



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109633170 A

(43)申请公布日 2019.04.16

(21)申请号 201811630454.1

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2018.12.29

G01N 21/76(2006.01)

(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 孙冯博 王新明 刘功成 李晓霞
乔晓芳 郑业焕 渠海 付光宇
吴学炜

(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 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54)发明名称

一种EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,包括以VCA基因重组抗原片段做为包被抗原的磁微粒混悬液,以辣根过氧化物酶标记的抗人IgA单克隆抗体酶结合物,样本稀释液和化学发光底物液。本发明采用磁性微粒作为抗体的固相载体,利用化学发光免疫分析技术,在全自动化学发光分析仪上可实现单人份、随机、快速、自动化检测。由于本发明在技术原理上采用的是间接法,从30多种EB病毒靶抗原蛋白中选用与既往感染及新近感染最有价值的多个优势抗原片段,避免了市场上常规试剂盒位点的不全面导致的特异性和灵敏度受到影响的问题。本试剂盒适用于人血清或血浆样品中EB病毒衣壳抗原(VCA)IgA抗体的定性检测,辅助临床诊断鼻咽癌。

1. 一种EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,其特征在于:包括以VCA基因重组抗原片段做为包被抗原的磁微粒混悬液,以辣根过氧化物酶标记的抗人IgA单克隆抗体酶结合物,样本稀释液和化学发光底物液。

2. 根据权利要求1所述的EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述磁微粒的直径为0.2~4 μ m,所述VCA基因重组抗原片段通过化学试剂共价交联的方法偶联在所述磁微粒上,其工作浓度为10~250 μ g/ml。

3. 根据权利要求1或2所述的EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述VCA基因重组抗原片段为从Genbank获取VCA-P18、VCA-P23和VCA-gp125片段基因序列,以EBV标准株全基因组DNA为模板,PCR扩增其全基因片段;将酶切后的目的片段克隆入原核表达载体pET28a,构建重组载体pET28a-VCA-P18、pET28a-VCA-P23和pET28a-VCA-gp125,经酶切和测序鉴定正确后转化至表达菌E.coli BL21 (DE3) 中,以IPTG诱导蛋白表达,用SDS-PAGE鉴定蛋白表达形式,Western blot鉴定表达蛋白的免疫反应性,并用Ni²⁺-NTA亲和层析柱纯化,SDS-PAGE分析纯化蛋白纯度后的重组蛋白。

4. 根据权利要求1所述的EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述抗人IgA单克隆抗体为鼠抗人IgA单克隆抗体或羊抗人IgA多克隆抗体或兔抗人IgA多克隆抗体。

5. 根据权利要求1所述的EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述样本稀释液为PBS缓冲液稀释的牛血清白蛋白。

6. 根据权利要求1所述的EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述化学发光底物液包括底物A液和底物B液,其中底物A液为异鲁米诺衍生物,底物B液为过氧化氢。

7. 根据权利要求1所述的EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括阴性对照和阳性对照,其中阳性对照参与临界值的计算。

一种EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术,尤其是涉及一种EB病毒壳抗原(VCA) IgA抗体检测试剂盒。

背景技术

[0002] EB病毒是疱疹病毒科病毒 γ 亚科中唯一能够引起人类感染的淋巴滤泡病毒,具有嗜B淋巴细胞的特性,能够在B淋巴细胞中建立起隐性感染,刺激细胞的增生与转化。可能与包括传染性单核细胞增多症、伯基特淋巴瘤、Burkitts肉瘤、霍奇金病和鼻咽癌等在内的多种疾病有关。其中,80%的鼻咽癌病例发生在中国,在我国南方数省鼻咽癌的发病率和死亡率均占恶性肿瘤的第一位。EB病毒感染细胞后的裂解复制期产生壳抗原(VCA) IgA抗体,其在鼻咽癌中的阳性率达93%,具有极高的特异性。随病期发展,壳抗原(VCA) IgA抗体滴度水平逐渐升高。

[0003] EB病毒检测方法有多种。首先是病毒分离,由于EB病毒的传播方式以口腔传播为主,所以咽漱液中病毒的分离率最高,尤其是与EB病毒相关疾病(例如IM)患儿的咽漱液中,排毒率可达80%以上,甚至在临床症状消失后的数年内还可以间歇性地排毒。但由于该方法耗时并且需要特殊的组织培养条件,故不适合作为常规临床检测使用。

