



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108398554 B

(45)授权公告日 2020.08.07

(21)申请号 201810188202.1

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2018.03.07

G01N 21/76(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108398554 A

(56)对比文件

CN 103616507 A,2014.03.05

(43)申请公布日 2018.08.14

审查员 石剑平

(73)专利权人 深圳市伯劳特生物制品有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区月亮湾

大道2076号中国高科大厦六楼A2

(72)发明人 张大准 肖川 张永顶 马伟民

王洪涛 马新民

(74)专利代理机构 深圳市深佳知识产权代理事

务所(普通合伙) 44285

代理人 王仲凯

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

(54)发明名称

一种抗torch-IgM型抗体谱芯片及其制备方法  
与TORCH检测的试剂盒

(57)摘要

本发明属于生物检测技术领域,公开了一种抗torch-IgM型抗体谱芯片及其制备方法与TORCH检测的试剂盒及检测方法。本发明所述抗torch-IgM型抗体谱芯片不仅能同时定量检测TORCH多种相关病原微生物的感染,而且通过优化芯片的包被液和包被条件、封闭稳定剂,使抗torch-IgM型抗体谱芯片稳定性更好,使用周期更长。本发明所述TORCH检测的试剂盒,不仅能有效降低相关抗原的使用量,减少抗原成本,同时使其稳定期更长,使用周期更长,降低运输成本,提高储存、运输的方便性。本发明所述TORCH检测方法能同时定量检测TORCH多种相关病原微生物的感染,灵敏度高,特异性好。

1. 一种抗torch-IgM型抗体谱芯片, 包被有TORCH检测相关的病原微生物的抗原的蛋白芯片; 所述的芯片的制备方法, 用包被缓冲液稀释TORCH检测相关的病原微生物的抗原、质控点蛋白和/或参考点蛋白, 通过点样仪以点阵列形式包被于芯片基质上, 用封闭稳定剂封闭; 所述包被缓冲液为含0.5%的PEG4000、0.02%的Captisol、5%的海藻糖、0.05%的Proclin300和15%的甘油pH9.6的CB缓冲液; 所述封闭稳定剂为含1%甘露醇, 2%的PVP40000、1%NH<sub>2</sub>-PEG、0.05%NaN<sub>3</sub>的pH7.4的0.01M磷酸氢二钠溶液。

2. 根据权利要求1所述的芯片, 所述TORCH检测相关的病原微生物为弓形虫(TOX)、巨细胞病毒(CMV)、风疹病毒(RV)、单纯疱疹病毒(HSV)、人类微小病毒B19、柯萨奇病毒, 梅毒螺旋体、乙肝病毒(HBV)、衣原体中至少一种。

3. 根据权利要求1或2所述的芯片, 所述蛋白芯片还包含质控点和/或参考点; 所述质控点包含至少一个阳性质控点(PC)、至少一个阴性质控点(NC)、至少一个样品质控点(SC)和/或至少一个酶标质控点(EC); 所述参考点包含不同浓度的参考曲线点(S1-S5)和/或至少一个芯片位置参考点(Loc)。

4. 根据权利要求3所述的芯片, 所述阳性质控点包被人IgM或包被BSA-DNP偶联物; 所述阴性质控点包被低于反应信号值的微量浓度的人IgM或其他的与TORCH检测病原微生物无关的蛋白; 所述样品质控点为包被抗人IgM; 所述酶标质控点包被人IgM或抗兔的抗体; 所述参考曲线点包被不同浓度的人IgM; 所述芯片位置参考点包被已知浓度的人IgM溶液。

5. 权利要求1-4任意一项所述的芯片的制备方法, 用包被缓冲液稀释TORCH检测相关的病原微生物的抗原、质控点蛋白和/或参考点蛋白, 通过点样仪以点阵列形式包被于芯片基质上, 用封闭稳定剂封闭; 所述包被缓冲液为含0.5%的PEG4000、0.02%的Captisol、5%的海藻糖、0.05%的Proclin300和15%的甘油pH9.6的CB缓冲液; 所述封闭稳定剂为含1%甘露醇, 2%的PVP40000、1%NH<sub>2</sub>-PEG、0.05%NaN<sub>3</sub>的pH7.4的0.01M磷酸氢二钠溶液。

6. 根据权利要求5所述的制备方法, 所述包被为2-8℃, 静置包被16-24h; 所述芯片基质为酶标反应板、玻璃片、化学膜、多孔硅胶。

7. 一种TORCH检测的试剂盒, 包括权利要求1-4任意一项所述的抗torch-IgM型抗体谱芯片。

8. 根据权利要求7所述的试剂盒, 还包括酶标记物、酶标稀释稳定剂、样品稀释液、洗涤液、显色液中的至少一种。

9. 根据权利要求8所述的试剂盒, 所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的抗人IgM抗体; 酶标稀释稳定剂为包含0.05M的柠檬酸、3%-5%的牛血清γ球蛋白、2%-4%的PEG10000、0.05%-0.2%的阿拉伯树胶1%-2%的甜菜碱、0.05%的Proclin3000的pH7.4的100mM的Tris溶液; 样品稀释液为包含0.15M NaCl、0.05%Tween20、0.01%酪蛋白的pH7.4的0.02M Tris溶液; 洗涤液为包含0.15M NaCl、0.05%Tween20的pH7.4的0.02M Tris溶液; 所述显色液为沉降型TMB。

