

# 一株抗 H5 亚型禽流感病毒血凝素蛋白单克隆抗体的广谱中和活性

罗海峰<sup>1</sup>, 陈毅歆<sup>1</sup>, 陈自敏<sup>1</sup>, 郭永利<sup>1</sup>, 王嘉<sup>2</sup>, 张军<sup>1</sup>, 陈鸿霖<sup>2,3</sup>, 管轶<sup>2,3</sup>, 夏宁邵<sup>1</sup>

(1. 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 福建省医学分子病毒学研究中心, 厦门 361005; 2. 汕头大学医学院 汕港联合流感中心, 汕头 515031; 3. 香港大学 微生物系 新发传染病国家重点实验室, 香港)

**摘要:**以 H5N1 禽流感病毒株 Ck/ HK/ Yu22/ 02 作为抗原, 应用常规杂交瘤技术和血凝抑制实验筛选出抗 H5 亚型禽流感病毒血凝素蛋白的单抗 8H5, 单抗 8H5 经免疫荧光鉴定具有很好的 H5 特异性。选择 33 株 2002~2006 年不同地域, 不同宿主中分离的不同遗传变异亚系的 H5N1 病毒代表株, 对单抗 8H5 分别进行血凝抑制实验及中和试验分析, 结果显示单抗 8H5 对所有 H5 亚型病毒均有较强反应, 而对非 H5 亚型标准病毒株均不反应, 说明 8H5 是一株广谱性抗 H5 特异性中和单抗, 并提示单抗 8H5 的 HA 识别表位可能是一个相当保守的中和表位。并且单抗 8H5 双抗夹心系统的初步评价显示了其在诊断应用上的前景。

**关键词:** 禽流感病毒; H5N1; 单克隆抗体; 血凝素; 中和

**中图分类号:** R373.1<sup>+</sup>3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2007)02-0085-06

禽流感 (Avian influenza, AI) 是一种由禽流感病毒 (Avian influenza virus, AIV) 引起的病毒性疾病。根据两种表面糖蛋白的抗原性不同, 禽流感病毒可分为 16 个 HA 亚型和 9 个 NA 亚型<sup>[1]</sup>。2003 年底至今, 高致病性 H5N1 禽流感病毒陆续在亚洲、欧洲、非洲的多个国家和地区暴发流行, 造成大量禽鸟感染死亡, 并且直接跨越种间屏障造成人类感染致死。截止至 2006 年 8 月 9 日, WHO 已证实全球共有 236 人感染 H5N1 禽流感病毒, 其中 138 人死亡<sup>[1-3]</sup>, 且感染人数呈现逐年上升趋势。尽管 H5N1 禽流感病毒尚未获得有效的人传人能力, 但多数流感专家认为, 这已不是能否发生而是何时发生的问题, 世界正处于全球流感大流行的前夜<sup>[2]</sup>。

血凝素蛋白 (Haemagglutinin, HA) 是禽流感病毒最主要的表面抗原蛋白, 是禽流感疫苗、中和抗体及诊断试剂的最主要靶点<sup>[4,5]</sup>。血凝素编码的基因是禽流感病毒基因组中变异最大的基因, 很大程度上决定了禽流感病毒的抗原性和致病性。因此, 寻

找能够识别 H5N1 变异株血凝素蛋白的广谱中和性单克隆抗体, 对于禽流感的诊断、疫苗和治疗的研究均具有重要的意义。

## 材料与方法

**1 材料** 小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/0-Ag14 (SP2/0)、MDCK 细胞和 HeLa 细胞为本实验室保存。所有病毒由香港大学微生物系新发传染病国家重点实验室充分灭活后提供。BALB/c 小鼠 (6~8 周龄) 为本中心动物室提供。PEG1500、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基嘌呤、DMSO、HRP、标记有荧光标记物的二抗等试剂均为 Sigma 公司的产品。RPMI 1640、MEM 基础培养基为 Gibco 公司的产品。胎牛血清为 Hyclone 公司的产品。脂质体 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 为 Invitrogen 公司产品。微孔血凝板、细胞培养板购自 Greiner 公司, 96 孔微孔酶标板由北京万泰生物药业有限公司提供。酶标仪购自 TECAN 公司。

