



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110672844 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201911034672.3

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2019.10.29

(71)申请人 华中科技大学

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路
1037号

申请人 武汉纳达康生物科技有限公司

(72)发明人 杨海 计梦琴 杨宝凤 张德军
成诗琦

(74)专利代理机构 华中科技大学专利中心
42201

代理人 孙杨柳 李智

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

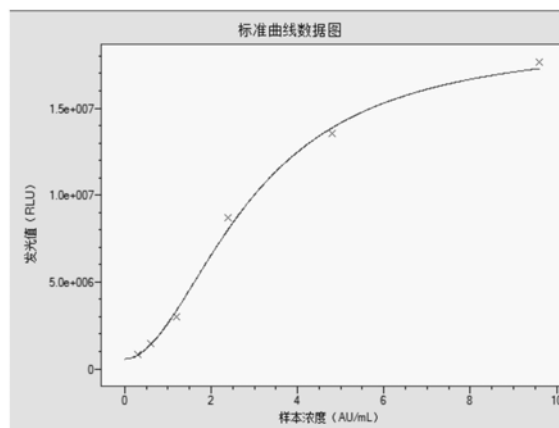
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测
试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用,属于免疫学检测领域。试剂盒含有酶标抗IgY抗体、磁标新城疫病毒抗原和发光底物液。先将磁标新城疫病毒抗原分别与稀释后的血清样本和标准品溶液混匀,形成磁标新城疫病毒抗原与新城疫病毒抗体复合物,然后进行磁分离,将沉淀物清洗后,将酶标抗体加入到沉淀物中,与复合物上的抗体结合,然后进行磁分离和沉淀物的清洗,再加入发光底物液,使发光底物与结合到复合物上的酶标抗体上的酶反应,检测发光值,以加入标准品溶液的发光值绘制标准曲线,以加入待检测样品的发光值计算待测样品中抗体的含量。采用所述的试剂盒检测抗体,具有灵敏度和准确度高以及特异性强的效果。



1. 一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有酶标抗IgY抗体、磁标新城疫病毒抗原和发光底物液;

所述磁标新城疫病毒抗原能与血清中的新城疫病毒抗体特异性结合;所述酶标抗IgY抗体的抗体部分能与血清中的新城疫病毒抗体结合,所述酶标抗IgY抗体的酶部分能与所述发光底物液中的发光底物发生反应,使所述发光底物发光;

所述试剂盒用于定量检测禽类动物血清中的新城疫病毒抗体。

2. 如权利要求1所述的新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述酶标抗IgY抗体为碱性磷酸酶标抗IgY抗体,所述发光底物液中的发光底物为3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷。

3. 如权利要求1所述的新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述酶标抗IgY抗体为辣根过氧化物酶标抗IgY抗体,所述发光底物液中的发光底物为3-氨基苯二甲酰肼。

4. 如权利要求1所述的新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述磁标新城疫病毒抗原为核壳结构;所述核壳结构的内核为超顺磁性纳米颗粒,所述核壳结构的外壳为新城疫病毒抗原和新城疫病毒抗原位点之外的封闭蛋白;所述超顺磁性纳米颗粒与所述新城疫病毒抗原和封闭蛋白通过共价结合和疏水作用连接。

5. 如权利要求1所述的新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还含有标准品溶液、样本稀释液和浓缩洗涤液。

6. 如权利要求2所述的新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述碱性磷酸酶标抗IgY抗体通过以下方法制备得到,包括以下步骤:

(1) 将活化剂加入到碱性磷酸酶中,使所述碱性磷酸酶上引入马来酰亚胺基团,得到活化的碱性磷酸酶;

(2) 将还原剂加入到抗IgY抗体中,使所述抗IgY抗体中的二硫键断开,从而暴露出具有活性的巯基,得到具有活性巯基的抗IgY抗体,将该具有活性巯基的抗IgY抗体与步骤(1)得到的活化的碱性磷酸酶进行混合,在2℃-4℃条件下,使所述活化的碱性磷酸酶与所述具有活性巯基的抗IgY抗体发生偶联反应,再依次加入马来酰亚胺溶液和乙醇胺溶液,终止偶联反应,即得到碱性磷酸酶标抗IgY抗体;

或者将N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰巯基乙酸酯加入到抗IgY抗体中,使所述抗IgY抗体上引入惰性巯基,再加入羟胺溶液,使所述惰性巯基活化,得到具有活性巯基的抗IgY抗体,将该具有活性巯基的抗IgY抗体与步骤(1)得到的活化的碱性磷酸酶进行混合,在2℃-4℃条件下,使所述活化的碱性磷酸酶与所述具有活性巯基的抗IgY抗体发生偶联反应,即得到碱性磷酸酶标抗IgY抗体。

7. 如权利要求6所述的新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述活化剂为4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯;所述还原剂为二硫苏糖醇;所述偶联反应的时间为16h-18h。

8. 如权利要求6所述的新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,其特征在于,所述抗IgY抗体为羊抗IgY抗体。

9. 如权利要求1-8任一所述的试剂盒应用于检测新城疫病毒抗体的方法,其特征在于,含有以下步骤:

(1) 将待测血清用样品稀释液对血清进行稀释；

(2) 取磁标新城疫病毒抗原分别与标准品溶液和稀释后的血清样本充分混匀，使所述标准品溶液和所述待测样品中的新城疫病毒抗体与所述磁标新城疫病毒抗原特异性结合，形成磁标新城疫病毒抗原与新城疫病毒抗体复合物，然后进行磁分离，弃上清液后将沉淀物用稀释后的浓缩洗涤液清洗；将碱性磷酸酶标抗IgY抗体或辣根过氧化物酶标抗IgY抗体加入到上述清洗后的沉淀物中，使碱性磷酸酶标抗IgY抗体或辣根过氧化物酶标抗IgY抗体与所述复合物上的抗体结合，然后进行磁分离，弃上清液后将沉淀物用稀释后的浓缩洗涤液清洗；

(3) 向步骤(2)得到的产物中加入发光底物液，使所述发光底物液中的发光底物与结合到所述复合物上的酶反应，检测发光值，以加入标准品溶液的浓度为纵横坐标，以发光值为纵坐标绘制标准曲线，以加入待检测样品的发光值计算待测样品中抗体的含量。

