

[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 200910001113.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

[43] 公开日 2009年10月7日

[11] 公开号 CN 101551392A

[22] 申请日 2009.1.22

[21] 申请号 200910001113.2

[30] 优先权

[32] 2008.1.22 [33] CN [31] 200810004346.3

[71] 申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路
422号

共同申请人 养生堂有限公司

[72] 发明人 程通 郑舟 周国栋 杜海莲
张军 夏宁邵

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所
代理人 罗菊华

权利要求书3页 说明书32页 附图5页

[54] 发明名称

一种检测人乳头瘤病毒中和抗体的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种高效、简便的人乳头瘤病毒中和抗体的检测方法，该方法可适用于对人乳头瘤病毒中和抗体的高通量检测。本发明方法的特征在于用斑点检测法来检测被人乳头瘤病毒或假病毒感染的细胞。本发明同时还公开了上述方法在筛选和鉴定中性 HPV 单克隆抗体、评价人乳头瘤病毒疫苗免疫保护性、人乳头瘤病毒疫苗效力试验 (ED₅₀ 测定) 等方面的用途。

1、高通量检测被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞的方法，包括：(1) 使被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞带有适于斑点检测仪器（或，斑点检测法）检测的信号，但未被感染的细胞不带有该信号；和 (2) 通过使用斑点检测仪器（或，通过以斑点检测法）检测该信号来检测被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞。

2、权利要求 1 的方法，用于被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞的计数。

3、通过使样品中可能存在的人乳头瘤病毒中和抗体与人乳头瘤病毒假病毒或病毒接触以阻止人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染细胞（通常是培养细胞），并检测被人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染的细胞，来检测样品中的人乳头瘤病毒中和抗体的方法，其特征在于：采用权利要求 1 或 2 的方法来检测被人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染的细胞。

4、权利要求 3 所述方法，其中所述样品为来自待检个体的分离的生物学样品，优选所述样品为血清；或来自组织培养的生物学样品。

5、权利要求 3-4 任一项所述方法，其中所述方法用于检测样品中人乳头瘤病毒中和抗体的存在与否和/或其效价。

6、权利要求 1-5 之任一项所述的方法，其中所述斑点检测法中检测数据是通过使用斑点检测仪器获得的，斑点检测仪器能够用于从细胞群体中分辨和测算产生特定信号（例如颜色）的细胞的数量，优选 Elispot。

7、权利要求 1-6 之任一项所述的方法，其中使感染细胞产生能够被斑点检测仪器检测的信号是通过如下方法获得的：报告基因表达元件在感染细胞中表达产生报告蛋白，该报告蛋白可直接产生或间接（例如通过显色反应）产生能够被斑点检测仪器检测的信号。

8、权利要求 7 所述的方法，其中所述的报告基因在感染细胞中的表达是通过人乳头瘤病毒假病毒或病毒感染细胞实现的；报告基因表

..

达元件可通过带有报告基因表达元件的人乳头瘤病毒假病毒感染细胞而导入细胞中表达，或者，也可通过人乳头瘤病毒假病毒或病毒感染带有报告基因表达元件的细胞后激活该报告基因表达元件表达，优选带有报告基因表达元件的人乳头瘤病毒假病毒的方式。

9、权利要求 1-8 之任一项所述的方法，其中所述的报告基因因为其表达产物可以直接或间接导致产生能够被斑点检测仪器检测的信号基因，如 β 半乳糖苷酶基因等。

10、权利要求 1-9 之任一项所述的方法，其包括以下步骤：

A) 将细胞培养于固相培养载体（例如细胞培养皿、细胞培养板等，优选细胞培养板，更优选 96 孔细胞培养板）上，作为人乳头瘤病毒或人乳头瘤病毒假病毒感染的靶细胞；所述细胞为动物细胞，特别是哺乳动物细胞，也可是一种改造的细胞，其可在人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染后表达报告蛋白；

B) 根据所需要检测的人乳头瘤病毒中和抗体所属的人乳头瘤病毒型别，准备需要的人乳头瘤病毒或人乳头瘤病毒假病毒，例如带有报告基因表达元件的人乳头瘤病毒假病毒；

其中，A) 中所述的细胞在被 B) 中所述的人乳头瘤病毒或者人乳头瘤病毒假病毒感染后能够表达报告蛋白，该报告蛋白能直接产生或间接（例如通过显色反应）产生能够被斑点检测仪器检测的信号；

C) 使待检测样品与步骤 B) 中所述的人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒接触，使得样品中的人乳头瘤病毒中和抗体，如果存在的话，会与人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒结合，从而能够阻止人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒对步骤 A) 中所述靶细胞的感染；该接触在允许样品中的中和抗体与人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒结合的条件下进行；

D) 使步骤 C) 的产物（检测样品与人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒的混合液）和步骤 A) 的产物（培养于固相培养载体的细胞）接触，该接触在允许细胞正常生长的条件下进行；

E) 应用斑点检测仪器（如 Elispot），通过检测带有由报告蛋白

直接或间接产生的信号的细胞，检测被感染细胞的数量；

F) 根据步骤 E) 获得的结果测算样品中是否有人乳头瘤病毒中和抗体和/或其效价。

11、权利要求 10 的方法，其中步骤 E) 应用斑点检测仪器（如 Elispot）检测被感染细胞的数量通过如下方法来进行：细胞如被人乳头瘤病毒或人乳头瘤病毒假病毒感染后，细胞内或通过人乳头瘤病毒假病毒导入的报告基因表达产生报告蛋白，该报告蛋白可直接作为信号产生体产生信号，也可通过反应（如酶促反应等）使其它信号产生体产生信号；细胞是否被感染的判定标准是细胞是否具有由信号产生体产生的信号；检测具有由信号产生体产生的信号的细胞的数量。

12. 权利要求 9 的方法，其中步骤 A) 中所述的“改造的细胞”为其在基因组中或者基因组外携带包含权利要求 9 中所述的报告基因编码序列的编码核酸序列，这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接，表达控制序列在人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染后可启动报告基因的表达。

13、权利要求 11 的方法，其中信号产生体产生的信号为颜色信号，可使细胞产生与正常细胞不同的颜色（如蓝色），该颜色信号可被斑点检测仪器（如 Elispot）所检测。

14、权利要求 11 的方法，其中信号产生体是酶、化学发光物质、同位素、或稀土元素。

15. 斑点检测仪器或斑点检测法或权利要求 1-14 任一项的方法在检测人乳头瘤病毒中和抗体中的用途、在筛选 HPV 中和性单克隆抗体中的用途、在检测 HPV 中和抗体效价中的用途、在制备 HPV 中和抗体诊断试剂盒中的用途、在 HPV 疫苗开发和质控中的用途、在筛选或制备抗 HPV 或其相关疾病药物中的用途、或在治疗 HPV 感染中的用途。

一种检测人乳头瘤病毒中和抗体的方法

技术领域

本发明涉及人乳头瘤病毒抗体检测领域。更具体地，本发明涉及通过联合应用带有报告基因的人乳头瘤病毒假病毒和自动扫描仪器，对人乳头瘤病毒中和抗体进行检测的方法。

背景技术

人乳头瘤病毒 (HPV) 感染的流行范围广，所引发的相关致死性的恶性肿瘤和多种性传播疾病对人类健康具有严重的危害性，开发安全有效的预防或治疗性疫苗具有重大意义。针对 HPV 的中和抗体水平是 HPV 疫苗研究开发的关键性指标，因此建立高效、准确和便捷的中和抗体检测方法十分重要。然而，由于 HPV 具有严格的宿主特异性，同时其病毒复制与宿主细胞的分化状态密切相关，目前难于在体外对 HPV 进行快速高效的组织培养，也缺乏适宜的动物模型。因此探索建立可及时快速鉴定或筛选中和抗体和评估待选疫苗保护性的方法是十分必要的。

目前，已发展出多种不同类型的 HPV 中和抗体评估方法，如基于免疫缺陷小鼠组织移植模型的评估方法 (White WI 等，病毒学杂志，1998 年，72 卷：959-964 页)、基于体外感染原代上皮组织的评估方法 (Meyers C 等，科学，1992 年，257 卷：971-973 页)、基于 HPV 类病毒颗粒 (VLP) 的 ELISA 方法 (1999 年，Semin Cancer Biol) 以及血凝抑制实验 (Roden RB 等，病毒学杂志，1996 年，70 卷：3298-3301 页) 等，但这些方法分别存在操作复杂、效率低、实验周期长或不能准确反映抗体的中和保护作用等问题。因此，迫切需要发展能够便捷、有效地检测 HPV 中和抗体的方法，同时希望新方法能够适合于进行高通量的检测。近来，研究显示 HPV VLP 具有可非特异

性包裹质粒核酸的特点,因此可构建携带报告质粒的 HPV 假病毒(HPV pseudovirus)用于体外有效模拟 HPV 感染过程,并可用于对 HPV 中和抗体进行快速检测(Buck CB 等,病毒学杂志,2004 年,78 卷:751-757 页)。基于 HPV 假病毒的中和抗体检测方法相比其它传统方法具有较为明显的简便、效率高的优点,实验周期缩短,对于不同的 HPV 亚型具有较好的通用性。目前,基于 HPV 假病毒的中和抗体检测方法已得到日益广泛的应用。

然而随着研究的深入,对 HPV 中和抗体检测提出了更高的要求,除了灵敏度和准确度好外,同时要求能够更为快速、简便,能够更准确地进行客观的量化检测以提高重复性。当前基于 HPV 假病毒的中和抗体检测方法,主要有 2 种:(1)以绿色荧光蛋白(GFP)为报告基因,构建带有 GFP 报告基因表达元件的 HPV 假病毒,在感染 293TT 细胞后用荧光显微镜目测或流式细胞仪(FACS)检测发绿色荧光的细胞(被感染细胞),通过检测 HPV 中和抗体对假病毒感染的阻断能力评估其效价;(2)以分泌型碱性磷酸酶(SEAP)为报告基因,构建带有 SEAP 报告基因表达元件的 HPV 假病毒,感染 293TT 细胞后通过离心收集细胞培养上清,之后通过 SEAP 化学发光检测试剂盒进行显色,再用化学发光酶标仪获得结果,通过检测 HPV 中和抗体对假病毒感染的阻断能力评估其效价。在应用中发现,上述第一种方法的操作较为复杂耗时,需要进行细胞消化操作,然后逐孔用 FACS 进行检测,1 个 96 孔板的检测过程通常需要 2 至 3 个小时,耗时费力;第二种方法的操作可使用类似酶标仪的仪器进行快速扫描判定,有利于批量检测,但其试剂盒成本较高,其主要检测酶促显色反应程度,同时这种方法存在灵敏度低的问题,细胞在被少量感染时 SEAP 分泌量低就会存在读值的阳性/阴性值比(P/N 比)低的问题,会影响结果判定。因此为了提高 P/N 比,就需要使用更大量的假病毒,不利于提高实验效率。

