

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/577

G01N 33/543

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510077451.6

[43] 公开日 2005 年 11 月 23 日

[11] 公开号 CN 1700010A

[22] 申请日 2005.6.23

[21] 申请号 200510077451.6

[71] 申请人 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

权利要求书 1 页 说明书 21 页

[54] 发明名称 乙型肝炎病毒大蛋白前 S 区抗原检测试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种单克隆抗体，它是通过使用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区抗原免疫动物、筛选杂交瘤克隆而获得的。本发明还提供了含有该单克隆抗体的试剂盒、其制备方法及其应用。该试剂盒可用于乙型肝炎病毒的发展水平、预后诊断，可作为早期诊断乙肝病毒感染的指标，判断被病毒感染后的个体是否具有传染性，根据对乙肝大蛋白表达水平的监测还能确定患者的预后水平及引发肝硬化和肝癌的几率，为乙型肝炎的预防、诊断、治疗提供最直接的支持。

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

1. 一种乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区酶联免疫测定试剂盒；其特征在於，它含有使用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区抗原免疫小鼠、筛选杂交瘤克隆而获得的单克隆抗体。
- 5 2. 一种乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区酶联免疫测定试剂盒，其特征在於，它含有通过下述方法制备出的单克隆抗体：用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区重组抗原或从血清中提取的具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原纯品对 Balb/c 小鼠进行免疫，取免疫小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合，筛选 LP 特异的杂交瘤克隆，注射小鼠腹腔，收集腹水，纯化单克隆抗体。
- 10 3. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，它还含有 LP 阳性、阴性对照、酶标板、辣根过氧化物酶标记多克隆抗体、辅助试剂，其特征在於，所述的单克隆抗体是包被在酶标板上。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂盒，它还含有 LP 标准品、酶
15 标板、辣根过氧化物酶标记多克隆抗体、辅助试剂，其特征在於，所述的单克隆抗体是包被在酶标板上。
5. 一种制作权利要求 3 所述的试剂盒的方法，其包括 LP 阳性、阴性对照的制备、单克隆抗体包被板的制备、酶标多克隆抗体的制备、以及辅助试剂的配制。
- 20 6. 一种制作权利要求 4 所述的试剂盒的方法，其包括 LP 标准品的制备、单克隆抗体包被板的制备、酶标多克隆抗体的制备、以及辅助试剂的配制。
7. 一种检测乙型肝炎病毒复制情况的方法，其中包括使权利要求 1-6 中的任一项所述的试剂盒与血清或血浆样品相接触的步骤。

乙型肝炎病毒大蛋白前 S 区抗原检测试剂盒

技术领域

- 5 本发明属于生物技术领域，更具体地说，本发明提供了一种使用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区抗原制备出的单克隆抗体、含有该单克隆抗体的试剂盒、其制备方法及其应用。利用该试剂盒可以快速、准确地诊断人体内乙型肝炎病毒的复制情况。

背景技术

- 10 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。目前尚无有效的抗病毒方法治疗乙型肝炎病毒慢性感染，因此病毒的预防和检测就是避免感染的重要手段，对病毒感染的动态监测也能为乙肝的发展、预后提供重要信息。
- 15 乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 是 HBV 的外膜蛋白，由 HBV 基因组的 S 区所编码，S 区分为 *preS1*、*preS2* 和 S 基因 3 段，它们阅读框相位相同，连续串联排列，可以共用 1 个终止密码。这 3 个基因分别编码三种表面蛋白：(1) 主要表面蛋白：简称主蛋白，由 S 基因编码，是病毒包膜及亚单位颗粒的主要成分，因其分子量小，因此称之为小蛋白，传统上 HBsAg 常指由 S 基因编码的蛋白；(2) 中等分子 S 蛋白 (M 蛋白)，由 S 及 Pre-S2 基因区所编码；(3) 大分子 S 蛋白 (L 蛋白)，由 S、Pre-S1 及 Pre-S2 基因区所编码。大蛋白 (Large protein, LP) 是三种蛋白中分子量最大的。大蛋白的前 S1 在前 S2 区的上游，前 S1 和前 S2 区段形成
- 20
- 25

构象型的前 S 区蛋白，作为大蛋白的组成，位于病毒颗粒表面，在病毒感染、复制、刺激机体产生免疫反应方面以及对乙型肝炎患者的诊断、治疗和预后均有重要参考意义。

HBV 感染者血清中有 3 种不同形态的病毒颗粒：小球形颗粒（直径 22nm）、管状颗粒（直径 22nm、长度 100-1000nm）、Dane 颗粒。S、Pre-S1 及 Pre-S2 这 3 种蛋白在不同颗粒表面存在的情况不同，Dane 颗粒与管形颗粒的包膜蛋白组成相同，每个病毒含有 300 - 400 个分子的 S 蛋白与 40 - 80 个分子的 M 蛋白和 L 蛋白。小球形蛋白的包膜蛋白组成则随病毒是否复制而异：在有病毒复制者中，小球形颗粒包膜上的 M 蛋白和 S 蛋白含量与 Dane 颗粒上的大致相同，存在 L 蛋白，但比例低于 1/20；在无病毒复制者中，小球形颗粒的包膜蛋白几乎全部是 S 蛋白，无 L 蛋白，仅有 1% 的 M 蛋白。

乙肝感染者中，外膜颗粒在血流中的分布：在感染者的病人血流中大多数为 22nm 的小球颗粒，仅仅由大蛋白或同时有约 5% 的中蛋白组成；病毒复制期病人同时有少数长短不一、直径 22nm 的管型颗粒，由主蛋白、2%-5% 中蛋白和 5%-10% 大蛋白组成。在病毒非复制期，大蛋白在血清中很低和无，大量滞留在肝细胞中。因此可以根据检测血液中大蛋白的有无，来判断病毒携带者体内的 HBV 病毒是否在进行复制。

酶联免疫吸附技术是目前最常用的检测患者血清中乙型肝炎表面抗原的存在情况的技术，通常利用单克隆抗体检测 HBsAg。单克隆抗体由于是针对一个抗原表位的抗体，具有很高特异性，可以特异性识别相应抗原。利用固相包被的单克隆抗体将血清中的 HBsAg 特异地结合下来，再吸附酶标记的抗 HBsAg 多克隆抗体，对底物反应显色，显色结果就能作为量化指标反映血清中 HBsAg 的含量，体现乙型肝炎病毒的感染水平。

在血清大蛋白的免疫检测中，目前都利用大蛋白特有的区段 preS1 做为免疫原，制备单克隆抗体构建诊断试剂。但是蛋白的免疫表位中有很重要的一部分是依赖蛋白空间折叠后形成的高级结构出现的，制作单克隆抗体时，如果获得的抗原是低级结构的，理论上再好的序列，也会在实际形成高级结

构时，可能被折叠、蜷曲而失去暴露表位的机会；构成表位的某些肽段在缺少其他肽段的辅助折叠的情况下，形成的拓扑结构可能与生理状态下的不同。这样的抗原制作出来的单克隆抗体在实际应用中必然导致漏检，就象现在的前 S1 抗原诊断试剂盒，临床应用发现大量 DNA 阳性的标本试剂盒前 S1 检测是阴性。在乙肝病毒大蛋白上并不单独存在前 S1 区段，而是存在前 S1 和前 S2 区组成的构象型前 S 区，乙肝病毒中的 LP 大蛋白中的前 S 区是构象型蛋白，具有复杂的拓扑结构，只有针对此复杂结构的特异性单克隆抗体，才能真正捕捉到大蛋白的存在。

本发明的目的正是为了解决目前临床上用抗 preS1 单抗来作为乙型肝炎大蛋白指标检测手段的不足，利用针对大蛋白前 S 区构象型表位的单克隆抗体诊断乙型肝炎病毒的复制水平，并且提供了操作简便、准确灵敏的检测试剂盒和测定方法，从而可以提高乙型肝炎病毒大蛋白的检出率，以便临床从蛋白水平上观察病毒复制水平，能尽早采取有效的综合治疗方案，预防肝硬化和肝癌的发生。

15

发明内容

本发明提供了诊断试剂盒及其制备方法，通过该试剂盒可以准确地诊断出乙型肝炎病毒的复制感染情况。由于使用了特异针对构象型乙型肝炎大蛋白的单克隆抗体，能真实地反应出血清中大蛋白的存在水平，没有交叉反应性，特异性良好，便于质量控制，也显示出极高的灵敏度。

一方面，本发明提供了一种单克隆抗体，其特征在于，它是通过使用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白抗原免疫小鼠、筛选杂交瘤克隆而获得的。优选地，所述的单克隆抗体是由下述方法制备出的：用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区重组抗原或从血清中提取的具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白纯品对 Balb/c 小鼠进行免疫，取免疫小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合，筛选 LP 特异的杂交瘤克隆，注射小鼠腹腔，收集腹水，纯化单克隆抗体。

另一方面，本发明还提供了上述的单克隆抗体在制备用于检测乙型肝炎病毒复制情况的试剂盒中的应用。

另一方面，本发明提供了一种制备单克隆抗体的方法，其包括：用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区重组抗原或从血清中提取的具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白纯品对 Balb/c 小鼠进行免疫，取免疫小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合，筛选 LP 特异的杂交瘤克隆，注射小鼠腹腔，收集腹水，纯化单克隆抗体。

另一方面，本发明提供了乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白酶联免疫测定试剂盒，它含有单克隆抗体，其特征在于，所述的单克隆抗体是通过使用构象型乙肝病毒表面抗原大蛋白对动物免疫、筛选杂交瘤克隆而获得的。优选地，所述的单克隆抗体是由下述方法制备出的：用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区重组抗原或从血清中提取的具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白纯品对 Balb/c 小鼠进行免疫，取免疫小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合，筛选 LP 特异的杂交瘤克隆，注射小鼠腹腔，收集腹水，纯化单克隆抗体。

上述的本发明的试剂盒还可以含有 LP 阳性、阴性对照、酶标板、辣根过氧化物酶（HRP）标记多克隆抗体、辅助试剂，其中，所述的单克隆抗体是包被在酶标板上。

另一方面，本发明还提供了上述试剂盒的制作方法，其包括 LP 阳性、阴性对照的制备、单克隆抗体包被板的制备、酶标多克隆抗体的制备、以及辅助试剂的配制。

本发明试剂盒中的 LP 阳性、阴性对照是从人血清中制备的。一种制备步骤包括：收集乙型肝炎急性期病人血清和健康正常人血清，高温灭活，过滤除菌、分装，即获得 LP 阳性、阴性对照。

