



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102305857 A

(43) 申请公布日 2012.01.04

(21) 申请号 201110219417.3

(22) 申请日 2011.08.02

(71) 申请人 深圳市亚辉龙生物科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区兴海路荔  
山工业区第五栋

(72) 发明人 胡德明 周小棉 吴本清 黄楚铭  
刘清波 何林 阳辉

(74) 专利代理机构 深圳市千纳专利代理有限公  
司 44218

代理人 胡坚

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

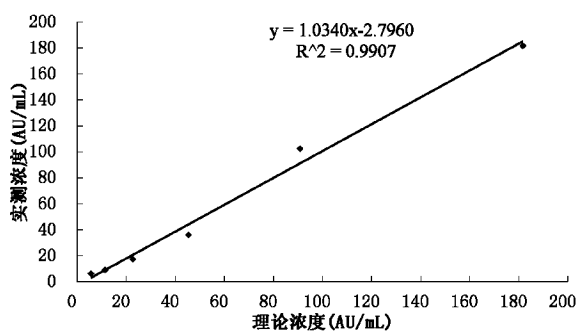
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

### (54) 发明名称

一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂及其检测方法

### (57) 摘要

本发明申请提供一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂以及利用该试剂进行胶乳免疫比浊法检测的方法,该试剂包括 pH 值为  $8.0 \pm 0.3$  的缓冲液、幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂、校准品、低值质控物和高值质控物,其中,幽门螺杆菌特异性抗原可为幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原、幽门螺杆菌尿素酶抗原、幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 抗原或幽门螺杆菌细胞空泡毒素 A 抗原,校准品、低值质控物和高值质控物是用来与样本比较,进行结果计算和质量控制的幽门螺杆菌抗体溶液。所述的试剂为液体双试剂,适用于各类型全自动生化分析仪和半自动生化分析仪,具有灵敏度高、重复性好、检测准确度和精密度好的优点。



1. 一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂,其特征在于:所述的试剂包括 pH 值为  $8.0 \pm 0.3$  的缓冲液、幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂、校准品、低值质控物和高值质控物,其中,

1) pH 值为  $8.0 \pm 0.3$  的缓冲液包括 Tris/HCl 缓冲液、磷酸盐缓冲液、HEPES 缓冲液、甘氨酸缓冲液、巴比妥缓冲液、MOPSO 缓冲液、DIPSO 缓冲液、HEPPS 缓冲液中的一种或多种;

2) 幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂所含抗原包括幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原、幽门螺杆菌尿素酶抗原、幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白 A 抗原或幽门螺杆菌细胞空泡毒素 A 抗原;

3) 校准品、低值质控物和高值质控物是用来与样本比较,进行结果计算和质量控制的幽门螺杆菌抗体溶液,包括 PBS 缓冲液、FBS、适量稳定剂、适量防腐剂和一定浓度的幽门螺杆菌特异性抗体。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂,其特征在于:所述的 pH 值为  $8.0 \pm 0.3$  的缓冲液为 Tris/HCl 缓冲液,并含有 NaCl、PEG 6000 和 Tween 80。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂,其特征在于:所述的幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂的制备包括如下步骤:

1) 步骤 1:幽门螺杆菌特异性抗原的制备;

2) 步骤 2:在胶乳粒径为 50-150nm 的胶乳溶液中加入步骤 1 所得抗原,室温搅拌 8-15 小时,以 10,000rpm 的速度离心 10-20 分钟,去除上清液;

3) 步骤 3:在步骤 2 所得沉淀中加入封闭液,混合均匀,室温搅拌 0.5 小时,以 10,000rpm 的速度离心 10-20 分钟,去除上清液;

4) 步骤 4:在步骤 3 所得沉淀中加入含稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂,其特征在于:所述的幽门螺杆菌特异性抗原的制备包括如下步骤:

1) 步骤 1:细菌培养,包括固态培养、液态小量培养和液态大量培养;

2) 步骤 2:细菌鉴定、破碎、离心、提取上清、纯化及蛋白浓度测定。

5. 根据权利要求 3 所述的试剂,其特征在于:步骤 1 所获得的抗原用 pH = 7.0 的 0.05M 甘氨酸缓冲液调节至中性,加入至步骤 2 所述胶乳溶液中后,在 10 分钟之内与胶乳颗粒溶液化学交联致敏,形成共价抗原-胶乳复合物。

6. 根据权利要求 3 所述的试剂,其特征在于:步骤 2 所述胶乳溶液为用 PBS 将聚乙烯基苄基氯胶乳颗粒混匀、离心、清洗后获得。

7. 根据权利要求 3 所述的试剂,其特征在于:步骤 3 中将形成的共价抗原-胶乳复合物溶液,用 0.05% BSA 的磷酸盐缓冲液封闭胶乳颗粒未结合抗原的表面活性基团甲基氯。

