



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110095593 A

(43)申请公布日 2019.08.06

(21)申请号 201910379115.9

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2019.04.28

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

(71)申请人 深圳贝安基因生物科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区桃源街
道塘朗社区塘兴路351号同富裕工业
城9号厂房3层

申请人 深圳市检验检疫科学研究院

(72)发明人 张立兵 秦智锋

(74)专利代理机构 深圳市宾亚知识产权代理有
限公司 44459

代理人 毋军

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

一种检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶
的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,包括预包被H5N8神经氨酸酶特异性单克隆抗体的96孔酶标板、阳性品、阴性品、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色液和终止液;将H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因片段克隆、重组表达、纯化复性后获得神经氨酸酶N8蛋白免疫抗原,利用生物信息学软件预测H5N8亚型禽流感病毒的神经氨酸酶抗原表位,人工合成相应多肽后将其预包被至酶标板,采用多肽-酶联免疫吸附(ELISA)模式,筛选杂交瘤中的神经氨酸酶特异性抗体,多肽-ELISA检测体系获得稳定的多个位点杂交瘤细胞株及单抗,构建双抗夹心N8蛋白-ELISA检测体系检测试剂盒。



1. 一种检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,其特征在于:以H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶N8重组蛋白为免疫原,表位多肽1-KIITIGSISLGLVVFNVLLHAVSIILTTLAL、2-DSKAVAVVHYGGVPTDVVN、3-NRPVLVISPDLSYRIGYLCAGLPS、4-GSFTLPVELSGRECLVPCFWV为筛选抗原,获得各表位特异性单克隆抗体,筛选配对夹心抗体对;包括预包被特异性抗原表位1单抗的96孔酶标板、N8阳性样品、阴性对照、辣根过氧化物酶标记抗原表位4抗体、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色液和终止液;所特异性抗原表位1单抗,用包被液稀释浓度至5微克/毫升后包被于96孔酶标板,100微升/孔,4℃反应过夜后洗板3次;每孔加入200微升含1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液进行封闭,37℃孵育2小时后洗板3次,晾干,即为试剂盒中预包被抗体的酶标板;取待测样品加入包被孔,分别以N8重组蛋白作为阳性对照、阴性血清作为阴性对照,37℃孵育1小时后洗板5次;每孔加入100微升1:5000稀释的HRP-特异性抗原表位4 IgG,37℃孵育1小时,洗板5次;每孔加入100微升显色液,37℃暗反应15分钟;每孔加入50微升终止液,震荡混匀,用酶标仪测定492纳米的吸光度值,以阴性对照孔的平均吸光度值的2.1倍为阈值判定阴阳性。

2. 如权利要求1所述的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,其特征在于:重组禽流感病毒H5N8亚型神经氨酸酶抗原,禽流感病毒H5N8亚型的神经氨酸酶核酸为模板,通过反转录聚合酶链式反应扩增获得血凝素基因,将该基因克隆于大肠杆菌原核表达载体并转化入宿主细胞后,用异丙基-b-d-硫代半乳糖苷诱导表达并纯化获得神经氨酸酶蛋白抗原。

3. 如权利要求1所述的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶特异性抗原的夹心-酶联免疫吸附试剂盒,其特征在于:所述酶标板分别预先包被5微克/毫升H5N8神经氨酸酶抗原表位1单抗作为捕获抗体,包被液为碳酸盐缓冲液,然后用1%的牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液进行封闭、晾干备用。

4. 如权利要求1所述的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶特异性抗原的夹心-酶联免疫吸附试剂盒,其特征在于:所述夹心抗体为5000稀释的HRP-特异性抗原表位4 IgG。

5. 如权利要求1所述检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶特异性抗原的夹心-酶联免疫吸附试剂盒,其特征在于:所述阳性样品是序列明确重组的H5N8蛋白,阴性血清是未被H5N8感染的正常人血清。

6. 如权利要求1所述检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶特异性抗原的夹心-酶联免疫吸附试剂盒,其特征在于:所述试剂盒应保存在-4℃,避免溶剂的反复冻融,同时显色液应避光保存。

7. 如权利要求1所述的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶特异性抗原的夹心-酶联免疫吸附试剂盒,其特征在于:所述试剂盒能够特异性地识别样本中的H5N8神经氨酸酶特异性抗原位点。

一种检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测试剂盒技术领域,特别是用于检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶(N8)特异性位点的夹心-酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒。

背景技术

[0002] 禽流感病毒是A型流感病毒属的负链RNA病毒,根据血凝素(Hemagglutinin,HA)和神经氨酸酶(Neuraminidase,NA)的抗原性差异可分成不同亚型,HA有16种抗原型,NA有9种抗原型,不同的HA和NA组成不同的流感病毒亚型。NA是一种糖蛋白,构成病毒囊膜纤突的重要成分,能够水解糖末端的唾液酸残基,使病毒颗粒从宿主细胞受体上释放。目前已确认可感染人的禽流感病毒亚型有H5N1、H9N2、H7N7、H7N2、H7N3、H5N2、H5N8、H10N7和H6N1,其中以H5N1最为常见。新型H5N8是2013年爆发的能感染人类的禽流感病毒亚型,人感染后主要表现为流感样症状,进而发展为肺炎和急性呼吸窘迫综合征等重症,患者重症比例高,致死率可达29%,因此引起了社会各界的广泛关注。

[0003] 研制有效的检测试剂和疫苗对H5N8亚型禽流感病毒的防控具有重要意义。目前,H5N8的检测多采用临床诊断与实验室诊断相结合的方法来进行,实验室诊断以反转录聚合酶链反应技术(RT-PCR)为主,所需仪器价格昂贵,并且对操作者要求较高。ELISA诊断方法具备高敏感性和特异性、检测方便易行、自动化程度高,而且价格低廉等诸多优点,已成为一种常用的检测方法。神经氨酸酶作为H5N8禽流感病毒第二个重要的表面抗原,是理想的检测靶标。

[0004] 因此本领域建立一种快速、简便、灵敏度高、特异性强、成本低的检测H5N8禽流感病毒特异性抗原的试剂盒具有重要的应用价值。

发明内容

[0005] 本发明目的是利用双抗夹心-酶联免疫吸附试验的模式,提供一种快速、简便、灵敏度高、特异性强的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的试剂盒,用于禽流感病毒快速检测和流行病学研究。

