

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510061379.8

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 6 月 21 日

[11] 公开号 CN 1789415A

[22] 申请日 2005.11.2

[21] 申请号 200510061379.8

[71] 申请人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路 38
号

[72] 发明人 周继勇 吴建祥 陈洪勋

[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 张法高

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称

重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原、制备
方法及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素(HA)抗原、制备方法及其用途。本发明的重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原，它采用大肠杆菌原核表达系统表达了我国水禽流感病毒分离株的血凝素基因，利用表达的血凝素蛋白作为抗原可检测 H5 亚型流感病毒及感染产生的抗血凝素蛋白抗体。虽然 A 型流感病毒亚型众多，但血凝素抗原是流感病毒分类和诊断基础，因此，基于重组水禽流感病毒血凝素蛋白抗原建立的诊断技术可以检测鸭、鹅等水禽流感病毒的感染。本发明所生产的重组膜蛋白不仅生产容易，操作简单而且纯度较高，具有良好的特异性和敏感性。且重组膜蛋白纯化后包被聚苯乙烯微量反应板也可建立敏感性更高的 ELISA 诊断方法。

1. 一种重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原，其特征在于：水禽流感病毒 H5 亚型的核糖核酸为模板，通过反转录聚合酶链式反应扩增获得血凝素基因，将该基因克隆于大肠杆菌原核表达载体并转化入宿主细胞后，用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导表达并纯化获得血凝素蛋白抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的一种重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原，其特征在于：所述的血凝素基因具有 SEQ ID No.1 所示的核苷酸开放读码框序列，并且编码具有 SEQ ID No.2 所示的多肽序列。

3. 一种重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原的制备方法，其特征在于方法的步骤如下：

1) 水禽流感病毒 H5 亚型的核糖核酸为模板，以 5'-GCGGATCCGGTTACCATGCAAACAACTC-3', 5'-GCAAGCTTTACTGCCATCCTCCCTCTA-3' 为引物，通过反转录聚合酶链式反应方法扩增获得血凝素基因；

2) 将血凝素基因插入到原核表达载体 PET28a，获得含有血凝素基因的原核表达重组载体 PET-血凝素；

3) 将该重组载体转化宿主细胞 BL21，并用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导；

4) 诱导表达的蛋白经 Ni-NTA Argarose 纯化系统可得到纯的 H5 血凝素蛋白抗原。

4. 一种重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原在诊断中的用途，其特征在于：利用原核表达的血凝素蛋白作为抗原检测 H5 亚型流感病毒感染产生的抗血凝素蛋白抗体，诊断水禽流感病毒及免疫动物的抗体水平。

重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原、制备方法及其用途

技术领域

本发明涉及生物技术领域，进一步涉及到一种重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原、制备方法及其用途。

背景技术

禽流感(avian influenza)，全称禽类流行性感冒病毒感染，是由正粘病毒科、流感病毒属的 A 型流感病毒引起禽类的一种从呼吸系统感染到败血症等多种症状的传染病，禽类感染后病死率很高。1878 年,Perroncito 在意大利首次发现禽流感。1900 年其病原体首次被人发现，1955 年才经血清学证实属 A(甲)型流感病毒。此后禽流感病毒一直在世界各地家禽中普遍存在，并造成了程度不同的影响。特别是 1997 年香港爆发的禽流感已经对人类健康构成威胁。至此，禽流感问题引起了世界各地的广泛关注。目前已证明，只有 H5 和 H5 亚型可引起 HPAI。禽流感在全球广泛分布，其主要的储存宿主是水禽和迁徙的鸟类。

