



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103333865 A

(43) 申请公布日 2013. 10. 02

(21) 申请号 201310218341. 1

(22) 申请日 2013. 06. 04

(71) 申请人 中国食品药品检定研究院

地址 100050 北京市东城区天坛西里 2 号

申请人 王佑春

聂建辉

黄维金

吴雪伶

(72) 发明人 王佑春 聂建辉 黄维金 吴雪伶

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司 11285

代理人 张广育 姜建成

(51) Int. Cl.

C12N 7/01 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

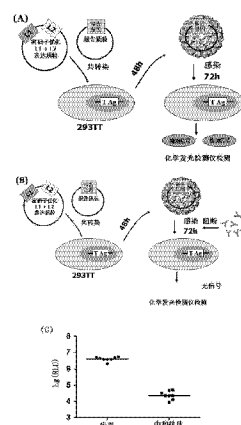
权利要求书1页 说明书12页 附图5页

(54) 发明名称

HPV 假病毒和其试剂盒以及检测 HPV 中和抗体的方法

(57) 摘要

本发明涉及免疫学领域,更具体地涉及一种 HPV 假病毒、含有所述 HPV 假病毒的试剂盒及利用其检测 HPV 中和抗体的方法。



1. 一种假病毒,其包含 HPV 衣壳蛋白和编码 Gluc 蛋白的基因。
2. 权利要求 1 的假病毒,其中所述 HPV 衣壳蛋白是 HPV16、HPV18、HPV6、HPV11、HPV52 或 HPV58 的衣壳蛋白。
3. 权利要求 1 或 2 的假病毒,其中所述编码 Gluc 蛋白的基因被插入表达载体中形成重组表达载体,并且所述基因的核苷酸序列与所述表达载体的表达控制序列可操作地连接;优选地,所述表达载体为真核细胞表达载体;更优选地,所述重组表达载体如图 10 所示。
4. 一种血清中和抗体的检测方法,包括:
 - (1) 将权利要求 1 到 3 中任一项的假病毒和待测血清共孵育后,加入受体细胞中共培养;
 - (2) 吸取一定量的共培养上清,加入化学发光检测试剂;
 - (3) 进行化学发光检测;以及
 - (4) 依据所测得的化学发光检测值计算待测血清的中和抗体滴度。
5. 权利要求 4 的方法,包括:
 - (1) 将权利要求 1 到 3 中任一项的假病毒和待测血清共孵育后,加入等体积的真核细胞培养物中共培养;
 - (2) 吸取一定量的共培养上清,加入 1/10 体积的化学发光检测试剂;
 - (3) 用化学发光检测仪进行化学发光检测;
 - (4) 依据测得的化学发光检测值计算感染抑制率;
 - (5) 将所测得感染抑制率大于 50% 的待测血清样本稀释后再次进行检测;以及
 - (6) 以感染抑制率大于 50% 的最高血清稀释倍数作为待测血清的中和抗体滴度。
6. 权利要求 5 的方法,其中所述化学发光检测试剂为 **BioLux[®]** Gluc Substrate、所述化学发光检测仪为 GloMax 化学发光检测仪。
7. 权利要求 4 到 6 中任一项的方法,其中所述真核细胞培养物中真核细胞的浓度为 75-600 个细胞 / μ l;优选地,所述真核细胞培养物中真核细胞的浓度为 300 个细胞 / μ l;优选地,所述真核细胞为 293TT 或 293FT 细胞。
8. 一种试剂盒,其含有权利要求 1 到 3 中任一项的假病毒。
9. 权利要求 8 的试剂盒,其还含有化学发光检测试剂和真核细胞;
优选地,所述化学发光检测试剂为 **BioLux[®]** Gluc Substrate;
优选地,所述真核细胞为 293TT 或 293FT 细胞。
10. 权利要求 1 到 3 中任一项的假病毒、权利要求 8 或 9 的试剂盒用于检测血清中 HPV 病毒中和抗体的用途;
优选地,所述血清为家兔血清、人血清或小鼠血清;
优选地,所述 HPV 病毒为 HPV16、HPV18、HPV6、HPV11、HPV52 或 HPV58 病毒。

HPV 假病毒和其试剂盒以及检测 HPV 中和抗体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,更具体地涉及一种 HPV 假病毒、含有所述 HPV 假病毒的试剂盒及利用其检测 HPV 中和抗体的方法。

背景技术

[0002] 人乳头瘤病毒(Human papillomavirus, HPV)属于乳头瘤病毒科(papillomaviridae),为无包膜的双链环状 DNA 病毒,现在经过完全测序后归类的 HPV 可分为 100 多种基因型 [1, 2]。根据其致癌性可分为“低危”型和“高危”型。前者包括 HPV6、HPV11 等,主要引起良性的生殖器疣和低度的宫颈上皮坏死(CIN) [3];后者包括 HPV16、HPV18 等,它们的感染是引发宫颈癌的主要原因 [4-6]。在大多数情况下,免疫系统能在 HPV 造成伤害之前将其清除,95% 以上的生殖道 HPV 感染能在 3 到 5 年内痊愈 [7]。但也有少数 HPV 感染不能被清除,经过多年的一系列的病变发展为宫颈癌。

[0003] 宫颈癌是危害女性健康的第二大恶性肿瘤,95% 以上的宫颈癌病理组织中能够检测到 HPV DNA,超过 15 种 HPV 基因型与宫颈癌的发病有关 [8],因而宫颈癌成为第一个由世界卫生组织(WHO)确认的完全由病毒感染所引起的癌症 [9]。宫颈癌全球每年发病约 50 万例,主要发生于发展中国家,我国每年新发病例约 13.5 万,约占世界宫颈癌新发病例总数的 1/4,死亡人数约为 5 万人。

[0004] 开发、研制 HPV 预防性疫苗被认为是预防 HPV 感染及宫颈癌的最根本手段。预防性疫苗成功与否的关键是其能否诱导有效的体液免疫,只有产生针对 HPV 的中和抗体才能抵抗外来 HPV 的感染。因此,建立稳定、有效的疫苗评价系统用于检测疫苗免疫反应的保护效果,对于疫苗的研制和质控具有重要意义。但是,由于 HPV 的生活周期与细胞的分化状态密切相关,无法在体外通过传统的细胞培养系统进行生长繁殖 [10],且从被感染的病理组织中提取的病毒量太少,不能满足中和试验的需要。

[0005] Buck [11] 等利用 HPV 衣壳蛋白 L1、L2 能够非特异包装 DNA 的特性,将含密码子优化的 HPV L1、L2 基因的质粒与表达绿色荧光蛋白(GFP)的报告质粒共转染,48 小时后收取细胞裂解液,成功产生了高滴度的假病毒。这种假病毒与天然病毒的结构和抗原表位类似,可体外模拟 HPV 感染,对于 HPV 的生物学研究、抗体中和活性的鉴定和疫苗开发都有重要意义。Pastrana [12] 等用优化的基因共转染产生了包裹分泌性碱性磷酸酶(SEAP)报告基因的假病毒,并在此基础上建立了基于 SEAP 的检测 HPV 中和抗体的方法。

[0006] 现有方法及缺点:

[0007] 1. 裸鼠异源组织移植模型:该模型原理为 HPV 能够体外感染分化完全的上皮组织。其检测过程是将待测血清与 HPV 病毒悬液及包皮组织块共孵育后,将包皮组织块移植入裸鼠肾包膜下培养,一段时间后取出移植物,通过移植物的大小形态变化、组织学鉴定、RT-PCR 分析 HPV mRNA 等方法来判断血清是否具有中和 HPV 的能力。该方法的缺点是:试验操作复杂,操作周期长(约需 3 个月左右),对实验者熟练程度要求较高,不适于大批量样本检测。另外,该试验需要活的感染性病毒颗粒,但是从患者乳头瘤组织中可提取的 HPV 太

