



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102890154 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 23

(21) 申请号 201210385843. 9

(22) 申请日 2012. 10. 12

(71) 申请人 武汉康苑生物医药科技有限公司

地址 430075 湖北省武汉市东湖高新区光谷  
生物医药产业园高新大道 858 号 A6-1  
栋

(72) 发明人 张年

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页

### (54) 发明名称

丙型肝炎病毒核心抗原时间分辨免疫荧光分析  
法及检测试剂盒

### (57) 摘要

本发明公开了丙型肝炎病毒核心抗原时间分辨免疫荧光分析法及检测试剂盒。本发明通过分析丙型肝炎病毒核心抗原序列而得到四株单克隆抗体，使用其中的抗 HCV-cAg 单克隆抗体 I、II 作为包被抗体，抗 HCV-cAg 单克隆抗体 III、IV 作为标记抗体，用双抗体夹心时间分辨免疫荧光分析法制备 HCV-cAg 诊断试剂盒。检测试剂盒包括盒体，设在盒体内的包被板和设在盒体内试剂及不干胶封片和使用说明书。其中所述的包被板各孔包被有包被抗体 I、II；所述试剂包括：抗 HCV-cAg 单克隆抗体 III、IV 标记抗体、HCV 核心抗原标准品、反应缓冲液、25X 浓缩洗涤液、增强液。本发明具有较高的灵敏度、特异性及稳定性；且分析系统高度自动化，可提高临床检验结果的速度，可大幅度降低人为误差和增加检出结果的可靠性。

1. “丙型肝炎病毒核心抗原时间分辨免疫荧光分析法”,其特征就在于检测原理为:本发明采用时间分辨免疫荧光分析法,检测丙型肝炎病毒核心抗原;该发明建立双抗体夹心的基础之上,在这里,样品中的核心抗原首先被包被于微孔板上的抗 HCV-cAg 单克隆抗体 I、II 固相抗体捕获;在洗掉样品的其它部分,再加入抗 HCV-cAg 单克隆抗体 III、IV 铕标记抗体,就可以形成抗 HCV-cAg 单克隆抗体固相抗体-核心抗原-抗 HCV-cAg 单克隆抗体铕标记抗体复合物,洗板加入增强液,用时间分辨分析仪测量荧光值,荧光值与样本中核心抗原浓度呈正相关,从而计算核心抗原浓度。

2. 丙型肝炎病毒核心抗原时间分辨免疫荧光分析法检测试剂盒,其特征就在于包括盒体,设在盒体内的包被板和设在盒体内试剂及不干胶封片和使用说明书。

3. 根据权利要求 2 所述包被板,其特征就在于包被板包被的是固相抗体,制备工艺是将包被抗体用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释作为包被液,包被反应板,形成固相抗体,并用封闭液封闭。

4. 根据权利要求 3 所述包被抗体,其特征就在于此抗体是抗 HCV-cAg 单克隆抗体。

5. 根据权利要求 3 所述 Tris-HCl 缓冲溶液,其特征就在于 Tris-HCl 缓冲溶液为 PH 为 7.2 浓度为 50mmol/L Tris-HCl。

6. 根据权利要求 3 所述包被液,其特征就在于包被液中抗 HCV-cAg 单克隆抗体的浓度均为 0.1-20  $\mu$ g/ml。

7. 根据权利要求 2 所述设在盒体内试剂,其特征就在于所述试剂包括:抗 HCV-cAg 铕标记抗体、HCV 核心抗原标准品、分析缓冲液、25 X 浓缩洗涤液、增强液。

8. 根据权利要求 7 所述抗 HCV-cAg 铕标记抗体,其特征就在于镧系元素离子标记抗体制备:取待标记抗体抗 HCV-cAg 单克隆抗体 III、IV 均稀释至 1mg/ml,用常规方法进行镧系元素离子标记。

9. 根据权利要求 8 所述镧系元素离子,其特征就在于镧系元素离子为  $\text{Eu}^{3+}$ 。

10. 根据权利要求 7 所述 HCV 核心抗原标准品,其特征就在于用小牛血清将 HCV 核心抗原稀释为 0ng/ml,0.05ng/ml,0.5ng/ml,2 ng/ml,8 ng/ml,20 ng/ml 六个浓度梯度。

