



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104634961 A

(43) 申请公布日 2015. 05. 20

(21) 申请号 201310551662. 3

*B01J 13/02*(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 11. 07

*G01N 21/64*(2006. 01)

(71) 申请人 珠海出入境检验检疫局检验检疫技  
术中心

地址 519015 广东省珠海市九洲大道东  
1144 号

(72) 发明人 朱绍智 薄清如 罗宝正 邵建宏  
徐海聂 沙才华 黄新民 廖秀云

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有  
限公司 44205

代理人 陈国荣

(51) Int. Cl.

*G01N 33/533*(2006. 01)

*C09K 11/06*(2006. 01)

权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

狂犬病毒均质荧光复合微球的制备方法及其  
检测方法

(57) 摘要

本发明公开了狂犬病毒均质荧光复合微球的  
制备方法及其检测方法。本发明以聚苯乙烯纳  
米微球为功能化内核,标记荧光物质  $\text{Eu}^{3+}$ , 并采用络  
合剂 BHHCT 标记重组狂犬病毒抗原,制得狂犬病  
毒均质荧光复合微球。将本发明方法制备的狂  
犬病毒均质荧光复合微球用于检测狂犬病毒  
抗体,不需要进行解离和增强,并且,均质荧光  
复合微球表面覆有氨基硅烷形成的保护层,荧  
光信号受外界环境影响降低,荧光寿命长,可  
很好的满足时间分辨荧光免疫分析的需要。  
本发明建立的狂犬病毒均质荧光复合微球检  
测方法灵敏度高,检测成本低,减少了操作步  
骤和反应时间,更容易实现自动化操作,仪器  
读数线性范围更宽。

1. 狂犬病毒均质荧光复合微球的制备方法,包括以下步骤:
  - 1) 制备聚苯乙烯纳米微球;
  - 2)  $\text{Eu}^{3+}$  的标记:将聚苯乙烯纳米微球悬浮于无水乙醇,加入络合剂 BHHCT,避光反应 15 ~ 25min,用无水乙醇洗涤,Tris-HCl 缓冲液重悬后,加入  $\text{EuCl}_3$ ,避光反应 16 ~ 25min;离心,再用无水乙醇重悬沉淀,加入氨基硅烷,避光反应 1.5 ~ 2.5 小时,洗涤,得均质荧光复合微球;
  - 3) 抗原的标记:
    - a、取均质荧光复合微球,重悬于无水乙醇,加入碳化二亚胺,避光反应 23 ~ 35min;
    - b、离心,磷酸盐缓冲液重悬,加入狂犬病毒抗原,避光反应 12 ~ 20h;
    - c、加入 20%BSA 溶液,反应 22 ~ 35min;
    - d、离心,洗涤,得到用于检测狂犬病毒的标记狂犬病毒抗原的均质荧光复合微球。
2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:步骤 1)中,将聚乙烯吡咯烷酮、过硫酸钾、苯乙烯以质量比 25:0.6:100 溶于乙醇水溶液,氮气保护下进行聚合反应;离心,用无水乙醇重悬沉淀,加入氨基硅烷,避光反应 1.6 ~ 3 小时,洗涤,制得聚苯乙烯纳米微球。
3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:超声条件下,52 ~ 65 $^{\circ}\text{C}$ ,进行聚合反应。
4. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:步骤 2)中,BHHCT 与聚苯乙烯纳米微球的质量比为 1:50。
5. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征在于:步骤 3)中,均质荧光复合微球与碳化二亚胺的质量比为 1:1。
6. 狂犬病毒的检测方法,包括以下步骤:
  - 1) 用 pH7.4、0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液将重组金黄色葡萄球菌蛋白 A 稀释后,加入到酶标板孔内,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 放置 13 ~ 18 小时;
  - 2) 每孔加入 200  $\mu\text{L}$  封闭液,2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 放置 13 ~ 18 小时;
  - 3) 弃去板内液体,洗板,晾干;
  - 4) 将标准品或待检样品加入到酶标板孔内,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育;
  - 5) 弃去板内液体,洗板,晾干;
  - 6) 将权利要求 1 ~ 5 任意一项所述方法制备的狂犬病毒均质荧光复合微球稀释后,加入到酶标板孔内,每孔 100  $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育;
  - 7) 弃去板内液体,洗板,晾干;
  - 8) 以多功能酶标仪的时间分辨荧光模式检测荧光信号,激发光波长为 330nm,发射光波长为 610nm;
  - 9) 以标准品浓度的对数值为横坐标,测得相对荧光单位的对数值为纵坐标,获得标准曲线,对比待检样品的检测值,判定结果。
7. 根据权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于:步骤 1)中,重组金黄色葡萄球菌蛋白 A 的稀释浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
8. 根据权利要求 6 所述的检测方法,其特征在于:步骤 6)中,狂犬病毒均质荧光复合微球的稀释倍数为 5000 倍。
9. 根据权利要求 6 ~ 8 任意一项所述的检测方法,其特征在于:步骤 4)孵育 60min,步

