(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1932517 B
(45)授权公告日 2012.05.09

(21)申请号 200610099953.3
(22)申请日 2000.08.18
(30)优先权数据
233171/1999 1999.08.19 JP
(62)分案原申请数据
00124157.5 2000.08.18
(83)生物保藏信息
FERM BP-6838 1999.08.12
FERM BP-6842 1999.08.12
FERM BP-6840 1999.08.12
FERM BP-6841 1999.08.12
FERM BP-6839 1999.08.12
(73)专利权人 协和梅迪克斯株式会社
地址 日本东京
(72)发明人 守田和树 西田绫子 福井正宪
近藤大 小原道法
(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 程泳
(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/577(2006.01)
G01N 33/576(2006.01)
(56)对比文件
CN 1105703 A,1995.07.26, 全文.
US 5753430 A,1998.05.19, 全文.
US 5595868 A,1997.01.21, 全文.
审查员 王奕

权利要求书 1 页 说明书 16 页

(54)发明名称

检测或确定HCV核心抗原的方法及其中应用的用于检测或确定的试剂

(57)摘要

本发明提供了一种检测样品中HCV核心抗原的免疫测定,包括使碱性磷酸酶标记的抗-HCV核心蛋白抗体和样品中的HCV核心抗原在含有高浓度盐的水溶液中进行抗原-抗体反应,形成抗原-抗体复合物,然后测定形成的抗原-抗体复合物的碱性磷酸酶活性。还提供了一种检测HCV核心抗原的试剂,其包括碱性磷酸酶标记的抗-HCV核心蛋白抗体,浓度为0.5M至饱和的盐,以及测定碱性磷酸酶活性的试剂。

CN 1932517 B

权 利 要 求 书

1. 一种识别 HCV 核心蛋白 N- 末端 21-40 位氨基酸序列的单克隆抗体，其由杂交瘤 KTM-163(FERM BP-6841) 或杂交瘤 KTM-167(FERMBP-6842) 制备。

检测或确定HCV核心抗原的方法及其中应用的用于检测或确定的试剂

[0001] 本发明涉及检测或确定丙型肝炎病毒(HCV)的方法以及检测或确定HCV的试剂。

[0002] 用于检测感染的病因性病毒的方法是抗体试验、抗原试验和遗传试验。

[0003] 免疫测定是抗体试验和抗原试验的基本方法,广泛应用于病毒感染的诊断,输血用血液之病毒筛选试验,监测病毒感染的治疗等。遗传试验可以利用基因扩增法进行,例如聚合酶链式反应(PCR)、连接酶链式反应(LCR)和基于核酸序列的扩增(NASBA)、具有改进的标记效能的分支DNA(bDNA)方法等,这些方法能够进行高灵敏度地测定。

[0004] 遗传试验不仅用于确定诊断,而且用于检测水平在上述抗体试验和抗原试验检测水平限之下的病毒,以及评价药物治疗中的病毒消除。近来,期望将基因扩增法应用于输血用血液的筛选试验,以检测抗体试验或抗原试验不能检测到的早期病毒感染.

[0005] 然而,遗传试验还存在多种问题;例如,程序复杂,需要特殊装置,需要技术人员,花费高昂,缺乏足够的重现性和测量精确性,不适合处理大量样品,由于样品中的抑制因素易于显示假阴性结果,与样品中的蛋白质相比核酸自身不稳定,而且基因的扩增效能不一致。据报道,如果来源于病毒的核酸是RNA,则核酸仍然不太稳定,得出根据试验方法和试验样品的保存条件而变化很大的结果。

[0006] 抗病毒抗体的试验,即检测体内免疫机制产生的抗病毒抗体,是观察病毒感染效果的方法。针对抗原的抗体的产生在不同个体中各不相同;即,存在表现高抗体效价的个体和根本不能产生抗体的个体。而且,难以预测患者的实际状况和患者体内的病毒量,因为抗体量不一定对应于病毒量。还存在不能做出准确判断的问题,因为病毒感染的早期不产生抗体,这就不可能检测早期感染,还观察到抗体的非特异性反应。

[0007] 抗原试验是检测来源于病毒的抗原的方法,商业提供了多种用于来源于病毒的抗原的测定系统。对于抗原试验,主要应用利用识别病毒来源抗原的抗体的免疫测定,但与基因扩增法相比它的灵敏度不够好。于是,还存在小量病毒不能被准确检测到的问题。而且,病毒和抗病毒抗体在体内共同存在,这些共存的抗体和免疫测定中应用的抗体竞争性地与抗原反应,有时这使得难于高灵敏度地测定抗原。已经研究出一些检测HBV和其它肝炎病毒、HIV等的抗原测定系统,但它们比DNA扩增法例如PCR灵敏度低,不足以用作诊断或治疗的标志。

[0008] 近来,研究出一种用于HCV核心蛋白质(HCV的内部抗原)的测定系统(日本公开而未审的专利申请,公开号29427/96)。与测定基因的方法相比,该方法简便,能够稳定测定,该方法中应用的试剂盒用于HCV的确诊和HCV治疗效能的预测和判断。然而,与PCR法相比,该方法灵敏度不够好,因此单独该HCV核心蛋白测定法不足以用作诊断或治疗的标志。实际上,该方法的检测限为8pg/ml(PCR滴度为10^{4-5}病毒粒/ml),它高于PCR法的局限10倍以上.因此,在判断治疗效果时,HCV核心蛋白含量为8pg/ml或更低的样品被判断为阴性,这意味着该方法不能检测小量病毒。

[0009] 通常知道抗原-抗体反应中应用高浓度的盐会抑制反应,并使抗原从抗原-抗体反应产物中解离出来。

[0010] 例如，超灵敏酶免疫测定［Eiji Ishikawa，Gakkai Shuppan Center(1993)］的第9章中有下列描述：“因为蛋白质与固相的非特异性吸附依条件而改变，因此期望通过调整条件减少血清的相互作用，从而降低非特异性吸附的程度。在胰岛素夹心免疫测定中，通过降低与抗-胰岛素IgG-固定化聚苯乙烯小珠一同培养的血清浓度和减少培养时间而降低了血清干扰（表IX-14)(Ruan等，1986)。还可以通过增加无机盐的浓度降低蛋白质与固相非特异性吸附的程度，而降低血清干扰（表IX-15，图IX-18-IX-21)(Hashida，等1983)。有效浓度根据无机盐的种类而改变；然而，如果浓度太高，免疫反应自身被抑制。例如，对于氯化钠，最高浓度可以是0.3-0.4mol/l。”

[0011] 本发明的目的在于提供一种检测或确定HCV抗原的方法，它能够简便和高灵敏度地检测或确定HCV抗原，适用于需处理大量样品的血液交易和健康检查中筛选，本发明的目的还在于提供所述方法中应用的检测或确定HCV抗原的试剂。

[0012] 本发明人出乎意料地发现，与应用其它物质而不是碱性磷酸酶标记抗HCV核心蛋白抗体的情况不同，使碱性磷酸酶标记的抗HCV核心蛋白抗体和HCV核心蛋白在含有高浓度盐的水溶液中进行抗原-抗体反应，能够高灵敏度地检测HCV核心抗原，而不抑制免疫反应。本发明基于这些发现完成。

[0013] 本发明涉及下列(1)-(29)方面：

[0014] (1)检测或确定样品中HCV核心抗原的免疫测定，包括使碱性磷酸酶标记的抗-HCV核心蛋白抗体和样品中的HCV核心抗原在含有高浓度盐的水溶液中进行抗原-抗体反应，形成抗原-抗体复合物，然后测定形成的抗原-抗体复合物的碱性磷酸酶活性。

[0015] (2)按照(1)的免疫测定，其中盐是卤化碱金属盐。

[0016] (3)按照(1)的免疫测定，其中盐是氯化钠.

