

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/576

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00115678.0

[43]公开日 2001年11月28日

[11]公开号 CN 1323988A

[22]申请日 2000.5.15 [21]申请号 00115678.0

[71]申请人 上海新新医学生物工程公司

地址 200433 上海市黑山路181号

共同申请人 杜凤鸣

[72]发明人 杜凤鸣 郭葆玉

[74]专利代理机构 上海医药专利事务所

代理人 王巍

权利要求书1页 说明书8页 附图页数0页

[54]发明名称 乙肝病毒前 S₁ 抗原酶联免疫测定试剂盒
及制备方法

[57]摘要

本发明涉及一种乙肝病毒前 S₁ 蛋白酶免测定试剂盒。该试剂盒具有简便、灵敏和稳定等特点,操作简便快速,可以补充或替代常规的“两对半”和 PCR 检测法。本发明提供了制备方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

- 1、一种乙肝病毒 preS₁ 抗原酶联免疫测定试剂盒，其特征在于该试剂盒是由主要成份前 S₁ 抗体预包被反应条 48~96 孔、酶标记前 S₁ 抗体和次要成份阳性对照液 1 支、阴性对照液 1 支、20 倍浓洗涤液 1 瓶、底部缓冲液甲 1 瓶、底物缓冲液乙 1 瓶及终止液 (4N H₂SO₄) 1 瓶组成。
- 2、一种如权利要求 1 所述的一种乙肝病毒 pre S₁ 抗原酶联免疫测定试剂盒的制备方法，其特征在于该方法包括下列步骤：
 - (一) 前 S₁ 抗原基因重组成前 S₁ 基因片断的 21-47aa 及 10-199aa；
 - (二) 免疫 Balb / c 小鼠，得前 S₁ 抗体阳性鼠；
 - (三) 细胞融合，Balb / c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞株；
 - (四) 筛选阳性克隆后，进行杂交瘤细胞扩增，得腹水；
 - (五) 抗前 s₁ 单抗制备，腹水除去细胞及其他杂质得纯化前 s₁ 单抗；
 - (六) HRP—抗前 S₁ 单抗制备，辣根过氧化物酶 (HRP) 与前 S₁ 单抗偶联；
 - (七) 包被前 S₁ 抗体成为予包被反应条；
 - (八) 分装试剂盒其余 7 种成份，按试剂盒需要量分装在小瓶或尖底离心管中；
 - (九) 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格；
 - (十) 组装成为成品。
- 3、根据权利要求 1 所述的一种乙肝病毒 pre S₁ 抗原酶联免疫测定试剂盒，其特征在于其中所述的阳性对照液为 HBV—DNA 和 HbeAg 均阳性血清、阴性对照液为正常人血清、浓洗涤液为磷酸—Tween—20、底物缓冲液甲为 H₂O₂、底物缓冲液乙为 3,3' .5.5' —四甲基联苯胺。

乙肝病毒前 S₁ 抗原酶联免疫测定试剂盒及制备方法

本发明涉及免疫诊断试剂，具体涉及一种乙肝病毒前 S₁(Pre-S₁) 抗原酶联免疫测定试剂盒及制备方法。

长期以来，临床医生是根据“二对半”试剂盒检验结果判断乙肝患者的病情。但是“二对半”试剂查的是与乙型肝炎病毒(HBV)相关的表面和核内抗原和抗体，不是直接查 HBV。因此该方法不能确定患者有无 HBV。此外，用“二对半”试剂盒检查结果表明全世界约有 3 亿人为乙肝表面抗原(HBsAg)携带者，我国约有 1.3 亿，已成为世界之最，但实际上其中的部分人既无临床症状，转氨酶也不高，因此，并非所有 HBsAg 阳性者都携带 HBV。

本发明的目的在于克服现有检测 HBV 的缺陷，研制一种特异性强、简便、灵敏的检测试剂。

本发明提供了一种乙肝病毒前 S₁ 抗原酶联免疫测定试剂盒。该试剂盒是由主要成份为预包被反应条、酶标记前 S₁ 抗体、次要成份为阳性对照液 1 支、阴性对照液 1 支，20 倍浓洗涤液 1 瓶、底物缓冲液甲 1 瓶、底物缓冲液乙 1 瓶和终止液 1 瓶组成。