由于 A 型流感病毒引起的禽流感，其病理变化因感染病毒毒株毒力的强弱、病程长短和禽种的不同而不同。其临床症状因感染禽的种类、年龄、性别、并发感染情况及所感染毒株的毒力和其他环境等不同而表现出的症状很不一致。鸡的流感病毒的抗体检测相继建立了鸡流感琼脂扩散(AGP)、血球凝集抑制试验(HI)、间接酶联免疫吸附试验(ELISA)等血清学检测技术。然而，由于水禽的品种特殊性，其流感抗体的检测方法一直是困惑水禽疫苗免疫效果评估和水禽流感诊断的难题。因此，研制开发适用于水禽流感抗体检测的特异的、敏感的、生物安全度高的、适合于基层使用的诊断检测的器具，对水禽免疫水平进行实时监控和建立科学、灵活的水禽流感的免疫程序，以及对疫病的预防和控制有重要意义。

发明内容

本发明的目的是提供一种重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原、制备方法及其用途。

重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原：水禽流感病毒 H5 亚型的核糖核酸为模板，通过反转录聚合酶链式反应扩增获得血凝素基因，将该基因克隆于大肠杆菌原核表达载体并转化入宿主细胞后，用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导表达并纯化获得血凝素蛋白抗原。

所述的血凝素基因具有 SEQ ID No.1 所示的核苷酸开放读码框序列，并且编码具有 SEQ ID No.2 所示的多肽序列。

重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原的制备方法的步骤如下：

1) 水 禽 流 感 病 毒 H5 亚 型 的 核 糖 核 酸 为 模 板 ， 以
5'-GCGGATCCGGTTACCATGCAAACAACTC-3',5'-GCAAGCTTTACTGCCATCCTCCCTC

TA-3'为引物，通过反转录聚合酶链式反应方法扩增获得血凝素基因；

2) 将血凝素基因插入到原核表达载体 PET28a，获得含有血凝素基因的原核表达重组载体 PET-血凝素；

3) 将该重组载体转化宿主细胞 BL21，并用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷诱导；

4) 诱导表达的蛋白经 Ni-NTA Argarose 纯化系统可得到纯的 H5 血凝素蛋白抗原。

重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原在诊断中的用途：利用原核表达的血凝素蛋白作为抗原检测 H5 亚型流感病毒感染产生的抗血凝素蛋白抗体，诊断水禽流感病毒及免疫动物的抗体水平。

本发明具有如下积极效果：

1. 基于重组的水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原的诊断技术的建立为在我国对水禽流感的流行病学调查及诊断提供了重要的技术基础；

2. 所生产的重组膜蛋白不仅生产容易，操作简单而且纯度较高，具有良好的特异性和敏感性；

3. 将重组膜蛋白纯化后包被聚苯乙烯微量反应板也可建立敏感性更高的 ELISA 诊断方法；

4. 建立了简单、方便、快速易于推广的水禽流感诊断方法，解决了一直困惑于我国的关于水禽流感的诊断问题。制作过程简单，而且成本低，便于推广使用；

5. 由于血凝素/HI 技术除需要一定的技术条件外也容易产生非特异性的结果。而在原核表达系统中表达的膜蛋白不仅表达量高而且具有生物反应活性，是近来用于生产诊断性抗原的一种新型方法，利用表达产物的生物活性可直接检测病毒的感染，而且所表达的膜蛋白融合了组氨酸标签，这同时也使蛋白质的纯化易于操作。为建立更为敏感的酶联免疫吸附试验诊断方法提供了技术支持；

6. 高致病性禽流感是世界各国重点检疫和防范的疫病，危害巨大，除直接影响养禽业的发展，给家禽养殖业造成沉重打击外，还影响禽类产品的安全和影响国内、国际贸易。而且，还具有重要的公共卫生意义，向人类健康提出了新的严峻挑战。野生水禽尤其是鸭、鹅，被公认为是禽流感病毒的储存宿主和传染源，因此为了研究和控制禽流感的广泛流行，必须对野生水禽免疫水平进行实时监控并建立科学、灵活的水禽流感的免疫程序，为控制其流行达到预防目的。本产品为防治工作开创了新的途径；

