



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104407143 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 11

(21) 申请号 201410698139. 8

(22) 申请日 2014. 11. 28

(71) 申请人 山东博科生物产业有限公司

地址 250200 山东省济南市章丘市明水经济开发区山东博科生物产业园

(72) 发明人 谢清华 王进 甘宜梧 谭柏清 王绮 肖慧 包兴艳

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所 37218

代理人 贾波

(51) Int. Cl.

G01N 33/576(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

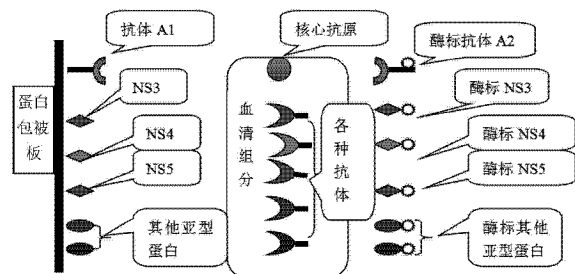
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种丙型肝炎病毒抗原 - 抗体联合检测试剂盒

(57) 摘要

本发明属于丙型肝炎检测技术领域,具体涉及一种丙型肝炎病毒抗原 - 抗体联合检测试剂盒。试剂盒包括蛋白包被板、酶结合物、对照血清、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色剂和终止液。本发明将抗丙型肝炎病毒核心抗原的抗体和丙型肝炎病毒其他亚型重组蛋白固定到固相载体上,能保证样本中的丙肝核心抗原及多种亚型的抗体都可以通过免疫反应吸附到固相载体上,避免了漏检;试剂盒中的酶结合物,是对包被抗体和抗原配对的对应抗体和抗原进行酶标记,能够与包被抗体和抗原配对应用,保证检测的特异性。本发明的试剂盒,选用大分子物质作为封闭液,无蛋白结构,同时在封闭液中加入蛋白保护剂,有效保证了试剂盒的稳定性。



1. 一种丙型肝炎病毒抗原-抗体联合检测试剂盒,其特征在于,试剂盒包括蛋白包被板和酶结合物;

所述蛋白包被板是由以下方法制备得到的: pH7.4 浓度 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液将抗原和抗体稀释成 1:2000 浓度,制得包被液;按 100 μ L/孔加入稀释好的包被液,在 37 $^{\circ}$ C 下包被 2 小时;弃去包被板内的包被液,将包被板拍干,按 100 μ L-300 μ L /孔加入包被板封闭液,在 2-8 $^{\circ}$ C 下包被 16-20 小时;弃去包被板内的封闭液,将包被板拍干后,放置于湿度小于 30% 的 35-39 $^{\circ}$ C 干燥箱中烘干 4-6 小时,即得蛋白包被板;

所述酶结合物是通过以下方法制备得到的:将 5mg 辣根过氧化物酶溶于 1ml 浓度为 0.2mol/L、pH5.6 醋酸盐缓冲液中,再加入体积浓度为 1% 的 2,4-二硝基氟苯的无水乙醇溶液 0.1ml,室温下搅拌 1h,得溶液 1;在溶液 1 中加入新鲜配置的 0.1mol/L 的 NaIO_4 0.5ml, 4 $^{\circ}$ C 放置 30min,得溶液 2;在溶液 2 中加入体积浓度为 2.5% 的乙二醇 1ml,室温下搅拌 1h,得溶液 3;在溶液 3 中加入辣根过氧化物酶标记的蛋白 5mg,用 pH9.5 浓度为 1.0mol/L 的碳酸盐缓冲液调节溶液 pH 值至 9.0,混匀,4 $^{\circ}$ C 过夜,得溶液 4;在溶液 4 中加入 0.1mol/L 的硼氢化钠溶液 0.1ml,混匀,4 $^{\circ}$ C 放置 3h,得溶液 5;在溶液 5 中加入浓度为 0.01mol/L、pH7.4 磷酸盐缓冲液,4 $^{\circ}$ C 透析过夜,换液 3 次,得溶液 6;将溶液 6 离心 30min,去除沉淀物,所得上清液即为酶结合物。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述包被板封闭液是由以下物质组成的:pH=7.4 的 Tris-HCl 缓冲液 0.1mol/L、大分子物质 0.5-1.0g/L、蛋白保护剂 1.5-10g/L、叠氮钠 0.5-1g/L。

3. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,所述大分子物质为 PEG-20000、聚乙烯吡咯烷酮中的一种或两种的混合物。

