



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108680743 A

(43)申请公布日 2018.10.19

(21)申请号 201810449006.5

(22)申请日 2018.05.11

(71)申请人 合肥安为康医学检验有限公司

地址 230011 安徽省合肥市高新区红枫路
富邻广场2号研发楼406室

(72)发明人 汤衡

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种快速检测甲型流感病毒的方法

(57)摘要

本发明公开了一种快速检测甲型流感病毒的方法,包括以下步骤:制备:取0.01%氯金酸水溶液100mL,加热至沸腾,加入1%柠檬酸三钠水溶液1.3mL,继续煮沸10min,冷却,制得胶体金;标记物制备:取上述制得胶体金100mL。本发明通过以柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒,标记抗甲型流感病毒内部抗原的单克隆抗体,硝酸纤维素膜上包被两种抗甲型流感病毒单克隆抗体的混合液,制成免疫层析试纸,待测样品中的甲型流感病毒首先与胶体金标记抗体结合,后移动至硝酸纤维素上与固定的单克隆抗体发生反应,形成肉眼可见的红色带,不仅简便快速、无需特殊仪器设备而且特异性强,对甲型流感的诊断和流行病学调查具有十分重要的应用价值。

1.一种快速检测甲型流感病毒的方法,其特征在于,包括以下步骤:

制备:取0.01%氯金酸水溶液100mL,加热至沸腾,加入1%柠檬酸三钠水溶液 1.3mL,继续煮沸10min,冷却,制得胶体金;

标记物制备:取上述制得胶体金100mL,用0.1mol/L K₂CO₃调节至pH8.2,边搅拌边缓慢加入单克隆抗体3F1 3mg,继续搅拌30min后加入BSA至终浓度 1%,加入PEG至终浓度0.5%,继续搅拌30min,3000 r/min离心10 min,弃沉淀,上清8500 r/min 离心30 min,弃上清,以pH7.0,0.01mol/L-2%BSA 悬浮沉淀,制得胶体金标记物溶液,将玻璃纤维浸泡于胶体金标记溶液中,取出冷冻干燥;

抗体包被:单克隆抗体3F1和3E8 分别稀释成3 mg/mL,后等量混合,羊抗鼠 IgG稀释成2.5mg/mL,将以上两种液体分别吸入喷膜机的两个注射器中,以1μL/cm喷于硝酸纤维素膜中间位置,两条线间隔0.5 cm,37C干燥过夜;

试纸条组装:试纸条由吸水纸、硝酸纤维素膜、样品垫和塑料板组成,将各部分依次粘贴到塑料板上,用切条机切成4 mm宽的条,加干燥剂密封于铝箔袋中;

检测:将检测试纸条放于水平桌面上,取100μL待测样品滴于加样处,第10-15min读取结果,15min后的结果无效;

特异性测定:测定试纸与甲型流感病科毒及乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒和呼吸道合胞病毒等病毒标本的特异性反应;

灵敏性测定:选取3个代表性甲型流感病毒毒株A/京防/53/97、A/莫斯科/13/98和A/贵防/10/94,做系列稀释,以原液为基准,分别稀释至1:10、1:100、1:500、1:800、1:1000和1:1200,测定可检测的最高稀释度。

2.根据权利要求1所述的快速检测甲型流感病毒的方法,其特征在于,所述用于甲型流感病毒的检测,其中检测试纸条纤维素膜上出现两条红色线为Flu-A阳性,出现一条红色线靠近吸水纸端为阴性,无红色线条出现为试剂无效。

3.根据权利要求1所述的快速检测甲型流感病毒的方法,其特征在于, 所述用于试剂盒特异性测定,其中,所用引物和探针核苷酸序列如下:

甲型流感病毒通用型检测体系 (5' - 3') :

Infa-F1 (W) :CGATCCTGTCACCTCTGACTAAG ,

Infa-R1 (W) :AGGGCATTTGGCAAAGC ,

Infa-FP1 (W) :FAM-TGCCAGTGAGCGAGGACTGC-BHQ1 ,

RnaseP-F1:CGCGGACAATGGCACTC ,

RnaseP-R1:CGCACCCAGCTTCCCTCA ,

RnaseP-FP1:HEX-ATGTCACTCTTCACAGTCAGCGGC-BHQ1 ;

