

学校编码: 10384
学号: 21720061152192

分类号 _____ 密级 _____
UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

H5 亚型高致病性禽流感病毒血凝素抗原快速
诊断试剂盒的研制

Preparation of a Rapid Antigen Detection Test for HA of
High Pathogenic H5 Avian Influenza Virus

王锐

指导教师姓名: 张 军 教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交日期: 2009 年 月

论文答辩时间: 2009 年 月

学位授予日期: 2009 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2009 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	II
缩 略 语.....	III
第一章 前 言	1
一、甲型流感病毒生物学特性.....	1
1. 病毒的分类与命名.....	1
2. 病毒的形态与结构.....	2
3. 甲型流感病毒基因组及其所编码蛋白.....	2
4. 病毒对理化因素的抵抗力.....	6
二、甲型及H5 亚型流感病毒的流行病学.....	6
1. 流感病毒的宿主范围不断扩大.....	6
2. 水禽是流感病毒重要的传染源和基因储存库.....	7
3. 流感病毒快速变异获得稳定的感染人类的能力.....	7
4. H5 亚型流感病毒的流行与危害.....	9
5. 流感病毒爆发大流行的潜在可能性.....	10
三、流感病毒及H5 亚型流感病毒的特异性诊断.....	12
1. 传统流感诊断方法.....	12
2. 核酸检测.....	13
3. 快速诊断.....	14
四、本论文的研究目的、思路和意义.....	15
1. 研究目的与思路.....	15
2. 研究意义.....	16
第二章 材料与方 法	17
一、材料.....	17
二、方法.....	27

第三章 结果与分析	40
一、H5 亚型血凝素单克隆抗体的制备及鉴定.....	40
二、H5-Dot的研制	40
1. 免疫渗滤技术 (Dot-ELISA) 检测平台的建立.....	40
2. 试剂盒生产工艺研究及反应体系的建立.....	43
3. 试剂盒内部质控病毒株 (参考品) 建立.....	46
4. H5-Dot试剂盒组成.....	46
三、H5-Dot的性能评估	48
1. 对培养病毒的检测.....	49
2. 对现场标本的检测.....	53
3. H5-Dot检测不同类型标本的结果.....	55
4. H5-Dot与同类试剂检测比较.....	55
5. 评价小结.....	59
第四章 讨论	61
一、H5-Dot诊断试剂盒的研制.....	61
二、H5-Dot的性能评估.....	62
三、未来的工作.....	64
小 结.....	66
参考文献.....	67
致 谢.....	73
附 录.....	74

Contents

Abstract in Chinese	I
Abstract in English	II
Abbreviations	III
Chapter 1: Preface	1
I. The biological properties of Influenza A Virus	1
II. The epidemiology of FLUA and H5 influenza virus	6
III. The specific diagnosis of FLUA and H5 Influenza virus	12
IV. The purpose and meaning of this research	15
Chapter 2: Materials and Methods	17
I. Materials	17
II. Methods	27
Chapter 3: Results and Analysis	40
I. Preparation of McAbs against H5-subtype HA	40
II. Development of H5-HA(Ag) Dot-ELISA	40
III. Evaluation of H5-HA(Ag) Dot-ELISA	48
Chapter 4: Discussion	61
I. Development of H5-Dot	61
II. Clinical evaluation of H5-HA(Ag) Dot-ELISA	62
III. The next work	64
Brief Summary	66
References	67
Acknowledgement	73
Appendix	74

摘要

2003 年底至今, 东南亚地区持续爆发 H5N1 禽流感疫情, 并随着候鸟迁移不断扩散至欧洲、非洲等地区, 引起大规模禽类感染和散在的人感染事件。长期的监测结果表明, H5N1 型病毒由于其变异快速、致病性强, 能够感染人类, 最有可能成为流感大流行的候选株。目前, 检测 H5 亚型禽流感病毒快速诊断试剂尚无大规模商品化的产品出现, 现有的诊断方法难以满足对禽流感疫情的及时发现和控制的需要。本研究致力于研制出一种特异性针对 H5N1 禽流感病毒血凝素抗原的快速诊断试剂盒, 并对其全面的性能评估。

