

[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 200810105410.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

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 101368963A

[22] 申请日 2008.4.29

[21] 申请号 200810105410.7

[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9页

[54] 发明名称

一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学
发光试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。本发明试剂盒采用捕获法检测单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的原理为，将抗人 μ 链单克隆抗体吸附于固相载体，加入待测样本，洗涤后再加入特异抗原和酶标抗体，形成免疫复合物，最后加入化学发光底物液，测定其发光值即可得出 IgM 抗体的含量。所述的酶为碱性磷酸酶，所述的化学发光底物液含有 1, 2 - 二氧乙烷类衍生物。本发明易操作，精密性良好，样本检测结果与酶联免疫分析方法检验结果相符。

1. 一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒, 包含阴性、阳性对照品, 抗人 μ 链单克隆抗体包被的固相载体, 中和抗原, 酶标记的单纯疱疹病毒 II 型抗体, 化学发光底物液和浓缩洗涤液, 其特征在于, 所述的酶为碱性磷酸酶, 所述的化学发光底物液含有 1,2-二氧乙烷类衍生物。

2. 根据权利要求 1 所述的化学发光试剂盒, 其特征在于, 所述的固相载体为微孔板和塑料管。

3. 根据权利要求 1 所述的化学发光试剂盒, 其特征在于, 所述的 1,2-二氧乙烷类衍生物含有(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 (AMPPD)、CSPD 或 CDP-Star。

4. 根据权利要求 1 所述的化学发光试剂盒, 其特征在于, 所述的化学发光底物液含有 0.20 mol/L Tris-HCl, 16% NaCl, 0.4% KCl, 0.1% proclin 300, 2% AMPPD, pH 7.4。

5. 根据权利要求 1 所述的化学发光试剂盒, 其特征在于, 所述的浓缩洗涤液含有 0.2 mol/L Tris-HCl, 16% NaCl, 1% Tween-20, pH 7.2。使用时用去离子水稀释 20 倍。

6. 检测单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒的制备方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

- A、阴性、阳性对照品的制备;
- B、酶标记的单纯疱疹病毒 II 型抗体的制备;
- C、中和抗原的制备;
- D、抗人 μ 链单克隆抗体的固相载体的制备;
- E、化学发光底物液的制备;
- F、浓缩洗涤液的制备。

7. 如权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述的固相载体为微孔板或塑料管, 所述的化学发光底物液含有 1,2-二氧乙烷类衍生物。

8. 如权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述酶标记的单纯疱疹病毒 II 型抗体的制备采用以下方法: 用戊二醛联法将单纯疱疹病毒 II 型抗体与碱性磷酸酶偶联, 对 0.01mol/L pH 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液充分透析, 加入等体积甘油, -20℃ 以下保存备用;

9. 如权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述抗人 μ 链单克隆抗体的固相载体的制备采用以下方法: 将抗人 μ 链单克隆抗体加入到 0.10mol/L pH 9.2~9.8 的碳酸盐包被液中至 1.5 μ g/mL, 将包被液加到微孔板各孔中, 每孔 110 μ L, 4℃ 放置 24 小时; 甩掉包被液, 每孔分别加入含 0.01mol/L 磷酸盐、1%BSA、0.1% proclin 300、pH 7.0~7.5 的封闭液 300 μ L, 室温放置 3 小时, 甩掉封闭液, 拍干, 室温除湿干燥 24 小时, 封袋, 置 2~8℃ 保存。

10. 如权利要求 7 所述的方法, 其特征在于, 所述 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''-磷酸氧基)苯基-1, 2-二氧乙烷、CSPD 或 CDP-Star。

11. 根据权利要求 6 所述的方法, 其特征在于, 所述的化学发光底物液的组成为 0.20 mol/L Tris-HCl, 16% NaCl, 0.4% KCl, 0.1% proclin 300, 2% AMPPD, pH 7.4。

一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒

技术领域

本发明涉及免疫分析医学领域，更具体地说，涉及一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒及其制备方法。

背景技术

单纯疱疹病毒（Herpes simplex virus, HSV）呈圆形，内层为双链线状 DNA 构成的核心，外部为三层壳体结构。HSV 有两种血清型，HSV-I 型感染占 10%，常为口腔粘膜、上身皮肤、淋巴结肿大，主要引起上半身皮肤、粘膜或器官疱疹，但极少感染胎儿。HSV-II 型为生殖器疱疹，占 90%，主要引起生殖器、肛门及腰以下的皮肤疱疹，直接有性传播占绝大多数。孕妇感染 HSV 的症状主要为子宫颈阴道及外生殖器的疱疹、溃疡并有疼痛，新生儿在产道中感染的表现为眼、皮肤或口腔出现疱疹。

机体遭受病原体感染时，体内会产生相应的抗体来抵抗病原体，以保护机体功能的正常运转。一般先产生 IgM 抗体，然后产生 IgG 抗体，IgM 抗体滴度在达到高峰后很快开始逐渐下降至较低水平，下降后一般不易检出，而 IgG 抗体达到高峰后则基本稳定在一个较高的滴度且持续较长时间。

检查出特异性 IgM 抗体说明患者近期感染，潜伏的病毒被激活产生复发感染时亦可检出 IgM 抗体；检查出 IgG 抗体说明曾经感染过，而且有一定的免疫水平。当患者发生继发感染时，IgM 抗体和 IgG 抗体都能较快地上升到较高滴度，其中 IgG 上升极其显著。

单纯疱疹病毒抗体的检测方法主要有放射免疫分析法，荧光免疫分析法和酶联免疫分析法等。放射免疫分析虽然高灵敏、高特异，但存在有效期短、

具有放射性污染的缺点。荧光免疫分析法虽然特异性强、敏感性高、速度快，但非特异性染色问题尚未完全解决，结果判定的客观性不足，程序也比较复杂。酶联免疫分析虽然灵敏度高、特异性强，但存在内源性酶干扰、底物大部分有毒或为致癌物质等缺点，而且划痕等外在因素也会对吸光度的测定产生影响。

1977年，Halman第一次把化学发光与免疫分析结合，1980年化学发光免疫分析(Chemiluminescence Immunoassay, CIA)一词开始出现，如今 CLIA 发展更为成熟，应用领域更为广泛。化学发光免疫分析是借助于化学发光反应的高灵敏性和免疫反应的高特异性而建立的一种测定方法，是继荧光免疫分析法、酶免疫分析法和放射免疫分析法之后迅速发展起来的一种新型免疫分析技术。它包括标记化学发光物质的化学发光免疫分析、标记酶的化学发光酶免疫分析和标记荧光物质的荧光化学发光免疫分析。

血清中针对某种抗原的特异性 IgM 抗体和 IgG 抗体同时存在，所以间接法测定 IgM 抗体时，IgG 抗体可干扰 IgM 抗体的测定。因此捕获法的工作原理设计为：先将针对 IgM 抗体的抗人 (IgM) μ 链抗体连接于固相载体，用以结合样品中所有特异或非特异的 IgM 抗体，洗涤除去 IgG 等无关物质，然后加入特异抗原与待检 IgM 抗体结合，再加入抗原特异性酶标抗体，最后形成固相二抗-IgM 抗体-抗原-酶标抗体复合物，加入示踪底物，即可测定样品中待检 IgM 抗体的含量。

发明内容

为了解决间接法测定 IgM 抗体的不足，同时避免多种外在因素对结果测定的影响，本发明提供了一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒，包含阴性、阳性对照品，抗人 μ 链单克隆抗体包被的固相载体，中和抗原，酶标记的单纯疱疹病毒 II 型抗体，化学发光底物液和浓缩洗涤液。

其中，所述的固相载体为微孔板和塑料管，所述的酶为碱性磷酸酶，所述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'-磷酸氧基)苯基-1、2-二氧乙烷 (AMPPD)、CSPD 或 CDP-Star。

在上述技术方案的基础上，本发明优选方案为：

所述化学发光底物液含有：0.20 mol/L Tris-HCl，16% NaCl，0.4% KCl，0.1% proclin 300，2% AMPPD，pH 7.4。

本发明还提供了一种检测单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒的制备方法，包括以下步骤：

A、阴性、阳性对照品的制备：

阴性对照品：HSV-II IgM 阴性人血清，56℃ 1 小时灭活，除菌过滤，冷冻保存。

阳性对照品：已确定的高滴度 HSV-II IgM 阳性人血清，56℃ 1 小时灭活后，用含 10% 新生牛血清，0.1% 防腐剂，pH 7.2 ~ 7.4 的 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液稀释后制成阳性对照品，稀释比例为 1:200，冷冻保存。

B、酶标记的单纯疱疹病毒 II 型抗体的制备：

单纯疱疹病毒 II 型抗体用戊二醛法与碱性磷酸酶偶联，对 0.01mol/L pH 7.0~7.5 的磷酸盐缓冲液充分透析，加入等体积甘油，-20℃ 以下保存备用；将酶标抗体用酶标记物用含 0.1mol/L Tris-HCl、0.5% BSA、0.1% proclin 300、pH 7.2 ~ 7.6 的稀释液稀释，采用方阵法选择酶标抗原的稀释度为 1:3000-1:5000。

C、中和抗原的制备：

采用方阵法选择中和抗原的稀释度为 1:2500-1:4500。稀释液采用上述 B 步骤中的稀释液配方。

D、抗人 μ 链单克隆抗体包被的固相载体的制备：将抗人 μ 链单克隆抗体加入到含 0.03mol/L 无水碳酸钠、0.07mol/L 碳酸氢钠、pH 9.2~9.8 的包被液中至 1.5 μ g/mL，加到微孔板各孔中，每孔 110 μ L，4 $^{\circ}$ C 放置 24 小时；甩掉包被液，每孔分别加入含 0.01mol/L 磷酸盐缓冲液、1% BSA、0.1% proclin 300、pH 7.0~7.5 的封闭液 300 μ L，室温放置 3 小时，甩掉封闭液，拍干，室温除湿干燥 24 小时，封袋，置 2~8 $^{\circ}$ C 保存；

E、化学发光底物液的制备；

F、浓缩洗涤液的制备。

根据本发明的方法，所述的固相载体为微孔板和塑料管，所述的酶为碱性磷酸酶，所述的化学发光底物液含有 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 (AMPPD)、CSPD 或 CDP-Star。

在上述技术方案的基础上，本发明优选方案为：

所述化学发光底物液含有：0.20 mol/L Tris-HCl，16% NaCl，0.4% KCl，0.1% proclin 300，2% AMPPD，pH 7.4。

所述浓缩洗涤液含有：0.20 mol/L Tris-HCl，16% NaCl，0.4% KCl，0.1% proclin 300，2% AMPPD，pH 7.4。

该方法便于生产、易于监控生产过程，保证了批次间的稳定性。

附图说明

具体实施方式

以下所举实例只用于解释本发明，并非用于限定本发明的范围。

实施例 1

单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒的制备：

阴性对照品：HSV-II IgM 阴性人血清 56℃ 1 小时灭活，除菌过滤，2-8℃ 保存。

阳性对照品：已确定的高滴度 HSV-II IgM 阳性人血清，56℃ 1 小时灭活后，用含 10% 新生牛血清，0.1% 防腐剂，pH 7.2 的 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液稀释后制成阳性对照品，稀释比例为 1:200，2-8℃ 保存。

酶标记的单纯疱疹病毒 II 型抗体的制备：单纯疱疹病毒 II 型抗体用戊二醛法与碱性磷酸酶偶联，对 0.01 mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液充分透析，加入等体积甘油，-20℃ 以下保存备用。称取 Tris 12.120g，HCl 10mL，牛血清白蛋白(BSA) 5g，proclin 300 1mL，用双蒸水定容至 1000mL，pH 7.2，配制稀释液。将酶标抗体用酶标记物稀释液稀释，采用方阵法选择酶标抗体的稀释度为 1:3000。

中和抗原的制备：采用方阵法选择中和抗原的稀释度为 1:2500。稀释液使用上一步骤中的稀释液。

抗人 μ 链单克隆抗体包被的固相载体的制备：称取 Na_2CO_3 1.59g， NaHCO_3 2.94g，溶解于双蒸水并定容到 500mL，混匀后，调整 pH 至 9.6，加入抗人 μ 链单克隆抗体至 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混匀，然后加到微孔板各孔中，每孔 110 μL ，4℃ 放置 24h 后甩掉包被液。取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2g， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g，BSA 10g，Proclin300 1mL，用双蒸水定容至 1000mL，pH 值为 7.0 ~ 7.5，配制成封闭液。每孔分别加入封闭液 300 μL ，室温放置 3 小时。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℃ 保存。

化学发光底物液的制备。采用如下配方：取 Tris 24g，HCl 15ml，NaCl 160g，KCl 4g，proclin300 1mL，AMPPD 20 mL，加入双蒸水溶解后，定容至 1000mL。

浓缩洗涤液的制备。采用如下配方：取 Tris 24g，HCl 15mL，NaCl 160g，

Tween-20 10 mL, 用去离子水定容至 1000mL。使用时用蒸馏水稀释 20 倍。

实施例 2

单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体化学发光免疫分析测定试剂盒

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

实施例 3

单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光免疫分析试剂盒的制备:

酶标记的单纯疱疹病毒 II 型抗体的制备: 将酶标抗体用酶标记物稀释液稀释, 选择酶标抗体的稀释度为 1:5000。

中和抗原的制备: 选择中和抗原的稀释度为 1:4500。

其余与实施例 1 相同。

实施例 4

单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒的使用方法。

- A. 自 4℃ 冰箱中取出实施例 1 所制单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光免疫分析试剂盒, 室温平衡 15 分钟;
- B. 将待测样本用生理盐水 1:100 稀释;
- C. 设空白 1 孔, 阴性对照 2 孔, 阳性对照 2 孔, 除空白孔外各孔加稀释后的阴性对照品、阳性对照品或样本 50 μ L, 用微量震荡器充分振荡混匀, 37℃ 温育 30 分钟;
- D. 甩去反应液, 每孔加满 20 倍稀释后的洗涤液, 洗板 5 次, 最后在干净的吸水纸上扣干;
- E. 除空白孔外各孔加酶标抗体和中和抗原各 50 μ L, 用微量震荡器充分

- 振荡混匀，37℃温育 30 分钟；
- F. 甩去反应液，每孔加满 20 倍稀释后的洗涤液，洗板 5 次，最后在干净的吸水纸上扣干；
- G. 各孔加入化学发光底物液 50 μ L，用微量震荡器充分振荡混合均匀，室温（20~25℃）避光反应 30 分钟；
- H. 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；结果判定：样品的 RLU $\geq 2.1 \times$ 阴性对照品的平均值，判断为阳性，否则为阴性。

实施例 5

单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒精密度的测定。

采用实施例 1 中所制备纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光免疫分析试剂盒按实施例 4 所述方法对同一份阳性标本，进行 3 次重复测定，每次 10 孔，计算发光强度 RLU 变异系数，数据如下：

表 1 本发明试剂盒精密性测定结果

编号	RLU	CV%
1	569324 \pm 46685	8.2
2	521487 \pm 39633	7.6
3	503654 \pm 39789	7.9

结果可见，CV%均小于 10%，说明本发明的试剂盒精密性良好，符合要求。

实施例 6

单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒特异性的检定。

采用实施例 1 中所制备的单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光免疫分析试剂盒按实施例 4 所述方法与酶联试剂盒同时检测 HSV-II IgM 阳性样本 54 例，阴性样本 28 例，比较二者检测结果。结果如下：

表 2 两种试剂盒检测结果对照表

		酶联试剂盒	
		+	-
本发明 试剂盒	+	54	0
	-	0	28

由表 2 可知，本发明的试剂盒与单纯疱疹病毒 II 型 IgM 酶联试剂盒的结果完全一致。

实施例 7

单纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光试剂盒灵敏度的测定。

将一份高滴度的阳性样本按 1:50、1:100、1:200、1:400、1:800 的比例稀释，采用实施例 1 中所制备纯疱疹病毒 II 型 IgM 抗体的化学发光免疫分析试剂盒按实施例 4 所述方法与酶联试剂盒同时检测，比较二者的灵敏度。结果如下：

表 3 两种试剂盒检测结果对照表

稀释比例	本发明试剂盒	酶联试剂盒
1:50	+	+
1:100	+	+
1:200	+	+
1:400	+	+
1:800	-	-

当高滴度阳性样本 1:50~1:400 稀释时，两种试剂盒均可检测为阳性；当高滴度阳性样本 1:800 稀释时，两种试剂盒检测结果都为阴性。由上表可知，本发明的试剂盒与酶联试剂盒灵敏度相当。

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II型IgM抗体的化学发光试剂盒		
公开(公告)号	CN101368963A	公开(公告)日	2009-02-18
申请号	CN200810105410.7	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	G01N33/577 G01N33/571 G01N21/76 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测单纯疱疹病毒II型IgM抗体的化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法。本发明试剂盒采用捕获法检测单纯疱疹病毒II型IgM抗体的原理为，将抗人 μ 链单克隆抗体吸附于固相载体，加入待测样本，洗涤后再加入特异抗原和酶标抗体，形成免疫复合物，最后加入化学发光底物液，测定其发光值即可得出IgM抗体的含量。所述的酶为碱性磷酸酶，所述的化学发光底物液含有1, 2 - 二氧乙烷类衍生物。本发明易操作，精密性良好，样本检测结果与酶联免疫分析方法检验结果相符。

		酶联试剂盒	
		+	-
本发明 试剂盒	+	54	0
	-	0	28