[0006] 本发明涉及一种特异性检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,包括以H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶N8重组蛋白为免疫原,表位多肽1-KIITIGSISLGLVVFNVLLHAVSIILTVLAL、2-DSKAVAVVHYGGVPTDVVN、3-NRPVLVISPDLSYRIGYLCAGLPS、4-GSFTLPVELSGRECLVPCFWV为筛选抗原,获得各表位特异性单克隆抗体,组建成功配对夹心抗体对;包括预包被特异性抗原表位1单抗的96孔酶标板、N8阳性样品、阴性对照、辣根过氧化物酶标记抗原表位4抗体、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色液和终止液;特异性抗原表位1单抗,用包被液稀释浓度至5微克/毫升后包被于96孔酶标板,100微升/孔,4℃反应过夜后洗板3次;每孔加入200微升含1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液进行封闭,37℃孵育2小时后洗板3次,晾干,即为试剂盒中预包被抗体的酶标板;取待

测样品加入包被孔,分别以N8重组蛋白作为阳性对照、阴性血清作为阴性对照,37℃孵育1小时后洗板5次;每孔加入100微升1:5000稀释的HRP-特异性抗原表位4IgG,37℃孵育1小时,洗板5次;每孔加入100微升显色液,37℃暗反应15分钟;每孔加入50微升终止液,震荡混匀,用酶标仪测定492纳米的吸光度值,以阴性对照孔的平均吸光度值的2.1倍为阈值判定阴阳性。

[0007] 本发明提供的重组禽流感病毒H5N8亚型神经氨酸酶抗原以神经氨酸酶核酸为模板,通过反转录聚合酶链式反应扩增获得血凝素基因,将该基因克隆于大肠杆菌原核表达载体并转化入宿主细胞后,用异丙基-b-d-硫代半乳糖苷诱导表达并纯化获得神经氨酸酶蛋白抗原。

[0008] 本发明提供的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,酶标板分别预先包被5微克/毫升的N8特异性抗原表位1单抗,包被液为碳酸盐缓冲液,然后用1%的牛血清白蛋白(BSA)磷酸盐缓冲液进行封闭、晾干备用。

[0009] 本发明提供的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,阳性样品是序列明确的重组H5N8蛋白,阴性血清是未被H5N8感染的正常人血清。

[0010] 本发明提供的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,试剂盒应保存在-4℃,避免溶剂的反复冻融,同时显色液应避光保存。

[0011] 本发明提供的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,能够特异性地识别样本中的H5N8神经氨酸酶特异性抗原位点。

[0012] 进一步方案为:重组禽流感病毒H5N8亚型神经氨酸酶抗原,禽流感病毒H5N8亚型的神经氨酸酶核酸为模板,通过反转录聚合酶链式反应扩增获得神经氨酸酶基因,将该基因克隆于大肠杆菌原核表达载体并转化入宿主细胞后,用异丙基-b-d-硫代半乳糖苷诱导表达并纯化获得神经氨酸酶蛋白抗原。

[0013] 进一步方案为:所述酶标板分别预先包被5微克/毫升H5N8神经氨酸酶抗原表位1单抗作为捕获抗体,包被液为碳酸盐缓冲液,然后用1%的牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液进行封闭、晾干备用。

[0014] 进一步方案为:所述夹心抗体为5000稀释的HRP-特异性抗原表位4IgG。

[0015] 进一步方案为:所述阳性样品是序列明确重组的H5N8神经氨酸酶蛋白,阴性血清是未被H5N8感染的正常人血清。

[0016] 进一步方案为:所述试剂盒应保存在4℃,避免溶剂的反复冻融,同时显色液应避光保存。

[0017] 进一步方案为:所述试剂盒能够特异性地识别样本中的H5N8神经氨酸酶特异性抗原位点。

[0018] 本发明的优点及积极效果:

[0019] (1) 本发明首次提供H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶双抗夹心-ELISA检测方法;

[0020] (2) 本发明试剂盒的捕获抗体、夹心HRP标记抗体均为鼠源杂交瘤单克隆腹水,容易大量获取并且纯度高;

[0021] (3) 本发明试剂盒表位1、表位4单克隆抗体特异性、亲和力高,能够有效配对识别H5N8神经氨酸酶,快速检测H5N8感染;

[0022] (4) 本发明试剂盒具有成本低、操作简便、速度快、灵敏度高、特异性强等优点,能

够被基层单位广泛使用。

附图说明

[0023] 图1为流感病毒示意图；

[0024] 图2为本发明的H5N8禽流感病毒神经氨酸酶双抗夹心-酶联免疫吸附检测试剂盒的制备工艺流程图；

[0025] 图3为本发明的H5N8禽流感病毒株的神经氨酸酶基因测序结果；

[0026] 图4为本发明的H5N8禽流感病毒株的神经氨酸酶重组蛋白表达 SDS-PAGE电泳鉴定结果；

[0027] 图5为本发明的H5N8禽流感病毒株的神经氨酸酶氨基酸序列的抗原性、亲水性和表面可及性分析结果；

[0028] 图6为本发明的H5N8禽流感病毒株的神经氨酸酶抗体免疫印迹实验鉴定结果。

具体实施方式

[0029] 以下实施例用来解释说明本发明，而不是对本发明进行限制，在本发明的精神和权利要求的保护范围内，对本发明作出的任何修改和改变，都落入本发明的保护范围。

[0030] 如图1至图6所示，本发明涉及一种特异性检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒，流程工艺(见附图2)包括以H5N8 亚型禽流感病毒神经氨酸酶N8重组蛋白为免疫原，表位多肽 1-KIITIGSISLGLVVFNVLLHAVSIILTIVLAL、2-DSKAVAVVHYGGVPTDVVN、3-NRPVLVISPDLSYRIGYLCAGLPS、4-GSFTLPVELSGRECLVPCFWV为筛选抗原，获得各表位特异性单克隆抗体，组建成功配对夹心抗体对；包括预包被特异性抗原表位1单抗的96孔酶标板、N8阳性样品、阴性对照、辣根过氧化物酶标记抗原表位4抗体、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色液和终止液；特异性抗原表位1单抗，用包被液稀释浓度至5微克/毫升后包被于96孔酶标板，100微升/孔，4℃反应过夜后洗板3次；每孔加入200微升含1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液进行封闭，37℃孵育2小时后洗板3次，晾干，即为试剂盒中预包被抗体的酶标板；取待测样品加入包被孔，分别以N8重组蛋白作为阳性对照、阴性血清作为阴性对照，37℃孵育1小时后洗板5次；每孔加入100微升1:5000稀释的HRP-特异性抗原表位4IgG，37℃孵育1小时，洗板5次；每孔加入100微升显色液，37℃暗反应15分钟；每孔加入50微升终止液，震荡混匀，用酶标仪测定492纳米的吸光度值，以阴性对照孔的平均吸光度值的 2.1倍为阈值判定阴阳性。

