



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103048454 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 17

(21) 申请号 201210550172. 7

(22) 申请日 2012. 12. 18

(71) 申请人 苏州浩欧博生物医药有限公司

地址 215123 江苏省苏州市工业园区星湖街  
218 号 C6 栋

(72) 发明人 于大为 程晓蕾

(74) 专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有  
限公司 32103

代理人 孙仿卫 汪青

(51) Int. Cl.

G01N 33/576(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

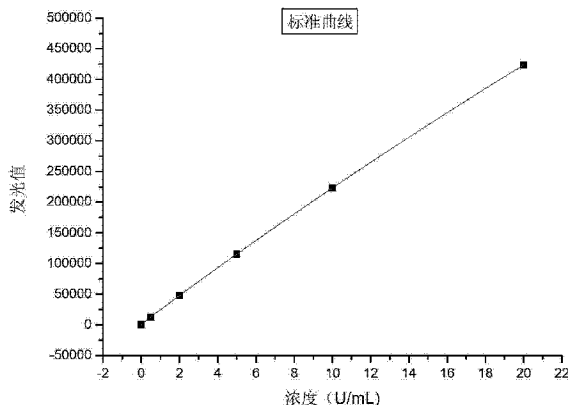
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学  
发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米  
磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测  
方法,试剂盒包括含有荧光素标记的乙型肝炎病  
毒 e 抗原抗体的溶液、包被有荧光素抗体的磁微  
粒的悬浮液,以及含有碱性磷酸酶标记的乙型肝  
炎病毒 e 抗原抗体的溶液。本发明使得能够以更  
低成本和更高准确度和精密度对乙型肝炎病毒 e  
抗原进行定量检测。



1. 一种乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,所述试剂盒包括:  
第一试剂:含荧光素标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液;  
第二试剂:含碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液;  
磁分离剂:含包被着荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。

2. 根据权利要求 1 所述的乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其特征在于:所述碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体由碱性磷酸酶与乙型肝炎病毒 e 抗原抗体通过交联剂 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯和 2-亚氨基硫烷盐酸盐连接构成。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其特征在于:所述第一试剂中的荧光素标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ ,所述第一试剂的 pH 为 7-9;所述第二试剂中的碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ ,所述第二试剂的 pH 为 7-9。

4. 一种如权利要求 3 所述的乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒的制备方法,其包括分别制备所述含有荧光素标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液、所述含有碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液以及所述包被有荧光素抗体的磁微粒的悬浮液的步骤,其特征在于:所述含有碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液的制备过程如下:

① 将乙型肝炎病毒 e 抗原抗体加入交联剂 2-亚氨基硫烷盐酸盐溶液中室温静置后,再加入甘氨酸溶液,再次室温静置,收集活化后的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体,于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  下保存备用;

② 将碱性磷酸酶溶液加入交联剂 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液,室温静置,收集活化后的碱性磷酸酶,于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  下保存备用;

③ 将上述步骤①所得活化后的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体与步骤②所得活化后的碱性磷酸酶混合,静置反应,使生成碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体,反应结束后,将反应液用 Supperdex200 凝胶纯化柱纯化,选择具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH 值即得所述第二试剂;

其中,所述的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体、所述碱性磷酸酶的纯度均大于等于 95wt%,且所述碱性磷酸酶的比活性超过 1000u/mg。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:步骤①中,取乙型肝炎病毒 e 抗原抗体,加入偶联剂 2-IT 溶液溶解,室温静置 10min~30min,加入甘氨酸溶液,室温静置 2~10min,用 G-25 凝胶纯化柱除盐,收集活化后的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体,于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  保存备用。

6. 根据权利要求 4 或 5 所述的制备方法,其特征在于:步骤②中,取浓度大于等于 5mg/mL 的碱性磷酸酶溶液,加入 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液,室温静置 20~40min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后碱性磷酸酶,于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  保存备用。

7. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:所述第一试剂的制备方法如下:配制含有荧光素的 pH 为 9~10 的缓冲液,然后按照荧光素与乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的分子比为 20~200:1 的比例,将所述含有荧光素的 pH 为 9~10 的缓冲液与乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的 pH 为 9~10 的缓冲液混合,混匀后,室温静置反应,然后将反应液通过 G-25 凝胶柱进行分

