

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/569

G01N 33/543

G01N 33/535

G01N 21/78



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510200159.9

[43] 公开日 2005 年 9 月 28 日

[11] 公开号 CN 1673749A

[22] 申请日 2005.3.23

[21] 申请号 200510200159.9

[71] 申请人 北京科卫临床诊断试剂有限公司

地址 100043 北京市石景山区古城西街 19 号

[72] 发明人 王保君 冯长访 马晓晖

[74] 专利代理机构 北京中建联合知识产权代理事务所

代理人 朱丽岩 王琳

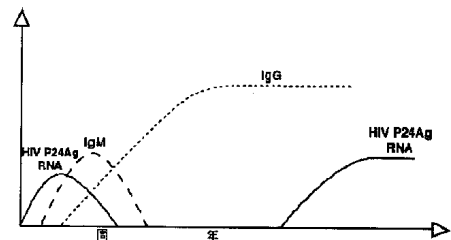
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称 HIV 病毒抗体/抗原诊断试剂盒及其制备方法、检测方法

[57] 摘要

一种 HIV 病毒抗体/抗原诊断试剂盒及其制备方法、检测方法，试剂盒的组分包括：用 HIV 抗原和 P24 单克隆抗体包被的预包被酶联板、用生物素标记的兔抗 P24 多克隆抗体、用辣根过氧化物酶标记的亲合素和 HIV 抗原结合物、含有吐温的磷酸盐缓冲液的洗涤液、含有过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液的显色液 A、含有四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液显色液 B、含有硫酸溶液的终止液、含有磷酸盐缓冲液的样品稀释液、阴性对照正常人血清、HIV 抗体阳性对照血清、P24 抗原阳性对照血清。本发明可同时检测 HIV 抗体和 P24 抗原，提高了检测的特异度和敏感度，适用于样品中人类免疫缺陷病毒抗体的诊断。

感染者血清中 HIV 标志物出现顺序



ISSN 1008-4274

**【权利要求1】**

一种人类免疫缺陷病毒1+2型抗体/P24抗原诊断试剂盒，其特征在于试剂盒的组分包

括：

- (1)、用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板；
- (2)、用生物素标记的兔抗P24多克隆抗体；
- (3)、用辣根过氧化物酶标记的亲合素和HIV抗原结合物；
- (4)、含有吐温的磷酸盐缓冲液的洗涤液；
- (5)、含有过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液的显色液A；
- (6)、含有四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液显色液B；
- (7)、含有硫酸溶液的终止液；
- (8)、含有磷酸盐缓冲液的样品稀释液；
- (9)、阴性对照正常人血清；
- (10)、HIV抗体阳性对照血清；
- (11)、P24抗原阳性对照血清。

**【权利要求2】**

一种人类免疫缺陷病毒1+2型抗体/P24抗原诊断试剂盒的制备方法，其特征在于有以下方法：

I、将包被用HIV抗原和鼠抗P24单克隆抗体加至碳酸盐缓冲液中混匀，加至酶联板内，每孔100微升，孵育过夜，用含有吐温的磷酸盐缓冲液洗涤酶联板后，再加入含有酪蛋白的Tris缓冲液，37℃孵育2小时后，弃去孔内液体，干燥酶联板，即完成用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板的制作；

II、将兔抗P24多克隆抗体和生物素进行标记，即为生物素标记的兔抗P24多克隆抗体；

III、将辣根过氧化物酶与亲合素进行标记，即为辣根过氧化物酶标记的亲合素结合

物；

IV、将标记用HIV重组抗原和辣根过氧化物酶用改良过碘酸钠法结合在一起，即制成用辣根过氧化物酶标记的HIV抗原结合物；

V、试剂盒其它组分包括：洗涤液为含有吐温的磷酸盐缓冲液，显色液A为含有过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液，显色液B为含有四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液，终止液为2M硫酸，样品稀释液为含有酪蛋白的磷酸盐缓冲液，阴性对照血清为正常人血清，HIV抗体阳性对照血清为含有HIV抗体的人血清，P24抗原阳性对照血清为含P24蛋白的人血清。

