



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109239347 A

(43)申请公布日 2019.01.18

(21)申请号 201811245702.0

G01N 21/76(2006.01)

(22)申请日 2018.10.24

(71)申请人 苏州长光华医生物医学工程有限公
司

地址 215100 江苏省苏州市高新区锦峰路8
号4号楼

(72)发明人 欧赛英 邱春明 徐滕

(74)专利代理机构 苏州知途知识产权代理事务
所(普通合伙) 32299

代理人 马刚强

(51)Int.Cl.

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

(54)发明名称

一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒及其制
备方法和应用

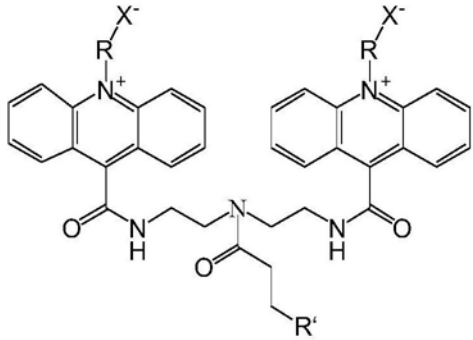
(57)摘要

本发明涉及一种HBeAb化学发光免疫检测试
剂盒及其制备方法和应用,所述试剂盒包括:生
物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物
标记的重组HBeAg工作液、链霉亲和素标记的磁
颗粒试剂、HBeAb校准品溶液、化学发光底物液及
清洗液,所述重组HBeAg为真核表达系统表达的
重组HBeAg。本专利试剂盒对HBeAb的检测创新性
地采用双抗原夹心法模式,由HBeAg标记生物素,
先将待测样本、生物素标记的重组HBeAg、化学发
光标记物标记的重组HBeAg反应形成抗原-抗体-
抗原夹心复合物,再加入链霉亲和素包被的磁颗
粒试剂,对HBeAb检测的准确度高,且精密性、特
异性好,临床适用性强。

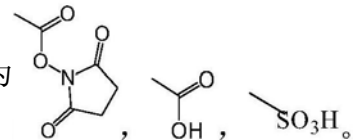
1. 一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,包括:生物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液、链霉亲和素标记的磁颗粒试剂、HBeAb校准品溶液、化学发光底物液及清洗液,所述重组HBeAg为真核表达系统表达的重组HBeAg。

2. 根据权利要求1所述的HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶化合物。

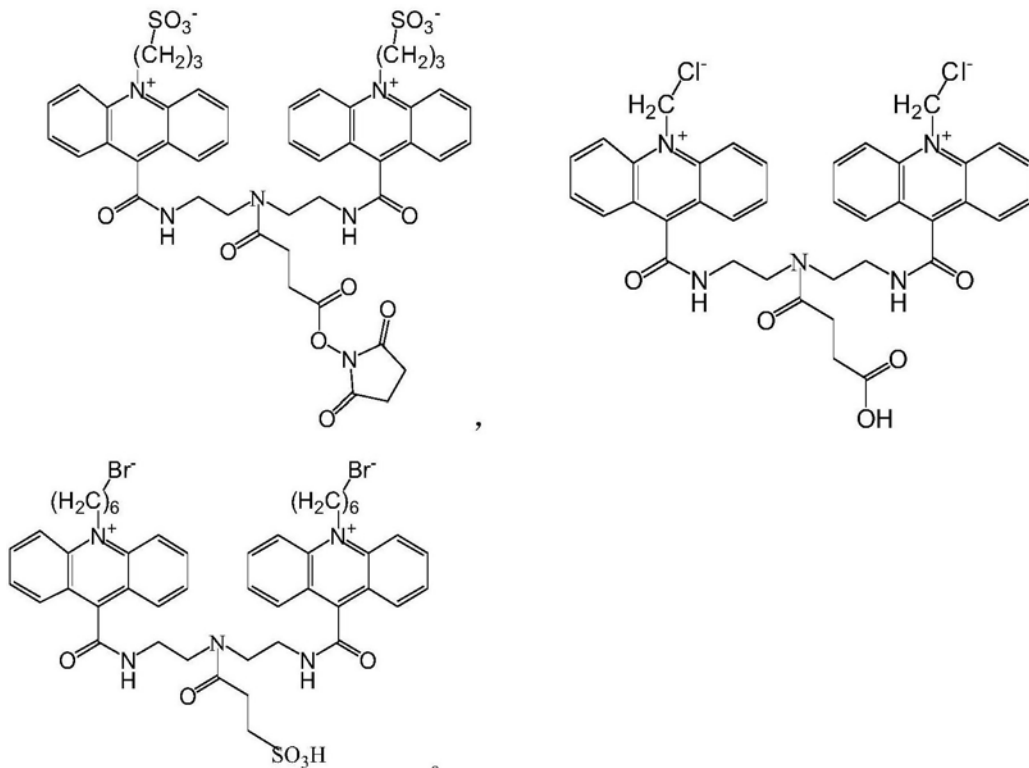
3. 根据权利要求2所述的HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光标记物为吡啶化合物,述吡啶化合物的结构如下:



