[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610017402.8

[43] 公开日 2007 年 8 月 15 日

[11] 公开号 CN 101017167A

[22] 申请日 2006.2.8

[21] 申请号 200610017402.8

[71] 申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450002 河南省郑州市金水区东风路 5 号河南省生物工程技术研究中心

[72] 发明人 李晨阳 李玉林 陈小科 李智涛 王云龙

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称

流感与普通感冒的鉴别及流感抗体检测方法

[57] 摘要

本发明属疾病诊断领域中体外病毒及其抗体快速检测法。涉及使用流感病毒膜蛋白 M1 蛋白和 M2 蛋白的 N 端的高度保守保守九肽 MSLLTEVET 及其变异表位，经过修饰后做成诊断试剂盒，进行流感抗体水平检测；使用 MSLLTEVET 及其变异表位的抗体，经过修饰后做成诊断试剂盒，进行流感病毒检测。本发明可用为流感监测、接种免疫、临床用药提供科学依据。

1. 一种用于流行性感冒与普通感冒的快速鉴别及流感病毒抗体水平检测的方法，其特征为：用基因工程或化学合成的方法将含流感病毒膜蛋白M1蛋白和M2蛋白的N端的高度保守的表位MSLLTEVET及其变异表位（MSLLTE保守，后三个氨基酸可变）的多肽或蛋白及其抗体得到，并用于流感病毒及其抗体水平的快速检测。

2.如权利要求1所述流感，不仅包括人感染流感病毒所引起的感冒，而且包括其他动物感染流感病毒所引起的感冒。

3. 如权利要求1所述的这种用于流行性感冒与普通感冒的快速鉴别及流感病毒抗体水平检测的方法，所用的检测方法包括一切可用于病毒及其抗体检测的方法,包括且不限于利用金标记、硒标记、过氧化物酶标记、碱性磷酸酶标记、化学发光基团标记的检测方法。

4. 如权利要求1所述的这种用于流行性感冒与普通感冒的快速鉴别及流感病毒抗体水平检测的方法，不仅可以用于人流感的诊断，而且可以用于其他动物流感的诊断。

5. 如权利要求1所述的含流感病毒膜蛋白M1蛋白和M2蛋白的N端的高度保守的表位MSLLTEVET及其变异表位（MSLLTE保守，后三个氨基酸可变）的多肽或蛋白，包括利用基因工程的手段得到的含MSLLTEVET或MSLLTE的多肽或融合蛋白，包括利用化学和成的手段得到的含MSLLTEVET或MSLLTE的多肽或多肽偶联物，包括利用其他技术手段获取的天然的含MSLLTEVET或MSLLTE的多肽或蛋白。

6. 如权利要求1所述的MSLLTEVET及其变异表位（MSLLTE保守，后三个氨基酸可变）的抗体，包括可以同MSLLTEVET或MSLLTE特异性结合的单克隆抗体、多克隆抗体及其修饰产物。

7. 如权利要求6所述单克隆抗体、多克隆抗体及其修饰产物，包括用任何方式修饰的产物,包括且不限于经胃蛋白酶、木瓜蛋白酶、无花果蛋白酶等蛋白酶及各类还原剂氧化剂修饰后的单克隆抗体、多克隆抗体产物。

流感与普通感冒的鉴别及流感抗体检测方法

技术领域

本发明属流感病毒抗原的表位及其变异表位在快速诊断中的应用，特别涉及流感病毒膜蛋白M1蛋白和M2蛋白的N端的高度保守的抗原表位及其抗体、变异表位及其抗体在流感与普通感冒的鉴别及流感抗体检测中的应用,属疾病诊断领域中体外快速检测法。

背景技术

流感与普通感冒是完全不同的两种传染病。

普通感冒，俗称“伤风”，以鼻咽部炎症为主要表现。大约有150种以上的病毒可以引起感冒，所以我们一生中才会不断地感冒。一般来说，小孩平均每年感冒约5～8次，成年人每年患感冒约2～5次。

