



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107085111 A

(43)申请公布日 2017.08.22

(21)申请号 201710244167.6

(22)申请日 2017.04.14

(71)申请人 江苏福隆生物技术有限公司

地址 214434 江苏省无锡市江阴市城东街道东盛西路78号

(72)发明人 戴宝平 彭会军 徐亮 王剑

(74)专利代理机构 江阴市同盛专利事务所(普通合伙) 32210

代理人 孙燕波

(51)Int.Cl.

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书3页 说明书10页

(54)发明名称

乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒及制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒，包括的试剂：生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、乙肝病毒前S1阴性对照、乙肝病毒前S1阳性对照、浓缩洗液、底物液A、底物液B。本发明的主要设计思路是在化学发光免疫分析基础上，通过引入具有抗生物素抗体-生物素体系，稳定试剂盒检测特异性的同时，大幅增加了检测灵敏度以及检测时间。改进了高温振荡式抗生物素抗体包被工艺，从而降低抗体/抗原使用量的同时，简化了试剂生产流程，缩短了生产周期。

1. 一种乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒，其特征在于：包括的试剂：生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、乙肝病毒前S1阴性对照、乙肝病毒前S1阳性对照、浓缩洗液、底物液A、底物液B。

2. 根据权利要求1所述的乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒，其特征在于：所述生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的浓度为0.01~5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，所述抗生物素抗体包被的酶标板的抗生物素抗体的包被浓度为0.1~5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，所述辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的浓度为0.03~5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

3. 根据权利要求1所述的乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒，其特征在于：所述乙肝病毒前S1阴性对照的未包含乙肝病毒前S1，所述乙肝病毒前S1阳性对照是乙肝病毒前S1阳性血清以pH值为7.4的Tris-HCl缓冲液配制得到的，稀释体积比为1:5000。

4. 根据权利要求1所述的乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒，其特征在于：所述生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备过程为：生物素标记的乙肝病毒前S1抗体加入到pH值为7.4的缓冲液中，调节到适宜倍数，混匀得到。

5. 根据权利要求1所述的乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒，其特征在于：所述抗生物素抗体包被的酶标板的制备过程为：所述抗生物素抗体包被板采用高温振荡式包被，包被温度为39±1°C，包被时间为1~3小时，采用低速振荡包被形式，振荡幅度与方式：3mm，采用水平回转，转速为200~500rpm，封闭和干燥温度为37±1°C，封闭时间为1.5~3小时，干燥时间为2~4小时；采用高温振荡式包被工艺，包被板制备时间可控制在5~7小时。

6. 根据权利要求1所述的乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒，其特征在于：所述辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备过程为：辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液加入到pH值为7.4的缓冲液中，调节到适宜倍数，混匀得到。

7. 根据权利要求1所述的乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒，其特征在于：所述抗生物素抗体包被的酶标板所用包被液为0.01M的碳酸缓冲液，pH9.6±0.1，所用封闭液的含0.3wt%BSA、0.1% Proclin300(v/v)、1 wt %羊血清、1 wt %鱼皮明胶、2 wt %海藻糖和10 wt %蔗糖的0.1M pH7.4 TBS缓冲液。

8. 一种制备权利要求1所述的乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒的方法，其特征在于：包括如下步骤

一、浓缩洗液的配制，步骤如下：

- 1、称取KCl 60g、NaCl 300g于1L 容器中；
- 2、称取20.0g Tween-20 于100ml 容器中加50ml 水使其完全溶解后，倒入上述1L 容器中；
- 3、用移液器将Proclin-300 量取2ml，倒入上述1L 容器中；
- 4、用量筒量取适量纯化水于上述1L 容器中，充分搅拌直至完全溶解；
- 5、调pH，控制其范围在7.35~7.45 之间；
- 6、最后定容至1000ml，完全溶解后用0.2 $\mu\text{m}$  滤器过滤即得；

## 二、底物液的配制

### (一) 底物液A 的配制步骤

- 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、鲁米诺2.0g 和对碘苯酚0.2mg 于1L 烧杯中；
- 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中，充分搅拌直至完全溶解，调pH，控制其范围在7.95–8.05 之间；

