

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200710051442.9

[51] Int. Cl.

*C12N 1/21 (2006.01)*  
*G01N 33/68 (2006.01)*  
*G01N 33/577 (2006.01)*  
*G01N 33/569 (2006.01)*  
*G01N 33/53 (2006.01)*  
*C07K 16/18 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2009 年 8 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 100526452C

[51] Int. Cl. (续)

*A61K 35/74 (2006.01)*

*A61K 39/02 (2006.01)*

*C12R 1/19 (2006.01)*

[22] 申请日 2007.1.31

[21] 申请号 200710051442.9

[73] 专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街 1 号

[72] 发明人 毕丁仁 胡思顺 郑兴华 王喜亮

张万坡 肖运才 刘梅 李自力

石德时 许青荣 金秀娥

[56] 参考文献

CN1286971C 2006.11.29

CN1704474A 2005.12.7

口蹄疫病毒非结构蛋白 3B 基因的克隆表达及 3B-ELISA 鉴别诊断方法的初步建立. 阮力, 钱平, 何启盖, 王贵平, 刘正飞, 陈焕春. 中国兽医学报, 第 25 卷第 5 期. 2005

审查员 王莉

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所

代理人 王敏锋

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图 4 页

[54] 发明名称

一种鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒及应用

[57] 摘要

本发明属于动物免疫技术领域, 具体涉及一种鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒及其应用。该试剂盒包含盒体、设在盒体内的酶标板、试纸条和样品稀释液。其中的试纸条是由样品垫、吸收垫、涂覆有金标记抗鸡 IgG Fc 单克隆抗体的金标垫、包被有禽流感病毒重组非结构蛋白 NS1 的检测线和包被有抗鼠 IgG 的质控线的硝酸纤维素膜, 依次按吸收垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫的顺序粘贴在不吸水的支撑薄片上构成。本发明还公开了一种表达重组 NS1 蛋白的重组大肠杆菌 BL21/pKG-NS1 (保藏号为 CCTCC NO: M207007) 的制备。本发明的试剂盒具有操作简便, 诊断快速、准确, 费用低的显著优点。

---

1、一种表达禽流感病毒重组非结构蛋白 NS1 的重组大肠杆菌 BL21/pKG-NS1, 保藏在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 其保藏号为 CCTCC NO: M207007。

2、权利要求 1 所述的重组大肠杆菌在制备鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒中的应用。

## 一种鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒及应用

### 技术领域

本发明属于免疫应用领域，涉及动物分子生物学、免疫学等相关领域。具体地讲是一种借助胶体金标记显色的免疫层析反应，用于鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的快速鉴别诊断。

### 背景技术

众所周知，禽流感、新城疫、法氏囊、传染性支气管炎、传染性喉气管炎、马立克、减蛋综合症等疫病是危害全球养禽业的重要疫病，其中尤以禽流感为甚。2004年以来，亚洲部分国家和地区相继发生了H5N1亚型高致病性禽流感，我国也未能幸免，给我国养禽业造成了巨大的经济损失，因此我国政府对禽流感的防制高度重视，并相继提出了一系列的防制措施，要求对家禽进行禽流感疫苗免疫，但随着禽流感灭活疫苗的广泛使用，也增加了禽流感的监测难度，容易产生假阳性，因此，建立一种能区别鸡禽流感病毒野毒感染与疫苗免疫的鉴别诊断方法是一个亟待解决的问题。

流感病毒的基因组为单股负链RNA，含有大小不同的8个独立的RNA片段，其第8片段为非结构蛋白基因，编码非结构蛋白NS1和NS2。NS1蛋白存在于病毒感染的细胞中，但在毒粒中却检测不到NS1蛋白。在细胞感染的早期，可发现细胞核内有大量的NS1蛋白存在，在感染的晚期，NS1蛋白可以在细胞浆中出现。NS1蛋白可刺激机体产生非结构蛋白抗体。研究表明，非结构蛋白及其抗体可以作为病毒感染机体的一个重要标记。

胶体金免疫层析分析(gold-immunochromatography assay GICA)是20世纪80年代发展起来的一项新的免疫分析方式，是应用胶体金标记技术，以胶体金作为示踪物，应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。它具有简便，快速，特异性强，费用低的优点。依据胶体金免疫层析技术，在国内外无论人医应用方面，还是兽医应用方面，都已经研制出了多种胶体金免疫层析快速检测试纸条。

检索现有文献对于禽流感病毒抗原、抗体检测及胶体金免疫层析技术，已经公开了几项发明专利及申请，如专利号：ZL200410088716.8的文献“一种检测H5N1亚型禽流感病毒的方法及其专用试剂盒，专利申请号为200510042631.0的“禽流感病毒抗原检测方法及其金标快速诊断试剂盒和制备方法，专利申请号为200510057023.7的文献“禽流感免疫胶体金诊断试

纸条和测试卡”公开了几种检测禽流感病毒抗原的制备方法，但未涉及禽流感抗体的检测；申请号为200610089463.5 “禽流感病毒(H5N1亚型)血清抗体的aGST-ELISA检测方法和专利号为ZL2005 10011521.8 的文献“一种单克隆抗体，包含该单克隆抗体的检测试剂盒及应用”公开了禽流感病毒血清抗体检测方法，但未涉及禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的鉴别诊断技术；专利申请“鉴别诊断禽流感自然感染鸡群酶联免疫吸附试验的方法（申请号为200510027316.0）”、和“一种禽流感病毒非结构蛋白基因NS1及其制备方法与应用（专利号为ZL 200410009157.7）”及“一种检测禽流感病毒自然感染的试剂盒及其制备方法(申请号为200310117066.0)”公开了用于禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的鉴别诊断的ELISA方法，但未涉及胶体金免疫层析技术。本发明利用胶体金免疫层析技术及禽流感病毒重组非结构蛋白NS1和一种抗鸡IgG Fc单克隆抗体制备了一种鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒，该试剂盒能特异灵敏地检测出禽流感病毒野毒感染抗体，而疫苗免疫抗体检测不出，从而实现鸡禽流感病毒野毒感染和疫苗免疫的鉴别诊断。

#### 发明内容

本发明的第一个目的是制备一种表达禽流感病毒重组非结构蛋白 NS1 的重组大肠杆菌 BL21/pKG-NS1，为检测鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染鉴别诊断试剂盒提供核心抗原。

本发明的第二个目的是组装一种用于鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒。

本发明的总体技术路线图见图 1 所示。

本发明是这样实现的：

申请人制备了一种禽流感病毒重组非结构蛋白 NS1，它包括下列步骤：

(1)以自主分离鉴定的禽流感病毒基因组为模板（见实施例），通过 RT-PCR 方法扩增得到禽流感病毒非结构蛋白基因 NS1 的 cDNA 序列；

(2)在将禽流感病毒非结构蛋白基因 NS1 的 cDNA 序列与表达载体 pGEX-KG 连接，构建重组表达载体 pKG-NS1；

(3)将重组表达载体 pKG-NS1 转入大肠杆菌的感受态细胞 BL21 (DE3)，得到表达禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的重组大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21/ pKG-NS1（该大肠杆菌已于 2007 年 1 月 26 日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC)，保藏编号为 CCTCC NO: M207007)，用 50 μg/mL 氨苄青霉素抗性筛选单个重组菌。诱导该菌株，得到特异表达的重组禽流感病毒非结构蛋白 NS1；

(4)亲和层析纯化所表达的重组 NS1 蛋白，得到本发明所需要的高纯度的重组 NS1 蛋白。

利用保藏编号为 CCTCC—C200501 的杂交瘤细胞系 BDRPDP 分泌抗鸡 IgG Fc 片断的单克隆抗体和上述步骤制备的重组非结构蛋白（NS1 蛋白）作为核心试剂，构建用于鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒。

本发明的试剂盒是由盒体和包含在盒体内的酶标板（例如 96 孔或 48 孔）、试纸条和样品稀释液（8% 盐水）组成。其中试纸条（结构图如图 2、3 所示）是本发明的试剂盒的核心。

本发明的试纸条是由吸收垫（1）、硝酸纤维素膜（2）、金标垫（3）、样品垫（4）按图示的顺序依次粘附在不吸水的支撑薄片（7）上组装而成的。金标垫上涂覆有金标记抗鸡 IgG Fc 单克隆抗体；硝酸纤维素膜上包被有检测线（5）和质控线（6），其中检测线为本发明制备的禽流感病毒重组非结构蛋白（NS1 蛋白），质控线为本发明制备的抗鼠 IgG 抗体。样品稀释液为 8% 盐水。所述硝酸纤维素膜、吸收垫、金标垫、样品垫、不吸水的支撑薄片均购自 Millipore 公司。所述亲和层析柱购自 Amersham Biosciences 公司。

本发明的原理是选用亲和层析纯化的对鸡禽流感病毒野毒感染抗体有特异性的重组非结构蛋白（NS1 蛋白）作为检测线，抗鸡 IgG Fc 片断单克隆抗体作为胶体金标记的抗体，利用间接法【Shyu RH 等， Colloidal gold-based immunochromatographic assay for detection of ricin J Toxicon 2002,40(3):255-258】来检测被检材料中是否含有鸡禽流感病毒野毒感染抗体。检测时，样品中所有的鸡 IgG 分子的 Fc 先和金标记抗鸡 IgG Fc 单克隆抗体结合，由于毛细管作用，反应复合物沿包被膜向前泳动，若样品中有抗鸡禽流感病毒野毒感染的特异性抗体，到达检测线时，遇到包被在硝酸纤维素膜上的重组非结构蛋白（NS1 蛋白），就会形成 NS1 蛋白-抗体-金标记单克隆抗体复合物，从而富集在检测线上，形成红色沉淀线；不是抗鸡禽流感病毒野毒感染的非特异性抗体形成的抗体-金标记的单克隆抗体复合物则通过检测线，富集在质控线上，形成红色沉淀线，判为阳性结果。若样品中不含有鸡禽流感病毒野毒感染抗体，反应复合物到达检测线时，遇到捕获抗原就不会形成 NS1 蛋白-抗体-金标记单克隆抗体复合物，反应复合物通过检测线，富集在质控线上，形成红色沉淀线，判为阴性结果。

本发明优点：

1、本发明的优点之一是生物安全性高。本发明所涉及到的表达载体 pGEX-KG 是分子生物学中常用的表达载体，没有生物危险性，在此基础上构建的表达载体 pKG-NS1 也没有任何生物危险性。重组大肠杆菌 BL21/ pKG-NS1 是将表达载体 pKG-NS1 转化至分子生物学中常用的大肠杆菌 BL21 感受态细胞后经氨苄青霉素抗性筛选获得，也不具生物危险性。本发明中的试纸条检测线包被的是本发明制备的禽流感病毒重组非结构蛋白，制备过程中不涉及禽流感活病毒，因此没有禽流感活病毒逃逸、扩散的潜在危险。

2、本发明的优点之二是生产成本低。本发明所提供的禽流感鉴别诊断方法和诊断试剂盒所需的核心试剂是抗鸡 IgG Fc 单克隆抗体与禽流感病毒重组非结构蛋白 (NS1 蛋白)。抗鸡 IgG Fc 单克隆抗体可以通过将分泌抗鸡 IgG Fc 片断的单克隆杂交瘤细胞系(保藏编号为 CCTCC -C200501)注射 Balb/C 小鼠腹腔, 诱生腹水, 通过经济的辛酸-硫酸铵方法纯化而大量获得。NS1 蛋白可以通过重组大肠杆菌 BL21/pKG-NS1 在体外得到大量的表达, 适合大规模的生产。