4. 根据权利要求 2 所述的试剂盒,其特征在于,所述蛋白保护剂为海藻糖、吐温-20 中的一种或两种的混合物。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括对照血清、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色剂和终止液。

一种丙型肝炎病毒抗原 - 抗体联合检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于丙型肝炎检测技术领域,具体涉及一种丙型肝炎病毒抗原 - 抗体联合检测试剂盒。

背景技术

[0002] 丙型病毒性肝炎,简称为丙型肝炎、丙肝,是一种由丙型肝炎病毒(HCV)感染引起的病毒性肝炎,主要经输血、针刺、吸毒等传播,据世界卫生组织统计,全球 HCV 的感染率约为 3%,估计约 1.8 亿人感染了 HCV,每年新发丙型肝炎病例约 3.5 万例。丙型肝炎呈全球性流行,可导致肝脏慢性炎症坏死和纤维化,部分患者可发展为肝硬化甚至肝细胞癌(HCC)。未来 20 年内与 HCV 感染相关的死亡率(肝衰竭及肝细胞癌导致的死亡)将继续增加,对患者的健康和生命危害极大,已成为严重的社会和公共卫生问题。根据卫生部历年公布的丙肝疫情人数如图 1 所示。

[0003] 丙型肝炎病毒(HCV)为嗜肝性慢性病毒 HCV 感染后,患者的起病和临床症状极不典型,以亚临床感染为多见,容易造成漏诊。HCV 感染的慢性化发生率明显高于乙型肝炎,较乙型肝炎易早期出现肝硬化、肝癌,死亡率较高。因此 HCV 的检测对丙型肝炎病毒感染的早期诊断和指导临床治疗有重大的意义。

[0004] 国内至今还没有丙型肝炎(简称丙肝)预防疫苗问世也没有特效药物治疗,而早期诊断仍是防止 HCV 传播的有效手段。目前用于检测丙肝的试剂主要是检测 HCV RNA 的 RT-PCR 方法,针对抗-HCVELISA 检测试剂,以及针对于 HCV-cAg 的 ELISA 检测试剂。其中 RT-PCR 检测 HCV RNA 价格昂贵,操作繁杂,不适于广泛推广;抗-HCVELISA 检测的丙肝抗体是在人体对丙肝抗原产生免疫反应后,才可以检测到,因此有一个较长的“窗口期”,一般要感染后 70 天才能很好检测到;2001 年 Ortho 公司推出了检测 HCV 核心抗原(HCV-cAg)ELISA 试剂,通过大量临床考核评价,证明比抗-HCV 试剂检出早,但是还是存在一定的漏检,造成在临床应用中,经试剂筛选后,仍有少部分输血后丙肝发生。有部分血站或医院,同时应用丙肝抗体和丙肝核心抗原两种试剂盒进行检测,但这不仅加大了医护人员的工作量,而且大大增大了检测成本。这些检测方法的缺陷制约了丙肝检测试剂的临床应用。

发明内容

[0005] 针对于现在临床对丙肝检测存在漏检,而且利用多种试剂盒操作造成工作量增大、成本增加的问题,本发明提供了一种丙型肝炎病毒抗原 - 抗体联合检测的试剂盒,该试剂盒能灵敏、准确的检测丙型肝炎病毒。

[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原 - 抗体联合检测试剂盒,包括蛋白包被板和酶结合物;

所述的,蛋白包被板是由以下方法制备得到的:pH7.4 浓度 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液将包被蛋白稀释成 1:2000 浓度,制得包被液;pH7.4 浓度为 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液将抗原和抗体稀释成一定浓度;按 100 μ L/孔加入稀释好的包被液,在 37 $^{\circ}$ C 下包被 2 小

时;弃去包被板内的包被液,将包被板拍干,按 $100\ \mu\text{L}$ - $300\ \mu\text{L}$ /孔加入包被板封闭液,在 $2\text{-}8^{\circ}\text{C}$ 下包被 $16\text{-}20$ 小时;弃去包被板内的封闭液,将包被板拍干后,放置于湿度小于 30% 的 $35\text{-}39^{\circ}\text{C}$ 干燥箱中烘干 $4\text{-}6$ 小时,即得蛋白包被板。

[0007] 本发明所用的包被蛋白为:a)抗丙型肝炎病毒核心抗原的抗体 A1;b)丙型肝炎病毒其他亚型重组蛋白为 NS3、NS4、NS5 等所有由丙型肝炎病毒 RNA 表达的其他蛋白。

