

高致病性 H5 亚型禽流行性感病毒血凝素 单克隆抗体的制备与初步应用

陈毅歆¹, 罗海峰¹, 葛胜祥¹, 郭永利¹, 彭耿², 王嘉³, 陈鸿霖^{3,4}, 张军¹, 管轶^{3,4}, 夏宁邵¹

(1. 厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室 福建省医学分子病毒学研究中心, 厦门 361005; 2. 北京万泰生物药业有限公司, 北京 102200;
3. 汕头大学医学院 汕港联合流感中心 汕头 515031; 4. 香港大学微生物系 香港)

摘要:以禽流感病毒株 Ck/ HK/ Yu22/ 02 (H5N1) 作为免疫原, 利用常规杂交瘤技术和血凝抑制试验法成功地筛选出 6 株稳定分泌抗高致病性 H5 亚型禽流感病毒血凝素的单克隆抗体(单抗), 分别命名为 2F2、3C8、3FC1、7C6、10HD4 和 13G4。经血凝抑制试验法分析, 结果发现这 6 株单抗具有特异性高、反应性强、识别谱宽且互补等特点。基于单抗 2F2, 初步建立了三种 H5N1 病毒诊断方法, 经评估证实均具有很好的特异性。由此说明, 研究制备的抗 H5 亚型禽流感病毒血凝素单抗可适用于 H5N1 病毒的诊断。

关键词: 禽流行性感病毒 H5N1; 血凝素; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附试验; 胶体金免疫试验

中图分类号: R373.17 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2005)06-0422-06

禽流感(Avian influenza, AI)是禽流行性感冒的简称, 是一种由禽流感病毒(Avian influenza virus, AIV)引起的急性传染病。目前, 在世界各地分离的 16 个 H 亚型和 9 个 N 亚型禽流感病毒中, 高致病性禽流感均由 H5 或 H7 亚型病毒引起。1997 年香港 H5N1 禽流感传人事件的发生, 改变了人们传统上认为禽流感不能直接传人的概念^[1, 2], 即无需中间宿主的适应过程。此一由禽直接向人类的跨种族传播 2003 年又发生在香港^[3, 4]。自 2003 年底, 东南亚各国再次持续暴发 H5N1 流行, 截止 2005 年 9 月, 已先后有 112 例人感染 H5N1, 导致死亡 57 人^[5]。最让人担心的是其中有些病例可能为人传人导致的^[6]。鉴于此, 专家一致认为高致病性禽流感 H5N1 病毒无疑是最有可能的流感大流行候选株, WHO 已向全球发出暴发世界性大流行的警报, 并全力组织世界各国为下一次流感大流行的预防、治疗及疾控进行全力准备。而当前全球对流感大流行的应对工作主要包括三个部分, 即疫苗株的选择及生产, 抗流感药物的生产及储存, 特异性快速诊断试剂的准备, 其中尤以特异性快速诊断试剂的准备

最为不足。本研究根据 Li 等^[7]对近年来东南亚 H5N1 分离株 HA 基因的分子进化分析结果, 选取基因同源性最保守的代表性 H5N1 病毒株 A/ Ck/ HK/ Yu22/ 02 (以下简称 Yu22) 作为免疫原, 免疫 BALB/c 小鼠, 利用杂交瘤技术和血凝抑制试验法(Haemagglutinin inhibition, HI) 筛选出 6 株能稳定分泌抗 H5 血凝素单克隆抗体(单抗)的杂交瘤细胞株, 并对其性质做了初步的鉴定。在此基础上, 利用单抗 2F2 成功建立了三种 H5N1 病毒诊断方法, 即检测病毒抗原的 H5 抗原酶联免疫吸附试验(H5 抗体 ELISA, H5 - Ag ELISA)、H5 抗原胶体金免疫试验和检测抗血凝素抗体的 H5 抗体酶联免疫吸附试验(H5 抗体 ELISA, H5 - Ab ELISA)。

材料与方法

1 细胞、病毒、单抗和动物 小鼠骨髓瘤细胞株 Sp2/ O-Ag14(Sp2/ 0) 为本实验室保存。所有病毒株及 3 株抗 H5 单抗(Memphis) 等均由香港大学微生物系管轶教授惠赠。BALB/c 小鼠(6~8 周龄) 为本中心动物室提供。鸡胚(9~11 日龄) 购自澄海市白沙农场。