**2 单克隆抗体的制备** 单抗制备方法参见文献<sup>[6]</sup>。

**3 重组质粒的构建** 按常规方法构建<sup>[7]</sup>, 将 H5N1 病毒株 Yu22 中的 HA 全长基因 (1.7 kb) 导入 pcDNA3.1 载体中, 形成重组质粒 pcDNA-HA。

**4 脂质体转染** 参照 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 说明书, 在 6 孔板上预铺 HeLa 细胞 (5 × 10<sup>5</sup> 个/孔), 当细胞贴壁率达 80% 时, 在室温下进行细胞转染。先将 4.0 μg 重组质粒 DNA 和 10 μl 脂质体分别加入 250 μl 无血清培养基后轻轻混匀, 再加入 6 孔板细胞中孵育 20min, 转染后 4 h, 更换含 10% FBS 的新鲜培养基, 在 37 °C 的 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养, 48h 后收获细胞进行后续实验。对照细胞转染空质粒。

**5 间接免疫荧光试验** 转染细胞经甲醇固定后, 依次与抗

收稿日期: 2006-08-24; 修回日期: 2006-11-30

基金项目: 国家禽流感防治专项 (2004BA519A73); 福建省科技重点项目 (2005 Y020); 福建省科技重大专项 (2004 YZ01-1); 教育部跨世纪优秀人才培养计划。

作者简介: 罗海峰 (1982-), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生, 研究分子病毒学和免疫学。

通讯作者: 夏宁邵 (1964-), 男, 湖南娄底人, 博士生导师, 研究分子病毒学。Tel: 86-592-2184110; Fax: 86-592-2181258; E-mail: nsxia@xmu.edu.cn

H5 单抗和 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 抗体反应 45 min, 每次反应后用 PBS 洗涤 3 次, 最后用含 50% 甘油的 PBS 液封片, 用荧光显微镜观察并拍照。

**6 血凝抑制实验(HI)** 按 WHO 标准方法进行<sup>[8]</sup>。静脉取血获得正常健康鸡血, 添加千分之一肝素, 摇匀置 4℃ 保存。以生理盐水洗 3 次, 末次经 2 000r/min 离心 10min, 将红细胞用生理盐水配成 1% 浓度。灭活病毒液在微孔血凝板中用生理盐水作 1:2 系列倍比稀释, 每孔加入 50 μl 后再加入等量 1% 鸡红细胞, 摇匀, 室温静置 30 min 后观察。以出现完全血凝的血凝素最高稀释度为其血凝效价。标准 HI 实验中需要在每个含有 25 μl 倍比稀释样品的孔中加入 4 个血凝单位的病毒, 因此每 25 μl 病毒溶液应当含有 4 个血凝单位。因为血凝效价的测定采用了 50 μl 病毒, 所以血凝效价除以 8 即为获得每 50 μl 病毒溶液含有 8 个血凝单位的稀释度。例如某病毒血凝效价为 160, 则稀释 20 倍可以得到每 50 μl 含有 8 个血凝单位的病毒稀释液。将实验样品用生理盐水做系列倍比稀释, 在微孔血凝板上每孔加入 25 μl, 再加入 25 μl 稀释好的灭活病毒稀释液, 孵育 30 min, 后每孔加入 25 μl 1% 鸡红细胞, 摇匀并置室温 30 min 后观察。以出现完全抑制的样品最高稀释度的倒数为样品中抗体的效价。所有实验都重复进行 3 次。

**7 微孔中和试验(NI)** 按 WHO 标准方法进行<sup>[8]</sup>。抗体腹水首先稀释 100 倍后, 采用无血清 MEM 培养作 1:2 系列倍稀, 每个稀释孔加入等量的 200 倍半数致死率(TCID<sub>50</sub>)浓度的流感病毒, 混匀, 置 37℃ 孵育 2h。随后在铺有单层 MDCK 细胞的 96 孔细胞培养板中每孔对应加入各种抗体稀释液与病毒混合液 35 μl。细胞在 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 1h 后换入新鲜无病毒含 10% FBS 的 MEM 培养基, 在