[0031] 本发明提供的重组水禽流感病毒H5N8亚型神经氨酸酶抗原以神经氨酸酶核酸为模板，通过反转录聚合酶链式反应扩增获得血凝素基因，将该基因克隆于大肠杆菌原核表达载体并转化入宿主细胞后，用异丙基-b-d-硫代半乳糖苷诱导表达并纯化获得神经氨酸酶蛋白抗原。

[0032] 本发明提供的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒，酶标板分别预先包被5微克/毫升的N8特异性抗原表位1 单抗，包被液为碳酸盐缓冲液，然后用1%的牛血清白蛋白(BSA)磷酸盐缓冲液进行封闭、晾干备用。

[0033] 本发明提供的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒，阳性样品是序列明确的重组H5N8神经氨酸酶蛋白，阴性血清是未被H5N8感染的正常人

血清。

[0034] 本发明提供的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,试剂盒应保存在-4℃,避免溶剂的反复冻融,同时显色液应避光保存。

[0035] 本发明提供的检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒,能够特异性地识别样本中的H5N8神经氨酸酶特异性抗原位点。

[0036] 本发明通过下列技术方案完成:

[0037] 重组禽流感病毒H5N8亚型神经氨酸酶抗原以神经氨酸酶核酸为模板,通过反转录聚合酶链式反应扩增获得血凝素基因,将该基因克隆于大肠杆菌原核表达载体并转化入宿主细胞后,用异丙基-b-d-硫代半乳糖苷诱导表达并纯化获得神经氨酸酶蛋白抗原。所述的禽流感病毒H5N8亚型神经氨酸酶基因具有SEQ ID No.1所示的核苷酸开放读码框序列,上述的核苷酸序列经一个或多个核苷酸添加、删除、替换、修饰等突变后得到的重链可变区核苷酸序列和轻链可变区保守性变异序列,其所编码的氨基酸序列组成的基因片段,编码具有SEQ ID No.2所示的多肽序列仍保留特异结合H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的抗原特异性能力。重组禽流感病毒 H5N8亚型神经氨酸酶抗原的制备方法的步骤如下:

[0038] 1) 禽流感病毒H5N8亚型神经氨酸酶的核糖核酸为模板(见附表3),通过反转录聚合酶链式反应方法扩增获得血凝素基因,测序鉴定序列正确

[0039] (见附图3);

[0040] 2) 将神经氨酸酶基因插入到原核表达载体PET28a,获得含有神经氨酸酶基因的原核表达重组载体PET-神经氨酸酶;

[0041] 3) 将该重组载体转化宿主细胞BL21,并用异丙基-b-d-硫代半乳糖苷诱导;

[0042] 4) 诱导表达的蛋白经Ni-NTAArgarose纯化系统可得到纯的H5神经氨酸酶蛋白抗原,SDS-PAGE电泳鉴定目标蛋白正确(见附图4)。

[0043] 2、利用马德里康普顿斯大学医学免疫学团队基于Kolaskar和Tongaonkar 方法开发的生物信息学软件PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES程序,对 H5N8亚型禽流感病毒株的神经氨酸酶氨基酸序列进行分析,根据抗原性、亲水性和表面可及性指数的加强原则(见附图5),预测出抗原表位多肽,选择 1-KIITIGSISLGLVVFNVLLHAVSIILTIVLAL、2-DSKAVAVVHYGGVPTDVVN、3-NRPVLVISPDLSYRIGYLCAGLPS、4-GSFTLPVELSGRECLVPCFWV(见附表2)。人工合成相应多肽,用包被液稀释浓度至10微克/毫升包被于96孔酶标板,100微升/孔,4℃反应过夜后洗板3次。每孔加入200微升含1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液进行封闭,37℃孵育2小时后洗板3次,晾干,即为试剂盒中预包被抗原的酶标板;取待测样品加入包被孔,分别以重组蛋白作为阳性对照、阴性血清作为阴性对照,37℃孵育1小时后洗板5次;每孔加入 100微升1:5000稀释的HRP-IgG,37℃孵育1小时,洗板5次;每孔加入100 微升显色液,37℃暗反应15分钟;每孔加入50微升终止液,震荡混匀,用酶标仪测定492纳米的吸光度值,以阴性对照孔的平均吸光度值的2.1倍为阈值判定阴阳性(见附表1)。ELISA筛选检测结果见表1如下:

[0044] ELISA筛选检测结果表1

[0045]

夹心	夹心	夹心	夹心	夹心	夹心	表位 1 肽	表位 4 肽	重组蛋白	重组蛋白
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.9548	2.4641	2.2966	2.006	2.3743	0.3178	2.7299	2.7218	2.7773	2.784
2.0494	2.0953	2.251	2.2015	2.6655	0.3743	2.6917	2.7006	2.7333	2.81
2.2523	2.4378	2.3674	2.0923	2.7242	0.2425	2.6018	2.6354	2.7673	2.7514
2.1169	2.0849	2.2376	2.1459	2.4989	0.2401	2.4722	2.636	2.7164	2.7108
2.1919	2.165	2.332	2.023	2.443	0.1113	2.3805	2.3629	2.5141	2.557
2.1509	1.7846	2.2217	1.9955	2.3266	0.1127	2.1153	2.2551	2.6053	2.6329
1.5895	1.6651	2.1115	1.9562	2.3095	0.1151	2.1211	2.1985	2.4871	2.5471
0.0611	0.0612	0.0582	0.0562	0.2944	0.2704	0.2681	0.2416	0.2752	0.3743
样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	阳性对 照	阴性对 照	表位 1 抗 体	表位 2 抗 体	表位 1 抗 体	表位 2 抗 体

[0046] 3、利用原核表达的经氨基酸酶蛋白作为免疫原杂交瘤的制备。

[0047] 小白鼠：雌性，6周龄Balb/c鼠购自广东省实验动物中心，并在深圳市疾控中心饲养实验。

[0048] 我们使用标准的体内免疫方式和PEG融合方法获得单克隆抗体，详细方法参见Ed Harlow et al, "Antibodies A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory 1988. 简要过程如下：

[0049] a) 小鼠免疫：

[0050] 将上述预处理的纯化蛋白抗原与福氏完全佐剂(CFA)等体积混合乳化，经四肢肌肉多点注射，每只每次注射300ul。首次免疫后15d和29d，分别用同样剂量的蛋白抗原加弗氏不完全佐剂(IFA)进行加强免疫。第二加强后采血检测HI的抑制效价，当效价达到1:640后，取小鼠脾脏做融合。融合前72hr再次加强免疫，经尾静脉注射病抗原1次，50ul/只。制备10块融合板，编号1-10。

