

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

[21] 申请号 200610037624.6

[43] 公开日 2006年6月28日

[11] 公开号 CN 1793929A

[22] 申请日 2006.1.6

[21] 申请号 200610037624.6

[71] 申请人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼2号

[72] 发明人 孟继鸿 戴星 梁久红 田华
赵宇 董晨 汪源 邓蕾
张红梅

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司
代理人 陆志斌

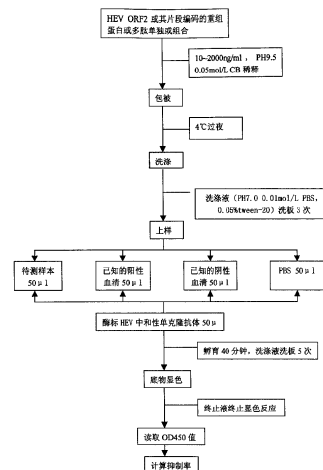
权利要求书1页 说明书21页 附图2页

[54] 发明名称

戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测方法，其特征在于血清(浆)或其他生物学样本中的抗戊型肝炎病毒中和抗体与酶标记戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体竞争结合包被抗原上的中和抗原表位，根据酶作用底物显色反应减弱的程度，实现对生物学样本中的戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测。与现有技术相比，本发明具有：一、简便快速：应用竞争法 ELISA 检测戊型肝炎病毒中和抗体，简便易行。二、特异性强：由于应用戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体作为竞争结合物，能与其产生竞争的仅有戊型肝炎病毒中和抗体，因而具有高度的特异性。三、成本低、安全性好：由于使用 ELISA 方法，实验中所应用试剂生产操作成本低，且不须接触感染性的病毒颗粒或病毒核酸，安全性好。



-
- 1、一种戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测方法，其特征在于血清（浆）或其他生物学样本中的抗戊型肝炎病毒中和抗体与酶标记戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体竞争结合包被抗原上的中和抗原表位，根据酶作用底物显色反应减弱的程度，实现对生物学样本中的戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测。
 - 2、如权利要求 1 所述的戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测方法，包被抗原为不同基因型和亚型的戊型肝炎病毒开放读码框架 2 或其片段编码的重组蛋白或多肽，可单独或组合形成包被抗原。

戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测方法

技术领域

本发明涉及属于血清（浆）抗体的 ELISA 检测方法的血清（浆）中戊型肝炎病毒中和抗体检测方法，尤其涉及戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测方法。

技术背景

戊型肝炎病毒（hepatitis E virus, HEV）是无包膜的单正链 RNA 病毒，经粪口途径传播，引起的急性戊型肝炎（hepatitis E, HE），多表现为急性黄疸型肝炎，易发展为亚急性重症肝炎或淤胆肝炎。根据中华人民共和国卫生部 27 种法定报告传染病疫情报告统计，HE 发病率高，死亡率高，近年来呈逐年上升趋势。2002 年~2005 年 11 月 HE 平均病死率约为 0.37%，远较同样经粪口途径传播的甲型肝炎（0.06%）为高，在病毒性肝炎中高居首位，尤其是孕妇患病，病死率高达 20%甚至 35%，且易感人群多为 15~59 岁的青壮年，危害严重。目前 HE 尚无特异的治疗方法，也无主动和被动免疫制剂可供预防。国内外学者致力于戊型肝炎病毒疫苗的研究。疫苗的有效性在于诱导机体产生中和抗体，与病毒结构蛋白上的中和抗原表位结合，阻断该表位与敏感细胞的细胞膜上的相应受体结合，从而阻止该病毒入侵敏感细胞，发挥疫苗的保护作用。而衡量疫苗是否有效的标准，就是疫苗能否诱导产生中和抗体，以及诱导产生中和抗体的能力，传统采用体内和（或）体外中和试验鉴定疫苗的有效性。目前对戊型肝炎病毒敏感的动物只有非人灵长类动物，然而非人灵长类动物感染戊型肝炎病毒后多为亚临床型感染，难以获得满意的动物模型，而且使用非人灵长类动物建立动物模型，价格昂贵，方法繁琐，试验周期长，动物饲养要求高，耗费大量的人力物力，难以在基层广泛使用。另外，由于戊型肝炎病毒缺乏有效的组织培养体系，传统的体外中和试验鉴定难以进行，1998 年孟继鸿等发明了基于 PCR 和细胞培养的体外

中和试验用以评价戊型肝炎病毒疫苗的有效性,但该体外中和试验需要细胞培养及 RT-PCR 技术,方法繁琐,价格也较昂贵,也难以普遍推广应用。因而开发一种简便易行的检测戊型肝炎病毒中和抗体的方法,是为当务之急。

发明内容

本发明的目的是:研制出戊型肝炎病毒中和抗体竞争酶联免疫检测方法,代替戊型肝炎病毒体内和(或)体外中和试验,克服体内和(或)中和试验方法繁琐、昂贵、费时、费力的缺点,评价疫苗的有效性。

本发明是这样实现的:一种戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测方法:血清(浆)或其他生物学样本中的抗戊型肝炎病毒中和抗体与酶标记戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体竞争结合包被抗原上的中和抗原表位,根据酶作用底物显色反应减弱的程度,实现对生物学样本中的戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测。

上述包被抗原为不同基因型和亚型的戊型肝炎病毒开放读码框架 2 或其片段编码的重组蛋白或多肽,可单独或组合形成包被抗原。

本发明的积极效果:一、简便快速:应用竞争法 ELISA 检测戊型肝炎病毒中和抗体,简便易行,可随时随地进行,克服了体内和(或)体外中和试验方法繁琐、费时费力的缺点,可用于科研院所开发疫苗的实验评价,也可在基层推广应用。二、特异性强:由于应用戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体作为竞争结合物,能与其产生竞争的仅有戊型肝炎病毒中和抗体,因而具有高度的特异性。三、成本低、安全性好:由于使用 ELISA 方法,实验中所应用试剂生产操作成本低,克服了体内中和试验使用非人灵长类动物,价格昂贵、耗时、耗力的缺点,且无须接触感染性的病毒颗粒或病毒核酸,不会对任何环境造成污染,安全性好。四、社会效益好:戊型肝炎病毒感染呈逐年上升趋势,HE 病死率高,青壮年易感,危害严重,疫苗的应用是预防传染病的重要措施,建立简便有效的疫苗评价方法,可以对疫苗的有效性进行较好的评价,降低社会防治成本,具有良好的社会效益。

附图说明

图 1 是本发明实施例所采用竞争 ELISA 检测戊型肝炎病毒疫苗免疫恒河猴血清抗-戊型肝炎病毒中和抗体的结果图。

图 2 是本发明戊型肝炎病毒中和抗体竞争酶联免疫检测方法流程示意图。

具体实施方式

以下实施例详述本发明：

1、 包被抗原的获得

包被抗原来自不同基因型和亚型的戊型肝炎病毒开放读码框架 2 或其片段编码的重组蛋白或多肽，可单独或组合形成包被抗原。下面以具有代表性的 7 株戊型肝炎病毒为例详述包被抗原的获得。

7 株戊型肝炎病毒分别为来自第 I 基因型 Ia 亚型的戊型肝炎病毒缅甸株 (M 73218)、Ib 亚型的戊型肝炎病毒巴基斯坦株 (M80581)、Ic 亚型的戊型肝炎病毒摩洛哥株 (AY230202)，来自第 II 基因型的戊型肝炎病毒墨西哥株 (M74506)，来自第 III 基因型的戊型肝炎病毒美国株 (AF060668) 和戊型肝炎病毒新西兰猪株 (AF082843)，以及来自第 IV 基因型的戊型肝炎病毒中国株 (AJ272108)。