离,除去游离的荧光素,得到含有荧光素标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液,接着用具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH,即得第一试剂。

8. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征在于:所述磁分离剂的制备方法如下:使含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体在偶联剂碳二亚胺的存在下,室温反应 2~18 小时,反应结束,磁分离,去上清,用具有适当 pH 值的缓冲液调整 pH 和浓度,即得所述的磁分离剂;其中所述的磁微粒具有超顺磁性,其直径为 0.5~2  $\mu\text{m}$ ,每克磁微粒上所带的羧基活性基团的含量大于等于 0.4mmol;所述的荧光素抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,纯度大于等于 90wt%,稀释效价大于 1:100 万。

9. 根据权利要求 4 或 7 或 8 所述的制备方法,其特征在于:所述的具有适当 pH 值的缓冲液为含有 0.5% 牛血清白蛋白、pH8.0 的 TRIS 缓冲液。

10. 采用权利要求 1~3 中任一项权利要求所述的试剂盒用于对乙型肝炎病毒 e 抗原定量检测的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 免疫反应:在检测管中加入待测样本原液,依次加入第一试剂和第二试剂,混匀,在 25~40°C 下进行第一次温育,然后加入磁分离试剂,混匀,在 25~40°C 下进行第二次温育;

(2) 洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清;

(3) 加底物溶液检测发光强度:在检测管中加入碱性磷酸酶催化的化学发光底物,去除磁场,充分混悬后检测发光强度值。

## 一种乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种结合了免疫磁微粒分离技术和化学发光免疫分析技术的乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法。

### 背景技术

[0002] 乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)是以隐蔽形式存在 HBV 核心中的一种可溶性蛋白,其编码基因相互重叠,是 HBcAg 的亚成分。在感染 HBV 后,HBeAg 可与 HBsAg 同时或稍后出现于血中,其消失则稍早于 HBsAg。HBsAg 仅存在于 HBsAg 阳性者的血液中,通常伴有肝内 HBV DNA 的复制,血中存在较多 Dane 颗粒和 HBV DNA 聚合酶活性增高,因此,HBeAg 阳性是病毒活动性复制的重要指标,传染性高。急性肝炎患者若 HBeAg 持续阳性 10 周以上,则易于转为持续感染。

[0003] 目前用于检测乙型肝炎病毒 e 抗原的免疫分析方法主要有酶联免疫分析法、化学发光免疫分析法等。酶联免疫分析法存在灵敏度低,线性范围窄、不易实现全自动化等方法学限制因素。化学发光免疫分析法是在酶联免疫分析法基础上发展起来的一种免疫检测技术,具有灵敏度高、检测线性范围宽、操作简便,自动化程度高等优势。目前化学发光免疫分析技术因其具有上述诸多优点得到了广泛的应用。

[0004] 然而,在实际的免疫检测中,由于待测样品中所含的杂质成分较多,一定程度上影响了检测灵敏度和准确性,所以从复杂的样品基质中快速分离、纯化出目的待测物,是临床检验工作者面临的难题之一。

[0005] 磁微粒免疫检测技术是利用高分子材料合成一定粒度大小的磁性固相微粒作载体,以物理吸附、化学偶联等方法包被上具有特异性亲和力的抗体或抗原等各种免疫活性物质,具有分离速度快、效率高、可重复性好、操作简单、不影响被分离细胞或其他生物材料的生物学性状和功能等特点,在外加磁场作用下可定向运动,使得某些特殊成分得以分离、浓集或纯化。

### 发明内容

[0006] 本发明所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其能够以较低的成本制备得到,且能够实现乙型肝炎病毒 e 抗原准确和高精确地定量测定。

[0007] 本发明同时还提供一种乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒的制备方法,该方法工艺稳定,成本低,且所得试剂盒的精密度高。

[0008] 癌抗原所用的试剂盒的简便和低成本的制备方法。

[0009] 一种乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:

- [0010] 第一试剂:含荧光素标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液;
- [0011] 第二试剂:含碱性磷酸酶(ALP)标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液;
- [0012] 磁分离剂:含包被着荧光素抗体的磁微粒的悬浮液。
- [0013] 优选地,该碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体由碱性磷酸酶与乙型肝炎病毒 e 抗原抗体通过交联剂 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(Succinimidyl 4-(N-Maleimidomethyl)Cyclohexane-1-Carbo, SMCC)和 2-亚氨基硫烷盐酸盐(2-Iminothiolane HCl, 2-IT)连接构成。
- [0014] 进一步地,所述磁微粒试剂中,包被有荧光素抗体的磁微粒由荧光素抗体与磁微粒通过偶联剂相化学偶联。
- [0015] 进一步地,所述第一试剂中的荧光素标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ ,所述第一试剂的 pH 为 7-9;所述第二试剂中的碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的浓度为  $0.5 \sim 1 \mu\text{g/mL}$ ,所述第二试剂的 pH 为 7-9。
- [0016] 本领域技术人员应知晓,本发明的试剂盒还可以进一步包括有其它检测所需的试剂,例如底物溶液。但是诸如底物溶液等其它试剂可以另行购买或配制,因此,虽然试剂盒中可以包括这些试剂,但它们对于本发明试剂盒来说并非必不可少。
- [0017] 本发明采取的又一技术方案是:一种上述的乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒的制备方法,其包括分别制备所述第一试剂、所述第二试剂以及磁分离剂的步骤,其中:所述第二试剂的制备过程如下:
- [0018] ①将乙型肝炎病毒 e 抗原抗体加入交联剂 2-亚氨基硫烷盐酸盐溶液中室温静置后,再加入甘氨酸溶液,再次室温静置,收集活化后的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体,于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  下保存备用;
- [0019] ②将碱性磷酸酶溶液加入交联剂 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯溶液,室温静置,收集活化后的碱性磷酸酶,于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  下保存备用;
- [0020] ③将上述步骤①所得活化后的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体与步骤②所得活化后的碱性磷酸酶混合,静置反应,使生成碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体,反应结束后,将反应液用 Supperdex200 凝胶纯化柱纯化,选择具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH 值即得所述第二试剂;
- [0021] 其中,所述的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体、所述碱性磷酸酶的纯度均大于等于 95wt%,且所述碱性磷酸酶的比活性超过 1000u/mg。
- [0022] 优选地,步骤①中,取乙型肝炎病毒 e 抗原抗体,加入交联剂 2-IT 溶液溶解,室温静置 10min~30min,加入甘氨酸溶液,室温静置 2~10min,用 G-25 凝胶纯化柱除盐,收集活化后的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体,于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  保存备用。
- [0023] 优选地,步骤②中,取浓度大于等于 5mg/mL 的碱性磷酸酶溶液,加入交联剂 SMCC 溶液,室温静置 20~40min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后碱性磷酸酶,于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  保存备用。
- [0024] 优选地,步骤③中,将上述活化的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体与活化的碱性磷酸酶按分子摩尔比为 1:1~1:2 混合,于  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  条件下静置 12-24h。
- [0025] 其中适当 pH 值的缓冲液可以为例如含有 0.5% 牛血清白蛋白、pH8.0 的 TRIS 缓冲液。
- [0026] 进一步地,所述的第一试剂的制备方法如下:配制含有荧光素的 pH 为 9~10 的缓冲

液,然后按照荧光素与乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的分子比为 20~200:1 的比例,将所述含有荧光素的 pH 为 9~10 的缓冲液与乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的 pH 为 9~10 的缓冲液混合,混匀后,室温静置反应,然后将反应液通过 G-25 凝胶柱进行分离,除去游离的荧光素,得到含有荧光素标记的抗乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液,接着用具有适当 pH 值的缓冲液调整浓度和 pH,即得所述的第一试剂。其中适当 pH 值的缓冲液可以为例如含有 0.5% 牛血清白蛋白、pH8.0 的 TRIS 缓冲液。

[0027] 进一步地,所述磁分离剂的制备方法如下:将含有羧基活性基团的磁微粒与荧光素抗体在偶联剂碳二亚胺的存在下,室温反应 2~18 小时,反应结束,磁分离,去上清,用具有适当 pH 值的缓冲液调整 pH 和浓度,即得所述的磁分离剂。其中所述的磁微粒具有超顺磁性,其直径为 0.5~2 μm,每克磁微粒上所带的羧基活性基团的含量不低于 0.4mmol;所述的荧光素抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,纯度大于等于 90wt%,稀释效价大于 1:100 万。

