

[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 200710098927.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月3日

[11] 公开号 CN 101046477A

[22] 申请日 2007.4.29

[21] 申请号 200710098927.3

[71] 申请人 陈禹保

地址 100012 北京市朝阳区安外大羊坊6号

共同申请人 北京中亚国瑞生物经济研究所

[72] 发明人 陈禹保

[74] 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有限公司

代理人 李超

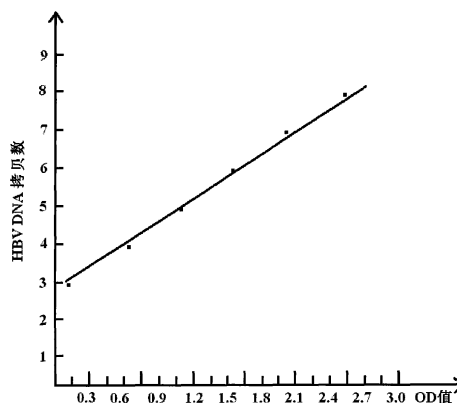
权利要求书3页 说明书9页 附图1页

## [54] 发明名称

乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV - DNA 试剂盒

## [57] 摘要

本发明公开了一种乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV - DNA 试剂盒及其制备方法,属于分子生物学与免疫学诊断试剂领域。该试剂盒包括:(1)荧光定量 HBV - DNA 血清标准品 6 支,(2)HBV 表面抗体(HBsAb)多抗预包被酶标板反应条;(3)HBV 核心抗体(HBcAb)多抗预包被酶标板反应条;(4)开壳剂;(5)酶标记核心抗体;(6)底物显色剂;(7)阳性对照;(8)阴性对照;(9)终止液。本发明的优点是:能非常专一而准确的通过检测乙肝核心抗原酶联免疫定量测定血清 HBV DNA 的含量。具有操作简便、灵敏度高、特异性强和稳定等特点。本试剂盒整个实验中不需要贵重仪器设备,试剂便宜,对实验环境和人员要求低,收费低廉,能适应各级医院及临床检验中心。



1. 一种乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒，其特征在于：该试剂盒包括：

(1) 荧光定量 HBV-DNA 血清标准品 6 支，DNA 含量分别为  $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^8$ copies/ml；

(2) HBV 表面抗体 (HBsAb) 多抗预包被酶标板反应条；

(3) HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗预包被酶标板反应条；

(4) 开壳剂：5~15%的乙基苯基聚乙二醇 40 (NP-40) 溶液；

(5) 酶标记核心抗体：HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗偶联辣根过氧化物酶；

(6) 底物显色剂：A 液 1~3%的  $H_2O_2$ ， B 液 0.15%四甲基联苯胺；8~13%的海藻糖保护剂；

(7) 阳性对照：核心抗原 (HBcAb) 阳性血清；

(8) 阴性对照：正常人血清；

(9) 终止液：2N  $H_2SO_4$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的一种乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒，其特征在于：所述试剂盒中还包括

(10) 洗涤液：PBS-吐温 20。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV DNA 试剂盒，其特征在于：所述 HBV 表面抗体多抗预包被酶标板反应条为 48 孔或 96 孔。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV DNA 试剂盒，其特征在于：所述 HBV 核心抗体多抗预包被酶标板反应条为 48 孔或 96 孔。

5. 权利要求 2-4 中任何一项所述的乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒的制备方法，包括下列步骤：

(1) 制备荧光定量 HBV-DNA 血清标准品：采用荧光定量 PCR 方法，将 HBV 大三阳血清或小三阳血清分别制备成 DNA 含量为  $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^7$  和  $2 \times 10^8$ copies/m 的血清标准品；

(2) 用 HBV 表面抗体 (HBsAb) 多抗包被酶标板：称取适量 HBV 表面抗体 (HBsAb) 多抗，加入到 pH 值为 9.6 的碳酸缓冲液中至多抗最终浓度为 5-12 微克/毫升，每反应孔加 100 微升，加盖后置 4℃ 过夜，甩干；用 10%的正常牛血清，加入反应孔 110

微升，4℃过夜，甩干，干燥后，真空包装，于4℃保存；

(3) 用 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗包被酶标板：称取适量 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗，加入到 pH 值为 9.6 的碳酸缓冲液中至多抗最终浓度为 5-10 微克/毫升，每反应孔加 100 微升，加盖后置 4℃过夜甩干；用 10% 的正常牛血清，加入反应孔 110 微升，4℃过夜，甩干，干燥后，真空包装，于 4℃保存；

(4) 配制开壳剂：配制 5-15% 的乙基苯基聚乙二醇 40 (NP-40) 溶液；

(5) 制备酶标记核心抗体：将辣根过氧化物酶与 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗用过碘酸钠偶联，10000 转/分离心 10-15 分钟，得沉淀，将沉淀融于 0.2M 的磷酸缓冲液，对磷酸缓冲液透析 4~8 小时，得标记物，于 -20℃保存；

(6) 制备底物显色剂：

A 液：用 0.1M 柠檬酸缓冲液配制 3% 的双氧水溶液；

B 液：用 0.1M 柠檬酸缓冲液配制 0.15% 的四甲基联苯胺溶液含 8-13% 的海藻糖；

(7) 制备阳性对照：核心抗原 (HBcAg) 和 HBV DNA 同为阳性的血清，60℃放置 1 小时，除菌过滤，测定 OD 值大于 0.35，于 -20℃保存；

(8) 制备阴性对照：取 OD 值小于 0.03 的正常人血清，加保护剂 PC300，最终浓度在 0.5~1.5% PC300 于 -20℃保存备用；

(9) 制备洗涤液：配制 0.15MPBS PH7.4-0.05%吐温 20；

(10) 制备终止液：用浓硫酸配制 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

6. 根据权利要求 5 所述的乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒的制备方法，其特征在于：所述 HBV 表面抗体 (HBsAb) 多抗的制备及纯化方法是：用乙肝表面抗原免疫羊，得抗表面抗原多抗血清；用硫酸氨分级沉淀处理表面抗原多抗血清，得多抗粗品；用离子交换柱分离纯化多抗粗品得 BV 表面抗体 (HBsAb) 多抗纯品。

7. 根据权利要求 5 所述的乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒的制备方法，其特征在于：所述 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗和 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗的制备方法是：

(1) 用乙肝核心抗原 (HBcAg) 免疫兔，得抗 HBcAg 多抗血清；用乙肝核心抗原免疫 Balb/C 小鼠得阳性鼠脾细胞，与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞，筛选效价高于 1:2000 的阳性细胞，用该阳性细胞株制备小鼠腹水；

(2) 抗 HBcAg 多抗血清和小鼠腹水分别用硫酸氨或正辛酸常规处理，得 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗和 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗粗品；

(3) 将 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗和 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗粗品通过 DEAE 阴离子离子交换层析, 得 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗和 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗纯品。

8. 根据权利要求 5 所述的乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒的制备方法, 其特征在于: 所述制备方法还包括

(11) 半成品的分装: 将各种试剂按 48 人份或 96 人份用量分装到滴瓶或 1.5 毫升离心管中;

(12) 成品的组装: 将半成品组装成乙肝核心抗原酶联免疫定量检测 HBV DNA 试剂盒, 放于 4℃ 保存。

## 乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒

### 技术领域

本发明涉及一种乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒及其制备方法，属于分子生物学与免疫学诊断试剂领域。

### 背景技术

乙型肝炎病毒（HBV）是肝炎的主要致病因子，在全世界乙型肝炎病毒携带者约 1.5 亿人。乙肝核心抗原（HBcAg）存在于乙肝病毒颗粒中，而不是以游离状态存在于血液中，是乙肝病毒活动的直接指标。但长期以来，临床医生是根据“两对半”五种试剂盒检验结果判断乙肝患者的病情，根据 HBV DNA PCR 荧光定量试剂盒对血清乙肝病毒 DNA 测定了解药物疗效。但“两对半”试剂不能很好的反映乙肝病毒的存在状况，不能定量；HBV DNA 荧光定量 PCR 试剂盒虽能定量 HBV DNA 拷贝数，但不能反映病毒真实状态和患者免疫反应情况，且价格昂贵操作复杂。

### 发明内容

本发明要解决的技术问题是：提供一种能够定量测定 HBV DNA 拷贝数并且真实反映患者免疫情况的乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV DNA 试剂盒。