本实验室在 H5 亚型禽流感病毒单抗制备方面已有多年经验, 利用分子进化树手段分析近年来在东南亚地区流行的 H5N1 禽流感病毒株的 HA1 基因序列的进化规律, 选择了以 A/Ck/HK/Yu22/02 (H5N1) 为主的共 14 株代表性毒株作为抗 H5 亚型单抗制备的免疫原, 最终获得了 476 株抗 H5 亚型血凝素单抗, 并且对全部单抗的性质做了鉴定。这些前期工作为诊断试剂的研制奠定了坚实的基础。

基于上述基础, 本研究通过对单抗的进一步筛选挑选了 4 株单抗 (1A6、13H8、2F10 和 6B7) 研制出了一种特异性检测 H5N1 禽流感病毒血凝素抗原的快速诊断试剂盒, 建立了试剂盒的生产工艺, 并对其进行了大规模的性能评估。临床评估结果表明, H5-Dot 对培养病毒的检测灵敏度为 100% (85/85), 特异性为 100% (61/61); 检测现场标本的灵敏度为 77.3% (92/119), 特异度为 99.2% (20/2527)。H5-Dot 对 H5N1 病毒培养液的检测下限约相当于 4×10^7 病毒拷贝 ($4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$), 分析灵敏度约比甲型流感诊断试剂 QuickVue A+B 高 25 倍、比另外一种甲型流感诊断试剂 Directigen 试剂高 8 倍。上述结果提示, H5-Dot 具有较好的检测性能, 能够满足流感疫情的监控需要。

关键词: H5N1; 单克隆抗体; 快速诊断

Abstract

H5N1 subtype avian influenza began to attack the southeastern Asia since late 2003, and recently spread to Europe and Africa by the migratory birds. It caused fatal disease on avian and human. Long inspect results indicate that H5N1 subtype avian influenza virus may become the candidate for the next pandemic influenza because of its quick variation, causing fatal disease, and infecting human. Presently, the big problem is the lack of rapid diagnostic tests for influenza. The existing diagnostic methods can not meet the needs of monitoring the influenza epidemic situation. The purpose of this research is to develop a new rapid antigen detection test for HA of H5N1 avian influenza virus. Also, comprehensive evaluation will be done.

Our lab has a great deal of experience in H5 McAbs preparation. With the help of phylogenetic analysis of H5N1 virus isolated from southeastern Asia recently, we know the evolution genesis of the HA1 gene in H5N1, then choose the high pathogenic strain "A/Ck/HK/Yu22/02" as the main immunogen for H5 McAbs preparation. At last, we get 476 H5 McAbs, and characterization of all the H5 McAbs was done. All of these work lay the solid groundwork for diagnostics development.

Four McAbs (1A6, 13H8, 2F10, 6B7) were choosed from the panel of H5 McAbs to establish a new rapid antigen detection test for HA of H5N1 avian influenza virus(H5-Dot) and its manufacturing technique. To evaluate the detection capability of H5-Dot, much work had been done. Results showed that both the sensitivity (85/85) and specificity (61/61) for virus strains in the allantoic fluid were 100%; the sensitivity and specificity for field samples was 77.3% (92/119) and 99.2% (20/2527). The detect limit of H5N1 virus strains in the allantoic fluid was 4×10^7 copies ($4 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$), analytical sensitivity was 25 times higher than QuickVue A+B, and 8 times higher than Directigen. These results suggest that H5-Dot is an acceptable detection test, and can play an important role on monitoring the influenza epidemic situation.