本发明的试剂盒中所述预包被反应条为 48~96 孔；阳性对照液为 HBV-DNA 和 HBeAg 均阳性血清；阴性对照液为正常人血清；底物缓冲液甲为 H₂O₂；底物缓冲液乙为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)和终止液为 4N H₂SO₄。

本发明的乙肝病毒前 S₁ 抗原酶联免疫测定试剂盒的临床结果如下：

1993 年 9 月至 1994 年 3 月，新华医院、第一人民医院、长海医院、长征医院、海军 411 医院和北京佑安医院等单位，使用上海新新医学生物工程公司研制、生产的乙型肝炎病毒前 S₁(Pre-S₁) 蛋白双抗体夹心 ELISA 试剂盒，检测各种急、慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染后的血清标本，并与常规乙肝病毒免疫标志物(HBV-M)和乙肝病毒 DNA(HBV-DNA)进行比较。现将结果总结报告如下。

I 材料与方 法

一、临床血清标本

各医院临床收集血清标本总数为 1244 份，包括 HBV-M 有一项以上的阳性标本 900 份，HBV-M 阴性 196 份，(其中长海 48 份，市一 82 份，411 医院 66 份)。

二、实验方法

1、Pre-S₁ 蛋白检测：按“乙肝病毒前 S₁ 抗原酶联免疫测定试剂盒”说明书进行操作。即取已包被 Pre-S₁ 蛋白单抗条排酶标板，孔内加血清标本 50 μl，同时设阳性和阴性标准孔；37℃温育 30min，

弃血清并洗涤三遍后加稀释后的酶标抗 Pre-S₁ 蛋白单抗 50 μl, 置酶标板于 37℃温育 30min 后, 弃液并充分洗涤 5 遍。用 TMB 底物显色、终止反应, 在酶标仪上读波长为 450nm 处的吸光度值(OD 值)。测定孔 OD 值大于阴性标准孔 8 倍为阳性。其中 LAK 细胞治疗前后的阳性配对标本尚计算不同稀释度的 P / N 比值。

2、HBV-M 检测: 均采用国产或进口 EIA 试剂盒检测。

3、HBV-DNA: PCR 法。

II 结果

一、Pre-S₁ 与 HBeAg 阳性符合率: 以 HBeAg 为比较参项, 219 份 HBeAg 阳性血清中有 195 份为 Pre-S₁ 阳性, 其阳性符合率为 89. 0 % (见表 1)。

二、Pre-S₁ 与 HBV-DNA (PCR 法) 符合率: 以 HBV-DNA (PCR 法) 为比较参项, 219 份 HBV-DNA (PCR 法) 阳性血清中有 200 份为 Pre-S₁ 阳性, 其阳性符合率为 91. 3% (见表 2)。

三、各类 HBV 感染者 Pre-S₁ 蛋白和 HBV-DNA 测定结果: 海军 411 医院选择的 200 份血清标本分为急性乙型肝炎、慢性活动性肝炎、慢性迁延性肝炎和无症状携带者 4 类。测定结果表明, 在急性乙型肝炎, Pre-S₁ 阳性率达 93. 3%, HBV-DNA 阳性率为 96. 6%; 在慢性活动性肝炎的阳性率分别为 33. 3% 和 38. 1%。四组之间阳性率比较相差显著 ($p < 0. 01$), 急性乙肝和慢活肝组 Pre-S₁ 阳性率分别高于慢迁肝和无症状携带者组 ($p < 0. 01$), 而急性乙肝组 Pre-S₁ 阳性率又高于慢活肝组 ($p < 0. 01$)。见表 3。

