

分析登革病毒非結構蛋白1之單株抗體的交叉反應力

Analyzing the Cross-Reactivity of Monoclonal Antibodies Against Dengue Virus Non-Structural Protein 1

學生：陳宣而 指導老師：范怡琴 老師

研究背景

- 登革熱(Dengue)疫情近年來在世界各地蔓延，全球大約有40億人處於流行區域，每年多達4億人感染，4萬人死於嚴重登革熱[1]。
- 登革病毒(Dengue Virus, DENV)屬於黃病毒屬(Flavivirus)，單股RNA病毒，分為I、II、III、IV四種血清型(D1、D2、D3、D4)。
- 多數感染者無症狀或有輕微的發燒，部分個案會發展成嚴重出血或休克的重症，其中一重症機制為抗體依賴性免疫加強反應(Antibody-dependent enhancement, ADE)。目前沒有專一性的抗病毒藥物，現有疫苗也因為可能引起ADE而困難重重[2]。
- 登革熱疫苗誘發的中和性抗體主要辨認病毒的結構蛋白套膜蛋白，但辨認套膜蛋白的抗體同時參與ADE；而病毒非結構性蛋白NS1(Nonstructural Protein 1)透過和宿主細胞進行交互作用，造成宿主血管滲漏和免疫功能異常，因此透過不參與ADE之NS1抗體抑制病毒致病可作為登革熱疫苗發展之策略之一，然而目前對NS1抗體特性的了解仍有限[3]。

研究目的

- 由於NS1抗體辨認登革病毒四種血清型能力和其抑制病毒致病能力有關，因此本研究分析NS1單株抗體的交叉反應力。
- 比較酵素結合免疫吸附分析法(ELISA)和斑點印跡法(dot blotting)分析NS1抗體之交叉反應力的結果。

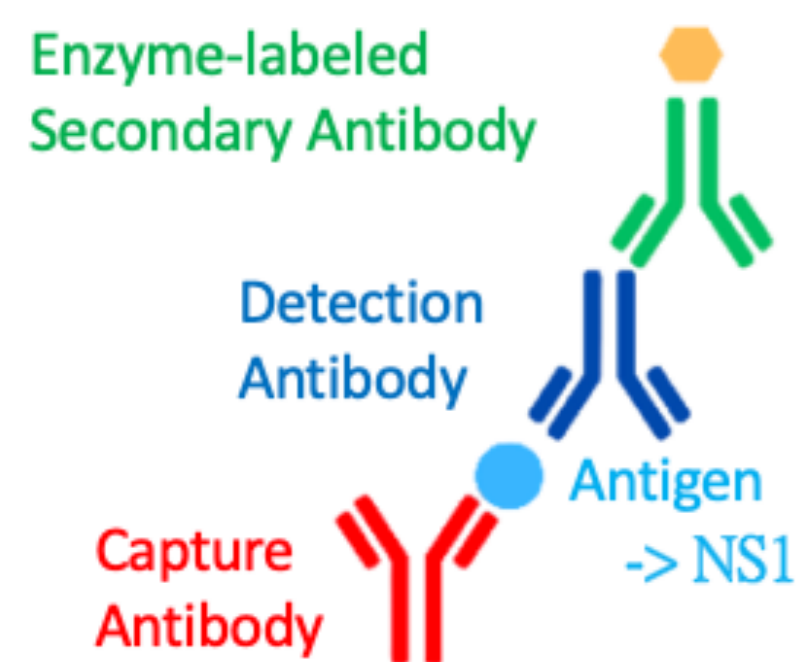
→ 抗體對於病毒的交叉反應會影響疫苗的效用與安全性，了解抗體的交叉反應結果有助於後續分析其與抑制病毒致病力的關係。

材料與方法

- NS1單株抗體與資料來源
根據台大微生物所蔡錦華教授實驗室生產並利用斑點印跡法(dot blotting)檢測多種單株抗體對不同血清型特異性的結果。

- 研究流程和方法
1. 決定進行ELISA時NS1抗原所需的濃度。
2. 利用ELISA分析NS1單株抗體之交叉反應力：給予相同濃度之四種血清型NS1和單株抗體進行反應，將單株抗體分別辨認四種血清型之吸光值(Optical Density, OD)除以陰性抗原之吸光值，計算得到的P/N比值 ≥ 3 判為陽性，代表抗體可辨識該血清型。經由序列稀釋單株抗體，計算辨識NS1的P/N比值為3時的抗體濃度或稀釋倍數作為其辨識NS1的能力。