为实现上述目的，本发明采用以下技术方案：

一种乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒，保存于 4℃，包括：

- (1) 荧光定量 HBV-DNA 血清标准品 6 支，DNA 含量分别为  $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^8$  copies/ml，保存于 -20℃；
- (2) HBV 表面抗体（HBsAb）多抗预包被酶标板反应条（48 孔或 96 孔）；
- (3) HBV 核心抗体（HBcAb）多抗预包被酶标板反应条（48 孔或 96 孔）；
- (4) 开壳剂：（体积百分比浓度）5~15% 的乙基苯基聚乙二醇 40 (NP-40) 溶液；
- (5) 酶标记核心抗体：HBV 核心抗体（HBcAb）单抗偶联辣根过氧化物酶，保存于 -20℃；
- (6) 底物显色剂：A 液（体积百分比浓度）1~3% 的  $H_2O_2$ ，B 液（质量百分比浓度）0.15% 四甲基联苯胺；（质量百分比浓度）8~13% 的海藻糖保护剂；
- (7) 阳性对照：核心抗原（HBcAb）阳性血清，保存于 -20℃；
- (8) 阴性对照：正常人血清，含浓度（体积百分比浓度）为 0.5~1.5% 的

PC300, 保存于 $-20^{\circ}\text{C}$  ;

(9) 终止液:  $2\text{N H}_2\text{SO}_4$  ;

(10) 洗涤液: PBS-吐温 20。

本发明的原理是: 利用 ELISA 夹心法测定标准血清的核心抗原 OD 值和待测血清的核心抗原 OD 值, 然后以标准血清 DNA 含量为纵坐标, 测定标准血清核心的 OD 值为横坐标, 做标准曲线; 通过待测血清核心抗原的 OD 值查标准曲线, 可得血清中相对的 HBV DNA 含量。从而根据 HBcAg 酶联免疫测定的 OD 值就能判断治疗乙肝病人药物的效果及病情的变化。

本发明要解决的另一个技术问题是: 提供一种上述试剂盒的制备方法。

乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定 HBV-DNA 试剂盒的制备方法, 包括下列步骤 (步骤顺序可以前后调整, 不影响效果):

(1) 制备荧光定量 HBV-DNA 血清标准品: 采用荧光定量 PCR 方法, 将 HBV 大三阳血清或小三阳血清分别制备成 DNA 含量为  $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^7$  和  $2 \times 10^8$  copies/m 的血清标准品; 于 $-20^{\circ}\text{C}$  保存

(2) 用 HBV 表面抗体 (HBsAb) 多抗包被酶标板: 称取适量 HBV 表面抗体 (HBsAb) 多抗, 加入到 pH 值为 9.6 的碳酸缓冲液中至多抗最终浓度为 5-12 微克/毫升, 每反应孔加 100 微升, 加盖后置  $4^{\circ}\text{C}$  过夜甩干; 用 (体积百分比浓度) 10% 的正常牛血清, 加入反应孔 110 微升,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜, 甩干, 干燥后, 真空包装, 于  $4^{\circ}\text{C}$  保存;

(3) 用 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗包被酶标板: 称取适量 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗, 加入到 pH 值为 9.6 的碳酸缓冲液中至多抗最终浓度为 5-10 微克/毫升, 每反应孔加 100 微升, 加盖后置  $4^{\circ}\text{C}$  过夜甩干; 用 10% 的正常牛血清, 加入反应孔 110 微升,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜, 甩干, 干燥后, 真空包装, 于  $4^{\circ}\text{C}$  保存;

(4) 配制开壳剂: 配制 5-15% 的乙基苯基聚乙二醇 40 (NP-40) 溶液;

(5) 制备酶标记核心抗体: 将辣根过氧化物酶与 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗用过碘酸钠偶联, 10000 转/分离心 10-15 分钟, 得沉淀, 将沉淀融于 0.2M 的磷酸缓冲液, 对磷酸缓冲液透析 4~8 小时, 得标记物, 于 $-20^{\circ}\text{C}$  保存;

(6) 制备底物显色剂: 于  $4^{\circ}\text{C}$  保存

A 液: 用 0.1M 柠檬酸缓冲液配制 3% 的双氧水溶液;

B 液: 用 0.1M 柠檬酸缓冲液及 8-13% 的海藻糖配制 0.15% 的四甲基联苯胺溶液;

(7) 制备阳性对照: 核心抗原 (HBcAg) 和 HBV DNA 同为阳性的血清,  $60^{\circ}\text{C}$  放

置 1 小时，除菌过滤，测定 OD 值大于 0.35，于 -20℃ 保存；

(8) 制备阴性对照：取 OD 值小于 0.03 的正常人血清，加保护剂 PC300 (PROCLIN300, 购自美国 SIGAMA 公司)，最终浓度在 0.5~1.5% PC300，于 -20℃ 保存备用；

(9) 制备洗涤液：配制 0.15MPBS pH7.4-0.05%吐温 20，于 4℃ 保存；

(10) 制备终止液：用浓硫酸配制 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，于 4℃ 保存；

(11) 半成品的分装：将各种试剂按 48 人份或 96 人份用量分装到滴瓶或 1.5 毫升离心管中；

(12) 成品的组装：将半成品组装成乙肝核心抗原酶联免疫定量检测 HBV DNA 试剂盒，放于 4℃ 保存。

所述 HBV 表面抗体 (HBsAb) 多抗的制备及纯化方法是：用乙肝表面抗原免疫羊，得抗表面抗原多抗血清；用硫酸氨分级沉淀处理表面抗原多抗血清，得多抗粗品；用离子交换柱分离纯化多抗粗品得 BV 表面抗体 (HBsAb) 多抗纯品。

所述 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗和 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗的制备方法是：

(1) 用乙肝核心抗原 (HBcAg) 免疫兔，得抗 HBcAg 多抗血清；用乙肝核心抗原免疫 Balb/C 小鼠得阳性鼠脾细胞，与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞，筛选高效价 (效价大于 1:2000 以上即可选用) 阳性细胞，用该阳性细胞株制备小鼠腹水；

(2) 抗 HBcAg 多抗血清和小鼠腹水分别用硫酸氨或正辛酸常规方法处理，得 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗和 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗粗品；

(3) 将 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗和 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗粗品通过 DEAE 阴离子离子交换层析，得 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗和 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗纯品。

单克隆抗体的制备方法为本领域的公知技术，本发明制备的 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗并不针对特定的抗原结合位点，凡是效价 1:2000 以上的 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗均可与辣根过氧化物酶反应制成酶标记抗体，并能取得本发明的效果。而且制备效价超过 1:2000 的 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗的过程并不需要花费创造性劳动，本领域的普通技术人员通过有限次数的实验即可筛选到令人满意的杂交瘤细胞株。因此，本发明已经进行了充分的公开，无须对某个杂交瘤细胞株进行特定保藏以重现本发明的内容。同理，无论是采用哪个细胞株分泌的 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗来制备酶标记抗体，均不得用于仿制本发明。进一步说，使用或者购

买他人合法制备或销售的 HBV 核心抗体 (HBcAb) 单抗用于制备酶标记抗体, 也不得用于仿制本发明。

本发明的试剂盒在使用时可如下操作:

#### 一. 检测

1. 取出 HBV 表面抗体多抗预包被酶标板反应条, 蒸馏水洗 2 次, 拍干。
2. 设空白对照 1 孔, 阴性、阳性对照各 2 孔, 每孔加入阴阳血清各 100ul (空白孔不加), 定量 HBV DNA 标准血清 6 孔, 其余各孔加入待检标本 100ul, 用封片纸封好, 置 45℃温育 30 分钟。
3. 弃去孔内液体, 用蒸馏水洗 7 次, 拍干。
4. 加开壳剂: 每孔加入开壳剂 3 滴 (空白孔不加) 置 45℃温育 30 分钟。
5. 取出 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗预包被酶标板反应条, 蒸馏水洗 2 次, 拍干。
6. 用 100ul 加样器吸取 HBV 表面抗体多抗预包被酶标板反应条上的开壳液 50ul 转移到检测 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗预包被酶标板反应条的对应孔内, 每吸一份样品要更换一个吸头。然后, 每孔加入酶标记核心抗体 (HRP-HbcAgMcAb 结合物) 1 滴 (50ul) (空白孔不加), 震荡混匀 1 分钟, 封板, 置 45℃温育 30 分钟。
7. 弃去孔内液体, 用蒸馏水洗 7 次, 拍干。
8. 每孔加入底物显色剂 A 液、B 液各 1 滴, 混匀, 室温放置 10~20 分钟。
9. 每孔加入终止液 1 滴, 混匀, 立即上酶标仪测 OD 值。

#### 二. 结果判读:

以 HBV DNA 标准品浓度为纵坐标, 以标准品 OD 值为横坐标, 绘出标准曲线图, 从各待测血清 OD 值就可在标准曲线上查出血清的 HBV DNA 含量。

