

# 抗 EV71 多克隆抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病毒的特异性富集

霍美俊<sup>1,2\*</sup>, 张长清<sup>2,3\*</sup>, 闫妍<sup>1,2</sup>, 赵凌云<sup>1</sup>, 貌盼勇<sup>4</sup>, 盛军<sup>5</sup>, 唐劲天<sup>1</sup>

1. 清华大学工程物理系; 粒子技术与辐射成像教育部重点实验室, 北京 100084
2. 北京中医药大学中药学院生物制药系, 北京 100102
3. 上海医药工业研究院, 上海 200040
4. 中国人民解放军第 302 医院传染病研究所病毒研究室, 北京 100039
5. 长春生物制品研究所, 长春 130062

**摘要** 手足口病是幼儿和儿童常见的一种传染病, 严重时会引起患者死亡。EV71 病毒(人肠道病毒 71 型)是引起手足口病的一种主要病毒。为寻求一条快速诊断 EV71 病毒感染的新方法, 将免抗 EV71 多克隆抗体, 通过戊二醛交联法偶联在氨基硅烷修饰的磁性纳米颗粒表面, 获得抗 EV71 多克隆抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒用于 EV71 病毒的检测。通过酶联免疫、免疫荧光方法证实了抗体耦合在磁性纳米颗粒表面, 并通过 BCA 法测得其耦合的效率为 94.1%。采用抗体偶联的磁性纳米颗粒对 EV71 病毒液中的病毒抗原进行吸附, 通过 ELISA 法检测上清液中病毒含量的变化, 并对磁性纳米颗粒表面吸附的病毒进行免疫荧光和核酸 PCR 检测, 证明了抗体偶联的磁性纳米颗粒可以与病毒抗原特异性结合。由于该纳米颗粒同时具有抗体的靶向性和磁性颗粒的磁响应性, 对病毒抗原有良好的特异性吸附能力, 可以用于低浓度大样本的 EV71 病毒抗原的富集检测。利用抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒, 同时具有可在病毒感染的细胞周围特异性富集和磁颗粒可在交变磁场下感应升温的双重功能, 将其作为磁感应热疗的靶向介质, 有望研制出病毒感染性疾病磁感应热疗的靶向介质, 为靶向热疗病毒感染性疾病提供新的尝试。

**关键词** EV71; 抗体偶联; 磁性纳米颗粒; 病毒检测; 磁感应热疗

**中图分类号** R318.08

**文献标识码** A

**文章编号** 1000-7857(2010)16-0025-06

## Specific Enrichment of Viral Antigen with EV71 Polyclonal Antibody-coupled Magnetic Particles

HUO Meijun<sup>1,2\*</sup>, ZHANG Changqing<sup>2,3\*</sup>, YAN Yan<sup>1,2</sup>, ZHAO Lingyun<sup>1</sup>, MAO Panyong<sup>4</sup>, SHENG Jun<sup>5</sup>, TANG Jintian<sup>1</sup>

1. Key Laboratory of Particle & Radiation Imaging, Ministry of Education; Department of Engineering Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China
2. Department of Biopharmaceuticals, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China
3. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040, China
4. Department of Virology, Institute of Infectious Diseases, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China
5. Changchun Institute of Biological Products, Changchun 130062, China

**Abstract** Hand, Foot, and Mouth Disease (HFMD) is a common viral illness of infants and children. The disease causes fever and blister-like eruptions in the mouth and/or a skin rash. Enterovirus 71 (EV71) is known as one of the major causative agents for HFMD, and is sometimes associated with severe central nervous system diseases. In this paper, a novel method for specific enrichment of viral antigen by

收稿日期: 2010-04-14; 修回日期: 2010-07-22

作者简介: 霍美俊, 硕士研究生, 研究方向为生物医学工程, 电子信箱: huomeijun86@126.com; 张长清, 硕士研究生, 研究方向为生物医学工程, 电子信箱: zhchq2933@163.com; 唐劲天 (通信作者, 中国科协所属全国学会个人会员登记号: S090800253M), 教授, 研究方向为肿瘤学, 电子信箱: tangji@mail.tsinghua.edu.cn; \* 为共同第一作者