3、用0.2μm 滤器过滤收集滤液，用纯化水定容至1000ml，混匀后即得；

### (二) 底物溶液B 的配制

- 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、过氧化脲0.2g 和PC300 500μl 于1L 烧杯中；
- 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中，充分搅拌直至完全溶解，调 pH 控制其范围在7.95–8.05 之间；

3、用0.2μm 滤器过滤收集滤液，用纯化水定容至1000ml，混匀后即得；

## 三、对照品稀释液的配制，步骤如下：

- 1、称取Tris 12.11g 和HC1 7 ml 于1L 的容器中，调节溶液pH，控制其范围在7.35–7.45 之间，定容至1000ml ；

2、用量筒量取小牛血清300ml，加入上述溶液中，作为校准品稀释液备用；

## 四、阴性对照、阳性对照的配制

阴性对照的配制：取对照稀释液，分装到适宜规格。

9. 阳性对照的配制：按1:5000(1:500~1:10000) 在对照稀释液中加入商品化的Pre-S1；

## 五、抗生素抗体包被的酶标板

1配制0.01M的碳酸缓冲液，调节pH至pH9.6±0.1，备用；

- 2在上述0.01M的碳酸缓冲液中加入抗生素抗体溶液至终浓度为0.1~5μg/ml搅拌30分钟至混合均匀；

3将上述混匀后的溶液按包被量为100 μL每孔加入酶标板中，采用高温振荡式包被，包被温度为39±1℃，包被时间为1~3小时，采用低速振荡包被形式，选用的振荡仪为艾本森科学仪器有限公司微孔板振荡器，振荡幅度与方式：3mm，采用水平回转，转速为200~500rpm；

4配制0.1M , pH7.4TBS缓冲液，含0.3wt%BSA, 1wt%羊血清, 0.1% Proclin300(v/v) , 1wt%鱼皮明胶, 2wt%海藻糖和10wt%蔗糖，作为封闭液加入到清洗后的包被板中，封闭量为150μL每孔，封闭温度为37±1℃，封闭时间为2~5小时；

5吸掉封闭液，放置在干燥箱中，干燥温度控制在37±1℃，干燥时间为2~4小时，再以铝箔袋真空包装，贴签备用；

## 六、辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备

### (一) 酶反应物稀释液的配制

- 1、取Tris 4.846g、HC1 2900μl 于烧杯中，然后在烧瓶中加入纯化水，充分搅拌使试剂完全溶解；

2、调pH，控制 pH 在 7.35–7.45 ；

3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中；

4、最后烧杯定容至400ml，用0.2um 滤器过滤即得；

(二) 辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗Pre-S1抗体的偶联

- 1、取乙肝病毒前S1抗体1mg 放置于1ml 玻璃管中；
  - 2、取200 $\mu$ l DMSO 溶解抗体使抗体的终浓度到达5mg/ml，然后充分混匀；
  - 3、按照1mol 抗体加入10mol 的辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比例加辛二酸二琥珀酰亚胺酯到上述2 溶液中，37℃恒温箱中反应 1.5 小时；
  - 4、按照3mol 抗体加入1mol HRP的摩尔比往上述3 的溶液中添加HRP，然后加入1ml 的pH 为7.4 浓度为0.1M 的PB 缓冲液，置于 37℃恒温箱中反应 3小时；
  - 5、将上述4 配制的溶液用PD-10 柱纯化，收集纯化液，按照1:3000 的体积添加自制的酶反应物稀释液，控制最终使用浓度在0.03–5.0 $\mu$ g/ml，混合均匀即得酶反应物；
- 七、生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备
- (一) 生物素反应物稀释液的配制
- 1、取Tris 4.846g、HCl 2847 $\mu$ l 于烧瓶中，然后在烧瓶中加入纯化水，充分搅拌使试剂完全溶解；
  - 2、调pH，控制 pH 在 7.35–7.45 ；
  - 3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中；
  - 4、最后烧杯定容至400ml，用0.2 $\mu$ m 滤器过滤即得；
- (二) 取生物素化抗体，以生物素反应物稀释液稀释，控制最终使用浓度在0.01~5.0 $\mu$ g/ml，混匀，即可得到生物素结合物。