7 株戊型肝炎病毒 ORF2 编码核苷酸序列分别为：

戊型肝炎病毒缅甸株 (M 73218) ORF2:

```
AtgCGCCctcggcctatttGtGctGctcctcatgttttgcctatgctgcccgccaccgcccggtcagccgtctg
gccgCCgtcgtggcggcgcagcggcgggttcggcgggtggttctggggtagaccgggtgattctcagcccttcgaatc
ccctatattcatccaaccaacccttcgccccgatgtcaccgctgCGGCCggggtgacctcgtgttcgcaaccgccc
cgaccactcggctccgcttggcgtgaccaggcccagcggccgCGgtgcctcagctcgttagacctaccacagctgggg
ccgcgccgctaaccCGgtcgtccggcccatgacaccccgccagtgctgatgtcactcccCGggcgccatcttgccg
ccggcagtataacctatcaacctctccccttacctctccgtggccaccggcactaacctggttctttatgccgcccctcttagt
ccgcttttacccttcaggacggcaccataccatataatggccacggaagcttctaattatgccagtagccgggtgccc
gtgccacaatccggttaccgcccgtggtcccaatgctgtcggcggttacgcatctccatctcattctggccacagaccac
```

caccaccccgacgtccgttgatatgaattcaataacctcgacggatgttcgtatatttagtccagcccggcatagcctctgagct
 tggatcccaagtgagcgcctacactatcgaaccaaggctggcgctccgtcgagacctctgggggtggctgaggaggagg
 ctacctctggtcttggtatgcttgcatacatggctcactcgtaaattcctataactaatacacctataaccggtgccctcgggctg
 ttggacttggccttgagcttgagttcgaaccttacccccggtaacaccaatacgcgggtctcccgtattccagcactgct
 cgccaccgccttcgtcgcgggtcgggacgggactccgagctcaccaccacggctgctaccgctttatgaaggacctcta
 tttactagtactaatggtgtcgggtgagatcgccgcgggatagccctcacctgttcaaccttgctgacactctgcttggcgg
 cctgccgacagaattgatttcgtcgggtggtggccagctgttctactcccgtcccgttctcagccaatggcgagccgact
 gtttaagttgtatacatctgtagagaatgctcagcaggataagggtattgcaatcccgatgacattgacctcggagaatctcg
 tgggttattcaggattatgataaccaatgaacaagatcgccgacgccttctccagcccatcgcgccctttctctgtcct
 tcgagctaataatgatgtcttggctctctcaccgctccgagatgaccagtccacttatggctcttcgactggcccagttat
 gtttctgactctgtgaccttggtaatgttgcgaccggcgcgagggcgttggccggtcgtcgtcgttggaccaaggtcacact
 tgacggtcgccccctctccaccatccagcagtactcgaagaccttcttctcctgccgctccgcggtaagctctctttctggg
 aggcaggcacaactaaagccgggtacccttataattataacaccactgctagcgaccaactgcttctcagagaatgccgccg
 ggcaccgggtcgtatttccacttacaccactagcctgggtgctgggtccgtctccatttctcgggttggcgttttagcccccc
 actctgcgctagcattgcttgaggataccttgactaccctgccgcgccatactttgatgatttctgccagagtccggcc
 cccttggcctcagggtcgcgcttccagtctactgtcgtgagcttcagcgccttaagatgaaggtgggtaaaactcggga
 gttgtag

戊型肝炎病毒巴基斯坦株 (M80581) ORF2:

Atgcgccctcggcctattttgctgttctcctcatgttctgcctatgctgcccgccaccgcccggcagccgctg
 gccgccgtcgtgggcggcgcagcggcgggtccggcggtggttctggggtgaccgggtgattctcagcccttcgcaatc
 ccctatattcatccaaccaaccccttcgccccgatgtcaccgctcggccgggggtggacctcgtgttcgccaaccgcc
 cgaccactcggctccgcttggcgtgaccaggcccagcggccgcccgtcctcacgtcgtagacctaccacagctgggg
 ccgcccgttaaccggtcgtcggccatgacacccgccagtcctgatgttactcccggcggccatcctcgcg
 ccggcagataacctatcaacatctccccctacctcttccgtggccaccggcacaatttggttctttacgccctccttag
 cccgcttctaccctccaggacggcacaataactcatataatggctacagaagcttcaattatgccagtagccgggtgctc
 gtgccacaattcgtaccgcccgtgttcccaacgctgttgggtgctacgtatctccatttcttggccacagaccacc
 accaccccgacgtccgttgacatgaattcaataacctcgacggatgtccgtatttttagtccagcccggcatagcctccgagc

ttgttattccaagtgagcgcctacactatcgcaaccaaggtggcgcctctgtgagacctccggggtggcggaggaggagg
 ccacctctggctctgtcatgctctgcatacatggctcacctgtaaattcttataactaatacacctataccggtgccctcgggct
 gtggactttgccctcgaactgagttccgcaacctacccccggaataaccaatacgcgggtctcgcgttactccagcactg
 cccgtcaccgccttcgtcgcgggtgcagatgggactgccgagctcaccaccacggctgctactcgttcatgaaggacctct
 atttactagtactaatggtgttggtgagatcggccgcccgatagcgttaccctgttaacctgctgacacctgcttggcg
 gtctaccgacagaattgatttcgtcggctggtggccagctgttctactctcgcctcgtctcagccaatggcgagccgact
 gtttagctgtatacatctgtggagaatgctcagcaggataagggtattgcaatcccgcgatgacatcgacctcggggaatccc
 gtgtagttattcaggattatgacaaccaacatgagcaggaccgaccgacacctccccagccccatcgcgtccttttctgtc
 ctccgagctaacgatgtgctttggctttctcaccgctgccgagatgaccagtccacttacggctcttcgaccggcccagt
 ctatgtctctgactctgtgacctggtaatgttgcaccggcgcgcaggccgttcccggctactcgactggaccaaggctc
 aacttgatggtcgcctccctccaccatccagcagattcaagaccttcttgcctgccgctccgcggtaagctctcctttt
 gggaggcaggaactactaaagccgggtacccttataattataacaccactgctagtgaccaactgctcgttgagaatgccg
 ctgggcatcgggtgctattccacactactagcctgggtgctggccccgtctctattccgcggttctgcttttagcccc
 ccactctgtgctagcattgcttgaggataccatggactacctgcccgcgccatacttcgatgacttctgccggagtgcc
 gcccccttggcctccagggtgtgctttcagctactgtcgtgagcttcagcgccttaagatgaagggtgggtaaaactcgg
 gagttatag

戊型肝炎病毒摩洛哥株 (AY230202) ORF2:

Atgcgccctcggcctattttgtgctgttcctcatgtttctgcctatgttcccgcgccaccgtccggctcagccgtctgg
 ccgccgtcgtggcggcgcagcggcgggtccggcgggtggttctggggtgaccgggtgattctcagcccttcgaatcc
 cctatattcatccaaccaacccttcgccccgatgtcaccgctgcggccgggctggacctcgtgttcgcaaccgcc
 gaccactcggctccgcttggcgtgaccaggcccagcgcctccgctgcctcacgtcgtgacctaccacagctggggc
 cgcgccgctgactgcgggtgtcggcccatgataccccgcctgtgcccgatgttgattctcggcgcctatcttgcgccg
 gcagtataatcittcaacatcccctctacctcctccgtggccactggcaccaatttggctcctttatgctgccctcttagcccgc
 ttttccccctcaggacggcacaatactcatataatggccacggaggctccaattatgccagttaccgagttgccgcgc
 cacaatccgctaccgccctctggttccaatgctgttgggtgctatgctatctctatcgttctggccgcagaccactaccac
 cccgacgtccgtcagatgaattctataacctcagcggatgttcgtattctcgtccagcccgtattgcctcagagcttggat
 tccaagtgaacgcctgcattatcgcaaccagggttggcgtctgttgaacctccggggtggcggaggaggaggccacct

ctggccttgtcatgctttgtatacatggctcacctgtgaactcttatactaacacaccttacactgggtccctcgggttggtgat
 tttgctctcagacttgagttccgcaacctcaccctggtaacaccaatacacgggttcccgtactctagcaccgccgcca
 ccgtcttcgccgtggcgcagacgggactgccgagctcaccaccacggctgcgactcgtttatgaaggatctctattttcta
 gcactaatgggttggcgagatggccgcgggatagccctfacctgtttaatcttctgacaccctgcttggcggcctacc
 gacagaattgatttcgtcggctgggtggccaactgtttactctcggccggctcgtctcagccaatggcgagccgactgcaag
 ctgtatacatctgtagagaatgctcagcaggataagggtattgcaatccctcacgacatcgacctgggggaatctcgtgtagt
 catccaggattatgacaatcagcatgagcaggaccgtccgacacctcccagccccgtctcggccttttctgttctccggg
 ccaatgatgtgcttggctctctctactgctgctgagtatgatcagtcacctatggctcttctactggcccagctatgtctcc
 gactctgtgaccttggcaatgttgcgaccggcgcgagccggtgctcggctcgttactggactaagggtcacacttgatg
 gccgccctcttctactatccagcagattcgaagactttcttctcctcggccttcgtggttaaactttcctctgggaggcaggt
 accactaaagccgggtacccttacaattataataactactgctagtgaccaactgctcgttgagaatgccgccgggcaccgg
 gtggctatttccacctacaccactagcttgggtgctggccctgtctcatttctcgggtggctgctcggccccactctcgcg
 ttagcactgcttgaggataccctggattaccctgctcgcgccatactttgatgatttctgccagagtgccgcccccctcggc
 ctccagggtgcgccttccagtcactgctgctgagctccagcggcttaagatgaaggtgggtaaaactcgggagttatag

戊型肝炎病毒墨西哥株 (M74506) ORF2:

Atgcgccttaggcctcttttctgtgttctcttctgttctgcctatgtgcccgcgccaccgaccggctcagccgtctgg
 ccgccgtcgtggcgggcgcagcggcggtaccggcggtgttctgggggtgaccgggtgattctcagcccttcgcaatcc
 cctatattcatccaaccaaccctttgccccagacgttccgctgcgctccgggtctggacctcgccttcgcaaccagcccc
 gccacttggctccacttggcgagatcaggcccagcggcctccgctgcctcccgtcggcactgccacagccggggct
 gcggcgctgacggctgtggcgctgccatgacacctaccctccggacgttgattctcgggtgcaattctacgccg
 ccagtataatttctacttcaccctgacatcctctgtggcctctggcactaatttagctctgtatgcagcccccttaatccgc
 ctctgccgctgcaggacgggtactaatactcacattatggccacagaggcctccaattatgcacagtaccgggttggccgcg
 ctactatccgttaccggcccctagtgcctaatagcagttggaggctatgctatatccatttcttctggcctcaacaaccacaac
 ccctacatctgttgacatgaattccattactccactgatgacaggttctgttcaacctggcatagcatctgaattggtcatccc
 aagcgagcgccttactaccgcaatcaaggtggcgctcgggtgagacatctggtgttctgagggaggaagccacctccg
 gtcttgcattgtatgcatacatggctctccagtttaactcctataccaataacccttataaccgggtgcccttggcttactggactttg
 ccttagagcttgagtttcgcaatctcaccacctgtaacaccaatacacgtgtgtcccgttactccagcactgctcgtcactccg

cccgagggggccgacgggactgcggagctgaccacaactgcagccaccagggtcatgaaagatctccactttaccggcctt
 aatggggtaggtgaagtcggccgcgggatagcttaacattacttaaccttgcacacgctcctcggcgggctcccgaca
 gaattaatttcgtcggctggcgggcaactgtttattcccgccgggtgtctcagccaatggcgagccaaccgtgaagctcta
 tacatcagtgagaaatgctcagcaggataagggtgttctatccccacgatatcgatcttggtgattcgcgtgtggtcattca
 ggattatgacaaccagcatgagcaggatcgcccaccccgtcgcctgcgccatctcggccttttctgttctccgagcaaat
 gatgtactttggctgtcctcactgcagccgagtatgaccagtccacttacgggtcgtcaactggcccggttatatctcgga
 cagcgtgactttggtgaatgttgcgactggcgcgcaggccgtagccgatcgttactggtccaaagtcaccctcgacgg
 gggcccctcccgactgttgagcaatattccaagacattcttctgtctccccctcgtggcaagctctcctttgggaggccg
 gcacaacaaaagcagggtatccttataattataactactgctagtaccagattctgattgaaaatgctgccggccatcggg
 tcgccattcaacctataaccaggcttggggccgggtccggctgccatttctcggccgcggtttggctccacgctccgc
 cctggctctgctggaggatactttgattatccggggcgggcgcacacattgatgacttctgccctgaatgccgcgcttag
 gcctccagggtgtgctttccagtcactgtcgtgagctccagcgcctaaagttaagggtgggtaaaactcgggagttgtag

戊型肝炎病毒美国株 (AF060668) ORF2:

Atgcgccctagggctgttctgttgttctcctcatgtttctgcctatgctgcccgcgccaccggccggcagccgtctg
 gccgtcggcgtgggcggcgcagcggcggtgccggcggtgttctggagtacaggggtgattctcagccctcgcctc
 ccctatattcatccaaccaacccctcgcggccgatgtcgtttcacaacccggggctggaactcgcctcgacagccgcc
 cgccccctcggttccgcttggcgtgaccagtccaagcggccctccgttccccccgtcgtc gatctacccagctggggct
 gcggcgtaactgcoatatcaccagcccctgatacagctcctgtacctgatgttactcacgtggtgctatttgcgccggca
 gtacaattgtctacgtccccgcttacatcatctgttctctggtactaatctggttctctatgctgccccgctgaacctctctt
 cctctcaggatggccaacactcatattatggctactgaggcatctaattacgccagtatcgggtgttcgggctacgatt
 cgttatcggccgttgggtccaaatgctgttgggtgtatgtatctctatttcttctggcctcaaactacaactaccctacttct
 gttgacatgaattctacttactgatgacaggtcgttccagcccgggtatagcctccgagttagtcacccctagtgaac
 gccttactaccgcaaccaaggctggcgtctgttggaccacgggtgtggccgaagaggaggctacctccggtctggta
 atgctttgtattcatggctcccctgttaactcctacactaatacaccttacaccggtgcattggggcttcttgatttgcattagaa
 ctgaatttagaatttgacaccgggaacactaacaccctgtttcccgggtatactagcacagcccgccaccggctgcgcc
 gcgggtgctgatgggaccgctgagctcaccaccacagcagccacacgcttcatgaaggattgcatttactggctacgaacg
 gcgttggtaggtgggtcgtggtattgccctgactctgttaacttctgctgatacgttcttgggtgttaccgacagaattgatt

cgtcggctgggggtcaactgtttactcccgccctgtgtctcggccaatggcgagccaacagtaaagtatacacatctgtt
gagaatgcgcagcaagacaagggcatcaccattccacacgacatagatttaggtgactcccgtgtggttatccaggattatg
ataaccagcacgaacaagatcgacctaccccgtcacctgccccctcccgcccttctcagttctctgtccaatgatgtttgt
ggctctctctcactgccgctgagtagrccagaccacgtatgggtcgtccaccaaccctatgtatgtctctgatacagtcag
cttgtaatgtagccactgggtgctcaggctgtgcccgtctcttactggtctaaagtactctggatggcgcctcttactac
cattcagcagtattctaagaaattttatgttctcccgttcgsgggaagctgtcctttgggaggctggtagaccaaggccgg
ctacccgtataattataataaccactgctagtaccaaaatttgattgagaacgcggccggcaccgtgtgccatttctactat
accactagttgggtgccggccctacctcgatytctggcgtcgggtgactagctccacattcggcccttctgttctcgaggat
actgttgattatcctgctcgtgccatactttgatgatttctgccggagtgtcgcacccttggctcgcagggttgatcca
atctactattgcigaactcagcgtcttaaaatgaaggtaggtaaaaccgggagtctaa

戊型肝炎病毒新西兰猪株 (AF082843) ORF2:

atgcgccctagggtgttctgttgttctctcgtcctctgcctatgtgcccgccaccggccggccagccgtct
ggccgccgttggggcggcgcaacggcgggtgccggcgggttctggggtgacagggtgattctcagcccttcgccct
cccctatattcatccaaccaacccttcgctgccgatgtcgttcacaaccggggctggagtccgctcgacagccgccc
cgcccccttggtccgcttggcgtgaccagtcaccgccccctcactgcccccgctcgtcgtatctgccccagctggggc
tgcgccgctgactgctgtatcaccggccccgacacagctcctgtacctgatgtgactcacgtggtgctatcctgcgccg
cagtacaatctgtctacgtccccgctcacgtcatctgtcgtcgtgtgtaccaacctggttctctatgccgccccgctgaatcct
ctcttgcctccaggatggcaccacactcatattatggctactgaggcgtccaattatgctcagtatcgggttgttcgagct
acgatccgttatgcccgctggtgccaatgctgttgggtatgctatctctatttcttctgacctcaactacaaccaccc
ctacttcagttgacatgaactctattacctcactgatgtcaggatgttgggtcagcccgggtattgcctccgagttagtcaccc
agtgagcgccttcattaccgcaatcaaggctggcgtctgtagagaccacggcgtggccgaggaggaagctacctccg
gtctgtaatgcttgcattcacggttctcctgttaactctataactaacacaccttactggtgattggggctccttgatttg
cattagagcttgaattcagaaattgacaccgggaactaacaccggttcccgttacaccagcacagcccgccatc
ggctgcgccggtgctgatgggaccgcagagcttaccaccacagcagccacacgttcatgaaggactgcattcacc
ggcacgaacggcgttgggtgaggtgggtcgcggtatagcttaactgttaacctgctgatacgttcttgggtgttacc
gacagaattgattcgtcggccggggccaactgtttactcccgccctgtcgtctcggccaatggcgagccgacgggtaa
gttatatacatctgttgagaatgcgcagcaggacaagggcattaccatccacacgatatagatctgggtgattcccgtgtg

ttattcaggattatgataaccagcacgagcaagaccgacctactccgtcaccagccccctctcgcctttctcagttcttcgcg
 ccaatgatgttctgtggctctccctcaccgccgctgagtacgatcagactacatatgggtcgtccaccaacctatgtatgtct
 ccgatacgggtcacgctagtaaatgtggccactgggtgctcaggtgttggccgctctcttgattgggtctaaagtcactctggatg
 gccgccccctcactaccattcagcagattcaagacattctatgttctccgctccgcggaagctgtcctttggagggt
 ggtaccactaaggccggctaccctgataattataataaccactgctagtatcaaatgttattgagaacgggctggccaccg
 tgttgctatctctacatacactagcttgggtgccggccctacctcgattccgcttgggtgtgtagccccacactcggc
 tctcggctcctgaggatactgtgattaccctgctcgtgctcacttttgatgattctgccggagtccgcacccttggttt
 gcagggttgtgattccagctactattgctgagctcagcgtctaaatgaaggtaggtaaaaccgggagtctaa

戊型肝炎病毒中国株（AJ272108）ORF2:

atgaataacatgttctttgctccgtgcatggagatgccaccatgcgctctcgggctcttctgttctcctctcgtcttc
 tgcctatgttggccgcccaccggccggctcagccgtctggccgtcggcgggcaagcggggtcggcggtggtttctg
 ggtgaccgggtgattctcagccctcggccctccctatattcatccaaccaacccctcgcactctgacattccagccgcc
 ccgggactggagctcggccctcggcagccaatccgtccactcggctccgcttggcgtgaccagtcccagcggcccggcc
 ttccaccgctcgtcagctgccccagctggggctcggcgttactgctgtggctcggctcctgacactgcacctgtcccc
 gatgctgattcccgtggcgtattctacgccccagtagcaattgtccacatccccgctcacgtccactattgcaactggcac
 caatttctgctatatgctgccccacttagtcccctgctaccgctcaggatggcaccataaccacatcatggctactgaagc
 atctaattatgccagtagctgtgttctgctgctaccatccgatatgcccttgggtgccgaatgccgttggcgggtatgccata
 tctatctcctttggcctcagacaacgaccaccccaacgtctgttgatagaattcaattacctccactgatgtccgcattctgt
 ccagcctggtagcttctgagttgtaactccagtgagcgcctcattatcgaatcaaggatggcgttcgggtgagacct
 ctgggtcgtgaggaagaagcagctctggcctgttatgcttgcattcatgggtcacctgtgaattcctatactaatacacc
 ttataccggtgccctcggcttacttgacttgcactcagctcaggttcgcaatttgacacctggtaacaccaatacgcgcgtt
 tctcgttattcagtagcgcgctcacaactcgcggaggcctgatgtactgctgagttgactactactgccgccacac
 gttttatgaaagacctccattttacggggactaatggtgttgggtgaggtcggctgtggtatagcgttaactttgttaacttctgctg
 atacgcttctcgggtggctccgacagaattgattcgtcggcagggggtcagttattctactcccggccgttctcagcca
 atggcgagctgacagtgaactttacacttcagtcgagaacgctcagcaggacaagggtgtagctattccacatgatattga
 ccttgggtgagctccgctgtggttattcaggattatgacaaccaatgagcaagatcgtcccactcccctcccctcctcctc
 tccattttctgttctcgtgctaatgatgtgcttggcttctactactgctgctgagtagatcaaacgacttatggctcctctacca

accctatgtatgttctgacactgttacatttgttaacgtagcgactgggccaggggttcgcgctctctggattggctaa
 ggtcactctcgaatggccgtccactcaccaccatccagcagatttctaagactttctatgtcttgccccttcgtgtaagcttccct
 ttgggagggccggcaccactaaagccggctaccctataattataacactactgctagtgaccagatcctgattgagaatgca
 gcgggccaccgagtttgcactctactacactaactgggctccggcctgtgtctgtatctgctgttggtgctcctgcc
 cctcactctgcgctggctgctttggaggataccgctgactaccctgctcgcgccatactttgatgatttctgccctgaatgc
 cgtgcactcggcctcagggttgcctccaatctactgttggtgagttacagcgtctaaatgaaggtgggtaaaccg
 ggagtattga

7 株戊型肝炎病毒 ORF2 编码蛋白的氨基酸序列分别为：

戊型肝炎病毒缅甸株 (M 73218) pORF2:

MRPRPILLLLMFLPMLPAPPPGQPSGRRRGRRSGGSGGGFWGDRVDSQP
 FAIPYIHPTNPFAPDVTAAGAGPRVRQPARPLGSAWRDQAQRPAVASRRRPTT
 AGAAPLTAVAPAHDTPPVPDVDSRGAILRRQYNLSTSPVTSSVATGTNLVLYAA
 PLSPLLPLQDGTNTHIMATEASNYAQYRVARATIRYRPLVPNAVGGYAISISFWP
 QTTTTPTSVDMSITSTDVIRILVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRSVETSGVA
 EEEATSGLVMLCIHGSLVNSYTNTPYTGALGLLDFALELEFRNLTPGNTNTRVS
 RYSSTARHRLRRGADGTAELTTAATRFMKDLYFTSTNGVGEIGRGIALTLFNL
 ADLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGIAIPH
 DIDLGESRVVIQDYDNQHEQDRPTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQ
 STYGSSTGPVYVSDSVTLNVNATGAQAVARSLDWTKVTLTLDGRPLSTIQQYSKT
 FFVLPLRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQLLVENAAGHRVAISTYTTSL
 GAGPVSISAVAVLAPHSALALLEDTLDPARAHTFDDFCPECRPLGLQGCAFAQ
 STVAELQRLKMKVGKTREL.

