



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114184781 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 05

(21) 申请号 202111668292.2

G01N 33/58 (2006.01)

(22) 申请日 2021.12.31

G01N 33/531 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114184781 A

(56) 对比文件

US 2021088517 A1,2021.03.25

WO 9936564 A1,1999.07.22

(43) 申请公布日 2022.03.15

Andrew Cameron等.A Multiplex

(73) 专利权人 山西大学

Microsphere IgG Assay for SARS-CoV-2

地址 030006 山西省太原市坞城路92号

Using ACE2-Mediated Inhibition as a

(72) 发明人 孟庆来 田帅燕 吴长新 王谢冬

Surrogate for Neutralization.《Clinical

(74) 专利代理机构 太原申立德知识产权代理事

Microbiology》.2021,第59卷(第2期),第

务所(特殊普通合伙) 14115

e02489-20页.

专利代理师 张向莹

审查员 王静雯

(51) Int.Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

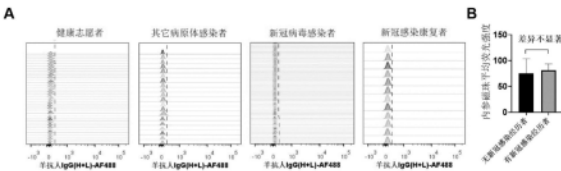
权利要求书6页 说明书19页 附图5页

(54) 发明名称

一种新型病原体抗体检测方法及其检测新冠病毒抗体应用

(57) 摘要

本发明公开一种新型病原体抗体检测方法以及以该方法为基础发展的一种新型冠状病毒IgG/IgM抗体检测试剂盒及应用方法,属于免疫学检测技术领域。本发明通过引入一个与血源样品发生非特异结合概率极低的内参磁珠作为目标病原体蛋白磁珠的阴性对照磁珠。检测时以所测血源样品及荧光物质标记二抗先后平行处理内参磁珠和目标病原体蛋白磁珠,用流式细胞仪对荧光二抗染色的内参磁珠和目标病原体蛋白磁珠进行检测。以目标病原体磁珠与内参磁珠之间的抗体磁珠相对阳性百分率为参数对目标病原体抗体活性进行定量分析。新型冠状病毒抗体检测试剂盒不依赖于内参抗体即可实现对新冠病毒IgG及IgM抗体稳定地、可对比地定量分析,且试剂盒具有高水平的检测灵敏性及特异性。



1. 一种新型病原体非诊断目的的抗体检测方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤1,目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠的制备和保存:将目标病原体蛋白和内参蛋白通过化学共价交联或生物素/链霉亲和素系统饱和固相于微磁珠表面,制备出目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠;

将制备的目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠保存于含有质量体积百分比为0.02%的叠氮化钠的抗体稀释液;所述内参磁珠表面固相有重组人血管紧张转化酶2蛋白,用ACE2蛋白表示;

步骤2,样品预处理:对待测血源样品以预先确定好的优选稀释度用样品稀释液进行稀释,以100 μL /孔把稀释的样品加入到圆底96孔板的两个孔内,室温下孵育至少5分钟;

步骤3,磁珠预处理:根据待测样品的数量,以至少5000个步骤1中制备的目标病原体蛋白磁珠或内参磁珠/反应吸取一定数量的目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠至圆底96孔板两孔内,用抗体稀释液以200 μL /孔清洗两次;

以200 μL 抗体稀释液轻轻重悬磁珠2~3次,然后把圆底96孔板放在磁极上至少吸附3分钟,吸弃孔内上清液后完成一次清洗;在进行下一次磁珠清洗时,要把96孔板从磁极上取下后再重新加入200 μL 抗体稀释液对磁珠进行重悬;

步骤4,抗原-抗体反应:根据待测样品的数量,以5 μL /样品对步骤3清洗后的目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠用抗体稀释液进行重悬,后把5 μL 目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠分别加入到步骤2中准备的两个含有100 μL 稀释后样品的两个孔内,轻轻吹匀后室温下孵育至少30分钟;

步骤5,清洗磁珠:用磁极吸附孔板内磁珠,吸弃上清;从磁极上取下孔板,再向磁珠孔中加入200 μL 洗涤液重悬磁珠,把微孔板置于磁极上3分钟,吸弃上清,保留磁珠于板底;重复本步骤清洗磁珠共3次;

步骤6,荧光标记二抗染色:抗体稀释液稀释荧光物质标记的动物抗待测血源样品所来源物种某型抗体的二抗至可饱和染色血源样品预孵育目标病原体蛋白磁珠的浓度;后以100 μL 稀释的二抗液/孔加入步骤5中准备的各孔,吹吸重悬磁珠,室温避光孵育30分钟;

步骤7,清洗磁珠:用磁极吸附孔板内磁珠,吸弃上清;从磁极上取下孔板,再向磁珠孔中加入200 μL 洗涤液重悬磁珠,把微孔板置于磁极上3分钟,吸弃上清,保留磁珠于板底;重复本步骤清洗磁珠共2次;最后一次清洗后,用200 μL 洗涤液重悬磁珠;

步骤8,样品的检测:根据步骤6中的荧光物质标记的动物抗某物种某型抗体所用荧光物质确定流式细胞仪检测激光管和检测光路;然后用流式细胞分析仪在该荧光物质对应的荧光光路对步骤7中清洗、重悬后的目标病原体蛋白磁珠和参考磁珠进行检测,并计算经同一样品所孵育的目标病原体蛋白磁珠和参考磁珠经相同荧光光路检测后前者相对后者的磁珠相对阳性百分率,该参数即代表所测样品中含有的目标病原体蛋白特异性某型抗体的活性。

2. 根据权利要求1所述的一种新型病原体抗体检测方法,其特征在于:所述目标病原体蛋白和内参蛋白通过化学共价交联固相于微磁珠表面,包括但不限于(1)目标病原体蛋白或内参蛋白中的伯氨基和巯基与表面甲苯磺酰基化的微磁珠通过共价键直接交联;(2)目标病原体蛋白或内参蛋白中的伯氨基与表面带有羧酸基团的微磁珠形成共价酰胺键进行交联;(3)目标病原体蛋白或内参蛋白中的羧酸基团与表面带有氨基基团的微磁珠通过醛

的还原胺化进行共价结合。

3. 根据权利要求2所述的一种新型病原体抗体检测方法,其特征在于:所述目标病原体蛋白和内参蛋白通过生物素/链霉亲和素系统固相于微磁珠表面,包括目标病原体蛋白和内参蛋白通过化学方法对目标病原体蛋白和内参蛋白进行生物素化后与表面固相有链霉亲和素磁珠共孵育进行蛋白固相;或是目标病原体蛋白和内参蛋白在其C端或N端与His标签及AVI标签进行融合表达的重组蛋白经生物素连接酶的作用下被生物素标记,然后通过AVI标签进行生物素化的蛋白与表面固相有链霉亲和素的微磁珠共孵育进行蛋白固相。

4. 根据权利要求3所述的一种新型病原体抗体检测方法,其特征在于:所述内参磁珠需要同时满足以下要求:(1)内参磁珠在分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后,内参磁珠产生明显的假阳性染色可能性极低,概率<1%;(2)含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠与不含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠之间的平均荧光强度没有显著性差异;(3)内参磁珠与目标病原体蛋白磁珠分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后,以含目标病原体抗体的血清或血浆所孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率显著高于以不含目标病原体抗体的血清或血浆所孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率,从而可以有效区分含目标病原体特异性抗体的血清或血浆样品和不含目标病原体抗体的血清或血浆样品。

5. 根据权利要求4所述的一种新型病原体抗体检测方法,其特征在于:所述抗体稀释液为含有0.1~0.5% 不含IgG的牛血清白蛋白的0.01M磷酸盐缓冲液,pH值为7.2~7.4;所述微磁珠的磁珠直径为0.8~5 μm 。

6. 根据权利要求5所述的一种新型病原体抗体检测方法,其特征在于:所述洗涤液为含有体积百分比为0.025% 吐温的0.01M 磷酸盐缓冲液,pH值为7.4;所述荧光物质包括荧光染料、荧光蛋白、荧光染料/荧光蛋白合成物及量子点。

7. 根据权利要求6所述的一种新型病原体抗体检测方法,其特征在于:所述步骤2中优选稀释度通过下列方法进行确定:将待测血源样本用样本稀释液按1:10~1:80稀释;以无目标病原体感染经历的所测样品同种血源样品为阴性对照样品;以一组阴性对照样品在1:10~1:80范围稀释后与目标病原体蛋白磁珠孵育并经荧光物质标记二抗染色后,磁珠发生明显假阳性荧光染色频率低于10%的最小稀释度为待测样品的优选稀释度。

8. 根据权利要求7所述的一种新型病原体抗体检测方法,其特征在于:所述样品稀释液包含以体积百分数记的对待测物种血源样品与目标病原体蛋白磁珠及内参磁珠非特异结合有较好封闭作用的、且与待测物种不同种类动物血清5~10%、甘油4~8%、0.1~1%吐温20、硼酸盐缓冲液30~50%、无菌去离子水30~50%,并用NaOH将pH调节至7.4。

9. 根据权利要求8所述的一种新型病原体抗体检测方法,其特征在于:所述步骤6中可饱和染色血源样品预孵育目标病原体蛋白磁珠的浓度通过以下方法进行确定:对用样品稀释液以优化稀释度稀释的含有目标病原体蛋白抗体的血源样品孵育的目标病原体蛋白磁珠,在清洗后与用抗体稀释液稀释的一系列不同浓度的荧光物质标记的抗所测血源样品中某类抗体的二抗染色后,目标病原体蛋白磁珠平均荧光强度达到高台水平所对应的二抗终浓度。

10. 根据权利要求9所述的一种新型病原体抗体检测方法,其特征在于:所述步骤8样品

的检测中:在用流式细胞分析仪对磁珠进行检测时,首先通过调节电压在FSC和SSC门中找到并圈定磁珠群,再从磁珠群收集2000个或以上磁珠,对所收集磁珠在荧光物质标记二抗对应的荧光通路对磁珠荧光染色情况进行分析;

用流式分析软件对流式数据进行分析时,在荧光物质标记二抗相对应的荧光通道画组方图对内参磁珠和目标病原体蛋白磁珠的染色图进行分析;以内参磁珠染色图的右侧边缘画门,分析目标病原体蛋白磁珠染色图在该门内的磁珠荧光染色百分率;该百分率数值就是目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠经相同荧光光路检测后的磁珠相对阳性百分率;

以该数值为依据既可对所测血源样品中目标病原体蛋白特异性抗体的活性进行定量分析也可对所测血源样品是否存在病原体蛋白特异性抗体进行定性判断。

11.一种如权利要求1所述新型病原体非诊断目的的抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用,其特征在于:所述检测新冠病毒抗体应用包括一种新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒;

所述试剂盒包括S1蛋白磁珠、内参磁珠、荧光物质标记的动物抗人IgG抗体、荧光物质标记的动物抗人IgM抗体、SARS-CoV-2 IgG抗体阴性质控品、SARS-CoV-2 IgG抗体阳性质控品、SARS-CoV-2 IgM抗体阴性质控品、SARS-CoV-2 IgM抗体阳性质控品、样品稀释液、抗体稀释液和浓缩洗涤液;

所述S1蛋白磁珠和内参磁珠通过以下方法制备得到:在每20 μ L 0.01M pH值为7.2~7.4的磷酸盐缓冲液中以每10 μ g固相有链霉亲和素的磁珠对200~800 ng 的预生物素化重组新型冠状病毒刺突蛋白S1亚基或预生物素化重组人血管紧张转化酶2蛋白为比例,其中预生物素化重组新型冠状病毒刺突蛋白S1亚基用S1蛋白表示,预生物素化重组人血管紧张转化酶2蛋白用ACE2蛋白表示;把S1蛋白或ACE2蛋白固相到磁珠上;室温下共孵育40 min,在共孵育20 min后吹吸重悬一次,共孵育后把固相有S1蛋白的链霉亲和素磁珠或固相有ACE2蛋白的链霉亲和素磁珠转入一个新的容器中,置于2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C,当磁珠完全沉降于底部后,吸弃上清;以含有质量体积百分比为0.02% 叠氮化钠的抗体稀释液重悬磁珠沉淀,体积为固相时磷酸盐缓冲液体积的4倍,制备成S1蛋白磁珠和内参磁珠。

12.根据权利要求11所述的新型病原体抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用,其特征在于:所述荧光物质标记的动物抗人IgG抗体浓度为1~1000 μ g/mL;所述荧光物质标记的动物抗人IgG抗体中的荧光物质包括但不限于荧光染料、荧光蛋白、荧光染料/荧光蛋白合成物及量子点,要求该荧光物质与标记动物抗人IgM抗体中的荧光物质在流式细胞仪检测时所用光路不同;所述荧光物质标记动物抗人IgG抗体中的动物包括但不限于小鼠、山羊、绵羊、牛、驴、兔、大鼠及羊驼。

13.根据权利要求12所述的新型病原体抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用,其特征在于:所述荧光物质标记的动物抗人IgM抗体浓度为1~1000 μ g/mL;所述荧光物质标记动物抗人IgM抗体中的荧光物质包括但不限于荧光染料、荧光蛋白、荧光染料/荧光蛋白合成物及量子点,要求该荧光物质与标记动物抗人IgG抗体中的荧光物质在流式细胞仪检测时所用光路不同;所述荧光物质标记动物抗人IgM抗体中的动物包括但不限于小鼠、山羊、绵羊、牛、驴、兔、大鼠及羊驼。

14.根据权利要求13所述的新型病原体抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用,其特征在于:所述SARS-CoV-2 IgG抗体阴性质控品为保存于含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白

和质量体积比为0.02%叠氮化钠的pH值为7.4磷酸盐缓冲液的人IgG;

