

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/576

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01105293.7

[43] 公开日 2002 年 9 月 11 日

[11] 公开号 CN 1368638A

[22] 申请日 2001.2.1 [21] 申请号 01105293.7

[71] 申请人 上海新新医学生物工程公司

地址 200433 上海市黑山路 181 号

共同申请人 杜凤鸣

[72] 发明人 杜凤鸣

[74] 专利代理机构 上海新天专利代理有限公司

代理人 王 巍

权利要求书 4 页 说明书 13 页 附图页数 0 页

[54] 发明名称 乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒及制备方法

[57] 摘要

本发明公开了一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒及制备方法。本发明的试剂在乙肝血清中检测前 S<sub>1</sub> 抗体的阳性率较高, 检出的前 S<sub>1</sub> 抗体与乙肝病情的恢复一致, 对乙肝疾病能否及时康复有早期预示作用。试剂的特异性高, 在乙肝检测中有较高应用价值。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

1、一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒，其特征在于该试剂盒是由预包被反应条，酶结合物工作液、阳性对照物、阴性对照物、样品稀释液、浓洗涤液、显色剂 A、显色剂 B 和终止液组成的。

2、一如权利要求1所述的一种乙肝病毒前S<sub>1</sub>抗体酶免测定试剂盒的制备，其特征在于该方法是：

(一) 基因工程前S1抗原的制备

(1) 前S1 DNA序列

1            10            20            30            40            50            60  
MGGWSSKPRKEMGMTLSYPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPVKDDWPAANQVGVGA  
70            80            90            100            110  
FGPRLTPPNGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQA

(2) 材料: HBV由军科院五年四室提供, PCR Kit、限制性内切酶,T4 DNA连接酶购自上海华美公司, GST,还原型4B购自Sigma公司, 上海基康公司合成上游引物 5'-CGGATC-CATGGGAGGTTGGTCTTCCA, 下游引物 5'-GC-GATTTCCTAGTGGAATGTTGTGGAGT,

(3) 方法: 反应在Progene公司PCR合成仪上进行, 反应条件为94℃ 30s,60C 30s,72℃ 30s,35个循环, PCR产物由基康公司测序,

(4) 表达和纯化: 将PCR产物用BamH I和EcoR I酶切,在1% 琼脂糖凝胶上电泳回收387 bp的片段,与相同酶切的载体pGEX-4T-1连接,转化大肠杆菌HB101株, 诱导用IPTG, 终浓度1mmol/L,SDS-PAGE分析结果,按Sepharose 4B说明书纯化表达融合蛋白产物,采用间接ELISA法检测前S1抗体,

(二) SPA-HRP的制备

(1) 称5mg辣根过氧化物酶(HRP)加0.5ml蒸馏水,再加0.5ml 60mM 过碘酸钠氧化15' 4℃中,

(2) 加0.16M乙二醇0.5ml中止氧化4℃ 30'

(3) 加10mg/ml纯SPA0.5ml,装袋对碳酸钠缓冲液过夜,

(4) 取出袋内液体,加5mg/ml硼氢化钾0.2ml,4℃ 3h再装透析袋对PH7.2 0.01M PBS透析24h换液4-5次,

(5) 取出SPA-HRP作活性和效价测定

(三) 阴性对照血清配

(1) 用本试剂盒检测正常人血清30份,混合A450<0.1的血清,

(2) 上述混合血清加等量小牛血清后再检测一次,确定A450<0.1,

(3) 混合血清中加2/万叠氮钠,过滤分装-20℃中保存,

(四) 阳性对照血清配制

(1) 取兔抗前S1抗血清作ELISA前S1抗体效价测定;取A450>2.0 的滴定效价的2倍浓度为阳性对照血清,

(2) 取该浓度抗血清加等量小牛血清再做ELISA测定A450>1.5

(3) 上述阳性血清中加2/万叠氮钠,过滤分装,-20℃中保存,

(五) 底物缓冲液配制

1、甲液

(1) 各称磷酸氢二钠18.4克,柠檬酸5克,PM50mg,放入容量瓶中加双蒸水至1000ml,搅拌溶解后再加30%双氧水400ul,

(2) 过滤除菌后分装小瓶

2、乙液

(1) 称EDTA 150mg加入1000ml双蒸水中,加热溶解,

(2) 上液冷却后加柠檬酸 1.05 克,再加用二甲亚砷溶解的TMB250mg,

(3) 分装入黑色小瓶中,

(六) 本发明乙肝病毒preS1抗体酶联免疫测定方法的建立,

(1) 用20mM Tris-Hcl液将纯前S1抗原稀释为5ug/ml浓度,各反应孔中加0.1ml,置4℃中24h,弃去上清液,拍干,

(2) 在试管中将待检血清用蒸馏水(或生理盐水)作1:25稀释,

(3) 各孔中滴加1滴样品稀释液,然后分别加1:25稀释的待检血清50ul,同时做阳性对照孔和阴性对照孔,

(4) 置37℃温箱中反应25分钟后,甩去孔内液体先在草纸上拍2-3下,然后用洗涤液洗5次,每次条孔加满洗涤液后停留30秒种,每次甩去孔中液体后都要在草纸上拍干,以便彻底洗涤,