## 乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒及制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析领域,特别是涉及一种高灵敏板式化学发光法定量检测血清的乙型肝炎病毒前S1抗原试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒(HBV)外膜蛋白包括S、前S2和前S1三种成分。前S1蛋白在病毒侵入肝细胞过程中起重要作用。病毒附着于肝细胞上,最重要的介导部位是前S1蛋白的氨基酸(AA)21-47片段,变异的病毒只要这一区段完好就有传染性。含有前S1的蛋白主要存在于Dane颗粒和管型颗粒上。前S1蛋白在病毒感染、装配、复制和刺激机体产生免疫反应等方面起着十分重要作用。

[0003] 乙肝病毒前S1抗原酶免测定试剂盒的正式推向临床以及近两年在北京、四川、浙江、河南、深圳、海南等近百家医院与乙肝“两对半”检测的联合应用,充分显示了该试剂在病毒性乙型肝炎的临床诊断,指导治疗等方面的重要价值。前S1抗原(Pre-S1Ag)检测是对乙肝“两对半”尤其是e抗原和HBV-DNA测定的重要补充和加强。

[0004] 前S1抗原与HBV-DNA检出率两者符合,前S1抗原仅在HBV-DNA阳性血清中检出。前S1蛋白随HBeAg消失而消失,且与阴转时间呈正相关,这样,前S1抗原可作为病毒清除与病毒转阴的指标。前S1抗原阳性的乙型肝炎患者传播乙型肝炎病毒比前S1抗原阴性和无症状HBsAg携带者的危险性更大,因而说明前S1抗原可反映乙型肝炎病毒复制和传染性的指标。如果前S1抗原持续阳性,指示AHB向慢性转变。比较急性乙型肝炎、慢性乙型肝炎、和HBsAg阳性的患者血清中前S1蛋白,前S1抗原阴转愈早,AHB患者的疗程愈短,预后也愈好。说明前S1抗原及其抗体的检测是急性乙型肝炎的临床诊断,疗效观察和判断预后的良好指标。

[0005] 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,提示临幊上只检测“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(-)的“误诊”。病毒附着于肝细胞上,最重要的介导部位是前S1蛋白的氨基酸(AA)21-47片段,变异的病毒只要这一区段完好就有传染性。

[0006] 为了提高乙肝病毒前S1抗原诊断水平和改善治疗效果,从检测角度上来说,目前临幊上用于测定前S1抗原的方法主要有放射性免疫技术、酶联免疫技术、时间分辨荧光免疫分析方法和化学发光技术等。过去以放射性免疫技术为代表的人乙肝病毒前S1抗原测定试剂盒由于方法学的限制,其灵敏度和抗干扰能力严重不足,存在很大的弊端,已基本上退出市场;目前应用较多的为酶联免疫技术、时间分辨荧光免疫分析和化学发光技术,其中化学发光技术兴起于上个世纪80年代,是继酶联免疫技术和放射性免疫技术之后发展起来的新兴技术,由于其高灵敏度、高特异性,同时方法简便、快速,标记结合物稳定,相对时间

分辨荧光免疫分析成本低廉、操作简便,相对放射性免疫分析技术无放射性同位素损伤和污染等特点,在近些年得到了飞速发展。

## 发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种板式化学发光法检测血清乙肝病毒前S1抗原的试剂盒及其制备方法,研发和优化了与血清学免疫反应原理相关的各种关键技术,从而提高了针对临床患者体内的乙肝病毒前S1抗原检测灵敏度和准确性,开发出灵敏度高、稳定性好、生产便捷、操作方便的板式化学发光诊断试剂盒。

[0008] 本发明的主要设计思路是在化学发光免疫分析基础上,通过引入具有抗生物素抗体-生物素体系,稳定试剂盒检测特异性的同时,大幅增加了检测灵敏度。

[0009] 本发明解决上述问题所采用的技术方案为:

一种乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒,包括的试剂:生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、乙肝病毒前S1阴性对照、乙肝病毒前S1阳性对照、浓缩洗液、底物液A、底物液B。

[0010] 上述生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的浓度为0.01~5.0 $\mu$ g/ml,所述抗生物素抗体包被的酶标板的抗生物素抗体的包被浓度为0.1~5.0 $\mu$ g/ml,所述辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的浓度为0.03~5.0 $\mu$ g/ml。

[0011] 上述乙肝病毒前S1阴性对照的未包含乙肝病毒前S1,所述乙肝病毒前S1阳性对照是乙肝病毒前S1阳性血清以pH值为7.4的Tris-HCl缓冲液配制得到的,稀释体积比为1:5000。

