



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102072957 B

(45) 授权公告日 2013. 08. 07

(21) 申请号 201110009901. 3

WO 0195784 A2, 2001. 12. 20,

(22) 申请日 2011. 01. 18

CN 1190740 A, 1998. 08. 19,

(73) 专利权人 威海威高生物科技有限公司

林金明. 化学发光基础理论与应用. 《化学发光基础理论与应用》. 2004, 第 41 页第 3 段第 4 行, 第 42 页第 1 段第 1-7 行.

地址 264200 山东省威海市高技区世昌大道  
312 号

审查员 黄晓丽

(72) 发明人 贾向阳 郭兰英 蒙红胜 姚继承  
周雷

(74) 专利代理机构 青岛高晓专利事务所 37104  
代理人 宋文学

(51) Int. Cl.

G01N 33/576 (2006. 01)

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 21/76 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101551394 A, 2009. 10. 07,

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明属于免疫诊断技术领域,具体涉及一种微粒子化学发光法丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒及其制备方法。试剂盒由测抗 HCV 磁微粒、测抗 HCV 示踪结合物、测抗 HCV 样品稀释液、质控品组成,本发明还公开了该诊断试剂盒的制备方法,其采用的是微粒子化学发光免疫分析技术,比 ELISA 具有更高的灵敏度和特异性,适合于临床 HCV 的辅助诊断和献血员筛查,填补了国内微粒子化学发光法检测 HCV 抗体诊断试剂生产的空白。

1. 一种丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒的制备方法,所述试剂盒包括测抗 HCV 磁微粒、测抗 HCV 示踪结合物、测抗 HCV 样品稀释液、质控品;所述测抗 HCV 磁微粒为标记有含盖丙肝病毒 Core、NS3、NS4、NS5 基因片段的特异性重组抗原的磁性微粒子;测抗 HCV 示踪结合物为标记有特异性抗人 IgG 的异鲁米诺;测抗 HCV 样品稀释液为含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;质控品溯源至国家参考品,包括一低含量 HCV 抗体的血清和一高含量 HCV 抗体的血清;其特征是:具体制备方法包括以下步骤:

(1)制备测抗 HCV 磁微粒 将带羧基磁微粒与 EDC 的重量比为 1:2,磁微粒与含盖丙肝病毒 Core、NS3、NS4、NS5 基因片段的特异性重组抗原的比例为每毫克磁微粒标记 20  $\mu$ g 的抗原,在室温下进行标记,标记时间 1 小时,标记后采用甘氨酸封闭 EDC 的多余的位点,使之浓度达到 25mM,反应 30 分钟,洗涤三次,加入含 1% 牛血清白蛋白的 0.01MPBS,2-8 $^{\circ}$ C 保存;

(2)制备测抗 HCV 示踪结合物 特异性抗人 IgG 与异鲁米诺的标记,反应体系为:戊二醛最佳使用浓度为 1.25%,特异性抗人 IgG 与异鲁米诺的最佳重量比为 2:1,在室温反应 1.5 小时,用 pH7.2-7.4 的 0.01M PBS 进行透析进行透析,透析后加入等体积甘油 -20 $^{\circ}$ C 存放;

(3)制备测抗 HCV 样品稀释液 磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液;

(4)质控品溯源至国家参考品,包括质控品 1 和 2,其中质控品 1 为低含量 HCV 抗体的血清,质控品 2 为高含量 HCV 抗体的血清。

## 丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫诊断技术,具体地说是一种磁微粒作为载体的丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 丙型病毒性肝炎由丙型肝炎病毒(HCV)引起的传染病,呈全世界分布,主要通过输血或血制品传播,近年发现丙型肝炎也多见于非输血人群,主要通过注射、针刺、含 HCV 血液污染伤口和其他密切接触传播,并证实也可通过母婴传播。研究表明,20%~50%的 HCV 感染者会发生自发性病毒清除,50%~80%感染者会持续感染,其中 85% 进展为慢性肝炎,10~30 年后,部分慢性丙肝患者(尤其年龄较长患者)发展为肝硬化,2~10 年后,可能发展为肝癌。由于与慢性乙肝相比,丙肝更隐蔽,潜伏期为 2~26 周;症状更不明显,高达 75% 的感染者无任何症状,因此很容易被忽视,中国丙肝漏报率高达 52%。

