

文章编号 :1009- 0002(2008)03- 0407- 03

研究报告

定量检测猕猴血清中重组人源化抗狂犬病毒单克隆抗体 间接 ELISA 法的建立

刘晓雷, 侯禹男, 陈知航, 单成启, 车津晶, 刘运龙, 宋艳霞, 苗小红, 程远国

军事医学科学院 微生物流行病学研究所, 北京 100071

[摘要] 目的: 建立定量检测血清中重组人源化抗狂犬病毒单克隆抗体(HuMabs) NM57 的间接 ELISA 法, 为药代动力学研究提供一种简单快速的方法。方法: 采用狂犬病毒糖蛋白包被酶标板、HRP 标记的 IgG- Fc 段为标记抗体, 建立定量检测 HuMabs NM57 的间接 ELISA 法, 并对其特异性、灵敏度、精密度及准确度进行检测。结果: 间接 ELISA 法检测 HuMabs NM57 的灵敏度为 5 ng/mL, 组内及组间精密度分别为 2.6%~6.0%、8.5%~11.3%。结论: 建立了灵敏度高、特异性强的检测 HuMabs NM57 的间接 ELISA 法, 精密度及准确度均符合药代动力学要求, 可用于猕猴及人血清中 HuMabs NM57 的检测。

[关键词] 重组人源化抗狂犬病毒单克隆抗体; 间接 ELISA 法; 定量检测

[中图分类号] R392.1

[文献标识码] A

Establishment of Indirect ELISA for Quantitative Measurement of Recombinant Human Rabies Monoclonal Antibody in Rhesus Serum

LIU Xiao-Lei, HOU Yu-Nan, CHEN Zhi-Hang, SHAN Cheng-Qi, SONG Yan-Xia,

LIU Yun-Long, CHE Jin-Jing, MIAO Xiao-Hong, CHENG Yuan-Guo

Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China

[Abstract] Objective: To establish indirect ELISA for quantitative measurement of recombinant human rabies monoclonal antibody(HuMabs)NM57 and provide a new convenient method for the investigation of pharmacokinetics. Methods: The microplate was coated with glycoprotein of rabies. HRP labeled IgG- Fc was used as labelled antibody. The established ELISA would be evaluated by the specificity, sensitivity, precision and accuracy. Results: The lower limit of sensitivity of the assay was 5 ng/mL. Intra- assay and inter- assay variability were 2.6%~6.0% and 8.5%~11.3%, respectively. Conclusion: The results showed that the established indirect ELISA was a sensitive and specific method and could be used for quantitative measurement of HuMabs NM57 in rhesus serum samples.

[Key words] indirect ELISA; recombinant human rabies monoclonal antibody; quantitative measurement

狂犬病是由狂犬病病毒引起的世界性人畜共患传染病, 一旦发病死亡率为 100%^[1]。狂犬病的暴露后预防是防治狂犬病的主要措施, 对暴露者应同时接受主动和被动免疫治疗, 以获得快速的保护作用^[2]。

人源抗狂犬病毒单克隆抗体(HuMabs)能特异性中和狂犬病毒的糖蛋白, 其主要作用机制为: 阻断病毒对敏感细胞的吸附^[3]; 抑制病毒内核内涵体的酸化溶合作用, 从而导致病毒的脱衣壳^[4]; 对已吸附细胞发挥作用, 使其解吸附或抑制受体介导的内吞; 抑制病毒的复制及其从细胞内释放^[5]。实验显示, HuMabs NM57 在病毒感染早期即发挥有效保护作用, 是一种安全性好、特异性强的被动免疫制剂。为了定量检测血清中的 HuMabs NM57 含量, 为药代动力学研究提供简单快速的方法, 我们建立了新的间接 ELISA 法。

1 材料和方法

1.1 材料

重组人抗狂犬病毒单克隆抗体由华北制药集团提供, 批号为 20060904; 狂犬病毒糖蛋白由 MTTI 公司提供, 批号为 52457; HRP 标记的 IgG- Fc 段抗体(Fc- HRP)由 Sigma 公司生产, 批号为 A- 0170; 酶标板条为 Costar 公司产品, 批号为 32105026。

