



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108398564 A

(43)申请公布日 2018.08.14

(21)申请号 201810188210.6

(22)申请日 2018.03.07

(71)申请人 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 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书12页

(54)发明名称

一种抗torch-IgG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-IgG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-IgG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-IgG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-IgG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。

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IgG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IgG或其他与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IgG; 所述酶标质控点包被人IgG或抗兔的抗体; 所述参考曲线点包被不同浓度的人IgG; 所述芯片位置参考点包被已知浓度的人IgG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座上。

6. 根据权利要求5所述的制备方法, 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; 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. 根据权利要求6所述的制备方法, 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; 所述PEG为PEG4000; 所述PEG的含量为0.5%~1%; 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; 所述海藻糖的含量为5%~8%; 所述防腐剂为Proclin300; 所述防腐剂的含量为0.05%; 所述甘油的含量为15%。

8. 根据权利要求5-7任意一项所述的制备方法, 还包括用封闭稳定剂封闭的步骤。

9. 根据权利要求8所述的制备方法, 所述封闭稳定剂为含1%~5% BSA、2%-6% 海藻糖、0.8%-1% PVA 20000、0.2%-0.4% 甜菜碱、0.05% NaN₃的pH7.4的0.01M PBS溶液。

10. 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-IgG型抗体谱芯片。

11. 根据权利要求10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。

12. 根据权利要求11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IgG抗体(羊抗人); 酶标稀释稳定剂为包含0.05M的柠檬酸、2%-5%的山羊血清、2%-4%的PEG10000、0.2%-0.5%的对羟基苯甲酸钠、0.1%-0.2%的阿拉伯树胶、0.05%的Proclin3000的pH7.4的1M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。

13. 一种TORCH检测方法, 待测样品用样品稀释液稀释后加入权利要求1-4任意一项所述的抗torch-IgG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-IgG型抗体信号值。

一种抗torch-IgG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-IgG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(Other)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-IgG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-IgG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IgG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-IgG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IgG,使用的酶联免疫标记物是抗人IgG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IgG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IgG。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IgG。在其他的一些实施例中也可使用其他的抗人IgG。

[0016] 在本发明的一些实施例中,所述酶标质控点可以是人IgG。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IgG),例如羊抗兔IgG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IgG。

[0018] 本发明中,所述芯片本身的位置参考点包被的是2 μ g/ml的人IgG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-IgG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%~5%BSA、2%-6%海藻糖、0.8%-1%PVA 20000、0.2%-0.4%甜菜碱、0.05%NaN₃的pH7.4的0.01M PBS溶液。在一些实施例中,所述封闭稳定剂为含1%BSA、4%海藻糖、0.8%PVA20000、0.2%甜菜碱、0.05%NaN₃的pH7.4的0.01M PBS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-IgG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IgG抗体,如羊抗人IgG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、2%-5%的山羊血清、2%-4%的PEG10000、0.2%-0.5%的对羟基苯甲酸钠、0.1%-0.2%的阿拉伯树胶、0.05%的Proclin3000的pH7.4的1M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、5%的山羊血清、2%的PEG10000、0.2%的对羟基苯甲酸钠、0.1%的阿拉伯树胶、0.05%的Proclin3000的pH7.4的1M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-IgG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-IgG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IgG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-IgG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-IgG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-IgG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,进一步采用封闭液封闭。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-IgG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-IgG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-IgG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、NaN₃、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-IgG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):

[0050]

S1	PC	TOX	HPV B19
S2	NC	RV	CV
S3	SC	CMV	TP
S4	EC	HSV II	CT
S5	Loc	HSV I	HBV

[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 μ g/ml、0.01 μ g/ml、0.1 μ g/ml、0.5 μ g/ml、2 μ g/ml、4 μ g/ml、8 μ g/ml、2 μ g/ml的人IgG,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 μ g/ml的兔抗人IgG抗体,稀释缓冲液为pH9.6的CB缓冲液。[0055] Loc点包被的是2 μ g/ml的人IgG,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 μ g/ml,HSV-I重组抗原20 μ g/ml,HSV-II重组抗原20 μ g/ml,RV重组抗原15 μ g/ml,CMV重组抗原10 μ g/ml,HBV抗原8 μ g/ml,TP重组抗原40 μ g/ml,B19重组抗原25 μ g/ml,CV重组抗原30 μ g/ml,CT重组抗原25 μ g/ml。

