



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101762703 A

(43) 申请公布日 2010.06.30

(21) 申请号 201010017927.8

(22) 申请日 2010.01.18

(71) 申请人 南京工业大学

地址 江苏省南京市新模范马路5号南京工业大学

(72) 发明人 林远 王月华

(51) Int. Cl.

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

### (54) 发明名称

丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检验试剂盒及其制备方法和检测方法

### (57) 摘要

本发明涉及一种基于流式微球载体技术的丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检验试剂盒及其制备和检测方法。具体包括将 HCV 重组抗原包被活化高聚分子微球,用牛血清白蛋白封闭空白结合点,制成特异性 HCV 探针-高聚分子微球;再与待测标本共培养,捕获待测 HCV 抗体;洗涤离心除去未结合的 HCV 抗体,再加入荧光标记的抗人 IgG 或 IgM 抗体;使用流式细胞仪检测微球的荧光强度,间接对受测抗体进行定性和定量分析。该试剂盒具有灵敏度高、特异性好、稳定性好的优点,可同时检测包括 HCV 抗体在内的多价检测。

1. 一种基于流式微球载体技术的丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检验试剂盒,其特征在於试剂盒的组分包括:微球载体、阴性对照血清、阳性对照血清、荧光标记抗体和浓缩样本稀释液。

2. 一种基于流式微球载体技术的丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检验试剂盒的制备方法,其特征在於:

(1) 微球载体的制备:重组 HCV 抗原与活化的高聚分子微球按比例混合,2-8℃温育 4 小时以上,用 PBS 缓冲液洗涤、离心、弃上清液,加入一定浓度的牛血清白蛋白封闭液,温育 30 分钟,完成流式微球载体的制备。

(2) 其它组分的制备:阴性对照血清是非丙肝患者的混合血清,阳性对照血清为经确诊的丙肝抗体阳性血清,荧光标记抗体为羊、兔和鼠抗人免疫球蛋白抗体,浓缩样本稀释液中含有 PBS、小牛血清白蛋白。

3. 一种基于流式微球载体技术的丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检验试剂盒的检测,其特征在於借助流式细胞仪检测对 HCV 抗体定性或定量检验,以及包括 HCV 抗体在内的多价检测。

4. 权利要求 3 所述的 HCV 抗体检验试剂盒的检测,其特征在於定性检测是用阴性、阳性对照血清为参照,根据待测样品的荧光强度来定性,强度大于或等于阴性检测值的 2.1 倍时为阳性,小于时为阴性。

5. 权利要求 3 所述的 HCV 抗体检验试剂盒的检测,其特征在於定量检测是使用一组已知浓度的阳性对照血清,以此制作标准曲线,用以对受测样本的定量分析。

6. 权利要求 3 所述的 HCV 抗体检验试剂盒的检测,其特征在於包括 HCV 抗体在内指标作多价检测,涉及使用不同直径微球载体和不同内置荧光的混合物,每种微球载体包被一种探针,用该混合物与血清等样本在同一试管共培养,每种微球载体捕获一种特异性配体,最后使用流式细胞仪分析将其区分。

7. 权利要求 3 所述的 HCV 抗体检验试剂盒的检测,其特征在於借助流式细胞仪检测。

## 丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检验试剂盒及其制备方法和检测方法

### 方法

#### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于流式微球载体技术的丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检验试剂盒及其制备方法和检测方法,属于免疫分析医学诊断技术领域。

#### 背景技术

[0002] 丙型肝炎 (简称丙肝) 是严重威胁人类健康的传染病之一。目前,全球约有 1.7 亿人受到感染,每年新增 300 ~ 400 万例患者。其中在发展中国家的感染率、发病率尤高。我国的丙肝感染率大约为 3.2%,至少有 4000 ~ 6000 万丙肝患者和丙肝病毒携带者。

