



## 甲型和乙型流感病毒



**流**感病毒是仅有的可以在全球范围内对所有年龄段造成突发性普遍疾病的病毒。在过去的几个世纪中曾经发生过三次与病毒表面糖蛋白（HA，NA）“变异”相关的“流行病”。其中，发生在1918年的“西班牙流感”造成了全球超过2千万人死亡，并且死者

主要是青壮年。每年流感流行与不同的病毒类型或亚型有关，可以导致大量的发病率和死亡率，尤其是在高风险组。尽管流感有特有的临床症状，如突然发热（ $>38^{\circ}\text{C}$ ），明显的中毒症状（头痛，肌痛），干咳，呼吸急促和胸骨疼痛等，但是根据年龄不同，个人的免疫状态不同，伴随着人的病毒株的致病性及病理学特征不同，临床表现也不尽相同。随着实验室测试应用的发展，在流感流行前或者流行过程中进行诊断的手段得以实现。流感的实验室诊断是基于直接检查和配对血清标本的血清学检测。免疫荧光（IF）可以用于直接对鼻咽分泌物进行测试。EIA测试一般是比较客观的，并且比IF直接检测更敏感。这些诊断对于针对病因的治疗处方是非常必要的。

甲型和乙型流感病毒属于正粘病毒科，含八段单链RNA，呈球形（直径30-100nm）。流感病毒的核蛋白（NP）抗原与病毒RNA的特异性相关，根据NP的不同流感病毒可以分为甲乙丙三种类型。另外两个重要的抗原是血凝素（HA）和神经氨酸酶（NA），二者都是糖蛋白，决定流感病毒的亚型。

所有的流感病毒抗原的工艺相似。来源是接种了相应病毒株的10-12日龄鸡胚尿囊液。尿囊液通过低速离心澄清，病毒通过在SW 27转子（贝克曼）高速离心1h分离沉淀。再经过两个连续的超速离心进一步纯化病毒。然后再经过蔗糖密度梯度离心后，收集病毒带，用STE缓冲液稀释，最后通过超速离心1h沉淀。

为确保病毒的稳定性，病毒以高浓度保存在 $-20^{\circ}\text{C}$ 。免疫反应是用内部ELISA测试的，使用针对甲流和乙流的单克隆抗体，抗原滴度从1:5000至1:10000。在MDCK培养的感染性测试呈阴性。甲型和乙型流感病毒抗原在特异性IgG、IgM和IgA抗体血清学试验有很好的表现，也包含EIA检测。我们也推荐这些病毒抗原用于多克隆抗体的制备。

### 1. 甲型流感单克隆抗体

HyTest可以提供高灵敏度和高特异性的单克隆抗体用于甲型流感病毒的检测。甲型流感单克隆抗体可用于常规的免疫试验（直接或间接ELISA，夹心免疫检测系统，Western blotting）测试不同生物样本（鼻咽分泌物，细胞溶解物等）中最重要的特异性流感抗原如血凝素（HA）和核蛋白（NP）。这些单克隆抗体与乙型流感病毒没有交叉反应，所以可用来区分甲型和乙型两种流感。

#### 1.1. H1和H3单克隆抗体

宿主动物:	小鼠Balb/c
融合用细胞系:	Sp2/O
免疫原:	从尿囊液提纯的甲型流感H1N1或H3N2
特异性:	血凝素H1
提纯方法:	蛋白A或蛋白G亲和层析
物理状态:	溶于含0.1%叠氮化钠的PBS

杂交瘤细胞克隆株来源于杂交的Sp2/O骨髓瘤与Balb/c小鼠脾细胞，后者经纯化甲型流感病毒A/New Caledonia/20/99 (strain H1N1) 或 A/Shangdong/9/93 (strain H3N2) 免疫。血凝素特异性抗体可在ELISA和Western blotting实验中选择性检测甲型流感凝集素H1或H3。