[0051] b) 融合、杂交瘤的筛选：

[0052] 取血清HI滴度最高的小鼠脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞相融合，先把脾脏研磨得到脾细胞悬液，然后与细胞数低十倍的处于对数生长期的SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞混合，经PEG1500作用1min将两种细胞融合一起，然后把融合细胞液100ml分装到10块96孔板中培养。融合培养基为含HAT和 20%FBS的RPMI1640完全筛选培养基。抗原特异性克隆通过免疫蛋白和合成多肽间接ELISA和免疫印迹(WB)实验筛选(见附图6)，经3次克隆化后，得到稳定的单克隆抗体细胞株。

[0053] 5) 筛选结果：

[0054] 获得12株单克隆抗体，其中BA2019-3B8、BA2019-5F7通过竞争ELISA 法、夹心ELISA法配对成功。

[0055] 6) 杂交瘤的培养：

[0056] 稳定的杂交瘤单克隆抗体细胞株先在二氧化碳培养箱中扩增培养，经 96孔转移

至24孔,再转移至50ml细胞瓶经扩增培养。然后收集细胞瓶内的细胞注射到小鼠腹腔内,7-10天后从小鼠腹腔中吸取腹水。

[0057] 7) 单克隆抗体的纯化、HRP标记:

[0058] 腹水先用50%的硫酸铵沉淀处理,然后对PBS, pH7.2透析,之后用 PROTEIN A agarose下纯化,得到纯化后的单克隆抗体,经SDS-PAGE鉴定纯化后的单克隆抗体纯度,取10mg做HRP标记。

[0059] 4、H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶双抗夹心-酶联免疫吸附检测试剂盒的制备方法,具体制备工艺流程图,其步骤如下:

[0060] (1) 准备包被特异性抗原表位1BA2019-3B8单抗的96孔酶标板、神经氨酸酶重组蛋白阳性样品、阴性对照、辣根过氧化物酶标记抗原表位4抗体(BA2019-5F7-HRP)、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色液和终止液;特异性抗原表位1单抗,用包被液稀释浓度至5微克/毫升后包被于96孔酶标板,100微升/孔,4℃反应过夜后洗板3次;每孔加入200微升含1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液进行封闭,37℃孵育2小时后洗板3次,晾干,即为试剂盒中预包被抗体的酶标板;取待测样品加入包被孔,分别以N8重组蛋白作为阳性对照、阴性血清作为阴性对照,37℃孵育1小时后洗板5次;每孔加入100微升1:5000稀释的HRP-特异性抗原表位4IgG,37℃孵育1小时,洗板5次;每孔加入100微升显色液,37℃暗反应15分钟;每孔加入50微升终止液,震荡混匀,用酶标仪测定492纳米的吸光度值,以阴性对照孔的平均吸光度值的2.1倍为阈值判定阴阳性。

[0061] (2) 特异性抗原表位1BA2019-3B8单抗,用包被液稀释至5微克/毫升后加入96孔酶标板,100微升/孔,4℃反应过夜,用洗涤液洗板3次;每孔加入200微升含1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液进行封闭,37℃孵育2小时,用洗涤液洗板3次,晾干。

[0062] (3) 试剂盒所需溶液的制备:

[0063] 包被缓冲液(0.05摩尔/升碳酸盐缓冲液, pH9.6): 1.59克碳酸钠(Na_2CO_3), 2.93克碳酸氢钠(NaHCO_3), 加入1000毫升蒸馏水,溶解混匀。

[0064] 磷酸盐缓冲液(0.01摩尔/升PBS, pH7.4): 8.0克氯化钠(NaCl), 0.2克磷酸二氢钾(KH_2PO_4), 2.9克磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)和0.2克氯化钾(KCl), 加入1000毫升蒸馏水,溶解混匀。

[0065] 封闭液: 1克牛血清白蛋白, 加入100毫升PBS洗液, 溶解混匀。

[0066] 样品稀释液: PBS中加入1%牛血清白蛋白及0.1%吐温-20, 调节pH至7.4。

[0067] 酶标抗体: 辣根过氧化物酶标记抗原表位4抗体(BA2019-5F7-HRP), 1:5000倍稀释后使用。

[0068] 浓缩洗涤液: 含有1%吐温-20, pH7.4的100毫摩尔/升PBS, 洗涤时稀释10倍使用。

[0069] 显色液: 由酶底物A溶液、B溶液和底物C混匀组成。A溶液: 5.1克柠檬酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$), 18.4克磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 加入1000毫升蒸馏水混匀; B溶液: 30%双氧水(H_2O_2) 1毫升; 底物C: 邻苯二胺(OPD) 粉末1克。

[0070] 终止液(2摩尔/升的硫酸溶液): 取108.7毫升98%浓硫酸加入891.3毫升水中, 混匀冷却。

[0071] (4) 预包被抗体96孔酶标板和试剂盒所需溶液均保存在4℃, 避免溶剂的反复冻融, 同时显色液应避光保存。

[0072] (5) 本发明试剂盒检测血清样本的操作方法如下：病毒采样本标本灭活提取后离心10分钟，取上清检测；在预包被特异性抗原表位1BA2019-3B8 单抗的酶标板中加入100u1的待测样本液，分别以纯化蛋白作为阳性对照、阴性血清作为阴性对照，100微升/孔，37℃孵育1小时，用洗涤液洗板3次；在上述酶标板反应孔中加入1:5000稀释的酶标抗体，100微升/孔，37℃孵育1小时，用洗涤液洗板5次；每孔加入100微升显色液，37℃避光反应15分钟；每孔加入50微升终止液，用酶标仪读取在492纳米波长下的吸光度值；以样品OD492≥阴性对照孔平均OD492的2.1倍为阳性、样品OD492<阴性对照孔平均OD492的2.1倍为阴性。

[0073] 实施例一预测及确定H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶(6)的线性B细胞抗原表位，

[0074] (1) 利用马德里康普顿斯大学医学免疫学团队基于基于Kolaskar和 Tongaonkar方法开发的生物信息学软件PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES程序，对H5N8亚型禽流感病毒浙江株的神经氨酸酶氨基酸序列进行分析，根据抗原性、亲水性和表面可及性指数的加强原则，预测出抗原表位多肽，选择1-KIITIGSISLGLVVFNVLLHAVSIILTVLAL、2-DSKAVAVVHYGGVPTDVVN、3-NRPVLVISPDLSYRIGYLCAGLPS、4-GSFTLPVELSGRECLVPCFWV。表2为已预测的H5N8神经氨酸酶线性 B细胞抗原表位的多肽信息，见表2如下：