所述SARS-CoV-2 IgG抗体阳性质控品为保存于含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的pH值为7.4磷酸盐缓冲液的人源化或全人源抗新冠病毒S1蛋白IgG重组抗体或含有抗新冠病毒S1蛋白IgG抗体的人血清。

15. 根据权利要求14所述的新型病原体抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用,其特征在于:所述SARS-CoV-2 IgM抗体阴性质控品为保存于含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的pH值为7.4磷酸盐缓冲液的人IgM;

所述SARS-CoV-2 IgM抗体阳性质控品为保存于含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的pH值为7.4磷酸盐缓冲液的人源化或全人源抗新冠病毒S1蛋白IgM重组抗体或含有抗新冠病毒S1蛋白IgM抗体的人血清。

16. 根据权利要求15所述的新型病原体抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用,其特征在于:所述样品稀释液包含以体积百分数记的以下物质:山羊血清5~10%、甘油4~8%、0.1~1%的吐温20、硼酸盐缓冲液30~50%、无菌去离子水30~50%,并用NaOH将pH调节至7.2~7.4。

17. 根据权利要求16所述的新型病原体抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用,其特征在于:所述抗体稀释液为含有0.1~0.5% 牛血清白蛋白的0.01M磷酸盐缓冲液,pH值为7.2~7.4;所述浓缩洗液为含有体积百分比为0.25% 吐温的0.1M 磷酸盐缓冲液,pH值为7.4;实际使用时,浓缩洗液需用去离子水稀释10倍成洗液后再使用。

18. 根据权利要求17所述的新型病原体抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用,其特征在于:所述固相有链霉亲和素的微磁珠直径为0.8~5 μm ;所述预生物素化的重组S1蛋白和预生物素化的重组人ACE2蛋白通过化学方法对重组S1蛋白和重组人ACE2蛋白进行生物素化所获得或是S1蛋白和人ACE2蛋白在各自C端与His标签及AVI标签进行融合表达的重组蛋白,这两个蛋白在生物素连接酶的作用下被生物素标记而获得;重组S1蛋白和重组人ACE2蛋白或重组S1-His/AVI标签融合蛋白和重组人ACE2-His/AVI标签融合蛋白均生产于哺乳动物细胞;所述人ACE2蛋白为人ACE2蛋白细胞外结构域的全部或部分。

19. 一种如权利要求11~18任意一项所述新型病原体非诊断目的的抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用的应用方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤1,样本稀释:将待测血源样本用样本稀释液按1:10~1:80稀释;

步骤2,质控品稀释:以抗体稀释液对SARS-CoV-2 IgG及 IgM阳性质控品进行一定的稀释,要求稀释后的SARS-CoV-2 IgG阳性质控品和SARS-CoV-2 IgM阳性质控品及其相对应的荧光物质标记的动物抗人二抗在分别平行对S1蛋白磁珠和内参磁珠进行一抗孵育、二抗荧光染色和流式细胞仪样品检测后,S1蛋白磁珠和内参磁珠的磁珠相对阳性百分率在20%-80%;以抗体稀释液对SARS-CoV-2 IgG及 IgM阴性质控品进行一定的稀释,要求稀释后的SARS-CoV-2 IgG阴性质控品和SARS-CoV-2 IgM阴性质控品及其相对应的荧光物质标记的动物抗人二抗在分别平行对S1蛋白磁珠和内参磁珠进行一抗孵育、二抗荧光染色和流式细胞仪样品检测后,S1蛋白磁珠和内参磁珠的磁珠相对阳性百分率<5%;

步骤3,样品孔板布局:如果实验计划对血源样品中新冠病毒IgG和IgM抗体同时进行检测,那么把稀释的IgG阴性质控品和IgM阴性质控品各50 μL 加入到圆底96孔板的同一孔中,把稀释的IgG阳性质控品和IgM阳性质控品各50 μL 加入到同一孔中;如果实验计划只对血源样品中新冠病毒IgG或IgM抗体进行检测,那么对IgG或IgM阴性质控品和阳性质控品分别

以100 μL /孔加入到2个孔中;无论计划对血源样品中新冠病毒IgG和IgM抗体同时进行检测还是只对血源样品中新冠病毒IgG或IgM抗体进行检测,都是把稀释的血源样品以100 μL /孔加入到2个孔中;

步骤4,抗原-抗体反应:在每次试验中,每个血源样品或每个质控品都需要在步骤3中准备好的2个反应孔中分别加入S1蛋白磁珠和内参磁珠;以1 μL S1蛋白磁珠液或内参磁珠液/反应孔计算出每次实验所需S1蛋白磁珠和内参磁珠的总体积;根据计算结果取出相应体积的S1蛋白磁珠和内参磁珠放入96孔板,用200 μL 抗体稀释液清洗磁珠两次,磁极吸附磁珠,吸弃上清液,加入抗体稀释液重悬磁珠,以5 μL S1蛋白磁珠液或内参磁珠液/反应孔加入步骤3中的各孔中,轻轻吹匀,把96孔板放置于室温孵育30 min;

步骤5,清洗磁珠:用磁极吸附孔板内磁珠,吸弃上清;从磁极上取下孔板,再向磁珠孔中加入200 μL 洗液重悬磁珠,把微孔板置于磁极上3分钟,吸弃上清,保留磁珠于板底;重复本步骤清洗磁珠共3次;

步骤6,荧光标记二抗染色:如果计划对新冠病毒IgG和IgM抗体同时检测,那么用同一份抗体稀释液稀释荧光物质标记动物抗人IgG抗体和荧光物质标记动物抗人IgM抗体至终浓度为可饱和染色步骤5所得经血源样品预孵育并清洗的S1蛋白磁珠的浓度;如果计划只对新冠病毒IgG或IgM抗体进行检测,那么用抗体稀释液稀释荧光物质标记的动物抗人IgG抗体或荧光物质标记的动物抗人IgM抗体至终浓度为可饱和染色步骤5所得经血源样品预孵育并清洗的S1蛋白磁珠的浓度;要求把上述荧光物质标记的动物抗人二抗稀释液以100 μL /孔加入步骤5中准备的各孔,吹吸重悬磁珠,室温避光孵育30分钟;

步骤7,清洗磁珠:用磁极吸附孔板内磁珠,吸弃上清;从磁极上取下孔板,再向磁珠孔中加入200 μL 洗涤液重悬磁珠,把微孔板置于磁极上3分钟,吸弃上清,保留磁珠于板底;重复本步骤清洗磁珠共2次;最后一次清洗后,用200 μL 洗涤液重悬磁珠;

步骤8,样品的检测:用流式细胞分析仪在上述两荧光物质对应的荧光光路对血源样品、抗体阴性质控品和抗体阳性质控品染色的S1蛋白磁珠和内参磁珠进行检测,并计算同一样品所处理S1蛋白磁珠和内参磁珠经相同荧光光路检测后的相对磁珠阳性百分率;

步骤9,检测结果的判定:当IgG或IgM阴性质控品所孵育的两种磁珠所测得的相对磁珠阳性百分率 $<5\%$,同时IgG或IgM阳性质控品所孵育的两种磁珠所测得的相对磁珠阳性百分率 $\geq 20\%$ 时,那么本次试验判断视为有效试验。

20. 根据权利要求19所述的一种新型病原体抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用的应用方法,其特征在于:所述步骤6荧光物质标记动物抗人IgG抗体和荧光物质标记动物抗人IgM抗体终浓度为可饱和染色经血源样品预孵育并清洗的S1蛋白磁珠的浓度,确定荧光标记的动物抗人IgG或IgM二抗可饱和染色血源样品预孵育并清洗的S1蛋白磁珠的终浓度方法为:对于用样品稀释液以1:40稀释的含有抗S1蛋白IgG或IgM抗体的血源样品孵育的S1蛋白磁珠,在清洗后与用抗体稀释液稀释的一系列不同浓度的荧光物质标记的抗人IgG或IgM二抗染色后,S1蛋白磁珠平均荧光强度达到高台水平所对应的二抗终浓度。

21. 根据权利要求20所述的新型病原体抗体检测方法检测新冠病毒抗体应用的应用方法,其特征在于:所述步骤8在用流式细胞分析仪对磁珠进行检测时,首先通过调节电压在FSC和SSC门中找到并圈定磁珠群,再从磁珠群收集2000个或以上磁珠,如果只对新冠病毒IgG或IgM抗体进行检测,那么就对所收集磁珠在荧光物质标记动物抗人IgG或IgM抗体相对

应的荧光通路对磁珠荧光染色情况进行分析;如果对新冠病毒IgG和IgM抗体同时进行检测,那么就对所收集磁珠在荧光物质标记动物抗人IgG和IgM抗体相对应的荧光通路对磁珠荧光染色情况同时进行分析;

用流式分析软件对流式数据进行分析时,在荧光物质标记动物抗人IgG和IgM抗体相对应的荧光通道画组方图对所收集的内参磁珠和S1蛋白磁珠进行染色分析;以内参磁珠染色图的右侧边缘画门,分析S1磁珠染色图在该门内的磁珠阳性染色百分率;该百分率数值就是S1蛋白磁珠和内参蛋白磁珠经相同荧光光路检测后的磁珠相对阳性百分率,下简称为:磁珠相对阳性百分率;该参数既可用于对血源样品中新冠病毒S1蛋白特异性IgG或IgM抗体进行定量分析,也可用于对血清中是否存在新冠病毒S1蛋白特异性IgG和IgM抗体进行定性判断。

一种新型病原体抗体检测方法及其检测新冠病毒抗体应用

技术领域

[0001] 本发明属生物医药领域,具体为一种新型病原体抗体检测方法及其为基础发展的一种新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒及其应用方法。

背景技术

[0002] 精准定量评价病原体特异性抗体对诊断病原体感染、评估病原体感染疾病进程及评价病原体疫苗免疫效果具有重要意义。如乙肝病毒核心抗原特异性抗体可作为发生乙肝病毒感染的诊断指标,而乙肝病毒表面抗体活性则可作为评价乙肝疫苗诱导保护性免疫反应的重要指标。对新冠病毒特异性IgG和IgM抗体联合开展检测是一种有效的新冠病毒感染辅助诊断方法。国家卫生健康委员会在其发布的《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第七版)》中明确指出新冠病毒特异性IgM抗体、IgG抗体阳性可作为疑似病例确诊的证据之一。

[0003] 目前,国内外市场检测病原体特异性抗体的主流检测方法为胶体金检测法和化学发光检测法。胶体金法优点在于检测快速、操作简便、无需仪器辅助,但只可定性测定,假阳性率较高。化学发光法是利用化学反应所产生的荧光进行测定的一种方法,由于荧光的强度高,使得这种检测方法具有很高的灵敏度,可进行高通量定量分析。但每次检测只能检测一个参数,因此无法同时对多个抗体类型进行检测。磁珠免疫荧光抗体检测技术是一种结合磁珠载体可高通量自动化操作优势和流式细胞仪高灵敏、多参数荧光检测性能优势为一体的新型抗体检测技术。近期研究报道以该技术为基础发展的luminex检测策略可对靶向多个新冠病毒抗原的IgG抗体同时进行检测,检测特异性和灵敏性根据病人疾病严重程度不同可分别达到95.1%-99.0%和83.6%-95.7%。

[0004] 间接法是目前化学发光检测技术及磁珠免疫荧光检测技术对病原体抗体进行检测的一个重要方法,其原理是以固相有病原体抗原的磁珠捕获所测血清样品和内参抗体中的抗原特异性抗体,经荧光物质标记的二抗染色磁珠后可在磁珠表面形成“抗原-抗原特异性抗体-荧光标记二抗”三聚体复合物。以化学发光检测仪或流式细胞仪检测所测血清样品孵育磁珠和内参抗体孵育磁珠的荧光强度,最终通过前者和后者的相对荧光强度判断所测血清样品中是否存在病原体特异性抗体及其相对活性。这种检测策略是以磁珠平均荧光强度(MFI)为检测参数,所测样品染色磁珠的平均荧光强度通过与内参抗体染色磁珠的平均荧光强度进行比对实现稳定相对定量,抗体活性数值与所用内参抗体直接相关。

[0005] 对于以化学发光、磁珠免疫荧光等技术路线为基础发展的多类病原体抗体检测试剂盒,试剂盒内的内参抗体一般是以含有不同活性病原体抗体的多个血清样品混合制备而成。由于一般情况下不同厂家生产的试剂盒所用内参抗体不同,而且内参抗体具有活性不同、不可再生和无法大规模生产的特性,所以不同厂家生产的新冠病毒抗体检测试剂盒所测的样品相对抗体活性数值相互间不具有可比较性;有时相同厂家所生产的抗体试剂盒由于内参抗体批次不同,即使内参抗体经过相同的溯源链进行了活性校对,由于内参抗体的基质效应不同,也无法保证相同样品检测数值完全相同。除此之外试剂盒终端用户所用检测仪器的检测参数设置不同、检测器件不同及检测器件性能状态不同等也会导致相同样品

在不同用户间检测结果不同。因此这种依赖于内参抗体进行抗体的相对定量检测会导致病原体抗体检测数据在不同试剂盒间无法进行相互比对,从而目前无法应用同类病原体抗体检测试剂盒所发表的海量病原体抗体检测数据对该病原体感染人群和该病原体疫苗免疫人群的病原体特异性抗体水平进行大规模平行比较分析。在这种情况下,发展一种不依赖于内参抗体进行抗体稳定定量分析的病原体抗体检测试剂盒具有重要意义。

[0006] 流式细胞分析术对目标蛋白在细胞表面表达进行定量分析时除可分析目标蛋白在细胞群表达平均荧光强度(MFI),还可分析该目标蛋白在整个细胞群中的表达百分率。目前尚无一种以“病原体蛋白磁珠抗体阳性百分率”为检测参数对病原体抗体进行定量分析的方法以及以该方法为基础发展的病原体抗体检测试剂盒。