(5) 各孔加2ug/mlSPA-HRP结合物50ul,37℃反应25分钟,

(6) 同上彻底洗涤拍干,

(7) 各孔滴加底物缓冲液甲、乙各1滴,置37℃中反应5分钟,再每孔滴加终止液1滴,测A450值,

(8) 结果判定

阴性对照A值 $\times 2.5$ =临界值,凡待检标本孔A值>临界值即为阳性,阴性对照小于0.05时按0.05计算,

(七) 灵敏度,特异性和精密度试验,

1、灵敏度测定

(1) 阳性血清浓度的定值

在检测前S1抗原实验操作中,能中和1ng/ml前S1抗原最高稀释度血清的抗体定为1u/ml,实际操作时将前S1抗原配成20ng/ml浓度,

(2) 灵敏度实验

将上述实验中滴定为1280u/ml, 160u/ml和40u/ml的3份阳性血清用样品稀释液作不同浓度稀释后,按实验操作方法作灵敏度测定,结果如下:

血清	血清抗体效价(u/ml)							
	1280	640	320	160	80	40	20	10
1号	>2*	1.65	1.46	0.98	0.74	0.40	0.24	0.17
2号			1.15	0.70	0.46	0.27	0.15	0.06
3号					0.45	0.27	0.10	

#### \*A450

测定阴性血清6份,A450分别为0.14,0.06,0.11,0.07,0.07,0.08,阴性平均A450=0.088,阳性临界值=0.088×2.5=0.22,则本检测方法对3份阳性血清的检测灵敏度分别为20u/ml,40u/ml和20u/ml平均为26.7u/ml,

#### 2、特异性测定

对用上海长征医学科学有限公司生产的乙肝二对半试剂盒检测五项指标全部阴性的血清共30份,按本实验方法前S1抗体测定,结果如下:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.06	0.05	0.06	0.05	0.08	0.07	0.10	0.05	0.04	0.11	0.09	0.07
2	0.10	0.12	0.10	0.07	0.18	0.11	0.13	0.07	0.06	0.10	0.12	0.14
3	0.12	0.10	0.13	0.09	0.08	0.07						

同时用6份小牛血清按实验操作方法测定的A值分别为 0.05, 0.05,0.08,0.07,0.06,0.09,平均值为0.067,临界值=0.067×2.5=0.168,则30份血清中有1份血清为可疑阳性,特异性=29/30=96.7%,

#### 3、精密度测定

取实验吸光度分别为高中低A值的3份阳性血清做精密度试验,批内试验为每份血清同时做12个复孔,批间试验为每份血清间隔2-3天实验1次,共测定6次,结果如下:

##### 批内试验:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	S	CV(%)
1	1.42	1.37	1.40	1.35	1.37	1.45	1.32	1.40	1.32	1.48	1.30	1.27	1.37	0.0625	4.6
2	0.74	0.86	0.70	0.81	0.83	0.80	0.72	0.82	0.70	0.85	0.82	0.84	0.79	0.059	7.5
3	0.26	0.25	0.31	0.27	0.24	0.32	0.25	0.26	0.25	0.25	0.28	0.29	0.27	0.0257	9.5

平均批内CV=7.2%

##### 批间试验

	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	S	CV(%)
1	1.45	1.30	1.41	1.38	1.28	1.29	1.35	0.071	5.3
2	0.72	0.86	0.70	0.75	0.84	0.77	0.773	0.0644	8.3
3	0.26	0.21	0.31	0.25	0.28	0.26	0.262	0.033	12.7

平均批间 CV=8.77%。

3、根据权利要求 1 所述的一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒,

其特征在于其中所述的包被反应条为—48孔。

4、根据权利要求1所述的一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒，其特征在于其中所述的阳性对照物为阳性对照血清、阴性对照物为阴性对照血清。

5、根据权利要求1所述的一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒，其特征在于其所述的样品稀释液为 PBST。

6、根据权利要求1所述的一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒，其特征在于其中所述的洗涤液为 20 倍浓缩洗涤液。

7、根据权利要求1所述的一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒，其特征在于其中所述的显色剂 A 为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、显色剂 B 为 TMB。

乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒及制备方法

本发明涉及生物技术试剂,具体涉及一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒及制备方法。

乙型肝炎病毒(HBV)的DNA序列分析表明HBV基因的S区由S、前S<sub>1</sub>、前S<sub>2</sub>所组成,其编码的蛋白有主要蛋白(HBsAg),中分子蛋白(HBsAg加前S<sub>2</sub>)和大分子蛋白(HBsAg,前S<sub>2</sub>和前S<sub>1</sub>),因前S<sub>1</sub>蛋白存在于大分子蛋白中,故感染血液中的前S<sub>1</sub>蛋白全部存在于HBsAg阳性血清中,前S<sub>1</sub>蛋白由108个或119个氨基酸组成,其长度因亚型而异,ayw亚型为108aa,adw亚型有119个aa,前S<sub>1</sub>蛋白位于病毒颗粒的表面,因而它具有高度的免疫原性。Milich以大分子蛋白免疫小鼠,然后做前S<sub>1</sub>各段合成肽的T细胞增殖试验,实验显示,前S<sub>1</sub>肽链的P1-21,12-32和94-117三段多肽可以引起的T细胞明显增殖,说明该三段氨基酸序列具有免疫原性,是免疫决定簇区,而P32-53及P74-89肽段不能在体外使T细胞增殖,提示该二段序列无免疫原性。对P1-21及12-32肽段的进一步研究,在用P12-32肽段免疫小鼠后,再用1-21和12-32可以引起相同的T细胞增殖,提示这二肽段的共同序列即P12-21是重要的抗原决定簇区,起了主要的激活作用。用更短肽链的实验结果又显示,P12-19的免疫活性只及P12-21的1.6%,P14-21的活性只及P12-21的0.4%,也即去掉P12-21氨基酸端或羧基端的氨基酸,就极度影响了P12-21的免疫原性,证实了引起T细胞对免疫原性识别的最小氨基酸数为10肽。在P12-21肽中,分别替代其中的第14,18和19位,免疫原性分别只相当于肽链的66.6%,0.7%和1.6%,说明P12-21的10肽中,第18和19位氨基酸对免疫原性最为重要。这对合成前S<sub>1</sub>多肽抗原有较高参考价值。而Alberti用P21-32,32-47及94-117三段前S<sub>1</sub>多肽均能检测到急性乙肝患者血清中的相应抗体,说明P32-53并非没有免疫原性,并且从前S<sub>1</sub>抗体的动力学态势分析,抗P32-47的前S<sub>1</sub>抗体具有更为重要的作用。多数急性乙肝患者早期先出现P32-47抗体,然后出现P21-32和P94-117抗体,有的患者只出现P32-47抗体,而另二种抗体始终阴性。在恢复顺利的急性乙肝中,P94-117抗体均与P32-47抗体同时存在,没有单独P94-117抗体阳性的情况,而在慢性乙肝中,往往就只有P94-117抗体而无另二种抗体,由此可见,P32-47及P21-32抗体多数出现于预后较好的急性乙肝中,而单独P94-117抗体阳性一般为慢性肝炎。