流行性感冒，简称流感。是由流感病毒引起的急性呼吸道传染病，病原体为甲、乙、丙三型流行性感冒病毒。尤其以甲型多见，好发于冬、春季。流感病毒通常由打喷嚏或咳嗽的飞沫传播。人得了流感后，症状会突然发生且在数小时内恶化，发高烧，体温可达39℃以上。两眼胀痛，四肢疼痛，疲乏，有时眼结膜充血，鼻塞、流鼻涕，咽喉干痛。儿童常有腹痛、腹胀、腹泻、呕吐等消化系统症状，甚至发生惊厥。流感的症状对婴幼儿、老年人和患有慢性病者的生命更是威胁。世界上每年因流感死亡的人数以千计，但我国临床中往往以流感引起的并发症为死因，而忽略了流感是发病的罪魁祸首。基于以上问题，加强科学研究，加快建立更加快速、敏感、准确的诊断方法并长期应用于流行病学监测和临床诊断，以期早期发现流感，及早采取措施进行控制。

流感病毒(Influenza virus) 属正黏病毒科,流感病毒属。按照病毒核蛋白(NP) 和基质蛋白(M) 的不同可分为A、B、C 三个型。A 型流感病毒又可根据病毒粒子血凝素(HA) 和神经氨酸酶(NA) 蛋白抗原性的不同分为不同的亚型。B、C型流感病毒只可感染人类，但A型流感病毒除感染人类外还可以感染禽类和马、猪及其他哺乳动物；并且目前研究发现，仅有A型流感病毒可以造成大流行。

典型的流感病毒粒子呈球状，直径80～120 nm。流感病毒的核酸是负链单股RNA，其基因组共有8个独立的RNA片段(分别以片段1～8命名) 组成，核酸总长度约为13.6kb。

病毒RNA片段4编码流感病毒的主要膜蛋白血凝素(HA)。该片段的变异率很高，不同亚型的毒株或同一亚型的不同毒株均有差异，自然状态下以棒状三聚体形式存在于双层类脂层上。HA蛋白是病毒的主要免疫原性蛋白。A型流感病毒的HA有15个亚型。在HA和NA介导的抗体 的选择压力下，HA基因极易发生变异，

从而引起流感病毒的抗原漂移和抗原转变。

病毒RNA片段5编码的是流感病毒的主要结构蛋白核衣壳蛋白(NP)。NP蛋白是保守的结构蛋白,在病毒进化过程中变异率很低。NP蛋白和M蛋白决定流感病毒的型特异性，是病毒分型的依据。

编码基质蛋白(M)的片段总长约1027个核苷酸,分别翻译为M1、M2和M3蛋白。M3蛋白与M1由相同的读码框转录,其编码的氨基酸长度只有9个，目前这一肽段尚未分离到,功能未知。目前对M2蛋白免疫学特性研究主要集中在对M2的膜外区域(M2e)区的研究。M2e较为保守,在感染的细胞表面表达丰富。其N端的最初9个氨基酸高度保守，而且M1蛋白N端也有和M2e相同的9个保守氨基酸。

Liu等（FEMS Immunol Med Microbio, 2003, 35: 14121460）根据A型流感病毒株M2e区的氨基酸序列合成四条肽段疫苗免疫兔子,结果只有含整个M2e和含N末端最初9个保守氨基酸的肽段疫苗产生的抗体可以明显抑制A、B型流感病毒株在MDCK细胞上的复制，而相对应于M2e中部和C末端氨基酸序列的合成肽疫苗产生的抗体却不能有效抑制。推测M2e的N末端含有能诱导在体外抑制流感病毒复制的抗体的表位。

本发明综合前人研究发现：流感病毒共有10种蛋白，分别为:PB1，PB2,PA,HA，NP，NA，M1，M2， NS1，NS2。其中含量最多的是M1，它构成病毒的基质膜。免疫原性最强为HA和NA，抗原变异率最高的也是HA和NA。这两种抗原的变异可独立发生也可同时发生，是流感病毒常见的一种自然变异。

