



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103869073 A

(43) 申请公布日 2014.06.18

(21) 申请号 201410129830.4

(22) 申请日 2014.04.01

(71) 申请人 广州市丰华生物工程有限公司
地址 510730 广东省广州市开发区银谊街6号

(72) 发明人 谭玉华 李奕辉 陈建起 范主桥

(74) 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司
44202

代理人 郝传鑫

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/571(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种 HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒。该分析方法主要包括：制备同时包被有 HIV 重组抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体的固相载体；制备生物素标记的 HIV-1p24 单克隆抗体；制备镧系元素 1 标记的 HIV 重组抗原；制备镧系元素 2 标记的链霉亲和素；在抗原和抗体固相载体中，加入含有 HIV 标准抗体和 HIV p24 标准抗原的校准品或待测样品，加入生物素标记的 HIV-1p24 抗体，孵育、洗涤后，加入镧系元素 1 标记的 HIV 抗原和镧系元素 2 标记的链霉亲和素，再次孵育、洗涤后，加入增强液进行荧光检测。本发明的分析方法解决了现有 HIV 抗原抗体联合检测中抗体与抗原不能区分的难点，实现了同时定量检测 HIV 抗体和 HIV-1p24 抗原，缩短了 HIV 检测窗口期。

1. 一种 HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

①制备抗原和抗体固相载体:将 HIV 抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体用包被缓冲液稀释后作为包被液,包被固相载体,用封闭液封闭,形成抗原和抗体固相载体;

②制备生物素标记抗体:用常规方法对 HIV-1p24 单克隆抗体进行生物素标记,形成生物素标记抗体;

③制备镧系元素 1 标记的 HIV 抗原:参照镧系元素离子标记试剂盒说明书,用镧系元素 1 对 HIV 抗原进行标记,制备镧系元素 1 标记的 HIV 抗原;

④制备镧系元素 2 标记的链霉亲和素:参照镧系元素离子标记试剂盒说明书,用镧系元素 2 对链霉亲和素进行标记,制备镧系元素 2 标记的链霉亲和素;其中,所述镧系元素 1 和镧系元素 2 是不同的镧系元素;

⑤测定方法:在步骤①制得的抗原和抗体固相载体中,加入含有 HIV 标准抗体和 HIV-1p24 标准抗原的校准品或待测样品,加入步骤②制备的生物素标记抗体,经孵育、洗涤所述固相载体后,加入步骤③制备的镧系元素 1 标记的 HIV 抗原和步骤④制备镧系元素 2 标记的链霉亲和素,再次孵育、洗涤所述固相载体后,加入增强液进行荧光检测;其中,所述 HIV 标准抗体中不含 HIV-1p24 抗体。

2. 如权利要求 1 所述的分析方法,其特征在于,所述步骤①中,具体制备步骤如下:将 HIV 抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体用包被缓冲液分别稀释至 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 后作为包被液,包被固相载体,孵育、洗涤固相载体后,用封闭液进行封闭,晾干;其中,所述固相载体为微孔反应条或微孔反应板;所述包被缓冲液为 pH9.6 的 50mmol/L 碳酸盐缓冲液、pH4.5 的 20mmol/L 磷酸盐缓冲液、pH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液或 pH4.5 的 50mmol/L 柠檬酸盐缓冲液;所述封闭液为含 0.5% BSA、pH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液。

3. 如权利要求 1 所述的分析法,其特征在于,所述步骤③中,具体制备步骤如下:将 HIV 抗原加入到截留分子量为 10000 的超滤离心管中,8000r / min 离心 5 ~ 6min,用 pH8.0 ~ 9.8、50mmol/L 碳酸盐标记缓冲液重复洗涤后,将处理得到的 HIV 抗原加入到预先用标记缓冲液溶解的镧系元素 1 标记试剂中,混匀,2 ~ 8°C 振荡孵育 $72 \pm 2\text{h}$,反应液经用 pH7.8、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡的层析柱层析,在 A_{280} 监测收集第一洗脱峰;其中,所述 HIV 抗原和所述镧系元素 1 标记试剂的质量比为 1:1 ~ 10:1。

4. 如权利要求 1 所述的分析法,其特征在于,所述步骤④中,具体制备步骤如下:将链霉亲和素加入到截留分子量为 10000 的超滤离心管中,8000r / min 离心 5 ~ 6min,用 pH8.0 ~ 9.8、50mmol/L 碳酸盐标记缓冲液重复洗涤后,将处理得到的链霉亲和素加入到预先用标记缓冲液溶解的镧系元素 2 标记试剂中,混匀,2 ~ 8°C 振荡孵育 $72 \pm 2\text{h}$,反应液经用 pH7.8、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡的层析柱层析,在 A_{280} 监测收集第一洗脱峰;其中,所述链霉亲和素和所述镧系元素 2 标记试剂的质量比为 1:1 ~ 10:1。

5. 如权利要求 1 所述的分析法,其特征在于,所述步骤⑤中含有 HIV 标准抗体和 HIV-1p24 标准抗原的校准品采用以下方式制备:

用含有 10g/L BSA 的 pH7.8、50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液将 HIV 标准抗体原料和 HIV-1p24 标准抗原原料稀释成含有 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml 的 HIV 标准抗体和对应的 0、10、40、160、640、1280U/ml 的 HIV-1p24 标准抗原的混合校准品;或者,

用 50% ~ 55% 的血细胞比容的全血将 HIV 标准抗体原料和 HIV-1p24 标准抗原原料制备成含有 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml 的 HIV 标准抗体和对应的 0、10、40、160、640、1280U/ml 的 HIV-1p24 标准抗原的混合校准品,用采血滤纸作为载体,将制备好的含有 HIV 标准抗体和 HIV-1p24 标准抗原的混合校准品滴加到所述采血滤纸的 6 个不同位置上,室温自然干燥后得到的干滤纸片校准品。

6. 一种 HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:同时包被有 HIV 抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体的固相载体、校准品、生物素标记的 HIV-1p24 单克隆抗体、镧系元素 1 标记的 HIV 抗原、镧系元素 2 标记的链霉亲和素、实验缓冲液、浓缩洗液以及增强液;