少,不能满足中和实验的需要。为解决该问题,1987 年首次报道了通过裸鼠可在实验室生产 HPV11 [13, 14],但是这种方法只适用于少数的 HPV 基因型,因此可用于裸鼠移植模型进行中和试验的 HPV 基因型别非常有限。

[0008] 2. 利用体外培养角质化细胞的中和试验:HPV 可在完全分化的角质化细胞中生长复制,因此其可在体外感染培养的人角质化细胞,并在细胞中进行复制增殖。该方法的检测过程是将 HPV 与待测血清预孵育后感染体外培养的角质化细胞,若待测血清中含有 HPV 基因型特异性中和抗体,则可阻断 HPV 对角质化细胞的感染,其 RT-PCR 检测 HPV mRNA 结果将为阴性 [13]。该方法的缺点是:可应用的 HPV 基因型别十分有限,且需要培养人角质化细胞,难度较大,操作较为复杂。

[0009] 3. 酶联免疫吸附试验(ELISA):

[0010] 3.1 直接 ELISA 法是检测抗体最常用的方法,该方法首先将主要衣壳蛋白 L1 形成的病毒样颗粒(VLP)作适当稀释后包被 ELISA 板,封闭后加入倍比稀释的待测血清,再加入酶标的二抗,底物显色,通过酶标仪读取每孔光密度值,判断血清中的中和抗体滴度。该方法的缺点是:直接 ELISA 只能初步测定总抗体滴度,而非中和抗体滴度。

[0011] 3.2 竞争抑制 ELISA 是用 VLP 包被封闭后,加入待测血清与辣根过氧化物酶(HRP)标记的中和单抗的混合物,室温反应后洗涤,然后加入底物进行显色检测。该方法的缺点是:利用该方法检测中和抗体时,待测血清中不与 HRP 标记的中和单抗竞争 VLP 中特定表位的中和抗体不能被检测到,因此在竞争抑制 ELISA 法中 HRP 标记的中和单抗应是针对 VLP 主要中和表位的单抗。另外,待测血清中存在的某些非中和抗体可能会在构象上阻止 VLP 与 HRP 标记的中和单抗结合,造成假阳性结果。

[0012] 4. 假病毒中和实验:HPV 的衣壳蛋白 L1、L2 在体外具有自我组装成病毒样颗粒并包装外源基因的特性,利用多质粒共转染方法制备假病毒效率高、周期短、操作简单,被认为是目前构建假病毒最理想的方法。

[0013] 4.1 基于 GFP 的假病毒中和抗体检测方法:将 HPV 的衣壳蛋白 L1、L2 表达质粒和 GFP 表达质粒共转染真核细胞(293FT 或 293TT),包装形成包含 GFP 基因的假病毒颗粒,裂解细胞收获假病毒,所得假病毒可以再感染真核细胞并表达 GFP。将所述假病毒与含中和抗体的待测血清样本共孵育后感染靶细胞,然后通过检测靶细胞中是否表达 GFP 及其表达量来判断待测血清样本所含中和抗体的量。该方法最终通过流式细胞仪检测表达 GFP 的细胞占有细胞的百分比来定量,其缺点是:操作相对较复杂,并且难于实现高通量检测,不适用于大规模的临床试验或临床样本的流行病学调查。

[0014] 4.2 基于 SEAP 的假病毒中和抗体检测方法:该方法原理与基于 GFP 的中和抗体检测方法类似,只是报告基因不同,最后通过化学发光检测细胞表达分泌的 SEAP 来确定样本中和抗体的水平。其缺点是:靶细胞 SEAP 的本底值较高,难于制备高滴度的假病毒,虽然能实现高通量,但操作相对较复杂,且试验成本较高,不适用于大规模的临床试验或临床样本的流行病学调查。

[0015] 总之,目前的试验方法难于检测大规模临床样本的中和抗体水平,因此亟需开发一种灵敏度高、特异性好、周期短且能实现高通量检测的方法。

发明内容

[0016] 本发明构建了包含编码 Gluc 蛋白(gaussia luciferase,长腹水蚤荧光素酶)的基因和人乳头瘤病毒(HPV)衣壳蛋白的假病毒株,其可用于 HPV 中和抗体检测。

[0017] 本发明第一方面提供一种假病毒,其包含 HPV 衣壳蛋白和编码 Gluc 蛋白的基因;

[0018] 本发明第二方面提供一种血清中和抗体的检测方法,包括:

[0019] (1) 将本发明第一方面所述的假病毒与待测血清共孵育后,加入受体细胞中共培养;

[0020] (2) 吸取一定量的共培养上清,加入化学发光检测试剂;

[0021] (3) 进行化学发光检测;以及

[0022] (4) 依据所测得的化学发光检测值计算待测血清中和抗体滴度;

[0023] 本发明第三方面提供一种试剂盒,其含有本发明第一方面所述的假病毒;

[0024] 本发明第四方面提供本发明第一方面的假病毒、第三方面的试剂盒用于检测血清中 HPV 病毒中和抗体的用途。

[0025] 本发明方法的优点包括:1、检测周期短;2、灵敏度高;3、可重复性好;4、结果判读客观;5、高通量;6、样品需求量少;7、检测成本低;8、方法可标准化,便于推广应用。

附图说明

[0026] 图 1 示出了基于化学发光的高通量 HPV 中和抗体检测方法的原理示意图(图 1. A-C)。

[0027] 图 2 示出了细胞量对病毒滴度的影响。

[0028] 图 3 示出了细胞量对中和实验的影响。

[0029] 图 4 示出了孵育时间对病毒滴度的影响。

[0030] 图 5 示出了孵育时间对中和实验的影响。

[0031] 图 6 示出了检测时间对病毒滴度的影响。

[0032] 图 7 示出了检测时间对中和实验的影响。

[0033] 图 8 示出了实验内重复性。

[0034] 图 9 示出了实验间重复性。

[0035] 图 10 示出了 pCMV-Gluc 质粒图谱。

具体实施方式

[0036] 本发明方法是基于血清样本中人乳头瘤病毒(HPV)特异性中和抗体可以阻断假病毒感染细胞而建立的。其原理如下:

[0037] 首先,利用 lipofectamine2000 脂质体共转染技术,分别将可表达不同基因型别 HPV 衣壳蛋白 L1、L2 的质粒与编码 Gluc 蛋白的基因共转染真核表达细胞,然后收获由所述质粒表达的 HPV 衣壳蛋白包裹编码 Gluc 蛋白的基因形成的假病毒。使用所述假病毒感染真核细胞(293TT 或 293FT)后,表达 Gluc 蛋白,加入化学发光检测底物产生化学发光反应。

[0038] 由于发光值和感染细胞的 HPV 病毒量成正比,因此可以通过微孔板光度计读取的发光值反映病毒感染量(图 1A)。若待测血清中含有 HPV 特异性中和抗体,可以与病毒表面相应表位结合,从而可阻断病毒进入细胞内,导致无法检测到酶促发光信号(图 1B)。将只加入所述假病毒感染受体细胞后的发光值与同时加入血清样本后假病毒感染受体细胞的发

光值进行比较,可得到待测血清样本对于 HPV 的感染抑制率(图 1C)。

[0039] 本发明第一方面提供一种假病毒,其包含 HPV 衣壳蛋白和编码 Gluc 蛋白的基因;

