

[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 200810105412.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/571 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101368956A

[22] 申请日 2008.4.29

[21] 申请号 200810105412.6

[71] 申请人 北京科美东雅生物技术有限公司

地址 100094 北京市海淀区永丰基地丰贤中
路7号北科技园

[72] 发明人 蒋冰飞 应希堂 宋胜利 胡国茂
郑金来 于尚永

权利要求书2页 说明书8页

[54] 发明名称

一种检测单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体的化学发光免疫分析试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及一种检测试剂盒及其制备方法，具体地，是一种间接法检测单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。试剂盒的组分包括：固相包被载体，生物素化抗原，阴阳性对照品，酶标抗体，化学发光底物液和浓缩洗涤液。试剂盒的制备过程包括：亲和素包被固相载体、生物素标记抗原、制备阴阳性对照品、酶标记抗人 IgG 抗体，以及配制化学发光底物液和浓缩洗涤液，分装上述半成品制成试剂盒。本发明属于医学检验领域，是一种灵敏的检测单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体的方法。

1、一种单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括：亲和素包被的固相载体；生物素化的单纯疱疹病毒 I 型抗原；阴性对照品；阳性对照品；碱性磷酸酶标记的抗人 IgG 抗体；化学发光底物液和浓缩洗涤液。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述亲和素化的固相载体为微孔板或塑料管。

3、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述碱性磷酸酶化学发光底物液的发光剂为 1,2-二氧乙烷类衍生物，包括(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''-磷酸氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。

4、如权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于，所述化学发光底物液包含 24g Tris、160g NaCl、4g KCl、15mL HCl、20mL 3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3''-磷酸氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷、1mL Proclin 300、1000mL 双蒸水。

5、一种单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法，其特征在于：

1) 亲和素包被固相载体

将亲和素加至 pH 为 7.0-7.5 的 0.05mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)中混匀配制成所需浓度，并将包被液负载于固相载体上；用生理盐水洗涤上述固相载体后，用含 1%BSA，0.1%防腐剂，pH 值为 7.0-7.5 的 0.01mol/L PBS 作为封闭液封闭上述固相载体。

2) 生物素化单纯疱疹病毒 I 型抗原

用常规方法将生物素(BNHS)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)，用 0.1mol/L NaHCO₃ 将纯化的单纯疱疹病毒 I 型抗原进行适当稀释，将二者混合室温下搅拌反应 2-4h 后用 0.01mol/L pH 为 7.0-7.5 PBS 于 4℃透析过夜，结合物加入等体积

甘油， -20°C 以下保存备用。

3) 配制阴阳性对照品；

将多份高效价 HSV-I IgG 阳性人血清混合后， 56°C 1h 灭活，除菌过滤，适当稀释后制成阳性对照品，稀释液为 10%新生牛血清，0.1%防腐剂，0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液，pH 7.0-7.5。

将多份 HSV-I IgG 阴性人血清混合， 56°C 1h 灭活后除菌过滤，制成阴性对照品。

4) 碱性磷酸酶标记抗人 IgG 抗体；

采用戊二醛法将碱性磷酸酶与抗人 IgG 抗体偶联，然后对 0.01mol/L pH 为 7.0-7.5 的 PBS 充分透析，加入等体积甘油， -20°C 以下保存备用。

5) 配制化学发光底物液

化学发光底物液中包含 0.15-0.25mol/L Tris-HCl，16% NaCl，0.4% KCl，0.1% 防腐剂，1.5%-4.0% 发光剂。

6) 配制浓缩洗涤液

浓缩洗涤液中包含 0.15-0.25mol/L Tris-HCl，16% NaCl，1% Tween-20。使用时用蒸馏水稀释 20 倍。

将上述制备好的半成品分装，组装成成品试剂盒。

6、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述亲和素包被的固相载体为微孔板或塑料管。

7、如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述碱性磷酸酶化学发光底物液的发光剂为 1,2-二氧乙烷类衍生物，包括(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。

一种检测单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体的化学发光免疫分析试剂盒

技术领域

本发明涉及医学检验领域，提供了一种采用生物素-亲和素包被技术和化学发光免疫分析技术检测单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体（HSV-I IgG）的试剂盒及其制备方法。

背景技术

单纯疱疹是单纯疱疹病毒所引起的一种急性疱疹性皮肤病，属于 DNA 病毒，人是单纯疱疹病毒唯一的自然宿主，传播方式主要是直接接触传染，亦可通过被唾液污染的餐具而间接传染。

