



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112229994 A

(43) 申请公布日 2021.01.15

(21) 申请号 202011432236.4

G01N 21/76 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.10

(71) 申请人 丹娜(天津)生物科技股份有限公司

地址 300467 天津市滨海新区生态城中天大道2018号生态科技园办公楼14号楼(3B)1楼101室-2

(72) 发明人 刘春龙 张舟 马少华 王家顺

栗艳 周泽奇

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 巩克栋

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

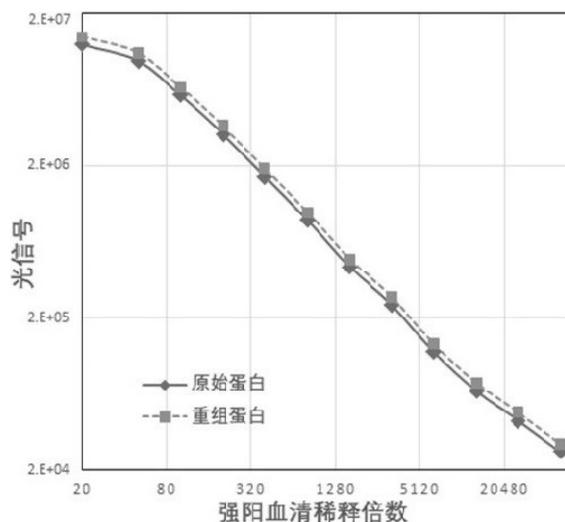
序列表9页 附图2页

(54) 发明名称

一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒抗体检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒抗体检测试剂盒。所述检测试剂盒包括：链霉亲和素磁微粒、生物素标记的新型冠状病毒抗原、吡啶碘酰胺标记的二抗、样本稀释液和质控品；所述生物素标记的新型冠状病毒抗原包括重组核衣壳蛋白和重组棘突蛋白S1。将待检样本、生物素标记抗原与链霉亲和素磁微粒混合，孵育和洗涤，再加入吡啶碘酰胺标记的抗体，形成磁微粒-链霉亲和素-生物素-抗原-新型冠状病毒抗体-二抗复合物，进而检测发光强度实现对待测样品的定性。



1. 一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,包括:

链霉亲和素磁微粒、生物素标记的新型冠状病毒抗原、吖啶磺酰胺标记的二抗、样本稀释液和质控品,所述生物素标记的新型冠状病毒抗原中包括重组核衣壳蛋白和重组棘突蛋白S1;

所述重组核衣壳蛋白中利用寡聚脯氨酸残基连接原始核衣壳蛋白的优势表位,并利用寡聚赖氨酸残基形成C端;

所述重组棘突蛋白S1中利用寡聚脯氨酸残基连接原始棘突蛋白S1的优势表位,并利用寡聚赖氨酸残基形成C端;

所述重组核衣壳蛋白包括如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列;

所述重组棘突蛋白S1包括如SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的新型冠状病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,所述重组核衣壳蛋白与重组棘突蛋白S1的质量比为(1~3):1;

所述生物素标记的新型冠状病毒抗原中,生物素与新型冠状病毒抗原的质量比为(0.06~0.48):1。

3. 根据权利要求1所述的新型冠状病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,所述样本稀释液中包含牛血清白蛋白、类风湿因子吸附剂、抑菌剂、尿素或阻断剂中的任意一种或至少两种的组合。

4. 根据权利要求1所述的新型冠状病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,所述质控品包括阳性质控品和阴性质控品;

所述阳性质控品为含新型冠状病毒抗体的缓冲液。

5. 根据权利要求1所述的新型冠状病毒抗体检测试剂盒,其特征在于,所述新型冠状病毒抗体检测试剂盒中还包括激发液和洗涤液。

6. 一种如权利要求1~5任一项所述的新型冠状病毒抗体检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述制备方法包括:

(1) 制备生物素标记的新型冠状病毒抗原:将新型冠状病毒的核衣壳蛋白和棘突蛋白S1作为抗原与PBS缓冲液混合,加入活化生物素标记1.5~2.5 h,而后透析得到所述生物素标记的新型冠状病毒抗原;

(2) 制备吖啶磺酰胺标记的二抗:将二抗与CBS缓冲液混合,加入NSP-SA-NHS标记0.5~1.5 h,再加入赖氨酸溶液,透析得到所述吖啶磺酰胺标记的二抗;

(3) 将所述生物素标记的新型冠状病毒抗原、吖啶磺酰胺标记的二抗、链霉亲和素磁微粒、样本稀释液和质控品分别包装,得到所述新型冠状病毒抗体检测试剂盒。

7. 一种如权利要求1~5任一项所述的新型冠状病毒抗体检测试剂盒的使用方法,其特征在于,所述使用方法包括如下步骤:

在待测样品中加入生物素标记的新型冠状病毒抗原和链霉亲和素-磁微粒,进行第一次孵育,洗涤,再加吖啶磺酰胺标记的二抗进行第二次孵育,洗涤,而后检测得到检测结果。

8. 根据权利要求7所述的使用方法,其特征在于,所述待测样品为血清或血浆;

所述待测样品经过样品稀释液稀释;

所述待测样品稀释后的效价比为1:(103~110);

所述待测样品、生物素标记的新型冠状病毒抗原与链霉亲和素磁微粒的体积比为(50~

100) : (25~75) : (30~50) ;

所述吡啶磺酰胺标记二抗的工作浓度为0.125~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

所述第一次孵育的时间为5~15 min;

所述第二次孵育的时间为5~15 min。

9. 根据权利要求7所述的使用方法, 其特征在于, 所述检测结果中指数 $I \geq 1.0$, 则待测样本为阳性;

所述检测结果中指数 $I < 1.0$, 则待测样本为阴性。

一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒抗体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析检测技术领域,涉及一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒抗体检测试剂盒。

背景技术

[0002] 冠状病毒是一类具外套膜(envelope)的单股正链RNA病毒,直径约60~220 nm,广泛存在与人和其它哺乳动物之间。大多数冠状病毒感染为轻症感染,但仍有两种冠状病毒曾爆发肆虐,引起严重后果:重症急性呼吸道综合征冠状病毒(SARS-CoV)和中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)。

[0003] 新型冠状病毒(2019-nCoV)可经呼吸道飞沫、接触等传播,具有较强的人与人传染能力,其基本再生数R0约为2.2(90%高密度区间1.4-3.8)。该病毒感染最常见的症状为发烧、咳嗽、肌痛或疲劳,所有患者均并发肺炎,胸部CT检查发现异常。部分患者在一周后出现呼吸困难,严重者病情进展迅速,数日内即可出现急性呼吸窘迫综合征、脓毒症休克、难以纠正的代谢性酸中毒和出凝血功能障碍。总体而言,新型冠状病毒引起的严重呼吸系统疾病。

[0004] 目前,新型冠状病毒肺炎诊断方法主要包括影像学诊断、分子诊断和血清学诊断,血清学诊断方法包括胶体金法、酶联免疫法和化学发光法。然而,影像学诊断存在异病同影问题,特异度低,易出现假阳性结果;分子诊断特异度高,但灵敏度低,易出现假阴。对于血清学诊断方法,胶体金法灵敏度高,但特异度低,易出现假阳性;酶联免疫法需要手工操作,存在生物安全风险。

[0005] 因此,利用化学发光法提供一种检测准确度高、特异性好且减少生物安全风险的检测试剂盒,对新型冠状病毒的检测和诊断具有重要的意义。

发明内容

[0006] 针对现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒抗体检测试剂盒,同时还提供了所述检测试剂盒的制备方法和使用方法。

[0007] 为达此目的,本发明采用以下技术方案:

第一方面,本发明提供一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒抗体检测试剂盒,包括:链霉亲和素磁微粒、生物素标记的新型冠状病毒抗原、吖啶磺酰胺标记的二抗、样本稀释液和质控品;所述生物素标记的新型冠状病毒抗原包括重组核衣壳蛋白和重组棘突蛋白S1。

[0008] 所述重组核衣壳蛋白中利用寡聚脯氨酸残基连接原始核衣壳蛋白的优势表位,并利用寡聚赖氨酸残基形成C端;