[0040] 在一些实施方案中,所述 HPV 衣壳蛋白选自:HPV16、HPV18、HPV6、HPV11、HPV52 或 HPV58 的衣壳蛋白;

[0041] 在一些实施方案中,所述编码 Gluc 蛋白的基因被插入表达载体中形成重组表达载体,并且所述基因的核苷酸序列与所述表达载体的表达控制序列可操作地连接;

[0042] 在一些实施方案中,所述表达载体为真核细胞表达载体;

[0043] 在一个优选的实施方案中,所述重组表达载体如图 10 所示。

[0044] 本发明第二方面提供一种血清中和抗体的检测方法,包括:

[0045] (1) 将本发明第一方面所述的假病毒和待测血清共孵育后,加入受体细胞中共培养;

[0046] (2) 吸取一定量的共培养上清,加入化学发光检测试剂;

[0047] (3) 进行化学发光检测;以及

[0048] (4) 依据所测得的化学发光检测值计算待测血清中和抗体滴度;

[0049] 在一些实施方案中,所述方法包括:

[0050] (1) 将本发明第一方面的假病毒和待测血清共孵育后,加入等体积的真核细胞培养物中共培养;

[0051] (2) 吸取一定量的共培养上清,加入 1/10 体积的化学发光检测试剂;

[0052] (3) 用化学发光检测仪进行化学发光检测;

[0053] (4) 依据测得的化学发光检测值计算感染抑制率;

[0054] (5) 将所得感染抑制率大于 50% 的待测血清样本稀释后再次进行检测;以及

[0055] (6) 以感染抑制率大于 50% 的最高血清稀释倍数作为待测血清的中和抗体滴度。

[0056] 在一些实施方案中,所述化学发光检测试剂为 **BioLux[®]** Gluc Substrate (购自 NEB 公司的 **BioLux[®]** Gaussia Luciferase Assay Kit,产品目录号:E3300);

[0057] 在一些实施方案中,所述化学发光检测仪为 GloMax 化学发光检测仪(购自 Promega 公司);

[0058] 在一些实施方案中,所述真核细胞培养物中真核细胞的浓度为 75-600 个细胞 / μ l;

[0059] 在一个优选的实施方案中,所述真核细胞培养物中真核细胞的浓度为 300 个细胞 / μ l;

[0060] 在一些实施方案中,所述真核细胞为 293TT 或 293FT 细胞;

[0061] 在一个优选的实施方案中,所述真核细胞为 293TT 细胞。

[0062] 本发明第三方面提供一种试剂盒,其含有本发明第一方面所述的假病毒;

[0063] 在一些实施方案中,所述试剂盒还含有化学发光检测试剂和真核细胞;

[0064] 在一个优选的实施方案中,所述化学发光检测试剂为 **BioLux[®]** Gluc Substrate;

[0065] 在一些实施方案中,所述真核细胞为 293TT 或 293FT 细胞;

[0066] 在一个优选的实施方案中,所述真核细胞为 293TT 细胞。

[0067] 本发明第四方面提供本发明第一方面的假病毒、第三方面的试剂盒 用于检测血清中 HPV 病毒中和抗体的用途。

[0068] 在一些实施方案中,所述血清为家兔血清、人血清或小鼠血清;

[0069] 在一些实施方案中,所述 HPV 病毒为 HPV16、HPV18、HPV6、HPV11、HPV52 或 HPV58 病毒。

[0070] 以下结合实施例对本发明进行具体说明。实施例中使用的化合物或试剂可通过商业途径购得,或者通过本领域技术人员已知的常规方法制备得到;所使用的实验仪器可通过商业途径购得。

[0071] 实施例 1 假病毒的制备

[0072] 1 结构基因表达质粒和报告质粒共转染 293FT 细胞

[0073] 在 75cm² 细胞培养瓶中将 293FT 细胞接种到 15ml DMEM 完全培养基(含 1% 双抗即青霉素链霉素溶液(购自 Hyclone 公司),1%L- 谷氨酰胺(购自 Hyclone 公司),1% 非必需氨基酸(购自 Hyclone 公司),10%FBS (购自 Invitrogen 公司))中,在 37℃,5%CO₂ 的孵箱中培养。待所述细胞长至 85% 以上的汇合率时,将细胞培养基吸出,加入 6ml PBS 清洗细胞,然后将 PBS 吸出,加入 3ml 0.05%胰酶(购自 Hyclone 公司,用 PBS 溶液将其按 1:5 体积比稀释后使用)消化 293FT 细胞,5 分钟后用 DMEM 完全培养基重悬细胞并计数。

[0074] 按 4×10⁵ 个细胞 /ml 将所述细胞接种于 75cm² 细胞培养瓶中的 15ml DMEM 完全培养基中,在 37℃,5%CO₂ 的孵箱中培养。待细胞汇合率达 50% 左右时,利用 Lipofectamine2000 (购自 Invitrogen 公司)将结构基因表达质粒 p16sheLL[15、16]、p18sheLL[17、18]、p6sheLLr[19]、p11L1w[20]、p11L2w[21]、p52sheLL[22] 或 p58sheLL[23] (所述结构基因表达质粒分别对应于 HPV16、HPV18、HPV6、HPV11、HPV52 和 HPV58 基因型,均由 NIH 的 John Schiller 教授惠赠,参见 <http://home.ccr.cancer.gov/LC0/packaging.htm>) 分别与报告质粒 pCMV-Gluc (购自 NEB 公司,产品目录号:N8081S) 共转染 293FT 细胞,同时设单独用 pCMV-Gluc 报告质粒转染 293FT 细胞的阴性对照。

[0075] 所述用质粒转染 293FT 细胞的过程如下:

[0076] (1)取结构基因表达质粒和 pCMV-Gluc 报告质粒各 15 μg (1 μg/μl, 15 μl)溶于 1.875ml 无抗性、无牛血清的 Opti-MEM 培养基(购自 Invitrogen 公司)中,并轻柔混匀得到质粒混合液;将 15 μg pCMV-Gluc 报告质粒溶于相同体积的 Opti-MEM 培养基中作为阴性对照;

[0077] (2)取 75 μl Lipofectamine2000,溶于 1.875ml 无抗性、无牛血清的培养基中,轻柔混匀,然后室温静置 5min (静置时间不宜超过 25min),得到脂质体混合液;

[0078] (3)将 1.875ml 所述脂质体混合液加入到 1.875ml 所述质粒混合液中得到转染混合液,并轻柔混匀,然后室温孵育 20min (此时溶液可能出现轻微浑浊);

[0079] (4)将 3.75ml 上述孵育后的转染混合液加入到上述已接种 293FT 细胞并且细胞汇合率达 50% 左右的培养瓶中,轻柔地前后左右摇动使其混匀;

[0080] (5)将所述细胞培养瓶置于细胞培养箱中,37℃、5% CO₂,孵育 6 小时进行转染;

[0081] (6)转染 6 小时后,吸除上清,更换为 15ml DMEM 完全培养基,继续培养。

[0082] 2 转染的 293FT 细胞的收集

[0083] (1)转染 48h 后,弃去细胞培养瓶中的培养基上清;

[0084] (2)用 3ml 0.05% 胰酶(同上)在 37℃ 消化细胞 5 分钟,然后加入 10ml DMEM 完全培养基终止,并将所得细胞悬液转移至 50ml 离心管中;

[0085] (3)离心 210×g, 5min, 弃上清;

[0086] (4)用 1ml DPBS-Mg 溶液(含 Dulbecco's PBS (购自 Invitrogen#14040-141); 9.5mM MgCl₂ 和 1× 抗细菌真菌复合物(购自 Invitrogen#15240-112)) 将细胞重新悬起,并将所得细胞悬液转移至 1.5ml 离心管中, 210×g 离心, 弃上清。

