



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101726593 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 17

(21) 申请号 200910040560. 9

(22) 申请日 2009. 06. 25

(83) 生物保藏信息

CCTCC-C200857 2008. 11. 24

CCTCC-C200859 2008. 11. 24

CCTCC-C200855 2008. 11. 24

(73) 专利权人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市广州大道北
1838 号

(72) 发明人 车小燕 丁细霞 潘玉先 丘立文

(74) 专利代理机构 广州市天河庐阳专利事务所
44244

代理人 胡济元

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/577 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101343319 A, 2009. 01. 14, 说明书全文.

CN 101226196 A, 2008. 07. 23, 说明书全文.

审查员 唐华东

权利要求书 1 页 说明书 12 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒, 该试剂盒包括捕获抗体和与标记物结合的检测抗体, 其特征在于所述的捕获抗体由单抗 2E8A5、单抗 DV2-M6 和单抗 4B14A1 组成, 所述的检测抗体是单抗 3B1A15, 所述的标记物可以是生物素、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、胶体金或荧光素。该试剂盒能特异性的检测 4 个血清型登革病毒的 NS1 蛋白, 与其他黄病毒属病毒, 如黄病毒和乙型脑炎病毒无交叉反应, 其灵敏度比国外商品化试剂盒检测的灵敏度至少高出 4 倍, 可有效降低临床应用中的漏检现象。

1. 一种检测登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒,该试剂盒包括捕获抗体和与标记物结合的检测抗体,其特征在于所述的捕获抗体是由质量比为 1 : 1 : 1 的单抗 2E8A5、单抗 DV2-M6 和单抗 4B14A1 组成,其中单抗 2E8A5 由保藏号为 CCTCC-C200855 的杂交瘤细胞株分泌,单抗 4B14A1 由保藏号为 CCTCC-C200857 的杂交瘤细胞株分泌,单抗 DV2-M6 由保藏号为 CCTCC-C200736 的杂交瘤细胞株分泌;所述的检测抗体是单抗 3B1A15,由保藏号为 CCTCC-C200859 的杂交瘤细胞株 3B1A15 分泌;所述的标记物是生物素、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、胶体金或荧光素。

2. 权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于该试剂盒是一种基于双抗体夹心 ELISA 方法的酶联免疫诊断试剂盒,由包被了单抗 2E8A5、单抗 DV2-M6 和单抗 4B14A1 的微孔反应板、样品处理液、标记了辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的单抗 3B1A15、阳性对照物、阴性对照物、浓缩洗液、显色液和终止液组成,其中所述的显色液中含有辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的底物。

一种检测登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,具体涉及一种医用配制品,特别是用于诊断登革病毒的试剂盒。

背景技术

[0002] 登革热是目前仅次于疟疾的重要虫媒性传染病,主要流行于热带和亚热带地区;由于旅游业和国际贸易的发展、生态环境的改变、全球人口的增长并向城市集中化以及全球气候变暖等因素的改变,登革病毒的传播已不再局限于部分地区,而是随着人口的流动在全球大部分地区迅速传播。据 WHO 统计,每年发生登革病毒感染患者超过 1 亿人,其中 50 万人发展成为登革出血热,每年死亡人数高达 3 万人。目前,全球有将近 25 亿的人口生活在登革热的疫区中,备受登革病毒感染的威胁。总而言之,登革病毒所引起的登革热和登革出血热已成为热带、亚热带地区的一个非常严重的公共卫生问题。

[0003] 登革病毒有 4 个血清型,分别为 I 型、II 型、III 型和 IV 型 (DV1、DV2、DV3 和 DV4)。任何一种血清型的感染均可引起一系列的临床症状,包括隐匿性感染、典型登革热以及导致高死亡率发生的登革出血热或登革休克综合征。初次感染登革病毒对于同型病毒的再次感染可产生长久的免疫力,但对其他血清型的再次感染仅能产生部分而且短暂的免疫保护作用。由于存在抗体依赖的病毒感染增强作用,异型登革病毒再次感染是发生登革出血热或登革休克综合征的主要危险因素。由于在一个地区存在不同血清型登革病毒的交替流行,人群普遍易感,这就更增加了登革出血热发生的可能性。

[0004] 目前,具有保护性的登革病毒疫苗尚未研制成功,临床上对于登革病毒的感染亦未有特异性的治疗措施。但实践表明及时采取临床救治措施可以大大减少登革出血热的发病率和死亡率,因此登革热的治疗很大程度上取决于早期感染的诊断。由于多数登革病毒感染早期缺乏特异的临床表现,仅有发热、寒战等流感样症状,难以和其它发热疾病和出血热疾病区分,因此,登革病毒感染的确诊依赖于实验室的诊断手段。目前,登革病毒的实验室诊断方法主要包括病毒分离、血清学检测和核酸检测。其中病毒分离是登革病毒感染诊断和血清型鉴定的金标准,但该方法费时而且对于实验室的条件要求较高。尽管病毒核酸的检测方法比传统的病毒分离法更灵敏、快速,但分子诊断操作相对繁琐,对技术水平要求较高,并较易发生污染导致假阳性结果,同时由于毒株变异、潜在突变等序列改变也可能引起假阴性结果。而抗体检测试剂不能用于早期诊断,而且由于 4 个血清型登革病毒之间以及与其它黄病毒存在血清学交叉反应,特别是接种乙型脑炎病毒、黄热病毒疫苗的人群易发生抗体假阳性反应结果。因此,建立一种快速、可靠、标准化的实验室诊断登革病毒以及各血清型别感染的早期检测试剂显得非常必要。

[0005] 登革病毒的非结构蛋白 1(nonstructural protein 1, NS1) 是一种相对保守的糖蛋白,分子量为 45 ~ 50kDa,有膜型和分泌型两种形式,在感染细胞中高度表达,在登革病毒的研究中已经将它作为诊断登革热的靶抗原。研究发现在登革热患者的早期血中存在高浓度的 NS1 循环抗原,因此检测急性期病人血清中的循环 NS1 抗原可用于早期诊断登革