2 试剂 PEG1500、次黄嘌呤、胸腺嘧啶、氨基嘌呤、DMSO 和 HRP 等为 Sigma 公司的产品。RPMI 1640 基础培养基为 Gibco 公司的产品。胎牛血清为 Hyclone 公司的产品。HRP - GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 及 GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3 为 Serotec 公司的产品。

3 流感病毒株的培养与灭活 病毒大量培养, 一次接种 30

收稿日期: 2005-10-14; 修回日期: 2005-10-25

基金项目: 教育部跨世纪优秀人才培养计划(2002); 福建省科技重大专项(2004 YZ01-1)。

作者简介: 陈毅歆(1977 -), 男, 福建东山人, 博士研究生, 研究分子病毒学和免疫学。

通讯作者: 夏宁邵(1964 -), 男, 湖南娄底人, 厦门大学生物学教授, 博士生导师, 研究分子病毒学。Tel: 86 - 592 - 2184110; Fax: 86 - 592 - 2181258; E-mail: nsxia@jngxian.xmu.edu.cn

个 10 日龄鸡胚,先把禽流感病毒株 A/Ck/HK/Yu22/02 (H5N1)用加有抗生素的 PBS 适当稀释后,用一次性注射器抽取 200 μ l,经尿囊腔接种鸡胚,35 $^{\circ}$ C 孵育 72h 后,将接种的鸡胚放入 4 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻过夜。然后在收集的尿囊液中加入终浓度为 0.03% 福尔马林液,在 4 $^{\circ}$ C 冷房里转动 48h 之后,用鸡胚培养法确定病毒是否灭活完全。结果盲传 3 代均为阴性者,说明灭活完全;若结果阳性,必须继续灭活。最后收集病毒液做 HA 试验测定病毒 HA 效价。

4 单克隆抗体的制备 以 HA 滴度 512 的 Yu22 灭活病毒液与等量的福氏完全佐剂混匀,经皮下注射免疫 BALB/c 小鼠,剂量为 400 μ l/次。初免后 15 天和 29 天,分别用同样剂量的病毒液加弗氏不完全佐剂进行加强免疫。融合前 3 天,再以 100 μ l 病毒液经脾脏注射做最后加强免疫。细胞融合、克隆化、腹水制备及纯化均按常规方法进行^[8],融合株筛选使用基于 Yu22 病毒的血凝抑制试验法。

5 单抗一般特性的鉴定 Ig 亚类的测定采用直接 ELISA 法进行鉴定,所用二抗为 HRP-GAM IgM、IgG1、IgG2a、IgG2b 和 IgG3。杂交瘤细胞培养上清及腹水中单抗的滴度测定采用基于 Yu22 病毒的血凝抑制试验法。

6 交叉试验 采用血凝抑制试验法检测单抗腹水与非 H5 亚型病毒的交叉反应,所选病毒包括 H1、H2、H3、H4、H6、H7、H8、H9、H11 和鸡 NDV 等 12 种不同毒株,有血凝抑制的判为有交叉反应,无血凝抑制的判为无交叉反应。

7 病毒识别谱分析 使用血凝抑制试验法分析单抗腹水对 14 株不同地区、不同时间、不同宿主中分离的代表性 H5 亚型病毒株反应识别谱,同时用当前已证明有效的 3 株抗 H5 单抗(Memphis)CP25、CP58、CP176/26^[9]作为对照。根据对不同毒株的血凝抑制实验结果的不同,确定单抗对 H5 亚型病毒的识别谱特性及反应性。

8 辣根过氧化物酶(HRP)的标记 采用改良过碘酸钠法将 HRP(Sigma 公司)标记单抗 2F2^[10]。

9 H5 抗原 ELISA(双抗体夹心法) 以 10mmol/L 的磷酸缓冲液(PB, pH7.4)溶解高纯度单抗 2F2,按 100ng/孔包被于 96 孔聚苯乙烯微孔板,37 $^{\circ}$ C 吸附 2h,4 $^{\circ}$ C 过夜;PBST 洗涤液(pH7.4)洗涤 1 遍,200 μ l/孔封闭液(含 2%明胶、0.2%酪蛋白和 2%蔗糖的 PBS)37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,甩尽、拍干后真空密封,4 $^{\circ}$ C 保存备用。检测时,每孔加入 100 μ l 样品和 50 μ l 裂解液,用封口膜封板后置微量振荡器上中等速度室温震荡 60min;PBST 洗涤 5 次,扣干后每孔加入 100 μ l 酶标抗体(2F2-HRP),37 $^{\circ}$ C 温育 30min;PBST 洗涤 5 次并扣干,加入显色剂,37 $^{\circ}$ C 避光显色 30min,终止,读取 OD_{450/620nm} 的吸光值。