本发明试剂盒中的单克隆抗体包被板是用 HBV-LP 蛋白纯品对小鼠免疫而获得的鼠抗人单克隆抗体包被酶标板而制作的。酶标板可选用国产板或进口板；规格可以是 96 孔平板或 12×8、12×4 可拆条板。一种单克隆抗体包被酶标板的制作步骤如下：

1) 制备单克隆抗体: 用乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区重组抗原或血清中提取的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白纯品, 按常规对 Balb/c 小鼠进行免疫后, 取免疫小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 筛选 LP 特异的杂交瘤克隆, 注射小鼠腹腔, 收集腹水经重组 proteinG 预装层析柱纯化后即获得抗 LP 单克隆抗体。

2) 包被: 将上述单克隆抗体用 0.05M 碳酸缓冲液稀释后加入酶标板各孔, 每孔 100 μ 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, 即获得单克隆抗体包被酶标板。

10 本发明试剂盒中的酶标多克隆抗体是用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 HBsAg 多克隆抗体而制备的。一种酶标多克隆抗体的制备步骤如下:

a) 以 NaIO₄-乙二醇法进行 HRP 的氧化, 达到终浓度 10mg/ml。

b) 多克隆抗体和 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 NaBH₄ 溶液终止反应, 再对 PBS 15 透析过夜。

c) 用饱和硫酸铵沉淀, 获得纯化的 HRP 酶标抗 HBsAg 多克隆抗体。

本发明试剂盒中的辅助试剂包括酶联反应底物溶液、显色液、反应终止液和清洗缓冲液, 一种配制辅助试剂的方法如下:

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

b) 显色液 B: 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% 25 吐温 20 溶液。

另一方面, 本发明还提供了检测乙型肝炎病毒的复制情况的方法, 其中包括使上述试剂盒与血清或血浆样品相接触的步骤。

更具体地, 本发明的检测方法包括下述步骤:

a) 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入 50 μ l 阳性、阴性对照血清, 或待测血清样品, 将 HRP-多克隆抗体溶液加入各孔, 每孔 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 分钟。重复洗板操作 4 次。

b) 显色反应: 每孔依次加入底物溶液 A, 显色液 B 各 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50 μ l 反应终止液结束反应。

c) 比色: 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。

d) 结果判断:

A. 阳性质控血清 OD 值在 2.0 以上, 阴性质控血清 OD 值在 0.05 以下时, 本次测定有效。

B. 待测样品 OD 值大于 0.105 时判为乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白阳性。

另一方面, 本发明提供了一种乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白定量酶联免疫测定试剂盒, 它含有 LP 标准品、单克隆抗体、酶标板、辣根过氧化物酶标记多克隆抗体、辅助试剂, 其特征在于, 所述的单克隆抗体是通过使用构象型乙肝病毒表面抗原大蛋白对动物免疫、筛选杂交瘤克隆而获得的, 且包被在所述的酶标板上。优选地, 所述的单克隆抗体是由下述方法制备出的: 用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区重组抗原或从血清中提取的具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白纯品对 Balb/c 小鼠进行免疫, 取免疫小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合, 筛选 LP 特异的杂交瘤克隆, 注射小鼠腹腔, 收集腹水, 纯化单克隆抗体。

另一方面, 本发明还提供了上述试剂盒的制作方法, 其包括标准品的制备、单克隆抗体包被板的制作、酶标多克隆抗体的制备、以及辅助试剂的配制。

本发明试剂盒中的 LP 标准品是通过基因工程、分子生物学和生物化学的手段重组表达制备的。一种制备步骤包括: 用杆状病毒表达乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白, 利用融合表达的蛋白标签做亲和纯化, 即获

得 LP 标准品。

本发明试剂盒中的单克隆抗体包被板是用 HBV-LP 蛋白纯品对小鼠免疫而获得的鼠抗人单克隆抗体包被酶标板而制作的。酶标板可选用国产板或进口板；规格可以是 96 孔平板或 12×8、12×4 可拆条板。一种单克隆抗体包被酶标板的制作步骤如下：

1) 制备单克隆抗体：用乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区重组抗原或血清中提取的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白纯品按常规对 Balb/c 小鼠进行免疫后，取免疫小鼠的脾脏细胞与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合，筛选 LP 特异的杂交瘤克隆，注射小鼠腹腔，收集腹水经重组 proteinG 预装层析柱纯化后即获得抗 LP 单克隆抗体。

2) 包被：将上述单克隆抗体用 0.05M 碳酸缓冲液稀释后加入酶标板各孔，每孔 100 μ 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，即获得单克隆抗体包被酶标板。

本发明试剂盒中的酶标多克隆抗体是用辣根过氧化物酶（HRP）标记 HBsAg 多克隆抗体而制备的。一种酶标多克隆抗体的制备步骤如下：

a) 以 NaIO₄-乙二醇法进行 HRP 的氧化，达到终浓度 10mg/ml。

b) 多克隆抗体和 HRP 在碱性 CB 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 NaBH₄ 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 酶标抗 HBsAg 多克隆抗体。

