



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101023098 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 18

(21) 申请号 200580031444. 0

(22) 申请日 2005. 09. 21

(30) 优先权数据

274852/2004 2004. 09. 22 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 03. 19

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2005/017420 2005. 09. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02006/033368 JA 2006. 03. 30

(73) 专利权人 株式会社先端生命科学研究所

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 榎昇 福田泰之 木村达治

小田阳子 大植千春 草野修

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公

司 31100

代理人 范征

(51) Int. Cl.

C07K 16/08 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

C12N 15/02 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

C12P 21/08 (2006. 01)

C07K 14/02 (2006. 01)

G01N 33/576 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5693497 A, 1997. 12. 02, 全文.

W0 2002/14871 A1, 2002. 02. 21, 全文.

Richard A. Lerner 等. Chemically synthesized peptides predicted from the nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome elicit antibodies reactive with the native envelope protein of Dane particles. PNAS. 1981, 78(6), 3403-3407.

审查员 王璟

权利要求书 1 页 说明书 28 页

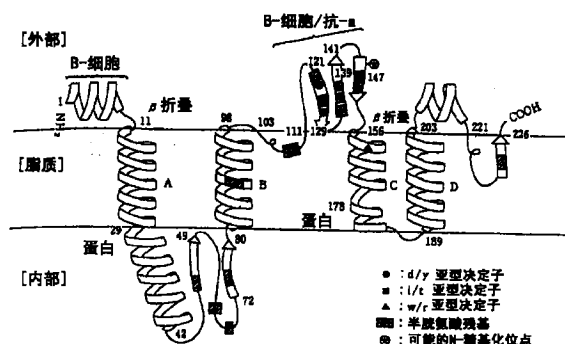
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

乙肝病毒 s 抗原的检测方法

(57) 摘要

本发明要提供一种可用于检测 HBV 或 HBs 抗原的探针, 利用此探针能检测样品中可能存在的乙肝病毒 (HBV) 的逃避突变体; 与利用此探针的方法。[解决问题的方法] 一种探针, 其能识别位于包含 SEQ ID NO: 1 所示氨基酸序列的肽上的; 以及利用此探针检测乙肝病毒或乙肝病毒 s 抗原的方法。



HBs 抗原的二级结构 (模式图) 部分改变

1. 一种单克隆抗体用于制备检测乙肝病毒或乙肝病毒 s 抗原的试剂的用途,所述单克隆抗体能识别乙肝病毒 s 抗原中 31-50 位的氨基酸组成的多肽,或能识别 SEQ ID NO:1 中 6-25 位的氨基酸组成的多肽。

2. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,在有变性剂存在下制备。

3. 如权利要求 2 所述的用途,其特征在于,所述变性剂是表面活性剂。

4. 如权利要求 2 所述的用途,其特征在于,通过用含有 (1) 酸化剂与 (2) 作为变性剂的表面活性剂和 / 或蛋白变性剂的处理试剂处理,以使乙肝病毒 s 抗原解离以及结合乙肝病毒 s 抗原的抗体灭活。

5. 如权利要求 2 所述的用途,其特征在于,通过用含有 (1) 碱化剂与 (2) 作为变性剂的表面活性剂和 / 或蛋白变性剂的处理试剂处理,以使乙肝病毒 s 抗原解离以及结合乙肝病毒 s 抗原的抗体灭活。

6. 如权利要求 2 所述的用途,其特征在于,通过用含有 (1) 碱化剂与 (2) 作为变性剂的表面活性剂和 / 或蛋白变性剂和 / 或还原剂的处理试剂处理,以使乙肝病毒 s 抗原解离以及结合乙肝病毒 s 抗原的抗体灭活。

7. 如权利要求 1 所述的用途,其特征在于,还利用除乙肝病毒 s 抗原以外的乙肝病毒抗原的单克隆抗体。

8. 一种用于检测乙肝病毒 s 抗原的试剂,所述试剂包含单克隆抗体以及变性剂,所述单克隆抗体能识别乙肝病毒 s 抗原中 31-50 位的氨基酸组成的多肽,或能识别 SEQ ID NO:1 中 6-25 位的氨基酸组成的多肽。

9. 一种用于检测乙肝病毒 s 抗原的试剂,所述试剂包含单克隆抗体、除乙肝病毒 s 抗原以外的乙肝病毒抗原的单克隆抗体以及变性剂,所述单克隆抗体能识别乙肝病毒 s 抗原中 31-50 位的氨基酸组成的多肽,或能识别 SEQ ID NO:1 中 6-25 位的氨基酸组成的多肽。

乙肝病毒 s 抗原的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及能识别乙肝病毒 (HBV) s 抗原 (HBs 抗原) 的新颖表位的探针与利用该探针检测 HBV 或 HBs 抗原的方法。

背景技术

[0002] 主要通过检测病毒或病毒相关组分 (蛋白质或核酸) 或通过检测病毒感染后活体产生的特异性抗体来诊断病毒感染。

[0003] 一般通过确认存在 HBs 抗原或 HBc 抗体来获知 HBV 感染。乙肝病毒 e 抗原 (HBe 抗原) 的含量、该抗原的抗体含量或 HBV 的 DNA (HBV-DNA) 含量可作为 HBV 感染与 HBV 携带者的临床状态或对预后和治疗效果判断的指标来检测。

[0004] 在构成 HBV 病毒颗粒 (HBV 颗粒) 的抗原中, HBs 抗原是感染性 HBV 颗粒表面的主要组成型包膜蛋白, 其锚定在包裹了含 HBV-DNA 的核心颗粒的源自肝细胞的脂双层中。感染了 HBV 的患者血液中由 HBs 抗原构成的非感染性小球形颗粒或管状颗粒。该小球形颗粒在血液中含量最丰富, 每一个或几个 HBV 颗粒可观察到约 1000 个小球形颗粒。目前可购得的大多数 HBs 抗原检验试剂主要检测小球形颗粒形式的 HBs 抗原。

[0005] HBs 抗原是由 226 个氨基酸残基 (氨基酸号 1-226) 构成, 穿过脂双层 4 次的膜蛋白。虽然 HBs 抗原的跨膜结构的模型尚未完全阐明, Howard 等 (Howard 等, 《病毒性肝炎与肝脏疾病》(Viral Hepatitis and Liver Disease), (ZuckermanAJ, Alan R 编), 第 1094-1101 页, Liss Inc., 纽约, 1988) 提出 HBs 抗原由以下部分构成: 脂双层外, 由 HBs 抗原的 N 末端 1-11 位构成的 (ER 腔侧) 区; 由 12-28 位构成, 穿过脂双层的疏水性跨膜区域; 脂双层内由 29-80 位构成的区域; 由 81-97 位构成的疏水性跨膜区域; 由 98-156 位构成的亲水性 ER 腔区域; 与 157-226 位构成的两个疏水性跨膜区域 (图 1)。

[0006] 常规方法检测 HBs 抗原所用的主要共有“a”决定子位于氨基酸 110-156 位, 其包含在位于 ER 腔侧的 98-156 位氨基酸中, 即病毒颗粒的表面。据报道此共有“a”决定子由其中存在至少 4 个表位的复杂高级结构构成 (冈本宏明, Nippon Rinsho, Bunshi Kan-En Uirusubyogaku, Kiso-Rinsho-Yobo (日本临床, 分子肝炎病毒学, 基础临床预防), 下卷, 甲型、乙型、丁型、戊型肝炎病毒, 第 212-222 页, 1995 年 10 月 26 日出版)。

[0007] HBV 是 DNA 病毒, 但已知 HBV 可发生与 RNA 病毒相当的突变, 因为在病毒增殖期间, 其 DNA 复制为 RNA, 再通过逆转录酶从此 RNA 合成 DNA。因此, 据估计, 感染了 HBV 的个体中会发生具有各种突变的突变体。当给这种个体中的 HBV 施加外部选择压力, 例如中和抗体时, 会发生对压力敏感的 HBV 病毒株减少的现象, 而对压力耐受或不敏感的突变体增加。近年来, 逐渐成问题的所谓“逃避突变体”是在该主要共有的“a”决定子中发生氨基酸取代、缺失或插入, 从而该突变体可通过逃避识别突变前的“a”决定子的抗体来维持其感染能力。

[0008] 发生逃避突变体的相关问题是此突变体可维持持久的感染能力, 因为它能规避通过接种利用突变前的“a”决定子的疫苗所诱导的抗体。

[0009] 另一问题是常规 HBs 抗原检测方法不能检测此逃避突变体。在共有“a”决定子

上具有突变的逃避突变体一般与针对野生型 HBV 的共有“a”决定子的单克隆抗体具有较低的反应性,因此,常规 HBs 抗原检测方法所用的、针对野生型共有“a”决定子的单克隆抗体不能识别逃避突变型 HBV 的 HBs 抗原,从而不能发现实际发生的 HBV 感染。例如,据报道 145Arg 突变体,即其中 145 位的氨基酸从野生型的 Gly 改变为 Arg 的突变体,与针对共有“a”决定子的单克隆抗体的反应性显著降低(冈本宏明, Nippon Rinsho, Bunshi Kan-En Uirusubiyogaku, Kiso-Rinsho-Yobo(日本临床,分子肝炎病毒学,基础临床预防),下卷,甲型、乙型、丁型戊型肝炎病毒,第 212-222 页,1995 年 10 月 26 日出版)。实际上,据报道,在用常规 HBs 抗原检测试剂进行的 HBV 筛选测试中呈 HBs 抗原阴性的输血导致了 HBV 感染(Thiers 等, Lancet, ii, 1273-1276, 1988)。

[0010] 在 HBV 急性感染中,报道了 HBV 感染的患者在感染最初阶段是 HBs 抗原阳性,然后转变为 HBs 抗原阴性同时变为 Hbs 抗体阳性的现象。患者变为 HBs 抗体阳性的原因在于患者体内产生针对 HBs 抗原的共有“a”决定子的抗体。该患者针对共有“a”决定子的抗体与 HBs 抗原测试试剂所用的单克隆抗体所识别的共有“a”决定子的同一区域相结合,从而导致两种抗体间发生竞争,通过竞争降低了 HBs 抗原测试试剂的灵敏度,进而阻止了测试试剂对 HBV 的检测。

