

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/558

G01N 33/569



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03119356.0

[43] 公开日 2004 年 9 月 22 日

[11] 公开号 CN 1530658A

[22] 申请日 2003.3.17 [21] 申请号 03119356.0

[71] 申请人 上海博昇微晶科技有限公司

地址 200042 上海市静安区武定西路 1189 号  
230 室

[72] 发明人 温龙平 吴长龙 曹 军

[74] 专利代理机构 北京金信联合知识产权代理有  
限公司

代理人 白 澎

权利要求书 4 页 说明书 14 页 附图 1 页

[54] 发明名称 多种血液传染病的混合型排除式酶  
联免疫吸附检测方法

[57] 摘要

多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法，所述检测方法包括将两种或两种以上的血液传染病病原体的抗原或抗体混合在一起，经一次检测，即可判定所测样品是否对所述的两种或两种以上血液传染病病毒包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、艾滋病病毒、梅毒螺旋体、HTLV 病毒全部呈阴性；检测时可采用常规的 ELISA 检测方案及常规的仪器设备进行；本发明的优点主要有：通过单孔一次检测就可判定多种传染病免疫标志是否全部阴性或者至少有一项是阳性，大大简化了操作，降低了成本，提高了效率，而且减少了人为误差的可能性；包被及检测均采用常规的 ELISA 操作步骤，应用可靠；无须使用任何新的设备或装置，节省资金。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法，其特征是：

所述检测方法包括将两种或两种以上的血液传染病病原体的抗原或抗体混合在一起，经一次检测，即可判定所测样品是否对所述的两种或两种以上血液传染病病毒全部呈阴性。

2、根据权利要求1所述的多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法，其特征是：所述的两种或两种以上的血液传染病病毒包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、艾滋病病毒、梅毒螺旋体、HTLV病毒；

所述的一次检测为在酶标板的微孔中包被两种或两种以上所述的血液传染病病原体的抗原或抗体，并使用与所述的两种或两种以上血液传染病病原体对应的酶标抗原或抗体，通过一次检测来判定所测样品是否对在测的两种或两种以上所述的血液传染病病原体全部呈阴性。

3、根据权利要求2所述的多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法，其特征是：

检测时是采用常规的ELISA检测方案及常规的仪器设备进行的。

4、根据权利要求2或3所述的多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法，其特征是所使用的检测试剂盒包括：混合包被了所述的两种至五种血液传染病病原体的抗原或抗体的酶标板，对应于所述的两种至五种血液传染病病原体的抗原或抗体的混合酶标试剂，以及阴性对照、阳性对照、洗涤液、酶底物和终止液。

5、根据权利要求 4 所述的多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法，其特征是：

(1) 乙型肝炎病毒表面抗原检测：采用双抗体夹心法，包被使用一种单克隆或多克隆抗体，测定使用另一种单克隆或多克隆抗体并带酶标记；

(2) 丙型肝炎病毒抗体检测：采用间接法，使用 Core、NS3、NS4 及 NS5 这几种丙肝病毒抗原的一种或数种用于包被，较佳选择是使用含有这几个抗原簇的通过重组 DNA 技术产生的单个蛋白分子；测定则使用带酶标记的鼠或兔抗人 IgG；

(3) 艾滋病病毒抗体检测：采用双抗原夹心法，检测覆盖 HIV-1 及 HIV-2；使用 HIV-1 中的 gP120、gP41、P24 以及 HIV-2 中的 gP36 这几种艾滋病病毒抗原的一种或数种用于包被和测定；较佳选择是使用含有这几个抗原簇的通过重组 DNA 技术产生的单个蛋白分子；

(4) 梅毒螺旋体抗体检测：采用双抗原夹心法；使用 kD47、kD42、kD15 这几种梅毒螺旋体抗原的一种或数种用于包被和测定；较佳选择是使用含有这几个抗原簇的通过重组 DNA 技术产生的单个蛋白分子；

(5) HTLV 病毒抗体检测：采用双抗原夹心法，检测覆盖 HTLV-1 及 HTLV-2，使用 HTLV-1 中的 gP46、gP21 以及 HTLV-2 中的 gP36 这几种 HTLV 病毒抗原的一种或数种用于包被和测定；较佳选择是使用含有这几个抗原簇的通过重组 DNA 技术产生的单个蛋白分子。

6、根据权利要求 5 所述的多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法，其特征：检测可以采用一步法，亦即样品和酶标抗体抗原混合液同步加入微孔中，也可以是两步法，亦即样品先加入微孔中，培养一段时间后洗涤去除，再加入酶标抗体抗原混合液。

7、根据权利要求 6 所述的多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫

吸附检测方法，其特征是：包被抗体浓度范围为每毫升 50ng 至 5mg；包被抗原浓度范围为每毫升 10ng 至 1mg；测定抗体浓度范围为每毫升 1ng 至 100ug；测定抗原浓度范围为每毫升 1ng 至 100ug；包被及测定抗原抗体的用量以完全覆盖酶标板孔底为基准；

