



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101963616 B

(45) 授权公告日 2014. 01. 29

(21) 申请号 201010235696. 8

(22) 申请日 2010. 07. 23

(73) 专利权人 中国检验检疫科学研究院

地址 100123 北京市朝阳区高碑店北路甲 3 号

(72) 发明人 王静 杨永莉 杨宇 孙肖红
张晓龙 景滢滢

(74) 专利代理机构 北京中创阳光知识产权代理有限公司 11003

代理人 尹振启

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

王静等. 定量检测 SARS-CoV N 蛋白的悬浮芯片方法研究. 《检验检疫学刊》. 2009, 第 19 卷 (第 3 期), 1-4.

丁艳丽等. 编码微球悬浮芯片与改良 ELISA 鼠疫杆菌检测方法的比较研究. 《中国国境卫生检疫杂志》. 2006, 第 29 卷 35-37.

文海燕等. 五种生物恐怖细菌基因悬浮芯片多重检测方法的建立. 《四川大学学报》. 2009, 第 40 卷 (第 2 期), 325-329.

审查员 李保安

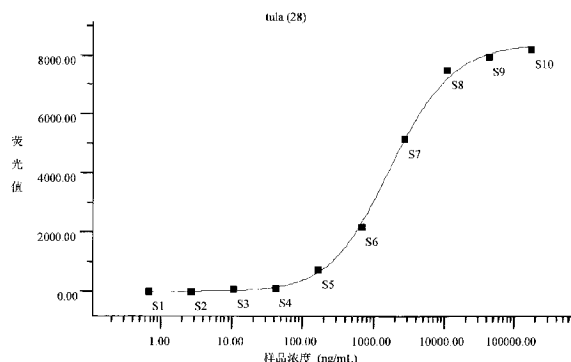
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

一种检测血清样本中土拉抗体的蛋白悬浮芯片及其制备方法和使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种检测血清样本中土拉抗体的蛋白质悬浮芯片及其制备方法和使用方法。本发明的方法检测能力好、灵敏度高、特异性强、动态范围宽,并建立了以土拉抗体为代表的细菌性抗体蛋白悬浮芯片检测的开放性检测模式化平台。



1. 一种检测血清样本中土拉抗体的蛋白悬浮芯片,其特征在于,该芯片包括:编码微球,作为包被编码微球抗原的土拉 fopA 蛋白,生物素标记的二抗和 SPA 作为捕获抗体,链亲和素-藻红蛋白和相关缓冲溶液。

2. 一种检测土拉抗体的蛋白悬浮芯片的制备方法,其特征在于,该方法具体为:在相关缓冲溶液中,编码微球用土拉 fopA 蛋白抗原包被,用生物素标记的二抗为羊抗兔 IgG 或/和 Biotin-SPA,用链亲和素-藻红蛋白作为信号检测物。

3. 一种采用蛋白悬浮芯片检测血清样本中土拉抗体的间接免疫学检测方法,其特征在于,该方法包括下列步骤:

- 1) 将土拉 fopA 蛋白抗原作为捕获抗原来包被编码微球;
- 2) 向检测载体内加入含已包被捕获抗原编码微球的工作溶液,用清洗液清洗;
- 3) 加入待测血清样品,孵育后清洗;
- 4) 加入用生物素标记的二抗,孵育后清洗;
- 5) 加入链亲和素-藻红蛋白,孵育后清洗;
- 6) 加入检测缓冲液后混合均匀;
- 7) 用悬浮芯片系统读取平均荧光强度数值并分析数据判定检测结果。

4. 如权利要求 4 所述的检测方法,其特征在于,采用生物素标记的 SPA 作为检测物,并且其与土拉 fopA 蛋白组合组成间接法检测体系。

5. 如权利要求 4 所述的检测方法,其特征在于,所述步骤 1) 中包被所述编码微球的土拉 fopA 蛋白抗原用量为 $0.01 \sim 50 \mu\text{g}/1.25 \times 10^6$ 个编码微球或 $0.002 \sim 200\text{ng}/2500 \sim 5000$ /测试。

6. 如权利要求 4 所述的检测方法,其特征在于,所述步骤 4) 中二抗为羊抗兔 IgG 或/和 Biotin-SPA。

7. 如权利要求 7 所述的检测方法,其特征在于,标记所述羊抗兔 IgG 或/和 Biotin-SPA 的生物素为羧基活性的生物素。

8. 如权利要求 4 所述的检测方法,其特征在于,所述步骤 4) 中采用 2mg/mL 生物素化的二抗 Bioin-SPA 以 $1:2500$ 稀释作为检测物进行检测。

9. 如权利要求 4 所述的检测方法,其特征在于,所述检测载体为 96 孔滤板或者微量离心管,所述检测步骤中全部反应在 96 孔滤板的孔或者微量离心管内进行。

10. 一种采用蛋白悬浮芯片定量检测血清样本中土拉抗体的方法,其特征在于,该方法包括下列步骤:

- 1) 加入的阳性检测样品或标准品经梯度倍比稀释;
- 2) 将系列稀释样品在悬浮芯片系统中检测读取对应荧光值;
- 3) 制作样品浓度对应荧光值的剂量-反应曲线;
- 4) 用分析软件拟合剂量-反应曲线和方程;

5) 根据剂量-反应曲线判定动态检测范围,根据剂量-反应方程判断检测样品中土拉抗体的浓度。

11. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述步骤 1) 中梯度倍比稀释为 4 倍。

12. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述步骤 1) 中加入的阳性检测样品为兔抗土拉抗体。

