

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810026820.2

[51] Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 8 月 20 日

[11] 公开号 CN 101246167A

[22] 申请日 2008.3.17

[21] 申请号 200810026820.2

[71] 申请人 广东省昆虫研究所

地址 510260 广东省广州市海珠区新港西路
105 号

[72] 发明人 季 芳 万玉玲 饶军华 刘晓明

[74] 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司

代理人 万志香 曾旻辉

权利要求书 2 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

一种 STL V 双抗原夹心酶联免疫吸附测定法及其试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种 STL V 双抗原夹心酶联免疫吸附测定法及其试剂盒，该测定法包括以下步骤：

1) STL V 抗原包被；2) 包被板封闭；3) 加入酶标的 STL V 抗原；4) 加入被检标本以及标本稀释液，使标本中的抗体与固相载体上的抗原复合物充分反应，形成固相抗原 - 抗体 - 酶标抗原复合物，洗涤除去未结合抗体和杂质；5) 加底物显色，通过比色，测标本中抗体的量。经过改良的 STL V 双抗原夹心酶联免疫吸附测定法及其试剂盒具有检测速度快，节省人力、物力、降低检测成本等优点。符合快速、简单、明了的方法，易于推广，能满足基础需要，并适合流行病学调查。

1. 一种 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附测定法, 其特征是: 包括以下步骤:

A. 制备酶联板:

1)、抗原包被: 将浓度为 $6 \mu\text{g/mL}$ 的 STLV 特异性抗原 $90-110 \mu\text{L}$ 包被聚氯乙烯板或聚苯乙烯板中的微孔中, 使形成固相抗原后, 洗去未结合的抗原及杂质, 4°C 阴干, 得到包被板;

2)、包被板封闭: 将 $110-130 \mu\text{L}$ 封闭液于 4°C 加到包被板的微孔中, 封闭 $10-14 \text{h}$, 甩干后阴干;

3)、每孔微孔中加入浓度为 $8 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ 酶标 STLV 抗原 $45-55 \mu\text{L}$, 放在真空冷冻干燥箱中干燥, 使酶标 STLV 抗原附着在固相抗原表面, 得到制备好的酶联板;

B. 检测步骤:

4)、加入 $40-60 \mu\text{L}$ 待检测的血清或血浆标本以及 $40-60 \mu\text{L}$ 标本稀释液, 37°C 温育 $1-2 \text{h}$, 使标本中的抗体与固相载体上的抗原复合物充分反应, 形成固相抗原-抗体-酶标抗原复合物, 洗涤除去未结合抗体和杂质;

5)、加底物显色: 加入显色底物, 固相上的酶催化底物产生有色产物, 通过比色, 测标本中抗体的量。

2. 根据权利要求 1 所述的 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附测定法, 其特征是: 所述封闭液为 0.1mol/L 的 PBS 溶液, 该溶液中还含有 1% BSA、4% 蔗糖, 5% 蛋白胨。

3. 根据权利要求 1 所述的 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附测定法, 其特征是: 所述标本稀释液为 0.015mol/L 的三羟甲基氨基甲烷溶液, 该溶液中还含有 2% 蔗糖, 1% 吐温-20, 1% 硫柳汞, 10% 小牛血清。

4. 根据权利要求 1 所述的 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附测定法, 其特征是: 步骤 1) 中包被抗原的量为 $50 \mu\text{L}$; 步骤 3) 中加入酶标的 STLV 抗原的量为 $50 \mu\text{L}$ 。

5. 一种 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附试剂盒, 其特征是: 包括有酶联板, 该酶联板为包被有固相 STLV 特异性抗原-酶标 STLV 抗原复合物的聚氯乙烯板或聚苯乙烯板; 该酶联板的制备方法为: 1)、抗原包被: 将浓度为 $6 \mu\text{g/mL}$ 的 STLV 特异性抗原 $90-110 \mu\text{L}$ 包被聚氯乙烯板或聚苯乙烯板中的微孔中, 使形成固相抗原后, 洗去未结合的抗原及杂质, 4°C 阴干, 得到包被板;

2)、包被板封闭：将 110-130 μL 封闭液 4℃ 加到包被板的微孔中，封闭 10—14 h, 甩干后阴干；

3)、每孔微孔中加入浓度为 8×10^{-2} $\mu\text{g/mL}$ 酶标的 STL V 抗原 45—55 μL ，放在真空冷冻干燥箱中干燥，使之附着在固相抗原表面，得到制备好的酶联板。

6. 根据权利要求 5 所述 STL V 双抗原夹心酶联免疫吸附试剂盒，其特征是：步骤 1) 中包被 STL V 特异性抗原的量为 50 μL ；步骤 3) 中加入酶标的 STL V 抗原的量为 50 μL 。

一种 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附测定法及其试剂盒

技术领域

本发明属于医药生物领域，具体底是涉及一种改良的 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附（ELISA）测定法及其试剂盒。

