

学号： S18080782



长春理工大学

Changchun University of Science and Technology

硕士学位论文(毕业)论文

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 免疫学检测方法的建立

研 究 生： 孙子琪

类 别 领 域： 生物工程

指 导 教 师： 于源华

二〇二一年六月

**Establishment of immunological detection
method for novel coronavirus
SARS-CoV-2**

by

Sun Ziqi

Dissertation submitted to

Changchun University of Science and Technology

in partial fulfillment of the requirements

for the degree of

Professional Master of master of Engineering

Supervisor

Professor **Yu Yuanhua**

June, 2021

长春理工大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：所提交的硕士学位论文《新型冠状病毒 SARS-CoV-2 免疫学检测方法的建立》是本人在指导教师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

作者签名： 孙子琳 2021 年 6 月 2 日

长春理工大学学位论文版权使用授权书

本学位论文作者及指导教师完全了解长春理工大学硕士、博士学位论文版权使用规定，即：研究生在校攻读学位期间论文工作的知识产权单位属长春理工大学。本人保证毕业离校后，发表论文或使用论文工作成果时署名单位仍然为长春理工大学。同意长春理工大学保存并使用学位论文；同意长春理工大学向国家图书馆、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学信息研究所送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。（涉密论文在解密后遵守此规定）

论文涉密情况约定：（打“√”选择）

本论文非涉密论文。

本论文属于涉密论文，在____年解密后使用本授权书。

作者签名： 孙子琳 2021 年 6 月 2 日

导师签名： 于源华 2021 年 6 月 2 日

摘要

新冠肺炎自爆发以来,已造成人类生命财产重大损失。专家评估认为新型冠状病毒 SARS-CoV-2 可能长期和人类共存,因此,早期诊断、早期治疗的技术与产品成为临床医学、生命科学以及药学领域学者和各企业关注的热点。

本文以市售的 SARS-CoV-2 抗原及抗体为原料,以免疫学原理作为检测方法学基础,构建新型冠状病毒血清学的三种检测方法,分别是胶体金免疫层析检测方法、酶联免疫吸附检测方法和磁珠化学发光免疫检测方法,对三种方法的实验条件进行优化,研究三种方法的线性相关范围、特异性、灵敏性以及批间批内的重复性等。

实验结果表明,胶体金免疫层析检测方法,检测抗体 IgM、IgG 的最低浓度为 12 ng/mL,同批次内与不同批次之间的变异系数均小于 5%,与其他干扰物质不发生交叉反应,临床应用性能评估结果符合标准,实现了良好的定性检测。ELISA 检测方法,在浓度为 0.25-16 ng/mL 时的相关性较好,其线性回归方程为 $y=0.3163x+0.8556$,相关系数为 $R^2=0.996$,最低可检测到 0.25 ng/mL 的抗原,没有与其他的蛋白产生交叉反应,回收率为 99.25%,批间批内 C.V 值小于 10%,符合要求,具有临床应用价值。磁微珠化学发光检测方法的线性浓度在 0.125-16 ng/mL 区间内,线性回归方程是 $y=331.72+11725x$,相关系数为 0.9961,检测抗原的最低浓度为 0.125 ng/mL,和干扰物不发生交叉反应,批间批内变异系数均小于 10%,回收率达到 99%以上,未出现假阴性“HOOK”现象。本文的研究为临床快速检测提供了实验室基础。

关键词: 新型冠状病毒; 血清学; 胶体金; ELISA; 磁珠化学发光

ABSTRACT

Since the outbreak of Corona Virus Disease 2019, human life and property have been greatly damaged. Experts estimate that New Coronavirus may coexist with humans for a long time. Therefore, early diagnosis and early treatment techniques and products have become the focus of attention in clinical medicine, life sciences and pharmacy.

Based on the commercial SARS-CoV-2 antigen and antibody, and using immunological principle as the basis of detection, three methods of Serology Detection for New Coronavirus were established. They are colloidal gold immunochromatography assay, enzyme-linked immunosorbent assay and magnetic bead chemiluminescence immunoassay. The experimental conditions of the three methods are optimized and three kinds of methods are studied. The linear correlation range, specificity, sensitivity and intra assay repeatability of the method were analyzed.

The results showed that the colloidal gold immunoassay method could detect at least 12ng/ml IgM and IgG antibodies, the coefficient of variation within the same batch and between different batches was less than 5%, there was no cross reaction with other interfering substances, the clinical application performance evaluation met the standard, and achieved good qualitative detection. The linear regression equation was $y=0.3163x+0.8556$, and the correlation coefficient was $R^2=0.996$. The lowest detectable antigen was 0.25ng/ml, and there was no cross reaction with other proteins. The recovery rate was 99.25%, and the coefficient of variation was less than 10%, which met the requirements and had clinical application value. The linear concentration was 0.25-16ng/ml, the linear regression equation was $y=331.72+11725x$, the correlation coefficient was 0.9961, the lowest detectable antigen concentration was 0.125ng/ml, there was no cross reaction with interfering substances, the coefficient of variation was less than 10%, the recovery rate was more than 99%, there was no false negative "HOOK" phenomenon. This study provides a laboratory basis for clinical rapid detection.

Key words: novel coronavirus; serology; colloidal gold; chemiluminescence immunoassay of ELISA; Chemiluminescence of magnetic beads

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT	II
目 录	III
第一章 绪 论	1
1.1 冠状病毒	1
1.2 新型冠状病毒.....	1
1.3 SARS-CoV-2 的检测方法	3
1.3.1 CT 检测	3
1.3.2 核酸检测	3
1.3.3 病毒分离测序	4
1.3.4 蛋白检测	4
1.4 胶体金免疫层析检测方法.....	4
1.5 酶联免疫吸附检测方法 (ELISA)	5
1.6 化学发光免疫检测方法	6
1.6.1 磁珠在化学发光检测技术中的应用	7
1.7 本课题的研究目的及意义.....	8
第二章 SARS-CoV-2 抗体胶体金免疫层析检测方法的建立.....	9
2.1 实验材料	9
2.1.1 实验设备仪器	9
2.1.2 实验药品	9
2.2 实验内容	10
2.2.1 胶体金溶液的制备及检测过程.....	10
2.2.2 胶体金-鼠抗人 IgM 及鼠抗人 IgG 抗体结合物的制备	10
2.2.3 试剂卡材料的筛选	12
2.2.4 金稀液成分的选择	12
2.2.5 试剂卡 C 线包被浓度的选择	13
2.2.6 试剂卡 T 线包被浓度的选择	13
2.2.7 试剂卡的性能评估	13
2.2.8 临床应用验证	14
2.3 实验结果	14
2.3.1 胶体金溶液的制备及检测过程.....	14
2.3.2 胶体金-鼠抗人 IgM 及鼠抗人 IgG 抗体结合物的制备	15
2.3.3 试剂卡材料的筛选	17

2.3.4	金稀液成分的选择	18
2.3.5	试剂卡 C 线包被浓度的选择	18
2.3.6	试剂卡 T 线包被浓度的选择	19
2.3.7	试剂卡的性能评估	20
2.3.8	临床应用验证	21
2.4	小结	26
第三章	SARS-CoV-2 酶联免疫吸附检测方法的建立	27
3.1	实验材料	27
3.1.1	实验设备仪器	27
3.1.2	实验药品	27
3.1.3	实验试剂的配置	27
3.2	实验内容	28
3.2.1	SARS-CoV-2 ELISA 检测方法步骤	28
3.2.2	包被抗原与抗体最佳工作浓度的确定	29
3.2.3	包被缓冲液的筛选	29
3.2.4	最佳包被条件的确定	29
3.2.5	发光底物最佳工作时间的确定	30
3.2.6	建立标准曲线	30
3.2.7	性能评估	30
3.3	实验结果	30
3.3.1	包被抗原与抗体最佳工作浓度的确定	30
3.3.2	包被缓冲液的筛选	31
3.3.3	最佳包被条件的确定	32
3.3.4	发光底物最佳工作时间的确定	32
3.3.5	建立标准曲线	32
3.3.6	性能评估	33
3.4	小结	34
第四章	SARS-CoV-2 磁珠化学发光免疫检测方法的建立	36
4.1	实验材料	36
4.1.1	主要使用仪器	36
4.1.2	主要使用化药	36
4.1.3	主要使用试剂	36
4.2	实验方法	37
4.2.1	免疫磁珠的制备过程	37
4.2.2	磁珠化学发光检测方法的操作步骤	38

4.2.3 磁珠偶联抗体含量的确定.....	38
4.2.4 反应孵育时间的确定	38
4.2.5 化学发光底物反应时间的确定.....	38
4.2.6 化学发光免疫检测方法标准曲线的建立	38
4.2.7 磁珠化学发光免疫检测方法性能分析	39
4.3 实验结果	39
4.3.1 磁珠偶联抗体含量的确定.....	39
4.3.2 反应孵育时间的确定	40
4.3.3 化学发光底物反应时间的确定.....	41
4.3.4 化学发光免疫检测方法标准曲线的建立	41
4.3.5 磁珠化学发光免疫检测方法性能分析	42
4.3.6 “HOOK” 实验.....	43
4.4 小结.....	44
第五章 结论与展望.....	45
5.1 结论.....	45
5.2 展望.....	46
参考文献.....	47
攻读硕士学位期间取得的成果.....	52
致 谢	53

第一章 绪论

1.1 冠状病毒

冠状病毒 (CoV), 拥有着庞大数目的自然宿主, 也是人类发现至今最大的一类 RNA 病毒^[1], 它的主要宿主为人类、哺乳动物与飞禽类, 常常会引发呼吸道、肠道疾病, 严重会危害到肝脏与神经系统^[2]。CoV 是一种被包被、非节段、阳性的单链 RNA 病毒组, 其大小从 26 到 32 Kb 不等, 其组成成分主要含有磷酸化的核衣壳蛋白 (N) 和基因组的 RNA 组分, 磷脂双层膜由两种不同的 Spike 蛋白遮盖, 一种是存在于全部 CoV 里的 Spike 糖蛋白三聚体 (S), 另一种是出现在部分 CoV 里的血凝素酯酶 (HE), 其中膜蛋白 (M) 和包膜蛋白 (E) 是病毒包膜 S 蛋白的重要组分, 而在磷脂双层膜下则是核衣壳的所在地。冠状病毒的亚科在基因型和血清学领域上可以大致分为四个属: α 、 β 、 γ 、 δ , 其中 β 分为四个谱系, 人类所患的冠状病毒主要是由 α 和 β 这两属引起的, 感染后能够致使人类患病的病毒主要有以下六种: 229E、OC43、NL43、HKU1、SARS-CoV 以及 MERS-CoV, SARS 冠状病毒是以蝙蝠为自然寄主并进化形成的^[3-4], 以上病毒通常引起感冒症状, 人畜共患病有时与致命疾病有关, 但 CoV 是常见的人类病原体, 30 %-60 % 的中国人抗 CoV 抗体呈阳性。尽管人类感染冠状病毒后的症状通通与急性呼吸道感染相关, 但是它拥有着不同的宿主物种, 也因此使它很容易变成了复杂的病原体^[5]。

1.2 新型冠状病毒

2019 年冠状病毒病 (COVID-19) 于 2019 年 12 月下旬在中国中部湖北省省会武汉开始爆发与蔓延, 该病的病原体为新型冠状病毒 (SARS-CoV-2), 从病人身上分离出来的 SARS-CoV-2 病毒的基因序列与之前发表的蝙蝠 SARS 冠状病毒基因组有着 86.9 % 的序列同源性, 新型冠状病毒和现有的 β 冠状病毒在保守复制酶区域内的核苷酸序列同源性小于 90 %, 因此它是一种新产生的与现有冠状病毒不同的 β 属回旋病毒, 隶属于冠状病毒科的 sarbecovirus 亚属^[2]。SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 基因组核苷酸相比较它仅仅存在 4 % 的变异, 但中性点偏差却在 10%-20% 之间, 差异比之前估计的要大很多。这次爆发的新型冠状病毒主要有两个类型, L 型 (70 %), 28144 位点为亮氨酸, 武汉疫情刚刚严重时, 流行的大多是 L 型, 当 1 月中旬时频率就开始出现下降的趋势, 因施加严重的选择性压力, 更具攻击性和快速的传播能力。S 型 (30 %), 28144 位点为丝氨酸, 祖先的版本, 进化较老, 攻击性较低, 选择性压力相比较 L 型很小, 所以在频率上就会有所增加。

新型冠状病毒是一种极其经典的冠状病毒，一种含有覆盖膜的正义 RNA 病毒，同样也拥有冠状病毒最明显的特点，在他们的表面呈现棍棒状的突刺。SARS-CoV-2 的基因序列也可以说是类似于典型的 β 属冠状病毒，S、E、M、N 基因、3'非翻译区 (UTR)、5'UTR、复制酶结构域 (orflab) 以及部分不确定的非结构域开放阅读框^[6]。结构蛋白主要包含 4 部分，分别是核衣壳蛋白 (N)、膜蛋白 (M)、膜蛋白 (E)、刺突蛋白 (S)，病毒基因组的 3'端编码着结构蛋白^[7]。新型冠状病毒的结构如下图 1.1。

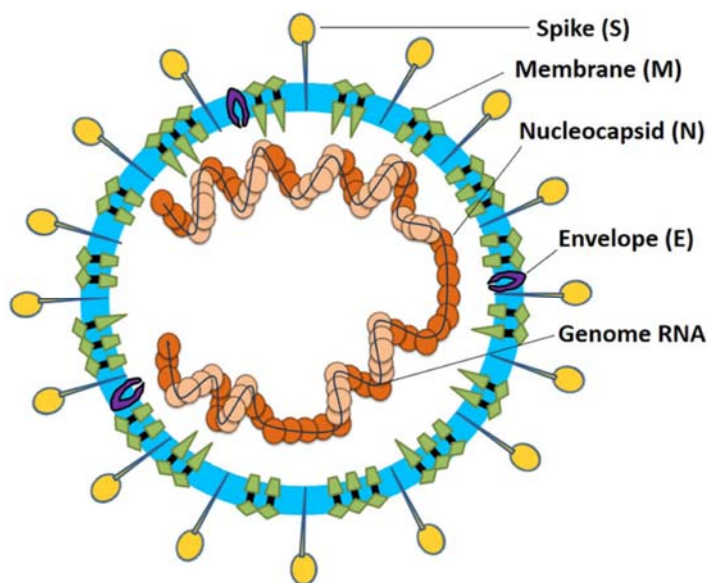


图 1.1 SARS-CoV-2 的结构剖析图

目前，新型冠状病毒的结构已经获得解析^[8]。核衣壳内仅有一种蛋白，便是 N 蛋白，是两个单独的结构域组成了该蛋白，分别为 N 端结构域 (NTD) 和 CTD，两者在体外通过各自的方法纷纷与 RNA 进行结合，这也说明了 RNA 结合的最适状态是需要两种结构域共同参与^[9-10]。并且 N 蛋白也和复制酶结构域的两个重要成分 M 膜蛋白^[11]、nsp3^[10,12]相结合，分析到他们相互作用可能起到将衣壳化的基因组有效包装成病毒微粒的效果^[13]。M 蛋白是病毒体内数目占比最多的蛋白，仅仅跨膜结构域就拥有三个^[14]，起到帮助病毒体变化成其形状的作用。它含有一个体积较大的 C 端内域和一个体积较小的 N 端糖基化胞外域，可以延申 7、8 nm 在病毒微粒内^[15]。M 蛋白是在病毒颗粒内的二聚体，同时是以多种构象存在，进而可以帮助进行膜的弯曲并且可以与核衣壳进行牢固结合^[16]。E 蛋白在病毒体内的占比非常少。E 蛋白的重要组分别是 C 端的内域和 N 端的胞外域，E 蛋白还拥有着离子通道的活性，有助于病毒的释放与组装，而重组病毒的致死性不如以前的重要原因就是缺乏了跨膜 E 蛋白^[17]。新型冠状病毒的外表面是 S 蛋白，它是一种非常经典的 I 跨膜糖蛋白^[18]，在病毒表面形成独特的尖峰结构^[19-20]。它主要由 S1 和 S2 亚基组合而成。S1 亚基构成了 spike 蛋白的球状头部，包含受体结合结构 (RBD) 和大受体结合域 N 端结构域 (NTD)。它主要负责识别宿

主细胞受体。穗蛋白的茎由 S2 组成，在膜融合中起着一定的作用^[21]。S2 亚基包含三个功能域：融合肽（FP）和肽重复序列（HR1 和 HR2）。融合肽与 RBD 在 S1 末端结合后，通过插入宿主细胞膜改变其构象，刺激肽重复序列形成六螺旋束（6hb），从而使细胞膜与病毒膜的进行了融合^[18]。

