



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107589253 A

(43)申请公布日 2018.01.16

(21)申请号 201710793541.8

(22)申请日 2017.09.06

(71)申请人 詹爱军

地址 518010 广东省深圳市福田区福强路
1011号

申请人 深圳市检验检疫科学研究院

(72)发明人 詹爱军 陈枝楠 张婷 谢晋雄

陈峰 陈勇 王飞 李维

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

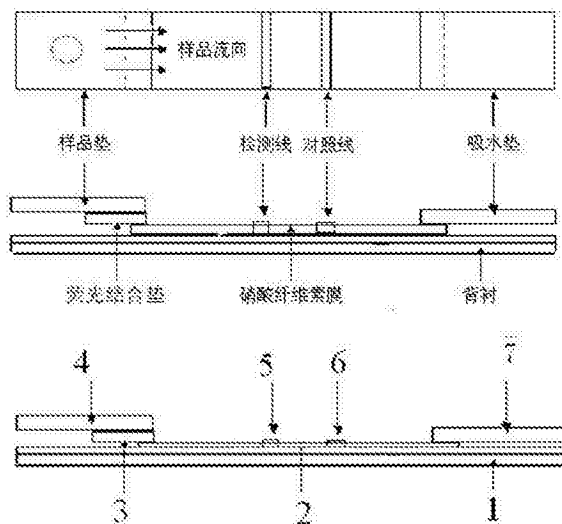
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条及其应用

(57)摘要

一种H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,包括背衬(1)、吸水纸垫(7)、纤维素膜(2)、样品垫(4)、以及喷涂有荧光微球标记H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(2G4)的荧光标记垫;硝酸纤维素膜(2)的上表面从左到右依次设有另一株H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)层及羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白层,其中H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)层上设有检测线(5),羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白层上设有对照线(6)。本发明的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条操作简单,实用性极强,检测效率较高。



1. 一种H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,包括背衬(1)、吸水纸垫(7)、纤维素膜(2)、样品垫(4)、以及喷涂有荧光微球标记H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(2G4)的荧光标记垫,纤维素膜(2)位于背衬(1)上,荧光标记垫(3)的右侧位于纤维素膜(2)上表面的左侧,荧光标记垫(3)的左侧伸出到纤维素膜(2)外,样品垫(4)的左侧位于荧光标记垫(3)上,样品垫(4)的右侧伸出到荧光标记垫(3)外,吸水纸垫(7)的左侧位于纤维素膜(2)上表面的右侧,吸水纸垫(7)的右侧伸出到纤维素膜(2)外;

其中,纤维素膜(2)的上表面从左到右依次设有另一株H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)层及羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白层,其中H9亚型禽流感病毒单抗(1C3)层上设有检测线(5),羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白层上设有对照线(6)。

2. 根据权利要求1所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,其特征在于,所述纤维素膜(2)为硝酸纤维素膜。

3. 根据权利要求2所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,其特征在于,所述硝酸纤维素膜的型号为硝酸纤维素膜140。

4. 根据权利要求2所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,其特征在于,所述纤维素膜(2)的厚度为0.2mm、宽度为3.5mm。

5. 根据权利要求1所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球标记H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(2G4)中荧光微球为平均直径为110nm、羧基修饰的荧光微球。

6. 根据权利要求1所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,其特征在于,所述荧光微球与H9亚型禽流感病毒血凝素单克隆抗体(2G4)的质量比例为5:0.37。

7. 根据权利要求1所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,其特征在于,所述检测线用于划膜的禽流感病毒单克隆抗体(1C3)的包被量为 $0.5\mu\text{l}/\text{cm}\sim 1.5\mu\text{l}/\text{cm}$;质控线用于划膜的羊抗鼠二抗的包被量为 $0.5\mu\text{l}/\text{cm}\sim 1.5\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

8. 根据权利要求1所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,其特征在于,所述检测线用于划膜的禽流感病毒单克隆抗体(1C3)的包被浓度为 $1.0\text{mg}/\text{ml}\sim 2.5\text{mg}/\text{ml}$;荧光微球与H9亚型禽流感病毒血凝素单克隆抗体(2G4)偶联物的喷量为 $2.0\mu\text{l}/\text{cm}\sim 3.0\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

9. 根据权利要求1所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,其特征在于,所述质控线用于划膜的羊抗鼠二抗的浓度为 $0.5\text{mg}/\text{ml}\sim 2\text{mg}/\text{ml}$ 。

10. 一种H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条在检测H9亚型禽流感病毒中的应用,其特征在于,使用权利要求1~9任意一项所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条对样品进行检测:

如在对照线(6)没有条带,则检测无效;如在对照线(6)出现条带,检测线(5)未出现条带,则为阴性;如在对照线(6)出现条带,检测线(5)出现条带,则为阳性。

一种H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于病毒检测领域,具体涉及一种H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条及其应用。