10. 如权利要求9所述的方法，其特征在于，步骤(3)所述标准曲线的建立包括以下步骤：

(3-1) 将血凝抑制效价分别为 $\log_2$ 、 $2\log_2$ 、 $3\log_2$ 、 $4\log_2$ 、 $5\log_2$ 和 $6\log_2$ 相对应的标准品的浓度分别定义为0.3AU/mL、0.6AU/mL、1.2AU/mL、2.4AU/mL、4.8AU/mL和9.6AU/mL；

(3-2) 将步骤(3-1)所述标准品浓度为横坐标，将所述标准品浓度对应的发光值为纵坐标，用四参数Logistic曲线拟合得到标准曲线。

一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测领域,特别地,涉及一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 新城疫病毒(NDV),有些地方称之为禽副粘病毒I型(APMV-1),为副粘病毒科的腮腺炎病毒数。NDV的基因组是一条全程15156kb的单链负股RNA,分子量在 $5.2 \times 10^6 \sim 5.6 \times 10^6$ 之间,可编码6种特异性结构蛋白。病毒颗粒具有双层包膜结构,该包膜由受感染机体细胞外膜的脂类与病毒的糖蛋白结合而衍生得到的。病毒颗粒内含一多盘绕的竹状衣壳,囊膜表面的糖蛋白具有血凝素和神经酰胺酶活性。

[0003] 新城疫俗称“鸡瘟”,新城疫病毒的强毒株引起多种禽类急性、高接触性、致死性传染病。由于其传播快、死亡率高,给禽养殖业带来毁灭性打击,造成非常严重的影响,国际兽疫局(OIE)将新城疫列为A类传染病,我国农业部也将其列为动物的一类疫病和优先防控的动物重大疫病之一。

[0004] 目前,我国大多数畜禽养殖场都进行了新城疫病毒疫苗的免疫接种,为了了解ND免疫状况,经常采用ND抗体水平来检测禽类的免疫效果。其中血清学诊断技术中最为流行的是血凝抑制实验,但该技术对操作人员的专业素质要求较高,过程繁琐,对结果的判定也有较强的主观性,且对实验环境也有一定的要求,基本不能实现高通量的检测,而禽类养殖一般规模、养殖密度较大,需要检测的样本量也较大。因此,迫切需要开发一种操作简单、高灵敏度、高准确度、高通量的检测方法。

发明内容

[0005] 本发明解决了现有技术中新城疫病毒抗体检测特异性不强、灵敏度和准确度不高的技术问题,提供了一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用。试剂盒中含有酶标二抗、磁标新城疫病毒抗原和发光底物液,磁标新城疫病毒抗原能与血清中的新城疫病毒抗体特异性结合,酶标二抗的抗体部分能与血清中的新城疫病毒抗体结合,酶标二抗的酶部分能与所述发光底物液中的发光底物发生反应,使所述发光底物发光。本发明提供的试剂盒应用于检测新城疫抗体时,具有较高的灵敏度、特异性和准确度的效果,而且实现了全自动化检测,缩短检测时间,提高检测通量,减少人为操作误差。

[0006] 按照本发明的第一方面,提供了一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,所述试剂盒含有酶标抗IgY抗体、磁标新城疫病毒抗原和发光底物液;

[0007] 所述磁标新城疫病毒抗原能与血清中的新城疫病毒抗体特异性结合;所述酶标抗IgY抗体的抗体部分能与血清中的新城疫病毒抗体结合,所述酶标抗IgY抗体的酶部分能与所述发光底物液中的发光底物发生反应,使所述发光底物发光;

[0008] 所述试剂盒用于定量检测禽类动物血清中的新城疫病毒抗体。

[0009] 优选地,所述酶标抗IgY抗体为碱性磷酸酶标抗IgY抗体,所述发光底物液中的发

光底物为3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2- 二氧环乙烷。

[0010] 优选地,所述酶标抗IgY抗体为辣根过氧化物酶标抗IgY抗体,所述发光底物液中的发光底物为3-氨基苯二甲酰肼。

[0011] 优选地,所述磁标新城疫病毒抗原为核壳结构;所述核壳结构的内核为超顺磁性纳米颗粒,所述核壳结构的外壳为新城疫病毒抗原和新城疫病毒抗原位点之外的封闭蛋白;所述超顺磁性纳米颗粒与所述新城疫病毒抗原和封闭蛋白通过共价结合和疏水作用连接。

[0012] 优选地,所述试剂盒中还含有标准品溶液、样本稀释液和浓缩洗涤液。

[0013] 优选地,所述碱性磷酸酶标抗IgY抗体通过以下方法制备得到,包括以下步骤:

[0014] (1) 将活化剂加入到碱性磷酸酶中,使所述碱性磷酸酶上引入马来酰亚胺基团,得到活化的碱性磷酸酶;

[0015] (2) 将还原剂加入到抗IgY抗体中,使所述抗IgY抗体中的二硫键断开,从而暴露出具有活性的巯基,得到具有活性巯基的抗IgY抗体,将该具有活性巯基的抗IgY抗体与步骤(1)得到的活化的碱性磷酸酶进行混合,在2℃-4℃条件下,使所述活化的碱性磷酸酶与所述具有活性巯基的抗IgY 抗体发生偶联反应,再依次加入马来酰亚胺溶液和乙醇胺溶液,终止偶联反应,即得到碱性磷酸酶标抗IgY抗体;

[0016] 或者将N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰巯基乙酸酯加入到抗IgY抗体中,使所述抗IgY抗体上引入惰性巯基,再加入羟胺溶液,使所述惰性巯基活化,得到具有活性巯基的抗IgY抗体,将该具有活性巯基的抗IgY抗体与步骤(1)得到的活化的碱性磷酸酶进行混合,在2℃-4℃条件下,使所述活化的碱性磷酸酶与所述具有活性巯基的抗IgY抗体发生偶联反应,即得到碱性磷酸酶标抗IgY抗体。

[0017] 优选地,所述活化剂为4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯;所述还原剂为二硫苏糖醇;所述偶联反应的时间为16h-18h。