四、LAK 细胞治疗前后 Pre-S₁ 滴度和 HBV-DNA 比较: 长征医院测定了 26 对慢活肝 LAK 细胞治疗前后血清 Pre-S 滴度, 见表 4。结果表明: LAK 细胞治疗后 HBV-DNA 阴转率 26. 3%, Pre-S₁ 阴转率 29. 4%。两者的阴转率比较相差不显著 ($P > 0. 05$)。

五、Pre-S₁ 阳性样品重复性结果 (CV%) 在 10% 以内, 见北京佑安医院的结果, 见表五。

III 讨论

Pre-S₁ 蛋白是 HBVS 区基因编码产物, 它和 Pre-S₂ 蛋白一起在 HBV 附着和侵入肝细胞的机制中起重要作用。Pre-S₁ 蛋白主要存在于 Dane 颗粒中, HBsAg 球形颗粒中亦有少量 Pre-S₁ 蛋白。已证实 HBV 的前 S₁ 的 P₂₁₋₄₇ 肽是吸附于靶细胞受体的配体。

目前, 通过血清学检查以判断 HBV 感染状态的常用手段是检测 HBV-M, 即所谓“两对半”: HBsAg-HBsAb, HbeAg-HBeAb 和 HBcAb, 其中 HBeAg 和 HBcAb 阳性, 表明 HBV 在肝内复制。然而, 常规 HBV-M 检测方法繁琐、耗时, 且结果分析比较复杂。PCR 法测定 HBV-DNA 亦已在一些大、中型医疗机构开展, 但是尽管该方法有敏感性高、

特异性强等特点，亦因其操作步骤繁琐、技术要求高、消耗性试剂昂贵等不能被普遍应用。Theilman 等首先报告用 western blot 技术检测了 HBsAg 阳性病人血清 Pre-S₁ 蛋白，认为该蛋白与 HBeAg 和 HBV-DNA 有良好的相关性，是 HBV 在体内复制的标志。Pre-S₁ 蛋白单克隆抗体的制备，使该蛋白的酶联免疫测定技术的建立成为可能”，上海新新医学生物工程公司成功制备了抗 Pre-S₁ 蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞，并建立了 Pre-S₁ 的双抗体夹心 ELISA 技术。经过临床应用结果表明，Pre-S₁ 检测在下述几个方面具有重要价值：

一、Pre-S₁—蛋白是很好的 HBV 复制标志：

本文各医院 219 份 HBeAg 阳性血清标本，195 份检出 Pre-S₁ 蛋白，阳性率达 89.0%。各医院 219 份 HBV-DNA(PCR 法)阳性血清标本，200 份检出 Pre-S₁ 蛋白，阳性符合率为 91.3%，显示试剂盒检出的 Pre-S₁ 蛋白与 HBeAg 和 HBV-DNA(PCR 法)有良好的相关性，HBsAb 和 HBeAb 均阳性标本未检出 Pre-S₁ 蛋白和 HBV-DNA，提示机体建立了清除 HBV 机制后，HBV-DNA 和 Pre-S₁ 蛋白均消失。HBV-M 和 HBV-DNA 阴性的健康人血清标本也未检出 Pre-S₁ 蛋白，因而本 Pre-S₁ 蛋白试剂盒能很好判断病人是否有乙肝病毒复制。

二、Pre-S₁ 蛋白的检测方法与乙型肝炎活动程度有关：

表 3 结果提示，在乙型肝炎的急性期，Pre-S₁—蛋白多为阳性(92.5%)，与本型肝炎 HBV 的高度复制状态相吻合；在慢性活动性肝炎组，Pre-S₁ 蛋白的阳性率(35.1%)明显高于慢性迁延性肝炎(4.4%)和无症状携带者(2.0%)。据此，我们认为，对于 Pre-S₁ 蛋白阳性，同时合并其他肝功能异常或伴临床症状者，应高度怀疑慢性活动性肝炎或急性乙型肝炎。

