

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/543

G01N 33/569



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03118528.2

[43] 公开日 2003 年 8 月 6 日

[11] 公开号 CN 1434297A

[22] 申请日 2003.1.24 [21] 申请号 03118528.2

[71] 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山

[72] 发明人 周俊 杨占秋 徐连根 肖红
文莉

[74] 专利代理机构 武汉科宏专利事务所

代理人 王敏锋

权利要求书 1 页 说明书 7 页

[54] 发明名称 一种快速检测风疹病毒抗体的酶免疫学方法

[57] 摘要

本发明公开了一种快速检测风疹病毒抗体的酶免疫学方法，主要是利用 PEG 可以加快抗原抗体反应，从而缩短常规 ELISA 的反应时间。首先将可溶性抗原包被于酶标板中；其次是配制 PH9.6 的 PBS 洗液和含 PEG 的样本稀释液；第三是将待测血清及阳性对照和阴性对照血清用含 PEG 的样本稀释液稀释；第四将稀释好的血清加入前述酶标板孔中温育；第五是甩去酶标板孔内的抗原溶液，用 PBS 洗液洗涤；第六是将已知的酶标记抗体用含 PEG 的稀释液稀释；第七是酶标板孔中加入稀释好的酶标记抗体温育；第八是取出酶标板，用 PBS 洗涤；最后加底物显色。本发明操作简便，敏感性特异性高，检测时间短，费用低。主要用于孕期风疹病毒感染的快速检测和流行病学调查。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种快速检测风疹病毒抗体的酶免疫学方法，配制碳酸盐缓冲液，将 1.59 克碳酸钠和 2.93 克碳酸氢钠溶于 1000 毫升双蒸水中、风疹可溶性抗原用碳酸盐缓冲液以 1: 200 或 1: 400 或 1: 800 稀释后包被于 96 孔聚苯乙烯反应板，每孔加 100 微升，在 4℃ 孵育过夜或 37℃ 温育 2~4 小时，其特征在于：

A、配制 pH 值 9.6 的磷酸盐缓冲液，将 4.8 克磷酸氢二钠加热溶解于适量双蒸水中，再加入 4.3 克磷酸二氢钾和 68 克氯化钠，搅拌混匀后，补足溶液总量至 1000 毫升；

B、取上述磷酸盐缓冲液 500ml，加入 50 微升的吐温-20，配成含 1/1000 吐温-20 的磷酸盐缓冲液洗液；

C、取磷酸盐缓冲液 500ml，加入 25ml 的小牛血清和 20 克的聚乙二醇 6000，配成含 4% 聚乙二醇的样本稀释液；

D、甩去酶标板孔内的抗原溶液，用上述磷酸盐缓冲液洗液洗涤 3~5 次，每次 3~5 分钟；

E、待测血清及阳性对照和阴性对照血清用含 4% 聚乙二醇的样本稀释液作 1: 200 或 1: 100 稀释后，于酶标板中每孔加入 100ul，置湿盒中 37℃ 作用 5~30 分钟，取出用磷酸盐缓冲液洗液洗涤，方法同上；

F、将辣根过氧化物酶标记的羊抗人免疫球蛋白 MIgM 用含 4% 聚乙二醇的样本稀释液作 1: 1000 或 1: 500 或 1: 2000 稀释，每孔加入 100ul，置湿盒中 37℃ 作用 5~30 分钟；

G、配制底物缓冲液，将 3.4 克乙酸钠和 5.25 克的柠檬酸加入 500ml 的双蒸水中混匀，调 pH 值至 4.8；

H、配制底物溶液，在 10ml 上述底物缓冲液中加入 100ul 1% 的四甲基乙二胺和 10ul 双氧水混匀；

I、取出酶标板，用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次，方法同上，每孔加入 100ul 该混合物，置湿盒中 37℃ 作用 5~15 分钟，在酶标仪上读取波长为 450 纳米时的吸光度值或肉眼观察结果。