[0008] 所述的,酶结合物是通过以下方法制备得到的:将 5mg 辣根过氧化物酶溶于 1ml 浓度为 0.2mol/L 、 $\text{pH}5.6$ 醋酸盐缓冲液中,再加入体积浓度为 1% 的 $2,4\text{-}$ 二硝基氟苯的无水乙醇溶液 0.1ml ,室温下搅拌 1h ,得溶液 1;在溶液 1 中加入新鲜配置的 0.1mol/L 的 NaIO_4 0.5ml , 4°C 放置 30min ,得溶液 2;在溶液 2 中加入体积浓度为 2.5% 的乙二醇 1ml ,室温下搅拌 1h ,得溶液 3;在溶液 3 中加入辣根过氧化物酶标记的蛋白 5mg ,用 $\text{pH}9.5$ 浓度为 1.0mol/L 的碳酸盐缓冲液调节溶液 pH 值至 9.0 ,混匀, 4°C 过夜,得溶液 4;在溶液 4 中加入 0.1mol/L 的硼氢化钠溶液 0.1ml ,混匀, 4°C 放置 3h ,得溶液 5;在溶液 5 中加入浓度为 0.01mol/L 、 $\text{pH}7.4$ 磷酸盐缓冲液, 4°C 透析过夜,换液 3 次,得溶液 6;将溶液 6 离心 30min ,去除沉淀物,所得上清液即为酶结合物。

[0009] 本发明辣根过氧化物酶标记的蛋白为:a)丙型肝炎病毒核心抗原另一活性位点的抗体 A2;b)丙型肝炎病毒其他亚型重组蛋白配对的 NS3、NS4、NS5 等所有由丙型肝炎病毒 RNA 表达的其他蛋白。

[0010] 所述的,包被板封闭液是由以下物质组成的:Tris-HCl 缓冲液($\text{pH}=7.4$) 0.1mol/L 、大分子物质 $0.5\text{-}1.0\text{g/L}$ 、蛋白保护剂 $1.5\text{-}10\text{g/L}$ 、叠氮钠 $0.5\text{-}1\text{g/L}$;

所述的,大分子物质为 PEG-20000、聚乙烯吡咯烷酮中的一种或两种的混合物;

所述的,蛋白保护剂为海藻糖、吐温-20 中的一种或两种的混合物。

[0011] 所述的,试剂盒还包括对照血清、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色剂和终止液。

[0012] 本发明的试剂盒的使用方法如下:

1) 加样:取出检测试剂盒, $15\text{-}30^{\circ}\text{C}$ 放置 30 分钟;在蛋白包被板上预设置空白、阴性和阳性对照各一孔,其余每孔加 $100\ \mu\text{L}$ 样品稀释液,再加入 $100\ \mu\text{L}$ 待测样品;空白孔加入 $200\ \mu\text{L}$ 样品稀释液;阴、阳性对照孔分别加入 $200\ \mu\text{L}$ 阴性、阳性对照血清,混匀后 37°C 水浴振荡 90 分钟;

2) 洗板:用 $1:20$ 稀释后的洗涤液洗板 4 次,最后一次拍干;

3) 加酶结合物:每孔加 $200\ \mu\text{L}$ 酶结合物 37°C 水浴 30 分钟,剩余酶结合物 4°C 保存;

4) 洗板:洗板同步步骤 2);

5) 显色:先加入显色剂 A 液 $100\ \mu\text{L}$,再加入显色剂 B 液 $100\ \mu\text{L}$, 37°C 水浴避光显色 $10\text{-}15$ 分钟;

6) 终止:每孔加 $50\ \mu\text{L}$ 终止液;

7) 测定: 10 分钟内以酶标仪 450nm 波长测定各孔 OD 值;

临界值确定:阴性对照平均 OD 值 + 0.06 (若阴性对照平均 OD 值 ≤ 0.06 时,按 0.06 计算;OD > 0.06 时,按实际测定阴性对照平均 OD 值 + 0.06 计算)。测试标本的 OD 值小于临界值则为 HCV-cAg 阴性。测试标本中的 OD 值等于或大于临界值则为 HCV-cAg 阳性。

[0013] 本发明试剂盒中所用的阳性对照血清的主要成份为 HCV-cAg 强阳血清及亚型抗体;阴性对照血清是主要成份为不含 HCV-cAg 的正常人血清;样品稀释液的主要成份为加

有山羊血清的 PBS ;浓缩洗涤液的主要成份为 NaCl, 磷酸盐、吐温 -20 ;显色剂 A 的主要成份为过氧化尿素 ;显色剂 B 的主要成份为 TMB. 2HCL ;终止液的主要成份为 2M H₂SO₄。