1.3 SARS-CoV-2 的检测方法

COVID-19 自爆发与传播至 2021 年 3 月以来，国内已累计确诊 102051 人，死亡 4848 人，而国外更为严重，累计确诊 14595309 人，累计死亡 3522166 人。因此全球开始寻求更有效的防控与治愈方法。做好防控的前提是对 COVID-19 有更快速的诊断技术，目前对于新型冠状病毒的检测方法主要有以下几种：

1.3.1 CT 检测

疫情初期湖北曾把 CT 扫描列为 COVID-19 的临床诊断方法^[22]。人体胸部的 CT 扫描是没有侵入性的，只需要通过 x 射线对不同角度进行测量便可产生患者的横断面图像^[23-24]。放射科专业人士进行图像分析，找寻可能的异常症状获得诊断结果^[23]。新型冠状病毒肺炎患者的 CT 图像特征通常是存在毛玻璃样的混浊（GGO）于肺周边和胸膜下^[25]。而针对于新冠肺炎的 CT 扫描诊断方法有一定的局限性，因特异性较弱（25%）而无法将新冠肺炎和其他普通肺炎区分开，有研究表明 COVID-19 的 CT 成像异常有其特点，同时特点表征下淋巴结病等的发生率很低，但其 CT 扫描的特征会和其他同样为病毒性的肺炎重叠，所以 CT 扫描缺少准确性。后期有报道称可将胸膜分布病变和 GGO 组合特征等作为新冠肺炎鉴别诊断的手段，在 CT 扫描确诊后，需重复 RT-PCR 检测。

1.3.2 核酸检测

新型冠状病毒肺炎目前确诊的最主要手段是核酸检测^[26-27]，是一种基于基因组信息学的检测方法，可以为确诊提供有效直接的证明^[28-29]。主要是对新型冠状病毒的两个基因位点进行核酸检测，分别是位于开放阅读框中 ORF1ab 区的 RdRP 基因和位于结构蛋白编码区编码 N 蛋白的基因，编码 E 蛋白的 E 蛋白就很少用于检测^[30]。

现对于新冠肺炎呼吸道样本进行诊断的主要办法是 RT-PCR，而对于 COVID-19 的核酸测试剂盒目前已经被国家药监局（NMPA）批准了 15 种。核酸检测的主要过程分为两部分：1）进行序列的比对和对引物的设计 2）对体系进行优化分析并上机测试。有研究通过对大量 SARS 病毒的基因组序列进行分析对比后，进行引物与探针的设计与修改，采用双靶位检测，一条引物与多种冠

病毒配对, 不限于 SARS-CoV-2, 另一条引物则只与新型冠状病毒适配。同时还需对检测条件如反应时间、温度等进行优化提升。

1.3.3 病毒分离测序

还有一个用于检测病毒感染患者的方法是通过病毒分离进行测序诊断。方法是从感染病人的病毒样本中分离病毒株, 在实验室通过组织细胞培养、动物接种和鸡胚接种三种方式进行病毒株培养, 最常用的方法是通过组织细胞进行培养^[31-32]。但该方法对操作人员要求非常高, 是一种限制。因此尽管病毒分离技术能够对新冠肺炎进行诊断, 但该方法分离耗时长, 标准和要求都非常的高, 对于操作的技术人员也存在威胁, 并不适合检测中心及医院等大数量检测。

1.3.4 蛋白检测

蛋白检测, 是以抗原抗体结合反应作为原理的检测技术, 当人体接触新型冠状病毒后, 人类的免疫系统就会提供对应的特异性抗体进行抵御, 特异性抗体 IgM 会在感染后一周内产生进行免疫, 而 IgG 抗体是出现在感染一至两星期以内, 存在时间较长^[33]。与此同时在感染的 1-2 天内, 人体会含有对应抗原, 也可用于病毒感染诊断。主要作为核酸检测的辅助诊断, 可以更加便捷、快速^[34], 而且是在可控性不如实验室的环境。WHO 建议将血清学快速检测用于科研, 如若出现特异性极强的抗体, 也可将新冠病毒抗体抗原检测作为体检项目, 这将对 SARS-CoV-2 感染的预前、预后、诊断以及治疗等具有重要意义。

1.4 胶体金免疫层析检测方法

胶体金免疫层析技术是由 Faulk W P 和 Taylor G M 在 1971 年创立并应用于大肠埃希菌^[35], 是在采用酶、荧光和放射免疫作为标记物之后新发明的一种免疫标记技术^[36], 它是在免疫标记技术的基础上, 将抗原和抗体与胶体金结合作为一种示踪剂, 拥有方便、快捷、不依赖大型仪器等优点, 俨然成为临床快速诊断领域中的新方向^[37]。

氯金酸 (chloroauric acid, HAuCl_4) 经过抗坏血酸、白磷等还原型试剂的作用下, 聚集成成为带有负电荷的疏水性溶液即为胶体金。以金颗粒作为内核, 表面被 AuCl_4^- 和 H^+ 双层离子所吸附, 在并不损失结合物的生物特性的情况下^[38]。通过静电作用力与蛋白分子及毒素、抗生素、酶等非共价大分子的正电基团吸引结合在一起, 同时并不影响结合物的生物特性^[38]。胶体金粒子表面吸附蛋白质分子进行包被的过程就是胶体金标记方法的本质。氯金酸溶液通过还原法可获得 1-150 nm 不同直径大小的胶体金粒子^[39]。粒子直径的大小与胶体金溶液颜色有

一定关联：当胶溶液呈现为酒红色时，直径约为 5-20 nm；当胶溶液呈现为深红色时，直径约为 20-40 nm；当胶溶液呈现为紫红色时，金粒子直径约为 60 nm 以上。当粒子达到一定浓度时，因为标记物聚集在一起，所以就会显现明显的红色及斑点^[40]。正因此特点也让胶体金免疫层析技术得以广泛应用于定性以及半定量的快速检测中。

同时也因为该方法不能进一步定量检测，无法满足在临床快速检测中指标量化的需求，只能靠肉眼判定检验结果，存在一定的灵敏度较低等困难，还需优化完善。针对以上所提出的问题新型的胶体金检测技术进行了优化，解决了存在的问题。

Zhou G 补充了棉线等从未用于胶体金免疫层析的材料。用棉线和尼龙纤维束代替样品垫和 NC 膜，整体形态支撑是使用尼龙纤维束材料。对检测结果可以进行定量分析，解决了无法定量的难题^[41]。采用特殊的光电信号放大系统和亲和素生物素放大技术在新型的免疫层析技术当中，提高了检测灵敏度，减少了样品的背景干扰^[42]。基于原始的免疫色谱法，将颜色预包装采用抗原或纤维膜抗体标记的荧光胶乳，可以用于免疫分析仪来检测荧光信号，它具有优于传统标记物的优势^[43]。简言之，胶体金免疫层析方法在基础临床快检中扮演着重要角色，大大提高了诊断准确性和敏感性，减少假阴性和假阳性，并实现定量检测。

1.5 酶联免疫吸附检测方法（ELISA）

ELISA 法采用的是抗原与抗体之间的特殊反应将被测物质和生物酶结合，能够做到定量是因为生物酶可以催化底物进行显色，可用于检测抗体或抗原^[44]。选用不消耗抗原抗体免疫活性的固相载体，将抗原抗体进行包被结合在其中，然后将抗体抗体偶联物和生物酶作用。当偶联物和包被在载体上的抗原或抗体进行反应时，就被吸附在固相载体上，便和相应的底物作用显色，产物的颜色与抗原或抗体的含量成正比^[45]。可以通过肉眼与相关显微镜进行观察判断，也可用分光光度计测定，该方法简便，也有着一定的特异性^[46]。

ELISA 检测方法主要是在实验室和临床检测中被应用，它作为临床快检技术，主要拥有以下几点优势：主要是高灵敏度，因为实验中所用到的酶具有非常高效的催化作用，对免疫应答有增强的功能，所以可以对微量的抗原抗体进行检测；同时免疫反应的结合也保证了实验的特异性。无危险性，没有有害物质参与反应，同时也保证了环境不受到污染，操作简单，安全系数较高^[47]。

可以根据试剂的来源，样品的性质和检测条件来设计不同的 ELISA 方法。ELISA 检测双抗夹心法：该实验原理是通过抗原上会有多种决定簇的单抗可以与之结合，所以找寻对应单抗和抗体进行，抗体-抗原-抗体或者抗原-抗体-抗原排列的结合，来测定夹心物质^[48]。ELISA 检测竞争法：与其他方法步骤相似，第

一步是将抗体包被于固相载体上,然后加入两组样品进行竞争结合,一组是与酶标记过的抗原相结合,一组是只有酶标记的抗原,经过孵育洗涤等一系列步骤最后显色,其中这两组底物的降解量便是待测物质含量。它通常适用于小分子的抗原测定,优点是快速,不足是实验对酶标记抗原的需求很大,不是很节省。ELISA检测间接法:通常用于对抗体进行效价,以检测抗体为例,第一步是将特异性抗原包被在固相之上,然后对待测抗体进行孵育,加入酶标单抗进行显色等实验步骤,便可进行检测,对于不同待测的抗体只要将包被抗原进行替换便可,传染病确诊更多采用间接法进行测定。

ELISA 检测方法的应用越来越多并且出现增长的趋势。从原理上来讲,ELISA 检测方法适用于一切的抗原及抗体,同时它还可以检测溶于检测液中的可溶性抗原^[49],可以采用相关的显微镜对酶联免疫吸附进行测定(EIA)来研究抗原的位置和结构。可以采用酶标记抗原或抗体和免疫扩散、免疫电泳等方法提高测试的灵敏度^[50],同时也可以应用于微生物学,药理学,流行病学和传染病诊断^[51]。内分泌方面更是可以用于测定 HCG^[52]、胰岛素^[53]和孕激素等。也可以用于血液学方面的凝固因子^[54]以及结合球蛋白^[55]的检测等。该方法也适合来检查甲胎蛋白^[56](AFP)癌胚抗原^[57](CEA),其中癌胚抗原的检测目前并不能用于临床应用。现阶段已然成熟完善的是诊断传染病中对乙型肝炎表面抗原的筛查,ELISA 的原料供应已可在国内外找到^[58]。

1.6 化学发光免疫检测方法

化学发光标记(CLL)及发光免疫分析(LIA)具有着较高的灵敏度、很强的特异性、检测出结果快速以及无放射性危害等优点。化学发光是通过氧化还原等化学反应时发出可见光的现象。有些化合物在没有紫外光或者可见光照射的情况下,通过吸收化学能的形式,从基态到激发态,激发能转移到受体分子上,当受体不再激发时,以光的形式释放出能量,这个现象便称为“化学发光”^[59]。通过测量化学发光反应中释放的光的强度,可以求出反应内化学物质和生物物质的确切含量,特别是采用和免疫学方法结合以后,所建立的化学发光免疫检测方法,拥有着发光测定灵敏度高和免疫反应的强特异性的优点,同时检测过程快速,试剂无害,因此而被广泛应用^[60]。

化学发光免疫层析技术可以细分为以下几种:化学发光酶免疫技术、化学发光免疫技术、微粒子化学发光免疫技术、电化学发光免疫技术^[61]。

1) 化学发光酶免疫技术:化学发光酶免疫检测方法(CLEIA)的原理是将反应底物替换为化学发光剂来进行酶标记的免疫结合检测。本身较灵敏的化学发光再叠加上酶的作用,使该方法具有很高的灵敏度。通常选用鲁米诺等材料作为发光底物,而用作标记的酶常常选择为过氧化物酶,在此基础上向体系中加入发

光增强剂可以大大提高检测方法的稳定性与灵敏性。在实际的应用当中原材料可以进行更多的筛选，标记酶可以选择碱性磷酸酶代替，而发光底物也可以换做 dioxetane 磷酸酯，固相载体现在也可以由酶标板替换为磁性微粒^[62]。

2) 化学发光免疫技术：化学发光免疫检测方法（CLIA），是以抗原抗体特异性结合作为基础，用发光剂标记其中一个物质，当环境处于碱性条件下，作为发光底物的较优物质吖啶酯就会因为过氧化氢的作用而氧化发光^[63]。其中作为化学发光剂的条件最基础的是能够参加到化学发光的反应当中，其次能够与抗原抗体形成稳定结合物，并且结合后仍然保留较高的动力及效应，以及抗原抗体的特性，最重要的是免疫活性^[64]。

3) 微粒子化学发光免疫技术：微粒子化学发光免疫技术检测可以采用竞争法与双抗夹心法进行检测，竞争法常用作检测较小分子的抗原物质，而大分子的抗原物质则选用双抗夹心法进行相关的检测^[65]。实验所用到的固相磁粉颗粒体积非常小，它的直径只有 1.0 μm ，这样便大幅度增加了与试剂接触的表面积，增添了抗原或抗体的吸附数量，使反应速度增快，也使清洗和分离更加便捷。竞争法的反应过程是，把被磁珠充分包裹的抗体、待检抗原和标记发光底物的抗原同一时间加入到反应容器内进行孵育，在这个体系内，免疫结合会出现两种情况，一种是标记的抗原会与抗体结合，另一种则是待测抗原与抗体相结合。双抗体夹心法的反应过程是，对应抗体与对应抗原依次结合，互不干扰，最终形成包被抗体-待测抗原-标记抗体双抗夹心的复合物^[66]。

4) 电化学发光免疫技术：电化学发光免疫分析（ECLI）是一种通过电化学方法在电极外表层引起的特异性发光反应。用于标记的物质是电化学发光反应中的底物，如三联吡啶钌，在化学反应下与抗原和抗体形成结合物，标记抗原和抗体^[67]，和 ELISA 的检测方法大体一致。而用作标记的物质则为在电化学发光反应中的底物，三联吡啶钌等，它们可以在化学反应下与抗原抗体形成结合物，以此为抗原抗体进行标记^[67]。电化学发光免疫检测与 ELISA 的检测类型相似。ECLI 的反应原理是通过免疫反应复合物中的三丙胺和三联吡啶钌在电极周围失去电子，形成了三价自由基，激发态的三联吡啶钌退激时发射波长 620 nm 的光子，并在电极表面反复进行产生更多光子，测定这些光子使被检测物的信号得以加强^[68]。

1.6.1 磁珠在化学发光检测技术中的应用

磁性微球现在已经在多领域被广泛利用，在生物学、医学治疗领域可以应用于蛋白质的分离纯化^[69]、细胞分离^[70]、靶向用药^[71-72]、磁共振成像^[73-74]等方面。而在免疫检测领域上，它可以代替酶标板作为固相载体，进行抗原抗体的包被，拥有着可以更加充分与试剂相结合的优点。它还可以作为标记物来提供检测信

号, 根据所测的磁信号可以确定待测物的实际含量。

以磁珠作为固相载体进行免疫检测的最先应用是检测早孕^[75], 然后, Zhang^[76]等人也是在基于磁性微球的基础上对人的 AFP 水平实施了检测。Wang^[77]建立了利用磁性微球作为固相的酶免疫化学发光方法, 用以检测糖抗原 50 (CA 50) 含量, 整个反应体系完成下来仅仅需要 50 分钟。而磁性微球进一步的研究方向可能是致力于制造具有更高磁性应答, 同时提高单位作用面积、更加分散的磁性颗粒^[78]。

1.7 本课题的研究目的及意义

新型冠状病毒是引发新型冠状病毒肺炎的病原菌。新型冠状病毒传播感染速度快, 同时还具有一定的致命性, 目前已构成全球大流行, 导致了数千万人死亡, 已经成为目前全球关注的公共健康问题。此次的病毒感染有较长的潜伏期, 而且发病初期没有较为明显的症状与特征, 因此, 保证临床早期的高效检出病毒感染是全面防控病毒的一个重要手段。

SARS-CoV-2 是一种 RNA 病毒, 有研究发现新型冠状病毒的结构蛋白在病毒感染传播过程中发挥着重要的作用, 同时表明其核酸 RNA 也具有高突变率和不稳定性, 所以开发基于病毒蛋白的诊断和治疗相关技术十分必要。

因此本文拟建立针对 2019 新型冠状病毒进行检测的免疫学检测方法, 选择了比较成熟的胶体金免疫层析检测方法、酶联免疫吸附检测方法和磁微粒化学发光检测方法, 对其实验条件及材料进行优化, 以便于更为高效的应用于临床快速检测, 补充现有检测技术空缺, 提供更快速、方便、灵敏度高的检测方法。

第二章 SARS-CoV-2 抗体胶体金免疫层析检测方法的建立

胶体金免疫层析检测方法，是基于胶体金作为检测标记物，应用至抗原和抗体的特异性结合过程中的一项快速诊断技术，在医学检测、食品安全检测、进出口产品病原微生物检测等领域得到了广泛的应用。本章对 SARS-CoV-2 的特异性抗体 IgM、IgG 建立检测方法，采用的是较为常见的柠檬酸三钠还原法，使氯金酸（ HAuCl_4 ）聚集形成金粒子，制取胶体金溶液。通过实验对组建胶体金试纸条的膜材料进行筛选、优化胶体金复合物的稳定性、摸索检测线与质控线的最佳抗体包被浓度，并对实验所建立的检测方法进行性能评估，同时加以临床样本应用验证。

