



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106950372 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(21)申请号 201710121203.X

(22)申请日 2017.03.02

(71)申请人 广州市康润生物科技有限公司

地址 511442 广东省广州市番禺区南村镇  
塘埗东村登云大路8号2栋601A

(72)发明人 曹益彬 胡洪海 黄文喜 林琴  
叶晶龙 谢文锋

(74)专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 赵蕊红

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/52(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂

(57)摘要

一种EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,成分包括细胞片、荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品、封片剂、PBS粉剂和盖玻片。细胞片的制备包括:B95-8细胞系和Raji细胞系及细胞片的均一性控制。稀释液含有稳定剂,稀释的荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品在2~8℃的条件下均可稳定12个月。本发明的试剂的敏感性和特异性性能均佳,稳定性良好,适合与自动化设备配套使用。

1. 一种EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:主要成分包括细胞片、荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品、封片剂、PBS粉剂和盖玻片。

2. 根据权利要求1所述的EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:细胞片的制备过程如下,

(1) 建立细胞系

(1.1) 培养液的设置:以RPMI 1640为基础培养基,添加10%~15%的胎牛血清,调整培养液PH初始值为7.2~7.4;

(1.2) 建立B95-8细胞系和Raji细胞系

B95-8细胞系的建立工艺是:将B95-8细胞放于上述培养液中,置于35~37℃含3~6% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,建立表达效率稳定均一的B95-8细胞系;

Raji细胞系的激活工艺是:在500~1000rpm的条件下离心5~10分钟收集Raji细胞,用新的培养液重悬Raji细胞,并调整Raji细胞深度为 $(1\sim3)\times 10^6$ 个/mI,增加正丁酸钠至终浓度为0.1~1mM,增加TPA至终浓度为10~100ng/mI,并置于35~37℃含3~6% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养12~48h,即建立了表达效率稳定均一的Raji细胞系;

(2) 细胞片的均一性控制

涂片的细胞控制传代在50代以内,以细胞裂解个数少于5%为标准,以相同的涂片工艺进行涂片。

3. 根据权利要求2所述的EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:

(1) 建立细胞系

(1.1) 培养液的设置:以RPMI 1640为基础培养基,添加12%~14%的胎牛血清,调整培养液PH初始值为7.3;

(1.2) 建立B95-8细胞系和Raji细胞系

B95-8细胞系的建立工艺是:将B95-8细胞放于上述培养液中,置于36℃含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,建立表达效率稳定均一的B95-8细胞系;

Raji细胞系的激活工艺是:在600~900rpm的条件下离心6~8分钟收集Raji细胞,用新的培养液重悬Raji细胞,并调整Raji细胞深度为 $2\times 10^6$ 个/mI,增加正丁酸钠至终浓度为0.3~0.5mM,增加TPA至终浓度为30~80ng/mI,并置于36℃含5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养15~36h,即建立了表达效率稳定均一的Raji细胞系。

4. 根据权利要求1或2或3所述的EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:

稀释的荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品在2~8℃的条件下均可稳定12个月。

所述荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品或阴性对照质控品的稀释液含有稳定剂;

以稀释液重量份为1,稳定剂含有如下重量百分比的成分:

甘氨酸 1%~5%、

海藻糖 1%~5%、

BSA 1%~5%、

PBS 1%~3%。

5. 根据权利要求4所述的EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:

稳定剂含有如下重量百分比的成分：

甘氨酸 2%~3%、

海藻糖 1%~4%、

BSA 2%~3%、

PBS 2%~2.5%。

6. 根据权利要求5所述的EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:

以重量百分比计,所述封片剂含有:

甘油 10%~30%;

荧光保护剂 3~8%;

PBS 50%~90%。

7. 根据权利要求6所述的EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:

以重量百分比计,所述封片剂含有:

甘油 15%~20%;

荧光保护剂 5~7%;

PBS 65%~80%。

8. 根据权利要求7所述的EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:

成品结构为在一载玻片上具有12孔疏水圆孔的结构,12孔疏水圆孔呈两列设置,每列均为6个。

9. 根据权利要求8所述的EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:12孔疏水圆孔呈两行六列矩阵排布。

10. 根据权利要求9所述的EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂,其特征在于:成品结构的载玻片具有识别码。

## EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,特别是涉及一种EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂。

### 背景技术

[0002] 鼻咽癌是我国南方地区常见的恶性肿瘤,鼻咽癌的发生是个多因素、多阶段的过程。EB病毒可导致鼻咽部上皮细胞永生化,从而进一步使其恶化。

[0003] 在针对鼻咽癌的筛查及临床诊断研究中,较为肯定的EB病毒抗原主要有衣壳抗原(VCA)和早期抗原(EA)。已有研究证实EBV VCA-IgA抗体可出现于鼻咽癌确诊前10-61个月,通过持续检测EBV VCA-IgA有助于发现早期鼻咽癌。EA-IgA的出现通常提示机体EB病毒复制开始,在鼻咽癌患者有较高的特异性,不足之处在于敏感性较低,临床筛查及血清学诊断多与VCA-IgA配合使用,可提高筛查的准确率。