[0017] (4)按照(1)-(3)之一的免疫测定，其中盐浓度为0.5M至饱和。

[0018] (5)按照(1)-(4)之一的免疫测定，其中抗-HCV核心蛋白的抗体是识别HCV核心蛋白N-末端11-50位氨基酸序列中至少5个连续氨基酸残基序列的抗体。

[0019] (6)按照(1)-(4)之一的免疫测定，其中抗-HCV核心蛋白抗体选自KTM-145、KTM-153、KTM-157、KTM-163和KTM-167。

[0020] (7)按照(1)-(6)之一的免疫测定，其中样品在进行抗原-抗体反应之前，用促溶物质和/或碱性试剂处理。

[0021] (8)按照(7)的免疫测定，其中促溶物质是胍盐。

[0022] (9)按照(7)或(8)的免疫测定，其中碱性试剂是氢氧化碱金属。

[0023] (10)按照(7)-(9)之一的免疫测定，其中促溶物质的浓度为1M至饱和。

[0024] (11)按照(7)-(10)之一的免疫测定，其中碱性物质的处理在45-55℃下进行。

[0025] (12)检测或确定HCV核心抗原的试剂，包括一种碱性磷酸酶标记的抗-HCV核心蛋白抗体，一种浓度为0.5M至饱和的盐，和一种测定碱性磷酸酶活性的试剂。

[0026] (13)按照(12)的试剂，其中盐是卤化碱金属盐。

[0027] (14)按照(12)或(13)的试剂，其中盐是氯化钠。

[0028] (15)按照(12)-(14)之一的试剂，其中抗-HCV核心蛋白抗体是识别HCV核心蛋白N-末端11-50位氨基酸序列中至少5个连续氨基酸残基序列的抗体。

[0029] (16)按照(12)-(14)之一的试剂，其中抗-HCV核心蛋白抗体选自KTM-145、 KTM-153、KTM-157、KTM-163 和 KTM-167。

[0030] (17) 检测或确定 HCV 核心抗原的试剂盒，包括 (12)-(16) 之一的试剂和包含促溶物质和 / 或碱性试剂的样品处理试剂。

[0031] (18) 按照 (17) 的试剂盒，其中促溶物质是胍盐。

[0032] (19) 按照 (17) 或 (18) 的试剂盒，其中碱性试剂是氢氧化碱金属盐。

[0033] (20) 按照 (17)-(19) 之一的试剂盒，其中促溶物质的浓度为 1M 至饱和。

[0034] (21) 识别 HCV 核心蛋白 N- 末端 11-50 位氨基酸序列中至少 5 个连续氨基酸残基序列的单克隆抗体。

[0035] (22) 识别 HCV 核心蛋白 N- 末端 41-50 位氨基酸序列的单克隆抗体。

[0036] (23) 按照 (22) 的单克隆抗体，其由杂交瘤 KTM-145(FERMBP-6838) 制备。

[0037] (24) 识别 HCV 核心蛋白 N- 末端 11-30 位氨基酸序列的单克隆抗体 .

[0038] (25) 按照 (24) 的单克隆抗体，其由杂交瘤 KTM-153(FERMBP-6839) 制备。

[0039] (26) 识别 HCV 核心蛋白 N- 末端 31-50 位氨基酸序列的单克隆抗体。

[0040] (27) 按照 (26) 的单克隆抗体，其由杂交瘤 KTM-157(FERMBP-6840) 制备。

[0041] (28) 识别 HCV 核心蛋白 N- 末端 21-40 位氨基酸序列的单克隆抗体。

[0042] (29) 按照 (28) 的单克隆抗体，其由杂交瘤 KTM-163(FERMBP-6841) 或杂交瘤 KTM-167(FERM BP-6842) 制备。

[0043] 任何来源的碱性磷酸酶都可以用于制备本发明的碱性磷酸酶标记的抗 -HCV 核心蛋白抗体。例如，可以使用来源于微生物 (例如大肠杆菌) 和动物 (例如牛) 的碱性磷酸酶。

[0044] 用于制备本发明的碱性磷酸酶标记的抗 -HCV 核心蛋白抗体的抗 -HCV 核心蛋白抗体是指，可与日本公开未审的专利申请 No.145194/95 和肝病学 (Hepatology)16，886(1992) 中描述的 HCV 核心蛋白反应的抗体。可以用日本公开未审专利申请 145194/95 和 29427/96 以及肝病学，16，886(1992) 中所述的重组 DNA 技术制备 HCV 核心蛋白。可以按照制备单克隆抗体的已知方法，例如，单克隆抗体试验手册 (Sakujitoyama 编，Kodansha) 中描述的方法，利用上述重组 HCV 核心蛋白作为免疫原制备抗体。

[0045] 将上述免疫原对动物例如小鼠、大鼠、仓鼠、兔、豚鼠、山羊、绵羊或家禽，优选小鼠或大鼠施用，用于免疫接种以制备单克隆抗体。

[0046] 可以按照已知方法 [例如 Saido 和 Toyoshima，Shin Seikagaku JikkenKoza(关于生化试验的新文献)1,389(1990)Tokyo Kagaku Dojin] 进行免疫接种。例如，将免疫原用完全或不完全弗氏佐剂乳化，将得到的乳液给动物腹膜内、皮下或肌内施用。以 7-30 天，优选 12-16 天的有规律的间隔给药两次或多次，优选 2-4 次，完成免疫接种。

[0047] 可以从免疫动物的脾、淋巴结、外周血等处得到生成抗体的细胞 . 还可以通过所谓的“体外免疫”，即通过直接免疫从未免疫动物的脾、淋巴结、外周血等中收集到的负责抗体产生的细胞，得到产生抗体的细胞 [Arai 和 Ohta，试验药物，6，43(1988)]。

[0048] 对用于与产生抗体的细胞融合的骨髓瘤细胞没有特别限制，但优选使用来源于与产生抗体的细胞来源动物相同种动物的细胞系。还优选使用具有特定药物标记的骨髓瘤细胞以便有效地选择已适当融合的细胞。例如，优选使用 8- 氮杂鸟嘌呤抗性骨髓瘤细胞，因为它们不能在含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基 (下文称为 HAT 培养基) 中