黑猩猩的感染实验证明,血清前S<sub>1</sub>抗原蛋白最早可在感染后的第5周从电泳带上检测到,至第8周血清中出现抗前S<sub>1</sub>抗体,18周时前S<sub>1</sub>抗原消失,在直至36周的整个观察期间,前S<sub>1</sub>抗体始终阳性,而抗HBs直至33周才出现,因为乙肝的潜伏期为6周-6个月,所以大多数急性乙肝发

病时,抗前S1抗体就可呈现阳性结果,它是乙肝早期诊断的可靠指标。

前S1抗体一般出现于急性自限性乙肝中,而慢性化发展的急性乙肝及HBsAg长期携带者,该抗体的检出率都很低。Theilmann报道入院时血清中前S1抗体阳性的4例急性乙肝均顺利康复,而6例前S1抗体阴性的未能康复而转为慢性,10例HBsAg携带者该抗体全部阴性。说明血清中出现前S1抗体是病情预后良好的早期信号。Budkowska也指出急性乙肝顺利康复的患者均有前S1抗体,而急性乙肝慢性化以及前S1抗原持续阳性的慢性肝炎中都检测不到前S1抗体。前S1抗体促进疾病康复的机理可能是前S1抗体发挥了PHSA的竞争抑制作用,抗体封闭了前S1抗原和肝细胞上的PHSA受体,使PHSA不能发挥“桥连”作用,从而阻断了HBV进入肝细胞的途径。另外,前S1抗体特异性地与HBV上前S1抗原结合后,通过其它免疫途径发挥了清除病毒的作用,因此,前S1抗体是体内的中和性抗体。近十多年来,众多国外研究报告显示,乙肝病毒的前S1抗体是中和性抗体,具有阻止病毒复制和清除病毒的作用,它是乙肝疾病呈现恢复趋向的最早期信号,在了解病情和判断预后方面较二对半项目更为直接和及时。因此,它是乙肝疾病的早期恢复指标,抗前S1抗体几乎与HBsAg及抗HBc同时出现于血清中,所以它又是乙肝感染的早期诊断指标。

据 Alberti A,Caralietto D, Chemello L.et al: Fine specificity of human antibody response to the preS1 domain of hepatitis B Virus.Hepatology 1990;12(2):199-203. 和 TheilmannL,Klinkert MQ,Gmelin K,et al:Detection of antibodies against pre-S1 proteins in sera of patients with hepatitis B virus(HBV)infection,J hepato 1987;

4:22-28等报道,急性乙肝患者入院时,多数患者能同时检测到前S1抗原、前S1抗体、HBsAg、HBV-DNA及抗HBc等指标的阳性结果,虽然从动物实验研究中,了解到在感染的潜伏期中间,前S1抗原及HBsAg等指标要比前S1抗体提早2-4周出现于血液中,但这并不影响它作为临床早期诊断指标的作用。

乙肝二对半指标中,只有抗HBs是保护性抗体,它在血液中的阳转表示病毒的清除,疾病的康复,但抗HBs一般要在HBsAg转阴后才出现,它出现的时间较晚,对一般急性乙肝患者,抗HBs的阳性出现于发病后的4-5个月,因此它就根本无早期预后作用。而抗前S1抗体多数在发病后数日的血清中就呈阳性结果,它可与抗HBc,HBsAg,HBeAg等早期诊断指标同时存在于血清中。抗HBc虽也在HBV后较早出现,但它只是一项感染性指标,抗HBc并不是中和抗体,对清除病毒和病情预后并无多大作用。而与抗HBc同时早期出现的抗前S1抗体却在这方面有明显的指示作用,对该抗体多方面的研究都显示了抗前S1抗体有阻止乙肝病毒进入肝细胞繁殖及清除病毒的作用,它在血清中的阳转预示HBsAg及前S1抗原等感染因子均可顺利转阴,疾病可以较早康复,它

的早期预后作用在乙肝所有指标中是独一无二的,因此它在乙肝的实验室诊断中有很大的应用价值。

本发明的目的在于研制一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒。

本发明提供了一种乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒,该试剂盒是由预包被反应条、酶结合物工作液、阳性对照物、阴性对照物、样品稀释液、浓洗涤液、显色剂 A、显色剂 B 和终止液组成的。

