

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/576

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02157663.7

[43] 公开日 2004 年 7 月 7 日

[11] 公开号 CN 1510421A

[22] 申请日 2002.12.23 [21] 申请号 02157663.7

[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 12 页

[54] 发明名称 一种乙肝病毒前 S1 抗原酶联免疫测定试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种“一步法乙肝病毒前 S1 蛋白酶免测定试剂盒”。该试剂盒能检出完整 HBV，并且具有简便、灵敏和稳定等特点，操作简便快速，可以补充或替代常规的“两对半”和 PCR 检测法。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“一步法乙肝病毒 PreS1 抗原酶联免疫测定试剂盒”，其特征在于该试剂盒包括由主要成份抗体预包被反应条 48-96 孔、酶标记前 S1 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、底物缓冲液甲 1 瓶、底物缓冲液乙 1 瓶及终止液(4N H₂SO₄) 1 瓶组成。

2. 一种如权利要求 1 所述的一种“一步法乙肝病毒 PreS1 抗原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) 制备抗原：

HBV-DNA 重组 PreS1 Ag 基因片断的 21-47aa 及 1-199aa；

(2) 制备抗体：

用上述重组抗原免疫豚鼠，得抗 PreS1 抗血清或免疫 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；

抗血清或腹水用(NH₄)₂SO₄或正辛酸沉淀处理，得粗提抗 PreS1 抗体；

用 DE₅₂ 离子交换层析法得纯抗 PreS1 抗体；

经高压液相色谱 HPLC 检定，纯抗 PreS1 抗体呈单一峰，其纯度 95%以上。

(3) HRP-抗前 S1 抗体制备：辣根过氧化物酶（HRP）与纯化的抗前 S1 抗体偶联；

(4) 包被抗体成为予包被反应条：用抗 HBs 或抗 PreS1 豚抗；

(5) 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；

(6) 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格；

(7) 组装成为成品。

3. 根据权利要求 1 所述的一种一步法乙肝病毒 PreS1 抗原酶联免疫测定试剂盒，其特征在于其中所述的抗体预包被反应条为 48—96 孔、

酶标记抗体、阳性对照液为 HBV-DNA 和 HBeAg 均阳性血清、阴性对照液为正常人血清、浓洗涤液为磷酸-Tween-20、底物缓冲液甲为 H_2O_2 、底物缓冲液乙为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺和终止液为 $4NH_2SO_4$ 。

一种乙肝病毒前 S1 抗原酶联免疫测定试剂盒及制备方法

技术领域

本发明书属生物制剂技术领域。具体涉及一种一步法（立可读）乙肝病毒前 S1（PreS1）抗原(Ag)酶联免疫测定试剂盒及制备方法。

背景技术

长期以来，临床医生是根据“二对半”试剂盒检验结果判断乙肝患者的病情。但是“二对半”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，不是直接查 HBV。因此该方法不能确定患者有无 HBV。此外，用“二对半”试剂盒检查结果表明全世界约有 3 亿人为乙肝表面抗原（HbsAg）携带者，我国约有 1.3 亿，已成为世界之最，但实际上其中的部分人既无临床症状，转氨酶也不高，因此，并非所有 HbsAg 阳性者都携带 HBV。

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，设计并建成了一步法 PreS1 Ag 的试剂盒。

为了克服上述检测 HBV 的缺陷，我们发明了“一步法（立可读）乙肝病毒 PreS1 Ag 酶免测定试剂盒”。因为已证明 PreS1 Ag 是 HBV-DNA 复制的必然标志物，若检测出病人 PreS1 Ag 阳性，说明其 HBV-DNA 存在。

本发明提供了一种“一步法（立可读）PreS1 Ag 酶联免疫测定试剂盒”，该试剂盒是包括主要成份为抗体预包被反应条、酶标记抗前 S1 抗体、次要成份为阳性对照液 1 支、阴性对照液 1 支、20 倍浓洗涤液 1 瓶、底物缓冲液甲 1 瓶、底物缓冲液乙 1 瓶和终止液 1 瓶组成。