骤6) 孵育。

10. 根据权利要求6所述的检测方法,其特征在于:封闭液含 pH7.4、0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液,4%BSA,0.01% 的  $\text{NaN}_3$ 。

## 狂犬病毒均质荧光复合微球的制备方法及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及狂犬病毒均质荧光复合微球的制备方法及其检测方法。

### 背景技术

[0002] 狂犬病毒(Rabies virus, RV)的糖蛋白(简称 RVG)是唯一能刺激机体产生中和抗体的病毒蛋白,同时也是很好的检测抗原。因此,将狂犬病毒糖蛋白在大肠杆菌中进行高效表达,经 Western blot 等方法验证纯化后的重组蛋白可与 RV 阳性血清产生特异性反应,这为 RV 抗体检测试剂盒的研制奠定了基础。

[0003] 时间分辨荧光分析法(Time-resolved Fluoroimmunoassay, TrFIA)利用镧系元素螯合物标记抗原、抗体、多肽、激素等,发生如抗原/抗体免疫反应、生物素/亲和素反应等反应后,加入增强液解离镧系元素,使其荧光信号得到加强,再经外源性脉冲光激发,并采用延时读取等光电技术检测镧系元素的特异荧光,从而达到对样品分析检测的目的。由于发光物质铕离子和螯合剂结合后与包被的抗原或抗体进行免疫反应,形成的抗原-抗体-铕标记物复合物在弱碱性缓冲液中经激发光激发所发生的荧光信号甚弱,须加入增强液( $\beta$ -酮体、TOPO、Triton X-100、pH2-3 的醋酸和邻苯酸氢钾的酸性溶液),使稀土离子从络合物上离下来,与新的络合物结合形成大分子的微囊,这种微囊将能量传递给  $\text{Eu}^{3+}$ ,阻断水所产生的淬灭效应,使原来的荧光信号增强近 100 万倍,利于荧光测量。可见,增强液在 TrIFA 中是不可或缺的。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供狂犬病毒均质荧光复合微球的制备方法及其检测方法。

[0005] 本发明所采取的技术方案是:

狂犬病毒均质荧光复合微球的制备方法,包括以下步骤:

1) 制备聚苯乙烯纳米微球;

2)  $\text{Eu}^{3+}$  的标记:将聚苯乙烯纳米微球悬浮于无水乙醇,加入络合剂 BHHCT,避光反应 15 ~ 25min,用无水乙醇洗涤,Tris-HCl 缓冲液重悬后,加入  $\text{EuCl}_3$ ,避光反应 16 ~ 25min;离心,再用无水乙醇重悬沉淀,加入氨基硅烷,避光反应 1.5 ~ 2.5 小时,洗涤,得均质荧光复合微球;

3) 抗原的标记:

a、取均质荧光复合微球,重悬于无水乙醇,加入碳化二亚胺,避光反应 23 ~ 35min;

b、离心,磷酸盐缓冲液重悬,加入狂犬病毒抗原,避光反应 12 ~ 20h;

c、加入 20%BSA 溶液,反应 22 ~ 35min;

d、离心,洗涤,得到用于检测狂犬病毒的标记狂犬病毒抗原的均质荧光复合微球。

[0006] 优选的,步骤 1)中,将聚乙烯吡咯烷酮、过硫酸钾、苯乙烯以质量比 25:0.6:100 溶于乙醇水溶液,氮气保护下进行聚合反应;离心,用无水乙醇重悬沉淀,加入氨基硅烷,避光反应 1.6 ~ 3 小时,洗涤,制得聚苯乙烯纳米微球。

