

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510031683.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 12 月 13 日

[11] 公开号 CN 1877330A

[22] 申请日 2005.6.10

[21] 申请号 200510031683.8

[71] 申请人 湖南景达基因有限公司

地址 410013 湖南省长沙市河西高新技术产业
业开发区火炬城 M2 栋金荣科技园 B 座
7 楼

[72] 发明人 李少波 张贺秋 刘劭钢 王国华
李宏实 陈 坤 周祖岳 李 凯
周松华

权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 3 页

[54] 发明名称

丙型肝炎病毒核心抗原酶联免疫诊断试剂盒
及其制备方法

[57] 摘要

一种丙型肝炎病毒核心抗原酶联免疫诊断试剂盒及其研制方法，本发明通过分析丙型肝炎病毒不同亚型的核心抗原序列，克隆表达 HCV 高度保守的特征性核心抗原基因，获得高效分泌的抗 HCV 核心抗原的细胞株，纯化出包含 HCV 核心四个 aa 表位的高比活单克隆抗体：使用其中的 Cab1、Cab2 作为包被抗体，Cab3、Cab4 作为酶标抗体，用双抗体夹心技术制备 HCV - cAg ELISA 诊断试剂盒。本发明大大缩短 HCV 病毒检测的“窗口期”，使其从现有 ELISA 抗体检测方法的 70 天缩短到 14 天，为 HCV 感染的早期诊断提供了更为先进的技术支持。同时其灵敏度和特异性较现有产品有明显提高。

1、一种丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-core Ag)酶联免疫诊断试剂盒,其特征
在于:试剂盒内装有 96 人份抗体检测板 1 块,酶结合物、阳性参考血清、阴
性参考血清、样品稀释液、浓缩洗液、显色液 A、显色液 B、和终止液各
1 瓶。

2、根据权利要求 1 所述的一种丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-core Ag)酶联
免疫诊断试剂盒,其特征
在于:其包被抗体及酶标第二抗体为抗丙型肝炎病
毒核心基因区不同表位的单克隆抗体,单克隆抗体对应的核心区氨基酸序
列为:

CAb1: 包含 HCV 核心区氨基酸位置: 20-35aa

CAb2: 包含 HCV 核心区氨基酸位置: 35-50aa

CAb3: 包含 HCV 核心区氨基酸位置: 100-115aa

CAb4: 包含 HCV 核心区氨基酸位置: 115-130aa

使用其中的 CAb1、Cab2 作为包被抗体,使用 Cab3、CAb4 作为酶标第二抗
体。

3、根据权利要求 1 所述的一种丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-core Ag)酶联
免疫诊断试剂盒,其特征
在于:抗体检测板的最佳制备条件为,使用包被单
克隆抗体以最佳包被抗体浓度(CAb1: 10ug/ml,CAb2: 10ug/ml),用
0.05M, pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释,每孔加 200 μ l 于检测板孔内,置 4℃,12
小时。弃去包被液,用洗涤液充分洗涤各孔,每次 300 μ l / 孔,随之拍干。
加入封闭液,220 μ l / 孔,4℃封闭 4 小时,随后弃去封闭液拍干,室温干
燥 24 小时。干燥后的酶联板,迅速真空封口包装,将封装好的板存于 2-8
℃。

4、根据权利要求 1 所述的一种丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-core Ag)酶联免疫诊断试剂盒,其特征就在于其酶结合物的制备方法为:取 5mg HRP 溶于 1.0 ml NaHCO_3 溶液,充分溶解 HRP。加入适量 0.06M NaIO_4 室温避光搅拌 30 分钟。移入透析袋,用 0.01M, pH9.6 碳酸盐缓冲液透析过夜。取纯化包被单抗(CAb1 和 CAb2) 5mg,用 0.01M 的 NaHCO_3 溶液充分溶解,与酶液混合,装入透析袋,用 0.01M, pH9.6 碳酸盐缓冲液 4℃ 避光透析 20 小时,换液 3 次。取透析后结合液,加入 0.4% NaBH_4 (按 5mg HRP 溶于 0.2ml NaBH_4 溶液计)搅拌 30 分钟后,4℃ 放置 4 小时。将酶结合物装入透析袋,用 PH7.2, 0.01M 的 PBS 透析 48 小时。Sephadex G-200 凝胶过滤:将透析液上 Sephadex G-200 层析柱,用 0.01M, PH7.2 的 PBS 洗脱,收集第一个的洗脱峰,再用 PEG2000 浓缩,测量浓缩液体积后加等体积甘油, -20℃ 保存备用。

5、根据权利要求 1 所述的一种丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-core Ag)酶联免疫诊断试剂盒,其特征就在于: 1) 阳性对照的制备: 从 HCV 感染者静脉采血后分离血清,经抗 HCV-EIA 抗体检测阴性; 单项转氨酶高 (大于 40), 经 HCV-RNA PCR 法测定亦为阳性; 经 ortho 抗原检测试剂 (EIA) 对比检测均为阳性, 抗 HIV、HBsAg 均为阴性血清样品, HCV-C 抗原检测为阳性。2) 阴性对照的制备: 选用正常献血员血清,经抗 HCV-EIA 检测为阴性、抗 HIV、HbsAg 及 Tp 亦为阴性正常人血清 10 份,其中包括较高本底的样品,加入 0.02% 的硫柳汞,除菌过滤后分装, -20℃ 保存。