13. 如权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述步骤 2) 中采用 2mg/mL 生物素化的检测抗体 Bio- 羊抗兔抗体以 1 : 500 稀释作为捕获抗体进行检测。

一种检测血清样本中土拉抗体的蛋白悬浮芯片及其制备方法和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测血清样本中土拉抗体的蛋白悬浮芯片及其制备方法和使用方法。

背景技术

[0002] 土拉菌病 (tularemia) 是由土拉弗朗西斯菌 (*Francisella tularensis*) 引起的多种野生动物、家畜及人共患病, 亦称野兔热。临床上以体温升高、淋巴结肿大、脾和其他内脏坏死为特征, 土拉菌可以被用作生物战中的致病病菌, 感染者会出现高烧、浑身疼痛、腺体肿大和咽食困难等症状。

[0003] 免疫学方法酶联免疫实验 (ELISA) 中利用抗原与抗体特异性反应来检测抗原或抗体主要有由双抗原夹心测抗体、双抗体夹心测抗原、竞争法、间接法等。间接法测抗体的原理是特异性抗原结合到固相载体上, 然后和待检血清中的相应抗体结合形成免疫复合物, 洗涤后再加酶标记二抗与免疫复合物中的抗体结合形成酶标记二抗 - 抗体 - 固相抗原复合物, 加底物显色, 判断抗体含量。

[0004] 悬浮芯片 (suspension array) 也称液相芯片, 是 20 世纪 70 年代美国 Luminex 公司研制出的新一代生物芯片技术, 利用带编码的微球体作为载体, 流式细胞仪作为检测平台, 对核酸、蛋白质等生物分子进行大规模测定。目前, 该技术已广泛应用于免疫分析、核酸研究、酶学分析、抗体筛选及受体与配体的识别分析等领域。

[0005] 目前发展的悬浮芯片主要是基于实验室检测方法的建立和方法评价及优化, 以缩短检测时间, 降低方法的检测成本。但是悬浮芯片方法是否能够检测人血清中的土拉抗体, 其定量检测能力如何, 尚缺乏模型和评价。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种检测血清样本中土拉抗体的蛋白悬浮芯片, 该芯片包括: 编码微球, 作为包被编码微球抗原的土拉 fopA 蛋白、生物素标记的二抗和 SPA 作为捕获抗体, 链亲和素 - 藻红蛋白 (SA-PE) 及相关缓冲溶液。

[0007] 本发明提供上述检测土拉抗体的蛋白悬浮芯片的制备方法, 该方法具体为: 在相关缓冲溶液中, 编码微球用土拉 fopA 蛋白抗原包被、用生物素标记的二抗为羊抗兔 IgG 或 / 和 Biotin-SPA、用链亲和素 - 藻红蛋白 (SA-PE) 作为信号检测物, 所述编码微球优选 028 号编码微球。

[0008] 本发明提供一种采用上述蛋白悬浮芯片检测血清样本中土拉抗体的间接免疫学检测方法, 该方法采用间接法检测抗体的免疫学检测原理, 在检测过程中所有反应可在 96 孔滤板上或在微量离心管中进行, 其中包括下列步骤: (1) 将土拉 fopA 蛋白抗原作为捕获抗原来包被编码微球; (2) 每孔或管中加入含有已包被捕获抗原, 即土拉 fopA 蛋白抗原的编码微球的工作溶液, 用清洗液清洗; (3) 加入待测血清样品, 孵育后清洗; (4) 加入用生物

素化的二抗, 孵育后清洗; (5) 加入链亲和素-藻红蛋白 (SA-PE), 孵育后清洗, (6) 加入检测缓冲液后混匀, (7) 用悬浮芯片系统读取 MFI 数值 (即平均荧光强度) 并分析数据判定检测结果阴性或阳性。

[0009] 该方法中, 采用生物素标记的 SPA 作为捕获抗体, 并且其与土拉 fopA 蛋白组合组成间接法检测体系; 包被编码微球的捕获抗原土拉 fopA 蛋白抗原用量为 $0.01 \sim 50 \mu\text{g}/1.25 \times 10^6$ 个编码微球或 $0.002 \sim 200\text{ng}/2500 \sim 5000$ 个微球 / 测试, 标记检测抗体羊抗兔 IgG 的生物素为羧基活性的生物素, $2\text{mg}/\text{mL}$ 生物素化的检测二抗 Bioin-SPA 以 $1 : 2500$ 稀释作为检测物进行检测。

[0010] 本发明还提供一种采用上述蛋白悬浮芯片定量检测血清样品中土拉抗体的方法, 该方法包括下列步骤: (1) 加入的阳性检测样品或标准品经 4 倍梯度倍比系列稀释, (2) 将系列稀释样品在悬浮芯片系统中检测读取对应荧光值 (MFI); (3) 制作样品浓度对应 MFI 值的剂量-反应标准曲线, (4) 用分析软件拟合剂量-反应曲线和方程, (5) 根据剂量-反应曲线可判定方法的动态检测范围, 未知浓度样品可根据剂量-反应方程判断检测样品的浓度。

