



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109725152 A

(43)申请公布日 2019.05.07

(21)申请号 201811528961.4

G01N 33/577(2006.01)

(22)申请日 2018.12.13

G01N 33/543(2006.01)

(71)申请人 厦门万泰凯瑞生物技术有限公司

G01N 33/532(2006.01)

地址 361000 福建省厦门市海沧区新阳街道新园路124号

G01N 21/76(2006.01)

申请人 厦门大学

(72)发明人 陈自敏 熊君辉 徐伟玲 王龙
童勋章 葛胜祥 孙旭东(74)专利代理机构 厦门市首创君合专利事务所
有限公司 35204

代理人 张松亭 姜谧

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

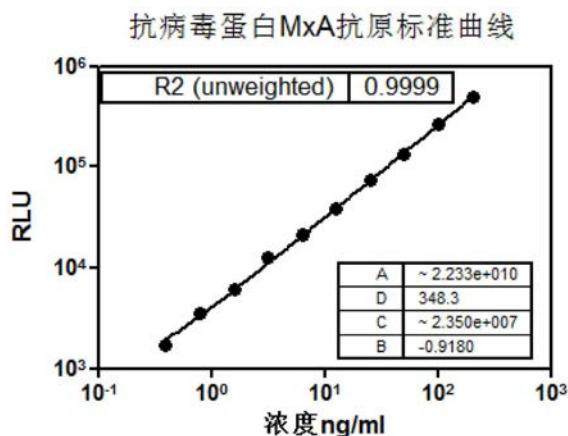
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒，包括包被反应缓冲液、磁性微粒子溶液、第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体溶液、第一发光液、第二发光液、全血裂解液、不同浓度的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液和浓缩洗涤液。本发明填补了国内抗病毒蛋白MxA检测的微粒子化学发光诊断试剂生产的空白，具有操作简单、灵敏度高、线性范围宽、结果稳定、安全性好，便于自动化等优点，在临床检验等方面具有广阔的应用前景。



1. 一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于:包括包被反应缓冲液,为pH7.35~7.44的磷酸盐缓冲液,其中还含有牛血清白蛋白、酪蛋白、非离子型表面活性剂和防腐剂;
磁性微粒子溶液,其中的磁性微粒子包被有第一抗病毒蛋白MxA单克隆抗体;
第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体溶液,其中的第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体标记有吖啶酯;
第一发光液,为过氧化氢和硝酸的水溶液;
第二发光液,为氢氧化钠与非离子型表面活性剂的水溶液;
全血裂解液,为NP40和DOC的水溶液;
不同浓度的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液,其溶剂为上述包被反应缓冲液;
和浓缩洗涤液,为非离子型表面活性剂和生物防腐剂的磷酸盐缓冲液溶液;
其使用方法包括如下步骤:
(1) 取待测全血,在其中加入上述全血裂解液,裂解并离心处理,获得上清液;
(2) 在上述上清液中加入上述磁性微粒子溶液进行反应,然后用稀释后的上述浓缩洗涤液洗涤,接着加入上述第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体溶液进行反应;
(3) 将步骤(2)所得的物料用稀释后的上述浓缩洗涤液洗涤,然后加入第一发光液和第二发光液进行反应,测定发光值,然后通过对应上述不同浓度的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液的标准曲线,算出结果。
2. 如权利要求1所述的一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于:所述包被反应缓冲液中含0.5% (W/V) 牛血清白蛋白、0.5% (W/V) 酪蛋白、0.05% (W/V) 非离子型表面活性剂和适量防腐剂。
3. 如权利要求1所述的一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于:所述磁性微粒子为表面覆有亲水性聚合物和羧基的磁珠,粒径为1.5~3μm。
4. 如权利要求1所述的一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于:所述第一发光液中,过氧化氢的浓度为0.5~3wt %,硝酸的浓度为0.01~0.5M。
5. 如权利要求1所述的一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于:所述第二发光液中,氢氧化钠的浓度为0.05~1M,非离子型表面活性剂的体积浓度为0.1~2%。
6. 如权利要求1所述的一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于:所述全血裂解液中含有1% (V/V) NP40和0.25% (W/V) DOC。
7. 如权利要求1至6中任一权利要求所述的一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于:所述非离子型表面活性剂为Triton X-100。
8. 如权利要求1至6中任一权利要求所述的一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒,其特征在于:所述生物防腐剂为Proclin。

