

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810114767.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月1日

[11] 公开号 CN 101470116A

[22] 申请日 2008.6.12

[21] 申请号 200810114767.1

[71] 申请人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路-甲3号中国检验检疫科学研究院

[72] 发明人 邹明强 李锦丰 薛强 齐小花  
金涌 田世民

[74] 专利代理机构 北京双收知识产权代理有限公司

代理人 赵天真

权利要求书5页 说明书11页 附图1页

[54] 发明名称

检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法及其试剂盒

[57] 摘要

本发明提供一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法及其试剂盒,步骤如下:1)制备免疫渗滤试纸条;2)禽流感病毒多克隆抗体在免疫渗滤试纸条上的固定化;3)制备禽流感病毒金标单克隆抗体金标探针;4)制备增敏试剂;5)检测禽流感病毒。本发明利用氯金酸与抗坏血酸发生氧化还原反应生成金原子可被胶体金吸附的特点,来定位胶体金沉积部位进行显色加强,提高了待检抗原的检测灵敏度8~50倍。本发明是在胶体金斑点免疫渗滤测定法(双抗体夹心)的基础上,采用纳米金颗粒增敏技术,能提高检测禽流感病毒的检测灵敏度,能进行样品的高通量筛查,适用于基层或现场检测禽流感病毒。

1. 一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法，步骤如下：

1) 制备免疫渗滤试纸条

免疫渗滤试纸条为 A 或 B 之一；

制备免疫渗滤试纸条 A：沿长为 40-110mm、宽为 3-6 mm 的矩形聚乙烯塑料基片长的方向设有孔间距为 2-4 mm 的 8-15 个呈一行分布的直径为 0.5-3 mm 的圆形进样孔；将与聚乙烯塑料基片大小相同的硝酸纤维素膜片粘附于其下面；加样时带有进样孔的聚乙烯塑料基片在上；

制备免疫渗滤试纸条 B：切制 8-15 个直径 0.5-3 mm 的圆形硝酸纤维素膜片粘附于长为 40-110mm、宽为 3-6 mm 的矩形聚乙烯塑料基片，膜片间距为 3-4 mm；每个膜片下方的塑料基片上设有两个吸水孔，吸水孔是将与膜片圆心重叠、与塑料基片长平行的长轴比膜片圆的直径长 0.3mm、与塑料基片宽平行的短轴比膜片圆的直径短 0.2mm 的椭圆未被膜片覆盖的部分去除得到的孔，加样时带吸水孔的塑料聚乙烯基片在下面；

2) 禽流感病毒多克隆抗体在免疫渗滤试纸条上的固定化

(1) 制备固定化禽流感病毒多克隆抗体的免疫渗滤试纸条

a. 制备禽流感病毒多克隆抗体溶液

用磷酸盐缓冲液 PBS 稀释禽流感病毒多克隆抗体，使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 0.05-0.3mg/mL，制得禽流感病毒多克隆抗体溶液；

b. 禽流感病毒多克隆抗体在免疫渗滤试纸条上的固定化

禽流感病毒多克隆抗体在免疫渗滤试纸条上固定化采用点样固定化法或浸泡固定化法之一；

点样固定化法：向上述免疫渗滤试纸条 A 的每个进样孔或免疫渗滤试纸条 B 的每个膜片上点 1-3  $\mu\text{L}$  上述禽流感病毒多克隆抗体溶液；点样可为 1 次-3 次，待渗，风干；得到固定化试纸条 A 或 B；

或浸泡固定化法：取 500-1000  $\mu\text{L}$  上述禽流感病毒多克隆抗体溶液置于小试管中，4 $^{\circ}\text{C}$  浸泡 5-10 条免疫渗滤试纸条 A 或 B 10-15 小时，取出，风干；得到固定化试纸条 A 或 B；

(2) 试纸条的封闭

将上述用点样法或浸泡法得到的固定化试纸条 A 或 B，放入用双蒸水稀释的重量百分比浓度为 1-5% 的牛血清白蛋白溶液中，37℃ 封闭 20-60min；取出，风干，得到待用固定化试纸条；4℃ 保存，备用；

### 3) 制备禽流感病毒金标单克隆抗体探针

#### (1) 制备胶体金溶液

##### a. 制备胶体金溶液的试剂及其体积配比：

双蒸水	100mL 、
新鲜制备的重量百分比浓度为 1% 的氯金酸水溶液	1mL、
重量百分比浓度为 1% 的柠檬酸三钠水溶液	1.0-1.5 mL；

##### b. 制备胶体金溶液

将所需的双蒸水加热煮沸；加入所需的新鲜制备的重量百分比浓度为 1% 的氯金酸水溶液，迅速加入所需的重量百分比浓度为 1% 的柠檬酸三钠水溶液，不断搅拌，得到酒红色的胶体金溶液；

#### (2) 胶体金标记禽流感病毒单克隆抗体

##### a. 制备禽流感病毒单克隆抗体

用禽流感病毒免疫小鼠制备获得能够分泌禽流感单克隆抗体的杂交瘤细胞株，获得通用 A 型禽流感病毒、H5 亚型禽流感病毒、H7 亚型禽流感病毒或 H9 亚型禽流感病毒的特异性单克隆抗体之一；