发明内容

[0011] 本发明要解决的问题

[0012] 常规 HBs 抗原测试试剂利用针对野生型 HBV 的共有“a”决定子的单克隆抗体,故其不能检测在共有“a”决定子上具有突变的逃避突变体,当将以此测试试剂判断为阴性的血液用于输血时,可能导致 HBV 感染。本发明的目的是开发一种能检测这种 HBV 逃避突变体的探针与利用此探针检测 HBs 抗原的方法。

[0013] 本发明的另一目的是开发一种不被针对共有“a”决定子的患者抗体所阻止,即使在受感染患者的 HBs 抗体阳性样品中也能检测 HBs 抗原的探针,以及利用此探针检测 HBs 抗原的方法。

[0014] 解决问题的方法

[0015] 本发明人利用抗体作为探针成功地解决了上述问题,所述抗体能识别位于由 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列构成的肽上的表位。

[0016] 即,本发明涉及的探针能识别位于对应于乙肝病毒 s 抗原中 26-80 位氨基酸序列构成的肽上的表位,具体地说该探针能识别位于 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列构成的肽上的表位。

[0017] 本发明也涉及检测乙肝病毒或乙肝病毒抗原的方法,所述方法包括利用上述探针。

[0018] 在本说明书中,226 个氨基酸残基构成的 HBs 抗原中部分氨基酸序列的位置以指定该抗原的 N-末端氨基酸残基为数字 1 来表示。在 HBV 基因的 S 区域中有 Pre-S1、Pre-S2 和 S 基因来编码由 389-400 个氨基酸残基构成,受 Pre-S1 基因 +Pre-S2 基因 +S 基因控制的大 S 蛋白;由 281 个氨基酸残基构成,受 Pre-S2 基因 +S 基因控制的中等 S 蛋白;由 226 个氨基酸残基构成,受 S 基因控制的小 S 蛋白(三田村圭二, Nippon Rinsho, Bunshi Kan-En Uirusubiyogaku, Kiso-Rinsho-Yobo(日本临床,分子肝炎病毒学,基础临床预防),下卷,第

13-27 页,1995 年 10 月 26 日出版)。除非另有说明,本文所用的术语“HBs 抗原”一般表示小 S 蛋白。然而,本发明的检测方法也可检测所有大 S 蛋白、中等 S 蛋白与小 S 蛋白,因此该方法检测的乙肝病毒 s 抗原(HBs 抗原)包含以上 3 种蛋白。

[0019] 本发明探针能识别 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列构成的肽上的表位,通常是能特异性识别该表位的多克隆抗体或单克隆抗体。该抗体的具体例子是杂交瘤细胞株 1C10、4A3 或 6G6 产生的单克隆抗体,这些细胞株在 2004 年 9 月 9 日由日本,茨城县, Tsukuba 市, 東 1 丁目 1 番地 1, 中央第 6 的独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心以登录号 FERM ABP-10115、ABP-10116 和 ABP-10117 保藏。

[0020] SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列对应于 HBs 抗原的 26-80 位的氨基酸序列,即 HBs 抗原脂双层内的亲水性区域。此表位位于 HBV 病毒颗粒、小球形颗粒或管状颗粒内,与位于 ER 腔侧、含 HBs 抗原共有“a”决定子的区域不同,该表位不经受选择压力,例如能诱导逃避突变体的中和抗体。因此,与常规方法所用的共有“a”决定子相比,以上表位中的突变几乎不经受选择压力,利用本发明表位,很少或从不发生只有特定突变体占据优势而造成只有不与 HBs 抗原检测试剂发生反应的突变体增加的情况。

[0021] 当利用本发明的探针检测 HBs 抗原时,其几乎不受患者针对 HBs 抗原的抗体干扰。这可能是因为本发明探针所识别的表位处于 HBV 颗粒、小球形颗粒与管状颗粒的内部,因而与 HBs 抗原的共有“a”决定子相比,此表位不易在感染 HBV 的患者体内起到免疫原的作用,因此抑制了患者产生针对该表位的抗体。

[0022] 通过利用本发明的探针,即使在共有“a”决定子上具有突变的逃避突变体中,亦可能可靠地检测 HBs 抗原。

[0023] 为利用本发明探针检测样品的 HBV 颗粒、小球形颗粒或管状颗粒中的 HBs 抗原,位于脂双层内部或球形或管状颗粒中的 HBs 抗原 26-80 位的氨基酸序列上的表位应处于可与该探针接触的状态。

[0024] 本发明的另一方面是检测样品中 HBV 或 HBs 抗原的方法,所述方法包括向样品中加入能使脂双层或蛋白质凝聚物变性的变性剂,通常是蛋白质变性剂,例如表面活性剂、离液离子等,特别是表面活性剂从而能用本发明探针检测样品中的 HBs 抗原。

[0025] 在本发明中,利用变性剂使 HBV 颗粒、小球形颗粒与管状颗粒变性,从而使由 HBs 抗原 26-80 位的氨基酸序列构成的它们的内部区域,即存在于 HBs 抗原的脂双层内部的亲水性区域与外部相接触。本文可用的变性剂是能破坏 HBV 颗粒的脂双层并断裂小球形颗粒和管状颗粒中 HBs 抗原间的键(凝聚)但不使本发明探针失活的变性剂,通常可用诸如十二烷基硫酸钠的表面活性剂。

[0026] 本发明也提供检测 HBV 病毒的方法,所述方法包括利用本发明的探针、变性剂与能特异性识别除 HBs 抗原以外的 HBV 抗原的探针,以及具有这种构成的检测 HBV 的试剂,即该试剂包括本发明的探针、变性剂与能特异性识别除 HBs 抗原以外的 HBV 抗原的探针。

[0027] 通过与本发明的探针联用的某探针检测除 HBs 抗原以外的 HBV 抗原,例如 HBcr 抗原(WO 02/14871),可将因只检测 HBs 抗原而错误判断为 HBV 阴性的 HBV 患者样品可靠地判断为 HBV 阳性。

[0028] 如上所述,已知 HBs 抗原能以与 RNA 病毒相当的高频率发生突变。因此,突变型 HBs 抗原也可由不同于 HBs 抗原 26-80 位的氨基酸序列中 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的

序列构成。

[0029] 然而,即使具有这种突变的 HBs 抗原,如果确定了其氨基酸序列,也能根据本说明书的内容在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 中表达与纯化。得到针对这种纯化的突变型 HBs 抗原的探针,将其用于检测 HBs 抗原。因此,在本发明中,对应于 HBs 抗原 26-80 位的氨基酸序列的序列不限于识别 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列上表位的探针或利用所述探针的检测方法。

[0030] 本发明的作用

[0031] 利用本发明的探针与利用该探针检测 HBV 或 HBs 抗原的方法,能高度敏感性地检测在 HBs 抗原的共有“a”决定子上具有突变、不能用常规 HBs 抗原检测方法检测的逃避突变体等,从而可高度可靠地判断 HBV 感染。即使如果针对 HBs 抗原的共有“a”决定子的患者抗体抑制了 HBs 抗原的检测,采用本发明的检测方法也能可靠地判断 HBV 感染。

[0032] 即使患者的抗体与本发明的探针竞争并抑制了 HBs 抗原的检测,通过联用酸化剂或碱化剂与变性剂预处理能可靠地判断 HBV 感染。

[0033] 联用本发明的探针与能识别另一 HBV 抗原的探针来同时检测 HBs 抗原与另一 HBV 抗原,能更可靠地检测 HBV 感染。

[0034] 附图简述

[0035] 图 1 阐述了 HBs 抗原的二级结构。

[0036] 实施本发明的最佳方式

[0037] 本发明的探针可以是能特异性识别对应于 HBs 抗原 26-80 位的氨基酸序列(例如 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列)构成的肽上表位的任何探针,通常可用针对抗原,例如上述肽或 HBs 抗原产生的抗体,特别是单克隆抗体。

[0038] 可通过利用编码该肽的基因的重组基因技术或化学合成制备 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列构成的肽,采用本身已知的各种方法或仪器等可得到这种制备工艺。

[0039] 可通过从 HBV 患者血清中分离病毒基因,经 PCR 扩增该目标基因来制备含有编码 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列的核苷酸序列的基因片段。利用源自 PCR 期间加入的接头的限制性酶切位点或源自基因片段所插入的质粒的限制性酶切位点,可将该基因克隆入表达载体。

[0040] 将此表达载体转化入宿主,例如大肠杆菌中,培养大肠杆菌得到位于脂双层内部的 HBs (26-80) 抗原。采用诸如超声破碎细胞、离心与各种层析技术的常规技术可实现从经培养得到的微生物中收集与纯化目标蛋白质的方法。即,当采用上述方法有效地表达目标蛋白质时,许多蛋白质在微生物中形成内含体。利用此特征,可在生理条件(例如生理盐水)下将这些微生物悬浮在缓冲液中,然后超声破碎细胞,离心破碎的微生物物质回收不可溶组分。用 6M 脲提取回收的不可溶组分,凝胶过滤得到高纯度的 trpE-HBs (26-80) 抗原,然后将其用作免疫原。

[0041] 可通过单用上述 HBs (26-80) 抗原或多肽(下文称为本发明抗原)或将与 BSA、KLH 等偶联的本发明抗原与佐剂(例如完全弗氏佐剂)的混合物周期性免疫动物,例如大鼠、家兔、山羊或绵羊,然后收集其血清来制备本发明的探针,例如多克隆抗体。为获得具有特异性识别位点的多克隆抗体,有可利用目标区域中的部分肽作为免疫原的方法。

[0042] 熟知利用杂交瘤制备单克隆抗体。例如,单用本发明抗原或其与 BSA、KLH 等的偶

联物作为与佐剂（例如完全弗氏佐剂）的混合物周期性免疫动物，例如 BALB/c 小鼠。当血液中的抗体滴度增加时，在最后一次免疫中将本发明抗原给予尾静脉，无菌切下脾脏，将脾细胞与合适的小鼠骨髓瘤细胞融合得到杂交瘤。可采用 Kohler 和 Milstein 的方法 (Nature, 256 :495-497, 1975) 实施此方法。