[0087] 3 细胞裂解

[0088] 向上述所得含细胞沉淀的离心管中加入与上述细胞沉淀等体积的细胞裂解液(含 0.5%Brij58 (购自 Sigma), 0.2%Benzonase (购自 Sigma), 0.2%Plasmid Safe (购自 Epicentre) 的 DPBS-Mg 溶液), 混匀, 放至培养箱中, 37℃ 孵育 24 小时进行细胞裂解。

[0089] 4 盐抽提

[0090] (1)取出所得细胞裂解液, 冰浴 5min。

[0091] (2)加入 0.17 倍体积的 5M 的 NaCl 溶液, 使 NaCl 终浓度为 850mmol/L。

[0092] (3)冰浴 10 ~ 20min。

[0093] (4)5000×g 离心 10min。

[0094] (5)取上清即为假病毒抽提液, 并将其分装、-70℃ 冻存。

[0095] 5 假病毒的 TCID₅₀ 测定

[0096] (1)将 293TT 细胞铺于 96 孔细胞培养板(购自 Corning 公司 #3599)中, 每孔加入 100 μl 含 3×10² 个 293TT 细胞 / μl 的 DMEM 完全培养基, 在 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养 6 小时。

[0097] (2)用 DMEM 完全培养基将上述各基因型(HPV16、HPV18、HPV6、HPV11、HPV52 和 HPV58)假病毒抽提液分别先以 1:1000 的倍比稀释, 再进行 2 倍系列稀释(即稀释系数为 2) 获得假病毒稀释液, 每种基因型假病毒抽提液各 9 种稀释度(稀释倍数的倒数);

[0098] (3)在 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 μl 假病毒稀释液(与上述含 293TT 细胞的培养液等体积), 每种基因型假病毒的每种稀释度各 8 个重复孔。

[0099] (4)将细胞培养板置于 37℃, 5%CO₂ 的孵箱中共孵育 72 小时。

[0100] (5)共孵育结束后, 将细胞培养板每孔中的培养上清各转移 15 μl 至化学发光检测板(购自 Corning 公司 #3925)的相应孔中, 然后向所述化学发光检测板各孔中分别加入 15 μl 化学发光检测试剂 **BioLux**[®] Gluc Substrate, 并立即将其放入 GloMax 化学发光检测仪(购自 Promega 公司)中读数。

[0101] (6)根据化学发光检测值计算组织细胞培养半数感染量(TCID₅₀), 即病毒感染一半组织细胞时的病毒稀释倍数, 用 Reed - Muench 方法计算:

[0102] ①计算各病毒稀释度阳性孔数目(a)和阴性孔数目(b);

[0103] ②计算阳性和阴性孔的累积数: 阳性孔累积数(由下向上累计)为(c), 阴性孔累积数(由上向下累计)为(d);

[0104] ③计算阳性孔的百分比: 比率 = (c) / ((c) + (d)) × 100;

[0105] ④计算距离比例:

[0106] 距离比例 = (大于 50% 的阳性百分比 - 50%) / (大于 50% 的阳性百分比 - 小于 50% 的阳性百分比);

[0107] TCID₅₀ 的对数 = 大于 50% 的阳性百分比的最高稀释倍数的对数 + 距离比例 × 稀释系数的对数

[0108] 结果见表 1。

[0109] 表 1 不同基因型假病毒的滴度测定结果

[0110]

假病毒型别	HPV16	HPV18	HPV6	HPV11	HPV52	HPV58
病毒滴度 (TCID ₅₀ /ml)	1024000	32000	256000	256000	128000	4096000

[0111] 实施例 2 血清中 HPV 病毒中和抗体检测

[0112] 世界卫生组织 (WHO) 在其发布的《HPV VLP 疫苗质量、安全性及效力评价指导原则》指出中和实验是评价 HPV 疫苗诱导的抗体是否具有保护作用的“金标准”。

[0113] 本实验分别用上述 6 种基因型的 HPV L1 抗原免疫家兔 (新西兰大耳白, 由中国食品药品检定研究院实验动物生产和供应室提供) 后, 用同型的假病毒和不同型的假病毒分别检测免疫后血清, 步骤如下:

[0114] (1) 将 293TT 细胞铺于 96 孔培养板, 每孔加入 100 μ l 含 3.0×10^2 个 293TT 细胞 / μ l 的 DMEM 完全培养基, 在 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养 6 小时。

[0115] (2) 依据实施例 2 中所得 TCID₅₀ 值, 用 DMEM 完全培养基将所述假病毒抽提液按表 2 进行稀释, 得到假病毒稀释液。

[0116] 表 2 不同基因型假病毒抽提液的稀释倍数

[0117]

假病毒型别	HPV16	HPV18	HPV6	HPV11	HPV52	HPV58
稀释倍数	5120	160	1280	1280	640	20480

[0118] (3) 用 DMEM 完全培养基将上述各基因型 HPV L1 抗原免疫后的家兔血清分别按 1:40 的比例进行稀释, 得到待测血清稀释液。

[0119] (4) 在 96 孔稀释板的每个孔中将 60 μ l 所述假病毒稀释液和 60 μ l 所述待测血清稀释液等体积混合, 每份待测血清样本作两个重复孔。同时设立用 60 μ l DMEM 完全培养基 (代替待测血清) 与 60 μ l 假病毒稀释液混合的对照孔, 以及只加入 120 μ l DMEM 完全培养基的对照孔。

[0120] (5) 将所述 96 孔稀释板在 4℃ 放置 1 小时。

[0121] (6) 从所述 96 孔稀释板的孔中各吸取 100 μ l (与 (1) 中所述含 293TT 细胞的培养液体积相等) 的假病毒与待测血清 (或培养基) 混合物或者 100 μ l DMEM 完全培养基 (对照孔), 贴壁缓缓加入到所述预先已铺好 293TT 细胞并培养 6 小时的 96 孔培养板的对应孔中 (此时总体积为 200 μ l, 293TT 细胞浓度为 1.5×10^2 个细胞 / μ l), 轻拍培养板四周使其混匀。

[0122] (7) 将所述细胞培养板置于 37℃, 5%CO₂ 的孵箱中共孵育 72 小时。

[0123] (8) 共孵育结束后, 将细胞培养板各孔中的培养上清分别转移 15 μ l 至化学发光检测板的相应孔中, 然后向所述化学发光检测板各孔中分别加入 15 μ l 化学发光检测试剂

BioLux[®] Gluc Substrate, 并立即将所述检测板放入 GloMax 化学发光检测仪中读数。

[0124] (9) 根据检测结果计算感染抑制率, 公式为:

[0125] 感染抑制率(%) = (1 - 待测血清组化学发光的细胞比值 / 阴性对照组化学发光的细胞比值) × 100。

[0126] (10) 将感染抑制率大于 50% 的血清样本按 1:40 的梯度进行系列稀释后再次进行中和试验。

[0127] (11) 以感染抑制率大于 50% 的最高血清稀释倍数作为血清的中和抗体滴度(见表 3), 中和抗体滴度高于 40 的血清样本被认为是 HPV 基因型特异的中和抗体阳性样本。

[0128] 结果如表 3 所示, 同型的血清只能中和同型的假病毒, 这说明本发明的方法具有很高的特异性。

[0129] 表 3 血清中和抗体滴度检测结果

[0130]

血清样本 滴度 假病毒	HPV16	HPV18	HPV6	HPV11	HPV52	HPV58
HPV16	3280	<40	<40	<40	<40	<40
HPV18	<40	1552	<40	<40	<40	<40
HPV6	<40	<40	620	<40	<40	<40
HPV11	<40	<40	<40	580	<40	<40
HPV52	<40	<40	<40	<40	2586	<40
HPV58	<40	<40	<40	<40	<40	4581