病毒感染。目前已报道了几种基于多克隆抗体的检测登革病毒 NS1 的抗原捕获 ELISA 法,但是这些方法都是在多克隆抗体的基础上建立的,在不同批次的抗血清中存在很大差异,难以重复和实现实验室的标准化;而利用抗 NS1 的单克隆抗体来检测登革病毒的商品化试剂盒只有两种:Pan-E Dengue Early ELISA test Kit, Panbio, Queensland, Australia; PLATELIATM DENGUE NS1 AG, Bio-Rad, France, 该试剂盒含有抗 I ~ IV 型登革病毒 NS1 的单克隆抗体,通过 ELISA 方法来实现登革病毒感染的早期诊断,其敏感度、特异性和稳定性都比较好。但本发明人进一步研究发现,试剂盒 (Pan-E Dengue Early ELISA test kit, Panbio, Queensland, Australia) 对 I ~ IV 型的登革病毒的敏感度不同,尤其对 III 型和 IV 型登革病毒检测的敏感性很低,而早期感染登革病毒的患者血液样本中的病毒含量相对较低,用该试剂盒检测 III 型和 IV 型登革病毒的感染有可能会漏检现象,不利于临床应用。

[0006] 发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是提高检测登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒的灵敏度,缩小登革病毒四个血清型 NS1 抗原检测敏感度间的差异性。

[0008] 本发明解决上述问题的技术方案是:

[0009] 一种检测登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒,该试剂盒包括捕获抗体和与标记物结合的检测抗体,其特征在于所述的捕获抗体由质量比为 1 : 1 : 1 的单抗 2E8A5、单抗 DV2-M6 和单抗 4B14A1 组成,所述的检测抗体是单抗 3B1A15。

[0010] 本发明试剂盒中,所述的单抗组合 2E8A5、DV2-M6、4B14A1 和单抗 3B1A15 均是免疫球蛋白,其中单抗 2E8A5 能同时与 IV 和 III 型登革病毒的非结构蛋白 1(nonstructural protein1, NS1) 结合,属 IgG1,由保藏号为 CCTCC-C200855 的杂交瘤细胞株分泌;单抗 4B14A1 能同时与 I 型和 III 型登革病毒 NS1 蛋白结合,属 IgG1,由保藏号为 CCTCC-C200857 的杂交瘤细胞株分泌;单抗 DV2-M6 能特异性结合 II 型登革病毒 NS1 蛋白,属 IgG1,由保藏号为 CCTCC-C200736 的杂交瘤细胞株分泌,记载于国知局 2008 年 7 月 23 日公布的发明专利“一种检测 II 型登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒”(申请号为 200810026250.7);单抗 3B1A15 能同时与四个血清型登革病毒 NS1 蛋白结合,属 IgG2a,由保藏号为 CCTCC-C200859 的杂交瘤细胞株分泌。其中,保藏号为 CCTCC-C200855 的杂交瘤细胞株、保藏号为 CCTCC-C200857 的杂交瘤细胞株和保藏号为 CCTCC-C200859 的杂交瘤细胞株均于 2008 年 11 月 24 日保藏于中国典型培养物保藏中心(地址为中国武汉大学)。

[0011] 本发明试剂盒中,所述的标记物可以是生物素、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、胶体金、荧光素等,当本发明所述的检测抗体上结合的标记物为生物素时,本发明试剂盒还含有标记有辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的亲和素。所述的亲和素能与生物素以 1 : 4 的比例结合,起到放大检测信号的作用,进一步提高敏感度。

[0012] 当所述的标记物为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶时,本发明试剂盒是一种基于双抗体夹心 ELISA 方法的酶联免疫诊断试剂盒,由包被了单抗组合 2E8A5、DV2-M6 和 4B14A1 的微孔反应板、样品处理液、标记了辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的单抗 3B1A15、阳性对照物、阴性对照物、浓缩洗液、显色液和终止液组成。其中所述的显色液中含有辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶的底物。该试剂盒对 I 型和 II 型登革病毒的敏感性均为 49PFU/ml,是商品化进口试剂盒 Pan-E Dengue Early ELISA test kit 的 4 倍;对 III 型和 IV 型登革病毒

的敏感性分别为 49PFU/ml 和 781PFU/ml,为进口试剂盒 Pan-E Dengue Early ELISA test kit 的 32 倍。

[0013] 本发明所用的捕获抗体和检测抗体 3B1A15 是从一组抗登革病毒的 NS1 蛋白的单克隆抗体中筛选出来的,其中,捕获抗体是一组由单抗 2E8A5、DV2-M6 和 4B14A1 组成的多克隆抗体,分别结合不同血清型的登革病毒 NS1 蛋白,不仅有效地提高了登革病毒检测的特异性和敏感性,更保证了试剂盒的稳定性,使得该试剂盒能更准确、快速地检测出四个血清型登革病毒,而与其他黄病毒属,如乙型脑炎病毒、黄热病毒无交叉反应,且对四个血清型登革病毒都具有很高的敏感度,可有效降低临床应用中的漏检现象。本发明试剂盒既克服了多克隆抗血清难以重复和实现实验室的标准化的缺点,同时又兼有多克隆抗体的放大效应,提高了检测的敏感性,对登革病毒四个血清型 NS1 蛋白检测的敏感性均高于国外同类产品。

[0014] 附图说明

[0015] 图 1 是单抗 2E8A5、4B14A1、DV2-M6 和 3B1A15 的免疫印迹图,其中 A、B、C、D 显示的是重组 DV1NS1、DV2NS1、DV3NS1、DV4NS1 蛋白与杂交瘤细胞培养上清的反应;E、F、G 和 H 分别显示的是天然 DV1、DV2、DV3 和 DV4 病毒中的 NS1 蛋白与杂交瘤细胞培养上清的反应,条带 1 为杂交瘤细胞株 DV2-M6 培养上清;条带 2 为杂交瘤细胞株 2E8A5 培养上清;条带 3 为杂交瘤细胞株 4B14A1 培养上清;条带 4 为杂交瘤细胞株 3B1A15 培养上清;条带 5 为无关杂交瘤细胞培养上清。

[0016] 具体实施方式:

[0017] 下面通过具体的例子和实验报告进一步阐明本发明的试剂盒:

[0018] 1、所述的单抗 2E8A5、4B14A1、DV2-M6 和 3B1A15 的制备方法和鉴定结果:

[0019] (1) 免疫抗原的制备

[0020] 本发明用于制备单克隆抗体的免疫原为基因重组 DV2NS1、DV3NS1、DV4NS1 蛋白和已灭活天然的病毒抗原。基因重组 DVNS1 蛋白是用一种携带 DVNS1 基因的工程菌株进行制备的,其制备按常规方法进行,经用镍-次氨基三醋酸金属亲和层析的方法进行纯化获得 NS1 抗原,详细的制备方法可参照使用手册。将 NS1 蛋白纯化后,以考马斯亮蓝 (Coomassie) 蛋白分析试剂 (PIERCE, Cat, No. ED62976) 定量。Western blot 对纯化的重组蛋白鉴定结果显示,小鼠抗 his mAb 在分子量约 45KDa 处出现特异性的反应条带,与预测的 DVNS1 分子量大小一致。已灭活天然的病毒抗原,是从 DV2、DV3、DV4 感染的病毒宿主细胞 (C6/36, 一种白蚊伊蚊细胞) 获得。