[0043] 在合适培养基中培养采用上述方法得到的杂交瘤，然后选择并克隆产生能与本发明抗原发生特异性反应的抗体的杂交瘤细胞。为克隆产生抗体的杂交瘤，不只可采用有限稀释也能采用软琼脂方法 (Eur J Immunol., 6 :511-519, 1976)。可在培养基或小鼠腹腔中培养此杂交瘤从而在培养基或腹水中制备单克隆抗体。

[0044] 可采用例如蛋白 A 的柱层析的方法纯化血清中的多克隆抗体或培养基或腹水中制备的单克隆抗体。可采用，例如利用载体固定的抗原的亲亲和层析方法处理多克隆抗体，从而只纯化能与特定抗原反应的抗体，也可以类似方式得到不与特定抗原反应的抗体。

[0045] 除了单克隆抗体与多克隆抗体，可制备用作探针的分子。例如，Hoogenboon 的综述 (Trends in Biotechnology, 15 :62-70, 1997) 详述了重组抗体。

[0046] 本发明所用的变性剂可以是能破坏 HBV 颗粒的脂双层结构并断裂小球形颗粒和管状颗粒中 HBs 抗原间的键（凝聚）的任何变性剂。例如，可利用脲、酸化剂与碱化剂，表面活性剂特别有效。表面活性剂包括非离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂与阴离子表面活性剂，以上任一种只要能破坏脂双层的结构就可用。例如，非离子表面活性剂，如吐温 20 与 Nonidet P-40 能有效地破坏脂双层结构从而使本发明的表位暴露，虽然它们的表面活性不是很强。

[0047] 认为阴离子表面活性剂，例如 SDS 与 Sarcosyl 具有强表面活性，这种表面活性剂也能使本发明的表位暴露。用强表面活性剂处理可能破坏蛋白质的构象表位，因而在某些情况中识别构象表位的抗体不能与抗原结合；在此情况中，可利用能识别 HBs 抗原的线性表位的探针来检测抗原。

[0048] 变性剂的作用不只能有效地释放存在于样品中的 HBs 抗原，也能使单克隆抗体易于和 HBs 抗原结合。

[0049] 在本发明中，特别优选利用能特异性地与用上述表面活性剂变性的抗原相结合的探针。当将抗体用作探针时，该抗体应是能与通过上述变性处理而暴露和变性的本发明表位相结合的探针。

[0050] 例如，当利用具有强表面活性的具体表面活性剂时，需要选择针对利用该表面活性剂而暴露和变性的表位的单克隆抗体。因此，需要用已用表面活性剂变性处理过的、对应于 HBs 抗原 26-80 位的氨基酸（序列）构成的肽（例如，SEQID NO :1 所示氨基酸序列构成的肽）免疫动物，也需要用所述肽选择抗体。

[0051] 为筛选抗体，将经变性处理的肽抗原固定在固相上，在含有表面活性剂的溶液中筛选与该抗原反应的单克隆抗体，从而得到适合于免疫测定的本发明抗体。由于筛选溶液含有表面活性剂，可得到能耐受表面活性剂的变性作用的单克隆抗体。

[0052] 可采用免疫测定，例如酶联免疫吸附测定 (ELISA)、酶免疫斑点测定、放射性免疫测定与基于凝集的试验或其它熟知的免疫测定来检测样品中经变性处理的 HBs 抗原。当利用标记的抗体检测时，可使用标记物诸如荧光物质、化学发光物质、放射性物质或酶。

[0053] 例如，当采用根据 ELISA 夹心反应原理的方法来检测样品中的 HBs 抗原时，所述方

法包括以下步骤。首先,将能识别位于脂双层内部的表位的抗体等与固体支持物(例如,微滴定孔的内壁)结合。然后,用牛血清白蛋白等封闭以防止非特异性反应。向此支持物加入用表面活性剂等处理过的样品,从而使固定于其上的抗体捕获 HBs 抗原。针对捕获的 HBs 抗原的标记抗体等可与该 HBs 抗原反应来检测。待与固体支持物结合的抗体可以是能与位于脂双层内部的表位结合的任何抗体。标记的抗体可以是能与 HBs 抗原结合的任何抗体。它们的组合是随意的,可选择能实现高选择性与高特异性的组合。

[0054] 上述可用的固体支持物包括聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯微滴定板、试管、毛细管、珠(乳胶颗粒、红细胞、金属化合物等)、膜(脂质体等)与过滤器等。可检测其中的本发明 HBs 抗原的样品包括生物学体液,例如全血、血浆、血清、尿、唾液与脑脊液以及组织,例如肝脏组织。

[0055] 将样品中的 HBs 抗原处理为适合于和探针,例如单克隆抗体(发生)结合反应的状态而不涉及复杂过程的方法对本发明很重要。即,溶解样品所含 HBs 抗原的脂双层从而使原来不暴露于病毒颗粒表面的表位变得暴露是重要的。

实施例

[0056] 以下实施例是为说明本发明,而不是要限制本发明的范围。

[0057] 实施例 1

[0058] trpE-HBs (26-80) 抗原的表达与纯化

[0059] (A) 构建表达 TrpE-HBs (26-80) 抗原的质粒

[0060] 采用以下方法构建 HBs (26-80) 区域的表达质粒。将 100 μ l HBV 患者的血清与 100 μ l DNA 提取物 [10 μ l 1M Tris-HCl (pH8.4), 8 μ l 250mM EDTA, 40 μ l 10% SDS, 8 μ l 5M NaCl, 10 μ l 20mg/ml 蛋白酶 K, 1 μ l tRNA (5 μ g/ μ l), 与 23 μ l 无菌水] 混合, 54°C 培育 30 分钟。将样品与 200 μ l 苯酚/氯仿 (1/1) 溶液混合, 然后 15Krpm 离心 5 分钟得到上清液, 向上清液中加入 150 μ l 异丙醇与 7 μ l 5M NaCl, -20°C 静置 1 小时。4°C, 15Krpm 离心 5 分钟后, 用 70% 乙醇洗涤沉淀物, 然后再 4°C 以 15Krpm 离心 5 分钟。风干沉淀物, 溶解于 20 μ l 无菌水得到 HBV DNA 溶液。

[0061] 5 μ l 此 HBV DNA 溶液利用两种引物(即, 5'-GAATTCCTCACAATACCACAGAGTCTA-3' (SEQ ID NO:2) 和 5'-GGATCCTTAAAAACGCCGACACATCCAGCG-3' (SEQ ID NO:3)) 进行 PCR。利用 GeneAmp™ (Perkin Elmer Cetus 制造的 DNA 扩增试剂试剂盒) 以 95°C 1 分钟 DNA 变性、55°C 1 分钟退火与 72°C 1 分钟 DNA 合成为条件进行 PCR, 采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 玻璃粉方法 (glass powder method) (GeneClean) 纯化得到的 DNA 片段。37°C, 用 20 μ l 限制性酶切反应溶液 [50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM 二硫苏糖醇, 100mM NaCl, 15U EcoRI 酶与 15U BamHI 酶] 消化 0.5 μ g 该扩增的 HBs (26-80) 基因片段 1 小时, 然后进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳来纯化约 180-bp 的 EcoRI-BamHI 片段。

[0062] 然后, 在 37°C 用 20 μ l 限制性酶反应溶液 [50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM 二硫苏糖醇, 100mM NaCl, 15U EcoRI 酶与 15U BamHI 酶] 消化 0.5 μ g DNA (即表达载体 pATtrpE) 1 小时, 再向反应溶液中加入 39 μ l 水, 接着将溶液在 70°C 加热处理 5 分钟, 向其中加入 1 μ l (250U/ μ l) 细菌碱性磷酸酶 (BAP), 37°C 培育 1 小时。

[0063] 苯酚提取该反应溶液, 乙醇沉淀得到的水相, 干燥沉淀物。将 0.5 μ g 所得的

EcoRI-BamHI-处理的载体 DNA 与上述 180-bp HBs(26-80) 片段加入 $1\mu\text{l}$ (350U/ μl) T4 连接酶与 $5\mu\text{l}$ $10\times$ 连接酶缓冲液 [660mM Tris-HCl (pH7.5), 66mM MgCl₂, 100mM 二硫苏糖醇, 1mM ATP] 制备的混合物中, 然后用水调节至 $50\mu\text{l}$, 16℃ 培育过夜进行连接反应。为获得表达质粒 pATtrpE-HBs(26-80), 利用此连接反应溶液转化大肠杆菌 HB101。

[0064] 采用氯化钙方法 [Mandel, M. 和 Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159-162, (1970)] 制备用于转化的感受态大肠杆菌菌株。转化的大肠杆菌涂布在含有 $25\mu\text{g/ml}$ 氨苄西林的 LB 平板 (1% 胰蛋白胨, 0.5% NaCl, 1.5% 琼脂) 上, 37℃ 培育过夜。利用铂接种环将平板上出现的转化的细菌菌落转移至含有 $25\mu\text{g/ml}$ 氨苄西林的 LB 培养基中, 37℃ 培育过夜。

[0065] 离心 1.5ml 转化的细菌培养液收集细菌, 采用碱方法 [Manniatitis 等, 《分子克隆: 实验室手册》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), (1982)] 进行质粒 DNA 的少量制备。37℃, 用 $20\mu\text{l}$ 限制性酶切反应溶液 [50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM 二硫苏糖醇, 100mM NaCl, 15U EcoRI 酶和 15UBamHI 酶] 消化 $1\mu\text{g}$ 得到的质粒 DNA 1 小时, 然后采用琼脂糖凝胶电泳分离 pATtrpE-HBs(26-80) 表达质粒得到约 180-bp EcoRI-BamHI 片段。