[0028] 优选地,上述的具有适当 pH 值的缓冲液为含有 0.5% 牛血清白蛋白、pH8.0 的 TRIS 缓冲液。

[0029] 本发明所述的荧光素可以是已知的各种荧光素,常用的有例如异硫氰酸荧光素,四乙基罗丹明,四甲基异硫氰酸罗丹明等。

[0030] 本发明同时还提供了一种采用上述的试剂盒应用于乙型肝炎病毒 e 抗原定量检测的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0031] (1) 免疫反应:在检测管中加入待测样本原液,依次加入第一试剂和第二试剂,混匀,在 25~40°C 下进行第一次温育,然后加入磁分离试剂,混匀,在 25~40°C 下进行第二次温育;

[0032] (2) 洗涤:使磁微粒在磁场中沉降,去除上清,加入清洗液,去除磁场,震荡使磁微粒充分混悬,然后磁分离,去除上清;

[0033] (3) 加底物溶液检测发光强度:在检测管中加入碱性磷酸酶催化的化学发光底物,去除磁场,充分混悬后检测发光强度值。

[0034] 进一步地,步骤(1)中所述第一次温育的时间可以为 10~40min,通常为 30min;第二次温育的时间可以为 5~20min,通常为 10min。

[0035] 由于以上技术方案的实施,本发明与现有技术相比具有如下优点:

[0036] 1. 申请人发现,采取 SMCC 和 2-IT 作为交联剂进行碱性磷酸酶和乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的偶联时,具有和其它交联剂相比更高的偶联效率,在降低制备成本的同时,有利于提高检测效果。因此,本发明的试剂盒中的三种试剂均可以通过稳定的制备工艺制备得到,生产成本低,且由于制备工艺的稳定性,试剂盒分析批间差异小,检测的分析间精密度提高;

[0037] 2. 本发明的试剂盒中的含有碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体的溶液的制备方法,能够有效将乙型肝炎病毒 e 抗原抗体与碱性磷酸酶偶联,偶联效率高,进一步降低试剂盒的成本和确保试剂盒的检测效果。

[0038] 3、采取本发明的试剂盒进行检测,准确度好,精密度高,灵敏度高,检测范围宽,样品无需预稀释,操作简单省时。与采用进口试剂盒进行检测的方法相比,本发明的检测方法在成本上具有显著的优势。

## 附图说明

[0039] 图 1 为测试校准品标准曲线；

[0040] 图 2 为灵敏度评价拟合曲线；

[0041] 图 3 为血清样本检测结果相关性(其中横坐标 x 为实施例 4 制备得的试剂盒样本测值,浓度单位为 U/mL,纵坐标 y 为 Diasorin 公司试剂盒样本测值,浓度单位为 U/mL)。

## 具体实施方式

[0042] 实施例 1 第一试剂的制备

[0043] (1)材料与仪器:以磷酸盐缓冲液保存的乙型肝炎病毒 e 抗原单克隆抗体(纯度超过 95wt%,浓度为 2mg/mL);异硫氰酸荧光素(FITC),碳酸钠等试剂应达到化学纯;G-25 凝胶纯化柱采购自 GE 公司。

[0044] (2)制备步骤:

[0045] ①用 0.1~0.2mol/L pH 9.0~10.0 的碳酸盐缓冲液配制 0.5mg/mL 的 FITC 溶液;

[0046] ②按照乙型肝炎病毒 e 抗原抗体与 FITC 分子比为 1:20 的比例在抗体溶液中加入步骤①所配 FITC 溶液,混合均匀,室温静置 12h 小时,反应生成 e 抗原抗体-FITC 连接物;

[0047] ③将经过步骤②的反应液通过 G-25 凝胶柱进行分离,除去未反应的 FITC,得到含有乙型肝炎病毒 e 抗原抗体-FITC 连接物(即 FITC 标记的乙型肝炎病毒 e 抗原抗体)的溶液;

