



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102768274 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 07

(21) 申请号 201110114157. 3

(22) 申请日 2011. 05. 04

(71) 申请人 武汉康苑生物医药科技有限公司

地址 430073 湖北省武汉市东湖新技术开发  
区高新大道 666 号

(72) 发明人 林志铿

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

### (54) 发明名称

一种人类免疫缺陷病毒 P24 抗原酶联免疫检测试剂盒

### (57) 摘要

本发明公开了一种人类免疫缺陷病毒 P24 抗原酶联免疫检测试剂盒,解决传统酶标板批间差不足的问题,设计并建立了 P24 抗原的检测试剂盒,该试剂盒是包括亲和素预先包被后加入生物素化抗人类免疫缺陷病毒 P24 抗体的酶标板包被反应条、酶标记抗 P24 抗原抗体、阳性对照液一支、阴性对照液一支、20 倍浓洗涤液 1 瓶、底物缓冲液甲 1 瓶、底物缓冲液乙 1 瓶及终止液 1 瓶组成。本发明具有较好的均一性,特异性,灵敏度,定量精确,快速简便,适用于人类免疫缺陷病毒 P24 抗原早期检测。

1. “一种人类免疫缺陷病毒 p24 抗原酶联免疫检测试剂盒”,其特征在於该试剂盒包括:

(1) 用亲和素预先包被酶标板,并加入生物素标记的抗 P24 抗原抗体二次包被反应,制成抗体预包被反应条 48-96 孔;

(2) 酶标记抗 P24 抗原抗体;

(3) 阳性对照液 1 支、阴性对照液 1 支;

(4) 20 倍浓缩洗液 1 瓶;

(5) 底物缓冲液甲 1 瓶;

(6) 底物缓冲液乙 1 瓶;

(7) 终止液 1 瓶组成。

2. 一种如权利 1 所描述的一种“人类免疫缺陷病毒 p24 抗原酶联免疫检测试剂盒”的制备方法,其特征在於该方法包括下列步骤:

(1) 利用人类免疫缺陷病毒 p24 抗原基因片段,通过原核表达或者真核表达制备抗原;

(2) 制备抗体的制备和纯化:

用上述重组抗原免疫豚鼠、兔子或者羊,得抗 P24 抗血清或免疫 Balb/C 小鼠得阳性鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞,筛选阳性克隆株,得腹水;抗血清或腹水用盐析、离子交换层析、或者亲和层析法进行纯化,得纯抗 P24 抗体,其纯度 95% 以上,效价大于 10 万。

(3) 用亲和素预先包被酶标板,并加入生物素标记的抗人类免疫缺陷病毒 P24 单克隆抗体或者多克隆抗体进行二次包被反应,制成抗体预包被反应条 48-96 孔;

(4) 辣根过氧化物酶 (HRP) 与纯化的抗人类免疫缺陷病毒 P24 抗体酶联,制成酶标抗体;

(5) 配制阳性对照液、阴性对照液;

(6) 配制 20 倍浓缩洗液;

(7) 配制底物缓冲液甲;

(8) 配制底物缓冲液乙;

(9) 配制终止液;

(10) 分装上述试剂盒除预包被板其余七种成分,按需要分装在小瓶或尖底离心管中;

(11) 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密性、稳定性合格;

(12) 组装成成品。

3. 根据权利 1 所述的一种“人类免疫缺陷病毒 p24 抗原酶联免疫检测试剂盒”,其特征在於其中所述的抗体预包被反应条 48-96 孔、酶标记 P24 抗体、阳性对照液为 HIV 阳性血清,阴性对照液为正常人血清、浓洗涤液为磷酸-Tween-20 缓冲液,底物缓冲液甲为 H2O2、底物缓冲液乙为 3,3',5,5'-四甲基联苯胺和终止液为 (4N H2SO4)。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其特征在於,所述亲和素包被固相载体酶标板采用一下方法:

用 0.05M 的 pH 值为 4.5-5.0 的柠檬酸缓冲液配制所需浓度的亲和素包被液,将包被液加入固相载体酶标上,并洗涤、封闭,再加入生物素化的人类免疫缺陷病毒 P24 单克隆抗体进行反应后,经洗涤、抽湿干燥后用铝箔袋密封。

5. 如权利要求 2 所述方法,其特征在于,所述浓缩洗涤液配方为:含 0.02MPBS、8.9% NaCl 和 0.5% Tween-20。

## 一种人类免疫缺陷病毒 P24 抗原酶联免疫检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明书属生物制剂技术领域。具体涉及一种人类免疫缺陷病毒 P24 抗原酶联免疫检测试剂盒及制备方法。

### 背景技术

[0002] HIV 病毒的诊断对于 HIV 病毒的防治具有重要的作用,目前许多国家均采用测定病毒 RNA 的方法来缩短检测窗口期,病毒 RNA 的检测窗口期短,且在 HIV 感染的各阶段均存在,因此这种方法也常被应用于监测病程进展和判断抗病毒治疗效果。RNA 测定法较 P24 检测法成熟、灵敏度高,但因其操作复杂、耗时长、花费高,且需要特殊昂贵的仪器,因此,在许多发展中国家中难以推广应用,有碍疾病的治疗和控制。

[0003] 2004 年, HIV 病毒发现者之一、美国马里兰大学 Dr. Gallo 领导的实验室的一篇高灵敏度检测 P24 抗原的研究论文引起了广泛的关注: P24 抗原检测方法的灵敏度得到了大幅提高。随着其检测灵敏度的不断提高, P24 抗原的检测逐渐从主要用于在窗口期辅助早期诊断和进一步缩短窗口期,发展到用于病毒载量的测定。目前, P24 抗原在以下几方面都有重要应用: 抗 HIV-1 不确定或“窗口期”的辅助诊断; 抗 HIV-1 阳性母亲所生婴儿早期的辅助鉴别诊断; 第 4 代 HIV-1 抗原 / 抗体 ELISA 试剂检测呈阳性反应, 但抗 HIV-1 确认阴性者的辅助诊断; 监测病程进展和抗病毒治疗效果。随着 P24 抗原检测技术的不断进步, 低成本的 P24 抗原检测有望在一定程度上替代现有的昂贵的 RNA 测定法。

[0004] 但是目前普遍使用双抗体夹心法检测人类免疫缺陷病毒 P24 抗原, 具有很好的特异性, 但是单纯利用物理吸附把单克隆抗体或者多克隆抗体吸附在酶标板上会存在单抗使用量大, 活性损失大, 特别是批间精密度差等缺点, 而将亲和素包被在板上, 再加入生物素化的抗体, 则可以很好的解决这一问题, 其不但可以减少批间差, 而且可以在检测过程中可一步直接加入样品血清和酶标记抗体进行反应, 形成固相亲和素 - 生物素化抗体 - 人类免疫缺陷病毒 P24 抗原 - 酶标抗 P24 抗原抗体复合物, 然后加入底物缓冲液甲和乙进行反应, 就可以定量或者定性分析血清中的人类免疫缺陷病毒 P24 抗原。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于解决传统酶标板批间差不足的问题, 设计并建立了 P24 抗原的检测试剂盒。

[0006] 本发明提供了“一种人类免疫缺陷病毒 P24 抗原酶联免疫检测试剂盒”, 该试剂盒是包括亲和素预先包被后加入生物素化抗人类免疫缺陷病毒 P24 抗体的酶标板包被反应条、酶标记抗 P24 抗原抗体、阳性对照液一支、阴性对照液一支、20 倍浓洗涤液 1 瓶、底物缓冲液甲 1 瓶、底物缓冲液乙 1 瓶及终止液 1 瓶组成。

[0007] 1. 抗体制备:

[0008] (1) 利用 P24 抗原基因片段通过原核表达或者真核表达制备抗原;

[0009] (2) 制备抗体的制备和纯化:

[0010] 用上述重组抗原免疫豚鼠、兔子或者羊,得抗 P24 抗血清或免疫 Ba1b/C 小鼠得阳性鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞,筛选阳性克隆建株,得腹水;抗血清或腹水用盐析、离子交换层析、或者亲和层析法进行纯化,得纯抗 P24 抗体,其纯度 95%以上。

[0011] (3) 用亲和素预先包被酶标板,并加入生物素标记的抗人类免疫缺陷病毒 P24 抗体进行二次包被反应,制成抗体预包被反应条 48-96 孔;

[0012] (4) 辣根过氧化物酶 (HRP) 与纯化的抗人类免疫缺陷病毒 P24 抗体酶联,制成酶标抗体;

[0013] (5) 配制阳性对照液、阴性对照液;

[0014] (6) 配制 20 倍浓缩洗液;

[0015] (7) 配制底物缓冲液甲;

[0016] (8) 配制底物缓冲液乙;

[0017] (9) 配制终止液。

[0018] (10) 分装上述试剂盒除预包被板其余七种成分,按需要分装在小瓶或尖底离心管中;

[0019] (11) 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密性、稳定性合格;

[0020] (12) 组装成成品。

[0021] 2、本发明的试剂盒在使用时可以如下操作:

[0022] (1) 取出已包被条孔或板,恢复至室温。

[0023] (2) 配液:将浓缩洗涤液 (20X) 用蒸馏水或去离子水稀释备用 (20 倍浓洗涤液 1ml+19ml 蒸馏水即为工作液)。

[0024] (3) 加样:每孔加待检血清 50ul,各板设阳性对照一孔 (50ul),阴性对照一孔 (50ul),空白对照一孔 (加蒸馏水 50ul),然后除空白对照孔外,各孔加酶标记液 50ul,

[0025] (4) 温育:用封板膜封板后置 37℃温育 30 分钟。

[0026] (5) 洗涤:小心揭掉封板膜,将孔内液体甩干,用洗涤液充分洗涤 5 遍,扣干。

[0027] (6) 每孔加入显色液 A、B 各 1 滴 (50ul),轻轻振荡混匀,37℃避光显色 15 分钟

[0028] (7) 测定 OD 值:每孔加终止液 1 滴 (50ul),轻轻振荡混匀,设定酶免分析仪波长于 450nm 处 (建议用双波长 450/630nm 检测),测定各孔 OD 值。

[0029] (8) 结果判定

[0030] 阴性对照 (A 值)\*2.5 = 临界值 (cut off 值),阴性对照高于 0.05 时按实际 OD 值计算,阴性对照小于 0.05 按 0.05 计算,凡待检标本孔 A 值大于临界值即为阳性。

[0031] 本发明的试剂盒能非常专一地检测患者血清中 P24 蛋白的浓度。它具有简便、灵敏和稳定等特点。且本试剂盒操作简便快速,比 PCR 检测法省时 (PCR 法最快需要 6-8 小时完成实验),经临床试用 P24 蛋白检测阳性与 PCR 检测的 HIV 阳性有很好的符合率,本试剂盒和 PCR 法相比,PCR 需贵重的仪器设备,消耗性试剂昂贵,收费价又高,而本试剂盒整个实验中无需贵重仪器设备,消耗性试剂便宜且收费价低廉,能适用于各级医院及临床测试中心,也可用于流行病学普查。本发明的试剂盒,具有简便、灵敏、重复性好的优点,能检出完整 P24 抗原,将可被普遍使用。

## 具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施两例,进一步阐述本发明。本实施例仅用于说明本发明而不用限制本发明要求保护的围。

[0033] 实施例 1

[0034] 制备人类免疫缺陷病毒 P24 抗原酶免检测试剂盒的生产步骤

[0035] 1、生物素化抗体制备:

[0036] (1) 纯化包被抗体:

[0037] 用重组抗原免疫豚鼠、兔子或者羊,得抗 P24 抗血清或免疫 Ba1b/C 小鼠得阳性鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合成杂交瘤细胞,筛选阳性克隆建株,得腹水;抗血清或腹水用盐析、离子交换层析、或者亲和层析法进行纯化,得纯抗 P24 抗体,其纯度 95% 以上。效价大于 10 万。