[0131]

[0132] 注: 表中血清样本按相应的抗原基因型编号, 血清样本为家兔血清。

[0133] 实施例 3 方法学验证和参数优化

[0134] 1 细胞量的选择:

[0135] 向 96 孔细胞培养板的培养孔中分别加入 100 μl 浓度为 75 个细胞 / μl、150 个细胞 / μl、300 个细胞 / μl 和 600 个细胞 / μl 的 293TT 细胞在 DMEM 完全培养基中的培养物。在 37℃, 5%CO₂ 孵箱中培养 6 小时, 然后加入等体积(100 μl) 的假病毒稀释液, 混匀后置于 37℃、5%CO₂ 的孵箱中共孵育 72 小时。

[0136] 共孵育结束后, 将细胞培养板中的培养上清各转移 15 μl 至化学发光检测板的相应孔中, 然后向所述化学发光检测板各孔中分别加入 15 μl 化学发光检测试剂(同上), 并立即放入化学发光检测仪(同上)中读数。

[0137] (1) 细胞量对病毒滴度检测的影响:

[0138] 用 DMEM 完全培养基将实施例 1 所得的假病毒抽提液先进行 1:1000 倍稀释, 再进行 2 倍系列稀释, 然后分别接种至所述含有不同细胞量的细胞培养板中, 孵育 72 小时后按上述方法检测化学发光值。所用 293TT 细胞培养物中的细胞浓度、假病毒抽提液的稀释倍数及检测结果如图 2 所示, 其中横坐标为: 假病毒抽提液稀释倍数的对数; 纵坐标为: 相对发光单位(RLU)的对数。通过图 2 可以看出, 当所述细胞培养物中 293TT 细胞的浓度为 300 个细胞 / μl 时, 所用病毒量与化学发光检测值的相关系数最大(R²=0.994)。

[0139] (2) 细胞量对中和实验结果的影响:

[0140] 使用相同的血清样本、相同假病毒量, 在不同细胞量的情况下检测中和抗体滴度。

所用 293TT 细胞培养物中的细胞浓度、血清样本的稀释倍数及检测结果如图 3 所示(横坐标为:血清样本稀释倍数的对数;纵坐标为:感染抑制率(%)),并通过计算感染抑制率为 50% 时的血清稀释倍数,即 IC₅₀ (本文中 IC₅₀ 的定义以此为准),判断检测的灵敏度。结果显示,当所述细胞培养物中 293TT 细胞的浓度为 300 个细胞/ μ l 时,检测的灵敏度最高(IC₅₀=3052)。

[0141] 综合上述两方面的实验结果,将所用细胞培养物中的细胞浓度优选为 300 个细胞/ μ l。

[0142] 2 病毒量的选择:

[0143] 在所用细胞培养物中的细胞浓度为 300 个细胞/ μ l 时,分别使用两份不同的血清样本,在不同病毒量的情况下,检测样本的中和抗体滴度,结果如表 4 所示。从表 4 的结果可以看出,当病毒量为 32000TCID₅₀/ml 时会降低检测的灵敏度;病毒量为 500TCID₅₀/ml 时,结果变异度会增大;中间 5 个稀释倍数的病毒量对检测结果的影响不大。这说明本发明方法的适用范围广,最终选择中间的病毒量(4000TCID₅₀/ml)作为实验的优选病毒用量。

[0144] 表 4 病毒量对不同血清样本中和抗体滴度的影响

[0145]

血清样本	病毒量 (TCID ₅₀ /ml)						
	32000	16000	8000	4000	2000	1000	500
16	8880	14503	15322	15175	13114	14763	15248
M	7601	10669	10173	11003	11164	12018	3724

[0146] 注:16 代表 1 μ g HPV16 基因型 L1 抗原免疫 Balb/c 小鼠后的血清样本;

[0147] M 代表 0.1 μ g Merck HPV 疫苗 Gardasil (由 Merck 公司惠赠)免疫 Balb/c 小鼠后的血清样本;

[0148] 3 孵育时间的选择:

[0149] 从孵育时间对病毒滴度测定和中和实验结果的影响两方面来对本发明方法的孵育时间进行优化。所选择的孵育时间、假病毒抽提液的稀释倍数及检测结果如图 4(横坐标为:假病毒抽提液稀释倍数的对数;纵坐标为:相对发光单位(RLU)的对数)和图 5(横坐标为:血清样本稀释倍数的对数;纵坐标为:感染抑制率(%))所示。当孵育时间为 72 小时,病毒量与检测值的相关系数最大($R^2=0.9891$)且病毒滴度最高,中和抗体检测结果灵敏度较高(IC₅₀=3024)。因此,最终将孵育时间优选为 72 小时。

[0150] 4 检测时间的选择:

[0151] 从检测时间对病毒滴度测定和中和实验结果的影响两方面来对本发明方法的检测时间进行优化。使用相同的假病毒抽提液并按相同的比例稀释,假病毒抽提液的稀释倍数、检测时间点及检测结果如图 6(横坐标为:假病毒抽提液稀释倍数的对数;纵坐标为:相对发光单位(RLU)的对数)和图 7(横坐标为:检测时间(min);纵坐标为:IC₅₀)所示。

[0152] 结果发现,当在加入化学发光检测试剂后 12 分钟之内检测时,病毒量与检测值的相关系数差异不大,并且病毒滴度检测结果差异不大;中和抗体检测结果灵敏度(IC₅₀)差

异不大。因此,最终将检测时间优选为加入化学发光检测试剂之后 10 分钟内读数。

[0153] 5 本发明检测方法的重复性:

[0154] 使用相同的待测血清样本同一次实验内检测 5 次(分别为:1-1、1-2、1-3、1-4 和 1-5),使用相同的待测血清样本进行不同实验间检测 3 次(分别为:1、2 和 3),分别计算实验内和实验间的变异系数(CV),其计算公式为:变异系数 = 标准差 / 平均值。如图 8 (横坐标为:血清样本稀释倍数的对数;纵坐标为:感染抑制率(%))、图 9 (横坐标为:血清样本稀释倍数的对数;纵坐标为:感染抑制率(%))和表 5 所示,实验内 CV 为 8%,实验间的 CV 为 17%,均小于 20%,表明本发明方法的实验重复性较好。

[0155] 表 5

[0156]

	试验次数	CV
实验内	5	8%
实验间	3	17%

[0157] 实施例 4 不同假病毒检测方法检测结果的比较

[0158] 目前应用最广泛的假病毒检测方法是以 GFP 和 Seap 为报告基因的假病毒中和抗体检测方法。通过使用本发明建立的以 Gluc 为报告基因的方法与所述两种方法检测相同的血清样本,来比较检测结果的差异。结果如表 6 所示,本发明方法(Gluc)与 Seap 方法的检测灵敏度接近,高于 GFP 方法检测灵敏度。

[0159] 表 6 不同方法检测结果的比较

[0160]

IC50 样本 \ 方法	GFP	Seap	Gluc
16	9043	20137	23174
M	6655	8551	11003
NIBSC	93	114	119

[0162] 注:16 代表 1 μ g HPV16 基因型 L1 抗原免疫小鼠后的血清样本;

[0163] M 代表 0.1 μ g Merck HPV 疫苗 Gardasil 免疫小鼠后的血清样本;

[0164] NIBSC 代表 HPV16 基因型抗体国际参考品,为人血清样本(NIBSC code:05/134)。

[0165] 本发明新建立的基于化学发光的高通量人乳头瘤病毒中和抗体检测方法是目前常用的假病毒检测方法比较优势如表 7 所示。

[0166] 表 7

[0167]

检测结果 指标	方法	Gluc	Seap	GFP
灵敏度		高	高	较低
成本		2.4 元/样本	16 元/样本	20 元/样本
高通量		96 孔	96 孔	单孔
检测时间(96 孔板)		6 min	70 min	60 min
操作复杂程度		+	++	+++

[0168] 参考文献

[0169] [1]de Villiers EM,Fauquet C,Broker TR,Bernard HU,zur HH. Classification of papillomaviruses. Virology2004Jun20;324(1):17-27.