ELISA實驗原理示意圖



Dot blotting需要將抗原乾燥、固定在膜上，再使其與抗體反應；ELISA是在液體環境下進行，相較之下更能反應出真實細胞內抗體與抗原的反應情況。

研究結果

一、決定抗原濃度

將抗原二倍稀釋五個稀釋倍數，分別為500、250、125、62.5、31.25 (ng/ml)，最後根據結果計算出OD值為1時的抗原濃度。

	D1	D2	D3	D4
OD值=1時抗原濃度	69.3	84.9	51.5	207.9

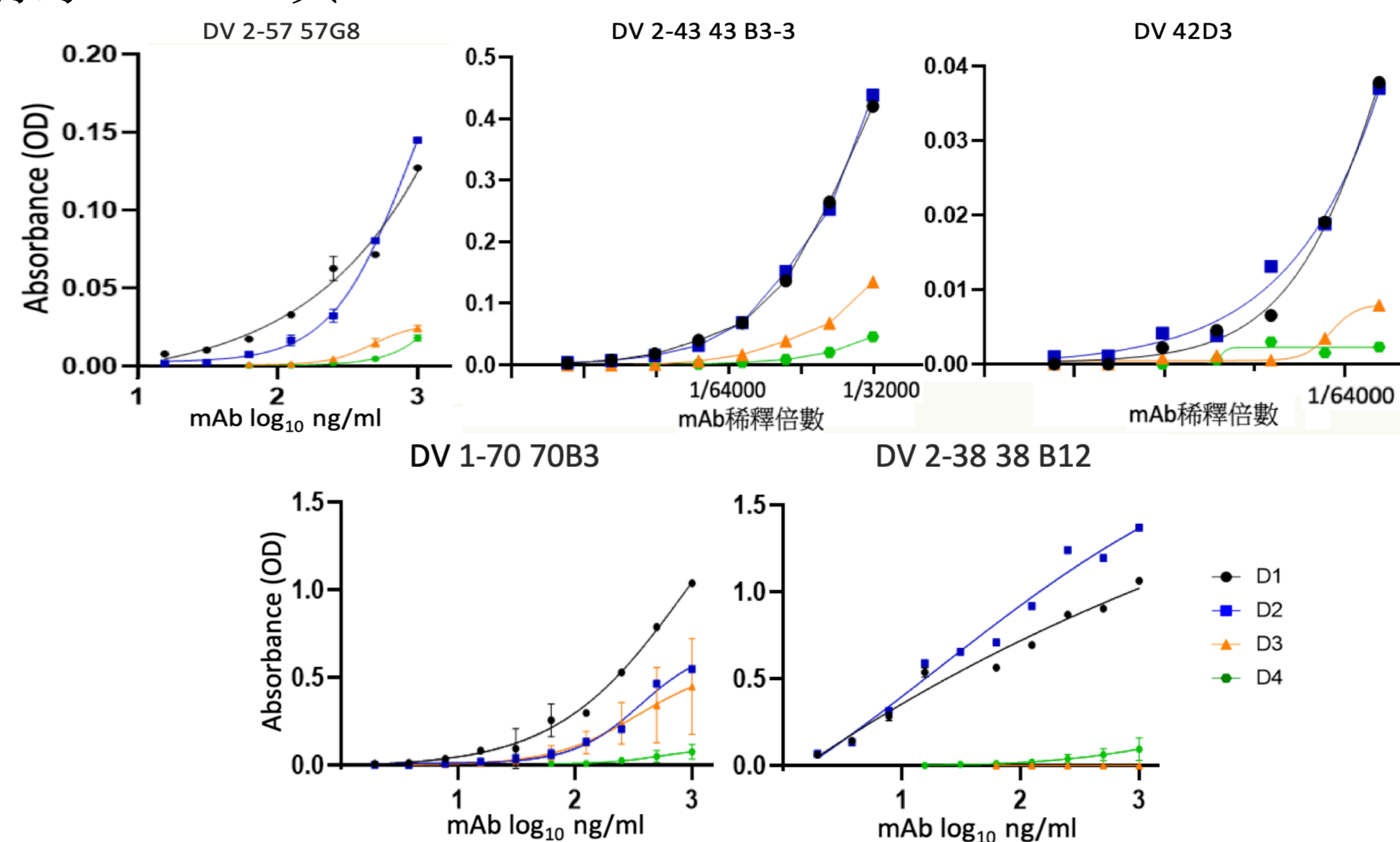
其中D4較弱，需要較高濃度的抗原才能有顯著的結合效果，因為後續需加入定量的各血清型抗原，以公平地進行評估抗體效力，而最終選定200ng/ml，以確保不會因抗原量過少而影響結果。

