



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105044355 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 11

(21) 申请号 201510398322. 0

(22) 申请日 2015. 07. 08

(71) 申请人 同昕生物技术(北京)有限公司
地址 102206 北京市昌平区生命园路 29 号
创新大厦 A 座 211 室

(72) 发明人 吴凡 卢晓希 焦守恕 李全

(74) 专利代理机构 北京海虹嘉诚知识产权代理
有限公司 11129
代理人 吴泳历

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页

序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

用于检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的化学发光试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种用于检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的化学发光试剂盒及其应用,属于生物技术、医学免疫学与体外血清学诊断技术领域。所述化学发光试剂盒包括包被有抗 His 标签单抗的磁颗粒,携带 His 标签的 Rta 蛋白,携带 His 标签的特异性人工多肽及吖啶酯标记的抗人 IgG 抗体;所述特异性人工多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。本发明还提供了基于所述化学发光试剂盒的检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的方法。采用本发明所述的化学发光试剂盒及检测方法能够快速、准确、高效、灵敏、特异地检出待测样品中存在的 EB 病毒 Rta 蛋白抗体,同时能实现多样本处理,缩短了检测时间,提高了检测效率。

1. 用于检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的化学发光试剂盒, 其特征在于, 包括包被有抗 His 标签单抗的磁颗粒, 携带 His 标签的 Rta 蛋白, 携带 His 标签的特异性人工多肽及吡啶酯标记的抗人 IgG 抗体;

所述特异性人工多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的化学发光试剂盒, 其特征在于, 所述 Rta 蛋白为保藏号 CGMCC6955 的 CHO 细胞株 CHO/RTA 表达所得。

3. 根据权利要求 1 所述的化学发光试剂盒, 其特征在于, 还包括 EB 病毒 Rta/IgG 校准品、样品稀释液和洗涤液。

所述 EB 病毒 Rta/IgG 校准品为含人 EBV Rta-IgG 的磷酸盐缓冲液;

所述样品稀释液为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液;

所述洗涤液为 pH 值为 7.2 ~ 8.5, 包含有 Proclin300 和吐温 -20 的 0.01 ~ 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液, 所述 Proclin300 在所述洗涤液中的终浓度为体积百分比 0.02 ~ 0.05%, 所述吐温 -20 在所述洗涤液中的终浓度为体积百分比 1.0 ~ 2.0%。

4. 权利要求 1-3 任一所述的化学发光试剂盒在检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体方面的应用。

5. 一种检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的方法, 其特征在于, 进行如下检测步骤:

(1) 获取标准曲线和曲线方程,

其横坐标为 Rta/IgG 校准品梯度浓度数值, 纵坐标为以梯度浓度的 Rta/IgG 校准品进行以下步骤所得的荧光值;

(2) 在载玻片上依次滴加工作液 1、工作液 2, 孵育、干燥;

(3) 加入经样品稀释液稀释后的待测样品, 孵育、干燥;

(4) 加入工作液 3, 孵育、干燥;

(5) 经洗涤液洗涤后, 将载玻片置于荧光显微镜下观察读数;

(6) 读出的荧光值代入所述标准曲线获得待测样品蛋白浓度。

所述工作液 1 为包被有抗 His 标签单抗的磁颗粒溶液;

所述工作液 2 为携带 His 标签的 Rta 蛋白及携带 His 标签的特异性多肽的混合溶液;

所述工作液 3 为吡啶酯标记的抗人 IgG 抗体溶液;

所述特异性多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述 Rta 蛋白为保藏号 CGMCC6955 的 CHO 细胞株 CHO/RTA 表达所得。

7. 根据权利要求 5 所述的方法, 其特征在于, 所述样品稀释液为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液;

所述洗涤液为 pH 值为 7.2 ~ 8.5, 包含有 Proclin300 和吐温 -20 的 0.01 ~ 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液, 所述 Proclin300 在所述洗涤液中的终浓度为体积百分比 0.02 ~ 0.05%, 所述吐温 -20 在所述洗涤液中的终浓度为体积百分比 1.0 ~ 2.0%。

用于检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的化学发光试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术、医学免疫学与体外血清学诊断技术领域,具体涉及用于检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的化学发光试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 鼻咽癌是指发生在鼻腔与咽之间鼻咽部的恶性肿瘤,占头颈部恶性肿瘤的 78.08%,占上呼吸道癌肿的 92.99%。鼻咽癌好发年龄在 35 至 50 岁之壮年期,占发病人数 60%,易对社会、经济、劳力及家庭造成重大冲击,危害性很大。

