



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108169478 B

(45) 授权公告日 2021.06.04

(21) 申请号 201711347809.1

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2017.12.15

G01N 33/535 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 赵晓明

申请公布号 CN 108169478 A

(43) 申请公布日 2018.06.15

(73) 专利权人 广东海大畜牧兽医研究院有限公司

地址 510000 广东省广州市番禺区沙头街福平路八街5号

(72) 发明人 杨洁 李其昌 陈善真 陈克宏
刘博奇 王贵平

(74) 专利代理机构 广州市合本知识产权代理事务所(普通合伙) 44421

代理人 林玲

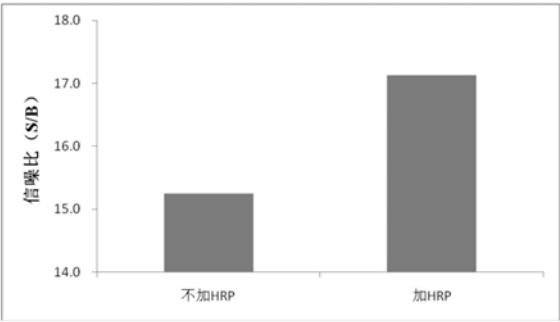
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一种间接酶联免疫抗体检测试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种间接酶联免疫抗体检测试剂盒,包括抗体稀释液和酶标二抗,所述抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分:75~95%作为溶剂体系的1×PBS缓冲液、0.1~8%的牛血清白蛋白、0.01~0.5%的硫柳汞钠、0.05~5%的抗凝剂、0.1~15%的非常规性饲养动物血清以及0.05~2%的青链霉素双抗;所述酶标二抗的稀释度为1:(500-10000)。本发明还公开了一种间接酶联免疫抗体检测方法。本发明能降低普通酶联免疫检测方法的阴性背景,提高检测方法的信噪比和检测方法的灵敏度。



1. 一种间接酶联免疫抗体检测试剂盒, 其特征在于, 包括抗体稀释液和酶标二抗, 所述抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分: 75~95% 作为溶剂体系的1×PBS缓冲液、0.1~8% 的牛血清白蛋白、0.01~0.5% 的硫柳汞钠、0.05~5% 的抗凝剂、0.1~15% 的非常规性饲养动物血清以及0.05~2% 的青链霉素双抗; 所述酶标二抗的稀释度为1:8000; 所述酶标二抗为HRP过氧化氢酶或ALP碱性磷酸酶标记的羊抗猪、羊抗兔、羊抗鼠、兔抗猪、兔抗鼠中的一种; 所述非常规性饲养动物血清为骆驼血清。

2. 如权利要求1所述的间接酶联免疫抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分: 85~92% 作为溶剂体系的1×PBS缓冲液、0.1~5% 的牛血清白蛋白、0.1~0.3% 的硫柳汞钠、0.1~2% 的抗凝剂、3~8% 的非常规性饲养动物血清以及0.1~1% 的青链霉素双抗。

3. 如权利要求2所述的间接酶联免疫抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分: 91% 作为溶剂体系的pH7.2的1×PBS缓冲液、2.0% 的牛血清白蛋白、0.2% 的硫柳汞钠、1.0% 的抗凝剂、5.0% 的非常规性饲养动物血清以及0.8% 的青链霉素双抗。

4. 如权利要求1所述的间接酶联免疫抗体检测试剂盒, 其特征在于, 所述1×PBS缓冲液包含80.0g/LNaCl、2.0g/LKCl、29.0g/LNa₂HPO₄·12H₂O和2.0g/LKH₂PO₄。

5. 一种间接酶联免疫抗体检测方法, 其特征在于, 采用权利要求1-4任一项所述的间接酶联免疫抗体检测试剂盒, 包括

配置PBS缓冲液的步骤: 配制1×PBS缓冲液;

配置稀释液: 将牛血清白蛋白、硫柳汞钠、乙二胺四乙酸二钠溶于洁净灭菌的容器中, 加入灭菌蒸馏水溶解, 然后用加好脱脂棉的一次性注射器将非常规性饲养动物血清缓慢过滤至容器中, 再用灭菌量筒量取上述PBS缓冲液, 充分搅拌混匀后, 用NaOH溶液调节pH值, 然后继续加蒸馏水搅拌均匀, 最后加入青链霉素双抗, 得到抗体稀释液;

酶标二抗稀释步骤: 在上述抗体稀释液中加入酶标二抗, 充分搅拌均匀, 得到酶标二抗稀释液;