EV71 polyclonal antibody-coupled magnetic particles is developed. Targeted magnetic nano-particles for specific recognition and enrichment of EV71 antigen were prepared by modifying the polyclonal antibody of EV71 onto the surface of amino-silane coated Magnetic Nanoparticles (MNPs) through glutaraldehyde cross-linking. Antiserum of EV71 was generated by immunization of rabbits with purified EV71 antigen. Next, the serum was precipitated by saturated ammonium sulfate and then was ligated on the surface of Amino-silane-modified magnetic particles through glutaraldehyde cross-linking. Thus, the targeted magnetic medium was prepared for specific enrichment of EV71. Both ELISA and immuno-fluorescence technique were applied to confirm the successful coupling of EV71 polyclonal antibody onto the surface of MNPs, with the coupling efficacy as high as 94.1%. Specific enrichment of the EV71 antigen by the above-mentioned targeted MNPs was studied by immunofluorescence and PCR. Except for the specific enrichment of the virus antigen, with the inductive heating property under Alternative Magnetic Field (AMF), the antibody coupled MNPs can be further applied as the agent of the Magnetic Mediated Hyperthermia (MMH) for the targeted treatment of infective diseases.

**Keywords** EV71; antibody-coupled; magnetic particles; virus detection; magnetic mediated hyperthermia

## 0 引言

病毒是许多疾病的病原微生物,严重威胁着人类健康。据估计,人类疾病的发生大约有70%与病毒感染有关,平均每人一生受病毒感染200多次。迄今为止,许多病毒感染性疾病仍然没有很好的治疗方法。特别是一些新出现的病毒,由于人群中没有相应的抗体,往往有较高的致病率及致死率,如2003年出现的非典型肺炎病毒(SARS)<sup>[1]</sup>、2009年4月出现的甲型流感病毒。寻找快速检测及治疗病毒感染的方法,是医学界的一个重要课题。

手足口病是幼儿和儿童常见的一种传染病,可以引起手、足、口腔等部位的疱疹,少数患者可引起神经性肺水肿、心肌炎、无菌性脑膜炎等并发症<sup>[2]</sup>。个别重症患儿病情发展较快,甚至会导致死亡。引发手足口病的病毒有20多种,常见的有柯萨奇病毒A16型(Cox A16)和新肠道病毒71型(EV71)<sup>[3]</sup>。导致严重并发症甚至死亡的病例多为EV71引起的感染<sup>[4]</sup>。目前尚缺乏对EV71病毒有效的疫苗和药物,只能对其进行预防或感染后及早治疗。传统的病毒检测方法是病毒滴定法,其容易因实验者的技术水平和经验差异造成判断的主观性<sup>[5]</sup>,而体外培养后利用单克隆抗体和免疫荧光法检测病毒的方法,用时较长,不适合爆发流行期间的快速检测。所以,开发EV71病毒准确、快速的诊断方法对于及早治疗EV71病毒感染具有重要意义。

抗体偶联的磁性纳米颗粒现已广泛用于细胞以及细菌的富集、纯化和分离<sup>[6-9]</sup>,近年来也逐渐被用于病毒颗粒的富集鉴定<sup>[10-14]</sup>。本研究拟采用抗EV71多克隆抗体为靶向磁性纳米颗粒偶联的抗体,制备出一种可以特异性富集EV71病毒的靶向磁性纳米颗粒,以期能够寻求一条快速诊断EV71病毒感染的新方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

EV71病毒、FITC标记及未标记的兔抗EV71多克隆抗体、羊抗兔荧光抗体、鼠抗EV71血清、羊抗鼠EV71荧光抗

体,均由中国人民解放军第302医院传染病研究所病毒研究室提供;氨基硅烷修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 磁性纳米颗粒,由清华大学工程物理系提供;Vero细胞(非洲绿猴肾细胞),由吉林大学疫苗中心提供;牛血清白蛋白、小牛血清,由北京军区兽医防治中心生物工程研究所提供。

恒温水浴摇床(太仓市科教器材厂),荧光倒置显微镜(日本Olympus公司),酶标仪(Labsystems公司),MJMiniPCR扩增仪、凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

BCA法(二喹啉甲酸法)试剂盒(PIERCE公司),QIAamp Viral RNA Mini Kit(病毒RNA提取试剂盒)(QIAamp公司),FBS(胎牛血清)(天津四季青生物制品公司)。其他试剂均为国产或进口分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 抗EV71多克隆抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒制备

