



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104797934 B

(45)授权公告日 2018.09.14

(21)申请号 201380051914.4
 (22)申请日 2013.10.03
 (65)同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 104797934 A
 (43)申请公布日 2015.07.22
 (30)优先权数据
 2012-222618 2012.10.05 JP
 (85)PCT国际申请进入国家阶段日
 2015.04.02
 (86)PCT国际申请的申请数据
 PCT/JP2013/076892 2013.10.03
 (87)PCT国际申请的公布数据
 W02014/054712 JA 2014.04.10
 (73)专利权人 电化生研株式会社
 地址 日本东京都
 (72)发明人 三股亮太郎 泉谷宪幸
 (74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
 代理人 张桂霞 林森

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/569(2006.01)
 (56)对比文件
 CN 102171334 A,2011.08.31,
 Yuichiro Sato 等.High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner.《Biochemical and Biophysical Research Communications》.2011,第405卷291-296.
 Yuichiro Sato 等.High mannose-specific lectin (KAA-2) from the red alga *Kappaphycus alvarezii* potently inhibits influenza virus infection in a strain-independent manner.《Biochemical and Biophysical Research Communications》.2011,第405卷291-296.

审查员 周洋

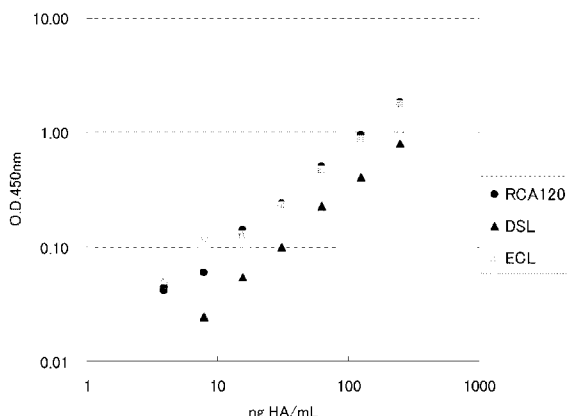
权利要求书1页 说明书9页 附图3页

(54)发明名称

流感病毒的血凝素的测定方法

(57)摘要

本发明公开了一种流感病毒血凝素的新型测定方法,该方法与使用两种抗血凝素抗体的夹层免疫测定法相比可以在短期间内构建测定系统。流感病毒血凝素的测定方法采用了夹层免疫测定法,该夹层免疫测定法包含:用与血凝素结合而不与抗体结合的凝集素和与该血凝素进行抗原抗体反应的抗血凝素抗体夹持该血凝素。



1. 利用夹层免疫测定法进行的流感病毒血凝素的测定方法,该方法包括:用与流感病毒的血凝素结合而不与抗体结合的凝集素和与该血凝素进行抗原抗体反应的一种抗血凝素抗体夹持该血凝素,

其中,上述不与抗体结合是指不与与免疫测定中使用的构成抗体的免疫球蛋白同种、同类的免疫球蛋白结合,

适用上述测定方法的样本是含有流感病毒血凝素的样本,

上述凝集素为选自蓖麻凝集素、曼陀罗凝集素和刺桐凝集素的至少一种,

将上述凝集素固定在固相上,标记上述抗血凝素抗体,经由上述凝集素和上述血凝素测定与固相结合该标记抗体。

2. 权利要求1所述的方法,其中,上述血凝素是通过用阳离子型或阴离子型表面活性剂处理流感病毒而提取的血凝素。

3. 权利要求2所述的方法,其中,上述阳离子型或阴离子型表面活性剂是选自十二烷基硫酸钠、十二烷基硫酸锂、十六烷基三甲基溴化铵、十六烷基三甲基氯化铵和氯化十六烷基吡啶的至少一种。

4. 权利要求3所述的方法,其中,上述表面活性剂为十六烷基三甲基溴化铵。

流感病毒的血凝素的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及作为流感病毒的抗原的血凝素的测定方法。

背景技术

[0002] 流感病毒属于正粘病毒科,根据存在于病毒内部的核蛋白和基质蛋白的抗原性不同被分类为A型、B型和C型。每年可见流行的流感病毒是A型和B型,特别是A型病毒,根据作为颗粒表面抗原的糖蛋白的不同,其血凝素被分类为16种亚型、而神经氨酸苷酶被分类为9种亚型,是容易发生抗原性变异的病毒。因此,必须预测每个季节的流感流行以选择疫苗株,还必须随着株的变更来准备作为疫苗的主要抗原的血凝素测定用试剂。

[0003] 现有技术文献

[0004] 非专利文献

[0005] 非专利文献1:Mahmood N, Hay AJ., An ELISA utilizing immobilised snowdrop lectin GNA for the detection of envelope glycoproteins of HIV and SIV. J Immunol Methods., 151(1992)9-13;

[0006] 非专利文献2:Legastelois I.等人, Avian glycan-specific IgM monoclonal antibodies for the detection and quantitation of type A and B haemagglutinins in egg-derived influenza vaccines. J Virol Methods., 178(2011)129-136。

发明内容

[0007] 发明所要解决的课题

[0008] 作为血凝素的灵敏度高且样本处理能力高的测定方法,可以列举使用单克隆抗体和多克隆抗体的夹层ELISA法,但需要株特异性的两种抗体,鉴于抗体的制作期间,难以在新型疫苗制造株或大流行性病毒的血凝素测定中供给单克隆抗体。而且,在如非专利文献2记载的使用鸟类的糖链特异性单克隆抗体的测定方法中,由于特殊抗体的缘故,与其说是供给量等问题,不如说是普及性低的测定方法,而且在动物细胞中扩增的流感病毒的血凝素测定中无法使用。

