



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102854314 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 24

(21) 申请号 201210382122. 2

(22) 申请日 2012. 10. 10

(73) 专利权人 深圳康美生物科技股份有限公司  
地址 518057 广东省深圳市南山区科丰路二  
号通讯工业大厦二楼东侧一号

(72) 发明人 张英伟

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限  
公司 11227

代理人 冯琼

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

G01N 33/536 (2006. 01)

G01N 21/31 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101813700 A, 2010. 08. 25, 全文.

CN 101863964 A, 2010. 10. 20, 全文.

CN 102305857 A, 2012. 01. 04, 权利要求 1,  
说明书第【0016】段、第【0019】-【0020】段、第  
【0034】-【0035】段、【0071】-【0072】段、第【0075】  
段、.

CN 102305857 A, 2012. 01. 04, 权利要求 1,  
说明书第【0016】段、第【0019】-【0020】段、第  
【0071】-【0072】段.

CN 102662059 A, 2012. 09. 12, 权利要求 4.

US 005932430 A, 1999. 08. 03, 全文.

Yoshinori Uji et al. Measurement of  
serum myoglobin by a turbidimetric latex  
agglutination method. 《Journal of Clinical  
Laboratory Analysis》. 1992, 第 6 卷 7-11.

Markus Robers et al. Development  
of a Rapid Microparticle-enhanced  
Turbidimetric Immunoassay for Plasma  
Fatty Acid-binding Protein, an Early  
Marker of Acute Myocardial Infarction.  
《Clinical Chemistary》. 1998, 第 44 卷 (第 7  
期), 1564-1567.

梁学亚等. 检测反流性食管炎患者血清胃蛋  
白酶原和幽门螺杆菌抗体的临床意义. 《现代检  
验医学杂志》. 2011, 第 26 卷 (第 5 期), 29-31.

胡平等. 幽门螺杆菌基因克隆表达及其抗原  
表位分析. 《中国公共卫生》. 2008, 第 24 卷 (第  
9 期), 1090-1093.

张孝林. 幽门螺杆菌 HspA 和 UreB 在蚕蛹中  
的表达及表达产物免疫活性的鉴定研究. 《医药  
卫生科技辑》. 2010, E059-59.

Guillermo E. Elicabe et al. Latex  
Particle size distribution. 《Journal of  
Colloid and Interface Science》. 1989, 第 129  
卷 (第 1 期), 192-200.

审查员 李宏悦

权利要求书1页 说明书7页

序列表5页 附图1页

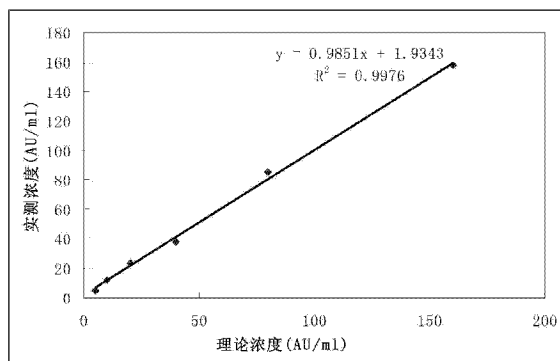
(54) 发明名称

一种胶乳免疫比浊法进行幽门螺杆菌抗体检  
测的试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体公开一种采  
用胶乳免疫比浊法检测幽门螺杆菌抗体含量  
的试剂盒。本发明所述试剂盒包含幽门螺杆菌  
抗体校准品、pH 值 6.5-8.5 的缓冲液以及幽  
门螺杆菌基因重组抗原胶乳试剂。本发明所  
述试剂盒采用胶乳免疫比浊法检测样品中幽  
门螺杆菌抗体含量,灵敏度高,可达到 0.10  
μg/ml;稳定性好,操作简单、快速;特异性  
强,不易受干扰;定量准确,具有

广泛的应用前景。



1. 一种采用胶乳免疫比浊法检测幽门螺杆菌抗体含量的试剂盒,其特征在于,包含试剂 R1、试剂 R2、幽门螺杆菌抗体校准品;所述试剂 R1 为 pH 值 6.5-8.5 的缓冲液,所述试剂 R2 为幽门螺杆菌基因重组抗原胶乳试剂,所述 R2 试剂中幽门螺杆菌基因重组抗原胶乳试剂与幽门螺杆菌的尿素酶 B 亚单位 UreB 抗体特异性结合;所述基因重组抗原的氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述缓冲液选自 Tris/HCl 缓冲液、磷酸盐缓冲液、HEPES 缓冲液、甘氨酸缓冲液、巴比妥缓冲液、MOPSO 缓冲液、DIPSO 缓冲液、HEPPS 缓冲液中的一种,并含有 0.7% -0.9% 的 NaCl、1% -6% 的 PEG6000、0.01% -0.1% 的 Tween80。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的幽门螺杆菌基因重组抗原胶乳试剂的制备包括如下步骤:

步骤 1:聚苯乙烯胶乳溶液的准备:以 pH 为 5 的 MES 溶液分散胶乳,用 EDC 活化 12-15 分钟形成粒径为 90nm-300nm,具有羧基官能团的胶乳;

步骤 2:14000 转 / 分钟,离心 10 分钟收集胶乳沉淀,分散胶乳,调整胶乳浓度;

步骤 3:加入基因重组抗原,所述基因重组抗原的氨基酸序列如 SEQ ID No. 2 所示;室温搅拌后加入封闭液,混合均匀,室温搅拌以 10,000rpm 的速度离心 10-20 分钟,去除上清液;

步骤 4:以缓冲液洗涤分散步骤 3 所得沉淀,加入含 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液洗涤分散即得。

4. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于:步骤 2 所述分散为以 PBS 震荡分散或超声分散。

5. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于:步骤 3 中所述封闭液为用 0.1% BSA 的 PBS 缓冲液。

6. 根据权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于:还包含稳定剂和防腐剂。

7. 根据权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:所述稳定剂选自蛋白质、氨基酸、无机盐、表面活性剂、助悬剂或抗氧剂中的一种或多种;所述的防腐剂选自 0.1% 的叠氮钠、Proclin-300 或庆大霉素。

## 一种胶乳免疫比浊法进行幽门螺杆菌抗体检测的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,特别涉及应用基因重组抗原制备胶乳免疫试剂以及含有该试剂的胶乳免疫比浊法进行幽门螺杆菌抗体检测的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 幽门螺杆菌, *Helicobacter pylori*, 简称 Hp, 由巴里·马歇尔(Barry J. Marshall)和罗宾·沃伦(J. Robin Warren)二人首次发现,此二人因此获得 2005 年的诺贝尔生理学或医学奖。幽门螺杆菌是一种单极、多鞭毛、末端钝圆、螺旋形弯曲的细菌,长 2.5 ~ 4.0  $\mu\text{m}$ , 宽 0.5 ~ 1.0  $\mu\text{m}$ 。在胃粘膜上皮细胞表面常呈典型的螺旋状或弧形。

[0003] 幽门螺杆菌感染是慢性活动性胃炎、消化性胃溃疡以及胃黏膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤的主要致病因素,并且与胃癌的发生密切相关,1994 年世界卫生组织/国际癌症研究机构(WHO/IARC)将幽门螺杆菌定为 I 类致癌原。在亚洲地区,中国内地、中国香港、越南、印度等少年幽门螺杆菌的感染率分别 60%、50%、40%、70%,慢性胃炎患者的胃粘膜活检标本中幽门螺杆菌检出率可达 80% ~ 90%,而消化性胃溃疡患者更高,可达 95% 以上,甚至接近 100%。胃癌由于局部上皮细胞已发生异化,因此其检出率高低报道不一。幽门螺杆菌的感染已是个世界性问题,对其进行准确诊断有利于控制 HP 传播与流行及根除 HP 感染治疗的监测。

[0004] 1983 年通过胃镜取活检标本分离培养成功以来,对幽门螺杆菌感染的诊断已发展出了许多方法,包括有细菌学、病理学、血清学、同位素示踪、分子生物学等。但总的讲来,从标本采集角度看,可以分为侵袭性和非侵袭性两大类。

[0005] 侵入性方法主要指必需通过胃镜取活检标本检查的方法,是目前消化病学科的常规方法。它包括细菌的分离培养和直接涂片、快速尿素酶试验,药敏试验。

[0006] 非侵入性方法主要指不通过胃镜取活检标本诊断幽门螺杆菌标本感染的方法。这类方法包括抗体检测、抗原检测、尿素 13C/14C 呼气试验等。抗体检测目前已有的方法包括酶联免疫法、免疫印迹法、胶体金法和胶乳增强免疫比浊法等,为 HP 的流行病学调查提供了有利便捷手段。胶乳增强免疫比浊法,是将一定量的抗原或者抗体标记到一定粒径大小的胶乳颗粒上制备成胶乳溶液,与相应的抗体或者抗原溶液混合后会引发抗原抗体反应,而形成一定的浊度,检测浊度的变化从而用以判定抗体或抗原浓度的方法。幽门螺杆菌抗体检测方法则是应用幽门螺杆菌特异性抗原标记胶乳颗粒,从而检测人血清样本中相应抗体含量的一种方法。胶乳增强免疫比浊法使用自动生化分析仪,能够简便、快速、大批量且定量的进行样本检测,对于疾病的防治意义重大。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于克服目前使用天然抗原制备胶乳试剂的缺点,天然抗原之间批次间差异大,且制备过程繁琐、周期长,提供一种使用基因重组抗原制备胶乳免疫试剂盒,以测定幽门螺杆菌抗体以及使用该试剂进行临床样本检测的方法。

[0008] 为实现本发明的目的,本发明提供一种采用胶乳免疫比浊法检测幽门螺杆菌抗体含量的试剂盒,包含试剂R1、试剂R2、幽门螺杆菌抗体校准品;所述试剂R1为pH值6.5-8.5的缓冲液,所述试剂R2为幽门螺杆菌基因重组抗原胶乳试剂。

[0009] 作为优选,所述R2试剂中幽门螺杆菌基因重组抗原胶乳试剂与幽门螺杆菌的尿素酶B亚单位UreB、幽门螺杆菌黏附素HpaA、空泡毒素VacA、细胞毒素相关蛋白CagA、热休克蛋白HspB、鞭毛蛋白A亚单位FlaA和B亚单位FlaB中的一种特异性结合。

[0010] 幽门螺杆菌特异性蛋白抗原包括是尿素酶B亚单位(UreB)、幽门螺杆菌黏附素(HpaA)、空泡毒素(VacA)、细胞毒素相关蛋白(CagA)、热休克蛋白(HspB)、鞭毛蛋白A亚单位(FlaA)和B亚单位(FlaB)等。其中尿素酶B亚单位(UreB)、幽门螺杆菌黏附素(HpaA)、热休克蛋白(HspB)、鞭毛蛋白A亚单位(FlaA)和B亚单位(FlaB)几乎在所有的幽门螺杆菌中都有表达。尿素酶蛋白对细菌在体内的定植及致病发挥着重要作用。尿素酶B亚单位(ureB)是尿素酶的两个亚单位之一,已证实是幽门螺杆菌的一个重要保护性抗原。

[0011] 本发明所述胶乳为聚苯乙烯胶乳,是一种核壳形式的胶乳颗粒,其胶乳核是甲基丙烯酸甲酯聚合物,胶乳壳是甲基丙烯酸甲酯聚合物,是一种亲水性胶乳。在壳的表面具有高密度的羧基基团,经活化后在水溶液中可以与预标记蛋白分子,如抗体的氨基基团反应,产生一种稳定的共价化合物。通过加入适当的表面活性剂,胶乳颗粒的表面形成机械性或电性的保护膜,可以抑制胶乳颗粒的絮凝;根据胶乳颗粒的比重,通过适当助悬剂调节缓冲液比重和粘度,能够使胶乳颗粒稳定悬浮而不会沉降。

[0012] 作为优选,所述缓冲液选自Tris/HCl缓冲液、磷酸盐缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲液、巴比妥缓冲液、MOPSO缓冲液、DIPSO缓冲液、HEPPS缓冲液中的一种,并含有0.7%-0.9%的NaCl、1%-6%的PEG 6000、0.01%-0.1%的Tween80。所述缓冲液中含有促凝剂PEG6000,质量体积百分比浓度为1%-6%,可以加快抗原抗体的免疫反应速度,缩短检测时间。并含有无机盐NaCl,可以调节离子强度,质量体积百分比浓度为0.7%-0.9%。

[0013] 作为优选,所述R2试剂中所述基因重组抗原的氨基酸序列如SEQ ID No. 2所示。

[0014] 在本发明的具体实施方式中,公开了所述的幽门螺杆菌基因重组抗原胶乳试剂的制备包括如下步骤:

[0015] 步骤1:聚苯乙烯胶乳溶液的准备:以pH为5的MES溶液分散胶乳,用EDC活化12-15分钟形成粒径为90nm-300nm,具有羧基官能团的胶乳;

[0016] 步骤2:14000转/分钟,离心10分钟收集胶乳沉淀,分散胶乳,调整胶乳浓度;

[0017] 步骤3:加入基因重组抗原,室温搅拌后加入封闭液,混合均匀,室温搅拌以10,000rpm的速度离心10-20分钟,去除上清液;

[0018] 步骤4:以缓冲液洗涤分散步骤3所得沉淀,加入含0.1%BSA的PB S缓冲液洗涤分散即得。

[0019] 作为优选,步骤2所述分散为以PBS震荡分散或超声分散。

[0020] 步骤3所述基因工程抗原加入胶乳溶液中后,在2小时之内通过活化的羧基与胶乳颗粒溶液化学交联致敏,形成共价抗原-胶乳复合物。

[0021] 步骤3所述封闭剂为0.1%BSA的磷酸盐缓冲液,封闭胶乳颗粒表面未结合抗原的表面活性基团。

[0022] 更优选地,步骤3所述基因重组抗原的氨基酸序列如SEQ ID No. 2所示。

[0023] 本发明所述的试剂盒,还包含稳定剂和防腐剂;所述稳定剂选自蛋白质、氨基酸、无机盐、表面活性剂、助悬剂或抗氧剂中的一种或多种;所述防腐剂选自本领域技术人员已知的适当防腐剂,包括 0.1% (g/ml) 的叠氮钠、Proclin-300、庆大霉素。

[0024] 在具体实施例中,公开了一种制备幽门螺杆菌基因重组抗原的方法,其制备步骤包括:

[0025] 1) 步骤 1:特异性抗原的基因序列合成、基因工程表达载体的构建、蛋白表达;

[0026] 2) 步骤 2:蛋白纯化及蛋白浓度测定。

[0027] 步骤 1 中,基因序列来源于公开的 Genbank 数据库;构建的基因工程载体带有选择性蛋白标签,如 His、GST 等。

[0028] 本发明所述校准品是一种用来与样本比较,进行结果计算和质量控制的幽门螺杆菌抗体溶液,包括 PBS 缓冲液、适量稳定剂、适量防腐剂以及一定浓度的幽门螺杆菌特异性抗体。在使用时用水稀释成多个不同浓度的参考校准品。校准品的浓度可以是高浓度单点参考校准品,使用时用水稀释成多个不同浓度的参考校准品。在具体实施例中,公开了一种制备校准品的方法。

[0029] 本发明测定样本的原理是胶乳增强免疫比浊法,所选样本为人体血清,样本与试剂 R1 (pH 值为 6.5-8.5 的缓冲液) 预孵育 3-5 分钟后(使样本中的抗体结合位点充分暴露),加入试剂 R2 (幽门螺杆菌特异性抗原胶乳试剂),继续孵育 3-5 分钟,人体血清中的幽门螺杆菌特异性抗体的两个 Fab 片段分别与不同胶乳颗粒的幽门螺杆菌特异性抗原结合,形成不溶性的胶乳抗原-抗体-胶乳抗原复合物,产生一定的浊度,其浊度高低与检测样本中的特异性抗体浓度成正比。在规定波长下测定该不溶性抗原-抗体复合物的吸光度值,与已知浓度的幽门螺杆菌特异性抗体校准品进行比较,则可计算出样本中幽门螺杆菌抗体的浓度。

[0030] 本发明所述试剂盒采用胶乳免疫比浊法检测幽门螺杆菌抗体含量,灵敏度高,可达到分析灵敏度为 3AU/mL;稳定性好,操作简单、快速;特异性强,不易受干扰;定量准确,具有广泛的应用前景。

## 附图说明

[0031] 图 1 为本发明所述试剂盒线性范围相关性示意图。

## 具体实施方式

[0032] 本发明公开了幽门螺杆菌抗体检测试剂盒及应用胶乳试剂检测幽门螺杆菌抗体含量的方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,通过适当改进工艺参数而实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明所要求保护的技术方案之内。本发明的产品及方法已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0033] 为使本发明更加容易理解,下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。实施例 1:幽门螺杆菌基因重组抗原的制备(以尿素酶 B 抗原为例)

**[0034] (a) 蛋白表达**

**[0035]** 以 GeneBank 数据库中幽门螺杆菌尿素酶 B 公开的核酸序列(AAU21200.1 GI:51989332)为模板,借鉴蛋白序列分析软件保留 C 端富含抗原决定簇的碱基序列,而将 N 端截去 450 个碱基后送 Invitrogen 公司进行基因序列合成,将合成后的基因序列(序列如 SEQ ID No.1 所示)插入带 6X His Tag 的表达载体 pET30a 中,以此表达载体转化大肠杆菌 BL21。当培养物达到 OD600 值为 80 时,将诱导剂 IPTG 加到培养物中以诱导蛋白质表达。将培养物进一步培养 40-45 小时,直至 600nm 的 OD 值增加到 100 至 120。

**[0036] (b) 步骤 2:蛋白纯化及蛋白浓度测定。**

**[0037]** 超声破碎自发酵液收集的大肠杆菌细胞,澄清过滤后,采用 Ni-NTA 亲和层析柱(BioColor)纯化此重组蛋白。纯化的幽门螺杆菌尿素酶 B 抗原重组蛋白氨基酸序列如 SEQ ID No.2 所示。

**[0038]** 以 Bio-Rad 蛋白测定试剂盒定量幽门螺杆菌抗原蛋白浓度,首先将胎牛血清蛋白(BSA)溶于 PBS 中制备下列各浓度之标准品:0mg/ml、0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml,然后以二次水 5 倍稀释分析缓冲液(含考马斯亮兰 R-250),接着在 96 微孔盘中加入 100  $\mu$ l 稀释后的分析缓冲液,最后分别加入 10  $\mu$ l 各浓度标准品及(2)中所获幽门螺杆菌抗原蛋白质溶液,于室温反应 5 分钟,以可见分光光度计或酶标仪在 595nm 波长下读取 OD 值,绘制标准曲线,并计算幽门螺杆菌抗原蛋白质浓度。

**[0039] 实施例 2:幽门螺杆菌抗体胶乳免疫试剂盒的制备****[0040] 1、试剂 R1 的制备**

**[0041]** 先以双蒸水溶解 NaCl(7.0 ~ 9.0g),再加入 Tris-HCl 缓冲液,最后加双蒸水至 1000ml,使 Tris 终浓度为 0.05mol/L,充分摇匀,再加入少量 PEG 6000 和 Tween80,混合均匀即可。

**[0042]** 本领域技术人员也可选择其他的常规缓冲液,如磷酸盐缓冲液、HEPES 缓冲液、甘氨酸缓冲液、巴比妥缓冲液中的一种或多种。

**[0043] 2、试剂 R2 的制备**

**[0044]** 以 pH=5 的 MES 溶液分散胶乳,使之浓度为 1%,加入 EDC 混合均匀后震荡 12-15 分钟,活化为粒径为 90nm-300nm,具有羧基官能团的胶乳。14000 转/分钟,离心 10 分钟收集胶乳沉淀,以 1XPBS 震荡或超声分散胶乳,调整胶乳浓度至 2%。在活化的胶乳溶液中加入基因重组抗原,室温搅拌 2 小时后,加入封闭剂(10%BSA 1XPBS 溶液)少许,混合均匀,室温搅拌 0.5 小时以 10,000rpm 的速度离心 10-20 分钟,去除上清液。所得沉淀中加入含 0.1% BSA 的 1XPBS 缓冲液洗涤分散胶乳使之浓度为 0.1%。

**[0045] 3、校准品的制备(也可选用市售的已知浓度的幽门螺杆菌抗体)**

**[0046]** 用幽门螺杆菌基因重组抗原多次免疫新西兰兔,免疫完毕后取颈动脉血,于室温静置 4 小时,待血液凝结完全,析出血清,以 3,000rpm 离心 10 分钟,取上清以 PBS 稀释后,经 Protein A(Zymed)管柱层析纯化,获得抗体蛋白溶液。

**[0047]** 用实施例一中(b)所述方法测定幽门螺杆菌抗体浓度,再以 1XPBS 加入幽门螺杆菌抗体溶液,使其最终浓度为 1mg/ml(转换成活性单位为 80AU/ml),置于 4℃备用。

**[0048] 实施例 3:幽门螺杆菌抗体检测试剂的测定方法**

**[0049]** 本试剂盒适用于贝克曼、日立、奥林巴斯、东芝、罗氏、雅培、西门子、迈瑞等品牌的

全自动或半自动生化分析仪,测定方法如下:

[0050] 1、测定条件

[0051] 本发明所述试剂盒的测定条件

[0052] 温度 :37℃

[0053] 主波长 :548nm

[0054] 副波长 :800nm

[0055] 样本量 :5  $\mu$  L

[0056] R1 用量 :200  $\mu$  L

[0057] R2 用量 :50  $\mu$  L

[0058] 分析类型 :两点终点法

[0059] 2、测定方法如下:

[0060] 测定空白吸光度,在 200 $\mu$ l R1 试剂中加入 5  $\mu$  L 样本,预孵育 5 分钟,测定空白吸光度后,加入 50  $\mu$  LR2 试剂,孵育 5 分钟,测定反应吸光度。

[0061] 样本量、R1 用量及 R2 用量可按不同型号生化分析仪的要求,按“测定条件”中规定的样本与试剂用量的比例进行调整。如仪器内无指定波长,可选择与指定波长最接近的数值输入。

[0062] (3) 定标、质量控制及样本测定

[0063] 使用试剂盒中的校准品按所使用分析仪器说明书中的校准程序要求定标,模式为多点定标,以去离子水将 80AU/mL 校准品按倍比稀释 1:3、1:1、2:1,以水为零点,校准品为高值点建立工作曲线。

[0064] 定标后,测定血清样本,依据工作曲线可算出样本中的抗体浓度。实施例 4:幽门螺杆菌抗体胶乳免疫试剂的分析性能评估

[0065] 1、分析灵敏度或最低检出限

[0066] 以零标准品为样本,按实施例三所述方法进行测定,重复测定 20 次,计算结果平均值为 0.7AU/mL,标准偏差 SD 为 0.53,平均值与 3 倍标准偏差之和为 2.29AU/mL,因此本发明试剂盒的分析灵敏度为 3AU/mL。

[0067] 2、准确度和重复性

[0068] 以 80.1AU/ml 的校准品和标示值为 36AU/ml 的人血清作为样本,按实施例三所述方法分别重复测定 20 次,分别计算测定平均值 X、标准偏差 SD 及变异系数 CV。结果显示变异系数分别为 1.71% 和 1.93%。

[0069] 表 1 本发明所述试剂盒的准确度和重复性

序号	标示值为 80.1AU/ml 的检 测值 (AU/ml)	标示值为 36AU/ml 的检 测值 (AU/ml)
①	79.7	35.6
②	82.2	36.4
③	78.9	35.9
④	79.9	35.8
⑤	80.1	37.2
⑥	79.3	36.4
⑦	80.8	36.1
⑧	83.3	35.7
⑨	79.5	36.8
⑩	80.2	34.7
平均值 (X)	80.39	36.06
标准差 (SD)	1.37	0.67
变异系数 (CV)	1.71%	1.93%

[0072] 以相对偏差来考察测定准确度,相对偏差均在  $\pm 15\%$  范围内,以变异系数考察批内精密度,低值质控物和高值质控物的变异系数分别为 5.9% 和 5.3%。

[0073] 3、批间精密度

[0074] 用 3 个批号的本发明所述试剂,按实施例三所述方法分别测定同一个血清样本,5 次,计算 5 次测定结果的变异系数 (CV) 以考察批间精密度,结果显示变异系数为 5.7%。

[0075] 4、线性范围

[0076] 将接近线性范围上限的高值样本 (浓度为 185AU/mL)。以去离子水按 1 : 1、1 : 2、1 : 4、1 : 8、1 : 16、1 : 32 稀释,共得 6 个不同浓度的溶液,按实施例三所述方法每个浓度测定 3 次,对实测平均值与相应理论值作回归分析,计算回归方程为  $y = 0.9851x + 1.9343$ ,相关系数  $r = 0.9992$ ,表明本发明试剂盒在 (5 ~ 180)AU/mL 线性范围内相关性较好,见附图 1。

[0077] 5、干扰物质的影响

[0078] 将标示浓度为 80AU/mL 的校准品,分别加入相同体积的各干扰物质溶液与去离子水、浓度为 1mg/mL 的胆红素溶液、浓度为 5mg/mL 的血红蛋白溶液、浊度为 3000FTU 的乳糜

按 9 : 1 的比例混合均匀,按实施例三所述方法测试每个样本 3 次,取均值。观察加入干扰物质与加入去离子水后测定结果的相对偏差。结果表明:加入上述浓度干扰物质样本与加入同体积去离子水的样本测定结果的相对误差不超过 8%,可以认为在中轻度溶血、黄疸或乳糜时,此测定方法的检测结果基本不受干扰。

#### [0079] 6、稳定性

[0080] 将本发明所述试剂盒开瓶后置于 2-8℃ 保存 2 周后,取出按实例三所述方法测定标示值为 80AU/mL 的校准品,各重复测定 3 次,计算检测平均值与标示值的相对偏差。实验结果表明,开瓶 2 周后本发明所述试剂盒检测平均值与标示值的相对偏差均小于 4%,开瓶稳定性较好。

[0081] 将本发明所述试剂盒置于 2-8℃ 保存 16 个月后,取出按实例三所述方法测定标示值为 80AU/mL 的校准品,各重复测定 3 次,计算检测均值与标示值的相对偏差。结果显示检测值与标示值的相对偏差均小于 4%,表明本发明试剂盒在 2-8℃ 保存 16 个月是比较稳定的。

[0082] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 深圳康美生物科技股份有限公司

&lt;120&gt; 一种胶乳免疫比浊法进行幽门螺杆菌抗体检测的试剂盒

&lt;130&gt; MP1209249

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1257

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 幽门螺杆菌

&lt;400&gt; 1

atggtaaaca ccatgattgg tggcggaact ggtcctgctg atggcaactaa cgaaccact 60

atcaactccag gcagaagaaa cttaaatgg atgctcagag cggctgaaga atattccatg 120

aacttagggtt tcttagctaa aggtaacact tctaacgatg cgagctttagc ccatcaaatt 180

gaagccggtg cgattgggtt taaaatccac gaagactggg gaacaactcc ttctgcaatc 240

aatcatgcgt tagatgttgc ggacaaatac gatgtgcaag tcgctatcca cacagacact 300

ttgaatgaag ccggttgtgt agaagacact atggcagcca ttgccggacg cactatgcac 360

actttccaca ctgaaggcgc tgggtggcgga cacgctcctg atattattaa agtggccggc 420

[0002]

gaacacaaca ttctgcccgc ttccactaac cccactatcc ctttactgt gaatacagaa	480
gcagaacaca tggacatgct tatggtgtgc caccacttgg ataaaagcat taaagaagat	540
gttcagttcg ctgattcaag gatccgccct caaactattg cggetgaaga cactttgeat	600
gacatgggga ttttctccat cactagttct gactetcaag ctatgggtcg tgtgggtgaa	660
gftatcacta gaacttggca aacagctgac aaaaacaaaa agaatttgg ccgcttgaaa	720
gaagaaaaag gcgataacga caacttcagg atcaaacgct acttgtctaa atacaccatt	780
aaccagcga tcgctcatgg gattagcgag tatgtaggtt ctgtagaagt gggcaaagtg	840
gctgacttgg tattgtggag tccagcattc tttggcgtga aaccaacat gatcatcaaa	900
ggcgggttca ttgcgttaag tcaaatgggc gatgcgaacg cttctatccc taceccacaa	960
ccagtttatt acagagaaat gttcgetcat catggtaaag ccaaatcga tgcaaacatc	1020
acttttgtgt ctaageggc ttatgacaaa ggcattaaag aagaattagg gcttgaaaga	1080
caagtgttgc cggtaaaaaa ttgcagaaac atcactaaaa aagacatgca attcaacgac	1140
actaccgctc acattgaagt caatcctgaa acttaccatg tttcgtgga tggcaaagaa	1200
gtaactteta aaccagccac faaagtgage ttggcacaac tctttagcat tttctag	1257

[0003]

<210> 2  
 <211> 423  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <400> 2  
 Met Thr Thr Met Ile Gly Gly Gly Thr Gly Pro Ala Asp Gly Thr Asn  
 1 5 10 15  
 Ala Thr Thr Ile Thr Pro Gly Arg Arg Asn Leu Lys Trp Met Leu Arg  
 20 25 30  
 Ala Ala Glu Glu Tyr Ser Met Asn Leu Gly Phe Leu Ala Lys Gly Asn  
 35 40 45  
 Thr Ser Asn Asp Ala Ser Leu Ala Asp Gln Ile Glu Ala Gly Ala Ile  
 50 55 60  
 Gly Phe Lys Ile His Glu Asp Trp Gly Thr Thr Pro Ser Ala Ile Asn  
 65 70 75 80  
 His Ala Leu Asp Val Ala Asp Lys Tyr Asp Val Gln Val Ala Ile His  
 85 90 95  
 Thr Asp Thr Leu Asn Glu Ala Gly Cys Val Glu Asp Thr Met Ala Ala  
 100 105 110  
 Ile Ala Gly Arg Thr Met His Thr Phe His Thr Glu Gly Ala Gly Gly  
 115 120 125  
 Gly His Ala Pro Asp Ile Ile Lys Val Ala Gly Glu His Asn Ile Leu  
 130 135 140  
 Pro Ala Ser Thr Asn Pro Thr Ile Pro Phe Thr Val Asn Thr Glu Ala  
 145 150 155 160  
 Glu His Met Asp Met Leu Met Val Cys His His Leu Asp Lys Ser Ile  
 165 170 175

[0004]

Lys Glu Asp Val Gln Phe Ala Asp Ser Arg Ile Arg Pro Gln Thr Ile  
 180 185 190  
 Ala Ala Glu Asp Thr Leu His Asp Met Gly Ile Phe Ser Ile Thr Ser  
 195 200 205  
 Ser Asp Ser Gln Ala Met Gly Arg Val Gly Glu Val Ile Thr Arg Thr  
 210 215 220  
 Trp Gln Thr Ala Asp Lys Asn Lys Lys Glu Phe Gly Arg Leu Lys Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Lys Gly Asp Asn Asp Asn Phe Arg Ile Lys Arg Tyr Leu Ser Lys  
 245 250 255  
 Tyr Thr Ile Asn Pro Ala Ile Ala His Gly Ile Ser Glu Tyr Val Gly  
 260 265 270  
 Ser Val Glu Val Gly Lys Val Ala Asp Leu Val Leu Trp Ser Pro Ala  
 275 280 285  
 Phe Phe Gly Val Lys Pro Asn Met Ile Ile Lys Gly Gly Phe Ile Ala  
 290 295 300  
 Leu Ser Gln Met Gly Asp Ala Asn Ala Ser Ile Pro Thr Pro Gln Pro  
 305 310 315 320  
 Val Tyr Tyr Arg Glu Met Phe Ala His His Gly Lys Ala Lys Tyr Asp  
 325 330 335  
 Ala Asn Ile Thr Phe Val Ser Gln Ala Ala Tyr Asp Lys Gly Ile Lys  
 340 345 350  
 Glu Glu Leu Gly Leu Glu Arg Gln Val Leu Pro Val Lys Asn Cys Arg  
 355 360 365  
 Asn Ile Thr Lys Lys Asp Met Gln Phe Asn Asp Thr Thr Ala His Ile  
 370 375 380  
 Glu Val Asn Pro Glu Thr Tyr His Val Phe Val Asp Gly Lys Glu Val  
 385 390 395 400

[0005]

---

Thr Ser Lys Pro Ala Thr Lys Val Ser Leu Ala Gln Leu Phe Ser Ile

405

410

415

Phe His His His His His His

420

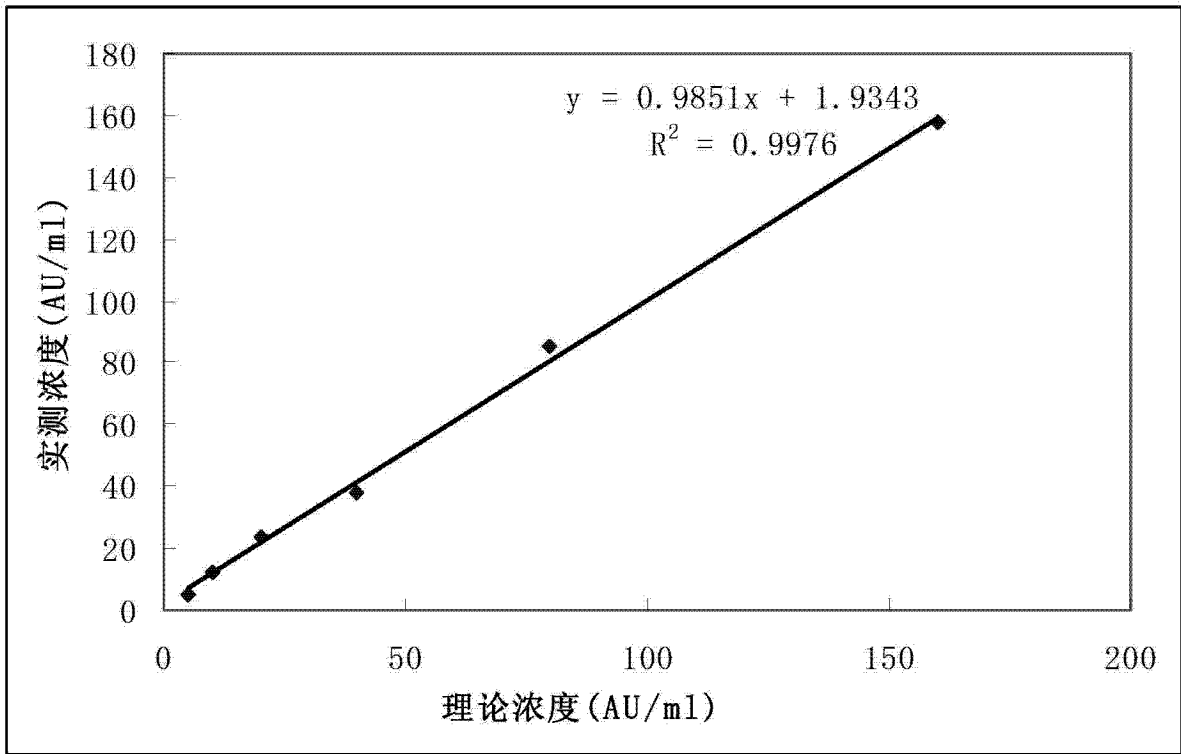


图 1

专利名称(译)	一种胶乳免疫比浊法进行幽门螺杆菌抗体检测的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102854314B</a>	公开(公告)日	2014-12-24
申请号	CN201210382122.2	申请日	2012-10-10
[标]申请(专利权)人(译)	深圳康美生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳康美生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳康美生物科技股份有限公司		
[标]发明人	张英伟		
发明人	张英伟		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/536 G01N21/31		
代理人(译)	冯琼		
其他公开文献	CN102854314A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，具体公开一种采用胶乳免疫比浊法检测幽门螺杆菌抗体含量的试剂盒。本发明所述试剂盒包含幽门螺杆菌抗体校准品、pH值6.5-8.5的缓冲液以及幽门螺杆菌基因重组抗原胶乳试剂。本发明所述试剂盒采用胶乳免疫比浊法检测样品中幽门螺杆菌抗体含量，灵敏度高，可达到0.10μg/ml；稳定性好，操作简单、快速；特异性强，不易受干扰；定量准确，具有广泛的应用前景。

张英伟：幽门螺杆菌(HSP68)的ELISA试剂盒的灵敏度及表达产物免疫活性的鉴定研究，《医药科技辑》，2010, E059-59.  
Guillermo E. Elicabe et al. Latex particle size distribution. 《Journal of Colloid and Interface Science》. 1989, 第 129 第 1 期), 192-200.

审查员 李宏悦

权利要求书1页 说明书7页  
序列表5页 附图1页

的应用前景。