这些巨大的变异给流感的诊断带来极大的不便，本发明分析了几乎所有的公开的流感病毒序列，找到了流感病毒的种属特异性抗原表位即大多数致病性流感病毒基质蛋白M1和M2所共有的一段保守氨基酸序列：MSLLTEVET。

编码基质蛋白(M)的片段分别翻译为M1、M2和M3蛋白。编码M1和M2的ORF间存在71个核苷酸的重叠,分别位于1~26位,715~759位。M1由252个氨基酸组成,是病毒的主要结构蛋白。M1蛋白具有型特异性，和NP蛋白一起成为病毒分型的依据。M2由97个氨基酸残基组成,为穿膜蛋白。其膜外区(M2e)、穿膜区、胞浆区分别由24、19和54个氨基酸组成。M2蛋白主要以四聚体的形式存在感染细胞的细胞膜上。M2蛋白的离子通道活性可被抗流感病毒药物(如盐酸金刚烷胺）特异性地抑制。M2蛋白在所有A型流感病毒中保守，可潜在地为所有A型流感病毒提供交叉保护。

目前，对M2蛋白免疫学特性研究主要集中在对M2的膜外区域(M2e)区的研究：M2e较为保守,在感染的细胞表面表达丰富；其N端的最初9个氨基酸高度保守，而且M1蛋白N端也有和M2e相同的9个保守氨基酸。

Wainright PO报道，在感染禽流感病毒的鸡群中，非常容易分离到耐盐酸

金刚烷胺的禽流感病毒。在细胞培养上对耐药株的筛选结果同体内及鸡胚内筛选结果不同(WainrightPO et al,1991)。但现有耐盐酸金刚烷胺毒株的显著特点是基质蛋白M2跨膜域第27, 30, 31位氨基酸发生突变。在这些毒株中，没发现有N端的最初9个氨基酸突变的。

所有研究资料显示，大多数致病性流感病毒基质蛋白上含有一段保守九肽: MSLLTEVET，除A/Vietnam/1196/04序列为MSLLTEVPT同MSLLTEVET在第8位氨基酸上有差异外，其它A型流感病毒全部具有该序列；也未见除流感病毒外的其他病毒具有该序列,且大多数其它型流感病毒具有MSLLTE氨基酸序列。同时，基质蛋白M在流感病毒表面的含量丰富，并且MSLLTEVET或其变异表位位于膜外，给诊断提供了方便。

目前，市场上非常缺乏科学简便、易于推广普及的流感与普通感冒鉴别及流感抗体检测试剂。大部分疫病防治单位缺乏必要的检测手段，导致流感的传播难以控制；同时流感的非典型化、多种病原的混合感染使疾病疫情复杂，诊断更加困难。由于疫病不能及时检测与确诊，免疫接种也带有极大的盲目性和投机性。

随着防疫意识的加强，人们也必定会在禽类和其它动物引种、畜禽商品流通及制定合理的免疫计划时加强流感病毒及其抗体水平的检测，因此快速、敏感、特异、价廉且适合基层使用的商品化禽流感诊断试剂的需求量将会越来越大。

发明内容

本发明的目的是: 提供流感病毒的种属特异性抗原表位、变异表位用于对流感、普通感冒的鉴别；提供流感病毒的种属特异性抗原表位、变异表位的高特异性抗体用作流感病毒抗体水平检测。

本发明所提供的流感病毒的种属特异性抗原表位是大多数致病性流感病毒基质蛋白M1和M2所共有的一段保守氨基酸序列，该序列为以下九肽: MSLLTEVET。本发明所提供的流感病毒的种属特异性抗原表位的变异表位是少数（尤其是耐药性）流感病毒基质蛋白M1和M2所共有的一段保守氨基酸序列，该序列的特征为前六个多肽为MSLLTE,后边三个肽为任意氨基酸的组合。本发明所提供的流感病毒的种属特异性抗原表位抗体是可以识别MSLLTEVET和/或MSLLTE的抗体。