三、Pre-S₁ 蛋白可以作为药物或其他生物疗法，治疗乙型肝炎的疗效判定指标：

最近，Haruna 等对 35 例 HBeAg 携带者干扰素治疗前后 Pre-S₁、S₂ 蛋白水平进行动态定量观察，结果发现，治疗有效者 Pre-S₁、S₂ 蛋白水平明显低于无效者。认为临床上有可能以 Pre-S₁ 蛋白的消长作为干扰素或其他抗病毒制剂的疗效判定指标。本组初步观察了 LAK 细胞治疗后 Pre-S₁ 蛋白的消长与 HBV-DNA 转阴之间的关系，结果表明，LAK 细胞治疗后，随着 HBV-DNA 的阴转，Pre-S₁ 蛋白亦转阴或滴度下降，说明 Pre-S₁ 蛋白的消长与 HBV 的清除相关。

我们认为，该试剂盒具有操作简便、迅速、经济、可靠等特点，更因 Pre-S₁ 蛋白与 HBV-DNA 和 HBV-M 之间良好的相关性，该检测项目可以补充或替代常规“两对半”和 PCR 检测法，深为临床检验工作者欢迎。

表 1 各医院 HBeAg 阳性血清中 Pre-S₁ 阳性符合率结果

医院	检测总例数	HbeAg(+)	PreS ₁ (+)	PreS ₁ 和HbeAg
长海	236	40	34	85.0%(34/40)
长征	118	86	82	95.3%(82/36)
新华	174	12	10	83.3%(10/12)
市一	200	20	18	90.0%(18/20)
411	298	61	51	83.6%(51/61)
合计	1096	219	195	87.4%(195/219)

表2 各医院HBV-DNA(PCR法)阳性血清中Pre-S₁阳性符合率结果

医院	检测总例数	HBV-DNA (PCR法)	PreS ₁	PreS ₁ 和HBV-DNA
长海	236	39	36	92.3
长征	188	114	98	86.0
新华	174	16	12	75.0
市一	200	20	16	80.0
411	298	40	38	95.0
北京佑安	148	61	54	88.5
合计	1244	280	254	86.1(254/280)

表3 各型肝炎前S₁蛋白与HBV-DNA的关系

临床类型	N	前S ₁ -	前S ₁ +	DNA-	DNA+
急性乙型肝炎	40	3	37	2	38
慢性活动性肝炎	94	61	33	57	37
慢性迁延性肝炎	113	108	5	103	10
无症状带抗体者	51	48	3	48	3
正常对照组	66	66	0	66	0

本发明的另一目的是提供了乙肝病毒前S₁抗原酶免测定试剂盒的制备方法。该方法包括下列步骤:

- (一)前 S₁ 抗原基因重组成前 S₁ 基因片断的 21-47aa 及 10-199aa;
- (二)免疫 Balb / c 小鼠, 得前 S₁ 抗体阳性鼠;
- (三)细胞融合, Balb / c 小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞株;
- (四)筛选阳性克隆后, 进行杂交瘤细胞扩增, 得腹水;
- (五)抗前 s₁ 单抗制备, 腹水除去细胞及其他杂质得纯化前 s₁ 单抗;
- (六)HRP—抗前 S₁ 单抗制备, 辣根过氧化物酶(HRP)与前 S₁ 单抗偶联;
- (七)包被前 S₁ 抗体成为予包被反应条;
- (八)分装试剂盒其余 7 种成份, 按试剂盒需要量分装在小瓶或尖底离心管中;
- (九)检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、稳定性合格;
- (十)组装成为成品。

本发明的试剂盒在使用时可以如下操作:

1. 取出已包被条孔, 插入支架上, 用胶布固定, 以防脱落。
2. 每孔加待检血清 50u1, 各板设阳性对照 1 孔(50u1)阴性对照 1 孔(50u1), 空白对照 1 孔(加蒸馏水 501d), 然后除空白对照孔外各孔加酶标记液 1 滴(50u1), 置 37℃中反应 20 分钟。
3. 取出反应板甩去孔内液体后在草纸上拍 2-3 下, 然后用洗涤液洗 5 次, 每次条孔加满洗涤液后停留 30 秒钟, 每次甩去洗涤液后都要在草纸上拍干, 以便洗涤彻底。(20 倍浓洗涤液 1ml+19ml 蒸馏水即为工作洗涤液)
4. 各孔滴加底物缓冲液甲、乙各 1 滴, 室温避光 10~15 分钟后再每孔滴加终止液 1 滴, 置酶标仪中 450nm 波长读数。