[0018] 优选地,所述抗IgY抗体为羊抗IgY抗体。

[0019] 按照本发明的另一方面,提供了任一所述的试剂盒应用于检测新城疫病毒抗体的方法,含有以下步骤:

[0020] (1) 将待测血清用样品稀释液对血清进行稀释;

[0021] (2) 取磁标新城疫病毒抗原分别与标准品溶液和稀释后的血清样本充分混匀,使所述标准品溶液和所述待测样品中的新城疫病毒抗体与所述磁标新城疫病毒抗原特异性结合,形成磁标新城疫病毒抗原与新城疫病毒抗体复合物,然后进行磁分离,弃上清液后将沉淀物用稀释后的浓缩洗涤液清洗;将碱性磷酸酶标抗IgY抗体或辣根过氧化物酶标抗IgY抗体加入到上述清洗后的沉淀物中,使碱性磷酸酶标抗IgY抗体或辣根过氧化物酶标抗IgY抗体与所述复合物上的抗体结合,然后进行磁分离,弃上清液后将沉淀物用稀释后的浓缩洗涤液清洗;

[0022] (3) 向步骤(2)得到的产物中加入发光底物液,使所述发光底物液中的发光底物与结合到所述复合物上的酶反应,检测发光值,以加入标准品溶液的浓度为纵横坐标,以发光值为纵坐标绘制标准曲线,以加入待检测样品的发光值计算待测样品中抗体的含量。

[0023] 优选地,步骤(3)所述标准曲线的建立包括以下步骤:

[0024] (3-1) 将血凝抑制效价分别为 $\log_2$ 、 $2\log_2$ 、 $3\log_2$ 、 $4\log_2$ 、 $5\log_2$ 和 $6\log_2$ 相对应的

标准品的浓度分别定义为0.3AU/mL、0.6AU/mL、1.2AU/mL、2.4AU/mL、4.8AU/mL和9.6AU/mL;

[0025] (3-2) 将步骤(3-1)所述标准品浓度为横坐标,将所述标准品浓度对应的发光值为纵坐标,用四参数Logistic曲线拟合得到标准曲线。

[0026] 总体而言,通过本发明所构思的以上技术方案与现有技术相比,主要具备以下的技术优点:

[0027] (1) 本发明碱性磷酸酶标记抗体,采用活化剂对碱性磷酸酶进行活化从而引入酰胺基,采用衍生化试剂对抗IgY抗体处理,引入保护性巯基,再用羟胺处理使惰性巯基转化为具有反应活性的巯基,将活化后的碱性磷酸酶和活化的抗IgY抗体混合,通过酰胺基与巯基的结合制备出活性高、稳定性良好的碱性磷酸酶标抗体。或者将还原剂加入到抗IgY抗体中,使所述抗IgY抗体的二硫键断开,从而暴露出具有活性的巯基,得到具有活性巯基的抗IgY抗体。本发明提供了新的碱性磷酸酶标记抗体的技术应用在化学发光检测试剂盒中具有特异性强和准确度高的效果。

[0028] (2) 本发明新城疫病毒抗体的磁免疫化学发光检测试剂盒具有较高的灵敏度和特异性,对新城疫病毒抗体的检测灵敏度可达到0.3AU/mL;并根据血凝抑制实验的不同样本效价如全阴样本、log2、2log2、3log2、4log2、5log2、6log2建立起和血凝抑制实验样本效价相对应的线性关系,并且建立新的计量单位AU/mL,实现了新城疫病毒抗体的定量检测,并可以同时定量检测大批样本,技术上有明显的进步;通过对样本抗体含量的检测,可实现抗体水平的监测,通过监测结果可制定合理、有效的免疫程序,提高群体免疫水平。

[0029] (3) 本发明提供的试剂盒应用于检测新城疫抗体时,具有较高的灵敏度、特异性和准确度的效果,而且实现了全自动化检测,缩短检测时间,提高检测通量,减少人为操作误差。

附图说明

[0030] 图1本发明磁免疫化学发光检测试剂盒标准曲线。

[0031] 图2为本发明实施例1制备碱性磷酸酶标抗体的蛋白纯化图谱。

[0032] 图3为本发明实施例2制备碱性磷酸酶标抗体的蛋白纯化图谱。

具体实施方式

[0033] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0034] 本发明提供了一种磁标新城疫抗原的制备方法,含有以下步骤:

[0035] (1) 将超顺磁性微球于酸性缓冲液4-吗啉乙磺酸(MES, pH5.0~5.5)中混匀,加入EDC和NHS对磁微球上的羧基进行活化;

[0036] (2) 去除步骤(1)活化反应后的活化剂及副产物,将缓冲体系更换至PBS缓冲体系,向步骤(1)所述活化的磁微球中投入新城疫抗原;

[0037] (3) 对步骤(2)所述的磁标抗原反应产物进行位点封闭,封闭结束后将磁标抗原产

物保存于磁微粒保存缓冲液中,即得终产物。

[0038] 优选地,所述超顺磁性纳米颗粒为超顺磁性四氧化三铁纳米颗粒或超顺磁性三氧化二铁纳米颗粒。

[0039] 优选地,所述的磁标新城疫抗原的封闭反应,所用封闭试剂为5%脱脂奶(M:V)。封闭剂所用缓冲溶液为pH 7.2~7.4,含0.05%Tween-20的0.05M Tris缓冲液。

[0040] 优选地,所述的磁标新城疫抗原的长期保存缓冲液,所用磁微粒保存缓冲液为pH 7.2~7.4,含1%Triton X-100(M:V)和0.5%BSA(M:V),0.05M Tris缓冲盐溶液中,磁标抗原的终浓度为10mg/mL。

[0041] 为实现上述目的,本发明提供了一种碱性磷酸酶标抗体的制备方法,含有以下步骤:

[0042] (1) 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)对碱性磷酸酶进行活化,活化时间15~30min,反应温度为室温;

[0043] (2) 二硫苏糖醇对抗体进行还原,使抗体暴露出巯基(-SH),反应时间15~30min,反应温度为室温;