[0057] 将稀释好的抗原分别用0.22 μ 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 μ l的封闭稳定剂(1%BSA、4%的海藻糖、0.8%的PVA20000、0.2%的甜菜碱以及0.05%Na₃N防腐剂和pH7.4 0.01M PBS),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] 用酶标稳定缓冲液(pH7.4的0.1M的Tris,其中含0.05M的柠檬酸、5%的山羊血清、2%的PEG10000、0.2%的对羟基苯甲酸钠,0.1%的阿拉伯树胶、以及0.05%的Proclin300)将辣根过氧化物酶标记的兔抗人IgG抗体稀释至4000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 μ l加入待测芯片孔中反应。

[0065] 温育:室温反应30min。加300 μ 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 μ l酶标抗体。[0067] 温育:室温反应30min。加300 μ l洗涤液,洗涤3次,每次1min。

[0068] 显色:每孔加入TMB显色剂50μl,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-IgG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IgG阳性血清和10例抗弓形虫IgG阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgG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-IgG型抗体谱芯片测试抗弓形虫IgG血清结果

[0073]	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	抗弓形虫IgG阳性血清										抗弓形虫IgG阴性血清									
芯片弓形虫-IgG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IgG阳性血清和10例抗风疹病毒IgG阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgG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-IgG型抗体谱芯片测试抗风疹病毒IgG血清结果

[0076]	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	抗风疹病毒IgG阳性血清										抗风疹病毒IgG阴性血清									
芯片风疹病毒-IgG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IgG阳性血清和10例抗巨细胞病毒IgG阴性血清,实施例1制备的抗torch-IgG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-IgG型抗体谱芯片测试抗巨细胞病毒IgG血清结果

[0079]	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	抗巨细胞病毒IgG阳性血清										抗巨细胞病毒IgG阴性血清									
芯片巨细胞病毒-IgG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 IgG阳性血清和10例单纯疱疹病毒-I IgG阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgG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-IgG型抗体谱芯片测试抗单纯疱疹病毒-I IgG血清结果

[0082]

	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	抗单纯疱疹病毒-I型IgG阳性血清										抗单纯疱疹病毒-I型IgG阴性血清									
芯片单纯疱疹病毒-I-IgG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 IgG阳性血清和10例抗单纯疱疹病毒-II IgG阴性血清,实施例1制备的抗torch-IgG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-IgG型抗体谱芯片测试抗单纯疱疹病毒-II IgG血清结果

[0085]

	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	抗单纯疱疹病毒-II IgG阳性血清										抗单纯疱疹病毒-II IgG阴性血清									
芯片单纯疱疹病毒-II-IgG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B1IgG阳性血清和10例抗细小病毒B1IgG阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片进行测试,结果如下表6(+表示阳性,-表示阴性)。

[0087] 表6实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片测试抗细小病毒B1IgG血清结果

[0088]

	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	确定抗细小病毒B19 IgG阳性血清										确定抗细小病毒B19 IgG阴性血清									
芯片细小病毒B19-IgG测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0089] 7、用EUROIMMUN公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗柯萨奇病毒IgG阳性血清和10例抗柯萨奇病毒IgG阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片进行测试,结果如下表7(+表示阳性,-表示阴性)。

[0090] 表7实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片测试抗柯萨奇病毒IgG血清结果

[0091]

	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	抗柯萨奇病毒-IgG阳性血清										抗柯萨奇病毒IgG阴性血清									
芯片柯萨奇病毒-IgG测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0092] 8、用EUROIMMUN公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗梅毒螺旋体(TP) IgG阳性血清和10例抗梅毒螺旋体(TP) IgG阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片进行测试,结果如下表8(+表示阳性,-表示阴性)。

[0093] 表8实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片测试抗梅毒螺旋体IgG血清结果

[0094]

	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	抗梅毒螺旋体(TP)-IgG阳性血清										抗梅毒螺旋体(TP)-IgG阴性血清									
芯片梅毒螺旋体(TP)-IgM测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0095] 9、用Diasorin公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗乙肝病毒(HBV) 核心抗体IgG阳性血清和10例抗乙肝病毒核心抗体IgG阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片进行测试,结果如下表9(+表示阳性,-表示阴性)。