间接酶联免疫抗体检测步骤: 分别用上述酶标二抗稀释液稀释阴性标准和阳性血清, 然后将稀释好的阳性血清加样到预先包被的ELISA板上, 室温孵育后洗涤, 用1×洗涤液将微孔板洗涤后拍干; 再加入酶标二抗稀释液, 室温孵育后重复上述洗涤步骤一次; 每孔加入底物, 避光显色, 最后每孔加入终止液, 并用酶标仪在450nm波长读数。

6. 如权利要求5所述的间接酶联免疫抗体检测方法, 其特征在于, 所述间接酶联免疫抗体检测步骤中, 孵育时间为20-30分钟, 所述洗涤液洗涤次数为3次, 洗涤液的添加量为300μL/孔, 酶标二抗稀释液的加入量为100μL/孔。

一种间接酶联免疫抗体检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测试剂技术领域,更具体地说,涉及一种间接酶联免疫抗体检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 酶联免疫吸附测定(ELISA)方法广泛用于测定抗体和抗原,其原理利用蛋白质或多肽与固体表面如ELISA板高度结合的亲合力。在用于血清学抗体测定的间接ELISA系统中,由于血清免疫球蛋白对固体表面的固有高结合亲和力,这种亲合力比任何目前使用的阻断剂高得多,此外,血清样品中的总体免疫球蛋白浓度高,为mg/ml,而抗原特异性抗体免疫球蛋白的浓度很低,为ng或 μ g/ml,非抗体免疫球蛋白会与抗原分子引起显著的非特异性相互作用。这些因素均会导致ELISA产生强烈的假阳性背景(BG)噪声反应。这种BG噪声反应始终是酶联免疫吸附测定方法所面临的技术瓶颈,一直以来该方法导致了众多不确定的结论和误解,为了防止进一步误用ELISA技术和误解血清学抗体测定数据,重要的是重新考虑免疫测定系统的原理和所有类型的非特异性反应。

[0003] 在ELISA检测中,影响检测灵敏度的最主要因素是信噪比,即方法中阳性对照与阴性对照的比值。为了提高灵敏度,可以通过增强抗原与抗体结合能力,对信号进行放大,对背景(噪音)进行降低等方法。现有检测方法中存在检测背景偏高,即建立的检测方法的敏感性过低,检测时间过长等问题。

发明内容

[0004] 针对现有技术的上述缺陷,本发明的目的在于提供一种间接酶联免疫抗体检测试剂盒,降低检测方法噪声,提高信噪比,增加检测灵敏度,提升检测试剂盒的性能。

[0005] 本发明的另一目的在于提供一种间接酶联免疫抗体检测方法;降低普通酶联免疫检测方法的阴性背景,提高检测方法的信噪比和检测方法的灵敏度。

[0006] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案如下:

[0007] 一种间接酶联免疫抗体检测试剂盒,其特征在于,包括抗体稀释液和酶标二抗,所述抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分:75~95%作为溶剂体系的1 $\times$ PBS缓冲液、0.1~8%的牛血清白蛋白、0.01~0.5%的硫柳汞钠、0.05~5%的抗凝剂、0.1~15%的非常规性饲养动物血清以及0.05~2%的青链霉素双抗;所述酶标二抗的稀释度为1:(500-10000)。

[0008] 作为进一步的方案,本发明所述的酶标二抗为HRP过氧化氢酶或ALP碱性磷酸酶标记的羊抗猪、羊抗兔、羊抗鼠、兔抗猪、兔抗鼠中的一种。

[0009] 作为进一步的方案,本发明所述的抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分:85~92%作为溶剂体系的1 $\times$ PBS缓冲液、0.1~5%的牛血清白蛋白、0.1~0.3%的硫柳汞钠、0.1~2%的抗凝剂、3~8%的非常规性饲养动物血清以及0.1~1%的青链霉素双抗。

[0010] 作为进一步的方案,本发明所述的抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分:

91%作为溶剂体系的pH7.2的1×PBS缓冲液、2.0%的牛血清白蛋白、0.2%的硫柳汞钠、1.0%的抗凝剂、5.0%的非常规性饲养动物血清以及0.8%的青链霉素双抗。

[0011] 作为进一步的方案,本发明所述的抗凝剂为肝素或乙二胺四乙酸二钠;所述非常规性饲养动物血清为骆驼、驼鹿、羊驼、马、鸵鸟、鸽、牦牛等动物血清中的一种或两种混合。

[0012] 作为进一步的方案,本发明所述的1×PBS缓冲液包含80.0g/L NaCl、2.0g/L KCl、29.0g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 和2.0g/L KH_2PO_4 。

[0013] 一种间接酶联免疫抗体检测方法,包括

[0014] 配置PBS缓冲液的步骤:配制1×PBS缓冲液;