[0048] ④将步骤③所得含有乙型肝炎病毒 e 抗原抗体-FITC 连接物的溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)pH 8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到乙型肝炎病毒 e 抗原抗体-FITC 连接物浓度为 0.5~1 μg/mL,即为第一试剂。

[0049] 实施例 2 第二试剂的制备

[0050] (1)材料与仪器:以磷酸盐缓冲液保存的乙型肝炎病毒 e 抗原单克隆抗体(纯度超过 95wt%,浓度为 2mg/mL);以磷酸缓冲液保存的碱性磷酸酶(ALP 溶液,ALP 纯度为约 99%,比活性为约 1500U/mg,浓度为 10mg/mL);交联剂 SMCC,2-IT 购自 THERMO 公司,TRIS 等化学试剂应达到化学纯;G-25 凝胶纯化柱为 GE 公司产品。

[0051] (2)制备步骤:

[0052] ①取 1mg e 抗原抗体,加入 10mg/mL 的偶联剂 2-IT 溶液 2-4 μL,室温静置 20min,加入 0.1mol/L 的甘氨酸溶液 10 μL,室温静置 5min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后 CA125 抗体,2-8℃保存备用;

[0053] ②取 1.5mg 的 ALP 溶液,加入 5mg/mL 的 SMCC 溶液 10-20 μL,室温静置 30min,用 G-25 凝胶柱除盐,收集活化后 ALP,2-8℃保存备用;

[0054] ③将上述活化的癌抗原 e 抗原抗体与活化的 ALP 混合,2-8℃条件下静置 12-24h,用 Supperdex200 凝胶纯化柱纯化偶联物,获得 CA125 抗体-ALP 连接物浓溶液,2-8℃保存备用;

[0055] ④将 e 抗原抗体-ALP 连接物浓溶液用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA)pH8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液稀释到 0.5-1 μg/mL,完成第二试剂的制备。

[0056] 实施例 3 磁分离试剂的制备

[0057] (1)材料与仪器:

[0058] 磁微粒的悬浮液：磁微粒含量 5wt%，磁微粒含羧基(COOH)活性集团，每克(g)磁微粒(干重)羧基含量不低于 0.4 毫摩尔(mmol)，具有超顺磁性，直径在 0.5-2 $\mu$ m 之间。

[0059] 抗 FITC 抗体：可以是多克隆抗体，也可以是单克隆抗体，纯度为 90wt% 以上，稀释效价超过 1:100 万；

[0060] 2- 吗啉乙磺酸(MES)、碳二亚胺(EDC)、TRIS 和其他试剂应达到化学纯。

[0061] (2) 制备步骤：

[0062] ①取 100mg 磁微粒的悬浮液，磁分离去上清，用 0.05mol/L, pH 4.5~5MES 缓冲液 10mL 重悬；

[0063] ②加入 2~4mg 的抗 FITC 抗体，室温混悬 30~60min；

[0064] ③加入 0.5~1mL 新鲜配制的 10mg/mL 的 EDC 水溶液，室温混悬 2~12h；

[0065] ④磁分离，去上清，用含 0.5% 牛血清白蛋白(BSA) pH 8.0 的 0.1mol/L 的 TRIS 缓冲液重悬到 1mg/mL, pH 8.0, 即为磁分离试剂。