一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于化学发光检测试剂盒技术领域,具体涉及一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒。

背景技术

[0002] Mx蛋白的分子量约为70~80kD,其蛋白结构至少由N-末端结构域、中间结构域、C-末端结构域等3个区域组成,约300个氨基酸组成的N-末端结构域是GTP酶的活性区,约100个氨基酸组成的C-末端结构域是GTP酶的效应区,中间结构域是由约150个氨基酸组成。MxA蛋白在细胞质中与滑面型内质网相连接,与病毒的核衣壳相结合后构型发生改变,结合MxA蛋白的核衣壳以纤维状复合物的形式沉积在细胞核周围,活化的MxA蛋白使病毒失去核衣壳,病毒核酸从而被释放出来,又很快被存在于细胞质中的核酸内切酶所降解,因此达到抗病毒作用。

[0003] 病毒感染时,机体内源性IFN明显增高。MxA蛋白由IFN- α /IFN- β 诱导产生,能够反映体内IFN表达的情况,有助于鉴别细菌性感染和病毒性感染,其次检测MxA蛋白水平有利于对IFN疗效进行评估。目前,抗病毒蛋白MxA的临床诊断技术主要包括:酶联免疫试验(ELISA),但因为操作繁琐,耗时长,易受人为操作和外界因素干扰,自动化程度低,而限制了抗病毒蛋白MxA检测的推广应用,使其无法广泛地应用于临床诊断与科研工作。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于克服现有技术缺陷,提供一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒。

[0005] 本发明的技术方案如下:

[0006] 一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒,包括

[0007] 包被反应缓冲液,为pH7.35~7.44的磷酸盐缓冲液,其中还含有牛血清白蛋白、酪蛋白、非离子型表面活性剂和防腐剂;

[0008] 磁性微粒子溶液,其中的磁性微粒子包被有第一抗病毒蛋白MxA单克隆抗体;

[0009] 第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体溶液,其中的第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体标记有吖啶酯;

[0010] 第一发光液,为过氧化氢和硝酸的水溶液;

[0011] 第二发光液,为氢氧化钠与非离子型表面活性剂的水溶液;

[0012] 全血裂解液,为NP40(乙基苯基聚乙二醇)和DOC(脱氧胆酸钠)的水溶液;

[0013] 不同浓度的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液,其溶剂为上述包被反应缓冲液;

[0014] 和浓缩洗涤液,为非离子型表面活性剂和生物防腐剂的磷酸盐缓冲液溶液;

[0015] 其使用方法包括如下步骤:

[0016] (4)取待测全血,在其中加入上述全血裂解液,裂解并离心处理,获得上清液;

[0017] (5)在上述上清液中加入上述磁性微粒子溶液进行反应,然后用稀释后的上述浓

缩洗涤液洗涤，接着加入上述第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体溶液进行反应；

[0018] (6) 将步骤(2)所得的物料用稀释后的上述浓缩洗涤液洗涤，然后加入第一发光液和第二发光液进行反应，测定发光值，然后通过对应上述不同浓度的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液的标准曲线，算出结果。

[0019] 在本发明的一个优选实施方案中，所述包被反应缓冲液中含0.5% (W/V) 牛血清白蛋白、0.5% (W/V) 酪蛋白、0.05% (W/V) 非离子型表面活性剂和适量防腐剂。