[0014] 本发明试剂盒的反应原理图,如图 2 所示。

[0015] 通过本发明的技术方案,可以获得一种同时检测丙型肝炎病毒的抗原 - 抗体联合检测试剂盒,该试剂盒通过在包被板上同时包被丙型肝炎病毒核心抗体和各种亚型蛋白的方式,降低了检测的漏检率,同时通过加入无蛋白大分子的封闭液,保证了试剂盒的高效、稳定,具有很好的潜在临床应用价值。

[0016] 本发明的丙型肝炎病毒抗原 - 抗体联合检测的试剂盒的创新之处在于 :

(1) 将抗丙型肝炎病毒核心抗原的抗体和丙型肝炎病毒其他亚型重组蛋白固定到固相载体 - 蛋白包被板上,能保证样本中的丙肝核心抗原及多种亚型的抗体都可以通过免疫反应吸附到固相载体上,避免了漏检。

[0017] (2) 试剂盒中的酶结合物,是对包被抗体和抗原配对的对应抗体和抗原进行酶标记,能够与包被抗体和抗原配对应用,保证了试剂盒检测的特异性。

[0018] (3) 本发明的试剂盒,选用大分子物质作为封闭液,无蛋白结构,同时在封闭液中加入蛋白保护剂,有效地保证了试剂盒的稳定性。

附图说明

[0019] 图 1 卫生部历年公布丙肝疫情统计图 ;

图 2 本发明试剂盒的反应原理图 ;

图 3 实施例 3 对比 RT-PCR 试剂盒检测相关性。

具体实施方式

[0020] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。

[0021] 实施例 1

一种丙型肝炎病毒抗原 - 抗体联合检测试剂盒包括对照血清、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色剂、终止液、蛋白包被板和酶结合物。

[0022] 试剂盒中所用的对照血清包括阳性对照血清和阴性对照血清,阳性对照血清的主要成份为 HCV-cAg 强阳血清及亚型抗体 ;阴性对照血清是主要成份为不含 HCV-cAg 的正常人血清 ;样品稀释液的主要成份为加有山羊血清的 PBS ;浓缩洗涤液的主要成份为 NaCl、磷酸盐、吐温 -20 ;显色剂 A 的主要成份为过氧化尿素 ;显色剂 B 的主要成份为 TMB. 2HCL ;终止液的主要成份为 2M H₂SO₄。

[0023] 蛋白包被板是由以下步骤制得的 :

pH7.4 浓度为 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液将抗原和抗体稀释成一定浓度 ;按 100 μ L/孔加入稀释好的包被液,在 37°C 下包被 2 小时 ;弃去包被板内的包被液,将包被板拍干,按 100 μ L-300 μ L / 孔加入包被板封闭液,在 2-8°C 下包被 16-20 小时 ;弃去包被板内的封闭液,将包被板拍干后,放置于湿度小于 30% 的 35-39°C 干燥箱中烘干 4-6 小时,即得蛋白包被板。

[0024] 酶结合物是通过以下方法制备得到的 :

将 5mg 辣根过氧化物酶溶于 1ml 浓度为 0.2mol/L、pH5.6 醋酸盐缓冲液中,再加入体

积浓度为 1% 的 2,4-二硝基氟苯的无水乙醇溶液 0.1ml, 室温下搅拌 1h, 得溶液 1; 在溶液 1 中加入新鲜配置的 0.1mol/L 的 NaIO_4 0.5ml, 4℃ 放置 30min, 得溶液 2; 在溶液 2 中加入体积浓度为 2.5% 的乙二醇 1ml, 室温下搅拌 1h, 得溶液 3; 在溶液 3 中加入辣根过氧化物酶标记的蛋白 5mg, 用 pH9.5 浓度为 1.0mol/L 的碳酸盐缓冲液调节溶液 pH 值至 9.0, 混匀, 4℃ 过夜, 得溶液 4; 在溶液 4 中加入 0.1mol/L 的硼氢化钠溶液 0.1ml, 混匀, 4℃ 放置 3h, 得溶液 5; 在溶液 5 中加入浓度为 0.01mol/L、pH7.4 磷酸盐缓冲液, 4℃ 透析过夜, 换液 3 次, 得溶液 6; 将溶液 6 离心 30min, 去除沉淀物, 所得上清液即为酶结合物。

[0025] 本实施例的包被板封闭液是由以下物质组成的

Tris-HCl 缓冲液 (pH=7.4) 0.1mol/L; PEG-20000 1g/L; 吐温 -20 5g/L; 海藻糖 10g/L; 叠氮钠 1g/L。