本发明利用人工合成的MSLLTEVET和MSLLTE制备出高特异性单抗，利用双抗体夹心法检测流感病毒的基质蛋白的存在进而确定流感病毒的存在。利用本发明制作成的流感快速诊断试剂可快速、准确的区分普通感冒和流感，为临床用药提供科学的依据。利用本发明制作成流感抗体检测试剂盒为流感抗体水平检测、接种免疫及免疫评价提供科学依据。

本发明是这样实现的：

流感病毒检测试剂盒可采用两种方式实现：可以利用人工合成的方法合成MSLLTEVET和MSLLTE多肽，经高压液相纯化得到高纯度的MSLLTEVET和MSLLTE。然后，利用化学的方法将MSLLTEVET和MSLLTE分别和载体蛋白相偶联得到可用于免疫的复合物，同佐剂混合后免疫动物制备MSLLTEVET和MSLLTE的高特异性抗体。然后利用该抗体制备用于流感与普通感冒鉴别的快速诊断试剂盒。该试剂盒的特征为：包被和标记的均为MSLLTEVET和/或MSLLTE抗体，用于检测流感病毒的存在。

还可以通过基因工程的手段，直接表达多肽MSLLTEVET和MSLLTE，或者MSLLTEVET和MSLLTE的融合蛋白，免疫动物制备MSLLTEVET和MSLLTE的高特异性抗体。然后利用该抗体制备用于流感与普通感冒鉴别的快速诊断试剂盒。该试剂盒的特征为：包被和标记的均为MSLLTEVET和/或MSLLTE抗体，用于检测流感病毒的存在。

流感病毒抗体检测试剂盒可以利用人工合成和/或基因工程的方法获得MSLLTEVET和/或MSLLTE多肽、MSLLTEVET和/或MSLLTE多肽偶联复合物、基因工程获得的MSLLTEVET和/或MSLLTE的融合蛋白进行包被和标记制成试剂盒。该试剂盒的特征为：包被物和标记物均为MSLLTEVET和/或MSLLTE多肽、MSLLTEVET和/或MSLLTE多肽偶联复合物、MSLLTEVET和/或MSLLTE的融合蛋白，可用于检测流感病毒抗体的抗体水平。

本发明的积极效应为：

1.本发明可用于鉴别普通感冒和流感，为控制流感的蔓延和临床用药提供科学依据；

2.本发明可以用于检测流感抗体水平，为流感疫苗的接种、免疫效果评价提供科学依据；

3.本发明不仅可以用于人流感及其抗体的检测，还可以应用于其它动物流感及其抗体的检测，使诸如禽流感之类的严重传染病得到有效防制，从而减少疾病所造成的损失和扑灭的花费。

具体实施方式

本发明利用人工合成的MSLLTEVET和MSLLTE（纯度不低于95%）与载体蛋白相偶联，免疫小鼠，制备并筛选单抗，进而完成流感诊断试剂的研制。具体实施实例如下：

1.多肽的获得与偶联：采用人工合成的方法合成多肽MSLLTEVET和MSLLTE，并与牛血清白蛋白（BSA）偶联。

2.MSLLTEVET和MSLLTE单克隆抗体的制备

以 MSLLTEVET 和 MSLLTE 的偶联物作为免疫抗原，免疫 BALB/c 小鼠，将免疫小鼠的脾脏淋巴细胞与骨髓瘤细胞相融合，然后用有限稀释方法获得单克隆。具体步骤如下：

