

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780032305.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/545 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月7日

[11] 公开号 CN 101553732A

[22] 申请日 2007.8.31

[21] 申请号 200780032305.9

[30] 优先权

[32] 2006.8.31 [33] JP [31] 235356/2006

[32] 2007.1.29 [33] JP [31] 018400/2007

[86] 国际申请 PCT/JP2007/067072 2007.8.31

[87] 国际公布 WO2008/026741 日 2008.3.6

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.27

[71] 申请人 大阪府

地址 日本大阪府

共同申请人 希森美康株式会社

[72] 发明人 高桥和郎 奥野良信 西村公志

一口毅 齐藤纪幸 谷口友邦

[74] 专利代理机构 北京金之桥知识产权代理有限公司

代理人 梁朝玉

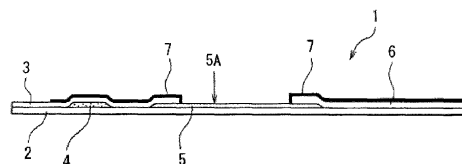
权利要求书 2 页 说明书 29 页 序列表 14 页
附图 13 页

[54] 发明名称

对禽流感病毒的特异性快速诊断法

[57] 摘要

本发明提供一种检测禽流感病毒的方法，其利用免疫学测定法，使用对人流感 A 型病毒 H1 亚型、H2 亚型、H3 亚型及人流感 B 型病毒不显示反应性，而对禽流感病毒的多种亚型显示反应性的抗流感病毒抗体，检测出禽流感病毒。本发明提供一种运用于此的免疫层析法试验用具。通过本发明，可以与人流感病毒进行区分，特异性且快速简便地检测出禽流感病毒。



1. 一种禽流感病毒检测方法，其特征在于：用一种对禽流感病毒的多种亚型显示反性应而不对人流感 A 型病毒 H1 亚型、H2 亚型和 H3 亚型以及人流感 B 型病毒显示反应性的抗流感病毒抗体，通过免疫学测定方法检测试样中的禽流感病毒。

2. 权利要求1所述方法，其特征在于：所述抗流感病毒抗体显示反应性的禽流感病毒亚型中至少有一种是选自由禽流感病毒H5亚型、H7亚型和H9亚型构成的群体。

3. 权利要求1所述方法，其特征在于：所述抗流感病毒抗体至少对H3~15亚型禽流感病毒显示反应性。

4. 权利要求 1 所述方法，其特征在于：所述抗流感病毒抗体是抗流感 A 型病毒的核蛋白质的抗体。

5. 权利要求 1 所述方法，其特征在于：所述抗流感病毒抗体是识别禽流感病毒的核蛋白质的氨基酸序列 N 端起第 46 位~第 159 位区域内的表位的抗体。

6. 权利要求 1 所述方法，其特征在于：所述抗流感病毒抗体是由国际寄存受理号 FERM ABP-10904（国内寄存受理号：FERM P-20822）杂交瘤产生的单克隆抗体。

7. 权利要求 1 所述方法，其特征在于：所述免疫学测定法包括这一步骤：用抗流感病毒的第一和第二抗体形成含有被标记的所述第一抗体、固定在固相上的所述第二抗体及流感病毒的复合物，且至少所述第二抗体是对人流感 A 型病毒 H1 亚型、H2 亚型和 H3 亚型以及人流感 B 型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的若干亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。

8. 权利要求 7 所述方法，其特征在于：所述第一和第二抗体是对人流感 A 型病毒 H1 亚型、H2 亚型和 H3 亚型以及人流感 B 型病毒不显示反应

性、而对禽流感病毒的若干亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。

9. 权利要求7或8所述方法，其特征在于：所述免疫学测定法是免疫层析法。

10. 权利要求9所述方法，其特征在于：所述免疫层析法包括在固定有所述第二抗体的层析膜担体上形成包含该第二抗体、被标记的所述第一抗体和流感病毒的复合物的步骤，且所述第二抗体是对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的若干亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。

11. 一种利用抗流感病毒的第一和第二抗体检测试样中所含禽流感病毒的免疫层析试验用具，其特征在于：

具有添加所述试样的试样添加部件；

放置被标记物标记的第一抗体的标记物固定部件；

配有固定了第二抗体的判断区的层析膜担体；

所述第一抗体对禽流感病毒显示反应性；

所述第二抗体是对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的若干亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。

12. 权利要求11所述免疫层析试验用具，其特征在于：所述标记物是非溶性粒状标记物。

13. 权利要求12所述免疫层析试验用具，其特征在于：所述非溶性粒状标记物是显色合成高分子粒子或胶体金属粒子。

对禽流感病毒的特异性快速诊断法

技术领域:

本发明涉及一种禽流感病毒检测方法及检测禽流感病毒用免疫层析试验用具。

背景技术:

流感病毒因核蛋白质(NP)和膜蛋白质(M)的抗原性不同而分为A型、B型和C型。其中流感A型病毒又根据血凝素(HA)和神经氨酸酶(NA)的氨基酸序列或抗原性的不同,把HA分为H1~15十五种,NA分为N1~9九种,还有其组合的多种亚型。其中,以人为宿主感染到人的亚型为H1~3、N1~2。流感A型病毒(H1~3、N1~2)和流感B型病毒(以下有时也称为“人流感病毒”)是每年引起大范围流行的所谓流感(人流感)的原因。

流感A型病毒不仅感染人,也感染大多数哺乳动物和鸟类。流感A型病毒感染鸟类引起的鸟类的感染症就是“禽流感”,作为其原因的禽流感病毒已确认有H1~15、N1~9的所有亚型。禽流感病毒的虽然大部分不显示出重症,但H5和H7亚型的禽流感病毒中在感染到鸟类时有的会出现严重症状。这些被称为高致病性禽流感病毒,对人类感染的可能性令人担忧。另外,H9亚型禽流感病毒中也有人类与感染病毒的家禽接触后被感染、发病的报告,因此,其在人类中扩大感染范围也令人担忧。

目前,在临床上,用快速检测流感病毒抗原的试剂盒对流感进行诊断。这种快速诊断试剂盒如有以酶免疫测试法(EIA)和免疫层析法为原理使用的试剂,有的仅检测流感A型病毒(参照如专利公开2006-67979号公报等)、有的一揽子检测流感A型病毒和流感B型病毒,有的则分别检测流感A型病毒和流感B型病毒等等。

然而,专利文献1的快速诊断试剂盒不能区分是人流感A型病毒还是禽流感病毒,只能检测属于流感A型病毒的这一大范围的病毒。因此,当人出

现流感征兆时，无法诊断是禽流感病毒所致还是人流感病毒所致。为此需要研制能快速诊断出禽流感病毒的方法。

发明内容：

本发明的目的是，鉴于上述情况，提供一种能区别于人流感病毒、特异、迅速、简便地检测出禽流感病毒的方法及用于此方法的免疫层析试验用具。

本发明为了达到上述目的，采取了以下技术手段。

本发明与禽流感病毒检测方法相关，其特征在于：用一种只对禽流感病毒的若干亚型显示反应性而对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒不显示反应性的抗流感病毒抗体，通过免疫学测定方法检测试样中的禽流感病毒。

上述禽流感病毒检测方法适于上述抗流感病毒抗体显示反应性的禽流感病毒亚型中至少有一个是选自由禽流感病毒H5亚型、H7亚型和H9亚型构成的群体。

在上述禽流感病毒检测方法中，上述抗流感病毒抗体也可以至少对H3~15亚型禽流感病毒显示反应性。

在上述禽流感病毒检测方法中，作为上述抗流感病毒抗体，可以使用抗流感A型病毒核蛋白质的抗体，也可以使用能识别禽流感病毒核蛋白质的氨基酸序列N端起第46位~第159位区域的表位的抗体。

在上述禽流感病毒检测方法中，上述抗流感病毒抗体最好是由国际寄存受理号FERM ABP-10904（国内寄存受理号：FERM P-20822）杂交瘤产生的单克隆抗体。

在上述禽流感病毒检测方法中，最好是所述免疫学测定法包括这一步骤：用抗流感病毒的第一和第二抗体形成含有被标记的上述第一抗体、固定在固相上的上述第二抗体及流感病毒的复合物，且至少上述第二抗体最好是对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的若干亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。

上述第一和第二抗体最好是对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的若干亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。

所述免疫学测定法最好是免疫层析法。

所述免疫层析法最好包括在固定有上述第二抗体的层析膜担体上形成包含该第二抗体、被标记的上述第一抗体和流感病毒的复合物的步骤，且上述第二抗体最好是对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的若干亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。

本项关于免疫层析试验用具的发明是利用抗流感病毒的第一和第二抗体检测试样中所含流感病毒的免疫层析试验用具，其特征在于：具有添加上述试样的试样添加部件、放置被标记物标记的第一抗体的标记物固定部件和配置了固定有第二抗体的判断区的层析膜担体，上述第一抗体对禽流感病毒显示反应性，上述第二抗体是对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的若干亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。

在上述免疫层析试验用具中，所述标记物最好是非溶性粒状标记物。其中尤以显色合成高分子粒子或胶体金属粒子为宜。

附图说明：

[图1]为本发明一实施方式所涉及的免疫层析试验用具的截面图。

[图2] 为特定单克隆抗体4E3和1C10所识别抗原的试验结果的显示图。

[图3] 为r-人流感 NP、r-禽流感 NP、r-Ch1 流感 NP、r-Ch2 流感 NP、r-Ch3 流感 NP和r-Ch4 流感 NP的氨基酸序列的示意图。

[图4] 为r-人流感 NP和r-禽流感 NP以及来源于12种人流感病毒株的NP和来源于12种禽流感病毒株的NP的氨基酸序列第1位到第50位的显示图。

[图5] 为相同氨基酸序列第51位到第100位的显示图。

[图6] 为相同氨基酸序列第101位到第150位的显示图。

[图7] 为相同氨基酸序列第151位到第200位的显示图。

[图8] 为相同氨基酸序列第201位到第250位的显示图。

[图9] 为相同氨基酸序列第251位到第300位的显示图。

[图10] 为相同氨基酸序列第301位到第350位的显示图。

[图11] 为相同氨基酸序列第351位到第400位的显示图。

[图12] 为相同氨基酸序列第401位到第450位的显示图。

[图13] 为相同氨基酸序列第451位到第504位的显示图。

[图14] 为4E3和抗His-Tag抗体对各种基因重组NP的反应性的比较图。

具体实施方式：

禽流感病毒检测方法是一种用只对禽流感病毒的若干种亚型显示反应性而不对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒显示反应性的抗流感病毒抗体、通过免疫学测定方法检测试样中的禽流感病毒的方法。

