

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510049765.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 3 月 8 日

[11] 公开号 CN 1743848A

[22] 申请日 2005.5.9

[21] 申请号 200510049765.5

[71] 申请人 浙江大学

地址 310029 浙江省杭州市凯旋路 268 号浙江大学动物科学院

[72] 发明人 周继勇 陈洪勋 申会刚

[74] 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司

代理人 冯子玲

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称

H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA
检测试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒。试剂盒内设有抗体检测板，酶结合物工作液，阳性对照，阴性对照，样品稀释液，10 × 浓缩洗涤液，显色液 A，显色液 B 和终止液，该试剂盒的检测板为包被水禽流感 H5 亚型血凝素蛋白 (HA) 的可拆 96 孔酶标板，酶结合物工作液为 HRP 标记兔抗水禽 IgG 多克隆抗体，阳性对照为 H5 亚型水禽流感标准阳性血清，阴性对照为水禽标准阴性血清。本发明有益的积极效果是：检测试剂盒对水禽的特异性强、敏感性高、操作简单，易于大范围推广应用，具有广阔的市场前景。

1.一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，试剂盒内设有抗体检测板，酶结合物工作液，阳性对照，阴性对照，样品稀释液，10×浓缩洗涤液，显色液 A，显色液 B 和终止液，其特征在于：抗体检测板为包被水禽流感 H5 亚型血凝素蛋白（HA）的可拆 96 孔酶标板，酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记兔抗水禽 IgG 多克隆抗体，阳性对照为 H5 亚型水禽流感标准阳性血清，阴性对照为水禽标准阴性血清。

2.根据权利要求 1 所述的一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其特征在于：所说水禽流感 H5 亚型血凝素蛋白（HA）为利用原核高效表达系统表达和纯化的基因工程重组蛋白，可与水禽流感 H5 亚型血凝素抗体特异结合。

3.根据权利要求 1 所述的一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其特征在于：所说的水禽流感 H5 亚型血凝素蛋白的制备为利用 RT-PCR 技术扩增水禽流感血凝素蛋白基因序列，将其亚克隆于 pET28a 原核表达载体构建 pET/HA(H5) 重组表达载体，pET/HA(H5) 用氯化钙法转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后，表达的水禽流感病毒血凝素蛋白经商用 Ni-NTA 亲和层析柱获得纯化，纯化的蛋白用于 H5 亚型水禽流感病毒阳性血清检测。

4.根据权利要求 1 所述的一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其特征在于：所说的抗体检测板的最佳制备条件为，用 pH8.5 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液作包被液，将水禽流感病毒血凝素蛋白稀释为 8 μ g/ml，按 100 μ l/孔加入聚苯乙烯微孔板中，37℃ 2 小时，再 4℃ 包被过夜，甩干，按 100 μ l/孔加入含 1% 牛血清白蛋白（BSA），PH7.4 的磷酸盐缓冲液 37℃ 封闭 2 小时，洗涤甩干，再加入 20% 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时，置干燥室干燥后，装入含干燥剂的包装袋中保存。

5. 根据权利要求 1 所述的一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其特征在于：所说的酶结合物工作液的制备过程为：

(1) 用超纯水配制辣根过氧化物酶 (HRP, RZ \geq 3.0) 溶液，加入 0.06M 过碘酸钠溶液 4℃ 避光 1 小时，加入 160mM 乙二醇，室温反应 30 分钟，加入 PH4.4 的醋酸缓冲液 2—8℃ 透析过夜，换液两次；

(2) 将纯化的兔抗水禽 IgG 加入上述活化的酶中，转移至透析袋，于 0.05mM PH9.6 的碳酸缓冲液中透析，4℃ 搅拌过夜，换液两次；

(3) 透析液吸至离心管中，加现配的 0.05M 硼氢化钠溶液，4℃ 反应 2 小时，加入等量的饱和硫酸铵溶液 4℃ 放置 30 分钟，4℃ 4000rpm 离心 20 分钟，弃上清，沥干，将沥干的沉淀溶于少量 PBS，装入透析袋中，对 0.02M PBS (PH7.4) 透析，4℃ 过夜；

(4) 收集透析袋中液体，4000rpm 离心 20 分钟，上清液即为辣根过氧化物酶标记的兔抗水禽 IgG 多克隆抗体，将其与等量甘油混和，-20℃ 冻存，以含 0.1% BSA, 0.05% 吐温-20, 0.01% 硫柳汞钠, pH7.4 的磷酸缓冲液按 1:200—5000 稀释冻存的辣根过氧化物酶标记的兔抗