[0020] 在本发明的一个优选实施方案中，所述磁性微粒子为表面覆有亲水性聚合物和羧基的磁珠，粒径为1.5~3μm。

[0021] 在本发明的一个优选实施方案中，所述第一发光液中，过氧化氢的浓度为0.5~3wt%，硝酸的浓度为0.01~0.5M。

[0022] 在本发明的一个优选实施方案中，所述第二发光液中，氢氧化钠的浓度为0.05~1M，非离子型表面活性剂的体积浓度为0.1~2%。

[0023] 在本发明的一个优选实施方案中，所述全血裂解液中含有1% (V/V) NP40和0.25% (W/V) DOC。

[0024] 进一步优选的，所述非离子型表面活性剂为Triton X-100。

[0025] 进一步优选的，所述生物防腐剂为Proclin。

[0026] 本发明的有益效果是：

[0027] 1、本发明的抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒，填补了国内抗病毒蛋白MxA检测的微粒子化学发光诊断试剂生产的空白，具有操作简单、灵敏度高、线性范围宽、结果稳定、安全性好，便于自动化等优点，在临床检验等方面具有广阔的应用前景。

[0028] 2、本发明的反应缓冲液为抗原抗体反应提供合适的反应条件。

[0029] 3、本发明采用磁性微粒子偶联单克隆抗体，由于微粒子可以悬浮于样本溶液中，有利用微粒子表面抗体与待测物充分接触，缩短反应时间。

[0030] 4、本发明以吖啶酯作为标记物，可以得到稳定、高强度的信号。

附图说明

[0031] 图1为本发明实施例1中的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液曲线。

[0032] 图2为本发明实施例1中的抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒和BioVendor公司生产的Human MxA Protein ELISA分别对58份婴幼儿样本检测结果的相关性分析结果图。

具体实施方式

[0033] 以下通过具体实施方式结合附图对本发明的技术方案进行进一步的说明和描述。

[0034] 实施例1

[0035] 一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒，包括包被反应缓冲液、磁性微粒子溶液、第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体溶液第一发光液、第二发光液、全血裂解液、不同浓度的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液和浓缩洗涤液。其使用方法包括如下步骤：

[0036] (1) 取待测全血，在其中加入上述全血裂解液，裂解并离心处理，获得上清液；

[0037] (2) 在上述上清液中加入上述磁性微粒子溶液进行反应，然后用稀释后的上述浓

缩洗涤液洗涤,接着加入上述第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体溶液进行反应;

[0038] (3) 将步骤(2)所得的物料用稀释后的上述浓缩洗涤液洗涤,然后加入第一发光液和第二发光液进行反应,测定发光值,然后通过对应上述不同浓度的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液的标准曲线,算出结果。

[0039] 包被反应缓冲液,为pH7.4的磷酸盐缓冲液,其中含0.5% (W/V) 牛血清白蛋白、0.5% (W/V) 酪蛋白、0.05% (W/V) Triton X-100和适量防腐剂;

[0040] 磁性微粒子溶液,其中的磁性微粒子包被有第一抗病毒蛋白MxA单克隆抗体(购自厦门万泰凯瑞生物技术有限公司,货号M3353),磁性微粒子为表面覆有亲水性聚合物和羧基的磁珠,粒径为1.5~3nm;其制备方法为:将磁性微粒子、EDC与NHS的质量比为1:1:1,并加入pH为5.0的50mM MES溶液,使磁性微粒子浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上活化,活化环境温度25℃,时间20min;将活化后的磁性微粒子与第一抗病毒蛋白MxA单克隆抗体比例为每毫克磁性微粒子标记15ug的第一抗病毒蛋白MxA单克隆抗体,放置在垂直旋转仪上标记,反应环境温度25℃,时间3h;将反应后的磁性微粒子用洗液洗涤3次,加入含有甘氨酸、0.5% 牛血清白蛋白、0.05% TritonX-100、pH为7.4的磷酸盐缓冲液,使磁性微粒子浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上终止,反应环境温度25℃,时间2h;将终止后的磁性微粒子用洗液洗涤3次,加入含有0.5% (W/V) 牛血清白蛋白、0.5% (W/V) 酪蛋白、0.05% T (W/V) ritonX-100、防腐剂、pH为7.4的磷酸盐缓冲液,使磁性微粒子浓度为4mg/mL,2~8℃保存备用;