H7 检测体系:

rH7 (S) -F5:CATTCCGACAAATGCAGACAA ,

rH7 (S) -R5:CACTCCTTTCAAGTTAACATGTGTTACTTT ,

rH7 (S) -FP5:FAM-ATCTGCCTCGGACATCATGCTGTGTC-BHQ1 ,

RnaseP-F1:CGCGGACAATGGCACTC ,

RnaseP-R1:CGCACCCAGCTTCCCTCA ,

RnaseP-FP1:HEX-ATGTCACTCTTCACAGTCAGCGGC-BHQ1 ;

N9 检测体系：

rH7N9 (S) -F5: CAGAAGGCCTGTTGCAGAAAT,
rH7N9 (S) -R5: TGGCAYACACATTAGATTCCCT,
rH7N9 (S) -FP5:

FAM-AACACATGGGCCGAAACATACTAAGAAC-BHQ1,
RnaseP-F1: CGCGGACAATGGCACTC,
RnaseP-R1: CGCACAGCTCTCCTCA,

RnaseP-FP1: HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1;

NP (2013) 检测体系：

H7N9 (NP) -F1: GAGGGAACACCAACCAACAGA,

H7N9 (NP) -R1: GCCATAATGGTGCTCTTCG,

H7N9 (NP) -FP1:

FAM-CAGGTAGCGTTCAACCCACTTCTCAG-BHQ1,

RnaseP-F1: CGCGGACAATGGCACTC,

RnaseP-R1: CGCACAGCTCTCCTCA,

RnaseP-FP1: HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1。

4. 根据权利要求1所述的快速检测甲型流感病毒的方法，其特征在于，试剂盒的浓度和
1 人份测试用量标准为：

Infa-F1 (W) 10pmoL/μL 1.5μL,
Infa-R1 (W) 10pmoL/μL 1.5μL,
Infa-FP1 (W) 2.5pmoL/μL 1.5μL,
rH7 (S) -F5 10pmoL/μL 1.0μL,
rH7 (S) -R5 10pmoL/μL 1.0μL,
rH7 (S) -FP5 2.5pmoL/μL 1.5μL,
rH7N9 (S) -F5 10pmoL/μL 2.0μL,
rH7N9 (S) -R5 10pmoL/μL 2.0μL,
rH7N9 (S) -FP5 2.5pmoL/μL 2.0μL,
H7N9 (NP) -F1 10pmoL/μL 1.5μL,
H7N9 (NP) -R1 10pmoL/μL 1.5μL,
H7N9 (NP) -FP1 2.5pmoL/μL 1.5μL,
RnaseP-F1 10pmoL/μL 0.5μL,
RnaseP-R 10pmoL/μL 0.5μL,
RnaseP-FP1 2.5pmoL/μL 0.5μL。

一种快速检测甲型流感病毒的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒检测技术领域,具体来说,涉及一种快速检测甲型流感病毒的方法。

背景技术

[0002] 甲型流感病毒是一类致病率极高的上呼吸道感染病毒,发病人群可达80%~90%,而且其不但会感染人,也可感染猪、鸡等动物,常会引起大规模或局部的流行。甲型流感病毒的持续流行给人们的健康、生活以及社会公共防疫系统带来了极大的干扰和压力,它已经成为流行病学的主要研究对象之一。而且,近年来随着一些抗甲型流感病毒特性药的上市,对流感病毒的准确检测已经成为药物使用的基础。因此开发一种快速检测甲型流感病毒的试剂盒对流感的控制具有重要的临床意义。

[0003] 针对相关技术中的问题,目前尚未提出有效的解决方案。

发明内容

[0004] 针对相关技术中的问题,本发明提出一种快速检测甲型流感病毒的方法,以克服现有相关技术所存在的上述技术问题。

[0005] 本发明的技术方案是这样实现的:

一种快速检测甲型流感病毒的方法,包括以下步骤:

制备:取0.01%氯金酸水溶液100mL,加热至沸腾,加入1%柠檬酸三钠水溶液 1.3mL,继续煮沸10min,冷却,制得胶体金;

