

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810105411.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/571 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101368955A

[22] 申请日 2008.4.29

[21] 申请号 200810105411.1

[71] 申请人 北京科美东雅生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中
路7号北科技园

[72] 发明人 蒋冰飞 应希堂 宋胜利 胡国茂
唐宝军 于尚永

权利要求书3页 说明书7页

[54] 发明名称

一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体的化学发光免疫分析试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体的试剂盒及其制备方法，其中采用碱性磷酸酶标记抗体，化学发光底物液中含有 1, 2 - 二氧乙烷类衍生物。所述试剂盒由固相包被载体，生物素化抗原，阴阳性对照品，酶标抗体，化学发光底物液和浓缩洗涤液组成。本发明属于医学检验领域，建立了敏感快速的检测单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体的方法，具有良好的精密度，是一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体的可靠方法。

1、一种单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括：亲和素包被的固相载体；生物素化的单纯疱疹病毒 II 型抗原；阴性对照品；阳性对照品；碱性磷酸酶标记的抗人 IgG 抗体；化学发光底物液和浓缩洗涤液

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述亲和素化的固相载体为微孔板或塑料管。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述碱性磷酸酶化学发光底物液的发光剂为 1,2-二氧乙烷类衍生物，包括(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酸氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。

4、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述化学发光底物液的组成为 0.20mol/L Tris-HCl、16% NaCl、0.4% KCl、2% 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酸氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷、1% Proclin 300。

5、一种单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法，其特征在于：

1) 亲和素包被固相载体

将亲和素加至 pH 为 7.0-7.5 的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中混匀配制成所需浓度，并将包被液负载于固相载体上；用生理盐水洗涤上述固相载体后，用含 1%BSA，0.1%防腐剂，pH 为 7.0-7.5 的 0.01mol/L PBS 作为封闭液封闭上述固相载体。

2) 生物素化单纯疱疹病毒 II 型抗原

将生物素 (BNHS) 溶于二甲基亚砷 (DMSO) 配制成 10mg/mL 的溶液，用 0.1mol/L 硼酸钠缓冲液将纯化的单纯疱疹病毒 II 型抗原稀释至 1-2mg/mL，将二者按 1:50 的比例混合室温下搅拌反应 4h，然后在 0.01mol/L pH 为 7.0-7.5 的 PBS

中 4℃透析过夜，结合物加入等体积甘油，-20℃以下保存备用。

3) 配制阴阳性对照品；

将多份高效价 HSV-II IgG 阳性人血清混合后，56℃ 1h 灭活，除菌过滤，适当稀释后制成阳性对照品，稀释液为 10%新生牛血清，0.1%防腐剂，0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.0-7.5。

将多份 HSV-II IgG 阴性人血清混合，56℃ 1h 灭活后除菌过滤，制成阴性对照品。

4) 碱性磷酸酶标记抗人 IgG 抗体；

采用戊二醛法将碱性磷酸酶与抗人 IgG 抗体偶联，然后对 0.01mol/L pH 为 7.0-7.5 的 PBS 充分透析，加入等体积甘油，-20℃以下保存备用。

5) 配制化学发光底物液

化学发光底物液的组成为 0.15-0.25mol/L Tris-HCl, 16% NaCl, 0.4% KCl, 0.1% 防腐剂, 1.5%-4.0% 发光剂, pH 为 7.0-7.5。

6) 配制浓缩洗涤液

浓缩洗涤液的组成为 0.15-0.25mol/L Tris-HCl, 16% NaCl, 1% Tween-20, pH 为 7.0-7.5。使用时用蒸馏去离子水稀释 20 倍。

将上述制备好的半成品分装，组装成成品试剂盒。

6、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述亲和素包被的固相载体为微孔板或塑料管。

7、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述碱性磷酸酶化学发光底物液的发光剂为 1,2-二氧乙烷类衍生物，包括(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。

8、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述化学发光底物液的组成为 0.20mol/L Tris-HCl、16% NaCl、0.4% KCl、2% 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷、1% Proclin 300, pH 为 7.2。

9、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述浓缩洗涤液的组成为 0.20mol/L Tris-HCl，16% NaCl，1% Tween-20，pH 为 7.2。

一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体的化学发光免疫分析试剂盒

技术领域

本发明涉及临床检验领域，提供了一种采用生物素-亲和素包被技术和化学发光免疫分析技术检测单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体（HSV-II IgG）的试剂盒及其制备方法。

