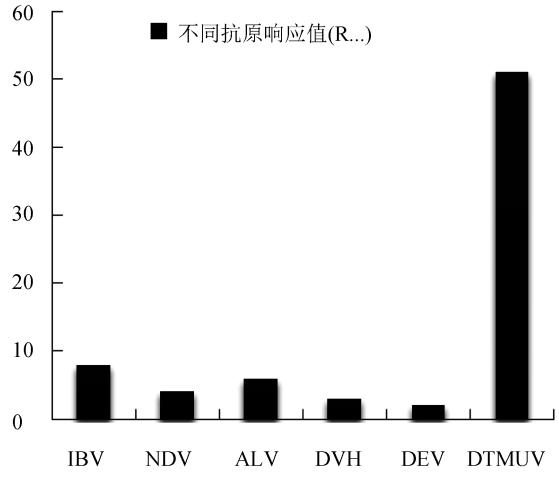


图 5 特异性分析实验结果

Fig. 5 Specificityanalysis results for DTMUV

4 讨 论

生物传感器是近年来发展起来的用于实时监测生物大分子之间的相互作用新型技术平台。BIAcore 系列生物传感器的原理即是利用表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR) 现象来监测传感片表面介质的折射率变化所引发的共振角变化。其控制

系统特异、灵敏, 可动态观察大分子之间结合与解离的平衡关系, 较为准确地测定分子间相互作用的亲和力。与常规方法相比较, 生物传感器具有实时(real time)、高效、客观、敏感度高、操作简便等优点, 近年来广泛应用于病毒抗原-抗体相互作用的研究[12-14], 配体-受体等蛋白互作的研究[15]。应用生物传感器研究生物大分子间相互作用的基本的操作流程, 通常都是首先将一种生物大分子结合到传感器的传感片表面, 封闭后用于该大分子与其它相关物质的相互作用, 获得相应的结合曲线, 然后用适当的缓冲系统使样品分子解离, 最后进行再生过程。

本研究展示了利用偶联在传感器表面的鼠抗抗体来捕获相应的单抗, 而后检测不同类型的病原样品的原始结果和实验流程。实验中所应用的 Biacore 的微流控系统 (IFC)和全自动进样系统 (auto sampler), 为实验设计带来了极大的灵活性, 能够快捷地发现鼠抗抗体与单抗分子间能否发生结合。并通过亲和力=解离平衡常数=K_D, 来描述两者之间的结合强度。动力学常数是亲和力之外, 表征分子结合/复合物稳定性的重要信息, 在本研究通过直接捕获杂交瘤上清、腹水抗体, 在 5~10 min 内即可快速筛选 1 株单克隆抗体, 运行成本更低, 芯片亦可反复使用, 这为大面积推广所筛选的抗体在其他免疫学实验中的应用提供了重要的参考数据。在对纯化 mAb 的亲和常数的分析中, 利用生物传感器可获得不同浓度的 mAb 对偶联鼠抗的结合曲线, 通过 BIAevaluation 分析软件对结果进行分析和计算。设定基线, 拟合结合曲线和解离曲线。选取适当时间的结合反应(反应刚开始的结合速率较快, 所受干扰小, 以此时的反应曲线进行计算结果相对准确; 选取的反应时间过长会加大计算量)进行动力学常数的计算。在此过程中, 分析软件可分别提供根据理论获得的与反应曲线相对应的反应曲线, 根据实验结果与理论曲线的误差分析, 最终由软件根据所选择的类型计算出抗原抗体反应的动力学常数。

参考文献

[1] Su J, Li S, Hu X, *et al*. Duck egg-drop syndrome caused by BYD virus, a new Tembusu-related flavivirus [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e18106.

[2] Yan P, Zhao Y, Zhang X, *et al*. An infectious disease of ducks caused by a newly emerged Tembusu*virus* strain in mainland China [J]. Virology, 2011, 417(1): 1–8.