#### 1.1.1. 甲型流感H1和H3 ELISA 检测

抗血凝素的单克隆抗体可以在直接或间接ELISA中特异性检测甲型流感病毒。图3为单克隆抗体InA4（H1特异性）和单克隆抗体InA246（H3特异性）的滴定曲线。

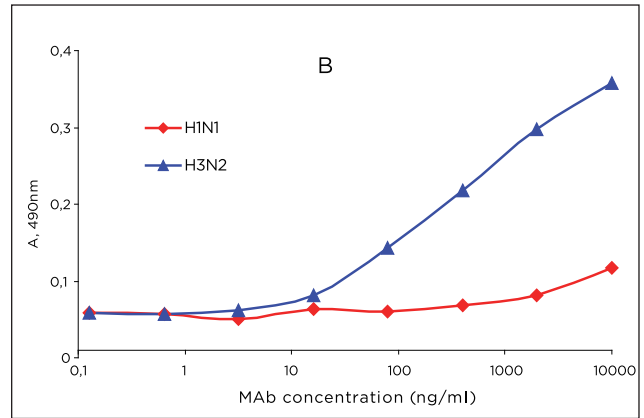
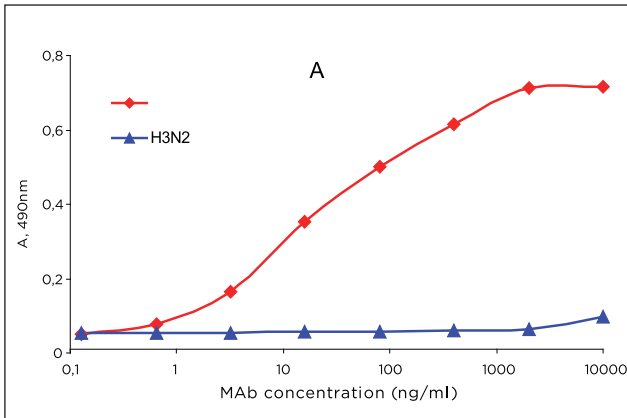


图1. 在间接ELISA中, 甲流 H1和 H3特异性单抗的滴定曲线。

A. 单抗 InA4 (H1 特异性抗体)  
B. 单抗 InA246 (H3 特异性抗体)

抗原:

H1N1 - Influenza A/New Caledonia/20/99 - 0.1 µg/孔  
H3N2 - Influenza A/Shangdong/9/93 - 0.1 µg/孔

### 1.1.2. 甲型流感定量夹心免疫试验

所有的单克隆抗体都在夹心荧光免疫分析中分别作为捕获抗体或检测抗体进行了测定。筛选出的抗体对可以高特异性和高灵敏度的检测甲型流感病毒的特异毒株。纯化的甲型流感病毒毒株 (H1N1和H3N2) 与重组的H1和H3均作为抗原进行了测试。我们推荐以下配对用于特异性检测甲流H1免疫测定 (捕获抗体-检测抗体) :

InA97 - InA134

所有抗体对都可以检测病毒或者重组血凝素H1, 并可用于甲型流感H1Nx的免疫检测系统。其中一对单克隆抗体的校准曲线见图2。

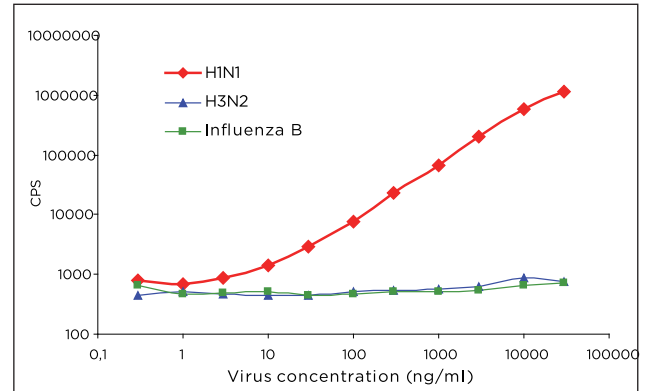


图2. H1抗体在夹心荧光免疫实验中的校准曲线

捕获抗体: MAb InA97 - 1 µg/孔  
检测抗体(销标记): MAb InA134 - 0.2 µg/孔  
孵育时间: 45 min

抗原:

H1N1 - Influenza A/New Caledonia/20/99  
H3N2 - Influenza A/Shangdong/9/93  
Influenza B - 乙流病毒混合物(strains B/Qingdao/102/91, B/Tokio/53/99, B/Victoria/504/00)

### 1.1.3. 甲型流感H1和 H3 Western-blotting检测

血凝素H1或H3经还原性SDS-PAGE电泳后在Western-blotting中可被所有单抗检测。单克隆抗体可以结合加工或非加工的血凝素的HA1链。特异性抗体免疫检测甲型流感血凝素见图3。

图3. 抗血凝素单克隆抗体在还原PAGE western blotting中检测甲流病毒

抗鼠 IgG与HRP结合用于血凝素-单抗复合物的可视化观察。

抗原 (1ug/孔)

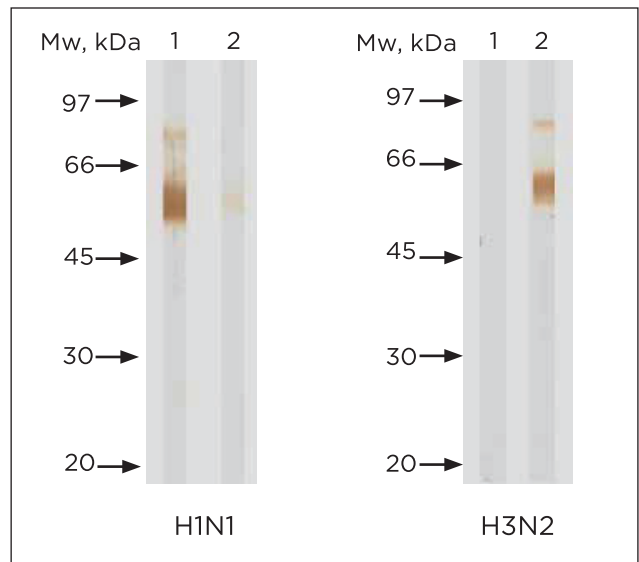
H1N1 - Influenza A/New Caledonia/20/99

H3N2 - Influenza A/Shangdong/9/93

抗体 (5 µg/ml):