背景技术

单纯疱疹病毒直径约为 120-150 μm ，向外依次由包膜、体被、衣壳三种同心结构组成，体被由纤维质构成，细胞膜内含有脂成份。在低温下可生存数月，在湿热 50 $^{\circ}\text{C}$ 及干燥 90 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 30 分钟可消灭。人类是单纯疱疹病毒的唯一自然宿主，人群感染高达 80%-90%，10%无症状。

单纯疱疹病毒分为 I 型和 II 型二种，I 型疱疹病毒主要是通过呼吸道、皮肤和粘膜密切接触传播，感染腰以上部位的皮肤粘膜和器官。II 型疱疹病毒主要引起生殖器疱疹，而且主要通过直接接触病灶而传播，并导致皮肤病变。生殖器疱疹的病原体 90%为 II 型疱疹病毒，仅 10%为 I 型疱疹病毒。

单纯疱疹病毒一旦病毒进入人体，在疱疹初次发作后的数周内，抗体可持续产生并存在于血液中，对于人体的自然防御非常重要。单纯疱疹的抗体主要有两种，一种是 IgM 抗体，一般在病毒繁殖的高发期出现，持续时间比较短；另一种抗体是 IgG 抗体，该抗体一旦产生，会长时间存在。只要感染了单纯疱疹，IgG 抗体就会在体内存在。大多数成年人都可终生存在单纯疱疹病毒的 IgG 抗体。

生物素-亲和素之间的结合常数高达 $10^{15}(\text{mol/L})^{-1}$ ，一经结合就极为稳定。生物素和亲和素既可与酶等多种材料标记，又可偶联抗体等一系列大分子生物活性物质，这为临床检测抗原或抗体提供了更为有效和灵敏的手段。特别是近年来，链

霉亲和素的问世克服了传统生物素-亲和素系统存在一定程度非特异性结合的缺点，使该系统的应用日益广泛。

发明内容

本发明的目的是提供一种将生物素-亲和素包被技术与化学发光免疫分析技术结合，用于检测 HSV-II 型 IgG 抗体的试剂盒及其制备方法。

本发明的技术方案：一种 HSV- II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒，其组成为：亲和素包被的固相载体；生物素化的单纯疱疹病毒 II 型抗原；阴性对照品；阳性对照品；碱性磷酸酶标记的抗人 IgG 抗体；上述酶所作用的化学发光底物液和浓缩洗涤液。

根据本发明的试剂盒，所述固相载体为微孔板或塑料管；所述碱性磷酸酶的化学发光底物液的发光剂为 1,2-二氧乙烷类衍生物，包括 1,2-二氧乙烷类衍生物为(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷(AMPPD)、CSPD 或 CDP-Star。

本发明的单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

1) 亲和素包被固相载体：

将亲和素加至 0.05mol/L pH 为 7.0-7.5 的 PBS 中混匀配制成所需浓度，并将包被液负载于固相载体上；用生理盐水洗涤上述固相载体后，用含有 1%BSA，0.1%防腐剂，pH 值为 7.0-7.5 的 0.01mol/L PBS 作为封闭液封闭上述固相载体。

在上述方法中，所述亲和素的固相载体为微孔板或塑料管；

2) 生物素化单纯疱疹病毒 II 型抗原

将生物素（BNHS）溶于二甲基亚砜（DMSO）配制成 10mg/mL 的溶液，用 0.1mol/L 硼酸钠缓冲液将纯化的单纯疱疹病毒 II 型抗原稀释至 1-2mg/mL，将二

者按 1:50 的比例混合，室温下搅拌反应 4h，然后在 0.01mol/L pH 为 7.0-7.5 的 PBS 中 4℃透析过夜，结合物加入等体积甘油，-20℃以下保存备用。

3) 配制阴阳性对照品；

将多份高效价 HSV-I IgG 阳性人血清混合后，56℃ 1h 灭活，除菌过滤，适当稀释后制成阳性对照品，稀释液为 10%新生牛血清，0.1%防腐剂，0.02M Tris-HCl 缓冲液，pH 7.0-7.5。

将多份 HSV-I IgG 阴性人血清混合，56℃ 1h 灭活后除菌过滤，制成阴性对照品。

4) 制备碱性磷酸酶标记的抗人 IgG 抗体；

采用戊二醛法将碱性磷酸酶与抗人 IgG 抗体偶联，然后对 0.01mol/L pH 为 7.0-7.5 的 PBS 充分透析，加入等体积甘油，-20℃以下保存备用。

