

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/547

G01N 33/569

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410024658.2

[43] 公开日 2005 年 12 月 7 日

[11] 公开号 CN 1704756A

[22] 申请日 2004.5.26

[21] 申请号 200410024658.2

[71] 申请人 杜凤鸣

地址 200433 上海市安波路 985 弄 4 号 402 室

[72] 发明人 杜凤鸣

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 王 巍

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 4 页

[54] 发明名称 乙型肝炎 e 抗原酶联免疫定量法测定试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明属于免疫诊断试剂技术领域。本发明公开了一种乙型肝炎 e 抗原酶联免疫定量法测定试剂盒。本发明的试剂盒包括 HbeAg 标准品、抗体预包被反应条、酶标记乙型肝炎 e 抗体和阳性对照液、阴性对照液、洗涤液、底物缓冲液与终止液组成。本发明的试剂盒与 HBV - PVC 荧光法想必具有快速、简便、灵敏、价廉、重复性好的优点，是对 HBV 感染、复制和乙肝病人的诊断、治疗和预后有很好的量化方法，有较高的临床使用价值。本发明提供了制备方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种乙型肝炎 e 抗原酶联免疫定量法测定试剂盒, 其特征在于该试剂盒包括主要成份为 HbeAg 标准品 6 支、抗体预包被反应条 48 或 96 孔、酶标记乙型肝炎 e 抗体和次要成份阳性对照液 1 支、阴性对照液 1 支、20 倍浓洗涤液 1 瓶、底物缓冲液 2 瓶及终止液 1 瓶组成。

2. 根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎 e 抗原酶联免疫定量法测定试剂盒, 其特征在于其中 HbeAg 标准品为 HBV-DNA 重组的 HbeAg 片断 1-178aa 6 支、抗体预包被反应条为 48 或 96 孔、酶标记抗 HbeAb 单抗为偶联辣根过氧化物酶、阳性对照液为 HbeAb 阳性血清、阴性对照液为正常人血清、浓洗涤液为磷酸-Tween-20、底物缓冲液为 H_2O_2 和 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺、终止液为 $4NH_2SO_4$ 。

3. 一种如权利要求 1 所述的一种“定量法 HbeAg 酶联免疫测定试剂盒”的制备方法, 其特征在于该方法包括下列步骤:

(1) HbeAg 制备:

用亲和层析法从乙肝患者血中提取和纯化 HBV-DNA, 用 HBV-DNA 重组 HbeAg 基因片断的 1-178 氨基酸 (aa) 并测序和检定, 用于制备标准品和免疫源;

(2) HbeAb 制备:

用上述重组 HbeAg 免疫豚鼠, 得抗 HbeAb 多抗和免疫 Balb/C 小鼠得阳性鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞, 筛选阳性克隆建株, 得腹水;

抗 HbeAb 多抗和腹水用 $(NH_4)_2SO_4$ 或正辛酸沉淀处理, 得粗提抗 HbeAb 多抗和单抗;

用 DE_{52} 离子交换层析法得纯抗 HbeAb 多抗和单抗;
经高压液相色谱 (HPLC) 检定, 纯抗 HbeAb 多抗和单抗均呈单一峰, 其纯度 95% 以上;

(3) PreS1 Ag 标准品的制备:

用 HBV-DNA 重组 HbeAg 纯品 1-178aa, 分装成 0、7.5、31.15、125.0、250.0、500.0ng/ml 共 6 支;

(4) HRP-抗 HbeAb 单抗体制备: 辣根过氧化物酶 (HRP) 与纯化的抗 HbeAb 偶联;

(5) 包被抗体成为予包被反应条: 用抗 HbeAb 多抗包被;

(6) 分装试剂盒其余 7 种成份, 按试剂盒需要量分装在小瓶或尖底离心管中;

(7) 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格;

(8) 组装成为成品。

乙型肝炎 e 抗原酶联免疫定量法测定试剂盒及制备方法

技术领域

本发明属于免疫诊断试剂技术领域。具体涉及一种乙型肝炎 e 抗原酶联免疫定量法测定试剂盒及制备方法。

背景技术

乙型肝炎病毒 (HBV) 肝炎是一种较常见的疾病, 在全世界乙型肝炎 e 抗原 (HbeAg) 携带者约有 1.3 亿人。长期以来, 临床医生是根据“二对半”五种试剂盒检验结果判断乙肝患者的病情。但是这五种试剂查的是与乙型肝炎病毒 (HBV) 相关的表面和核内抗原和抗体。仅能定性, 不能定量。对治疗效果及病情变化较难做出确切的判断。