Keywords: H5N1; McAb; rapid detection

缩略语

缩写	英文全称	中文名称
4003	A/Ck/ST/4003/04(H5N1)	H5N1 病毒株 4003
6151	A/Dk/ST/6151/03(H5N3)	H5N3 病毒株 6151
AIV	avian influenza virus	禽流感病毒
BhGs	bar-headed goose	斑头雁
Ck	chicken	鸡
DFA	direct fluorescent assay	直接免疫荧光检测
Dk	duck	鸭
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附实验
ER	endoplasmic reticulum	粗面内质网
FJ	fujian	福建
Flu	influenza	流感
Freunds	freunds adjuvant	福氏佐剂
Ghr	grey heron	灰苍鹭
Golgi	golgi body	高尔基体
Gs	goose	鹅
GX	guangxi	广西
HA	hemagglutinin	血凝素
HI	haemagglutination inhibition test	血凝抑制实验
HK	hong kong	香港
HN	hunan	湖南
HPAIV	high pathogenic avian influenza virus	高致病禽流感病毒
HRP	horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IFA	Indirect immunofluorescent assay	间接免疫荧光检测
JX	Jiangxi	江西
kD	kilo daltons	千道尔顿
LPAIV	low pathogenic avian influenza virus	低致病禽流感病毒
M	matrix	基质蛋白
mAb	monoclonal antibody	单克隆抗体
MDCK	Madin-darby canine kidney	犬肾细胞
Mdk	migrate duck	侯鸟野鸭
NA	neurominidase	神经氨酸酶
NASBA	nucleic acid sequence-based amplification	基于核酸的序列扩增
NDV	new castle virus	新城疫病毒
NP	nucleocapsid	核壳蛋白
NPAIV	non-pathogenic avian influenza virus	非致病禽流感病毒
NS	nonstructural	非结构蛋白

缩略语 (Abbreviations)

PA	polymerase A	多聚蛋白酶 A
PB1	polymerase B1	多聚蛋白酶 B1
PB2	polymerase B2	多聚蛋白酶 B2
PEG	polyethylene glycol	聚乙二醇
PMK	primary rhesus monkey	新生恒河猴
POC	point-of-care	床边诊断
Ql	quail	鹌鹑
RIBIs	RIBIs adjuvant	RIBI 佐剂
RNPs	ribonucleoproteins	核糖核蛋白体
ST	shantou	汕头
THL	thailand	泰国
vRNA	viral RNA	病毒 RNA
vRNPs	viral ribonucleoproteins	病毒核糖核蛋白体
Wb	wild birds	野鸟
Wdk	wild duck	野鸭
YN	yunnan	云南
Yu22	A/Ck/HK/Yu22/02(H5N1)	H5N1 病毒株 Yu22

注：按缩写词的第一个字母排序。

第一章 前言

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引起的急性高度致死性传染病, 被国际兽医局定为A类烈性传染病。禽流感广泛存在于多种家禽和野生禽类体中^[1,2]。

根据毒株对禽类致病性的差别, 可将禽流感病毒分为高致病性 (HPAIV)、低致病性 (LPAIV) 和非致病性 (NPAIV) 三大类。NPAIV 不会引起明显症状, 仅使染病的禽类体内产生病毒抗体; LPAIV 可使禽类出现轻度呼吸道症状, 食量减少、产蛋量下降, 出现零星死亡; 而 HPAIV 的发病率和死亡率高。

自 1997 年香港首次发生高致病性禽流感病毒H5N1 致人死亡事件后, 该病毒已成为人类生命安全的新威胁。2003 年至今, 高致病性H5N1 禽流感病毒从东南亚地区逐渐扩散到欧洲、中东、非洲等地区并持续流行, 不仅使疫区养禽业蒙受巨大损失, 而且还不断发生病毒突破种间屏障直接传人感染致死事件, 造成全球社会恐慌^[3-5]。