针对的是血清中抗体 IgM、IgG 的检测，所以采用间接法原理制备胶体金试纸条，若滴加样品中含有一定浓度的待测物质时，质控线和检测线会同时显色，检测结果为阳性，可用肉眼观察显色程度判断样品中所含检测物的含量，也可通过相关仪器进行具体测定。

2.1 实验材料

2.1.1 实验设备仪器

表 2.1 实验设备信息

仪器名称	生产厂家	型号规格
小型高速离心机	江苏 其林贝尔	LX-500
漩涡混合器	江苏 其林贝尔	VORTEX-5
加热磁力搅拌器	江苏 其林贝尔	GL-3250A
紫外-可见分光光度计	Shimadzu	UV-2550
XYZ 三维划膜喷金仪	北京海峰致远	HM3030
恒温摇床	上海 智城	ZWYR-2102C
高压灭菌锅	上海 博迅	YXQ-LS-18SI
恒温培养箱	杭州奥盛	MK-10

2.1.2 实验药品

S 蛋白购于武汉华美生物工程有限公司，IgM、IgG 抗体、小鼠抗人 IgM、小鼠抗人 IgG 以及羊多抗购自北京博奥龙免疫技术有限公司，临床样品由北京科赫生物科技有限公司，氯金酸、柠檬酸三钠、pH 试纸购自默克 Sigma，其他试剂均为国产分析纯。

2.2 实验内容

2.2.1 胶体金溶液的制备及检测过程

(1) 制备胶体金溶液前, 将实验所需的锥形瓶等玻璃器皿, 采用流动水将灰尘清洗干净, 放入浓硫酸中充分浸泡 48 小时后取出, 用洗洁剂清洗 4-5 次, 流水冲洗, 蒸馏水再清洗 3-4 次, 恒温烘箱高温烘干待用;

(2) 称量 1 g 的氯金酸一次溶解于蒸馏水中, 定容瓶定容至 100 mL, 制成 1 % 的氯金酸溶液。取 1 mL 1 % 的氯金酸溶液和 99 mL 蒸馏水加入经过处理的 250 mL 容量的锥形瓶中, 放置于加热磁力搅拌器上进行加热处理, 将温度调到最大控制, 磁力搅拌速率调至最小;

(3) 溶液加热至沸腾后开始计时, 3 分钟后, 迅速加入 1 mL 1 % 的柠檬酸三钠水溶液, 充分混匀, 继续搅拌加热至 7 分钟, 在此过程中会观察到溶液逐渐从无色至蓝色, 最后变成酒红色;

(4) 完全反应结束后, 将锥形瓶取下使其冷却至室温, 因溶液加热产生水蒸气而有部分水分流失, 故将其用蒸馏水再次定容至 100 mL, 封口膜封好瓶口, 放置 4 摄氏度, 冷藏避光保存待用;

(5) 制备成功后的胶体金溶液无浑浊杂质, 清澈透亮, 采用紫外-分光光度计检测溶液在波长范围为 400 至 600 nm 处的吸收光谱, 记录最高吸收峰值, 代入公式, 计算出制取得到的金颗粒直径。

2.2.2 胶体金-鼠抗人 IgM 及鼠抗人 IgG 抗体结合物的制备

1) 胶体金结合最适 pH 值的选择

胶体金与抗体能否成功结合, pH 值是重要因素影响之一, 一般只有在蛋白质等电点 (pI) 略偏碱的条件下, 二者才能牢固结合, 此时蛋白质呈中性, 与金粒子之间的静电作用力较小, 疏水作用力占有优势, 因此蛋白质较易吸附于胶体金颗粒表面。可用 0.1 mol/L 的 K_2CO_3 试剂调试胶体金溶液的 pH 值, 其中由于金溶液会损坏 pH 仪探头, 所以采用 pH 试纸进行测定, 具体操作步骤如下:

(1) 取 10 支高温灭菌后的 1.5 mL EP 管, 按 1-10 依次标记序号, 每管中加入 1 mL 配制好的胶体金溶液

(2) 按标记序号每管依次加入 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液 0, 8, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 μ L 作为梯度, 充分均匀混合;

(3) 加入适量的鼠单抗进行标记, 于 37 摄氏度, 180 rpm 条件下, 结合反应 30 min;

(4) 采用饱和氯化钠法加入 10 % NaCl 溶液, 于室温避光条件下, 静置 2 h,

使游离胶体金粒子充分沉淀；

(5) 根据胶体金溶液颜色判断与抗体结合的最佳 pH 值。

2) 鼠抗人 IgM 及鼠抗人 IgG 最佳标记量的选择

对于标记抗体最佳量摸索的具体操作步骤如下：

(1) 取 8 支高温灭菌后的 1.5 mL EP 管，按 1-12 依次标记序号，每管中加入 1 mL 配制好的胶体金溶液，调节至最适合结合反应的 pH 值；

(2) 将所用标记的鼠单抗用 PBS 缓冲液稀释至 1 mg/mL，按标记序号每管依次加入 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 μ L 的单抗作为梯度，充分均匀混合，于 37 摄氏度，180 rpm 条件下，结合反应 30 min；

(3) 采用饱和氯化钠法加入 10 % NaCl 溶液，于室温避光条件下，静置 2 h；

(4) 用酶标仪对每管溶液在 528 nm 波长下进行检测，记录光吸度值。

3) 金标抗体复合物的制备

采用高温低速离心方法纯化按上述实验已获得的胶体金结合最适 pH 值及最佳抗体标记量所制备的胶体金-抗体复合物。具体操作步骤如下：

(1) 取 8 支高温灭菌好的 1.5 mL EP 管，取 1 mL 制好的胶体金溶液加入至每管，用 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液进行调节，使溶液达到结合抗体的最佳 pH 值；

(2) 每管中加入最佳标记抗体量，充分均匀混合，于 37 摄氏度，180 rpm 条件下，结合反应 30 min；

(3) 以牛血清蛋白溶液作为封闭液，每管中加入 50 μ L，充分均匀混合，于 37 摄氏度，180 rpm 条件下，结合反应 30 min；

(4) 用低温离心机对以上 8 支 EP 管进行 4 摄氏度，10000 r/min，20 min 离心；

(5) 用微量移液器将每管中的上清液小心吸出弃掉，在该过程中注意不要晃动 EP 管，否则沉淀物将再次溶于溶液中；

(6) 取 60 μ L 金稀液加入至第一个 EP 管当中，充分重悬混匀，吸出至第二个 EP 管中进行重悬，依次操作至最后一支 EP 管，便可获得金标抗体原液，置于 4 摄氏度储存待用。

4) 金标垫的制备

(1) 金标垫预处理

因蛋白易非特异性吸附于硝酸纤维素膜上，出现背景染色以及显色不足，为弥补这一情况，需对金标垫做如下处理：

首先将玻璃纤维素膜剪裁成长 5 cm、宽 1 cm 的尺寸，再将其放入含有 1 % 吐温-20、0.5 % 牛血清白蛋白、和 0.02 mol/L TBST 的封闭剂中浸泡 0.5 h，取出放置到 37 摄氏度恒温烘箱内干燥完全。

(2) 金标垫的制备

取一次性 PE 手套铺垫于大型号平皿底层，将经过预处理的干燥玻璃纤维素膜平铺放置其中，向膜上滴加前述实验中所制备好的金标抗体原液，直至全膜浸润完全，放置 37 摄氏度恒温烘箱中 3 h，烘干后取出，密封冷藏保存于 4 摄氏度。

2.2.3 试剂卡材料的筛选

1) 硝酸纤维素膜（NC 膜）的筛选

硝酸纤维素膜孔径的大小对试剂卡生产过程中检测线与质控线的包被效果以及在层析显色过程中的流速快慢均有着重要影响，因此对硝酸纤维素膜进行筛选十分必要。

采购英国 Whatman 品牌的型号为 AE99、Millipore 品牌的型号为 135、Sartorius 品牌的型号为 CN140、Seebio 品牌的 KWH0040A 的 NC 膜进行筛选比较，试验液体流经 4 cm 膜长度，根据所需时间、显色是否清晰以及膜背景是否干净进行判断选择。

2) 结合释放垫的筛选

层析过程中，胶体金复合物从结合释放垫上的释放情况直接影响膜上的出线情况，只有优质的结合释放垫才足以让胶体金复合物的干燥、留存、复润以及释放，每一步都达到最佳状态。分别采购上海捷宁公司的型号为 8965、美国 PALL 品牌的型号为 AccuWik Ultra 和 8715 的结合释放垫进行筛选比较，根据层析结束后，释放垫上的背景颜色及显色程度进行判断选择。

3) 样品垫的筛选

采购上海杰一生物公司的 XQY7、GL-b02、上海金标生物公司的 RB65、KB 50 四种不同型号的样品垫材料同时进行实验检测。首先将样品垫材料裁剪成长 1.5 cm、宽 0.5 cm 的尺寸，向材料中央滴加 100 μ L 液体后，开始计时，根据液体完全浸湿样品垫的时间对材料进行判断选择。

2.2.4 金稀液成分的选择

金稀液的配伍原则是秉承着使胶体金结合物更加稳定、利用率发挥到最大限度，以保证后续的检测过程更加准确、显色更加清晰。蛋白需保存在缓冲体系当中，所以我们需要一种缓冲介质，缓冲液通常有 PB 和 Tris-HCl，而在胶体金标记蛋白时对 pH 值的把控非常严格，低 pH 值会使蛋白带正电荷造成死金现象，所以缓冲液选取 pH 8.5 的 Tris-HCl。其余试剂成分通过实验效果进行筛选。

BSA 起到封闭作用，一方面对金垫进行封闭，另一方面流动封闭 NC 膜，防止产生层析不干净，出线反白等情况，同时高浓度存在也保护了标记蛋白；酪蛋

白有促进金粒子释放的作用，同时对免疫反应有着较强的封闭能力；Tween-20 作为表面活性剂，具有增加亲水性，促进结合的作用。蔗糖具有干燥保护剂的作用，给金标物提供一个相对亲水的环境，使其有效释放。

根据查阅资料及实验室经验设计 6 组不同配比的金稀液配方，具体内容如下表 2.2 所示，按以下配方配置 6 组试剂卡进行检测，通过观察金标垫颜色残留、NC 膜背景颜色以及出线情况来对金稀液进行选择。

表 2.2 金稀液配方

组别	BSA	酪蛋白钠	Tween-20	蔗糖
1	0.5 %	1 %	0.3 %	5 %
2	0.5 %	0.3 %	1 %	5 %
3	1 %	1 %	0.3 %	10 %
4	1 %	0.3 %	1 %	10 %
5	5 %	1 %	0.3 %	15 %
6	5 %	0.3 %	1 %	15 %

2.2.5 试剂卡 C 线包被浓度的选择

将羊抗鼠 IgM、IgG 用 PBS 溶液分别稀释至 0.5、1、1.5、2 mg/mL 包被在硝酸纤维素膜质控线上，捕获蛋白按 1 mg/mL 包被在硝酸纤维素膜检测线上，组装试剂卡，滴加 100 μ L 标准品进行检测，依据质控线显色效果进行筛选。

2.2.6 试剂卡 T 线包被浓度的选择

将捕获蛋白用 PBS 溶液分别稀释至 0.5、1、1.5、2 mg/mL 包被在硝酸纤维素膜检测线上，质控线上二抗按筛选浓度进行包被，组装试剂卡，滴加 100 μ L 标准品进行检测，依据检测线显色效果进行筛选。

2.2.7 试剂卡的性能评估

1) 灵敏度实验

按上述实验所得最佳实验条件进行试剂卡组装，将待测标准品用 PBS 溶液分别稀释至 6 ng/mL、12 ng/mL、24 ng/mL、48 ng/mL、96 ng/mL、960 ng/mL，用制备好的试剂卡对以上 6 组待测样品进行检测，每组重复检测 3 次，根据试剂卡显色情况确认最低检测限。

2) 重复性实验

按实验所得条件制作一批试剂卡，对选取的两个不同浓度的标准品进行检测，观察显色结果，分析批内重复性；制作三批次试剂卡，对选取的两个不同浓度的标准品进行检测，观察显色结果，分析批间重复性。

3) 稳定性实验

按实验所得条件制作一批试剂卡,密封保存于 37 °C烘箱中,每天取出若干支分别检测低、中、高三浓度的标准品,观察试剂卡显色情况,直至试剂卡完全失效。

2.2.8 临床应用验证

1) 重复性验证

分别选取临床确诊新型冠状病毒(2019-nCoV)感染的阳性样本,分别为:M1、M2、M3,检测信号强度分别为+++、++++、+++。将上述样本梯度稀释检测,样本稀释度为 1/100、1/1000、1/2000、1/4000、1/6000 每个稀释梯度重复检测 20 次,统计结果。

2) 最低检测限验证

分别选取不同地区收集的临床确诊新型冠状病毒 SARS-CoV-2 感染阳性样本,用于 IgM 检测的样品分别为 M21、M22、M23,用于 IgG 检测的样品为 M21、M22、M23、G21、G22、G23,依据实验研究结果,使用健康人血清稀释至最低检测限,重复检测 20 次,统计结果。

2.3 实验结果

2.3.1 胶体金溶液的制备及检测过程

依据柠檬酸三钠还原法原理制取的胶体金溶液,通过肉眼观察可以看见液体颜色呈现出酒红色,液体光泽亮丽、晶莹透亮、无微粒状沉金现象,均一性良好,初步鉴定良好,如图 2.1 所示。在实验中,1%柠檬酸三钠与 1%氯金酸溶液的加入量均为 1 mL,还原反应制备得到胶体金溶液 100 mL,用紫外分光光度计测其 400-600 nm 波长范围内的吸收值,扫描图谱如图 2.2 所示。分析图谱显示在波长为 528 nm 处,达到胶体金溶液吸收峰最高值,根据金粒子颗粒直径的线性方程 $y=0.4271x+514.56$ 计算得出,本实验制备胶体金溶液的粒子直径约为 31 nm。



图 2.1 柠檬酸三钠还原法制取的胶体金溶液

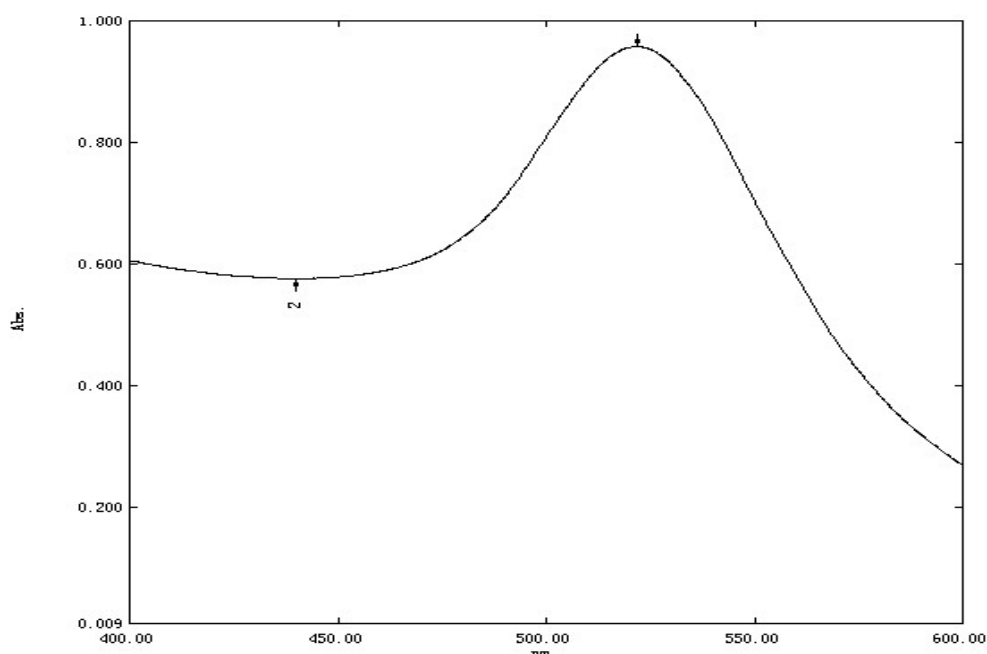


图 2.2 胶体金在 400-600 nm 波长下的吸收光谱曲线

2.3.2 胶体金-鼠抗人 IgM 及鼠抗人 IgG 抗体结合物的制备

1) 胶体金结合最适 pH 值的选择

每管胶体金溶液加入 K_2CO_3 溶液进行调节之后的 pH 值见下表 2.3, pH 对胶体金的影响情况见图 2.3, 观察下图可以发现, 当胶体金溶液中添加 K_2CO_3 的量大于 $22 \mu L$, 即 pH 大于 8.2 时, 胶体金开始出现死金现象, 所以胶体金-抗体复合物最佳结合 pH 值范围在 8.2-8.4 之间, 调节 pH 值所用的 K_2CO_3 加入量选为 $22 \mu L$ 。