[0011] 悬浮芯片的基本原理是利用聚苯乙烯 (polystyrene) 所制作的微球, 包覆不同比例的红光及红外光发色剂, 而产生 100 种不同比例颜色, 作为 100 种独特的色彩编号, 每颗微球大小约 $5.6 \mu\text{m}$, 可依不同研究目的如免疫分析、核酸研究、酶分析、受体和配体识别分析等, 并根据不同研究目的而标定特定抗体、核酸探针及各种受体探针。其在以下悬浮芯片系统中完成检测, 标记探针的微球与待测物在 96 孔板中进行反应, 反应后, 利用机器自动将反应液吸起并通过一微细管检测通道, 每次仅允许一个微球通过检测通道。检测通道中设有两道激光, 一道为红色, 激发微球基质中的颜色, 识别微球分类编码以确定检测项目; 一道为绿色, 激发报告分子的颜色, 记录信号强弱以检测待测物的含量。当待测样本与特定微球的探针吸附在一起时, 两道激光所激发的光都可被检测到。而若样本中不含该标的物, 则仅有微球中的激发光可被检测到。再通过机器与计算机自动统计分析两道激光所激发的微球种类与数量, 从而判定待测样本中有几种测试目标物在其中, 得知测试样本中有无待测病原存在, 或同时存在有几种至数十种病原。悬浮芯片技术由于利用微球在溶液中反应, 克服了片膜芯片在大分子检测时受表面张力、空间效应等对反应动力学的影响, 同时利用激光检测技术, 大大提高了样品检测的准确性和重复性, 具有优于片膜芯片的操作简便、重复性好等特点。

[0012] 本发明人经过大量试验和深入的研究, 对土拉抗体的蛋白悬浮芯片制备及其检测条件作了实质性的改进和创新, 其具有下列优点:

[0013] 1、抗原包被量的改进

[0014] 土拉 fopA 蛋白抗原的包被量是成功检测的关键, 本发明对包被微球的抗原包被量进行实质性优化使血清样本的检测效果非常良好, 并且包被悬浮芯片所需的抗原包被量很低, 本发明的抗原包被量为 $0.01 \sim 50 \mu\text{g}/1.25 \times 10^6$ 个微球, 即 $0.002 \sim 200\text{ng}/2500 \sim 5000$ 个微球 / 测试, 而传统免疫学 ELISA 方法的包被量为 $1 \mu\text{g}/\text{测试}$ 。

[0015] 2、生物素标记的改进

[0016] 通常, 标记抗体需要使用过量的生物素。理论上讲, 在检测过程中, 过量的生物素因未标记上抗体而不被微球上结合捕获抗体的抗体连接, 清洗时被抽滤掉, 不会与随后加

入的 SA-PE 反应,不影响检测。但在实际检测过程中,偶尔遇到过检测信号可能过高的现象,出现假阳性,因此建议生物素标记抗体后,尽量去除多余的生物素。以标记 2mg/mL 的 IgG(分子量 150,000)1mL 溶液为例,需加入 10mM 生物素溶液约 27 μ L。

[0017] 3、检测的灵敏度及动态范围

[0018] 本发明的血清样品土拉抗体的蛋白质悬浮芯片定量检测方法经典的免疫学 ELISA 检测方法相比,结果有着很好的吻合性(相关系数 $R^2 = 0.9826$)。同时,悬浮芯片方法检测灵敏度为 2.28ng/mL,其高于 ELISA 方法的检测灵敏度为 690.6ng/mL,灵敏度增高 100 倍以上;并且悬浮芯片方法动态检测范围为 2.69ng/mL $\sim$ 44200ng/mL,其高于 ELISA 方法动态检测范围(即 690ng/mL $\sim$ 44200ng/mL)2 个数量级。

[0019] 4、方法的特异性

[0020] 本发明通过选用土拉 fopA 蛋白为包被抗原,以兔抗土拉抗体为待测抗体,以生物素化的羊抗兔为捕获抗体。本研究试验证明,在存在鼠抗登革热 IgG、兔抗禽流感 H5 血清、兔抗西尼罗多克隆抗体、兔抗登革热 NS3 抗体等干扰抗体存在的条件下,本方法具有良好的特异性。

[0021] 5、样品的检测能力

[0022] 本发明评价了悬浮芯片方法对人血清的检测能力。通过对人血清的检测,初步证实了该方法在检测人血清中土拉抗体的实用性。

附图说明

[0023] 图 1 为 028 号微球包被土拉 fopA 蛋白检测土拉抗体示意图;

[0024] 图 2 为蛋白悬浮芯片方法检测兔抗土拉抗体剂量-反应标准曲线图;

[0025] 图 3 为 ELISA 方法检测兔抗土拉抗体标准曲线图;

[0026] 图 4 为蛋白悬浮芯片与 ELISA 方法检测兔抗土拉抗体的相关性。

具体实施方式

[0027] 如图 1 至图 4 所示,本发明涉及的检测土拉抗体的蛋白悬浮芯片制备方法、检测及定量方法通过下面的具体实施方式作进一步说明,但本发明不以任何方式受该实施例的限制。

[0028] 一、材料

[0029] 1. 蛋白悬浮芯片的相关缓冲液:

[0030] (1)PBS 缓冲液 (pH7.4):NaCl 137mmol/L;KCl 2.7mmol/L;Na₂HPO₄10mmol/L;KH₂PO₄2mmol/L。用 800mL 蒸馏水溶解 8gNaCl,0.2gKCl,1.44g Na₂HPO₄ 和 0.24g KH₂PO₄。用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4,加水至 1L。分装后在 15psi (1.05kg/cm²) 高压蒸汽 20 分钟,或过滤除菌,保存于室温。

