

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/576



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02154602.9

[43] 公开日 2004 年 6 月 9 日

[11] 公开号 CN 1502991A

[22] 申请日 2002.11.27 [21] 申请号 02154602.9

[71] 申请人 王 虹

地址 510230 广东省广州市海珠区东晓路雅  
敦街 2 号 1503

[72] 发明人 王 虹

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 血清丙型肝炎抗原 (HCV Ag) 定量 ELISA 检测技术等提供良好的技术支持。

[57] 摘要

丙型肝炎血清抗原 (HCV Ag) 定量 ELISA 检测技术是体外生物诊断生的一部分。该技术选用抗 -HCV C、NS3、NS5 抗原 McAb 作为包被及酶标抗体, 通过检测各种 HCV 标准血清及临床血清, 确定该试剂盒的各种检测指标: 特异性 99.5%、敏感性 99.5%、重复性 CV 值 < 10%、HCV Ag 检测的最低含量为 0.3pg/ml、1pg HCV Ag 对应 1800 拷贝的 HCV RNA。HCV Ag 定量 ELISA 技术原理是双抗体夹心法酶免疫显色技术, 先用三种 HCV 特异性抗体进行包被, 与 HCV 血清中的 HCV Ag 抗原特异性反应, 形成 HCV Ag/Ab 复合物, 再与抗 HCV 特异性抗体反应, 通过底物显色后来确定抗原的含量。同时用 NASBA 法测定血清 HCV RNA 的拷贝数, 确定 HCV Ag 含量与 HCV RNA 的线性关系, 为 HCV 感染的大规模筛查、早期诊断、疗效判定

知识产权出版社出版

ISSN 1008-4274

血清丙型肝炎抗原(HCV Ag)定量 ELISA 检测技术是体外诊断生物试剂的一部分。该技术方案为：选用抗-HCV C、NS3、NS5 抗原 McAb 作为包被及酶标抗体，检测各种 HCV 标准血清及临床血清，确定该试剂盒的特异性及敏感性为 99.5%，重复性 CV 值<10%，HCV Ag 检测的最低含量为 0.3pg/ml、1pgHCV Ag 对应 1800 拷贝的 HCV RNA。

要求权利保护：

1 用抗-HCV C、NS3、NS5McAb 作为包被抗体及酶标抗体制备血清 HCV Ag ELISA 检测试剂盒的技术要求保护；

2 其它类似用抗-HCV C、NS3、NS5McAb 组合制备的血清 HCV Ag ELISA 检测试剂盒的方法也要求保护。

## 血清丙型肝炎抗原（HCV Ag）定量 ELISA 检测技术

### 一、技术领域

体外生物学诊断技术（定量 ELISA 技术）

### 二、背景技术

ELISA 集中了抗原抗体反应的特异性和酶促反应的放大作用，理想的底物显示信号使其结果的判读更为客观、简单和快捷。本研究克隆、表达、纯化了 HCV C、NS3、NS5 抗原，免疫 BALB/c 小鼠，制备三种相应的单克隆抗体（McAb），作为包被抗体及酶标抗体，用供血者血清、健康人群血清、HCV 感染患者血清、其它肝炎或自身免疫患者血清、我国 SDA HCV 标准品、市售的其它公司的 HCV 标准品等检测了该试剂盒的特异性、敏感性及重复性，研制出符合国家标准 HCV Ag 定量检测试剂盒，并以国际上公认的 HCV RNA NASBA 定量检测试剂盒作为对照，确定 HCV Ag 检测的最低浓度、HCV Ag 定量与 HCV RNA 拷贝数间的关系，为 HCV 病情程度判断、疗效评价提供一个简便、价廉的检测手段。其关键技术为获得高度特异性、高亲和力的抗-HCV McAb，用三种不同的 McAb 作为包被抗体及酶标抗体，确定最佳的 ELISA 工作条件，制备了高特异度、高敏感度、重复性好、定量准确的 HCV Ag 检测试剂盒。

### 三、发明内容

该技术选用抗-HCV C、NS3、NS5 抗原 McAb 作为包被及酶标抗体，检测了各种 HCV 标准血清及临床血清，结果：该试剂盒的特异性

及敏感性为 99.5%，重复性 CV 值<10%，HCV Ag 检测的最低含量为 0.3pg/ml、1pg HCV Ag 对应 1800 拷贝的 HCV RNA。

#### 四、具体实施方式

##### HCV Ag ELISA 定量检测的主要技术方案:

1. 包被: 各取等量的纯化抗-HCV C、NS3、NS5 McAb 混合后, 用包被液(0.05mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.6)稀释后, 按 1.0 μg 抗体/100 μl/孔包被酶标板, 4℃包被 12h。