5) 配制化学发光底物液；

化学发光底物液的组成为 0.15-0.25mol/L Tris-HCl, 16% NaCl, 0.4% KCl, 0.1% 防腐剂, 1.5%-4.0% 发光剂, pH 为 7.0-7.5。

在上述方法中，所述碱性磷酸酶的化学发光底物液的发光剂为 1,2-二氧乙烷类衍生物，包括(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷、CSPD 或 CDP- Star。

6) 配制浓缩洗涤液

浓缩洗涤液的组成为 0.15-0.25mol/L Tris-HCl, 16% NaCl, 1% Tween-20, pH 为 7.0-7.5。使用时用去离子水稀释 20 倍。

将上述制备好的半成品分装，组装成成品试剂盒。

本发明的有益效果：本发明中的试剂盒应用生物素-亲和素包被技术，不仅可以保持被标记抗原的生物活性，而且因生物素与亲和素之间极高的亲和力，减少了包被过程中的非特异吸附，并且在高度稀释的条件下仍可达到与直接包被同样的效果，从而节省了包被抗体的用量。应用化学发光免疫分析技术可以避免酶联

免疫分析试剂盒检测过程中划痕等外在因素对结果的影响。两种方法的结合有效地提高了单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体检测的灵敏度，是一种可靠的检测方法。

具体实施方式

实施例 1 制备本发明的单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

1) 亲和素固相微孔板的制备

将亲和素加入 0.05mol/L pH 为 7.2 的 PBS 包被液中混匀配成 2.5 μ g/mL，然后加入到微孔板各孔中，每孔 110 μ L，4 $^{\circ}$ C 放置 24h。用生理盐水洗三次，每孔分别加入封闭液 300 μ L，室温放置 3 小时，封闭液的配制为 1.3mmol/L NaH₂PO₄·2H₂O、8.7mmol/L NaH₂PO₄·12H₂O、1%BSA 和 0.1%生物防腐剂，定容至 1000ml，pH 值为 7.2。

甩掉封闭液，在吸水纸上拍干。室温除湿干燥 24 小时。立即进行封袋，贴签后置 2~8 $^{\circ}$ C 保存。

2) 酶标抗体的制备

采用戊二醛法将碱性磷酸酶与抗人 IgG 抗体偶联，然后对 0.05mol/L pH 为 7.2 的 PBS 充分透析，加入等体积甘油，-20 $^{\circ}$ C 以下保存备用。

3) 生物素化抗原的制备

将生物素 (BNHS) 溶于二甲基亚砜 (DMSO) 配制成 10mg/mL 的溶液，用 0.1mol/L 硼酸钠缓冲液将纯化的单纯疱疹病毒 II 型抗原稀释至 1mg/mL；将二者按 1:50 的比例混合，室温下搅拌反应 4h；装入透析袋对 0.05mol/L pH 值为 7.2 的 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜，结合物加入等体积甘油，小量分装，-20 $^{\circ}$ C 以下保存备用。

采用方阵法选择生物素化抗原和酶标抗体的工作浓度分别为 1:2000 和 1:4000，将生物素化抗原和酶标抗体用酶标抗体稀释液稀释，其组成成分为 Tris 12.120g，

HCl 10mL, BSA 5g, Proclin 300 1ml, 去离子水定容至 1000mL。

4) 阴阳性对照品的制备

将多份高效价 HSV-II IgG 阳性人血清混合后, 56℃ 1h 灭活, 除菌过滤, 用含 10%新生牛血清, 0.1%防腐剂, pH 7.2 的 0.02M Tris-HCl 缓冲液稀释制成阳性对照品, 稀释比例为 1:500。

将多份 HSV-II IgG 阴性人血清混合, 56℃ 1h 灭活后除菌过滤, 制成阴性对照品。阴阳性对照品均冷冻保存。

5) 化学发光底物液的制备

取 Tris 24g, HCl 15ml, NaCl 160g, KCl 4g, proclin300 1mL, AMPPD 20mL, 加入去离子水溶解后, 定容至 1000mL。

6) 浓缩洗涤液的制备

取 Tris 24g, HCl 15mL, NaCl 160g, Tween-20 10 mL, 用去离子水定容至 1000mL。使用时用去离子水稀释 20 倍。

将上述制备好的半成品分装, 组装成成品试剂盒。

实施例 2 制备本发明的单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

除以塑料管作为固相载体外, 其余均以与实施例 1 相同的方法制备单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒。

实施例 3 制备本发明的单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

化学发光底物液的制备: 取 Tris 27g, HCl 16.88mL, NaCl 160g, KCl 4g, proclin300 1mL, CPD-Star 32mL, 加入双蒸水溶解后, 定容至 1000mL。