[0044] (3) 活化的碱性磷酸酶和含巯基的抗体混合反应,反应条件为2~4℃,偶联时间16~18h,再依次加入马来酰亚胺和乙醇胺,终止反应;

[0045] (4) GE Healthcare Life Science的蛋白质分离纯化系统上分离纯化碱性磷酸酶与抗体的偶联产物。

[0046] 按照本发明的另一方面,所述内容中碱性磷酸酶标抗体的偶联终止反应,其特征在于,所用终止试剂为马来酰亚胺和乙醇胺,配制过程及投料量如下:

[0047] (1) 马来酰亚胺终止:称取10mg马来酰亚胺固体溶于1.03mL DMF,再用0.01M的pH7.4的PBS溶液对上述溶液稀释10倍,即配成10 mM马来酰亚胺溶液。每毫升连接物加入10 μ L 10mM马来酰亚胺溶液,混匀静止10min。

[0048] (2) 乙醇胺终止:20 μ L乙醇胺溶于1.98mL的0.01M pH为7.4的 PBS溶液中,再取上述乙醇胺溶液600 μ L,加入到400 μ L的0.01M pH为 7.4的PBS溶液中,即得100mM乙醇胺溶液。每毫升连接物加入10 μ L 100mM乙醇胺溶液,混匀静止10min。

[0049] 按照本发明的另一方面,所述内容中碱性磷酸酶标抗体的分离纯化过程,其特征在于,洗脱和保存缓冲液均为pH 7.2~7.4,含5mM MgCl₂的0.05 M Tris缓冲盐溶液,产物于2~8℃保存。

[0050] 为实现上述目的,本发明提供了第二种碱性磷酸酶标抗体的制备方法,含有以下步骤:

[0051] (1) 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)对碱性磷酸酶进行活化,活化时间15~30min,反应温度为室温;

[0052] (2) 称取N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰巯基乙酸酯(SATA),溶于DMF配制成浓度为5mg/mL的溶液;加入到抗体中于室温下搅拌反应15~30min;

[0053] (3) 用含0.01M EDTA的PBS缓冲溶液配制0.5M羟胺溶液,将此溶液加入到(2)所述反应溶液中,室温搅拌反应30min以上;

[0054] (4) 将(1)与(3)所述的溶液混合,室温反应30min以上;

[0055] (5) GE Healthcare Life Science的蛋白质分离纯化系统上分离纯化碱性磷酸酶

与抗体的偶联产物。

[0056] 按照本发明的另一方面,所述内容中碱性磷酸酶标抗体的分离纯化过程,洗脱和保存缓冲液均为pH 7.2~7.4,含5mM MgCl₂的0.05M Tris缓冲盐溶液,产物于2~8℃保存。

[0057] 按照本发明的另一方面,提供了一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒,所述试剂盒含有以下试剂:酶标二抗、磁标新城疫抗原、标准品溶液、样本稀释液、发光底物液和浓缩洗涤液;

[0058] 磁标新城疫抗原与血清中的新城疫病毒抗体特异性结合,形成磁标新城疫抗原-抗体复合物;

[0059] 酶标二抗上的抗体部分与所述磁标新城疫抗原-抗体复合物上的抗体特异性结合;所述酶标抗体上的酶降解所述发光底物液中的发光底物,使所述发光底物发光。

[0060] 优选地,所述酶标抗体的制备方法选择第一种制备方法,即抗体利用 DTT断开二硫键从而暴露出具有活性的巯基,与SMCC活化的碱性磷酸酶混合后通过共价结合制备出活性高、稳定性良好的碱性磷酸酶标抗体。

[0061] 优选地,所述发光底物液中的发光底物为3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷。

[0062] 按照本发明的另一方面,提供了所述的试剂盒应用于检测抗体的方法,含有以下步骤:

[0063] (1) 样品与清洗液的准备:取澄清透亮的血清,用样品稀释液对血清进行10倍稀释;将浓缩洗涤液用纯化水稀释至使用浓度备用。

[0064] (2) 取磁标抗原分别与标准品溶液和稀释后的血清样本充分混匀,37℃条件下反应15min,使所述标准品溶液或所述待测溶液中的抗体与所述磁标新城疫抗原特异性结合形成磁标抗原-新城疫病毒抗体复合物,然后进行磁分离2min,弃上清液后将沉淀物用洗涤液清洗;将酶标二抗加入到上述清洗后的沉淀物中,37℃条件下反应15min,使酶标二抗与所述磁标抗原-新城疫病毒抗体复合物上的抗体结合,然后进行磁分离2min,弃上清液后将沉淀物用洗涤液清洗;

[0065] (3) 向步骤(2)得到的产物中加入发光底物液,使所述发光底物液中的发光底物与结合到所述酶标二抗上的酶反应,检测发光值,以加入标准品溶液的浓度为横坐标、发光值为纵坐标绘制标准曲线,以加入待检测样品的发光值从所述标准曲线上计算待测样品中抗体的含量。

[0066] 优选地,步骤(2)所述酶标二抗为碱性磷酸酶标记的抗IgY抗体;步骤(3)所述发光底物液中的发光底物为3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷或3-氨基苯二甲酰肼;

[0067] 优选地,步骤(3)所述标准曲线是通过以下方法建立的:

[0068] S1:将血凝抑制效价分别为log₂、2log₂、3log₂、4log₂、5log₂和6log₂ 相对应的标准品的浓度分别定义为0.3AU/mL、0.6AU/mL、1.2AU/mL、2.4AU/mL、4.8AU/mL和9.6AU/mL;

[0069] S2:将步骤S1所述标准品浓度为横坐标,将所述标准品浓度对应的发光值为纵坐标,用四参数Logistic曲线拟合得到标准曲线。

[0070] 实施例1:试剂盒具体组分的制备

[0071] 1.酶标抗体的制备方法(一)

[0072] A、碱性磷酸酶活化

[0073] 以DMSO为溶剂,配制10mM SMCC溶液;向29.5 μ L 10mM SMCC 溶液中加入240 μ L 5mg/mL碱性磷酸酶,混匀后室温静置15~30min;0.01M pH 7.4的PBS溶液对活化后的AP酶过脱盐柱除杂并超滤浓缩,产物测定 280nm的吸光度,酶浓度为:ABS280*稀释因子/1.0,酶质量:酶浓度*产物体积(mg/mL),2~8℃保存。

