



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102539776 A

(43) 申请公布日 2012.07.04

(21) 申请号 201010594390.1

(22) 申请日 2010.12.10

(71) 申请人 浙江普康生物技术股份有限公司

地址 310053 浙江省杭州市滨江区浦沿街道
滨康路 587 号

(72) 发明人 高孟 罗永能 周康凤 姜云水

毛子旭 王一虎 唐彩华 朱莲

高丽美 庄昉成 毛子安 毛江森

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务有限公司

司 33200

代理人 韩介梅

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫
吸附检测方法

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,特别是用于血清中肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, 简称 EV71) 特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法。通过间接酶联免疫吸附法 (ELISA) 的方法,将制备的 EV71 病毒抗原固定到酶标板上,通过抗原抗体的特异性吸附来实现抗体的检测。由于包被的抗原包含 EV71 病毒的特异性抗原表位,因而能用来检测出血清中 EV71 病毒的特异性抗体,从而减少血清检测的假阳性。本发明适合对大批量动物或人体血清标本进行检测,适用于大规模的血清学和流行病学调查。

1. 一种肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法,其特征在于将纯化的肠道病毒 71 型病毒颗粒,合成的病毒样颗粒抗原,合成的含病毒特异性抗原表位的多肽固定到酶标板上,通过间接酶联免疫吸附的方法进行测定。

2. 根据权利要求 1 所述的肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法,其特征在于具体步骤如下:

A. 酶标板的预制

A. 1EV71 病毒抗原的固定:用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将纯化的 EV71 病毒抗原稀释至 1~5 微克/毫升,按 50~100 微升/孔的量,加入酶标板的孔中,放于 4℃ 孵育过夜,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗液洗板 3~5 次;

A. 2 酶标板的封闭:用封闭液按 200 微升/孔的量加入步骤 A.1 的酶标板孔中,37℃ 孵育 1~2 小时,PBS 洗液洗板 3~5 次;

A. 3 加保护剂:用 5% 蔗糖按 100~200 微升/孔的量,加入步骤 A.2 酶标板的孔中,37℃ 孵育 0.5~1 小时,拍干,4 度储存待用;

B. 用含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 将血清作不同的稀释度,按 50~100 微升/孔的量,加入步骤 A.3 酶标板的孔中,同时设立阴性对照,阳性对照和空白孔,37℃ 孵育 1~2 小时,PBS 洗液洗板 3~5 次;

C. 按 50~100 微升/孔的量,在步骤 B 的酶标板的各孔中,加入酶标抗体,放入 37℃ 孵育 0.5~1 小时,PBS 洗液洗板 3~5 次;

D. 按 50~100 微升/孔的量,在步骤 C 的酶标板的各孔中,加入邻苯二胺显色液,放入湿盒中,于 37℃ 保温 10~20 分钟;

E. 按 50~100 微升/孔的量,在步骤 D 的酶标板的各孔中,加入终止液,而后置于酶标仪上,在 492nm 波长下,用空白孔调零后检测吸光度 OD 值,即得到检测结果。

3. 根据权利要求 1 所述的肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法,其特征在于含有病毒特异性抗原表位的多肽抗原用作固定抗原。

4. 根据权利要求 2 所述的肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法,其特征在于 A.3 步骤所述的添加 5% 蔗糖作为稳定保护剂。

5. 根据权利要求 2 所述的肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法,其特征在于洗板用磷酸盐缓冲液洗液在洗板机上洗板或手工洗板。

6. 根据权利要求 2 所述的肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法,其特征在于磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液洗液、碳酸盐缓冲液、终止液、邻苯二胺显色液、封闭液为常规用液。

7. 根据权利要求 1 所述的肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法,其特征在于用于血清中肠道病毒 71 型特异性抗体的定性或定量检测。

一种肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,特别是用于肠道病毒 71 型 (Enterovirus71,简称 EV71) 特异性抗体的定性或定量检测,通过酶联免疫吸附测定肠道病毒 71 型抗体的检测方法。