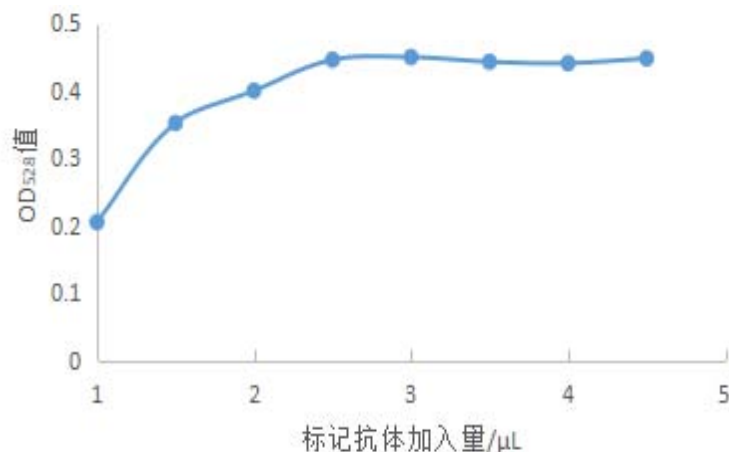
表 2.3 加入 K_2CO_3 溶液后的 pH 值

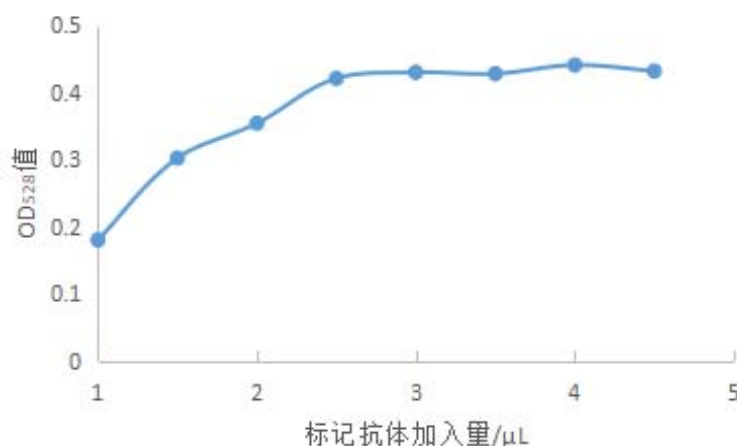
编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
胶体金 (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
K_2CO_3 (μ L)	0	8	16	18	20	22	24	26	28	30
pH 值	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.2	8.4	9.0	10	10.5

图 2.3 加入 K_2CO_3 溶液后的胶体金

2) 鼠抗人 IgM 及鼠抗人 IgG 最佳标记量的选择

将标记抗体加入量和在酶标仪下测得 OD_{528nm} 分别作为横坐标与纵坐标制作图表, 鼠抗人 IgM、鼠抗人 IgG 不同加入量的检测结果相关曲线如图 2.4、图 2.5 所示, 从图中可得出, 伴随标记单抗加入量的增加, OD_{528nm} 值呈现上升状态, 直至加入量达到 2.5μ L 时, OD 值不再有较大变化, 趋于平稳, 最佳抗体标记量应在实验结果的基础上增加 10%-20%, 因此应选取 3μ L 作为抗体最适标记量。

图 2.4 鼠抗人 IgM 加入量与 OD_{528nm} 值的相关曲线图

图 2.5 鼠抗人 IgG 加入量与 OD_{528nm} 值的相关曲线图

2.3.3 试剂卡材料的筛选

1) 硝酸纤维素膜 (NC 膜) 的筛选

采买四款不同的硝酸纤维素膜,这四款 NC 膜的爬速均在 120 ± 40 s 范围内,英国沃特曼品牌的 AE99 无背衬,其余三款均有背衬。根据色素水溶液在 4 cm 膜上的层析时间进行筛选,其中 Whatman 品牌的 AE99 流经 4 cm 的时间最长,影响读数较慢,产生非特异性结合的可能性也较大,易产生结果误差;Seebio 品牌的 KWH0040A 层析速度最快,读数较快,但因为停留时间较短,易出现结合反应不完全,呈现假阴性的结果;而 Millipore135 和 Sartorius CN140 层析时间适中,Millipore135 更适合血清传染病检测,显色更清晰;最后综合考虑,选择 Millipore 品牌的 135 型号硝酸纤维素膜作为实验材料。

2) 结合释放垫的筛选

采买三款不同的胶体金结合释放垫,进行金标垫处理制备组装试剂卡,检测结果如图 2.6 所示,释放垫 8965 吸收胶体金复合物的容量较大,但结合复合物释放不够充分,显色一般;释放垫 8715 吸附能力较弱,释放能力不足,显色较差;释放垫 Accuwik Ultra 吸附能力略低于 8965 型号,但释放能力强,显色效果良好;综合分析,最终选取 PALL 公司的 Accuwik Ultra 型号结合释放垫作为实验材料。

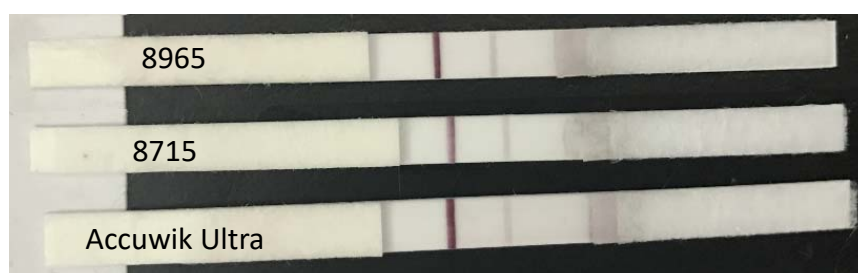


图 2.6 结合释放垫测试效果

3) 样品垫的筛选

采买四款不同的样品垫，均剪裁成为长 1.5 cm、宽 0.5 cm 同样大小，滴加 100 μL 色素水溶液，观察液体完全浸润各个样品垫所需时间，浸润速度过慢，易产生非特异性结合，浸润速度过快，则会导致反应不完全，产生假阴性结果，所以选取浸润速度适中的材料即可，依据实验结果，最终选择四款膜中购自杰一生物的 XQ-Y7 作为实验材料。

2.3.4 金稀液成分的选择

按金稀液成分表 2.1 配置 6 组不同配比的试剂，分别应用于试剂卡的制备过程当中，滴加样品进行检测，依据金标垫残留背景颜色、NC 膜背景颜色、出线速度和显色情况进行筛选。结果如图 2.7 所示，按 1、2、5 组配方制备的试剂卡出线产生反白现象，按 3、6 配方制备的试剂卡金标垫有试剂残留，观察得到第 4 组的出线清晰，金标垫较为干净。因此选择以 0.01 M 的 Tris-HCl 作为缓冲液，其中 BSA 占比为 1%，酪蛋白钠占比为 0.3%，Tween-20 占比为 1%，蔗糖占比为 10% 的配方作为实验选择。

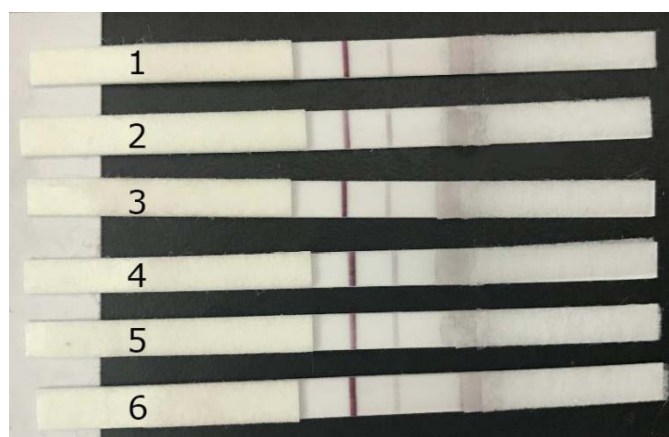


图 2.7 金稀液成分的选择

2.3.5 试剂卡 C 线包被浓度的选择

用 PBS 将待包被的羊抗鼠 IgM、羊抗鼠 IgG 多抗分别稀释到 0.5 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL 和 2 mg/mL，捕获抗原包被浓度为 1 mg/mL，进行检测。测试结果如下图 2-8、2-9 所示，C 线的颜色随着二抗浓度的增加而逐渐变深，1.5 mg/mL 时显色明显，2mg/mL 的显色与之相比相差不大，考虑耗材成本，确定羊抗鼠 IgM、IgG 最佳包被的浓度是 1.5 mg/mL。



图 2.8 羊抗鼠 IgM 包被浓度的选择
不同包被多抗浓度：A 0.5 mg/mL；B 1.0 mg/mL；C 1.5 mg/mL；D 2.0 mg/mL



图 2.9 羊抗鼠 IgG 包被浓度的选择
包被浓度同图 2.8

2.3.6 试剂卡 T 线包被浓度的选择

用 PBS 将待包被的捕获抗原分别稀释到 0.5 mg/mL、1 mg/mL、1.5 mg/mL 和 2 mg/mL，山羊抗鼠 IgM、IgG 按照 2.3.5 进行包被，检验测试结果如下图所示，包被的抗原浓度小于 0.5 mg/mL 时，T 线的显色现象微弱甚至没有显色；当捕获抗原的浓度高于或者等于 1.5 mg/mL 时，T 线的显色会随之变深，但增加到一定浓度时，T 线的颜色停止变化。因此，选择捕获抗原的包被浓度为 1.5 mg/mL。



图 2.10 IgM T 线包被浓度的选择
不同包被抗原浓度：A 0.5 mg/mL；B 1.0 mg/mL；C 1.5 mg/mL；D 2.0 mg/mL

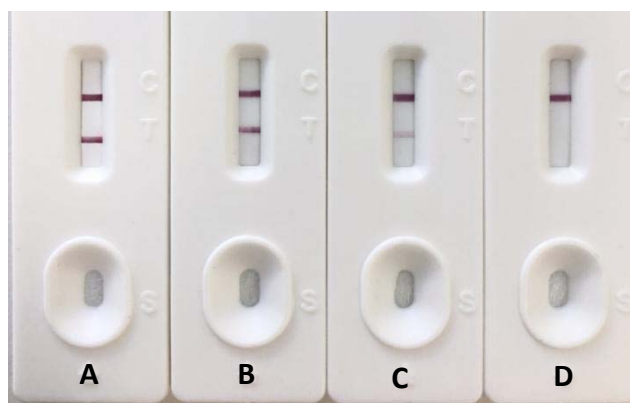


图 2.11 IgG T 线包被浓度的选择

不同包被抗原浓度：A 2.0 mg/mL；B 1.5 mg/mL；C 1.0 mg/mL；D 0.5 mg/mL

2.3.7 试剂卡的性能评估

1) 灵敏度实验

按上述实验摸索的条件进行试剂卡组装，对不同浓度待测样品进行检测。检测浓度分别为 6 ng/mL、12 ng/mL、24 ng/mL、48 ng/mL、96 ng/mL、960 ng/mL，试剂卡检测显色结果如图 2.12、2.13 所示，当待测样品浓度是 6 ng/mL 时，C 线显色，T 线不显色，当待测样品浓度大于等于 12 ng/mL 时，C 线、T 线均显色呈阳性，且随着待测样品浓度逐渐升高，T 线显色也逐渐加深，所以本实验所制备的试剂卡最低检测浓度为 12 ng/mL。



图 2.12 IgM 检测试剂卡灵敏度实验

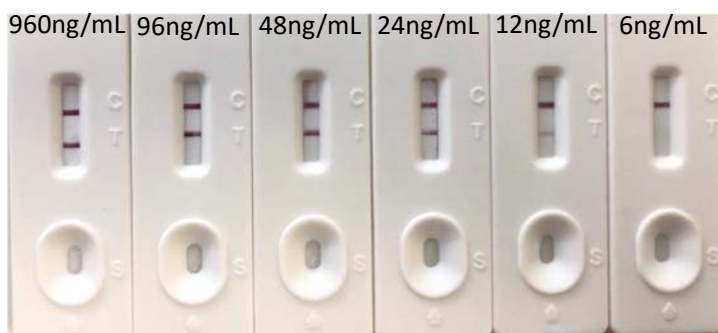


图 2.13 IgG 检测试剂卡灵敏度实验

2) 重复性实验

用本文建立的胶体金免疫层析检测方法制作相同批次和不同批次试剂卡, 选取 12 ng/mL 和 960 ng/mL 两个浓度的 IgM、IgG 标准品进行测试, 对本文建立的检测方法进行重复性实验, 实验结果如下表 2.4、2.5, 不同浓度的 IgM、IgG 批内重复性均达到 100%, 不同批次之间变异系数小于 5%, 该检测方法一致性良好。

表 2.4 IgM 检测试剂卡重复性测试

	样品浓度	阳性检出率	阴性检出率
批内	12 ng/mL	10/10	10/10
	960 ng/mL	10/10	10/10
批间	12 ng/mL	29/30	30/30
	960 ng/mL	30/30	30/30

表 2.5 IgG 检测试剂卡重复性测试

	样品浓度	阳性检出率	阴性检出率
批内	12 ng/mL	10/10	10/10
	960 ng/mL	10/10	10/10
批间	12 ng/mL	30/30	30/30
	960 ng/mL	30/30	30/30

3) 稳定性实验

按实验摸索的条件制作一批试剂卡, 密封保存于 37 °C 烘箱中, 每天分别测试 12 ng/mL、48 ng/mL、960 ng/mL 三个浓度的待测样品, 连续测试 3 周, 前 8 天试剂卡阳性检出率达到 100%, 显色情况也较为良好, 第 9 天有部分试剂卡出线颜色变浅, 直至第 15 天, 试剂卡彻底失效, 无法正常进行检测。根据检测试剂盒行业标准可以得出, 37 °C 存放 7 天相当于冷藏 4 °C 存放一年, 本实验构建的胶体金免疫层析检测方法稳定性良好。

2.3.8 临床应用验证

1) 重复性验证

对获得的三个阳性样本按 1: 100、1: 1000、1: 2000、1: 4000、1: 6000 梯度进行稀释, 每个浓度检测 20 次, 实验结果如表 2.6、2.7 所示, 样本的每个浓度检出信号强度重复率均大于 90%, 符合标准。

表 2.6 IgM 检测试剂卡重复性验证

M1 检测	1/100	1/1000	1/2000	1/4000	1/6000
1#	+++	++	++	+	+
2#	+++	++	++	+	+

续表 2.6

3#	+++	++	+	+	+
4#	+++	++	++	+	+
5#	+++	++	++	+	+
6#	+++	++	++	+	+
7#	+++	++	++	+	+
8#	+++	++	++	+	+
9#	+++	++	++	+	+
10#	+++	++	++	+	+
11#	+++	++	++	+	+
12#	+++	++	++	+	+
13#	+++	++	++	+	+
14#	+++	++	++	+	+
15#	+++	++	++	+	+
16#	+++	++	+	+	+
17#	+++	++	++	+	+
18#	+++	++	++	+	+
19#	+++	++	++	+	+
20#	+++	++	++	+	-

M2 检测	1/100	1/1000	1/2000	1/4000	1/6000
1#	++++	+++	++	++	+
2#	++++	+++	++	++	+
3#	++++	+++	++	++	+
4#	++++	+++	++	+	+
5#	++++	+++	++	++	+
6#	++++	+++	++	++	+
7#	++++	+++	++	++	+
8#	++++	++	++	++	+
9#	++++	+++	++	++	+
10#	++++	+++	++	++	+
11#	++++	+++	++	++	+
12#	++++	+++	++	++	+
13#	++++	+++	++	++	+
14#	++++	+++	++	++	+
15#	++++	+++	++	++	+
16#	++++	+++	++	++	+
17#	++++	+++	++	++	+
18#	++++	+++	++	++	+
19#	++++	+++	++	++	+
20#	++++	+++	++	+	+

第二章 SARS-CoV-2 抗体胶体金免疫层析检测方法的建立

M3 检测	1/100	1/1000	1/2000	1/4000	1/6000
1#	+++	++	++	+	+
2#	+++	++	++	+	+
3#	+++	++	++	+	+
4#	+++	++	++	+	+
5#	+++	++	+	+	+
6#	+++	+	++	+	+
7#	+++	++	++	+	+
8#	+++	++	++	+	+
9#	+++	++	++	+	+
10#	+++	++	++	+	+
11#	+++	++	++	+	+
12#	+++	++	+	+	+
13#	+++	++	++	+	+
14#	+++	++	++	+	+
15#	+++	++	++	+	-
16#	+++	++	++	+	+
17#	+++	++	++	+	+
18#	+++	++	++	+	+
19#	+++	++	++	+	+
20#	+++	++	++	+	+