所述重组棘突蛋白S1中利用寡聚脯氨酸残基连接原始棘突蛋白S1的优势表位,并利用寡聚赖氨酸残基形成C端。

[0009] 本发明中,所述检测试剂盒的检测原理为:基于链霉亲和素磁微粒的化学发光,将

待检样本、生物素标记抗原与链霉亲和素磁微粒混合,孵育和洗涤,再加入信号物标记二抗,进行二次孵育和洗涤。若如样本中存在新型冠状病毒IgM抗体,则形成磁微粒-链霉亲和素-生物素-抗原-新型冠状病毒IgM抗体-二抗复合物,通过二抗上标记的信号物读取待测样本的发光强度数值。所述信号物可以是吡啶酯、吡啶磺酰胺、碱性磷酸酶和辣根过氧化物酶,本发明中优选吡啶磺酰胺。

[0010] 本发明使用寡聚脯氨酸残基-(P)_n-连接这些优势表位,形成一条串联预测优势表位且易伸展弯曲的重组抗原,利于抗体对优势表位的结合,提高检测灵敏度。

[0011] 以寡聚赖氨酸残基-(K)_n-形成C端,由于赖氨酸残基有1个多余的氨基,便于与生物素、吡啶酯、羧基磁微粒等标记物的偶联,一方面能增大重组抗原与标记物的结合概率,同时当重组抗原通过C端寡聚赖氨酸残基与固相载体结合时,N端的抗原表位更容易与抗体接触;另一方面能够降低重组抗原中优势表位与标记物的结合概率,防止表位被标记物遮挡,导致抗体识别困难。

[0012] 本发明中,所述检测试剂盒能够检测新型冠状病毒IgM和IgG抗体,可根据需要检测的抗体类型调整二抗的种类,例如检测IgM时,可选用羊抗人IgM抗体作为二抗,检测IgG时,可选用羊抗人IgG抗体作为二抗。

[0013] 同时,本发明选择以生物素标记抗原、以吡啶磺酰胺标记二抗,检测时采用的是间接法而非捕获法(捕获法:以生物素标记二抗,以吡啶磺酰胺标记抗原),该方法能提高所得试剂盒检测结果的准确度。

[0014] 本发明中,将核衣壳蛋白和棘突蛋白S1的质量比设置为(1~3):1,其中最优选为1.5:1,相比于单独使用核衣壳蛋白或棘突蛋白S1,或使用其他比例,例如分别按照4:1、2:3、1:4的比例混合,核衣壳蛋白和棘突蛋白S1比例为3:2时样本之间的区分度较大。

[0015] 作为本发明优选的技术方案,所述生物素标记的新型冠状病毒抗原中,活化生物素(Sulfo-NHS-LC-Biotin)与新型冠状病毒抗原的质量比为(0.06~0.48):1;例如可以是0.06:1、0.1:1、0.12:1、0.15:1、0.2:1、0.25:1、0.3:1、0.4:1或0.48:1等,优选为0.24:1。

[0016] 在制备过程中,取新型冠状病毒核衣壳蛋白和棘突蛋白S1置于玻璃器皿内,用0.02 M PBS缓冲液将新型冠状病毒核衣壳蛋白和棘突蛋白S1稀释;取12 μL的10 mg/mL的Sulfo-NHS-LC-Biotin溶液加入到上述抗原缓冲液中,混匀,避光置于室温2小时;用0.02 M PBS缓冲液在2~8℃环境中过夜透析,得到生物素标记抗原母液;添加12 μL的样品相对于添加3、6和24 μL的样品,其筛选区分度较大。

[0017] 优选地,所述重组核衣壳蛋白包括如SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列。

[0018] SEQ ID NO.1为:

GGPSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTPPPALNTPKDHIGTRNPANNPPPGFYAEGSRGGSQASSRS
SSRSRNSSRNSTPGSSRGTSPARMAGNGDPPPLESKMSGKGGQQQQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKPPAFG
RRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKHWPPPKLDDKDPNFKDQPPPTFPPTPEPKKDKKKKADETQALPQRQKKQQTVP
PPLDDFSKQLQQSMSSADSTQAKKK;

其中,下划线所示均为重组核衣壳蛋白的优势表位。

[0019] 原始核衣壳蛋白的序列如SEQ ID NO.2所示:

MSDNGPQNQRNAPRITFGPSDSTGSNQNGERSGARSKQRRPQGLPNNTASWFTALTQHGKEDLKFPRGQGV
PINTNSSPDDQIGYYRRATRRIRGGDGKMKDLSRWYFYLLGTGPEAGLPYGANKDGI IWVATEGALNTPKDHIGT

RNPANNAIIVLQLPQGTTLPKGFYAEGSRGGSQASSRSSSRSRNSSRNSTPGSSRGTSPARMAGNGGDAALALLLL
DRLNQLKESKMSGKGGQQGQTVTKKSAEASKKPRQKRTATKAYNVTQAFGRRGPEQTQGNFGDQELIRQGTDYKH
WPQIAQFAPSASAFFGMSRIGMEVTPSGTWLTYTGAIKLDDKDPNFKDQVILLNKHIDAYKTFPPTEPKDKKKKA
DETQALPQRQKKQQTVTLLPAADLDDFSKQLQQSMSSADSTQA。

[0020] 用DNASar Protean软件分析原始序列,其氨基酸序列18~49、138~154、170~216、
230~266、273~301、338~349、362~392、400~419多位于 β 转角(多位于蛋白表面,易与抗体结
合),亲水指数、抗原指数、表面可能性均较高,预测为优势表位。

[0021] 本发明中,还可将不同的优势表位随机排列组合,形成新的重组抗原。由于同样还
有优势表位,其效果与SEQ ID NO.1所示的氨基酸序列相近。

[0022] 优选地,所述重组核衣壳蛋白的两端连接含苯环的氨基酸残基(如苯丙氨酸F/色
氨酸W/酪氨酸Y),有利于提高重组抗原的稳定性。

[0023] 优选地,所述重组棘突蛋白S1包括如SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列;

SEQ ID NO.3为:

VSGTNGTKRFDNPVLPPPASTEKSNIIPPPGTTLDSKTQPPPYHKNKSWMEPPPLKYNENGTITPPPAWNR
KRISNCPPPAPGQTGKIADYNYKLPDDFTPPPLFRKSNLKPFERDISTPPPVCGPKKSTNLVKNKCVNPPPTESNK
KFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLPPPQTQTNSPRRARSVAPPPIAVEQDKNTQEPPPILPDPSKPSKRSFIPPP
LGQSKRVDFCGKPPVPPAQEKNFTTAPPVTQRNFYEPPPYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPBVDLGDPPPAK
NLNESLIDLQELGKYEQYIPPPKFDEDDSEPVLKGVKLHYTKKK;

其中,下划线所示均为重组棘突蛋白S1的优势表位。

[0024] 原始棘突蛋白S1的序列如SEQ ID NO.4所示:

MFVFLVLLPLVSSQCVNLTTRTQLPPAYTNSFTRGVYYPDKVFRSSVLHSTQDLFLPFFSNVTFWFAIHVSG
TNGTKRFDNPVLPFNDGVYFASTEKSNIIRGWIFGTTLDSKTQSLLIVNNATNVVIVKVEFQFCNDPFLGVYYHKN
NKSWMSEFRVYSSANNCTFEYVSQPFLMDLEGKQGNFKNREFVFKNIDGYFKIYSKHTPINLVRDLPQGFSALE
PLVDLPIGINITRFQTLALHRSYLTGPDSSSGWTAGAAAYVGYLQPRTFLLKYNENGTITDAVDCALDPLSETK
CTLKSFTVEKGIYQTSNFRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSASFST
FKCYGVSPTKLNLCFTNVYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNL
YRLFRKSNLKPFERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYPYRVVLSFELLHAPATVCGPK
KSTNLVKNKCVNFNGLTGTGVLTESNKKFLPFQQFGRDIADTTDAVRDPQTLIELDITPCSFGGVSVITPGTNT
SNQVAVLYQGVNCTEVPVAIHADQLTPTWRVYSTGSNVFQTRAGCLIGAEHVNSYECDIPIGAGICASYQTQNTS
PRRARSVASQSIIAYTMSLGAENSVAYSNNIAIPTNFTISVTTEILPVSMTKTSVDCTMYICGDSTECNLLLQY
GSFCTQLNRALTGIAVEQDKNTQEVFAQVKQIYKTPPIKDFGGFNFSQILPDPSKPSKRSFIEDLLFNKVTLDAG
FIKQYGDCLGDIAARDLICAQKFNGLTVLPPLTDEMIAYQTSALLAGTITSGWTFGAGAALQIPFAMQMAYRFNG
IGVTQNVLYENQKLIANQFNSAIGKIQDLSSTASALGKLQDVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRL
DKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAAEIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDFCGKGYHLSFPQSAPHGV
VFLHVTYVPAQEKNFTTAPAICHGKAHFPREGVFSNGTHWFVTQRNFYEPQIITDNTFVSGNCDVVIGIVNNT
VYDPLQPELDSFKEELDKYFKNHTSPDVLGDISGINASVUNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKW
PWYIWLGFIAGLIAIVMVTIMLCCMTSCCSCLKGCCSCGSCCKFDEDDSEPVKGVKLHYT。