3、与已公开的用于禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的鉴别诊断的 ELISA 方法相比, 本发明的禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断方法具有许多 ELISA 方法所不能比拟的优点, 如检测快速 (10min); 不需要任何特殊仪器、设备, 可用于现场操作; 操作简便, 只需一步反应, 不需由专业人员操作; 检测成本低; 检测过程中只需一种试剂 (8%NaCl), 对人体无危害, 对环境无污染; 储存方便, 对温度要求不高, 在 4℃下有效保存期可达一年; 在室温下可保存六个月 (表 1)。

表 1 本发明的胶体金免疫层析快速鉴别诊断方法与已公开的 ELISA 方法的比较

ELISA 方法	本发明方法 (胶体金免疫层析方法)
特异性强, 灵敏度高	特异性强, 灵敏度高
检测时间长 (2-4h)	检测快速 (10min)
需要酶标仪等设备, 不适合现场操作	不需要任何特殊仪器、设备, 可用于现场操作
操作烦琐, 需要多步反应, 需由专业人员操作;	操作简便, 只需一步反应, 不需由专业人员操作;
检测成本较高	检测成本低
检测过程中需多种试剂, 尤其是联苯二胺(TMB), 有害人体, 污染环境。	检测过程中只需一种试剂 (8% NaCl), 对人体无危害, 对环境无污染。
储存于 4℃, 室温保存期很短。	储存方便, 对温度要求不高, 在 4℃下有效保存期可达一年; 在室温下可保存六个月。

#### 附图说明

图 1: 本发明的总体技术路线图

图 2: 本发明试纸条的侧视图, 图中:

1 为吸收垫, 2 为硝酸纤维素膜, 3 为金标垫, 4 为样品垫, 5 为检测线, 6 为质控线, 7 为不吸水的支撑薄片条

图 3: 本发明试纸条的俯视图, 图中:

1 为吸收垫, 2 为硝酸纤维素膜, 3 为金标垫, 4 为样品垫, 5 为检测线, 6 为质控线, 7 为不吸水的支撑薄片条

图 4: 本发明涉及的 NS1 重组蛋白表达质粒的构建图

图 5: 本发明检测试纸条结果判定示意图, 图中:

1 为阳性结果, 2 为阴性结果, 3、4 为试纸条失效。

## 具体实施方式

### 实施例 1

#### 1、单克隆抗体的制备与纯化

将本申请人自己制备的分泌抗鸡 IgG Fc 片断的单克隆杂交瘤细胞系(保藏编号为 CCTCC-C200501) 注射 Balb/C 小鼠腹腔, 诱生腹水, 生产单克隆抗体。单克隆抗体纯化参照朱立平等《免疫学常用实验方法》人民军医出版社 2000 版中的方法: 取所得的小鼠腹水 5 ml 与适量的二氧化硅混合, 加入等体积的巴比妥缓冲液, 室温振荡 1 h 后, 室温静置 30 min, 取上清于洁净离心管中, 4°C, 3000 r/m 离心 10 min; 取上清液 8 ml, 加入 16 ml 0.06mol 醋酸钠缓冲液, 用 HCL 调 pH 值至 4.5, 充分搅拌下缓缓加入辛酸 132 $\mu$ l 后, 室温搅拌 30 min, 然后转入 4°C 冰箱充分沉淀 2 h, 4°C, 15000 r/m 离心 30 min, 得上清液 22 ml, 加入 2.2 ml 0.1M 的磷酸缓冲液, 用 NaOH 调 pH 值至 7.6, 搅拌下缓缓加入硫酸铵至终浓度为 0.277 g/ml 4°C 冰箱充分沉淀 2h 后, 4°C, 12000 r/m 离心 30 min, 弃上清, 沉淀用 5 ml 0.1M 的磷酸缓冲液重悬, 装入透析袋, 对 5000 ml 0.01M pH7.2 磷酸盐缓冲液 (PBS) 充分透析后, 再对 2000 ml 蒸馏水透析, 最后对 3000 ml 三蒸去离子水透析, 将充分透析好的蛋白溶液用聚乙二醇-20000 (PEG-20000) 浓缩至 3 ml, 然后 4°C, 12000 r/m 离心 30 min, 弃沉淀, 收集上清液, 测得蛋白浓度为 1.6 mg/ml。经 SDS-PAGE 电泳鉴定为纯化的单克隆抗体, 纯度为 98%。以该单克隆抗体作为鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的鉴别诊断的核心试剂。

### 实施例 2

重组鸡禽流感病毒 NS1 蛋白的制备:

制备方法参见文献: 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 主编(金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 第二版, 北京科学出版社, 1992 中提供的方法进行。

#### 1、NS1 基因的克隆与测序

本发明所涉及的 NS1 基因是申请人自己克隆得到的, NS1 基因的克隆与测序具体方法是: 用申请人所在的微生物与免疫实验室分离得到的一株禽流感毒株 A/chicken/China/HSS2004(H9N2)【GeneBank 登录号为 AY788915, 病毒的分离和鉴定见文献: 李自力等 湖北