##### b. 制备胶体金标记禽流感病毒单克隆抗体

取上述制备的胶体金溶液 10 mL，用重量百分比浓度为 1% 的碳酸钾水溶液调节 pH 至 8.5—9.2；用磷酸盐缓冲液 PB 将上述制备获得的禽流感病毒单克隆抗体稀释至蛋白含量为 0.1—1 mg/mL、pH 与上述调节后的胶体金溶液的 pH 值相同，各取 0.1-0.5mL，分别在 13000rpm、4℃ 下离心 1 小时，得到上清液；快速搅拌下将上清液逐滴加入到上述调节过 pH 值的胶体金溶液中，至液体的最小蛋白量为 10—20μg/mL，室温放置 5min；再分别加入过滤后的重量百分比浓度为 10% BSA 溶液 1ml，继续搅拌 10-15 分钟，然后在 13000 rpm、4℃ 离心 1 小时，小心弃去上清液，得到沉淀物；用 10 ml、浓度为 0.01mol/L、pH 8.2 且其中 BSA 的重量百分比浓度为 1% 的三羟甲基氨基甲烷溶液将上述各沉淀物溶解，再在 1000 rpm/min、4℃ 离心下 10 分钟，去除聚集物，留上清液，弃去底部

的沉淀，将上清液 13000 rpm、4℃离心 1 小时；用 5 mL 含有重量百分比浓度分别为 0.02%的叠氮钠、1%的蔗糖、1%的 BSA 且 pH 为 8.2 的三羟甲基氨基甲烷溶液重新悬浮底部疏松沉淀，得到禽流感金标单克隆抗体探针；置于 4℃冰箱保存备用；

#### 4)制备增敏试剂

增敏试剂为试剂 A 和试剂 B；

配制试剂 A：配制重量百分比浓度为 1%—10%的氯金酸水溶液；

配制试剂 B：配制重量百分比浓度大于 0.1-0.5%的抗坏血酸水溶液；

#### 5)检测禽流感病毒

(1) 向上述制备的待用固定化试纸条 A 的进样孔或 B 的膜片上分别滴加用 PBS 稀释成溶液中抗原重量百分比浓度为 0.05-0.1mg/mL 的通用 A 型、H5、H7 或 H9 型禽流感病毒抗原之一作为需要检测的阳性对照、用洗脱离心稀释常规方法前处理后溶于 PBS 缓冲溶液的待测样本、针对所要检测的阳性对照抗原通过鸡胚获得的未经病毒感染的尿囊液的阴性对照，各滴加 1—3  $\mu\text{L}$ ，待渗，在室温下反应 1 分钟以上；得到带阳性对照抗原、待测样本及阴性对照的试纸条；

(2) 取与上述已选定的需要检测的阳性对照抗原相对应的金标单克隆抗体探针溶液，每份取 1—3  $\mu\text{L}$ ，滴加于上述带阳性对照抗原、待测样本及阴性对照的试纸条 A 的每个已加过样品的进样孔或 B 的每个膜片上；室温反应 0.5~2 分钟，再分别加入含体积百分比浓度为 0.02%的吐温 20 的磷酸盐洗液 PBST，洗 2-5 次，每次三滴，每滴 2—10 $\mu\text{L}$ ，得到待检测试纸条；

(3) 分别向上述待检测试纸条 A 已加过金标单克隆抗体探针的每个进样孔或试纸条 B 的每个膜片上先滴加 1-3  $\mu\text{L}$  上述增敏试剂的试剂 A，然后再滴加 3—8  $\mu\text{L}$  增敏试剂的试剂 B，待风干后，再重复述操作 1 至 2 次；最后一次滴加后 1—2 分钟观察结果，肉眼观察若有灰黑色斑点，则认为该位置对应的禽流感病毒为阳性结果，与阴性对照显色结果无明显区别，则认为该位置对应的禽流感病毒为阴性结果。

2. 如权利要求 1 所述一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法，其特征在于，制备禽流感病毒多克隆抗体溶液的步骤中，溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 0.1-0.2 mg/mL。

3. 如权利要求 2 所述一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法, 其特征在于, 制备胶体金溶液的的步骤中, 试剂中重量百分比浓度为 1% 的柠檬酸三钠水溶液的配比为 1.2 mL。

4. 如权利要求 3 所述一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法, 其特征在于, 制备胶体金标记禽流感病毒单克隆抗体的步骤中, 将胶体金溶液调节 pH 为 8.7-9.0。

5. 如权利要求 4 所述一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法, 其特征在于, 制备胶体金标记禽流感病毒单克隆抗体的步骤中, 快速搅拌下将上清液逐滴加入到上述调节过 pH 值的胶体金溶液中, 至液体的最小蛋白量为 10-16 $\mu$ g/mL。

6. 如权利要求 5 所述一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法, 其特征在于, 制备增敏试剂 A 试剂的步骤中, 氯金酸水溶液中氯金酸的重量百分比浓度为 1-2%。

7. 如权利要求 6 所述一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法, 其特征在于, 制备增敏试剂 B 试剂的步骤中, 抗坏血酸水溶液中抗坏血酸的重量百分比浓度为 0.15%。

8. 如权利要求 1 所述一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法, 其特征在于, 试剂盒的装配包括:

1) 按上述方法制备的固定化渗滤试纸条 A 或 B 100 条, 平时于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存;

2) 磷酸盐缓冲液 PBS 100ml, 置于塑料瓶中;

3) 按上述方法制备的增敏试剂 A 试剂 10 mL, 可检测 100 组试纸条; 按上述方法制备的增敏试剂 B 试剂 10 mL, 可检测 100 条试纸条;