其中,所述校准品为同时含有呈浓度梯度的 HIV 标准抗体和呈浓度梯度的 HIV-1p24 标准抗原的混合校准品,所述 HIV 标准抗体中不含 HIV-1p24 抗体;

所述镧系元素 1 和镧系元素 2 是不同的镧系元素。

7. 如权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:所述 HIV 抗原包括 HIVgp120、gp41 和 / 或 gp36 抗原。

8. 如权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:所述校准品为同时含有 HIV 标准抗体原液配制而成的 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml 的 HIV 标准抗体和对应的 HIV-1p24 标准抗原原液配制而成的 0、10、40、160、640、1280U/ml 的 HIV-1p24HIV 标准抗原的混合校准品,所述 HIV 标准抗体中不含 HIV-1p24 抗体。

9. 如权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:所述镧系元素 1 为 Eu^{3+} ,所述镧系元素 2 为 Sm^{3+} 。

10. 如权利要求 6 所述的试剂盒,其特征在于:所述实验缓冲液为含 100ml/L BSA、0.05g/L 染料 1、6ml/L Tween20、0.01mg/L EDTA、30ppmProcline300 的 pH7.8、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液;所述浓缩洗液为含有 4ml/L Tween20、30ppm 染料 2、30ppm Procline300 的 pH7.8、50mmol/LTris-HCl 缓冲液,其中所述染料 1 的颜色和所述染料 2 的颜色不一样;所述增强液为含 0.5ml/L 曲拉通 -100、0.8ml/L 冰乙酸、0.5g/L 乙酸钠、24mg/L 三正辛基氧化磷、3mg/L β -萘甲酰三氟丙酮的 pH3.4、6mmol/L 醋酸盐缓冲液。

HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)的分析检测技术,尤其涉及一种 HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 人类免疫缺陷病毒(HIV)于 1981 年在美国首次发现,是一种感染人类免疫系统细胞的慢病毒(lentivirus),属反转录病毒的一种。该病毒破坏人体的免疫能力,导致免疫系统的失去抵抗力,从而导致各种疾病及癌症在人体中的发生,发展到最后,导致艾滋病(获得性免疫缺陷综合症,acquired immuno deficiency syndrome,AIDS)。

[0003] HIV 病毒基因组是两条相同的正链 RNA,每条 RNA 长约 9.2-9.8kb,编码了至少 9 个蛋白,可分为 3 类:结构蛋白、调控蛋白、辅助蛋白。根据基因组序列和结构,将 HIV 分为 HIV-1 与 HIV-2,核酸杂交法检查 HIV-1 与 HIV-2 的核苷酸序列仅 40% 相同。目前已发现 HIV-1 的主要抗原为 gag 基因编码水解形成的 P24 核蛋白以及 env 基因编码的 gp160、gp120;HIV-10 的主要抗原为 env 基因编码的 gp41, HIV-2 的主要抗原为 env 基因编码的 gp36。

[0004] 目前用于 HIV 检测方法有检测 HIV 感染者体液中病毒抗原和 / 或抗体的方法,操作方便,易于普及应用,其中抗体检测尤普遍。但 HIV-1p24 抗原在 HIV 感染检测中的地位 and 重要性也日益受到重视。HIV-1 侵入机体后,核心抗原 P24 的水平随着病毒 RNA 水平的发展而发展,并在急性感染期即可出现,通常被认为是病毒复制的间接标志,与病情发展密切相关。因此,血液及其它体液标本中 P24 抗原的检测可以缩短窗口期,有助于 HIV-1 的早期诊断、预后判断及评价抗病毒治疗的效果,具有良好的实际应用价值。随着 P24 抗原检测技术的不断进步,低成本的 P24 抗原检测有望在一定程度上替代现有的昂贵的 RNA 测定法。目前,最新一代(第四代)HIV 检测试剂采用的是 HIV-1/HIV-2 抗体与 HIV-10 亚群抗体及 HIV-1 p24 抗原的联合检测方法,但该试剂只能用于定性检测,难以实现精确定量,且不能区分 HIV 抗体和抗原。

[0005] 目前,HIV 常用的检测方法有放射免疫分析法 (radioimmunoassay, RIA)、酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、化学发光免疫分析法 (chemiluminescent immunoassay, CLIA)、电化学发光免疫分析法 (electro-chemiluminescence immunoassay, ECLI)等。RIA 由于放射性污染,对环境和操作者影响较大,批内批间变异较大,难于自动化;ELISA 采用大分子酶标记,且酶容易失活,这种依靠比色法或偏振光法的检测技术所受的干扰因素太多(即使是优秀的“管式 ELISA”,其试管形状的变化也会影响试验的结果),其灵敏度、线性和稳定性未能高于 RIA;CLIA 的化学发光通常是瞬间完成,发光峰值很快衰减,温度和 pH 值对发光有很大影响,该类因素影响了该类方法的应用;ECLI 仍为非开放系统,试剂依赖进口,试剂昂贵,维修及检测成本

高,这也限制了其推广应用。

[0006] 时间分辨荧光免疫分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 利用具有独特荧光特性的镧系元素,如铈 (Eu)、铽 (Te)、钐 (Sm)、镝 (Dy) 等及其螯合物为示踪剂,代替酶、同位素、荧光物质、化学发光物质等标记抗体、抗原、源素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物细胞,待反应体系完成后,用时间分辨荧光免疫分析检测仪测定反应物中的荧光强度,定量分析待测物质的含量。由于镧系元素荧光时间极长,为传统荧光的 $10^3 \sim 10^6$ 倍。激发光与发射光之间的 stokes 位移大,可达 290nm,而普通荧光素的 stokes 位移仅 28nm,采用波长分辨和时间延迟的方法,可大大提高检测灵敏度和特异性,目前已应用于临床微量物质,如乙型肝炎病毒标志物以及前列腺抗原、癌胚抗原、甲胎蛋白等肿瘤标志物的定量测定。TRFIA 克服了 RIA 放射性污染的不足、酶标记物的不稳定性和定量范围窄的缺陷、化学发光仅能一次发光、一般荧光标记受环境干扰的难点和 ECLI 的非直接标记等缺点, Eu 标记 TRFIA 的灵敏度可达 10^{-19} mol/L,目前已实现了分析技术的自动化。然而由于 TRFIA 法是刚刚开发出来的方法,可检测项目不多,许多项目亟待研究开发;而且在研发过程中需解决本方法稳定性、可重复性的问题。

发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题即是克服上述现有技术的缺陷,提供一种 HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫分析方法。通过本发明的方法,能解决现有技术中关于 HIV 检测存在的灵敏度低、稳定性差、操作繁琐等技术问题,尤其可以定量区分出 HIV 抗体和抗原,缩短 HIV 检测窗口期,还可用于短期抗病毒治疗效果价值的评估。

[0008] 为实现上述发明目的,本发明的 HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫分析方法,包括以下步骤:

[0009] ①制备抗原和抗体固相载体:将 HIV 抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体用包被缓冲液稀释后作为包被液,包被固相载体,用封闭液封闭,形成抗原和抗体固相载体;

[0010] ②制备生物素标记抗体:用常规方法对 HIV-1p24 单克隆抗体进行生物素标记,形成生物素标记抗体;

[0011] ③制备镧系元素 1 标记的 HIV 抗原:参照镧系元素离子标记试剂盒说明书,用镧系元素 1 对 HIV 抗原进行标记,制备镧系元素 1 标记的 HIV 抗原;

[0012] ④制备镧系元素 2 标记的链霉亲和素:参照镧系元素离子标记试剂盒说明书,用镧系元素 2 对链霉亲和素进行标记,制备镧系元素 2 标记的链霉亲和素;其中,镧系元素 1 和镧系元素 2 是不同的镧系元素;

[0013] ⑤测定方法:在步骤①制得的抗原和抗体固相载体中,加入含有 HIV 标准抗体和 HIV-1p24 标准抗原的校准品或待测样品,加入步骤②制备的生物素标记抗体,经孵育、洗涤所述固相载体后,加入步骤③制备的镧系元素 1 标记的 HIV 抗原和步骤④制备的镧系元素 2 标记的链霉亲和素,再次孵育、洗涤所述固相载体后,加入增强液进行荧光检测;其中, HIV 标准抗体中不含 HIV-1p24 抗体。

[0014] 作为本发明的一种优选实施方式,步骤①中,具体制备步骤如下:将 HIV 抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体用包被缓冲液分别稀释至 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$ 后作为包被液,包被固相载体,孵育、洗涤固相载体后,用封闭液进行封闭,晾干;其中,固相载体为微孔反应条或微

孔反应板；包被缓冲液为 pH9.6 的 50mmol/L 碳酸盐缓冲液、pH4.5 的 20mmol/L 磷酸盐缓冲液、pH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液或 pH4.5 的 50mmol/L 柠檬酸盐缓冲液；封闭液为含 0.5% BSA、pH7.8 的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液。

[0015] 作为本发明的一种优选实施方式，步骤③中，具体制备步骤如下：将 HIV 抗原加入到截留分子量为 10000 超滤离心管中，8000r / min 离心 5 ~ 6min，用 pH 为 8.0 ~ 9.8 的 50mmol/L 碳酸盐标记缓冲液重复洗涤后，将处理得到的 HIV 抗原加入到预先用标记缓冲液溶解的镧系元素 1 标记试剂中，混匀，2 ~ 8℃ 振荡孵育 72 ± 2h，反应液经用 pH7.8、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡的层析柱层析，在 A₂₈₀ 监测收集第一洗脱峰；其中，HIV 抗原和镧系元素 1 标记试剂的质量比为 1:1 ~ 10:1。

[0016] 作为本发明的一种优选实施方式，步骤④中，具体制备步骤如下：将链霉亲和素加入到截留分子量为 10000 超滤离心管中，8000r / min 离心 5 ~ 6min，用 pH 为 8.0 ~ 9.8 的 50mmol/L 碳酸盐标记缓冲液重复洗涤后，将处理得到的链霉亲和素加入到预先用标记缓冲液溶解的镧系元素 2 标记试剂中，混匀，2 ~ 8℃ 振荡孵育 72 ± 2h，反应液经用 pH7.8、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液平衡的层析柱层析，在 A₂₈₀ 监测收集第一洗脱峰；其中，链霉亲和素和镧系元素 2 标记试剂的质量比为 1:1 ~ 10:1。

[0017] 作为本发明的一种优选实施方式，步骤⑤中含有 HIV 标准抗体和 HIV-1p24 标准抗原的校准品采用以下方式制备：用含有 10g/L BSA 的 pH7.8、50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液将 HIV 标准抗体原料和 HIV-1p24 标准抗原原料稀释成含有 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml 的 HIV 标准抗体和对应的 0、10、40、160、640、1280U/ml 的 HIV-1p24 标准抗原的混合校准品；或者，用 50% ~ 55% 的血细胞比容的全血将 HIV 标准抗体原料和 HIV-1p24 标准抗原原料制备成含有 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml 的 HIV 标准抗体和对应的 0、10、40、160、640、1280U/ml 的 HIV-1p24 标准抗原的混合校准品，用采血滤纸作为载体，将制备好的含有 HIV 标准抗体和 HIV-1p24 标准抗原的混合校准品滴加到所述采血滤纸的 6 个不同位置上，室温自然干燥后得到的干滤纸片校准品。

[0018] 本发明的另一目的在于提供一种 HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫试剂盒。

[0019] 为实现上述发明目的，本发明的 HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原双标记时间分辨荧光免疫试剂盒包括：同时包被有 HIV 抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体的固相载体、校准品、生物素标记的 HIV-1p24 单克隆抗体、镧系元素 1 标记的 HIV 抗原、镧系元素 2 标记的链霉亲和素、实验缓冲液、浓缩洗液以及增强液；其中，校准品为同时含有呈浓度梯度的 HIV 标准抗体和呈浓度梯度的 HIV-1p24 标准抗原的混合校准品，HIV 标准抗体中不含 HIV-1p24 抗体；镧系元素 1 和镧系元素 2 是不同的镧系元素。

