



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109324184 A

(43)申请公布日 2019.02.12

(21)申请号 201811483460.9

(22)申请日 2018.12.05

(71)申请人 厦门同仁心生物技术有限公司

地址 361000 福建省厦门市海沧区翁角西路2072号厦门生物医药产业园B12号楼5层01单元

(72)发明人 周国栋

(74)专利代理机构 北京华际知识产权代理有限公司 11676

代理人 邓娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页

(54)发明名称

一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法,该检测试剂盒包括以下组分:荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1、丙型肝炎病毒抗体2、羊抗鼠捕获抗体、磷酸盐缓冲液和样品稀释液;该检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:制备样品稀释液;制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1;制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1;制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;标准品,组装,即得荧光免疫层析检测试剂盒;该检测试剂盒,可实现现场快速、简便的进行丙型肝炎病毒抗原的定量检测;本发明的检测试剂盒具有较好的检测灵敏度、精密度和准确度。

1. 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于,该荧光免疫层析检测试剂盒包括以下组分:荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1、丙型肝炎病毒抗体2、羊抗鼠捕获抗体、磷酸盐缓冲液和样品稀释液。

2. 根据权利要求1所述的一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于,所述样品稀释液包括以下浓度的组分:Tris-HCl缓冲液100ml/L、CHAPS干粉15g/L、Triton X-1003ml/L和SDS 150g/L。

3. 根据权利要求2所述的一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于:所述Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L,pH为8.0。

4. 根据权利要求1或3中任一项所述的一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,其特征在于:所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,pH为7.2-7.4。

5. 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,其特征在于,该荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

(1) 制备样品稀释液:取Tris-HCl缓冲液、CHAPS干粉、Triton X-100和SDS加入容器中混合均匀,定容,即得样品稀释液;

(2) 制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1:取荧光微球,用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺活化,然后向其中加入丙型肝炎病毒抗体1,标记上后再用密封液密封,离心,保存,即得荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1,备用;

(3) 制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1:将步骤(2)所制得的荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1用步骤(1)所制得的样品稀释液进行稀释,然后涂在载体1上,冻干,即得包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1;

(4) 制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2:将丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体分别用磷酸盐缓冲液进行稀释,然后将其用划膜仪划到载体2上,干燥,即得包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;

(5) 组装:将步骤(3)所制得的包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1和步骤(4)所制得的包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2组装成丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒。

6. 根据权利要求5所述的一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,其特征在于,该荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

(1) 制备样品稀释液:取100ml 1mol/L的Tris-HCl缓冲液、15g CHAPS干粉、3ml Triton X-100和150g SDS加入容器中混合均匀,再用去离子水定容至1L,即得样品稀释液;

(2) 制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1:取100 $\mu$ l的荧光微球,用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺进行活化,然后向其中加入160g的丙型肝炎病毒抗体1,在室温条件下反应5h,再用密封液密封1h,离心,置于悬浮液中,4 $^{\circ}$ C保存,即得荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1,备用;

(3) 制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1:将步骤(2)所制得的荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1用步骤(1)所制得的样品稀释液进行稀释,然后均匀涂在载体1上,用冻干机冻干过夜,即得包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1;

(4) 制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2:将丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体分别用磷酸盐缓冲液稀释到1mg/ml,然后将其用划膜仪依次以1.0-1.5 $\mu$

1/cm的喷量划到载体2上,干燥过夜,即得包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;

(5) 组装:将步骤(3)所制得的包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1和步骤(4)所制得的包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2组装成丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒。

7. 根据权利要求6所述的一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,其特征在于:所述步骤(3)中荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1与样品稀释液的体积比为1:50。

8. 根据权利要求5至7中任一项所述的一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,其特征在于:所述步骤(3)中载体1为玻纤,所述步骤(4)中载体2为硝酸纤维素膜。

## 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测分析技术领域,具体是一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)所致,丙型肝炎经血液传播。目前中国有4000万以上的丙型肝炎病毒感染者,其中70%的丙肝患者发展为慢性肝炎,20%发展为肝硬化,12%发展为肝癌,危害严重。所以早发现、早诊断、早治疗对于丙肝患者具有重要的意义。