4) 磷酸盐洗液 PBST 100mL;

5) 阳性对照抗原液, 用 PBS 稀释成溶液中抗原重量百分比浓度为 0.05-0.1mg/mL 的通用 A 型、H5、H7 或 H9 型禽流感病毒抗原之一的溶液 1ml; 可检测 100 条试纸条;

6) 阴性对照液, 针对所要检测的阳性对照抗原通过鸡胚获得的未经病毒感染的尿囊液 10mL; 可检测 100 条试纸条;

7) 金标探针试剂, 取蛋白含量为 10—20 $\mu\text{g}/\text{mL}$  的针对阳性对照的禽流感病毒单克隆抗体探针液 1000  $\mu\text{L}$ , 放在小玻璃瓶中, 抽成真空后封口, 平时于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存; 可检测 100 条试纸条;

8) 塑料滴瓶 10 个、1—25 $\mu\text{L}$  量程的移液枪;

9) 长、宽分别大于渗滤试纸条 A 或 B 的滤纸 100 张。

## 检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法及其试剂盒

### 技术领域

本发明涉及一种病毒的检测方法,尤其涉及一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法及其试剂盒。

### 背景技术

禽流感 (Avian Influenza, AI) 是由 A 型流感病毒引起的禽类的一种从呼吸病到严重败血症等多种症状的急性高致病性传染病。除了禽类, A 型流感病毒还感染其他种属的动物, 如马、猪等, 1997 年首次发现高致病性禽流感 H5N1 可感染人类。自禽流感于 1878 年在意大利发现以来, 给养鸡业造成巨大的经济损失。历史上危害最大, 经济损失最严重的一次禽流感 (H5N1) 爆发于 1983 年美国滨州地区, 美国政府为此共花费了 6000 多万美元, 间接经济损失估计达 3.48 亿美元。我国香港地区近期爆发的禽流感, 据估计损失约达 8000 万港币。1997 年及 2003 年在香港 H5N1 禽流感已干扰 18 人, 4 人死亡, 2003 年年底开始该病毒在亚洲国家已造成上百人感染, 几十人死亡。2006 年 2 月以来, 禽流感疫情愈演愈烈, 马来西亚、俄罗斯、中国、波黑、罗马尼亚、法国、印度、埃及、德国、奥地利、伊朗、希腊、斯洛文尼亚、意大利等国相继报道了禽流感疫情。因此对禽流感病毒简便、快捷、高灵敏度、高特异性的检测成为控制禽流感疫情扩散的当务之急。

现有禽流感病毒检测方法主要分为抗体检测及抗原检测方法。抗体检测方法包括: 血凝抑制试验 (Hemagglutination inhibition, HI)、琼脂免疫扩散试验 (Agarose gel immunodiffusion, AGID)、酶联免疫吸附试验 (Enzyme-linked Immunosorbent Assay, ELISA)、补体结合试验 (Complement Fixation Assays, CF)、神经氨酸酶抑制试验 (Neuraminidase inhibitor test, NIT) 以及病毒中和试验 (Virus neutralization Test, VNT) 等。由于抗体检测方法不能区分人工注射疫苗和病毒感染因而对动物检疫缺乏实际应用意义。因此, 目前禽流感病毒检测主要为抗原检测方法, 相对快速的方法为 ELISA 和荧光 RT-PCR, 但这两种方法在大范围应用中存在以下缺陷: (1) 需要昂贵的仪器设备, 检测成本较高且不易在基层单位推

广；(2)所有这些技术方法都不能在基层生产场、检疫站和临床等现场使用，必须有专门的实验室；(3)操作较繁琐，检测时间均在数小时以上，直接影响了疫情的防控速度。

由于胶体金颗粒对许多蛋白质都有很强的吸附作用，可与 SPA、IgG、毒素、糖蛋白、酶、抗生素和激素等多种物质非共价结合，从而使其成为免疫反应的优良标记物，并使得固相膜免疫测定技术（Solid Phase Membrane-based Immunoassay）更加简便。常用的固相膜为硝酸纤维素（nitrocellulose, NC）膜。斑点免疫测定法（Dot-Immunobinding Assay, DIBA）是在免疫印迹技术基础上改良发展起来的一项技术。由于其敏感性、特异性与酶联免疫测定法（ELISA）相当，且操作简单、快速而发展为不同的方法。其中包括斑点免疫渗滤测定法（Dot Immuno Filtration Assay, DIFA）和斑点免疫层析测定法（Dot Immuno Chromatographic Assay, DICA）。以胶体金为标记物的斑点免疫渗滤测定法称为胶体金免疫渗滤测定法（Dot-Immunogold Filtration Assay, DIGFA）。然而，上述几种方法检测禽流感病毒难以满足高灵敏度的要求。以往人们主要利用银染色技术来提高 DIGFA 的检测灵敏度。然而，该技术的缺点是背景模糊，增敏效果相对不强，因而限制了其应用范围。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法及其试剂盒。本发明是在胶体金斑点免疫渗滤测定法（双抗体夹心）的基础上，采用纳米金颗粒增敏技术，能显著提高检测禽流感病毒的灵敏度，具有敏感、快速和特异性好等特点，并且价格低廉，能进行样品的高通量筛查，适用于基层或现场检测禽流感病毒，从而克服了目前胶体金免疫渗滤测定法（DIGFA）检测灵敏度不高的问题。

