



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102236021 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 09

(21) 申请号 201010152496. 6

(22) 申请日 2010. 04. 20

(71) 申请人 上海新波生物技术有限公司

地址 201201 上海市浦东新区瑞庆路 590 号
5 号甲幢

(72) 发明人 张小寒

(74) 专利代理机构 上海浦东良风专利代理有限
责任公司 31113

代理人 张劲风

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

人类免疫缺陷病毒抗体时间分辨免疫荧光分
析法及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了人类免疫缺陷病毒 HIV(1+2 型) 抗体检测双抗原夹心时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒, 其选用重组你作为包被抗原, 用碳酸钠缓冲溶液稀释至 1-10ug/mL 作为包被液; 配对 HIV 重组抗原用镧系元素离子标记作为标记抗原; 实验时用反应缓冲液按 1 : 21 稀释使用; 在包被抗体的反应板上, 每孔依次加入 100uL 的 HIV 阴阳性对照或待测样品、以及稀释的标记抗原, 孵育后进行荧光检测。本发明还提供相应的试剂盒。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. 人类免疫缺陷病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法,其特征是包括下列步骤:

①固相抗体制备:将HIV重组抗原用碳酸盐缓冲液稀释至1-10ug/mL作为包被液,包被反应板,形成固相抗体,并用封闭液封闭;

②镧系元素离子标记重组抗原制备:选用配对HIV重组抗原用常规方法进行镧系元素离子标记;

③在步骤①制得的具有固相抗体的反应板上,每孔加入HIV阴阳性对照或待测样品,以及用反应缓冲液稀释的标记抗原进行孵育,经荧光增强液解离后,最后进行荧光测定。

2. 根据权利要求1所述人类免疫缺陷病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法,其特征是步骤②中配对HIV重组抗原需用反应缓冲液以体积比1:21稀释。

3. 根据权利要求1所述人类免疫缺陷病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法,其特征是步骤②中的镧系元素离子为 Eu^{3+} 。

4. 根据权利要求1或2所述人类免疫缺陷病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法,其特征是反应缓冲液为pH 7.8的50mmol/L Tris-HCl,内含0.9% NaCl,1% BSA,0.05%牛IgG,20uM EDTA,0.08%吐温20和0.1% NaN_3 。

5. 根据权利要求1所述人类免疫缺陷病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法,其特征是且该步骤③在时间分辨荧光免疫分析仪器上自动完成。

6. 人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒,其特征是试剂盒包括:包被抗原的缓冲液、封闭液、反应缓冲液、工作洗涤液、荧光增强液,作为包被抗原的HIV重组抗原,镧系元素离子标记的HIV重组抗原。

7. 根据权利要求6所述人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒,其特征是:

包被抗原的缓冲液:碳酸盐缓冲液;

封闭液:磷酸盐缓冲液及0.5% BSA;

反应缓冲液:pH 7.8的50mmol/L Tris-HCl,内含0.9% NaCl,1% BSA,0.05%牛IgG,20uM EDTA,0.08%吐温20和0.1% NaN_3 ;

工作洗涤液:磷酸盐缓冲液;

荧光增强液: β 二酮体。

人类免疫缺陷病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明涉及人类免疫缺陷病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒，特别是人类免疫缺陷病毒 HIV(1+2 型) 抗体检测试剂盒。

背景技术：

[0002] 艾滋病 (AIDS) 是 Acquired Immune Deficiency Syndrome 的简称，即“后天（获得性）免疫缺乏症候群”。艾滋病是由艾滋病毒所引起的，艾滋病毒又称为人类免疫缺乏病毒 (Human Immunodeficiency Virus)，简称 HIV。自 1981 年首先在美国被发现至今近 20 年的时间内，已经在全世界发生了非常广泛的流行，造成十分严重的危害。据《中国艾滋病防治联合评估报告 (2007 年)》统计，截至 2007 年 10 月底，全国累计报告艾滋病病毒感染者和艾滋病病人 223501 例，其中艾滋病病人 62838 例，死亡报告 22205 例。