本发明试剂盒中的辅助试剂包括酶联反应底物溶液、显色液、反应终止液和清洗缓冲液，一种配制辅助试剂的方法如下：

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

b) 显色液 B：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×): PBS (pH7.4)配制的0.05%吐温20溶液。

另一方面,本发明还提供了检测乙型肝炎病毒的复制情况的方法,其中包括使上述试剂盒与血清或血浆样品相接触的步骤。

5 更具体地,本发明的检测方法包括下述步骤:

a) 抗原-抗体反应:在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入50μl已稀释好的不同浓度的标准品,或待测血清样品,将HRP-多克隆抗体溶液加入各孔,每孔50μl,37℃水浴保温30分钟。重复洗板操作4次。

10 b) 显色反应:每孔依次加入底物溶液A,显色液B各50μl,37℃水浴保温10分钟,每孔再加入50μl反应终止液结束反应。

c) 比色: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。

d) 结果计算:

15 A 制作标准曲线:以标准品浓度为横坐标,标准品测定的OD值为纵坐标,作出标准曲线;计算标准曲线回归系数 R^2 ,当 $R^2>0.98$ 时本次测定有效;

B 计算待测血清样品浓度:根据待测样品的OD值从标准曲线计算出待测血清样品的LP浓度。

20 与已有的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白检测指标preS1试剂相比较,本发明试剂盒具有以下优点:

a) 本发明试剂盒以preS1+preS2段形成的构象型抗原免疫获得的单克隆抗体作为乙型肝炎病毒感染复制水平的诊断指标,克服了以往检测试剂仅用preS1免疫获得抗体进行检测的低检出率,与PCR检测结果达到96%以上的吻合。

25 b) 大蛋白单克隆抗体对S蛋白没有反应,对preS的构象型表位有高度特异性,能有效反映出血清中大蛋白的存在水平,提高复制状态的HBV的检出率。

c) 试剂盒配套用的标准品,能够定量计算出血样标本中所含的乙肝

病毒大蛋白的含量，而以往的前 S1 试剂只是定性。

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 5 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: LP 定性酶联免疫检测试剂盒的制作

一种乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白酶联免疫检测试剂盒(96 人份)，

10 其组成包括：

LP 阴性、阳性对照各 1 瓶；

LP 单克隆抗体包被板（96 孔）1 块；

辣根过氧化物酶（HRP）标记的 HBsAg 多克隆抗体 1 瓶，6ml/瓶；

底物溶液 A、显色液 B 各 1 瓶，各 5ml/瓶；

15 反应终止液 1 瓶，5ml/瓶；

清洗缓冲液（20X 浓缩）1 瓶，30ml/瓶。

具体操作如下：

1. 制备 LP 阴性、阳性对照：

20 1) 收集血清：从医院或血站获得健康正常人、健康产妇胎盘血清和急性期乙型肝炎患者血清，于-70℃保存备用；

2) 分装：

LP 阳性对照血清：急性期乙型肝炎患者血清，经检定为 LP 阳性，经 60℃ 1 小时处理后过滤除菌，在无菌条件下分装入 1.5ml eppendorf 管中，每管 0.5ml。贮存于 4℃。

25 LP 阴性对照血清：健康产妇胎盘血清或其他正常人血清，经检定为 LP 阴性。取多份以上血清合并成批，经 60℃ 1 小时处理后，过滤除菌在无菌的条件下分装入 1.5ml eppendorf 管中，每管 0.5ml。贮存于 4℃。

2. 制作 LP 单克隆抗体包被板：

1) LP 单克隆抗体制备:

a) 乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区重组抗原的构建(免疫原):
在乙型肝炎病毒表面抗原编码区中, *preS1* 区段是大蛋白独有的区段, 是
检测 LP 的必然选择。为获得该区段的构象型表位, 选取 *preS1* 和 *preS2*
5 编码序列的全段, 在杆状病毒中与亲和纯化标签 his-tag 融合表达, 经镍
柱亲和层析, 获得纯化的构象型乙型肝炎表面抗原大蛋白 preS 抗原。

b) 乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白的制备(免疫原): 以 a)亲和纯化的
preS 抗原免疫兔。产生的多克隆抗体利用 PreS 偶联的 sepharose 4B 做纯
化。随后亲和纯化的多克隆抗体再偶联到 sepharose 4B 上, 得到亲和柱,
10 用于纯化来自急性 HBV 感染病人的天然的 HBV preS 抗原, 获得 HBV
表面抗原大蛋白纯品。

c) 免疫和细胞融合: 如 b)制备的免疫原(乙型肝炎病毒表面抗原大
蛋白)与弗氏完全佐剂混合, 得到油状乳液。将该乳液以 0.2 毫升的剂量
皮下施给 BALB/C 小鼠(CLEAJapan 的产品, 6 周龄雄性)的背部位点。第
15 一次免疫 7 天或 14 天后增强免疫, 然后在细胞融合前 3 天, 腹腔内施用
0.2 毫升上述免疫原。最后一次增强 3 天后, 从各小鼠上切下脾脏细胞,
与骨髓瘤细胞(SP2/0-Ag14 株, RikenGeneBank)以 10: 1 混合, 用 50% 聚
乙二醇 4000 融合。在 HAT 培养基(Gibco 的产品)上选择性培养杂交瘤。