[0004] VCA-IgA和EA-IgA的常见的检测方法有:酶联免疫吸附法、免疫酶法、间接免疫荧光法。

[0005] 酶联免疫吸附法:将VCA或EA重组抗原包被于微孔板中,血清中的抗体与微孔中的抗原反应,形成抗原-抗体复合物;洗板后加入酶标二抗进行反应,形成抗原-抗体-酶标二抗复合物;洗板后加入显色底物进行显色反应,然后加入酸性终止液终止反应。使用酶标仪读取反应液的OD值。根据比较样本的OD值与阳性质控品的OD值来判读阴阳性。酶联免疫吸附法.敏感性高,但特异性低,容易产生假阳性和假阴性。另外该方法属于半定量,无法实现精准定量。

[0006] 免疫酶法:特定的细胞固定于载玻片上,血清中的抗体与载玻片上的细胞孵育反应,形成细胞-抗体复合物;洗片后加入酶标二抗,形成细胞-抗体-酶标二抗复合物;洗片后加入显色底物反应;反应结束后洗片,并封片,利用普通光学显微镜观察细胞着色情况。根据细胞着色深浅判断血清样本的阴阳性。免疫酶法存在干扰因子较多,容易误判的缺陷,而人工判读则又存在主观性强,难以进行质量控制和统一比较。

[0007] 间接免疫荧光法:特定的细胞固定于载玻片上,血清中的抗体与载玻片上的细胞孵育反应,形成细胞-抗体复合物;洗片后加入荧光素标记二抗,形成细胞-抗体-荧光素标记二抗复合物;反应结束后洗片,并封片,利用荧光显微镜观察细胞荧光情况。根据细胞荧光有无或深浅判断血清样本的阴阳性。间接免疫荧光法敏感性不高、自动化程度低,主观性强,无法实现标准化定量。

[0008] 以上各种检测方法结果的准确性、自动化操作程度的局限因素均与检测试剂有关,如果能够提供性能较好的试剂可以提高检测的准确性。

[0009] 因此,针对现有技术不足,提供一种EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂以克服现有技术不足甚为必要。

### 发明内容

[0010] 本发明的目的在于避免现有技术的不足之处而提供一种EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,该EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂具有良好的敏感性和特异性,能够提高检测准确结果。

[0011] 本发明的上述目的通过如下技术手段实现。

[0012] 提供一种EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,主要成分包括细胞片、荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品、封片剂、PBS粉剂和盖玻片。

[0013] 细胞片的制备过程如下,

[0014] (1) 建立细胞系

[0015] (1.1) 培养液的设置:以RPMI1640为基础培养基,添加10%~15%的胎牛血清,调整培养液PH初始值为7.2~7.4;

[0016] (1.2) 建立B95-8细胞系和Raji细胞系

[0017] B95-8细胞系的建立工艺是:将B95-8细胞放于上述培养液中,置于35~37℃含3~6%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,建立表达效率稳定均一的B95-8细胞系;

[0018] Raji细胞系的激活工艺是:在500~1000rpm的条件下离心5~10分钟收集Raji细胞,用新的培养液重悬Raji细胞,并调整Raji细胞深度为(1~3)×10<sup>6</sup>个/ml,增加正丁酸钠至终浓度为0.1~1mM,增加TPA至终浓度为10~100ng/ml,并置于35~37℃含3~6%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养12~48h,即建立了表达效率稳定均一的Raji细胞系;

[0019] (2) 细胞片的均一性控制

[0020] 涂片的细胞控制传代在50代以内,以细胞裂解个数少于5%为标准,以相同的涂片工艺进行涂片。

[0021] 另一优选的,(1) 建立细胞系

[0022] (1.1) 培养液的设置:以RPMI1640为基础培养基,添加12%~14%的胎牛血清,调整培养液PH初始值为7.3;

[0023] (1.2) 建立B95-8细胞系和Raji细胞系

[0024] B95-8细胞系的建立工艺是:将B95-8细胞放于上述培养液中,置于36℃含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,建立表达效率稳定均一的B95-8细胞系;

[0025] Raji细胞系的激活工艺是:在600~900rpm的条件下离心6~8分钟收集Raji细胞,用新的培养液重悬Raji细胞,并调整Raji细胞深度为2×10<sup>6</sup>个/ml,增加正丁酸钠至终浓度为0.3~0.5mM,增加TPA至终浓度为30~80ng/ml,并置于36℃含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养15~36h,即建立了表达效率稳定均一的Raji细胞系。

