



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104360055 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201410621724. 8

(22) 申请日 2014. 11. 07

(71) 申请人 山东泰邦生物制品有限公司

地址 271000 山东省泰安市虎山东路 14 号

(72) 发明人 朱孟沼 马杰 巩艳艳 陈振

菅长永 马山

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公

司 37205

代理人 宋玉霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

(54) 发明名称

测定水痘－带状疱疹病毒中和抗体的试剂盒
及生产方法

(57) 摘要

本发明涉及体外诊断试剂的技术领域, 具体是一种能测定水痘－带状疱疹病毒中和抗体效价的试剂盒及其生产方法。该试剂盒采用感染 VZV 的细胞作为抗原, 包被固定在 96 孔板的孔内, 使用细胞表面携带的大量病毒糖蛋白(中和抗原)来捕获待测样品中的中和抗体, 同时保持细胞完整, 内部的其他病毒抗原并不与样品接触, 从而能保证测定中和抗体的特异性。该试剂盒可以直接用于自动生化分析仪或酶标仪, 快速测定 VZV 中和抗体效价。测定过程简单、快捷, 测定样本通量高, 并能实现定量测定。

1. 一种测定水痘-带状疱疹病毒中和抗体的试剂盒,采用感染 VZV 的细胞作为抗原,包被固定在 96 孔板的孔内,使用细胞表面携带的大量病毒糖蛋白来捕获待测样品中的中和抗体,同时保持细胞完整,内部的其他病毒抗原并不与样品接触,从而能保证测定中和抗体的特异性。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,其组成为:

96 孔板:感染了 VZV 的人胚肺成纤维细胞均匀包被在每个孔内;

样本稀释液,也称为试剂 R1:20mmol/L 磷酸盐、叠氮钠 0.1%、牛血清白蛋白 1%;

标准血清,也称为试剂 R2:来自水痘愈后患者,其效价经过 VZV IgG 国际标准品标定的人抗 VZV 血清,用 R1 稀释到 1IU/ml;

洗涤液,也称为试剂 R3:20mmol/L 磷酸盐、氯化钠 0.9%、吐温-20 0.1%、牛血清白蛋白 1%;

酶标二抗,也称为试剂 R4:20mmol/L 磷酸盐、牛血清白蛋白 1%、辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG;

底物,也称为试剂 R5:取含 2mg/ml 3,3',5,5'-四甲基联苯胺的无水乙醇溶液 1.56ml,50mmol/L 磷酸氢二钠-25mmol/L 枸橼酸缓冲液 31.25ml,0.75% 过氧化氢溶液 0.1ml,混匀;

终止液,也称试剂 R6:2mol/L 硫酸。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述的 96 孔板的每个孔内均匀包被有感染了 VZV 的人胚肺成纤维细胞,每孔包被抗原细胞的数量为 300-3000 个。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,96 孔板内各孔包被细胞数目 $CV < 10\%$ 。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,细胞包被后的 96 孔板在经过 3 次洗涤和 3 次 37℃ 恒温振荡处理后,孔内细胞脱落不超过 20%。

6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,细胞包被后的 96 孔板在经过 3 次洗涤和 3 次 37℃ 恒温振荡处理后,孔内细胞脱落不超过 10%。

7. 一种测定水痘-带状疱疹病毒中和抗体的试剂盒的制备方法,其操作步骤如下:

(1) 在长成致密单层的人胚肺成纤维细胞中接种 VZV 毒种;接种比例为:每 1000 个细胞接种 50-300 个噬斑形成单位 PFU 的 VZV 病毒,37℃、5% 二氧化碳条件下培养 2~5 天,细胞病变 50-80%,使用 0.25% 胰酶将细胞消化成单个,并加入人血白蛋白或牛血清白蛋白,控制其终浓度为 2%-10%;并将细胞密度控制到能满足步骤(2)的要求;

(2) 将步骤(1)中消化下来的细胞充分混匀、悬浮,加入准备好的 96 孔板中,每孔加细胞悬液 5-10 微升,控制每孔中细胞数目在 300-3000 个之间,水平震荡 96 孔板,使细胞悬液均匀分布在孔底,每孔再加入 5-10 微升 2%-5% 的戊二醛溶液,水平震荡 96 孔板,混匀,室温反应 10 分钟后孔内溶液凝固,待用;