此检测方法使用上述抗体，因此比起迄今不能区分是来源于人类的流感病毒还是来源于禽类的流感病毒、只能作为A型流感病毒检测的方法，能够区分人流感病毒和禽流感病毒，检测出数种亚型禽流感病毒。

用于禽流感病毒检测方法的抗体是一种不对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒显示反应性、而对禽流感病毒的多种亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。此抗流感病毒抗体和人流感病毒（A型（H1~H3亚型）和B型）不反应，对禽流感病毒的多种亚型起反应，因此，能够一反过去不区分来源于人类还是禽类地检测流感A型病毒的状况，先区分来源于人类还是禽类，然后检测出来源于禽类的流感A型病毒。

抗流感病毒抗体显示反应性的禽流感病毒亚型中，最好至少有一种是选自自由禽流感病毒H5亚型、H7亚型和H9亚型构成的病毒群。因为禽流感病毒H5亚型、H7亚型或H9亚型是已确认能感染人类的禽流感病毒，有可能在人类中引起大面积感染。

抗流感病毒抗体也可以是至少对H3~15亚型禽流感病毒显示反应性的抗体。此时，禽流感病毒只要属H3~15亚型就能检测出来。

抗流感病毒抗体最好是针对流感A型病毒核蛋白质的抗体。作为抗流感病毒抗体也可以使用识别禽流感病毒核蛋白质的氨基酸序列N端起第46位~第159位区域中的表位的抗体。

作为抗流感病毒抗体，具体可列举出由杂交瘤鼠—鼠杂交瘤4E3产生的单克隆抗体(以下称“4E3”)。

该杂交瘤被命名且表示为鼠—鼠杂交瘤4E3，在布达佩斯条约下，以受理号FERM ABP-10904[受理日：2007年（平成19年）8月30日，国内寄存受理号：FERM P-20822，国内寄存日：2006年（平成18年）2月24日]寄存在位于日本国茨城县筑波市东1丁目1-1中央第6（邮政编码305-8566）的独立行政法人产业技术研究所特许生物寄存中心。

此杂交瘤是小鼠骨髓肿瘤细胞来源细胞株与小鼠淋巴球的融合细胞，产生与流感A型病毒H3~15亚型的核蛋白质（NP）结合的单克隆抗体（4E3）。4E3可以通过以下方法制造：将杂交瘤鼠—鼠杂交瘤4E3在含有10%牛胎儿血清、10mM L-谷氨酸盐、0.25%NaHCO₃的RPMI 1640培养基（SIGMA R6504）中，在37℃、5%CO₂环境下培养，用众所周知的方法回收、提纯所产生的4E3。

此单克隆抗体包括其片段及其嵌合抗体和人化抗体等改变抗体和变异抗体。这些片段、改变抗体或变异抗体也具有与源抗体同样的对禽流感病毒数种亚型的特异性。这些均可以由专业人士用已知手段或方法制造。

免疫学测定法（免疫测定）是一种利用与抗体的结合能力定量测定物质的方法，比如可以使用放射免疫测定（RIA）法、免疫放射定量测定（IRMA）法、酶免疫测定(EIA)法、酶联免疫吸附测定（ELISA）法、均一酶免疫测定法、荧光免疫检测（FIA）法、免疫荧光分析（IFMA）法、荧光偏振法、化学发光免疫检测（CLIA）法、化学发光酶免疫分析（CLEIA）法、免疫层析法。在免疫学测定法中使用的上述抗流感病毒抗体可以是一种也可以是二种以上。

试样只要是可能含有流感病毒的物质即可，比如可以是将采自疑似患者的眼泪、眼垢、咳痰、唾液及大便等生物试样与生理盐水、磷酸缓冲液等溶剂混合的物质、用上述溶剂从擦拭疑似患者的患病部位（鼻腔、咽喉等）的纱布和棉签等冲洗或提取的物质、或用上述溶剂清洗疑似患者的患病部位的清洗液。

在免疫学测定法中也尤以采用以夹心法为测定原理的免疫学测定法为宜，其中包含以下步骤：用抗流感病毒的第一和第二抗体形成含有被标记的上述第一抗体、固定在固相上的上述第二抗体和流感病毒的复合物。

在此，至少作为上述第二抗体使用对上述人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的多种亚型显示反应的抗流感病毒抗体。因为用第一抗体—禽流感病毒（抗原）—第二抗体构建所谓的夹心结构，可以灵敏地测定试样中的禽流感病毒。

上述第一和第二抗体最好是上述抗流感病毒抗体。第一和第二抗体二者都使用上述抗流感病毒抗体可以提高敏感度和特异性，从而提高检测精度。

以夹心法为测定原理的免疫学测定法包含IRMA法、ELISA法、IFMA法、免疫层析法等。

作为结合到第一抗体的标记物如有：放射性同位素（ ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等）、酶（ β —半乳糖苷酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶等）、荧光物质（荧光素衍生物、若丹明衍生物等）、非溶性粒状标记物等。

固定第二抗体的固相素材或形状可根据测定法适当选择。作为固相的素材比如有聚氯乙烯、聚偏氟乙烯（PVDF）、聚苯乙烯、苯乙烯—二乙烯基苯共聚物、苯乙烯—无水马来酸共聚物、尼龙、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺、聚丙烯腈、聚丙烯等合成有机高分子化合物、葡聚糖衍生物、琼脂糖凝胶、纤维素等多糖类、玻璃、硅胶、硅酮等无机高分子化合物。这些还可以是导入氨基、氨酰基、羧基、酰基、羟基、硝基等官能基后的物质。作为固相的形状，可以是微量滴定板（ELISA板）、磁盘等平板状、串珠等粒子状、试管、软管等管状、纤维状、膜状。

在以夹心法为测定原理的免疫学测定法中，最好是免疫层析法，因为该法操作简便，不需要特别的装置，能够快速进行测定。

上述免疫层析法最好包括这一步骤：在固定有上述第二抗体的层析膜担体上形成含有该第二抗体、被标记的上述第一抗体和流感病毒的复合物，且上述第二抗体最好是对上述人流感A型病毒H1亚型、H2亚型和H3亚型以及人流感B型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的多种亚型显示反应性的抗流感病毒抗体。此时，在层析膜担体上形成的是第一抗体、抗原、第二抗体的复合物（夹心结构），因此，可以通过识别第一抗体的标记检出禽流感病毒。

在免疫层析法中也可以使用上述标记物，但为了用肉眼观察颜色就能便捷地判断，最好使用非溶性粒状标记物。非溶性粒状标记物指在免疫层析法中作为标记物使用的粒子中其本身带有颜色的粒子，比如胶体金、胶体白金等胶体状金属粒子、用染料等染色的聚苯乙烯乳胶等合成高分子粒子（显色合成高分子粒子）和共聚染色粒子等。

图 1 是本发明的实施方式之一所涉及的免疫层析试验用具的截面图。此免疫层析试验用具 1 在由表面有粘着层的塑料板构成的底板 2 上配有由人造纤维无纺布构成的试样添加部件 3、由玻璃纤维无纺布构成的标记物固定部件 4、由硝酸纤维素多孔体构成的层析膜担体 5 和纤维素无纺布的吸收部件 6。

底板2用于适当地配置试样添加部件3和标记物固定部件4等上述部件，除塑料以外还可以使用纸、玻璃等材质的东西。

向试样添加部件3添加试样。作为试样可以使用与上述免疫学测定法中常用的试样相同的东西，但最好是鼻腔抽取液、鼻腔擦拭液或咽喉擦拭液。试样也可用缓冲液等适当的溶剂稀释后添加。作为试样添加部件3，除人造纤维无纺布外，比如还可以使用多孔聚乙烯、多孔聚丙烯等多孔合成树脂薄布或薄膜、滤纸、棉布等纤维素制的纸、纺布或无纺布、玻璃纤维的无纺布。

标记物固定部件4与试样添加部件3接触配置，承载由标记物标记的第一抗体。此第一抗体与试样中的待测物发生抗原抗体反应，在此使用的是对

禽流感呈反应性的抗体。只要是对禽流感显示反应性的抗体，可以使用一种或二种以上。第一抗体推荐使用**4E3**。也可以将**4E3**与其他对禽流感呈反应性的抗流感病毒抗体组合起来使用。

标记第一抗体的标记物可以使用与上述以夹心法为测定原理的免疫学测定法和免疫层析法所用标记物相同的东西。其中尤以能用肉眼观察到颜色变化便捷作出判断的非溶性粒状标记物为佳，特别是有色合成高分子粒子或胶体金属粒子最好。

该标记物固定部件**4**的制备可以采取将玻璃纤维无纺布中浸入已标记第一抗体的悬浮液，将其干燥等方法。标记物固定部件**4**使用的是玻璃纤维无纺布，但不限于此，比如也可以使用纤维素类的布（滤纸、硝化纤维膜等）、聚乙烯、聚丙烯等多孔塑料布等。

层析膜担体**5**距标记物固定部件**4**一定间隔配置，具有固定了与待测物产生抗原抗体反应的第二抗体的判断区**5A**。第二抗体是对人流感**A**型病毒**H1**亚型、**H2**亚型和**H3**亚型以及人流感**B**型病毒不显示反应性、而对禽流感病毒的多种亚型显示反应性的抗流感病毒抗体，最好是**4E3**。

层析膜担体**5**在此使用的是硝化纤维多孔体，但只要能将试样所含待测物层析展开、且能固定形成上述判断区**5A**的第二抗体，任何东西均可，也可以使用其他纤维（如醋酸纤维）膜、尼龙（如可以羧基、烷基等为置换基的、导入了氨基的修饰尼龙）膜和聚偏二氟乙烯（**PVDF**）膜等。

