



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106546732 A

(43) 申请公布日 2017. 03. 29

(21) 申请号 201510593406. X

(22) 申请日 2015. 09. 17

(71) 申请人 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术产业园科技南十二路迈瑞大厦

(72) 发明人 吴令嘉 余枝广 姜德华 王頔
张强 杨薇

(74) 专利代理机构 深圳鼎合诚知识产权代理有限公司 44281

代理人 郭燕 彭家恩

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

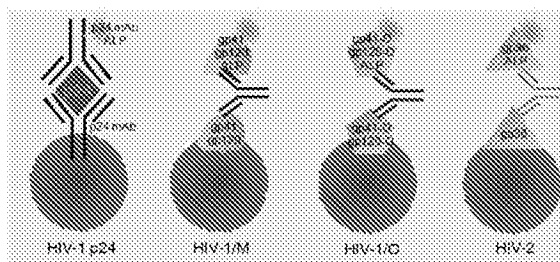
权利要求书1页 说明书32页 附图3页

(54) 发明名称

人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒及其用途和检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒及其用途和检测方法。本发明的检测试剂盒,包括如下组分:(a)磁微粒包被物:在磁微粒上包被有 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/O 特异的抗原、HIV-2 gp36 抗原和 HIV p24 抗体,存在于磁微粒稀释液中;(b)酶标记物:标记酶标记的 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/O 特异的抗原、HIV-2 gp36 抗原和 HIV p24 抗体,存在于酶标记物稀释液中;(c)样本处理液:含有非离子表面活性剂;和(d)测试稀释液:用于稀释待测试样本的缓冲液。能够实现对人类免疫缺陷病毒抗原和抗体的联合检测,特异性好,灵敏度高。



1. 一种人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒,包括如下组分:

(a) 磁微粒包被物:在磁微粒上包被有 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/0 特异的抗原、HIV-2 gp36 抗原和 HIV p24 抗体,存在于磁微粒稀释液中;

(b) 酶标记物:标记酶标记的 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/0 特异的抗原、HIV-2 gp36 抗原和 HIV p24 抗体,存在于酶标记物稀释液中;

(c) 样本处理液:含有非离子表面活性剂;和

(d) 测试稀释液:用于稀释待测试样本的缓冲液。

2. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述磁微粒为表面基团为氨基的磁微粒。

3. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述酶标记物稀释液中含有选自 Triton 类和 / 或 Tween 类的非离子表面活性剂,优选含有 TritonX-405 和 / 或 Tween 80。

4. 根据权利要求 3 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述酶标记物稀释液中含有 1.0~5.0% 的 Triton X-405 或 1.0~5.0% 的 Tween 80,优选含有 2.0% 的 Triton X-405 或 2.0% 的 Tween 80。

5. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述样本处理液中的非离子表面活性剂选自 Triton 类和 / 或 Nonidet P 类,优选 Triton X-100 和 / 或 Nonidet P40。

6. 根据权利要求 5 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述样本处理液中含有 1.5~4.0% 的 Triton X-100 或 0.5~1.5% 的 Nonidet P40,优选含有 2.8% 的 Triton X-100 或 1.0% 的 Nonidet P40。

7. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述测试稀释液中含有脱脂乳粉。

8. 根据权利要求 7 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述测试稀释液中含有 0.1~20% 的脱脂乳粉,优选含有 0.2~10% 的脱脂乳粉,更优选含有 0.4~5% 的脱脂乳粉。

9. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于:所述样本处理液与磁微粒包被物工作液混合后的反应体系的 pH 值为 3.5 ~ 6.0,优选为 4.0 ~ 5.0。

10. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述标记酶为碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶,优选碱性磷酸酶。

11. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/0 特异的抗原和 HIV-2 gp36 抗原为重组性抗原;所述 HIV p24 抗体为单克隆抗体,优选使用两种以上来源的单克隆抗体。

12. 根据权利要求 1 所述的检测试剂盒,其特征在于,所述检测试剂盒还包括所述标记酶的反应底物,优选地所述反应底物为 (3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷。

13. 权利要求 1-12 任一项所述的检测试剂盒在联合检测生物样本中的人类免疫缺陷病毒抗原和抗体中的用途。

14. 一种联合检测生物样本中的人类免疫缺陷病毒抗原和抗体的方法,包括:将权利要求 1-12 任一项所述的检测试剂盒中的组分(a)和(c)与样本接触并进行孵育反应,磁分离反应产物;然后加入组分(b)和(d)并继续进行孵育反应,再次磁分离反应产物;最后加入化学发光底物,测量反应所产生的光子数并计算出所述样本中人类免疫缺陷病毒抗原和抗体的含量。