[0012] 上述生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备过程为:生物素标记的乙肝病毒前S1抗体加入到pH值为7.4的缓冲液中,调节到适宜倍数,混匀得到。

[0013] 上述抗生物素抗体包被的酶标板的制备过程为:所述抗生物素抗体包被板采用高温振荡式包被,包被温度为39±1℃,包被时间为1~3小时,采用低速振荡包被形式,选用的振荡仪为艾本森科学仪器有限公司微孔板振荡器,振荡幅度与方式:3mm,采用水平回转,转速为200~500rpm,封闭和干燥温度为37±1℃,封闭时间为1.5~3小时,干燥时间为2~4小时;采用高温振荡式包被工艺,包被板制备时间可控制在5~7小时。跟室温包被普遍的3~4天制备时间相比,具备明显的效率优势,同时提高了反应的灵敏度,降低抗体/抗原使用量的同时,简化了试剂生产流程,缩短了生产时间。国内包被板技术采用链霉亲和素包被较多,采用抗生物素抗体尚未见专利文献报告。另外,低速振荡包被法相比常规的室温包被法明显缩短了包被板的生产时间,提高了试剂生产效率。

[0014] 上述辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备过程为:辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液加入到pH值为7.4的缓冲液中,调节到适宜倍数,混匀得到。

[0015] 上述抗生物素抗体包被的酶标板所用包被液为0.01M的碳酸缓冲液, pH9.6±0.1, 所用封闭液的含0.3wt%BSA、0.1 % Proclin300 (v/v)、1 wt %羊血清、1 wt %鱼皮明胶、2 wt %海藻糖和10 wt %蔗糖的0.1M pH7.4 TBS缓冲液。针对本发明的抗生物素抗体包被体系,采用0.01M的碳酸缓冲液,并在封闭液中以少量BSA屏蔽了酶标板大部分未结合位

点,在缓冲体系的协同作用下,以动物血清消除非特异性结合位点,保证了包被板的精密度和低本底,以蔗糖、海藻糖和鱼皮明胶作为稳定体系,强化了包被板对高温、干燥的抗性,保证了抗生物素抗体包被板的性能。

[0016] 本发明试剂盒的检测方法是,将样品和生物素标记的乙型肝炎病毒前S1抗体加入到抗生物素抗体包被的酶标板中,样品中的PreS1Ag和该抗体结合形成免疫复合物,同时,该免疫复合物通过抗生物素抗体和生物素之间的结合作用被固定到酶标板上。使用洗液清洗酶标板,去除未结合的游离成分。加入辣根过氧化物酶标记的乙型肝炎病毒表面抗体(Anti-HBs),该酶标抗体通过免疫反应与被固定的免疫复合物结合。再次清洗微孔板后,加入底物液激发化学发光,测定相对光强度RLU。在一定浓度范围内,RLU值随样品中PreS1Ag含量的升高而线性升高。与阴性对照比较,即可检测人血清样品中是否存在PreS1Ag,与阳性对照比较可预测PreS1Ag含量。

[0017]

本发明的乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光法检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤

一、浓缩洗液的配制,步骤如下:

- 1、称取KCl 60g、NaCl 300g于1L 容器中;
- 2、称取20.0g Tween-20 于100ml 容器中加50ml 水使其完全溶解后,倒入上述1L 容器中;
- 3、用移液器将Proclin-300 量取2ml,倒入上述1L 容器中;
- 4、用量筒量取适量纯化水于上述1L 容器中,充分搅拌直至完全溶解;
- 5、调pH,控制其范围在7.35~7.45 之间;
- 6、最后定容至1000ml,完全溶解后用0.2μm 滤器过滤即得;

二、底物液的配制

(一) 底物液A 的配制步骤

- 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、鲁米诺2.0g 和对碘苯酚0.2mg 于1L 烧杯中;
- 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调pH,控制其范围在7.95~8.05 之间;
- 3、用0.2μm 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得;

(二) 底物溶液B 的配制

- 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、过氧化脲0.2g 和PC300 500μl 于1L 烧杯中;
- 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调 pH 控制其范围在7.95~8.05 之间;
- 3、用0.2μm 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得;

三、对照品稀释液的配制,步骤如下:

- 1、称取Tris 12.11g 和HCl 7 ml 于1L 的容器中,调节溶液pH, 控制其范围在7.35~7.45 之间, 定容至1000ml ;
- 2、用量筒量取小牛血清300ml,加入上述溶液中,作为校准品稀释液备用;

四、阴性对照、阳性对照的配制

阴性对照的配制:取对照稀释液,分装到适宜规格。

[0018] 阳性对照的配制:按1:5000(1:500~1:10000)在对照稀释液中加入商品化的Pre-S1(北京新锐银通);

### 五、抗生素抗体包被的酶标板

1配制0.01M的碳酸缓冲液,调节pH至pH9.6±0.1,备用;

2在上述0.01M的碳酸缓冲液中加入抗生素抗体溶液至终浓度为0.1~5μg/ml搅拌30分钟至混合均匀;

3将上述混匀后的溶液按包被量为100 μL每孔加入酶标板中,采用高温振荡式包被,包被温度为39±1℃,包被时间为1~3小时,采用低速振荡包被形式;

4配制0.1M , pH7.4TBS缓冲液,含0.3wt%BSA,1wt%羊血清,0.1% Proclin300(v/v),1wt%鱼皮明胶,2wt%海藻糖和10wt%蔗糖,作为封闭液加入到清洗后的包被板中,封闭量为150μL每孔,封闭温度为37±1℃,封闭时间为2~5小时;

5吸掉封闭液,放置在干燥箱中,干燥温度控制在37±1℃,干燥时间为2~4小时,再以铝箔袋真空包装,贴签备用;

### 六、辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备

#### (一) 酶反应物稀释液的配制

1、取Tris 4.846g、HCl 2900μl 于烧杯中,然后在烧瓶中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;

2、调pH,控制 pH 在 7.35~7.45 ;

3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中;

4、最后烧杯定容至400ml,用0.2um 滤器过滤即得;

#### (二) 辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗Pre-S1抗体的偶联

1、取乙肝病毒前S1抗体1mg 放置于1ml 玻璃管中;

2、取200μl DMSO 溶解抗体使抗体的终浓度到达5mg/ml,然后充分混匀;

3、按照1mol 抗体加入10mol 的辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比例加辛二酸二琥珀酰亚胺酯到上述2 溶液中,37℃恒温箱中反应 1.5 小时;

4、按照3mol 抗体加入1mol HRP的摩尔比往上述3 的溶液中添加HRP,然后加入1ml 的pH 为7.4 浓度为0.1M 的PB 缓冲液,置于 37℃恒温箱中反应 3小时;

5、将上述4 配制的溶液用PD-10 柱纯化,收集纯化液,按照1:3000 的体积添加自制的酶反应物稀释液,控制最终使用浓度在0.03~5.0μg/ml,混合均匀即得酶反应物;

### 七:生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备

#### (一) 生物素反应物稀释液的配制

1、取Tris 4.846g、HCl 2847μl 于烧瓶中,然后在烧瓶中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;

2、调pH,控制 pH 在 7.35~7.45 ;

3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中;

4、最后烧杯定容至400ml,用0.2μm 滤器过滤即得;

(二) 取生物素化抗体,以生物素反应物稀释液稀释,控制最终使用浓度在0.01~5.0μg/ml,混匀,即可得到生物素结合物。

[0019] 与现有技术相比,本发明的板式化学发光法检测血清CA242抗原的试剂盒及其制

备方法,在化学发光免疫分析基础上,通过引入具有抗生物素抗体包被的酶标板,并改进了高温振荡式抗生物素抗体包被工艺,通过抗生物素抗体-生物素方法体系,提高反应的灵敏度,节省生产成本,在降低抗体/抗原使用量的同时,也简化了试剂生产流程,缩短了生产时间,简化了检测步骤,可为市场提供质优价廉、稳定可靠、重复性好、批间差小、准确度高新一代检测试。

## 具体实施方式

[0020] 以下结合具体实施例对本发明进行说明,所举的实施例仅是对本发明产品或方法作概括性例示,有助于更好地理解本发明,但并不会限制本发明范围。下述实施例中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法;所述材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0021] 本实施例的糖类抗原242的板式化学发光法检测试剂盒主要试剂包括:生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、乙肝病毒前S1阴性对照、乙肝病毒前S1阳性对照、浓缩洗液、底物液A、底物液B。。