[0003] 经多年研究发现,鼻咽癌与 EB 病毒关系最为密切,EB 病毒被激活感染鼻咽部细胞,由潜伏期进入裂解复制状态时,导致鼻咽部细胞发生异常分裂增生造成癌变。鼻咽癌患者血清中具有针对多种 EB 病毒抗原的抗体谱,一般通过检测血清 EB 病毒抗体来评估患鼻咽癌的危险度,为鼻咽癌的诊断提供了有效的检测指标。申请号为 200610113403 的发明专利申请公开了 Rta 是 EB 病毒刚刚进入裂解复制状态时就表达的立即早期基因 BRLF1 的编码转录激活蛋白,是 EB 病毒进入裂解复制状态必需的激活元件而且仅在鼻咽癌发生时表达,对诊断鼻咽癌具有较高的灵敏度和特异性。

[0004] 在酶联免疫领域,同昕生物技术(北京)有限公司的研究人员构建了针对 EB 病毒 BRLF1 基因的原核表达系统,通过大肠杆菌表达出 EB 病毒 Rta 蛋白,并利用表达的 Rta 蛋白建立了临床用于鼻咽癌筛查、早期诊断和疗效监控的 ELISA 试剂盒(专利申请号:200610113403.2)。为提高包被抗原的生物活性,同昕生物技术(北京)有限公司研究人员成功建立了高效稳定表达 EB 病毒 Rta 蛋白的重组 CHO 细胞株 CHO/RTA(其保藏号为:GMCC6955,专利号为:201210534965.X),并利用其表达纯化蛋白建立了定量检测 EB 病毒 Rta-IgG 抗体的酶标板及 ELISA 试剂盒(专利号为:201210533496.X)。

[0005] 在快速诊断领域,同昕生物技术(北京)有限公司的研究人员经过研究,将鼻咽癌标志抗原 Rta 和 VCA 抗原应用于胶体金免疫平台上,成功建立了鼻咽癌双标记物金标测试卡(专利申请号:200920222433.6)。

[0006] 尚未见有磁颗粒化学发光免疫分析方法检测 EB 病毒 Rta-IgG 抗体的检测试剂盒的报道。

[0007] 化学发光免疫分析(CLIA)是继放射免疫分析、酶免疫分析和荧光免疫分析之后发展起来的一项新的免疫分析技术。大量的实验结果及临床应用资料显示,化学发光免疫分析技术具有灵敏度高、快速、准确、重复性好、效期长并安全无毒无污染等优点,成为取代放射免疫分析和酶联免疫分析技术的首选。鲁米诺、异鲁米诺及其衍生物是最早使用的一类化学发光物质,但其应用于化学发光免疫分析,需要使用催化剂及增强剂,这将导致背景发光增强,使测量本底升高,从而限制了这一技术的灵敏度和它的应用及发展。到 1983 年 Weeks 首次合成了用于化学发光免疫分析的吖啶酯以来,由于吖啶酯具备发光体系简单,不需要催化剂,在有 H₂O₂ 的稀碱性溶液中即能发光,特别是无须一个催化过程,也不需要增强剂,从而降低了背景发光,提高了灵敏度且干扰作用小。吖啶酯的光释放快速集中,发光峰

值在 0.4s,半衰期为 0.8s,发光效率高且强度大;易于蛋白质联结,且分子量小,对联结后抗体构象影响小,且标记物稳定性好,已成为国际主流品牌厂家选择的化学发光免疫分析方法,广泛应用于临床。

发明内容

[0008] 本发明针对上述领域空白,提供一种检测 EB 病毒 Rta 蛋白抗体 IgG 的吡啶酯标记的磁颗粒化学发光检测试剂盒。本试剂盒填补了市场空白,并且经临床实验证明,灵敏度高,特异性高,稳定性好。

[0009] 本发明请求保护的技术方案如下:

[0010] 用于检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的化学发光试剂盒,其特征在于,包括包被有抗 His 标签单抗的磁颗粒,携带 His 标签的 Rta 蛋白,携带 His 标签的特异性人工多肽及吡啶酯标记的抗人 IgG 抗体;

[0011] 所述特异性人工多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0012] 所述 Rta 蛋白为保藏号 CGMCC6955 的 CHO 细胞株 CHO/RTA 表达所得。

[0013] 所述化学发光试剂盒还包括 EB 病毒 Rta/IgG 校准品、样品稀释液和洗涤液。

[0014] 所述 EB 病毒 Rta/IgG 校准品为含人 EBV Rta-IgG 的磷酸盐缓冲液;

[0015] 所述样品稀释液为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液;

[0016] 所述洗涤液为 pH 值为 7.2 ~ 8.5, 包含有 Proclin300 和吐温 -20 的 0.01 ~ 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述 Proclin300 在所述洗涤液中的终浓度为体积百分比 0.02 ~ 0.05%, 所述吐温 -20 在所述洗涤液中的终浓度为体积百分比 1.0 ~ 2.0%。

[0017] 所述化学发光试剂盒在检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体方面的应用。

[0018] 一种检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的方法,其特征在于,进行如下检测步骤:

[0019] (1) 获取标准曲线和曲线方程,

[0020] 其横坐标为 Rta/IgG 校准品梯度浓度数值,纵坐标为以梯度浓度的 Rta/IgG 校准品进行以下步骤所得的荧光值;

[0021] (2) 在载玻片上依次滴加工作液 1、工作液 2, 孵育、干燥;

[0022] (3) 加入经样品稀释液稀释后的待测样品, 孵育、干燥;

[0023] (4) 加入工作液 3, 孵育、干燥;

[0024] (5) 经洗涤液洗涤后, 将载玻片置于荧光显微镜下观察读数;

[0025] (6) 读出的荧光值代入所述标准曲线获得待测样品蛋白浓度。

[0026] 所述工作液 1 为包被有抗 His 标签单抗的磁颗粒溶液;

[0027] 所述工作液 2 为携带 His 标签的 Rta 蛋白及携带 His 标签的特异性多肽的混合溶液;

[0028] 所述工作液 3 为吡啶酯标记的抗人 IgG 抗体溶液;

[0029] 所述特异性多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

[0030] 所述 Rta 蛋白为保藏号 CGMCC6955 的 CHO 细胞株 CHO/RTA 表达所得。

[0031] 所述样品稀释液为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液;

[0032] 所述洗涤液为 pH 值为 7.2 ~ 8.5, 包含有 Proclin300 和吐温 -20 的 0.01 ~ 0.03mol/L 的磷酸盐缓冲液,所述 Proclin300 在所述洗涤液中的终浓度为体积百分比

0.02 ~ 0.05%，所述吐温-20 在所述洗涤液中的终浓度为体积百分比 1.0 ~ 2.0%。

[0033] 本发明提供的试剂盒，利用抗 His 标签单抗结合添加了 His 标签的抗原，与待测样品进行反应，再与吡啶酯标记的抗人 IgG 抗体结合，洗涤后，将结果置于荧光显微镜下观察，若待测样品中的 EB 病毒 Rta/IgG 抗体呈阳性，则出现发光信号；若无发光信号，则待测样品为 EB 病毒 Rta/IgG 抗体阴性。所述添加了 His 标签的抗原为添加 His 标签的 Rta 蛋白和特异性多肽，所述 Rta 蛋白为保藏号 CGMCC6955 的 CHO 细胞株 CHO/RTA 表达所得；所述特异性多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。所述 CHO 细胞株 CHO/RTA 的保藏信息如下：菌株分类：CHO 细胞株，其保藏编号为：CGMCC6955。

[0034] 为了增加该试剂盒的灵敏度和特异性，本发明根据 EB 病毒 Rta 蛋白的氨基酸 (Protein Id:CAA24813.1) 序列 (GenBank:V01555.2) 设计出高特异性多肽，如 SEQ ID NO:1 所示，该片段是抗原表位比较集中且不影响蛋白空间结构的片段拼接而得，其与 Rta 蛋白混合后作为反应抗原，在人工合成过程中添加 His 标签。

[0035] 由于选择的特异性多肽能够提供额外的线性表位，可以使检测试剂盒的灵敏度和特异性都得到了提高。用 Rta 蛋白作为反应抗原制备的试剂盒检测相同样本的对比实验数据表明，仅以 Rta 蛋白作为反应抗原制备的试剂盒在灵敏度和特异性上均低于本发明所述的试剂盒，从而证实了本发明试剂盒在检测效果方面的优越性。

[0036] 实验数据表明，本发明所述试剂盒可应用于 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的快速检测，能够准确、高效、灵敏、特异地检测样品中存在的 EB 病毒 Rta 蛋白抗体。

[0037] 本发明制备的优选试剂盒中，主要试剂采用工作液形式，成本低廉，操作简便，简化了传统检测方法的步骤，缩短了检测时间，同时能实现多样本处理，提高了检测效率。

[0038] 综上，本发明提供的利用吡啶酯标记技术建立的磁颗粒 EB 病毒 Rta-IgG 抗体检测试剂，能够准确、高效、灵敏、特异地检出待测样品中存在的 EB 病毒 Rta 蛋白抗体。在鼻咽癌的临床诊断应用方面，与传统的检测方法相比，提高了鼻咽癌诊断的灵敏度和特异性，缩短了检测时间，使医生能够迅速了解患者的病情，及时提出合适的治疗方案，同时使患者能得到及时的治疗，减轻痛苦。在鼻咽癌病人血清样本和健康人血清样本的检测中，鼻咽癌病人的阳性检出率，即灵敏度为 93.3%；健康人群检测的阴性率为 95.6%。