结果判定

阴性对照(A 值)×2.5=临界值(cut off 值), 阴性对照高于 0.05 时按实际 OD 值计算, 阴性对照小于 0.05 按 0.05 计算, 凡待检标本孔 A 值大于临界值即为阳性。

本发明的试剂盒能非常专一地检测患者血清中 HBsAg—preS1 蛋白的浓度。它具有简便, 灵敏和稳定等特点。且本试剂盒操作简便快速, 采用酶标一步检测法可在 1 小时内获得实验结果, 比 PCR 检测法省时 60% 以上(PCR 法最快需 3 小时完成实验), 经临床试用 preS1 蛋白检测阳性与 PCR 检测的 HBV—DNA 阳性有很好的符合率, 药盒的临床阴阳性预示值为 90%。因而本药盒对判断病人是否有病毒复制, 确定乙肝感染病程具有十分重要的参考意义, 与 PCR 操作相比它没有苛刻的技术和条件的限制, 整个实验中无需贵重仪器设备, 凭肉眼可判断实验结果, 能适用于各级医院及临床测试中心, 也可用于流行病学普查。PreS₁ 抗原检测试剂盒, 具有简便、灵敏、重复

性好的优点，能检出完整 HBV，将可被普遍使用，做为 HBV 感染，复制和乙肝病人诊断、治疗和预后的一个新的标志，与其 PreS₁ 抗体合成新的乙肝检测系统。

实例：制备乙肝病毒前 S₁ 蛋白酶免试剂盒的生产

(一) 纯化包被抗体 (HBsAb)：抗 HBs 单抗 (SOH₃) 腹水，离心除去细胞，加等体积的饱和 (NH₄)₂SO₄ 沉淀，经 DE—52 柱纯化，收集蛋白峰，加 (NH₄)₂SO₄ 沉淀，PBS 透析得单抗 SOH₃。SDS—PAGE 鉴定上样蛋白浓度为 5—10ug / ml，基本为均一的染色条带。纯度 >80%，效价 >10 万。

(二) 酶标记抗体制备

1. 单抗制备：细胞株复苏扩增，注射 Balb / c 小鼠腹腔中，取腹水，效价 >10 万，腹水用 50% 饱和 (NH₄)₂SO₄ 沉淀粗提，再经 DE—52 柱纯化，得抗 preS₁ 单抗。效价 >10 万，SDS—PAGE 鉴定。

2. 酶标记抗体制备

抗 preS₁ 单抗原用过碘酸钠法与辣根过氧化物酶偶联

对 PBS 充分透析，加等体积甘油，—20℃ 以下保存。效价 >2000

3. 酶标记抗体浓度选定

采用方阵滴定法选择酶标记抗体的工作浓度大于 1:2000。

preS₁ 合成抗原从 10ng / ml 倍半稀释，包被酶标板，加梯度稀释的酶标抗体测定，以确定最适稀释度。

(三) 预包被抗体板的制备

1. 包被

Na ₂ CO ₃	0.6g
NaHCO ₃	1.58g
重蒸水	500ml

加入适量 Anti-S 抗体，调整 PH 至 9.5，加入微孔板各孔中，置湿盒中加盖，4℃ 过液后甩干。

2. 洗涤

Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	2.6g
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	0.4g
20% Tween—20	2.5ml
NaCL	8.2g
重蒸水	100ml