[0075] H5N8神经氨酸酶线性B细胞抗原表位的多肽信息表2

[0076]

n	Start Position	Sequence	End Position
1	6	KIITIGSISLGLVVFNVLLHAVSIILTVLAL	36
2	45	CNGTVVR	51
3	58	RIEKVIQ	64
4	66	YNTSVIEYVP	75
5	87	EPICDVKGFAP	97
6	108	SRGHVFIREFPFVSCSPVECRFFLTQGS	136
7	152	PFRTLMSVEV	161
8	163	QSPNVYQSRFEAVAWSATACHD	184
9	197	DSKAVAVVHYGGVPTDVVN	215
10	225	QESSCTCIQGNCYW	238
11	245	AHRQAQYRI	253
12	263	GQTDVSFS	270

[0077]	13	273	HIEECSCYPN	282
	14	284	GKVECVCR	291
	15	298	NRPVLVISPDLSYRIGYLCAGLPS	321
	16	328	DAQFVG SCT	336
	17	355	TDVWVGR	361
	18	388	IRKQVVVD	395
	19	404	GSFTLPVELSGRECLVPCFWV	424
	20	438	TSSSSIVMCGVDY	450
	21	459	DGAILPF	465

[0078] 实施例二预包被H5N8禽流感病毒神经氨酸酶线形B细胞抗原表位多肽的ELISA酶标板的制备

[0079] (1) 用包被液将人工合成的N9抗原多肽稀释至10~30微克/毫升后加入 96孔酶标板,100微升/孔,4℃反应过夜,用洗涤液洗板3次;

[0080] (2) 每孔加入200微升含1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液进行封闭, 37℃孵育2小时,用洗涤液洗板3次,晾干。

[0081] 所用溶液配方如下:

[0082] 包被缓冲液(0.05摩尔/升碳酸盐缓冲液,pH9.6):1.59克碳酸钠(Na₂CO₃),2.93克碳酸氢钠(NaHCO₃),加入1000毫升蒸馏水,溶解混匀。

[0083] 磷酸盐缓冲液(0.01摩尔/升PBS,pH7.4):8.0克氯化钠(NaCl),0.2克磷酸二氢钾(KH₂PO₄),2.9克磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O)和0.2克氯化钾(KCl),加入1000毫升蒸馏水,溶解混匀。

[0084] 封闭液:1克牛血清白蛋白,加入100毫升PBS洗液,溶解混匀。

[0085] 实施例三试剂盒内其他溶液的制备

[0086] (1) 样品稀释液:PBS中加入1%牛血清白蛋白及0.1%吐温-20,调节 pH至7.4。

[0087] (2) 酶标抗体:表位4抗体HRP标记的IgG,1:5000稀释后使用。

[0088] (3) 浓缩洗涤液:含有1%吐温-20、pH7.4的100毫摩尔/升PBS,稀释 10倍使用。

[0089] (4) 显色液:由酶底物A溶液、B溶液和底物C组成。A溶液:5.1克柠檬酸(C₆H₈O₇·H₂O),18.4克磷酸氢二钠(Na₂HPO₄·12H₂O),加入1000 毫升蒸馏水混匀;B溶液:30%双氧水(H₂O₂)1毫升;底物C:邻苯二胺(OPD) 粉末1克。

[0090] (5) 终止液(2摩尔/升的硫酸溶液):取108.7毫升98%浓硫酸加入891.3 毫升水中,混匀冷却。

[0091] 实施例四本试剂盒检测患者样本中H5N8禽流感病毒神经氨酸酶特异性抗体

[0092] (1) 取样本灭活,放置提取液1小时或4℃放置过夜后离心10分钟,取上清检测;

[0093] (2) 在预包被N8抗原表位1抗体5微克/毫升的酶标板中加入100ul的待测样本,分别以纯化蛋白作为阳性对照、阴性血清作为阴性对照,100 微升/孔,37℃孵育1小时,用洗涤液洗板3次;

[0094] (3) 在上述酶标板反应孔中加入1:5000稀释的酶标抗体,100微升/孔, 37℃孵育1小时,用洗涤液洗板5次;

[0095] (4) 每孔加入100微升显色液,37℃避光反应15分钟;

[0096] (5) 加入终止液,50微升/孔,用酶标仪读取在492纳米波长下的吸光度值;

[0097] (6) 结果判定:样品OD492 \geq 阴性对照孔平均OD492的2.1倍为阳性,样品OD492<阴性对照孔平均OD492的2.1倍为阴性。

[0098] 如图1所示,为流感病毒示意图:

[0099] 其中序列表

[0100] (1) SEQ ID No.1的信息:

[0101] (a) 序列特征:

[0102] 长度:1413个碱基

[0103] 类型:核酸

[0104] 链型:单链

[0105] 拓扑结构:线性

[0106] (b) 分子类型:cDNA

[0107] (c) 最初来源:禽流感病毒

[0108] (d) 序列描述:SEQ ID No.1:

[0109] SEQ ID No.1:

[0110] N8 (37-GDD) 优化后

[0111] CAACCCGAACCAGAAAAATCATCACCATCGGTTCTATCTCTCTGGG TCTGGTTGTTTTCAACGTTCTGCTGCACGCTGTTTCTATCATCCTGACC GTTCTGGCTCTGTGGAAATCTGAAAACAACGGTATCTGCAACGGTACCGTTGTTTCGTGAATACAACGAAACCGTTCGTATCGAAAAAGTTATCCAG TGGTACAACACCTCTGTTATCGAATACGTTCCGCACTGGAACGAAGGT ACCTACATCAACAACACCGAACCGATCTGCGACGTTAAAGGTTTCGCT CCGTCTCTAAAGACAACGGTGTTTCGTGTTGGTTCTCGTGGTCACGTT TTCGTTATCCGTGAACCGTTCGTTTCTTGCTCTCCGGTTGAATGCCGTA CCTTCTTCCTGACCCAGGGTTCTCTGCTGAACGACAAACACTCTAACG GTACCGTTAAGACCGTTCTCCGTTCCGTACCCTGATGTCTGTTGAAG TTGGTCAGTCTCCGAACGTTTACCAGTCTCGTTTCGAAGCTGTTGCTT GGTCTGCTACCGCTTGCCACGACGGTAAAAAATGGATGACCATCGGTG TTACCGGTCCGGACTCTAAAGCTGTTGCTGTTGTTCACTACGGTGGTG TTCCGACCGACGTTGTTAACTCTTGGGCTGGTGACATCCTGCGTACCC AGGAATCTTCTTGACCTGCATCCAGGGTAACTGCTACTGGGTATGA CCGACGGTCCGGCTCACCGTCAGGCTCAGTACCGTATCTACAAAGCTA ACCAGGGTAAATCATCGGTCAGACCGACGTTTCTTTCTCTGTTGCTC ACATCGAAGAATGCTCTTGCTACCCGAACGACGGTAAAGTTGAATGC GTTGCCGTGACAACTGGACCGGTACCAACCGTCCGGTTCTGTTATC TCTCCGGACCTGTCTTACCGTATCGGTTACCTGTGCGCTGGTCTGCCGT CTGACACCCGCGTGGTGAAGACGCTCAGTTCGTTGGTTCTTGACCT CTCCGATGGGTAAACCAGGGTTACGGTGTAAAGGTTTCCGTTCCGTC AGGGTACCGACGTTTGGGTTGGTCGTACCATCTCTCGTACCTCTCGTT CTGGTTTCGAAATCATCCGTATCAAAAACGGTTGGACCCAGACCTCTA AAGAACAGATCCGTAAACAGGTTGTTGTTGACAACTGAACTGGTCT GGTACTCTGGTTCTTTCACCCTGCCGGTTGAACTGTCTGGTCGTGAA TGCCTGGTTCCGTGCTTCTGGGTTGAAATGATCCGTGGTCGTCCGGAA GAACGTACCATCTGGACCTCTTCTTCTTCTATCGTTATGTGCGGTGTTG ACTACGAAATCGCTGACTGGTCTTGGCAGCAGCGGTGCTATCCTGCCGT TCGACATCGACAAAATGA