[0025] 用DNASar Protean软件分析原始序列结果,其氨基酸序列70~84、93~101、107~
115、145~154、277~286、352~361、410~430、455~470、524~540、553~582、675~688、770~780、

805~818、1034~1045、1068~1078、1104~1111、1138~1168、1180~1210、1255~1273多位于β转角(多位于蛋白表面,易与抗体结合),亲水指数、抗原指数、表面可能性均较高,预测为优势表位。

[0026] 本发明中,还可将不同的优势表位随机排列组合,形成新的重组抗原。由于同样还有优势表位,其效果与SEQ ID NO.3所示的氨基酸序列相近。

[0027] 优选地,所述重组棘突蛋白S1的两端连接含苯环的氨基酸残基(如苯丙氨酸F/色氨酸W/酪氨酸Y),有利于提高重组抗原的稳定性。

[0028] 优选地,所述生物素标记的新型冠状病毒抗原分散于PBS缓冲液中。

[0029] 优选地,所述PBS缓冲液的浓度为0.02~0.1 M,例如可以是0.02 M、0.05 M、0.06 M、0.08 M或0.1 M等,优选为0.02 M。

[0030] 优选地,所述PBS缓冲液的pH为7.2~9.0,例如可以是7.2、7.3、7.5、7.6、7.8、8.0、8.2、8.5、8.8或9.0等,优选为7.2。

[0031] 本发明中,所述缓冲体系为0.02 M PBS(pH7.2)缓冲液,相较于0.1 M PBS(pH7.2)、0.05 M PBS(pH7.2)、0.1 M CBS(pH 9.0)、0.05 M CBS(pH 9.0)、0.02 M CBS(pH 9.0)缓冲液,其效果最佳。

[0032] 作为本发明优选的技术方案,所述吡啶磺酰胺标记的二抗分散于CBS缓冲液中。

[0033] 优选地,所述CBS缓冲液的浓度为0.02~0.1 M,例如可以是0.02 M、0.05 M、0.06 M、0.08 M或0.1 M等,优选为0.1 M。

[0034] 优选地,所述CBS缓冲液的pH为7.2~9.0,例如可以是7.2、7.3、7.5、7.6、7.8、8.0、8.2、8.5、8.8或9.0等,优选为9.0。

[0035] 本发明中,所述缓冲体系为0.1 M CBS(pH 9.0)缓冲液,相较于0.1 M PBS(pH7.2)、0.05 M PBS(pH7.2)、0.02 M PBS(pH7.2)、0.1 M CBS(pH 9.0)、0.05 M CBS(pH 9.0)、0.02 M CBS(pH 9.0)缓冲液,其效果最佳。

[0036] 作为本发明优选的技术方案,所述样本稀释液中包含牛血清白蛋白、类风湿因子吸附剂、抑菌剂、尿素或阻断剂中的任意一种或至少两种的组合。

[0037] 通过使用阻断剂,可消除血液样本中异嗜性抗体的干扰;通过采用类风湿因子吸附剂,可以消除血液样本中类风湿因子的干扰;通过使用尿素,可以降低血液样本对固相载体的非特异性结合。

[0038] 本发明中,所述样本稀释液可以为0.01M的PBS,其中添加质量分数为0.4~0.6%(例如可以是0.42%、0.44%、0.45%、0.48%、0.5%、0.55%、0.58%或0.6%等)、质量分数为0.01~0.05%(例如可以是0.012%、0.015%、0.02%、0.025%、0.03%、0.035%、0.04%或0.05%等)抑菌剂ProClin300、质量分数为1~10%(例如可以是1%、2%、3%、5%、6%、8%或10%等)尿素和质量分数为0.1~0.5%(例如可以是0.12%、0.15%、0.2%、0.25%、0.3%、0.35%、0.4%或0.5%等)阻断剂。

[0039] 作为本发明优选的技术方案,所述质控品包括阳性质控品和阴性质控品;

优选地,所述阳性质控品为含新型冠状病毒抗体的缓冲液。

[0040] 作为本发明优选的技术方案,所述新型冠状病毒抗体检测试剂盒中还包括激发液和洗涤液。

[0041] 第二方面,本发明提供一种如第一方面所述的新型冠状病毒抗体检测试剂盒的制备方法,所述制备方法包括如下步骤:

(1) 制备生物素标记的新型冠状病毒抗原:将新型冠状病毒的核衣壳蛋白和棘突蛋白S1作为抗原与PBS缓冲液混合,加入活化生物素标记1.5~2.5 h,而后透析得到所述生物素标记的新型冠状病毒抗原;

(2) 制备吖啶磺酰胺标记的二抗:将二抗与CBS缓冲液混合,加入NSP-SA-NHS标记0.5~1.5 h,再加入赖氨酸溶液,透析得到所述吖啶磺酰胺标记的二抗;

(3) 将所述生物素标记的新型冠状病毒抗原、吖啶磺酰胺标记的二抗、链霉亲和素磁微粒、样本稀释液和质控品分别包装,得到所述新型冠状病毒抗体检测试剂盒。

[0042] 第三方面,本发明还提供一种如第一方面所述的新型冠状病毒抗体检测试剂盒的使用方法,所述使用方法包括如下步骤:

在待测样品中加入生物素标记的新型冠状病毒抗原和链霉亲和素-磁微粒,进行第一次孵育,洗涤,再加吖啶磺酰胺标记的二抗进行第二次孵育,洗涤,而后检测得到检测结果。

[0043] 本发明中采用两步法检测待测样品,即将样品、生物素标记抗原和链霉亲和素磁微粒混合孵育,再加入吖啶磺酰胺标记抗体孵育;相对于三步法(将链霉亲和素磁微粒与生物素标记抗原混合孵育,再加入样品孵育,再加入吖啶磺酰胺标记抗体孵育)和一步法(直接将样品、生物素标记抗原、链霉亲和素磁微粒和吖啶磺酰胺标记抗体混合孵育),两步法的检测效果较好。

[0044] 优选地,所述待测样品为血清或血浆。同一样本不同样本类型(血浆/血清)检测发光值的相对偏差绝对值小于10%,认为血浆和血清检测结果相同。

[0045] 优选地,所述待测样品经过样品稀释液稀释。用样本稀释液将样本分别稀释25倍、50倍、100倍、200倍、400倍;用化学发光法检测经稀释的样本,可知样品稀释倍数为100倍时,区分度最大。

[0046] 优选地,所述待测样品稀释后的效价比为1:(103~110),例如可以是1:103、1:104、1:105、1:106、1:107、1:108、1:109或1:110等,优选为1:103。

[0047] 本发明中,分别以样品的加液量为50、75和100 μL 、生物素标记抗原加液量为25、50和75 μL 、磁微粒加液量为30、40和50 μL 、第一步反应时间为4、6、8、10 min、最佳吖啶磺酰胺标记二抗浓度1、0.5、0.25、0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、第二步反应时间为4、6、8、10 min、洗涤次数为1、2、3、4次,测试最佳的反应条件。

[0048] 优选地,所述待测样品、生物素标记的新型冠状病毒抗原与链霉亲和素磁微粒的体积比为(50~100):(25~75):(30~50),例如可以是50:25:30、75:25:30、100:25:30、50:50:30、50:75:30、50:75:40、100:50:40、100:50:50或100:75:50等,优选为100:50:40。

[0049] 优选地,所述吖啶磺酰胺标记二抗的工作浓度为0.125~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,例如可以是0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 或1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等,优选为0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0050] 优选地,所述第一次孵育的时间为5~15 min,例如可以是5 min、6 min、7 min、8 min、9 min、10 min、12 min、14 min或15 min等,优选为8 min。

[0051] 优选地,所述第二次孵育的时间为5~15 min,例如可以是5 min、6 min、7 min、8 min、9 min、10 min、12 min、14 min或15 min等,优选为8 min。

[0052] 优选地,所述检测结果中指数 $I \geq 1.0$,则待测样本为阳性;