[0004] 免疫酶法是我国科学家曾毅院士90年代建立的,其初衷是为替代成本昂贵的“金标准”免疫荧光抗体法,效果显著,在过去几十年里对鼻咽癌的筛查和防治起到了很大的作用,是目前很多医疗机构依然在使用的常规方法;但是由于其操作繁琐、技术要求高、结果主观性强等天然的缺点,需专门的技术人员操作,难以在基层推广,已面临淘汰的局面。

[0005] 目前已上市的EB病毒壳抗原(VCA) IgA抗体检测方法有免疫酶法、酶联免疫法和胶体金层析法等。免疫酶法需要固相化细胞作为抗原,批间差异大,显微镜观察结果,判断的主观性大且不同机构结果报告差异大,难以进行质量控制和平行比对,另外需专门的技术人员操作,容易存在误差。酶联免疫法是将抗原或抗体固定在聚苯乙烯微孔板上,以辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶作为标记物,通过显色吸光度值判断结果,实验的反应时间长,自动化程度低。胶体金层析法是将抗原或抗体固定在硝酸纤维素膜上,以胶体金为标记物,通过液体毛细作用在检测线显色,结果判读基本需要肉眼观察,虽然快速但准确性低。

[0006] 化学发光法具有灵敏度高,线性范围宽,特异性高,操作快速简便,易于自动化,不存在环境污染等优点。化学发光技术依据其反应载体不同分为两种:一种基于微孔板反应的半自动化学发光技术,另一种基于磁微粒反应的全自动化学发光技术,更趋均相、更加快速、更易于自动化。目前国产的大部分产品为前者。国际主流的大型诊断公司,大多数采取基于磁微粒反应的化学发光技术。现在,国外多家公司均已研发了磁微粒化学发光检测系统和配套试剂。磁微粒化学发光检测技术必将成为检测方法的主要发展方向之一,成为EB血清学检测的主流技术,广泛用于鼻咽癌等疾病的筛查与诊断。

[0007] 磁微粒化学发光技术应用用于EB检测方面,具有高灵敏度、快速、准确、重复性好、线性范围宽、安全无毒、无放射性污染等优点,易于实现自动化检测。同时可以进一步缩短检

测时间,适宜于急诊检测。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种新的EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,该试剂盒利用化学发光免疫技术,但与目前产品相比更具技术优势。

[0009] 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病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒,包括以VCA基因重组抗原片段做为包被抗原的磁微粒混悬液,以辣根过氧化物酶标记的抗人IgA单克隆抗体酶结合物,样本稀释液和化学发光底物液。

[0010] 其中磁微粒的直径为0.2~4 μ m,所述VCA基因重组抗原片段通过化学试剂共价交联的方法偶联在所述磁微粒上,其工作浓度为10~250 μ g/ml。

[0011] 所述VCA基因重组抗原片段为从Genbank获取VCA-P18、VCA-P23和VCA-gp125片段基因序列,以EBV标准株全基因组DNA为模板,PCR扩增其全基因片段;将酶切后的目的片段克隆入原核表达载体pET28a,构建重组载体pET28a-VCA-P18、pET28a-VCA-P23和pET28a-VCA-gp125,经酶切和测序鉴定正确后转化至表达菌E.coli BL21 (DE3) 中,以IPTG诱导蛋白表达,用SDS-PAGE鉴定蛋白表达形式,Western blot鉴定表达蛋白的免疫反应性,并用Ni²⁺-NTA亲和层析柱纯化,SDS-PAGE分析纯化蛋白纯度后的重组蛋白。

[0012] 检测时,该VCA基因重组抗原片段可针对性结合人血清中特异性抗体VCA-P18、VCA-P23和VCA-gp125蛋白,并形成抗原抗体免疫复合物。

[0013] 本发明试剂盒的抗人IgA单克隆抗体可为鼠抗人IgA单克隆抗体或羊抗人IgA多克隆抗体或兔抗人IgA多克隆抗体。

[0014] 本发明试剂盒的样本稀释液为PBS缓冲液稀释的牛血清白蛋白。

[0015] 本发明试剂盒的化学发光底物液包括底物A液和底物B液,其中底物A液为异鲁米诺衍生物,底物B液为过氧化氢。

[0016] 本发明试剂盒还包括阴性对照和阳性对照,其中阳性对照参与临界值的计算。

[0017] 本发明的优点在于采用磁性微粒作为抗体的固相载体,利用化学发光免疫分析技术,在全自动化学发光分析仪上可实现单人份、随机、快速、自动化检测。由于本发明在技术原理上采用的是间接法,从30多种EB病毒靶抗原蛋白中选用与既往感染及新近感染最有价值的多个优势抗原片段,避免了市场上常规试剂盒位点的不全面导致的特异性和灵敏度受到影响的问题。

[0018] 本试剂盒适用于人血清或血浆样品中EB病毒衣壳抗原(VCA) IgA抗体的定性检测,辅助临床诊断鼻咽癌。

具体实施方式

[0019] 下面通过具体实施例对本申请做更加详细的说明,以便于本领域技术人员的理解。如无特殊说明,本发明中所用的检测仪器和检测试剂均为市售产品,采用的试验方法也为本领域常规方法。

[0020] 实施例1 制备EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒

1、制备VCA抗原偶联磁微粒混悬液

1.1 磁性微粒洗涤

取200 μ l表面含羧基的磁微粒放在玻璃瓶中,用磁铁将磁微粒吸附在玻璃瓶底部,除去上清;加入2ml 0.02M PBS (pH 8.0),重复以上操作3次。

[0021] 1.2 磁性微粒活化

将EDC和NHS分别溶解在0.1M MES (pH 5.0)缓冲液中,浓度呈10~70mg/ml,然后各取1ml加入到磁微粒中;室温轻轻震荡反应30~60分钟;用磁铁将磁微粒吸附在底部,除去上清;再加入2ml 0.1M MES (pH 5.0)缓冲液,重悬磁微粒;重复以上操作2次。

[0022] 2、制备抗人IgA单克隆抗体酶结合物

辣根过氧化物酶 (HRP) 用常规改良过碘酸钠法活化,加入抗人IgA单克隆抗体,2~8℃反应过夜,加硼氢化钠还原酶结合物,透析去除未反应的试剂,加50%体积甘油,置-20℃保存;使用时按照1:1000~1:5000的比例稀释在含20%小牛血清和0.1% P300防腐剂的缓冲液中,2~8℃保存。

[0023] 3、制备样本稀释液

由于酶促化学发光技术产生的信号值较高,某些阴性样本存在发光值偏高,甚至接近临界值的情况。因此我们需要对这些样本进行稀释以降低其发光值,提高试剂的特异性。样品稀释液的选择标准:缓冲系统有利于免疫反应的进行,使抗原抗体的结合最大化。基于以上原则,考核了不同缓冲液基质对样品稀释液的影响,确定了以下述组分配比配制样本稀释液。

[0024] 配制1000ml样本稀释液:十二水磷酸氢二钠5.80g、二水磷酸二氢钠0.59g、氯化钠9.00g、BSA 10g、吐温-20 1ml,用去离子水定容至1000ml,加入0.02%叠氮钠防腐剂。

[0025] 4、制备阴性对照和阳性对照

阴性对照为基质液,配制1000ml阴性对照:十二水磷酸氢二钠5.80g、二水磷酸二氢钠0.59g、氯化钠9.00g、BSA 10g,用去离子水定容至1000ml,加入0.02%叠氮钠防腐剂。

[0026] 阳性对照是在基质液中加入1/100~1/1000的EB病毒VCA抗体阳性物质制备而成。

[0027] 5、制备化学发光底物液:底物A液采用异鲁米诺衍生物,底物B液采用过氧化氢。

[0028] 实施例2 本发明试剂盒的检测方法

采用实施例1制备的试剂盒,与郑州安图生物工程股份有限公司生产的全自动化学发光仪AutoLumo A2000或AutoLumo A2000 Plus配合使用,用以检测呼吸道合胞病毒IgM抗体:

在反应容器(以下简称“孔”)中依次加入阳性对照3孔(用于定Cutoff值),阴性对照2孔,100 μ L/孔;其余孔中每孔分别加入10 μ L样本和100 μ L样品稀释液;

每孔分别加入磁微粒混悬液20 μ L;混匀后,37℃温育15分钟;然后用清洗液洗涤5次;

每孔分别再加入酶结合物50 μ L、抗原溶液50 μ L;混匀后37℃温育17分钟;清洗液洗涤5次;

最后每孔再加入底物A液和底物B液各50 μ L;混匀后1~5分钟检测发光强度;

结果计算:Cutoff值=阳性对照孔平均发光值 \times 0.4;

阳性判断值:S/CO=待测样本发光值/ Cutoff值;

S/CO \geq 1.00时,结果判为阳性;S/CO<1.00时,结果判为阴性。

[0029] 实施例3 本发明试剂盒的性能评价

1、重复性

重复性是指对同一份样品重复测定,每次测定结果和均值的接近程度,以变异系数CV表示。

[0030] 选择不同浓度的3份样本,每天检测4个重复,连续检测5天,变异系数 $CV < 8\%$,结果见表1:

表1

	检测次数	样本 1	样本 2	样本 3
第一天	1	9.67	4.16	1.45
	2	8.90	4.38	1.38
	3	9.05	4.84	1.41
	4	9.68	4.54	1.51
第二天	5	9.34	4.53	1.62
	6	9.69	4.64	1.41
	7	9.19	4.41	1.38
	8	9.52	4.32	1.31
第三天	9	9.93	4.41	1.23
	10	8.59	4.74	1.48
	11	9.53	4.84	1.55
	12	9.27	4.65	1.42
第四天	13	9.35	4.46	1.34
	14	9.03	4.32	1.56
	15	9.83	4.23	1.41
	16	9.16	4.38	1.37
第五天	17	9.82	4.74	1.53
	18	8.91	4.44	1.42
	19	9.66	4.56	1.31
	20	9.05	4.51	1.40
	平均值	9.36	4.51	1.42
	标准差	0.37	0.19	0.10
	变异系数	3.95%	4.25%	6.72%

从表1中结果可以看出:样本1的变异系数为3.95%,样本2的变异系数为4.25%,样本3的变异系数为 6.72%,均小于行业要求的10%,证明其重复性良好。

2、特异性

检测乙肝、丙肝、梅毒、HIV、EB-EA、EB-NA1、HSV-1、HSV-2、CMV、VCA-IgG、VCA-IgM及HAMA阳性样本,每种病原体各10份,无交叉反应性。

[0031] 检测类风湿因子RF阳性和抗核抗体(ANA)阳性样本各12份,无干扰,结果见表2:

表2

类风湿因子 RF			ANA		
样本编号	RF 抗体含量 (IU/mL)	本试剂的检测结果 (S/CO)	样本编号	ANA 抗体含量 (IU/mL)	本试剂的检测结果 (S/CO)
1	39.5	0.19	1	84.36	0.13
2	110.9	0.15	2	103.748	0.25
3	25.9	0.81	3	60.054	0.15
4	120.5	0.21	4	69.728	0.35
5	120.5	0.35	5	99.074	0.16
6	25.5	0.31	6	24.07	0.07
7	36.5	0.29	7	17.07	0.09
8	30.3	0.13	8	21.74	0.26
9	23.7	0.11	9	12.38	0.2
10	24.2	0.62	10	19.43	0.38
11	58.6	0.07	11	15.47	0.26
12	24	0.12	12	21.2	0.16

从表2结果可以看出:所检测的不同病原体阳性不与本试剂盒产生交叉反应,类风湿因子RF和自身抗体ANA不对本试剂盒产生干扰。

[0032] 3、样本的采集和处理

临床检验的样本类型一般为血清或者血浆。血浆样本采用的抗凝剂有柠檬酸钠,EDTA-2Na或者肝素钠等。不同抗凝剂及普通管(不含添加剂)的采血管均需要考核其对检测结果是否存在干扰。对比不同采血管的阳性样本和阴性样本,检测结果是否存在干扰。检测结果见表3:

表3 不同抗凝剂对比

抗凝剂	1 阳性	2 阳性	3 阳性	4 阳性	5 阳性	6 阳性	7 阴性	8 阴性	9 阴性	10 阴性
普通管	13678	77676	44847	33841	14583	42460	11	11	18	12
柠檬酸钠	13864	72331	47984	32265	14871	37180	9	7	19	13
EDTA	12557	73596	49732	31884	15280	43648	10	12	10	17
肝素钠	14180	71721	50320	30233	13669	36548	10	9	19	11
发光值										
柠檬酸钠	1.4%	-6.9%	7.0%	-4.7%	2.0%	-12.4%	-18.2%	-36.4%	5.6%	8.3%
EDTA	-8.2%	-5.3%	10.9%	-5.8%	4.8%	2.8%	-9.1%	9.1%	-44.4%	-41.7%
肝素钠	3.7%	-7.7%	12.2%	-10.7%	-6.3%	-13.9%	-9.1%	-18.2%	5.6%	-8.3%
差别%										

结果显示,不同抗凝剂样本检测信号值差异较小,说明抗凝剂对检测结果无明显干扰。因此,本试剂盒适用的样本类型可以是血清或血浆,抗凝剂可以使用EDTA-2Na或K、枸橼酸钠或肝素。

[0033] 4、样本中内源性物质的干扰

样本中的内源性干扰物质可能会干扰检测结果,需要考核本试剂盒对内源性干扰物质的耐受浓度。在6份阳性样本(1份弱阳性、3份中强阳性、2份强阳性)和6份阴性样本中分别添加以下浓度的纯品:1.0 g/L血红蛋白、0.4 g/L胆红素和30g/L甘油三酯进行检测。

[0034] 对于阳性样本,计算样本和对照品的平均发光值,计算每个样本发光值的干扰百分比:干扰百分比=(样本平均发光值-对照品平均发光值)/对照品平均发光值×100%,如果阳性样本干扰在±15%以内,阴性样本本底无明显变化,不影响结果判定,认为本试剂盒对

证的阳性65例,本试剂盒全部检出为阳性,阳性符合率为100%;免疫酶法(IE)检测为阴性的样本135例,本试剂盒检测有1例为阳性,阴性符合率为97.78%,总符合率为98.5%,符合预期目标,结果见表6:

表6

		本发明试剂盒		合计
		+	-	
免疫酶法	+	65	0	65
(IE)	-	3	132	135
合计		68	132	200

从表6结果可以看出:本试剂盒与免疫酶法(IE)具有较高的临床符合率,证明本试剂盒具有很高的灵敏度和特异性。

[0042] 以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,做出若干等同替代或明显变型,而且性能或用途相同,都应当视为属于本发明的保护范围。

专利名称(译)	一种EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒		
公开(公告)号	CN109633170A	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201811630454.1	申请日	2018-12-29
[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	孙冯博 王新明 刘功成 李晓霞 乔晓芳 郑业焕 渠海 付光宇 吴学炜		
发明人	孙冯博 王新明 刘功成 李晓霞 乔晓芳 郑业焕 渠海 付光宇 吴学炜		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/536 G01N33/543 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/536 G01N33/54326 G01N33/577 G01N33/6893		
代理人(译)	王霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种EB病毒壳抗原IgA抗体检测试剂盒，包括以VCA基因重组抗原片段做为包被抗原的磁微粒混悬液，以辣根过氧化物酶标记的抗人IgA单克隆抗体酶结合物，样本稀释液和化学发光底物液。本发明采用磁性微粒作为抗体的固相载体，利用化学发光免疫分析技术，在全自动化学发光分析仪上可实现单人份、随机、快速、自动化检测。由于本发明在技术原理上采用的是间接法，从30多种EB病毒靶抗原蛋白中选用与既往感染及新近感染最有价值的多个优势抗原片段，避免了市场上常规试剂盒位点的不全面导致的特异性和灵敏度受到影响的问题。本试剂盒适用于人血清或血浆样品中EB病毒衣壳抗原（VCA）IgA抗体的定性检测，辅助临床诊断鼻咽癌。

Cut-off 值	特异性 (%)	灵敏度 (%)	假阳性率 (%)
	真阴性率	真阳性率	FPR
100	96.94	100	3.04
400	97.87	100	2.13
800	98.37	100	1.53
1200	99.04	99.38	0.96
2000	99.52	96.31	0.48
5000	99.81	92.00	0.19