- [0007] 优选的,超声条件下,52 ~ 65℃,进行聚合反应。
- [0008] 优选的,步骤 2) 中,BHHCT 与聚苯乙烯纳米微球的质量比为 1:50。
- [0009] 优选的,步骤 3) 中,均质荧光复合微球与碳化二亚胺的质量比为 1:1。
- [0010] 狂犬病毒的检测方法,包括以下步骤:

1) 用 pH7.4、0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液将重组金黄色葡萄球菌蛋白 A 稀释后,加入到酶标板孔内,每孔 100 μL,2 ~ 8℃放置 13 ~ 18 小时;

2) 每孔加入 200 μL 封闭液,2 ~ 8℃放置 13 ~ 18 小时;

3) 弃去板内液体,洗板,晾干;

4) 将标准品或待检样品加入到酶标板孔内,每孔 100 μL,37℃孵育;

5) 弃去板内液体,洗板,晾干;

6) 将权利要求 1 ~ 5 任意一项所述方法制备的狂犬病毒均质荧光复合微球稀释后,加入到酶标板孔内,每孔 100 μL,37℃孵育;

7) 弃去板内液体,洗板,晾干;

8) 以多功能酶标仪的时间分辨荧光模式检测荧光信号,激发光波长为 330nm,发射光波长为 610nm;

9) 以标准品浓度的对数值为横坐标,测得相对荧光单位的对数值为纵坐标,获得标准曲线,对比待检样品的检测值,判定结果。

[0011] 优选的,步骤 1) 中,重组金黄色葡萄球菌蛋白 A 的稀释浓度为 2 μg/mL。

[0012] 优选的,步骤 6) 中,狂犬病毒均质荧光复合微球的稀释倍数为 5000 倍。

[0013] 优选的,步骤 4) 孵育 60min,步骤 6) 孵育。

[0014] 优选的,封闭液含 pH7.4、0.05mol/L 的磷酸盐缓冲液,4%BSA,0.01% 的  $\text{NaN}_3$ 。

[0015] 本发明的有益效果是:

本发明在传统 TrFIA 基础上,用纳米微球作为荧光物质  $\text{Eu}^{3+}$  的载体,即在功能化内核的聚合作用下形成均质荧光复合微球,然后通过螯合作用交联 RVG。本发明使用的双功能络合剂 BHHCT 由于只有一个氯磺酞基,一端与稀土元素连接,一端与抗原或抗体连接,避免了蛋白质分子之间的交联反应,且由于荧光物质  $\text{Eu}^{3+}$  没有和生物大分子直接接触,不会影响生物活性,不需要进行解离和增强。并且,均质荧光复合微球表面覆有氨基硅烷形成的保护层,荧光信号受外界环境影响降低,狂犬病毒均质荧光复合微球的稳定常数高达  $10^{10}$ ,荧光寿命达到几百微秒,可很好的满足时间分辨荧光免疫分析的需要。

[0016] 本发明狂犬病毒均质荧光复合微球的制备方法简单,检测成本低,减少了操作步骤和反应时间,更容易实现自动化操作;仪器读数更高,线性范围更宽,检测灵敏度明显高于 ELISA。

## 附图说明

[0017] 图 1 为聚苯乙烯纳米微球的扫描电镜照片。

[0018] 图 2 为均质荧光复合微球的  $\text{Eu}^{3+}$  荧光光谱。

[0019] 图 3 为实施例 2 均质荧光复合微球检测方法建立的标准曲线。

## 具体实施方式

[0020] 提高 TrFIA 灵敏度的关键是稀土元素络合剂。本发明使用的双功能络合剂 4, 4'-二(1",1",1",2",2",3",3"-七氟-4",6"-己二酮-6"-基)-氯磺酰基-邻二苯基苯(BHHCT)是 Yuan 等(Yuan, J, et al., 1998)研发的一种稳定的能发出强烈荧光的  $\text{Eu}^{3+}$  络合剂,它所含有的四配位基团比以往的  $\beta$ -二酮类络合剂在灵敏度上有了很大的提高。BHHCT 由于只有一个氯磺酰基,一端与稀土元素连接,一端与抗原或抗体连接,避免了蛋白质分子之间的交联反应。