[0031] (2)微球清洗液:PBS (pH7.4),0.05% TWEEN-20。

[0032] (3)微球活化缓冲液 100mM NaH₂PO₄:3g NaH₂PO₄,5N NaOH 1.5mL,定容于 250mL,pH 6.2。

[0033] (4)微球包被缓冲液 0.05M MES, pH 5.0:2.44g MES,5N NaOH0.15mL,定容于 250mL。

- [0034] (5) 微球保存液 PBS-TBN :PBS, 0.1% BSA, 0.02% TWEEN, 0.05% 叠氮化物, pH 7.4。
- [0035] (6) 微球封闭液 PBS-BN :PBS, 1% BSA, 0.05% 叠氮化物, pH7.4。
- [0036] (7) 检测缓冲液 :PBS, 1% BSA, pH7.4。
- [0037] (8) 抗体稀释液 PBS, pH7.4。
- [0038] (9) 微球稀释液 :PBS, 1% BSA, pH7.4。
- [0039] (10) 样品稀释液 PVX :PBS, 0.5% PVA, 0.8% PVP ;
- [0040] (11) 生物素化检测物稀释液 :PBS-TBN (PBS, 0.1% BSA, 0.02% TWEEN-20, 0.05% NaN₃, pH7.4)。

[0041] (12) SA-PE 稀释液 :PBS (pH7.4), 1% BSA。

[0042] 2. 抗原与抗体

[0043] 本发明所使用的抗原为土拉 fopA 蛋白, 可购自中国检验检疫科学研究院。

[0044] 本发明所使用检测抗体为兔抗土拉 IgG, 可购自中国检验检疫科学研究院, 检测二抗为生物素化羊抗兔 IgG 和生物素化 SPA, 所述的羊抗兔 IgG 可购自北京鼎国生物技术公司、SPA 可购自 Sigma 公司。

[0045] 二、待测样品的制备

[0046] 1、目标分析物样品的制备

[0047] 目标分析物为兔抗土拉 IgG, 干扰样品或作为方法特异性测试的样品是目标检测物外的其它抗体或其它蛋白质, 包括鼠抗登革热 IgG、兔抗禽流感 H5 血清、兔抗登革热 NS3 抗体、BSA、酪蛋白、胰蛋白胨等。将上述待分析样品均溶于样品稀释液中, -4℃ 保存。兔抗土拉 IgG 的储备液浓度为 0.1768mg/mL。比较实验中, 相同样品用于 ELISA 和悬浮芯片的检测。

[0048] 将待分析的兔抗土拉 IgG 用样品稀释液以 4 倍倍比系列稀释为不同浓度样品, 以绘制样品检测剂量 - 反应的标准曲线, 其中几个样品浓度低于检测的敏感度, 高浓度样品应使编码微球的结合位点处于饱和状态。

[0049] 2、人血清样本的处理

[0050] 将人血清样本用样品稀释液 1 : 10 稀释, 例如人血清样本 5 μL 加样品稀释液 50 μL 混匀后, 作为待检样品进行悬浮芯片方法的检测。

[0051] 实施例 1、检测土拉抗体的蛋白悬浮芯片的制备

[0052] 1、捕获抗原包被编码微球

[0053] 本发明采用的 028 号编码微球购自美国 Bio-Rad 公司, 编码微球用于标记可以捕获土拉抗体的土拉 fopA 蛋白抗原, 即利用土拉 fopA 蛋白包被微球。

[0054] A、编码微球的活化

[0055] 取 100 μL (1.25 × 10⁶ 个) 编码微球到 1.5mL 离心管中, 14000 × g 离心, 小心吸出并弃去上清液。加入 100 μL 的微球清洗缓冲液悬浮, 震荡并超声后 14000 × g 离心, 小心吸出并弃去上清液。加入 100 μL 的微球活化缓冲液, 接着先加入 10 μL 新鲜配置的 EDC (50mg/mL), 再加入 10 μL 新鲜配置的 50mg/mL 的 Sulfo-NHS, 高速震荡 30 秒后用铝箔包裹, 在室温震荡 20 分钟。加入 150 μL 的 PBS (pH7.4), 震荡后, 14000 × g 离心, 小心吸出并弃去上清液。加入 100 μL 的 PBS (pH7.4) 悬浮编码微球。

[0056] B、用抗原包被编码微球

[0057] 取捕获抗原即土拉 fopA 蛋白抗原 0.01 ~ 50 μ g 加入到活化后的编码微球中,用 PBS 缓冲液定容至 500 μ L,室温震荡 2 小时。14000 $\times$ g 离心,小心吸出并弃去上清液。用 500 μ L 的 PBS 缓冲液洗一次,14000 $\times$ g 离心,小心吸出并弃去上清液。加入 250 μ L 的封闭缓冲液悬浮编码微球,在室温震荡 30 分钟,14000 $\times$ g 离心,小心吸出并弃去上清液。加入 500 μ L 的微球保存液洗涤编码微球,16000 $\times$ g 离心,小心吸出并弃去上清液。最后用 150 μ L 的微球保存液悬浮编码微球,于 4 $^{\circ}$ C 避光保存备用。

[0058] C、包被微球的计数

[0059] 吸取适量微球,稀释后,用血球计数板 (0.10mm ;1/400mm²) 在普通显微镜下计数。根据公式 (每个大格数 $\times 10^4 \times$ 稀释倍数 $\times$ 体积 (mL)) 计算微球数量。