[0026] 进一步的,稀释的荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品在2~8℃的条件下均可稳定12个月。

[0027] 进一步的,荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品或阴性对照质控品的稀释液含有稳定剂;

[0028] 以稀释液重量份为1,稳定剂含有如下重量百分比的成分:

[0029] 甘氨酸 1%~5%、

[0030] 海藻糖 1%~5%、

[0031] BSA 1%~5%、

[0032] PBS 1%~3%。

- [0033] 另一优选的,稳定剂含有如下重量百分比的成分:
- [0034] 甘氨酸 2%~3%、
- [0035] 海藻糖 1%~4%、
- [0036] BSA 2%~3%、
- [0037] PBS 2%~2.5%。
- [0038] 进一步的,以重量百分比计,所述封片剂含有:
- [0039] 甘油 10%~30%;
- [0040] 荧光保护剂 3~8%;
- [0041] PBS 50%~90%。
- [0042] 另一优选的,以重量百分比计,所述封片剂含有:
- [0043] 甘油 15%~20%;
- [0044] 荧光保护剂 5~7%;
- [0045] PBS 65%~80%。
- [0046] 优选的,上述的EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂,成品结构为在一载玻片上具有12孔疏水圆孔的结构,12孔疏水圆孔呈两列设置,每列均为6个。
- [0047] 进一步的,12孔疏水圆孔呈两行六列矩阵排布。
- [0048] 进一步的,成品结构的载玻片具有识别码。
- [0049] 本发明的EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂,主要成分包括细胞片、荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品、封片剂、PBS粉剂和盖玻片。本发明的试剂具有敏感性、特异性高的特点,能够提高检测的精确度。

### 具体实施方式

- [0050] 结合以下实施例对本发明作进一步描述。
- [0051] 实施例1。
- [0052] 一种EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂,主要成分包括细胞片、荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品、封片剂、PBS粉剂和盖玻片。
- [0053] 细胞片的制备过程如下,
- [0054] (1) 建立细胞系
- [0055] (1.1) 培养液的设置:以RPMI1640为基础培养基,添加10%~15%的胎牛血清,调整培养液PH初始值为7.2~7.4。
- [0056] (1.2) 建立B95-8细胞系和Raji细胞系
- [0057] B95-8可天然表达EBV VCA,B95-8细胞系的建立工艺是:将B95-8细胞放于上述培养液中,置于35~37℃含3~6%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,建立表达效率稳定均一的B95-8细胞系。
- [0058] Raji细胞培养条件与B95-8细胞一样,但Raji细胞须经激活剂激活方可表达EBV EA。Raji细胞系的激活工艺是:在500~1000rpm的条件下离心5~10分钟收集Raji细胞,用新的培养液重悬Raji细胞,并调整Raji细胞深度为(1~3) × 10<sup>6</sup>个/ml,增加正丁酸钠至终浓度为0.1~1mM,增加TPA至终浓度为10~100ng/ml,并置于35~37℃含3~6%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养12~48h,即建立了表达效率稳定均一的Raji细胞系。

[0059] (2) 细胞片的均一性控制

[0060] 涂片的细胞控制传代在50代以内,以细胞裂解个数少于5%为标准,以相同的涂片工艺进行涂片。

[0061] 本发明稀释的荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品在2~8℃的条件下均可稳定12个月。

[0062] 稳定性的效果通过稳定剂作用达到。具体的,荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品或阴性对照质控品的稀释液含有稳定剂,含有稳定剂的稀释液的PH值控制在7.2至7.3之间。

[0063] 以稀释液重量份为1,稳定剂含有如下重量百分比的成分:

[0064] 甘氨酸 1%~5%、

[0065] 海藻糖 1%~5%、

[0066] BSA 1%~5%、

[0067] PBS 1%~3%。

[0068] 具体的,以重量百分比计,封片剂含有:

[0069] 甘油 10%~30%;

[0070] 荧光保护剂 3~8%;

[0071] PBS 50%~90%。

[0072] 该EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,成品结构为在一载玻片上具有12孔疏水圆孔的结构,12孔疏水圆孔呈两列设置,每列均为6个。优选,12孔疏水圆孔呈两行六列矩阵排布。为了识别准确及自动化应用,成品结构的载玻片具有识别码,适用于与自动化免疫分析仪匹配,并可配套EBV VCA/EA-IgA CIF即时滴度定量判读软件进行实时定量判读,使得自动化监测成为可能。

[0073] 本发明的EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,主要成分包括细胞片、荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品、封片剂、PBS粉剂和盖玻片。

[0074] 本发明中新改良了两种经激活可稳定高效表达抗原的细胞系B95-8和Raji,同时对细胞片、荧光二抗和质控品做了稳定性处理和优化,使试剂的敏感性和特异性均大大提高。

