



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104749372 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201310736768. 0

(22) 申请日 2013. 12. 30

(71) 申请人 北京义翘神州生物技术有限公司

地址 100176 北京市经济技术开发区中和街
14 号 B-203

(72) 发明人 谢良志 罗春霞 孙春昀 张杰
李东 张延静 李雁 王加兰

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

H9N2 流感病毒血凝素蛋白 ELISA 试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种甲型 H9N2 流感病毒血凝素蛋白双抗体夹心 ELISA 试剂盒。该试剂盒包含有包被单克隆抗体的固相载体,辣根过氧化物酶标记的兔多克隆抗体、H9N2 血凝素蛋白标准品、样品稀释液、洗涤液、底物显色液和反应终止液,不但灵敏度好,可以对 H9N2 流感病毒血凝素蛋白进行定量检测,而且特异性识别甲型 H9N2 流感病毒,与甲型流感病毒的其它主要亚型包括 H1N1, H2N2, H3N2, H5N1 和 H7N7 以及乙型流感病毒的血凝素蛋白无交叉反应。试剂盒操作简单,能够同时快速检测大批样本,既可以用于支持 H9N2 流感病毒的基础研究,同时,对于开展流感病毒的流行病学研究具有重要意义。

1. 一种检测 H9N2 流感病毒血凝素蛋白的 ELISA 试剂盒,其包括:

- 1) 包被 H9N2 流感病毒血凝素蛋白单克隆抗体的酶标板;
- 2) 酶标记的 H9N2 流感病毒血凝素蛋白多克隆抗体;

其中,所述用于包被酶标板的 H9N2 流感病毒血凝素蛋白单克隆抗体的轻链和重链氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2;所述酶标记的 H9N2 流感病毒血凝素蛋白多克隆抗体为辣根过氧化物酶标记的兔多克隆抗体。

2. 如权利要求 1 所述的 H9N2 流感病毒血凝素蛋白 ELISA 试剂盒,其特征在于,还包括以下试剂:H9N2 血凝素蛋白标准品、样品稀释液、洗涤液、底物显色液和反应终止液。其中,所述 H9N2 血凝素蛋白标准品为重组表达的血凝素蛋白;所述样品稀释液为含有 0.1%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;所述洗涤液为含有 0.1%吐温的磷酸盐缓冲液;所述底物显色液由显色液 A 和显色液 B 组成,显色液 A 为过氧化氢或过氧化脲,显色液 B 为四甲基联苯胺;所述反应终止液为 2mol/L 的硫酸。

3. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的辣根过氧化物酶标记的抗 H9N2 流感病毒血凝素蛋白兔多克隆抗体的制备过程如下:用重组 H9N2 流感病毒血凝素蛋白免疫新西兰兔 0.5mg/只/次,皮下多点免疫,间隔 2-3 周,共免疫四次,心脏取血,经蛋白 A 和 H9N2 血凝素蛋白抗原亲和纯化后得到纯化的多克隆抗体,再用辣根过氧化物酶进行标记获得。

4. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,采用重组 H9N2 流感病毒血凝素蛋白作为标准品,可以对 H9N2 流感病毒血凝素蛋白进行定量检测。

5. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,特异性的识别甲型 H9N2 流感病毒血凝素蛋白,与甲型流感病毒的其它主要亚型包括 H1N1, H2N2, H3N2, H5N1 和 H7N7 以及乙型流感病毒的血凝素蛋白无交叉反应。

H9N2 流感病毒血凝素蛋白 ELISA 试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学领域,具体涉及 H9N2 流感病毒血凝素蛋白特异性单克隆抗体制备,以及一种定量 H9N2 流感病毒血凝素蛋白双抗夹心 ELISA 检测试剂盒。