[0060] 2、检测物标记生物素

[0061] A、生物素的标记

[0062] 分别配制好浓度为 10mM 生物素溶液和 2mg/mL 的待标记抗体溶液,将计算好体积的生物素加入到待标记物溶液中,在室温震荡 30 分钟 (或冰上 2 小时),过柱脱盐后分装, -20 $^{\circ}$ C 冻存储备用。

[0063] B、抗体的用量

[0064] 以标记 2mg/mL 的 IgG (分子量 150,000) 1mL 溶液为例,需加入 10mM 生物素溶液约 27 μ L。

[0065] 实施例 2、悬浮芯片制备法条件的优化

[0066] 1、微球包被抗原包被量的选择

[0067] 分别以 1 μ g、2.5 μ g、5 μ g、7.5 μ g、10 μ g、12.5 μ g、15 μ g、20 μ g、25 μ g 的量包被 100 μ L 编码为 028 号的微球。经检测效果比较 1 ~ 25 μ g/1.25 $\times 10^6$ 个编码微球或 0.2 ~ 100ng/2500 ~ 5000 个微球 / 测试包被效果好,显微镜下计数后避光冷藏保存待用。如图 1 所示,包被土拉 fopA 蛋白抗原的 028 号微球均落在其正确检测区域内,并且获得高信噪比结果 (MFI 值远大于 2000),说明优化的悬浮芯片检测系统可成功用于土拉抗体的检测。

[0068] 2、生物素化检测物的优化

[0069] 本发明分别用氨基活性的生物素,例如 LC- 酰肼 (hydrazide)- 生物素和羧基活性的生物素,例如 Sulfo-NHS- 生物素和 SH- 活性的生物素标记检测抗体,经质控过程检测效果比较,本实验中 Sulfo-NHS- 生物素标记检测物检测效果较好,检测方法采用本领域的常规方法或按照制造商的产品说明书所述的方法。

[0070] 本发明人经过试验验证,发现 2mg/mL 生物素化的抗体羊抗兔以 1 : 500 稀释作为检测物进行检测兔血清中的土拉抗体,检测结果显示生物素化检测物 Bio- 羊抗兔抗体可获得高检测值和低背景值的检测效果;2mg/mL 生物素化的检测物 Biotin-SPA 以 1 : 2500 稀释作为检测人血清中土拉抗体的检测物,检测结果显示生物素化检测物 Biotin-SPA 可获得高检测值和低背景值的检测效果。

[0071] 实施例 3、悬浮芯片样品制备、检测及结果判定

[0072] 1、待测样品制备

[0073] 用样品稀释液将待测样本配置为不同浓度样本进行蛋白悬浮芯片检测。

[0074] 2、样品的检测及结果判定

[0075] 检测过程全部反应均在 96 孔滤板上进行,检测过程如下:

- [0076] 1) 每孔加入 50 μ L 含相应编码微球的工作溶液,用清洗液洗涤并用真空泵抽滤;
- [0077] 2) 加入 50 μ L 检测样品,混匀后室温避光震荡 30 分钟,用清洗液洗涤并抽滤;
- [0078] 3) 加入 50 μ L 适当浓度的用检测物稀释液稀释后的生物素化检测物,混匀后室温避光震荡 30 分钟,洗液洗涤并真空泵抽滤;
- [0079] 4) 加入 50 μ L 的 SA-PE,混匀后室温避光震荡 10 分钟。洗液洗涤并真空泵抽滤;
- [0080] 5) 加入 125 μ L 的检测缓冲液,经涡旋重悬混匀;
- [0081] 6) 用悬浮芯片系统读取 MFI 数值并分析数据。

[0082] 3、检测结果判定

[0083] 根据试验研究结果与相关研究报道,本发明定义蛋白质悬浮芯片方法检测土拉抗体的最低检出限 (LOD 值) 为检测荧光强度临界值 (Cutoff) 对应的检测物浓度。其中, Cutoff 的定义是采用空白对照样品 (Blank) 荧光检测信号 MFI 均值加 3 倍标准差 (SD), 即 Cutoff 值为 = MFI (空白对照) + 3 倍标准差。若检测结果高于 LOD 对应荧光强度值则判定为土拉抗体检测结果阳性;若检测结果低于 LOD 对应荧光强度值则判定为土拉抗体检测结果阴性。

[0084] 实施例 4、悬浮芯片对土拉蛋白抗原特异性检测

[0085] 应用悬浮芯片检测方法分别对兔抗土拉 IgG、鼠抗登革热 IgG、兔抗禽流感 H5 血清、兔抗土拉 FopA 多克隆抗体、兔抗登革热 NS3 抗体、BSA、酪蛋白、胰蛋白胍等进行检测,根据实施例 3 中检测结果判定标准,仅兔抗土拉 IgG 为阳性,其余干扰抗体或蛋白均为阴性。说明本发明所建立的土拉抗体的悬浮芯片检测方法与其它测试抗体均不发生交叉反应或非特异反应。