CO<sub>2</sub> 浓度为 5% 的 37℃ 培养箱中培养 3d。3d 后取细胞上清进行血凝实验, 阴性血凝即表示病毒被单抗所中和, 中和阳性的抗体最高稀释度的倒数即为该抗体的中和滴度。该实验在香港大学生物安全 3 级 (BSL-3 级) 实验室完成。

**8 双抗体夹心 ELISA** 纯化单抗用 20 mmol/L 磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.4) 溶解, 按 100 ng/孔包被于微孔板, 4~17 过夜, PBST 洗板一次后封闭 2h, 加入灭活流感病毒液 37℃ 温育 30 min, PBST 洗板 5 次, 扣干后加入合适浓度的 HRP-McAb, 37℃ 温育 30 min, PBST 洗板 5 次, 扣干后显色读值。

## 结 果

### 1 杂交瘤细胞株 8H5 的获得

利用 HI 试验筛选抗 H5 特异性单抗, 最终获得稳定分泌抗 H5 亚型禽流感病毒血凝素单抗的杂交瘤细胞株 8H5, 细胞上清对 Yu22 病毒 HI 滴度为 1:256, 亚型鉴定结果为 IgG2a, 腹腔接种 BALB/c 小鼠后, 制备高滴度单抗腹水。

### 2 间接免疫荧光

重组质粒 pcDNA-HA 用脂质体转染 HeLa 细胞后, 于荧光显微镜下进行观察, 结果如图 1 所示。可见表达 H5N1 病毒 Yu22 的 HA 蛋白的细胞有明显的绿色荧光(图 1A), 而空质粒转染的细胞未见荧光物质(图 1B), 说明单抗 8H5 与 H5 亚型病毒 HA 蛋白有特异性反应。

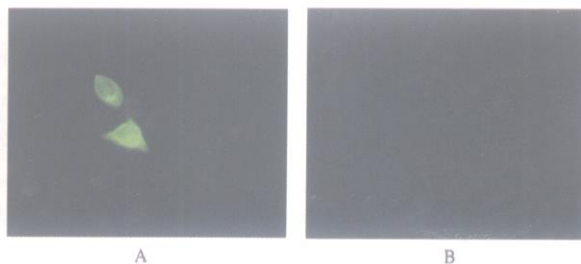


图 1 抗 H5 单抗 8H5 的免疫荧光鉴定

Figure 1 Identification of anti-H5 McAb 8H5 by indirect IF

A. HeLa cells transfected with pcDNA-HA; B. HeLa cells transfected with pcDNA3.1(+). The first antibody was 8H5 ascites (1:200); the second antibody was GAM-FITC and amplification ratio was 1:400.

### 3 单抗 8H5 对不同 H5N1 禽流感病毒的血凝抑制活性

利用血凝抑制实验, 比较单抗 8H5 和本实验室早期报道的两株抗 H5 特异性单抗 2F2、3C8 对 33 株亚洲地区分离的不同遗传变异亚系<sup>[9]</sup>的 H5N1 病毒代表株的反应性, 结果(表 1)可见, 单抗 8H5 的病毒反应谱最广, 对九个变异亚系的 33 株 H5N1

病毒均有较强反应, 而单抗 2F2、3C8 分别和其中的 9 株、10 株病毒不反应 (HI 滴度 < 100) 或弱反应 (100 < HI 滴度 < 400), 尤其对于 2006 年分离的 3 株 H5N1 病毒株, 仅 8H5 具有较强的反应性, 而 2F2、3C8 则不反应。提示 8H5 识别的表位是一个相对保守的抗原表位。同时用如下 H1~H4 和 H6~H13 的流感标准病毒株: Dk/ST/1734/2003

(H1)、Dk/ ST/ 992/ 2000 (H2)、Dk/ ST/ 708/ 2000 (H3)、Dk/ SIBERIA/ 378/ 2001 (H4)、Teal/ HK/ W312/ 1997 (H6)、Dk/ C/ A47 (H7)、Turkey/ Ontario/ 6118/ 1968 (H8)、Dk/ HK/ Y280/ 1997 (H9)、Dk/ ST/ 1796/ 2001 (H10)、Dk/ ST/ 834/ 2001 (H11)、