11. 根据权利要求 7 所述分析缓冲液,其特征就在于分析缓冲液为 PH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl,内含 0.9% NaCl, 1% BSA, 0.5% 酪蛋白,0.1% Tween-20 和 0.1%  $\text{NaN}_3$ 。

## 丙型肝炎病毒核心抗原时间分辨免疫荧光分析法及检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及丙型肝炎病毒核心抗原时间分辨免疫荧光分析法及检测试剂盒,属于时间分辨免疫荧光分析法以及体外诊断检测领域。

### 背景技术

[0002] 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 呈球形,直径小于 80nm (在肝细胞中为 36 ~ 40nm,在血液中为 36-62nm),为单股正链 RNA 病毒,在核衣壳外包绕含脂质的囊膜,囊膜上有刺突。丙型肝炎病毒可引起丙型肝炎主要经输血,针刺,吸毒等传播。HCV 感染通常是持续性的终生感染,抗体检测是一个非常有效的方法。但因感染 HCV 后,抗 HCV 出现较慢,一般情况下,抗体的血清学转换可以延迟到暴露后几个月才发生,此时可发生抗 HCV 的假阴性 (也就是说在抗体可检出之前或在血清学转换之中即所谓的“窗口期”),故在早期诊断丙肝感染上有困难。HCV 核心抗原检出时间早于抗体,HCV-cAg 检测可作为 HCV 抗体检测的补充试剂。

[0003] 目前丙型肝炎的检测方法主要有三类:

1. 丙型肝炎抗体检测:其缺点是感染丙型肝炎病毒 HCV 后,有 2-26 周的潜伏期,一般到抗 HCV 抗体出现 (转阳) 有一个较长的窗口期,平均为 70d,有的患者窗口期可延长至 6-9 个月或更长。由于窗口期的存在,对潜伏期和隐形感染者容易造成漏检,机体感染 HCV 后,在抗 HCV 抗体出现之前约 2 周左右,血循环中即可出现病毒颗粒,此时丙型肝炎病毒 HCV 的 RNA 经 PCR 方法检测可为阳性,血液具有感染性,而用抗体检测方法根本无法测出;

2. 丙型肝炎病毒 HCV 核酸检测:感染丙型肝炎病毒 HCV 后 1-2 周,血清中即可检测到 HCV-RNA。因此,HCV 核酸检测 (HCV RT-PCR 检测) 可用于丙型肝炎的早期诊断,并且通过对病毒拷贝数的定量检测可对其临床疗效进行监测。因为 PCR 法检测 HCV-RNA 影响因素较多,在样本收集、储存和检测方面都有严格的要求,并且 PCR 的检测操作过程复杂、费时;

3. 丙型肝炎抗原检测:丙型肝炎病毒 HCV 核心抗原是由 HCV 基因中最为保守的部分编码而来,在 HCV-RNA 出现后的 1-2d 内即出现丙型肝炎病毒 HCV 抗原,且与 HCV-RNA 的水平相平行,可以作为 HCV 复制的标志。有研究表明,HCV 抗原检测与抗 HCV 抗体检测相比,HCV 抗原的检测可使检测的窗口期平均提前 49 天,缩短窗口期 HCV 感染者的献血的风险。与 RT-PCR 方法相比具有操作简便、时间短、对环境要求低的特点,在临床上可用于早期急性丙型肝炎诊断。

[0004] 时间分辨免疫荧光分析 (Time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 是在荧光分析 (FIA) 的基础上发展起来的一种特殊的荧光分析法。它利用了具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物为示踪物,标记抗体、抗原、激素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物细胞,以代替传统的荧光物质、酶、同位素、化学发光物质。用时间分辨荧光免疫分析检测仪测定反应产物中的荧光强度,根据产物荧光强度和相对荧光强度的比值,准确地测定反应体系中被分析物的浓度。TRFIA 所使用的荧光标记物是镧系稀土金属,由于镧系稀土金属离子螯合

