



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187953 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201811272740.5

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2018.10.30

(71)申请人 郑州安图生物工程股份有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区经开第十五大街199号

(72)发明人 王苗苗 付光宇 刘功成 王新明
孙冯博

(74)专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒,包括磁微粒、样本稀释液、阴性对照、阳性对照、酶结合物;磁微粒包被有重组EB病毒Zta抗原,酶结合物包含有辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgA单克隆抗体。包被有重组EB病毒Zta抗原的磁微粒保存在磁微粒稀释液中。包含有辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgA单克隆抗体的酶结合物保存在酶标记物稀释液中。样本稀释液中含有非离子表面活性剂。本发明试剂盒不仅特异性好,而且使抗原和抗体都达到了很高的检出灵敏度,实现了全自动测定。与传统的酶联免疫吸附法相比,本发明试剂盒可以配合全自动化学发光仪A2000 Plus使用,降低了人为操作对测试结果的影响,使检测结果更可靠,更准确,更快速且更具有可重复性。

1. 一种EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒,其特征在于:包括磁微粒、样本稀释液、阴性对照、阳性对照、酶结合物;所述磁微粒包被有重组EB病毒Zta抗原,所述酶结合物包含有辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgA单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述包被有重组EB病毒Zta抗原的磁微粒保存在磁微粒稀释液中。

3. 根据权利要求1所述的EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述包含有辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgA单克隆抗体的酶结合物保存在酶标记物稀释液中。

4. 根据权利要求1所述的EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述样本稀释液中含有非离子表面活性剂。

EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外检测技术,尤其是涉及一种EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒。

背景技术

[0002] EB病毒(Epstein-Barr virus,EBV)是一种嗜人类淋巴B细胞的 γ 疱疹病毒,主要侵犯B淋巴细胞,对人的B淋巴细胞、上皮细胞(包括腮腺管、咽以及宫颈等)和腺细胞有亲和力。1997年世界卫生组织的国际抗癌联盟年会上将其归类为第一类致癌物。Zta蛋白是由立即早期基因BZLF1表达的EB病毒早期激活因子,是由潜伏性感染转化为溶解性感染立即早期时相的产物,是EB病毒进入裂解复制状态必需的激活元件,在病毒从潜伏感染转变为溶解感染,以及溶解性感染期病毒基因组的转录和表达等过程中扮演重要角色。立即早期蛋白在EB病毒癌变过程中所起的作用,近几年越来越受到研究者的关注。目前的研究发现EB病毒感染与多种人类肿瘤如鼻咽癌、淋巴癌等相关。

[0003] 现有检测EB病毒的方法主要有:

Real-time定量PCR法:该方法主要用于EB病毒DNA的定量检测。用荧光定量PCR方法检测鼻咽(NPC)癌患者的血浆中EB病毒DNA,检出率达96%,并在随后的研究中证实放疗后肿瘤消退的患者血浆中EB病毒DNA也迅速下降。采用Real-time定量PCR技术,利用一对特异性引物和特异性荧光探针,结合PCR技术和荧光检测技术,实现对EB病毒的定量检测。但在早期诊断中灵敏度低,特异性与FA IgA相似。

[0004] 间接免疫荧光/免疫酶法:用含病毒淋巴细胞涂片的间接免疫荧光法检测EB病毒特异性抗体的方法目前国外还在使用,主要是检测VCA IgA抗体和FA IgA抗体,需使用荧光显微镜。中国自80年代起,推广使用了免疫酶法(EIA法)检测VCA IgA抗体和FA IgA抗体,然而,该方法存在批间质量差异较大,肉眼观察欠缺客观性,指标较粗等缺点,目前已逐步被酶联免疫法取代。

