



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104090108 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201410347050. 7

(22) 申请日 2014. 07. 21

(71) 申请人 威海威高生物科技有限公司

地址 264209 山东省威海市世昌大道 312 号

(72) 发明人 蒙红胜 刘京伟 林芳芳 王凌凌
赵海英

(74) 专利代理机构 青岛高晓专利事务所 37104
代理人 宋文学

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于免疫诊断技术领域,具体涉及一种微粒子化学发光法乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒及其制备方法。试剂盒由测 PreS1 磁微粒、测 PreS1 示踪结合物、校准品、分析缓冲液、样本稀释液组成,本发明还公开了该定量测定试剂盒的制备方法,其采用的是微粒子化学发光免疫分析技术,比 ELISA 具有更高的灵敏度和特异性,适合于临床乙肝的辅助诊断,填补了国内微粒子化学发光法检测前 S1 抗原检测试剂生产的空白。

1. 一种乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒,包括

- (1) 测 PreS1 磁微粒:标记有 PreS1 单克隆抗体的磁性微粒子;
- (2) 测 PreS1 示踪结合物:标记有另一株 PreS1 单克隆抗体的异鲁米诺;
- (3) 校准品:一低含量前 S1 抗原的溶液和一高含量前 S1 抗原的溶液;
- (4) 分析缓冲液:含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;
- (5) 样本稀释液:含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

2. 一种制备权利要求 1 乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒的方法,其特征是具体步骤如下:

(1) 制备测 PreS1 磁微粒

将带羧基磁微粒与 EDC 按质量比 1 : 2,磁微粒与 PreS1 单克隆抗体的比例为每毫克磁微粒标记 25 μ g 的单抗,在 22~26℃混匀的情况下进行标记,标记时间 1 小时,标记后采用甘氨酸封闭多余的位点,使之浓度达到 25mM,反应 30 分钟,洗涤三次,加入磁微粒保存液,所述磁微粒保存液为含 1% 牛血清白蛋白的 0.01M PBS 缓冲系统,使之终浓度达到每 20 μ L 测 PreS1 磁微粒中含有 80 μ g 的磁微粒标记抗体,2~8℃保存;

(2) 制备测 PreS1 示踪结合物

另一株 PreS1 单克隆抗体与异鲁米诺的标记,反应体系为:戊二醛使用浓度为 1.0%-2.0%,PreS1 单抗与异鲁米诺的质量比为 2 : 1,在 22~26℃反应 1.5 小时,用 pH7.2-7.4 的 0.01M PBS 进行透析,透析后加入等体积甘油 -20℃存放;最终将异鲁米诺标记抗体用示踪结合物稀释液,所述示踪结合物稀释液为含 20% 小牛血清的 0.01M PBS 缓冲系统,按照 1 : 3000 的稀释比例稀释成测 PreS1 示踪结合物;

(3) 制备分析缓冲液

磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液;

(4) 制备样本稀释液

磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液;

校准品包括校准品 1 和校准品 2,其中校准品 1 为低含量前 S1 抗原的溶液,校准品 2 为高含量前 S1 抗原的溶液。

3. 根据权利要求 2 所述乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒的制备方法,其特征在于:步骤(2)中戊二醛使用浓度为 1.25%。

乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫诊断技术,具体地说是一种磁微粒作为载体的乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 我国是个肝炎大国,发病人数众多,仅乙型肝炎病毒感染者就达 1.2 亿。约占我国总人口的 10%,乙型肝炎病程迁延,如得不到及时有效的治疗,将会发展为肝硬化甚至肝癌,即人们通常所说的“乙肝发展三部曲”。有资料显示,全球每年有 100 万人因感染乙肝病毒而死亡,占全球疾病死亡原因的第九位,可见乙型肝炎是严重危害人类健康的疾病之一。