8. 根据权利要求 3 所述的试剂,其特征在于:步骤 4 所述稳定剂选自蛋白质、氨基酸、无机盐、表面活性剂、助悬剂或抗氧剂中的一种或多种;所述的防腐剂选自 0.1% 的叠氮钠、Proclin-300 或庆大霉素;校准品的浓度可以是高浓度单点参考校准品,在使用时用生理盐水稀释成多个不同浓度的参考校准品,也可以直接制备成多个不同浓度的参考校准品,还可以是固定浓度的单点参考校准品,与生理盐水共同绘制校准曲线。

9. 根据权利要求 8 所述的试剂,其特征在于:所述稳定剂为含 0.05% BSA 的磷酸盐缓冲液;所述校准品、低值质控物和高值质控物的浓度分别为 40AU/mL、10AU/mL 和 30AU/mL。

10. 一种利用权利要求 1 所述的试剂测定幽门螺杆菌抗体的方法,其特征在于:所述的方法如下:

所选样本为人体血清,样本与 pH 值为  $8.0 \pm 0.3$  的缓冲液预孵育 3-5 分钟后,使样本中的抗体结合位点充分暴露,加入幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂,继续孵育 3-5 分钟,人体血清中的幽门螺杆菌特异性抗体与幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂中的幽门螺杆菌特异性抗原结合,形成不溶性的抗原-抗体复合物,产生一定的浊度,其浊度高低与检测样本中的特异性抗体浓度成正比,在规定波长下测定该不溶性抗原-抗体复合物的吸光度值,与已知浓度的幽门螺杆菌特异性抗体校准品进行比较,则可计算出样本中幽门螺杆菌抗体的浓度。

## 一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明申请涉及生物检测技术领域,具体涉及一种检测人体血清中幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂及其检测方法。

### 背景技术

[0002] 幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, 简称 HP) 是一种单极、多鞭毛、末端钝圆、螺旋形弯曲的细菌,呈革兰染色阴性,在胃粘膜上皮细胞表面常呈典型的螺旋状或弧形。

[0003] 幽门螺杆菌感染是慢性活动性胃炎、消化性胃溃疡以及胃黏膜相关淋巴组织 (MALT) 淋巴瘤的主要致病因素,并且与胃癌的发生密切相关,1994 年世界卫生组织 / 国际癌症研究机构 (WHO/IARC) 将幽门螺杆菌定为 I 类致癌原。慢性胃炎患者的胃粘膜活检标本中幽门螺杆菌检出率可达 80%~90%,而消化性胃溃疡患者更高,可达 95%以上,甚至接近 100%。胃癌由于局部上皮细胞已发生异化,因此其检出率高低报道不一。幽门螺杆菌的感染已是个世界性问题,对其进行准确诊断有利于控制 HP 传播与流行及根除 HP 感染治疗的监测。

[0004] 目前,国内外已建立的 HP 检测方法从检测手段上分为侵入性和非侵入性两大类。

#### [0005] 一、侵入性检测方法

[0006] 这类方法的特点是使用内窥镜取得胃活检组织后进行检测,试验方法主要有快速尿酶试验法、病理学检测法及细菌培养法。

[0007] 1、快速尿酶检测法:依据 HP 具有丰富的尿素酶可分解尿素产生氨气,由 pH 指示剂显色。该法简便、迅速、灵敏,但也有可能因含尿素酶的其他细菌存在而产生假阳性。此外,近期使用过降低胃部细菌量或直接抑制尿素酶活性的药物的样品可产生假阴性。

[0008] 2、病理学检测法:通过对胃粘膜组织进行切片染色检查,可直接显示 HP 菌体而证实,其中银染法检测率高,但不同病理学家观察的差异性对于胃萎缩样品的诊断具有一定的困难性。

[0009] 3、细菌培养法:取胃粘膜活组织作 HP 培养,因培养细菌较少、操作过程较复杂、时间周期较长、费用昂贵而不适宜普遍应用。

#### [0010] 二、非侵入性检测方法

[0011] 此类方法特点是不需要使用内窥镜采取胃活检组织,从而避免病人因反复做胃窥镜而带来的侵害痛苦或发生其它类型的感染。试验方法主要有尿素呼吸试验、PCR 检测法和免疫血清学法。

[0012] 1、尿素呼吸试验:由于 HP 富含尿素酶,用  $^{13}\text{C}$  或  $^{14}\text{C}$  标记的尿素由受试者服用后,根据气体核素质谱仪检测到分解产生的带同位素标记的二氧化碳标本,来判断 HP 感染程度。该法灵敏度高,可定量,但有一定的放射性危险,并且受设备限制难于普遍推广。

