



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101915838 A

(43) 申请公布日 2010.12.15

(21) 申请号 201010245668.4

(22) 申请日 2010.08.05

(71) 申请人 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三  
号

(72) 发明人 邹明强 张帆 李锦丰 薛强

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

### (54) 发明名称

一种基于流式荧光编码微球的禽流感病毒多型同步检测方法及试剂盒

### (57) 摘要

本发明提供一种基于流式微球技术的用于不同亚型禽流感病毒同步免疫检测法及试剂盒,是以聚苯乙烯荧光编码微球作为固相载体,以量子点作为荧光标记物,用于不同亚型禽流感病毒同步检测的一种流式液相免疫检测法。首先,将包被抗体共价结合在编码微球表面,在滤膜板中,经包被抗体、病毒、检测抗体、二抗特异性结合形成微球-包被抗体偶联物-病毒-检测抗体-量子点标记二抗(或者微球-包被抗体偶联物-病毒-量子点标记的检测抗体)的荧光免疫复合体,然后逐一流经流式分析系统的检测区,经识别不同编码微球并检测量子点荧光强度,并计算平均荧光强度比率完成检测。用不同编码微球连接不同亚型禽流感单克隆抗体或者多克隆抗体,可同时检测同一样品中的多种亚型禽流感病毒,或者同时检测多个样品中不同种亚型禽流感病毒,具有快速、高通量的优点。

1. 一种基于流式荧光编码微球的用于禽流感病毒多亚型同步检测的双抗体夹心免疫检测方法,其特征在于:以具有功能化基团的聚苯乙烯荧光编码微球作为固相载体,将禽流感病毒亚型特异性抗体以形成共价键方式包被到固相载体上,形成微球-包被抗体偶联物,与不同亚型禽流感病毒发生特异性反应,再与荧光标记的禽流感病毒抗体反应或者与禽流感病毒抗体反应后再与荧光标记的二抗反应,使用流式分析系统对反应产物中逐一通过检测区的微球所负载的多种荧光信号进行检测,通过与阴性样本对比,判断样本是否为阳性。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于:微球-包被抗体偶联物的形成过程,在96孔滤膜板内的微球-包被抗体偶联物的体系中加入待测病毒与检测抗体,待测病毒与检测抗体发生双抗体夹心形式的特异性反应,检测抗体再与量子点标记二抗特异性结合而形成基于微球的荧光免疫复合体。

3. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于:基于微球的荧光免疫复合体的形成是以量子点作为荧光标记物,用量子点标记二抗,加入的微球-包被抗体偶联物、待测病毒与检测抗体反应完后,加入量子点标记二抗反应形成微球-包被抗体偶联物-病毒-检测抗体-量子点标记二抗的荧光免疫复合体。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于:根据内部包埋荧光染料比例的不同对微球进行编码,不同的荧光编码微球连接抗禽流感病毒不同型的包被抗体,加入可特异性结合的检测抗体,可同步检测同一样品中多型禽流感病毒,或者同步检测多个样品中不同型禽流感病毒。

5. 一种在权利要求1所述的基于荧光编码微球的禽流感病毒多亚型同步检测试剂盒,其特征在于包括(1)包被禽流感各亚型抗体的不同荧光编码微球;(2)量子点标记的二抗;(3)检测抗体;(4)阳性对照;(5)阴性对照;(6)pH 7.2-7.4的磷酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所说的用流式系统对逐一流过检测区的微球所负载的荧光信号进行检测,是指检测系统的两束激光光源发射波长分别为488nm和635nm,一束通过判定微球内包埋的染料比例从而对待测物进行种类定性分析,另一束通过测定微球上反应连接的荧光探针强度从而判断待测物含量多少。

7. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于定性检测使用阴性、阳性对照样本为参照,根据待测病毒的平均荧光强度比率来定性,平均荧光强度比率大于或等于阴性检测值的2.1倍时为阳性,小于时为阴性。

## 一种基于流式荧光编码微球的禽流感病毒多型同步检测方法 及试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于流式微球技术的禽流感亚型病毒的多靶标同步免疫检测方法,特别是涉及一种以量子点为荧光标记物、聚苯乙烯荧光编码微球为固相载体的多靶标同步免疫检测法及所使用的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 禽流感是禽流行性感冒的简称,它是一种由禽流感病毒引起的传染性疾病,被国际兽疫局定为甲类传染病,又称真性鸡瘟或欧洲鸡瘟。按病原体类型的不同,禽流感可分为高致病性、低致病性和非致病性禽流感三大类。非致病性禽流感不会引起明显症状,仅使染病的禽鸟体内产生病毒抗体。低致病性禽流感可使禽类出现轻度呼吸道症状,食量减少,产蛋量下降,出现零星死亡。高致病性禽流感最为严重,发病率和死亡率均高,人感染高致病性禽流感死亡率约是 60%,家禽鸡感染的死亡率几乎是 100%,无一幸免。