附图说明

[0039] 图 1 为本发明所述试剂盒的反应模式图；

[0040] 图 2 为 ROC 曲线分析图；

[0041] 图 3 为用系列单位浓度的 EB 病毒 Rta/IgG 校准品获取的标准曲线。

具体实施方式

[0042] 提供下述实施例是为了更好地进一步理解本发明，并不局限于所述最佳实施方式，不对本发明的内容和保护范围构成限制。任何人在本发明的启示下或是将本发明与其它现有技术的特征进行组合而得出的任何与本发明相同或相近似的产品，均落在本发明的保护范围之内。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明，均为本领域技术人员熟知的常规实验方法。

[0043] 试剂来源及规格

- [0044] 磁颗粒购自 MERCK, 货号为 :27712084
- [0045] 抗 His 标签单克隆抗体购自金斯瑞生物, 货号为 :A00186-100 ;
- [0046] 多肽合成由上海生物工程公司完成 ;
- [0047] 吡啶酯 (活化) 购于上海迈拓威化工新材料科技有限公司, 货号为 MTW-004 ;
- [0048] 过氧化氢购于 SIGMA, 货号为 7722-84-1 ;
- [0049] 1—2mol/L 氢氧化钠溶液购于北京化工厂, 批号为 1310-73-2。
- [0050] 生物材料来源
- [0051] CHO 细胞株 CHO/RTA 来源如下 :
- [0052] 菌株分类 :CHO 细胞株, 其保藏编号为 :CGMCC6955
- [0053] 保藏单位 :中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
- [0054] 保藏日期 :2012. 12. 06
- [0055] 保藏地址 :北京市朝阳区北辰西路 1 号院, 中国科学院微生物研究所
- [0056] 申请人声明, 以上生物材料均在申请人实验室有保存, 自申请日起二十年内可向公众发放用于验证试验。
- [0057] 45 份鼻咽癌样本及 45 份健康体检样本来自广西梧州市肿瘤防治研究所。
- [0058] 实施例 1. 本发明所述试剂盒的制备
- [0059] 一、EB 病毒 Rta 蛋白及多肽制备
- [0060] 制备 :将保藏号为 :CGMCC6955 的 CHO/RTA 细胞株接种到细胞培养皿中, 该细胞的完全培养液须补加 0. 1mmol/L 次黄嘌呤和 0. 016mmol/L 胸腺嘧啶, 10% 胎牛血清 (杭州四季青生物工程有限公司), 待细胞达到 90% 左右的密度后, 换用不加氨甲基喋呤 (MTX) 的无血清培养基, 1-2 天后收集细胞培养液, 采用三氯乙酸沉淀法提取细胞培养液中的蛋白。
- [0061] 纯化 :用 GE 公司的 streptavidin sepharose high performance 纯化细胞上清液中的目的蛋白。按照 BCA-100 蛋白质定量试剂盒 (北京赛驰生物, 产品货号 300001-B) 操作说明书进行试验, 为表达的 EB 病毒 Rta 蛋白进行定量测定, 具体为根据 BCA-100 蛋白质定量试剂盒标准蛋白所测平均 OD 值为纵座标, 各孔的蛋白质浓度 (mg/ml) 为横座标制作标准蛋白曲线, 经线性回归拟合得回归方程, 将样本的 OD 值代入, 计算出 EB 病毒 Rta 蛋白浓度为 3. 68mg/ml。
- [0062] 为了增加该试剂盒的灵敏度和特异性, 我们使用 ABCpred、BepiPred 等抗原表位预测软件筛选出高特异性多肽, 与 Rta 蛋白混合后作为反应抗原。由于选择的多肽能够提供额外的线性表位, 可以使检测试剂盒的灵敏度和特异性都得到了提高。具体地, 在 NCBI 网站查找 EB 病毒 Rta 蛋白的氨基酸 (Protein Id :CAA24813. 1) 序列 (GenBank:V01555. 2), 用 ABCpred、BepiPred 等抗原表位预测选择抗原表位比较集中且不影响蛋白空间结构的片段, 然后选择保留的多肽片段的氨基酸序列信息进行连接得到人工抗原的氨基酸序列, 如 SEQ ID NO:1 所示, 在合成的过程中添加 His 标签。
- [0063] 二、工作液 1 的制备
- [0064] 用 0. 1mol/L pH 值为 9. 6 碳酸盐缓冲液将磁颗粒及抗 His 标签单克隆抗体按质量 / 体积浓度为 1:100 进行包被, 2-8℃ 搅拌过夜 ;用含有 5% (m/m) 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液进行封闭处理, 2-8℃ 封闭过夜, 4℃ 保存, 用时轻轻摇匀。
- [0065] 三、工作液 2 的制备

[0066] 采用实施例 1 制备的高纯度基因重组 Rta 蛋白及多肽,最终确定工作浓度为 200ng/ml,二者等比例混合。

[0067] 四、工作液 3 的制备

[0068] 将羊抗人 IgG 抗体,采用 0.05mol/LpH9.5 碳酸盐缓冲液配制终浓度为 1mg/ml;按抗体:吡啶酯=1:20 摩尔比加入已活化吡啶酯,室温反应 2 小时;将反应液移至透析袋(截留分子量 8000~12000),采用 0.05mol/LpH9.5 碳酸盐缓冲液透析 24 小时后,加入等量甘油,放置 -20℃ 以下保存。