[0005] 酶联免疫法(ELISA):酶联免疫法(ELISA)检测血清或血浆中各类抗体,采用基因重组的EB病毒复制周期不同阶段表达的抗原。国内应用得最为广泛的是病毒溶解性感染B淋巴细胞,增殖开始时所产生的EB病毒早期抗原,以及增殖后期合成的EB病毒壳抗原VCA。但ELISA法操作复杂,检测时间长,人工操作步骤多,需要对待测样品进行稀释、温育、分离、洗涤和显色等操作,过程复杂,自动化程度低,容易在各个环节引入污染,造成结果的准确性和可靠性出现问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于针对现有检测方法操作复杂、耗时长的缺陷,提供了一种EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒,该试剂盒检测更方便、更便捷且结果更准确。

[0007] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

本发明所述的EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒,包括磁微粒、样本稀释

液、阴性对照、阳性对照、酶结合物；所述磁微粒包被有重组EB病毒Zta抗原，所述酶结合物包被有辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgA单克隆抗体。

[0008] 所述包被有重组EB病毒Zta抗原的磁微粒保存在磁微粒稀释液中。

[0009] 所述包被有辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgA单克隆抗体的酶结合物保存在酶标记物稀释液中。

[0010] 所述样本稀释液中含有非离子表面活性剂。

[0011] 本发明试剂盒可以与全自动化学发光仪A2000、A2000 Plus配套使用，其实现EB病毒Zta IgA抗体检测的原理和流程如下：

第一步：将样本、样本稀释液和磁微粒包被物工作液加入反应杯中，在37℃孵育15min分钟，样本中的EB病毒Zta IgA抗体与重组Zta抗原充分结合孵育完成后，固相置于一个磁场内被吸住，结合在固相上的物质被保留，而其他未结合的物质被冲洗除去；样本稀释液和磁微粒包被物工作液可以同时与样本混合，也可以先后加入。

[0012] 第二步：将酶结合物添加到反应管在37℃孵育15分钟，辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgA单克隆抗体与磁微粒包被物上被捕获的抗原、抗体结合，形成夹心复合物；在反应管内孵育完成后，该复合物被一个磁场吸住，而其他未结合的物质被冲洗除去。

[0013] 第三步：将化学发光底物添加到反应管内，生成不稳定的中间产物，该中间产物通过分子内电子转移产生间氧苯甲酸甲醋阴离子，处于激发态的间氧苯甲酸甲醋阴离子从激发态至基态时，产生化学发光图。再通过光电倍增管对反应所产生的光子数进行测量。所产生的光子数与样本内EB病毒Zta IgA抗体的含量成正比。

[0014] 样本中是否含有EB病毒Zta IgA抗体，首先需要测定阳性对照的相对发光值，通过计算得到CUT OFF值，然后测定样本相对发光值，该发光值与CUT OFF的比值即为COI。样本测试的最终结果以COI值形式给出。样本中是否含有EB病毒Zta IgA抗体，需要将样本的测试结果COI值与参考值进行比较，如果小于1，表示样本中的EB病毒Zta IgA抗体均为阴性，如果大于或等于1，表示样本中的EB病毒Zta IgA抗体为阳性。

[0015] 本发明试剂盒采用化学发光与磁微粒分离技术结合，同时检测EB病毒特异性抗原早期激活因子Zta抗体，既可用于EB病毒感染相关的鼻咽癌的辅助诊断，也可用于高危人群的筛选和风险评估，为疾病及早发现及早治疗提供可能。

[0016] 传统的酶联免疫吸附法采用酶标板为固相载体，酶加底物为显色系统。该方法免疫反应发生的面积有限，吸光度变化缓慢，信号无法放大，限制了该方法的灵敏度。本发明的试剂盒采用磁微粒作为固相载体，具有较大的比表面积，能够增大免疫反应发生面积，提高了反应的灵敏度；磁微粒球形和均一的表面减少了化学性粘附和非特异性结合，提高了特异性；酶促化学发光系统能够实现反应信号的有效放大，同时通过对缓冲液配方的优化（添加了非离子表面活性剂如吐温-20），试剂盒实现了免疫反应的低本底和高信号。因此，本发明的试剂盒不仅特异性好，而且使抗原和抗体都达到了很高的检出灵敏度，实现了全自动测定。与传统的酶联免疫吸附法相比，本发明试剂盒可以配合全自动化学发光仪A2000 Plus使用，降低了人为操作对测试结果的影响，使检测结果更可靠，更准确，更快速且更具有可重复性。