6. 根据权利要求 1 所述的一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其特征在于：所说的样品稀释液为含 0.05% 吐温-20 的 0.01M 磷酸盐缓冲液(pH7.4)；10×浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH7.4)；显色液 A 为 0.2mg/ml 的四甲基联苯胺 (TMB) 溶液，显色液 B 为含 0.5% 过氧化氢尿素的柠檬酸一磷酸盐缓冲液；终止液为 2M 硫酸溶液。

7. 根据权利要求 1 所述的一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其特征在于：所说的阳性对照为经 H5 亚型 HA 蛋白免疫获得的 H5 亚型水禽流感病毒标准阳性血清 ($OD_{450nm} \geq 1.00$) 加入少量红色颜料并按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素，无菌过滤；阴性对照为经筛选获得的水禽标准阴性血清 ($OD_{450nm} \leq 0.150$)，按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素，无菌过滤。

8. 根据权利要求 1 所述的一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其检测程序为：(1) 将 10×浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液；(2) 将待检血清用样品稀释液作 1:100 稀释，按 100 μ l/孔加入抗体检测板中，同时设只加 100 μ l 样品稀释液的空白、水禽标准阴性血清作为阴性对照、H5 亚型水禽标准阳性血清作为阳性对照，37℃ 孵育 20—45 分钟，甩干；(3) 每孔加洗涤液 200 μ l，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；(4) 每孔加 100 μ l 的酶结合物工作液，空白不加，37℃ 孵育 20—45 分钟，甩干；(5) 每孔加洗涤液 200 μ l，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；(6) 依次加 50 μ l 显色液 A 和 50 μ l 显色液 B，37℃ 避光孵育 5-15 分钟；(7) 加 50 μ l 终止液，用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔光吸收值 (OD_{450nm} 值)。

9. 根据权利要求 1 所述的一种 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其检测样本的判定标准为：以待检样本 OD_{450nm} 值与标准阴性 OD_{450nm} 值的比值(P/N)，大于或等于 2.2 判为阳性，小于或等于 1.7 为阴性，介于 1.7—2.2 之间为可疑，须重检；重测时 P/N 值大于或等于 2.0 判为阳性，小于 2.0 为阴性。

H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒

技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及水禽的一种病毒抗体的快速诊断方法和器具，具体是 H5 亚型水禽流感病毒（AIV）血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒。

背景技术

禽流感(avian influenza)，全称禽类流行性感冒病毒感染，是由正粘病毒科、流感病毒属的 A 型流感病毒引起禽类的一种从呼吸系统感染到败血症等多种症状的传染病，禽类感染后病死率很高。1878 年，Perroncito 在意大利首次发现禽流感。1900 年其病原体首次被人发现，1955 年才经血清学证实属 A(甲)型流感病毒。此后禽流感病毒一直在世界各地家禽中普遍存在，并造成了程度不同的影响。特别是 1997 年香港爆发的禽流感已经对人类健康构成威胁。至此，禽流感问题引起了世界各地的广泛关注。目前已证明，只有 H5 和 H7 亚型可引起 HPAI。禽流感在全球广泛分布，其主要的储存宿主是水禽和迁徙的鸟类。

由于 A 型流感病毒引起的禽流感，其病理变化因感染病毒毒株毒力的强弱、病程长短和禽种的不同而不同。其临床症状因感染禽的种类、年龄、性别、并发感染情况及所感染毒株的毒力和其他环境等不同而表现出的症状很不一致。鸡的流感病毒的抗体检测相继建立了鸡流感琼脂扩散(AGP)、血球凝集抑制试验(HI)、间接酶联免疫吸附试验(ELISA)等血清学检测技术。然而，由于水禽的品种特殊性，其流感抗体的检测方法一直是困惑水禽疫苗免疫效果评估和水禽流感诊断的难题。因此，研制开发适用于水禽流感抗体检测的特异的、敏感的、生物安全度高的、适合于基层使用的诊断检测的器具，对水禽免疫水平进行实时监控和建立科学、灵活的水禽流感的免疫程序，以及对疫病的预防和控制有重要意义。

发明内容

本发明的目的是提供一种 H5 亚型水禽流感病毒(AIV)血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒。

本发明的目的是这样实现的：采用原核表达的水禽流感病毒血凝素蛋白(HA)作为抗原包被可拆 96 孔酶标板，以辣根过氧化物酶标记兔抗水禽 IgG 制备酶结合物工作液，以间接 ELISA 法直接检测标本中的 AIV 血凝素抗体。具体如下：