发明内容

[0007] 针对目前以化学发光技术路线和磁珠免疫荧光技术路线为基础所发展的病原体抗体检测试剂盒均需内参抗体才能实现稳定相对定量分析,而内参抗体本质上的不一致属性又导致相同样品的检测结果在不同试剂盒间无法进行相互比对的问题,本发明提供了一种新型病原体抗体定量检测、分析方法。并应用该抗体检测方法建立了一种新型的新冠病毒抗体检测方法及检测试剂盒。该新冠病毒抗体检测方法及检测试剂盒对血清样品的检测无需通过与内参抗体检测数值进行比对即可实现稳定的定量分析,且经临床样品验证本试剂盒对新冠病毒特异性IgM和IgG抗体具有很好的检测灵敏性和特异性。

[0008] 为了达到上述目的,本发明采用了下列技术方案:

[0009] 一种新型病原体抗体检测方法,包括以下步骤:

[0010] 步骤1,目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠的制备和保存:将目标病原体蛋白和内参蛋白通过化学共价交联或生物素/链霉亲和素系统饱和固相于微磁珠表面,制备出目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠;

[0011] 将制备的目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠保存于含有质量体积百分比为0.02%的叠氮化钠的抗体稀释液;

[0012] 步骤2,样品预处理:对待测血源样品以预先确定好的优选稀释度用样品稀释液进行稀释,以100 μL /孔把稀释的样品加入到圆底96孔板的两个孔内,室温下孵育至少5 min(优选5 min);

[0013] 步骤3,磁珠预处理:根据待测样品的数量,以至少5000个步骤1中制备的目标病原体蛋白磁珠或内参磁珠/反应吸取一定数量的目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠至圆底96孔板两孔内,用抗体稀释液以200 μL /孔清洗两次。以200 μL 抗体稀释液轻轻重悬磁珠2-3次,然后把圆底96孔板放在磁极上至少吸附3 min(优选3 min),吸弃孔内上清液后完成一次清洗。在进行下一次磁珠清洗时,要把96孔板从磁极上取下后再重新加入200 μL 抗体稀释液对磁珠进行重悬;

[0014] 步骤4,抗原-抗体反应:根据待测样品的数量,以5 μL /样品对步骤3清洗后的目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠用抗体稀释液进行重悬,后把5 μL 目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠分别加入到步骤2中准备的两个含有100 μL 稀释后样品的两个孔内,轻轻吹匀后室温下孵育至少30 min(优选30 min);

[0015] 步骤5,清洗磁珠:用磁极吸附孔板内磁珠,吸弃上清。从磁极上取下孔板,再向磁

珠孔中加入200 μL 洗涤液重悬磁珠,把微孔板置于磁极上3 min,吸弃上清,保留磁珠于板底。重复本步骤清洗磁珠共3次;

[0016] 步骤6,荧光标记二抗染色:抗体稀释液稀释荧光物质标记的动物抗待测血源样品所来源物种某型抗体的二抗至可饱和染色血源样品预孵育目标病原体蛋白磁珠的浓度。后以100 μL 稀释的二抗液/孔加入步骤5中准备的各孔,吹吸重悬磁珠,室温避光孵育30 min;

[0017] 步骤7,清洗磁珠:用磁极吸附孔板内磁珠,吸弃上清。从磁极上取下孔板,再向磁珠孔中加入200 μL 洗涤液重悬磁珠,把微孔板置于磁极上3 min,吸弃上清,保留磁珠于板底。重复本步骤清洗磁珠共2次;最后一次清洗后,用200 μL 洗涤液重悬磁珠;

[0018] 步骤8,样品的检测:根据步骤6中的荧光物质标记的动物抗某物种某型抗体所用荧光物质确定流式细胞仪检测激光管和检测光路。然后用流式细胞分析仪在该荧光物质对应的荧光光路对步骤7中清洗、重悬后的目标病原体蛋白磁珠和参考磁珠进行检测,并计算经同一样品所孵育的目标病原体蛋白磁珠和参考磁珠经相同荧光光路检测后前者相对后者的磁珠相对阳性百分率,该参数即代表所测样品中含有的目标病原体蛋白特异性某型抗体的活性。

[0019] 所述病原体是可对人或动物发生感染后能够引发疾病的微生物和寄生虫的统称,其中微生物包括细菌、病毒、衣原体、支原体、立克次氏体、螺旋体和真菌;寄生虫包括蠕虫和原虫。

[0020] 所述病原体蛋白和参考蛋白,蛋白可通过物理/化学方法从本源病原体或来源生物体中分离、纯化获得或经基因重组技术在细胞系或工程菌中表达并分离、纯化获得。

[0021] 所述病原体蛋白,病原体中抗原活性较强的1个基因所对应的蛋白或经基因重组技术表达的多个基因融合蛋白或1个基因中的某个蛋白结构域。

[0022] 所述“饱和固相”是目标病原体蛋白或内参蛋白在优化的反应条件下能够固相到微米磁珠上的最多数量。

[0023] 所述血源样品为人或动物血清或血浆。

[0024] 进一步,所述目标病原体蛋白和内参蛋白通过化学共价交联固相于微磁珠表面,包括但不限于(1)目标病原体蛋白或内参蛋白中的伯氨基和巯基与表面甲苯磺酰基化的微磁珠通过共价键直接交联;(2)目标病原体蛋白或内参蛋白中的伯氨基与表面带有羧酸基团的微磁珠形成共价酰胺键进行交联;(3)目标病原体蛋白或内参蛋白中的羧酸基团与表面带有氨基基团的微磁珠通过醛的还原胺化进行共价结合。

[0025] 进一步,所述目标病原体蛋白和内参蛋白通过生物素/链霉亲和素系统固相于微磁珠表面,包括目标病原体蛋白和内参蛋白通过化学方法对目标病原体蛋白和内参蛋白进行生物素化后与表面固相有链霉亲和素磁珠共孵育进行蛋白固相;或是目标病原体蛋白和内参蛋白在其C端或N端与His标签/AVI标签进行融合表达的重组蛋白经生物素连接酶的作用下被生物素标记,后这些通过AVI标签进行生物素化的蛋白与表面固相有链霉亲和素的微磁珠共孵育进行蛋白固相。

[0026] 进一步,所述内参磁珠需要同时满足以下要求:(1)内参磁珠在分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后,内参磁珠产生明显的假阳性染色可能性极低,概率<1%;(2)含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠与不含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠之间的平均荧光强度

没有显著性差异；(3)内参磁珠与目标病原体蛋白磁珠分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后,以含目标病原体抗体的血清或血浆所孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率显著高于以不含目标病原体抗体的血清或血浆所孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率,从而可以有效区分含目标病原体特异性抗体的血清或血浆样品和不含目标病原体抗体的血清或血浆样品。

[0027] 进一步,所述步骤2中优选稀释度通过下列方法进行确定:将待测血源样本用样本稀释液按1:10~1:80稀释;以无目标病原体感染经历的所测样品同种血源样品为阴性对照样品;以一组阴性对照样品在1:10~1:80范围稀释后与目标病原体蛋白磁珠孵育并经荧光物质标记二抗染色后,磁珠发生明显假阳性荧光染色频率低于10%的最小稀释度为待测样品的优选稀释度。

[0028] 进一步,所述抗体稀释液为含有0.1~0.5% 不含IgG的牛血清白蛋白的0.01M磷酸盐缓冲液,pH值为7.2~7.4;所述微磁珠磁珠直径为0.8~5 μm 。

[0029] 进一步,所述洗涤液为含有体积百分比为0.025% 吐温的0.01M 磷酸盐缓冲液,pH值为7.4;所述荧光物质包括荧光染料、荧光蛋白、荧光染料/荧光蛋白合成物及量子点。

[0030] 进一步,所述样品稀释液包含对待测物种血源样品与目标病原体蛋白磁珠及内参磁珠非特异结合有较好封闭作用的、且与待测物种不同种类的动物血清5~10%、甘油4~8%、0.1~1%吐温20、硼酸盐缓冲液30~50%、无菌去离子水30~50%,并用NaOH将pH调节至7.4左右。

[0031] 进一步,所述步骤6中可饱和染色血源样品预孵育目标病原体蛋白磁珠的浓度通过以下方法进行确定:对用样品稀释液以优化稀释度稀释的含有目标病原体蛋白抗体的血源样品孵育的目标病原体蛋白磁珠,在清洗后与用抗体稀释液稀释的一系列不同浓度的荧光物质标记的抗所测血源样品中某类抗体的二抗染色后,目标病原体蛋白磁珠平均荧光强度达到高台水平所对应的二抗终浓度。

[0032] 进一步,所述步骤8样品的检测中:在用流式细胞分析仪对磁珠进行检测时,首先通过调节电压在FSC门和SSC门中找到并圈定磁珠群,再从磁珠群收集2000个或以上磁珠,对所收集磁珠在荧光物质标记二抗对应的荧光通路对磁珠荧光染色情况进行分析;

[0033] 用流式分析软件对流式数据进行分析时,在荧光物质标记二抗相对应的荧光通道画组方图对内参磁珠和目标病原体蛋白磁珠的染色图进行分析;以内参磁珠染色图的右侧边缘画门,分析目标病原体蛋白磁珠染色图在该门内的磁珠荧光染色百分率;该百分率数值就是目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠经相同荧光光路检测后的磁珠相对阳性百分率;

[0034] 以该数值为依据既可对所测血源样品中目标病原体蛋白特异性抗体的活性进行定量分析也可对所测血源样品是否存在病原体蛋白特异性抗体进行定性判断。

[0035] 一种新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒。

[0036] 进一步,所述试剂盒包括S1蛋白磁珠、内参磁珠、荧光物质标记的动物抗人IgG抗体、荧光物质标记的动物抗人IgM抗体、SARS-CoV-2 IgG抗体阴性质控品、SARS-CoV-2 IgG抗体阳性质控品、SARS-CoV-2 IgM抗体阴性质控品、SARS-CoV-2 IgM抗体阳性质控品、样品稀释液、抗体稀释液和浓缩洗涤液。

[0037] 进一步,所述S1蛋白磁珠和内参磁珠通过以下方法制备得到:在每20 μL 0.01M pH值为7.2~7.4的磷酸盐缓冲液中以每10 μg 固相有链霉亲和素的磁珠对200~800 ng (优

选剂量为300 ng)的预生物素化重组新型冠状病毒刺突蛋白S1亚基(S1蛋白)或预生物素化重组人血管紧张转化酶2蛋白(ACE2蛋白)为比例把S1蛋白或ACE2蛋白固相到磁珠上;室温下共孵育40 min,在共孵育20 min后吹吸重悬一次,共孵育后把固相有S1蛋白的链霉亲和素磁珠或固相有ACE2蛋白的链霉亲和素磁珠转入一个新的容器中,置于2℃~8℃,当磁珠完全沉降于底部后,吸弃上清;以含有质量体积百分比为0.02% 叠氮化钠的抗体稀释液重悬磁珠沉淀,体积为固相时磷酸盐缓冲液体积的4倍,制备成S1蛋白磁珠和内参磁珠;根据所需S1蛋白磁珠和内参磁珠的数量,制备磁珠时可按上述比例进行放大或缩小。

[0038] 进一步,所述荧光物质标记的动物抗人IgG抗体浓度为1~1000 $\mu\text{g/mL}$;所述荧光物质标记的动物抗人IgG抗体中的荧光物质包括但不限于荧光染料、荧光蛋白、荧光染料/荧光蛋白合成物及量子点,要求该荧光物质与标记动物抗人IgM抗体中的荧光物质在流式细胞仪检测时所用光路不同;所述荧光物质标记动物抗人IgG抗体中的动物包括但不限于小鼠、山羊、绵羊、牛、驴、兔、大鼠及羊驼。

[0039] 进一步,所述荧光物质标记的动物抗人IgM抗体浓度为1~1000 $\mu\text{g/mL}$;所述荧光物质标记动物抗人IgM抗体中的荧光物质包括但不限于荧光染料、荧光蛋白、荧光染料/荧光蛋白合成物及量子点,要求该荧光物质与标记动物抗人IgG抗体中的荧光物质在流式细胞仪检测时所用光路不同;所述荧光物质标记动物抗人IgM抗体中的动物包括但不限于小鼠、山羊、绵羊、牛、驴、兔、大鼠及羊驼。

[0040] 进一步,所述SARS-CoV-2 IgG抗体阴性质控品为保存于含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的pH值为7.4磷酸盐缓冲液的人IgG;

[0041] 所述SARS-CoV-2 IgG抗体阳性质控品为保存于含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的pH值为7.4磷酸盐缓冲液的人源化或全人源抗新冠病毒S1蛋白IgG重组抗体或含有抗新冠病毒S1蛋白IgG抗体的人血清。

[0042] 进一步,所述SARS-CoV-2 IgM抗体阴性质控品为保存于含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的pH值为7.4磷酸盐缓冲液的人IgM;

[0043] 所述SARS-CoV-2 IgM抗体阳性质控品为保存于含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的pH值为7.4磷酸盐缓冲液的人源化或全人源抗新冠病毒S1蛋白IgM重组抗体或含有抗新冠病毒S1蛋白IgM抗体的人血清。

[0044] 进一步,所述样品稀释液包含以体积百分数记的以下物质:山羊血清5~10%、甘油4~8%、0.1~1%的吐温20、硼酸盐缓冲液30~50%、无菌去离子水30~50%,并用NaOH将pH调节至7.2~7.4。