所述检测结果中指数 $I < 1.0$,则待测样本为阴性。

[0053] 本发明所述的数值范围不仅包括上述例举的点值,还包括没有例举出的上述数值范围之间的任意的点值,限于篇幅及出于简明的考虑,本发明不再穷尽列举所述范围包括的具体点值。

[0054] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

(1) 本发明提供的基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒抗体检测试剂盒,选择链霉亲和素磁微粒,以生物素标记抗原、以吖啶磺酰胺标记二抗,一方面,通过调整磁微粒偶联、封闭条件以及调整体系稳定剂组成,有效地降低血液样本中假阳性因素;另一方面,通过采用新型冠状病毒两种抗原(棘突蛋白和核衣壳蛋白)混合的手段,重组核衣壳蛋白和棘突蛋白S1的质量比为(1~3):1,提高检测的特异度;

(2) 本发明提供的抗体检测试剂盒采用重组核衣壳蛋白和重组棘突蛋白作为新型冠状病毒的抗原,所述重组蛋白具有原始蛋白序列的优势表位,亲水指数、抗原指数、表面可能性均较高,能够显著提高检测的灵敏度;

(3) 本发明提供的检测试剂盒的灵敏度较好,其最低检测限为1:103,精密度较高,多次重复试验时重复度较高,特异性好,对可能产生交叉反应的样本及正常人样本,检测结果均为阴性,且对于样本中可能存在的干扰物质,检测结果的相对偏差可控;且通过配套自动化检测仪器,有效避免操作人员暴露风险,提高生物安全性,还能实现高通量检测,提高新型冠状病毒的检测速度。

附图说明

[0055] 图1为试验例1中以重组蛋白和原始蛋白为抗原制备的检测试剂盒在检测不同稀释倍数的强阳性血清时得到的荧光检测结果曲线图。

[0056] 图2为试验例5中IgM抗体检测结果散点图。

具体实施方式

[0057] 下面结合附图并通过具体实施方式来进一步说明本发明的技术方案,但下述的实例仅仅是本发明的简易例子,并不代表或限制本发明的权利保护范围,本发明的保护范围以权利要求书为准。

[0058] 以下实施例中,若无特殊说明,均采用本领域常见的技术手段进行实验和检测。

[0059] 实施例1

本实施例提供一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒IgM抗体检测试剂盒,具体包括:

0.3 mg/mL链霉亲和素磁微粒、生物素标记的新型冠状病毒抗原、吖啶磺酰胺标记的羊抗人IgM抗体、样本稀释液,阳性质控品、阴性质控品、样本稀释液和洗涤液。

[0060] 其中,(1)生物素标记的新型冠状病毒抗原的制备方法为:

将0.3 mg新型冠状病毒的重组核衣壳蛋白和0.2 mg重组棘突蛋白S1使用0.02 M PBS (pH7.2)缓冲液稀释,最终混合抗原的浓度为1 mg/mL;

其中,重组核衣壳蛋白的序列为SEQ ID NO.1;重组棘突蛋白S1的序列为SEQ ID NO.3;

取12 μ L的10 mg/mL的活化生物素加入到上述抗原缓冲液中,混匀,避光置于室温2小时;用0.02 M PBS缓冲液在4 $^{\circ}$ C环境中过夜透析,得到生物素标记抗原母液;

生物素标记的新型冠状病毒抗原的工作浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$;

(2) 吡啶磺酰胺标记的羊抗人IgM抗体的制备方法为:

取0.2 mg羊抗人IgM抗体置于玻璃器皿内,用0.1 M CBS(pH9.0)缓冲液将羊抗人IgM抗体稀释到1 mg/mL;取9.1 μL 2 mg/mL的NSP-SA-NHS溶液加入到上述抗体稀释液中,混匀,避光置于室温60 min;

再加入1.33 μL 的10%赖氨酸溶液,混匀,避光置于室温30分钟;用0.02 M PBS缓冲液在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中过夜透析,得到吡啶磺酰胺标记的抗体母液;

吡啶磺酰胺标记的羊抗人IgM抗体的工作浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0061] 实施例2

本实施例提供基于磁微粒化学发光的新冠状病毒IgM抗体检测试剂盒,与实施例1的区别在于,重组核衣壳蛋白和重组棘突蛋白S1的质量比分别设置为5:0、4:1、2:3、1:4和0:5;

检测区分度,结果如表1所示:

表 1

参考 品	核衣壳蛋白和棘突蛋白 S1 比例					
	5:0	4:1	3:2	2:3	1:4	0:5
	S/C0					
N01	0.18	0.18	0.18	0.17	0.18	0.19
N02	0.28	0.28	0.28	0.25	0.28	0.29
N03	0.32	0.32	0.31	0.30	0.33	0.32
N04	0.34	0.37	0.35	0.33	0.36	0.36
N05	0.35	0.36	0.36	0.36	0.38	0.37
N06	0.42	0.44	0.41	0.71	1.10	1.40
N07	0.42	0.40	0.42	0.41	0.42	0.43
N08	0.39	0.38	0.38	0.36	0.38	0.36
N09	0.27	0.25	0.26	0.26	0.27	0.25
N10	2.08	1.16	0.37	0.27	0.21	0.12
N11	0.16	0.23	0.18	0.20	0.18	0.07
N12	0.09	0.11	0.09	0.09	0.09	0.08
N13	1.51	0.74	0.21	0.18	0.16	0.10
N14	0.34	0.42	0.34	0.33	0.31	0.35
N15	0.10	0.11	0.10	0.10	0.09	0.10
P01	26.69	25.31	26.77	24.13	25.45	28.19
P02	11.51	11.91	11.42	12.09	12.15	13.14
P03	8.44	9.68	8.92	8.78	8.39	8.80
P04	5.55	5.27	5.20	5.68	5.98	5.74
P05	3.45	3.42	3.36	3.41	3.38	3.43
L1	0.44	0.43	0.43	0.44	0.43	0.38
L2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
L3	5.05	4.59	4.59	5.21	4.66	4.78

其中,参考品为标准样品,是试剂盒研发过程中使用的待测样品,编号为N01~ N15(阴性样本)、P01~05(阳性样本)和L1~L3(质控品);由上表可知,核衣壳蛋白和棘突蛋白S1比例为5:0、4:1、1:4、0:5时,阴性符合率(即区分度小于1)均为14/15;

具体为:比例为5:0时,N10样本区分度为2.08;比例为4:1时,N10样本区分度为1.16;比例为1:4时,N06样本区分度为1.10;比例为0:5时,N06样本区分度为1.40;

而当二者比例为3:2和2:3时阴性符合率均为15/15,阳性符合率为5/5;且比例为2:3时,阴性参考品N06的检测值为0.71,较比例为3:2时N06检测值的0.41较大且接近临界值(对于阴性样本而言区分度数值越小越好),因此检测效果较差,出于高特异性考虑,选择3:2时样本区分度较好,故选择核衣壳蛋白和棘突蛋白S1比例为3:2。

[0062] 实施例3

本实施例提供一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒IgM抗体检测试剂盒,与实施例1的区别在于,Sulfo-NHS-LC-Biotin溶液的添加量分别设置为3、6和24 μL 。

[0063] 具体结果如下表2所示;

表 2

Sulfo-NHS-LC-Biotin 用量 (μL)	3	6	12	24
样品	S/C0			
N01	0.11	0.11	0.10	0.10
P01	6.68	6.94	7.18	7.01
P05	1.00	1.00	1.00	1.00

实施例4

本实施例提供一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒IgM抗体检测试剂盒,与实施例1的区别在于,生物素标记的新型冠状病毒抗原的缓冲体系分别设置为0.1 M PBS (pH7.2)、0.05 M PBS (pH7.2)、0.1 M CBS (pH 9.0)、0.05 M CBS (pH 9.0)、0.02 M CBS (pH 9.0)。

[0064] 具体结果如下表3所示;

表 3

样品	0.1 M PBS	0.05 M PBS	0.02 M PBS
	S/C0		
N01	0.11	0.11	0.10
P01	6.26	6.89	7.06
P05	1.00	1.00	1.00
样品	0.1 M CBS	0.05 M CBS	0.02 M CBS
	S/C0		
N01	0.10	0.10	0.10
P01	6.49	6.13	6.26
P05	1.00	1.00	1.00