##### 1.2.1.1 氨基硅烷修饰的磁性纳米颗粒与戊二醛交联

称取10mg氨基硅烷修饰的磁性纳米颗粒,悬浮于4mL磷酸缓冲液(PBS,0.01mol/L,pH 8.0)中,搅拌滴加25%的戊二醛水溶液545 $\mu\text{L}$ ,使戊二醛的终浓度为3%。在摇床150r/min的转速下室温反应3.5h后,通过磁性分离得到磁性纳米颗粒,并用PBS洗涤5次,去掉残留的戊二醛,加入4mL PBS混悬备用。

##### 1.2.1.2 抗EV71多克隆抗体与磁性纳米颗粒偶联

将4mL戊二醛交联的磁性纳米颗粒置于摇床混悬,滴加抗EV71多克隆抗体1mL,使其终浓度达到3mg/mL左右。摇床150r/min的转速下室温反应24h,磁性分离,收集上清液,用于计算偶联效率。抗体偶联的磁性纳米颗粒用PBS清洗5次,加入过量的牛血清白蛋白,4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。封闭后用PBS清洗5次,并溶于8mL PBS中,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

##### 1.2.2 免疫荧光法检测抗体与磁性纳米颗粒偶联

吸取0.5mL抗体偶联的磁性纳米颗粒液,用含30% FBS的PBST溶液(PBS内含有0.2% Tween-20)封闭4h。磁性分离,PBST液清洗5遍,加入羊抗兔荧光抗体50 $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1h。磁性分离,PBST液清洗5遍,加入500 $\mu\text{L}$  PBS液混悬。吸

取 50 $\mu$ L 磁性纳米颗粒滴于载玻片上,室温下晾干。以未偶联抗体的磁性纳米颗粒为对照,置于荧光显微镜下观察。

### 1.2.3 BCA 法测定偶联效率

将 BCA 蛋白定量试剂盒提供的蛋白质标准品稀释为 2000、1500、1000、750、500、250、100、50、25 $\mu$ g/mL。将 25mL A 液 (Protein Assay Reagent A) 与 500 $\mu$ L B 液 (Protein Assay Reagent B) 进行混合,配成标准工作液。取不同浓度的标准品各 100 $\mu$ L 分别与 2mL 标准工作液混匀后,37 $^{\circ}$ C 水浴 30min。吸取不同浓度的混合液各 100 $\mu$ L 至酶标板中,每个浓度设 5 个复孔,以 100 $\mu$ L 纯水为空白对照,测定 562nm 处的吸光度值。以每个浓度吸光度值的平均值为该浓度的吸光度值,绘制蛋白质浓度与吸光度值关系的标准曲线,并拟合方程。将抗体偶联前后的上清液稀释 3 倍,采用相同的方法测定其吸光度值,并根据拟合方程分别计算偶联前后的蛋白质浓度,从而计算抗体的偶联效率。

### 1.2.4 ELISA 法检测抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病毒抗原的吸附

#### 1.2.4.1 确定 ELISA 法检测病毒抗原的线性区间

用包被缓冲液对病毒液进行稀释,分别稀释 10、20、40、80、160、320、640、1280、2560、5120、10240 倍。将稀释后的液体包被于酶标板上,每个浓度设 8 个复孔,每孔 100 $\mu$ L。4 $^{\circ}$ C 包被过夜,使病毒抗原充分吸附于酶标板上。洗板机用 PBST 液洗板 5 次,晾干后加入 30% 的小牛血清封闭过夜。PBST 液洗板 5 次,加入用样品稀释液稀释 400 倍的兔抗 EV71 抗体 100 $\mu$ L,孵育 30min。PBST 液洗板 5 次,加入用样品稀释液稀释 2500 倍的羊抗兔荧光抗体 100 $\mu$ L,孵育 30min。PBST 液洗板 5 次,滴加 ELISA 显色剂 A 和 B,37 $^{\circ}$ C 显色 15min。酶标仪 450nm 下测定吸光度值。

#### 1.2.4.2 抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒吸附后的病毒液上清中病毒抗原含量变化

吸取 1mL 病毒液,加入 100 $\mu$ L 抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒,充分混合后 4 $^{\circ}$ C 放置 1h,磁性分离后吸取上清液,同时收集磁性纳米颗粒,备用。根据实验结果,将上清液用包被液稀释 200 倍,使其浓度在 ELISA 检测的线性范围内。将稀释后的液体包被于酶标板上,每孔 100 $\mu$ L,以 Vero 细胞的培养基上清液为阴性对照,病毒稀释液为阳性对照,氨基硅烷修饰的磁性纳米颗粒为普通对照。其余步骤同第 1.2.4.1 节。