[0066] 实施例 4 乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒

[0067] 该试剂盒包括：

[0068] 按照实施例 1 方法制备的第一试剂(浓度为 0.75 $\mu$ g/mL), 50mL；

[0069] 按照实施例 2 方法制备的第二试剂(浓度为 0.75 $\mu$ g/mL), 50mL；

[0070] 按照实施例 3 方法制备的磁分离试剂 50mL。

[0071] 实施例 5 乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒

[0072] 该试剂盒包括：

[0073] 按照实施例 1 方法制备的第一试剂(浓度为 0.5 $\mu$ g/mL), 50mL；

[0074] 按照实施例 2 方法制备的第二试剂(浓度为 0.5 $\mu$ g/mL), 50mL；

[0075] 按照实施例 3 方法制备的磁分离试剂 50mL。

[0076] 实施例 6 乙型肝炎病毒 e 抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒

[0077] 该试剂盒包括：

[0078] 按照实施例 1 方法制备的第一试剂(浓度为 1 $\mu$ g/mL), 50mL；

[0079] 按照实施例 2 方法制备的第二试剂(浓度为 1 $\mu$ g/mL), 50mL；

[0080] 按照实施例 3 方法制备的磁分离试剂 50mL。

[0081] 实施例 7 采取实施例 4 的试剂盒进行乙型肝炎病毒 e 抗原的定量检测

[0082] (1) 检测步骤：

[0083] ①免疫反应：在检测管中加入 30 $\mu$ L 待测样本(血清)原液，然后加入 50 $\mu$ L 第一试剂，50 $\mu$ L 第二试剂，混匀，37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 条件下温育 30min；加入 50 $\mu$ L 磁分离试剂，混匀，37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C 条件下温育 10min；

[0084] ②洗涤：使磁微粒在磁场中沉降，去除上清，加入 300 $\mu$ L 的清洗液，去除磁场，震荡使磁微粒充分混悬，然后磁分离，去除上清；此步骤重复 3 次；

[0085] ③加底物溶液检测发光强度：在检测管中加入 100 $\mu$ L 碱性磷酸酶化学发光底物溶液(北京阿匹斯生物技术有限公司 APCL- I)，震荡使磁微粒充分混悬，在 5min 内检测发光强度。

[0086] (2) 绘制校准品标准曲线

[0087] 校准品标准曲线参见图 1。

[0088] (3) 灵敏度评价

[0089] 检测“0”浓度样本,重复检测 20 次,计算相对发光强度(RLU)的平均值(M)和标准差(SD),并计算  $M+2SD$  值,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU 进行两点回归拟合得出一次方程,将  $M+2SD$  值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。本方法的灵敏度不小于 2U/mL。其中:A 点发光值分别参见表 1:

[0090] 表 1

[0091]

HBeAg-STD-A (RLU)			
556	568	540	539
565	574	521	502
598	555	506	569
588	564	564	518
626	521	554	526

[0092] A 点发光均值  $X=553$

[0093]  $SD=32$

[0094]  $X+2SD=616$

[0095] B 点发光值分别参见表 2。

[0096] B 点发光均值  $X=12311$

[0097] 表 2

[0098]

HBeAg-STD-B (RLU)
12365
12256

[0099] A, B 点连点拟合曲线参见图 2。灵敏度 =0.003U/mL。

[0100] (4) 精密度评价

[0101] ①分析内精密度

[0102] 将实施例 4 的试剂盒一批,分别测定低、中、高三种不同浓度的血清,10 孔平行测定,结果参见表 3,得出批内变异系数为 4.12% ~ 5.69%。

[0103] 表 3 分析内精密度测试

[0104]

测定血清浓度 (U/mL)	测定次数	分析内 CV (%)
1.23	10	5.69
6.32	10	4.12

11.26	10	4.36
-------	----	------

[0105] ②分析间精密度

[0106] 将实施例 4 的试剂盒取三批,每批试剂盒均测定低、中、高三种不同浓度的血清,10 孔平行测定。每份血清得到 30 个浓度测值,参见表 4,统计分析间变异系数,为 5.20%~7.41%。

[0107] 表 4 分析间精密度测试

[0108]

测定血清浓度 (U/mL)	测定次数	分析内 CV (%)
1.23	30	6.69
6.32	30	7.41
11.26	30	5.20

[0109] (5) 准确度评价

[0110] 在 2 例混合血清样本中添加不同量 HBeAg 标准品,形成 3 个浓度水平的血清添加样本,添加物体积小于总体积的 10%。检测样本浓度,按下述公式计算回收率。本方法血清基质回收率在 90-110% 之间。数据参见表 5。

$$[0111] \quad R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$

[0112] R:回收率;

[0113] V:加入标准溶液的体积;

[0114]  $V_0$ :人源样品的体积;

[0115] C:人源样品加入标准溶液后的检测浓度;

[0116]  $C_0$ :人源样品的检测浓度;

[0117]  $C_s$ :标准溶液的浓度。

[0118] 表 5 准确度评价—添加回收实验数据

[0119]

样品值	添加浓度 (U/mL)	添加后终浓度 (U/mL)	测定平均值 (U/mL)	回收率 (%)
0.56	3	3.56	3.41	95.7%
	6	6.56	6.17	94.0%
	12	12.56	11.79	93.9%
1.22	3	4.22	4.36	103.2%
	6	7.22	6.73	93.1%
	12	13.22	12.80	96.8%