发明内容

本发明所要解决的技术问题在于克服上述不足之处, 设计乙型肝炎 e 抗原酶联免疫定量法测定试剂盒。

本发明提供了一种乙型肝炎 e 抗原酶联免疫定量法测定试剂盒 (定量 HbeAg 酶免试剂盒)。本发明的试剂盒包括主要成分为乙型肝炎 e 抗原 (HbeAg) 标准品、抗体预包被反应条、酶标记抗乙型肝炎 e 抗体 (HbeAg) 单抗与次要成分为阳性对照液 1 支、阴性对照液 1 支、20 倍浓洗涤液 1 瓶、底物缓冲液 2 瓶和终止液 1 瓶组成。

本发明的试剂盒中所述乙型肝炎 e 抗原标准品为用 HBV (乙型肝炎病毒) 重组的 HbeAg 片断 1-178 氨基酸(aa), 用抗 HbeAb 多抗预包被反应条为 48 或 96 孔; 酶标记的 HbeAb 单抗为辣根过氧化物酶; 阳性对照液为 HbeAb 阳性血清; 阴性对照液为正常人血清; 底物缓冲液分别为 H_2O_2 和 3,3', 5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 各一瓶,

终止液为 $4\text{NH}_2\text{SO}_4$ 。

本发明“乙肝病毒 HbeAg 酶免定量法测定试剂盒”检测的 HbeAg 含量与聚合酶链反应 (PCR) 有非常显著的一致性, 所以检测出病人 HbeAg 的含量, 就能知道 HBV-DNA 含量, 可以根据乙型肝炎 e 抗原的含量的多少判断治疗乙肝病人药物的效果及其病情的变化。

一、定量法 HbeAg 酶免试剂盒的实验方法

定量 HbeAg 检测的具体操作如下:

(1) 取出已包被条孔, 插入支架上, 用胶布固定, 以防脱落。

(2) 反应孔中分别加各浓度标准品每孔加 0、7.5、31.15、125.0、250.0、500.0ng/ml、待检血清、阴性对照血清及阳性质控血清各 $50\ \mu\text{l}$, 每次实验设空白 1 孔, 加蒸馏水 $50\ \mu\text{l}$, 然后除空白孔外各孔加酶标记液 $50\ \mu\text{l}$, 置 37°C 中反应 30 分钟。

(3) 甩去反应孔内液体在草纸上拍 2-3 下, 然后用洗涤液洗 5 次, 每次孔中加满洗涤液后停留 30 秒钟, 甩去洗涤液后都要在草纸上拍干, 以便洗涤彻底。(20 倍浓洗涤液 1ml+19ml 蒸馏水即为工作洗涤液)

(4) 各孔滴加底物缓冲液甲、乙各 1 滴, 37°C 中反应 10 分钟后各孔滴加终止液 1 滴, 置酶标仪 450nm 波长读取各孔光密度 (OD) 值。

(5) 以标准品浓度为横座标, OD 值为纵座标绘出标准曲线, 以各待测血清 OD 值在标准曲线上查出该血清的 HbeAg 浓度。

二、定量法测 HbeAg 酶免试剂盒方法学鉴定

用国家药品生物制品检定所提供的参考品进行检定, 见下表 1:

表 1

检验项目	标准规定	检验结果
阴性参考品符合率	不得出现假阳性 (0/15) (+/-)	0/15
阳性参考品符合率	允许出现 1 份假阴性 (1/10) (-/+)	1/10
精密性 CV (%)	$\leq 15\%$ (n=10)	$\leq 15\%$ (n=10)
灵敏度	$\leq 2\text{NCU/ml}$	$\leq 2\text{NCU/ml}$
稳定性	试剂各组分置 37°C 至少 3 天	符合标准

说明“定量法 HbeAg 酶免试剂盒”的特异性、精密性、灵敏度和稳定性是良好的合格的。

三、定量法 HbeAg 酶免试剂盒的定量标准曲线的制定

用 HBV-DNA 重组 HbeAg 基因片断的 1-178 氨基酸(aa)经纯化后,分装成标准品为 0、7.5、31.15、125.0、250.0、500.0ng/ml 共 6 支。用本试剂盒检测的 6 种标准的 OD 值为纵坐标, HbeAg 的 6 个标准含量为横坐标绘制成 HbeAg 试剂盒的定量标准曲线;