[0096] 表9实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片测试抗乙肝病毒核心抗体IgG血清结果

[0097]

	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	抗乙肝病毒核心抗体-IgG阳性血清										抗乙肝病毒核心抗体-IgG阴性血清									
芯片乙肝病毒-IgM测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0098] 10、用IBL公司ELISA试剂盒筛选的10例确定抗沙眼衣原体(CT) IgG阳性血清和10例抗沙眼衣原体(CT) IgG阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片进行测试,结果如下表10(+表示阳性,-表示阴性)。

[0099] 表10实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片测试抗沙眼衣原体IgG血清结果

[0100]

	ELISA试剂盒确定										ELISA试剂盒确定									
	抗沙眼衣原体IgG阳性血清										抗沙眼衣原体IgG阴性血清									
芯片沙眼衣原体 (CT)-IgG测试结果	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0101] 综上所述,本发明制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片测试各项抗病原体IgG的准确性符合要求,准确性高。

[0102] 实施例3、抗torch-IgG型抗体谱芯片试剂盒特异性评价

[0103] 比较本发明所述抗torch-IgG型抗体谱芯片试剂盒与传统ELISA试剂盒特异。以弓形虫项目为例,选取20例抗弓形虫IgG抗体临床阴性血清,用实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片与Diasorin公司ELISA试剂盒同时进行测试,测试数据如下表11 (“+”表示阳性,“±”表示弱阳“-”表示阴性)。

[0104] 表11实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片特异性比较结果

[0105]

样本	实施例1抗torch-IgG型抗体谱芯片 测试抗弓形虫IgG抗体结果	Diasorin公司ELISA试剂盒 测试抗弓形虫IgG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	-	-

[0106] 结果显示,实施例1制备的抗torch-IgG型抗体谱芯片测试20例阴性血清出现1例假阳,而市场上的Diasorin公司ELISA试剂盒测试20例阴性血清出现3例假阳。表明本发明所述抗torch-IgG型抗体谱芯片特异性较Diasorin公司ELISA试剂盒更好。

[0107] 实施例4、抗torch-IgG型抗体谱芯片试剂盒的稳定性评价

[0108] 将实施例1制备抗torch-IgG型抗体谱芯片试剂盒分别放置在2-8℃0个月、6个月、12个月、18个月、24个月,放置在18-28℃0个月、2个月、4个月、6个月、8个月后用抗相应抗原IgG质控血清分别测试信号值数据,结果如表12和13。

[0109] 表12实施例1制备抗torch-IgG型抗体谱芯片试剂盒2-8℃稳定性评价结果

[0110]

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	45743	42017	91.85%	41534	90.80%	98.85%	41367	90.43%	98.45%	99.60%	41993	91.80%	99.94%	101.11%	101.51%
风疹病毒	68734	67387	98.04%	65460	95.24%	97.14%	64192	93.39%	95.26%	98.06%	62012	90.22%	92.02%	94.73%	96.60%
巨细胞病毒	52814	52711	99.80%	50910	96.39%	96.58%	49007	92.79%	92.97%	96.26%	47425	89.80%	89.97%	93.15%	96.77%
单纯疱疹病毒-I	9517	9425	99.03%	9016	94.74%	95.66%	8849	92.98%	93.89%	98.15%	8486	89.17%	90.04%	94.12%	95.90%
单纯疱疹病毒-II	8981	8926	99.39%	8879	98.86%	99.47%	8233	91.67%	92.24%	92.72%	8049	89.62%	90.17%	90.65%	97.77%
柯萨奇病毒	18234	18015	98.80%	18002	98.73%	99.93%	17954	98.46%	99.66%	99.73%	17880	98.06%	99.25%	99.32%	99.59%
梅毒螺旋体	38925	38700	99.42%	38546	99.03%	99.60%	38231	98.22%	98.79%	99.18%	37976	97.56%	98.13%	98.52%	99.33%
乙肝病毒	27751	27538	99.23%	27132	97.77%	98.53%	26564	95.72%	96.46%	97.91%	26122	94.13%	94.86%	96.28%	98.34%
沙眼衣原体	48971	48572	99.19%	46773	95.51%	96.30%	46456	94.86%	95.64%	99.32%	45711	93.34%	94.11%	97.73%	98.40%
细小病毒B19	35724	34521	96.63%	33453	93.64%	96.91%	33132	92.74%	95.98%	99.04%	32001	89.58%	92.70%	95.66%	96.59%