(3) 将(2)步骤中的 96 孔板浸入封闭液中,保证所有孔中充满封闭液,室温封闭 1-2 小时,使用 R3 洗后自然风干;封闭液为含 5% 脱脂奶粉或 1% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液;

(4) 按照以下方法配置各种试剂:

R1:20mmol/L 磷酸盐、叠氮钠 0.1%、牛血清白蛋白 1%;

R2:人抗 VZV 血清(来自水痘愈后患者,其效价经过 VZV IgG 国际标准品标定),用 R1 稀释到 1IU/ml;

R3:20mmol/L 磷酸盐、氯化钠 0.9%、吐温-20 0.1%、牛血清白蛋白 1%;

R4 :20mmol/L 磷酸盐、牛血清白蛋白 1%、辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG ;

R5 :取含 2mg/ml 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 的无水乙醇溶液 1.56ml, 50mmol/L 磷酸氢二钠 -25mmol/L 枸橼酸缓冲液 31.25ml, 0.75% 过氧化氢溶液 0.1ml, 混匀 ;

R6 :2mol/L 硫酸。

8. 一种测定水痘 - 带状疱疹病毒中和抗体的试剂盒的使用方法, 具体步骤如下 :

用 R1 将待测样本稀释到合适的浓度, 同时用 R1 将 R2 进行系列倍比稀释, 用于制作标准曲线 ;

将稀释好的待测样本与标准样品分别加入 96 孔板的孔中, 1 孔加入 R1 作为空白对照 ;

每孔加样 100 微升, 37℃ 孵育 30 分钟 ;

用 R3 清洗 96 孔板 3 次, 甩干残余洗涤液 ;

每孔加入 100 微升 R4, 振荡混匀, 37℃ 孵育 30 分钟 ;

重复步骤 C ;

每孔加入 100 微升 R5, 振荡混匀, 37℃ 孵育 10 分钟 ;

每孔加入 100 微升 R6, 振荡混匀, 使用酶标仪在 405nm 读取 OD 值 ;

所有样品的 OD 值扣减空白对照孔的 OD 值 ;

根据标准样品的效价和 OD 值制作标准曲线, 将待测样品 OD 值带入回归方程即可计算出效价。

测定水痘－带状疱疹病毒中和抗体的试剂盒及生产方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断试剂的技术领域，具体是一种能测定水痘－带状疱疹病毒中和抗体效价的试剂盒及其生产方法。

技术背景

[0002] 水痘－带状疱疹病毒 (VZV) 是人类水痘及带状疱疹疾病的病原体，具有高度传染性，传播广泛，是儿童时期常见的接触性传染病之一，易感者接触病毒后罹病率在 75% 以上。易感者是指体内无 VZV 中和抗体，或者中和抗体含量达不到保护水平的个体。一般情况下，患过水痘及接种过水痘－带状疱疹疫苗的人群都会产生高于保护水平的 VZV 中和抗体。然而，水痘－带状疱疹疫苗在我国尚未列入计划免疫的范围内，普及率较低；而水痘疾病通常在幼儿期或儿童期发病，成年人对自己是否有水痘患病史往往记忆模糊；虽然水痘一般情况下能够自愈，但是对于无保护性抗体的孕妇及胎儿的危害性非常严重。因此，在临床上测定人体内 VZV 中和抗体效价，对于水痘疾病的治疗和预防非常重要。另一方面，测定 VZV 中和抗体效价，也是评价水痘－带状疱疹疫苗临床有效性的关键指标。

[0003] 虽然常规的酶联免疫吸附实验 (ELISA) 是一种最常用的抗体检测方法，然而在 VZV 中和抗体测定中的特异性却比较差。人体免疫系统接触 VZV 后能够产生许多种抗体，其中只有少数几种抗体能够中和 VZV 的感染性，即杀灭病毒。大量研究文献表明，现有 ELISA 方法的测定结果与 VZV 中和抗体含量的相关性较差，因此不能用于评价水痘－带状疱疹疫苗的临床有效性。这主要是因为 ELISA 板上包被的通常为 VZV 全抗原，能够同所有的 VZV 抗体结合。目前，测定 VZV 中和抗体的方法主要是中和试验 (NT) 和膜抗原荧光抗体实验 (FAMA)。