所述R为取代或未取代的C₁-C₆亚烷基,X为磺酰基或卤素,R'为



4. 根据权利要求3所述的HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述吡啶化合物为下述结构中的一种:



5. 根据权利要求1-4任一项所述的HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,链霉亲和素包被的磁颗粒为纳米级的Fe₂O₃或Fe₃O₄磁性粒子和有机高分子材料的复合物,所述

磁颗粒的粒径大小为0.1-5 μm 。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,其特征在于,所述化学发光底物液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含无机酸和过氧化物,所述化学发光激发液2含氢氧化物。

7. 一种权利要求1-6任一项所述的HBeAb化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

制备生物素标记的重组HBeAg工作液:用浓度为0.02-0.08M、pH为8.5-10.5的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与生物素琥珀酰亚胺酯按1:10~20的摩尔比例室温反应0.5~1.5小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

制备化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液:用浓度为0.02-0.08M、pH为8.5-10.5的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与化学发光标记物按1:10~20的摩尔比例室温反应0.5~1.5小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

以链霉亲和素标记磁颗粒,制备链霉亲和素标记的磁颗粒试剂;

配制HBeAb校准品溶液;

配制化学发光底物液;

配制清洗液;

分装上述生物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液、链霉亲和素标记的磁颗粒试剂、HBeAb校准品溶液、化学发光底物液及清洗液,并组装为成品试剂盒。

8. 根据权利要求7所述的HBeAb化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述配制化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液的缓冲液中含有0.5-1.5wt%的PEG20000。

9. 一种权利要求1-6任一项所述的HBeAb化学发光免疫检测试剂盒的应用,其特征在于,按照以下步骤使用:

将待测抗体样本、生物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液混合,加热孵育,形成抗原-抗体-抗原夹心复合体溶液;

于抗原-抗体-抗原夹心复合体溶液中加入链霉亲和素包被的磁颗粒试剂,加热孵育,形成磁性复合物悬浮液;

将磁性复合物悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合物;

向洗涤后的磁性复合物中注入化学发光激发液,检测其化学发光光子强度。

10. 根据权利要求9所述的HBeAb化学发光免疫检测试剂盒的应用,其特征在于,所述加热孵育的温度为30-45 $^{\circ}\text{C}$,时间为5-15min。

一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用,属于体外诊断技术领域。

背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus,HBV)感染是全球公共卫生问题。据WHO统计,全球约有20亿人曾经感染过HBV,其中慢性感染者约3.6亿,每年死于HBV感染引发的肝硬化和肝癌患者约100万人。HBV感染引发的公共卫生问题在发展中国家尤为突出,75%的慢性HBV感染发生在亚洲和非洲,我国是传统的乙肝大国,全国约有1.2亿慢性HBV携带者,慢性患者约3000万例,对国民健康造成了严重威胁。

[0003] HBV负链核苷酸包含4个开放阅读框,分别是S、C、P和X,编码的蛋白分别是包膜蛋白(PreS/S)、核心蛋白(PreCore/Core)、聚合酶(polimerase)及X蛋白(HBxAg)。其中,跟HBV血清学诊断相关的主要蛋白为小表面蛋白即HBsAg,二十面体核衣壳蛋白即HBcAg和HBcAg的分泌形式HBeAg,以及人体诊断这三种蛋白产生的三种抗体,分别是乙肝表面抗体(HBsAb)、乙肝e抗体(HBeAb)和乙肝核心抗体(HBcAb),由于HBcAg包裹在病毒内无法用常规的方法检测到,所以在HBV感染免疫学检查时,通常判断HBV感染状况的指标为HBsAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb,即所谓的乙肝“两对半”。

[0004] 乙肝“两对半”出现的顺序通常是HBsAg最早出现,然后是HBeAg,稍后是HBcAb(由于核心抗原的强免疫原性),之后是抗HBeAb(e抗原的免疫原性比核心抗体弱100倍左右),最后出现的是抗HBs(保护性抗体,意味着病毒被中和)。HBeAb的出现是患者体内HBV复制减弱或停止的表征,标示患者的免疫系统由耐受转向激活,预示着患者较好的自愈能力或治疗效果。临床上HBeAg/HBeAb的转换是乙肝病程好转的一个重要标志,因此,HBeAb的检测是“乙肝两对半”检测中的重要一项,是临床医生判断患者治疗效果的重要依据。

[0005] 临床上测定抗原通常用双抗体夹心法,如HBsAg和HBeAg均采用双抗体夹心法来检测。对于抗体的测定方法有双抗原夹心法、间接法、竞争抑制法等,其中双抗原夹心法不论是灵敏度还是特异性均优于后两种,HBsAb的检测通常采用双抗原夹心法的方法,目前临床应用效果比较满意;但HBeAb和HBcAb的检测一般采用竞争法,主要原因是抗原中杂质难以去除,HBeAg较HBcAg仅多29个氨基酸,因此这两种抗原在分离纯化的过程很难达到高纯,彼此互相包含,如果用双抗原夹心法或间接法的话,HBeAb与HBcAb的检测会互相干扰,造成检测的特异性差。

