



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101629959 B

(45) 授权公告日 2013. 11. 20

(21) 申请号 200910160634. 2

(22) 申请日 2009. 07. 17

(30) 优先权数据

2008-187368 2008. 07. 18 JP

(83) 生物保藏信息

NITE BP-601 2008. 06. 26

FERM BP-11119 2007. 07. 19

NITE BP-602 2008. 06. 26

(73) 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县神户市中央区脇浜海岸通
1 丁目 5 番 1 号

(72) 发明人 朝枝步 冲津直哉 隈元裕司

坂口晃司 长谷川武宏

(74) 专利代理机构 北京市安伦律师事务所

11339

代理人 刘良勇

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

(56) 对比文件

US 5866125 A, 1999. 02. 02, 第 24-36 栏.

Slinger Robert et al. Evaluation of the QuickLab RSV test, a new rapid lateral-flow immunoassay for detection of respiratory syncytial virus antigen. 《JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY》. 2004, 第 42 卷 (第 8 期), 3731-3733.

Becton, Dickinson and Company. Understanding RSV Testing. 《Technical Bulletin》. 2004, 第 1 卷 (第 1 期), 1-8.

审查员 范东升

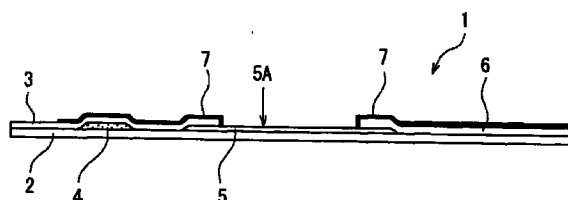
权利要求书1页 说明书21页 附图1页

(54) 发明名称

使用抗 RSV 单克隆抗体的 RSV 检测试剂盒、免疫层析试验用具和抗 RSV 单克隆抗体

(57) 摘要

本发明公开一种 RSV 检测用试剂盒以及免疫层析试验用具。至少包括：由杂交瘤 RSF2-412 培育的识别 RS 病毒 (RSV) F 蛋白的抗 RSV 单克隆抗体。同时，本发明还公开了一种抗 RSV 单克隆抗体，由从杂交瘤 RSF2-412、杂交瘤 RSF1-1565 和杂交瘤 RSF6-255 构成的群中选择的至少一种杂交瘤培育，识别 RS 病毒 F 蛋白质。



1. 一种检测 RSV 用试剂盒,包括:由保藏日为 2008 年 6 月 26 日、保藏号为 NITE BP-601 号的杂交瘤 RSF2-412 培育的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体、由保藏日为 2007 年 7 月 19 日、保藏号为 FERM BP-11119 的杂交瘤 RSF1-1565 培育出的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体、由保藏日为 2008 年 6 月 26 日、保藏号为 NITE BP-602 号的杂交瘤 RSF6-255 培育出的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体。

2. 权利要求 1 所述试剂盒,其特征在于:用于试剂盒的所述抗 RSV 单克隆抗体中至少一种用标记物标记。

3. 权利要求 2 所述试剂盒,其特征在于:被标记物标记的抗 RSV 单克隆抗体为由所述杂交瘤 RSF1-1565 培育出的抗 RSV 单克隆抗体。

4. 权利要求 1 所述试剂盒,其特征在于:抗 RSV 单克隆抗体中至少一种固定在固相上。

5. 权利要求 4 所述试剂盒,其特征在于:固定在固相上的抗 RSV 单克隆抗体是选自杂交瘤 RSF2-412 和杂交瘤 RSF6-255 培育的抗 RSV 单克隆抗体中的至少一种。

6. 一种 RSV 检测用免疫层析试验用具,包括,由保藏日为 2008 年 6 月 26 日、保藏号为 NITE BP-601 号的杂交瘤 RSF2-412 培育的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体、由保藏日为 2007 年 7 月 19 日、保藏号为 FERM BP-11119 的杂交瘤 RSF1-1565 培育出的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体、由保藏日为 2008 年 6 月 26 日、保藏号为 NITE BP-602 号的杂交瘤 RSF6-255 培育出的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体。

7. 权利要求 6 所述免疫层析试验用具,其特征在于:具有添加可能含 RSV 的试样的加样垫,固定抗 RSV 单克隆抗体的标记附着垫,有固定与标记附着垫所固定的抗体不同的抗 RSV 单克隆抗体的判断区的层析膜;

固定在标记附着垫的抗体被标记物标记。

8. 权利要求 7 所述免疫层析试验用具,其特征在于:被标记物标记的抗体是由杂交瘤 RSF1-1565 培育出的抗 RSV 单克隆抗体。

9. 权利要求 7 所述免疫层析试验用具,其特征在于:标记物为非溶性颗粒状物质。

10. 权利要求 9 所述免疫层析试验用具,其特征在于:非溶性颗粒状物质为显色合成高分子粒子或胶体金属粒子。

11. 权利要求 7 所述免疫层析试验用具,其特征在于:固定在判断区的抗 RSV 单克隆抗体是选自杂交瘤 RSF2-412 和杂交瘤 RSF6-255 培育的抗 RSV 单克隆抗体中的至少一种。

使用抗 RSV 单克隆抗体的 RSV 检测试剂盒、免疫层析试验用具和抗 RSV 单克隆抗体

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种使用抗呼吸道合胞病毒单克隆抗体、可对呼吸道合胞病毒进行高灵敏检测的呼吸道合胞病毒检测试剂盒及免疫层析试验用具。本发明还涉及一种可用于制作该试剂盒或该用具的抗呼吸道合胞病毒单克隆抗体。

背景技术：

[0002] 呼吸道合胞病毒（以下简称“RSV”或“RS 病毒”）是引起小儿呼吸道感染的主要病原。通常感染 RSV 时，引起类似感冒的轻微症状。但是，当免疫力低下的婴幼儿和老年人感染 RS 病毒时，可引起毛细支气管炎，发生呼吸困难，甚至有死亡的病例。因此，人们希望能快速简便地检测该病毒感染。

[0003] RSV 主要根据血清学上的不同，分为 A 型和 B 型两个亚型。A 型 RSV 已知 Long 株、A2 株等。B 型 RSV 已知 9320 株、B1 野生型株等。

[0004] RSV 包膜中有糖蛋白质的 G 蛋白质和与细胞融合相关的 F 蛋白质。G 蛋白质已知在 RSV 亚型（A 型、B 型）间氨基酸序列有很大差异。另一方面，F 蛋白质已知在 RSV 亚型（A 型、B 型）间氨基酸序列差异很小。

[0005] 识别 RSV 的抗 RSV 单克隆抗体已知有几个。特许公开 2001-510329 号公报公开了与 RS 病毒的 F 蛋白质结合、有中和活性的变异单克隆抗体。特许公开 2005-522996 号公报公开了一种人 RSV 抗体。特许公开平 11-507640 号公报也公开了与 RS 病毒的 F 蛋白结合的人单抗。

[0006] 各种克隆获得的与 RS 病毒的 F 蛋白质结合的抗 RSV 单克隆抗体都可以在市面上买到。

[0007] 另外，基于利用诸如 BD RSV examen (BD 公司)、Check RSV (Alfresa Pharma 公司 [爱芙乐赛制药株式会社])、BinaxNOW (荣研化学)、免疫卡 (TFB 公司)、pocxten S RSV (希森美康公司) 等抗 RSV 单抗的免疫层析技术检测 RSV 用的试剂盒市场上也有销售。

[0008] 然而，用这些传统的 RSV 检测用试剂盒检测 RSV 时，灵敏度不够，有时全阳性样本的 30 ~ 40% 会被诊断为阴性。

发明内容：

[0009] 本发明的范围只由后附权利要求书所规定，在任何程度上都不受这一节发明内容的陈述所限。

[0010] 本发明提供一种检测 RSV 用试剂盒，其包括：由杂交瘤 RSF2-412 培育出的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体。

[0011] 所述试剂盒，还包括由杂交瘤 RSF1-1565 和杂交瘤 RSF6-255 培育出的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体中的至少其中一种。

[0012] 所述试剂盒用于试剂盒的所述抗 RSV 单克隆抗体中至少一种用标记物标记。

[0013] 被标记物标记的抗 RSV 单克隆抗体为由杂交瘤 RSF1-1565 培育出的抗 RSV 单克隆抗体。

[0014] 所述试剂盒其中抗 RSV 单克隆抗体的至少一种固定在固相上。

[0015] 固定在固相上的抗 RSV 单克隆抗体是选自杂交瘤 RSF2-412 和杂交瘤 RSF6-255 培育的抗 RSV 单克隆抗体中的至少一种。

[0016] 本发明还提供一种 RSV 检测用免疫层析试验用具,至少包括由杂交瘤 RSF2-412 培育的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体。