[0069] 选择商品化抗体稀释液按照 1:8000 进行稀释成工作浓度,抗体稀释液由 biopanda 诊断试剂公司生产。

[0070] 五、校准品的配制

[0071] 经检测 HIV 抗体、HCV 抗体和 HBsAg 均为阴性,用本发明试剂盒检测 EBV Rta-IgG 为阳性,经过稀释为相应单位浓度(200U/ml、100U/ml、50U/ml、25U/ml、12.5U/ml、0U/ml),配制一系列单位浓度的校准品用于拟合标准曲线。

[0072] 六、试剂盒的组装

[0073] 1、包被抗 His 标签单克隆抗体的磁颗粒:包被抗 His 标签单克隆抗体,其工作浓度为 0.25~1ng/ml;

[0074] 2、检测用 Rta 蛋白及多肽工作液,其工作浓度可以为 50-400ng/ml

[0075] 3、吡啶酯标记抗体,其工作稀释度可以为 1:5000—1:50000;

[0076] 4、EB 病毒 Rta-IgG 校准品溶液:6 瓶,1ml/瓶,浓度分别为 0U/ml、12.5U/ml、25U/ml、50U/ml、100U/ml、200U/ml;

[0077] 5、样品稀释液:为含 0.3M NaCl 的 50mM 的磷酸盐缓冲液,50ml/瓶,1 瓶;

[0078] 6、浓缩洗涤液:pH 值为 7.4,含有在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 0.05% Proclin300、在所述浓缩洗涤液中的终浓度为 2.0%吐温-20、0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液,40ml/瓶,1 瓶。

[0079] 实施例 2. 利用本发明所述试剂盒检测样品

[0080] 用本发明试剂盒检测 45 份鼻咽癌样本及 45 份健康体检样本进行检验:步骤如下:

[0081] (1) 获取标准曲线和曲线方程,

[0082] 其横坐标为 Rta/IgG 校准品梯度浓度数值,纵坐标为以梯度浓度的 Rta/IgG 校准品进行以下步骤所得的荧光值;

[0083] (2) 在载玻片上依次滴加工作液 1、工作液 2,孵育、干燥;

[0084] (3) 加入经样品稀释液稀释后的待测样品,孵育、干燥;

[0085] (4) 加入工作液 3,孵育、干燥;

[0086] (5) 经洗涤液洗涤后,将载玻片置于荧光显微镜下观察读数;

[0087] (6) 将荧光值代入所述标准曲线获得样品的蛋白浓度。

[0088] 在符合检测准确性的前提下,在检测某一批待测样品之前可以获取新的标准曲线,也可以直接使用在相同的实验条件下已经获取到的现成的标准曲线。

[0089] 检测结果如下:

[0090] 表 1. 正常人 EB 病毒 Rta-IgG 含量检测结果

[0091]

样本编号	组别	检测结果 U/ml	样本编号	组别	检测结果 U/ml	样本编号	组别	检测结果 U/ml
01	正常人	7.08	16	正常人	5.80	31	正常人	4.20
02	正常人	28.31	17	正常人	23.65	32	正常人	5.23
03	正常人	22.74	18	正常人	6.39	33	正常人	3.47

[0092]

04	正常人	3.14	19	正常人	5.50	34	正常人	5.65
05	正常人	7.27	20	正常人	4.22	35	正常人	8.55
06	正常人	13.58	21	正常人	3.53	36	正常人	4.73
07	正常人	15.45	22	正常人	2.26	37	正常人	5.44
08	正常人	8.06	23	正常人	2.74	38	正常人	2.54
09	正常人	5.49	24	正常人	7.27	39	正常人	6.86
10	正常人	3.43	25	正常人	4.03	40	正常人	22.62
11	正常人	9.74	26	正常人	29.63	41	正常人	6.54
12	正常人	4.63	27	正常人	2.95	42	正常人	10.38
13	正常人	5.60	28	正常人	3.26	43	正常人	6.22
14	正常人	8.55	29	正常人	3.89	44	正常人	24.28
15	正常人	11.41	30	正常人	5.54	45	正常人	9.42

[0093] 表 2. 鼻咽癌病人 EB 病毒 Rta-IgG 含量检测结果

[0094]