10 H5 抗原胶体金免疫试验 分别在硝酸纤维素膜上的检测区包被高纯度单抗 2F2,对照区包被羊抗鼠 IgG。检测时,先把液体标本等体积加入病毒裂解液处理;固体标本(如粪便)按 1:10 加入裂解液(0.1g 加入 1ml 裂解液)。若标本为拭子,则根据拭子大小加入适量裂解液,室温振荡裂解 30min,离心取上清。吸取上清液 70 μ l 在加样处缓慢滴加,平置于室温。30min 内观察结果有效,在检测区及对照区各凝

集成一条红色条带,判定为阳性;只在对照区形成一条红色条带,判定为阴性;不出现红色条带则视为无效。

11 H5 抗体 ELISA(竞争法) 以 10mmol/L 的磷酸缓冲液(PB, pH7.4)溶解高纯度单抗 2F2,按 100ng/孔包被于 96 孔聚苯乙烯微孔板,37 $^{\circ}$ C 孵育,此为一次包被;反应 2h 后,洗涤封闭 2h,然后用 0.05mol/L 碳酸缓冲液(CB, pH9.5)溶解 Yu22 灭活病毒致终浓度为 64 HA,并在一次包被孔上进行二次包被,之后再封闭 2h,拍干后真空密封,4 $^{\circ}$ C 保存备用。检测时,在每个孔中加入 50 μ l 标本,然后再加入 50 μ l 酶标抗体(2F2-HRP),混匀后用封口膜封板,置 37 $^{\circ}$ C 温育 60min;PBST 洗涤 5 遍,扣干后 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15min,终止,读取 OD_{450/620nm} 的吸光值。

结 果

1 杂交瘤细胞株的建立

利用常规杂交瘤技术和血凝抑制试验筛选法获得 6 株(2F2、3C8、3FC1、7C6、10HD4、13G4)能稳定分泌抗 H5 亚型禽流感病毒血凝素单抗的杂交瘤细胞株,腹腔接种 BALB/c 小鼠后,获得高滴度特异性单抗腹水。

2 单克隆抗体类与亚类鉴定

上述单抗经纯化后,用直接 ELISA 法测定单抗亚型。先把纯化后单抗包被并封闭于 96 孔板上,再与各亚型单抗的酶标抗体直接孵育,显色读值。分类结果为,2F2、3C8 属 IgG1,7C6、13G4 属 IgG2a,3FC1、10HD4 属 IgM。

3 单克隆抗体滴度测定

采用血凝抑制试验法检测系列稀释的培养上清及腹水中单抗的滴度。结果表明,6 株杂交瘤细胞培养上清的血凝抑制抗体滴度为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$,腹水 HI 抗体滴度为 $1 \times 10^{14} \sim 1 \times 10^{18}$ 。

4 单克隆抗体的特异性

血凝抑制试验的病毒交叉反应结果表明,6 株单抗与 H1~H11 及 NDV 共 12 株非 H5 病毒均无交叉反应,但都与 H5N1 病毒 Yu22 发生强反应,证明此 6 株单抗确是抗 H5 亚型禽流感病毒血凝素特异性单抗。

5 单克隆抗体对不同 H5 亚型病毒的反应识别谱特性

选取 14 株 1987~2005 年分离的 H5 亚型禽流感病毒,与上述制备的 H5 单抗称作 XMU-H5MAb) 及 1987 年 Memphis 制备的 H5 单抗(称作 Memphis-H5MAb)进行血凝抑制试验。结果(表 1)结果可见,各单抗株与病毒的反应情况有所不同,所有单