1: MAb InA4 - 抗甲流血凝素H1

2: MAb InA246 - 抗甲流血凝素H3



**订购信息:**

产品名称	货号	克隆号	亚型	应用
Anti-Influenza A haemagglutinin	3IH4	C102	IgG1	Haemagglutinin H1, EIA, IF, HIT, IHC
Anti-Influenza A haemagglutinin H1	3AH1	InA97	IgG1	EIA (capture), WB
Anti-Influenza A haemagglutinin H1	3AH1	InA134	IgG1	EIA (detection), WB
Anti-Influenza A haemagglutinin H1	3AH1	InA139	IgG1	EIA, WB
Anti-Influenza A haemagglutinin H3	3HG3	InA227	IgG1	EIA, WB
Anti-Influenza A haemagglutinin H3	3HG3	InA246	IgG2a	EIA, WB

**1.2. 抗甲型流感血凝素H5单克隆抗体**

宿主动物: 小鼠Ba1b/c  
 融合用细胞系: Sp2/O  
 免疫原: 提纯的甲型禽流感病毒 (H5N1)  
 特异性: 血凝素H5  
 提纯方法: 蛋白G亲和层析  
 物理状态: 溶于含0.1%叠氮化钠的PBS

禽流感病毒自然产生于鸟类之间，并可引起禽流感感染。通常所说的“禽流感”主要是指发现于鸟类之间的甲型流感病毒，但这种病毒也可以感染人类。禽流感在100年前的意大利流感大爆发中被首次确认。之后，这一疾病在世界范围内无规律的不断发生。

经氨基酸酶[NA]。HA和NA可以任意结合，且每种结合都是一种不同的亚型。在16种不同血凝素类型中，只有包含H5和H7亚型的病毒会引发禽流感，它们具有高度传染性并可快速致死。如果高致病性的流感H5病毒爆发，家禽的死亡率常常高达90%-100%。

甲型流感病毒有很多不同的亚型，它们的不同是因为甲型流感病毒表面某些特定蛋白发生了改变（血凝素[HA]和神

**订购信息:**

产品名称	货号	克隆号	亚型	应用
Anti-Influenza A haemagglutinin H5	3H5N	15A6	IgG2a	EIA, HIT, Dot blot
Anti-Influenza A haemagglutinin H5	3H5N	18D5	IgG2a	EIA, HIT, Dot blot
Anti-Influenza A haemagglutinin H5	3H5N	19C11	IgG2a	EIA, HIT, Dot blot
Anti-Influenza A haemagglutinin H5	3H5N	8D2	IgG2a	EIA, HIT, Dot blot
Anti-Influenza A haemagglutinin H5	3H5N	6C8	IgG1	EIA, HIT
Anti-Influenza A haemagglutinin H5	3H5N	1C7	IgG2a	EIA, HIT
Anti-Influenza A haemagglutinin H5	3H5N	6B4	IgG2a	EIA, HIT
Anti-Influenza A haemagglutinin H5	3H5N	1B4	IgG2a	EIA

**1.3. 抗甲型流感血凝素H7单克隆抗体**

宿主动物: 小鼠Ba1b/c  
 融合用细胞系: Sp2/O  
 免疫原: 从尿囊液提纯的甲型流感H7N7或H7N1  
 特异性: 血凝素H7  
 提纯方法: 蛋白A或蛋白G亲和层析  
 物理状态: 溶于含0.1%叠氮化钠的PBS

杂交瘤细胞克隆株来源于杂交的Sp2/O骨髓瘤与Balb/c小鼠脾细胞，后者经纯化后的甲型流感病毒Influenza A/Netherlands/219/O3 (H7N7病毒) 免疫。血凝素

特异性抗体，可通过多种免疫方法选择性的检测甲型流感H7血凝素，如直接或间接ELISA，夹心免疫检测等。

### 1.3.1. 甲型流感 ELISA 检测

所有单克隆抗体可以通过直接或间接ELISA检测出甲型流感H7血凝素。抗血凝素H7单克隆抗体InA334的典型滴定曲线见图9。

我们对所有单克隆抗体与其它甲流病毒的交叉反应也进行了测定。交叉反应测试包括如下病毒：甲型流感H1N1 (strain A/New Caledonia/20/99), 甲型流感 H2N2 (strain A/Japan/305/57), 甲型流感H3N2 (strain A/Panama/2007/99), 甲型流感 H7N7 (strain A/Netherlands/219/03) 和副流感病毒(type 1 Sendai)。

