



# 光激化学发光免疫分析技术在仙台病毒检测中的应用

常 慧<sup>1</sup>, 高 伟<sup>2</sup>, 张江义<sup>2</sup>, 向志光<sup>1</sup>, 魏 强<sup>1</sup>

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学实验动物研究所, 北京 100021; 2. 北京市中关村医院, 北京 100190)

**【摘要】** 目的 应用光激化学发光免疫分析技术(AlphaLISA)建立仙台病毒检测方法。方法 通过方阵实验筛选仙台病毒 AlphaLISA 检测的最佳抗原浓度以及供体微珠与受体微珠的最佳受试浓度及比例,对大鼠血清进行测试,确立血清检测浓度;对40份大鼠血清分别使用 AlphaLISA 检测方法和 ELISA 检测方法进行检测,并对检测结果进行比较。结果 生物素化标记的仙台病毒多肽类抗原的最佳测试浓度为 250 nmol/L,供体微珠与受体微珠的最佳比例为 1:1,使用浓度为 20 μg/mL,在 AlphaLISA 检测方法中大鼠血清测试最佳使用浓度 1:10000;共检测 40 份大鼠血清,ELISA 方法检出阳性 7 份,阳性率为 17.5%,AlphaLISA 方法检出阳性 8 份,阳性率为 20.0%,ELISA 检测阳性的 7 份血清经 AlphaLISA 方法检测均为阳性,AlphaLISA 检出的另外一份样品经 IFA 方法验证为阳性。结论 初步建立了仙台病毒光激化学发光免疫分析技术(AlphaLISA)的检测方法,该方法敏感性堪比经典 ELISA 方法,且血清样本的用量减少,无需洗涤等步骤,在方法的简并性及准确性上有一定优势。

**【关键词】** 仙台病毒;AlphaLISA

**【中图分类号】** R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0058-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.014

## Development of an amplified luminescent proximity homogeneous assay for detecting Sendai virus

CHANG Hui<sup>1</sup>, GAO Wei<sup>2</sup>, ZHANG Jiang-yi<sup>2</sup>, XIANG Zhi-guang<sup>1</sup>, WEI Qiang<sup>1</sup>

(1. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China; 2. Zhongguancun Hospital, Beijing 100190, China)

**【Abstract】 Objective** To establish the amplified luminescent proximity homogeneous assay (AlphaLISA) for the detection of Sendai virus. **Methods** The antigen concentration, serum concentration and the donor beads/acceptor beads ratio used in the AlphaLISA method were optimized by the phalanx experiments, then the antibodies of Sendai Virus in 40 rat sera were detected by the established AlphaLISA method and ELISA detection method. The results were compared and the differentia between the two methods was confirmed by IFA. **Results** The optimum concentration of SV bio-peptide in AlphaLISA assay was 250 nmol/L, the best proportion of donor beads/acceptor beads ratio was 1:1, using the concentration of 20 μg/mL and the serum dilution was 1:10000. 7 of the 40 rat sera were detected SV positive by ELISA, the positive rate was 17.5%, 8 of the 40 rat sera were determined SV positive by AlphaLISA, and the positive rate was 20.0%, the AlphaLISA positive serum was confirmed by IFA. **Conclusions** We preliminary established the Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (AlphaLISA) for the detection of Sendai virus. The sensitivity of the method is comparable to classical ELISA method, but this method use less serum samples and without washing steps. The method has

[基金项目] 协和青年基金和中央高校基本科研业务费专项资金资助(3332013042;33320140015)。

[作者简介] 常慧(1988-),女,硕士,E-mail: changhai9012@163.com。

[通讯作者] 向志光,E-mail: xiangzg@cnilas.org;魏强,E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

some advantages in degeneracy and accuracy.

