

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/547 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610019984.3

[43] 公开日 2007 年 2 月 7 日

[11] 公开号 CN 1908666A

[22] 申请日 2006.8.14

[21] 申请号 200610019984.3

[71] 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 黄 健 邓丽娟 严 兵

[74] 专利代理机构 武汉天力专利事务所

代理人 程 祥 冯卫平

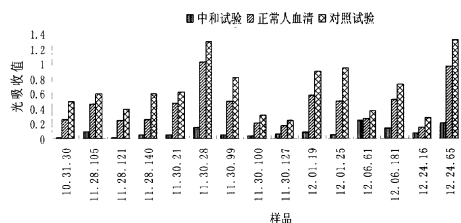
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 1 页

[54] 发明名称

一种检测乙肝核心抗体的双夹心法酶联免疫
诊断试剂盒及应用

[57] 摘要

本发明公开了一种检测乙肝核心抗体的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒，该试剂盒包括微孔反应板和酶结合物；微孔反应板是由 90% 以上纯度、效价为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5 \text{ u/mg}$ 的乙肝核心抗原重组蛋白包被而成；酶结合物是由辣根过氧化物酶标记乙肝核心抗原重组蛋白获得。本发明用于检测乙肝核心抗体具有检测特异性高、检测灵敏度高、可消除因操作时间差所产生的误差；检测结果易于目视判断；可有效方便地对乙肝核心抗体进行定性或半定量检测。



1、一种检测乙肝核心抗体的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒，该试剂盒包括微孔反应板和酶结合物；其特征是：微孔反应板是由90%以上纯度、效价为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ u/mg的乙肝核心抗原重组蛋白包被而成；酶结合物是由辣根过氧化物酶标记乙肝核心抗原重组蛋白获得。

2、根据权利要求1所述的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒，其特征是：90%以上纯度、效价为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ u/mg的乙肝核心抗原重组蛋白是通过表达含乙肝核心抗原蛋白基因的重组基因工程菌后，经硫酸铵盐析和免疫亲和层析分离纯化而获得的，其中免疫亲和层析的洗脱液为0.1mol/ml pH11.5 三乙胺。

3、根据权利要求1或2所述双夹心法酶联免疫诊断试剂盒，其特征是：包被的乙肝核心抗原重组蛋白的工作浓度体积比为1：200~2000；酶结合物的工作浓度体积比为1：500~2000。

4、根据权利要求3所述的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒，其特征是：酶结合物的工作浓度由含10克/升的牛血清白蛋白、体积比为0.05%的Tween-20，0.1克/升的硫柳汞、5克/升的氨基吡啶的0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液稀释得到。

5、权利要求1所述的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒在检测乙肝核心抗体中应用。

一种检测乙肝核心抗体的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒及应用

技术领域

本发明涉及一种检测乙肝核心抗体的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒,适用于乙肝核心抗体的定性或半定量检测。

背景技术

乙肝病毒(HBV)是致人乙型肝炎的病原体,是目前世界上传染最广泛的致命病毒之一。据统计,全世界有超过35亿的人群是慢性乙型肝炎病毒的携带者[Zuckerman J N, Zuckerman A J. Current topics in hepatitis B. *J Infect*, 2000, 41(2): 130~136], 其中中国有1.2亿;而且每年在全球范围内约有一百万人因感染HBV而死亡[Parkin, D. M, Pisani P, Munoz N and Ferlay J. The global health burden of infection associated cancers. *Cancer Surv*, 1999, 33: 5~33.]。

由于目前还没有治疗乙型肝炎的有效手段,因此疫苗接种、早期检测诊断是预防乙型肝炎的重点。

乙型肝炎的病原学诊断,最常用的是乙肝病毒血清标志物(HBVM)的检测。HBVM主要包括七种血清标志物:乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝表面抗体(anti-HBs)、乙肝核心抗体(anti-HBc)、乙肝e抗原(HBeAg)、乙肝e抗体(anti-HBe)、HBV-DNA及DNA多聚酶(DNA-p)。通过检测HBVM可以间接的多角度了解患者HBV感染、复制以及病情恢复情况。