[0009] 因此,本发明的目的在于提供流感病毒的血凝素的新型测定方法,与使用两种抗血凝素抗体的夹层免疫测定法相比,该方法可以在短期间内构建测定系统。

[0010] 用于解决课题的手段

[0011] 本申请发明人深入研究的结果,发现凝集素与流感病毒的血凝素结合而不与抗体结合,想到了若用凝集素和抗血凝素抗体夹持血凝素,则需要的抗血凝素抗体只有一种,与使用两种抗血凝素抗体的夹层免疫测定法相比可以在短期间内构建测定系统,完成了本发明。

[0012] 即,本发明提供通过夹层免疫测定法进行的流感病毒的血凝素的测定方法,该方法包括:用与流感病毒的血凝素结合而不与抗体结合的凝集素和与该血凝素进行抗原抗体反应的抗血凝素抗体夹持该血凝素。

[0013] 发明效果

[0014] 根据本发明,使用一种抗血凝素抗体,通过夹层免疫测定,可以高精度地测定流感病毒的血凝素。

附图说明

[0015] 图1-1和图1-2是在利用以下的各表面活性剂处理灭活全颗粒病毒后,通过蛋白质印迹显示基于蔗糖密度梯度离心分离法的馏分分析的图。A. 未处理、B. 1.0%的TritonX-100处理、C. 1.0%的NP-40处理、D. 1.0%的Tween80处理、E. 1.0%的Brij35处理、F. 1.0%的CHAPS处理、G. 1.0%的Zwittergent 3-14处理、H. 1.0%的CTAB处理、I. 0.3%的SDS处理、J. 4.0M的尿素处理、K. 3.0M的盐酸胍处理;

[0016] 图2是显示下述实施例中进行的通过夹层免疫测定测得的血凝素浓度与吸光度的关系的图。

具体实施方式

[0017] 如上所述,本发明的方法涉及通过夹层免疫测定法进行的血凝素的测定方法,该方法是用与流感病毒的血凝素(以下,有时仅称作“血凝素”)结合而不与抗体结合的凝集素和与该血凝素进行抗原抗体反应的抗血凝素抗体夹持该血凝素。

[0018] 本发明的方法中使用的凝集素是与血凝素结合的凝集素。是否与血凝素结合,可以通过下述参考例2中具体记载的凝集素印记法(使标记凝集素与转移到PVDF膜上的血凝素反应,看是否检测到标记)来确认。另外,“不与抗体结合”是指不与与免疫测定中使用的构成抗体的免疫球蛋白同种、同类的免疫球蛋白(通常是小鼠、兔或绵羊等的IgG)结合,不与来自小鼠、兔和绵羊等各动物的IgG结合,如下述参考例3中具体记载的那样,可以根据通过与各动物的HRP标记IgG的ELISA测定的吸光度是否不足阴性对照(空白)平均值的2倍、优选不足1.5倍来确认。作为与血凝素结合、而不与抗体结合的凝集素的优选例子,可以列举:曼陀罗凝集素(DSL)、刺桐凝集素(ECL)和蓖麻凝集素(RCA120)。与血凝素结合、而不与抗体结合的凝集素既可以单独使用,也可以组合使用两种以上的凝集素。

[0019] 在本发明的方法中,优选将上述凝集素固定在固相上再进行夹层法。作为固相,可以使用夹层ELISA等周知的夹层免疫测定中使用的任一种固相,可以列举:板、管、珠粒、膜、凝胶等。作为材质,可以列举:聚苯乙烯、聚丙烯、尼龙、胶乳、玻璃、交联糊精、琼脂糖、交联琼脂糖、聚丙烯酰胺等。

[0020] 作为使凝集素吸附在这些固相上的方法,可以采用共价键合法、物理吸附法、离子结合法和生物化学特异性结合法(例如使结合有生物素的凝集素与结合有链霉亲和素的固相结合等)等。在操作简便方面,特别优选物理吸附法和生物化学特异性结合法。

[0021] 这里,物理吸附法例如可以列举下述方法:将凝集素溶解于含有0.05% Tween20(商品名)的pH7~9的缓冲液(例如Tris盐酸缓冲液生理盐水、磷酸缓冲液生理盐水、碳酸缓冲液等)中,之后加入到固相(例如微量培养板的孔)中,在室温下静置1~2小时左右或者在4℃左右静置一夜使其吸附。另外,生物化学特异性结合法可以列举下述方法:由于结合有链霉亲和素的固相(板或珠粒)有市售,所以例如将凝集素溶解于含有0.05% Tween20(商品名)的pH7~9的缓冲液(例如Tris盐酸缓冲液生理盐水、磷酸缓冲液生理盐水、碳酸缓冲液

等)中,之后添加到市售的结合有链霉亲和素的固相中,在室温下静置1~2小时左右或者在4℃左右静置一夜使其吸附(参照下述实施例)。在物理吸附法、生物化学特异性结合法中,对与固相反应的凝集素的浓度均没有特别限定,通常以终浓度计为10μg/mL~60μg/mL左右。

[0022] 在吸附了凝集素的固相表面,有时会残留没有吸附凝集素的表面部分,若其中吸附了样本中的血凝素或其他分子种类,则有可能无法获得正确的测定结果。因此,优选在样本与固相接触之前添加封闭物质,以包被没有吸附凝集素的部分。作为这样的封闭物质,可以列举:可以由哺乳动物、例如牛等采集的血清白蛋白、酪蛋白、乳蛋白、乳酸发酵物、胶原以及它们的分解物质等,另外,还可以使用作为免疫测定中的封闭物质来销售的物质。

[0023] 本发明的方法中使用的抗血凝素抗体是与流感病毒的血凝素进行抗原抗体反应的物质,可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。在进行流感病毒的型特异性测定时,通常使用与各型血凝素进行特异性抗原抗体反应的抗血凝素单克隆抗体。

[0024] 抗血凝素抗体通常被标记。作为用于标记的标记物质,可以列举:酶(过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、萤光素酶、乙酰胆碱酯酶等)、同位素(¹²⁵I、¹³¹I、³H等)、荧光色素(氨基苯二酰肼(发光氨)、异硫氰酸荧光素、7-羟基香豆素(umbelliferone)、7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸等)、化学发光物质、半抗原、生物素、亲和素(例如链霉亲和素等),但只要是通常能够用于蛋白标记的物质,则没有特别限定。需要说明的是,这里的标记物质还包括:象生物素这样不直接检测其本身,而是在组合使用该物质具有特异性结合能力的物质(例如亲和素)上结合有可检测的标记的物质的方法中使用的物质。

[0025] 上述的抗体标记方法可以从适合于标记物质的公知方法中适当选择,例如在标记酶时,可以从戊二醛法、过碘酸交联法、马来酰亚胺交联法、碳化二亚胺法、活化酯法等中适当选择;用放射性同位素标记时,可以从氯胺T法、乳过氧化物酶法等中适当选择。需要说明的是,关于标记抗血凝素抗体,由于针对各种型的抗体均有销售,所以还可以使用市售品。

[0026] 在本发明的方法中,通常使上述的固相化凝集素和标记抗血凝素抗体、与含有流感病毒血凝素的样本反应,清洗后测定与固相结合标记。

[0027] 适用本发明的方法的样本只要是含有流感病毒血凝素的样本即可,可以是含有流感病毒颗粒的样本,也可以是从中提取血凝素而获得的样本。提取血凝素时,不管血凝素的存在形式如何均可测定,无论是存在于病毒颗粒中还是以游离血凝素的形式存在均可测定,测定精度也有所提高,因此优选。提取血凝素时,可以使用阳离子型或阴离子型表面活性剂(以下,将两者统称为“离子型表面活性剂”)。作为离子型表面活性剂的优选例子,可以列举:十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基硫酸锂(LiDS)、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、十六烷基三甲基氯化铵(CTAC)和氯化十六烷基吡啶(HPC),特别优选为十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)。离子型表面活性剂可以单独使用,也可以将两种以上组合使用。

[0028] 用离子型表面活性剂进行处理的条件优选在样本中添加离子型表面活性剂使终浓度达到0.1~2.0%,在37℃下静置或搅拌1~2小时左右,可以从病毒颗粒中提取血凝素,但并不限于此。

[0029] 可以使固相化凝集素、样本和标记抗血凝素抗体同时反应,也可以首先使固相化凝集素与样本反应,清洗后再与标记抗血凝素抗体反应,还可以先使样本与标记抗血凝素抗体反应形成免疫复合物,之后再与固相化凝集素反应。各反应可以在室温下进行30分钟

~120分钟左右。反应系统中的血凝素的终浓度范围通常是1ng/mL~1μg/mL左右,标记抗血凝素抗体的终浓度范围通常是0.2~50μg/mL左右。

[0030] 反应后,清洗固相,测定与固相结合标记。作为清洗液,例如可以列举:添加有Tween(商品名)系表面活性剂等表面活性剂的缓冲液(例如磷酸缓冲液、磷酸缓冲液生理盐水、Tris盐酸缓冲液、Tris盐酸缓冲液生理盐水)等。作为标记物质的检测方法,根据使用的标记物质而不同,例如在标记物质中使用生物素时,可以列举下述方法等:经由链霉亲和素等使过氧化物酶等酶与包含生物素作为标记物质的复合体结合,加入作为该酶的底物的四甲基联苯胺等显色物质和过氧化氢水,再根据吸光度的变化测定酶反应产物的显色程度。另外,在标记物质中使用荧光物质或化学发光物质时,可以列举测定反应后的溶液的荧光或发光的方法等。

[0031] 需要说明的是,还可以采用下述的间接抗体法:用未标记的抗血凝素抗体代替标记抗血凝素抗体来进行反应,再与标记抗免疫球蛋白抗体反应,清洗后,测定与固相结合标记。可是,在间接抗体法中,由于抗原抗体反应的次数多于1次,因此在要求迅速检查时,优选如上所述的使用标记抗血凝素抗体的直接法。

[0032] 在本发明的测定方法中,可以通过下述方法定量样本中的血凝素浓度:事先使用已知浓度的血凝素标准液就血凝素与标记物质的检测结果的关系制作标准曲线,再利用对于未知浓度的样本的检测结果和上述标准曲线的方法。

[0033] 以下,说明本发明的测定方法的一个优选方式。首先,使凝集素吸附(包被)在固相上。优选的吸附方法如上所述。

[0034] 优选在上述吸附之后,添加含有脱脂乳等封闭物质的缓冲液,在室温下静置30~2小时左右,以事先包被未吸附凝集素的部分。

[0035] 当样本中的血凝素存在于病毒颗粒中时,在样本中添加CTAB使终浓度达到0.1~2.0%,在37℃下静置或搅拌1~2小时左右,从病毒颗粒中提取血凝素。

[0036] 接着,在吸附了凝集素的固相中添加样本或进行了血凝素提取处理的样本,例如在室温下静置或搅拌30~120分钟的适当时间,使血凝素与上述凝集素结合。

[0037] 之后,用含有Tween系表面活性剂等缓冲液(例如Tris盐酸缓冲液生理盐水、磷酸缓冲液生理盐水等)等清洗液清洗结合有该复合体的固相。再向上述固相中添加用标记物质标记的抗血凝素抗体或抗血凝素抗体和用标记物质标记的抗抗血凝素抗体,例如在室温下静置或搅拌30~120分钟,使抗血凝素抗体(或抗血凝素抗体-抗抗血凝素抗体)与血凝素结合。通过该操作,形成由固相-凝集素-血凝素-抗血凝素抗体(或固相-凝集素-血凝素-抗血凝素抗体-抗抗血凝素抗体)构成的复合体。接下来,检测上述复合体的标记物质以测定血凝素。

[0038] 另外,就血凝素标准品的浓度与标记物质的检测结果(例如吸光度)的关系制作标准曲线,利用对于未知样品的检测结果和上述标准曲线来定量未知样品中的血凝素。

实施例

[0039] 以下,通过实施例来具体说明本发明,但本发明并不限于这些实施例。

[0040] 参考例1 血凝素提取用表面活性剂的研究

[0041] 在通过发育鸡蛋扩增、并通过超滤、蔗糖密度梯度离心分离法和β-丙内酯进行了

纯化和灭活的A/Brisbane/59/2007株的灭活全颗粒病毒中添加TritonX-100(商品名、シグマアルドリッチジャパン公司制造)、NP-40(商品名、ナカライテスク公司制造)、Tween80(商品名、和光纯药工业公司制造)、Brij35(商品名、和光纯药工业公司制造)、CHAPS(商品名、同仁化学研究所公司制造)、Zwittergent 3-14(商品名、Calbiochem公司制造)和CTAB(和光纯药工业公司制造)使终浓度达到1.0%,再添加SDS使终浓度达到0.3%、添加尿素(エムピーバイオジャパン公司制造)和盐酸胍(エムピーバイオジャパン公司制造)使终浓度达到4.0M和3.0M,在37℃下静置60分钟使之进行了反应。在反应溶液中添加蔗糖使终浓度达到20%,将其通过分馏密度为20~50w/w%的蔗糖密度梯度离心分离法分馏成17个馏分。将各馏分溶液与SDS-PAGE用样品缓冲液(8%的SDS、40%的甘油/250mM的Tris-HCl缓冲液,pH6.8)等量混合,在100℃下静置5分钟使之进行了反应。使反应溶液在12.5%的聚丙烯酰胺凝胶(アト一公司制造 ePAGEL)中电泳,使用半干式转印装置(アト一公司制造)进行了向PVDF膜上转印的反应。将转印后的PVDF膜浸在75mL封闭缓冲液(含10%脱脂乳的TBS)中,在室温下进行了4小时的掩蔽(封闭)反应。反应后,用适量的TBS清洗PVDF膜3次,之后将PVDF膜浸在抗HA抗体溶液(SRD(单向辐射免疫扩散,Single radial immunodiffusion)用抗血清)中,在4℃下反应了约16小时(一次抗体反应)。一次抗体反应后,用含Tween20(商品名)的TBS清洗PVDF膜5次,再添加HRP标记抗绵羊抗体(Bethyl公司制造)溶液,在室温下反应了60分钟(二次抗体反应)。二次抗体反应后,用含Tween20(商品名)的TBS清洗PVDF膜5次,使用Super Signal West Pico化学发光底物(商品名、サーモサイエンチフック公司制造)进行了血凝素的检测。检测中使用了LAS-3000(商品名、GEヘルスケア公司制造)。

[0042] 由此,如图1-1和图1-2所示,在未处理的灭活全颗粒病毒或作为蛋白变性剂的尿素或盐酸胍处理中,只在高密度区检测到血凝素,在作为非离子型表面活性剂的TritonX-100(商品名)、NP-40(商品名)、Tween80(商品名)和Brij35(商品名)或作为两性离子表面活性剂的CHAPS(商品名)和Zwittergent 3-14(商品名)中,从高密度到低密度在各种密度下检测到了血凝素。另一方面,通过作为离子型表面活性剂的CTAB或SDS处理,在低密度侧血凝素的谱带会聚,因此判断为离子型表面活性剂处理最适合于血凝素的增溶、提取处理。

[0043] 参考例2 各种凝集素与血凝素的结合

[0044] 使用MDCK细胞和发育鸡蛋调制了A/California/7/2009(H1N1)、A/Brisbane/59/2007(H1N1)、A/Victoria/210/2009(H3N2)、A/Uruguay/716 /2007(H3N2)、B/Brisbane/60/2008(B型 Victoria谱系)和B/Florida/4 /2006(B型 Yamagata谱系)这6株的病毒溶液。将所调制的病毒和SDS-PAGE用样品缓冲液(8%的SDS,40%的甘油/250mM的Tris-HCl缓冲液,pH6.8)等量混合,在100℃下静置5分钟使之进行了反应。使反应溶液在12.5%的聚丙烯酰胺凝胶(アト一公司制造 ePAGEL)中电泳,使用半干式转印装置(アト一公司制造)进行了向PVDF膜上转印的反应。将转印后的PVDF膜浸在75mL封闭缓冲液(含10%脱脂乳的TBS)中,室温下进行了4小时的掩蔽反应。反应后,用适量的TBS清洗PVDF膜3次,使其与各种生物素化凝集素(VECTOR LABORATORIES公司制造)在室温下反应了4小时。与凝集素反应后,用含Tween20(商品名)的TBS清洗PVDF膜5次,添加HRP标记链霉亲和素(サーモサイエンチフック公司制造)溶液,在室温下反应了60分钟。反应后,用含Tween20(商品名)的TBS清洗PVDF膜5次,使用Super Signal West Pico化学发光底物(商品名、サーモサイエンチフック公司制造)检测了血凝素与凝集素的复合体。检测中使用了LAS-3000(商品名、GEヘルスケア