[0003] 完整的乙肝病毒为直径 42nm 的球形颗粒,又称为 Dane 颗粒,是 1970 年 Dane 发现的;病毒含有双层衣壳,外衣壳由脂质双层与蛋白质构成,HBsAg 镶嵌于此层中,内衣壳含有 HBcAg,HBcAg 在酶的作用下降解,而释放出 HBeAg;在内衣壳内部为病毒的核心部分,含有 DNA 和 DNA 多聚酶;DNA 为双股环状,正股较短,负股较长,且有一缺口。负股 DNA 链上有 4 个开放读码框,分别称之为 S、C、P、X 区;S 区中有 S 基因,pre-S1 基因和 pre-S2 基因,分别编码 HBsAg、PreS1 抗原、PreS2 抗原;C 区编码 HBcAg;P 区编码多聚酶。

[0004] 乙型肝炎病毒至少有三种不同的抗原,而每种抗原物质都能刺激人体产生相应的抗体,就是说抗原与抗体是配对的,乙型肝炎常见的有三对抗原和抗体。三对抗原抗体分别是乙肝表面抗原和抗体,乙肝 e 抗原和抗体,乙肝核心抗原和抗体,但因核心抗原在血清中一般不易检出,仅其余两对半在血液中可检测出,故俗称“两对半”。近年来,前 S1 抗原检测要比 HBeAg 更反映 HBV 复制情况。因此,前 S1 抗原作为 HBV 病毒感染、复制的指标比 HBeAg 敏感,有独立检测的价值,是对 HBV “五项(二对半)”标志物检测起重要补充作用。

[0005] 前 S1 抗原在病毒侵入肝细胞过程中起重要作用,它主要存在于 Dane 颗粒和管型颗粒上。前 S1 抗原在病毒感染、装配、复制和刺激机体产生免疫反应等方面起有十分重要的作用。前 S1 抗原主要存在于血清中 HBV 表面,提示机体内含有 HBV 就有前 S1 抗原。前 S1 抗原与 HBV-DNA, HBeAg 检测率高度符合是一项十分重要的病毒复制指标,提示前 S1 抗原可作为 HBeAg 和 HBV-DNA 检测的补充和对照。抗 HBeAb (+) 慢性乙型肝炎(约占患者的 30% 左右)和 HBV 慢性无症状携带者中,前 S1 抗原(+)可表示病毒的复制,提示临床上只检测“乙肝五项”是不够的,补充前 S1 抗原的测定是十分重要的,可弥补因病毒变异和其它原因造成的 HBeAg 阴性的“误寻”。病毒附着于肝细胞上,最重要的介导部位是前 S1 抗原的氨基酸(AA) 21-47 片段,变异的病毒只要这一区段完好就有传染性。急性乙型肝炎患者前 S1 抗原阴转越早,预后越好,是病毒清除的最早迹象,反之,前 S1 抗原持续阳性,将发展至慢性肝炎。因此它是 HBV 的感染与复制状况的重要指标。同时可作为预后及药物疗效的判断指标。

[0006] 前 S1 抗原的传统检测方法包括酶联免疫法、胶体金法及化学发光检测法,这些方法虽然具有很多优点,但在检测的灵敏度、特异性、稳定性等方面还有待进一步提高。全自动微粒子化学发光免疫分析是在酶免疫分析基础上结合了高灵敏度的化学发光测定技术

和磁性微粒分离技术,与其他方法相比,这种方法有许多独特的优点,首先它用顺磁性微粒作为固相载体,由于颗粒体积小,表面积大,扩大了反应面积,大大提高了检测灵敏度;其次由于使用全自动仪器及配套试剂,使人为因素减至最低,提高了方法的稳定性和结果的重复性,同时也使得批内差异与批间差异都较小。与放射免疫法相比,微粒子化学发光法除具有高灵敏度、高精度、高可靠性等优点外,还具有如下优点:a. 无放射性污染,稳定性好;b. 特异性高;c. 试剂可随用随取,测定方便迅速,可作为急诊检测项目。根据大量的实验结果以及临床应用资料,从实用性、稳定性、准确性及其发展前景来看,该方法逐渐成为取代放射性免疫分析和酶免疫分析的首选。但是目前国内尚无生产用于前 S1 抗原定量检测的微粒子化学发光法诊断试剂,目前急需灵敏度和特异性较高的微粒子化学发光诊断试剂,可以作为酶联免疫试剂及胶体金等试剂的替代品,用于前 S1 抗原的诊断。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是克服上述现有技术的不足,提供一种具有高灵敏度和特异性,适合于临床乙型肝炎病毒的辅助诊断的微粒子化学发光法前 S1 抗原定量测定试剂盒及其制备方法。

[0008] 本发明解决上述技术问题采用的技术方案是:一种乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒,其包括测 PreS1 磁微粒、测 PreS1 示踪结合物、校准品、分析缓冲液、样本稀释液。其特征是:所述测 PreS1 磁微粒为标记有 PreS1 单克隆抗体的磁性微粒子;测 PreS1 示踪结合物为标记有另一株 PreS1 单克隆抗体的异鲁米诺;分析缓冲液、样本稀释液分别为含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;校准品为一低含量前 S1 抗原的溶液和一高含量前 S1 抗原的溶液,用于测定仪内储存主曲线的校正。

[0009] 本发明还提供了上述乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒的制备方法,具体步骤如下:

(1) 制备测 PreS1 磁微粒

将带羧基磁微粒与 EDC 按质量比 1 : 2,磁微粒与 PreS1 单克隆抗体的比例为每毫克磁微粒标记 25 μ g 的单抗,在 22~26℃ 混匀的情况下进行标记,标记时间 1 小时,标记后采用甘氨酸封闭多余的位点,使之浓度达到 25mM,反应 30 分钟,洗涤三次,加入磁微粒保存液(含 1% 牛血清白蛋白的 0.01M PBS 缓冲系统),使之终浓度达到每 20 μ L 测 PreS1 磁微粒中含有 80 μ g 的磁微粒标记抗体,2~8℃ 保存;

(2) 制备测 PreS1 示踪结合物

另一株 PreS1 单克隆抗体与异鲁米诺的标记,反应体系为:戊二醛使用浓度为 1.0%-2.0%,其最佳使用浓度为 1.25%,PreS1 单抗与异鲁米诺的质量比为 2 : 1,在 22~26℃ 反应 1.5 小时,用 pH7.2-7.4 的 0.01M PBS 进行透析,透析后加入等体积甘油 -20℃ 存放;最终将异鲁米诺标记抗体用示踪结合物稀释液(含 20% 小牛血清的 0.01M PBS 缓冲系统)按照 1 : 3000 的稀释比例稀释成测 PreS1 示踪结合物;

(3) 制备分析缓冲液

磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液;

(4) 制备样本稀释液

磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液;

(5)校准品包括校准品 1 和校准品 2,其中校准品 1 为低含量前 S1 抗原的溶液,校准品 2 为高含量前 S1 抗原的溶液。

[0010] 本发明的原理是利用微粒子化学发光免疫分析技术,采用双抗体夹心法定量测定人血清/血浆中乙型肝炎病毒前 S1 抗原的含量。在磁性微粒子上共价标记 PreS1 单克隆抗体,加入待测样本和分析缓冲液,温育后,再加入异鲁米诺标记的另一株 PreS1 单克隆抗体,形成磁微粒标记抗体-抗原-异鲁米诺标记抗体复合物,充分洗涤后,加入激发液发光,相对发光强度(RLU)与血清/血浆中 PreS1 含量呈正相关,样本的含量可以利用该批号试剂盒已设定的曲线,通过全自动化学发光测定仪自动计算出来。

[0011] 本发明试剂盒的优点是采用了微粒子化学发光免疫分析技术,比 ELISA 具有更高的灵敏度和更好的特异性,填补了国内前 S1 抗原定量检测的微粒子化学发光法诊断试剂生产的空白。

具体实施方式

[0012] 本发明试剂盒采用微粒子化学发光免疫分析技术,检测血清或血浆中是否存在前 S1 抗原。下面具体描述前 S1 抗原定量测定试剂盒及其制备方法。

[0013] 一种乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒,其包括测 PreS1 磁微粒、测 PreS1 示踪结合物、校准品、分析缓冲液、样本稀释液。所述测 PreS1 磁微粒为标记有 PreS1 单克隆抗体的磁性微粒;测 PreS1 示踪结合物为标记有另一株 PreS1 单克隆抗体的异鲁米诺;分析缓冲液、样本稀释液分别为含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;校准品为一低含量前 S1 抗原的溶液和一高含量前 S1 抗原的溶液,用于测定仪内储存主曲线的校正。

[0014] 本发明上述前 S1 抗原定量测定试剂盒的制备方法,其具体步骤如下:

(1) 制备测 PreS1 磁微粒

将带羧基磁微粒与 EDC 按质量比 1 : 2,磁微粒与 PreS1 单克隆抗体的比例为每毫克磁微粒标记 25 μ g 的单抗,在 22~26℃ 混匀的情况下进行标记,标记时间 1 小时,标记后采用甘氨酸封闭多余的位点,使之浓度达到 25mM,反应 30 分钟,洗涤三次,加入磁微粒保存液(含 1% 牛血清白蛋白的 0.01M PBS 缓冲系统),使之终浓度达到每 20 μ L 测 PreS1 磁微粒中含有 80 μ g 的磁微粒标记抗体,2~8℃ 保存;

(2) 制备测 PreS1 示踪结合物

另一株 PreS1 单克隆抗体与异鲁米诺的标记,反应体系为:戊二醛使用浓度为 1.0%-2.0%,其最佳使用浓度为 1.25%,PreS1 单抗与异鲁米诺的质量比为 2 : 1,在 22~26℃ 反应 1.5 小时,用 pH7.2-7.4 的 0.01M PBS 进行透析,透析后加入等体积甘油 -20℃ 存放;最终将异鲁米诺标记抗体用示踪结合物稀释液(含 20% 小牛血清的 0.01M PBS 缓冲系统)按照 1 : 3000 的稀释比例稀释成测 PreS1 示踪结合物;

(3) 制备分析缓冲液

磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液;

(4) 制备样本稀释液

磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液;

(5)校准品包括校准品 1 和校准品 2,其中校准品 1 为低含量前 S1 抗原的溶液,校准品 2 为高含量前 S1 抗原的溶液。

[0015] 本发明上述各种原材料的选择要求如下:

1、磁微粒标记用 PreS1 单克隆抗体的选择

首先就抗体的外观、浓度、纯度、效价进行验证,结果抗体为微带乳光的澄清液体,无肉眼可见异物,无摇不散的沉淀,用紫外吸收法检测其蛋白含量应不低于 2.0mg/mL,效价应不低于标示效价且不低于 1:10000,SDS-PAGE 检测纯度应主带清晰,无明显杂带,研究结果表明 PreS1 单克隆抗体完全可用于本发明试剂盒的制备。

[0016] 2、异鲁米诺标记用另一株 PreS1 单克隆抗体的选择

首先仍就抗体的外观、浓度、纯度、效价进行验证,结果抗体为微带乳光的澄清液体,无肉眼可见异物,无摇不散的沉淀,用紫外吸收法检测其蛋白含量应不低于 2.0mg/mL,效价应不低于标示效价且不低于 1:10000,SDS-PAGE 检测纯度应主带清晰,无明显杂带,研究结果表明另一株 PreS1 单克隆抗体也完全可用于本发明试剂盒的制备。

[0017] 3、磁微粒的选择

通过对磁微粒的外观,标记蛋白的比率,磁响应性,磁微粒吸附一致性等方面进行分析,经过多次分析研究,将磁微粒混匀,在灯光下观察,易分散,无聚集,无异物;将蛋白采用不同的方法进行标记,标记率应大于 90%;将磁微粒置 370-380 特斯拉的磁铁上,观察磁微粒的聚集速度,分散均匀的磁微粒在 10 秒钟内完全聚集;磁微粒吸附一致性 $CV \leq 10\%$ 。研究结果表明直径为 0.90-1.10 μm 的磁微粒,含有羧基基团,标记率最高,可用于本发明诊断试剂盒的制备。

[0018] 4、异鲁米诺的选择

将异鲁米诺用 DMSO(二甲基亚砷)进行溶解,用纯化水进行稀释至 $1.2 \times 10^{-5} M/L$ 的量,加入 10 μL 异鲁米诺液体,各加入 200 μL 激发液,测定其发光值,发光值应 ≥ 160000 ,经过研究,符合要求的异鲁米诺可作为发光的原料。