本发明的优点是: 本发明的试剂盒能非常专一而准确的通过检测乙肝核心抗原酶联免疫定量测定血清 HBV DNA 的含量。具有操作简便、灵敏度高、特异性强和稳定等特点。比 PCR 检测快速的多, 乙肝核心抗原酶联免疫定量检测 HBV DNA 试剂盒不仅能检测核心抗原, 而且能定量测定 HBV DNA 拷贝数, 因此本试剂盒对判断病人是否有乙肝病毒复制, 对确定乙肝感染病程预后及药物疗效具有十分重要的指导意义。PCR 检测法需要贵重的仪器设备, 试剂昂贵, 对实验环境和人员要求很高, 收费高。本试剂盒整个实验中不需要贵重仪器设备, 试剂便宜, 对实验环境和人员要求低, 收费低廉, 能适应各级医院及临床检验中心。本发明是一种对 HBV 感染、复制

和乙肝病人诊断、治疗和预后判断新的量化检测方法。

下面结合具体实施方式对本发明作进一步说明，本发明的实施方式并不限于此，凡是根据本发明公开的内容或者原理，实施的任何本领域的等同替换，均属于本发明的保护范围。

### 附图说明

图 1 为核心抗原酶联免疫定量测定 HBV DNA 试剂盒的定量标准曲线，横坐标为 HBcAg ELLSA 测定的 OD 值，纵坐标为定量 HBV DNA 的拷贝数对数值。

### 具体实施方式

实施例 1：乙肝核心抗原酶联免疫定量测定 HBV DNA 试剂盒的制备

#### 一. 制备并纯化抗 HbsAg 多抗：

用 HbsAg（购自北京美迪科生物技术有限公司）免疫兔子（购自北京实验动物研究中心），得抗血清；在抗血清中加入饱和硫酸氨至终浓度为 33%，并搅拌 1 小时；4000g 离心 15 分钟，去上清；沉淀用与上述相同体积的饱和硫酸氨重新溶解并到沉淀；4000g 离心 15 分钟，弃上清，用适当磷酸缓冲液溶解并透析，得粗品多抗，再经 DEAE 柱层析去掉杂蛋白（DEAE 纤维层析柱购自 PHAMACIAL 公司），用 PB 缓冲液预先平衡 DEAE 柱，然后进行洗脱，收集蛋白峰，通过免疫沉淀或琼脂扩散确定该蛋白峰含有 HbsAg 多抗，用磷酸缓冲液透析 8-10 小时得 HbsAg 多抗。效价：1-3 万。

#### 二. 制备并纯化 HBcAg 多抗和单抗：

用 HBcAg（购自中国人民解放军 302 医院免疫研究所），免疫兔子（北京实验动物研究中心），得抗血清，在抗血清中加入饱和硫酸氨至终浓度为 33%，并搅拌 1 小时；4000g 离心 15 分钟，去上清；沉淀用与上述相同体积的饱和硫酸氨重新溶解并到沉淀；4000g 离心 15 分钟，弃上清，用适当磷酸缓冲液溶解并透析，得粗品多抗，再经 DEAE 柱层析去掉杂蛋白（DEAE 纤维层析柱购自 PHAMACIAL 公司），收集蛋白峰，通过免疫沉淀或琼脂扩散确定该蛋白峰含有 HbcAg 多抗，用磷酸缓冲液透析 8-10 小时得 HbcAg 多抗。

用 HBcAg 免疫 Balb/C 小鼠（北京实验动物研究中心），分三次免疫，每次相隔 2 个星期，用 ELISA 法检测抗原特异性抗体；然后获得免疫脾细胞，将此脾细胞与预先准备好的骨髓肿瘤细胞以 5：1~10：1 比例混合，加入 20~25ml RPMI-1640 培养

液（购自美国 INVITROGENE 公司），1000 转/分离心 10 分钟，弃上清，得细胞沉淀并使其分散，加入 1 毫升 30-50%的聚乙醇 8000，得融合细胞，于 HAT 培养基（美国 INVITROGENE 公司）中培养。在培养板孔的上清夜中可用 ELISA 或琼脂糖扩散法检测到杂交瘤细胞分泌的特异性抗体。通过进一步筛选克隆，建立分泌高效价特异性抗体的单克隆细胞株，于液氮中保存。用培养好的分泌高效价特异性抗体的杂交瘤细胞注入到 BALB/c 小鼠的腹腔，得腹水；采用常用的正辛酸法纯化；得单抗。