取健康 MSLLTEVET 和 MSLLTE 的偶联物，加入弗氏完全佐剂稀释到 10mg/ml 免疫小鼠，0.1ml/点，共四点。2 周后第二次免疫，剂量同上，腹腔注射。再 2 周后第三次免疫，腹腔注射（5～7 天后采血测其效价）。再过 2～3 周后加强免疫，剂量 0.5ml，腹腔注射。最后一次加强免疫，剂量 0.5ml，腹腔注射，3 天后小鼠拉颈处死，无菌取脾脏，培养液洗一次，将脾脏研碎，过不锈钢筛网，离心，细胞用培养液洗 2 次，计数，取 1×10^7 脾淋巴细胞悬液备用，准备融合。

将 6～10 周大的 BALB/C 小鼠拉颈处死，浸泡在 75%酒精内，3～5min，用无菌剪刀剪开皮肤，暴露腹膜，用无菌注射器注入 5～6ml 预冷的培养液（严禁刺破肠管）反复冲洗，吸出冲洗液放入 10ml 离心管，1200rpm/分离 5～6min，用 20%小牛血清（NCS）的培养液混悬，调整细胞数至 1×10^7/ml，加入 96 孔板，100μl/孔放入 37℃ CO_2 孵箱培养，制得饲养细胞。

将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1: 10 或 1: 5 的比例混合在一起，在 50ml 离心管中用无血清不完全培养液洗 1 次，离心，1200rpm, 8min; 弃上清，用吸管吸净残留液体，以免影响聚乙二醇（PEG）浓度。轻轻弹击离心管底，使细胞沉淀略松动。90s 内加入 37℃预温的 1ml 45%PEG（分子量 4000）溶液，边加边轻微摇动，37℃水浴作用 90s，加 37℃预温的不完全培养液以终止 PEG 作用，每隔 2min 分别加入 1ml、2ml、3ml、4ml、5ml 和 6ml，离心，800rpm, 6min。弃上清，用含 20%小牛血清 HAT 选择培养液重悬细胞。将上述细胞加到已有饲养细胞层的 96 孔板内，每孔加 100μl。一般一个免疫脾脏可接种 4 块 96 孔板。将培养板置 37℃、5% CO_2 培养箱中培养，完成融合。

在用 HAT 选择培养 1～2 天内，将有大量瘤细胞死亡，3～4 天后瘤细胞消失，杂交细胞形成小集落，HAT 选择培养液维持 7～10 天后应换用 HT 培养液，再维持 2 周，改用一般培养液。在上述选择培养期间，杂交瘤细胞布满孔底 1/10 面积时，即可开始筛选所需要的杂交瘤细胞系。在选择培养期间，一般每 2～3 天换一半培养液。最后进行有限稀释得到单克隆：克隆前 1 天制备饲养细胞层（同上）；将要克隆的杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹下，计数，调整细胞为 3～10 个细胞/ml；取前一天准备的有饲养细胞层的细胞培养板，每孔加入稀释细胞 100μl，孵育于 37℃、5% CO_2 孵箱中；在第 7 天换液，以后每 2～3 天换液 1 次。8～9 天可见细胞克隆形成，及时检测抗体活性。将阳性孔的细胞移至 24 孔板中扩大培养。挑取效价高于 8×10^7 的特异性单克隆冻存，并复苏传代，挑取稳定的细胞株冻存备用。

先注射 0.5ml Pristane (降植烷)或液体石蜡于 BALB/C 鼠腹腔，1～2 周后腹腔注射 1×10^6 个杂交瘤细胞，接种细胞 7～10 天后可产生腹水，密切观察动物的健康状况与腹水征象，待腹水尽可能多而小鼠濒于死亡之前，处死小鼠，用滴管将腹水吸入试管中，一般一只小鼠可获 2～5ml 腹水。

将蛋白A-Sepharose置于50倍体积的Tris 缓冲液（pH8.6）中（超过介质50倍v/v），充分溶胀，在室温下将其装入直径2.5cm的玻璃层析柱中，用Tris缓冲液洗以平衡；腹水样品经三倍体积Tris 缓冲液稀释、过滤后，以1-5ml/min速度上样，用Tris缓冲液洗至未结合的蛋白全被洗脱（以A280进行监测）；依次用柠檬酸缓冲液、乙酸盐缓冲液以及甘氨酸--HCl缓冲液连续洗脱结合蛋白；将分部收集的洗脱的蛋白直接装入有中和缓冲液的试管中（所加有的中和缓冲液应为洗脱液的1/4体积）；分部收集的各管洗脱液；用超滤器浓缩所得的单克隆抗体至1-5mg/ml，将浓缩的抗体置-20℃储存。