[0021] 以下实施例中所用金黄色葡萄球菌细胞壁的重组蛋白 A (重组蛋白 SPA)购自北京义翘神州生物技术有限公司;荧光螯合物 BHHCT、重组狂犬病毒抗原 RVG 由北京泰普生物技术公司馈赠;抗犬温热病毒抗体、抗犬细小病毒抗体购自 Hytest;ELISA 试剂盒购自北京北瑞达医药科技有限公司;标准品质控血清由本实验室保存。

#### [0022] 实施例 1

狂犬病毒均质荧光复合微球的制备:

##### (1) 功能化内核聚苯乙烯纳米微球的制备

将 2.5g 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、0.06g 过硫酸钾(KPS)、10g 苯乙烯(St)加入到 250ml 无水乙醇/水介质中溶解后置于超声波反应器中,通氮气,开启超声波发生器,60℃下进行聚合反应,得到聚苯乙烯纳米微球分散液。离心收集沉淀,以无水乙醇悬浮,加入氨基硅烷,室温搅拌反应,无水乙醇洗涤后收集聚苯乙烯纳米微球,无水乙醇悬浮保存备用。

##### [0023] (2) $\text{Eu}^{3+}$ 标记纳米微球

将纳米微球悬浮液浓缩至 20mg/mL,向 5mL 悬浮液加入 0.5mL 的 4mg/mL BHHCT 的乙醇溶液,室温避光搅拌反应 20min;以无水乙醇洗涤,Tris-HCl 缓冲液重悬,加入 0.5mL 的 0.01mol/L  $\text{EuCl}_3$  溶液,室温避光搅拌反应 20min;离心收集后再以无水乙醇悬浮,加入氨基硅烷,室温避光搅拌反应 2 小时,以 1mL 无水乙醇洗涤后收集沉淀,制得均质荧光复合微球,无水乙醇悬浮保存备用。

##### [0024] (3) 狂犬病毒抗原 RVG 的标记

a、取 100  $\mu\text{L}$  的 20mg/mL 均质荧光复合微球悬浮液,0.05mol/L PB 6.0 洗涤 3 次,超声悬浮,加入 20  $\mu\text{L}$  碳化二亚胺(EDC, 100mg/mL, Sigma) 溶液,室温避光反应 30 分钟;

b、离心收集沉淀,100  $\mu\text{L}$  的 0.05mol/L PB 6.0 悬浮,加入 2mg RVG,室温避光反应 16 小时;

c、加入 100  $\mu\text{L}$  的 20%BSA 溶液,室温反应 30 分钟;

d、0.05mol/L Tris 8.0 洗涤 3 次,悬浮于 100  $\mu\text{L}$  保存液(0.05mol/L Tris 8.0, 1%BSA, 0.1% PVP40)中,2~8℃避光保存备用。

[0025] 图 1 所示的是粒径约为 60nm 的聚苯乙烯纳米微球的扫描电镜照片。图 1 (A) 为所制得的聚苯乙烯纳米微球分散液,从图中可以看出其微球大小较一致,没有粘结且分布较均匀。图 1 (B) 是所制备的均质荧光复合微球的扫描电镜照片,可见,包被的微球在形状上没有改变,没有粘结且分布较均匀,即与内核在形态上没有区别。

[0026] 图 2 为均质荧光复合微球的  $\text{Eu}^{3+}$  荧光光谱, $\text{Eu}^{3+}$  的激发光在 330nm,发射光波长集中在 610-620nm,而且荧光信号强烈,Stokes 位移有 290-300nm 的差距,可以看出微球荧光信号发射稳定。

#### [0027] 实施例 2

### 一、狂犬病毒的检测方法：

(1) 预包被：将 SPA 用包被缓冲液 (pH7.4, 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液) 加入到 96 微孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 放置 16 小时；

(2) 封闭：每孔加入 200  $\mu$ L 封闭液 (0.05mol/L PB 7.4, 4%BSA, 0.01%的  $\text{NaN}_3$ ), 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 16 小时；