公司制造)。

[0045] 其结果,可以确认到:RCA120、DSL和ECL均与来自使用MDCK细胞和发育鸡蛋中的任一种作为表达基材调制的病毒的血凝素结合。

[0046] 参考例3 各种凝集素与IgG的结合

[0047] 在链霉亲和素包被的微量培养板(Nunc公司制造)上,以100 μ L/孔添加用0.05%的Tween20(商品名)/Tris盐酸缓冲液生理盐水(TBST)稀释成终浓度为30 μ g/mL的各生物素化凝集素,在25 $^{\circ}$ C下反应了2小时。凝集素反应后,用300 μ L清洗缓冲液(TBST)对各孔进行了5次清洗。接下来,在各孔中添加300 μ L 2.5%的脱脂乳/TBST,在25 $^{\circ}$ C下进行了1小时的封闭,之后,用300 μ L清洗缓冲液清洗各孔5次,在各孔中添加100 μ L用0.5%脱脂乳/TBST或0.5%BSA/TBST稀释的HRP标记化IgG抗体(小鼠抗体:BioSS公司制造,小鼠抗兔IgG二次抗体(H+L),HRP缀合物;兔抗体:Bethyl Laboratories公司制造,绵羊IgG-重链和轻链抗体;绵羊抗体:Bethyl Laboratories公司制造,兔IgG-重链和轻链抗体),在25 $^{\circ}$ C下反应了1小时。抗体反应后,用300 μ L清洗缓冲液清洗各孔5次,在各孔中添加200 μ L TMB溶液(和光纯药工业公司制造),在25 $^{\circ}$ C下反应20分钟后,在各孔中添加50 μ L 1mol/L的硫酸(和光纯药工业公司制造)停止了反应。反应停止后,测定了450nm的吸光度。

[0048] 结果见表1。如表1所示,可知RCA120、DSL和ECL与小鼠、兔和绵羊IgG反应时的吸光度均不足阴性对照(空白)值的2倍,不与小鼠、兔和绵羊IgG反应。

[0049] 需要说明的是,由于在上述参考例2中确认到RCA120、DSL和ECL均与血凝素结合,因此认为即使使用这些凝集素中的任一种,也可以通过夹层免疫测定来测定血凝素。

[0050] [表1]

凝集素	空白				小鼠 IgG			兔 IgG			绵羊 IgG		
	1	2	3	平均	1	2	3	1	2	3	1	2	3
[0051] RCA120	0.057	0.051	0.055	0.054	0.065	0.072	0.070	0.079	0.079	0.077	0.065	0.063	0.067
DSL	0.046	0.047	0.050	0.048	0.055	0.061	0.061	0.055	0.056	0.058	0.054	0.053	0.052
ECL	0.049	0.051	0.047	0.049	0.053	0.061	0.058	0.056	0.058	0.057	0.052	0.055	0.051

[0052] 实施例1 夹层免疫测定

[0053] 在由NIBSC(The National Institute for Biological Standards and Control)购入的SRD试验用标准抗原的小瓶(vial)中加入1mL水,静置5分钟后进行了充分搅拌(50 μ g HA/mL)。将50 μ L NIBSC标准品(50 μ g HA/mL)和50 μ L 1.0%的CTAB混合,充分搅拌后(25 μ g HA/mL)在37 $^{\circ}$ C下静置了2小时。接着,稀释10倍,调制了2.5 μ g HA/mL的血凝素溶液。稀释该标准液,调制了3.13、6.25、12.5、25、50、100和250ng HA/mL的血凝素溶液。

[0054] 在链霉亲和素包被的微量培养板(Nunc公司制造)上,以100 μ L/孔添加用0.05%的Tween20(商品名)/Tris盐酸缓冲液生理盐水(TBST)稀释成终浓度为30 μ g/mL的各生物素化凝集素,在25 $^{\circ}$ C下反应了2小时。凝集素反应后,用300 μ L清洗缓冲液(TBST)清洗各孔5次。接下来,在各孔中添加300 μ L 2.5%脱脂乳/TBST,在25 $^{\circ}$ C下进行1小时的封闭,之后,用300 μ L清洗缓冲液对各孔进行了5次清洗,在各孔中添加100 μ L所调制的各浓度的血凝素溶液,在25 $^{\circ}$ C下反应了2小时。反应后,用300 μ L清洗缓冲液清洗各孔5次,在各孔中添加100 μ L用0.5%脱脂乳/TBST稀释成终浓度为2 μ g/mL的HRP标记抗血凝素抗体(Sino Biological公司制造,2009H1N1流感(Swine Flu)血凝素ELISA试剂盒中附带)溶液,在25 $^{\circ}$ C下反应了1小时。与抗

血凝素抗体反应后,用300 μ L清洗缓冲液清洗各孔5次,在各孔中添加200 μ L TMB溶液(和光纯药工业公司制造),在25 $^{\circ}$ C下反应20分钟后,在各孔中添加50 μ L 1mol/L的硫酸(和光纯药工业公司制造)停止了反应。反应停止后,测定了450nm的吸光度。

[0055] 表2和图2显示通过使用了RCA120、DSL和ECL的ELISA进行的血凝素测定结果,在所有的凝集素中均确认到血凝素(HA)浓度与吸光度具有良好的相关性。因此,利用血凝素结合凝集素和一种抗血凝素抗体,可以构成高灵敏度的血凝素测定法。

[0056] [表2]

HA浓度 (ng/mL)	RCA120	DSL	ECL
250	1.936	0.850	1.808
125	1.040	0.462	0.916
62.5	0.589	0.285	0.506
31.3	0.322	0.158	0.272
15.6	0.223	0.112	0.170
7.81	0.144	0.083	0.158
3.91	0.125	0.106	0.093
空白	0.084	0.058	0.042

