



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20220034

## 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)免疫检测方法的建立

江思思<sup>1</sup>, 刘俊伟<sup>2</sup>, 陆 旸<sup>1</sup>

(1. 天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457; 2. 天津国际生物医药联合研究院, 天津 300457)

**摘要:** 核酸检测是检测新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的主要检测方法,但该方法实验步骤复杂,检测时间较长,实验条件要求高,故本文研发了两种便捷、高效的免疫检测方法,作为核酸检测的重要补充.本研究通过提取新型冠状病毒核衣壳蛋白(N 蛋白)作为抗原,制备出高特异性单克隆抗体,建立了 N 蛋白间接竞争 ELISA 法和胶体金免疫层析试纸条两种 SARS-CoV-2 免疫检测方法.通过优化间接竞争 ELISA 法的 N 蛋白包被量、抗体稀释倍数和稀释液 pH 等条件,得到该方法的灵敏度  $IC_{50}$  为  $(22.16 \pm 1.77) \mu\text{g/L}$ ,最低检测限  $IC_{15}$  为  $(0.31 \pm 0.75) \mu\text{g/L}$ .通过优化胶体金免疫层析试纸条法的 N 蛋白和羊抗鼠二抗的稀释倍数、硝酸纤维素(NC)膜种类等条件,得到该方法的可视检测限(vLOD)和临界值分别为  $62 \mu\text{g/L}$  和  $500 \mu\text{g/L}$ .两种方法皆可在 10 min 左右得出结果,可以作为早期筛查的重要手段.本研究建立的两种新型冠状病毒抗原快速检测方法在 SARS-CoV-2 的早期检测、预防和控制领域具有良好的应用前景.

**关键词:** 新型冠状病毒; 快速检测; 酶联免疫; 免疫层析; 胶体金

中图分类号: Q814.9; R446.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(2022)04-0023-07

## Development of Immunoassay for SARS-CoV-2 Determination

JIANG Sisi<sup>1</sup>, LIU Junwei<sup>2</sup>, LU Yang<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China;

2. Tianjin International Joint Academy of Biomedicine, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** Nucleic acid testing is the primary test for the novel coronavirus (SARS-CoV-2). However, due to its complex experimental steps, long detection time and high experimental requirements, we developed two immune detection methods with convenient and efficient as an important supplement to nucleic acid detection. In our study, novel coronavirus nucleocapsid protein (N protein) was extracted as antigen to prepare monoclonal antibodies with high specificity, and indirect competitive ELISA method and colloidal gold immunochromatographic strip method for N protein were established. The sensitivity  $IC_{50}$  and the minimum detection limit  $IC_{15}$  of the indirect competitive ELISA method were respectively  $(22.16 \pm 1.77) \mu\text{g/L}$  and  $(0.31 \pm 0.75) \mu\text{g/L}$  by optimizing the encapsulation amount of N protein, dilution ratio of antibody and pH of dilution solution. The visual detection limit (vLOD) and critical value of colloidal gold immunochromatographic test strip method were respectively  $62 \mu\text{g/L}$  and  $500 \mu\text{g/L}$  by optimizing the dilution ratio of N protein and sheep anti-rat secondary antibody, nitrocellulose (NC) membrane type and other conditions. Moreover, the results could be obtained in about 10 min, which can be used as an important means of early screening. Therefore, our two immunological methods for rapid detection of novel coronavirus antigens have important reference value for early detection, prevention and control of SARS-CoV-2.

**Key words:** novel coronavirus; rapid detection; enzyme-linked immunization; immunochromatography; colloidal gold

与其他常见的呼吸道传播病原体相比,新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的潜伏期更长、传染性更强,早

诊断、早发现、早隔离仍然是疫情防控的关键<sup>[1-2]</sup>. 现在以具有高特异性、高灵敏度等特点的核酸检测作为

收稿日期: 2022-02-25; 修回日期: 2022-04-07

基金项目: 天津科技大学新型冠状病毒防治科研攻关项目(2020STCV0026)

作者简介: 江思思(1998—),女,广东人,硕士研究生;通信作者: 陆 旸,副教授, luyang@tust.edu.cn

新型冠状病毒的主要检测手段<sup>[3]</sup>,但由于 RNA 不太稳定,容易降解,所以对样品的采集、运输及提取要求很高;另外,还存在检测时间长、实验条件依赖度高问题.就检测时间而言,仅 PCR 温度改变的过程就需要 2h,加上样本处理的时间,整个检测过程需几小时甚至更长时间.就实验条件而言,核酸检测需要专用的 PCR 仪和专业实验人员,并且要在安全等级至少为 2 级的生物安全实验室进行检测<sup>[4]</sup>.

酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)是免疫学与酶学相结合的免疫分析方法.抗原与抗体特异性结合,并在酶的高效催化下,使该方法具有较高的特异性和灵敏度.同时,ELISA 实验操作简单,实验要求不高,可在普通实验室内检测,2h 内出检测结果,在食品安全、临床医学、微生物及病毒检测等多个领域被广泛运用<sup>[4-6]</sup>.免疫层析技术(lateral flow assay, LFA),又称为侧向层流技术,是一种以毛细作用为驱动力的快速检测方法<sup>[7-8]</sup>.其中以纳米材料胶体金作为免疫标记的免疫层析法操作简单,具有耗时短、价格低廉、结果稳定等特点,可在 10~15 min 内出结果,易于进行商品化和标准化,常用于快速诊断和现场检测,是 LFA 中运用最广泛的方法<sup>[9-10]</sup>.相较于核酸检测,以免疫学为基础的 ELISA 和 LFA 检测方法具有检测时间短、操作步骤简单和实验要求低等特点,逐渐成为一种重要的检测手段<sup>[4]</sup>.

SARS-CoV-2 是正链 RNA 冠状病毒,有 4 种结构蛋白<sup>[11-12]</sup>,其中核衣壳蛋白(N 蛋白)因高度保守且有良好的免疫原性,常用于检测新型冠状病毒的单克隆抗体制备<sup>[13-14]</sup>.因此,本文将 N 蛋白作为抗原制备出特异性高的单克隆抗体并建立了间接竞争 ELISA 法和胶体金免疫层析试纸条法,用于快速检测 SARS-CoV-2 的 N 蛋白.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 动物与细胞

含有新型冠状病毒重组 N 蛋白基因序列的大肠杆菌(*E. coli*) BL21 (DE3) 菌株,天津国际生物医药研究院;雌性 Balb/c 免疫小鼠,天津市奥易德实验用品有限公司;SP2/0 骨髓瘤细胞,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司.

#### 1.1.2 试剂与仪器

二甲基亚砜,德国 Merck 公司;脱脂乳粉,美国

BD 公司;牛血清白蛋白(BSA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、柠檬酸、 $\beta$ -糊精、过氧化氢脲、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、三羟甲基氨基甲烷(THAM)、聚乙二醇(PEG, 50%)、PEG 200、PEG 20000、氯金酸、柠檬酸三钠、聚乙烯吡咯烷酮(PVP),美国 Sigma 公司;HRP-羊抗鼠 IgG 酶标二抗(羊抗鼠二抗)、酶标稀释液,美国 Promega 公司;DMEM 低糖培养基、胎牛血清、HAT 选择性培养基、HT 选择性培养基,美国 Gibco 公司;卡那霉素、IPTG 诱导剂、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、咪唑、石蜡油、红细胞裂解液,北京索莱宝生物科技有限公司;酵母提取物、胰蛋白胨,北京酷来博科技有限公司;Triton X-100,生工生物工程(上海)股份有限公司;其他化学试剂均为分析纯试剂,国药集团化学试剂有限公司.

超声波破碎细胞机,上海秉越电子仪器有限公司;亲和层析镍柱,北京索莱宝生物科技有限公司;酶标仪、紫外分光光度计、CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、-80 °C 冰箱、细胞培养板、25 cm<sup>2</sup> 细胞培养瓶,美国 Thermo 公司;冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司;高压灭菌锅,日本 Hirayama 公司;倒置显微镜,日本 Nikon 公司;双维往复划膜仪、微电脑自动斩切机,上海金标生物科技有限公司;型号为 CN140 和 CN95 的硝酸纤维素(NC)膜,德国 Sartorius 公司;型号为 HF180 的 NC 膜,美国 Millipore 公司;型号为 NC90 的 NC 膜,美国 Pall 公司.

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 重组抗原 N 蛋白的表达与纯化

将大肠杆菌 BL21 (DE3) 进行平板划线培养,37 °C 培养过夜获得单克隆菌落.将单克隆菌落移至 800 mL 的 LB 培养基中,37 °C 振荡扩大培养.在菌液中加入 800  $\mu$ L 1 mmol/L IPTG 诱导剂,16 °C 继续培养 18 h 进行蛋白质的表达;表达完成后将菌液离心并收集菌落,用缓冲液(20 mmol/L HEPES、150 mmol/L NaCl、5% 甘油, pH 7.5)将沉淀悬浮,-20 °C 保存.

用超声破碎机将已表达的菌体破碎至澄清透明并离心,将离心后的上清液加到已平衡好的镍柱中,4 °C 振荡结合 4~5 h.用洗脱液(20 mmol/L HEPES、150 mmol/L NaCl、5% 甘油、100 mmol/L 咪唑, pH 7.5)洗脱杂质蛋白,用洗脱液(20 mmol/L HEPES、150 mmol/L NaCl、5% 甘油、500 mmol/L 咪唑, pH 7.5)洗脱目的蛋白.将目的蛋白转移到超滤管中,加入一定量 0.01 mol/L PBS 缓冲液,离心超滤 60 min

进行换液浓缩;收集上层液体,即为 N 蛋白. 用 BCA 试剂盒测定 N 蛋白的质量浓度并进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)实验,用 Image J 对凝胶图进行灰度分析,计算其纯度.