背景技术

[0002] 禽流感是一种由禽流感病毒引起的疾病,所表现的临床症状随病毒亚型不同而异。至今已发现的甲型流感病毒的血凝素 16 个亚型 (H1 ~ H16) 和神经氨酸酶 9 个亚型 (N1 ~ N9) 均能从禽中分离到,但它们并不是都能引起禽流感。目前发现能感染人的禽流感病毒主要有 :H5N1、H9N2、H7N7、H7N2、H7N3 和 H7N9 亚型。

[0003] H9N2 是一种禽流感病毒,属于正黏病毒科 A 型流感病毒属。1966 年 HoMee 从患温和呼吸道病的火鸡中分离到第一株 H9N2 亚型禽流感病毒,之后 H9N2 亚型禽流感在世界范围内迅速流行,尤其是 1994 ~ 1999 年在世界范围内造成了巨大的经济损失。近几年,对我国部分省市鸡场进行的禽流感血清学调查中发现,221 个禽流感阳性鸡群中 H9 亚型阳性鸡群占阳性群总数的 93.67%,证实了 H9N2 亚型禽流感在我国广泛存在,是当前禽流感流行的主要亚型。研究表明,近年来 H9N2 亚型部分流行株的致病力明显变异,尤其对肉仔鸡,死亡率可达到 30% 以上;对产蛋高峰期的蛋鸡,其产蛋下降幅度大,恢复困难,因此对养禽业有巨大危害。

[0004] H9N2 病毒在人类身上发现比较罕见,可以感染人但一般不致人死亡,主要传染源为禽类,在人群中不易传播。1998 年广东省的流感监测系统在韶关、汕头市分别发现 4 例和 5 例 H9N2 禽流感病毒感染病例,为全球首次发现人 H9N2 感染病例。以前认为禽流感和人是有种属屏障的,但近几年的禽流感感染人事件表明,这种屏障正在减弱或消失看,而且禽流感不仅在鸡、鸭、鹅、候鸟等禽类上发生,目前已经开始波及到猪、老虎、海狮等哺乳类动物,因此潜在危害性不断加大。

[0005] H9N2 禽流感病毒亚型毒性虽然弱于 H5N1 亚型,人群发病率低,但近年来,随着传染源愈来愈多,感染谱逐渐扩大,以及非典型性禽流感流行增多,给禽流感的消灭和控制带来了巨大困难,H9N2 发生变异导致致病性增加和人际传播,引发严重流感疫情的可能性一直存在,因此人类在高度警惕 H5N1 的同时,也不能忽视 H9N2 的威胁。

[0006] 综上所述,H9N2 不但严重危害养殖业的发展,其公共卫生意义也日渐显著。对 H9N2 的检测,在减少世界经济损失和提高人类卫生健康方面,都具有深远的意义。目前 H9N2 还是以基于核酸检测的定量 PCR 方法为主,这种方法对环境,样品以及仪器要求较高,需要专业人员操作,不易推广。另外,现有的基于 ELISA 原理的 H9N2 检测试剂,缺点是无法进行定量检测,而且针对不同流感病毒亚型的检测特异性差,因此亟需一种操作简单,灵敏度好,特异性高的定量检测试剂。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种检测灵敏度高、准确性强、低成本的 H9N2 流感病毒血凝

素蛋白双抗夹心法检测试剂盒。

[0008] 本发明所提供的检测试剂盒包括包含有包被单克隆抗体的固相载体,酶标检测多克隆抗体以及蛋白标准品、样品稀释液、洗涤液、底物显色液和反应终止液。

[0009] 其中所述包被单克隆抗体为鼠单克隆抗体,其轻链和重链氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO:2;所述酶标检测多克隆抗体为辣根过氧化物酶 (Horseradish peroxidase, HRP) 标记的兔多克隆抗体;所述蛋白标准品为重组 H9N2 流感病毒血凝素蛋白。

[0010] 所述鼠单克隆抗体采用重组 H9N2 流感病毒血凝素蛋白免疫动物,然后选择高血清效价小鼠通过经典杂交瘤技术制备获得;所述酶标兔多克隆抗体采用 H9N2 流感病毒血凝素蛋白免疫动物,通过蛋白 A 纯化和抗原亲和纯化技术制备纯化的多克隆抗体,然后按照常规方法利用 HRP 标记抗体获得。