吸收部件**6**与层析膜担体**5**接触配置，用于吸收多余的试样。吸收部件**6**可以使用能迅速吸收并锁住液体的任何材质的东西，比如棉布、滤纸、由聚乙烯、聚丙烯等构成的多孔塑料无纺布等。试样添加部件**3**的一部分和吸收部件**6**的表面如图**1**所示用透明条**7**覆盖。

本发明的免疫层析试验用具**1**可如下制作。首先，将层析膜担体**5**贴在底板**2**的中段，然后在底板**2**的上游与该层析膜担体**5**的层析展开起点一侧（即图**1**的左侧，以下称“上游侧”）末端空一定间隔、不接触地贴上标记物固定部件**4**。再将试样添加部件**3**的上游部分贴在底板**2**的最上游侧，与此同时，该试样添加部件**3**的层析展开终点一侧（即图**1**的右侧，以下称“下

游侧”) 部分贴到位于标记物固定部件4和层析膜担体5之间的底板2上。将吸收部件6的上游侧部分放置到层析膜担体5的下游侧部分上面, 同时将该吸收部件6的下游侧部分贴到底板2的最下游侧部位。用透明条7覆盖试样添加部件3的下游侧部分和吸收部件6的表面。

此后, 再根据需要将试样与适当溶剂混合, 制备成可层析展开的混合液, 将上述免疫层析试验用具1的上游(试样添加部件3)一侧浸入该混合液, 则该混合液通过试样添加部件3在标记物固定部件4与标记的第一抗体混合。

此时, 上述混合液中如果存在禽流感病毒(抗原)的话, 就会起抗原抗体反应而使标记物固定部件4和第一抗体结合, 形成复合物。

此复合物在层析膜担体5中层析展开, 到达判断区5A, 与固定在那里的第二抗体发生抗原抗体反应并被捕捉。

此时, 如果使用蓝色乳胶粒子等有色合成高分子粒子作为标记物的话, 由于该粒子的集聚, 判断区5A显示出蓝色, 立即就能肉眼确认禽流感病毒的存在。

如上所述, 使用此免疫层析试验用具1的话, 由于使用的抗流感病毒抗体不与人流感病毒(A型(H1~3亚型)和B型)起反应, 而对禽流感病毒的多种亚型有反应, 因此, 当人感染流感时, 可以确认致病的流感病毒是否来源于禽类。

另外, 层析膜担体5也可以不仅有一个而是有二个以上判断区。层析膜担体5也可以备有对照区。当有对照区时, 只要标记物固定部件4固定比如红色乳胶粒子标记的抗生物素蛋白, 则只需将与抗生物素蛋白特异性结合的生物素固定在层析膜担体5的对照区即可。可以将2, 4-二硝基苯酚(DNP)等半抗原和识别其半抗原的抗体组合起来使用, 取代抗生物素蛋白和生物素的组合。此时, 作为半抗原最好使用测定所用试样中没有的半抗原。

本发明的禽流感病毒检测方法所用抗流感病毒抗体显示反应性的亚型不仅仅被限定到H15亚型, 也包含现在作为流感A型病毒亚型所确认的H16亚型和将来可能确认的H17以后的亚型。

实施例

下面用实施例、比较例和实验例更具体地说明本发明，但本发明不限于此。

实施例和比较例的免疫层析试验用具所使用的抗体是前面所说的杂交瘤[独立行政法人产业技术研究所特许生物寄存中心的国际寄存受理号：FERM ABP-10904（国内寄存受理号：FERM P-20822）]产生的单克隆抗体4E3和杂交瘤鼠-鼠杂交瘤 1C10产生的单克隆抗体（以下称“1C10”）。

该杂交瘤被命名、表示为鼠-鼠杂交瘤 1C10，在布达佩斯条约下，以受理号FERM ABP-10903[受理日：2007年（平成19年）8月30日，国内寄存受理号：FERM P-20821，国内寄存日：2006年（平成18年）2月24日]寄存在日本国茨城县筑波市东1丁目1-1中央第6（邮政编码305-8566）的独立行政法人产业技术研究所特许生物寄存中心。

在此，用感染了流感病毒的MDCK细胞通过酶抗体法检查4E3或1C10对流感病毒的反应性。将流感病毒和MDCK细胞在96孔微孔板的孔中培养12小时，使MDCK细胞感染流感病毒。再用乙醇固定受感染的MDCK细胞，培养产生4E3的杂交瘤所得上清或培养产生1C10的杂交瘤所得上清在室温下培养30分钟。培养后用PBS清洗，然后让过氧化物酶标记抗鼠免疫球蛋白抗体反应30分钟。反应后用PBS清洗，添加二氨基联苯胺，使抗鼠免疫球蛋白抗体显现。根据此方法，当感染MDCK细胞的流感病毒与4E3或1C10的抗体结合时，抗鼠免疫球蛋白抗体的标记能检测出来，如果不结合，则检测不出标记。作为流感病毒如表1所示，使用了从人类分离出的流感A型病毒（14种）、从禽类分离出的流感A型病毒（16种）和流感B型病毒（5种）。

其结果见表1。在表1中，将确认感染MDCK细胞的流感病毒与抗体有结合的标记为（+），未确认结合的标记为（-）。

[表1]

		病毒株	4E3	1C10
流感 A型	从人类分离	A/北京 /262/95 (H1N1)	-	-
		A/新喀里多尼亚 /20/99 (H1N1)	-	-
		A/曼谷 /10/83 (H1N1)	-	-
		A/山形县 /120/86 (H1N1)	-	-
		A/山形县 /32/89 (H1N1)	-	-
		A/PR/8/34 (H1N1)	-	-
		A/奥田/57 (H2N2)	-	-
		A/怀俄明州/3/03 (H3N2)	-	-
		A/爱知县 /2/68 (H3N2)	-	-
		A/悉尼 /5/97 (H3N2)	-	-
		A/巴拿马/2007/99 (H3N2)	-	-
		A/福冈市 /C29/85 (H3N2)	-	-
		A/四川 /2/87 (H3N2)	-	-
		A/北九州 /159/93 (H3N2)	-	-
	从禽类分离	A/小鸚鵡 /爱知县 /1/77 (H3N8)	+	-
		A/鸭子/捷克斯洛伐克 /1/56 (H4N6)	+	-
		A/乌鸦/京都 //04 (H5N1)	+	+
		A/鸭子/HK/342/78 (H5N2)	+	+
		A/鸭子/HK/820/80 (H5N3)	+	+
		A/火鸡 /安大略湖 /7732/66 (H5N9)	+	+
		A/海鸥类飞鸟 /澳大利亚 /1/72 (H6N5)	+	-
		A/凤头潜鸭 /岛根县 /124R/80 (H7N7)	+	-
		A/火鸡 /安大略湖 /6118/68 (H8N4)	+	-
		A/火鸡 /威斯康星州 /66 (H9N2)	+	-
		A/小鸡 /德国 /N/49 (H10N7)	+	-
		A/鸭子/英格兰 /56 (H11N6)	+	-
		A/鸭子/阿尔伯达 /60/76 (H12N5)	+	-
		A/鸥 /马里兰 /704/77 (H13N6)	+	-
A/野鸭 /阿斯特拉罕 /263/82 (H14N5)	+	-		
A/鸭子/澳大利亚/341/83 (H15N8)	+	-		
流感 B型	B/利什特 /40	-	-	
	B/山东 /7/97	-	-	
	B/山梨县 /166/98	-	-	
	B/约翰内斯堡 /5/99	-	-	
	B/上海 /361/02	-	-	

从表1可以确认，4E3对从禽类分离出的流感A型病毒H3~15亚型显示反应性。1C10仅对从禽类分离出的流感A型病毒H5亚型显示反应性。

实施例1

使用上述4E3作为被标记物标记的第一抗体和固定在层析膜担体5的第二抗体，按以下方法制作免疫层析试验用具1（以下称试验用具）。

首先如图1所示，用抗体涂敷仪（BioDot公司制）将用磷酸缓冲液（pH7.0）稀释到浓度为2.0mg/mL的4E3涂敷到由硝酸纤维素膜构成的层析膜担体5的判断区5A，在50℃干燥30分钟。

干燥后的层析膜担体5浸入封闭液（含有BSA的磷酸缓冲液（pH7.0）），进行包封。然后用清洗液（含有SDS的磷酸缓冲液（pH7.0））清洗，在40℃干燥120分钟，获得层析膜担体5。

接着，使4E3染成蓝色的聚苯乙烯乳胶粒子（粒径0.3μm）发生致敏作用，悬浊于分散用缓冲液（含有BSA和蔗糖的磷酸缓冲液（pH7.0））中，制作4E3致敏乳胶粒子。致敏时的抗体浓度为每1mL1%乳胶粒子中有200μg IgG。将此4E3致敏乳胶粒子添加到玻璃纤维垫后，用真空干燥机干燥，获标记物固定部件4。

用此层析膜担体5和标记物固定部件4以常法获得实施例1的试验用具。

试验例1

用实施例1的试验用具探讨对从人类分离的流感病毒（人流感病毒）的反应性。

（1） 在本试验例中，将以下表2所示19种人流感病毒鸡胚培养，用生理盐水稀释所得病毒，作为病毒液使用。病毒液中的病毒浓度用HA价或FFU表示。各病毒液中的病毒浓度见表2。HA价是利用流感所具有的凝集红细胞能力进行流感定量分析（红细胞凝集法）的单位，是表示具感染性的病毒活性的标准，FFU（病灶形成单位）是一种表示根据通过免疫染色感

染细胞的病毒能够确认的病毒感染细胞数算出的病毒数的单位。在表2中的HA价或FFU中标为（-）的表示HA价或FFU未测定。

（2） 接下来，在800 μ L标本抽取试剂（含有0.3w/v% NP-40(聚氧乙烯（9）辛基苯基醚)的磷酸缓冲液pH7.3）中加入一定浓度的病毒液150 μ L混合，作为试样。

（3） 将约200 μ L上述（2）制备的试样滴入玻璃试管，将以上述方法制作的试验用具1的上游（试样添加部件3）一侧放入其中，放置约10分钟后用肉眼观察判断区5A的显色情况。判断以观察到显色的为（+），以未看到显色的为（-）来评价。其结果见表2。