6、根据权利要求 1 所述的一种丙型肝炎病毒核心抗原(HCV-core Ag)酶联免疫诊断试剂盒,其检测程序为:

1) 取出试剂, 15-30℃ 放置 30 分钟; 每孔加 100 μl 样品稀释液, 然后再加入 100 μl 待测样品; 包被板均需留空白孔, 阴、阳性对照孔。空白孔加入 200 μl 样品稀释液, 阴、阳性对照孔直接加入 200 μl 阴、阳对照血清, 混匀后 37℃ 水浴振荡 90 分钟。

2) 用 1:20 稀释后的洗涤液洗板 4 次, 最后一次拍干。

3) 每孔加 100 μl 酶结合物 37℃ 水浴 30 分钟, 剩余酶结合物 4℃ 保存。

4) 洗板同 2)。

5) 先加入显色剂 A 液 $50\mu\text{l}$ ，再加入显色剂 B 液 $50\mu\text{l}$ ， 37°C 水浴避光显色 15-20 分钟。

6) 每孔加 $50\mu\text{l}$ 终止液。终止后 10 分钟用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔光吸收值 (OD450nm)。

7) 根据判定标准进行判定。

7、根据权利要求 1 所述的一种丙型肝炎病毒核心抗原 (HCV-core Ag) 酶联免疫诊断试剂盒, 其判定标准为: 临界值 (cut off 值) = 阴性对照平均 OD 值 + 0.05 = 0.118。阴性对照 OD 值 ≤ 0.06 时按 0.06 计算; 若 > 0.06 , 则按实际 OD 值计算。凡待检标本 OD 值大于临界值即判为阳性。待检标本 OD 值小于临界值即判为阴性。

丙型肝炎病毒核心抗原酶联免疫诊断试剂盒及其制备方法

技术领域

本发明涉及病毒抗原检测试剂盒及其制备方法，具体涉及丙型肝炎病毒核心抗原（HCV-core Ag）酶联免疫诊断试剂盒及该试剂盒的制备方法。

背景技术

丙型肝炎是由丙型肝炎病毒（HCV）感染引起，主要经输血传播的非甲非乙型肝炎，据统计全世界约有 1.7 亿 HCV 的感染者，我国的丙肝病毒感染者已达到 4000 万。目前还没有确实有效的临床治疗方法，针对 HCV 的疫苗也尚未面世，这种状况已引起我国政府有关部门的高度重视，特别是在血液制品生产领域，国家已颁布相关法规对其质量进行严格把关。但由于现行 HCV Ab-ELISA 法检测 HCV 感染“窗口期”过长的原因，我们仍未能有效地阻止 HCV 的传播。

目前用于临床诊断 HCV 感染的方法主要有两类：PCR 法检测 HCV RNA 和免疫学检测 HCV 抗体法。

1. PCR（聚合酶链式反应）检测法：直接用来检测 HCV 的核酸物质，HCV RNA 阳性说明病毒的存在。它能在 HCV 感染早期体内病毒含量很少的时候就能检出病毒，因此，它是诊断 HCV 感染的一种直接检测实验，也是目前最灵敏的检测方法，它更适合于丙型肝炎的早期诊断。但由于 PCR 非常敏感，实验过程中的污染问题非常容易导致出现假阳性结果。因此，前段时期 PCR 诊断试剂的生产、临床检测工作较为混乱，卫生部曾经暂停 PCR 的临床检测工作，最近卫生部虽然已经同意重新开始进行该类项目的临床检测，但其距临床的大规模应用尚存在很大的距离。

2. 免疫学检测 HCV 抗体法：人体在感染 HCV 后能够产生特异性的 HCV

抗体,因此,用免疫学方法测定 HCV 抗体是一种快速简便的检测手段。现阶段国内对于 HCV 病毒检测绝大部分采用 HCV Ab-ELISA 检测诊断试剂,该类诊断试剂在对 HCV 进行检测时,检测灵敏度和特异性较低,检测“窗口期”长达 50~70 天,不利于 HCV 的及早发现和及时治疗,同时使血液制品使用者面临着较高的 HCV 病毒潜在感染风险。

美国 ORTHO 公司于 2000 年推出了 HCV Ag-ELISA 诊断试剂盒,该产品具有很高的灵敏度和特异性,检测效果稳定,“窗口期”为 14 天,各类指标明显优于目前被广泛使用的 HCV Ab-ELISA 检测方法。由于技术保密等原因,ORTHO 公司尚未在中国进行新产品申报注册,也未在中国申报发明专利,同时由于价格过高导致该产品未能在中国得以推广和普及。不同 HCV 检测方法性能比较见表 1