1.2 标准品溶液的配制

精确抽取 HuMabs NM57 标准品, 将其用猕猴血清稀释成 5、10、25、50、100、200 ng/mL 等 6 个浓度值。

1.3 抗原包被板的制备

将狂犬病毒糖蛋白用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液 (0.05 mol/L) 配制成 0.3 µg/mL, 按照 100 µL/孔加入酶标板中, 4 避光放置 12 h; 弃去包被液, 用洗液洗板 5 次, 拍干; 每孔再加入 100 µL 2%酪蛋白, 37 温育 1 h, 拍干, 4 放置。

1.4 底物

底物包括 A 液、B 液。A 液为四甲基联苯胺(TMB), B 液为含

[收稿日期] 2007- 10- 09

[作者简介] 刘晓雷(1980-), 男, 硕士研究生

[通讯作者] 程远国, (E- mail)chengyg@nic.bmi.ac.cn

0.03% H₂O₂ 的乙酸钠。使用时将 A、B 液等体积混匀，每孔加 100 μL，显色 10 min。

1.5 HuMabs NM57 间接 ELISA 检测法

将稀释好的标准品系列溶液加入已包被好的酶标板，每孔 100 μL，37 ℃ 温育 1 h，用 PBS-T (0.05% 的 Tween-20) 洗板 5 次；每孔加入抗体 Fc- HRP 100 μL，37 ℃ 温育 1 h，用 PBS-T 洗板 5 次；每孔加入 100 μL 底物，37 ℃ 避光显色 10 min；加入 2 mol/L H₂SO₄ 100 μL 终止反应；用酶标仪检测波长为 450 nm 的吸光度值。

2 结果

2.1 间接 ELISA 法条件优化

2.1.1 Fc- HRP 抗体稀释度的选择 按 1 500、1 1 000、1 2 000 的比例用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液将 Fc- HRP 抗体稀释，按照上述间接 ELISA 法进行 HuMabs NM57 标准品溶液的检测。结果如图 1，在 1 1 000 至 1 500 的稀释范围内，Fc- HRP 抗体均有良好的显色反应，因此 Fc- HRP 抗体最佳稀释范围为 1 1 000 ~1 500。