[0004] 中和试验是一种生物学实验，是直接将血清样本与 VZV 病毒液混合，使血清中的中和抗体与 VZV 充分接触、中和，然后再接种到 VZV 易感的细胞培养物 (通常为人胚肺成纤维细胞)，测定剩余活病毒的滴度，与中和前的病毒滴度比较，从而计算血清的中和抗体效价。这种方法的优势在于，通过测定经过血清中和后病毒对细胞的感染能力，直接体现了抗体对病毒的中和、杀灭能力，属于生物学活性的测定。然而这种方法也有明显的缺点：需要进行细胞培养和病毒培养，需要符合生物安全标准的实验室；实验周期长，通常要 10 天以上；测定的样本量有限，无法实现高通量测定。

[0005] 研究发现，VZV 感染人体细胞过程中的关键性抗原是定位在病毒包膜上的几种糖蛋白，能够中和这些糖蛋白的抗体就是 VZV 中和抗体。细胞被 VZV 感染后，这些糖蛋白在细胞内表达并被运输到宿主细胞膜上，而这些细胞膜最终会包裹在成熟病毒颗粒上，成为病毒的包膜。在感染了 VZV 数天后的细胞培养物 (细胞膜上已经有病毒糖蛋白表达) 中加入血清样本并孵育，血清中的中和抗体会与细胞膜上的糖蛋白特异性结合。再加入带有荧光标记的抗人 IgG，荧光抗体就会与被糖蛋白捕获的中和抗体特异性结合。通过显微镜观察就会发现细胞表面有典型的环状荧光。如果血清中无 VZV 中和抗体，细胞表面就不会产生荧光。这就是膜抗原荧光抗体实验 (FAMA) 测定 VZV 中和抗体的理论基础。大量已公开的研究文献

表明,FAMA 法与 NT 法测定结果具有较高的相关性。由于荧光实验具有更高的灵敏度,可以检测到更低水平的 VZV 中和抗体,已经成为测定 VZV 中和抗体的金标准,在疫苗有效性评价中大量应用。然而,FAMA 法也有自身的缺点:需要昂贵的荧光显微镜;荧光强度通过人眼判定,具有很强的主观性,不利于在不同的实验室内推广;仍然需要细胞培养和病毒培养。因此,虽然 FAMA 法已经建立几十年了,现在仍没有商品化的 FAMA 试剂盒面世。

[0006] 要实现 VZV 中和抗体测定试剂盒的商品化,就需要找到一种方法将纯化的中和抗原均匀固定多孔板上,并保持抗原活性和完整性。然而由于中和抗原(病毒糖蛋白)定位在病毒包膜和染毒细胞的细胞膜上,纯化难度非常高,成本高昂,而且纯化过程中容易失活。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于针对上述存在的种种缺陷而提供一种能测定水痘-带状疱疹病毒中和抗体效价的试剂盒。该试剂盒可以直接用于自动生化分析仪或酶标仪,快速测定 VZV 中和抗体效价。测定过程简单、快捷,测定样本通量高,并能实现定量测定。

[0008] 本发明的另一个目的是提供上述试剂盒的生产制备及使用方法。按照本发明提供的方法生产的试剂盒,可以实现批量生产、标准化和商品化。

[0009] 本发明的技术方案为:

一种测定水痘-带状疱疹病毒中和抗体的试剂盒,采用感染 VZV 的细胞作为抗原,包被固定在 96 孔板的孔内,使用细胞表面携带的大量病毒糖蛋白(中和抗原)来捕获待测样品中的中和抗体,同时保持细胞完整,内部的其他病毒抗原并不与样品接触,从而能保证测定中和抗体的特异性。

[0010] 为实现上述目的,本发明提供的试剂盒组成为:

- A. 96 孔板:感染了 VZV 的人胚肺成纤维细胞均匀包被在每个孔内;
- B. 样本稀释液,也称为试剂 R1:20mmol/L 磷酸盐、叠氮钠 0.1%、牛血清白蛋白 1%;
- C. 标准血清,也称为试剂 R2:来自水痘愈后患者,其效价经过 VZV IgG 国际标准品标定的人抗 VZV 血清,用 R1 稀释到 1IU/ml;
- D. 洗涤液,也称为试剂 R3:20mmol/L 磷酸盐、氯化钠 0.9%、吐温-20 0.1%、牛血清白蛋白 1%;
- E. 酶标二抗,也称为试剂 R4:20mmol/L 磷酸盐、牛血清白蛋白 1%、辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG;
- F. 底物,也称为试剂 R5:取含 2mg/ml 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)的无水乙醇溶液 1.56ml,50mmol/L 磷酸氢二钠-25mmol/L 枸橼酸缓冲液 31.25ml,0.75% 过氧化氢溶液 0.1ml,混匀;
- G. 终止液,也称试剂 R6:2mol/L 硫酸。