作为比较例，用上述1C10作为第一抗体和第二抗体，此外均与实施例1同样制作试验用具（比较例1）。用4E3作为第一抗体，以1C10为第二抗体，此外均与实施例1同样制作试验用具（比较例2）。

以市场销售的人用流感检测试剂盒pocstem流感A/B（希森美康株式会社）为比较例3。对于比较例1~2，与上述试验例1同样进行评价。对于比较例3，按照试剂盒附带的使用手册进行评价。其结果一并列在表2中。

[表2]

病毒株	比较例 1	比较例 2	比较例 3	实施例 1	试验浓度	
					HA价	FFU/mL
H1N1	A/北京 /262/95 (H1N1)	-	+(A)	-	85	—
	A/新喀里多尼亚 /20/99 (H1N1)	-	+(A)	-	—	1.1×10^7
	A/曼谷 /10/83 (H1N1)	-	+(A)	-	85	—
	A/山形县 /120/86 (H1N1)	-	+(A)	-	43	—
	A/山形县 /32/89 (H1N1)	-	+(A)	-	85	—
	A/PR/8/34 (H1N1)	-	+(A)	-	171	—
H2N2	A/奥田 /57 (H2N2)	-	+(A)	-	43	—
H3N2	A/怀俄明州 /3/03 (H3N2)	-	+(A)	-	85	6.3×10^6
	A/爱知县/2/68 (H3N2)	-	+(A)	-	85	—
	A/悉尼 /5/97 (H3N2)	-	+(A)	-	—	1.0×10^7
	A/巴拿马 /2007/99 (H3N2)	-	+(A)	-	—	3.7×10^6
	A/福冈市 /G29/85 (H3N2)	-	+(A)	-	21	2.6×10^6
	A/四川 /2/87 (H3N2)	-	+(A)	-	21	6.7×10^5
B型	A/北九州 /159/93 (H3N2)	-	+(A)	-	85	9.0×10^6
	B/利什特 /40	-	+(B)	-	21	—
	B/山东 /7/97	-	+(B)	-	21	—
	B/山梨县 /166/98	-	+(B)	-	21	—
	B/约翰内斯堡 /5/99	-	+(B)	-	21	—
	B/上海 /361/02	-	+(B)	-	43	—

从表2中得知，实施例1、比较例1和比较例2的试验用具与从人类分离的流感病毒（人流感病毒）完全不起反应。与此相反，市场销售的人用流感检测试剂盒比较例3对试验的所有人流感病毒都显示反应。

试验例2

下面，探讨实施例1和比较例1~3的试验用具是否与从禽类分离的流感病毒（禽流感病毒）反应。

在本试验例中，鸡胚培养以下表3所列17种人流感病毒，用生理盐水稀释所得病毒作为病毒液使用。各病毒液中的病毒浓度见表3。在表3中的HA价或FFU标为（-）的表示HA价或FFU未测定。

[表3]

病毒株	比较例 1	比较例 2	比较例 3	实施例 1	试验浓度	
					HA价	FFU/mL
A/小鸚鵡 / 爱知县 / 1/77 (H3N8)	-	-	+(A)	+	171	—
A/鸭子 / 捷克斯洛伐克 / 1/56 (H4N6)	-	-	+(A)	+	85	—
A/鸭子 / HK/342/78 (H5N2)	+	+	+(A)	+	—	1.1×10^7
A/火鸡 / 安大略湖 / 7732/66 (H5N9)	+	+	+(A)	+	—	1.375×10^6
A/海鸥类飞鸟 / 澳大利亚 / 1/72 (H6N5)	-	-	+(A)	+	85	—
A/鸭子 / HK/301/78 (H7N1)	-	-	+(A)	+	128	—
A/凤头潜鸭 / 岛根县 / 124R/80 (H7N7)	-	-	+(A)	+	43	—
A/火鸡 / 安大略湖 / 6118/68 (H8N4)	-	-	+(A)	+	11	—
A/火鸡 / 威斯康星州 / 66 (H9N2)	-	-	+(A)	+	43	—
A/鸭子 / HK/448/78 (H9N2)	-	-	+(A)	+	68	—
A/鸭子 / HK/702/79 (H9N5)	-	-	+(A)	+	68	—
A/小鸡 / 德国 / N/49 (H10N7)	-	-	+(A)	+	24,016	—
A/鸭子 / 英格兰 / 56 (H11N6)	-	-	+(A)	+	171	—
A/鸭子 / 阿尔伯达 / 60/76 (H12N5)	-	-	+(A)	+	—	1.1×10^6
A/海鸥 / 马里兰 / 704/77 (H13N6)	-	-	+(A)	+	—	1.1×10^7
A/野鸭 / 阿斯特拉罕 / 263/82 (H14N5)	-	-	+(A)	+	—	3.1×10^6
A/鸭子 / 澳大利亚 / 341/83 (H15N8)	-	-	+(A)	+	—	2.2×10^6

从表3得知，实施例1的试验用具对试验的所有禽流感病毒（H3~15亚型）显示反应性。与此相反，比较例1和2的试验用具仅与禽流感病毒H5亚

型有反应。比较例3的试验用具（市场销售的人用流感检测试剂盒）对试验的所有禽流感病毒显示反应性。

从试验例1和试验例2的结果得知，实施例1和比较例1~2的试验用具以与人流感病毒（A型（H1~3亚型）及B型）不产生反应、而对禽流感病毒反应的抗流感病毒抗体（4E3或1C10）为第二抗体，因此与过去的区分来源于人类的流感病毒还是来源于禽类的流感病毒均作为流感A型病毒检测的试验用具（比较例3）不同，能够先区分来源于人类还是禽类，然后检测出来源于禽类的流感A型病毒。用比较例1~2的试验用具只能检出禽流感病毒H5亚型，而实施例1的试验用具所使用的4E3对禽流感病毒的多种亚型起反应，故可以检测出禽流感病毒的多种亚型。即，用实施例1的试验用具可检出禽流感病毒的多种亚型。

试验例3

用实施例1、比较例1~2的试验用具对二种禽流感病毒H5亚型进行稀释试验，检验各种试验用具的敏感度。

在本试验例中，用生理盐水稀释禽流感病毒H5N2（A/鸭子/HK/342/78）和H5N9（A/火鸡/安大略湖/7732/66），将其作为病毒液。具体而言，禽流感病毒H5N2的病毒液先调制出病毒浓度为 1.1×10^7 FFU/mL的病毒液，再对此进行阶段稀释，制备如以下表4所列病毒浓度的病毒液。禽流感病毒H5N9的病毒液先调制出病毒浓度为 1.375×10^6 FFU/mL的病毒液，再对此进行阶段稀释，制备如以下表5所列病毒浓度的病毒液。用此病毒液与上述试验例1同样进行试验。禽流感病毒H5N2的结果见表4，禽流感病毒H5N9的结果见表5。

[表4]

	FFU/mL									
	11,000,000	5,500,000	2,750,000	1,375,000	687,500	343,750	171,875	85,938	42,969	
实施例 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
比较例 1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
比较例 2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[表5]

	FFU/mL									
	1.375.000	687.500	344.000	172.000	86.000	43.000	21.500	10.750	5.375	
实施例1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
比较例1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
比较例2	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

从表4和表5得知，使用4E3作为第一和第二抗体的实施例1的试验用具比使用1C10作为第二抗体的比较例1和2的试验用具能够更灵敏地检测出禽流感病毒H5亚型。

试验例4

用实施例1的试验用具探讨对感染人的禽流感病毒的反应性。

在本试验例中，从感染了以下表6所示10种禽流感病毒的人咽喉采集咽喉擦拭液，接种到MDCK细胞上培养4~5天。回收培养后所得培养液上清。

以此为病毒液，与上述试验例1同样进行试验。作为比较例，使用上述比较例3，按试剂盒附带使用手册进行评价。其结果一并列在表6。

[表6]

病毒株	比较例 3		实施例 1
	流感 A	流感 B	
1. 流感 A/H5 SP/33/04	+	-	+
2. 流感 A/H5 SP/83/04	+	-	+
3. 流感 A/H5 KAN/353/04	+	-	+
4. 流感 A/H5 KK/494/04	+	-	+
5. 流感 A/H5 SP/528/04	+	-	+
6. 流感 A/H5 NKRM/1035/04	+	-	+
7. 流感 A/H5 PCBR/1623/04	+	-	+
8. 流感 A/H5 PCB/2031/04	+	-	+
9. 流感 A/H5 SKT/2964/04	+	-	+
10. 流感 A/H5 TH/878/05	+	-	+

从表6得知，实施例1的试验用具可以检出感染人的禽流感病毒。

下面制作实施例2的试验用具，以探讨能否使用二种以上抗流感抗体作为第一抗体。

实施例2

作为第一抗体分别等量使用4E3和1C10，除此之外均与上述实施例1同样，获得实施例2的试验用具。

试验例5

用实施例1和实施例2的试验用具探讨试验用具对与试验例3不同的禽流感病毒H5亚型的敏感度。

在本试验例中，除使用的是禽流感病毒H5N3（A/鸭子/HK/820/80），并将其用生理盐水稀释为病毒浓度 3.4×10^6 FFU/mL以外，其余与试验例3同样进行试验。其结果见表8。各条带根据蓝色的显色度不同划分为“—”、“W”、“1+”、“2+”和“3+”五个阶段进行判断。“—”、“W”、“1+”、“2+”和“3+”是根据用TRS3000膜条阅读器（Membrane Strip reader（Bio Dot公司制））测定出现的条带时所获得的测定值，以表7所列标准设定的。表中的ROD值指作为背景从条带的测定值减去测定硝酸纤维素膜浓淡的值所得的差。顺便提一下，能够用肉眼确认蓝色条带的是“W”、“1+”、“2+”和“3+”。

[表7]

	ROD值
—	0.000~0.006
W	0.007~0.014
1+	0.015~0.029
2+	0.030~0.079
3+	0.080以上

[表8]

	第一抗体	第二抗体	上段：滴定量(FFU/mL)			
			下段：稀释倍率			
			425,000	212,500	106,250	53,125
			8倍	16倍	32倍	64倍
实施例1	4E3	4E3	2+	1+	W	—
实施例2	4E3/1C10	4E3	2+	W	W	—