## 一种抗torch-IgM型抗体谱芯片及其制备方法与TORCH检测的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,具体涉及一种抗torch-IgM型抗体谱芯片及其制备方法与TORCH检测的试剂盒。

### 背景技术

[0002] TORCH是导致先天性宫内感染及围产期感染而引起围产儿畸形的病原体,它是一组病原微生物的英文名称缩写,其中T(Toxoplasma)是弓形虫,O(Others)是其他病原微生物,如梅毒螺旋体、带状疱疹病毒、细小病毒B19、柯萨奇病毒等,R(Rubella.Virus)是风疹病毒,C(Cytomegalo.Virus)是巨细胞病毒,H(Herpes.Virus)即是单纯疱疹I/II型。TORCH感染是严重危害新生儿健康的重要因素之一,在围生医学中称为TORCH综合征,其感染呈世界性分布。我国人群中,TORCH感染广泛存在,孕妇在妊娠期间发生TORCH感染后无明显临床症状,但胎儿感染后,可能引起胎儿或新生儿的肝、肾、心、脑等多个器官出现发育缺陷和功能障碍,有可能引起胚胎/胎儿流产、早产、宫内发育迟缓、畸形、死胎和新生儿死亡等不良后果,对优生优育与人口素质构成极大的威胁。因此,为减少病残儿的出生率及提高出生人口素质,应极做好TORCH感染的血清学筛查以便及早发现不良妊娠并及时处理。对新生儿也应常规开展TORCH检测,了解新生儿TORCH感染情况,以便早干预、早治疗。

[0003] TORCH的检测中弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹I/II型四种病原微生物的感染约占90%,其余的10%为其他病原微生物,包括细小病毒B19、柯萨奇病毒、梅毒螺旋体、乙肝病毒、衣原体等感染。目前对TORCH的检测方法主要有ELISA、免疫荧光试验(IFT)、胶体金以及基因芯片等。在我国最方便、最常用的早期筛查方法是采用ELISA诊断技术。ELISA是检测人体血清中的特异性IgM、IgG抗体,由于IgM为早期感染指标,对胎儿影响巨大,所以IgM的检测备受关注,胎盘中特异性IgM的检测是诊断胎儿宫内感染的可靠依据。ELISA试剂因其稳定、灵敏度高、特异性强、成本低等优点而在普通实验室中广泛采用,但一般用来做定性,不能定量。而IFT一般只针对单项指标的检测,胶体金的方法一般也只是定性或者半定量,基因芯片技术虽然效果好,但成本高,一般价格昂贵。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明针对现有技术中的缺陷,提供了一种抗torch-IgM型抗体谱芯片及其制备方法与TORCH检测的试剂盒。

[0005] 为实现本发明的目的,本发明采用如下技术方案。

[0006] 一种抗torch-IgM型抗体谱芯片,包被有TORCH检测相关的病原微生物的抗原的蛋白芯片。

[0007] 本发明采用蛋白质芯片技术,将TORCH的多种病原体集成在蛋白芯片上制备了高通量、多检测指标、性能稳定、重复性好、准确度高的TORCH相关抗体IgM芯片。

[0008] 其中,作为优选,所述TORCH检测相关的病原微生物为弓形虫(TOX)、巨细胞病毒

(CMV)、风疹病毒(RV)、单纯疱疹病毒(HSV)、人类微小病毒B19、柯萨奇病毒,梅毒螺旋体、乙肝病毒(HBV)、衣原体中至少一种。

[0009] 在一些实施方案中,所述TORCH检测相关的病原微生物为弓形虫(TOX)、巨细胞病毒(CMV)、风疹病毒(RV)、单纯疱疹病毒(HSV)、人类微小病毒B19、柯萨奇病毒,梅毒螺旋体、乙肝病毒(HBV)和衣原体,TORCH相关的病原微生物共9种。其中单纯疱疹病毒(HSV)包括单纯疱疹病毒-I型、单纯疱疹病毒-II型。

[0010] 本发明所述抗torch-IgM型抗体谱芯片,所述蛋白芯片还包含质控点和/或参考点。

[0011] 其中,所述质控点包含至少一个阳性质控点(PC)、至少一个阴性质控点(NC)、至少一个样品质控点(SC)和/或至少一个酶标质控点(EC)。所述参考点包含不同浓度的参考曲线点(S1-S5)和/或至少一个芯片位置参考点(Loc)。