本发明检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏测定方法，步骤如下：

#### 1. 制备免疫渗滤试纸条

免疫渗滤试纸条为 A 或 B 之一；

制备免疫渗滤试纸条 A：沿长为 40-110mm、宽为 3-6 mm 的矩形聚乙烯（PE）塑料基片长的方向设有孔间距为 2-4 mm 的 8-15 个呈一行分布的直径为 0.5-3 mm 的圆形进样孔；将与聚乙烯（PE）塑料基片大小相同的硝酸纤维素

(NC)膜片粘附于其下面；加样时带有进样孔的聚乙烯(PE)塑料基片在上；

制备免疫渗滤试纸条 B：切制 8-15 个直径 0.5-3 mm 的圆形硝酸纤维素膜片粘附于长为 40-110mm、宽为 3-6 mm 的矩形聚乙烯(PE)塑料基片，膜片间距为 3-4 mm；每个膜片下方的塑料基片上设有两个吸水孔，吸水孔是将与膜片圆心重叠、与塑料基片长平行的长轴比膜片圆的直径长 0.3mm、与塑料基片宽平行的短轴比膜片圆的直径短 0.2mm 的椭圆未被膜片覆盖的部分去除得到的孔，加样时带吸水孔的塑料聚乙烯(PE)基片在下面；

## 2. 禽流感病毒多克隆抗体在免疫渗滤试纸条上的固定化

### 1) 制备固定化禽流感病毒多克隆抗体的免疫渗滤试纸条

a. 制备禽流感病毒多克隆抗体溶液，用 800mL 蒸馏水溶解 8g 氯化钠(NaCl)、0.2g 氯化钾(KCl)、1.44g 磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )和 0.24g 磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )，用盐酸(HCl)调节溶液的 pH 值至 7.4，加水至 1L，摇匀，制成 pH7.4 的磷酸盐缓冲液(PBS, Phosphate Buffer Saline)，用磷酸盐缓冲液 PBS 稀释禽流感病毒多克隆抗体，使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 0.05-0.3mg/mL，优选重量百分比浓度为 0.1-0.2 mg/mL，制得禽流感病毒多克隆抗体溶液；

### b. 禽流感病毒多克隆抗体在免疫渗滤试纸条上的固定化

禽流感病毒多克隆抗体在免疫渗滤试纸条上固定化采用点样固定化法或浸泡固定化法之一；

点样固定化法：向上述免疫渗滤试纸条 A 的每个进样孔或免疫渗滤试纸条 B 的每个膜片上点 1-3  $\mu\text{L}$  上述禽流感病毒多克隆抗体溶液；点样可为 1 次-3 次，待渗，风干；得到固定化试纸条 A 或 B；

或浸泡固定化法：取 500-1000  $\mu\text{L}$  上述禽流感病毒多克隆抗体溶液置于小试管中，4 $^{\circ}\text{C}$  浸泡 5-10 条免疫渗滤试纸条 A 或 B 10-15 小时，取出，风干；得到固定化试纸条 A 或 B；

### 2) 试纸条的封闭

将上述用点样法或浸泡法得到的固定化试纸条 A 或 B，放入用双蒸水稀释的重量百分比浓度为 1-5% 的牛血清白蛋白溶液(BSA)中，37 $^{\circ}\text{C}$  反应 20-60min；取出，风干，得到待用固定化试纸条；4 $^{\circ}\text{C}$  保存，备用；

### 3. 制备禽流感病毒金标单克隆抗体探针

#### 1) 制备胶体金溶液

##### a. 制备胶体金溶液的试剂及其体积配比:

双蒸水	100mL、
新鲜制备的重量百分比浓度为1%的氯金酸水溶液	1mL、
重量百分比浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液	1.0-1.5 mL;

其中重量百分比浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液的优选配比为1.2 mL;

##### b. 制备胶体金溶液

将所需的双蒸水加热煮沸;加入所需的新鲜制备的重量百分比浓度为1%的氯金酸水溶液,迅速加入所需的重量百分比浓度为1%的柠檬酸三钠水溶液,不断搅拌,得到酒红色的胶体金溶液;

#### 2) 胶体金标记禽流感病毒单克隆抗体

##### a. 制备禽流感病毒单克隆抗体

用禽流感病毒免疫小鼠制备获得能够分泌禽流感单克隆抗体的杂交瘤细胞株,获得通用A型禽流感病毒、H5亚型禽流感病毒、H7亚型禽流感病毒或H9亚型禽流感病毒的特异性单克隆抗体之一;各亚型禽流感病毒单克隆抗体只与相应亚型的禽流感病毒抗原发生特异性反应,从而决定了试纸条的特异性;用上述胶体金标记抗体,制成金标抗体,可与待检样品中的禽流感病毒特异性的结合;

##### b. 制备胶体金标记禽流感病毒单克隆抗体

取上述制备的胶体金溶液10 mL,用重量百分比浓度为1%的碳酸钾( $K_2CO_3$ )水溶液调节pH至8.5—9.2(用前调节,过早调节会出现聚集现象),优选pH为8.7—9.0;用800mL蒸馏水溶解0.2g氯化钾(KCl),1.44g磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4$ )和0.24g磷酸二氢钾( $KH_2PO_4$ ),用盐酸(HCl)调节溶液的pH值至7.4,加水至1L,摇匀,制成磷酸盐缓冲液(PB, Phosphate Buffer);用磷酸盐缓冲液(PB)将上述制备获得的禽流感病毒单克隆抗体稀释至蛋白含量为0.1—1 mg/mL、pH与上述调节后的胶体金溶液的pH值相同,取0.1-0.5mL,在13000rpm、4℃下离心1小时,得到上清液;快速搅拌下将上清液逐滴加入到上述调节过pH值的胶体金溶液中,至液体的最小蛋白量为10—20 $\mu$ g/mL,优选最