2. 封闭: 用 3% BSA+0.05%Tween-20 封闭 14h。

3. 加待测血清: 待测血清 100 μl (各种 HCV 血清标准品、HCV 感染不同阶段的血清、其它肝炎及自身免疫疾病血清、治疗前后的系列血清等)用 50 μl 裂解液预处理后, 取 100 μl 加入酶标孔, 37℃ 1h。用已知浓度的 HCV 抗原倍比稀释(用正常人血清稀释)后作为阳性对照(最低稀释至 0.1pg/ml), 以确定最低的检测浓度, 绘制标准曲线。所有血清同时用抗-HCV EIA3 进行抗-HCV 抗体的检测。为确定 HCV Ag 水平与 HCV RNA 滴度间的关系, 采用了 NASBA 定量检测试剂盒作为对照同时进行 HCV RNA 的定量, 同时绘制 HCV Ag 吸光度值(A 值)与 HCV RNA 拷贝数间(IU/ml)的对数曲线。

4. 加酶标抗体: 抗-C、NS3、NS5 McAb 用辣根过氧化物酶(HRP)标记, 作为酶标二抗, 100 μl/孔, 37℃ 1h。具体标记方法参照 Wilson 和 Nakane 的过碘酸钠氧化法: 42mg HRP 溶于 10.5ml ddH<sub>2</sub>O (浓度为 4mg/ml), 取 2.1ml 0.1mol/L NaIO<sub>4</sub>加入 HRP 溶液, 室温轻搅避光放

置 20min, 4℃对 1mmol/L 醋酸缓冲液(pH 4.4)透析过夜, 加入 0.21ml 0.2mol/L 碳酸缓冲液 (pH 9.5) 调 HRP-醛基溶液 pH 至 9.2, 立即加入 10.5ml 8mg/ml 的 McAb (10mol/L 碳酸缓冲液稀释, pH 9.5), 室温搅拌 2h, 加入 1.05ml 4mg/ml NaBH<sub>4</sub>水溶液, 4℃放置 2h, 电磁搅拌下逐滴加入等体积 100%饱和硫酸铵溶液, 4℃搅拌 1h, 静置 30min, 3 000r/min 离心 20min, 50%饱和硫酸铵溶液洗涤沉淀物 2 次, 加入 10.5ml PBS 溶解沉淀物, 4℃对 PBS 透析至蔡氏试剂检测阴性, 加入 BSA 至 10mg/ml, 分装, -70℃保存。

5. 加底物显色: 以 TMB 作为底物, 100 μ l/孔, 37℃ 5min。

6. 终止: 用 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止显色反应, 50 μ l/孔。

7. 测定 A<sub>450nm</sub> 值: 在酶标仪上测定 A<sub>450nm</sub> 值。

8. 判定结果: 根据被检血清 (P) 及阴性对照 (N) 的 A<sub>450nm</sub> 值, 如 P/N ≥ 2.1, 则确定为阳性。

9. HCV cAg 标准品最低检测浓度及最大线性范围的确定: 根据阳性判定标准, 首先确定 HCV Ag 最低检出浓度, 根据 HCV cAg 不同浓度与吸光度值的线性关系确定检测最大线性范围, 绘制吸光度值与 HCV RNA 拷贝数间的关系, 确定 1pg/ml HCV Ag 对应多少拷贝或 IU/ml 的 HCV RNA。

专利名称(译)	血清丙型肝炎抗原 ( HCV Ag ) 定量ELISA检测技术		
公开(公告)号	<a href="#">CN1502991A</a>	公开(公告)日	2004-06-09
申请号	CN02154602.9	申请日	2002-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	王宏		
申请(专利权)人(译)	王虹		
当前申请(专利权)人(译)	王虹		
[标]发明人	王虹		
发明人	王虹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/576		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

丙型肝炎血清抗原(HCV Ag)定量ELISA检测技术是体外生物诊断生的一部分。该技术选用抗 - HCV C、NS3、NS5抗原McAb作为包被及酶标抗体，通过检测各种HCV标准血清及临床血清，确定该试剂盒的各种检测指标：特异性99.5%、敏感性99.5%、重复性CV值 < 10%、HCV Ag检测的最低含量为0.3pg/ml、1pg HCV Ag对应1800拷贝的HCV RNA。

HCV Ag定量ELISA技术原理是双抗体夹心法酶免疫显色技术，先用三种HCV特异性抗体进行包被，与HCV血清中的HCV Ag抗原特异性反应，形成HCV Ag/Ab复合物，再与抗HCV特异性抗体反应，通过底物显色后来确定抗原的含量。同时用NASBA法测定血清HCV RNA的拷贝数，确定HCV Ag含量与HCV RNA的线性关系，为HCV感染的大规模筛查、早期诊断、疗效判定等提供良好的技术支持。