

学校编码: 10384

分类号_____密级

学号: 21720091152053

UDC

廈門大學

硕士学位论文

酶联免疫斑点法在轮状病毒检测及轮状病毒中和试验中的应用

The Application of Elispot in Detection of Rotavirus And
Rotavirus Neutralization Assay

董军纪

指导教师姓名: 夏宁邵 教授

专业名称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2012年05月

论文答辩时间: 2012年06月

学位授予日期: 2012年06月

答辩委员会主席:

评阅人:

2012年5月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ ）课题（组）的研究成果，获得（ ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ ）实验室完成。
（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：……

2012年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

200 年 月 日

目 录

摘 要.....	VII
Abstract.....	VIII
缩略词	IX
1 前 言.....	1
1.1 轮状病毒性状	1
1.2 轮状病毒的基因组	2
1.3 轮状病毒蛋白	3
1.3.1 轮状病毒内核蛋白.....	4
1.3.2 轮状病毒的内衣壳蛋白.....	6
1.3.3 轮状病毒的外衣壳蛋白.....	7
1.3.4 轮状病毒的非结构蛋白.....	10
1.4 轮状病毒的复制	11
1.4.1 轮状病毒吸附，入胞.....	12
1.4.2 病毒的转录和复制.....	12
1.4.3 病毒的装配.....	13
1.4.4 病毒的释放.....	13
1.5 轮状病毒的流行病学	13
1.5.1 病毒的传播途径.....	13
1.5.2 轮状病毒的致病机制.....	14
1.5.3 轮状病毒的流行特征.....	14
1.6 轮状病毒的控制	19
1.6.1 轮状病毒病原学检测.....	19
1.6.2 轮状病毒感染性检测.....	21
1.6.3 轮状病毒中和抗体检测.....	22
1.6.4 轮状病毒的治疗及预防.....	23
1.6.5 轮状病毒的疫苗研究史.....	23
1.7 轮状病毒动物模型	25

1.8 本研究的目 的, 意义及主要研究内容	26
2 材 料 和 方 法	27
2.1 材 料	27
2.1.1 主要仪器.....	27
2.1.2 细胞 病毒株及实验动物.....	27
2.1.3 试剂.....	28
2.1.4 试验常用溶液和细胞培养基的配置.....	28
2.1.5 EIA 检测试验试剂.....	29
2.2 方 法	29
2.2.1 细胞生物学常用方法.....	29
2.2.2 轮状病毒的分离培养及鉴定.....	31
2.2.3 轮状病毒的鉴定.....	32
2.2.4 轮状病毒酶联免疫斑点法.....	34
2.2.5 小鼠免疫.....	36
2.2.6 利用间接酶联免疫吸附法检测血清中的抗体.....	37
2.2.7 杂交瘤细胞的融合和筛选.....	37
2.2.8 杂交瘤细胞的培养 及腹水诱导.....	38
2.2.9 单抗腹水的诱导.....	39
2.2.10 单抗腹水的纯化.....	39
3 结 果 与 分 析	40
3.1 第一部分: 轮状病毒分离与鉴定	40
3.1.1 轮状病毒的分离.....	40
3.1.2 轮状病毒分离株的鉴定.....	40
3.1.2.1 轮状病毒滴度检测方法.....	41
3.2 第二部分: 轮状病毒酶联免疫斑点法的建立	43
3.2.1 轮状病毒酶联免疫斑点法的原理.....	43
3.2.2 轮状病毒酶联免疫斑点法的建立.....	44
3.2.2.1 选择合适的检测单抗.....	44
3.2.2.2 轮状病毒酶联免疫斑点法检测时间点的确定.....	46