省禽流感的诊断及病毒株的分离与初步鉴定, 中国预防兽医学报, 2001, 23(3): 146-148】尿囊腔接种AIV于9-11日龄健康鸡胚, 弃24h前死胚, 收集24-96h的鸡胚尿囊液; 4℃条件下4,000 rpm离心30 min, 取上清; 4℃条件下30,000rpm离心60min浓缩病毒。用灭菌的pH 7.2的PBS (PBS由焦碳酸二乙脂(DEPC)处理水配制。DEPC处理水的制备: 在去离子水中加入0.1% DEPC, 37℃过夜。)溶解沉淀, 分装后-70℃保存备用。设计特异引物扩增NS1基因。上游引物P1: GAATTCTAATGGATTCCAACACTGTGTCAAGC; 下游引物P2: CTCGAGAACTTCTGACTCAATTGTTCTCGC。两引物之间包含有NS1基因完整的阅读框架。P1中引入了*EcoRI*位点, P2加入了*XhoI*位点, 两酶切位点用下划线标出。取100μl适量病毒悬液提取RNA, 参照RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1试剂盒 (TaKaRa 产品) 中提供的方法扩增出cDNA, 采用UNI-Q-10柱式DNA胶回收试剂盒(E. Z. N. A公司产品)回收纯化RT-PCR扩增产物, 将回收的RT-PCR产物直接与克隆载体pMD18-T (TaKaRa公司产品)的进行连接, 然后将连接产物转化到大肠杆菌DH5α的感受态细胞中, 涂布含50 μg/mL氨苄青霉素的LB琼脂平板37℃培养过夜, 用α互补检查转化效果。挑取阳性克隆增殖后, 采用碱裂解法提取重组质粒DNA, 并对重组质粒DNA进行鉴定。将鉴定正确的重组质粒命名为pMD-NS1, 并送中国上海英俊生物技术公司进行测序, 然后将序列测定结果与GeneBank中的有关数据进行同源性比较和分析。

## 2、表达载体 pKG-NS1 的构建

pMD-NS1用*EcoRI*和*XhoI*酶切后, 回收0.7kb左右的片段, 然后将此片段与用同样的酶酶切的表达载体pGEX-KG连接, 构建重组表达载体。重组表达载体转化新鲜制备的DH5α感受态细胞, 并将转化菌涂布含50 μg/mL氨苄青霉素的LB琼脂平板37℃培养过夜。挑数个单菌落培养过夜后用碱裂解法(分子克隆实验指南(第二版), 萨姆布鲁克J, 弗里奇EF, 曼尼阿蒂斯T主编(金冬雁, 黎孟枫等译)小量制备质粒, 进行酶切分析和PCR扩增鉴定。将得到的阳性克隆命名为pKG-NS1。对阳性克隆用碱裂解法大量制备质粒DNA, 并分装冻存于-20℃。重组表达质粒pKG-NS1构建流程如图4所示。

## 3、NS1蛋白的表达

将构建好的表达质粒pKG-NS1转入大肠杆菌BL21(DE3)的感受态细胞中, 涂布到含有氨苄青霉素(50 μg/mL)的LB平皿上, 37℃培养16-18h。挑取数个单菌落于加有相应抗生素的3mL LB中培养过夜。将过夜培养物按比例1:50稀释入新鲜的LB培养基中, 37℃中振荡培养(250-300rpm)到OD<sub>600</sub>=0.5-0.8时, 加入终浓度为1mmol/L异丙基硫代-β-D-半乳糖苷(IPTG), 继续培养诱导表达5h。4℃条件下8,000rpm离心15min, 收集细菌。细菌用0.01M pH 7.2磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤一次后离心, 反复快速冻融3-4次, 用缓冲液(配方:

50.0mmol/L NaCl, 50.0mmol/L Tris-Cl, 0.5mmol/L EDTA, 5%甘油, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇 (DDT)重悬后在冰浴中超声 (250W, 超声 5s, 间歇 5s, 工作 20min) 破碎。4℃条件下 12,000 rpm 离心 15min, 弃沉淀, 将上清对 0.01M pH7.2 PBS 进行充分透析后浓缩至原菌液体积的 1/10, 按蛋白纯化柱 (HiTrap affinity columns, Amersham Biosciences 公司产品) 说明书提供的程序进行亲和层析纯化, 得到纯化的重组 NS1 蛋白。该蛋白可用于制备鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的鉴别诊断的核心试剂。

### 实施例 3

兔抗鼠 IgG 抗体的制备:

参见何昭阳等主编,《动物免疫学实验技术》 长春, 吉林科学技术出版社 (2002 版) 教导的方法, 提取 Balb/C 小鼠 IgG 免疫健康家兔, 制备高特异性、高效价的兔抗鼠 IgG 高免血清, 对高免血清采用饱和硫酸铵沉淀法进行粗提, 经 G-200 过柱后得到高纯度的兔抗鼠 IgG 抗体。利用该抗体可作为质控线。

### 实施例 4

硝酸纤维素膜的制备

1、包被缓冲液的配制: 含 6%甲醇的 0.01M pH 7.2 PBS 缓冲液为包被缓冲液, 0.22 $\mu$ 膜滤过, 置 4℃备用, 有效期一周。1000 ml 6%甲醇的 0.01M pH 7.2PBS 缓冲液配方: NaCl 8g, KCl 0.2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2g, 甲醇 60 ml, 双蒸去离子水定容至 1000 ml。

2、硝酸纤维素膜的制备: 用包被缓冲液将 NS1 蛋白稀释到 1.0~1.5mg/ml, 调整机器, 划线为 T 线, 即为检测线, T 线靠近金标垫端, 距金标垫端约 5 mm; 用包被缓冲液将兔抗鼠 IgG 抗体稀释到 0.5~1.0mg/ml, 调整机器, 划线为 C 线, 即为控制线, C 线靠近吸收垫, 距吸收垫约 3 mm。两线距离 5~8 mm, 线应细致、均匀。37℃烘干, 封装备用。

### 实施例 5

胶体金、金标记单克隆抗体的制备

#### 1、溶液的配制

(1) 氯金酸的配制: 用双蒸去离子水溶解氯金酸, 配成 1%溶液, 置 4℃备用, 有效期四个月。1000 ml 1%氯金酸溶液配方: 10g 氯金酸; 双蒸去离子水定容至 1000 ml。