小蛋白含量为 10–16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ；室温放置 5min；再分别加入过滤后的重量百分比浓度为 10%BSA 溶液 1ml，继续搅拌 10-15 分钟，然后在 13000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$  离心 1 小时，小心弃去上清液（应无色液体，若出现红色则说明离心速度和时间不够），得到沉淀物；用 10 ml 浓度为 0.01mol/L、pH 8.2 且其中 BSA 的重量百分比浓度为 1%的三羟甲基氨基甲烷溶液(TBS, Tris Buffered Saline)将上述沉淀物溶解，再在 1000 rpm/min、4 $^{\circ}\text{C}$  离心下 10 分钟，去除聚集物，留上清液，弃去底部的沉淀，将上清液 13000 rpm、4 $^{\circ}\text{C}$  离心 1 小时；用 5 ml 含有重量百分比浓度分别为 0.02%的叠氮钠、1%的蔗糖、1%的 BSA 且 pH 为 8.2 的三羟甲基氨基甲烷溶液（TBS）重新悬浮底部疏松沉淀，得到禽流感金标单克隆抗体探针；置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用；

#### 4. 制备增敏试剂

增敏试剂为试剂 A 和试剂 B；

配制试剂 A：配制重量百分比浓度为 1%–10%的氯金酸水溶液；氯金酸水溶液中氯金酸的优选重量百分比浓度为 1-2%；

配制试剂 B：配制重量百分比浓度大于 0.1-0.5%的抗坏血酸水溶液；抗坏血酸水溶液中抗坏血酸的优选重量百分比浓度为 0.15%；

#### 5. 检测禽流感病毒

1) 向上述制备的待用固定化试纸条 A 的进样孔或 B 的膜片上分别滴加用 PBS 稀释成溶液中抗原重量百分比浓度为 0.05-0.1mg/mL 的通用 A 型、H5、H7 或 H9 型禽流感病毒抗原之一作为需要检测的阳性对照、用洗脱离心稀释常规方法前处理后溶于 PBS 缓冲溶液的待测样本、针对所要检测的阳性对照抗原通过鸡胚获得的未经病毒感染的尿囊液的阴性对照，各滴加 1–3  $\mu\text{L}$ ，每个样品滴加 1–2 份（即分别将 2 份相同的抗原、待测样品或阴性对照细胞液分别滴入或 2 个进样孔或 2 个膜片上，可同时做平行样），待渗，在室温下反应 1 分钟以上；得到带阳性对照抗原、待测样本及阴性对照的试纸条；

2) 取与上述已选定的需要检测的阳性对照抗原相对应的金标单克隆抗体探针溶液，每份取 1–3  $\mu\text{L}$ ，滴加于上述带阳性对照抗原、待测样本及阴性对照的试纸条 A 的每个已加过样品的进样孔或 B 的每个膜片上；室温反应 0.5~2 分钟，优选时间为 1–2 分钟；再分别加入含体积百分比浓度为 0.02%的吐温 20 的磷酸

盐洗液 PBST, 洗 2-5 次, 每次三滴, 每滴 2—10 $\mu$ L, 得到待检测试纸条;

3) 分别向上述待检测试纸条 A 已加过金标单克隆抗体探针的每个进样孔或试纸条 B 的每个膜片上先滴加 1-3  $\mu$ L 上述增敏试剂的试剂 A, 然后再滴加 3—8  $\mu$ L 增敏试剂的试剂 B, 待风干后, 再重复上述操作 1 至 2 次; 最后一次滴加后 1—2 分钟观察结果, 肉眼观察若有灰黑色斑点, 则认为该位置对应的禽流感病毒为阳性结果, 与阴性对照显色结果无明显区别, 则认为该位置对应的禽流感病毒为阴性结果。

若待测人或动物的分泌物、血清、尿液或者食品浸提液中含有禽流感病毒凝素亚型 (H 型) 和神经氨酸酶亚型 (N 型) 的一种或数种, 当 NC 膜与分泌物、血清、尿液或者食品浸提液等待测样本接触时, 如果禽流感病毒单克隆抗体对应的斑点呈阳性时, 则可特异性地确定禽流感病毒属于某种或某些种病毒亚型。采用增敏试剂进行一次或多次处理, 与原有斑点免疫金测定法相比, 禽流感检测灵敏度可显著提高 8~50 倍。