[0041] 第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体(购自厦门万泰凯瑞生物技术有限公司,货号M3352)溶液,其中的第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体标记有吖啶酯;其制备方法为:取待标记第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体50ug,加入含NaCl的磷酸盐缓冲液至体积为300μL,再加入5μL吖啶酯母液,振荡混匀,室温避光反应30min;反应后加入200μL含NaCl和甘氨酸的磷酸盐缓冲液,手工颠倒20次混匀,室温避光反应30min;反应后将产物转移至透析袋中,透析液为pH为7.4的20mM PBS缓冲液,2~8℃避光透析,每隔2h换一次PBS缓冲液,共更换3次,以除去未标记的吖啶酯;将标记物取出,按实际体积加入10% (W/V) 牛血清白蛋白至牛血清白蛋白的终浓度为0.1% (V/V 1:100),加入等体积甘油,手工颠倒混匀后,-15℃以下避光保存备用。

[0042] 第一发光液,为过氧化氢和硝酸的水溶液,过氧化氢的浓度为0.5~3wt %,硝酸的浓度为0.01~0.5M;

[0043] 第二发光液,为氢氧化钠与Triton X-100的水溶液,氢氧化钠的浓度为0.05~1M,Triton X-100的体积浓度为0.1~2%;

[0044] 全血裂解液,为NP40(乙基苯基聚乙二醇) 和DOC(脱氧胆酸钠) 的水溶液,含有1% (V/V) NP40和0.25% (W/V) DOC;

[0045] 不同浓度的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液,其溶剂为上述包被反应缓冲液;其制备方法包括:采用厦门万泰凯瑞生物技术有限公司自主研发生产的高纯度抗病毒蛋白MxA抗原,使用含有1% 牛血清白蛋白、0.5% (W/V) 酪蛋白、0.1% (W/V) TritonX-100、防腐剂、pH为7.4的磷酸盐缓冲液梯度稀释为200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、1.5625ng/mL、0.78125ng/mL、0.390625ng/mL的系列的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液,绘制如图1所示的标准曲线;

[0046] 浓缩洗涤液,为Triton X-100和Proclin的磷酸盐缓冲液;

[0047] 其使用方法包括如下步骤:

[0048] (1) 取10μL待测全血,在其中加入90μL上述全血裂解液,裂解并12000rpm离心5min,获得上清液;

[0049] (2) 在50μL上述上清液中加入50μL上述磁性微粒子溶液(用上述包被反应缓冲液稀释为0.4mg/ml)在37℃的条件下反应15min,然后用稀释后的上述浓缩洗涤液洗涤2次,接着加入50μL上述第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体溶液37℃反应10min;

[0050] (3) 将步骤(2)所得的物料用稀释后的上述浓缩洗涤液洗涤4次,然后加入第一发光液和第二发光液进行反应,测定发光值,然后通过如图1所示的标准曲线,通过发光仪自动计算出结果。

[0051] 本实施例的抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒和BioVendor公司生产的Human MxA Protein ELISA分别对来至厦门市妇幼保健院的58份婴幼儿的全血样本检测结果对比,如表1所示:

[0052] 表1

妇幼保健院全血样本序号	Human MxA Protein ELISA (ng/ml)	抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫检测试剂盒 (ng/ml)
1	11.46	11.63
2	4.68	2.57
3	5.96	4.69
4	9.46	7.49
5	2.49	1.68
6	5.86	2.51
7	7.81	7.07
8	12.44	16.98
9	13.55	21.93
10	12.44	16.68
11	8.16	10.64
12	11.12	15.85
13	5.79	5.26
14	0.56	0.23
15	0.65	0.23
16	0.00	0.29
17	0.55	1.21
18	0.00	0.17
19	0.00	0.31
20	0.00	0.22
21	0.00	0.40
22	0.00	0.45
23	0.00	0.21
24	0.37	1.10
25	0.13	0.56
26	0.03	0.23
27	0.52	0.24
28	0.00	0.18
29	0.00	0.19
30	0.00	0.29
31	0.00	1.25
32	0.00	0.53
33	0.00	0.20
34	0.00	0.22
35	0.00	0.49
36	0.00	0.47
37	0.00	0.35
38	12.03	15.86
39	0.00	0.39
40	12.56	15.74
41	13.27	16.00
42	6.24	3.96
43	7.32	6.41
44	6.78	5.40
45	6.59	8.58
46	0.00	0.17
47	0.77	1.36
48	0.68	1.48
49	8.44	9.75
50	1.79	4.07
51	11.75	12.69
52	0.36	0.74
53	12.18	20.37
54	7.46	7.67
55	0.26	0.92
56	6.18	8.40
57	3.15	1.80
58	10.44	17.67

[0053]

[0054]]如图2所示,本实施例的抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒和BioVendor公司生产的Human MxA Protein ELISA分别对来至厦门市妇幼保健院的58份婴幼儿样本检测结果的相关性为0.9061。

[0055] 以上所述，仅为本发明的较佳实施例而已，故不能依此限定本发明实施的范围，即依本发明专利范围及说明书内容所作的等效变化与修饰，皆应仍属本发明涵盖的范围内。