[0020] 作为本发明的一种优选实施方式，所述 HIV 抗原包括 HIV gp120、gp41 和 / 或 gp36 抗原。

[0021] 作为本发明的一种优选实施方式，校准品为同时含有 HIV 标准抗体原液配制而成的 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml 的 HIV 标准抗体和对应的 HIV-1p24 标准抗原原液配制而成的 0、10、40、160、640、1280U/ml 的 HIV-1p24 HIV 标准抗原的混合校准品，所述 HIV 标准抗体中不含 HIV-1p24 抗体。

[0022] 作为本发明的一种优选实施方式，镧系元素 1 为 Eu³⁺，镧系元素 2 为 Sm³⁺。

[0023] 作为本发明的一种优选实施方式,实验缓冲液为含 100ml/L BSA、0.05g/L 染料 1、6ml/L Tween20、0.01mg/L EDTA、30ppm Procline300 的 pH7.8、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液;所述浓缩洗液为含有 4ml/L Tween20、30ppm 染料 2、30ppm Procline300 的 pH7.8、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液,其中所述染料 1 的颜色和所述染料 2 的颜色不一样;所述增强液为含 0.5ml/L 曲拉通-100、0.8ml/L 冰乙酸、0.5g/L 乙酸钠、24mg/L 三正辛基氧化磷、3mg/L β -萘甲酰三氟丙酮的 pH3.4、6mmol/L 醋酸盐缓冲液。

[0024] 本发明的 HIV 抗体及 HIV-1p24 抗原时间分辨荧光免疫分析方法和试剂盒,联合采用了双抗原夹心、双抗体夹心和生物素-亲和素时间分辨荧光免疫原理,解决了现有 HIV 抗体和抗原联合检测中抗体(HIV-1/HIV-2 型 /HIV-10 群)与抗原(HIV-1p24)不能区分的难点;实现了一个微孔能分别检测出 HIV 抗体和抗原,也实现了一个微孔能同时定量检测 HIV 抗体(HIV-1/HIV-2 型 /HIV-10 群)和抗原(HIV-1p24);该分析方法溯源至国家标准血清物质,实现了 HIV 抗体(HIV-1/HIV-2 型 /HIV-10 群)和抗原(HIV-1p24)检测结果的溯源性;使 HIV 检测窗口期缩短, HIV-1p24 抗原的定量检测不仅可以将窗口期缩短 4~5 天,还有利于短期抗病毒治疗效果价值的评估。还具有检测结果准确性、灵敏度高、特异性强、稳定性好、检测方法简便、高效等特点。

附图说明

[0025] 图 1 为本发明试剂盒一个实施例中 HIV 抗体的血清检测剂量-反应曲线。

[0026] 图 2 为本发明试剂盒一个实施例中 HIV-1p24 抗原的血清检测剂量-反应曲线。

[0027] 图 3 为本发明试剂盒一个实施例中 HIV 抗体的滤纸片检测剂量-反应曲线。

[0028] 图 4 为本发明试剂盒一个实施例中 HIV-1p24 抗原的滤纸片检测剂量-反应曲线。

具体实施方式

[0029] 本发明分析方法的基本原理是:以 HIV 抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体共同包被固相载体,在固相载体中加入校准品或待测样本,再加入生物素标记 HIV-1p24 抗体,孵育后,校准品或待测样本中的 HIV 抗体或 p24 抗原分别与固相载体上的 HIV 抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体结合,形成固相 HIV 抗原-HIV 抗体或固相 HIV p24 抗体-HIV p24 抗原-生物素标记的 HIVp24 抗体;洗涤去除校准品或对待测样本中未结合的抗体、抗原和杂质,然后同时加入镧系元素 1-HIV 抗原和镧系元素 2-链霉亲和素,孵育后,形成固相 HIV 抗原-HIV 抗体-镧系元素 1-HIV 抗原和固相 HIV p24 抗体-HIVp24 抗原-生物素标记的 HIV p24 抗体-镧系元素 2-链霉亲和素;洗涤去除未结合的标记物和杂质,利用时间分辨荧光免疫法的原理检测荧光值,镧系元素 1 标记荧光检测采用镧系元素 1 标记窗口检测程序,镧系元素 2 标记荧光检测采用镧系元素 2 标记窗口检测程序,荧光值强度与校准品或待测样本中的抗体或抗原的含量成正比,根据荧光值比值,从而可以定量测定且区分出所测样本中 HIV 抗体和 p24 抗原的值。

[0030] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件中所述条件,或按照制造厂商所建议的条件。

[0031] 实施例中的 HIV 重组抗原、HIV p24 单克隆抗体、生物素标记 HIV p24 抗体、

链霉亲和素购于 Sigma 公司；固相载体 96 孔微孔空白板(8×12 孔) 购于深圳市金灿华实业有限公司；铕 (Eu^{3+}) 与钐 (Sm^{3+}) 标记试剂盒购于芬兰 Wallac 公司；琼脂糖凝胶 Sepharose CL-6B 购于瑞典 Pharmacia 公司；S&S903 滤纸购于芬兰 Thermo Labsystems 公司；GBW(E)090052HIV-1 抗体血清(液体) 标准物质和 GBW(E)090122HIV-1p24 抗原血清(液体) 标准物质为中国卫生部临床检验中心提供；HIV 抗体参考品、HIV-1p24 抗原的参考品为中国食品药品检定研究院提供；增强液、浓缩洗液、实验缓冲液、FWZ- I 型微量振荡仪、DEM- III 型全自动酶标洗板均由广州市丰华生物工程有限公司提供。Victor_{TM}²D1420 型 TRFIA 仪购于美国 Perkin Elmer 公司。其他试剂为国产分析纯。

