

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610087496.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010年1月13日

[11] 授权公告号 CN 100580453C

[22] 申请日 2006.6.12

[21] 申请号 200610087496.6

[73] 专利权人 北京热景生物技术有限公司

地址 100070 北京市丰台区科学城航丰路  
8号中关村丰台园生命科学孵化中  
心420室

[72] 发明人 林长青

[56] 参考文献

CN1512178A 2004.7.14

WO02/12258A1 2002.2.14

US2003/0216546A1 2003.11.20

WO03/106498A2 2003.12.24

CN1704756A 2005.12.7

审查员 李冰

[74] 专利代理机构 北京市卓华知识产权代理有限公司

代理人 陈子英

权利要求书2页 说明书20页 附图2页

[54] 发明名称

评价乙肝患者机体免疫力水平的检测试剂盒  
及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及了一种评价乙肝患者机体免疫力水平的方法、应用于该方法的一种检测核心抗体亚类 IgG3 和 IgG1 的酶联免疫试剂盒和一种检测核心抗体亚类 IgG3 和 IgG1 的化学发光检测试剂盒及其制备方法。所述方法包括下列步骤：(1) 检测核心抗体亚类 IgG3 和 IgG1；(2) 计算 IgG3 和 IgG1 的比值；(3) 根据 IgG3 和 IgG1 的比值评估乙肝患者机体清除病原体的能力，预测乙肝治疗效果和预后。所述各试剂盒采用所述方法，对人血清中的乙肝核心抗原抗体中的亚类 IgG3 和 IgG1 进行检验。本发明可用于乙型肝炎病毒的发展水平、预后诊断，治疗效果评价等。

1、一种检测核心抗体亚类 IgG3 和 IgG1 的酶联免疫试剂盒，包括下列组件：

- (1) 包被了乙肝核心抗原的酶标板；
- (2) 酶工作液；
- (3) 酶联反应底物溶液、显色液、反应终止液和清洗缓冲液，

所述的底物溶液为磷酸-柠檬酸缓冲液配制的 3%过氧化氢溶液；显色液为四甲基联苯胺甲醇溶液，浓度为 0.1mg/ml；反应终止液为 2mol/L 硫酸；清洗缓冲液为 PBS 配制的 0.05%吐温 20 溶液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒的制作方法，包括以下步骤：

- (1) 获得乙肝核心抗原，包被到酶标板吸附过夜；
- (2) 用吐温磷酸盐缓冲液洗板，再用含牛血清白蛋白的吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜，甩干后晾干；
- (3) 获得酶标记物鼠抗人 IgG3 单克隆抗体和鼠抗人 IgG1 单克隆抗体；
- (4) 将酶标记物分别溶解于含有小牛血清白蛋白的溶解液中，配成酶工作液 1、酶工作液 2；
- (5) 将酶标板、各酶工作液、酶联反应底物溶液、显色液、反应终止液和清洗缓冲液共同包装，得到试剂盒。

3、如权利要求 1 或 2 所述的试剂盒的制作方法，其特征在于所述酶标单克隆抗体的制备采用下列步骤：

- (a) NaIO<sub>4</sub>-乙二醇法进行 HRP 的氧化，达到终浓度 10mg/ml；
- (b) 单克隆抗体和 HRP 在碱性碳酸盐缓冲液中透析 6 小时，实现 HRP 对单克隆抗体的标记，反应结束后用 NaBH<sub>4</sub> 溶液终止反应，再对 PBS 透析过夜；
- (c) 用饱和硫酸铵沉淀，获得纯化的 HRP 酶标鼠抗人 IgG1 或 IgG3 单克

隆抗体。

4、一种检测核心抗体亚类 IgG3 和 IgG1 的化学发光检测试剂盒，包括下列组件：

- (1) 包被了乙肝核心抗原的化学发光酶标板；
- (2) 酶工作液；
- (3) 酶联反应底物溶液、显色液、清洗缓冲液、标准品。

所述的底物溶液为 1.0ml EDTA、1.0ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、0.4ml HCl、0.2ml 吐温 20；显色液为 luminol；清洗缓冲液为 PBS 配制的 0.05%吐温 20 溶液；标准品包括人核心抗体 IgG3 和人核心抗体 IgG1 标准品。

5、如权利要求 4 所述的试剂盒的制作方法，包括以下步骤：

- (1) 获得乙肝核心抗原，包被到化学发光酶标板吸附过夜；
- (2) 用吐温磷酸盐缓冲液洗板，再用含牛血清白蛋白的吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜，甩干后晾干；
- (3) 获得酶标记物鼠抗人 IgG3 单克隆抗体和鼠抗人 IgG1 单克隆抗体；
- (4) 将酶标记物分别溶解于含有小牛血清白蛋白的溶解液中，配成酶工作液 1、酶工作液 2；
- (5) 将酶标板、各酶工作液、酶联反应底物溶液、显色液、清洗缓冲液、标准品共同包装，得到试剂盒。

6、如权利要求 4 或 5 所述的试剂盒的制作方法，其特征在于所述酶标单克隆抗体的制备采用下列步骤：

- (a) NaIO<sub>4</sub>-乙二醇法进行 HRP 的氧化，达到终浓度 10mg/ml；
- (b) 单克隆抗体和 HRP 在碱性碳酸盐缓冲液中透析 6 小时，实现 HRP 对多克隆抗体的标记，反应结束后用 NaBH<sub>4</sub> 溶液终止反应，再对 PBS 透析过夜；
- (c) 用饱和硫酸铵沉淀，获得纯化的 HRP 酶标鼠抗人 IgG1 或 IgG3 单克隆抗体。

## 评价乙肝患者机体免疫力水平的检测试剂盒 及其制备方法

### 技术领域

本发明涉及了一种评价乙肝病毒感染者机体免疫力水平的方法,还涉及应用于该方法的两种检测试剂盒及其制备,该方法通过检测乙肝核心抗原抗体亚类 IgG3/IgG1 比值评价乙肝病毒感染者的免疫力水平,其检测结果同乙肝五项指标、ALT 的检测结果对照,对判断 HBV 病毒在体内的发展和治疗情况的预后有重要的指导意义。

### 背景技术

乙型肝炎是由乙型肝炎病毒 (HBV) 引起的全球性传染病,据估计,全世界目前大约有 3 亿乙肝病毒携带者,且这一数字还在增加。其中,中国是乙型肝炎的高流行区,据我国 70 年代末和 90 年代初两次全国肝炎的流行病学调查的数据显示,我们国家感染过乙肝病毒的人有 6.9 亿,感染率是 57.6%,长期携带乙肝病毒的人有 1.2 亿,乙肝病毒表面抗原的携带率 9.75%,历年累积下来,现有慢性乙肝病人约两千多万。HBV 属嗜肝病毒家族,可引起急性肝炎、慢性肝炎和肝硬化,而且与肝癌的发生有密切的关系。

