



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110058016 A

(43)申请公布日 2019.07.26

(21)申请号 201910175094.9

(22)申请日 2019.03.08

(71)申请人 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 李自力 邵雨 胡思顺 毕丁仁
王喜亮 肖运才 金卉

(74)专利代理机构 北京三高永信知识产权代理有限公司 11138

代理人 徐立

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

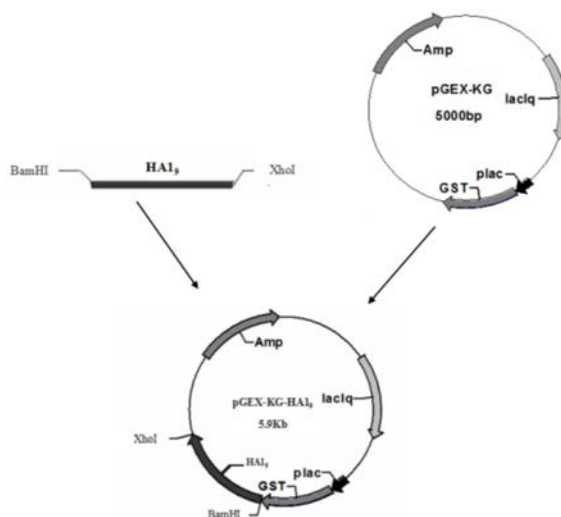
权利要求书1页 说明书11页
序列表1页 附图3页

(54)发明名称

禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸和测试卡

(57)摘要

本发明提供一种禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸和测试卡,可以检测多种禽类的免疫水平,适用范围广、特异性强、灵敏度高、操作简单、耗时短。所述试纸包含顺序连接的样品垫、金标垫和硝酸纤维素膜,其中,所述金标垫上包被有单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物;所述硝酸纤维素膜上设有靠近金标垫一端的检测线和远离金标垫一端的质控线,所述检测线上包被有AIV-HA1₉重组蛋白,所述质控线上包被有二抗,编码所述AIV-HA1₉重组蛋白的DNA序列如SEQ ID NO.1所示。



1. 一种禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸,其特征在于,包含顺序连接的样品垫、金标垫和硝酸纤维素膜,其中,

所述金标垫上包被有单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物;

所述硝酸纤维素膜上设有靠近金标垫一端的检测线和远离金标垫一端的质控线,所述检测线上包被有AIV-HA1₉重组蛋白,所述质控线上包被有二抗,

所述单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4由杂交瘤细胞株LZLPHZ分泌得到,

编码所述AIV-HA1₉重组蛋白的DNA序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 如权利要求1所述的试纸,其特征在于,所述二抗为羊抗鼠IgG抗体。

3. 如权利要求1所述的试纸,其特征在于,所述AIV-HA1₉重组蛋白的制备方法为:

(1) 扩增H9亚型禽流感病毒HA1基因,并在HA1基因5'端加上BamHI酶切位点,3'端加上XhoI酶切位点;

(2) 与pGEX-KG载体进行连接反应,得到所述重组质粒pGEX-KG-HA1₉,转化、表达后获得AIV-HA1₉重组蛋白。

4. 如权利要求3所述的试纸,其特征在于,所述AIV-HA1₉重组蛋白的制备方法中,所述步骤(1)的具体方法为:

通过上游引物P1和下游引物P2扩增HA1基因,其中

上游引物P1:CCGGGATCCGATAAAATCTGCATCGGCTAC

下游引物P2:CGGCTCGAGTCTACTTGATCTAGCAGGCAC;

扩增得到960bp的HA1基因片段。

5. 如权利要求1所述的试纸,其特征在于,所述单克隆抗体鼠抗IgY FcCH3-CH4的胶体金标记物的制备方法如下:

(1) 生成胶体金;

(2) 于磁力搅拌下,用0.1M碳酸钾溶液调胶体金的pH值至8.0,按8.0μg抗体/mL胶体金加入上述单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4,继续搅拌混匀,加入10%牛血清白蛋白至终浓度为1%,静置30min后12000rpm、4℃离心30min,弃上清,沉淀用0.02M pH9.0的硼酸盐缓冲液洗涤两次,用十分之一初始胶体金体积的0.02M pH9.0的硼酸盐缓冲液,将沉淀重悬,得到单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物。

6. 如权利要求5所述的试纸,其特征在于,所述胶体金通过水热法反应生成。

7. 如权利要求6所述的试纸,其特征在于,所述胶体金由氯金酸和柠檬酸三钠通过水热法反应生成。

8. 如权利要求5所述的试纸,其特征在于,所述硼酸盐缓冲液的配方为:硼酸0.1237g, PEG-20000 1g,用三蒸水定容至1000mL,调pH至9.0。

9. 包含权利要求1-6中任一项所述试纸的测试卡。

10. 如权利要求9所述的测试卡,其特征在于,所述测试卡由所述试纸装入测试卡壳中得到。

禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸和测试卡

技术领域

[0001] 本发明涉及动物免疫应用技术领域,特别涉及一种禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸和测试卡。

背景技术

[0002] H9亚型禽流感病毒(AIV)在禽群中长期存在,给养禽业造成巨大的经济损失。自1994年在首次分离以来,H9N2亚型禽流感病毒(H9N2AIV)在我国广泛分布,是我国养禽业中常见的病原体之一。1994年在我国广东某鸡场首次分离到了H9N2型禽流感病毒,临床表现为产蛋率下降,并有一定的死亡率。这次AIV发生之后,H9N2AIV在我国一直为上升趋势,严重制约了养禽业的发展。水禽类被称为流感病毒的“自然基因储存库”,近年来,随着我国养殖业快速发展,鸭、鹅上也不断分离出H9N2AIV。唐秀英等先后从发病鸡、鸭和鹌鹑体内分离到大量的H9N2AIV。之后在鸟类中不断有通鸶、鸬鹚感染H9N2AIV的报道。目前,H9AIV已在家禽中建立稳定的种系,广泛分布在世界各地,在各种鸟类以及家禽体内均有分离,并有人类感染的事件发生,因此对于H9N2亚型禽流感的研究具有重要的经济意义和公共卫生学意义。

[0003] 由于H9AIV感染常引起轻微呼吸道症状、产蛋鸡产蛋量下降等,这些症状都和新城疫、传染性喉气管炎、传染性支气管炎等禽类疾病极为相似,在临床上很难区分。因此,研制和开发一种方便快捷的H9AIV的检测及鉴别诊断方法具有重要的意义。

[0004] 目前对H9亚型禽流感病的诊断方法主要包括病毒的分离鉴定、分子生物学方法、血清学诊断方法。病毒的分离鉴定有特异好、敏感性高的优点,但是它还是存在需时长和漏检的缺点,且禽流感病毒的分离要在生物安全三级及三级以上实验室中进行。分子生物学方法需要特定的仪器和设备,这都不能满足快速诊断的要求。现在抗体检测的方法众多,其灵敏度、准确性、重复性并不完全相同,加上试纸质量不一,都影响到实验结果。在应用或建立一个方法时,检测系统中所有成分的浓度必须经过严格的滴定,选择最恰当的浓度范围。但这些方法的对操作人员、设备等有较高的要求。而且上述方法大多耗时较长(如血凝抑制试验需1~2小时;ELISA试验需2~3小时等),不便于适时和快速诊断,所以均无法在基层大范围地推广使用。