[3] 曹贞贞, 张存, 黄瑜. 鸭出血性卵巢炎的初步研究[J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(12): 3–6.
Cao ZZ, Zhang C, Huang Y, *et al*.Preliminary studies on duck hemorrhagic ovaritis [J].Chin J VeterMed, 2010, 46(12): 3–6.

[4] 李译君. 鸭坦布苏病毒的分离鉴定及生物学特性研究[J]. 中国家禽, 2011, 33(17): 34–35.
Li ZJ. Isolation and identification of duck tembusu virus and biological characteristic research [J] Chin Poul, 2011, 33(17): 34–35.

[5] 马秀丽, 于可响, 高凤. 鸭黄病毒 BZ 株的生物学特性研究[J]. 中国家禽, 2011,33(21):12–14.
Ma XL, Yu KX, Gao F, *et al*. Biological characteristics of BZ isolate of duck flavivirus [J]. Chin Poul, 2011, 33(21): 12–14.

[6] 李玉峰. 一种从鸭新分离的黄病毒研究初报[J]. 畜牧兽医学报, 2011,42(6):885–891.
Li YF. A brief report of *Flaviviruses* newly isolated from duck [J].Chin J Animal VeterSci, 2011, 42(6): 885–891.

[7] 姬希文, 闫丽萍, 颜丕熙. 鸭坦布苏病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2011,33(8):630–634.
Ji XW, Yan LP, Yan PX, *et al*. Establishment of an indirect ELISA for detection of antibody against duck Tembusu virus [J]. Chin J PrevenVeteri Med, 2011, 33(8): 630–634.

[8] Li X, Li G, Teng Q, *et al*. Development of a blocking ELISA for detection of serum neutralizing antibodies against newly emerged duckTembusu virus [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e53026.

[9] Deckert F, Legay F. Development and validation of an immunoreceptor assay for simulect based on surface plasmon resonance [J]. Anal Biochem, 1999, 274(1): 81–89.

[10] Nilsson CE, Abbas S, Bennemo M, *et al*. A novel assay for influenza virus quantification using surface plasmon resonance [J]. Vaccine, 2010, 28(3): 759–766.

[11] Takemoto DK, Skehel JJ, Wiley DC. A surface plasmon resonance assay for the binding of influenza virus hemagglutinin to its sialic acid receptor [J]. Virology, 1996, 217(2): 452–458.

[12] Rusnati M, Chiodelli P, Bugatti A, *et al*. Bridging the past and the future of virology: surface plasmon resonance as a powerful tool to investigate virus/host interactions [J]. Crit Rev Microbiol, 2015, 41(2): 238–260.

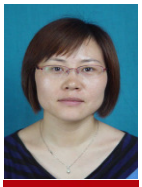
[13] Villiers MB, Cortay JC, Cortes S, *et al*. Protein-peptide arrays for detection of specific anti-hepatitis D virus (HDV) genotype 1, 6, and 8 antibodies among HDV-infected patients by surface plasmon resonance imaging [J]. J ClinMicrobiol, 2015, 53(4): 1164–1171.

[14] Wang W, Wolff MW, Reichl U, *et al*. Avidity of influenza virus: model-based identification of adsorption kinetics from surface plasmon resonance experiments [J]. J Chromatogr A, 2014, 1326: 125–129.

[15] Kim M, Park K, Jeong EJ, *et al*. Surface plasmon resonance imaging analysis of protein-protein interactions using on-chip-expressed capture protein [J]. Anal Biochem, 2006, 351(2): 298–304.

(责任编辑: 金延秋)

作者简介



崔晓娜，讲师，主要研究方向为动物源性食品卫生检验。
E-mail: sdwfcxn@163.com

孙　涛，高级兽医师，主要研究方向为动物源性食品安全检测。
E-mail: suntaosdciq@163.com

撤稿声明

本刊 2015 年第 6 卷第 3 期(2015, 6(3): 1022-1027)刊发的论文《西地那非多克隆抗体的制备及特异性分析》文章，因涉及保密协议方面原因，作者要求撤稿，特此声明。

《食品安全质量检测学报》编辑部