[0017] 所述免疫层析试验用具,还包括由杂交瘤 RSF1-1565 和杂交瘤 RSF6-255 培育出的识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗 RSV 单克隆抗体中的至少一种。

[0018] 所述免疫层析试验用具,具有添加可能含 RSV 的试样的加样垫、固定抗 RSV 单克隆抗体的标记附着垫、有固定与标记附着垫所固定的抗体不同的抗 RSV 单克隆抗体的判断区的层析膜,固定在标记物吸附垫的抗体被标记物标记。

[0019] 所述被标记物标记的抗体是由杂交瘤 RSF1-1565 培育出的抗 RSV 单克隆抗体。

[0020] 所述标记物为非溶性颗粒状物质。

[0021] 所述非溶性颗粒状物质为显色合成高分子粒子或胶体金属粒子。

[0022] 所述免疫层析试验用具,固定在判断区的抗 RSV 单克隆抗体是选自由杂交瘤 RSF2-412 和杂交瘤 RSF6-255 培育的抗 RSV 单克隆抗体中的至少一种。

[0023] 本发明另提供一种抗 RSV 单克隆抗体,由从杂交瘤 RSF2-412、杂交瘤 RSF1-1565 和杂交瘤 RSF6-255 构成的群中选择的至少一种杂交瘤培育,识别 RS 病毒 F 蛋白。

附图说明：

[0024] 图 1 为本发明的免疫层析试验用具的某种实施方式的例示图。

具体实施方式：

[0025] 下面参照附图就本发明的具体实施方式进行说明。

[0026] (杂交瘤和抗 RSV 单克隆抗体)

[0027] 本发明的用于 RSV 检测用试剂盒和免疫层析试验用具的抗 RSV 单克隆抗体由杂交瘤 RSF2-412(以下称为“杂交瘤 412”)培育而成。下面把这一抗体称为“412 抗体”。

[0028] 本发明的抗体可以从其本身用众所周知的方法培养的杂交瘤获得。即用与所希望相符的辅药混合的 RSV 抗原、最好是用 RS 病毒 F 蛋白质免疫适当的哺乳动物(比如小鼠、大鼠等)。使该动物的脾细胞、淋巴细胞、B 淋巴细胞等抗体产生细胞与来源于适当的哺乳动物(比如小鼠、大鼠等)的骨髓瘤细胞融合,即可获得杂交瘤。通常,抗体产生细胞和骨髓瘤细胞来源于同种动物。

[0029] 细胞融合可以通过在适当的培养基中在聚乙二醇等参与下使抗体产生细胞和骨髓瘤细胞融合的 PEG 法等进行。细胞融合后,用 HAT 培养基等选择性培养基选择杂交瘤,关于杂交瘤产生识别 RS 病毒 F 蛋白质的抗体的能力,按常法(比如酶免疫检测法(EIA))进行筛选。然后,按常法(如有限稀释法)克隆产生适当抗体的杂交瘤,选择产生单克隆抗体的杂交瘤。

[0030] 在本发明中,如以下实施例所示,用 RS 病毒 F 蛋白质免疫小鼠获得的小鼠脾细胞

和小鼠骨髓瘤细胞融合,获得杂交瘤 412。杂交瘤 412 于 2008 年 6 月 26 日寄存于国家技术评估研究所专利微生物寄存中心(日本国千叶县木更津市上总镰足 2-5-8),2009 年移交国际保藏(保藏日 2008 年 6 月 26 日,保藏号 NITE BP-601 号)。

[0031] 在本发明中,用与上述同样的方法获得 RSF1-1565(以下称“杂交瘤 1565”)和杂交瘤 RSF6-255(以下称“杂交瘤 255”)。杂交瘤 1565 于 2007 年 7 月 19 日寄存于独立行政法人产业技术研究所特许生物寄存中心(日本国茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6),2009 年移交国际保藏(保藏日 2007 年 7 月 19 日,保藏号 FERM BP-11119)。杂交瘤 255 于 2008 年 6 月 26 日寄存于国家技术评估研究所专利微生物寄存中心(日本国千叶县木更津市上总镰足 2-5-8),2009 年移交国际保藏(保藏日 2008 年 6 月 26 日,保藏号 NITE BP-602 号)。由杂交瘤 1565 和杂交瘤 255 产生的抗 RSV 单克隆抗体以下分别称为 1565 抗体和 255 抗体。

[0032] 上述杂交瘤 412、1565 和 255 的具体获得办法在后述实施例中明示。

[0033] 上述各杂交瘤产生的 412 抗体、1565 抗体和 255 抗体可与 RS 病毒 F 蛋白质结合。RSV Long 株的 F 蛋白质的氨基酸序列众所周知,表示为序列号 1。

[0034] 如后述实施例所示,这三种抗体识别 RS 病毒 F 蛋白各个不同的表位。

[0035] 在本说明书中,“抗体”包含抗体、具有与该抗体同等 RS 病毒 F 蛋白质结合特性的抗体片段及其重构抗体。作为该抗体片段有 Fab 片段、F(ab')₂ 片段、Fab' 片段、sFv 片段等。

[0036] (RSV 检测用试剂盒)

[0037] 本发明的 RSV 检测用试剂盒至少包含由杂交瘤 412 产生的 412 抗体。

[0038] 在本说明书中,所谓“RSV 检测用试剂盒”指包括数个组分、通过这些组分组合使用能够检测出 RSV 的组分集合。本发明的 RSV 检测用试剂盒由包括上述 412 抗体在内的第一组分和其他组分构成。这些组分可以是含或不含抗体的溶液、含或不含抗体的固体载体及其组合等。

[0039] 本发明的试剂盒最好还包含识别与上述 412 抗体识别的 RS 病毒 F 蛋白质的表位不同表位的抗 RSV 抗体(以下称“其他抗体”)。该其他抗体可以是一种或几种,但最好是二种。本发明的试剂盒最好包含 412 抗体及其他二种抗 RSV 抗体,共三种抗体,以此与过去的 RSV 检测试剂盒相比,可以提高 RSV 检测灵敏度。

[0040] 上述其他抗体识别的表位是否与 412 抗体识别的表位相同可以用众所周知的方法检测。作为众所周知的方法有竞争抑制法。所谓竞争抑制法就是探讨目标抗体对任意抗体和抗原结合的竞争抑制能力,是一种研究各抗体结合的表位是否相同的方法。更具体地说,就是在后述实施例 3 所示条件下进行的方法。上述任意抗体只要不是目标抗体,无特别限定。

[0041] 比如,在上述竞争抑制法中,当某种抗 RSV 抗体无法抑制 412 抗体可以抑制的任意抗体与 RSV 抗原的结合时,该抗 RSV 抗体就是上述“其他抗体”。当某种抗 RSV 抗体能够抑制 412 抗体不能抑制的任意抗体与 RSV 抗原的结合时,该抗 RSV 抗体也是上述“其他抗体”。

[0042] 在上述竞争抑制法中,“能抑制”意思是对上述任意抗体和 RSV 抗原的结合抑制 30%以上、理想的是 50%以上、更好的是 90%以上。

[0043] 在上述竞争抑制法中,“不能抑制”意思是对上述任意抗体和 RSV 抗原的结合只能

抑制不到 30%、更好的是不到 10%、最好是 0%。

[0044] 412 抗体以外的本发明试剂盒中所含上述其他抗体最好是不与有序列号 2 所示氨基酸序列的蛋白质结合的抗 RSV 单克隆抗体。序列号 2 的氨基酸序列是 RS 病毒的 F 蛋白质的氨基酸序列（序列号 1）的第 421 赖氨酸残基变异为苏氨酸残基的氨基酸序列。不与有序列号 2 氨基酸序列的蛋白质结合的抗 RSV 单克隆抗体比如有 1565 抗体等（参照实施例 5）。

[0045] 作为其他理想的其他抗体如有 255 抗体。特别是作为其他抗体最好是 1565 抗体和 255 抗体都含有的试剂盒。

[0046] 本发明的试剂盒只要包括有 412 抗体、包括可进行用抗原抗体反应检出抗原的免疫检测的这些组成要素，没有其他特别限定。这种组成要素是该行业人员都知道的。

[0047] 作为免疫检测法可采用免疫沉降、标记免疫检测等方法。作为标记免疫检测法如有免疫层析法、酶免疫试验（EIA）、放射免疫测定（RIA）、荧光免疫测定（FIA）、化学发光免疫测定等。