其余与实施例 1 相同。

实施例 4 制备本发明的单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

化学发光底物液的制备：取 Tris 21g, HCl 13.13mL, NaCl 160g, KCl 4g, NaN_3 1mL, CSPD 16mL, 加入双蒸水溶解后，定容至 1000mL。

其余与实施例 1 相同。

实施例 5 本发明的试剂盒的使用方法

以上实施例 1 制备的单纯疱疹病毒 II 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒的具体操作如下：

- 1) 自 4℃冰箱中取出试剂盒，室温平衡 15 分钟；取出包被板条，插入板架上。
- 2) 每次试验设空白 1 孔，阴性对照孔和阳性对照孔各两孔，除空白孔外，各孔加生物素化的抗原 50 μL ，再加入阴阳性对照品和用生理盐水 1:100 稀释的样本 100 μL ，用微量震荡器充分振荡混匀，37℃温育 30 分钟；
- 3) 甩去反应液，每孔加满稀释后的洗涤液，洗板 5 次，最后在干净的吸水纸上扣干；
- 4) 每孔加入酶标记物 100 μL ，用微量震荡器充分振荡混匀，37℃温育 30 分钟；
- 5) 甩去反应液，每孔加满稀释后的洗涤液，洗板 5 次，最后在干净的吸水纸上扣干；
- 6) 每孔加入 50 μL 化学发光底物液，用微量震荡器充分振荡混合均匀，室温育 30 分钟，在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度 (RLU)，测量时间 1 秒/孔；
- 7) $\text{CUT OFF} = 2.1 \times \overline{\text{阴性对照品RLU}}$ ，RLU 大于 Cut off 为阳性，否则为阴性。

实施例 6 本发明的试剂盒的方法学检定

1) 精密度

对同一份阳性标本，按照实施例 5 所述操作方式进行 3 次重复测定，每次 10 孔，考察本发明试剂盒的精密度。经计算，三次测定 RLU 的 CV%分别为 8.6%，7.7%和 8.9%，均小于 10%，说明本发明的试剂盒精密性良好，符合要求。

2) 特异性

用本发明的试剂盒按照实施例 5 所述操作方法检测经临床确诊的单纯疱疹病毒 II 型感染者血清样本 105 例，健康人血清样本 92 例，考察符合率。由表 1 可知，本发明试剂盒于单纯疱疹病毒感染者血清样本中检出 2 份阴性，符合率 98.1%，而健康人血清样本的检测结果显示与临床检测结果完全相符，总体符合率为 99.0%。

表 1 本发明的试剂盒特异性检测结果

检测项目	例数	阳性检测结果
阳性样本	105	105
阴性样本	92	0

3) 灵敏度

将一份高滴度阳性样本以 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 的比例稀释，考察本发明的试剂盒的灵敏度（见表 2）。

表 2 本发明的试剂盒灵敏度检测结果

检测项目	检测结果
1:40	+
1:80	+
1:160	+
1:320	+
1:640	-

由表 2 可知，当高滴度阳性样本 1:40-1:320 稀释时本发明的试剂盒仍可检测为阳性，当 1:640 稀释时，检测结果为阴性，说明本发明试剂盒的灵敏度较高。

以上所述仅为本发明的较佳实施例，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种检测单纯疱疹病毒II型IgG抗体的化学发光免疫分析试剂盒		
公开(公告)号	CN101368955A	公开(公告)日	2009-02-18
申请号	CN200810105411.1	申请日	2008-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美生物技术有限公司		
[标]发明人	蒋冰飞 应希堂 宋胜利 胡国茂 唐宝军 于尚永		
发明人	蒋冰飞 应希堂 宋胜利 胡国茂 唐宝军 于尚永		
IPC分类号	G01N33/571 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测单纯疱疹病毒II型IgG抗体的试剂盒及其制备方法，其中采用碱性磷酸酶标记抗体，化学发光底物液中含有1，2 - 二氧乙烷类衍生物。所述试剂盒由固相包被载体，生物素化抗原，阴阳性对照品，酶标抗体，化学发光底物液和浓缩洗涤液组成。本发明属于医学检验领域，建立了敏感快速的检测单纯疱疹病毒II型IgG抗体的方法，具有良好的精密度，是一种检测单纯疱疹病毒II型IgG抗体的可靠方法。

检测项目	例数	阳性检测结果
阳性样本	105	105
阴性样本	92	0