



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102608314 A

(43) 申请公布日 2012.07.25

(21) 申请号 201110025085.5

(22) 申请日 2011.01.24

(71) 申请人 中国科学院动物研究所
地址 100101 北京市朝阳区北辰西路1号院
5号

(72) 发明人 何宏轩 江龙 罗静 董文杰
王承民 董国英 夏玥瞳

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理
有限公司 11280
代理人 郭广迅

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 3 页

(54) 发明名称

一种用于检测甲型流感病毒的偶联物、其制备方法和用途

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测甲型流感病毒的偶联物、其制备方法和用途。本发明提供的偶联物包括：1) 聚联乙炔囊泡；和 2) 偶联到聚联乙炔囊泡上的特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体。本发明提供的偶联物是将特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体，在偶联剂的作用下，偶联到 10, 12- 二十五二炔酸与二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱混合制备的聚联乙炔囊泡上。本发明提供的偶联物可用于流感病毒的现场及实验室检测，可用肉眼直接观察结果，还具有操作简便、快速、灵敏度高，特异性强，检测周期短等特点。

1. 一种用于检测甲型流感病毒的偶联物,其特征在于,所述偶联物包括:

1) 聚联乙炔囊泡;和

2) 偶联到所述聚联乙炔囊泡上的特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体;

优选地,所述单克隆抗体是用完整或部分甲型流感病毒 NP 蛋白、完整或部分甲型流感病毒 NP 蛋白的编码基因构建的真核表达载体免疫小鼠制备的单克隆抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的偶联物,其特征在于,所述偶联物中聚联乙炔囊泡与所偶联的单克隆抗体之间的比为 $1 \mu\text{mol} : 1 \mu\text{g}$ 。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的偶联物,其特征在于,所述聚联乙炔囊泡是由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱与 10,12-二十五二炔酸混合制备的。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的偶联物,其特征在于,所述聚联乙炔囊泡的制备方法包括:

将二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱与 10,12-二十五二炔酸分别以 1mM 的浓度,按 4 : 6 的摩尔比混合,再经过超声水合处理和紫外光照射聚合处理。

5. 根据权利要求 4 所述的偶联物,其特征在于,所述超声水合处理的条件为:超声温度 80°C ,超声功率 200W,每间隔 5 秒工作 5 秒,共 15 分钟,冷却至室温后,经 4°C 过夜;

所述紫外光照射聚合处理的条件为:照射波长 254nm,照射功率 32W,照射时间 30 分钟。

6. 制备权利要求 1 至 5 中任一项所述偶联物的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

1) 制备聚联乙炔囊泡;

2) 在偶联剂作用下,将特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体偶联到步骤 1) 所制备的聚联乙炔囊泡上。

7. 根据权利要求 6 所述的方法,其特征在于,所述步骤 1) 中制备聚联乙炔囊泡的方法如下:

将二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱与 10,12-二十五二炔酸以 1mM 的浓度,按 4 : 6 的摩尔比混合,再经过超声水合处理和紫外光照射聚合处理;

优选地,所述超声水合处理的条件为:超声温度 80°C ,超声功率 200W,每间隔 5 秒工作 5 秒,共 15 分钟,冷却至室温后,经 4°C 过夜;和 / 或所述紫外光照射聚合处理的条件为:照射波长 254nm,照射功率 32W,照射时间 30 分钟。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中的偶联剂为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺。

9. 根据权利要求 6 至 8 中任一项所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中的偶联方法如下:在室温,用和步骤 1) 制备的聚联乙炔囊泡中 10,12-二十五二炔酸分别为等物质量的所述两种偶联剂活化聚联乙炔囊泡 30 分钟,再加入特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体于 4°C 下搅拌 3 ~ 4 小时,在 pH 7.4 的磷酸缓冲液中透析过夜,即得。

10. 权利要求 1 至 5 中任一项所述偶联物在制备用于检测甲型流感病毒的工具中的用途。

11. 一种用于检测甲型流感病毒的试剂盒,其包含权利要求 1 至 5 中任一项所述偶联物。

一种用于检测甲型流感病毒的偶联物、其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测甲型流感病毒的偶联物、其制备方法和用途。