用上述方法得纯品多抗和单抗。效价：多抗 1-3 万，单抗：4-5 万。

### 三. 制备 HbsAg 多抗预包被酶标板反应条：

1. 包被：称取适量 HbsAg 多抗，加入到 pH 值为 9.6 的碳酸缓冲液中至最终 HbsAg 多抗浓度在 5~12 微克/毫升，每反应孔加 100 微升，加盖后置 4℃ 过夜，甩干；

2. 封闭：用 10%的正常牛血清，加入反应孔 110 微升，4℃ 过夜，甩干，再在吸水纸上拍干，待干燥后，真空包装，于 4℃ 保存。

### 四. 制备 HBcAg 多抗预包被酶标板反应条：

1. 包被：称取适量 HbcAg 多抗，加入到 pH 值为 9.6 的碳酸缓冲液中至 HBcAg 多抗最终浓度为 5-10 微克/毫升，每反应孔加 100 微升，加盖后置 4℃ 过夜甩干；

2. 封闭：用 10%的正常牛血清，加入反应孔 110 微升，4℃ 过夜，甩干，再在吸水纸上拍干，待干燥后，真空包装，于 4℃ 保存。

### 五. 制备酶标 HbcAb 单抗：为本领域常规方法

将辣根过氧化物酶（HRP）（购自上海生化所）与 HbcAb 单抗原用碘酸钠偶联，（HRP 和 HbcAb 单抗的用量各是 4mg 和 8mg）10000 转/分离心 10~15 分钟，得沉淀，将沉淀融于 0.2M 的磷酸缓冲液，并对磷酸缓冲液透析 4~8 小时，得标记物。效价大于 1500，于 -20℃ 保存。

采用棋盘滴定法确定酶标抗体的最价工作浓度大于 1: 3000 。

### 六. 制备荧光定量 HBV-DNA 血清标准品：

用荧光定量 PCR 定量的 HBV DNA 血清（血清来自淮南肝病研究所），制备成为标准品为  $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^8$  copies/ml，共 6 支，于 -20℃ 保存。

### 七. 制备阳性对照：

HBcAg 和 HBV DNA 同为阳性的血清（血清来自北京右安医院），60℃ 放置 1 小时，除菌过滤，用本试剂盒测定 OD 值大于 0.35，分装，于 -20℃ 保存，备用。

#### 八. 制备阴性对照:

用本试剂盒测定正常人血清 OD 值小于 0.03, 加保护剂 PC300, 最终浓度在 0.5~1.5%, 分装于-20℃保存备用。

#### 九. 配制底物显色液:

A 液: 用 0.1M 柠檬酸缓冲液配制 3%的双氧水溶液。

B 液: 用 0.1M 柠檬酸缓冲液及 8-13%的海藻糖配制 0.15%的四甲基联苯胺 (TMB) 溶液。

十. 配制终止液: 用浓硫酸配制成 2N 硫酸液即可。

#### 十一. 半成品和成品的组装:

上述试剂按需求量 48 人份或 96 人份用量进行分装, 分装到滴瓶中或 1.5 毫升离心管中, 既为半成品, 抽检合格, 组装成乙肝核心抗原酶联免疫定量检测 HBV DNA 试剂盒。组装成成品再抽检, 合格品放于 4℃保存。

### 实施例 2: HBcAg 定量测定 HBV DNA 的使用方法

#### 一. 检测

1. 从试剂盒中取出 HBV 表面抗体多抗预包被反应条板, 在室温放置一段时间, 至板条温度与室温一致, 蒸馏水洗 2 次, 拍干。

2. 反应孔中分别加各浓度 HBV DNA 血清标准品、待测血清、阴性血清及阳性血清各 100 微升, 每次实验设空白 1 孔, 加缓冲液 100 微升, 45℃反应 30 分钟。

3. 弃去孔内液体, 用蒸馏水洗 7 次, 拍干。

4. 加开壳剂: 每孔加入开壳剂 3 滴 (空白孔不加) 置 45℃温育 30 分钟 (注意: 千万不能将此液倒掉)。

5. 取出 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗预包被酶标板反应条, 蒸馏水洗 2 次, 拍干。

6. 用 100ul 加样器吸取 HBV 表面抗体多抗预包被酶标板反应条上的开壳液 50ul 转移到检测 HBV 核心抗体 (HBcAb) 多抗预包被酶标板反应条的对应孔内, 每吸一份样品要更换一个吸头。然后, 每孔加入酶标记核心抗体 (HRP-HbcAgMcAb 结合物) 1 滴 (50ul) (空白孔不加), 震荡混匀 1 分钟, 封板, 置 45℃温育 30 分钟。