[0038] (2) 生物素偶联抗 P24 抗体:

[0039] 用常规方法将生物素 (BNHS) 溶于 N,N-二甲基酰胺 (DMF) 配成 1mg/ml,用 0.1mol/L pH 值为 9.0 的 NaHCO<sub>3</sub> 将纯化的抗 P24 抗体稀释成 1-2mg/ml,按 BNHS 与抗体的容积比为 1 : 8 或重量比为 1 : 7 左右混合,室温搅拌下反应 2-4h,装入透析对 0.05mol/L pH 值为 7.2 的 PBS,4℃ 透析过夜,结合物加等体积的甘油,小量分装,-20℃ 一下保存备用。

[0040] 2、酶标记抗体制备

[0041] (1) 抗体制备:

[0042] 基因重组的 P24Ag 免疫豚鼠、兔子或者羊得抗 P24 抗体或重组的 P24Ag 免疫 Ba1b/C 小鼠得腹水,抗血清或腹水用盐析、离子交换层析、或者亲和层析法进行纯化,得纯抗 P24 抗体,其纯度 95% 以上。效价大于 10 万。

[0043] (2) 酶标记抗体制备

[0044] 抗 P24 抗体用过碘酸钠法与辣根过氧化物偶联。

[0045] (3) 酶标记抗体浓度选定

[0046] 采用方阵滴定法选择酶标记抗体的工作浓度大于 1 : 2000。

[0047] P24 重组抗原从 10ug/ml 倍增稀释,包被酶标板,加梯度稀释的酶标抗体测定,以确定最适稀释度。

[0048] 3、预包被抗体板的制备

[0049] (1) 包被

[0050] 用 0.05M 的 pH 值为 4.5-5.0 的柠檬酸缓冲液配制所需浓度的亲和素包被液,将包被液加入固相载体酶标上,置湿盒中加盖,40C 过夜甩干。

[0051] (2) 洗涤

[0052] 用生理盐水洗涤三遍,以去除剩余亲和素。

[0053] (3) 封闭

[0054]

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2.6g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.4g
20%Tween-20	2.5mL
NaCl	8.2g
BSA	10g
Proclin300	1mL

重蒸水 定容至 1000mL

[0055] 调整PH至7.2,将封闭液 300 μ L加入微孔板各孔中,静置5秒后甩干,上述操作重复三次,甩掉封闭液,拍干。

[0056] (4) 二次反应包被

[0057] 将生物素化的抗P24抗体用0.02M的PBS稀释至合适浓度,加110 μ L于微孔板各孔中,置湿盒中加盖,40C过夜甩干。用0.02M的PBS溶液洗涤三遍并抽湿干燥,放入有干燥剂铝箔袋封存备用。

[0058] 4、阳性对照的制备

[0059] HIV呈阳性的患者血清。600C放置1个小时,除菌过滤,用本药盒测定A值>0.3,备用,分装。

[0060] 5、阴性对照的制备

[0061] 用本试剂盒测定正常人血清A值在0-0.03,加千分之一的Proclin300,分装备用。

[0062] 6、酶标单抗配置

[0063] 用含10%小牛血清和90%0.15M的PBS稀释Anti-p24-HRP,稀释20倍,分装。

[0064] 7、酶标单抗稀释液

[0065]

BSA	0.5g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	2.6g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.4g
NaCl	8.2g
20%Tween-20	100ml
Proclin300	1mL

[0066] 调整 pH 至 7.2

[0067] 8、底物液 A

[0068]

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	1.7g
柠檬酸·H <sub>2</sub> O	0.5g
3%H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 μ l
重蒸水	100ml