本发明所需的通用 A 型禽流感病毒抗原和各亚型禽流感病毒抗原、禽流感病毒多克隆抗体可到相关专业的研究单位、公司购买或定制; 所需的仪器、设备、药品均有市售。

#### 附图说明

图 1: 免疫渗滤试纸条为 A 的正视图。

图 2: 免疫渗滤试纸条为 A 的俯视图。

图 3: 免疫渗滤试纸条为 B 的正视图。

图 4: 免疫渗滤试纸条为 B 的俯视图。

#### 具体实施方式

本发明通过以下实施例作进一步具体描述。

##### 实施例 1: 各种试剂的配制

1. 氯金酸水溶液: 称取 1.0g 氯金酸, 溶解于 100mL 双蒸水中, 形成重量百分比浓度为 1%的氯金酸水溶液, 摇匀。

2. 柠檬酸三钠水溶液: 称取 1.0g 柠檬酸三钠, 溶解于 100mL 双蒸水中, 形成重量百分比浓度为 1%的柠檬酸三钠水溶液, 摇匀。

3. 磷酸盐缓冲液 (PBS): 用 800mL 蒸馏水溶解 8g 氯化钠 (NaCl), 0.2g

氯化钾 (KCl), 1.44g 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 和 0.24g 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 用盐酸 (HCl) 调节溶液的 pH 值至 7.4, 加水至 1L, 摇匀。

4. 磷酸盐缓冲液 (PB): 用 800mL 蒸馏水溶解 0.2g 氯化钾 (KCl), 1.44g 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 和 0.24g 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 用盐酸 (HCl) 调节溶液的 pH 值至 7.4, 加水至 1L, 摇匀。

5. 磷酸盐洗液 (PBST): 用 800mL 蒸馏水溶解 8g 氯化钠 (NaCl), 0.2g 氯化钾 (KCl), 1.44g 磷酸氢二钠 ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 和 0.24g 磷酸二氢钾 ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), 用盐酸 (HCl) 调节溶液的 pH 值至 7.4, 加水至 1L, 摇匀, 加入 200  $\mu\text{L}$  的吐温 20, 摇匀。

6. 禽流感多克隆抗体: 用 PBS 稀释, 摇匀, 使溶液中多克隆抗体重量百分比浓度为 0.05-0.3mg/mL。

#### 实施例 2: 禽流感病毒胶体金免疫渗滤增敏试剂盒及使用方法

##### 1. 禽流感病毒胶体金免疫渗滤增敏方法试剂盒的装配

1) 按上述方法制备的固定化渗滤试纸条 A 或 B 100 条, 平时于 4°C 冰箱中保存;

下面结合附图对试纸条 A 或 B 作进一步说明:

如图 1、图 2, 试纸条 A 的塑料基片 1 长为 40mm、宽为 3 mm, 沿长的方向设有孔间距为 2mm 的 8 个呈一行分布的直径为 0.5mm 的圆形进样孔 3, 与塑料基片大小相同的硝酸纤维素膜片 2 重叠置于其下面。或试纸条 A 的塑料基片 1 长为 110mm、宽为 6 mm, 沿长的方向设有孔间距为 4mm 的 15 个呈一行分布的直径为 3mm 的圆形进样孔 3, 与塑料基片大小相同的硝酸纤维素膜片 2 重叠粘附于其下面;

如图 3、图 4, 试纸条 B 为切制 8 个直径 0.5 mm 的圆形硝酸纤维素膜片 1 粘附于长为 40mm、宽为 3 mm 的塑料基片 2 上, 各个膜片间距为 3 mm; 每个膜片下方的塑料基片上设有两个吸水孔 3, 吸水孔是将与膜片圆心重叠、与塑料基片长平行的长轴为比膜片圆的直径长 0.3mm 即 0.8mm、与塑料基片宽平行的短轴为比膜片圆的直径短 0.2mm 即 0.3mm 的椭圆未被膜片覆盖的部分去除得到的孔, 加样时带吸水孔的塑料聚乙烯 (PE) 基片在下面; 或试纸条 B 为切制 15 个直径 3 mm 的圆形硝酸纤维素膜 2 片置于长为 110mm、宽为 6 mm 的塑料基片

1 上, 各个膜片间距为 4 mm; 每个膜片下方的塑料基片上设有两个吸水孔 3, 吸水孔是将与膜片圆心重叠、与塑料基片长平行的长轴为比膜片圆的直径长 0.3mm 即 3.3mm、与塑料基片宽平行的短轴比膜片圆的直径短 0.2mm 即 2.8mm 的椭圆未被膜片覆盖的部分去除得到的孔, 加样时带吸水孔的塑料聚乙烯 (PE) 基片在下面;

2) 磷酸盐缓冲液 (PBS) 100ml, 置于塑料瓶中;

3) 按上述方法制备的增敏试剂试剂 A; 取氯金酸 1.0 g, 用双蒸水稀释到 100 mL 放在棕色试剂瓶中, 分装后每个试剂盒内装 10 mL, 可以同时检测 100 组试纸条。按上述方法制备的增敏试剂试剂 B; 取抗坏血酸 1.0 g, 用双蒸水稀释到 100-150 mL 放在棕色试剂瓶中, 分装后每个试剂包装内装 10 mL; 可检测 100 条试纸条;

4) 磷酸盐洗液 (PBST): 取 200 $\mu$ L 吐温 20, 用 pH7.4、0.01mol/L 的 PBS 缓冲液配制成 1000mL, 分装后每个试剂盒内装 100mL;

5) 阳性对照抗原液, 用 PBS 稀释成溶液中抗原重量百分比浓度为 0.05-0.1mg/mL 的通用 A 型、H5、H7 或 H9 型禽流感病毒抗原之一的溶液 1ml; 可检测 100 条试纸条;

6) 阴性对照液, 针对所要检测的阳性对照抗原通过鸡胚获得的未经病毒感染的尿囊液 10mL; 可检测 100 条试纸条;