具体实施方式

[0017] 下面通过具体实施例对本申请做更加详细的说明,以方便本领域技术人员的理解。如无特殊说明,本发明中的试剂和检测仪器均采用市售产品,其方法为本领域常规方法。

[0018] 实施例1 制备检测EB病毒Zta IgA抗体的试剂盒

一、磁微粒包被物的制备

将特异性抗原通过共价偶联的方式连接到磁珠上的过程称为磁微粒包被;制备得到的磁微粒抗原的结合物称为磁微粒包被物。

[0019] 包被的基本原理为:抗原或抗体表面的氨基或竣基或疏基与磁珠表面的化学基团,在化学交联剂的作用下,发生化学反应,形成抗原抗体-磁微粒的共价结合物,该共价结合物经过洗涤和封闭,去除未反应的抗原或抗体,以及封闭非特异性结合的位点,最终制备成工试剂盒磁珠包被物。

[0020] 本实施例的制备工艺中,磁微粒包被物可以通过常规的磁微粒包被的方法获得,常规操作过程如下:

1)活化前洗涤:将配剂人员配制好的羧基磁微粒工作液放置在磁架上分离至上清澄清,弃去上清;用0.02mol/L PBS缓冲液重复洗涤4次,弃去上清。

[0021] 2)活化:加入EDC(用PH4.0的醋酸缓冲液稀释,5分钟内有效),室温条件下置摇床上200r/min活化30min。

[0022] 3)活化后洗涤:将反应容器放置在磁架分离至上清澄清,弃去上清;用0.01mol/L PBS缓冲液重复洗涤2次,弃去上清。

[0023] 4)包被:加入一定量的0.01mol/L PBS缓冲液,再加入指定量的EB病毒Zta 包被抗原,室温条件下置摇床上200r/min反应2h。

[0024] 5)封闭:使用含有BSA的封保液重复封闭3次,弃去上清。

[0025] 6)制备后储存:用含有BSA封保液定容至一定量,置摇床上200r/min混匀5min,盖紧瓶盖/容器封口,贴上标示签,然后置于2~8℃贮存。磁微粒混悬液制备完毕。

[0026] 二、酶标记物的制备

将鼠抗人IgA单克隆抗体通过共价偶联的方式结合到辣根过氧化物酶上的过程,称为酶标记。

[0027] 本实施例的试剂盒所采用的工艺中,辣根过氧化物酶标记物可以通过常规的酶标记的方法获得,常规操作过程如下:

1)取待标记的抗体以及辣根过氧化物酶,加入到酶标记缓冲液(MES缓冲体系,PH5.5)中,混合均匀;

2)取待标记的抗体,以50~100倍体积的抗体缓冲液B(PBS缓冲液)对其进行3次离心超滤操作,将待标记抗原抗体的缓冲液置换为抗体缓冲液B;

3)取处理后的抗体以及辣根过氧化物酶,加入到酶标记缓冲液A(MES缓冲液)中,混合均匀;

4)称取交联剂EDC,以酶标记缓冲液A将其配制为10mg/ml的EDC溶液;

5)称取交联剂NHS,以酶标记缓冲液A将其配制为10mg/ml的NHS的溶液;

6)在待标记的抗原抗体与碱性磷酸酶的混合液中加入EDC溶液,混合均匀;