[0074] B、抗体的还原

[0075] 以0.01M PBS为溶剂,配制0.1M还原剂二硫苏糖醇(DTT);取1.2mg 抗体,向其中加入16 μ L 0.1M的DTT溶液,混匀后室温静置15min~30min;过脱盐柱除杂并超滤浓缩,测定280nm的吸光度,蛋白浓度为:ABS280* 稀释因子/1.36,蛋白质量为:酶浓度*产物体积(mg/mL),2~8℃保存。

[0076] C、碱性磷酸酶与抗体的偶联

[0077] 活化的碱性磷酸酶与被还原的抗体按照质量比0.91:1偶联,在2℃~8℃条件下静止反应16~18h。

[0078] D、偶联反应的终止

[0079] 第一步终止:每毫升连接物加入10 μ L 10mM马来酰亚胺溶液,混匀静止10min。其中10mM马来酰亚胺溶液配制过程为:称取10mg马来酰亚胺固体溶于1.03mL DMF,再用0.01M的pH7.4的PBS溶液对上述溶液稀释10倍,即配成10 mM马来酰亚胺溶液。

[0080] 第二步终止:每毫升连接物加入10 μ L的100mM乙醇胺溶液,混匀静止10min,其中100mM乙醇胺溶液配制过程为:20 μ L乙醇胺溶于1.98mL 的0.01M pH为7.4的PBS溶液中,再取上述乙醇胺溶液600 μ L,加入到 400 μ L的0.01M pH为7.4的PBS溶液中,即得100mM乙醇胺溶液。

[0081] E、偶联产物的最终纯化和长期保存

[0082] 用Superdex 200层析柱在GE Healthcare Life Science的蛋白质分离纯化系统上分离纯化碱性磷酸酶与抗体的偶联产物,洗脱和保存缓冲液均为 0.05M pH 7.4,含5mM MgCl₂的Tris缓冲盐溶液,产物于2~8℃保存。本实施例中蛋白纯化图谱如图2所示,由图2可知,经Superdex 200分离纯化后的偶联产物有3个特征峰,其中出峰时间最短的特征峰对应的产物即为所述的具有最优活性的碱性磷酸酶标记的抗体。

[0083] 2.酶标抗体的制备方法(二)

[0084] A、碱性磷酸酶活化

[0085] 以DMSO为溶剂,配制10mM SMCC溶液;向29.5 μ L 10mM SMCC 溶液中加入240 μ L 5mg/mL碱性磷酸酶,混匀后室温静置20min;0.01M pH 7.4的PBS溶液对活化后的AP酶过脱盐柱除杂并超滤浓缩,产物测定280 nm的吸光度,酶浓度为:ABS280*稀释因子/1.0,酶质量:酶浓度*产物体积(mg/mL),2~8℃保存。

[0086] B、抗体的活化

[0087] 以DMSO为溶剂,配制5mg/mL SATA溶液。用0.01M PBS缓冲液配制浓度为2~5mg/mL的抗体。取2.5 μ L配制好的SATA溶液加入到1.2mg 二抗中,室温搅拌反应15~30min。

[0088] 用含0.01M EDTA的PBS缓冲溶液配制0.5M羟胺溶液,取10 μ L该羟胺溶液加入至上述溶液中,室温搅拌反应30min以上。过脱盐柱纯化除杂,收集活化好的IgY抗体。

[0089] C、碱性磷酸酶与抗体的偶联:将活化好的碱性磷酸酶与抗体混合,室温搅拌反应

30min以上。

[0090] D、偶联产物的最终纯化和长期保存

[0091] 用Superdex 200层析柱在GE Healthcare Life Science的蛋白质分离纯化系统上分离纯化碱性磷酸酶与抗体的偶联产物,洗脱和保存缓冲液均为 pH 7.4,含5mM MgCl₂的0.05M Tris缓冲盐溶液,产物于2~8℃保存。本实施例中蛋白纯化图谱如图3所示,由图3可知,经Superdex 200分离纯化后的偶联产物有2个特征峰,其中出峰时间最短的特征峰对应的产物即为所述的具有最优活性的碱性磷酸酶标记的抗体。

[0092] 3.磁标新城疫抗原的制备

[0093] A、磁性微球官能团的活化

[0094] 取40mg经过修饰后带有羧基的超顺磁性微球,先用0.01M PBS清洗磁性微球2次以洗去磁性微球保存缓冲液中的保护成分,再用4-吗啉乙磺酸(MES, pH5.0~5.5)对磁性微球进行清洗使磁性微球处于适合活化反应的缓冲体系中。其上述磁性微球悬浊液中加入1mg的EDC和0.5mg的NHS,充分混匀后置于血浆混匀仪上中速混匀,活化反应条件和时间22℃~25℃活化15min~30min。

[0095] B、新城疫抗原包被活化后的磁性微球

[0096] 用0.01M PBS清洗磁性微球去除活化剂和反应副产物,活化后的磁性微球暂存于0.01M PBS中,向磁性微球悬浊液中加入0.01mg的新城疫抗原,充分混匀后置于血浆混匀仪上中速混匀,包被反应条件和时间4℃反应 16h~18h。

[0097] C、对磁标新城疫抗原进行封闭

[0098] 用0.01M PBS清洗磁性微球去除游离抗原和反应副产物。配制pH 7.2~7.4,含0.05%Tween-20的0.05M Tris缓冲液,用此缓冲液配制5%脱脂奶(M:V)作为封闭剂。用封闭剂将磁标新城疫抗原充分混匀后置于血浆混匀仪上中速混匀,封闭反应条件和时间22℃~25℃反应2h。

[0099] D、磁标新城疫抗原的长期保存

[0100] 用pH 7.2~7.4,含0.05%吐温-20的0.05M Tris缓冲液对磁标新城疫抗原清洗2次。磁分离2min,弃上清,保存在pH 7.2~7.4,含1%Triton X-100(M:V)和0.5%BSA(M:V),0.05M Tris缓冲盐溶液中,终浓度为10 mg/mL。