[0026] 2. 试剂盒的应用及检测操作程序

1) 加样: 取出检测试剂盒, 15-30℃ 放置 30 分钟; 在蛋白包被板上预设置空白、阴性、阳性对照各一孔, 其余每孔加 100 μL 样品稀释液, 再加入 100 μL 待测样品; 空白孔加入 200 μL 样品稀释液; 阴、阳性对照孔各加入 200 μL 阴、阳对照血清, 混匀后 37℃ 水浴振荡 90 分钟;

2) 洗板: 用 1:20 稀释后的洗涤液洗板 4 次, 最后一次拍干;

3) 加酶结合物: 每孔加 200 μL 酶结合物 37℃ 水浴 30 分钟, 剩余酶结合物 4℃ 保存;

4) 洗板: 洗板同步步骤 2);

5) 显色: 先加入显色剂 A 液 100 μL , 再加入显色剂 B 液 100 μL , 37℃ 水浴避光显色 10-15 分钟;

6) 终止: 每孔加 50 μL 终止液;

7) 测定: 10 分钟内以酶标仪 450nm 波长测定各孔 OD 值;

临界值确定: 阴性对照平均 OD 值 + 0.06 (若阴性对照平均 OD 值 \leq 0.06 时, 按 0.06 计算; OD > 0.06 时, 按实际测定阴性对照平均 OD 值 + 0.06 计算)。测试标本的 OD 值小于临界值则为 HCV-cAg 阴性。测试标本中的 OD 值等于或大于临界值则为 HCV-cAg 阳性。

[0027] 实施例 2

一种丙型肝炎病毒抗原-抗体联合检测试剂盒包括对照血清、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色剂、终止液、蛋白包被板和酶结合物。

[0028] 试剂盒中所用的对照血清包括阳性对照血清和阴性对照血清, 阳性对照血清的主要成份为 HCV-cAg 强阳血清及亚型抗体; 阴性对照血清是主要成份为不含 HCV-cAg 的正常人血清; 样品稀释液的主要成份为加有山羊血清的 PBS; 浓缩洗涤液的主要成份为 NaCl、磷酸盐、吐温 -20; 显色剂 A 的主要成份为过氧化尿素; 显色剂 B 的主要成份为 TMB. 2HCL; 终止液的主要成份为 2M H_2SO_4 。

[0029] 蛋白包被板是由以下步骤制得的:

pH7.4 浓度为 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液将抗原和抗体稀释成一定浓度; 按 100 μL /孔加入稀释好的包被液, 在 37℃ 下包被 2 小时; 弃去包被板内的包被液, 将包被板拍干, 按 100 μL -300 μL /孔加入包被板封闭液, 在 2-8℃ 下包被 16-20 小时; 弃去包被板内的封闭液, 将包被板拍干后, 放置于湿度小于 30% 的 35-39℃ 干燥箱中烘干 4-6 小时, 即得蛋白包被板。

[0030] 酶结合物是通过以下方法制备得到的：

将 5mg 辣根过氧化物酶溶于 1ml 浓度为 0.2mol/L、pH5.6 醋酸盐缓冲液中，再加入体积浓度为 1% 的 2,4-二硝基氟苯的无水乙醇溶液 0.1ml，室温下搅拌 1h，得溶液 1；在溶液 1 中加入新鲜配置的 0.1mol/L 的 NaIO_4 0.5ml，4℃ 放置 30min，得溶液 2；在溶液 2 中加入体积浓度为 2.5% 的乙二醇 1ml，室温下搅拌 1h，得溶液 3；在溶液 3 中加入辣根过氧化物酶标记的蛋白 5mg，用 pH9.5 浓度为 1.0mol/L 的碳酸盐缓冲液调节溶液 pH 值至 9.0，混匀，4℃ 过夜，得溶液 4；在溶液 4 中加入 0.1mol/L 的硼氢化钠溶液 0.1ml，混匀，4℃ 放置 3h，得溶液 5；在溶液 5 中加入浓度为 0.01mol/L、pH7.4 磷酸盐缓冲液，4℃ 透析过夜，换液 3 次，得溶液 6；将溶液 6 离心 30min，去除沉淀物，所得上清液即为酶结合物。

[0031] 本实施例的包被板封闭液是由以下物质组成的：

Tris-HCl 缓冲液 (pH=7.4) 0.01mol/L；聚乙烯吡咯烷酮 0.5g/L；吐温 -20 0.5g/L；海藻糖 1g/L；叠氮钠 0.1g/L。