[0005] 胶体金免疫层析(gold-immunochromatography assay GICA)是以胶体金作为示踪物,基于胶体金标记技术应用于抗原抗体反应的一种新型免疫标记技术。其核心技术是以硝酸纤维素膜为固相载体,因毛细管作用而促使样品溶液在层析条上泳动,并使样品中的待检物与层析膜上针对待检物的受体(如抗原或抗体)在短时间内发生高特异性、高亲和性的免疫反应。它具有简便,快速,特异性强,灵敏度高,费用低的优点。

[0006] 基于该技术,国内外在人医疾病监测、环境危害监控、食品安全保障及畜禽疾病检测等领域,都已经研制出了多种胶体金免疫层析快速检测测试卡。在鸡疫病诊断和检测方面,鸡传染性支气管炎、鸡传染性法氏囊及鸡毒霉形体抗体免疫胶体金快速检测试纸获得相关专利(专利号:200710169105.X;200710169104.5;200710169106.4)。

[0007] 在实现本发明的过程中,发明人发现现有技术中至少存在以下问题:上述胶体金检测试纸仅对鸡相关疾病或疫苗免疫后的抗体水平进行定性或者半定量检测,而不能同时针对多种禽类,并且不能动态定量的监测禽类群体抗体水平。针对多种禽类感染后的快速诊断以及免疫后抗体水平检测对于疾病的控制有着重要的意义。

发明内容

[0008] 鉴于此,本发明提供一种禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸和测试卡,可以检测多种禽类的免疫水平,适用范围广、特异性强、灵敏度高、操作简单、耗时短。

[0009] 具体而言,根据本发明的第一方面,本发明实施例提供了一种禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸,包含顺序连接的样品垫、金标垫和硝酸纤维素膜,其中,

[0010] 所述金标垫上包被有单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物;

[0011] 所述硝酸纤维素膜上设有靠近金标垫一端的检测线和远离金标垫一端的质控线,所述检测线上包被有AIV-HA1₉重组蛋白,所述质控线上包被有二抗,

[0012] 所述单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4由杂交瘤细胞株LZLPHZ分泌得到,据中国公开专利文献CN107299086A记载,所述杂交瘤细胞株LZLPHZ已于2015年11月13日保藏在中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC-C2015188;

[0013] 编码所述AIV-HA1₉重组蛋白的DNA序列如SEQ ID NO.1所示。

[0014] 具体的,所述AIV-HA1₉重组蛋白的制备方法为:

[0015] (1) 扩增H9亚型禽流感病毒HA1基因,并在HA1基因5'端加上BamH I酶切位点,3'端加上XhoI酶切位点;

[0016] (2) 与pGEX-KG载体进行连接反应,得到所述重组质粒pGEX-KG-HA1₉,转化、表达后获得AIV-HA1₉重组蛋白。

[0017] 进一步的,所述AIV-HA1₉重组蛋白的制备方法中,所述步骤(1)的具体方法为:

[0018] 通过上游引物P1和下游引物P2扩增HA1基因,其中

[0019] 上游引物P1:CCGGGATCCGATAAAATCTGCATCGGCTAC

[0020] 下游引物P2:CGGCTCGAGTCTACTTGATCTAGCAGGCAC;

[0021] 扩增得到960bp的HA1基因片段。

[0022] 具体的,所述单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物的制备方法如下:

[0023] (1) 生成胶体金;

[0024] (2) 于磁力搅拌下,用0.1M碳酸钾溶液调胶体金的pH值至8.0,按8.0μg抗体/mL胶体金加入上述单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4,继续搅拌混匀,加入10%牛血清白蛋白至终浓度为1%,静置30min后12000rpm、4℃离心30min,弃上清,沉淀用0.02M pH9.0的硼酸盐缓冲液洗涤两次,用十分之一初始胶体金体积的0.02M pH9.0的硼酸盐缓冲液,将沉淀重悬,得到单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物。

[0025] 具体的,所述胶体金通过水热法反应生成。进一步的,所述胶体金由氯金酸和柠檬酸三钠通过水热法反应生成。

[0026] 进一步的,所述硼酸盐缓冲液的配方为:硼酸0.1237g,PEG-20000 1g,用三蒸水定容至1000mL,调pH至9.0。

[0027] 具体的,所述二抗为羊抗鼠IgG抗体。

[0028] 一般的,上述试纸的制备方法如下:

[0029] 1) 通过上游引物P1和下游引物P2扩增HA1基因,并连接相应载体从而构建重组质粒pGEX-KG-HA1₉,转化、表达后获得AIV-HA1₉重组蛋白;

[0030] 2) 用实验室保存的杂交瘤细胞株LZLPHZ注入经处理过的Balb/C小鼠,得到含单抗的腹水,经辛酸-硫酸铵法(朱立平主编《免疫学常用实验方法》,人民军医出版社,2000版)得到纯化的单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4;

[0031] 3) 用柠檬酸三钠与氯金酸(购自Sigma公司)反应制备胶体金;

[0032] 4) 将步骤2)制备的鼠抗IgY Fc CH3-CH4抗体,加入步骤3)制备的胶体金中,得到单克隆抗体-胶体金标记物按一定体积混合浓缩之后构成金标混合物;

[0033] 5) 将金标混合物包被在金标垫上;

[0034] 7) 如图2所示,将步骤1)制备的抗原(AIV-HA1₉重组蛋白)包被在硝酸纤维素膜上构成检测线5;并将二抗包被在硝酸纤维素膜上构成质控线6;

[0035] 8) 在所述的PVC背衬7上按顺序依次粘附所述的样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4,得到所述的适用于多种禽类的H9亚型禽流感抗体的检测免疫胶体金试纸;

[0036] 根据本发明的第二方面,本发明实施例提供了包含上述试纸的测试卡。根据本领域公知常识,将所述试纸装入测试卡壳中即可构成测试卡。

[0037] 本发明所述试纸采用了间接法检测抗体,可以明显提高试纸的检测效果。所述间接法检测抗体(为报道的常规方法)的原理为:当待检样品中含有H9亚型禽流感抗体时,样本中的H9亚型禽流感抗体会在金标垫位置和单克隆抗体-胶体金标记物(IgY Fc CH3-CH4)发生反应,形成“金标抗体-抗体”,反应复合物层析到检测线位置时,包被在检测线T上的抗原(AIV-HA1₉重组蛋白)会和复合物中的“金标抗体-抗体”发生反应,从而在检测线位置形成“金标抗体-抗体-包被抗原”间接复合物,由于在复合物中有一种抗体是胶体金标记的,所以在检测线位置就会出现肉眼可见的红色条带,这样就得到阳性结果。未参与反应的金标抗体层析到质控线位置,被包被的羊抗鼠IgG所捕获而显色。相反,如果样品中不含H9亚型禽流感抗体时,在检测线位置不含间接复合物,就不会出现红色条带,这样就得到了阴性结果。检测线颜色深度与被检血清中的抗体含量呈正相关,颜色越深说明被检测样品的抗体含量越高,质控线C无条带出现则判为检测试纸失效。

[0038] 本发明使用的杂交瘤细胞株LZLPHZ制备的单克隆抗体可以和多种禽类(鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸽子、孔雀和鸵鸟)的IgY Fc片段结合,因此建立的试纸和测试卡可对多种禽类的H9亚型禽流感抗体进行动态定量检测。