二、檢測單株抗體交叉反應力

本實驗共採用八支單株抗體，依照資料中dot blotting交叉反應結果將抗體分成三組：Flavivirus group or DENV serocomplex（能辨認D1-4四種血清型和其他黃病毒屬病毒，如茲卡病毒）、DENV subcomplex（辨認二至三種血清型）、DENV-2 type-specific（具有D2專一性）。

單株抗體	Dot blotting 結果	給予最高濃度的抗體時P/N值				ELISA 結果
		D1	D2	D3	D4	
DV 2-57 57G8	D1、D2、D3、D4、ZIKV	11.38	12.82	3.80	3.07	D1、D2、D3、D4
*DV 2-43 43 B3-3		61.04	63.57	20.34	7.55	
*DV 42D3		5.37	5.28	1.91	1.27	
DV 1-70 70B3	D1、D2、D3	113.77	60.45	28.61	6.00	D1、D2、D3、D4
DV 2-38 38 B12	D1、D2	134.98	178.08	1.037	8.15	D1、D2、D4
DV 2-75 75C8	D2	1.36	1.01	0.90	1.11	X
DV 2-23 23D11		1.18	1.32	1.73	1.87	
DV 1-46 46H2		0.92	0.73	0.82	0.95	
PC		185.37 \pm 87.84	183.23 \pm 81.64	165.36 \pm 41.43	138.19 \pm 54.06	D1、D2、D3、D4

▲ PC: Positive Control (YH0023- flavivirus group cross-reactive mAb 已知能辨認D1-4種血清型)，納入陽性對照組P/N值以排除因為抗原給予的量有誤而導致結果產生誤差的可能。純化過的單株抗體從1000ng/ml開始序列稀釋；*DV 2-43 43 B3-3和DV 42D3為未經純化之單株抗體，從1/1000開始稀釋，觀察陰性對照組數值到達穩定正常值時稀釋倍數，訂為以上之最高濃度，分別為：1/32000與1/64000。



單株抗體	Flavivirus group or DENV serocomplex	ELISA endpoint titers (ng/ml or dilution)			
		D1	D2	D3	D4
DV 2-57 57G8		51.65	87.26	668.83	568.53
DV 2-43 43 B3-3		1/1794679	1/1267423	1/389968	1/116111
DV 42D3		1/141108	1/266891	>1000	>1000
DV 1-70 70B3	DENV subcomplex	2.92	12.24	18.95	203.75
DV 2-38 38 B12		<1	<1	>1000	93.69
DV 2-23 23D11	DENV-2 type-specific	>1000	>1000	>1000	>1000
DV 2-75 75C8		>1000	>1000	>1000	>1000
DV 1-46 46H2		>1000	>1000	>1000	>1000

▲ 計算出P/N值=3(endpoint)時的單株抗體濃度或是稀釋倍數，可以看到雖然抗體被判定為可辨認NS1抗原，但是各個抗體之間以及各血清型辨認程度具有差異，大多皆是D1、D2有較顯著的反應效果。

討論

- D4免疫抗原性較差，同時有研究指出ELISA的敏感度較dot blotting高，可能可以解釋ELISA中DENV subcomplex抗體能辨認D4抗原，但是訊號較D1、D2低的情況。
- DENV-2 type-specific 抗體P/N值皆未達3，無法辨認任何一種血清型的NS1抗原，可能原因：其他抗體在原資料中能辨識DENV2 NGC strain 與16681 strain，而此三個單株抗體僅能辨識第二個病毒株，本實驗使用之DENV2（生產自HEK293細胞）抗原可能與第二個病毒株之基因序列相差大，而產生結果上的誤差。
- 登革病毒NS1抗體具有區分不同血清型病毒之能力，若能了解單株抗體之交叉反應能力，可協助分析專一性抗體是否對於病毒有較佳抑制效果，有利於更加有效與安全的疫苗開發。

參考資料

- World Health Organization. (2023, March). Dengue and severe dengue. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- Dejnirattisai, W. et al. Cross-Reacting Antibodies Enhance Dengue Virus Infection in Humans. Science 328, 745 (2010) DOI: [10.1126/science.1185181](https://doi.org/10.1126/science.1185181)
- Chen, H. R. et al. Dengue virus non-structural protein 1: a pathogenic factor, therapeutic target, and vaccine candidate. Journal of Biomedical Science (2018) 25:58 <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0462-0>