实施例5

本实施例提供一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒IgM抗体检测试剂盒,与实施例1的区别在于,吡啶磺酰胺标记的二抗的缓冲体系分别设置为0.1 M PBS (pH7.2)、0.05 M PBS (pH7.2)、0.02 M PBS (pH7.2)、0.05 M CBS (pH 9.0)、0.02 M CBS (pH 9.0)。

[0065] 具体结果如下表4所示;

表 4

样品	0.1 M PBS	0.05 M PBS	0.02 M PBS
	S/C0		
N01	0.10	0.10	0.10
P01	6.88	7.01	7.03
P05	1.00	1.00	1.00
样品	0.1 M CBS	0.05 M CBS	0.02 M CBS
	S/C0		
N01	0.09	0.10	0.10
P01	7.28	7.06	6.95
P05	1.00	1.00	1.00

实施例3、4和5中的待测样品为标准样品,是试剂盒研发过程中使用的待测样品,编号为N01、P01和P05;

由实验结果可知,表2中Sulfo-NHS-LC-Biotin溶液的添加量为12 μL 时,阳性样本P01的区分度最高;表3中抗原缓冲体系为0.02 M PBS时,阳性样本P01的区分度最高;表4中二抗的缓冲体系为0.1 M CBS时,阳性样本P01的区分度最高;因此,实施例1中提供的条件包括Sulfo-NHS-LC-Biotin溶液的添加量为12 μL 、抗原缓冲体系为0.02 M PBS和二抗的缓冲体系为0.1 M CBS时,所得到的区分度最大。

[0066] 实施例6

本实施例提供三种不同的检测步骤,具体包括:

(1) 三步法:50 μL 链霉亲和素磁微粒加入50 μL 生物素标记抗原孵育5min,洗涤;加100 μL 参考品,孵育10 min,洗涤;加入50 μL 吖啶磺酰胺标记抗体孵育10 min,洗涤;加激发液检测发光值。

[0067] (2) 两步法:100 μL 参考品加入50 μL 生物素标记抗原、50 μL 链霉亲和素磁微粒,孵育10 min,洗涤;

加50 μL 吖啶磺酰胺标记抗体孵育10 min,洗涤;加激发液检测发光值。

[0068] (3) 一步法:100 μL 参考品加入50 μL 生物素标记抗原、50 μL 吖啶磺酰胺标记抗体、50 μL 链霉亲和素一磁微粒孵育20 min,洗涤;加激发液检测发光值。

[0069] 检测区分度,结果如表5所示:

表 5

样品	三步法	两步法	一步法
	S/C0		
N01	0.14	0.08	0.23
P01	4.67	7.87	3.56
P05	1.00	1.00	1.00

其中,参考品为标准样品,是试剂盒研发过程中使用的待测样品,编号为N01、P01和

P05;从上表可知,两步法的区分度较大,故选择两步法作为操作步骤。

[0070] 试验例1:最低检测限评估

将3份阳性血浆分别按倍数进行稀释,得到检测结果覆盖临界值附近的样品;每个梯度重复稀释3份样品,每份样品用实施例1中采用的试剂盒各重复检测20次(化学发光法检测时,样本需稀释100倍)。

[0071] 计算每份样品的阳性检出率,筛选阳性检出率在90~95%范围内的待测抗体效价水平作为最低检测限。

[0072] 检测结果如下表6所示:

表 6

阳性样本稀释 倍数	均值			阳性检出率 (%)		
	1	2	3	1	2	3
效价 (1:105.6)	1.09	1.09	1.10	98.33	100.00	96.67
效价 (1:95)	0.99	0.98	0.99	45.00	41.67	45.00
效价 (1:86.4)	0.94	0.93	0.93	16.67	15.00	8.33
效价 (1:114.4)	1.26	1.24	1.25	100.00	100.00	100.00
效价 (1:103)	1.07	1.07	1.07	95.00	93.33	93.33
效价 (1:93.6)	0.96	0.97	0.96	23.33	30.00	26.67
效价 (1:123.3)	1.29	1.29	1.29	100.00	100.00	100.00
效价 (1:111)	1.19	1.20	1.19	100.00	100.00	100.00
效价 (1:100.9)	1.02	1.03	1.02	66.67	70.00	66.67

当梯度稀释样品的效价为1:103时,阳性检出率在90~95%范围内,故将效价为1:103作为最低检测限。

[0073] 此外,以强阳性样本为待测样本,在以重组蛋白和原始蛋白为抗原制备的检测试剂盒在检测时,针对不同稀释倍数的强阳性血清所得到的荧光检测结果如图1所示;

由图1可知,重组蛋白在检测相同效价的时,所得到的荧光强度明显高于原始蛋白,这说明,本发明中提供的重组蛋白在检测时具有更高的灵敏度。

[0074] 试验例2:精密度评估

将4个临床样本(1例阴性样本、1例临界阳性样本、1例中阳性样本、1例强阳性样本)和2个质控品用2个机型分别检测,每种机型2个操作人员,共4个操作人员,每种机型分别使用3个批次的实施例1提供的试剂盒,检测5天,每天每个样品做5个重复(2个机型×3个试剂盒批次×5天×5个重复/天=150个结果/样品);

机型1:重庆科斯迈生物科技有限公司的全自动化学发光测定仪,型号:SMART 6500;

机型2:重庆科斯迈生物科技有限公司的全自动化学发光免疫分析仪,型号:SMART 500S。

[0075] 检测结果如下表7所示:

表 7

SMART 6500		重复性		室内精密度	
样本	检测总均值	SDR	%CV	SD _{wi}	%CV
阳性质控品	4.74	0.05	0.96%	0.05	1.10%
中阳性样本	3.24	0.09	2.74%	0.13	4.08%
强阳性样本	10.13	0.35	3.41%	0.47	4.62%
样本	检测总均值	I 值 ≥ 1.0 的结果数		I 值 < 1.0 的结果数	
临界阳性样本	1.08	75		0	
阴性样本	0.21	0		75	
阴性质控品	0.13	0		75	

其中,SDR表示:随机误差引起的标准差;SD_{wi}表示在一个实验室内由试剂盒批次、日间重复检测、操作人员及随机误差引起的标准差;

从上表数据分析结果可知,机型SMART 6500检测中阳性样本、强阳性样本和阳性质控品的重复性、室内精密度和批间精密度CV均小于等于10%,符合要求(重复性CV<10%,批间CV<15%);临界阳性样本的阳性检出率≥95%,符合要求;阴性样本及阴性质控品的阴性检出率应为100%,符合要求;

同样的,机型SMART 500S的检测结果同样符合要求,此处出于篇幅和简明的考虑,不再列出。

[0076] 试验例3:特异性评价

使用本发明提供的新型冠状病毒抗体检测试剂盒检测可能产生交叉反应的样本及正常人样本,观察是否检测为阳性;若为阳性,说明该类样本对新型冠状病毒IgM抗体检测存在影响。

[0077] 地方性人类冠状病毒(HKU1,OC43,NL63和229E)血浆样本,用蛋白印迹和血清学方法确认血浆中含有特异性IgM抗体;H1N1(新型甲型H1N1流感病毒(2009)、季节性H1N1流感病毒)IgM抗体阳性血浆样本;

检测结果如表8所示:

表 8

编号	可能交叉的样本名称	检测值	判读
1	人类冠状病毒 HKU 1 样本	0.36	阴性
2	人类冠状病毒 OC43 样本	0.52	阴性
3	人类冠状病毒 NL63 样本	0.32	阴性
4	人类冠状病毒 229E 样本	0.16	阴性
5	新型甲型 H1N1 流感病毒(2009) 样本	0.52	阴性
6	季节性 H1N1 流感病毒样本	0.16	阴性
7	H3N2 样本	0.20	阴性
8	HSN1 样本	0.28	阴性
9	H7N9 样本	0.32	阴性
10	乙型流感 Yamagata 阳性样本	0.32	阴性
11	乙型流感 Victoria 阳性样本	0.16	阴性
12	人巨细胞病毒病毒阳性样本	0.64	阴性
13	诺如病毒阳性样本	0.16	阴性
14	腮腺炎病毒阳性样本	0.48	阴性
15	正常人样本	0.28	阴性
16		0.44	阴性
17	新冠病毒 IgG 抗体高阳性样本	0.40	阴性