### 1.2.2 N 蛋白单克隆抗体的制备

选用精神状态良好、生长正常的 10 周龄 Balb/c 雌性小鼠 5 只,将上述纯化的重组 N 蛋白作为免疫抗原,用 0.9% 生理盐水进行稀释后,与佐剂等体积混合,充分乳化后对小鼠进行腹腔注射免疫. 每次免疫间隔两周,共免疫 4 次,用间接 ELISA 法测定小鼠免疫血清的效价. 选择效价最高的小鼠进行冲刺免疫,3 d 后取其脾细胞,在 PEG 200 的作用下与骨髓瘤细胞进行细胞融合. 用 HAT 选择性培养基筛选杂交瘤细胞,选出 450 nm 处吸光度( $A_{450}$ )最高的杂交瘤细胞株制备单克隆抗体. 本文采用正辛酸-饱和硫酸铵沉淀法对小鼠腹水进行纯化.

### 1.2.3 间接竞争 ELISA 法

用 0.05 mol/L 碳酸钾溶液稀释 N 蛋白后加到酶标板中,每孔 100  $\mu$ L, 4  $^{\circ}$ C 过夜;弃孔中液体,用 0.01 mol/L PBST 洗板 3 次后,每孔加入含 0.5% 脱脂乳粉的封闭液 200  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h 进行封闭,洗板 3 次;每孔加入样品溶液 50  $\mu$ L、N 蛋白单克隆抗体 50  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 h,洗板 4 次;加入已稀释 10 000 倍的羊抗鼠二抗,每孔 100  $\mu$ L, 37  $^{\circ}$ C 孵育 30 min,洗板 5 次;加入底物液,每孔 100  $\mu$ L,显色,37  $^{\circ}$ C 反应 15 ~ 30 min;加入终止液,每孔 50  $\mu$ L,终止显色,利用酶标仪测定  $A_{450}$ . 按照式(1)计算小鼠抗体的抑制率,并绘制抑制曲线.

$$\text{抑制率} = \frac{A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $A_{\text{对照}}$  为加 50  $\mu$ L 抗体和 50  $\mu$ L PBS 缓冲液的  $A_{450}$ ,  $A_{\text{测定}}$  为加 50  $\mu$ L 抗体和 50  $\mu$ L N 蛋白的  $A_{450}$ ,  $A_{\text{空白}}$  为加 100  $\mu$ L PBS 缓冲液的  $A_{450}$ .

对 N 蛋白包被量、抗体稀释倍数、稀释液 pH 及封闭条件进行优化,用最优条件参数进行实验,建立标准曲线.

### 1.2.4 胶体金免疫层析试纸条法

通过柠檬酸三钠还原法制备胶体金,将胶体金与 N 蛋白单克隆抗体相连制备金标抗体,以此作为试纸条实验的探针. 将羊抗鼠二抗和 N 蛋白分别作为质控线(C 线)和检测线(T 线)包被在 NC 膜上,37  $^{\circ}$ C 烘干后组装并切割试纸条. 将适量的金标探针与 100  $\mu$ L 0.01 mol/L PBS 缓冲液混匀后滴到样品垫上,

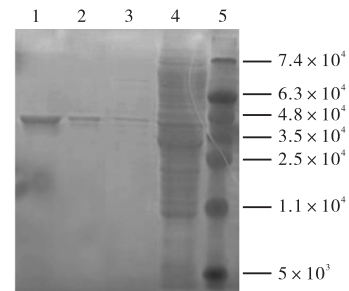
10 min 后观察结果. 胶体金免疫层析试纸条法采用竞争法检测新型冠状病毒 N 蛋白,样品中的新型冠状病毒 N 蛋白与 T 线上的 N 蛋白竞争金标抗体,导致 T 线上的颜色与样品中 N 蛋白浓度成反比.

对实验条件中的羊抗鼠二抗和 N 蛋白的稀释倍数、NC 膜种类、碳酸钾溶液和抗体的添加量、上样缓冲液的种类及 pH 进行优化,用最优条件参数进行试纸条实验,确定可视检测限(vLOD)和临界值.

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组抗原 N 蛋白的鉴定

超滤后 N 蛋白的(SDS-PAGE)电泳分析图如图 1 所示.