[0021] (2) 免疫小鼠 (三种免疫方案)

[0022] 第一种免疫方案:取 4-6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,第一次采用弗氏完全佐剂与等体积 DV2NS1 抗原混匀乳化,每只小鼠皮下多点注射 30 μ g,以后每 10 天以弗氏不完全佐剂与天然的 DV2 抗原或重组的 DV2 NS1 抗原交替免疫共 4 次后,于融合前 3 天每只小鼠腹腔注射 DV2 NS1 抗原 100 μ g 进行加强免疫。

[0023] 第二种免疫方案:取 4-6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,第一次采用弗氏完全佐剂与等体积 DV3NS1 抗原混匀乳化,每只小鼠皮下多点注射 30 μ g,以后每 10 天以弗氏不完全佐剂与天然的 DV3 抗原或重组的 DV3 NS1 抗原交替免疫共 4 次后,于融合前 3 天每只小鼠腹腔注射 DV3 NS1 抗原 100 μ g 进行加强免疫。

[0024] 第三种免疫方案:取 4-6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,第一次采用弗氏完全佐剂与等体积 DV4NS1 抗原混匀乳化,每只小鼠皮下多点注射 30 μ g,以后每 10 天以弗氏不完全佐剂与天然的 DV4 抗原或重组的 DV4NS1 抗原交替免疫共 4 次后,于融合前 3 天每只小鼠腹腔注射 DV4NS1 抗原 100 μ g 进行加强免疫。

[0025] (3) 杂交瘤细胞的制备和鉴定

[0026] 加强免疫 3 天后,无菌操作取小鼠脾脏,制成脾细胞悬液与对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞株 NS-1 按 10 : 1 的比例混合,45% 聚乙二醇 (PEG, MW4000, Sigma) 作用下进行融合。按下述步骤将聚乙二醇溶液加入细胞。在 37°C 水浴中,在 1min 内缓慢加入 1.0ml PEG,边加边轻轻摇匀,分别于 1min、2min、3min、4min、5min 内加 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 无血清 RPMI-1640 培养基终止融合,最后加入 10ml 含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,室温 800rpm 离心 5min,弃上清,用 60ml 含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基轻轻悬起细胞。将此细胞悬液加入 6 块 96 孔培养板上,在 37°C、5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中培养。次日于融合细胞中加入 120 μ l 2 \times HAT 筛选培养基。以后每 3 天用 1 \times HAT 培养基换液一次,当克隆长至占孔底面积的 1/10 时,取培养上清经间接 ELISA 法用重组的 DVNS1 蛋白和 DV 病毒进行双筛选。阳性克隆转至 24 孔培养板中扩大培养,经 ELISA 和免疫荧光 (DV 感染细胞抗原片) 复测仍为强阳性的克隆用有限稀释法进行克隆化。克隆化 2~3 次至阳性率达 100%,选择分泌抗体效价高的细胞株扩增培养后置液氮保存,记为杂交瘤细胞株 2E8A5、4B14A1、3B1A15 和杂交瘤细胞株 DV2-M6。杂交瘤细胞株 2E8A5 于 2008 年 11 月 24 日在中国典型培养物保藏中心 (地址:中国武汉大学) 保藏,保藏号为 CCTCC-C200855;杂交瘤细胞株 4B14A1 于 2008 年 11 月 24 日在中国典型培养物保藏中心 (地址:中国武汉大学) 保藏,保藏号为 CCTCC-C200857;杂交瘤细胞株 3B1A15 于 2008 年 11 月 24 日在中国典型培养物保藏中心 (地址:中国武汉大学) 保藏,保藏号为 CCTCC-C200859;杂交瘤细胞株 DV2-M6 于 2007 年 11 月 29 日在中国典型培养物保藏中心 (地址:中国武汉大学) 保藏,保藏号为 CCTCC-C200736。

[0027] (4) 抗 DVNS1 蛋白单克隆抗体亚类检测

[0028] 采用间接 ELISA, DV1NS1、DV2NS1、DV3NS1 和 DV4NS1 抗原包被的微孔板,封闭后与杂交瘤细胞培养上清孵育,再分别与 1 : 1000 倍稀释的 HRP 标记的兔抗小鼠不同亚类特异性免疫球蛋白反应,其中包括兔抗小鼠 IgG1 (美国 ZYMED LABORATORIES, INC, 目录号 61-0120),兔抗小鼠 IgG2a (同上,目录号 61-0220),兔抗小鼠 IgG2b (同上,目录号 61-0320),兔抗小鼠 IgG3 (同上,目录号 61-0420),兔抗小鼠 IgM (同上,目录号 61-6820)。检测结果显示,本专利发明的 4 株单克隆抗体中 3B1A15 为 IgG2a 阳性;其余 3 株单克隆抗体均为 IgG1 阳性。

[0029] (5) 单克隆抗体腹水制备和纯化

[0030] 腹水制备:采用体内诱生法制备本发明中单克隆抗体,即在小鼠体内接种杂交瘤细胞制备腹水。简述如下:每只小鼠腹腔内注射 0.5ml 弗氏不完全佐剂 (Sigma 公司),使瘤细胞能以腹水瘤形式在腹腔内生长。大约 1~2 周后,将 2 \times 10⁶ 个对数生长期的杂交瘤细胞悬浮于无血清 RPMI 1640 培养基中,注入小鼠腹腔。约 1~2 周后,用 7 号针头放腹水,离心后收集腹水上清,立即加入叠氮钠至终浓度为 0.1%,存放于 4°C 备用。

[0031] 单抗纯化:采用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水中的抗体,操作方法如下:腹水用

60mM、pH5.0 醋酸缓冲液稀释 2 倍,室温下于 30 分钟内边搅拌边逐滴缓慢加入辛酸,为每毫升稀释前腹水加 33 μ l 辛酸,出现大量沉淀,4 $^{\circ}$ C 静置 2 小时,10000g,4 $^{\circ}$ C 离心 30 分钟,取上清,加入 1/10 体积的 pH7.4 100mM 磷酸盐缓冲液,并用 1N 氢氧化钠调 pH 值至 7.4,冰浴搅拌下缓慢加入硫酸铵,为每毫升液体加入 0.277 硫酸铵即为 45% 饱和度,4 $^{\circ}$ C 静置过夜,10000g,4 $^{\circ}$ C 离心 30 分钟,弃上清,沉淀溶于适量 10mM 磷酸盐缓冲液,用同样的液体,4 $^{\circ}$ C 透析过夜,换液三次。以考马斯亮蓝 (Coomassie) 蛋白分析试剂 (PIERCE, Cat, No. ED62976) 定量。测定浓度后的抗体加入终浓度 50% 的甘油于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