[0013] 2、PCR 检测法:主要检测胃液、粘膜中 HP 尿素酶 (UReA) 基因和毒素相关蛋白 A (CagA) 基因,但操作复杂,易污染,对检验人员的专业知识及操作技术的要求较高,且大大增加患者的经济开支,因此在临床上的应用也较为有限。

[0014] 3、免疫血清学法：目前已有方法包括酶联免疫法、免疫印迹法和胶体金法，为 HP 的流行病学调查提供了有利便捷手段，但检测速度慢，除酶联免疫法可使用全自动酶免分析仪（且需 2～3 小时、步骤多）外，其余都需手工操作，患者获得检测结果为定性分析，不适于治疗监控及疗效评估。

[0015] 目前，虽然检测幽门螺旋杆菌感染的方法繁多，但还没有一种合适的生化分析仪，能够简便、快速、大批量且定量的进行检测。如能建立该方法，则能使检测过程大为简化，操作人员只需设置好上机参数，将试剂和样本置于相应位置后，生化分析仪即可全自动完成检测，并能够迅速得到结果，易于在各级医疗机构推广应用，对于幽门螺旋杆菌的防治具有重大的临床意义和普及价值。

### 发明内容

[0016] 本发明申请的目的在于克服现有方法及技术的缺陷，提供一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂盒及其制备方法以及使用该试剂进行临床样本检测的方法。该试剂适用于各类型生化分析仪，具有样本无需稀释、操作简单、快速、定量准确、重复性好、稳定性好、敏感度高、特异性强的特点。

[0017] 为实现本发明的目的，采用如下的技术方案：

[0018] 一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂，包括 pH 值为  $8.0 \pm 0.3$  的缓冲液、幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂、校准品、低值质控物和高值质控物。

[0019] 其中，pH 值为  $8.0 \pm 0.3$  的缓冲液包括 Tris/HCl 缓冲液、磷酸盐缓冲液、HEPES 缓冲液、甘氨酸缓冲液、巴比妥缓冲液、MOPSO 缓冲液、DIPSO 缓冲液或 HEPPS 缓冲液中的一种或多种。

[0020] 作为优选，所述的 pH 值为  $8.0 \pm 0.3$  的缓冲液为 Tris/HCl 缓冲液，并含有 NaCl、PEG 6000 和 Tween 80，无机盐 NaCl 可以调节离子强度，PEG 6000 可以加快抗原抗体的免疫反应速度，缩短检测时间。

[0021] 所述的幽门螺杆菌特异性蛋白包括幽门螺杆菌全菌体蛋白、幽门螺杆菌尿素酶、细胞毒素相关蛋白 A (Cytotoxin associated gene A, Cag A) 或细胞空泡毒素 A (Vacuolating cytotoxin A, Vac A)。

[0022] 幽门螺杆菌可以产生大量的尿素酶，该尿素酶对细菌在体内的定植及致病发挥着重要作用。尿素酶主要由 A (UreA) 和 B (UreB) 两个亚单位组成，分子量分别约为 30kD 和 63kD，业已证实尿素酶 B 亚单位 (ureB) 是幽门螺杆菌的一个重要保护性抗原。

[0023] 现有研究进一步表明，大约占 50-60% 的幽门螺杆菌能在体外产生细胞毒素活性，其中细胞毒素的表达与暴露在幽门螺杆菌表面的细胞毒素相关基因 A 密切相关，该基因表达的蛋白仅存在于产细胞毒素的幽门螺杆菌中，并具有良好的免疫原性，现在认为，该蛋白作为抗原能为临床胃部疾患的诊断提供依据。

[0024] 细胞空泡毒素 A (VacA) 也是幽门螺杆菌的特异性表达蛋白，对于临床幽门螺杆菌的检测具有重要的参考价值。

[0025] 本发明所述的幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂，制备步骤包括：

[0026] 步骤 1：幽门螺杆菌特异性抗原的制备；

[0027] 步骤 2：在胶乳粒径为 50-150nm 的胶乳溶液中加入步骤 1 所得抗原，室温搅拌

8-15 小时,离心 (10,000rpm,10-20 分钟),去除上清液;

[0028] 步骤 3:在步骤 2 所得沉淀中加入封闭液,混合均匀,室温搅拌 0.5 小时,离心 (10,000rpm,10-20 分钟),去除上清液;

[0029] 步骤 4:在步骤 3 所得沉淀中加入含稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散。

[0030] 优选的,洗涤分散后的浓度为 1%。

[0031] 作为优选,步骤 1 所获得的抗原用 0.05M 甘氨酸缓冲液 (pH = 7.0) 调节至中性,加入至步骤 2 所述胶乳溶液中后,在 10 分钟之内与胶乳颗粒溶液化学交联致敏,形成共价抗原-胶乳复合物,否则抗原的空间三维结构容易回复到没有活性的自然构象。