[0003] 丙肝是经血液、性接触、母婴及日常生活接触等途径传播的一种肝脏疾病。特点是:急性肝炎症状较轻,常无黄疸或黄疸较轻,黄疸患者仅占 25%。慢性化程度高,50% 的急性肝炎易发展为慢性肝炎。采用联合干扰素与病毒唑治疗为目前较有效的治疗方法。丙肝的早期诊断对于早期实施有效的治疗、防止传播和预后具有重要意义。

[0004] HCV 抗原的血清水平一般低于检测的下限,不像乙肝表面抗原容易在携带者血清中查出。所以,血清抗体检测在 HCV 感染诊断中具有重要价值。丙肝抗体检测目前被广泛用于献血员中的 HCV 感染筛查和临床实验室检测,抗-HCV 检测阳性提示接触过病毒;对大部分病例而言,抗-HCV 阳性常伴有病毒核酸 (HCV RNA) 的存在。因此,抗-HCV 是判断 HCV 感染的一个重要标志。

[0005] 目前,检测 HCV 抗体最常用的方法是酶联免疫吸附法 (ELISA)。ELISA 检测抗-HCV IgG 系利用固定在固相载体 (如酶标板) 上的 HCV 重组表达和 / 或人工合成多肽抗原,捕捉待测样品中的抗-HCV IgG,然后,通过加入酶 (辣根过氧化物酶 HRP、碱性磷酸酶 ALP 等) 标记的抗-人 IgG 检测所捕捉到的特异性抗-HCV-IgG,然而,该方法的灵敏度、可重复性和稳定性等方面还存在缺陷。因此,探索新的 HCV 抗体检测技术是临床 HCV 诊断的迫切需要。

[0006] 流式微球载体技术是使用流式细胞术和高聚分子微球载体检测生物分子的新技术。该技术在微载体表面进行免疫吸附反应,通过流式细胞仪测量示踪物的荧光强度,具有灵敏度高、分辨率高和稳定性好的优点。另外,可在游离相与结合相分子共存的情况下作均相法测定,省略了清洗和离心,使操作步骤简化。使用不同直径和内置荧光的微球载体,可在同一试管进行多加分析,形成高效检测模式。

#### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种基于流式微载体技术的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒及其制备和检测方法,解决了现有技术功能单一的缺点,可进行包括 HCV 在内多价抗体检测,即可定性检测又可定量检测,并且具有高灵敏度、高特异性、稳定性高的特点。主要用于丙型肝炎的筛查和辅助诊断。

[0008] 本发明的技术方案:一种基于流式微球载体技术的丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检验

试剂盒,其特征在于试剂盒的组分包括:微球载体、阴性对照血清、阳性对照血清、荧光标记抗体和浓缩样本稀释液。

[0009] 一种基于流式微球载体技术的丙型肝炎病毒(HCV)抗体检验试剂盒的制备方法,其特征在于:

[0010] (1) 微球载体的制备:重组 HCV 抗原与活化的高聚分子微球按比例混合,2-8℃温育 4 小时以上,用 PBS 缓冲液洗涤、离心、弃上清液,加入一定浓度的牛血清白蛋白封闭液,温育 30 分钟,完成流式微球载体的制备。

[0011] (2) 其它组分的制备:阴性对照血清是非丙肝患者的混合血清,阳性对照血清为经确诊的丙肝抗体阳性血清,荧光标记抗体为羊、兔和鼠抗人免疫球蛋白抗体,浓缩样本稀释液中含有 PBS、小牛血清白蛋白

[0012] 一种基于流式微球载体技术的丙型肝炎病毒(HCV)抗体检验试剂盒的检测,其特征在于借助流式细胞仪检测对 HCV 抗体定性和定量检验,以及包括 HCV 抗体在内的多价检测。