背景技术

[0002] 禽流感(Avian influenza,AI)是由正粘病毒科A型流感病毒引起的禽类高度接触性传染病,有16个HA亚型和10个NA亚型,禽流感病毒(Avian influenza virus,AIV)是养禽业毁灭性疾疾病之一,属于正粘病毒科流感病毒属(Influenza virus),其感染范围较广,根据病毒致病性的不同,可分为高致病性禽流感病毒和低致病性禽流感病毒。低致病性的H9亚型禽流感病毒虽然不引起感染禽类的大量死亡,但是该病毒却在我国造成大范围的流行。我国自1994年首次报道鸡群分离到H9N2亚型AIV以来,H9亚型低致病性AIV广泛存在于我国大部分地区,给我国的养禽业造成巨大经济损失。

[0003] 目前,针对AIV的检测主要是通过病原分离和血清学试验,这些方法耗时、费力,在实际应用中对混合感染的AIV的检测具有一定的局限性。实时荧光定量PCR是将普通PCR方法与荧光检测方法相结合,通过在PCR反应体系中加入能与扩增模板特异性结合、并标有荧光基团的探针,通过荧光积累来实时监测PCR进程,结果可以直接通过电脑实时观察,不需要进行凝胶电泳,样品中相应病毒的含量可以根据荧光曲线的域值估算,实现了实时、定量检测的目的,但所需检测仪器昂贵,实验室条件严苛,不易在基层兽医部门推广。胶体金检测法检测灵敏度太低,很容易造成漏检。因此急需一种能够快速简便、检测成本低、检测效率高、灵敏度高的H9亚型禽流感病毒的检测已经成为行业内的一大问题。

发明内容

[0004] 基于荧光微球的免疫层析检测技术相较胶体金检测灵敏度可提高10倍-100倍,既能实现现场检测,又能够实现超灵敏检测,是取代禽流感胶体金低灵敏检测的必然趋势。通过制订超前的、达到国际领先水平的禽流感病毒系列荧光现场检测标准,可切实提高处置禽流感突发公共事件的能力,将禽流感突发公共事件造成的影响降到最低限度。

[0005] 即,本发明的目的在于提供一种H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条,包括背衬(1)、吸水纸垫(7)、纤维素膜(2)、样品垫(4)、以及喷涂有荧光微球标记H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(2G4)的荧光标记垫,纤维素膜(2)位于背衬(1)上,荧光标记垫(3)的右侧位于纤维素膜(2)上表面的左侧,荧光标记垫(3)的左侧伸出到纤维素膜(2)外,样品垫(4)的左侧位于荧光标记垫(3)上,样品垫(4)的右侧伸出到荧光标记垫(3)外,吸水纸垫(7)的左侧位于纤维素膜(2)上表面的右侧,吸水纸垫(7)的右侧伸出到纤维素膜(2)外;纤维素膜(2)的上表面从左到右依次设有另一株H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)层及羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白层,其中H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)层上设有检测线(5),羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白层上设有对照线(6)。

[0006] 优选地,本发明所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条中,所述纤维素膜(2)为

硝酸纤维素膜。

[0007] 优选地,本发明所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条中,所述硝酸纤维素膜的型号为硝酸纤维素膜140。

[0008] 优选地,本发明所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条中,所述纤维素膜(2)的厚度为0.2mm、宽度为3.5mm。

[0009] 优选地,本发明所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条中,所述荧光微球标记H9亚型禽流感病毒抗体中荧光微球为平均直径为110nm、羧基修饰的荧光微球。

[0010] 优选地,本发明所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条中,所述荧光微球与H9亚型禽流感病毒血凝素单克隆抗体的质量比例为5:0.37。

[0011] 优选地,本发明所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条中,所述检测线喷涂H9亚型禽流感病毒抗体的包被量为 $0.5\mu\text{l}/\text{cm}\sim 1.5\mu\text{l}/\text{cm}$;质控线用于划膜的羊抗鼠二抗的包被量为 $0.5\mu\text{l}/\text{cm}\sim 1.5\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0012] 优选地,本发明所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条中,所述检测线用于划膜的禽流感病毒单克隆抗体(1C3)的包被浓度为 $1.0\text{mg}/\text{ml}\sim 2.5\text{mg}/\text{ml}$;荧光微球与H9亚型禽流感病毒血凝素单克隆抗体(2G4)偶联物的喷量为 $2.0\mu\text{l}/\text{cm}\sim 3.0\mu\text{l}/\text{cm}$ 。

[0013] 优选地,本发明所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条中,所述质控线喷用于划膜的羊抗鼠二抗的浓度为 $0.5\text{mg}/\text{ml}\sim 2\text{mg}/\text{ml}$ 。