生长，但这些骨髓瘤细胞和正常细胞融合得到的融合细胞能够在 HAT 培养基中生长，因此可以从未融合的骨髓瘤细胞中区分出来。具体实施例是 P3x63-Ag.8.653[免疫学杂志，123,1548(1979)]，P3x63-Ag.8.UI[微生物免疫学当前课题(Curr.Topics.Microbiol.Immunol.),81,1(1978)](下文简称为 P3U1) 和 Sp/O-Ag14[自然,276,269(1978)]。

[0049] 可以通过 Köhler 和 Milstein[自然,256,495(1975)] 研究出来的方法和它的各种改进方法进行细胞融合。在通常应用的方法中，产生抗体的细胞和骨髓瘤细胞以 10-3:1 的比例混合，然后用 30-50％的聚乙二醇(平均分子量 :1500-6000) 作为融合试剂处理。还可以通过电穿孔进行融合 [Ohkouchi 等，试验药物,6,50(1988)]。

[0050] 已经历细胞融合处理的细胞悬浮于选择培养基(例如，HAT 培养基)，在适于选择所需细胞的培养容器例如 96- 孔培养板中培养，以选择性地使融合细胞生长。通过例如酶免疫测定或放射免疫测定等方法检测融合细胞的培养基上清液中是否存在所需抗体，从上述生长的融合细胞中筛选产生抗 HCV 核心蛋白抗体的细胞。通过限制性稀释法、软琼脂培养法等从筛选的细胞得到单细胞克隆，建立生产 HCV 核心蛋白特异性单克隆抗体的杂交瘤细胞系。

[0051] 得到的杂交瘤在适当的培养基中培养，或者移植到动物腹膜内，使其在腹水中生长。可以从收集的培养物或腹水得到单克隆抗体。如果需要，可以纯化后使用培养物或腹水中的抗体 . 可以通过各种方法，例如利用硫酸铵进行的盐析分级分离、离子交换色谱、凝胶过滤柱色谱、利用蛋白 A 或蛋白 G 进行的亲和柱色谱、以及利用抗原 - 固定化凝胶进行的亲和柱色谱，以及它们的组合进行纯化。本发明中可用的抗体包括抗体片段，例如通过使上面获得的抗体接受酶例如胃蛋白酶和 / 或还原处理得到的 Fab、Fab' 和 F(ab)2。

[0052] 优选的抗体是识别 HCV 核心蛋白 N- 末端 11-50 位氨基酸序列至少 5 个连续氨基酸残基序列的抗体。

[0053] 产生本发明单克隆抗体的杂交瘤的具体例子是杂交瘤 KTM-145、杂交瘤 KTM-153、杂交瘤 KTM-157、杂交瘤 KTM-163 和杂交瘤 KTM-167。

[0054] 杂交瘤 KTM-145、杂交瘤 KTM-153、杂交瘤 KTM-157、杂交瘤 KTM-163 和杂交瘤 KTM-167 于 1999 年 8 月 12 日保藏于国家生物科学和人类技术研究所，工业科学和技术处，国际贸易和工业部，1-3，Higashi1-chome，Tsukuba-shi，Ibaraki-ken，305-8566，日本，登记号分别为 FERM BP-6838、FERM BP-6839、FERM BP-6840、FERM BP-6841 和 FERM BP-6842。杂交瘤 KTM-145、杂交瘤 KTM-153、杂交瘤 KTM-157、杂交瘤 KTM-163 和杂交瘤 KTM-167 产生的单克隆抗体在下文分别称为 KTM-145、KTM-153、KTM-157、KTM-163 和 KTM-167。

[0055] 按照例如戊二醛法、高碘酸法、马来酰亚胺法、吡啶二硫化物法和应用已知交联剂的方法(参见，例如，Eiji Ishikawa，酶免疫测定，IgakuShoin)，将抗 -HCV 核心蛋白抗体与碱性磷酸酶经共价键结合得到本发明的碱性磷酸酶标记的抗 -HCV 核心蛋白抗体 .

[0056] 在一个实施方案中，用亚胺硫烷等巯基化的抗体与用 SMCC(4-[N- 马来酰亚胺甲基]- 环己烷 -1- 羧酸琥珀酰亚胺酯) 马来酰亚胺基化的碱性磷酸酶混合。

[0057] 如本文使用的“含有高浓度盐的水溶液”指含有 0.5M 或更多无机盐的水溶液。稳定的无机盐包括卤化碱金属盐、例如，氯化钠、氯化钾和氯化锂。无机盐的浓度优选 0.5M 至饱和，更优选 1-3M。如果需要，含有高浓度盐的水溶液可以包括缓冲液、除氯化钠之外的盐、表面活性剂、血清、防腐剂、免疫反应中的非特异性吸附抑制剂等。

[0058] 上述溶液中可以使用任何缓冲液。合适的缓冲液是 Tris 缓冲液。表面活性剂的例子是 Triton X-100、Triton X-705 和 Tween20. 防腐剂的例子是叠氮钠。血清的例子是正常小鼠血清。除氯化钠之外其它盐的例子是氯化锌和氯化镁。免疫反应中非特异性吸附抑制剂的例子是蛋白质，例如牛血清白蛋白和酪蛋白，和商业产品 Block Ace(DainipponPharmaceutical Co.，Ltd.)。

[0059] 可以通过本发明的方法测定的试验样品包括全血、血清、血浆、尿和淋巴液。

[0060] 待测定 HCV 抗原存在与否的样品可以如上述使用，也可以利用病毒分离试剂浓缩后使用。分级分离试剂的例子是用于密度梯度的试剂，例如聚乙二醇 (PEG) 试剂和 Percoll。PEG 的分子量和浓度没有特别限制，但分子量优选 1000-20000，浓度优选在 3-10％范围内。

[0061] 优选用具有蛋白质变性活性、蛋白质溶解活性、和蛋白质分散活性的试剂处理样品。试剂的例子是促溶物质、碱性试剂、酸性试剂和表面活性剂。优选促溶物质和碱性试剂。

[0062] 促溶物质的例子是脲、盐酸胍和硫氰酸胍。优选脲和盐酸胍。盐酸胍的浓度优选 1-8M。

[0063] 作为碱性试剂，可以应用任何水溶液中 pH 为 10 或更高的碱性试剂。适当的碱性试剂的例子是氢氧化碱金属盐 . 优选氢氧化钠溶液。

[0064] 酸性试剂的例子是盐酸、硫酸、乙酸、三氟乙酸和三氯乙酸。

[0065] 适当的表面活性剂包括非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂和两性表面活性剂。

[0066] 优选用促溶物质和碱性试剂二者处理样品。用碱性试剂处理优选在 45-55℃下进行。

[0067] 优选将用酸性试剂或碱性试剂处理的样品中和后，进行抗原 - 抗体反应。样品用酸性试剂处理的情况下，用碱性试剂进行中和 ;样品用碱性试剂处理的情况下，用酸性试剂进行中和。在这两种情况下，可还使用具有高缓冲容量的溶液。