四、正常人 HbeAg 含量及灰区的确定

随机取 288 名献血员血清用“定量法乙肝病毒 HbeAg 酶联免疫测定试剂盒测定结果如下:

288 名献血员血清 HbeAg 测定的 OD 值均值 (X) =0.113, 标准差 (SD) =0.0474。所以其 OD 值的 cut off 值 (临界值) 为均值 (X) +3SD=0.113+0.142=0.255。再查标准曲线光密度 0.255=6.8ng/ml 血清。即 450nm 测定血清 OD 值大于 0.255=6.8ng/ml 血清者为阳性。

灰区范围的确定:

HbeAg 阴性或正常 (献血员) 人的 OD 值为 (X) =0.113, HbeAg 阳性的 OD 值为 X (0.113) +3SD(0.142)=0.255, 其 HbeAg 含量为 6.8ng/ml 血清。则灰区 OD 值范围就是 0.113 至 0.255 之间, 遇灰区患者视为可疑要复查。(附表 1: 288 名献血员 HBeAg 的 OD 值)

本发明定量 HbeAg 酶免试剂盒的临床应用和与定量 PCR 荧光试剂盒比较

第二军医大学附属长海医院、南京市第二医院和上海市传染病医院使用本发明的“定量法 HbeAg 酶免试剂盒”和“HBV 的 PCR 荧光定量法检测试剂盒”同时检测乙肝患者阳性血清 168 份, 以比较两种定量之间的相关性。

一、临床血清标本的来源:

各医院临床收集乙肝患者血清标本总数为 168 份, 其中长海医院 79 份、南京二院 55 份、传染病医院 34 份, 共 168 份。

另外, 从长海医院收集到献血员血 288 份 (做正常值用)

二、使用定量法 HbeAg 酶免法与 HBV-PCR 荧光定量法比较

(1) 方法

三个医院分别使用“定量法 HbeAg 酶免试剂盒”（按其说明书操作）和 PCR 荧光定量法试剂盒（按 HBV-PCR 荧光检测试剂盒说明书操作—深圳匹基生物技术开发有限公司）检测同一血样 168 份，并经统计学处理结果表明，该两种方法检测的结果非常显著的相关，以表 2 和图 2-4 显示如后：

(2) 结果

三个医院分别使用“定量法 HbeAg 酶免试剂盒”和 HBV-PCR 荧光定量法试剂盒检测同一血样 168 份结果（见表 3）。

表 2 288 名献血员 HBeAg 的 OD 值

0.049	0.075	0.076	0.080	0.071	0.082	0.088	0.052	0.071	0.070	0.071	0.063
0.063	0.075	0.079	0.079	0.075	0.150	0.076	0.067	0.075	0.067	0.074	0.080
0.075	0.258	0.077	0.081	0.073	0.083	0.075	0.082	0.094	0.070	0.074	0.072
0.063	0.072	0.076	0.083	0.077	0.083	0.075	0.086	0.077	0.089	0.064	0.070
0.066	0.070	0.077	0.077	0.074	0.074	0.084	0.078	0.079	0.069	0.066	0.053
0.069	0.084	0.075	0.076	0.083	0.086	0.071	0.075	0.084	0.080	0.067	0.076
0.125	0.067	0.072	0.088	0.079	0.082	0.086	0.087	0.074	0.076	0.089	0.075
0.069	0.077	0.070	0.079	0.073	0.091	0.068	0.073	0.080	0.078	0.070	0.074
0.074	0.071	0.077	0.079	0.070	0.067	0.089	0.070	0.191	0.069	0.129	0.068
0.076	0.089	0.077	0.075	0.088	0.141	0.082	0.079	0.088	0.072	0.067	0.125
0.075	0.232	0.081	0.156	0.074	0.069	0.082	0.082	0.074	0.074	0.083	0.067
0.056	0.070	0.074	0.081	0.079	0.086	0.075	0.074	0.077	0.077	0.071	0.065
0.072	0.067	0.097	0.080	0.086	0.074	0.083	0.079	0.082	0.078	0.074	0.065
0.075	0.075	0.073	0.096	0.085	0.076	0.083	0.075	0.078	0.079	0.261	0.074
0.082	0.073	0.069	0.075	0.067	0.077	0.150	0.076	0.077	0.079	0.076	0.062
0.068	0.074	0.074	0.074	0.057	0.092	0.085	0.073	0.083	0.079	0.083	0.053
0.049	0.076	0.077	0.086	0.072	0.084	0.089	0.051	0.073	0.071	0.071	0.064
0.080	0.101	0.080	0.113	0.077	0.152	0.077	0.068	0.075	0.069	0.134	0.151
0.087	0.174	0.078	0.078	0.077	0.082	0.074	0.083	0.094	0.092	0.073	0.219
0.062	0.073	0.077	0.082	0.079	0.108	0.109	0.152	0.078	0.091	0.065	0.188
0.065	0.071	0.115	0.128	0.138	0.138	0.085	0.148	0.079	0.072	0.068	0.054
0.069	0.138	0.076	0.077	0.089	0.086	0.072	0.075	0.126	0.082	0.225	0.076
0.126	0.068	0.073	0.089	0.081	0.084	0.157	0.089	0.075	0.078	0.089	0.076
0.069	0.147	0.071	0.144	0.073	0.093	0.135	0.144	0.080	0.078	0.071	0.074