[0045] 进一步,所述抗体稀释液为含有0.1~0.5% 牛血清白蛋白的0.01M磷酸盐缓冲液,pH值为7.2~7.4;所述浓缩洗液为含有体积百分比为0.25% 吐温的0.1M 磷酸盐缓冲液,pH值为7.4;实际使用时,浓缩洗液需用去离子水稀释10倍成洗液后再使用。

[0046] 进一步,所述固相有链霉亲和素的微磁珠直径为0.8~5 μm ;所述预生物素化的重组S1蛋白和预生物素化的重组人ACE2蛋白通过化学方法对重组S1蛋白和重组人ACE2蛋白进行生物素化所获得或是S1蛋白和人ACE2蛋白在各自C端与His标签/AVI标签进行融合表达的重组蛋白,这两个蛋白在生物素连接酶的作用下被生物素标记而获得;重组S1蛋白和重组人ACE2蛋白或重组S1-His标签/AVI标签融合蛋白和重组人ACE2-His标签/AVI标签融合蛋白均生产于哺乳动物细胞;所述人ACE2蛋白为人ACE2蛋白细胞外结构域的全部或部分

分。

[0047] 一种新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒的应用方法,包括以下步骤:

[0048] 步骤1,样本稀释:将待测血源样本用样本稀释液按1:10~1:80稀释,优选1:40;

[0049] 步骤2,质控品稀释:以抗体稀释液对SARS-CoV-2 IgG及 IgM阳性质控品进行一定的稀释,要求稀释后的SARS-CoV-2 IgG阳性质控品和SARS-CoV-2 IgM阳性质控品及其相对应的荧光物质标记的动物抗人二抗在分别平行对S1蛋白磁珠和内参磁珠进行一抗孵育、二抗荧光染色和流式细胞仪样品检测后,S1蛋白磁珠和内参磁珠的磁珠相对阳性百分率在20%-80%;以抗体稀释液对SARS-CoV-2 IgG及 IgM阴性质控品进行一定的稀释,要求稀释后的SARS-CoV-2 IgG阴性质控品和SARS-CoV-2 IgM阴性质控品及其相对应的荧光物质标记的动物抗人二抗在分别平行对S1蛋白磁珠和内参磁珠进行一抗孵育、二抗荧光染色和流式细胞仪样品检测后,S1蛋白磁珠和内参磁珠的磁珠相对阳性百分率<5%;

[0050] SARS-CoV-2 IgG及IgM阴性和阳性质控品均用抗体稀释液稀释到终浓度为2~100 ng/mL,如果计划对血清中新冠病毒IgG和IgM同时进行检测,那么IgG阴性质控品和阳性质控品的优选浓度为20 ng/mL,IgM阴性质控品和阳性质控品的优选浓度为40 ng/mL;如果计划只对血清中新冠病毒IgG抗体进行检测,那么IgG阴性质控品和阳性质控品的优选浓度为10 ng/mL。如果计划只对血清中新冠病毒IgM抗体进行检测,那么IgM阴性质控品和阳性质控品的优选浓度为20 ng/mL;

[0051] 步骤3,样品孔板布局:如果实验计划对血源样品中新冠病毒IgG和IgM抗体同时进行检测,那么把稀释的IgG阴性质控品和IgM阴性质控品各50 μ L加入到圆底96孔板的同一孔中,把稀释的IgG阳性质控品和IgM阳性质控品各50 μ L加入到同一孔中;如果实验计划只对血源样品中新冠病毒IgG或IgM抗体进行检测,那么对IgG或IgM阴性质控品和阳性质控品分别以100 μ L/孔加入到2个孔中;无论计划对血源样品中新冠病毒IgG和IgM抗体同时进行检测还是只对血源样品中新冠病毒IgG或IgM抗体进行检测,都是把稀释的血源样品以100 μ L/孔加入到2个孔中;

[0052] 步骤4,抗原-抗体反应:在每次试验中,每个血源样品或每个质控品都需要在步骤3中准备好的2个反应孔中分别加入S1蛋白磁珠和内参磁珠。以1 μ L S1蛋白磁珠液或内参磁珠液/反应孔计算出每次实验所需S1蛋白磁珠和内参磁珠的总体积。根据计算结果取出相应体积的S1蛋白磁珠和内参磁珠放入96孔板,用200 μ L抗体稀释液清洗磁珠两次,磁极吸附磁珠,吸弃上清液,加入抗体稀释液重悬磁珠,以5 μ L S1蛋白磁珠液或内参磁珠液/反应孔加入步骤3中的各孔中,轻轻吹匀,把96孔板放置于室温孵育30 min;

[0053] 步骤5,清洗磁珠:用磁极吸附孔板内磁珠,吸弃上清。从磁极上取下孔板,再向磁珠孔中加入200 μ L 洗液重悬磁珠,把微孔板置于磁极上3分钟,吸弃上清,保留磁珠于板底。重复本步骤清洗磁珠共3次;

[0054] 步骤6,荧光标记二抗染色:如果计划对新冠病毒IgG和IgM抗体同时检测,那么用同一份抗体稀释液稀释荧光物质标记动物抗人IgG抗体和荧光物质标记动物抗人IgM抗体至终浓度为可饱和染色步骤5所得经血源样品预孵育并清洗的S1蛋白磁珠的浓度;如果计划只对新冠病毒IgG或IgM抗体进行检测,那么用抗体稀释液稀释荧光物质标记的动物抗人IgG抗体或荧光物质标记的动物抗人IgM抗体至终浓度为可饱和染色步骤5所得经血源样品预孵育并清洗的S1蛋白磁珠的浓度。要求把上述荧光物质标记的动物抗人二抗稀释液以

100 μ l /孔加入步骤5中准备的各孔,吹吸重悬磁珠,室温避光孵育30分钟;

[0055] 步骤7,清洗磁珠:用磁极吸附孔板内磁珠,吸弃上清;从磁极上取下孔板,再向磁珠孔中加入200 μ L洗涤液重悬磁珠,把微孔板置于磁极上3分钟,吸弃上清,保留磁珠于板底;重复本步骤清洗磁珠共2次;最后一次清洗后,用200 μ L洗涤液重悬磁珠;

[0056] 步骤8,样品的检测:用流式细胞分析仪在上述两荧光物质对应的荧光光路对血源样品、抗体阴性质控品和抗体阳性质控品染色的S1蛋白磁珠和内参磁珠进行检测,并计算同一样品所处理S1蛋白磁珠和内参磁珠经相同荧光光路检测后的相对磁珠阳性百分率;

[0057] 步骤9,检测结果的判定:当IgG或IgM阴性质控品所孵育的两种磁珠所测得的相对磁珠阳性百分率 $<5\%$,同时IgG或IgM阳性质控品所孵育的两种磁珠所测得的相对磁珠阳性百分率 $\geq 20\%$ 时,那么本次试验判断视为有效试验。

[0058] 进一步,所述步骤6荧光物质标记动物抗人IgG抗体和荧光物质标记动物抗人IgM抗体终浓度为可饱和染色经血源样品预孵育并清洗的S1蛋白磁珠的浓度,确定荧光标记的动物抗人IgG或IgM二抗可饱和染色血源样品预孵育并清洗的S1蛋白磁珠的终浓度方法为:对于用样品稀释液以1:40稀释的含有抗S1蛋白IgG或IgM抗体的血源样品孵育的S1蛋白磁珠,在清洗后与用抗体稀释液稀释的一系列不同浓度的荧光物质标记的抗人IgG或IgM二抗染色后,S1蛋白磁珠平均荧光强度达到高台水平所对应的二抗终浓度。

[0059] 进一步,所述步骤8在用流式细胞分析仪对磁珠进行检测时,首先通过调节电压在FSC和SSC门中找到并圈定磁珠群,再从磁珠群收集2000个或以上磁珠,如果只对新冠病毒IgG或IgM抗体进行检测,那么就对所收集磁珠在荧光物质标记动物抗人IgG或IgM抗体相对应的荧光通路对磁珠荧光染色情况进行分析;如果对新冠病毒IgG和IgM抗体同时进行检测,那么就对所收集磁珠在荧光物质标记动物抗人IgG和IgM抗体相对应的荧光通路对磁珠荧光染色情况同时进行分析;

[0060] 用流式分析软件对流式数据进行分析时,在荧光物质标记动物抗人IgG和IgM抗体相对应的荧光通道画组方图对所收集的内参磁珠和S1蛋白磁珠进行染色分析;以内参磁珠染色图的右侧边缘画门,分析S1磁珠染色图在该门内的磁珠阳性染色百分率;该百分率数值就是S1蛋白磁珠和内参蛋白磁珠经相同荧光光路检测后的相对磁珠阳性百分率,下简称为:磁珠相对阳性百分率;该参数既可用于对血源样品中新冠病毒S1蛋白特异性IgG或IgM抗体进行定量分析,也可用于对血清中是否存在新冠病毒S1蛋白特异性IgG和IgM抗体进行定性判断。

[0061] 本发明在病原体抗体检测系统中除应用目标病原体蛋白磁珠捕获血源样品中目标病原体蛋白特异性的抗体外,还创造性地引入内参磁珠作为检测内参,通过内参磁珠作为目标病原体蛋白磁珠的阴性对照使检测系统在无需内参抗体的条件下通过分析目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率这一参数即可实现所测样品抗体活性的定量分析。从而使检测结果只决定于所测样品本身而与内参抗体不再有关。具体来讲,就是在抗体检测过程中以所测血源样品和荧光物质标记二抗相继对目标病原体蛋白磁珠和内参磁珠进行平行处理,然后以内参磁珠的染色峰图作为阴性对照“画门”,分析目标病原体蛋白磁珠相对于内参磁珠的相对阳性染色百分率,即为磁珠相对阳性百分率。以该参数数值为依据可分析血源样品中目标病原体蛋白特异性抗体活性。

[0062] 内参磁珠是在本抗体检测系统中保证抗体活性检测准确的重要因素。合格的内参

磁珠需要同时满足如下要求：(1)内参磁珠在分别经血浆或血清样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后，内参磁珠产生明显的假阳性染色可能性极低(概率<1%)；(2)含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠与不含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠之间的平均荧光强度没有显著性差异；(3)内参磁珠与目标病原体蛋白磁珠分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后，以含目标病原体抗体的血清或血浆所孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率显著高于以不含目标病原体抗体的血清或血浆所孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率，从而可以有效区分含目标病原体特异性抗体的血清或血浆样品和不含目标病原体抗体的血清或血浆样品。通过对多种内参蛋白候选物进行染色比较，发现只有人ACE2固相磁珠可以很好的满足上述内参磁珠的要求，从而为本发明所公开的抗体检测方法确定了关键的系统组分。

[0063] 以本发明所公开的新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒及其使用方法对大量明确已知健康志愿者、非新冠其它病原体感染者、新冠病毒感染者及新冠病毒感染康复者的血清样品进行检测，确认本发明所公开的新冠病毒IgG和IgM抗体检测试剂盒具有高水平的检测灵敏性和特异性，从而证明了本发明所公开的新型抗体检测技术及以该技术为基础发展的新冠病毒IgG和IgM抗体检测试剂盒的检测有效性。

[0064] 与现有技术相比本发明具有以下优点：

[0065] 本发明公开了一种应用内参磁珠代替内参抗体对血源样品中病原体抗体进行定量分析的方法及以该方法为基础发展出的新冠病毒抗体检测试剂盒。现有技术通过对所测血源样品孵育的病原体蛋白磁珠的平均荧光强度与内参抗体孵育的病原体蛋白磁珠的平均荧光强度相比对确定所测样品中病原体抗体的活性。由于内参抗体具有无法保证完全一致性的本质以及终端用户所用仪器的检测性能或检测参数设置不同导致检测相同病原体抗体的不同试剂盒在检测同一样品时检测结果不同，从而导致同一样品的检测结果不具有广泛可比性。而本发明所公开的抗体检测方法通过转换内参，以病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率这一参数对抗体活性进行定量分析。当流式细胞仪检测条件或检测性能发生变化时，荧光抗体染色的内参磁珠和目标病原体蛋白磁珠将受到相同程度的影响，因此磁珠相对阳性百分率这一数值将不会产生明显变化，从而有效确保了检测结果的稳定性。由于所用制备内参磁珠和病原体蛋白磁珠的原料是重组蛋白和磁珠，而品质相同的原料又可在标准相同的条件下通过大规模生产稳定获得。在这种情况下样品中抗体活性只决定于样品的本身，因此本技术相对于现有技术相比抗体活性检测结果会更稳定，以本发明技术为基础生产的病原体抗体检测试剂盒具有以现有技术为基础生产的病原体抗体检测试剂盒所不具备的对同一样品的抗体活性检测结果可比性的优势。

附图说明

[0066] 图1. 分析内参磁珠经健康志愿者、非新冠其它病原体感染者(下简称为：其它病原体感染者)、新冠病毒感染者或新冠感染康复者血清样品孵育及AF488标记羊抗人IgG二抗染色后，内参磁珠的平均荧光强度。图A为组方图分析健康志愿者(n=40)、其它病原体感染者(n=20)、新冠病毒感染者(n=64)或新冠感染康复者(n=12)各血清样品所孵育内参磁珠的羊抗人IgG抗体的平均荧光强度原始数据。图B为比较分析无新冠病毒感染经历者血清样

品(包括健康志愿者和其它病原体感染者两组血清样品)和有新冠病毒感染经历者血清样品(包括新冠病毒感染者和新冠病毒感染康复者两组血清样品)所孵育内参磁珠的羊抗人IgG抗体平均荧光强度。