一种快速检测风疹病毒抗体的酶免疫学方法

技术领域

本发明属于临床医学检测领域，更具体涉及一种改良的酶免疫学方法检测风疹病毒的方法。

背景技术

风疹病毒是导致胎儿严重畸形的两种病毒之一。妊娠妇女怀孕前四个月如果原发感染风疹病毒，无论是显性或隐性感染，均可导致流产、死胎和先天性风疹综合征。因此，风疹病毒感染的早期诊断与优生优育、提高出生人口素质极为重要。目前临床上风疹的早期诊断主要依靠血清中特异性抗体即免疫球蛋白 M (IgM) 的检测，国内广泛采用常规间接酶联免疫吸附实验(ELISA)，由于其操作繁琐，流程长，如何简化操作步骤，缩短检测时间是各学者多年来探讨的重要课题。目前研究的各种检测风疹病毒 IgM 抗体的酶免疫学方法如酶联捕获法 (EIA)、间接混合夹心酶试验 (Indirect mix enzyme immunosorbent assay, IMEIA)，虽然对传统的间接 ELISA 法在特异性、敏感性等方面作了很多改进，但普遍存在着操作繁琐、耗时长或价格高等缺点。

常规间接酶联免疫吸附实验检测风疹病毒 IgM 抗体的步骤为：

1. 配制碳酸盐缓冲液，将 1.59 克碳酸钠和 2.93 克碳酸氢钠溶于 1000 毫升 (ml) 双蒸水中。
2. 将风疹可溶性抗原用碳酸盐缓冲液作最适抗原浓度稀释（最适抗原浓度可根据棋盘滴定法确定）。
3. 用稀释的抗原致敏聚苯乙烯酶标板，每孔加 100 微升 (ul)，在 4℃ 孵育过夜。
4. 配制 pH 值 9.6 的磷酸盐缓冲液 (PBS)，将 4.8 克磷酸氢二钠加热溶解于适量双蒸水中，再加入 4.3 克磷酸二氢钾和 68 克氯化钠，搅拌混匀后，补足溶液总量至 10000 毫升。
5. 取上述 PBS 500ml，加入 50 微升的吐温-20，配成含 1/1000 吐温-20 的 PBS 洗液。

6. 取 PBS500ml, 加入 25ml 的小牛血清, 配成含 5%牛血清的 PBS 稀释液。
7. 甩去酶标板孔内的抗原溶液, 用上述 PBS 洗液洗涤 3 次, 每次 3~5 分钟。
8. 待测血清及阳性对照和阴性对照血清用上述 PBS 稀释液作 1: 200 (或 1: 100) 稀释后, 于酶标板中每孔加入 100ul, 置湿盒中 37℃作用 1 小时。取出用 PBS 洗液洗涤, 方法同上。
9. 将辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗人免疫球蛋白 MIgM 用稀释液作 1: 1500 (或 1: 2000, 1: 3000) 稀释, 每孔加入 100ul, 置湿盒中 37℃作用 1 小时。
10. 配制底物缓冲液, 将 3.4 克乙酸钠和 5.25 克的柠檬酸加入 500ml 的双蒸水中混匀, 调 pH 值至 4.8。
11. 配制底物溶液, 在 10ml 上述底物缓冲液中加入 100ul 1%的四甲基乙二胺 (TMB) 和 10ul 双氧水 (H₂O₂) 混匀。
12. 取出酶标板, 用 PBS 洗涤 3 次, 方法同上。每孔加入 100ul 该混合物, 置温盒中 37℃作用 15 分钟, 在酶标仪上读取波长为 450 纳米时的吸光度值或肉眼观察结果。判定标准以待检血清(P)与已知阴性对照血清(N) 的比值 P/N≥2.1 为阳性。

本方法除去包被抗原时间, 各步温育时间分别为 1 小时, 1 小时, 15 分钟, 总耗时达 2~3 小时, 不宜于应即检测和大规模的流行病学调查。

酶联捕获法 (EIA) 检测风疹病毒 IgM 抗体的步骤为:

1. 配制抗体包被液。
2. 将羊抗人 IgM 用包被液稀释。
3. 将羊抗人 IgM 溶液包被于酶标板, 37℃温育 2 小时。
4. 制 pH 值 9.6 的 PBS, 将 1.48 克磷酸氢二钠加热溶解于适量双蒸水中, 再加入 0.43 克磷酸二氢钾和 6.80 克氯化钠, 搅拌混匀后, 补足溶液总量至 1000 毫升。
5. 上述 PBS500ml, 加入 50 微升吐温-20, 配成含 1/1000 吐温-20 的 PBS 洗液。
6. 取 250ml 的 PBS, 加入 50ml 的牛血清, 配成 20%牛血清的 PBS 封闭液。
7. 取 PBS250ml, 加入 12.5ml 的小牛血清, 配成含 5%牛血清的样本稀释液。
8. 甩去酶标板孔内的羊抗人 IgM 溶液, 用上述 PBS 洗液洗涤 3 次, 每次 3~5 分钟。
9. 每孔加入封闭液 100ul, 室温过夜, 洗 3 次, 方法同上。
10. 每孔加入兔抗风疹病毒抗体, 37℃作用 1 小时后洗板, 方法同上。
11. 每孔加入羊抗兔 IgM 酶标抗体, 37℃作用 1 小时后洗板, 方法同上。

12. 每孔加入兔抗风疹病毒抗体, 37℃作用 1 小时后洗板, 方法同上。
13. 待测血清及阳性对照和阴性对照血清用样本稀释液作 1: 200 (或 1: 100) 稀释后, 于酶标板中每孔加入 100ul, 置湿盒中 37℃作用 1 小时。取出用 PBS 洗液洗涤, 方法同上。
13. 配制底物缓冲液, 将 3.4 克乙酸钠和 5.25 克的柠檬酸加入 500ml 的双蒸水中混匀, 调 pH 值至 4.8。
14. 配制底物溶液, 在 10ml 上述底物缓冲液中加入 100ul 1%的四甲基乙二胺 (TMB) 和 10ul 双氧水 (H₂O₂) 混匀。
15. 取出酶标板, 用 PBS 洗涤 3 次, 方法同上。每孔加入 100ul 该混合物, 置温盒中 37℃作用 15 分钟, 在酶标仪上读取波长为 450 纳米时的吸光度值或肉眼观察结果。判定标准以待检血清(P)与已知阴性对照血清(N) 的比值 P/N≥2.1 为阳性。

酶联捕获法 (EIA) 用于检测风疹病毒 IgM 抗体, 较常规间接 ELISA 法特异性明显提高, 且可以消除 ELISA 方法中可能出现的 RF 因子的影响, 但该方法敏感性较间接 ELISA 低, 且步骤繁琐。

另外还有利用单克隆抗体作为酶标抗体的间接 ELISA 法, 也可以大大提高传统方法的特异性和敏感性, 但由于单克隆抗体制备过程复杂, 且价格昂贵, 不宜普及。

发明内容

本发明的目的在于提供一种快速检测风疹病毒抗体的酶免疫学方法, 使其操作简便, 检测时间短, 费用低廉, 敏感性及特异性高。

为达到上述目的, 本发明采用以下技术措施:

聚乙二醇 (PEG) 是 1, 2-亚乙基二醇聚合而成的一类分子量不同的化合物, 目前应用较多的有聚乙二醇 4000 (分子量为 4000), 聚乙二醇 6000, 聚乙二醇 10000, 聚乙二醇 12000, 聚乙二醇 20000 等。近年来研究表明, 聚乙二醇类化合物可以提高抗原抗体反应的敏感性, 加快抗原抗体结合的速度。将分子量 6000 的聚乙二醇用于快速检测风疹病毒抗体, 并同时加入血清稀释液和酶标记物稀释液中 (酶标记物浓度较间接 ELISA 法提高), 以促使抗原抗体反应的加速, 以缩短反应时间, 简化操作。