[0003] 最早的人禽流感病例出现在 1997 年的香港。那次 H5N1 型禽流感病毒感染导致 12 人发病,其中 6 人死亡。其后,本病一直在亚洲区零星爆发,但在 2003 年 12 月开始,禽流感在东亚多国——主要在越南、韩国、泰国——严重爆发,并造成越南多名病人丧生。直到 2005 年中,疫症不单未有平息迹象,而且还不断扩散。根据世界卫生组织的统计,到目前为止全球共有 15 个国家和地区的 393 人感染,其中 248 人死亡,死亡率 63%。

[0004] 流式微球技术 (eytometric bead array, CBA) 是近年来刚刚兴起的一种检测技术;它利用球形基质作为载体,以流式细胞术作为检测平台,可以在较短时间内对核酸、蛋白质等生物分子进行大规模检测;该技术集中了分子生物学、免疫学、高分子化学、激光检测技术、微流体技术、计算机技术等方面的先进技术。而该系统主要基于流式荧光编码微球为载体和荧光探针进行免疫检测,检测通量大、灵敏度高,可实现同步检测多靶标。该技术最先被应用在细胞、基因、抗体、病毒检测等基因研究与生物医疗诊断领域,后来延伸到动植物中病毒等的检测与监控。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种基于流式微球技术的多靶标同步免疫检测法,实现用不同的编码微球和同一种荧光探针可同时检测同一样品中多种禽流感亚型病毒成分或者同时检测多个样品中的不同种禽流感亚型病毒。

[0006] 本发明的进一步目的是提供了一种在此检测方法过程中使用的检测试剂盒。

[0007] 本发明是以量子点进行荧光标记,应用于抗原抗体特异性反应的一种荧光免疫检测法,根据微球内部包埋荧光染料比例的不同进行光学编码,选用不同编码的微球作为固相载体同步检测不同样品中的单种或多种待测禽流感亚型病毒,旨在提高检测通量,提高检测速度。

[0008] 本发明的技术解决方案如下:

[0009] 首先,将禽流感亚型抗体包被在聚苯乙烯微球上,形成微球-包被抗体偶联物,在96孔滤膜板上,微球-包被抗体偶联物与待测物中禽流感亚型病毒和检测抗体发生特异性反应,其中,多余的检测抗体经洗涤抽滤而被从反应体系中去除,而与微球-包被抗体偶联物反应的检测抗体与后续加入的荧光探针(如量子点标记二抗)进行特异性结合形成微球-包被抗体偶联物-病毒-检测抗体-二抗-量子点的荧光免疫复合体,经仪器检测荧光信号便可完成检测过程。

[0010] 所述包被抗体是指抗禽流感亚型病毒的多克隆抗体或者单克隆抗体。

[0011] 所述微球-包被抗体偶联物是指使用碳二亚胺法,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化微球表面的羧基官能团,然后与包被抗体上的氨基反应,从而以共价键方式形成微球-包被抗体偶联物。

[0012] 所述检测抗体是指抗禽流感病毒抗体,检测抗体可与微球-包被抗体偶联物发生特异性反应。

[0013] 所述量子点标记二抗是指用量子点作为荧光探针标记的二抗。

[0014] 所述微球-包被抗体偶联物-病毒-检测抗体-二抗-量子点荧光免疫复合体,是指在待测样品中禽流感病毒与检测抗体发生反应结束后,加入的量子点标记二抗与微球-包被抗体偶联物-病毒-检测抗体复合物继续发生特异性反应生成的复合物,而多余的量子点标记二抗则通过在96孔滤膜板洗涤、抽滤而离开反应体系。

[0015] 所述96孔滤膜板是指框架与常规酶标板一致,板底使用亲水性滤膜进行替代的反应板,使用的滤膜孔径小于微球粒径,未与微球-多抗偶联物结合的荧光免疫复合物则可以透过滤膜,经真空抽滤后从反应体系中被去除。

[0016] 所述荧光检测是指用流式分析系统中的两束荧光,定性区分不同的编码微球从而确定存在何种禽流感亚型病毒。

[0017] 本发明的同步免疫检测法,所说的流式分析系统激光光源发射波长为488nm和635nm。目前,美国Luminex公司、Bio-Rad公司、Beckman公司可提供满足测试要求的检测仪器及编码微球。

[0018] 上述待测病毒可以是任何一种亚型禽流感病毒,使用不同的单克隆抗体或多克隆抗体就可检测不同的相应亚型的禽流感病毒。

[0019] 一种量子点为荧光标记物、聚苯乙烯微球为固相载体的同步免疫检测法诊断试剂盒,包括以下试剂:

[0020] (1) 基于聚苯乙烯荧光编码微球包被有禽流感亚型抗体的微球-包被抗体偶联物;

[0021] (2) 量子点标记的抗小鼠(或抗兔、抗鸡等)二抗;

[0022] (3) 检测抗体;

[0023] (4) 阳性对照;

[0024] (5) 阴性对照;