本发明的 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒内设有抗体检测板，酶结合物工作液，阳性对照，阴性对照，样品稀释液，10×浓缩洗涤液，显色液 A，显色液 B 和终止液，抗体检测板为包被水禽流感 H5 亚型血凝素蛋白(HA)的可拆 96 孔酶标板，酶结合物工作液为辣根过氧化物酶标记兔抗水禽 IgG 多克隆抗体，阳性对照为 H5 亚型水禽流感标准阳性血清，阴性对照为水禽标准阴性血清。

水禽流感 H5 亚型血凝素蛋白(HA)为利用原核高效表达系统表达和纯化的基因工程重组蛋白，可与水禽流感 H5 亚型血凝素抗体特异结合。它的制备为：利用 RT-PCR 技术扩增水

禽流感能血凝素蛋白基因序列，将其亚克隆于 pET28a 原核表达载体构建 pET/HA(H5)重组表达载体，pET/HA(H5)用氯化钙法转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，大肠杆菌 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后，表达的水禽流感病毒血凝素蛋白经商用 Ni-NTA 亲和层析柱获得纯化，纯化的蛋白用于 H5 亚型水禽流感病毒阳性血清检测。

抗体检测板的最佳制备条件为：用 pH8.5 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液作包被液，将水禽流感病毒血凝素蛋白稀释为 8 μ g/ml，按 100 μ l/孔加入聚苯乙烯微孔板中，37℃2 小时，再 4℃包被过夜，甩干，按 100 μ l/孔加入含 1% 牛血清白蛋白 (BSA)，PH7.4 的磷酸盐缓冲液 37℃封闭 2 小时，洗涤甩干，再加入 20% 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时，置干燥室干燥后，装入含干燥剂的包装袋中保存。

酶结合物工作液的制备过程为：

(1) 用超纯水配制辣根过氧化物酶 (HRP, RZ \geq 3.0) 溶液，加入 0.06M 过碘酸钠溶液 4℃避光 1 小时，加入 160mM 乙二醇，室温反应 30 分钟，加入 PH4.4 的醋酸缓冲液 2—8℃透析过夜，换液两次；

(2) 将纯化的兔抗水禽 IgG 加入上述活化的酶中，转移至透析袋，于 0.05mM PH9.6 的碳酸缓冲液中透析，4℃搅拌过夜，换液两次；

(3) 透析液吸至离心管中，加现配的 0.05M 硼氢化钠溶液，4℃反应 2 小时，加入等量的饱和硫酸铵溶液 4℃放置 30 分钟，4℃4000rpm 离心 20 分钟，弃上清，沥干，将沥干的沉淀溶于少量 PBS，装入透析袋中，对 0.02M PBS (PH7.4) 透析，4℃过夜；

(4) 收集透析袋中液体，4000rpm 离心 20 分钟，上清液即为辣根过氧化物酶标记的兔抗水禽 IgG 多克隆抗体，将其与等量甘油混和，-20℃冻存，以含 0.1% BSA, 0.05% 吐温-20, 0.01% 硫柳汞钠，pH7.4 的磷酸缓冲液按 1:200—5000 稀释冻存的辣根过氧化物酶标记的兔抗水禽 IgG 多克隆抗体作为酶结合物工作液。

本发明 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒中，样品稀释液为含 0.05% 吐温-20 的 0.01M 磷酸盐缓冲液(pH7.4); 10×浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液(pH7.4); 显色液 A 为 0.2mg/ml 的四甲基联苯胺 (TMB) 溶液，显色液 B 为含 0.5% 过氧化氢尿素的柠檬酸—磷酸盐缓冲液；终止液为 2M 硫酸溶液；阳性对照为经 H5 亚型 HA 蛋白免疫获得的 H5 亚型水禽流感病毒标准阳性血清 (OD_{450nm} \geq 1.00) 加入少量红色颜料并按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素，无菌过滤；阴性对照为经筛选获得的水禽标准阴性血清 (OD_{450nm} \leq 0.150)，按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素，无菌过滤。

本发明 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其检测程序为：(1) 将 10×浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液；(2) 将待检血清用样品稀释液作 1:100 稀释，按 100 μ l/孔加入抗体检测板中，同时设只加 100 μ l 样品稀释液的空白、水禽标准阴性血清作为阴性对照、H5 亚型水禽标准阳性血清作为阳性对照，37℃孵育 20—45 分钟，甩干；(3) 每孔加洗涤液 200 μ l，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；(4) 每孔加 100 μ l 的酶结合物工作液，空白不加，37℃孵育 20—45 分钟，甩干；(5) 每孔加洗涤液 200 μ l，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；(6) 依次加 50 μ l 显色液 A 和 50 μ l 显色液 B，37℃避光孵育 5—15 分钟；(7) 加 50 μ l 终止液，用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔光吸收值 (OD_{450nm} 值)。