标记物制备:取上述制得胶体金100mL,用0.1mol/L K₂CO₃调节至pH8.2,边搅拌边缓慢加入单克隆抗体3F1 3mg,继续搅拌30min后加入BSA至终浓度 1%,加入PEG至终浓度0.5%,继续搅拌30min,3000 r/min离心10 min,弃沉淀,上清8500 r/min 离心30 min,弃上清,以pH7.0,0.01mol/L-2%BSA 悬浮沉淀,制得胶体金标记物溶液,将玻璃纤维浸泡于胶体金标记溶液中,取出冷冻干燥;

抗体包被:单克隆抗体3F1和3E8 分别稀释成3 mg/mL,后等量混合,羊抗鼠 IgG稀释成2.5mg/mL,将以上两种液体分别吸入喷膜机的两个注射器中,以1μL/cm喷于硝酸纤维素膜中间位置,两条线间隔0.5 cm,37C干燥过夜;

试纸条组装:试纸条由吸水纸、硝酸纤维素膜、样品垫和塑料板组成,将各部分依次粘贴到塑料板上,用切条机切成4 mm宽的条,加干燥剂密封于铝箔袋中;

检测:将检测试纸条放于水平桌面上,取100μL待测样品滴于加样处,第10-15min读取结果,15min后的结果无效;

特异性测定:测定试纸与甲型流感病科毒及乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒和呼吸道合胞病毒等病毒标本的特异性反应;

灵敏性测定:选取3个代表性甲型流感病毒毒株A/京防/53/97、A/莫斯科/13/98和A/贵防/10/94,做系列稀释,以原液为基准,分别稀释至1:10、1:100、1:500、1:800、1:1000和

1:1200, 测定可检测的最高稀释度。

[0006] 进一步的, 所述用于甲型流感病毒的检测, 其中检测试纸条纤维素膜上出现两条红色线为Flu-A阳性, 出现一条红色线靠近吸水纸端为阴性, 无红色线条出现为试剂无效。

[0007] 进一步的, 所述用于试剂盒特异性测定, 其中, 所用引物和探针核苷酸序列如下:

甲型流感病毒通用型检测体系 (5' - 3') :

Infa-F1 (W) : CGATCCTGTCACCTCTGACTAAG,

Infa-R1 (W) : AGGGCATTGGCAAAGC,

Infa-FP1 (W) : FAM-TGCCAGTGAGCGAGGACTGC-BHQ1,

RnaseP-F1: CGCGGACAATGGCACTC,

RnaseP-R1: CGCACCCAGCTTCCCTCA,

RnaseP-FP1: HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1 ;

H7 检测体系:

rH7 (S) -F5: CATTCCGACAAATGCAGACAA,

rH7 (S) -R5: CACTCCTCTTCAGTTAACGTGTTACTTT,

rH7 (S) -FP5: FAM-ATCTGCCTCGGACATCATGCTGTGTC-BHQ1,

RnaseP-F1: CGCGGACAATGGCACTC,

RnaseP-R1: CGCACCCAGCTTCCCTCA,

RnaseP-FP1: HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1 ;

N9 检测体系:

rH7N9 (S) -F5: CAGAAGGCCTGTTGCAGAAAT ,

rH7N9 (S) -R5: TGGCAYACACATTAGATTCCCT ,

rH7N9 (S) -FP5:

FAM-AACACATGGGCCGAAACATACTAAGAACAA-BHQ1 ,

RnaseP-F1: CGCGGACAATGGCACTC,

RnaseP-R1: CGCACCCAGCTTCCCTCA,

RnaseP-FP1: HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1 ;

NP (2013) 检测体系:

H7N9 (NP) -F1: GAGGGAACACCAACCAACAGA ,

H7N9 (NP) -R1: GCCATAATGGTTGCTCTTCG ,

H7N9 (NP) -FP1:

FAM-CAGGTCAGCGTTCAACCCACTTCTCAG-BHQ1 ,

RnaseP-F1: CGCGGACAATGGCACTC,

RnaseP-R1: CGCACCCAGCTTCCCTCA,

RnaseP-FP1: HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1 。

[0008] 本发明的有益效果是:通过以柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒, 标记抗甲型流感病毒内部抗原的单克隆抗体, 硝酸纤维素膜上包被两种抗甲型流感病毒单克隆抗体的混合液, 制成免疫层析试纸, 待测样品中的甲型流感病毒首先与胶体金标记抗体结合, 后移动至硝酸纤维素上与固定的单克隆抗体发生反应, 形成肉眼可见的红色带, 不仅简便快速、无需特殊仪器设备而且特异性强, 对甲型流感的诊断和流行病学调查具有十分重要的应用价

