



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105938144 A

(43)申请公布日 2016.09.14

(21)申请号 201610256459.7

(22)申请日 2016.04.22

(71)申请人 苏州新波生物技术有限公司

地址 215400 江苏省苏州市太仓市经济开发区太平北路115号

(72)发明人 户元林 李荣娥 周娟

(74)专利代理机构 上海申新律师事务所 31272

代理人 竺路玲

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/534(2006.01)

G01N 33/545(2006.01)

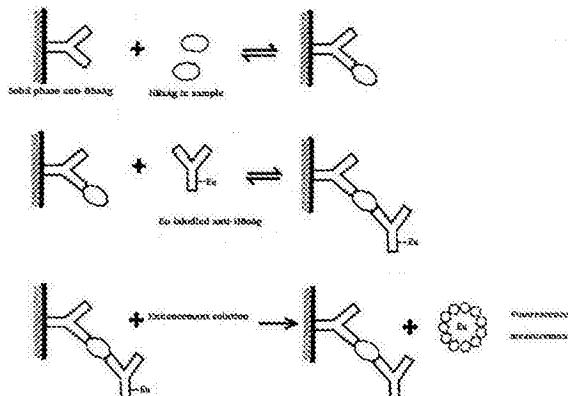
权利要求书1页 说明书5页 附图4页

(54)发明名称

一种HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒及其制备方法，本发明采用时间分辨免疫荧光分析法，TRFIMA应用镧系元素作为示踪剂，标记抗原或抗体，用时间分辨技术测量荧光，同时检出波长和时间两个参数进行信号分辨，可有效地排除非特异性荧光的干扰；另外，本发明的包被反应板的板架为黑色，使得阴性样本与空白对照的荧光本底大大降低，进而进一步地提高了试剂盒的灵敏度；同时本试剂盒采用特定的抗-HBs单克隆抗体包被反应板，镧系元素离子标记的特定的抗-HBs多克隆抗体，使得本发明的试剂盒相对现有技术，特异性更强、稳定性更好、精密度更高，同时本发明有效地控制了试剂盒成本，制造成本远低于同等灵敏度的进口试剂盒。



1. 一种HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒，包括包被反应板，其特征在于，还包括乙型肝炎表面抗原校准品和镧系元素离子标记的抗-HBs多克隆抗体，所述包被反应板为吸附有抗-HBs单克隆抗体的微孔板。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒，其特征在于，所述包被反应板包括相互配合的板架和酶标板，所述板架设有多个与酶标板配合的通孔。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒，其特征在于，所述的板架为完全不透光的材料制作，所述酶标板为经钴60辐照30天后，将抗-HBs IgM抗体和抗-HBs IgA抗体以质量比2:5混合，使用碳酸盐缓冲液稀释至5~20 $\mu$ g/mL后以100 $\mu$ L/孔加入酶标板内，包被过夜后经洗涤、封闭、干燥程序而获得。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒，其特征在于，还包括缓冲液、洗涤液、荧光增强液。

5. 根据权利要求1~4任意一项所述的试剂盒，其特征在于，所述镧系元素离子为Eu<sup>3+</sup>、Tb<sup>3+</sup>、Sm<sup>3+</sup>、Dy<sup>3+</sup>中的至少一种。

6. 根据权利要求1~4任意一项所述的试剂盒，其特征在于，所述镧系元素离子为Eu<sup>3+</sup>。

7. 根据权利要求4所述的试剂盒，其特征在于，所述荧光增强液含有β-二酮类化合物或芳香胺类化合物。

8. 一种制备如权利要求4所述的试剂盒的方法，其特征在于，包括以下步骤：步骤1制备预处理包被反应板：

使用黑色聚苯乙烯制备板架，预留与酶标板相互配合的通孔；酶标板经过钴60辐照30天后，与板架配合组装，获得预处理包被反应板，备用；

步骤2抗-HBs单克隆包被板的获得：

将抗-HBs IgM抗体和抗-HBs IgA抗体以质量比2:5混合，使用缓冲液稀释至5~20 $\mu$ g/mL后加入步骤1获得的预处理包被反应板的酶标板微孔内，以100 $\mu$ L/孔包被过夜，然后经洗涤、封闭、干燥，将微孔板条真空密封于铝箔袋内，冷藏备用；

步骤3镧系元素离子标记的抗-HBs多克隆抗体的获得：

将抗-HBs多克隆抗体经缓冲液透析后，与镧系元素离子以3:1的比例混合，静置22~24小时后经Sephadryl S-200HR分离柱，再经过疏水柱去除多聚体，获得镧系元素离子标记的抗-HBs多克隆抗体；