包被缓冲液可以是碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、TRIS 缓冲液，其 pH 值范围在 5 到 11 之间；包被温度在 4℃ 到 42℃ 之间，包被时间 1 小时至 48 小时；

包被之后需要封闭，封闭剂可以是牛血清白蛋白 (BSA)、酪蛋白 (Casein)、明胶 (Gelatin)、脱脂牛奶、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)；

待测样品可以是血清、血浆、体液、唾液、尿液；

洗涤缓冲液可以是磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液、碳酸盐缓冲液，盐浓度在 0 到 1.2M，pH 值范围在 5 到 11 之间；洗涤温度在 4℃ 到 42℃ 之间，洗涤 3 到 5 次，每次 10 秒至 1 分钟；洗涤液中加入少量表面活性剂，包括 Tween 20、Triton X-100；方案是采用 PBS-Tween (50mM 磷酸盐缓冲液，150mM NaCl, 0.1% Tween 20, PH7.5) 用于基于颜色反应的 ELISA，或采用 Tris-Tween (20mM Tris 缓冲液，150mM NaCl, 0.1% Tween 20, PH7.4) 用于基于化学发光反应的 ELISA；

标记的酶可以是过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (AP)；结果判定可以采用颜色反应或化学发光反应；HRP 颜色反应底物包括 OPD (O-phenylenediamine, 邻苯二胺)、TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 四甲基联苯胺) 和 ABTS [2,2'-azino-di-(3-ethylbenziazobine sulfonate-6), 2,2'-连氨基-2(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6) 铵盐]，化学发光反应采用基于鲁米诺 (Luminol) 的增强型化学发光底物；AP 颜色反应底物包括 P-NPP (P-nitrophenyl phosphate, 对硝基苯磷酸酯)，化学发光采用基于 1,2-dioxetane 或 P-4Mu (4-methylumbelliferyl phosphate, 磷酸 4-甲基伞

酮)的底物;

终止液为 2M HCl 或 2M H<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>.

8、根据权利要求 7 所述的多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法,其特征是:所述的包被抗体浓度的较好范围为每毫升 400ng 至 400ug;包被抗原浓度的较好范围为每毫升 50ng 至 50ug;测定抗体浓度的较好范围为每毫升 4ng 至 4ug;测定抗原浓度范的较好范围为每毫升 5ng 至 3ug;

所述的包被缓冲液的 pH 值范围以 8 到 10 为佳;

所述的洗涤缓冲液的 pH 值范围以 6 到 9 为佳;

9、根据权利要求 8 所述的多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法,其特征是:所述的包被抗体浓度 最佳范围为每毫升 4ug 至 40ug;包被抗原浓度 最佳范围为每毫升 0.5ug 至 5ug;测定抗体浓度 最佳范围为每毫升 40ng 至 400ng;测定抗原浓度范 最佳范围为每毫升 30ng 至 300ng;

## 多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法

### 技术领域

本发明涉及医学检测技术领域，尤其是血液传染病的免疫检测领域，具体是多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法。

### 背景技术

据报道，近年来由各种血液传染病给血液接受者带来的威胁日益突出。因此，对献血员进行传染性疾病预防十分必要。目前，国内由卫生部指定的献血员传染性疾病预防项目有 HBsAg（乙型肝炎病毒表面抗原）、抗-HCV（丙型肝炎病毒抗体）、抗-HIV（艾滋病病毒抗体）及梅毒螺旋体抗体；此外，日本、美国、加拿大等国家已相继将同样可通过血液感染的人类 T 淋巴细胞白血病病毒（HTLV）抗体检测列为献血员的常规筛查项目之一。据世界卫生组织（WHO）统计，全世界平均每年每人供血 8ml 方可满足临床用血的需要，也就是说，我国每年必须有五千二百万人次献血，方可满足我国的临床用血需要。而我国的现状是每年有约一千万人次献血。由此可见，我国的献血员筛查具有巨大的现有市场及发展空间。此外，各种形式的体检，如出国前体检，婚前体检、征兵体检、招生体检及饮食、托幼等特殊行业从业人员的体检等，也往往需要检测上述几种血液传染病。

上述血液传染病的检测主要有酶联免疫吸附（ELISA）法、试纸类快速检测法和聚合酶链式反应（PCR）法等三种方法。PCR 方法检测病毒 DNA，由于污染问题不易解决、设备及人员要求较高以及其它各种局限，目前尚未广泛采用；试纸类快速检测则由于灵敏度和特异性不够高、批量检测能力不足等因素的局限，目前仅用于某些场合下的初筛，不适于确认性的检测应用；而 ELISA 检测方法因具有灵敏度高、特异性强、操作简便、结果