调整 PH 至 7.2，1:10 稀释后，加入微孔板各孔中，静置 5 秒后甩干，上述操作重复三次，以除去剩余抗体。

3. 封闭

明胶	1.1g	微波炉加温	注入酶标
BSA	5.0g	至呈透明溶液	板各孔中

0.1N PBS 20ml → 冷却至室温 → 蒸馏水至 100ml

弃去液体，
放入湿盒中(加盖) 吸水纸上拍干 重复一次，待干燥后，
→ 37°C 1hr → 放入有干燥剂的塑料袋
封口，保存于 4°C。

(四) 阳性对照的制备

HBeAg 和 HBV-DNA 同时呈阳性的乙肝患者血清，60°C 放置 1 小时，除菌过滤，用本药盒测定 A 值 > 0.3，备用，分装。

(五) 阴性对照的制备

用本试剂 盒测定 A 值 → 0-0.40 → 万分之一硫柳汞 备用
正常人血清 → 用小牛血清 万分之一
→ 0.040-0.100 → 备
用 稀释 0.040 硫柳汞 分装

(六) 酶标单抗配制

10% 小牛血清
90% 0.15M PBS
Anti-preS₁-HRP → 稀释 20 倍，分装。
(稀释度 1: 2000)

(七) 标单抗稀释液

BSA 0.5g
Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.6g
NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.4g
NaCl 8.2g
20% Tween-20 2.5ml
重蒸水 100ml
调整 PH 至 7.2

(八) 底物液 A

Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.7g
柠檬酸 · H₂O 0.5g
3% H₂O₂ 200ul
重蒸水 100ml
调整 PH 至 5.0

(九) 底物液 B

Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.7g
柠檬酸 · H₂O 0.5g

重蒸水 100ml

调整 PH 至 5.0 后，加入 10ml DMSO 含 60mg TMB 的溶液 25ul

(十) 终止液

浓 H_2SO_4 10ml

蒸馏水 80ml

(十一) 10x 洗涤液

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 2.6g

$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.4g

20% Tween—20 2.5ml

重蒸水 100ml

调整 PH 至 7.2

(十二) 半成品及成品的组成

上述(一) → (十一) 步骤所得产品装入小瓶及尖底离，b 管中，即为半成品。抽出三份经过特异性、稳定性、灵敏度及精密度检定合格才能组装成 $preS_1$ 试剂盒。组装成盒后还需抽出三份同半成品一样经过检定合格才能出售。

专利名称(译)	乙肝病毒前S1抗原酶联免疫测定试剂盒及制备方法		
公开(公告)号	CN1323988A	公开(公告)日	2001-11-28
申请号	CN00115678.0	申请日	2000-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
当前申请(专利权)人(译)	杜凤鸣		
[标]发明人	杜凤鸣 郭葆玉		
发明人	杜凤鸣 郭葆玉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/576		
代理人(译)	王巍		
其他公开文献	CN100501399C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种乙肝病毒前S1蛋白酶免测定试剂盒。该试剂盒具有简便、灵敏和稳定等特点,操作简便快速,可以补充或替代常规的“两对半”和PCR检测法。本发明提供了制备方法。

长海	236	40	34	85.0%(34/40)
长征	118	86	82	95.3%(82/36)
新华	174	12	10	83.3%(10/12)
市一	200	20	18	90.0%(18/20)
411	298	61	51	83.6%(51/61)
合计	1096	219	195	87.4%(195/219)

表 2 各医院 HBV-DNA (PCR 法) 阳性血清中 Pre-S1 阳性符合率结果

医院	检测总例数	HBV-DNA (PCR 法)	PreS ₁	PreS ₁ 和 HBV-DNA
长海	236	39	36	92.3
长征	188	114	98	86.0
新华	174	16	12	75.0
市一	200	20	16	80.0
411	298	40	38	95.0
北京佑安	148	61	54	88.5
合计	1244	280	254	86.1(254/280)

表 3 各型肝炎前 S₁ 蛋白与 HBV-DNA 的关系

临床类型	N	前 S ₁ -	前 S ₁ +	DNA-	DNA+
急性乙型肝炎	40	3	37	2	38
慢性活动性肝炎	94	61	33	57	37
慢性迁延性肝炎	113	108	5	103	10
无症状带抗体者	51	48	3	48	3
正常对照组	66	66	0	66	0

本发明的另一目的是提供了乙肝病毒前 S1 抗原酶免测定试剂盒的制备方法。该方法包括下列步骤: