

[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 200910038361.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月7日

[11] 公开号 CN 101551393A

[22] 申请日 2009.4.2

[21] 申请号 200910038361.4

[71] 申请人 南方医科大学

地址 510515 广东省广州市广州大道北 1838 号

[72] 发明人 车小燕 丁细霞

[74] 专利代理机构 广州市天河庐阳专利事务所

代理人 胡济元

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称

一种检测 IV 型登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测特异性 IV 型登革病毒抗原的免疫诊断试剂盒，该诊断试剂盒包括包被单抗 2E8A5 的微孔反应板、样品处理液、结合有标记物的单抗 7A6A1、阳性对照、阴性对照、浓缩洗液、显色液和终止液。该试剂盒能特异性的检测 IV 型登革病毒抗原，与其他 3 种血清型登革病毒抗原无交叉反应，检测 IV 型登革病毒培养上清敏感度是商品化同类试剂盒 Pan - E Dengue Early ELISA test kit 的 64 倍，大大提高了临床血清样本检测的灵敏度，同时也降低了临床应用中的漏检现象。

1、一种特异性检测IV型登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒，该试剂盒是基于双抗体夹心 ELISA 方法的检测试剂盒，由包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、与标记物结合的检测抗体、阳性对照物、阴性对照物、浓缩洗液、显色液和终止液组成，其特征在于所述的捕获抗体为 2E8A5，由保藏号为 CCTCC-C200855 的杂交瘤细胞株 2E8A5 分泌得到；所述的检测抗体为 7A6A1，由保藏号为 CCTCC-C200854 的杂交瘤细胞株 7A6A1 分泌得到。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于所述的标记物是辣根过氧化物酶。

一种检测IV型登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒

技术领域

本发明涉及医药领域，具体涉及一种医用配制品，特别是用于诊断IV型登革病毒的试剂盒。

背景技术

登革热是一种热带传染病，通过埃及伊蚊和白纹伊蚊传播，根据 E 蛋白的抗原性不同分为 4 个血清型，分别为 I 型、II 型、III 型和 IV 型（简称 DV1、DV2、DV3 和 DV4）。任何型别的登革病毒感染均可引起一系列的临床症状，表现为隐性感染、发热、登革热、或更为严重的登革出血热和登革休克综合征。近年来，由于国际旅游业的发展和传染性疾病的防治措施不当，登革热广泛流行于热带和亚热带的 100 多个国家和地区，特别是东南亚一带的流行甚为严重。目前，世界上约有 25 亿人受到登革病毒感染的威胁，每年发生登革病毒感染患者超过 1 亿人，并且有 50 万人发展成为登革出血热或登革休克综合征，造成大约 30000 人死亡。初次感染登革病毒对于同型病毒的再次感染可产生终身的免疫保护作用，但对于其它血清型的再次感染缺乏交叉免疫保护作用，同时由于存在抗体依赖的病毒感染增强效应（ADE），异型登革病毒再次感染是导致登革热患者发生登革出血热的首要危险因素。而在登革疫区中，往往存在四型登革病毒的交替流行，增加了不同血清型别登革病毒反复感染的危险性，更增加了登革出血热发生的可能性。

由于 ADE 的存在，增加了登革疫苗研制的难度，目前，具有保护性的登革疫苗尚未研制成功，临床上对登革病毒感染还缺乏特异性的治疗药物。实践表明，早期确诊能大大降低登革出血热的发病率和死亡率，因此登革热的治疗很大程度上取决于早期感染的诊断。但是，多数登革病毒感染者早期缺乏特异的临床表现，仅有发热、寒战等流感样症状，难以和其它发热疾病和出血热疾病区分，必须依赖于实验室的诊断。

目前登革热的实验室诊断方法主要包括病毒分离、抗体和核酸检测。其中病毒分离是登革病毒感染诊断和血清型鉴定的金标准，但该方法费时而且对于实验室的条件要求较高。尽管病毒核酸的检测方法比传统的病毒分离法更灵敏、更快速，但分子诊断操作相对繁琐，对技术水平要求较高，并较易发生污染导致假阳性结果，同时由于毒株的变异、潜在突变等序列改变也可能引起假阴性结果。而抗体检测试剂不能用于早期诊断，而且由于 4 个血清型登革病毒之间以及与其它病毒属间存在血清学交叉反应，特别是接种乙型脑炎病毒、黄热病毒疫苗的人群易发生抗体假阳性反应结果。因此，建立一种能够特异性区分登革病毒四个血清型感染的早期诊断试剂盒势在必行。

登革病毒的非结构蛋白 1（nonstructural protein 1, NS1）是一种相对保守的糖蛋白，有膜

型和分泌型两种形式，在感染细胞中高度表达，具有很强的抗原性，且研究发现在登革热患者的早期血中存在高浓度的 NS1 循环抗原，因此检测急性期病人血清中的循环 NS1 抗原可用于早期诊断登革病毒感染或者预警登革出血热（DHF）的发生。通过基于登革病毒 NS1 的抗原捕获 ELISA 法来检测登革病毒的方法可分为两类，一类是在多克隆抗体的基础上建立的，这类方法在不同批次的抗血清中存在很大差异，难以重复和实现实验室的标准化。另一类利用 NS1 的单克隆抗体来检测登革病毒，如商品化的试剂盒 Pan-E Dengue Early ELISA test kit（Panbio, Queensland, Australia）和 Platelia Dengue NS1 Ag kits（Bio-Rad, France）。Pan-E Dengue Early ELISA test kit 含有抗 I～IV 型登革病毒 NS1 的单克隆抗体，通过 ELISA 方法来实现登革病毒感染的早期诊断，其敏感度、特异性和稳定性都有了较大的提高。但本发明人进一步研究发现，该试剂盒对 I～IV 型的登革病毒的敏感度不同，分别为 195 PFU/mL、195 PFU/mL、1563 PFU/mL、25000 PFU/mL，而早期感染登革病毒的患者血液样本中的病毒含量相对较低，用该试剂盒检测 III 型和 IV 型登革病毒的感染有可能会漏检现象。再者，这两种试剂盒不能区分四种血清型的登革病毒，由于不同血清型的登革病毒感染所引起的临床症状和治疗方案是不同的，临床医师必须尽早确定哪种血清型的登革病毒感染，以便于快速采取有效的治疗措施。因此，及时确定登革病毒感染的类型，是降低登革病毒感染死亡率的前提，也是控制登革病毒扩散的有效措施，而目前市面上的商品化试剂盒均无法达到此目的。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足，提供一种具有高灵敏度和特异性的 IV 型登革病毒 NS1 抗原免疫诊断试剂盒，它可直接检测到血液标本中的 DV4 NS1 抗原，实现登革病毒感染的早期分型诊断。

为了解决以上技术问题，本发明提供一种检测 IV 型登革病毒 NS1 抗原的免疫诊断试剂盒，该试剂盒是基于双抗体夹心 ELISA 方法的检测试剂盒，由包被捕获抗体的微孔反应板、样品处理液、与标记物结合的检测抗体、阳性对照物、阴性对照物、浓缩洗液、显色液和终止液组成，其特征在于所述的捕获抗体为单抗 2E8A5，由保藏号为 CCTCC-C200855 的杂交瘤细胞株 2E8A5 分泌得到；所述的检测抗体为单抗 7A6A1，由保藏号为 CCTCC-C200854 的杂交瘤细胞株 7A6A1 分泌得到。

本发明试剂盒中，所述的单抗 2E8A5 和单抗 7A6A1 均是 IgG1 亚类的免疫球蛋白，其中单抗 2E8A5 能同时与 IV 和 III 型登革病毒的 NS1 蛋白结合，由保藏号为 CCTCC-C200855 的杂交瘤细胞株 2E8A5 分泌；单抗 7A6A1 能特异性结合 IV 型登革病毒，由保藏号为 CCTCC-C200854 的杂交瘤细胞株 7A6A1 分泌。所述的杂交瘤细胞株 2E8A5 和 7A6A1 是用重组的 DV4NS1 蛋白和天然的 NS1 蛋白交叉免疫 Balb/c 小鼠，然后用免疫后的小鼠脾细胞和商品化

的小鼠骨髓瘤细胞 NS-1 融合，最后用 HAT 培养基筛选得到。

本发明试剂盒中，所述的标记物是指能标记在抗体的非活性部位且可定量分析的物质，例如酶；而相应的显色液则含有能与所述标记物反应并产生颜色变化的物质，例如酶的底物。这些都是本领域的常识，本领域技术人员可根据这些常识轻易地选定标记物与相应的显色液，如辣根过氧化物酶及其底物过氧化氢尿素和四甲基联苯胺（简称 TMB）就是 ELISA 试验中常用的标记物及显色液组合，也同样适用于本发明。所述的样品处理液、浓缩洗液和终止液均是双抗体夹心 ELISA 方法中的常用试剂，所述的阳性对照物是指 IV 型登革病毒 NS1 蛋白，所述的阴性对照物是不含 IV 型登革病毒 NS1 蛋白的空白对照物。

本发明试剂盒是一种基于双抗体夹心 ELISA 方法的检测试剂盒，其中所述的捕获抗体 2E8A5 是一种具有交叉反应性的单抗，间接免疫荧光检测结果显示该单抗能同时结合 III 型和 IV 型登革病毒，但检测抗体 7A6A1 是从一组抗 IV 型登革病毒 NS1 蛋白的单克隆抗体中筛选出来的，能特异性结合 IV 型登革病毒，因此，该试剂盒能准确、快速地检测出 IV 型登革病毒，而与其它 I 型、II 型和 III 型登革病毒以及乙型脑炎病毒、黄热病毒均无交叉反应，且对 IV 型登革病毒具有很高的敏感度，检测 IV 型登革病毒的敏感度是商品化试剂盒 Pan-E Dengue Early ELISA test kit 的 64 倍，大大降低了漏检的几率，有利于登革病毒的早期诊断和治疗；此外，本发明试剂盒能特异地检测 IV 型登革病毒，有利于对登革病毒感染作出早期分型诊断。同时，该试剂盒成本低，操作简便，能同时快速检测大批样品；主要试剂均以工作液形式提供，操作简便；具有高灵敏度、高特异性的特点；也是目前国际上首个能特异性检测到 IV 型登革病毒抗原的试剂盒。

具体实施方式：

下面通过具体的例子和实验报告进一步阐明本发明的试剂盒：

1、所述的单抗 2E8A5 和 7A6A1 的制备方法和鉴定结果：

(1) 免疫抗原的制备

本发明用于制备单克隆抗体的免疫原为基因重组 DV4NS1 蛋白和已灭活天然的病毒抗原。基因重组 DV4 NS1 蛋白是用一种携带 DV4 NS1 基因的工程菌株制备的，其制备按常规方法进行，经用镍一次氨基三醋酸金属亲和层析的方法进行纯化获得 NS1 抗原，详细的制备方法可参照使用手册。将 NS1 蛋白纯化后，以考马斯亮蓝(Coomassie)蛋白分析试剂(PIERCE, Cat, No. ED62976)定量。Western blot 对纯化的重组蛋白鉴定结果显示，小鼠抗 his MAbs 在分子量约 45KDa 处出现特异性的反应条带，与预测的 DV4 NS1 分子量大小一致。已灭活天然的病毒抗原，是从 DV4 感染的病毒宿主细胞（C6/36，一种白蚊伊蚊细胞）获得。

(2) 免疫小鼠

取4-6周龄雌性BALB/c小鼠，第一次采用弗氏完全佐剂与等体积DV4 NS1抗原混匀乳化，每只小鼠皮下多点注射30 μ g，以后每10天以弗氏不完全佐剂与天然的DV4抗原或重组的DV4 NS1抗原交替免疫共4次后，于融合前3天每只小鼠腹腔注射DV4 NS1抗原100 μ g进行加强免疫。

(3) 杂交瘤细胞的制备和鉴定

加强免疫3天后，无菌操作取小鼠脾脏，制成脾细胞悬液与对数生长期的小鼠骨髓瘤细胞株 NS-1 按 10:1 的比例混合，在 45% 聚乙二醇 (PEG, MW4000, Sigma) 作用下进行融合。具体方法如下：在 37 $^{\circ}$ C 水浴中，在 1min 内缓慢加入 1.0ml PEG，边加边轻轻摇匀，分别于 1min、2min、3min、4min 和 5min 内加 1ml、2ml、3ml、4ml 和 5ml 无血清 RPMI-1640 培养基终止融合，最后加入 10ml 含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基，室温 800rpm 离心 5min，弃上清，用 60ml 含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基轻轻悬起细胞。将此细胞悬液加入 6 块 96 孔培养板上，在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的二氧化碳培养箱中培养。次日于融合细胞中加入 120 μ l 2 \times HAT 培养基。以后每 3 天用 1 \times HAT 培养基换液一次，当克隆长至占孔底面积的 1/10 时，取培养上清经间接 ELISA 法用 NS1 蛋白和 DV4 病毒进行双筛选。阳性克隆转至 24 孔培养板中扩大培养，经 ELISA 和免疫荧光 (DV4 感染细胞抗原片) 复测仍为强阳性的克隆用有限稀释法进行克隆化。克隆化 2~3 次至阳性率达 100%，选择分泌抗体效价高的两个细胞株扩增培养后置液氮保存，记为杂交瘤细胞株 2E8A5 和杂交瘤细胞株 7A6A1，并于 2008 年 11 月 24 号在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 保藏，其保藏登记号分别为 CCTCC-C200855 和 CCTCC-C200854。

(4) 抗 DV4 NS1 蛋白单克隆抗体亚类检测

采用间接 ELISA 方法检测，方法如下：用 DV4 抗原包被微孔板，封闭后与杂交瘤细胞培养上清孵育，再分别与 1:1000 倍稀释的 HRP 标记的兔抗小鼠不同亚类特异性免疫球蛋白反应，其中包括兔抗小鼠 IgG1 (美国 ZYMED LABORATORIES, INC, 目录号 61-0120)，兔抗小鼠 IgG2a (同上，目录号 61-0220)，兔抗小鼠 IgG2b (同上，目录号 61-0320)，兔抗小鼠 IgG3 (同上，目录号 61-0420)，兔抗小鼠 IgM (同上，目录号 61-6820)。检测结果显示，上述两株杂交瘤细胞的培养上清均为 IgG1 阳性，即说明这两株杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体均为 IgG1 阳性。

(5) 单克隆抗体腹水制备和纯化

腹水制备：采用体内诱生法制备本发明中单克隆抗体，即在小鼠体内接种杂交瘤细胞制备腹水。具体方法如下：每只小鼠腹腔内注射 0.5ml 弗氏不完全佐剂 (Sigma 公司)，使瘤细胞能以腹水瘤形式在腹腔内生长。大约 1~2 周后，将 2 \times 10⁶ 个对数生长期的杂交瘤细胞悬浮

于无血清 RPMI 1640 培养基中，注入小鼠腹腔。约 1~2 周后，用 7 号针头放腹水，离心后收集腹水上清，立即加入叠氮钠至终浓度为 0.1%，存放于 4℃ 备用。

单抗纯化：采用辛酸—硫酸铵沉淀法纯化腹水中的抗体，操作方法如下：腹水用 60mM、pH5.0 醋酸缓冲液稀释 2 倍，室温下于 30 分钟内边搅拌边逐滴缓慢加入辛酸，为每毫升稀释前腹水加 33 μ l 辛酸，出现大量沉淀，4℃ 静置 2 小时，10000g，4℃ 离心 30 分钟，取上清，加入 1/10 体积的 pH7.4 100 mM 磷酸盐缓冲液，并用 1N 氢氧化钠调 pH 值至 7.4，冰浴搅拌下缓慢加入硫酸铵，为每毫升液体加入 0.277 硫酸铵即为 45% 饱和度，4℃ 静置过夜，10000g、4℃ 离心 30 分钟，弃上清，沉淀溶于适量 10 mM 磷酸盐缓冲液，用同样的液体，4℃ 透析过夜，换液三次。以考马斯亮蓝(Coomassie)蛋白分析试剂 (PIERCE, Cat, No. ED62976) 定量。测定浓度后的抗体加入终浓度 50% 的甘油于 -80℃ 保存。

(6) 单克隆抗体的特异性鉴定

a. 间接 ELISA 法鉴定单克隆抗体的特异性

分别用四个血清型重组 DV NS1 抗原和天然的 DV 抗原包被微孔板，按照常规的间接 ELISA 法进行检测。即在包被的微孔板中加入本专利发明的杂交瘤细胞培养上清液，37℃ 孵育 1h，加入 1: 1000 稀释的 HRP 标记羊抗小鼠 IgG (Sigma, Inc)，100 μ l/孔 37℃ 孵育 30min，加 TMB 显色液室温避光显色 10min，加 1M H₂SO₄ 终止反应，测 450nm 吸光值 (A₄₅₀)。表 1 结果显示本专利发明的单克隆抗体 2E8A5 和 7A6A1 均为 DV4 的特异性单抗；与其它三型登革病毒均无交叉反应。

表 1 DV4NS1 单克隆抗体与重组 DV4 NS1 抗原和天然 DV4 抗原反应的间接 ELISA 结果

	DV4 NS1 单克隆抗体		无关抗体
	2E8A5	7A6A1	
重组的 DV1 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	0.048	0.05	0.066
重组的 DV2 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	0.062	0.055	0.057
重组的 DV3 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	0.07	0.076	0.059
重组的 DV4 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	3.108	0.065	0.063
天然的 DV1 抗原检测 A ₄₅₀	0.067	0.058	0.067
天然的 DV2 抗原检测 A ₄₅₀	0.06	0.093	0.059
天然的 DV3 抗原检测 A ₄₅₀	0.092	0.058	0.062
天然的 DV4 抗原检测 A ₄₅₀	2.192	1.928	0.058

b. 间接免疫荧光法鉴定单克隆抗体的特异性

分别用 DV1、DV2、DV3 和 DV4 感染 C6/36 细胞，当有 2/3 细胞出现病变时，收集细胞，用预冷的 1×PBS 洗细胞二遍，然后将细胞滴于无菌干燥的玻片上，干燥后，制备成涂片，充分干燥，用冷丙酮固定 10 分钟后吹干，分别与阳性杂交瘤细胞培养上清和 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 孵育，并设立未感染病毒的 C6/36 细胞抗原片作为阴性对照，最后用 0.25% 的伊文

氏蓝染色后，荧光显微镜下观察荧光图像，以荧光的强度和染色形态进行结果判定，检测抗体强度以（+ ~++++）计为阳性，抗体强度（±）和（-）计为阴性。如表 2 结果显示，本专利发明的单克隆抗体 2E8A5 与III型和IV型登革病毒同时结合的交叉性单抗；而 7A6A1 与 DV4 抗原特异性结合，而与其它三个血清型 DV 均无交叉反应。

表 2 DV4 NS1 单克隆抗体的免疫荧光检测结果

	DV 感染 C6/36 细胞涂片				正常 C6/36 细胞涂片
	DV1	DV2	DV3	DV4	
2E8A5	-	-	+++	++++	-
7A6A1	-	-	-	++++	-

c. 免疫印迹鉴定单克隆抗体的特异性

将灭活 DV4 培养液或重组的 DV4 NS1 蛋白，用 2×SDS 加样缓冲液稀释一倍，将样品加到 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶中，电泳分离蛋白质，通过电洗脱使在凝胶上分离出来的蛋白质转印到硝酸纤维膜上，转印膜用含 7%脱脂奶和 3%BSA 的 10mM PBS 于 4℃封闭 24 小时，将转印膜装在专门的反应板中，分别加入杂交瘤细胞培养上清中，室温反应 1 小时，用含有 0.5%Tween 20 的 10mM PBS 洗涤膜后，加入 1:500 倍稀释的 HRP 标记羊抗鼠 IgG，室温反应 1 小时，用同样的洗涤液洗涤膜后，DAB 显色后，用去离子水终止显色。结果显示，本发明的单克隆抗体 2E8A5 与重组 DV4NS1 蛋白和灭活 DV4 培养液在分子量为 45 千道尔顿可见一条很强的蛋白质结合带，与预测分子量相一致；而特异性单抗 7A6A1 与重组 DV4NS1 蛋白和灭活 DV4 培养液均不产生反应，可能跟单抗识别构象表位有关。

2、本发明试剂盒的组成和制备

(1) 所用试剂的配制

a. 样品处理液：由样品处理液 A 和样品处理液 B 组成，其中 A 为 1.5M 甘氨酸溶液 (PH2.8)，B 为 1.5M Tris-HCl 溶液 (PH9.7)；

b. 浓缩洗液：含有 2% Tween-20 的 20×PBS, 即 1L 溶液中含有 4.56g Na₂HPO₄, 58.02g Na₂HPO₄.12H₂O, 175.3g NaCl, 15 磅 20min 高压灭菌后, 加入 20ml Tween-20 搅匀, 使用时 20 倍稀释；

c. 阳性对照：DV4 天然 NS1 抗原 1:1000 稀释液；

d. 阴性对照：含 0.1%Tween-20 的 10mM PH7.4 PBS, 制备方法如下：将 4.56g Na₂HPO₄、58.02g Na₂HPO₄.12H₂O 和 175.3g NaCl 用水溶解并定量至 1 升, 15 磅 20min 高压灭菌, 稀释 20 倍后加入 0.1% Tween-20；

e. 显色液：由显色液 A 和 B 组成，使用时取二者等量混匀使用。其中显色液 A、B 的制备方法如下：

将 0.89g 柠檬酸和 0.16g EDTA 二钠溶于 1000ml 水中, 115°C 高压 30min, 降至 90°C 后加 TMB 0.25g, 摇匀后得显示液 A, 于 4°C 闭光保存;

将 9.33g 柠檬酸和 14.6g EDTA 二钠溶于 1000ml 水中, 115°C 高压 30min 后, 降至 90°C 后加 0.75% 过氧化氢尿素 12.8ml, 摇匀后得显示液 B, 于 4°C 闭光保存;

f. 终止液: 1M H_2SO_4 。

(2) 所述包被单抗 2E8A5 的微孔反应板的制备方法如下: 将本发明单抗 2E8A5 用 10mM pH7.6 的磷酸盐缓冲液稀释至 $10\mu g/ml$, 用 $150\mu l$ /孔包被聚苯乙烯 96 孔微孔板, 于 4°C 过夜。拍干后, 每孔加入 $300\mu l$ /孔的 0.25% 酪蛋白 (Sigma) 的封闭液, 于 4°C 过夜以封闭非特异性结合位点。甩干板条, 真空干燥 12~24h, 用铝膜袋真空包装 4°C 保存备用。

(3) 所述辣根过氧化物酶标记的单抗 7A6A1 的制备方法如下:

采用改良过碘酸钠法, 操作方法如下: 将 5mg HRP 搅拌溶解于 1mL 双蒸水中, 加入 0.2mL 新配 0.1M 过碘酸钠避光室温搅拌 30min, 置 1mM pH4.4 醋酸钠缓冲液中, 4°C 透析过夜; 次日加入 0.2M pH9.5 碳酸盐缓冲液使 PH 值达 9.0~9.5 后, 与预先调节 pH 至 9.5 的抗体 10mg 混合, 在室温避光轻轻搅拌 2~3 小时, 然后加入 $100\mu l$ 新配 4mg/mL 硼氢化钠, 4°C 避光轻搅过夜; 次日将过夜的抗体溶液用 1×PBS 稀释 5~10 倍, 冰浴搅拌下逐滴加入等体积饱和硫酸铵 (硫酸铵用前先用氨水调 pH 至 7.4), 置 4°C 避光过夜; 12 000rpm 4°C 离心 30 min, 弃上清, 沉淀溶于适量 1×PBS 缓冲液, 并置 1×PBS 中 4°C 透析过夜, 换液三次。收集结合物加入终浓度 50% 的 2%BSA 甘油-PBS 保护剂, 最后用磷酸盐缓冲液稀释 1000 倍, 即为工作液。

3、应用本发明试剂盒检测血清样品中的 IV 型登革病毒 NS1 抗原

(1) 检测方法:

取待测的样品 $50\mu l$, 加入样品处理液 A $50\mu l$, 混匀后 37°C 作用 1h, 再加样品处理液 B $50\mu l$ 混匀, 取 $100\mu l$ 加入 2E8A5 包被的聚苯乙烯 96 孔微量测试板中, 同时设阴性对照和阳性对照, 37°C 温育 1h, 浓缩洗涤液 20 倍稀释后洗涤板条, 洗板 6 次后, 加入 1:1000 稀释的 HRP 标记的单抗 7A6A1, $100\mu l$ /孔, 37°C 温育 30min, 同上洗板 8 次后, 加显色液 (显色液 A 和 B 等量混合, 现用现配), $100\mu l$ /孔, 室温避光显色 10min 后, 加入终止液, $100\mu l$ /孔, 终止反应。

(2) 结果判定: 以空白孔调零, 于 450nm 波长测定吸光度 (A 值)。阳性对照平均值 ≥ 0.50 , 阴性对照平均值 ≤ 0.10 , 实验成立。样品 A 值 \geq 阴性对照 A 值平均值 $\times 2.1$, 则判为阳性, 反之为阴性。

(3) 本发明试剂盒检测相关病毒的特异性和灵敏度分析

通过对 DV1、DV2、DV3、DV4 进行空斑实验确定病毒滴度分别为 2.6×10^5 PFU/mL、 6.88×10^4 PFU/mL、 2.37×10^5 PFU/mL、 7.84×10^5 PFU/mL。采用上述建立的方法检测灭活的 DV1、DV2、DV3、DV4，从 1×10^5 开始倍比稀释多个梯度进行检测，同时以检测四个血清型 DV NS1 抗原的商品化试剂盒“pan-E DENGUE EARLY ELISA”（Panbio, Australia）进行同步检测比较，操作步骤按照试剂盒说明书进行。本发明试剂盒的检测结果显示对 DV4 培养上清的检测灵敏度高达 391 PFU/ml，与其余 3 种血清型登革病毒培养液无交叉反应，并且与其它黄病毒属的病毒如乙脑病毒及黄热病毒均不发生交叉反应。说明建立的双抗体夹心抗原捕获 ELISA 检测具有登革病毒血清型特异性。如表 3 所示。商品化的 pan-E DENGUE EARLY ELISA 检测结果显示，对四个血清型的 DV 培养上清的检测敏感性不同，详见表 4 结果。商品化试剂盒对 DV4 培养上清的检测灵敏度为 25000PFU/ml，远低于本发明的试剂盒检测 DV4 培养上清的灵敏度。

虽然本发明试剂盒的结果判读方式和商品试剂盒 pan-E DENGUE EARLY ELISA 的不一样，具体体现在认定阳性的标准不同，但是在以下特异性实验和临床实验中，本发明试剂盒按上述判读方式检测都没有出现假阳性，说明本发明试剂盒的阳性标准是可靠的，同时也进一步证明本发明试剂盒具有比现有技术更好的灵敏度和特异性。

表 3 本发明试剂盒检测四个血清型 DV 培养上清结果

DV 病毒	病毒滴度 (PFU/ml)								
	50000	25000	12500	6250	3125	1563	782	391	195
DV1	0.078/-	0.081/-	0.08/-	0.08/-	0.086/-	0.083/-	0.083/-	0.081/-	0.082/-
DV2	0.08/-	0.078/-	0.083/-	0.08/-	0.092/-	0.1/-	0.11/-	0.105/-	0.088/-
DV3	0.116/-	0.1/-	0.119/-	0.117/-	0.118/-	0.109/-	0.12/-	0.124/-	0.109/-
DV4	4.03/+	3.987/+	3.49/+	2.362/+	1.218/+	0.693/+	0.376/+	0.222/+	0.169/-
Control	0.1/-	0.089/-	0.094/-	0.081/-	0.097/-	0.091/-	0.098/-	0.107/-	0.1/-

表注^a：此试剂盒的结果判定如下：样品检测值 \geq 阴性对照平均值的 2.1 倍（计算为 $0.095 \times 2.1 = 0.2$ ）为阳性，反之为阴性。

表 4 进口试剂盒 pan-E DENGUE EARLY ELISA 检测四个血清型 DV 培养上清结果

DV 病毒	病毒滴度 (PFU/ml)									
	50000	25000	12500	6250	3125	1563	782	391	195	97
DV1	104.8/+	103.3/+	103.0/+	97.9/+	92.5/+	73.4/+	53.2/+	31.4/+	16.7/+	8.7/-
DV2	103.7/+	102.9/+	99.4/-	93.4/+	83.3/+	63.3/+	41.1/+	23.9/+	11.6/+	6.8/-
DV3	95.7/+	87.1/+	76.3/+	53.3/+	32.0/+	17.9/+	9.7/-	5.7/-	3.3/-	2.1/-
DV4	31.7/+	17.6/+	9.7/-	5.6/-	3.2/-	2.4/-	1.7/-	1.6/-	1.4/-	1.3/-
Control	2.2/-	1.8/-	1.6/-	1.5/-	1.4/-	1.4/-	1.4/-	1.4/-	1.4/-	1.4/-

表注：此试剂盒的结果判定如下：显示值 <9.0 为阴性，显示值 $9.0-11.0$ 为可疑阳性，显示 >11.0 为阳性。

4、临床试验

首先将临床血清标本用 1.5M 甘氨酸 (PH2.8) 进行预处理使 NS1 与血清中的抗体形成的复合物解离，从而释放游离的 NS1 抗原，再用 1.5M Tris-Hcl (PH9.7) 中和后用上述建立的

方法进行检测。

本发明试剂盒检测正常人血清标本的特异性：

本发明的试剂盒检测了 500 例正常人血清，用此检测结果确定本方法的临界值。对检测值进行分析，计算得平均值为 0.125，标准差为 0.025，以平均值加上 5 个标准差作为本方法的检测临界值即： $0.125+0.025\times 5=0.25$ ，以大于或等于临界值作为判断检测值阳性标准，500 例正常人血清均为阴性，可确定本方法的特异度为 100%。

专利名称(译)	一种检测IV型登革病毒NS1抗原的免疫诊断试剂盒		
公开(公告)号	CN101551393A	公开(公告)日	2009-10-07
申请号	CN200910038361.4	申请日	2009-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学		
[标]发明人	车小燕 丁细霞		
发明人	车小燕 丁细霞		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	Y02A50/53		
其他公开文献	CN101551393B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测特异性IV型登革病毒抗原的免疫诊断试剂盒，该诊断试剂盒包括包被单抗2E8A5的微孔反应板、样品处理液、结合有标记物的单抗7A6A1、阳性对照、阴性对照、浓缩洗液、显色液和终止液。该试剂盒能特异性的检测IV型登革病毒抗原，与其他3种血清型登革病毒抗原无交叉反应，检测IV型登革病毒培养上清敏感度是商品化同类试剂盒Pan - E Dengue Early ELISA test kit的64倍，大大提高了临床血清样本检测的灵敏度，同时也降低了临床应用中的漏检现象。

	DV4 NS1 单克隆抗体		无关抗体
	2E8A5	7A6A1	
重组的 DV1 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	0.048	0.05	0.066
重组的 DV2 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	0.062	0.055	0.057
重组的 DV3 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	0.07	0.076	0.059
重组的 DV4 NS1 抗原检测 A ₄₅₀	3.108	0.065	0.063
天然的 DV1 抗原检测 A ₄₅₀	0.067	0.058	0.067
天然的 DV2 抗原检测 A ₄₅₀	0.06	0.093	0.059
天然的 DV3 抗原检测 A ₄₅₀	0.092	0.058	0.062
天然的 DV4 抗原检测 A ₄₅₀	2.192	1.928	0.058