[0012] 在一些实施方案中,本发明所述芯片包含一个阳性质控点(PC)、一个阴性质控点(NC)、一个样品质控点(SC)、一个酶标质控点(EC)、5个参考曲线点(S1-S5)和一个芯片位置参考点(Loc)。

[0013] 在本发明的一些实施例中,所述阳性质控点可以是人IgM,使用的酶联免疫标记物是抗人IgM的酶标。在其他的一些实施例中,所述阳性质控点也可以包被BSA-DNP偶联物,使用的酶联免疫标记物就是酶标记抗人IgM以及抗DNP-BSA的酶标记抗体的混合液。

[0014] 在本发明的一些实施例中,所述阴性质控点可以是低于反应信号值的微量浓度的人IgM。在其他的一些实施例中也可用其他的无关蛋白来替代。

[0015] 在本发明的一些实施例中,样品质控点可以是鼠抗人的IgM。在其他的一些实施例中也可使用其他的抗人IgM。

[0016] 在本发明的一些实施例中,所述酶标质控点可以是人IgM。在其他的一些实施例中也可使用其他的抗兔的抗体(酶标用的是兔抗人IgM),例如羊抗兔IgM抗体。

[0017] 本发明的一些实施例中,所述参考曲线点是五种不同浓度的人IgM。如0.5 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、2.5 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml的人IgG。

[0018] 本发明中,所述芯片本身的位置参考点包被的是2 $\mu$ g/ml的人IgM溶液,主要就是对阵列取值时的定位作用。

[0019] 本发明还提供了所述抗torch-IgM型抗体谱芯片的制备方法,用包被缓冲液稀释TORCH检测相关的病原微生物的抗原、质控点蛋白和/或参考点蛋白,通过点样仪以点阵列形式包被于芯片基质上。

[0020] 本发明通过高度精密的点样仪将TORCH检测相关的10种病原微生物的抗原以及所需要的质控点蛋白、参考点蛋白以4 $\times$ 5的点阵列形式包被于芯片基质上

[0021] 其中,所述包被缓冲液为含PEG、水溶性环糊精、海藻糖、防腐剂和甘油的缓冲液。

[0022] 在一些实施例中,所述缓存液为pH9.6的CB缓冲液、pH8.5的Tris缓冲液或pH7.4-7.6的PBS缓冲液。

[0023] 本发明所述包被缓冲液中含有PEG。在一些实施方案中,所述PEG为PEG4000。所述PEG的含量优选为0.5%~1%,更优选为0.5%。

[0024] 本发明所述包被缓冲液中含有水溶性环糊精,使得包被更稳定、均一、包被的点更规则、更圆,CV更小。作为优选,所述水溶性环糊精为0.01%~0.02%Captisol、0.02%-

0.04%的2-羟基-β-环糊精或羧甲基-β-环糊精；

[0025] 本发明所述包被缓冲液中含有海藻糖。作为优选，所述海藻糖的含量为5%~8%；

[0026] 本发明所述包被缓冲液中含有防腐剂。在一些实施方案中，所述防腐剂为Proclin300。作为优选，所述防腐剂的含量为0.05%。

[0027] 本发明所述包被缓冲液中含有甘油。作为优选，所述甘油的含量为15%。

[0028] 作为优选，本发明所述芯片的制备方法中所述包被为2-8℃，静置包被16-24h。

[0029] 本发明所述芯片基质包括但不限于为酶标反应板、玻璃片、化学膜、多孔硅胶。其它适合蛋白质附着的载体也可以作为芯片基质。

[0030] 进一步的，本发明所述芯片的制备方法还包括用封闭稳定剂封闭的步骤。

[0031] 作为优选，所述封闭稳定剂为含1%-4%甘露醇，2%-5%的PVP40000、1%-3%NH<sub>2</sub>-PEG、0.05%NaN<sub>3</sub>的pH7.4的0.01M磷酸氢二钠溶液。在一些实施例中，所述封闭稳定剂为1%甘露醇，2%的PVP40000、1%NH<sub>2</sub>-PEG、0.05%NaN<sub>3</sub>的pH7.4的0.01M磷酸氢二钠溶液。

[0032] 所述封闭优选为室温封闭1h。

[0033] 本发明还提供了一种TORCH检测的试剂盒，包括所述的抗torch-IgM型抗体谱芯片。

[0034] 进一步，所述TORCH检测的试剂盒还包括酶标记物、酶标稀释稳定剂、样品稀释液、洗涤液、显色液中的至少一种。在一些实施例中，所述TORCH检测的试剂盒还包括酶标记物、酶标稀释稳定剂、样品稀释液、洗涤液和显色液。