[0067] 图2. 分析内参磁珠经健康志愿者、其它病原体感染者、新冠病毒感染者或新冠感染康复者血清样品孵育及PE标记鼠抗人IgM二抗染色后,内参磁珠的平均荧光强度。图A:组方图分析健康志愿者(n=27)、其它病原体感染者(n=23)、新冠病毒感染者(n=57)或新冠感染康复者(n=13)各血清样品所孵育内参磁珠的鼠抗人IgM抗体的平均荧光强度原始数据。图B:比较分析无新冠病毒感染经历者血清样品(包括健康志愿者和其它病原体感染者两组血清样品)和有新冠病毒感染经历者血清样品(包括新冠病毒感染者和新冠病毒感染康复者两组血清样品)所孵育内参磁珠的鼠抗人IgM抗体平均荧光强度。

[0068] 图3. 比较分析无新冠病毒感染经历者血清样品和有新冠病毒感染经历者血清样品的新冠病毒特异性IgG抗体和IgM抗体磁珠相对阳性百分率。S1蛋白磁珠和内参磁珠平行经过血清样品孵育及AF488标记的羊抗人IgG二抗或PE标记的鼠抗人IgM二抗染色,流式细胞术分析新冠病毒特异性IgG和IgM抗体磁珠相对阳性百分率。当进行新冠病毒IgG抗体分析时,无新冠病毒感染经历者的血清样品来自40名健康志愿者和20名其它病原体感染者,有新冠病毒感染经历者的血清样品来自64名新冠病毒感染者和12名新冠感染康复者;当进行新冠病毒IgM抗体分析时,无新冠病毒感染经历者的血清样品来自27名健康志愿者和23名其它病原体感染者,有新冠病毒感染经历者的血清样品来自57名新冠病毒感染者和13名新冠感染康复者。图A和图B:分别比较无新冠病毒感染经历者血清样品和有新冠病毒感染经历者血清样品的新冠病毒特异性IgG和IgM抗体磁珠相对阳性百分率。

[0069] 图4. 应用本发明所公开的新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒及其使用方法对健康志愿者、其它病原体感染者、新冠病毒感染者和新冠感染康复者的血清样品检测结果对试剂盒检测新冠病毒IgG抗体和IgM抗体的性能进行ROC曲线分析。图A:应用本发明所公开的新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒及其使用方法对40名健康志愿者、20名其它病原体感染者、64名新冠病毒感染者和12名新冠感染康复者的血清样品所检测的新冠病毒特异性IgG抗体磁珠相对阳性百分率数据进行试剂盒检测新冠病毒IgG抗体性能的ROC曲线分析。图B:应用本发明所公开的新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒及其使用方法对27名健康志愿者、23名其它病原体感染者、57名新冠病毒感染者和13名新冠感染康复者的血清样品所检测的新冠病毒特异性IgM抗体磁珠相对阳性百分率数据进行试剂盒检测新冠病毒IgM抗体性能的ROC曲线分析。

[0070] 图5. 流式细胞仪所设置检测电压的变化对检测新冠病毒特异性IgG和IgM抗体磁珠相对阳性百分率结果的影响。图A:组方图分析流式细胞仪在不同检测电压条件下对相同血清样品所测得的新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率各数据。图B:对图A数据进行作图,并分析该组数据的变异系数(CV)。图C:组方图分析流式细胞仪在不同检测电压条件下对相同血清样品所测得的新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率各数据。图D:对图C数据进行作图,并分析该组数据的变异系数(CV)。

[0071] 图6. 对BD流式细胞仪和Beckman流式细胞仪所测相同一组血清样品的新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率数据的一致性分析。图A:组方图分析BD流式细胞仪所测一组血清样品的各样品新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率结果。图B:组方图分析Beckman流

式细胞仪所测一组血清样品的各样品新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率结果。图C：Bland-Altman方法分析BD流式细胞仪和Beckman流式细胞仪分别所测相同一组血清样品的新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率数据的一致性。

[0072] 图7. 对BD流式细胞仪和Beckman流式细胞仪所测相同一组血清样品的新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率数据的一致性分析。图A：组方图分析BD流式细胞仪所测一组血清样品的各样品新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率结果。图B：组方图分析Beckman流式细胞仪所测一组血清样品的各样品新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率结果。图C：Bland-Altman方法分析BD流式细胞仪和Beckman流式细胞仪分别所测相同一组血清样品的新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率数据的一致性。

具体实施方式

[0073] 下面结合本发明实施例和附图,对本发明实施例中的技术方案进行具体、详细的说明。以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,除所用血清样品外原料均为市售产品。健康志愿者血清样品是从40位身体健康、未曾接种过新冠病毒疫苗且未感染过新冠病毒的志愿者处采集并保存;非新冠其它病原体感染者血清样品,采集自23位非新冠病毒感染但其它传染性疾病感染的就医病人,这些病人血清呈甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、EB病毒、人巨细胞病毒、腺病毒、衣原体、支原体或柯萨奇病毒抗体阳性;新冠病毒感染者血清样品是从64位临床确诊新冠病毒感染病人处采集并保存,包含确诊后早、中、晚不同阶段样品;新冠病毒感染者康者血清样品是从25位新冠病毒感染康复后志愿者采集并保存。

[0074] 一、在所有实施例中如未特别指明所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒由以下各组分组成:S1蛋白磁珠、内参磁珠、AF488标记的山羊抗人IgG抗体、PE标记的鼠抗人IgM抗体、SARS-CoV-2 IgG抗体阴性质控品、SARS-CoV-2 IgG抗体阳性质控品、SARS-CoV-2 IgM抗体阴性质控品、SARS-CoV-2 IgM抗体阳性质控品、样品稀释液、抗体稀释液和浓缩洗涤液。

[0075] 其中S1蛋白磁珠和内参磁珠的制备方法如下:在140 μ L 0.01M pH值为7.4的磷酸盐缓冲液中以70 μ g的预生物素化重组S1蛋白或是预生物素化重组人ACE2蛋白与2.1 μ g的固相有链霉亲和素的磁珠室温下共孵育40 min对S1蛋白或人ACE2蛋白进行磁珠固相。在共孵育20 min后吹吸重悬一次,共孵育后把固相有S1蛋白的链霉亲和素磁珠或固相有ACE2蛋白的链霉亲和素磁珠转入一个新的微量离心管中,置于2-8 $^{\circ}$ C,当磁珠完全沉降于底部后,吸弃上清。以560 μ L含有质量体积百分比为0.02% 叠氮化钠的抗体稀释液重悬磁珠,制备成S1蛋白磁珠和内参磁珠。使用时以1 μ L的S1蛋白磁珠或内参磁珠悬液/反应进行实验。其中链霉亲和素磁珠磁珠为Invitrogen公司产品Dynabeads[™] MyOne[™] Streptavidin T1 (货号为65601),该磁珠的直径为1 μ m;其中预生物素化人ACE2蛋白购于Kactus biosystem公司(货号为ACE-HM401),是人ACE2胞外结构域(Gln18-Ser740)C端与His标签及Avi标签融合表达重组蛋白在生物素酶的作用下对Avi标签进行生物素化;其中预生物素化S1蛋白购于北京百普赛斯生物科技公司(货号为S1N-C82E8),是新冠病毒S1蛋白(Vall16-Arg685)C端与His标签及Avi标签融合表达重组蛋白在生物素酶的作用下对Avi标签进行生物素化。

[0076] AF488标记的山羊抗人IgG抗体:产自赛默飞公司的AF488标记的山羊抗人IgG (H+L) 二抗以(货号为A-11013)以含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液(pH值为7.4)稀释至终浓度为200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制备而成。

[0077] PE标记的鼠抗人IgM抗体:购自Biolegend公司(货号为314508,克隆号:MHM-88)。

[0078] SARS-CoV-2 IgG抗体阴性质控品:产自Biolegend公司的人IgG1同型对照重组抗体(货号为403502)以含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液(pH值为7.4)稀释至终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制备而成。

[0079] SARS-CoV-2 IgG抗体阳性质控品:产自义翘神州公司的人源化S1蛋白IgG重组抗体(货号为40150-D004)以含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液(pH值为7.4)稀释至终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制备而成。

[0080] SARS-CoV-2 IgM抗体阴性质控品:产自Sigma公司的人IgM(货号为18260)以含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液(pH值为7.4)稀释至终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制备而成。

[0081] SARS-CoV-2 IgM抗体阳性质控品:产自博奥龙公司的全人源化S1蛋白IgM重组抗体(货号为BF03084-SR-1mL)以含有质量体积比为0.5%牛血清白蛋白和质量体积比为0.02%叠氮化钠的磷酸盐缓冲液(pH值为7.4)稀释至终浓度为5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 制备而成。

[0082] 样品稀释液:为包含10%的山羊血清、6%的甘油、0.5%的吐温20、0.0835M的硼酸缓冲液的水溶液,pH值用NaOH调节至7.4。

[0083] 抗体稀释液为含有质量体积比为0.1% 牛血清白蛋白的0.01M磷酸盐缓冲液,pH值为7.4;浓缩洗液为含有体积百分比为0.25% 吐温的0.1M 磷酸盐缓冲液,pH值为7.4。使用时,浓缩洗液需用去离子水稀释10倍成洗液后再使用。

[0084] 所述内参磁珠需要同时满足以下要求:(1)内参磁珠在分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后,内参磁珠产生明显的假阳性染色可能性极低(概率<1%);(2)含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠与不含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠之间的平均荧光强度没有显著性差异;(3)内参磁珠与目标病原体蛋白磁珠分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后,以含目标病原体血清或血浆孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率显著高于以不含目标病原体抗体血清或血浆孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率,从而可以有效区分含目标病原体特异性抗体的血清或血浆样品和不含目标病原体抗体的血清或血浆样品。

[0085] 二、在所有实施例中如未特别指明所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒的使用方法为:

[0086] 步骤1,样本稀释:将待测血清或血浆样本用样本稀释液按1:40稀释;如果是人源化或全人源化S1蛋白特异性IgG或IgM重组抗体,就以抗体稀释液稀释至待测终浓度;

[0087] 步骤2,质控品稀释:SARS-CoV-2 IgG阴性质控品和SARS-CoV-2 IgG阳性质控品分别用抗体稀释液按照1:500比例稀释,SARS-CoV-2 IgM阴性质控品和SARS-CoV-2 IgM阳性质控品按照1:250比例稀释;

[0088] 步骤3,加样布局:对IgG或IgM阴性质控品和阳性质控品分别以100 μL /孔平行加入到96孔板中的2个孔中。把稀释的样品以100 μL /孔加入到2个孔中。

[0089] 步骤4, 抗原-抗体反应: 在每次试验中, 每个样品或每个质控品都需要在步骤3中准备好的2个反应孔中分别加入S1蛋白磁珠和内参磁珠。以1 μL S1蛋白磁珠液或内参磁珠液/反应孔计算出每次实验所需S1蛋白磁珠和内参磁珠的总体积。根据计算结果取出相应体积的S1蛋白磁珠和内参磁珠放入96孔板, 用200 μL 抗体稀释液清洗磁珠两次, 磁极吸附磁珠, 吸弃上清液, 加入抗体稀释液重悬磁珠, 以5 μL S1蛋白磁珠液或内参磁珠液/反应孔加入步骤3中的各孔中, 轻轻吹匀, 把96孔板放置于室温孵育30 min;

[0090] 步骤5, 清洗磁珠: 用磁极吸附孔板内磁珠, 吸弃上清。从磁极上取下孔板, 再向磁珠孔中加入200 μL 洗液重悬磁珠, 把微孔板置于磁极上3 min, 吸弃上清, 保留磁珠于板底。重复本步骤清洗磁珠共3次;

[0091] 步骤6, 荧光标记二抗染色: 如果计划对新冠病毒IgG抗体检测, 那么用抗体稀释液稀释AF488标记山羊抗人IgG抗体至终浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。如果计划对新冠病毒IgM抗体检测, 那么用抗体稀释液稀释PE标记鼠抗人IgM抗体至终浓度为0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。要求把上述荧光物质标记的动物抗人二抗稀释液以100 μL /孔加入步骤5中准备的各孔, 吹吸重悬磁珠, 室温避光孵育30min;

[0092] 步骤7, 清洗磁珠: 用磁极吸附孔板内磁珠, 吸弃上清。从磁极上取下孔板, 再向磁珠孔中加入200 μL 洗涤液重悬磁珠, 把微孔板置于磁极上3min, 吸弃上清, 保留磁珠于板底。重复本步骤清洗磁珠共2次; 最后一次清洗后, 用200 μL 洗涤液重悬磁珠;

[0093] 步骤8, 样品的检测: 用流式细胞分析仪在上述AF488和PE对应的荧光光路对样品、抗体阴性质控品和抗体阳性质控品染色的S1蛋白磁珠和内参磁珠进行检测; 用流式细胞分析仪对磁珠进行检测时, 首先通过调节电压在FSC和SSC门中找到并圈定磁珠群, 再从磁珠群收集2000个或以上磁珠进行分析, 计算同一样品所处理S1蛋白磁珠和内参磁珠经相同荧光光路检测后的磁珠相对阳性百分率;

[0094] 步骤9, 数据分析方法: 用流式分析软件对流式数据进行分析时, 在AF488标记动物抗人IgG二抗和PE标记动物抗人IgM二抗相对应的荧光通道画组方图对所收集的内参磁珠和S1蛋白磁珠进行染色分析。以内参磁珠染色图的右侧边缘画门, 分析S1磁珠染色图在该门内的磁珠阳性染色百分率。该百分率数值就是S1蛋白磁珠和内参蛋白磁珠经相同荧光光路检测后的磁珠相对阳性百分率(下简称为: 磁珠相对阳性百分率)。该参数既可用于对血源样品中新冠病毒S1蛋白特异性IgG或IgM抗体进行定量分析, 也可用于对血清中是否存在新冠病毒S1蛋白特异性IgG和IgM抗体进行定性判断。