2.1.2 HuMabs NM57 检测范围的确定 将已配制好的标准品系列溶液按照上述 ELISA 条件进行检测，并对标准品浓度及 D_{450nm} 值进行 4 参数 Logistic 回归（图 2），在 5 ~200 ng/mL 范围

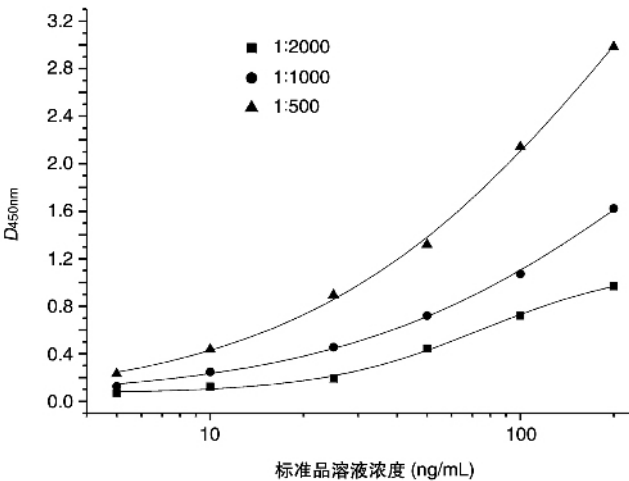


图 1 Fc- HRP 不同稀释度对间接 ELISA 法测定值的影响

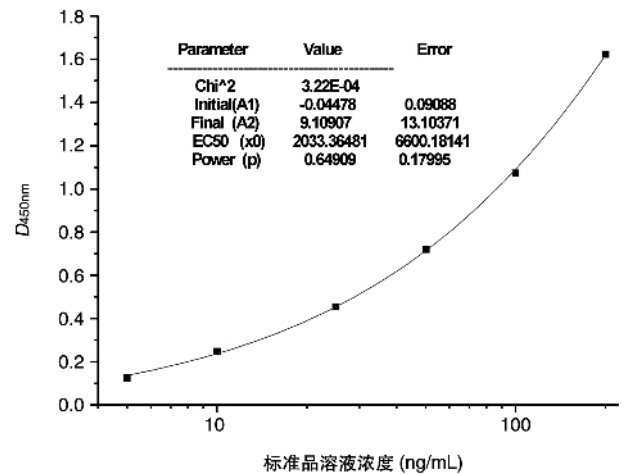


图 2 不同浓度 HuMabs NM57 标准品的 4 参数 logistic 函数拟合曲线

内，标准品浓度与 D_{450nm} 值呈现较好的 Logistic 曲线拟合关系。

2.2 间接 ELISA 测定 HuMabs NM57 的方法学评价及确证

2.2.1 特异性 按照制备标准曲线的方法制备 10 ng/mL 的 HuMabs NM57 样品，选用 10 mg/mL 的丙种球蛋白、重组人型肿瘤坏死因子受体- 抗体融合蛋白、CD20 单克隆抗体等与 HuMabs NM57 进行交叉反应试验，结果显示 HuMabs NM57 的测定回收率没有受到影响（表 1）。

2.2.2 精密度 选低、中、高（10、50、200 ng/mL）3 个浓度标准样品，板内每个浓度测定 6 次，连续测定 5 d，计算得板内精密度的 2.6% ~6.0%、板间精密度的 8.5% ~11.3%，表明在浓度 5 ~200 ng/mL 范围内测定的板内及板间重现性良好（表 2）。

2.2.3 回收率 选低、中、高（10、50、200 ng/mL）3 个浓度标准样品，每个浓度测定 6 次，以测定值与加入标准品量的比率计算回收率（表 3）。

2.2.4 灵敏度 选取 5 ng/mL 标准样品，重复测定 3 次，计算回收率（表 4）。结果显示，回收率满足大于 70% 的最低要求，且 RSD 小于 20%，符合最低定量限的要求。

2.3 猕猴血清样本中 HuMabs NM57 的检测

取给药后不同时间点采集的猕猴血清样品，用已建立的间接 ELISA 法检测血清中 HuMabs NM57 的含量。结果表明（图 3），我们建立的 ELISA 法可用于猕猴血清中 HuMabs NM57 的检测，为进一步的药代动力学研究提供了快速、灵敏的方法。

表 1 受试品 HuMabs NM57 加入重组人型肿瘤坏死因子受体- 抗体融合蛋白、重组人鼠嵌合抗 CD20、丙种球蛋白的回收率

交叉反应物	HuMabs NM57 检出量 (ng/mL) (n=2)	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
重组人型肿瘤 坏死因子受体- 抗体融合蛋白	11.6 10.1	116 101	108.5±0.6	9.8
重组人鼠嵌合 抗 CD20 单抗	9.8 10.8	98 108	103.0±7.1	6.9
丙种球蛋白	9.5 10.3	95 103	99.0±5.7	5.7

表 2 间接 ELISA 法检测加入猴血清中 HuMabs NM57 的精密度

标准品浓度 (ng/mL)	平均测定值 (ng/mL)	板内精密度 /% (n=6)	板间精密度 /% (n=5)
10	10.0±1.1	4.6	11.3
50	50.3±4.3	2.6	8.5
200	194.1±20	6	10.3

表 3 间接 ELISA 法检测加入猴血清中 HuMabs NM57 的回收率

浓度 (ng/mL)	平均回收率 (n=6)	RSD /%
10	102.8±4.9	4.8
50	100.3±2.6	2.6
200	101.2±10.5	10.4

表 4 ELISA 法检测加入猴血清中 HuMabs NM57 的灵敏度

加入量 (ng/mL)	检出量 (ng/mL)	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
5.0	4.6	92		
5.0	5.2	104	98.0±6.0	6.1
5.0	4.9	98		

3 讨论

狂犬病现今仍然是无法治愈的致死性疾病，注射狂犬疫苗是其防治措施，但疫苗起效时间慢，无法起到快速保护作用。

用。免疫球蛋白是最常用的被动免疫制剂, 与疫苗联合应用可起协同作用, 但其免疫反应较多、价格昂贵, 限制了其推广^[6-8]。重组人源化抗狂犬病毒单克隆抗体防治狂犬病的效果与人抗狂犬病毒免疫球蛋白近似, 且起效快、特异性强、副反应少、成本低, 为被动免疫制剂的发展开拓了新的空间^[9-13]。