1. 超滤后的 N 蛋白; 2. 500 mmol/L 咪唑洗脱液; 3. 100 mmol/L 咪唑洗脱液; 4. 超声破碎后的全菌液; 5. marker

图 1 超滤后 N 蛋白的 SDS-PAGE 电泳分析图

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of N protein after ultrafiltration

超滤后蛋白质的相对分子质量约为  $4.7 \times 10^4$ , 已知新型冠状病毒 N 蛋白含有 419 个氨基酸, 相对分子质量约为  $4.74 \times 10^4$ <sup>[15]</sup>, 由此可以确定成功制备出 N 蛋白. 用 Image J 对凝胶图进行灰度分析, 计算出 N 蛋白的纯度为 90% 左右, 用 BCA 试剂盒测定其质量浓度为 0.5 mg/mL.

### 2.2 N 蛋白单克隆抗体的制备

#### 2.2.1 小鼠免疫血清效价的测定

三免和四免后 1 周, 对 5 只小鼠采血并测定其免疫血清的效价, 结果见表 1.

表 1 三免和四免后免疫血清效价的测定结果

Tab. 1 Results of immune serum titer after the third and fourth immunization

小鼠编号	三免后免疫血清的效价	四免后免疫血清的效价
1	1 : $1.28 \times 10^5$	1 : $5.12 \times 10^5$
2	1 : $1.28 \times 10^5$	1 : $2.56 \times 10^5$
3	1 : $1.28 \times 10^5$	1 : $2.56 \times 10^5$
4	1 : $6.4 \times 10^4$	1 : $1.28 \times 10^5$
5	1 : $6.4 \times 10^4$	1 : $2.56 \times 10^5$

由表 1 可知: 每只小鼠在免疫后, 其免疫血清效价都提高了, 其中 1 号小鼠在四免后免疫血清的效价最高, 为  $1 : 5.12 \times 10^5$ , 故选用 1 号小鼠进行细胞融合实验.

2.2.2 细胞融合及筛选

将免疫血清效价最高的小鼠的脾细胞与骨髓瘤细胞进行融合并经过 3 次筛选, 选出 3 株效价最高的细胞株 1F5、2B3 和 2G3 进行两次亚克隆, 结果见表 2. 由表 2 可知: 2G3 两次亚克隆的阳性比率都低于 50%, 不能稳定地产生抗体, 而 1F5 和 2B3 这两株细胞株, 两次亚克隆的阳性比率都高于 90%, 故选取这两株细胞所克隆的并且效价最高的单克隆细胞株 (编号分别为 1F57A6G、2B39F2B) 进行后续扩大培养并制备单克隆抗体.

表 2 筛选细胞的两次亚克隆结果

Tab. 2 Results of two subclones of screened cells

细胞株 编号	第 1 次		第 2 次	
	阳性孔数/个	阳性比率/%	阳性孔数/个	阳性比率/%
1F5	88	91.7	93	96.8
2B3	94	97.9	95	99.0
2G3	23	24.0	34	35.4

2.2.3 单克隆抗体效价的测定

以每孔  $1 \mu\text{g}$  的 N 蛋白包被量, 用质量浓度均为  $8 \text{ mg/mL}$  的 2B39F2B 和 1F57A6G 两种单克隆抗体通过间接 ELISA 法测定其效价, 结果见表 3. 当  $A_{450}$  为  $0.8 \sim 1.2$  时, 2B39F2B 对应的效价为  $1 : 1.024 \times 10^6$ , 比 1F57A6G 的效价 ( $1 : 5.12 \times 10^5$ ) 更高, 说明 2B39F2B 中特异性抗体的浓度更高, 故选用 2B39F2B 用于后续的实验.

表 3 纯化后单克隆抗体效价的测定结果

Tab. 3 Determination results of titer of purified monoclonal antibody

细胞株编号	$A_{450}$	效价
1F57A6G	0.932	$1 : 5.12 \times 10^5$
2B39F2B	1.031	$1 : 1.024 \times 10^6$

2.3 间接竞争 ELISA 法的建立

2.3.1 N 蛋白包被量及抗体稀释倍数的确定

分别选取 6 个不同的孔包被量  $0.01$ 、 $0.02$ 、 $0.05$ 、 $0.1$ 、 $0.2$ 、 $0.5 \mu\text{g}$ , 再分别选取 9 个不同的 N 蛋白单克隆抗体稀释倍数  $7.5 \times 10^4$ 、 $1.5 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $7 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ , 采用棋盘法组合不同包被量和抗体稀释倍数. 用间接 ELISA 法测定其  $A_{450}$ , 选择  $A_{450}$  在  $1.0$  附近的组合并通过标准曲线计算  $IC_{50}$ . 包被量及抗体稀释倍数优化结果见表

4. 当包被量由每孔  $0.1 \mu\text{g}$  升至每孔  $0.5 \mu\text{g}$  时, 抗体稀释倍数和  $IC_{50}$  逐渐增大, 这可能是由于包被过量形成多层抗原吸附, 在操作过程中抗原可能会发生脱落而降低了灵敏度. 当包被量由每孔  $0.1 \mu\text{g}$  降至每孔  $0.01 \mu\text{g}$  时, 抗体稀释倍数逐渐降低,  $IC_{50}$  却逐渐增大, 这可能是由于包被量太低导致显色不稳定. 当包被量为每孔  $0.1 \mu\text{g}$  时, 显色较为稳定, 且  $IC_{50}$  最低, 因此选择每孔  $0.1 \mu\text{g}$  的包被量和  $1 : 2 \times 10^6$  的抗体稀释倍数为最佳优化条件.