表 1 现有丙型肝炎病毒诊断方法性能比较

技术指标	PCR 方法	免疫学抗体检测方法	ORTHO 公司产品
窗口期	11 天	70 天	14 天
灵敏度	高	较高	1pg
特异性	较低	高	高

发明内容

本发明的目的在于针对现有丙型肝炎抗体诊断试剂检测“窗口期”过长的不足,避免现有检测方法的局限性,提供一种丙型肝炎病毒核心抗原酶联免疫诊断试剂盒。

该试剂盒包括:

96 人份抗 HCV-cAg 单克隆抗体包被板 1 块,酶结合物 1 瓶,阳性参考血清 1 瓶,阴性参考血清 1 瓶,样品稀释液 1 瓶,浓缩洗液 1 瓶,显色液 A 1 瓶,显色液 B 1 瓶,终止液 1 瓶,说明书 1 份及不干胶纸片 2 张。

上述试剂盒采用双抗体夹心 ELISA 法(图 1),包被物为抗 HCV-cAg

单克隆抗体 CAb1、CAb2, 两种单抗包被浓度均为 10ug/ml, 每孔加样 200 μ l, 包被缓冲液为 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液, 指示抗体为过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 HCV-cAg 单克隆抗体 CAb3、CAb4, 显色体系为 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺(TMB) 体系。

本发明的另一目的是提供上述试剂盒的制备方法, 包括以下步骤:

(1) HCV-core 重组抗原的制备: 选择 HCV 核心抗原 1~160 位氨基酸序列进行重组克隆表达。

(2) 用基因重组表达的 HCV-cAg 免疫 BALB/C 小鼠, 制备抗 HCV-cAg 单克隆抗体。抗体包含了针对 HCV 核心抗原四个氨基酸表位的单克隆抗体, 分别为: CAb1 (20~35aa), CAb2 (35~50aa), CAb3 (100~115aa), CAb4 (115~130aa)。

(3) 包被抗HCV-cAg单克隆抗体CAb1、CAb2成为包被反应板。

(4) 将辣根过氧化物酶(HRP)与 CAb3、CAb4 单抗偶联制备酶标抗体。

(5) 样品稀释液、浓缩洗液、显色液及终止液的配制。

(6) 阳性对照和阴性对照的制备。

(7) 分装试剂盒的各种成分, 按试剂盒需要量分装在小瓶中。

(8) 检定试剂盒的特异性、灵敏度、精密度。

(9) 组装成为成品。

与现有技术相比, 本发明具有以下突出优点:

1. 本发明通过从基因库中调出 HCV 全序列基因, 对不同亚型 HCV 核心抗原的序列进行分析, 同时使用 Macvector 程序对丙型肝炎核心抗原 1~160 氨基酸序列的抗原性、亲水性和抗原表位进行分析。选择序列保守、抗原性强的 4 个主要的抗原表位, 分别位于 20~35、35~50 和 100~115、115~130 位氨基酸残基。利用这些抗原表位制备单克隆抗体构建丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒, 经检测该试剂盒能很好地识别丙型肝炎病毒核心抗原, 具有较高特异性和较低假阴

性率及假阳性率，预示着有良好的应用前景。

2. 本发明基于酶联免疫吸附的基本原理，采用包被抗 HCV 核心抗原的单克隆抗体的方法，能直接检测到血制品中 HCV 核心抗原，其应用可以大大缩短 HCV 病毒检测的“窗口期”，使其从第三代 ELISA 抗体检测方法的 70 天缩短到 14 天，对于加强输血及血液制品使用的安全性具有重要意义，同时为 HCV 感染的早期临床诊断提供了更为先进的技术支持，增加了丙肝预防和治疗的主动性。

3. 本发明所采用的标酶方法可以大大提高抗原检测灵敏度。常规标酶方法是过碘酸钠法和戊二醛法，这两种方法产生的酶结合物中，酶分子与待测抗原结合部位之间距离很近，如过碘酸钠法中两者距离接近于 1 个碳原子，由此制成的酶结合物只有一个表面可与底物接触。而本发明所采用的标酶方法可以使 HRP 与抗原结合部位的间距增加到约 25 个碳原子的距离，酶结合物与待测抗原分子反应并加入底物后，HRP 酶分子可全部浸在底物中（酶与抗体间可同时通过 10 个以上的底物分子），由此提高了酶表面底物的浓度，抗原检测灵敏度相应得到较大提高，可检测到 0.1ml 血清中 1pg 量的丙型肝炎病毒抗原。

附图说明

图 1: HCV-cAg ELISA 双抗体夹心检测原理图。图中：1 为 ELISA 微孔板，2 为抗 HCV 核心抗体，3 为 HCV 核心抗原，4 为抗 HCV 核心第二抗体，5 为 HRP 辣根过氧化物酶，6 为底物显色反应。

图 2: HCV 核心抗原的抗原性、亲水性和抗原表位的分析图。图中（1）为抗原性分析图；（2）为抗原亲水性分析图；（3）为抗原表位分析图。

图 3: 重组 HCV 核心抗原的克隆表达图。

具体实施方式

1. HCV-core 重组抗原的制备

1.1 重组抗原克隆表达：从基因库中调出 HCV 全序列基因，对不同亚型 HCV 核心抗原的序列进行分析：

	10	20	30	40	50
HCV 1	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR
HCV 1b	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR
HCV 2a	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR
HCV 2b	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR
HCV 3	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFPGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR

	60	70	80	90	100
HCV 1	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YPWPLYGNEG	CGWAGWLLSP
HCV 1b	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YPWPLYGNEG	CGWAGWLLSP
HCV 2a	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YPWPLYGNEG	CGWAGWLLSP
HCV 2b	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YPWPLYGNEG	CGWAGWLLSP
HCV 3	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YPWPLYGNEG	CGWAGWLLSP

	110	120	130	140	150
HCV 1	RGSRPSWGPT	DPRRRSRNLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	GAPLGGARRA
HCV 1b	RGSRPSWGPT	DPRRRSRNLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	GAPLGGARRA
HCV 2a	RGSRPSWGPT	DPRRRSRNLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	GAPLGGARRA
HCV 2b	RGSRPSWGPT	DPRRRSRNLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	MAPLGGARRA
HCV 3	RGSRPSWGPT	DPRRRSRNLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	MAPLGGARRA

	160
HCV 1	LAHGVRVLED
HCV 1b	LAHGVRVLED
HCV 2a	LAHGVRVLED
HCV 2b	LAHGVRVLED
HCV 3	LAHGVRVLED

同时使用 Macvector 程序对丙型肝炎核心抗原 1~160 氨基酸序列的抗原性、亲水性和抗原表位进行分析（图 2）。其中有 4 个序列保守、抗原性强的抗原表位，分别位于 20~35、35~50 和 100~115、115~130 位氨基酸残基。选择 2~160 位氨基酸序列插入表达载体 pBVIL1 进行重组克隆表达（图 3）。

1.2 重组 HCV-cAg 的纯化和活性鉴定：将工程菌中提取的重组 HCV-C 抗原经 S-Sepharose 柱阶段梯度洗脱，收集 0.15M NaCl 洗脱峰，再经 Sephadex G50 柱脱盐，收集第一个洗脱峰。用 SDS-PAGE 方法鉴定抗原纯度，蛋白质上样量为 10 μg 的条件下仅存一条带，扫描纯度

≥95%。用已纯化 HCV-c 抗原对室内质控血清进行 ELISA 试验以测定活性。纯化后的抗原于-20℃低温保存。

2. 抗HCV-cAg单克隆抗体的制备

2.1 制备腹水：取 HCV-cAg 免疫的 Balb/c 小鼠，无菌取出已免疫的 Balb/c 小鼠脾脏，分离脾细胞，将脾细胞与骨髓瘤细胞按 9: 1 的比例混合，PEG 促融合，于 HAT 培养液（20%胎牛血清/DMEM 1×HAT）上融合成杂交瘤细胞。制备成杂交瘤细胞，接种杂交瘤细胞，制备腹水。

2.2. 抗体纯化：单克隆腹水先经辛酸-硫酸铵法粗纯化，再上 Sephadex G-50 凝胶柱作进一步纯化，PEG2000 浓缩，测 280nm 时 OD 值计算纯化抗体的浓度，用 SDS-PAGE 方法鉴定纯度，冻干，-20℃保存备用。

3. 抗 HCV-cAg 单克隆抗体包被板的制备

使用包被抗体 (CAb1、CAb2) 以最佳包被抗体浓度 (CAb1 10ug/ml, CAb2 10ug/ml)，用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液稀释，每孔加 200 μl 于酶联板孔内，置 4℃12 小时。弃去包被液，用洗涤液充分洗涤各孔，每次 300 μl / 孔，随之拍干。加入封闭液 (BSA2g, 1%硫柳汞 6ml, 加 0.01M PBS 至 1000ml) 220 μl / 孔，4℃封闭 4 小时，随后弃去封闭液拍干，室温干燥 24 小时。干燥后的酶联板，迅速真空封口包装。将封装好的板存于 2-8℃。

4. 酶标抗体的制备

取 5mg HRP 溶于 1.0 ml NaHCO₃ 溶液，充分溶解 HRP。加入适量 0.06M NaIO₄ 室温避光搅拌 30 分钟。移入透析袋，用 0.01M, pH9.6 碳酸盐缓冲液透析过夜。取纯化酶标单抗 5mg，用 0.01M NaHCO₃ 溶液充分溶解后与酶液混合，装入透析袋，用 0.01M, pH9.6 碳酸盐缓冲液 4℃避光透析 20 小时，中间换液 3 次。取透析后结合液加入 0.4%NaBH₄ 0.2ml，搅拌 30 分钟后，4℃放置 4 小时。将酶结合物装入透析袋，用 PH7.2, 0.01M PBS 透析 48 小时。Sephadex G-200 凝胶过滤：将透

析液上 Sephadex G-200 层析柱，用 PH7.2, 0.01M PBS 洗脱，收集第一个的洗脱峰，再用 PEG2000 浓缩，-20℃ 保存备用。抗人 IgG 酶标记物采用方阵滴定，以间接 ELISA 法测定效价。

5. 样品稀释液、洗液、终止液的配制

1) 样品稀释液:

山羊血清	100ml
1%硫柳汞	20ml
0.1M铁氰化钾	10ml
吐温-20	0.5ml
10mg/ml 庆大霉素	10ml
0.01M PBS (PH7.4) 至 1000ml，过滤除菌，4℃ 保存	