本发明的试剂盒中所述抗体预包被反应条为 48-96 孔；酶标记 PreS1 抗体为辣根过氧化物酶；阳性对照液为 HBV-DNA 和 HbeAg 均阳性血清；阴性对照液为正常人血清；浓洗涤液为磷酸-Tween-20；底物缓冲液甲为 H_2O_2 ；底物缓冲液乙为 3,3', 5,5'-四甲基联苯胺 (TMB) 和终止液为 $4NH_2SO_4$ 。

本发明的“一步法乙肝病毒前 S1 抗原酶联免疫测定试剂盒”的临床应用结果如下：

1998 年 9 月至 2000 年 3 月上海第二医科大学附属新华医院、上海中医药大学附属曙光医院和上海市传染病医院使用我们研制、生产的“一步法乙型肝炎病毒 PreS1 Ag 双抗体夹心 ELISA 试剂盒，检测各种急、慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染后的血清标本，并与常规乙肝病毒免疫标志物 (HBV-M) 和 HBV-DNA (PCR 法) 进行比较。现将结果总结报告如下。

材料和方法

1. 临床血清标本

各医院临床收集血清标本总数为 1445 份，其中新华医院 437 份，曙光医院 324 份和传染病医院 648 份。

2. 实验方法

2.1. PreS1 蛋白检测：按“一步法乙肝病毒前 S1 抗原酶联免疫测定试剂盒”说明书进行操作。即取已包被抗体板条，孔内加血清标本 $50\mu l$ ，同时设空白对照一孔，阳性和阴性标准孔，立即加稀释后的酶标记抗 PreS1 抗体 $50\mu l$ ， $37^\circ C$ 温育 30min，弃液并充分洗涤 5 遍。用底物甲 H_2O_2 及乙 TMB 显色、终止反应，在酶标仪上读波长为 450nm 处的吸光度值 (OD 值)。

结果判定：阴性对照 (A 值) $\times 2.5 =$ 临床值 (cut off 值)，阴性对照高于 0.05 时按实际 OD 值算，阴性对照小于 0.05 按 0.05 计算，凡待检标本孔 A 值大于临界值即为阳性。

2.2. HBV-M 检测：均采用国产或进口 EIA 试剂盒检测。

2.3. HBV-DNA PCR 法。

结果

1. 大三阳与 PreS1 Ag 阳性符合率:

二对半的大三阳血清中，三家医院应用报告 PreS1 Ag 阳性率结果，新华医院为 87.1%（见表 1），曙光医院为 91.9%（见表 2）和传染病医院为 83.4%（见表 3）。

2. HbeAg 与 PreS1 Ag 阳性符合率:

新华医院 121 例 PreS1 Ag(+)中有 74 例 HBeAg(+)(见表 4)

曙光医院 270 例 PreS1 Ag(+)中有 148 例 HBeAg(+)(见表 5)

传染病医院 390 例 PreS1 Ag(+)有 267 例 HBeAg(+)(见表 6 及 9)

3. HBV-DNA (PCR 法) 与 PreS1 Ag 阳性符合率:

新华医院 140 例 HBV-DNA(PCR 法)(+)血清中有 128 例 PreS1 Ag(+) 阳性率为 91.4%。（见表 7）

曙光医院 68 例 HBV-DNA(PCR 法) (+) 血清中有 64 例 PreS1 Ag(+) 阳性率为 94.1%。（见表 8）

传染病医院 464 例 HBV-DNA (PCR 法) (+) 血清中有 390 例 PreS1 Ag(+) 阳性率为 84.1%。（见表 9）

4. 一步法 PreS1 Ag 酶免试剂盒与二步法 PreS1 Ag 酶免试剂盒检测的比较。用中国药品生物制品检定所拟定的二步法 PreS1 Ag 酶免试剂盒 61 份标准参考品来检定二步法和“一步法 PreS1 Ag 酶免试剂盒”其检定结果完全一致，如下：