### 【权利要求3】

一种人类免疫缺陷病毒1+2型抗体/P24抗原诊断试剂盒的检测方法，其特征在于有以下步骤：

a、加样：取用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板，每次实验设空白对照孔1孔，阴性对照孔、阳性对照孔及P24抗原对照孔各2孔和样品孔。依次加入阴性对照血清、阳性对照血清及P24抗原对照血清及待检样品各75  $\mu$  l，同时在各孔内加用生物素标记的兔抗P24多克隆抗体25  $\mu$  l，混匀，贴上不干胶条，置37 $^{\circ}$ C温育60分钟；

b、洗板：弃去各孔内液体，将洗涤液用蒸馏水稀释20倍后注满各孔，静置10-20秒，甩掉洗涤液；重复洗板，最后拍干；

c、加酶：每孔加用辣根过氧化物标记的亲合素和HIV抗原结合物100  $\mu$  l，空白对照孔不加，贴上不干胶条，置37 $^{\circ}$ C温育30分钟；

d、洗板：方法同步骤b；

e、显色：依次在每孔加显色剂A液、显色剂B液各50  $\mu$  l，混匀，置37 $^{\circ}$ C避光温育10分钟；

f、终止：依次在每孔加终止液50  $\mu$  l，混匀；

g、测定：用酶标仪对空白孔调零，测定各孔的光吸收度值（OD值）；

h、结果判定：根据样品的测定OD值与临界值的比值。若比值大于1，则为阳性反应，说明样品中含有HIV抗体或P24抗原；若比值小于1，则为阴性反应，说明样品中不含有HIV抗体或P24抗原。

## HIV病毒抗体/抗原诊断试剂盒及其制备方法、检测方法

## (一) 技术领域

本发明涉及一种检测样品中是否存在病毒抗体和抗原的试剂盒，特别是同时检测人类免疫缺陷病毒1+2型抗体和P24抗原的诊断试剂盒及其制备方法和检测方法。

## (二) 背景技术

人类免疫缺陷病毒(HIV)是艾滋病(AIDS)的病原体，分为HIV1和HIV2两类。艾滋病是当前危害人类健康的最主要传染病之一，主要通过性接触、血液、静脉滥用药物和母婴等途径传播。据世界卫生组织估计，已有约超过8000万人感染了HIV，已有2000余万人被艾滋病夺去了生命，目前尚无有效的方法治愈艾滋病，但通过检测血液样品中人类免疫缺陷病毒1+2型抗体和P24抗原是否存在的生理参数可以作为及早诊断HIV感染的依据，也是切断传染源、有效防止HIV传播的重要手段。现有检测HIV的方法有聚合酶链式反应、HIV抗体检测和P24抗原检测。其缺点是现有的诊断试剂盒是只能检测抗体或抗原中的一种，二者不能同时检测，使检测的窗口期较长，并容易出现漏检情况。

## (三) 发明内容

本发明的目的是提供一种HIV病毒抗体/抗原诊断试剂盒及其制备方法、检测方法，解决现有技术只能检测抗体或抗原中的一种，二者不能同时检测，使检测的窗口期较长，容易出现漏检情况的技术问题。

本发明的技术方案：这种HIV病毒抗体/抗原诊断试剂盒，其特征在于试剂盒的组分包括：

- (1)、用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板；
- (2)、用生物素(Biotin)标记的兔抗P24多克隆抗体；
- (3)、用辣根过氧化物酶(HRP)标记的亲合素(Streptavidin)和HIV抗原结合物；
- (4)、含有吐温的磷酸盐缓冲液的洗涤液；
- (5)、含有过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液的显色液A；
- (6)、含有四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液显色液B；
- (7)、含有硫酸溶液的终止液；
- (8)、含有磷酸盐缓冲液的样品稀释液；
- (9)、阴性对照正常人血清；

(10)、HIV抗体阳性对照血清；

(11)、P24抗原阳性对照血清。

这种HIV病毒抗体/抗原诊断试剂盒的制备方法，其特征在于有以下方法：

I、将包被用HIV抗原和鼠抗P24单克隆抗体加至碳酸盐缓冲液中混匀，加至酶联板内，每孔100微升，孵育过夜，用含有吐温的磷酸盐缓冲液洗涤酶联板后，再加入含有酪蛋白的Tris缓冲液，37℃孵育2小时后，弃去孔内液体，干燥酶联板，即完成用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板的制作；

II、将兔抗P24多克隆抗体和生物素进行标记，即为生物素标记的兔抗P24多克隆抗体；

III、将辣根过氧化物酶与亲和素进行标记，即为辣根过氧化物酶标记的亲和素；将标记用HIV重组抗原和辣根过氧化物酶用改良过碘酸钠法结合在一起，即为用辣根过氧化物酶标记的HIV抗原结合物；

IV、试剂盒其它组分包括：洗涤液为含有吐温的磷酸盐缓冲液，显色液A为含有过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液，显色液B为含有四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液，终止液为2M硫酸，样品稀释液为含有酪蛋白的磷酸盐缓冲液，阴性对照血清为正常人血清，HIV抗体阳性对照血清为含有HIV抗体的人血清，P24抗原阳性对照血清为含P24蛋白的人血清。

这种HIV病毒抗体/抗原诊断试剂盒的检测方法，其特征在于有以下步骤：

a、加样：取用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板，每次实验设空白对照孔1孔，阴性对照孔、阳性对照孔及P24抗原对照孔各2孔和样品孔。依次加入阴性对照血清、阳性对照血清及P24抗原对照血清及待检样品各75  $\mu$  l，同时在各孔内加用生物素标记的兔抗P24多克隆抗体25  $\mu$  l，混匀，贴上不干胶条，置37℃温育60分钟；

b、洗板：弃去各孔内液体，将洗涤液用蒸馏水稀释20倍后注满各孔，静置10—20秒，甩掉洗涤液；重复洗板，最后拍干；

c、加酶：每孔加用辣根过氧化物酶标记的亲和素和HIV抗原结合物100  $\mu$  l，空白对照孔不加，贴上不干胶条，置37℃温育30分钟；

d、洗板：方法同步骤b；

e、显色：依次在每孔加显色剂A液、显色剂B液各50  $\mu$  l，混匀，置37℃避光温育10分钟；

f、终止：依次在每孔加终止液50  $\mu$  l，混匀；

g、测定：用酶标仪对空白孔调零，测定各孔的光吸收度值（OD值）；

h、结果判定：根据样品的测定OD值与临界值的比值。若比值大于1，则为阳性反应，说明样品中含有HIV抗体或P24抗原；若比值小于1，则为阴性反应，说明样品中不含有HIV抗体或P24抗原。

本发明的有益效果：本发明可以同时检测HIV感染者血中的HIV抗体和P24抗原，较现有技术只能检测HIV抗体的方法，又进一步缩短了检测的窗口期。显著提高了检测的灵敏度和准确率，可进一步减小输血后HIV感染的机率。如下图所示。在制作方法中，将免抗P24多克隆抗体用生物素进行标记，再将亲和素用辣根过氧化物酶标记，利用生物素和亲和素能结合的特性，从而起到信号放大作用，大大提高了P24抗原检测的灵敏度。

本发明临床考核结果。分别委托中国人民解放军第302医院、河南省性病艾滋病防治研究所、北京市红十字血液中心进行了临床考核试验。结果如下表：

检验项目	检验结果	结果描述
阴性血清标本847份	841/847	特异度为99.29%
阳性血清标本200份	200/200	敏感度为100%
易干扰标本408份	26/408	假阳性率为6.37%

为了进一步考核本发明较现有技术的优越性，委托中国药品生物制品检定所进行临床考核试验，结果在1份早期感染HIV血清中，本发明检测结果为阳性，而现有技术没能检出。结果如下：

样品编号	PCR结果	RIBA结果	现有技术检测结果	本发明检测结果
6	阳性	阴性	阴性	阳性

结果显示，本发明提高了检测的敏感度和特异度，能够完全符合临床使用要求。

此方法中区别于国外同类试剂盒的制备技术为生物素-亲和素系统的使用。本发明用于人类免疫缺陷病毒感染的诊断。

#### （四）、附图说明

图1是感染者血清中HIV标志物出现顺序曲线图。

参见图1，本发明可同时检测HIV抗体（IgM\IgG）和P24抗原，较只能检测HIV抗体的现有技术，又进一步缩短了检测的窗口期。

#### （五）、具体实施方式

本发明人类免疫缺陷病毒1+2型抗体/P24抗原诊断试剂盒的组分实施例：

（1）、用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板；

- (2)、用生物素 (Biotin) 标记的兔抗P24多克隆抗体;
- (3)、用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的亲合素 (Streptavidin) 和HIV抗原结合物;
- (4)、含有吐温的磷酸盐缓冲液的洗涤液;
- (5)、含有过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液的显色液A;
- (6)、含有四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液显色液B;
- (7)、含有硫酸溶液的终止液;
- (8)、含有磷酸盐缓冲液的样品稀释液;
- (9)、阴性对照正常人血清;
- (10)、HIV抗体阳性对照血清;
- (11)、P24抗原阳性对照血清。

本发明人类免疫缺陷病毒1+2型抗体/P24抗原诊断试剂盒的制备方法的实施例:

I、将包被用HIV抗原和鼠抗P24单克隆抗体加至碳酸盐缓冲液中混匀, 加至酶联板内, 每孔100微升, 孵育过夜, 用含有吐温的磷酸盐缓冲液洗涤酶联板后, 再加入含有酪蛋白的Tris缓冲液, 37℃孵育2小时后, 弃去孔内液体, 干燥酶联板, 即完成用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板的制作;

II、将兔抗P24多克隆抗体和生物素进行标记, 即为生物素标记的兔抗P24多克隆抗体;

III、将辣根过氧化物酶与亲合素进行标记, 即为辣根过氧化物酶标记的亲合素; 将标记用HIV重组抗原和辣根过氧化物酶用改良过碘酸钠法结合在一起, 即为用辣根过氧化物酶标记的HIV抗原结合物;

改良过碘酸钠法, 具体步骤如下:

氧化辣根过氧化物酶 (HRP): 用纯化水将HRP配成4mg/ml溶液, 加入0.2ml含有6mg过碘酸钠的溶液, 室温避光反应20分钟;

透析: 将氧化后HRP溶液用pH4.5 1mmol/l乙酸盐溶液透析, 30分钟1次, 共8次;

调节pH: 用0.1mol/l, pH9.5的碳酸盐缓冲液将上述HRP溶液的pH调至9.0以上;

准备HIV抗原: 用0.01 mol/l, pH9.5的碳酸盐缓冲液将HCV抗原调配成8mg/ml浓度;

与HIV抗原交联: 将上述HRP溶液与HIV抗原溶液以等体积比例, 将抗原溶液缓慢加入HRP溶液中, 室温搅拌2小时;

还原: 将新鲜配制的2mg/ml硼氢化钠溶液, 按0.2ml/4mgHRP的浓度加入上述HRP-HIV抗原溶液, 4℃反应2小时;

透析: 将HRP-HIV抗原结合物溶液, 用100倍以上体积的0.01 mol/l, pH7.2磷酸盐缓

冲液透析过夜，至少换3次透析液；

分装保存：加入等量甘油，分装后低温保存。

IV、试剂盒其它组分包括：洗涤液为含有吐温的磷酸盐缓冲液，显色液A为含有过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液，显色液B为含有四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液，终止液为2M硫酸，样品稀释液为含有酪蛋白的磷酸盐缓冲液，阴性对照血清为正常人血清，HIV抗体阳性对照血清为含有HIV抗体的人血清，P24抗原阳性对照血清为含P24蛋白的人血清。