[0066] (B) TrpE-HBs(26-80) 抗原的表达与纯化

[0067] 将含有表达质粒 pATtrpE-HBs(26-80) 的大肠杆菌 HB101 菌株接种在含有 $50\mu\text{g/ml}$ 氨苄西林的 3ml 2YT 培养液中 (1.6% 胰蛋白胨, 1% 酵母提取物, 0.5% NaCl), 然后在 37℃ 培养 9 小时。将 1ml 此培养液接种入含有 $50\mu\text{g/ml}$ 氨苄西林的 100ml M9-CA 培养液 (0.6% Na₂HPO₄, 0.5% KH₂PO₄, 0.5% NaCl, 0.1% NH₄Cl, 0.1mM CaCl₂, 2mM MgSO₄, 0.5% 酪蛋白氨基酸, 0.2% 葡萄糖) 中, 然后在 37℃ 培养。当 OD₆₀₀ 达到 0.3 时, 加入吡啶-丙烯酸至终浓度为 40mg/l, 再培养 16 小时。以 5Krpm 离心此培养液 10 分钟收集微生物。

[0068] 将微生物悬浮在 20ml 缓冲液 A [50mM Tris-HCl (pH8.0), 1mM EDTA, 30mM NaCl] 中, 再次离心得到 2.6g 表达微生物。将得到的微生物悬浮在 10ml 缓冲液 A 中, 然后超声破碎大肠杆菌膜, 再离心得到含有 trpE-HBs(26-80) 融合抗原的不可溶组分。

[0069] 将此不可溶组分溶解于含有 8M 脲、10mM 二硫苏糖醇与 1mM EDTA 的 3ml PBS 中, 有 6M 脲存在下经 Sephacryl S300HR 柱凝胶过滤, 从而使 trpE-HBs(26-80) 融合抗原达到几乎均质。

[0070] 实施例 2

[0071] 制备杂交瘤

[0072] 用 6M 脲溶解以上述方法制备的多肽 [trpE-HBs(26-80)], 然后用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.3) (PBS) 将其稀释至终浓度为 0.2-1.0mg/ml, 与等体积的弗氏佐剂混合后以 10-20 μg 的剂量腹膜内给予 4-6 周龄的 BALB/c 小鼠。

[0073] 以与上述相同的方式每 2-4 周进行加强免疫, 将溶解在 PBS 中的 10 μg HBs 给予尾静脉进行最终免疫。

[0074] 最终免疫后 3 天时, 无菌取出小鼠的脾脏, 然后用剪刀与金属筛网使其破碎为单个细胞, 用 RPMI-1640 培养液洗涤 3 次。用 RPMI-1640 培养基洗涤对数生长期的骨髓瘤细胞株 Sp2/Oag14 三次, 将细胞以 1:5 的比例与脾细胞混合。以 $200\times g$ 离心 5 分钟后, 弃去上清液, 轻缓混合下将含有 50% 聚乙二醇 (PEG) 4000 (Merck) 的 1ml RPMI-1640 培养基缓慢加入细胞团中, 然后再加入 10ml RPMI-1640 培养基以实现细胞融合。

[0075] 离心 (200×g, 5 分钟) 得到的融合细胞以除去 PEG, 融合悬浮在含有 10% 胎牛血清和次黄嘌呤、氨基蝶呤与胸腺嘧啶 (HAT) 的 RPMI-1640 培养液中, 涂布到 96-孔细胞培养板上。培养约 10 天只使杂交瘤增殖后, 采用 ELISA 方法选择产生目标抗体的克隆从而得到产生具有所需反应特异性的单克隆抗体的杂交瘤。

[0076] 采用有限稀释将得到的杂交瘤制成单克隆从而得到产生抗体的杂交瘤。得到的杂交瘤分别命名为 6G6、4A3 和 1C10。这些杂交瘤细胞在 2004 年 9 月 9 日由国际专利生物保藏单位 (IPOD), 日本的国立高级工业科学与技术研究所 (AIST) 保藏。

[0077] 实施例 3

[0078] 单克隆抗体的制备与分析

[0079] 采用实施例 2 所述方法得到的各杂交瘤植入已给予降植烷的 BALB/c 小鼠腹腔内, 获得在腹水中产生的单克隆抗体。

[0080] 利用蛋白 A 琼脂糖柱通过亲和层析纯化含有单克隆抗体的 IgG 组分。

[0081] 利用 TrpE-HBs (26-80) 抗原与由 20 个氨基酸构成的各个合成肽分析所得的各单克隆抗体的靶表位, 结果 (如表 1 所示) 发现这些单克隆抗体识别位于脂双层内部的 HBs 抗原表位 (氨基酸号: 26-80), 所述合成肽根据源自 HBs 区域的序列合成。

[0082] [表 1]

[0084]

(多)肽的名称	氨基酸号	单克隆抗体名称		
		4A3	6G6	1C10
HBS-1	1-20	-	-	-
HBS-2	11-30	-	-	-
HBS-3	21-40	-	-	-
HBS-4	31-50	+	-	-
HBS-5	41-60	-	+	-
HBS-6	51-70	-	+	+
HBS-7	61-80	-	-	-
HBS-8	71-90	-	-	-
TrpE-HBs(26-80)	26-80	+	+	+

[0083] 利用抗-小鼠 Ig 同种型抗体采用同种分型试剂盒 (Zymed) 鉴定各单克隆抗体的 (亚) 类。结果如表 2 所示, 6G6 和 4A3 的亚类是 IgG1、κ, 1C10 的亚类是 IgG2a、κ。

[0084] 能识别存在于本发明氨基酸号 31-70 区域中的抗原表位的抗体未见报道, 发现单克隆抗体 6G6、4A3 和 1C10 各自识别新颖的表位。

[0085] [表 2]

[0089]

克隆名称	亚类	预计的识别位点(氨基酸号)
4A3	IgG1, κ	31-50
6G6	IgG1, κ	51-60
1C10	IgG2a, κ	51-70

[0086] 实施例 4

[0087] 检验利用表面活性剂的检测方法

[0088] 用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) 将抗-HBs 抗原的单克隆抗体 6G6 稀释至 $6 \mu\text{g/ml}$ 的终浓度, 然后以每孔 $80 \mu\text{l}$ 的体积移液至 96-孔微滴定板 (Nunc) 上。将微滴定板置于 4°C 过夜, 用含有 0.15M NaCl 的 0.35ml 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) 洗涤两次, 然后加入含有 0.5% 酪蛋白-Na 的 0.35ml 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) (下文称为封闭溶液), 再于室温培育 2 小时。

[0089] 除去封闭溶液后, 向各孔加入含有 0.15M NaCl、1% BSA 和 0.5% 酪蛋白-Na 的 $40 \mu\text{l}$ 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) (其中加入了终浓度为 4% 或 8% 的各种表面活性剂) 与 $40 \mu\text{l}$ 检测样品, 然后在室温反应 1 小时, 用 0.35ml 洗涤溶液洗涤 5 次后, 加入 $80 \mu\text{l}$ 用过氧化物酶 (POD) 标记的单克隆抗体 (5C3), 混合物在室温反应 30 分钟。用 0.35ml 洗涤溶液洗涤各孔 6 次, 其与 $80 \mu\text{l}$ 底物 (邻苯二胺, 下文称为 OPD) 溶液在室温反应 30 分钟后, 向各孔加入 $80 \mu\text{l}$ 2N 硫酸溶液, 然后检测其在波长为 492nm 处的吸光度 (OD_{492}), 以其在 630nm 处的吸光度用作参比值。

[0090] 采用各种表面活性剂时检测 HBs 阳性血清的结果见表 3。当利用不含表面活性剂的缓冲液检测 HBs 抗原阳性血清时, 不能检测 HBs 抗原, 但当利用含有各种表面活性剂 (阴离子、阳离子、两性与非离子表面活性剂) 的缓冲液检测时可获得足够的信号从而能清楚地检测 HBs 抗原。因此这说明可以利用各种表面活性剂使表位暴露于外部来检测存在于 HBs 抗原脂双层内部的新颖表位。

[0091] 用过氧化物酶标记的单克隆抗体 5C3 是通过表达由 1-226 位氨基酸序列构成的抗原 (即全长 HBs 抗原), 然后纯化此重组抗原并用它免疫小鼠获得的一种单克隆抗体。证实如此获得的抗体 5C3 能与以上重组 HBs 抗原结合。然而, 当根据 HBs 抗原 1-226 位的氨基酸序列合成各自由 20 个氨基酸构成, 彼此有 10 个氨基酸重叠的合成肽并通过与实施例 3 相同的方法检验它们与抗体 5C3 的结合 (情况) 时, 抗体 5C3 不与任何合成肽反应。因此, 据估计抗体 5C3 不识别 HBs 抗原的氨基酸序列的线性表位, 而识别其构象表位。

[0092] [表 3]

[0093]

试剂名称	极性	浓度(%)	阴性血清	阳性血清 1	阳性血清 2
无添加 (对照)	-	-	0.004	0.005	0.010
C10TAC	阳离子	8	0.008	0.579	0.451
C14TAC	阳离子	8	0.025	2.222	1.466
氯化月桂基吡啶鎓	阳离子	8	0.026	0.145	0.121
吐温 20	非离子	8	0.006	0.552	0.541
Triton X100	非离子	8	0.004	0.895	0.629
NP40	非离子	8	0.005	0.640	0.528
MEGA10	非离子	8	0.012	1.051	0.738
Brij35	非离子	8	0.011	1.003	0.811
CHAPS	两性	8	0.015	0.053	0.040
C12APS	两性	4	0.007	1.523	1.232
十二烷基肌氨酸钠	阴离子	4	0.010	1.990	1.833
SDS	阴离子	4	0.029	1.401	1.198

[0094]

无添加 (对照)	-	-	0.014	0.019	0.021
C12TAB	阳离子	4	0.020	0.949	0.689
C14APS	两性	4	0.014	2.857	2.911
C16APS	两性	4	0.013	2.829	2.870
C18APS	两性	4	0.013	2.806	2.698
C8SO3	阴离子	4	0.016	0.740	0.223
C11SO3	阴离子	4	0.048	2.912	2.922
十六烷基硫酸钠	阴离子	4	0.010	0.397	0.139