[0086] 实施例 5、悬浮芯片定量检测模型的建立

[0087] 1、兔抗土拉 IgG 标准曲线样品制备

[0088] 用样品稀释液将兔抗土拉 IgG 标准品由浓度为 0.1768mg/mL 以 4 倍倍比梯度稀释至浓度为 0.6744ng/mL 成系列浓度样品。

[0089] 2、剂量 - 反应标准曲线的绘制

[0090] 按照实施例 3 中的检测方法检测上述系列浓度样品,并根据悬浮芯片系统检测结果绘制剂量 - 反应标准曲线 (如图 2 所示)。其中, X 轴代表滴度, Y 轴代表悬浮芯片仪检测的荧光值 (MFI)。每个数据代表 3 次的检测结果平均值,坐标轴以对数 - 对数关系设定,图 2 中兔抗土拉抗体的浓度分别为: S1 : 0.6744ng/mL, S2 : 2.6977ng/mL, S3 : 10.7910ng/mL, S4 : 43.164ng/mL, S5 : 172.6563ng/mL, S6 : 690.625ng/mL, S7 : 2762.5ng/mL, S8 : 11050ng/mL, S9 : 44200ng/mL, S10 : 176800ng/mL。

[0091] 悬浮芯片系统根据检测结果拟合兔抗土拉 IgG 剂量 - 反应标准曲线方程: $FI = 0.287177 + (8408.98 - 0.287177) / [1 + (\text{Conc} / 1173.81)^{-0.935296}]^{1.3258}$

[0092] 3、悬浮芯片检测兔抗土拉 IgG 的灵敏度和动态范围

[0093] 根据最低检出限定义和剂量 - 反应标准曲线方程,本发明即蛋白悬浮芯片方法检测兔抗土拉 IgG 的灵敏度为: 2.28ng/mL (Cutoff = 3.56, MFI (空白对照) = 2.5, 标准差 = 1.0606)。

[0094] 本发明定义最高检出限为使编码微球的结合位点处于饱和状态的检测物浓度。根据标准曲线随着兔抗土拉 IgG 浓度的升高,其对应的 MFI 值也随之递增,当兔抗土拉 IgG 浓

度超过 44200ng/mL 时,抗原抗体的免疫反应达到饱和状态,MFI 值开始进入平台期,说明样品中的待检物浓度过高,需要将样品稀释后再检测。

[0095] 因此,根据最低检出限与最高检出限可以判定本发明即悬浮芯片定量检测兔抗土拉 IgG 的动态范围为 2.69ng/mL ~ 44200ng/mL。

[0096] 实施例 6、蛋白悬浮芯片方法与 ELISA 方法检测土拉血清的比较

[0097] 1、生物素-亲和素 ELISA (BAS-ELISA) 检测方法

[0098] 作为对比,生物素-亲和素 ELISA 采用包括下列步骤:1) 向普通 ELISA 微孔板每孔加入 50 μ L 用 PBS 缓冲液稀释的土拉 fopA 蛋白 3-50 μ g 4 $^{\circ}$ C 静止过夜;

[0099] 2) 加入封闭液,在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2 小时;

[0100] 3) 洗液洗 3 次,拍干;

[0101] 4) 加入检测样品,每孔 50 μ L,室温放置 40 分钟;洗液洗 3 次,拍干;

[0102] 5) 加入适量生物素化检测物,每孔 50 μ L,室温放置 30 分钟;洗液洗 3 次,拍干;

[0103] 6) 加入适量 SA/HRP (辣根酶标记链霉亲和素),50 μ L/孔,室温放置 3 分钟;洗液洗 3 次,拍干;

[0104] 7) 加入 TMB 显色液 (可溶型单组分 TMB 底物溶液) 显色,50 μ L/孔,室温放置 10 分钟;

[0105] 8) 用 2M H_2SO_4 终止反应;

[0106] 9) 应用酶标仪测读 A450nm 数值。

[0107] 2、样品的悬浮芯片检测方法

[0108] 采用间接法测抗体的免疫学检测模式,检测过程中全部反应均在 96 孔滤板上进行。

[0109] 1) 每孔加入 50 μ L 含相应编码微球的工作溶液,洗液洗涤并用真空泵抽滤 2 次;

[0110] 2) 加入 50 μ L 检测样品,混匀后室温避光震荡 30 分钟,用清洗液洗涤并抽滤 3 次;

[0111] 3) 加入 50 μ L 适当浓度的用抗体稀释液稀释后的生物素化抗体,混匀后室温避光震荡 30 分钟,洗液洗涤并真空泵抽滤 3 次;

[0112] 4) 加入 50 μ L 的 SA-PE,混匀后室温避光震荡 10 分钟。用清洗液洗涤并真空泵抽滤 3 次;

[0113] 5) 加入 125 μ L 的检测缓冲液,经涡旋重悬混匀;

[0114] 6) 用 Bio-Plex 悬浮芯片系统读取 MFI 数值并分析数据。

[0115] 3、两种检测方法的灵敏度和动态范围及相关性的比较

[0116] 制备的相同一组兔抗土拉抗体样品用样品稀释液 4 倍比稀释同时应用悬浮芯片和 ELISA 方法进行检测。绘制 ELISA 方法检测兔抗土拉抗体的标准曲线 (图中横坐标为样品浓度,纵坐标为吸光度值,坐标轴取对数-对数关系),并与悬浮芯片方法结果进行比较。

[0117] 根据两种方法标准曲线:悬浮芯片方法如图 2 所示,灵敏度为 2.28ng/mL,线性检测范围 2.69ng/mL ~ 44200ng/mL;ELISA 方法如图 3 所示,灵敏度为 690ng/mL (血清滴度),线性检测范围 690ng/mL ~ 44200ng/mL。可以得出结论:检测相同兔抗土拉血清样品,蛋白悬浮芯片方法比 ELISA 方法具有更高的检测灵敏度,即高 100 倍;并且具有更宽的动态检测范围,即高 2 个数量级。