[0048] （标记抗体）

[0049] 作为本发明的试剂盒最好是标记免疫检测试剂盒。在这种试剂盒中，所用的抗 RSV 单克隆抗体至少有一种被标记物标记。作为被标记物标记的抗体最好是不与有序列号 2 所示氨基酸序列的蛋白质结合的抗 RSV 单克隆抗体，尤以 1565 抗体为宜。

[0050] 上述标记物只要是在通常的免疫检测中可用的标记物即可，无特别限定。比如可以是酶、荧光物质、放射性同位素、非溶性粒状物等。

[0051] 作为酶如有碱性磷酸酶、过氧化物酶、葡萄糖氧化酶、酪氨酸酶、酸性磷酸酶等。

[0052] 作为荧光物质如有异硫氰酸荧光素（FITC）、绿色荧光蛋白质（GFP）、萤光素等。

[0053] 作为放射性同位素如有 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P 等。

[0054] 作为上述非溶性粒状物质，可以使用如寒天、琼脂糖、架桥琼脂糖、架桥海藻酸、架桥瓜尔胶、硝酸纤维素和羧基纤维素等纤维素酯类、凝胶、架桥凝胶、乳胶、橡胶、聚酯、聚乙烯、聚丙烯、苯乙烯-丁二烯共聚物、聚氯乙烯树脂、聚醋酸乙烯酯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、苯乙烯-甲基丙烯酸酯共聚物、聚甲基丙烯酸环氧丙酯、丙烯醛-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物等天然或合成树脂及其衍生物。还可以使用用色素分子、荧光分子或磁粒子等标记由玻璃（比如活性化玻璃）、硅胶、高岭土、云母、硅铝、氧化铝、硫酸钡等无机材料构成的粒子所得标记粒子作为非溶性粒状物质。也可以将金胶体等金属胶体粒子及红细胞等作为非溶性粒状物质使用。作为非溶性粒状物质，尤以用色素分子标记上述合成高分子而成的显色合成高分子粒子和金属胶体粒子为宜。

[0055] （固定在固相上的抗体）

[0056] 作为上述标记免疫检测最好采取利用抗体结合到固相上的固相法。

[0057] 在固相法中，所用抗 RSV 单克隆抗体至少一种固定在固相上。

[0058] 固定在固相上的抗体应至少一种是选自 412 抗体和 255 抗体。最好这两种抗体都固定在固相上。

[0059] 作为固相法所用固相，如有微量滴定板、薄膜、粒子等。

[0060] 作为固相的材料可以使用胶乳、橡胶、聚乙烯、聚丙烯、苯乙烯树脂、苯乙烯-丁二烯共聚物、聚氯乙烯、聚醋酸乙烯酯、聚丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸酯、苯乙烯-甲基丙烯酸

酯共聚物、聚甲基丙烯酸环氧丙酯、丙烯醛-乙二醇二甲基丙烯酸酯共聚物、聚偏氟乙烯(PVDF)、纤维素类(硝酸纤维素、醋酸纤维素等)、尼龙(如也可以羧基和烷基作为置换基的导入了氨基的修饰尼龙)等聚合物材料;琼脂糖;明胶;红细胞;硅胶、玻璃、无活性矾土、磁体等无机材料等。固相也可以将其中的一种或二种以上材料组合起来使用。

[0061] (试样)

[0062] 用本发明的 RSV 检测用试剂盒进行试验的试样包括从 RSV 疑似患者采集的生物试样、和对该生物试样进行前期处理所得的试样。作为生物试样,如有血液、血清、粪便、尿液、唾液、鼻腔抽取液、拭液、汗液、泪液等。作为上述前期处理比如有将生物试样溶解到适当的前期处理试剂中,用过滤器过滤溶解所得溶液等。

[0063] (试剂盒的组成要素)

[0064] 当上述固相为微量滴定板时,本发明的试剂盒包含微量滴定板和至少含有上述 412 抗体的溶液。或者也可以将含有固定有 412 抗体的微量滴定板的试剂盒作为本发明的试剂盒。

[0065] 当上述固相是薄膜时,本发明的试剂盒包含薄膜和至少含有上述 412 抗体的溶液。或者也可以将含有固定有或吸附有 412 抗体的薄膜的试剂盒作为本发明的试剂盒。

[0066] 当上述固相是粒子时,本发明的试剂盒包含粒子和至少含有上述 412 抗体的溶液。或者也可以将含有固定有 412 抗体的粒子的试剂盒作为本发明的试剂盒。

[0067] 作为本发明的试剂盒,最好是免疫层析用试剂盒。即上述试剂盒包含固定或吸附有 412 抗体的免疫层析试验用具。

[0068] 在本说明书中,所谓“吸附”抗体意指固相上的抗体可移动。

[0069] (免疫层析试验用具)

[0070] 本发明还提供一种固定或附着有 412 抗体的免疫层析试验用具。

[0071] 上述免疫层析试验用具最好具备添加可能含有 RSV 的试样的加样垫、吸附抗 RSV 单克隆抗体的标记附着垫和层析用膜载体(以下称“层析膜”)。

[0072] 在上述免疫层析试验用具,最好加样垫和标记附着垫接触。

[0073] 加样垫和层析膜最好接触。加样垫最好在层析膜的试样展开方向上游与层析膜接触。

[0074] 标记附着垫最好配置在层析膜的试样展开方向上游。标记附着垫可以与层析膜接触,也可以不接触。

[0075] 在本说明书,所谓“试样展开方向上游”和“试样展开方向下游”指对于免疫层析试验用具的长边方向,当将加样一侧当作上游,试样展开(流动)方向作为下游时的相对方向。

[0076] (试验用具的抗体)

[0077] 在上述免疫层析试验用具中,吸附在标记附着垫的抗体最好用上述标记物标记。作为该标记物要能够用肉眼便捷地观察到颜色变化,因此最好是非溶性粒状物,尤以显色合成高分子粒子或金属胶体粒子为宜。

[0078] 在上述免疫层析试验用具,用标记物标记的抗体以不与有序列号 2 所示氨基酸序列的蛋白质结合的抗 RSV 单克隆抗体为宜,最好是 1565 抗体。

[0079] 固定在上述判断区的抗 RSV 单克隆抗体应至少有一种选自 412 抗体和 255 抗体,

最好是这二种抗体。

[0080] (加样垫)

[0081] 上述加样垫可以是棉花、玻璃纤维、多孔聚乙烯、多孔聚丙烯等多孔合成树脂和纤维素纤维等材质。加样垫可以是这些材料构成的布、无纺布、滤纸、条或膜。

[0082] (标记附着垫)

[0083] 上述标记附着垫可以是玻璃纤维、纤维素纤维、塑料(如聚酯、聚丙烯、聚乙烯等)纤维等材质的东西。

[0084] 上述标记附着垫最好还附着用于确认试样是否适当展开的质控用标记物。质控用标记物最好对试样中的成份实际上没有反应。该质控用标记物可以与下述能与质控用标记物结合的物质成对使用。即,质控用标记物和能结合到质控用标记物的物质是二个能特异性结合的物质组合,其中,以哪个为质控用标记物均可。作为这种能特异性结合的二个物质的组合可以列举出半抗原和能与之结合的蛋白质,如生物素与链霉亲和素或亲和素、2,4-二硝基酚或异羟洋地黄毒苷与蛋白质(如清蛋白、酪蛋白、纤维蛋白原等)等。这些质控用标记物的组合最好使用试样中没有的组合。

[0085] 作为上述质控用标记物的标记可以使用与上述标记物同样的标记。质控用标记物可用与抗体相同的标记成份标记,也可以不同标记成份标记。

[0086] (层析膜)

[0087] 上述层析膜可以是靠静电作用和疏水相互作用等物理作用能与蛋白质结合且能通过毛细管现象展开试样的材质。作为层析膜,可以列举出硝化纤维、尼龙(如也可以羧基和烷基作为置换基的导入了氨基的修饰尼龙)、聚偏氟乙烯(PVDF)、醋酸纤维素等。

[0088] 上述层析膜最好有固定了可与质控用标记物结合的物质质的质控区,用于确认试样是否适当展开。

[0089] 可与上述质控用标记物结合的物质如以上关于质控用标记物的叙述。

[0090] (其他部件)

[0091] 上述免疫层析试验用具还可以有吸收垫。吸收垫可以用纤维素、玻璃纤维、聚乙烯、聚丙烯等多孔塑料等材质的织物、无纺布等。该吸收垫最好配置在比层析膜靠近试样展开方向下游的位置,并与层析膜接触。在这种位置上配置吸收垫可以加快试样的展开速度。