2) 洗涤液(20 倍浓缩)

NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	2.96g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	29g
NaCl	234g
吐温-20	20ml
双蒸 H ₂ O 至 1000ml，过滤除菌，4℃ 保存	

3) 中止液

浓 H ₂ SO ₄	112ml
双蒸 H ₂ O 至 1000ml，过滤除菌，4℃ 保存	

6. 阳性对照和阴性对照的制备

1) 阳性对照的制备：从 HCV 感染者静脉采血后分离血清，经抗 HCV-EIA 抗体检测阴性；单项转氨酶高（大于 40），经 HCV-RNA PCR 法测定亦为阳性；经 ortho 抗原检测试剂（EIA）对比检测均为阳性，抗 HIV、HBsAg 均为阴性血清样品，HCV-C 抗原检测为阳性。

2) 阴性对照的制备：选用正常献血员血清，经抗 HCV-EIA 检测为阴性、抗 HIV、HbsAg 及 Tp 亦为阴性正常人血清 10 份，其中包括较

高本底的样品，加入 0.02%的硫柳汞，除菌过滤后分装，-20℃保存。

7. 显色液的配制

1) 显色液 A

醋酸钠	27.2g
柠檬酸	3.2g
30% H_2O_2	0.6ml
双蒸 H_2O 至 1000ml	

2) 显色剂 B

TMB	0.4g
EDTA- Na_2	0.4g
柠檬酸	1.9g
甘油	100ml
双蒸 H_2O 至 1000ml	

8. 试剂盒检测操作程序

1) 取出试剂，15-30℃放置 30 分钟，每孔加 100 μ l 样品稀释液，然后再加入 100 μ l 待测样品，留空白孔，阴、阳性对照孔，其中空白孔加入 200 μ l 样品稀释液，阴、阳性对照孔直接加入 200 μ l 阴、阳对照血清，混匀后 37℃水浴振荡 90 分钟。

2) 用 1:20 稀释后的洗涤液洗板 4 次，最后一次拍干。

3) 每孔加 100 μ l 酶结合物，37℃水浴 30 分钟，剩余酶结合物 4℃保存。

4) 洗板同 2)。

5) 先加入显色剂 A 液 50 μ l，再加入显色剂 B 液 50 μ l，37℃水浴避光显色 15-20 分钟。

6) 每孔加 50 μ l 终止液。终止后 10 分钟用酶标仪在 450nm 波长下读取每孔光吸收值(OD450nm)。

7) 根据判定标准进行判定。

判定标准为:临界值 (cut off 值) = 阴性对照平均 OD 值 + 0.05 = 0.118。阴性对照 OD 值 ≤ 0.06 时按 0.06 计算; 阴性对照 OD 值 > 0.06 时则按实际 OD 值计算。凡待检标本 OD 值大于临界值即判为阳性。待检标本 OD 值小于临界值即判为阴性。

9. 试剂盒的准确性, 特异性, 敏感性和精密性检测.

1) 准确性: 用内控阳性样品检测三批试剂无 1 例假阴性, 在 10pg 的 OD450nm 均大于临界值 0.118 (表 2)。

表 2 阳性内质控血清试验 (450nm OD 值)

批号	P1	P2	P3	P4	P5
030606	2.580	0.560	1.419	0.328	0.239
030608	2.627	0.570	1.451	0.337	0.235
030610	2.573	0.575	1.454	0.333	0.233

2) 特异性: 用内控阴性样品检测三批试剂无 1 例假阳性, 在 10pg 的 OD450nm 均小于临界值 0.118 (表 3)。

表 3 阴性内质控血清试验 (450nm OD 值)

批号	N1	N2	N3	N4	N5
030606	0.065	0.062	0.067	0.057	0.058
030608	0.035	0.064	0.072	0.033	0.067
030610	0.042	0.067	0.065	0.047	0.073

批号	N6	N7	N8	N9	N10
030606	0.062	0.056	0.066	0.066	0.065
030608	0.059	0.069	0.081	0.069	0.082
030610	0.085	0.065	0.071	0.068	0.073

3) 敏感性: 三批试剂用灵敏度标准品测定在 10pg 的 OD450nm 大于临界值 (表 4)。

表 4 灵敏度试验

批号	100ng	10ng	1ng	100pg	10pg
030606	2.555	1.663	1.387	0.914	0.479
030608	2.550	1.678	1.476	0.910	0.487
030610	2.549	1.756	1.463	0.911	0.489

4) 精密性

(1) 板间精密性 (CV%) 测定: 随机抽取 8 块抗体包被板, 各取 1 条板条, 组成 1 块整板。取 1 份阳性内质控血清及 1 份阴性内质控血清, 用样品稀释液 10 倍稀释后各加 42 孔, 按正常程序检测, 测定各孔 OD 值, 分别计算阴、阳性组的变异系数 (CV%), 要求 $CV\% \leq 15\%$ 。检测结果见(表 5)。