[0013] 其中定性检测是用阴性、阳性对照血清为参照,根据待测样品的荧光强度来定性,强度大于或等于阴性检测值的 2.1 倍时为阳性,小于时为阴性。

[0014] 定量检测是使用一组已知浓度的阳性对照血清,以此制作标准曲线,用以对受测样本的定量分析。

[0015] 包括 HCV 抗体在内指标作多价检测,涉及使用不同直径微球载体和不同内置荧光的混合物,每种微球载体包被一种探针,用该混合物与血清等样本在同一试管共培养,每种微球载体捕获一种特异性配体,最后使用流式细胞仪分析将其区分。

[0016] HCV 抗体检验试剂盒的检测,其特征在于借助流式细胞仪检测。

[0017] 有益效果:本发明的试剂盒可进行包括 HCV 在内的多价抗体检测,既可定性检测又可定量检测,借助流式细胞仪及计算机技术间接检测待测抗体,因此高灵敏度、高特异性、稳定性高,准确率高是现有技术所不及的。

[0018] 本发明经中国药品生物制品检定所用国家标准品检定结果显示:外观检查,阴性标准品符合率,阳性标准品符合率,灵敏度,精密度,稳定性均符合国家标准。其中阴性标准品符合率:30/30,阳性标准品符合率:30/30,灵敏度 100%,精密度 < 10%,特异性 100%。

[0019]

检验项目	标准规定	检验结果
阴性参考品 30 份	符合率 ≥ 29/30	30/30
阳性参考品 30 份	符合率 ≥ 29/30	30/30
精密度	≤ 15%	≤ 10%

[0020] 本发明临床考核结果:中国人民解放军第四军医大学唐都医院进行了临床考核,结果如下:

[0021]

检测项目	检测结果	结果描述
阴性血清标本 100 份	100/100	特异性 100%
阳性血清标本 100 份	100/100	灵敏度 100%

### 具体实施方式

[0022] 1. 本发明所涉及的一种基于流式微球载体法丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检测试剂盒组分实施例：

[0023] (1) 基因工程重组丙肝病毒抗原包被的高聚分子球微载体

[0024] (2) 荧光标记抗人免疫球蛋白抗体

[0025] (3) 阴性对照血清

[0026] (4) 阳性对照血清

[0027] (5) 浓缩样本稀释液

[0028] 2. 本发明所涉及的一种基于流式微球载体法丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检测试剂盒制备实施例：

[0029] (1) 基因工程重组丙肝病毒抗原包被的高聚分子球微载体：

[0030] 微球载体的材质可以是乳胶、硅、树脂、苯乙烯, 溴苯乙烯, 以及丙烯酸, 丙烯酸胺、甲基丙烯酸盐、氯化乙烯、氯化苯乙烯、乙烯醋酸盐制成的聚亚胺脂和聚合性单体。用基因工程重组丙肝病毒抗原包被聚苯乙烯微球, 2-8℃ 卵育 4 小时以上, PBS 洗涤、离心除去未结合的包被抗原, 再用牛血清封闭白蛋白微球上的空白点, 制成 HCV 抗原特异性微球载体。

[0031] (2) 荧光标记抗人免疫球蛋白抗体

[0032] 荧光标记抗体, 包括 (但不限于) 荧光标记的羊、兔、鼠抗人 IgG、IgM、IgA。荧光染料包括荧光素异硫氰酸、四甲基若丹明, 藻红素蛋白, Cy- 色素, 硫氰酸, PerCP, 羧基荧光素乙酰乙酸盐琥珀酰酯, 碘化物, 硅纳米微粒, 等其它任何生物或非生物发光染料。

[0033] (3) 阴性对照血清

[0034] 阴性对照血清是非丙肝患者的混合血清, 可以稀释一定倍数, 例如 100、500 倍。

[0035] (4) 阳性对照血清

[0036] 阳性对照血清为经确诊的丙肝抗体阳性血清, 可以稀释一定倍数, 例如 100、500 倍, 荧光强度大于临界值, 稀释倍数与阴性对照血清一致。

[0037] (5) 浓缩样本稀释液: 磷酸盐缓冲液 (PBS), pH 7.2±0.2; 1% 牛血清蛋白; 0.5% 叠氮钠 (NaN<sub>3</sub>)。