3.2.2.3 检测系统的优化.....	47
3.2.2.4 酶联免疫斑点法最适细胞密度的确定.....	47
3.2.3 轮状病毒酶联免疫斑点法的验证.....	48
3.2.3.1 轮状病毒用量与检测值之间的相关性.....	48
3.2.3.2 验证建立的轮状病毒酶联免疫斑点检测法的广谱性.....	49
3.2.3.3 轮状病毒酶联免疫斑点法和传统 TCID ₅₀ 检测法的相关性.....	50
3.3 第三部分：轮状病毒中和试验方法的建立	51
3.3.1 TCID ₅₀ 法检测轮状病毒血清中和抗体	51
3.3.2 轮状病毒中和试验的建立.....	52
3.3.4 轮状病毒中和试验的重复性验证.....	53
3.4 第四部分：轮状病毒中和试验方法的初步应用	53
3.4.1 中和抗体的筛选.....	53
3.4.1.1 小鼠免疫.....	53
3.4.1.2 中和抗体的筛选.....	54
3.4.2 血清中和抗体的检测.....	56
4 讨 论.....	59
4.1 轮状病毒的流行趋势及轮状病毒标本的收集	59
4.2 轮状病毒的分离培养及纯化	59
4.3 轮状病毒酶联免疫斑点法的建立	60
4.4 酶联免疫斑点法的应用	62
5 小结与展望	64
参考文献	65
致 谢.....	80

Contents

Chinese abstract.....VII

English abstract.....VIII

Abbreviations.....X

1 Introduction.....1

1.1 The properties of rotavirus1

1.2 The genome of rotavirus.....2

1.3 The proteins coded by rotavirus3

 1.3.1 core peoteins of rotavirus.....4

 1.3.2 inner shell proteins of rotavirus6

 1.3.3 Outer shell proteins of rotavirus7

 1.3.4 non-structural proteins of rotavirus.....10

1.4 The replication of rotavirus.....11

 1.4.1 The absorption and endocytosis of rotavirus12

 1.4.2 The transcription and replication of rotavirus.....12

 1.4.3 The assemble of rotavirus13

 1.4.4 The release of rotavirus.....13

1.5 The epidemiology of rotavirus13

 1.5.1 The route of transmission.....13

 1.5.2 Pathogenesis.....14

 1.5.3 The epidemiologic features14

1.6 The provention of rotavirus19

 1.6.1 The detection of etiology19

 1.6.2 The detection of infectivity21

 1.6.3 The detection of neutralizing antibodies22

 1.6.4 The treatment and precaution of rotavirus23

 1.6.5 The history of vaccine of rotavirus23

1.7 Animal models25

1.8 The significance and contents of this research	26
2 Materials and methods	27
2.1 Materials	27
2.1.1 Main instruments	27
2.1.2 Cells, viruses and animals	27
2.1.3 Reagents	28
2.1.4 Solutions and culture media	28
2.1.5 EIA assay	29
2.2 Methods.....	29
2.2.1 Commonly used methods of cell experiments	29
2.2.2 The separation, culture and identification of rotavirus	31
2.2.3 Identification	32
2.2.4 Elispot	34
2.2.5 The immunity of mice	36
2.2.6 The detection of antibodies in sera by indirect ELISA	37
2.2.7 The fusion and screening of hybridoma cells	37
2.2.8 The culture of hybridoma cells and induction of ascites	38
2.2.9 The induction of monoclonal ascites	39
2.2.10 The purification of monoclonal ascites	39
3 Results	40
3.1 Part one: the separation and identification of rotavirus	40
3.1.1 Separation	40
3.1.2 Identification	40
3.1.2.1 The methods of detecting the titer of rotavirus	41
3.2 Part two: the establishment of Elispot for rotavirus	43
3.2.1 The principles of Elispot	43
3.2.2 The establishment of Elispot for rotavirus	44
3.2.2.1 The selection of suitable monoclonal antibodies	44
3.2.2.2 The establishment of timing	46

3.2.2.3 The optimization of detection system	47
3.2.2.4 The determination of optimal cell density	47
3.2.3 The testing of Elispot for rotavirus	48
3.2.3.1 The relevance of the amount of rotavirus and detection value	48
3.2.3.2 The testing of broad-spectrum	49
3.2.3.3 The relevance of Elispot and TCID50	50
3.3 Part three: The neutralizing assay of rotavirus	51
3.3.1 The detection of neutralizing antibodies in rotavirus sera by TCID50.	51
3.3.2 The establishment of neutralizing test for rotavirus	52
3.3.4 The testing of repeatability of neutralization test	53
3.4 Part four: The preliminary application in the neutralizing assay	53
3.4.1 The screening of neutralizing antibodies	53
3.4.1.1 The immunity of mice.....	53
3.4.1.2 The spanning of neutralizing antibodies	54
3.4.2 The detection of antibodies in sera	56
4 Discussion.....	59
4.1 The trend of rotavirus and selection of samples.....	59
4.2 The separation, culture and identification of rotavirus.....	59
4.3 The establishment of Elispot for rotavirus	60
4.4 The application of Elispot	62
5 Conclusions and out look	64
References	65
Acknowledgement	80