在HBVM中,anti-HBc较为独特:首先,anti-HBc是除HBV感染的最初阶段外,其它所有阶段均能检测到的一种血清标志物;这个标志物在HBsAg消失后的急性HBV感染期和慢性HBV携带期均存在,甚至可以终身保存。因此它是现在及过去曾感染HBV的指标,对anti-HBc的检测可以为特定人群的乙肝流行性动态提供最好的信息。其次,anti-HBc是窗口期(HBsAg不能检测到而anti-HBs还未出现的时期)仅有的、可检测到的血清标志物[Lee W M. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*, 1997, 337(24): 1733~1745.]。因为许多具有感染HBV风险的血制

品主要源自处于感染窗口期的HBV携带者 [Schreiber G B , Busch M P , Kleinman S H , Korelitz J J . The risk of transfusion-transmitted viral infections. *N Engl J Med* , 1996 , 334 (26) : 1685~1690.] , 所以anti-HBc的筛选对预防输血后HBV感染有着重要的意义。另外, 人们还发现: 一些HBV变异株在HBsAg检测中表现为阴性, 但是其anti-HBc却能被检测到[Carman W F , Korula J , Wallace L . Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg Elisa. *Lancet* , 1995 , 345 : 1406~1407.; Jongerius J M , Wester M , Cuypers H T M , van Oostendorp W R , Lelie P N , van der Poel C L , et al . New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays. *Transfusion* , 1998 , 38 (1) : 56~59.]。所以, 对anti-HBc的检测可以降低HBV感染者被漏检的风险。综上所述: anti-HBc的检测对乙肝的诊断治疗、流行病学调查以及对乙肝疫苗安全性鉴定具有重要意义。

目前, 乙肝核心抗体 (anti-HBc) 的检测方法主要分为三大类: 免疫吸附血凝试验 (IAHA)、酶联免疫吸附检测 (ELISA) 技术和放射免疫检测 (RAI) 技术。其中 ELISA 技术灵敏度高, 价格相对较低, 国内外应用较为广泛。[姚桢等, 分子乙型肝炎病毒相关病学。中国医药科技出版社, 2003, p27~28。]

最常采用的ELISA检测方法是竞争性抑制法。这种检测方法的优点是: 对包被抗原的纯度要求不高, 当抗原材料中的干扰物质不易除去, 或不易得到足够的纯化抗原时, 可用此法检测特异性抗体。但缺点也是很明显: 灵敏度不高, 对低水平表达的anti-HBc样品难以检出; 同时, 因为包被抗原的纯度不高, 所以可能会导致非特异性反应, 从而出现假阳性检测结果。虽然近年来国内外有文献报道: 加入某种还原剂可以增加竞争抑制法检测anti-HBc的特异性[John A Weare et al. Improvement in the specificity of assays for detection of antibody to Hepatitis B core antigen. *J Clin Microbiol* , 1991 , 29 (3) : 600~604.]。但事实表明: 这种特异性的提高是以牺牲灵敏度为代价的, 不能从根本上解决问题。其次, 在检测过程中因先加入标本, 再加酶标anti-HBc, 所以会导致标本的anti-HBc优先结合HBcAg, 使样品anti-HBc与酶标anti-HBc产生“不公平竞争”, 在成批样品测定时, 这种时间差异的加大会使得“不公平竞争”加剧, 可能会产生前后检测结果不一的问题[杜青等, 加酶时间对竞争ELISA法检测HBcAb的影响。Jangsu Med J, 2005, 31 (6) :

466~468.]。此外,传统的竞争抑制法检测不易于通过目视来区别弱阳性样品与阴性样品。

发明内容

本发明的目的在于提供一种检测乙肝核心抗体的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒,该双抗原夹心法酶联免疫诊断试剂盒不仅可使用目前存在市场上的所有类型酶标比色仪,更重要的是能快速地对乙肝核心抗体进行更为准确的检测。

为了实现上述目的,本发明要用以下技术措施:一种检测乙肝核心抗体的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒,该试剂盒包括微孔反应板和酶结合物,微孔反应板是由90%以上纯度、效价为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ u/mg的乙肝核心抗原重组蛋白(rHBcAg)包被而成;酶结合物是由辣根过氧化物酶(HRP)标记乙肝核心抗原重组蛋白获得。

本发明上述90%以上纯度、效价为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ u/mg的乙肝核心抗原重组蛋白可通过表达含乙肝核心抗原蛋白基因的重组基因工程菌后,经硫酸铵盐析和免疫亲和层析分离纯化而获得的,其中免疫亲和层析的洗脱液为0.1mol/ml pH11.5 三乙胺。

上述包被的乙肝核心抗原重组蛋白的工作浓度为1:200~2000(体积比);酶结合物的工作浓度为1:500~2000(体积比)。

上述酶结合物的工作浓度由含10克/升的牛血清白蛋白、体积比为0.05%的Tween-20,0.1克/升的硫柳汞、5克/升的氨基吡啉的0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液稀释得到。

本发明所述的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒在检测乙肝核心抗体中应用。

本发明与现有技术相比具有以下优点和效果:

- 1、检测的特异性高;
- 2、检测的灵敏度高;
- 3、可消除因操作时间差所产生的误差;
- 4、检测结果易于目视判断;
- 5、可同时对样品进行半定量检测。

附图说明

图1为本发明试剂盒用于检测 anti-HBc 的确证实验;

图2为本发明试剂盒用于检测 anti-HBc 的动力学曲线图。

具体实施方式

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应当理解,实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明要求保护的范围。

实施例1 检测乙肝核心抗体的双夹心法酶联免疫诊断试剂盒组成与配制

辣根过氧化物酶:购自 Faizyme;

重组基因工程菌: E.coli JM105 (pKK 223-3) [Marc Tordjeman et al. Specific detection of anti-HBC antibodies with an enzyme immunoassay using recombinant HBcAg and monoclonal antibodies. *J. Virol. Meth*, 1993, 43 : 21~30]; E.coli JM105 (pFS14NSD) [Florian Schodel et al. Structure of hepatitis B Virus Core and e-Antigen : a single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly. *J Biol Chem* , 1993, 268 (2) : 1332~1337]; E.coli M15 (pQE30) [周福元等, 应用 pQE30 系统表达和纯化乙型肝炎病毒核心抗原. *Chin J Biologicals*, 2000, 13 (1) : 13~15];

乙肝核心抗原重组蛋白: 将表达乙肝核心抗原的重组基因工程菌 8000rpm 离心 10 分钟获得菌体沉淀;将收集的菌体用 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液重悬,冰浴,超声波破菌 3min 左右,至悬液澄清;其后 10000rpm,离心 20min,收集上清;将此上清用 40wt%硫酸铵盐析后上免疫亲和层析柱,用 0.1M pH11.5 三乙胺溶液洗脱,获得 90%以上纯度、效价为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ u/mg 纯化的乙肝核心抗原重组蛋白;

聚苯乙烯微量反应板:购自 Greiner bio-one;

包被液: 50mmol/L pH9.5 Na_2CO_3 - NaHCO_3 缓冲液;

封闭液:含 50 克/升蔗糖,10 克/升牛血清白蛋白,0.1 克/升硫柳汞的 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液;

样品稀释液:含 10 克/升牛血清白蛋白,体积比为 0.05% Tween-20, 0.1 克/升硫柳汞的 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液;

酶稀释液：含 10 克/升牛血清白蛋白，体积比为 0.05% Tween-20，0.1 克/升硫柳汞，5 克/升氨基吡啶的 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液；

洗涤液：含体积比为 0.5% Tween-20 的 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液；

底物缓冲液：含 0.51g/L 柠檬酸，1.46g/L Na_2HPO_4 的 pH5.0 磷酸-柠檬酸缓冲液；

底物溶液：含 0.1g/L 四甲基联苯胺(TMB)，体积比为 50%的二甲基甲酰胺(DMF)，体积比为 0.3% H_2O_2 的底物缓冲液；

终止液：2mol/L H_2SO_4 ；

酶结合物：采用过碘酸盐改良法[Wilson M B , Nakane P K . Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase to antibodies. Immunofluorescence and related staomomg techniques. North-Holland Biomedical Press , Amsterdam , 1978 , pp215-224. ; Nanci Donacki , Peroxidase Conjugation by Periodate Method. Protocol online. 2004.] 用辣根过氧化物酶(HRP) 标记乙肝核心抗原重组蛋白(rHBcAg)；

微孔反应板：用包被液将乙肝核心抗原按体积比 1：200~2000 稀释后，以 100 μl /孔包被 96 孔板，置 4℃过夜；其后洗板 5 次，每次 5 分钟；再加 150 μl /孔封闭液于 96 孔板中，置 37℃温育 2 小时，最后洗板 3 次后烘干，用封口胶封存，于 4℃保存备用。