### [0022] 试剂盒的制备方法

一、浓缩洗液的配制,步骤如下:

- 1、称取KCl 60g、NaCl 300g于1L 容器中;
- 2、称取20.0g Tween-20 于100ml 容器中加50ml 水使其完全溶解后,倒入上述1L 容器中;
- 3、用移液器将Proclin-300 量取2ml,倒入上述1L 容器中;
- 4、用量筒量取适量纯化水于上述1L 容器中,充分搅拌直至完全溶解;
- 5、调pH,控制其范围在7.35~7.45 之间;
- 6、最后定容至1000ml,完全溶解后用0.2μm 滤器过滤即得;

### 二、底物液的配制

#### (一) 底物液A 的配制步骤

- 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、鲁米诺2.0g 和对碘苯酚0.2mg 于1L 烧杯中;
- 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调pH,控制其范围在7.95-8.05 之间;
- 3、用0.2μm 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得;

#### (二) 底物溶液B 的配制

- 1、称取硼砂11.44g、硼酸4.948g、过氧化脲0.2g 和PC300 500μl 于1L 烧杯中;
- 2、用量筒量取纯化水于1L 烧杯中,充分搅拌直至完全溶解,调 pH 控制其范围在7.95-8.05 之间;
- 3、用0.2μm 滤器过滤收集滤液,用纯化水定容至1000ml,混匀后即得;

### 三、对照品稀释液的配制,步骤如下:

- 1、称取Tris 12.11g 和HCl 7 ml 于1L 的容器中,调节溶液pH, 控制其范围在7.35-7.45 之间, 定容至1000ml ;
- 2、用量筒量取小牛血清300ml,加入上述溶液中,作为校准品稀释液备用;

### 四、阴性对照、阳性对照的配制

阴性对照的配制:取对照稀释液,分装到适宜规格。

[0023] 阳性对照的配制:按1:5000(1:500~1:10000)在对照稀释液中加入商品化的Pre-S1(北京新锐银通);

### 五、抗生素抗体包被的酶标板

1配制0.01M的碳酸缓冲液,调节pH至pH9.6±0.1,备用;

2在上述0.01M的碳酸缓冲液中加入抗生素抗体溶液至终浓度为0.3μg/ml搅拌30分钟至混合均匀;

3将上述混匀后的溶液按包被量为100 μL每孔加入酶标板中,采用高温振荡式包被,包被温度为39±1℃,包被时间为1~3小时,采用低速振荡包被形式;

4配制0.1M ,pH7.4TBS缓冲液,含0.3wt%BSA,1wt%羊血清,0.1% Proclin300(v/v),1wt%鱼皮明胶,2wt%海藻糖和10wt%蔗糖,作为封闭液加入到清洗后的包被板中,封闭量为150μL每孔,封闭温度为37±1℃,封闭时间为2~5小时;

5吸掉封闭液,放置在干燥箱中,干燥温度控制在37±1℃,干燥时间为2~4小时,再以铝箔袋真空包装,贴签备用;

### 六、辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备

#### (一)酶反应物稀释液的配制

1、取Tris 4.846g,HCl 2900μl 于烧杯中,然后在烧瓶中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;

2、调pH,控制 pH 在 7.35–7.45 ;

3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中;

4、最后烧杯定容至400ml,用0.2μm 滤器过滤即得;

#### (二)辣根过氧化物酶 (HRP) 与抗Pre-S1抗体的偶联

1、取乙肝病毒前S1抗体1mg 放置于1ml 玻璃管中;

2、取200μl DMSO 溶解抗体使抗体的终浓度到达5mg/ml,然后充分混匀;

3、按照1mol 抗体加入10mol 的辛二酸二琥珀酰亚胺酯的摩尔比例加辛二酸二琥珀酰亚胺酯到上述2 溶液中,37℃恒温箱中反应 1.5 小时;

4、按照3mol 抗体加入1mol HRP的摩尔比往上述3 的溶液中添加HRP,然后加入1ml 的pH 为7.4 浓度为0.1M 的PB 缓冲液,置于 37℃恒温箱中反应 3 小时;

5、将上述4 配制的溶液用PD-10 柱纯化,收集纯化液,按照1:3000 的体积添加自制的酶反应物稀释液,控制最终使用浓度在0.5μg/ml,混合均匀即得酶反应物;