戊型肝炎病毒巴基斯坦株 (M80581) pORF2:

MRPRPILLLLMFLPMLPAPPPGQPSGRRRGRRSGGSGGGFWGDRVDSQP
 FAIPYIHPTNPFAPDVTAAGAGPRVRQPARPLGSAWRDQAQRPAASRRRPT
 TAGAAPLTAVAPAHDTPPVPDVDSRGAILRRQYNLSTSPVTSSVATGTNLVLYA

APLSPLLPLQDGTNTHIMATEASNYAQYRVARATIRYRPLVNPNAVGGYAISISF
 WPQTTTTPTSVDMSITSTDVRLVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRSVETSG
 VAEEEATSGLVMLCIHGSPVNSYTNTPYT GALGLLDFALELEFRNLTPGNTNTR
 VSRYSSTARHRLRRGADGTAELTTTAATRFMKDLYFTSTNGVGEIGRGIALTLF
 NLADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGIA
 IPHDIDLGESRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEY
 DQSTYGSSTGPVYVSDSVTLNVATGAQAVARSLDWTKVTL DGRPLSTIQQYS
 KTFVPLRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQLLVENAAGHRVAISTYT
 TSLGAGPVSISAVAVLAPHSVLALLEDTMDYPARAHTFDDFCPECRPLGLQGC
 AFQSTVAELQRLKMKVGKTREL.

戊型肝炎病毒摩洛哥株 (AY230202) pORF2:

MRPRPILLFLMFLPMLPAPPSGQPSGRRRGRSSGGGGFWGDRVDSQP
 FAIPYIHPTNPFAPDVTAAGAGPRVRQPARPLGSAWRDQAQRPAASRRRPT
 TAGAAPLTAVAPAHDTTPVPDVSARGAILRRQYNLSTSPLTSSVATGTNLVLYA
 APLSPLLPLQDGTNTHIMATEASNYAQYRVARATIRYRPLVNPNAVGGYAISISF
 WPQTTTTPTSVDMSITSTDVRLVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRSVETSG
 VAEEEATSGLVMLCIHGSPVNSYTNTPYT GALGLLDFALELEFRNLTPGNTNTR
 VSRYSSTARHRLRRGADGTAELTTTAATRFMKDLYFSSTNGVGEIGRGIALTLF
 NLADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGIA
 IPHDIDLGESRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEY
 DQSTYGSSTGPVYVSDSVTLNVATGAQAVARSLDWTKVTL DGRPLSTIQQYS
 KTFVPLRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQLLVENAAGHRVAISTYT
 TSLGAGPVSISAVAVLAPHSALALLEDTLDYPARAHTFDDFCPECRPLGLQGCA
 FQSTVAELQRLKMKVGKTREL.

戊型肝炎病毒墨西哥株 (M74506) pORF2:

MRPRPLLLLFLFLPMLPAPPTGQPSGRRRGRSSGGTGGGGFWGDRVDSQP
 FAIPYIHPTNPFAPDVAAASGSGPRLRQPARPLGSTWRDQAQRPSAASRRRPAT

AGAAALTAVAPAHDTSPPVDVDSRGAILRRQYNLSTSPILTSSVASGTNLVLYAA
 PLNPPLPLQDGTNTHIMATEASNYAQYRVARATIRYRPLVPNAVGGYAISISFWP
 QTTTTPTSVDMSITSTDVRLVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRSVETSGVA
 EEEATSGLVMLCIHGSPVNSYTNTPYTGA LGLLDFALELEFRNLTCNTNTRVS
 RYSSTARHSARGADGTAELTTAATRFMKDLHFTGLNGVGEVGRGIALTLLNL
 ADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGVAIP
 HDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYD
 QSTYGSSTGPVYISDSVTLVNVATGAQAVARSLDWSKVTLDGRPLPTVEQYSK
 TFFVLPLRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQILIENAAGHRVAISTYTTRL
 GAGPVAISAAVLA PRSALALLEDTFDYPGRAHTFDDFCPECRALGLQGCAFAQ
 STVAELQRLKVKGKTREL.

戊型肝炎病毒美国株 (AF060668) pORF2:

MRPRAVLLLFLMFLPMLPAPPAGQPSGRRRGRRSGGAGGGFWSDRVDSQ
 PFALPYIHPTNPFAADVVSQPGAGTRPRQPPRPLGSAWRDQSKRPSVAPRRRST
 PAGAAPLTAISPAPDTAPVPDSDRGAILRRQYNLSTSPILTSSVASGTNLVLYAA
 PLNPLLPLQDGTNTHIMATEASNYAQYRVVRATIRYRPLVPNAVGGYAISISFW
 PQTTTTPTSVDMSITSTDVRLVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRSVETTGV
 AEEEATSGLVMLCIHGSPVNSYTNTPYTGA LGLLDFALELEFRNLTPGNTNTRV
 SRYTSTARHRLRRGADGTAELTTAATRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLF
 NLADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKGITI
 PHDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEY
 XQTTYGSSTNPMYVSDTVTLVNVATGAQAVARSLDWSKVTLDGRPLTTIQQY
 SKKFYVLPLRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQILIENAAGHRVAISTYT
 TSLGAGPTSISAVGLAPHSALAVLEDTVDPARAHTFDDFCPECRTLGLQGC
 AFQSTIAELQRLKMKVGKTRES.

戊型肝炎病毒新西兰猪株 (AF082843) pORF2:

MRPRAVLLLLFVLLPMLPAPPAGQPSGRRCGRRNGGAGGGFWGDRVDS

QPFALPYIHPTNPF AADVVSQPGAGVRPRQPPRPLGSAWRDQSQRPSTAPRRR
 SAPAGAAPLTAVSPAPDTAPVPDVDSRGAILRRQYNLSTSP LSSVAAGTNLVLY
 AAPLNPLLPLQDGTNTHIMATEASN YAQYRVVRATIRYRPLVPNAVGGY AISIS
 FWPQTTTTPTSVDMNSITSTDV RILVQPGIASELVIPSERLHYRNQGWRSVETT
 GVAEEEATSGLVMLCIHGSPVNSYTNTPYT GALGLLDFALELEFRNLTPGNTNT
 RVSRYTSTARHRLRRGADGTAE LTTTAATR FMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALT
 LFNLADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGEPTVKLYTSVENAQQDKG
 ITIPHDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTA A
 EYDQTTYGSSTNPMYVSDTVTLVNVATGAQAVARSLDWSKVTL DGRPLTTIQ
 QYSKTFYVLPLRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQIL IENAAGHRVAIST
 YTTSLGAGPTSISAVGVLAPHSALAVLEDTVDPARAHTFDDFCPECRTLGLQ
 GCAFQSTIAELQRLKMKVGKTRES.

戊型肝炎病毒中国株 (AJ272108) pORF2:

MNNMFFCSVHG DATMRSRALLFLLFVLLPMLPAPPAGQPSGRRRRGQAGC
 GGGFWGDRVDSQPFALPYIHPTNPFASDIPAAAGTGARPRQPIRPLGSAWRDQ
 SQRPAASTRRRPAPAGASPLTAVAPAPDTAPVPDADSRGAILRRQYNLSTSP LTS
 TIATGTNFVLYAAPLSPLLPLQDGTNTHIMATEASN YAQYRVVRATIRYRPLVP
 NAVGGY AISISFWPQTTTTPTSVDMNSITSTDV RILVQPGIASELVTPSERLHYR
 NQGWRSVETSGVAEEEATSGLVMLCIHGSPVNSYTNTPYT GALGLLDFALELE
 FRNLTPGNTNTRVSRYS SARHKLRRGPDGTAE LTTTAATR FMKDLHFTGTNG
 VGEVGRGIALTLFNLADTLLGGLPTELISSAGGQLFYSRPVVSANGELTVKLYT
 SVENAQQDKGVAIPHDIDLGESRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPFSVLR A
 NDVLWLSLTA AEYDQTTYGSSTNPMYVSDTVTFVNVATGAQGVSRS LDWSK
 VTL DGRPLTTIQQYSKTFYVLPLRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQILI
 ENAAGHRVCISTYTTNLGSGPVSVSAVGVLAPHSALAALEDTADYPARAHTF
 DDFCPECRALGLQGCAFQSTVGELQRLKMKVGKTREY.

抗原蛋白选择戊型肝炎病毒 ORF2 或其片段编码的重组蛋白或多肽, 优选

戊型肝炎病毒 ORF2 编码第 452~617 位氨基酸之间 166 个氨基酸的重组蛋白，命名为 p166，氨基酸序列如下：

戊型肝炎病毒缅甸株 (M 73218) p166Bur:

TPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQSTYGSSTGPVYVSDSVTLVN
VATGAQAVARSLDWTKVTL DGRPLSTIQQYSKTFFVLPLRGKLSFWEAGTTKA
GYPYNYNTTASDQLLVENAAGHRVAISTYTTSLGAGPVSISAVAVLAPHSALAL
LEDTLDYP

戊型肝炎病毒巴基斯坦株 (M80581) p166Sar:

PTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQSTYGSSTGPVYVSDSVTLV
NVATGAQAVARSLDWTKVTL DGRPLSTIQQYSKTFFVLPLRGKLSFWEAGTTK
AGYPYNYNTTASDQLLVENAAGHRVAISTYTTSLGAGPVSISAVAVLAPHSVL
ALLEDTMDYP

戊型肝炎病毒摩洛哥株 (AY230202) p166Mor:

PTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQSTYGSSTGPVYVSDSVTLV
NVATGAQAVARSLDWTKVTL DGRPLSTIQQYSKTFFVLPLRGKLSFWEAGTTK
AGYPYNYNTTASDQLLVENAAGHRVAISTYTTSLGAGPVSISAVAVLAPHSAL
ALLEDTLDYP

戊型肝炎病毒墨西哥株 (M74506) p166Mex:

PTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYDQSTYGSSTGPVYISDSVTLVN
VATGAQAVARSLDWSKVTL DGRPLPTVEQYSKTFFVLPLRGKLSFWEAGTTK
AGYPYNYNTTASDQILIENAAGHRVAISTYTTSLGAGPVAISAAAVLAPRSALA
LLEDTFDYP

戊型肝炎病毒美国株 (AF060668) p166Us:

PTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTAAEYXQTTYGSSTNPMYVSDTVTLV
NVATGAQAVARSLDWSKVTL DGRPLTTIQQYSKKFYVLPLRGKLSFWEAGTT

KAGYPYNYNTTASDQILIANAAGHRVAISTYTTSLGAGPTSISAVGVLAPHSAL
AVLEDTVDP

戊型肝炎病毒新西兰猪株 (AF082843) p166Nz:

PSPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTA AEYDQTTYGSSTNPMYVSDTVTFV
NVATGAQAVARSLDWSKVTL DGRPLTTIQQYSKTFYVLPLRGKLSFWEAGTT
KAGYPYNYNTTASDQILIANAAGHRVAISTYTTSLGAGPVS VSAVGVLAPHSA
LAILEDTVDP

戊型肝炎病毒中国株 (AJ272108) p166Chn:

PTPSPAPSRPFSVLRANDVLWLSLTA AEYDQTTYGSSTNPMYVSDTVTFV
NVATGAQGVSRSLDWSKVTL DGRPLTTIQQYSKTFYVLPLRGKLSFWEAGTT
KAGYPYNYNTTASDQILIANAAGHRVCISTYTTNLGSGPVSISAVGVLAPHSAL
AALEDTVDP

(1) 根据序列合成特异性引物, 以上述 7 株戊型肝炎病毒基因组序列为模板, 分别扩增上述 7 株戊型肝炎病毒编码 ORF2 C 端 452~617 位氨基酸的基因片段。PCR 条件为: 94°C—45 秒, 52°C—45 秒, 72°C—50 秒, 35 个循环。PCR 产物经琼脂糖凝胶回收纯化, 克隆入质粒载体 pGEX-4T-2 载体 (Pharmacia 产品)。

引物序列为:

戊型肝炎病毒缅甸株 (M 73218) p166Bur: 引物 B1: CCC GGA TTC CCG ACG
CCT TCT CCA GCC CCA TC, 引物 B2: CCC CTC GAG TCA AGG GTA GTC
CAA GGT ATC CTC AA;

戊型肝炎病毒巴基斯坦株 (M80581) p166Sar: 引物 S1: CCC GGA TTC CCG ACC
CCT TCT CCT GCC CCA TC, 引物 S2: CCC CTC GAG TCA AGG GTA GTC CAT
GGT ATC CTC AA;

戊型肝炎病毒摩洛哥株 (AY230202) p166Mor: 引物 Mo1: CCC GGA TTC CCG
ACC CCT TCT CCT GCC CCA TC, 引物 Mo2: CCC CTC GAG TCA AGG GTA

ATC CAG GGT ATC CTC AA

戊型肝炎病毒墨西哥株(M74506)p166Mex: 引物 Me1: CCC GGA TTC CCG ACC
CCT TCT CCT GCC CCA TC, 引物 Me2: CCC CTC GAG TCA CGG ATA ATC
AAA AGT ATC CTC CA;

戊型肝炎病毒美国株 (AF060668) p166Us: 引物 U1: CCC GGA TTC CCG ACC
CCT TCT CCT GCC CCA TC, 引物 U2: CCC CTC GAG TCA TCC TAT TAG TTG
TCA TAG GAG C;

戊型肝炎病毒新西兰猪株 (AF082843) p166Nz: 引物 N1: CCC GGA TTC CCG
ACC CCT TCT CCT GCC CCA TC, 引物 N2: CCC CTC GAG TCA CGA ATA ATC
AAC AGT ATC TTC AA;

戊型肝炎病毒中国株 (AJ272108) p166Chn: 引物 C1: CCC GGA TTC CCG ACC
CCT TCT CCT GCC CCA TC, 引物 C2: CCC CTC GAG TCA AGG GTA ATC AAC
AGT GTC CTC CA。

(2) 将表达质粒转化入表达菌株 *E. coli* JM109 菌株 (Promega 产品) 中, 挑取单菌落, 用含有 50 ug/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基培养至 $OD_{550}=0.6\sim 0.8$, 用终浓度为 0.2~1.0 mM IPTG 进行诱导, 诱导温度为 37°C, 摇床摇速为 200rpm, 3-4 小时后离心收集菌体, 用细胞裂解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.2, 300 mM NaCl) 悬浮菌体沉淀, 冻融 6 次后超声破碎菌体, 离心收集上清液, 经 GST-Sepharose4B (Pharmacia 产品) 亲和层析纯化, 得到 7 种代表戊型肝炎病毒不同基因型和亚型的重组蛋白即抗原, 分别命名为 p166Bur、p166Pak、p166Mor、p166Mex、p166Us、p166Nz 和 p166Chn。最后使用 UV₂₈₀、SDS-PAGE 等方法进行检测、定量。

2、中和性单克隆抗体的制备和鉴定

(1) **动物免疫:** 采用常规方法分别以代表 4 种主要基因型戊型肝炎病毒的重组蛋白 p166Bur、p166Mex、p166US 和 p166Chn 各 50 μg 与福氏佐剂混合腹腔注射免疫 6-8 周龄雌性 Balb/c 小鼠, 共 3 次, 间隔 2 周至 1 月。

(2) **杂交瘤细胞株的建立:** 用所免疫的 p166Bur、p166Mex、p166US 和 p166Chn 重组蛋白包被酶标反应板, GST 包被酶标反应板作为对照孔。采用间接 ELISA 法筛选, 凡 p166Bur、p166Mex、p166US 和 p166Chn 阳性, 同时 GST 阴性者, 为单克隆抗体阳性孔。经 3 次亚克隆, 获得稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株分别对应为 4G5、8G10、3D4 和 5G5。

(3) **单克隆抗体的大量制备和鉴定:** 采用制备腹水和培养瓶直立培养法大量制备单克隆抗体。以 HRP 标记的兔抗鼠 IgG 亚类抗体及兔抗鼠 IgM 抗体为二抗, 采用间接 ELISA 法检测鉴定单克隆抗体免疫球蛋白类型和亚类。所收集的培养上清或腹水经倍比稀释后用 ELISA 法检测抗体效价。