具体步骤:

1. 配制碳酸盐缓冲液, 将 1.59 克碳酸钠和 2.93 克碳酸氢钠溶于 1000 毫升 (ml) 双蒸水中。
2. 风疹可溶性抗原用碳酸盐缓冲液以 1: 200 或 1: 400 或 1: 800 稀释后包

被于 96 孔聚苯乙烯反应板，每孔加 100 微升 (ul)，在 4℃ 孵育过夜或 37℃ 温育 2~4 小时。

3. 配制 pH 值 9.6 的磷酸盐缓冲液 (PBS)，将 4.8 克磷酸氢二钠加热溶解于适量双蒸水中，再加入 4.3 克磷酸二氢钾和 68 克氯化钠，搅拌混匀后，补足溶液总量至 1000 毫升。
4. 取上述磷酸盐缓冲液 (PBS) 500ml，加入 50 微升的吐温-20，配成含 1/1000 吐温-20 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗液。
5. 取磷酸盐缓冲液 (PBS) 500ml，加入 25ml 的小牛血清和 20 克的聚乙二醇 (PEG) 6000，配成含 4% 聚乙二醇 (PEG) 的样本稀释液。
6. 甩去酶标板孔内的抗原溶液，用上述磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗液洗涤 3~5 次，每次 3~5 分钟。
7. 待测血清及阳性对照和阴性对照血清用含 4% 聚乙二醇 (PEG) 的样本稀释液作 1: 200 (或 1: 100) 稀释后，于酶标板中每孔加入 100ul，置湿盒中 37℃ 作用 5~30 分钟。取出用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗液洗涤，方法同上。
8. 将辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗人免疫球蛋白 M (IgM) 用含 4% 聚乙二醇 (PEG) 的样本稀释液作 1: 1000 或 1: 500 或 1: 2000 稀释，每孔加入 100ul，置湿盒中 37℃ 作用 5~30 分钟。
9. 配制底物缓冲液，将 3.4 克乙酸钠和 5.25 克的柠檬酸加入 500ml 的双蒸水中混匀，调 pH 值至 4.8。
10. 配制底物溶液，在 10ml 上述底物缓冲液中加入 100ul 1% 的四甲基乙二胺 (TMB) 和 10ul 双氧水 (H₂O₂) 混匀。
11. 取出酶标板，用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次，方法同上。每孔加入 100ul 该混合物，置温盒中 37℃ 作用 5~15 分钟，在酶标仪上读取波长为 450 纳米时的吸光度值或肉眼观察结果。判定标准以待检血清 (P) 与已知阴性对照血清 (N) 的比值 $P/N \geq 2.1$ 为阳性。

本发明的优点和效果：本方法最大的特点是将常规间接 ELISA 反应时间由原来的 2-3 小时缩至最短 30 分钟以内。可以将常规间接 ELISA 的两步温育时间同时缩短，温育时间由 5 分钟到 30 分钟，本底改变不明显，均可得出满意的结果，因此在实际操作中，温育时间可任意选用，快、慢可灵活掌握，快到 5 分钟，慢到 30 分钟，特别适用于即时检测。本发明还可以缩短显色时间至 5 分钟，有时甚至可以立即读数；可提高吸光度值，阴性本底无明显升高，反应模式清晰，阴阳性反差明显，与常规间接 ELISA 比较，阳性显色明显提高而阴性本底升高不明显；延长反应时间，阳性增色明显强于阴性增色，无碍结果判断；无论是目测