已经得到证实的是，所有单抗对甲型流感H7病毒具有高度特异性且它不会与测试中的其他甲型流感病毒结合（单克隆抗体InA334的典型交叉反应见图4）。

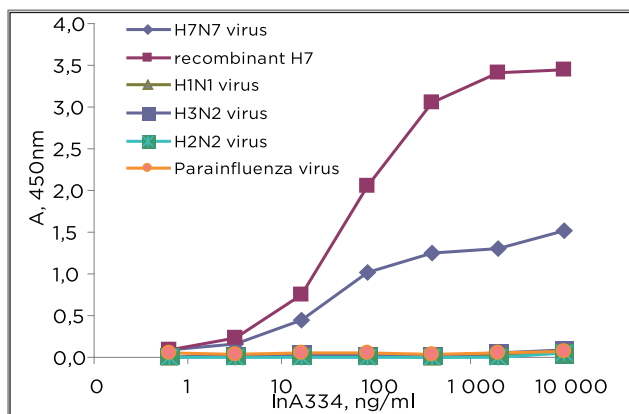


图4. 在间接ELISA中，血凝素H7特异性抗体InA334的滴定曲线  
 抗原：  
 病毒 - 200 ng/孔  
 重组 H7 (A/Chicken/Netherlands/1/03)(aa 17-527) - 10 ng/孔

### 1.3.2. 甲型流感 H7定量夹心免疫试验

所有的单克隆抗体都在夹心荧光免疫分析中作为捕获抗体或检测抗体进行了测定。筛选出的抗体对可以高特异性和高灵敏度地检测甲型流感血凝素H7。纯化的甲型流感病毒 Influenza A/Netherlands/219/03 H7N7和重组的H7均在夹心荧光免疫实验中作为抗原。推荐用于特异性检测甲流H7免疫测定的配对抗体（捕获抗体-检测抗体）：

InA334 - InA331  
 InA334 - InA414

所有推荐的抗体对都可以检测甲流H7N7病毒或者重组血凝素H7。其中一对单克隆抗体的校准曲线见图5。

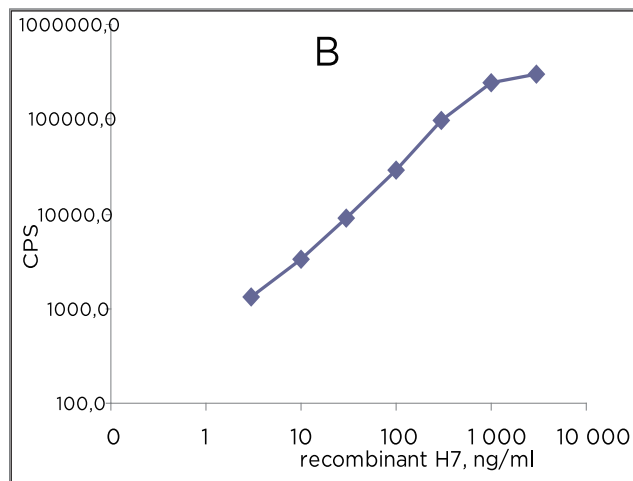
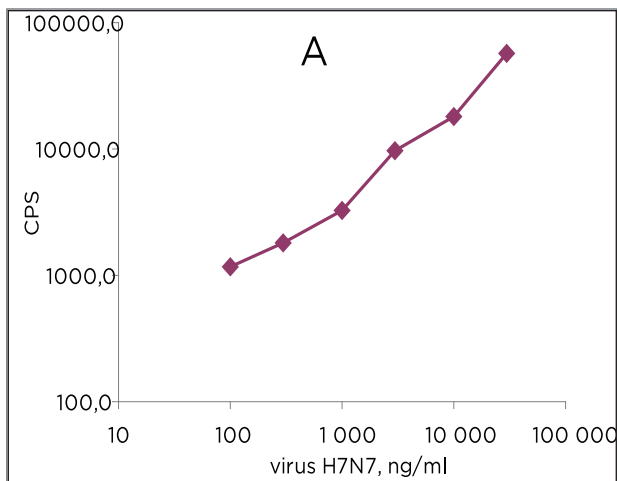


图5. 在夹心荧光免疫实验中，H7抗体的校准曲线InA334-InA331 (捕获抗体-检测抗体)

捕获抗体: InA334 - 1 µg/孔  
 检测抗体: (销标记): InA331 - 0.1 µg/孔  
 孵育时间: 45 min  
 抗原:  
 A - Influenza A/Netherlands/219/03 H7N7 virus  
 B - 重组 H7 (A/Chicken/Netherlands/1/03) (aa 17-527)