样本编号	组别	检测结果 U/ml	样本编号	组别	检测结果 U/ml	样本编号	组别	检测结果 U/ml
01	鼻咽癌	111.21	16	鼻咽癌	117.91	31	鼻咽癌	50.81
02	鼻咽癌	43.91	17	鼻咽癌	96.36	32	鼻咽癌	81.00
03	鼻咽癌	15.31	18	鼻咽癌	38.03	33	鼻咽癌	56.57
04	鼻咽癌	74.27	19	鼻咽癌	77.06	34	鼻咽癌	126.23
05	鼻咽癌	82.01	20	鼻咽癌	48.47	35	鼻咽癌	12.5
06	鼻咽癌	99.69	21	鼻咽癌	76.84	36	鼻咽癌	171.04
07	鼻咽癌	76.73	22	鼻咽癌	15.68	37	鼻咽癌	45.27
08	鼻咽癌	26.31	23	鼻咽癌	104.79	38	鼻咽癌	45.05
09	鼻咽癌	81.46	24	鼻咽癌	84.74	39	鼻咽癌	152.69
10	鼻咽癌	74.27	25	鼻咽癌	111.51	40	鼻咽癌	57.32
11	鼻咽癌	28.45	26	鼻咽癌	101.70	41	鼻咽癌	29.92
12	鼻咽癌	26.58	27	鼻咽癌	76.74	42	鼻咽癌	81.32
13	鼻咽癌	193.02	28	鼻咽癌	159.84	43	鼻咽癌	85.27
14	鼻咽癌	130.72	29	鼻咽癌	56.04	44	鼻咽癌	54.87
15	鼻咽癌	78.98	30	鼻咽癌	98.18	45	鼻咽癌	119.94

[0095] 根据检验结果使用 SPSS 软件进行 ROC 曲线分析, 具体结果如表 1 所示, ROC 曲线

分析图如图 2 所示。

[0096] 表 3. 曲线下的面积

[0097]

面积	标准误 ^a	渐进 Sig. ^b	渐进 95% 置信区间	
			下限	上限
0.981	0.009	0.000	0.962	0.999

[0098] a. 在非参数假设下

[0099] b. 零假设 : 实面积 = 0.5

[0100] 利用本发明所述试剂盒检测鼻咽癌病人血清样本和健康人血清样本, 以 25U/ml (使用 SPSS 软件进行 ROC 曲线分析的结果) 为判定值时, 鼻咽癌病人的阳性检出率为 93.3%, 健康人群检测的阴性率为 95.6%, 因此本发明所述试剂盒的灵敏度为 93.3%, 特异性为 95.6%。ROC 曲线分析结果显示曲线下面积为 0.976, 表明本发明所述试剂盒在临床诊断中的准确性较高。

[0101] 实施例 3. 用 Rta 蛋白作为反应抗原制备的试剂盒检测同一样本的对比实验数据

[0102] 用 Rta 蛋白作为反应抗原制备的试剂盒检测 45 份鼻咽癌样本及 45 份健康体检样本, 检测结果如下:

[0103] 表 4. 正常人 EB 病毒 Rta-IgG 含量检测结果

[0104]

样本编号	组别	检测结果	样本编号	组别	检测结果	样本编号	组别	检测结果
01	正常人	-	16	正常人	-	31	正常人	-
02	正常人	+	17	正常人	+	32	正常人	-
03	正常人	-	18	正常人	-	33	正常人	-
04	正常人	-	19	正常人	-	34	正常人	-
05	正常人	-	20	正常人	-	35	正常人	-
06	正常人	-	21	正常人	-	36	正常人	-
07	正常人	-	22	正常人	-	37	正常人	-
08	正常人	-	23	正常人	-	38	正常人	-
09	正常人	-	24	正常人	-	39	正常人	-
10	正常人	-	25	正常人	-	40	正常人	-
11	正常人	-	26	正常人	+	41	正常人	-
12	正常人	-	27	正常人	-	42	正常人	-
13	正常人	-	28	正常人	-	43	正常人	-
14	正常人	-	29	正常人	-	44	正常人	-
15	正常人	-	30	正常人	-	45	正常人	-

[0105] 表 5. 鼻咽癌病人 EB 病毒 Rta-IgG 含量检测结果

[0106]

样本编号	组别	检测结果	样本编号	组别	检测结果	样本编号	组别	检测结果
01	鼻咽癌	+	16	鼻咽癌	+	31	鼻咽癌	+
02	鼻咽癌	+	17	鼻咽癌	+	32	鼻咽癌	+
03	鼻咽癌	-	18	鼻咽癌	+	33	鼻咽癌	+
04	鼻咽癌	+	19	鼻咽癌	+	34	鼻咽癌	+
05	鼻咽癌	+	20	鼻咽癌	+	35	鼻咽癌	-
06	鼻咽癌	+	21	鼻咽癌	+	36	鼻咽癌	+
07	鼻咽癌	+	22	鼻咽癌	-	37	鼻咽癌	+

[0107]