### 七:生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液的制备

#### (一)生物素反应物稀释液的配制

1、取Tris 4.846g,HCl 2847μl 于烧瓶中,然后在烧瓶中加入纯化水,充分搅拌使试剂完全溶解;

2、调pH,控制 pH 在 7.35–7.45 ;

3、称取BSA 4g 倒入上述烧杯中;

4、最后烧杯定容至400ml,用0.2μm 滤器过滤即得;

(二)取生物素化抗体,以生物素反应物稀释液稀释,控制最终使用浓度在0.5μg/ml,混匀,即可得到生物素结合物。

[0024]

### 八、优化与验证

主要性能指标均符合发光检测试剂技术评审规范。

[0025] 1、阴性符合率

检测260例雅培化学发光试剂检测的临床血样,阴性符合率(-/-)为260/260,符合率100%。

[0026] 2、阳性符合率

检测215份雅培化学发光试剂检测的临床血样,阳性符合率(+/+)为212/215,符合率为98.6%。

[0027] 3、重复性

用经国家参考品标化的企业精密度参考品重复检测10 次,其变异系数CV在1.60~2.75%之间,符合不大于10.0%的行业规范(全自动仪器操作)。

精密性质控品	RLU									
L	9476	9596	9789	9094	9366	9080	9737	9217	9114	9376
M	11158 9	10001 2	10255 5	10347 5	11002 5	11162 8	10571 3	10394 3	11015 4	10511 3
H	81388 8	82270 5	80990 5	82282 6	80229 8	83467 8	80478 4	84100 9	82850 0	81265 0

精密性质控品	平均值	标准差	CV%
L	9384.5	262.4	2.80%
M	106421	4133.8	3.88%
H	819324	12814.9	1.56%

[0028] 4、批间差

用经国家参考品标化的企业精密度质控品检测三个批号试剂盒,其批间变异系数(CV)在2.50~4.24%之间,符合行标小于15%的要求(全自动仪器操作)。

低浓度精密性质控品										
批次	RLU									
Lot 1	9476	9596	9789	9094	9366	9080	9737	9217	9114	9376
Lot 2	9476	9596	9789	9094	9366	9080	9737	9217	9114	9376
Lot 3	9476	9596	9789	9094	9366	9080	9737	9217	9114	9376
中浓度精密性质控品										
批次	RLU									
Lot 1	105248	107038	105194	110247	101506	102210	111005	104844	102340	109029
Lot 2	102387	114487	108280	104326	113242	114616	105452	110845	113206	112289
Lot 3	100272	103674	112606	107304	106902	109040	103692	107787	107228	100741
高浓度精密性质控品										
批次	RLU									
Lot 1	822428	831147	832265	833460	806331	833710	805262	839882	843365	814606
Lot 2	826543	838648	811915	841064	800283	808649	818472	835266	833743	815690
Lot 3	844515	803393	817873	815631	815831	805859	812860	841114	808577	840777

[0029] 分析结果如下：

精密性质控品	平均值	标准差	CV%
L	9384.5	253.2	2.70%
M	107235	4252.5	3.97%
H	823305	14060.3	1.71%

### 5、稳定性

热稳定性：试剂盒在37℃放置7天后进行检测，检测信号与对照相比，变化幅度不超过15%。

[0030]

质控品	RLU (37°C烘烤 7 天)			RLU (未烘烤对照)			烘烤前后对比%
L	9693	9549	9855	9310	9312	9725	102.65%
M	96696	98305	95972	113588	113911	105870	87.28%
H	803914	814147	829670	829355	807185	842437	98.74%

