



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106257283 A

(43)申请公布日 2016.12.28

(21)申请号 201610506956.8

(22)申请日 2016.06.30

(71)申请人 深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区南山街道兴海路荔山工业区5栋1-4层

(72)发明人 钱纯亘 祝亮 王刚 夏福臻
黄湘东

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/553(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

G01N 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法,HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒包括:HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物。这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成HBsAg PreS的检测。这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,相对于传统的HBsAg PreS的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

1. 一种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括:HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物。

2. 根据权利要求1所述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒中,所述HBsAg PreS单克隆抗体与所述羧基化的磁微粒的比例为1:25~100。

3. 根据权利要求1所述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物中,所述HBsAg PreS单克隆抗体与所述化学发光标记物的比例为1:10~100。

4. 根据权利要求1所述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述羧基化的磁微粒的粒径为0.05μm~1μm。

5. 根据权利要求1所述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。

6. 根据权利要求1所述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液。

7. 根据权利要求6所述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述A液为H₂O₂溶液,所述B液为NaOH溶液。

8. 根据权利要求1所述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,还包括HBsAg PreS定标品。

9. 根据权利要求8所述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述HBsAg PreS定标品为COI 1~10的HBsAg PreS溶液。

10. 一种根据权利要求1~9中任一项所述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入HBsAg PreS单克隆抗体,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒;以及取HBsAg PreS单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液后混匀,然后加入化学发光标记物后混匀,室温下避光反应1h~2h后除杂,得到HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物。

HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测领域,尤其涉及一种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒(HBV)感染已成为全球性的公共健康问题,HBV被清除的特征为乙型肝炎表面抗原(HBsAg)在血清中消失及表面抗体(HBsAb)在血清出现。理论上,体内存在HBV复制的同一患者中二者不可能同时检出,但也有部分临床患者血清标本中二者均可检出,且多见于慢性乙型病毒性肝炎(简称乙肝)患者。有研究认为HBsAg、HBsAb共阳性与HBV S基因主要亲水区α决定簇的氨基酸突变及pre S区,特别是pre S2的核酸缺失、突变等因素密切相关。

[0003] 目前HBsAg PreS的检测主要有以下几种方法:

一、酶联免疫吸附法

酶联免疫吸附法(ELISA)被广泛应用,但该方法也存在着下述的不足之处:

(1) 使用 12×8 型、 6×8 型、 8×12 型或整板型96孔专用微孔板作为抗体包被用具和反应容器,在使用时只能分成12批次、6批次、8批次或整板一次使用,无法进行独立的、单人份的检测;

(2) 定性测定所用的试剂种类较多,每一种检测试剂都要用试剂瓶来盛装,并且每使用一种试剂时都需要更换吸液嘴来分别加注到微孔板的微孔中,不但试剂瓶种类多,加注试剂的操作也极为繁琐;

(3) 缺少对检测信息的相应标注,只能通过查看试剂盒外包装盒的标识才能了解或知悉检测试剂的生产批号及有效期信息,而且所知悉的信息在检测过程中不受控,具有很大的随意性;

(4) 检测试剂在检测过程中处于开放的空间,容易引起各种试剂之间的交叉污染而影响检测结果的准确性;

(5) 检测过程多采用手工操作,试剂或样本的加量不很精确,操作过程极为繁琐和复杂,容易发生操作差错,检测结果的准确度和精密度较差;

(6) 在检测项目成套试剂的数量配置及使用上均为项目数 $\times 48/96$ 人份,如果需要检测10个项目,则试剂的配置及使用数须为 $10 \times 48/96$ 人份,如果只有一份样本需要检测10个不同的项目,也需要配置 $10 \times 48/96$ 人份的试剂,存在着不够经济合理的缺点。

