



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101975859 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 16

(21) 申请号 201010279319. 4

(22) 申请日 2010. 09. 13

(71) 申请人 北京倍爱康生物技术有限公司
地址 100070 北京市丰台区海鹰路 1 号院 6 号楼

(72) 发明人 郭健夫 朱世伟 王佳晔 全文斌

(51) Int. Cl.

G01N 33/576(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种乙型肝炎病毒表面抗原的磁微粒分离化学发光免疫分析检测方法

(57) 摘要

本发明提供了乙型肝炎病毒表面抗原的体外检测方法,该方法采用了磁微粒分离化学发光免疫分析技术,它是酶标记技术、磁微粒分离技术和化学发光检测技术相结合的产物,兼具灵敏度高、特异性好、重复性好等特点。可用于人血清、血浆中乙肝表面抗原含量的测定,临床上该指标多用于判断是否感染过乙肝病毒,主要用于监测乙型肝炎的病情及治疗效果和预后。

		对照	
		+	-
倍爱康	+	310	10
	-	10	350
		320	360

1. 一种乙型肝炎病毒表面抗原磁微粒分离化学发光免疫分析检测方法,其特征就在于结合了酶标记技术、磁微粒分离技术和化学发光检测技术,并生成了检测试剂盒。

2. 根据权利要求1所述的酶标记技术,其特征就在于生物酶标记乙肝表抗原的抗体的方法如下:

所述的生物酶可以是辣根过氧化物酶(HRP),也可以是碱性磷酸酶(ALP)。偶联方法可以是过碘酸钠氧化法、戊二醛法或 Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate(SMCC)、2-Iminothiolane·HCl(2IT) 交联等多种方法。

3. 根据权利要求1所述的磁分离技术,其特征就在于磁分离试剂的制备方法如下:

将 FITC 抗体连接在磁微粒表面。所述的磁微粒直径在 0.01-5.0 μm 之间,具有超顺磁性,表面含有氨基(NH₂-)或羧基(COOH-)活性基团。所述的 FITC 抗体与磁微粒可以通过化学交联剂,如戊二醛、1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride(EDC)等以共价键的形式,也可以通过物理吸附(静电作用、离子键或疏水作用等)的形式进行偶联。

4. 根据权利要求1所述的化学发光检测技术,其特征就在于化学发光所用的底物溶液可以是 HRP 催化的发光底物鲁米诺(Luminol),也可以是 ALP 催化的发光底物 AMPPD, CSPD 和 CSPD-Star 等。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征就在于试剂盒中的对照品和定标液是选取经灭活的人血清,将其混合后用稀释液按一定比例稀释而成。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征就在于试剂盒中乙肝表面抗原抗试剂包含偶联有生物酶的乙肝表面抗原的抗体和偶联有 FITC 的乙肝表面抗原的抗体。

7. 根据权利要求6所述的用于偶联 FITC 的抗体可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体。

8. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征就在于检测步骤如下:

(1) 加样与免疫反应:在试管中加入 5-100 μL 处理好的样本、定标液和对照品,然后加入 10-500 μL 乙肝表面抗原抗试剂,混匀,37℃温育 5-60 分钟;

(2) 免疫复合物与磁微粒结合:向试管中加入 20-100 μL, 0.1-10mg/mL 磁分离试剂,混匀,37℃温育 0-30 分钟(也可不温育);

(3) 磁分离与洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清;加入 100-600 μL 清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清;可再次加入清洗液清洗两次(也可省去);

(4) 加底物溶液并读出样本浓度:每管加入 50-300 μL 生物酶催化的发光底物,酶促底物发光,根据样本的发光值和 Cut Off 值读出样本中乙肝表面抗原的 S/CO 值,判定样本阴阳性。

一种乙型肝炎病毒表面抗原的磁微粒分离化学发光免疫分析检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,涉及到临床判定乙型肝炎病毒感染的一项诊断指标乙型肝炎病毒表面抗原,提供了一种乙型肝炎病毒表面抗原的磁分离化学发光免疫检测方法,适用于人血清、血浆乙型肝炎病毒表面抗原的定量检测。

背景技术

[0002] 乙型肝炎又称为血清性肝炎、乙型病毒性肝炎(简称乙肝),是由乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)引起的传染病。通过血液与体液传播,具有慢性携带状态。乙肝临床表现多样化,易发展为慢性肝炎和肝硬化,一些病人可转变为原发性肝癌。