**【Key words】** Sendai virus; AlphaLISA

仙台病毒(sendai virus, SV)是啮齿类实验动物常见的感染性病原体,对实验动物自身有一定危害<sup>[1]</sup>,同时干扰动物实验研究<sup>[2]</sup>。因此在国内外的实验动物繁殖和使用机构,仙台病毒是啮齿类等实验动物的必需排查的病毒<sup>[3-4]</sup>。

目前,国内外对于仙台病毒的检测多采用血清学的检测方法,包括间接免疫荧光(IFA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)以及多通道荧光免疫分析(multiplexed fluometric immune assay, MFIA)等方法。然而这些方法仍存在问题:仙台病毒天然抗原存在与其他病原体的交叉抗原,影响了检测技术的特异性<sup>[5]</sup>;荧光检测受到激发荧光背景值的影响,影响其特异性和敏感性;在现有的固相免疫和 MFIA 等方法中均存在多次洗涤步骤,增加了检测体系的不确定性。

与仙台病毒全病毒颗粒相比,多肽抗原的敏感性堪比 ELISA 检测方法,其特异性更好,是仙台病毒检测较好的线性抗原<sup>[8]</sup>。

光激化学发光免疫分析技术(amplified luminescent proximity homogeneous assay, AlphaLISA)是近年来新近开发的一种基于增强化学发光的均相免疫检测技术,在其检测体系中存在着 4 类元件:待检样品 B;与待检样品可特异结合的已知纯化制品 A;供体微珠,标记识别 A 分子;受体微珠,标记识别 B 的分子。A 与 B 的特异性识别将供体微珠和受体微珠的距离拉近,用 680 nm 的激光激发供体微珠产生大量的单线态氧分子,这些分子将能量传递到受体微珠,从而诱导其波长 615 nm 的发射峰,光信号的强度在一定范围反映反应体系中 A、B 的特异结合<sup>[6-7]</sup>。

本研究利用前期实验筛选出的多肽抗原<sup>[8]</sup>初步建立了仙台病毒的光激化学发光免疫分析技术(AlphaLISA)检测方法,在方法的简并性及准确性上有一定优势,为进一步研究仙台病毒检测提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料和试剂

AlphaLISA 样品稀释液, AlphaLISA Streptavidin Donor beads, AlphaLISA anti-Rat IgG Acceptor beads, 384 孔微孔板均购于美国 PerkinElmer 公司,检测仪

为美国 PerkinElmer 的 Enspire 多标记微孔板检测系统。

生物素化仙台病毒多肽参照之前方法制备,并增加生物素化标记<sup>[8]</sup>。大鼠阳性血清为仙台病毒免疫血清,大鼠阴性血清为 SPF 大鼠仙台病毒阴性血清。

### 1.2 实验方法

1.2.1 预实验初步确定抗原和血清稀释度 将 AlphaLISA buffer 稀释至工作浓度,作为样品稀释液,选总体积为 20  $\mu$ L。抗原浓度分别为 100 nmol/L, 500 nmol/L 和血清使用浓度 1:100, 1:1000, 供体微珠和受体微珠比例 1:1 进行预实验。

1.2.2 最佳供体微珠和受体微珠比例的确定 用抗原浓度 100 nmol/L, 血清浓度 1:100, 分别用供体受体微珠比例为 4:1, 1:1, 1:2, 1:4 比例进行检测, 分析检测信号值, 确定最适比例。

1.2.3 AlphaLISA 抗原、血清最佳使用浓度的确定 将 AlphaLISA buffer 稀释至工作浓度,作为样品稀释液,选总体积为 20  $\mu$ L。为了确定抗原及血清的最佳使用浓度,将抗原稀释终浓度为 0.75 nmol/L, 7.5 nmol/L, 75 nmol/L, 250 nmol/L, 500 nmol/L; 血清终浓度 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 稀释, 抗原和血清各 5  $\mu$ L, 并作空白对照, 加入 384 孔板中, 同时加入 5  $\mu$ L 浓度为 80  $\mu$ g/mL, 终浓度为 20  $\mu$ g/mL 的受体微珠, 1000 r/min 离心 1 min 后 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 避光加入供体微珠 5  $\mu$ L, 终浓度为 20  $\mu$ g/mL, 1000 r/min 离心 1 min 后 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后置于 Enspire 多标记微孔板检测系统上检测信号值。

1.2.4 ELISA 和 IFA 检测方法 大鼠仙台病毒 ELISA 检测方法参见本实验室制备的仙台病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测方法<sup>[10]</sup>。IFA 方法采用实验动物国家标准推荐方法<sup>[3-4]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 预实验初步确定抗原和血清稀释度