抗病毒蛋白MxA抗原标准曲线

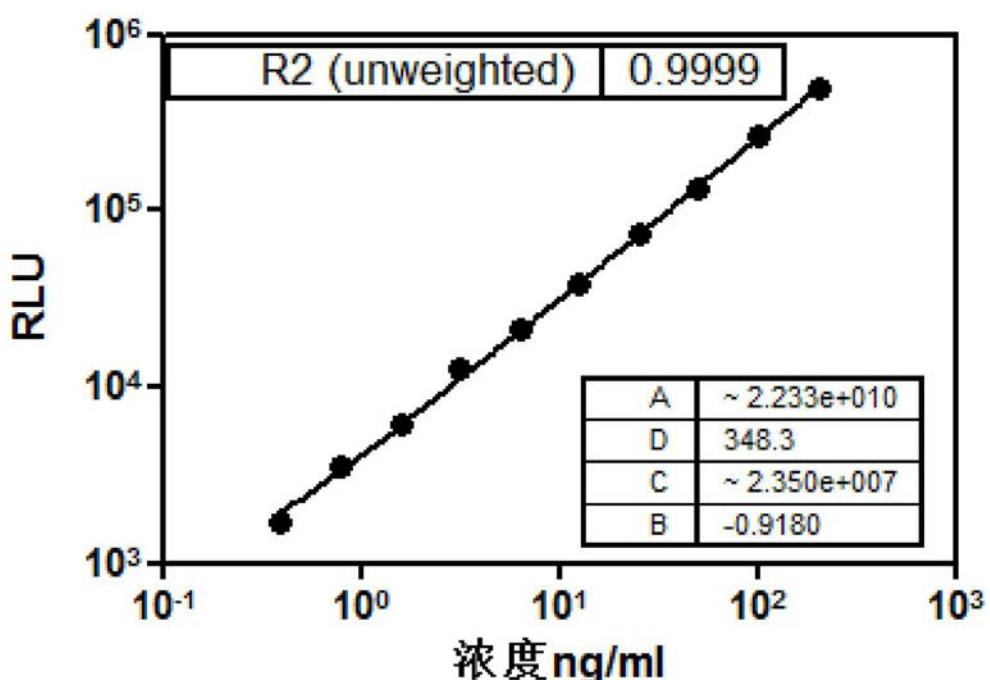


图1

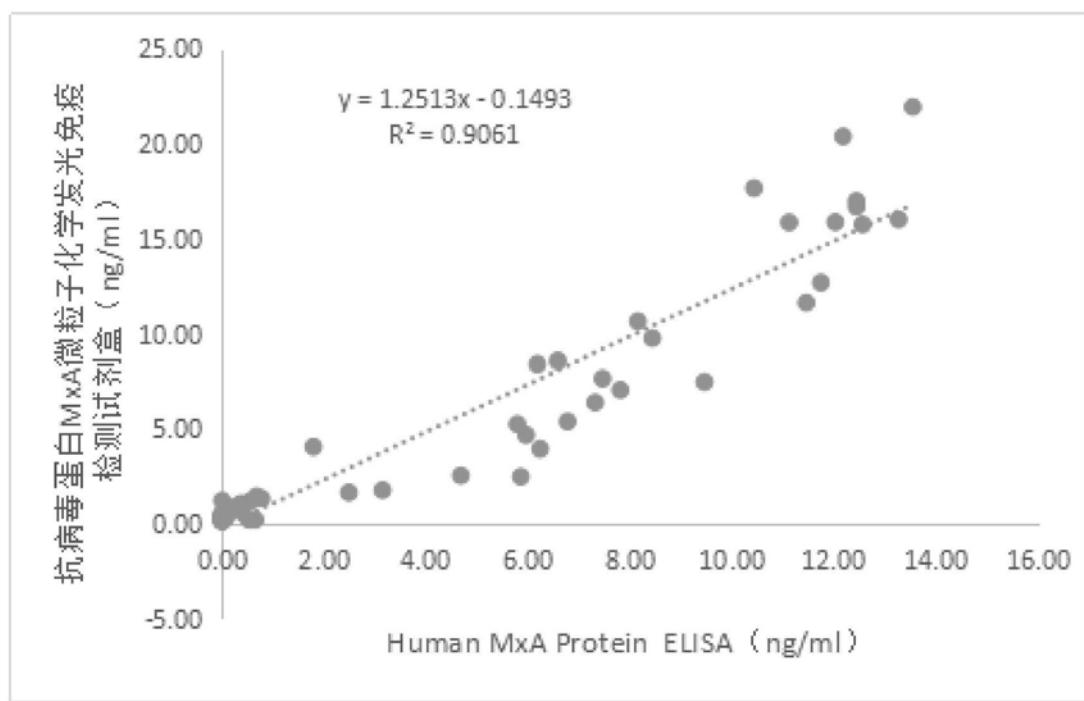


图2

专利名称(译)	一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109725152A	公开(公告)日	2019-05-07
申请号	CN201811528961.4	申请日	2018-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	厦门万泰凯瑞生物技术有限公司 厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门万泰凯瑞生物技术有限公司 厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门万泰凯瑞生物技术有限公司 厦门大学		
[标]发明人	陈自敏 熊君辉 徐伟玲 王龙 童勋章 葛胜祥 孙旭东		
发明人	陈自敏 熊君辉 徐伟玲 王龙 童勋章 葛胜祥 孙旭东		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/58 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/532 G01N21/76		
代理人(译)	张松亭 姜谧		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种抗病毒蛋白MxA微粒子化学发光免疫分析检测试剂盒，包括包被反应缓冲液、磁性微粒子溶液、第二抗病毒蛋白MxA单克隆抗体溶液、第一发光液、第二发光液、全血裂解液、不同浓度的抗病毒蛋白MxA抗原标准品溶液和浓缩洗涤液。本发明填补了国内抗病毒蛋白MxA检测的微粒子化学发光诊断试剂生产的空白，具有操作简单、灵敏度高、线性范围宽、结果稳定、安全性好，便于自动化等优点，在临床检验等方面具有广阔的应用前景。