[0011] 本发明的技术方案为优选具有高灵敏度、高特异性的单克隆抗体与酶标多克隆抗体配对组合,将单克隆抗体作为包被抗体吸附于固相载体上,包被抗体可以特异性的捕获样本中的 H9N2 流感病毒血凝素蛋白以及蛋白标准品,加入酶标检测抗体后,形成包被抗体、抗原、检测抗体复合物,相应底物显色后终止,读取样本吸光值,通过与标准曲线比较即可得出样本中 H9N2 流感血凝素蛋白的含量。

[0012] 血凝素蛋白是流感病毒感染宿主细胞的关键功能蛋白,同时,也是流感治疗性药物及疫苗开发的重要靶点,本发明采用双抗夹心法,能够定性或定量检测样本中的甲型 H9N2 流感血凝素蛋白水平,检验方法方便易行,检测灵敏度和准确度高、特异性强、能够同时快速检测大批样本,作为试剂盒关键组成部分的包被和检测抗体均为自主研发,因此成本低,可靠性强,易溯源,预计将在 H9N2 的相关基础和临床研究中发挥重要作用。

附图说明

[0013] 图 1. H9N2 流感病毒血凝素蛋白 ELISA 试剂盒标准曲线图

具体实施方式

[0014] 以下结合具体实施例对本发明做进一步的描述和说明。

[0015] 实施例 1H9N2 流感血凝素蛋白 ELISA 试剂盒的组分制备

[0016] 1. 小鼠单克隆抗体的制备:

[0017] 1) 动物免疫

[0018] 采用 Balb/c 小鼠作为免疫动物,以义翘神州生物技术有限公司生产的重组 H9N2 流感血凝素蛋白 (货号:11229-V08H) 为免疫原,免疫剂量为每次每只小鼠免疫 50 μ g 的蛋白。首次免疫时将免疫原与等量的完全弗氏佐剂制成乳化剂,腹部皮下多点注射,间隔 2~3 周后取相同剂量免疫原与等量不完全弗氏佐剂制成乳化剂,加强免疫两次,三次免疫后使用间接 ELISA 法测定血清效价,血清效价达到 1:16000 以后,选择效价最高的小鼠腹腔加强免疫一次,4 天后取脾细胞进行细胞融合。

[0019] 2) 细胞融合和克隆化

[0020] 取小鼠脾脏,研磨过滤后离心获得单个脾细胞悬液,细胞计数后,按 5:1 或 10:1 的比例与处于对数生长期的 SP2/0 小鼠骨髓瘤细胞混合,采用聚乙二醇 (PEG) 法进

行细胞融合,铺板,通过选择培养基的作用,骨髓瘤细胞和脾细胞等未融合或未有效融合的细胞将无法生长,而有效融合的杂交瘤细胞将在培养孔内生长、增殖,并分泌抗体。三次换液后,融合后第 9-12 天取细胞培养上清,以重组 H9N2 流感血凝素蛋白作为包被抗原,利用间接 ELISA 法测定上清液,筛选阳性孔,并通过有限稀释法对阳性细胞进行克隆化培养,直至得到稳定分泌特异性抗体的单克隆杂交瘤细胞株。以上细胞融合和克隆化方法均为免疫学单克隆抗体技术中的常用经典方法。

[0021] 3) 单克隆抗体的生产与纯化

[0022] 选取杂交瘤细胞株,利用培养瓶或生物反应器进行细胞培养,收集细胞培养上清,利用常规蛋白 A 亲和层析柱进行纯化,获得的抗体通过 SDS-PAGE 电泳和间接 ELISA 法鉴定抗体纯度和特异性后分装,于 -20°C 低温保存备用。