[0015] 配置稀释液:将牛血清白蛋白、硫柳汞钠、乙二胺四乙酸二钠溶于洁净灭菌的容器中,加入灭菌蒸馏水溶解,然后用加好脱脂棉的一次性注射器将非常规性饲养动物血清缓慢过滤至容器中,再用灭菌量筒量取上述PBS缓冲液,充分搅拌均匀后,用NaOH溶液调节pH值,然后继续加蒸馏水搅拌均匀,最后加入青链霉素双抗,得到抗体稀释液;

[0016] 酶标二抗稀释步骤:在上述抗体稀释液中加入酶标二抗,充分搅拌均匀,得到酶标二抗稀释液;

[0017] 间接酶联免疫抗体检测步骤:分别用上述酶标二抗稀释液稀释阴性标准和阳性血清,然后将稀释好的阳性血清加样到预先包被的ELISA板上,室温孵育后洗涤,用1×洗涤液将微孔板洗涤后拍干;再加入酶标二抗稀释液,室温孵育后重复上述洗涤步骤一次;每孔加入底物,避光显色,最后每孔加入终止液,并用酶标仪在450nm波长读数。

[0018] 作为进一步的方案,本发明所述的酶标二抗稀释步骤中,酶标二抗与抗体稀释液的稀释比例为1:(500-10000)。

[0019] 作为进一步的方案,本发明所述的间接酶联免疫抗体检测步骤中,孵育时间为20-30分钟,所述洗涤液洗涤次数为3次,洗涤液的添加量为300μL/孔,酶标二抗稀释液的加入量为100μL/孔。

[0020] 相比现有技术,本发明具有以下有益效果:

[0021] 1.本发明所述的间接酶联免疫抗体检测试剂盒中包括添加非常规性饲养动物异源血清的抗体稀释液,这种来自于非常规性饲养动物异源血清中的免疫球蛋白可有效预防待测样本血清免疫球蛋白与塑料表面非特异结合;

[0022] 2.本发明所述的间接酶联免疫抗体检测试剂盒中包含了酶标二抗,能显著降低普通酶联免疫检测方法的阴性背景,提高检测方法的信噪比和检测方法的灵敏度;

[0023] 3.本发明所述的间接酶联免疫抗体检测能够明显缩短检测时间。

附图说明

[0024] 图1为PRRSV抗体稀释液中加入羊抗猪HRP标记二抗对信噪比的影响;

[0025] 图2为PCV2抗体稀释液中加入羊抗猪HRP标记二抗对信噪比的影响;

[0026] 图3为PRRSV抗体稀释液中羊抗猪HRP稀释浓度对信噪比的影响;

[0027] 图4为PCV2抗体稀释液中羊抗猪HRP稀释浓度对信噪比的影响;

[0028] 图5为PRRSV抗体检测反应时间对信噪比的影响;

[0029] 图6为PCV2抗体检测反应时间对信噪比的影响。

具体实施方式

[0030] 下面,结合具体实施方式,对本发明做进一步描述:

[0031] 在本发明中,若非特指,所有的份、质量百分比均为重量单位,所采用的设备和原料等除在本发明中特别限定外,均可从市场购得或是本领域常用的。下述实施例中的方法,如无特别说明,均为本领域的常规方法。

[0032] 一种间接酶联免疫抗体检测试剂盒,其特征在于,包括抗体稀释液和酶标二抗,所述抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分:75~95%作为溶剂体系的1×PBS缓冲液、0.1~8%的牛血清白蛋白、0.01~0.5%的硫柳汞钠、0.05~5%的抗凝剂、0.1~15%的非常规性饲养动物血清以及0.05~2%的青链霉素双抗;所述酶标二抗的稀释度为1:(500-10000)。优选的所述酶标二抗的稀释度为1:8000。

[0033] 由于血清样品中的总体免疫球蛋白浓度通常为mg/ml,而抗原特异性抗体免疫球蛋白的浓度较低为ng或μg/ml,非抗体免疫球蛋白会与抗原分子引起显著的非特异性相互作用。在本发明中,为了降低这种非特异相互作用,在ELISA特异抗体与抗原反应体系中加入酶标二抗,酶标二抗免疫球蛋白与该体系中样本血清免疫球蛋白(包括非特异和特异免疫球蛋白)迅速结合形成较大的分子团(一抗+二抗+酶),与单体蛋白分子相比,这个三联体蛋白分子团与抗原包被并封闭的固相酶标版体系的特异结合力与非特异相互作用就会显著减弱,因而不论信号OD值或背景OD值均会降低,但最终的结果是信噪比值(S/B)将升高,从而提高了使该ELISA的灵敏度。作为进一步的方案,本发明所述的酶标二抗为HRP过氧化氢酶或ALP碱性磷酸酶标记的羊抗猪、羊抗兔、羊抗鼠、兔抗猪、兔抗鼠中的一种。

