

[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 200310117066.0

[51] Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年4月4日

[11] 授权公告号 CN 1308689C

[22] 申请日 2003.12.8

[21] 申请号 200310117066.0

[73] 专利权人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路2号

[72] 发明人 刘金华 吴清民 樊玉磊 魏卉玲
刘祥

[56] 参考文献

DETECTION OF ANTIBODIES TO THE NON-STRUCTURAL PROTEIN(NS1) OF INFLUENZA A VIRUS ALLOWS DISTINCTION BETWEEN VACCINATED AND INFECTED HORSES H OZAKI ET AL, VETERINARY MICROBIOLOGY, Vol. 8 No. 2 2001

H9N2 亚型禽流感病毒非结构蛋白(NSI)基因的克隆与表达 刘金华等, 中国病毒学, 第18卷第5期 2003

我国部分鸡源 H9N2 亚型流感病毒 NSI 基因序列分析 刘金华等, 微生物学报, 第43卷第5期 2003

审查员 徐莉

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关畅

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测禽流感病毒自然感染的试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种检测自然禽流感病毒感染的试剂盒及其制备方法。本发明所提供的检测自然禽流感病毒感染的试剂盒,包括包被在酶标板上的禽流感病毒非结构蛋白 NS1、禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清和酶标二抗。制备上述检测自然禽流感病毒感染的试剂盒的方法,包括以下步骤:1)制备禽流感病毒非结构蛋白 NS1,并包被于酶标板上,用封闭液封闭;2)制备禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清;3)将步骤1)中得到的酶标板、步骤2)中得到的抗血清与酶标二抗共同包装,得到检测自然禽流感病毒感染的试剂盒。本发明的试剂盒能特异灵敏地检测出禽流感病毒感染抗体,疫苗免疫抗体检测不出,具有良好的应用前景。

1、一种检测自然禽流感病毒感染的试剂盒，包括包被在酶标板上的禽流感病毒非结构蛋白 NS1、禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清、阴性血清对照、辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的兔抗鸡抗抗体、血清稀释液、浓缩洗涤剂、显色剂和终止液；其中，将禽流感病毒非结构蛋白 NS1 包被在酶标板上时用的包被缓冲液为 pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液；血清稀释液为含 0.5%—1.5%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液；浓缩洗涤剂为 pH7.4 的含 0.8%—1.2%吐温的磷酸盐缓冲液；显色剂由 A 液和 B 液组成, A 液为过氧化氢或过氧化脲, B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；终止液为 1mol/L 的硫酸或盐酸。

2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：所述禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的编码基因是以序列表中 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 为引物进行 PCR 扩增得到的。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，其特征在于：所述禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清为鸡源、兔源、鼠源、羊源或马源抗血清。

4、一种制备权利要求 1 所述检测自然禽流感病毒感染的试剂盒的方法，包括以下步骤：

- 1) 制备禽流感病毒非结构蛋白 NS1，并包被于酶标板上，用封闭液封闭；
- 2) 制备禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清；
- 3) 将步骤 1) 中得到的酶标板、步骤 2) 中得到的抗血清以及阴性血清对照、辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶标记的兔抗鸡抗抗体、血清稀释液、浓缩洗涤剂、显色剂和终止液共同包装，得到检测禽流感病毒自然感染的试剂盒。

一种检测禽流感病毒自然感染的试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及一种检测禽流感病毒自然感染的试剂盒及其制备方法。

背景技术

由于禽流感对我国的养鸡业已造成了很大的损失，因而在我国许多养鸡场不得不使用禽流感灭活疫苗，但灭活疫苗的使用增加了禽流感的监测难度，可以造成许多假阳性；而按照世界卫生组织和国家要求，必须对禽流感进行定期普查和监测。因此，建立一种能区别自然感染鸡和疫苗免疫鸡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。

发明创造内容

本发明的目的是提供一种检测禽流感病毒自然感染的试剂盒。

本发明所提供的检测禽流感病毒自然感染的试剂盒，包括包被在酶标板上的禽流感病毒非结构蛋白 NS1、禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清和酶标二抗。