[0035] 作为优选，所述酶标记物为辣根过氧化物酶标记的抗人IgM抗体，如羊抗人IgM抗体。

[0036] 作为优选，所述酶标稀释稳定剂为包含0.05M的柠檬酸、3%-5%的牛血清γ球蛋白、2%-4%的PEG10000、0.05%-0.2%的阿拉伯树胶1%-2%的甜菜碱、0.05%的Proclin3000的pH7.4的100mM的Tris溶液。更优选的，所述酶标稀释稳定剂为包含0.05M的柠檬酸、3%的牛血清γ球蛋白、2%的PEG10000、0.05%的阿拉伯树胶1%的甜菜碱、0.05%的Proclin3000的pH7.4的100mM的Tris溶液。

[0037] 作为优选，所述样品稀释液为包含0.15M NaCl、0.05%Tween20、0.01%酪蛋白的pH7.4的0.02M Tris溶液。

[0038] 作为优选，所述洗涤液为包含0.15M NaCl、0.05%Tween20的pH7.4的0.02M Tris溶液。

[0039] 作为优选，所述显色液为沉降型TMB。

[0040] 本发明还提供了一种TORCH检测方法，待测样品用样品稀释液稀释后加入所述的抗torch-IgM型抗体谱芯片上，加入酶标记物，加入显色液避光显色，荧光检测装置检测结果，计算待测样品中的抗torch-IgM型抗体信号值。

[0041] 进一步的，所述检测方法在加入酶标记物和加入显色液之前包括温育后洗涤液洗涤的步骤。

[0042] 本发明所述检测方法通过抗原抗体反应的免疫学原理来检测受试者样本中TORCH感染的相关抗体IgM的水平。本发明所述检测方法的信号检测体系是化学发光的方式，可用底物是如鲁米诺等的化学发光底物，通过荧光检测装置或仪器来进行结果的读取。

[0043] 由上述技术方案可知，本发明提供了一种抗torch-IgM型抗体谱芯片及其制备方

法与TORCH检测的试剂盒及检测方法。本发明所述抗torch-IgM型抗体谱芯片,包被有TORCH检测相关的病原微生物的抗原的蛋白芯片。进一步还包含质控点和/或参考点。所述抗torch-IgM型抗体谱芯片用包被缓冲液稀释TORCH检测相关的病原微生物的抗原、质控点蛋白和/或参考点蛋白,通过点样仪以点阵列形式包被于芯片基质上,进一步采用封闭稳定剂封闭。相较于传统的酶联免疫、胶体金检测以及现有的基因芯片技术,本发明不仅能同时定量检测TORCH多种相关病原微生物的感染,而且通过优化芯片的包被液和包被条件、封闭稳定剂,使抗torch-IgM型抗体谱芯片稳定性更好(2-8℃冷藏2年,室温可储存8个月),使用周期更长。本发明所述TORCH检测的试剂盒,包括所述的抗torch-IgM型抗体谱芯片以及酶标记物、酶标稀释稳定剂、样品稀释液、洗涤液、显色液中的至少一种。该试剂盒不仅能有效降低相关抗原的使用量,减少抗原成本,同时优化了试剂盒,使其稳定期更长,2-8℃可放置两年,室温可放置8个月,试剂盒的整体性能更好,使用周期更长,也能进一步降低运输成本,提高储存、运输的方便性。本发明所述TORCH检测方法能同时定量检测TORCH多种相关病原微生物的感染,灵敏度高,特异性好,为优生优育提供了一种新的高效、快捷的检测手段。

### 具体实施方式

[0044] 本发明公开了一种抗torch-IgM型抗体谱芯片及其制备方法与TORCH检测的试剂盒。本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及产品已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0045] 为了进一步理解本发明,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0046] 如无特殊说明,本发明实施例中所涉及的试剂均为市售产品,均可以通过商业渠道购买获得。其中,BSA的含量为质量体积比,按g/ml计,如5%BSA为100ml PBS中含5gBSA;吐温-20的含量为体积比,如0.05%吐温-20为1ml PBS含0.5μl吐温-20;PEG4000的含量质量体积比,按g/ml计,如0.5%PEG为100ml缓冲液中含0.5g PEG4000;海藻糖为质量体积比,按g/ml计,如5%海藻糖为100ml缓冲液中含5g海藻糖;Captisol为质量体积比,按g/ml计,如0.02%的Captisol为100ml缓冲液中含0.02gCaptisol;Proclin300为质量体积比,按g/ml计,如0.05%的Proclin300为100ml缓冲液中含0.05g Proclin300。此外,PVA、甜菜碱、NaN<sub>3</sub>、对羟基苯甲酸钠、阿拉伯树胶、酪蛋白为质量体积比,按g/ml计。

[0047] 实施例1、抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒的制备

[0048] 1、抗原的包被:

[0049] 1) 芯片的阵列设计以及抗原及参考点的具体分布如下(不仅限于如下的安排设计):

	S1	SC	NC	PC
	S2	Tox	CV	HPV B19
[0050]	S3	HSV-I	CT	CMV
	S4	HSV-I I	TP	EC
	S5	RV	HBV	Loc

[0051] 2)、具体的包被过程:

[0052] 先按下所述稀释抗原和相关参考点蛋白:

[0053] 阵列中的PC、NC、S1、S2、S3、S4、S5、EC点分别包被的是2 $\mu$ g/ml、0.01 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、1 $\mu$ g/ml、2.5 $\mu$ g/ml、5 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、2.5 $\mu$ g/ml的人IgM,稀释缓冲液为pH9.6的CB缓冲液(其中含0.5%的PEG4000、5%的海藻糖,0.02%的Captisol,0.05%的Proclin300,以及15%的甘油)。

[0054] SC点包被的是2 $\mu$ g/ml的羊抗IgM抗体,稀释缓冲液为pH9.6的CB缓冲液。

[0055] Loc点包被的是2 $\mu$ g/ml的人IgM,稀释缓冲液是pH9.6的CB缓冲液。

[0056] 包被抗原的稀释:Tox提纯抗原50 $\mu$ g/ml,HSV-I重组抗原20 $\mu$ g/ml,HSV-II重组抗原20 $\mu$ g/ml,RV重组抗原15 $\mu$ g/ml,CMV重组抗原10 $\mu$ g/ml,HBV抗原8 $\mu$ g/ml,TP重组抗原40 $\mu$ g/ml,B19重组抗原25 $\mu$ g/ml,CV重组抗原30 $\mu$ g/ml,CT重组抗原25 $\mu$ g/ml。

[0057] 将稀释好的抗原分别用0.22 $\mu$ m的滤膜过滤,然后用BioDot精密点样仪进行阵列的包被。全部阵列完成点样之后,将芯片置于2-8 $^{\circ}$ C,包被16-24h。

[0058] 2、封闭:

[0059] 取出包被的芯片,用pH7.4的PBST洗涤液清洗3次,然后每孔加入150 $\mu$ l的封闭稳定剂(1%甘露醇、2%的PVA40000、1%NH<sub>2</sub>-PEG、0.05%Na<sub>3</sub>防腐剂pH7.4的磷酸氢二钠溶液),室温封闭1h,然后拍干,于湿度15%以下,室温放置,干燥4h后密封,2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0060] 3、制备酶标试剂

[0061] 用酶标稀释稳定剂(100mM的Tris,其中含50mM的柠檬酸、3%的牛血清 $\gamma$ 球蛋白、2%的PEG10000、0.05%的阿拉伯树胶1%的甜菜碱、以及0.05%的Proclin300)将辣根过氧化物酶标记的兔抗人IgM抗体稀释至6000倍。

[0062] 4、试剂盒的反应体系的建立

[0063] 取出芯片试剂,平衡至室温;

[0064] 加样:将阴性和阳性对照血清以及用样品稀释液(0.02M Tris,0.15M NaCl,0.05%Tween20,0.01%酪蛋白,pH7.4)稀释了101倍的待测样品,每孔100 $\mu$ l加入待测芯片孔中反应。

[0065] 温育:室温反应30min。加300 $\mu$ l洗涤液(0.02M Tris,0.15M NaCl,0.05%Tween20,pH7.4),洗涤3次,每次1min。

[0066] 加酶标二抗(酶标记物):每孔加入50 $\mu$ l酶标抗体。

[0067] 温育:室温反应30min。加300 $\mu$ l洗涤液,洗涤3次,每次1min。

[0068] 显色:每孔加入TMB显色剂50 $\mu$ l,室温避光反应30min。

[0069] 测定:30min内,用检测仪读取并计算每个反应孔对应抗体的信号值。

[0070] 实施例2、抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒准确性评价

[0071] 1、用Diasorin公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗弓形虫IgM阳性血清和10例抗弓形虫IgM阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片进行测试,结果如下表1(+表示阳性,-表示阴性)。

[0072] 表1实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片测试抗弓形虫IgM血清结果

	ELISA试剂盒确定 抗弓形虫IgM阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗弓形虫IgM阴性血清									
[0073]	芯片弓形虫-IgM测试结果																			
	+++++										-----									

[0074] 2、用Diasorin公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗风疹病毒IgM阳性血清和10例抗风疹病毒IgM阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片测试,结果如下表2(+表示阳性,-表示阴性)。

[0075] 表2实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片测试抗风疹病毒IgM血清结果

	ELISA试剂盒确定 抗风疹病毒IgM阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗风疹病毒IgM阴性血清									
[0076]	芯片风疹病毒-IgM测试结果																			
	+++++										-----									

[0077] 3、用Diasorin公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗巨细胞病毒IgM阳性血清和10例抗巨细胞病毒IgM阴性血清,实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片进行测试,结果如下表3(+表示阳性,-表示阴性)。

[0078] 表3实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片测试抗巨细胞病毒IgM血清结果

	ELISA试剂盒确定 抗巨细胞病毒IgM阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗巨细胞病毒IgM阴性血清									
[0079]	芯片巨细胞病毒-IgM测试结果																			
	+++++										-----									