[0095] 步骤10, 检测结果的判定: 当IgG或IgM阴性质控品所孵育的两种磁珠所测得的相对磁珠阳性百分率 $<5\%$, 同时IgG或IgM阳性质控品所孵育的两种磁珠所测得的相对磁珠阳性百分率 $\geq 20\%$ 时, 那么本次试验判断视为有效试验。

[0096] 实施例1

[0097] 比较分析经各组人群血清样品孵育的内参磁珠在AF488标记的羊抗人IgG二抗染色后的平均荧光强度。

[0098] 实验材料:

[0099] (1) 具体实施方式中所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒

[0100] (2) 采集于40位健康志愿者、20位非新冠病毒其它病原体感染者(下简称为其它病原体感染者)、64位新冠病毒感染者及12位新冠病毒感染康复者的血清样品。

[0101] 实验仪器及分析软件:

[0102] (1)BD LSRFortessa X-20流式细胞仪 (2)GraphPad 9.0软件 (3)Flowjo 10.0软件

[0103] 试验方法及步骤:

[0104] 应用具体实施方式中新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒的使用方法对健康志愿者、其它病原体感染者、新冠病毒感染者及新冠病毒感染康复者四组人群各血清样品孵育的内参磁珠进行AF488标记的羊抗人IgG二抗染色,然后分析内参磁珠表面羊抗人IgG抗体荧光强度。无新冠病毒感染经历者包括健康志愿者和其它病原体感染者,有新冠病毒感染经历者包括新冠病毒感染者和新冠病毒感染康复者。利用非成对t检验比较两组数据之间的差异。

[0105] 实验结果:

[0106] 根据图1.A所示健康志愿者、其它病原体感染者、新冠病毒感染者及新冠病毒感染康复者四组人群共136个血清样品孵育的内参磁珠表面羊抗人IgG抗体平均荧光强度很低,且数值相近。这些数据表明内参磁珠与所测四组人群各血清样品中人IgG抗体及其它物质没有发生明显的非特异结合,因此内参磁珠与人血清中物质发生非特异性结合而导致荧光标记二抗发生明显非特异染色内参磁珠的概率应该低于0.75%。说明本发明所述内参磁珠符合对内参磁珠的第一点要求:即内参磁珠在分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后,内参磁珠产生明显的假阳性染色可能性极低(概率低于1%)。另外根据图1.B所示无新冠病毒感染经历者和有新冠病毒感染经历者两组血清样品所孵育的内参磁珠表面羊抗人IgG抗体平均荧光强度没有显著性区别,说明本发明所述内参磁珠符合对内参磁珠的第二点要求:即含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠与不含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠之间的平均荧光强度没有显著性差异。

实施例2

[0107] 比较分析经各组人群血清样品孵育的内参磁珠在PE标记的鼠抗人IgM二抗染色后的平均荧光强度。

[0108] 实验材料:

[0109] (1)具体实施方式中所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒

[0110] (2)采集于27位健康志愿者、23位其它病原体感染者、57位新冠病毒感染者及13位新冠病毒感染康复者的血清样品。

[0111] 实验仪器及分析软件:

[0112] (1)BD LSRFortessa X-20流式细胞仪 (2)GraphPad 9.0软件 (3)Flowjo 10.0软件

[0113] 试验方法及步骤:

[0114] 应用具体实施方式中新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒的使用方法对健康志愿者、其它病原体感染者、新冠病毒感染者及新冠病毒感染康复者四组人群各血清样品孵育的内参磁珠进行PE标记的鼠抗人IgM二抗染色,然后分析内参磁珠表面鼠抗人IgM抗体荧光强度。无新冠病毒感染经历者包括健康志愿者和其它病原体感染者,有新冠病毒感染经历者包括新冠病毒感染者和新冠病毒感染康复者。利用非成对t检验比较两组数据之间的差异。

[0115] 实验结果:

[0116] 根据图2.A所示健康志愿者、其它病原体感染者、新冠病毒感染者及新冠病毒感染康复者四组人群共120个血清样品孵育的内参磁珠表面鼠抗人IgM抗体平均荧光强度很低,且数值相近。这些数据表明内参磁珠与所测四组人群各血清样品中人IgM抗体及其它物质没有发生明显的非特异结合,因此内参磁珠与人血清中物质发生非特异性结合而导致荧光标记二抗发生明显非特异染色内参磁珠的概率应该低于0.83%。说明本发明所述内参磁珠在检测病原体抗体时符合对内参磁珠的第一点要求:即所述内参磁珠在分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后,内参磁珠产生明显的假阳性染色可能性极低(概率低于1%)。另外根据图2.B所示无新冠病毒感染经历者和有新冠病毒感染经历者两组血清样品所孵育的内参磁珠表面鼠抗人IgM抗体平均荧光强度没有显著性区别,说明本发明所述内参磁珠在检测人IgM抗体时符合对内参磁珠的第二点要求:即含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠与不含目标病原体抗体的血清或血浆样品孵育及二抗染色的内参磁珠之间的平均荧光强度没有显著性差异。

实施例3

[0117] 比较无新冠病毒感染经历者血清样品和有新冠病毒感染经历者血清样品新冠病毒特异性IgG/IgM抗体磁珠相对阳性百分率。

[0118] 实验材料:

[0119] (1)具体实施方式中所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒

[0120] (2)当进行新冠病毒特异性IgG抗体磁珠相对百分率分析时,血清样品来自于40位健康志愿者、20位其它病原体感染者、64位新冠病毒感染者及12位新冠病毒感染康复者;当进行新冠病毒特异性IgM抗体磁珠相对百分率分析时,血清样品来自于27位健康志愿者、23位其它病原体感染者、57位新冠病毒感染者及13位新冠病毒感染康复者的血清样品。

[0121] 实验仪器及分析软件:

[0122] (1)BD LSRFortessa X-20流式细胞仪(2)GraphPad 9.0软件(3)Flowjo 10.0软件

[0123] 试验方法及步骤:

[0124] 应用具体实施方式中新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒的使用方法对健康志愿者、其它病原体感染者、新冠病毒感染者及新冠病毒感染康复者四组人群各血清样品孵育的内参磁珠和S1蛋白磁珠进行AF488标记的羊抗人IgG二抗染色或是PE标记的鼠抗人IgM二抗染色,流式细胞仪分析内参磁珠和S1蛋白磁珠表面羊抗人IgG抗体或鼠抗人IgM抗体荧光强度,然后计算各样品新冠病毒特异性IgG和/或IgM抗体磁珠相对荧光百分率。无新冠病毒感染经历者包括健康志愿者和其它病原体感染者,有新冠病毒感染经历者包括新冠病毒感染者和新冠病毒感染康复者。利用非成对t检验比较两组数据之间的差异。

[0125] 实验结果

[0126] 如图3中图A和图B所示,绝大多数健康志愿者和其它病原体感染者血清样品被检测出极低水平的新冠病毒IgG和IgM抗体磁珠相对荧光百分率;与此相反绝大多数新冠病毒感染者和新冠病毒感染康复者分别被检查出较高水平和高水平的新新冠病毒IgG和IgM抗体磁珠相对荧光百分率。当把健康志愿者血清样品和其它病原体感染者血清样品合并成无新冠病毒感染经历者血清样品与把新冠病毒感染者血清样品和新冠病毒感染康复者血清样品合并成有新冠病毒感染经历者血清样品进行比较时,发现两组人群血清样品的新新冠病毒

IgG和IgM抗体磁珠相对荧光百分率均有极其显著的差异。这些数据表明应用本发明所建立的抗体磁珠相对阳性百分率这一参数可以有效区分无新冠病毒感染经历者和有新冠病毒感染经历者。而且说明本发明所述内参磁珠符合对内参磁珠的第三点要求：即内参磁珠与目标病原体蛋白磁珠分别经血清或血浆样品孵育、荧光标记二抗染色及流式细胞仪检测后，以含目标病原体血清或血浆所孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率显著高于以不含目标病原体抗体血清或血浆所孵育的目标病原体蛋白磁珠与内参磁珠之间的磁珠相对阳性百分率，从而可以有效区分含目标病原体特异性抗体的血清或血浆样品和不含目标病原体抗体的血清或血浆样品。综合实施例1、2和3中的数据表明本发明所述人ACE2蛋白磁珠全部满足对内参磁珠的三点要求，是一种可以应用于病原体抗体检测的合格内参磁珠。

[0127] 实施例4

[0128] 对新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒的检测性能进行受试者工作特征曲线(ROC)分析

[0129] 实验材料：

[0130] 实施例3中所测得的健康志愿者、其它病原体感染者、新冠病毒感染者及新冠病毒感染康复者四组人群各血清样品新冠病毒IgG抗体磁珠相对荧光百分率数据和新冠病毒IgM抗体磁珠相对荧光百分率数据。

[0131] 分析软件：

[0132] (1)GraphPad 9.0软件

[0133] 分析方法及步骤：

[0134] 把实施例3中所测健康志愿者、其它病原体感染者、新冠病毒感染者及新冠病毒感染康复者四组人群各血清样品新冠病毒IgG抗体磁珠相对荧光百分率数据和新冠病毒IgM抗体磁珠相对荧光百分率数据输入GraphPad9.0软件，进行ROC曲线分析。根据约登指数计算试剂盒检测新冠病毒IgG或IgM抗体时平衡的检测敏感性、特异性、对应的临界值(cut-off值)及ROC曲线下的面积。

[0135] 分析结果：

[0136] 如图4. A所示当以四组人群血清样品新冠病毒IgG抗体磁珠相对荧光百分率数据进行ROC曲线分析时发现本发明所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒及其使用方法在检测新冠病毒特异性IgG抗体时检测灵敏性和特异性分别为91.25%和93.22%，临界值为14.4%，ROC曲线下的面积为0.9406。如图4. B所示当以四组人群血清样品新冠病毒IgM抗体磁珠相对荧光百分率数据进行ROC曲线分析时发现本发明所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒及其使用方法在检测新冠病毒特异性IgM抗体时检测灵敏性和特异性分别为97.18%和96%，临界值为5.91%，ROC曲线下的面积为0.9761。这些数据表明本发明所公开的新型新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒对于新冠病毒IgG和IgM抗体的检测都具有较高的检测灵敏性和特异性。同时也表明该试剂盒是一种具有新冠病毒IgG/IgM抗体优秀检测性能的试剂盒。

[0137] 实施例5

[0138] 评价流式细胞仪检测电压变化对新冠病毒IgG/IgM抗体磁珠相对百分率数值的影响

[0139] 实验材料:

[0140] (1) 具体实施方式中所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒

[0141] (2) 一位健康志愿者的血清样品

[0142] 实验实验仪器及分析软件:

[0143] (1) BD LSRFortessa X-20流式细胞仪 (2) GraphPad 9.0软件 (3) Flowjo 10.0软件

[0144] 试验方法及步骤:

[0145] 应用具体实施方式中新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒的使用方法对一份加入新冠病毒IgG抗体阳性质控品或IgM抗体阳性质控品的健康志愿者血清样品进行检测。其中新冠病毒IgG抗体阳性质控品在血清中的浓度为200 ng/mL;其中新冠病毒IgM抗体阳性质控品在血清中的浓度为800 ng/mL。检测步骤依据在试剂盒使用方法基础上略有修改。操作步骤简述如下:

[0146] 对加入新冠病毒IgG抗体或IgM抗体阳性质控品的血清样品用样品稀释液以1:40进行稀释,再加入到96孔板的两孔中。新冠病毒IgG抗体和IgM抗体阳性质控品在检测中的终浓度分别为5 ng/mL和20 ng/mL。在评价流式细胞仪检测电压对新冠病毒IgG抗体磁珠相对百分率数值的影响时,吸取S1蛋白磁珠和内参磁珠各11mL,在清洗磁珠后分别与上述两孔中稀释后的血清样品在室温下孵育。然后经过标准的洗液清洗、AF488标记的羊抗人IgG二抗染色、清洗步骤后。分别把S1蛋白磁珠和内参磁珠平均分加到11个流式上样管中,制备出11组样品。在流式细胞仪检测时,在AF488相对应的荧光光路分别以507、517、527、537、547、557、567、577、587、597及607 V电压对一组处理染色后的S1蛋白磁珠和内参磁珠进行检测。然后Flowjo软件分析在每一个检测电压下相同样品的新 coronavirus IgG抗体磁珠相对阳性百分率数值。

[0147] 在评价流式细胞仪检测电压对新冠病毒IgM抗体磁珠相对百分率数值的影响时,吸取S1蛋白磁珠和内参磁珠各10mL,在清洗磁珠后分别与上述两孔中稀释后的血清样品室温下孵育。然后经过标准的洗液清洗、PE标记的鼠抗人IgM二抗染色、清洗步骤后。分别把S1蛋白磁珠和内参磁珠平均分加到10个流式上样管中,制备出10组上样样品。在流式细胞仪检测时,在PE相对应的荧光光路分别以460、470、480、490、500、510、520、530、540及550V电压对一组处理染色后的S1蛋白磁珠和内参磁珠进行检测。然后Flowjo软件分析在每一个检测电压下相同样品的新 coronavirus IgM抗体磁珠相对阳性百分率数值。应用Graphpad软件计算出相同检测样品在不同流式检测电压下新冠病毒IgG抗体和新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率数量的变异系数。

[0148] 实验结果

[0149] 如图5. A和B所示,相同样品在流式检测电压值分别为507、517、527、537、547、557、567、577、587、597及607 V时,新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率数值分别为83.1%、80.1%、80.3%、79.6%、79.3%、78.3%、79.7%、83.2%、79.4%、80.4%和81%。这组数值的变异系数为1.92%。如图5. C和D所示,相同样品在流式检测电压值分别为460、470、480、490、500、510、520、530、540及550V时,新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率数值分别为95.1%、93.9%、95.2%、94.2%、95.3%、95%、95.6%、94.5%、95.7%和95.2%。这组数值的变异系数为0.56%。这些数据表明流式细胞仪的检测电压设置对相同样品新冠病毒IgG抗体及新冠病毒