7. 弃去孔内液体, 用蒸馏水洗 7 次, 拍干。

8. 每孔加入底物显色剂 A 液、B 液各 1 滴, 混匀, 室温放置 10~20 分钟。

9. 每孔加入终止液 1 滴，混匀，立即上酶标仪测 OD 值。

## 二. 结果判读:

以 HBV DNA 标准品浓度为纵坐标，以标准品 OD 值为横坐标，绘出标准曲线图，从各待测血清 OD 值就可在标准曲线上查出血清的 HBV DNA 含量。

### 1. 核心抗原酶联免疫定量测定 HBV DNA 试剂盒的定量标准曲线的制定:

用荧光定量 PCR 定量的 HBV DNA 血清，制备成为标准品为  $2 \times 10^3$ 、 $2 \times 10^4$ 、 $2 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^8$  copies/ml，共 6 支。用本试剂盒检测的 6 种标准品的 OD 值为横坐标，HBV DNA 标准含量为纵坐标，绘制成核心抗原酶联免疫定量测定 HBV DNA 试剂盒的定量标准曲线（图 1）。

### 2. 试剂盒临界（cut off）值的确立

根据阴阳性血清 OD 值，建立 OD 值与人群的正态分布，所得数据经统计学处理。我们找来已测定的 450 份阴性血清用两家进口试剂、两家国产试剂，对 450 份阴性血清进行鉴定，确定后从中选出 400 份阴性血清用我们自己的试剂盒进行鉴定，测出最高值为 0.08、最低值为 0.01，因此我们定出界限值为  $2.1 \times$  阴性对照平均值（N）如 N 值低于 0.05 按 0.05 计算，高于 0.05 按实际值计算，界限值  $\pm 10\%$  为可疑，如界限值  $= 2.1 \times 0.05 = 0.105$ ， $0.105 + 0.011 \sim 0.105 - 0.011$  为可疑区。即  $0.116 \sim 0.094$  为可疑区。 $0.105 \sim 0.116$  为阳性可疑区， $0.094 \sim 0.105$  为 阴性可疑区。可疑标本应重复，如重复试验仍为可疑，阳性可疑报阳性，阴性可疑报阴性。

## 实施例 3: HBcAg ELISA 定量测定 HBV DNA 应用与荧光定量 PCR 检测 HBVDNA 比较

### 一. 临床标本来源:

本发明人从淮南肝病研究所和北京佑安医院收集 152 份阳性血清，其中大三阳 79 例、小三阳 73 例，和 43 全阴性血清；共 195 份血清。然后用本发明方法和商品化的荧光定量 HBV DNA PCR 检测试剂盒对这些血清进行同时测定。

### 二. 测定方法:

HBcAg ELISA 定量测定血清 HBV DNA 按使用说明书（试剂盒自制）进行操作（方法同实施例 2），荧光定量 HBV DNA PCR 测定按广州中山达安基因科技股份有限公司生产的荧光定量 PCR 检测试剂盒说明书操作，检测同一血样 195 份，经统计学分析检测结果，结果表明，该两种方法检测的结果具有很好的一致性。

### 三. 结果:

采用本发明方法和达安基因公司的荧光定量 PCR 检测方法对收集的 195 份血清同时进行进行检测，结果在 79 份大三阳血清中，本发明方法检测的阳性为 73 例，荧光定量 PCR 检测的阳性为 78 例，检测符合率达 93.4%，血清 HBV DNA 定量准确性达 91.2%；在 73 份小三阳血清中，本发明方法检测出 42 例，荧光定量 PCR 检测出 46 例，检测符合率达 91.3%，血清 HBV DNA 定量准确性 92.7%；在 43 份阴性血清中，本发明方法和荧光定量 PCR 方法检测的结果都为阴性，特异性符合率为 100%。经统计学分析实验结果，本发明方法和荧光定量 PCR 检测方法具有显著的相关性 ( $P < 0.01$ )。

综上所述，本发明方法能非常特异的通过核心抗原 ELISA 检测而定量测定出血清 HBV DNA，与目前的荧光定量 PCR 方法检测 HBV DNA 具有高度一致性，检测符合率和定量准确性都达到 91%以上，符合实际临床检验要求，既能测定核心抗原还能定量 HBV DNA，因而本发明对判断病人是否有病毒复制，对确定乙肝感染病程预后和用药后的疗效具有重要的指导意义。而且本发明方法操作简便、快速、实用性强；在整个实验过程中无需贵重设备仪器，试剂盒价格低廉，适合各基层医疗单位。