CD4+细胞是调节免疫应答的一类重要调节性细胞,具有辅助体液免疫和细胞免疫的功能。1986 年 Mosmann 据其产生的细胞因子的不同,将小鼠 CD4+细胞分为 Th1 和 Th2 两个亚群, Th1 主要分泌 IL-2、IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ , 主要参与诱导细胞免疫反应和产生 IgG2a 型抗体, Th2 主要分泌 IL-4、IL-5、IL-10、IL-13 等细胞因子,刺激 B 细胞增殖和分化,主要参与介导体液免疫和产生 IgG1 和 IgE 型抗体。Th1、Th2 相互调节、相互制约,共同维持机体的免疫状态。随着对 Th1 和 Th2 的研究逐步深入,发现在人类也存在 Th1 和 Th2 细胞,现在已经明确 Th1 / Th2 型细胞因子可以调节机体的免疫反应,影响免疫应答的格

局。人 TH2 通过分泌 IL-4 和 IL-5 辅助 IgG1 和 IgA 合成,分泌 IL-10,抑制 TH1 细胞合成细胞因子,而 TH1 对 IgG1 合成则有抑制作用,但辅助其他几种类型 IG 的合成,包括 IgG3 的合成。因此 TH2 功能与抗体亚类 IgG1 产量相关,TH1 功能与抗体亚类 IgG3 产量相关。

免疫学研究表明 TH1/TH2 应答能反映机体对病原体清除的能力。TH1 和 TH2 型细胞因子的平衡是机体处于正常状态的保证,二者失衡是感染、自身免疫病、变态反应、器官移植排斥反应、肿瘤发生与恶化的重要促进因素。在 HBV 感染中,机体能否建立有效清除 HBV 的保护性免疫有赖于免疫系统中的细胞免疫和体液免疫,而免疫应答过程需要多种免疫细胞的参与,其中 Th 细胞起重要作用。

研究已经证实乙型肝炎的发生和发展与机体的免疫功能密切相关。许多临床表明,慢乙肝的发展和后果主要取决于宿主的免疫应答。

一般认为 Th1 免疫应答能增强宿主对感染(尤其是胞内病原体)的免疫应答和防御功能,而 Th2 应答则与感染的进展、持续性和慢性化有关,Th1 和 Th2 所介导的免疫反应通常是通过自己分泌的细胞因子互相抑制的,既总是一个较另外一个具有优势。以往的研究已经证实,在乙肝慢性者外周血中 TH2 占优势,TH1 较弱。

在慢性肝炎 TH1 和 TH2 的对比中,TH1 类细胞因子明显降低( $P < 0.001$ ),TH2 类细胞则升高( $P < 0.001$ ),即在慢性肝炎中,细胞免疫下降,而体液免疫加强,TH1 / TH2 类细胞免疫应答出现了失衡,可见 TH2 类细胞因子水平上升与感染慢性化相关;目前的研究显示,TH2 型细胞应答与病情慢性化有关,TH2 型应答愈占优势,炎症反应愈趋向于慢性化。各型慢性肝炎中,TH1 类细胞因子均降低,TH2 类细胞因子则升高。自限性 HBV 急性感染期间以 Th1 应答为主,恢复期表现以 Th0 细胞应答占优(即同时分泌 Th1 类和 Th2 类细胞因子),但分泌水平均下降。因此机体对 HBV 的免疫应答失衡是慢性乙型肝炎的重要发生机

制之一，表现为 Th1 型免疫低下而 Th2 型免疫亢进。Th1 型免疫低下致使免疫系统不能产生足量的 Tc 细胞及 Th1 型细胞因子以杀伤、破坏病毒感染的靶细胞和抑制病毒基因的复制及表达，机体不能及时清除病毒；Th2 型细胞因子则进一步抑制 Th1 型免疫应答；病毒抗原的持续刺激又诱导特异性 T 细胞凋亡或无能，因此形成宿主对病毒抗原的免疫耐受；最终导致了 HBV 的慢性持续感染。

因此如何检测宿主（即患者）的免疫应答对于有效治疗和预后预示都是具有重大意义。

当前判断疾病免疫发病机制中 Th1 或 Th2 细胞效应为主导的方法，主要是依据炎症组织局部细胞因子的表达，也可根据外周血清中抗体反应，如 IgG 亚类的变化进行判断。细胞因子检测方法既检测 TH1 相关的 IL-2、IFN  $\gamma$  和 TH2 相关的 IL-4、IL-10。本方法检测指标较多，联合评价方法复杂。由于已经知道 TH2 与抗体亚类 IgG1 相关，TH1 与抗体亚类 IgG3 相关，因此检测抗体的亚类是个可以选择的方向。

乙型肝炎病毒核心抗原 (hepatitis B virus core antigen, HBcAg) 蛋白由 183~185 个氨基酸残基(各亚型之间稍有不同)组成，相对分子质量为 21 000，其 C 端富含精氨酸，有结合核酸 RNA 的能力，并与其组装成乙肝核心颗粒有关，同时也含有多种蛋白酶作用位点，N 端的 1~144 位氨基酸残基是真正的颗粒装配区。HBcAg 能够直接激活 B 细胞，是典型的 T 细胞非依赖性抗原。同时 HBcAg 也是强有效的 T 细胞免疫原，即也是 T 细胞依赖性抗原。

HBcAg 为强免疫原，几乎在所有 HBV 感染中均可出现抗-HBc 和 T 细胞应答。乙肝感染后，HBcAb 在绝大部分患者体液内都可以获得，目前所检测方法均为测总抗体方法，没有对其抗体亚类进行检测。在多种病毒和寄生虫的免疫机制中发现，患者感染后血液中总的 IgG 也许是正常，但是 IgG 某些亚类是缺陷的，而不同亚类 IgG 与肌体免疫保护力相关，因此此时正常水平总的 IgG 可能是误导，不能起到诊断的作用。

目前临床上缺乏简便的手段来衡量乙肝患者自身对病源体清除的能力。申请人研究发现了检测乙肝核心抗体中的 IgG3 和 IgG1 亚类的比值可以反映乙肝患者体内 TH1/TH2 的平衡, 并发现这对指标联合检测可以预示疾病恢复, 肌体免疫力。对不同人群乙肝抗体亚类 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 进行分析, 发现乙肝核心抗体 IgG3 亚类与 IgG1 亚类的比率是预示肝炎疾病转归的指示性指标。由于 IgG3/IgG1 被认为可以反映 TH1/TH2 的相关情况, 因此检测 IgG3/IgG1 可以用于评价乙肝病毒感染者免疫力水平。本方法较采用双抗体夹心 ELISA 法检测血清 TH1 型细胞因子 (IL-2、IFN  $\gamma$ ) 和 TH2 型细胞因子 (IL4、IL-10) 水平判断 TH1/TH2 更为简便。