背景技术

[0002] 流行性感是由流行性感冒病毒引起的急性呼吸道传染病,传染性强、传染迅速、发病急,常有高热、头痛、全身酸痛、疲乏无力等明显的中毒症状和呼吸道炎症的表现。流行性感冒病毒有甲、乙、丙三型。每一型中又包括多种亚型,其中甲型流感病毒变异性最大,而且连续不断,约 10-15 年即发生较大变异,出现新的亚型。因为人群对新的亚型没有免疫力,所以甲型多引起大流行。2004 年 H5N1 禽流感席卷亚洲以来,波及欧美各国,引起家禽大批死亡,并感染人类,造成近 200 多人死亡,流行的余波至今未平息。2009 年 H1N1 流感病毒席卷全球,世界卫生组织一度将流感大流行警告级别提高至 6 级。这些均属于甲型流感。

[0003] 流感对人类的威胁已经引起世界美注,如何有效预防和控制该病的流行,已经成为各国科学家的重要研究课题。很多国家都开始进行这方面的研究,包括在疫苗、诊断技术和药物等方面。

[0004] 目前,常用于疫病诊断的检测方法主要包括病原学检测方法、免疫学检测方法及分子生物学检测方法。病原学方法是传统的诊断方法,主要以检测病原体为诊断依据,在过去的疾病控制上发挥了巨大的作用,但是其费时费力,需要数天甚至一周以上才能得到诊断结果,往往贻误疾病控制的最好时机。免疫学方法是以抗原抗体的特异性结合反应为基础,具有敏感、特异、简便、快速等优点,特别适合于病原微生物的单一或多样品检测,目前以 ELISA 方法最为常用,很多 ELISA 快速检测试剂盒已成功实现商业化并在实验室得到广泛应用。以 PCR/RT-PCR 为代表的分子生物学方法近年来也获得快速发展,这类方法主要以病原微生物的基因组 RNA 或 DNA 为检测靶标,灵敏,特异。然而,分子生物学方法与 ELISA 方法往往需要贵重的仪器设备、专业的技术人员并且在实验室内进行操作,因此大大限制了其在临床上的广泛应用。

[0005] 快速、敏感、特异、简便,尤其是能够在现场快速检测,是当前疾病诊断的发展方向。探索合适的检测技术并开发相应的检测仪器是迫在眉睫的科研任务,对于有效控制我国动物疫病的发生和流行,保障人类生命安全具有重要意义。

发明内容

[0006] 因此,本发明的目的是提供一种用于检测甲型流感病毒的偶联物。

[0007] 本发明的另一个目的是提供上述偶联物的制备方法及其用途。

[0008] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的。一方面,本发明提供一种用于检测甲型流感病毒的偶联物,所述偶联物包括:1) 聚联乙炔囊泡;2) 偶联到所述聚联乙炔囊泡上的特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体。所述单克隆抗体可以用完整或部分甲型流感病毒 NP 蛋白、完整或部分甲型流感病毒 NP 蛋白的编码基因构建的真核表达载体免疫小鼠制备的单克隆抗体。

[0009] 优选地,所述偶联物中该聚联乙炔囊泡与所偶联的单克隆抗体之间的比为 $1 \mu\text{mol} : 1 \mu\text{g}$ 。

[0010] 优选地,所述聚联乙炔囊泡是由二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱与 10,12-二十五二炔酸混合制备的。

[0011] 优选地,所述聚联乙炔囊泡的制备方法如下:将二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)与 10,12-二十五二炔酸(PCDA)分别以 1mM 的浓度,按 4 : 6 的摩尔比混合,再经过超声水合处理和紫外光照射聚合处理。

[0012] 优选地,所述超声水合处理的条件为:超声温度 80°C ,超声功率 200W,每间隔 5 秒工作 5 秒,共 15 分钟,冷却至室温后,经 4°C 过夜;所述紫外光照射聚合处理的条件为:照射波长 254nm,照射功率 32W,照射时间 30 分钟。

[0013] 另一方面,本发明提供制备上述偶联物的方法,所述方法包括以下步骤:1) 制备聚联乙炔囊泡;2) 在偶联剂作用下,将特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体偶联到步骤 1) 所制备的聚联乙炔囊泡上。

[0014] 优选地,所述步骤 1) 中制备聚联乙炔囊泡的方法如下:将二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱与 10,12-二十五二炔酸以 1mM 的浓度,按 4 : 6 的摩尔比混合,再经过超声水合处理和紫外光照射聚合处理;优选地,所述超声水合处理的条件为:超声温度 80°C ,超声功率 200W,每间隔 5 秒工作 5 秒,共 15 分钟,冷却至室温后,经 4°C 过夜;所述紫外光照射聚合处理的条件为:照射波长 254nm,照射功率 32W,照射时间 30 分钟。