[0023] 4) 单克隆抗体的序列测定

[0024] 杂交瘤细胞长期保存可能由于多次传代后不稳定以及污染问题导致阳性克隆丢失,为解决上述问题,在本发明过程中,利用分子生物学技术分别提取了阳性克隆的抗体轻链和重链基因,进行了序列测定,包含有抗体基因的质粒可以在 -20°C 条件下长期稳定保存,同时,根据抗体基因序列,本专业领域内的技术人员可以按照常规分子生物学方法克隆表达获得相同的单克隆抗体。

[0025] 抗体基因提取具体方法如下:收集生长状态良好的杂交瘤细胞,按 BBI 公司的 classical total RNA isolation kit 说明书的操作方案提取杂交瘤细胞总 RNA,通过电泳检测质量,UV 测定浓度。按 BBI 公司的 MMLV first strand cDNA synthesis kit 说明书的操作方案将 mRNA 反转录为 cDNA, -20°C 冻存备用。反转录反应体系为: $11\mu\text{l}$ RNA ($2.7\mu\text{g}$), $5\times$ reaction buffer $4\mu\text{l}$, RNase inhibitor ($20\text{U}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$, dNTP mix (10mmol/L) $2\mu\text{l}$, M-MuLV reverse transcriptase $1\mu\text{l}$, 总反应体积为 $20\mu\text{l}$ 。根据参考文献设计引物,以 cDNA 为模板分别 PCR 获得抗体的轻链和重链片段,反应体系为: $2.0\mu\text{l}$ $10\times$ pyrobest buffer, $1.6\mu\text{l}$ 2.5mM dNTP, $1.4\mu\text{l}$ $10\mu\text{M}$ 引物对, $0.4\mu\text{l}$ 杂交瘤细胞 cDNA, $0.2\mu\text{l}$ $15\text{U}/\mu\text{l}$ Pyrobest DNA Polymerase, 反应体系为 $20\mu\text{l}$ 。扩增条件:变性 94°C 4min;变性 94°C 1min, 退火 58°C 1min, 延伸 72°C 1min, 30 个循环;延伸 72°C 5min。将轻链和重链片段插入到 pcDNA3T 载体上,构建 pcDNA3-anti-H9N2-L 和 pcDNA3-anti-H9N2-H 载体。将载体转化大肠杆菌,挑取阳性克隆,进行测序鉴定,分析测序结果,获得正确的轻链和重链氨基酸序列。测定结果及序列分析显示该抗体的轻链氨基酸序列为 SEQ ID NO:1;重链氨基酸序列为 SEQ ID NO:2, 详见序列表。具体实验操作参考本领域技术人员熟知的【萨幕布鲁克 J 等,《分子克隆试验指南》,北京科学出版社】。

[0026] 2. 兔多克隆抗体的制备:

[0027] 选取新西兰兔作为免疫动物,以重组 H9N2 流感血凝素蛋白为免疫原进行免疫,免疫剂量为每只兔子每次免疫 $500\mu\text{g}$ 的蛋白。首次免疫将免疫原与等量的完全弗氏佐剂制成乳化剂,颈背部皮下多点注射,间隔 2~3 周取相同剂量免疫原与等量不完全弗氏佐剂制成乳化剂,加强免疫,共免疫 4-5 次,间接 ELISA 法测定血清效价达到 1:25000 以后,心脏取血,通过常规蛋白 A 亲和层析柱和血凝素蛋白抗原亲和柱两步纯化后得到纯化的多克隆抗体,分装,于 -20°C 低温保存用于酶标抗体的制备。其中血凝素蛋白抗原亲和纯化具体步骤如下:

[0028] a) 称 0.7g 溴化氰活化的琼脂糖凝胶 (GE 公司), 用 1mM HCl 溶胀, 然后用 1mM HCl 洗三次, 备用;

[0029] b) 取 2mg 的血凝素蛋白利用超滤方法将蛋白缓冲液置换成 0.1M NaHCO₃, pH8.3, 并控制体积为 1 ~ 2ml;

[0030] c) 将蛋白溶液加入到步骤 a) 洗涤好的活化琼脂糖凝胶中, 室温摇 4h;