背景技术

猴T淋巴细胞趋向性病毒1型(Simian T-lymphotropic virus type 1, STLV-1)是猴群中一种重要的传染性病毒，该病毒主要侵害猴的免疫系统，引起免疫器官的病变或免疫机能紊乱，从而影响动物实验的研究。早在1992年，中华人民共和国卫生部颁布的《医学实验动物标准》规定STLV-1型是SPF实验猴必须排除的病毒之一。随着当前国际市场对SPF实验猴需求量的增加，STLV-1病毒已被列为必须排除的病原之一。

酶联免疫吸附实验（ELISA）是继免疫荧光和放射免疫技术后发展的一种酶免技术，涉及到医学、生物学、遗传学、免疫等许多科学，其基本原理是利用抗原、抗体的特异性反应，用已知抗原或抗体检测未知抗原或抗体，由于ELISA试验方法具有敏感、特异、经济、简便、安全等特点，在疾病的诊断和疗效观察以及预防医学方面应用尤为广泛。

目前使用的 STLV 双抗原夹心方法用于测定抗体，基本操作步骤如下：

- 1、抗原包被：将特异性抗原包被固相载体，使形成固相抗原后，洗去未结合的抗原及杂质；
- 2、加入待检测的血清或血浆标本，使标本中的抗体与固相载体上的抗原充分反应，形成固相抗原抗体复合物，洗涤除去未结合抗体和杂质；
- 3、加入酶标的已知抗原，孵育，使形成固相抗原-待测抗体-酶标抗原夹心复合物，洗涤除去未结合酶标抗原。
- 4、加底物显色。固相上的酶催化底物产生有色产物，通过比色，测标本中抗体的量。

上述 ELISA 方法中，由于步骤较多，经常会发生酶标抗原和标本漏加或错加的现象，标本污染酶标抗原的现象，以及溶液状态保存的酶标抗原会由于运输和放置过程中产生的各种原因导致免疫活性下降，进而影响检测结果的准确性，因此，本发明旨在建立一种方便可行的双抗原夹心快速检测方法，提高检测灵敏度，加快检测速度，降低加样过程中的污染问题，节省人力、物力，降低检测成本。

发明内容

本发明所要解决的技术问题之一在于提供一种新的 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附测定

法, 该测定法可减少双抗原夹心方法中的加样步骤, 减少加样污染, 且更为快速、灵敏的检测方法。

解决的技术问题的技术内容如下:

一种 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附测定法, 包括以下步骤:

A. 制备酶联板

- 1)、抗原包被: 将 6 ng/mL 的 (90—110 μ L) STLV 特异性抗原包被聚氯乙烯板或聚苯乙烯板中的微孔中, 使形成固相抗原后, 洗去未结合的抗原及杂质, 4℃阴干, 得到包被板;
- 2)、包被板封闭: (110—130 μ L) 封闭液于 4℃加到包被板的微孔中, 封闭 10—14h, 甩干后阴干;
- 3)、加入 (45—55 μ L) 酶标的已知 STLV 抗原 (6 ng/mL), 放在真空冷冻干燥箱中干燥 1—3h, 使之附着在固相抗原表面, 得到制备好的酶联板;

B. 检测步骤

- 4)、加入 40—60 μ L 被待检测的血清或血浆标本以及 (40—60 μ L) 标本稀释液, 使标本中的抗体与固相载体上的抗原复合物充分反应, 形成固相抗原-抗体-酶标抗原复合物, 洗涤除去未结合抗体和杂质;
- 5)、加底物显色: 加入显色底物 (TMB), 固相上的酶催化底物产生有色产物, 通过比色, 测标本中抗体的量。

本发明中, 酶联板为聚氯乙烯板或聚苯乙烯板, 优选聚苯乙烯板。

本发明中, 封闭液为 (0.1mol/l) PBS 溶液, 内含 1% BSA (牛血清白蛋白)、4%蔗糖, 5%蛋白胨, 有效屏蔽未包被的空间, 减少非特异性反应。

本发明中, 标本稀释液为 (0.015mol/L) 三羟甲基氨基甲烷溶液, 内含 2%蔗糖, 1‰吐温-20, 1‰硫柳汞, 10%小牛血清, 减少非特异性反应。

本发明中, 所述小牛血清的是灭活或不灭活的无菌小牛血清。

本发明所要解决的另一技术问题是提供一种 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附试剂盒。

具体方案如下:

一种 STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附试剂盒, 其特征是: 包括有酶联板, 该酶联板为包被有固相 STLV 特异性抗原-酶标 STLV 抗原复合物的聚氯乙烯板或聚苯乙烯板; 该酶联板的制备方法为: 1)、抗原包被: 将浓度为 6 μ g/mL 的 STLV 特异性抗原 90—110 μ L 包被聚氯乙烯板或聚苯乙烯板中的微孔中, 使形成固相抗原后, 洗去未结合的抗原及杂质, 4℃阴干, 得到包被板;