表 4 包被量及抗体稀释倍数优化结果

Tab. 4 Optimization results of coating amount and antibody dilution ratio

每孔包被量/ $\mu\text{g}$	抗体稀释倍数	$A_{450}$	$IC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
0.01	$1 : 1.5 \times 10^5$	0.945	33.27
0.02	$1 : 3 \times 10^5$	1.033	31.78
0.05	$1 : 1 \times 10^6$	1.177	28.43
0.1	$1 : 2 \times 10^6$	0.958	23.04
0.2	$1 : 4 \times 10^6$	0.998	36.24
0.5	$1 : 7 \times 10^6$	1.132	42.43

2.3.2 封闭液的优化

封闭液的作用是封闭酶标板上未被蛋白质包被的孔, 减少实验误差. 选取质量分数分别为  $0.5\%$  和  $1\%$  的脱脂乳粉和 BSA 制备封闭液进行实验, 结果见表 5.

表 5 封闭液优化结果

Tab. 5 Optimization results of blocking buffer

封闭液	$A_{450}$	$IC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
0.5% 脱脂乳粉	0.993	24.60
1.0% 脱脂乳粉	0.962	31.08
0.5% BSA	0.925	34.15
1.0% BSA	0.903	38.42

由表 5 可知: 脱脂乳粉对应的  $IC_{50}$  都低于 BSA 对应的  $IC_{50}$ , 表明脱脂乳粉的封闭效果优于 BSA. 通常由于 BSA 中只有单一的蛋白质, 抗体与之结合发生交叉反应的概率很低; 而脱脂乳粉有更多种类的蛋白质, 且存在脱脂不完全的可能, 未完全去除的脂质会影响蛋白质与酶标板底孔的结合, 进而影响封闭效果. 然而, 实验中脱脂乳粉的封闭效果优于 BSA, 其可能原因: 一是因为所购买的脱脂乳粉脱脂完全; 二是 N 蛋白单克隆抗体特异性很好, 不会与脱脂乳粉发生交叉反应; 三是脱脂乳粉中含有更多种类的非特异性蛋白, 具有更好的封闭作用.  $0.5\%$  脱脂乳粉对应的  $IC_{50}$  为  $24.60 \mu\text{g/L}$ , 低于  $1.0\%$  脱脂乳粉所对应的  $IC_{50}$  ( $31.08 \mu\text{g/L}$ ). 这可能是因为封闭液浓度过高, 在一定程度上会阻挡抗原的结合表位, 影响抗体与抗原的结合, 导致灵敏度降低, 故选择  $0.5\%$  脱脂乳粉为最

佳封闭条件.

### 2.3.3 稀释液 pH 的优化

选取 pH 为 5.7、7.4 和 8.5 的 PBS 进行间接竞争 ELISA 实验, 稀释液 pH 优化结果见表 6. 结果表明: 当稀释液 pH 为酸性或碱性时, 其  $IC_{50}$  都比 pH 为中性时高, 检测的灵敏度下降. 其原因可能是酸/碱条件抑制了蛋白质的活性或使其发生变性, 影响抗体捕获抗原的灵敏度以及酶促反应的效果<sup>[16]</sup>, 故选稀释液 pH 7.4 为最佳实验条件.

表 6 稀释液 pH 优化结果

Tab. 6 Optimization results of pH of solution

稀释液 pH	$A_{450}$	$IC_{50}/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$
5.7	0.916	30.29
7.4	0.990	22.16
8.5	0.932	81.67

### 2.3.4 N 蛋白间接竞争 ELISA 标准曲线的绘制

通过上述实验的优化后, 用 N 蛋白单克隆抗体建立的间接竞争 ELISA 法最佳条件为: 包被量为每孔  $0.1\ \mu\text{g}$ , 抗体稀释  $2 \times 10^6$  倍, 用 0.5% 脱脂乳粉制备封闭液, 酶标稀释液二抗稀释  $2 \times 10^5$  倍, 用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液稀释抗体和标准品. 在最优条件下进行间接竞争 ELISA 实验, 绘制其标准曲线如图 2 所示, 该方法的灵敏度  $IC_{50}$  为  $(22.16 \pm 1.77)\ \mu\text{g}/\text{L}$ , 检测限  $IC_{15}$  为  $(0.31 \pm 0.75)\ \mu\text{g}/\text{L}$ .