稳定可靠等特点而被国内以及国外卫生权威机构设立为献血员筛查的“金标准”，并在各种体检中广泛采用。

目前血液传染病病毒的 ELISA 试剂盒通常围绕单种病毒检测展开，亦即在微孔板（以 96 孔板为最常见）的每一孔中包被单一抗原或抗体，或者包被数种抗原或抗体的组合，用于检测一个或数个病毒指标，但这些病毒指标只属于单种病毒。以爱滋病病毒抗体检测试剂盒为例，每一孔中包被有分属于 HIV-1 及 HIV-2 的数种抗原，可以同时检测人体产生的这两种爱滋病病毒的任何一种的抗体，但不能检测其它种病毒如梅毒。因此，目前献血员每个血样要进行多次 ELISA 检测，对乙肝、丙肝、梅毒、爱滋病及 HTLV 这五种病毒就需要分别做五次，耗时耗力，成本高昂，效率低下，且多次检测增加了人为误差的可能性。

有助于解决上述问题的改进的 ELISA 相关检测技术方案在文献中已有报道。一种方案是将生物芯片技术与 ELISA 技术相结合。中国专利公开 CN1390953A 披露了一种与 96 孔酶标板操作系统兼容的生物芯片，在其固态基底表面点样后，可置于标准的酶标检测系统中进行加样、反应、洗板等操作，同时进行多指标、多样本的并行检测。然而，该系统需要特殊的经活性基团处理过的玻璃基底，需要将基底与带孔框架胶合，需要使用昂贵的点样仪器和特制的扫描系统，制备复杂，操作繁琐，造价不菲。

另一种方案是应用快速检测技术在试纸条上或试纸卡上实现多指标的同时检测。中国专利公开 CN1197117A 披露了一种同步检测鸡四种病毒的条形酶标斑点试剂盒的制备方法，它将上述四种病毒的抗体分别包被在同一条形载体上的四个区域内，通过酶标显色反应测定样品中是否含有这四种病毒。然而，同其它基于试纸条或试纸卡的技术相似，酶标斑点法的检测灵敏度低，且不适合于批量检测。

再一种方案是采用特殊的酶标板。中国专利号 92245089.7 披露了一种一孔法检测肝炎多项免疫标志的反应板，它将酶标板上的每个孔分隔成 2、3、4 或 5 个小孔，在每个小孔中分别包被不同抗原或抗体，从而一孔可以同时测定 2 到 5 个免疫标志。然而，该方法需要将本来就不大的微孔板上

的每个孔物理地分隔成 2 到 5 个小孔，并要在每个小孔中分别包被，制备过程不易。而更大的问题在于使用，由于每个小孔间有分隔层，每孔中液体的清除需要在每各小孔分别进行而无法一次性完成，操作繁琐，且不能使用标准的洗板机。

如上所述，尽管 ELISA 已经有几十年的历史，在各种领域得到广泛应用，并且是献血员检测的首选方法，但目前的技术仍无法有效地、方便地、低成本地进行多样品多指标的同时检测。

### **本发明的内容**

包括上述改进的 ELISA 相关技术在内的现有技术都属于“鉴定型”技术，亦即它们在检测一个样品时不仅仅判定该样品是否病毒阳性，而且判定是哪一种或哪几种病毒阳性。然而，献血员检测和体检中的传染病检测的首要需求是“排除型”的，它在乎的是待测样品中是否有任何病毒阳性，而不重视究竟是哪一种或哪几种病毒阳性。事实上，绝大部分的献血员检测和体检结果是阴性，对数量众多的此类样品重复做 4 次或 5 次 ELISA 无疑是极大的资源浪费。

本发明的目的是针对献血员检测和一些体检的特殊需求，提供一种只需一次检测就能判定样品是否无病毒感染的“排除式”ELISA 方法及试剂盒，以大大节约样品重复检测中浪费的资源。

为实现上述目的，本发明采用混合包被及混合测定的模式，在酶标板的微孔中包被两种或两种以上血液传染病病原体的抗原或抗体，并使用这两种或两种以上血液传染病病原体对应的酶标抗原或抗体，应用常规的 ELISA 检测方案及仪器设备，通过一次检测就能判定所测样品是否对在测的两种或两种以上血液传染病病原体全部阴性。本发明提供了一种新型的“排除式”ELISA 方法，特别适用于献血员检测、体检等需要同时检测多项血液传染病免疫标志且偏重于阴性结果的应用市场。

更具体来说，本发明披露的“排除式”ELISA方法针对乙型肝炎病毒表面抗原、丙型肝炎病毒抗体、艾滋病病毒抗体、梅毒螺旋体抗体、HTLV病毒抗体这五种项目的混合检测，包含下列可能性：

- 上述五种项目中任意两种的组合，使用所选取的两种血液传染病病原体的抗原或抗体进行包被及测定，阴性结果表示所测的两种血液传染病项目皆为阴性，阳性则表示所测的两种血液传染病项目至少有一种阳性；
- 上述五种项目中任意三种的组合，使用所选取的三种血液传染病病原体的抗原或抗体进行包被及测定，阴性结果表示所测的三种血液传染病项目皆为阴性，阳性则表示所测的三种血液传染病项目至少有一种阳性；
- 上述五种项目中任意四种的组合，使用所选取的四种血液传染病病原体的抗原或抗体进行包被及测定，阴性结果表示所测的四种血液传染病项目皆为阴性，阳性则表示所测的四种血液传染病项目至少有一种阳性；
- 上述五种项目中所有五种的组合，使用这五种血液传染病病原体的抗原或抗体进行包被及测定，阴性结果表示这五种血液传染病项目皆为阴性，阳性则表示这五种血液传染病项目至少有一种阳性。