表 3 三个医院两种方法比较

医院	血样数	相关系数 (r)	P 值	备注
长海	79	0.607	<0.01	非常显著相关
新华	55	0.698	<0.01	非常显著相关
传染	34	0.591	<0.01	非常显著相关

三个医院使用“定量法 HBeAg 酶免试剂盒”与“HBV-PCR 荧光定量试剂盒”测定同一血样的比较结果，两种方法均非常显著相关，均 P 值 < 0.01。说明两种方法具有同等的使用价值，“定量法 HBeAg 酶免试剂盒”与“HBV-PCR 荧光定量试剂盒”相比美。

本发明的另一目的是提供了乙型肝炎 e 抗原酶联免疫定量法测定试剂盒的制备方法。该方法包括下列步骤：

一、HBeAg 的制备：

用乙肝病人血提取纯化 HBV-DNA，用 HBV-DNA 重组 HBeAg 基因片断的 1-178 氨基酸序列测序和检定；

(1) 乙型肝炎 e 抗原的融合表达

材料和方法

材料：HBV-DNA 从用乙肝患者血中提取、纯化，PCR Kit、限制性内切酶购自 Tkara 公司，T4DNA 连接酶购自 Promega 公司，GST，还原型 4B 购自 Sigma 公司，上海捷倍思公司合成上又引物 5'-GGATCCATGCAACTT TTTACCTCTGC-3'，下游引物 5'-CTCGAGAACAACAGTAGTTTCCGGAAG-3'；

方法：反应在 PCR 合成仪上进行，反应条件为 94℃ 30S，60℃ 30S，72℃ 30S，35 个循环。PCR 产物由基康公司测序；

表达和纯化：将 PCR 产物用 BamHI 和 EcoRI 酶切，在 1% 琼脂糖凝胶上电泳回收 387bp 的片段，与相同酶切的载体 Ggex-4T-1 连接，转化大肠杆菌 HB101 株，诱导用 IPTG，终浓度 1mmol/l，SDS-PAGE 分析结果，按 Sepharoses 4B 说明书纯化表达融合蛋白产物，采用间接 ELISA 法检测 HBeAg，以检定 HBeAg；

(2) 乙型肝炎病毒 e 抗原的氨基酸 (1-178) 如下：

1	10	20	30	40
MQLFHLCLIISCSCPTVQASKLCLGWLWGMIDIDPYKEFGASVELL				
50	60	70	80	90
SFLPSDFFPSIRDLLDTASALYREALESPHHTALRQAILCWG				
100	110	120	130	
ELMNLATWVGSNLEDPASRELVVSYVNVNMGLKIRQLLWFHISCL				

140 150 160 170 178
TFGRETVLEYLVSFGVWIRTPPAYRPPNAPILSTLPETTVV

二、HbeAb 的制备:

(1)用上述重组抗原免疫豚鼠,得抗 HbeAg 抗血清并免疫 Balb/C 小鼠得阳性鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞,筛选阳性克隆建株,得腹水;

(2) 抗血清和腹水用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或正辛酸沉淀处理,得粗提抗 HbeAb 抗体和单抗;

(3)用 DE_{52} 离子交换层析法得纯抗 HbeAb 多抗和抗 HbeAb 单抗;

(4) 经高压液相色谱(HPLC)检定,纯抗 HbeAb 多抗和抗 HbeAb 单抗呈单一峰,其纯度 95%以上;

三、HRP-抗 HbeAb 单抗制备: 辣根过氧化物酶 (HRP) 与纯化的抗 HbeAb 单抗偶联;