[0034] 作为进一步的方案,本发明所述的抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分:85~92%作为溶剂体系的1×PBS缓冲液、0.1~5%的牛血清白蛋白、0.1~0.3%的硫柳汞钠、0.1~2%的抗凝剂、3~8%的非常规性饲养动物血清以及0.1~1%的青链霉素双抗。

[0035] 作为进一步的方案,本发明所述的抗体稀释液包含以质量分数计的以下组分:91%作为溶剂体系的pH7.2的1×PBS缓冲液、2.0%的牛血清白蛋白、0.2%的硫柳汞钠、1.0%的抗凝剂、5.0%的非常规性饲养动物血清以及0.8%的青链霉素双抗。

[0036] 本发明所述的抗体稀释液中,这种来自于非常规性饲养动物异源血清中的免疫球蛋白可有效预防待测样本血清免疫球蛋白与塑料表面非特异结合,提高检测的特异性。作为进一步的方案,本发明所述的抗凝剂为肝素或乙二胺四乙酸二钠;所述非常规性饲养动物血清为骆驼、驼鹿、羊驼、马、鸵鸟、鸽、牦牛等动物血清中的一种或两种混合。

[0037] 作为进一步的方案,本发明所述的1×PBS缓冲液包含80.0g/L NaCl、2.0g/L KCl、29.0g/L Na₂HPO₄·12H₂O和2.0g/L KH₂PO₄。

[0038] 一种间接酶联免疫抗体检测方法,包括

[0039] 配置PBS缓冲液的步骤:配制1×PBS缓冲液;

[0040] 配置稀释液:将牛血清白蛋白、硫柳汞钠、乙二胺四乙酸二钠溶于洁净灭菌的容器中,加入灭菌蒸馏水溶解,然后用加好脱脂棉的一次性注射器将非常规性饲养动物血清缓慢过滤至容器中,再用灭菌量筒量取上述PBS缓冲液,充分搅拌混匀后,用NaOH溶液调节pH值,然后继续加蒸馏水搅拌均匀,最后加入青链霉素双抗,得到抗体稀释液;

[0041] 酶标二抗稀释步骤:在上述抗体稀释液中加入酶标二抗,充分搅拌均匀,得到酶标二抗稀释液;

[0042] 间接酶联免疫抗体检测步骤:分别用上述酶标二抗稀释液稀释阴性标准和阳性血清,然后将稀释好的阳性血清加样到预先包被的ELISA板上,室温孵育后洗涤,用1×洗涤液将微孔板洗涤后拍干;再加入酶标二抗稀释液,室温孵育后重复上述洗涤步骤一次;每孔加入底物,避光显色,最后每孔加入终止液,并用酶标仪在450nm波长读数。

[0043] 作为进一步的方案,本发明所述的酶标二抗稀释步骤中,酶标二抗与抗体稀释液的稀释比例为1:(500-10000)。

[0044] 作为进一步的方案,本发明所述的间接酶联免疫抗体检测步骤中,孵育时间为20-30分钟,所述洗涤液洗涤次数为3次,洗涤液的添加量为300μL/孔,酶标二抗稀释液的加入量为100μL/孔。

[0045] 以下是本发明具体的实施例。

[0046] 实施例1

[0047] 抗体稀释液的配制方法:准确称取1.0g牛血清白蛋白(BSA)、0.10g硫柳汞钠、1.0g乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)于1000mL洁净灭菌烧杯中,加700mL灭菌蒸馏水溶解,然后用加好脱脂棉的一次性50mL注射器,将已经量取好的20mL骆驼血清缓慢过滤至配液烧杯中,再用100mL灭菌量筒量取0.1M PBS 100mL加入,充分搅拌混匀后,用1M NaOH溶液调节pH至7.2,然后继续加蒸馏水定容至1000mL,最后加入1mL青链霉素(1000IU)双抗。

[0048] 实施例2

[0049] 羊抗猪HRP标记二抗稀释液的配制:准确量取基础抗体稀释液100ml于洁净灭菌的200ml细胞培养基玻璃瓶中,加羊抗猪HRP标记IgG(KPL),充分搅拌混匀,分别配制成1:500、1:1000、1:2000、1:5000、1:8000、1:10000羊抗猪HRP标记二抗稀释液。

[0050] 实施例3

[0051] 检测猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV)抗体(间接ELISA):用实施例2的羊抗猪HRP标记二抗稀释液按1:40倍稀释PRRSV标准阴、阳性血清,然后分别将两种将稀释液稀释好的血清100μL/孔加样到PRRSV特异多肽预先包被的ELISA板上,室温孵育30分钟后洗涤,用1×洗涤液将微孔板洗涤3次,300μL/孔,洗涤后拍干;然后加入实施例2 1:8000的羊抗猪HRP标记二抗稀释液100μL/孔,室温中孵育30分钟,重复上述洗涤步骤一次;每孔加入100μL底物,避光显色10分钟,最后每孔加入50μL终止液,并用酶标仪在450nm波长读数。

[0052] 对比例1

[0053] 按照实施例3的方法及步骤用基础抗体稀释液替代羊抗猪HRP标记二抗稀释液。

[0054] 由图1结果可见,PRRSV抗体检测ELISA中,实施例3的抗体羊抗猪HRP标记二抗(1:8000)后的信噪比(S/B)值远高于对比例1。

[0055] 实施例4

[0056] 检测猪圆环病毒2(PCV II)抗体(间接ELISA):用实施例2配好羊抗猪HRP标记二抗稀释液按1:40倍稀释PCV II标准阴、阳性血清,然后将稀释好的血清100μL/孔加样到PCV II特异多肽预先包被的ELISA板上,室温孵育30分钟后洗涤,用1×洗涤液将微孔板洗涤3次,300μL/孔,洗涤后拍干;然后加入用1:8000羊抗猪HRP标记二抗稀释液100μL/孔,室温中孵育30分钟,重复上述洗涤步骤一次;每孔加入100μL底物,避光显色10分钟,最后每孔加入50μL终止液,并用酶标仪在450nm波长读数。

[0057] 对比例2

[0058] 按照实施例3的方法及步骤用基础抗体稀释液替代羊抗猪HRP标记二抗稀释液。

[0059] 由图2结果可见,PCVII抗体检测ELISA中,抗体基础稀释液中添加羊抗猪HRP标记二抗(1;8000)后的信噪比(S/B)值远高于对比例2。

[0060] 实施例5

[0061] 检测含有不同稀释度的羊抗猪HRP标记二抗抗体稀释液PRRSV间:用上述配好的基础抗体稀释液分别制备含有不同稀释度(1:2000、1:4000、1:8000)羊抗猪HRP标记二抗稀释液,按1:40倍稀释PRRSV标准阴、阳性血清,然后将稀释好的血清100 μ L/孔加样到PRRSV特异多肽预先包被的ELISA板上,室温孵育30分钟后洗涤,用1 $\times$ 洗涤液将微孔板洗涤3次,300 μ L/孔,洗涤后拍干;然后加入用基础抗体稀释液1:8000稀释的酶标二抗,100 μ L/孔,室温中孵育30分钟,重复上述洗涤步骤一次;每孔加入100 μ L底物,避光显色10分钟,最后每孔加入50 μ L终止液,并用酶标仪在450nm波长读数。

[0062] 由图3结果可见,PRRSV抗体检测ELISA中,抗体基础稀释液中添加羊抗猪HRP标记二抗(1;8000)后的信噪比(S/B)高于其它两组(1:2000、1:4000)。

[0063] 实施例6

[0064] 检测含有不同稀释度的羊抗猪HRP标记二抗抗体稀释液PCV II:用上述配好不同稀释度(1:1000、1:4000、1:8000)羊抗猪HRP标记二抗稀释液,按1:40倍稀释PCV II标准阴、阳性血清,然后将稀释好的血清100 μ L/孔加样到PCV II特异多肽预先包被的ELISA板上,室温孵育30分钟后洗涤,用1 $\times$ 洗涤液将微孔板洗涤3次,300 μ L/孔,洗涤后拍干;然后加入用基础抗体稀释液1:8000稀释的酶标二抗,100 μ L/孔,室温中孵育30分钟,重复上述洗涤步骤一次;每孔加入100 μ L底物,避光显色10分钟,最后每孔加入50 μ L终止液,并用酶标仪在450nm波长读数。

[0065] 由图4结果可见,PCVII抗体检测ELISA中,抗体基础稀释液中添加羊抗猪HRP标记二抗(1;8000)后的信噪比(S/B)高于其它两组(1:1000、1:4000)。

[0066] 实施例7

[0067] 检测添加羊抗猪HRP标记二抗(1;8000)稀释液后PRRSV ELISA一抗、二抗最佳反应时间

[0068] 按照上述实施例3、5中描述的PRRSV间接ELISA基本步骤,分别检验一抗、二抗孵化时间的不同组合对信噪比(S/B)的影响,常规PRRSV ELISA(一抗反应30min+二抗反应30min)作为对照。

[0069] 由图5结果可见,PRRSV抗体检测ELISA中,抗体基础稀释液中添加羊抗猪HRP标记二抗(1;8000)后,样本血清一抗孵化10min和HRP酶标二抗孵化20min的信噪比(S/B)高于其它三组。