#### 订购信息:

产品名称	货号	克隆号	亚型	应用
Anti-Influenza A haemagglutinin H7	3H17	InA331	IgG1	EIA
Anti-Influenza A haemagglutinin H7	3H17	InA334	IgG1	EIA
Anti-Influenza A haemagglutinin H7	3H17	InA414	IgG2b	EIA

## 1.4. 抗甲型流感核蛋白 (NP) 单克隆抗体

宿主动物:	小鼠Ba1b/c
融合用细胞系:	Sp2/0
抗原:	提纯的甲型流感病毒H1N1
特异性:	单抗可与核蛋白发生反应, 常见于甲流病毒H1N1, H3N2和其它甲流病毒
提纯方法:	蛋白A亲和层析
物理状态:	溶于含0.1%叠氮化钠的PBS

HyTest有许多用于检测甲流病毒的抗核蛋白 (NP) 单克隆抗体。免疫原为甲型流感病毒H1N1。所有这些抗体可以高特异性的检测出甲型流感的核蛋白且不会与乙型流感核蛋白发生交叉反应。我们对F8单克隆抗体特异性研究表明它可以识别表达在核蛋白上的保守型表位, 后者常见于具有不同抗原结构和种类起源的甲型流感病毒。我们对25组来自人和禽的甲型流感病毒 (分别来自1934到1993不同时段的不同瘟疫) 进行检测, 所有测试都有特异性反应发生。我们又通过直接免疫荧光的方法检测了265个取自流感爆发期间儿童患者的鼻分泌物, 结果显示NP抗体对甲型流感的敏感性和特异性分别为60%和98.2%。

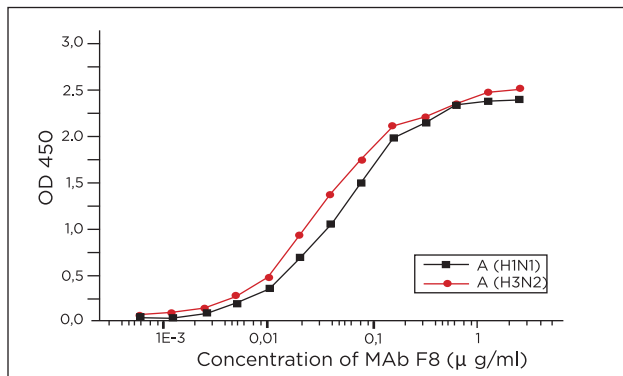


图6. 在ELISA实验中, 单抗F8与纯化的甲流病毒 (H1N1和H3N2) 的特异性反应

### 1.4.1. 甲型流感NP的ELISA检测

我们用抗核蛋白单克隆抗体对不同亚型的甲型流感进行检测。单克隆抗体InA108的滴定曲线见图7。

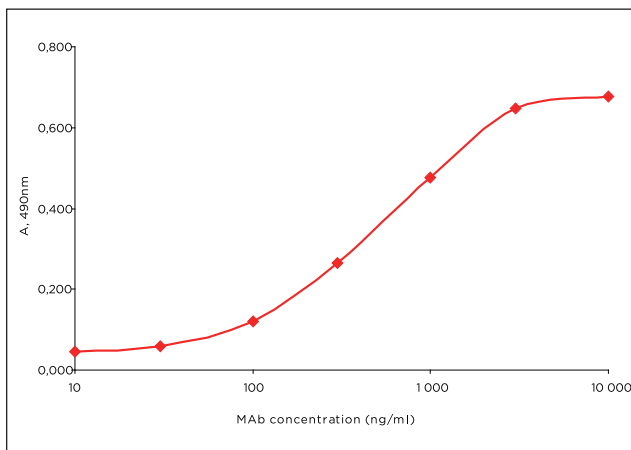


图7. 在间接ELISA中, 甲流NP特异性抗体InA108的滴定曲线  
抗原: Influenza A/New Caledonia/20/99 (H1N1) -0.2 µg/孔