单纯疱疹的抗体主要有两种，一种是 IgM 抗体，一般在病毒繁殖的高发期出现，持续时间比较短；另一种抗体是 IgG 抗体，该抗体一旦产生，会长时间存在。只要感染了单纯疱疹，IgG 抗体就会在体内存在。单纯疱疹病毒分为 I 和 II 型两种，一般认为单纯疱疹病毒 I 型主要感染腰以上部位，如咽扁桃体炎、角结膜炎及口唇疱疹等。大多数成年人都可终生存在单纯疱疹病毒的 IgG 抗体。

单纯疱疹病毒抗体的血清学诊断可作为临床诊断疱疹的重要辅助手段，现今用于检测单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体的方法主要有放射免疫分析法，免疫胶体金渗滤法，免疫印迹法和酶联免疫分析方法等。放射免疫分析法涉及放射性同位素，检测所需时间长，较少采用；免疫胶体金渗滤法和免疫印迹法操作过程相对复杂，且试剂需要低温保存；酶联免疫分析方法影响因素较多，灵敏度不高。

现今化学发光免疫分析方法是一种较先进的免疫分析方法，自从 Halman 于 1978 年成功地建立了 CLIA，许多新材料、新技术、新工艺以及新仪器的研制相继

取得成功，加速了CLIA的逐步完善，目前已广泛应用到基础和临床医学的各领域。从实用性、稳定性、准确性等方面来看，化学发光免疫分析已经达到并超过了放射免疫分析和荧光免疫分析等方法，具有良好的发展前景。

生物素-亲和素系统是70年代后期应用于免疫学，并得到迅速发展的一种新型生物反应放大系统。亲和素可预包被在固相载体内，再将生物素化抗原或抗体包被于孔内，从而解决了一些抗原或抗体不易包被的难题，也提高了检测灵敏度。在间接法中，将生物素化抗原，待测抗体和酶标记二抗进行反应，在固相载体表面形成BA-抗原-待测抗体-酶标记二抗免疫复合物，再加入示踪物，通过提高免疫复合物的量放大反应信号，从而提高了免疫分析的灵敏度。

发明内容

本发明的目的是提供一种将生物素-亲和素包被技术与化学发光技术结合，用于检测HSV-I型IgG的试剂盒及其制备方法。

本发明的技术方案：一种HSV-I型IgG化学发光免疫分析测定试剂盒，其组成为：亲和素包被的固相载体；生物素化的单纯疱疹病毒I型抗原；阴性对照品；阳性对照品；碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体；上述酶所作用的化学发光底物液和浓缩洗涤液。

根据本发明的试剂盒，所述固相载体为微孔板或塑料管；所述碱性磷酸酶的化学发光底物液的发光剂为1,2-二氧乙烷类衍生物，包括1,2-二氧乙烷类衍生物为(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧乙烷(AMPPD)、CSPD或CDP-Star。

本发明的单纯疱疹病毒I型IgG抗体化学发光免疫分析测定试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

- 1) 亲和素包被固相载体：

将亲和素加至 0.05mol/L pH 为 7.0-7.5 的 PBS 中混匀配制成所需浓度，并将包被液负载于固相载体上；用生理盐水洗涤上述固相载体后，用含有 1%BSA，0.1%防腐剂，pH 值为 7.0-7.5 的 0.01mol/L PBS 作为封闭液封闭上述固相载体。

在上述方法中，所述亲和素的固相载体为微孔板或塑料管；

2) 生物素化单纯疱疹病毒 I 型抗原

用常规方法将生物素 (BNHS) 溶于 N, N-二甲基甲酰胺 (DMF)，用 0.1mol/L NaHCO₃ 将纯化的单纯疱疹病毒 I 型抗原进行适当稀释，将二者混合室温下搅拌反应 2-4h 后用 0.01mol/L pH 为 7.0-7.5 的 PBS 于 4℃透析过夜，结合物加入等体积甘油，-20℃以下保存备用。

3) 配制阴阳性对照品；

将多份高效价 HSV-I IgG 阳性人血清混合后，56℃ 1h 灭活，除菌过滤，适当稀释后制成阳性对照品，稀释液为 10%新生牛血清，0.1%防腐剂，0.02M Tris-HCl 缓冲液，pH 7.0-7.5。

将多份 HSV-I IgG 阴性人血清混合，56℃ 1h 灭活后除菌过滤，制成阴性对照品。

4) 制备碱性磷酸酶标记的抗人 IgG 抗体；

采用戊二醛法将碱性磷酸酶与抗人 IgG 抗体偶联，然后对 0.01mol/L pH 为 7.0-7.5 的 PBS 充分透析，加入等体积甘油，-20℃以下保存备用。