d) 杂交瘤选择: 在融合后第 12 天, 用 ELISA 法测定各培养上清液
20 中的抗体活性。各取 200 微升的融合细胞的培养上清液加到 96 孔 ELISA
板 Coaster 的产品)的孔中, 其中每孔固定有 10 微克/毫升的抗原, 分别是
杆状病毒表达的不同区段 HBV 表面抗原前 S 区重组抗原, 包括 preS1、
preS2 和 preS1+preS2 抗原。反应在 37°C 进行 1 小时, 然后用含 0.05%
Tween 20 的 PBS(洗液)洗涤, 在各孔中加入 200 微升过氧化物酶标记的
25 抗小鼠 IgG (Cappel 产品, 1: 20, 000)。反应在 37°C 进行 1 小时后, 用
上述洗液洗涤板。然后在各孔中加入 200 微升底物溶液(0.1M 联苯二胺和
0.012% 过氧化氢水溶液), 使反应在室温下进行 15 分钟。然后, 在各孔
中加入 50 微升 3.5mol 硫酸终止酶反应, 测量 492 纳米的吸光度, 选择

能与 preS1 和 preS1+preS2 抗原产生反应而不与 preS2 产生反应的抗体，并收获吸光度不低于 0.15 的杂交瘤克隆。用限制稀释法对各克隆进行两次克隆。克隆后的杂交瘤移植到 BALB/C 小鼠中，结果发现 32 个杂交瘤克隆产生各种可作为腹水回收的单克隆抗体。

5 2) 包被:

酶标板采用 Costar 公司生产的 12×8 可拆条板。将步骤 1) 所获单克隆抗体用 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，即获得单克隆抗体包被酶标板。按 96 孔/块用铝箔袋包装、真空封闭。

10

3. 制备辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 HBsAg 多克隆抗体

1) 酶的氧化 (全过程避光)

a) 称取 HRP 5mg，加 ddH₂O 250μl 溶解。

15

b) 称取 NaIO₄ 5mg，加 ddH₂O 250μl 溶解，配制成 20mg/mL 的浓度。

c) 往 HRP 溶液中逐滴加入 NaIO₄ 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 ddH₂O 中，逐滴加入上述混合溶液中，边加边搅拌。

20

f) 室温静置 30 分钟。

g) 酶氧化过程完成，HRP 终浓度为 10mg/ml。

2) 多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 NaHCO₃ 与 1mol/L Na₂CO₃ 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。

25

b) 将多克隆抗体与 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 NaBH₄ 溶液终止反应。摇匀, 4℃静置 2 小时, 每半小时摇一次, NaBH₄ 溶液加入的量要合适。

d) 用 pH7.2 的 10 mM PBS(预配置 0.01mol/L 的 Na₂HPO₄ 和 NaH₂PO₄ 储备液, 根据需要的 pH 值混匀二者成 PBS 缓冲液)透析过夜。

5 换液一次即可。

3) 纯化 HRP 酶标抗 HBsAg 多克隆抗体

a) 完成标记的多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℃静置 1 小时。

10 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。

15 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-多克隆抗体对 PBS 透析过夜。

20 i) 超滤管离心浓缩纯化的 HRP-多克隆抗体, 获得克分子比接近 1:8 的酶标抗 HBsAg 多克隆抗体。

4) 组装: 用含 10%胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 3) 获得的酶标抗 HBsAg 多克隆抗体至合适的工作浓度, 按 6ml/瓶分装, 贮存于 4℃。

25 4. 配制底物溶液 A: 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 B: TMB(0.1mg/ml) 甲醇溶液, 按 5ml/瓶分装。

6. 配制反应终止液: 2mol/L H₂SO₄, 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。

应用本发明技术制备 LP 定性酶联免疫检测试剂盒的质量检测

1) 准确性: 15 份 LP 阴性质控血清 (包括特异性对照血清) 参考品的检测结果, 无假阳性出现。10 份 LP 阳性质控血清的参考品检测结果
5 无假阴性出现。对系列稀释阳性参考品检测的阳性终点均不低于 1: 8。

2) 精密度: 随机抽取 20 盒不同批次试剂盒, 用同一份 LP 阳性质控血清按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果, 求出均值、SD 和变异系数 CV。精密度试验结果显示批间 CV < 15%。

3) 检测灵敏度: 根据 LP 重组表达抗原梯度稀释测定结果, 本试剂
10 盒的检测灵敏度为 2.4ng/ml。

4) 特异性: 取四份待测样品混合后分为四份混合血清标本, 每份 1ml。分别加入 50ng 剂量的组织型纤溶酶原激活剂 (tPA)、血纤维蛋白溶酶 (Plasmin)、或纤粘连蛋白 (FN) 后制成干扰试验血清标本 #1、#2、#3, 未加任何干扰物的 #4 混合血清标本作为基础样品。按说明书操作步骤进
15 行测定并计算结果。然后按干扰试验计算公式计算干扰率。标本 #1、#2、#3 的干扰误差均小于 1.5%。

实施例 2: LP 定性酶联免疫检测试剂盒的使用

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
20 倍稀释。

2. 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入 50 μ l 阳性或阴性质控血清, 或待测血清样品, 将 HRP-多克隆抗体溶液加入各孔, 每孔 50ul, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 分钟。重复洗板操作 5 次, 每次 3 分钟。