### 1.2.5 核酸 PCR 法检测抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病毒抗原的吸附

收集第 1.2.4.2 节实验中吸附病毒后的抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒,用 PBST 清洗 5 次,再用无核酶水清洗 5 次,用 QIAamp Viral RNA Mini Kit 试剂盒提取病毒 RNA,方法如其说明书。将提取的 RNA 逆转录成 cDNA,然后进行 PCR 扩增。所用 PCR 引物为 5'GAGAGTTCTATAGGGGAAGT3' 和 5'AGCTGTGCTATGTGAATTAGGAA3'。对 PCR 产物进行电泳,在凝胶成像仪下观察有无相应条带,以检测抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒吸附病毒抗原的情况。

### 1.2.6 免疫荧光法检测抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病毒抗原的吸附

分别于 500、1000mL PBS 中各加入 10 $\mu$ L 病毒液,混匀后再各加入 100 $\mu$ L 抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒,在摇床 30r/min 转速下室温反应 30min。磁性分离,向磁性纳米颗粒中加入鼠抗 EV71 血清 10 $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。PBST 清洗 8 次,加入羊抗鼠 EV71 荧光抗体,37 $^{\circ}$ C 孵育 30min。PBST 清洗 8 次后,用 PBS 稀释,涂于盖玻片上,置于荧光显微镜下观察。

### 1.2.7 抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病变细胞的特异性富集

将 Vero 细胞接种于 6 孔板中,待其生长成单层后按照常规方法接种 EV71 病毒液。当 10% 的细胞发生病变后,加入 50 $\mu$ L FITC 标记的抗 EV71 多克隆抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒混悬液,与细胞培养基混匀后放入 33 $^{\circ}$ C 的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1h。荧光倒置显微镜下采用普通光和荧光两种模式,观察抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒在 EV71 感染并发生病变的细胞周围的聚集情况。

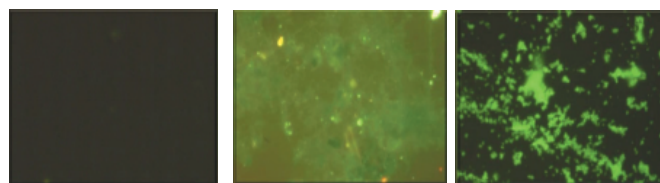
### 1.2.8 统计分析

数据处理采用 SAS 软件、ANOVA 方差分析法,检验各组数据间是否存在统计学差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 免疫荧光法检测抗体与磁性纳米颗粒的偶联效果

以未偶联抗体的磁性纳米颗粒为对照,检测抗 EV71 多克隆抗体与磁性纳米颗粒的偶联情况,结果如图 1 所示。抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒在荧光显微镜下发出绿色荧光,这是因为靶向磁性纳米颗粒表面偶联的 EV71 多克隆抗体与羊抗兔荧光抗体发生了特异性结合,因此可以证明抗 EV71 多克隆抗体可以很好地偶联在磁性纳米颗粒表面。由于未封闭的戊二醛修饰的磁性纳米颗粒可以和蛋白质交联,所以也能吸附羊抗兔荧光抗体显示荧光。但由于其对蛋白质的吸附没有特异性,也会吸附其他蛋白类物质,所以戊二醛修饰的磁性纳米颗粒不具备靶向吸附病毒抗原的能力。



(a) 氨基硅烷修饰 (b) 戊二醛修饰(未封闭) (c) 抗体偶联  
(a) Amino-silane modified (b) Glutaraldehyde modification (not be blocked) (c) Antibody coupled

图 1 不同磁性纳米颗粒的免疫荧光图

Fig. 1 Immunofluorescence map of different magnetic nanoparticles

### 2.2 BCA 法测定偶联效率

通过对不同浓度蛋白质标准品的吸光度值测定,绘制出蛋白质浓度与吸光度值关系的标准曲线如图 2 所示。

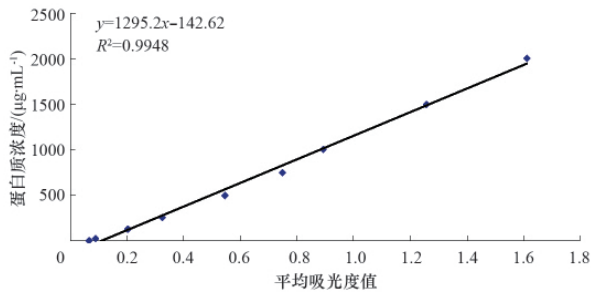


图2 蛋白质浓度与吸光度值的关系

Fig. 2 Relationship between the concentration of protein and the corresponding absorbance values