[0112] (2) SEQ ID No.2的信息:

[0113] (a) 序列特征:

[0114] 长度:470个氨基酸

[0115] 类型:氨基酸

[0116] 拓扑结构:线性

[0117] (b) 分子类型:多肽

[0118] (c) 序列描述:SEQ ID No.2:

[0119] SEQ ID NO.2

[0120] H5N8禽流感病毒神经氨酸酶基因序列、蛋白序列如下:

[0121] MNPNQKIITIGSISLGLVVFNVLLHAVSIILTVLALWKSENNGI CNGTVVREYNETVRIEKVIQWYN
TSVIEYVPHWNEGTYINNTEPICDVK GFAPFSKDNQVRVGSRGHV FVIREPFVSCSPVECRTFFLTQGSLLNDKHS
NGTVKDRSPFRTLMSVEVGQSPNVYQSRFEAVAWSATA CHDGKKWMTI GVTGPDSKAVAVVHYGGVPTDVVNSWA
GDILRTQESSCTCIQGCYWVMTDGP AHRQAQYRIYKANQGKIIGQTDV SFSGGHIEE CSCYPNDGKVECVC RD
NWTGTNRPV LVISPDLSYRIGYLCAGLP SDTPR GEDAQFVGS CTSPMGNQGYGVKGFGRQGT DVVWGRTISRT
SRSGFEIIRIKNGWTQT SKEQIRKQVVVDNLNWSGYS GSFTLPVELSGRECLVPCFWVEMIRGRPE ERTIWTSS
SSIVMCGVDYEIADWSWHDGAILPFDIDKM

[0122] 以上为H5N8禽流感病毒神经氨酸酶基因序列、蛋白序列表3。

[0123] 以上所述仅为本专利优选实施方式,并非限制本专利范围,凡是利用说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,直接或间接运用在其它相关的技术领域,均属于本专利保护范围。