从上述试验结果可知,用本试剂盒检测上述可能产生交叉反应的样本及正常人样本,检测结果均为阴性,可见上述病原体感染样本及正常人样本与本试剂盒不存在交叉反应。

[0078] 试验例4:可能产生干扰的物质对检测结果的影响

临床样本中的血红蛋白主要是由于标本溶血,包括病理性溶血与技术性溶血。非显性溶血是指血红蛋白含量小于0.5 mg/mL,此时肉眼观察不到溶血。轻度溶血血红蛋白浓度为0.5~3 mg/mL,中度溶血血红蛋白浓度为3.1~5 mg/mL,重度溶血血红蛋白浓度>5 mg/mL。实验证明,血红蛋白浓度达到7 mg/mL时,检测结果的相对偏差绝对值未超过10%,说明对检测结果无干扰。

[0079] 正常人血清中胆红素范围为2~8 mg/L(1周内的婴儿的胆红素范围为10~120 mg/

L), 样本中的胆红素浓度高达300 mg/L时, 检测结果的相对偏差绝对值未超过10%, 说明对检测结果无干扰。

[0080] 临床样本中甘油三酯正常高限为1.7 mmol/L, 从实验结果可知, 样本中甘油三酯含量为7.5 mmol/L时, 检测结果的相对偏差绝对值未超过10%, 说明对检测结果无干扰。

[0081] 此外, 类风湿因子、抗核抗体、抗双链DNA抗体、抗线粒体抗体、HAMA阳性样本, 高浓度新型冠状病毒IgG抗体样本, 50 g/L人总IgG抗体(健康成人总IgG量: 7~16.6 g/L)、10 g/L人总IgM抗体(健康成人总IgM量: 400~3450 mg/L)等可能的干扰物质对本检测结果均无影响。

[0082] 试验例5: 对不同时间段采样后的样本进行检测

对临床收集到的有明确发病日期和采样日期的65份确诊样本进行检测, 分别求出不同采样时间段的阳性检出率, 再以发病天数(采样日期和发病日期的间隔天数)为横坐标, 以对应发病天数样本检测结果I值为纵坐标, 绘制IgM抗体随发病天数变化的散点图, 如图2所示。

[0083] 且结果如下表9所示:

表 9

采样时间段	早期 (0~7天)	中期 (8~14天)	后期 (≥15天)
各期阳性检出率	62.5% (10/16)	100.0% (16/16)	90.9% (30/33)
总阳性检出率	86.2% (56/65)		

从表9和图1可知, IgM抗体在发病早期检出率为62.5%, 随着发病时间的推移, IgM抗体持续升高, 在2周时IgM抗体浓度达到峰值, 随着发病时间推移, 逐渐出现了下降。

[0084] 实施例7

本实施例提供一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒IgG抗体检测试剂盒, 具体包括:

链霉亲和素磁微粒、生物素标记的新型冠状病毒抗原、吡啶磺酰胺标记的羊抗人IgG抗体、样本稀释液, 阳性质控品、阴性质控品、样本稀释液和洗涤液。

[0085] 其中, (1) 生物素标记的新型冠状病毒抗原的制备方法为:

将0.3 mg新型冠状病毒的核衣壳蛋白和0.2 mg棘突蛋白S1使用0.02 M PBS (pH7.2) 缓冲液稀释, 最终混合抗原的浓度为1 mg/mL;

取12 μL的10 mg/mL的活生物素加入到上述抗原缓冲液中, 混匀, 避光置于室温2小时; 用0.02 M PBS缓冲液在4℃环境中过夜透析, 得到生物素标记抗原母液;

生物素标记的新型冠状病毒抗原的工作浓度为1 μg/mL;

(2) 吡啶磺酰胺标记的羊抗人IgG抗体的制备方法为:

取0.2 mg羊抗人IgG抗体置于玻璃器皿内, 用0.1 M CBS (pH9.0) 缓冲液将羊抗人IgG稀释到1 mg/mL;

取9.1 μL 2 mg/mL的NSP-SA-NHS溶液加入到上述抗体稀释液中, 混匀, 避光置于室温

60 min;

再加入1.33 μL 的10%赖氨酸溶液,混匀,避光置于室温30分钟;用0.02 M PBS缓冲液在4 $^{\circ}\text{C}$ 环境中过夜透析,得到吡啶磺酰胺标记的抗体母液;

吡啶磺酰胺标记的羊抗人IgG抗体的工作浓度为1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[0086] 同样的,所述IgG抗体检测试剂盒在检测新型冠状病毒时也具有较高的准确度。使用其检测不同样本后所得检测结果如下表10所示:

表 10

试剂盒批号	批次 1		批次 2		批次 3	
	血清检测 I 值	血浆检测 I 值	血清检测 I 值	血浆检测 I 值	血清检测 I 值	血浆检测 I 值
阴性 1	0.12	0.12	0.16	0.12	0.16	0.16
阴性 2	0.24	0.28	0.24	0.20	0.24	0.20
阴性 3	0.24	0.24	0.24	0.28	0.28	0.20
阴性 4	0.32	0.36	0.36	0.32	0.32	0.32
阴性 5	0.36	0.40	0.36	0.36	0.40	0.44
阴性 6	0.36	0.40	0.36	0.32	0.40	0.36
阴性 7	0.48	0.44	0.52	0.48	0.44	0.52
阴性 8	0.56	0.56	0.52	0.60	0.60	0.64
阴性 9	0.64	0.60	0.56	0.72	0.64	0.56
阴性 10	0.64	0.68	0.64	0.68	0.52	0.56
阳性 1	1.16	1.28	1.12	1.20	1.16	1.24
阳性 2	1.40	1.40	1.44	1.36	1.40	1.48
阳性 3	1.72	1.72	1.56	1.64	1.68	1.72
阳性 4	1.84	1.76	1.96	1.88	1.80	1.88
阳性 5	2.08	2.32	2.08	2.12	1.88	2.24
阳性 6	2.32	2.40	2.20	2.36	2.24	2.32
阳性 7	2.44	2.48	2.16	2.28	2.52	2.32
阳性 8	3.20	3.08	2.96	3.24	3.24	3.24
阳性 9	5.28	5.04	4.92	4.88	5.32	5.08
阳性 10	6.72	7.36	6.32	6.72	7.00	6.44
阳性 11	7.40	7.00	7.16	7.16	6.92	6.80
阳性 12	8.28	8.44	8.48	8.36	8.40	8.04
阳性 13	10.20	9.96	10.28	9.96	10.48	10.08
阳性 14	11.20	11.84	11.80	10.24	11.20	10.96
阳性 15	14.04	12.92	13.88	14.80	13.44	14.44
阳性 16	16.92	18.08	14.96	16.12	16.76	15.52
阳性 17	23.72	22.48	24.60	24.68	24.96	25.16
阳性 18	25.88	24.96	27.32	27.20	24.56	26.68
阳性 19	32.28	33.76	34.24	31.72	29.80	32.60
阳性 20	46.08	46.84	44.80	44.08	47.72	45.00

由上表可知,本实施例提供的IgG抗体检测试剂盒能够精确检测,灵敏度好,准确性高。

[0087] 综上所述,本发明提供的检测试剂盒在检测IgM抗体和IgG抗体时均就具有较好的灵敏度。其中,IgM抗体检测试剂盒最低检测限为1:103,精密度较高,多次重复试验时重复度较高,特异性好,对可能产生交叉反应的样本及正常人样本,检测结果均为阴性,且对于样本中可能存在的干扰物质,检测结果的相对偏差可控。

[0088] 申请人声明,以上所述仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,所属技术领域的技术人员应该明了,任何属于本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,均落在本发明的保护范围和公开范围之内。

SEQUENCE LISTING

<110> 丹娜(天津)生物科技股份有限公司

<120> 一种基于磁微粒化学发光的新型冠状病毒抗体检测试剂盒

<130> 20201202

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 1

Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn Thr
 20 25 30
 Pro Pro Pro Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp His Ile Gly Thr Arg Asn
 35 40 45
 Pro Ala Asn Asn Pro Pro Pro Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser Arg Gly
 50 55 60
 Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn Ser Ser
 65 70 75 80
 Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala Arg Met
 85 90 95
 Ala Gly Asn Gly Gly Asp Pro Pro Pro Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly
 100 105 110
 Lys Gly Gln Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala
 115 120 125
 Glu Ala Ser Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Pro Pro
 130 135 140
 Pro Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly
 145 150 155 160
 Asp Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Pro
 165 170 175
 Pro Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Pro Pro Pro
 180 185 190
 Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp
 195 200 205
 Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Pro