25 3. 显色反应: 每孔依次加入底物溶液 A、TMB 显色液 B 各 50 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50ul 反应终止液结束反应。

4. 酶联反应: 将 HRP-多克隆抗体溶液加入各孔, 每孔 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 分钟。重复洗板操作 4 次, 每次 3 分钟。

5. 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; 计算双孔阳性、阴性质控血清 OD 值的平均值。

6. 结果判断

- 5 阳性质控血清 OD 值在 2.0 以上, 阴性质控血清 OD 值在 0.05 以下时, 本次实验有效。待测样品 OD 值大于 0.105 时判为乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白阳性。

实施例 3: LP 定量酶联免疫检测试剂盒的制作

- 10 一种乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白酶联免疫定量检测试剂盒 (96 人份), 其组成包括:

LP 标准品 1 瓶;

LP 单克隆抗体包被板 (96 孔) 1 块;

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的 HBsAg 多克隆抗体 1 瓶, 6ml/瓶;

- 15 底物溶液 A、显色液 B 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。

具体操作如下:

1. 制备 LP 标准品:

- 20 1) LP 重组表达: PCR 获得 *preS1*、*preS2* 和 *S* 编码的 HBV 大蛋白全长序列, 插入杆状病毒表达载体中, 利用杆状病毒表达系统表达构相型 LP 蛋白, 再利用融合表达的 His 标签做亲和纯化;

2) HBV 表面抗原大蛋白纯品按试剂盒说明书中标准曲线第一点所需要浓度分装 (75ng/ml)、冷冻干燥、贮存于 4℃。

- 25 2. 制作 LP 单克隆抗体包被板:

1) LP 单克隆抗体制备:

a) 乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前 S 区重组抗原的构建 (免疫原): 在乙型肝炎病毒表面抗原编码区中, *preS1* 区段是大蛋白独有的区段, 是

检测 LP 的必然选择。为获得该区段的构象型表位，选取 *preS1* 和 *preS2* 编码序列的全段，在杆状病毒中与亲和纯化标签 his-tag 融合表达，经镍柱亲和层析，获得纯化的构象型乙型肝炎表面抗原大蛋白 preS 抗原。

b) 乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白的制备(免疫原): 以 a)亲和纯化的 preS 抗原免疫兔。产生的多克隆抗体利用 PreS 偶联的 sepharose 4B 做纯化。随后亲和纯化的多克隆抗体再偶联到 sepharose 4B 上，得到亲和柱，用于纯化来自急性 HBV 感染病人的天然的 HBV preS 抗原，获得 HBV 表面抗原大蛋白纯品。

c) 免疫和细胞融合: 如 b)制备的免疫原(乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白)与弗氏完全佐剂混合，得到油状乳液。将该乳液以 0.2 毫升的剂量皮下施给 BALB/C 小鼠(CLEAJapan 的产品，6 周龄雄性)的背部位点。第一次免疫 7 天或 14 天后增强免疫，然后在细胞融合前 3 天，腹膜内施用 0.2 毫升上述免疫原。最后一次增强 3 天后，从各小鼠上切下脾脏细胞，与骨髓瘤细胞(SP2/0-Ag14 株，RikenGeneBank)以 10: 1 混合，用 50% 聚乙二醇 4000 融合。在 HAT 培养基(Gibco 的产品)上选择性培养杂交瘤。

d) 杂交瘤选择: 在融合后第 12 天，用 ELISA 法测定各培养上清液中的抗体活性。各取 200 微升的融合细胞的培养上清液加到 96 孔 ELISA 板 Coaster 的产品)的孔中，其中每孔固定有 10 微克/毫升的抗原，分别是杆状病毒表达的不同区段 HBV 表面抗原前 S 区重组抗原，包括 preS1、preS2 和 preS1+preS2 抗原。反应在 37°C 进行 1 小时，然后用含 0.05% Tween 20 的 PBS(洗液)洗涤，在各孔中加入 200 微升过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG (Cappel 产品，1: 20, 000)。反应在 37°C 进行 1 小时后，用上述洗液洗涤板。然后在各孔中加入 200 微升底物溶液(0.1M 联苯二胺和 0.012% 过氧化氢水溶液)，使反应在室温下进行 15 分钟。然后，在各孔中加入 50 微升 3.5mol 硫酸终止酶反应，测量 492 纳米的吸光度，选择能与 preS1 和 preS1+preS2 抗原产生反应而不与 preS2 产生反应的抗体，并收获吸光度不低于 0.15 的杂交瘤克隆。用限制稀释法对各克隆进行两次克隆。克隆后的杂交瘤移植到 BALB/C 小鼠中，结果发现 32 个杂交瘤

克隆产生各种可作为腹水回收的单克隆抗体。

2) 包被:

酶标板采用 Costar 公司生产的 12×8 可拆条板。将步骤 1) 所获单克隆抗体用 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，即获得单克隆抗体包被酶标板。按 96 孔/块用铝箔袋包装、真空封闭。

3. 制备辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 HBsAg 多克隆抗体

1) 酶的氧化 (全过程避光)