本发明并提供一种基于上述“排除式”ELISA方法的ELISA检测试剂盒，它由下列组分组成：混合包被了两种至五种血液传染病病原体的抗原或抗体的酶标板，对应于这两种至五种血液传染病病原体的抗原或抗体的混合酶标试剂，以及适量的阴性对照、阳性对照、洗涤液、酶底物和终止液，如图1所示为酶标板的制备过程图。

酶标板可以有多种形式，常见为96孔板及48孔板，但亦可以是8孔板、16孔板、24孔板、256孔板、1024孔板等。

包被及测定使用的抗原抗体随检测方法不同而异，具体如下：

- 乙型肝炎病毒表面抗原检测：采用双抗体夹心法。包被使用一种单克隆或多克隆抗体，测定使用另一种单克隆或多克隆抗体并带酶标记。
- 丙型肝炎病毒抗体检测：目前常规采用间接法。使用 Core、NS3、NS4 及 NS5 这几种丙肝病毒抗原的一种或数种用于包被，较佳选择是使用含有这几个抗原簇的通过重组 DNA 技术产生的单个蛋白分子。测定则使用带酶标记的鼠或兔抗人 IgG。丙肝病毒抗体的双抗原夹心法目前正在研发中，一旦成功将成为本发明的最佳选择。
- 艾滋病病毒抗体检测：采用双抗原夹心法，检测覆盖 HIV-1 及 HIV-2。使用 HIV-1 中的 gP120、gP41、P24 以及 HIV-2 中的 gP36 这几种艾滋病病毒抗原的一种或数种用于包被和测定。较佳选择是使用含有这几个抗原簇的通过重组 DNA 技术产生的单个蛋白分子。
- 梅毒螺旋体抗体检测：采用双抗原夹心法。使用 kD47、kD42、kD15 这几种梅毒螺旋体抗原的一种或数种用于包被和测定。较佳选择是使用含有这几个抗原簇的通过重组 DNA 技术产生的单个蛋白分子。
- HTLV 病毒抗体检测：采用双抗原夹心法，检测覆盖 HTLV-1 及 HTLV-2。使用 HTLV-1 中的 gP46、gP21 以及 HTLV-2 中的 gP36 这几种 HTLV 病毒抗原的一种或数种用于包被和测定。较佳选择是使用含有这几个抗原簇的通过重组 DNA 技术产生的单个蛋白分子。

上述包被抗体浓度范围为每毫升 50ng 至 5mg，较好范围为每毫升 400ng 至 400ug，最佳范围为每毫升 4ug 至 40ug。包被抗原浓度范围为每毫升 10ng 至 1mg，较好范围为每毫升 50ng 至 50ug，最佳范围为每毫升 0.5ug 至 5ug。测定抗体浓度范围为每毫升 1ng 至 100ug，较好范围为每毫升 4ng 至 4ug，最佳范围为每毫升 40ng 至 400ng。测定抗原浓度范围为每毫升 1ng 至 100ug，

较好范围为每毫升 5ng 至 3ug，最佳范围为每毫升 30ng 至 300ng。包被及测定抗原抗体的用量以完全覆盖酶标板孔底为基准，以 96 孔酶标板为例，每孔用量 50ul 至 150ul。

包被缓冲液可以是碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、TRIS 缓冲液等多种选择，pH 值范围在 5 到 11 之间，以 pH8 到 10 为佳。常用的有 pH9.6 的 50mM 碳酸盐缓冲液。包被温度在 4℃ 到 42℃ 之间，包被时间 1 小时至 48 小时，常用的方案是 4℃ 过夜包被或 37℃ 包被 2 至 4 小时。

包被之后需要封闭，以去除酶标板微孔表面多余的结合部位。封闭剂可以是牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白 (Casein)、明胶 (Gelatin)、脱脂牛奶、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 等多种选择，常用的有 1% 至 10% BSA 或 10% 至 50% 脱脂牛奶。

待测样品可以是血清、血浆、体液、唾液、尿液等。

如图 2 为 ELISA 的反应流程图，所述检测可以采用一步法，亦即样品和酶标抗体抗原混合液同步加入微孔中；也可以是两步法，亦即样品先加入微孔中，培养一段时间后洗涤去除，再加入酶标抗体抗原混合液。由于丙肝抗体检测为间接法，若混合检测包括丙肝抗体检测项目，则以两步法为佳。