物有很长的荧光寿命（微秒级），有别于传统荧光的短荧光寿命，使其能通过时间分辨方式区别于背景荧光（纳秒级），正是由于荧光衰变时间长，可以延缓测量时间，待测样品中短寿命的本底荧光衰变后再测稀土离子的特异荧光，因此可完全消除本底荧光的干扰。镧系稀土金属离子螯合物荧光很宽的 Stokes 位移使其容易通过波长分辨方式进一步区别于背景荧光，提高方法学的稳定性。镧系稀土金属离子螯合物狭窄的荧光发射峰使其荧光检测具有很高的效率，进一步提高了信号检测的特异性和灵敏性。此外，由于检测时加入了荧光增强液，它可使原来荧光增强 100 万倍，以上各种因素使 TRFIA 的检测灵敏度和准确性大大提高。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种用于丙型肝炎病毒核心抗原检测的时间分辨免疫荧光分析法及检测试剂盒，主要解决现有技术存在的灵敏度低、稳定性差、操作烦琐及污染环境等技术问题。最主要解决的问题是缩短窗口期，可用于早期急性丙型肝炎诊断。

[0006] 本发明采用时间分辨免疫荧光分析法，检测丙型肝炎病毒核心抗原。该检测建立双抗体夹心的基础之上，在这里，样品中的核心抗原首先被包被于微孔板上的抗 HCV-cAg 单克隆抗体 I、II 固相抗体捕获。在洗掉样品的其它部分，再加入抗 HCV-cAg 单克隆抗体 III、IV 钕标记抗体，就可以形成抗 HCV-cAg 单克隆抗体固相抗体 - 核心抗原 - 抗 HCV-cAg 单克隆抗体钕标记抗体复合物，洗板加入增强液，用时间分辨分析仪测量荧光值，荧光值与样本中核心抗原浓度呈正相关，从而计算核心抗原浓度。

[0007] 与现有技术相比，本发明具有以下突出优点：

1. 本发明采用丙型肝炎抗原检测大大缩短窗口期。现阶段丙型肝炎的检测一般是检测丙型肝炎抗体：其缺点是感染丙型肝炎病毒后，有 2-26 周的潜伏期，一般到抗 HCV 抗体出现（转阳）有一个较长的窗口期，平均为 70d，有的患者窗口期可延长至 6-9 个月或更长。由于窗口期的存在，对潜伏期和隐形感染者容易造成漏检。本发明采用丙型肝炎抗原检测，丙型肝炎病毒 HCV 核心抗原是由 HCV 基因中最为保守的部分编码而来，在 HCV-RNA 出现后的 1-2d 内即出现丙型肝炎病毒 HCV 抗原，且与 HCV-RNA 的水平相平行，可以作为 HCV 复制的标志。有研究表明，HCV 抗原检测与抗 HCV 抗体检测相比，HCV 抗原的检测可使检测的窗口期平均提前 49 天，缩短窗口期 HCV 感染者的献血的风险。且本发明具有操作简便、时间短、对环境要求低的特点，在临床上可用于早期急性丙型肝炎诊断。

[0008] 2. 本发明是采用先进的时间分辨免疫荧光分析法，具有灵敏度高，不易污染，检测时间快等优势。时间分辨免疫荧光分析是在荧光分析（FIA）的基础上发展起来的一种特殊的荧光分析法。它利用了具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物为示踪物，标记抗体、抗原、激素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物细胞，以代替传统的荧光物质、酶、同位素、化学发光物质。用时间分辨荧光免疫分析检测仪测定反应产物中的荧光强度，根据产物荧光强度和相对荧光强度的比值，准确地测定反应体系中被分析物的浓度。TRFIA 所使用的荧光标记物是镧系稀土金属，由于镧系稀土金属离子螯合物有很长的荧光寿命（微秒级），有别于传统荧光的短荧光寿命，使其能通过时间分辨方式区别于背景荧光（纳秒级），正是由于荧光衰变时间长，可以延缓测量时间，待测样品中短寿命的本底荧光衰变后再测稀土离子的特异荧光，因此可完全消除本底荧光的干扰。镧系稀土金属离子螯合物荧光很宽的 Stokes

位移使其容易通过波长分辨方式进一步区别于背景荧光,提高方法学的稳定性。镧系稀土金属离子螯合物狭窄的荧光发射峰使其荧光检测具有很高的效率,进一步提高了信号检测的特异性和灵敏性。此外,由于检测时加入了荧光增强液,它可使原来荧光增强 100 万倍,以上各种因素使 TRFIA 的检测灵敏度和准确性大大提高。