实施例 2 用双夹心法酶联免疫诊断试剂盒检测乙肝核心抗体

1. 在微孔反应板加入待测标本 100 μl /孔（待测标本用样品稀释液作 1：30 稀释），设置阴性对照、阳性对照各两孔，并设空白对照一孔；封板，置 37℃温育 1h；
2. 洗板 3 次，每次 5min
3. 加入 1：1200 稀释后的酶标抗原 100 μl /孔，空白对照孔只加酶稀释液；封板，置 37℃温育 30min；
4. 洗板 3 次，每次 5min
5. 加底物溶液，封板，置 37℃温育 15min；
6. 加 50 μl /孔终止液终止反应；

7. 检测：用酶标光度计检测各孔在 450nm、630nm 处的光吸收值；其检测结果为：样品 $OD_{450}=0.985$, $OD_{630}=0.041$ ；空白对照 $OD_{450}=0.065$, $OD_{630}=0.047$ ；阴性对照 1 $OD_{450}=0.084$, $OD_{630}=0.045$ ；阴性对照 2 $OD_{450}=0.088$, $OD_{630}=0.045$ ；阳性对照 1 $OD_{450}=0.794$, $OD_{630}=0.045$ ；阳性对照 2 $OD_{450}=0.820$, $OD_{630}=0.052$ 。经计算得：样品 $OD=0.926$ ；阴性对照 $OD_1=0.021$, $OD_2=0.025$ ；阳性对照 $OD_1=0.741$, $OD_2=0.754$ 。
8. 结果判定：样品 OD 值 / 阴性对照平均 OD 值 ≥ 2.1 判断为阳性，否则为阴性；其中阴性对照 OD 值低于 0.05 作 0.05 计算，高于 0.05 按实际 OD 值计算。因此，可以判定：该样品为乙肝核心抗体阳性。

实施例 3 双夹心法酶联免疫诊断试剂盒与传统竞争抑制法酶联免疫诊断试剂盒检测乙肝核心抗体的比较

1. 我们采集了不同 HBV 状态的血清共 943 例（表 1）。每份血清样品均用双抗原夹心 ELISA 法和竞争抑制 ELISA 法诊断试剂盒（购自上海科华生物工程股份有限公司）同时检测。若样品的检测结果处于边缘状态以及两种检测结果存在差异，则用两种检测程序再检测一遍。

表 1 被检测血清样品分类

样品类型	样品数量	所占百分比%
过去和现在未感染过 HBV 的正常人血清	90	9.54
注射过乙肝疫苗或既往感染过 HBV 的正常人血清	260	27.6
HBsAg ⁺ , HBcAb ⁻	5	0.53
HBsAg ⁺ , HBcAb ⁺	583	61.8
仅 HBcAg ⁺	5	0.53
合计	943	100

检测结果表明：有 16 份血清样品的检测结果不一致。以竞争抑制性 ELISA 法检测试剂盒的检测结果为参考值，则双抗原夹心 ELISA 法的灵敏度可以达到 99.8%，特异性达 95.7%，符合率为 98.3%（表 2）。

表2 两种诊断试剂盒检测乙肝核心抗体结果比较一览表

		竞争抑制法		合计
		+	-	
双抗原夹心法	+	597	15 ^b	612
	-	1 ^a	330	331
合计		598	345	943

灵敏度：597/598=99.8%，特异性：330/345=95.7%，符合率：927/943=98.3%；a：1份血清 HBsAg 阳性，b：3份血清 HBsAg 阳性，7份血清 HBsAb 阳性，5份血清无乙肝标志物

2. 特异性比较

我们对这 16 份检测结果不一致的血清样品进行双夹心法确证实验（即中和试验）的检测，以确证检测的特异性。其检测结果（图 1）为：15 份血清样品的中和试验比对照试验和加入正常人血清试验的显色结果均要浅得多，说明在双抗原夹心法检测中，此 15 份样品的检测结果为真阳性，是特异性检测结果。而另一份编号 12.06.61 的血清样品，其中和试验与对照试验的显色几乎相同，表明此为非特异性反应。综上所述：本发明在检测 anti-HBc 的特异性方面比现行竞争抑制性 ELISA 诊断试剂盒高。

3. 灵敏度的比较：

选取 7 份不同的阳性血清样品进行倍比稀释，记录到达终点滴度时血清样品的最大稀释度，从而比较两种检测方法的灵敏度，结果表明：双抗原夹心 ELISA 法灵敏度是竞争法的 32 到 256 倍（表 3）。