(2) 柠檬酸三钠的配制: 用双蒸去离子水溶解柠檬酸三钠, 配成 1%溶液, 0.22 $\mu$ 膜滤过, 置 4℃备用, 现配现用。

(3) 0.1M 碳酸钾的配制: 用双蒸去离子水配制, 0.22 $\mu$ 膜滤过, 置 4℃备用, 有效期四个月。1000 ml 0.1M 碳酸钾溶液配方: 13.8g 碳酸钾; 双蒸去离子水定容至 1000 ml。

(4) 2% PEG-20000 的配制：用双蒸去离子水配制，0.22 $\mu$ 膜滤过，置 4℃ 备用，有效期四个月。1000ml 2% PEG-20000 溶液配方：20g PEG-20000；双蒸去离子水定容至 1000 ml。

(5) 标记洗涤保存液的配制：2%牛血清白蛋白（BSA），0.05%叠氮钠（NaN<sub>3</sub>），0.01M pH 7.2 PBS 溶液，0.22 $\mu$ 膜滤过，置 4℃ 备用，有效期四个月。1000 ml 标记洗涤保存液配方：20g BSA，0.5g NaN<sub>3</sub>，0.01M pH 7.2 PBS 溶液定容至 1000 ml。

## 2、胶体金的制备：

用双蒸去离子水将 1%氯金酸稀释成 0.01%，置电炉煮沸，按每 100 ml 0.01%氯金酸加入 2 ml 1%柠檬酸三钠，继续煮沸，直到液体呈亮红色即停止加热，冷却至室温后补足失水。制备好的胶体金外观应纯净、透亮、无沉淀和漂浮物，有效期一周。

## 3、胶体金标记单克隆抗体的制备：

用 0.1M 碳酸钾调胶体金的 pH 值至 8.2，按 8~10 $\mu$ g 抗体/ml 胶体金加入抗鸡 IgG Fc 单克隆抗体，磁力搅拌器混匀 30 min，搅拌下加入 BSA 至终浓度为 1%，静置 1h。10000 rpm、4℃ 离心 30min，弃上清，沉淀用标记洗涤保存液洗涤两次，用十分之一初始胶体金体积的标记洗涤保存液将沉淀重悬，置 4℃ 备用，有效期一周。

## 实施例 6

### 金标垫的制备

#### 1、封闭液的配制：

2% BSA，0.05% NaN<sub>3</sub>，0.3%聚乙烯吡咯烷酮 K30，2.5%蔗糖，0.01M pH 7.2 PBS 溶液，0.22 $\mu$ m 微孔滤膜滤过，置 4℃ 备用，有效期一个月。1000 ml 封闭液配方：20g BSA，0.5g NaN<sub>3</sub>，3g 聚乙烯吡咯烷酮 K30，25g 蔗糖，0.01M pH7.2PBS 溶液定容至 1000 ml。

#### 2、金标垫的制备：

将金标垫浸泡于封闭液中 30 min 后，于 37℃ 烘干。然后将制备好的金标记抗体均匀的铺在金标垫上，每毫升溶液铺 20 平方厘米，冷冻干燥，封装，置 4℃ 备用。

## 实施例 7

### 试纸条样品垫的制备

#### 1、封闭液的配制：

2% BSA，0.05% NaN<sub>3</sub>，0.3%聚乙烯吡咯烷酮 K30，2.5%蔗糖，0.01M pH 7.2 PBS 溶液，0.22 $\mu$ m 微孔滤膜滤过，置 4℃ 备用，有效期四个月。1000 ml 封闭液配方：2% BSA，0.05% NaN<sub>3</sub>，0.3%聚乙烯吡咯烷酮 K30，2.5%蔗糖，0.01M pH7.2PBS 溶液定容至 1000 ml。

#### 2、样品垫的制备：

将样品垫浸泡于封闭液中 30 min 后，于 37℃ 烘干，封装，置 4℃ 备用。

### 实施例 8

#### 试纸条的组装

将硝酸纤维素膜、玻璃纤维、吸收垫、样品垫按图依次层叠起来，切成 3mm 宽的小条。每十小条一包，加入干燥剂，真空封装。4~8℃ 保存，有效期一年；常温保存，有效期 6 个月。

### 实施例 9

鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒组成

1、鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒包括：

- |                 |            |
|-----------------|------------|
| ①、试纸条           | 一包（10 条/包） |
| ②、样品稀释液         | 一瓶（10ml/瓶） |
| ③、带底座的 96 孔酶标板条 | 一条（12 孔/条） |

#### 2、相关溶液的配制

样品稀释液：样品稀释液为 8% NaCl 溶液。配制方法：80g NaCl，加蒸馏水定容至 1000 ml。

### 实施例 10

本发明试剂盒的使用方法：

1、样品制备：鸡血清样品的制备，取 5 μl 待检血清置于酶标板孔内，用 8% 盐水稀释至 100 μl；或者将血清样品用 8% 盐水稀释 20 倍后，取 100 μl 置于酶标板孔内。

2、检测：取出试剂盒，室温平衡 20min；打开包装袋，取出试纸条，将试纸条的样品垫端浸入制备好的样品中，10min 内判定结果。

3、结果判定：如图 5 所示，当试纸条出现肉眼可见的紫红色质控线，没有出现肉眼可见的紫红色检测线，结果判为阴性，记为“—”；当试纸条出现肉眼可见的紫红色质控线，同时也出现肉眼可见的紫红色检测线，结果判为阳性，记为“+”；检测线颜色越深说明被检测样品的抗体水平越高；当试纸条没出现肉眼可见的紫红色质控线，不管有没有出现肉眼可见的紫红色检测线，结果都判为检测试纸条失效，应废弃。

### 实施例 11

鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒的制备及应用

1、鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒的制备

按实施例 1-10 的方法制备鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒。

## 2、鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒的应用

### ①动物试验——禽流感野毒感染鸡和疫苗免疫鸡血清样品的制备

将 25 只非免疫健康鸡平均分成五组，每组五只。用申请人所在的兽医微生物与免疫学实验室分离得到的一株禽流感毒株 A/chicken/China/ HSS2004(H9N2)，【GencBank 登录号为 AY788915，病毒的分离和鉴定见文献：李自力等 湖北省禽流感的诊断及病毒株的分离与初步鉴定，中国预防兽医学报，2001，23(3)：146-148】尿囊腔接种于 9-11 日龄健康鸡胚，弃 24h 前死胚，收集 24-96h 的鸡胚尿囊液，血凝价为  $2^6$ ，在实验室隔离条件下，分别对一、二、三组的非免疫健康鸡进行禽流感病毒弱毒肌肉接种，接种剂量分别为 0.6ml $10^{10}$  倍稀释的尿囊液/只、0.8ml $10^{10}$  倍稀释的尿囊液/只、1ml $10^{10}$  倍稀释的尿囊液/只，分别于第 11 天、第 18 天、第 30 天翅静脉采血制得血清，平均血凝抑制价第 11 天分别为  $2^{6.6}$ ， $2^{6.6}$ ， $2^{7.2}$ ，第 18 天分别为  $2^{7.2}$ ， $2^{7.5}$ ， $2^{7.8}$ ，第 30 天分别为  $2^5$ ， $2^4$ ， $2^{6.25}$ ；分别对第四组的非免疫健康鸡进行禽流感油乳剂灭活苗肌肉接种，分别于第 18 天、第 30 天翅静脉采血制得血清，平均血凝抑制价分别为  $2^6$ ， $2^7$ ；第五组为空白对照。

### ②特异性试验

分别将上述自制的禽流感野毒感染鸡血清、禽流感疫苗免疫鸡血清及标准的鸡新城疫 (ND) 阳性血清、鸡传染性支气管炎 (IB) 阳性血清、鸡传染性法氏囊 (IBD) 阳性血清、SPF 鸡阴性血清（以上各标准血清均购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所）按实施例 8 所述本发明方法 (GICA) 进行试验。结果见表 2。表 2 显示，本发明检测试纸条禽流感野毒感染鸡血清试验后，质控线及检测线出现明显的紫红色条带；而与生理盐水(空白)、SPF 鸡阴性血清、标准鸡新城疫病毒 (ND)、鸡传染性法氏囊病毒 (IBD)、鸡传染性支气管炎病毒 (IB) 等阳性血清及禽流感疫苗免疫鸡血清试验后，检测线不出现紫红色条带。这表明本发明试纸条特异性高，与鸡的其他呼吸道疫病病毒抗体无任何交叉反应。

表 2 应用本发明的试剂盒对鸡血清检测结果

检测样品	生理 盐水	SPF 鸡 血清	ND 阳性 血清	IB 阳性 血清	IBD 阳性 血清	禽流感疫苗 免疫鸡血清	禽流感野毒 感染鸡血清
检测结果	—	—	—	—	—	—	+

### ③禽流感野毒感染鸡和疫苗免疫鸡的鉴别诊断

用本发明的试剂盒对来自实施例 11 中动物试验的禽流感病毒 H9N2 感染的第一、二、三组 15 只非免疫健康鸡的 56 份血清，禽流感油乳剂灭活苗免疫的第四组的 5 只鸡的 10 份血清及第五组空白对照的 20 份血清，按实施例 10 所述方法进行检测。结果表明第一、二、三组

禽流感病毒 H9N2 免疫前 15 份血清均为阴性，感染后的 41 份血清中 36 份呈阳性，阳性率为 87.8%；而禽流感油乳剂灭活苗免疫的 10 份鸡血清及空白对照的 20 份血清均为阴性，结果见表 3。结果表明本发明试剂盒可以用来对禽流感野毒感染的鸡进行检测，可以用于鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的鉴别诊断。

表 3 本发明的试剂盒对来自动物试验样品的检测结果

鸡编号 天数	第一组					第二组					第三组					第四组					第五组				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
第 0 天	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-
第 11 天	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-
第 18 天	+	-	+	+	+	-	+	+	+	*	+	+	+	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-
第 30 天	+	+	-	+	-	-	+	*	+	*	*	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注：“+”表示阳性，“-”表示阴性，“\*”表示未采集到血清。第一、二、三组均为禽流感病毒 H9N2 感染组，第四组为禽流感油乳剂灭活苗免疫组，第五组为空白对照组。

#### ④保存期试验

分别将一系列禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒保存于 4℃ 与室温，每隔一个月检测一次。结果表明，4℃ 保存的试剂盒 12 个月内，室温保存的试剂盒 6 个月内，都能够对鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染进行快速（10min 内）、灵敏的鉴别诊断。

尽管本发明的内容是结合本实施例进行说明，但是不能认为是对本发明范围的限制，本发明的范围由所附权利要求书限定。另外，本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内对本发明进行各种改动或修饰，这些改动或修饰形式同样落在本发明的保护范围内。