拟合方程为  $y=1295.2x-142.62$ 。将抗体偶联前后上清液(3倍稀释)的吸光度值分别带入方程,可计算出抗体偶联前的蛋白质浓度为  $993.3481 \times 3 (\mu\text{g}/\text{mL})$ ,抗体偶联后的蛋白质浓度为  $58.609 \times 3 (\mu\text{g}/\text{mL})$ ,则抗体的偶联效率为  $(993.3481 - 58.609) / 993.3481 = 94.1\%$ 。抗体的偶联效率较高,说明抗体可以很好地偶联到磁性纳米颗粒表面,确保抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒具有较好的靶向性。

### 2.3 ELISA 法检测抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病毒抗原的吸附

ELISA 法检测抗原(或抗体)时,吸光度与抗原(或抗体)含量在一段区间内存在线性关系。因此,采用 ELISA 法对抗原(或抗体)进行定量检测时,抗原(或抗体)的含量必须在此线性区间内才有意义。

#### 2.3.1 ELISA 法检测病毒抗原的线性区间

由图3可知,将病毒液稀释160~1280倍(图中箭头所示区间),稀释倍数与吸光度呈线性关系。在此稀释范围内,采用抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病毒进行吸附,测定病毒液上清液中病毒抗原含量的变化,可以获知该靶向磁性纳米颗粒吸附病毒的能力。所以,实验中将病毒液上清用包被液稀释了200倍,使其浓度在ELISA检测的线性区间内。

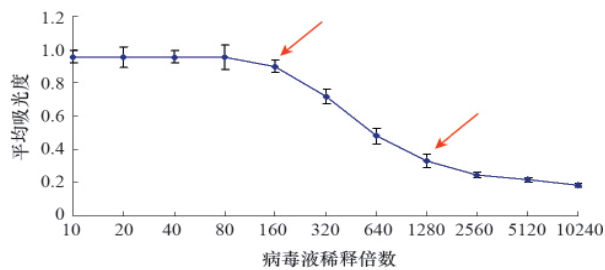


图3 吸光度值与病毒液稀释倍数之间的关系

Fig. 3 Relationship between dilution values and the corresponding absorbance values

#### 2.3.2 抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒吸附后的病毒液上清液中病毒抗原含量变化

以抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒为实验组, Vero 细胞的培养基上清液为阴性对照,病毒稀释液为阳性对照,氨基硅烷修饰的磁性纳米颗粒为普通对照,用磁性纳米颗粒对病毒

液中的病毒抗原进行吸附,通过 ELISA 法测定上清液中病毒抗原含量的变化情况,结果如图4所示。抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒和阴性对照没有统计学差异,说明抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒具有很强的吸附病毒的能力,吸附后上清液中的病毒含量很低。氨基硅烷修饰的磁性颗粒和阳性对照没有统计学差异,证明其没有吸附病毒颗粒作用,指示抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病毒抗原的吸附能力源于偶联的抗体与病毒抗原的特异性结合,而非磁性纳米颗粒性质。

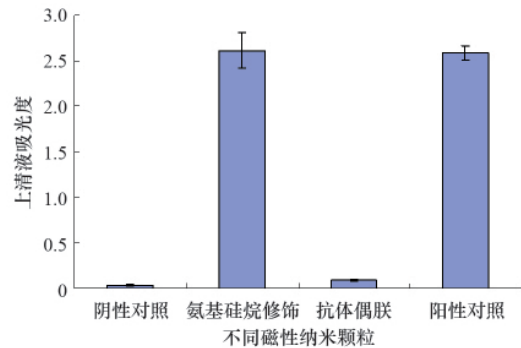


图4 磁性纳米颗粒吸附病毒后病毒液上清的吸光度

Fig. 4 Absorbance values of the supernatant after adsorbing virus with magnetic nanoparticles

### 2.4 核酸 PCR 法检测抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病毒抗原的吸附

对吸附病毒颗粒的抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒提取 RNA,并将提取的 RNA 逆转录后进行 PCR 扩增,其结果如图5所示。1、2、3泳道的扩增产物与7泳道阳性对照相同,即为EV71病毒,说明该靶向磁性纳米颗粒可以特异性吸附病毒抗原。