[0019] 本发明前 S1 抗原定量测定试剂盒检测样品中前 S1 抗原的检测方法是:首先取出浓缩洗液,用纯化水按照倍数进行稀释。而后取出激发 A 液和 B 液,放置全自动化学发光测定仪合适的位置。激发 A 液为含有 4%NaOH 的缓冲液,激发 B 液为含有 0.12% H_2O_2 的缓冲液。接着将试剂盒从冰箱中取出后,放于仪器试剂区至少混匀 30 分钟后方可使用,并严格按照设定的程序进行加样和温育。

[0020] 具体加样方法如下:80 μL 血清/血浆样本、10 μL 分析缓冲液以及 20 μL 测 PreS1 磁微粒在 37°C 的条件下反应 20 分钟,加入 150 μL 测 PreS1 示踪结合物,37°C 反应 10 分钟,再用稀释后的洗液洗涤 3 次,最终分别加入 200 μL 激发 A 液和激发 B 液,测定发光值。样本的含量可以利用该批号试剂盒已设定的曲线,通过发光仪自动计算出来。

[0021] 本发明质量控制要求是:试剂盒第一次操作,必须采用校准品进行定标,每间隔 10 天用校准品对试剂盒的主曲线进行修正,按照修正的主曲线对样本进行定量。

[0022] 本发明试剂盒检测 PreS1 企业内控品,检测的结果显示:该试剂盒的阴、阳性参考品符合率、灵敏度、精密度、准确度、线性、稳定性等各项质量指标均符合企业要求。阴性符

合率:10 份阴性参考品符合率 10/10;阳性符合率:10 份阳性参考品符合率 10/10;灵敏度系列检测:QL1、QL2、QL3 为阳性,QL4 为阴性;精密度:10 孔检测变异系数(CV) $\leq$ 15%;准确度:准确度内控品测定浓度与标示浓度比值在 0.90-1.10 范围内;线性:试剂盒的线性相关系数 r 不低于 0.9900;稳定性:试剂各组分于 37℃放置 6 天,检定结果达到标准。

[0023] 本发明试剂盒由河南中医学院第二附属医院、河南中医学院第三附属医院、中国人民解放军第一五三中心医院三家医院进行临床考核,结果:

(1)河南中医学院第二附属医院考核 225 例阴性样本和 112 例阳性样本,本发明试剂盒阴性样本 225 例全部检出,阳性样本检出 108 例。该试剂盒阴性检出率为 100%,阳性检出率为 96.43%。

[0024] (2)河南中医学院第三附属医院考核 226 例阴性样本和 118 例阳性样本,本发明试剂盒阴性样本 226 例全部检出,阳性样本检出 114 例。该试剂盒阴性检出率为 100%,阳性检出率为 96.61%。

[0025] (3)中国人民解放军第一五三中心医院考核 230 例阴性样本和 128 例阳性样本,本发明试剂盒阴性样本 230 例全部检出,阳性样本检出 123 例。该试剂盒阴性检出率为 100%,阳性检出率为 96.09%。

[0026] 该检测试剂盒总的灵敏度为 96.37%,特异性为 100%。

[0027] 乙型肝炎病毒前 S1 抗原定量测定试剂盒(微粒子化学发光法)灵敏度为 96.37%,特异性为 100%,适合于临床乙肝的辅助诊断。

专利名称(译)	乙型肝炎病毒前S1抗原定量测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104090108A	公开(公告)日	2014-10-08
申请号	CN201410347050.7	申请日	2014-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	威海威高生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	威海威高生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	威海威高生物科技有限公司		
[标]发明人	蒙红胜 刘京伟 林芳芳 王凌凌 赵海英		
发明人	蒙红胜 刘京伟 林芳芳 王凌凌 赵海英		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/56983 G01N33/5764		
代理人(译)	宋文学		
其他公开文献	CN104090108B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫诊断技术领域，具体涉及一种微粒子化学发光法乙型肝炎病毒前S1抗原定量测定试剂盒及其制备方法。试剂盒由测PreS1磁微粒、测PreS1示踪结合物、校准品、分析缓冲液、样本稀释液组成，本发明还公开了该定量测定试剂盒的制备方法，其采用的是微粒子化学发光免疫分析技术，比ELISA具有更高的灵敏度和特异性，适合于临床乙肝的辅助诊断，填补了国内微粒子化学发光法检测前S1抗原检测试剂生产的空白。