7. 水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗体间接酶联免疫吸附试验诊断技术的建立为我国对该病的流行进行调查及及时准确的诊断和防治本病提供了技术基础。以水禽流感病毒 H5 亚型血凝素蛋白为基础可以进行多方面的开发利用，例如：a. 以重组蛋白为基础的 ELISA 诊断技术可实现对野生水禽及家禽的 H5 亚型禽流感感染的鉴别诊断；b. 以重组膜蛋白为基础可进行

血凝素蛋白的纯化，进而可用于研究血凝素蛋白的功能结构等；以重组膜蛋白为基础可进行血凝素蛋白的纯化，进而建立更敏感的 Dot-ELISA，免疫荧光和免疫印迹等诊断方法。

附图说明

附图是重组 AIV/H5 血凝素蛋白的抗原活性鉴定结果，图中 A 为重组蛋白的聚丙稀酰胺凝胶电泳分析，B 为重组蛋白的免疫印迹试验鉴定，M 为蛋白质 Marker，1 为大肠杆菌 BL21(DE3)菌体蛋白，2 为重组质粒未诱导菌体蛋白，3 为重组质粒诱导 5h 表达产物，4 为纯化的重组 H5/血凝素融合蛋白，5 为表达产物 H5/血凝素蛋白的免疫印迹

具体实施方式

重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原是诊断水禽流感病毒 H5 亚型感染的重组膜蛋白，它采用大肠杆菌原核表达系统表达了我国 H5 亚型水禽流感病毒分离株（H5N1 亚型）血凝素基因，利用原核表达的血凝素蛋白作为抗原检测水禽流感病毒 H5 亚型感染产生的抗血凝素蛋白抗体。

重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原的表达方法是利用反转录聚合酶链式反应方法克隆了分离于 H5 亚型水禽流感病毒的血凝素基因，然后将血凝素基因用限制性内切酶消化下来再与相同处理的原核表达载体 PET28a 进行连接，获得含有血凝素基因的表达质粒 PET-血凝（PETHA）。

用 PETHA 转化受体菌 BL21 (DE3)，挑取单个菌落，用诱导剂以不同浓度进行诱导驯化，并在不同时间收集样品。经聚丙稀酰胺凝胶电泳分析证实血凝素的表达并确定异丙基-β-D-硫代半乳糖苷的最佳诱导浓度及诱导时间为 1 毫摩尔和 5 小时。用聚丙稀酰胺凝胶电泳后的蛋白带进行转膜，免疫印迹试验证实了所表达的重组膜蛋白大小相符，并具有反应活性。通过特异性、敏感性及工作条件的选择性实验，建立了水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗体间接酶联免疫吸附试验检测技术。

重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原在诊断中应用于酶联免疫吸附试验（ELISA），琼扩诊断技术（AGIP），免疫印迹试验（Western Blot），也可用于检测 H5 亚型流感病毒感染，包括 H5 亚型鸭流感病毒，H5 亚型鹅流感病毒等其它水禽流感病毒。

实施例 1：

重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原的表达和制备方法：

一、H5N1 亚型 AIV 的培养及 RNA 的提取

取 H5N1 种毒经尿囊腔接种于 9-11 日龄 SPF 鸡胚，35℃温箱孵育，收集 24h 后死亡鸡胚尿囊液，采用差速离心法纯化病毒，用 TEN 缓冲液重悬病毒，RNA 提取按 Trizol 试剂盒说明书进行；所提取的 RNA 用于 RT-PCR。

合成用于扩增 AIV 血凝素基因的引物

根据 Genebank 中 AIV/H5 亚型的血凝素基因序列, 针对血凝素基因的 ORF 两端设计了 5' 端和 3' 端一对引物。5' 端引物和 3' 端引物分别引入 *BamH I*、*Hind III* 酶切位点。合成以下两条引物:

5' 端引物(P1): 5'-GCGGATCCGGTTACCATGCAAACAACTC-3'

3' 端引物(P2): 5'-GCAAGCTTTACTGCCATCCTCCCTCTA-3'

二、血凝素基因的 RT-PCR

(一) AIV RNA 的反转录

取上述病毒 RNA 溶液, 加入 12umol/L 的血凝素上游引物 1ul, 瞬时离心后置 70℃ 孵育 5 分钟, 取出置冰上; 然后加入反转录试剂盒中的 5×reaction buffer 4ul、20U/ml Rnasin 1ul、10mM dNTPs 2ul, 混匀后置 37℃ 孵育 5 分钟, 取出置冰上; 再加入 200U/ml AMV-Rnase 1ul, 混匀后置 42℃ 孵育 1 小时。最后置 70℃ 水浴 10 分钟灭活 AMV-Rnase, 迅速取出后置冰浴中 5 分钟。

(二) 血凝素基因的 PCR

取上述的 4ul cDNA 产物用作 PCR 模板, PCR 反应组成 (50ul 体系):

TaKaRa LA Taq (5u/ml) 0.5ul

10×LapCR Buffer (含 Mg²⁺) 5ul

dNTP Mixture (各 2.5mM) 1ul

引物 P1 (12umol/L) 1ul

引物 P2 (12umol/L) 1ul

灭菌去离子水 37.5ul

PCR 反应条件: 95℃ 预变性 1min、94℃ 1min, 53℃ 45s、72℃ 1.0min, 进行 30 个循环, 反应结束前 72℃ 延伸 10min。

三、表达载体 PET-血凝素的构建

1、PCR 产物纯化试剂盒回收目的片段, 利用 T-A 克隆策略直接连接于 PMD18-T 载体, 连接产物转化 *E.coli* DH5α 感受态细胞, 蓝白斑筛选。挑取阳性克隆, 分别进行 PCR 鉴定和酶切鉴定。

2、经 *BamH I*、*Hind III* 双酶切后, 回收目的片段并克隆于表达质粒 PET28a 的 *BamH I* +*Hind III* 酶切窗口中, 构建重组表达质粒 PET/血凝素 (H5), 转化宿主菌 TOP10, 提取重组质粒进行 PCR、双酶切鉴定和序列测定。

四、血凝素基因的诱导表达

经鉴定的重组质粒转入 BL21 (DE3) 宿主菌, 挑取单克隆接种到含有卡那霉素的 10mlLB 培养基中, 37℃ 培养过夜, 按 1: 100 的比例将培养物接种于 100mlLB 培养基中, 250rpm 震

荡培养 2 小时左右，使 OD₆₀₀≈0.5，以 10mM、5mM、1mM、0.5mM、0.1mM 的终浓度加入 100mM 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）诱导驯化，分别在诱导后 1 小时、2 小时、3 小时、4 小时和 5 小时收集菌液，离心收集菌体。将菌体加入适量的 1×SDS 上样缓冲液，采用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）分析，考马斯亮兰染色，观察结果。经 SDS-PAGE 电泳分析证实血凝素已表达，大小约 40kD 的融合蛋白并随诱导时间的增加，表达量也增加，诱导 5 小时表达量最大。不同终浓度的诱导剂诱导时，目的蛋白都能表达，但在终浓度小于 1mM 时表达不明显，因此确定 IPTG 的最佳诱导浓度为 1mM。薄层扫描分析，该蛋白可占菌体蛋白总量的 10~15%。

五、蛋白活性的测定和纯化

Western-blot 分析：表达蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜（NC）上，用含有 5%（w/v）脱脂奶粉的 PBS（PH=7.4）37℃温育 1-2 小时封闭 NC 膜；然后加入含 5% 脱脂奶粉、1% 水禽流感标准阳性血清的 PBS 37℃温育 1 小时；PBS 洗涤膜三次后，加入用含 5%（w/v）脱脂奶粉的 PBS1/5000 稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗水禽 IgG 37℃温育 1 小时；PBS 洗涤膜三次后，加入 TMB 显色液进行显色，结果能见到与 SDS-PAGE 特异性条带相对应的反应条带。诱导表达的蛋白采用 Ni-NTA Argarose 纯化，具体操作参照说明书进行。