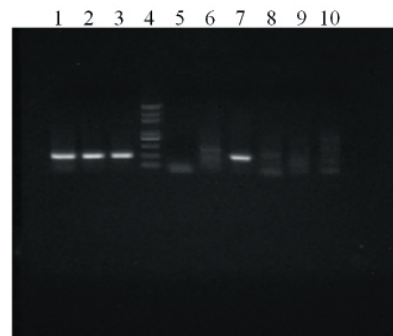


图5 电泳图

Fig. 5 Electrophoretogram

注:1~3泳道为抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒吸附病毒颗粒检测;4泳道为 marker;5、6泳道为阴性对照;7泳道为阳性对照;8~10泳道为封闭后的戊二醛修饰的磁性纳米颗粒吸附病毒颗粒检测。

Notes: 1 to 3 lanes are for the analysis of the virus adsorbed by the antibody-coupled magnetic nanoparticles; 4 lane is for the marker; 5 and 6 lanes are for negative control; 7 lane is for positive control; 8 to 10 lanes are for the analysis of the virus adsorbed by the glutaraldehyde modified magnetic nanoparticles which are blocked.

## 2.5 免疫荧光法检测抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对病毒抗原的吸附

靶向磁性纳米颗粒表面偶联的抗 EV71 多克隆抗体可与 EV71 病毒抗原发生特异性免疫反应, 加入鼠抗 EV71 血清后, 血清中的抗体也与 EV71 病毒抗原特异性结合, 加入羊抗鼠 EV71 荧光抗体进行孵育后, 在荧光显微镜下可以看到显绿色荧光的磁性纳米颗粒, 如图 6 所示。如果抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒不能吸附病毒抗原, 就不能结合鼠抗 EV71 抗体和羊抗鼠荧光抗体, 不能荧光显色。图 6 显示, 抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒对 50000 倍稀释和 100000 倍稀释后的病毒液中的 EV71 病毒都有较强的吸附能力, 可以用于低浓度大样本的病毒富集检测。

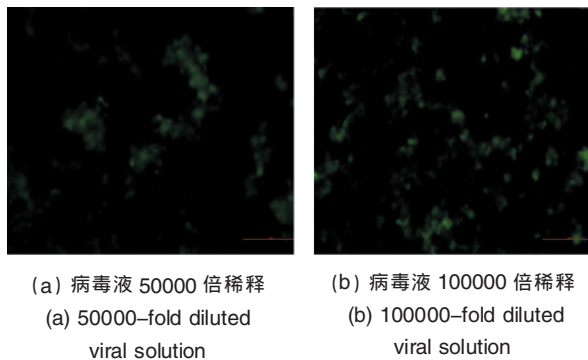


图 6 荧光显微镜检测抗体偶联的磁性颗粒对病毒抗原的富集  
Fig. 6 Enrichment of viral antigen with antibody-coupled magnetic particles under fluorescence microscopy

## 2.6 抗体偶联靶向磁性纳米颗粒对病变细胞的特异性富集

图 7 是在普通光模式与荧光模式下针对同一位置拍摄的照片, 图 7(a) 可以看到正常细胞和被 EV71 病毒感染后发生病变的细胞, 图 7(b) 中的荧光指示抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒所在的位置 (图中箭头所示)。对比两图可以发现, 该靶向磁性纳米颗粒在病变细胞周围特异性聚集, 证明其具有针对病毒抗原的靶向性。抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒同时具有可在病毒感染的细胞周围特异性富集以及磁颗粒可在交变磁场下感应升温的双重功能, 提示该纳米颗粒可以作为磁感应热疗的靶向磁介质, 用于病毒感染性疾病的热疗。

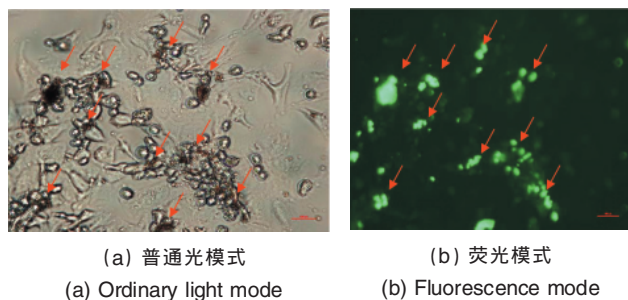


图 7 抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒在病变细胞周围特异性富集  
Fig. 7 Specific enrichment of antibody-coupled magnetic particles around virus-infected cells