[0095] 实施例 5

[0096] 检测 HBs 抗原阴性样品

[0097] 采用实施例 4 的改进方法检测 HBs 抗原阴性但怀疑感染了 HBs 的样品中的 HBs 抗原。

[0098] 用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) 将抗-HBs 抗原的单克隆抗体 6G6 稀释至 6 μg/ml 的终浓度, 然后以每孔 100 μl 的体积移液至 96-孔微滴定板 (Nunc) 上。将微滴定板置于 4℃ 过夜, 用含有 0.15M NaCl 的 0.35ml 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) 洗涤两次, 然后加入含有 0.5% 酪蛋白钠与 3% 蔗糖的 0.35ml 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) (封闭溶液), 将混合物置于室温 2 小时。

[0099] 除去封闭溶液后, 向各孔加入含有 0.15M NaCl、10mM EDTA-2Na、0.2% proclin、1% BSA、0.1% 酪蛋白钠、3% 马血清、2% 小鼠血清和 10% Brij 35 的 50 μl 100mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.0) 与 50 μl 检测样品, 室温反应 1 小时, 用 0.35ml 洗涤溶液洗涤 5 次后, 加入 100 μl 用过氧化物酶 (POD) 标记的单克隆抗体 (5C3), 混合物在室温反应 30 分钟。

[0100] 反应后, 用 0.35ml 洗涤溶液洗涤各孔 6 次, 其与 100 μl 底物 (邻苯二胺, 下文称为 OPD) 溶液在室温反应 30 分钟后, 向样品中加入 2N 硫酸溶液, 然后检测样品在波长为 492nm 处的吸光度 (OD₄₉₂), 以其在 630nm 处的吸光度作参比值。

[0101] 所用的样品购自 IIC 日本; 采用 Abbott Laboratories 的 CLIA 方法检测 HBs 抗原与抗-HBs 抗体; 采用 Gen-Probe Incorporated 的 TMA 方法检测 HBN-DNA。

[0102]

表 4

号 码	HBV-DNA		HBsAg (本发明 的检测方法)		HBsAg		HBsAb		HBcAg	HBcAb	HBcAb	HBcrAg	
	TMA	LGE/ml	平均值	判断	IU/ml	判断	mIU/ml	判断				RLI	判断
1	6.1		2.772	+	2.28	+	115.7	+	-	+	+	965,534	+
2	6.7		2.819	+	0.02	-	541.8	+	-	+	+	152,531	+
3	6.6		0.005	-	0.01	-	773.0	+	-	+	+	252,891	+
4	6.8		2.646	+	1.42	+	174.1	+	-	+	+	337,807	+
5	6.4		2.682	+	0.01	-	545.6	+	-	+	+	312,615	+

[0103] 表 4 所示的 5 份样品通过 TMA 方法（检测）为 HBV-DNA- 阳性。这些样品通过 Abbott Laboratories 的 CLIA 方法也（检测）为 HBs 抗体阳性，认为它们是来自感染了 HBV

患者的血清。然而,第 2、3 和 5 号样品通过 Abbott Laboratories 的 HBsAg CLIA 方法,即常规的 HBs 抗原检测方法判断为阴性。

[0104] 当通过本发明方法判断这些 HBs 抗原阴性样品时,在第 2 和 5 号样品中检测到 HBs 抗原。HBcrAg 检测方法能检测到由本发明检测方法与 Abbott Laboratories 的 HBsAg CLIA 方法判断为 HBs 抗原阴性的第 3 号样品,同时检测 HBs 抗原与 HBcr 抗原可用于更精确地检测 HBV 抗原。

[0105] 实施例 6

[0106] 1) 酸化剂的浓度

[0107] 将各种浓度的 50 μ l 盐酸水溶液加入 50 μ l HBV 抗原阴性样品或 3 份含有抗-HBs 抗体的 HBV 抗原阳性样品 (#990493、#990640、#990650),然后室温培育 10 分钟,通过以下方法检验作为检测样品的 50 μ l 混合物溶液。

[0108] 用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) 将抗-HBs 抗原的单克隆抗体 6G6 稀释至 6 μ g/ml 的终浓度,然后以每孔 100 μ l 的体积移液至 96-孔微滴定板 (Nunc) 上。将微滴定板于 4°C 培育过夜。

[0109] 用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) 洗涤微滴定板两次,然后加入含有 0.5% 酪蛋白钠的 350 μ l 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.1),培育微滴定板 2 小时。除去封闭溶液后,向各孔加入含有中和抗体的 100 μ l 反应缓冲液与每种经样品处理方法得到的各种检测样品,室温振荡反应 2 小时,用含有 0.05% 吐温 20 的 350 μ l 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) (洗涤溶液) 洗涤 6 次后,加入 100 μ l 用过氧化物酶 (POD) 标记的单克隆抗体 (5C3),混合物在室温反应 30 分钟。用洗涤溶液洗涤各孔 6 次,然后与 100 μ l 底物 (邻苯二胺,下文称为 OPD) 溶液培育 30 分钟后,向各孔中加入 100 μ l 2N 硫酸溶液,然后检测其在波长为 492nm 处的吸光度 (OD_{492}),以其在 630nm 处的吸光度作参比值。表中所示的盐酸浓度是样品与处理试剂混合后处理期间的浓度。

[0110] 即使将含有抗-HBs 抗体的 HBs 抗原阳性样品 (#990493、#990640、#990650) 与不含盐酸的溶液在室温培育 10 分钟,也几乎检测不到 HBs 抗原活性。处理时从 0.05N 的盐酸浓度开始检测到 HBs 抗原活性,在 0.25-1.0N 的浓度处出现峰值 (表 5)。

[0111] [表 5]

	HCl 浓度 (N)	HBV 阴性样品	HBV 阳性样品		
		健康人的血清	#990493	#990640	#990650
[0112]	0	0.002	0.002	0.002	0.005
	0.05	0.003	0.210	0.045	0.163
	0.1	0.003	0.425	0.055	0.223
	0.25	0.001	0.565	0.079	0.369
	0.5	0.001	0.541	0.097	0.301
	0.75	0.000	0.550	0.100	0.393
	1	0.003	0.450	0.085	0.333
	1.5	0.003	0.550	0.084	0.281

[0113] 实施例 7

[0114] 2) 有酸化剂存在下的各种表面活性剂

[0115] 将溶解于 1.0N 盐酸水溶液的每种 30 μ L 各种表面活性剂加入 30 μ L HBV 抗原阴性样品或 HBs 抗原阳性样品 (#990493、#990640、#990650), 然后室温培育 10 分钟, 通过 1) 所述的方法检验作为检测样品的 50 μ L 混合物溶液 (表 6-9)。表中所示的盐酸浓度与表面活性剂浓度是样品与处理试剂混合后处理期间的浓度。

[0116] 如表 6-9 所示, 3 份样品中至少 1 份显示反应性高于各样品判断标准的表面活性剂判断为有效的表面活性剂。结果发现将各种表面活性剂与酸化剂, 例如盐酸或硫酸一起加入时, 利用表面活性剂的 HBs 抗原阳性样品中 HBs 抗原的免疫反应性增加。判断为有效的表面活性剂是在其分子中具有直链烷基和叔胺或季铵盐的两性或阳离子表面活性剂。

[0117] 非离子表面活性剂, 例如 Triton X100 和 Bridj 35 也检测为有效的。具有固醇骨架的表面活性剂, 例如 CHAPS 未显示反应性增加。此外, 也检测了阴离子表面活性剂, 例如 SDS 和 N-月桂酰肌氨酸钠与脱氧胆酸, 但这些表面活性剂在有酸化剂存在时溶解性不佳, 因而不能对它们作出检测。

[0118] 向酸化剂中加入在分子中具有直链烷基与叔胺或季铵盐的两性或阳离子表面活性剂能提高检测灵敏度。将在处理溶液中存在酸化剂时有效的这种表面活性剂用于不存在酸化剂的处理溶液中时, 其检测灵敏度显著降低。从上述可知, 灵敏度增加的原因是酸化剂使作为 HBs 抗原检测抑制因素的抗-HBs 抗体失活, 而加入表面活性剂使位于样品中 HBs 抗原的脂双层内部的表位暴露于外部, 因而显著提高其与 6G6 的反应性。

[0119] [表 6]

[0120] 阳离子 (TAC 型)

		HBV 阴性 样品	HBV 阳性样品		
		健康人的 血清	#990493	#990640	#990650
无添加	浓度 (%)	0	0.541	0.097	0.254
判断表面活性剂作用的标准		0.006	0.812	0.146	0.381
向 0.5 N HCl 中加入的表 面活性剂					
[0121]	氯化辛基三甲铵	0.5	0.014	0.648	0.146
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.018	0.783	0.194
		2	0.019	0.898	0.272
		5	0.012	1.285	0.419
	氯化癸基三甲铵	0.5	0.020	0.727	0.231
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.022	0.976	0.346
		2	0.011	1.232	0.391
		5	0.004	1.602	0.419
	氯化十二烷基三甲铵	0.5	0.034	0.797	0.261
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.030	0.941	0.303
		2	0.024	0.972	0.259
		5	0.006	0.990	0.234
	氯化十四烷基三甲铵	0.5	0.029	0.924	0.261
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.035	1.002	0.306
		2	0.015	1.032	0.216
		5	0.005	0.804	0.136
[0122]	氯化十六烷基三甲铵	0.5	0.032	0.933	0.254
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.031	0.974	0.271
		2	0.021	0.977	0.206
		5	0.005	0.811	0.164
		0.5	0.021	0.587	0.190
		0.5	0.021	0.587	0.190
	氯化月桂基吡啶鎓	2	0.003	0.896	0.236
	$[\text{C}_5\text{H}_5\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3]\text{Cl}$	5	0.001	0.847	0.168
					0.249
[0123]	[表 7]				
[0124]	阳离子 (TAB 型)				