[0003] 至今还没有研制成功可以预防丙肝的疫苗,防治丙肝只有早期进行诊断,才能在早期进行治疗并防治病情的进一步恶化,否则将会传染给他人和使自身病情加重、影响身体健康和传给后代。因此有必要开发出一种性能较好的诊断方法,能有效地在早期就将该疾病诊断出来,及时治疗,减少因丙肝带来的健康和财产的损失。

[0004] 目前 HCV 感染的诊断实验室化验方法有:1. 检测 HCV 抗体的血清化验;2. 定量检测 HCV RNA 的分子试验(包括 RT-PCR, TMA, bDNA);3. 基因分型技术。由于感染者体内 HCV RNA 水平的有限以及不稳定性,使方法 2 的商业化具有局限性。另外商品化的基因型确定方法已经出现,但是均未通过 FDA 批准,基因分型技术也未普及。HCV 抗体的血清化验主要是酶联免疫吸附法(ELISA)。ELISA 检测丙肝抗体的方法已得到了大量的推广,该方法具有很多优点,但在检测的灵敏度,稳定性等方面还有待进一步提高。全自动微粒子化学发光免疫分析是在酶免疫分析基础上结合了高灵敏度的化学发光测定技术和磁性微粒分离技术,与其他方法相比,这种方法有许多独特的优点,首先它用顺磁性微粒作为固相载体,由于颗粒体积小,表面积大,扩大了反应面积,大大提高了检测灵敏度;其次由于使用全自动仪器及配套试剂,使人为因素减至最低,提高了方法的稳定性和结果的重复性,同时也使得批内差异与批间差异都较小。与放射免疫法相比,磁微粒子化学发光法除具有高灵敏度、高精度、高可靠性等优点外,还具有如下优点:a. 无放射性污染,稳定性好;b. 特异性高;c. 试剂可随用随取,测定方便迅速,可作为急诊检测项目。根据大量的实验结果以及临床应用资料,从实用性、稳定性、准确性及其发展前景来看,该方法逐渐成为取代放射性免疫分析和酶免疫分析的首选。但是目前国内尚无生产用于丙肝抗体检测的微粒子化学发光法诊断试剂,目前急需灵敏度和特异性较高的微粒子化学发光诊断试剂,可以作为 ELISA 试剂和其他试剂的替代品,用于丙肝的诊断。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是克服上述现有技术的不足,提供一种具有高灵敏度

和特异性,适合于临床丙型肝炎病毒的辅助诊断和献血员筛查的微粒子化学发光法丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒及其制备方法。

[0006] 本发明解决上述技术问题采用的技术方案是:一种丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒,其包括测抗 HCV 磁微粒、测抗 HCV 示踪结合物、测抗 HCV 样品稀释液、质控品。其特征是:所述测抗 HCV 磁微粒为标记有丙肝病毒特异性重组抗原(含盖 Core、NS3、NS4、NS5 的基因片段)的磁性微粒子;测抗 HCV 示踪结合物为标记有特异性抗人 IgG 的异鲁米诺;测抗 HCV 样品稀释液为含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液;质控品溯源至国家参考品,包括一低含量 HCV 抗体的血清和一高含量 HCV 抗体的血清。

[0007] 本发明还提供了上述丙肝病毒抗体诊断试剂盒的制备方法,其特征是:具体步骤如下:

[0008] (1) 制备测抗 HCV 磁微粒 将带羧基磁微粒与 EDC 的重量比为 1:2,磁微粒与丙肝病毒特异性重组抗原(即含盖 Core、NS3、NS4、NS5 的基因片段)比例为每毫克磁微粒标记 20  $\mu$ g 的抗原,在室温下进行标记,标记时间 1 小时,标记后采用甘氨酸封闭 EDC 的多余的位点,使之浓度达到 25mM,反应 30 分钟,洗涤三次,加入含 1% 牛血清白蛋白的 0.01MPBS, 2-8 $^{\circ}$ C 保存;

[0009] (2) 制备测抗 HCV 示踪结合物 特异性抗人 IgG 与异鲁米诺的标记,反应体系为:戊二醛最佳使用浓度为 1.25%,特异性抗人 IgG 与异鲁米诺的最佳重量比为 2:1,在室温反应 1.5 小时,用 0.01M PBS (pH7.2-7.4) 进行透析,透析后加入等体积甘油 -20 $^{\circ}$ C 存放;

[0010] (3) 制备测抗 HCV 样品稀释液 磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液;

[0011] (4) 质控品溯源至国家参考品,包括质控品 1 和 2,其中质控品 1 为低含量 HCV 抗体的血清,质控品 2 为高含量 HCV 抗体的血清。

[0012] 本发明的原理是利用微粒子化学发光免疫分析技术,用特异性的 HCV 重组多抗原组份(即含盖 Core、NS3、NS4、NS5 的基因片段)标记磁微粒,特异性抗人 IgG 标记异鲁米诺,反应体系采用两步法,即测抗 HCV 磁微粒与待测样本先温育一段时间,再加入测抗 HCV 示踪结合物,形成抗原—HCV 抗体—特异性抗人 IgG 免疫复合物,再加入激发液,催化产生光子,通过化学发光分析仪检测相对发光单位,发光值的高低与样本中 HCV 抗体的含量成正比,样本的含量可以利用该批号试剂盒已设定的曲线,通过全自动化学发光测定仪自动计算出来。

[0013] 本发明试剂盒的优点是采用了微粒子化学发光免疫分析技术,比 ELISA 具有更高的灵敏度和更好的特异性,填补了国内 HCV 抗体检测的微粒子化学发光法诊断试剂生产的空白。

### 具体实施方式

[0014] 本发明试剂盒采用微粒子化学发光免疫分析技术,检测血清中是否存在 HCV 抗体。下面具体描述 HCV 抗体诊断试剂盒及其制备方法。

[0015] 一种丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒,其包括测抗 HCV 磁微粒、测抗 HCV 示踪结合物、测抗 HCV 样品稀释液、质控品。所述测抗 HCV 磁微粒为标记有丙肝病毒特异性重组多抗原组份(含盖 Core、NS3、NS4、NS5 的基因片段)的磁性微粒子;测抗 HCV 示踪结合物为标记

有特异性抗人 IgG 的异鲁米诺；测抗 HCV 样品稀释液为含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液；质控品溯源至国家参考品，包括质控品 1 和 2，其中质控品 1 为低含量 HCV 抗体的血清，质控品 2 为高含量 HCV 抗体的血清。

[0016] 本发明上述 HCV 抗体诊断试剂盒的制备方法，其具体步骤如下：

[0017] (1) 制备测抗 HCV 磁微粒。将带羧基磁微粒与 EDC 的重量比为 1:2，磁微粒与丙肝病毒特异性重组多抗原组份（即含盖 Core、NS3、NS4、NS5 的基因片段）比例为每毫克磁微粒标记 20  $\mu$ g 的抗原，在室温进行标记，标记时间 1 小时，标记后采用甘氨酸封闭 EDC 的多余的位点，使之浓度达到 25mM，反应 30 分钟，洗涤三次，加入含 1% 牛血清白蛋白的 0.01MPBS，2-8 $^{\circ}$ C 保存。