Dk/ HK/ 838/ 1980 (H12)、Gull/ MD/ 704/ 1977 (H13)和1株新城疫病毒株(NDV)对单抗8H5进行血凝抑制实验,结果均为阴性(HI滴度 < 10),说明单抗8H5具有很好的H5亚型特异性。

表1 H5单抗8H5对不同遗传亚系的H5N1禽流感病毒代表株的血凝抑制滴度

Table 1 HI titers of different strains representing different genetic lineages of H5N1 virus with H5 McAb 8H5

Virus strain	Sub-lineage	HI titers		
		8H5	2F2	3C8
Ck/ HK/ Yu22/ 02	Reference	12800	12800	6400
Ck/ Indonesia/ 2A/ 2003	IDN	12800	12800	6400
Ck/ Malang/ BBVet-IV/ 04	IDN	12800	12800	6400
Ck/ Jogjakarta/ BBVet-IX/ 04	IDN	6400	12800	6400
Ck/ Bantul/ BBVet-I/ 05	IDN	12800	12800	6400
Ck/ Indonesia/ 5/ 05	IDN	3200	1600	< 100
Ck/ Salatiga/ BBVet-I/ 05	IDN	12800	12800	6400
VNM/ 1203/ 04	VTM	3200	6400	3200
VNM/ 1194/ 04	VTM	12800	12800	3200
Ck/ Malaysia/ 5858/ 04	VTM	6400	3200	1600
Dk/ VNM/ N-XX/ 04	VTM	6400	800	400
Dk/ VNM/ 283/ 05	VTM	6400	12800	6400
Ck/ VNM/ 568/ 05	VNM2	6400	200	< 100
Dk/ HN/ 101/ 04	HN	12800	6400	3200
Ck/ HN/ 999/ 05	HN	3200	3200	1600
Dk/ HN/ 157/ 05	HN	3200	1600	800
Dk/ HN/ 1265/ 05	HN	12800	12800	1600
Ck/ YN/ 115/ 04	YN	3200	800	1600
Dk/ HK/ 821/ 02	GD	6400	12800	12800
Ck/ HK/ Yu324/ 03	GD	12800	12800	3200
HK/ 213/ 03	GD	12800	12800	12800
BhGs/ QH/ 15/ 05	MB	6400	6400	3200
MDk/ JX/ 2295/ 05	MB	12800	6400	6400
MDk/ JX/ 1653/ 05	MB	3200	< 100	400
Ck/ ST/ 4231/ 03	Mixed	6400	6400	3200
Ck/ GX/ 2439/ 04	Mixed	12800	< 100	400
Gs/ GX/ 2112/ 04	Mixed	6400	< 100	800
Dk/ GX/ 951/ 05	Mixed	12800	12800	400
Dk/ FJ/ 897/ 05	Mixed	1600	< 100	200
CP Heron/ HK/ 18/ 05	Mixed	12800	< 100	1600
Oriental Magpie Robin/ HK/ 366/ 06	HK06	1600	< 100	< 100
Common magpie/ HK/ 2256/ 06	HK06	6400	< 100	< 100
Japanese White Eya/ HK/ 1038/ 06	HK06	1600	< 100	< 100

Sublineage defined by Chen et al.<sup>[9]</sup> HI test was performed in microtiter plate with 0.5% chicken RBCs. Titers were the reciprocal lowest dilutions of McAbs that inhibited hemagglutinin caused by 4 HA units of virus. HK. Hong Kong; YN. Yunnan; GX. Guangxi; FJ. Fujian; HN. Hunan; ST. Shantou; JX. Jiangxi; QH. Qinghai; IDN. Indonesia; GD. Guangdong; MB. Migratory bird; VTM. Vietnam/ Thailand/ Malaysia; VNM2. Recent Vietnam introduction; HK06. Isolates from Hong Kong in 2006; Ck. Chicken; Dk. Duck; BhGs. Bar-headed goose; MDk. Migratory duck; CP heron. Chinese pond heron; Gs. Goose; Qa. Quail.