08	鼻咽癌	+	23	鼻咽癌	+	38	鼻咽癌	+
09	鼻咽癌	+	24	鼻咽癌	+	39	鼻咽癌	+
10	鼻咽癌	+	25	鼻咽癌	+	40	鼻咽癌	+
11	鼻咽癌	+	26	鼻咽癌	+	41	鼻咽癌	+
12	鼻咽癌	+	27	鼻咽癌	+	42	鼻咽癌	+
13	鼻咽癌	+	28	鼻咽癌	-	43	鼻咽癌	+
14	鼻咽癌	+	29	鼻咽癌	+	44	鼻咽癌	+
15	鼻咽癌	+	30	鼻咽癌	+	45	鼻咽癌	+

[0108] 从实验结果可以得知,采用 Rta 蛋白作为反应抗原制备的试剂盒的灵敏度为 91.2%,特异性为 93.2%,均低于本发明试剂盒的灵敏度和特异性。

[0109] 实施例 4 本发明试剂盒的性能验证

[0110] 按照本技术领域常规的制造及检测规程对制备试剂盒进行性能验证,结果如表 6 所示:

[0111] 表 6

[0112]

检验项目	检验标准	检验结果
准确性	回收率应在 85-115%范围内	103.6%
线性	剂量反应曲线相关系数(r)的绝对值应不低于 0.9900	0.9926
空白限	应不大于 2U/ml	0.96U/ml
重复性	变异系数(CV)应不大于 10.0%	5.6%
批间差	变异系数(CV)应不大于 15.0%	9.6%
稳定性	37℃保存 6 天	符合

[0113] 上述结果表明,本发明所述试剂盒各方面性能参数良好,可稳定地用于检测样品中的 Rta/IgG 抗体。

[0001]

SEQUENCE LISTING

<110> 同昕生物技术（北京）有限公司

<120> 用于检测 EB 病毒 Rta/IgG 抗体的化学发光试剂盒及其应用

<130> P141338/TXS

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 48

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 带 His 标签的 EB 病毒（epstein-barr virus）Rta 蛋白特异性多肽