IgM抗体磁珠相对阳性百分率的检测数值影响极小。新冠病毒IgG抗体和新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率这一参数基本不受流式细胞仪检测电压条件的影响。

[0150] 实施例6

[0151] 评价不同流式细胞仪对相同一组血清样品进行新冠病毒IgG抗体活性检测时检测数值的一致性

[0152] 实验材料:

[0153] (1) 具体实施方式中所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒

[0154] (2) 10份新冠病毒感染康复者的血清样品,编号分别为2、3、4、5、6、7、8、10、11及13号

[0155] 实验实验仪器及分析软件:

[0156] (1) BD Fortessa X-20流式细胞仪 (2) Beckman Coulter MoFlo Astrios EQ流式细胞仪 (3) GraphPad 9.0软件 (4) Flowjo 10.0软件 (5) SPSS 25.0软件

[0157] 试验方法及步骤:

[0158] 应用具体实施方式中新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒的使用方法对一组新冠感染康复者血清样品进行检测。检测步骤在试剂盒使用方法基础上略有修改。操作步骤简述如下:

[0159] 对一组新冠病毒感染康复者血清样品的各样品以1:500用样品稀释液后加入到96孔板2孔中。吸取S1蛋白磁珠和内参磁珠各2mL;在清洗磁珠后分别与上述两孔中的血清样品室温下孵育。然后经过标准的洗液清洗、AF488标记的羊抗人IgG二抗染色、清洗步骤后。把S1蛋白磁珠和内参磁珠各自平均分加到2个流式上样管中,准备出的两组样品分别用于两个不同流式细胞仪的检测。在用BD流式细胞仪检测时,在AF488相对应的荧光光路以476 V电压对一组处理染色后的S1蛋白磁珠和内参磁珠进行检测;在用Beckman流式细胞仪检测时,在AF488相对应的荧光光路以469 V电压对一组处理染色后的S1蛋白磁珠和内参磁珠进行检测。然后Flowjo软件分析在用BD流式细胞仪和Beckman流式细胞仪所测相同样品的新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率数值。用Graphpad软件以Bland-Altman方法对两个流式细胞仪所测得的两组数据的一致性进行比较、作图。用SPSS软件对两个流式细胞仪所测得的两组数据进行组内相关系数(ICC)分析。

[0160] 实验结果:

[0161] 如图6. A所示应用BD流式细胞仪对2、3、4、5、6、7、8、10、11及13号样品新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率的检测结果分别为96.7%、21%、89.4%、25.1%、5.02%、63%、94.8%、94.9%、2.4%和92.9%。如图6. B所示应用Beckman流式细胞仪对2、3、4、5、6、7、8、10、11及13号样品新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率的检测结果分别为97.8%、25%、90.1%、25%、1.72%、69.6%、94.8%、95.5%、1.23%和90%。如图6. C所示两流式细胞仪所测的两组数据的差异在-6.55%到5.35%之间,组内相关系数为0.997。这些数据表明两个流式细胞仪对相同一组血清样品所测得的新冠病毒IgG抗体磁珠相对阳性百分率数值具有极好的一致性。

[0162] 实施例7

[0163] 评价不同流式细胞仪对相同一组血清样品进行新冠病毒IgM抗体活性检测时检测数值的一致性

[0164] 实验材料:

[0165] (1)具体实施方式中所述新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒;

[0166] (2)10份新冠病毒感染康复者的血清样品,编号分别为3、4、5、6、7、8、9、10、11及13号;

[0167] 实验实验仪器及分析软件:

[0168] (1)BD Fortessa X-20流式细胞仪(2)Beckman Coulter MoFlo Astrios EQ流式细胞仪(3)GraphPad 9.0软件(4)Flowjo 10.0软件 (5)SPSS 25.0软件

[0169] 试验方法及步骤:

[0170] 应用具体实施方式中新型冠状病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒的使用方法对一组新冠感染康复者血清样品进行检测。检测步骤在试剂盒使用方法基础上略有修改。操作步骤简述如下:

[0171] 对一组新冠病毒感染康复者血清样品的各样品以1:300用样品稀释液后加入到96孔板2孔中。吸取S1蛋白磁珠和内参磁珠各2mL;在清洗磁珠后分别与上述两孔中的血清样品室温下孵育。然后经过标准的洗液清洗、PE标记的鼠抗人IgM二抗染色、清洗步骤后。把S1蛋白磁珠和内参磁珠各自平均分加到2个流式上样管中,准备出的两组样品分别用于两个不同流式细胞仪的检测。在用BD流式细胞仪检测时,在PE相对应的荧光光路以454 V电压对一组处理染色后的S1蛋白磁珠和内参磁珠进行检测;在用Beckman流式细胞仪检测时,在PE相对应的荧光光路以468 V电压对一组处理染色后的S1蛋白磁珠和内参磁珠进行检测。然后Flowjo软件分析在用BD流式细胞仪和Beckman流式细胞仪所测相同样品的新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率数值。用Graphpad软件以Bland-Altman方法对两个流式细胞仪所测得的两组数据的一致性进行分析、作图。用SPSS软件对两个流式细胞仪所测得的两组数据进行组内相关系数(ICC)分析。

[0172] 实验结果:

[0173] 如图7. A所示应用BD流式细胞仪对3、4、5、6、7、8、9、10、11及13号样品新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率的检测结果分别为93.2%、42.5%、31.6%、54.8%、10.4%、87.9%、31.9%、92.2%、22.1%和82%。如图7. B所示应用Beckman流式细胞仪对3、4、5、6、7、8、9、10、11及13号样品新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率的检测结果分别为90.4%、39.3%、35.0%、57.7%、10.1%、94.8%、35.1%、92.9%、27.7%和87.1%。如图7. C所示两流式细胞仪所测的两组数据的差异在-8.57%到4.49%之间,组内相关系数为0.994。这些数据表明两个流式细胞仪对相同一组血清样品所测得的新冠病毒IgM抗体磁珠相对阳性百分率数值具有极好的一致性。

[0174] 综合实施例6和7的数据可以发现虽然两台流式细胞仪由两个不同公司生产,由此导致机器所使用操作软件不同、荧光强度的计算方法不同及所用激光管的功率都不相同,但即使在如此众多的不同条件因素下,以本发明所述的新冠病毒IgG及IgM抗体磁珠相对阳性百分率为检测参数仍可以对相同样品获得很好一致性的检测结果。这些数据说明以本发明所述的新冠病毒IgG/IgM抗体磁珠荧光检测试剂盒及其使用方法对样品进行新冠病毒IgG/IgM抗体检测时检测结果与所用的检测流式细胞仪无关,只与所检测样品本身有关。因此应用本发明所述的新冠病毒抗体检测试剂盒对相同样品的抗体活性检测结果在不同实验室间甚至不同地区间也将具有很好的可比对性。

[0175] 本发明说明书中未作详细描述的内容属于本领域专业技术人员公知的现有技术。

尽管上面对本发明说明性的具体实施方式进行了描述,以便于本技术领域的技术人员理解本发明,但应该清楚,本发明不限于具体实施方式的范围,对本技术领域的普通技术人员来讲,只要各种变化在所附的权利要求限定和确定的本发明的精神和范围内,这些变化是显而易见的,一切利用本发明构思的发明创造均在保护之列。

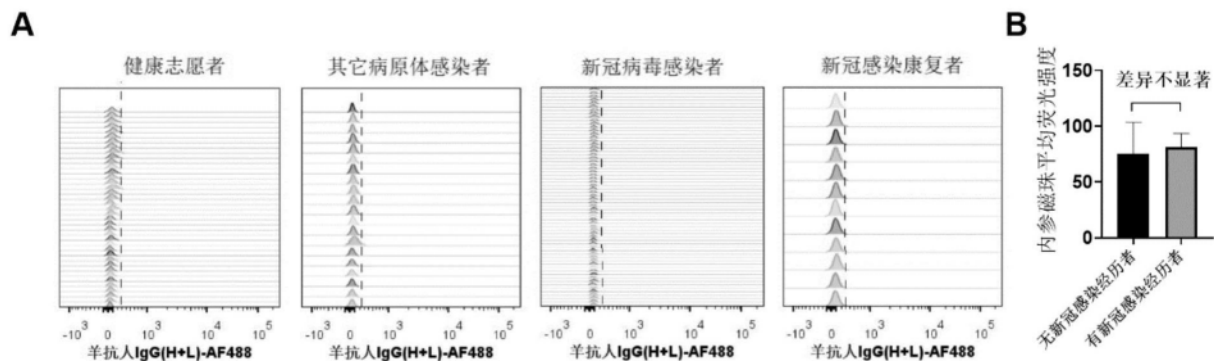


图1

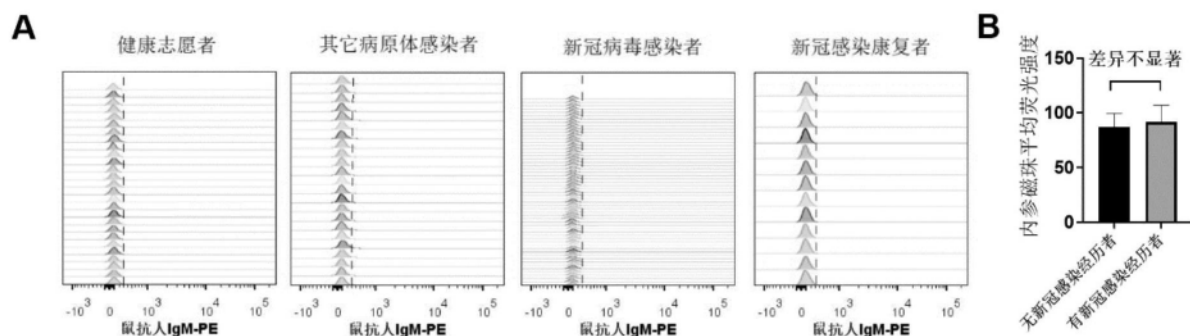


图2

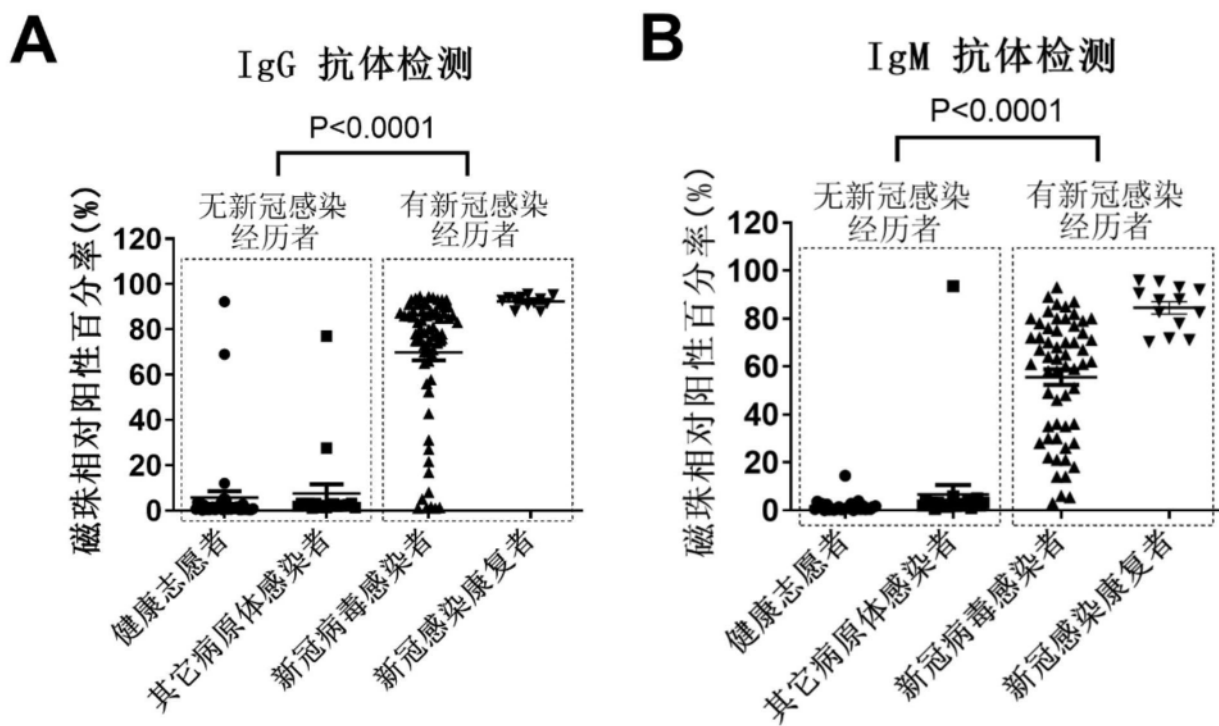


图3

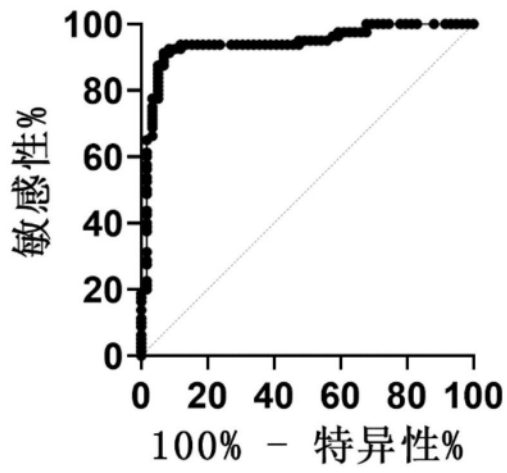
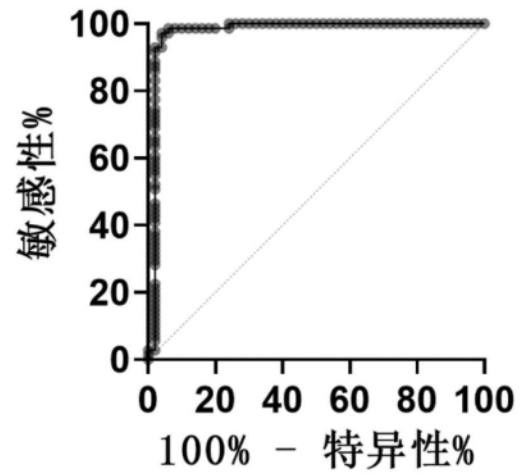
A ROC曲线: IgG抗体检测**B** ROC曲线: IgM抗体检测