[0111] 表13实施例1制备抗torch-IgG型抗体谱芯片试剂盒18-28℃稳定性评价结果

[0112]

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	45721	44115	96.49%	43137	94.35%	97.78%	41591	90.97%	94.28%	96.42%	40803	89.24%	92.49%	94.59%	98.11%
风疹病毒	68629	68243	99.44%	64579	94.10%	94.63%	62760	91.45%	91.97%	97.18%	62042	90.40%	90.91%	96.07%	98.86%
巨细胞病毒	52793	51826	98.17%	51576	97.69%	99.52%	51091	96.78%	98.58%	99.06%	50539	95.73%	97.52%	97.99%	98.92%
单纯疱疹病毒-I	9545	9315	97.59%	9075	95.08%	97.42%	8956	93.83%	96.15%	98.69%	8749	91.66%	93.92%	96.41%	97.69%
单纯疱疹病毒-II	8981	8772	97.67%	8438	93.95%	96.19%	8195	91.25%	93.42%	97.12%	8085	90.02%	92.17%	95.82%	98.66%
柯萨奇病毒	18427	18175	98.63%	18035	97.87%	99.23%	17987	97.61%	98.97%	99.73%	17046	92.51%	93.79%	94.52%	94.77%
梅毒螺旋体	38925	35451	91.08%	34948	89.78%	98.58%	34977	89.86%	98.66%	100.08%	34796	89.39%	98.15%	99.57%	99.48%
乙肝病毒	27751	26774	96.48%	26218	94.48%	97.92%	25943	93.48%	96.90%	98.95%	25156	90.65%	93.96%	95.95%	96.97%
沙眼衣原体	48971	47743	97.49%	46997	95.97%	98.44%	46081	94.10%	96.52%	98.05%	45878	93.68%	96.09%	97.62%	99.56%
细小病毒B19	35724	34132	95.54%	34100	95.45%	99.91%	33297	93.21%	97.55%	97.65%	32554	91.13%	95.38%	95.47%	97.77%

[0113] 结果显示,本发明所述抗torch-IgG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。

[0114] 实施例5、抗torch-IgG型抗体谱芯片试剂盒中封闭液和酶标稀释液对稳定性的影响

[0115] 采用本发明实施例1制备的抗torch-IgG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-IgG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、12个月、18个月、24个月,放置在18-28℃、2个月、4个月、6个月、8个月后用抗相应抗原IgG质控血清分别测试信号值数据,结果如表14和15。

[0116] 表14 2-8℃封闭稳定剂、酶标稀释稳定剂稳定性评价结果

[0117]

2-8℃	对应病原体	本发明的torch-IgG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	42017	41008	97.60%
	风疹病毒	67387	65265	96.85%
	巨细胞病毒	52711	52076	98.80%
	单纯疱疹病毒-I	9425	9317	98.85%
	单纯疱疹病毒-II	8926	8745	97.97%
	柯萨奇病毒	18015	17806	98.84%
	梅毒螺旋体	38700	9673	24.99%
	乙肝病毒	27538	27011	98.09%
	沙眼衣原体	48572	47186	97.15%
	细小病毒	34521	32562	94.33%
12个月	弓形虫	41534	39315	94.66%
	风疹病毒	65460	62259	95.11%
	巨细胞病毒	50910	50013	98.24%
	单纯疱疹病毒-I	9016	8742	96.96%
	单纯疱疹病毒-II	8879	8136	91.63%
	柯萨奇病毒	18002	17482	97.11%
	梅毒螺旋体	38546	35169	91.24%
	乙肝病毒	27132	25673	94.62%
	沙眼衣原体	46773	43712	93.46%
	细小病毒	33453	32153	96.11%
18个月	弓形虫	41367	26421	63.87%
	风疹病毒	64192	24534	38.22%
	巨细胞病毒	49007	25341	51.71%
	单纯疱疹病毒-I	8849	4632	52.34%
	单纯疱疹病毒-II	8233	3419	41.53%
	柯萨奇病毒	17954	7231	40.28%
	梅毒螺旋体	38231	8065	21.10%
	乙肝病毒	26564	16728	62.97%
	沙眼衣原体	46456	15527	33.42%
	细小病毒	33132	16452	49.66%
24个月	弓形虫	41993	9391	22.36%
	风疹病毒	62012	12431	20.05%
	巨细胞病毒	47425	9778	20.62%
	单纯疱疹病毒-I	8486	1225	14.44%
	单纯疱疹病毒-II	8049	2115	26.28%
	柯萨奇病毒	17880	1956	10.94%
	梅毒螺旋体	37976	2450	6.45%
	乙肝病毒	26122	4679	17.91%
	沙眼衣原体	45711	2672	5.85%
	细小病毒	32001	6186	19.33%