[0068] 对于本发明的免疫测定没有特别限制，可以使用本领域广泛使用的方法，例如夹心免疫测定。

[0069] 具体地说，本发明的免疫测定可以通过夹心免疫测定，例如已知的 1 步法、延迟 1 步法和 2 步法，利用结合到固相支持物上的抗体和碱性磷酸酶标记的抗 -HCV 核心蛋白抗体进行。优选的是 2 步法，其包括 (1) 将抗体结合的固相和含抗原的水溶液样品一同保温，然后用清洗溶液清洗固相，(2) 向其中加入含有标记抗体的水溶液和高浓度盐，然后进一步培养和清洗，以及 (3) 测定固相上形成的抗原 - 抗体复合物的碱性磷酸酶活性。

[0070] 上述方法中可以使用常规免疫测定中使用的各种固相支持物 . 有用的固相支持物的例子是塑料试管、微板孔、玻璃珠、塑料珠、各种膜和磁性颗粒 (参见，例如，Eiji Ishikawa，酶免疫测定，Igaku Shoin)。待结合固相支持物的抗体的例子是上述抗 -HCV 核心蛋白单克隆抗体，优选使用识别不同于碱性磷酸酶标记之抗体识别表位的抗体。抗体与固相支持物的结合可以通过已知方法进行，例如物理吸附和化学结合。

[0071] 碱性磷酸酶的活性可以利用色原、荧光试剂、发光试剂等通过常规方法测定。(参见，例如，Bunji Maruo，酶手册，Asakura Shoten)。可以使用本领域已知的任何色原，它们包括能够灵敏检测的酶循环反应试剂，具体是，利用催化辅酶 NAD(AmpliQ，Dako) 等氧

化-还原循环的酶的酶循环反应试剂。荧光试剂是4-甲基伞形酮衍生物和2-羟基二苯基衍生物。

[0072] 发光试剂的例子是具有二氧杂丁环(dioxetane)结构的衍生物,具体说是AMPPD[3-(2'-螺金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯基-1,2-二氧杂丁环],CDP-星[4-氯-3-(甲氧基螺{1,2-二氧杂丁环-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)-苯基磷酸氢二钠]和CSPD[3-(4-甲氧基螺{1,2-二氧杂丁环-3,2'-(5'-氯)三环[3.3.1.1^{3,7}]癸烷}-4-基)苯基磷酸氢二钠]。不具有二氧杂丁环结构的发光原衍生物也可以使用,具体是APS化合物([10-甲基-9(10H)-亚吖啶基]苯氧甲基磷酸氢二钠等。

[0073] 检测或确定本发明的HCV核心抗原的试剂包括碱性磷酸酶标记的抗-HCV核心蛋白抗体,浓度为0.5M至饱和的盐,和测定碱性磷酸酶活性的试剂。试剂可以进一步包括抗-HCV核心蛋白抗体-固定化固相和标准HCV核心蛋白。本发明的试剂可以为包括含有上述成分试剂的试剂盒形式。

[0074] 试剂盒可以进一步含有样品浓缩试剂和样品处理试剂。样品浓缩试剂的例子是上述分级分离试剂。样品处理试剂的例子是上述具有蛋白质变性活性、蛋白质溶解活性和蛋白质分散活性的试剂。用于测定碱性磷酸酶活性的试剂包括含有上述色原、荧光物质或发光物质的试剂。抗-HCV核心蛋白抗体的例子是上述单克隆抗体。

[0075] 本发明的某些实施方式以下面实施例方式举例说明。本发明的这些实施例不构成本发明范围的限制。至于血清样品,使用Uniglobe或BostonBiomedica,Inc.(BBI)商业提供的样品。

[0076] 参考实施例1:HCV核心蛋白的制备

[0077] 按照日本公开未审专利申请No.29437/96描述的方法制备和纯化具有HCV核心蛋白N-末端125个氨基酸残基的重组HCV核心蛋白。

[0078] 利用BioRad蛋白质测定试剂盒(BioRad)和BCA蛋白质测定试剂盒(Pierce)计算纯化的重组HCV核心蛋白质的浓度。

[0079] 参考实施例2:抗-HCV核心蛋白抗体的制备

[0080] 用完全弗氏佐剂乳化从参考实施例1中得到的HCV核心蛋白(25-100μg),得到的乳剂施于BALB/C小鼠或SD大鼠用于免疫。2-3周后,用不完全弗氏佐剂乳化HCV核心蛋白(25-100μg),得到的乳剂施于动物进行加强免疫。确定抗体效价升高后,静脉给药25-100μg HCV核心蛋白。3-4天后,从动物中取出脾,制备脾细胞。然后,预先在RPMI-1640培养基中培养的小鼠骨髓瘤细胞(P3U1)与脾细胞以1:2-1:5的比率混合,然后用聚乙二醇进行细胞融合。融合的细胞悬浮于HAT培养基,将得到的悬浮液移入96孔培养板,然后在CO_2培养箱中于37℃培养。以下述方式筛选抗-HCV核心蛋白的抗体。

[0081] 将HCV核心蛋白悬浮于8M盐酸胍溶液或10M脲溶液,至浓度为2μg/ml,得到的悬浮液移入96孔ELISA平板(Nunc),每孔50μl,4℃静置过夜,使HCV核心蛋白吸附到平板上。用含有1%牛血清白蛋白(下文简称为BSA)的磷酸盐缓冲盐水(下文简称为PBS溶液)封闭后,将50μl融合细胞的培养上清液置于各孔,然后在室温下反应1小时。清洗后,向各孔中加入过氧化物酶标记的抗-小鼠IgG抗体,然后室温下反应1小时。清洗后,向孔中加入底物ABTS,观察到颜色的孔被筛选出来,用来得到产生识别HCV核心蛋白的抗体的

杂交瘤 KTM-145、KTM-153、KTM-157、KTM-163 和 KTM-167。将杂交瘤分别移植到降植烷等处理的小鼠腹腔,得到在腹水中产生的单克隆抗体。按照常规方法,利用蛋白质 A 柱 (Sakuji Toyama 编,单克隆抗体试验手册,Kodansha) 纯化获得的单克隆抗体。得到的抗体被分别称为 KTM-145、KTM-153、KTM-157、KTM-163 和 KTM-167。

[0082] 参考实施例 3 :单克隆抗体的反应特异性

[0083] 利用 HCV 核心蛋白 - 或大肠杆菌裂解液吸附的 96 孔微滴平板,确定参考实施例 2 中得到的单克隆抗体的反应特异性。结果证明 KTM-145、KTM-153、KTM-157、KTM-163 和 KTM-167 与 HCV 核心蛋白特异性反应。还通过 Western 印迹确证它们表现相同的反应。另外,利用 HCV 核心蛋白的部分肽进行了表位分析,由此证实 KTM-145 识别 HCV 核心蛋白 N- 末端 41-50 位的序列,KTM-153 识别 11-30 位的序列,KTM-157 识别 31-50 位的序列,KTM-163 和 KTM-167 识别 21-40 位的序列。