图4

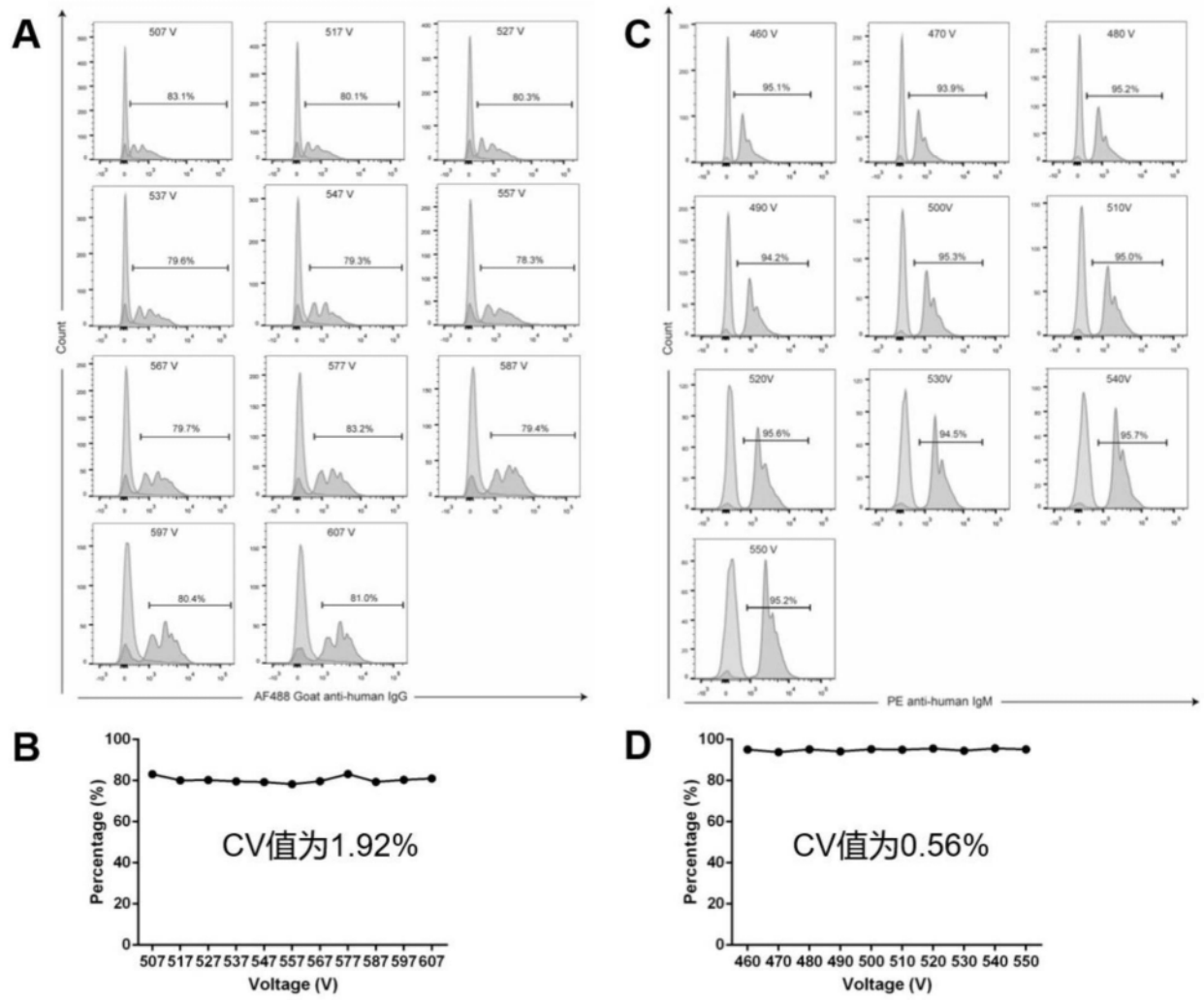
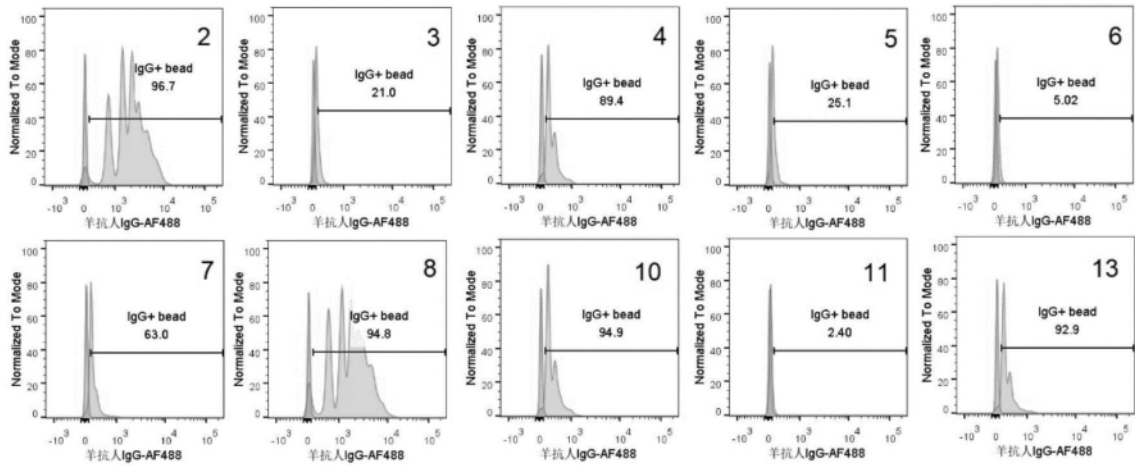
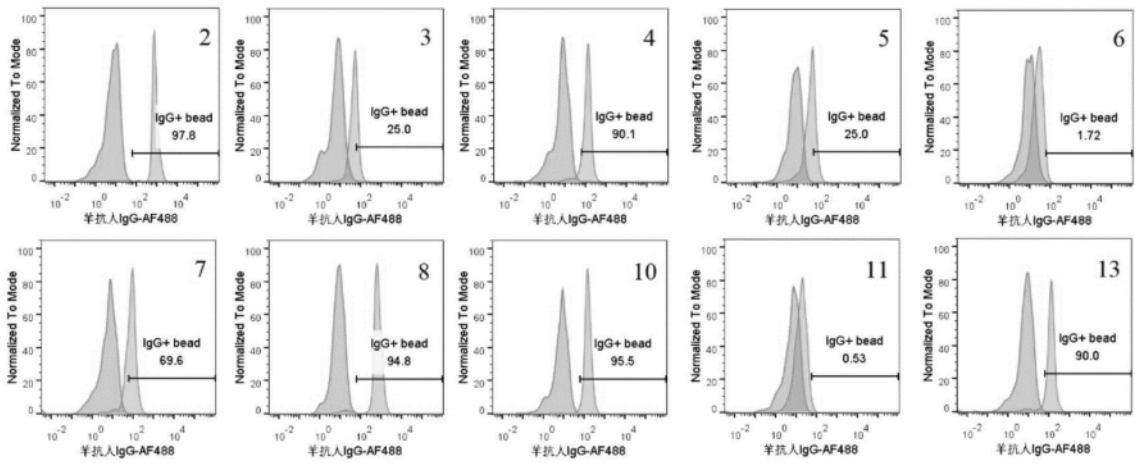


图5

A**B****C**

IgG抗体检测

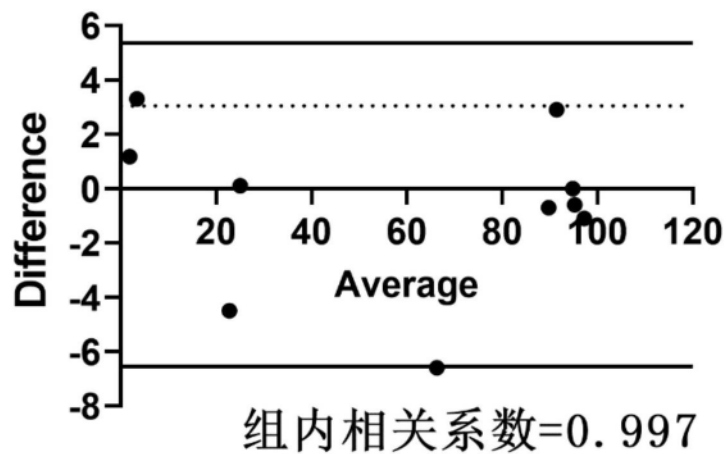
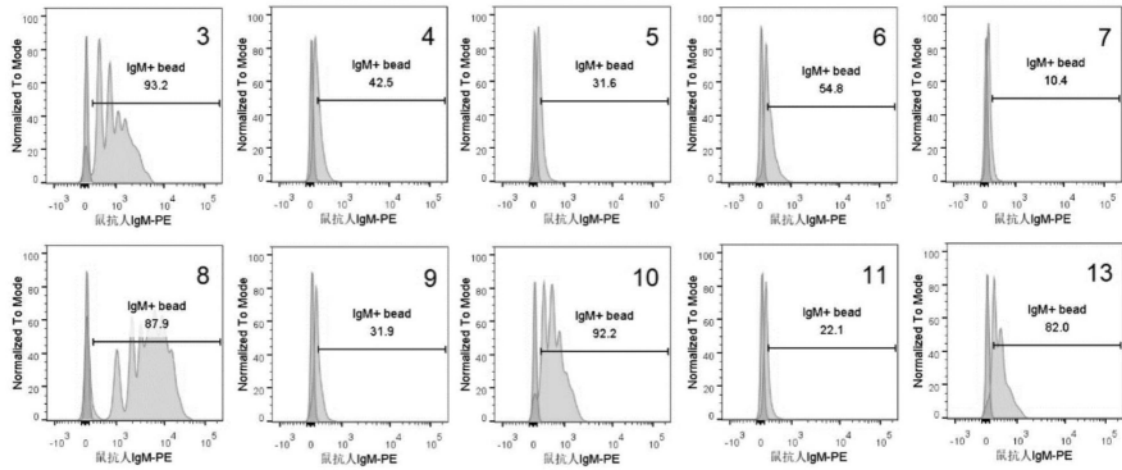
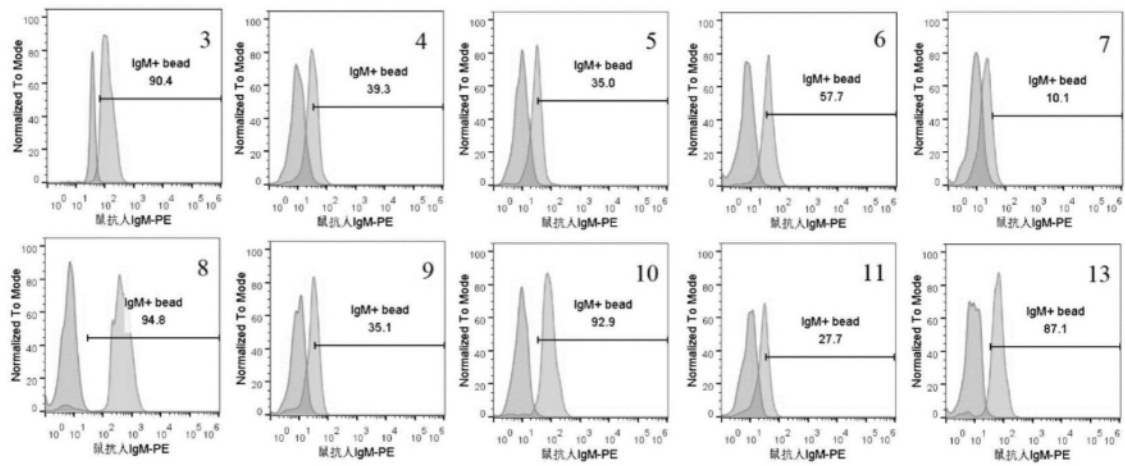


图6

A**B****C**

IgM抗体检测

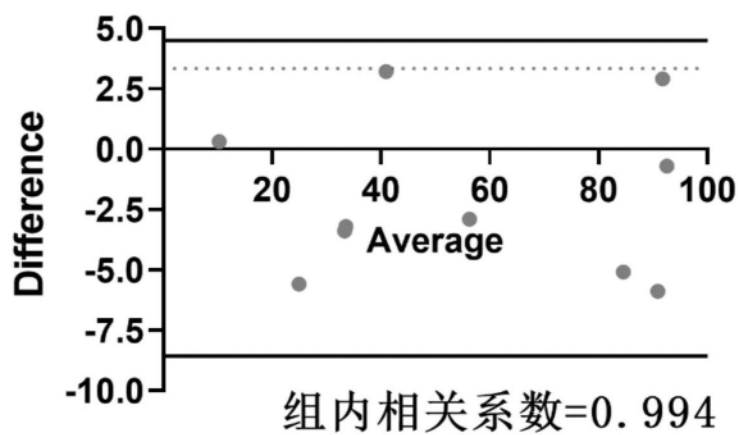


图7