本发明 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒，其检测样本的判定标准为：以待检样本 OD_{450nm} 值与标准阴性 OD_{450nm} 值的比值(P/N)，大于或等于 2.2 判为阳性，小于或等于 1.7 为阴性，介于 1.7—2.2 之间为可疑，须重检；重测时 P/N 值大于或等于 2.0 判为阳性，小于 2.0 为阴性。

本发明有益的积极效果是：操作简单，人人都可操作，能较好满足不同层次人员的需要，如疫病监测、海关检疫、卫生防疫、集约化养殖到个体养殖等，易于大范围推广应用，具有广阔的市场前景和较大的经济、社会效益。

本发明具有下列优点：

(1) 特异性强，敏感性高，安全性好。H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒以基因工程表达的重组 HA 蛋白为基础制备而成；重组 HA 蛋白为非全病毒抗原、安全性好，不含无关杂蛋白，只与相应亚型水禽流感病毒阳性血清特异结合，不与水禽其它疫病阳性血清发生交叉反应。具有良好抗原性，因此具有很高的特异性和敏感性。

(2) 操作简便快速。使用 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体检测试剂盒检测 AIV 血凝素抗体时，无需另配其它试剂，样品无需无菌处理，按试剂盒说明在 1-2 小时内即可判定检测结果。

(3) 结果判定形象、准确、可靠。H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒以显色的深浅显示检测结果，即检测孔出现蓝色显色为阳性，中止后呈黄色，无色为阴性，结果判定形象。采用酶标仪机读数，减少主观性，准确可靠。

(4) 成本低，投资少。H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒可批量检测，一步到位，成本低廉，投资少，见效快。

附图说明

图 1 是 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒检测原理示意图，图中：

1 为酶标板，2 为 AIV/H5 HA 抗原，3 为水禽 AIV/H5 抗体或待检血清，4 为 HRP 标记兔抗水禽 IgG 多克隆抗体。

图 2 是重组 AIV/H5 HA 蛋白的抗原活性鉴定结果，图中：

A 为重组蛋白的 SDS-PAGE 分析，B 为重组蛋白的 Western Blot 鉴定，M 为蛋白质 Marker，1 为大肠杆菌 BL21(DE3) 菌体蛋白，2 为重组质粒未诱导菌体蛋白，3 为重组质粒诱导 4h 表达产物，4 为纯化的重组 H5/HA 融合蛋白，5 为表达产物 H5/HA 蛋白的 Western blot

具体实施方式

根据本发明的技术方案，具体制备如下：

(1) AIV/H5 重组 HA 蛋白的制备

利用 RT-PCR 技术从 H5 亚型水禽流感基因组中扩增部分血凝素蛋白基因序列（HA 基因 5' 端 1020bp 的片段）（见图 3），将其插入到原核表达载体 PET28a 的下游构建 PET-H5/HA 表达载体，并用氯化钙法转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，经 1mM IPTG 诱导表达，用超声波裂解细菌，利用商用的 Ni-NTA 亲和层析柱纯化表达的蛋白(HA)，获得水禽流感病毒部分血凝素蛋白（图 2），该蛋白保留了绝大部分血凝素蛋白的抗原性，可与水禽流感病毒相应亚型血凝素抗体特异结合（图 2）。测定 HA 蛋白的蛋白浓度，用于间接 ELISA 检测试剂盒抗体检测板

的制备。

(2) AIV/H5 抗体检测板的制备

用 pH8.5 的 0.05M Tris-HCl 缓冲液作包被液，将水禽流感病毒 H5/HA 蛋白稀释为 8 μ g/ml，按 100 μ l/孔加入可拆 96 孔酶标板，37℃2 小时，再 4℃包被过夜，用 1%BSA 37℃ 封闭 2 小时，以含 0.05% 吐温-20 的 PBS(pH7.4)洗涤液充分洗涤，甩干。再加入 20% 蔗糖磷酸盐缓冲液室温保护 3 小时，置干燥室干燥后，用于 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒装配。

(3) 兔抗水禽 IgG 多克隆抗体的制备

采取水禽全血，分离血清，以辛酸-硫酸铵沉淀法粗提水禽 IgG。再经 Sephadex G200 凝胶层析和 DEAE 纤维素离子交换层析进一步纯化，获得 IgG 纯品。将纯化的水禽 IgG 蛋白按 600~1000 μ g/kg 体重皮下和肌肉注射免疫健康兔 4~5 次，末次免疫一周后，静脉采血，以 ELISA 测定其血清抗体效价在 1: 2000 以上时，心脏采血或颈动脉放血，收集高免血清；以辛酸-硫酸铵沉淀法纯化兔抗水禽 IgG 抗体，不重述，再经 DEAE 纤维素离子交换层析纯化，收集浓缩兔抗水禽 IgG 多克隆抗体，用于制备 H5 亚型水禽流感病毒血凝素检测试剂盒酶结合物工作液。