其中，所述禽流感病毒非结构蛋白 NS1 是以序列表中 SEQ ID No: 1 和 SEQ ID No: 2 为引物进行 PCR 扩增得到的；所述禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清可为鸡源、兔源、鼠源、羊源、马源等常用免疫动物的抗血清，优选为鸡源抗血清；所述标记酶可为辣根过氧化物酶或碱性磷酸酯酶，优选为辣根过氧化物酶，辣根过氧化物酶可通过戊二醛法或过碘酸法交联在抗体上；所述二抗可为抗鸡或抗鼠抗体，优选为兔抗鸡 IgG。

序列表中 SEQ ID No: 1 由 23 个碱基组成，序列为：5'-ACA GAA TTC TAA TGG ATT CCA AC-3'；SEQ ID No: 2 由 23 个碱基组成，序列为：5'-TTA CTC GAG CTG AAA

CTA GAA AG-3'，扩增片段长度为 850bp。

为了方便现场监控和大量样本筛查，所述试剂盒还包括阴性血清对照、血清稀释液、洗涤剂、终止剂、显色剂。

所述阴性血清对照为未感染禽流感病毒的 SPF 鸡血清；所述血清稀释液为 BSAT（含有 BSA 的 PBST 缓冲液）；所述洗涤剂为含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液；所述显色剂由显色液 A 液和显色液 B 液组成，所述显色液 A 液为过氧化氢或过氧化脲，所述显色液 B 液为邻苯二胺或四甲基联苯胺；所述终止剂为 1-2mol/L 硫酸或盐酸。

本发明的第二个目的是提供一种制备上述检测禽流感病毒自然感染的试剂盒的方法。

本发明的制备上述检测禽流感病毒自然感染的试剂盒的方法，包括以下步骤：

- 1) 制备禽流感病毒非结构蛋白 NS1，并包被于酶标板上，用封闭液封闭；
- 2) 制备禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清；
- 3) 将步骤 1) 中得到的酶标板、步骤 2) 中得到的抗血清与酶标二抗共同包装，得到检测自然禽流感病毒感染的试剂盒。

在实际应用中，为了方便现场操作，可将阴性血清对照、血清稀释液、洗涤剂、终止剂、显色剂也包装入上述试剂盒。

本发明巧妙地利用禽流感病毒非结构蛋白 NS1 制备了检测禽流感病毒自然感染的试剂盒，该试剂盒能特异灵敏地检测出禽流感病毒感染抗体，疫苗免疫抗体检测不出；而且制备容易，操作简单，使用方便，敏感性高，特异性强，反应快速，稳定，不但可用于实验室的诊断与科研，而且可用于大规模的流行病学调查，具有良好的应用前景。

附图说明

图 1 为检测禽流感病毒自然感染的试剂盒结构示意图

具体实施方式

实施例 1、抗原-禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的制备

(1) 禽流感病毒非结构蛋白 NS1 基因的扩增、克隆、测序

用酚-氯仿、乙醇沉淀方法自流感病毒感染尿囊液中提取 RNA，反转录之后按常规法进行 PCR 扩增。上游引物 SEQ ID No: 1: 5'-ACA GAA TTC TAA TGG ATT CCA AC-3'，含

有 *EcoR* I 限制性酶切位点；下游引物 SEQ ID No: 2: 5'-TTA CTC GAG CTG AAA CTA - GAA AG-3'，含有 *Xho* I 限制性酶切位点。扩增片段长度为 850bp。扩增程序为：96℃预变性 30s，96℃变性 30s，55℃退火 1min，72℃延伸 2min，进行 30 个循环，最后 72℃延伸 5min。PCR 产物经 QIAquick PCR purification Kit 纯化后，克隆到 pGEM-T Vector 中，得到重组质粒 pT/NS1。用 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切质粒 pT/NS1 和表达质粒载体 pET-30(c)，并从凝胶中回收 NS1 片段和载体片段，然后用 T4 连接酶做连接反应，连接产物转化于 BL21(DE3) 大肠杆菌感受态细胞中得重组表达质粒 pET/NS1。

以纯化质粒 pET/NS1 为模板，以 T7 promoter primer 和 T7 terminator primer 为测序引物，用 CEQ Dye Terminal Cycle Sequence Quick Start kit 试剂盒进行测序反应，用 CEQ 2000 Backman Coulter Sequencer (Backman Coulter) 全自动测序仪测序，序列测定结果证明插入片段与载体的连接部位的可读框正确。