实施例中试剂盒的一种半自动仪器检测方法，检测步骤包括

(1) 取出试剂盒置于室温，使试剂盒的温度平衡至室温(18~25℃)。

[0031] (2) 样本应混合均匀，若样本为冻融样本，平衡至室温(18~25℃)后再进行检测。

[0032] (3) 按照浓缩洗液：蒸馏水=1:39的比例配制洗液，混合均匀后，转入洗液瓶中。

[0033] (4) 取出检测乙型肝炎病毒前S1抗原板板条，设好校准品孔、待检样品孔。将其余板条放回铝箔袋中，封存。

[0034] (5) 按表1顺序，进行半自动加样与反应操作。

[0035] 表1加样和操作对照表

步骤	加样物	校准孔 ( $\mu\text{L}$ )	样品孔 ( $\mu\text{L}$ )
1	对照品	50	
	样品		50
2	生物素化乙型肝炎病毒前 S1 抗体	50	50
3	/	用膜封好孔口, 混匀, 37°C温育 30 分钟, 用洗液洗孔, 每次每孔 350 $\mu\text{L}$ , 清洗 3 次后, 拍干孔中残留液体	
4	检测乙型肝炎病毒前 S1 抗原酶	100	100
5	/	用膜封好孔口, 混匀, 37°C温育 60 分钟, 用洗液洗孔, 每次每孔 350 $\mu\text{L}$ , 清洗 5 次后, 拍干孔中残留液体	
6	底物液 A	50	50
7	底物液 B	50	50
8	/	混匀, 室温 (18~25°C) 避光放置 5 分钟, 及时测量 RLU	

底物液A和B也可在用前等体积混匀后每孔加100 $\mu\text{L}$ , 如果底物液A和B混匀使用, 则混合液应在30分钟内被使用。

[0036]

实施例中试剂盒的一种半全自动仪器检测方法, 采用全自动化学发光免疫分析仪ADC CLIA 200/300/400/500/600以及Smart3000/Smart300/ Smart3000S进行检测, 检测步骤包括

(1) 在使用全自动化学发光免疫分析仪(以下简称“仪器”)时, 请务必仔细阅读仪器的操作手册, 务必按照相应的操作说明对仪器进行设置、检查和维护, 以实现最佳检测性能。

[0037] (2) 按照仪器的操作手册说明配置试剂信息, 并在“微板布局设置”中设置对照品孔和样本孔的位置。特别地, 请在仪器的“方法编辑”界面按照表2所示参数进行检测方法配置。

[0038] (3) 按照表2全自动仪器参数设置表, 进行参数设置与数据

表2 全自动化学发光免疫分析仪参数表

配置项	配置参数		
样品/对照品加入量	50μL；		
生物素化乙型肝炎病毒前 S1 抗体加入量	50μL；		
第一次温育设置	加盖；	温度：37℃；	温育时间：30min；
第一次清洗设置	洗液量：350μL/次/孔；	清洗次数：3 次；	
检测乙型肝炎病毒前 S1 抗原酶加入量	100μL；		
第二次温育设置	加盖；	温度：37℃；	温育时间：30min；
第二次清洗设置	洗液量：350μL/次/孔；	清洗次数：5 次；	
底物液 A 加入量	50μL；		
底物液 B 加入量	50μL；		
读数前温育设置	加盖；	温度：20℃；	温育时间：5min；
读数设置	静置时间：0s；	读数后动作：回原板位；	读 数 仪：PETECK96；

除上述实施例外，本发明还包括有其他实施方式，凡采用等同变换或者等效替换方式形成的技术方案，均应落入本发明权利要求的保护范围之内。

专利名称(译)	乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光检测试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107085111A</a>	公开(公告)日	2017-08-22
申请号	CN201710244167.6	申请日	2017-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏福隆生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏福隆生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏福隆生物技术有限公司		
[标]发明人	戴宝平 彭会军 徐亮 王剑		
发明人	戴宝平 彭会军 徐亮 王剑		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56983 G01N33/5761		
其他公开文献	CN107085111B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

**摘要(译)**

本发明涉及一种乙型肝炎病毒前S1抗原的板式化学发光检测试剂盒，包括的试剂：生物素标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、抗生物素抗体包被的酶标板、辣根过氧化物酶标记的乙肝病毒前S1抗体溶液、乙肝病毒前S1阴性对照、乙肝病毒前S1阳性对照、浓缩洗液、底物液A、底物液B。本发明的主要设计思路是在化学发光免疫分析基础上，通过引入具有抗生物素抗体-生物素体系，稳定试剂盒检测特异性的同时，大幅增加了检测灵敏度以及检测时间。改进了高温振荡式抗生物素抗体包被工艺，从而降低抗体/抗原使用量的同时，简化了试剂生产流程，缩短了生产周期。

精密性质控品	平均值	标准差	CV%
I	9384.5	262.4	2.80%
M	106421	4133.8	3.88%
H	819324	12814.9	1.56%