表 5 : 板间精密性 (CV%) 测定结果

	阴性血清 CV%	阳性血清 CV%
包被抗体板	X =0.046 SD=0.003 CV= 6.5%	X =0.467 SD=0.014 CV= 3%

(2) 板内精密性 (CV%) 测定: 随机抽取 1 块抗体包被板, 取 1 份阳性内质控血清及 1 份阴性内质控血清, 用样品稀释液 10 倍稀释后各加 42 孔, 按正常程序检测, 测定各孔 OD 值, 分别计算阴、阳性组的变异系数 (CV%), 要求 $CV\% \leq 15\%$ 。检测结果见表 6。

表 6 : 板内精密性 (CV%) 测定结果

	阴性血清 CV%	阳性血清 CV%
包被抗体板	X=0.048 , SD=0.004 CV=8.3%	X=0.465, SD=0.013 CV=2.8%

3) 用 1 份弱阳性血清进行三批精密性实验(表 7)

表 7 三批精密性实验

批号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	CV%
030606	0.483	0.465	0.470	0.454	0.465	0.452	0.454	0.457	0.455	0.449	2.2%
030608	0.512	0.464	0.461	0.457	0.457	0.459	0.465	0.457	0.452	0.453	3.8%
030610	0.495	0.466	0.464	0.453	0.464	0.456	0.462	0.456	0.455	0.455	2.7%

试验结果表明，本试剂盒灵敏度为 10pg；在所设定 cut off 临界值下，标本阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，精密性 (CV%)，符合质控标准。

对五种氨基酸序列的四个抗原表位的补充说明：

对五种不同亚型 HCV 核心抗原（HCV 1、HCV 1b、HCV 2a、HCV 2b、HCV 3）的 1~160 氨基酸序列进行分析，选择序列保守、抗原性强的 4 个主要的抗原表位，分别为 20~35aa， 35~50aa， 100~115aa， 115~130aa。

针对 HCV 核心抗原四个氨基酸表位的单克隆抗体，分别为：CAb1， CAb2， CAb3， CAb4。使用其中的 CAb1、Cab2 作为检测板包被抗体，使用 Cab3、CAb4 作为酶标第二抗体。

SEQUENCE LISTING

<110> 湖南景达基因有限公司

<120> 丙型肝炎病毒核心抗原酶联免疫诊断试剂盒及其制备方法

<130>

<140> 2005100316838

<141> 2005-06-10

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 160

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<220>

<221> DOMAIN

<222> (20)..(35)

<220>

<221> DOMAIN

<222> (35)..(50)

<220>

<221> DOMAIN

<222> (100)..(115)

<220>

<221> DOMAIN

<222> (115)..(130)

<400> 1

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Gln Pro Glu Gly Arg Thr Trp Ala Gln Pro Gly

65	70	75	80
Tyr Pro Trp Pro	Leu Tyr Gly Asn Glu	Gly Cys Gly Trp	Ala Gly Trp
	85	90	95
Leu Leu Ser Pro	Arg Gly Ser Arg	Pro Ser Trp Gly	Pro Thr Asp Pro
	100	105	110
Arg Arg Arg Ser	Arg Asn Leu Gly	Lys Val Ile Asp	Thr Leu Thr Cys
	115	120	125
Gly Phe Ala Asp	Leu Met Gly Tyr	Ile Pro Leu Val	Gly Ala Pro Leu
	130	135	140
Gly Gly Ala Arg	Arg Ala Leu Ala	His Gly Val Arg	Val Leu Glu Asp
	145	150	155
<210> 2			
<211> 160			
<212> PRT			
<213> Hepatitis C virus			
<220>			
<221> DOMAIN			
<222> (20)..(25)			
<220>			
<221> DOMAIN			
<222> (35)..(50)			
<220>			
<221> DOMAIN			
<222> (100)..(115)			
<220>			
<221> DOMAIN			
<222> (115)..(130)			
<400> 2			
Met Ser Thr Asn	Pro Lys Pro Gln	Arg Lys Thr Lys	Arg Asn Thr Asn
1	5	10	15
Arg Arg Pro Gln	Asp Val Lys Phe	Pro Gly Gly Gly	Gln Ile Val Gly
	20	25	30
Gly Val Tyr Leu	Leu Pro Arg Arg	Gly Pro Arg Leu	Gly Val Arg Ala

35					40					45					
Thr	Arg	Lys	Thr	Ser	Glu	Arg	Ser	Gln	Pro	Arg	Gly	Arg	Arg	Gln	Pro
50						55					60				
Ile	Pro	Lys	Ala	Arg	Gln	Pro	Glu	Gly	Arg	Thr	Trp	Ala	Gln	Pro	Gly
65					70					75					80
Tyr	Pro	Trp	Pro	Leu	Tyr	Gly	Asn	Glu	Gly	Met	Gly	Trp	Ala	Gly	Trp
				85					90					95	
Leu	Leu	Ser	Pro	Arg	Gly	Ser	Arg	Pro	Ser	Trp	Gly	Pro	Thr	Asp	Pro
			100					105					110		
Arg	His	Arg	Ser	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Val	Ile	Asp	Thr	Leu	Thr	Cys
		115					120					125			
Gly	Phe	Ala	Asp	Leu	Met	Gly	Tyr	Ile	Pro	Leu	Val	Gly	Ala	Pro	Leu
	130					135					140				
Gly	Gly	Ala	Arg	Arg	Ala	Leu	Ala	His	Gly	Val	Arg	Val	Leu	Glu	Asp
145					150					155					160