(2) 禽流感病毒非结构蛋白 NS1 基因的蛋白表达、验证、纯化及大量制备

选择克隆阳性菌落接种于含卡那霉素的 LB 培养基中，37℃振荡培养至 $OD_{600} \approx 0.5$ ，加 IPTG 至终浓度为 0.4mmol/L，继续培养 2.5h，之后置冰中 5min，5000r/min 离心 5min，取沉淀按常规法进行 12%SDS-PAGE 电泳，结果表明，含 pET/NS1 重组质粒的 BL21(DE3) 大肠杆菌经 0.4mmol/L IPTG 诱导后有预期的蛋白表达，其分子量约为 30kDa。阳性者，留种保存，并进行 Western-blot 验证，结果表明，IPTG 诱导样本有特异条带，而未加 IPTG 诱导的大肠杆菌未见特异条带，证明该 30kDa 蛋白带系 NS1 基因表达产物。

经鉴定表达蛋白正确的菌株留种保存备用，并接种 LB 培养基，以 IPTG 为诱导剂，大规模培养重组工程菌，培养物经离心后，用蛋白纯化试剂盒纯化重组蛋白，经计算，纯化蛋白的浓度为 1.2mg/ml。

实施例 2、阳性血清对照和阴性血清对照的制备

(1) 禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清的制备

选择 6~8 周龄的健康 SPF 鸡，经 HI 和 ELISA 检测合格后，用表达纯化的非结构蛋白 NS1 免疫四次后。用琼脂扩散试验检测制备血清的效价，合格者，鸡只进行心脏采血。分离鸡血清，-20 冰箱冷冻备用。

(2) 阴性血清的制备

选择 6~8 周龄的健康 SPF 鸡，经 HI 和 ELISA 检测合格后，进行心脏采集血，血液凝固后，置 4 冰箱过夜，行无菌操作技术，分离鸡血清，-20 冰箱冷冻备用。

实施例 3、酶标板的制备

用包被缓冲液将稀释成 $0.1-1 \mu\text{g/ml}$ 的实施例 1 中纯化的 NS1，聚苯乙烯微量反应板每孔加入 $100 \mu\text{l}$ ， 37°C 包被 2h， 4°C 过夜，倾去包被液，用洗涤液洗涤 3 次，每次 30 秒，拍干，然后在每孔中加入 $150-200 \mu\text{l}$ 封闭液， 37°C 温育 1-2h，倾去孔内液体，干燥后用铝膜真空密封保存。

实施例 4、试剂盒的结构

(1) 试剂盒的结构

该试剂盒的结构如图 1 所示，它包括一个箱体 10，其中，箱体 10 内带有阳性血清 1、阴性血清 2、酶标二抗 3、底物显色液 A 液 4、底物显色液 B 液 5、终止液 6；血清稀释液 7；浓缩洗涤液 8；泡沫托架 9；和用铝塑膜袋封装的包被板 11，以上各种液体分别装在小瓶内。

(2) 试剂配制

1. 包被缓冲液 pH9.6, 0.05mol/L 的碳酸盐缓冲液。
2. 封闭液 含 0.5—1.5%牛血清白蛋白, 0.1%—0.5%Tween-20 的磷酸盐缓冲液。
3. 阳性血清 禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的抗血清, 1—2ml/瓶, 1 瓶。
4. 阴性血清 禽流感病毒非结构蛋白 NS1 的阴性血清, 1—2ml/瓶, 1 瓶。
5. 酶标二抗 酶标记兔抗鸡的抗抗体稀释液, 5—10ml/瓶, 1 瓶。
6. 底物显色液 A 液 过氧化氢或过氧化脲, 5—10ml, 1 瓶。
7. 底物显色液 B 液 邻苯二胺 (OPD) 或四甲基联苯胺 (TMB), 5—10ml/瓶, 1 瓶。
8. 终止液 1mol/L 硫酸或盐酸, 8—10ml/瓶, 1 瓶。
9. 血清稀释液 含 0.5%—1.5%牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液, 30~50ml/瓶, 1 瓶。
10. 浓缩洗涤液 含 0.8%—1.2%吐温的磷酸盐缓冲液 (0.01M pH7.4), 为正常使用浓度的 15~25 倍, 30~50ml/瓶, 1 瓶。含 0.05%Tween-20 的磷酸盐缓冲液。