### 1.4.2. 甲流NP Western Blotting 检测

甲流病毒的NP经还原性SDS-PAGE电泳后在Western blotting中可被InA108和InA245检测。

抗核蛋白的单克隆抗体InA108对甲型流感NP的免疫检测结果见图8。

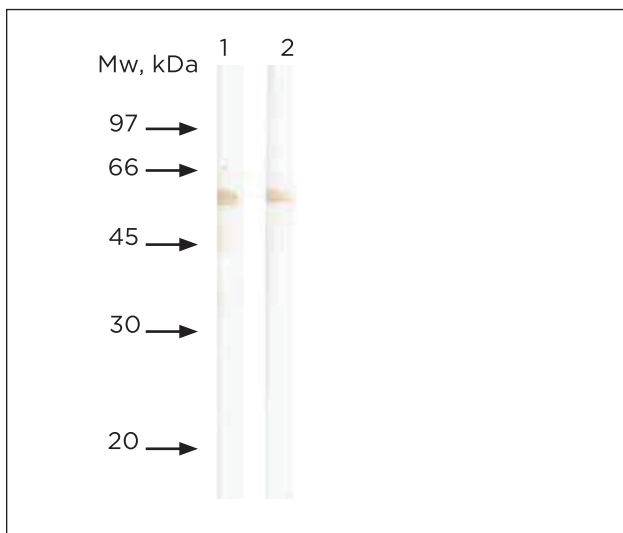


图8. 还原性PAGE后, InA108对甲流病毒的western-blotting检测  
抗-鼠 IgG与HRP结合用于单克隆抗体-核蛋白复合物的可视化观察。  
抗原 (1µg/孔)  
1.H1N1- Influenza A/New Caledonia/20/99  
2.H3N2 - Influenza A/Shangdong/9/93  
抗体 (5 µg/ml):  
MAb InA108-抗甲型流感核蛋白 (NP)

### 1.4.3. 甲型流感核蛋白定量夹心免疫检测

所有的单克隆抗体都在夹心荧光免疫分析中作为捕获抗体或检测抗体进行了测定。筛选出的抗体对可以对H1N1和H3N2的核蛋白具有等同的检测能力。抗甲型流感结构蛋白抗体的最佳配对为（捕获抗体-检测抗体）：

InA108 - InA245

InA180 - InA245

所有的抗体对都可以检测甲流病毒的不同毒株。其中一对单克隆抗体的校准曲线见图9。

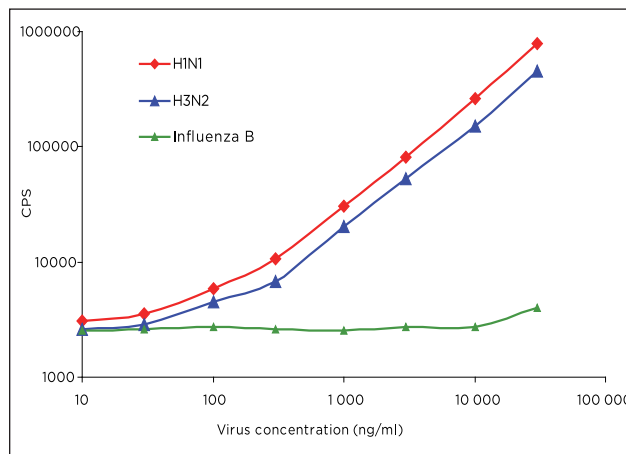


图9. 甲流核蛋白夹心荧光免疫检测系统校准曲线。

捕获抗体：InA108 - 1 μg/孔

检测抗体（销标记）：InA245-0.2 μg/孔

孵育时间：45min

抗原：H1N1 - Influenza A/New Caledonia/20/99

H3N2 - Influenza A/Shangdong/9/93

乙型流感- 乙型流感病毒混合物 (strains B/Qingdao/102/91, B/Tokio/53/99, B/Victoria/504/00)

#### 订购信息：

产品名称	货号	克隆号	亚型	应用
Anti-Influenza A virus (nucleoprotein)	3IN5	F8	IgG2a	EIA, IHC
Anti-Influenza A virus (nucleoprotein)	3IN5	InA108	IgG1	EIA (capture), WB
Anti-Influenza A virus (nucleoprotein)	3IN5	InA180	IgG3	EIA
Anti-Influenza A virus (nucleoprotein)	3IN5	InA224	IgG1	EIA (capture)
Anti-Influenza A virus (nucleoprotein)	3IN5	InA245	IgG2b	EIA (detection), WB

## 2. 乙型流感单克隆抗体

### 2.1. 乙型流感核蛋白（NP）单克隆抗体

宿主动物：小鼠SJL/J (2/3单克隆抗体), 小鼠Balb/c (其它)  
 融合用细胞系：Px (2/3的单克隆抗体), Sp2/O (其它)  
 抗原：提纯的乙型流感病毒  
 特异性：乙型流感病毒的核蛋白  
 提纯方法：蛋白G或蛋白A亲和层析  
 物理状态：溶于含0.1%叠氮化钠的PBS