[0101] 本发明磁珠标新城疫抗原,采用带有羧基的超顺磁性微球,利用活化剂活化羧基,使磁球与抗原多肽通过共价键结合,通过此种制备方法得到的磁标新城疫抗原具有良好的稳定性。

[0102] 实施例2:试剂盒的组建

[0103] 组建检测新城疫病毒抗体的磁免疫化学发光检测试剂盒,使其含有下列组分:

[0104] (1) 碱性磷酸酶标记二抗

[0105] (2) 磁标新城疫抗原

[0106] (3) 新城疫病毒抗体标准品溶液

[0107] (4) 样本稀释液

[0108] (5) 化学发光底物液

[0109] (6) 浓缩洗涤溶液

[0110] 本发明所用的酶标抗体稀释液是pH 7.2~pH 7.4,含0.1%BSA(M:V)和 15%牛血

清(V:V),0.05M Tris缓冲盐溶液。

[0111] 所述磁标新城疫抗原稀释液是pH 7.2~7.4,含1%TritonX-100(M:V)和 0.5%BSA(M:V),0.05M Tris缓冲盐溶液。

[0112] 新城疫病毒抗体标准品溶液,浓度分别为:0.3AU/mL、0.6AU/mL、1.2AU/mL、2.4AU/mL、4.8AU/mL、9.6AU/mL,标准品稀释液为pH 7.4,0.05M Tris缓冲盐溶液。

[0113] 所述标准品稀释液是pH 7.2~7.4,含0.01%Tween-20(V:V)、0.5%BSA(M:V)和15%牛血清(V:V),0.01M PBS缓冲液溶液。

[0114] 所述样品稀释液是pH7.2~7.4,含0.01%Tween-20(V:V),0.01M PBS 缓冲液溶液。

[0115] 所述化学发光底物液的缓冲液是pH 9.0,0.1M Tris缓冲盐溶液。

[0116] 所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数pH 8.0~8.5,含2%Tween-20的0.75 M Tris缓冲盐溶液,将浓缩洗涤液用纯化水稀释15倍即可使用。

[0117] 实施例3:样品中新城疫病毒抗体的检测

[0118] 检测与结果分析:

[0119] 将稀释后的酶标抗体装入化学发光检测仪酶标抗体工作液容器中,其中与酶标抗体稀释液是按照1:1000~1:3000的体积比进行稀释的;将稀释的磁标新城疫抗原装入化学发光检测仪磁珠抗原工作液容器中,与相应的稀释液是按照1:9~1:14的体积比进行稀释的;将浓缩洗涤液用纯化水稀释 15倍后装入化学发光检测仪洗涤工作液容器中;将样本稀释液装入化学发光检测仪样本稀释工作液容器中;对每个样本/标准品设置样品架上的位置,输入样本信息和需要检测的测试项目名称;将样本管/标准品管放入已设定好的样品架上,化学发光检测仪分别吸取10 μ L样本,90 μ L样本稀释液和 30 μ L磁标抗原,依次加入到反应杯中,在37℃下反应15min,再通过清洗装置进行磁分离30s,弃上清液后用洗涤液300 μ L对沉淀清洗3次;吸取100 μ L酶标二抗加入到反应杯中,在37℃下反应15min,再通过清洗装置进行磁分离30s,弃上清液后用洗涤液300 μ L对沉淀清洗3次;加入化学发光底物液100 μ L,检测发出的光强度(RLU),标准品RLU为纵坐标,对应标准品的浓度为横坐标,用四参数Logistic曲线拟合标准曲线;将样本的发光值代入标准曲线中,每一个样本的浓度可以从标准曲线上读出,含量值 ≥ 2.4 AU/mL,判定为阳性;含量值 < 2.4 AU/mL,判定为阴性。

[0120] 本发明采用6个新城疫病毒抗体标准品(0.3AU/mL、0.6AU/mL、1.2AU/mL、2.4AU/mL、4.8AU/mL、9.6AU/mL)进行曲线测绘。计量单位AU/mL的建立方法为,根据样本的血凝抑制实验结果,挑选效价分别为log2、2log2、3log2、4log2、5log2、6log2的样本,建立起和血凝抑制实验样本效价相对应的线性关系,并且建立起和血凝抑制实验效价分别为 log2、2log2、3log2、4log2、5log2、6log2相对应的标准品,标准品分别为 0.3、0.6、1.2、2.4、4.8、9.6,并且建立计量单位AU/mL。标准品RLU为纵坐标,新城疫病毒抗体的含量为横坐标,用四参数Logistic曲线拟合标准曲线,每一个样本的浓度可以从标准曲线上读出。含量值 ≥ 2.4 AU/mL,判定为阳性;含量值 < 2.4 AU/mL,判定为阴性。标准曲线如图1所示。

[0121] 实施例4:试剂盒质量的测定

[0122] 1、试剂盒特异性

[0123] 按照实例3的方法测定H5禽流感病毒、H9禽流感病毒、新城疫(NDV)、马立克病毒(MDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性腔上囊病病毒(IBDV)、传染性喉气管炎病毒

(ILTV)、鸭瘟病毒(DPV)、小鹅瘟病毒(GPV)、鹅副黏病毒(GPMV)阳性样本,检测结果为H5禽流感病毒、H9 禽流感病毒、新城疫(NDV)、马立克病毒(MDV)、传染性支气管炎病毒(IBV)、传染性腔上囊病病毒(IBDV)、传染性喉气管炎病病毒(ILTV)、鸭瘟病毒(DPV)、小鹅瘟病毒(GPV)、鹅副黏病毒(GPMV)阳性样本的含量均小于 0.1AU/mL,无特异性反应。数据如下:

[0124]	样本	浓度 (AU/ml)	发光值 (RLU)
	校准品 1	0.3	877462
	校准品 2	0.6	1524461
	校准品 3	1.2	2962535
	校准品 4	2.4	8768863
	校准品 5	4.8	12321725
	校准品 6	9.6	18346127
[0125]	H5 禽流感病毒阳性样本	<0.33	457772
	H9 禽流感病毒阳性样本	<0.33	493427
	新城疫(NDV)阳性样本	8.63	17268142
	禽流感(AIV)阳性样本	<0.33	411563
	马立克病毒(MDV)阳性样本	<0.33	811757
	传染性支气管炎病毒(IBV)阳性样本	<0.33	327721
	传染性腔上囊病病毒(IBDV)阳性样本	<0.33	866653
	传染性喉气管炎病病毒(ILTV)阳性样本	<0.33	691587
	鸭瘟病毒(DPV)阳性样本	<0.33	700125
	小鹅瘟病毒(GPV)阳性样本	<0.33	675354
	鹅副黏病毒(GPMV)阳性样本	<0.33	556778

[0126] 2、试剂盒的检测限

[0127] 试剂盒检测限(分析灵敏度)的定义为:测定20次阴性样品,测定的平均值加上3倍标准差。该试剂盒的检测限为:0.3AU/mL。

[0128] 3、试剂盒的准确度

[0129] 准确度是指测定值与真值间的符合程度,选择20份血凝抑制效价不同的样本,以血凝抑制实验为标准,血凝抑制效价 $\geq 4\log 2$ 为阳性,效价 $< 4\log 2$ 为阴性;本试剂盒含量值 $\geq 2.4\text{AU/mL}$,判定为阳性;含量值 $< 2.4\text{AU/mL}$,判定为阴性。有数据可知本试剂盒和血凝抑制实验的阴阳符合率为100%,数据如下:

[0130]

样本	血凝抑制 试验效价	发光值 (RLU)	浓度 (AU/mL)	样本	血凝抑制 试验效价	发光值 (RLU)	浓度 (AU/mL)
校准品 1	/	824974	0.3(2 ¹)	8	6log2	17485690	10.32
校准品 2	/	1452957	0.6(2 ²)	9	6log2	16942108	8.63
校准品 3	/	2978534	1.2(2 ³)	10	5log2	13002213	4.27
校准品 4	/	8714050	2.4(2 ⁴)	11	5log2	13957134	4.86
校准品 5	/	13534629	4.8(2 ⁵)	12	5log2	14020158	4.90
校准品 6	/	17628692	9.6(2 ⁶)	13	4log2	8725631	2.59

[0131]

1	<log2	754620	< 0.33	14	4log2	8714521	2.59
2	<log2	698217	< 0.33	15	4log2	8693687	2.58
3	3log2	3088742	1.12	16	6log2	17957853	12.78
4	3log2	3124750	1.13	17	5log2	13521547	4.57
5	log2	697821	< 0.33	18	2log2	1312257	0.53
6	log2	742236	< 0.33	19	2log2	1401975	0.58
7	3log2	2968125	1.09	20	2log2	1395824	0.57

[0132] 本领域的技术人员容易理解,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、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