[0120] (6) 试剂盒特异性评价

[0121] 对试剂盒特异性检验是选取与乙型肝炎病毒 e 抗原测值有可能交叉反应的 HBsAg 阳性样本,以本方法进行测定。结果见表 6,本法与 HBsAg 无交叉反应。

[0122] 表 6 特异性实验

	交叉反应物	实验浓度 (ng/ml)	乙型肝炎病毒 e 抗原 测定浓度 (U/mL)
[0123]	乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)	1000	<0.02

[0124] (7) 相关性评价

[0125] 用试剂盒和 Diasorin 公司的化学发光试剂盒对 100 份人血清样品同时进行检测。其检测结果参见附图 3,以本发明方法的测的血清 HBeAg 浓度为横坐标,以 Diasorin 公司试剂盒测定的结果为纵坐标作回归分析,相关方程为:  $y = -0.01076 + 1.0084x$ , 相关系数为: 0.9938。经统计学处理结果表明,本方法同国外试剂盒临床样本测值相关性良好。

[0126] (8) 热稳定性评价

[0127] 对试剂盒分别进行 4℃ 12 个月和 37℃ 7 天的稳定性实验,结果表明试剂盒标准品发光强度的变化、批内和批间精密度、准确性等指标均在正常范围之内,试剂盒有效期可达 12 个月。

[0128] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围,凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