H5N1病毒属甲型流感病毒 (Influenza A Virus), 具有甲型流感病毒的所有特性。

一、甲型流感病毒生物学特性

1. 病毒的分类与命名

流感病毒属正粘病毒科 (Orthomyxoviridae), 流感病毒属, 为有包膜的单链负义RNA病毒。根据病毒核蛋白 (NP) 和基质蛋白 (MS) 的抗原性及其基因特性的不同可将其分为甲、乙、丙血清型^[6], 其中甲型流感变异较快, 可见于人类、禽类、猪及其它哺乳动物, 分布区域十分广泛; 乙型流感变异较慢, 局部流行; 而丙型流感未见明显变异, 呈散发流行。乙型和丙型流感病毒一般只见于人类。根据甲型病毒表面糖蛋白血凝素 (HA) 和神经氨酸酶 (NA) 抗原性的不同将其分为 16 个H亚型和 9 个N亚型, H5 亚型病毒即可引起高致病性禽流感^[7-9]。

对于流感病毒分离株, 标准的命名法规定其完整的名称必须包括型别 (A、B、C) 或 (甲、乙、丙) /宿主来源 (若为人, 可省略) /分离地点/毒株序号/分

离年代, 对于甲型流感病毒还需要将其所属 HA 和 NA 亚型注明在括号内。比如一株于 2002 年在香港从人分离得到的甲型流感病毒分离株 YU22 的标准命名应该是: A/HongKong/YU22/2002(H5N1)。

2. 病毒的形态与结构

研究表明, 流感病毒的多种蛋白 (HA, NA, M1 和 M2) 以及病毒所感染的宿主细胞对病毒颗粒的形态学结构特征有着显著的影响^[10-16]。从流感病毒的外部形态上来看, 甲、乙型流感病毒的结构基本相同, 均有两种刺突蛋白, 而丙型流感病毒颗粒表面只有一种。典型的甲、乙型流感病毒呈球形, 少部分呈丝状或呈杆状, 直径约为 80~120nm^[8]。

甲型流感病毒颗粒主要由囊膜和核衣壳两部分组成, 囊膜表面有许多由糖蛋白 HA 和 NA 组成的放射状排列的刺突 (Spike), 长度约为 12~14nm^[8]。囊膜上镶嵌着三种蛋白 (HA、NA 和 M2)。囊膜由外向内, 可分为糖蛋白、类脂和基质蛋白三层。类脂层是脂质双层结构, 其中大部分为磷脂, 还有少量的胆固醇和糖脂, 它来自宿主细胞膜或核膜, 其中镶嵌的两种糖蛋白 HA 和 NA 向外突出形成刺突, 构成了流感病毒囊膜的最外层。在囊膜下面是一层内膜基质蛋白 (M1), 它介于核蛋白与脂质双层膜之间, 与组成脂质双层膜的种类紧密结合, 紧紧地包裹着核衣壳, 在维持病毒形状与完整性上起重要作用^[8]。

病毒的核心在电子显微镜下呈电子致密状, 主要由核糖蛋白体 (RNPs, ribonucleoproteins) 组成。RNPs 的组成是由 4 种核蛋白环绕螺旋状 RNA 形成的, 四种蛋白中以 NP 蛋白为主, 另外三种是 RNA 多聚酶 (PB1、PB2、PA)。RNPs 中的核酸是决定流感病毒的遗传特性的基因组 RNA, 在甲、乙型流感病毒中有 8 个节段, 而丙型病毒则只有 7 个节段。

3. 甲型流感病毒基因组及其所编码蛋白

3.1. 甲型流感病毒基因组

甲型流感病毒属于正粘病毒科, 流感病毒属, 其基因组由 8 条线状的、单链负义 RNA 片段组成。这 8 个片段至少编码 10 个病毒蛋白, 即 8 个结构蛋白 (PB2、PB1、PA、HA、NP、NA、M1、M2) 和两个非结构蛋白 (NS1 和 NS2), 根据