[0031] d) 用 pH8.0, 0.1M 的 Tris 缓冲液封闭未反应基团;

[0032] e) 装重力柱, 柱床体积约 2ml, 用 PBS 冲洗, 并平衡;

[0033] 取蛋白 A 纯化的多抗过柱, 用 PBS 冲洗未结合抗体, 用 pH3.0 柠檬酸缓冲液洗脱特异结合的抗体, 用 Tris 缓冲液中和洗脱液到 pH7.0-7.5。

[0034] 3. 酶标抗体的制备:

[0035] a) 称取 5mg 的 HRP 溶解于 0.5mL 蒸馏水中;

[0036] b) 加入 0.5mL 新配的 0.1M 的 NaIO₄ 溶液, 室温下避光搅拌 20 分钟;

[0037] c) 将上述溶液装入透析袋中, 1mM 的醋酸钠缓冲液 (pH4.4) 透析 4℃ 过夜;

[0038] d) 取 5mg 亲和纯化的多克隆抗体, 加入到 1mL 0.01M 碳酸盐缓冲液中, 备用;

[0039] e) 向 c) 液中加入 0.2M 碳酸盐缓冲液 (pH9.5), 使 pH 升高到 9.0 ~ 9.5, 然后立即加入 d) 液中, 室温避光轻轻搅拌 2 小时;

[0040] f) 加 0.2mL 现配的 4mg/mL NaBH₄ 液, 混匀, 于 4℃ 放置 2 小时;

[0041] 将上述液装入透析袋中, 于 pH7.4, 0.15M 的 PBS 透析, 4℃ 过夜。

[0042] 实施例 2H9N2 流感血凝素蛋白 ELISA 试剂盒的组建

[0043] 组建的 ELISA 试剂盒, 包含以下试剂:

[0044] a) 小鼠单克隆包被抗体;

[0045] b) HRP 标记的兔多克隆抗体;

[0046] c) H9N2 流感血凝素蛋白标准品;

[0047] d) 包被缓冲液: pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液;

[0048] e) 封闭液: 含有 2% 牛血清白蛋白的 Tris 缓冲液;

[0049] f) 样品稀释液: 含有 0.1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;

[0050] g) 洗涤液: 含有 0.1% 吐温的磷酸盐缓冲液;

[0051] h) 底物显色液: 由显色液 A 和显色液 B 组成, 显色液 A 为过氧化氢或过氧化脲, 显色液 B 为四甲基联苯;

[0052] i) 终止液: 2mol/L 的硫酸

[0053] 实施例 3H9N2 流感血凝素蛋白 ELISA 试剂盒的制备

[0054] 1. 利用正交试验摸索酶联免疫试剂盒的最佳抗体组合及工作浓度

[0055] 按照紫外分光光度计法, 测定抗体及抗原的浓度。采用正交试验方法, 摸索最佳抗体组合以及最佳抗体使用浓度, 将不同抗 H9N2 流感血凝素蛋白单克隆抗体稀释至浓度为 4 μg/ml、2 μg/ml、1 μg/ml, 重组血凝素蛋白浓度稀释至 1000pg/ml、100pg/ml、0pg/ml, HRP 标记的兔多克隆抗体稀释浓度至 4 μg/ml、2 μg/ml、1 μg/ml、0.5 μg/ml。综合考虑空白孔背景及阳性实验孔的光吸收值, 优选出一株鼠单克隆抗体作为包被抗体, 并确认其最佳工作浓度为 2 μg/ml, HRP 标记多克隆抗体的工作浓度为 1 μg/ml。

[0056] 2. 试剂盒的批量制备

[0057] 1) 包被酶标板 :用碳酸盐包被缓冲液 (称取 3.18g Na_2CO_3 , 5.86g NaHCO_3 , 1g Na_2N_3 , 定容至 2L 的去离子水中, 调 pH 值为 9.6), 将抗 H9N2 流感血凝素蛋白单克隆抗体稀释至浓度为 $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$, $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$, 包被酶标板, 4°C 孵育过夜, 用洗涤液洗板 1 次, $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$ 。