[0011] 作为进一步优化,本发明提供的试剂盒的 96 孔板的每个孔内均匀包被有感染了 VZV 的人胚肺成纤维细胞,并具有以下特征:

a. 每孔包被细胞的数量能够提供检测抗体所需的抗原量,又不影响吸光度测定,恰当的范围为 300~3000 个。

[0012] b. 96 孔板内各孔包被细胞数目 $CV < 10\%$ 。

[0013] c. 细胞包被后的 96 孔板在经过 3 次洗涤和 3 次 37℃ 恒温振荡处理后, 孔内细胞脱落不超过 20%, 进一步优化为不超过 10% 更好。

[0014] 本发明提供的试剂盒的制备方法, 其操作步骤如下:

(1) 在长成致密单层的人胚肺成纤维细胞中接种 VZV 毒种: 接种比例为: 每 1000 个细胞接种 50~300 个噬斑形成单位(PFU)的 VZV 病毒, 37℃、5% 二氧化碳条件下培养 2~5 天, 细胞病变 50~80%, 使用 0.25% 胰酶将细胞消化成单个, 并加入人血白蛋白或牛血清白蛋白, 控制其终浓度为 2%~10%; 并将细胞密度控制到能满足步骤(2)的要求;

(2) 将步骤(1)中消化下来的细胞充分混匀、悬浮, 加入准备好的 96 孔板中, 每孔加细胞悬液 5~10 微升, 控制每孔中细胞数目在 300~3000 个之间, 水平震荡 96 孔板, 使细胞悬液均匀分布在孔底, 每孔再加入 5~10 微升 2%~5% 的戊二醛溶液, 水平震荡 96 孔板, 混匀, 室温反应 10 分钟后孔内溶液凝固, 待用;

(3) 将(2)步骤中的 96 孔板浸入封闭液中, 保证所有孔中充满封闭液, 室温封闭 1~2 小时, 使用 R3 洗后自然风干; 封闭液为含 5% 脱脂奶粉或 1% 牛血清白蛋白的 PBS 溶液。

[0015] (4) 按照以下方法配置各种试剂:

R1: 20mmol/L 磷酸盐、叠氮钠 0.1%、牛血清白蛋白 1%。

[0016] R2: 人抗 VZV 血清(来自水痘愈后患者, 其效价经过 VZV IgG 国际标准品标定), 用 R1 稀释到 1IU/ml。

[0017] R3: 20mmol/L 磷酸盐、氯化钠 0.9%、吐温-20 0.1%、牛血清白蛋白 1%。

[0018] R4: 20mmol/L 磷酸盐、牛血清白蛋白 1%、辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG。

[0019] R5: 取含 2mg/ml 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB)的无水乙醇溶液 1.56ml, 50mmol/L 磷酸氢二钠-25mmol/L 枸橼酸缓冲液 31.25ml, 0.75% 过氧化氢溶液 0.1ml, 混匀。

[0020] R6: 2mol/L 硫酸。

[0021] 本发明提供的试剂盒的使用方法, 具体步骤如下:

A、用 R1 将待测样本稀释到合适的浓度, 同时用 R1 将 R2 进行系列倍比稀释(用于制作标准曲线);

B、将稀释好的待测样本与标准样品分别加入 96 孔板的孔中, 1 孔加入 R1 作为空白对照。每孔加样 100 微升, 37℃ 孵育 30 分钟;

C、用 R3 清洗 96 孔板 3 次, 甩干残余洗涤液;

D、每孔加入 100 微升 R4, 振荡混匀, 37℃ 孵育 30 分钟;

E、重复步骤 C;

F、每孔加入 100 微升 R5, 振荡混匀, 37℃ 孵育 10 分钟;

G、每孔加入 100 微升 R6, 振荡混匀, 使用酶标仪在 405nm 读取 OD 值;

H、所有样品的 OD 值扣减空白对照孔的 OD 值。

[0022] I、根据标准样品的效价和 OD 值制作标准曲线(线性或非线性回归), 将待测样品 OD 值带入回归方程即可计算出效价。

[0023] 本发明的有益效果为:

使用感染 VZV 的细胞做为抗原, 保证了中和抗原的完整性和有效性, 保证所测定的抗体活性为中和抗体活性。用本发明提供的试剂盒检测 VZV 中和抗体的结果与中和试验(NT)法的测定结果相关系数(r^2)大于 0.95; 而用 VZV 全病毒包被法制备的试剂盒的检测结果与

中和试验(NT)法的测定结果相关系数(r^2)通常都小于 0.8,甚至小于 0.6。

[0024] 白蛋白与戊二醛反应形成多聚交联物,固定和包埋细胞,有效防止细胞脱落,使测定结果稳定可靠。当待检样品浓度不低于 0.5IU/ml 时,检测结果板内变异系数不超过 8%;而常规酶联免疫检测方法的变异系数在 20% 以内。

[0025] 本发明提供的试剂盒可以实现商业化的批量生产。

具体实施方式

[0026] 下面结合具体实施例对本发明的技术方案进行详细的说明。

[0027] 实施例 1 最佳的孔内包被细胞数目研究。每孔包被细胞数目过少,抗原量不足,将导致试剂盒的检测上限过低;包被细胞数目过多,细胞引起光散射,将影响测定过程中吸光值的测定结果。

[0028] 在长成致密单层的人胚肺成纤维细胞中接种 VZV 毒种。接种比例为:每 1000 个细胞接种 200 个噬斑形成单位(PFU)的 VZV 病毒。37℃、5% 二氧化碳条件下培养 60 小时,细胞病变 70%,使用 0.25% 胰酶将细胞消化成单个,并加入牛血清白蛋白(终浓度 5%),细胞密度分别调整为 3×10^4 个/ml、 6×10^4 个/ml、 1.2×10^5 个/ml、 2×10^5 个/ml、 4×10^5 个/ml、 6×10^5 个/ml、 1×10^6 个/ml。将上述不同浓度的细胞充分混匀、悬浮,分别加入 96 孔板的不同孔中(每个浓度设 12 孔重复),每孔加细胞悬液 5 微升。水平震荡 96 孔板,使细胞悬液均匀分布在孔底。每孔再加入 5 微升 4% 的戊二醛溶液,水平震荡 96 孔板,混匀,室温反应 10 分钟后孔内溶液凝固。96 孔板浸入 5% 脱脂奶粉配制的封闭液中,保证所有孔中充满封闭液,室温封闭 2 小时。96 孔板使用含有 0.9% 氯化钠、0.1% 吐温-20、1% 牛血清白蛋白的 20mmol/L 磷酸盐缓冲液(洗涤液, R3)洗涤(洗板机)后自然风干。

[0029] 每孔加入 0.3ml 含有叠氮钠 0.1%、牛血清白蛋白 1% 的 20mmol/L 磷酸盐缓冲液(样本稀释液, R1),使用酶标仪在 405 纳米波长检测不同孔的 OD 值。没有包被细胞的空白 96 孔板,每孔加入 0.3ml 上述相同的样本稀释液,用酶标仪在 405 纳米波长检测各孔的 OD 值,作为空白对照。

[0030] 检测上限测定:人抗 VZV 血清(来自水痘愈后患者,其效价经过 VZV IgG 国际标准品标定),用上述样本稀释液 R1 分别稀释到 2IU/ml、1.8IU/ml、1.6IU/ml、1.4IU/ml、1.2IU/ml、1.0IU/ml、0.8IU/ml、0.6IU/ml、0.4IU/ml、0.2 IU/ml 共 10 个浓度。每个浓度再用 R1 稀释 100 倍,待用。每种细胞密度的孔中,都分别加入上述稀释后的 10 种浓度的人抗 VZV 血清 50 微升,37℃ 孵育 30 分钟,用上述洗涤液 R3 洗涤 2 次,每孔加入 0.1ml 含有辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 的磷酸盐缓冲液(R4),37℃ 孵育 30 分钟,用上述洗涤液 R3 洗涤 2 次,每孔加入反应底物溶液(R5) 0.1ml,37℃ 孵育 10 分钟,每孔加入终止液(R6) 0.1ml,使用酶标仪在 405nm 读取 OD 值。以 OD 值不再随人抗 VZV 血清效价升高的血清稀释度作为检测上限。