背景技术

[0002] 肠道病毒引起的传染病,多发生于 5 岁以下儿童,可引起手、足、口腔等部位的疱疹。引起手足口疾病的主要致病原是肠道病毒 71 型和柯萨奇病毒 A16。大量的流行病学研究表明,肠道病毒 71 型病毒的感染多发生于 5 岁以下的婴幼儿,其感染可能引起多种与神经系统相关的严重疾病,包括致死脑炎、无菌性脑膜炎和急性麻痹等。因而,对 EV71 病毒的特异性诊断具有非常重大的临床意义。

[0003] EV71 病毒属于小核糖核酸 (RNA) 病毒科肠道病毒属的成员,其病毒颗粒为二十面体立体对称的球形结构,无包膜和突起,直径大约在 24 ~ 30nm。病毒粒子的衣壳由 60 个亚单位构成,后者由 4 种衣壳蛋白 (VP1-VP4) 拼装成五聚体样,抗原决定簇基本上位于 VP1-VP3 上。病毒衣壳与病毒毒力有关,而由 297 个氨基酸组成的 VP1 结构蛋白,其大部分结构暴露于病毒表面,含有 EV71 病毒的重要抗原表位,可以诱发机体产生特异性的 EV71 中和抗体。因此,可以利用这些特异性的抗原表位来捕获机体中的特异性抗体,从而实现特异性抗体的检测。

[0004] 目前,针对 EV71 病毒的特异性检测方法包括病毒分离、核酸分子生物学检测和血清学检测。病毒分离常用的细胞系有 Vero、RD、Hep-2 细胞。目前发现 Vero 细胞分离病毒的阳性率最高。用于病毒分离的样本有咽拭子、肛拭或粪便、脑脊液、血清及囊泡液。有研究显示病毒分离阳性率最高的样本是咽拭子,可达 90% -95%;其次是肛拭样本,约为 40% -50%;囊泡液也有较高的阳性率,而脑脊液的病毒分离率很低。病毒分离的缺点是繁杂费时,无法满足病毒流行期间同时处理大量样本的需要。

[0005] 核酸分子生物学检测方法具有较高的敏感度和特异性,包括 RT-PCR (反转录聚合酶链反应) 和荧光定量 RT-PCR 检测方法。与其他肠道病毒一样,PCR 检测主要针对 EV71 的 VP1 区保守的核苷酸序列设计引物和探针。采用半巢式 RT-PCR 直接从样本中检测 EV71,检出率可达 53%。荧光定量 RT-PCR 方法特异度达 100%,可检测 5 个拷贝病毒量,可用于直接检测样本。与普通 RT-PCR 相比,由于其污染可能性小,手上操作时间少,为 EV71 的快速检测提供了有效手段。但是该方法操作较为复杂,对操作人员的要求较高,且标本中的杂质可能引起聚合酶的失活等问题,在实际的应用过程中存在一些问题,无法满足病毒流行期间同时处理大量样本的需要。

[0006] 血清学检测包括中和试验和 ELISA 检测方法。其中最常用方法目前仍是中和实验,但该方法的灵敏度和特异性较差。而且该方法在检测过程中需要进行细胞培养,从而导致试验周期变长,往往需要 1 个月左右的时间才能得到结果,在实际的应用过程中存在一定的局限性。与血清中和试验相比,运用 ELISA 方法对 EV71 进行特异性的检测,具有较好

的灵敏度和特异性其方法简便、快速,具有很好的应用前景。

发明内容

[0007] 本发明的目的是利用 EV71 特异性的抗原作为固定包被抗原,建立一种特异性检测肠道病毒 71 型抗体的方法,利用间接酶联免疫吸附法 (ELISA),提供一种特异性好、灵敏度高、使用方便、检测快速的肠道病毒 71 型抗体的检测方法,可以用于血清中肠道病毒 71 型抗体检测及效价测定,能适用于大规模的血清学和流行病学调查。

[0008] 本发明肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, 简称 EV71) 特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法,通过间接酶联免疫吸附法 (ELISA) 的方法,将制备的 EV71 病毒抗原固定到酶标板上,通过抗原抗体的特异性吸附来实现抗体的检测。由于包被的抗原包含 EV71 病毒的特异性抗原表位,因而能用来检测出血清中 EV71 病毒的特异性抗体,从而减少血清检测的假阳性。本发明适合对大批量动物或人体血清标本进行检测,适用于大规模的血清学和流行病学调查。