[0039] 本发明实施例提供的技术方案的有益效果至少包括:

[0040] 本发明实施例提供的H9亚型禽流感抗体胶体金试纸和测试卡,能够用于多种禽类(鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸽子、孔雀和鸵鸟)的检测,具有适用范围广,特异性强,灵敏度高,检测时间短(10分钟)判断直观等优点;

[0041] 本发明可以将胶体金试纸与胶体金生物传感器有机整合成胶体金定量检测系统。运用免疫定量速测仪不仅减少了人为主观判断无法正确识别可疑物检测是否存在阳性的情况,减少了因人为主观判读带来的错误率,而且增加了客观性、准确性;并且提高了人为眼观检测的敏感性;

[0042] 本发明可以通过质控线C、检测线T的显色深浅与被检测抗体的量呈对应关系,从

而确定待测抗体的含量。胶体金在特定波长下,对光的吸收和散射与胶体金颗粒的量相关,通过光电感应器检测胶体金颗粒对光的吸收和散射,从而测得待测抗体的含量;

[0043] 本发明的试纸操作简便,储存方便,对储存温度要求不高,在4℃下的保质期至少为90天。

附图说明

[0044] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0045] 图1为本发明的总体技术路线图;

[0046] 图2为本发明检测试纸的组装示意图,

[0047] 其中1-样品垫,2-金标垫,3-硝酸纤维素膜,4-吸收垫,5-检测线,6-质控线,7-PVC背衬;

[0048] 图3为本发明检测试纸结果判定示意图,

[0049] 其中,9:表示检测H9为阳性结果;10:表示检测H9为阴性结果;11、12:表示检测试纸失效;

[0050] 图4为本发明实施例所述重组质粒的物理构建图;

[0051] 图5为本发明实施例所述检测试纸定量标准曲线图。

具体实施方式

[0052] 为使本发明的技术方案和优点更加清楚,下面将结合附图对本发明实施方式作进一步地详细描述。

[0053] 根据本发明的第一方面,本发明实施例提供了一种禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸,包含顺序连接的样品垫、金标垫和硝酸纤维素膜,其中,

[0054] 所述金标垫上包被有单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物;

[0055] 所述硝酸纤维素膜上设有靠近金标垫一端的检测线和远离金标垫一端的质控线,所述检测线上包被有AIV-HA1₉重组蛋白,所述质控线上包被有二抗,

[0056] 所述单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4由杂交瘤细胞株LZLPHZ分泌得到,据中国公开专利文献CN107299086A记载,所述杂交瘤细胞株LZLPHZ已于2015年11月13日保藏在中国典型培养物保藏中心,其保藏编号为CCTCC-C2015188;

[0057] 编码所述AIV-HA1₉重组蛋白的DNA序列如SEQ ID NO.1所示。

[0058] 具体的,所述AIV-HA1₉重组蛋白的制备方法为:

[0059] (1) 扩增H9亚型禽流感病毒HA1基因,并在HA1基因5'端加上BamHI酶切位点,3'端加上XhoI酶切位点;

[0060] (2) 与pGEX-KG载体进行连接反应,得到所述重组质粒pGEX-KG-HA1₉,转化、表达后获得AIV-HA1₉重组蛋白。

[0061] 进一步的,所述AIV-HA1₉重组蛋白的制备方法中,所述步骤(1)的具体方法为:

[0062] 通过上游引物P1和下游引物P2扩增HA1基因,其中

[0063] 上游引物P1:CCGGGATCCGATAAAATCTGCATCGGCTAC

[0064] 下游引物P2:CGGCTCGAGTCTACTTGATCTAGCAGGCAC;

[0065] 扩增得到960bp的HA1基因片段。

[0066] 具体的,所述单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物的制备方法如下:

[0067] (1)生成胶体金;

[0068] (2)于磁力搅拌下,用0.1M碳酸钾溶液调胶体金的pH值至8.0,按8.0 μ g抗体/mL胶体金加入上述单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4,继续搅拌混匀,加入10%牛血清白蛋白至终浓度为1%,静置30min后12000rpm、4℃离心30min,弃上清,沉淀用0.02M pH9.0的硼酸盐缓冲液洗涤两次,用十分之一初始胶体金体积的0.02M pH9.0的硼酸盐缓冲液,将沉淀重悬,得到单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物。

[0069] 具体的,所述胶体金通过水热法反应生成。进一步的,所述胶体金由氯金酸和柠檬酸三钠通过水热法反应生成。

[0070] 进一步的,所述硼酸盐缓冲液的配方为:硼酸0.1237g,PEG-20000 1g,用三蒸水定容至1000mL,调pH至9.0。

[0071] 具体的,所述二抗为羊抗鼠IgG抗体。

[0072] 一般的,上述试纸的制备方法如下:

[0073] 1)通过上游引物P1和下游引物P2扩增HA1基因,并连接相应载体从而构建重组质粒pGEX-KG-HA1₉,转化、表达后获得AIV-HA1₉重组蛋白;

[0074] 2)用实验室保存的杂交瘤细胞株LZLPHZ注入经处理过的Balb/C小鼠,得到含单抗的腹水,经辛酸-硫酸铵法(朱立平主编《免疫学常用实验方法》,人民军医出版社,2000版)得到纯化的单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4;

[0075] 3)用柠檬酸三钠与氯金酸(购自Sigma公司)反应制备胶体金;

[0076] 4)将步骤2)制备的鼠抗IgY Fc CH3-CH4抗体,加入步骤3)制备的胶体金中,得到单克隆抗体-胶体金标记物按一定体积混合浓缩之后构成金标混合物;

[0077] 5)将金标混合物包被在金标垫上;

[0078] 7)如图2所示,将步骤1)制备的抗原(AIV-HA1₉重组蛋白)包被在硝酸纤维素膜上构成检测线5;并将二抗包被在硝酸纤维素膜上构成质控线6;

[0079] 8)在所述的PVC背衬7上按顺序依次粘附所述的样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜3、吸收垫4,得到所述的适用于多种禽类的H9亚型禽流感抗体的检测免疫胶体金试纸;

[0080] 根据本发明的第二方面,本发明实施例提供了包含上述试纸的测试卡。根据本领域公知常识,将所述试纸装入测试卡壳中即可构成测试卡。

[0081] 本发明所述试纸采用了间接法检测抗体,可以大大提高试纸的检测效果。所述间接法检测抗体(为报道的常规方法)的原理为:当待检样品中含有H9亚型禽流感抗体时,样本中的H9亚型禽流感抗体会在金标垫位置和单克隆抗体-胶体金标记物(IgY Fc CH3-CH4)发生反应,形成“金标抗体-抗体”,反应复合物层析到检测线位置时,包被在检测线T上的抗原(AIV-HA1₉重组蛋白)会和复合物中的“金标抗体-抗体”发生反应,从而在检测线位置形成“金标抗体-抗体-包被抗原”间接复合物,由于在复合物中有一种抗体是胶体金标记的,所以在检测线位置就会出现肉眼可见的红色条带,这样就得到阳性结果。未参与反应的金标抗体层析到质控线位置,被包被的羊抗鼠IgG所捕获而显色。相反,如果样品中不含H9亚