[0031] 表 1 数据是关于包被细胞数目的影响的研究。结果表明:最适细胞包被量为 300~3000/孔。

[0032] 表 1 每孔包被细胞数目对检测上限和光散射的影响

每孔包被细胞数目	检测上限 IU/ml	光散射影响	
		OD 值	与空白对照比值
0(空白对照)	0	0.065	1.00
150	0.4	0.066	1.02
300	0.8	0.065	1.00
600	1.1	0.068	1.05
1000	1.3	0.071	1.09
2000	1.4	0.075	1.15
3000	1.4	0.077	1.18
5000	1.4	0.135	2.08

备注：

1、OD 值测定：在包被好的 96 孔板中，每孔加入 200 微升纯化水，用酶标仪在 405nm 测定 OD 值。

[0033] 2、检测上限一般不应低于 0.8 IU/ml。

[0034] 3、包被细胞后与空白对照 OD 值的比值超过 1.2，认为光散射严重。

[0035] 实施例 2 关于包被细胞的孔间分布情况，以及包被细胞经洗涤、振荡后脱落情况的研究。

[0036] 在长成致密单层的人胚肺成纤维细胞中接种 VZV 毒种。接种比例为：每 1000 个细胞接种 200 个噬斑形成单位(PFU)的 VZV 病毒。37℃、5% 二氧化碳条件下培养 60 小时，细胞病变 70%，使用 0.25% 胰酶将细胞消化成单个，并加入牛血清白蛋白(终浓度 5%)，细胞密度分别调整为 6×10^4 个 /ml、 1.2×10^5 个 /ml、 2×10^5 个 /ml。将上述不同浓度的细胞充分混匀、悬浮，分别加入 96 孔板的不同孔中(每个浓度设 12 孔重复)，每孔加细胞悬液 5 微升。水平震荡 96 孔板，使细胞悬液均匀分布在孔底。每孔再加入 5 微升 4% 的戊二醛溶液，水平震荡 96 孔板，混匀，室温反应 10 分钟后孔内溶液凝固。96 孔板浸入 5% 脱脂奶粉配制的封闭液中，保证所有孔中充满封闭液，室温封闭 2 小时。96 孔板使用洗涤液(R3)洗涤(洗板机)后自然风干。96 孔板每孔分别按照 300、600、1000 个细胞 / 孔包被后，在显微镜下进行每孔计数，然后按照常规的 ELISA 实验中常用的恒温振荡、洗涤操作，分别操作 6 次，再进行每孔计数。

[0037] 表 2 的数据结果表明：孔间细胞分布不超过 $\pm 10\%$ ；细胞脱落率不超过 10%。

包被后细胞数目	孔间分布	洗涤、震荡后细胞数目	脱落率
291	-4.67%~8.33%	284	2.41%
288		283	1.74%
309		301	2.59%
295		290	1.69%
304		299	1.64%
312		301	3.53%
288		285	1.04%
325		306	5.85%
311		301	3.22%
286		281	1.75%
295		291	1.36%
301		296	1.66%
600	-1.83%~1.67%	580	3.33%
614		587	4.46%
605		581	3.93%
609		581	4.59%
596		580	2.70%
604		582	3.64%
589		571	3.11%
610		580	4.90%
597		579	3.03%
604		586	2.97%
599		573	4.35%
596		566	5.03%
1076	-9.7%~9.4%	1023	4.92%
1070		987	7.73%
955		901	5.72%
1049		963	8.22%
989		924	6.62%
934		878	6.01%
998		921	7.70%
1094		1009	7.72%
1068		1005	5.88%
903		829	8.13%
947		902	4.82%
987		916	7.22%

[0038] 实施例3 试剂盒制备与样本检测结果分析

1. 96孔板制备

A、向长成致密单层的人胚肺成纤维细胞(MRC5, 75cm², 约 3×10^6 个细胞)中接种水痘-带状疱疹病毒(VZV, oka 株) 3×10^5 PFU, 37℃、5% 二氧化碳条件下培养3天, 镜检细胞病变达到70%, 使用0.25%胰酶将细胞消化、吹打分散成单个的细胞, 离心, 并用PBS洗涤细胞, 用20ml含5%牛血清白蛋白的PBS溶液重悬细胞, 用细胞计数板镜检计数为 1.6×10^5 个/ml。