(4) 酶结合物工作液的制备

用改良过碘酸钠法将辣根过氧化物(HRP)酶偶联于兔抗水禽 IgG 多克隆抗体。用超纯水 1ml 溶解辣根过氧化物酶 (HRP,RZ \geq 3.0) 5mg 溶液，加入 1ml 0.06M 过碘酸钠溶液 4℃避光 1 小时，加入 1ml 160mM 乙二醇，室温反应 30 分钟，加入 PH4.4 的醋酸缓冲液 2~8℃透析过夜，换液两次。将 10mg 纯化的兔抗水禽 IgG 加入上述活化的酶中，转移至透析袋，于 0.05mM PH9.6 的碳酸缓冲液中透析，4℃搅拌过夜（换液两次）。透析液吸至离心管中，加入 5mg/ml 的 0.05M 硼氢化钠溶液 0.4ml，4℃反应 2 小时。加入等量的饱和硫酸铵溶液，4℃30 分钟，4℃4000 转离心 20 分钟，弃上清，沥干。将沉淀溶于少量 PBS，装入透析袋中，对 0.02M PBS (PH7.4) 透析，4℃过夜。将透析液中液体吸至离心管中，离心，将上清液吸出，加等量甘油，混匀，-20℃保存。再以含 0.1% BSA, 0.05% 吐温-20, 0.01% 硫柳汞钠的磷酸缓冲液(pH7.4) 按 1:200~5000 稀释冻存的标记酶作为酶结合物工作液。

(5) 样品稀释液、洗涤液、终止液的配制

样品稀释液为含 0.05% 吐温-20 的 0.01M 磷酸盐缓冲液 (KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄•12H₂O 2.9g, NaCl 8g, 定容至 1000ml, pH7.4, 再加 0.5ml 吐温-20); 10×浓缩洗涤液为含 0.5% 吐温-20 的 0.1M 磷酸盐缓冲液 (KH₂PO₄ 2g, Na₂HPO₄•12H₂O 29g, NaCl 80g, 定容至 1000ml, pH7.4, 再加 5ml 吐温-20); 终止液为 2M 硫酸溶液，即量取 111.2ml 浓硫酸(18M)稀释定容至 1000ml。

(6) 阳性对照和阴性对照的制备

将用 H5/HA 蛋白免疫获得的 H5 亚型水禽流感病毒标准阳性血清用样品稀释液 1:100 稀释 (OD_{450nm} \geq 1.00) 加入少量红色颜料并按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素，无菌过滤，作为 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒阳性对照；将筛选获得的水禽标准阴性血清用样品稀释液 1:100 稀释 (OD_{450nm} \leq 0.150)，按 1000U/ml 加入青霉素和链霉素，无

菌过滤，作为 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒阴性对照。

(7) 显色液的配制

称取 200mg 四甲基联苯胺(TMB)，用 100ml 无水乙醇或 DMSO 溶解后，以双蒸水定容至 1000ml，配制显色液 A；称取 21g 一水柠檬酸，28.2g 无水磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)，6.4ml 0.75% 过氧化氢尿素，双蒸水定容至 1000ml，调 pH 值到 4.5-5.0，配制显色液 B。

(8) 试剂盒检测操作程序

其检测程序为：1) 将 10×浓缩洗涤液稀释 10 倍即为洗涤液；2) 将待检血清用样品稀释液作 1:100 稀释，按 100μl/孔加入抗体检测板中，同时设空白（只加 100μl 样品稀释液）、阴性对照（水禽标准阴性血清）、阳性对照（H5 亚型水禽标准阳性血清），37℃孵育 20—45 分钟，甩干；3) 每孔加洗涤液 200μl，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；4) 每孔加 100μl 酶结合物工作液（空白不加），37℃孵育 20—45 分钟，甩干；5) 每孔加洗涤液 200μl，洗涤 6 次，每次间隔 1 分钟，拍干；6) 依次加 50μl 显色液 A 和 50μl 显色液 B，混匀，37℃避光孵育 5-15 分钟；7) 加 50μl 终止液，用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔光吸收值 (OD_{450nm} 值)。