[0118] 另外,将两种方法检测结果在 0.6744ng/mL ~ 176800ng/mL 范围内进行比较,可以

判定蛋白悬浮芯片方法与 ELISA 方法有良好的相关性,相关系数为 0.9826。

[0119] 实施例 7、人血清样品的检测

[0120] 1、人血清样品的准备

[0121] 将人血清用样品稀释液 1 : 10 稀释 (人血清样本 5 μ L 加样品稀释液 50 μ L 混匀) 后用于蛋白悬浮芯片检测。

[0122] 2、人血清样品的检测

[0123] 1) 每孔加入 50 μ L 含相应编码微球的工作溶液,用清洗液洗涤并用真空泵抽滤;

[0124] 2) 加入 50 μ L 待检测人血清样品,混匀后室温避光震荡 30 分钟,用清洗液洗涤并抽滤;

[0125] 3) 加入 50 μ L 适当浓度的用抗体稀释液稀释后的生物素化 SPA,混匀后室温避光震荡 30 分钟,洗液洗涤并真空泵抽滤;

[0126] 4) 加入 50 μ L 的 SA-PE,混匀后室温避光震荡 10 分钟。洗液洗涤并真空泵抽滤;

[0127] 5) 加入 125 μ L 的检测缓冲液,经涡旋重悬混匀;

[0128] 6) 用悬浮芯片系统读取 MFI 数值,根据标准曲线,确定待检测人血清中土拉抗体的浓度。

[0129] 经过多次重复试验,生物素化 SPA 稀释比例选用 1 : 2500 稀释,SA-PE 稀释比例选用 1 : 300 稀释,经过对 94 份人血清的检测,所得的 MFI 值的均值与其标准差的 3 倍之和为作为判断阴阳性的界值,即 Cutoff 值为 719.65,检测得到的 MFI 值如果大于 719.65,即血清中的土拉浓度过高,可视为土拉抗体阳性可能被土拉菌感染,如果 MFI 值小于 719.65,即血清中的土拉抗体浓度低正常值可判断为土拉抗体阴性,未感染土拉菌或隐性携带者。