[0032] 步骤 2 所述胶乳溶液为用 PBS 将聚乙烯基苄基氯胶乳颗粒混匀、离心、清洗后获得。聚乙烯基苄基氯胶乳颗粒是一种核壳形式的胶乳颗粒,其胶乳核是苯乙烯聚合物,胶乳壳是乙烯基苄基氯的聚合物,是一种疏水性胶乳。在壳的表面具有高密度的氯甲基基团,能够在温和的水溶液中直接与抗体、抗原或其他配体的氨基基团反应,通过一步反应产生一种稳定的共价化合物。通过加入适当的表面活性剂,胶乳颗粒的表面形成机械性或电性的保护膜,可以抑制胶乳颗粒的絮凝;根据胶乳颗粒的比重,通过适当助悬剂调节缓冲液比重和粘度,能够使胶乳颗粒稳定悬浮而不会沉降。

[0033] 步骤 3 将形成的共价抗原-胶乳复合物溶液,用 0.05% BSA 的磷酸盐缓冲液封闭胶乳颗粒未结合抗原的表面活性基团——甲基氯。

[0034] 步骤 4 所述稳定剂选自蛋白质、氨基酸、无机盐、表面活性剂、助悬剂、抗氧剂中的一种或多种。优选为含 0.05% BSA 的磷酸盐缓冲液,将封闭后的溶液用含有稳定剂和防腐剂的缓冲液洗涤分散,即得到稳定的幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂。

[0035] 所述防腐剂选自本领域技术人员已知的适当防腐剂,包括 0.1% (g/ml) 的叠氮钠、Proclin-300、庆大霉素。

[0036] 本发明所述幽门螺杆菌特异性抗原的制备步骤包括:

[0037] 步骤 1:细菌培养,包括固态培养、液态小量培养和液态大量培养;

[0038] 步骤 2:细菌鉴定、破碎、离心、提取上清、纯化及蛋白浓度测定。

[0039] 在具体实施例中,公开了一种制备幽门螺杆菌全菌体抗原的方法。

[0040] 本发明所述校准品、低值质控物和高值质控物是一种用来与样本比较,进行结果计算和质量控制的幽门螺杆菌抗体溶液,包括 PBS 缓冲液、FBS、适量稳定剂、适量防腐剂以及一定浓度的幽门螺杆菌特异性抗体。

[0041] 校准品的浓度可以是高浓度单点参考校准品,在使用时用生理盐水稀释成多个不同浓度的参考校准品,也可以直接制备成多个不同浓度的参考校准品,还可以是固定浓度的单点参考校准品,与生理盐水共同绘制校准曲线。本发明优选固定浓度的单点参考校准品,校准品、低值质控物和高值质控物的浓度分别为 40AU/mL、10AU/mL 和 30AU/mL。在具体实施例中,公开了一种制备校准品、低值质控物和高值质控物的方法。

[0042] 本发明测定样本的原理是胶乳免疫比浊法,所选样本为人体血清,样本与试剂 R1 (pH 值为 8.0±0.3 的缓冲液) 预孵育 3-5 分钟后 (使样本中的抗体结合位点充分暴露),加入试剂 R2 (幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂),继续孵育 3-5 分钟,人体血清中的幽门螺杆菌特异性抗体与试剂 R2 中的幽门螺杆菌特异性抗原结合,形成不溶性的抗原-抗体复合物,产生一定的浊度,其浊度高低与检测样本中的特异性抗体浓度成正比。在规定波长下测

定该不溶性抗原-抗体复合物的吸光度值,与已知浓度的幽门螺杆菌特异性抗体校准品进行比较,则可计算出样本中幽门螺杆菌抗体的浓度。

[0043] 本发明提供的试剂为液体双试剂,适用于各类型全自动生化分析仪和半自动生化分析仪,与现有技术相比,具有以下特点:

[0044] 1、定量检测,灵敏度高,可达到 2.0AU/mL;

[0045] 2、在 (5 ~ 180)AU/mL 检测范围内高度相关,重复性好;

[0046] 3、检测准确度和精密度好;

[0047] 4、特异性强,且不易受干扰;

[0048] 5、稳定性好,2 ~ 8°C 可避光贮存至少 12 个月,各试剂开瓶后至少可以保存 14 天;

[0049] 6、样本不用预稀释、操作简单、快速,从检测到出结果仅需 10 分钟,特别适用于大批量筛查,检测速度可随生化分析仪检测速度的提高而提高。

#### 附图说明

[0050] 附图为本发明所述试剂盒线性范围相关性示意图。

#### 具体实施方式

[0051] 本发明公开了一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂及其制备与应用,本领域技术人员可以借鉴本文内容,通过适当改进工艺参数而实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明所要求保护的技术方案之内。本发明的产品及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0052] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0053] 实施例一