型禽流感抗体时,在检测线位置不含间接复合物,就不会出现红色条带,这样就得到了阴性结果。检测线颜色深度与被检血清中的抗体含量呈正相关,颜色越深说明被检测样品的抗体含量越高,质控线C无条带出现则判为检测试纸失效。

[0082] 本发明使用的杂交瘤细胞株LZLPHZ制备的单克隆抗体可以和多种禽类(鸡、鸭、鹅、鹌鹑、鸽子、孔雀和鸵鸟)的IgY Fc CH3-CH4结合,因此建立的试纸条可对多种禽类的H9亚型禽流感抗体进行动态定量检测。

[0083] 下述实施例中,所用试剂信息如下:

	牛血清白蛋白 (BSA)	Biosharp
	RPMI-1640 培养基	HyClone
	新生牛血清	浙江四季青公司
	巴比妥钠	国药集团化学试剂有限公司
	巴比妥	国药集团化学试剂有限公司
	四氯金酸	国药集团化学试剂有限公司
	二水合柠檬酸三钠	国药集团化学试剂有限公司
	叠氮钠 (NaN ₃)	国外进口, 科瑞生物分装
	蔗糖	国药集团化学试剂有限公司
[0084]	聚乙二醇 (PEG-20000)	国药集团化学试剂有限公司
	羊抗鼠 IgG	博士德
	HRP 兔抗鸡 IgY	ABClone
	硝酸纤维素 (NC) 膜	Millipore
	异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷	Biosharp
	氨苄青霉素	Biosharp
	其它化学试剂	国药分析纯
	标准阴性血清	中国兽医药品监察所
	标准阳性血清	中国兽医药品监察所

[0085] 实施例1

[0086] 1. AIV-HA1₉重组蛋白的制备

[0087] 1.1 H9亚型禽流感HA1基因的克隆与测序及重组质粒pGEX-KG-HA1₉的构建

[0088] 本发明涉及的H9亚型禽流感HA1基因的序列及克隆方法及表达载体pGEX-KG-HA1₉的构建方法参考文献为:雷霆, H9亚型禽流感病毒HA1基因的克隆表达及其生物学活性的初步分析[J]. 中国预防兽医学报, 2006. 具体实施方法如下: 用华中农业大学微生物与免疫实验室冻干保存的AIV-H9N2病毒, 于尿囊腔接种AIV-H9N2于9-11日龄健康SPF (无特定病原体) 鸡胚 (购自武汉生物制品研究所), 弃24小时前死胚, 收集24-96小时的鸡胚尿囊液; 4℃条件下4,000rpm离心30min, 取上清; 4℃条件下30,000rpm离心60min浓缩病毒。用pH 7.2的PBS (DEPC处理水配制) 溶解沉淀, 分装后-80℃保存备用。根据GenBank收录的AIV (A/chicken/Hubei/01/1999 (H9N2)) HA基因序列 (登录号: CY077084.1) 扩增HA1基因。按TaKaRa

RNA PCR Kit (AMV) Ver.2.1说明书中提供的方法,取适量病毒悬液提取RNA并扩增出DNA,扩增引物如下:

[0089] 上游引物P1:CCGGGATCCGATAAAATCTGCATCGGCTAC

[0090] 下游引物P2:CGGCTCGAGTCTACTTGATCTAGCAGGCAC

[0091] P1位于启动子上游,加有BamHI位点,P2加入了XhoI位点,两酶切位点用下划线标出。采用UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒(E.Z.N.A Gel Extraction Kit)回收纯化RT-PCR扩增产物,将回收的RT-PCR产物960bp的片段,与华中农业大学微生物与免疫实验室的pGEX-KG进行连接反应,构建重组质粒pGEX-KG-HA1₉。重组质粒pGEX-KG-HA1₉转化至DH5 α 感受态细胞,并将转化菌涂布含Amp的LB琼脂平板37℃培养过夜。挑数个单菌落培养过夜后用TIANGEN质粒抽提试剂盒提取质粒,进行酶切分析和PCR扩增鉴定,鉴定成功分装冻存于-20℃。重组质粒pGEX-KG-HA1₉构建流程如图4所示。

[0092] 1.2 AIV-HA1₉重组蛋白的表达

[0093] 用重组质粒pGEX-KG-HA1₉转化大肠杆菌BL21 (DE3),涂含氨苄青霉素(Amp)的LB平板(1% (W/V) Tryptone,0.5% (W/V) Yeast Extract,0.5% (W/V) NaCl,0.1mg/mL Amp和1.5% (W/V) Agar),置37℃恒温箱培养,挑取单菌落,接种于2.0mL含氨苄青霉素(Amp)的液体LB培养基(1% (W/V) Tryptone;0.5% (W/V) Yeast Extract;0.5% (W/V) NaCl和0.1mg/mL Amp)内,37℃250-300r/min振荡培养,当OD_{600nm}达到0.6-1.0时。接种1.0mL菌液到10.0mL含氨苄青霉素(Amp)的液体LB培养基内,37℃250-300r/min振荡培养3h,而后加入终浓度为0.8mg/mL的诱导剂IPTG(异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷),37℃诱导5小时,离心收集菌体进行SDS-PAGE检测。

[0094] 1.3 AIV-HA1₉重组蛋白的纯化

[0095] (1) 包涵体的纯化与复性

[0096] 按照上述1.2中的条件大量诱导表达,将诱导后的细菌培养物于4℃、8,000r/min离心10min,沉淀用约为原菌液体积的1/10的PBS (pH7.4,140mM NaCl,2.4mM KCl,10mM Na₂HPO₄·12H₂O,1.8mM KH₂PO₄)重悬,加DTT(二硫苏糖醇)至终浓度为10mmol/L,用压力破碎仪破碎至液体变为透明,4℃,12,000r/min离心10min,将破碎离心后的沉淀用PBS (pH7.4)洗2次,加19.7mL缓冲液A (50mM Tris-Cl,0.5mM EDTA,50mM NaCl,5% (W/V) Glycerol)及0.3mL 20% (W/V) SKL(十二烷基肌氨酸钠)贮存液,剧烈搅动,使其溶解,静置2h,于4℃12000r/min离心10min,弃沉淀,取上清,加20% (W/V) PEG-4000(聚乙二醇4000)至终浓度为0.2%,加50mmol/L的氧化型谷胱甘肽至终浓度为1mmol/L,加100mmol/L的还原型谷胱甘肽至终浓度为2mmol/L,静置2h,以PBS (pH7.4)透析2~3天,-80℃保存备用。

[0097] (2) 蛋白浓度的测定及鉴定

[0098] 用核酸蛋白测定仪分别测定蛋白质溶液在280nm和260nm波长下的光吸收值为A₂₈₀、A₂₆₀。依据公式计算出蛋白浓度,将达到要求浓度的蛋白溶液分装成100 μ L/管,取50 μ L进行SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳)鉴定和Western-blot分析,其余置-80℃保存备用。