[0092] 上述免疫层析试验用具为了将上述加样垫、标记附着垫和层析膜以及吸收垫任意地组装在一起,最好有衬底。衬底只要可以作为普通免疫层析试验用具的衬底使用即可,无特别限定。作为衬底比如可以使用塑料、纸张、玻璃等。该衬底为了组装上述各部件,最好表面具有粘性。

[0093] (试验用具的制作方法)

[0094] 本发明的免疫层析试验用具可以与众所周知的免疫层析试验用具一样的方法制作。即通过将标记附着垫浸泡在含有抗体、最好是标记抗体的适当缓冲液中,再干燥,即可制作出标记附着垫。或者在标记附着垫中添加该缓冲液,再干燥,也可制作出标记附着垫。层析膜为了使该抗体固定在判断区,可通过在判断区添加适当抗体并干燥来制作。这些标记附着垫和层析膜与加样垫适当组合裁剪,即可获得上述免疫层析试验用具。

[0095] (试验用具的优选实施方式)

[0096] 图1为本发明的一个实施方式所涉及的免疫层析试验用具的截面图。此免疫层析

试验用具 1 在由表面有粘附层的塑料板构成的衬底 2 上有由棉质无纺布构成的加样垫 3、由玻璃纤维无纺布构成的标记附着垫 4、由硝化纤维等多孔物质构成的层析膜 5 和由纤维无纺布构成的吸收垫 6。

[0097] 衬底 2 为适当地配置加样垫 3 和标记附着垫 4 等上述部件而设。衬底 2 可以为纸或玻璃等材质。

[0098] 加样垫 3 上添加试样。试样只要可能含有 RSV, 没有特别限定。作为试样尤以鼻腔提取液、鼻腔擦拭液或咽喉擦拭液为佳。试样也可以用缓冲液等适当溶剂稀释后添加。

[0099] 在本实施方式中, 标记附着垫 4 与加样垫 3 接触配置, 吸附有被标记物标记的第一抗体 (1565 抗体)。

[0100] 在本实施方式中, 层析膜 5 不直接与标记附着垫 4 接触。层析膜 5 有固定了与待测物发生抗原抗体反应的第二抗体的判断区 5A。第二抗体只要是与上述第一抗体不同的抗体即可。在本实施方式中, 使用 412 抗体和 255 抗体作为第二抗体。如果标记附着垫或判断区的某一个含有 412 抗体的话, 也可以在本发明的抗 RSV 单克隆抗体以外组合其他抗 RSV 单克隆抗体使用。

[0101] 吸收垫 6 与层析膜 5 接触配置, 用于吸收过剩试样。吸收垫 6 只要能迅速吸收并保持液体即可。而且, 加样垫 3 的一部分和吸收垫 6 的表面可以如图 1 所示用透明条 7 覆盖。

[0102] 本发明的免疫层析试验用具 1 比如可如下制作。

[0103] (1) 将层析膜 5 贴在衬底 2 的中部。

[0104] (2) 在衬底 2 的上游一侧、层析膜 5 的试样展开开始处 (即图 1 的左侧, 以下称为“上游侧”) 与层析膜 5 末端不接触、间隔地粘贴标记附着垫 4。

[0105] (3) 将加样垫 3 上游部分贴在衬底 2 的最上游部分。

[0106] (4) 将加样垫 3 的试样展开结尾处 (即图 1 的右侧, 以下称“下游侧”) 部分放在标记附着垫 4 和层析膜 5 的上游侧上面。

[0107] (5) 在标记附着垫 4 和层析膜 5 之间的衬底 2 贴上加样垫 3。

[0108] (6) 将吸收垫 6 的上游侧部分放在层析膜 5 的下游侧上面。

[0109] (7) 将吸收垫 6 的下游侧部分贴在衬底 2 的最下游侧处。

[0110] (8) 用透明条 7 覆盖加样垫 3 下游侧部分和吸收垫 6 的表面。

[0111] 试样根据需要进行适当的溶剂混合, 制成可层析展开的混合液。再将上述免疫层析试验用具 1 的上游 (加样垫 3) 浸入该混合液, 或将该混合液添加到加样垫。这样, 该混合液通过加样垫 3 在标记附着垫 4 与标记的第一抗体混合。如果上述混合液中存在 RSV 抗原, 则在抗原抗体反应的作用下, RSV 抗原与第一抗体结合, 形成复合物。此复合物在层析膜 5 中移动, 到达判断区 5A。复合物与固定在判断区 5A 的第二抗体发生抗原抗体反应, 被判断区 5A 捕捉。此时, 如果作为标记物使用的是蓝色乳胶粒子等显色合成高分子粒子的话, 判断区 5A 会因该粒子的聚集显现为蓝色。这样就可以马上目测确认 RSV 的存在。

[0112] 层析膜 5 也可以不止有一个, 而是有二个以上判断区。层析膜 5 也可以有质控区。当有质控区时, 只要在标记附着垫 4 上可移动地附着用标记物比如红色乳胶粒子标记的亲合素, 在层析膜 5 的质控区固定与亲合素特异性结合的生物素即可。

[0113] 使用本发明的 RSV 检测用试剂盒和免疫层析试验用具, 比传统的 RSV 检测方法更

能提高 RSV 检测灵敏度。因此,能够更准确、便捷地检测出 RSV,得以为更准确地诊断 RSV 感染提供指标。

[0114] 实施例

[0115] 下面通过以下实施例更详细地说明本发明,但本发明不限于这些实施例。

[0116] [实施例 1]

[0117] 杂交瘤的制备

[0118] (小鼠免疫)

[0119] 在市场销售的 Capricon 公司制的含有 RSV 抗原的磷酸缓冲液 (PBS) 100 μ L 中加入 100 μ l 福氏完全佐剂 (FCA) 混合、乳化,制作 FCA RSV 抗原溶液 200 μ l。再以上述同样的方法不使用 FCA,而使用福氏不完全佐剂 (FIA) 制作 200 μ l 的 FIA RSV 抗原溶液。

[0120] 用 200 μ l 的 FCA RSV 抗原溶液向 7 ~ 8 周龄的 BALB/C 雌鼠进行腹腔内注射,进行首次免疫。首次免疫后,隔 2 ~ 3 周用 FIA RSV 抗原溶液 200 μ l 进行追加免疫。在分离脾细胞 10 天前和 3 天前静脉注射 200 μ l RSV 抗原 (Capricon 公司制)。最后一次注射结束三天后,分离脾细胞,用 PEG 法融合脾细胞和 P3 X63-Ag8 • 653 鼠骨髓瘤细胞,制备杂交瘤。

[0121] (杂交瘤培养)

[0122] 将杂交瘤悬浮于 HAT 培养基,浓度至 2.5×10^6 细胞 /ml,向 96 孔微孔板 (Corning 康宁公司制;以下称培养板) 各孔分装 2.5×10^5 细胞 / 孔。培养板在 37℃、8% CO₂ 的恒温槽内静置,开始杂交瘤的培养。培养十天以上,出现杂交瘤集落时筛选产生单克隆抗体的杂交瘤。

[0123] (杂交瘤筛选)

[0124] 在含有 0.1w/v% NaN₃ 的 0.1M 磷酸缓冲液 (PBS pH7.5) 中添加 RSV 抗原,直至 RSV 抗原 (Capricon 公司制) 浓度为 0.5 μ g/ml,调制固定用 RSV 抗原溶液。将此固定用 RSV 抗原溶液 100 μ l 分装到免疫模块 (NUNC 公司制) 各孔 (以下称抗原固定板)。抗原固定板 4℃ 过夜后,在浓度为 0.05% 时用含有 Tween20 的 PBS 缓冲液 (以下称缓冲液 A) 洗涤三次。洗涤后,在浓度为 1w/v% 时将含 BSA 的 PBS 缓冲液 (以下称缓冲液 B) 300 μ l 分装到抗原固定板各孔,2 ~ 8℃ 静置存放 4 小时以上。抗原固定板在使用前一直在 2 ~ 8℃ 保存。

[0125] 除去抗原固定板中的缓冲液 B。除去后,向抗原固定板各孔分别分装 75 μ l 缓冲液 B。再将上述杂交瘤培养上清从培养板各孔取出,并向抗原固定板各孔分别添加 25 μ l。添加缓冲液 B 和培养上清后,室温搅拌一小时。搅拌后用缓冲液 A 洗涤抗原固定板各孔三次。洗涤后,向抗原固定板各孔分别添加用缓冲液 B 稀释了 10000 倍的辣根过氧化物酶 (POD) 标记抗小鼠 Ig 多克隆抗体 (DAKO 公司制;编号 No. P0447) 各 100 μ l,室温反应 30 分钟。反应后,用缓冲液 A 洗涤抗原固定板各孔三次。洗涤后,每孔各加 100 μ l 含 POD 的底物即邻苯二胺 (OPD) 的底物液,室温中静置 10 分钟。再加含 2H H₂SO₄ 的反应终止液于抗原固定板各孔,每孔 100 μ l。对于各孔中的反应液,用酶标仪 (分子仪器公司制) 测定 492nm 处的吸光度。

[0126] 所得三个杂交瘤 RSF1-1565、RSF2-412、RSF6-255 委托国际保藏 (保藏号 FERM BP-11119 号、保藏号 NIT E 601 号、和保藏号 NIT E 602 号)。

[0127] [实施例 2]

[0128] 抗 RS 病毒 -F 蛋白质单克隆抗体的反应性的确认

[0129] (1565 抗体、412 抗体和 255 抗体的反应性的确认)

[0130] RS 病毒 -F 抗原使用的是 Long 株 (10^{6.7}TCID₅₀/ml)、A2 株 (10^{5.5}TCID₅₀/ml)、9320 株 (10^{5.5}TCID₅₀/ml) 和 B1 野生型 (wild-type) (BWV) 株 (10^{4.5}TCID₅₀/ml) 的 RSV。这些 RSV4 株可从美国标准生物制品收藏中心 (ATCC) 购得。用含牛血清白蛋白 (BSA) 的磷酸缓冲液 (以下称为第一缓冲液) 将上述 RSV 稀释到 1/10。

[0131] 已稀释的各抗原液和样本萃取液 (100mM 柠檬酸 -0.4M NaCl、10mM 二硫苏糖醇、0.1(v/v)% 聚氧乙烯辛基苯基醚 (Polyoxyethylene octyl phenyl ether)) 等量混合, 萃取处理 5 分钟, 制备各种抗原萃取液。

[0132] 制备含市面上出售的抗鼠抗体 IgG 与琼脂糖凝胶珠 (安玛西亚生物科学 (Amersham Biosciences) 公司制) 结合而成的珠体浓度为 15v/v% 的琼脂糖凝胶溶液。

[0133] 混合琼脂糖凝胶溶液、上述各抗原萃取液和第一缓冲液, 制备各种抗原试样。各抗原试样中的琼脂糖凝胶溶液和各抗原萃取液的混合量例示如表 1。

[0134] [表 1]

[0135]

	琼脂糖凝胶溶液	抗原提取液	第 1 缓冲液
Long 株抗原试样	1ml	0.2ml	0.8ml
A2 株抗原试样	1ml	0.1ml	0.9ml
9320 株抗原试样	1ml	0.05ml	0.95ml
BWV 株抗原试样	1ml	0.2ml	0.8ml

[0136] 抗原试样加入 96 孔 V 底板 (三博特 (sanplatec) 公司制) 各孔, 每孔 60 μ L。再将 1565 抗体、412 抗体和 255 抗体分别用第一缓冲液稀释到 1 μ g/ml, 制备 1565 抗体液、412 抗体液和 255 抗体液。将制备的各抗体液分别加入各孔, 每孔 30 μ L。然后, 室温搅拌 96 孔 V 底板 60 分钟。搅拌后, 96 孔 V 底板静置 10 分钟。

[0137] 在免疫模块 (能肯 (NUNC) 公司制) 各孔分别加入 100 μ L 的用 0.1M 磷酸钠缓冲液稀释到浓度 10 μ g/ml 的 133-1H 抗体 (CHEMICON 公司制; 抗 RSV 的抗体) 溶液。再用含 (Tween20) 吐温 20 的磷酸缓冲液 (以下称第二缓冲液) 洗涤三次各孔。洗涤后, 在各孔分别注入 300 μ L 第一缓冲液封闭 (称此免疫模块为 133-1H 抗体致敏板)。

[0138] 清除 133-1H 抗体致敏板中的第一缓冲液。清除后, 在 133-1H 抗体致敏板各孔添加上述静置 10 分钟的 96 孔 V 底板各孔的上清 50 μ L。133-1H 抗体致敏板室温中搅拌 30 分钟后, 用第二缓冲液洗涤三遍 133-1H 抗体致敏板。

[0139] 在洗净后的 133-1H 抗体致敏板各孔添加 100 μ L 含生物素标记的 B016 抗体 (Serotec 公司制; 最终浓度 2 μ g/ml) 和用链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶 (POD; 最终浓度 50mU/ml) 的第一缓冲液。室温中搅拌 133-1H 抗体致敏板 60 分钟。然后, 用第二缓冲液洗涤 133-1H 抗体致敏板三遍。

[0140] 将含 POD 的底物即邻苯二胺 (OPD) 的底物液分别添加至 133-1H 抗体致敏板各孔

各 100 μ l, 室温中静置 10 分钟。再在 133-1H 抗体致敏板各孔各添加 100 μ l 含 2N H_2SO_4 的反应终止液, 用酶标仪 (美国分子仪器 (Molecular Devices) 公司制) 测定各孔中反应液在 492nm 处的吸光度 (吸光度 A)。

[0141] 作为质控试验, 将抗体液换为第一缓冲液制备质控试样, 进行同样的试验, 测定吸光度 (吸光度 B)。作为质控试验, 还用第一缓冲液代替抗体液和抗原试样, 制备质控试样, 进行同样的试验, 测定吸光度 (吸光度 C)。

[0142] 用所得吸光度 A ~ C 以下述 (1) 式求使用各来源于杂交瘤的抗 RS 病毒 -F 蛋白单克隆抗体的测定试样的吸收率。

[0143] 吸收率 (%) = $[1 - (A - C) / (B - C)] \times 100$ (1)

[0144] 各抗 RSV-F 蛋白单克隆抗体的反应性评价结果如表 2 所示。在表 2 中, “+++” 表示 (1) 式所求吸收率为 90% 以上, “++” 表示 50% 以上, “+” 表示 30% 以上, “-” 表示不到 30%。

[0145] [表 2]

[0146]

单克隆抗体... 克隆抗体名	使用RSV株			
	Long株	A2株	9320株	B1 wild-type株
RSF1-1565	+++	+++	+++	+++
RSF2-412	++	++	+	++
RSF6-255	+++	+++	+++	+++

[0147] 从表 2 的结果明显看出, 1565 抗体、412 抗体和 255 抗体对 Long 株、A2 株、9320 株及 BWV 株的任何一种抗原均显示反应性。

[0148] [实施例 3]

[0149] 抗 RS 病毒 -F 蛋白单克隆抗体的抗原识别部位的确认

[0150] (对 B016 抗体的抑制试验)

[0151] A2 株 (10^{5.5} TCID₅₀/ml) 用第一缓冲液稀释到 1/10。等量混合稀释的抗原液和样本萃取液, 进行 5 分钟的萃取处理, 制备 A2 株抗原萃取液。再将 A2 株抗原萃取液用第一缓冲液稀释到 1/20, 制备抗原试样。

[0152] 用 0.1M 磷酸钠缓冲液稀释到浓度 10 μ g/mL 的 133-1H 抗体 (DHEMICON 公司) 溶液在免疫模块 (NUNC 公司制) 各孔分别加入 100 μ L。用第二缓冲液洗涤各孔三次。洗涤后各孔各加 300 μ L 第一缓冲液封闭 (以下称此免疫模块为 133-1H 抗体致敏板)。

[0153] 除去 133-1H 抗体致敏板中的第一缓冲液。除去后在 133-1H 抗体致敏板各孔中加 100 μ L 抗原试样, 搅拌 30 分钟。再用第二缓冲液洗涤抗体致敏板各孔三遍。

[0154] 1565 抗体、412 抗体和 255 抗体分别用第一缓冲液稀释为 10 μ g/ml, 制备 1565 抗体液、412 抗体液和 255 抗体液。将制备的各抗体液各加 50 μ L 于 133-1H 抗体致敏板各孔中。再在 133-1H 抗体致敏板各孔中加入 50 μ L 含生物素标记的 B016 抗体 (UK Serotec 公司制; 最终浓度 2 μ g/ml; 针对 RSV 的抗体) 和链霉亲和素标记的 POD (最终浓度 40mU/ml) 的第一缓冲液, 之后, 室温中搅拌 133-1H 抗体致敏板 60 分钟, 再用第二缓冲液洗涤 133-1H 抗体致敏板三遍。