- 7) 在待标记的抗原抗体与碱性磷酸酶的混合液中加入NHS溶液,混合均匀;
- 8) 将上述酶标记反应物置于恒温箱中(26±1℃),静置反应150分钟,使抗原抗体与辣根过氧化物酶发生活化、交联反应;
- 9) 待交联反应完毕,在上述酶标记反应物中加入1/10体积的酶标记终止反应液(TBS缓冲液,含Proclin300和NaN₃),混合均匀;
- 10) 将酶标记反应物置于恒温箱中(26±1℃),静置反应30分钟,终止抗原抗体和辣根过氧化物酶之间的交联反应;
- 11) 终止反应完毕,以50~100倍体积的酶标记终止反应液对酶标记物进行3次离心超滤操作,以除去未反应的交联剂等小分子杂质;
- 12) 回收纯化后的酶标记物,加入等体积的蛋白保护剂,混合均匀;
- 13) 用0.22um滤器将酶标记物进行过滤除菌,置于-20℃保存备用。

[0028] 三、样本稀释液

使用Tris-HCl缓冲液,添加牛血清白蛋白、防腐剂及非离子表面活性剂吐温-20配制而成。

[0029] 四、阴性对照 使用Tris-HCl缓冲液,添加小牛血清、防腐剂等。

[0030] 五、阳性对照 使用PBS缓冲液,添加小牛血清、蛋白保护剂、防腐剂等。

[0031] 实施例2 本发明制备的试剂盒的性能测试

临床检测统计:

收集100例疑似鼻咽癌病人血清样本、30例确诊鼻咽癌病人血清病例,与传统的EB病毒检测的免疫酶染色法相比较,本发明制备等试剂盒有2例疑似患者未能检出,其灵敏度为100%,特异性为98%;确诊病人都呈阳性,其中疑似病例免疫酶染色法与本发明试剂盒检测结果如下表所示:

| | 疑似病例 | 阳性病例 | 阴性病例 | 灵敏度 | 特异性 |
|--------|------|------|------|------|-----|
| 免疫酶染色法 | 100 | 38 | 62 | 100% | 96% |
| 本发明试剂盒 | 100 | 40 | 60 | 100% | 98% |

试验结果表明:本发明制备的磁微粒化学发光检测试剂盒具有较高的灵敏度和特异性,非常适合临床应用。

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN109187953A | 公开(公告)日 | 2019-01-11 |
| 申请号 | CN201811272740.5 | 申请日 | 2018-10-30 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 郑州安图生物工程股份有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 郑州安图生物工程股份有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 郑州安图生物工程股份有限公司 | | |
| [标]发明人 | 王苗苗 付光宇 刘功成 王新明 孙冯博 | | |
| 发明人 | 王苗苗 付光宇 刘功成 王新明 孙冯博 | | |
| IPC分类号 | G01N33/535 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/68 G01N21/76 | | |
| 代理人(译) | 王霞 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种EB病毒Zta IgA抗体磁微粒化学发光检测试剂盒，包括磁微粒、样本稀释液、阴性对照、阳性对照、酶结合物；磁微粒包被有重组EB病毒Zta抗原，酶结合物包含有辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgA单克隆抗体。包被有重组EB病毒Zta抗原的磁微粒保存在磁微粒稀释液中。包含有辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgA单克隆抗体的酶结合物保存在酶标记物稀释液中。样本稀释液中含有非离子表面活性剂。本发明试剂盒不仅特异性好，而且使抗原和抗体都达到了很高的检出灵敏度，实现了全自动测定。与传统的酶联免疫吸附法相比，本发明试剂盒可以配合全自动化学发光仪A2000 Plus使用，降低了人为操作对测试结果的影响，使检测结果更可靠，更准确，更快速且更具有可重复性。

| | 疑似病例 | 阳性病例 | 阴性病例 | 灵敏度 | 特异性 |
|--------|------|------|------|------|-----|
| 免疫酶染色法 | 100% | 98% | 62% | 100% | 98% |
| 本发明试剂盒 | 100% | 40% | 60% | 100% | 98% |