分子量大小排序, 8 条基因分别为片段 1~8, 其中片断 7 和片段 8 均编码两种蛋白, 分别为M1、M2 和NS1、NS2^[6], 如图 1-1 所示。

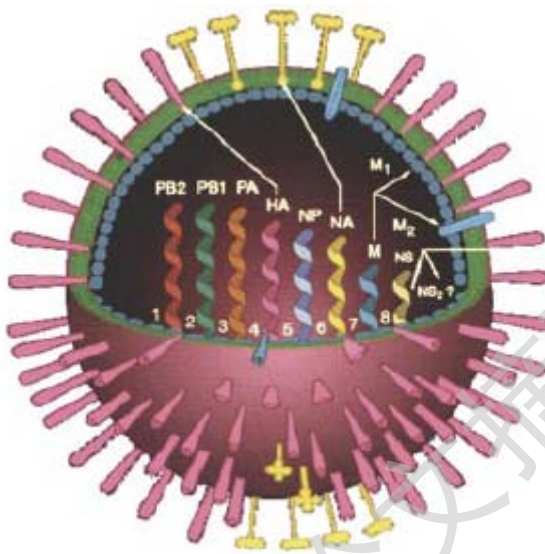


图 1-1 流感病毒颗粒的结构模拟图

Fig.1-1 Structure of the influenza virus particle

From: Am J Health-Syst pharm.2007; 64:149-65.

3. 2. 甲型流感病毒主要蛋白

甲型流感病毒基因组至少编码 10 个蛋白。其中, 血凝素(Hemagglutinin, HA) 属于I型糖蛋白, 是病毒表面的主要刺突成分, 在病毒吸附及穿膜过程中起关键作用。神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA) 属于 II 型糖蛋白, 是构成病毒囊膜刺突的另一个重要成分, 其功能是将病毒颗粒从宿主细胞受体上释放出来, 以利于新生子代病毒离开细胞进一步传播。多聚蛋白酶 (PB2, PB1 和PA) 和病毒mRNA 的转录和复制相关。核蛋白 (Nucleocapsid, NP) 在病毒基因组的转录、复制及决定宿主特异性方面有重要作用。基质蛋白 (Matrix Protein) 中M1 的作用在于维持病毒形态, 协助病毒脱衣壳及在感染细胞后与RNPs结合并转运出核, M2 的作用在于调控HA合成及病毒脱壳时的PH环境。非结构蛋白 (NS1, NS2) 亦和病毒的复制及RNPs的出核运输相关, 是主要的免疫调节子, 另外NS1 还可能是高致病性病毒复制的重要遗传元件, 其缺失突变可能与病毒的毒力变化有关^[6,7,18,30]。下面主要介绍两种糖蛋白——HA和NA。

3.2.1. 血凝素 (Hemagglutinin, HA)

HA是由片段4编码的,是流感病毒囊膜的主要刺突成分,也是病毒最主要的表面抗原,可诱生保护性抗体及细胞免疫^[7],是当前疫苗的关键成分,也是寻找中和抗体的主要指导成分^[18]。HA在病毒吸附及穿膜过程中以及决定病毒致病力方面均起关键作用。

HA的一级结构有4个结构域,分别为信号肽、胞浆域、跨膜区和胞外区域。信号肽位于HA的氨基端,约由16个疏水氨基酸组成。HA蛋白以棒状同源三聚体的形式突出于病毒表面^[19,20]。从三维结构图(图1-2)可看出,HA蛋白可分为两部分:球状的头部和杆状的基底部。每个HA是由HA1和HA2两个亚单位经二硫键连接组成的。HA1约有324个氨基酸,由一些不平行的 β 折叠构成球状头部,含有受体结合位点和主要抗原决定簇。HA1上的受体结合位点能与不同宿主细胞上的不同唾液酸受体结合,起决定宿主范围的功能;HA2约有222个氨基酸,和部分HA1片段组成杆状部分,是参与和细胞膜融合的重要亚单位。HA中的两个亚单位可被宿主细胞的转运蛋白水解酶酶解。而HA能否被水解为HA1和HA2是病毒感染细胞的先决条件,也是决定病毒致病力高低的重要因素之一。