- 10 a) 称取 HRP 5mg，加 ddH₂O 250μl 溶解。
- b) 称取 NaIO₄ 5mg，加 ddH₂O 250μl 溶解，配制成 20mg/mL 的浓度。
- c) 往 HRP 溶液中逐滴加入 NaIO₄ 溶液，边加边搅拌。
- d) 将混合好的溶液置于 4℃，静置 30 分钟。
- 15 e) 取 5ml 乙二醇溶于 25μl ddH₂O 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) 多克隆抗体的准备及标记 (避光)

- 20 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 NaHCO₃ 与 1mol/L Na₂CO₃ 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) 将多克隆抗体与 HRP 按 1: 4 混合，于 50mmol/L pH9.5 CB 25 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 NaBH₄ 溶液终止反应。摇匀，4℃静置 2 小时，每半小时摇一次，NaBH₄ 溶液加入的量要合适。
- d) 用 pH7.2 的 10 mM PBS(预配置 0.01mol/L 的 Na₂HPO₄ 和

NaH₂PO₄ 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 酶标抗 HBsAg 多克隆抗体

5 a) 完成标记的多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℃ 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。

10 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。

15 g) 收集分离的各个组分, SDS-PAGE 鉴定纯度。提纯的 HRP-多克隆抗体对 PBS 透析过夜。

h) 超滤管离心浓缩纯化的 HRP-多克隆抗体, 获得克分子比接近 1:8 的酶标抗 HBsAg 多克隆抗体。

20 4) 组装: 用含 10%胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 3) 获得的酶标抗 HBsAg 多克隆抗体至合适的工作浓度, 按 6ml/瓶分装, 贮存于 4℃。

4. 配制底物溶液 A: 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 B: TMB(0.1mg/ml) 甲醇溶液, 按 5ml/瓶分装。

6. 配制反应终止液: 2mol/L H₂SO₄, 按 3ml/瓶分装。

25 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。

应用本发明技术制备 LP 定量酶联免疫检测试剂盒的质量检测

1) 准确性: 取三份待测样品混合后分为三份混合血清标本, 每份 1ml。

分别加入 0、20、100ng 的 LP 纯品，制成回收试验血清标本#1、#2、#3。按说明书操作步骤进行测定并计算结果。然后按回收率计算公式计算回收率。标本#2、#3 的回收率分别为 96.4% 和 98.7%，平均回收率为 97.5%，即试剂盒的比例偏差为 2.5%，准确性为 97.5%。

- 5 2) 精密度：随机抽取 20 盒不同批次试剂盒，用同一份待测样本按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果，求出均值、SD 和变异系数 CV。精密度试验结果显示批间 CV < 15%

10 3) 线性范围：用 LP 纯品稀释成一系列不同浓度的纯品溶液：300ng、150ng、75ng、37.5ng、18.8ng、9.5ng、4.8ng、2.4ng、1.2ng。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 150ng/ml，最低检测下限值为 2.4ng/ml。试剂盒的线性范围为 2.4~75ng/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 2.4ng/ml。

- 15 5) 特异性：取四份待测样品混合后分为四份混合血清标本，每份 1ml。分别加入 50ng 剂量的组织型纤溶酶原激活剂 (tPA)、血纤维蛋白溶酶 (Plasmin)、或纤粘连蛋白 (FN) 后制成干扰试验血清标本#1、#2、#3，未加任何干扰物的#4 混合血清标本作为基础样品。按说明书操作步骤进行测定并计算结果。然后按干扰试验计算公式计算干扰率。标本#1、
20 #2、#3 的干扰误差均小于 1.5%。

实施例 4：LP 定量酶联免疫检测试剂盒的使用

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。

- 25 2. 将试剂盒提供的标准品第一点冻干粉 (浓度 75ng/ml) 用 500ul 清洗缓冲液溶解，然后进行倍比稀释 5 次。试剂盒中的标准曲线由 6 个不同浓度的 LP 标准品组成，标准曲线各点浓度分别为 75ng/ml、37.5ng/ml、18.8ng/ml、9.5ng/ml、4.8ng/ml、2.4ng/ml。

3. 抗原-抗体反应：在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别加入 100 μ l 已稀释好的不同浓度的标准品，或待测血清样品，37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 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：将 HRP-多克隆抗体溶液加入各孔，每孔 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 水浴保温 60 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 A、TMB 显色液 B 各 50 μ l，37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟，每孔再加入 50 μ l 反应终止液结束反应。

6. 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；计算双孔标准品 OD 值的平均值。

10 7. 结果计算

1) 标准曲线的绘制：以标准品浓度为横坐标、标准品测定的平均 OD 值为纵坐标，绘制本次测定的标准曲线；计算标准曲线回归系数 R²，当 R²>0.98 时本次实验有效。

2) 计算待测样品浓度：当标准曲线和质控品均被判定有效时，根据 15 待测样本的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品中的 LP 浓度。

实施例 5: 本发明 LP 定性酶联免疫检测试剂盒对 HBV-DNA 阳性样品的检测

为判断本发明 LP 定性酶联免疫检测试剂盒与 HBV-DNA PCR 检测 20 结果的符合率，取本发明 LP 定性酶联免疫检测试剂盒与同类型阿尔法前 S1 酶联免疫试剂进行比较。地坛医院临床研究数据：200 份已知 HBV-DNA 阳性标本，100 份体检健康血清，100 份丙型肝炎血清。分别用 LP 定性酶联免疫检测试剂盒及阿尔法前 S1 试剂盒检测和判断，结果见表 1。