[0015] 优选地,所述步骤 2) 中的偶联剂为 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 N-羟基琥珀酰亚胺。

[0016] 优选地,所述步骤 2) 中的偶联方法如下:在室温,用和步骤 1) 制备的聚联乙炔囊泡中 10,12-二十五二炔酸分别为等物质的量的上述两种偶联剂活化聚联乙炔囊泡 30 分钟,再加入特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体于 4°C 下搅拌 3 ~ 4 小时,在 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液中透析过夜,即得。

[0017] 在一个优选的实施方案中,本发明提供的偶联物可用如下方法制备:将二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱与 10,12-二十五二炔酸混溶于氯仿,浓度 1mM,摩尔比为 4 : 6,利用旋转蒸发法于 37°C 水浴去除氯仿,加入等体积双蒸水,在 80°C 下超声水合,功率 200W,每间隔 5 秒工作 5 秒,共 15 分钟,经 4°C 过夜,得到无色澄清的非聚合的囊泡溶液。将此囊泡溶液用波长 254nm,功率 32W 的紫外灯照射 30min,得到蓝色的变色囊泡溶液。在偶联剂的作用下,将特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体偶联到囊泡上,从而形成具有特异性识别甲型流感病毒功能的变色囊泡溶液。在 50u1 蓝色的具有特异性识别甲型流感病毒功能的变色囊泡溶液中加入 5u1 待检溶液, 30°C 孵育 15min。当加入 100u1 含 20ng/ml 的甲型流感病毒的液体时,体系由蓝色变为紫红色。

[0018] 此外,本发明还提供了上述偶联物在制备用于检测甲型流感病毒的工具中的用途。并且,本发明还提供包含上述偶联物的用于检测甲型流感病毒的试剂盒。

[0019] 可见,本发明提供的方法利用了聚联乙炔分子囊泡的两色性和荧光性。组装的偶联物正常为蓝色,当其表面插入的抗体与对应抗原识别结合,可对囊泡本身的线性骨架产生扰动,使偶联物颜色从蓝色转变为红色,这种颜色变化可以用于检测,用肉眼即可识别。这种变色囊泡生物传感器识别迅速,使用方便,可满足野外检测的需求。

[0020] 综上所述,本发明经过试验优化了组装用于检测甲型流感病毒的变色囊泡的条件,如变色囊泡成分比例、抗体与囊泡偶联比例等,提供了一种检测甲型流感病毒的偶联物,即变色囊泡,该囊泡是将 10,12- 二十五二炔酸与二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱混合制备的聚联乙炔囊泡,在偶联剂 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐和 N- 羟基琥珀酰亚胺的作用下,偶联特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体。本发明的囊泡可用于流感病毒的现场及实验室检测,可用肉眼直接观察结果,还具有操作简便,快速,灵敏度可达 10ng/ml,能够特异性识别甲型流感病毒,检测周期短等特点。

附图说明

[0021] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0022] 图 1 为 254nm 紫外光聚合不同时长制备的囊泡的紫外可见光吸收光谱图。

[0023] 图 2 为偶联物识别抗原,其中 Ab+ 表示制备变色囊泡时偶联有特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体,Ab- 表示制备变色囊泡时未偶联特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体;Ag+ 表示加入的待检溶液为 100ul 含 20ng/ml 的甲型流感病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液,Ag- 表示加入的待检溶液为 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液,不含甲型流感病毒。

[0024] 图 3 为偶联物识别抗原的紫外可见光吸收光谱图,其中实线和虚线分别表示加入甲型流感病毒前、后。

[0025] 图 4 为不同成分组成的囊泡制备的偶联物响应抗原的紫外可见光吸收光谱图。其中 DMPC 表示二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱,PCDA 表示 10,12- 二十五二炔酸;实线表示囊泡由 1mM PCDA 制备,不含 DMPC,虚线表示囊泡由 1mM PCDA 和 1mM DMPC 按 6 : 4 的体积比混合制备。

[0026] 图 5 为偶联物响应不同待检溶液的紫外可见光吸收光谱图。其中,NDV 表示待检溶液为 100ul 含 20ng/ml 新城疫病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液,AIV 表示待检溶液为 100ul 含 20ng/ml 甲型禽流感病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液。

[0027] 图 6 为偶联物对 100ul 的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液 (PBS)、含 10ng/ml 及 1ng/ml 甲型禽流感病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液的检测结果。