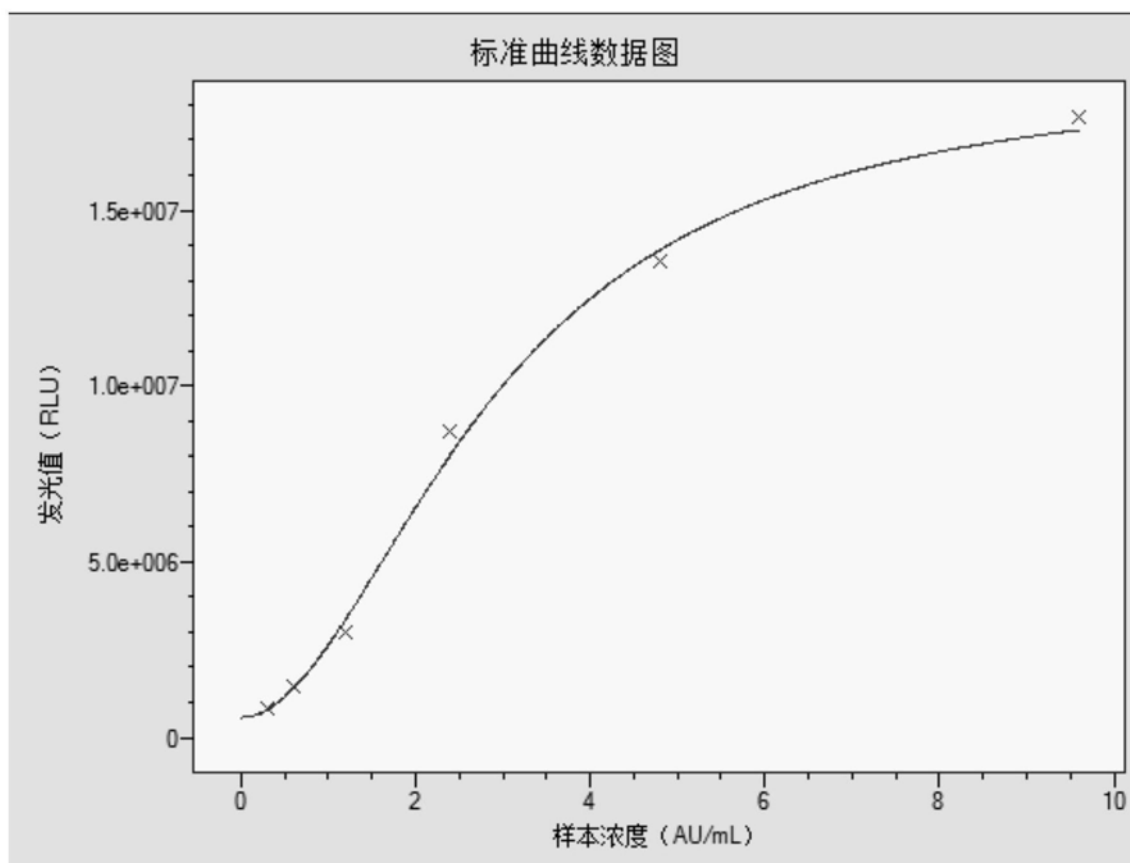


图1

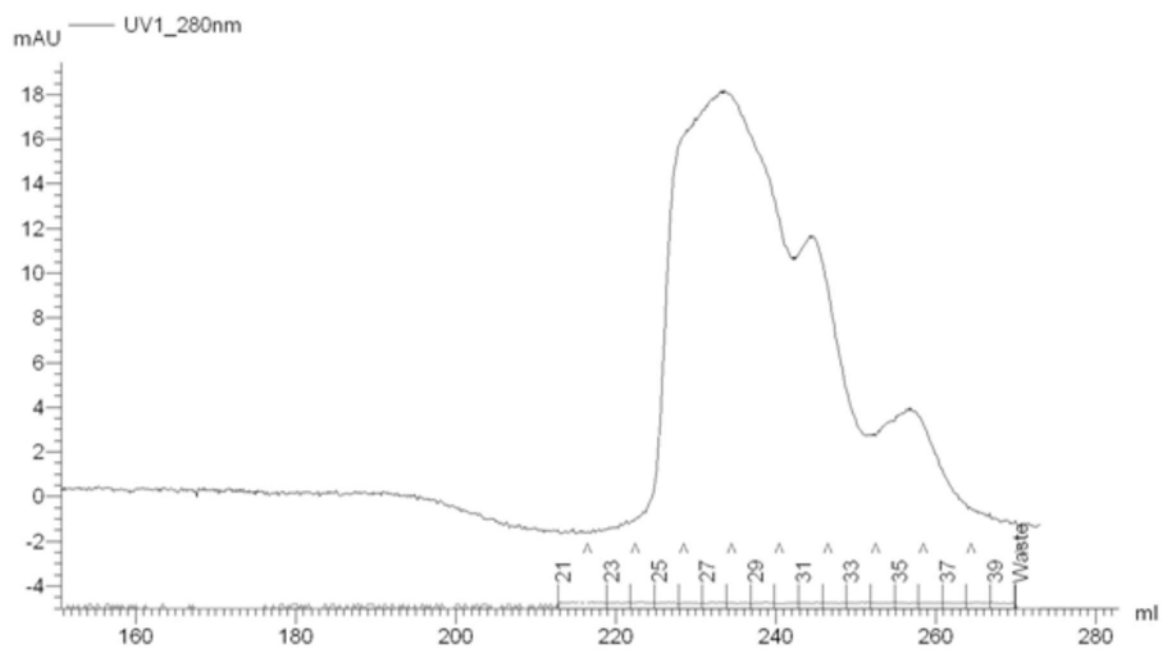


图2

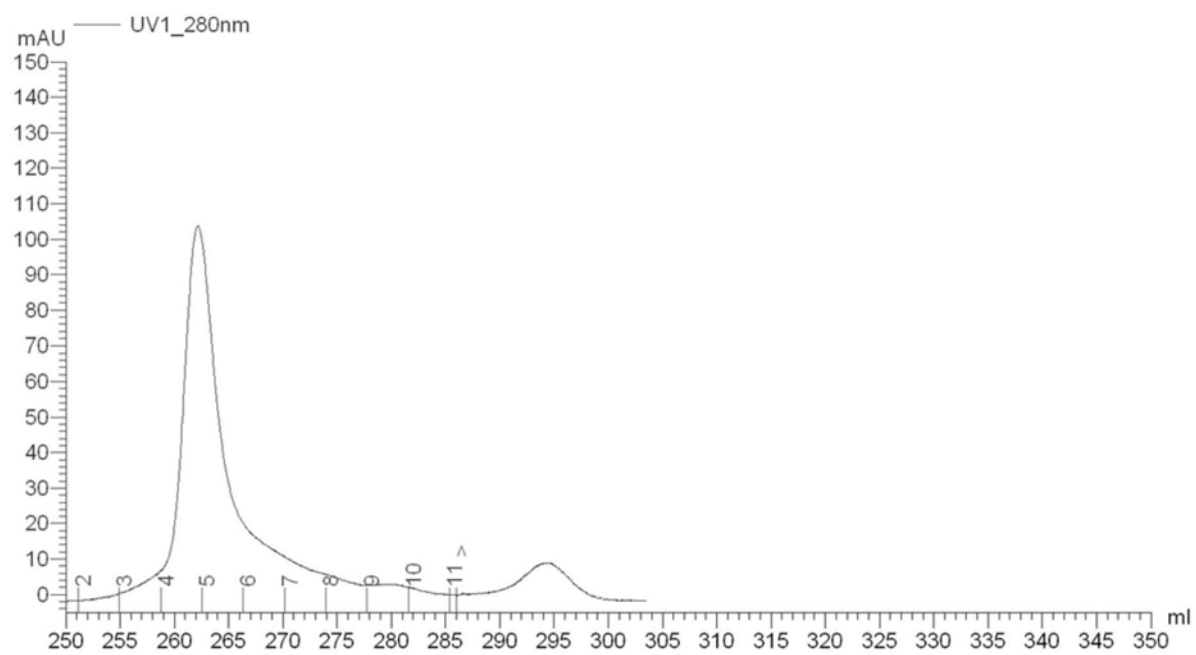


图3

专利名称(译)	一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN110672844A	公开(公告)日	2020-01-10
申请号	CN201911034672.3	申请日	2019-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	华中科技大学		
[标]发明人	杨海 计梦琴 杨宝凤 张德军 成诗琦		
发明人	杨海 计梦琴 杨宝凤 张德军 成诗琦		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/68 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/56983 G01N33/6854 G01N2333/125		
代理人(译)	孙杨柳 李智		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种新城疫病毒抗体磁免疫化学发光检测试剂盒及其应用，属于免疫学检测领域。试剂盒含有酶标抗IgY抗体、磁标新城疫病毒抗原和发光底物液。先将磁标新城疫病毒抗原分别与稀释后的血清样本和标准品溶液混匀，形成磁标新城疫病毒抗原与新城疫病毒抗体复合物，然后进行磁分离，将沉淀物清洗后，将酶标抗体加入到沉淀物中，与复合物上的抗体结合，然后进行磁分离和沉淀物的清洗，再加入发光底物液，使发光底物与结合到复合物上的酶标抗体上的酶反应，检测发光值，以加入标准品溶液的发光值绘制标准曲线，以加入待检测样品的发光值计算待测样品中抗体的含量。采用所述的试剂盒检测抗体，具有灵敏度和准确度高以及特异性强的效果。