[0032] 实施例 1：试剂盒的制备

[0033] 本实施例 1 的试剂盒包括：同时包被有 HIV 抗原和 HIV-1p24 单克隆抗体的固相载体、校准品、生物素标记的 HIV-1p24 单克隆抗体、镧系元素 1 标记的 HIV 抗原、镧系元素 2 标记的链霉亲和素、实验缓冲液、浓缩洗液以及增强液。其具体制备方法如下：

[0034] ①制备抗原和抗体固相载体：将 HIV 重组抗原(含 HIV gp120、gp41、gp36 表位，可检测 HIV-1 型、HIV-2 型、HIV-10 亚群) 和 HIV-1p24 单克隆抗体用包被缓冲液(可以使用 pH9.6、50mmol/L 的碳酸缓冲液；pH4.5 的 20mmol/L 的磷酸盐缓冲液；pH7.8、50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液或 pH4.5、50mmol/L 的柠檬酸盐缓冲液等) 分别稀释至 0.1、0.5、1、2、5、10 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度作为包被液，在 96 孔微孔空白板加入 HIV 抗原包被液和 HIV-1p24 抗体包被液各 100 μL /孔，孵育过夜，将 96 孔板洗涤 1 次，然后再按 250 μL /孔加入 0.5% BSA、pH7.8、50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液封闭液，37±2℃ 条件下孵育 2~3h；将 96 孔板甩干，晾干，真空包装，2~8℃ 保存备用。

[0035] ②制备校准品：在本发明中校准品可以是液态的也可以是滤纸干血片。(1) 液态校准品：分别以 GBW(E)090052HIV-1 型抗体血清(液体) 标准物质和 GBW(E)090122HIV-1 型 p24 抗原血清(液体) 标准物质为参比，将 HIV 单克隆抗体(不含 HIV-1p24 抗体) 原料和 HIV-1p24 重组抗原原料用含有 10g/L BSA 的 pH7.8、50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液稀释成含有 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml HIV 标准抗体和对应的 0、10、40、160、640、1280U/ml HIV-1p24 标准抗原的混合校准品，分装成 0.5ml/瓶。(2) 滤纸干血片校准品：以 HIV-1 抗体血清标准物质和 HIV-1p24 抗原血清标准物质为参比，将 HIV 抗体(不含 HIV-1p24 抗体) 原料和 HIV-1p24 抗原原料加入到 50%-55% 的血细胞比容的全血中充分混匀，制备成含有 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml HIV 标准抗体和对应的 0、10、40、160、640、1280U/ml HIV-1p24 标准抗原的混合校准品，用 S&S903 采血滤纸作为载体，将以 50 μL 体积将各个不同浓度的校准品点加至滤纸上，每套标准品共有 6 个血斑，并有低、中、高浓度的质量控制品 3 个血斑，经自然阴干后过塑。

[0036] ③制备生物素标记抗体：可以采用常规方法对 HIV-1p24 单克隆抗体进行生物素标记，形成生物素标记抗体，本实施例中直接采用商业化的生物素标记的 HIV-1p24 抗体。采用棋盘方阵滴定法，选出生物素标记 HIV-1p24 抗体的最适工作浓度，将生物素标记 HIV-1p24 抗体用含有 10g/L BSA 的 pH7.8、50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液稀释成最适工作浓度的 1/20 倍，使其实际使用时用实验缓冲液再按 1:20 稀释检测效果最佳。

[0037] ④制备镧系元素 1 标记的 HIV 抗原：按照 Eu^{3+} 标记试剂盒说明书操作，将 1.0mg 的 HIV 重组抗原加入 Millipore 公司的截留分子量为 10000 的超滤离心管中，8000r / min

离心 5 ~ 6min,再用标记缓冲液 (pH 为 8.0 ~ 9.8 的 50mmol/L 碳酸盐缓冲液) 重复洗涤 6 次,将处理得到的 200 μ L HIV 重组抗原加入到 1.0mg 的预先用标记缓冲液溶解的 Eu^{3+} 标记试剂充分混匀,2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 (72 \pm 2) h。反应液用 pH7.8、50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1cm \times 40cm) 层析,在 A_{280} 监测收集第一洗脱峰。采用棋盘滴定法确定 Eu^{3+} 标记 HIV 抗原浓度的最佳工作浓度,使其实际使用时用实验缓冲液再按 1:20 稀释检测效果最佳。

[0038] ⑤制备镧系元素 2 标记的链霉亲和素:按照 Sm^{3+} 标记试剂盒说明书操作,将 1.0mg 的 SA 加入 Millipore 公司的截留分子量为 10000 的超滤离心管中,8000r / min 离心 5 ~ 6min,再用标记缓冲液 (pH 为 8.0 ~ 9.8 的 50mmol/L 碳酸盐缓冲液) 重复洗涤 6 次,将处理得到的 200 μ l SA 加入到 1.0mg 的预先用标记缓冲液溶解的 Sm^{3+} 标记试剂充分混匀,2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 振荡孵育 (72 \pm 2) h。反应液经分别用 pH7.8、50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液平衡的 Sepharose CL-6B 柱 (1cm \times 40cm) 层析,在 A_{280} 监测收集第一洗脱峰。采用棋盘滴定法确定 Sm^{3+} 标记链霉亲和素的最佳工作浓度,使其实际使用时用实验缓冲液再按 1:20 稀释检测效果最佳。

[0039] ⑥制备实验缓冲液、浓缩洗液和增强液:

[0040] 实验缓冲液:含 100ml/L 小牛血清、0.05g/L 染料 1、6ml/L Tween20、0.01mg/L EDTA、30ppm Procline300 的 pH7.8、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液;

[0041] 浓缩洗液:含有 4ml/L Tween20、30ppm 染料 2、30ppm Procline300 的 pH7.8、50mmol/L Tris-HCl 缓冲液,其中染料 1 和染料 2 的颜色不同,染料的选择没有限制,只要有颜色的水溶性好、低吸附性的色素染料均可。

[0042] 增强液:0.5ml/L 曲拉通 -100、0.8ml/L 冰乙酸、0.5g/L 乙酸钠、24mg/L 三正辛基氧化磷、3mg/L β -萘甲酰三氟丙酮的 pH3.4、6mmol/L 醋酸盐缓冲液。