值。

具体实施方式

[0009] 下面将结合本发明实施例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。根据本发明的实施例，提供了一种快速检测甲型流感病毒的方法。

[0010]

[0011] 根据本发明实施例的快速检测甲型流感病毒的方法，包括制备：取0.01%氯金酸水溶液100mL，加热至沸腾，加入1%柠檬酸三钠水溶液 1.3mL，继续煮沸10min，冷却，制得胶体金；

标记物制备：取上述制得胶体金100mL，用0.1mol/L K₂CO₃调节至pH8.2，边搅拌边缓慢加入单克隆抗体3F1 3mg，继续搅拌30min后加入BSA至终浓度 1%，加入PEG至终浓度0.5%，继续搅拌30min，3000 r/min离心10 min，弃沉淀，上清8500 r/min 离心30 min，弃上清，以pH7.0, 0.01mol/L-2%BSA 悬浮沉淀，制得胶体金标记物溶液，将玻璃纤维浸泡于胶体金标记溶液中，取出冷冻干燥；

抗体包被：单克隆抗体3F1和3E8 分别稀释成3 mg/mL，后等量混合，羊抗鼠 IgG稀释成2.5mg/mL，将以上两种液体分别吸入喷膜机的两个注射器中，以1μL/cm喷于硝酸纤维素膜中间位置，两条线间隔0.5 cm,37C干燥过夜；

试纸条组装：试纸条由吸水纸、硝酸纤维素膜、样品垫和塑料板组成，将各部分依次粘贴到塑料板上，用切条机切成4 mm宽的条，加干燥剂密封于铝箔袋中；

检测：将检测试纸条放于水平桌面上，取100μL待测样品滴于加样处，第10-15min读取结果，15min后的结果无效；

特异性测定：测定试纸与甲型流感病科毒及乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒和呼吸道合胞病毒等病毒标本的特异性反应；

灵敏性测定：选取3个代表性甲型流感病毒毒株A/京防/53/97、A/莫斯科/13/98和A/贵防/10/94，做系列稀释，以原液为基准，分别稀释至1:10、1:100、1:500、1:800、1:1000和1:1200，测定可检测的最高稀释度。

[0012] 进一步的，所述用于甲性流感病毒的检测，其中检测试纸条纤维素膜上出现两条红色线为Flu-A阳性，出现一条红色线靠近吸水纸端为阴性，无红色线条出现为试剂无效。

[0013] 进一步的，所述用于试剂盒特异性测定，其中，所用引物和探针核苷酸序列如下：

甲型流感病毒通用型检测体系（5' - 3'）：

Infa-F1 (W) : CGATCCTGTCACCTCTGACTAAG,

Infa-R1 (W) : AGGGCATTGGCAAAGC,

Infa-FP1 (W) : FAM-TGCCAGTGAGCGAGGACTGC-BHQ1 ,

RnaseP-F1:CGCGGACAATGGCACTC,

RnaseP-R1:CGCACCAAGCTTCCCTCA ,

RnaseP-FP1:HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1 ;

H7 检测体系：

rH7 (S) -F5:CATTCCGACAAATGCAGACAA ,

rH7 (S) -R5: CACTCCTCTTCAGTTAATGTGTTACTTT,
rH7 (S) -FP5: FAM-ATCTGCCTCGGACATCATGCTGTGTC-BHQ1,
RnaseP-F1: CGCGGACAATGGCACTC,
RnaseP-R1: CGCACCCAGCTCTCCTCA,
RnaseP-FP1: HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1;
N9 检测体系:
rH7N9 (S) -F5: CAGAAGGCCTGTTGCAGAAAT,
rH7N9 (S) -R5: TGGCAYACACATTAGATTCCCT,
rH7N9 (S) -FP5:
FAM-AACACATGGGCCGAAACATACTAAGAACAA-BHQ1,
RnaseP-F1: CGCGGACAATGGCACTC,
RnaseP-R1: CGCACCCAGCTCTCCTCA,
RnaseP-FP1: HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1;
NP (2013) 检测体系:
H7N9 (NP) -F1: GAGGGAACACCAACCAACAGA,
H7N9 (NP) -R1: GCCATAATGGTTGCTCTTCG,
H7N9 (NP) -FP1:
FAM-CAGGTCAGCGTTCAACCCACTTCTCAG-BHQ1,
RnaseP-F1: CGCGGACAATGGCACTC,
RnaseP-R1: CGCACCCAGCTCTCCTCA,
RnaseP-FP1: HEX-ATGTCACTCTCACAGTCAGCGGC-BHQ1。