用抗原浓度 100 nmol/L, 血清浓度 1:100 时阳性对照血清和阴性对照血清信号值比值最高。

### 2.2 最佳供体微珠和受体微珠比例的确定

在上述预实验条件下, 分别用供体受体微珠比例为 4:1, 1:1, 1:2, 1:4 进行检测, 在供体受体比例为 1:1 时, 阴性血清信号值最低, 且阳性血清与阴性

血清信号值比值最高,最终确定供体受体比例为 1:1 (20 μg/mL:20 μg/mL) (图 1)。

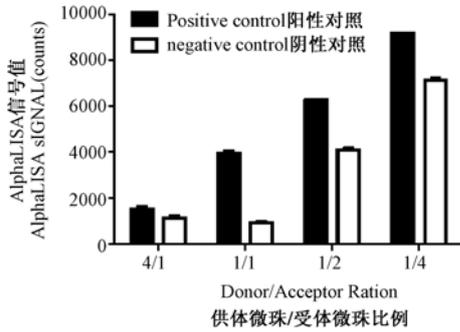
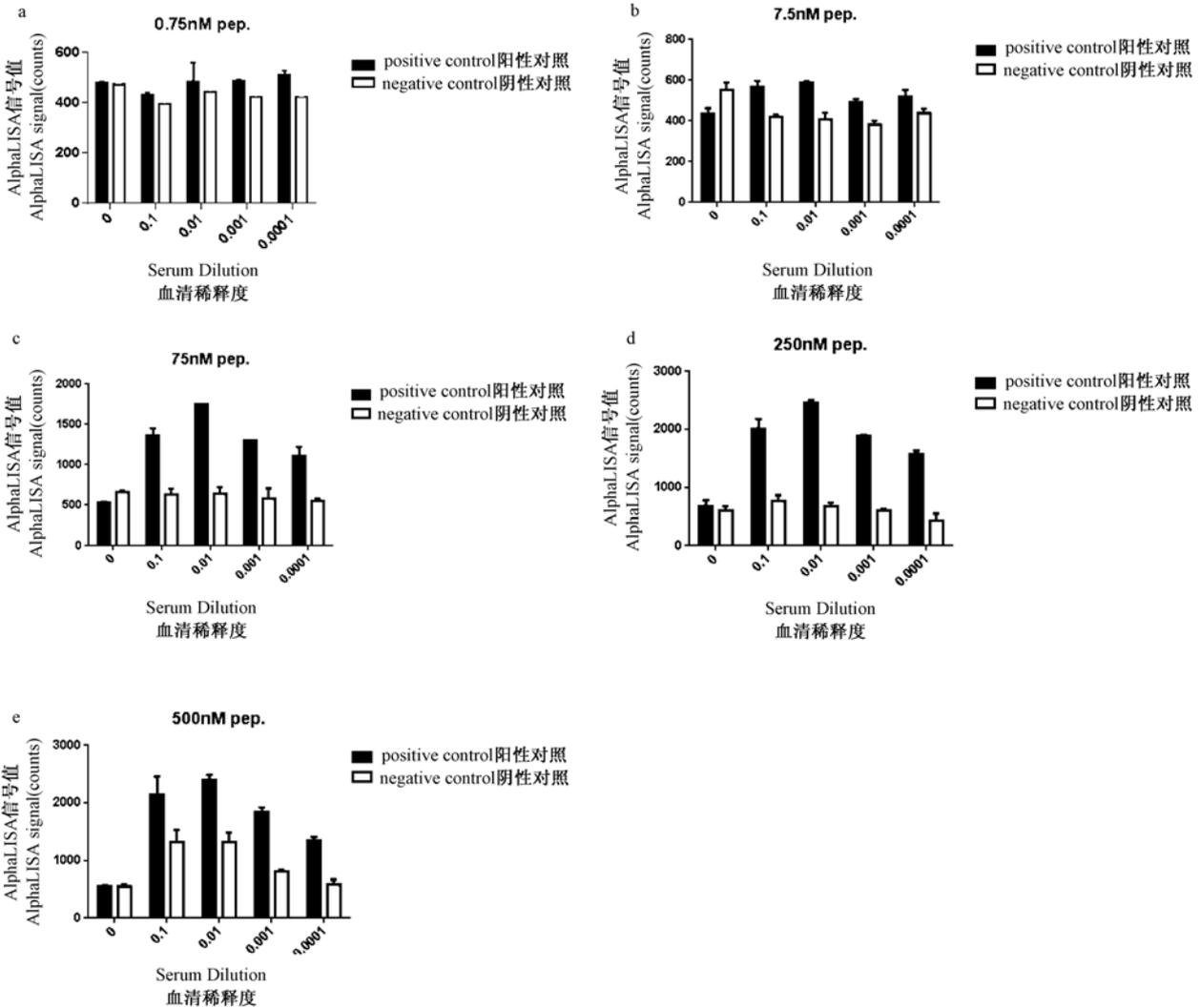