- [0069] 调整 pH 至 5.0
- [0070] 9、底物液 B
- |        |  |       |
|--------|--|-------|
| [0071] | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 1.7g  |
| [0072] | 柠檬酸·H <sub>2</sub> O                                 | 0.5g  |
| [0073] | 重蒸水  | 100ml |
- [0074] 调整 pH 至 5.0 后,加入 10mlDMSO 含 60mgTMB 的溶液 25 μ l
- [0075] 10、终止液
- |        |                                  |      |
|--------|----------------------------------|------|
| [0076] | 浓 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | 10ml |
| [0077] | 重蒸水                              | 80ml |
- [0078] 11、20X 洗涤液
- |        |  |         |
|--------|--|---------|
| [0079] | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O | 2.6g    |
|        | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O  | 0.4g    |
|        | Tween-20   | 2.5 μ l |
- [0080]
- |  |     |      |
|--|-----|------|
|  | 重蒸水 | 50ml |
|--|-----|------|
- [0081] 调整 pH 至 7.2
- [0082] 12、半成品及成品的组成
- [0083] 上述 (1) → (11) 步骤所得产品装入小瓶及尖底离心管中,即为半成品。抽出三份经过特异性、稳定性、灵敏度及精密度检定合格才能组装成 p24 试剂盒。组装成盒后还需抽出三份,同半成品一样经过检定合格才能出售。
- [0084] 实施例 2
- [0085] 一种人类免疫缺陷病毒 P24 抗原酶免检测试剂盒的操作步骤
- [0086] 1、操作步骤如下:
- [0087] (1) 取出已包被条孔或板,恢复至室温。
- [0088] (2) 配液:将浓缩洗涤液 (20X) 用蒸馏水或去离子水稀释备用 (20 倍浓洗涤液 1ml+19ml 蒸馏水即为工作液)。
- [0089] (3) 加样:每孔加待检血清 50u1,各板设阳性对照一孔 (50u1),阴性对照一孔 (50u1),空白对照一孔 (加蒸馏水 50u1),然后除空白对照孔外,各孔加酶标记液 50u1。
- [0090] (4) 温育:用封板膜封板后置 37℃温育 30 分钟。
- [0091] (5) 洗涤:小心揭掉封板膜,将孔内液体甩干,用洗涤液充分洗涤 5 遍,扣干。
- [0092] (6) 每孔加入显色液 A、B 各 1 滴 (50u1),轻轻振荡混匀,37℃避光显色 15 分钟
- [0093] (7) 测定 OD 值:每孔加终止液 1 滴 (50u1),轻轻振荡混匀,设定酶免分析仪波长于 450nm 处 (建议用双波长 450/630nm 检测),测定各孔 OD 值。
- [0094] (8) 结果判定
- [0095] 阴性对照 (A 值)\*2.5 = 临界值 (cut off 值),阴性对照高于 0.05 时按实际 OD 值算,阴性对照小于 0.05 按 0.05 计算,凡待检标本孔 A 值大于临界值即为阳性。

专利名称(译)	一种人类免疫缺陷病毒P24抗原酶联免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102768274A</a>	公开(公告)日	2012-11-07
申请号	CN201110114157.3	申请日	2011-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	武汉康苑生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	武汉康苑生物医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	武汉康苑生物医药科技有限公司		
[标]发明人	林志铿		
发明人	林志铿		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)	Na <sub>2</sub> HP04. 12H <sub>2</sub> O	2. 6g
<p>本发明公开了一种人类免疫缺陷病毒P24抗原酶联免疫检测试剂盒，解决传统酶标板批间差不足的问题，设计并建立了P24抗原的检测试剂盒，该试剂盒是包括亲和素预先包被后加入生物素化抗人类免疫缺陷病毒P24抗体的酶标板包被反应条、酶标记抗P24抗原抗体、阳性对照液一支、阴性对照液一支、20倍浓洗涤液1瓶、底物缓冲液甲1瓶、底物缓冲液乙1瓶及终止液1瓶组成。本发明具有较好的均一性，特异性，灵敏度，定量精确，快速简便，适用于人类免疫缺陷病毒P24抗原早期检测。</p>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> . 12H <sub>2</sub> O	0. 4g
	20%Tween-20	2. 5mL
	NaCl	8. 2g
	BSA	10g
	Proclin300	1mL
	重蒸水	定容至 1000mL