#### 发明内容

为克服现有技术的上述缺陷, 本发明提供了一种简便有效的评价乙肝患者机体免疫力水平的方法, 还提供了应用于该方法的两种检测试剂盒及其制备方法。采用本发明的方法和产品, 可以更好地评估乙型肝炎感染后机体的免疫情况, 更好地评价治疗效果和预后情况, 并配合现有的检测技术, 为乙肝患者的治疗提供帮助。

本发明提供的评价乙肝患者机体免疫力水平的方法, 包括下列步骤:  
(1) 检测核心抗体亚类 IgG3 和 IgG1; (2) 计算 IgG3 和 IgG1 的比值; (3) 根据 IgG3 和 IgG1 的比值评估乙肝患者机体清除病原体的能力, 预测乙肝治疗效果和预后。

其中所述核心抗体亚类 IgG3 和 IgG1 的检测方法可以采用下列方法中的一种或几种: 酶联免疫吸附实验方法、化学发光检测方法、时间分辨方法、流式细胞仪。

如 IgG3/IgG1 的比值小于 1, 说明机体免疫能力不完善, 比值越小说明免疫能力越不完善; 随着比值升高, 显示机体免疫能力趋向完善, 如果 IgG3/IgG1 的比值大于 1, 说明机体免疫能力较好, 治疗有效。

本发明提供一种试剂盒为检测核心抗体亚类 IgG3 和 IgG1 的酶联免疫试剂盒，其包括包被了乙肝核心抗原的酶标板、酶工作液、酶联反应底物溶液、显色液、反应终止液和清洗缓冲液。

这种试剂盒的制作方法如下：

- (1) 获得乙肝核心抗原，包被到酶标板吸附过夜；
- (2) 用吐温磷酸盐缓冲液洗板，再用含牛血清白蛋白的吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜，甩干后晾干；
- (3) 获得酶标记物鼠抗人 IgG3 单克隆抗体和鼠抗人 IgG1 单克隆抗体；
- (4) 将酶标记物分别溶解于含有小牛血清白蛋白的溶解液中，配成酶工作液 1、酶工作液 2；
- (5) 将酶标板、各酶工作液、酶联反应底物溶液、显色液、反应终止液和清洗缓冲液共同包装，得到试剂盒。

其中：所述包被板制作的过程为：包被乙肝核心抗原，该核心抗原可以是病毒中提取也可以是基因工程重组蛋白，具有生物高活性，经过电泳鉴定，蛋白纯度超过 90%。将此抗原用碳酸缓冲液体 (CB Buffer) 稀释成低浓度进行包被，包被载体为聚苯乙烯塑料板。包被时每孔 100 $\mu$ l，吸附过夜，用吐温磷酸盐缓冲液洗板，再用含牛血清白蛋白的吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜，甩干后晾干，即获得核心抗原包被酶标板，酶标板可选用国产板或进口板，规格可以是 96 孔平板或 12 $\times$ 8、12 $\times$ 4 可拆条板；

所述酶工作液的制备过程为：将酶标记物 HRP (辣根过氧化物酶) 标记的鼠抗人 IgG3 单克隆抗体和 HRP 标记鼠抗人 IgG1 单克隆抗体，分别溶解于含有小牛血清白蛋白的溶解液中，配成酶工作液 1、酶工作液 2；

所述酶标单克隆抗体的制备可以采用下列步骤：

- (a) NaIO<sub>4</sub>-乙二醇法进行 HRP 的氧化，达到终浓度 10mg/ml；
- (b) 单克隆抗体和 HRP 在碱性碳酸盐缓冲液中透析 6 小时，实现 HRP 对

单克隆抗体的标记，反应结束后用  $\text{NaBH}_4$  溶液终止反应，再对 PBS 透析过夜；

(c) 用饱和硫酸铵沉淀，获得纯化的 HRP 酶标鼠抗人 IgG1 或 IgG3 单克隆抗体。

所述辅助试剂的配制过程为：

(a) 底物溶液：磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 配制的 3% 过氧化氢溶液；

(b) 显色液：四甲基联苯胺 (TMB) 甲醇溶液，浓度为 0.1mg/ml；

(c) 反应终止液：2mol/L 硫酸；

(d) 清洗缓冲液 (20 倍浓缩液, 20 $\times$ )：PBS (pH7.4) 配制的 0.05% 吐温 20 溶液。

检测方法包括下述步骤：

(1) 抗原-抗体反应：在包被板的 2 个微孔中分别加入 50 $\mu\text{l}$  待测血清样品，进行温育：37 $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 30 分钟；

(2) 加酶：2 个微孔中分别加入酶工作液 1 和酶工作液 2，进行温育：37 $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 30 分钟；

(3) 显色反应：每孔依次加入底物溶液，显色液各 50 $\mu\text{l}$ ，37 $^{\circ}\text{C}$  水浴保温 10 分钟，每孔再加入 50 $\mu\text{l}$  反应终止液结束反应；

(4) 测量：以空白对照孔的吸光值调零，用酶标仪在 450nm 测定 OD 值并记录；

(5) 结果判断：对比 IgG3 和 IgG1 的显色 OD 值，IgG3/IgG1 比值越小，说明机体清除病原体能力越差，IgG3/IgG1 比值越大，说明机体清除病原体能力越好，比值升高或者大于 1 说明即将恢复或已经恢复。

本发明提供的另一种试剂盒为检测核心抗体亚类 IgG3 和 IgG1 的化学发光检测试剂盒，其包括包被了乙肝核心抗原的酶标板；酶工作液；酶联反应底物溶液、显色液、清洗缓冲液、标准品。

这种试剂盒的制作方法包括以下步骤：

- (1) 获得乙肝核心抗原，包被到化学发光酶标板吸附过夜；
- (2) 用吐温磷酸盐缓冲液洗板，再用含牛血清白蛋白的吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜，甩干后晾干；
- (3) 获得酶标记物鼠抗人 IgG3 单克隆抗体和鼠抗人 IgG1 单克隆抗体；
- (4) 将酶标记物分别溶解于含有小牛血清白蛋白的溶解液中，配成酶工作液 1、酶工作液 2；
- (5) 将酶标板、各酶工作液、酶联反应底物溶液、显色液、清洗缓冲液、标准品共同包装，得到试剂盒。其中，