实施例 5、阴阳性临界值的确定

测定 30 份经 IDEXX 公司禽流感抗体检测结果为阳性而经临床调查没有经过流感疫苗免疫过的血清以及 20 份 SPF 鸡经禽流感病毒弱毒静脉接种而分离的血清，计算其 OD 值及标准差。阴阳性临界值 = 阴性样本 OD 平均值 + 3X 标准差。经计算，把阴阳性临界值定为 0.16。OD 值大于 0.16 可判定禽流感 NS1 抗体阳性，否则判为阴性。

实施例 6、用本发明试剂盒检测禽流感自然感染鸡和疫苗免疫鸡

1、禽流感自然感染鸡和疫苗免疫鸡血清样品的采集

在实验室条件下，在隔离条件下，对 20 只 SPF 鸡进行禽流感病毒弱毒静脉接种，10 天后翅静脉采集血清，100 倍稀释后，进行 ELISA 检测。另一组 10 只鸡进行禽流感油乳剂灭活苗肌肉接种，15 天后，翅静脉采集血清，100 倍稀释后，进行检测。

2、检测方法

(1) 加入阳性血清对照、阴性血清对照：向图 1 两个孔中分别加入实施例 3 制备的阳性血清对照、阴性血清对照，每孔 100 微升。

(2) 加样品：将待检血清用实施例 5 中的血清稀释液按 1:100 的比例稀释后，加入包被板 11 的孔中（100 微升），37°C 反应 30 分钟。

(3) 洗涤：弃掉样品，向每孔加入洗涤液（含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液）200 微升，洗涤 3 次。

(4) 加酶标二抗：每孔加入实施例 4 中制备的酶标二抗 100 微升，37°C 反应 30 分钟。

(5) 洗涤：弃掉酶标二抗，向每孔加入洗涤液（含 0.05% Tween-20 的磷酸盐缓冲液）200 微升，洗涤 3 次。

(6) 加底物：弃掉以上洗涤液后，每孔加入实施例 5 中的底物显色液 A 液 50 μ l，再加底物显色液 B 液 50 μ l，轻轻振荡混匀，37°C 恒温箱避光显色 15-30 分钟。每孔加入 1mol/L 硫酸 50 μ l，轻轻振荡混匀，用酶标仪，测定每孔吸光度值（OD₄₅₀ 值）。