表 2.7 IgG 检测试剂卡重复性验证

M1 检测	1/100	1/1000	1/2000	1/4000	1/6000
1#	+++	++	++	+	+
2#	+++	++	++	+	+
3#	+++	++	++	+	+
4#	+++	++	++	+	+
5#	+++	++	++	+	+
6#	+++	++	++	+	+
7#	+++	++	++	+	+
8#	+++	++	++	+	+
9#	+++	++	+	+	+
10#	+++	++	++	+	+
11#	+++	++	++	+	-
12#	+++	++	++	+	+
13#	+++	++	++	+	+
14#	+++	++	++	+	+
15#	+++	++	++	+	+
16#	+++	++	+	+	+
17#	+++	++	++	+	+
18#	+++	++	++	+	+
19#	+++	++	++	+	+
20#	+++	++	++	+	+

第二章 SARS-CoV-2 抗体胶体金免疫层析检测方法的建立

M2 检测	1/100	1/1000	1/2000	1/4000	1/6000
1#	++++	+++	++	++	+
2#	++++	+++	++	++	+
3#	++++	+++	++	++	+
4#	++++	+++	++	+	+
5#	++++	+++	++	++	+
6#	++++	+++	++	++	+
7#	++++	+++	++	++	+
8#	++++	++	++	++	+
9#	++++	+++	++	++	+
10#	++++	+++	++	+	+
11#	++++	+++	+	++	+
12#	++++	+++	++	++	+
13#	++++	+++	++	++	+
14#	++++	+++	++	++	+
15#	++++	+++	++	++	+
16#	++++	+++	++	++	+
17#	++++	+++	++	++	+
18#	++++	+++	++	++	+
19#	++++	+++	++	++	+
20#	++++	+++	++	+	+

M3 检测	1/100	1/1000	1/2000	1/4000	1/6000
1#	+++	++	++	+	+
2#	+++	++	++	+	+
3#	+++	++	++	+	+
4#	+++	++	++	+	+
5#	+++	++	+	+	-
6#	+++	+	++	+	+
7#	+++	++	++	+	+
8#	+++	++	++	+	+
9#	+++	++	++	+	+
10#	+++	++	++	+	+
11#	+++	++	+	+	+
12#	+++	++	++	+	+
13#	+++	++	++	+	+
14#	+++	++	++	+	+
15#	+++	++	+	+	+
16#	+++	++	++	+	+
17#	+++	++	++	+	+
18#	+++	++	++	+	+
19#	+++	++	++	+	+
20#	+++	++	++	+	+

2) 最低检测限验证

不同地区收集的临床确诊新型冠状病毒 SARS-CoV-2 感染阳性样本使用健康人血清稀释至检测下限浓度，用制备好的试剂卡重复检测 20 次。IgM 检测试剂卡验证结果如表 2.8 所示，阳性的检出率分别为 M 21=95 %、M 22=90 %、M 23=95 %。IgG 检测试剂卡验证结果如表 2.9 所示，阳性检出率分别为 M 21=95 %、M 22=90 %、M 23=95 %、G 21=95 %、G 22=95 %、G 23=95 %，性能均符合标准。

表 2.8 IgM 检测试剂卡最低检测限验证

	M 21	M 22	M 23	健康人
1#	+	+	+	-
2#	+	-	+	-
3#	+	+	+	-
4#	+	+	+	-
5#	+	+	+	-
6#	+	+	+	-
7#	+	+	+	-
8#	+	+	+	-
9#	+	+	+	-
10#	+	+	+	-
11#	+	+	-	-
12#	+	+	+	-
13#	+	+	+	-
14#	-	+	+	-
15#	+	-	+	-
16#	+	+	+	-
17#	+	+	+	-
18#	+	+	+	-
19#	+	+	+	-
20#	+	+	+	-

表 2.9 IgG 检测试剂卡最低检测限验证

	M 21	M 22	M 23	G 21	G 22	G 23	健康人
1#	+	+	+	+	+	+	-
2#	+	+	+	+	+	+	-
3#	+	+	+	+	+	+	-
4#	+	+	+	-	+	-	-
5#	+	+	+	+	+	+	-
6#	+	+	+	+	+	+	-
7#	+	-	+	+	+	+	-
8#	+	+	+	+	+	+	-

续表 2.9

9#	+	+	+	+	-	+	-
10#	+	+	+	+	+	+	-
11#	+	+	-	+	+	+	-
12#	+	+	+	+	+	+	-
13#	+	+	+	+	+	+	-
14#	-	+	+	+	+	+	-
15#	+	+	+	+	+	+	-
16#	+	-	+	+	+	+	-
17#	+	+	+	+	+	-	-
18#	+	+	+	+	+	+	-
19#	+	+	+	+	+	+	-
20#	+	+	+	+	+	+	-

2.4 小结

胶体金免疫层析技术以其操作简单、准确快速、不依赖仪器等特点，被列为当今最便捷灵敏的免疫学检测方法之一，在临床防疫过程中，该技术方法可突破检测技术对工作人员以及场地的限制。本章节建立了针对 SARS-CoV-2 抗体 IgM、IgG 的胶体金免疫检测方法，通过化学还原法制备金颗粒粒径为 31 nm 的胶体金溶液，溶液光亮透明，均一性良好，实验验证当溶液中加入 22 μL 的 K_2CO_3 溶液使 pH 值调至 8.2-8.4 之间、抗体标记量为 3 μL 时，胶体金溶液具有较为良好的结合能力，可以形成稳定的胶体金-抗体复合物。对试剂卡各组分材料的筛选工作，最终确定选取 Millipore 公司的 135 型号硝酸纤维素膜、PALL 公司的 Accuwik Ultra 型号结合释放垫以及杰一生物的 XQ-Y7 样品垫作为试剂卡组分材料。金稀液最佳配方是以 pH 8.5 的 Tris-HCl 作为缓冲液，其中 BSA 含量为 1%、酪蛋白钠含量为 0.3%、Tween-20 含量为 1%、蔗糖含量为 10%。

实验摸索确定 C 线最适包被浓度为 1.5 mg/mL、T 线的最适包被浓度为 1.5 mg/mL，构建的胶体金检测方法最低检测限为 12 ng/mL，试剂卡变异系数小于 5%，稳定性显示良好，可放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏保存 1 年。临床样本进行性能验证，均符合实验标准。在本实验中建立的检测 SARS-CoV-2 特异性抗体 IgM、IgG 方法可以做到半定量分析测定，也可以进一步通过胶体金试纸分析仪提高结果判读，对其定量分析。

第三章 SARS-CoV-2 酶联免疫吸附检测方法的建立

ELISA 主要是将抗原或抗体包被于酶标板上,再将抗原与抗体进行特异性反应,用酶标抗体进行标记,根据显色底物反应量测出对应待检样品含量。本章节针对 SARS-CoV-2 蛋白建立间接法酶联免疫吸附检测方法,对实验要求及条件进行摸索优化,对构建成功的方法进行性能评估实验。

3.1 实验材料

3.1.1 实验设备仪器

表 3.1 实验设备信息

仪器名称及型号	生产厂家
微量移液器	Eppendorf 有限公司
高压蒸汽灭菌锅	哈尔滨东联
PB-10pH 检测仪	北京西杰
sunergy 酶标仪	BioTek
DHG-101-2 电热恒温鼓风干燥	上海赫田
LX-500 小型高速低温离心机	海门其林贝尔

3.1.2 实验药品

SRBD 蛋白、S 抗体 (Antibody) 采买于武汉华美生物工程有限公司, HRP 标记的羊抗鼠采买自武汉博士德生物工程有限公司, BSA 购买于 sigma, 其他试剂均为国产分析纯。

3.1.3 实验试剂的配置

1) 包被液

(1) pH 值 12.0、0.01 M NaOH 溶液: 称量 4 g 氢氧化钠, 用超纯水使其完全溶解并定容至 1 L, 冷藏待用。

(2) pH 值 7.4、0.01 M PBS 缓冲液: 称量 0.2 g 氯化钾, 8 g 氯化钠, 0.24 g KH_2PO_4 和 1.44 g Na_2HPO_4 溶于 800 mL 蒸馏水中, 用 HCl 调试溶液 pH 值到 7.4, 蒸馏水定容至 1 L, 高压灭菌锅灭菌 20 min, 冷藏待用。

(3) pH 值 9.6、0.05 M 碳酸盐缓冲液: 称量 2.93 g 碳酸氢钠、1.59 g 碳酸钠溶于 800 mL 的纯水当中, 调节 pH 值到 9.6, 超纯水定容至 1 L, 高压灭菌锅灭菌 20 min, 冷藏待用。

2) 洗涤液

pH 值 7.2、0.05 M PBS-T 溶液: 在配置好的 0.05 M PBS 溶液中加入 Tween-20, 调节 pH 值到 7.2, 4 °C 冷藏保存。

3) 稀释液

(1) 称量 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.16 g 溶于 100 mL 的蒸馏水

(2) 称量 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.12 g 溶于 100 mL 的蒸馏水

取 (1) 试剂 81 mL、(2) 试剂 19 mL 置于高温灭菌后的三角烧瓶中, 充分混合均匀, 超纯水定容至 400 mL, 4 °C 冷藏保存。

4) 封闭液

(1) PBST 溶液 (1 % BSA): 将 Tween-20 添加至配置好的 0.05 M PBS 溶液中, 再添加 BSA 至终浓度为 1 %。

(2) PBST 溶液 (0.5 % 明胶): 同上, 向配置好的洗涤液中加入 0.5 % 的明胶。

(3) 酪蛋白钠水溶液 (2 %): 向蒸馏水中加入 2 % 的酪蛋白钠。

(4) 牛血清水溶液 (3 % BSA): 向蒸馏水中加入 3 % 的 BSA。

5) 显色液

称量 60 mg TMB 溶解于 10 mL 的二甲基亚砷溶液中, 制备成 TMB 贮液, 称量 100 mL 添加稀释液 10 mL、30 % 的 H_2O_2 溶液 15 μL , 混匀待用。

6) 终止液

称量 60 mL 蒸馏水加入 10 mL 98 % 浓硫酸, 定容至 100 mL 配置成 2 mM 浓硫酸溶液 (注意先水后酸)。

3.2 实验内容

3.2.1 SARS-CoV-2 ELISA 检测方法步骤

(1) SRBD 抗原的包被: 将 SARS-CoV-2 抗原用制好的包被液进行稀释, 以每孔 100 μL 添入到 96 孔酶标板, 4 °C 包被过夜。

(2) 洗板: 将板中包被液弃掉, 用 PBS-T 溶液以每孔加入 200 μL 进行清洗, 每次停留 3 min, 共反复清洗 3 次, 最后甩掉孔中液体。

(3) 一抗孵育: 将 S Antibody 用稀释液进行稀释, 以每孔 100 μL 加入至已包被的 96 孔板内, 37 °C 温育 1 h。

(4) 洗板: 将酶标板中液体弃掉, 用 PBST-T 溶液进行清洗, 即每孔添加 200 μL , 停留 3 min, 共反复清洗 3 次, 最后甩掉孔中液体。

(5) 酶标抗体孵育：用稀释液对酶标抗体按照一定的比例进行稀释，以每孔 100 μL 添加至 96 孔板内，37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱温育 1 h。

(6) 洗板：将孔中液体弃掉甩干，用 PBS-T 溶液以每孔添加 200 μL 进行清洗，每次停留 3 min，此次清洗进行 5 次，最后一次弃掉洗涤液，用蒸馏水进行清洗，200 μL /孔，停留 3 min，反复清洗 2 次，弃掉。

(7) 显色：在 96 孔板中添加制备好的显色液，每孔 100 μL ，室温避光放置 30 min。

(8) 终止：以每孔 50 μL 加入预先配好的终止液至酶标板内，轻微柔和震荡使反应完全终止。

(9) 读值：终止反应 15 min 内，在酶标仪上检测 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 吸光度。

3.2.2 包被抗原与抗体最佳工作浓度的确定

采用棋盘阵法可对 SRBD 包被抗原以及抗体进行最佳工作浓度的同步摸索，用制备好的包被缓冲液对包被抗原进行稀释，稀释梯度为 8、4、2、1、0.5、0.25 ng/mL，按照实验步骤进行包被、洗涤，将 S Antibody 按梯度 1: 4500、1: 9000、1: 18000、1: 36000、1: 72000、1: 148000 用包被缓冲液进行稀释，每孔 100 μL 添加至酶标板中进行 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育，后续洗板、孵育酶标抗体，用 PBS-T 溶液洗涤 5 次，纯水洗涤 2 次，加入显色液避光 30 min，终止上机读数，测定在 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 波长下，P/N 读数最大值对应浓度即为最佳工作浓度。

3.2.3 包被缓冲液的筛选

包被抗原及抗体按照上述确定的最佳工作浓度进行稀释包被和孵育，包被缓冲液分别选用 0.01 M NaOH 溶液 (pH 12.0)、0.01 M PBS 缓冲液 (pH 7.4)、0.05 M 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6)，按照实验步骤进行包被、洗涤、抗体温育等，最后显色、终止反应，上机读数，测定在 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 波长下，与最大 P/N 读数匹配的缓冲液即为最适包被缓冲液。

3.2.4 最佳包被条件的确定

将 SARS-CoV-2 抗原按照上述实验确定的浓度进行稀释，分别 4 $^{\circ}\text{C}$ 包被过夜、恒温 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 1 h、2 h，清洗后，加入最佳工作浓度的抗体进行包被，后续进行洗涤、酶标抗体孵育、显色、终止反应。酶标仪检测 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ ，依据 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 下 P/N 值最大时来确定最佳包被条件。

3.2.5 发光底物最佳工作时间的确定

将包被抗原以及抗体按照上述摸索的最佳条件实施包被、洗涤、孵育后,将显色液以每孔 100 μL 添加至固相板内,从 5 min 起,每隔 5 min 对一排样本加入终止液并上机检测 OD_{450nm},检测阳性吸光值与阴性吸光值的比值,选择 P/N 最大时为发光底物最优工作时间。

3.2.6 建立标准曲线

按照上述确定的最佳条件进行酶联免疫吸附法检测,将抗原按以下浓度进行稀释:0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、8 ng/mL、16 ng/mL,根据检测数据制作标准曲线,计算线性方程,得出回归系数。

3.2.7 性能评估

1) 灵敏度实验

采用已经建立的 ELISA 检测方法对按一定梯度稀释的 SARS-CoV-2 抗原进行测试,阴性对照选用 PBS 试剂,确定最低检出浓度。

2) 特异性实验

为确定实验构建的 ELISA 检测方法的特异性,选用实验室现有致病菌表达蛋白 KOD、tk0178 作为干扰物进行检测,同时选择 PBS 作为阴性对照组。

3) 重复性实验

重复性体现于变异系数 CV 值,即在不同浓度条件下,测得样本标准差与平均值的比值,随变异系数的变小,重复性逐渐增强。实验选择高、中、低 3 个不同浓度的样本进行同一批次检测 6 次、不同批次检测 6 次,依据检测出的 OD_{450nm} 值,计算变异系数,最后根据变异系数对建立的检测方法进行重复性评估。

4) 加标回收实验

加标回收实验选择浓度为 1.25 ng/mL 的抗原作为标准品,向其中加入不同浓度的样品稀释液,用构建的 ELISA 酶联免疫吸附法进行检测,一个浓度重复检测 3 次,检测 OD_{450nm} 值,计算加标回收率。

3.3 实验结果

3.3.1 包被抗原与抗体最佳工作浓度的确定

经过棋盘方阵滴定法检测后,上机检测的实验数据如下表 3.2 所示,可以明

确分析到当包被抗原浓度为 2 ng/mL, 抗体浓度为 1: 36000 时, 测得 P/N 值最大, 即该浓度为最佳工作浓度。

表 3.2 包被抗原与抗体最佳工作浓度的确定

包被抗体 稀释倍数	抗原稀释浓度 (ng/mL)					
	8	4	2	1	0.5	0.25
1: 4500 (P)	2.01	1.97	1.92	1.85	1.79	1.7
1: 4500 (N)	0.825632	0.746212	0.76494	0.767635	0.721774	0.661479
P/N	2.77	2.64	2.51	2.41	2.48	2.57
1: 9000 (N)	1.95	1.92	1.87	1.83	1.75	1.68
1: 9000 (P)	0.68662	0.695652	0.690037	0.665455	0.662879	0.658824
P/N	2.84	2.76	2.71	2.75	2.64	2.55
1: 18000 (P)	1.87	1.84	1.8	1.77	1.7	1.62
1: 18000 (N)	0.636054	0.689139	0.654545	0.629893	0.561056	0.661224
P/N	2.94	2.67	2.75	2.81	3.03	2.45
1: 36000 (P)	1.8	1.79	1.74	1.689	1.62	1.58
1: 36000 (N)	0.550459	0.544073	0.52568	0.53619	0.525974	0.537415
P/N	3.27	3.29	3.31	3.15	3.08	2.94
1: 72000 (P)	1.71	1.68	1.62	1.57	1.53	1.42
1: 72000 (N)	0.575758	0.581315	0.570423	0.592453	0.556364	0.533835
P/N	2.97	2.89	2.84	2.65	2.75	2.66
1: 148000 (P)	1.56	1.52	1.46	1.39	1.32	1.23
1: 148000 (N)	0.496815	0.47352	0.467949	0.44838	0.434211	0.418367
P/N	3.14	3.21	3.12	3.09	3.04	2.94