[0054] 幽门螺杆菌抗体胶乳免疫试剂盒的制备

[0055] 1、幽门螺杆菌特异性抗原的制备(以全菌体蛋白抗原为例)

[0056] (1) 细菌培养

[0057] (a) 固态培养

[0058] 将 HP 菌种接种于巧克力培养基中,置于 5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub> 和 85% N<sub>2</sub> 的环境条件下,37°C 培养 3 ~ 4 天,即产生扁平带点透明而似胶状菌落,此即为幽门螺旋杆菌,以接种环挑起数个菌落,将细菌于巧克力培养基上用三区划线法划开后,置于 5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub> 和 85% N<sub>2</sub> 的环境条件下,37°C 培养 3 ~ 4 天,每隔四天传种菌一次以保持菌的活性。

[0059] (b) 小量液态培养

[0060] 将固态培养出的幽门螺旋杆菌菌落,以接种环挂下数个菌落,并抖落于 125ml 锥形瓶中,瓶内盛有 BHI 培养液 50ml,其中含 1ml 新生小牛血清和 0.1ml 幽门螺旋杆菌筛选液,将锥形瓶瓶口以棉塞覆盖紧,置于 5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub> 和 85% N<sub>2</sub> 的环境条件下,37°C 培养 3 ~ 4 天。

[0061] (c) 大量液态培养

[0062] 吸取 0.5ml 小量培养菌液,进行初步尿素鉴定以及外观观察,确认没有受到其他杂菌污染。吸取 15ml 菌液加入 500ml 锥形瓶中,瓶内盛有 BHI 培养液 250ml,其中含 5ml 新生小牛血清和 0.5ml 幽门螺旋杆菌筛选液,将锥形瓶瓶口以棉塞覆盖紧,置于 5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub> 和 85% N<sub>2</sub> 的环境条件下,37℃ 培养 3 ~ 4 天。

[0063] (2) 细菌鉴定、破碎、离心和提取上清

[0064] (a) 细菌鉴定

[0065] 外观形态观察:观察菌落在巧克力培养基上之生长形态,为扁平带点透明而似胶状菌落。

[0066] 尿素检验法:幽门螺旋杆菌的尿素酶极为丰富,约含菌体蛋白的 15%,尿素酶催化尿素水解可产生氨气。取 0.5ml 尿素测试溶液置于试管中,加入 0.5ml 菌液,于 37℃ 反应约半小时。若含有幽门螺旋杆菌,则测试溶液会由黄色转变为粉红色。

[0067] (b) 细菌破碎、离心和提取上清

[0068] 取 250ml 幽门螺旋杆菌菌液,于 8000rpm 离心 20 分钟,弃上清,沉淀加入 10ml 0.05M 甘氨酸缓冲液 (pH = 7.0) 清洗,于 8000rpm 离心 20 分钟,弃上清,沉淀加入 10ml 0.05M 甘氨酸缓冲液 (pH = 7.0) 混合均匀,超声破菌,于 18,000rpm 离心 20 分钟,取出上清液并将其放置 -80℃ 备用。

[0069] (c) 抗原蛋白浓度测定

[0070] 以 Bio-Rad 蛋白测定试剂盒定量幽门螺旋杆菌抗原蛋白浓度,首先将胎牛血清蛋白 (BSA) 溶于 PBS 中制备下列各浓度之标准品:0mg/ml、0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml,然后以二次水 5 倍稀释分析缓冲液 (含考马斯亮兰 R-250),接着在 96 微孔盘中加入 100 μl 稀释后的分析缓冲液,最后分别加入 10 μl 各浓度标准品及 (2) 中所获幽门螺旋杆菌抗原蛋白质溶液,于室温反应 5 分钟,以可见分光光度计或酶标仪在 595nm 波长下读取 OD 值,绘制标准曲线,并计算幽门螺旋杆菌抗原蛋白质浓度。

[0071] 2、试剂 R1 的制备

[0072] 先以重蒸水少许溶解 NaCl (3.5 ~ 9.0g),再加 Tris-HCl 缓冲液,最后加重蒸水至 1000ml,充分摇匀使 Tris 终浓度为 0.05mol/L,再加入少量 PEG 6000 和 Tween80,混合均匀即可。

[0073] 本领域技术人员也可选择其他的常规缓冲液,如磷酸盐缓冲液、HEPES 缓冲液、甘氨酸缓冲液、巴比妥缓冲液、MOPSO 缓冲液、DIPSO 缓冲液、HEPPS 缓冲液中的一种或多种。