[0014] 本发明的另一目的在于提供上述H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条在检测H9亚型禽流感病毒中的应用,即使用如上所述的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条对样品进行检测:

[0015] 如在对照线(6)没有条带,则检测无效;如在对照线(6)出现条带,检测线(5)未出现条带,则为阴性;如在对照线(6)出现条带,检测线(5)出现条带,则为阳性。

[0016] 本发明与现有技术相比,本发明具有以下优点:

[0017] 本发明所述的荧光层析试纸条在使用时,只需要将待检测动物的口腔或泄殖腔粘液溶液、组织液滴加在样品垫上,当样品有H9亚型禽流感病毒时,则H9亚型禽流感病毒的抗原与荧光标记垫上的荧光标记H9 A1V单抗(2G4)发生反应生成H9亚型禽流感病毒-荧光标记H9 A1V单抗的复合物,H9亚型禽流感病毒-荧光标记H9 A1V单抗(2G4)的复合物向右移动至H9 A1V单抗(1C3)层时,则形成H9 A1V单抗(1C3)-H9亚型禽流感病毒-荧光标记H9 A1V单抗(2G4)的复合物,并在检测线附近形成激发荧光条带,同时未结合的荧光标记H9 A1V单抗向右移动,并与羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白反应生成羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白-荧光标记抗H9 A1V单抗(2G4)的复合物,从而在对照线附近形成激发荧光条带,即在用特定荧光层析分析仪检测时,当检测线及对照线上同时出现荧光条带时,则说明待检测动物的液体上含有H9亚型禽流感病毒,操作简单,实用性极强,检测效率较高。

附图说明

[0018] 图1为本发明的H9亚型禽流感病毒荧光层析检测卡研制和应用技术路线图;

[0019] 图2为本发明H9亚型禽流感病毒荧光层析检测卡纵切面和正面示意图;

[0020] 图3为本发明的荧光层析检测卡检测反应示意图;

[0021] 图4为本发明一个实施例中的H9亚型禽流感病毒荧光微球检测卡的测试结果示意

图；

[0022] 图5为本发明一个实施例中的H9亚型禽流感病毒荧光检测卡测试结果图。

具体实施方式

[0023] 下面结合附图对本发明做进一步详细描述：

[0024] 参考图2,本发明所述的荧光层析试纸条结构包括背衬1、吸水纸垫7、纤维素膜2、样品垫4、以及含有荧光标记H9 A1V单抗(2G4)的荧光标记垫3,纤维素膜2位于背衬1上,荧光标记垫3的右侧位于纤维素膜2上表面的左侧,荧光标记垫3的左侧伸出到纤维素膜2外,样品垫4的左侧位于荧光标记垫3上,样品垫4的右侧伸出到荧光标记垫3外,吸水纸垫7的左侧位于纤维素膜2上表面的右侧,吸水纸垫7的右侧伸出到纤维素膜2外;纤维素膜2的上表面从左到右依次设有H9 A1V单抗(1C3)层及羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白层,其中H9 A1V单抗(1C3)层上设有检测线5,羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白层上设有对照线6。

[0025] 需要说明的是,所述纤维素膜2为硝酸纤维素膜,纤维素膜2的厚度为0.2cm,纤维素膜2的宽度为3.5mm。

[0026] 本发明的检测过程为：

[0027] 只需要将待检测动物的粘液或组织液滴加在样品垫4上,当样品垫4有H9亚型禽流感病毒时,则H9亚型禽流感病毒的抗原与荧光标记垫3上的荧光标记H9 A1V单抗(2G4)发生反应生成H9亚型禽流感病毒-荧光标记H9 A1V单抗(2G4)的复合物,同时在吸水纸垫7的作用下,H9亚型禽流感病毒-荧光标记H9 A1V单抗(2G4)的复合物向右移动至H9 A1V单抗(1C3)层时,则形成H9 A1V单抗(1C3)-H9亚型禽流感病毒-荧光标记H9 A1V单抗(2G4)的复合物,并在检测线5附近形成荧光条带,同时未结合的荧光标记H9 A1V单抗向右移动,并与羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白反应生成羊抗Ba1b/c小鼠免疫球蛋白-荧光标记抗H9 A1V单抗(2G4)的复合物,从而在对照线6附近形成荧光条带,用荧光分析仪检测时,当检测线5及对照线6上同时出现荧光条带时,则说明待检测动物的液体上含有H9亚型禽流感病毒;当对照线6以内没有出现荧光条带时,则说明待检测动物的液体上没有含有H9亚型禽流感病毒,当对照线6没有显示荧光条带时,则说明本发明所述的荧光层析试纸条失效或操作不正确。

[0028] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0029] 实施例1 荧光微球标记禽流感病毒抗体的制备