[0032] (6) 单克隆抗体的特异性鉴定

[0033] a. 间接 ELISA 法鉴定单克隆抗体的特异性

[0034] 分别用四个血清型重组 DV NS1 抗原和天然的 DV 抗原包被微孔板,按照常规的间接 ELISA 法进行检测。即在包被的微孔板中加入本专利发明的杂交瘤细胞培养上清液,37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,加入 1 : 1000 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG (Sigma, Inc),100 μ l/孔 37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,加 TMB 显色液室温避光显色 10min,加 1M H₂SO₄ 终止反应,测 450nm 吸光值 (A₄₅₀)。表 1 结果显示本专利发明的单克隆抗体 DV2-M6 为 DV2NS1 的特异性单抗;与其它三型登革病毒均无交叉反应;单克隆抗体 2E8A5、4B14A1 和 3B1A15 为 DV NS1 的交叉单抗。

[0035] 表 1 DVNS1 单克隆抗体与重组的 DVNS1 抗原和天然的 DV 抗原反应间接 ELISA 结果
[0036]

	DV NS1 单克隆抗体				无关抗体
	2E8A5	4B14A1	DV2-M6	3B1A15	
重组的 DV1 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	0.062	0.186	0.062	1.607	0.074
重组的 DV2 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	2.285	0.058	2.285	2.049	0.087
重组的 DV3 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	0.069	2.181	0.069	0.433	0.078
重组的 DV4 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	0.061	0.061	0.058	0.325	0.065
天然的 DV1 抗原检测 A ₄₅₀	0.061	1.416	0.061	0.245	0.072
天然的 DV2 抗原检测 A ₄₅₀	1.009	0.058	1.009	0.305	0.068
天然的 DV3 抗原检测 A ₄₅₀	0.065	1.734	0.065	0.802	0.059
天然的 DV4 抗原检测 A ₄₅₀	0.06	0.056	0.06	0.196	0.073

[0037] b. 间接免疫荧光法鉴定单克隆抗体的特异性

[0038] 分别用 DV1、DV2、DV3 和 DV4 感染 C6/36 细胞,当有 2/3 细胞出现病变时,收集细胞,用预冷的 1 \times PBS 洗细胞二遍,然后将细胞滴于无菌干燥的玻片上,干燥后,制备成涂片,充分干燥,用冷丙酮固定 10 分钟后吹干,分别与阳性杂交瘤细胞培养上清和 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 孵育,并设立未感染病毒的 C6/36 细胞抗原片作为阴性对照,最后用 0.25% 的伊文氏蓝染色后,荧光显微镜下观察荧光图像,以荧光的强度和染色形态进行结果判定,检测抗体强度以 (+ ~ +++) 计为阳性,抗体强度 (±) 和 (-) 计为阴性。如表 2 结果显示本专利发明的单克隆抗体 4D41A6 与 II 型登革病毒结合的特异性单抗;2E8A5 与 III 型和 IV 型登

革病毒同时结合的交叉性单抗;4B14A1 与 I 型和 III 型登革病毒同时结合的交叉单抗;而 3B1A15 与 4 个血清型的登革病毒 NS1 蛋白同时结合的交叉单抗。

[0039] 表 2 DVNS1 单克隆抗体的免疫荧光检测结果

[0040]

杂交瘤细胞株保藏号	DV 感染 C6/36 细胞涂片				正常 C6/36 细胞涂片
	DV1	DV2	DV3	DV4	
CCTCC-C200855	-	-	+++	++++	-
CCTCC-C200857	++++	-	++++	-	-
CCTCC-C200859	++++	++++	++++	++++	-
CCTCC-C200736	-	++++	-	-	-

[0041] c. 免疫印迹鉴定单克隆抗体的特异性

[0042] 将灭活 DV 培养液或重组的 DVNS1 蛋白,用 2×SDS 加样缓冲液稀释一倍,将样品加到 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中,电泳分离蛋白质,通过电洗脱使在凝胶上分离出来的蛋白质转印到硝酸纤维膜上,转印膜用含 7%脱脂奶和 3% BSA 的 10mM PBS 于 4℃封闭 24 小时,将转印膜装在专门的反应板中,分别加入杂交瘤细胞培养上清中,室温反应 1 小时,用含有 0.5% Tween 20 的 10mM PBS 洗涤膜后,加入 1 : 500 倍稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG,室温反应 1 小时,用同样的洗涤液洗涤膜后,DAB 显色后,用去离子水终止显色。

[0043] 免疫印迹结果如图 1 所示,本发明的特异性单克隆抗体 DV2-M6 与重组 DV2NS1 蛋白和灭活 DV2 培养液在分子量为 45 千道尔顿可见一条很强的蛋白质结合带,与预测分子量相一致;单克隆抗体 2E8A5 与重组 DV3NS1、DV4NS1 蛋白和灭活 DV4 培养液在分子量为 45 千道尔顿可见一条很强的蛋白质结合带,与预测分子量相一致;单克隆抗体 4B14A1 与重组 DV1NS1、DV3NS1 蛋白和灭活 DV3 培养液在分子量为 45 千道尔顿可见一条很强的蛋白质结合带,与预测分子量相一致;交叉单抗 3B1A15 与 4 个血清型的重组 DVNS1 蛋白和灭活的 DV 培养液在分子量为 45 千道尔顿可见一条很强的蛋白质结合带,与预测分子量相一致;无关单克隆抗体与各抗原均不产生反应。

[0044] 2、本发明试剂盒的组成及制备

[0045] 例 1

[0046] (1) 所用试剂的配制

[0047] a. 样品处理液:由样品处理液 A 和样品处理液 B 组成,其中 A 为 1.5M 甘氨酸溶液 (PH2.8),B 为 1.5M Tris-HCl 溶液 (PH9.7);

[0048] b. 浓缩洗液:含有 2% Tween-20 的 20×PBS,即 1L 溶液中含有 4.56g NaH₂PO₄, 58.02g Na₂HPO₄·12H₂O, 175.3g NaCl, 15 磅 20min 高压灭菌后,加入 20ml Tween-20 搅匀,使用时 20 倍稀释;

[0049] c. 阳性对照物:重组 DVNS1 蛋白 1 : 1000 稀释液;