7) 金标探针试剂, 取蛋白含量为 10-20 $\mu$ g/mL 的针对阳性对照的禽流感病毒单克隆抗体探针液 1000  $\mu$ L, 放在小玻璃瓶中, 抽成真空后封口, 平时于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存; 可检测 100 条试纸条;

8) 塑料滴瓶 10 个、1-25 $\mu$ L 量程的移液枪;

9) 长、宽分别大于渗滤试纸条 A 或 B 的滤纸 100 张。

2. 试剂盒的使用方法如下:

1) 取出上述试纸条 A 或 B 一条, 放于平放在桌面上的一张滤纸上面;

2) 分别将需要检测的阳性对照抗原液、用洗脱离心稀释常规方法前处理后溶于 PBS 缓冲溶液的待测样本液及阴性对照液 1-3  $\mu$ L, 滴入上述试纸条 A 的进样孔或试纸条 B 的膜片, 每个样品分别做 2 份, 待渗;

3) 向上述已加入样品的纸条 A 的进样孔或试纸条 B 的膜片上分别加入

1  $\mu\text{L}$  与上述需要检测的禽流感抗原相对应的金标单克隆抗体探针溶液，置干；

4) 向上述已加入金标单克隆抗体探针试剂的试纸条 A 的进样孔或试纸条 B 的膜片分别滴加 10  $\mu\text{L}$  磷酸盐洗液 (PBST) 洗 NC 膜，每次三滴，洗 2-5 次，室温下置干；

5) 向上述已用磷酸盐洗液 (PBST) 洗过 NC 膜的试纸条 A 的进样孔或试纸条 B 的膜片上分别加入 2  $\mu\text{L}$  增敏试剂的试剂 A，再加入 5  $\mu\text{L}$  增敏试剂的试剂 B，显色 1-2 分钟；可重复该操作一次或数次；

6) 最后一次显色 1-2 分钟后观察相应位置有无灰黑色斑点，有则认为该位置对应的禽流感病毒为阳性结果，没有或颜色与相应阴性对照相比淡则认为该位置对应的禽流感病毒呈阴性结果。

以上检测过程每次选定一种禽流感病毒的抗原做阳性的对照抗原，再选用与这种抗原相对应的胶体金标记的单抗，用以确定待测样本所含禽流感病毒的种类。一般首先选定通用 A 型禽流感病毒抗原做阳性的对照抗原，再选用与这种抗原相对应的胶体金标记的单抗稀释液，进行筛查；检测呈阳性，再分别选定亚型病毒抗原做阳性对照及与其相对应的胶体金标记的单抗进一步检测确定具体的种类。因为每种试剂盒只能针对一种病毒进行检测，如需现场进行种类的定性甄别，则需携带所需检测的病毒抗原相应的检测试剂盒。

### 实施例 3：胶体金的制备方法

本发明以 1% 氯金酸、1% 柠檬酸三钠与双蒸水为原料，采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒，可通过改变柠檬酸三钠的加入量，制备不同直径且大小较为均一的胶体金颗粒(15-150nm)；

取 100 mL 双蒸水，加热煮沸，加入 1mL 新鲜制备的 1% 氯金酸水溶液 ( $\text{HAuCl}_4$ )，迅速加入 1.2 mL 1% 柠檬酸三钠，不断搅拌，制备成酒红色的胶体金用于测试效果最好，此时合成的胶体金较稳定，在 4 $^{\circ}\text{C}$  下可保存 12 个月。

### 实施例 4：胶体金标记最适 pH 值的确定

取若干个 5mL 试管，分别加入 1mL 胶体金溶液，用 0.1 mol/L HCl 和 25 mmol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  将溶液的 pH 值分别调为 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14；取一 96 孔培养板，按 pH 值从低到高将上述胶体金溶液各取 100 $\mu\text{L}$  加入孔中，重复三次；每孔分别加入 3 $\mu\text{L}$  重量百分比浓度为 1mg/mL 的纯化好的禽流

感单克隆抗体，孔内混合均匀，室温下放置 15min；每孔分别加入 20 $\mu$ L 浓度为 10%NaCl，孔内混合均匀，室温下放置 10min；观察胶体金的颜色变化，并分别测定其 OD<sub>520 nm</sub> 和 OD<sub>580 nm</sub>，记录在 OD<sub>520 nm</sub> 和 OD<sub>580 nm</sub> 差值最大时的 pH(X)；重复前面的步骤，再进一步细化 pH 值梯度，将 pH 值梯度设定为 X -0.6；X-0.3；X；X+0.3；X+0.6；X+1，观察胶体金颜色变化，直到室温下放置 2 小时，分别测定其 OD<sub>520 nm</sub> 和 OD<sub>580 nm</sub> 值，记录在 OD<sub>520 nm</sub> 与 OD<sub>580 nm</sub> 差值最大时的 pH 值，据此判断标记时的适宜 pH 值为 8.5-9.2，优选 pH 值为 8.7-9.2。

#### 实施例 5：确定胶体金标记最低蛋白稳定量

最低蛋白稳定量的确定实验，以 0.1 mol/L K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液调节胶体金溶液至 pH 8.5 进行标记，稀释后的抗体与其他有关试剂按下表逐项操作。

表 2 分光光度计测定稳定胶体金最小蛋白计量

试 剂	试 验 管										对 照 管
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
AVI 抗体 ( $\mu$ L)	0	90	80	70	60	50	40	30	20	10	100(H <sub>2</sub> O)
缓冲液 ( $\mu$ L)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
胶体金 (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
摇匀，放置 2min											
10%NaCl ( $\mu$ L)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
摇匀，放置 5min 后，OD <sub>580nm</sub> 测定											