[0058] 2) 封闭 :每孔加入 $300\ \mu\text{L}$ 封闭液封闭非特异性结合位点, 室温孵育 1 小时 ;然后用洗涤液洗板 2 次, $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$;拍干后用真空包装机包装, 4°C 保存备用。

[0059] 3) 蛋白标准品的制备 :用样品稀释液稀释 H9N2 流感血凝素蛋白, 分装后冻干, 4°C 保存备用。

[0060] 4) 酶标抗体的制备 :将亲和纯化后的兔多克隆抗体用 HRP 标记, 加入 50% 甘油, 分装后 -20°C 保存备用。

[0061] 实施例 4ELISA 试剂盒包被抗体检测限测定

[0062] a) 将 H9N2 流感血凝素蛋白用碳酸盐包被缓冲液稀释成, $1.56\text{ng}/\text{mL}$, $0.78\text{ng}/\text{mL}$, $0.39\text{ng}/\text{mL}$, $0.195\text{ng}/\text{mL}$, $0.0975\text{ng}/\text{mL}$, $0.049\text{ng}/\text{mL}$, $0.0245\text{ng}/\text{mL}$, $100\ \mu\text{L}/\text{孔}$, 包被酶标板, 4°C 孵育过夜, 用洗涤液洗板 1 次, $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$;

[0063] b) 每孔加入 $300\ \mu\text{L}$ 封闭液封闭非特异性结合位点, 室温孵育 1 小时 ;然后用洗涤液洗板 2 次, $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$;

[0064] c) 将抗 H9N2 流感血凝素蛋白鼠单克隆抗体用样本稀释液稀释至 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$, 加入预先包被和封闭好的酶标板, $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$, 室温孵育 1 小时 ;然后用洗涤液洗板 3 次, $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$;

[0065] d) 加入 HRP 标记的抗小鼠 IgG 二抗, $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$, 室温孵育 1 小时 ;然后用洗涤液洗板 3 次, $200\ \mu\text{L}/\text{孔}$;

[0066] e) 加入 $200\ \mu\text{L}$ 新鲜配置的 TMB 底物, 室温避光显色 20 分钟, 加入 $50\ \mu\text{L}$ $2\text{mol}/\text{L}$ 硫酸终止反应, 酶标仪 450nm 波长下读值。

[0067] f) 以各样本组吸光值的平均值减去 3 倍标准差的数值与空白对照组 (用不含有重组蛋白的包被缓冲液包被酶标板, 其它步骤同实验组) 吸光值平均值加上 3 倍标准差的数值相比, 取样本组数值大于空白对照组数值条件下的最低蛋白包被浓度为抗体的检测限。结果显示抗体的检测限能够达到 $0.195\text{ng}/\text{ml}$ (表 1), 说明抗体有较高的检测灵敏度。

[0068] 表 1 包被抗体检测限测定

[0069]

	OD-1	OD-2	OD-3	OD-4	平均值	标准差 SD	平均值 +3sD	平均值 -3SD	检测限 (ng/ml)
空白对照	0.043		0.041	0.042	0.042	0.001	0.045		
$0.0245\text{ng}/\text{mL}$	0.042	0.042	0.041	0.042	0.042	0.001		0.039	
$0.049\text{ng}/\text{mL}$	0.041	0.038	0.042	0.041	0.041	0.002		0.035	
$0.0975\text{ng}/\text{mL}$	0.045	0.044	0.047	0.05	0.047	0.003		0.038	
$0.195\text{ng}/\text{mL}$	0.053	0.052	0.056	0.059	0.055	0.003		0.046	0.195
$0.39\text{ng}/\text{mL}$	0.069	0.069	0.067	0.065	0.068	0.002		0.062	

0.78ng/mL	0.094	0.096	0.094	0.094	0.095	0.001		0.092	
1.56ng/mL	0.175	0.176	0.165	0.167	0.171	0.006		0.153	