[0084] 参考实施例 4 :碱性磷酸酶标记的单克隆抗体的制备

[0085] 按照常规方法 (Eiji Ishikawa,酶免疫测定,Igaku Shoin),通过马来酰亚胺化将参考实施例 2 中得到的各种单克隆抗体与碱性磷酸酶 (Boehringer Mannheim) 结合。单克隆抗体 (5mg) 对 50mM Tris 缓冲液 (pH8) 透析,然后用亚氨基硫烷巯基化。通过 SephadexG-25 柱 (Pharmacia) 从亚氨基硫烷化的抗体中除去游离亚氨基硫烷。用马来酰亚胺化试剂 SMCC(Pierce) 使碱性磷酸酶马来酰亚胺化,通过 G-25 柱从中除去游离的 SMCC。

[0086] 将上述巯基化的单克隆抗体和马来酰亚胺化的碱性磷酸酶混合,使其在 4℃下反应过夜。反应完成后,用 Sephacryl S-200 柱 (Pharmacia) 纯化形成的碱性磷酸酶标记的单克隆抗体。

[0087] 用标记的抗体稀释液 [含有 50mM Tris 缓冲液 (pH7.6),10mM 氯化镁,0.1mM 氯化锌和 20% Block Ace(Dainippon Pharmaceutical Co.,Ltd.) 的水溶液] 将纯化的碱性磷酸酶标记抗体稀释到固定浓度,用于酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

[0088] 参考实施例 5 :固相的制备

[0089] 用含有 0.1% 叠氮钠的 PBS 将参考实施例 2 中得到的各种单克隆抗体稀释至终浓度为 5μg/ml。将抗体稀释液置于固相 96 孔微滴平板的孔中,每孔 200μl,4℃静置过夜。用 PBS 清洗后,向各孔中加入 300μl 含有 0.1% BSA 的 PBS,然后使平板在 4℃静置过夜,以使封闭。

[0090] 参考实施例 6 :过氧化物酶标记的单克隆抗体的制备

[0091] 按照常规方法将参考实施例 2 中得到的各种单克隆抗体和过氧化物酶 (Toyobo Co.,Ltd.) 通过马来酰亚胺化结合。单克隆抗体 (5mg) 对 50mM Tris 缓冲液 (pH8) 透析,然后用亚氨基硫烷巯基化。通过 SephadexG-25 柱 (Pharmacia) 从亚氨基硫烷化的抗体中除去游离亚氨基硫烷.用马来酰亚胺化试剂 SMCC(Pierce) 使过氧化物酶马来酰亚胺化,通过 G-25 柱从中除去游离 SMCC。

[0092] 将上述巯基化的单克隆抗体和马来酰亚胺化的过氧化物酶混合,使其在 4℃下反应过夜。用 Sephacryl S-200 柱 (Pharmacia) 纯化获得的过氧化物酶标记的单克隆抗体。

[0093] 用标记的抗体稀释液 [含有 50mM Tris 缓冲液 (pH7.6),10mM 氯化镁,0.1mM 氯化锌和 20% Block Ace(Dainippon Pharmaceutical Co.,Ltd.) 的水溶液] 将纯化的标记抗体稀释到固定浓度,用于 ELISA。

[0094] 实施例 1:重组 HCV 核心蛋白的确定

[0095] 参考实施例 1 中得到的重组 HCV 核心蛋白用含有 0.1% BSA 的 PBS 稀释至浓度为 0-100pg/ml。

[0096] 将各重组 HCV 核心蛋白的稀释液置于参考实施例 5 中制备的微平板的孔中,每孔 200μl,然后在室温下反应 1 小时。用清洗液(含有 AMPAK 灵敏度增强试剂,Dako)清洗后,向孔中加入参考实施例 4 得到的标记抗体。用含有 50mM Tris 缓冲液(pH7.6),10mM 氯化镁,0.1mM 氯化锌,20% Block Ace(Dainippon Pharmaceutical Co.,Ltd.)和 0-3M 氯化钠的溶液稀释标记抗体,得到的稀释液移入孔中,每孔 200μl。室温下振荡反应 1 小时后,用清洗液清洗孔,向各孔加入 200μl 颜色试剂[酶循环反应试剂(Dako)],然后在室温下振荡反应 20 分钟。向各孔加入 100μl 混入上述试剂的反应终止剂,测定 490nm 主波长和 660nm 辅波长处的吸光度。该试验中,KTM-145 应用于固相,KTM-163 应用于碱性磷酸酶标记。

[0097] 结果显示在表 1 中。在表 1 中,各抗原浓度的数字表示吸光度(Abs)。

[0098] 表 1

[0099]

氯化钠的浓度(M)	抗原浓度(pg/ml)		S/N 比值
	0	100	
0	0.146	0.226	1.55
0.25	0.145	0.317	2.18
0.5	0.146	0.453	3.11
0.75	0.144	0.583	4.06
1.0	0.150	0.666	4.45
1.5	0.151	0.818	5.43
2.0	0.152	0.925	6.10
3.0	0.195	1.032	5.29

[0100] 标记抗体稀释液中氯化钠浓度的升高几乎不影响无抗原(0pg/ml)试验组的吸光度;然而,它使含有抗原(100pg/ml)试验组的吸光度增加。在表中,S/N 的比率表明,含有抗原(100pg/ml)的试验组与无抗原(0pg/ml)的试验组之间吸光度的比值。发现添加氯化钠增加 S/N 比值,能够高灵敏度地检测抗原。也就是说,上述结果表明应用本发明的方法能够准确地判断尽管存在抗原但不能被判断抗原为阳性的样品,因为在缺乏氯化钠的情况下,存在抗原的样品的吸光度与无抗原样品相比轻微增加。

[0101] 实施例 2:重组 HCV 核心蛋白的确定

[0102] 参考实施例 1 中得到的重组 HCV 核心蛋白用含有 0.1% BSA 的 PBS 稀释至浓度为 0-20pg/ml。

[0103] 将各重组 HCV 核心蛋白的稀释液置于参考实施例 5 制备的微平板的孔中,每孔 200μl,然后在室温下反应 1 小时。用清洗液(含有 AMPAK 灵敏度增强试剂,Dako)清洗后,向孔中加入参考实施例 4 得到的标记抗体。用含有 50mM Tris 缓冲液(pH7.6),10mM 氯化镁,0.1mM 氯化锌,20% Block Ace(Dainippon Pharmaceutical Co.,Ltd.)和 0-2M 氯化钠的溶液稀释标记抗体,得到的稀释液移入孔中,每孔 200μl。室温下振荡反应 1 小时后,用清洗液清洗孔,向各孔加入 200μl 颜色试剂[酶循环反应试剂(Dako)],然后在室温下振荡反应 40 分钟。向各孔加入 100μl 混入上述试剂的反应终止剂,测定 490nm 主波长和 660nm

辅波长处的吸光度。该试验中，KTM-145 应用于固相，KTM-163 应用于碱性磷酸酶标记。

[0104] 结果显示在表 2 中。在表 2 中，各抗原浓度的数字表示吸光度 (Abs)。

[0105] 表 2

[0106]