[0074] 3、试剂 R2 的制备

[0075] 以 1XPBS 稀释胶乳使其为 1% (g/V),混合均匀后 10,000rpm 离心 10 分钟,去除上清液,并以 1XPBS 将胶乳清洗数次后,加入 1XPBS 将胶乳打散,加入 1 中提取的幽门螺旋杆菌全菌体抗原或经纯化后的尿素酶抗原、细胞毒素相关蛋白 A 或细胞空泡毒素 A,室温搅拌 12 小时,10,000rpm 离心 10 分钟,去除上清液,沉淀中加入封闭剂 (含 0.05% BSA 的 1XPBS) 混合均匀,室温搅拌 0.5 小时,10,000rpm 离心 10 分钟,去除上清液,沉淀以含 0.05% BSA 的 1XPBS 分散成乳白色混悬液使致敏的抗原胶乳颗粒浓度为 1% (g/V)。

[0076] 4、校准品、低值质控物和高值质控物的制备

[0077] 用幽门螺旋杆菌特异性抗原多次免疫新西兰兔,抽取血液,于室温静置 4 小时,待血液凝结完全,以 3,000rpm 离心 10 分钟,血清中便含有大量抗体。

[0078] 将兔血清经硫酸铵抽提、PBS 透析、Protein A (Zymed) 管柱层析等步骤进行纯化，测定收集液在 280nm 的吸光度值，确定抗体的存在。

[0079] 用 1 中 (3) 所述方法测定幽门螺杆菌抗体浓度，再以 1XPBS 将胎牛血清稀释 10 倍，加入幽门螺杆菌抗体溶液，使其最终浓度分别为 0.5mg/ml、0.375mg/ml、0.125mg/ml (转换成活性单位分别为 40AU/ml、30AU/ml、10AU/ml)，于 4℃ 混合 30 分钟后，置于 4℃ 备用。

[0080] 实施例二

[0081] 幽门螺杆菌抗体胶乳免疫试剂的测定方法

[0082] 本试剂盒适用于贝克曼、日立、奥林巴斯、东芝、罗氏、雅培、西门子、迈瑞等品牌的全自动或半自动生化分析仪，测定方法如下：

[0083] 1、测定条件 (表 1)

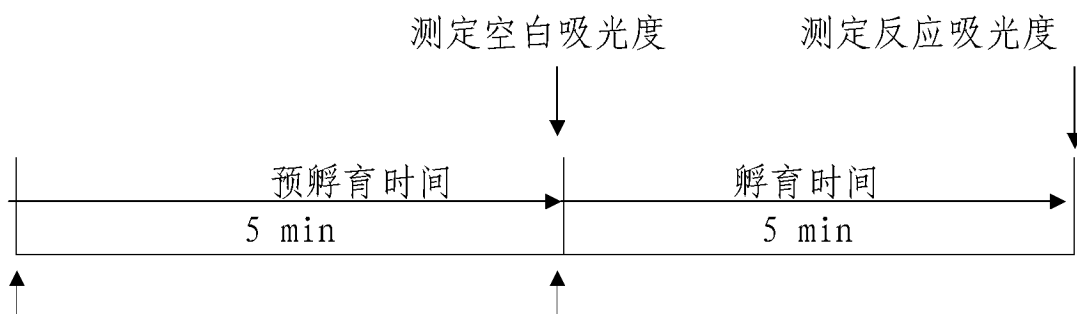
[0084] 表 1 本发明所述试剂盒的测定条件

[0085]

|       |         |
|-------|---------|
| 温度    | 37℃     |
| 主波长   | 546nm   |
| 副波长   | 800nm   |
| 样本量   | 4 μ L   |
| R1 用量 | 160 μ L |
| R2 用量 | 40 μ L  |
| 分析类型  | 两点终点法   |

[0086] 2、测定方法

[0087]



[0088] 加入样本 : 4 μ L      加入 R2 : 40 μ L

[0089] R1 : 160 μ L

[0090] 样本量、R1 用量及 R2 用量可按不同型号生化分析仪的要求，按“测定条件”中规定的样本与试剂用量的比例进行调整。如仪器内无指定波长，可选择与指定波长最接近的数值输入。

[0091] (3) 定标、质量控制及样本测定

[0092] 使用试剂盒中的校准品按所使用分析仪器说明书中的校准程序要求定标，模式为

两点（即生理盐水与浓度为 40AU/mL 校准品）定标，仪器自动生成校准曲线。

[0093] 定标后，分别测定试剂盒中的低值质控物和高值质控物，检测结果应在标示值的 ±15% 范围内。

[0094] 质控在控后即可按同样方法测定临床血清样本。

[0095] 实施例三

[0096] 幽门螺杆菌抗体胶乳免疫试剂的分析性能评估

[0097] 1、分析灵敏度

[0098] 以零标准品为样本，按实施例二所述方法重复测定 20 次，计算结果平均值为 0.8AU/mL，标准偏差 SD 为 0.16，平均值与 3 倍标准偏差之和为 1.2AU/mL，因此本发明试剂盒的分析灵敏度为 2.0AU/mL。