四、前 HbeAg 标准品的制备: 用 HBV-DNA 重组的 HbeAg 纯品 1-178aa; 分装成 0、7.5、31.15、25.0、250.0、500.0ng/ml 共 6 支;

五、包被抗体成为予包被反应条: 用抗 HbeAb 多抗;

六、分装试剂盒其余 7 种成份,按试剂盒需要量分装在小瓶或尖端离心管中;

七、检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格;

八、组装成为成品。

本发明的试剂盒在使用时可以如下操作:

(1) 取出已包被条孔,插入支架上,用胶布固定,以防脱落。

(2) 反应孔中,分别加各浓度标准品。待检血清 $50\ \mu\text{l}$, 各板设阳性对照 1 孔 ($50\ \mu\text{l}$) 阴性对照 1 孔 ($50\ \mu\text{l}$), 空白对照 1 孔 (加蒸馏水 $50\ \mu\text{l}$), 然后除空白对照孔外各孔加酶标记液 $50\ \mu\text{l}$, 置 37°C 中反应 30 分钟。

(3) 取出反应板甩去孔内液体后停留 30 秒钟,每次甩去洗涤液后都要在草纸上拍干,以便洗涤彻底。(20 倍浓洗涤液 1ml+19ml 蒸馏水即为工作洗涤液)

(4) 各孔滴加底物缓冲液甲、乙各 1 滴，室温避光 10-15 分钟后再每孔滴加终止液 1 滴，置酶标仪中 450nm 波长读数(测 OD 值)。

(5) 结果判定

以标准品浓度为横座标,以标准品的 OD 值为纵座标,给出标准曲线图,从各待检血清 OD 值就可在标准曲线上查出该血清的 HBeAg 浓度 (HBeAg ng/ml 血)。

本发明的试剂盒能非常专一地定量测出检测患者血清 HBeAg 的含量。它具有简便、灵敏和稳定等特点。且本试剂盒操作简便快速,采用一步法可在短时间内,约 40 分钟左右获得实验结果,比 PCR 检测法 (PCR 法最快需 6-8 小时完成实验) 快速;经临床试用 HBeAg 定量法与 PCR 定量的 HBV-DNA 有很好的符合率,因而本试剂盒对判断病人是否有病毒复制和定量,对确定乙肝感染病程预后及用药后的疗效具有十分重要的参考意义;PCR 法需贵重的仪器设备,试剂昂贵,收费高,而本试剂盒整个实验中无需贵重仪器设备,试剂便宜且收费低廉,能适用于各级医院及临床测试中心,也可用于流行病学普查,因而具有简便、灵敏、重复性好的优点,是一种对 HBV 感染、复制和乙肝病人诊断、治疗和预后具有 HBV 的量的量化的新方法。

附图说明

图 1 本发明定量 HBeAg 酶免试剂盒标准曲线图

(横坐标为 HBeAg 标准品的浓度)

图 2 长海医院使用本发明定量 HBeAg 酶免试剂盒与 HBV-PCR 荧光法比较图

横坐标 X 为定量 HBeAg 酶免法 (HBeAg ng/ml 血)

纵坐标 Y 为 HBV-PCR 荧光法 (HBV 拷贝数/ml 血)

两种方法相关系数 (r) =0.607 P 值 <0.01

直线方程: $Y=4.376+0.501X$

图3 南京市二院使用本发明定量HBeAg酶免试剂盒与HBV-PCR
荧光法比较图

横坐标 X 为定量 HBeAg 酶免法 (HBeAg ng/ml 血)
纵坐标 Y 为 HBV-PCR 荧光法 (HBV 拷贝数/ml 血)
两种方法相关系数 (r) =0.698 P 值 <0.01
直线方程: $Y=0.236+1.306X$

图4 上海传染病医院使用本发明定量 HBeAg 酶免试剂盒与 HBV
-PCR 荧光法比较图

横坐标 X 为定量 HBeAg 酶免法 (HBeAg ng/ml 血)
纵坐标 Y 为 HBV-PCR 荧光法 (HBV 拷贝数/ml 血)
两种方法相关系数 (r) =0.591 P 值 <0.01
直线方程: $Y=1.163+0.258X$

具体实施方式

实施例1 定量法 HbeAg 酶免试剂盒的生产步骤

一、首先从乙肝患者血中提取纯化 HBV-DNA

(1) 取乙肝患者血清过亲和层析柱, 得纯 HBV-DNA

(2) 用 HBV-DNA 重组 HbeAg1-178aa 测序并检定, 得到 HbeAg
片断 1-178aa 序列;