本发明的试剂盒在第二军医大学第一附属医院临床使用结果如下:

受上海新新医学生物工程公司委托对其生产的乙肝抗前 S<sub>1</sub> 酶联试剂盒进行了临床使用考核,病例血清样品来自于本院传染科和检验科,实验操作严格按说明书进行,临床使用结果和评价如下:

1、乙型肝炎不同阶段中乙肝前 S<sub>1</sub> 抗体阳性率

表 1 乙肝前 S<sub>1</sub> 抗体在乙型肝炎中的阳性率

血清标志	血清标本	抗前 S <sub>1</sub> 阳性	抗前 S <sub>1</sub> 阴性	阳性率(%)
HbsAg(+) 抗 HBc(+) 抗 HBs(-)	254	107	147	42.1
HbsAg(-) 抗 HBc(+) 抗 HBs(-)	127	35	92	27.6
HbsAg(-) 抗 HBc(+) 抗 HBs(+)	175	105	70	60
合计	556	247	309	44.4

表 1 中抗前 S<sub>1</sub> 在乙肝血清中的总阳性率为 44.4%,该抗体可出现于 HbsAg 阳性或阴性的任何期乙肝血清中,尤其值得注意的是在 HbsAg 已转阴,而抗 HbsAg 尚未阳转的血清中,前 S<sub>1</sub> 抗体的阳性率也达 27.6%,这显示了该抗体比抗 HBs 出现早,也提示该抗体的阳转预示了疾病向康复期发展,抗 HBs(+)血清中该抗体的阳性率为 60%,表明在恢复期中,前 S<sub>1</sub> 抗体在血清中的存在时间比抗 HBs 要短。

2、抗前 S<sub>1</sub> 与抗 HBs 阳转的时间关系

对 56 例乙肝病程中先后出现前 S<sub>1</sub> 抗体阳性的病例分析了该抗体与抗 HBs 抗体阳转的时间关系,结果见表 2。

表 2 抗前 S<sub>1</sub> 与抗 HBs 阳转的时间关系

阳转期	例数	2-3月	3-4月	4-5月	5-6月	6-7月	7-8月	合计
<2周	12	2	7	2	1			12
2-4周	17	1	7	4	1	4		17
1-2月	10			3	3	2	1	9
2-3月	7			1	1	1	2	5
3-4月	5					1	2	3
4-5月	5					1	2	3
合计	56	3	14	10	6	9	7	49

从表 2 中可看出, 前 S<sub>1</sub> 抗体在血清中的出现时间比抗 HBs 至少提早 1 个月出现, 一般可提早 12-16 周, 在 56 例抗前 S<sub>1</sub>(+)血清中, 于 8 个月的观察期中, 最后抗 HBs 阳性者 49 例占 87.5%, 因抗 HBs 的出现说明乙肝的康复, 故抗前 S<sub>1</sub> 抗体是乙肝疾病最早的康复指标, 有很好的实用价值。

3、考核期间共检测非乙肝血清(乙肝二对半指标全阴性) 252 份, 抗乙肝前 S<sub>1</sub> 抗体(+)4 份, 阴性 248 份, 特异性 98.4%, 假阳性 1.6%, 该试剂的特异性高。

4. 因为乙型肝炎中前 S<sub>1</sub> 抗体并非 100% 阳性, 如表 1 中该抗体在乙肝中的阳性率为 44.4%, 又国内外尚无前 S<sub>1</sub> 抗体试剂盒可与此作对比测定, 故本考核中未做试剂真阳性率试验。

#### 5. 变异系数实验

取 3 份乙肝前 S<sub>1</sub> 抗体阳性, 每份血清同时做 12 个复孔测定, 经计算平均批内变异系数为 7.53%。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	X	S	CV
1	0.962	0.947	1.034	0.857	1.086	0.953	0.893	0.895	0.934	0.955	0.959	0.890	0.947	0.064	6.7%
2	0.524	0.549	0.493	0.555	0.581	0.487	0.590	0.605	0.531	0.524	0.510	0.587	0.545	0.040	7.3%
3	0.410	0.443	0.398	0.384	0.410	0.459	0.493	0.395	0.476	0.447	0.486	0.419	0.435	0.038	8.6%

该 3 份阳性血清在不同日期中共测定 5 次,平均批间变异系数为 8.8%。

	1	2	3	4	5	$\bar{X}$	S	CV
1	0.895	1.056	0.927	0.976	1.031	0.977	0.068	6.9%
2	0.474	0.536	0.613	0.492	0.557	0.534	0.055	10.3%
3	0.390	0.376	0.470	0.413	0.387	0.407	0.038	9.2%

评价:该试剂在乙肝血清中检测前 S1 抗体的阳性率较高,检出的前 S1 抗体与乙肝病情的恢复一致,对乙肝疾病能否及时康复有早期预示作用。试剂的特异性很高,假阳性很低,变异系数在标准范围内,精密度试验符合要求,因此,我们认为该试剂盒质量可靠,在乙肝检测中有较高应用价值。

本发明的试剂盒在上海第二医科大学附属新华医院临床使用结果如下:

使用上海新新医学生物工程公司研制的乙肝前 S1 抗体 ELISA 试剂盒对甲乙丙戊四类病毒性肝炎患者血清计 368 例,1786 份血样作前 S1 抗体测定,结果如下:

#### 一、抗前 S1 在各项病毒性肝炎中的阳性率

表 1 乙肝前 S1 抗体阳性率

肝炎类型	例数	血清标志	例数	抗前 S1(+)	抗前 S1(-)	阳性率(%)
甲型	74	抗 HAV IgM(+)	72	0	72	0
		抗 HAV IgM(+) 伴 HBsAg(+)	2	0	2	0
乙型	225	至少 HBsAg(+) 一项以上	225	139	86	61.7
丙型	48	抗 HCV(+)	37	0	37	0
		抗 HCV(+) 伴 HBsAg(+)	11	3	8	27.3
戊型	21	抗 HEV IgM(+)	18	0	18	0
		抗 HEV(+) 伴乙肝血清标志	3	1	2	33.3
合计	368		368	143	225	38.9

\*乙肝血清标志系指 HBsAg,抗 HBs,HBeAg,抗 HBe,抗 HBc 五项标志中至少出现一项阳性者。

表 1 中四类病毒性肝炎 368 例中抗前 S1 抗体(+)共 143 例,总阳性率为 38.9%,其中主要出现于乙肝患者中,在乙肝观察病程中出现抗前 S1(+)者占 139/225,阳性率为 61.7%,无合并乙肝的甲、丙戊三类肝炎中,抗前 S1 抗体全部(-),其测定特性为 100%。合并有乙肝的

三类肝炎共 16 例,抗前 S1(+)<sup>4</sup> 例,阳性率 25%,经统计分析,单纯乙肝中抗前 S1(+)<sup>4</sup> 率与乙肝合并其它肝炎中的抗前 S1(+)<sup>4</sup> 率比较, $X^2=8.37, P<0.01$ ,两者差异非常显著。

表 2 1786 份肝炎血清中抗前 S1 阳性率

肝炎类型	例数	血清份数	抗前 S1(+)	抗前 S1(-)	阳性率(%)
甲型	74	259	0	259	0
乙型	225	1192	572	620	48
丙型	48	235	7	228	2.9
戊型	21	100	4	96	4
合计	368	1786	583	1203	32.6

表 2 显示了抗前 S1 抗体在病毒性肝炎中的总体阳性率,在乙型肝炎的所有检测血清中,该抗体阳性率为 48%,低于表 1 中 61.7%阳性值。该表中的丙型和戊型肝炎中的抗前 S1 阳性率是各以总检测血清计算,其值分别为 2.9%和 4%。丙肝合并乙肝的有 11 例,抗前 S1 血清共 51 份,阳性血清为 7 份,阳性率为 13.7%,戊肝合并乙肝的 3 例,检测抗前 S1 的血清有 17 份,出现阳性的共 4 份,阳性率为 23.5%,这二个数值也都低于表 1 中 27.3%和 33.3%的相应值,这提示抗前 S1 的阳转与病期有关,也说明了单纯乙肝中,抗前 S1 阳转较早,而合并了丙肝或戊肝后,推迟了抗体的阳转时间。

## 二、抗前 S1 抗体的阳转时间

表 3 抗前 S1 抗体阳转与病期的关系

类型	例数	<2 周	2-4 周	4-12 周	12-16 周	16-20 周
乙肝	139	62	47	17	5	8
丙戊肝合并乙肝	4		1	1	2	

表 3 显示在 139 例乙肝中,62 例的抗前 S1 抗体在发病 2 周内阳转,占 44.6%,4 周内阳转数已达 109 例,占总例数的 78.4%,说明前 S1 抗体在乙肝病程中出现较早,有一定的诊断和判断预后的价值,但合并有其它肝炎后,该抗体的阳转时间推迟,影响了病情的恢复。

应用上海新新医学生物工程公司前 S1 抗体试剂盒在病毒性肝炎中的检测实践,认为该试剂盒的优点是 1.特异性强,在不合并乙肝的 127 例其它型肝炎中,无一例该抗体阳性。2.有早期诊断价值。在单纯乙肝中抗前 S1 抗体的阳性率为 61.7%,且近半数在发病 2 周内抗体阳转。3.前 S1 抗体的检出率与病情有关,单纯乙肝中前 S1 抗体阳性率 61.7%,合并有其它肝炎的乙肝中该抗体的阳性率为 25%,两者差异非常显著。这提示后者的乙肝往往更难恢复与前 S1 抗体的阳性率低有关,在单纯的乙肝中,前 S1 抗体的阳转时间与疾病的恢复也有关系,阳转时间早,一般病情恢复比较顺利,说明前 S1 抗体在乙肝的康复中起作用。4.试剂盒稳定,操作方便,检测结果正确。

本发明的试剂盒在上海中医药大学附属曙光医院临床使用结果如下:

#### 1.乙肝前 S1 抗体阳性检出率

表 1 比较了前 S1 抗体在乙型肝炎和非乙型肝炎患者血清中的阳性检测率。乙肝以二对半五项指标出现任何一项阳性为标准,非乙肝为二对半五项指标全部阴性,尚有部份乙肝患者合并有丙型肝炎,也分类作统计。从表 1 中可以看出乙肝中的前 S1 抗体阳性检出率为 40.9%,明显高于乙肝合并有丙肝的该抗体阳性率,由于前 S1 抗体是保护性抗体,可促进病情的恢复,因此该统计说明了合并有丙肝的乙肝因前 S1 抗体阳性率低而致更难康复。非乙肝组中血清前 S1 抗体的阳性率 2.3%,这是该试剂的假阳性率,特异性为 97.7%,说明该前 S1 检测试剂盒的特异性较高。

表 1 乙肝前 S1 抗体阳性率

组别	血清份数	前 S1 抗体(+)	前 S1 抗体(-)	阳性率(%)
乙型肝炎	584	239	345	40.9
乙肝合并丙肝	53	11	42	20.7
非乙肝	178	4	174	2.3