[0050] d. 阴性对照物:含 0.1% Tween-2 的 10mM PH7.4PBS,其制备方法是:将 4.56g NaH₂PO₄, 58.02g Na₂HPO₄·12H₂O, 175.3g NaCl 溶于水中并定量至 1L,在 15 磅压力下高压灭菌 20min,20 倍稀释后加入 0.1% Tween-20;

[0051] e. 显色液:由显色液 A 和 B 组成,使用时取二者等量混匀使用。其中显色液 A、B

的组成成分如下：

[0052] 显色液 A：

[0053] 将 0.89g 柠檬酸和 0.16g EDTA 二钠溶于 1000ml 水中，115℃ 高压 30min，降至 90℃ 后加 TMB 0.25g，摇匀于 4℃ 闭光保存；

[0054] 显色液 B：

[0055] 将 9.33g 柠檬酸和 14.6g EDTA 二钠溶于 1000ml 水中，115℃ 高压 30min 后，降至 90℃ 后加 0.75% 过氧化氢尿素 12.8ml，摇匀于 4℃ 闭光保存；

[0056] f. 终止液：1M H_2SO_4 。

[0057] (2) 所述包被捕获抗体的微孔反应板的制备方法：将本发明单抗 2EgA5、DV2-M6 和 4B14A1 用 10mM pH7.6 的磷酸盐缓冲液稀释至每株单抗的终浓度为 $6\mu g/ml$ ，用 $150\mu l$ /孔包被聚苯乙烯 96 孔微孔板，于 4℃ 过夜。拍干后，每孔加入 $300\mu l$ /孔的 0.25% 酪蛋白 (Sigma) 的封闭液，于 4℃ 过夜以封闭非特异性结合位点。甩干板条，真空干燥 12~24h，用铝膜袋真空包装 4℃ 保存备用。

[0058] (3) 所述辣根过氧化物酶标记的单抗 3B1A15 的制备方法：

[0059] 采用改良过碘酸钠法，操作方法如下：将 5mg HRP 搅拌溶解于 1mL 双蒸水中，加入 0.2mL 新配 0.1M 过碘酸钠避光室温搅拌 30min，置 1mM pH4.4 醋酸钠缓冲液中，4℃ 透析过夜；次日加入 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液使 PH 值达 9.0~9.5 后，加入到预先调节 pH 至 9.5 的抗体 (10mg) 中，在室温避光轻轻搅拌 2~3 小时，然后加入 $100\mu l$ 新配 4mg/mL 硼氢化钠，4℃ 避光轻搅过夜；次日将过夜的抗体溶液用 $1\times PBS$ 稀释 5~10 倍，冰浴搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵 (硫酸铵用前先用氨水调 pH 至 7.4)，置 4℃ 避光过夜；12000rpm 4℃ 离心 30min，弃上清，沉淀溶于适量 $1\times PBS$ 缓冲液，并置 $1\times PBS$ 中 4℃ 透析过夜，换液三次。收集结合物加入终浓度 50% 的 2% BSA 甘油-PBS 保护剂，最后用磷酸盐缓冲液稀释 1000 倍，即为工作液。

[0060] 3、用本发明试剂盒检测血清样品中的登革病毒 NS1 抗原

[0061] (1) 使用方法：

[0062] 取待测的样品 $50\mu l$ ，加入样品处理液 A $50\mu l$ ，混匀后 37℃ 作用 1h，再加样品处理液 B $50\mu l$ 混匀，取 $100\mu l$ 加入多克隆抗体 (2E8A5、DV2-M6 和 4B14A1) 包被的聚苯乙烯 96 孔微量测试板中，同时设阴性对照和阳性对照，37℃ 温育 1h，浓缩洗涤液 20 倍稀释后洗涤板条，洗板 6 次后，加入 1:1000 稀释的 HRP 标记的单抗 3B1A15， $100\mu l$ /孔，37℃ 温育 30min，同上洗板 8 次后，加显色液 (显色液 A 和 B 等量混合，现用现配)， $100\mu l$ /孔，室温避光显色 10min 后，加入终止液， $100\mu l$ /孔，终止反应。

[0063] (2) 结果判定：以空白孔调零，于 450nm 波长测定吸光度 (A 值)。阳性对照平均值 ≥ 0.50 ，阴性对照平均值 ≤ 0.10 ，实验成立。样品 A 值 \geq 阴性对照 A 值平均值 $\times 2.1$ ，则判为阳性，反之为阴性。

[0064] (3) 本发明试剂盒检测相关病毒的特异性和灵敏度分析

[0065] a. 灵敏度分析

[0066] 通过对 DV1、DV2、DV3、DV4 进行空斑实验确定病毒滴度分别为 $2.6\times 10^5 PFU/mL$ 、 $6.88\times 10^4 PFU/mL$ 、 $2.37\times 10^5 PFU/mL$ 、 $7.84\times 10^5 PFU/mL$ 。采用上述建立的方法检测灭活的 DV1、DV2、DV3、DV4，从 1×10^5 开始倍比稀释多个梯度进行检测，同时以检测四个血清型 DV

NS1 抗原的商品化试剂盒“pan-E DENGUE EARLY ELISA”(Panbio, Australia) 进行同步检测比较, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。本发明试剂盒的检测结果显示对 DV1、DV2、DV3 培养上清的检测灵敏度高达 49PFU/ml; 对 DV4 培养上清的检测灵敏度为 782PFU/ml; 而对其他病毒的检测结果均为阴性, 如表 3 所示。商品化的 pan-E DENGUE EARLY ELISA 检测结果显示, 对四个血清型的 DV 培养上清的检测敏感性不同, 详见表 4 结果。pan-E DENGUE EARLY ELISA 试剂盒对 DV1、DV2 培养上清的检测灵敏度均为 195PFU/ml; 对 DV3 培养上清的检测灵敏度为 1563PFU/ml; 对 DV4 培养上清的检测灵敏度为 25000PFU/ml; 明显低于本发明的试剂盒检测 4 个血清型登革病毒培养上清的灵敏度。

[0067] 表 3 本发明试剂盒检测四个血清型 DV 培养上清结果

[0068]