图 1 生物素化仙台病毒多肽 AlphaLISA 供体受体最佳比例的确定

Fig. 1 The optimization of donor/acceptor ratio for SV bio-peptide AlphaLISA assay

### 2.3 最佳抗原使用浓度和最佳血清使用浓度的确定

将抗原稀释终浓度为 0.75 nmol/L, 7.5 nmol/L, 75 nmol/L, 250 nmol/L, 500 nmol/L; 血清终浓度 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 稀释, 比较不同浓度时的信号值。结果显示:在抗原浓度为 75 nmol/L 时, 抗原与阳性血清具有较好的特异性反应, 阴性血清信号值维持在较稳定的水平, 且随着抗原终浓度的增加, 信号值呈上升趋势, 进而优化抗原终浓度为 250 nmol/L, 500 nmol/L, 在抗原终浓度为 500 nmol/L 时, 阴性对照信号值有明显增高, 确定抗原用量终浓度为 250 nmol/L, 250 nmol/L 时, 血清终浓度 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 稀释时, 阳性对照和阴性对照血清信号值比值均在有效范围内, 但是为了减少血清用量, 选择血清终浓度为 1:10000 进行后续实验。



注: 多肽使用浓度为 a. 0.75 nmol/L; b. 7.5 nmol/L; c. 75 nmol/L; d. 250 nmol/L; e. 500 nmol/L。

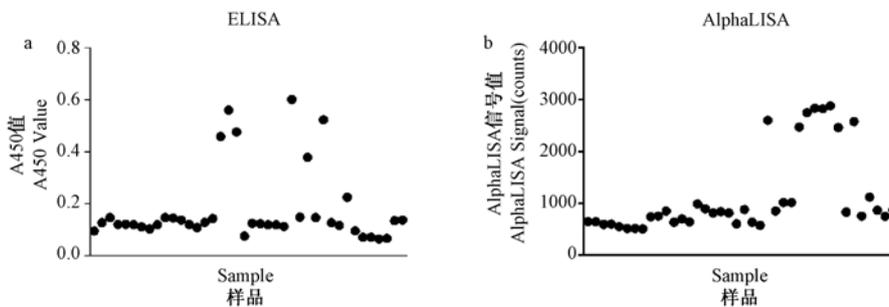
图 2 生物素化仙台病毒多肽 AlphaLISA 最佳抗原和血清使用浓度的确定

Fig. 2 The ptimization of the concentration of antigen and the serum working concentration for SV bio-peptide AlphaLISA assay

### 2.4 AlphaLISA 方法与 ELISA 检测方法的比较

共检测大鼠血清 40 份, ELISA 检测出阳性血清 7 份, 大鼠样品中检出仙台病毒的阳性率为 17.5%, AlphaLISA 检测中, 以检测值/阴性对照值  $\geq 2.1$

判断标准, 检出阳性血清 8 份, 阳性率为 20.0%, ELISA 阳性的 7 份血清经 AlphaLISA 方法检测均为阳性, 如图 3 所示, AlphaLISA 检出的另外一份阳性样品经 IFA 方法验证为阳性。



注: a. ELISA 检测结果; b. AlphaLISA 检测结果。

图 3 ELISA 与 AlphaLISA 检测方法的比较

Fig. 3 The comparison of ELISA and AlphaLISA assay. a. The results of the ELISA assay; b. The results of the AlphaLISA assay