洗涤缓冲液可以是磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液、碳酸盐缓冲液等多种选择，盐浓度在 0 到 1.2M，pH 值范围在 5 到 11 之间，以 pH6 到 9 为佳。洗涤温度在 4℃ 到 42℃ 之间，常规在室温或 37℃ 洗涤 3 到 5 次，每次 10 秒至 1 分钟。洗涤液中通常加入少量表面活性剂以增强洗涤效果，常用的有 Tween 20、Triton X-100 等。常用的方案是采用 PBS-Tween (50mM 磷酸盐缓冲液，150mM NaCl, 0.1% Tween 20, PH7.5) 用于基于颜色反应的 ELISA 或采用 Tris-Tween (20mM Tris 缓冲液, 150mM NaCl, 0.1% Tween 20, PH7.4) 用于基于化学发光反应的 ELISA。

标记的酶可以是过氧化物酶 (HRP) 或碱性磷酸酶 (AP)。结果判定可以采用颜色反应或化学发光反应。HRP 颜色反应底物常用的有 OPD (O-phenylenediamine, 邻苯二胺)、TMB (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 四甲基联苯胺) 和 ABTS [2,2'-azino-di-(3-ethylbenziazobine sulfonate-6), 2,2'-连氨基-2(3-乙基-苯并噻唑啉磺酸-6)铵盐], 化学发光通常采用基于鲁米诺 (Luminol) 的增强型化学发光底物。AP 颜色反应底物常用的有 P-NPP (P-nitrophenyl phosphate, 对硝基苯磷酸酯) 等, 化学发光通常采用基于 1,2-dioxetane 或 P-4Mu (4-methylumbelliferyl phosphate, 磷酸 4-甲基伞酮) 的底物。

终止液为 2M HCl 或 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

综上所述, 与现有技术相比, 本发明的优点主要有:

- 通过单孔一次检测就可判定 2~5 种传染病免疫标志是否全部阴性或者至少有一项是阳性, 大大简化了操作, 降低了成本, 提高了效率, 而且减少了人为误差的可能性;
- 包被及检测均采用常规的 ELISA 操作步骤, 应用可靠;
- 无须使用任何新的设备或装置, 节省资金

### 附图简要说明

图 1 为酶标板的制备过程图

图 2 为 ELISA 的反应流程图

### 实施例

### 实施例 1 梅毒抗体/爱滋病抗体二合一检测

材料：包被及标记采用在大肠杆菌表达并纯化的重组梅毒螺旋体抗原和重组爱滋病病毒抗原。梅毒螺旋体抗原含有 kD47 和 kD15 的抗原簇，爱滋病病毒抗原含有 HIV-1 中的 gP120 和 gP41 以及 HIV-2 中的 gP36 抗原簇，均为单一蛋白分子，包被及标记用的抗原含有同样的抗原簇组合但分子量不同，以减少大肠杆菌污染蛋白带来的假阳性。阴性样品（对五种血液传染病均为阴性）、梅毒抗体阳性样品和爱滋病抗体阳性样品均为病人血清并经独立实验证实。包被采用 pH9.6 的 50mM 碳酸盐缓冲液。洗液为 PBS-Tween。显色底物为 TMB，由 A、B 两组份组成。终止液为 2M HCl。结果读取采用 Labsystems MK-II 酶标仪。

方法：将用碳酸盐缓冲液配制的混合包被抗原（重组梅毒抗原 1.5 ug/ml + 重组爱滋病病毒抗原 2 ug/ml）加入 96 孔酶标板内，每孔 100ul，4℃ 静置过夜。PBS 洗液洗涤 3 次后，每孔加入 10%牛奶 120ul，37℃ 静置 2 小时。洗液洗涤 3 次，扣干，依次每孔加入阳性样品或阴性样品 50ul 以及混合酶标（HRP 标记的重组梅毒抗原 80 ng/ml + HRP 标记的重组爱滋病病毒抗原 75 ng/ml）50ul，轻拍混匀，37℃ 温育 60 分钟。洗液洗涤 5 次后（每次应保持 30-60 秒的浸泡时间），扣干，加入 A、B 底物各 50ul，轻拍混匀，37℃ 暗置 20 分钟。每孔加入终止液 50ul，混匀。用酶标仪测定各孔 OD 值。结果示于表 1。

表 1

包被	酶标	检测样品	OD 值
重组梅毒抗原	重组梅毒抗原	阴性血清	0.057
		梅毒抗体阳性血清	3.431
重组爱滋病抗原	重组爱滋病抗原	阴性血清	0.062
		爱滋病抗体阳性血清	3.110
重组梅毒抗原 + 重组爱滋病抗原	重组梅毒抗原	阴性血清	0.071
		梅毒抗体阳性血清	3.025
	重组爱滋病抗原	阴性血清	0.079
		爱滋病抗体阳性血清	2.941
	重组梅毒抗原 + 重组爱滋病抗原	阴性血清	0.084
		梅毒抗体阳性血清	2.787
		爱滋病抗体阳性血清	2.881
		混合阳性血清*	2.524