[0039] B、准备40个96孔板, 使用12道移液器将上述混匀的细胞按照5微升/孔加入96孔板中。水平震荡96孔板使细胞悬液均匀分布在孔底。每孔再加入5微升4%的戊二醛溶液, 水平震荡96孔板, 混匀, 室温反应10分钟后孔内溶液凝固。

[0040] C、96孔板浸入5%脱脂奶粉配制的封闭液中, 保证所有孔中充满封闭液, 室温封闭2小时。96孔板使用洗涤液(R3)洗涤(洗板机)后自然风干。

[0041] 2. 其他各种试剂配置：

A. 试剂 R1 (样本稀释液): 20mmol/L 磷酸盐、叠氮钠 0.1%、牛血清白蛋白 1%。

[0042] B. 试剂 R2 (标准血清): 人抗 VZV 血清 (来自水痘愈后患者, 其效价经过 VZV IgG 国际标准品标定), 用 R1 稀释到 1IU/ml。

[0043] C. 试剂 R3 (洗涤液): 20mmol/L 磷酸盐、氯化钠 0.9%、吐温-20 0.1%、牛血清白蛋白 1%。

[0044] D. 试剂 R4 (酶标二抗): 20mmol/L 磷酸盐、牛血清白蛋白 1%、辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG。

[0045] E. 试剂 R5 (底物): 取含 2mg/ml 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺 (TMB) 的无水乙醇溶液 1.56ml, 50mmol/L 磷酸氢二钠 -25mmol/L 枸橼酸缓冲液 31.25ml, 0.75% 过氧化氢溶液 0.1ml, 混匀。

[0046] F. 试剂 R6 (终止液): 2mol/L 硫酸。

[0047] 3. 血浆样品 VZV 中和抗体效价测定

A、标准品稀释: 试剂 R2 用 R1 进行系列倍比稀释, 分别为 1IU/ml、0.5IU/ml、0.25IU/ml、0.125IU/ml、0.0625IU/ml。

[0048] B、加样: 抗凝血浆 15 份 (已知 VZV 中和效价), 以及步骤 A 中准备好的标准品 (5 个), 分别用 R1 进行 100 倍 (1:99) 稀释, 分别加入 96 孔板的 95 个孔中 (每份血浆做 6 孔重复测定), 每孔 50 微升; 剩余 1 孔加 50 微升 R1, 作为空白对照。从上述制备的 96 孔板中随机抽取 3 个孔板进行重复测定。

[0049] C、温育、洗涤: 将 96 孔板放入洗板机, 用 R3 洗涤 2 次, 甩干残余洗涤液。

[0050] D、加酶标二抗、温育、洗涤: 每孔加入 100 微升 R4, 37℃ 恒温 30min, 用 R3 洗涤 2 次, 甩干残余洗涤液。

[0051] E、加底物、终止、酶标仪测定: 每孔加入 100 微升 R5, 37℃ 恒温 10min, 每孔加入 100 微升 R6, 振荡 15 秒, 立即使用酶标仪在 405nm 读数。

[0052] F、结果计算: 所有样品的 OD 值扣减空白对照。根据标准样品的效价和 OD 值制作标准曲线, 得到线性回归方程, 将待测样品 OD 值带入回归方程即可计算出效价。

[0053] G、测定结果见表 3。

[0054] 表 3 检测结果对比

血浆 编号	1 号板测定结果 IU/ml	2 号板测定结果 IU/ml	3 号板测定结果 IU/ml	VZV 中和效价 IU/ml
1	0.061±0.01	0.058±0.008	0.065±0.009	0.05±0.042
1	0.032±0.006	0.038±0.006	0.031±0.005	0.05±0.046
3	0.055±0.01	0.056±0.004	0.059±0.004	0.05±0.052
4	0.12±0.02	0.13±0.01	0.15±0.01	0.1±0.061
5	0.082±0.015	0.088±0.011	0.089±0.009	0.1±0.072
6	0.13±0.02	0.14±0.01	0.13±0.01	0.1±0.059
7	0.23±0.03	0.25±0.02	0.24±0.015	0.2±0.087
8	0.21±0.03	0.22±0.018	0.21±0.016	0.2±0.102
9	0.17±0.025	0.18±0.012	0.19±0.016	0.2±0.119
10	0.42±0.031	0.42±0.021	0.42±0.026	0.4±0.154
11	0.34±0.028	0.33±0.024	0.34±0.023	0.4±0.172
12	0.46±0.029	0.46±0.032	0.45±0.033	0.4±0.159
13	0.65±0.036	0.64±0.039	0.65±0.042	0.8±0.301
14	0.98±0.041	0.96±0.049	0.99±0.045	0.8±0.392
15	0.79±0.039	0.8±0.041	0.82±0.044	0.8±0.329