210	215	220
Pro Pro Leu Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser		
225	230	235
Ala Asp Ser Thr Gln Ala Lys Lys Lys		240
	245	
<210> 2		
<211> 419		
<212> PRT		
<213> 人工合成		
<400> 2		
Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr		
1	5	10
Phe Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg		
	20	25
Ser Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn		
	35	40
Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu		
	50	55
Lys Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro		
65	70	75
Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly		
	85	90
Gly Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr		
	100	105
Leu Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp		
	115	120
Gly Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp		
	130	135
His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln		
145	150	155
Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser		
	165	170
Arg Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn		
	180	185
Ser Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala		
	195	200
Arg Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu		
	210	215
Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln		220

225		230		235		240
Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys						
		245		250		255
Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln						
		260		265		270
Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp						
		275		280		285
Gln Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile						
		290		295		300
Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile						
305		310		315		320
Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala						
		325		330		335
Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu						
		340		345		350
Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro						
		355		360		365
Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln						
		370		375		380
Arg Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu						
385		390		395		400
Asp Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser						
		405		410		415
Thr Gln Ala						
<210> 3						
<211> 344						
<212> PRT						
<213> 人工合成						
<400> 3						
Val Ser Gly Thr Asn Gly Thr Lys Arg Phe Asp Asn Pro Val Leu Pro						
1		5		10		15
Pro Pro Ala Ser Thr Glu Lys Ser Asn Ile Ile Pro Pro Pro Gly Thr						
		20		25		30
Thr Leu Asp Ser Lys Thr Gln Pro Pro Pro Tyr His Lys Asn Asn Lys						
		35		40		45
Ser Trp Met Glu Pro Pro Pro Leu Lys Tyr Asn Glu Asn Gly Thr Ile						
		50		55		60
Thr Pro Pro Pro Ala Trp Asn Arg Lys Arg Ile Ser Asn Cys Pro Pro						
65		70		75		80

Pro Ala Pro Gly Gln Thr Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu
 85 90 95
 Pro Asp Asp Phe Thr Pro Pro Pro Leu Phe Arg Lys Ser Asn Leu Lys
 100 105 110
 Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Thr Pro Pro Pro Val Cys Gly Pro Lys
 115 120 125
 Lys Ser Thr Asn Leu Val Lys Asn Lys Cys Val Asn Pro Pro Pro Thr
 130 135 140
 Glu Ser Asn Lys Lys Phe Leu Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Ile
 145 150 155 160
 Ala Asp Thr Thr Asp Ala Val Arg Asp Pro Gln Thr Leu Pro Pro Pro
 165 170 175
 Gln Thr Gln Thr Asn Ser Pro Arg Arg Ala Arg Ser Val Ala Pro Pro
 180 185 190
 Pro Ile Ala Val Glu Gln Asp Lys Asn Thr Gln Glu Pro Pro Pro Ile
 195 200 205
 Leu Pro Asp Pro Ser Lys Pro Ser Lys Arg Ser Phe Ile Pro Pro Pro
 210 215 220
 Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Pro Pro Pro Val
 225 230 235 240
 Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Pro Pro Val Thr Gln
 245 250 255
 Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Pro Pro Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu
 260 265 270
 Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser
 275 280 285
 Pro Asx Val Asp Leu Gly Asp Pro Pro Pro Ala Lys Asn Leu Asn Glu
 290 295 300
 Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Pro
 305 310 315 320
 Pro Pro Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys Gly Val
 325 330 335
 Lys Leu His Tyr Thr Lys Lys Lys
 340

<210> 4

<211> 1273

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 4

305		310		315		320									
Gln	Pro	Thr	Glu	Ser	Ile	Val	Arg	Phe	Pro	Asn	Ile	Thr	Asn	Leu	Cys
				325					330					335	
Pro	Phe	Gly	Glu	Val	Phe	Asn	Ala	Thr	Arg	Phe	Ala	Ser	Val	Tyr	Ala
				340					345					350	
Trp	Asn	Arg	Lys	Arg	Ile	Ser	Asn	Cys	Val	Ala	Asp	Tyr	Ser	Val	Leu
				355					360					365	
Tyr	Asn	Ser	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Phe	Lys	Cys	Tyr	Gly	Val	Ser	Pro
				370					375					380	
Thr	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu	Cys	Phe	Thr	Asn	Val	Tyr	Ala	Asp	Ser	Phe
385									390						400
Val	Ile	Arg	Gly	Asp	Glu	Val	Arg	Gln	Ile	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Gly
				405					410						415
Lys	Ile	Ala	Asp	Tyr	Asn	Tyr	Lys	Leu	Pro	Asp	Asp	Phe	Thr	Gly	Cys
				420					425					430	
Val	Ile	Ala	Trp	Asn	Ser	Asn	Asn	Leu	Asp	Ser	Lys	Val	Gly	Gly	Asn
				435					440					445	
Tyr	Asn	Tyr	Leu	Tyr	Arg	Leu	Phe	Arg	Lys	Ser	Asn	Leu	Lys	Pro	Phe
				450					455					460	
Glu	Arg	Asp	Ile	Ser	Thr	Glu	Ile	Tyr	Gln	Ala	Gly	Ser	Thr	Pro	Cys
465									470					475	480
Asn	Gly	Val	Glu	Gly	Phe	Asn	Cys	Tyr	Phe	Pro	Leu	Gln	Ser	Tyr	Gly
				485					490					495	
Phe	Gln	Pro	Thr	Asn	Gly	Val	Gly	Tyr	Gln	Pro	Tyr	Arg	Val	Val	Val
				500					505					510	
Leu	Ser	Phe	Glu	Leu	Leu	His	Ala	Pro	Ala	Thr	Val	Cys	Gly	Pro	Lys
				515					520					525	
Lys	Ser	Thr	Asn	Leu	Val	Lys	Asn	Lys	Cys	Val	Asn	Phe	Asn	Phe	Asn
				530					535					540	
Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Gly	Val	Leu	Thr	Glu	Ser	Asn	Lys	Lys	Phe	Leu
545									550					555	560
Pro	Phe	Gln	Gln	Phe	Gly	Arg	Asp	Ile	Ala	Asp	Thr	Thr	Asp	Ala	Val
				565					570					575	
Arg	Asp	Pro	Gln	Thr	Leu	Glu	Ile	Leu	Asp	Ile	Thr	Pro	Cys	Ser	Phe
				580					585					590	
Gly	Gly	Val	Ser	Val	Ile	Thr	Pro	Gly	Thr	Asn	Thr	Ser	Asn	Gln	Val
				595					600					605	
Ala	Val	Leu	Tyr	Gln	Gly	Val	Asn	Cys	Thr	Glu	Val	Pro	Val	Ala	Ile
				610					615					620	

His	Ala	Asp	Gln	Leu	Thr	Pro	Thr	Trp	Arg	Val	Tyr	Ser	Thr	Gly	Ser	625	630	635	640
Asn	Val	Phe	Gln	Thr	Arg	Ala	Gly	Cys	Leu	Ile	Gly	Ala	Glu	His	Val	645	650	655	
Asn	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Asp	Ile	Pro	Ile	Gly	Ala	Gly	Ile	Cys	Ala	660	665	670	
Ser	Tyr	Gln	Thr	Gln	Thr	Asn	Ser	Pro	Arg	Arg	Ala	Arg	Ser	Val	Ala	675	680	685	
Ser	Gln	Ser	Ile	Ile	Ala	Tyr	Thr	Met	Ser	Leu	Gly	Ala	Glu	Asn	Ser	690	695	700	
Val	Ala	Tyr	Ser	Asn	Asn	Ser	Ile	Ala	Ile	Pro	Thr	Asn	Phe	Thr	Ile	705	710	715	720
Ser	Val	Thr	Thr	Glu	Ile	Leu	Pro	Val	Ser	Met	Thr	Lys	Thr	Ser	Val	725	730	735	
Asp	Cys	Thr	Met	Tyr	Ile	Cys	Gly	Asp	Ser	Thr	Glu	Cys	Ser	Asn	Leu	740	745	750	
Leu	Leu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Phe	Cys	Thr	Gln	Leu	Asn	Arg	Ala	Leu	Thr	755	760	765	
Gly	Ile	Ala	Val	Glu	Gln	Asp	Lys	Asn	Thr	Gln	Glu	Val	Phe	Ala	Gln	770	775	780	
Val	Lys	Gln	Ile	Tyr	Lys	Thr	Pro	Pro	Ile	Lys	Asp	Phe	Gly	Gly	Phe	785	790	795	800
Asn	Phe	Ser	Gln	Ile	Leu	Pro	Asp	Pro	Ser	Lys	Pro	Ser	Lys	Arg	Ser	805	810	815	
Phe	Ile	Glu	Asp	Leu	Leu	Phe	Asn	Lys	Val	Thr	Leu	Ala	Asp	Ala	Gly	820	825	830	
Phe	Ile	Lys	Gln	Tyr	Gly	Asp	Cys	Leu	Gly	Asp	Ile	Ala	Ala	Arg	Asp	835	840	845	
Leu	Ile	Cys	Ala	Gln	Lys	Phe	Asn	Gly	Leu	Thr	Val	Leu	Pro	Pro	Leu	850	855	860	
Leu	Thr	Asp	Glu	Met	Ile	Ala	Gln	Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu	Leu	Ala	Gly	865	870	875	880
Thr	Ile	Thr	Ser	Gly	Trp	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	885	890	895	
Pro	Phe	Ala	Met	Gln	Met	Ala	Tyr	Arg	Phe	Asn	Gly	Ile	Gly	Val	Thr	900	905	910	
Gln	Asn	Val	Leu	Tyr	Glu	Asn	Gln	Lys	Leu	Ile	Ala	Asn	Gln	Phe	Asn	915	920	925	
Ser	Ala	Ile	Gly	Lys	Ile	Gln	Asp	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Ala	Ser	Ala				