		HBV 阴性 样品	HBV 阳性样品				
		健康人的 血清	#990493	#990640	#990650		
无添加	浓度 (%)	0	0.013	0.569	0.097	0.286	
判断表面活性剂作用的 标准			0.854	0.146	0.429		
向 0.5 N HCl 中加入的表 面活性剂							
[0125]	溴化辛基三甲铵	0.5	0.019	0.713	0.128	0.301	
	[CH ₃ (CH ₂) ₇ N(CH ₃) ₃]Br	1	0.022	0.836	0.165	0.347	
		2	0.025	0.968	0.202	0.361	
		5	0.012	1.381	0.314	0.639	
	溴化癸基三甲铵	0.5	0.025	0.788	0.183	0.306	
	[CH ₃ (CH ₂) ₉ N(CH ₃) ₃]Br	1	0.026	1.051	0.260	0.462	
		2	0.008	1.535	0.320	0.588	
		5	0.005	1.784	0.465	0.800	
	溴化十二烷基三甲铵	0.5	0.029	0.938	0.205	0.353	
	[CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₃]Br	1	0.037	1.153	0.303	0.445	
		2	0.028	1.343	0.309	0.544	
		5	0.011	1.402	0.317	0.496	
	溴化十四烷基三甲铵	0.5	0.034	0.994	0.210	0.366	
	[CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₃]Br	1	0.041	1.181	0.284	0.467	
		2	0.020	1.272	0.237	0.443	
		5	0.007	1.201	0.289	0.443	
		0.5	0.034	1.080	0.208	0.429	
		1	0.037	1.196	0.236	0.498	
		2	0.037	1.321	0.226	0.472	
		5	0.005	1.017	0.179	0.414	
	[0126]	[表 8]					
	[0127]	两性					

		HBV 阴 性样品	HBV 阳性样品			
		健康人的 血清	#990493	#990640	#990650	
	浓度 (%)					
无添加		0	0.008	0.533	0.097	0.240
判断表面活性剂作用的标准			0.799	0.146	0.359	
向 0.5 N HCl 中加入的表面 活性剂						
[0128]	3-[3-(胆酰胺丙基)二甲基-氨基(ammonio)]-1-丙磺酸盐	0.5	0.009	0.606	0.115	0.248
		1	0.007	0.635	0.125	0.302
		2	0.001	0.547	0.076	0.246
		5	0.000	0.456	0.040	0.184
	N-十二烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸盐	0.5	0.013	0.807	0.189	0.379
		1	0.009	1.073	0.246	0.455
	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]	2	0.002	1.296	0.302	0.651
		5	0.000	1.365	0.410	0.695
	N-十四烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸盐	0.5	0.012	0.873	0.181	0.386
		1	0.010	1.076	0.245	0.477
	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]	2	0.005	1.267	0.268	0.554
		5	0.000	1.362	0.356	0.558
	N-十六烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸盐	0.5	0.015	1.013	0.209	0.502
		1	0.016	1.233	0.287	0.581
	CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]	2	0.014	1.290	0.256	0.575
		5	0.002	1.286	0.276	0.519
[0129]	[表 9]					
[0130]	非离子					
		HBV 阴 性样品	HBV 阳性样品			
		健康人的 血清	#990493	#990640	#990650	
[0131]	浓度 (%)					
无添加		0	0.005	0.459	0.070	0.210
判断表面活性剂作用的标准			0.689	0.105	0.315	

[0132]

向 0.5 N HCl 中加入的 表面活性剂						
	Triton X-100	0.5	0.011	0.545	0.117	0.284
		1	0.009	0.675	0.163	0.356
		2	0.007	0.790	0.193	0.344
		5	0.003	0.827	0.201	0.382
	Triton X-114	0.5	0.006	0.470	0.112	0.283
		1	0.005	0.554	0.149	0.372
		2	0.003	0.678	0.160	0.370
		5	0.001	0.489	0.118	0.258
	吐温 20	0.5	0.009	0.437	0.086	0.251
		1	0.007	0.468	0.110	0.278
		2	0.008	0.647	0.118	0.341
		5	0.007	0.605	0.147	0.307
	吐温 80	0.5	0.007	0.339	0.063	0.209
		1	0.007	0.312	0.068	0.220
		2	0.009	0.451	0.051	0.245
		5	0.007	0.498	0.063	0.240
	Bridj 35	0.5	0.010	0.496	0.076	0.241
		1	0.010	0.526	0.097	0.291
		2	0.011	0.704	0.108	0.374
		5	0.020	0.907	0.173	0.434

[0133] 实施例 8

[0134] 3) 有酸化剂存在下的蛋白变性剂

[0135] 将溶解于 1.0N 盐酸水溶液的 30 μ L 蛋白变性剂（脲或盐酸胍）加入 30 μ L HBV 抗原阴性样品或 3 份 HBs 抗原阳性样品（#990493、#990640、#990650），然后室温培育 10 分钟，通过 1) 所述的方法检验作为检测样品的 50 μ L 混合物溶液。表 10 显示了各 HBs 抗原阳性样品的免疫反应性。表 10 所示盐酸浓度与蛋白变性剂浓度是样品与处理试剂混合后处理期间的浓度。

[0136] 样品显示在有酸化剂存在下利用蛋白变性剂的免疫反应性高于只有酸化剂时的免疫反应性；即，用脲使免疫反应性增加约 1.5-3 倍，用盐酸胍使免疫反应性增加约 2-3 倍。用酸化剂处理时，血清蛋白等可能变性而造成沉淀或者在一些情况中变得混浊进而阻碍了移液过程，沉淀物往往是得到假阳性结果的主要原因。由于目标抗原掺入这种沉淀物中，也可能降低灵敏度。发现在处理时加入浓度为 0.5M 或更高的脲或盐酸胍可显著减少这种沉淀物形成，在处理时加入浓度为 1.5-4M 的脲与浓度为 2-3.5M 的盐酸胍此作用尤其更好。

[0137] [表 10]

[0138]

		HBV 阴性 样品	HBV 阳性样品		
		健康人的 血清	#990493	#990640	#990650
浓度 (M)					
无添加	0	0.018	0.483	0.076	0.175
向 0.5 N HCl 中加 入的蛋白变性剂					
脲	0.5	0.015	0.555	0.085	0.204
	1	0.010	0.619	0.076	0.236
	1.5	0.006	0.636	0.090	0.248
	2	0.005	0.686	0.081	0.293
	2.5	0.005	0.725	0.100	0.335
	3	0.005	0.771	0.088	0.382
	3.5	0.003	0.830	0.116	0.443
	4	0.008	1.041	0.143	0.578
胍-HCl	0.5	0.027	0.706	0.116	0.235
	1	0.024	0.802	0.146	0.270
	1.5	0.020	0.820	0.140	0.307
	2	0.014	0.943	0.179	0.385
	2.5	0.008	1.039	0.183	0.455
	3	0.005	1.113	0.235	0.504
	3.5	0.003	0.970	0.248	0.528

[0139] 实施例 9

[0140] 4) 有酸化剂存在下检验还原剂

[0141] 将作为还原剂的二硫苏糖醇、盐酸 2- 巯基乙胺或盐酸 2- 二乙基氨基乙硫醇溶解于 1.0N 盐酸水溶液, 将此 30 μ L 混合溶液加入 30 μ L HBV 抗原阴性样品 (正常血浆) 或 3 份 HBs 抗原阳性样品 (#990493、#990640、#990650), 然后室温培育 10 分钟, 通过 1) 所述的方法检验作为检测样品的 50 μ L 混合物溶液 (表 11)。

[0142] 本文所用的还原剂浓度是其在样品处理期间的浓度。甚至当还原剂加入 HBV 抗原阴性样品中时, 未检测到其信号有变化, 但在一份 HBs 抗原阳性样品 (#990640) 中, 利用浓度为 1-5mM 的二硫苏糖醇时检测到有 30% 或更高的增幅。

[0143]

表 11
还原剂

	HBV 阴性样品		HBV 阳性样品			
	健康人的血清		#990493	#990640	#990650	
	浓度 (mM)		相比于对照%		相比于对照%	
对照	0	0.012	0.446	100	0.073	100
向 0.5 N HCl 中 加入的还原剂	0.25	0.016	0.497	111	0.080	110
	0.5	0.014	0.487	109	0.083	114
	1	0.013	0.500	112	0.101	138
	2	0.012	0.453	102	0.124	170
	5	0.011	0.324	73	0.116	159
	10	0.007	0.082	18	0.040	55
	20	0.008	0.029	7	0.011	15
	0.25	0.014	0.432	97	0.056	77
	0.5	0.009	0.429	96	0.064	88
	1	0.009	0.426	96	0.060	82
盐酸 2-巯基乙 胺	2	0.008	0.411	92	0.069	95
	5	0.004	0.350	78	0.068	93
	10	0.001	0.278	62	0.075	103
					0.177	111
					0.184	116
					0.184	116
					0.174	109
					0.092	58
					0.033	21
					0.023	14
					0.154	97
					0.144	91
					0.148	93
					0.129	81
					0.109	69
					0.074	47

[0144]

盐酸 2-二乙基 氨基-乙醇	20	0.002	0.217	49	0.058	79	0.063	40
	50	0.000	0.140	31	0.037	51	0.033	21
	0.25	0.015	0.429	96	0.066	90	0.165	104
	0.5	0.012	0.429	96	0.067	92	0.156	98
	1	0.013	0.456	102	0.066	90	0.166	104
	2	0.008	0.436	98	0.083	114	0.151	95
	5	0.008	0.397	89	0.081	111	0.129	81
	10	0.004	0.298	67	0.085	116	0.090	57
	20	0.008	0.259	58	0.079	108	0.078	49
	50	0.006	0.145	33	0.065	89	0.049	31

[0145] 实施例 10

[0146] 5) 碱化剂的浓度

[0147] 将 50 μ L 各种浓度的氢氧化钠水溶液加入 50 μ L HBV 抗原阴性样品或三份含有抗-HBs 抗体的 HBV 抗原阳性样品 (#990493、#990640、#990650)，然后在室温培育 10 分钟，

按照以下检测方法检测作为检测样品的 50 μ L 混合物溶液。

[0148] 用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) 将抗-HBs 抗原的单克隆抗体 6G6 稀释至 6 μ g/ml 的终浓度,然后以每孔 100 μ l 的体积移液至 96-孔微滴定板 (Nunc) 上。将微滴定板于 4℃ 培育过夜。