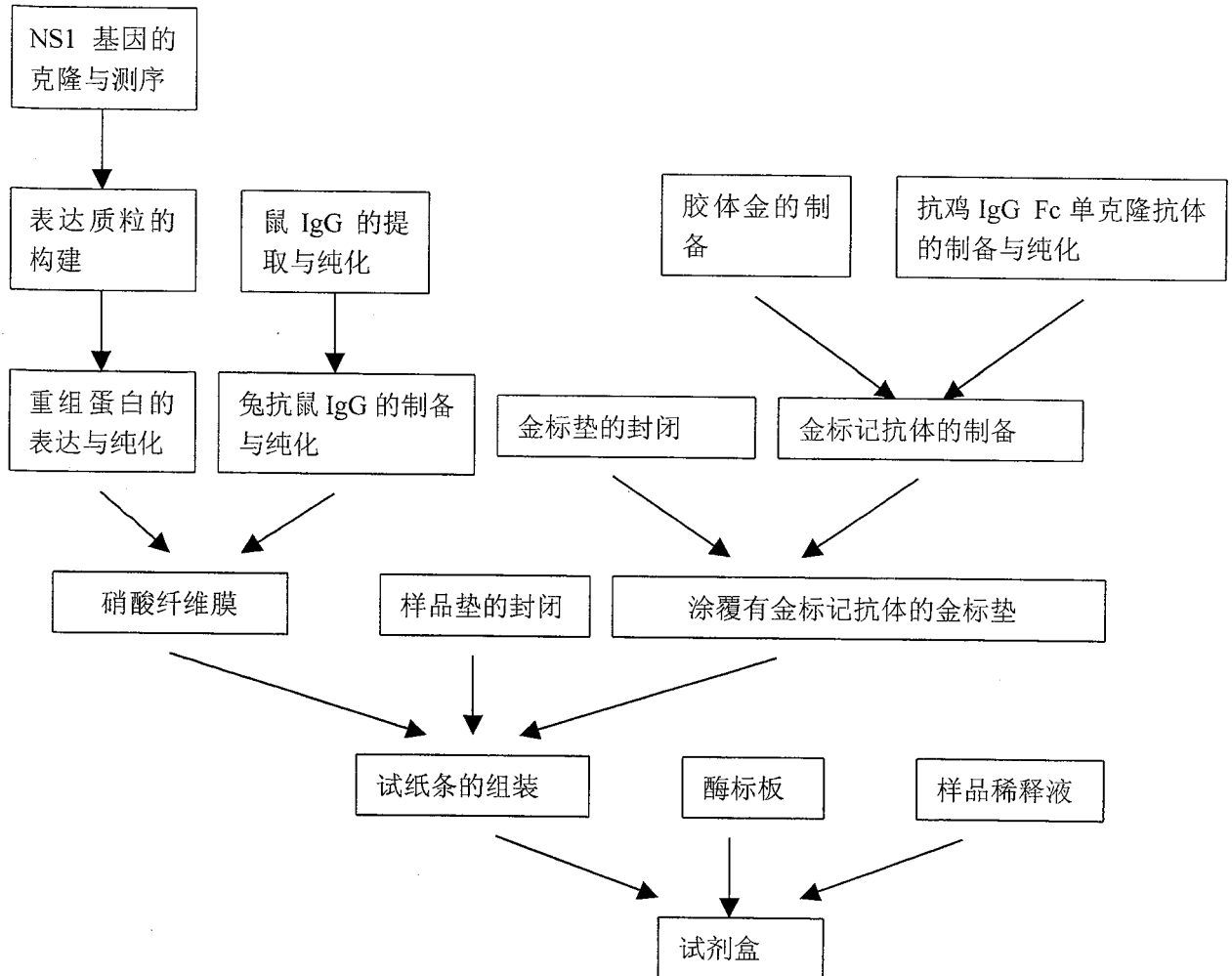


图 1

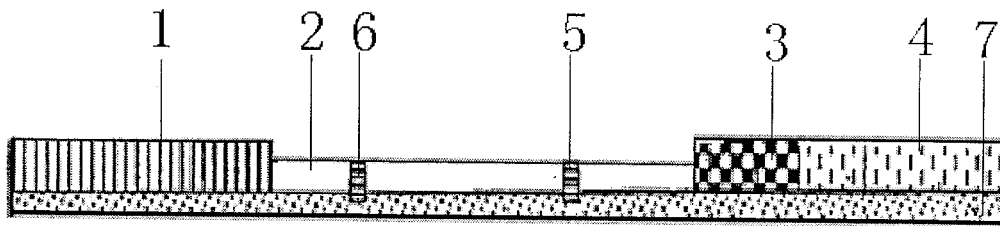


图 2

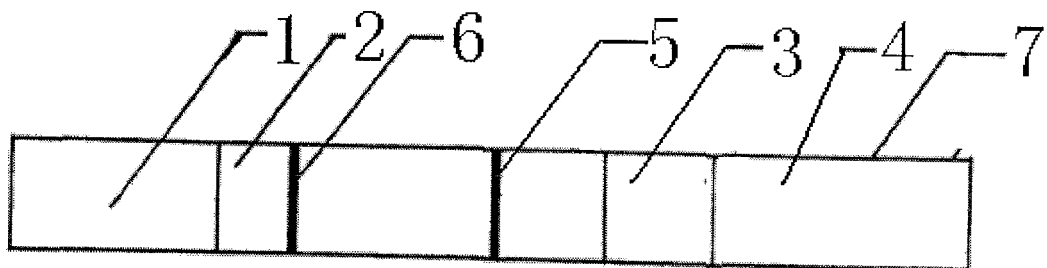


图 3

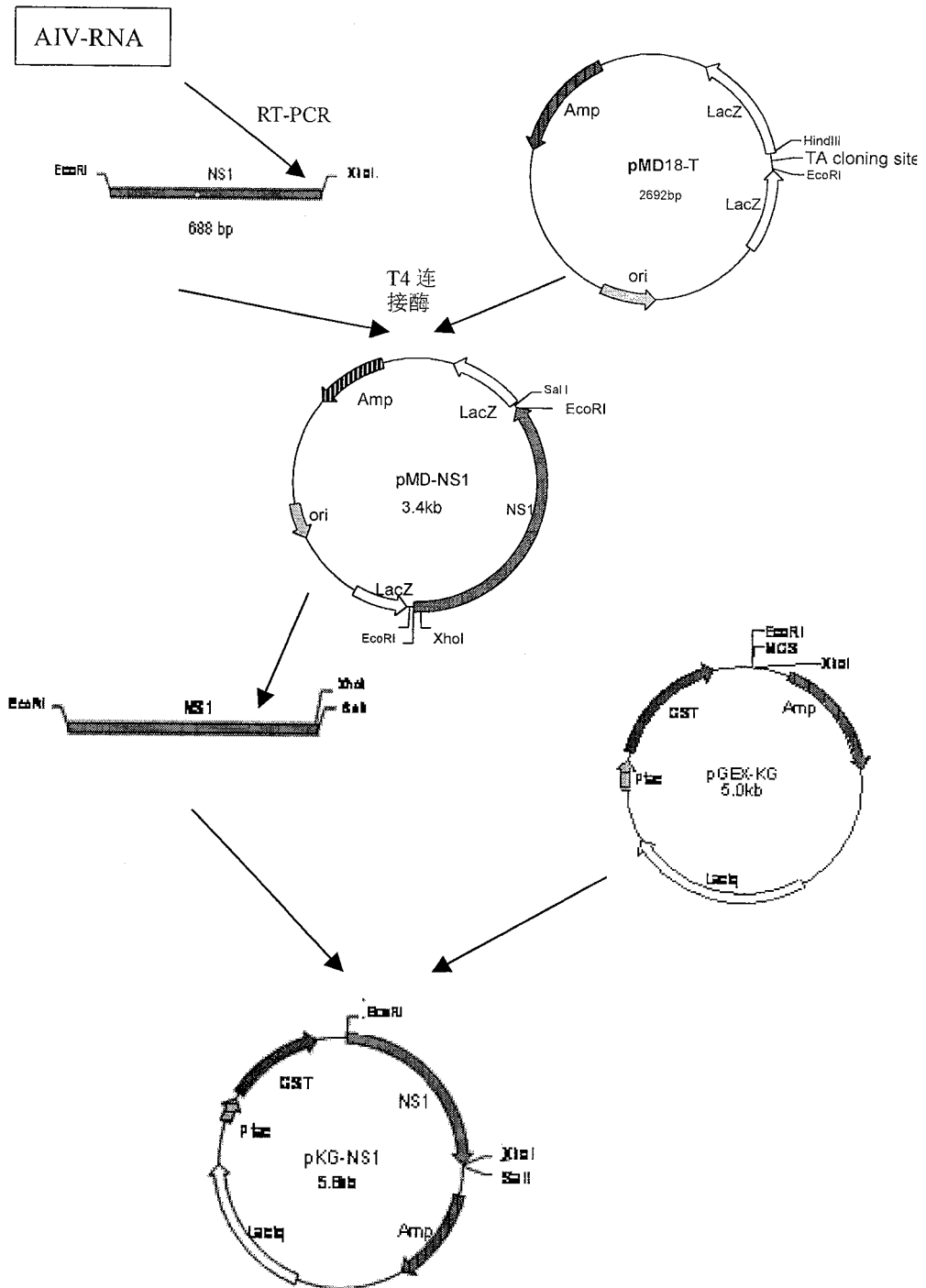


图 4

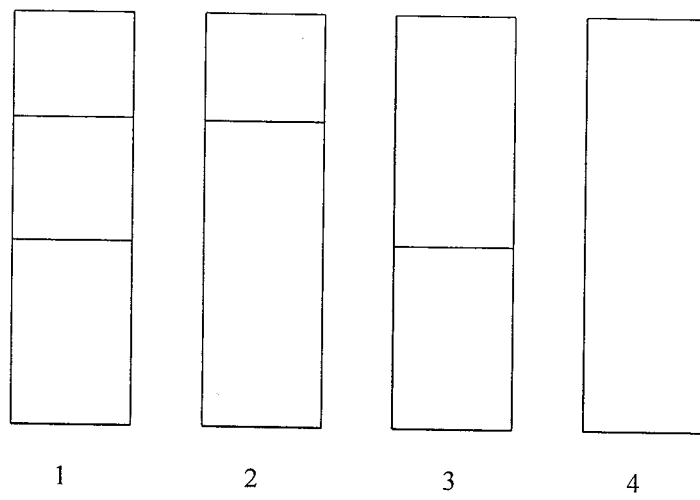


图 5

专利名称(译)	一种鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN100526452C</a>	公开(公告)日	2009-08-12
申请号	CN200710051442.9	申请日	2007-01-31
[标]申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中农业大学		
[标]发明人	毕丁仁 胡思顺 郑兴华 王喜亮 张万坡 肖运才 刘梅 李自力 石德时 许青荣 金秀娥		
发明人	毕丁仁 胡思顺 郑兴华 王喜亮 张万坡 肖运才 刘梅 李自力 石德时 许青荣 金秀娥		
IPC分类号	C12N1/21 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/53 C07K16/18 A61K35/74 A61K39/02 C12R1/19 A61K35/741		
代理人(译)	王敏锋		
审查员(译)	王莉		
其他公开文献	CN101012445A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于动物免疫技术领域，具体涉及一种鸡禽流感疫苗免疫与病毒野毒感染的胶体金免疫层析快速鉴别诊断试剂盒及其应用。该试剂盒包含盒体、设在盒体内的酶标板、试纸条和样品稀释液。其中的试纸条是由样品垫、吸收垫、涂覆有金标记抗鸡IgG Fc单克隆抗体的金标垫、包被有禽流感病毒重组非结构蛋白NS1的检测线和包被有抗鼠IgG的质控线的硝酸纤维素膜，依次按吸收垫、硝酸纤维素膜、金标垫、样品垫的顺序粘贴在不吸水的支撑薄片上构成。本发明还公开了一种表达重组NS1蛋白的重组大肠杆菌BL21/pKG-NS1(保藏号为CCTCC NO : M207007)的制备。本发明的试剂盒具有操作简便，诊断快速、准确，费用低的显著优点。

鸡编号 天数	第一组					第二组					第三组					第四组					第五组				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
第0天	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-
第11天	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-
第18天	+	-	+	+	+	-	+	+	+	*	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
第30天	+	+	-	+	-	-	+	*	+	*	*	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-