[0099] SDS-PAGE检测:取上述收集的菌体,用40.0 μ L ddH₂O充分重悬菌体,加入等体积的加样缓冲液(250mM Tris-HCl,10% (W/V) SDS,0.5% (W/V) 溴酚蓝,50% (V/V) 甘油,5% (V/V) β -巯基乙醇),水浴煮沸3-5min,然后冰浴等待加样电泳。按萨姆布鲁克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,1992版所述方法制备分离胶和积层胶,加入1×Tris-甘氨酸电泳缓冲液(25mM Tris-base,0.1% (W/V) SDS,0.25M Glycine),取处理的样品点样,电泳2h,取下凝胶,考马斯亮蓝R250染色液(0.1% (W/V) 考马斯亮蓝R250,25% (V/V) 异丙醇,10% (V/V) 冰醋酸)染色2h,然后用SDS-PAGE脱色液(5% (V/V) 乙醇,10% (V/V) 冰醋酸)脱色,观察照相。并通过凝胶薄层扫描分析所表达的外源蛋白含量。

[0100] Western-blot分析:为了分析所表达的带GST标签的HA19重组蛋白的免疫学活性,按如上所述方法进行SDS-PAGE电泳,电泳后的凝胶,不经染色,直接用转印装置将蛋白带电转印到NC膜上,以15V电转印1.5h。转印结束后,将NC膜于TBST(150mM NaCl,20mM Tris-HCl,0.05% Tween20)中漂洗一下,再将NC膜转入可加热密封的加样槽,按0.1mL-0.15mL/cm²(NC膜面积)加入封闭液(含1% (W/V) 牛血清白蛋白的TBST),尽可能避免气泡后,37℃2h或4℃过夜。然后弃封闭液,将膜取出,PBST漂洗2-3次,按0.1mL-0.15mL/cm²的量加入经TBST稀释(1:150)的NDV标准阳性血清,同上排除气泡,在摇床上室温作用1h,用TBST洗6次,每次5min,将膜置于加样槽中,按0.1mL-0.15mL/cm²加入经TBST稀释(1:5000)的兔抗鸡IgY(购自博士德公司),室温反应1h,TBST洗6次,每次5min,最后再用TBS漂洗2次,加入以0.01mol/L Tris-Cl(pH7.6)配制的底物溶液(DAB-H₂O₂)显色,一旦出现蛋白带,立即用ddH₂O终止,即可观察结果及扫描保存。

[0101] 根据公式计算蛋白质浓度(mg/mL) = $1.45 \times A_{280} - 0.74 \times A_{260}$ 获得纯化的目标蛋白浓度为:2.4mg/mL。利用Western-blot分析结果表明本发明的AIV-HA19重组蛋白(61KDa),与相应的阳性血清发生了特异性的反应,证实表达产物具有较好的抗原性。

[0102] 2.鼠抗IgY Fc CH3-CH4单克隆抗体制备:

[0103] 2.1杂交瘤细胞复苏

[0104] 准备37℃水浴,将分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞从液氮罐中取出,用止血钳夹着冻存管迅速在37℃水浴中转动,直到细胞解冻,吸取冻存液,1200r/min水平离心5min,用RPMI-1640基础培养液1mL重悬,洗细胞两次,用1mL完全培养液将细胞重悬后加入培养瓶中,在37℃CO₂恒温培养箱中培养。

[0105] 2.2饲养细胞的制备

[0106] 在制备饲养细胞时,采用Balb/c小鼠的腹腔巨噬细胞和脾细胞的混合细胞作为饲养细胞,其制备步骤如下:取1只空白Balb/c小鼠,摘除眼球放血,用1.5mL离心管收集血液(作为阴性对照),直至小鼠失血而死,将处死后的小鼠用75%的酒精浸泡消毒5min后,拧干酒精,腹部朝上用针头固定在泡沫板上,用灭菌的镊子提起小鼠腹部皮肤,用灭菌的剪刀在提起部位剪开一小口,小心剥去皮肤,使小鼠胸腹部完全暴露;在小鼠腹膜中央剪开一小口,将2.5mL 1640基础培养基从剪开的小口注入小鼠的腹腔,吹吸数次后,转移至50mL离心管,重复一次以尽可能多的获得腹腔巨噬细胞;剥去小鼠的腹膜,交叉固定两后肢,充分暴露脾脏;分离脾脏,用剪刀剪碎脾脏置于灭菌的玻璃匀浆器中;取5mL 1640基础培养基,匀浆,直至无红色组织块,补加5mL 1640基础培养基,混匀后垂直静置1min,待白色的结缔组织沉到管底后,小心取出上层细胞悬液,转移至50mL离心管中,重复一次后,1200r/min水平离心5min,弃上清;用10mL 1640基础培养基重悬离心一次,弃上清;用75mL含HAT的1640完全培养基重悬细胞,放入37℃CO₂培养箱备用。

[0107] 2.3小鼠腹水法生产单克隆抗体

[0108] 本实验室采用灭菌液体石蜡预处理Balb/c小鼠后,再注射杂交瘤细胞的方法生产腹水,其具体过程如下:Balb/c小鼠的预处理:用灭菌的液体石蜡处理小鼠,腹腔注射0.5mL/只,十天后即可注射杂交瘤细胞。

[0109] 阳性孔的扩大培养:在24孔细胞培养板加入饲养细胞,4滴/孔,将96孔板内的阳性细胞转到24孔细胞培养板进行扩大培养。待到细胞长满孔底即可注射小鼠。杂交瘤细胞注射:将24孔板的细胞重悬,1200r/min,离心5min,细胞计数,用RPMI-1640基础培养液稀释成 $(1-5) \times 10^6/\text{mL}$,腹腔注射小鼠0.5mL/只,8天左右观察到小鼠腹部隆起,即可采集腹水。

[0110] 3.单克隆抗体的纯化

[0111] 参照参考文献:朱立平等,《免疫学常用实验方法》,人民军医出版社,2000版中报道的方法:取所得的小鼠腹水5mL与适量的二氧化硅混合,加入等体积的巴比妥缓冲液(配方:氯化钠85.00g,巴比妥5.75g,巴比妥钠3.75g,叠氮钠2.00g,用蒸馏水定容至2000mL),室温振荡1h后,在室温下静置30min,取上清于洁净离心管中,于4℃,3000rpm离心10min;取上清液8mL,加入16mL 0.06mol醋酸缓冲液,用HCl调pH值至4.5,充分搅拌下缓缓加入辛酸132μL后,室温搅拌30min,然后转入4℃冰箱充分沉淀2h,4℃,15000rpm离心30min,得上清液22mL,加入2.2mL 0.1M的磷酸缓冲液(简称PB,配方:10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和1.8mM KH_2PO_4 ,pH7.2),用NaOH调pH值至7.6,搅拌下缓缓加入硫酸铵至终浓度为0.277g/mL,4℃冰箱充分沉淀2h后,于4℃,12000rpm离心30min,弃上清,沉淀用5mL 0.01M的PBS缓冲液(配方:140mM NaCl,2.4mM KCl,10mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,1.8mM KH_2PO_4 ,pH7.2)重悬,装入透析袋,对5000mL 0.01M pH7.2的PBS缓冲液充分透析后,再对2000mL蒸馏水透析,最后对3000mL三蒸去离子水透析,将充分透析好的蛋白溶液用PEG-20000浓缩至3mL,然后于4℃,12000rpm离心30min,弃沉淀,收集上清液,测得单克隆抗体浓度为5.0mg/mL。经SDS-PAGE鉴定为纯化的鼠抗IgY Fc CH3-CH4单克隆抗体,其纯度大于95%。该单克隆抗体可用于制备免疫胶体金。

[0112] 4.单克隆抗体—胶体金标记物的制备

[0113] (1)胶体金的制备:

[0114] 用双蒸去离子水将1%氯金酸稀释成0.01%,置磁力加热搅拌器上搅拌煮沸,按每100mL 0.01%氯金酸加入1.5mL 1%柠檬酸三钠,继续煮沸,直到液体呈橙红色即停止加热,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,置4℃保存。

[0115] (2)单克隆抗体—胶体金标记物的制备:

[0116] 将所得的鼠抗IgY Fc CH3-CH4单克隆抗体标记胶体金颗粒。具体步骤如下:于磁力搅拌下,用0.1M碳酸钾溶液调胶体金的pH值至8.0,按8.0μg抗体/mL胶体金加入上述单克隆抗体(鼠抗IgY Fc CH3-CH4),继续搅拌混匀30min,加入10%BSA(牛血清白蛋白)至终浓度为1%,静置30min。12000rpm,4℃离心30min,弃上清,沉淀用0.02M pH9.0的硼酸盐缓冲液(配方:硼酸0.1237g,PEG-20000 1g,用三蒸水定容至1000mL,调pH至9.0)洗涤两次,用十分之一初始胶体金体积的0.02M pH9.0的硼酸盐缓冲液(配方:硼酸0.1237g,PEG-20000 1g,用三蒸水定容至1000mL,调pH至9.0)将沉淀重悬,置4℃备用,保质期60天。

[0117] 6.金标垫的包被

[0118] 将金标垫浸泡于封闭液(配方:1%BSA,2%蔗糖,0.3%PVP K-30,0.02%NaN₃,0.5%吐温-20,0.29%Na₂HPO₄·12H₂O和0.02%KH₂PO₄,pH7.6)中30min后,于37℃烘干用上海金标点膜仪将制备好的单克隆抗体-胶体金标记物均匀包被在金标垫上,每厘米金标垫包被7μL单克隆抗体-胶体金标记物,真空干燥(按常规方法),真空封装(按常规方法),置4℃备用。

[0119] 7. 样品垫的处理

[0120] 将样品垫浸泡于封闭液(含3%BSA,2%蔗糖,0.3%PVPK-30,0.02%NaN₃,0.29%Na₂HPO₄·12H₂O和0.02%KH₂PO₄,pH6.0)中30min后,于37℃烘干,真空封装,置4℃备用。

[0121] 8. 硝酸纤维素膜的包被

[0122] 用包被液(含3%甲醇、1%蔗糖的0.01M pH 7.4PBS缓冲液)将AIV-HA1₉重组蛋白稀释至0.8mg/mL,用上海金标点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上作为检测线5(检测线为T,1μL/cm,该检测线靠近金标垫端,距金标垫端约5mm);用包被液将二抗(羊抗鼠IgG抗体)(购自博士德公司)稀释到800μg/mL,用上海金标点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜作为质控线6(质控线为C,包被量为1μL/cm,该质控线靠近吸收垫,距吸收垫约5mm),质控线与检测线之间距离为3~4mm。37℃烘干30-40min,备用。

[0123] 9. 试纸的组装

[0124] 将样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜(简称NC膜)3、吸收垫4按图2所示的顺序依次粘附在PVC背衬7上,切成4mm宽的小条,得到试纸,封装于测试卡壳中组成测试卡,制备完成后将测试卡真空封装。于4℃保存,保质期至少为90天。

[0125] 10. H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸的使用方法

[0126] (1) 样品稀释液:样品稀释液为经纯水仪过滤的纯水;

[0127] (2) 样品制备,样本采集和处理的详细操作方法如下:

[0128] 血清制备:翼根静脉采血,固定动物,左手将家禽双翼提起,露出翼静脉的采血位置,把覆盖血管的羽毛拨开,即可见到明显一条较粗的静脉血管。采血时用左手大拇指夹住覆盖静脉的羽毛,食指协调大拇指夹住双翼,中指、无名指和手掌轻轻提起或轻按背部保定鸡只,待其安静方可刺针。针头在据静脉血管0.3-0.5cm一旁斜刺入皮肤,再与血管平行进针0.2-0.4cm后刺入血管,见有少量回血即可采集血液,采血完成后立刻压迫伤口止血。将血样37℃自然凝固,待血清开始出现后,放置4℃12或24小时,离心分离血清,3000rpm 5-10min,得到的上清即为血清,小心将上清吸出,注意切勿吸出细胞成分。将血清与样品稀释液按1:2稀释后进行检测。

[0129] (3) 检测:测试卡室温平衡20分钟;取50μL制备好的样品滴入测试卡的加样孔中(滴于样品垫上),10分钟内判定结果。

[0130] (4) 结果判定:当试纸中NC膜上的质控线出现肉眼可见的紫红色,而相对应的检测线没有出现肉眼可见的紫红色,检测样品中不含AIV-H9抗体,结果判为阴性,记为“-”;当质控线出现肉眼可见的紫红色质控线,同时相对应的检测线如T出现肉眼可见的紫红色,检测样品中含AIV-H9抗体,结果判为阳性,记为“+”;检测线颜色深度与被检血清中的抗体呈正相关,颜色越深说明被检测样品的抗体含量越高,质控线无条带出现则判为检测试纸失效。

[0131] 11. 定量标准曲线的建立

[0132] 1) 用本发明所述试纸分别检测不同抗体效价(2¹⁰、2⁹、2⁸、2⁷、2⁶、2⁵、2⁴、2³、2²、2¹)的

样品,重复5次,用免疫定量速测仪读取T/C比值(检测线/质控线)。

[0133] 2) 以HI试验测得的血清效价为横坐标,T/C比值为纵坐标,确立标准曲线,如图5所示。

[0134] 对于待检样品,检测得出y值(即T/C值),根据对应标准方程得出效价x值。

[0135] 12. 特异性试验

[0136] 分别将商购的H9亚型禽流感标准阳性、新城疫、鸡毒支原体、传染性支气管炎、传染性法氏囊炎、禽流感H5、H7阳性血清和标准阴性血清用超纯水1:2稀释后进行试验。其中,标准阴性血清购自中国兽医药品监察所,上述其余生物材料购自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所。本发明试纸本发明试纸中的检测卡检测新城疫、鸡毒支原体、传染性支气管炎、传染性法氏囊炎、禽流感H5、H7阳性血清时,质控线出现明显的紫红色条带,非对应的检测线则不显紫红色条带;而检测H9亚型禽流感标准阳性血清,质控线、检测线均出现紫红色条带。这表明本发明试纸特异性高,与禽的其它重要疾病抗原无交叉反应。

[0137] 13. 敏感性试验:本发明所述试纸在检测效价为 2^3 及 2^9 时具有良好的线性关系,在效价为 2^3 和 2^4 的信号值之间存在极显著差异($P < 0.01$),表明试纸条的检测限为 2^3 。

[0138] 14. 本发明的测试卡对临床样品的检测及其与血凝抑制(HI)试验方法的比较

[0139] 用本实验的检测卡对湖北省武汉市周边养殖场共采集鸡、鸭、鹅共110份血清样品进行了检测,以HI检测为对照,其中90份的检测卡结果与HI的检测一致,两者符合率81.82%。