本发明建立了一种简单、准确而又高灵敏度的 HPV 中和抗体检测方法,可更好地满足对 HPV 中和抗体检测实验的要求。

发明概述

本发明的目的是建立简便、有效、高灵敏度的，并且能够更适合于进行高通量检测的 HPV 中和抗体检测方法。本发明在检测中引入了具有快速扫描检测能力的斑点检测仪器，采用斑点检测法检测被 HPV 或 HPV 假病毒感染的细胞，同时相应采用了可使被感染细胞产生颜色标记信号以适于应用斑点检测仪器进行检测的报告基因，从而组合建立了一种新型高效的 HPV 中和抗体检测模式，并将这种模式应用于 HPV 中和抗体的检测方法，可用于检测不同亚型 HPV 的中和抗体。

本发明的 HPV 中和抗体检测方法具有简便、快速、更适于进行高通量检测的特点。在一个实施方案中，应用本发明方法和当前常用方法对同一样品进行了对比检测实验，结果显示二者具有高度的重合性，说明了本发明的方法同样具有很好的灵敏度。由于本发明的方法采用斑点检测法，是一种原位检测的方式，在检测过程中采用自动化连续检测的斑点检测仪器，可显著减少检测过程中的人工干预，从而能够显著提高检测的效率。

具体地，本发明的 HPV 中和抗体检测方法涉及了将使被 HPV 或 HPV 假病毒感染的细胞产生颜色标记的方法和斑点检测仪器检测方法组合应用于 HPV 中和抗体检测的方法。

本发明提供了可使被 HPV 或 HPV 假病毒感染的细胞产生颜色标记的方法，通过构建带有报告基因表达元件的 HPV 假病毒，其感染细胞后可介导报告基因的表达，其产物可直接作为信号产生体或间接（如通过催化作用等）导致另外的信号产生体产生可被本发明所述的斑点检测仪器所识别检测的信号。本发明还提出了其它的可使被 HPV 或 HPV 假病毒感染的细胞产生颜色标记的方法，通过一种改造后的细胞，该细胞的基因组中或者基因组外携带了其表达产物可以直接或间接导致细胞产生能够被斑点检测仪器检测的信号的报告基因的编码核酸序列，该编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接，表达控制序列在 HPV 假病毒或 HPV 感染后可启动报告基因的表达，从而使被 HPV 或 HPV

假病毒感染后的细胞产生可被斑点检测仪器检测的信号。

本发明涉及了将斑点检测仪器应用于 HPV 中和抗体检测。斑点检测仪器的主要特征是能够用于从细胞群体中分辨和测算与正常细胞不同颜色的细胞的数量，同时最好还能够进行连续自动检测。在一个具体实施方案中，本发明以目前广泛应用于细胞免疫检测实验的仪器 Elispot 为示例。Elispot 的性能符合本发明提出的对斑点检测仪器的要求，能够有效地满足本发明的检测方法的需要。目前，还尚未有 Elispot 用于 HPV 中和实验的报道。

本发明还涉及了选择适合本发明的 HPV 中和抗体检测方法要求的报告基因。该报告基因具有的特征是：其在细胞中的表达产物可以直接或间接导致细胞产生能够被斑点检测仪器检测的信号。在一个具体实施方案中，本发明以 β -半乳糖苷酶报告基因为示例。 β -半乳糖苷酶报告基因在细胞中的表达产物 β -半乳糖苷酶在显色底物（如 X-gal 或 blue-gal 等）存在的情况下，可使所表达细胞产生出区别于未表达细胞的可被斑点检测仪器（如 Elispot）识别的蓝色信号。本发明还提供了构建可用于本发明的 HPV 中和抗体检测方法的 HPV 假病毒的构建方法。

本发明还涉及本发明的 HPV 中和抗体检测方法在筛选 HPV 中和性单克隆抗体中的用途。

本发明还涉及本发明的 HPV 中和抗体检测方法在检测 HPV 中和抗体效价中的用途。

本发明还涉及本发明的 HPV 中和抗体检测方法在制备 HPV 中和抗体诊断试剂盒中的用途。

本发明还涉及本发明的 HPV 中和抗体检测方法在 HPV 疫苗开发和质控中的用途。

本发明还涉及本发明的 HPV 中和抗体检测方法在筛选或制备抗 HPV 或其相关疾病药物中的用途。

本发明还涉及本发明的 HPV 中和抗体检测方法在治疗 HPV 感染中的用途。

下面结合附图对本发明进行更详细的说明。从下文的详细描述中，本发明的上述方面和本发明的其他方面将是明显的。

附图说明

图1显示了使用斑点检测仪器Elispot对包装有 β -半乳糖苷酶报告质粒的HPV假病毒感染后并经显色反应后的293FT细胞的检测结果，被感染细胞可显示出蓝色，区别于未感染细胞，可被Elispot所识别检测，每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数量可显示于各孔图像的左上方。

图2显示了本发明的HPV中和抗体检测方法的示例简图。

图3显示了分别应用本发明的HPV中和抗体检测方法与目前常用的HPV中和抗体检测方法对同一经梯度稀释的HPV16中和性单克隆抗体8A9的中和效价的检测结果的相关性比较结果，

图4显示了应用本发明的HPV中和抗体检测方法检测HPV16 VLP免疫后的兔、羊的血清样品中的HPV16中和抗体的水平。

图5显示了应用本发明的HPV中和抗体检测方法在HPV16疫苗供试品免疫保护性评价实验中的检测结果。

具体实施方式

除非另外定义，这里所用的所有技术和科学名词都表达的是在本发明涉及领域里的熟练技术人员所理解的通常含义。这里所用的命名和在细胞培养、分子生物学、生物化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。

一方面，本发明提供一种通过斑点检测法高通量检测被HPV假病毒或病毒感染的细胞或其数量的方法。

在一个实施方案中，可以通过使用斑点检测仪器检测感染细胞特有（未感染细胞不具有）的信号来检测被HPV假病毒或病毒感染的细胞或其数量。

本发明还提供一种高通量检测被HPV假病毒或病毒感染的细胞或

其数量的方法，包括：（1）使被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞带有适于斑点检测仪器检测的信号，但未被感染的细胞不带有该信号；和（2）通过使用斑点检测仪器检测该信号（或带有该信号的细胞）来检测被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞或其数量。

在一个具体实施方案中，使被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞带有适于斑点检测仪器检测的信号是通过如下方法获得的：报告基因表达元件在感染细胞中表达产生报告蛋白，该报告蛋白可直接产生或间接（例如通过显色反应）产生能够被斑点检测仪器检测的信号。

在一个具体实施方案中，所述的报告基因在感染细胞中的表达是通过人乳头瘤病毒假病毒或病毒感染细胞实现的。报告基因表达元件可通过带有报告基因表达元件的人乳头瘤病毒假病毒感染细胞而导入细胞中表达，或者，也可通过人乳头瘤病毒假病毒或病毒感染带有报告基因表达元件的细胞后激活该报告基因表达元件表达，优选带有报告基因表达元件的人乳头瘤病毒假病毒的方式。

在一个具体实施方案中，所述的报告基因因为其表达产物可以直接或间接导致产生能够被斑点检测仪器检测的信号基因，如 β 半乳糖苷酶基因等。

优选地，本发明检测感染细胞的方法用于被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞的计数。因此，本发明还提供一种高通量检测被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞数量的方法。

所述细胞通常是培养细胞。

本发明还提供一种采用斑点检测法检测样品中的人乳头瘤病毒中和抗体的方法。

本发明还提供一种通过使样品中可能存在的人乳头瘤病毒中和抗体与人乳头瘤病毒假病毒或病毒接触以阻止人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染细胞（通常是培养细胞），并检测被人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染的细胞，来检测样品中的人乳头瘤病毒中和抗体的方法，其特征在于：采用斑点检测法高通量检测被人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染的细胞或其数量。

在一个实施方案中，可以通过使用斑点检测仪器检测感染细胞特有（未感染细胞不具有）的信号来检测被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞或其数量。

在一个具体实施方案中，所述高通量检测被人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染的细胞或其数量采用如下方法来进行，所述方法包括：（1）使被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞带有适于斑点检测仪器检测的信号，但未被感染的细胞不带有该信号；和（2）通过使用斑点检测仪器检测该信号（或带有该信号的细胞）来检测被 HPV 假病毒或病毒感染的细胞。

另一方面，本发明涉及一种简便、高效、适于进行高通量检测的 HPV 中和抗体检测方法，可用于检测样品中是否存在 HPV 中和抗体，也可用于评价样品中 HPV 中和抗体的效价。本发明的方法可适用于检测不同亚型 HPV 的中和抗体，在本发明的具体实施方案中，作为示例，本发明的 HPV 中和抗体检测方法被应用于分别检测 HPV16、HPV18、HPV6、HPV11 中和抗体，也可以应用于检测其他 HPV 亚型的中和抗体，如 HPV33、HPV35、HPV34、HPV52、HPV45、HPV59、HPV31、HPV56、HPV58 等。

在本发明所述方法中，所述样品为来自待检个体的分离的生物学样品，优选所述样品为血清；也来自组织培养的生物学样品。

所述 HPV 中和抗体检测方法可用于检测样品中人乳头瘤病毒中和抗体的存在与否和/或其效价。

在本发明中，所述斑点检测法中检测数据优选是通过使用斑点检测仪器获得的。斑点检测仪器能够用于从细胞群体中分辨和测算产生特定信号（例如颜色）的细胞的数量，优选 Elispot。斑点检测仪器（如 Elispot）一般可以通过检测带有由报告蛋白直接或间接产生的信号的细胞来检测被感染细胞的数量。

在一个具体实施方案中，使感染细胞产生能够被斑点检测仪器检测的信号是通过如下方法获得的：报告基因表达元件在感染细胞中表达产生报告蛋白，该报告蛋白可直接产生或间接（例如通过显色反应）

产生能够被斑点检测仪器检测的信号。

在一个具体实施方案中，所述的报告基因在感染细胞中的表达是通过人乳头瘤病毒假病毒或病毒感染细胞实现的。报告基因表达元件可通过带有报告基因表达元件的人乳头瘤病毒假病毒感染细胞而导入细胞中表达，或者，也可通过人乳头瘤病毒假病毒或病毒感染带有报告基因表达元件的细胞后激活该报告基因表达元件表达，优选带有报告基因表达元件的人乳头瘤病毒假病毒的方式。

在一个具体实施方案中，所述的报告基因因为其表达产物可以直接或间接导致产生能够被斑点检测仪器检测的信号基因，如 β 半乳糖苷酶基因等。

在一个具体实施方案中，本发明提供一种 HPV 中和抗体检测方法，该方法包括以下步骤：

A) 将细胞培养于固相培养载体（例如细胞培养皿、细胞培养板等，优选细胞培养板，更优选 96 孔细胞培养板）上，作为人乳头瘤病毒或人乳头瘤病毒假病毒感染的靶细胞；所述细胞为动物细胞，特别是哺乳动物细胞，也可以是一种改造的细胞，其可在人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染后表达报告蛋白；

B) 根据所需要检测的人乳头瘤病毒中和抗体所属的人乳头瘤病毒型别，准备需要的人乳头瘤病毒或人乳头瘤病毒假病毒，例如带有报告基因表达元件的人乳头瘤病毒假病毒；

C) 使待检测样品与步骤 B) 中所述的人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒接触，使得样品中的人乳头瘤病毒中和抗体，如果存在的话，会与人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒结合，从而能够阻止人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒对步骤 A) 中所述靶细胞的感染；该接触在允许样品中的中和抗体与人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒结合的条件下进行，如在 4℃ 放置 1 小时；