## 2、乙肝前 S1 抗体与 HbsAg 转阴率

表 2 统计了 50 例前 S1 抗体阳性和 63 例前 S1 抗体阴性的乙型肝炎血清中 HBsAg 的转阴率,结果表明抗体阳性组的 HBsAg 转阴率明显高于抗体阴性组,统计差异非常显著,说明前 S1 抗体可以促进 HBsAg 转阴,因此该抗体的检测是判断乙肝预后的一项早期指标。

表 2 前 S1 抗体与 HBsAg 转阴率

组别	例数	HBsAg 转阴数	转阴率
前 S1 抗体(+)	50	41	82.0*
前 S1 抗体(-)	63	24	38.1

P<0.01

### 3.试剂盒的精密度试验

#### (1)批内变异系数

取 2 份阳性血清各做 12 个复孔,测得平均批内变内系数为 6.85%。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	S	CV
A450	0.902	0.804	0.871	0.822	0.810	0.912	0.881	0.854	0.894	0.871	0.842	0.852	0.859	0.035	4.1%
	0.595	0.617	0.682	0.553	0.586	0.708	0.523	0.681	0.680	0.596	0.572	0.588	0.615	0.059	9.6%

#### (2)批间变异系数

2 份乙肝前 S1 抗体阳性血清在不同时间各测定 6 次,测得平均变异系数为 7.8%。

	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	S	CV
A450	0.871	0.903	0.825	0.897	0.817	0.917	0.871	0.042	4.8%
	0.572	0.619	0.687	0.523	0.697	0.640	0.623	0.067	10.8%

使用结果表明,该试剂稳定性好,操作简便,阴性背景清晰,阴阳性反差明显,实验结果较易判定,前 S1 抗体的阳性检出率与文献报道接近,该指标的阳转时间明显早于血清中 HBsAg 的阴转时间,因此,它的检测对乙肝病情的预后判断有较高的参考意义。

本发明的另一目的是提供了上述乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒的制备方法,该方法是

#### (一) 基因工程前S1抗原的制备

##### (1) 前S1 DNA序列

```

1           10           20           30           40           50           60
MGGWSSKPRKEMGTMLSYPNPLGFFPDHQLDPAFGANSNNPDWDFNPKDDWPAANQVGVA
           70           80           90           100          110
FGPRLTPPNGGILGWSPQAQGILTTVSTIPPPASTNRQSGRQPTPISPPLRDSHPQA
    
```

##### (2) 材料: HBV由军科院五年四室提供。PCR Kit、限制性内切酶,T4

DNA连接酶购自上海华美公司。GST,还原型4B购自Sigma公司,上海基康公司合成上游引物 5'-CGGATC-CATGGGAGGTTGGTCTTCCA,下游引物 5'-GC-GATTCCTAGTGGAATGTTGTGGAGT。

(3) 方法: 反应在Progene公司PCR合成仪上进行, 反应条件为94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 35个循环。PCR产物由基康公司测序。

(4) 表达和纯化: 将PCR产物用BamH I和EcoR I酶切, 在1%琼脂糖凝胶上电泳回收387 bp的片段, 与相同酶切的载体pGEX-4T-1连接, 转化大肠杆菌HB101株, 诱导用IPTG, 终浓度1mmol/L, SDS-PAGE分析结果。按Sepharose 4B说明书纯化表达融合蛋白产物。采用间接ELISA法检测前S1抗体。

## (二) SPA-HRP的制备

(1) 称5mg辣根过氧化物酶(HRP)加0.5ml蒸馏水, 再加0.5ml 60mM过碘酸钠氧化15' 4℃中。

(2) 加0.16M乙二醇0.5ml中止氧化4℃ 30'

(3) 加10mg/ml纯SPA0.5ml, 装袋对碳酸钠缓冲液过夜。

(4) 取出袋内液体, 加5mg/ml硼氢化钾0.2ml, 4℃ 3h再装透析袋对PH7.2 0.01M PBS透析24h换液4-5次。

(5) 取出SPA-HRP作活性和效价测定

## (三) 阴性对照血清配

(1) 用本试剂盒检测正常人血清30份, 混合A450<0.1的血清。

(2) 上述混合血清加等量小牛血清后再检测一次, 确定A450<0.1。

(3) 混合血清中加2/万叠氮钠, 过滤分装-20℃中保存。

## (四) 阳性对照血清配制

(1) 取兔抗前S1抗血清作ELISA前S1抗体效价测定; 取A450>2.0的滴定效价的2倍浓度为阳性对照血清。

(2) 取该浓度抗血清加等量小牛血清再做ELISA测定A450>1.5

(3) 上述阳性血清中加2/万叠氮钠, 过滤分装, -20℃中保存。

## (五) 底物缓冲液配制

### 1、甲液

(1) 各称磷酸氢二钠18.4克, 柠檬酸5克, PM50mg, 放入容量瓶中加双蒸水至1000ml, 搅拌溶解后再加30%双氧水400ul。

(2) 过滤除菌后分装小瓶

### 2、乙液

(1) 称EDTA 150mg加入1000ml双蒸水中, 加热溶解。

(2) 上液冷却后加柠檬酸 1.05 克, 再加用二甲亚砷溶解的TMB250mg。

(3) 分装入黑色小瓶中。

(六) 本发明乙肝病毒preS1抗体酶联免疫测定方法的建立。

(1) 用20mM Tris-Hcl液将纯前S1抗原稀释为5ug/ml浓度, 各反应孔中加0.1ml, 置4℃中24h, 弃去上清液, 拍干。

(2) 在试管中将待检血清用蒸馏水(或生理盐水)作1:25稀释。

(3) 各孔中滴加1滴样品稀释液, 然后分别加1:25稀释的待检血清50ul, 同时做阳性对照孔和阴性对照孔。

(4) 置37℃温箱中反应25分钟后, 甩去孔内液体先在草纸上拍2-3下, 然后用洗涤液洗5次, 每次条孔加满洗涤液后停留30秒种, 每次甩去孔中液体后都要在草纸上拍干, 以便彻底洗涤。