[0080] 4、用Diasorin公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗单纯疱疹病毒-I IgM阳性血清和10例单纯疱疹病毒-I IgM阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片测试,结果如下表4(+表示阳性,-表示阴性)。

[0081] 表4实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片测试抗单纯疱疹病毒-I IgM血清结果

	ELISA试剂盒确定 抗单纯疱疹病毒-I型IgM阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗单纯疱疹病毒-I型IgM阴性血清									
[0082]	芯片单纯疱疹病毒-I-IgM测试结果																			
	+++++										-----									

[0083] 5、用Diasorin公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗单纯疱疹病毒-II IgM阳性血清和10例抗单纯疱疹病毒-II IgM阴性血清,实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片进行测试,结果如下表5(+表示阳性,-表示阴性)。

[0084] 表5实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片测试抗单纯疱疹病毒-II IgM血清结果

	ELISA试剂盒确定 抗单纯疱疹病毒-II IgM阳性血清										ELISA试剂盒确定 抗单纯疱疹病毒-II IgM阴性血清									
[0085]	芯片单纯疱疹病毒-II-IgM测试结果																			
	+++++										-----									

[0086] 6、用EUROIMMUN公司ELISA试剂盒筛选的10例确定感染感染抗细小病毒B1 IgM阳



“±”表是弱阳“-”表示阴性)。

[0102] 表11实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片特异性比较结果

样本	实施例1抗torch-IgM型抗体谱芯片 测试抗弓形虫IgM抗体结果	Diasorin公司ELISA试剂盒 测试抗弓形虫IgM抗体结果
样本1	-	-
样本2	-	-
样本3	-	±
样本4	-	-
样本5	-	-
样本6	-	-
样本7	-	-
样本8	-	-
样本9	-	-
样本10	-	-
样本11	-	-
样本12	-	-
样本13	-	-
样本14	-	-
样本15	-	-
样本16	-	-
样本17	-	-
样本18	-	-
样本19	-	±
样本20	-	-

[0103] 结果显示,实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片测试20例阴性血清没有出现假阳,而市场上的Diasorin公司ELISA试剂盒测试20例阴性血清出现2例假阳。表明本发明所述抗torch-IgM型抗体谱芯片特异性较Diasorin公司ELISA试剂盒更好。

[0104] 实施例4、抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒的稳定性评价

[0105] 将实施例1制备抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒分别放置在2-8℃0个月后、6个月后、12个月后、18个月后、24个月,放置在18-28℃0个月后、2个月后、4个月后、6个月后、8个月后用抗相应抗原IgM质控血清分别测试信号值数据,结果如表12和13。

[0106] 表12实施例1制备抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒2-8℃稳定性评价结果

[0108]

对应病原体	0个月	6个月	6个月/0个月	12个月	12个月/0个月	12个月/6个月	18个月	18个月/0个月	18个月/6个月	18个月/12个月	24个月	24个月/0个月	24个月/6个月	24个月/12个月	24个月/18个月
弓形虫	43755	43025	98.33%	42621	97.41%	99.06%	41362	94.53%	96.13%	97.05%	40891	93.45%	95.04%	95.94%	98.86%
风疹病毒	57732	56387	97.67%	55459	96.06%	98.35%	54399	94.23%	96.47%	98.09%	53012	91.82%	94.01%	95.59%	97.45%
巨细胞病毒	32834	32908	100.23%	32910	100.23%	100.01%	32007	97.48%	97.26%	97.26%	31425	95.71%	95.49%	95.49%	98.18%
单纯疱疹病毒-I	39511	38025	96.24%	37401	94.66%	98.36%	36495	92.37%	95.98%	97.58%	35865	90.77%	94.32%	95.89%	98.27%
单纯疱疹病毒-II	7986	7577	94.88%	7432	93.06%	98.09%	7233	90.57%	95.46%	97.32%	7249	90.77%	95.67%	97.54%	100.22%
柯萨奇病毒	8234	8218	99.81%	8047	97.73%	97.92%	7954	96.60%	96.79%	98.84%	7783	94.52%	94.71%	96.72%	97.85%
梅毒螺旋体	10921	9997	91.54%	10135	92.80%	101.38%	9985	91.43%	99.88%	98.52%	10110	92.57%	101.13%	99.75%	101.25%
乙肝病毒	37756	37533	99.41%	35432	93.84%	94.40%	34564	91.55%	92.09%	97.55%	34128	90.39%	90.93%	96.32%	98.74%
沙眼衣原体	28971	27875	96.22%	26773	92.41%	96.05%	26456	91.32%	94.91%	98.82%	26711	92.20%	95.82%	99.77%	100.96%
细小病毒B19	35656	34564	96.94%	34455	96.63%	99.68%	34132	95.73%	98.75%	99.06%	33099	92.83%	95.76%	96.06%	96.97%