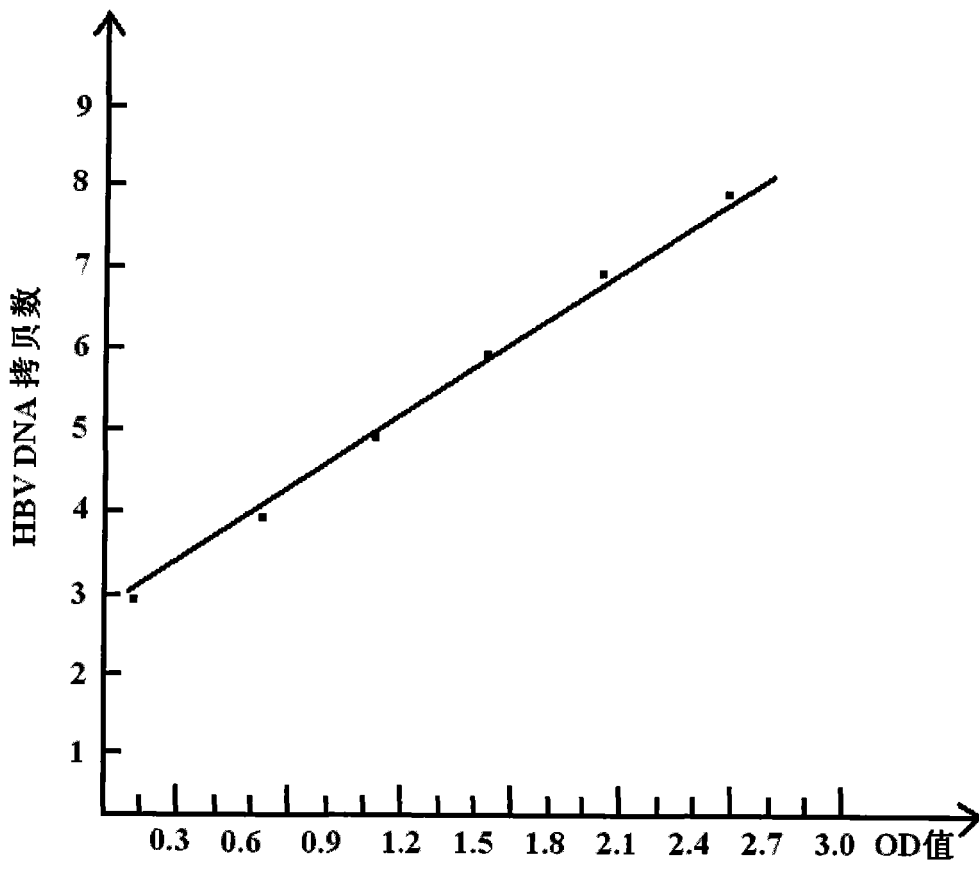


图 1

专利名称(译)	乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定HBV - DNA试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101046477A</a>	公开(公告)日	2007-10-03
申请号	CN200710098927.3	申请日	2007-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	陈禹保 北京中亚国瑞生物经济研究所		
申请(专利权)人(译)	陈禹保 北京中亚国瑞生物经济研究所		
当前申请(专利权)人(译)	陈禹保 北京中亚国瑞生物经济研究所		
[标]发明人	陈禹保		
发明人	陈禹保		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/576 G01N33/543 G01N33/533		
代理人(译)	李超		
其他公开文献	CN101046477B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种乙型肝炎核心抗原酶联免疫定量测定HBV - DNA试剂盒及其制备方法,属于分子生物学与免疫学诊断试剂领域。该试剂盒包括:(1)荧光定量HBV - DNA血清标准品6支,(2)HBV表面抗体(HBsAb)多抗预包被酶标板反应条;(3)HBV核心抗体(HBcAb)多抗预包被酶标板反应条;(4)开壳剂;(5)酶标记核心抗体;(6)底物显色剂;(7)阳性对照;(8)阴性对照;(9)终止液。本发明的优点是:能非常专一而准确的通过检测乙肝核心抗原酶联免疫定量测定血清HBV DNA的含量。具有操作简便、灵敏度高、特异性强和稳定等特点。本试剂盒整个实验中不需要贵重仪器设备,试剂便宜,对实验环境和人员要求低,收费低廉,能适应各级医院及临床检验中心。