从表8得知，实施例1和实施例2的试验用具可以以相同的敏感度检出禽流感病毒。因此，用4E3和对禽流感病毒显示反应性的其他抗流感病毒抗体的组合作为第一抗体、以4E3为第二抗体的试验用具也可以检测出禽流感病毒。在敏感度上，实施例1的试验用具略胜一筹。

试验例6

通过免疫沉淀反应特定上述试验例使用的单克隆抗体4E3和1C10识别的抗原。

作为病毒，使用的是流感病毒H3亚型A/北九州/159/93(H3N2) 和流感病毒H5亚型A/火鸡/安大略湖/7732/66 (H5N9)。

作为抗体使用的是上述4E3和1C10、识别流感A型病毒核蛋白质(NP)的抗体7304 (Medix Biochemica公司)、识别流感B型病毒核蛋白质(NP)的抗体41027 (Capricon公司)及识别流感A型病毒H3亚型血凝素(HA)的抗体F49 (日本宝生物工程株式会社 (TAKARA BIO株式会社))。

1. 病毒感染

让上述病毒在注满 (confluent) 6孔的MCDK细胞感染1小时。去上清，加1mL分离用培养基，培养一昼夜。用细胞刮刀将细胞回收到分离管中，离心后，用冷的 PBS (-) 漂洗。加溶解液进行超声波处理，粉碎细胞，用干冰保存。

2. 标记和免疫沉淀反应

使用细胞标记和免疫沉淀试剂盒 (Roche Diagnostics公司)按照此试剂盒附带的使用手册进行标记和免疫沉淀反应。在此,首先生物素化病毒蛋白质。再将生物素化病毒蛋白质、抗体和蛋白质A琼脂糖凝胶混合,在蛋白质A琼脂糖凝胶上形成抗体和与该抗体特异性结合的生物素化病毒蛋白质的复合物。

3. 电泳

在上述琼脂糖凝胶上添加50 μ L电泳缓冲液,在100 $^{\circ}$ C沸腾3分钟。将试样各10 μ L用于梯度凝胶(5~20%),以30mA电泳(SDS-PAGE)90分钟。电泳后的凝胶中的蛋白质在250mA下用2小时转录到PVDF膜。然后用5%脱脂乳·PBS(-)封闭,清洗三次膜。在稀释到1:1000的链霉亲和素-过氧化物酶溶液中让其反应30分钟,清洗膜,用4-氯-1-萘酚液检测。其结果如图2所示。

从图2,由于在4E3的H5病毒处出现的条带与在7304(识别A型流感核蛋白质(NP)的抗体)上出现的条带处于相同位置,因此,可以确认4E3是识别禽流感病毒(H5N9)核蛋白质(NP)的抗体。在1C10的H5病毒处出现的条带与在F49出现的条带处于相同位置,因此可以确认,1C10是识别禽流感病毒(H5N9)血凝素(HA)的抗体。

试验例7

以特定在上述试验例中使用的单克隆抗体4E3识别的表位为目的进行以下试验。

(1) 构建基因重组核蛋白质(NP)

使用从大阪府立公共卫生研究所获得的人流感病毒株(Puerto Rico/8/34),将人流感病毒感染到MDCK细胞,培养感染的MDCK细胞。用QIAGEN个人型自动核酸抽取装置(QIAGEN Magtration System 6GC)(QIAGEN)和EZ病毒迷你试剂盒(EZ Virus Mini kit)试剂(QIAGEN)

N) 从所得培养上清中抽取病毒核酸。通过用以下引物(序列号1和2)的RT-PCR法从抽取的病毒核酸扩增含编码人流感病毒NP的区域的DNA片段。

上游引物: 5'-ATGGCGTCCCAAGGCACCAA-3' (序列号1)

下游引物: 5'-TTAATTGTCGTACTIONCTCTGCA-3' (序列号2)

用以下引物(序列号3和4)对上述扩增的含编码人流感病毒NP的区域的DNA片段进行PCR, 以便附加编码限制酶(KpnI和EcoRI)切割位点和6个组氨酸残基的序列。

上游引物: 5'-ATGGTACCATGGCGTCCCAAGGCACCAA-3' (序列号3)

下游引物: 5'-TAGAATTCTAGTGATGGTGATGGTGATGATTGTCGTACTIONCTCTGCATT-3' (序列号4)

因此, 本试验例获得的基因重组NP将在C端附加6个组氨酸残基。

培养从大阪府立公共卫生研究所获得的禽流感病毒株(H5N9/Ontario/7732/1966)感染细胞, 用与上述同样方法从所得培养上清中抽取病毒核酸。通过用以下引物(序列号5和6)的RT-PCR法从抽取的病毒核酸扩增含编码禽流感病毒NP的区域的DNA片段。

上游引物: 5'-ATGGCGTCTCAAGGCACCAAAC-3' (序列号5)

下游引物: 5'-TTAATTGTCATATTCCTCTGCATTG-3' (序列号6)

用以下引物(序列号7和8)对上述扩增的含编码禽流感病毒NP的区域的DNA片段进行PCR, 以便附加编码限制酶(KpnI和EcoRI)切割位点和6个组氨酸残基的序列。

上游引物: 5'-ATGGTACCATGGCGTCTCAAGGCACCAAAC-3' (序列号7)

下游引物：5'- TAGAATTCTAGTGATGGTGATGGTGATGATTGT
CATATTCCTCTGCATTGTC-3' (序列号8)

将所得各DNA片段 (含编码限制酶切割位点和6个组氨酸残基的序列) 放入真核细胞用表达载体pcDNA3.1(+)(Invitrogen)的KpnI/EcoRI部位, 构建野生型人流感NP表达载体和野生型禽流感NP表达载体。

接下来, 用限制酶 (KpnI和BamHI) 切割野生型人流感NP表达载体, 电泳所得片段后, 用QIA 快速凝胶抽取试剂盒 (QIA quick Gel Extraction Kit) (QIAGEN) 分别提纯编码人流感NP的N端159位氨基酸的DNA片段和编码C端339位氨基酸和6个组氨酸残基及载体的片段。

同样对野生型禽流感NP表达载体用限制酶 (KpnI和BamHI) 处理, 电泳所得片段后, 分别提纯编码禽流感NP的N端159位氨基酸的DNA片段和编码C端339位氨基酸和6个组氨酸残基及载体的片段。

用DNA 连接试剂盒 (DNA Ligation kit) (日本宝生物工程株式会社) 将编码禽流感NP的N端159位氨基酸的DNA片段和编码人流感NP的C端339位氨基酸和6个组氨酸残基及其载体的片段连接起来, 构建嵌合体NP1的表达载体。

同样连接编码人流感NP的N端159位氨基酸的DNA片段和编码禽流感NP的C端339位氨基酸和6个组氨酸残基及其载体的片段, 构建嵌合体NP2的表达载体。

然后用限制酶 (KpnI和ApaLI) 切割野生型人流感NP表达载体, 与上述同样提纯编码人流感NP的N端45位氨基酸的DNA片段以及编码C端453位氨基酸和6个组氨酸残基及其载体的片段。

再用限制酶 (KpnI和ApaLI) 切割野生型禽流感NP表达载体, 与上述同样提纯编码禽流感NP的N端45位氨基酸的DNA片段以及编码C端453位氨基酸和6个组氨酸残基及其载体的片段。

用DNA 连接试剂盒（DNA Ligation kit）（日本宝生物工程株式会社）连接编码禽流感NP的N端45位氨基酸的DNA片段和编码人流感NP的C端453位氨基酸和6个组氨酸残基及其载体的片段，构建嵌合体NP3表达载体。

同样方法连接编码人流感NP的N端45位氨基酸的DNA片段和编码禽流感NP的C端453位氨基酸和6个组氨酸残基及其载体的片段，构建嵌合体NP4表达载体。

如上构建的野生型人流感NP表达载体、野生型禽流感NP表达载体、嵌合体NP1表达载体、嵌合体NP2表达载体、嵌合体NP3表达载体和嵌合体NP4表达载体分别用EndoFree质粒大量提取试剂盒（EndoFree Plasmid Maxi kit）（QIAGEN）提纯。然后用Superfect转染试剂（Superfect transfection reagent）（QIAGEN）将纯化后的各表达载体导入来源于猴子肾脏的COS-7细胞，在5%CO₂培养器皿内培养48小时，使各基因重组NP表达。其中，以从野生型人流感NP表达载体获得的基因重组NP为r-人流感 NP（序列号9），以从野生型禽流感NP表达载体获得的基因重组NP为r-禽流感 NP（序列号10），以从嵌合体NP1表达载体获得的基因重组NP为r-Ch1 流感 NP（序列号11），以从嵌合体NP2表达载体获得的基因重组NP为r-Ch2 流感 NP（序列号12），以从嵌合体NP3表达载体获得的基因重组NP为r-Ch3 流感 NP（序列号13），以从嵌合体NP4表达载体获得的基因重组NP为r-Ch4 流感 NP（序列号14）。

图3是r-人流感 NP（序列号9）、r-禽流感 NP（序列号10）、r-Ch1 流感 NP（序列号11）、r-Ch2 流感 NP（序列号12）、r-Ch3 流感 NP（序列号13）和r-Ch4 流感 NP（序列号14）的氨基酸序列的示意图。如图3所示，所有氨基酸序列均为全长504个残基，C端的氨基酸6个残基（即氨基酸序列第499位到第504位）为组氨酸。

r-人流感 NP的氨基酸序列第1位到第498位相当于禽流感病毒NP的氨基酸序列的全长（498个残基）。

r-禽流感 NP的氨基酸序列第1位至第498位，相当于禽流感病毒NP的氨基酸序列的全长（498个残基）。

r-Ch1 流感 NP的氨基酸序列第1位到第159位相当于禽流感NP的N端159个氨基酸，氨基酸序列第160位到第498位相当于人流感NP的C端339个氨基酸。

r-Ch2 流感 NP的氨基酸序列第1位到第159位相当于人流感NP的N端159个氨基酸，氨基酸序列第160位到第498位相当于禽流感NP的C端339个氨基酸。

r-Ch3 流感 NP的氨基酸序列第1位到第45位相当于禽流感NP的N端45个氨基酸，氨基酸序列第46位到第498位相当于人流感NP的C端453个氨基酸。

r-Ch4 流感 NP的氨基酸序列第1位到第45位相当于人流感NP的N端45个氨基酸，氨基酸序列第46位到第498位相当于禽流感NP的C端453个氨基酸。作为参考，本次构建的r-人流感 NP和r-禽流感 NP以及来源于以下12种人流感病毒株的NP和来源于以下12种禽流感病毒株的NP的氨基酸序列如图4~图13所示。