[0140] 实施例2

[0141] 本发明的禽H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸稳定性的考核

[0142] 将分别在4℃和37℃放置的真空封装的本发明的试纸,在第7、16、35、54、70、90天取出,H9亚型禽流感标准阳性血清用纯水倍比稀释后进行检测。结果如表4,本发明的试纸在4℃的保存期较长,保存期至少为90天。

[0143] 表4试纸不同贮存条件下的保存期试验结果

[0144]

时 间 温 度	第 7 天	第 16 天	第 35 天	第 54 天	第 70 天	第 90 天
4℃	+	+	+	+	+	+
37℃	+	+	+	+	-	-

[0145] 注:“+”检测线显色,“-”表示检测线不显色。

[0146] 以上所述仅是为了便于本领域的技术人员理解本发明的技术方案,并不用以限制本发明。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

序列表

<110> 华中农业大学

<120> 禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸和检测卡

<160> 1

<170> SIP0SequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 960

<212> DNA

<213> H9亚型禽流感病毒 (Avian Influenza Virus-H9)

<400> 1

```

gataaaatct gcatcggtta ccaatcaaca aactccacag aaactgtaga cacgctaaca 60
gaaaacaatg ttcctgtgac acatgccaaa gaattgctcc acacagagca caatgggatg 120
ctgtgtgcaa caaatctggg acatcctctt attctagaca cctgtaccat tgaaggacta 180
atctatggca acccttcttg taatctactg ttgggaggaa gagaatggtc ctacatcgtc 240
gaaagaccat cggctgttaa tgggttgtgt taccgccgta atgtagaaaa cctagaagaa 300
ctaaggtcac ttttttagctc tgctagtctt taccaaagca tccagatctt tccagacaca 360
atctggaatg tgtcttacag tgggacaagc aaagcatggt cagattcatt ctacagaagc 420
atgagatggt tgacccaaaa gaacaacgct taccctattc aagacgcca atacacaaat 480
aatagaggaa agaacattct tttcatgtgg ggcataaatc acccaccac tgatactgtg 540
cagacagatc tgtacacaag gactgacaca acaacaagtg tggcaacaga agatataaat 600
aggaccttca aaccattgat agggccaagg cctcttgtca atggtcagca gggaagaatt 660
gattattatt ggtcgggtatt gaaaccaggt cagacattgc gagtaagatc caatgggaat 720
ctaactgctc catgggtatg gcacattctt tcaggagaga gccacggaag aatcctgaag 780
actgatttaa acagtggtaa ctgtgtagtg caatgtcaga cagaaagagg tggcttgaat 840
actacattgc cattccacaa tgtaagtaag tatgcatttg gaaactgccc aaaatatgtt 900
ggagtaaaga gtctcaaatt ggcagttggt ctgaggaatg tgcctgctag atcaagtaga 960