\*混合阳性血清为梅毒抗体阳性血清与爱滋病抗体阳性血清按 1: 1 比例混合

#### 实施例 2 爱滋病抗体/HTLV 抗体二合一检测

爱滋病包被及标记抗原见实施例 1。HTLV 的包被及标记抗原采用在大肠杆菌表达并纯化的单一重组抗原分子，含有 HTLV-1 中的 gP46 和 gP21 抗原簇，包被及标记用的抗原含有同样的抗原簇组合但分子量不同。该抗原组合亦能较好地检测 HTLV-2。混合包被抗原组成为重组爱滋病抗原 2 ug/ml + 重组 HTLV 病毒抗原 2.5 ug/ml。混合酶标组成为 HRP 标记的重组爱滋病抗原 75 ng/ml + HRP 标记的重组 HTLV 病毒抗原 100 ng/ml。其它材料、仪器及方法同实施例 1。

结果示于表 2。

表 2

包被抗原	酶标	检测样品	OD 值	
重组 HTLV 抗原	重组 HTLV 抗原	阴性血清	0.078	
		HTLV 抗体阳性血清	2.646	
重组 HTLV 抗原 + 重组爱滋病抗原	重组 HTLV 抗原	阴性血清	0.064	
		HTLV 抗体阳性血清	2.175	
	重组爱滋病抗原	阴性血清	0.061	
		爱滋病抗体阳性血清	2.712	
	重组 HTLV 抗原 + 重组爱滋病抗原	重组 HTLV 抗原 + 重组爱滋病抗原	阴性血清	0.091
			HTLV 抗体阳性血清	1.921
			爱滋病抗体阳性血清	2.314
			混合阳性血清*	2.002

\*混合阳性血清为 HTLV 抗体阳性血清与爱滋病抗体阳性血清按 1: 1 比例混合

### 实施例 3 乙肝表面抗原/丙肝抗体二合一检测

材料：乙肝病毒表面抗原检测采用双抗体夹心法，包被及标记分别使用不同的鼠抗人单克隆抗体。丙肝病毒抗体检测采用间接法，包被使用在大肠杆菌表达并纯化的单一重组抗原分子，含有 Core、NS3、NS4 及 NS5 这几种蛋白的抗原簇，测定则使用 HRP 标记的兔抗人 IgG。乙肝病毒表面抗原阳性样品和丙肝病毒抗体阳性样品均为病人血清并经独立实验证实。其它材料及仪器同实施例 1。

方法：将用碳酸盐缓冲液配制的混合包被液（包被用乙肝病毒表面抗原单克隆抗体 10 ug/ml + 重组丙肝病毒抗原 1.1 ug/ml）加入 96 孔酶标板内，每孔 100ul，4℃ 静置过夜。洗液洗涤 3 次后，每孔加入 10% BSA 120ul，37℃ 静置 2 小时。洗液洗涤 3 次，扣干，每孔加入阳性样品或阴性样品 100ul，室温温育 60 分钟。洗液洗涤 3 次后，每孔加入酶标混合液（HRP 标记的乙肝病毒表面抗原单克隆抗体 150 ng/ml + HRP 标记的重组丙肝病毒抗原 60 ng/ml）100ul，轻拍混匀，室温温育 60 分钟。洗液洗涤 5 次后，扣干，加

入 A、B 底物各 50 $\mu$ l，轻拍混匀，37 $^{\circ}$ C 暗置 20 分钟。每孔加入终止液 50 $\mu$ l，混匀。用酶标仪测定各孔 OD 值。结果示于表 3。

表 3

包被	酶标	检测样品	OD 值
乙肝表面抗原 单克隆抗体	乙肝表面抗原 单克隆抗体	阴性血清	0.024
		乙肝表面抗原 1 ng/ml	1.291
重组丙肝抗原	重组丙肝抗原	阴性血清	0.077
		丙肝抗体阳性血清	2.949
乙肝表面抗原 单克隆抗体 + 重组丙肝抗原	乙肝表面抗原 单克隆抗体	阴性血清	0.031
		乙肝表面抗原 1 ng/ml	1.046
	重组丙肝抗原	阴性血清	0.061
		丙肝抗体阳性血清	2.407
	乙肝表面抗原 单克隆抗体 + 重组丙肝抗原	阴性血清	0.082
		丙肝抗体阳性血清	2.111
	重组丙肝抗原	乙肝表面抗原 1 ng/ml	0.912
		混合阳性样品*	3.019

\*混合阳性样品为丙肝抗体阳性血清

性血清中加入 1 ng/ml 乙肝表面抗原

#### 实施例 4 梅毒抗体/爱滋病抗体/HTLV 抗体三合一检测

这三种传染病检测均采用双抗原夹心法，包被及标记抗原详见实施例 1 及 2。包被混合液组成为重组梅毒抗原 1.2  $\mu$ g/ml + 重组爱滋病病毒抗原 1.8  $\mu$ g/ml + 重组 HTLV 病毒抗原 2.1  $\mu$ g/ml。酶标混合液组成为 HRP 标记的重组梅毒抗原 70 ng/ml + HRP 标记的重组爱滋病病毒抗原 65 ng/ml + HRP 标记的重组 HTLV 病毒抗原 90 ng/ml。其它材料、仪器及方法同实施例 1。