[0032] 2. 试剂盒的应用及检测操作程序同实施例 1。

[0033] 实施例 3

一种丙型肝炎病毒抗原 - 抗体联合检测试剂盒包括对照血清、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色剂、终止液、蛋白包被板和酶结合物。

[0034] 试剂盒中所用的对照血清包括阳性对照血清和阴性对照血清，阳性对照血清的主要成份为 HCV-cAg 强阳血清及亚型抗体；阴性对照血清是主要成份为不含 HCV-cAg 的正常人血清；样品稀释液的主要成份为加有山羊血清的 PBS；浓缩洗涤液的主要成份为 NaCl、磷酸盐、吐温 -20；显色剂 A 的主要成份为过氧化尿素；显色剂 B 的主要成份为 TMB. 2HCL；终止液的主要成份为 2M H_2SO_4 。

[0035] 蛋白包被板是由以下步骤制得的：

pH7.4 浓度为 0.02mol/L 的磷酸盐缓冲液将抗原和抗体稀释成一定浓度；按 100 μL /孔加入稀释好的包被液，在 37℃ 下包被 2 小时；弃去包被板内的包被液，将包被板拍干，按 100 μL -300 μL / 孔加入包被板封闭液，在 2-8℃ 下包被 16-20 小时；弃去包被板内的封闭液，将包被板拍干后，放置于湿度小于 30% 的 35-39℃ 干燥箱中烘干 4-6 小时，即得蛋白包被板。

[0036] 酶结合物是通过以下方法制备得到的：

将 5mg 辣根过氧化物酶溶于 1ml 浓度为 0.2mol/L、pH5.6 醋酸盐缓冲液中，再加入体积浓度为 1% 的 2,4-二硝基氟苯的无水乙醇溶液 0.1ml，室温下搅拌 1h，得溶液 1；在溶液 1 中加入新鲜配置的 0.1mol/L 的 NaIO_4 0.5ml，4℃ 放置 30min，得溶液 2；在溶液 2 中加入体积浓度为 2.5% 的乙二醇 1ml，室温下搅拌 1h，得溶液 3；在溶液 3 中加入辣根过氧化物酶标记的蛋白 5mg，用 pH9.5 浓度为 1.0mol/L 的碳酸盐缓冲液调节溶液 pH 值至 9.0，混匀，4℃ 过夜，得溶液 4；在溶液 4 中加入 0.1mol/L 的硼氢化钠溶液 0.1ml，混匀，4℃ 放置 3h，得溶液 5；在溶液 5 中加入浓度为 0.01mol/L、pH7.4 磷酸盐缓冲液，4℃ 透析过夜，换液 3 次，得溶液 6；将溶液 6 离心 30min，去除沉淀物，所得上清液即为酶结合物。

[0037] 本实施例的包被板封闭液是由以下物质组成的：

Tris-HCl 缓冲液 (pH=7.4) 0.05mol/L；PEG-20000 0.5g/L；聚乙烯吡咯烷酮 0.5g/L；吐温 -20 (Tween-20) 1g/L；海藻糖 5g/L；叠氮钠 0.5g/L。

[0038] 2. 试剂盒的应用及检测操作程序同实施例 1。

[0039] 效果测试 1

选定 100 例临床样本进行检测,以实施例 1-3 制备的试剂盒作为实验例 1-3,美国 ortho 公司的丙型肝炎病毒核心抗原试剂盒作为对比例,分别对临床样本进行检测。检测结果如表 1 所示。

[0040] 表 1 100 个样本应用两种试剂的检测结果

| | 阳性 | 阴性 | 正确率 /% |
|-------|----|----|--------|
| 实验例 1 | 36 | 64 | 100 |
| 实验例 2 | 36 | 64 | 100 |
| 实验例 3 | 36 | 64 | 100 |
| 对比例 | 35 | 65 | 98 |

由表 1 可知,实施例 1-3 制备的试剂盒检测样本阴阳性结果一致,而美国 ortho 公司试剂盒检测有一例检测为假阴性,后期对该样本进行跟踪检测,该病号样本检测为丙型肝炎病毒感染。因此本实验制备的试剂盒,检测阴阳性符合率为 100%,没有漏检。

[0041] 效果测试 2

利用实施例 3 制备的试剂盒,对比丙型肝炎病毒检测的金标准实时定量 PCR 检测方法,验证两个试剂盒的相关性,对比试剂选择为中山大学达安基因股份有限公司的丙型肝炎病毒 (HCV) 核酸检测试剂盒 (PCR- 荧光探针法),同时对 40 例临床样本 (覆盖高低值) 进行检测,结果如图 3 所示。