将上述结果进行统计学分析,计算同一个 96 孔板内同一个样品测定结果的变异系数,三个 96 孔板间的变异系数,以及测定结果平均值与中和效价的相关性,具体见表 4。

[0055] 表 4 结果数据表

血浆 编号	1 号板内 CV	2 号板内 CV	3 号板内 CV	3 个 96 孔板间 CV	与中和效 价的相关 系数
1	16.39%	13.79%	13.85%	5.73%	0.9715
1	18.75%	15.79%	16.13%	11.25%	
3	18.18%	7.14%	6.78%	3.67%	
4	16.67%	7.69%	6.67%	11.46%	
5	18.29%	12.50%	10.11%	4.39%	
6	15.38%	7.14%	7.69%	4.33%	
7	13.04%	8.00%	6.25%	4.17%	
8	14.29%	8.18%	7.62%	2.71%	
9	14.71%	6.67%	8.42%	5.56%	
10	7.38%	5.00%	6.19%	0.00%	
11	8.24%	7.27%	6.76%	1.71%	
12	6.30%	6.57%	7.33%	1.26%	
13	5.54%	6.09%	6.46%	0.89%	
14	4.18%	5.10%	4.55%	1.56%	
15	4.94%	5.13%	5.37%	1.90%	

专利名称(译)	测定水痘-带状疱疹病毒中和抗体的试剂盒及生产方法		
公开(公告)号	CN104360055A	公开(公告)日	2015-02-18
申请号	CN201410621724.8	申请日	2014-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	山东泰邦生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东泰邦生物制品有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东泰邦生物制品有限公司		
[标]发明人	朱孟沼 马杰 巩艳艳 陈振 菅长永 马山		
发明人	朱孟沼 马杰 巩艳艳 陈振 菅长永 马山		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54313		
代理人(译)	宋玉霞		
其他公开文献	CN104360055B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及体外诊断试剂的技术领域，具体是一种能测定水痘-带状疱疹病毒中和抗体效价的试剂盒及其生产方法。该试剂盒采用感染VZV的细胞作为抗原，包被固定在96孔板的孔内，使用细胞表面携带的大量病毒糖蛋白（中和抗原）来捕获待测样品中的中和抗体，同时保持细胞完整，内部的其他病毒抗原并不与样品接触，从而能保证测定中和抗体的特异性。该试剂盒可以直接用于自动生化分析仪或酶标仪，快速测定VZV中和抗体效价。测定过程简单、快捷，测定样本通量高，并能实现定量测定。

血浆 编号	1号板测定结果 IU/ml	2号板测定结果 IU/ml	3号板测定结果 IU/ml	VZV中和效价 IU/ml
1	0.061±0.01	0.058±0.008	0.065±0.009	0.05±0.042
1	0.032±0.006	0.038±0.006	0.031±0.005	0.05±0.046
3	0.055±0.01	0.056±0.004	0.059±0.004	0.05±0.052
4	0.12±0.02	0.13±0.01	0.15±0.01	0.1±0.061
5	0.082±0.015	0.088±0.011	0.089±0.009	0.1±0.072
6	0.13±0.02	0.14±0.01	0.13±0.01	0.1±0.059
7	0.23±0.03	0.25±0.02	0.24±0.015	0.2±0.087
8	0.21±0.03	0.22±0.018	0.21±0.016	0.2±0.102
9	0.17±0.025	0.18±0.012	0.19±0.016	0.2±0.119
10	0.42±0.031	0.42±0.021	0.42±0.026	0.4±0.154
11	0.34±0.028	0.33±0.024	0.34±0.023	0.4±0.172
12	0.46±0.029	0.46±0.32	0.45±0.033	0.4±0.159
13	0.65±0.036	0.64±0.039	0.65±0.042	0.8±0.301
14	0.98±0.041	0.96±0.049	0.99±0.045	0.8±0.392
15	0.79±0.039	0.8±0.041	0.82±0.044	0.8±0.329