<400> 1

His His His His His His Pro Lys Asp Glu Gln Arg Asp Ile Ala Glu

1 5 10 15

Val Leu Asp His Leu Lys Thr Asn Arg Asp Leu Gly Leu Asp Asp Arg

20 25 30

Leu Trp Ala Leu Ile Arg Lys Leu Arg Asp Leu Leu Lys His Thr Lys

35 40 45

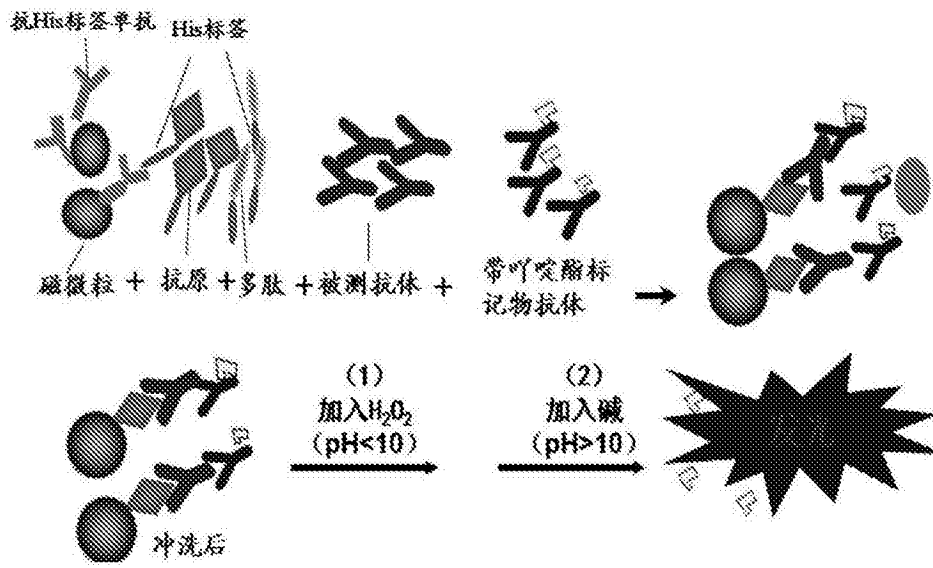


图 1

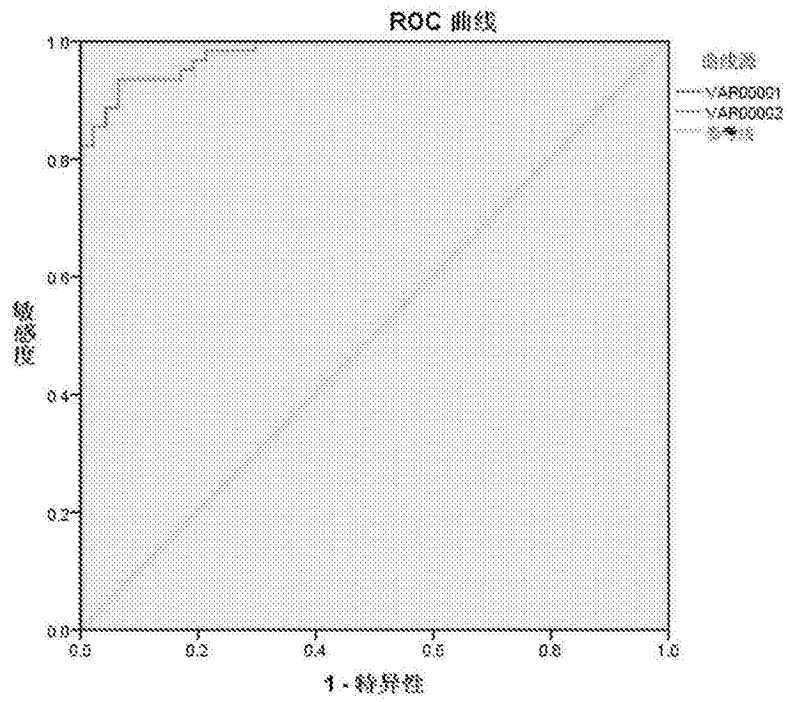


图 2

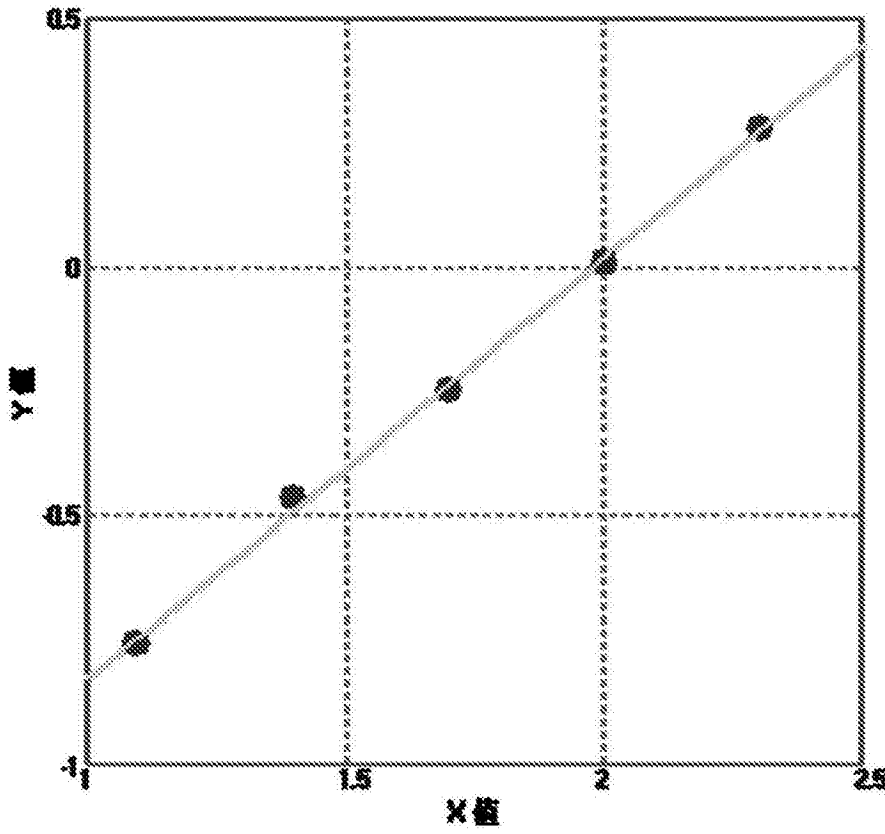


图 3

专利名称(译)	用于检测EB病毒Rta/IgG抗体的化学发光试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105044355A	公开(公告)日	2015-11-11
申请号	CN201510398322.0	申请日	2015-07-08
[标]申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	同昕生物技术(北京)有限公司		
[标]发明人	吴凡 卢晓希 焦守恕 李全		
发明人	吴凡 卢晓希 焦守恕 李全		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/569 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/56994 G01N33/68		
其他公开文献	CN105044355B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种用于检测EB病毒Rta/IgG抗体的化学发光试剂盒及其应用，属于生物技术、医学免疫学与体外血清学诊断技术领域。所述化学发光试剂盒包括包被有抗His标签单抗的磁颗粒，携带His标签的Rta蛋白，携带His标签的特异性人工多肽及吖啶酯标记的抗人IgG抗体；所述特异性人工多肽的氨基酸序列如SEQ ? ID ? NO:1所示。本发明还提供了基于所述化学发光试剂盒的检测EB病毒Rta/IgG抗体的方法。采用本发明所述的化学发光试剂盒及检测方法能够快速、准确、高效、灵敏、特异地检出待测样品中存在的EB病毒Rta蛋白抗体，同时能实现多样本处理，缩短了检测时间，提高了检测效率。