3.3.2 包被缓冲液的筛选

选择 3 种包被缓冲液开始酶联免疫吸附检测, 检测数据如下表 3.3 所示, 根据测得 OD_{450nm} 值及 P/N 值, 可以确定当包被缓冲液为 0.05 M 碳酸盐缓冲液时, P/N 值最大, 因此包被缓冲液确定为 0.05 M 碳酸盐缓冲液。

表 3.3 包被缓冲液的选择

包被液	0.01 M NaOH	0.01 M PBS	0.05 M 碳酸盐缓冲液
阳性 OD _{450 nm}	1.324	1.405	1.524
阴性 OD _{450 nm}	0.526	0.537	0.542
P/N	2.517	2.616	2.811

3.3.3 最佳包被条件的确定

包被温度以及时间均对实验检测有着重要影响,按照以下三组包被条件进行 ELISA 检测,检测数据如下表 3.4 所示,根据 OD_{450nm} 测值及 P/N 值,可以得出当包被条件设定为 4 °C 包被过夜时, P/N 值最大,因此 4 °C 包被过夜为最佳包被条件。

表 3.4 最佳包被条件的确定

OD _{450nm}	4 °C 过夜	37 °C 60 min	37 °C 120 min
阳性	1.536	1.425	1.233
阴性	0.432	0.609	0.584
P/N	3.556	2.340	2.111

3.3.4 发光底物最佳工作时间的确定

将抗原按照已得出的实验条件进行检测后,将显色液以每孔 100 μL 添加到酶标板中,从 5 min 起,每隔 5 min 对一排样本加入终止液并上机检测 OD_{450nm},共检测 9 组,实验结果如下表 3.5 所示,可以得发光底物反应时间为 20 min 时, OD_{450nm} 值最大,故发光底物最优作用时间选择为 20 分钟。

表 3.5 发光底物最佳工作时间的确定

反应时间	OD _{450nm}
5 min	2.11
10 min	2.397
15 min	2.385
20 min	2.42
25 min	2.241
30 min	2.161
35 min	1.984
40 min	1.513
45 min	1.128

3.3.5 建立标准曲线

依据实验建立的 ELISA 酶联免疫吸附检测方法对梯度稀释的抗原进行检测,根据实验数据绘制标准曲线如下图 3.1 所示,当 SRBD 浓度为 0.25-16 ng/mL 时,检测数值与其呈线性关系,回归方程式为 $y=0.3163x+0.8556$,相关系数是 $R^2=0.9960$ 。

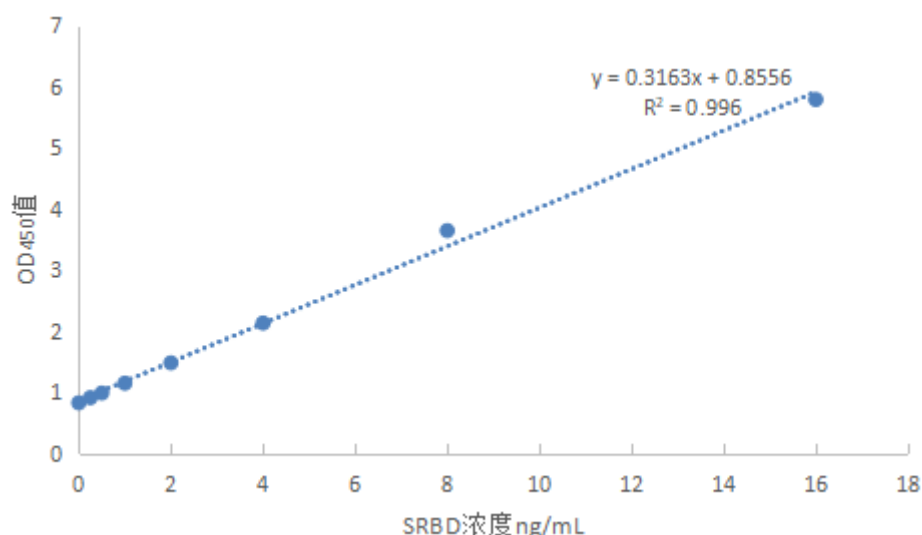


图 3.1 标准曲线

3.3.6 性能评估

1) 灵敏度实验

将 SRBD 抗原做梯度稀释，用已经构建的 ELISA 方法对其检测，结果如下表 3.6，可以检测的最低浓度为 0.25 ng/mL。

表 3.6 灵敏度实验

SARS-CoV-2 浓度 ng/mL	8	6	4	2	1	0.5	0.25	Blank
OD _{450nm}	3.379	2.723	2.131	1.732	1.172	1.014	0.931	0.732

2) 特异性实验

本实验采用以构建的 ELISA 检测方法对相同浓度的 KOD、tkO178 和 SRBD 进行检测，阴性对照组选择为 PBS，实验结果见下表 3.7，分析得出其余干扰物并不参加反应。

表 3.7 特异性实验

检测物	SARS-CoV-2	KOD	tk0178	PBS
OD _{450nm}	2.14	0.372	0.224	0.121

3) 重复性实验

通过实验对批间、批内进行检测，根据测定结果分别计算出批内及批间的变异系数，由表 3.8、表 3.9 的数据可知，批内变异系数在 7.10 %-8.89 % 范围，批间变异系数在 6.92 %-7.94 % 范围，均小于 10 %，证明本试验所构建的酶联免疫检测方法具有较好的重复性。

表 3.8 批内重复性试验

血清样品	检测次数	平均值 X	变异系数%
A	6	1.078	7.10
B	6	2.354	5.55
C	6	4.231	8.89

表 3.9 批间重复性试验

血清样品	包被批次	平均值 X	变异系数%
A	6	1.098	6.92
B	6	2.432	5.11
C	6	4.332	7.94

4) 加标回收实验

检测结果数据如下表 3.10 所示, 三个不同浓度的加标回收率分别为 97.05 %-102.70 %, 97.50 %-101.84 %, 99.86 %-101.46 %, 平均回收率为 99.25 %。

表 3.10 ELISA 加标回收试验结果

样品	原样品浓度	加入量 ng/mL	实测浓度	回收率
	ng/mL		ng/mL	%
1	1.25	2	3.304	102.70
2	1.25	2	3.152	95.10
3	1.25	2	3.191	97.05
4	1.25	30	30.501	97.50
5	1.25	30	30.375	97.08
6	1.25	30	31.803	101.84
7	1.25	60	62.124	101.46
8	1.25	60	61.669	100.70
9	1.25	60	61.164	99.86

3.4 小结

酶联免疫吸附检测方法已成功的应用于大分子量的抗原的定量测定, 成为临床血清流行病学调查的重要手段, 具有灵敏、特异、简单、快速、稳定等特点。本章节构建了针对 SRBD 检测的 ELISA 酶联免疫吸附检测方法, 通过棋盘方阵滴定法筛选了包被抗原和抗体的最优工作浓度, 同时对包被缓冲液进行了筛选, 优化了包被等实验条件, 最终建立的方法在 SRBD 浓度范围在 0.25-16 ng/mL 内和检测 OD_{450nm} 值呈线性关系, 回归方程式为 $y=0.3163x+0.8556$, 相关系数是 $R^2=0.996$ 。不与其他感染物产生反应, 变异系数在 10 % 以下, 重复性良好, 加标

回收率为 99.25%，符合要求，最低检测 SRBD 浓度为 0.25 ng/mL。

第四章 SARS-CoV-2 磁珠化学发光免疫检测方法的建立

将免疫反应和化学发光技术进行结合，是一种新型的特异性强、灵敏度高的免疫测定技术。用磁珠代替酶标板作为固相载体，同时其自身特性也是一种分离手段，提高了反应灵敏度以及检测效率。本文选用双抗夹心法构建磁珠作为固相测定 SARS-CoV-2 的化学发光免疫方法。

4.1 实验材料

4.1.1 主要使用仪器

表 4.1 实验仪器信息

仪器名称	生产厂家	型号规格
旋转混匀仪	美国 SCILOGEX	MX-RD-E
小型高速离心机	海门其林贝尔	LX-500
漩涡混合器	海门其林贝尔	VORTEX-5
高压灭菌锅	上海博迅	YXQ-LS-18SI
移液枪	eppendorf	1000/500/200/50 μ L
磁力架	BioMag beads	BMB50
多功能酶标仪	BioTek	Synergy2
酸度计	北京西杰	PB-10

4.1.2 主要使用化药

SRBD 蛋白、S Antibody 采买于武汉华美生物工程有限公司，兔多抗购买于上海起发，鲁米诺购买自 sigma，MES 采买于上海今品公司，100 nm 磁珠采买自 JSR，过氧化脲、氯化钠、对碘苯酚均来自国产分析纯。

5.1.3 主要使用试剂

1) 洗涤液：称量 Tris-HCl 3.94 g、氯化钠 8.766 g 溶于 900 mL 纯水中，向其中加入吐温-20 500 μ L，均匀混合，定容至 1000 mL，避光放置留存；

2) 连接缓冲液：称取 450 mL 蒸馏水，称量 9.76 g 吗啉乙磺酸溶解至其中，用 500 mL 定容至 500 mL，将 pH 调节为 5.0，高压灭菌锅进行灭菌，放置 4 $^{\circ}$ C 冷藏待用，溶液有效期限为两周；

3) 偶联试剂：制作 10 mg/mL EDC 溶液，连接缓冲液作为溶液，注意该试剂需配好后立即使用，不能存放；

4) 发光底物溶液

(1) 鲁米诺溶液: 称量 NaOH 药品 0.4 g, 用 100 mL 纯水充分溶解。称量鲁米诺试剂 0.8858 g 与 80 mL NaOH 溶液充分混匀, 容量瓶定容至 100 mL, 放置于 4°C 遮光待用。

(2) 对碘苯酚溶液: 配制浓度为 0.05 M 的对碘苯酚溶液, 称量对碘苯酚药品 0.11 g 和 10 mL DMF 充分混匀, 放置于 4 °C 冷藏密封保存。

(3) 底物缓冲液: Tris-HCl (0.01 M pH 5.0) 溶液中加入氯化钠和 Tween-20 的量分别为 0.9 % 和 0.1 %。

(4) 过氧化脲溶液: 称量过氧化脲溶解于上述 (3) 中至终浓度为 0.1 M。

(5) 发光底物应用液:

A. 将配制好的鲁米诺溶液和对碘苯酚溶液加入至含有 3 % DMF 的溶液中, 使鲁米诺和对碘苯酚的终浓度为 1 mM 和 2 mM。

B. 通过底物缓冲液把过氧化脲溶液稀释到终浓度为 2 mM。

实验室取相同体积的 A 和 B, 均匀混合后便可使用, 注意即用即配。

4.2 实验方法

4.2.1 免疫磁珠的制备过程

1) 用涡旋混合器把磁性微珠充分且均匀的散开, 用移液枪吸取出 100 μ L 磁珠悬浮液至 1.5 mL 的 EP 管, 注意动作轻缓, 避免重新混合;

2) 将 EP 管垂直固定于磁力架上, 2-3 分钟后, 出现磁珠分离现象, 上清液变得澄清透亮时, 用微量取液器小心吸出上清弃掉;

3) 取连接缓冲液 100 μ L 添加至 EP 管中, 置于涡旋混合器震荡均匀混合;

4) 取抗体 20 μ L 加入至 EP 管中, 使其充分混合, 26 °C 条件下, 在震荡仪上反应时长 30 min;

5) 在 EP 管中添入 10 μ L 偶联试剂, 移液枪操作液体混匀, 26 °C 环境下, 再震荡仪上反应时长 2 h;

6) 将 EP 管垂直固定于磁力架上, 2-3 分钟后, 出现磁珠分离, 上清液变澄清时, 用微量提取器将上清吸出扔掉。

7) 取 100 μ L 配置好的洗涤液加入至 EP 管中, 移液枪操作液体混合均匀, 再用涡旋混合器进一步混合;

8) 重复操作 (6)、(7) 两次;

9) EP 管垂直固定于磁力架上 3 min 后, 当磁珠分离充分后, 取出澄清透亮的上清弃之;

10) 配制含有 1 %-BSA 的洗涤液, 吸出 200 μ L 添加至上述 EP 管中, 充分

均匀混合，4 °C避光留存。

4.2.2 磁珠化学发光检测的操作步骤

将上述制备好的抗体-磁性微珠偶联物抽取 10 μL ，向其中添加 40 μL 抗原溶液和 50 μL 酶标记抗体，用移液枪吹打混匀，静置在 37 °C烘箱内反应 1 小时后，移置到磁力架上，磁珠分离，微量移液枪吸取上清，剩余沉淀加入 PBS 200 μL 洗涤 3 次，加入前述配制完成的发光底物 120 μL 移至化学发光板内，在 26 °C遮光反应 5 min 后，通过酶标仪检测其发光值。

4.2.3 磁珠偶联抗体含量的确定

在制作免疫磁性微球的过程当中，可以通过磁力架将未与磁珠成功偶联的抗体分离至上清中，去除闲置抗体后，可通过高速离心机，10000 rpm，工作 10 min，将未偶联成功的闲置磁性微球分离至上清。外购 BCA 蛋白定量检测试剂盒，根据试剂盒说明书进行操作，按照抗体浓度和测值建立标准曲线，计算偶联抗体最佳含量。

4.2.4 反应孵育时间的确定

按照 SRBD 浓度为 2 ng/mL，选择 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 酶标记抗体，加入 50 μL 制好的免疫磁珠，充分作用后进行上机检测化学发光值，反应时间分别为 20、30、40、50、60、90、120 min，根据测值选择孵育时间的最适时长。

4.2.5 化学发光底物反应时间的确定

按照确定后的最适实验条件进行化学发光免疫检测，添加上述制成的发光底物充分混合，室温遮光静置开始反应，每隔 5 min 上机用多功能酶标仪进行化学发光值的检测，根据测值确定最佳发光底物反应时间。

4.2.6 化学发光免疫检测方法标准曲线的建立

将 SRBD 蛋白浓度用 PBS 溶液进行稀释，稀释终浓度分别为 16 ng/mL、8 ng/mL、4 ng/mL、2 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL、0.25 ng/mL，依据上述确定的最优实验条件进行化学发光免疫检测，根据上机测得值绘制标准曲线，计算线性方程，得出回归系数。

4.2.7 磁珠化学发光免疫检测方法性能分析

1) 特异性实验

为确定实验构建的检测方法的特异性, 选用 KOD 蛋白、tk0178 蛋白配制同浓度后与实验中配制好的抗体-磁珠偶联物按照上述确认的实验条件进行磁性微球化学发光免疫检测, 同时选择相同浓度 SRBD 蛋白作为对照组, PBS 作为阴性对照。

2) 灵敏度实验

将 SRBD 蛋白用 PBS 溶液按照一定梯度进行稀释, 同时将 PBS 作为阴性对照, 采用前述实验条件及步骤进行磁性微粒化学发光免疫检测, 依照所测得的化学发光值确定建立的检测方法最低检出浓度。

3) 重复性实验

重复性体现于变异系数 CV 值, 即在不同浓度条件下, 测得样本标准差与平均值的比值, 随变异系数的变小, 重复性逐渐增强。实验选择高、中、低 3 个不同浓度的样本进行同一批次检测 6 次、不同批次检测 6 次, 依据测得 OD_{450nm} 值, 计算变异系数 CV, 最后根据 CV 值对建立的检测方法进行重复性评估。

4) 加标回收实验

加标回收实验选择一定浓度的抗原作为标准品, 向其中加入不同浓度的样品稀释液, 用构建的磁珠化学发光免疫检测方法进行测定, 每个浓度重复检测 3 次, 检测 OD_{450nm} 值, 计算加标回收率。

4.2.8 “HOOK” 效应

“HOOK” 效应类似于沉淀反应中抗原量过多有所剩余的现象, 当待测样本中抗原的浓度过高, 多余的抗原分别和磁珠固定的抗体、酶标抗体单独结合, 无法形成夹心的复合物, 测得量会比真实量低。制备高浓度的待测抗原, 根据实验构建的检测方法开始检测, 获得测值。

4.3 实验结果

4.3.1 磁珠偶联抗体含量的确定

构建检测 SRBD 的抗体-磁性微珠偶联物, 通过 BCA 蛋白检测试剂盒, 根据说明书操作, 检测制备偶联物过程中添加的抗体含量, 和制备完成后离心得到的上清液中剩余的抗体含量, 通过计算差值获得偶联在磁珠表层的抗体量。其中蛋白检测标准曲线如下图 4.1 所示, 抗体含量偶联变化测值见表 4.2。