[0099] 2、准确度和批内精密度

[0100] 以低值质控物和高值质控物为样本，按实施例二所述方法分别重复测定 20 次，分别计算测定结果与标示值的相对偏差、平均值  $\bar{x}$ 、标准偏差 SD 及变异系数 CV，结果如表 2 所示。

[0101] 表 2 本发明所述试剂盒的准确度和批内精密度考察

| 序号        | 低值质控物<br>(标示值为 10 AU/mL) |      | 高值质控物<br>(标示值为 30 AU/mL) |      |
|-----------|--------------------------|------|--------------------------|------|
|           | 检测值 (AU/mL)              | 相对偏差 | 检测值 (AU/mL)              | 相对偏差 |
| 1         | 10.4                     | 4%   | 28.9                     | -4%  |
| 2         | 10.8                     | 8%   | 28.4                     | -5%  |
| 3         | 9.1                      | -9%  | 27.8                     | -7%  |
| 4         | 10.9                     | 9%   | 30.2                     | 1%   |
| 5         | 9.1                      | -9%  | 28.4                     | -5%  |
| 6         | 10.3                     | 3%   | 27.4                     | -9%  |
| 7         | 9.6                      | -4%  | 29.0                     | -3%  |
| 8         | 10.0                     | 0%   | 27.1                     | -10% |
| 9         | 10.1                     | 1%   | 31.7                     | 6%   |
| 10        | 10.4                     | 4%   | 28.3                     | -6%  |
| 11        | 9.6                      | -4%  | 31.8                     | 6%   |
| 12        | 10.9                     | 9%   | 32.3                     | 8%   |
| 13        | 10.8                     | 8%   | 30.5                     | 2%   |
| 14        | 10.5                     | 5%   | 28.9                     | -4%  |
| 15        | 9.9                      | -1%  | 27.3                     | -9%  |
| 16        | 10.9                     | 9%   | 29.8                     | -1%  |
| 17        | 11.0                     | 10%  | 29.0                     | -3%  |
| 18        | 9.9                      | -1   | 27.5                     | -8 % |
| 19        | 10.6                     | 6    | 28.0                     | -7 % |
| 20        | 10.9                     | 9    | 29.5                     | -2 % |
| $\bar{x}$ | 10.3                     | —    | 29.1                     | —    |
| SD        | 0.6                      | —    | 1.5                      | —    |
| CV        | 5.9%                     | —    | 5.3%                     | —    |

[0103] 以相对偏差来考察测定准确度,相对偏差均在  $\pm 15\%$  范围内,以变异系数考察批内精密性,低值质控物和高值质控物的变异系数分别为 5.9%和 5.3%。

[0104] 3、批间精密性

[0105] 按实施例二所述方法用 3 个批号的本发明所述试剂盒分别测定同一个血清样本 10 次,计算 30 次测定结果的变异系数 (CV) 以考察批间精密性,结果显示变异系数为 7.3%。

[0106] 4、线性范围

[0107] 用生理盐水将高值样本 (浓度为 181.6AU/mL) 按 1 : 1、1 : 2、1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32 共 6 个梯度进行稀释,按实施例二所述方法每个浓度测定 3 次,对实测平均值与相应理论值作回归分析,计算回归方程为  $y = 1.0843x - 2.9756$ ,相关系数  $r = 0.9916$ ,表明本发明试剂盒在 (5 ~ 180) AU/mL 线性范围内相关性较好,见附图。