(9) 结果判定标准

判定标准以待检样本 OD_{450nm} 值与标准阴性 OD_{450nm} 值比值(P/N)，大于或等于 2.2 判为阳性，小于或等于 1.7 为阴性。介于 1.7—2.2 之间为可疑，须重检，重测时 P/N 值大于或等于 2.0 判为阳性，小于 2.0 为阴性。如果阳性对照无明显显色反应，或阴性对照出现显色，表明试剂盒失效或检测操作有误，需重新检测。

AIV/H5 重组 HA 蛋白制备的实施实例

以下通过 AIV/H5 重组 HA 蛋白制备的实施实例进一步描述本发明的 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒。

1. 寡核苷酸引物的设计与合成

根据 Genbank 中 AIV/H5 亚型的 HA 基因序列，针对 HA 基因的 ORF 两端设计了 5'端和 3'端一对引物。5'端引物和 3'端引物分别引入 *BamH I*、*Hind III* 酶切位点。合成以下两条引物：

5'端引物：5'-GCGGATCCGGTTACCATGCAAACAACTC-3'

3'端引物：5'-GCAAGCTTTACTGCCATCCTCCCTCTA-3'

2. 病毒的繁殖、纯化

病毒经尿囊腔接种于 9-11 日龄 SPF 鸡胚，35℃温箱孵育，收集 24h 后鸡胚尿囊液，采用差速离心法纯化病毒，用 TEN 缓冲液重悬病毒，-40℃保存备用。

3. RT-PCR 扩增目的基因片断

采用 Trizol reagent (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) 提取病毒 RNA，以此 RNA 为模板，5' 端和 3' 端合成引物，用 Reverse Transcription System kit 反转录合成 AIV/HA (H5) cDNA 第一链；反转录产物在 95℃ 1min、50℃ 45s、72℃ 1.5min 环境下 30 个循环进行 PCR，最后延伸 10min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

4. 测序载体的构建和序列测定

用PCR产物纯化试剂盒回收目的片段，利用T-A克隆策略直接连接于PMD18-T vector，连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞，蓝白斑筛选。挑取阳性克隆，分别进行PCR鉴定和酶切鉴定。DNA自动测序仪测定AIV/HA (H5) 基因核苷酸序列。AIV/HA (H5) 核苷酸及推导氨基酸序列见表1。

表 1 AIV/HA (H5) 核苷酸及氨基酸序列 (SEQ No. 1)

(1. 核苷酸序列 2. 氨基酸序列)