还是酶标仪读数计算 P/N 值都易于判定，并且稳定性和重复性均较好。

本方法的建立为孕期风疹病毒感染的快速检测和流行病学调查提供了新的手段。

具体实施方式

血清样品：39 份阳性血清采自医院门诊就诊的急性期风疹患者，经试剂盒（晶美生物工程有限公司生产）检测为风疹病毒 IgM 抗体阳性；184 份阴性血清采自育龄期女学生体检血清，经上述试剂盒检测为阴性。

实施步骤：

1. 制碳酸盐缓冲液，将 1.59 克碳酸钠和 2.93 克碳酸氢钠溶于 1000 毫升(ml) 双蒸水中。
2. 风疹可溶性抗原用碳酸盐缓冲液以 1：400 稀释后包被于 96 孔聚苯乙烯反应板，每孔加 100 微升 (ul)，在 4℃ 孵育过夜。
3. 配制 pH 值 9.6 的磷酸盐缓冲液 (PBS)，将 4.8 克磷酸氢二钠加热溶解于适量双蒸水中，再加入 4.3 克磷酸二氢钾和 68 克氯化钠，搅拌混匀后，补足溶液总量至 1000 毫升。
4. 取上述 PBS500ml，加入 50 微升的吐温-20，配成含 1/1000 吐温-20 的 PBS 洗液。
5. 取 PBS500ml，加入 25ml 的小牛血清和 20 克的 PEG 6000，配成含 4%PEG 的样本稀释液。
6. 甩去酶标板孔内的抗原溶液，用上述 PBS 洗液洗涤 3 次，每次 3 分钟。
7. 待测血清及阳性对照和阴性对照血清用含 4%PEG 的样本稀释液作 1:100 稀释后，于酶标板中每孔加入 100ul，置湿盒中 37℃ 作用 10 分钟。取出用 PBS 洗液洗涤，方法同上。
8. 将辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗人 IgM 用含 4%PEG 的样本稀释液作 1：1500 稀释，每孔加入 100ul，置湿盒中 37℃ 作用 10 分钟。
9. 配制底物缓冲液，将 3.4 克乙酸钠和 5.25 克的柠檬酸加入 500ml 的双蒸水中混匀，调 pH 值至 4.8。
10. 配制底物溶液，在 10ml 上述底物缓冲液中加入 100ul 1%的四甲基乙二胺 (TMB) 和 10ul 双氧水 (H₂O₂) 混匀。
11. 取出酶标板，用 PBS 洗涤 3 次，方法同上。每孔加入 100ul 该混合物，置湿盒中 37℃ 作用 10 分钟，在酶标仪上读取波长为 450 纳米时的吸光度值。判定标准以待检血清(P)与已知阴性对照血清 (N) 的比值 P/N ≥2.1 为阳性。

A. 比较间接 ELISA 与改良 ELISA 法的结果

表 1 间接 ELISA 与改良 ELISA 法对风疹病毒 IgM 抗体阳性血清的检测结果

		间接 ELISA		合计
		阳性	阴性	
改良 ELISA	阳性	35	3	38
	阴性	1	0	1
	合计	36	3	39

$\alpha=0.05$, $\chi^2=0.25$, $\nu=1$, $P>0.05$

表 2 间接 ELISA 与改良 ELISA 法对风疹病毒 IgM 抗体阴性血清的检测结果

		间接 ELISA		合计
		阴性	阳性	
改良 ELISA 法	阴性	152	23	175
	阳性	9	0	9
	合计	161	23	184

$\alpha=0.05$, $\chi^2=5.28$, $\nu=1$, $P<0.05$

从表 1 和表 2 可以看出,改良 ELISA 法对阳性血清的检出率为 97.4%(38/39),高于间接 ELISA 法的检出率 92.3%(36/39),但两者差异无统计学意义,说明两法的检出率一致;改良 ELISA 法对阴性血清的检出率为 95.1%(175/184),明显高于间接 ELISA 法的检出率 87.5%(161/184),差异有统计学意义。