表 2 H5 单抗 2F2、3C8、8H5 对部分 H5 亚型禽流感病毒株的中和滴度

Table 2 Neutralization titers of some H5N1 viruses with H5 McAbs 2F2, 3C8, 8H5

Virus strain	2F2	3C8	8H5
Ck/ Indonesia/ 2A/ 2003	12800	6400	12800
Ck/ HK/ Yu22/ 02	12800	6400	12800
HK/ 213/ 03	12800	12800	12800
Dk/ VNM/ N-XX/ 04	800	400	6400
Ck/ VNM/ 568/ 05	<100	<100	6400
Gs/ GX/ 2112/ 04	<100	800	6400
CP Heron/ HK/ 18/ 05	<100	1600	12800
Ck/ GX/ 2439/ 04	<100	200	12800
Ck/ Indonesia/ 5/ 05	800	<100	12800
Ck/ Indonesia/ 5/ 05	1600	<100	3200
Ck/ Indonesia/ 2A/ 2003	6400	6400	12800
VNM/ 1194/ 04	12800	3200	3200
MDk/ JX/ 2295/ 05	6400	3200	12800

4 单抗 8H5 对不同 H5N1 禽流感病毒的中和活性利用微孔中和试验测定单抗对 H5N1 禽流感病毒的中和滴度。表 2 显示了单抗 2F2、3C8、8H5 对于部分 H5 亚型禽流感病毒的中和活性,可见 2F2、3C8 对于一些病毒株无法有效地进行中和(NT 滴度 < 100),对于一些病毒株表现为中和活性较弱(100 NT 滴度 400),而 8H5 对于表中所列病毒均具有较高的中和滴度。为了进一步了解单抗 8H5 的性质,我们用单抗 8H5 对亚洲地区分离的 33 株不同遗传亚系的 H5N1 禽流感病毒代表株进行中和试验。结果(图 2),单抗 8H5 能有效中和所有试验所挑选的 H5 亚型病毒株,显示出了单抗 8H5 对于 H5 亚型禽流感病毒具有广谱中和活性。

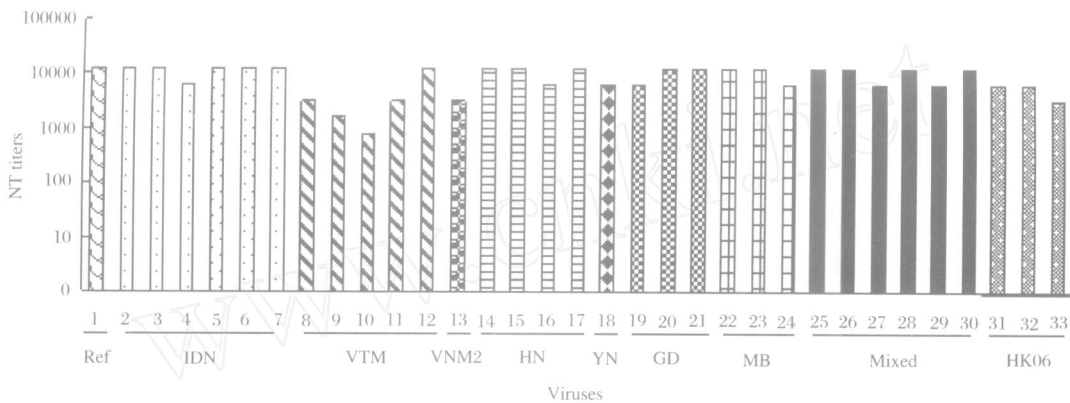


图 2 H5 单抗 8H5 对不同遗传亚系的 H5N1 禽流感病毒代表株的中和滴度

Figure 2 Neutralization titers of different strains representing different genetic lineages of H5N1 virus with H5 McAb 8H5