二、基因诊断

对许多RNA病毒来说RT-PCR诊断方法比传统的病毒分离和抗原诊断方法既快又灵敏。而且RT-PCR可以很容易的同时诊断多种病毒,另一些诊断方法如病毒分离和免疫荧光分析却不能。但该方法也有不足之处,如PCR技术,DNA扩增的高敏感性导致了极微量的污染即可出现假阳性,因而使结果失真。此外病毒作为外原基因的入侵者,必须在阐明其全部或部分核苷酸序列时,才可以设计引物或探针,进行核酸分子杂交和PCR检测。

[0005] 从现有的HBsAg PreS的检测方法可见,EIA、RT-PCR诊断方法尽管都有一定的特异性和敏感性的优点,但在操作上需要专业技术人员、专门的仪器设备和特定的条件及费时等缺点。

[0006] 吖啶酯作为标记物的直接化学发光相比以上方法具有明显优势,主要表现在:反应不需要催化剂,只要碱性环境即可进行,反应迅速,背景发光低,信噪比高,干扰因素少,试剂稳定性好,可以两点定标,体系简单,激发液成本低,吖啶酯易与蛋白质联结,且联结后光子产率不减少,已经成为HBsAg PreS诊断新的发展方向。

发明内容

[0007] 基于此,有必要提供一种检测灵敏度较高的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法。

[0008] 一种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,包括:HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物。

[0009] 在一个实施例中,所述HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒中,所述HBsAg PreS单克隆抗体与所述羧基化的磁微粒的比例为1:25~100。

[0010] 在一个实施例中,所述HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物中,所述HBsAg PreS单克隆抗体与所述化学发光标记物的比例为1:10~100。

[0011] 在一个实施例中,所述羧基化的磁微粒的粒径为0.05μm~1μm。

[0012] 在一个实施例中,所述化学发光标记物为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。

[0013] 在一个实施例中,还包括化学发光底物液,所述化学发光底物液包括A液和B液。

[0014] 在一个实施例中,所述A液为H₂O₂溶液,所述B液为NaOH溶液。

[0015] 在一个实施例中,还包括HBsAg PreS定标品。

[0016] 在一个实施例中,所述HBsAg PreS定标品为COI分别为0~0.5、1~10的HBsAg PreS的溶液。

[0017] 一种上述的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入HBsAg PreS单克隆抗体,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒;以及

取HBsAg PreS单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液后混匀,然后加入化学发光标记物后混匀,室温下避光反应1h~2h后除杂,得到HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物。

[0018] 这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具,完成HBsAg PreS的检测。这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒,经过实验,其检测灵敏度相对于传统的HBsAg PreS的检测方法灵敏度至少提高了10倍,这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

[0019]

附图说明

[0020] 图1为一实施方式的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒的制备方法的流程图；

具体实施方式

[0021] 为使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂，下面结合附图和具体实施例对本发明的具体实施方式做详细的说明。在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明。但是本发明能够以很多不同于在此描述的其它方式来实施，本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似改进，因此本发明不受下面公开的具体实施的限制。

[0022] 一实施方式的HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒，包括：HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和HBsAg PreS单克隆抗体单克隆抗体标记的化学发光标记物。

[0023] 优选的，HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒中，HBsAg PreS单克隆抗体与羧基化的磁微粒的比例为1:25~100。

[0024] 优选的，HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物中，HBsAg PreS单克隆抗体与化学发光标记物的比例为1:10~100。

[0025] 优选的，羧基化的磁微粒的粒径为0.05μm~1μm。

[0026] 化学发光标记物可以为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。其中，化学发光标记物优选为吖啶酯。

[0027] 在其他的实施例中，上述HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒还包括化学发光底物液。

[0028] 化学发光底物液包括A液和B液。A液可以为H₂O₂溶液，B液可以为NaOH溶液。

[0029] 本实施例中，A液为浓度为0.1moI/L的H₂O₂溶液，B液为浓度为0.25moI/L的NaOH溶液。

[0030] 在其他的实施例中，上述HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒还包括HBsAg PreS定标品。