## 3 讨论

随着人类对病毒认识的不断加强以及医疗科学的不断进步, 病毒感染性疾病的诊断和治疗方法也在不断推陈出新, 但是仍有许多病毒感染性疾病没有很好的治疗方法。针对许多病毒对热敏感的特性, 热处理的方法常用于病毒的灭活、医疗器械的消毒等方面。近年来也有一些关于热疗治疗病毒感染性疾病的报道, 如艾滋病<sup>[15-16]</sup>、带状疱疹等。作为一种对人体几乎无任何伤害的治疗方式, 随着医学物理技术的发展赋予热疗新的活力, 疾病临床治疗取得了突破。近年来, 迅速发展的肿瘤磁感应热疗技术将“铁磁材料交变磁场下感应升温”的基本物理学原理应用于肿瘤的临床治疗。崭新的治疗理念、治疗的精确靶向性、激发主动免疫的生物学特异性及研究的高度交叉融合等突出优势, 使得该治疗方法具有极为重要的理论价值和应用前景, 并有望在肿瘤的临床治疗上取得突破。随着生物学、材料学和电子技术等学科的综合发展, 磁感应肿瘤治疗取得了突破性进展。2008 年, 磁感应热疗 I 期临床试验获得成功。临床治疗中的磁介质采用氨基硅烷作为表面修饰剂, 细胞实验表明氨基硅烷大幅度提高了磁介质的特异靶向性, 肿瘤细胞对磁性纳米颗粒的摄取率是正常细胞的 500~2000 倍。临床治疗结果表明, 氨基硅烷修饰的磁性纳米颗粒是一种可行的临床效果良好的临床磁感应热疗介质。但迄今为止, 磁感应热疗的治疗范围仅限于肿瘤, 尚无报道将磁感应热疗应用于病毒感染性疾病的治疗。

本研究表明, 抗 EV71 多克隆抗体可以通过戊二醛交联法偶联在氨基硅烷修饰的磁性纳米颗粒表面, 且偶联效率可达到 94%。制备出的抗 EV71 多克隆抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒, 可以利用抗体与抗原特异性结合的原理, 产生主动靶向作用, 实现对 EV71 病毒的特异性吸附, 同时结合磁性纳米颗粒的磁响应性, 可通过磁性分离的方法方便地对病毒抗原进行富集。所以, 该靶向磁性纳米颗粒有望成为一种能够快速、简便、高效检测 EV71 病毒的新方法。

另外, EV71 病毒属于 RNA 病毒, 对热比较敏感, 可以在较高温度下失活。由于抗 EV71 多克隆抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒可以在 EV71 病毒感染的细胞周围特异性富集, 且磁性纳米颗粒可以在交变电场下升温, 所以, 该磁性纳米颗粒也是一种潜在的靶向磁介质, 可用于 EV71 病毒感染的磁感应热疗。以抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒为靶向介质的磁感应热疗, 为病毒感染性疾病的靶向治疗带来新的希望。

## 4 结论

本研究采用抗 EV71 多克隆抗体偶联氨基硅烷修饰的磁性纳米颗粒制备出的抗体偶联的磁介质, 同时具备抗体的主动靶向能力和磁性纳米颗粒的磁性分离的特点, 可以方便地对病毒进行富集, 结合 PCR 方法和酶联免疫分析方法, 可以从低病毒量样本中快速检测出 EV71 病毒。所以, 该靶向磁性纳米颗粒有望成为一种能够快速、简便、高效检测 EV71 病毒的新型纳米探针, 用于临床医学的辅助检测诊断。

利用抗体偶联的靶向磁性纳米颗粒可在病毒感染的细胞周围特异性富集以及磁颗粒可在交变磁场下感应升温的双重功能,将其作为磁感应热疗的靶向介质,有望研制出病毒感染性疾病磁感应热疗的靶向介质,为靶向热疗病毒感染性疾病提供新的尝试。