步骤4乙型肝炎表面抗原校准品的获得：

采用HBsAg WHO国际标准品00/588和03/262组成的线性系列来标定阳性血浆制备的HBsAg企业标准品，使用经标准化的HBsAg企业标准品标定HBsAg重组抗原，然后稀释成0、0.05、0.2、2、20及160IU/mL的HBsAg校准品；

步骤5荧光增强液的配制：

以无水乙醇溶解β-NTA、TOP0，再加入邻苯二甲酸氢钾和三蒸水，40℃溶解后，加入乙酸、Triton X-100，调PH至3.2，定容后保存备用；

步骤6组装各个组分，获得HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒。

9. 根据权利要求8所述的方法，其特征在于，所述镧系元素离子为Eu<sup>3+</sup>。

## 一种HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及病毒蛋白免疫分析技术领域,尤其涉及一种HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus,HBV)是一种嗜肝病毒,是肝病毒家族的DNA逆转录病毒,于1965年被丹娜发现,被称之为丹式颗粒。主要存在于肝细胞并损害肝细胞,该病原体可通过血液,母婴和性传播感染机体,引起肝细胞炎症、坏死、纤维化,损害肝脏,引发乙型病毒性肝炎疾病,简称乙肝。乙型病毒性肝炎分急性和慢性两种。急性乙型肝炎在成年人中90%可自愈,而慢性乙型肝炎表现不一,分为慢性乙肝携带者、慢性活动性乙型肝炎、乙肝肝硬化等。HBV在全世界范围内均有流行,据WHO统计,全球约有20亿人感染过HBV病毒,其中3亿以上的人群为慢性HBV携带者,迄今为止,每年仍有近100万人死于HBV感染引起的肝衰竭和肝癌。在我国,约有1亿的HBV携带者,目前乙肝病毒携带率为7.18%,其中约三分之二有反复肝损害,表现为活动性的乙型肝炎或者肝硬化。肝流行范围广,治疗困难,对人体造成危害大。首先,乙肝的传染性极强。乙肝病毒由质地坚硬的外壳包被,保护病毒不受外界恶劣环境侵害,使其生命力极其顽强,它可通过患者排出的各种体液传染给健康的人群。其次,乙肝的治愈非常困难,虽然现在市面上针对乙肝治疗的药品很多,但真正治愈的特效药品很少。此外,乙肝容易发生恶变,据统计,HBV携带者如果不加以治疗,31.6%~60.1%将会转化成慢性肝炎,而20.8%~56.3%的慢性肝炎会恶化变成肝硬化,肝硬化患者如不及时治疗就会有16%~51.1%的患者转化为肝癌,危及生命。乙肝还具有突发性,乙肝病毒在人体内存在,具有一定的潜伏期,不易被发现,当外界条件成熟,就可突然间发作,并且不可抑制。对HBV的防治成为全世界亟待解决的问题。在尚未找到较好的治疗方法之前,对乙肝病毒的检测和预防就显得尤为重要。

[0003] 近年来临幊上应用较多的乙型肝炎病毒表面抗原检测方法主要有酶联免疫分析法(Enzyme Immunoassay,EIA)和化学发光免疫分析法(Chemiluminescent Immunoassay,CLIA)和时间分辨免疫荧光分析法(Time-resolved Immunofluorometric Assay,TRFIMA)。EIA的优点在于其无污染、操作简单、试剂有效期长、特异性好等,但由于其敏感性相对较低,测定范围相对较窄等缺点,限制了其在微量免疫定量分析中的应用。CLIA的优点在于其敏感性高、测定范围宽,但由于大多数板式CLIA试剂盒仍采用EIA相同的酶促反应,以辣根酶或碱性磷酸酶交联抗体,使用鲁米诺或金刚烷等作为底物,检测的是动态发光,导致检测信号值衰减较快、高浓度和低浓度信号衰减速度不一致,限制了其在免疫定量分析中的低端检测灵敏度、稳定性和重复性。利用时间分辨免疫荧光分析法检测乙型肝炎病毒表面抗原是非常好的技术方案,但是国内生产的HBsAg检测试剂盒的灵敏度只能做到0.1IU/ml左右,而进口试剂的灵敏度可以达到0.05IU/ml,临床检测对试剂盒灵敏度的要求逐渐提高,合适成本范围内,提升国产试剂盒的灵敏度迫在眉睫。

## 发明内容

[0004] 本发明为解决现有技术中的上述问题,提出一种特异性强、稳定性好、精密度高、重复性好的HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒;具备和进口发光试剂相似的检测灵敏度与特异性,但成本低于进口发光试剂;使得HBsAg的灵敏度达到:adr亚型0.05IU/mI;adw亚型0.05IU/mI;ay亚型0.1IU/mI。