Virus 1. Ck/ HK/ Yu22/ 02; 2. Ck/ Indonesia/ 2A/ 2003; 3. Ck/ Malang/ BBVet-IV/ 04; 4. Ck/ Yogyakarta/ BBVet-IX/ 04; 5. Ck/ Bantul/ BBVet-I/ 05; 6. Ck/ Indonesia/ 5/ 05; 7. Ck/ Salatiga/ BBVet-I/ 05; 8. VNM/ 1203/ 04; 9. VNM/ 1194/ 04; 10. Ck/ Malaysia/ 5858/ 04; 11. Dk/ VNM/ N-XX/ 04; 12. Dk/ VNM/ 283/ 05; 13. Ck/ VNM/ 568/ 05; 14. Dk/ HN/ 101/ 04; 15. Ck/ HN/ 999/ 05; 16. Dk/ HN/ 157/ 05; 17. Dk/ HN/ 1265/ 05; 18. Ck/ YN/ 115/ 04; 19. Dk/ HK/ 821/ 02; 20. Ck/ HK/ Yu324/ 04; 21. HK/ 213/ 03; 22. BhGs/ QH/ 15/ 05; 23. MDk/ JX/ 2295/ 05; 24. MDk/ JX/ 1653/ 05; 25. Ck/ ST/ 4231/ 03; 26. Ck/ GX/ 2439/ 04; 27. Gs/ GX/ 2112/ 04; 28. Dk/ GX/ 951/ 05; 29. Dk/ FJ/ 897/ 05; 30. CP Heron/ HK/ 18/ 05; 31. Common magpie/ HK/ 2256/ 06; 32. Japanese White Eyas/ HK/ 1038/ 06; 33. Oriental Magpie Robin/ HK/ 366/ 06.

### 5 单抗 8H5 在双抗体夹心 ELISA 中的应用

本实验室陈毅歆等<sup>[6]</sup>利用单抗 2F2 建立了检测 H5 亚型流感病毒中 HA 蛋白的双抗体夹心 ELISA 诊断试剂。本研究利用 8H5 单抗建立类似检测方法,并比较二者对不同病毒株的检测性能,结果(图 3)可见,8H5 组合对 12 株 2002 ~ 2006 年间分离的 H5 亚型禽流感病毒株均可检出,对 1 株 H9 亚型禽流感病毒无非特异性反应,而 2F2 组合尽管对多数病毒的检测灵敏度较高,但对部分毒株出现明显的漏检,如对 2003 年分离株 6151 和 2006 年分离株 1038 未能检出,说明单抗 8H5 可能有助于提

高 H5 亚型诊断试剂的检出率。

## 讨论

本研究以禽流感 H5N1 病毒株 Yu22 为抗原,利用常规杂交瘤技术和血凝抑制实验制备并筛选到单抗 8H5,经免疫荧光试验和非 H5 亚型流感标准病毒株的血凝抑制实验分析,证实 8H5 是一株 H5 亚型特异性单抗。利用 33 株不同遗传变异亚系的 H5N1 病毒代表株进一步分析单抗 8H5 的血凝抑制活性及中和活性,结果显示单抗 8H5 对以上所有

病毒均能反应,并对全部检测的毒株均能有效中和,表明单抗 8H5 是一株良好的 H5 亚型特异性广谱中和单抗。

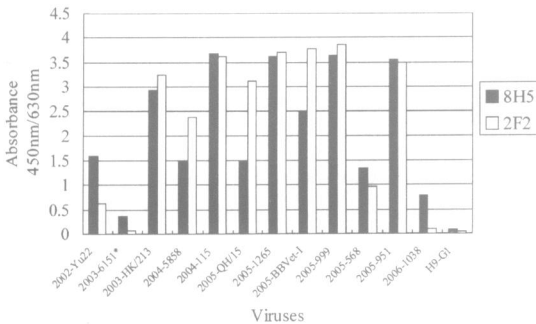


图3 双抗体夹心 ELISA 比较 H5 单抗 2F2 和 8H5

Figure 3 Comparison of H5 McAb 8H5 and 2F2 by two-antibody sandwich ELISA

\*. H5N3 subtype; Yu22. Ck/ HK/ YU22/ 02; 6151. Dk/ JX/ 6151/ 03; HK/ 213. HK/ 213/ 03; 5858. Ck/ Malaysia/ 5858/ 04; 115. Ck/ YN/ 115/ 04; QH/ 15. BhGs/ QH/ 15/ 05; 1265. DK/ HN/ 1265/ 05; BBVet-1. Ck/ Bantul/ BBVet-1/ 05; 999. Ck/ HN/ 999/ 05; 568. CK/ VNM/ 568/ 05; 951. Dk/ GX/ 951/ 05; 1038. Japanese White Eyas/ HK/ 1038/ 06; G1. Qa/ HK/ G1/ 97 (H9).