[0014] 借助于上述技术方案,通过以柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒,标记抗甲型流感病毒内部抗原的单克隆抗体,硝酸纤维素膜上包被两种抗甲型流感病毒单克隆抗体的混合液,制成免疫层析试纸,待测样品中的甲型流感病毒首先与胶体金标记抗体结合,后移动至硝酸纤维素上与固定的单克隆抗体发生反应,形成肉眼可见的红色带,不仅简便快速、无需特殊仪器设备而且特异性强,对甲型流感的诊断和流行病学调查具有十分重要的应用价值。

[0015] 另外,在一个实施例中,材料可提取为:毒株:Flu-A(16类)、乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒和呼吸道合胞病毒,由国家预防医学科学院病毒所提供,按常规方法接种鸡胚获得尿囊液。抗体:抗Flu-A 单克隆抗体,由本实验室制备;羊抗鼠 IgG,由军事医学科学院五所提供的。试剂:氯金酸和柠檬酸三钠,Sigma公司产品,对照试纸条,美国Quidel公司产品;硝酸纤维素膜,美国Millipore公司产品。仪器设备:离心机,型号3K30;冷冻干燥机,型号FD-1;喷膜机,型号xyz3000;切条机,型号CMH000。

[0016] 另外,在一个实施例中,供试的甲型流感病毒共16份,结果全部显示为阳性;而乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒和呼吸道合胞病毒共9份,结果全部显示为阴性。

[0017] 另外,在一个实施例中,取37位正常人鼻咽部分泌物用稀释液稀释后,分成两份,一份直接检测,结果全部呈阴性;另外一份加入500倍稀释的A/京防/53/97,检测结果全部呈阳性反应。

[0018] 另外,在一个实施例中,将GICA检测条置37℃温箱中7d,与置于4℃保存的试纸条其

检测结果没有表现出差异。

[0019] 综上所述,借助于本发明的上述技术方案,通过以柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒,标记抗甲型流感病毒内部抗原的单克隆抗体,硝酸纤维素膜上包被两种抗甲型流感病毒单克隆抗体的混合液,制成免疫层析试纸,待测样品中的甲型流感病毒首先与胶体金标记抗体结合,后移动至硝酸纤维素上与固定的单克隆抗体发生反应,形成肉眼可见的红色带,不仅简便快速、无需特殊仪器设备而且特异性强,对甲型流感的诊断和流行病学调查具有十分重要的应用价值。

[0020] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,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。

专利名称(译)	一种快速检测甲型流感病毒的方法		
公开(公告)号	CN108680743A	公开(公告)日	2018-10-19
申请号	CN201810449006.5	申请日	2018-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	合肥安为康医学检验有限公司		
申请(专利权)人(译)	合肥安为康医学检验有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	合肥安为康医学检验有限公司		
[标]发明人	汤衡		
发明人	汤衡		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/531		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测甲型流感病毒的方法，包括以下步骤：制备：取0.01%氯金酸水溶液100mL，加热至沸腾，加入1%柠檬酸三钠水溶液1.3mL，继续煮沸10min，冷却，制得胶体金；标记物制备：取上述制得胶体金100mL。本发明通过以柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒，标记抗甲型流感病毒内部抗原的单克隆抗体，硝酸纤维素膜上包被两种抗甲型流感病毒单克隆抗体的混合液，制成免疫层析试纸，待测样品中的甲型流感病毒首先与胶体金标记抗体结合，后移动至硝酸纤维素上与固定的单克隆抗体发生反应，形成肉眼可见的红色带，不仅简便快速、无需特殊仪器设备而且特异性强，对甲型流感的诊断和流行病学调查具有十分重要的应用价值。