[0043] ⑦分装上述水剂校准品、生物素标记抗体、制备镧系元素 1 标记的 HIV 抗原、制备镧系元素 2 标记的链霉亲和素、实验缓冲液 (30ml/瓶)、浓缩洗液 (40ml/瓶) 和增强液 (40ml/瓶)。

[0044] ⑧贴标签,组装为成品。

[0045] 实施例 2:检测分析 HIV 抗体和 HIV-1p24 抗原

[0046] ①试剂准备

[0047] 抗原和抗体固相载体:将实施例 1 制备的所需数量的抗原和抗体固相载体平衡至室温 (20 ~ 25 $^{\circ}\text{C}$)。余下的抗原和抗体固相载体及时置入自封袋密闭并于 2 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0048] 洗涤液:将实施例 1 中 40ml 浓缩洗液和 960ml 纯化水在干净的容器中混合,作为工作洗涤液备用。

[0049] 标记物工作液:将实施例 1 中制备的 Eu^{3+} 标记 HIV 重组抗原和 Sm^{3+} 标记链霉亲和素分别与实验缓冲液按体积比 1:1:20 加进洁净的同一个一次性容器中并混匀,使用前 30min 内配制,当次实验用完。

[0050] 生物素标记抗体工作液:将生物素标记 HIV-1p24 抗体与实验缓冲液按体积比 1:20 加进洁净的一次性容器中并混匀,使用前 30min 内配制,当次试验用完。

[0051] ②试验操作

[0052] 血清样本检测法:(1)吸取 75 μ l 的 HIV 抗体和 HIV-1p24 校准品或对照品、待测

样本加入抗原和抗体固相载体各个反应孔中；(2) 每个孔中加入 25 μ l 生物素标记抗体工作液；(3) 抗原和抗体固相载体在室温下,用振荡孵育 40min；(4) 第一步孵育结束后,用洗涤液洗涤 4 次；(5) 向每个反应位中加入 100 μ l 已配好的标记物工作液；(6) 在室温下,振荡孵育 40min；(7) 第二步孵育结束后,洗涤液洗涤 6 次；(8) 向每个反应位中加入增强液 100 μ l；(9) 抗原和抗体固相载体于室温下缓慢振荡 5min 后检测,在 30min 内完成检测并进行分析,检测在 TRFIA 仪上自动完成,软件中的参数根据实施例中的条件进行相应设置, Eu^{3+} 标记荧光检测采用铕标记窗口检测程序, Sm^{3+} 标记荧光检测采用钐标记窗口检测程序。其检测结果如图 1 和图 2 所示,图 1 中在 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml 范围内,曲线的线性线性回归方程为 $Y=6904.26X+2798$,相关系数 r 为 0.998,表明曲线线性趋势良好,采用双对数 LOG-LOG_B, SPLINE 数学拟合模型的剂量-反应曲线拟合程度高;图 2 中在 0、10、40、160、640、1280U/ml 范围内,曲线的线性回归方程为 $Y=3268.34X+2397$,相关系数 r 为 0.999,表明曲线线性趋势良好,采用双对数 LOG-LOG_B, SPLINE 数学拟合模型的剂量-反应曲线拟合程度高。

[0053] 滤纸干血片样本检测法:(1) 将校准品、质控品或待测样本用打孔器打下直径约 3.0mm 样品盘,将各样品盘放入抗原和抗体固相载体中;(2) 向反应板每孔中加入 200 μ l 已配好的生物素标记抗体工作液;(3) 抗原和抗体固相载体在室温下,用振荡孵育 60min;(4) 第一步孵育结束后,甩板,洗涤 4 次;(5) 向每个反应位中加入 200 μ l 已配好的标记物工作液;(6) 在室温下,振荡孵育 60min;(7) 第二步孵育结束后,洗涤 6 次;(8) 向每个反应位中加入增强液 200 μ l;(9) 抗原和抗体固相载体于室温下缓慢振荡 5min 后检测,在 30min 内完成检测并进行分析,检测在 TRFIA 仪上自动完成,软件中的参数根据实施例中的条件进行相应设置, Eu^{3+} 标记荧光检测采用铕标记窗口检测程序, Sm^{3+} 标记荧光检测采用钐标记窗口检测程序。其检测结果如图 3 和图 4 所示,图 3 中在 0、0.5、1、2、4、8NCU/ml 范围内,曲线的线性线性回归方程为 $Y=69.3X+213$,相关系数 r 为 1,表明曲线线性趋势良好,采用双对数 LOG-LOG_B, SPLINE 数学拟合模型的剂量-反应曲线拟合程度高;图 2 中在 0、10、40、160、640、1280U/ml 范围内,曲线的线性回归方程为 $Y=29.71X+329$,相关系数 r 为 0.999,表明曲线线性趋势良好,采用双对数 LOG-LOG_B, SPLINE 数学拟合模型的剂量-反应曲线拟合程度高。

[0054] 实施例 3:检测结果分析

[0055] (1) HIV 抗体的检测性能

[0056] ①阴性参考品符合率:检测 HIV 抗体国家阴性参考品 20 支,阳性反应不多于 2 份 ($\geq 18/20$)。

[0057] ②阳性参考品符合率:检测国家 HIV1 型抗体阳性参考品 18 支,均为阳性反应 (18/18),且 P11、P12 号样品的检测荧光值 $P12 \geq P11$;2 支 HIV2 型抗体阳性参考品,均为阳性反应 (2/2)。

[0058] ③最低检出限:检测国家最低检出限参考品 6 份,阳性反应不少于 3 份且基质血清 S1 为阴性反应。

[0059] ④线性:检测企业参考品, L1 ~ L5 共 5 个样品测定值统计分析后,实测值与理论值的线性相关系数 r 大于 0.98。

[0060] ⑤准确度:检测企业参考品, L1 ~ L5 共 5 个样品的实测值与理论值相对偏倚均在

±20.0% 内。

[0061] ⑥稳定性：试剂盒自成品生产之日起于 37℃放置 6 天(有效期为 12 个月)成品剩余效期内,则按 37℃放置 6 天有效期为 12 个月推算 37℃放置的时间进行检测,结果符合各项目规定的要求。