[0031] HBsAg PreS定标品为COI分别为0~0.5和1~10的HBsAg PreS的溶液。

[0032] 具体的，HBsAg PreS定标品可以采用标准品缓冲液、及将HBsAg PreS抗原投入标准品缓冲液配制成COI分别为0~0.5和1~10的HBsAg PreS的溶液。

[0033] 这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒用于HBsAg PreS检测时，利用全自动化学发光免疫分析仪对HBsAg PreS定标品进行检测，确定Cutoff值，内置于电脑软件；接着测试实际样本，根据样本发光值计算样本COI；最后对HBsAg PreS全自动化学发光免疫分析系统进行性能(灵敏度、精密度、干扰性)的评价。

[0034] 这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具，完成HBsAg PreS的检测这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒，经过实验，其检测灵敏度相对于传统的HBsAg PreS的检测方法灵敏度至少提高了10倍，这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

[0035] 此外，这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒还具有以下优点：

1、选择吖啶酯作为标记材料，并应用于化学发光免疫分析系统，该发光体系为直接化学发光，与传统的酶促化学发光相比，该反应不需要酶的参与，更加节约成本；

2、选用吖啶酯的化学发光免疫分析系统RLU读数范围宽，能达到200~5000000，而传统

的HBsAg PreS的检测方法的吸光度范围为0~4.0;

3、吖啶酯化学发光免疫分析系统重复性高,批内及批间差均在5%以内,这是其它化学发光免疫分析系统难以达到的;

4、化学发光免疫分析系统已实现样本的定性,通过内置Cutoff值到测试软件,只需测试样本就可直接得到样本的COI;

5、化学发光免疫分析系统可以实现全自动化,试剂及样本的添加全有仪器完成,操作更加简便,减少了人为的误差。

[0036] 如图1所示的上述HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

取羧基化的磁微粒的悬浮液,磁分离去上清后用MES缓冲液重悬,接着加入EDC水溶液,活化羧基化的磁微粒的表面羧基,接着加入HBsAg PreS单克隆抗体,室温下混悬2h~10h,磁分离去除上清后用Tris缓冲液重悬,得到HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒。

[0037] MES(2-(N-吗啡啉)乙磺酸)缓冲液的浓度为0.02M,pH为5.5。

[0038] Tris缓冲液的浓度为0.1M并且含有2%BSA,pH为8.0。

[0039] EDC(1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺)水溶液的浓度为10mg/mL~20mg/mL,EDC与羧基化的磁微粒的比例为0.05:0.1~1。

[0040] 优选的,HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒中,HBsAg PreS单克隆抗体与羧基化的磁微粒的比例为1:25~100。

[0041] 优选的,羧基化的磁微粒的粒径为0.05μm~1μm。

[0042] 取HBsAg PreS单克隆抗体,加入碳酸盐缓冲液后混匀,然后加入化学发光标记物后混匀,室温下避光反应1h~2h后除杂,得到HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物。

[0043] 碳酸盐缓冲液浓度为0.1M,pH为9.0~9.5,

除杂的操作为离心脱盐柱脱盐,具体操作为:先分别用纯净水及TBS缓冲液(40 mM Tris-HCl,0.5% BSA,1% NaCl,pH 8.0)处理离心脱盐柱,最后加入得到的HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物,最后收集离心管中的液体。

[0044] 优选的,HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物中,HBsAg PreS单克隆抗体与化学发光标记物的比例为1:10~100。

[0045] 化学发光标记物可以为鲁米诺、异鲁米诺、三联吡啶钌或吖啶酯。其中,化学发光标记物优选为吖啶酯。

[0046] 得到的HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物组合即可得到上述HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒。

[0047] 这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒在使用时,还需要化学发光底物液和HBsAg PreS定标品。

[0048] 化学发光底物液包括A液和B液。A液可以为H₂O₂溶液,B液可以为NaOH溶液。

[0049] 本实施例中,A液为浓度为0.1moI/L的H₂O₂溶液,B液为浓度为0.25moI/L的NaOH溶液。

[0050] 具体的,,HBsAg PreS定标品可以采用标准品缓冲液、及将HBsAg PreS抗原投入标准品缓冲液配制成COI分别为0~0.5和1~10的HBsAg PreS的溶液。