[0003] 乙型肝炎病毒表面抗原(HBs-Ag)是乙肝病毒的血清学标志物之一,该蛋白由S基因编码,有“a”、“b”、“y”、“r”、“w”等多种抗原决定簇,其中“a”是共同的抗原决定簇,“d”、“y”和“r”、“w”为主要的亚型决定簇。HBs-Ag主要有 adr, adw, ayr, 及 ayw 等4种亚型。HBs-Ag是急性感染时最早出现的血清学标志。该抗原常常在症状出现前1-6周就可检测到,免疫力正常的机体会产生表面抗体,该抗体可以中和病毒,是一种保护性抗体。HBs-Ag检测阳性是病毒活跃的标志,通常意味着患者具有传染性;阴性的情况要么是病人从未感染,要么是感染后已经康复或者隐匿性感染。症状出现后4个月,免疫力正常个体可以清除HBs-Ag,机体开始康复,在康复期HBs-Ag表现为阴性,但是,有些人尤其是婴幼儿或免疫力差的个体(如艾滋病患者),会形成慢性乙肝病毒感染,HBs-Ag会持续阳性。

[0004] 乙型肝炎的流行性监测通常以检测HBs-Ag作为标准,急性感染时,HBs-Ag可在感染后4周左右检测到,还常常伴有一定的临床症状;而慢性感染则通常以HBs-Ag阳性6个月以上为诊断标准。作为一种血清学标志物,HBs-Ag不仅用在诊断上,也用于筛查捐献的血液。

[0005] 临床上对乙型肝炎病毒表面抗原的检测主要是采用免疫学方法。临床免疫检测技术是利用抗原抗体反应原理检测生物体内物质的技术,该技术的引入使临床化学检验发生了革命性的变化:检测项目不断增加,方法的灵敏度更高、特异性更强,自动化程度更高。自上世纪80年代以后,免疫学检测技术随着单克隆抗体、人工合成多肽、基因工程表达抗原及各种标记技术的成熟而迅速发展,放射免疫测定(RIA)和酶免疫测定(EIA)逐渐取代传统的免疫沉淀和免疫凝聚,使检测的敏感性、特异性都大大提高,随后化学发光技术的应用使免疫学检测的敏感性和线性范围得到进一步的提高。这些技术在临床检验中的应用为疾病的定量检测、疗效观察及病因探讨提供了更直接和客观的资料。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种具有灵敏度高、特异性好、适用性广的检测乙型肝炎病毒表面抗原的磁微粒分离化学发光免疫检测方法。

[0007] 本发明生成的乙型肝炎病毒表面抗原磁微粒分离化学发光免疫的试剂盒组成包

括：①定标液（含一定浓度的乙型肝炎病毒表面抗原，用于确定 CutOff 值）；②乙型肝炎病毒表面抗原阴、阳对照品（阳性对照含一定浓度的乙型肝炎病毒表面抗原，用于检验的结果的质量控制）；③乙型肝炎病毒表面抗原抗试剂 1 号、2 号（偶联有生物酶的乙型肝炎病毒表面抗原的抗体和偶联有 FITC 的乙型肝炎病毒表面抗原的抗体）；④磁分离试剂（结合抗 FITC 的磁微粒混悬液）；⑤清洗液浓缩液（用于配制清洗液）；⑥底物溶液（生物酶催化的发光底物）。

[0008] 所述的乙型肝炎病毒表面抗原磁微粒分离化学发光免疫检测方法的检测步骤如下：

[0009] (1) 加样与免疫反应：在试管中加入 5-100 μ L 处理好的样本、定标液和对照品，然后分别加入 10-500 μ L 乙型肝炎病毒表面抗原抗试剂 1 号和 2 号，混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 5-60 分钟；

[0010] (2) 免疫复合物与磁微粒结合：向试管中加入 20-100 μ L 磁分离试剂，混匀，37 $^{\circ}$ C 温育 0-30 分钟（也可不温育）；

[0011] (3) 磁分离与洗涤：使磁微粒在磁场中沉降，去除上清；加入 100-600 μ L 清洗液，去除磁场，震荡使磁微粒充分混悬，然后再次使磁微粒在磁场中沉降，去除上清；可再加入洗液清洗多次（也可省去）；

[0012] (4) 加底物溶液并读出样本浓度：每管加入 50-300 μ L 生物酶催化的发光底物，酶促底物发光，根据样本的发光值和 Cut Off 值读出样本中乙肝表面抗原的 S/CO 值，判定样本阴阳性。

[0013] 所述的乙型肝炎病毒表面抗原磁微粒分离化学发光免疫检测方法的工作原理是：首先，待检样本与酶标记抗体、FITC 标记抗体特异性结合形成“三明治”结构的夹心复合物，夹心复合物再与磁微粒特异性结合（通过抗体上偶联的 FITC 与磁微粒上的抗 FITC 结合）；经过洗涤，结合物通过外加磁场被留下，未结合的抗原、抗体和其他物质被去除；加入底物，用化学发光分析仪检测其发光值。在一定浓度范围内，待测样本中的乙型肝炎病毒表面抗原浓度与发光值成正比，最后根据样本的发光值和 Cut Off 值读出样本中乙肝表面抗原的 S/CO 值，判定样本阴阳性。

[0014] 本发明的技术解决方案如下：

[0015] (1) 磁分离试剂的制备：将 FITC 抗体连接在磁微粒表面。所述的磁微粒直径在 0.01-5.0 μ m 之间，具有超顺磁性，表面含有氨基 (NH₂-) 或羧基 (COOH-) 活性基团。所述的 FITC 抗体与磁微粒可以通过化学交联剂，如戊二醛、1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbo diimide hydrochloride (EDC) 等以共价键的形式，也可以通过物理吸附（静电作用、离子键或疏水作用等）的形式进行偶联。

[0016] (2) 乙型肝炎病毒表面抗原抗试剂中酶标抗体的制备：将生物酶与乙型肝炎病毒表面抗原的抗体偶联，所述的生物酶可以是辣根过氧化物酶 (HRP)，也可以是碱性磷酸酶 (ALP)。偶联方法可以是过碘酸钠氧化法、戊二醛法或 Succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)、2-Iminothiolane · HCl (2IT) 交联等多种方法。

[0017] (3) 底物溶液：所述的底物溶液可以是 HRP 催化的发光底物鲁米诺 (Luminol)，也可以是 ALP 催化的发光底物 AMPPD, CSPD 和 CSPD-Star 等。

[0018] (4) 定标液和对照品：选取经灭活的人血清，将其混合后用稀释液按一定比例稀

释而成。

附图说明

[0019] 图 1 为本发明试剂盒与国外知名公司进口 HBsAg 化学发光试剂临床样本测试的一致性。

具体实施方式

[0020] 实施例 1 :抗 FITC 抗原与表面氨基 (COOH-) 磁微粒偶联,制备磁分离试剂

[0021] 取 100mg 表面含羧基 (COOH-) 活性基团的磁微粒用 0.1M MES(2-[N-morpholino] ethane sulfonic acid), pH 4.5-5 溶液 10ml 洗涤 3 次。磁微粒用该溶液 1ml 重悬,加入 2mg 抗 FITC 抗体,混合均匀。加入 100 μ l 10mg/ml EDC 溶液,混合均匀后室温反应 2 小时。用 10ml 含 1%牛血清白蛋白 (BSA) 的 0.01M 磷酸盐缓冲液 (PBS) pH7.4 洗涤磁珠 3 次后,用该溶液配制成 2.5mg/ml 的磁分离试剂工作液。

[0022] 实施例 2 :碱性磷酸酶 (ALP) 与乙型肝炎病毒表面抗原的抗体的偶联

[0023] 取 5mg 乙型肝炎病毒表面抗原的抗体,浓缩至 5mg/ml,加入 13.76mg/mL 的活化剂 2-Iminothiolane \cdot HCl (2IT) 溶液 10 μ l,室温放置 15 分钟后加甘氨酸终止活化反应,室温下放置 5 分钟。使用 PG10 柱子除盐,收集洗脱蛋白。

[0024] 取 7.5mg ALP 溶液,加入 6.69mg/mL 的 Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 溶液 50 μ l,室温放置 30 分钟,加入甘氨酸终止活化反应,室温放置 5 分钟。使用 PG10 柱子除盐,收集洗脱蛋白。