D) 使步骤 C) 的产物（检测样品与人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒的混合液）和步骤 A) 的产物（培养于固相培养载体的细胞）接触，该接触在允许细胞正常生长的条件下进行，如在 37℃ CO₂ 培养

箱中培养 72 小时；

E) 应用斑点检测仪器（如 Elispot）（通过例如检测带有由报告蛋白直接或间接产生的信号的细胞）检测被感染细胞的数量；

F) 根据步骤 E) 获得的结果测算样品中是否有人乳头瘤病毒中和抗体和/或其效价。

在一个优选实施方案中，A) 中所述的细胞在被 B) 中所述的人乳头瘤病毒或者人乳头瘤病毒假病毒感染后能够表达报告蛋白，该报告蛋白能直接产生或间接（例如通过显色反应）产生能够被斑点检测仪器检测的信号。

步骤 A) 中所述的细胞为动物细胞，特别是哺乳动物细胞；也可以是一种改造的细胞。所述的“改造的细胞”为其在基因组中或者基因组外携带包含报告基因编码序列的编码核酸序列，这些编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接，表达控制序列在人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染后可启动报告基因的表达。其中所述的报告基因需具有如下特征：其表达产物可以直接或间接导致所表达的细胞产生能够被斑点检测仪器检测的信号，如 β 半乳糖苷酶基因等。其中所述的“表达控制序列”是实现基因表达所需要的控制序列，是本领域熟知的，通常必须包括启动子（可以是任何适于在细胞中表达目的基因的启动子。可以是组成型的，优选是诱导型的。还可以是复合启动子，如双启动子），常常也包括转录终止序列，也可以包含其他序列，如增强子序列；基因表达对于蛋白质编码序列通常是指转录和翻译，产生成熟的蛋白质。其中所述的“可操作地连接”是指所连接的分子的连接方式使得能够实现预期的功能，例如，表达控制序列与基因编码序列的可操作的连接可实现表达控制序列对基因编码序列的表达控制作用。在制备本发明所述的“改造的细胞”的方法中，可以通过用包含所述的报告基因编码核酸序列的表达载体（如质粒载体或病毒载体等）转化或转染或转导细胞来获得本发明改造细胞，只要最终得到的细胞包含所述的报告基因的编码核酸序列即可。

步骤 B) 中所述的带有报告基因表达元件的人乳头瘤病毒假病毒

通过例如如下方法获得的：将带有报告基因表达元件（报告基因编码序列的编码核酸序列与表达控制序列可操作地连接）的报告质粒，与可表达 HPV L1 蛋白和 L2 蛋白的表达载体质粒共转染入细胞（如 293FT 细胞），在转染后收集细胞的裂解液，该裂解液中含有包装有报告质粒的 HPV 假病毒。其中所述的报告基因需具有如下特征：其表达产物可以直接或间接导致所表达的细胞产生能够被斑点检测仪器检测的信号，如 β 半乳糖苷酶基因、HIV TAT 基因等。其中所述的“表达控制序列”是实现基因表达所需要的控制序列，是本领域熟知的，通常必须包括启动子（可以是任何适于在细胞中表达目的基因的启动子。可以是组成型的，也可以是诱导型的。还可以是复合启动子，如双启动子），常常也包括转录终止序列，也可以包含其他序列，如增强子序列；基因表达对于蛋白质编码序列通常是指转录和翻译，产生成熟的蛋白质。其中所述的“可操作地连接”是指所连接的分子的连接方式使得能够实现预期的功能，例如，表达控制序列与基因编码序列的可操作的连接可实现表达控制序列对基因编码序列的表达控制作用。

步骤 E) 应用斑点检测仪器（如 Elispot）检测被感染细胞的数量通过例如如下方法来进行：细胞如被本发明所述的人乳头瘤病毒假病毒或人乳头瘤病毒感染后，通过人乳头瘤病毒假病毒导入的或细胞内的报告基因获得表达产生报告蛋白，该报告蛋白可直接作为信号产生体产生信号，也可通过反应（如酶促反应等）使其它信号产生体产生信号，其产生信号的方法可以采用已知或已公开的方法或者本发明实施例中涉及的方法；细胞是否被感染的判定标准是细胞是否具有由信号产生体产生的信号；检测具有由信号产生体产生的信号的细胞的数量。

本发明的方法中，信号产生体产生的信号为颜色信号，可使细胞产生与正常细胞不同的颜色（如蓝色），该颜色信号可被斑点检测仪器（如 Elispot）所检测。

本发明的方法中，信号产生体可以是任何能够使细胞产生可被斑点检测仪器（如 Elispot）检测的信号的物质，例如可以是酶、蛋白

质、化学发光物质、同位素、稀土元素。

在本发明所述的方法的一个具体实施方案中，涉及了对上述 HPV 假病毒的效价进行鉴定的方法。在一个具体实施方案中，本发明还涉及应用本发明的 HPV 中和抗体检测方法筛选 HPV 中和性单克隆抗体的方法。在一个具体实施方案中，本发明还涉及应用本发明的 HPV 中和抗体检测方法检测 HPV 中和抗体效价的方法。在一个具体实施方案中，本发明还涉及应用本发明的 HPV 中和抗体检测方法在 HPV 疫苗开发和质控中的应用方法。本发明的 HPV 中和抗体检测方法可用于制备 HPV 中和抗体诊断试剂盒。

本发明还提供斑点检测仪器或斑点检测法或本发明感染细胞或抗体检测方法在检测人乳头瘤病毒中和抗体中的用途、在筛选 HPV 中和性单克隆抗体中的用途、在检测 HPV 中和抗体效价中的用途、在制备 HPV 中和抗体诊断试剂盒中的用途、在 HPV 疫苗开发和质控中的用途、在筛选或制备抗 HPV 或其相关疾病药物中的用途、或在治疗 HPV 感染中的用途

下面结合具体实施例与所附图表，对本发明进一步加以描述。所述实施例旨在以举例方式具体阐明本发明。试剂、试剂的浓度、温度和其他变量的值以及载体和细胞的选择只是举例说明本发明的应用，而不构成对本发明的限制。

实施例

一. 本发明涉及的 HPV 假病毒的制备和鉴定

实施例 1. HPV 结构蛋白表达载体的构建

HPV 的病毒颗粒由 L1 蛋白和 L2 蛋白共同组成。研究已显示，在细胞中共表达 L1 和 L2 蛋白可组装获得 HPV 的类病毒颗粒，其结构特点与天然病毒颗粒结构相似（Roden RB 等，病毒学杂志，1996 年，70 卷：5875-5883 页）。本发明中，根据源自 Genbank 的 HPV 的基因数据，采用基因合成的方法分别设计合成包含不同亚型 HPV（这里

包括了 HPV16、HPV18、HPV6、HPV11、HPV52、HPV58 作为示例，但是也可以包括其他 HPV 亚型)的 L1 和 L2 蛋白的基因片段，片段的 5' 端添加 NotI 位点，3' 端添加 XbaI 位点；基因片段经 NotI、XbaI 酶切后与经同样酶切的哺乳动物细胞表达载体 pCDNA3.1 (+) 质粒连接，构建获得可分别表达不同亚型 HPV L1 和 L2 蛋白的表达载体，分别命名为：pCDNA3.1(+)-16L1、pCDNA3.1(+)-16L2、pCDNA3.1(+)-18L1、pCDNA3.1(+)-18L2、pCDNA3.1(+)-11L1、pCDNA3.1(+)-11L2、pCDNA3.1(+)-6L1、pCDNA3.1(+)-6L2、pCDNA3.1(+)-52L1、pCDNA3.1(+)-52L2、pCDNA3.1(+)-58L1、pCDNA3.1(+)-58L2。

Genbank 公开的 HPV L1 和 L2 基因序列如下：HPV16 L1 的基因序列 (Genbank 号 AJ313179)、HPV16 L2 的基因序列 (Genbank 号 AJ313180)、HPV18 L1 的基因序列 (Genbank 号 AY383628)、HPV18 L2 的基因序列 (Genbank 号 AY383629)、HPV6 L1 的基因序列 (Genbank 号 FJ615300)、HPV 6 L2 的基因序列 (Genbank 号 FJ615301)、HPV11 L1 的基因序列 (Genbank 号 AY541029)、HPV11 L2 的基因序列 (Genbank 号 FJ615302)、HPV52 L1 的基因序列 (Genbank 号 FJ615303)、HPV52 L2 的基因序列 (Genbank 号 FJ615304)、HPV58 L1 的基因序列 (Genbank 号 FJ615305)、HPV58 L2 的基因序列 (Genbank 号 FJ615306)。

实施例 2. 报告基因表达质粒的选择

本发明采用斑点检测仪器 (如 Elispot) 对 HPV 假病毒或 HPV 对靶细胞的感染效果进行检测，因此由 HPV 假病毒或 HPV 感染靶细胞后介导的报告基因表达产物产生的信号必须能够被斑点检测仪器所识别和检测，即需要选择其表达产物能够导致产生合适信号的报告基因。本实施例中，我们以 β -半乳糖苷酶作为报告基因进行示例， β -半乳糖苷酶报告基因表达元件在导入细胞后可表达获得 β -半乳糖苷酶，在显色底物 (如 X-gal 或 blue-gal 等) 存在的情况下，可使所表达的细胞产生出明显的蓝色信号，这种信号的产生可以不需要其它

光源的辅助，并且这种信号可以被斑点检测仪器（如 Elispot）所识别和检测。

斑点检测仪器（如 Elispot）是目前细胞免疫研究最常用的检测仪器之一，其检测原理是通过高灵敏度的摄像头采集样品板（可以是细胞培养板、专用显色板、显色用膜等）上的细胞显色图像，通过软件分析测算显色细胞的数量或空斑数量，具有很好的精确度和灵敏度，其灵敏度可以分辨出显色的单细胞。Elispot 的检测自动化水平高，可适用于包括 96 孔细胞培养板在内的多种常用的细胞培养容器，可进行全板范围的快速连续自动扫描检测。目前，尚未有将 Elispot 应用于 HPV 中和抗体检测实验的报道。

本实施例中作为示例的 β -半乳糖苷酶基因编码序列位于 pCMV β 质粒（clotech 公司，cat. Number 631719）中，该质粒可用于在细胞中表达 β -半乳糖苷酶。

实施例 3. HPV 假病毒的制备

本发明通过磷酸钙多质粒共转染方法在 293FT 细胞（invitrogen 公司，catalog no. R700-07）中制备 HPV 假病毒。将可表达 HPV L1 和 L2 蛋白的表达质粒与报告基因表达质粒（如 pCMV β ）共转染入 293FT 细胞中，在转染 48 小时后收集含有 HPV 假病毒的细胞裂解液。

实验方法：

293FT 细胞培养于 10cm 细胞培养皿中，培养基为 DMEM 培养基（添加 10%FBS, 2mM L-glutamine, 0.1mM MEM Non-Essential Amino Acids 及 1% penicillin-streptomycin），汇合率约为 80%。