[0006] HBeAb和HBcAb竞争法测定的可靠性在很大程度上受竞争抗体特异性和亲和力大小的影响,但竞争用抗体均为相应抗原免疫动物所的,与机体感染病毒后所产生的抗体肯定有所差异,因而,目前HBeAb和HBcAb的临床检测中,常有难以解释的测定结果出现,这是由竞争法的固有缺陷带来的。还有一点,由于使用大肠杆菌表达的重组抗原,由于纯化技术限制,使得纯化后的抗原常含一定浓度的大肠杆菌,而人体因感染大肠杆菌常含一定的大肠杆菌抗体,故检测结果有一定比例的假阳性。

[0007] 随着基因重组工程技术应用到抗原抗体生产及蛋白纯化技术水平的不断提高,原有的技术难题被不断突破。目前,国内外已研制出真核表达系统表达的重组HBeAg,在特异性、免疫反应性和纯度均优于传统的大肠杆菌表达体系,尤其是纯度方面有大幅度提高,为HBeAb检测方法的优化提供了条件。

[0008] 目前,对于HBeAb的检测,雅培、罗氏均采用中和抑制法,一些国内试剂商为简化操作程序,缩短检测时间,采用HBeAb包被固相板,一步法检测,由于中和试剂、被检样本及标记抗体一步加样,此时中和试剂HBeAg和标本中HBeAg均在液相中,可协同封闭标记抗体的抗原结合位点,假阳性的情况十分突出。更有甚者模仿HBcAb的竞争法模式,直接将HBeAg包被在固相上,由于HBeAg在固相上长时间易转变成HBcAg,因此只要是HBcAb阳性的样本,样本中HBcAb与固相HBcAg结合,标记的HBeAb无法全部结合到固相造成信号减弱而出现假阳性。

发明内容

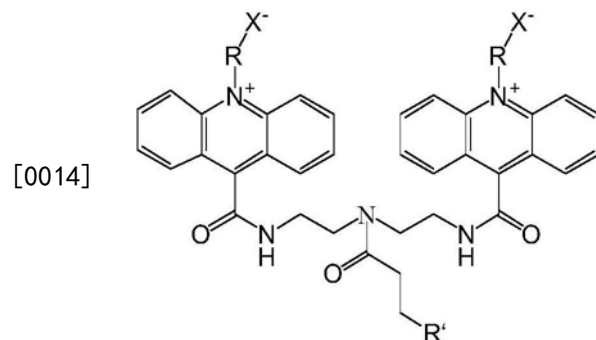
[0009] 本发明要解决的技术问题是:为解决现有乙肝病毒e抗体化学发光免疫检测试剂盒对HBeAb检测准确度低、灵敏度低的技术问题,提供一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用。

[0010] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

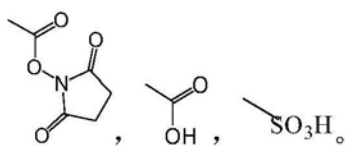
[0011] 一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,包括:生物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液、链霉亲和素标记的磁颗粒试剂、HBeAb校准品溶液、化学发光底物液及清洗液,所述重组HBeAg为真核表达系统表达的重组HBeAg,此真核系统能识别HBeAg前体蛋白的分泌信号肽,实现HBeAg的靶向分泌表达,因此无须裂解细胞来收集产物,来源于细胞培养上清液的重组抗原成分单一,不含干扰检测的菌体蛋白及蛋白酶,无须复杂的下游处理,在特异性、免疫反应性和纯度均优于传统的大肠杆菌表达体系,尤其是纯度方面有大幅度提高。

[0012] 优选地,所述化学发光标记物选自鲁米诺及其衍生物、异鲁米诺及其衍生物、吡啶化合物。

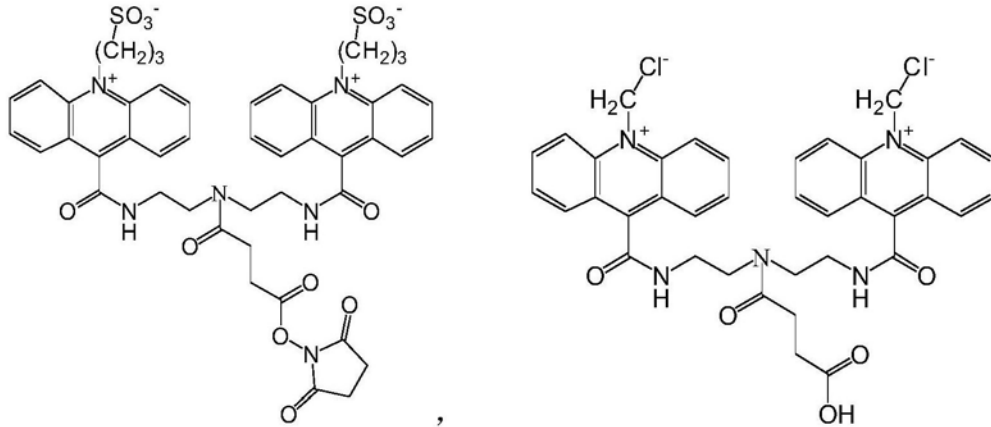
[0013] 优选地,所述化学发光标记物为吡啶化合物,述吡啶化合物的结构如下:



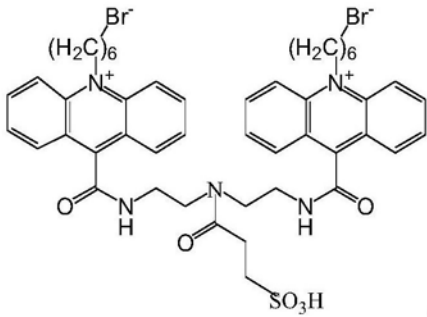
[0015] 所述R为取代或未取代的C₁-C₆亚烷基,X为磺酰基或卤素,R'为



[0016] 优选地,所述吡啶化合物为下述结构中的一种:



[0017]



[0018] 优选地,链霉亲和素包被的磁颗粒为纳米级的 Fe_2O_3 或 Fe_3O_4 磁性粒子和有机高分子材料的复合物,所述有机高分子材料优选为葡聚糖;所述磁颗粒的粒径大小为 $0.1\text{-}5\mu\text{m}$;所述磁颗粒还可以通过表面改性而带有一种或多种活性功能基团,所述活性功能基团为 $-\text{OH}$ 、 $-\text{COOH}$ 或 $-\text{NH}_2$ 。

[0019] 优选地,所述化学发光底物液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含无机酸和过氧化物,所述化学发光激发液2含氢氧化物。

[0020] 本发明还提供一种上述HBeAb化学发光免疫检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0021] 制备生物素标记的重组HBeAg工作液:用浓度为 $0.02\text{-}0.08\text{M}$ 、 pH 为 $8.5\text{-}10.5$ 的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与生物素琥珀酰亚胺酯按 $1:10\sim 20$ 的摩尔比例室温反应 $0.5\sim 1.5$ 小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

[0022] 制备化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液:用浓度为 $0.02\text{-}0.08\text{M}$ 、 pH 为 $8.5\text{-}10.5$ 的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与化学发光标记物按 $1:10\sim 20$ 的摩尔比例室温反应 $0.5\sim 1.5$ 小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

[0023] 以链霉亲和素标记磁颗粒,制备链霉亲和素标记的磁颗粒试剂;

[0024] 配制HBeAb校准品溶液;

[0025] 配制化学发光底物液;

[0026] 配制清洗液;

[0027] 分装上述生物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液、链霉亲和素标记的磁颗粒试剂、HBeAb校准品溶液、化学发光底物液及清洗液,并组装为成品试剂盒。

[0028] 优选地,所述配制化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液的缓冲液中含有0.5-1.5wt%的PEG20000,高聚物PEG20000含大量亲水基团的,能对磁珠实现即时封闭,对非特异性吸附起到更好的封闭效果,从而降低背景值,避免假阳性结果出现。

[0029] 本发明还提供上述HBeAb化学发光免疫检测试剂盒的应用,按照以下步骤使用:

[0030] 将待测抗体样本、生物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液混合,加热孵育,形成抗原-抗体-抗原夹心复合体溶液;

[0031] 于抗原-抗体-抗原夹心复合体溶液中加入链霉亲和素包被的磁颗粒试剂,加热孵育,形成磁性复合物悬浮液;

[0032] 将磁性复合物悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合物;

[0033] 向洗涤后的磁性复合物中注入化学发光激发液,检测其化学发光光子强度。

[0034] 优选地,所述加热孵育的温度为30-45℃,时间为5-15min。

[0035] 本发明的有益效果是:

[0036] 本专利试剂盒对HBeAb的检测创新性地用双抗原夹心法模式检测HBeAb,由HBeAg标记生物素,先将待测样本、生物素标记的重组HBeAg、化学发光标记物标记的重组HBeAg反应形成抗原-抗体-抗原夹心复合体,再加入链霉亲和素包被的磁颗粒试剂,磁颗粒与抗原-抗体-抗原夹心复合体的接触时间短,而且抗原没有直接接触磁珠固相,故不会在固相上转变成HBcAg,利用本发明的试剂盒对HBeAb检测的准确度高,且灵敏度高、特异性好、精密性好,临床适用性强,可以准确地反映出乙肝患者体内HBeAb的量,可替代传统的中和抑制法的检测试剂,在临床应用上具有广阔前景。

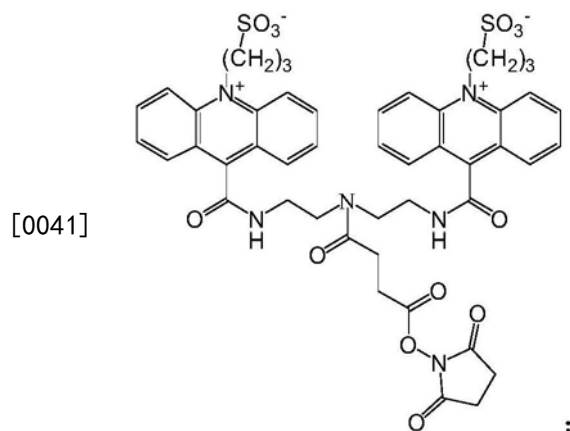
具体实施方式

[0037] 现在对本发明作进一步详细的说明。

[0038] 实施例1

[0039] 本实施例提供了一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:生物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液、链霉亲和素标记的磁颗粒试剂、HBeAb校准品溶液、化学发光底物液及清洗液,所述重组HBeAg为真核表达系统表达的重组HBeAg(深圳菲鹏生物股份有限公司,HBeAg-8#);

[0040] 所述化学发光标记物为吖啶化合物,所述吖啶化合物的结构如下:



[0042] 所述链霉亲和素包被的磁颗粒为纳米级的Fe₂O₃磁性粒子和葡聚糖的复合物,所述磁颗粒的粒径大小为0.1-5μm;

[0043] 所述化学发光激发液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含0.1M硝酸和1wt%过氧化氢,所述化学发光激发液2含0.1M氢氧化钠;

[0044] 所述生物素标记的重组HBeAg工作液采用以下方法制备:用浓度为0.02M、pH为8.5的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与生物素琥珀酰亚胺酯按1:10的摩尔比例室温反应0.5小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

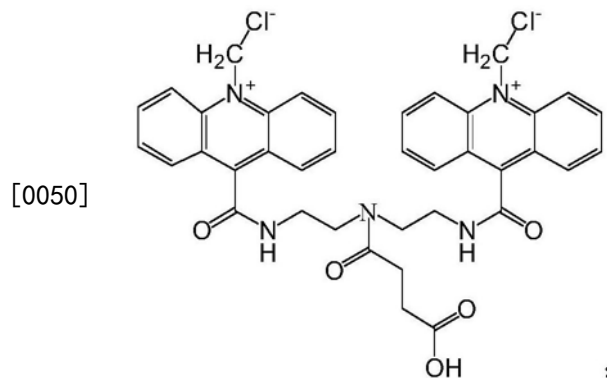
[0045] 所述化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液采用以下方法制备:用浓度为0.02M、pH为8.5、含有0.5wt% PEG20000的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与化学发光标记物按1:10的摩尔比例室温反应0.5小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

[0046] 所述清洗液为:浓度为10mM、pH为7.4的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液,所述缓冲液含有1wt%的NaCl和0.05wt%的Tw-20。

[0047] 实施例2

[0048] 本实施例提供了一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:生物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液、链霉亲和素标记的磁颗粒试剂、HBeAb校准品溶液、化学发光底物液及清洗液,所述重组HBeAg同实施例1;

[0049] 所述化学发光标记物为吖啶化合物,所述吖啶化合物的结构如下:



[0051] 所述链霉亲和素包被的磁颗粒为纳米级的 Fe_3O_4 磁性粒子和葡聚糖的复合物,所述磁颗粒的粒径大小为0.1-5 μm ;

[0052] 所述化学发光激发液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含0.1M硝酸和1wt%过氧化氢,所述化学发光激发液2含0.1M氢氧化钠;

[0053] 所述生物素标记的重组HBeAg工作液采用以下方法制备:用浓度为0.05M、pH为9.5的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与生物素琥珀酰亚胺酯按1:15的摩尔比例室温反应1小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

[0054] 所述化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液采用以下方法制备:用浓度为0.05M、pH为9.5、含有1wt% PEG20000的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与化学发光标记物按1:15的摩尔比例室温反应1小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

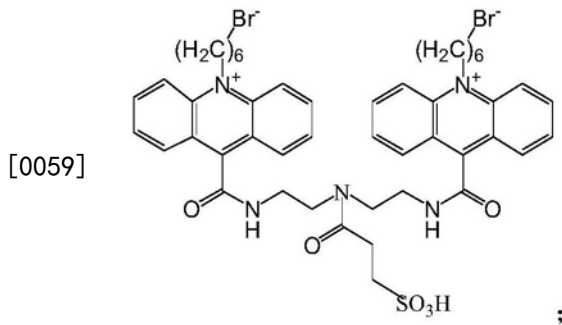
[0055] 所述清洗液为:浓度为10mM、pH为7.4的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液,所述缓冲液含有1wt%的NaCl和0.05wt%的Tw-20。

[0056] 实施例3

[0057] 本实施例提供了一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒,所述试剂盒包括:生物素标

记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液、链霉亲和素标记的磁颗粒试剂、HBeAb校准品溶液、化学发光底物液及清洗液,所述重组HBeAg同实施例1;

[0058] 所述化学发光标记物为吖啶化合物,所述吖啶化合物的结构如下:



[0060] 所述链霉亲和素包被的磁颗粒为纳米级的 Fe_2O_3 磁性粒子和葡聚糖的复合物,所述磁颗粒的粒径大小为 $0.1\text{-}5\mu\text{m}$;

[0061] 所述化学发光激发液包括化学发光激发液1和化学发光激发液2,所述化学发光激发液1含 0.1M 硝酸和 $1\text{wt}\%$ 过氧化氢,所述化学发光激发液2含 0.1M 氢氧化钠;

[0062] 所述生物素标记的重组HBeAg工作液采用以下方法制备:用浓度为 0.08M 、 pH 为 10.5 的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与生物素琥珀酰亚胺酯按 $1:20$ 的摩尔比例室温反应 1.5 小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

[0063] 所述化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液采用以下方法制备:用浓度为 0.08M 、 pH 为 10.5 、含有 $1.5\text{wt}\%$ PEG20000的缓冲液配制重组HBeAg溶液,将重组HBeAg溶液与化学发光标记物按 $1:20$ 的摩尔比例室温反应 1.5 小时,透析去除未交联的小分子,加入等体积甘油;

[0064] 所述清洗液为:浓度为 10mM 、 pH 为 7.4 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 缓冲液,所述缓冲液含有 $1\text{wt}\%$ 的 NaCl 和 $0.05\text{wt}\%$ 的Tw-20。

[0065] 对比例1

[0066] 本实施例提供一种基于双抗原夹心法的乙肝E抗体体外诊断试剂盒,所述试剂盒包括:1)已包被于固相载体的重组HBeAg;2)已进行酶标记的重组HBeAg;3)底物液,所述重组HBeAg同实施例1,所述试剂盒的制备方法如下:

[0067] 一、微孔板的制备

[0068] (1)包被

[0069] 0.05M pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液为包被稀释液,与HBeAg混合均匀后负载于微孔板上。

[0070] 具体地,所述包被方法包括:

[0071] Na_2CO_3 1.6g

[0072] NaHCO_3 2.9g

[0073] 蒸馏水 1000ml

[0074] 缓冲液完全溶解混匀后,加入 2mg 的HBeAg混匀,然后向微孔板的每个孔加入HBeAg的稀释液 0.1ml 。 37°C 放置 12 小时。

[0075] (2)洗板

[0076] 使用生理盐水为洗涤液。将微孔板内的HBeAg稀释液甩掉后,用生理盐水洗涤 2 次。

最后排干微孔板。

[0077] (3) 封闭

[0078] 0.01M pH为7.2的磷酸盐缓冲液 (PB), 含有水解酪蛋白和表面活性剂的溶液, 负载到微孔板上。

[0079] 具体地, 所述封闭方法包括:

NaH₂PO₄·2H₂O 0.2g

Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g

[0080] 水解酪蛋白 20g

Tween-20 0.5ml

蒸馏水 1000ml

[0081] 将它们混合至完全溶解后, 向微孔板上的每个孔加入0.11ml, 于37℃放置2小时, 之后, 把孔内的溶液甩掉, 排干、晾干。

[0082] (4) 包装

[0083] 将晾干的微孔板装入锡箔袋内, 加入一个防潮剂后, 用真空包装机封装。贴签后放入4-8℃存放。

[0084] 二、酶标记抗原的制备

[0085] (1) HBeAg的酶标记

[0086] HBeAg的标记采用MBS方法。该方法使用的酶为辣根过氧化物酶 (HRP)。具体地, 所述方法包括:

[0087] a) 将8mg HRP溶于0.1M的PB (pH7.0) 1ml中;

[0088] b) 用0.1ml二甲基酰胺溶解8mg MBS, 加入到HRP溶液中, 室温反应1小时;

[0089] c) 离心去除沉淀后, 用G25凝胶柱层析去除过量的MBS, 缓冲液为pH5.0 0.05M醋酸盐缓冲液;

[0090] d) 将已处理的酶液浓缩;

[0091] e) 把10mgHBeAg单体加入到酶液中, 室温反应1小时;

[0092] f) 将反应液过凝胶层析柱, 将偶联物和未偶联物分离, 收集偶联物;

[0093] g) 将偶联液过已偶联单克隆乙肝E抗体sepharose-4B亲和柱, 收集穿过峰。

[0094] h) 将穿过峰浓缩, 浓缩到适当体积后加入等量甘油, 冷冻保存。

[0095] (2) 酶稀释液的配制

[0096] 0.01M pH7.2的磷酸盐缓冲液, 含有小牛血清、防腐剂 and 表面活性剂的溶液。

[0097] 具体地, 所述配制方法包括:

NaH₂PO₄·2H₂O 0.2g

Na₂HPO₄·12H₂O 2.9g

小牛血清 200ml

[0098]

Tween-20 0.5ml

Proclin300 0.1ml

蒸馏水 800ml

[0099] 将它们混合至完全溶解。

[0100] (3) 酶标记HBeAg的稀释

[0101] 取2ml酶标记HBeAg,加入到50ml的酶稀释液,震荡混匀。然后再把其加入到950ml的酶稀释液中,回旋摇晃试剂瓶20分钟以上。测定混匀后,取样品测定,合格后,贴签后放入4-8℃存放。

[0102] (4) 分装

[0103] 按照每个包装瓶6ml的标准,精确地把已稀释好的酶标记HBeAg分装。

[0104] 三、显色液的配制

[0105] 本方法采用TMB为底物。显色液分为A液和B液配制,分别存放,在使用时等比例混合。具体方法包括:

[0106] 1) 显色液A(100ml,PH 4.7)的配制:

柠檬酸 0.86g

柠檬酸三钠 1.735g

[0107]

H₂O₂ 50μL

蒸馏水 100ml

[0108] 将它们混合至完全溶解。

[0109] 2) 显色液B(100ml,PH 4.7)的配制:

柠檬酸 0.8256g

柠檬酸三钠 1.6656g

蔗糖 6g

[0110]

蒸馏水 96ml

TMB 0.026g

DMSO 4ml。

[0111] 将它们混合至完全溶解。

[0112] 3) 取显色液A和B样品进行测定,符合质量要求后分装。按照每个包装瓶6ml的标准分装。分装完成后,贴签,放到避光处4-8℃存放。

[0113] 四、终止液的配制

[0114] 终止液为2M硫酸。具体地方法包括:

[0115] 浓硫酸 200ml

[0116] 蒸馏水 800ml

[0117] 溶液混合均匀后,分装。按照每个包装瓶6ml的标准分装。分装完成后,贴签于室温存放。

[0118] 五、洗涤液的配制

Tris 24g

[0119] NaCl 160g

KCl 4g

HCl 15ml

[0120]

蒸馏水 1000ml

[0121] 按照每个包装瓶20ml的标准分装。

[0122] 效果例1

[0123] 采用实施例1、实施例2的试剂盒、实施例3的试剂盒、对比例1的试剂盒、雅培的ARCHITECT试剂盒(乙型肝炎病毒e抗体测定试剂盒)、罗氏的elecsys试剂盒(乙型肝炎病毒e抗体检测试剂盒)对25例小三阳(HBsAg+,HBeAb+,HBcAb+)样本进行检测,采用实施例1的试剂盒、实施例2的试剂盒、实施例3的试剂盒检测的步骤如下:

[0124] 将25μL待测抗体样本、100μL浓度为100ng/mL生物素标记的重组HBeAg工作液、100μL浓度为100ng/mL化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液混合,37℃下孵育10min,形成抗原-抗体-抗原夹心复合体溶液;

[0125] 于抗原-抗体-抗原夹心复合体溶液中加入20μL浓度为100ng/mL链霉亲和素包被的磁颗粒试剂,37℃下孵育10min,形成磁性复合物悬浮液;

[0126] 将磁性复合物悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合物;

[0127] 向洗涤后的磁性复合物中注入100μL化学发光激发液1,1.5秒后,注入100μL化学发光激发液2,检测其化学发光光子强度,最后通过校准曲线测出待测样本中HBeAb浓度。

[0128] 采用对比例1的试剂盒检测的步骤如下:

[0129] 1) 加样:

[0130] 预包反应板(条),每板设阴、阳性对照各2孔,每孔加50μl。设空白对照1孔(不加任何试剂),其余各孔加待检血清50μl。每孔再加酶结合物50μl(或1滴),充分摇匀后置37℃保温30分钟;

[0131] 2) 洗板:

[0132] 甩去各孔液体,用洗液加满各孔,静置10秒钟后甩干,如此再洗三次,最后拍干;

[0133] 3) 显色:

[0134] 每孔(包括空白孔)加入显色液A50 μ l(或1滴)、再加入显色液B 50 μ l(或1滴),充分摇匀后,置37 $^{\circ}$ C显色15分钟;

[0135] 4) 终止:

[0136] 每孔加终止液50 μ l(或1滴)终止反应。

[0137] 5) 结果判定:

[0138] 用波长450nm校准空白孔OD=0,然后测定各孔OD值,并按下列公式计算结果: $S/N = \text{被检血清OD值} / \text{阴性对照平均OD值}$, $S/N \geq 2.1$ 为阳性, $S/N < 2.1$ 为阴性,阴性对照OD值 < 0.07 时,按0.07计算, > 0.07 时按实际OD值计算。

[0139] 采用雅培试剂盒检测(化学发光微粒子免疫检测法)的步骤如下:

[0140] 将25 μ L样本、100 μ L中和抗原(HBeAg)和100 μ L抗-HBe(鼠单抗)包被的顺磁性微粒子混合,37 $^{\circ}$ C下孵育10min,形成磁性复合体溶液;

[0141] 将磁性复合物悬浮液置于磁场内,洗涤所述磁性复合物;

[0142] 加入吖啶酯标记的抗-HBe结合物,37 $^{\circ}$ C下孵育10min,形成吖啶酯标记的磁性复合物悬浮液;

[0143] 将吖啶酯标记的磁性复合物悬浮液置于磁场内进行洗涤;

[0144] 加入100 μ L预激发液和100 μ L激发液到反应混合物中,测量化学发光反应结果,最后通过校准曲线测出待测样本中HBeAb浓度。

[0145] 采用罗氏的试剂盒检测(电化学发光法)的步骤如下:

[0146] 将35 μ L待测抗体样本与100 μ L HBe抗原结合;

[0147] 加入100 μ L生物素标记的抗体、100 μ L钕复合物标记的抗体及20 μ L链霉亲和素包被的磁颗粒,37 $^{\circ}$ C下孵育10min,形成免疫复合物溶液;

[0148] 将免疫复合物溶液置于测量池中,磁颗粒通过磁体吸附到电极上,未结合的物质被清洗液吸取,电极加电压后产生化学发光,通过光电倍增管进行测定。Elecsys自动将标本产生的光电信号与从Anti-HBe定标液得出的cutoff值进行比较。

[0149] 结果如表1:采用实施例1、实施例2的试剂盒、实施例3的试剂盒检测25例小三阳样本,结果全部为小三阳;采用雅培的试剂盒检测25例小三阳样本,准确率为96%;采用罗氏的试剂盒检测25例小三阳样本,准确率为92%;采用对比例1的试剂盒检测25例小三阳样本,结果7例检测为1,5模式(HBsAg+,HBeAb+),其余18例检测为小三阳模式;可见,采用对比例1的试剂盒检测HBeAb会有部分漏检,究其原因,就是因为HBeAg在微孔板上部分转变成了HBcAg,不能跟HBeAb形成HBeAg-HBeAb-HBeAg-HRP的夹心复合体而漏检,而采用实施例1的试剂盒进行检测时,由于HBeAg标记生物素,一直处于液体试剂中,只有到最后反应的10分钟时间里跟磁珠通过链霉亲和素-生物素系统间接接触,不仅接触时间短,而且没有直接接触磁珠固相,故不会在固相上转变成HBcAg,不会漏检。

[0150] 另外,由于本专利采用的是链霉亲和素包被的磁珠做固相,相对于板式固相而言,抗原抗体反应更少受固相的空间位阻反应,故而精密性更好。

[0151] 表1 25例小三阳样本的检测结果

[0152]

	准确率	精密度
实施例 1 的试剂盒	100%	4.8%
实施例 2 的试剂盒	100%	4.5%
实施例 3 的试剂盒	100%	4.3%
对比例 1 的试剂盒	54%	10%
雅培的试剂盒	96%	5.8%
罗氏的试剂盒	92%	6.5%

[0153] 效果例2

[0154] 采用实施例1的试剂盒、实施例2的试剂盒、实施例3的试剂盒、效果例1所用的雅培的试剂盒、效果例1所用的罗氏的试剂盒对1000例阴性健康样本进行检测,具体检测的步骤同效果例1;

[0155] 结果:采用实施例1的试剂盒、实施例2的试剂盒、实施例3的试剂盒检测1000例阴性健康样本的HBeAb阳性结果依次为2例、1例、1例,而采用雅培的试剂盒、罗氏的试剂盒检测1000例阴性健康样本的HBeAb阳性结果依次为12例、17例。此对比试验说明,相比于传统的中和抑制法(采用雅培的试剂盒、罗氏的试剂盒进行的检验),采用实施例1、2、3的试剂盒进行HBeAb检验(双抗原夹心法)的特异性更好。

[0156] 以上述依据本发明的理想实施例为启示,通过上述的说明内容,相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内,进行多样的变更以及修改。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容,必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。

专利名称(译)	一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109239347A	公开(公告)日	2019-01-18
申请号	CN201811245702.0	申请日	2018-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	苏州长光华生物医学工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州长光华生物医学工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州长光华生物医学工程有限公司		
[标]发明人	欧赛英 邱春明 徐滕		
发明人	欧赛英 邱春明 徐滕		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/58 G01N33/543 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/5761 G01N21/76 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/54346 G01N33/58		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种HBeAb化学发光免疫检测试剂盒及其制备方法和应用，所述试剂盒包括：生物素标记的重组HBeAg工作液、化学发光标记物标记的重组HBeAg工作液、链霉亲和素标记的磁颗粒试剂、HBeAb校准品溶液、化学发光底物液及清洗液，所述重组HBeAg为真核表达系统表达的重组HBeAg。本专利试剂盒对HBeAb的检测创新性地采用双抗原夹心法模式，由HBeAg标记生物素，先将待测样本、生物素标记的重组HBeAg、化学发光标记物标记的重组HBeAg反应形成抗原-抗体-抗原夹心复合体，再加入链霉亲和素包被的磁颗粒试剂，对HBeAb检测的准确度高，且精密性、特异性好，临床适用性强。