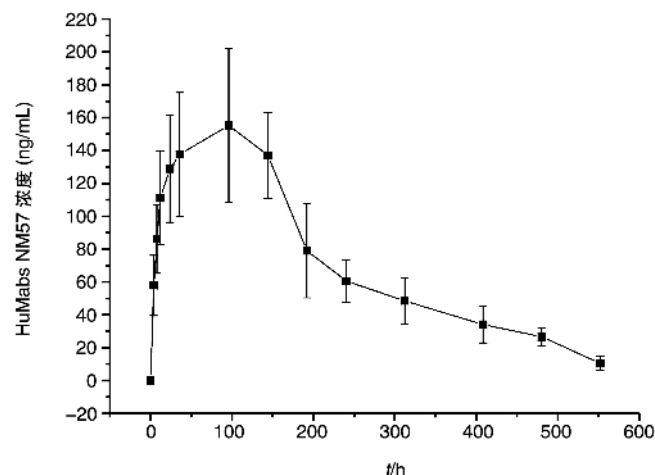


图3 猕猴血清中 HuMabs NM57 的浓度-时间曲线

目前, 检测狂犬病毒中和抗体的方法主要有小鼠中和试验 (MNT)、快速荧光灶抑制试验 (RFFIT) 及 ELISA 等。MNT 法实验费用高, 操作繁琐且周期长, 同时由于影响动物试验的因素较多, 使得实验结果误差较大, 重复性较低。RFFIT 法周期短, 准确率较高, 但操作较为复杂, 成本相对较高, 且对基础设施有较高的要求, 不利于推广。ELISA 法操作简单、快速、灵敏、经济并且适用于批量处理, 是蛋白多肽药代动力学研究的常用方法^[14]。我们选用与 HuMabs NM57 特异性结合的狂犬病毒糖蛋白包板, 用对结果影响最小的酪蛋白作为封闭液, 并用血清稀释单克隆抗体配制校正曲线, 这些改良方法可有效地降低血清本底的干扰, 提高试剂盒的准确度和精密度。结果表明, 我们所建立的间接 ELISA 法灵敏度高、特异性及重现性好, 完全符合药代动力学检测要求, 可用于猕猴及人血清中重组人源化抗狂犬病毒单克隆抗体的检测。

参考文献

- [1] Wilkerson J A. Rabies update[J]. Wilderness Environ Med, 2000,11 (1):9- 31.
- [2] 世界卫生组织狂犬病专家委员会第八次报告[C]. 郑海发, 俞永新, 董关木, 等译. 1995.
- [3] Turner G S. Immune response after rabies vaccination: Basic aspects[J]. Ann Inst Pasteur, 1985,136E:453- 460.
- [4] Dietzschold B, Wiktor T J, Lafon M, et al. Differences in cell to cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro[J]. J Virol, 1985,56:8- 12.
- [5] Dietzschold B, Tollis M, Lafon M, et al. Mechanisma of rabies virus neutralization by glycoprotein-specific monoclonal antibodies [J]. Virology, 1987,161(1):29- 36.
- [6] Kuwert E K. Passive immunization against rabies[J]. Immun Infekt, 1978,6(2):53- 61.
- [7] Wilde H, Chomchey P, Setal P. Adverse effects of equine rabies immune globulin[J]. Vaccine, 1989,7(1):1- 10.
- [8] 俞永新. 国内外狂犬病疫苗的发展和现状[J]. 上海预防医学杂志, 2006,18(5):216- 218.
- [9] Lafon M, Edelman L, Bouvet J P, et al. Human monoclonal antibodies specific for the rabies virus glucoprotein and N protein[J]. J Gen Virol, 1990,71(18):1689- 1696.
- [10] Dietzschold B, Gore M, Casali P, et al. Biological characterization of human monoclonal antibodies to rabies virus[J]. J Virol, 1990,64 (6):3087- 3090.
- [11] Ueki Y, Goldfarb I S, Harindranath N, et al. Clonal analysis of a human antibody response[J]. J Exp Med, 1990,171(1):19- 34.
- [12] Dorfman N, Dietzschold B, Kajiyama W, et al. Development of human monoclonal antibodies to rabies[J]. Hybridoma, 1994,13(5):397- 402.
- [13] Rando R F, Notkins A L. Production of human monoclonal antibodies against rabies virus[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1994,187: 195- 205.
- [14] Nagarajana T. A simple immuno-capture ELISA to estimate rabies viral glycoprotein antigen in vaccine manufacture [J]. Biopharma Thera Evid, 2006,34(1):21- 27.