(5) 各孔加2ug/ml SPA-HRP结合物50ul, 37℃反应25分钟。

(6) 同上彻底洗涤拍干。

(7) 各孔滴加底物缓冲液甲、乙各1滴, 置37℃中反应5分钟, 再每孔滴加终止液1滴, 测A450值。

(8) 结果判定

阴性对照A值 $\times 2.5$ =临界值, 凡待检标本孔A值 $>$ 临界值即为阳性, 阴性对照小于0.05时按0.05计算。

(七) 灵敏度, 特异性和精密度试验。

1、灵敏度测定

(1) 阳性血清浓度的定值

在检测前S1抗原实验操作中, 能中和1ng/ml前S1抗原最高稀释度血清的抗体定为1u/ml。实际操作时将前S1抗原配成20ng/ml浓度。

(2) 灵敏度实验

将上述实验中滴定为1280u/ml, 160u/ml和40u/ml的3份阳性血清用样品稀释液作不同浓度稀释后, 按实验操作方法作灵敏度测定, 结果如下:

血清	血清抗体效价(u/ml)							
	1280	640	320	160	80	40	20	10
1号	$>2^*$	1.65	1.46	0.98	0.74	0.40	0.24	0.17
2号			1.15	0.70	0.46	0.27	0.15	0.06
3号						0.45	0.27	0.10

\*A450

测定阴性血清6份, A450分别为0.14, 0.06, 0.11, 0.07, 0.07, 0.08, 阴性平均A450=0.088, 阳性临界值=0.088 $\times 2.5$ =0.22, 则本检测方法对3份阳性血清的检测灵敏度分别为20u/ml, 40u/ml和20u/ml平均为26.7u/ml。

## 2、特异性测定

对用上海长征医学科学有限公司生产的乙肝二对半试剂盒检测五项指标全部阴性的血清共30份,按本实验方法前S1抗体测定,结果如下:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0.06	0.05	0.06	0.05	0.08	0.07	0.10	0.05	0.04	0.11	0.09	0.07
2	0.10	0.12	0.10	0.07	0.18	0.11	0.13	0.07	0.06	0.10	0.12	0.14
3	0.12	0.10	0.13	0.09	0.08	0.07						

同时用6份小牛血清按实验操作方法测定的A值分别为 0.05, 0.05, 0.08, 0.07, 0.06, 0.09, 平均值为0.067, 临界值=0.067×2.5=0.168, 则30份血清中有1份血清为可疑阳性, 特异性=29/30=96.7%。

## 3、精密度测定

取实验吸光度分别为高中低A值的3份阳性血清做精密度试验, 批内试验为每份血清同时做12个复孔, 批间试验为每份血清间隔2-3天实验1次, 共测定6次, 结果如下:

批内试验:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	$\bar{X}$	S	CV(%)
1	1.42	1.37	1.40	1.35	1.37	1.45	1.32	1.40	1.32	1.48	1.30	1.27	1.37	0.0625	4.6
2	0.74	0.86	0.70	0.81	0.83	0.80	0.72	0.82	0.70	0.85	0.82	0.84	0.79	0.059	7.5
3	0.26	0.25	0.31	0.27	0.24	0.32	0.25	0.26	0.25	0.25	0.28	0.29	0.27	0.0257	9.5

平均批内CV=7.2%

批间试验

	1	2	3	4	5	6	$\bar{X}$	S	CV(%)
1	1.45	1.30	1.41	1.38	1.28	1.29	1.35	0.071	5.3
2	0.72	0.86	0.70	0.75	0.84	0.77	0.773	0.0644	8.3
3	0.26	0.21	0.31	0.25	0.28	0.26	0.262	0.033	12.7

平均批间CV=8.77%

## 实例 1、制备乙肝病毒前 S<sub>1</sub> 抗体酶免测定试剂盒

### 一、主要材料

1. 基因工程前S1抗原 本公司制备
2. 纯SPA 上海生物制品研究所产品
3. 辣根过氧化物酶 美国Sigma公司
4. 羊抗人IgM(u) 美国Sigma公司
5. 酶反应板条 华东理工大学新分离技术研究室
6. 小牛血清 杭州市四季青生物材料工程公司
7. 甘油 上海五四制药厂
8. NaCl 上海试剂一厂
9. Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 上海新华化工厂
10. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 天津市化学试剂六厂

11. Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	上海虹光化工厂
12. NaHCO <sub>3</sub>	上海虹光化工厂
13. 硼氢化钾	上海试剂一厂
14. 乙二醇	上海化学试剂总厂
15. 高碘酸钠	北京化工厂
16. 乙二胺四乙酸	上海试剂一厂
17. TMB	上海东风试剂厂
18. 柠檬酸	上海试剂一厂

二、方法: 反应在Progene公司PCR合成仪上进行, 反应条件为94℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 30s, 35个循环。PCR产物由基康公司测序。