实施例 2：

H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测技术的建立：

一、水禽 AIV/H5 抗体检测试板的制备

用 pH8.5 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液作包被液，将水禽流感病毒 H5/HA 蛋白稀释为 10μg/ml，按 100μl/孔加入可拆 96 孔酶标板，37℃2 小时，再 4℃包被过夜，用含 5% 脱脂奶的 PBS 37℃ 封闭 2 小时，以含 0.05% 吐温-20 的 PBS(pH5.4) 洗涤液充分洗涤，甩干。再加入 20% 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时，置干燥室干燥后，用于 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒装配。

二、兔抗水禽 IgG 多克隆抗体的制备

采取水禽全血，分离血清，以辛酸-硫酸铵沉淀法粗提水禽 IgG。再经 Sephadex G200 凝胶层析和 DEAE 纤维素离子交换层析进一步纯化，获得 IgG 纯品。将纯化的水禽 IgG 蛋白按 600~1000 g/kg 体重皮下和肌肉注射免疫健康兔 4~5 次，末次免疫一周后，静脉采血，以 ELISA 测定其血清抗体效价在 1:2000 以上时，心脏采血或颈动脉放血，收集高免血清；以辛酸-硫酸铵沉淀法纯化兔抗水禽 IgG 抗体，不重述，再经 DEAE 纤维素离子交换层析纯化，收集浓缩兔抗水禽多克隆抗体，用于制备 H5 亚型水禽流感病毒血凝素检测试剂盒酶结合物工作液。

三、酶结合物工作液的制备

用改良过碘酸钠法将辣根过氧化物(HRP)酶偶联于兔抗水禽 IgG 多克隆抗体。用超纯水 1ml 溶解辣根过氧化物酶 (HRP,RZ ≥ 3.0) 5mg 溶液，加入 1ml 0.06M 过碘酸钠溶液 4℃避光 1 小时，加入 1ml 160mM 乙二醇，室温反应 30 分钟，加入 PH4.4 的醋酸缓冲液 2—8℃透析过夜，换液两次。将 10mg 纯化的兔抗水禽 IgG 加入上述活化的酶中，转移至透析袋，于 0.05mM PH9.6 的碳酸缓冲液中透析，4℃搅拌过夜（换液两次）。透析液吸至离心管中，加入 5mg/ml 的 NaBH4 液 0.4ml，4℃反应 2 小时。加入等量的饱和硫酸铵溶液，4℃30 分钟，4℃4000 转离心 20 分钟，弃上清，沥干。将沉淀溶于少量 PBS，装入透析袋中，对 0.02M PBS (PH5.4) 透析，4℃过夜。将透析液中液体吸至离心管中，离心，将上清液吸出，加等量甘油，混匀，-20℃保存。再以含 0.1% BSA，0.05% 吐温-20，0.01% 硫柳汞钠的磷酸缓冲液 (pH5.4) 按 1:200-5000 稀释冻存的标记酶作为酶结合物工作液。

四、样品稀释液、洗涤液、终止液的配制

样品稀释液为含 0.05% 吐温-20 的 0.01M 磷酸盐缓冲液(KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄•12H₂O 2.9g, NaCl 8g, 定容至 1000ml, pH5.4, 再加 0.5ml 吐温-20); 10×浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 (KH₂PO₄ 2g, Na₂HPO₄•12H₂O 29g, NaCl 80g, 定容至 1000ml, pH5.4, 再加 5ml 吐温-20); 终止液为 2M 硫酸溶液，即量取 111.2ml 浓硫酸(18M)稀释定容至 1000ml。

五、阳性对照和阴性对照的制备

将用 H5/HA 蛋白免疫获得的 H5 亚型水禽流感病毒标准阳性血清用样品稀释液 1:100 稀释 (OD_{450nm} ≥ 1.00) 加入少量红色颜料并按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素，无菌过滤，作为 H5 亚型 AIV 血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒阳性对照；将筛选获得的水禽标准阴性血清用样品稀释液 1:100 稀释 (OD_{450nm} ≤ 0.150)，按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素，无菌过滤，作为 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒阴性对照。