[0025] 将收集的胱抑素 C 抗体与收集的 ALP 混合,4 $^{\circ}$ C 反应 20 个小时,然后使用 Superdex200 凝胶层析柱分离纯化,收集第二峰和第三峰即偶联物,并将其保存于 4 $^{\circ}$ C。

[0026] 实施例 3 :检测血清中乙型肝炎病毒表面抗原

[0027] 用本试剂盒对 680 例临床血清血清进行检测,确定了 CutOff 值的计算方法。

[0028] 材料与仪器

[0029] (1) 乙型肝炎病毒表面抗原试剂盒 ;

[0030] (2) 化学发光免疫分析仪 MAGLIA60 :北京倍爱康生物技术有限公司生产 ;

[0031] (3) 磁分离器 :北京倍爱康生物技术有限公司生产 ;

[0032] (4) 水浴箱 (用于 37 $^{\circ}$ C 温浴)。

[0033] 检测步骤如下 :

[0034] (1) 加样与免疫反应 :在试管中加入 100 μ l 处理好的样本、定标液和对照品,然后分别加入 30 μ l 乙型肝炎病毒表面抗原抗试剂 1 号和 2 号,混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟 ;

[0035] (2) 免疫复合物与磁微粒结合 :向试管中加入 60 μ l 磁分离试剂,混匀,37 $^{\circ}$ C 温育 6 分钟 ;

[0036] (3) 磁分离与洗涤 :使磁微粒在磁场中沉降,去除上清 ;加入 300 μ l 清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清。再重复两次加入 300 μ l 清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清 ;

[0037] (4) 加底物溶液并读出浓度 :每管加入 200 μ l 底物溶液,酶促底物发光,根据样本

的发光值和 Cut Off 值读出样本中乙肝表面抗原的 S/CO 值,判定样本阴阳性。

[0038] 检测结果:

[0039] 当 CutOff 值为定标液发光平均值除以 6 时,样本的阴阳性区分较好,符合率大于 97%。

[0040] 实施例 4:本试剂盒的性能评价

[0041] 根据体外诊断试剂的特点,按惯例检测本试剂盒的灵敏度、阴、阳性符合率、精密度和稳定性。材料与仪器、检测步骤同实施例 3。

[0042] 检测结果:

[0043] (1) 灵敏度:对国家参考品的三种亚型的灵敏度参考品进行检测,结果如下表:

[0044]

Ay2.0	+
Ay1.0	+
Ay0.5	-
Adw2.0	+
Adw1.0	+
Adw0.5	+
Adr1.0	+
Adr0.5	+
Adr0.2	-

[0045] (2) 阴、阳性符合率:对国家参考品的 3 支阳性参考品和 20 支阴性参考品进行检测,结果全部符合;

[0046] (3) 精密度:对三种浓度的内控物质进行精密度检测,每种物质平行测定 10 次,计算测得的 S/CO 值的变异系数,结果表明变异系数在 1.2%~7.5%之间。

[0047] (4) 稳定性:将试剂盒放置 37℃ 8 天后,测试内控品低、中、高,结果仍然在质控范围内;将试剂盒 2~8℃ 放置 12 个月后,能通过国家参考品标准,表明试剂盒稳定性良好,符合临床应用需要。

对照

	+	-
倍 爱 康	+	-
+	310	10
-	10	350
	320	360

图 1

专利名称(译)	一种乙型肝炎病毒表面抗原的磁微粒分离化学发光免疫分析检测方法		
公开(公告)号	CN101975859A	公开(公告)日	2011-02-16
申请号	CN201010279319.4	申请日	2010-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京倍爱康生物技术有限公司		
[标]发明人	郭健夫 朱世伟 王佳昶 全文斌		
发明人	郭健夫 朱世伟 王佳昶 全文斌		
IPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/576		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了乙型肝炎病毒表面抗原的体外检测方法，该方法采用了磁微粒分离化学发光免疫分析技术，它是酶标记技术、磁微粒分离技术和化学发光检测技术相结合的产物，兼具灵敏度高、特异性好、重复性好等特点。可用于人血清、血浆中乙肝表面抗原含量的测定，临床上该指标多用于判断是否感染过乙肝病毒，主要用于监测乙型肝炎的病情及治疗效果和预后。

		对照	
		+	-
倍 爱 康	+	310	10
	-	10	350
		320	360