结果示于表 4。

表 4

包被抗原	酶标	检测样品	OD 值
重组 HTLV 抗原 + 重组爱滋病抗原 + 重组梅毒抗原	重组 HTLV 抗原 + 重组爱滋病抗原 + 重组梅毒抗原	阴性血清	0.096
		HTLV 抗体阳性血清	1.895
		爱滋病抗体阳性血清	2.201
		梅毒抗体阳性血清	2.558
		混合阳性血清*	2.117

\*混合阳性血清为 HTLV 抗体阳性血清、爱滋病抗体阳性血清以及梅毒抗体阳性血清按同等比例混合

#### 实施例 5 丙肝抗体/梅毒抗体/爱滋病抗体/HTLV 抗体四合一检测

这四种传染病检测的包被及标记抗原详见实施例 1、2 及 3。包被混合液组成为重组丙肝病毒抗原 1 ug/ml+ 重组梅毒抗原 1.1 ug/ml + 重组爱滋病病毒抗原 1.6 ug/ml + 重组 HTLV 病毒抗原 2.0 ug/ml。酶标混合液组成为 HRP 标记的重组丙肝病毒抗原 50 ng/ml + HRP 标记的重组梅毒抗原 60 ng/ml + HRP 标记的重组爱滋病病毒抗原 55 ng/ml + HRP 标记的重组 HTLV 病毒抗原 80 ng/ml。其它材料及仪器同实施例 1。方法同实施例 3。

结果示于表 5。

表 5

包被抗原	酶标	检测样品	OD 值
重组丙肝抗原 + 重组爱滋病抗原 + 重组梅毒抗原 + 重组 HTLV 抗原	重组丙肝抗原 + 重组爱滋病抗原 + 重组梅毒抗原 + 重组 HTLV 抗原	阴性血清	0.155
		丙肝抗体阳性血清	1.614
		HTLV 抗体阳性血清	1.516
		爱滋病抗体阳性血清	1.817
		梅毒抗体阳性血清	1.912
		丙肝抗体阳性血清 + 梅毒抗体阳性血清	1.745
		HTLV 抗体阳性血清 + 爱滋病抗体阳性血清	1.884

### 实施例6 乙肝表面抗原/丙肝抗体/梅毒抗体/爱滋病抗体/HTLV 抗体五合一检测

这五种传染病检测的包被及标记抗体或抗原详见实施例 1、2 及 3。包被混合液组成为乙肝病毒表面抗原单克隆抗体 8 ug/ml+ 丙肝病毒抗原 0.9 ug/ml+ 重组梅毒抗原 1.1 ug/ml + 重组爱滋病病毒抗原 1.6 ug/ml + 重组 HTLV 病毒抗原 2.0 ug/ml。酶标混合液组成为 HRP 标记的乙肝病毒表面抗原单克隆抗体 120 ng/ml + HRP 标记的重组丙肝病毒抗原 50 ng/ml + HRP 标记的重组梅毒抗原 60 ng/ml + HRP 标记的重组爱滋病病毒抗原 55 ng/ml + HRP 标记的重组 HTLV 病毒抗原 80 ng/ml。其它材料及仪器同实施例 1。方法同实施例 3。

结果示于表 6。

表 6

包被抗原	酶标	检测样品	OD 值
乙肝表面抗原 单克隆抗体 + 重组丙肝抗原 + 重组爱滋病抗原 + 重组梅毒抗原 + 重组 HTLV 抗原	乙肝表面抗原 单克隆抗体 + 重组丙肝抗原 + 重组爱滋病抗原 + 重组梅毒抗原 + 重组 HTLV 抗原	阴性血清	0.181
		乙肝表面抗原 2 ng/ml	1.411
		丙肝抗体阳性血清	1.314
		HTLV 抗体阳性血清	1.289
		爱滋病抗体阳性血清	1.787
		梅毒抗体阳性血清	1.817
		丙肝抗体阳性血清 + 梅毒抗体阳性血清	1.745
		HTLV 抗体阳性血清 + 爱滋病抗体阳性血清	1.481

### 实施例7 乙肝表面抗原/爱滋病抗体二合一检测（化学发光法）

这两种检测的包被及标记抗体或抗原分别见实施例 1 和 3。包被混合液组成为重组乙肝病毒表面抗原单克隆抗体 10 ug/ml+ 重组爱滋病病毒抗原

2 ug/ml。酶标混合液组成为 HRP 标记的乙肝病毒表面抗原单克隆抗体 150 ng/ml + HRP 标记的重组爱滋病病毒抗原 75 ng/ml。化学发光底物为 Luminol 增强型化学发光底物 (ECL 试剂)，由 A、B 两组分组成。其它材料及仪器同实施例 1。方法同实施例 3，但加入底物为 ECL 试剂而不是 TMB 试剂，结果由 BERTHOLD Junior 型发光检测仪读取，以相对发光值 (RLU) 表示。