- 2)、包被板封闭：将 110-130 μL 封闭液 4℃ 加到包被板的微孔中，封闭 10-14 h, 甩干后阴干；
- 3)、每孔微孔中加入浓度为 $8 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ 酶标的 STLV 抗原 45-55 μL ，放在真空冷冻干燥箱中干燥，使之附着在固相抗原表面，得到制备好的酶联板。

本发明中，所述的酶联板中加入了特异性抗原和特异性酶标抗原。避免在检测过程中添加酶标抗原，减少双抗原夹心方法中的加样步骤，减少加样污染；其二，酶标抗原以一种固化的方式，降低了运输或保存过程中活性的降低。本方法不仅对医学微生物病原诊断有价值，而且对流行病学调查、筛选、临床诊断有重要意义。经过改良的双抗原夹心酶联免疫吸附 ELISA 测定法及其试剂盒具有检测速度快，节省人力、物力、降低检测成本等优点。符合快速、简单、明了的方法，易于推广，能满足基础需要，并适合流行病学调查。

具体实施方式

以下实施例中，所用试剂为：

封闭液：(0.1mol/l) PBS 溶液 (Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液)，内含 1% BSA (牛血清白蛋白)、4%蔗糖，5%蛋白胨。

标本稀释液：(0.015mol/L) 三羟甲基氨基甲烷溶液，内含 2%蔗糖，1%吐温-20，1%硫柳汞，10%小牛血清。

本实施例中，STLV 特异性抗原和酶标抗原来自北京养生堂生物技术有限公司。

实施例 1

STLV 双抗原夹心酶联免疫吸附 ELISA 测定法，包括下列步骤：

(一) 制备酶联板

- 1、抗原包被：将浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 的 STLV 特异性抗原 100 μL (可用 0.1mol/l PBS 溶液作为抗原稀释液) 包被固相载体，使形成固相抗原后，洗去未结合的抗原及杂质，4℃ 阴干；
- 2、包被板封闭：(120 μL) 封闭液 4℃ 放置 12 h, 甩干后阴干；
- 3、加入浓度为 $8 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$ (50 μL) 酶标的 STLV 抗原，放在真空冷冻干燥箱中干燥 2h, 使之附着在固相抗原表面；取出后放室温平衡 1h, 得到制备好的酶联板。

检测步骤

- 1、加入 50 μ L 实验猴的血清或血浆标本以及 50 μ L 稀释液，使标本中的抗体与固相载体上的抗原复合物充分反应，形成固相抗原-抗体-酶标抗原复合物，洗涤除去未结合抗体和杂质；
- 2、加底物显色。固相上的酶催化底物产生有色产物，通过比色，测标本中抗体的量。

灵敏度和特异性检测结果：

血清样品	阳性结果/测试样品	敏感度
Sample	Positive/tested	Sensitivity
STLV	90/90	100%
血清样品	阴性结果/测试样品	特异性
Sample	Negative/tested	Specificity
BV infectors	8/8	100%
SIV infectors	8/9	88.9%
Healthy donors	82/83	98.7%
		(98/100) 98.0%

专利名称(译)	一种STLV双抗原夹心酶联免疫吸附测定法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN101246167A	公开(公告)日	2008-08-20
申请号	CN200810026820.2	申请日	2008-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	广东省昆虫研究所		
申请(专利权)人(译)	广东省昆虫研究所		
当前申请(专利权)人(译)	广东省昆虫研究所		
[标]发明人	季芳 万玉玲 饶军华 刘晓明		
发明人	季芳 万玉玲 饶军华 刘晓明		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种STLV双抗原夹心酶联免疫吸附测定法及其试剂盒，该测定法包括以下步骤：1)STLV抗原包被；2)包被板封闭；3)加入酶标的STLV抗原；4)加入被检标本以及标本稀释液，使标本中的抗体与固相载体上的抗原复合物充分反应，形成固相抗原 - 抗体 - 酶标抗原复合物，洗涤除去未结合抗体和杂质；5)加底物显色，通过比色，测标本中抗体的量。经过改良的STLV双抗原夹心酶联免疫吸附测定法及其试剂盒具有检测速度快，节省人力、物力、降低检测成本等优点。符合快速、简单、明了的方法，易于推广，能满足基础需要，并适合流行病学调查。

血清样品	阳性结果/测试样品	敏感度
Sample	Positive/tested	Sensitivity
STLV	90/90	100%
血清样品	阴性结果/测试样品	特异性
Sample	Negative/tested	Specificity
BV infectors	8/8	100%
SIV infectors	8/9	88.9%
Healthy donors	82/83	98.7%
		(98/100)98.0%