[0149] 用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) 洗涤微滴定板两次,然后加入含有 0.5% 酪蛋白钠的 350 μ l 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.1),培育微滴定板 2 小时。除去封闭溶液后,向各孔加入含有中和抗体的 100 μ l 反应缓冲液与经各种样品处理方法得到的各检测样品,室温振荡反应 2 小时,用含有 0.05% 吐温 20 的 350 μ l 10mM 磷酸钠缓冲液 (pH7.3) (洗涤溶液) 洗涤 6 次后,加入 100 μ l 用生物素标记的单克隆抗体 (HBs124)。混合物在室温反应 30 分钟。用洗涤溶液洗涤各孔 6 次,然后向其中加入 100 μ l POD 标记的亲素 D,混合物在室温反应 30 分钟。用洗涤溶液洗涤各孔 6 次后,向其中加入 100 μ l 底物 (邻苯二胺,下文称为 OPD) 溶液,培育 30 分钟,向各孔中加入 2N 硫酸溶液后,检测其在波长为 492nm 处的吸光度 (OD_{492}),以其在 630nm 处的吸光度作参比值。表中所示的氢氧化钠浓度是样品与处理试剂混合物后处理期间的浓度。

[0150] 生物素标记的单克隆抗体 HBs124 是如实施例 1 所述通过表达与纯化全长 HBs 抗原 (即,由 1-226 位氨基酸序列构成的抗原),用该重组抗原免疫小鼠得到的单克隆抗体。证实抗体 HBs124 与以上重组 HBs 抗原结合。然而,当根据 HBs 抗原 1-226 位的氨基酸序列合成各由 20 个氨基酸构成,彼此有 10 个氨基酸重叠的合成肽并通过与实施例 3 相同的方法检验它们与抗体 HBs124 的结合 (情况) 时,抗体 HBs124 不与任何合成肽反应。因此,据估计抗体 HBs124 不识别 HBs 抗原的氨基酸序列的线性表位,而识别其构象表位。

[0151] 甚至通过在不含氢氧化钠的溶液中室温培育含有抗-HBs 抗体的 HBV 阳性样品 (#990493, #990640, #990650) 10 分钟未检测到 HBs 抗原活性,但用浓度为 0.25-1N 的氢氧化钠处理检测到 HBs 抗原的信号有增加 (表 12)。

[0152] [表 12]

	NaOH 浓度 (N)	HBV 阴性样品	HBV 阳性样品		
		健康人的血清	#990493	#990640	#990950
[0153]	0	0.006	0.005	0.006	0.006
	0.05	0.006	0.010	0.004	0.002
	0.1	0.010	0.014	0.010	0.008
	0.25	0.006	0.034	0.006	0.012
	0.5	0.008	0.058	0.006	0.030
	0.75	0.004	0.070	0.006	0.039
	1	0.010	0.044	0.018	0.042
	1.5	0.008	0.012	0.014	0.029

[0154] 实施例 11

[0155] 6) 有碱化剂存在下的各种表面活性剂浓度

[0156] 将溶解于 1.0N 氢氧化钠水溶液的 30 μ L 各种表面活性剂加入 30 μ L HBV 抗原阴性样品或三份 HBs 抗原阳性样品 (#990493、#990640、#990650),然后室温培育 10 分钟,通过 5) 所述的方法检验作为检测样品的 50 μ L 混合物溶液 (表 13-17)。表中所示的氢氧化钠水溶液与表面活性剂浓度是样品与处理试剂混合后处理期间的浓度。

[0157] 如表 13-17 所示, 3 份样品中至少 1 份显示反应性高于各样品判断标准的表面活性剂判断为有效的表面活性剂。结果发现将各种表面活性剂与碱化剂, 例如氢氧化钠一起加入时, 利用表面活性剂的 HBs 抗原阳性样品中 HBs 抗原的免疫反应性增加。判断为有效的表面活性剂包括阴离子表面活性剂, 例如十二烷基硫酸钠或 N-月桂酰肌氨酸钠与在其分子中具有直链烷基和叔胺或季铵盐的两性或阳离子表面活性剂。

[0158] 非离子表面活性剂, 例如 Triton X100、吐温 20 和 Bridj 35 与具有固醇骨架的表面活性剂, 例如 CHAPS 也检测为有效的。

[0159] 向碱化剂中加入阴离子表面活性剂或在分子中具有直链烷基与叔胺或季铵盐的两性或阳离子表面活性剂能提高检测灵敏度。将在处理溶液中存在碱化剂时有效的这种表面活性剂用于不存在碱化剂的处理溶液中时, 未发现增加检测灵敏度。认为通过联用碱化剂与表面活性剂, 作为 HBs 抗原检测抑制因素的抗-HBs 抗体失活, 样品中 HBs 抗原的脂双层内部的表位暴露于外部, 从而显著提高其与 6G6 的反应性。

[0160] [表 13]

[0161] 阴离子

		HBV 阴性样品	HBV 阳性样品			
		健康人的血 清	#990493	#990640	#990650	
	浓度 (%)					
	无添加	0	0.015	0.032	0.002	0.009
	判断表面活性剂作用的标准			0.160	0.010	0.045
	向 0.5 N NaOH 中加入的表 面活性剂					
[0162]	十二烷基硫酸钠	0.5	0.014	0.225	0.137	0.152
	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na	1	0.015	0.340	0.241	0.195
		2	0.016	0.457	0.371	0.308
		5	0.015	0.967	0.430	0.472
	十二烷基硫酸锂	0.5	0.009	0.239	0.168	0.132
	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Li	1	0.015	0.275	0.205	0.141
		2	0.007	0.468	0.416	0.272
		5	0.016	1.055	0.385	0.325
	N-月桂酰肌氨酸钠盐	0.5	0.008	0.254	0.280	0.143
		1	0.004	0.391	0.354	0.274
		2	0.007	0.540	0.434	0.361
		5	0.007	0.769	0.618	0.482

[0163] [表 14]

[0164] 阳离子 (TAC 型)

	浓度 (%)	HBV 阴性样品	HBV 阳性样品		
		健康人的血清	#990493	#990640	#990650
[0165]	无添加	0	0.021	0.041	0.013
	判断表面活性剂作用的 标准		0.205	0.065	0.105
	向 0.5 N HCl 中加入 的表面活性剂				
[0166]	氯化辛基三甲铵	0.5	0.020	0.163	0.120
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.024	0.277	0.200
		2	0.021	0.409	0.147
		5	0.030	0.299	0.032
	氯化癸基三甲铵	0.5	0.022	0.402	0.287
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.022	0.418	0.151
		2	0.018	0.220	0.041
		5	0.025	0.067	0.023
	氯化十二烷基三甲铵	0.5	0.021	0.513	0.351
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.013	0.302	0.111
		2	0.019	0.069	0.028
		5	0.014	0.029	0.015
	氯化十四烷基三甲铵	0.5	0.016	0.550	0.402
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.013	0.359	0.184
		2	0.016	0.091	0.041
		5	0.015	0.061	0.017
	氯化十六烷基三甲铵	0.5	0.020	0.566	0.326
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	1	0.017	0.418	0.204
		2	0.021	0.179	0.041
		5	0.017	0.208	0.023
	氯化月桂基吡啶鎓	0.5	0.011	0.029	0.043
	$[\text{C}_5\text{H}_5\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3]\text{Cl}$	1	0.010	0.022	0.049
		2	0.011	0.028	0.030
		5	0.049	0.043	0.039

[0167] [表 15]

[0168] 阳离子 (TAB 型)

		浓度 (%)	HBV 阴性样品	HBV 阳性样品		
			健康人的血清	#990493	#990640	#990650
无添加		0	0.007	0.031	0.005	0.011
判断表面活性剂作用的标准				0.155	0.025	0.055
向 0.5 N NaOH 中加入 的表面活性剂						
[0169]	溴化辛基三甲铵	0.5	0.008	0.134	0.094	0.180
	[CH ₃ (CH ₂) ₇ N(CH ₃) ₃]Br	1	0.008	0.229	0.173	0.202
		2	0.009	0.403	0.152	0.135
		5	0.011	0.256	0.025	0.019
		溴化癸基三甲铵	0.5	0.011	0.385	0.290
	[CH ₃ (CH ₂) ₉ N(CH ₃) ₃]Br	1	0.015	0.379	0.121	0.068
		2	0.010	0.250	0.025	0.021
		5	0.014	0.037	0.012	0.012
			0.5	0.009	0.521	0.343
		0.5	0.009	0.521	0.343	0.364
	溴化十二烷基三甲铵	2	0.007	0.047	0.028	0.085
	[CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₃]Br	5	0.009	0.041	0.008	0.015
[0170]	溴化十四烷基三甲铵	0.5	0.008	0.577	0.381	0.438
	[CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₃]Br	1	0.008	0.419	0.190	0.099
		2	0.009	0.109	0.031	0.028
		5	0.010	0.126	0.013	0.017
		溴化十六烷基三甲铵	0.5	0.011	0.611	0.335
	[CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(CH ₃) ₃]Br	1	0.011	0.437	0.234	0.183
		2	0.011	0.253	0.079	0.061
		5	0.011	0.067	0.013	0.019
		[表 16]				
	两性					

		HBV 阴 性样品	HBV 阳性样品			
		健康人的 血清	#990493	#990640	#990650	
		浓度 (%)				
无添加		0	0.008	0.027	0.004	0.010
判断表面活性剂作用的标准				0.135	0.020	0.050
向 0.5 N NaOH 中加入的表面 活性剂						
[0173]	3-[3-(胆酰胺丙基)二甲基-氨基]-1-丙磺酸盐	0.5	0.006	0.396	0.183	0.200
		1	0.007	0.496	0.201	0.267
		2	0.008	0.660	0.204	0.359
		5	0.007	0.709	0.139	0.290
	N-十二烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸盐	0.5	0.010	0.251	0.247	0.122
		1	0.008	0.292	0.288	0.140
	CH ₃ (CH ₂) ₁₁ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]	2	0.012	0.330	0.188	0.147
		5	0.006	0.268	0.105	0.119
	N-十四烷基-N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸盐	0.5	0.008	0.339	0.308	0.230
		1	0.007	0.419	0.347	0.187
	CH ₃ (CH ₂) ₁₃ N(CH ₃) ₂ [(CH ₂) ₃ SO ₃]	2	0.009	0.522	0.357	0.185
		5	0.008	1.037	0.451	0.218
		0.5	0.010	0.370	0.254	0.341
		1	0.008	0.527	0.324	0.278
		2	0.010	0.834	0.551	0.336
		5	0.005	1.110	0.451	0.257
[0174]	[表 17]					
[0175]	非离子					