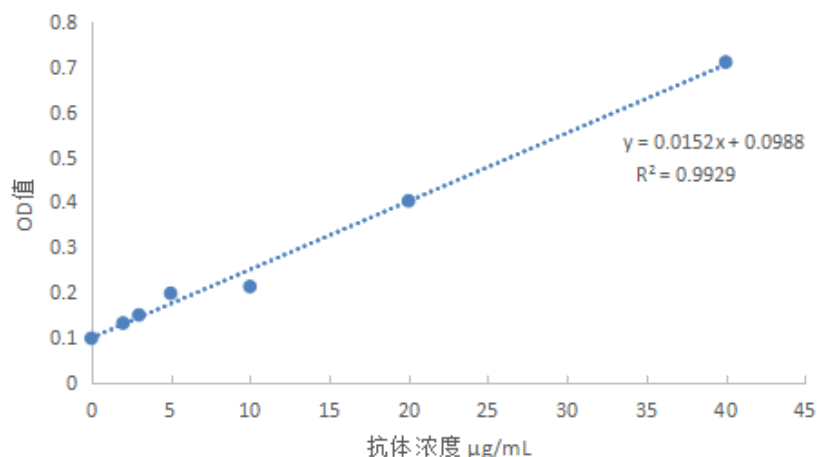


图 4.1 蛋白浓度检测标准曲线

表 4.2 抗体偶联变化测值表

	空白组	实验组
OD 值	0.102	0.275
上清蛋白浓度	0	11.6

根据图 4.1 蛋白浓度检测标准曲线和表 4.2 抗体偶联变化测值的数据进行分析, 计算得出偶联后上清蛋白浓度为 $11.6 \mu\text{g/mL}$, 其中实验制备过程中添加的抗体量为 $20 \mu\text{g}$, 磁珠添加量为 0.4 mg , 差值计算出每毫克的磁珠偶联的抗体量为 $21 \mu\text{g/mg}$ 。

4.3.2 反应孵育时间的确定

免疫反应中有着重要影响的条件是整个体系内的抗体与抗原的结合是否牢固稳定, 所以在实验中孵育抗原的时间也至关重要, 因此将孵育时间设定为 20 min 、 30 min 、 40 min 、 60 min 、 90 min 、 120 min , 共六组平行实验, 根据上机检测的发光值建立曲线, 如图 4.2 反应孵育时间对测值的影响, 从图中结果我们可以分析得出随着孵育时间的增加, 实验检测出的发光值越高, 在孵育时间为 60 min 时, 测值达到顶峰, 后续时间的延长对发光值并无明显影响, 所以我们可以得出结论, 反应孵育的最适时间为 60 min 。

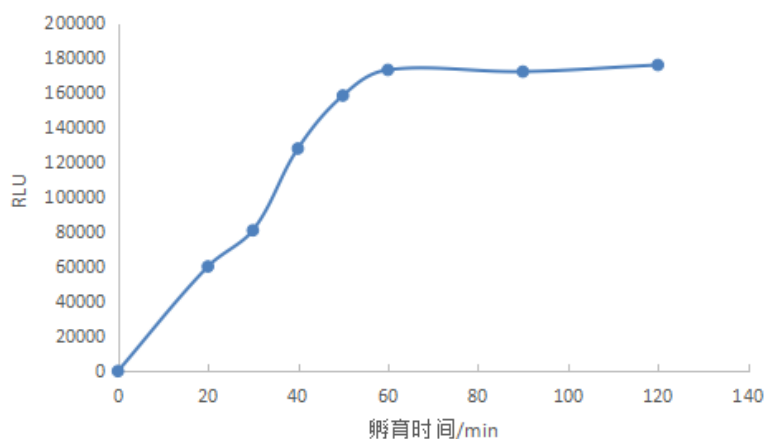


图 4.2 反应孵育时间的确定

4.3.3 化学发光底物反应时间的确定

化学发光检测中，对于化学发光底物添加后反应时间的把控也非常重要。加入发光底物进行反应后，随着时间增加发光值呈现下降趋势。因此设定两个浓度按照前述操作进行实验，检测结果如下图 4.3 所示，从图中可以观察得到，最初随着时间增长，发光值有所上升，但当时间增加到 6 min 时，所测得的数值逐渐下降，考虑实际操作消耗，最后确定当发光底物添加反应 5 min 后，酶标仪进行检测，即化学发光底物最优反应时间是 5 min。

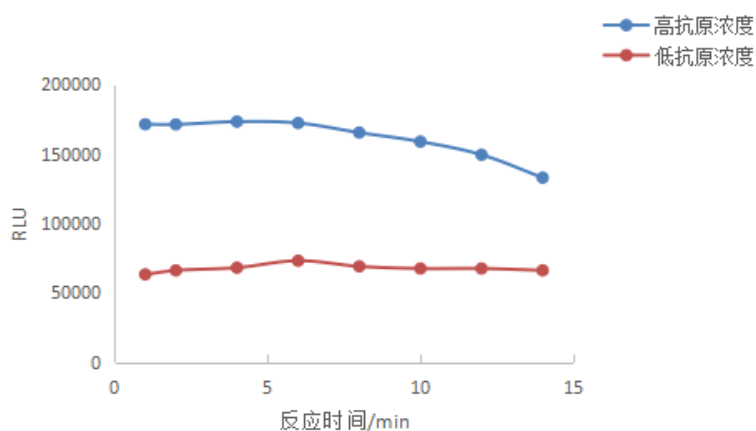


图 4.3 化学发光底物反应时间与测值的关系

4.3.4 化学发光免疫检测方法标准曲线的建立

将蛋白用 PBS 溶液进行稀释至终浓度分别为 16 ng/mL、8 ng/mL、4 ng/mL、2 ng/mL、1 ng/mL、0.5 ng/mL、0.25 ng/mL、0.125 ng/mL，按照上述确定的最佳实验条件进行化学发光免疫检测，获得如下图 4.4 化学发光免疫检测方法的标准曲线，线性方程为 $y=331.72x+11725$ ，回归系数为 0.9961。

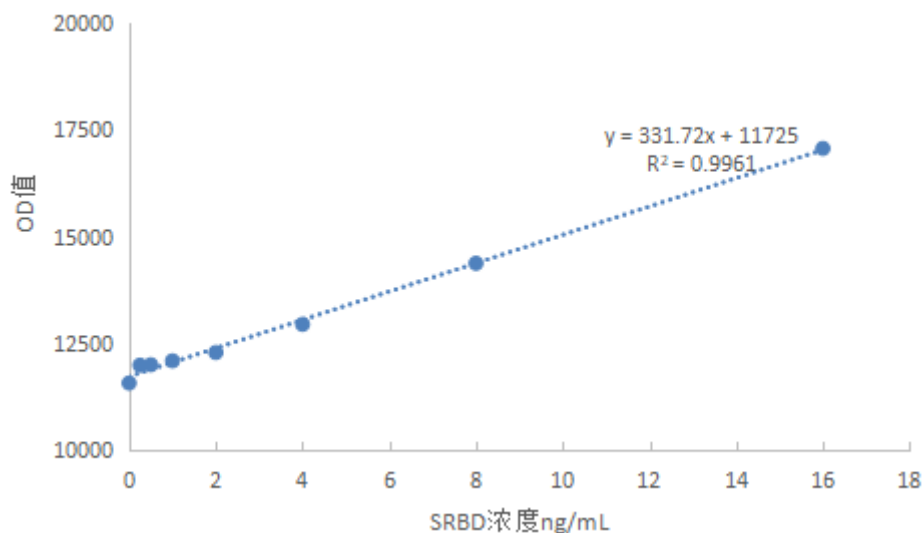


图 4.4 化学发光检测方法的标准曲线

4.3.5 磁珠化学发光免疫检测方法性能分析

1) 特异性实验

按照上述建立的磁珠化学发光免疫检测方法的步骤对相同浓度的从致病菌中提取出的蛋白 KOD、蛋白 tk0178 进行检测，PBS 作为阴性对照组，在 425 nm 波长下测出对应的化学荧光值，根据实验结果汇总如下表 4.3，数据显示 SRBD 蛋白的荧光吸收值远远高于其他的蛋白，说明该实验建立的检测方法不与其他干扰物产生反应。

表 4.3 特异性实验

检测样本	SRBD 蛋白	KOD 蛋白	tk0178 蛋白	PBS
荧光吸收值	170197	10739	11532	10762

2) 灵敏度实验

按照前述实验条件及步骤进行磁性微粒化学发光免疫检测，PBS 溶液作为阴性对照组，同时将 SRBD 蛋白用 PBS 溶液进行梯度稀释，根据所测得的化学发光值汇总如下表 4.4，当 SRBD 蛋白浓度为 0.125 ng/mL 时，判断为最低检出浓度。

表 4.4 灵敏度实验

SRBD 浓度 (ng/ml)	16	12	8	4	1	0.25	0.125	PBS
RLU	17001	15698	14279	13124	12013	11798	11243	10984

3) 重复性实验

根据前述实验所构建的检测方法，对高中低三个浓度分别是 0.25 ng/mL、2

ng/mL、8 ng/mL 进行相同批次内和不同批次之间的重复性实验，每个浓度重复测试 6 次，根据测得 RLU 对批间与批内的 C.V 值计算，最后汇总如下表 4.5、4.6，本实验所构建的方法相同批次内的变异系数小于 6%，不同批次之间的变异系数在 8% 以下，符合标准，说明该实验建立的检测方法一致性较好。

表 4.5 批内重复性实验

样本浓度(ng/mL)	次数	均值	C.V%
0.25	6	11787.33	5.63
2	6	12386.46	3.24
8	6	14277.65	3.87

表 4.6 批间重复性实验

样本浓度(ng/mL)	次数	均值	C.V%
0.25	6	11732.87	7.57
2	6	12403.58	5.73
8	6	14284.12	4.59

4) 加标回收实验

实验测得数据以及加标回收计算值见下表 4.7，低、中、高三种不同浓度的回收率分别在 99.25 %-115.20 %、97.54 %-100.68 %和 98.55 %-100.64 %之间。计算得出平均回收率在 99 %以上。

表 4.7 加标回收实验

样品	原样品浓度 (ng/mL)	加入量 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	回收率 (%)
1	1	2	3.304	115.20
2	1	2	3.103	105.15
3	1	2	2.985	99.25
4	1	30	30.604	98.68
5	1	30	30.261	97.54
6	1	30	31.205	100.68
7	1	60	60.748	99.58
8	1	60	61.384	100.64
9	1	60	60.127	98.55

4.3.6 “HOOK” 实验

“HOOK” 效应类似为在聚沉反应当中，抗原含量过多带来的连锁效应，当试剂中待测样品抗原浓度非常高时，多余的抗原分别和酶标抗体以及包被的抗体进行结合，无法再合成夹心复合物，所以结果低于实际样品中抗原的含量。因此固相载体化学发光反应有很大机率出现“假阴性”现象。此情况多发生在一步检验反应中，原因在于反应体系中酶标抗体量低于待测抗原的结合量。而磁珠在体系中可以均匀分散，与样品接触面积大大增加，所以这种情况出现的可能性也随之减少。

制备一系列 SRBD 蛋白溶液高浓度样品，依据本研究所建立的化学发光检测方法进行实验。结果如下图 4.5 所示，当样品浓度大于 1400 ng/ml 时，检测发光值开始下降；当样品的浓度不断增加时，发光值虽然减小明显，但没有出现“假阴性”的现象。

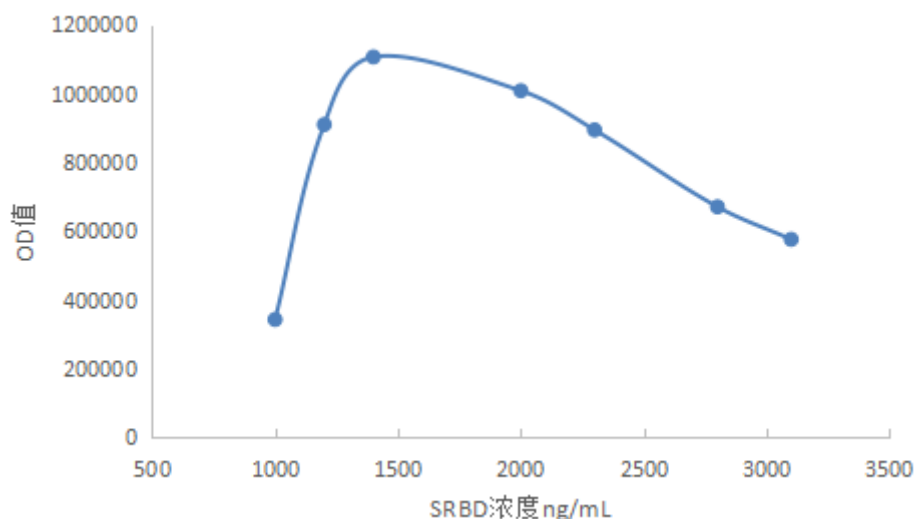


图 4.5 “HOOK”效应检测结果图

4.4 小结

磁性微珠化学发光免疫检测方法，采用磁性微球作为固相，偶联待测物特异性抗体，反应中连接待测样本抗原、酶标记抗体，形成夹心物质，反应充分后利用磁珠特性将未成功结合的抗体及抗原分离弃掉，再加入发光底物进行催化，完成后上机测定 RLU 值，能够做到定量检测出待测样品的含量。该种检测方法在反应面积、灵敏性和耗时等方面均有所优化提升。本章节所构建的 SARS-CoV-2 磁性微粒化学发光免疫检测方法，偶联到磁珠表层的抗体含量为 21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ，样本孵育时间筛选为 60 min，在发光底物加入反应 5 min 后测定 RLU 值，进而绘制标准曲线，得出线性方程为 $y=331.72x+11725$ ，相关系数 $R^2=0.9961$ ，当待测抗原浓度在 0.125 ng/mL 至 16 ng/mL 范围内时，呈线性关系。对建立的方法进行方法学性能分析，结果显示构建的方法最低可检出 0.125 ng/mL 的 SRBD 抗原，与实验中两种干扰蛋白不进行反应，重复性均小于 10%，最低平均回收率为达到 99 % 以上，且未出现“HOOK”假阴性现象。

第五章 结论与展望

5.1 结论

SARS-CoV-2 传播迅速、危害极大,针对该病毒的及时诊断和有效治疗预防十分重要。SARS-CoV-2 是一种 RNA 病毒,核酸检测是诊断新冠肺炎的“金标准”,免疫学检测方法作为辅助补充手段,拥有着特异、快速、灵敏和操作简易等优异特点,在大规模筛查中起着重要作用,因此本文采用购买的 SARS-CoV-2 抗原 SRBD 及 S 抗体,分别构建了胶体金免疫层析法、酶联免疫吸附法和磁微粒免疫化学发光检测方法,对实验条件进行优化调整,并对这三种方法进行了相关的方法学评估,其结论如下:

(1) 胶体金免疫层析检测方法建立:

采用间接法原理成功构建胶体金检测方法, IgM、IgG 最低检测浓度为 12 ng/mL,试剂卡批间批内 CV 值均小于 5%,稳定性测试结果显示良好,可放置于 4 °C 冷藏保存 1 年。对试剂卡进行了临床性能验证,检测临床阳性样本的结果一致性良好,最低检测浓度的临床样本阳性检出率也在 90 % 以上,同时实验结果和临床阳性样本的实验符合率为 100%。在本实验中建立的检测 SARS-CoV-2 特异性抗体 IgM、IgG 方法可以做到定性及半定量分析测定。

(2) 酶联免疫吸附检测方法建立:

采用间接法成功构建 ELISA 检测方法,当样品浓度处于 0.25-16 ng/mL 范围时呈现相关性, $y=0.3163x+0.8556$,相关系数是 $R^2=0.996$ 。性能验证结果显示,SRBD 最低检测限是 0.25 ng/mL,与实验室提供两种干扰蛋白不发生反应,批间批内变异系数均小于 10 %,加标回收率为 99.25 %。

(3) 磁微粒化学发光免疫检测方法建立:

通过一步连接法制备免疫磁珠,用 BCA 蛋白检测试剂盒对免疫磁珠的偶联情况进行测试,检测到当抗体包被磁珠的浓度为 21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 时,偶联效果优异,说明连接效果较好。利用双抗夹心法,完成 SRBD 磁微粒化学发光免疫检测法的建立,其线性方程 $y=331.72x+11725$,相关系数 $R^2=0.9961$,线性良好,在 SRBD 抗原浓度处于 0.125 ng/mL 至 16 ng/mL 间呈线性关系。SRBD 最低检测限是 0.125 ng/mL,与其他干扰蛋白无交叉反应,批间批内变异系数均小于 10 %,平均回收率 99 % 以上,且未出现“HOOK”效应,无假阴性。