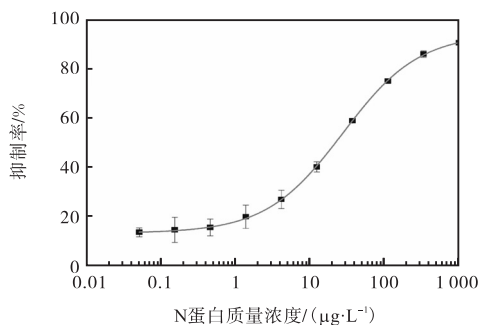


图 2 N 蛋白间接竞争 ELISA 标准曲线

Fig. 2 Standard curve of N protein by indirect competitive ELISA

## 2.4 胶体金免疫层析试纸条法的建立

### 2.4.1 胶体金的制备

通过柠檬酸三钠还原法制备胶体金, 溶液呈酒红色, 均匀透亮, 无沉淀和杂质. 用酶标仪设置紫外分光波长  $400 \sim 600\ \text{nm}$  扫描胶体金溶液的吸收峰, 其最高吸收峰对应波长为  $519\ \text{nm}$  (图 3), 参考文献<sup>[17]</sup>制备出的胶体金颗粒直径约为  $17\ \text{nm}$ .

### 2.4.2 羊抗鼠二抗和 N 蛋白稀释倍数的选择

将羊抗鼠二抗和 N 蛋白用 PBS 缓冲液分别稀释

一定倍数后划在 NC 膜上, 进行免疫层析实验, 结果见表 7.

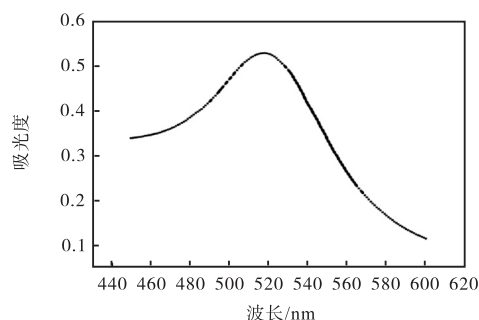


图 3 胶体金紫外分光扫描波长图谱

Fig. 3 UV scanning wavelength spectrum of colloidal gold

### 表 7 羊抗鼠二抗和 N 蛋白稀释倍数的选择

Tab. 7 Optimization of goat anti-mouse secondary antibody and N protein dilution ratio

N 蛋白稀释 倍数	羊抗鼠二抗稀释倍数		
	1 : 10	1 : 20	1 : 30
1 : 5	C+++/T+++	C+/T+++	C+/T+++
1 : 10	C+++/T++	C++/T++	C+/T++
1 : 15	C+++/T+	C+/T+	C+/T+

注: C 表示质控线; T 表示检测线; + 表示有颜色, + 越多表示颜色越深

当羊抗鼠二抗和 N 蛋白的稀释倍数分别大于 20 和 10 时, 出线颜色太浅; 当羊抗鼠二抗和 N 蛋白的稀释倍数分别小于 20 和 10 时, 出线颜色过深; 当羊抗鼠二抗和 N 蛋白分别稀释 20 倍和 10 倍时, 出线颜色基本一致且适中. 因此, 选择羊抗鼠二抗稀释 20 倍、N 蛋白稀释 10 倍作为最佳稀释条件.

### 2.4.3 NC 膜的优化

选 Sartorius 公司型号 CN140 和型号 CN95、Millipore 公司型号 HF180 和 Pall 公司型号 NC90 的 NC 膜分别组装成试纸条进行实验, 结果如图 4 所示.

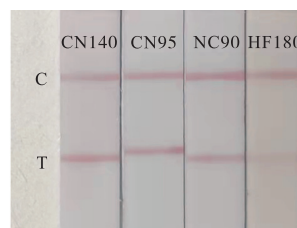


图 4 NC 膜的优化

Fig. 4 Optimization of different NC membrane

由图 4 可知: NC90 和 HF180 对应的 C 线颜色深于 T 线, 且 HF180 有背景干扰, 使显色不清晰; CN140 和 CN95 对应的 C 线与 T 线颜色基本一致, 但 CN95 的背景更干净, 显色更清晰, 故选择 CN95

型号的 NC 膜作为最佳实验条件.