摘要

轮状病毒是引起小儿腹泻的主因。全球每年有超过 1.25 亿婴幼儿腹泻是由轮状病毒引起的，并造成超过 60 万婴幼儿的死亡，且大部分死亡病例都发生在不发达的亚非国家。针对轮状病毒的治疗目前还没有特别有效的治疗药物，因此预防轮状病毒就显得至关重要；而预防轮状病毒最有效的方法就是研制轮状病毒疫苗，因此研制安全、广谱、高效的轮状病毒疫苗就成为当今各国政府及世界卫生组织（WHO）极为重要的任务。目前 TCID50 法是常用的检测轮状病毒感染力和轮状病毒中和抗体的方法，但由于 TCID50 法耗时长、主观误差大、工作量大等原因，限制其在大规模的筛选和试验中应用。因此建立一种快速、高效、准确的轮状病毒和轮状病毒中和抗体的检测方法对轮状病毒的病毒学研究和轮状病毒疫苗的开发都具有重要的作用和意义。

本论文建立了轮状病毒的分离，鉴定和扩大培养的方式，通过收集和分离培养不同的轮状病毒为以后的轮状病毒病毒学研究做准备。同时建立了一种新型的快速、高效轮状病毒及轮状病毒中和抗体的检测法——酶联免疫斑点法，该方法是酶联免疫斑点法和 ELISPOT 自动化扫描仪为基础，借助针对轮状病毒结构蛋白 VP6 的特异性酶标抗体 7H11 和 VP6 的特异性反应，通过 TMB 显色反应以区别感染和未感染细胞来实现检测的；在本论文中还从可靠性，稳定性等方面对建立的轮状病毒酶联免疫斑点法进行验证，通过对比发现新建立的轮状病毒酶联免疫斑点法不仅具有快速、可靠、准确等特点，而且还和传统的 TCID50 检测法具有很好的相关性。新建立的轮状病毒酶联免疫斑点法不仅可以用于轮状病毒中和抗体的检测还可以用于轮状病毒感染力的检测，同时在该论文中我们还以新建立的轮状病毒酶联免疫斑点法建立了轮状病毒中和抗体的筛选方法，同时还利用该方法对流调血清中中和抗体进行分析。

关键词：轮状病毒；酶联免疫斑点检测法；中和抗体筛选

Abstract

Rotavirus is the major pathogenesis of infantile diarrhea. 125 million infants all over the world caught diarrhea because of rotavirus and 60 thousand of them died of this disease. This often happened in undeveloped countries. No effective drugs have been developed by now, hence it is of significance to take precautions against rotavirus. As is known, vaccine is the most effective precaution. Then the development of safe and broad-spectrum of vaccine has become the object of increased interest. TCID₅₀ used to be a popular method for detecting neutralizing antibodies of rotavirus. But it was not convenient in large-scale screen because it was too time-consuming and subjective. Therefore, the establishment of an effective method was important to the investigation of rotavirus.

In this study, we established a new method of separating, identifying and culturing rotavirus to select different viruses. Besides, Elispot, a new method of rapidly detecting neutralizing antibodies of rotavirus was established. This method was based on Elispot and automatic screening. It could separate infected and uninfected cells through TMB reaction based on the reaction of the structural protein VP6 with its specific enzyme labeled antibody 7H11. This paper also evaluated the reliability and stability of Elispot. The results indicated that Elispot was rapid, reliable and accurate. Elispot could be applied not only in the detection of neutralizing antibodies of rotavirus but also in the detection of titer of rotavirus. In this study, we screened the antibodies and analyzed the neutralizing antibodies of epidemiological serum by Elispot.