[0009] 3. 本发明是定量检测丙型肝炎病毒核心抗原的含量,定量检测可以动态观察疗效和病情监测;定量检测丙型肝炎病毒核心抗原浓度变化可对 HCV 的病程、治疗、预后起一个动态监测的作用,能够让医生对病情疗效作出合理的解释提供依据,指导治疗。

[0010] 本发明的技术方案是:在进行时间分辨免疫荧光分析检测前需完成下列准备工作:

首先制备包被板,所用的包被板为特异性抗体包被的微孔板,丙型肝炎病毒核心抗原包被板条的制备包括以下步骤:

(1) 将纯化的抗 HCV-cAg 单克隆抗体 I、II 用 Tris-HCl 缓冲液稀释,稀释至 0.1-10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,然后加入包被板条各孔内,经吸附、洗涤、封闭、干燥后获得丙型肝炎病毒核心抗原单克隆抗体包被板条;

(2) 将丙型肝炎病毒核心抗原单克隆抗体包被板条装入专用的铝箔包装袋,封口并冷藏备用。

[0011] 其次是丙型肝炎病毒核心抗原标记物的制备,包括以下步骤:

(1) 取待标记抗体抗 HCV-cAg 单克隆抗体 III、IV 均稀释至 1mg/ml,按质量比为 2:1 的比例 (DTTA-Eu: 抗体) 边振荡边加入 DTTA-Eu,室温下在振板机上慢速振荡 1 小时,然后在黑暗中静置 48 小时;

(2) 标记好的抗体与游离 DTTA-Eu 通过 Sephadex G50 色谱柱 (1.5 X 50cm) 分离,分离过程用核酸蛋白仪监控;

(3) 用小试管依次收集流出物,同时测 Eu 标记抗体浓度;

(4) 加入 0.5% BSA, 2-8 $^{\circ}\text{C}$  保存。

[0012] 检测操作过程

1. 试剂的准备 (1) 洗涤液:25 $\times$  浓缩洗液以 1:25 稀释作为工作洗涤液备用;

(2) 标记物:使用前一小时内用标记稀释液按 1:10 倍稀释并一次用完;

2. 将试剂及所需数量的微孔反应条置室温平衡;

3. 吸取 100  $\mu\text{l}$  丙型肝炎病毒核心抗原校准品及待检样本,按顺序加入微孔反应条小孔中并加贴封片;

4. 微孔反应条在室温条件下,用振荡仪缓慢振摇孵育 60 分钟;

5. 在第一次孵育结束后,小心将微孔反应条上的封片揭下并弃掉,将微孔反应条放入洗板机吸干各孔并每孔注入洗涤液 350  $\mu\text{l}$ ,再吸干各孔,重复以上洗涤 4 次,最后一次将微孔反应条拍干;

6. 每孔中加入 100  $\mu\text{l}$  标记物工作液,并加贴封片;

7. 微孔反应条在室温条件下,用振荡仪缓慢振摇孵育 60 分钟;

8. 第二次孵育结束后,小心将微孔反应条上的封片揭下并弃掉,将微孔反应条放入洗板机吸干各孔并每孔注入洗涤液 350  $\mu\text{l}$ ,再吸干各孔,重复以上洗涤 6 次,最后一次将微孔反应条拍干;

9. 每一孔中加入增强液 100  $\mu$  l (加样过程中避免碰到小孔边缘或其中的试剂, 尽量避免污染);

10. 微孔反应条在室温下, 用振荡仪轻摇 5 分钟后测定荧光值, 分析结果。

[0013] 具体实施实例:

1. 制备包被板, 所用的包被板为特异性抗体包被的微孔板, 丙型肝炎病毒核心抗原包被板条的制备包括以下步骤:

(1) 将纯化的抗 HCV-cAg 单克隆抗体 I、II 用 Tris-HCl 缓冲液稀释, 均稀释至 3  $\mu$  g/ml, 然后加入包被板条各孔内, 经吸附、洗涤、封闭、干燥后获得丙型肝炎病毒核心抗原单克隆抗体包被板条;

(2) 将丙型肝炎病毒核心抗原单克隆抗体包被板条装入专用的铝箔包装袋, 封口并冷藏备用。

[0014] 2. 丙型肝炎病毒核心抗原铈标记物的制备, 包括以下步骤:

(1) 取待标记抗体抗 HCV-cAg 单克隆抗体 III、IV 均稀释至 1mg/ml, 按质量比为 2:1 的比例 (DTTA-Eu: 抗体) 边振荡边加入 DTTA-Eu, 室温下在振板机上慢速振荡 1 小时, 然后在黑暗中静置 48 小时;

(2) 标记好的抗体与游离 DTTA-Eu 通过 Sephadex G50 色谱柱 (1.5 X 50cm) 分离, 分离过程用核酸蛋白仪监控;

(3) 用小试管依次收集流出物, 同时测 Eu 标记抗体浓度;

(4) 加入 0.5% BSA, 抗体总浓度为 20  $\mu$  g/ml 稀释, 2-8 $^{\circ}$ C 保存。

[0015] 3. 分析缓冲液的制备: 分析缓冲液为 PH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl, 内含 0.9% NaCl, 1% BSA, 0.5% 酪蛋白, 0.08% Tween-20 和 0.1% NaN<sub>3</sub>。

[0016] 4. HCV 核心抗原标准品的制备: 用小牛血清将 HCV 核心抗原稀释为 0ng/ml, 0.05ng/ml, 0.5ng/ml, 2 ng/ml, 8 ng/ml, 20 ng/ml 六个浓度梯度。

[0017] 5. 25 X 浓缩洗涤液、增强液的制备。

[0018] 6. 检测操作过程

1). 试剂的准备 (1) 洗涤液: 25X 浓缩洗液以 1:25 稀释作为工作洗涤液备用;

(2) 铈标记物: 使用前一小时内用铈标记稀释液按 1:10 倍稀释并一次用完;

2). 将试剂及所需数量的微孔反应条置室温平衡;

3). 吸取 100  $\mu$  l 丙型肝炎病毒核心抗原校准品及待检样本, 按顺序加入微孔反应条小孔中并加贴封片;

4). 微孔反应条在室温条件下, 用振荡仪缓慢振摇孵育 60 分钟;

5). 在第一次孵育结束后, 小心将微孔反应条上的封片揭下并弃掉, 将微孔反应条放入洗板机吸干各孔并每孔注入洗涤液 350  $\mu$  l, 再吸干各孔, 重复以上洗涤 4 次, 最后一次将微孔反应条拍干;

6). 每孔中加入 100  $\mu$  l 铈标记物工作液, 并加贴封片;

7). 微孔反应条在室温条件下, 用振荡仪缓慢振摇孵育 60 分钟;

8). 第二次孵育结束后, 小心将微孔反应条上的封片揭下并弃掉, 将微孔反应条放入洗板机吸干各孔并每孔注入洗涤液 350  $\mu$  l, 再吸干各孔, 重复以上洗涤 6 次, 最后一次将微孔反应条拍干;

- 9). 每一孔中加入增强液  $100 \mu\text{l}$  ;
- 10). 微孔反应条在室温下,用振荡仪轻摇 5 分钟后测定荧光值,分析结果。

专利名称(译)	丙型肝炎病毒核心抗原时间分辨免疫荧光分析法及检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102890154A</a>	公开(公告)日	2013-01-23
申请号	CN201210385843.9	申请日	2012-10-12
[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	张年		
发明人	张年		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/532 G01N21/64		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了丙型肝炎病毒核心抗原时间分辨免疫荧光分析法及检测试剂盒。本发明通过分析丙型肝炎病毒核心抗原序列而得到四珠单克隆抗体,使用其中的抗HCV-cAg单克隆抗体I、II作为包被抗体,抗HCV-cAg单克隆抗体III、IV作为标记抗体,用双抗体夹心时间分辨免疫荧光分析法制备HCV-cAg诊断试剂盒。检测试剂盒包括盒体,设在盒体内的包被板和设在盒体内试剂及不干胶封片和使用说明书。其中所述的包被板各孔包被有包被抗体I、II;所述试剂包括:抗HCV-cAg单克隆抗体III、IV标记抗体、HCV核心抗原标准品、反应缓冲液、25X浓缩洗涤液、增强液。本发明具有较高的灵敏度、特异性及稳定性;且分析系统高度自动化,可提高临床检验结果的速度,可大幅度降低人为误差和增加检出结果的可靠性。