[0062] (2) HIV1 型 p24 抗原的检测性能

[0063] ①阴性参考品符合率：检测 HIV1 型 p24 抗原国家阴性参考品 20 支,均为阴性反应(20/20)。

[0064] ②阳性参考品符合率：检测 HIV1 型 p24 抗原国家阳性参考品 10 支,均为阳性反应(10/10)。

[0065] ③重复性：平行测定 HIV1 型 p24 抗原及抗体联合检测试剂用国家精密度参考品 10 孔,荧光值的精密度(CV 值) ≤ 15%。

[0066] ④最低检出限：检测国家灵敏度参考品 10 支：L1(20U/ml)、L2(10U/ml)、L3(5U/ml)、L4(2.5U/ml)、L5(1.25U/ml)……L10(稀释用基质血浆)；最低检出量不得高于 10U/ml, L10 不得出现阳性反应。

[0067] ⑤线性：检测国家参考品, L1 ~ L5 共 5 个样品测定值统计分析后,实测值与理论值的线性相关系数 r 大于 0.98。

[0068] ⑥准确度：检测国家参考品, L1 ~ L5 共 5 个样品的实测值与理论值相对偏倚均在 ±20.0% 内。

[0069] ⑦稳定性：试剂盒自成品生产之日起于 37℃放置 6 天(有效期为 12 个月);成品剩余效期内,则按 37℃放置 6 天有效期为 12 个月推算 37℃放置的时间进行检测,结果符合各项目规定的要求。

[0070] 实施例 4：干扰试验评价

[0071] 以上实施例 1 制备的试剂盒的分析特异性评价如下：血样本中胆红素 818 μmol/L、血红蛋白 180g/L、甘油三酯 21.54mmol/L 对本试剂盒的检测结果无干扰作用。不受血样本中柠檬酸钠(1.088mol/L)、乙二胺四乙酸二钾(0.2744mol/L)、草酸钾(0.5428mol/L)、氟化钠(0.4878mol/L)、肝素钠(150U/L)等抗凝剂的干扰。检测甲型肝炎病毒抗体、乙型肝炎病毒表面抗体、乙型肝炎病毒 e 抗体、乙型肝炎病毒核心抗体、丙型肝炎病毒抗体、梅毒抗体、乙型肝炎病毒表面抗原、乙型肝炎病毒 e 抗原、重组乙型肝炎病毒核心抗原、重组丙型肝炎病毒核心抗原均无交叉反应。

[0072] 实施例 5：实施例 1 的试剂盒与参比试剂盒的等效性评价

[0073] 用实施例 1 的试剂盒和参比试剂盒分别检测 1020 例正常人血清样本,其临床比对结果如表 1 所示。

[0074] 表 1

	实施例 1 试剂盒	参比试剂盒		合计
		+	-	
[0075]	+	0	0	0
	-	0	1020	1020
	合计	0	1020	1020

[0076] 由上表 1 可以看出,本发明的试剂盒的特异性为 100%。

[0077] 用实施例 1 的试剂盒和参比试剂盒分别检测 306 例 HIV 抗体阳性血清样本,其临床比对结果如表 2 所示。

[0078] 表 2

	实施例 1 试剂盒	参比试剂盒		合计
		+	-	
[0079]	+	306	0	306
	-	0	0	0
	合计	306	0	306

[0080] 由上表 2 可以看出,本发明的试剂盒检测 HIV 抗体的灵敏度为 100%。

[0081] 用实施例 1 的试剂盒和参比试剂盒分别检测 261 例 HIV-1p24 抗原阳性血清样本,其临床比对结果如表 3 所示。

[0082] 表 3

[0083]

	实施例 1 试剂盒	参比试剂盒		合计
		+	-	
	+	261	0	261
	-	0	0	0
	合计	261	0	261

[0084] 由上表 3 可以看出,本发明的本发明的试剂盒检测 HIVp24 抗原的灵敏度为 100%。

[0085] 本发明的试剂盒和检测分析方法联合采用了双抗原夹心、双抗体夹心和生物素-亲和素分辨荧光免疫法,操作简单快速,可实现自动化分析,非常值得在临床上应用推广。

[0086] 最后应说明的是:以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等均应包含在本发明的保护范围之内。