[0070] 实施例 5H9N2 流感血凝素蛋白 ELISA 试剂盒的特异性测定

[0071] 将不同流感病毒亚型的重组血凝素蛋白稀释至 50ng/ml, 用 H9N2 流感血凝素蛋白 ELISA 试剂盒测试, 结果显示试剂盒特异性的识别甲型 H9N2 流感病毒 (A/Hong Kong/1073/1999) 的血凝素蛋白, 与其它甲型流感病毒的主要亚型包括 H1N1, H1N2, H3N2, H5N1 和 H7N7 检测毒株的血凝素蛋白以及乙型流感病毒 (Influenza B/Florida/4/2006) 的血凝素蛋白无交叉反应。证明试剂盒特异性好, 可以用于支持 H9N2 流感的流行病学研究, 而且对于流感病毒的基础研究也具有重要的实际应用价值。

[0072] 表 2H9N2 流感血凝素蛋白 ELISA 试剂盒的特异性测定

[0073]

血凝素蛋白的亚型与毒株	OD450nm 值
Influenza B/Florida/4/2006	0.007
H1N1 (A/Brisbane/59/2007)	0.01
H2N2 (A/Canada/720/2005)	0.003
H3N2 (A/Brisbane/10/2007)	0.016
H5N1 (A/Anhui/1/2005)	0.011
H5N1 (A/bar-headed goose/Qinghai/14/2008)	0.011
H5N1 (A/Vietnam/1194/2004)	0.003
H5N1 (A/Indonesia/5/2005)	0.012
H5N1 (A/turkey/Turkey/1/2005)	0.007
H7N7 (A/Netherlands/219/03)	0.003
H9N2 (A/Hong Kong/1073/1999)	1.692

[0074] 实施例 6H9N2 流感血凝素蛋白 ELISA 试剂盒的检测步骤

[0075] 1. 加样

[0076] 1) 取出包被好的酶标板及冻干的标准品, 加 1ml 样品稀释液将标准品溶解。室温下放置 20 分钟。将标准品从 20ng/ml 起, 做 2 倍的倍比稀释, 共 7 个点, 将稀释液各取 100 μ l 加入 96 孔酶标板中。

[0077] 2) 取待测样本, 100 μ l/ 孔加入反应孔中, 室温下孵育 2 小时;

[0078] 3) 洗涤液洗板 3 次, 200 μ L/ 孔, 拍干酶标板。

[0079] 2. 加入检测抗体

[0080] 将HRP标记抗体用样品稀释液稀释至 $1\mu\text{g}/\text{mL}$,加入反应孔中, $100\mu\text{L}/\text{孔}$,室温下孵育1小时,洗涤液洗板3次, $200\mu\text{L}/\text{孔}$,拍干酶标板。

[0081] 3. 显色

[0082] 1) 加入 $200\mu\text{L}$ 新鲜配制的底物显色液,室温反应20分钟,然后加入 $50\mu\text{L}$ 终止液终止反应;

[0083] 2) 酶标仪 450nm 波长下读取吸光值。

[0084] 4. 标准曲线的建立

[0085] 以标准品的浓度为横坐标,OD值为纵坐标建立标准曲线(图1),根据测得的样品OD值可计算获得样品中的H9N2血凝素蛋白的含量。

[0001]

序列表

<110> 北京义翘神州生物技术有限公司

<120> H9N2 流感病毒血凝素蛋白 ELISA 试剂盒

<160> 2

<210> 1

<211> 219

<212> PRT

<213> mouse

<400> 1

Asp Val Val Val Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Phe Gly
 1 5 10 15
 Asp Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Ala Asn Ser
 20 25 30
 Tyr Gly Asn Thr Tyr Leu Ser Trp Tyr Leu His Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Thr Ile Lys Pro Glu Asp Leu Gly Met Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Gln Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125
 Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
 145 150 155 160
 Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
 180 185 190

[0002]

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
 195 200 205
 Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 210 215