氯化钠的浓度（M）	抗原浓度（pg/ml）			
	0	5	10	20
0	0.178	0.345	0.448	0.747
0.25	0.182	0.371	0.539	0.924
0.5	0.180	0.448	0.691	1.284
0.75	0.239	0.618	0.959	1.676
1.0	0.147	0.595	1.059	2.061
1.5	0.162	0.725	1.291	2.447
2.0	0.166	0.754	0.389	2.557

[0107] 标记抗体稀释液中氯化钠浓度的升高几乎不影响无抗原 (0pg/ml) 试验组的吸光度；然而，它使含有抗原的试验组的吸光度增加。该结果表明应用本发明的方法能够准确地判断尽管存在抗原但不能被判断抗原为阳性的样品，因为在缺乏氯化钠的情况下，与无抗原样品相比其吸光度轻微增加。

[0108] 实施例 3：检测限

[0109] 用含有 0.1% BSA 的 PBS 将参考实施例 1 中得到的重组 HCV 核心蛋白稀释至浓度为 0-10pg/ml。

[0110] 将各重组 HCV 核心蛋白的稀释液置于参考实施例 5 中制备的微平板的孔中，每孔 200μl，然后在室温下反应 1 小时．用清洗液（含有 AMPAK 灵敏度增强试剂，Dako）清洗后，向孔中加入参考实施例 4 得到的标记抗体。用含有 50mM Tris 缓冲液 (pH7.6)，10mM 氯化镁，0.1mM 氯化锌，20% Block Ace(Dainippon Pharmaceutical Co.，Ltd.) 和 0 或 1M 氯化钠的溶液稀释标记抗体，得到的稀释液移入孔中，每孔 200μl。室温下振荡反应 1 小时后，用清洗液清洗孔，向各孔加入 100μl 颜色试剂［酶循环反应试剂 (Dako)］，然后在室温下振荡反应 30 分钟。向各孔加入 100μl 混入上述试剂的反应终止剂，测定 490nm 主波长和 660nm 辅波长处的吸光度。该试验中，KTM-145 应用于固相，KTM-163 应用于碱性磷酸酶标记。

[0111] 结果显示在表 3 中。在表 3 中，各盐浓度的数字表示吸光度 (Abs)。

[0112] 表 3

[0113]

抗原浓度（pg/ml）	盐浓度（M）	
	0	1
0	0.100	0.067
0.125	未测出	0.080
0.25	未测出	0.096
0.5	未测出	0.120
1	0.114	0.178
2	未测出	0.299
5	0.172	0.686
10	未测出	1.325

[0114] 标记抗体稀释液中氯化钠浓度的升高使极端低浓度抗原的检测成为可能。如表3所示，当不加氯化钠时，观察到不含抗原的溶液和含有1pg/ml抗原的溶液之间10mAbs数量级的吸光度差异，而加有1M氯化钠时，不含抗原的溶液和含0.125pg/ml抗原的溶液之间即具有10mABs数量级的吸光度差异。表明，加入氯化钠增强了检测灵敏度。

[0115] 比较实施例1

[0116] 用含有0.1% BSA的PBS将参考实施例1中得到的重组HCV核心蛋白稀释至浓度为0、10、100和1000pg/ml。

[0117] 将各重组HCV核心蛋白的稀释液置于参考实施例5制备的微平板的孔中，每孔200μl，然后在室温下反应1小时。用清洗液（含有AMPAK灵敏度增强试剂，Dako）清洗后，向孔中加入参考实施例6得到的过氧化物酶标记的抗体。用含有50mM Tris缓冲液(pH7.2)，0.1% BSA和0-4M氯化钠的溶液稀释标记抗体，得到的稀释液移入孔中，每孔200μl。室温下振荡反应1小时后，用清洗液清洗孔，向各孔加入200μl颜色试剂TMB(四甲基联苯胺，Intergen Co.)，然后在室温下振荡反应30分钟。向各孔加入100μl1N硫酸，终止颜色反应，测定450nm主波长和660nm辅波长处的吸光度。该试验中，KTM-145应用于固相，KTM-163应用于碱性磷酸酶标记.

[0118] 结果显示在表4中。在表4中，各抗原浓度的数字表示吸光度(Abs)。

[0119] 表4

[0120]

氯化钠的浓度（M）	抗原浓度（pg/ml）			
	0	10	100	1000
0	0.125	0.136	0.144	0.296
0.1	0.166	0.188	0.202	0.479
0.2	0.191	0.211	0.251	0.606
0.5	0.217	0.234	0.310	0.893
1.0	0.234	0.284	0.372	1.076
1.5	0.283	0.331	0.388	1.050
2.0	0.403	0.387	0.411	1.141
3.0	0.616	0.588	0.624	1.138
4.0	0.898	0.839	0.915	1.293

[0121] 当使用过氧化物酶标记的抗体时，加入氯化钠降低了无抗原反应系统的反应特异性。在含有抗原的反应系统中，氯化钠浓度的升高没有改善反应特异性。

[0122] 实施例 4 :人血清样品的测定

[0123] 按照日本公开未审的专利申请 No.29427/96 描述的方法处理人血清。即将 50μ120％ PEG4000 加入 200μ1 血清样品，将得到的混合物在冰上静置 1 小时。4℃下 4000xg 离心 5 分钟，沉淀悬浮于 50μ1 的 50mM Tris 缓冲液 (pH8.0)，向其中加入 50μ1 的 0.5M 氢氧化钠溶液，在 37℃下处理 30 分钟。然后，用 50μ1 含有 0.3％ TritonX-100 的 0.5M 磷酸氢钠溶液中和混合液。用 300μ10.1％ BSA-PBS 溶液将得到的混合液稀释三倍，制备测定液。对于人血清样品，使用抗 HCV 抗体阳性样品 (Uni-2 和 0401) 和正常样品作为对照，按照实施例 1 测定吸光度 (Abs) 同样的方法测定。结果如表 5 所示

[0124] 表 5

[0125]

氯化钠浓度	正常样品	样品 Uni-2		样品 0401	
(M)	吸光度	吸光度	S/N 比值	吸光度	S/N 比值
0	0.149	0.166	1.11	0.201	1.35
0.25	0.148	0.189	1.27	0.269	1.81
0.50	0.146	0.237	1.63	0.385	2.65
0.75	0.149	0.287	1.93	0.464	3.12
1.00	0.152	0.314	2.07	0.542	3.57
1.50	0.156	0.360	2.30	0.665	4.26
2.00	0.164	0.397	2.42	0.726	4.43
3.00	0.241	0.526	2.19	0.953	3.96

[0126] 如表 5 所示，当使用正常血清样品时，升高标记抗体稀释液中氯化钠的浓度仅略微增加吸光度。另一方面，当使用抗 -HCV 抗体 - 阳性血清样品，升高标记抗体稀释液中氯化钠的浓度，能够增加吸光度。结果表明通过应用本方法能够正确判断含低水平抗原样品的抗原 - 阳性。还可以从 S/N 比值清楚地看到，当氯化钠浓度为 0.5-3M，尤其为 1-3M 时，灵敏度显著增加。