人流感病毒株：

A/香港/117/1977(H1N1)

A/日本/170/62(H2N2)

A/北九州/159/93(H3N2)

A/熊本/1/65(H2N2)

A/纽约/5/2004(H3N2)

A/波多黎各/8/34(H1N1)

A/基辅/59/79(H1N1)

A/北京/353/1989(H3N2)

A/巴西/11/1978(H1N1)

A/维多利亚/15681/59(H2N2)

A/新喀里多尼亚/20/1999(H1N1)

A/巴拿马/2007/1999(H3N2)

禽流感病毒株:

A/鸭子/澳大利亚/341/83(H15N8)

A/野鸭/阿斯特拉坎/263/82(H14N8)

A/鸥/马里兰/704/1977(H13N6)

A/针尾鸭/阿尔伯达/49/2003(H12N5)

A/鸭子/英格兰/1956(H11N6)

A/针尾鸭/阿尔伯达/584/1984(H10N6)

A/岸鸟/德国/261/2003(H9N5)

A/火鸡/安大略湖/6118/1968(H8N4)

A/小鸡/德国/R28/03(H7N7)

A/海鸥类飞鸟/澳大利亚/1972(H6N5)

A/黑鸭/纽约/184/1988(H5N2)

A/火鸡/安大略湖/7732/1966(H5N9)

(2) 反应性比较

用Trypsin—EDTA溶液（希格玛公司制）从器皿上剥离表达（1）中制备的基因重组NP的各COS—7细胞，用PBS清洗各COS—7细胞。将清洗的各COS—7细胞悬浊于适量的PBS中，制备细胞悬浮液。滴注适量细胞悬浮液于载玻片，风干后用丙酮固定。将4E3抗体液（含10 μ g/ml 4E3和1%BSA的PBS）滴至丙酮固定后的载玻片，使载玻片上的COS—7细胞和4E3起反

应。再向载玻片滴注用含1%BSA的PBS稀释100倍的FITC标记抗鼠Ig抗体(DAKO)。荧光显微镜下观察载玻片,调查4E3对在COS-7细胞表达的各基因重组NP的反应性。

作为对照,用抗His标签抗体(PentaHis、QIAGEN)取代4E3。结果如图14所示。

从图14可以看出,4E3对r-人流感 NP、r-Ch2 流感 NP和r-Ch3 流感 NP不反应,对r-禽流感 NP、r-Ch1 流感 NP和r-Ch4 流感 NP起反应。即,4E3对含有禽流感病毒NP氨基酸序列第46位~第159位的核蛋白质显示反应性,对不含的核蛋白质不显示反应性。由此可以推断,4E3识别禽流感病毒NP的N端特定区域(氨基酸序列第46位~第159位)内的表位。

运用本发明,可以区分人流感病毒和禽流感病毒,特异性地、快速简便地检测出禽流感病毒。

<110> 大阪府 希森美康株式会社	
<120> 对禽流感病毒的特异性快速诊断法	
<130> AH392PCT	
<150> JP 2006-235356	
<151> 2006-08-31	
<150> JP 2007-018400	
<151> 2007-01-29	
<160> 14	
<170> PatentIn version 3.1	
<210> 1	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于人流感病毒设计的DNA	
<400> 1 atggcgtccc aaggcaccaa	20
<210> 2	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于人流感病毒设计的DNA	
<400> 2 ttaattgtcg tactcctctg ca	22
<210> 3	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于人流感病毒设计的DNA	
<400> 3 atggtaccat ggcgtcccaa ggcaccaa	28
<210> 4	
<211> 49	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 基于人流感病毒设计的DNA	
<400> 4 tagaattcta gtgatggatga tggatgatgat tgtcgtactc ctctgcatt	49
<210> 5	

Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Leu Thr Ile Glu
 50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
 85 90 95

Tyr Arg Arg Val Asn Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp
 100 105 110

Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Asp Asp
 115 120 125

Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
 130 135 140

Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Lys Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Phe Glu Asp Leu
 245 250 255

Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro Ala Val Ala Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
 290 295 300

Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu
 305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
 325 330 335
 Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Lys Gly Thr Lys Val
 340 345 350
 Val Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
 355 360 365
 Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
 370 375 380
 Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg
 385 390 395 400
 Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
 405 410 415
 Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
 420 425 430
 Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
 435 440 445
 Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
 450 455 460
 Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
 465 470 475 480
 Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr
 485 490 495
 Asp Asn His His His His His His
 500

<210> 10
 <211> 504
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> r-禽流感NP的氨基酸序列

<400> 10

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Gly
 1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys

Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45

Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu
 50 55 60

Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80

Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
 85 90 95

Tyr Arg Arg Arg Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp
 100 105 110

Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asn
 115 120 125

Ala Ala Ala Gly Leu Thr His Leu Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
 130 135 140

Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160

Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175

Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190

Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205

Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220

Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Lys Ala Met Met Asp
 225 230 235 240

Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Phe Glu Asp Leu
 245 250 255

Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270

Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro Ala Val Ala Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
 290 295 300

Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu
305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Lys Gly Thr Lys Val
340 345 350

Val Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg
385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
405 410 415

Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
435 440 445

Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr
485 490 495

Asp Asn His His His His His His
500

<210> 12
<211> 504
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> r-Ch2流感NP氨基酸序列

<400> 12

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp
1 5 10 15

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Lys Met

Gly Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Arg Met
 20 25 30
 Val Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys
 35 40 45
 Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Leu Thr Ile Glu
 50 55 60
 Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu
 65 70 75 80
 Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile
 85 90 95
 Tyr Arg Arg Val Asn Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp
 100 105 110
 Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Asp Asp
 115 120 125
 Ala Thr Ala Gly Leu Thr His Met Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn
 130 135 140
 Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp
 145 150 155 160
 Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser
 165 170 175
 Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu
 180 185 190
 Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg
 195 200 205
 Gly Glu Asn Gly Arg Lys Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn
 210 215 220
 Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Lys Ala Met Met Asp
 225 230 235 240
 Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Phe Glu Asp Leu
 245 250 255
 Thr Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His
 260 265 270
 Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Pro Ala Val Ala Ser Gly
 275 280 285

Tyr Asp Phe Glu Arg Glu Gly Tyr Ser Leu Val Gly Ile Asp Pro Phe
290 295 300

Arg Leu Leu Gln Asn Ser Gln Val Tyr Ser Leu Ile Arg Pro Asn Glu
305 310 315 320

Asn Pro Ala His Lys Ser Gln Leu Val Trp Met Ala Cys His Ser Ala
325 330 335

Ala Phe Glu Asp Leu Arg Val Leu Ser Phe Ile Lys Gly Thr Lys Val
340 345 350

Val Pro Arg Gly Lys Leu Ser Thr Arg Gly Val Gln Ile Ala Ser Asn
355 360 365

Glu Asn Met Glu Thr Met Glu Ser Ser Thr Leu Glu Leu Arg Ser Lys
370 375 380

Tyr Trp Ala Ile Arg Thr Arg Ser Gly Gly Asn Thr Asn Gln Gln Arg
385 390 395 400

Ala Ser Ala Gly Gln Ile Ser Ile Gln Pro Thr Phe Ser Val Gln Arg
405 410 415

Asn Leu Pro Phe Asp Arg Thr Thr Ile Met Ala Ala Phe Thr Gly Asn
420 425 430

Thr Glu Gly Arg Thr Ser Asp Met Arg Thr Glu Ile Ile Arg Met Met
435 440 445

Glu Ser Ala Arg Pro Glu Asp Val Ser Phe Gln Gly Arg Gly Val Phe
450 455 460

Glu Leu Ser Asp Glu Lys Ala Ala Ser Pro Ile Val Pro Ser Phe Asp
465 470 475 480

Met Ser Asn Glu Gly Ser Tyr Phe Phe Gly Asp Asn Ala Glu Glu Tyr
485 490 495

Asp Asn His His His His His
500

<210> 14
<211> 504
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> r-Ch4流感NP氨基酸序列

<400> 14

Met Ala Ser Gln Gly Thr Lys Arg Ser Tyr Glu Gln Met Glu Thr Asp

1	5	10	15
Gly	Glu Arg Gln Asn Ala Thr Glu Ile Arg Ala Ser Val Gly Lys Met		
	20	25	30
Ile Gly Gly Ile Gly Arg Phe Tyr Ile Gln Met Cys Thr Glu Leu Lys			
	35	40	45
Leu Ser Asp Tyr Glu Gly Arg Leu Ile Gln Asn Ser Ile Thr Ile Glu			
	50	55	60
Arg Met Val Leu Ser Ala Phe Asp Glu Arg Arg Asn Lys Tyr Leu Glu			
	65	70	75
Glu His Pro Ser Ala Gly Lys Asp Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Ile			
	85	90	95
Tyr Arg Arg Arg Asp Gly Lys Trp Met Arg Glu Leu Ile Leu Tyr Asp			
	100	105	110
Lys Glu Glu Ile Arg Arg Ile Trp Arg Gln Ala Asn Asn Gly Glu Asn			
	115	120	125
Ala Ala Ala Gly Leu Thr His Leu Met Ile Trp His Ser Asn Leu Asn			
	130	135	140
Asp Ala Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Arg Thr Gly Met Asp			
	145	150	155
Pro Arg Met Cys Ser Leu Met Gln Gly Ser Thr Leu Pro Arg Arg Ser			
	165	170	175
Gly Ala Ala Gly Ala Ala Val Lys Gly Val Gly Thr Met Val Met Glu			
	180	185	190
Leu Ile Arg Met Ile Lys Arg Gly Ile Asn Asp Arg Asn Phe Trp Arg			
	195	200	205
Gly Glu Asn Gly Arg Arg Thr Arg Ile Ala Tyr Glu Arg Met Cys Asn			
	210	215	220
Ile Leu Lys Gly Lys Phe Gln Thr Ala Ala Gln Arg Ala Met Met Asp			
	225	230	235
Gln Val Arg Glu Ser Arg Asn Pro Gly Asn Ala Glu Ile Glu Asp Leu			
	245	250	255
Ile Phe Leu Ala Arg Ser Ala Leu Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His			
	260	265	270
Lys Ser Cys Leu Pro Ala Cys Val Tyr Gly Leu Ala Val Ala Ser Gly			