### 3 讨论

AlphaLISA 技术是一种基于微珠的化学发光的新型均相检测技术, 与目前被广泛使用的传统的 ELISA 技术相比具有更高的精确性、灵敏度、均一性、背景低、无需洗涤、广泛的动态检测范围以及样本需求量极少等优点<sup>[5-7]</sup>, AlphaLISA 是均相技术, 无洗涤步骤, 操作简单; 长波长激发, 短波长检测, 减低了反应背景; 单体氧信号强, 灵敏度高; 单个微珠可结合 200~300 个抗体, 可进行低亲和力生物分子的检测, 检测动态范围较宽; 反应体系小, 样品用量少。该技术可用于多种组织、细胞来源的生物分子的检测, 如细胞因子、抗原抗体的检测、蛋白相互作用及蛋白质与核酸相互作用的检测以及药物分析等研究。国外已有使用 AlphaLISA 检测炭疽芽胞杆菌的报道<sup>[7]</sup>。

与仙台病毒全病毒颗粒相比, 多肽抗原的敏感性堪比 ELISA 检测方法, 其特异性更好, 是仙台病毒检测较好的线性抗原<sup>[8-9,11]</sup>。本研究采用生物素化多肽作为抗原, 在对抗原和血清等条件进行优化后, 初步建立了 AlphaLISA 检测技术, 并与 ELISA 检测方法进行了比较研究, 结果显示, 该方法在检测敏感度、简便性上依靠 Alpha 技术特有的均相荧光检测技术较之目前常用的 ELISA 等方法有所提高, 而且减少了血清样本的用量, 不用洗涤等步骤, 和传统方法相比具有一定优势, 为进一步研究仙台病毒检测提供基础。

#### 参考文献:

[ 1 ] Brownstein DG, Winkler S. Genetic resistance to lethal Sendai virus pneumonia; virus replication and interferon production in C57BL/6J and DBA/2J mice[J]. Lab Anim Sci. 1986;36(2):

126-9.  
 [ 2 ] Jakab GJ. Interactions between Sendai virus and bacterial pathogens in the murine lung: a reviews[J]. Lab Anim Sci. 1981;31(2):170-7.  
 [ 3 ] 国家标准: 实验动物 微生物学等级及监测, GB14922.2-2011.  
 [ 4 ] 国家标准: 实验动物 仙台病毒检测方法, GB/T14926.23-2001.  
 [ 5 ] Ito Y, Tsurudome M, Hishiyama M, et al. Immunological interrelationships among human and non-human paramyxoviruses revealed by immunoprecipitation. [J]. J Gen Virol. 1987;68: 1289-97.  
 [ 6 ] Martina BS. AlphaLISA Immunoassay Platform-The “No-Wash” High-Throughput Alternative to ELISA. Assay and Drug Development Technologies [J]. Assay Drug Dev Technol. 2009; 7: 90-92.  
 [ 7 ] Adva M, Noam C, Shay W, et al. A novel homogeneous immunoassay for anthrax detection based on the AlphaLISA method: detection of B. anthracis spores and protective antigen (PA) in complex samples. [J]. Anal Bioanal Chem. 2013; 405:3965-3972.  
 [ 8 ] Xiang Z, Tong W, Li Y, et al. Three unique Sendai virus antigenic peptides screened from nucleocapsid protein by overlapping peptide array[J]. J Virol Methods. 2013;193(2): 348-52.  
 [ 9 ] Blüthner M, Mahler M, Müller DB. Identification of an alpha-helical epitope region on the PM/Scl-100 autoantigen with structural homology to a region on the heterochromatin p25beta autoantigen using immobilized overlapping synthetic peptides [J]. J Mol Med (Berl). 2000; 78(1): 47-54.  
 [ 10 ] 向志光, 佟巍, 李雨函, 等. 大鼠仙台病毒 ELISA、间接免疫荧光和免疫印迹三种检测方法的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2013;23(1):23-26.  
 [ 11 ] Asano A, Torigoe D, Sasaki N. Identification of antigenic peptides derived from B-cell epitopes of nucleocapsid protein of mouse hepatitis virus for serological diagnosis [J]. J Virol Methods. 2011;177:107-11.

[ 修回日期 ] 2015-04-08