[0109] 表13实施例1制备抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒18-28℃稳定性评价结果

[0110]

对应病原体	0个月	2个月	2个月/0个月	4个月	4个月/0个月	4个月/2个月	6个月	6个月/0个月	6个月/2个月	6个月/4个月	8个月	8个月/0个月	8个月/2个月	8个月/4个月	8个月/6个月
弓形虫	43654	43112	98.76%	41123	94.20%	95.39%	40591	92.98%	94.15%	98.71%	37092	84.97%	86.04%	90.20%	91.38%
风疹病毒	57542	56243	97.74%	54579	94.85%	97.04%	52760	91.69%	93.81%	96.67%	50042	86.97%	88.97%	91.69%	94.85%
巨细胞病毒	32782	31826	97.08%	30876	94.19%	97.02%	29990	91.48%	94.23%	97.13%	27539	84.01%	86.53%	89.19%	91.83%
单纯疱疹病毒-I	39272	37815	96.29%	36675	93.39%	96.99%	35756	91.05%	94.56%	97.49%	32996	84.02%	87.26%	89.97%	92.28%
单纯疱疹病毒-II	7889	7872	99.78%	7438	94.28%	94.49%	7195	91.20%	91.40%	96.73%	7185	91.08%	91.27%	96.60%	99.86%
柯萨奇病毒	8174	8177	100.04%	8035	98.30%	98.26%	7987	97.71%	97.68%	99.40%	7046	86.20%	86.17%	87.69%	88.22%
梅毒螺旋体	10988	10451	95.11%	10331	94.02%	98.85%	10257	93.35%	98.14%	99.28%	8965	81.59%	85.78%	86.78%	87.40%
乙肝病毒	37684	36774	97.59%	36018	95.58%	97.94%	34443	91.40%	93.66%	95.63%	32156	85.33%	87.44%	89.28%	93.36%
沙眼衣原体	28851	27743	96.16%	26998	93.58%	97.31%	26086	90.42%	94.03%	96.62%	24557	85.12%	88.52%	90.96%	94.14%
细小病毒B19	35457	34267	96.64%	34154	96.33%	99.67%	33299	93.91%	97.18%	97.50%	31550	88.98%	92.07%	92.38%	94.75%

[0111] 结果显示,本发明所述抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒在2-8℃稳定期为两年,在18-28℃稳定期为一年。

[0112] 实施例5、抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒中封闭稳定剂和酶标稀释液对稳定性的影响

[0113] 采用本发明实施例1制备的抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒中与采用一般封闭液(pH=7.4 0.01M PBS含5%BSA)、酶标稀释液(pH=7.4 0.01M PBS含0.05%吐温-20、1%BSA)组成的抗torch-IgM型抗体谱芯片对比试剂盒(试剂盒其他方法步骤同实施例1),分别放置在2-8℃6个月后、12个月后、18个月后、24个月,放置在18-28℃、2个月后、4个月后、6个月后、8个月后用抗相应抗原IgM质控血清分别测试信号值数据,结果如表14和15。

[0114] 表14 2-8℃封闭稳定剂、酶标稀释稳定剂稳定性评价结果

[0115]

2-8℃	对应病原体	本发明的torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒质控血清测试结果	一般封闭液和酶标稀释液的对比如试剂盒质控血清测试结果	两种试剂盒检测的信号值百分比
6个月	弓形虫	43025	43005	99.95%
	风疹病毒	56387	54261	96.23%
	巨细胞病毒	32908	31076	94.43%
	单纯疱疹病毒-I	38025	36175	95.13%
	单纯疱疹病毒-II	7577	7245	95.62%
	柯萨奇病毒	8218	7986	97.18%
	梅毒螺旋体	9997	9673	96.76%
	乙肝病毒	37533	35411	94.35%
	沙眼衣原体	27875	27186	97.53%
12个月	细小病毒	34564	32562	94.21%
	弓形虫	42621	41418	97.18%
	风疹病毒	55459	54459	98.20%
	巨细胞病毒	32910	31153	94.66%
	单纯疱疹病毒-I	37401	35470	94.84%
	单纯疱疹病毒-II	7432	7136	96.02%
	柯萨奇病毒	8047	7857	97.64%
	梅毒螺旋体	10135	9996	98.63%
	乙肝病毒	35432	34604	97.66%
18个月	沙眼衣原体	26773	24375	91.04%
	细小病毒	34455	32156	93.33%
	弓形虫	41362	16428	39.72%
	风疹病毒	54399	24538	45.11%
	巨细胞病毒	32007	15344	47.94%
	单纯疱疹病毒-I	36495	15893	43.55%
	单纯疱疹病毒-II	7233	3417	47.24%
	柯萨奇病毒	7954	3324	41.79%
	梅毒螺旋体	9985	4061	40.67%
24个月	乙肝病毒	34564	16725	48.39%
	沙眼衣原体	26456	14522	54.89%
	细小病毒	34132	16554	48.50%
	弓形虫	40891	839	2.05%
	风疹病毒	53012	12431	23.45%
	巨细胞病毒	31425	977	3.11%
	单纯疱疹病毒-I	35865	1225	3.42%
	单纯疱疹病毒-II	7249	2115	29.18%
	柯萨奇病毒	7783	1456	18.71%
24个月	梅毒螺旋体	10110	945	9.35%
	乙肝病毒	34128	679	1.99%
	沙眼衣原体	26711	827	3.10%
	细小病毒	33099	511	1.54%