[0018] (2) 制备测抗 HCV 示踪结合物。特异性抗人 IgG 与异鲁米诺通过戊二醛作用形成示踪结合物，反应体系为：戊二醛最佳使用浓度为 1.25%，特异性抗人 IgG 与异鲁米诺的最佳重量比为 2:1，在室温反应 1.5 小时，用 0.01M PBS (pH7.2-7.4) 进行透析，透析后加入等体积甘油 -20 $^{\circ}$ C 存放。

[0019] (3) 制备测抗 HCV 样品稀释液 取磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L，按上述配方配制稀释液。

[0020] (4) 质控品溯源至国家参考品，包括质控品 1 和 2，其中质控品 1 为低含量 HCV 抗体的血清，质控品 2 为高含量 HCV 抗体的血清。

[0021] 本发明上述各种原材料的选择要求如下。

[0022] 磁微粒标记用 HCV 抗原的选择 要求具有天然抗原的主要免疫活性区、纯度高、效价高、特异性高等。将 HCV 特异性重组多抗原组份（含盖 Core、NS3、NS4、NS5 的基因片段）作为抗原来源，这种多抗原组份为大肠杆菌表达的基因重组蛋白，包含 HCV 多种抗原优势表位，能够保证 HCV 抗体具有较高的检出率。首先就蛋白的外观、含量、纯度、效价进行验证，结果抗原溶液外观澄清、无肉眼可见异物、无摇不散的沉淀，纯度较高（均 > 95%），并具有较高的效价和很好的活性，特异性和灵敏度较好，研究结果表明重组多抗原组份完全可用于本发明诊断试剂盒的制备。

[0023] 异鲁米诺标记用特异性抗人 IgG 的选择 首先分析抗人 IgG 抗体的外观；用紫外吸收法测定蛋白质含量；用 SDS - PAGE 鉴定纯度；用 ELISA 法检测效价。根据上述多次试验研究，本发明制备试剂盒所用的抗人 IgG 抗体的质量标准为微带乳光的澄清液体，不含异物，无摇不散的沉淀；SDS-PAGE 检测，主带清晰无明显杂带，蛋白含量  $\geq$  2mg/ml，效价  $\geq$  1:10000。

[0024] 磁微粒的选择 通过对磁微粒的外观，标记蛋白的比率，磁响应性，磁微粒吸附一致性等方面进行分析，经过多次分析研究，将磁微粒混匀，在灯光下观察，易分散，无聚集，无异物；将蛋白采用不同的方法进行标记，标记率应大于 90%；将磁微粒置 370-380 特斯拉的磁铁上，观察磁微粒的聚集速度，分散均匀的磁微粒在 10 秒钟内完全聚集；磁微粒吸附一致性 CV  $\leq$  10%。研究结果表明默克的直径为 0.90-1.10  $\mu$ m 的磁微粒，含有羧基基团，标记率最高，可用于本发明诊断试剂盒的制备。

[0025] 异鲁米诺的选择 将异鲁米诺用 DMSO（二甲基亚砷）进行溶解，用纯化水进行稀释至  $1.2 \times 10^{-5}$ M/L 的量，加入 10  $\mu$ l 异鲁米诺液体，各加入 200  $\mu$ l 激发液，测定其发光值，发光值应  $\geq$  160000，经过研究，采用 Sigma-Aldrich 提供的异鲁米诺作为发光的原料。