3.流感病毒鉴别试剂的研制

金标试纸条的研制：将MSLLTEVET和/或MSLLTE的单克隆抗体利用PBS（PH7.8，0.02MPB，0.17MNaCl）稀释到4mg/ml,以点或线的形式包被到NC膜或其他类似性质的膜上；同时将MSLLTEVET和/或MSLLTE的单克隆抗体包被到金、硒等显色物质上制成试纸条，将可疑性患者的鼻腔分泌物、口腔分泌液、血液等稀释一倍后取50ul点到加样膜上,过10-15分钟如果包被MSLLTEVET和/或MSLLTE的单克隆抗体的包被线显色即可认为该患者感染流感病毒。

酶免检测试剂的研制：将MSLLTEVET和/或MSLLTE的单克隆抗体利用CB稀释到1mg/ml,以每孔100ul的量包被到酶标板上；同时将MSLLTEVET和/或MSLLTE的单克隆抗体同辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶相偶联，制成双抗体夹心检测试剂。将可疑性患者的鼻腔分泌物、口腔分泌液、血液等稀释一倍后后取100ul加到加样孔,37℃温浴30分钟，洗板五次后，将MSLLTEVET和/或MSLLTE的单克隆抗体同辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶相偶联的偶联物稀释到10ug/ml加入到加样孔中，37℃温浴30分钟，洗板五次后，加入显色剂显色，如果显色即可认为该患者感染流感病毒。

4.流感病毒抗体鉴别试剂的研制

金标试纸条的研制：将含MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽或多肽偶联物用PBS稀释到4mg/ml,以点或线的形式包被到NC膜或其他类似性质的膜上；同时将MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽或多肽偶联物包被到金、硒等显色物质上制成试纸条，将可疑性患者的口腔分泌液、血液等稀释一倍后取50ul点到加样膜上,过10-15分钟如果包被MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽或多肽偶联物的包被线显色即可认为该患者流感病毒抗体阳性。

酶免检测试剂的研制：将MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽或多肽偶联物利用CB（PH9.5，0.05MCB）稀释到0.01mg/ml,以每孔100ul的量包被到酶标板上；同时将MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽或多肽偶联物同辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶相偶联，制成双抗体夹心检测试剂。将可疑性患者的口腔分泌液、血液等稀释一倍后加100ul于加样孔,37℃温浴30分钟，洗板五次后，将MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽或多肽偶联物同辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶相偶联的偶联物稀释到酶的浓度为1ug/ml时加入到加样孔中，每孔加100ul ，37℃温浴30分钟，洗板五次后，加入显色剂显色10分钟，如果显色即可认为该患者流感病毒抗体阳性。

半定量酶免检测试剂的研制：将MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽或多肽偶联物利用CB（PH9.5，0.05MCB）稀释到0.001mg/ml,以每孔100ul的量包被到酶标板上；并用20%的小牛血清进行封闭，同时将MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽或多肽偶联物同辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶相偶联，将MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽的多抗稀释到500ng/ml、100ng/ml、10ng/ml作为标准对照，制成双抗体夹心检测试剂。将可疑性患者的口腔分泌液、血液等稀释一倍后和三组标定物一起各加100ul于加样孔，37℃温浴30分钟,洗板五次后,将MSLLTEVET和/或MSLLTE的多肽或多肽偶联物同辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶相偶联的偶联物稀释到酶的浓度为0.5ug/ml时加入到加样孔中，每孔加100ul ，37℃温浴30分钟，洗板五次后，加入显色剂显色10分钟，作光吸收曲线来定量。