[0116] 表15 18-28℃封闭稳定剂、酶标稀释稳定剂稳定性评价结果

[0117]

18-28℃	对应病原体	本发明的torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒质控血清测试结果	一般封闭液和酶标稀释液的对比如试剂盒质控血清测试结果	两种试剂盒检测的信号值百分比
2个月	弓形虫	43112	41905	97.20%
	风疹病毒	56243	54223	96.41%
	巨细胞病毒	31826	30496	95.82%
	单纯疱疹病毒-I	37815	37163	98.28%
	单纯疱疹病毒-II	7872	7267	92.31%
	柯萨奇病毒	8177	7988	97.69%
	梅毒螺旋体	10451	9847	94.22%
	乙肝病毒	36774	34591	94.06%
	沙眼衣原体	27743	25688	92.59%
	细小病毒	34267	31157	90.92%
4个月	弓形虫	41123	28570	69.47%
	风疹病毒	54579	40130	73.53%
	巨细胞病毒	30876	24964	80.85%
	单纯疱疹病毒-I	36675	19275	52.56%
	单纯疱疹病毒-II	7438	5673	76.27%
	柯萨奇病毒	8035	5677	70.65%
	梅毒螺旋体	10331	5024	48.63%
	乙肝病毒	36018	20557	57.07%
	沙眼衣原体	26998	16643	61.65%
	细小病毒	34154	28634	83.84%
6个月	弓形虫	40591	16950	41.76%
	风疹病毒	52760	1211	2.30%
	巨细胞病毒	29990	2715	9.05%
	单纯疱疹病毒-I	35756	4561	12.76%
	单纯疱疹病毒-II	7195	867	12.05%
	柯萨奇病毒	7987	1043	13.06%
	梅毒螺旋体	10257	876	8.54%
	乙肝病毒	34443	1824	5.30%
	沙眼衣原体	26086	2543	9.75%
	细小病毒	33299	867	2.60%
8个月	弓形虫	37092	1857	5.01%
	风疹病毒	50042	2431	4.86%
	巨细胞病毒	27539	1558	5.66%
	单纯疱疹病毒-I	32996	1654	5.01%
	单纯疱疹病毒-II	7185	273	3.80%
	柯萨奇病毒	7046	355	5.04%
	梅毒螺旋体	8965	735	8.20%
	乙肝病毒	32156	392	1.22%
	沙眼衣原体	24557	715	2.91%
	细小病毒	31550	547	1.73%

[0118] 结果显示,使用一般封闭液和酶标稀释液制备抗torch-IgM型抗体谱芯片检测试剂盒2-8℃放置12个月后或18-28℃放置2个月后使用相应的质控血清测试信号强度明显下降,而本发明的抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒放置2-8℃放置12个月或18-28℃放置2个月后用相应的质控血清测试还显示很好的性能。表明本发明的抗torch-IgM型抗体谱芯片检测试剂盒中的封闭稳定剂、酶标稀释稳定剂比一般封闭液和酶标稀释液好,能很大程度提高产品的稳定性。

[0119] 实施例6、抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒与胶体金试剂盒所使用的抗原成本的比较

[0120] 与申请号为201110220541的中国专利中公开的胶体金快速检测试纸比较抗原成

本：

[0121] 荧光免疫层析试剂盒所使用的抗原用量计算：

[0122] 以弓形虫抗原包被为例：CN201110220541专利中提到弓形虫抗原包被浓度1.5mg/ml,按1 $\mu$ l/cm包被,每个试纸条宽0.4cm,因此平均每人份抗原的用量约为0.6 $\mu$ g。

[0123] 本发明所述试剂盒所使用的抗原用量计算：

[0124] 本发明使用的是BioDot精密点样仪进行抗原的包被,每个点的包被体积仅为10nL,因此包被每人份所用抗原的量为：弓形虫提纯抗原用量： $50\mu\text{g}/\text{ml} \times 10\text{nL} \times 10^{-6} = 0.005\mu\text{g}$ 。

[0125] 由此可知,本发明中弓形虫抗原的使用量明显要低于胶体金快速检测试纸2个数量级。其他抗原用量情况与此相似。综上所述,表明本发明所述抗torch-IgM型抗体谱芯片试剂盒能有效的减少相关抗原的使用量,在保证试剂盒的灵敏性和特异性的同时,降低相关的抗原使用成本。