Key words: rotavirus; Elispot; spanning of neutralizing antibodies

缩略词

英文缩写	英文全称	中文名
aa	Amino acid	氨基酸
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	Base pair	碱基对
CB	Carbon acid buffer	碳酸缓冲液
CLP	Core-like particle	核心颗粒
CPE	Cytopathic effect	致细胞病变效应
CTL	Cytotoxic T lymphocyte	细胞毒性 T 淋巴细胞
DLP	Double-layer particle	双层病毒颗粒
ds-RNA	Double-single ribonucleic acid	双链核糖核酸
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	二乙胺四乙酸
EIA	Enzyme-linked immunosorbant assay	酶联免疫吸附法
Ig	Immunoglobulin	免疫球蛋白
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
KD	Kilo Daltons	千道尔顿
Kan	kanamycin	卡那霉素
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
NSP	Non-structural protein	非结构蛋白
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
RV	Rotavirus	轮状病毒

RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	反转录聚合酶链式反应
TCID ₅₀	Tissue culture infective	半数组织感染剂量
TLP	Triple-layer particle	三层病毒颗粒
T	Triangulation number	三角划分值
VLPs	Virus-like particles	类病毒颗粒
VP	Virus protein	病毒蛋白

1 前言

小儿腹泻是儿童的常见和多发病。据世界卫生组织（WHO）的报告显示，每年全球大约有 150—200 万婴幼儿死于腹泻相关的疾病或并发症^[1]，其中轮状病毒是导致全球儿童急性和重症腹泻的主要原因。1963 年，Adams 和 Kraft 首次在腹泻小鼠的肠组织切片中观察到轮状病毒颗粒^[2, 3]，由于其类似车轮状的结构而被命名为轮状病毒（rotavirus RV）；人的轮状病毒是在 1973 被澳大利亚学者 Bishop 发现的^[4]。自从轮状病毒被发现以来，人们对轮状病毒的结构、流行病学特征、致病机理、感染复制机制及免疫保护机制进行了大量研究，为轮状病毒的预防及治疗提供了大量的理论支持。目前由于轮状病毒尚未有特别有效的治疗药，因此研制疫苗对预防轮状病毒引起的腹泻具有重要的意义，目前有 Rotateq（默克），Rotarix（葛兰素史克）及罗特威（兰州生物制品研究所）三种轮状病毒疫苗已经上市，且都具有较好的免疫保护效果。

1.1 轮状病毒性状

轮状病毒（RV）属于呼肠孤病毒（Reoviridae）科，轮状病毒属，是一种无包膜病毒^[5]；完整的轮状病毒具有三层衣壳（内层、中间层、外层）（如图 1），直径约为 75nm，表面光滑，具有感染性；缺失最外层衣壳的双层轮状病毒颗粒直径约为 60nm，外表较为粗糙，不具有感染性，单层颗粒较为少见^[6]。病毒的三层颗粒从内到外依次有 VP2，VP6，VP7 组成。轮状病毒的基因组是具有成节的双链 RNA（dsRNA），在宿主细胞浆内复制；轮状病毒外面两层衣壳均为二十面立方体，每个面有 13 个颗粒组成，两层颗粒之间有 132 个通道，其生物学功能目前还不太清楚，可能是病毒与外界的物质及核酸信息交换相关。