三、表达和纯化: 将PCR产物用BamH I和EcoR I酶切, 在1% 琼脂糖凝胶上电泳回收387 bp的片段, 与相同酶切的载体pGEX-4T-1连接, 转化大肠杆菌HB101株, 诱导用IPTG, 终浓度1mmol/L, SDS-PAGE分析结果。按Sephacrose 4B说明书纯化表达融合蛋白产物。采用间接ELISA法检测前S1抗体。

#### 四、SPA-HRP的制备

(1) 称5mg辣根过氧化物酶(HRP)加0.5ml蒸馏水, 再加0.5ml 60mM 过碘酸钠氧化15' 4℃中。

(2) 加0.16M乙二醇0.5ml中止氧化4℃ 30'

(3) 加10mg/ml纯SPA0.5ml, 装袋对碳酸钠缓冲液过夜。

(4) 取出袋内液体, 加5mg/ml硼氢化钾0.2ml, 4℃ 3h再装透析袋对PH7.2 0.01M PBS透析24h换液4-5次。

(5) 取出SPA-HRP作活性和效价测定

#### 五、阴性对照血清配

(1) 用本试剂盒检测正常人血清30份, 混合A<sub>450</sub><0.1的血清。

(2) 上述混合血清加等量小牛血清后再检测一次, 确定A<sub>450</sub><0.1。

(3) 混合血清中加2/万叠氮钠, 过滤分装-20℃中保存。

#### 六、阳性对照血清配制

(1) 取兔抗前S1抗血清作ELISA前S1抗体效价测定; 取A<sub>450</sub>>2.0 的滴定效价的2倍浓度为阳性对照血清。

(2) 取该浓度抗血清加等量小牛血清再做ELISA测定A<sub>450</sub>>1.5

(3) 上述阳性血清中加2/万叠氮钠, 过滤分装, -20℃中保存。

#### 七、底物缓冲液配制

##### 1、甲液

(1) 各称磷酸氢二钠18.4克, 柠檬酸5克, PM50mg, 放入容量瓶中加双蒸水至1000ml, 搅拌溶解后再加30%双氧水400ul。

(2) 过滤除菌后分装小瓶

##### 2、乙液

- (1) 称EDTA 150mg加入1000ml双蒸水中,加热溶解。
- (2) 上液冷却后加柠檬酸 1.05 克,再加用二甲亚砷溶解的 TMB250mg。
- (3) 分装入黑色小瓶中。

#### 实例 2、

一、用途：本试剂盒采用 ELISA 间接法,供体外检测人血清中乙肝前 S1 蛋白抗体(抗 preS1)用,具有快速、灵敏、特异和方便的特点。

#### 二、试剂盒组成:

1. 预包被反应条 48 孔
2. 酶结合物工作液 1 瓶 3ml
3. 阳性对照 1 支 200ul
4. 阴性对照 1 支 200ul
5. 样品稀释液 1 瓶 3ml
6. 20 倍浓洗涤液 1 瓶 13ml
7. 显色剂 A 1 瓶 3ml
8. 显色剂 B 1 瓶 3ml
9. 终止液 1 瓶 3ml

#### 三、操作步骤:

1. 取出已包被条孔,插入支架上,用胶布固定,以防脱落。
2. 在试管中将待检血清,用蒸馏水(或生理盐水)作 1:25 稀释。
3. 各孔中滴加 1 滴样品稀释液(50ul), 然后分别加 1:25 稀释的待检血清 50ul,同时做阳性对照 1 孔,阴性对照 1 孔(各加 50ul), 空白对照 1 孔(孔含样品稀释液 2 滴)。
4. 置 37℃温箱中反应 25 分钟后,甩去孔内液体先在草纸上拍 2-3 下,然后用洗涤液洗 5 次,每次条孔加满洗涤液后停留 30 秒种,每次甩去洗涤液后都要在草纸上拍干,以便洗涤彻底。(20 倍浓洗涤液 1ml+19ml 蒸馏水即为工作洗涤液)
5. 除空白对照孔外, 每孔加酶结合物工作液 1 滴(50ul), 37℃中反应 25 分钟。
6. 同上彻底洗涤拍干。
7. 各孔滴加显色剂 A、B 各 1 滴,置 37℃中反应 5-10 分钟再每孔滴加终止液 1 滴,置酶标仪中 450nm 波长读数。

#### 四、结果判定:

阴性对照 A 值 $\times$ 2.5=临界值,凡待检标本孔 A 值大于临界值即为阳性。阴性对照小于 0.05 按 0.05 计算。

#### 五、注意事项:

- 1、试剂盒存放于 4℃-8℃中,有效期 12 个月。
- 2、温育反应板温度和时间必须严格控制,洗涤须彻底。
- 3、不同批号试剂不得混用。

专利名称(译)	乙肝病毒前S1抗体酶免测定试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1368638A</a>	公开(公告)日	2002-09-11
申请号	CN01105293.7	申请日	2001-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
当前申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
[标]发明人	杜凤鸣		
发明人	杜凤鸣		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/576		
代理人(译)	王巍		
其他公开文献	CN100385237C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种乙肝病毒前S1抗体酶免测定试剂盒及制备方法。本发明的试剂在乙肝血清中检测前S1抗体的阳性率较高,检出的前S1抗体与乙肝病情的恢复一致,对乙肝疾病能否及时康复有早期预示作用。试剂的特异性高,在乙肝检测中有较高应用价值。

血清	血清抗体效价(u/ml)							
	1280	640	320	160	80	40	20	10
1号	>2*	1.65	1.46	0.98	0.74	0.40	0.24	0.17
2号			1.15	0.70	0.46	0.27	0.15	0.06
3号						0.45	0.27	0.10