25

表 1. 不同检测方法的 HBV 检出率比较

血清来源	例数	阳性数 (阳性比例)		
		HBV-DNA	LP 酶联免疫检测试剂盒	阿尔法前 S1 试剂盒
乙型肝炎患	200	200	192 (96%)	123 (61.5%)

者				
HCV	100	0	0	0
健康体检	100	0	0	0

理论上研究,乙肝病毒大蛋白与病毒复制密切相关,因此与病毒 DNA 的存在应该高度符合,本实验结果表明,本发明对于 HBV-DNA 的符合率高达 96%,比原来依靠前 S1 的检测符合率明显提高很多。

5 实施例 6: 本发明 LP 定性酶联免疫检测试剂盒对乙肝大三阳标本和小三阳标本的检测

LP 检测结果与乙肝五项指标的检测结果对照,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。依据病毒学原理,乙肝大三阳患者其血清中 HBV 表面抗原大蛋白必定是阳性;而在小三阳患者中,LP 阳性显示病毒正处于复制状态,发展成肝炎的几率很大。以本发明 LP 定性酶联免疫检测试剂盒分别检测乙肝大三阳和小三阳标本,取同类型阿尔法前 S1 试剂盒做参照,结果分别见表 2 和表 3。

表 2. 不同检测方法对乙肝大三阳样品的检测结果。

大三阳	参考试剂	
	阿尔法前 S1	本发明
1	0.419	0.395
2	2.18	2.664
3	0.096	2.687
4	0.428	2.725
5	2.288	2.539
6	0.904	2.799
7	2.229	2.64
7	2.103	2.724
8	1.874	2.597
9	0.645	2.862
10	0.824	2.874
11	2.165	2.744
12-A	2.05	2.471
12-B	2.199	2.52
12-C	2.161	2.306
13	0.644	2.708
14	1.505	1.281
15	2.249	2.661
16-A	0.192	2.654
16-B	0.08	2.658
17	0.012	0.034

结果显示，大部分乙肝大三阳样品两种试剂检测结果均为阳性。针对 16-A 和 16-B 在两种检测试剂中完全不同的测定结果，再以 PCR 法确定，发现两标本均为 PCR 阳性，本发明 LP 酶联免疫检测试剂盒检测结果与之相符，但是阿尔法前 S1 试剂漏检。

5 表 3. 不同检测方法对乙肝小三阳样品的检测结果。

小三阳	阿尔法	本发明
1	0.128	0.95
2	0.403	0.092
3	0.958	0.35
4	0.025	0.015
5	2.077	1.714
6	2.234	1.957
7	0.025	0.028
8	0.103	1.584
9	2.241	2.033
10	2.113	1.151
11	0.024	0.149
12	0.028	0.072
13	1.974	0.806
14	1.015	0.513
15	0.965	0.438
16	0.021	0.169
17	0.078	0.062
18	0.988	2.415
19	0.016	0.047
20	0.009	0.022
21	0.013	1.027
22	0.022	0.017
23	0.296	1.552
24	0.341	0.128
25	0.216	1.347

结果显示，本发明 LP 酶联免疫检测试剂在 25 个小三阳标本中检出 16 个阳性，阳性率 64%，阿尔法前 S1 试剂仅有 60% 的阳性率，参照本发明 LP 酶联免疫检测试剂与 HBV-DNA PCR 检测的高符合率，阿尔法前 S1 试剂漏检的标本仍存在病毒大量复制的高度可能性。

专利名称(译)	乙型肝炎病毒大蛋白前S区抗原检测试剂盒		
公开(公告)号	CN1700010A	公开(公告)日	2005-11-23
申请号	CN200510077451.6	申请日	2005-06-23
[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)	北京热景生物技术有限公司		
[标]发明人	林长青		
发明人	林长青		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种单克隆抗体，它是通过使用具有构象型表位的乙型肝炎病毒表面抗原大蛋白前S区抗原免疫动物、筛选杂交瘤克隆而获得的。本发明还提供了含有该单克隆抗体的试剂盒、其制备方法及其应用。该试剂盒可用于乙型肝炎病毒的发展水平、预后诊断，可作为早期诊断乙型肝炎病毒感染的指标，判断被病毒感染后的个体是否具有传染性，根据对乙肝大蛋白表达水平的监测还能确定患者的预后水平及引发肝硬化和肝癌的几率，为乙型肝炎的预防、诊断、治疗提供最直接的支持。

不同检测方法对乙肝大三阳样品的检测

大三阳	参考试剂	
	阿尔法前 S1	本发明
1	0.419	0.395
2	2.18	2.664
3	0.096	2.687
4	0.428	2.725
5	2.288	2.539
6	0.904	2.799
7	2.229	2.64
7	2.103	2.724
8	1.874	2.597
9	0.645	2.862
10	0.824	2.874
11	2.165	2.744
12-A	2.05	2.471
12-B	2.199	2.52
12-C	2.161	2.306
13	0.644	2.708
14	1.505	1.281
15	2.249	2.661
16-A	0.192	2.654
16-B	0.08	2.658
17	0.012	0.034