具体实施方式

[0028] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0029] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0030] **实施例 1** 聚联乙炔囊泡的制备

[0031] 将二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱与 10,12- 二十五二炔酸混溶于氯仿,浓度 1mM,摩尔比为 4 : 6,利用旋转蒸发法于 37℃ 水浴去除氯仿,加入等体积双蒸水,在 80℃ 下超声水合,功率 200W,每间隔 5s 工作 5s,共 15min,直至得到无色澄清的溶液,再经 4℃ 过夜,得到无色澄清且稳定均一的非聚合的囊泡溶液。

[0032] 将此囊泡溶液用波长 254nm,功率 32W 的紫外灯照射,使其聚合,得到蓝色的囊泡溶液。检测这些溶液的紫外可见光吸收光谱,如图 1 所示,可见,囊泡溶液吸光度随着照射聚合时间的增加而增强,选定用 254nm 紫外光照射 30min 来聚合囊泡溶液。

[0033] **实施例 2** 甲型流感病毒单克隆抗体的制备

[0034] 参考黎玉梅等（黎玉梅, 邓国华, 冉多良, 熊蕊, 陈化兰, H5 亚型禽流感病毒单克隆抗体的制备和鉴定, 新疆农业大学学报, 2007, 30(4) :25 ~ 28) 的方法, 用自行原核表达的甲型流感病毒 NP 蛋白作为抗原, 制备弗氏佐剂疫苗免疫 SPF BALB/c 小鼠, 取其脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0, 在聚乙二醇作用下融合。采用间接 ELISA 检测法筛选获得 1 株分泌特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞, 这株杂交瘤细胞分泌甲型流感病毒单克隆抗体。

[0035] **实施例 3** 检测甲型流感病毒的偶联物的制备

[0036] 在室温下, 向实施例 1 制备的囊泡溶液中, 加入与所含 10,12- 二十五碳二炔酸非别为等物质的量的偶联剂 1-(3- 二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐和 N- 羟基琥珀酰亚胺活化实施例 1 制备的囊泡 30min, 然后向实施例 1 制备的 1mM 囊泡中按每 1mI 加入 1ug 实施例 2 制备的特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体的比例加入抗体, 于冰上搅拌 4h, 在磷酸缓冲溶液 (pH = 7.4) 中于 4℃ 透析过夜, 得到具有特异性识别甲型流感病毒功能的偶联物溶液。

[0037] **实施例 4** 甲型流感病毒的检测

[0038] 待检溶液的制备: 将甲型流感病毒经常规方法灭活纯化后测定初始浓度, 用 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液稀释至下述实验中的要求浓度。

[0039] 在 100uI 实施例 4 制备的蓝色的具有特异性识别甲型流感病毒功能的偶联物溶液中加入 100uI 待检溶液, 30℃ 孵育 15min, 结果如图 2 所示。当向 100uI 上述偶联有特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体的囊泡溶液中, 加入 (Ag+) 100uI 含 20ng/mI 的甲型流感病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液时, 体系由蓝色变为紫红色, 而加入 (Ag-) 100uI pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液时体系保持蓝色; 向 100uI 未偶联有特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体的囊泡溶液中, 加入上述两种待检溶液 (Ag+) 和 (Ag-) 时体系均保持蓝色。

[0040] 上述偶联物检测甲型流感病毒前、后的紫外可见光吸收光谱如图 3 所示。加入待检抗原 (100uI 含 20ng/mI 的甲型流感病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液) 后, 光谱在 650nm 左右的吸收峰减弱, 在 550nm 左右的吸收峰加强, 与体系加入待检抗原后颜色由蓝色变为粉紫色一致。

[0041] 另制备不加入二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱的 10,12- 二十五碳二炔酸囊泡, 制作方法如前述, 偶联有特异性识别甲型流感病毒的单克隆抗体, 加入 100uI 含 20ng/mI 的甲型流感病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液作待检溶液后, 不加入 DMPC 的囊泡不能对待检溶液发生响应, 体系保持蓝色, 而加入 40% DMPC 的囊泡体系由蓝色变为粉紫色, 光谱图如图 4 所示。

[0042] 向实施例 3 制备的检测甲型流感病毒的偶联物 100uI 中, 分别加入 100uI 不同的待检溶液, 含 20ng/mI 新城疫病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液 (NDV), 及含 20ng/mI 甲型禽流感病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液 (AIV)。含甲型流感病毒的待检溶液使体系变为粉紫色, 含新城疫病毒的待检溶液使体系保持蓝色, 不能变色, 溶液光谱图如图 5 所示。