<210> 3
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (20)..(35)

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (35)..(50)

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (100)..(115)

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (115)..(130)

<400> 3

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn

1	5	10	15
Arg Arg Pro	Gln Asp Val Lys Phe	Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly	
	20	25	30
Gly Val Tyr	Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala		
	35	40	45
Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro			
	50	55	60
Ile Pro Lys Asp Arg Gln Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly			
65	70	75	80
Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp			
	85	90	95
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Thr Trp Gly Pro Thr Asp Pro			
	100	105	110
Arg His Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys			
	115	120	125
Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Gly Ala Pro Val			
	130	135	140
Gly Gly Ala Arg Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp			
145	150	155	160

<210> 4
 <211> 160
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (20)..(35)

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (35)..(50)

<220>
 <221> DOMAIN
 <222> (100)..(115)

<220>

<221> DOMAIN

<222> (115).. (130)

<400> 4

Met Ser Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
50 55 60

Ile Pro Lys Asp Arg Gln Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly
65 70 75 80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp
85 90 95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
100 105 110

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
115 120 125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Val Val Met Ala Pro Leu
130 135 140

Gly Gly Ala Arg Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
145 150 155 160

<210> 5

<211> 160

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<220>

<221> DOMAIN

<222> (20).. (35)

<220>

<221> DOMAIN

<222> (35)..(50)

<220>

<221> DOMAIN

<222> (100)..(115)

<220>

<221> DOMAIN

<222> (115)..(130)

<400> 5

Met Ser Thr Leu Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Thr
1 5 10 15

Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
20 25 30

Gly Val Tyr Val Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
35 40 45

Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln Pro Arg Gly Arg Arg Gln Pro
50 55 60

Ile Pro Lys Ala Arg Gln Ser Glu Gly Arg Ser Trp Ala Gln Pro Gly
65 70 75 80

Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Cys Gly Trp Ala Gly Trp
85 90 95

Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
100 105 110

Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
115 120 125

Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Met Ala Pro Val
130 135 140

Gly Gly Ala Arg Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Ala Leu Glu Asp
145 150 155 160

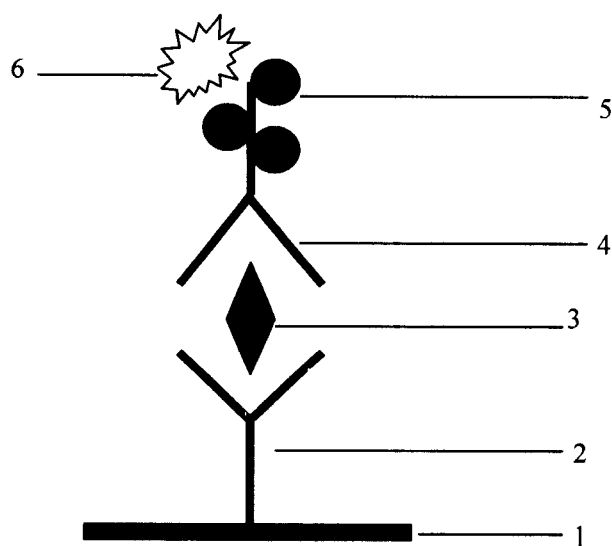
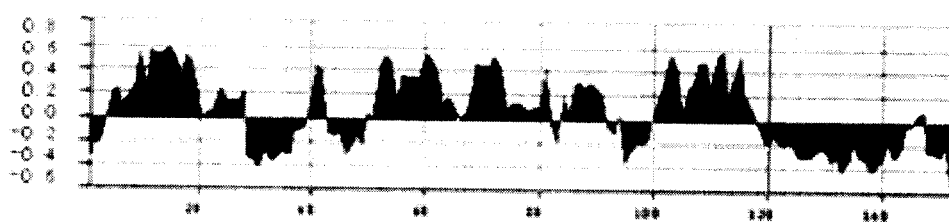
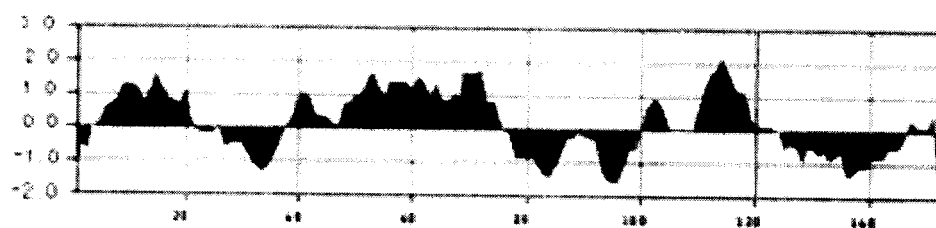