(3) 洗涤：弃去板内液体, 以洗涤液 (0.01mol/L PB 7.4, 0.9%NaCl, 0.1%Tween-20) 洗板 3 次, 37 $^{\circ}$ C 吹干后密封保存备用；

(4) 加标准血清及样品：将标准血清或处理好的待检样品加入到预包被 SPA 的酶标板孔内, 每孔 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育；

(5) 洗涤：弃去板内液体, 洗涤液洗板 5 次, 拍干；

(6) 加均质荧光复合微球：用稀释液 (0.05mol/L Tris-HCl 8.0, 0.5%Casein-Na, 5%NBS) 稀释实施例 1 制备的狂犬病毒均质荧光复合微球, 加入到洗涤后的酶标板孔内, 每孔 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育；

(7) 洗涤：弃去板内液体, 洗涤液洗板 5 次, 拍干；

(8) 以多功能酶标仪的时间分辨荧光模式检测荧光信号, 记录读值。酶标仪的激发光波长为 330nm, 发射光波长为 610nm。

### [0028] 二、狂犬病毒检测方法的优化：

#### 1、SPA 包被浓度的优化

用包被缓冲液 (pH7.4, 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液) 将 SPA 进行系列稀释 (分别为 0.5  $\mu$ g/mL、1  $\mu$ g/mL、2  $\mu$ g/mL、5  $\mu$ g/mL、10  $\mu$ g/mL), 进行预包被。按步骤一的方法进行操作。检测结果见表 1, 当包被浓度为 2  $\mu$ g/mL 时, 信噪比 S/N 达到最高, 即背景荧光的干扰最少, 故 2  $\mu$ g/mL 是 SPA 的最适包被工作浓度。

[0029] 表 1 不同 SPA 包被浓度的检测结果

包被浓度	0.5 $\mu$ g/mL	1 $\mu$ g/mL	2 $\mu$ g/mL	5 $\mu$ g/mL	10 $\mu$ g/mL
0.5IU/mL	22301	36723	45775	57176	82237
0IU/mL	2198	2219	2318	3572	6400
S/N	10.15	16.55	19.75	16.01	12.85

#### [0030] 2、均质荧光复合微球稀释倍数的优化

以 2  $\mu$ g/mL 最佳浓度的 SPA 包被酶标板, 用稀释液将均质荧光复合微球按 1000、2000、5000、10000 倍梯度进行稀释, 分别按步骤一的方法进行操作。检测结果见表 2, 当均质荧光复合微球稀释倍数为 5000 时, 信噪比 S/N 的比值达到最高, 本底干扰低, 荧光值高, 故 5000 是均质荧光复合微球的最适稀释倍数。

[0031] 表 2 均质荧光抗体复合微球的不同稀释倍数的检测结果

均质荧光复合微球稀释倍数	1000	2000	5000	10000
0.5IU/mL	75472	52347	46553	32201
0IU/mL	5071	3459	2303	2056
S/N	14.88	15.13	20.21	15.66

#### [0032] 3、反应时间的优化

按照步骤一所述方法, SPA 浓度为 2  $\mu$ g/mL, 均质荧光复合微球稀释倍数为 5000, 采用不同时间进行温育反应：一步法即步骤(6)40min 温育；两步法即步骤(4)40min + 步骤(6)40min 温育；两步法即步骤(4)60min+ 步骤(6)60min 温育。

[0033] 检测结果见表 3, 当使用两步法(60min+60min) 进行温育时, 信噪比 S/N 的比值达到最高, 故最佳反应时间为两步法(60min+60min)。

[0034] 表 3 不同反应时间的检测结果

反应时间	一步法(60min)	两步法(40min+40min)	两步法(60min+60min)
0.5IU/mL	34785	40152	50783
0IU/mL	2337	2214	2392
S/N	14.88	18.14	21.23