	浓度 (%)	HBV 阴性样品	HBV 阳性样品			
		健康人的血清	#990493	#990640	#990650	
无添加	0	0.022	0.044	0.013	0.025	
判断表面活性剂作用的 标准			0.220	0.065	0.125	
向 0.5 N NaOH 加入的 表面活性剂						
[0176]	Triton X-100	0.5	0.021	0.305	0.174	0.108
		1	0.021	0.344	0.168	0.121
		2	0.019	0.367	0.185	0.166
		5	0.018	0.299	0.188	0.164
	Triton X-114	0.5	0.023	0.293	0.128	0.111
		1	0.023	0.356	0.172	0.190
		2	0.020	0.404	0.173	0.250
		5	0.024	0.528	0.271	0.287
	吐温 20	0.5	0.020	0.094	0.033	0.063
		1	0.017	0.215	0.070	0.093
		2	0.021	0.345	0.187	0.250
		5	0.017	0.274	0.117	0.173
	吐温 80	0.5	0.017	0.104	0.038	0.081
		1	0.016	0.266	0.116	0.169
		2	0.020	0.379	0.212	0.215
		5	0.015	0.271	0.163	0.141
	Bridj 35	0.5	0.021	0.317	0.190	0.143
		1	0.016	0.260	0.193	0.150
		2	0.020	0.301	0.255	0.151
		5	0.017	0.365	0.278	0.207

[0177] 实施例 12

[0178] 7) 有碱化剂存在下的蛋白变性剂

[0179] 将溶解于 1.0N 氢氧化钠水溶液的 30 μ L 蛋白变性剂（脲或盐酸胍）加入 30 μ L HBs 抗原阴性样品或三份 HBs 抗原阳性样品（#990493、#990640、#990650），然后室温培育 10 分钟，通过 5) 所述的方法检验作为检测样品的 50 μ L 混合物溶液。表 18 显示了各 HBs 抗原阳性样品的免疫反应性。表 18 所示的氢氧化钠浓度与蛋白变性剂浓度是样品与处理试剂混合后处理期间的浓度。

[0180] 三份 HBs 抗原阳性样品显示在有碱化剂存在下利用蛋白变性剂的免疫反应性高于只有碱化剂时的免疫反应性；即，用脲使免疫反应性增加至少约 8 倍，用盐酸胍使免疫反应性增加至少约 4.5 倍。如果只用碱化剂处理，血清蛋白等在中和时可能变性而造成沉淀或者在一些情况中变得混浊，进而阻碍了移液过程，沉淀物往往是得到假阳性结果的主要原因。由于目标抗原掺入这种沉淀物中，也可能降低灵敏度。发现在处理时加入浓度为 1M 或更高的脲或盐酸胍可显著减少这种沉淀物形成，在处理时加入浓度为 2-4M 的脲与浓度为 2-3M 的盐酸胍此作用尤其更好。

[0181] [表 18]

	浓度 (M)	HBV 阴性样品	HBV 阳性样品		
		健康人的血清	#990493	#990640	#990650
无添加	0	0.015	0.032	0.002	0.009
向 0.5 N NaOH 中加入 的蛋白变性剂					
[0182]	脲	1	0.006	0.072	0.017
		2	0.005	0.168	0.048
		3	0.007	0.263	0.133
		4	0.004	0.267	0.179
	胍-HCl	0.5	0.008	0.037	0.017
		1	0.006	0.052	0.025
		2	0.006	0.121	0.065
		3	0.015	0.152	0.111
				0.144	

[0183] 实施例 13

[0184] 8) 有碱化剂存在下检验还原剂

[0185] 将作为还原剂的二硫苏糖醇、盐酸 2- 巯基乙胺、盐酸 2- 二乙基氨基乙硫醇、2- 巯基乙醇或盐酸三 (2- 羧乙基) 膦溶解于 1.0N 氢氧化钠, 将此 30 μ L 溶液加入 30 μ L HBV 抗原阴性样品或三份 HBs 抗原阳性样品 (#990493、#990640、#990650), 然后室温培育 10 分钟, 通过 5) 所述的方法检验作为检测样品的 50 μ L 混合物溶液 (表 19)。

[0186] 本文所用的还原剂浓度是其在样品处理期间的浓度。甚至通过加入还原剂, HBV 抗原阴性样品几乎不显示信号有变化, 但所有三份 HBs 抗原阳性样品显示, 分别利用浓度为 20mM 的盐酸 2- 巯基乙胺、盐酸二乙基氨基乙硫醇与 2- 巯基乙醇使信号增加约 2-3 倍。盐酸三 (2- 羧乙基) 膦更有效, 2mM 浓度时信号增加 1.5 倍, 10mM 时信号增加 15 倍或更多。

[0187] [表 19]

[0188] 还原剂

	浓度 (mM)	HBV 阴 性样品	HBV 阳性样品			
		健康人的 血清	#990493	#990640	#990650	
无添加	0	0.017	0.053	0.020	0.032	
向 0.5 N NaOH 中加入的还						
原剂						
[0189]	二硫苏糖醇	2	0.017	0.063	0.023	0.039
		5	0.016	0.058	0.019	0.041
		10	0.019	0.067	0.024	0.051
		20	0.019	0.089	0.025	0.050
	盐酸 2-巯基乙胺	2	0.027	0.074	0.028	0.043
		5	0.016	0.066	0.023	0.036
		10	0.017	0.086	0.038	0.058
		20	0.016	0.154	0.078	0.114
	盐酸 2-二乙基氨基-乙硫醇	2	0.027	0.066	0.029	0.035
		5	0.023	0.052	0.031	0.043
		10	0.029	0.065	0.067	0.075
		20	0.022	0.094	0.307	0.197
	2-巯基乙醇	2	0.027	0.082	0.033	0.047
		5	0.023	0.084	0.030	0.046
		10	0.025	0.109	0.041	0.058
		20	0.024	0.160	0.064	0.104
	盐酸三(2-羧乙基)磷	2	0.031	0.085	0.036	0.070
		5	0.028	0.141	0.042	0.104
		10	0.066	0.861	0.437	0.689
		20	0.131	0.495	0.534	0.479

序列表

<110> 株式会社先端生命科学研究所 (Advanced Life Science Institute, INC.)

<120> 乙肝病毒 s 抗原的检测方法

<130> SAP-729-PCT

<160> 3

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 55

<212> PRT

<213> 乙肝病毒

<400> 1

Leu	Thr	Ile	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Ser	Trp	Trp	Thr	Ser	Leu	Asn	Phe
1				5					10					15	
Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Thr	Cys	Pro	Gly	Gln	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Thr
			20					25					30		
Ser	Asn	His	Ser	Pro	Thr	Ser	Cys	Pro	Pro	Ile	Cys	Pro	Gly	Tyr	Arg
		35					40					45			
Trp	Met	Cys	Leu	Arg	Arg	Phe									
	50					55									

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 乙肝病毒

<400> 2

gaattctctca caataccaca gagtcta

27

<210> 3

<211> 33

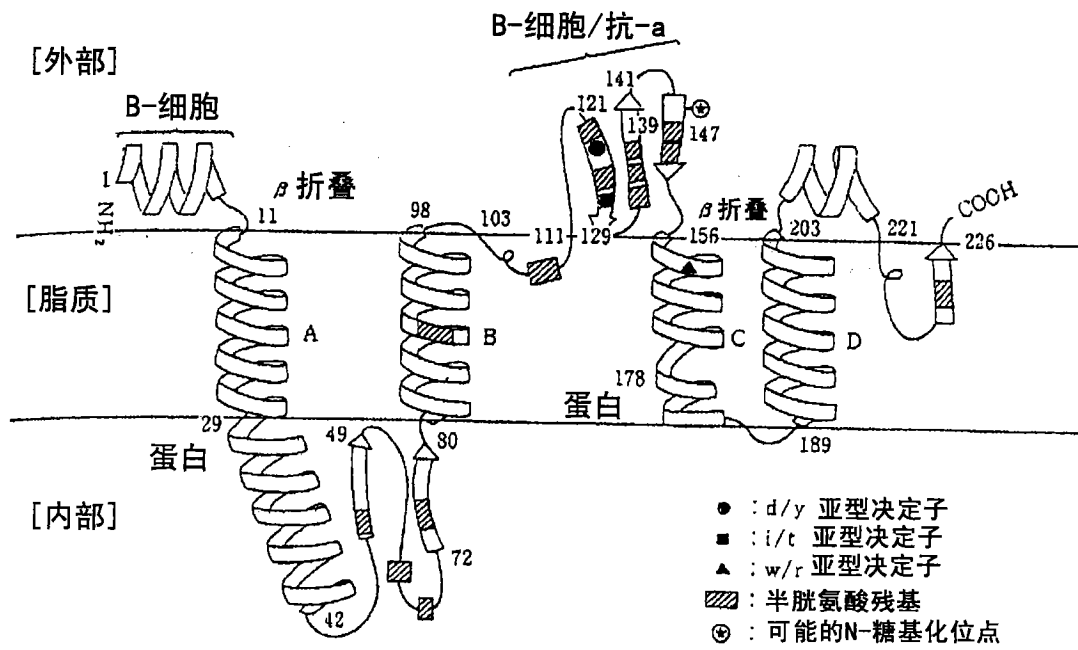
<212> DNA

<213> 乙肝病毒

<400>3

ggatccttaa aaacgccgca gacacatcca gcg

33



HBs抗原的二级结构(模式图)⁴⁾部分改变

图 1