[0155] 在 133-1H 抗体致敏板各孔中分别加入 100 μ L 含 OPD 的底物液, 室温中静置 10 分

钟。再在 133-1H 抗体致敏板各孔中各加 100 μ L 含 2N H_2SO_4 的反应终止液,对各孔中的反应液用酶标仪测定在 492nm 处的吸光度(吸光度 A)。

[0156] 作为质控试验,将抗体液换为第一缓冲液制备质控试样,进行同样的试验,测定吸光度(吸光度 B)。作为质控试验,还用第一缓冲液代替抗体液和抗原试样,制备质控试样,进行同样的试验,测定吸光度(吸光度 C)。

[0157] 用所得吸光度 A ~ C 以下述 (2) 式求出使用各来源于杂交瘤的抗 RS 病毒 -F 蛋白质单克隆抗体的测定试样的抑制率。

[0158] 抑制率 (%) = $[1 - (A - C) / (B - C)] \times 100$ (2)

[0159] (对 133-1H 抗体的抑制试验)

[0160] 试验除使用将 B016 抗体在免疫模块各孔致敏的 B016 抗体致敏板取代 133-1H 抗体致敏板、和用生物素标记的 133-1H 抗体取代生物素标记的 B016 抗体外,均与上述对 B016 抗体的抑制试验相同。

[0161] 各抗 RS 病毒 -F 蛋白质单克隆抗体对 133-1H 抗体和 B016 抗体的抑制结果如表 3 所示。在表 3 中,“+++”表示 (2) 式所求抑制率为 90% 以上,“++”表示 50% 以上,“+”表示 30% 以上,“-”表示不到 30%。

[0162] [表 3]

[0163]

克隆抗体名	对 133-1H 抗体的抑制	对 B016 抗体的抑制
RSF1-1565	+++	-
RSF2-412	-	-
RSF6-255	-	+++

[0164] 从表 3 的结果看,显然 412 抗体与 133-1H 抗体和 B016 抗体有不同的抗原识别部位。

[0165] [实施例 4]

[0166] 通过 RS 病毒 -F 蛋白质单克隆抗体组合检测 RSV 抗原的试验

[0167] 用第一缓冲液将 Long 株 (10 $[6.7]$ TCID (50) /ml) 稀释到 1/10。等量混合已稀释的各抗原液和样本萃取液,萃取处理 5 分钟,制备 Long 株抗原萃取液。

[0168] 向免疫模块各孔分别加入各 100 μ L 的用 0.1M 磷酸钠缓冲液稀释到浓度 5 μ g/mL 的 1565 抗体、412 抗体和 255 抗体。用第二缓冲液洗涤各孔三次。洗涤后各孔分别各加 300 μ L 第一缓冲液封闭,制作 1565 抗体致敏板、412 抗体致敏板和 255 抗体致敏板。

[0169] 除去各抗体致敏板中的第一缓冲液。除去后,向各抗体致敏板各孔中按照 50 μ L/孔添加 Long 株抗原萃取液。在室温中搅拌 30 分钟后,用第二缓冲液洗涤三遍。

[0170] 按众所周知的方法分别对 1565 抗体、412 抗体和 255 抗体进行生物素标记,以此制备生物素标记 RSF1-1565 抗体、生物素标记 RSF2-412 抗体和生物素标记 RSF6-255 抗体。

[0171] 向各抗体致敏板按照 100 μ L/孔添加含所制各生物素标记抗体(最终浓度 2 μ g/ml)和链霉亲和素标记的 POD(最终浓度 40mU/ml)的第一缓冲液。室温中搅拌各抗体致敏板 60 分钟后,用第二缓冲液洗涤三遍。

[0172] 在各抗体致敏板各孔中各加入 100 μ L 含 OPD 的底物液, 室温中静置 10 分钟。再在各抗体致敏板各孔中各加 100 μ L 含 2N H_2SO_4 的反应终止液。对各孔中的反应液用酶标仪测定 492nm 处的吸光度。测定结果见表 4。

[0173] [表 4]

[0174]

		固相一侧		
		RSF1-1565	RSF2-412	RSF6-255
标记一侧	RSF1-1565	0.049	1.579	1.551
	RSF2-412	2.250	0.011	1.812
	RSF6-255	2.383	1.499	0.006

[0175] 从表 4 的结果得知, 1565 抗体、412 抗体和 255 抗体只要固相一侧和标记一侧的抗体不用同一种抗体, 通过各种组合均可用夹心免疫检测法检出 RSV 抗原。

[0176] [实施例 5]

[0177] 1565 抗体的表位分析

[0178] (1565 抗体逃逸株的制备)

[0179] 将 RSV 感染细胞 Hep2 用添加了 10% 胎牛血清的 Eagle MEM (SIGMA 公司制) 在 24 孔板 (康宁 (Corning) 公司制) 中培养。Hep2 细胞形成集落时, 将培养液换成含 1% 胎牛血清的 Eagle MEM, 以 $MOI = 0.0005$ 感染 Long 株 ($10^{6.7}$ TCID₅₀/ml)。感染后, 在 37℃、5% CO_2 中培养 1 小时。经一小时培养后, 按照 20 μ g/孔添加 1565 抗体。添加抗体后, 在 37℃、5% CO_2 培养 3 ~ 4 天。

[0180] 除去另用含 10% 胎牛血清的 Eagle MEM 培养的 Hep2 细胞的培养液, 添加培养 3 ~ 4 天的上述细胞培养上清的 1/2 量。再添加与细胞培养上清等量的含 1% 胎牛血清的 Eagle MEM。添加后 37℃、5% CO_2 培养 1 小时。培养 1 小时后, 加 1565 抗体 20 μ g/孔。添加抗体后, 在 37℃、5% CO_2 培养 3 ~ 4 天。此操作再进行五次。

[0181] 在 1565 抗体存在的情况下进行共计七次 RSV 感染继代培养后, 观察细胞病变效应。根据观察的细胞病变效应得以确认出现 1565 抗体逃逸株, 因此将此细胞培养液全部回收, 冻结保存。

[0182] (1565 抗体逃逸株的 RS 病毒 -F 蛋白质基因序列分析及氨基酸序列分析)

[0183] 用 ReverTra Ace- α -(东洋纺公司制, 产品代码 FSK-101) 和引物 [序列: ATGGAGTTGCCAATCCTCAAAGC (序列号 3)] 从 1565 抗体逃逸株的培养上清和 Long 株合成 cDNA。

[0184] 用 PrimeStar (TAKARA 公司制产品代码 R010A) 和引物 [序列: ATGGATCCATGGAGTTGCCAATCCTCAAAGC (序列号 4)、TAGAATTCTAGTGATGGTGATGGTGATGATTTGTGGTGGATTTACCAGCAT (序列号 5)] 从合成的各 cDNA 进行聚合酶链式反应 (PCR)。PCR 在 95℃ 反应 2 分钟后, 以 95℃ 反应 30 秒、55℃ 反应 20 秒和 72℃ 反应 100 秒为一个循环, 重复这样的循环 35 次。反应结束后, 冻结保存 PCR 产物。

[0185] 用 MinElute PCR 纯化试剂盒 (QIAGEN 公司制) 从 PCR 产物除去引物。用 BigDye Terminator v3.1 循环测序试剂盒 (美国生物应用系统 (Applied

Biosystems) 公司制) 及引物 [序列 :ATGGATCCATGGAGTTGCCAATCCTCAAAGC (序列号 4)、TTTCTTGGTTTTTTGTTAGGTGTTGG (序列号 6)、TTTAACATTACCAAGTGAAATAAATCT (序列号 7)、TCTTCTTTTCCTTTTCTTGCTTAATG (序列号 8)] 从引物的 PCR 产物进行循环测序反应。反应后, 除去标记核苷, 用测序仪 (美国生物应用系统公司制) 和序列分析软件 (日立软件公司制) 进行基因序列分析和预测氨基酸序列分析。

[0186] 1565 抗体逃逸株的 RS 病毒 -F 蛋白质的氨基酸序列见序列号 2。Long 株的 RS 病毒 -F 蛋白质的氨基酸序列见序列号 1。从序列号 1 和序列号 2 可以看出, RSF1-1565 抗体逃逸株的 RS 病毒 -F 蛋白质第 421 赖氨酸 (K) 变为苏氨酸 (T)。

[0187] (对 1565 抗体逃逸株的反应性分析)

[0188] 1565 抗体逃逸株的培养上清液和 Long 株用第一缓冲液稀释到 1/10。等量混合稀释的各抗原液和样本萃取液, 萃取处理 5 分钟, 制备各抗原萃取液。再将各抗原萃取液用第一缓冲液稀释到 1/5, 制备抗原试样。