[0038] 3. 本发明所涉及的一种基于流式微球载体法丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检测试剂盒定量检测实施例: 方法是在试剂盒中配置 3 到 5 个不同但已知浓度的阳性标准血清, 例如 10、100、1000ng/mL, 用流式细胞仪制作浓度标准曲线, 横坐标为荧光强度, 纵坐标为血清浓度, 以此计算受测样本中的丙肝抗体含量。

[0039] 定性检测实施例: 临界值 (cut-off 值) 计算: 临界值 = 阴性对照荧光强度值 × 2.1。测定样本荧光强度值 ≥ 临界值, 抗 -HCV 抗体阳性; 测定样本荧光强度值 < 临界值时, 抗 -HCV 抗体阴性。

[0040] 多价检测实施例：将不同直径微米的微球载体，先包被上特异性抗原，再用不同直径的微球载体捕获不同荧光标记的抗体，最后将它们按比例混合，该混合物可在同一试管同步检测多价特异性抗体。例如 3.1 微米直径的微球载体包被人 IgG(Fc) 抗原，捕获 FITC-羊抗人-IgG, 5.1 微米直径的微球载体包被人 IgG(Fc) 抗原，捕获 PE-羊抗人-IgM, 方法见具体实施 4, 然后将两者以 1 : 2 混合, 上机分析。

[0041] 4. 本发明所涉及的一种基于流式微球载体法丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检测试剂盒检测实施例：①设定空白对照管（只加微球载体）、0 标准管（加微球载体和标记抗体）、阴性对照管（加阴性对照血清）、阳性对照管（加阳性对照血清）和若干待测样本管（加待测样本）；②给所有管加样本稀释液 90 微升，微球载体 10 微升。③给阴性对照管和阳性对照管分别加阴性和阳性对照血清 100  $\mu$  l, 给待测样本管加待测血清 1  $\mu$  l, 4 $^{\circ}$ C 培养 30 分钟。④给以上各管加磷酸缓冲液 4 毫升，离心（3500 转 5 分钟）一次，倒弃上清液。⑤给以上各管（除空白对照管）加羊抗人 IgG-FITC 或羊抗人 IgM-FITC 1  $\mu$  l, 4 $^{\circ}$ C 培养 30 分钟。⑥重复第四步一次。⑦给各管加 PBS 0.5 毫升，上流式细胞仪检测。

专利名称(译)	丙型肝炎病毒(HCV)抗体检验试剂盒及其制备方法和检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101762703A</a>	公开(公告)日	2010-06-30
申请号	CN201010017927.8	申请日	2010-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	南京工业大学		
[标]发明人	林远 王月华		
发明人	林远 王月华		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/544 G01N33/533		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种基于流式微球载体技术的丙型肝炎病毒(HCV)抗体检验试剂盒及其制备和检测方法。具体包括将HCV重组抗原包被活化高聚分子微球，用牛血清白蛋白封闭空白结合点，制成特异性HCV探针-高聚分子微球；再与待测标本共培养，捕获待测HCV抗体；洗涤离心除去未结合的HCV抗体，再加入荧光标记的抗人IgG或IgM抗体；使用流式细胞仪检测微球的荧光强度，间接对受测抗体进行定性和定量分析。该试剂盒具有灵敏度高、特异性好、稳定性好的优点，可同时检测包括HCV抗体在内的多价检测。

检验项目	标准规定	检验结果
阴性参考品 30 份	符合率 $\geq$ 29/30	30/30
阳性参考品 30 份	符合率 $\geq$ 29/30	30/30
精密度	$\leq$ 15%	$\leq$ 10%

临床考核结果：中国人民解放军第四军医大学唐都医院