[0170] [2]Bosch FX,Manos MM,Munoz N,Sherman M,Jansen AM,Peto J, et al.Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer:a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. J Natl Cancer Inst1995Jun7;87(11):796-802.

[0171] [3]zur HH,de Villiers EM. Human papillomaviruses. Annu Rev Microbiol1994;48:427-47.

[0172] [4]Lowy DR,Schiller JT. Papillomaviruses and cervical cancer: pathogenesis and vaccine development. J Natl Cancer InstMonogr1998; (23):27-30.

[0173] [5]zur HH. Viruses in human cancers. Science1991Nov22;254(5035):1167-73.

[0174] [6]Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. J Pathol1999Sep;189(1):12-9.

[0175] [7]Schlecht NF, Platt RW, Duarte-Franco E, Costa MC, Sobrinho JP, Prado JC, et al. Human papillomavirus infection and time to progression and regression of cervical intraepithelial neoplasia. J Natl Cancer Inst2003Sep3;95(17):1336-43.

[0176] [8]Munoz N, Bosch FX, Castellsague X, Diaz M, de SS, Hammouda D, et al. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. Int J Cancer2004Aug20;111(2):278-85.

[0177] [9]Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. J ClinPathol2002Apr;55(4):244-65.

[0178] [10]Bedell MA, Hudson JB, Golub TR, Turyk ME, Hosken M, Wilbanks GD, et al. Amplification of human papillomavirus genomes in vitro is dependent on epithelial differentiation. J Virol1991May;65(5):2254-60.

[0179] [11]Buck CB, Pastrana DV, Lowy DR, Schiller JT. Efficient intracellular

assembly of papillomaviral vectors. J Virol 2004 Jan; 78(2):751-7.

[0180] [12] Pastrana DV, Buck CB, Pang YY, Thompson CD, Castle PE, FitzGerald PC, et al. Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. Virology 2004 Apr 10; 321(2):205-16.

[0181] [13] Kreider JW, Howett MK, Leure-Dupree AE, Zaino RJ, Weber JA. Laboratory production in vivo of infectious human papillomavirus type 11. J Virol 1987; 61:590-593.

[0182] [14] Smith LH, Foster C, Hitchcock ME, Leiserowitz GS, Hall K, Isseroff R, Christensen ND, Kreider JW. Titration of HPV-11 infectivity and antibody neutralization can be measured in vitro. J Invest Dermatol 1995; 105:438-444.

[0183] [15] Buck, C. B., et al., Carrageenan is a potent inhibitor of papillomavirus infection. PLoS Pathog, 2006. 2(7):p. e69.

[0184] [16] Leder, C., et al., Enhancement of capsid gene expression: preparing the human papillomavirus type 16 major structural gene L1 for DNA vaccination purposes. J Virol, 2001. 75(19):p. 9201-9.

[0185] [17] Roberts, J. N., et al., Genital transmission of HPV in a mouse model is potentiated by nonoxynol-9 and inhibited by carrageenan. Nat Med, 2007. 13(7):p. 857-61.

[0186] [18] Pastrana, D. V., et al., Reactivity of human sera in a sensitive, high-throughput pseudovirus-based papillomavirus neutralization assay for HPV16 and HPV18. Virology, 2004. 321(2):p. 205-16.

[0187] [19] Pastrana, D. V., et al., Cross-neutralization of cutaneous and mucosal Papillomavirus types with anti-sera to the amino terminus of L2. Virology, 2005. 337(2):p. 365-72.

[0188] [20] Mossadegh, N., et al., Codon optimization of the human papillomavirus 11 (HPV11) L1 gene leads to increased gene expression and formation of virus-like particles in mammalian epithelial cells. Virology, 2004. 326(1):p. 57-66.

[0189] [21] Kieback, E. and M. Muller, Factors influencing subcellular localization of the human papillomavirus L2 minor structural protein. Virology, 2006. 345(1):p. 199-208.

[0190] [22] Kondo, K., et al., Modification of human papillomavirus-like particle vaccine by insertion of the cross-reactive L2-epitopes. J Med Virol, 2008. 80(5):p. 841-6.

[0191] [23] Kondo, K., et al., Neutralization of HPV16, 18, 31, and 58 pseudovirions with antisera induced by immunizing rabbits with synthetic peptides representing segments of the HPV16 minor capsid protein L2 surface region. Virology, 2007. 358(2):p. 266-72.