结果示于表 7。

表 7

包被	酶标	检测样品	RLU
乙肝表面抗原 单克隆抗体	乙肝表面抗原 单克隆抗体	阴性血清	16
		乙肝表面抗原 0.2 ng/ml	2,729
		乙肝表面抗原 1 ng/ml	28,604
重组爱滋病抗原	重组爱滋病抗原	阴性血清	24
		爱滋病抗体阳性血清	41,438
乙肝表面抗原 单克隆抗体 + 重组爱滋病抗原	乙肝表面抗原 单克隆抗体	阴性血清	63
		乙肝表面抗原 0.2 ng/ml	3,079
		乙肝表面抗原 1 ng/ml	26,431
	重组爱滋病抗原	阴性血清	76
		爱滋病抗体阳性血清	44,274
	乙肝表面抗原 单克隆抗体 + 重组爱滋病抗原	阴性血清	149
		爱滋病抗体阳性血清	41,339
		乙肝表面抗原 0.2 ng/ml	1,950
		乙肝表面抗原 1 ng/ml	26,319
		混合阳性样品*	56,380

\*混合阳性样品为爱滋病抗体阳性血清中加入 1 ng/ml 乙肝表面抗原

从上表可见化学发光法同样适用于混合型 ELISA，且灵敏度优于显色法，对乙肝病毒表面抗原检测可达到 0.2 ng/ml。

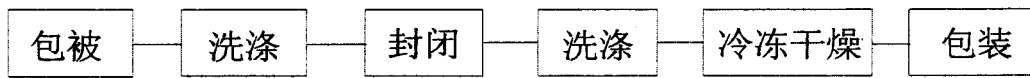


图 1

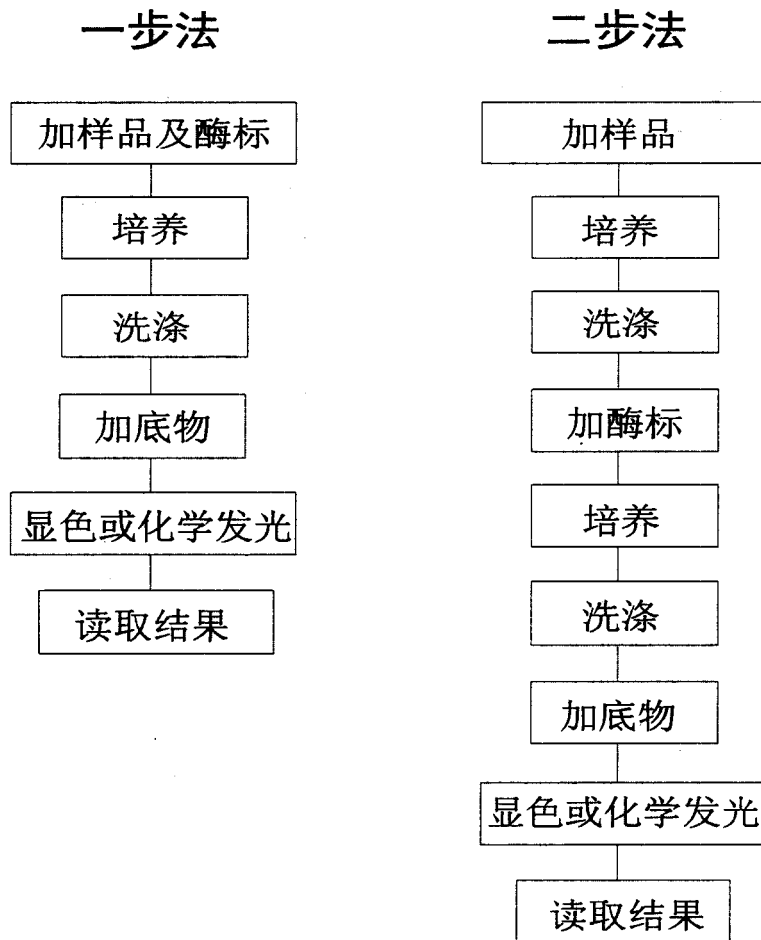


图 2

专利名称(译)	多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1530658A</a>	公开(公告)日	2004-09-22
申请号	CN03119356.0	申请日	2003-03-17
[标]发明人	温龙平 吴长龙 曹军		
发明人	温龙平 吴长龙 曹军		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535 G01N33/558 G01N33/569		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

多种血液传染病的混合型排除式酶联免疫吸附检测方法，所述检测方法包括将两种或两种以上的血液传染病病原体的抗原或抗体混合在一起，经一次检测，即可判定所测样品是否对所述的两种或两种以上血液传染病病毒包括乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、艾滋病病毒、梅毒螺旋体、HTLV病毒全部呈阴性；检测时可采用常规的ELISA检测方案及常规的仪器设备进行；本发明的优点主要有：通过单孔一次检测就可判定多种传染病免疫标志是否全部阴性或者至少有一项是阳性，大大简化了操作，降低了成本，提高了效率，而且减少了人为误差的可能性；包被及检测均采用常规的ELISA操作步骤，应用可靠；无须使用任何新的设备或装置，节省资金。