[0118] 表15 18-28℃封闭稳定剂、酶标稀释稳定剂稳定性评价结果

[0119]

18-28℃	对应病原体	本发明的torch-IgG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	44115	41803	94.76%
	风疹病毒	68243	67123	98.36%
	巨细胞病毒	51826	50496	97.43%
	单纯疱疹病毒-I	9315	9033	96.97%
	单纯疱疹病毒-II	8772	8534	97.29%
	柯萨奇病毒	18175	17928	98.64%
	梅毒螺旋体	35451	33401	94.22%
	乙肝病毒	26774	25597	95.60%
	沙眼衣原体	47743	46679	97.77%
	细小病毒	34132	32158	94.22%
4个月	弓形虫	43137	42001	97.37%
	风疹病毒	64579	62130	96.21%
	巨细胞病毒	51576	50961	98.81%
	单纯疱疹病毒-I	9075	8975	98.90%
	单纯疱疹病毒-II	8438	8273	98.04%
	柯萨奇病毒	18035	17691	98.09%
	梅毒螺旋体	34948	32571	93.20%
	乙肝病毒	26218	24553	93.65%
	沙眼衣原体	46997	45843	97.54%
	细小病毒	34100	32634	95.70%
6个月	弓形虫	41591	16950	40.75%
	风疹病毒	62760	22110	35.23%
	巨细胞病毒	51091	27150	53.14%
	单纯疱疹病毒-I	8956	4568	51.00%
	单纯疱疹病毒-II	8195	2331	28.44%
	柯萨奇病毒	17987	2543	14.14%
	梅毒螺旋体	34977	8231	23.53%
	乙肝病毒	25943	2826	10.89%
	沙眼衣原体	46081	3543	7.69%
	细小病毒	33297	3215	9.66%
8个月	弓形虫	40803	3857	9.45%
	风疹病毒	62042	8431	13.59%
	巨细胞病毒	50539	4558	9.02%
	单纯疱疹病毒-I	8749	1654	18.91%
	单纯疱疹病毒-II	8085	873	10.80%
	柯萨奇病毒	17046	855	5.02%
	梅毒螺旋体	34796	935	2.69%
	乙肝病毒	25156	795	3.16%
	沙眼衣原体	45878	1615	3.52%
	细小病毒	32554	1042	3.20%

[0120] 结果显示,使用一般封闭液和酶标稀释液(0.01M pH7.4PBS,10%BSA)制备抗torch-IgG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-IgG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-IgG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。

[0121] 实施例6、抗torch-IgG型抗体谱芯片试剂盒与荧光免疫层析试剂盒所使用的抗原成本的比较

[0122] 与申请号为201510487338.9的中国专利中公开的荧光免疫层析试剂盒比较抗原

成本:

[0123] 荧光免疫层析试剂盒所使用的抗原用量计算:

[0124] 以弓形虫抗原包被为例:CN201510487338.9专利中提到弓形虫抗原包被浓度0.5-0.8mg/ml,按1 μ 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0.2-0.32 μ g。

[0125] 本发明所述试剂盒所使用的抗原用量计算:

[0126] 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 μ g/ml $\times$ 10nL $\times$ 10⁻⁶=0.005 μ g。

[0127] 由此可知,本发明中弓形虫抗原的使用量明显要低于荧光免疫层析试剂盒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-IgG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。