1	GGT	TAC	CAT	GCA	AAC	AAC	TCA	ACA	GAG	CAG	GTT	GAC	ACA	ATA	ATG	GAA	AAG	AAC	54
2	G	Y	H	A	N	N	S	T	E	Q	V	D	T	I	M	E	K	N	54
1	GTT	ACT	GTT	ACA	CAT	GCC	CAA	GAC	ATA	CTG	GAA	AAG	ACA	CAC	AAC	GGG	AAG	CTC	108
2	V	T	V	T	H	A	Q	D	I	L	E	K	T	H	N	G	K	L	108
1	TGC	GAT	CTA	GAT	GGA	GTG	AAG	CCT	CTA	ATT	TTG	AGA	GAT	TGT	AGT	GTA	GCT	GGA	162
2	C	D	L	D	G	V	K	P	L	I	L	R	D	C	S	V	A	G	162
1	TCA	CTC	CTC	GGA	AAT	CCT	ATG	TGT	GAC	GAA	TTC	ATC	AAT	GTG	CCG	GAA	TGG	TCT	216
2	S	L	L	G	N	P	M	C	D	E	F	I	N	V	P	E	W	S	216
1	TAC	ATA	GTG	GAG	AAG	GCC	AAT	CCA	GCC	AAT	GAC	CTC	TGT	TAC	CCA	GGG	GAT	TTC	270
2	Y	I	V	E	K	A	N	P	A	N	D	L	C	Y	P	G	D	F	270
1	AAC	GAC	TAT	GAA	GAA	CTG	AAA	CAC	CTA	CTG	AGC	AGA	ATA	AAC	CAT	TTT	GAG	AAA	324
2	N	D	Y	E	E	L	K	H	L	L	S	R	I	N	H	F	E	K	324
1	ATT	CAG	ATC	ATC	CCC	AAA	AGT	TCT	TGG	TCC	AAT	CAT	GAA	GCC	TCA	TCA	GGG	GTG	378
2	I	Q	I	I	P	K	S	S	W	S	N	H	E	A	S	S	G	V	378
1	AGC	TCA	GCA	TGT	CCA	TAC	AAT	GGG	AAG	TCC	TCC	TTT	TTC	AGA	AAT	GTG	GTA	TGG	432
2	S	S	A	C	P	Y	N	G	K	S	S	F	F	R	N	V	V	W	432
1	CTT	ATC	AAA	AAG	AAC	AGT	GCA	TAC	CCA	ACA	ATA	AAG	AGG	AGC	TAC	AAT	AAT	ACC	486
2	L	I	K	K	N	S	A	Y	P	T	I	K	R	S	Y	N	N	T	486
1	AAC	CAA	GAA	GAT	CTT	TTG	ATA	CTG	TGG	GGG	ATT	CAC	CAT	CCT	AAT	GAT	GCG	GCA	540
2	N	Q	E	D	L	L	I	L	W	G	I	H	H	P	N	D	A	A	540
1	GAA	CAA	ACA	AAG	CTC	TAT	CAA	AAC	CCA	ACC	ACC	TAT	ATT	TCC	GTT	GGA	ACA	TCA	594
2	E	Q	T	K	L	Y	Q	N	P	T	T	Y	I	S	V	G	T	S	594
1	ACA	CTG	AAC	CAG	AGA	TTG	GTC	CCA	AAA	ATA	GCT	ACT	AGA	TCC	AAA	GTA	AAC	GGG	648
2	T	L	N	Q	R	L	V	P	K	I	A	T	R	S	K	V	N	G	648
1	CAA	AGT	GGA	AGA	ATG	GAG	TTC	TTC	TGG	ACA	ATT	TTA	AAG	CCG	AAT	GAT	ACC	ATC	702
2	Q	S	G	R	M	E	F	F	W	T	I	L	K	P	N	D	T	I	702
1	AAT	TTC	GAG	AGT	AAT	GGA	AAT	TTC	ATT	GCT	CCA	GAA	TAT	GCA	TAC	AAA	ATT	GTC	756
2	N	F	E	S	N	G	N	F	I	A	P	E	Y	A	Y	K	I	V	756
1	AAG	AAA	GGG	GAC	TCA	GCA	ATT	ATG	AAA	AGT	GAA	TTG	GAA	TAT	GGT	AAC	TGC	AAC	810
2	K	K	G	D	S	A	I	M	K	S	E	L	E	Y	G	N	C	N	810
1	ACC	AAG	TGT	CAA	ACT	CCA	ATG	GGG	GCG	ATA	AAC	TCT	AGC	ATG	CCA	TTC	CAC	AAC	864
2	T	K	C	Q	T	P	M	G	A	I	N	S	S	M	P	F	H	N	864
1	ATA	CAC	CCT	CTC	ACC	ATC	GGG	GAG	TGC	CCC	AAA	TAT	GTC	AAA	TCA	AAC	AGA	TTA	918
2	I	H	P	L	T	I	G	E	C	P	K	Y	V	K	S	N	R	L	918
1	GTC	CTT	GCG	ACT	GGA	CTC	AGA	AAC	ACC	CCT	CAA	AGA	GAG	AGA	AGA	AGA	AAA	AAG	972
2	V	L	A	T	G	L	R	N	T	P	Q	R	E	R	R	R	K	K	972
1	AGA	GGA	CTA	TTT	GGA	GCT	ATA	GCA	GGT	TTT	ATA	GAG	GGA	GGA	TGG	CAG		1020	
2	R	G	L	F	G	A	I	A	G	F	I	E	G	G	G	W	Q	1020	

5. PET/HA (H5) 表达载体构建、筛选及鉴定

以PMD18/HA (H5) 为模板在95°C1min、50°C45s、72°C1.5min环境下30个循环进行PCR，

最后延伸10min。PCR产物电泳回收后，经*BamH I*、*Hind III*双酶切后，回收目的片段并克隆于表达质粒PET28a的*BamH I+Hind III*酶切窗口中，构建重组表达质粒PET/HA (H5)，转化宿主菌TOP10，提取重组质粒进行PCR、双酶切鉴定和序列测定。

6. 重组 PET/HA (H5) 的表达

经鉴定的重组质粒转入 BL21 (DE3) 宿主菌，挑取单克隆接种到含有卡钠霉素 LB 培养基中，37℃培养过夜，按 1: 100 的比例将培养物接种于 LB 培养基中，250rpm 震荡培养 2 小时左右，使 OD₆₀₀≈0.5, 按 1: 100 的比例加入 100mM IPTG 诱导培养 4 小时，离心收集菌体。将菌体加入适量的 1×SDS 上样缓冲液，采用 12%的 SDS-PAGE 鉴定，产物表达量可达 10~15%。