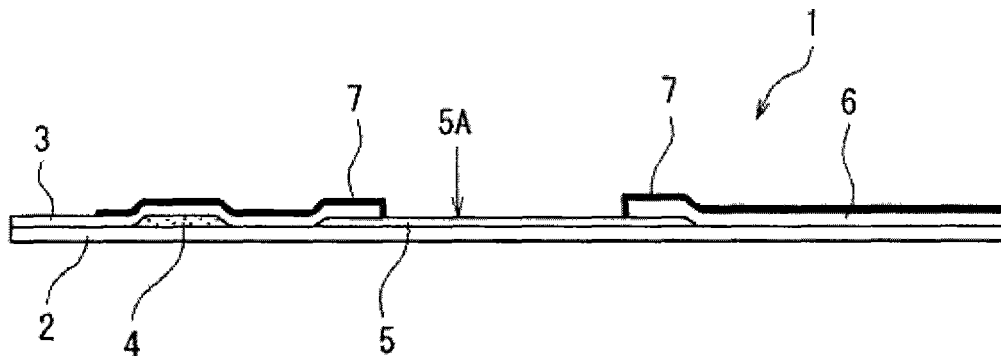


图1

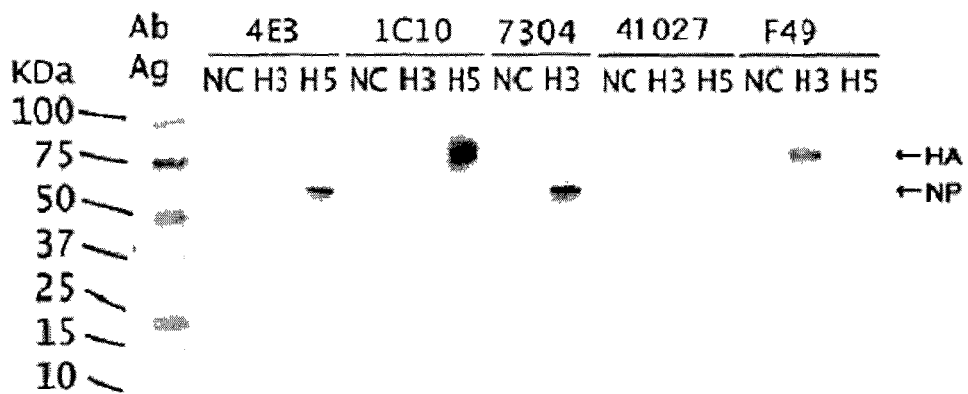


图2

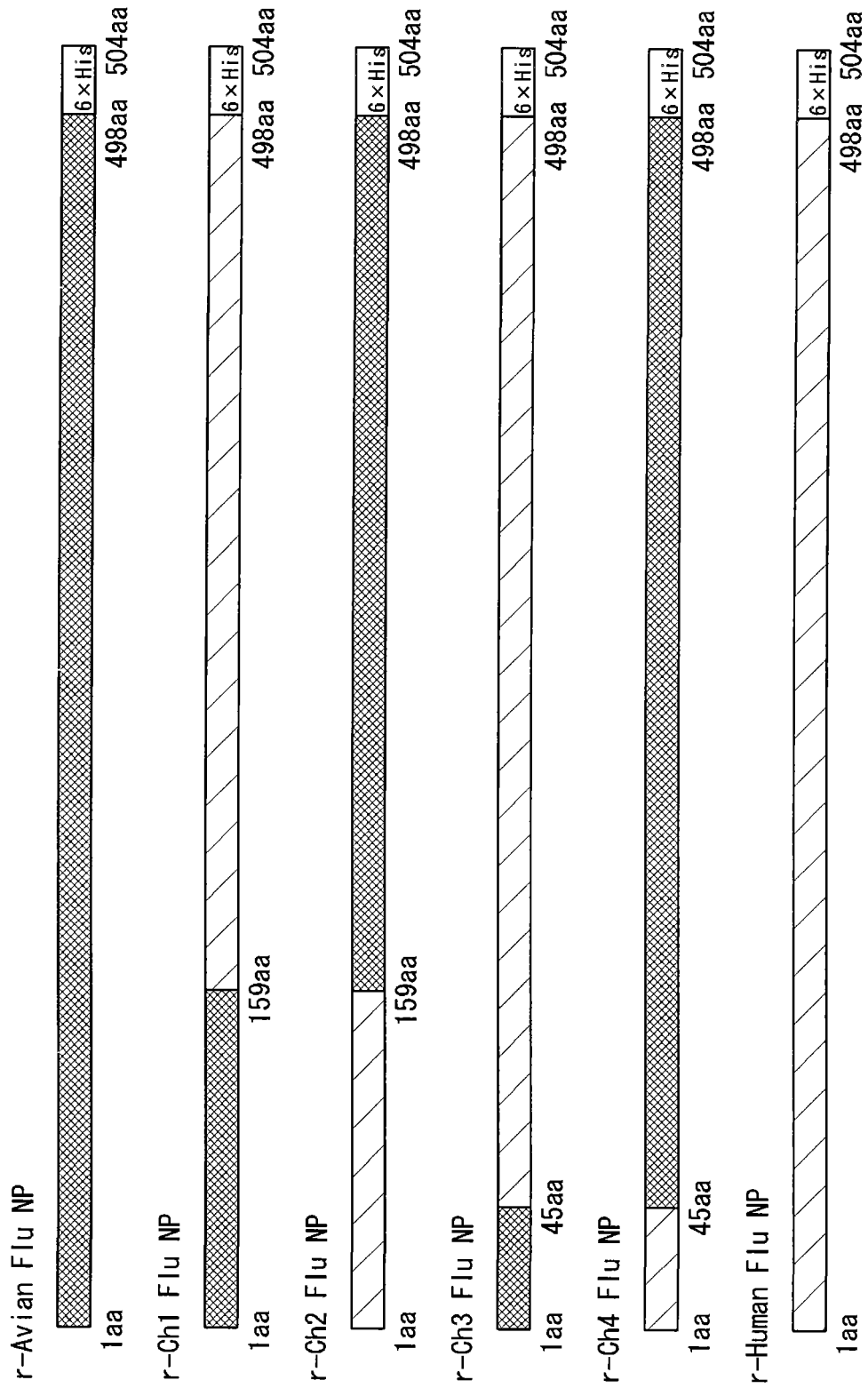


图 3

A/ 鸭子 / 澳大利亚 / 341 / 83_H15N8_ DHEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPSTGKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 野鸭 / 阿斯特拉坎 / 263 / 82_H14N8_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 鸥 / 马里兰 / 704 / 1977_H13N6_ DNEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPSTGRDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 针尾鸭 / 阿尔伯达 / 49 / 2003_H12N5_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 鸭子 / 英格兰 / 1956_H11N6_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 针尾鸭 / 阿尔伯达 / 584 / 1984_H10N6_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 岸鸟 / 德国 / 261 / 2003_H9N5_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 火鸡 / 安大略湖 / 6118 / 1968_H8N4_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 小鸡 / 德国 / R28 / 03_H7N7_ DHEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 海鸥类飞鸟 / 澳大利亚 / 1972_H6N5_ DHEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 黑鸭 / 纽约 / 184 / 1988_H5N2_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 火鸡 / 安大略湖 / 7732 / 1966_H5N9_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 r-禽流感 NP
 A/ 香港 / 117 / 1977_H1N1_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 日本 / 170 / 62_H2N2_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 北九州 / 159 / 93_H3N2_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 熊本 / 1 / 65_H2N2_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 纽约 / 5 / 2004_H3N2_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 波多黎各 / 8 / 34_H1N1_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 基辅 / 59 / 79_H1N1_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 北京 / 353 / 1989_H3N2_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 巴西 / 11 / 1978_H1N1_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 维多利亚 / 15681 / 59_H2N2_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 新喀里多尼亚 / 20 / 1999_H1N1_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 A/ 巴拿马 / 2007 / 1999_H3N2_ DYEGRLIQNSITIERMVL.SAFDERRNKYLEEHPKDPKKTGGP | YRRR 100
 r-人流感 NP

图 51

A/ 鸭子 / 澳大利亚 / 341/83_H15N8_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 野鸭 / 阿斯特拉坎 / 263/82_H14N8_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 鸥 / 马里兰 / 704/1977_H13N6_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 针尾鸭 / 阿尔伯达 / 49/2003_H12N5_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 鸭子 / 英格兰 / 1956_H11N6_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 针尾鸭 / 阿尔伯达 / 584/1984_H10N6_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 岸鸟 / 德国 / 261/2003_H9N5_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 火鸡 / 安大略湖 / 6118/1968_H8N4_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 小鸡 / 德国 / R28/03_H7N7_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 海鸥类飞鸟 / 澳大利亚 / 1972_H6N5_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 黑鸭 / 纽约 / 184/1988_H5N2_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 火鸡 / 安大略湖 / 7732/1966_H5N9_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 r-禽流感 NP
 A/ 香港 / 117/1977_H1N1_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 日本 / 170/62_H2N2_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 北九州 / 159/93_H3N2_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 熊本 / 1/65_H2N2_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 纽约 / 5/2004_H3N2_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 波多黎各 / 8/34_H1N1_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 基辅 / 59/79_H1N1_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 北京 / 353/1989_H3N2_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 巴西 / 11/1978_H1N1_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 维多利亚 / 15681/59_H2N2_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 新喀里多尼亚 / 20/1999_H1N1_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 A/ 巴拿马 / 2007/1999_H3N2_ TRAL_VRTGMDPRMCSL_MQGSTL_PRRSGAAGAAVKVGTVMAMEL_IRMIKRG_200
 r-人流感 NP