[0003] 根据联合国艾滋病规划署 (UNAIDS) 与世界卫生组织 (WHO) 共同发布的 2007 年艾滋病疫情更新报告 (2007AIDS Epidemic Update)，2007 年全球 HIV 携带者约 3320 万人，250 万例为新发 HIV 感染，210 万人死于艾滋病。AIDS 仍是目前人类死亡的重要原因。同时女性感染的人数也急剧增加，这也意味着通过母婴传播，越来越多的婴儿感染 HIV。HIV 是绝对依赖病原学诊断的传染病，HIV 检测是 HIV 防治工作的一个重要的组成部分；由于 HIV 有较长的潜伏期，只有通过病原学检测才能发现 HIV，并有效地控制 HIV 通过血液、性接触和母婴途径传播。

[0004] 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 自从 1981 年被发现以来，科学家们已进行了大量研究，建立了各种检测方法。抗 HIV 试剂自问世以来，已逐步完善并被普遍用于血源筛查和临床诊断。当前市场上主要的 HIV 抗体诊断试剂为第三代试剂，在灵敏度和特异性方面均比前代试剂有很大提高。

发明内容：

[0005] 本发明的目的是提供一种用于人类免疫缺陷病毒 HIV(1+2 型) 抗体检测的时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒，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。本发明采用铕标记技术，提供铕标记试剂盒，以提高方法的灵敏度及稳定性。

[0006] 本发明的技术方案是：

[0007] 人类免疫缺陷病毒 HIV(1+2 型) 抗体时间分辨免疫荧光分析法，包括下列步骤：

[0008] ①固相抗体制备：将 HIV 重组抗原用碳酸盐缓冲液稀释至 1-10ug/mL 作为包被液，包被反应板，形成固相抗体，并用封闭液（磷酸盐缓冲液及 0.5% (W/V) 的牛血清白蛋白 (BSA)）封闭；

[0009] ②镧系元素离子标记抗原制备：选用配对 HIV 重组抗原用常规方法进行镧系元素离子标记；

[0010] ③步骤①制得的具有固相抗体的反应板上，每孔加入 HIV 阴阳性对照或待测样

品,以及用反应缓冲液稀释的标记抗原进行孵育,经荧光增强液解离后,最后进行荧光测定。

[0011] 步骤①中包被液中单克隆抗体的浓度为 1-10ug/mL,步骤②中配对 HIV 重组抗原需在反应缓冲液 (pH 7.8 的 50mmol/L 三羟甲基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl),内含 0.9% NaCl,1% BSA,0.05% 牛 IgG,20uM EDTA,0.08% 吐温 (Tween) 20 和 0.1% NaN_3 (反应缓冲液组分%指的是 W/V)) 以体积比为 1 : 21 稀释。步骤②中的镧系元素离子优选为 Eu^{3+} 。步骤③中反应缓冲液同②;且该步骤③在时间分辨荧光免疫分析仪器上自动完成。所用荧光增强液为 β 二酮体。

[0012] 人类免疫缺陷病毒 HIV(1+2 型) 抗体检测试剂盒,其特征是试剂盒包括:包被抗原的缓冲液(碳酸盐缓冲液)、封闭液(磷酸盐缓冲液及 0.5% (W/V) BSA)、反应缓冲液 (pH 7.8 的 50mmol/L Tris-HCl,内含 0.9% NaCl,1% BSA,0.05% 牛 IgG,20uM EDTA,0.08% Tween20 和 0.1% NaN_3)、工作洗涤液(磷酸盐缓冲液)、荧光增强液,以及作为包被抗原的 HIV 重组抗体,镧系元素离子标记的 HIV 重组抗原。