[0127] 实施例 5 :用盐酸胍和碱处理样品

[0128] 将 50μ1 的 20％ PEG4000 加入 200μ1 血清样品，将得到的混合液在冰上静置 1 小时。4℃下 4000xg 离心 5 分钟，沉淀悬浮于 50μ1 含有 0-8M 盐酸胍的 50mM Tris 缓冲液 (pH8.0) 用来变性，向所得悬浮液中加入 50μ10.5M 氢氧化钠溶液，在 37℃下处理 30 分钟。然后，用 0.5M 磷酸氢钠溶液中和得到的混合液。然后用 0.1％ BSA-PBS 溶液将得到的混合液稀释三倍，制备测定液。按照如实施例 4 的同样方法进行测定，除了氯化钠的浓度为 1M。对于人样品，使用正常人血清样品和 3 个抗 -HCV 抗体 - 阳性样品 (U-19，U-21 和 U-29)。结果如表 6 所示。在表 6 中，各样品的数字表示吸光度 (Abs)。

[0129]　表 6

[0130]

盐酸胍 (M)	正常样品	U-19	U-21	U-29
0	0.129	0.890	0.350	0.320
2	0.129	1.020	0.503	0.499
4	0.059	1.358	0.816	0.631
6	0.045	1.982	1.226	0.912
8	0.052	2.614	1.798	1.268

[0131]　如表 6 所示，取决于盐酸胍的浓度，吸光度增加。

[0132]　实施例 6

[0133]　用脲和盐酸胍重复实施例 5 的同样程序。脲的浓度为 10M，盐酸胍的浓度为 8M。作为样品，使用正常人血清样品和 4 个抗 -HCV 抗体 - 阳性血清样品 (104、106、187 和 197)。结果如表 7 所示。在表 7 中，各试剂的数字表示吸光度 (Abs)。

[0134]　表 7

[0135]

样品	盐酸胍	脲
正常	0.044	0.041
104	0.078	0.059
106	0.654	0.416
187	0.429	0.252
197	0.165	0.042

[0136]　如表 7 所示，当用脲处理样品时，正常人血清与样品 104 和 197 的吸光度之间没有显著差异，这两个样品不能判断为阳性。然而用盐酸胍处理能够判断这两个样品为阳性。

[0137]　实施例 7 :关于碱处理之温度的试验

[0138]　重复实施例 6 的同样程序，除了改变碱处理的温度。作为血清样品，使用样品 6、9 和 138。在 37℃、50℃、70℃和 100℃进行碱处理。结果如表 8 所示。在表 8 中，各样品的数字表示吸光度 (Abs).

[0139]　表 8

[0140]

温度 (℃)	正常样品	样品 6	样品 9	样品 138
37	0.065	0.438	0.198	0.405
50	0.064	0.482	0.218	0.474
70	0.061	0.302	0.151	0.345
100	0.058	0.089	0.076	0.102

[0141]　如表 8 所示，血清碱处理的优选温度为 50℃左右。

[0142]　实施例 8 :各检测方法的比较

[0143]　以下列方式进行本发明的测定法。将 50μl 的 20% PEG4000 加入 200μl 各血清样品，将得到的混合物在冰上静置 1 小时。4℃下 4000xg 离心 5 分钟，沉淀悬浮于 50μl 含有 8M 用于变性的盐酸胍的 50mMTris 缓冲液 (pH8.0)。向得到的悬浮液中加入 50μl 0.5M 氢氧化钠溶液，在 50℃下处理 30 分钟，用含有 0.3% Triton X-100 的 0.5M 磷酸氢钠溶液中和得到的混合液。然后用 0.1% BSA-PBS 溶液将得到的混合液稀释三倍，制备测定液。按照实施例 4 的同样方法进行测定，除了标记抗体稀释液中使用 2M 氯化钠。

[0144]　另外，用下列市售试剂进行相同样品的测定，以比较本方法的灵敏度，市售试剂

为:Immunocheck F-HCV Ag core,它是一种测定 HCV 核心蛋白的测定试剂盒(Kokusai Siyaku,下文仅称为 HCV 核心蛋白质测定试剂盒),第三代抗 -HCV 抗体,它是一种抗 -HCV 抗体的测定试剂盒(Ortho,下文仅称为抗 -HCV 抗体测定试剂盒),以及 Amplicore HCVmonitor,它是一种通过 PCR 对 HCV 的 RNA 的测定试剂盒(Roche,下文仅称之为 RNA 测定试剂盒)。

[0145] 结果如表 9 所示。在表 9 中,“-”表示“未检测到”,“+”表示“可检测到”。

[0146] 表 9

[0147]

样品	本发明		HCV 核心蛋白测定试剂盒	抗-HCV 抗体测定试剂盒	RNA 测定试剂盒
	吸光度(Abs)	判断			
正常 1	0.059	-	-	-	-
正常 2	0.060	-	-	-	-
正常 3	0.062	-	-	-	-
正常 4	0.062	-	-	-	-
正常 5	0.061	-	-	-	-
正常 6	0.061	-	-	-	-
U-19	2.973	+	+	+	+
B-2	0.910	+	+	+	+
U-16	0.867	+	+	+	+
B-19	0.212	+	+	+	+
T1	0.582	+	+	+	未检
T2	0.145	+	-	+	未检
T3	0.134	+	-	+	未检
U168	0.117	+	-	+	+
U169	0.149	+	-	+	+

[0148] 如表 9 所示,通过本发明方法进行的测试对 HCV 核心蛋白测定试剂盒(International Reagents Corp.)不能判断是否为阳性的样品给出阳性结果。除了正常人血清样品,血清样品为抗 -HCV 抗体 - 阳性,通过 RNA 测定试剂盒 (Roche) 测试的样品被判断为 HCV- 阳性。

[0149] 测定血清样品的 HCV 核心蛋白测定试剂盒(International ReagentsCorp.)的灵敏度级别为 10^4 病毒粒 /ml,而本发明方法的数量级为 10^3 病毒粒 /ml,它等同于 RNA 测定试剂盒 (Roche) 的灵敏度。

[0150] 实施例 9 :抗体组合

[0151] 重复实施例 6 的相同程序,除了用于固相和碱性磷酸酶 - 标记的抗体种类被改变,来自未感染 HCV 的人血清和来自感染 HCV 的人血清用作样品,稀释标记抗体的氯化钠水溶液的浓度为 0 或 1M。测定各试验的吸光度,计算 S/N 比值。结果如表 10 所示。在表 10 中,各氯化钠浓度的数值表示 S/N 比值。

[0152] 表 10

[0153]

固相抗体	标记抗体	氯化钠浓度（M）	
		0	1
KTM-153	KTM-145	3.07	5.46
KTM-145	KTM-153	1.46	6.48
KTM-153	KTM-157	2.96	11.17
KTM-145	KTM-167	7.20	15.61
KTM-145	KTM-163	7.50	15.30