5) 配制化学发光底物液；

化学发光底物液中包含 0.15-0.25mol/L Tris-HCl，16% NaCl，0.4% KCl，0.1% 防腐剂，1.5%-4.0% 发光剂。

在上述方法中，所述碱性磷酸酶的化学发光底物液的发光剂为 1,2-二氧乙烷类衍生物，包括(金刚烷)-1,2-二氧乙烷、3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷、CSPD 或 CDP- Star。

6) 配制浓缩洗涤液

浓缩洗涤液中包含 0.15-0.25mol/L Tris-HCl, 16% NaCl, 1% Tween-20。使用时用蒸馏水稀释 20 倍。

将上述制备好的半成品分装, 组装成成品试剂盒。

本发明的有益效果: 本发明中的试剂盒将化学发光检测技术与生物素-亲和素包被技术结合, 采用抗体间接法测定单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体, 提高了检测的敏感性, 为诊断单纯疱疹感染提供更为可靠的依据。

具体实施方式

实施例 1 制备本发明的单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

1) 亲和素固相微孔板的制备

将亲和素加入包被液中混匀配成 2 μ g/mL, 然后加入到微孔板各孔中, 每孔 110 μ L, 4 $^{\circ}$ C 放置 24h, 包被液的配制为 2.2 g NaH₂PO₄·2H₂O, 12.9 g Na₂HPO₄·12H₂O, 9.0 g NaCl, 用蒸馏水定容至 1000ml, pH 为 7.4。

用生理盐水洗三次, 每孔分别加入封闭液 300 μ L, 室温放置 3 小时, 封闭液的配制为 0.2gNaH₂PO₄·2H₂O、2.9gNaH₂PO₄·12H₂O、10gBSA 和 1mL 生物防腐剂, 定容至 1000ml, pH 值为 7.2。

甩掉封闭液, 在吸水纸上拍干。室温除湿干燥 24 小时。立即进行封袋, 贴签后置 2~8 $^{\circ}$ C 保存。

2) 酶标抗体的制备

采用戊二醛法将碱性磷酸酶与抗人 IgG 抗体偶联, 然后对 0.05mol/L pH 为 7.2 的 PBS 充分透析, 加入等体积甘油, -20 $^{\circ}$ C 以下保存备用。

3) 生物素化抗原的制备

用常规方法将生物素(BNHS)溶于 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)配成 1mg/mL;

用 0.1mol/L 的 NaHCO_3 将纯化的单纯疱疹病毒 I 型抗原稀释为 1-2mg/mL。

按 BNHS 与抗体容积比为 1:8 或重量比 1:7 左右混合，室温搅拌下反应 2-4h；装入透析袋对 0.05mol/L pH 值为 7.2 的 PBS 4℃透析过夜，结合物加入等体积甘油，小量分装，-20℃以下保存备用。

采用方阵法选择生物素化抗原和酶标抗体的工作浓度分别为 1:3500 和 1:5000，将生物素化抗原和酶标抗体用酶标抗体稀释液稀释，其组成成分为 Tris 12.120g，HCl 10mL，BSA 5g，Proclin 300 1ml，定容至 1000mL。

4) 阴阳性对照品的制备

将多份高效价 HSV-I IgG 阳性人血清混合后，56℃ 1h 灭活，除菌过滤，用含 10%新生牛血清，0.1%防腐剂，pH 7.2 的 0.02M Tris-HCl 缓冲液稀释制成阳性对照品，稀释比例为 1:100。

将多份 HSV-I IgG 阴性人血清混合，56℃ 1h 灭活后除菌过滤，制成阴性对照品。阴阳性对照品都于 2-8℃保存。

5) 化学发光底物液的制备

取 Tris 24g，HCl 15ml，NaCl 160g，KCl 4g，proclin300 1mL，AMPPD 20mL，加入蒸馏水溶解后，定容至 1000mL。

6) 浓缩洗涤液的制备

取 Tris 24g，HCl 15mL，NaCl 160g，Tween-20 10mL，用蒸馏水定容至 1000mL。使用时用蒸馏水稀释 20 倍。

将上述制备好的半成品分装，组装成成品试剂盒。

实施例 2 制备本发明的单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

除以塑料管作为载体外，其余均以与实施例 1 相同的方法制备单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒。

实施例 3 制备本发明的单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定

试剂盒

化学发光底物液的制备：取 Tris 30g, HCl 18.75mL, NaCl 160g, KCl 4g, proclin300 1mL, CSPD 16mL, 加入蒸馏水溶解后, 定容至 1000mL。