[0005] 为了实现上述目的,本发明所采取的技术措施为:

[0006] 一种HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒,包括包被反应板,还包括乙型肝炎表面抗原校准品和镧系元素离子标记的抗-HBs多克隆抗体,所述包被反应板为吸附有抗-HBs单克隆抗体的微孔板。

[0007] 进一步地,上述包被反应板包括相互配合的板架和酶标板,所述板架设有多个与酶标板配合的通孔,且通孔深度足够将酶标板不同微孔之间光线完全阻隔;优选地,上述的板架为完全不透光的材料(更优选为黑色聚苯乙烯)制作,所述酶标板为经钴60辐照30天后,将抗-HBs IgM抗体和抗-HBs IgA抗体以质量比2:5混合,使用碳酸盐缓冲液稀释至5-20 $\mu$ g/mL后以100 $\mu$ L/孔加入酶标板内,包被过夜后经洗涤、封闭、干燥程序而获得;本发明的包被反应板,仅仅在微孔底部为良好透光,使得阴性样本与Blank的荧光本底大大降低,信噪比显著提高;同时在酶标板微孔包被抗体前,使用了特定辐照,使得酶标板微孔表面发生了氧化,产生了某些含氧的活性基团改善了对包被生物分子的亲水性与化学反应性能,使得其吸附性大大增加,从而在不改变检测的特异性情况下明显提高检测的敏感性和均一性,进而进一步提高了试剂盒的灵敏度。

[0008] 进一步地,上述的板架的高度和酶标板完全匹配,使得板架和酶标板组合后,不同微孔之间完全没有光线的相互干扰,板架的高度优选为1-1.5cm,板架上的通孔的边缘的相互距离为0.6-1.2mm。

[0009] 进一步地,本发明的试剂盒还包括缓冲液、洗涤液、荧光增强液。

[0010] 优选地,本发明试剂盒中所述镧系元素离子为Eu<sup>3+</sup>、Tb<sup>3+</sup>、Sm<sup>3+</sup>、Dy<sup>3+</sup>中的至少一种;更优选地,所述镧系元素离子为Eu<sup>3+</sup>。

[0011] 优选地,所述荧光增强液含有β-二酮类化合物或芳香胺类化合物。

[0012] 另一方面,本发明还提供一种制备上述试剂盒的方法,包括以下步骤:

[0013] 步骤1制备预处理包被反应板:

[0014] 使用黑色聚苯乙烯制备板架,预留与酶标板相互配合的通孔;酶标板经过钴60辐照30天后,与板架配合组装,获得预处理包被反应板,备用;

[0015] 步骤2抗-HBs单克隆包被板的获得:

[0016] 将抗-HBs IgM抗体和抗-HBs IgA抗体以质量比2:5混合,使用缓冲液稀释至5-20 $\mu$ g/mL后加入步骤1获得的预处理包被反应板的酶标板微孔内,以100 $\mu$ L/孔包被过夜,然后经洗涤、封闭、干燥,将微孔板条真空密封于铝箔袋内,冷藏备用;

[0017] 步骤3镧系元素离子标记的抗-HBs多克隆抗体的获得:

[0018] 将抗-HBs多克隆抗体经缓冲液透析后,与镧系元素离子以3:1的比例混合,静置22-24小时后经Sephacryl S-200HR分离柱,再经过疏水柱去除多聚体,获得镧系元素离子标记的抗-HBs多克隆抗体;

- [0019] 步骤4乙型肝炎表面抗原校准品的获得：
- [0020] 采用HBsAg WHO国际标准品00/588和03/262组成的线性系列来标定阳性血浆制备的HBsAg企业标准品，使用经标化的HBsAg企业标准品标定HBsAg重组抗原，然后稀释成0、0.05、0.2、2、20及160IU/mL的HBsAg校准品；
- [0021] 步骤5荧光增强液的配制：
- [0022] 以无水乙醇溶解β-NTA、TOPO，再加入邻苯二甲酸氢钾和三蒸水，40℃溶解后，加入乙酸、Triton X-100，调PH至3.2，定容后保存备用；
- [0023] 步骤6组装各个组分，获得HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒。
- [0024] 优选地，上述镧系元素离子为Eu<sup>3+</sup>。
- [0025] 本发明采用上述技术方案，与现有技术相比，具有如下技术效果：
- [0026] 本试剂盒采用的是时间分辨免疫荧光分析法，TRFIMA应用镧系元素作为示踪剂，标记抗原或抗体，根据镧系元素螯合物的发光特点，用时间分辨技术测量荧光，同时检出波长和时间两个参数进行信号分辨，可有效地排除非特异性荧光的干扰，极大的提高了灵敏度；另外，本发明的包被反应板的为完全不透光的板架和相应配合的酶标板组成，使得阴性样本与Blank的荧光本底大大降低，信噪比显著提高，酶标板包被采用特殊辐照，使得包被效果显著提高，进而进一步地提高了试剂盒的灵敏度；同时本试剂盒采用特定的抗-HBs单克隆抗体包被反应板，镧系元素离子标记的特定的抗-HBs多克隆抗体，使得本发明的试剂盒相对现有技术，特异性更强、稳定性更好、精密度更高、重复性更好，同时有效地控制了试剂盒成本。

## 附图说明

- [0027] 图1为利用本发明的试剂盒进行HBV表面抗原检测的检测原理示意图；
- [0028] 图2为实施例二中全部样本测值线性回归分析图；
- [0029] 图3为实施例二中线性范围内阳性样本测值线性回归分析图；
- [0030] 图4为本发明的试剂盒中包被反应板的板架示意图；
- [0031] 图5为发明的试剂盒中包被反应板的整体示意图。

## 具体实施方式

[0032] 本发明提供了一种HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒，包括包被反应板，还包括乙型肝炎表面抗原校准品和镧系元素离子标记的抗-HBs多克隆抗体，所述包被反应板为吸附有抗-HBs单克隆抗体的微孔板。

[0033] 下面通过具体实施例对本发明进行详细和具体的介绍，以使更好的理解本发明，但是下述实施例并不限制本发明范围。

- [0034] 实施例一HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒的制备
- [0035] 使用Eu<sup>3+</sup>作为荧光标记物制备试剂盒，具体操作如下：
- [0036] 1. 制备包被反应板：本发明的包被反应板和现有技术中的包被反应板均不同，在制备过程中使用特制模具，整体的板架采用完全不透光的黑色聚苯乙烯制作，底部设有和酶标板相应孔径的通孔（如图4所示）；酶标板则采用透光优秀的材料制备，在包被抗体前，经钴60辐照30天，获得高吸附性后，与板架组装，获得仅仅微孔底部透光的高吸附性预处理

包被反应板备用,如附图5所示。

[0037] 2. 抗-HBs单克隆包被板的获得:将抗-HBs IgM抗体和抗-HBs IgA抗体以质量比2:5混合,使用碳酸盐缓冲液稀释至 $15\mu\text{g}/\text{mL}$ 后加入上述步骤1中获得预处理包被反应板的微孔内, $100\mu\text{L}/\text{孔}$ ,包被过夜后经洗涤、封闭、干燥等程序,将微孔板条真空密封于铝箔袋内,冷藏备用。

[0038] 3. 抗-HBs多克隆抗体铕标记物的获得:将抗-HBs多克隆抗体经碳酸盐缓冲液透析后,与DTTA-Eu以3:1的比例混合,静置22~24小时后经Sephacryl S-200分离柱分离DTTA-Eu和Ab-Eu,再经过疏水柱去除多聚体,获得铕标记的多克隆抗体。

[0039] 4. 乙型肝炎表面抗原校准品的获得:采用HBsAg WHO国际标准品00/588和03/262组成的线性系列来标定阳性血浆制备的HBsAg企业标准品,使用经标化的HBsAg企业标准品标定HBsAg重组抗原,然后稀释成0,0.05,0.2,2,20,160IU/mL的HBsAg校准品。

[0040] 5. 荧光增强液的配制:以无水乙醇溶解 $\beta$ -NTA、TOPO,再加入令苯二甲酸氢钾和三蒸水,40℃溶解后,加入乙酸、Triton X-100,调PH至3.2,定容。

[0041] 上述组分制备完毕后,加入缓冲液、洗涤液等其他试剂盒组分,制备得到HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒。

[0042] 实施例二本发明的试剂盒与进口发光试剂的比较实验

[0043] 利用本发明的HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒与美国Abbott(雅培)公司乙型肝炎病毒表面抗原定量测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)在三家医院同时检测了1509例临床样本,其中包括阳性样本771例,阴性样本738例(其中包括干扰样本236例)。干扰因素包括CMV/EB/HAV/HCV/HIV/TP/HSV/HBsAb/ANA/RF/孕妇(HCG)。

[0044] 全部样本测值线性回归分析:三家医院临床研究共检测有效样本1509例,其中有21例样本稀释100倍后检测值仍高于线性检测范围(本发明试剂推荐的最大稀释倍数为100倍),有5份初测均高于雅培和本发明试剂线性检测范围,但余量不足未能完成稀释检测,另有4份初测即高于双方检测范围的阳性干扰样本,此30例不计入回归分析,故对1479例样本两方试剂检测结果进行线性回归及定量相关性分析,以参比试剂的测定数值为横坐标,考核试剂的测定数值为纵坐标,使用SPSS 19.0统计分析软件对数据进行线性回归及相关性分析,结果图2所示。

[0045] 线性范围内阳性样本测值线性回归分析:本实施例中共检测771例阳性样本,其中583例检测结果在两方试剂盒检测范围内,对583例样本检测结果进行线性回归及定量相关性分析,以参比试剂的测定数值为横坐标,考核试剂的测定数值为纵坐标,使用SPSS 19.0统计分析软件对数据进行线性回归及相关性分析,结果如图3所示。

[0046] 相对符合率分析:根据参比试剂和考核试剂的参考值范围(两试剂盒参考值范围均为0~0.05IU/mL:将浓度计算值大于等于0.05IU/mL的结果判定为参比试剂的阳性,小于0.05IU/mL的结果判定为参比试剂的阴性;对数据进行四格表分析,结果如表1所示:

[0047] 表1

[0048]

检验试验	雅培(参比)		合计
	阳性	阴性	
本发明 (考核)	阳性 769	2	771
	阴性 2	736	738
合计	771	738	1509

[0049] 本发明“HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒”，相比参比试剂美国雅培公司“乙型肝炎病毒表面抗原定量测定试剂盒(化学发光微粒子免疫检测法)”，根据四格表计算本发明的试剂盒各项性能指标结果如表2：

[0050] 表2

[0051]

项目	结果	95%置信区间
阳性符合率(相对灵敏度)	99.74%	98.38%-100.10%
阴性符合率(相对特异性)	99.73%	98.36%-100.10%
总符合率	99.73%	99.47%-99.99%

[0052] 由本实施例的实验可以证实，本发明的HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒在相对较低的制作成本下，相较于国外先进的检测试剂盒，灵敏度相似，检测效果稳定准确。

[0053] 综上所述，本试剂盒采用的是时间分辨免疫荧光分析法，TRFIMA应用镧系元素作为示踪剂，标记抗原或抗体，根据镧系元素螯合物的发光特点，用时间分辨技术测量荧光，同时检出波长和时间两个参数进行信号分辨，可有效地排除非特异性荧光的干扰，极大的提高了灵敏度；另外，本发明的包被反应板的板架为黑色；使得阴性样本与Blank的荧光本底大大降低，信噪比显著提高，进而进一步地提高了试剂盒低端的灵敏度；同时本试剂盒采用特定的抗-HBs单克隆抗体包被反应板，镧系元素离子标记的特定的抗-HBs多克隆抗体，使得本发明的试剂盒相对现有技术，特异性更强、稳定性更好、精密度更高、重复性更好，同时本发明有效地控制了试剂盒成本，制造成本远低于同等灵敏度的进口试剂盒。

[0054] 以上对本发明的具体实施例进行了详细描述，但其只是作为范例，本发明并不限制于以上描述的具体实施例。对于本领域技术人员而言，任何对本发明进行的等同修改和替代也都在本发明的范畴之中。因此，在不脱离本发明的精神和范围下所作的均等变换和修改，都应涵盖在本发明的范围内。

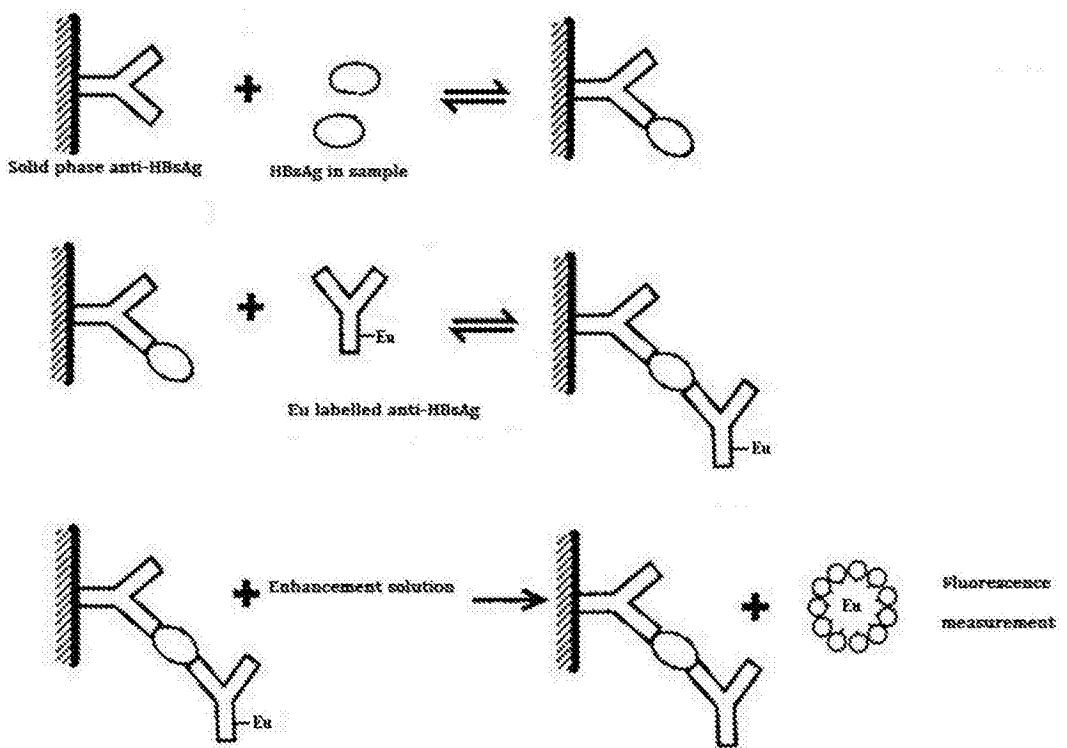


图1

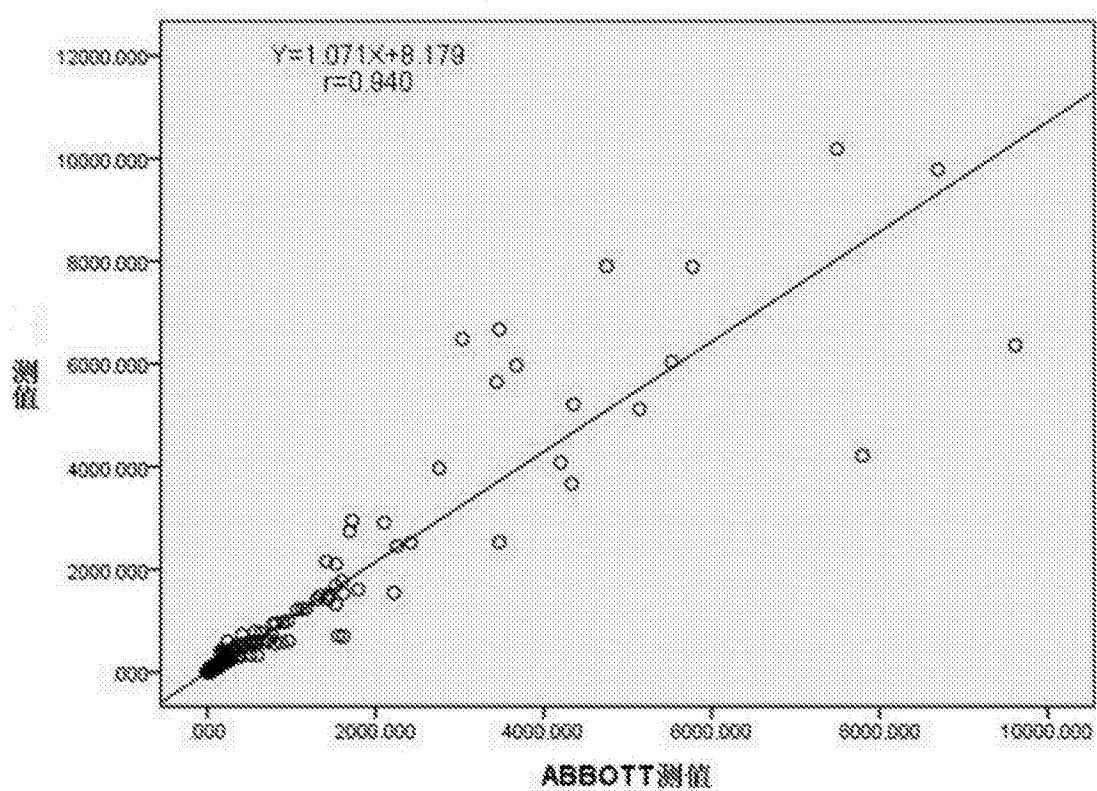
HBsAg临床样本测值总相关性 ( $n=1479$ )

图2

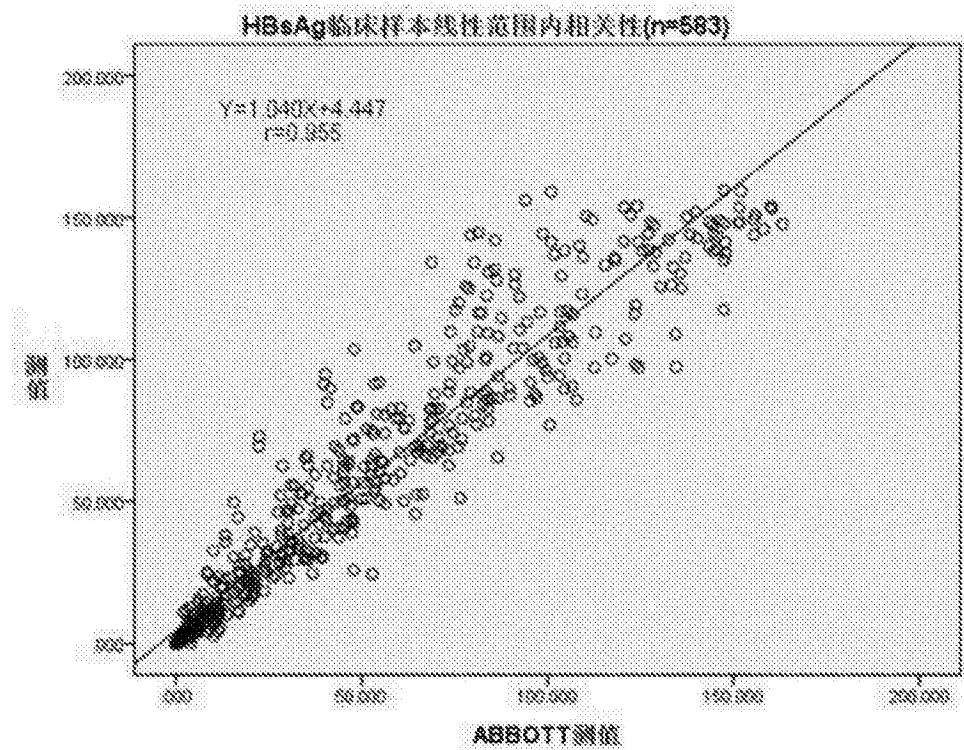


图3

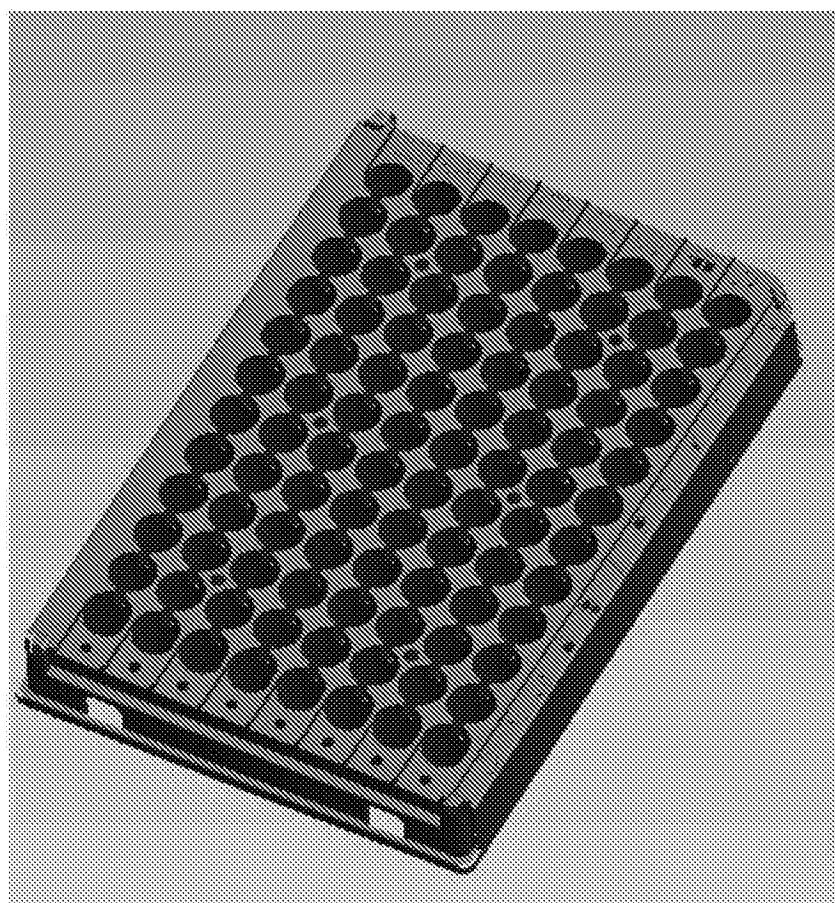


图4

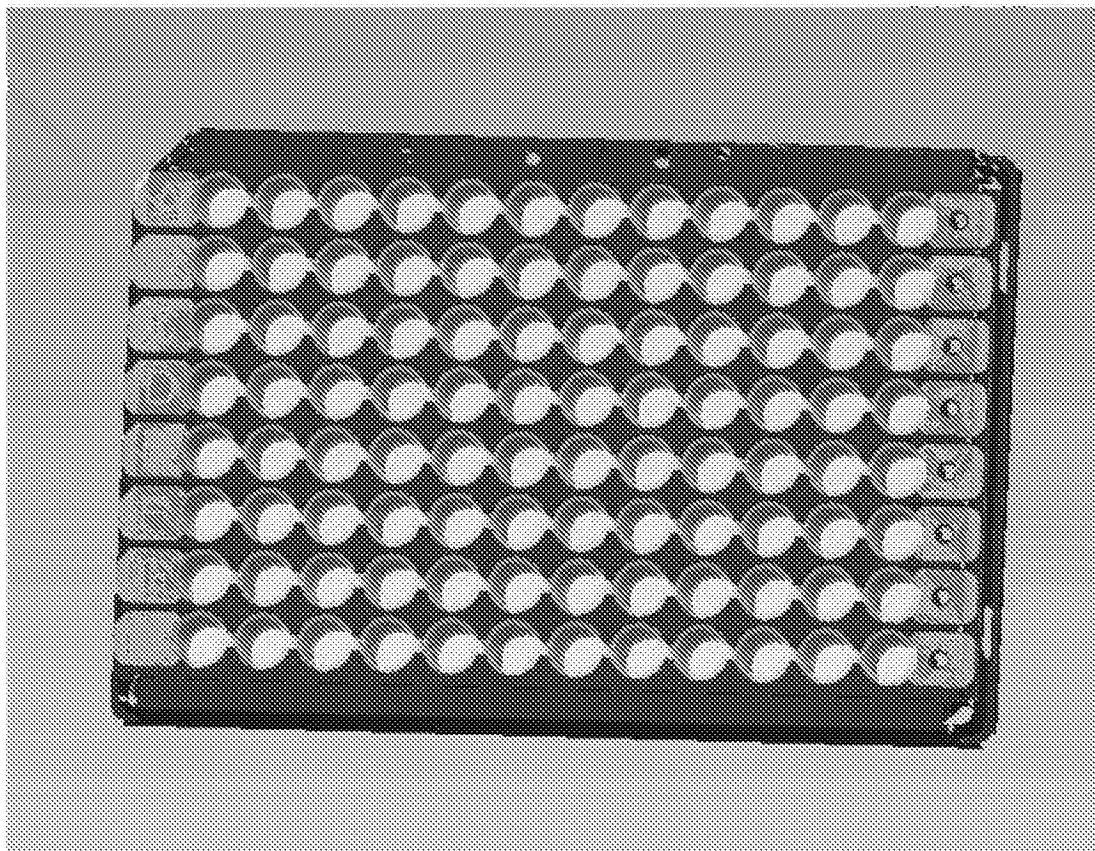


图5

专利名称(译)	一种HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN105938144A</a>	公开(公告)日	2016-09-14
申请号	CN201610256459.7	申请日	2016-04-22
[标]申请(专利权)人(译)	苏州新波生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州新波生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州新波生物技术有限公司		
[标]发明人	户元林 李荣娥 周娟		
发明人	户元林 李荣娥 周娟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/534 G01N33/545		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/534 G01N33/545 G01N33/56983 G01N2333/02		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

### 摘要(译)

本发明公开了一种HBV表面抗原时间分辨免疫荧光检测试剂盒及其制备方法，本发明采用时间分辨免疫荧光分析法，TRFIMA应用镧系元素作为示踪剂，标记抗原或抗体，用时间分辨技术测量荧光，同时检出波长和时间两个参数进行信号分辨，可有效地排除非特异性荧光的干扰；另外，本发明的包被反应板的板架为黑色，使得阴性样本与空白对照的荧光本底大大降低，进而进一步地提高了试剂盒的灵敏度；同时本试剂盒采用特定的抗-HBs单克隆抗体包被反应板，镧系元素离子标记的特定的抗-HBs多克隆抗体，使得本发明的试剂盒相对现有技术，特异性更强、稳定性更好、精密度更高，同时本发明有效地控制了试剂盒成本，制造成本远低于同等灵敏度的进口试剂盒。