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 (0/27) (+/-)	0/27
阳性参考品符合率	允许出现 1 份假阴性 (1/30) (-/+)	1/30
精密性 CV (%)	≤15	15
灵敏度: 1#	≥1: 64	1: 512
2#	≥1: 128	1: 1024
3#	≥1: 32	1: 256
稳定性:	37℃放 3 天后, 检定指标达到要求	合格

5. 三家医院使用结果

三家医院使用一步法测定 1445 份乙肝患者血清中 PreS1 Ag 与 HbeAg 及 HBV-DNA (PCR 法) 的比较, 见下列表 1-11。

表1 PreS1 Ag 与 HBV-M 的关系 (新华)

HBV-M	N	PreS1-positive	PreS1-positive (%)
HBsAg(+)+HBeAg(+)+anti-HBc(+)	85	74	87.1
HBsAg(+)+anti-HBe(+)+anti-HBc(+)	106	34	32.1
HBsAg(+)+anti-HBc(+)	46	7	15.2
HBsAg(+)+the other mode	74	6	8.1
合计	311	121	38.9

表2 PreS1 Ag 在各 HBV-M 中的阳性率 (曙光)

HBV-M 模式	血清份数	前 S1 蛋白 (+)	(%)
HBsAg(+)+HBeAg(+)+抗 HBc(+)	161	148	91.9
HBsAg(+)+抗 HBe(+)+抗 HBc(+)	356	81	22.7
HBsAg(+)+抗 HBc(+)	395	32	8.1
HBsAg(+)+抗 HBe(+)	42	4	9.5
HBsAg(+)	86	5	5.8
HBsAg(-)+抗 HBs(+)+抗 HBc(+)	178	0	0
HBsAg(-)的其它模式	304	0	0
合计	1522	270	17.7

表3 不同的 HBV-M 模式和 PreS1Ag、PreS1Ab 及 HBV DNA 的关系或检出率(传染)

HBV-M	例	Pre-S ₁ Ag		Pre-S ₁ Ab		HBVDNA	
		+	%	+	%	+	%
HBsAg HBeAg HBcAb 阳性	265	221	83.4	10	3.7	251	94.7
HBsAg HBeAb HBcAb 阳性	192	98	51	16	8.3	120	62.5
HBsAg HBcAb 阳性	121	71	58.7	5	4.1	90	74.4
HBsAb HBeAb HBcAb 阳性	38	0	0	0	0	0	0
HBsAb 阳性	17	0	0	0	0	0	0
HBV-M 阴性	15	0	0	0	0	0	0

表4 PreS1 Ag 与 E 系统的关系(新华)

	HBeAg(+)	HBeAg(-) anti-HBe(+)	anti-HBe(-)	Total
Pre-S1(+)	74	35	12	121
Pre-S1(-)	11	74	105	190
Total	85	109	117	311

表5 PreS1 Ag 与 E 系统间的关系(曙光)

前 S1 蛋白	HBeAg(+)		HBeAg(-)		合计
			抗 HBe(+)	抗 HBe(-)	
前 S1 蛋白(+)	148	85	37	270	
前 S1 蛋白(-)	13	313	444	770	
合计	161	398	481	1040	

表6 HBeAg 与 HBV DNA 的关系(传染)

		HBeAg		合计
		+	-	
HBVDNA	+	251	210	464
	-	15	172	187
合计		267	382	648

表7 PreS1 Ag HBeAg 和 HBV DNA 检测结果(新华)

HBV DNA	HBeAg		Pre-S1		Total
	+	-	+	-	
+	84	56	128	8	140
-	4	90	6	88	94
Total	88	142	134	96	234