所述包被板的制作过程为：包被乙肝核心抗原，该核心抗原可以是病毒中提取也可以是基因工程重组蛋白，具有生物高活性，经过电泳鉴定，蛋白纯度超过 90%。将此抗原用柠檬酸缓冲液体稀释成低浓度进行包被，包被载体为化学发光塑料板，包被时每孔 100 $\mu$ l，吸附过夜，用吐温磷酸盐缓冲液洗板，再用含牛血清白蛋白的吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜，甩干后晾干，即获得核心抗原包被酶标板，酶标板可选用国产或进口化学发光酶标板，规格可以是 96 孔平板或 12 $\times$ 8、12 $\times$ 4 可拆条板；

所述酶工作液的制备过程为：将酶标记物 HRP（辣根过氧化物酶）标记的鼠抗人 IgG3 单克隆抗体和 HRP 标记鼠抗人 IgG1 单克隆抗体，分别溶解于含有小牛血清白蛋白的溶解液中，配成酶工作液 1、酶工作液 2；

所述酶标单克隆抗体的制备可以采用下列步骤：

- (a) NaIO<sub>4</sub>-乙二醇法进行 HRP 的氧化，达到终浓度 10mg/ml；
- (b) 单克隆抗体和 HRP 在碱性碳酸盐缓冲液中透析 6 小时，实现 HRP 对多克隆抗体的标记，反应结束后用 NaBH<sub>4</sub> 溶液终止反应，再对 PBS 透析过夜；
- (c) 用饱和硫酸铵沉淀，获得纯化后的 HRP 酶标鼠抗人 IgG1 或 IgG3 单克隆抗体。

所述辅助试剂的配制，方法如下：

- (a) 底物溶液: 1.0ml EDTA ( $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ ) 1.0ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $7.5 \times 10^{-3} \text{M}$ )、0.4ml HCl ( $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ )、0.2ml Tween20 (1%);
- (b) 显色液: luminol  $5.0 \times 10^{-4} \text{mol/L}$ ;
- (c) 清洗缓冲液 (20 倍浓缩液, 20 $\times$ ): PBS (pH7.4) 配制的 0.05%吐温 20 溶液;
- (d) 标准品: 包括人核心抗体 IgG3 和人核心抗体 IgG1 标准品。

检测方法包括下述步骤:

(1) 抗原-抗体反应: 在化学发光包被板的微孔中分别加入  $50 \mu\text{l}$  已稀释好的不同浓度的 2 个系列标准品, 或 2 孔待测血清样品, 进行温育:  $37^\circ\text{C}$  水浴保温 30 分钟, 重复洗板操作 4 次

(2) 加酶: 将配成酶工作液 1、酶工作液 2 分别加入相应孔内; 进行温育:  $37^\circ\text{C}$  水浴保温 30 分钟, 重复洗板操作 4 次

(3) 显色反应: 每孔依次加入底物溶液, 显色液各  $25 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  水浴保温 10 分钟;

(4) 测量: 在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度 (RLU), 测量时间 1 秒/孔;

(5) 结果计算:

(a) 制作标准曲线: 以 IgG3 标准品浓度为横坐标, 标准品测定的 RLU 值为纵坐标, 作出标准曲线; 以 IgG1 标准品浓度为横坐标, 标准品测定的 RLU 值为纵坐标, 作出标准曲线;

(b) 计算待测血清样品浓度: 根据待测样品的 RLU 值从标准曲线计算出待测血清样品的核心抗体 IgG3 和 IgG1 浓度

(c) 结果判断: 对比 IgG3 和 IgG1 的含量, IgG3/IgG3 比值越小, 说明机体清除病原体能力越差, IgG3/IgG3 比值越大, 说明机体清除病原体能力越好, 比值升高或大于 1 说明即将恢复或已经恢复。

由于本发明通过检测乙肝核心抗体中的 IgG3 和 IgG1 亚类的比值,反映出乙肝患者体内 TH1/TH2 的平衡,从而对乙肝患者机体免疫力水平进行评价和判断,为评价治疗效果、预测预后情况提供了一个重要的依据,这些指标或判断同现有检测技术相配合,有助于做出更为准确的诊断,为乙肝患者的治疗提供帮助。本发明的两种试剂盒采用了本发明提出的方法,使用和操作方便,成本低,使本发明的方法得以实现。

#### 附图说明

图 1 为大三阳标本的 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的数据分布图;

图 2 为小三阳标本的 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的数据分布图;

图 3 为感染后自动恢复的标本 245 或 25 的 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的数据分布图。

#### 具体实施方式

下面用实施例进一步说明本发明。应该理解的是,本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制,根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发明要求保护的范围。

实施例 1: 一种乙型肝炎病毒核心抗原抗体亚类 IgG3/IgG1 酶联免疫检测试剂盒(96 人份)

其组成包括:

核心抗原包被板(96 孔)1 块;

辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗人 IgG3 酶标工作液体 1 瓶,6ml/瓶;

辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗人 IgG1 酶标工作液体 1 瓶,6ml/瓶;

底物溶液、显色液各 1 瓶,各 5ml/瓶;

反应终止液 1 瓶,5ml/瓶;

清洗缓冲液(20X 浓缩)1 瓶,30ml/瓶。

具体制作如下:

## 1. 制作核心抗原包被板:

包被: 酶标板采用 Costar 公司生产的 12×8 可拆条板, 核心抗原为市购。所获核心抗原用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液稀释为 20μg/ml 后加入酶标板各孔, 每孔 100μl, 吸附过夜, 用清洗缓冲液洗板, 再用该封闭液缓冲液封闭过夜, 甩干后晾干, 即获得核心抗原包被酶标板。按 96 孔/块用铝箔袋包装、真空封闭;

## 2. 制备辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗人抗 IgG3 或 IgG1 抗体:

### 1) 酶的氧化 (全过程避光):

- a) 称取 HRP 5mg, 加 ddH<sub>2</sub>O 250μl 溶解;
- b) 称取 NaIO<sub>4</sub> 5mg, 加 ddH<sub>2</sub>O 250μl 溶解, 配制成 20mg/mL 的浓度;
- c) 往 HRP 溶液中逐滴加入 NaIO<sub>4</sub> 溶液, 边加边搅拌;
- d) 将混合好的溶液置于 4℃, 静置 30 分钟;
- e) 取 5ml 乙二醇溶于 25μl ddH<sub>2</sub>O 中, 逐滴加入上述混合溶液中, 边加边搅拌;
- f) 室温静置 30 分钟;
- g) 酶氧化过程完成, HRP 终浓度为 10mg/ml;