[0009] 本发明肠道病毒 71 型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法,将纯化的肠道病毒 71 型 (EV71) 病毒颗粒,合成的病毒样颗粒 (VLP) 抗原,合成的含病毒特异性抗原表位的多肽固定到酶标板上,通过间接酶联免疫吸附的方法进行测定,其中合成的含病毒特异性抗原表位的多肽主要含有 EV71 病毒的 162-177 氨基酸位点、208-222 氨基酸位点以及 240-260 氨基酸位点。

[0010] 本发明采用间接酶联免疫吸附法,通过固定 EV71 抗原-待测血清-酶标抗体这样一个模型 (见图 1) 来实现。即将 EV71 抗原固定在酶标板孔上,随后加入待测血清,用相应的酶标抗体指示显色。

[0011] 本发明提供一种肠道病毒 71 型抗体的检测方法的技术方案,具体步骤如下:

[0012] A. 酶标板的预制

[0013] A. 1 EV71 抗原的固定:用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将 EV71 病毒特异性抗原稀释至 1~5 微克/毫升,按 50~100 微升/孔的量,加入酶标板的孔中,放于 4℃ 孵育过夜,用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗液洗板 3~5 次;

[0014] A. 2 酶标板的封闭:用封闭液按 200 微升/孔的量加入步骤 A. 1 的酶标板孔中,37℃ 孵育 1~2 小时, PBS 洗液洗板 3~5 次;

[0015] A. 3 加保护剂:用 5% 蔗糖按 100~200 微升/孔的量,加入步骤 A. 2 酶标板的孔中,37℃ 孵育 0.5~1 小时,拍干,4 度储存待用;

[0016] B. 用含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 将血清作不同的稀释度,按 50~100 微升/孔的量,加入步骤 A. 3 酶标板的孔中,同时设立阴性孔,阳性孔和空白孔,37℃ 孵育 1~2 小时, PBS 洗液洗板 3~5 次;

[0017] C. 按 50~100 微升/孔的量,在步骤 B 的酶标板的各孔中,加入酶标抗体,放入 37℃ 孵育 0.5~1 小时, PBS 洗液洗板 3~5 次;

[0018] D. 按 50~100 微升/孔的量,在步骤 C 的酶标板的各孔中,加入邻苯二胺 (OPD) 显色液,放入湿盒中,于 37℃ 保温 10~20 分钟;

[0019] E. 按 50~100 微升/孔的量,在步骤 D 的酶标板的各孔中,加入终止液,而后置于酶标仪上,在 492nm 波长下,用空白孔调零后检测吸光度 OD 值,即得到检测结果。

- [0020] 上述 A. 1 步骤所述的 EV71 病毒特异性抗原为本公司自制。
- [0021] 上述 A. 1 步骤所述 EV71 病毒特异性抗原将纯化的肠道病毒 71 型病毒颗粒,合成的病毒样颗粒抗原,合成的含病毒特异性抗原表位的多肽作为固定抗原。
- [0022] 上述 A. 3 步骤所述的添加 5%蔗糖作为稳定保护剂。
- [0023] 上述 C 步骤所述的酶标抗体为市购。
- [0024] 所述洗板为用磷酸盐缓冲液洗液在洗板机上洗板或者手工洗板。
- [0025] 所述磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液洗液、碳酸盐缓冲液、邻苯二胺显色液、终止液、封闭液均为现有技术的常规用液。
- [0026] 该方法用于血清中肠道病毒 71 型特异性抗体的定性或定量检测,减少血清检测的假阳性。

附图说明

- [0027] 图 1 为本发明实验模型。
- [0028] 图 2 为小鼠血清中肠道病毒 71 型抗体测定结果。
- [0029] 图 3 为人体肠道病毒 71 型阴、阳性血清标本中特异性抗体测定结果比较。
- [0030] 图 4 为不同年龄段正常人群血清的 EV71 抗体阳性率结果。
- [0031] 本发明具有以下优点和效果:根据上述方案,采用 EV71 病毒特异性抗原作为固定相,来检测血清样本中的 EV71 特异性抗体水平,从而判断机体针对 EV71 的免疫状况,该方法有助于提高抗体检测的特异性和灵敏度,减少假阳性的产生。本发明操作简单,试验周期短,全程实验不超过 2 小时,适用于大批量样本筛查,便于进行大规模的血清学和流行病学调查。

具体实施方案

- [0032] 实施例 1
- [0033] 固定纯化 EV71 病毒抗原检测小鼠血清中的 EV71 抗体效价
- [0034] 1) 用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将纯化的 EV71 病毒抗原稀释至 2 微克 / 毫升,按 100 微升 / 孔的量加入酶标板孔中,置于 4℃ 孵育过夜, PBS 洗液洗板 3 次;
- [0035] 2) 用封闭液按 200 微升 / 孔的量加入酶标板孔中,37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗液洗板 3 次;
- [0036] 3) 用 5%蔗糖按 100 微升 / 孔的量,加入酶标板孔中,37℃ 孵育 0.5 ~ 1 小时,拍干,4 度储存待用;
- [0037] 4) 用 0.9%生理盐水将待测血清稀释 10 倍,再用含有 1% BSA 的 PBS 将血清作一系列的稀释度:1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320、1 : 640、1 : 1280、1 : 2560,按 100 微升 / 孔的量,加入预制备的酶标板的孔中,37℃ 孵 1 小时, PBS 洗液洗板 4 次,同时设立阴性对照孔 2 个,和空白孔 1 个;
- [0038] 5) 按 100 微升 / 孔的量,在步骤 4) 所述的酶标板的各孔中,加入酶标抗体,放入 37℃ 孵育 0.5 小时, PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次;
- [0039] 6) 按 100 微升 / 孔的量,在步骤 5) 所述的酶标板的各孔中,加入邻苯二胺显色液,放入湿盒中,于 37℃ 保温 15 分钟;

[0040] 7) 按 50 微升 / 孔的量, 在步骤 6) 所述的酶标板的各孔中, 加入终止液, 而后置于酶标仪上, 在 492nm 波长下, 用空白孔调零后检测吸光度 A 值, 即得到检测结果 (结果见表 1 和图 2)。

[0041] 8) 判定结果:

[0042] 阴性对照空的平均值为 :0.06

[0043] 故域值 (Cutoff) 值 = $0.06 \times 2.1 = 0.126$

[0044] 按照样品的 A 值 \geq 域值 (Cutoff) 值, 该样品判定为阳性样品; 样品的 A 值 $<$ Cutoff 值, 该样品判为阴性。则本样品 1 : 20 ~ 1 : 1280 稀释度均为阳性, 1 : 2560 为阴性, 因此, 该血清中 EV71 抗体的效价为 1 : 1280。

[0045] 所用溶液如下:

[0046] 1、包被缓冲液 (0.05M 碳酸盐缓冲液, PH9.6): 碳酸钠 1.59 克, 碳酸氢钠 2.93 克, 加蒸馏水至 1000 毫升。

[0047] 2、磷酸盐缓冲液 (PBS, PH7.4): 磷酸二氢钾 0.2 克, 磷酸氢二钠 2.9 克, 氯化钠 8.0 克, 氯化钾 0.2 克, Tween-200.5 毫升, 加蒸馏水至 1000 毫升。

[0048] 3、PBS 洗液 :1000 毫升磷酸盐缓冲液中, 加入 0.5 毫升吐温 20。

[0049] 4、封闭液 :100 毫升 PBS 洗液中加入 1 克牛血清白蛋白, 溶解混匀。

[0050] 5、OPD 显色液 :称取 20mg 邻苯二胺, 溶于 50 毫升 0.1 摩尔浓度 / 升 pH 5.0 的柠檬酸钠 - 磷酸盐缓冲液, 再加入 20 微升双氧水, 混匀后避光保存。

[0051] 6、终止液 (2N 硫酸) :取浓硫酸 10 毫升, 缓慢加入 80 毫升水中, 冷却待用。

[0052] 表 1、小鼠血清中肠道病毒 71 型抗体测定结果 (A_{492} 值)

[0053]

稀释倍数	阳性	阴性	阴性	空白
20x	1.686	0.061	0.059	0.003
40x	1.617			
80x	1.279			
160x	0.858			
320x	0.517			
640x	0.286			
1280x	0.174			
2560x	0.102			

[0054] 实施例 2

[0055] 固定纯化 EV71 病毒抗原检测小鼠血清中的 EV71 抗体阳性率

[0056] 1) 用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将纯化的 EV71 病毒抗原稀释至 3 微克 / 毫升, 按 100

微升 / 孔的量加入酶标板孔中,置于 4℃ 孵育过夜, PBS 洗液洗板 3 次 ;

[0057] 2) 用封闭液按 200 微升 / 孔的量加入酶标板孔中, 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗液洗板 3 次 ;

[0058] 3) 用 5% 蔗糖按 100 微升 / 孔的量, 加入酶标板孔中, 37℃ 孵育 0.5 ~ 1 小时, 拍干, 4 度储存待用

[0059] 4) 将 75 份小鼠阳性血清分别稀释 100 倍, 按 100 微升 / 孔的量, 加入预制备的酶标板的孔中, 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗液洗板 4 次, 同时设立阴性对照孔 2 个, 和空白孔 1 个 ;

[0060] 5) 按 100 微升 / 孔的量, 在步骤 4) 所述的酶标板的各孔中, 加入酶标抗体, 放入 37℃ 孵育 0.5 小时, PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次 ;

[0061] 6) 按 100 微升 / 孔的量, 在步骤 5) 所述的酶标板的各孔中, 加入邻苯二胺显色液, 放入湿盒中, 于 37℃ 保温 15 分钟 ;

[0062] 7) 按 50 微升 / 孔的量, 在步骤 6) 所述的酶标板的各孔中, 加入终止液, 而后置于酶标仪上, 在 492nm 波长下, 用空白孔调零后检测吸光度 A 值, 即得到检测结果 (结果见表 2) 。

[0063] 8) 判定结果 :

[0064] 阴性对照空的平均值为 :0.027, 小于 0.05, 应按 0.05 计算,

[0065] 故 Cutoff 值 = $0.05 \times 2.1 = 0.105$

[0066] 按照样品的 A 值 \geq Cutoff 值, 该样品判定为阳性样品 ; 样品的 A 值 $<$ Cutoff 值, 该样品判为阴性。

[0067] 表 2、小鼠血清检测结果

[0068]

	阳性结果	阴性结果	阳性率
血样例数	70	5	93.3%

[0069] 实施例 3

[0070] 固定病毒特异性抗原表位多肽检测小鼠血清中的 EV71 抗体阳性率

[0071] 1) 用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将纯化的 EV71 病毒抗原稀释至 3 微克 / 毫升, 按 100 微升 / 孔的量加入酶标板孔中, 置于 4℃ 孵育过夜, PBS 洗液洗板 3 次 ;

[0072] 2) 用封闭液按 200 微升 / 孔的量加入酶标板孔中, 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗液洗板 3 次 ;

[0073] 3) 用 5% 蔗糖按 100 微升 / 孔的量, 加入酶标板孔中, 37℃ 孵育 0.5 ~ 1 小时, 拍干, 4 度储存待用

[0074] 4) 将 75 份接种 EV71 病毒的小鼠血清分别稀释 50 倍, 按 100 微升 / 孔的量, 加入预制备的酶标板的孔中, 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗液洗板 4 次, 同时设立阴性对照孔 2 个, 和空白孔 1 个 ;

[0075] 5) 按 100 微升 / 孔的量, 在步骤 4) 所述的酶标板的各孔中, 加入酶标抗体, 放入 37℃ 孵育 0.5 小时, PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次 ;

[0076] 6) 按 100 微升 / 孔的量, 在步骤 5) 所述的酶标板的各孔中, 加入邻苯二胺显色液, 放入湿盒中, 于 37℃ 保温 15 分钟 ;

[0077] 7) 按 50 微升 / 孔的量, 在步骤 6) 所述的酶标板的各孔中, 加入终止液, 而后置于酶标仪上, 在 492nm 波长下, 用空白孔调零后检测吸光度 A 值, 即得到检测结果 (结果见表 3)。

[0078] 8) 判定结果:

[0079] 阴性对照空的平均值为 :0.035, 小于 0.05, 应按 0.05 计算

[0080] 故 Cutoff 值 = $0.05 \times 2.1 = 0.105$

[0081] 按照样品的 A 值 \geq Cutoff 值, 该样品判定为阳性样品; 样品的 A 值 $<$ Cutoff 值, 该样品判为阴性。

[0082] 表 3、小鼠血清检测结果

[0083]

	阳性结果	阴性结果	阳性率
血样例数	71	4	94.7%

[0084] 实施例 4

[0085] 固定病毒特异性抗原表位多肽检测小鼠血清中的 EV71 抗体

[0086] 1) 用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将病毒特异性抗原表位多肽稀释至 1 微克 / 毫升, 按 100 微升 / 孔的量加入酶标板孔中, 置于 4℃ 孵育过夜, PBS 洗液洗板 3 次;

[0087] 2) 用封闭液按 200 微升 / 孔的量加入酶标板孔中, 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗液洗板 3 次;

[0088] 3) 用 5% 蔗糖按 100 微升 / 孔的量, 加入酶标板孔中, 37℃ 孵育 0.5 ~ 1 小时, 拍干, 4 度储存待用

[0089] 4) 用含有 1% BSA 的 PBS 将四份小鼠阳性血清和两份小鼠阳性血清作一系列的稀释度 :1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32, 按 100 微升 / 孔的量, 加入预制备的酶标板的孔中, 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗液洗板 4 次, 同时设立阴性对照孔 2 个, 和空白孔 1 个;

[0090] 5) 按 100 微升 / 孔的量, 在步骤 4) 所述的酶标板的各孔中, 加入酶标抗体, 放入 37℃ 孵育 0.5 小时, PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次;

[0091] 6) 按 100 微升 / 孔的量, 在步骤 5) 所述的酶标板的各孔中, 加入邻苯二胺显色液, 放入湿盒中, 于 37℃ 保温 15 分钟;

[0092] 7) 按 50 微升 / 孔的量, 在步骤 6) 所述的酶标板的各孔中, 加入终止液, 而后置于酶标仪上, 在 492nm 波长下, 用空白孔调零后检测吸光度 A 值, 即得到检测结果 (结果见表 4)。

[0093] 表 4、小鼠血清中肠道病毒 71 型抗体测定结果 (OD_{492} 值)

[0094]

稀释倍数	阳性 1	阳性 2	阳性 3	阳性 4	阴性 1	阴性 2
4	2.179	2.207	2.578	1.37	0.109	0.108
8	1.717	1.816	2.445	0.875	0.084	0.071

16	1.348	1.448	2.248	0.581	0.051	0.051
32	0.981	1.126	2.144	0.351	0.04	0.042

[0095] 实施例 5

[0096] 固定病毒特异性抗原表位多肽检测人体血清中肠道病毒 71 型抗体

[0097] 1) 用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 将病毒特异性抗原表位多肽稀释至 1 微克 / 毫升, 按 100 微升 / 孔的量加入酶标板孔中, 置于 4℃ 孵育过夜, PBS 洗液洗板 3 次;

[0098] 2) 用封闭液按 200 微升 / 孔的量加入酶标板孔中, 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗液洗板 3 次;

[0099] 3) 用 5% 蔗糖按 100 微升 / 孔的量, 加入酶标板孔中, 37℃ 孵育 0.5 ~ 1 小时, 拍干, 4 度储存待用

[0100] 4) 用含有 1% BSA 的 PBS 将分别对两份 EV71 人体阳性血清和两份人体阴性血清作一系列的稀释度: 1 : 10、1 : 20、1 : 40、1 : 80、1 : 160、1 : 320, 按 100 微升 / 孔的量, 加入步骤制备的酶标板的孔中, 37℃ 孵育 1 小时, PBS 洗液洗板 4 次, 同时设立空白孔 1 个;

[0101] 5) 按 100 微升 / 孔的量, 在步骤 4) 所述的酶标板的各孔中, 加入酶标抗体, 放入 37℃ 孵育 0.5 小时, PBS 洗液洗板 3 ~ 5 次;

[0102] 6) 按 100 微升 / 孔的量, 在步骤 5) 所述的酶标板的各孔中, 加入邻苯二胺显色液, 放入湿盒中, 于 37℃ 保温 15 分钟;

[0103] 7) 按 50 微升 / 孔的量, 在步骤 6) 所述的酶标板的各孔中, 加入终止液, 而后置于酶标仪上, 在 492nm 波长下, 用空白孔调零后检测吸光度 OD 值, 即得到检测结果 (结果见表 5 和图 3)。

[0104] 表 5、人体血清中肠道病毒 71 型抗体测定结果 (OD₄₉₂ 值)

[0105]

稀释倍数	阳性 1	阳性 2	阴性 1	阴性 2	空白
10	1.113	1.135	0.304	0.316	-0.003
20	1.019	1.081	0.222	0.244	
40	0.863	0.928	0.176	0.205	
80	0.688	0.746	0.137	0.168	
160	0.489	0.584	0.103	0.132	
320	0.358	0.429	0.081	0.1	

[0106] 实施例 6

[0107] 固定病毒特异性抗原表位多肽检测不同年龄人群血清 EV71 抗体水平

[0108] 运用本发明对 170 份不同年龄组的正常人群血清中的 EV71 抗体阳性水平进行

检测,将血清样平用稀释液稀释 50 倍,以阴性参照的 2.1 倍作为域值 (Cutoff 值),大于 Cutoff 值得血样判为阳性,反之则为阴性。结果见表 6 和图 4。从该结果可以看出,随着年龄的增长,人群中 EV71 抗体的阳性率逐渐增加,说明人群中 EV71 病毒的感染随着年龄的增长而增加,这一结果与流行病学规律相符。

[0109] 表 6、不同年龄段正常人群血清的 EV71 抗体检测结果

	年龄组	检测数	阳性数	阳性率
	0-3 岁	45	14	31.1%
[0110]	4-7 岁	35	21	60.0%
	8-17 岁	45	36	80.0%
	大于 18 岁	45	45	100.0%

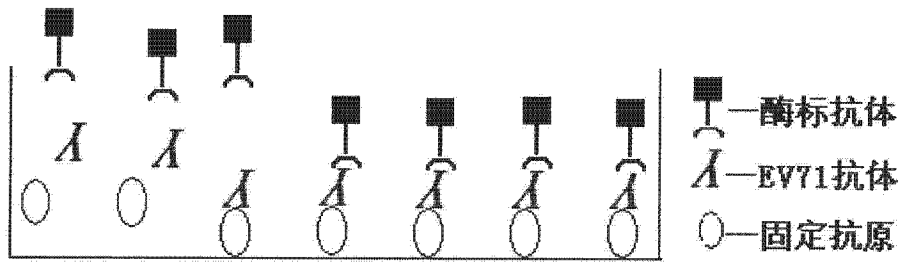


图 1

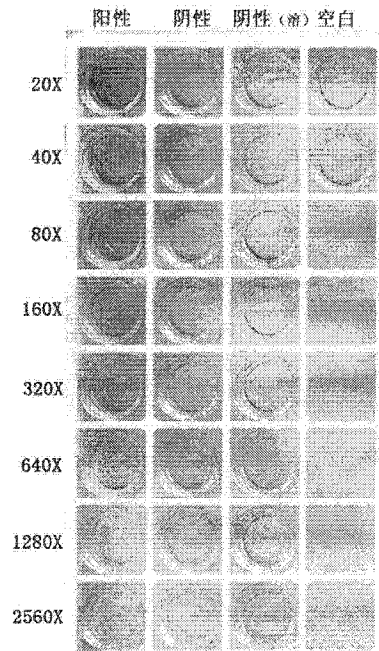


图 2

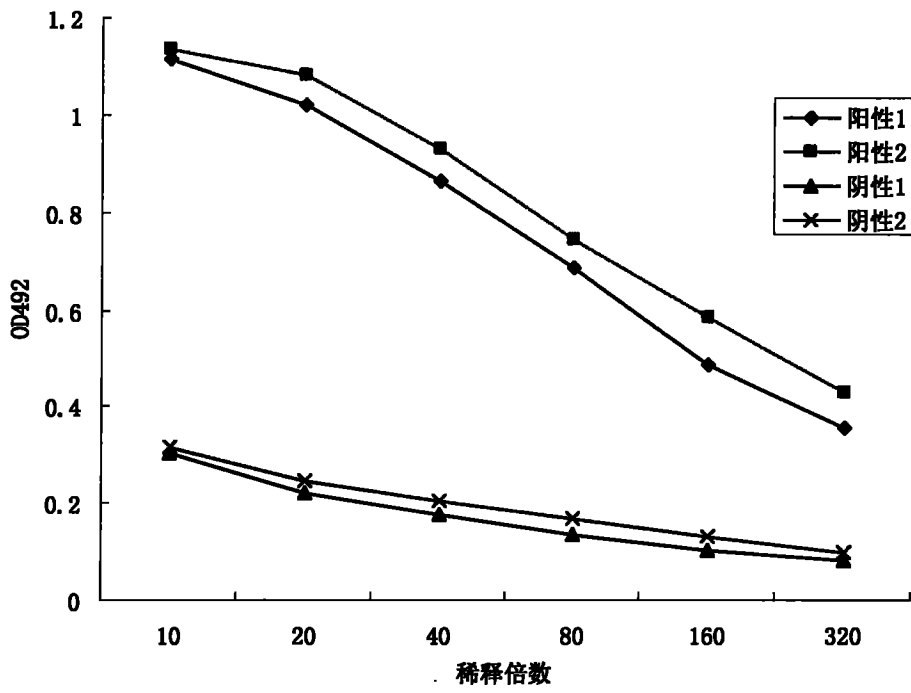


图 3

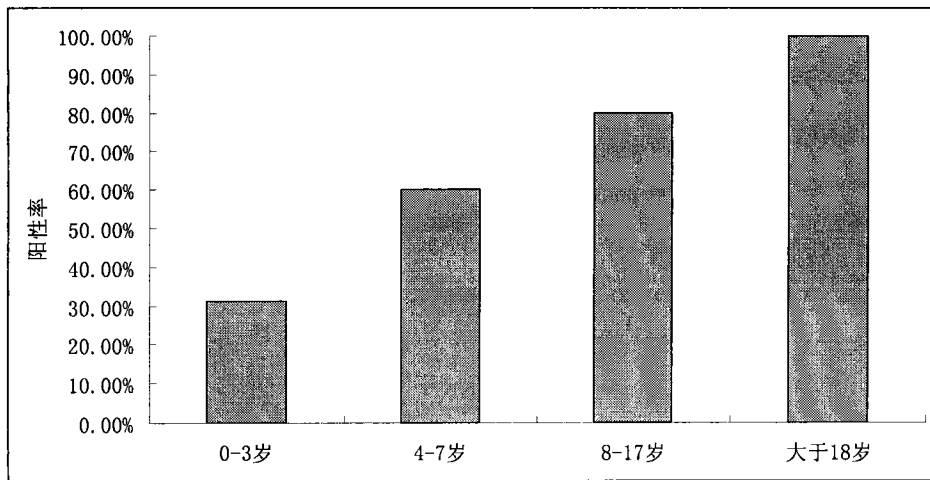


图 4

专利名称(译)	一种肠道病毒71型特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法		
公开(公告)号	CN102539776A	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201010594390.1	申请日	2010-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	浙江普康生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江普康生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江普康生物技术股份有限公司		
[标]发明人	高孟 罗永能 周康凤 姜云水 毛子旭 王一虎 唐彩华 朱莲 高丽美 庄昉成 毛子安 毛江森		
发明人	高孟 罗永能 周康凤 姜云水 毛子旭 王一虎 唐彩华 朱莲 高丽美 庄昉成 毛子安 毛江森		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，特别是用于血清中肠道病毒71型(Enterovirus 71，简称EV71)特异性抗体的酶联免疫吸附检测方法。通过间接酶联免疫吸附法(ELISA)的方法，将制备的EV71病毒抗原固定到酶标板上，通过抗原抗体的特异性吸附来实现抗体的检测。由于包被的抗原包含EV71病毒的特异性抗原表位，因而能用来检测出血清中EV71病毒的特异性抗体，从而减少血清检测的假阳性。本发明适合对大批量动物或人体血清标本进行检测，适用于大规模的血清学和流行病学调查。

年龄组	检测数	阳性数	阳性率
0-3岁	45	14	31.1%
4-7岁	35	21	60.0%
8-17岁	45	36	80.0%
大于18岁	45	45	100.0%