(7) 读数：酶标仪选择 450nm 波长读数，OD₄₅₀ 值大于 0.16 的为阳性。

结果表明禽流感实验感染鸡的 OD₄₅₀ 值平均值为 0.28，禽流感疫苗免疫鸡的 OD₄₅₀ 平均值为 0.07。

序列表

<160>2

<210>1

<211>23

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>1

acagaattct aatggattcc aac

23

<210>2

<211>23

<212>DNA

<213>人工序列

<220>

<223>

<400>2

ttactcgagc tgaaactaga aag

23

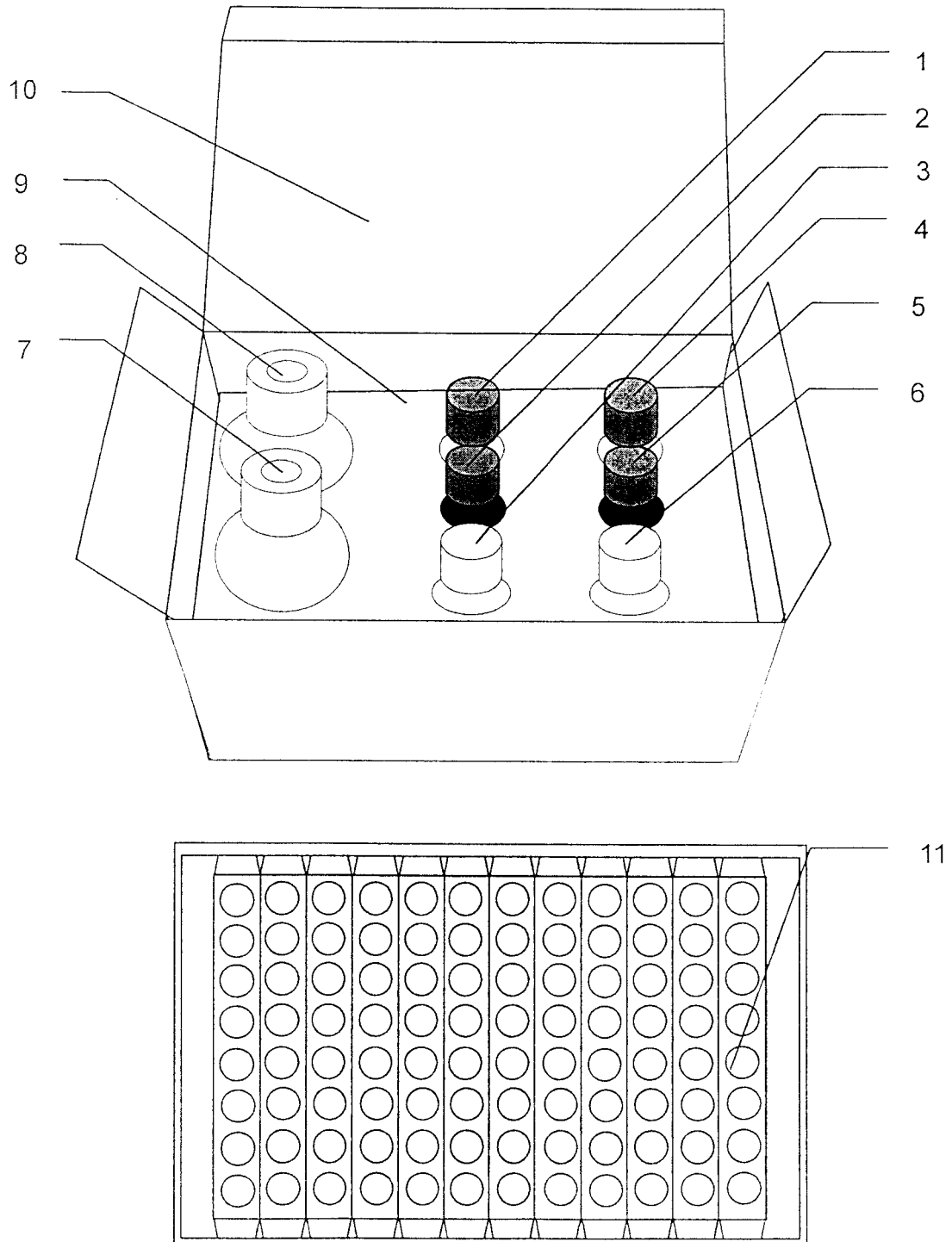


图 1

专利名称(译)	一种检测禽流感病毒自然感染的试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN1308689C	公开(公告)日	2007-04-04
申请号	CN200310117066.0	申请日	2003-12-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	刘金华 吴清民 樊玉磊 魏卉玲 刘祥		
发明人	刘金华 吴清民 樊玉磊 魏卉玲 刘祥		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1627075A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测自然禽流感病毒感染的试剂盒及其制备方法。本发明所提供的检测自然禽流感病毒感染的试剂盒，包括包被在酶标板上的禽流感病毒非结构蛋白NS1、禽流感病毒非结构蛋白NS1的抗血清和酶标二抗。制备上述检测自然禽流感病毒感染的试剂盒的方法，包括以下步骤：1)制备禽流感病毒非结构蛋白NS1，并包被于酶标板上，用封闭液封闭；2)制备禽流感病毒非结构蛋白NS1的抗血清；3)将步骤1)中得到的酶标板、步骤2)中得到的抗血清与酶标二抗共同包装，得到检测自然禽流感病毒感染的试剂盒。本发明的试剂盒能特异灵敏地检测出禽流感病毒感染抗体，疫苗免疫抗体检测不出，具有良好的应用前景。

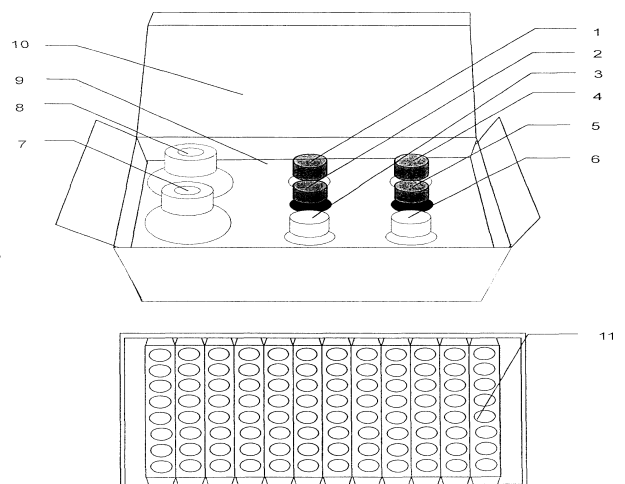


图 1