[0070] 实施例8

[0071] 检测添加羊抗猪HRP标记二抗(1;8000)稀释液后PCV II ELISA一抗、二抗最佳反应时间

[0072] 按照上述实施例4、6中描述的PCVII间接ELISA基本步骤,分别检验一抗、二抗孵化时间的不同组合对信噪比(S/B)的影响,常规PCV II ELISA(一抗反应30min+二抗反应30min)作为对照。

[0073] 由图6结果可见,PCV II抗体检测ELISA中,抗体基础稀释液中添加羊抗猪HRP标记

二抗(1;8000)后,样本血清一抗孵化10min和HRP酶标二抗孵化20min的信噪比(S/B)高于其它两组。

[0074] 对本领域的技术人员来说,可以在上描述的技术方案以及构思的基础上做出其它各种相应的改变以及形变,而所有的这些改变以及形变都应该属于本发明权利要求的保护范围之内。

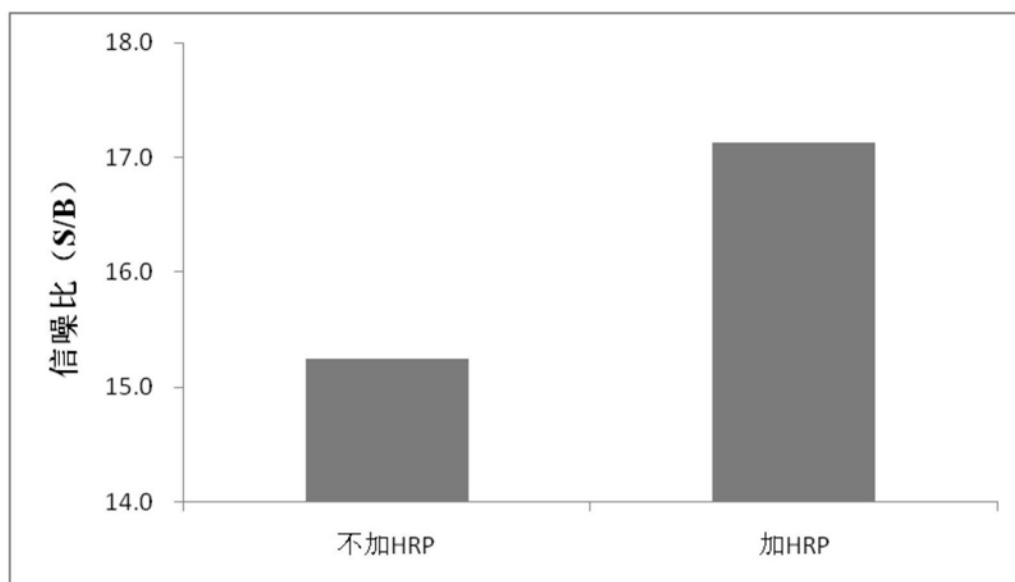


图1