表 1. 戊型肝炎病毒单克隆抗体的免疫球蛋白类型和亚类及其抗体效价

	4G5	8G10	3D4	5G5
Ig 类和亚类	IgG1	IgG2b	IgG1	Ig2b
抗体效价	1:10 ⁻⁵	1:10 ⁻⁵	1:10 ⁻⁵	1:10 ⁻⁵

(4) **单克隆抗体特异性鉴定:**

采用间接 ELISA 法和 Western-blot 法鉴定所获得的单克隆抗体 s 与 7 种不同戊型肝炎病毒基因型和亚型的 p166 重组蛋白 (p166Bur、p166Pak、p166Mor、p166Mex、p166Us、p166Nz 和 p166Chn) 的反应性。

表 2. 戊型肝炎病毒单克隆抗体与不同基因型和亚型 p166 重组蛋白的反应性

单克隆 抗体	不同基因型和亚型 p166 抗原 ELISA 检测不同单克隆抗体的 P/N 值							
	Bur	Pak	Mor	Mex	US	Nz	Chn	GST
	(Ia)	(Ib)	(Ic)	(II)	(III)	(III)	(IV)	
4G5	25.9	22.1	21.9	19.7	18.3	14.4	12.8	0.13
8G10	22.0	20.0	18.2	22.4	24.4	24.2	23.0	0.61
3D4	11.2	12.5	10.02	10.8	13.1	12.7	11.4	0.65
5G5	14.2	15.5	13.8	14.9	19.6	18.5	22.3	0.48

(5) 单克隆抗体的体外中和试验鉴定:

- 1) 培养 PLC/PRF/5 细胞生长至单层;
- 2) 将倍比稀释的单克隆抗体腹水 100 ul 与含 100 TCID₅₀/100ul 戊肝病毒悬液混合, 37°C 共同孵育 2 小时后接种 PLC/PRF/5 细胞;
- 3) 37°C 共同孵育 2 小时后, 洗去未吸附的病毒, 使用 Trizol 法提取核酸, 以引物 3 (5'-CCG ACA GAA TTG ATT TCG TCG GC-3')、引物 4 (5'-GTT GTC TCG GCC AAT GGC GAG CC-3')、引物 5 (5'-TCG GCG GCG GTG AGA GAG AGC CA-3')、引物 6 (5'-CCG TAA GTG GAC TGG TCG TAC TC-3') 进行逆转录-巢式 PCR 检测戊型肝炎病毒核酸, 巢式 PCR 条件为: 第一轮: 94°C—45 秒, 50°C—45 秒, 72°C—50 秒, 35 个循环, 引物为引物 3 和引物 6; 第二轮: 94°C—45 秒, 52°C—45 秒, 72°C—50 秒, 30 个循环, 引物为引物 4 和引物 5;
- 4) RT-PCR 阴性判为中和试验阳性, 最后将能中和病毒的单克隆抗体 4G5、8G10、3D4 和 5G5 判为戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体。

(6) 单克隆抗体的纯化:

- 1) 单克隆抗体离心去除沉淀, 滤纸过滤去除脂质, 加入 1/10 体积的 1M Tris.HCl,

PH 8.0, 调节 PH 至中性;

2) 用 10 倍体积的 1M Tris.HCl, PH 8.0 平衡 Pierce 公司生产的 Protein G 琼脂糖凝胶预装柱;

3) 上样: 取 1ml 预处理的单克隆抗体腹水上柱, 室温孵育 10min;

4) 洗柱: 加入 10 倍体积的 (0.1M Tris.HCl, PH 8.0) 洗柱, 洗去未结合之蛋白, 检测 A280, 至 A 值降至基线;

5) 洗脱: 每次加入 1 倍柱体积的洗脱缓冲液 0.05M Gly.HCl, PH 2.5-3.0 洗脱结合在纯化柱上的单克隆抗体, 收集、混合, 测定 A280 值定量, 分装后 -20℃ 保存。

3、酶标记单克隆抗体的制备

本实施例以辣根过氧化物酶为例详述酶标记单克隆抗体的制备。

1) 称取辣根过氧化物酶 5mg, 溶解于 0.2ml 去离子水中, 滴加新鲜配制的 0.1mol/L 高碘酸钠 (NaIO₄) 溶液 0.04ml, 室温搅拌 20 分钟;

2) 将醛化的辣根过氧化物酶装入透析袋, 对 1mmol/L 醋酸缓冲液 (PH4.4) 透析过夜;

3) 加入 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 (PH9.5) 调整辣根过氧化物酶溶液 PH 值为 9.0~9.5, 立即加入戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体 (PH9.0~9.5);

4) 加入新鲜配制的硼氢化钠溶液 (4mg/ml) 0.02ml, 4℃ 静止 2 小时;

5) 加入等量的饱和硫酸钠溶液, 4℃ 静止 30 分钟, 5000rpm 离心 30 分钟, 去上清;

6) 沉淀以适量 PBS 溶解, 装入透析袋, 对 PBS 透析 48 小时, 即为辣根共氧化物酶标记的戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体, 加入 1% 牛血清白蛋白, 再加入等体积甘油, -20℃ 保存。

4、戊型肝炎病毒中和抗体竞争 ELISA 检测方法的建立

以戊型肝炎病毒 ORF2 或其片段编码的重组蛋白或多肽作为包被抗原, 可单独

或组合形成包被抗原，下面以 p166 重组蛋白为例详述戊型肝炎病毒中和抗体竞争 ELISA 检测方法的建立。

(1) 包被抗原：

1) 包被抗原可以这样选择：上述 7 株戊型肝炎病毒 ORF2 C 端编码 452~617 位氨基酸的重组蛋白 p166Bur、p166Pak、p166Mor、p166Mex、p166Us、p166Nz 和 p166Chn 可分别形成包被抗原，用 PH9.5 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液稀释至 10~2000ng/ml，100 μ l/孔加入酶标反应板，4℃包被过夜。

2) 包被抗原也可以这样选择：上述 7 株戊型肝炎病毒 ORF2 C 端编码 452~617 位氨基酸的重组蛋白 p166Bur、p166Pak、p166Mor、p166Mex、p166Us、p166Nz 和 p166Chn 可以 1: 1 比例等浓度混合，再用 PH9.5 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液稀释至 10~2000ng/ml，100 μ l/孔加入酶标反应板，4℃包被过夜。

(2) 洗涤：包被第二天，以洗涤液 (PH7.0 0.01mol/L PBS, 0.05% tween-20) 洗板 3 次；

(3) 检测：取包被反应板，在检测孔中加入待测样本 50 μ l、阳性对照孔加入已知的阳性血清 50 μ l、阴性对照孔中加入已知的阴性血清 50 μ l、参比对照孔加入 PBS (0.05mol/L, PH7.0) 50 μ l，再加入酶标戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体 50 μ l，37℃共同孵育 40 分钟，洗涤液洗板 5 次，洗去未结合的抗体；