二、制备并纯化包被抗体 HbeAb:

用重组的 HbeAg 1-178aa 免疫小鼠得单抗和用重组 HbeAg 1-
178aa 免疫豚鼠得抗 HbeAg 多抗。加等体积的饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀,
粗提后再经 DE-52 柱纯化, 收集蛋白峰, PBS 透析得抗 HbeAb 单抗或
抗 HbeAb 多抗纯品。经 HPLC 检定得纯抗 HbeAb 多抗和单抗, 呈现单
一峰。纯度 >95%, 效价: 多抗 2-3 万, 单抗 8-10 万。

三、酶标记抗体制备

抗 HbeAg 抗体用过碘酸钠法与辣根过氧化物偶联

对 PBS 充分透析，加等体积甘油， -20°C 以下保存。效价 >2000 。

四、HBeAg 标准品的制备：

用 HBV—DNA 重组的 HbeAg 纯品 1—178aa 分装成 0、7.5、31.15、125.0、250.0、500.0ng/ml 共 6 支。

五、酶标记抗体浓度选定

采用方阵滴定法选择酶标记抗体的工作浓度大于 1：2000。

HbeAg 重组从 $10\mu\text{g/ml}$ 倍增稀释，包被酶标板，加梯度稀释的酶标抗体测定，以确定最适稀释度。

六、预包被抗体板的制备

(1) 包被

Na_2CO_3	0.6g
NaHCO_3	1.58g
重蒸水	500ml

加入适量 HBeAg 多抗，调整 PH 至 9.5，加入微孔板各孔中，置湿盒中加盖， 4°C 过夜甩干。

(2) 洗涤

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.6g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.4g
20%Tween—20	2.5ml
NaCL	8.2g
重蒸水	100ml

调整 PH 至 7.2，1:10 稀释后，加入微孔板各孔中，静置 5 秒后甩干，上述操作重复三次，以除去剩余抗体。

(1) 封闭

明胶	1.1g	微波炉加温	注入酶标
BSA	5.0g	至呈透明溶液	板各孔中
0.1N PBS	20ml	——→	冷却至室温 ——→
蒸馏水	至 100ml		

弃去液体

放入湿盒中（加盖） 吸水纸上拍干 重复一次，待干燥后，
 —— → 37℃ 1hr —— → 放入有干燥剂的塑料袋
 封口，保存于 4℃。

七、阳性对照的制备

HBeAg 和 HBV-DNA 同时呈阳性的乙肝患者血清，60℃放置 1 个小时，除菌过滤，用本药盒测定 OD 值 > 0.3，备用，分装。

八、阴性对照的制备

用本试剂盒测定正常人血清 OD 值在 0-0.03，加万分之二硫柳汞，分装备用。

酶标单抗配置 —————→
 10%小牛血清
 90%0.15MPBS

HBeAb—HRP —————→ 稀释 20 倍，分装。
 （稀释度 1:2000）

九、酶标单抗稀释液

BSA	0.5g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.6g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.4g
NaCl	8.2g
20%Tween—20	100ml

调整 PH 至 7.2

十、底物液 A

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	1.7g
柠檬酸 · H ₂ O	0.5g
3%H ₂ O ₂	200 μ l

重蒸水 100ml

调整 PH 至 5.0

十一、底物液 B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.7g

柠檬酸· H_2O 0.5g

重蒸水 100ml

调整 PH 至 5.0 后，加入 10ml DMSO 含 60mg TMB 的溶液 25 μl

十二、终止液

浓 H_2SO_4 10ml

重蒸水 80ml

十三、10x 洗涤液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.6g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.4g

20% Tween-20 2.5ml

重蒸水 100ml

调整 PH 至 7.2

十四、半成品及成品的组成

上述（一）→（十四）步骤所得产品装入小瓶及尖底离心管中，即为半成品。抽出三份经过特异性、稳定性、灵敏度及精密度检定合格才能组装成定量 HBeAg 试剂盒。组装成盒后还需抽出三份同半成品一样经过检定合格才能出售。