12 小时后每皿细胞转染 40 μ g HPV L1 表达质粒、40 μ g 报告基因表达质粒和 4 μ g HPV L2 表达质粒，转染试剂为磷酸钙，转染方法参见该试剂的操作指南。在共转染 48 小时后分别收集细胞进行裂解。

转染 48 小时后，离心收集细胞，用适当体积的裂解液（含有 0.25% Brij85, 9.5mM MgCl₂ 的 DPBS 溶液）重悬，每皿细胞使用 250 μ L 裂解液，

37℃孵育 16 小时后，离心收集含有 HPV 假病毒的上清液。加入 0.17 倍体积的 5M NaCl 溶液，分装成 50 μL 一份，-80℃保存。

实施例 4. HPV 假病毒对细胞的感染效果

研究已证明，293FT 细胞可以作为 HPV 假病毒的易感细胞，适于进行 HPV 假病毒的感染实验（卢五迅等，生物工程学报，2006 年，22 卷：990-995 页）。将收获的 HPV 假病毒分别感染 293FT 细胞，检测其对 293FT 细胞的感染效果及所介导的报告基因 β-半乳糖苷酶在细胞中的表达效果。

实验方法：

293FT 细胞培养于 96 孔细胞培养板中，约 1.5×10^4 /孔，培养基为 DMEM 培养基（添加 10%FBS，2mM L-glutamine，0.1mM MEM Non-Essential Amino Acids 及 1% penicillin-streptomycin），汇合率约为 80%。培养 8h 后每孔分别加入 0.1 μL HPV16 假病毒、HPV18 假病毒、HPV6 假病毒、HPV11 假病毒、HPV52 假病毒、HPV58 假病毒。继续培养 72 小时后，吸去各孔中的培养基，每孔中加入 50 μL 固定液（含有 1% 甲醛，0.2% 戊二醛的 PBS 溶液），静置 4 分钟；4 分钟后吸去固定液，每孔中加入 100 μL D-Hank' s 溶液洗细胞三次，再将 D-Hank' s 溶液吸弃；在每个孔中加入 50 μL 显色液（含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾，2% 0.2M 铁氰化钾，0.1% 2M $MgCl_2$ ，3% 40mg/mL X-gal 的 PBS 溶液），放置在 37℃ 中显色 2 小时，2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。实验对照为未进行感染实验的 293FT 细胞。

实施例 5. 应用斑点检测仪器 Elispot 检测 HPV 假病毒对细胞的感染效果

本发明中，我们构建的 HPV16 假病毒、HPV18 假病毒、HPV6 假病毒、HPV11 假病毒、HPV52 假病毒、HPV58 假病毒可有效感染细胞，并介导所包装的 β-半乳糖苷酶报告基因在靶细胞中表达，被感染细胞通过显色反应可显示出清晰的蓝色信号。这种信号在可见光下即可

被观察,可以不需要特殊光源(如激光、限定波长范围的汞灯光源等)的激发,适合于用斑点检测仪器 Elispot 进行检测。目前,经典的检测 β -半乳糖苷酶表达的方法是对显色细胞的数量进行人工计数,费力耗时,不适于进行高通量检测实验;且缺乏客观性,人为误差大,容易影响实验结果的重复性。应用斑点检测仪器 Elispot 进行检测,具有灵敏度高、特别是能够进行连续自动的快速扫描检测,短时间内即可获得大量样品的检测结果,可满足高通量检测的要求。

我们应用斑点检测仪器 Elispot 对 HPV16 假病毒、HPV18 假病毒、HPV6 假病毒、HPV11 假病毒、HPV52 假病毒、HPV58 假病毒感染并进行显色后的 293FT 细胞进行了检测。

实验方法: 293FT 细胞培养于 96 孔细胞培养板中,约 1.5×10^4 /孔,培养基为 DMEM 培养基。培养 8 小时后每孔分别加入 $0.1 \mu\text{L}$ HPV16 假病毒、HPV18 假病毒、HPV6 假病毒、HPV11 假病毒、HPV52 假病毒、HPV58 假病毒。37℃ 培养 72 小时后,吸去各孔中的培养基,每孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 固定液(含有 1% 甲醛,0.2% 戊二醛的 PBS 溶液),静置 4 分钟;4 分钟后吸去固定液,每孔中加入 $100 \mu\text{L}$ D-Hank' s 溶液洗细胞三次,再将 D-Hank' s 溶液吸弃;在每个孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 显色液(含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾,2% 0.2M 铁氰化钾,0.1% 2M MgCl_2 ,3% 40mg/mL x-gal 的 PBS 溶液),放置在 37℃ 中显色 2 小时;2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。启动斑点检测仪器 Elispot,将进行显色反应后的细胞培养板放在仪器的取样板上,用仪器检测每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数。Elispot 的详细操作步骤见该仪器的操作说明书。实验对照为未进行感染实验的 293FT 细胞。

通过自动连续扫描检测,可迅速获得所检测细胞板上各个孔的显色细胞数量即被感染细胞数量,结果如图 1 所示。各个孔中显色细胞数量即被 HPV 假病毒感染的细胞数量标于各孔图像的左上方,未进行感染实验的细胞孔未检测到显色细胞。这说明了本发明的设计思路的可行性,带有 β -半乳糖苷酶报告基因的 HPV 假病毒感染细胞后可使细胞产生可被斑点检测仪器 Elispot 识别的标记信号,同时使整个

检测过程十分的简便和迅速。

实施例 6. HPV 假病毒感染效价的测定

根据病毒效价空斑测定法的原理，在稀释度足够的情况下，HPV 假病毒感染细胞后表达报告蛋白产生可被检测仪器检测的信号，信号阳性细胞数即被感染细胞数可以认为是在该次感染实验中使用了多少感染单位的 HPV 假病毒。我们以梯度稀释蓝斑计数方法检测所构建的 HPV 假病毒的效价。本实施例中我们以检测 HPV16 假病毒、HPV18 假病毒的效价作为示例，也可以包括检测其他亚型 HPV 假病毒的效价。

效价测定方法：将 293FT 细胞铺于 96 孔细胞培养板中， 1.5×10^4 个/孔，培养基为 DMEM 培养基， 37°C 培养 8 小时。取 HPV 假病毒原液一份（ $50 \mu\text{L}$ ）以 10%DMEM 培养基 2 倍连续梯度稀释，最终使每 $100 \mu\text{L}$ 培养基中分别含有 $0.5 \mu\text{L}$ 、 $0.25 \mu\text{L}$ 、 $0.125 \mu\text{L}$... 等 10 个浓度梯度的病毒稀释液。将各梯度的病毒稀释液取 $100 \mu\text{L}$ 加入预铺于 96 孔细胞培养板中的 293FT 细胞中，每个梯度采取 4 孔重复。将 96 孔板放入 37°C 培养。培养 72 小时后，吸去各孔中的培养基，每孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 固定液（含有 1% 甲醛，0.2% 戊二醛的 PBS 溶液），静置 4 分钟；4 分钟后吸去固定液，每孔中加入 $100 \mu\text{L}$ D-Hank' s 溶液洗细胞三次，再将 D-Hank' s 溶液吸弃；在每个孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 显色液（含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾，2% 0.2M 铁氰化钾，0.1% 2M MgCl_2 ，3% 40mg/mL x-gal 的 PBS 溶液），放置在 37°C 中显色 2 小时；2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。启动斑点检测仪器 Elispot，将进行显色反应后的细胞培养板放在仪器的取样板上，用仪器检测每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数。Elispot 的详细操作步骤见该仪器的操作说明书。实验对照为未进行感染实验的 293FT 细胞（阴性孔）。结果如表 1 所示，与不同的假病毒原液用量对应的为被感染细胞的数量（为 4 孔平均值）。

HPV 假病毒效价计算方法：

感染效价 (TU/mL) = 检测孔被感染细胞数 / 检测孔假病毒原液

用量 (mL)。

其中，上述公式中“检测孔被感染细胞数”和“检测孔假病毒原液用量”选择被感染细胞数最接近于 50 且不低于 50 的检测孔的被感染细胞数与其对应的假病毒原液的用量。

例如，本实施例中，HPV16 假病毒效价检测实验中，被感染细胞数最接近于 50 且不低于 50 的检测孔的被感染细胞数为 102 与其对应的假病毒原液用量为 6.25×10^{-5} mL，检测孔的假病毒稀释液用量为 0.1 mL，代入上述公式即可计算获得该 HPV16 假病毒效价为 1.63×10^6 (TU/mL)。同样，在本实施例的 HPV18 假病毒效价检测实验中，被感染细胞数最接近于 50 且不低于 50 的检测孔的被感染细胞数为 66 与其对应的假病毒原液用量为 3.13×10^{-5} mL，检测孔的假病毒稀释液用量为 0.1 mL，代入上述公式即可计算获得该 HPV16 假病毒效价为 2.11×10^6 (TU/mL)。

表 1 HPV 假病毒的不同用量与被感染细胞数量的关系

假病毒原液用量 (10^{-3} mL)	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156
HPV16 假病毒	1527	691	272	102	42	20
HPV18 假病毒	1538	810	372	148	66	46

二. 本发明的 HPV 中和抗体检测方法的建立

实施例 7. 一种新的 HPV 中和抗体检测方法

HPV 中和抗体水平是评估 HPV 疫苗的关键性指标，因此建立高效、准确和便捷的中和抗体评估方法十分重要。本发明应用前面所述的 HPV 假病毒和斑点检测仪器（如 Elispot）建立了一种新的 HPV 中和抗体检测方法。该方法既具有高效、准确的优点，同时更有利于提高工作效率，更适于进行高通量检测。该方法的流程示意简图可见图 2。

方法流程描述：

(1) 293FT 细胞铺于 96 孔细胞培养板中， 1.5×10^4 个/孔，培养

基为 DMEM 培养基（添加 10%FBS, 2mM L-glutamine, 0.1mM MEM Non-Essential Amino Acids 及 1% penicillin-streptomycin），37℃培养 8 小时；

（2）取 HPV 假病毒原液（如需要检测的是 HPV16 中和抗体，可以使用 HPV16 假病毒；如是检测针对 HPV18 中和抗体，可以使用 HPV18 假病毒；检测针对其它亚型 HPV 的中和抗体，则可分别使用其它亚型的 HPV 假病毒），用上述的 DMEM 培养基（也可以根据需要进行选择的细胞培养基或缓冲液）进行稀释，稀释比例根据如下方法计算：稀释后 HPV 假病毒液的用量为 96 孔细胞培养板每个孔加 50 μL HPV 假病毒稀释液，以每孔 1.5×10^4 个细胞估算，HPV 假病毒对细胞的 MOI 为 0.02，以此用量计算 HPV 原液的稀释比例；

（3）将待检测的样品（如单克隆抗体样品、血清样品、腹水样品、细胞培养上清液样品、细胞裂解液样品等）用上述的 DMEM 培养基（也可以根据需要进行选择的细胞培养基或缓冲液）进行稀释（可以根据需要进行选择的稀释倍数）；

注：实验对照设置为未进行感染实验的 293FT 细胞（称为阴性孔，每个 96 孔板设置 3 个孔）和只进行 HPV 假病毒感染的 293FT 细胞（称为阳性感染孔，每个 96 孔板设置 6 个孔）。