[0003] 目前常见的丙型肝炎病毒早期检测方法包括核酸检测和抗原检测。核酸检测在设备和技术上要求较高,容易假阳,所以很难在常规和基层实验室中推广。抗原检测试剂多以酶联免疫、化学发光或者胶体金为主,如美国Ortho公司的ELISA试剂盒、湖南景达制药有限公司的ELISA检测试剂盒、Abbott的化学发光丙肝病毒核心抗原(HCV Core Ag)检测试剂盒等,但酶联免疫和化学发光均需要在中心检测实验室开展,而胶体金试剂又无法进行定量。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法,以解决现有技术中的问题。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,该荧光免疫层析检测试剂盒包括以下组分:荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1、丙型肝炎病毒抗体2、羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)、磷酸盐缓冲液和样品稀释液。

[0007] 作为优化,样品稀释液包括以下浓度的组分:Tris-HCl缓冲液100ml/L、CHAPS干粉15g/L、Triton X-1003ml/L和SDS 150g/L。

[0008] 作为优化,Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L,pH为8.0。

[0009] 作为优化,磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,pH为7.2-7.4。

[0010] 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,该荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0011] (1) 制备样品稀释液:取Tris-HCl缓冲液、CHAPS干粉、Triton X-100和SDS加入容器中混合均匀,定容,即得样品稀释液;

[0012] (2) 制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1:取荧光微球,用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺活化,然后向其中加入丙型肝炎病毒抗体1,标记上后再用密封液密封,离心,保存,即得荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1,备用;

[0013] (3) 制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1:将步骤(2)所制得的荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1用步骤(1)所制得的样品稀释液进行稀释,然后涂在载

体1上,冻干,即得包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1;

[0014] (4) 制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2:将丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体分别用磷酸盐缓冲液进行稀释,然后将其用划膜仪划到载体2上,干燥,即得包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;

[0015] (5) 组装:将步骤(3)所制得的包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1和步骤(4)所制得的包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2组装成丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒。

[0016] 作为优化,一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,该荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0017] (1) 制备样品稀释液:取100ml 1mol/L的Tris-HCl缓冲液、15g CHAPS干粉、3ml Triton X-100和150g SDS加入容器中混合均匀,再用去离子水定容至1L,即得样品稀释液;

[0018] (2) 制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1:取100 $\mu$ l的荧光微球,用1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺进行活化,然后向其中加入160 $\mu$ g的丙型肝炎病毒抗体1,在室温条件下反应5h,再用密封液密封1h,离心,置于悬浮液中,4 $^{\circ}$ C保存,即得荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1,备用;

[0019] (3) 制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1:将步骤(2)所制得的荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1用步骤(1)所制得的样品稀释液进行稀释,然后均匀涂布在载体1上,用冻干机冻干过夜,即得包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1;

[0020] (4) 制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)的载体2:将丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体分别用磷酸盐缓冲液稀释到1mg/ml,然后将其用划膜仪依次以1.0-1.5 $\mu$ l/cm的喷量划到载体2上,干燥过夜,即得包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;

[0021] (5) 组装:将步骤(3)所制得的包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1和步骤(4)所制得的包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2组装成丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒。

[0022] 作为优化,步骤(3)中荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1与样品稀释液的体积比为1:50。

[0023] 作为优化,步骤(3)中载体1为玻纤,所述步骤(4)中载体2为硝酸纤维素膜(NC膜)。

[0024] 本发明的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的应用方法,其检测程序为:

[0025] (A) 样本处理:于1.5ml Ep管内加入200 $\mu$ l样品稀释液和100 $\mu$ l血清样本,混合均匀后,在56 $^{\circ}$ C下处理30min;

[0026] (B) 加样:取出一张荧光免疫层析试纸卡,吸取80 $\mu$ l步骤(A)所得的样本,滴加到荧光免疫层析试纸卡的加样孔内,在室温条件下反应15min;

[0027] (C) 读值:根据T/C的结果,干式荧光免疫读值仪直接显示出样本结果。

[0028] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,可实现现场快速、简便的进行丙型肝炎病毒抗原的定量检测;本发明的试剂盒适用于人血清、血浆中的丙型肝炎病毒抗原的定量检测,辅助诊断是否感染丙型肝炎病毒,适用于临床及现场检测;实验结果表明,本发明的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检