由于流感病毒 HA 基因变异迅速,导致新的流感变异株层出不穷,给抗 H5 单抗的筛选带来不少困难。Chen 等<sup>[9]</sup>根据 HA 基因的分子进化分析结果认为,当前亚洲地区流行的 H5N1 禽流感病毒株已演变成至少 8 个较为稳定的不同遗传变异亚系,抗原性分析还证实不同亚系病毒不仅仅具有基因型的差异,其 HA 蛋白也存在明显的抗原性差异。因此,在这种情况下制备广谱性抗 H5N1 病毒 HA 单抗,免疫株的合理选择成为问题的关键。Li 等在亚洲地区 H5N1 病毒流行株的起源分析中提到,当前高致病性 H5N1 禽流感病毒的 HA 基因来源于中国 1996 年的广东分离株 Gs/ GD/ 1/ 96 (H5N1)<sup>[10,11]</sup>,随后 H5N1 病毒株一直处于高度变异中,先后演变出多个不同的基因型,如 2001 ~ 2002 年间出现的 X0 ~ X3 基因型、2000 ~ 2002 年间出现的 A、B、C、D、E、Y 基因型和 2002 年出现的 W 基因型,但这些基因型在短暂流行后很快消失。2002 年后开始流行 V、Z 和 Z+ 基因型,尤其是 Z 基因型占据了当前流行株的主导地位。根据对 Z 基因型 H5N1 病毒株的 HA 基因进化分析结果,发现病毒株 Ck/ HK/ Yu22/ 02 处在 Z 基因型进化树的根部<sup>[10,11]</sup>,提示 Yu22 病毒株的 HA 基因在进化上可能具有最大共同性,因此,初步确定将 Yu22 病毒

株作为单抗制备的免疫株,而且最终筛选结果也证实了这一选择的合理性和正确性。

面对如此多变的 H5N1 禽流感病毒,选择合适的病毒株对筛选到的抗 H5 单抗进行反应谱分析和对全面了解单抗性能都十分必要。当前 H5N1 病毒的变异亚系的形成主要与时间分布、地理分布和宿主类型有关<sup>[9]</sup>,本研究选用的 H5N1 病毒株的分离时间介于 2002 ~ 2006 年间,病毒分离地包括印尼、越南、马来西亚和中国的香港、广东、广西、云南、青海、湖南和江西等地,病毒分离宿主包括了人、水禽、陆禽和候鸟等当前 H5N1 病毒的主要宿主。血凝抑制实验结果表明,单抗 8H5 明显比早期报道的两株抗 H5 单抗 2F2 和 3C8<sup>[6]</sup>具有更广的识别谱,特别是其中的 7 株病毒对 8H5 有强反应而对 2F2、3C8 几乎不反应,它们分别是属于 VNM2 亚系的 2005 年分离的越南高变株 Ck/ VNM/ 568/ 05、属于 MB (候鸟) 亚系的 2005 年候鸟分离株 Mdk/ JX/ 1653/ 05、属于 Mixed 亚系的 2005 年福建分离株 Dk/ FJ/ 897/ 05、2004 年的广西分离株 Ck/ GX/ 2439/ 04 和属于 HK06 亚系的 3 株香港 2006 年禽分离株。上述结果进一步证实 H5N1 病毒 HA 基因具有高变异特性,但也提示在众多变异株的 HA 基因中可能存在一个相对保守的抗原性表位,而且这样的表位能够被单抗 8H5 特异识别,充分体现出单抗 8H5 是一株较为优秀的广谱性单抗。

类似 8H5 的广谱性抗 H5 单抗具有重要的应用价值。当前 H5N1 禽流感病毒的监测和快速控制很大程度上取决于能够应用于现场检测的快速诊断试剂的检测性能<sup>[2]</sup>。本实验室已开发和正在开发多个基于抗 H5 单抗的 H5 亚型特异性快速诊断试剂的技术平台,而病毒 HA 基因的高变异特性显然对抗 H5 单抗的反应性要求甚高,文中图 3 数据也进一步说明广谱性单抗 8H5 很可能有助于提高 H5 亚型病毒快速诊断试剂的检测性能。