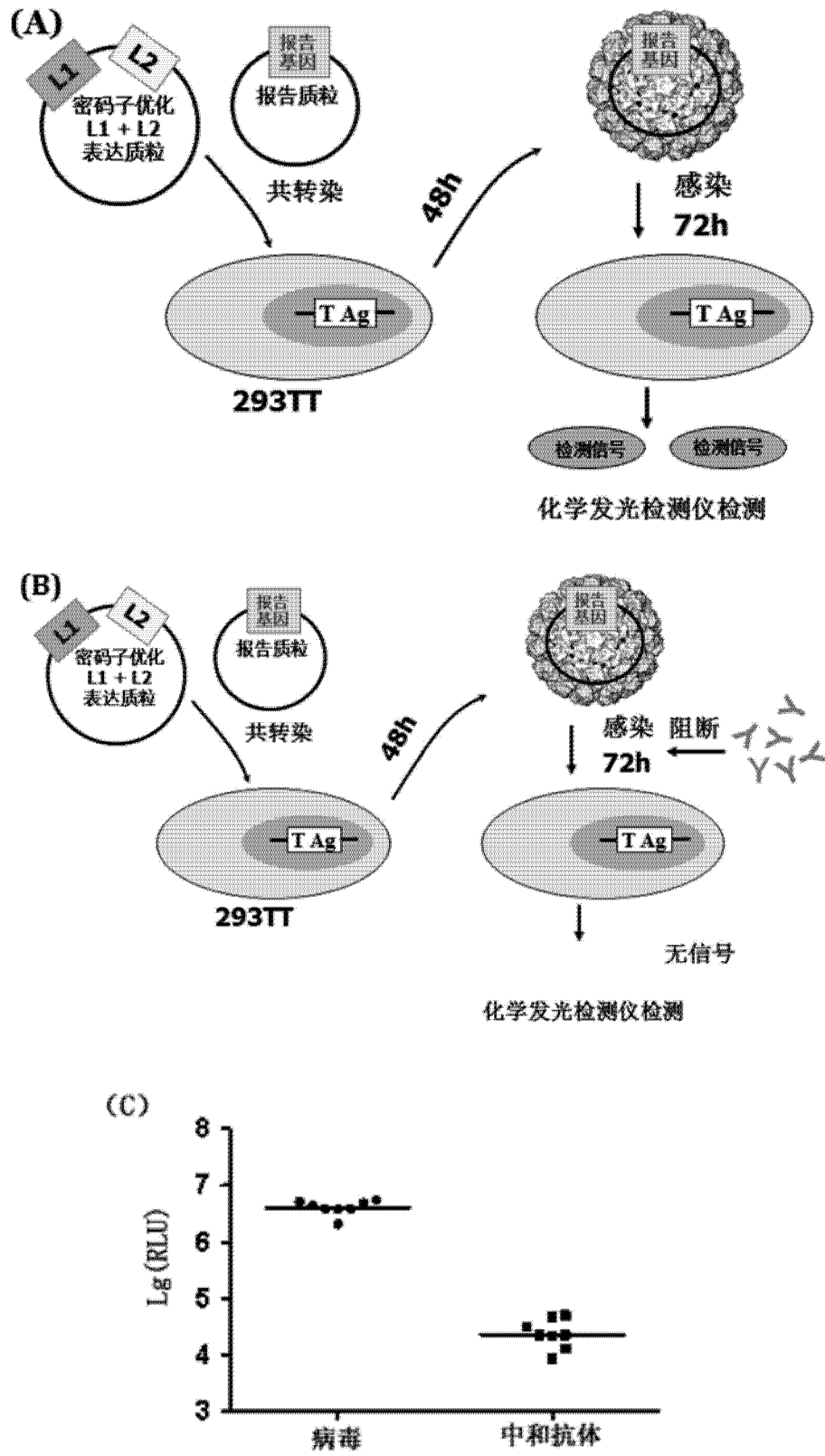


图 1

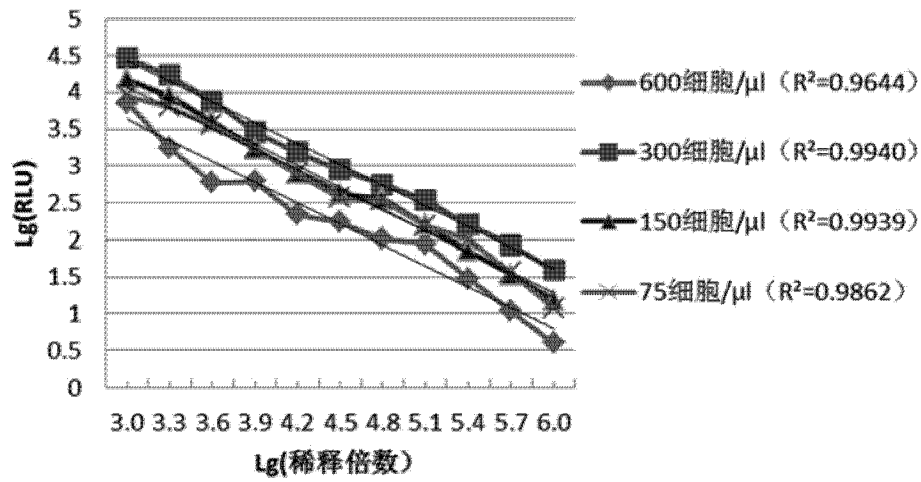


图 2

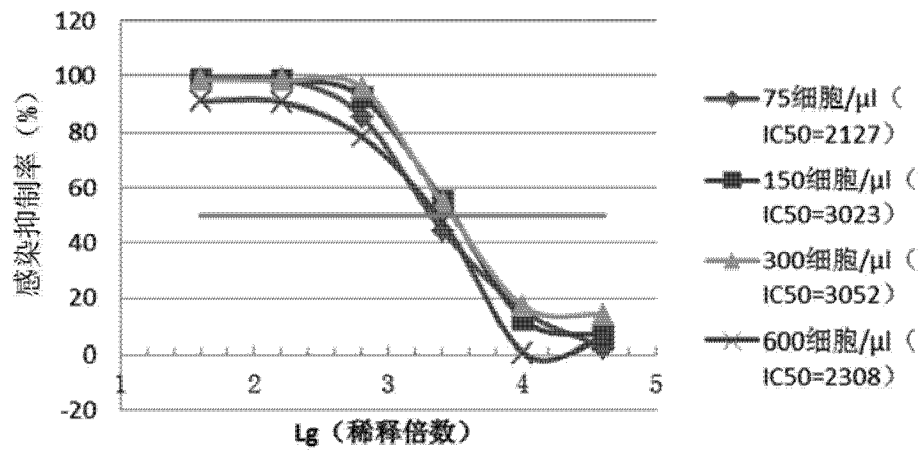


图 3

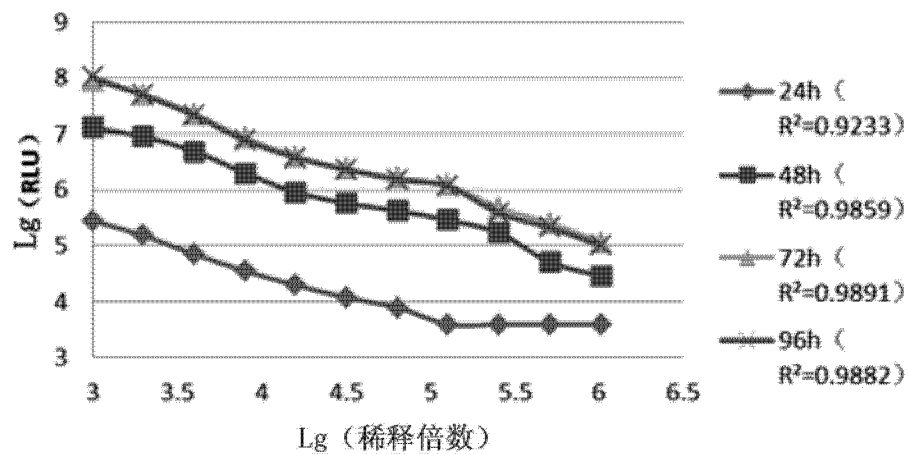


图 4

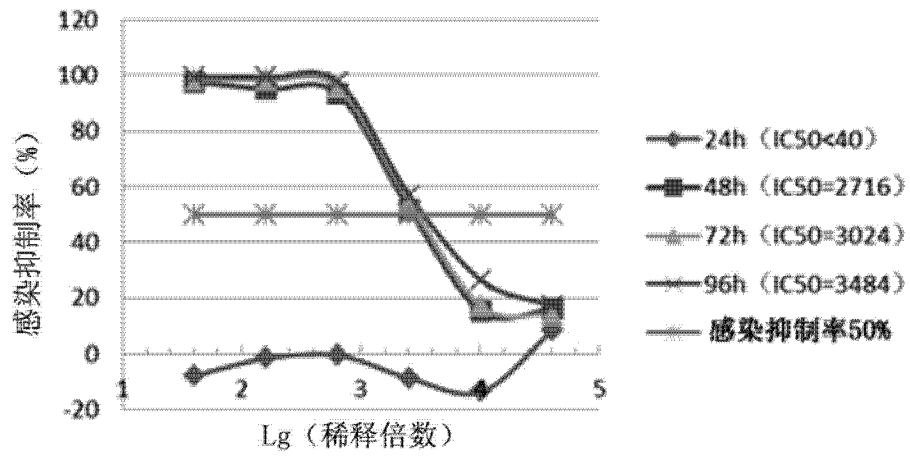


图 5

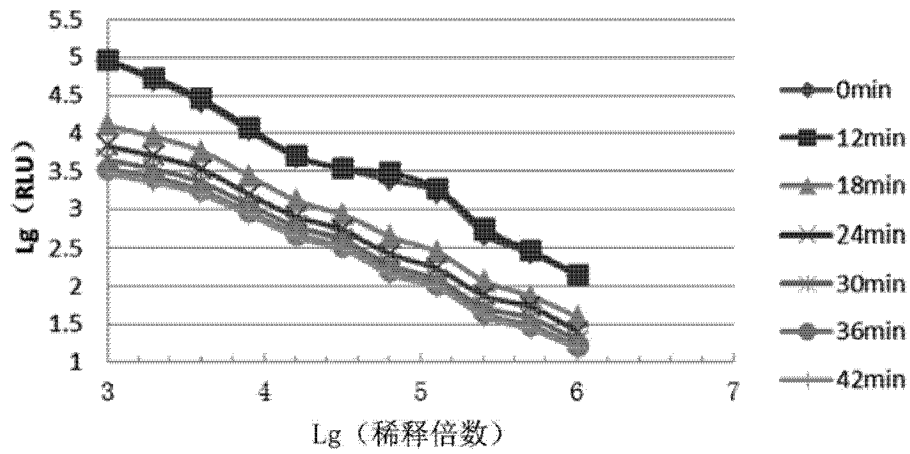


图 6

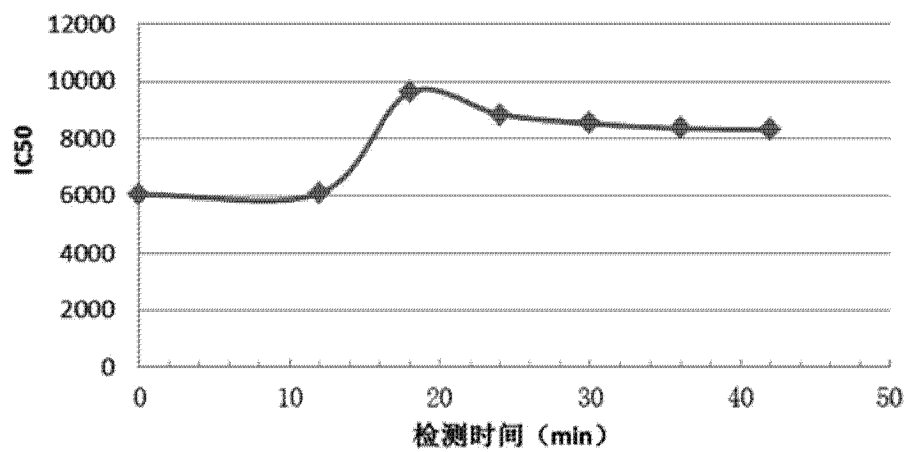


图 7

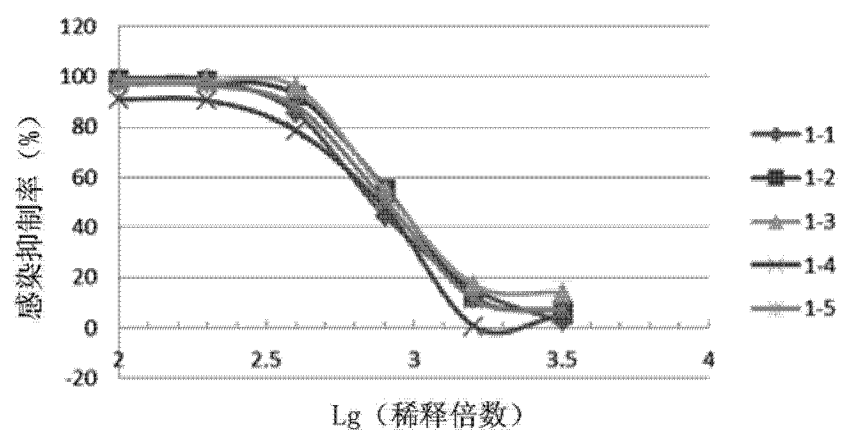


图 8

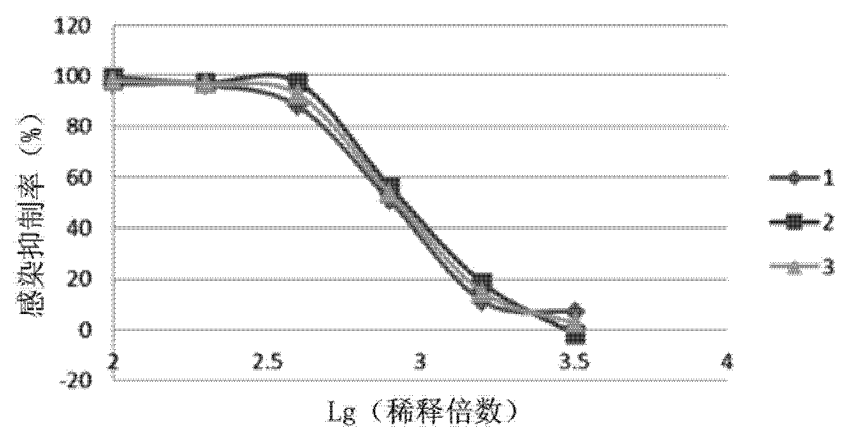


图 9

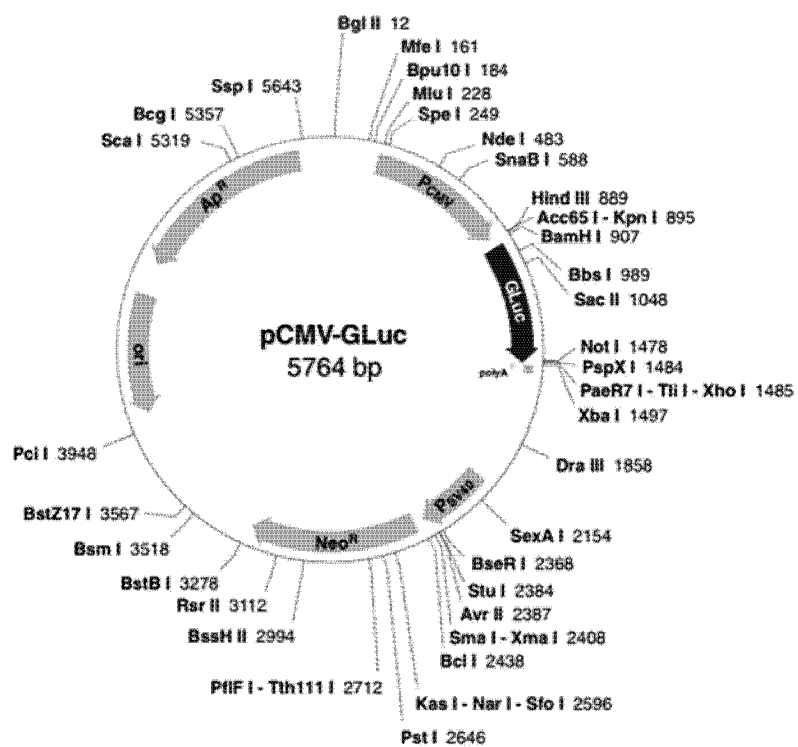


图 10

专利名称(译)	HPV假病毒和其试剂盒以及检测HPV中和抗体的方法		
公开(公告)号	CN103333865A	公开(公告)日	2013-10-02
申请号	CN201310218341.1	申请日	2013-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	中国食品药品检定研究院 王佑春 聂建辉 黄维金		
申请(专利权)人(译)	中国食品药品检定研究院 王佑春 聂建辉 黄维金		
当前申请(专利权)人(译)	中国食品药品检定研究院 王佑春 聂建辉 黄维金		
[标]发明人	王佑春 聂建辉 黄维金 吴雪伶		
发明人	王佑春 聂建辉 黄维金 吴雪伶		
IPC分类号	C12N7/01 G01N33/53		
代理人(译)	姜建成		
其他公开文献	CN103333865B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及免疫学领域，更具体地涉及一种HPV假病毒、含有所述HPV假病毒的试剂盒及利用其检测HPV中和抗体的方法。