本发明检测方法的实施例：

a、加样：取用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板，每次实验设空白对照孔1孔，阴性对照孔、阳性对照孔及P24抗原对照孔各2孔和样品孔。依次加入阴性对照血清、阳性对照血清及P24抗原对照血清及待检样品各75  $\mu$  l，同时在各孔内加用生物素标记的兔抗P24多克隆抗体25  $\mu$  l，混匀，贴不干胶条，置37 $^{\circ}$ C温育60分钟；

b、洗板：弃去各孔内液体，将洗涤液用蒸馏水稀释20倍后注满各孔，静置10 $\times$ 0秒，甩掉洗涤液；重复洗板，最后拍干；

c、加酶：每孔加用辣根过氧化物酶标记的亲合素和HIV抗原结合物100  $\mu$  l，空白对照孔不加，贴不干胶条，置37 $^{\circ}$ C温育30分钟；

d、洗板：方法同步骤b；

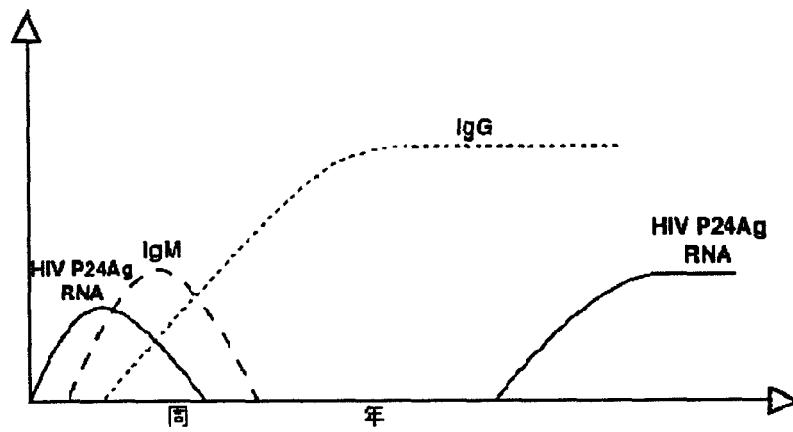
e、显色：依次在每孔加显色剂A液、显色剂B液各50  $\mu$  l，混匀，置37 $^{\circ}$ C避光温育10分钟；

f、终止：依次在每孔加终止液50  $\mu$  l，混匀；

g、测定：用酶标仪对空白孔调零，测定各孔的光吸收度值（OD值）；

h、结果判定：根据样品的测定OD值与临界值的比值。若比值大于1，则为阳性反应，说明样品中含有HIV抗体或P24抗原；若比值小于1，则为阴性反应，说明样品中不含有HIV抗体或P24抗原。

感染者血清中HIV标志物出现顺序



专利名称(译)	HIV病毒抗体/抗原诊断试剂盒及其制备方法、检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1673749A</a>	公开(公告)日	2005-09-28
申请号	CN200510200159.9	申请日	2005-03-23
[标]申请(专利权)人(译)	北京科卫临床诊断试剂有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科卫临床诊断试剂有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京科卫临床诊断试剂有限公司		
[标]发明人	王保君 冯长访 马晓晖		
发明人	王保君 冯长访 马晓晖		
IPC分类号	G01N21/78 G01N33/535 G01N33/543 G01N33/569		
代理人(译)	王琳		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种HIV病毒抗体/抗原诊断试剂盒及其制备方法、检测方法，试剂盒的组分包括：用HIV抗原和P24单克隆抗体包被的预包被酶联板、用生物素标记的兔抗P24多克隆抗体、用辣根过氧化物酶标记的亲合素和HIV抗原结合物、含有吐温的磷酸盐缓冲液的洗涤液、含有过氧化氢的柠檬酸盐缓冲液的显色液A、含有四甲基联苯胺的柠檬酸盐缓冲液显色液B、含有硫酸溶液的终止液、含有磷酸盐缓冲液的样品稀释液、阴性对照正常人血清、HIV抗体阳性对照血清、P24抗原阳性对照血清。本发明可同时检测HIV抗体和P24抗原，提高了检测的特异度和灵敏度，适用于样品中人类免疫缺陷病毒抗体的诊断。