[0030] 使用平均直径为110nm、羧基修饰的荧光微球(Bangs Laboratories, Inc.公司,产品目录号为FC02F/10930),以及两株抗H9亚型禽流感病毒血凝素的单克隆抗体(2G4和1C3)(购自扬州大学动物医学学院,传染病与预防兽医重点实验室),按照下述方法制备荧光微球标记禽流感病毒标记抗体：

[0031] 取5mg的上述羧基修饰的荧光微球用MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液(0.1M、pH4.7)洗涤并离心后,用1ml MES缓冲液(0.1M、pH4.7)重悬,加入1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)至终浓度为5mM、加入NHS(N-羟基丁二酰亚胺)至终浓度为10mM,室温避光,反应半小时得到活化后羧基修饰的荧光微球。

[0032] 用50mM pH8.5的硼砂缓冲液洗涤该活化后羧基修饰的荧光微球,取0.37mg上述待标记H9亚型禽流感病毒抗体(2G4)和5mg上述活化后羧基修饰的荧光微球混合到50mM pH8.5的硼砂缓冲液中充分混匀。室温避光下反应2小时,让抗体和荧光微球形成稳定的肽键,共价结合得到荧光微球与H9亚型禽流感病毒抗体的偶联物。反应结束后,加入终浓度为1% (质量百分含量)的BSA(牛血清白蛋白)溶液,对荧光微球与禽流感病毒抗体的偶联物上剩余活性羧基位点进行封闭,室温避光反应0.5小时。完成后,用pH7.4的0.02M PBS缓冲液洗涤、重悬得到5mg/ml荧光微球标记禽流感病毒抗体液体,4℃保存待用。

[0033] 实施例2 H9亚型禽流感病毒荧光检测卡的制备

[0034] 将实施例1所得荧光微球标记H9亚型禽流感病毒抗体溶液,采用BioDot的XYZ3050喷膜系统将其按照一定喷量喷涂至处理过的玻璃纤维素膜(购于waterman和Schleicher&Schuell公司),制备形成荧光抗体结合垫,然后用网格托盘将其移入一个真空干燥箱内,真空干燥2h,加入干燥剂或变色硅胶,密封保存于4℃冰箱中待用。

[0035] 选择检测线和质控线的包被体积即喷膜量的范围为 $0.5\mu\text{l}/\text{cm}$ — $1.5\mu\text{l}/\text{cm}$,根据经验选择合适蛋白包被浓度,用自动喷膜机喷涂检测线,喷膜量分别为 $0.5\mu\text{l}/\text{cm}$ 、 $0.75\mu\text{l}/\text{cm}$ 、 $1.0\mu\text{l}/\text{cm}$ 、 $1.5\mu\text{l}/\text{cm}$,比较用不同喷膜量所得的划线效果。

[0036] 采用抗原、二抗稀释液将H9亚型禽流感病毒抗体(1C3)稀释成不同浓度:1.0mg/ml,1.5mg/ml,2.0mg/ml,2.5mg/ml,进行检测线包被。用自动喷膜机在已经喷涂了上述四种浓度检测线的硝酸纤维素膜与不同喷量的结合垫组合,制备试纸条小样以及与其它辅料依次粘贴制成速测卡用于检测试验。

[0037] 使用pH为7.4的0.02M PBS缓冲液,将禽流感病毒H9N2亚型A1试验抗原稀释后,对速测卡进行检测实验。

[0038] 在以确定H9亚型禽流感病毒抗体(1C3)包被浓度和荧光标记结合物喷量的基础上,采用抗原、二抗稀释液将羊抗鼠二抗稀释成不同浓度:2mg/ml、1.5mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml,进行质控线包被,通过检测H9亚型禽流感细胞培养病毒,确定质控线包被浓度。

[0039] 采用抗原、二抗稀释液,将羊抗鼠二抗和H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)配制为一定浓度的溶液,选用BioDot的XYZ3050喷膜系统将羊抗鼠二抗划膜至包被膜(硝酸纤维素膜)的质控线(C线)位置,将H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)划膜至检测线(T线)位置,将荧光微球标记H9亚型禽流感病毒的抗体溶液,按照一定喷量喷涂至处理过的玻璃纤维素膜上,于相对湿度为30%以下的干燥车间进行抽湿24小时后干燥待用。

[0040] 在10万级洁净和干燥的车间中把干燥好的具有检测线和质控线的包被膜、上述样品垫、吸水垫、背板进行搭配组装后,采用BioDot的CM4000裁切系统将贴好的纸板裁切,装入检测用夹片待用。

[0041] 实验结果:

[0042] 1 H9亚型禽流感病毒荧光检测卡检测线、质控线包被体积的确定结果

[0043] 根据经验选择浓度为3mg/ml的H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)与浓度为1.5mg/ml的羊抗鼠二抗分别分别按照包被体积 $0.5\mu\text{l}/\text{cm}$ 、 $0.75\mu\text{l}/\text{cm}$ 、 $1.0\mu\text{l}/\text{cm}$ 和 $1.5\mu\text{l}/\text{cm}$ 划膜,其划线效果如表1所示:

[0044] 表1 检测线、质控线包被体积的确定

[0045]

	1.5 μ l/cm	1.0 μ l/cm	0.75 μ l/cm	0.5 μ l/cm
H9 亚型禽流感病毒单克隆抗体 (1C3)	+	+	±	±
羊抗鼠二抗	+	+	±	±

[0046] 备注：+表示条带清晰、集中、不扩散；-表示条带颜色不集中、不清晰、有扩散；±表示处于+与-之间。

[0047] 结果表明，当检测线与质控线包被体积为1.0 μ l/cm时，所划线边缘整齐，线条精细，且最为节省原料。

[0048] 2 H9亚型禽流感病毒荧光检测卡检测线包被浓度以及结合垫喷量体积的确定结果

[0049] 通过配制的样品对速测卡进行测试试验，测试结果详见表2。

[0050] 表2 抗体包被浓度和喷量的确定

[0051]

包被浓度 喷量	包被浓度			
	1.0mg/ml	1.5mg/ml	2.0mg/ml	2.5mg/ml
2.0 μ l/cm	-	-	-	±
2.5 μ l/cm	-	-	+	+
3.0 μ l/cm	-	±	+	+

[0052] 备注：+表示条带清晰、集中、不扩散；-表示条带颜色不集中、不清晰、有扩散；±表示处于+与-之间。

[0053] 结果表明，检测线包被浓度为2.0mg/ml以及结合垫喷量体积为2.5 μ l/cm时，显色条带清晰、集中。

[0054] 3 H9亚型禽流感病毒荧光检测卡质控线包被浓度的确定结果

[0055] 使用H9亚型禽流感细胞培养病毒样品对速测卡进行测试试验，测试结果详见表3

[0056] 表3 质控线包被浓度的确定

[0057]

	2mg/ml	1.5mg/ml	1mg/ml	0.5mg/ml
H9 亚型禽流感细胞培养病毒	+	+	+	-

[0058] 备注：+表示条带清晰、集中、不扩散；-表示条带颜色不集中、不清晰、有扩散；±

表示处于+与-之间。

[0059] 实验结果表明,包被浓度1mg/ml,在H9亚型禽流感细胞培养病毒样品中显色条带清晰、集中。

[0060] 因此,确定了检测卡检测线,质控线包被浓度及结合垫喷量体积,检测线(T线)H9亚型禽流感病毒单克隆抗体浓度2mg/ml,质控线(C线)羊抗鼠二抗浓度1mg/ml,结合垫禽流感病毒抗体溶液喷量体积2.5 μ l/cm。下面实施例3~4以该确定的H9亚型禽流感病毒荧光检测卡进行应用实验。

[0061] 实施例3 H9亚型禽流感病毒荧光检测卡的应用试验

[0062] H9亚型A1V的阳性血清和阴性血清、禽流感病毒H7N9抗原、H7亚型抗原、H5N1(Re-6)抗原、H5N2抗原、H9N2抗原,H1N1抗原、H3N2抗原、NDV抗原,1BDV抗原,1BV抗原、1LTV抗原均购自哈尔滨兽医研究所国家动物工程中心。

[0063] 用细胞培养的病毒抗原或阳性样品,对实施例2制备的H9亚型禽流感病毒荧光检测卡进行结果测试,其结果判断如图4所示,其中,在质控线没有条带,则检测无效;在质控线出现条带,检测线未出现条带,则为阴性;在质控线出现条带,检测线出现条带,则为阳性。

[0064] 测试结果如图5所示:(p7、p8为H9亚型禽流感病毒株)。

[0065] 实施例4 H9亚型禽流感病毒荧光检测卡的性能测试

[0066] H9亚型A1V的阳性血清和阴性血清、禽流感病毒H7N9抗原、H7亚型抗原、H5N1(Re-6)抗原、H5N2抗原、H9N2抗原,H1N1抗原、H3N2抗原、NDV抗原,1BDV抗原,1BV抗原、1LTV抗原均购自哈尔滨兽医研究所国家动物工程中心。

[0067] 1、以H9N2亚型A1试验抗原作为待测样品来测定的检测实施例2制备的H9亚型禽流感病毒检测卡的灵敏度。

[0068] 将禽流感病毒H9N2亚型A1试验抗原用pH为7.4的0.02M PBS缓冲液配制成系列浓度(64、32、16、8、4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.063、0.031、0.016、0HA unit),分别加入实施例1制备的H9亚型禽流感病毒荧光检测卡中配用荧光检测仪判读结果。检测步骤:检测前先将待检测样品恢复室温(25 $^{\circ}$ C),用精确移液器取待检测样品65 μ l垂直缓慢滴入H9亚型禽流感病毒检测卡的加样端,10min时判读结果,检测结果如下表4所示。