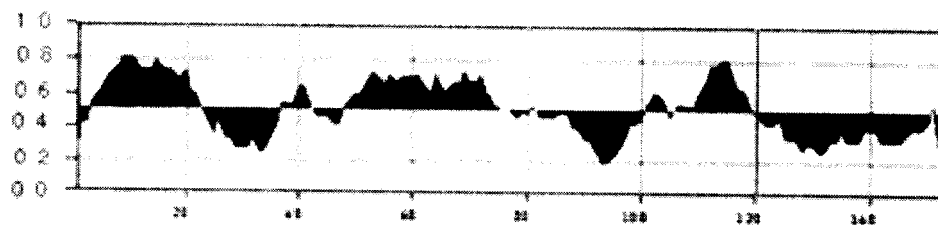
图 1



(1)



(2)



(3)

图 2

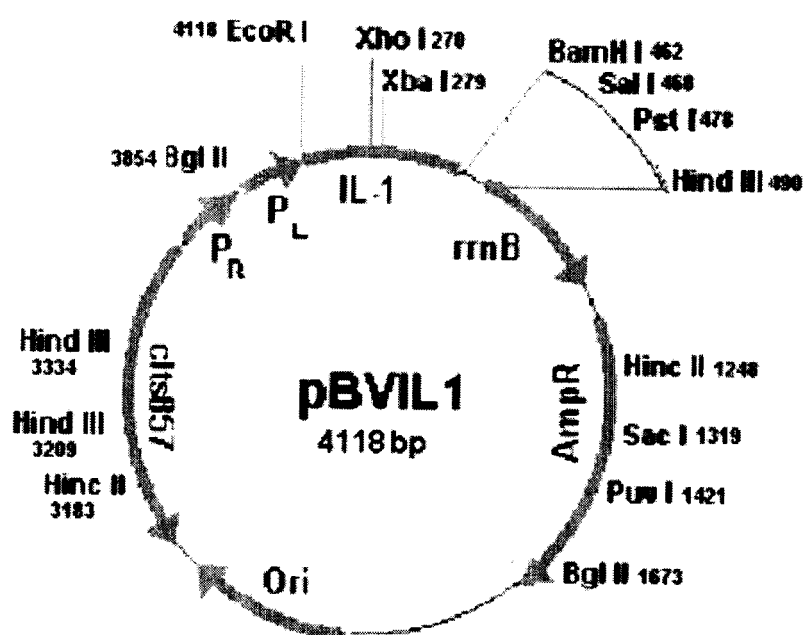


图 3

专利名称(译)	丙型肝炎病毒核心抗原酶联免疫诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN1877330A	公开(公告)日	2006-12-13
申请号	CN200510031683.8	申请日	2005-06-10
[标]发明人	李少波 张贺秋 刘劭钢 王国华 李宏实 陈坤 周祖岳 李凯 周松华		
发明人	李少波 张贺秋 刘劭钢 王国华 李宏实 陈坤 周祖岳 李凯 周松华		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/544 G01N33/52 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种丙型肝炎病毒核心抗原酶联免疫诊断试剂盒及其研制方法，本发明通过分析丙型肝炎病毒不同亚型的核心抗原序列，克隆表达HCV高度保守的特征性核心抗原基因，获得高效分泌的抗HCV核心抗原的细胞株，纯化出包含HCV核心四个aa表位的高比活单克隆抗体：使用其中的Cab1、Cab2作为包被抗体，Cab3、Cab4作为酶标抗体，用双抗体夹心技术制备HCV - cAg ELISA诊断试剂盒。本发明大大缩短HCV病毒检测的“窗口期”，使其从现有ELISA抗体检测方法的70天缩短到14天，为HCV感染的早期诊断提供了更为先进的技术支持。同时其灵敏度和特异性较现有产品有明显提高。

	10	20	30	40	50
HCV 1	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFFGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR
HCV 1b	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFFGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR
HCV 2a	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFFGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR
HCV 2b	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFFGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR
HCV 3	MSTNPKPQRK	TKRNTNRRPQ	DVKFFGGGQI	VGGVYLLPRR	GPRLGVRATR
	60	70	80	90	100
HCV 1	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YFWPLYGNEG	CGWAGWLLSP
HCV 1b	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YFWPLYGNEG	CGWAGWLLSP
HCV 2a	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YFWPLYGNEG	CGWAGWLLSP
HCV 2b	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YFWPLYGNEG	CGWAGWLLSP
HCV 3	KTSESRQPRG	RRQPIPKARQ	PEGRTWAQPG	YFWPLYGNEG	CGWAGWLLSP
	110	120	130	140	150
HCV 1	RGSRPESWGPT	DPRRSRNRLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	GAPLGGARRA
HCV 1b	RGSRPESWGPT	DPRRSRNRLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	GAPLGGARRA
HCV 2a	RGSRPESWGPT	DPRRSRNRLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	GAPLGGARRA
HCV 2b	RGSRPESWGPT	DPRRSRNRLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	GAPLGGARRA
HCV 3	RGSRPESWGPT	DPRRSRNRLG	KVIDTLTCGF	ADLMGYIPLV	GAPLGGARRA
	160				
HCV 1	LAHGVRVLED				
HCV 1b	LAHGVRVLED				
HCV 2a	LAHGVRVLED				
HCV 2b	LAHGVRVLED				
HCV 3	LAHGVRVLED				