[0035] 4、优化后的检测方法如下：

- (1) 预包被：将 2  $\mu$ g/mL 的 SPA 加入到 96 微孔板, 每孔 100  $\mu$ L, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 放置 16 小时；
- (2) 封闭：每孔加入 200  $\mu$ L 封闭液, 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 16 小时；
- (3) 洗涤：弃去板内液体, 以洗涤液洗板 3 次, 37 $^{\circ}$ C 吹干后密封保存备用；
- (4) 加标准血清及样品：将标准血清或处理好的待检样品加入到预包被的酶标板孔内, 每孔 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min；
- (5) 洗涤：弃去板内液体, 洗涤液洗板 5 次, 拍干；
- (6) 加均质荧光复合微球：将狂犬病毒均质荧光复合微球以稀释液(0.05mol/L Tris-HCl 8.0, 0.5%Casein-Na, 5%NBS) 稀释 5000 倍, 加入到洗涤后的酶标板孔内, 每孔 100  $\mu$ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育 60min；
- (7) 洗涤：弃去板内液体, 洗涤液洗板 5 次, 拍干；
- (8) 以多功能酶标仪的时间分辨荧光模式检测荧光信号, 记录读值。酶标仪的激发光波长为 330nm, 发射光波长为 610nm。

[0036] 5、标准曲线的建立

标准品的配制：用抗体稀释液(10% 小牛血清, 0.01% 的  $\text{NaN}_3$ ) 稀释得到 6 个标准血清浓度(抗体浓度分别为 0 IU/mL、0.05IU/mL、0.5 IU/mL、5 IU/mL、20 IU/mL、40 IU/mL)。

[0037] 采用上述优化的检测方法测定 6 个标准品的相对荧光单位(RLU), 每个标准品测两次求其平均值, 再根据双对数函数(横坐标为标准品浓度的对数值, 纵坐标为 RLU 平均值的对数值) 处理得到标准曲线, 进行分析。结果见表 4、图 3, 可知均质荧光复合微球检测技术的标准曲线相关系数为 0.994, 表明了线性相关性良好。

[0038] 表 4 标准品的检测结果

浓度(x) IU/ml	RLU-1	RLU-2	AVG (y)	logx	logy
0	2259	1989	2124	—	3.33
0.05	19187	19463	19325	-1.30	4.29
0.5	171871	179463	175667	-0.30	5.24
5	1440490	1411587	1426039	0.70	6.15
20	3101883	3117215	3109549	1.30	6.49
40	6382510	6612785	6497648	1.60	6.81

[0039] 实施例 3

1、本发明方法的灵敏度实验

用抗体浓度分别为 0 IU/mL、0.01 IU/mL、0.02 IU/mL、0.05 IU/mL、0.1 IU/mL、0.2 IU/mL、0.5 IU/mL、1 IU/mL、2 IU/mL、4 IU/mL、6 IU/mL、8 IU/mL、12 IU/mL 的标准血清做参考, 按照实施例 2 优化的检测方法进行灵敏度测试, 并和 ELISA 方法进行对比, 变异系数分析通过计算曲线的线性回归方程来比较灵敏度的差异。

[0040] 本发明均质荧光复合微球检测方法检测 0.01 IU/mL 的标准品, 其读值 5508 即与 0

IU/mL 参考品的结果 2075 有 2.5 倍的差异,因此本发明方法的最低检出限不低于 0.01 IU/mL。而使用 ELISA 方法,在标准品浓度为 0.2 IU/mL 时,其读值为 0.046,与 0IU/mL 标准品的结果 0.044 不能明显区分,即其最低检出限不低于 0.2 IU/mL。可以看出本发明方法的最低检出限比 ELISA 要高出约 20 倍。结果见表 5。

[0041] 表 5 均质荧光复合微球的灵敏度检测

参考品 (IU/mL)	ELISA (OD450)	微球检测 (RLU)
0	0.044	2075
0.01	0.04	5508
0.02	0.043	8376
0.05	0.044	14878
0.1	0.047	53627
0.2	0.046	71776
0.5	0.081	157404
1	0.122	285101
2	0.203	516395
4	0.357	935331
6	0.427	1223962
8	0.566	1494135
12	0.801	2298050

[0042] 2、本发明方法的特异性实验

用实施例 2 优化的检测方法检测犬温热病毒阳性血清、犬细小病毒阳性血清和阴性血清各 5 份,并将两种阳性血清检测值与阴性血清检测值进行对比分析。结果见表 6,犬温热病毒阳性血清和犬细小病毒阳性血清与阴性血清的测值基本没有差异,说明针对这两种病毒阳性血清,本发明方法在检测狂犬抗体样本时不会出现假阳性。