(4) 显色：加入酶的底物，该底物可以是辣根过氧化物酶的底物，室温下显色 10~15min；

(5) 终止：加入终止液终止显色反应，读取 OD 值；

(6) 结果判定：根据公式抑制率 = (1 - 待测样品孔 OD 值 / 参比对照孔 OD 值) \times 100%，以抑制率大于 50%判断为阳性。

5、戊型肝炎病毒中和抗体竞争 ELISA 检测方法在戊型肝炎病毒疫苗评价中的应用

采集本试验室制备的戊型肝炎病毒 ORF2 重组蛋白疫苗免疫的恒河猴血清，其

中 10 μ g 组、20 μ g 组各 3 只，每 4 周免疫一次，共免疫 3 次，对照组恒河猴 3 只，采用相同方案以 PBS (.0.05mol/3, PH7.0) 1ml 免疫，每 4 周免疫一次，共免疫 3 次。8 周时实验组和对照组 9 只恒河猴以中国株戊型肝炎病毒病毒悬液 1ml(PCR 滴度 10⁷) 攻击。各组恒河猴从 0 周开始每周采血一次，应用本发明的戊型肝炎病毒中和抗体竞争 ELISA 检测方法检测中和性抗体产生情况，见图 1。从图中数据可见，免疫组自免疫 4 周开始，血清抗-戊型肝炎病毒中和抗体有明显升高，并于 8-9 周后达到高峰，于 6 周左右开始中和抗体竞争抑制率 \geq 50%。对照组自病毒攻击 4 周后血清抗-戊型肝炎病毒中和抗体开始升高，并于攻毒 9 周后达到高峰。证明我们建立的戊型肝炎病毒中和抗体竞争 ELISA 检测抗-戊型肝炎病毒中和抗体行之有效，可用于疫苗的筛选和评价。

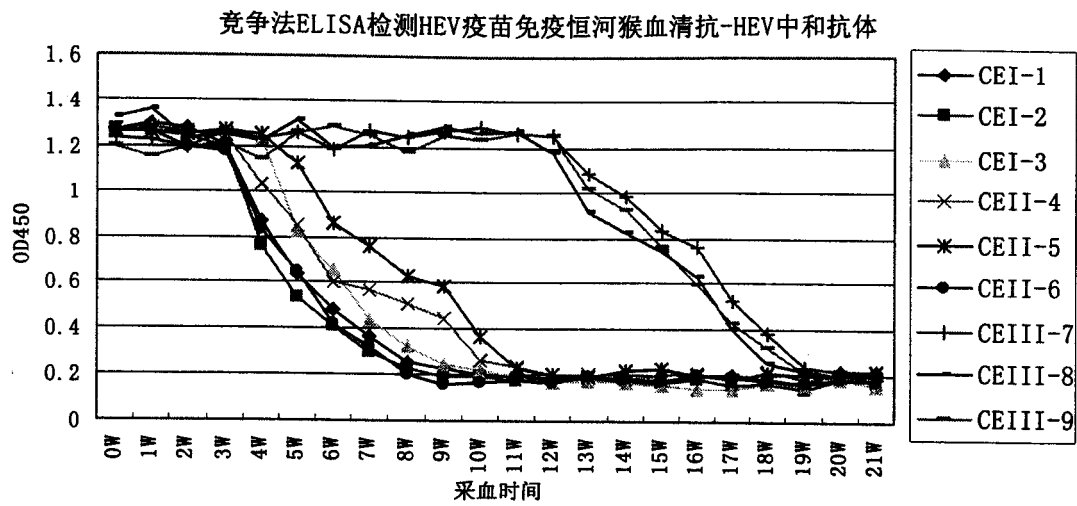


图 1

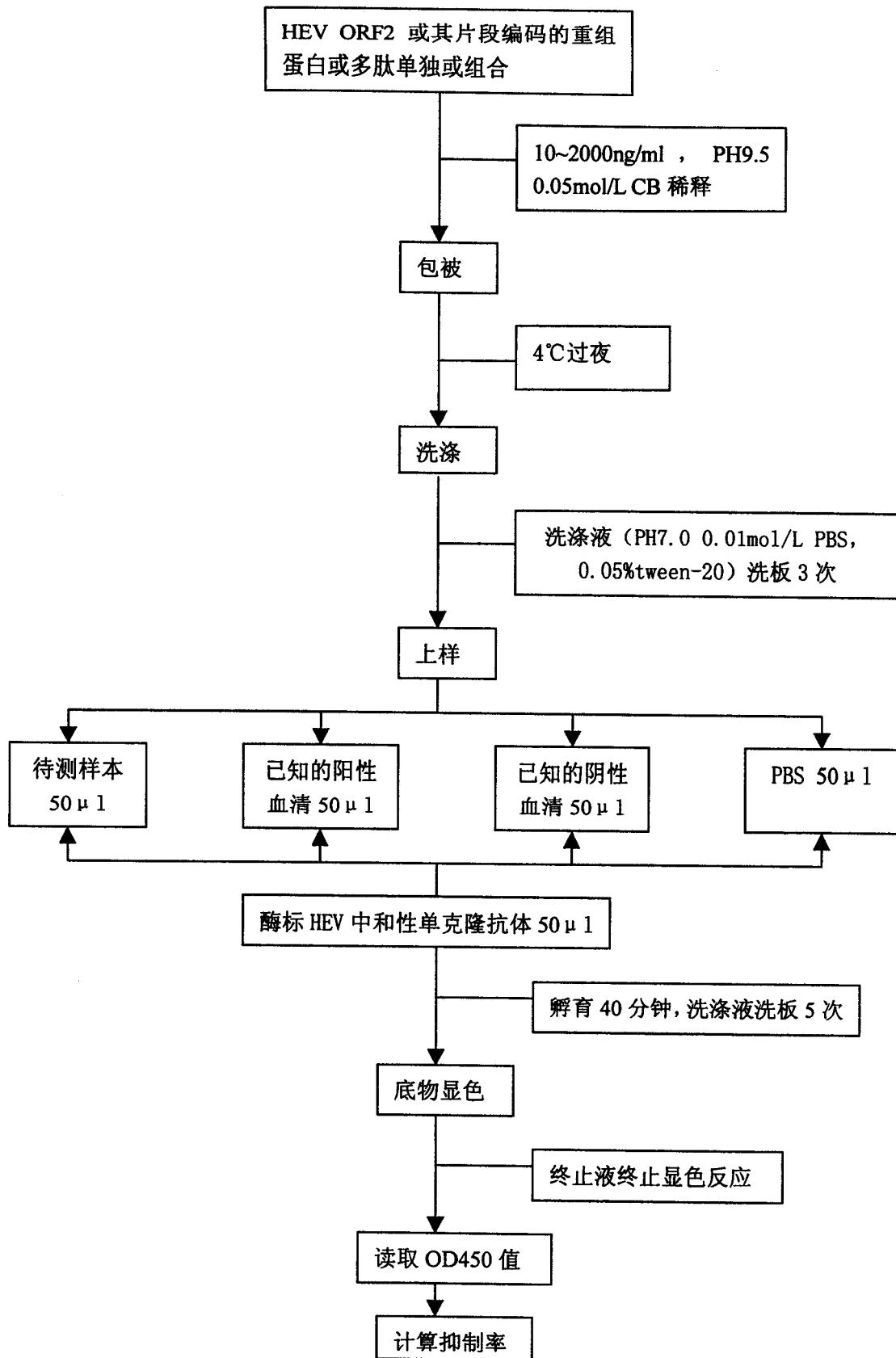


图 2

专利名称(译)	戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN1793929A	公开(公告)日	2006-06-28
申请号	CN200610037624.6	申请日	2006-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	孟继鸿 戴星 梁久红 田华 赵宇 董晨 汪源 邓蕾 张红梅		
发明人	孟继鸿 戴星 梁久红 田华 赵宇 董晨 汪源 邓蕾 张红梅		
IPC分类号	G01N33/577 G01N21/78 G01N33/531 G01N33/543		
代理人(译)	陆志斌		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测方法，其特征在于血清(浆)或其他生物学样本中的抗戊型肝炎病毒中和抗体与酶标记戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体竞争结合包被抗原上的中和抗原表位，根据酶作用底物显色反应减弱的程度，实现对生物学样本中的戊型肝炎病毒中和抗体的竞争酶联免疫检测。与现有技术相比，本发明具有：一、简便快速：应用竞争法ELISA检测戊型肝炎病毒中和抗体，简便易行。二、特异性强：由于应用戊型肝炎病毒中和性单克隆抗体作为竞争结合物，能与其产生竞争的仅有戊型肝炎病毒中和抗体，因而具有高度的特异性。三、成本低、安全性好：由于使用ELISA方法，实验中所应用试剂生产操作成本低，且无须接触感染性的病毒颗粒或病毒核酸，安全性好。