DV 病毒	病毒滴度 (PFU/ml)									
	12500	6250	3125	1563	782	391	195	98	49	24.5
DV1	4.033/+	4.005/+	3.951/+	3.518/+	2.105/+	0.959/+	0.489/+	0.268/+	0.148/+	0.094/-
DV2	4.031/+	4.011/+	3.945/+	3.655/+	2.335/+	1.21/+	0.551/+	0.288/+	0.158/+	0.104/-
DV3	3.981/+	3.965/+	3.197/+	2.024/+	1.078/+	0.591/+	0.3/+	0.178/+	0.141/+	0.085/-
DV4	1.164/+	0.764/+	0.451/+	0.244/+	0.148/+	0.086/-	0.063/-	0.053/-	0.050/-	0.051/-
Control	0.087/-	0.056/-	0.057/-	0.053/-	0.050/-	0.056/-	0.050/-	0.050/-	0.049/-	0.042/-

[0069] 表注: 此试剂盒的结果判定如下: 样品检测值 \geq 阴性对照平均值的 2.1 倍 (计算为 $0.062 \times 2.1 = 0.13$) 为阳性, 反之为阴性。

[0070] 表 4 进口试剂盒 pan-E DENGUE EARLY ELISA 检测四个血清型 DV 培养上清结果

[0071]

DV 病毒	病毒滴度 (PFU/ml)									
	50000	25000	12500	6250	3125	1563	782	391	195	97
DV1	104.8/+	103.3/+	103.0/+	97.9/+	92.5/+	73.4/+	53.2/+	31.4/+	16.7/+	8.7/-
DV2	103.7/+	102.9/+	99.4/-	93.4/+	83.3/+	63.3/+	41.1/+	23.9/+	11.6/+	6.8/-
DV3	95.7/+	87.1/+	76.3/+	53.3/+	32.0/+	17.9/+	9.7/-	5.7/-	3.3/-	2.1/-
DV4	31.7/+	17.6/+	9.7/-	5.6/-	3.2/-	2.4/-	1.7/-	1.6/-	1.4/-	1.3/-
Control	2.2/-	1.8/-	1.6/-	1.5/-	1.4/-	1.4/-	1.4/-	1.4/-	1.4/-	1.4/-

[0072] 表注: 此试剂盒的结果判定如下: 显示值 < 9.0 为阴性, 显示值 $9.0-11.0$ 为可疑阳性, 显示值 > 11.0 为阳性。

[0073] b. 特异性分析

[0074] 用梯度稀释的四个血清型登革病毒培养上清及乙脑病毒和黄热病毒培养液进行检测, 结果如表 5 显示, 本发明试剂盒仅特异地检测 4 个血清型登革病毒培养上清, 与其它黄病毒属的病毒如乙脑病毒及黄热病毒均不发生交叉反应。说明建立的双抗体夹心抗原捕获 ELISA 检测具有登革病毒特异性。

[0075] 表 5 本发明试剂盒检测登革病毒的特异性鉴定

[0076]

DV 病毒	病毒稀释度									
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	1:4096
DV1	4.052/+	4.033/+	4.005/+	3.951/+	3.518/+	2.105/+	0.959/+	0.489/+	0.268/+	0.148/+
DV2	4.039/+	4.031/+	4.011/+	3.945/+	3.655/+	2.335/+	1.21/+	0.551/+	0.288/+	0.158/+
DV3	4.01/+	3.981/+	3.965/+	3.197/+	2.024/+	1.078/+	0.591/+	0.3/+	0.178/+	0.141/+
DV4	3.982/+	3.774/+	2.47/+	1.164/+	0.764/+	0.451/+	0.244/+	0.148/+	0.086/-	0.063/-
YFV	0.099/-	0.087/-	0.052/-	0.053/-	0.048/-	0.044/-	0.055/-	0.039/-	0.042/-	0.048/-
JEV	0.113/-	0.086/-	0.059/-	0.06/-	0.058/-	0.057/-	0.056/-	0.061/-	0.057/-	0.05/-

[0077] 表注：此试剂盒的结果判定如下：样品检测值 \geq 阴性对照平均值的 2.1 倍（计算为 $0.062 \times 2.1 = 0.13$ ）为阳性，反之为阴性。

[0078] 4、临床试验

[0079] 首先将临床血清标本用 1.5M 甘氨酸 (PH2.8) 进行预处理使 NS1 与血清中的抗体形成的复合物解离，从而释放游离的 NS1 抗原，再用 1.5M Tris-Hcl (PH9.7) 中和后用上述建立的方法进行检测。

[0080] (1) 本发明试剂盒检测正常人血清标本：

[0081] 本发明的试剂盒检测了 552 例正常人血清，用此检测结果确定本方法的临界值。对检测值进行分析，计算得平均值为 0.06，标准差为 0.026，以平均值加上 3 个标准差作为本方法的检测临界值即： $0.06 + 0.026 \times 3 = 0.138$ ，以大于或等于临界值作为判断检测值阳性标准，552 例正常人血清标本检测到 1 例为弱阳性 (0.502)，可确定本方法的特异度为 99.8%。

[0082] (2) 本发明试剂盒检测 DV1 感染病人急性期血清

[0083] 本发明的试剂盒检测了 308 例可能为 DV1 感染患者急性期血清，这些血清标本经 MAC-ELISA 确定为 DV IgM/IgG 抗体阳性，同时与商品化抗原检测试剂盒“pan-E DENGUEEARLY ELISA”进行比较。本发明试剂盒检测的这 308 例血清，其中阳性的有 291 例，阳性率达 94.5% (291/308)，商品化试剂盒“pan-E DENGUE EARLY ELISA”检测结果显示，其中阳性的标本为 285 例，阳性率为 92.5% (285/308)。

[0084] 表 6 本发明试剂盒与 pan-E DENGUE EARLY ELISA 试剂盒检测临床标本的比较

[0085]

PAN	DENV		合计
	+	-	
+	285	0	285
-	6	17	23
合计	291	18	308

[0086] (3) 本发明试剂盒检测临床标本的灵敏度分析

[0087] 本发明试剂盒通过对 27 例经梯度稀释的 DV1 病人血清标本进行检测，同时以商品化试剂盒“pan-E DENGUE EARLY ELISA” (Panbio, Australia) 进行同步检测比较，操作步骤按照试剂盒说明书进行。结果表明，商品化试剂盒对 DV1 病人血清标本检测的最高稀释度为 1 : 1280，而本发明试剂盒检测的最高稀释度可达 1 : 5120，是商品化试剂盒的 4 倍，进一步验证了前面检测登革病毒培养上清的灵敏度实验结果（表 7），根据统计学分析，两

个试剂盒检测 DV1 病人血清标本的敏感性具有明显的统计学差异 ($P < 0.05$)。

[0088] 表 7 本发明试剂盒检测临床标本的灵敏度分析

[0089]