[0043] 表 6 特异性实验结果

编号	犬温热病毒阳性血清	犬细小病毒阳性血清	阴性血清
1	2475	2218	2154
2	3211	1732	2388
3	2901	2195	2461
4	2175	2247	2032
5	277	2173	2141

[0044] 3、临床样品的检测

在深圳福田区(F),罗湖区(L)和南山区(N)各宠物医院收集犬的血清共 30 份,另收集 8 份用 FAVN 金标准检测过的血清样品,用本发明优化的检测方法和 ELISA 法分别对其进行狂犬病抗体的检测。

[0045] 对比 30 份血清检测结果发现,两种方法符合率为 72%。对 8 份用 FAVN 金标准检测过的血清样品用此两种方法检测:FAVN 检测全为阳性;本发明方法检测时,一份样品处于临界值,而 ELISA 法检测该样品同样也处于临界值,且 ELISA 法检测还有另一份样品处于临界值,即 ELISA 法检测有两份样品处于临界值。可见,本发明建立的均质荧光复合微球法的灵敏度和线性范围都超过了 ELISA 法,且本发明方法的测定结果与 FAVN 方法的符合率达到 98%,而 ELISA 仅为 91%。由于 FAVN 的样本测试时间长达 96h,而本发明仅需 2h,可大大缩短检测时间。结果表明本发明建立的均质荧光复合微球法能快速、准确的进行样本测定。