#### 2.1.1. 乙型流感 ELISA 检测

所有抗核蛋白的单克隆抗体可以在直接或间接ELISA中检测出乙型流感的不同病毒种类。

其中一株单克隆抗体InB114的滴定曲线见图10。

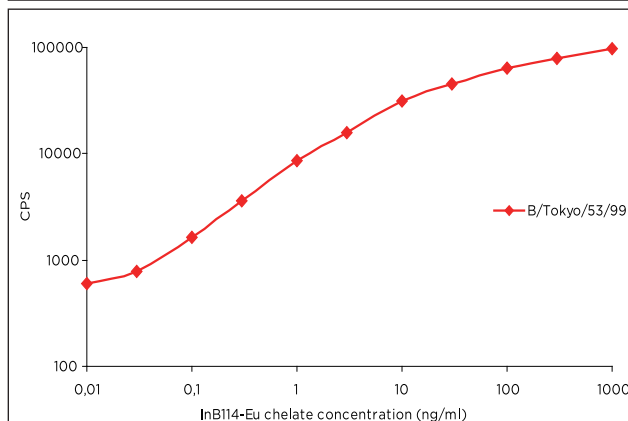
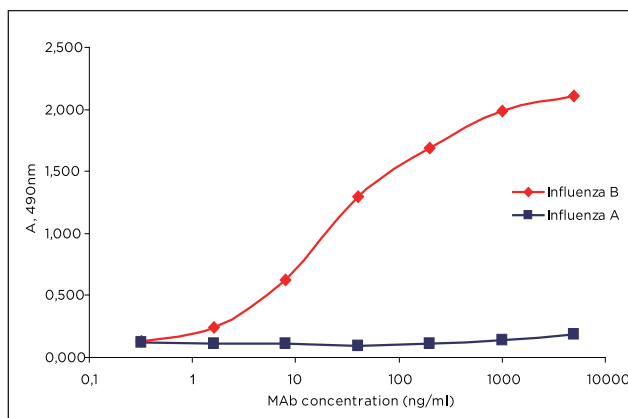


图10. 在间接ELISA (A) 和直接ELISA (B) 中，乙流病毒NP特异性抗体Mab 114的滴定曲线。

A. MAb InB114 在间接ELISA的滴定曲线

抗原：

Influenza B: Influenza B/Tokyo/53/99 - 0.5 μg/well

Influenza A: mixture of two strains - A/Shangdong/9/93 and A/New Caledonia/20/99

- 0.5 μg/well

B. 销标记的Mab InB114在直接ELISA中的滴定曲线

抗原：

Influenza B/Tokyo/53/99 - 0.2 μg/well

### 2.1.2. 乙型流感定量夹心免疫检测

所有的单克隆抗体都在夹心免疫实验中分别作为捕获抗体或检测抗体进行了测定。筛选出的配对抗体与所有检测的乙流病毒具有同样的特异性和高灵敏度。测试中所用抗原为乙型流感的不同病毒种类(Influenza B/Leningrad/86/93, Influenza B/Tokyo/53/99, Influenza B/Victoria/504/00)和重组的乙型流感病毒核蛋白。推荐乙型流感NP特异性免疫检测的抗体配对为(捕获抗体-检测抗体)：

InB12 - InB27  
InB12 - InB64  
InB36 - InB64

所有推荐的配对抗体都可用于乙型流感的免疫检测系统。其中一对单克隆抗体的校准曲线见图11。

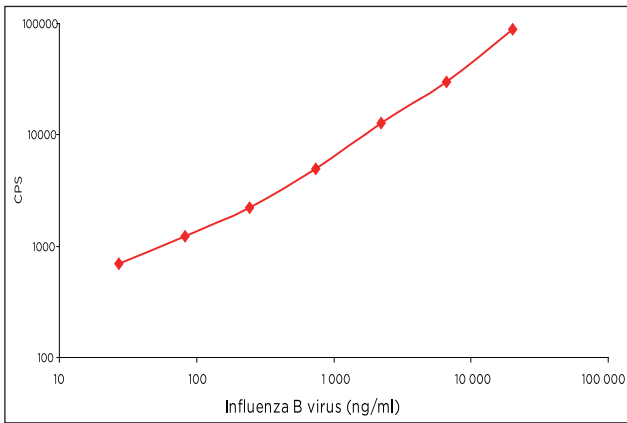


图11. 乙流NP抗体在夹心荧光免疫检测系统的校准曲线。

捕获抗体: MAbs InB36 - 1 Qg/孔  
检测抗体(标记): MAbs InB64 - 0.2 Qg/孔  
孵育时间: 45 min  
抗原: Influenza B/Tokio/53/99

单克隆抗体可特异性的对核蛋白分子的不同片段反应。选择针对不同抗原表位的单克隆抗体可以使NP免疫检测具有更高的灵敏度。所有单克隆抗体的表位特异性见表1。

表1 核蛋白特异性单克隆抗体的抗原表位特异性

Epitope	MAbs
Fragment 1: (1-80 a.a.r.)	InB12, InB36
Fragment 2: (120-200 a.a.r.)	InB27, InB64
Fragment 3: (240-320 a.a.r.)	InB204, InB210, 2/3
Fragment 4: (480-560 a.a.r.)	InB114, InB213

### 2.1.3. 乙型流感病毒的 Western blotting 免疫检测

乙型流感核蛋白 (NP) 经还原性SDS-PAGE电泳后在Western blotting中可被所有单抗检测。其中一个抗体对乙型流感病毒核蛋白 (NP) 的免疫检测结果见图12。