[0013] 本发明使用双抗原夹心法,反应步骤包括:试剂准备、加样反应、洗涤拍干、加增强液、测荧光值。

[0014] 本发明的有益效果是:分析灵敏度高(符合或超过 HIV 国家参比品的要求),检测时间短(100min),特异性好,与干扰物质的交叉反应小。

附图说明:

[0015] 图 1 为本发明的反应原理图

[0016] 本发明采用双抗原夹心二步法。HIV 重组抗原包被于 96 孔荧免板,阴阳性对照或样品中的 HIV 抗体与包被抗原于微孔内表面发生免疫反应;洗涤后,加入镧离子 (Eu^{3+}) 标记的 HIV 抗原,免疫反应后,微孔表面的夹心免疫复合物与游离标记抗原通过洗涤分离。微孔表面免疫复合物中的 Eu^{3+} 被荧光增强液解离后形成稳定的荧光配合物,荧光强度与阴阳性对照或样品中的 HIV 看题浓度呈正比例,通过 Cutoff 值可以判断 HIV 抗体阴阳性结果。

[0017] 图 2 为本发明操作流程图

[0018] 第一步:复融镧标记抗原,第二步:稀释镧标记物,第三步:加入阴阳性对照和待测样品,第四步:孵育,第五步:洗板,第六步:加入稀释后的镧标记,第七步:孵育,第八步:洗板,第九步:加入增强液,第十步:检测。

具体实施方式:

[0019] 下面参照图 1、2 通过实施例对本发明作进一步说明。

[0020] 实施例:人类免疫缺陷病毒 HIV(1+2 型) 抗体检测

[0021] 1、在进行时间分辨免疫荧光分析检测法前需完成下列准备工作:

[0022] 首先制备包被板,所用的包被板为特异性重组抗原包被的板,HIV 包被板条的制备包括以下步骤:

[0023] (1) 将纯化的 HIV 重组抗原用碳酸盐缓冲液稀释,然后加入包被板条各孔内,经吸附、洗涤、封闭、干燥后获得 HIV 重组抗原包被板条;

[0024] (2) 将 HIV 重组抗原包被板条装入专用的铝箔包装袋,封口并冷藏备用。其次是

HIV 重组抗原铕标记的制备,包括以下步骤:

[0025] (a) 取待标记抗原加入透析袋中,放入配制好的 pH 9.5 的碳酸盐缓冲液中,室温透析过夜;

[0026] (b) 次日,取出透析好的抗原用 pH 9.5 的碳酸盐缓冲液稀释至 0.2-5/mL,按质量比为 2 : 1 的比例 (DTTA-Eu (异硫氰酸苄基二亚乙基三胺四乙酸铕 (III)):抗原) 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;

[0027] (c) 标记好的抗原与游离 DTTA-Eu 通过 Sephadex G50 (8cm)+Sephacrose 6B (38cm) 色谱柱 (1.5×50cm) 分离,分离过程用核酸蛋白仪监控;

[0028] (d) 用小试管依次分段接受流出物,用分光光度计,在 280nm 处测吸光度,同时测荧光强度,计算出 Eu 标抗原浓度;

[0029] (e) 用孔径 0.2um 的过滤器过滤;

[0030] (f) 加入 0.3% (W/V) 优级纯 BSA,2-8℃ 保存。

[0031] 2、操作步骤

[0032] 1) 试剂盒准备:包被抗原的缓冲液(碳酸盐缓冲液)、封闭液(磷酸盐缓冲液及 0.5% BSA(W/V))、反应缓冲液(pH 7.8 的 50mmol/L Tris-HCl,内含 0.9% NaCl,1% BSA,0.05% 牛 IgG,20uM EDTA,0.08% Tween20 和 0.1% NaN₃)、工作洗涤液(磷酸盐缓冲液)、荧光增强液(β 二酮体),以及作为包被抗原的 HIV 重组抗体,镧系元素离子标记的 HIV 重组抗原。