[0189] 向免疫模块 (NUNC 公司制) 各孔中分别添加 100 μ L 的用 0.1M 磷酸钠缓冲液稀释到浓度 10 μ g/mL 的 B016 抗体 (UK-Serotec 公司制) 溶液。用含 Tween20 的磷酸缓冲液 (以下称第二缓冲液) 洗涤各孔三次。洗涤后, 在各孔中分别添加第一缓冲液 300 μ L 并封闭 (以下称此免疫模块为 B016 抗体致敏板)。

[0190] 除去 B016 抗体致敏板中的第一缓冲液。除去后向 B016 抗体致敏板各孔添加 100 μ L 抗原试样, 搅拌 30 分钟。然后用第二缓冲液洗涤 B016 抗体致敏板各孔三次。

[0191] 按众所周知的方法对 1565 抗体进行生物素标记, 制备生物素标记 RSF1-1565 抗体。

[0192] 向 B016 抗体致敏板各孔分别添加 100 μ L 的含有制备的 1565 生物素标记抗体 (最终浓度 2 μ g/mL) 和链霉亲和素标记 POD (最终浓度 40mU/mL) 的第一缓冲液后, B016 抗体致敏板在室温中搅拌 60 分钟。再用第二缓冲液洗涤 B016 抗体致敏板三次。

[0193] B016 抗体致敏板各孔分别添加 100 μ L 含 OPD 的底物液, 室温中静置 10 分钟。向 B016 抗体致敏板各孔分别添加 100 μ L 的含 2H H_2SO_4 的反应终止液后, 对各孔中的反应液, 用酶标仪测定 492nm 处的吸光度。吸光度的测定结果如表 5 所示。

[0194] 表 5

	吸光度
RSF1-1565 抗体逃逸株	0.03
Long 株	3.28

[0195] 从表 5 可以看出, 1565 抗体不识别 1565 抗体逃逸株的 RS 病毒 -F 蛋白质。

[0196] [实施例 6]

[0197] 制作检测 RSV 用免疫层析试验用具

[0198] (本发明试验用具的制作)

[0199] 将 1565 抗体作为标记物标记的第一抗体使用, 将 412 抗体和 255 抗体作为固定在层析膜上的第二抗体使用, 按以下方法制作图 1 所示免疫层析试验用具 1 (以下称试验用具)。

[0200] 首先,用磷酸缓冲液 (pH7.0) 将 412 抗体和 255 抗体最终浓度稀释到 1.0mg/mL,制备 412 抗体 • 255 抗体混合液。再用抗体涂敷机 (Bio-Dot 公司产品) 将 412 抗体 • 255 抗体混合液在硝化纤维膜制层析膜判断区 5A 涂 1mm 宽,50℃干燥 30 分钟。

[0201] 将干燥后的层析膜 5 浸入封闭液 (含 BSA 的磷酸缓冲液 (pH7.0)) 进行封闭。再用洗涤液 (含有 SDS 的磷酸缓冲液 (pH7.0)) 洗涤,于 40℃下干燥 120 分钟,获得层析膜 5。

[0202] 然后,使 1565 抗体对蓝色显色聚苯乙烯乳胶粒子 (粒径 0.3 μm) 发生致敏作用,悬浮于分散用缓冲液 (含 BSA 和蔗糖的磷酸缓冲液 (pH7.0)),制备 1565 抗体致敏乳胶粒子。致敏时的抗体浓度为每 1mL1%乳胶粒子 200 μg IgG。将此 1565 抗体致敏乳胶粒子加入玻璃纤维制衬垫后,用真空干燥机干燥,获得标记附着垫 4。

[0203] 用上述层析膜 5 和标记附着垫 4 得到本发明的试验用具。

[0204] (质控试验用具的制备)

[0205] 制备方法除用 B016 抗体作为第一抗体、用 133-1H 抗体作为第二抗体和用稀释到最终浓度为 2.0mg/mL 的 B016 抗体代替 412 抗体和 255 抗体混合液以外其他均与上述本发明试验用具的制作相同,制备质控试验用具。

[0206] [实施例 7]

[0207] 确认本发明试验用具和传统试验用具对 RSV 的反应性

[0208] (用本发明试验用具检测 RSV)

[0209] 用实施例 6 制备的本发明试验用具按下述步骤确认对 RSV 的反应性。

[0210] (1) 用 Vero 细胞培养表 6 所示三种 RSV(Long 株、BWV 株及 9320 株),用生理盐水按表 6 所示稀释倍率稀释所得病毒,制备病毒液。

[0211] (2) 向 800 μL 样本萃取试剂 (含 0.3w/v% NP-40 (乙基苯基聚乙二醇) 的磷酸缓冲液 pH7.3) 中添加 150 μL 上述 (1) 制备的一定稀释倍率的病毒液进行混合,制备测定用试样。

[0212] (3) 将约 200 μL 上述 (2) 制备的测定用试样滴入玻璃试管,本发明试验用具的上游 (加样垫 3) 浸入其中放置约 10 分钟后,用肉眼判断判断区 5A 显色情况。当确认显色时评价为 (+),未确认显色时评价为 (-)。结果见表 6。

[0213] (用传统试验用具检测 RSV)

[0214] 作为传统试验用具,使用了质控试验用具,市面上出售的试验用具使用的是 check RSV(Alfresa Pharma 公司制) 和 BD RSV examen(Becton • Dickinson 公司制),用此确认其对 RSV 的反应性。

[0215] 质控试验用具按与上述本发明试验用具同样的步骤确认了其对 RSV 的反应性。市面上出售的试验用具用上述病毒液按各市面上出售的试验用具附带的资料所记操作步骤确认了其对 RSV 的反应性。反应性的确认结果见表 6。

[0216] [表 6]

[0217]

固相 标记	稀释 倍率	质控试验用具	本发明试验用具	市面上出售的试验用具	
		133-1H	412 抗体 255 抗体	check RSV	RSV examen
		B016	1565 抗体		
Long	1:2.5	+	NT	NT	NT
	1:5	-	NT	NT	+
	1:10	NT	+	+	-
	1:20	NT	-	-	-
	1:40	NT	NT	NT	NT
BWV	1:2.5	+	NT	NT	+
	1:5	+	NT	NT	-
	1:10	-	NT	NT	-
	1:20	NT	NT	+	-
	1:40	NT	NT	-	NT
	1:80	NT	NT	NT	NT
	1:160	NT	+	NT	NT
	1:320	NT	-	NT	NT
9320	1:2.5	NT	NT	NT	+
	1:5	+	NT	NT	-
	1:10	+	NT	NT	-
	1:20	NT	NT	+	-
	1:40	NT	NT	-	NT
	1:80	NT	NT	-	NT
	1:160	NT	+	NT	NT
	1:230	NT	-	NT	NT

[0218] NT:未试验

[0219] 从表6可以看出,本发明的试验用具对RSV显示出比传统试验用具更高的反应性。

[0220] 序列表

[0221] <110> 希森美康株式会社

[0222] <120> 使用抗RSV单克隆抗体的RSV检测试剂盒、免疫层析试验用具和新型抗RSV单克隆抗体

[0223] <130>08-007

[0224] <160>8

[0225] <170>PatentIn version 3.1

[0226] <210>1

[0227] <211>574

[0228] <212>PRT

[0229] <213> 呼吸道合胞病毒

[0230] <400>1

18

[0270]	305	310	315	320
[0271]	Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg			
[0272]		325	330	335
[0273]	Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe			
[0274]		340	345	350
[0275]	Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp			
[0276]		355	360	365
[0277]	Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val			
[0278]		370	375	380
[0279]	Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr			
[0280]	385	390	395	400
[0281]	Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys			
[0282]		405	410	415
[0283]	Tyr Gly Lys Thr Lys Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile			
[0284]		420	425	430
[0285]	Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Ala Ser Asn Lys Gly Val Asp			
[0286]		435	440	445
[0287]	Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly			
[0288]		450	455	460
[0289]	Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro			
[0290]	465	470	475	480
[0291]	Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn			
[0292]		485	490	495
[0293]	Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu			
[0294]		500	505	510
[0295]	Leu His His Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr			
[0296]		515	520	525
[0297]	Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val			
[0298]		530	535	540
[0299]	Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser			
[0300]	545	550	555	560
[0301]	Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn			
[0302]		565	570	
[0303]	<210>2			
[0304]	<211>574			
[0305]	<212>PRT			
[0306]	<213> 呼吸道合胞病毒			
[0307]	<400>2			
[0308]	Met Glu Leu Pro Ile Leu Lys Ala Asn Ala Ile Thr Thr Ile Leu Ala			