### 2) 单克隆抗体的准备及标记 (避光):

a) 调整抗体浓度到 5mg/ml 左右 (蛋白浓度过低则用 PEG20000 浓缩), 用 pH9.5 左右的 50mmol/L CB (1mol/L NaHCO<sub>3</sub> 与 1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 按 10:1 的比例混合, 使用前以蒸馏水稀释 20 倍) 透析去甘油或杂质 (如 Tris), 4℃ 下透析过夜, 其中换液 3 次;

b) 将单克隆抗体与 HRP 按 1: 4 混合, 于 50mmol/L pH9.5 CB 中透析 6 小时以上, 头两个小时换液一次;

c) 用新鲜配置的 1mg NaBH<sub>4</sub> 溶液终止反应。摇匀, 4℃ 静置 2 小时, 每半小时摇一次, NaBH<sub>4</sub> 溶液加入的量要合适;

- d) 用 pH7.2 的 10 mM PBS (预配置 0.01mol/L 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  和  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  储备液, 根据需要的 pH 值混匀二者成 PBS 缓冲液) 透析过夜。换液一次即可;
- 3) 纯化 HRP 酶标鼠抗人 IgG3 或 IgG1 单克隆抗体:
- a) 完成标记的单克隆抗体溶液中逐滴加入饱和硫酸铵溶液, 边加入边搅拌, 直至饱和硫酸铵浓度降低至 1/3;
- b) 4°C 静置 1 小时;
- c) 8000rpm 离心 10 分钟, 将上清移至新管中, 沉淀用等体积 PBS 重新悬浮;
- d) 重复以上操作, 将饱和硫酸铵浓度提高到 40%, 分别收集上清和沉淀;
- e) 重复以上操作, 将饱和硫酸铵浓度提高到 50%, 分别收集上清和沉淀;
- f) 重复以上操作, 将饱和硫酸铵浓度提高到 60%, 分别收集上清和沉淀;
- g) 收集分离的各个组分, SDS-PAGE 鉴定纯度;
- h) 提纯的 HRP-单克隆抗体对 PBS 透析过夜;
- i) 超滤管离心浓缩纯化的 HRP-单克隆抗体, 获得克分子比接近 1:8 的酶标鼠抗人 IgG3 或 IgG1 单克隆抗体;
- 4) 组装: 用含 10%胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 3) 获得的酶标鼠抗人 IgG3 或 IgG1 单克隆抗体至合适的工作浓度, 按 6ml/瓶分装, 贮存于 4°C。
4. 配制底物溶液: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (PH5.0) 配制的 3% 过氧化氢溶液, 按 5ml/瓶分装;
5. 配制显色液: TMB (0.1mg/ml) 甲醇溶液, 按 5ml/瓶分装;
6. 配制反应终止液: 2mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 按 3ml/瓶分装;
7. 配制清洗缓冲液 (20 倍浓缩液): PBS (pH7.4) 配制的 1%吐温 20 溶液, 按 15ml/瓶分装。

这种试剂盒的质量检测方式为:

- 1) 准确性: 15 份大三阳慢性肝炎质控血清 (包括特异性对照血清) 参考

品的检测结果, IgG1/IgG3 大于 1。15 份小三阳慢性肝炎质量控制血清中, 3 份标本的 IgG3/ IgG1 大于 1, 15 份感染后恢复的标本(245 阳性), 12 份 IgG3/ IgG1 大于 1;

2) 精密度: 随机抽取 20 盒不同批次试剂盒, 用同一份质控血清按说明书操作步骤进行重复测定。分别计算核心抗体亚类 IgG1/IgG3 测定结果, 分别求出均值、SD 和变异系数 CV。精密度试验结果显示批间 CV <15%。

这种试剂盒的具体使用方式为:

1. 清洗缓冲液配制: 将试剂盒提供的浓缩清洗缓冲液加蒸馏水 20 倍稀释;
2. 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的核心抗原包被板的 2 个微孔中分别加入同一个待测血清样品;
3. 温育: 37℃水浴保温 30 分钟, 重复洗板操作 5 次, 每次 3 分钟;
4. 加酶: 分别加入鼠抗人 IgG3 酶工作液和鼠抗人 IgG1 酶工作液;
5. 温育: 37℃水浴保温 30 分钟。重复洗板操作 5 次, 每次 3 分钟;
6. 显色反应: 每孔依次加入底物溶液、TMB 显色液各 50 $\mu$ l, 37℃水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50 $\mu$ l 反应终止液结束反应;
7. 比色: 以空白对照孔的吸光值调零, 用酶标仪在 450nm 测定 OD 平均值; 记录各孔吸光值;

#### 6. 结果判断:

对比 IgG3 和 IgG1 的 OD 值, IgG3/IgG1 比值越小, 说明机体清除病原体能力越差, IgG3/IgG1 比值越大, 说明机体清除病原体能力越好, 比值升高或大于 1 说明即将恢复或已经恢复。

实施例 2: 一种乙肝核心抗体亚类 IgG3/IgG1 化学发光定量检测试剂(96 人份)

其组成包括:

核心抗原 IgG3 标准品 1 瓶;

核心抗原 IgG1 标准品 1 瓶;

核心抗原包被板 (96 孔) 1 块;

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗人 IgG3 单克隆抗体 1 瓶, 6ml/瓶;

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗人 IgG3 单克隆抗体 1 瓶, 6ml/瓶;

底物溶液、显色液各 1 瓶, 各 5ml/瓶;

清洗缓冲液 (20X 浓缩) 1 瓶, 30ml/瓶。

具体制作方法如下:

#### 1. 制作核心抗原包被板:

1) 酶标板采用 Costar 公司生产的 12×8 可拆条板, 核心抗原为基因工程重组或病毒提取, 市购;

2) 所获核心抗原用 0.05mol/L 柠檬酸缓冲液稀释为 20 $\mu$ g/ml 后加入酶标板各孔, 每孔 100 $\mu$ l, 吸附过夜, 用清洗缓冲液洗板, 再用该封闭液缓冲液封闭过夜, 甩干后晾干, 即获得核心抗原包被酶标板, 按 96 孔/块用铝箔袋包装、真空封闭;