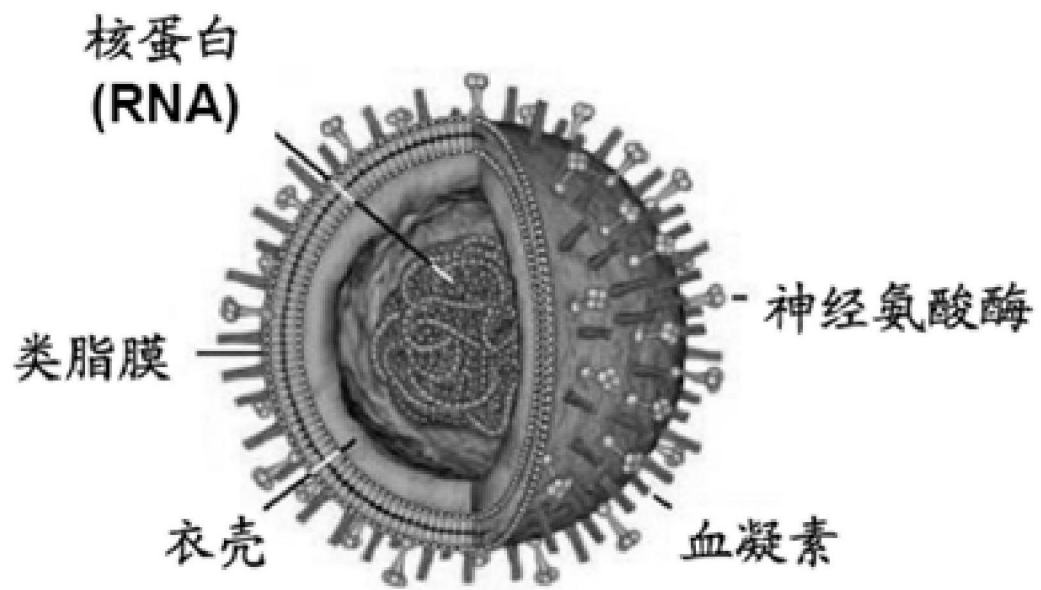


图1

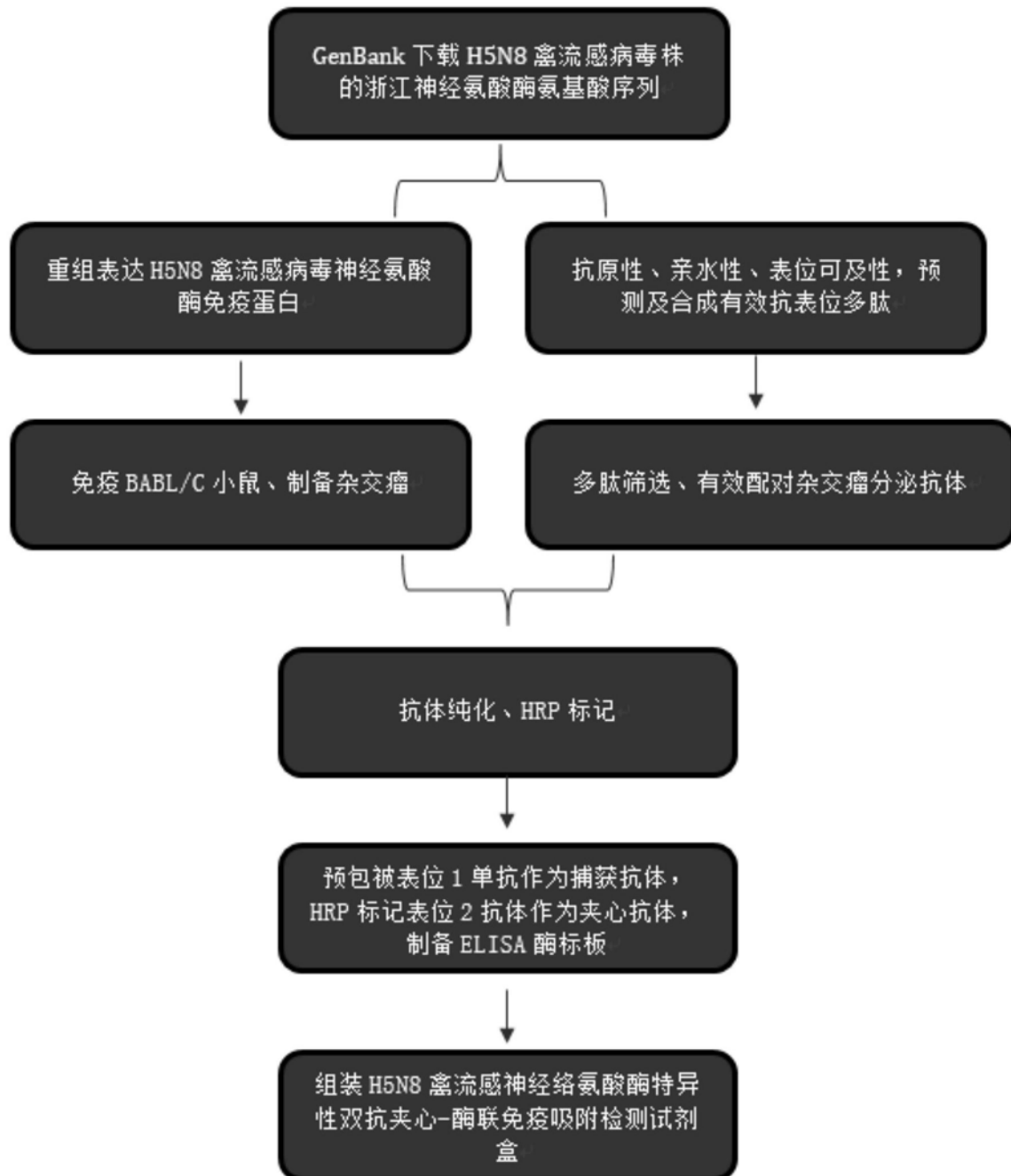


图2

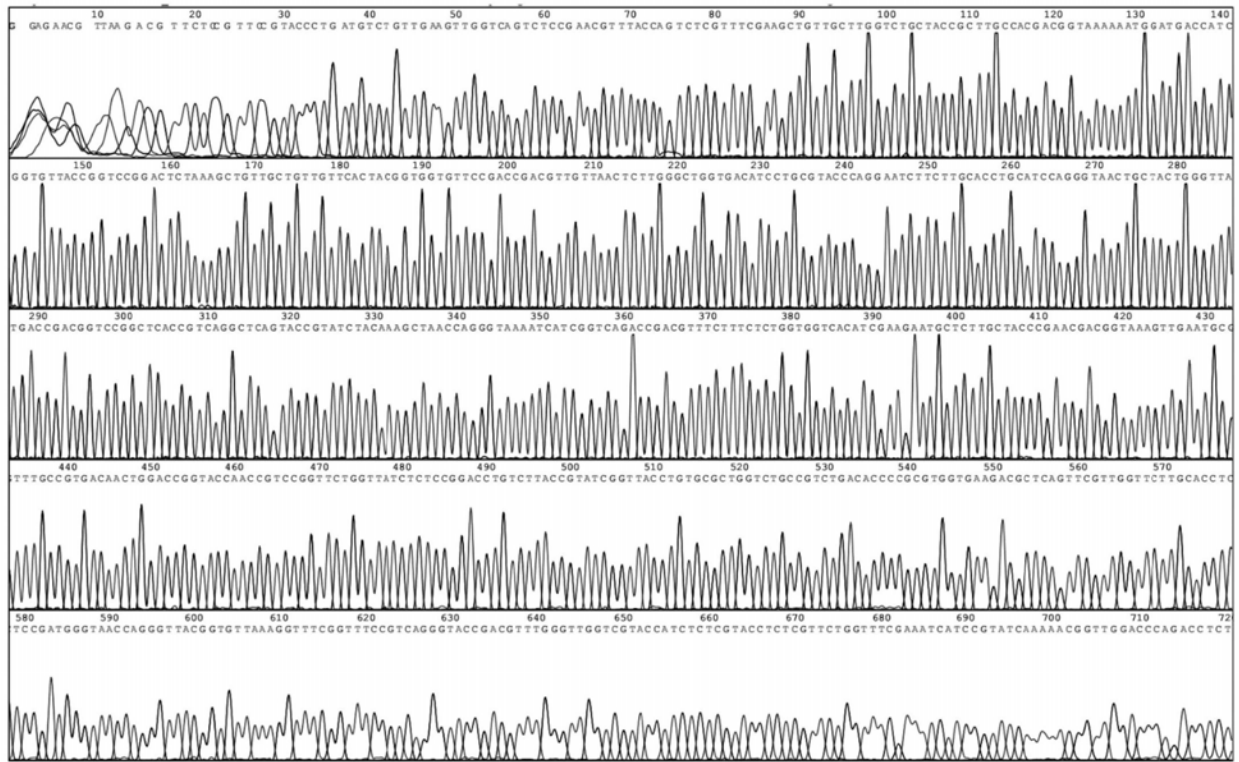


图3

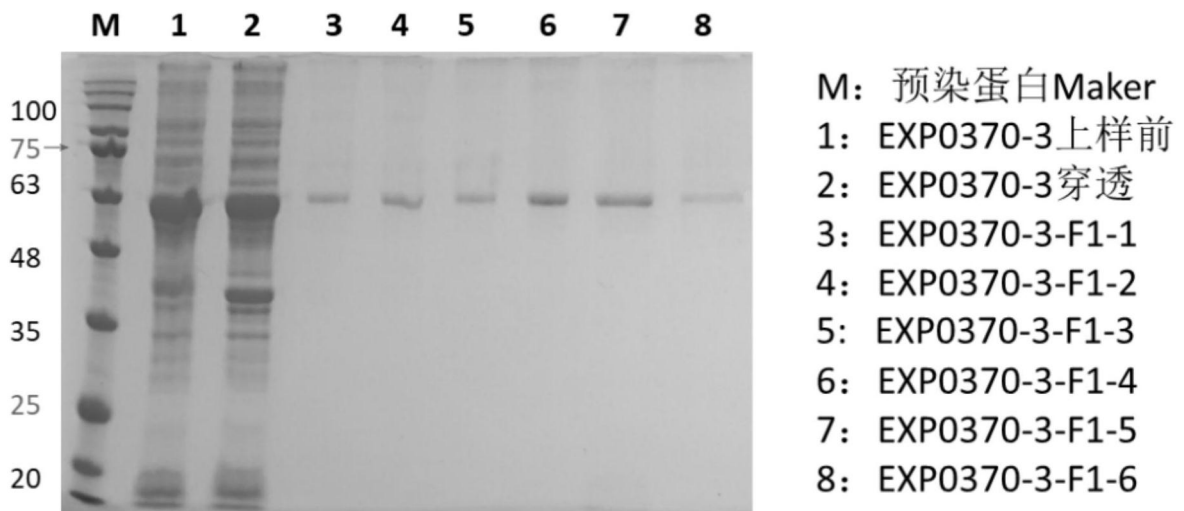


图4

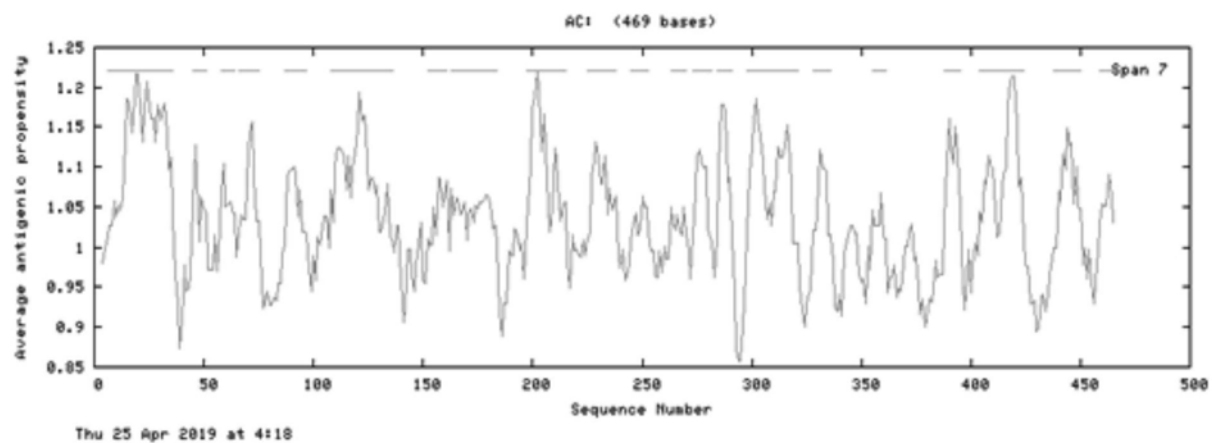


图5

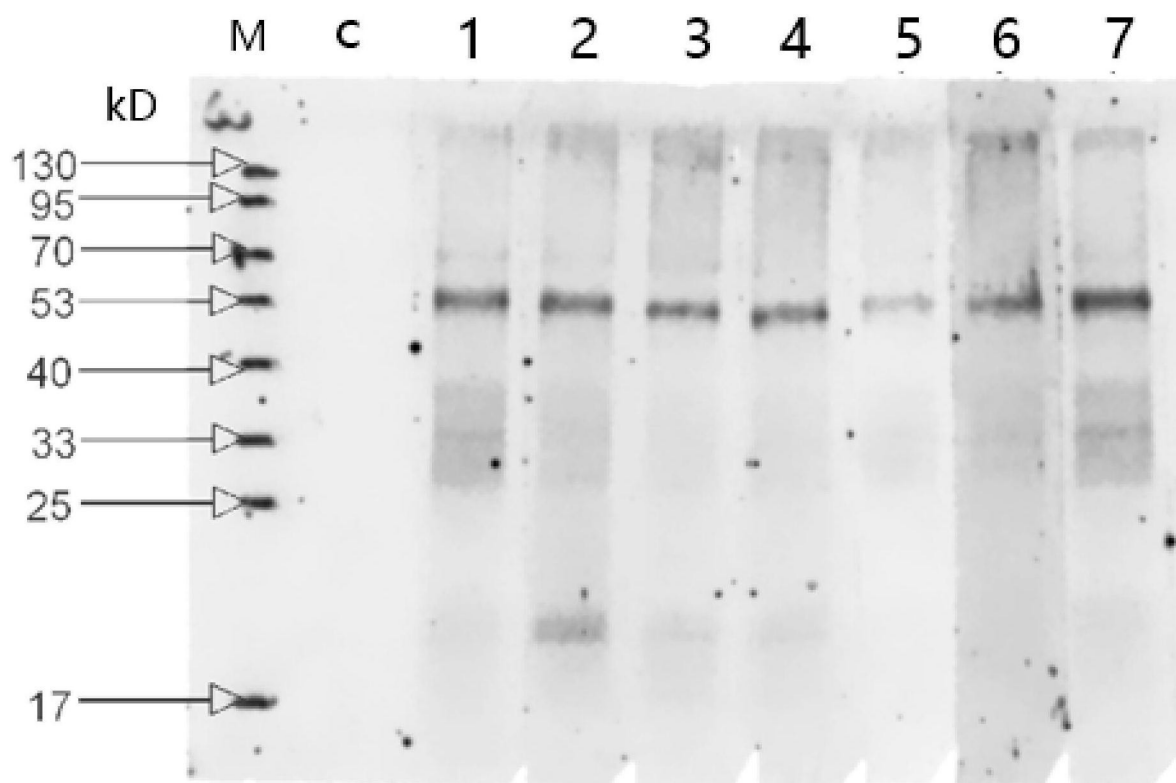


图6

专利名称(译)	一种检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶的双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒		
公开(公告)号	CN110095593A	公开(公告)日	2019-08-06
申请号	CN201910379115.9	申请日	2019-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市检验检疫科学研究院		
申请(专利权)人(译)	深圳市检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市检验检疫科学研究院		
[标]发明人	秦智锋		
发明人	张立兵 秦智锋		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/56983 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶双抗夹心-酶联免疫吸附试剂盒，包括预包被H5N8神经氨酸酶特异性单克隆抗体的96孔酶标板、阳性品、阴性品、辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗体、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色液和终止液；将H5N8亚型禽流感病毒神经氨酸酶基因片段克隆、重组表达、纯化复性后获得神经氨酸酶N8蛋白免疫抗原，利用生物信息学软件预测H5N8亚型禽流感病毒的神经氨酸酶抗原表位，人工合成相应多肽后将其预包被至酶标板，采用多肽-酶联免疫吸附(ELISA)模式，筛选杂交瘤中的神经氨酸酶特异性抗体，多肽-ELISA检测体系获得稳定的多个位点杂交瘤细胞株及单抗，构建双抗夹心N8蛋白-ELISA检测体系检测试剂盒。