B. 特异性试验

(1) 用 HSV、EHF 抗原取代 RV 抗原,结果为阴性。

(2) 采用改良 ELISA 法分别检测 RV、CBV、HSV-1、HSV-2、RSV 阳性血清各 3 份中的 RV-IgM 抗体,结果仅在 RV 阳性血清的标本内测到了相应的 RV-IgM 抗体,其 P/N 值随稀释倍数而下降,而其余标本结果均阴性,说明本法是特异的,见表 3。

表 3 快速 ELISA 法的特异性试验结果

血清稀释度	RV-IgM	CBV-IgM	HSV-1 IgM	HSV-2 IgM	RSV-IgM
1:100	6.2	1.8	1.2	1.4	0.9
1:200	5.0	1.5	1.3	1.3	1.0
1:400	2.8	1.6	1.1	1.2	1.1
1:800	2.1	1.2	1.1	1.4	0.9
1:1600	1.5	0.9	0.8	1.1	0.8

(3) 稳定性与重复性试验

将风疹 IgM 抗体阳性血清及风疹 IgM 抗体阴性血清各 5 份, 在同一块板上重复加样 5 次(孔), 测定其可重复性。测定 A 值基本一致, 批间变异系数小于 10% (见表 4); 选择阳性血清和阴性血清各 1 份在不同板和不同时间进行 5 次测定, 结果阳性血清 CV=10.3%, 阴性血清 CV=9.92%, 均在允许范围。由此可见本系统稳定性和重复性较好。见表 4。

表 4 风疹 IgM 的可重复性测定结果

次数	阳性血清 A 值					阴性血清 A 值				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	0.43	0.33	0.60	0.37	0.66	0.08	0.12	0.08	0.11	0.09
2	0.42	0.35	0.60	0.38	0.68	0.10	0.14	0.08	0.13	0.07
3	0.45	0.35	0.60	0.39	0.69	0.10	0.13	0.10	0.12	0.07
4	0.43	0.32	0.62	0.38	0.65	0.09	0.14	0.09	0.11	0.08

另外, 同时作不加 PEG 的对照, 仅提高酶标记物浓度或血清稀释度, 其它条件同本方法, 结果不能检出阳性标本, 说明本发明中反应时间缩短并不是由于酶标记物浓度较常规间接 ELISA 提高所致, 也不能由提高血清稀释度来缩短。

专利名称(译)	一种快速检测风疹病毒抗体的酶免疫学方法		
公开(公告)号	CN1434297A	公开(公告)日	2003-08-06
申请号	CN03118528.2	申请日	2003-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	周俊 杨占秋 徐连根 肖红 文莉		
发明人	周俊 杨占秋 徐连根 肖红 文莉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/569		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN1228634C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测风疹病毒抗体的酶免疫学方法，主要是利用PEG可以加快抗原抗体反应，从而缩短常规ELISA的反应时间。首先将可溶性抗原包被于酶标板中；其次是配制PH9.6的PBS洗液和含PEG的样本稀释液；第三是将待测血清及阳性对照和阴性对照血清用含PEG的样本稀释液稀释；第四将稀释好的血清加入前述酶标板孔中温育；第五是甩去酶标板孔内的抗原溶液，用PBS洗液洗涤；第六是将已知的酶标记抗体用含PEG的稀释液稀释；第七是酶标板孔中加入稀释好的酶标记抗体温育；第八是取出酶标板，用PBS洗涤；最后加底物显色。本发明操作简便，敏感性特异性高，检测时间短，费用低。主要用于孕期风疹病毒感染的快速检测和流行病学调查。

表3 快速ELISA法的特异性试验结果

血清稀释度	RV-IgM	CBV-IgM	HSV-1 IgM	HSV-2 IgM	RSV-IgM
1:100	6.2	1.8	1.2	1.4	0.9
1:200	5.0	1.5	1.3	1.3	1.0
1:400	2.8	1.6	1.1	1.2	1.1
1:800	2.1	1.2	1.1	1.4	0.9
1:1600	1.5	0.9	0.8	1.1	0.8