[0042] 经过与金标准的比对,实施例 3 制备的试剂盒具有与金标准极高相关性的检测结果,检测 40 个样本相关系数 $r=0.9977$,说明两个试剂盒在检测临床样本的结果基本一致。

[0043] 通过上述效果测试可知,本发明提供了一种丙型肝炎病毒抗原-抗体联合检测试剂盒,能够同时对丙型肝炎病毒感染产生的抗原及各亚型蛋白的抗体进行检测,检测结果准确,阴阳性符合率能够达到 100%,同时比对金标准 (RT-PCR 检测试剂盒) 具有高度一致性,本发明对于临床检测丙型肝炎病毒具有很高的潜在价值。

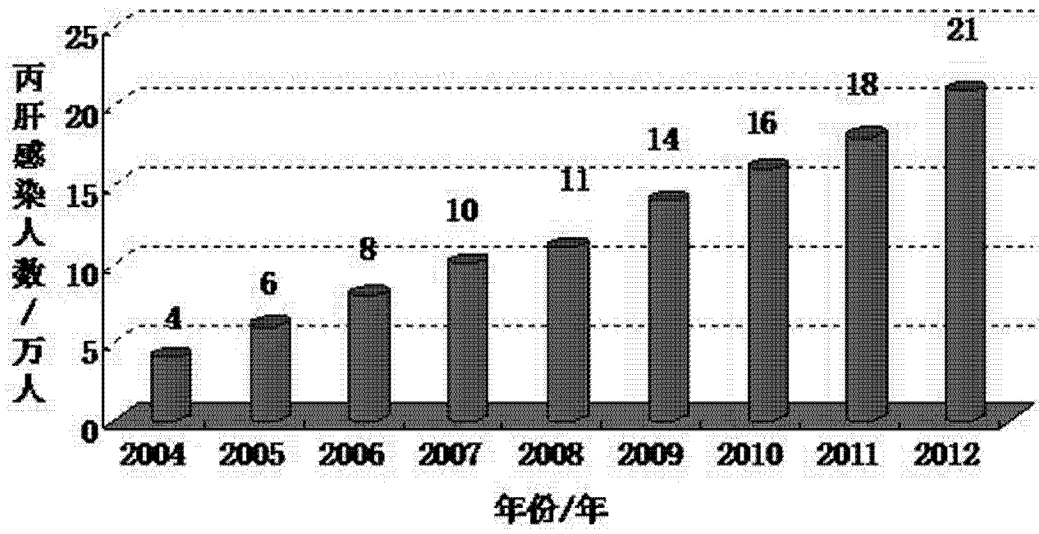


图 1

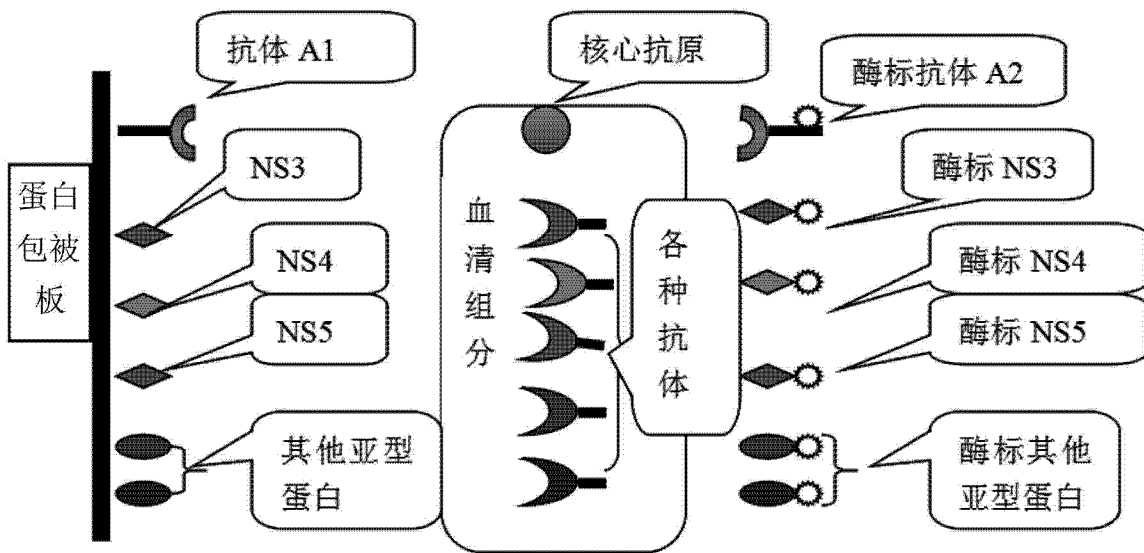


图 2

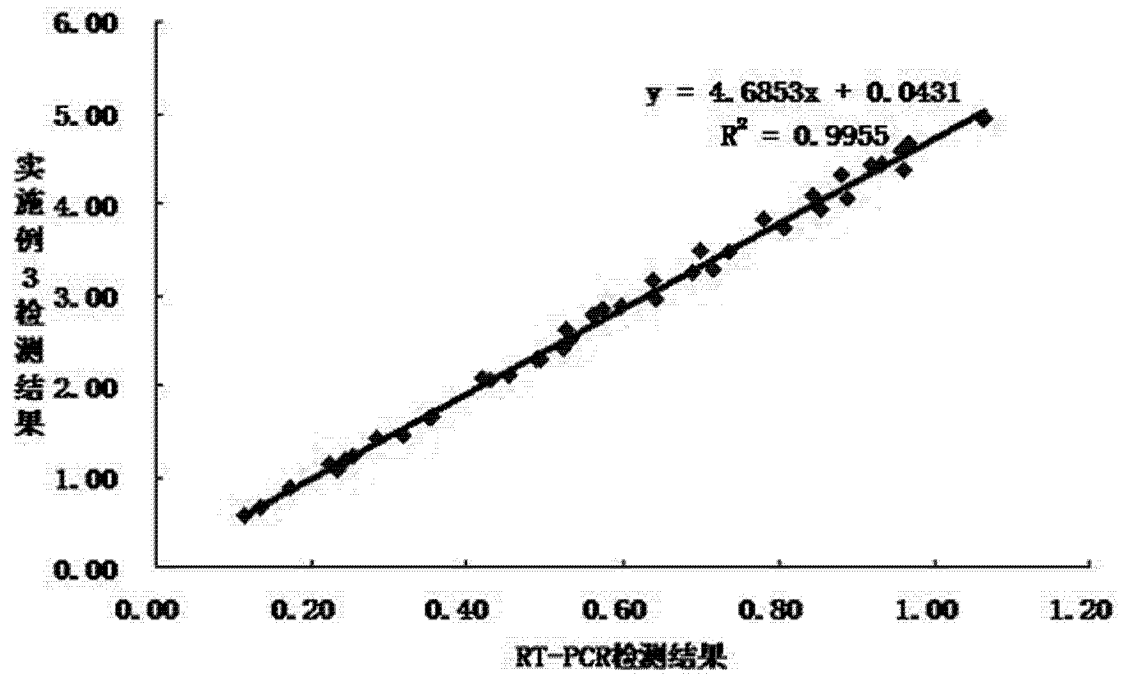


图 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种丙型肝炎病毒抗原-抗体联合检测试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | CN104407143A | 公开(公告)日 | 2015-03-11 |
| 申请号 | CN201410698139.8 | 申请日 | 2014-11-28 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 