#### 2.4.4 碳酸钾溶液添加量的优化

酸碱度对胶体金与抗体的标记至关重要,添加不同量的  $K_2CO_3$  溶液可以调节胶体金与抗体结合过程的 pH,结果如图 5 所示.当  $K_2CO_3$  溶液添加量大于  $5\mu L$  时,C 线、T 线颜色逐渐变浅,这可能是因为此时溶液的 pH 高于抗体的等电点,使抗体与胶体金之间的电荷发生排斥而限制两者的吸附.当  $K_2CO_3$  溶液添加量小于  $5\mu L$  时,C 线略浅于 T 线,这可能是因为此时溶液的 pH 低于抗体的等电点,使胶体金发生凝集作用<sup>[18]</sup>.当  $K_2CO_3$  溶液添加量为  $5\mu L$  时,C 线、T 线颜色基本一致且清晰,这是因为此时溶液的 pH 呈中性,使抗体与胶体金颗粒之间的静电作用最小、疏水作用较大,抗体能充分与胶体金颗粒稳定结合.故选  $5\mu L$  作为  $K_2CO_3$  溶液最佳添加量.

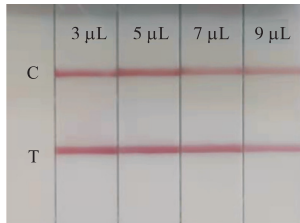


图 5 碳酸钾溶液添加量的优化

Fig. 5 Optimization of different volume of  $K_2CO_3$  solution

#### 2.4.5 抗体添加量的优化

在  $K_2CO_3$  溶液添加  $5\mu L$  条件下,添加不同量的 N 蛋白单克隆抗体与胶体金结合,结果如图 6 所示.当抗体添加量为  $1\mu L$  时,C 线、T 线颜色很浅,这是因为抗体添加量过少,胶体金与抗体未充分结合.当抗体添加量大于  $3\mu L$  时,C 线与 T 线颜色基本一致,且不再发生变化,这说明当抗体添加量为  $3\mu L$  时,胶体金与蛋白质结合已经处于饱和状态.考虑到添加过多的抗体会降低方法的灵敏度并提高成本,抗体最佳添加量选择  $3\mu L$ .

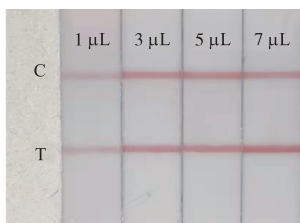


图 6 抗体添加量优化

Fig. 6 Optimization of different volume of antibody

#### 2.4.6 上样缓冲液种类的优化

不同的缓冲液影响金标抗体与 C 线、T 线的反

应,进而影响 C 线、T 线出线颜色.选取  $100\mu L$  pH 为 7.4 的 PB、PBS、PBST、BB 作为上样缓冲溶液,与金标抗体混匀后按照上述已优化的实验条件进行试纸条实验,结果如图 7 所示.当缓冲液为 PB 和 BB 时,C 线、T 线颜色较浅;当缓冲液为 PBST 时,C 线略浅于 T 线;当缓冲液为 PBS 时,C 线、T 线颜色基本一致且颜色适中,故选择 PBS 为最佳缓冲液种类.

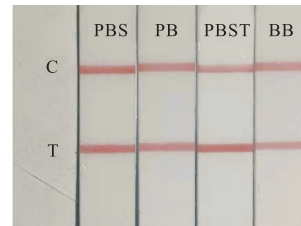


图 7 上样缓冲液种类的优化

Fig. 7 Optimization of different solution buffer

#### 2.4.7 上样缓冲液 pH 的优化

将最优上样缓冲液的 pH 调节为 5.7、7.4 和 8.5,与金标抗体混匀后按照上述已优化的实验条件进行试纸条实验,结果如图 8 所示.当 pH 为 5.7 时,C 线略浅于 T 线;当 pH 为 8.5 时,C 线略深于 T 线;当 pH 为 7.4 时,C 线、T 线颜色基本相同.这可能是由于过酸或过碱的环境都会影响蛋白质的活性,使蛋白质之间不能有效结合,当 pH 为 6~8 时更有利于蛋白质的结合<sup>[16]</sup>,故选择 pH 为 7.4 的上样缓冲液作为最佳条件.

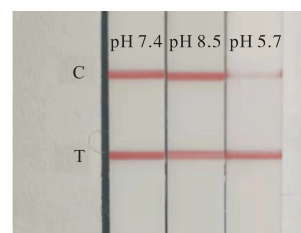


图 8 上样缓冲液 pH 的优化

Fig. 8 Optimization of different pH of PBS buffer

#### 2.4.8 胶体金免疫层析试纸条检测限的确定

取  $100\mu L$  上样缓冲液将 N 蛋白溶液稀释为 31、62、125、250、500、1 000  $\mu g/L$ ,与探针混合后按照上述已优化的实验条件进行实验,结果如图 9 所示.

当待测 N 蛋白质量浓度为  $500\mu g/L$  时,T 线完全消失,故本方法的临界值为  $500\mu g/L$ ;当待测 N 蛋白质量浓度为  $62\mu g/L$  时,T 线比 C 线略浅一点.故本方法的可视检测限为  $62\mu g/L$ .