图7

A/ 鸭子 / 澳大利亚 / 341/83_H15N8_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 野鸭 / 阿斯特拉坎 / 263/82_H14N8_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 鸥 / 马里兰 / 704/1977_H13N6_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 针尾鸭 / 阿尔伯达 / 49/2003_H12N5_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 鸭子 / 英格兰 / 1956_H11N6_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 针尾鸭 / 阿尔伯达 / 584/1984_H10N6_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 岸鸟 / 德国 / 261/2003_H9N5_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 火鸡 / 安大略湖 / 6118/1968_H8N4_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 小鸡 / 德国 / R28/03_H7N7_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSNF IRGT	350
A/ 海鸱类飞鸟 / 澳大利亚 / 1972_H6N5_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 黑鸭 / 纽约 / 184/1988_H5N2_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 火鸡 / 安大略湖 / 7732/1966_H5N9_	IDPFRLQNSQVFSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
r-禽流感 NP		
A/ 香港 / 117/1977_H1N1_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 日本 / 170/62_H2N2_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 北九州 / 159/93_H3N2_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 熊本 / 1/65_H2N2_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 纽约 / 5/2004_H3N2_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 波多黎各 / 8/34_H1N1_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 基辅 / 59/79_H1N1_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 北京 / 353/1989_H3N2_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 巴西 / 11/1978_H1N1_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 维多利亚 / 15681/59_H2N2_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 新喀里多尼亚 / 20/1999_H1N1_	VDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
A/ 巴拿马 / 2007/1999_H3N2_	IDPFKLLQNSQVYSL IRPNENPAHKSQL VWMACHSAAAFEDLRVSSF IRGT	350
r-人流感 NP		

图10

KVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMDTMDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVLPRGQLSTRGVQ | ASNENMETMNSSTLELRSKYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVI PRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTSQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGKLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVVPRGQLSTRGVQ | ASNENMETDSSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVI PRGKLSTRGVQ | ASNENMDTMSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVS PRGKLSTRGVQ | ASNENMDTMESSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVS PRGKLSTRGVQ | ASNENMDNMESSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVS PRGKLSTRGVQ | ASNENMDTMESSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVS PRGKLSTRGVQ | ASNENMDNMGSSSTLELRSYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVL PRGKLSTRGVQ | ASNENMETMESSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVS PRGKLSTRGVQ | ASNENMDTMESSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVS PRGKLSTRGVQ | ASNENMDNMESSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVI PRGKLSTRGVQ | ASNENMDTMSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVI PRGKLSTRGVQ | ASNENMDTMESSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 RVL PRGKLSTRGVQ | ASNENMDAIVSSTLELRSRYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVS PRGKLSTRGVQ | ASNENMDNMGSSSTLELRSYWAIRTRSGGNTNQQR 400
 KVVPRGKLSTRGVQ | ASNENMETMESSSTLELRSKYWAIRTRSGGNTNQQR 400

A/ 鸭子 / 澳大利亚 /341/83_H15N8_
 A/ 野鸭 / 阿斯特拉坎 /263/82_H14N8_
 A/ 鸥 / 马里兰 /704/1977_H13N6_
 A/ 针尾鸭 / 阿尔伯达 /49/2003_H12N5_
 A/ 鸭子 / 英格兰 /1956_H11N6_
 A/ 针尾鸭 / 阿尔伯达 /584/1984_H10N6_
 A/ 岸鸟 / 德国 /261/2003_H9N5_
 A/ 火鸡 / 安大略湖 /6118/1968_H8N4_
 A/ 小鸡 / 德国 /R28/03_H7N7_
 A/ 海鸥类飞鸟 / 澳大利亚 /1972_H6N5_
 A/ 黑鸭 / 纽约 /184/1988_H5N2_
 A/ 火鸡 / 安大略湖 /7732/1966_H5N9_
 r-禽流感 NP
 A/ 香港 /117/1977_H1N1_
 A/ 日本 /170/62_H2N2_
 A/ 北九州 /159/93_H3N2_
 A/ 熊本 /1/65_H2N2_
 A/ 纽约 /5/2004_H3N2_
 A/ 波多黎各 /8/34_H1N1_
 A/ 基辅 /59/79_H1N1_
 A/ 北京 /353/1989_H3N2_
 A/ 巴西 /11/1978_H1N1_
 A/ 维多利亚 /15681/59_H2N2_
 A/ 新喀里多尼亚 /20/1999_H1N1_
 A/ 巴拿马 /2007/1999_H3N2_
 r-人流感 NP

图二

A/鸭子 / 澳大利亚 /341/83_H15N8_	AKPEDVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/野鸭 / 阿斯特拉坎 /263/82_H14N8_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/ 鸥 / 马里兰 /704/1977_H13N6_	SRPEDVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEFDS	498
A/针尾鸭 / 阿尔伯达 /49/2003_H12N5_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/鸭子 / 英格兰 /1956_H11N6_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSKEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/针尾鸭 / 阿尔伯达 /584/1984_H10N6_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/岸鸟 / 德国 /261/2003_H9N5_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/火鸡 / 安大略湖 /6118/1968_H8N4_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/小鸡 / 德国 /R28/03_H7N7_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/海鸥类飞鸟 / 澳大利亚 /1972_H6N5_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/黑鸭 / 纽约 /184/1988_H5N2_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/火鸡 / 安大略湖 /7732/1966_H5N9_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
r-禽流感 NP	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN HHHH	504
A/ 香港 /117/1977_H1N1_	ARPEEVVSFQGRGVFELSDERAANP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/日本 /170/62_H2N2_	AKPEEMSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/北九州 /159/93_H3N2_	AKPEEVVSFRGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/ 熊本 /1/65_H2N2_	AKPEEMSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/ 纽约 /5/2004_H3N2_	AKPEEVVSFRGRGVFELSDEKATNP VPSFEMSNEGSYFFGDNAEEYD	497
A/ 波多黎各 /8/34_H1N1_	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKAASP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/ 基辅 /59/79_H1N1_	AKPEEVVSFRGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/ 北京 /353/1989_H3N2_	AKPEEVVSFRGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/ 巴西 /11/1978_H1N1_	ARPEEVVSFQGRGVFELSDERAANP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/ 维多利亚 /15681/59_H2N2_	AKPEEVVSFQGRGVFELSDEKATNP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/ 新喀里多尼亚 /20/1999_H1N1_	ARPEEVVSFQGRGVFELSDERAANP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
A/ 巴拿马 /2007/1999_H3N2_	AKPEEVVSFRGRGVFELSDEKATNP VPSFEMSNEGSYFFGDNAEEYDN	498
r-人流感 NP	ARPEVVSFQGRGVFELSDEKAASP VPSFDMNSNEGSYFFGDNAEEYDN HHHH	504

图 13

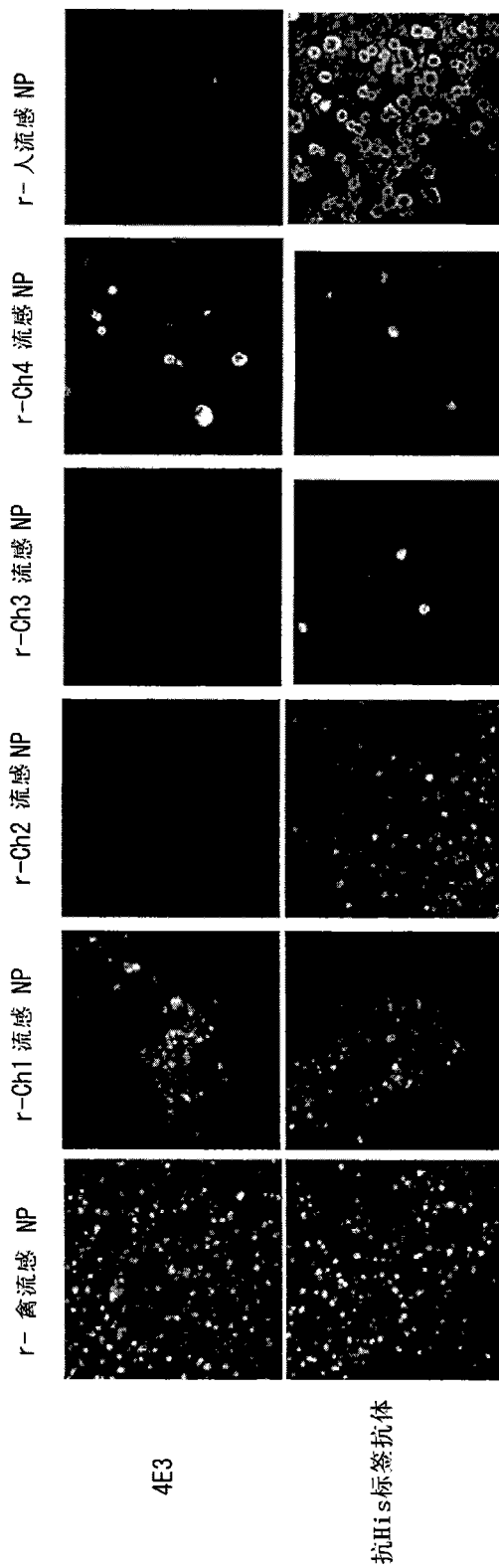


图14

专利名称(译)	对禽流感病毒的特异性快速诊断法		
公开(公告)号	CN101553732A	公开(公告)日	2009-10-07
申请号	CN200780032305.9	申请日	2007-08-31
[标]申请(专利权)人(译)	大阪府 希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	大阪府 希森美康株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	大阪府 希森美康株式会社		
[标]发明人	高桥和郎 奥野良信 西村公志 一口毅 齐藤纪幸 谷口友邦		
发明人	高桥和郎 奥野良信 西村公志 一口毅 齐藤纪幸 谷口友邦		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/545 G01N33/553 G01N33/577		
CPC分类号	C07K16/1018 G01N33/538 G01N33/56983 G01N2333/11		
代理人(译)	梁朝玉		
优先权	2007018400 2007-01-29 JP 2006235356 2006-08-31 JP		
其他公开文献	CN101553732B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测禽流感病毒的方法，其利用免疫学测定法，使用对人流感A型病毒H1亚型、H2亚型、H3亚型及人流感B型病毒不显示反应性，而对禽流感病毒的多种亚型显示反应性的抗流感病毒抗体，检测出禽流感病毒。本发明提供一种运用于此的免疫层析法试验用具。通过本发明，可以与人流感病毒进行区分，特异性且快速简便地检测出禽流感病毒。