单抗 8H5 是否具有中和活性决定了其在禽流感疫苗和治疗方面的应用价值。本研究利用 HI 鉴定中使用的 33 株 H5N1 病毒分析了单抗 8H5 的中和活性,结果全部病毒都被中和,说明 8H5 识别的表位是高度保守的中和表位,这对于流感病毒的深入研究、基因工程重组通用 H5 亚型禽流感疫苗的研究<sup>[12]</sup>、优于现今治疗禽流感病毒感染药物的新的手段的研究<sup>[13]</sup>等方面均有重要价值。

#### 参考文献:

[1] Menno D. de Jong D, Hien T T. Avian influenza (H5N1)

- [J]. *J Clin Virol*, 2006, 35: 2-13.
- [2] The Writing Committee of the World Health Organization (WHO). Consultation on Human Influenza A/ H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 1374-1385.
- [3] World Health Organization. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/ (H5N1) reported to WHO [DB]. (9 Aug. 2006) Available from: [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2006\\_08\\_09/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2006_08_09/en/index.html).
- [4] 金奇. 医学分子病毒学 [M]. 北京: 科学出版社, 2001: 14-17.
- [5] Luke C J, Subbarao K. Vaccines for pandemic influenza [J]. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12(1): 66-72.
- [6] 陈毅歆, 罗海峰, 葛胜祥, 等. 高致病性 H5 亚型禽流感病毒性感冒病毒血凝素单克隆抗体的制备与初步应用 [J]. *病毒学报*, 2005, 21(6): 422-427.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 16-68.
- [8] World Health Organization. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5Rev.1 (1 Sep. 2004) [DB]. Available from: [http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO\\_CDS\\_CSR\\_NCS\\_2002\\_5/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/influenza/WHO_CDS_CSR_NCS_2002_5/en/index.html)
- [9] Chen H, Smith G J D, Li K S, et al. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: Implications for pandemic control [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(8): 2845-2850.
- [10] Lipatov A S, Govorkova E A, Webby R J, et al. Influenza: Emergence and control [J]. *J Virol*, 2004, 78(17): 8951-8959.
- [11] Li K S, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia [J]. *Nature*, 2004, 430: 209-213.
- [12] Sette A, Fikes J. Epitope-based vaccines: an update on epitope identification, vaccine design and delivery [J]. *Curr Opin Immunol*, 2003, 15: 461-470.
- [13] Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, et al. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review [J]. *Lancet*, 2006, 367: 303-313.

## Characterization of a Broad-spectrum Neutralization Monoclonal Antibody against Haemagglutinin of H5 Subtype Avian Influenza Virus

LUO Hai-feng<sup>1</sup>, CHEN Yi-xin<sup>1</sup>, CHEN Zi-min<sup>1</sup>, GUO Yong-li<sup>1</sup>, WANG Jia<sup>2</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>,  
CHEN Hong-lin<sup>2,3</sup>, GUAN Yi<sup>2,3</sup>, XIA Ning-shao<sup>1</sup>

(1. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Research Center of Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Joint Influenza Research Center (SUMC & HKU), Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China; 3. State Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Department of Microbiology, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong SAR, China)

**Abstract:** The monoclonal antibody (McAb) 8H5 against the haemagglutinin of the H5 subtype avian influenza virus (AIV) was developed by fusing SP2/0 myeloma cells with the spleen cells of BALB/c mice immunized with Ck/ HK/ Yu22/02 (H5N1). McAb 8H5 was nonreactive to H5-HA by indirect immune fluorescence test and hemagglutinin inhibition test (HI) with 13 strains of non-H5 standard AIV. McAb 8H5 showed high reactivity with 33 strains of H5N1 virus isolated from 2002 to 2006 in different areas and hosts by HI test and neutralization test (NT). These results suggested that McAb 8H5 is a special broad-spectrum neutralization monoclonal antibody against haemagglutinin of H5 subtype AIV and recognizes a very conserved epitope in HA. Based on McAb 8H5, a diagnostic assay for H5N1 viruses was developed and the results suggested that McAb 8H5 will be of great use in diagnosing H5N1 viruses.

**Key words:** avian influenza virus; H5N1; McAb; HA; neutralization

Corresponding author: XIA Ning-shao, E-mail: nsxia@xmu.edu.cn