济南鑫贝西生物技术有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 山东博科生物产业有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 山东博科生物产业有限公司 | | |
| [标]发明人 | 谢清华 王进 甘宜梧 谭柏清 王绮 肖慧 包兴艳 | | |
| 发明人 | 谢清华 王进 甘宜梧 谭柏清 王绮 肖慧 包兴艳 | | |
| IPC分类号 | G01N33/576 G01N33/531 G01N33/543 | | |
| CPC分类号 | G01N33/54333 G01N33/56983 G01N33/5767 | | |
| 代理人(译) | 贾波 | | |
| 其他公开文献 | CN104407143B | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明属于丙型肝炎检测技术领域，具体涉及一种丙型肝炎病毒抗原-抗体联合检测试剂盒。试剂盒包括蛋白包被板、酶结合物、对照血清、样品稀释液、浓缩洗涤液、显色剂和终止液。本发明将抗丙型肝炎病毒核心抗原的抗体和丙型肝炎病毒其他亚型重组蛋白固定到固相载体上，能保证样本中的丙肝核心抗原及多种亚型的抗体都可以通过免疫反应吸附到固相载体上，避免了漏检；试剂盒中的酶结合物，是对包被抗体和抗原配对的对应抗体和抗原进行酶标记，能够与包被抗体和抗原配对应用，保证检测的特异性。本发明的试剂盒，选用大分子物质作为封闭液，无蛋白结构，同时在封闭液中加入蛋白保护剂，有效保证了试剂盒的稳定性。