表3 竞争抑制性 ELISA 法与双夹心 ELISA 法灵敏度比较

样品	终点滴度		相对灵敏度
	竞争抑制性 ELISA 法	双抗原夹心 ELISA 法	
1	240	7680	32
2	480	15360	32
3	1920	122880	64
4	480	15360	32
5	60	15360	256
6	240	61440	256
7	30	3840	128

此外，经研究[袁红、熊燕等，四种乙肝标志物ELISA试剂盒的动力学比较研究。*Med J West China* , 2003 , 1 (1) : 18~20.]发现：许多国产试剂盒，其anti-HBc的CO值接近于动力学曲线图形的平台区与线性区交界处，因此很容易在该区域造成结果误判。但是，从本发明试剂盒用于检测anti-HBc的 S/CO动力学曲线图（图2）看：一方面，其anti-HBc的CO值处于动力学曲线图形的线性变化区内，有利于对血清样品检测结果的定性判读；另一方面，其线性范围较宽，不同样品的稀释曲线几乎平行，有利于对血清样品中乙肝核心抗体进行半定量的检测，这种半定量的检测在临床检测与诊断中具有重要的意义。

4. 双夹心 ELISA 法重复性分析

选取低、中、高 3 份不同的阳性血清样品，用同一批双夹心法诊断试剂盒进行检测，每份样品分别平行测 8 孔，进行试剂盒批内重复性检测；同理选取低、中、高 3 份不同的阳性血清样品，用 6 份不同批次的双抗原夹心法诊断试剂盒进行检测，每份样品平行测 2 孔，进行试剂盒批间重复性检测。

检测结果为：本试剂盒的批内平均变异系数为 5.39%（表 4-1）；批间平均变异系数为 6.99%（表 4-2）。由此可以确定：双夹心测定法中所用的试剂都比较稳定，该试剂盒的重复性比较满意。

表 4-1 双夹心法检测试剂盒批内重复性检测结果

样品名称	S/CO 平均值	S/CO 中间值	S/CO 范围	SD 值	CV%值
1	8.326	8.238	7.743~9.038	0.459	5.50%
2	6.411	6.448	5.933~6.657	0.262	4.09%
3	2.194	2.200	1.924~2.267	0.144	6.57%
平均 CV%	5.39%				

表 4-2 双夹心法检测试剂盒批间重复性检测结果

样品名称	S/CO 平均值	S/CO 中间值	S/CO 范围	SD 值	CV%值
1	7.321	7.352	6.648~7.848	0.406	5.55%
2	12.066	12.248	10.952~13.100	0.774	6.41%
3	0.288	2.800	2.70~3.50	0.259	9.00%
平均 CV%	6.99%				

5. 双夹心 ELISA 法稳定性分析

将试剂存放于 37℃ 环境中保存，定期检测，直到其质量指标开始下降为止。通常认为在 37℃ 每稳定一天，可相当于 4~10℃ 保存一个半月。根据测定结果（表 5）表明：该试剂盒 37℃ 放置 5 天，其 S/CO 值变化属非显著性差异；但在第 5 天，样品于 4℃ 和 37℃ 所测定的两组数据的变异系数（CV%）超过了 15%。故推测：此双抗原夹心法检测试剂盒至少在 4℃ 可保存 6 个月，其试剂盒的稳定性较好。

综上所述：双夹心法酶联免疫诊断试剂盒灵敏度高、特异性好、检测结果准确可靠，其稳定性和重复性符合临床检测要求。

表 5 双夹心法诊断试剂盒的稳定性检测结果

样品 名称	第三天		第四天		第五天	
	S/CO 平均值±SD 值					
	4℃	37℃	4℃	37℃	4℃	37℃
1	0.786±0.055	0.898±0.017	0.824±0.001	0.79±0.071	0.886±0.021	0.639±0.040
2	1.276±0.045	1.491±0.045	1.376±0.005	1.37±0.028	1.377±0.030	1.000±0.053
3	1.065±0.088	1.215±0.001	1.216±0.088	1.12±0.014	1.171±0.066	0.88±0.027
CV%	9.34~9.97		0.38~5.82		20.07~22.91	