血清稀释度	阳性的血清标本/总的血清标本 (%)	
	Panbio	DENV
1: 10	27/27(100%)	27/27(100%)
1: 20	27/27(100%)	27/27(100%)
1: 40	27/27(100%)	27/27(100%)
1: 80	24/27(88.9%)	27/27(100%)
1: 160	20/27(74.1%)	26/27(96.3%)
1: 320	17/27 (63.0%)	23/27(85.2%)
1: 640	13/27 (48.1%)	19/27(70.4%)
1: 1280	5/27 (18.5%)	16/27(59.3%)
1: 2560	0/27(0%)	9/27(33.4%)
1: 5120	0/27(0%)	1/27(3.7%)

[0090] 例 2

[0091] 1、本发明试剂盒由以下试剂组成：

[0092] (1) 包被抗体 2E8A5、DV2-M6 和 4B14A1 的微孔反应板；

[0093] (2) 样品处理液：由样品处理液 A 和样品处理液 B 组成，其中 A 为 1.5M 甘氨酸溶液 (PH2.8)，B 为 1.5M Tris-HCl 溶液 (PH9.7)；

[0094] (3) 生物素标记的单抗 3B1A15；

[0095] (4) 辣根过氧化物酶标记的亲合素，购自 Zymed 公司；

[0096] (5) 浓缩洗液：含有 2% Tween-20 的 20×PBS，即 1L 溶液中含有 4.56g NaH_2PO_4 ，58.02g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，175.3g NaCl，15 磅 20min 高压灭菌后，加入 20ml Tween-20 搅匀，使用时 20 倍稀释；

[0097] (6) 阳性对照：DV NS1 抗原 1：1000 稀释液；

[0098] (7) 阴性对照：含 0.1% Tween-20 的 10mM PH7.4PBS，即 1L 溶液中含有 4.56g NaH_2PO_4 ，58.02g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ，175.3gNaCl，15 磅 20min 高压灭菌，20 倍稀释后加入 0.1% Tween-20；

[0099] (8) 显色液：由显色液 A 和 B 组成，使用时取二者等量混匀使用。其中显色液 A、B 的组成成分如下：

[0100] 显色液 A：

[0101] 将 0.89g 柠檬酸和 0.16g EDTA 二钠溶于 1000ml 水中，115℃ 30min 后，降至 90℃ 后加 TMB 0.25g，摇匀于 4℃ 避光保存；

[0102] 显色液 B：

[0103] 将 9.33g 柠檬酸和 14.6g EDTA 二钠溶于 1000ml 水中，115℃ 30min 后，降至 90℃ 后加 0.75% 过氧化氢尿素 12.8ml，摇匀于 4℃ 避光保存；

[0104] (9) 终止液：1M H_2SO_4 。

[0105] 上述试剂中，单抗 2E8A5、DV2-M6 和 4B14A1 的制备方法、包被单抗组合 2E8A5、

DV2-M6 和 4B14A1 的微孔反应板的制备方法同例 1 ;生物素标记的单抗 3B1A15 的制备方法为 :将 2.2mg 生物素溶解于 0.5ml 蒸馏水中,取其 30 μ l 加入到 1ml 单抗 DV2-M14(浓度为 2mg/ml) 中,4 $^{\circ}$ C 静置 2h 后装入透析袋中,于 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜,换液三次。收集结合物加入终浓度 50% 甘油保护剂,最后用磷酸盐缓冲液稀释 500 倍,即为工作液。

[0106] 2、使用方法 :

[0107] 取待测的样品 50 μ l,加入样品处理液 A 50 μ l,混匀后置 37 $^{\circ}$ C 1h,再加样品处理液 B 50 μ l 混匀,加入单抗组合 2E8A5、DV2-M6 和 4B14A1 包被的聚苯乙烯 96 孔微量测试板中,同时设阴性对照和阳性对照,37 $^{\circ}$ C 温育 1h,浓缩洗涤液 20 倍稀释后洗涤板条,洗板五次后,加入 1 : 500 稀释的生物素标记的单抗 3B1A15,100 μ l/ 孔,室温 30min,同上洗板五次后,加入 1 : 1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的亲合素,100 μ l/ 孔,室温 30min,同上洗板八次后加显色液(显色液 A 和 B 等量混合,现用现配),100 μ l/ 孔,室温避光 10min 后,加入终止液,100 μ l/ 孔,终止反应。

[0108] 3、结果判定 :以空白孔调零,于 450nm 波长测定吸光度(A 值)。阳性对照平均值 ≥ 0.50 ,阴性对照平均值 ≤ 0.10 ,实验成立。样品 A 值 \geq 阴性对照 A 值平均值 $\times 2.1$,则判为阳性,反之为阴性。

[0109] 例 3

[0110] 1、本发明试剂盒由以下试剂组成 :

[0111] (1) 包被单抗 2E8A5、DV2-M6 和 4B14A1 的微孔反应板 ;

[0112] (2) 样品处理液 :由样品处理液 A 和样品处理液 B 组成,其中 A 为 1.5M 甘氨酸溶液 (PH2.8),B 为 1.5M Tris-HCl 溶液 (PH9.7) ;

[0113] (3) 碱性磷酸酶标记的单抗 3B1A15 ;

[0114] (4) 浓缩洗液 :含有 2% Tween-20 的 20 \times PBS,即 1L 溶液中含有 4.56g Na_2HPO_4 ,58.02g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,175.3g NaCl,15 磅 20min 高压灭菌后,加入 20ml Tween-20 搅匀,使用时 20 倍稀释 ;

[0115] (5) 阳性对照 :DV2NS1 抗原 1 : 1000 稀释液 ;

[0116] (6) 阴性对照 :含 0.1% Tween-20 的 10mM PH7.4PBS,即 1L 溶液中含有 4.56g Na_2HPO_4 ,58.02g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,175.3g NaCl,15 磅 20min 高压灭菌,20 倍稀释后加入 0.1% Tween-20 ;

[0117] (7) 显色液为 PNPP(购于 PIERCE 公司),以 10mg PNPP 溶于 10mM 二乙醇胺溶液中 ;

[0118] (8) 终止液 :2M NaOH 溶液。

[0119] 上述试剂中,单抗 2E8A5、DV2-M6 和 4B14A1 的制备方法、包被单抗组合 2E8A5、DV2-M6 和 4B14A1 的微孔反应板的制备方法同例 1 ;碱性磷酸酶标记的单抗 3B1A15 的制备方法为 :采用戊二醛法,即取碱性磷酸酶 5mg 溶于 1ml 抗体 (2mg/ml) 溶液中,在 10mM PBS(PH7.2) 透析 24h,期间更换透析液 3 次,加入 2.5% 的戊二醛 20 μ l,室温静置 2h,在 10mM PBS(PH7.2) 透析 12h,期间更换透析液 3 次,在 50mM Tris-HCl 溶液 (PH8.0) 中透析 12h,期间更换透析液 3 次,用含 1% BSA 的 Tris-HCl 溶液 (PH8.0,含 0.02% NaN_3) 稀释至 4ml,加入等量 60% 中性甘油溶液,混匀后分装,-80 $^{\circ}$ C 冻存备用。

[0120] 2、使用方法 :样品处理液处理各种待测的样品后,加 150 μ l 于 2E8A5、DV2-M6 和

4B14A1 包被的聚苯乙烯 96 孔微量测试板中,同时设阴性对照和阳性对照,37℃温育 1h,浓缩洗涤液 20 倍稀释后洗涤板条,洗板四次后,加入酶结合物,150 μl/孔,37℃ 30min,同上洗板八次后,加显色液 PNPP,150 μl/孔,室温避光 30min 后,加入终止液,100 μl/孔,终止反应。

[0121] 3、结果判定:以空白孔调零,于 405nm 波长测定 A 值。阳性对照平均值 ≥ 0.50 ,阴性对照平均值 ≤ 0.10 ,实验成立。样品 A 值 \geq 阴性对照 A 值平均值 $\times 2.1$,则判为阳性。反之为阴性。

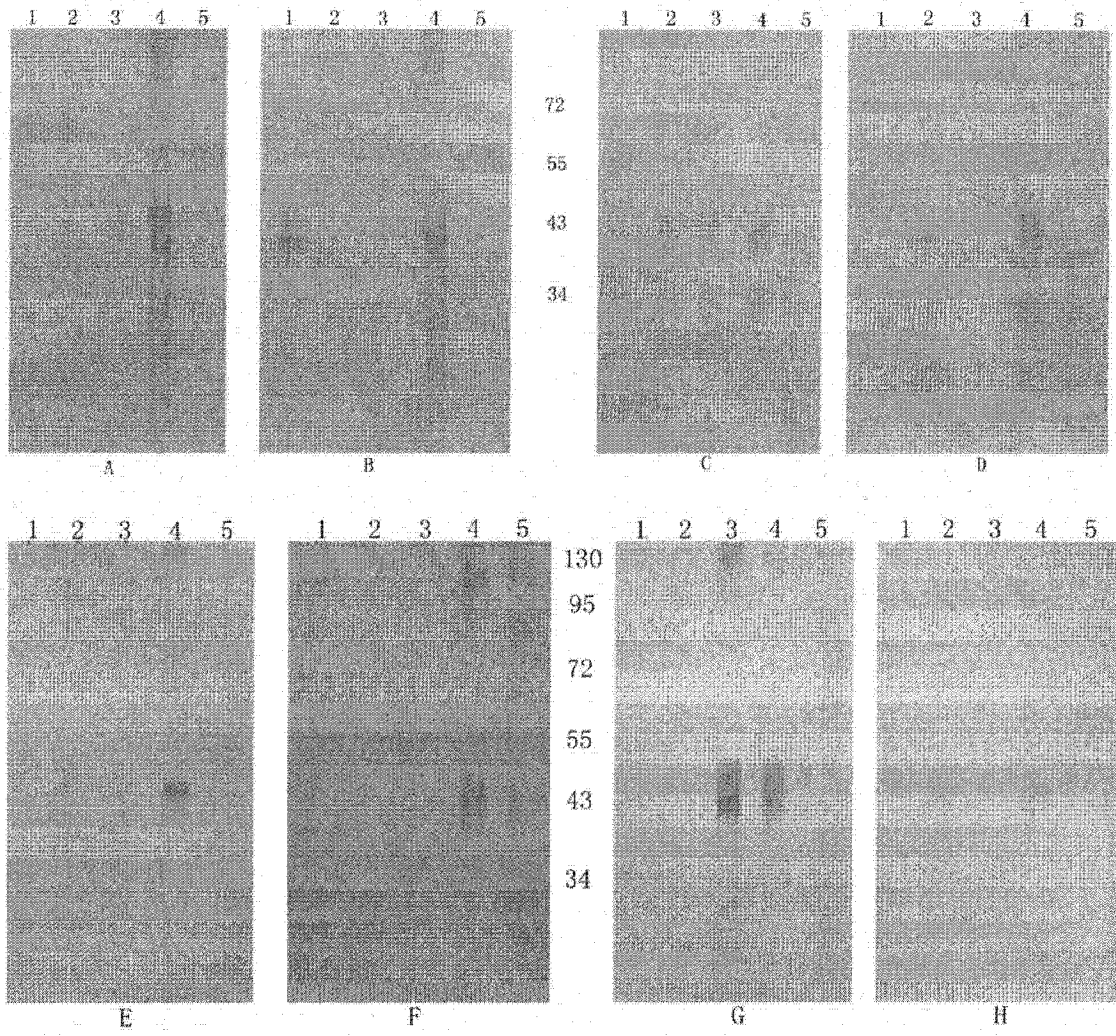


图 1

专利名称(译)	一种检测登革病毒NS1抗原的免疫诊断试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN101726593B	公开(公告)日	2012-10-17
申请号	CN200910040560.9	申请日	2009-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	车小燕 丁细霞 潘玉先 丘立文		
发明人	车小燕 丁细霞 潘玉先 丘立文		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/531		
CPC分类号	Y02A50/53		
审查员(译)	唐华东		
其他公开文献	CN101726593A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测登革病毒NS1抗原的免疫诊断试剂盒，该试剂盒包括捕获抗体和与标记物结合的检测抗体，其特征在于所述的捕获抗体由单抗2E8A5、单抗DV2-M6和单抗4B14A1组成，所述的检测抗体是单抗3B1A15，所述的标记物可以是生物素、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、胶体金或荧光素。该试剂盒能特异性的检测4个血清型登革病毒的NS1蛋白，与其他黄病毒属病毒，如黄病毒和乙型脑炎病毒无交叉反应，其灵敏度比国外商品化试剂盒检测的灵敏度至少高出4倍，可有效降低临床应用中的漏检现象。

杂交瘤细胞株保藏号	DV 感染 C6/36 细胞涂片				正常 C6/36 细胞涂片
	DV1	DV2	DV3	DV4	
CCTCC-C200855	.	.	+++	+++	.
CCTCC-C200857	+++	.	+++	.	.
CCTCC-C200859	+++	+++	+++	+++	.
CCTCC-C200736	.	+++	.	.	.