建立的三种方法,均以感染后的特异性免疫反应为基础对新型肺炎进行检测,在群体检测临床应用中能快速、便捷的筛选可疑人群,以便缩短检测周期,起到早确诊、早防御的作用。其中,磁微粒化学发光免疫检测与酶联免疫吸附检测方法灵敏度较高,胶体金检测方法则更加便捷、快速。

5.2 展望

新冠病毒的疫情还未结束，在海外仍然处于大肆蔓延传染的阶段，开发高效检测、预防、治疗技术及产品，降低成本、普惠人民健康意义重大。由于疫情等各种条件限制，本文建立的三种免疫学检测方法，只针对胶体金免疫层析检测方法进行了临床实验，下一步还需将其他两种方法进行临床应用与验证。本文建立的 ELISA、磁珠化学发光中所应用到的材料还需进行筛选和优化，以获得更为灵敏、快速、准确的检测方法。本文的实验结果为临床应用以及试剂盒的开发提供实验室基础。

参考文献

- [1]Li G, Fan Y, Lai Y, et al. Coronavirus infections and immune responses[J]. Wiley-Blackwell Online Open,2020, 92(4): 424-432.
- [2]Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. New Engl J Med, 2020, 382(8): 727-733.
- [3]Cui J, Li F, Shi Z-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. Nature Reviews Microbiology. 2019, 17(3): 92-181.
- [4]Li X, Song Y, Wong G, et al. Bat origin of a new human coronavirus: there and back again[J]. Science China Life Sciences. 2020, 63(3): 461-462.
- [5]杨田田, 薛松, 秦蒙. 基于新型冠状病毒结构蛋白的诊疗技术的研究进展[J]. 现代药物与临床, 2020, 035(005): 1015-1023.
- [6]程婷婷,洪如会,王和林,吴海涛.新型冠状病毒 SARS-CoV-2 基因组结构与特征[J].基因组学与应用生物学,2020, 39(08): 3899-3903.
- [7]刘彬,秦照玲,戚中田.新型冠状病毒基因组结构与蛋白功能[J].微生物与感染,2020, 15(01)5 2-57.
- [8]Wrapp D, Wang N, Corbett K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation[J]. Science, 2020, 367(6483): 1260-1263.
- [9]Chang C K, Sue S C, Yu T H, et al. Modular organization of SARS coronavirus nucleocapsid protein [J]. J Biomed Sci, 2006, 13(1): 59-72.
- [10]Hurst K R, Koetzner C A, Masters P S. Identification of in vivo-interacting domains of the murine coronavirus nucleocapsid protein [J]. J Virol, 2009, 83(14): 7221-7234.
- [11]Sturman L S, Holmes K V, Behnke J. Isolation of coronavirus envelope glycoproteins and interaction with the viral nucleocapsid [J]. J Virol, 1980, 33(1): 449-462.
- [12]Hurst K R, Koetzner C A, Masters P S. Characterization of a critical interaction between the coronavirus nucleocapsid protein and nonstructural protein 3 of the viral replicase-transcriptase complex [J]. J Virol, 2013, 87(16): 9159-9172.
- [13]Fehr A R, Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis [M]. New York: Springer New York, 2015: 1-23.
- [14]Armstrong J, Niemann H, Smeekens S, et al. Sequence and topology of a model intracellular membrane protein, E1 glycoprotein, from a coronavirus [J]. Nature, 1984, 308(5961): 751-752.
- [15]Nal B, Chan C M, Kien F, et al. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E [J]. J Gen Virol, 2005, 86(5): 1423-1434.
- [16]Neuman B W, Kiss G, Kunding A H, et al. A structural analysis of M protein in coronavirus assembly and morphology [J]. J Struct Biol, 2011, 174(1): 11-22.
- [17]DeDiego M L, Álvarez E, Almazán F, et al. A severe acute respiratory syndrome coronavirus that lacks the E gene is attenuated in vitro and in vivo [J]. J Virol, 2007, 81(4): 1701-1713.
- [18]Bosch B J, van der Zee R, de Haan C A M, et al. The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: Structural and functional characterization of the fusion core complex [J]. J Virol, 2003, 77(16): 8801-8811.

- [19]Beniac D R, Andonov A, Grudeski E, et al. Architecture of the SARS coronavirus prefusion spike [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2006, 13(8): 751-752.
- [20]Delmas B, Laude H. Assembly of coronavirus spike protein into trimers and its role in epitope expression [J]. *J Virol*, 1990, 64(11): 5367-5375.
- [21]de Groot R J, Luytjes W, Horzinek M C, et al. Evidence for a coiled-coil structure in the spike proteins of coronaviruses [J]. *J Mol Biol*, 1987, 196(4): 963-966.
- [22]路融, 罗军德, 陈纲. 新型冠状病毒肺炎的多层螺旋 CT 影像学特点及诊断价值[J]. *医疗卫生装备*, 2020, 041(005): 12-15.
- [23]Whiting P, Singatullina N, Rosser JH. Computed tomography of the chest: I. Basic principles[J]. *BJA Education*, 2015, 15(6): 299-304.
- [24]Elaine Y P Lee, Ming-Yen Ng, Pek-Lan Khong. COVID-19 pneumonia: what has CT taught us? [J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2020, 20(4): 384-385.
- [25]刘昶权, 邓西龙, 潘越峻, 等. 不同临床分型新型冠状病毒肺炎患者临床特征及肺部 CT 影像学特征分析[J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(05): 548-553.
- [26]WHO Laboratory Testing for Coronavirus Disease 2019(COVID-19)in Suspected Human Cases: Interim Guidance, WHO 2020. [2020-05-01]. <https://pps.who.int/iris/handle/10665/331501>.
- [27]WHO. Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). WHO, 2020. [2020-05-05]. [https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/who-china-joint-mission-on-coronavirus-disease-2019-\(covid-19\)](https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/who-china-joint-mission-on-coronavirus-disease-2019-(covid-19)).
- [28]Wu F, Zhao S, Yu B, et al. Holmes, E.C. and Zhang, Y. (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 579, 265-269.
- [29]鲍瑶菲, 薛茜茹, 武海萍, 等. 用于新型冠状病毒核酸检测的即时检测方法研究进展[J]. *中国药科大学学报*, 2020, 51(06): 635-645.
- [30]Wu A, Peng Y, Huang B, et al. Genome composition and divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) originating in China [J]. *Cell host & microbe*, 2020, 27(3): 325-328..
- [31]彭彦卿, 黄青徽, 文海燕, 等. 2017-2018 年重庆口岸甲型 H1N1 流感病毒分离株基因变异分析[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2020, 43(02): 82-87.
- [32]彭浩然, 李成忠, 唐海琳, 等. 上海 2 株严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 的分离与鉴定[J]. *第二军医大学学报*, 2020, 41(04): 365-370.
- [33]李泉, 刘钉宾, 乔正荣, 等. SARS-CoV-2IgM、IgG 抗体检测在新型冠状病毒肺炎中的诊断价值研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2020, 41(18): 2244-2246.
- [34]杨娜, 陈国强, 邱雪平, 等. 新型冠状病毒 IgM 和 IgG 抗体 4 种不同检测试剂的临床应用评价[J]. *中华检验医学杂志*, 2021, 44(02): 137-141.
- [35]李淑群, 曹碧云, 常化仿, 等. 胶体金免疫层析法快速检测牛奶、奶粉、饲料中的三聚氰胺[J]. *分析化学*, 2013, 41(07): 1025-1030.

- [36]程婷婷, 石峰, 陈创夫, 等. 布鲁氏菌抗体胶体金免疫层析法快速检测技术的建立[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(02): 122-130.
- [37]Wang R, Zeng L, Yang H, et al. Detection of okadaic acid (OA) using ELISA and colloidal gold immunoassay based on monoclonal antibody[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 339.
- [38]Song C, Liu C, Wu S, et al. Development of a lateral flow colloidal gold immunoassay strip for the simultaneous detection of *Shigella boydii* and *Escherichia coli* O157:H7 in bread, milk and jelly samples[J]. Food Control, 2016, 59.
- [39] Bendayan M. A review of the potential and versatility of colloidal gold cytochemical labeling for molecular morphology.[J]. Biotechnic and Histochemistry, 2000, 75(5): 203-242.
- [40]王森, 周亚莲, 盛慧萍, 等. 瘦肉精三合一胶体金快速检测板的研制及在畜肉中的应用[J]. 浙江农业科学, 2012, (12): 1715-1719.
- [41]卢桂香. 胶体金试纸法与化学发光免疫法检测全分子 HCG 分析[J]. 当代医学, 2012, 18(05): 25-26.
- [42]Foubert A, Beloglazova N V, Saeger S D. Comparative study of colloidal gold and quantum dots as labels for multiplex screening tests for multi-mycotoxin detection[J]. Analytica Chimica Acta, 2016: 48-57.
- [43]Airong Zhu, Rulin Huo, Wei Zhou, et al. Establishment of Colloidal Gold Immunochromatography Strip for Detection of Florfenicol Residues[J]. Current Pharmaceutical Analysis, 2014, 10(4):312-314.
- [44]姬希文, 闫丽萍, 颜丕熙, 等. 鸭坦布苏病毒抗体间接 ELISA 检测方法的建立[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(08): 630-634.
- [45]沈婷, 周斌, 陈溥言. 检测猪乙型脑炎病毒抗体间接 ELISA 方法的建立与应用[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(04): 1-7.
- [46]苟珍珠, 兰洋, 郑韵, 等. ELISA 法快速检测食品中重金属含量的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(12): 262-267.
- [47]P Hardt, A Hauenschild, J Nalop, et al. The Commercially Available ELISA for Pancreatic Elastase 1 Based on Polyclonal Antibodies Does Measure an as Yet Unknown Antigen Different from Purified Elastase 1. Binding Studies and Clinical Use in Patients with Exocrine Pancreatic Insufficiency[J]. Z Gastroenterol, 2003, 41(09): 903-906.
- [48]O'Donnell J L, Hayman M W, Spellerberg M B, et al. Antineutrophil cytoplasmic antibody measurement: advantages and disadvantages of a capture PR3 ELISA and a direct PR3 ELISA.[J]. Pathology, 2007, 39(2): 258-263.
- [49]谢琿, 章先, 王歆, 等. 黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 检测技术研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 2033-2040.
- [50]孙佳芝, 王新桐, 刘雪慧, 等. 产气荚膜梭菌 α 毒素双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(06): 930-941.
- [51]谢星星, 李祥瑞, 李银, 等. 检测坦布苏病毒病抗体 NS1-ELISA 方法的建立与初步应用

- [J]. 浙江农业学报, 2014, 26(01): 135-140.
- [52]Kuo H T, Yeh J Z, Wu P H, et al. Application of immunomagnetic particles to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for improvement of detection sensitivity of HCG.[J]. Journal of Immunoassay & Immunochemistry, 2012, 33(4): 377-387.
- [53]胡健. 检测血清中胰岛素抗体的一种微量酶联免疫吸附试验[J]. 国外医学. 内分泌学分册, 1986, (02): 99-100.
- [54]Tanja Špec, Sebastijan Peljhan, Jana Vidič, et al. CIM® monolith chromatography-enhanced ELISA detection of proteins in artists' paints: Ovalbumin as a case study[J]. Microchemical Journal, 2016, 127.
- [55]张小萍, 梁筱燕, 张庆璜, 等. 尼罗罗非鱼血清免疫球蛋白单克隆抗体制备及鉴定[J]. 免疫学杂志, 2013, 29(08): 663-667.
- [56]朱豆, 李宜铮, 吴意. 电化学发光法与 ELISA 法检测甲胎蛋白的比较[J]. 实用预防医学, 2011, 18(01): 145-147.
- [57]李琦, 宋朝君, 田莹, 等. 肿瘤标志物 CEA 夹心 ELISA 检测试剂盒的建立及初步应用[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(06):544.
- [58]张学东, 张泉, 谢慧波. 不同厂家试剂盒检测人血清乙肝表面抗体浓度值相关性分析[J]. 科技信息, 2009, (07): 362-363.
- [59]王高生, 李立和, 魏荣华, 等. 癌胚抗原化学发光免疫分析方法学研究[J]. 检验医学, 2009, 24(03): 228-230.
- [60]魏光伟, 余永鹏, 等. 化学发光免疫分析技术及其应用研究进展[J]. 动物医学进展, 2011, 31(3): 97-102.
- [61] Luppá P, Bruckner C, Schwab L, et al. 7 α -Biotinylated testosterone derivatives as tracers for a competitive chemiluminescence immunoassay of testosterone in serum[J]. Clin Chem, 1997, 43(11): 2345-2352.
- [62] Wang X, Chen H, Lin J M, et al. Development of a highly sensitive and selective microplate chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of free thyroxine in human serum[J]. International Journal of Biological Sciences, 2007, 3(5): 274-280.
- [63] Zhang Q Y, Wang X, Li Z J, et al. Evaluation of α -fetoprotein(AFP) in human serum by chemiluminescence enzyme immunoassay with magnetic particles and coated tubes as solid phases[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 631(2): 212-217.
- [64] Helen L, Larry J K. Influence of different luminols on the characteristics of the chemiluminescence reaction in human neutrophils[J]. J Biolumin Chemilumin, 1995, 10(6): 353-359.
- [65]李智勇, 肖勤, 应希堂, 等. 板式磁颗粒化学发光免疫分析测定人血清中糖类抗 125[J]. 化学学报, 2010, 68(02):162-168.
- [66] Nicobolas R H, Eckert B, Kraiss S. Electrochimiluminescence: leading-edge technology for automated immunoassays analyse detection[J]. Clin Chem, 1996, 42(9): 1575-1578.
- [67]元文宝, 李芳, 李华楠, 等. H9 亚型 AIV 型特异性电化学发光免疫检测方法的建立[J].

中国农业科学, 2015, 48(15):3064-3070.

[68]刘冰, 童朝阳, 郝兰群, 等. 一种基于金磁微粒的电化学发光免疫检测方法[J]. 分析测试学报, 2013, 32(08): 998-1002.

[69]Karl Holschuh, Achim Schwammler. Preparative purification of antibodies with protein A—an alternative to conventional chromatography[J]. Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2005, 293(1): 345–348.

[70]Ivo Safarik, Mirka Safarikova. Use of magnetic techniques for the isolation of cells [J]. Journal of Chromatography B, 1999, 722(1): 33–53 .

[71]Kharkevich D A, Alyautdin R N, Filippov V I. Employment of magnet-susceptible microparticles for the targeting of drugs[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 1989, 41(4): 286-288.

[72]Gupta P K, Hung C T. Albumin microspheres V.Evaluation of parameters controlling the efficacy of magnetic microspheres in the targeted delivery of adriamycin in rats International[J]. Journal of Pharmaceutics, 1990, 59(1): 57-67.

[73]Liang Z, Lauterbur P.C. Principles of Magnetic Resonance Imaging: A Signal Processing Perspective Approach[J]. SPIE Optical Engineering Press, 2000, 92(3): 99-127.

[74]马隽. 磁共振成像在甲状腺腺瘤诊断中的应用[J]. 中国地方病防治杂志, 2009, 24(5): 397-398.

[75]Gilchrist K, Medal R, Shorey D. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes[J]. Annals of Surgery, 1957, 146(4): 596-606.

[76]Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, et al. Folate-conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments[J]. Bioconjugate Chemistry, 2005, 16(5): 1181-1188.

[77]贾秀鹏, 张东生, 郑杰, 等. 用于肿瘤热疗的锰锌铁氧体纳米粒子的制备及表征[J]. 生物医学工程学杂志, 2006, 23(6): 1263-1266.

[78]Plotz C M, Singer J M. Latex Fixation Test: Application to Serologic Diagnosis of Rheumatoid Arthritis[J]. American Journal of Medicine, 1957, 21(6): 888-892.

攻读硕士学位期间取得的成果

1) 发表论文

孙子琪, 于源华, 新冠病毒胶体金检测方法的建立, 中国科技论文在线, 编号 202103-258

2) 获奖情况

- (1) 2018 年获得长春理工大学校级研究生学业二等奖学金;
- (2) 2019 年获得长春理工大学校级研究生学业三等奖学金。

致 谢

时光荏苒，三年的研究生生活就在此画上了句点。在这三年的时间里，我收获了学业上的进步，生活中的成熟，在这里我要特别感谢我的导师于源华教授，她在我实验遇到困惑的时候，为我指点迷津，在我生活上迷茫的时候，给我安慰及鼓励，是她让我成长为一个更加成熟稳重的人。她为我们提供优秀的实验平台，让我们把学校当作温暖的家，能够成为她的学生是我的幸运。同时我还要感谢王月，是他一直在背后默默的支持着我，让我能够安心的投身于科研，专注于实验。还有我的小伙伴周宏妍、王皓民，是她们在我疲惫时，给我带来快乐，鼓舞我继续前行。

最后我要感谢我的父母，是她们的支持，让我更加优秀，这些我永远会记在心里，努力成为一个对社会有用的人，来回馈她们的培育之恩。