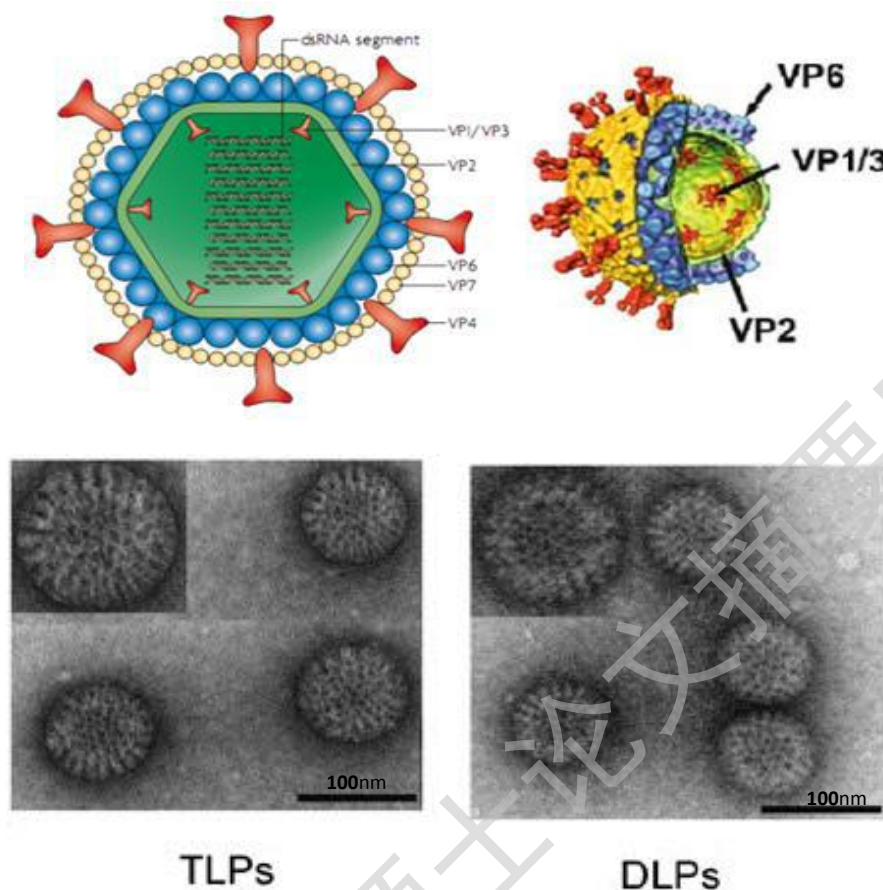


图 1. 轮状病毒结构示意图及电镜照片^[7, 8]

Fig 1 :The structure of rotavirus and EM of TLPs and DLPs

轮状病毒具有较高的稳定性，但是采用 EDTA、0.1% 的十二烷基磺酸钠可破坏其感染性。A 组轮状病毒具有较高的稳定性，可在自然环境中长期存活；但 B 组轮状病毒的稳定性较低、易失去感染力。轮状病毒还可被酚、甲醛、和 95% 乙醇等消毒剂灭活；56° C 孵育 1 小时可将轮状病毒完全灭活^[9]。

1.2 轮状病毒的基因组

轮状病毒基因组为成节的双链 RNA (dsRNA)，有 11 个基因片段组成，位于轮状病毒的核心衣壳内。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，可以清楚的观察到不同大小的基因片段。不同组的电泳图谱具有较大的差异，其中 A 组轮状病毒的基因组电泳图谱为典型的 4:2:3:2 型(如图 2)，因此也可以利用电泳图谱来区别不同组的轮状病毒。

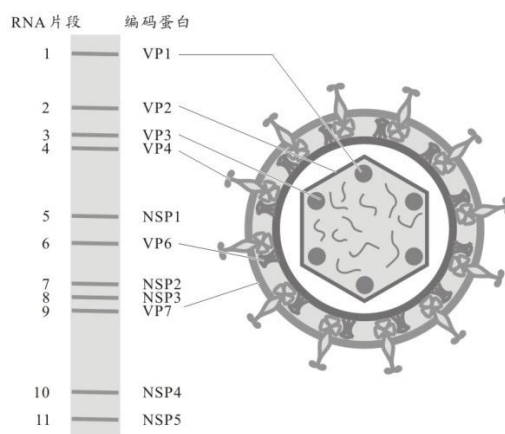


图 2: 轮状病毒基因组电泳示意图及其对应编码的蛋白^[10]

Fig 2: The genome and proteins of rotavirus

1.3 轮状病毒蛋白

轮状病毒编码 11 种蛋白（如表 1），按其具有的不同功能，可将其分为：轮状病毒内核蛋白（VP1, VP2, VP3）、轮状病毒结构（VP4, VP6, VP7）和轮状病毒非结构蛋白（NSP1—NSP5）。

表 1: 轮状病毒编码的蛋白^[100]

Table 1: Protein of rotavirus

RNA		编码蛋白			转录后修饰	位置及功能
基因片段	片段大小 (bp)	蛋白名称	蛋白大小 (kDa)			
1	3302	VP1	125		内核蛋白; RNA 聚合酶	
2	2690	VP2	103	十四烷基化	内核蛋白; 与 RNA 结合; 亮氨酸拉链	
3	2591	VP3	88		内核蛋白; 鸟苷转移酶; 甲基化酶	
4	2364	VP4 ^a	87	蛋白酶水解	病毒表面蛋白; 红细胞凝集作用; 中和抗原; 诱导病毒入胞; 决定病毒毒力	
5	1161	NSp	59		非结构蛋白; 锌指结构; 病毒的组装	

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库