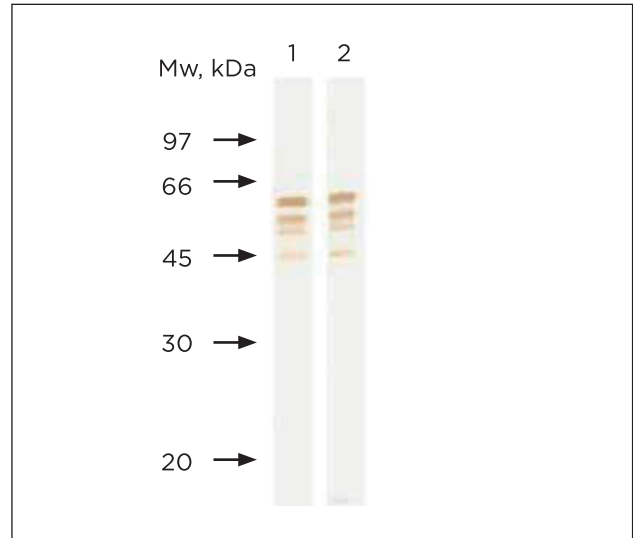


图12. NP特异性抗体在还原性PAGE Western blotting中对乙流NP的免疫检测

抗原: Influenza B/Tokio/53/99 - 1 µg/孔  
抗体: (5 µg/ml):  
1: MAb InB27  
2: MAb InB64

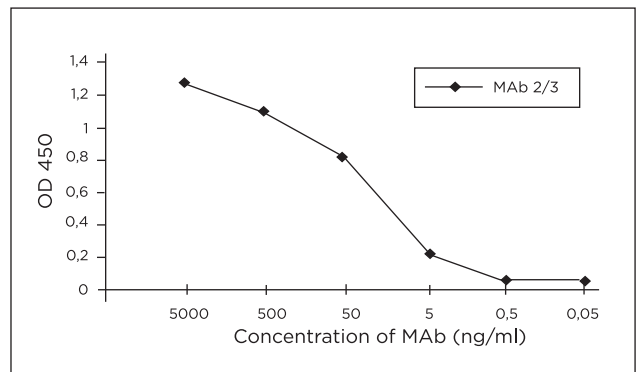


图13. MAb2/3 在ELISA中与纯化的病毒抗原B/Beijing/184/93的特异性反应

订购信息:

产品名称	货号	克隆号	亚型	应用
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	3IF18	InB12	IgG2b	EIA, WB
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	3IF18	InB27	IgG1	EIA, WB
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	3IF18	InB36	IgG1	EIA, WB
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	3IF18	InB64	IgG1	EIA, WB
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	3IF18	InB114	IgG1	EIA, WB
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	3IF18	InB204	IgG1	EIA, WB
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	3IF18	InB210	IgG1	EIA, WB
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	3IF18	InB213	IgG1	EIA, WB
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	3IF18	2/3	IgG2a	EIA, WB, IF
Anti-Influenza Virus B (nucleoprotein)	RIF17	R2/3	IgG2a	体外生产, EIA, WB

## 2.2. 抗乙型流感基质蛋白M1单克隆抗体

宿主动物: 小鼠Ba1b/c  
 融合用细胞系: Sp2/O  
 免疫原: 提纯的乙型流感病毒  
 特异性: 乙型流感病毒的基质蛋白M1  
 提纯方法: 蛋白A亲和层析  
 物理状态: 溶于含0.1%叠氮化钠的PBS

### 2.2.1. 乙型流感基质蛋白M1 ELISA检测

在直接和间接ELISA中用InB4检测乙型流感基质蛋白M1。其中一个单抗的滴定曲线见图14。

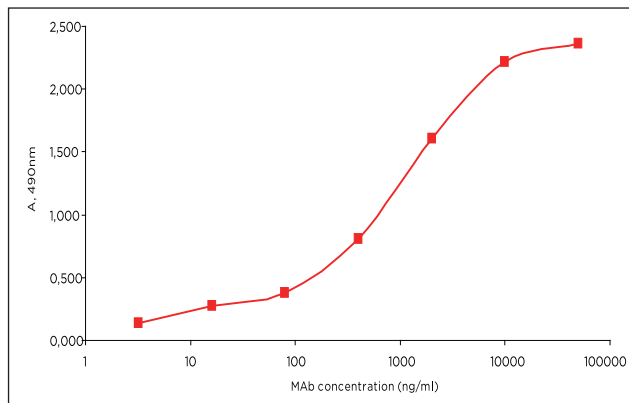


图14. 在间接ELISA中, 乙型流感病毒基质蛋白M1特异性抗体Mab InB4的滴定曲线。  
 抗原: Influenza B/Tokyo/53/99 - 0.5 μg/孔

订购信息:

产品名称	货号	克隆号	亚型	应用
Anti-Influenza Virus B (matrix protein M1)	3BM17	InB4	IgG1	EIA, WB