[0043] 向实施例 3 制备的检测甲型流感病毒的偶联物 100uI 中, 分别加入 100uI 的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液 (PBS)、含 10ng/mI 及 1ng/mI 甲型禽流感病毒的 pH 7.4 的 0.01M 磷酸缓冲液, 实验结果表明含 10ng/mI 的甲型流感病毒的待检溶液使体系变为粉紫色, 含 1ng/mI 的甲型流感病毒的待检溶液及 PBS 均使体系保持蓝色, 不能变色, 如图 6 所示。

[0044] 此外,采用做标准曲线的方法还可以定量检测甲型流感病毒。

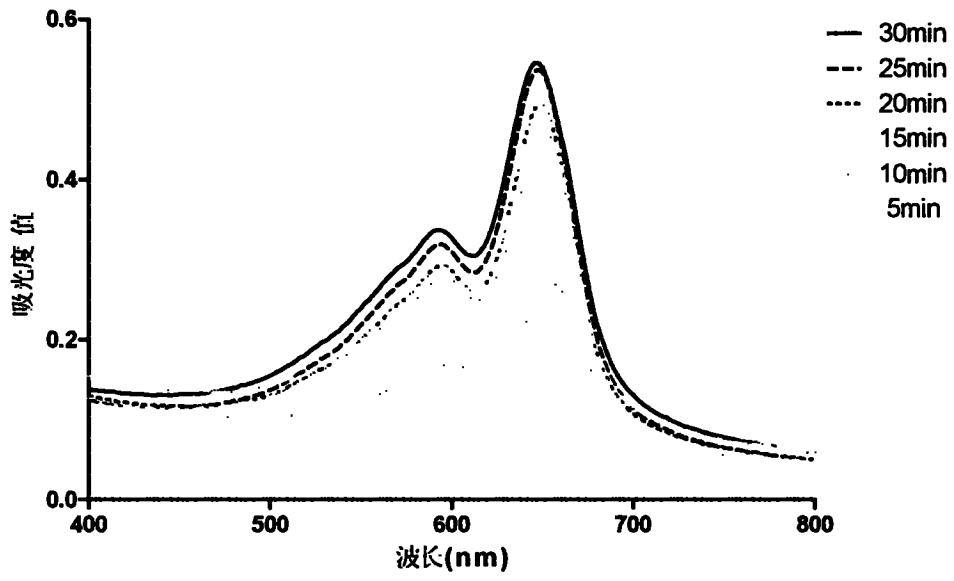


图 1

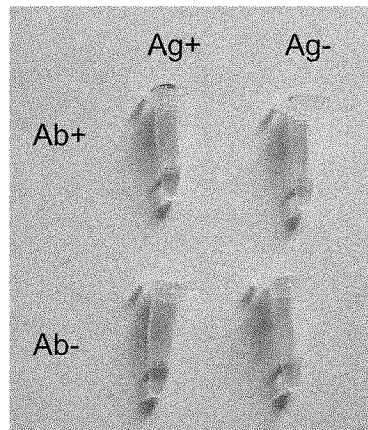


图 2

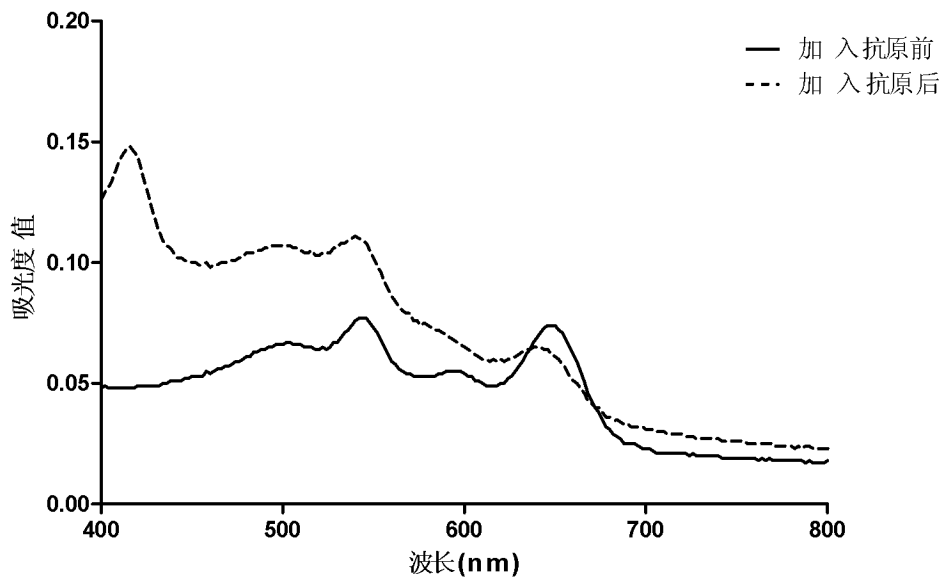


图 3

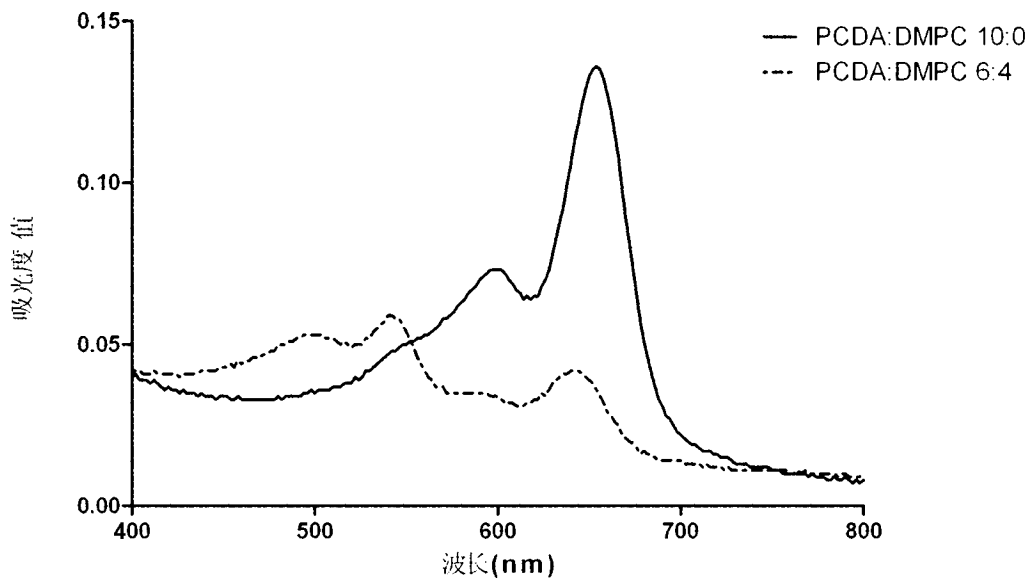


图 4

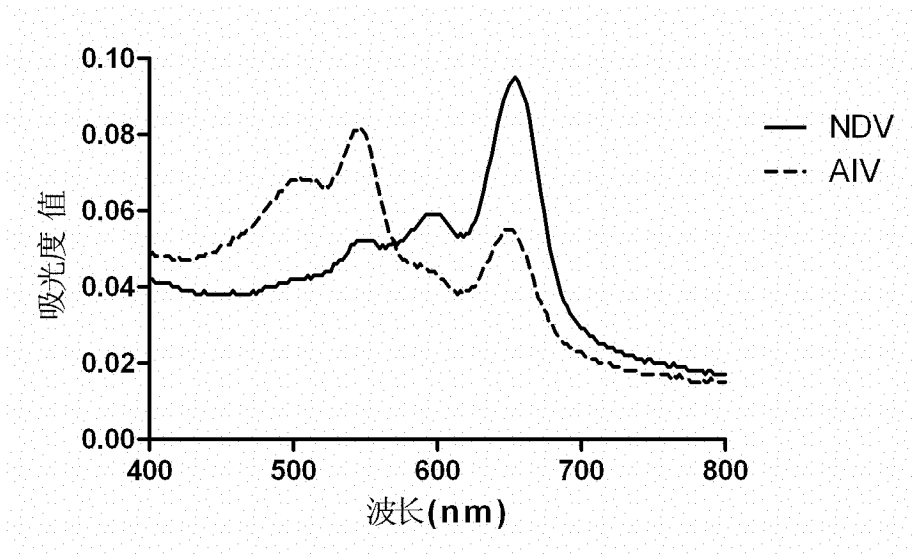


图 5

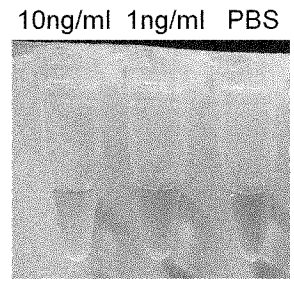


图 6