[0069] 表4 H9亚型禽流感病毒荧光检测卡不同样品浓度的检测结果

[0070]

浓度	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.2	0.12	0.06	0.03	0.01	0
结果									5	5	3	1	6	
H9N2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

[0071] 从检测结果中可以得出H9亚型禽流感病毒荧光检测卡检测标准的H9N2亚型流感病毒的灵敏度为0.031HA unit。

[0072] 2 H9禽流感病毒荧光检测卡特异性评估试验

[0073] 将H9亚型禽流感病毒和其他常见呼吸道病毒,包括家禽的呼吸道病毒(新城疫病毒(NDV)、传染病支气管炎病毒(1BV)、传染性喉气管炎病毒(1LTV)),人呼吸道病毒(副流感病毒、呼吸道合胞病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、冠状病毒)等相同症候群病毒,用pH为7.4的

0.02M PBS缓冲液配制为较高的浓度,分别用精确移液器取65 μ l垂直缓慢滴入实施例2制备的H9亚型禽流感病毒检测卡的加样端,10min时判读结果。

[0074] 采用所建立的H9亚型禽流感病毒荧光检测卡,对引起人的呼吸道症候群相关且与流感相近的病毒进行检测,检测结果全部为阴性。对流感相近且引起家禽呼吸道症候群的病毒进行检测,检测结果也全部为阴性。检测阴性基质,包括正常人的鼻咽拭子、痰液、正常家禽的棉拭子、正常的家禽组织,检测结果全部阴性,表明所建立的方法不受基质的影响,且检测结果特异性强。其检测结果如下表6所示。按照本方法制备的H9亚型禽流感病毒荧光检测卡能用于检测H9亚型禽流感病毒,与常见的呼吸道病毒IBV、呼肠孤病毒、NDV之间没有交叉反应,检测卡交叉反应检测结果详见表5。

[0075] 表5 H9亚型禽流感病毒荧光检测卡交叉反应检测结果

[0076]

病毒亚型	检测结果
H1N1	-
H3N2	-
H5N1	-
H5N2	-
H7	-
H7N9	-
H9N2	+
NDV	-
RSV	-
副流感病毒	-
IBDV	-
IBV	-
ILTV	-

[0077] 3、H9禽流感病毒荧光检测卡小规模田间试验

[0078] 采集田间试验样品,包括家禽棉拭子样品179份,采集医院临床样品21份,对样品同时进行禽流感病毒荧光RT-PCR检测,确定所建立方法的实用性。

[0079] 对采集田间试验样品200份,全部同时进行H9亚型禽流感病毒荧光检测卡的检测和荧光RT-PCR检测,两者的检测结果一致,表明所建立方法的实用性强,对比结果如下表6所示。