[0025] (6) pH 7.2-7.4的磷酸盐缓冲液。

[0026] 包被有禽流感亚型抗体的聚苯乙烯荧光编码微球是几种禽流感亚型特异性抗体结合在不同编码微球的混合物,检测抗体是抗禽流感病毒的抗体。

[0027] 使用方法:将试剂按说明书稀释后按以下流程操作。

[0028] (1) 制备荧光免疫复合体:在 96 孔滤模板中同时加入包被有禽流感亚型抗体的聚苯乙烯荧光编码微球、待测样品,37°C 避光振摇反应 0.5-1 小时后抽滤掉孔内反应液,再加检测抗体,37°C 避光振摇反应 0.5-1 小时,抽滤掉孔内反应液,后加入量子点标记二抗,37°C 避光振摇反应 0.5-1 小时,形成微球-包被抗体偶联物-病毒-检测抗体-二抗-量子点荧光免疫复合体;

[0029] (2) 荧光强度检测:用流式分析系统进行激光激发并检测荧光免疫复合体的荧光强度。

## 具体实施方式

[0030] 本发明的检测步骤如下:

[0031] 1、微球-包被抗体偶联

[0032] 取  $1.25 \times 10^6$  个微球为一批次,在 1.5mL 离心管中,使用 EDC、sulfo-NHS 溶液在 pH6.2 条件下对微球表面羧基进行常温活化 20 分钟,然后将微球置换到磷酸盐缓冲液(PBS,0.01M, pH7.4)中,加入优化量的包被抗体,避光振摇常温反应 2 小时,离心洗掉未结合的包被抗体,用含 1% BSA 的 PBS 重悬,避光振摇常温反应 0.5 小时,封闭微球表面未与包被抗体结合的剩余位点,最后,用含 0.1% BSA 的 PBS 储存微球-多抗偶联物。

[0033] 2、量子点-二抗标记

[0034] 首先将量子点和 EDC 溶液混合,室温避光旋转反应 30min;将二抗按优化比例滴加到量子点中,室温避光反应 3 小时,用 Sephadex G100 层析介质将游离的量子点去除,后用含 0.05%叠氮化钠的 PBS 保存。

[0035] 3、微球-包被抗体偶联物-病毒-检测抗体-二抗-量子点复合体形成

[0036] 在 96 孔滤模板中,同时加入微球-包被抗体偶联物、待测病毒,37°C 避光振摇反应 0.5-1 小时,抽滤掉板上孔中反应液,与微球-多抗偶联物结合的待测病毒留在孔中;再加入检测抗体,37°C 避光振摇反应 0.5-1 小时,抽滤掉板上孔中反应液,其中多余的检测抗体随反应液被抽滤掉;然后加入量子点标记二抗,37°C 避光振摇反应 0.5-1 小时,二抗与孔中检测抗体特异性结合,形成微球-包被抗体偶联物-病毒-检测抗体-二抗-量子点复合体。

[0037] 4、定性荧光检测

[0038] 该检测方法的测定原理是通过检测溶液中结合到微球上的包被抗体偶联物-病毒-检测抗体-二抗-量子点免疫复合体的荧光强度实现对待测物的检测。结合到微球上的检测病毒量不同,检测到的荧光强度不同。检测样本的同时,将三个空白样本作为阴性对照。计算阴性对照平均荧光强度的均值,将样本平均荧光强度与之比较并计算比率。临界值计算:临界值=阴性对照荧光强度值 $\times$ 2.1。测定样本荧光强度值 $\geq$ 临界值,样本中禽流感亚型病毒阳性;测定样本荧光强度值 $<$ 临界值时,样本中禽流感亚型病毒阴性。根据不同的编码微球上对应的禽流感不同亚型抗体,来判断待测样本中禽流感病毒为何种亚型。

|               |  |         |            |
|---------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)       | 一种基于流式荧光编码微球的禽流感病毒多型同步检测方法及试剂盒                 |         |            |
| 公开(公告)号       | <a href="#">CN101915838A</a>                   | 公开(公告)日 | 2010-12-15 |
| 申请号           | CN201010245668.4                               | 申请日     | 2010-08-05 |
| 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        | 邹明强<br>张帆<br>李锦丰<br>薛强                         |         |            |
| 发明人           | 邹明强<br>张帆<br>李锦丰<br>薛强                         |         |            |
| IPC分类号        | G01N33/569 G01N33/533                          |         |            |
| 外部链接          | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供一种基于流式微球技术的用于不同亚型禽流感病毒同步免疫检测法及试剂盒，是以聚苯乙烯荧光编码微球作为固相载体，以量子点作为荧光标记物，用于不同亚型禽流感病毒同步检测的一种流式液相免疫检测法。首先，将包被抗体共价结合在编码微球表面，在滤膜板中，经包被抗体、病毒、检测抗体、二抗特异性结合形成微球-包被抗体偶联物-病毒-检测抗体-量子点标记二抗(或者微球-包被抗体偶联物-病毒-量子点标记的检测抗体)的荧光免疫复合体，然后逐一流经流式分析系统的检测区，经识别不同编码微球并检测量子点荧光强度，并计算平均荧光强度比率完成检测。用不同编码微球连接不同亚型禽流感单克隆抗体或者多克隆抗体，可同时检测同一样品中的多种亚型禽流感病毒，或者同时检测多个样品中不同种亚型禽流感病毒，具有快速、高通量的优点。