六、显色液的配制

称取 200mg 四甲基联苯胺(TMB)，用 100ml 无水乙醇或 DMSO 溶解后，以双蒸水定容至 1000ml，配制显色液 A; 称取 21g 一水柠檬酸, 28.2g 无水磷酸氢二钠(Na₂HPO₄), 6.4ml 0.75% 过氧化氢尿素，双蒸水定容至 1000ml，调 pH 值到 4.5-5.0，配制显色液 B。

七、试剂盒检测操作程序

其检测程序为：1) 将 10×浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液；2) 将待检血清用样品稀释液作 1:100 稀释，按 100μl/孔加入抗体检测板中，同时设空白（只加 100μl 样品稀释液）、阴性对照（水禽标准阴性血清）、阳性对照（H5 亚型水禽标准阳性血清），37℃孵育 20—45 分钟，甩干；3) 每孔加洗涤液 200μl，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；4) 每孔加 100μl 酶结合物工作液（空白不加），37℃孵育 20-45 分钟，甩干；5) 每孔加洗涤液 200μl，洗涤 6 次，

每次间隔 1 分钟，拍干；6) 依次加 50 μ l 显色液 A 和 50 μ l 显色液 B，混匀，37℃避光孵育 5-15 分钟；7) 加 50 μ l 终止液，用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔光吸收值（OD450nm 值）。

八、结果判定标准

判定标准以待检样本 OD_{450nm} 值与标准阴性 OD_{450nm} 值比值(P/N)，大于等于 2.1 判为阳性，小于等于 1.7 为阴性。介于 1.7-2.1 之间为可疑，须重检，重测时 P/N 值大于等于 2.0 判为阳性，小于 2.0 为阴性。如果阳性对照无明显显色反应，或阴性对照出现显色，表明试剂盒失效或检测操作有误，需重新检测。

实施例 3.

利用琼扩诊断技术（AGIP）鉴定 H5 亚型流感抗体：

一、实验所用器材

载玻片（2.6×7.6cm），水平仪，毛细滴管，打孔器（常用直径 3mm 的绘图笔尖），湿盒等。

二、实验用试剂

pH8.6 0.1M 巴比妥缓冲液：巴比妥钠 10.3g，巴比妥 1.84g，硫柳汞 100mg，蒸馏水加至 500.0ml。1-1.2%琼脂凝胶：优质琼脂粉 1.1-1.2g，蒸馏水 50.0ml，水浴煮沸溶解，加上上述温热巴比妥缓冲液 50.0ml，充分混匀，分装（每支试管 3.5-4.0ml，融化后浇一块载玻片），4℃保存备用。

三、方法

1. 制板：将载玻片置水平台上，将水浴煮沸融化了的琼脂浇板（一支试管的琼脂浇一块载玻片）。

2. 打孔：琼脂冷却后，用打孔器打孔，一般打成梅花型，挑去孔内琼脂。一块载玻片上可打两组孔，两组孔之间的距离应尽可能大些，但组内抗原孔与抗体孔之间的距离不能过大，通常以 3-4mm 为宜。

3. 加样：梅花型中间的孔加标准抗原即纯化的 AIV/H5 HA 蛋白，周围孔中的一个孔加 H5 亚型标准阳性血清，其余的 5 孔分别加入 5 份待检血清。

4. 扩散：加样后琼脂板置湿盒中，于 37℃温箱中扩散 24-48 小时后，观察结果。

四、结果判定

待检血清与标准抗原孔之间产生沉淀线并与标准阳性血清所产生的沉淀线吻接成一线，表明待检血清为阳性(即该血清中含有 AIV/H5 亚型抗体)；待检血清与已知抗原孔之间无沉淀线，或与标准阳性血清所产生的沉淀线交叉，表明待检血清阴性(即该血清中不含有 AIV/H5 亚型抗体)。

实施例 4.

应用免疫印迹试验（Western Blot）鉴定 H5 亚型流感抗体：

一、抗原分离

用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离血凝素蛋白。

二、抗原印迹

切取抗原分离胶，置转移缓冲液（甘氨酸 2.98g，Trisbase 5.8g，SDS 0.37g，甲醇 200ml，定容至 1 升）中平衡 10-20 分钟。将硝酸纤维素滤膜（NC 膜）、滤纸预先用转移缓冲液浸湿，将两张滤纸铺在石墨板上，再依次铺上 NC 膜，胶和另外两张滤纸（注意不能让上下两层滤纸直接接触，以免短路，每层之间不能留有气泡）。用 0.5-2mA/cm² 的电流恒流转移 1-2 小时。

三、抗原鉴定

1. 抗原印迹后将 NC 膜放在含 5% 脱脂奶粉的 TBS（Trisbase 2.4228g，NaCl 8.766g，定容至 1 升）溶液中 37℃ 封闭 2 小时。

2. 待检血清和标准阳性血清用封闭液稀释（TBS）至 100 倍，NC 膜浸在其中 37℃ 反应 1.5 小时。

3. 反应完毕用 TBST（1 升 TBS 中加入 500ul 吐温-20）清洗 5 次，每次在 37℃ 慢摇 5 分钟。

4. HRP 标记兔抗水禽二抗用封闭液稀释 500 倍，将 NC 膜浸在其中 37℃ 反应 1.5 小时。

5. 反应完毕用 TBST 清洗 5 次，每次在 37℃ 慢摇 5 分钟。

6. 将适量显色底物 TMB 倒入一干净平皿，再将 NC 膜浸入 TMB 中反应，待出现明显条带或底色是用水冲洗 NC 膜，终止反应。

四、结果判定

观察显色后的 NC 膜，在加入标准阳性血清的膜上出现一条与 H5 HA 蛋白大小一致的显色条带，说明此次实验是成功的，在加入待检血清的膜上出现一条与阳性条带一致的显色条带时，说明此待检血清为阳性，如果没有出现，表明待检血清不含有 AIV/H5 抗体。

序 列 表

(1) SEQ ID No.1 的信息：

(a) 序列特征：

长度：1020 个碱基

类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

(b) 分子类型：cDNA

(c) 最初来源：水禽鸭流感病毒

(d) 序列描述：SEQ ID No.1：

SEQ ID No.1：

GGTTACCATGCAAACAACCTAACAGAGCAGGTTGACACAATAATGGAAAAGAACGTTACTGTTACACATGCCCAAGACAT

ACTGGAAAAGACACACAACCGGAAGCTCTGCGATCTAGATGGAGTGAAGCCTCTAATTGAGAGATTGTAGTAGCTG
 GATGGCTCCTCGGAAATCCTATGTGTGACGAATTCAATGTGCCGAATGGCTTACATAGTGGAGAAGGCAATCCA
 GCCAATGACCTCTGTTACCCAGGGATTCAACGACTATGAAGAACTGAAACACCTACTGAGCAGAATAAACCAATTG
 GAAAATTCAAGATCATCCCCAAAAGTTCTGGTCAATCATGAAGCCTCATCAGGGTGAGCTCAGCATGTCCATACAATG
 GGAAGTCCTCCTTTCAAGAAATGTGGTATGGCTTACAAAAGAACAGTACATACCCAAACAATAAGAGGAGCTACAAT
 AATACCAACCAAGAAGATCTTGATACTGTGGGGATTCAACATCTTAATGATGCGGCAGAACAAACAAAGCTCTATCA
 AAACCCAACCACCTATATTCCGTTGAAACATCAACACTGAACCAGAGATTGGTCCCAAAAATAGCTACTAGATCCAAAG
 TAAACGGGCAAAGTGBAAGAATGGAGTTCTGACAATTAAAGCCGAATGATACCATCAATTGAGAGTAATGGA
 AATTCAATTGCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTCAAGAAAGGGACTCAGCAATTATGAAAGTGAATTGGAATATGG
 TAACTGCAACACCAAGTGTCAAACCTCAATGGGGCGATAAAACTCTAGCATGCCATTCCACAACATACACCCCTCACCA
 TCGGGGAGTGCCTCAAATATGTGAAATCAAACAGATTAGTCCTGCGACTGGACTCAGAAACACCCCTCAAAGAGAGAGA
 AGAAGAAAAAGAGAGGACTATTGGAGCTATAGCAGGTTATAGAGGGAGGATGGCAG