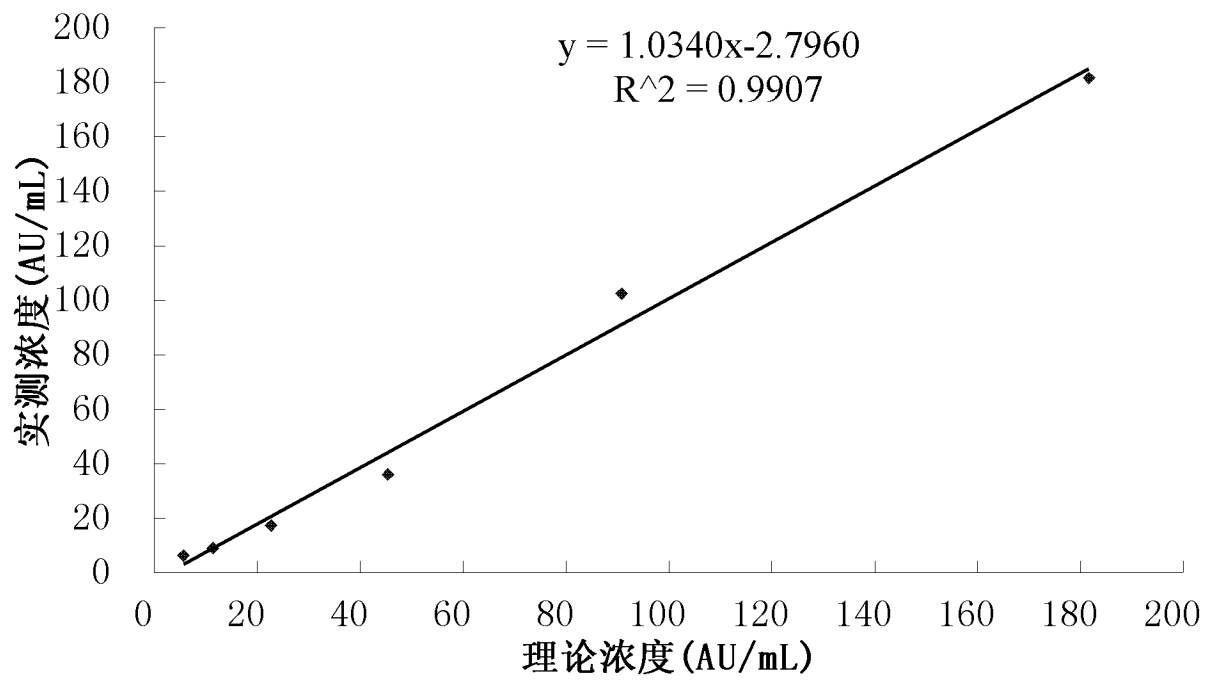
[0108] 5、干扰物质的影响

[0109] 分别将标示浓度为 30AU/mL 的高值质控物与生理盐水、浓度为 0.5mg/mL 的胆红素溶液、浓度为 5mg/mL 的血红蛋白溶液、浊度为 3000FTU 的乳糜按 9 : 1 的比例混合均匀,按实施例二所述方法测试每个样本 3 次,取均值。观察加入干扰物质与加入生理盐水后测定结果的相对偏差。结果表明:加入上述浓度干扰物质样本与加入同体积生理盐水的样本测定结果的相对误差不超过 7%,可以认为在中轻度溶血、黄疸或乳糜时,此测定方法的检测结果基本不受干扰。

#### [0110] 6、稳定性

[0111] 将本发明所述试剂盒开瓶后置于 2°C ~ 8°C 保存 2 周后,取出按实例二所述方法测定标示值为 30AU/mL 的高值质控物和标示值为 10AU/mL 的低值质控物,各重复测定 3 次,计算检测结果与标示值的相对偏差。结果表明,开瓶 2 周后本发明所述试剂盒检测值与标示值的相对偏差均小于 10%,开瓶稳定性较好。

[0112] 将本发明所述试剂盒置于 2°C ~ 8°C 保存 12 个月后,取出按实例二所述方法测定标示值为 30AU/mL 的高值质控物和标示值为 10AU/mL 的低值质控物,各重复测定 3 次,计算检测结果与标示值的相对偏差。结果表明,12 个月后本发明所述试剂盒检测值与标示值的相对偏差均小于 10%,长期稳定性较好。



|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂及其检测方法                       |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN102305857A</a>                   | 公开(公告)日 | 2012-01-04 |
| 申请号            | CN201110219417.3                               | 申请日     | 2011-08-02 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 深圳市亚辉龙生物科技有限公司                                 |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 深圳市亚辉龙生物科技有限公司                                 |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 深圳市亚辉龙生物科技有限公司                                 |         |            |
| [标]发明人         | 胡德明<br>周小棉<br>吴本清<br>黄楚铭<br>刘清波<br>何林<br>阳辉    |         |            |
| 发明人            | 胡德明<br>周小棉<br>吴本清<br>黄楚铭<br>刘清波<br>何林<br>阳辉    |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/569 G01N33/531                          |         |            |
| 代理人(译)         | 胡坚   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明申请提供一种测定幽门螺杆菌抗体的胶乳免疫试剂以及利用该试剂进行胶乳免疫比浊法检测的方法，该试剂包括pH值为 $8.0 \pm 0.3$ 的缓冲液、幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂、校准品、低值质控物和高值质控物，其中，幽门螺杆菌特异性抗原可为幽门螺杆菌全菌体蛋白抗原、幽门螺杆菌尿素酶抗原、幽门螺杆菌细胞毒素相关蛋白A抗原或幽门螺杆菌细胞空泡毒素A抗原，校准品、低值质控物和高值质控物是用来与样本比较，进行结果计算和质量控制的幽门螺杆菌抗体溶液。所述的试剂为液体双试剂，适用于各类型全自动生化分析仪和半自动生化分析仪，具有灵敏度高、重复性好、检测准确度和精密度好的优点。