[0075] 通过对细胞片、荧光二抗和EBV VCA/EA IgA质控品添加稳定剂,使试剂的效期大大增长。相比于目前市场上产品的有效期提高了至少一倍。

[0076] EBV VCA/EA IgA CIF检测试剂的成品设计可配套应用于全自动荧光免疫分析仪(HELIOS),实现操作过程自动化。且优化的涂片工艺和均匀性控制,使得细胞片批间差减少,应用在EBV VCA/EA IgA CIF即时滴度定量判读系统,可得出更准确的定量结果,实现全国实验室间的可比性。

[0077] 实施例2。

[0078] 一种EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂,其它特征与实施例1相同,不同之处在于:细胞片的制备过程如下。

[0079] (1) 建立细胞系

[0080] (1.1) 培养液的设置:以RPMI1640为基础培养基,添加12%~14%的胎牛血清,调整培养液PH初始值为7.3;

[0081] (1.2) 建立B95-8细胞系和Raji细胞系

[0082] B95-8细胞系的建立工艺是：将B95-8细胞放于上述培养液中，置于36℃含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养，建立表达效率稳定均一的B95-8细胞系；

[0083] Raji细胞系的激活工艺是：在600~900rpm的条件下离心6~8分钟收集Raji细胞，用新的培养液重悬Raji细胞，并调整Raji细胞深度为 $2 \times 10^6$ 个/ml，增加正丁酸钠至终浓度为0.3~0.5mM，增加TPA至终浓度为30~80ng/ml，并置于36℃含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养15~36h，即建立了表达效率稳定均一的Raji细胞系。

[0084] 本发明中新改良了两种经激活可稳定高效表达抗原的细胞系B95-8和Raji，同时对细胞片、荧光二抗和质控品做了稳定性处理和优化，使试剂的敏感性和特异性均大大提高。

[0085] 实施例3。

[0086] 一种EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂，其它特征与实施例1相同，不同之处在于：稳定剂含有如下重量百分比的成分：

[0087] 甘氨酸 2%~3%、

[0088] 海藻糖 1%~4%、

[0089] BSA 2%~3%、

[0090] PBS 2%~2.5%。

[0091] 本发明中新改良了两种经激活可稳定高效表达抗原的细胞系B95-8和Raji，同时对细胞片、荧光二抗和质控品做了稳定性处理和优化，使试剂的敏感性和特异性均大大提高。

[0092] 通过对细胞片、荧光二抗和EBV VCA/EA IgA质控品添加稳定剂，使试剂的效期大大增长。相比于目前市场上产品的有效期提高了至少一倍。

[0093] EBV VCA/EA IgA CIF检测试剂的成品设计可配套应用于全自动荧光免疫分析仪(HELIOS)，实现操作过程自动化。且优化的涂片工艺和均匀性控制，使得细胞片批间差减少，应用在EBV VCA/EA IgA CIF即时滴度定量判读系统，可得出更准确的定量结果，实现全国实验室间的可比性。

[0094] 实施例4。

[0095] 一种EB病毒VCA/EA-IgA细胞免疫荧光检测试剂，其它特征与实施例1相同，不同之处在于：以重量百分比计，封片剂含有：

[0096] 甘油 15%~20%；

[0097] 荧光保护剂 5~7%；

[0098] PBS 65%~80%。

[0099] 本发明的试剂的敏感性和特异性性能均佳，稳定性良好，适合与自动化设备配套使用。

[0100] 最后应当说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非对本发明保护范围的限制，尽管参照较佳实施例对本发明作了详细说明，本领域的普通技术人员应当理解，可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换，而不脱离本发明技术方案的实质和范围。

专利名称(译)	EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂		
公开(公告)号	<a href="#">CN106950372A</a>	公开(公告)日	2017-07-14
申请号	CN201710121203.X	申请日	2017-03-02
[标]申请(专利权)人(译)	广州市康润生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市康润生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市康润生物科技有限公司		
[标]发明人	曹益彬 胡洪海 黄文喜 林琴 叶晶龙 谢文锋		
发明人	曹益彬 胡洪海 黄文喜 林琴 叶晶龙 谢文锋		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/569 G01N33/533 G01N33/52		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/52 G01N33/533 G01N33/56994 G01N2333/05 G01N2800/14		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

一种EB病毒VCA/EA-IGA细胞免疫荧光检测试剂，成分包括细胞片、荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品、封片剂、PBS粉剂和盖玻片。细胞片的制备包括：B95-8细胞系和Raji细胞系及细胞片的均一性控制。稀释液含有稳定剂，稀释的荧光二抗FITC-IgA、阳性对照质控品、阴性对照质控品在2~8°C的条件下均可稳定12个月。本发明的试剂的敏感性和特异性性能均佳，稳定性良好，适合与自动化设备配套使用。