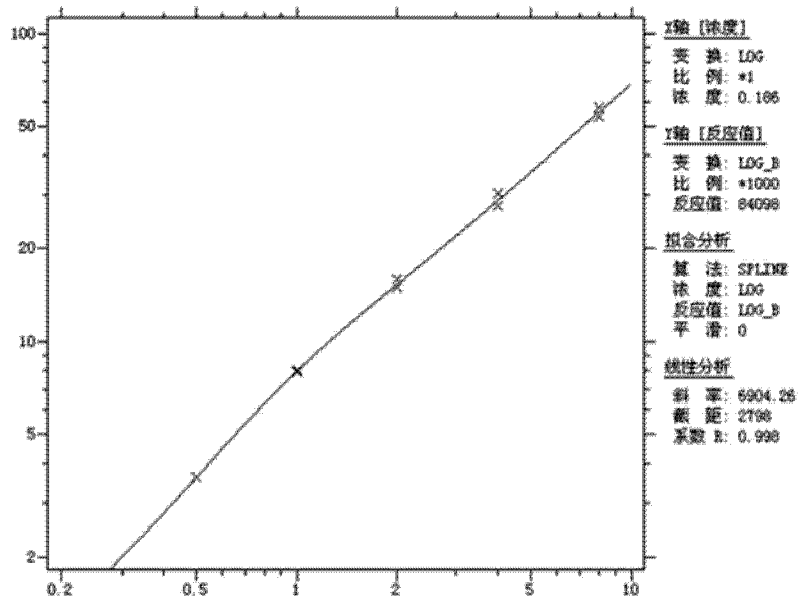


图 1

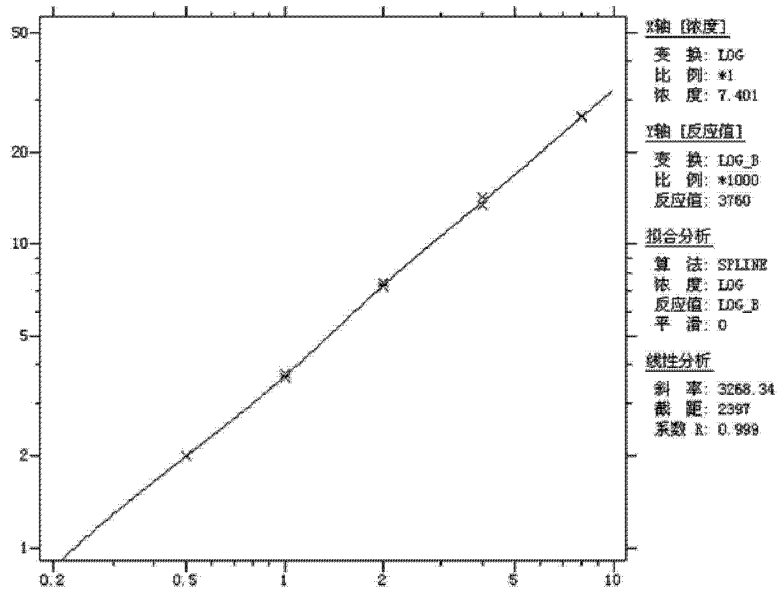


图 2

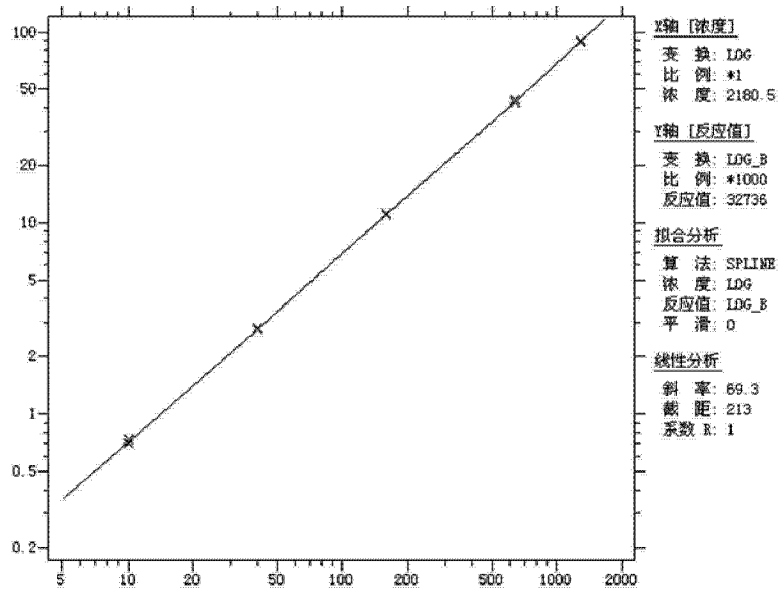


图 3

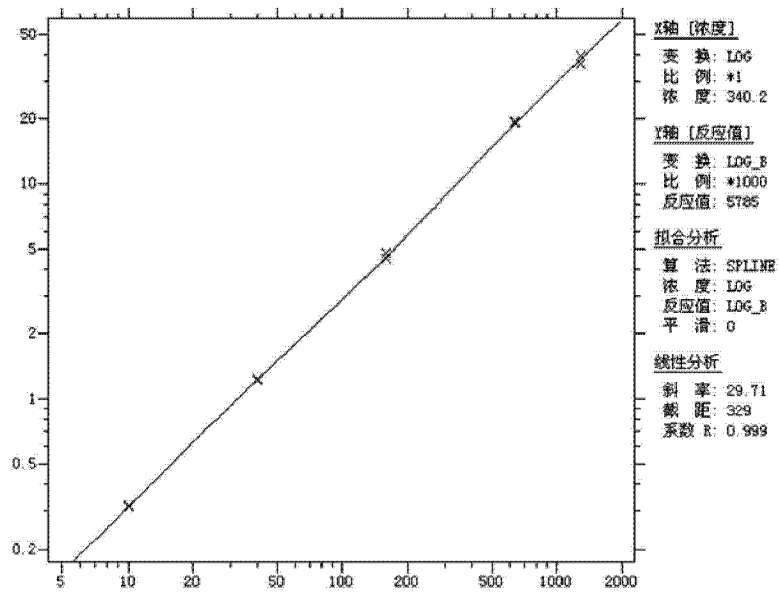


图 4

专利名称(译)	HIV抗体及HIV-1p24抗原双标记时间分辨荧光免疫分析及试剂盒		
公开(公告)号	CN103869073A	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201410129830.4	申请日	2014-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市丰华生物工程有限公司		
[标]发明人	谭玉华 李奕辉 陈建起 范主桥		
发明人	谭玉华 李奕辉 陈建起 范主桥		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/571 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/56983 G01N33/571 G01N2333/16		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种HIV抗体及HIV-1p24抗原双标记时间分辨荧光免疫分析方法及试剂盒。该分析方法主要包括：制备同时包被有HIV重组抗原和HIV-1p24单克隆抗体的固相载体；制备生物素标记的HIV-1p24单克隆抗体；制备镧系元素1标记的HIV重组抗原；制备镧系元素2标记的链霉亲和素；在抗原和抗体固相载体中，加入含有HIV标准抗体和HIV p24标准抗原的校准品或待测样品，加入生物素标记的HIV-1p24抗体，孵育、洗涤后，加入镧系元素1标记的HIV抗原和镧系元素2标记的链霉亲和素，再次孵育、洗涤后，加入增强液进行荧光检测。本发明的分析方法解决了现有HIV抗原抗体联合检测中抗体与抗原不能区分的难点，实现了同时定量检测HIV抗体和HIV-1p24抗原，缩短了HIV检测窗口期。

实施例1 试剂盒	参比试剂盒		合计
	+	-	
+	0	0	0
-	0	1020	1020
合计	0	1020	1020