抗至少都与一株病毒不反应或弱反应,而 Memphis 的 3 株单抗在整体反应性上明显不如本研究制备的单抗,它对多株病毒的血凝抑制值均小于 100。同时还可看出,除 3C8 的病毒识别谱略窄外,其余单抗(2F2、10HD4、3FC1、13G4 和 7C6)的识别谱均较广。分析单抗对病毒的抑制滴度可以看出,2F2、

10HD4 和 3FC1 是高反应性单抗,它们对阳性反应病毒的血凝抑制滴度几乎都高于 6 400。比较这 3 株高反应性单抗对 4 株弱反应毒株的识别性,发现彼此间识别病毒的能力具有互补性,提示其识别的抗原表位可能不同。

表 1 H5 单抗对不同 H5 亚型病毒株的血凝抑制滴度

Table 1 HI titers of different H5 viruses with H5 MAb

Virus strain	Memphis-H5MAb			XMU-H5MAb					
	CP25	CP58	CP176/26	2F2	3C8	3FC1	7C6	10HD4	13G4
Ck/PA/1370/87	12800	12800	12800	12800	12800	12800	12800	12800	12800
CK/HK/258/97	12800	12800	12800	12800	400	>12800	1600	>12800	6400
Gs/HK/437.4/99	6400	12800	12800	12800	200	12800	12800	>12800	12800
Dk/HK/ww461/00*	12800	12800	12800	12800	200	>12800	12800	12800	12800
Ck/HK/SF219/01	800	12800	400	12800	3200	>12800	12800	>12800	1600
Ck/HK/31.4/02	1600	1600	400	12800	3200	>12800	12800	>12800	3200
Ck/HK/YU22/02	12800	12800	12800	12800	12800	>12800	6400	>12800	3200
Sck/ST/4610/03	12800	12800	12800	200	>12800	>12800	6400	>12800	6400
Dk/JX/6151/03**	1600	12800	12800	12800	12800	>12800	6400	>12800	6400
Ck/THL/AIV1/04	400	400	12800	12800	6400	12800	3200	>12800	200
Ck/HN/99/05	12800	12800	6400	12800	200	>12800	400	>12800	3200
Dk/JX/1286/05	12800	12800	12800	12800	12800	>12800	1600	>12800	6400
Wdk/JX/1653/05	800	12800	200	12800	12800	12800	6400	3200	3200
Wdk/JX/2295/05	12800	3200	3200	12800	3200	6400	12800	12800	1600

* H5N2 subtype; ** H5N3 subtype; the others are H5N1 subtype; Ck. Chicken; PA. Pennsylvania; HK. Hong Kong; Gs. Goose; Dk.

Duck; Sck. Silk chicken; ST. Shantou; JX. Jiangxi; THL. Thailand; HN. Hunan; Wdk. Wild duck.

表 2 H5 抗原 ELISA 对病毒的检测

Table 2 Detection of virus with H5 - Ag ELISA

Virus subtype	Name	HA unit	Result	
H5 virus	Ck/ HK/ Yu22/ 2002	1/8*	+	
	Ck/ ST/ 4556/ 2002	1/20	+	
	Dk/ ST/ 6151/ 2003	1/16	+	
	Qa/ ST/ 4405/ 2004	1/2	+	
Non-H5 virus	H3	DK/ ST/ 213/ 2004	1024	-
		DK/ ST/ 273/ 2003	1024	-
	H9	Qa/ HK/ GI/ 1997	1024	-
		Dk/ HK/ Y280/ 1997	1024	-
		Ck/ ST/ 4617/ 2003	>2048	-
	NDV	Pa/ ST/ 6708/ 2004	1024	-
		Ck/ ST/ 1860/ 2004	>2048	-
		Sck/ ST/ 1670/ 2003	1024	-

*. 1/n, n times dilution of 1 HA unit virus; Ck. Chicken; HK. Hong Kong; ST. Shantou; Dk. Duck; Qa. Quail; Pa. Partridge; Sck. Silk chicken; NDV. Newcastle disease virus.