流感病毒感染是由病毒HA上受体结合位点与目标细胞上包含唾液酸的受体之间相互作用引发的。病毒HA上受体结合位点的结构是决定流感病毒宿主特异性的主要因素。常见的流感病毒受体有两种,一种形成唾液酸- α -2,3-N-乙酰神经氨酸半乳糖(SA α -2,3NeuAcGal),另一种形成唾液酸 α -2,6-N-乙酰神经氨酸半乳糖(SA α -2,6NeuAcGal)。一般情况下,禽流感病毒优先结合“SA α -2,3NeuAcGal”受体,这种受体多见于禽类肠道细胞上;而人流感病毒则优先结合常见于人类呼吸道细胞上的“SA α -2,6NeuAcGal”受体^[23,24]。研究表明,当HA上的受体结合位点处第226位氨基酸残基是Gln的时候,形成“SA α -2,3NeuAcGal”样受体;当该位点氨基酸残基为Leu的时候,形成“SA α -2,6NeuAcGal”样受体;如果该位点氨基酸残基为Met,则同时具有“SA α -2,3NeuAcGal”和“SA α -2,6NeuAcGal”两种受体的结合特性。一般情况下,禽流感病毒并不感染人,原因即在于此,而HA的突变则有可能形成结合人类细胞的结构,从而感染人。

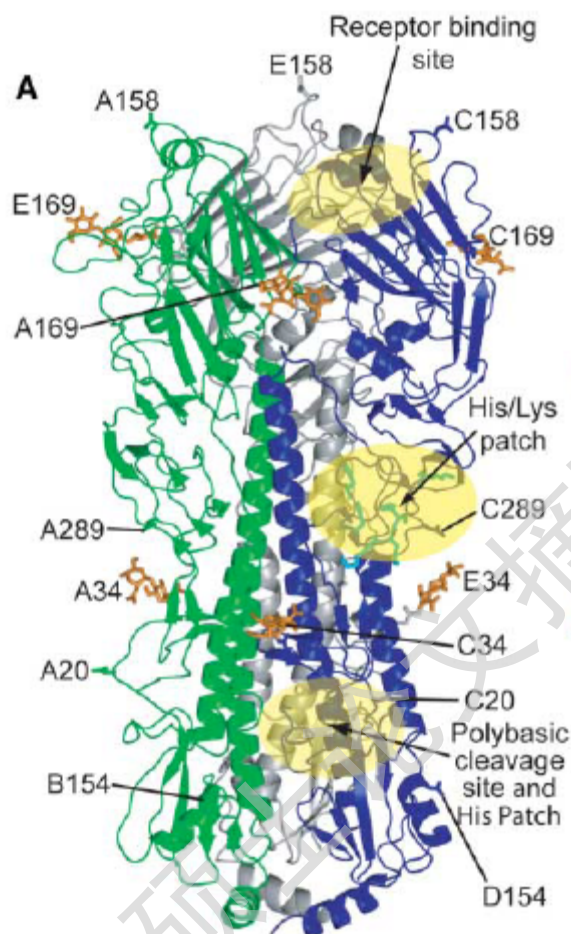


图1-2 流感血凝素蛋白 (HA) 的三维晶体结构

Fig.1-2 The crystal structure of HA of influenza virus

From: James Stevens, et al. Science, 2006; 312: 404-410.