以 OD 值为纵坐标，蛋白质用量为横坐标作一曲线，取曲线与横轴接近那一点的蛋白质用量即为最小蛋白质稳定量。在此基础上再加 10-20%即为实际蛋白质稳定量。结果显示，当蛋白含量为 10—20 $\mu$ g/mL 时，即认为合适；当蛋白含量为 10—16 $\mu$ g/mL 时，更为合适。

#### 实施例 6：禽流感病毒 NP 表达蛋白增敏检测敏感性和特异性试验

将人工表达禽流感病毒 NP 蛋白用 PBS 稀释 200 倍，后进行连续倍比稀释，直至稀释至 200 $\times$ 2<sup>5</sup> 倍，在使用试纸条检测时，即增敏前检测底限为样品 800 倍稀释，对检测试纸条进行增敏处理后检测底限为样品 6400 倍稀释，该金标增敏方法可以使禽流感病毒 NP 蛋白检测底线提高 8 倍。同时用新城疫病毒 (NDV) 进行检测，

试纸条检测含NDV的PBS稀释液和正常细胞培养液，都为阴性。这说明NDV对禽流感病毒通用型的检测不产生干扰。

#### 实施例 7： H9N2 亚型禽流感病毒胶体金免疫渗滤增敏检测试验

用 H9N2 亚型禽流感病毒接种鸡胚，收获鸡胚尿囊液用 PBS 进行连续倍比稀释，利用本发明提供的增敏检测方法，将增敏试剂 A 与增敏试剂 B 按照 1: 1 的体积比混合，制成增敏试剂，分别取增敏试剂 4  $\mu$  L 处理。在使用试纸条检测时，即增敏前检测底限为血凝素效价 (HAU) 为  $2^{-1}$ ，对检测试纸条进行增敏处理后 HAU 为  $2^{-5}$ ，比对试验结果表明，对 H9N2 亚型禽流感病毒胶体金检测可增敏 16 倍以上。

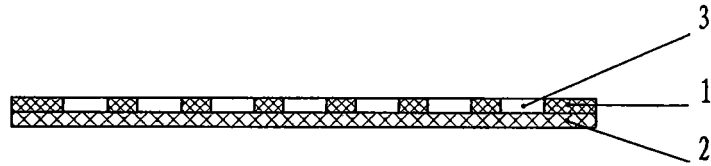


图 1

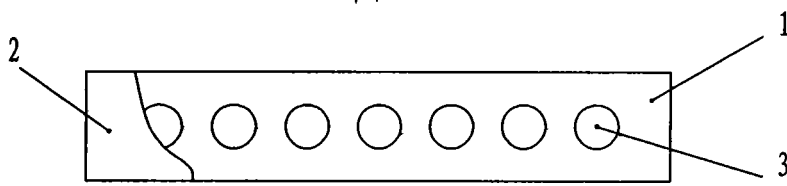


图 2

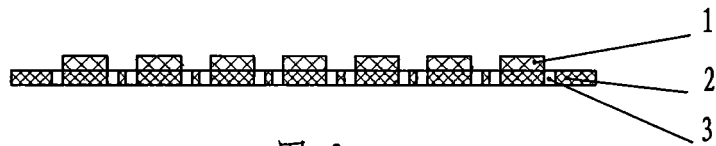


图 3

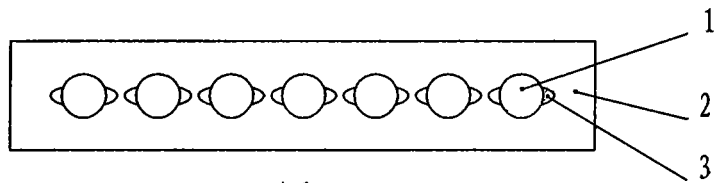


图 4

专利名称(译)	检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法及其试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101470116A</a>	公开(公告)日	2009-07-01
申请号	CN200810114767.1	申请日	2008-06-12
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	邹明强 李锦丰 薛强 齐小花 金涌 田世民		
发明人	邹明强 李锦丰 薛强 齐小花 金涌 田世民		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/531		
其他公开文献	CN101470116B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种检测禽流感病毒的胶体金免疫渗滤增敏方法及其试剂盒，步骤如下：1)制备免疫渗滤试纸条；2)禽流感病毒多克隆抗体在免疫渗滤试纸条上的固定化；3)制备禽流感病毒金标单克隆抗体金标探针；4)制备增敏试剂；5)检测禽流感病毒。本发明利用氯金酸与抗坏血酸发生氧化还原反应生成金原子可被胶体金吸附的特点，来定位胶体金沉积部位进行显色加强，提高了待检抗原的检测灵敏度8~50倍。本发明是在胶体金斑点免疫渗滤测定法(双抗体夹心)的基础上，采用纳米金颗粒增敏技术，能提高检测禽流感病毒的检测灵敏度，能进行样品的高通量筛查，适用于基层或现场检测禽流感病毒。

试剂	试验管										对照管
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
AVI 抗体(μL)	0	90	80	70	60	50	40	30	20	10	100(H <sub>2</sub> O)
缓冲液(μL)	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
胶体金(mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
摇匀，放置 2min											
10%NaCl(μL)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0
摇匀，放置 5min 后，OD580nm 测定											