6 H5 抗原 ELISA 对病毒抗原的检测结果

H5 抗原 ELISA 的检测原理为双抗体夹心。利用该方法检测了 4 株 H5 亚型、2 株 H3 亚型、5 株 H9 亚型及鸡 NDV 等分离株的鸡胚培养病毒,结果(表 2)可见,对 4 株 H5 亚型病毒均为阳性,对病毒

株 Ck/ ST/ 4556/ 2002 的检测灵敏度最高,为 1/20 个血凝单位(HA);对病毒株 Qa/ ST/ 4405/ 2004 的灵敏度较低,为 1/2 个 HA。而对其余非 H5 亚型病毒的检测均为阴性,特异性良好。

比较 H5-Ag ELISA 和标准 RT-PCR 法对 H5N1 病毒的检测灵敏度,由表 3 可见,两种方法的灵敏度相当,对 1 10000 稀释的同一份标本(Yu22 病毒液 HA = 2048)的检测均显示阳性。

表 3 H5 抗原 ELISA 与 RT-PCR 法检测 H5 亚型病毒的灵敏度比较

Table 3 Comparison of sensitivity between H5-Ag ELISA and standard RT-PCR in detecting H5 subtype

	Dilution ratio of Yu22				
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
H5-Ag ELISA	+	+	+	+	-
Standard RT-PCR	+	+	+	+	-

7 H5 抗原胶体金免疫试验对病毒抗原的检测结果

胶体金免疫试验具有方便、快速的特点,将处理后样品加进上样孔,30min 内即可判定结果。用该方法检测 H5 亚型流感病毒和非 H5 亚型病毒,由表 4 可见,6 份 H5 亚型病毒标本(滴度均为 20 个 HA)

均显示阳性,而 9 份非 H5 亚型病毒标本均为阴性,说明此胶体金试验的特异性良好。

表 4 H5 抗原胶体金免疫试验对流感病毒的检测

Table 4 Detection of the influenza virus with H5-Ag colloidal gold immunoassay

Virus subtype	Name	Results
H5 virus(20 HA units)	Ck/ HK/ Yu22/ 2002	+
	Ck/ ST/ 4556/ 2002	+
	Dk/ ST/ 6151/ 2003	+
	Dk/ YN/ 1747/ 2003	+
	Qa/ ST/ 4405/ 2004	+
	Ck/ ST/ 4003/ 2004	+
Non-H5 virus		
H3	DK/ ST/ 213/ 2004	-
	DK/ ST/ 273/ 2004	-
H9	Qa/ HK/ GI/ 1997	-
	Dk/ HK/ Y280/ 1997	-
	Ck/ ST/ 4617/ 2003	-
	Pa/ ST/ 6708/ 2004	-
	Ck/ ST/ 860/ 2004	-
NDV	Ck/ ST/ 4268/ 2002	-
	ScK/ ST/ 1670/ 2003	-

Ck. Chicken; HK. Hong Kong; ST. Shantou; Dk. Duck; YN. Yunnan; Qa. Quail; Pa. Partridge; ScK. Silk chicken; NDV. Newcastle disease virus.

8 H5 抗体 ELISA 对病毒抗体的检测结果

H5 抗体 ELISA 采用竞争法,标本中的抗 H5 抗体与酶标 H5 抗体(2F2-HRP)竞争结合包被于微

孔上的 H5 抗原,标本中 H5 抗体浓度越高,其竞争抑制值(inhibition ratio, IR)越高,显色 OD 值越低;反之越高。用该方法检测大量血清标本,由表 5 可见,6 份抗 Yu22 鼠血清均为阳性,50 份接种过 H5 疫苗的鸡血清有 48 份阳性,其余 179 份各种非 H5 血清均为阴性。检测 13 份禽流感病毒分型标准血清(H1 ~ H13)和 1 份鸡新城疫病毒标准分型血清(图 1),结果只有 H5 抗血清显示阳性,其余非 H5 抗血清反应均为阴性。此结果均说明该竞争 ELISA 方法检测 H5N1 病毒抗体特异性良好。

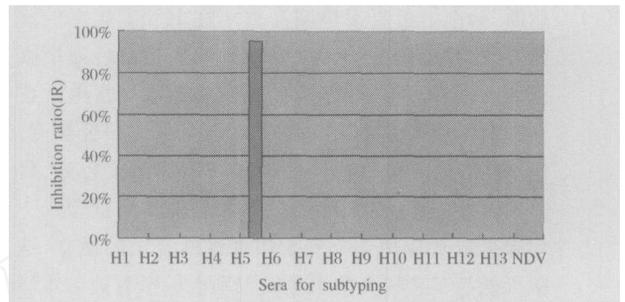


图 1 H5 抗体 ELISA 对流感病毒标准分型血清的检测

Figure 1 Subtyping of standard antisera

with H5-Ab ELISA

Positive. Inhibition ratio 50 %;

Negative. Inhibition ratio < 50 %.