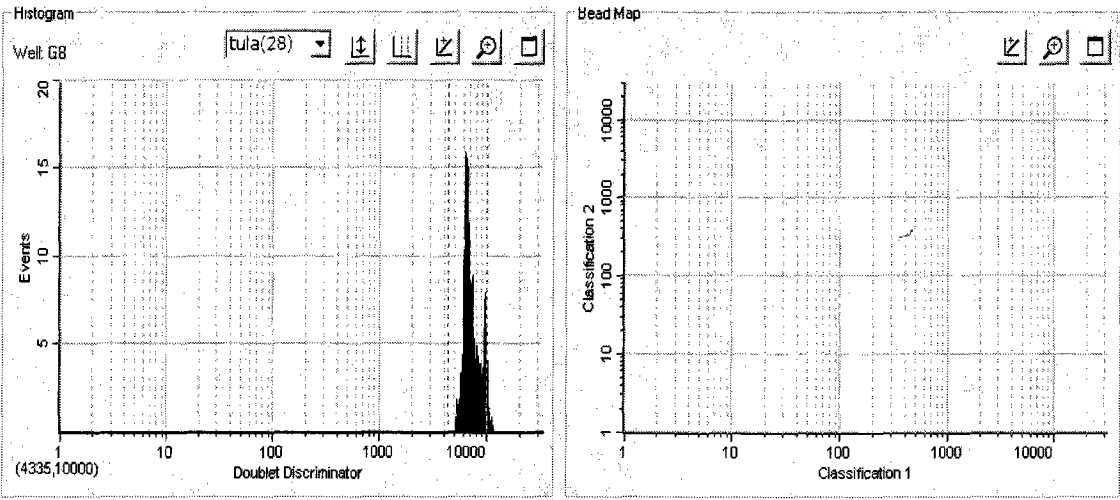


图 1

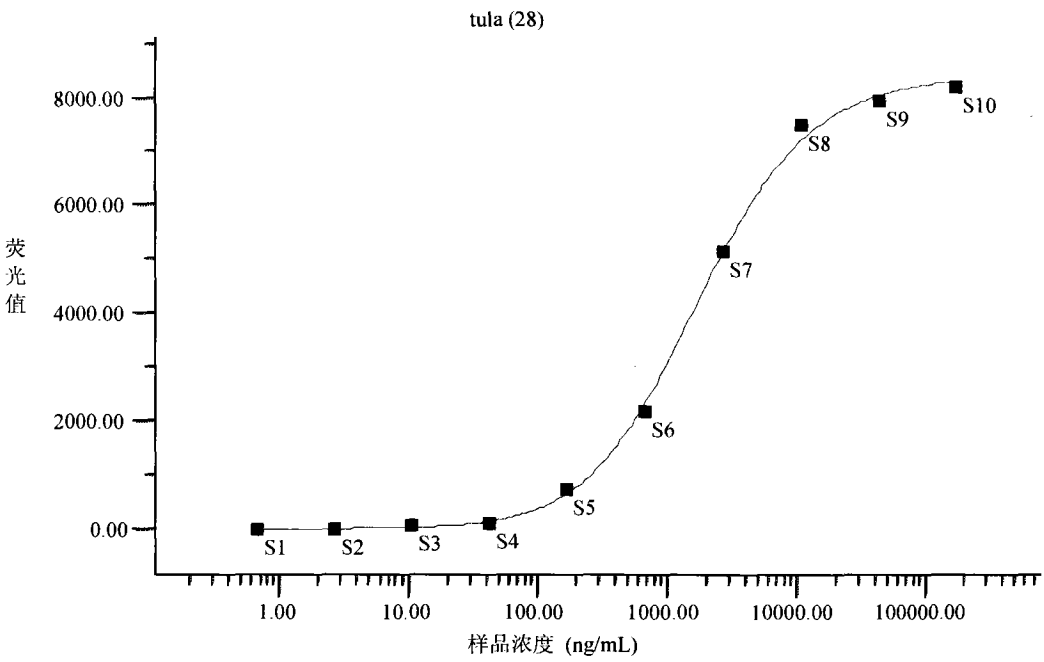


图 2

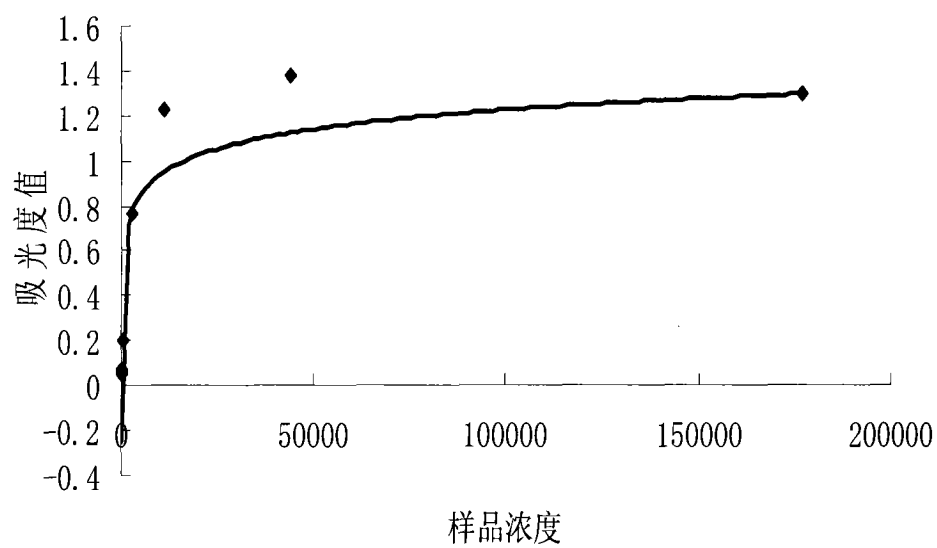


图 3

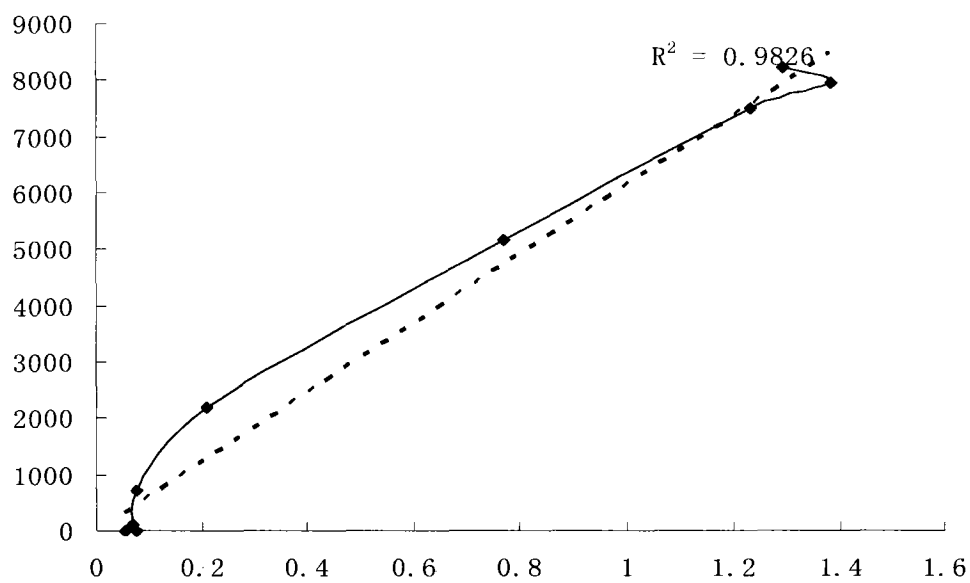


图 4

专利名称(译)	一种检测血清样本中土拉抗体的蛋白悬浮芯片及其制备方法和使用方法		
公开(公告)号	CN101963616B	公开(公告)日	2014-01-29
申请号	CN201010235696.8	申请日	2010-07-23
申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国检验检疫科学研究院		
[标]发明人	王静 杨永莉 杨宇 孙肖红 张晓龙 景滢滢		
发明人	王静 杨永莉 杨宇 孙肖红 张晓龙 景滢滢		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
审查员(译)	李保安		
其他公开文献	CN101963616A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测血清样本中土拉抗体的蛋白质悬浮芯片及其制备方法和使用方法。本发明的方法检测能力好、灵敏度高、特异性强、动态范围宽，并建立了以土拉抗体为代表的细菌性抗体蛋白悬浮芯片检测的开放性检测模式化平台。