t 检验结果：第三、四、五天 4℃ 和 37℃ 所测得的两组数据间的差异均为非显著性差异

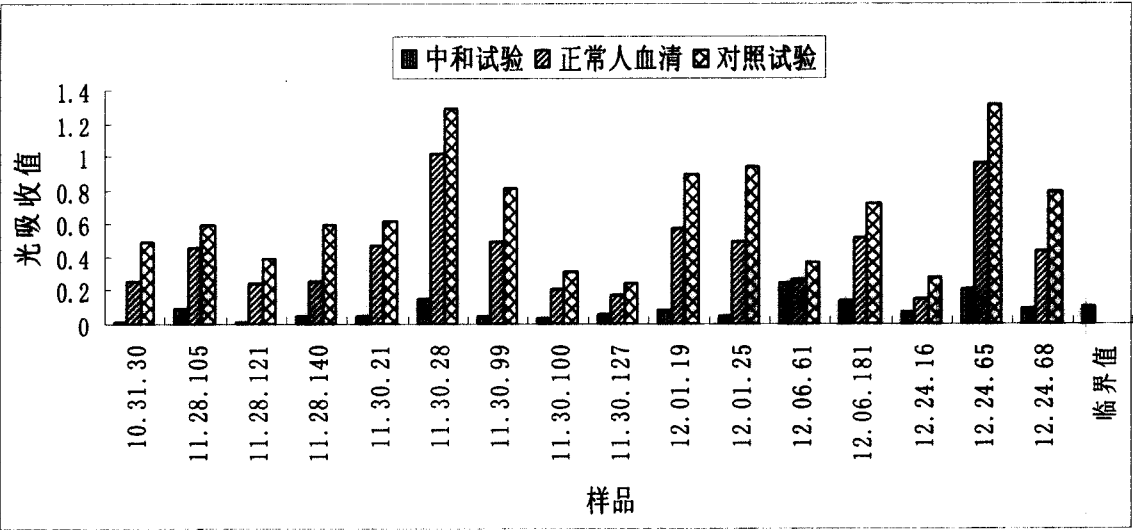


图 1

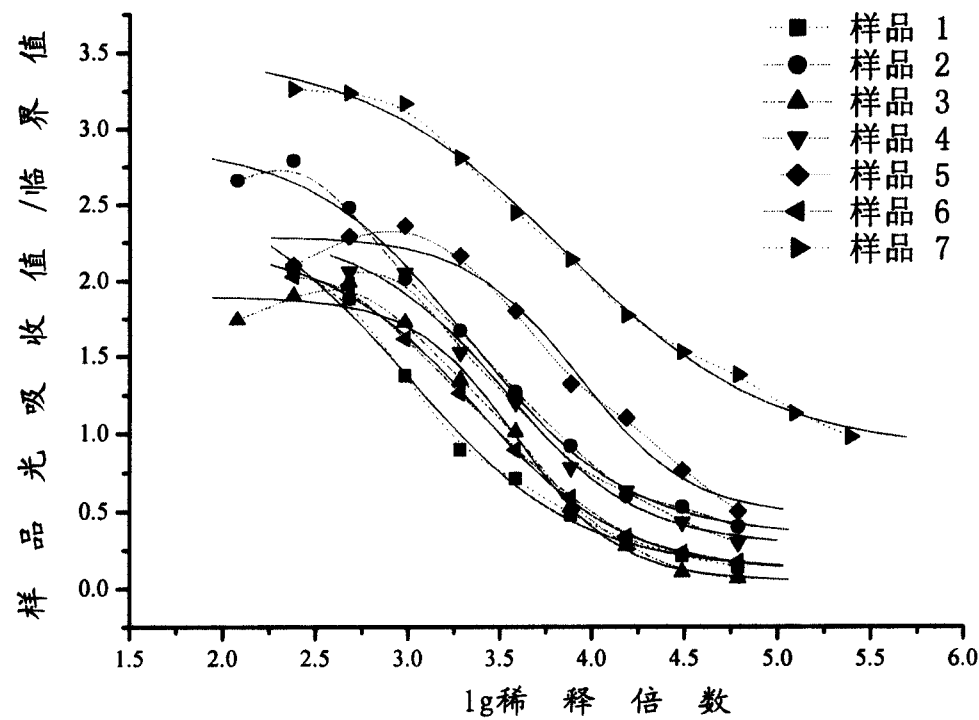


图 2