表 5 H5 抗体 ELISA 试剂对血清标本的检测

Table 5 Detection of sera with H5-Ab ELISA

	Sera							
	Mice anti- Yu22	Immunized chicken	Normal chicken	Normal people	Wild bird	Mice anti- H9	Rabbit anti- H9	Chicken anti- NDV
Positive	6/ 6	48/ 50	0/ 30	0/ 32	0/ 98	0/ 11	0/ 4	0/ 4

讨 论

本研究利用常规杂交瘤制备技术成功获得 6 株高特异性、高反应性的抗 H5 亚型禽流感病毒血凝素单抗。利用 HI 法分析证实,6 株单抗与多株非 H5 亚型流感病毒及其它禽类病毒均无交叉反应,显示出很好的特异性。分析 6 株单抗对 H5 亚型病毒的识别能力,以 14 株 1987 ~ 2005 年间从不同地区不同宿主分离的代表性 H5 亚型禽流感病毒和上述 H5 单抗进行 HI 实验,发现 6 株单抗的病毒识别谱有所差异,其中广识别谱单抗 2F2、3FC1、10HD4 对病毒的识别互补性好,且对多数病毒株均发生强抑

制。这些特性提示,这 3 株单抗在 H5 亚型流感诊断试剂的研制中具有很好的应用价值,其识别谱互补性显然有助于提高病毒诊断检出率。

血凝素基因是流感病毒中变异速率最快的基因^[11]。目前对流感病毒 HA 基因的抗原性变异分析主要是通过分子进化树分析进行间接推测。而通过血清学上的表型抗原性分析手段,由于缺乏有效的抗体而无法实施。应用上述制备的系列特异性 H5 亚型单抗,对流行中的 H5N1 病毒进行抗原性的表型分析,显然对于监控病毒株的抗原性变异规律及流感疫苗的评估与选择意义重大。虽然抗流感病毒治疗性化学药物 Relenza 和 Tamiflu 等^[12]已被证实能够有效抑制病毒在体内的扩散,但由于价格

昂贵且产量有限,使其很难满足流感大流行后的大批量需求。所以对上述单抗做进一步的中和试验鉴定,寻找高效中和单抗,并利用抗体人源化技术进行合理改造,将很可能成为一种未来治疗 H5N1 病毒感染的特效药。

2003 年底至今, H5N1 病毒在全球引发严重的禽流感危机,目前全球流感防控工作最迫切的任务之一就是建立一种有效的能直接、方便、快速检测 H5N1 病毒的快速诊断方法。而回顾当前全球范围内的各种流感诊断方法,尚未发现有真正符合“床边诊断”标准的可直接检测高致病性 H5N1 病毒的诊断方法,这使防止 H5N1 病毒的快速扩散传播面临巨大的困难。利用 H5 亚型流感病毒血凝素单抗建立 H5N1 病毒诊断方法,已成为当前一大研究热点。但诊断方法对单抗的亲合力和识别谱要求较高,目前国内外制备的抗 H5 亚型病毒血凝素单抗^[9,13,14]均未见成功应用于 H5N1 病毒诊断方法的建立,这很可能与其亲合力的不足或识别谱偏窄有关。本研究利用自行研制的抗 H5 亚型流感病毒血凝素单抗,初步建立起三种能够直接检测 H5 亚型病毒感染的诊断方法, H5 抗原 ELISA 和 H5 抗原胶体金免疫试验法能够直接检测标本中病毒血凝素抗原,均具有很好的特异性。其中 H5 抗原 ELISA 的检测灵敏度与标准 RT-PCR 几乎相当。H5 抗原胶体金免疫试验有简便、无需专门仪器和专业操作人员等优点,能够在 30min 内判定检测结果,符合“床边诊断”的要求^[15],显示出很好的应用前景。H5 抗体 ELISA 能够检测血清中的抗 H5 亚型血凝素抗体,经多份标本评估证实,该诊断方法具有很高的特异性,适用于 H5N1 流感病毒回顾性流行病学调查研究。由于标本数量来源有限,故上述三种检测方法还需做全面性能评估,而多种单抗的合理配伍显然有利于提高病毒诊断的检出率,这也是未来工作重点之一。

参考文献:

[1] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian

influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness[J]. *Science*, 1998, 279:393 - 396.

- [2] Claas E C, Osterhaus A D, van Beek R, et al. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus[J]. *Lancet*, 1998, 351:472 - 477.
- [3] Peiris J S, Yu W C, Leung C W, et al. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease[J]. *Lancet*, 2004, 363:617 - 619.
- [4] Guan Y, Poon L L, Cheung C Y, et al. H5N1 influenza: a protean pandemic threat[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(21):8156 - 8161.
- [5] CDC. Update: influenza activity-United States and worldwide, May 22-September 3, 2005, and 2005 - 06 season vaccination recommendations[J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2005, 54(36):899 - 902.
- [6] Ungchusak K, Auewarakul P, Dowell S F, et al. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1) [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(4):333 - 340.
- [7] Li K S, Guan Y, Wang J, et al. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia[J]. *Nature*, 2004, 430:209 - 213.
- [8] Harlow E, Lane D. Monoclonal Antibodies [A]. Harlow E, Lane D, eds. *Antibodies: a laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. 139 - 312.
- [9] Kawaoka Y, Nestorowicz A, Alexander DJ, et al. Molecular analyses of the hemagglutinin genes of H5 influenza viruses: origin of a virulent turkey strain[J]. *Virology*, 1987, 158(1):218 - 227.
- [10] Tijssen P, Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays[J]. *Anal Biochem*, 1984, 136:451 - 457.
- [11] Webster R G, Bean W J, Gorman O T, et al. Evolution and ecology of influenza A viruses[J]. *Microbiol Rev*, 1992, 56(1):152 - 179.
- [12] Graeme L. Influenza drug could abort a pandemic[J] *Nature*, 2005, 434:821.
- [13] 邵红霞, 秦爱建, 钱琨, 等. 抗禽流感病毒 H5 亚型血凝素特异性单克隆抗体的研制[J]. *中国动物检疫*, 2002, 19(8):21 - 23.
- [14] 曹振, 秦亚曼, 王传彬, 等. 抗 H5N1 亚型禽流感病毒血凝素单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(4):197 - 199.
- [15] Gavin P J, Thomson R B. Reviews of rapid diagnostic tests for influenza[J]. *Clin Applied Immunol Rev*, 2003, 4:151 - 172.

Development and Characterization of MAb against Haemagglutinin of Highly Pathogenic H5 Avian Influenza Virus

CHEN Yi-xin¹, LUO Hai-feng¹, GE Sheng-xiang¹, GUO Yong-li¹, PENG Geng²,
WANG Jia³, CHEN Hong-lin^{3,4}, ZHANG Jun¹, GUAN Yi^{3,4}, XIA Ning-shao¹

(1. The Key Laboratory of Education Minister for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Research Center of Medical Molecular Virology of Fujian Province, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Beijing Wantai Biological Pharmacy Co., Beijing 102200, China; 3. Joint Influenza Research Center (SUMC & HKU), Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China; 4. Department of Microbiology, The University of Hong Kong, Pokfulam, Hong Kong SAR, China)

Abstract : Six MAbs against haemagglutinin of highly pathogenic H5 avian influenza virus were developed by fusing SP2/0 myeloma cells with spleen cells of BALB/c mice immunized with Ck/ HK/ Yu22/ 02 (H5N1), which were designated as 2F2, 3C8, 3FC1, 7C6, 10HD4 and 13G4 respectively. By hemagglutinin inhibition test (HI), these six MAbs displayed high specificity and reactivity. Based on the MAb 2F2, we developed three diagnostic assays for H5N1 viruses, all displaying very good specificity to H5N1 virus. The results suggested that these MAbs will be very useful in diagnosing H5N1 viruses.

Key words : H5N1 ; HA ; MAb ; ELISA ; colloidal gold immunoassay

Corresponding author : XIA Ning-shao, E-mail : nsxia @jingxian. xmu. edu. cn