表8 PreS1 Ag、HbeAg 和 HBV DNA 检测结果(曙光)

HBV DNA	HBeAg(+)		前 S1 蛋白		合计
	+	-	+	-	
+	42	26	64	4	68
-	2	45	3	44	47
合计	44	71	67	48	115

表9 PreS1 Ag 与 HBV DNA 的关系(传染)

		PreS1Ag		合计
		+	-	
HBVDNA	+	340	124	464
	-	49	135	184
合计		390	258	648

表 10 PreS1 Ag 检测阳性率(新华)

诊断	N	PreS1-positive	PreS1-positive(%)
急性乙型肝炎	48	45	93.8
慢性活动性肝炎	86	44	51
慢性迁延性肝炎	120	29	24.2
HBsAg(+)携带者	57	3	5.3
HBsAg 阴性者	162	0	0

表 11 Pre-S₁Ag、Pre-S₁Ab 在不同乙肝患者中的检测情况(传染)

	例数	Pre-S ₁ Ag		Pre-S ₁ Ab		HBVDNA		HBeAg	
		+	-	+	-	+	-	+	-
HBV 携带	25	12	13	0	26	20	5	20	5
急性肝炎	81	35	46	10	71	38	43	20	61
慢性肝炎	317	210	107	9	308	252	65	156	161
亚重肝	5	1	4	0	5	2	3	1	4
慢重肝	48	28	20	7	41	37	11	17	31
肝硬化	128	97	31	4	124	107	21	53	75
肝癌	11	7	4	1	10	7	4	2	9

讨论

PreS1 蛋白是 HBVS 区基因编码产物, 它和 PreS2 蛋白一起在 HBV 附着和侵入肝细胞的机制中起重要作用。PreS1 蛋白主要存在于 Dane 颗粒中。已证实 HBV 的 PreS1 蛋白的 P21-47 肽是吸附于靶细胞受体的配体。

目前, 通过血清学检查以判断 HBV 感染状态的常用手段是检测 HBV-M, 即所谓“两对半”: HbsAg-HbsAb, HbeAg-HbeAb 和 HbcAb, 其中 HbeAg 和 HbcAb 阳性, 表明 HBV 在肝内复制。然而, 常规 HBV-M 检测方法繁琐、耗时, 且结果分析比较复杂。PCR 法测定 HBV-DNA (PCR 法) 亦已在一些大医院开展, 但是尽管该方法有敏感性高等特点, 亦因其操作步骤繁琐、费时、技术要求高、消耗性试剂昂贵收费价又高, 很难被普遍应用。Theilman 等首先报告用 western blot 技术检测了 HbsAg 阳性病人血清 PreS1 蛋白, 认为该蛋白与 HbeAg 和 HBV-DNA 有良好的相关性, 是 HBV 在体内复制的标志。我们用重组 PreS1 Ag 免疫豚鼠制备多体或免疫 Balb/c 小鼠得抗 PreS1 单抗,

经过 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 粗提，再柱层析 (DE_{52})，获高效价多体或单抗，在国内首先建成了一步法（立可读）乙肝病毒 PreS₁ Ag 酶免试剂盒。经过临床应用结果表明，PreS₁ Ag 检测在下述几个方面具有重要价值如下：

1. PreS₁ Ag 是很好的 HBV 复制标志：

本文三家医院检测的 1445 份乙肝患者血清中结果，发现一步法乙肝病毒 PreS₁ Ag 酶免法的阳性与 HBV-DNA (PCR 法) 的阳性符合率较高，显示本一步法 PreS₁ Ag 酶免试剂盒与 HBV-DNA (PCR 法) 有良好的相关性。HBV-M 和 HBV-DNA 阴性者血清标本也未检出 PreS₁ 蛋白，因而本一步法 PreS₁ Ag 试剂盒能很好判断病人是否有乙肝病毒复制。