测试剂盒具有较好的检测灵敏度,灵敏度可以达到20pg/ml;具有较好的检测精密度,cV(变异系数)值为8.8%;具有较好的检测准确度,检测结果准确度为100%。

### 具体实施方式

[0029] 下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0030] 实施例1:

[0031] 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,该荧光免疫层析检测试剂盒包括以下组分:荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1、丙型肝炎病毒抗体2、羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)、磷酸盐缓冲液和样品稀释液。

[0032] 其中,样品稀释液包括以下浓度的组分:Tris-HCl缓冲液100ml/L、CHAPS干粉15g/L、Triton X-1003ml/L和SDS 150g/L;Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L,pH为8.0;磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,pH为7.2。

[0033] 上述该荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0034] (1) 制备样品稀释液:取100ml 1mol/L的Tris-HCl缓冲液、15g CHAPS干粉、3ml Triton X-100和150g SDS加入容器中混合均匀,再用去离子水定容至1L,即得样品稀释液;

[0035] (2) 制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1:取100 $\mu$ l的荧光微球,用1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺进行活化,然后向其中加入160 $\mu$ g的丙型肝炎病毒抗体1,在室温条件下反应5h,再用密封液密封1h,离心,置于悬浮液中,4 $^{\circ}$ C保存,即得荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1,备用;

[0036] (3) 制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1:将步骤(2)所制得的荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1用步骤(1)所制得的样品稀释液进行稀释,然后均匀涂在玻纤上,用冻干机冻干过夜,即得包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1,荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1与样品稀释液的体积比为1:50;

[0037] (4) 制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)的载体2:将丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体分别用磷酸盐缓冲液稀释到1mg/ml,然后将其用划膜仪依次以1.0 $\mu$ l/cm的喷量划到硝酸纤维素膜上,干燥过夜,即得包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;

[0038] (5) 组装:将步骤(3)所制得的包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1和步骤(4)所制得的包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2组装成丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒。

[0039] 实施例2:

[0040] 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,该荧光免疫层析检测试剂盒包括以下组分:荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1、丙型肝炎病毒抗体2、羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)、磷酸盐缓冲液和样品稀释液。

[0041] 其中,样品稀释液包括以下浓度的组分:Tris-HCl缓冲液100ml/L、CHAPS干粉15g/

L、Triton X-100 3ml/L和SDS 150g/L;Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L,pH为8.0;磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,pH为7.3。

[0042] 上述丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,该荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0043] (1) 制备样品稀释液:取100ml 1mol/L的Tris-HCl缓冲液、15g CHAPS干粉、3ml Triton X-100和150g SDS加入容器中混合均匀,再用去离子水定容至1L,即得样品稀释液;

[0044] (2) 制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1:取100 $\mu$ l的荧光微球,用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺进行活化,然后向其中加入160 $\mu$ g的丙型肝炎病毒抗体1,在室温条件下反应5h,再用密封液密封1h,离心,置于悬浮液中,4 $^{\circ}$ C保存,即得荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1,备用;

[0045] (3) 制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1:将步骤(2)所制得的荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1用步骤(1)所制得的样品稀释液进行稀释,然后均匀涂在玻纤上,用冻干机冻干过夜,即得包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1,荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1与样品稀释液的体积比为1:50;

[0046] (4) 制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)的载体2:将丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体分别用磷酸盐缓冲液稀释到1mg/ml,然后将其用划膜仪依次以1.1 $\mu$ l/cm的喷量划到硝酸纤维素膜上,干燥过夜,即得包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;

[0047] (5) 组装:将步骤(3)所制得的包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1和步骤(4)所制得的包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2组装成丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒。

[0048] 实施例3:

[0049] 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,该荧光免疫层析检测试剂盒包括以下组分:荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1、丙型肝炎病毒抗体2、羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)、磷酸盐缓冲液和样品稀释液。

[0050] 其中,样品稀释液包括以下浓度的组分:Tris-HCl缓冲液100ml/L、CHAPS干粉15g/L、Triton X-100 3ml/L和SDS 150g/L;Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L,pH为8.0;磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,pH为7.4。