<210> 2
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> mouse

<400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Asn Lys Tyr Asp Pro Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Gly Arg Trp Gly Tyr Tyr Asp Glu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr
 180 185 190
 Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
 195 200 205

[0003]

Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg	Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	210	215	220	
Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	225	230	235	240
Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu	Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	245	250	255	
Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	260	265	270	
Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	275	280	285	
Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	290	295	300	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	305	310	315	320
Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	325	330	335	
Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile	Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	340	345	350	
Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	355	360	365	
Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp	Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	370	375	380	
Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp	Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	385	390	395	400
Val	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser	Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	405	410	415	
Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	420	425	430	
Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys							435	440		

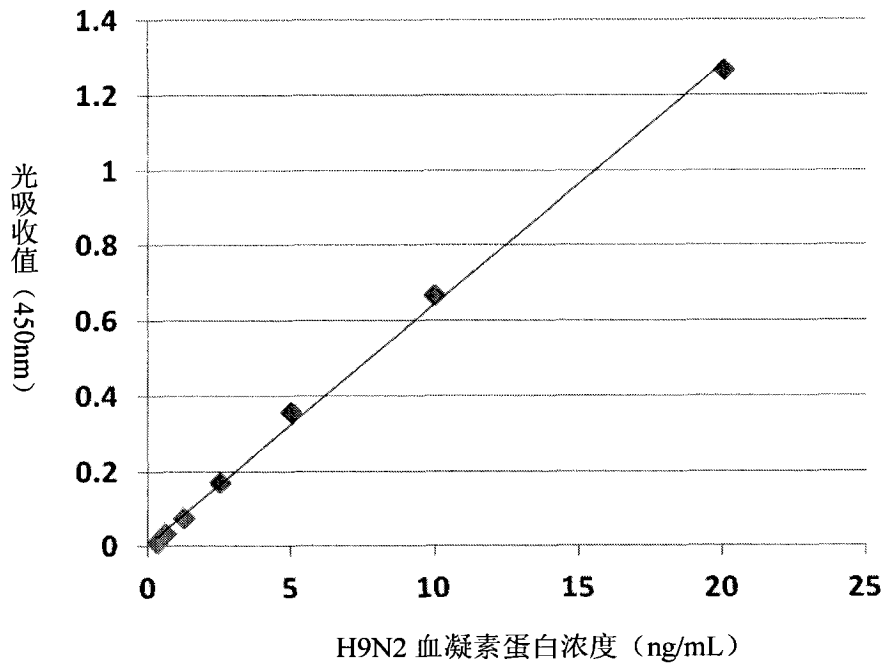


图 1

专利名称(译)	H9N2流感病毒血凝素蛋白ELISA试剂盒		
公开(公告)号	CN104749372A	公开(公告)日	2015-07-01
申请号	CN201310736768.0	申请日	2013-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	北京义翘神州生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京义翘神州生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京义翘神州生物技术有限公司		
[标]发明人	谢良志 罗春霞 孙春昀 张杰 李东 张延静 李雁 王加兰		
发明人	谢良志 罗春霞 孙春昀 张杰 李东 张延静 李雁 王加兰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/56983 G01N33/6803 G01N2333/11		
其他公开文献	CN104749372B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种甲型H9N2流感病毒血凝素蛋白双抗体夹心ELISA试剂盒。该试剂盒包含有包被单克隆抗体的固相载体，辣根过氧化物酶标记的兔多克隆抗体、H9N2血凝素蛋白标准品、样品稀释液、洗涤液、底物显色液和反应终止液，不但灵敏度好，可以对H9N2流感病毒血凝素蛋白进行定量检测，而且特异性识别甲型H9N2流感病毒，与甲型流感病毒的其它主要亚型包括H1N1，H2N2，H3N2，H5N1和H7N7以及乙型流感病毒的血凝素蛋白无交叉反应。试剂盒操作简单，能够同时快速检测大批样本，既可以用于支持H9N2流感病毒的基础研究，同时，对于开展流感病毒的流行病学研究具有重要意义。