2. PreS₁ Ag 的检测方法与乙型肝炎活动程度有关

从表 10 显示，在乙型肝炎的急性期 PreS₁ Ag 多为阳性 (93.8%) 与乙型肝炎 HBV 高度复制状态相吻合；慢性活动性肝炎 (51.0%) 明显高于慢性迁延性肝炎 (24.2%) 和 HbsAg 携带者 (5.3%) HbsAg 阴性者 (0%)。

3. PreS₁ Ag 的检测比 HBeAg 的检测更有临床意义

本文三家医院均发现一步法 PreS₁ Ag 和 HBeAg 同时与 HBV-DNA (PCR 法) 作比较，显示出 HBV-DNA (PCR 法) 阳性血清中一步法 PreS₁ Ag 酶免试剂盒的阳性率比 HBeAg 阳性率高，因此 PreS₁ Ag 的检测比 HBeAg 检测更有临床意义。

4. 一步法比二步法更受欢迎

用中国药品生物制品检定所拟定二步法 PreS₁ Ag 酶免试剂盒 75 份标准参考品检测一步法 PreS₁ Ag 酶免试剂盒其阳性和阳性参考品符合率、精密性、灵敏度和稳定性与二步法酶免试剂盒一样。

由于一步法在 40 分钟左右内出结果，所以普遍叫“立可读”。一步法比二步法 PreS₁ Ag 酶免试剂盒更具有操作简便、迅速和经济的特点，所以更受临床检验工作者和广大乙肝患者的欢迎。

本发明的另一目的是提供了上述“一步法 PreS₁ Ag 酶免测定试剂盒”的制备方法。该方法包括下列步骤：

1. 抗体制备:

1.1. 制备抗原: HBV-DNA 重组 PreS1 Ag 基因片断的 21-47aa 及 1-199aa;

1.2. 制备抗体:

1.2.1. 用上述重组抗原免疫豚鼠, 得抗 PreS1 抗血清或免疫 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;

1.2.2. 抗血清或腹水用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或正辛酸沉淀处理, 得粗提抗 PreS1 抗体;

1.2.3. 用 DE_{52} 离子交换层析法得纯抗 PreS1 抗体;

1.2.4. 经高压液相色谱(HPLC)检定, 纯抗 PreS1 抗体呈单一峰, 其纯度 95%以上。

2. HRP-抗前 S1 抗体制备: 辣根过氧化物酶 (HRP) 与纯化的抗前 S1 抗体偶联;

3. 包被抗体成为予包被反应条: 用抗 HBS 或抗 PreS1 豚抗;

4. 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;

5. 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格;

6. 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. 每孔加待检血清 $50\ \mu\text{l}$, 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 $1\text{ml}+19\text{ml}$ 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 分钟后每孔滴加终止液 1 滴, 置酶标仪中 450nm 波长读数。

结果判定

阴性对照(A值) $\times 2.5$ =临界值(cut off值), 阴性对照高于 0.05 时按实际 OD 值计算, 阴性对照小于 0.05 按 0.05 计算, 凡待检标本孔 A 值大于临界值即为阳性。

本发明的试剂盒能非常专一地检测患者血清中 HbsAg-PreS1 蛋白的浓度。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 40 分钟左右获得实验结果, 比 PCR 检测法省时 (PCR 法最快需 6-8 小时完成实验), 经临床试用 PreS1 蛋白检测阳性与 PCR 检测的 HBV-DNA 阳性有很好的符合率, 试剂盒的临床阴阳性预示值为 90%。因而本试剂盒对判断病人是否有病毒复制, 确定乙肝感染病程及预后具有十分重要的参考意义。本试剂盒与 PCR 法相比, PCR 法需贵重的仪器设备, 消耗性试剂昂贵, 收费价又高, 而本试剂盒整个实验中无需贵重仪器设备, 消耗性试剂便宜且收费价低廉, 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。一步法 PreS1 Ag 试剂盒, 具有简便、灵敏、重复性好的优点, 能检出完整 HBV, 将可被普遍使用, 做为 HBV 感染, 复制和乙肝病人诊断、治疗和预后的一个新的标志, 与其抗 PreS1 抗体联合可成为新的乙肝检测系统。