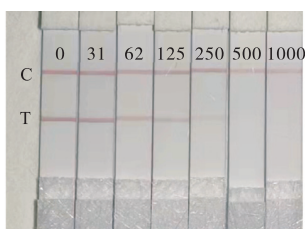


图9 胶体金免疫层析试纸条检测限的确定

Fig. 9 Detection limit of colloidal gold-labeled immunochromatographic test strips

### 3 结论

本研究以新型冠状病毒抗原为检测目标物建立了两种免疫检测方法. 间接竞争 ELISA 法的最优条件为: N 蛋白包被量为每孔 0.1  $\mu\text{g}$ , 单克隆抗体稀释  $2 \times 10^6$  倍, 用 0.5% 脱脂乳粉制备封闭液, 酶标稀释液二抗稀释  $2 \times 10^5$  倍. 在 pH 7.4 环境下, 该方法的灵敏度  $\text{IC}_{50}$  为  $(22.16 \pm 1.77) \mu\text{g/L}$ , 检测限  $\text{IC}_{15}$  为  $(0.31 \pm 0.75) \mu\text{g/L}$ . 胶体金免疫层析试纸条法的最优条件为: 羊抗鼠二抗稀释 20 倍, N 蛋白稀释 10 倍, 用 Sartorius 公司 CN95 型号的 NC 膜, 单克隆抗体添加量为 3  $\mu\text{L}$ , 碳酸钾溶液添加量为 5  $\mu\text{L}$ , pH 7.4 的 PBS 缓冲液作为上样缓冲液. 该方法可视检测限 (vLOD) 为 62  $\mu\text{g/L}$ , 临界值为 500  $\mu\text{g/L}$ , 可在 10 min 左右测出结果. 两种免疫学方法对 SARS-CoV-2 的 N 蛋白进行快速检测, 可作为核酸检测的重要辅助手段.

#### 参考文献:

- [1] PRATHER K A, WANG C C, SCHOOLRY R T. Reducing transmission of SARS-CoV-2[J]. Science, 2020, 368(6498): 1422-1424.
- [2] NIU Y, XU F J. Deciphering the power of isolation in controlling COVID-19 outbreaks[J]. The lancet global health, 2020, 50(6): 885.
- [3] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版修订版)的通知[EB/OL]. [2022-02-24]. [http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-04/15/content\\_5599795.html](http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-04/15/content_5599795.html).
- [4] 肖闪, 于涛. 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)快速诊断技术的研究现状[J]. 分析实验室, 2021, 40(7): 745-760.
- [5] 张强. ELISA 技术在食品安全检测中的应用研究进展[J]. 长江大学学报, 2015, 12(33): 45-49.
- [6] 郝江燕, 胡文忠, 冯叙桥, 等. 食品中大肠杆菌生物检测方法的研究进展[J]. 食品工业科技, 2013, 13: 370-375.
- [7] BOISEN M L, OOTTAMASATHIEN D, JONES A B, et al. Development of prototype filovirus recombinant antigen immunoassays[J]. Journal of infectious diseases, 2015, 212(S2): 359-367.
- [8] KOCZULA K M, GALLOTTA A. Lateral flow assays[J]. Essays in biochemistry, 2016, 60(1): 111-120.
- [9] 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: 154-160.
- [10] 樊淑华, 王永立. 胶体金免疫层析技术应用研究进展[J]. 动物医学进展, 2014, 35(10): 99-103.
- [11] KIM D, LEE J Y, YANG J S, et al. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome[J]. Cell, 2020, 181(4): 914-921.
- [12] ZHOU P, YANG X L, SHI Z L, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin[J]. Nature, 2020, 579(7798): 270-273.
- [13] DAN L, FENG W, YU C, et al. Comparative research on nucleocapsid and spike glycoprotein as the rapid immunodetection targets of COVID-19 and establishment of immunoassay strips[J]. Molecular immunology, 2021, 131: 6-12.
- [14] WOO J, LEE E Y, LEE M, et al. An in vivo cell-based assay for investigating the specific interaction between the SARS-CoV N-protein and its viral RNA packaging sequence[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2019, 520(3): 499-506.
- [15] ZENG W, LIU G, MA H, et al. Biochemical characterization of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2020, 527(3): 618-623.
- [16] 张雄鹰, 樊卫平. 微生物学与免疫学[M]. 2 版. 北京: 中国医药科技出版社, 2021: 92-93.
- [17] 贺昕, 熊晓东, 梁敬博, 等. 免疫检测用纳米胶体金的制备及粒径控制[J]. 稀有金属, 2005, 29(4): 471-474.
- [18] 张改平. 免疫层析试纸条快速检测技术[M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2015: 118-119.

责任编辑: 郎婧