#### 参考文献 (References)

- [1] Gatica M R, Echániz A G. SARS: A new public health challenge [J]. *Salud Pública de México*, 2003, 45(2): 146-152.
- [2] Singh S, Chow V T, Phoon M C, et al. Direct detection of enterovirus 71 (EV71) in clinical specimens from a hand, foot, and mouth disease outbreak in singapore by reverse transcription-PCR with universal enterovirus and EV71-specific primers[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2002, 40: 2823-2827.
- [3] Arora S, Arora G, Tewari V. Hand foot and mouth disease: Emerging epidemics[J]. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 2008, 74(5): 503-507.
- [4] Wang S M, Ho T S, Shen C F, et al. Enterovirus 71, one virus and many stories[J]. *Pediatr Neonatol*, 2008, 49(4): 113-117.
- [5] Yang Z F, Qin S, Mo Z Y, et al. Detection of five different cells' sensitivities to enterovirus 71 using plaque forming assay [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2009, 17(6): 573-577.
- [6] Yan H, Ding C, Tian P, et al. Magnetic cell sorting and flow cytometry sorting methods for the isolation and function analysis of mouse CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg cells [J]. *Journal of Zhejiang University Science B*, 2009, 10(12): 928-932.
- [7] Kuhara M, Yoshino T, Shiokawa M, et al. Magnetic separation of human podocalyxin-like protein 1 (hPCLP1)-positive cells from peripheral blood and umbilical cord blood using anti-hPCLP1 monoclonal antibody and protein a expressed on bacterial magnetic particles[J]. *Cell Structure and Function*, 2009, 34(1): 23-30.
- [8] Gitta S, Marek K, Alida S, et al. Coupling immunomagnetic separation on magnetic beads with matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for detection of staphylococcal enterotoxin B[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(21): 6945-6952.
- [9] Ditzel H J. Affinity isolation of antigen-specific circulating B cells for generation of phage display-derived human monoclonal antibodies [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 562(1): 37-43.
- [10] Leary T P, Gutierrez R A, Muerhoff A S, et al. A chemiluminescent, magnetic particle-based immunoassay for the detection of hepatitis C virus core antigen in human serum or plasma [J]. *Journal of Medical Virology*, 2006, 78(11): 1436-1440.
- [11] Dati F, Denoyel G, Helden J. European performance evaluations of the ADVIA Centaur infectious disease assays: requirements for performance evaluation according to the European directive on in vitro diagnostics[J]. *Journal of Clinical Virology*, 2004, 30(1): S6-S10.
- [12] Lien K Y, Lin J L, Liu C Y, et al. Purification and enrichment of virus samples utilizing magnetic beads on a microfluidic system[J]. *Lab Chip*, 2007, 7(7): 868-875.
- [13] Lien K Y, Lee W C, Lei H Y, et al. Integrated reverse transcription polymerase chain reaction systems for virus detection [J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(8): 1739-1748.
- [14] Yang S Y, Lien K Y, Huang K J, et al. Micro flow cytometry utilizing a magnetic bead-based immunoassay for rapid virus detection[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24(4): 855-862.
- [15] Chen X P, Xiao B Q, Xu H F, et al. Procedure and clinical assessments of malariotherapy: recent experience in 20 HIV patients [J]. *Chinese Medical Journal*, 2003, 6(7): 1016-1021.
- [16] Chen X P. Studies of highly active antiretroviral therapy plus malariotherapy in attempt to eradicate SIV reservoirs in infected rhesus monkeys[J]. *Journal of Medical Primatology*, 2006, 35(4-5): 306-307.

(责任编辑 吴晓丽)

#### ·学术动态·

## “中国针灸学会第九届全国中青年针灸推拿学术研讨会”征文



中国针灸学会将于2010年11月在上海市召开“第九届全国中青年针灸推拿学术研讨会”。根据国家中医药管理局继续教育最新规定,参加本次大会将授予国家级中医药继续教育学分。

征文内容:针灸推拿基础理论研究,针灸推拿及针药结合临床研究,针灸推拿教学与学习经验,针灸推拿专科、专病、专技建设及人才培养,针灸推拿器材研究与开发应用,针灸推拿临床诊治规范化研究,针灸推拿临床特色经验与特种技术的应用,针灸推拿新进展、新成果研究等。会议期间将评选优秀学术论文。

征文截止时间:2010年9月30日。

联系方式:北京市东直门内南小街16号中国针灸学会学术部(100700)文碧玲,易文军;电话:010-64014411-3065;传真:010-64030959;电子信箱:caamzqh@yahoo.com.cn。

会议网址: <http://www.caam.cn/gonggao/gonggao/201003/793.html>。