[0051] 上述丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,该荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0052] (1) 制备样品稀释液:取100ml 1mol/L的Tris-HCl缓冲液、15g CHAPS干粉、3ml Triton X-100和150g SDS加入容器中混合均匀,再用去离子水定容至1L,即得样品稀释液;

[0053] (2) 制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1:取100 $\mu$ l的荧光微球,用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺进行活化,然后向其中加入160 $\mu$ g的丙型肝炎病毒抗体1,在室温条件下反应5h,再用密封液密封1h,离心,置于悬浮液中,4 $^{\circ}$ C保存,即得荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1,备用;

[0054] (3) 制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1:将步骤(2)所制得的荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1用步骤(1)所制得的样品稀释液进行稀释,然后均匀涂在玻纤上,用冻干机冻干过夜,即得包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1,荧

光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1与样品稀释液的体积比为1:50;

[0055] (4) 制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)的载体2:将丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体分别用磷酸盐缓冲液稀释到1mg/ml,然后将其用划膜仪依次以1.2 $\mu$ l/cm的喷量划到硝酸纤维素膜上,干燥过夜,即得包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;

[0056] (5) 组装:将步骤(3)所制得的包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1和步骤(4)所制得的包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2组装成丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒。

[0057] 实施例4:

[0058] 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,该荧光免疫层析检测试剂盒包括以下组分:荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1、丙型肝炎病毒抗体2、羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)、磷酸盐缓冲液和样品稀释液。

[0059] 其中,样品稀释液包括以下浓度的组分:Tris-HCl缓冲液100ml/L、CHAPS干粉15g/L、Triton X-1003ml/L和SDS 150g/L;Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L,pH为8.0;磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,pH为7.2。

[0060] 上述丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,该荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0061] (1) 制备样品稀释液:取100ml 1mol/L的Tris-HCl缓冲液、15g CHAPS干粉、3ml Triton X-100和150g SDS加入容器中混合均匀,再用去离子水定容至1L,即得样品稀释液;

[0062] (2) 制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1:取100 $\mu$ l的荧光微球,用1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺进行活化,然后向其中加入160 $\mu$ g的丙型肝炎病毒抗体1,在室温条件下反应5h,再用密封液密封1h,离心,置于悬浮液中,4 $^{\circ}$ C保存,即得荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1,备用;

[0063] (3) 制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1:将步骤(2)所制得的荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1用步骤(1)所制得的样品稀释液进行稀释,然后均匀涂在玻纤上,用冻干机冻干过夜,即得包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1,荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1与样品稀释液的体积比为1:50;

[0064] (4) 制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)的载体2:将丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体分别用磷酸盐缓冲液稀释到1mg/ml,然后将其用划膜仪依次以1.4 $\mu$ l/cm的喷量划到硝酸纤维素膜上,干燥过夜,即得包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;

[0065] (5) 组装:将步骤(3)所制得的包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1和步骤(4)所制得的包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2组装成丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒。

[0066] 实施例5:

[0067] 一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒,该荧光免疫层析检测试剂盒包括以下组分:荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1、丙型肝炎病毒抗体2、羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)、磷酸盐缓冲液和样品稀释液。

[0068] 其中,样品稀释液包括以下浓度的组分:Tris-HCl缓冲液100ml/L、CHAPS干粉15g/L

L、Triton X-100 3ml/L和SDS 150g/L;Tris-HCl缓冲液的浓度为1mol/L,pH为8.0;磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,pH为7.4。

[0069] 上述丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法,该荧光免疫层析检测试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0070] (1) 制备样品稀释液:取100ml 1mol/L的Tris-HCl缓冲液、15g CHAPS干粉、3ml Triton X-100和150g SDS加入容器中混合均匀,再用去离子水定容至1L,即得样品稀释液;

[0071] (2) 制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1:取100 $\mu$ l的荧光微球,用1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺进行活化,然后向其中加入160 $\mu$ g的丙型肝炎病毒抗体1,在室温条件下反应5h,再用密封液密封1h,离心,置于悬浮液中,4 $^{\circ}$ C保存,即得荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1,备用;