[0057]

[0058] 实施例2 确认与SRD试验测定值的相关

[0059] 在A/California/07/2009(X-179A)、A/Victoria/361/2011(IVR-165)和B/Wisconsin/01/2010(BX-41A)的标准流感HA抗原(单向辐射免疫扩散试验用国立感染症研究所)的各小瓶中加入1mL水,静置5分钟后进行了充分搅拌。将50 μ L的标准流感HA抗原溶液和50 μ L 1.0%的CTAB混合,充分搅拌后在37 $^{\circ}$ C下静置了2小时。接着,稀释10倍,调制了血凝素溶液。稀释该标准液,调制了1.95、3.91、7.81、31.3、62.5和125ngHA/mL的血凝素溶液,将其作为标准曲线用标准溶液。另外,通过单向辐射免疫扩散试验(SRD试验)算出了HA浓度的制造工序液(A/California/07/2009(X-179A)株、A/Victoria/361/2011(IVR-165)株和B/Wisconsin/01/2010(BX-41A)株)也和上述标准曲线用标准溶液一样,进行了CTAB处理和稀释操作,作为测定样本。

[0060] 在链霉亲和素包被的微量培养板(Nunc公司制造)上,以100 μ L/孔添加用0.05% Tween20(商品名)/Tris盐酸缓冲液生理盐水(TBST)稀释成终浓度为30 μ g/mL的生物素化ECL,在25 $^{\circ}$ C下反应了2小时。凝集素反应后,用300 μ L清洗缓冲液(TBST)对各孔进行了5次清洗。接下来,在各孔中添加300 μ L 2.5%脱脂乳/TBST,在25 $^{\circ}$ C下进行1小时的封闭,之后,用300 μ L清洗缓冲液清洗各孔5次,在各孔中添加100 μ L所调制的标准曲线用标准溶液和测定样本,在25 $^{\circ}$ C下反应了2小时。反应后,用300 μ L清洗缓冲液清洗各孔5次,在各孔中添加100 μ L用0.5%脱脂乳/TBST稀释了2500倍的各株的参照抗血清(单向辐射免疫扩散试验用、国立感染症研究所)溶液作为抗血凝素抗体,在25 $^{\circ}$ C下反应了1小时。与抗血凝素抗体反应后,用300 μ L清洗缓冲液清洗各孔5次,在各孔中添加100 μ L用0.5%脱脂乳/TBST稀释了2500倍的HRP标记抗绵羊IgG抗体(Bethyl Laboratories公司),在25 $^{\circ}$ C下反应了1小时。与抗绵羊IgG抗体反应后,在各孔中添加200 μ L TMB溶液(和光纯药工业公司制造),在25 $^{\circ}$ C下反应20分钟后,在各孔中添加50 μ L 1mol/L的硫酸(和光纯药工业公司制造)停止了反应。反应停止后,测定了450nm的吸光度。

[0061] 表3、表4和表5显示A/H1N1亚型 (A/California/07/2009 X-179A)、A/H3N2亚型 (A/Victoria/361/2011 IVR-165) 和B型 (B/Wisconsin/01/ 2010 BX-41A) 的SRD试验的测定结果、使用了结合有血凝素的凝集素的ELISA的测定结果、以及ELISA测定值与SRD试验测定值的比例。如表所示,该ELISA测定值与SRD试验测定值的比例如下:A/H1N1亚型中为92.2~111%、A/H3N2亚型中为96.9%~132%、B型中为80.4~91.6%,可以确认到良好的相关。因此,通过使用了结合有血凝素的凝集素的该ELISA,可以获得与作为疫苗效价试验的SRD试验结果具有相关性的测定值。

[0062] [表3]

A/H1N1 : A/California/07/2009 (X-179A)

样本	ELISA (ugHA/mL)	SRD (ugHA/mL)	比例 (%) (ELISA / SRD)
H1-1	458	412	111
H1-2	441	425	104
H1-3	451	436	103
H1-4	445	430	103
H1-5	425	416	102
H1-6	432	405	107
H1-7	422	433	97.5
H1-8	389	422	92.2
H1-9	411	418	98.3
H1-10	421	410	103

[0063] [表4]

[0064] [表4]

A/H3N2 : A/Victoria/361/2011 (IVR-165)

样本	ELISA (ugHA/mL)	SRD (ugHA/mL)	比例 (%) (ELISA / SRD)
H3-1	467	361	129
H3-2	482	398	121
H3-3	440	370	119
H3-4	435	372	117
H3-5	411	366	112
H3-6	436	387	113
H3-7	475	361	132
H3-8	442	386	115
H3-9	428	377	114
H3-10	373	384	97.1

[0065]

[0066] [表5]

B : B/Wisconsin/01/2010 (BX-41A)

样本	ELISA (ugHA/mL)	SRD (ugHA/mL)	比例 (%) (ELISA / SRD)
B-1	395	431	91.6
B-2	362	423	85.6
B-3	365	412	88.6
B-4	353	422	83.6
B-5	353	439	80.4
B-6	375	451	83.1
B-7	391	446	87.7
B-8	365	437	83.5
B-9	384	461	83.3
B-10	363	436	83.3

[0067]

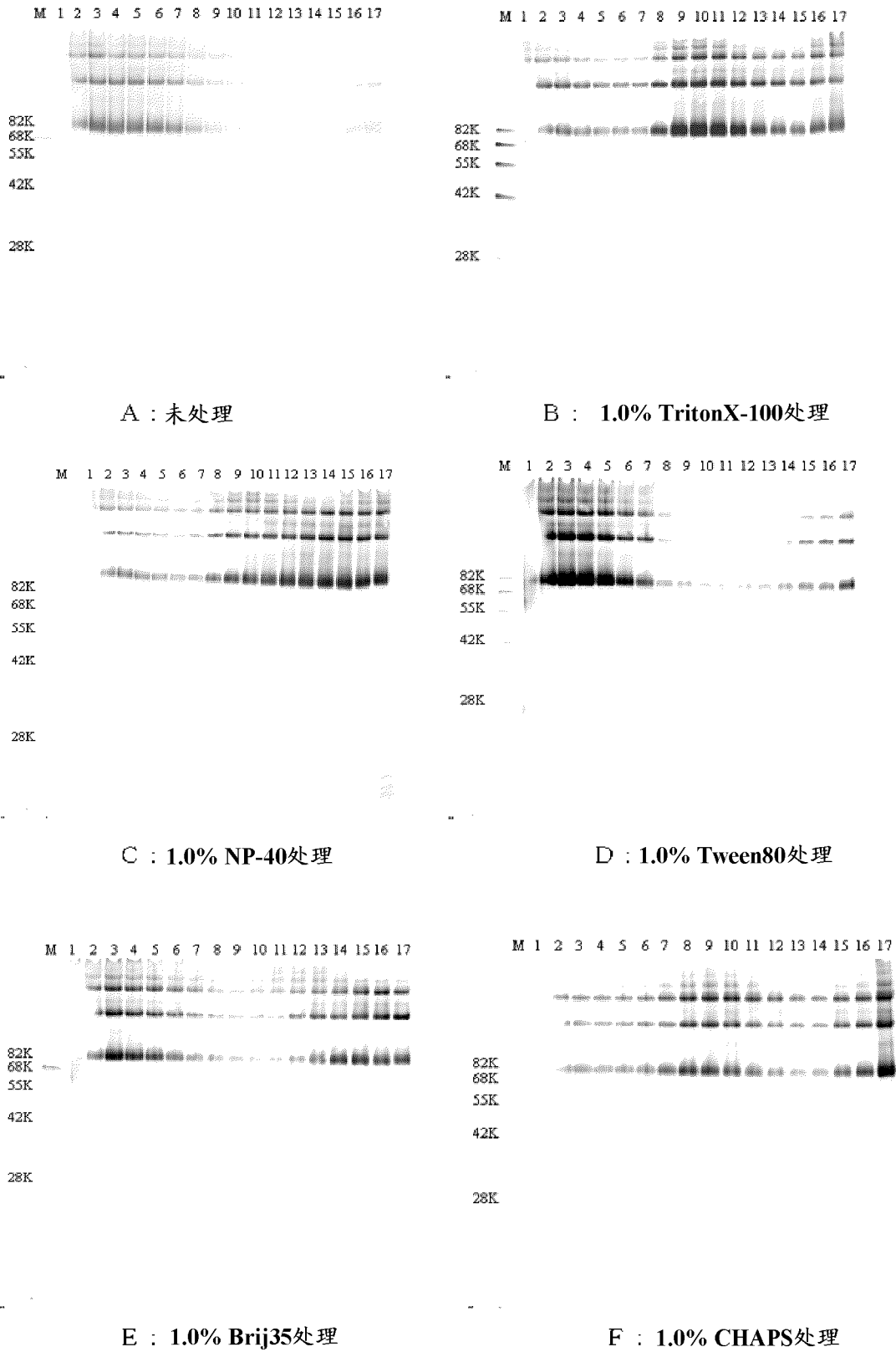


图 1-1

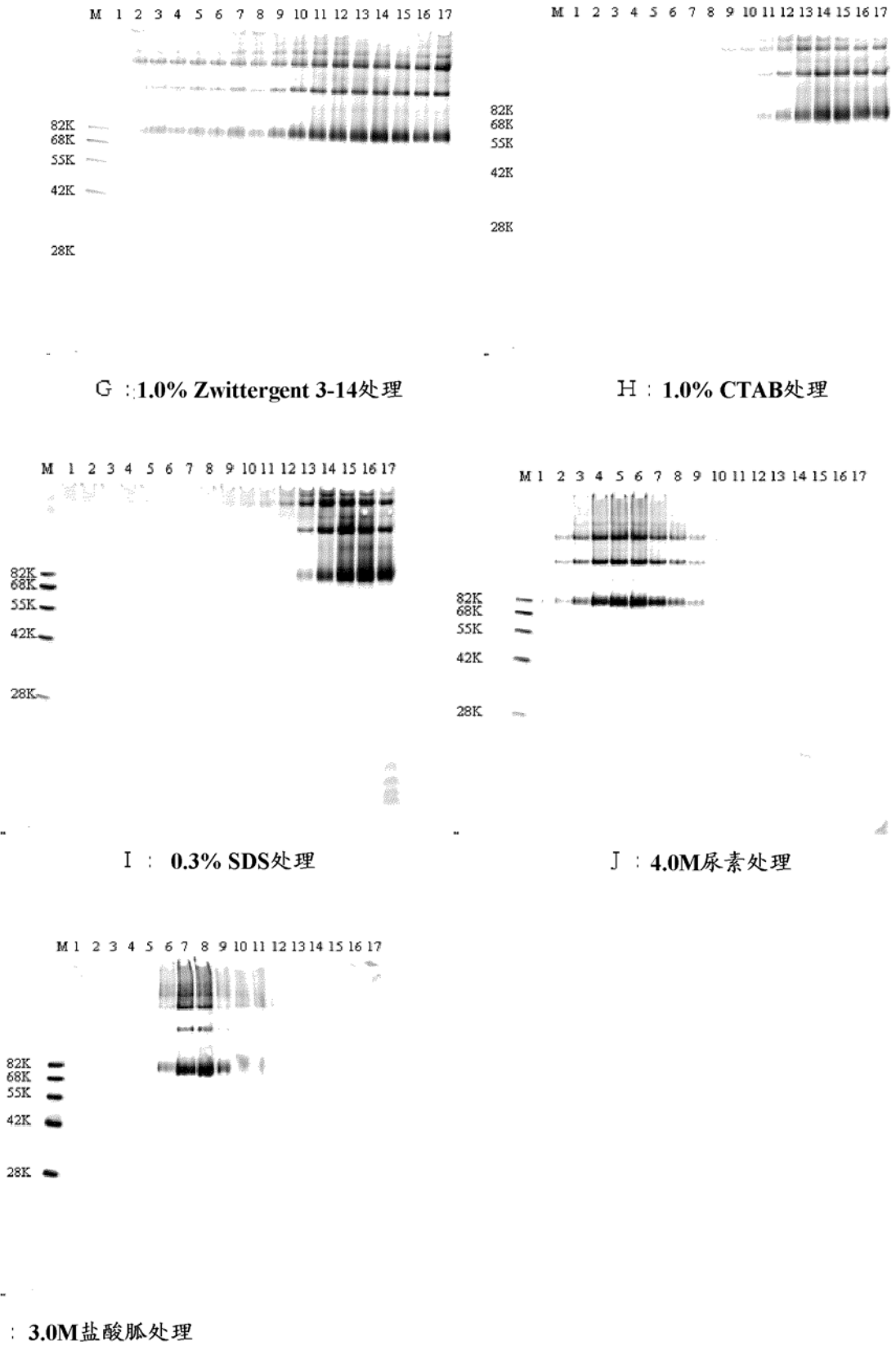


图 1-2

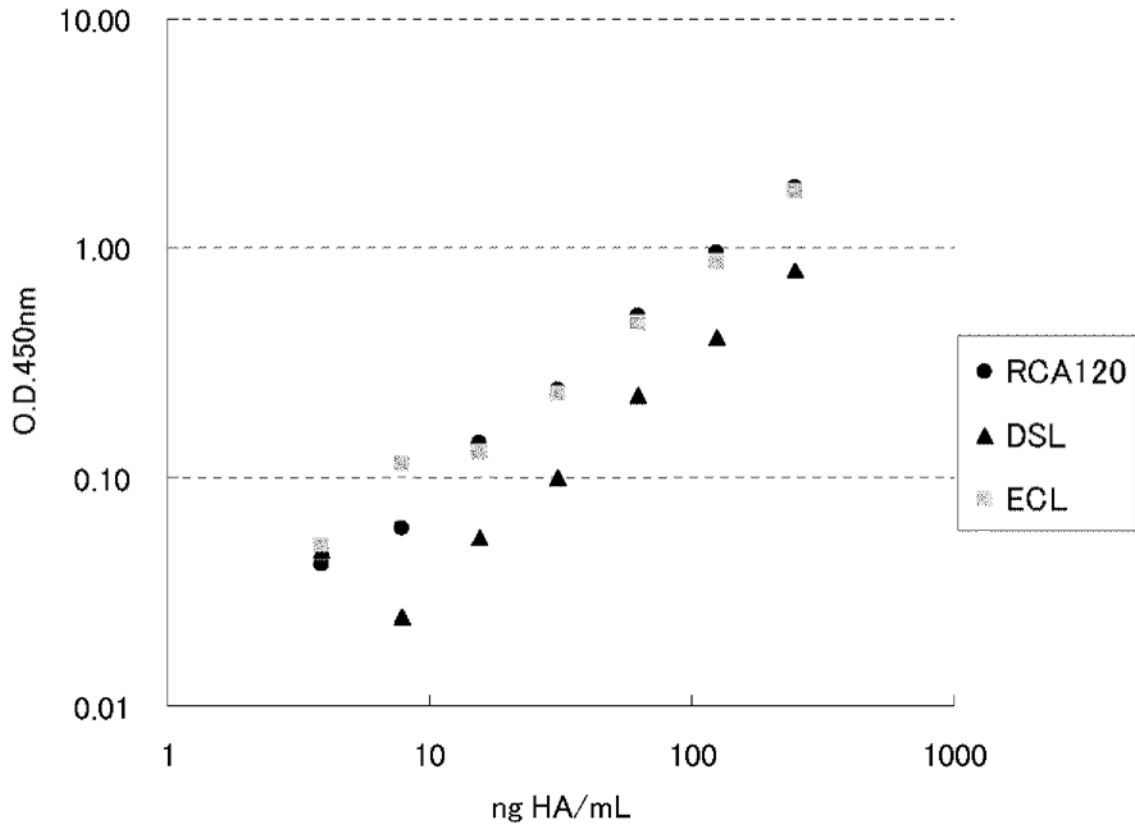


图 2

专利名称(译)	流感病毒的血凝素的测定方法		
公开(公告)号	CN104797934B	公开(公告)日	2018-09-14
申请号	CN201380051914.4	申请日	2013-10-03
[标]申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	电化生研株式会社		
[标]发明人	三股亮太郎 泉谷宪幸		
发明人	三股亮太郎 泉谷宪幸		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N2333/11		
代理人(译)	张桂霞 林森		
审查员(译)	周洋		
优先权	2012222618 2012-10-05 JP		
其他公开文献	CN104797934A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种流感病毒血凝素的新型测定方法，该方法与使用两种抗血凝素抗体的夹层免疫测定法相比可以在短期间内构建测定系统。流感病毒血凝素的测定方法采用了夹层免疫测定法，该夹层免疫测定法包含：用与血凝素结合而不与抗体结合的凝集素和与该血凝素进行抗原抗体反应的抗血凝素抗体夹持该血凝素。