[0154] 如表 10 所示，在固相抗体和标记抗体的所有组合中，通过将氯化钠加入溶液稀释标记抗体，增加了 S/N 比值。表明可以在存在氯化钠的条件下较高灵敏度地检测 HCV 感染。

[0155] 实施例 10

[0156] 用正常血清溶液连续稀释各样品溶液（U-14 和 U-19），制备样品．将 50μl 的 20％ PEG4000 加入 200μl 各连续稀释的样品，将得到的混合液在冰上静置 1 小时。4℃下 4000xg 离心 5 分钟，沉淀悬浮于 50μl 含有 8M 用于变性的盐酸胍的 50mM Tris 缓冲液（pH8.0）。向得到的悬浮液中加入 50μ10.5M 氢氧化钠溶液，在 50℃下处理 30 分钟，用含有 0.3％ Triton X-100 的 0.5M 磷酸氢钠溶液中和得到的混合液。然后用 0.1％ BSA-PBS 溶液将得到的混合液稀释三倍，制备测定液．按照实施例 4 描述的方法测定各稀释样品．标记抗体稀释液中氯化钠的浓度为 2M。

[0157] 用参考实施例 1 中得到的已知浓度的 HCV 核心蛋白作为标准物质制备标准曲线，从各样品的吸光度（Abs）计算 HCV 核心蛋白的量。

[0158] 应用样品 U-14 和样品 U-19 进行的测试结果分别显示于表 11 和表 12。

[0159] 表 11

[0160]

样品的稀释度	样品 U-14	
	吸光度	浓度（pg/ml）
1/128	0.073	0.14
1/64	0.082	0.26
1/32	0.105	0.56
1/16	0.146	1.11
1/8	0.204	1.86
1/4	0.372	4.08
1/2	0.661	7.89
1	1.219	15.26

[0161] 表 12

[0162]

样品的稀释	样品 U-19	
	吸光度	浓度（pg/ml）
1/800	0.084	0.28
1/400	0.104	0.59
1/200	0.138	1.11
1/100	0.199	2.07
1/10	1.413	20.40

[0163] 如表 11 和表 12 所示，本发明的测定方法能够检测级别为 0.1pg/ml 的 HCV 核心蛋白.

[0164] 实施例 11：在血清转化板样品中 HCV 核心抗原的检测

[0165] 按照实施例 8 中描述的方法测定商业提供的血清转化板 PHV908(BBI) 的 HCV 核心抗原。HCV 核心抗原的量表示为将正常人样品的吸光度定为 1 时，S/N 的比值形式。

[0166] 还用抗 -HCV 抗体测定试剂盒 (Ortho) 测定了上述板。抗体效价表示为阈值参数 (S/CO) 的形式，抗体效价为 1.0 或更高的样品判断为阳性。

[0167] 结果显示于表 13。

[0168] 表 13

[0169]

样品号	观察起始点之后的天数	本发明的方法 (S/N 比值)	抗 -HCV 抗体测定试剂盒 (S/CO)
01	0	6.5	0
02	3	6.4	0
03	5	4.8	0
04	11	7.1	0.1
05	13	7.1	0.3
06	19	10.9	1.7
07	25	11.1	4.9
08	27	6.9	4.9
09	32	4.5	>5.0
10	35	1.5	>5.0
11	41	1.9	>5.0
12	45	1.3	>5.0
13	48	6.4	>5.0

[0170] 如表 13 所示，本发明的方法能够在抗 -HCV 抗体测试得到阳性结果之前检测核心抗原；也就是说，本发明能够检测早期状态的 HCV 感染。

[0171] 实施例 12：HCV 核心蛋白测定试剂盒

[0172] 制备了包括下列试剂的试剂盒。

[0173] 抗体 - 包被的平板（按照参考实施例 5 描述的相同方法，应用参考实施例

[0174] 2 中得到的 KTM-145 制备）

[0175] 样品稀释液（包括含有 0.1％ BSA 和 1％正常小鼠血清的 PBS 之水溶液）酶标记抗体（按照参考实施例 4 中描述的同样方法，利用参考实施例 2

[0176] 中得到的 KTM-163 制备）

[0177] 标准抗原

[0178] 0pg/ml

[0179] 10pg/ml

[0180] （如下制备，将参考实施例 1 中得到的 HCV 核心蛋白溶解于包括含有 0.067％ BSA、0.89M 盐酸胍、5.56mM Tris 缓冲液 (pH8)、0.056M 氢氧化钠、0.056M 磷酸二氢钠和 0.005％ Triton X-100 的 PBS 溶液中，使浓度为 0 或 10pg/ml)。

[0181] 标记抗体稀释液（含有 50mM Tris 缓冲液 (pH7.6)、10mM 氯化镁、0.2mM 氯化锌、20％ BlockAce、2M 氯化钠、0.1％叠氮钠、0.1TritonX-705 和 1％正常小鼠血清）

[0182] 颜色试剂[在酶循环反应试剂 (AmpliQ，Dako) 中含有颜色试剂]

[0183] 反应终止剂[在酶循环反应试剂 (AmpliQ，Dako) 中含有反应终止剂]

[0184] 沉淀剂 (20％ PEG4000)

[0185] 分散剂 [8M 盐酸胍和 50mM Tris 缓冲液 (pH8)]

[0186] 碱性试剂 (0.5M 氢氧化钠溶液）

[0187] 中和剂 (0.5M 磷酸氢二钠和 0.3％ Triton X-100) patsnap

专利名称(译)	检测或确定HCV核心抗原的方法及其中应用的用于检测或确定的试剂		
公开(公告)号	CN1932517B	公开(公告)日	2012-05-09
申请号	CN200610099953.3	申请日	2000-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	协和梅迪克斯株式会社		
[标]发明人	守田和树 西田绫子 福井正宪 近藤大 小原道法		
发明人	守田和树 西田绫子 福井正宪 近藤大 小原道法		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/576 C07K16/10		
CPC分类号	G01N33/5306 C07K16/109 G01N33/5767		
代理人(译)	程泳		
审查员(译)	王奕		
优先权	1999233171 1999-08-19 JP		
其他公开文献	CN1932517A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测样品中HCV核心抗原的免疫测定，包括使碱性磷酸酶标记的抗-HCV核心蛋白抗体和样品中的HCV核心抗原在含有高浓度盐的水溶液中进行抗原-抗体反应，形成抗原-抗体复合物，然后测定形成的抗原-抗体复合物的碱性磷酸酶活性。还提供了一种检测HCV核心抗原的试剂，其包括碱性磷酸酶标记的抗-HCV核心蛋白抗体，浓度为0.5M至饱和的盐，以及测定碱性磷酸酶活性的试剂。

氯化钠的浓度 (M)	抗原浓度 (pg/ml)		S/N 比值
	0	100	
0	0.146	0.226	1.55
0.25	0.145	0.317	2.18
0.5	0.146	0.453	3.11
0.75	0.144	0.583	4.06
1.0	0.150	0.666	4.45
1.5	0.151	0.818	5.43
2.0	0.152	0.925	6.10
3.0	0.195	1.032	5.29