```

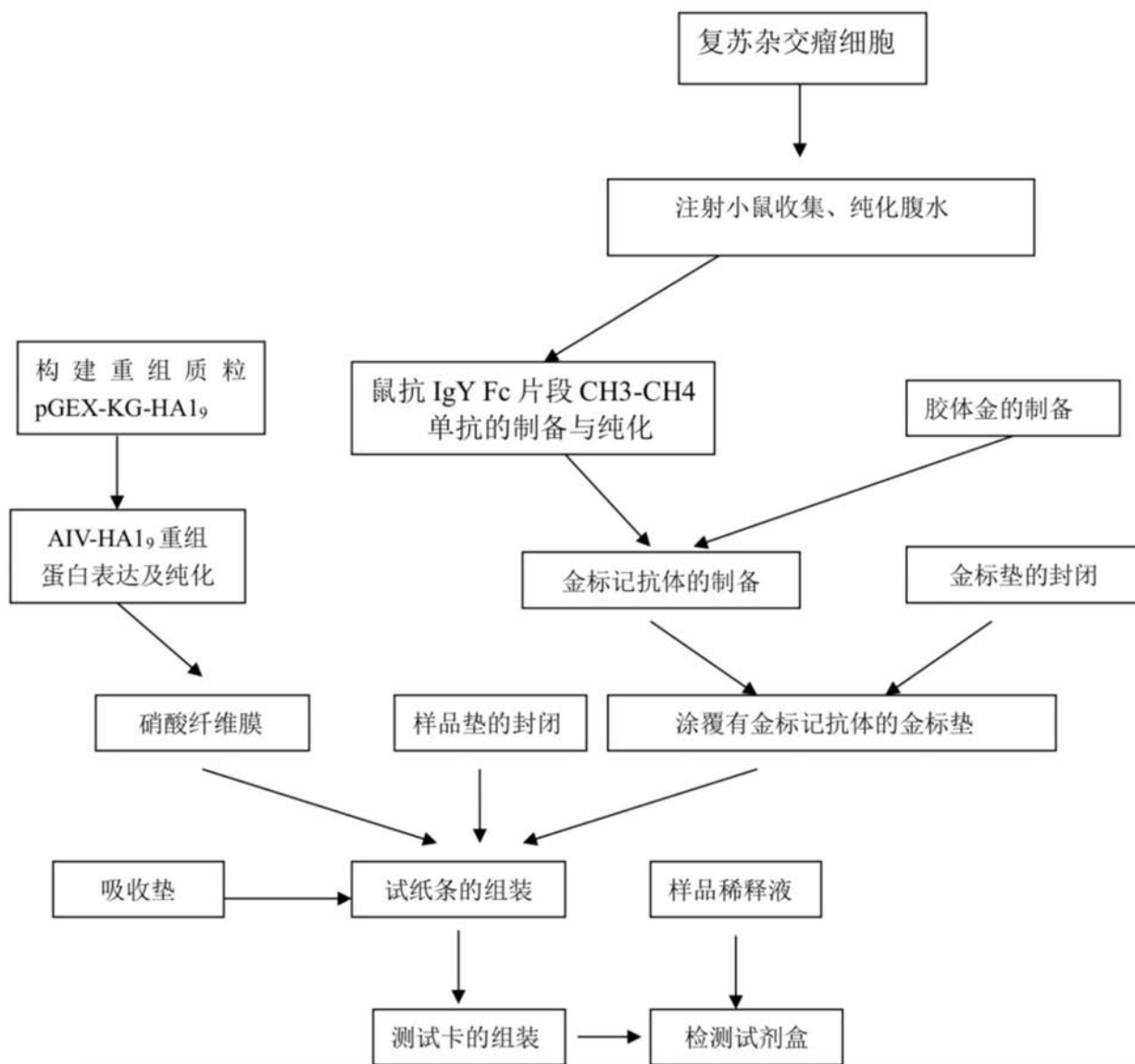


图1



图2

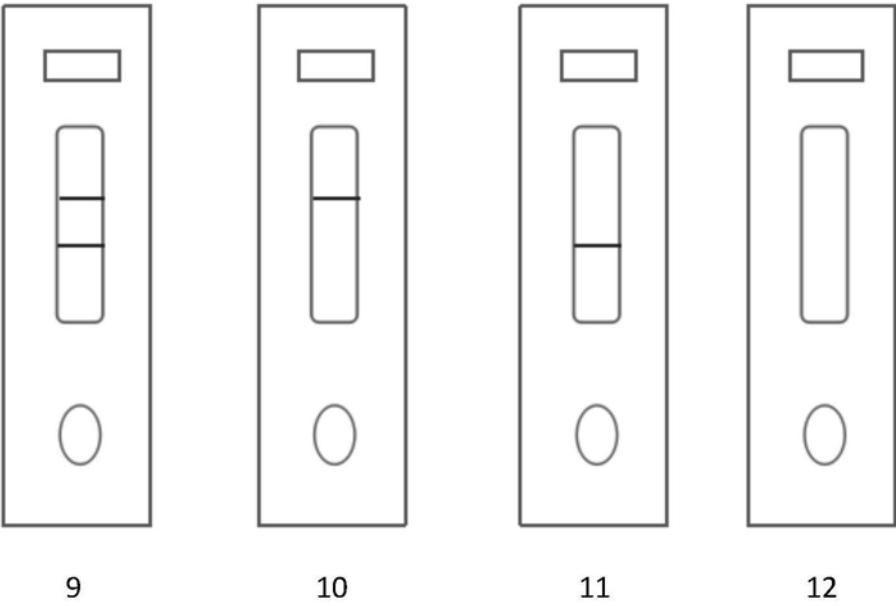


图3

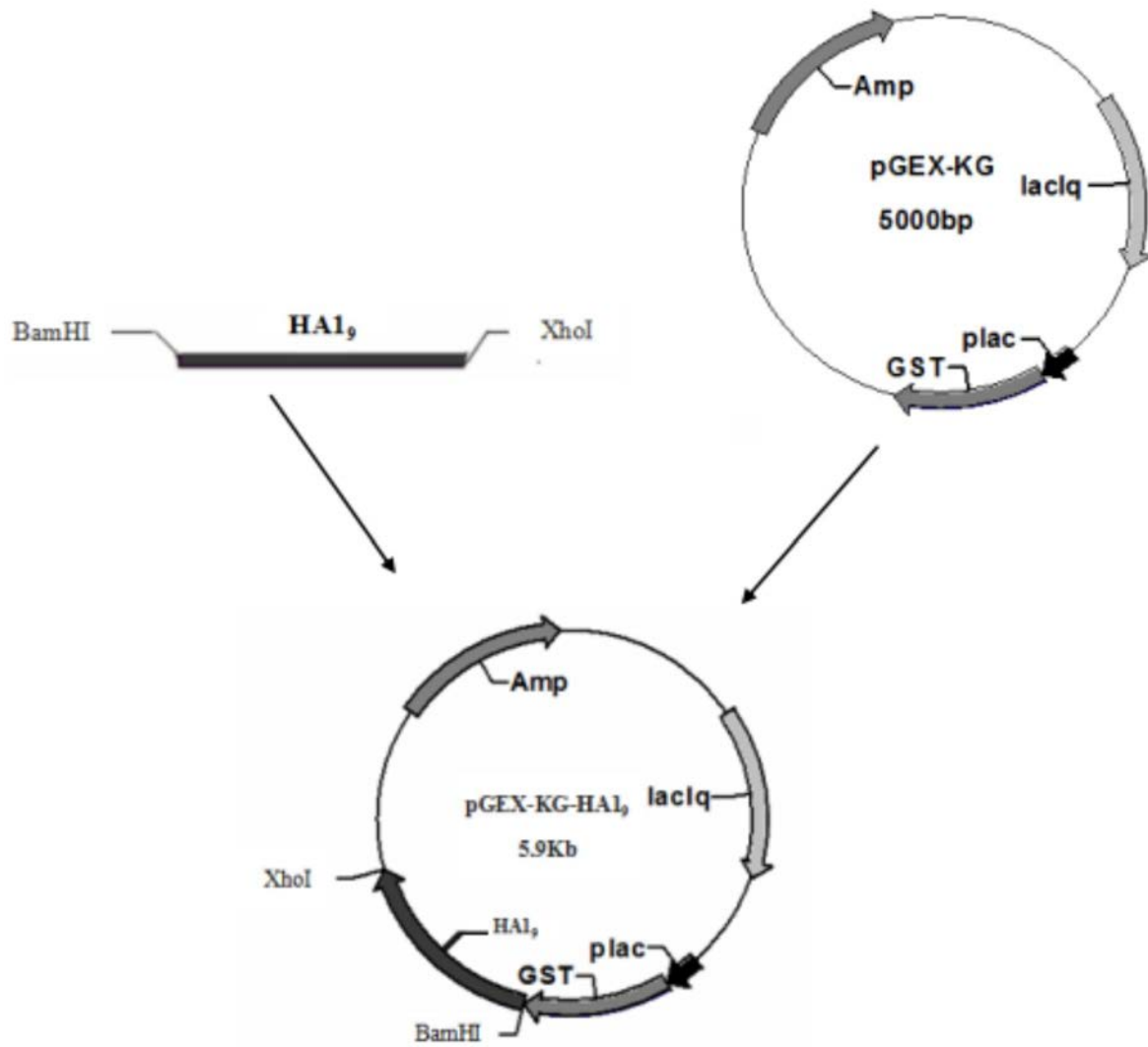


图4

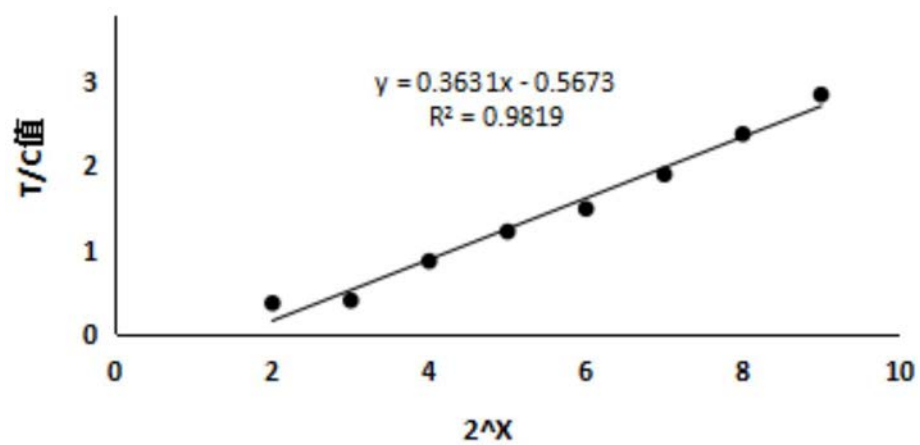


图5

专利名称(译)	禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸和测试卡		
公开(公告)号	CN110058016A	公开(公告)日	2019-07-26
申请号	CN201910175094.9	申请日	2019-03-08
[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	李自力 邵雨 胡思顺 毕丁仁 王喜亮 肖运才 金卉		
发明人	李自力 邵雨 胡思顺 毕丁仁 王喜亮 肖运才 金卉		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/56983		
代理人(译)	徐立		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种禽类H9亚型禽流感抗体胶体金检测试纸和测试卡，可以检测多种禽类的免疫水平，适用范围广、特异性强、灵敏度高、操作简单、耗时短。所述试纸包含顺序连接的样品垫、金标垫和硝酸纤维素膜，其中，所述金标垫上包被有单克隆抗体鼠抗IgY Fc CH3-CH4的胶体金标记物；所述硝酸纤维素膜上设有靠近金标垫一端的检测线和远离金标垫一端的质控线，所述检测线上包被有AIV-HA19重组蛋白，所述质控线上包被有二抗，编码所述AIV-HA19重组蛋白的DNA序列如SEQ ID NO.1所示。