(2)SEQ ID No.2 的信息：

(a)序列特征：

长度：340 个氨基酸

类型：氨基酸

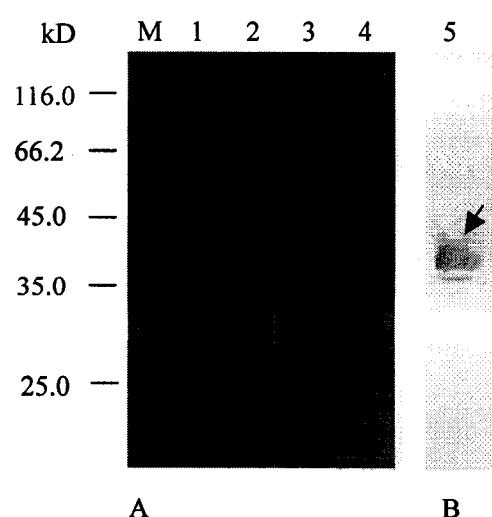
拓扑结构：线性

(b)分子类型：多肽

(c)序列描述：SEQ ID No.2:

SEQ ID NO.2

GYHANNSTEQVDTIMEKNVTVTHAQDILEKTHNGKLCDLDGVKPLILRDCSVAGWLLGNPMCDEFINVPEWSYIVEKANP
 ANDLCYPGDFNDYEELKHLLSRINHFEKIQIIPKSSWSNHEASSGVSSACPYNKGSSFFRNVVWLICKNSTYPTIKRSYN
 NTNQEDLLILWGIHHPNDAAEQTLYQNPTTYISVGTSTLNQRLVPKIATRSKVNGQSGRMEFFWTILKPNDTINFESNG
 NFIAPEYAYKIVKKGDSAIMKSELEYGNCNTKCQTPMGAINSSMPFHNIHPLTIGECPKYVKSNRVLATGLRNPQRER
 RRKKRGLFGAIAGFIEGGWQ。



A

B

专利名称(译)	重组水禽流感病毒 H5 亚型血凝素抗原、制备方法及其用途		
公开(公告)号	<u>CN1789415A</u>	公开(公告)日	2006-06-21
申请号	CN200510061379.8	申请日	2005-11-02
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	周继勇 吴建祥 陈洪勋		
发明人	周继勇 吴建祥 陈洪勋		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12N1/21 C12N15/13 C12N15/70 G01N33/53		
外部链接	<u>Espacenet</u>	<u>SIPO</u>	

摘要(译)

本发明公开了一种重组水禽流感病毒H5亚型血凝素(HA)抗原、制备方法及其用途。本发明的重组水禽流感病毒H5亚型血凝素抗原，它采用大肠杆菌原核表达系统表达了我国水禽流感病毒分离株的血凝素基因，利用表达的血凝素蛋白作为抗原可检测H5亚型流感病毒及感染产生的抗血凝素蛋白抗体。虽然A型流感病毒亚型众多，但血凝素抗原是流感病毒分类和诊断基础，因此，基于重组水禽流感病毒血凝素蛋白抗原建立的诊断技术可以检测鸭、鹅等水禽流感病毒的感染。本发明所生产的重组膜蛋白不仅生产容易，操作简单而且纯度较高，具有良好的特异性和敏感性。且重组膜蛋白纯化后包被聚苯乙烯微量反应板也可建立敏感性更高的ELISA诊断方法。