[0309]	1	5	10	15
[0310]	Ala Val Thr Phe Cys Phe Ala Ser Ser Gln Asn Ile Thr Glu Glu Phe			
[0311]	20	25	30	
[0312]	Tyr Gln Ser Thr Cys Ser Ala Val Ser Lys Gly Tyr Leu Ser Ala Leu			
[0313]	35	40	45	
[0314]	Arg Thr Gly Trp Tyr Thr Ser Val Ile Thr Ile Glu Leu Ser Asn Ile			
[0315]	50	55	60	
[0316]	Lys Glu Asn Lys Cys Asn Gly Thr Asp Ala Lys Val Lys Leu Ile Lys			
[0317]	65	70	75	80
[0318]	Gln Glu Leu Asp Lys Tyr Lys Asn Ala Val Thr Glu Leu Gln Leu Leu			
[0319]	85	90	95	
[0320]	Met Gln Ser Thr Pro Ala Ala Asn Asn Arg Ala Arg Arg Glu Leu Pro			
[0321]	100	105	110	
[0322]	Arg Phe Met Asn Tyr Thr Leu Asn Asn Thr Lys Lys Thr Ash Val Thr			
[0323]	115	120	125	
[0324]	Leu Ser Lys Lys Arg Lys Arg Arg Phe Leu Gly Phe Leu Leu Gly Val			
[0325]	130	135	140	
[0326]	Gly Ser Ala Ile Ala Ser Gly Thr Ala Val Ser Lys Val Leu His Leu			
[0327]	145	150	155	160
[0328]	Glu Gly Glu Val Asn Lys Ile Lys Ser Ala Leu Leu Ser Thr Asn Lys			
[0329]	165	170	175	
[0330]	Ala Val Val Ser Leu Ser Asn Gly Val Ser Val Leu Thr Ser Lys Val			
[0331]	180	185	190	
[0332]	Leu Asp Leu Lys Asn Tyr Ile Asp Lys Gln Leu Leu Pro Ile Val Asn			
[0333]	195	200	205	
[0334]	Lys Gln Ser Cys Arg Ile Ser Asn Ile Glu Thr Val Ile Glu Phe Gln			
[0335]	210	215	220	
[0336]	Gln Lys Asn Asn Arg Leu Leu Glu Ile Thr Arg Glu Phe Ser Val Asn			
[0337]	225	230	235	240
[0338]	Ala Gly Val Thr Thr Pro Val Ser Thr Tyr Met Leu Thr Asn Ser Glu			
[0339]	245	250	255	
[0340]	Leu Leu Ser Leu Ile Asn Asp Met Pro Ile Thr Asn Asp Gln Lys Lys			
[0341]	260	265	270	
[0342]	Leu Met Ser Asn Asn Val Gln Ile Val Arg Gln Gln Ser Tyr Ser Ile			
[0343]	275	280	285	
[0344]	Met Ser Ile Ile Lys Glu Glu Val Leu Ala Tyr Val Val Gln Leu Pro			
[0345]	290	295	300	
[0346]	Leu Tyr Gly Val Ile Asp Thr Pro Cys Trp Lys Leu His Thr Ser Pro			
[0347]	305	310	315	320

[0348] Leu Cys Thr Thr Asn Thr Lys Glu Gly Ser Asn Ile Cys Leu Thr Arg
 [0349] 325 330 335
 [0350] Thr Asp Arg Gly Trp Tyr Cys Asp Asn Ala Gly Ser Val Ser Phe Phe
 [0351] 340 345 350
 [0352] Pro Gln Ala Glu Thr Cys Lys Val Gln Ser Asn Arg Val Phe Cys Asp
 [0353] 355 360 365
 [0354] Thr Met Asn Ser Leu Thr Leu Pro Ser Glu Val Asn Leu Cys Asn Val
 [0355] 370 375 380
 [0356] Asp Ile Phe Asn Pro Lys Tyr Asp Cys Lys Ile Met Thr Ser Lys Thr
 [0357] 385 390 395 400
 [0358] Asp Val Ser Ser Ser Val Ile Thr Ser Leu Gly Ala Ile Val Ser Cys
 [0359] 405 410 415
 [0360] Tyr Gly Lys Thr Thr Cys Thr Ala Ser Asn Lys Asn Arg Gly Ile Ile
 [0361] 420 425 430
 [0362] Lys Thr Phe Ser Asn Gly Cys Asp Tyr Ala Ser Asn Lys Gly Val Asp
 [0363] 435 440 445
 [0364] Thr Val Ser Val Gly Asn Thr Leu Tyr Tyr Val Asn Lys Gln Glu Gly
 [0365] 450 455 460
 [0366] Lys Ser Leu Tyr Val Lys Gly Glu Pro Ile Ile Asn Phe Tyr Asp Pro
 [0367] 465 470 475 480
 [0368] Leu Val Phe Pro Ser Asp Glu Phe Asp Ala Ser Ile Ser Gln Val Asn
 [0369] 485 490 495
 [0370] Glu Lys Ile Asn Gln Ser Leu Ala Phe Ile Arg Lys Ser Asp Glu Leu
 [0371] 500 505 510
 [0372] Leu His His Val Asn Ala Gly Lys Ser Thr Thr Asn Ile Met Ile Thr
 [0373] 515 520 525
 [0374] Thr Ile Ile Ile Val Ile Ile Val Ile Leu Leu Ser Leu Ile Ala Val
 [0375] 530 535 540
 [0376] Gly Leu Leu Leu Tyr Cys Lys Ala Arg Ser Thr Pro Val Thr Leu Ser
 [0377] 545 550 555 560
 [0378] Lys Asp Gln Leu Ser Gly Ile Asn Asn Ile Ala Phe Ser Asn
 [0379] 565 570
 [0380] <210>3
 [0381] <211>23
 [0382] <212>DNA
 [0383] <213> 人工序列
 [0384] <220>
 [0385] <223> 反转录引物
 [0386] <400>3

[0387]	atggagttgc caatcctcaa agc	23
[0388]	<210>4	
[0389]	<211>31	
[0390]	<212>DNA	
[0391]	<213> 人工序列	
[0392]	<220>	
[0393]	<223>PCR 引物	
[0394]	<400>4	
[0395]	atggatccat ggagttgcc a tcctcaaag c	31
[0396]	<210>5	
[0397]	<211>52	
[0398]	<212>DNA	
[0399]	<213> 人工序列	
[0400]	<220>	
[0401]	<223>PCR 引物	
[0402]	<400>5	
[0403]	tagaattcta gtgatggtga tggatgat ttgtggtgga ttaccagca tt	52
[0404]	<210>6	
[0405]	<211>26	
[0406]	<212>DNA	
[0407]	<213> 人工序列	
[0408]	<220>	
[0409]	<223> 循环测序引物	
[0410]	<400>6	
[0411]	tttcttggtt ttttgtagg tgttgg	26
[0412]	<210>7	
[0413]	<211>27	
[0414]	<212>DNA	
[0415]	<213> 人工序列	
[0416]	<220>	
[0417]	<223> 循环测序引物	
[0418]	<400>7	
[0419]	tttaacatta ccaagtga a taaatct	27
[0420]	<210>8	
[0421]	<211>26	
[0422]	<212>DNA	
[0423]	<213> 人工序列	
[0424]	<220>	
[0425]	<223> 循环测序引物	

[0426] <400>8

[0427] ttttttttc ctttttttgc ttaatg

26

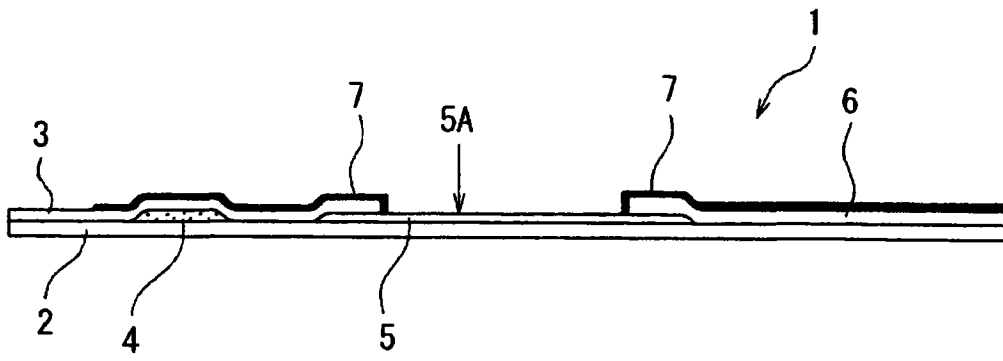


图 1