[0051] 这种HBsAg PreS化学发光检测试剂盒的制备方法简单方便,制得的HBsAg PreS化学发光检测试剂盒的检测灵敏度较高,具有良好的应用前景。

[0052]

以下为具体实施例。

[0053] 实施例1:HBsAg PreS化学发光检测试剂盒的制备

(1)HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒的制备:

取含有50mg粒径为 $0.05\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ 的羧基化的磁微粒(MagnaBind™,货号21353)悬浮液,磁分离去上清,用0.02 M, pH为5.5 MES缓冲液重悬,加入1mL新配置的10mg/mL的EDC水溶液,活化磁珠表面羧基,加入4mgHBsAg PreS单克隆抗体(biorbyt,货号orb48780),室温下混悬6h,磁分离,去除上清,用含2%BSA的0.1M, pH为8.0的Tris缓冲液重悬到1mg/mL,得到HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒,每瓶5mL分装保存于4℃备用。

[0054] (2)HBsAg PreS单克隆抗体标记的吖啶酯的制备:

取50 μL 浓度为10mg/mL的HBsAg PreS单克隆抗体,加入150 μL 浓度为0.1M、pH为9.0~9.5的碳酸盐缓冲液,混匀,然后加入1.5 μL 浓度为5mg/mL的吖啶酯溶液混匀,室温下避光反应,1.5h后取出,用2mL的zeba离心脱盐柱脱盐处理,脱盐过程中首先分别用纯净水及TBS缓冲液进行处理,最后加入得到的HBsAg PreS单克隆抗体标记的吖啶酯溶液,收集离心管中的液体至保存管得到HBsAg PreS单克隆抗体单克隆抗体标记的吖啶酯,每瓶5mL分装保存于4℃备用。

[0055] (3)HBsAg PreS定标品的制备:

用标准品缓冲液(40 mM Tris-HCl, 0.5% BSA, 1% NaCl, pH 8.0)、将HBsAg PreS抗原投入标准品缓冲液配置成COI为0~0.5和1~10,每瓶0.5 mL分装,4℃保存备用。

[0056]

实施例2:HBsAg PreS化学发光免疫检测方法

以全自动化学发光免疫分析仪(YHL0,货号iFIash3000)为检测工具,方法学模式为双抗体夹心法,即仪器依次加入50 μL 的样品、50 μL 的HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒以及50 μL 的HBsAg PreS处理液,反应20 min后,再加100 μL 的HBsAg PreS标记的吖啶酯,反应20 min后,进行磁分离,仪器将反应混合物送入暗室,依次加入发光底物A液(H_2O_2)及B液(NaOH)进行发光反应,最后记录发光值。

[0057]

实施例3:HBsAg PreS化学发光检测试剂盒性能评价

采用实施例2中的方法对HBsAg PreS定标品进行检测,得到Cutoff值。

[0058] 接着测试实际样本,根据样本发光值计算样本COI。

[0059] 精密度测定:

取COI为5及50两个HBsAg PreS样品,每个样本每个浓度各做3个平行,用三批试剂盒进行检测,计算试剂盒批内及批间差,结果表明该试剂盒批内及批间差均小于5%。

[0060] 干扰性实验:

取混合血清分别添加干扰物包括:结合胆红素、游离胆红素、血红蛋白、抗坏血酸、甘油酯,添加比例按照 1:20进行,分别测定混合血清及添加了各种干扰物后混合血清的测值,计算二者之间的偏差,以 $\pm 10\%$ 为可接受范围。结果表明,干扰性均达到 NCCLS 的文件标

准,可用于临床实验室HBsAg PreS 状况的准确评估。

[0061]

实施例4、HBsAg PreS化学发光检测试剂盒的对比实验

分别用化学发光检测方法和传统的酶联免疫吸附法对一组梯度稀释样品做检测,两种方法检测灵敏度相比,数据如下表所示:

测试次数	化学发光检测 (COI)	酶联免疫吸附法检测 (COI)
原倍样本	1122.76	17.78
1:10稀释样本	794.19	15.67
1:20稀释样本	547.48	9.17
1:40稀释样本	386.34	5.61
1:80稀释样本	220.19	3.22
1:160稀释样本	113.83	1.72
1:320稀释样本	52.32	0.94
1:640稀释样本	23.59	0.67
1:1280稀释样本	11.50	0.44
稀释液	0.22	0.22

由上表可以看出,化学发光检测方法的灵敏度较酶联免疫吸附法提高了约10倍。

[0062]

以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

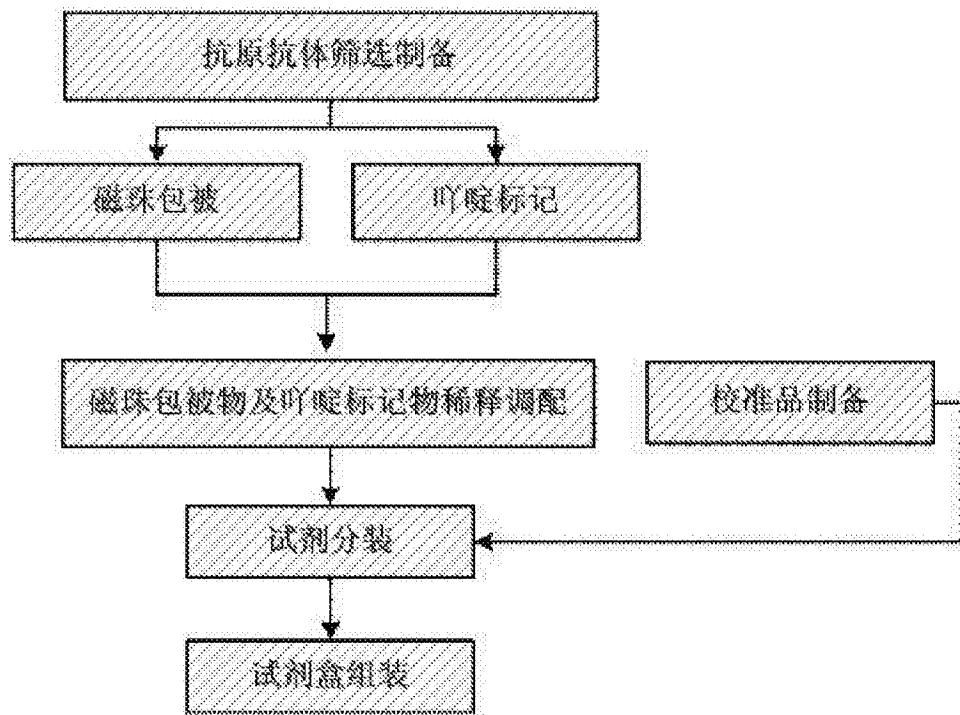


图1

专利名称(译)	HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106257283A	公开(公告)日	2016-12-28
申请号	CN201610506956.8	申请日	2016-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳市亚辉龙生物科技股份有限公司		
[标]发明人	钱纯亘 祝亮 王刚 夏福臻 黄湘东		
发明人	钱纯亘 祝亮 王刚 夏福臻 黄湘东		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/553 G01N33/532 G01N33/531 G01N21/76 G01N35/00		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/76 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/553 G01N35/00		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法，HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒包括：HBsAg PreS单克隆抗体包被的羧基化的磁微粒和HBsAg PreS单克隆抗体标记的化学发光标记物。这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒能够以全自动化学发光免疫分析仪为检测工具，完成HBsAg PreS的检测。这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒，经过实验，相对于传统的HBsAg PreS的检测方法灵敏度至少提高了10倍，这种HBsAg PreS化学发光免疫检测试剂盒的检测精度较高。