#### 2. 制备辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗人抗 IgG3 或 IgG1 抗体:

##### 1) 酶的氧化 (全过程避光):

a) 称取 HRP 5mg, 加 ddH<sub>2</sub>O 250 $\mu$ l 溶解;

b) 称取 NaIO<sub>4</sub> 5mg, 加 ddH<sub>2</sub>O 250 $\mu$ l 溶解, 配制成 20mg/mL 的浓度;

c) 往 HRP 溶液中逐滴加入 NaIO<sub>4</sub> 溶液, 边加边搅拌;

d) 将混合好的溶液置于 4 $^{\circ}$ C, 静置 30 分钟;

e) 取 5ml 乙二醇溶于 25 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 中, 逐滴加入上述混合溶液中, 边加边搅拌;

f) 室温静置 30 分钟;

g) 酶氧化过程完成, HRP 终浓度为 10mg/ml;

##### 2) 组装:

用含 10%胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 3) 获得的鼠抗人抗 IgG3 或 IgG1 抗体至合适的工作浓度, 按 6ml/瓶分装, 贮存于 4℃;

3) 底物溶液: 1.0ml EDTA ( $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ ) 1.0ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $7.5 \times 10^{-3} \text{M}$ )、0.4ml HCl ( $1.0 \times 10^{-2} \text{M}$ )、0.2ml Tween20 (1%), 按 5ml/瓶分装;

4) 配制显色液: 显色液: luminol  $5.0 \times 10^{-4} \text{Mol/L}$ , 按 5ml/瓶分装;

5) 配制清洗缓冲液 (20 倍浓缩液): PBS (pH7.4) 配制的 1%吐温 20 溶液, 按 15ml/瓶分装。

这种试剂盒的质量检测方式为:

1) 准确性: 15 份大三阳慢性肝炎质控血清 (包括特异性对照血清) 参考品的检测结果, IgG1 含量/IgG3 含量大于 1。15 份小三阳慢性肝炎质量控制血清中, 3 份标本的 IgG3 含量/IgG1 含量大于 1, 15 份感染后恢复的标本 (245 阳性), 12 份 IgG3/ IgG1 大于 1;

2) 精密度: 随机抽取 20 盒不同批次试剂盒, 用同一份质控血清按说明书操作步骤进行重复测定。分别计算核心抗体亚类 IgG1/IgG3 测定结果, 分别求出均值、SD 和变异系数 CV。精密度试验结果显示批间 CV  $\ll 15\%$ ;

3) 线性范围: 用核心抗体亚类 IgG1 或 IgG3 纯品稀释成一系列不同浓度的纯品溶液: 300ng、100 ng、25ng、10ng、5ng、1ng。按照说明书操作步骤进行测定。以浓度为横坐标、吸光度为纵坐标绘制曲线。线性范围内最高检测上限值为 300ng/ml, 最低检测下限值为 1ng/ml。试剂盒的线性范围为 1-300ng/ml;

4) 检测灵敏度: 根据上述线性范围测定结果, 本试剂盒的检测灵敏度为 1ng/ml。

这种试剂盒的具体使用方式为:

1. 清洗缓冲液配制: 将试剂盒提供的浓缩清洗缓冲液加蒸馏水 20 倍稀释;

2. 将试剂盒提供的 IgG3 和 IgG1 标准品作为标本平行检测, 标准品各点浓度分别为 300ng、100 ng、25ng、10ng、5ng、1ng;

3. 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的核心包被板的微孔中分别加入 50 $\mu$ l 已稀释好的 2 个系列的不同浓度的标准品, 或在平行的 2 孔中加入同一个待测血清样品, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 分钟。然后用清洗缓冲液重复洗板 4 次, 每次 3 分钟;

4. 酶联反应: 分别加入相应的鼠抗人 IgG3 或 IgG1 单克隆抗体酶工作液, 溶液加入各孔, 每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 分钟。重复洗板操作 4 次, 每次 3 分钟;

5. 显色反应: 每孔依次加入底物溶液、显色液各 25 $\mu$ l;

6. 读值: 在化学发光测量仪上依序测量各孔的发光强度 (RLU), 测量时间 1 秒/孔;

7. 结果计算:

a) 制作标准曲线: 以 IgG3 标准品浓度为横坐标, 标准品测定的 RLU 值为纵坐标, 作出标准曲线; 以 IgG1 标准品浓度为横坐标, 标准品测定的 RLU 值为纵坐标, 作出标准曲线;

b) 计算待测血清样品浓度: 根据待测样品的 RLU 值从标准曲线计算出待测血清样品的核心抗体 IgG3 和 IgG1 浓度;

c) 结果判定:

对比 IgG3 和 IgG1 的含量, IgG3/IgG3 比值越小, 说明机体清除病原体能力越差, IgG3/IgG3 比值越大, 说明机体清除病原体能力越好, 比值大于 1 说明即将恢复或已经恢复。

为对本发明进行检验, 申请人采用本发明的两种试剂盒, 对不同状况下的乙肝患者、过往感染者以及健康人群进行了 IgG3/IgG1 指标和其他现有检验指标的对比检验和分析, 证明本发明的方法以及本发明的两种试剂盒的可靠性

和有效性。采用本发明的方法和本发明的试剂盒，可以有效地检测出乙肝核心抗原抗体亚类 IgG3/IgG1 比值，用于评价乙肝病毒感染者的免疫力水平，其检测结果同乙肝五项指标、ALT 的检测结果对照，对判断 HBV 病毒在体内的发展和治疗情况的预后有重要的指导意义。

实验 1: 采用实施例 1 的酶联免疫检测试剂盒对不同乙型肝炎患者和过往感染恢复样品的检测

为判断本发明乙肝核心抗体亚类 IgG3/IgG1 酶联免疫检测试剂盒的检测情况，本发明取地坛医院病毒研究室血清总共 280 份研究数据：100 份已知 HBV-大三阳慢性肝炎标本，100 份经过抗病毒治疗后转阴性既小三阳标本，80 份过往感染乙肝病毒已经恢复的血清标本（245 阳性）。分别检测每个标本的 IgG3/IgG1 的 OD 值，结果见表 1。

表 1. 不同肝炎人群的 IgG3/IgG1 比较

血清来源	例数	检测情况 IgG3/IgG1	
		≤ 1	> 1
大三阳慢性乙型肝炎患者	100	97%	3%
小三阳慢性乙型肝炎患者	100	78%	22%
245 阳性	80	10%	90%

本实验结果表明，本发明对于与病程转归正性相关，小三阳中有 22% 免疫能力接近于达到清除病原体的能力。在恢复期标本中，体现了抗体亚类较为均衡，也体现了 TH1/TH2 的转化情况。

实验 2: 采用实施例 2 的化学发光定量检测试剂盒对不同乙型肝炎患者和过往感染恢复样品的检测

检测来源于浙江湖州医院的拉米夫定治疗系列血清 5 例，观察这些标本在经过治疗的过程中既从大三阳性到小三阳的转化过程中，核心抗体亚类 IgG3/IgG1 的情况。检测结果与乙肝五项指标、ALT 的检测结果对照，对判断 HBV 病毒在体内的发展和治疗情况的预后有重要的指导意义。结果分别见表 2

(基于保护患者个人隐私的考虑, 删除了表中的患者姓名)。

表 2. 乙肝患者 IgG3/IgG1 以及其他检测指标对照表

编号	姓名	用药时间	采血日期	检测时间点	DNA 定量	HBV M	ALT (U/L)	核心抗体 IgG3/IgG1
2		基线	2001.1.11	0	$7.66 \times 10^8$	135	83	0.1
2		3个月	2001.4.23	1	$<10^3$	135	217	0.1
2		6个月	2001.7.27	2	$<10^3$	15	65	0.5
2		9个月	2001.11.1	3	$<10^3$	15	99	0.7
2		12个月	2002.1.15	4	$<10^3$	15	167	0.6
3		基线	2001.2.1	0	$3.56 \times 10^8$	135	482	0.2
3		3个月	2001.5.10	1	$<10^3$	135	217	0.2
3		6个月	2001.8.16	2	$<10^3$	15	74	0.7
3		9个月	2001.11.15	3	$1.04 \times 10^3$	145	35	1.3
3		12个月	2002.2.7	4	$<10^3$	145	30	3.5
5		基线	2001.2.1	0	$4.71 \times 10^6$	135	120	0.1
5		3个月	2001.5.21	1	$<10^3$	15	147	0.2
5		6个月	2001.8.23	2	$<10^3$	15	87	0.8
5		9个月	2001.11.26	3	$<10^3$	15	109	1.7
5		12个月	2002.2.26	4	$<10^3$	15	82	1.6
8		基线	2001.2.15	0	$5.26 \times 10^7$	135	128	0.3
8		3个月	2001.5.23	1	$1.37 \times 10^6$	135	74	0.4
8		6个月	2001.8.24	2	$<10^3$	15	80	1.2
8		9个月	2001.11.22	3	$<10^3$	145	75	1.1
8		12个月	2002.2.25	4	$<10^3$	145	36	1.4
9		基线	2001.2.6	0	$3.11 \times 10^7$	135	161	0.3
9		3个月	2001.5.10	1	$<10^3$	15	49	0.9
9		6个月	2001.8.10	2	$<10^3$	145	42	1.5
9		9个月	2001.11.12	3	$<10^3$	145	23	4.7
9		12个月	2002.2.11	4	$<10^3$	145	19	5.6
10		基线	2001.3.23	0	$4.86 \times 10^6$	135	259	0.1
10		3个月	2001.5.24	1	$<10^3$	135		0.5
10		6个月	2001.8.23	2	$<10^3$	135	136	0.1
10		9个月	2001.11.23	3	$<10^3$	145	116	1.1
10		12个月	2002.2.21	4	$<10^3$	145	73	4.6
15		基线	2001.2.22	0	$6.37 \times 10^6$	135	182	0.1
15		3个月	2001.5.29	1	$<10^3$	5	12	1.1
15		6个月	2001.8.31	2	$<10^3$	5	12	2.5
15		9个月	2001.12.17	3	$<10^3$	145	11	2.8
15		12个月	2002.3.17	4	$<10^3$	145	14	5.2
19		基线	2001.2.9	0	$4.41 \times 10^7$	135	99	0.3

19		3个月	2001.5.2	1	$<10^3$	15	83	0.1
19		6个月	2001.8.9	2	$<10^3$	15	54	2.5
19		9个月	2001.11.14	3	$<10^3$	15	38	4.7
19		12个月	2002.2.25	4	$<10^3$	15	22	8.6
23		基线	2001.2.28	0	$9.83 \times 10^8$	135	124	0.2
23		3个月	2001.6.6	1	$9.81 \times 10^4$	15	11	1.1
23		6个月	2001.9.7	2	$<10^3$	15	24	2.5
23		9个月	2001.12.11	3	$<10^3$	15	15	4.1
23		12个月	2002.3.15	4	$<10^3$	15	10	7.1
25		基线	2001.2.28	0	$5.59 \times 10^8$	135	281	1.1
25		3个月	2001.6.4	1	$<10^3$	135	83	0.5
25		6个月	2001.9.4	2	$<10^3$	15	34	1.5
25		9个月	2001.12.14	3	$<10^3$	15	24	2.7
25		12个月	2002.3.16	4	$<10^3$	15	18	4.6
26		基线	2000.12.26	0	$6.72 \times 10^8$	135	880	0.2
26		3个月	2001.3.27	1	$<10^3$	15	20	0.8
26		6个月	2001.6.29	2	$<10^3$	15	28	1.5
26		9个月	2001.10.3	3	$<10^3$	15	24	4.2
26		12个月	2002.1.3	4	$<10^3$	15	12	7.6
1		基线	2001.1.11	0	$8.37 \times 10^8$	135	204	0
1		3个月	2001.4.19	1	$6.82 \times 10^7$	135	62	0.1
1		6个月	2001.7.19	2	$6.93 \times 10^5$	135	182	0.15
1		9个月	2001.10.18	3	$6.20 \times 10^5$	135	98	0.2
1		12个月	2002.1.17	4	$1.57 \times 10^5$	135	137	0.6
4		基线	2001.1.31	0	$8.76 \times 10^7$	135	61	0.1
4		3个月	2001.5.17	1	$1.55 \times 10^7$	135	46	0
4		6个月	2001.8.16	2	$1.08 \times 10^6$	135	68	0.1
4		9个月	2001.11.14	3	$1.18 \times 10^5$	135	54	0.12
4		12个月	2002.2.12	4	$4.20 \times 10^5$	135	44	0.2
6		基线	2001.3.23	0	$5.21 \times 10^7$	135	50	0.2
6		3个月	2001.6.1	1	$2.33 \times 10^6$	135	33	0
6		6个月	2001.9.7	2	$1.03 \times 10^6$	135	39	0.15
6		9个月	2001.11.26	3	$5.78 \times 10^5$	135	73	0.1
6		12个月	2002.2.27	4	$2.64 \times 10^6$	135	39	0.16

结果显示, 本发明乙肝核心抗体亚类 IgG3/IgG1 试剂在对治疗有效预后  
的检测与病情预后相同, 对治疗无效预后的检测也与病情预后相同。

实验 3: 本发明乙肝核心抗体亚类 IgG3/IgG1 酶免试剂在检测肝炎、正  
常人 TH1 和 TH2 相关指标关联分析

实验背景：对照组为中心血站献血人员 20 例，未携带病毒，并且单独表面抗体阳性。慢性肝炎 65 例，来源于地坛医院住院病人，ALT 均高于正常值。乙肝感染后恢复血清，其标志是乙肝二对半中 245 阳性。TH1 和 TH2 细胞因子检测采用商品化试剂盒。结果见表 3。

表 3. 对比实验结果

	TH1 类细胞因子		TH2 类细胞因子		IgG3 /IgG1
	IL-2	IFN- $\gamma$	IL-4	IL-10	ELISA OD 值 平均比值
对照正常人	308.44 ± 67.18	1211.28 ± 207.1	189.1 ± 38.34	243.6 ± 31.22	IgG3 检测不出，比值相当于 0
慢性肝炎组	122.55 ± 35.01	842.15 ± 144.22	281.21 ± 39.38	336.01 ± 31.28	0.35 ± 0.32
乙肝感染恢复后血清	385.27 ± 65.75	2460.27 ± 116.13	211.487 ± 36.27	251.06 ± 35.11	1.75 ± 1.11

分析：以上结果非常明显的看出，慢性肝炎患者体内 TH1 和 TH2 失衡，TH2 占优势，这个时候 IgG3/IgG1 的比率远小于 1，而在乙肝感染恢复后患者血清内的 TH1 增长，与 TH2 相比较，处于平衡或占有优势，体现在血清中 IgG3/IgG1 的比率大于 1。

根据上述实验，得出本发明乙肝核心抗体亚类 IgG1、IgG3、IgG2、IgG4、酶免试剂在检测乙型肝炎大三阳、小三阳、感染恢复后血清的对比图，即附图 1-3。从这些图中，也可以得出这样的结论：HBcAb 的 IgG3 与 IgG1 的比例均衡是对病毒治疗有效所具有的免疫力的一个重要特征。

可以理解的是，对于相同患者，采用不同的检测手段，得到的 HBcAb 的 IgG3 与 IgG1 数值可能是不同的，两者的比值也可能是不同。因此在不同的检测手段下，相同的 IgG3/IgG1 数值可以代表乙肝患者不同的机体免疫力水平状况，因此需要对不同检测手段下 IgG3、IgG1 和 IgG3/IgG1 数据同患者状况之间在统计学意义下的对应关系进行分析，或者对各种检测手段下这些数据的变化进行对比，以揭示不同检测手段下具体的 IgG3/IgG1 数据同患者免疫水平和预后状况的关系，确定在不同检测手段下判断预后良好和预后不良的

---

IgG3/IgG1 数据范围。同时,也应该理解到,任何一种检测指标都具有其局限性,应根据实际情况进行多指标的综合判断。

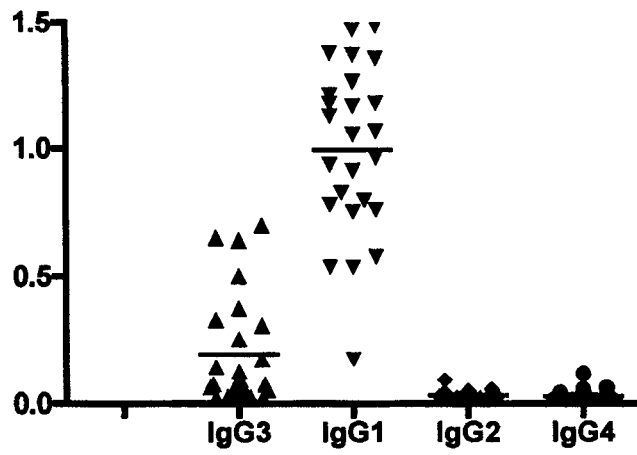


图 1

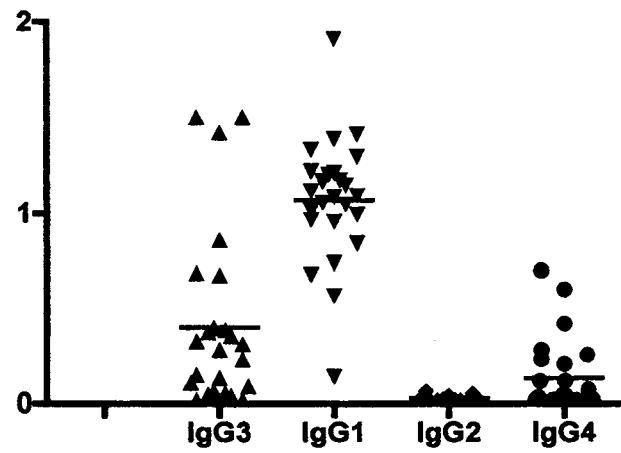


图 2

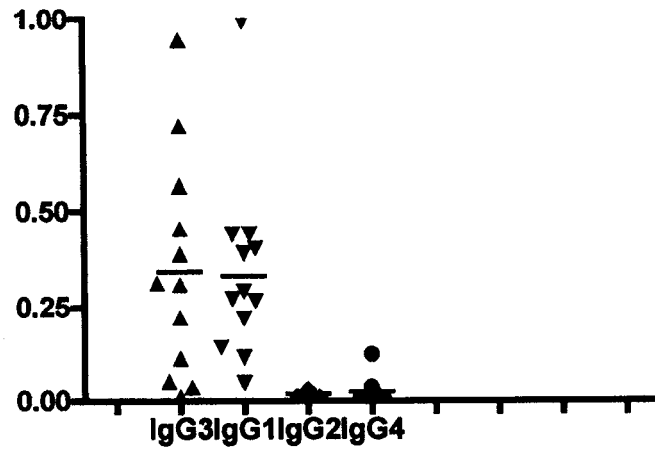


图 3

专利名称(译)	评价乙肝患者机体免疫力水平的检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN100580453C</a>	公开(公告)日	2010-01-13
申请号	CN200610087496.6	申请日	2006-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术股份有限公司		
[标]发明人	林长青		
发明人	林长青		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577		
审查员(译)	李冰		
其他公开文献	CN1869697A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及了一种评价乙肝患者机体免疫力水平的方法、应用于该方法的一种检测核心抗体亚类IgG3和IgG1的酶联免疫试剂盒和一种检测核心抗体亚类IgG3和IgG1的化学发光检测试剂盒检测试剂盒及其制备方法。所述方法包括下列步骤：(1)检测核心抗体亚类IgG3和IgG1；(2)计算IgG3和IgG1的比值；(3)根据IgG3和IgG1的比值评估乙肝患者机体清除病原体的能力，预测乙肝治疗效果和预后。所述各试剂盒采用所述方法，对人血清中的乙肝核心抗原抗体中的亚类IgG3和IgG1进行检验。本发明可用于乙型肝炎病毒的发展水平、预后诊断，治疗效果评价等。