[0080] 表6 H9亚型禽流感病毒检测卡检测法与RT-PCR检测法对比结果

	临床样品	阴性	阳性	总计/份
[0081]	H9 荧光检测	185	15	200
	RT-PCR 检测	185	15	200

[0082] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

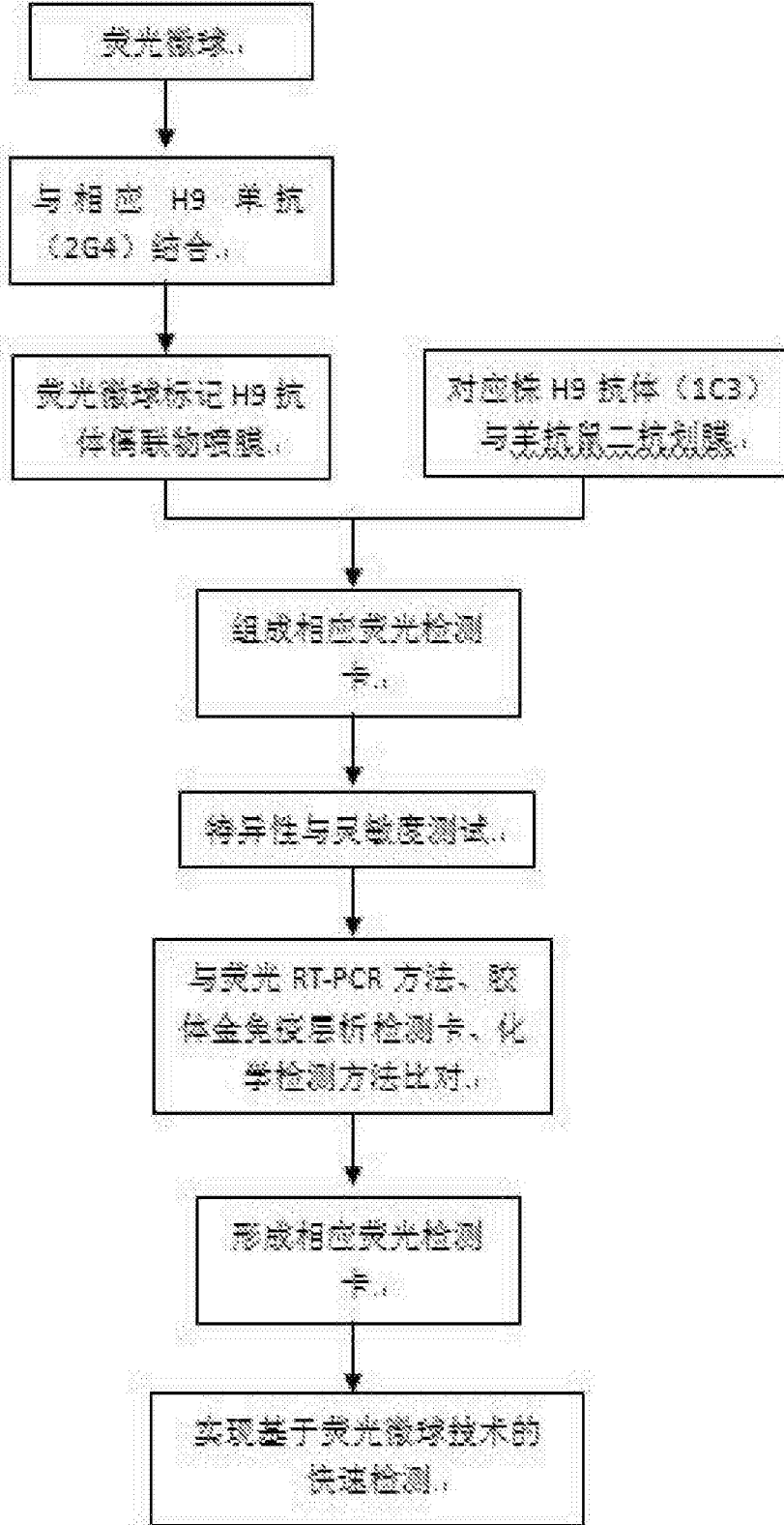


图1

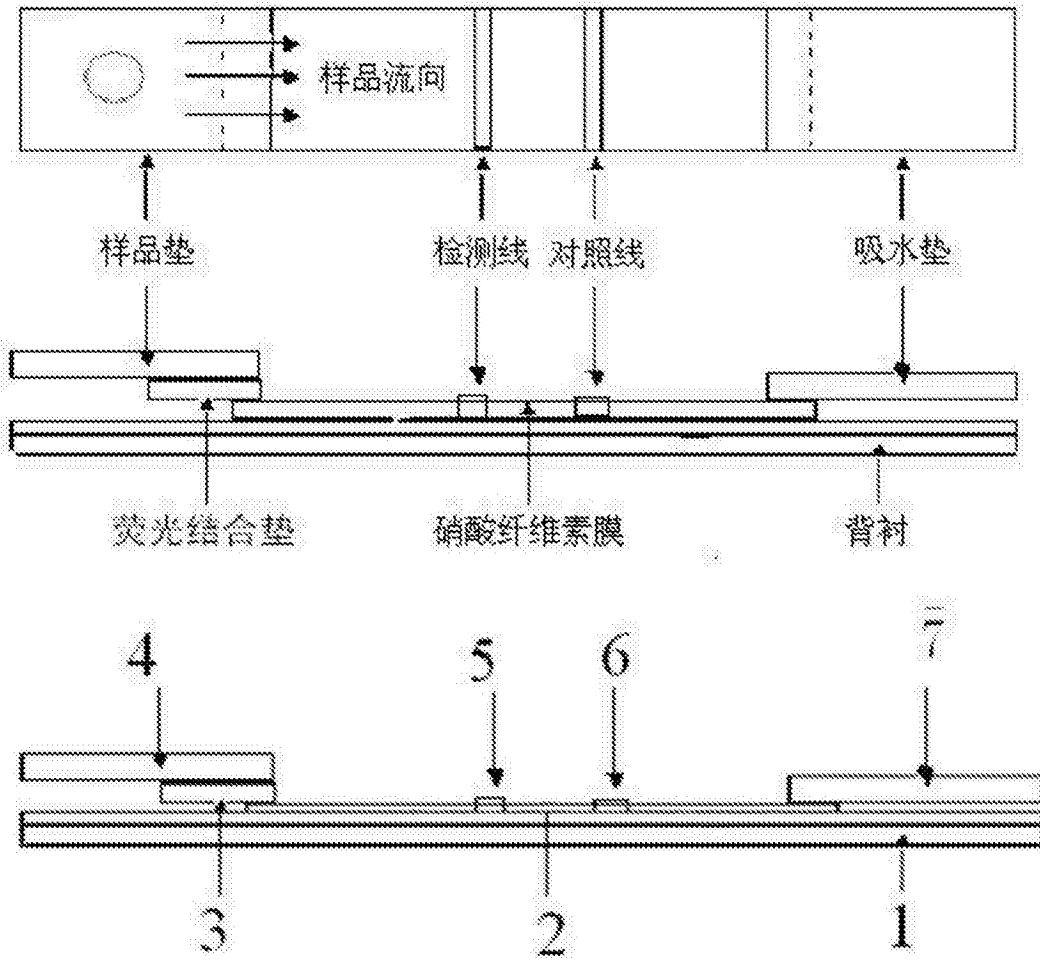


图2

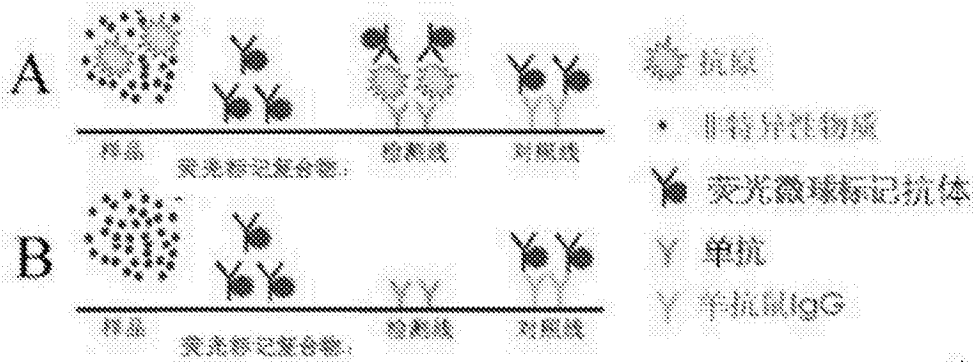


图3

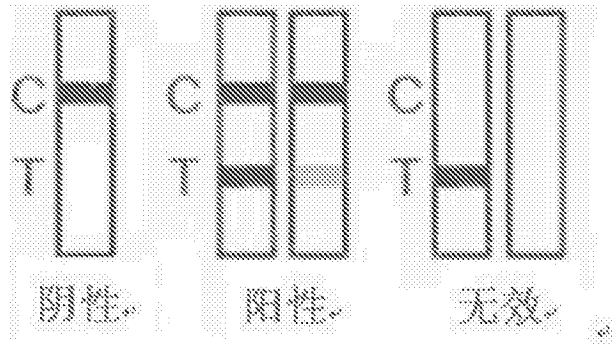


图4

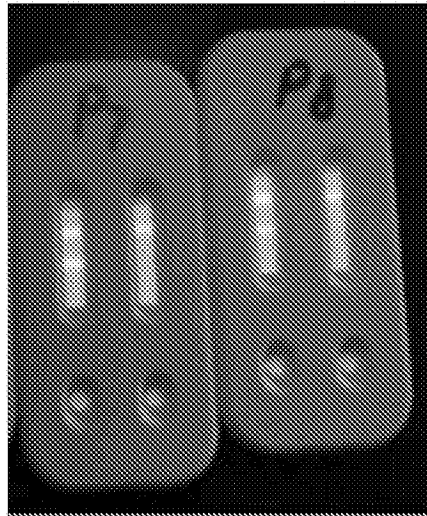


图5

专利名称(译)	一种H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条及其应用		
公开(公告)号	CN107589253A	公开(公告)日	2018-01-16
申请号	CN2017110793541.8	申请日	2017-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	詹爱军 深圳市检验检疫科学研究院		
申请(专利权)人(译)	詹爱军 深圳市检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	詹爱军 深圳市检验检疫科学研究院		
[标]发明人	詹爱军 陈枝楠 张婷 谢晋雄 陈峰 陈勇 王飞 李维		
发明人	詹爱军 陈枝楠 张婷 谢晋雄 陈峰 陈勇 王飞 李维		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/569 G01N33/577		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条，包括背衬(1)、吸水纸垫(7)、纤维素膜(2)、样品垫(4)、以及喷涂有荧光微球标记H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(2G4)的荧光标记垫；硝酸纤维素膜(2)的上表面从左到右依次设有另一株H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)层及羊抗Balb/c小鼠免疫球蛋白层，其中H9亚型禽流感病毒单克隆抗体(1C3)层上设有检测线(5)，羊抗Balb/c小鼠免疫球蛋白层上设有对照线(6)。本发明的H9亚型禽流感病毒荧光层析试纸条操作简单，实用性极强，检测效率较高。