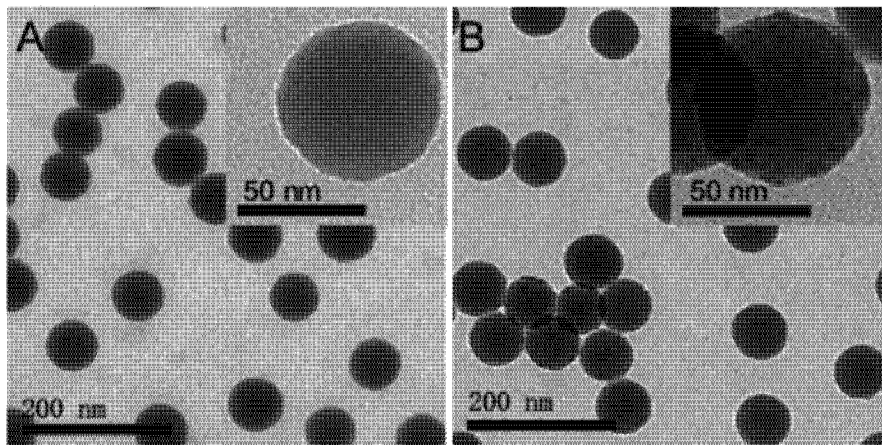


图 1

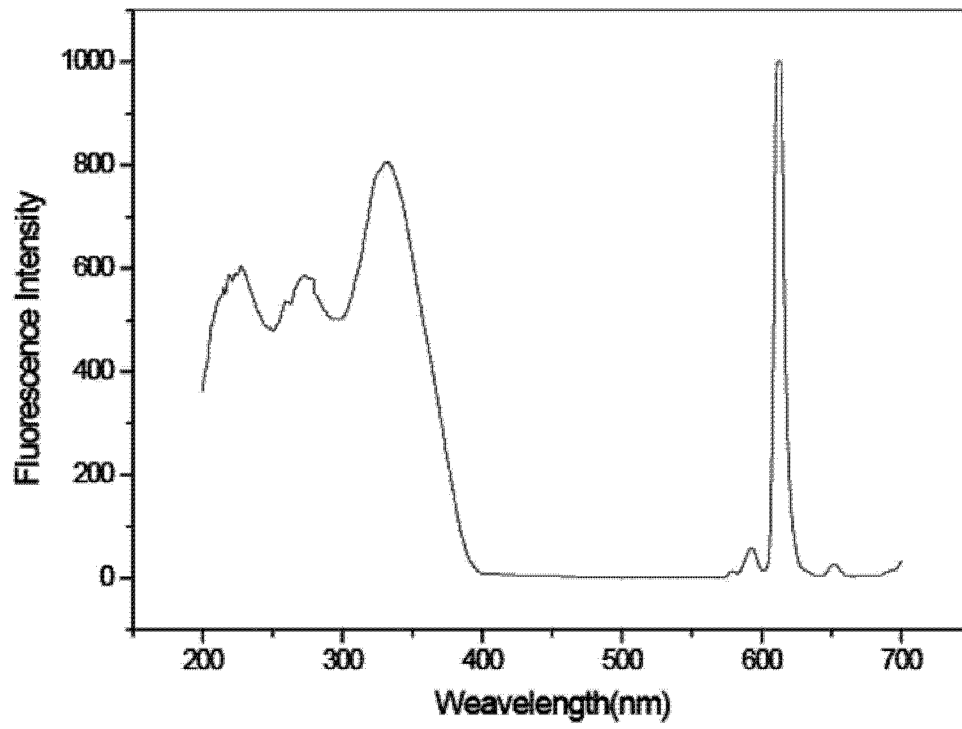


图 2

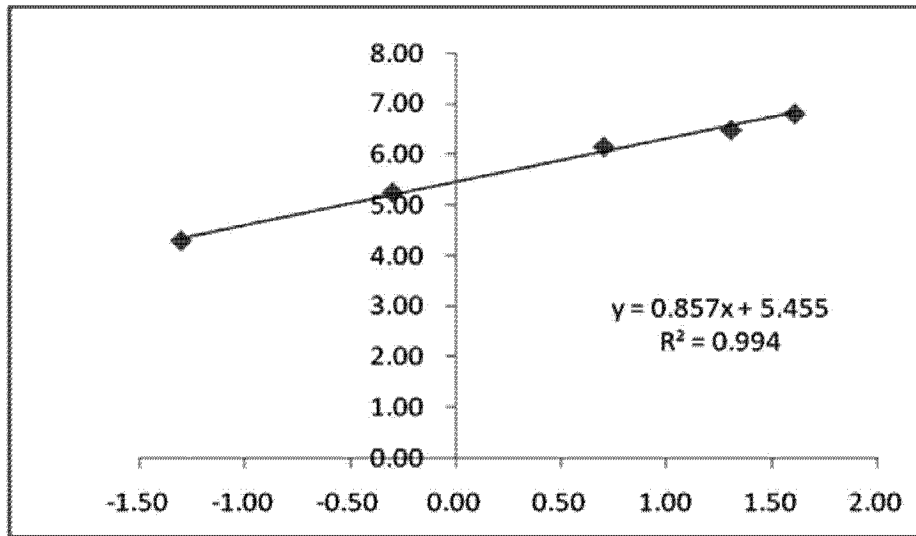


图 3

专利名称(译)	狂犬病毒均质荧光复合微球的制备方法及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104634961A</a>	公开(公告)日	2015-05-20
申请号	CN201310551662.3	申请日	2013-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	珠海出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
申请(专利权)人(译)	珠海出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
当前申请(专利权)人(译)	珠海出入境检验检疫局检验检疫技术中心		
[标]发明人	朱绍智 薄清如 罗宝正 邵建宏 徐海聂 沙才华 黄新民 廖秀云		
发明人	朱绍智 薄清如 罗宝正 邵建宏 徐海聂 沙才华 黄新民 廖秀云		
IPC分类号	G01N33/533 C09K11/06 B01J13/02 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/56983 G01N33/533		
代理人(译)	陈国荣		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了狂犬病毒均质荧光复合微球的制备方法及其检测方法。本发明以聚苯乙烯纳米微球为功能化内核，标记荧光物质Eu<sup>3+</sup>，并采用络合剂BHHCT标记重组狂犬病毒抗原，制得狂犬病毒均质荧光复合微球。将本发明方法制备的狂犬病毒均质荧光复合微球用于检测狂犬病毒抗体，不需要进行解离和增强，并且，均质荧光复合微球表面覆有氨基硅烷形成的保护层，荧光信号受外界环境影响降低，荧光寿命长，可很好的满足时间分辨荧光免疫分析的需要。本发明建立的狂犬病毒均质荧光复合微球检测方法灵敏度高，检测成本低，减少了操作步骤和反应时间，更容易实现自动化操作，仪器读数线性范围更宽。