具体实施方式

实施例 1

制备一步法乙肝病毒前 S1 蛋白酶免试剂盒的生产步骤

(一) 纯化包被抗体 (HbsAb): HbsAg 免疫豚鼠得单抗或用重组 PreS1 Ag 免疫豚鼠得抗 PreS1 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 HBs 或抗 PreS1 多抗纯品。经 HPLC 检定得纯抗 PreS1 抗体, 呈现单一峰。纯度 $>95\%$, 效价 >10 万。

(二) 酶标记抗体制备

1. 抗体制备:

基因重组的 PreS1 Ag (21-47aa) 及 (1-119aa) 免疫豚鼠得抗 PreS1 抗体或重组 PreS1 Ag 免疫 Balb/c 小鼠得腹水。用饱和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 沉淀粗提两次, 再经 DE-52 柱纯化, 得纯抗 PreS1 抗体或单克隆抗体。效价 > 10 万, 经 HPLC 鉴定纯度在 95% 以上。

2. 酶标记抗体制备

抗 PreS1 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。

3. 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。

PreS1 重组抗原从 $10\ \mu\text{g/ml}$ 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。

(三) 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 Anti-S 抗体, 调整 PH 至 9.5, 加入微孔板各孔中, 置湿盒中加盖, 4°C 过液甩干。

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。

3. 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°C 1hr —— → 放入有干燥剂的塑料袋封口，保存于 4°C。

（四）阳性对照的制备

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

（五）阴性对照的制备

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

（六）酶标单抗配置

—————→
 10%小牛血清
 90%0.15MPBS

Anti—preS1—HRP —————→ 稀释 20 倍，分装。

（稀释度 1:2000）

（七）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

（八）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	200μl
重蒸水	100ml

调整 PH 至 5.0

（九）底物液 B

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1.7g
柠檬酸·H ₂ O	0.5g
重蒸水	100ml

调整 PH 至 5.0 后，加入 10mlDMSO 含 60mgTMB 的溶液 25 μ l

(十) 终止液

浓 H₂SO₄ 10ml

重蒸水 80ml

(十一) 10x 洗涤液

Na₂HPO₄·12H₂O 2.6g

NaH₂PO₄·2H₂O 0.4g

20%Tween—20 2.5ml

重蒸水 100ml

调整 PH 至 7.2

(十二) 半成品及成品的组成

上述(一) → (十一) 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 preS1 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。

专利名称(译)	一种乙肝病毒前S1抗原酶联免疫测定试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN1510421A	公开(公告)日	2004-07-07
申请号	CN02157663.7	申请日	2002-12-23
[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	G01N33/531 G01N33/576		
代理人(译)	王巍		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种“一步法乙肝病毒前S1蛋白酶免测定试剂盒”。该试剂盒能检出完整HBV，并且具有简便、灵敏和稳定等特点，操作简便快速，可以补充或替代常规的“两对半”和PCR检测法。本发明提供了制备方法。

的关系或检出率(传染)

HBV-M	例	Pre-S ₁ Ag		Pre-S ₁ Ab		HBVDNA	
		+	%	+	%	+	%
HBsAg HBeAg HBeAb 阳性	265	221	83.4	10	3.7	251	94.7
HBsAg HBeAb HBeAb 阳性	192	98	51	16	8.3	120	62.5
HBsAg HBeAb 阳性	121	71	58.7	5	4.1	90	74.4
HBsAb HBeAb HBeAb 阳性	38	0	0	0	0	0	0
HBsAb 阳性	17	0	0	0	0	0	0
HBV-M 阴性	15	0	0	0	0	0	0