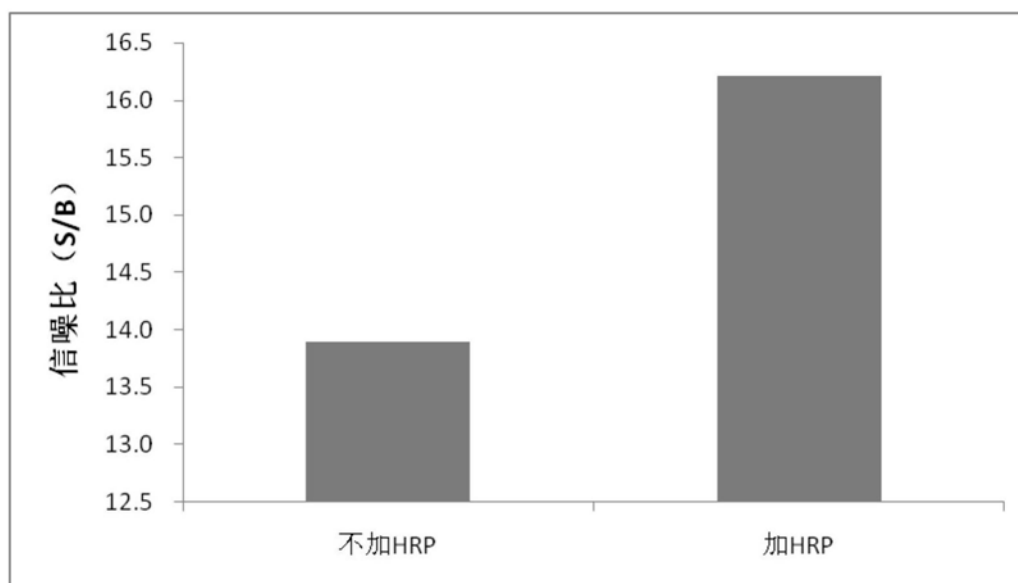


图2

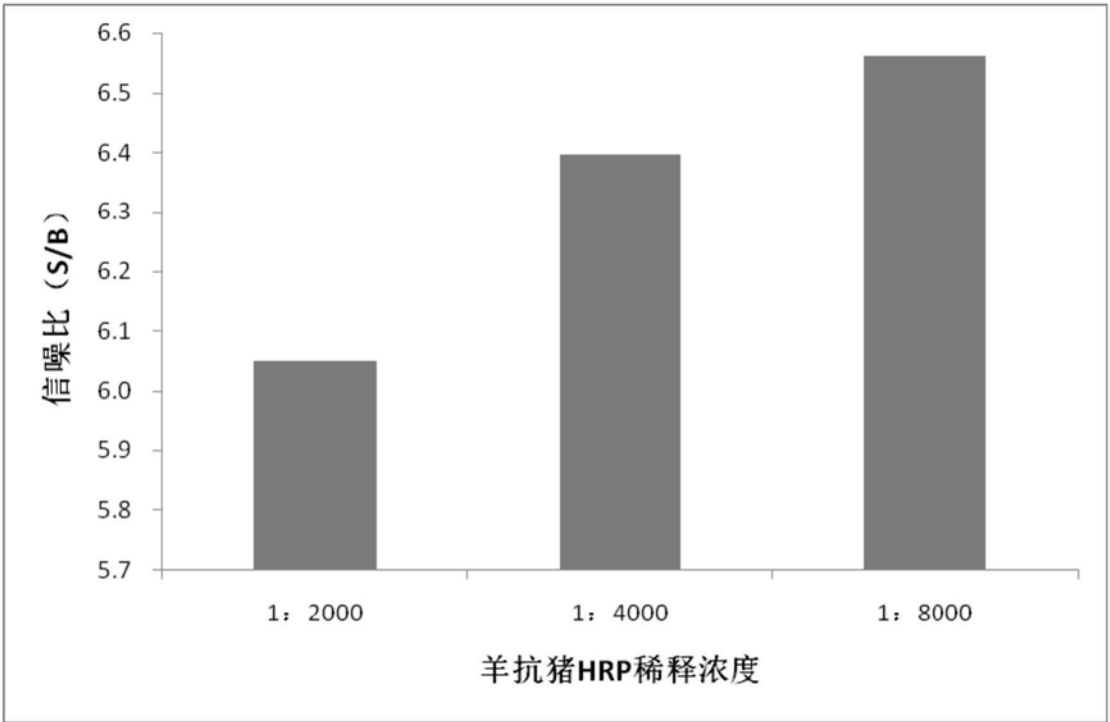


图3

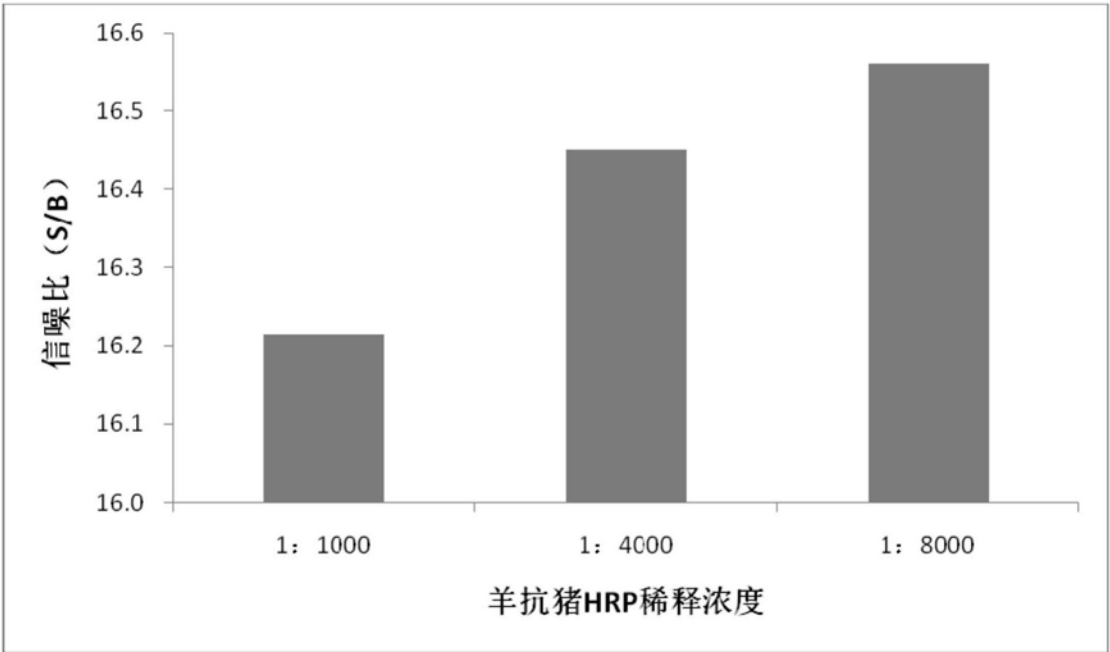


图4

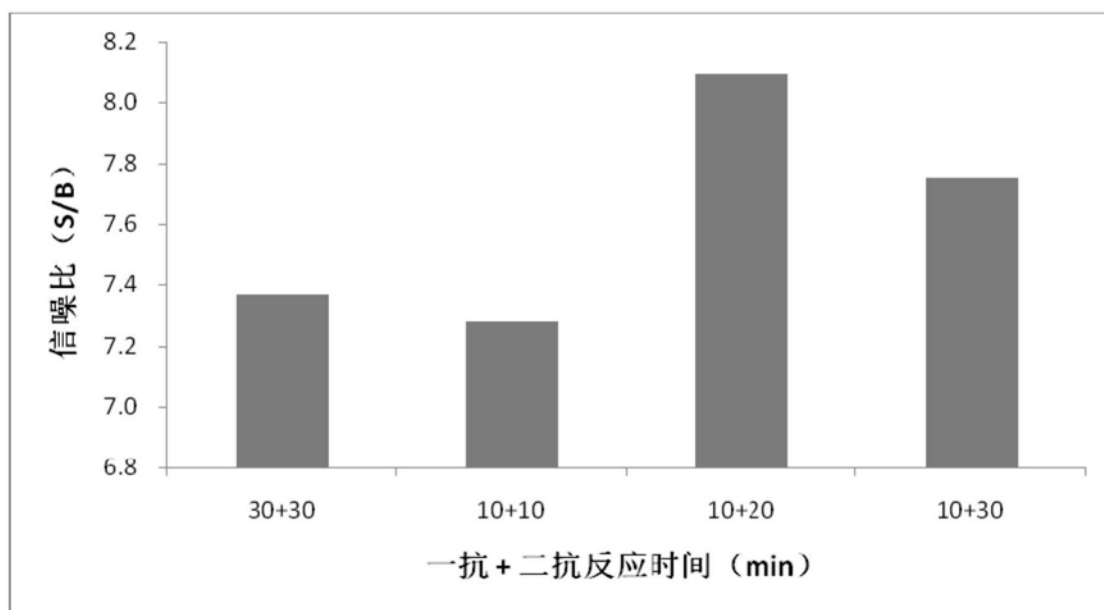


图5

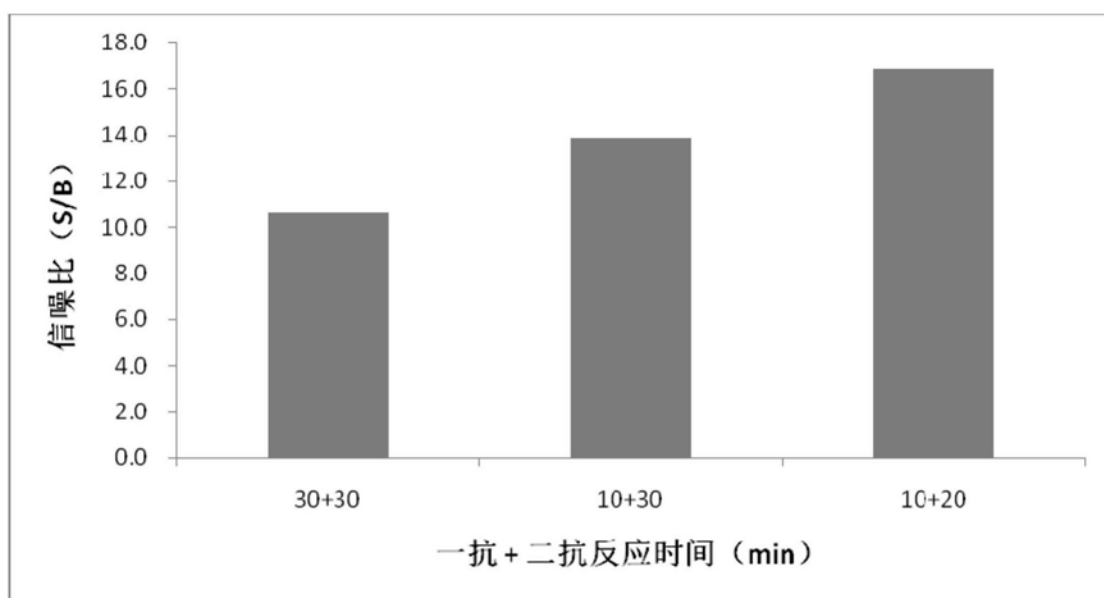


图6