7. 重组血凝素蛋白的制备、分离纯化及鉴定

经大肠杆菌菌株 BL21 (DE3) 表达的血凝素主要以融合蛋白的形式存在，菌体经超声波破碎后，可以得到血凝素蛋白粗制品，进一步用 QIAGEN 公司的 Ni-NTA 蛋白纯化系统可以较快的得到血凝素蛋白纯品。并以 AIV/H5 亚型阳性血清为一抗做 Western blot，结果可检测到表达的融合蛋白（如图 2）。

按实施例中(2)方法步骤制备 H5 亚型 AIV 血凝素抗体检测板，按实施例中(3)(4)方法步骤制备抗体检测试剂盒酶结合物工作液，按实施例中(5)方法步骤制备样品稀释液、洗涤液、终止液，按实施例中(6)方法步骤制备抗体检测试剂盒阳性对照和阴性对照，按实施例中(7)方法步骤制备显色液 A、显色液 B，最后，将各种组成成份装配成 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体检测试剂盒。

使用 H5 亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接 ELISA 检测试剂盒检测水禽 AIV 血凝素抗体或抗体水平时，将采集分离的水禽血清，用样品稀释液作 1:100 或梯度稀释，制备待检样品溶液或梯度稀释样品溶液，将待检样品、阳性和阴性对照分别加入抗原检测板，按实施例中(8)中操作程序，室温作用 30 分钟，洗涤液洗涤，加酶结合物工作液，室温作用 30 分钟，同上洗涤，加入显色液 A，显色液 B 各 50μl，室温避光显色 5min，滴加终止液 50μl 终止显色反应，酶标仪检测 OD_{450nm} 值。按实施例中(9)中的判定标准判定结果。检测孔 OD_{450nm} 值与标准阴性对照 OD_{450nm} 值比值 (P/N) 大于或等于 2.2 判为阳性。对于梯度稀释样品则检测孔为阳性的样品最高稀释度为该待检血清的血凝素抗体滴度。如果 AIV 阳性对照无明显显色反应，或阴性对照出现显色，表明试剂盒失效或检测操作有误，需重新检测。

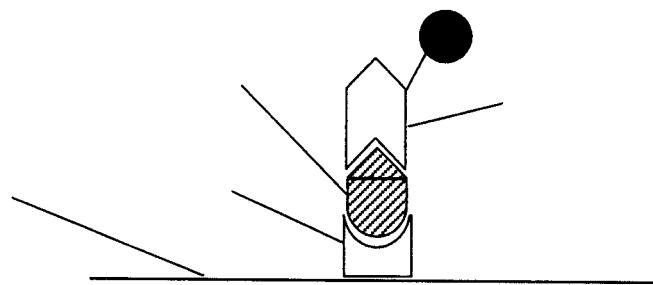


图 1

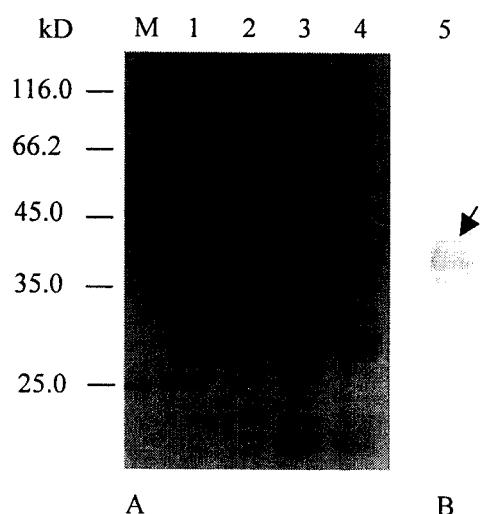


图 2

专利名称(译)	H5亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接ELISA检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1743848A	公开(公告)日	2006-03-08
申请号	CN200510049765.5	申请日	2005-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	周继勇 陈洪勋 申会刚		
发明人	周继勇 陈洪勋 申会刚		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/31		
其他公开文献	CN100451654C		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种H5亚型水禽流感病毒血凝素抗体间接ELISA检测试剂盒。试剂盒内设有抗体检测板，酶结合物工作液，阳性对照，阴性对照，样品稀释液，10×浓缩洗涤液，显色液A，显色液B和终止液，该试剂盒的检测板为包被水禽流感H5亚型血凝素蛋白(HA)的可拆96孔酶标板，酶结合物工作液为HRP标记兔抗水禽IgG多克隆抗体，阳性对照为H5亚型水禽流感标准阳性血清，阴性对照为水禽标准阴性血清。本发明有益的积极效果是：检测试剂盒对水禽的特异性强、敏感性高、操作简单，易于大范围推广应用，具有广阔的市场前景。