其余与实施例 1 相同。

实施例 4 制备本发明的单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

化学发光底物液的制备：取 Tris 18g, HCl 11.25mL, NaCl 160g, KCl 4g, NaN₃ 1mL, CPD-Star 32mL, 加入蒸馏水溶解后, 定容至 1000mL。

其余与实施例 1 相同。

实施例 5 本发明的试剂盒的使用方法

以上实施例 1 制备的单纯疱疹病毒 I 型 IgG 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒的具体操作如下：

- 1) 自 4℃ 冰箱中取出试剂盒, 室温平衡 15 分钟; 取出包被板条, 插入板架上。
- 2) 每次试验设空白 1 孔, 阴性对照孔和阳性对照孔各两孔, 除空白孔外, 各孔加生物素化的抗原 50μL, 再加入阴阳性对照品和用生理盐水 1:100 稀释的样本 100μL, 用微量震荡器充分振荡混匀, 37℃ 温育 30 分钟;
- 3) 甩去反应液, 每孔加满稀释后的洗涤液, 洗板 5 次, 最后在干净的吸水纸上扣干;
- 4) 每孔加入酶标记物 100μL, 用微量震荡器充分振荡混匀, 37℃ 温育 30 分钟;
- 5) 甩去反应液, 每孔加满稀释后的洗涤液, 洗板 5 次, 最后在干净的吸水纸上扣干;
- 6) 每孔加入 50μL 化学发光底物液, 用微量震荡器充分振荡混合均匀, 37℃ 温育 30 分钟, 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) $CUT\ OFF=2.1 \times \overline{\text{阴性对照品RLU}}$ ，RLU 大于 Cut off 为阳性，否则为阴性。

实施例 6 本发明的试剂盒的方法学检定

1) 精密度

对同一份阳性标本，按照实施例 5 所述操作方法进行 3 次重复测定，每次 10 孔，计算 RLU 变异系数，结果 CV% 均小于 15%，说明本发明的试剂盒精密性良好，符合要求。

2) 特异性

用本发明的试剂盒检测经临床确诊的单纯疱疹病毒 I 型感染者血清样本 112 例，健康人血清样本 108 例，检测结果如表 1。

表 1 本发明的试剂盒特异性检测结果

检测项目	样本数	阳性检测结果
阳性样本	112	111
阴性样本	108	0

本发明试剂盒于单纯疱疹病毒感染者血清样本中仅检出 1 份阴性，而健康人血清样本的检测方法与临床检测结果完全相符，可见本发明的试剂盒特异性良好。

3) 灵敏度

将一份高滴度阳性样本以 1:20，1:40，1:80，1:160，1:320 的比例稀释，用本发明的试剂盒检测（见表 2）。

表 2 本发明的试剂盒灵敏度检测结果

检测项目	检测结果
1:20	+
1:40	+
1:80	+
1:160	+
1:320	-

由表 2 可知，当高滴度阳性样本 1:20-1:160 稀释时，本发明试剂盒检测仍为阳

性，当高滴度阳性样本 1:320 稀释时，本发明试剂盒检测为阴性，说明本试剂盒的灵敏度良好。

以上所述仅为本发明的较佳实施例，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种检测单纯疱疹病毒I型IgG抗体的化学发光免疫分析试剂盒		
公开(公告)号	CN101368956A	公开(公告)日	2009-02-18
申请号	CN200810105412.6	申请日	2008-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科美东雅生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科美生物技术有限公司		
[标]发明人	蒋冰飞 应希堂 宋胜利 胡国茂 郑金来 于尚永		
发明人	蒋冰飞 应希堂 宋胜利 胡国茂 郑金来 于尚永		
IPC分类号	G01N33/571 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测试剂盒及其制备方法，具体地，是一种间接法检测单纯疱疹病毒I型IgG抗体的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。试剂盒的组分包括：固相包被载体，生物素化抗原，阴阳性对照品，酶标抗体，化学发光底物液和浓缩洗涤液。试剂盒的制备过程包括：亲和素包被固相载体、生物素标记抗原、制备阴阳性对照品、酶标记抗人IgG抗体，以及配制化学发光底物液和浓缩洗涤液，分装上述半成品制成试剂盒。本发明属于医学检验领域，是一种灵敏的检测单纯疱疹病毒I型IgG抗体的方法。

检测项目	样本数	阳性检测结果
阳性样本	112	111
阴性样本	108	0