930	935	940
Leu Gly Lys Leu Gln Asp	Val Val Asn Gln Asn	Ala Gln Ala Leu Asn
945	950	955
Thr Leu Val Lys Gln Leu Ser Ser	Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser	Val
	965	970
Leu Asn Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln		975
	980	985
Ile Asp Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val		990
	995	1000
Thr Gln Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn		1005
	1010	1015
Leu Ala Ala Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys		1020
	1025	1030
Arg Val Asp Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro		1035
	1040	1045
Gln Ser Ala Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val		1050
	1055	1060
Pro Ala Gln Glu Lys Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His		1065
	1070	1075
Asp Gly Lys Ala His Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Ser Asn		1080
	1085	1090
Gly Thr His Trp Phe Val Thr Gln Arg Asn Phe Tyr Glu Pro Gln		1095
	1100	1105
Ile Ile Thr Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val		1110
	1115	1120
Val Ile Gly Ile Val Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro		1125
	1130	1135
Glu Leu Asp Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn		1140
	1145	1150
His Thr Ser Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn		1155
	1160	1165
Ala Ser Val Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu		1170
	1175	1180
Val Ala Lys Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu		1185
	1190	1195
Gly Lys Tyr Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Ile Trp Leu		1200
	1205	1210
Gly Phe Ile Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Met		1215
	1220	1225
		1230

Leu	Cys	Cys	Met	Thr	Ser	Cys	Cys	Ser	Cys	Leu	Lys	Gly	Cys	Cys
1235						1240					1245			
Ser	Cys	Gly	Ser	Cys	Cys	Lys	Phe	Asp	Glu	Asp	Asp	Ser	Glu	Pro
1250						1255					1260			
Val	Leu	Lys	Gly	Val	Lys	Leu	His	Tyr	Thr					
1265						1270								

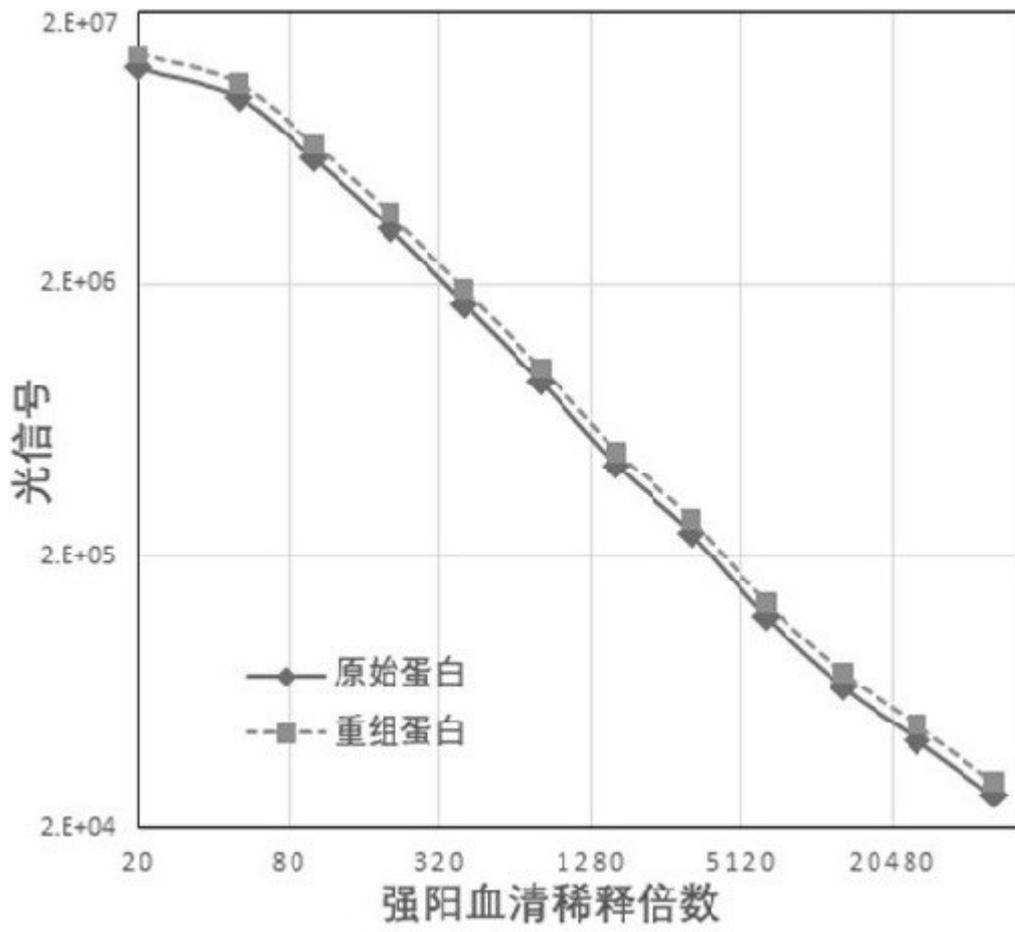


图1

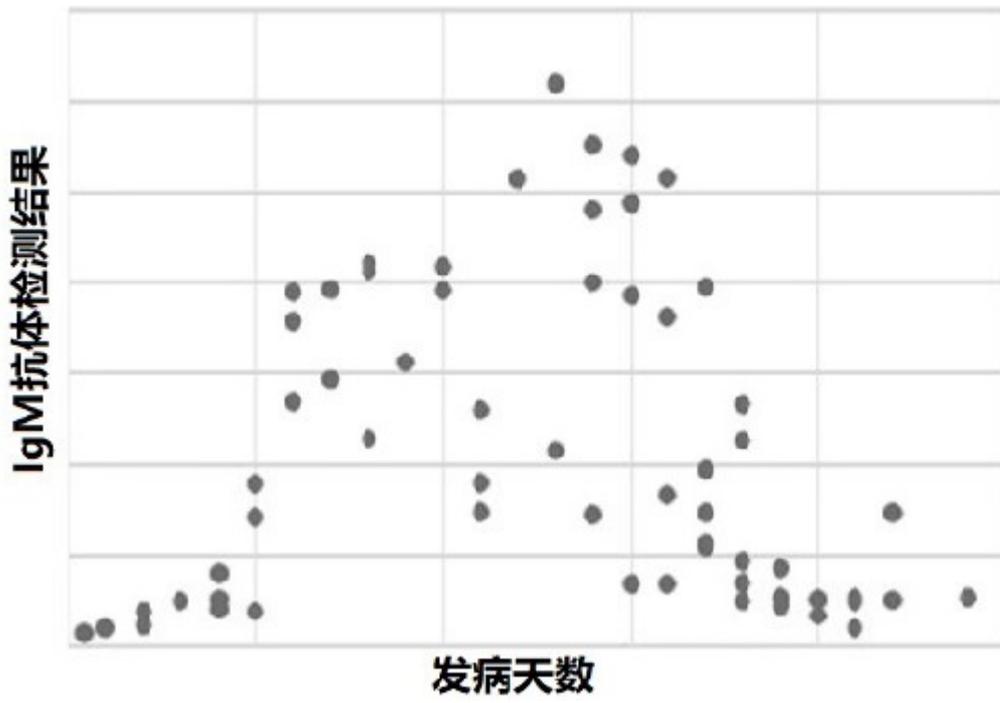


图2