（4）稀释后的待检测的样品各取 50 μL 分别与 50 μL 稀释后的 HPV 假病毒（MOI=0.02）混合，4℃孵育 1 小时；

（5）将孵育后的样品-假病毒混合液分别加入上述（1）预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中，37℃培养 72 小时；

（6）显色反应：培养 72 小时后进行显色反应，吸去各孔中的培养基，每孔中加入 50 μL 固定液（含有 1% 甲醛，0.2% 戊二醛的 PBS 溶液），静置 4 分钟；4 分钟后吸去固定液，每孔中加入 100 μL D-Hank' s 溶液洗细胞三次，再将 D-Hank' s 溶液吸弃；在每个孔中加入 50 μL 显色液（含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾，2% 0.2M 铁氰化钾，0.1% 2M MgCl₂, 3% 40mg/mL X-gal 的 PBS 溶液），放置在 37℃中显色 2 小时；2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。

(7) 结果检测: 启动斑点检测仪器 Elispot, 将显色反应后的细胞培养板放在取样板上, 扫描检测每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数。Elispot 的详细操作步骤可见该仪器的操作说明书。

(8) 结果判定:

具有中和能力的定义为: 在经 20 倍稀释后(也可以根据需求选择合适的稀释倍数, 也可以为原倍, 优选 20 倍稀释)能达到 50% 以上感染抑制率的样品视为具有中和能力。

中和抗体效价的定义为: 以达到 50% 感染抑制率以上的最大稀释倍数作为该样品的中和效价。

感染抑制率的计算方法: 各样品孔的感染抑制率 = $(1 - \text{样品孔被感染细胞数} / (\text{阳性感染孔被感染细胞数总和} / 6 - \text{阴性孔显色细胞数总和} / 3)) \times 100\%$ 。

实施例 8. 与当前常用的 HPV 中和抗体检测方法的对比

本实施例中, 我们将本发明的 HPV 中和抗体检测方法是目前常用的 HPV 中和抗体检测方法进行了对比实验。本实施例中, 我们应用两种方法同时对中和性 HPV16 单克隆抗体 8A9 (也可以采用其它抗体, 例如市售抗体) 的中和效价进行检测, 对两种方法的应用效果进行对比。

实验方法:

(1) 应用本发明的 HPV 中和抗体检测方法: 将 293FT 细胞铺于 96 孔细胞培养板中 (1.5×10^4 /孔)。8 小时后将单克隆抗体样品 8A9 (1mg/mL) 用 10% DMEM 进行连续倍比稀释 (以 1: 2 稀释为起点, 进行 5 倍比稀释), 然后各取 50 μ L 分别与 50 μ L 稀释于 10% DMEM 的 HPV16 假病毒 (MOI=0.02) 混合。4 $^{\circ}$ C 混合孵育 1 小时后分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中。培养 72 小时后进行显色反应, 吸去各孔中的培养基, 每孔中加入 50 μ L 固定液 (含有 1% 甲醛, 0.2% 戊二醛的 PBS 溶液), 静置 4 分钟; 4 分钟后吸去固定液, 每孔中加入 100 μ L D-Hank' s 溶液洗细胞三次, 再将 D-Hank' s 溶液吸弃; 在

每个孔中加入 50 μ L 显色液（含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾，2% 0.2M 铁氰化钾，0.1% 2M $MgCl_2$ ，3% 40mg/mL x-gal 的 PBS 溶液），放置在 37 $^{\circ}C$ 中显色 2 小时；2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。

启动斑点检测仪器 Elispot，将进行显色反应后的细胞培养板放在取样板上，检测每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数。Elispot 的详细操作步骤见该仪器的操作说明书。实验对照设置为未进行感染实验的 293FT 细胞（称为阴性孔，每个 96 孔板设置 3 个孔）和只进行 HPV16 假病毒感染的 293FT 细胞（称为阳性感染孔，每个 96 孔板设置 6 个孔）。

中和效价的判定方法：

抗体中和效价的定义为：以达到 50% 感染抑制率以上的最大稀释倍数作为该单克隆抗体样品的中和效价。

感染抑制率的计算方法：各样品孔的感染抑制率 = $(1 - \text{样品孔被感染细胞数} / (\text{阳性感染孔被感染细胞数总和} / 6 - \text{阴性孔显色细胞数总和} / 3)) \times 100\%$ 。

(2) 应用当前常用的 HPV 中和抗体检测方法：具体操作步骤可参见文献（卢五迅等，生物工程学报，2006 年，22 卷：990-995 页）。这里简述如下：将 293FT 细胞铺于 96 孔细胞培养板中 (1.5×10^4 / 孔)。8 小时后将单克隆抗体样品 8A9 (1mg/mL) 用 10% DMEM 进行连续倍比稀释（以 1:2 稀释为起点，进行 5 倍比稀释），然后各取 50 μ L 分别与 50 μ L 稀释于 10% DMEM 的包装有增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 的 HPV16 假病毒 (MOI=0.2) 混合。4 $^{\circ}C$ 混合孵育 1 小时后分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中。37 $^{\circ}C$ 培养 72 小时后，消化并吹下各孔细胞，分别用流式细胞仪进行检测各样品的感染率。实验对照设置为未进行感染实验的 293FT 细胞（称为阴性孔，每个 96 孔板设置 3 个孔）和只进行包装有 EGFP 的 HPV16 假病毒感染的 293FT 细胞（称为阳性感染孔，每个 96 孔板设置 6 个孔）。

中和效价的判定方法：

抗体中和效价的定义为：以达到 50% 感染抑制率以上的最大稀释

倍数作为该单克隆抗体样品的中和效价。

感染抑制率的计算方法：各样品孔的感染抑制率 = $(1 - \text{样品孔感染率} / \text{阳性感染孔感染率}) \times 100\%$ 。

检测结果：

在本实施例中，我们分别应用上述两种方法分别对同样的中和性 HPV16 单克隆抗体 8A9 样品的中和效价进行了检测，结果如图 3 所示，应用本发明的 HPV 中和抗体检测方法获得的检测结果与目前较广泛使用的 HPV 中和抗体检测方法相同，具有高度的重合性。

三. 本发明的 HPV 中和抗体检测方法的应用

实施例 9. 在筛选中和性 HPV 单克隆抗体中的应用

本发明建立的 HPV 中和抗体检测方法可应用于筛选中和性 HPV 单克隆抗体。本实施例中我们以筛选中和性 HPV16 单克隆抗体、中和性 HPV18 单克隆抗体、中和性 HPV6 单克隆抗体、中和性 HPV11 单克隆抗体作为示例，也可以包括筛选其他 HPV 亚型中和性单克隆抗体。

本实施例中 HPV 单克隆抗体的制备方法为：将不同亚型的 HPV VLP (HPV16 VLP (公开号：CN101293918A, 制备方法见实施例 1、2、3、4)、HPV18 VLP (申请号：200810093817.2, 制备方法见实施例 1、2、3、4)、HPV6 VLP (申请号：200810111390.4, 制备方法见实施例 1、2、3、4)、HPV11 VLP (申请号：200810111389.1, 制备方法见实施例 1、2、3、4)) 分别免疫 Balb/c 小鼠，初免 (剂量为 $80 \mu\text{g}/\text{只}$) 与等量福氏完全佐剂混合，加强免疫 (剂量为 $40 \mu\text{g}/\text{只}$) 则与等量福氏不完全佐剂混合，进行肌肉注射，初免后分别于 4、8 周各加强一次。加强免疫 3 次后进行单克隆抗体的筛选和制备，细胞融合、克隆化、腹水制备及纯化参见单克隆抗体的常规方法 (Harlow E 等, 抗体：实验室手册, 1998 年, 139-312 页)。

实验方法：将 293FT 细胞铺于 96 孔细胞培养板中 ($1.5 \times 10^4/\text{孔}$)。8h 后将待筛选的单克隆抗体样品用 10% DMEM 进行 1:20 稀释，然后取 $50 \mu\text{L}$ 分别与 $50 \mu\text{L}$ 同样稀释于 10% DMEM 的 HPV 假病毒 (MOI=0.02)

混合（如需要筛选的是针对 HPV16 的中和性单克隆抗体，可以使用 HPV16 假病毒；如需要筛选的是针对 HPV18 的中和性单克隆抗体，可以使用 HPV18 假病毒；筛选针对其它亚型 HPV 的中和性单克隆抗体，则分别使用其它亚型的 HPV 假病毒）。4℃混合孵育 1h 后分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中。37℃培养 72 小时后，吸去各孔中的培养基，每孔中加入 50 μL 固定液（含有 1% 甲醛，0.2% 戊二醛的 PBS 溶液），静置 4 分钟；4 分钟后吸去固定液，每孔中加入 100 μL D-Hank' s 溶液洗细胞三次，再将 D-Hank' s 溶液吸弃；在每个孔中加入 50 μL 显色液（含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾，2% 0.2M 铁氰化钾，0.1% 2M MgCl₂，3% 40mg/mL x-gal 的 PBS 溶液），放置在 37℃中显色 2 小时；2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。

启动斑点检测仪器 Elispot，将进行显色反应后的细胞培养板放在取样板上，检测每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数。Elispot 的详细操作步骤见该仪器的操作说明书。实验对照设置为未进行感染实验的 293FT 细胞（称为阴性孔，每个 96 孔板设置 3 个孔）和只进行 HPV 假病毒感染的 293FT 细胞（称为阳性感染孔，每个 96 孔板设置 6 个孔）。

中和性 HPV 单克隆抗体的判定标准：在经 20 倍稀释后能达到 50% 以上感染抑制率的 HPV 单克隆抗体视为具有中和能力。

感染抑制率的计算方法：各样品孔的感染抑制率 = $(1 - \text{样品孔被感染细胞数} / (\text{阳性感染孔被感染细胞数总和} / 6 - \text{阴性孔显色细胞数总和} / 3)) \times 100\%$ 。

在本实施例中，我们应用上述方法分别对多株 HPV16、HPV18、HPV6、HPV11 单克隆抗体进行了中和单克隆抗体筛选，结果如表 2、表 3、表 4、表 5 所示。

表 2：筛选获得的 HPV16 中和性单克隆抗体

单抗名称	20 倍稀释后的感染抑制率(%)	是否具有中和能力	单抗名称	20 倍稀释后的感染抑制率(%)	是否具有中和能力
1B8	> 50	是	8A9	> 50	是
3E7	> 50	是	3D10	> 50	是
PD1	> 50	是	1D12	> 50	是
21A5	> 50	是	19E9	> 50	是
15E11	> 50	是	15D11	> 50	是
17A9	> 50	是			

表 3：筛选获得的 HPV18 中和性单克隆抗体

单抗名称	20 倍稀释后的感染抑制率(%)	是否具有中和能力	单抗名称	20 倍稀释后的感染抑制率(%)	是否具有中和能力
3C3	> 50	是	3G3	> 50	是
15B10	> 50	是	18C12	> 50	是
11A9	> 50	是	13H12	> 50	是
2A7	> 50	是	10E8	> 50	是
16E3	> 50	是	11A3	> 50	是
2H5	> 50	是	9F5	> 50	是
4H12	> 50	是			

表 4：筛选获得的 HPV6 中和性单克隆抗体

单抗名称	20 倍稀释后的感染抑制率(%)	是否具有中和能力	单抗名称	20 倍稀释后的感染抑制率(%)	是否具有中和能力
13G12	> 50	是	8A10	> 50	是
18D2	> 50	是	12H9	> 50	是
2B6	> 50	是	5D3	> 50	是
12H4	> 50	是	7A8	> 50	是
10H1	> 50	是	11B10	> 50	是
17D5	> 50	是	16B12	> 50	是

17G7	> 50	是	15C4	> 50	是
15F7	> 50	是	13H5	> 50	是

表 5: 筛选获得的 HPV11 中和性单克隆抗体

单抗名称	20 倍稀释 后的感染 抑制率(%)	是否具有 中和能力	单抗名称	20 倍稀释 后的感染 抑制率(%)	是否具有 中和能力
1B3	> 50	是	12F2	> 50	是
2A2	> 50	是	14A6	> 50	是
4A1	> 50	是	15F6	> 50	是
5E10	> 50	是	16G7	> 50	是
9C12	> 50	是	18D3	> 50	是
10D6	> 50	是	19C7	> 50	是
20C12	> 50	是			

实施例 10. 在检测中和性 HPV 单克隆抗体中和效价中的应用

本发明建立的 HPV 中和抗体检测方法可应用于检测中和性 HPV 单克隆抗体的中和效价。本实施例中我们以检测中和性 HPV16 单克隆抗体、中和性 HPV18 单克隆抗体、中和性 HPV6 单克隆抗体、中和性 HPV11 单克隆抗体的中和效价作为示例，也可以包括检测其他 HPV 亚型中和性单克隆抗体的中和效价。

实验方法: 将 293FT 细胞铺于 96 孔细胞培养板中 (1.5×10^4 /孔)。8h 后将待检测的单克隆抗体样品用 10% DMEM 进行连续倍比稀释(以 1:20 稀释为起点, 可以进行 2 倍比稀释, 也可以进行 5 倍比稀释, 也可以进行 10 倍比稀释或其它类型的稀释比例, 其中优选进行 2 倍比稀释), 然后各取 50 μ L 分别与 50 μ L 稀释于 10% DMEM 的 HPV 假病毒 (MOI=0.02) 混合 (如需要检测的是针对 HPV16 的中和性单克隆抗体的中和效价, 可以使用 HPV16 假病毒; 如是检测针对 HPV18 的中和性单克隆抗体的中和效价, 可以使用 HPV18 假病毒; 检测针对其它亚型 HPV 的中和性单克隆抗体的中和效价, 则可分别使用其它亚型的 HPV 假病毒)。4 $^{\circ}$ C 混合孵育 1 小时后分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔

细胞培养板中。37℃培养 72 小时后，吸去各孔中的培养基，每孔中加入 50 μL 固定液（含有 1% 甲醛，0.2% 戊二醛的 PBS 溶液），静置 4 分钟；4 分钟后吸去固定液，每孔中加入 100 μL D-Hank' s 溶液洗细胞三次，再将 D-Hank' s 溶液吸弃；在每个孔中加入 50 μL 显色液（含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾，2% 0.2M 铁氰化钾，0.1% 2M MgCl₂，3% 40mg/mL x-gal 的 PBS 溶液），放置在 37℃ 中显色 2 小时；2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。

启动斑点检测仪器 Elispot，将进行显色反应后的细胞培养板放在取样板上，检测每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数。Elispot 的详细操作步骤见该仪器的操作说明书。实验对照设置为未进行感染实验的 293FT 细胞（称为阴性孔，每个 96 孔板设置 3 个孔）和只进行 HPV 假病毒感染的 293FT 细胞（称为阳性感染孔，每个 96 孔板设置 6 个孔）。

中和效价的判定方法：

抗体中和效价的定义为：以达到 50% 感染抑制率以上的最大稀释倍数作为该单克隆抗体样品的中和效价。

感染抑制率的计算方法：各样品孔的感染抑制率 = $(1 - \text{样品孔被感染细胞数} / (\text{阳性感染孔被感染细胞数总和} / 6 - \text{阴性孔显色细胞数总和} / 3)) \times 100\%$ 。

在本实施例中，我们应用上述方法分别检测了多个 HPV16、HPV18、HPV6、HPV11 中和性单克隆抗体的中和效价，结果分别如表 6、表 7、表 8、表 9 所示。

表 6：HPV16 中和性单克隆抗体的中和效价

单抗名称	中和效价	单抗名称	中和效价
1B8	6.25×10^5	8A9	6.25×10^5
3E7	1.25×10^5	3D10	3.12×10^4
PD1	3.12×10^3	1D12	2.5×10^4
21A5	6.25×10^3	19E9	6.25×10^3
15E11	6.25×10^3	15D11	1.25×10^3
17A9	1.25×10^3		

表 7: HPV18 中和性单克隆抗体的中和效价

单抗名称	中和效价	单抗名称	中和效价
13H12	7.8×10^5	11A9	3.9×10^6
3C3	3.9×10^5	18C12	1.25×10^4
15B10	6250	3G3	1250
2A7	1250	10E8	1250
16E3	250	11A3	250
2H5	250	9F5	250
4H12	250		

表 8: HPV6 中和性单克隆抗体的中和效价

单抗名称	中和效价	单抗名称	中和效价
13G12	3.1×10^8	8A10	6.25×10^7
18D2	6.25×10^7	12H9	1.25×10^7
2B6	1.25×10^7	5D3	1.25×10^7
12H4	1.25×10^7	7A8	1.25×10^7
10H1	1.25×10^7	11B10	1.25×10^7
17D5	1.25×10^7	16B12	2.5×10^6
17G7	2.5×10^6	15C4	2.5×10^6
15F7	2.5×10^6	13H5	5×10^5

表 9: HPV11 中和性单克隆抗体的中和效价

单抗名称	中和效价	单抗名称	中和效价
1B3	3.2×10^4	12F2	1.28×10^5
2A2	1.28×10^5	14A6	1.28×10^5
4A1	1.28×10^5	15F6	1.28×10^5
5E10	1.28×10^5	16G7	1.28×10^5
9C12	1.28×10^5	18D3	1.28×10^5
10D6	1.28×10^5	19C7	1.28×10^5
20C12	6.4×10^4		

实施例 11. 在检测血清样品的 HPV 中和抗体效价中的应用

本发明建立的 HPV 中和抗体检测方法可应用于检测血清样品中的 HPV 中和抗体效价。本实施例中我们检测血清样品中 HPV16 中和抗体作为示例，也可以包括检测血清样品中其他亚型 HPV 中和抗体。

待检测血清样品：为 HPV16 VLP 免疫后的兔和羊血清。

兔：普通级，雌性，购自广西省疾病预防控制中心，并在该中心饲养。用纯化的 HPV16 VLP（公开号：CN101293918A，制备方法见实施例 1、2、3、4）初免（剂量为 $100\ \mu\text{g}/\text{只}$ ）与等量福氏完全佐剂混合，加强免疫（剂量为 $50\ \mu\text{g}/\text{只}$ ）则与等量福氏不完全佐剂混合，进行肌肉注射，初免后分别于 4、10 周各加强一次。免疫后，每周抽取外周静脉血，分离血清待检。

羊：普通级，雌性，购自广西省疾病预防控制中心，并在该中心饲养。用纯化的 HPV16 VLP 初免（剂量为 $1\text{mg}/\text{只}$ ）与等量福氏完全佐剂混合，加强免疫（剂量为 $0.5\text{mg}/\text{只}$ ）则与等量福氏不完全佐剂混合，进行肌肉注射，初免后分别于 4、10、18 周各加强一次。免疫后，每周抽取外周静脉血，分离血清待检。

中和实验方法：将 293FT 细胞铺于 96 孔细胞培养板中（ $1.5 \times 10^4/\text{孔}$ ）。8 小时后将待检测的血清样品用 10% DMEM 进行连续倍比稀释（以 1:20 稀释为起点，可以进行 2 倍比稀释，也可以进行 5 倍比稀释，也可以进行 10 倍比稀释或其它类型的稀释比例，其中优选进行 10 倍比稀释），然后各取 $50\ \mu\text{L}$ 分别与 $50\ \mu\text{L}$ 稀释于 10% DMEM 的 HPV 假病毒（ $\text{MOI}=0.02$ ）混合（如需要检测的是针对 HPV16 的中和抗体效价，可以使用 HPV16 假病毒；如是检测针对 HPV18 的中和抗体效价，可以使用 HPV18 假病毒；检测针对其它亚型 HPV 的的中和抗体效价，则可分别使用其它亚型的 HPV 假病毒）。 4°C 混合孵育 1h 后分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中。 37°C 培养 72 小时后，吸去各孔中的培养基，每孔中加入 $50\ \mu\text{L}$ 固定液（含有 1% 甲醛，0.2% 戊二醛的 PBS 溶液），静置 4 分钟；4 分钟后吸去固定液，每孔中加入 $100\ \mu\text{L}$ D-Hank' s 溶液洗细胞三次，再将 D-Hank' s 溶液吸弃；在每个孔中

加入 50 μ L 显色液（含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾，2% 0.2M 铁氰化钾，0.1% 2M $MgCl_2$ ，3% 40mg/mL x-gal 的 PBS 溶液），放置在 37 $^{\circ}C$ 中显色 2 小时；2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。启动斑点检测仪器 Elispot，将进行显色反应后的细胞培养板放在取样板上，检测每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数。实验对照设置为未进行感染实验的 293FT 细胞（称为阴性孔，每个 96 孔板设置 3 个孔）和只进行 HPV 假病毒感染的 293FT 细胞（称为阳性感染孔，每个 96 孔板设置 6 个孔）。

中和效价的判定方法：

抗体中和效价的定义为：以达到 50% 感染抑制率以上的最大稀释倍数（稀释起点为 1: 20）作为该血清样品的中和效价。

感染抑制率的计算方法：各样品孔的感染抑制率 = $(1 - \text{样品孔被感染细胞数} / (\text{阳性感染孔被感染细胞数总和} / 6 - \text{阴性孔显色细胞数总和} / 3)) \times 100\%$ 。

在本实施例中，我们应用上述方法分别检测了 HPV16 VLP 免疫后的兔、羊血清中的 HPV 中和抗体效价，结果如图 4 所示。结果显示，在 HPV16 VLP 初免及加强后，可诱导出高滴度的中和抗体，HPV16 中和抗体效价迅速上升。

实施例 12. 在评价 HPV 疫苗免疫保护性中的应用

本实施例中，我们将本发明建立的 HPV 中和抗体检测方法应用于 HPV 疫苗免疫保护性评价实验。本实施例中我们以 HPV16 疫苗免疫保护性评价实验作为示例，也可以包括其他亚型 HPV 疫苗的免疫保护性评价实验。

HPV16 疫苗（公开号：CN101293918A，制备方法见实施例 1、2、3、4、5）供试品预处理：取 10 支疫苗供试品混匀，用疫苗稀释液一步稀释到 80 μ g/mL，后进行 2 倍系列稀释得终浓度分别为 40 μ g/mL、20 μ g/mL 的供试品系列溶液。

恒河猴：普通级，雌性，2 岁，购自广西省疾病预防控制中心，并在该中心饲养。

免疫方法：用上述疫苗供试品系列溶液进行左上肢三角肌注射，分 5ug、10ug、20ug 三个剂量，每个剂量 3 只恒河猴，每只 250 μ L，同时用疫苗稀释液同法操作免疫对照组。饲养 9 周，每周采血一次，血样于 37 $^{\circ}$ C 放置 1.5 小时后，10,000rpm 离心 5 分钟，收集血清。

中和抗体检测方法：

(1) 293FT 细胞预铺于 96 孔细胞培养板中， 1.5×10^4 个/孔，37 $^{\circ}$ C 培养 8 小时；

(2) 用 10% DMEM 培养基在 96 孔细胞培养板上对血清样品进行连续倍比稀释（以 1:20 稀释为起点，可以进行 2 倍比稀释，也可以进行 5 倍比稀释，也可以进行 10 倍比稀释或其它类型的稀释比例，其中优选进行 2 倍比稀释），稀释总体积为 50 μ L；

(3) 取 -80 $^{\circ}$ C 保存的 HPV 假病毒原液一份，按 MOI = 0.02 加入适量 10% DMEM 稀释；

(4) 往稀释好的血清中加入 50 μ L HPV 假病毒稀释液。枪尖吹吸 3 次混匀，4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时；

注：实验对照设置：未进行感染实验（加入 100 μ L 10% DMEM 培养基）的 293FT 细胞（称为阴性孔，每个 96 孔板设置 3 个孔）；只进行 HPV 假病毒感染（50 μ L 10% DMEM 培养基及 50 μ L HPV 假病毒稀释液）的 293FT 细胞（称为阳性感染孔，每个 96 孔板设置 6 个孔）。

(5) 将各个样品混合液及对照样品分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中。37 $^{\circ}$ C 培养 72 小时；

(6) 培养 72 小时后，吸去各孔中的培养基，每孔中加入 50 μ L 固定液（含有 1% 甲醛，0.2% 戊二醛的 PBS 溶液），静置 4 分钟；4 分钟后吸去固定液，每孔中加入 100 μ L D-Hank' s 溶液洗细胞三次，再将 D-Hank' s 溶液吸弃；在每个孔中加入 50 μ L 显色液（含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾，2% 0.2M 铁氰化钾，0.1% 2M $MgCl_2$ ，3% 40mg/mL x-gal 的 PBS 溶液），放置在 37 $^{\circ}$ C 中显色 2 小时；2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。

(7) 启动斑点检测仪器 Elispot, 将进行显色反应后的细胞培养板放在取样板上, 检测每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数。Elispot 的详细操作步骤见该仪器的操作说明书。

C. 结果分析

血清样品中和抗体效价的定义: 以达到 50% 感染抑制率以上的最大稀释倍数作为该血清样品的中和效价。

感染抑制率的计算方法: 各样品孔的感染抑制率 = $(1 - \text{样品孔被感染细胞数} / (\text{阳性感染孔被感染细胞数总和} / 6 - \text{阴性孔显色细胞数总和} / 3)) \times 100\%$ 。

在本实施例中, 我们应用上述方法对 HPV16 疫苗供试品进行了免疫保护性评价实验, 结果如图 5 所示。结果显示, 实验猴经 HPV16 疫苗供试品初免及加强后, 可诱导出高滴度的中和抗体, 中和抗体效价迅速上升。

实施例 13. 在 HPV 疫苗效力试验 (ED_{50} 测定) 中的应用

本实施例中, 我们将本发明建立的 HPV 中和抗体检测方法应用于 HPV 疫苗效力试验 (ED_{50} 测定)。本实施例中我们以 HPV16 疫苗效力试验作为示例, 也可以包括其他 HPV 亚型疫苗的效力试验。

小鼠: SPF 级 BALB/c 小鼠, 雌性, 6~8 周龄, 体重约为 18~22g。免疫 40 只小鼠前后采集的共 7 次血清进行了中和性评价。

HPV16 疫苗 (申请号: 200710097762.8) 供试品预处理: 取 10 支疫苗供试品混匀, 用疫苗稀释液一步稀释到 $0.1 \mu\text{g/mL}$, 后进行 3 倍系列稀释得终浓度分别为 $0.033 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.011 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.004 \mu\text{g/mL}$ 的供试品系列溶液。

实验方法:

A. 用上述疫苗供试品系列溶液进行小鼠腹腔注射 (每个浓度 1 组小鼠), 每只 1mL, 同时用疫苗稀释液同法操作免疫对照组。饲养 5 周进行眼眶采血, 血样于 37°C 放置 1.5 小时后, $10,000\text{rpm}$ 离心 5 分钟, 收集血清。

B. 中和实验

(1) 293FT 细胞预铺于 96 孔平底细胞培养板中, 1.5×10^4 个/孔, 37°C 培养 8h;

(2) 用 10% DMEM 将血清样品在 96 孔细胞培养板上做 1:50 稀释 (1.0 μL 血清+59 μL 培养基);

(3) 取 -80°C 保存的 HPV16 假病毒原液一份, 按 $\text{MOI}=0.02$ 加入适量 10% DMEM 稀释;

(4) 往稀释好的血清中加入 50 μL HPV 假病毒稀释液。枪尖吹吸 3 次混匀, 4°C 孵育 1 小时;

注: 实验对照设置: 未进行感染实验 (加入 100 μL 10% DMEM 培养基) 的 293FT 细胞 (称为阴性孔, 每个 96 孔板设置 3 个孔); 只进行 HPV 假病毒感染 (50 μL 10% DMEM 培养基及 50 μL HPV 假病毒稀释液) 的 293FT 细胞 (称为阳性感染孔, 每个 96 孔板设置 6 个孔)。

(5) 将各个样品混合液及对照样品分别加入预铺有 293FT 细胞的 96 孔细胞培养板中。 37°C 培养 72 小时;

(6) 培养 72 小时后, 吸去各孔中的培养基, 每孔中加入 50 μL 固定液 (含有 1% 甲醛, 0.2% 戊二醛的 PBS 溶液), 静置 4 分钟; 4 分钟后吸去固定液, 每孔中加入 100 μL D-Hank' s 溶液洗细胞三次, 再将 D-Hank' s 溶液吸弃; 在每个孔中加入 50 μL 显色液 (含有 2% 0.2M 亚铁氰化钾, 2% 0.2M 铁氰化钾, 0.1% 2M MgCl_2 , 3% 40mg/mL x-gal 的 PBS 溶液), 放置在 37°C 中显色 2 小时; 2 小时后吸弃板中的显色液终止显色。

(7) 启动斑点检测仪器 Elispot, 将进行显色反应后的细胞培养板放在取样板上, 检测每个孔中的蓝色细胞数即被感染细胞数。 Elispot 的详细操作步骤见该仪器的操作说明书。

C. 结果分析

具有中和能力的判定标准: 以能在上述疫苗效力试验 (ED_{50} 测定) 中能达到 50% 以上感染抑制率的血清样品视为具有中和能力, 该样品

所在孔可称为阳性孔，反之称为阴性孔。

感染抑制率的计算方法：样品孔的感染抑制率 = $(1 - \text{样品孔被感染细胞数} / (\text{阳性感染孔被感染细胞数总和} / 6 - \text{阴性孔显色细胞数总和} / 3)) \times 100\%$ 。

ED₅₀的计算方法：分别统计 HPV 疫苗供试品的不同免疫剂量组的阳性孔数和阴性孔数，然后利用 Reed-Munch 公式计算各个免疫剂量的中和抗体阳性比例。

在本实施例中，我们应用上述方法对 HPV16 疫苗供试品进行了疫苗效力试验（ED₅₀测定），结果如表 10 所示。

表 10 HPV16 疫苗的 ED₅₀测定

剂量 (μg)	免疫后时间						
	0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w
0.1	0	1	1	1	1	1	1
0.033	0	0.94	0.94	0.93	0.93	0.93	0.93
0.011	0	0.55	0.55	0.36	0.36	0.45	0.45
0.004	0	0	0	0	0	1	1
ED ₅₀	-	0.0100	0.0100	0.0150	0.0150	0.0120	0.0120

本领域的技术人员应当明了，尽管为了举例说明的目的本文描述了本发明的具体实施方案，但可以对其进行各种修改而不偏离本发明的精神和范围。因此，本发明的具体实施方案和实施例不应当视为限制本发明的范围。本发明仅受所附权利要求的限制。本申请中引用的所有文献均完整地并入本文作为参考。