[0072] (3) 制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1:将步骤(2)所制得的荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1用步骤(1)所制得的样品稀释液进行稀释,然后均匀涂在玻纤上,用冻干机冻干过夜,即得包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1,荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1与样品稀释液的体积比为1:50;

[0073] (4) 制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体(质控线抗体)的载体2:将丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体分别用磷酸盐缓冲液稀释到1mg/ml,然后将其用划膜仪依次以1.5 $\mu$ l/cm的喷量划到硝酸纤维素膜上,干燥过夜,即得包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2;

[0074] (5) 组装:将步骤(3)所制得的包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1和步骤(4)所制得的包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2组装成丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒。

[0075] 效果例1:

[0076] 对本发明的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的检测灵敏度进行测试,用20%的NBS(N-溴代琥珀酰亚胺)稀释HCV(丙型肝炎病毒)重组抗原得到浓度分别为5ng/ml、1ng/ml、500pg/ml、100pg/ml和20pg/ml的样本,利用本发明实施例1所得到的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒对上述样本进行检测,检测实验结果如表1所示。

[0077] 表1试剂盒的灵敏度测试结果

[0078]

样本浓度	荧光值
5ng/ml	351500
1ng/ml	110098
500pg/ml	59609
100pg/ml	12738
20pg/ml	2610

[0079] 从表1中可以看出,本发明实施例1所得到的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒具有较好的检测灵敏度,灵敏度可以达到20pg/ml。

[0080] 效果例2:

[0081] 对本发明的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的检测精密度进行测试,基于100pg/ml浓度的HCV重组抗原样本,用本发明实施例2所得到的丙型肝炎病毒抗原荧光

免疫层析检测试剂盒对上述样本进行反复检测10次,检测实验结果如表2所示。

[0082] 表2试剂盒的精密度测试结果

[0083]

次数	样本浓度	荧光值
1	100pg/ml	12738
2	100pg/ml	11002
3	100pg/ml	13201
4	100pg/ml	10981
5	100pg/ml	12126
6	100pg/ml	11765
7	100pg/ml	9865
8	100pg/ml	11463
9	100pg/ml	12721
10	100pg/ml	10985
	CV	8.8%

[0084] 从表2中可以看出,本发明实施例2所得到的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒具有较好的检测精密度,CV(变异系数)值为8.8%。

[0085] 效果例3:

[0086] 对本发明的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒的检测准确度进行测试,基于5份阳性样本(P1-P5)和5份阴性样本(N1-N5),用本发明实施例3所得到的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒对上述样本进行检测,检测实验结果如表3所示。

[0087] 表3试剂盒的准确度测试结果

[0088]

样本	荧光值
P1	3896
P2	12654
P3	5873
P4	25985
P5	16901
N1	984
N2	760
N3	532
N4	609
N5	674

[0089] 从表3中可以看出,本发明实施例3所得到的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒具有较好的检测准确度,检测结果准确度为100%。

[0090] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权

利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何标记视为限制所涉及的权利要求。

专利名称(译)	一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109324184A</a>	公开(公告)日	2019-02-12
申请号	CN201811483460.9	申请日	2018-12-05
[标]发明人	周国栋		
发明人	周国栋		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533 G01N33/56983		
代理人(译)	邓娜		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测试剂盒及其制备方法，该检测试剂盒包括以下组分：荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1、丙型肝炎病毒抗体2、羊抗鼠捕获抗体、磷酸盐缓冲液和样品稀释液；该检测试剂盒的制备方法包括以下步骤：制备样品稀释液；制备荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1；制备包被有荧光微球标记的丙型肝炎病毒抗体1的载体1；制备包被有丙型肝炎病毒抗体2和羊抗鼠捕获抗体的载体2；标准品，组装，即得荧光免疫层析检测试剂盒；该检测试剂盒，可实现现场快速、简便的进行丙型肝炎病毒抗原的定量检测；本发明的检测试剂盒具有较好的检测灵敏度、精密度和准确度。

[0078]

样本浓度	荧光值
5ng/ml	351500
1ng/ml	110098
500pg/ml	59609
100pg/ml	12738
20pg/ml	2610

[0079] 从表1中可以看出,本发明实施例1所得到的丙型肝炎病毒抗原荧光免疫层析检测