3. 2. 2. 神经氨酸酶 (Neuraminidase, NA)

NA 是由片段 6 编码的，也是病毒颗粒表面的糖蛋白之一，与 HA 一同构成病毒囊膜刺突，是病毒颗粒的第二个重要表面抗原。NA 能够水解糖末端的唾液酸残基，其功能是将病毒颗粒从宿主细胞受体上释放出来，以利于新生子代病毒离开细胞进一步传播。NA 的一级结构包括氨基端胞浆尾、非极性跨膜区、茎部和头部共 4 个结构域 (图 1-3)。非极性跨膜区有着固定 NA 和作为信号肽的双重功能；头部的顶端是 NA 酶活性的催化中心，作用是能水解细胞表面的特异性糖蛋白末端的 N-己酰基神经氨酸，避免病毒粒子的聚集，有利于新生病毒的释放，对病毒在感染细胞周围的扩散能力有很大影响。

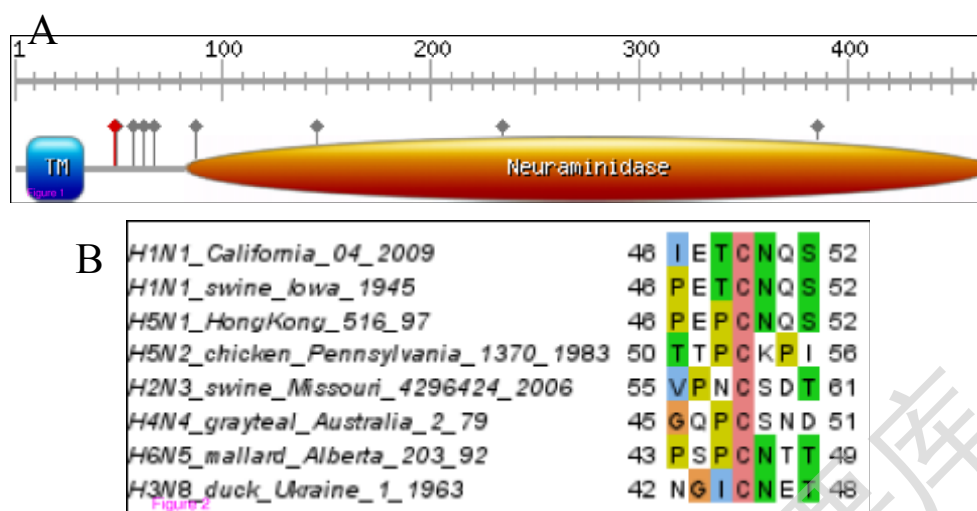


图 1-3 神经氨酸酶 (NA) 一级结构示意图

Fig.1-3 The schematic diagram of neuraminidase. (A) Besides the labelled domains (TM, transmembrane), grey lollipops indicate known and putative glycosylation sites and the red lollipop marks the conserved cysteine shown in B. **(B)** Representative alignment of the sequence environment of the conserved cysteine C49 that could either serve for intermolecular disulfide bridges or as palmitoylation site.

From: Sebastian Maurer-Stroh, et al. *Biology Direct* 2009; 4:18.

4. 病毒对理化因素的抵抗力

流感病毒抵抗力不强,可在加热、极端 PH 值、非等渗和干燥的条件下失活,一般加热 80℃, 2min 可以杀灭病毒。但对低温抵抗力较强,在 -20℃ 可保存几个月。阳光直射下 40~48h 即会失去活性。作为一种有囊膜的病毒,它对脂溶剂和去污剂较敏感,如福尔马林、β-丙内酯、氧化剂、稀盐酸、乙醚、去氧胆酸钠、甲醛、十二烷基硫酸钠等能迅速破坏其传染性。

在自然环境中,特别是在凉爽和潮湿的条件下可存活很长时间。当病毒随鼻腔分泌物和粪便排出时,因受这些有机物的保护大大增强其抗灭活能力。

二、甲型及 H5 亚型流感病毒的流行病学

1. 流感病毒的宿主范围不断扩大

流感病毒具有广泛的宿主范围,各亚型在不同的宿主中分布有所不同,存在宿主范围限制性 (Host Range Restriction)。流感病毒的宿主包括各种野生水禽、家禽、候鸟、海鸥、猪、马、狗、鲸鱼、海豹、人等。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库