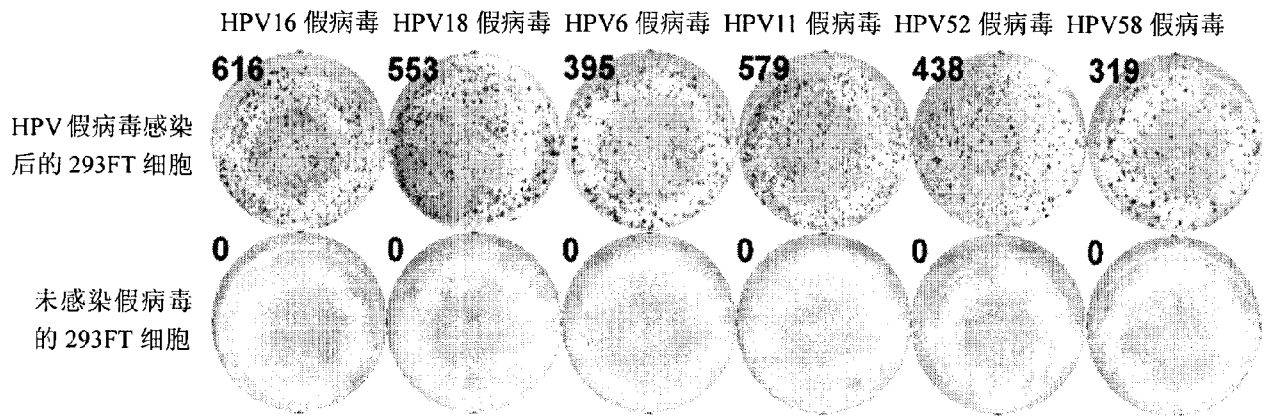


图 1

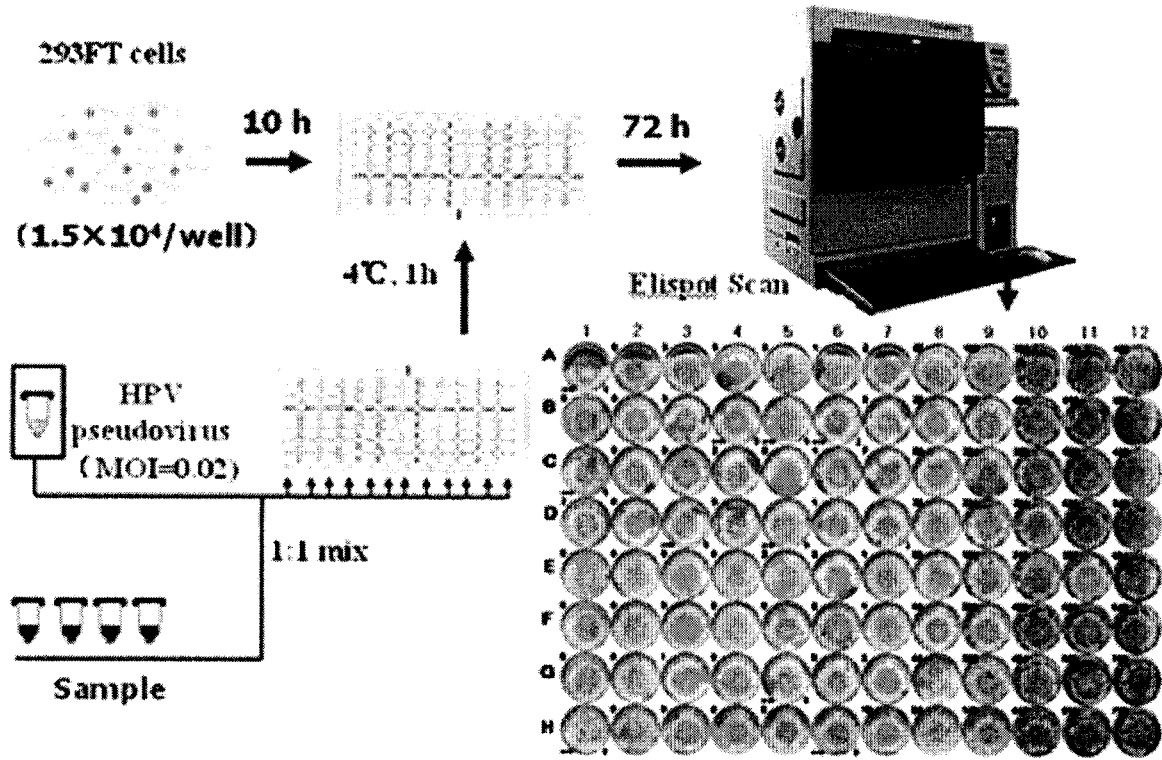


图 2

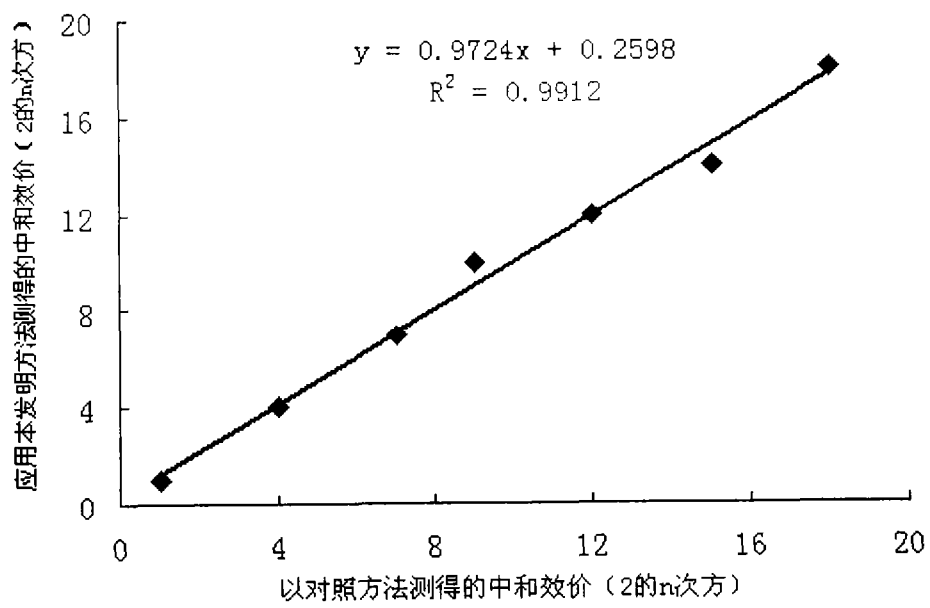
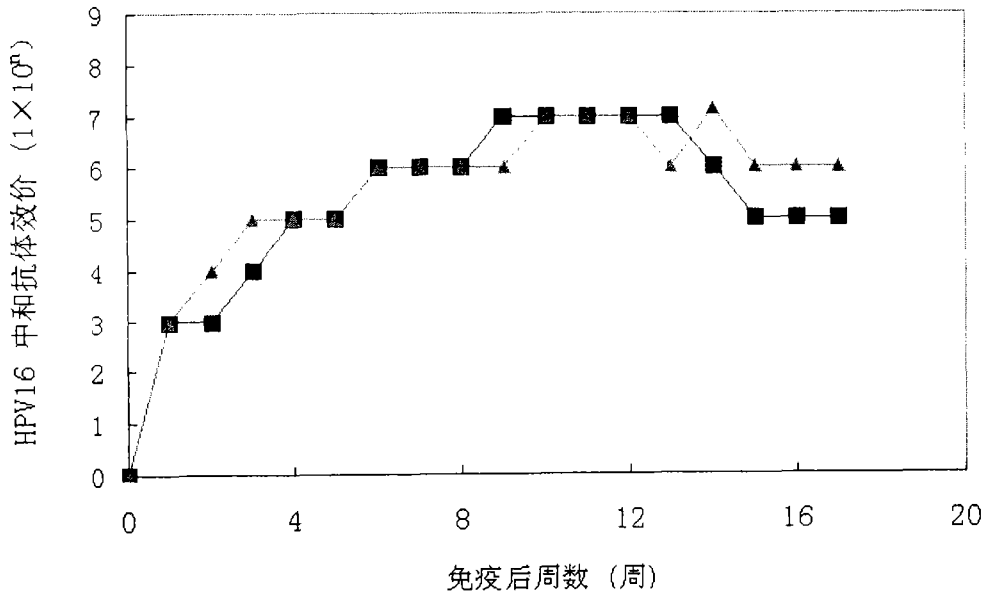
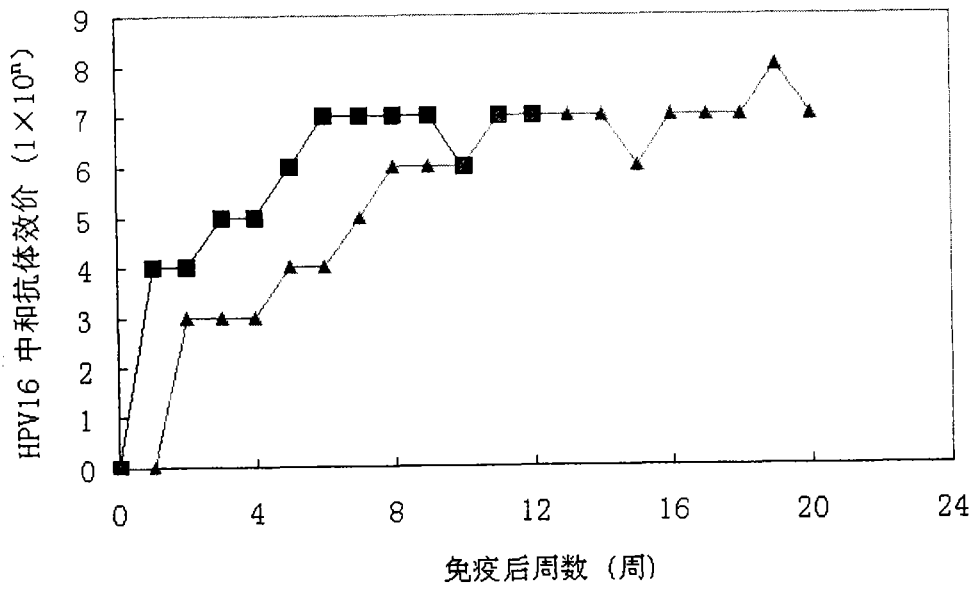


图 3



■ HPV16 VLP 免疫兔 11# ▲ HPV16 VLP 免疫兔 12#



■ HPV16 VLP 免疫羊 7# ▲ HPV16 VLP 免疫羊 8#

图 4

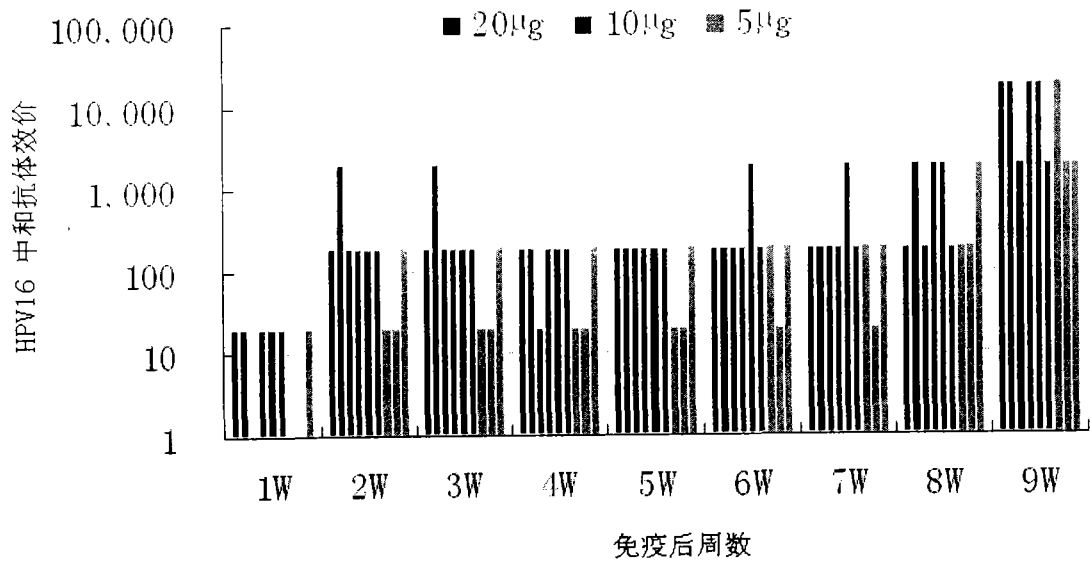


图 5

专利名称(译)	一种检测人乳头瘤病毒中和抗体的方法		
公开(公告)号	CN101551392A	公开(公告)日	2009-10-07
申请号	CN200910001113.2	申请日	2009-01-22
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学 养生堂有限公司		
申请(专利权)人(译)	厦门大学 养生堂有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学 养生堂有限公司		
[标]发明人	程通 郑舟 周国栋 杜海莲 张军 夏宁邵		
发明人	程通 郑舟 周国栋 杜海莲 张军 夏宁邵		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/533		
优先权	200810004346.3 2008-01-22 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种高效、简便的人乳头瘤病毒中和抗体的检测方法，该方法可适用于对人乳头瘤病毒中和抗体的高通量检测。本发明方法的特征在于用斑点检测法来检测被人乳头瘤病毒或假病毒感染的细胞。本发明同时还公开了上述方法在筛选和鉴定中和性HPV单克隆抗体、评价人乳头瘤病毒疫苗免疫保护性、人乳头瘤病毒疫苗效力试验(ED50测定)等方面的用途。

假病毒原液用量 (10 ⁻ⁱ mL)	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0313	0.0156
HPV16 假病毒	1527	691	272	102	42	20
HPV18 假病毒	1538	810	372	148	66	46