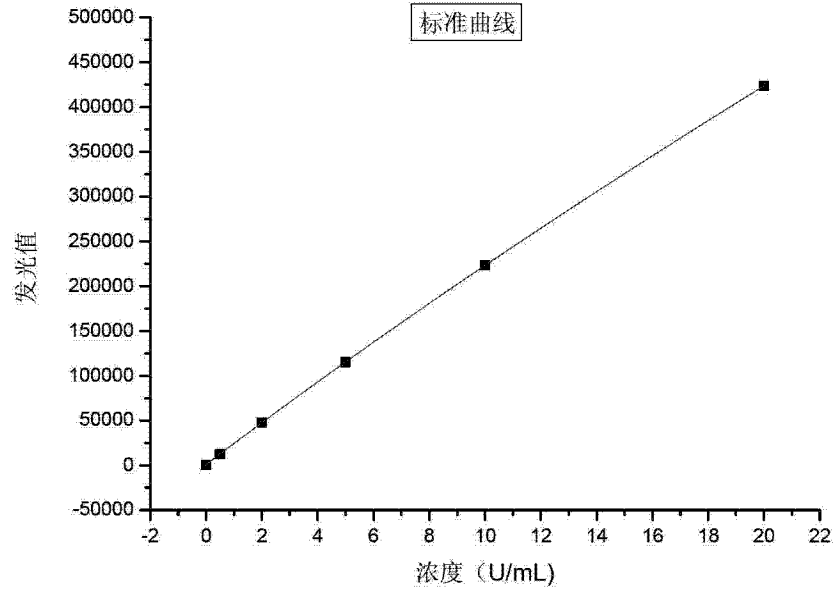


图 1

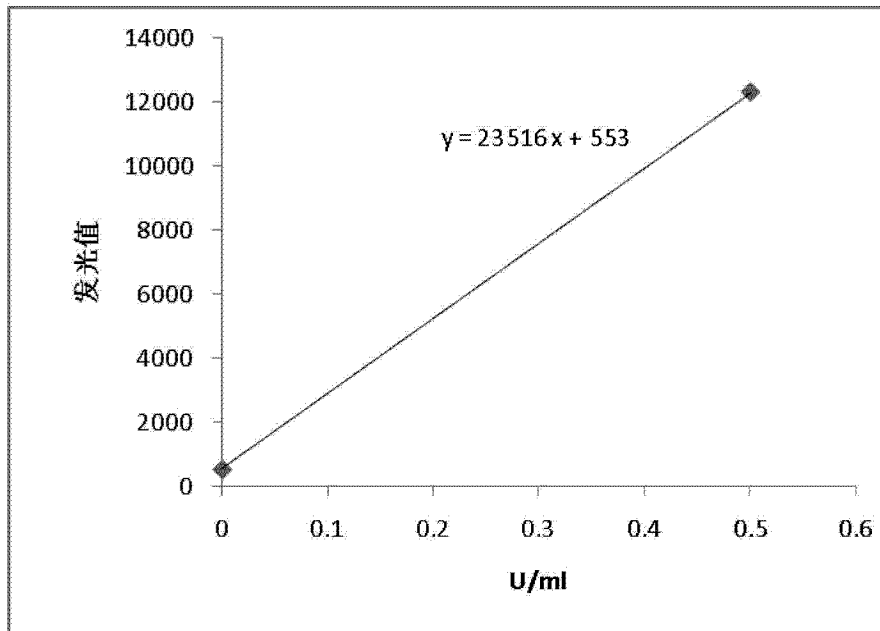


图 2

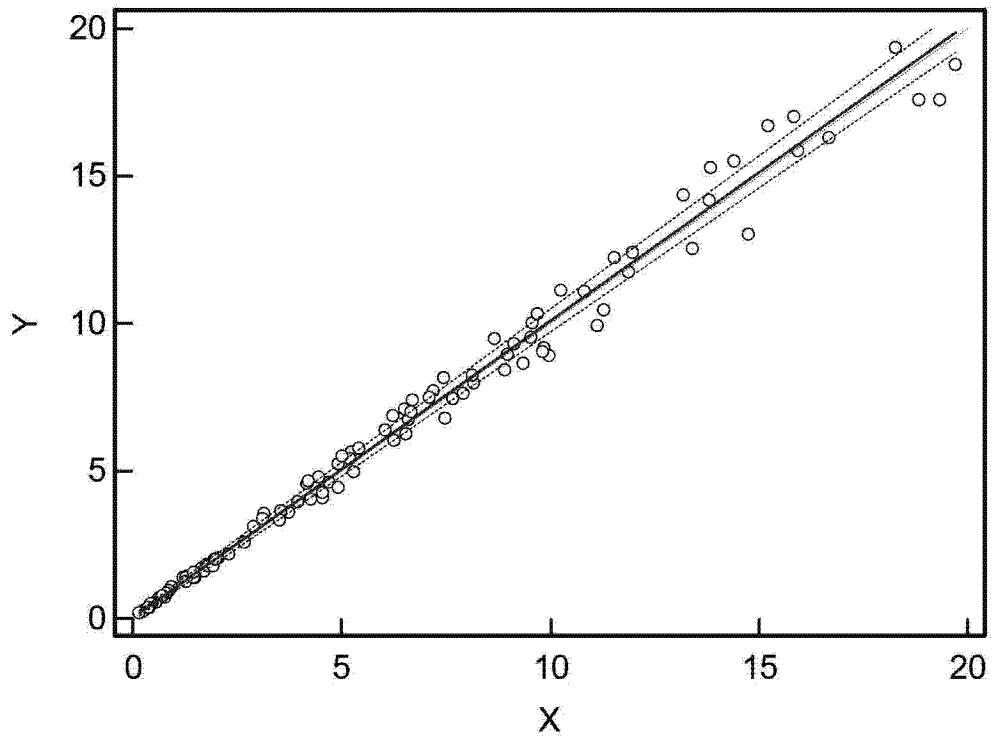


图 3

专利名称(译)	一种乙型肝炎病毒e抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103048454A</a>	公开(公告)日	2013-04-17
申请号	CN201210550172.7	申请日	2012-12-18
[标]申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州浩欧博生物医药有限公司		
[标]发明人	于大为 程晓蕾		
发明人	于大为 程晓蕾		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/577 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/535		
代理人(译)	汪青		
其他公开文献	CN103048454B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种乙型肝炎病毒e抗原的纳米磁微粒化学发光测定试剂盒及其制备方法和检测方法，试剂盒包括含有荧光素标记的乙型肝炎病毒e抗原抗体的溶液、包被有荧光素抗体的磁微粒的悬浮液，以及含有碱性磷酸酶标记的乙型肝炎病毒e抗原抗体的溶液。本发明使得能够以更低成本和更高准确度和精密度对乙型肝炎病毒e抗原进行定量检测。