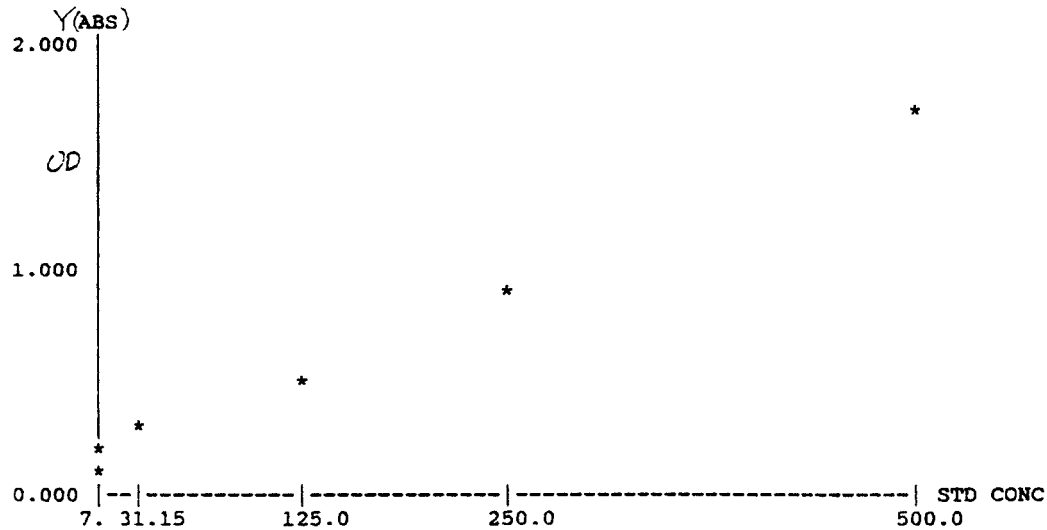
MULTISKAN EX PRIMARY EIA V. 2.1-0

ABSORBANCE MODE
CONTINUOUS MOVEMENT
FILTER 450

LINEAR STANDARD CALC.

	ABS	CONC	WELLS
STD 1	0.120	0.000	A6
STD 2	0.185	7.500	A5
STD 3	0.278	31.15	A4
STD 4	0.506	125.0	A3
STD 5	0.900	250.0	A2
STD 6	1.662	500.0	A1