[0033] 工作洗涤液配制:将 40mL 磷酸盐缓冲液(25 倍浓缩液)用蒸馏水或去离子水稀释至 1,000mL 备用。

[0034] 复溶 HIV 抗原 -Eu³⁺:在 HIV 抗原 -Eu³⁺ 冻干品中加入 1.0mL 蒸馏水或去离子水,混匀后至少静置 10 分钟。

[0035] 2) 编号:将样品对应微孔按序编号,每板应设 HIV 抗体阴、阳性对照各 2 孔。

[0036] 3) 加样:分别在相应微孔中加入 HIV 抗体阴性对照、阳性对照及待测样品 100 μ L。

[0037] 4) 第一步孵育:室温 (20 ~ 25℃) 于慢档振荡 60 分钟。

[0038] 5) 配制 HIV 抗原 -Eu³⁺ 工作液(第二步孵育前 1 小时之内配制):对每一条 12 孔板,取 75 μ L HIV 抗原 -Eu³⁺,加入 1.5mL 反应缓冲液,充分混匀。

[0039] 6) 第一次洗涤:用工作洗液洗涤微孔板 5 遍,扣干。

[0040] 7) 加 HIV 抗原 -Eu³⁺ 工作液:每孔加入 100 μ L。

[0041] 8) 第二步孵育:室温 (20 ~ 25℃) 于慢档振荡 40 分钟。

[0042] 9) 第二次洗涤:用工作洗液洗涤微孔板 5 遍,扣干。

[0043] 10) 荧光增强与测量:在每个微孔内加入 100 μ L 荧光增强液,慢档振动 5 分钟,选择相应程序检测荧光。

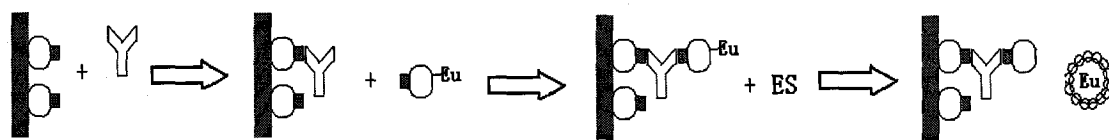


图 1

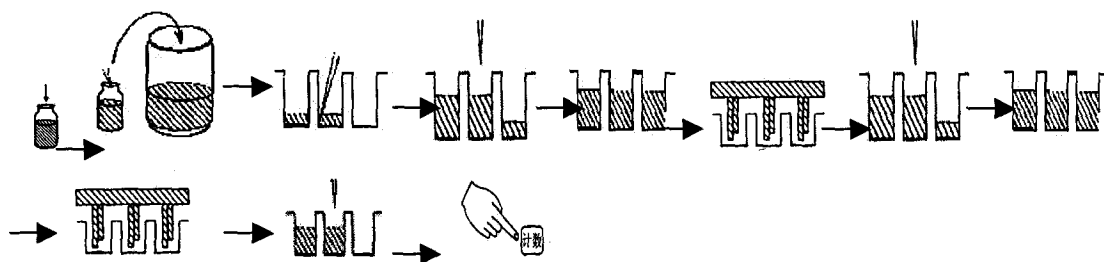


图 2

专利名称(译)	人类免疫缺陷病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒		
公开(公告)号	CN102236021A	公开(公告)日	2011-11-09
申请号	CN201010152496.6	申请日	2010-04-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海新波生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海新波生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海新波生物技术有限公司		
[标]发明人	张小寒		
发明人	张小寒		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了人类免疫缺陷病毒HIV(1+2型)抗体检测双抗原夹心时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒，其选用重组你作为包被抗原，用碳酸钠缓冲溶液稀释至1-10ug/mL作为包被液；配对HIV重组抗原用镧系元素离子标记作为标记抗原；实验时用反应缓冲液按1:21稀释使用；在包被抗体的反应板上，每孔依次加入100uL的HIV阴阳性对照或待测样品、以及稀释的标记抗原，孵育后进行荧光检测。本发明还提供相应的试剂盒。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。