[0026] 本发明 HCV 抗体诊断试剂盒检测样品中 HCV 抗体的检测方法是：首先取出浓缩洗液，用纯化水按照倍数进行稀释。而后取出激发液 A 液和 B 液，放置化学发光仪合适的位置。激发液 A 液为含有 1%NaOH 的缓冲液，激发液 B 液为含有 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的缓冲液。接着将试剂盒从冰箱中取出后，放于仪器试剂区至少混匀 30 分钟后方可使用，并严格按照设定的程序进行加样和温育。具体加样方法如下：10 μL 血清 / 血浆样本、100 μL 样品稀释液以及 20 μL 测抗 HCV 磁微粒在 37℃ 的条件下反应 10 分钟，然后用稀释好的洗液洗涤 5 次，再加入 150 μL 测抗 HCV 示踪结合物，37℃ 反应 10 分钟，再用洗液洗涤 5 次，最终分别加入 200 μL 激发 A 液和激发 B 液，测定发光值。样本的含量可以利用该批号试剂盒已设定的曲线，通过发光仪自动计算出来。

[0027] 本发明质量控制要求是：试剂盒第一次操作，必须采用定标质控品进行定标，每隔两周用定标质控品对试剂盒的主曲线进行修正，按照修正的主曲线对样本进行定量。定标质控品的测定值须在允许范围内，方可进行定标，如果定标质控结果与预期不符，提示检测结果不可靠，不应出具检测报告。

[0028] 本发明试剂盒检测 HCV 国家参考品，检测的结果显示：该试剂盒的阴阳参考品符合率、灵敏度、特异性、精密性、稳定性等各项质量指标均符合国家标准。阴性符合率：30 份阴性参比品符合率 30/30；阳性符合率：30 份阳性参比品符合率 30/30；灵敏度检测：L1 应检出阳性，L2 应检出阳性，L3 可检出阳性或阴性，L4 应检出阴性；精密性：10 孔检测变异系数 (CV) ≤ 10%；稳定性：试剂各组分于 37℃ 放置 6 天，检定结果达到标准。

[0029] 本发明试剂盒由河南中医学院第三附属医院、中国人民解放军第一五三中心医院、中国人民解放军第三七一医院三家医院进行临床考核，结果为：

[0030] (1) 河南中医学院第三附属医院考核 226 例阴性样本和 85 例阳性样本，本发明试剂盒阴性样本 226 例全部检出，阳性样本 85 例全部检出。该试剂盒阴性符合率为 100%，阳性符合率为 100%。

[0031] (2) 中国人民解放军第一五三中心医院考核 186 例阴性样本和 77 例阳性样本，本发明试剂盒阴性样本 186 例全部检出，阳性样本检出 76 例。该试剂盒阴性符合率为 100%，阳性符合率为 98.7%。

[0032] (3) 中国人民解放军第三七一医院考核 224 例阴性样本和 81 例阳性样本，本发明试剂盒阴性样本 224 例全部检出，阳性样本 81 例全部检出。该试剂盒阴性符合率为 100%，阳性符合率为 100%。

[0033] 该诊断试剂盒总的灵敏度为 99.5%，特异性为 100%，诊断试剂盒(间接法微粒子化学发光法)灵敏度为 99.5%，特异性为 100%，适合于临床丙肝的辅助诊断和献血员筛查。

专利名称(译)	丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102072957B</a>	公开(公告)日	2013-08-07
申请号	CN201110009901.3	申请日	2011-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	威海威高生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	威海威高生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	威海威高生物科技有限公司		
[标]发明人	贾向阳 郭兰英 蒙红胜 姚继承 周雷		
发明人	贾向阳 郭兰英 蒙红胜 姚继承 周雷		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/569 G01N33/558 G01N21/76 G01N33/532 G01N33/531		
代理人(译)	宋文学		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN102072957A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于免疫诊断技术领域，具体涉及一种微粒子化学发光法丙型肝炎病毒抗体诊断试剂盒及其制备方法。试剂盒由测抗HCV磁微粒、测抗HCV示踪结合物、测抗HCV样品稀释液、质控品组成，本发明还公开了该诊断试剂盒的制备方法，其采用的是微粒子化学发光免疫分析技术，比ELISA具有更高的灵敏度和特异性，适合于临床HCV的辅助诊断和献血员筛查，填补了国内微粒子化学发光法检测HCV抗体诊断试剂生产的空白。