ABS=SLOPE*CONC+INTERCEPT
SLOPE 0.003
INTERCEPT 0.149



HBeAg 标准品的浓度

图 1

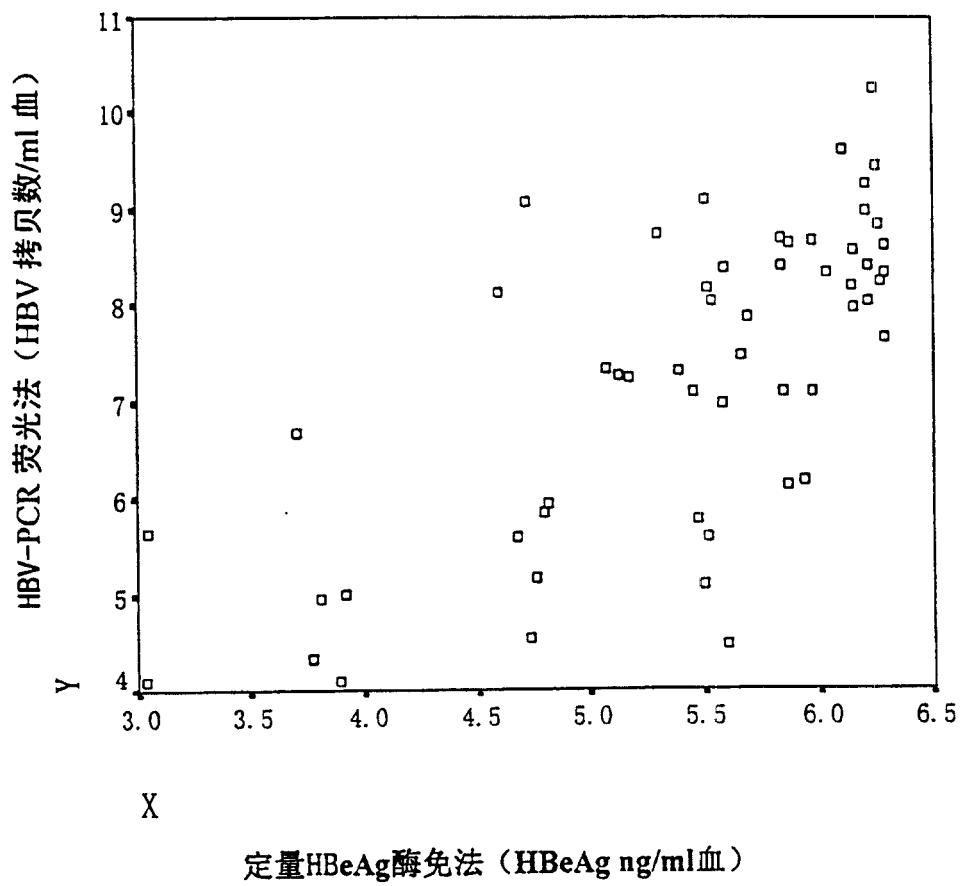


图 3

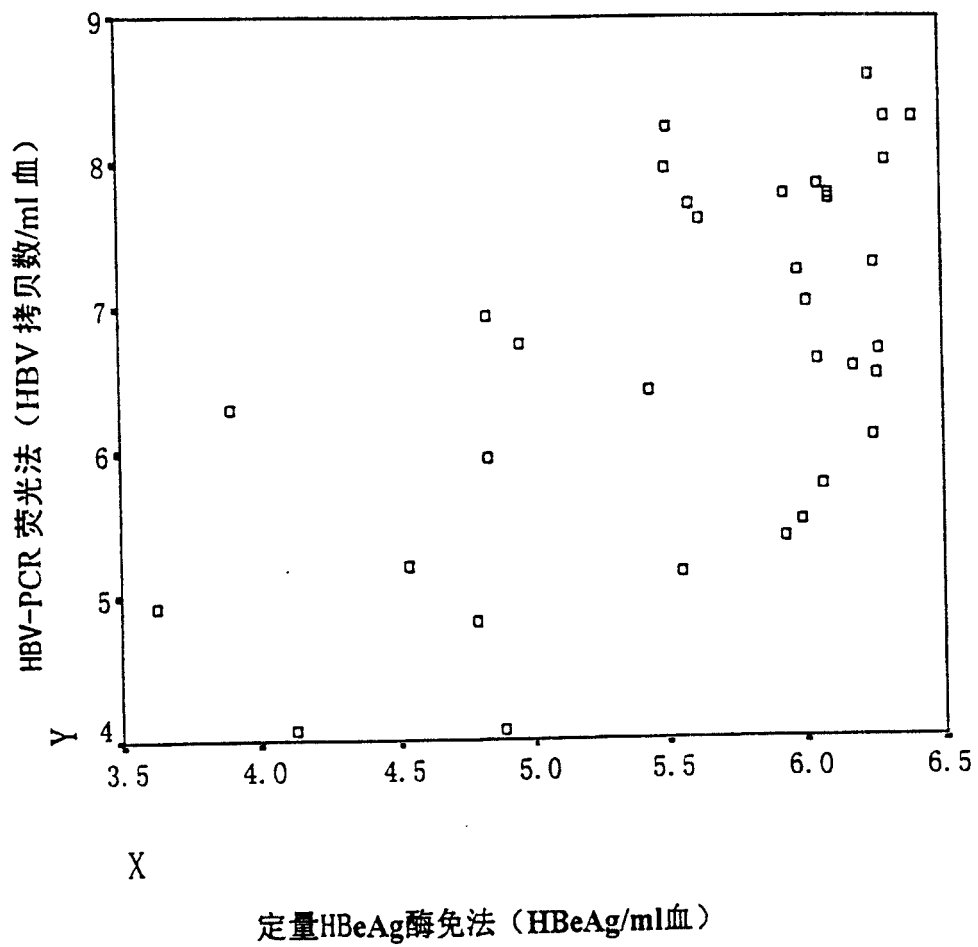


图 4

专利名称(译)	乙型肝炎e抗原酶联免疫定量法测定试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN1704756A	公开(公告)日	2005-12-07
申请号	CN200410024658.2	申请日	2004-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
当前申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
[标]发明人	杜凤鸣		
发明人	杜凤鸣		
IPC分类号	G01N33/547 G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	王巍		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫诊断试剂技术领域。本发明公开了一种乙型肝炎e抗原酶联免疫定量法测定试剂盒。本发明的试剂盒包括HbeAg标准品、抗体预包被反应条、酶标记乙型肝炎e抗体和阳性对照液、阴性对照液、洗涤液、底物缓冲液与终止液组成。本发明的试剂盒与HBV - PVC荧光法想必具有快速、简便、灵敏、价廉、重复性好的优点，是对HBV感染、复制和乙肝病人的诊断、治疗和预后有很好的量化方法，有较高的临床使用价值。本发明提供了制备方法。