人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒及其用途和检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及人类免疫缺陷病毒检测技术领域,尤其涉及一种人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒及其用途和检测方法。

背景技术

[0002] 人类免疫缺陷病毒 (Human Immunodeficiency Virus, HIV),即获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 的病原体,属于逆转录病毒科,慢病毒属,灵长类免疫缺陷亚属。HIV 的传播途径主要包括血液和受污染的血制品、性接触和孕前、孕期和孕后的母婴传播。

[0003] 目前发现有两种人类免疫缺陷病毒,即 HIV-1 型和 HIV-2 型,它们又有各自的亚型。不同地区流行的亚型不同,同一亚型在不同地区也存在一定差异。HIV-1 主要可分成 3 种关系较远的组别:M 组(主要组)、O 组(外围组)和 N 组(非 M 非 O 组)。其中,HIV-1/M 组是全球广泛传播的病毒组。HIV-1/O 组和 HIV-1/N 组发现于喀麦隆,相对罕见,主要存在于非洲中西部地区,但现在 HIV-1/O 组病毒已在其他地方发现。HIV-1/N 组目前只发现几十例感染病例。HIV-2 的传播范围也较广。

[0004] 当发生 HIV 感染时,人体的免疫系统会对 HIV 病毒的多种蛋白产生相应的抗体。其中包膜蛋白的免疫源性最强,通常感染后最早产生抗体,且在整个疾病阶段始终保持,因此抗 HIV 抗体成为检测 HIV 感染标志物。由于 HIV-1 和 HIV-2 的包膜蛋白与诱导产生的抗体相互之间很少有交叉反应,因此需要 HIV-1 和 HIV-2 特异性抗原以确保免疫分析法能够成功检测 HIV 感染。

[0005] 在 HIV 感染的早期,通过测定近期感染患者(血清转换前)血清或血浆标本中的 HIV p24 抗原,能早发现 HIV 感染。由于 p24 抗原只在感染早期出现,p24 抗原的检测主要用于早期感染或婴儿感染的检测。

[0006] 目前,人类免疫缺陷病毒检测的传统的免疫学方法主要为检测抗体的酶联免疫吸附法、胶体金法和酶标板化学发光法等第三代试剂盒。第三代试剂盒采用双抗原夹心法检测 HIV-1 抗体和 HIV-2 抗体,试剂中包含一个 HIV-1 特异抗原对和一个 HIV-2 特异抗原对。

[0007] 申请号为 200610114489.0、公开号为 CN101178404A 的中国专利申请“人类免疫缺陷病毒抗体化学发光诊断试剂盒及其制备方法”,公开了一种检测 HIV 抗体的试剂盒及其制备方法。该试剂盒的特点是在固相包被时使用 FITC 和抗-FITC 系统作为连接臂。但该试剂盒未实现对较罕见的 HIV-1/O 组病毒抗体的检测,而且只检测 HIV 抗体而不能检测 HIV 抗原。

[0008] 申请号为 200680055877.4、公开号为 CN101523216A 的中国专利申请“人类免疫缺陷病毒系列蛋白抗体测定方法”,公开了一种检测 HIV 抗体的试剂盒及其检测方法。试剂盒用 5 种 HIV-1 的抗原和一种 HIV-2 的抗原检测待测样本中的抗体,但是没有检测抗原。

[0009] 申请号为 200710119983.0、公开号为 CN101363853A 的中国专利申请公开了一种人类免疫缺陷病毒抗原/抗体化学发光免疫分析测定试剂盒及其制备方法。该方法的特

点是 HIV 抗体的 p24 酶标记系统采用生物素 - 亲和素系统。该试剂盒未实现对较罕见的 HIV-1/0 组病毒抗体的检测。

[0010] 目前,在人类免疫缺陷病毒检测技术领域需要能够同时检测 HIV-1/M 和 HIV-1/0 两种亚型的抗体,以及 HIV-2 抗体和 p24 抗原的试剂盒,以能够准确全面地检测到 HIV 的各种亚型并且尽早检测到病毒感染情况。遗憾的是,这样的要求对试剂盒的灵敏度和特异性提出了巨大挑战。

发明内容

[0011] 本发明一方面涉及一种人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒,包括如下组分:

[0012] (a) 磁微粒包被物:在磁微粒上包被有 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/0 特异的抗原、HIV-2gp36 抗原和 HIV p24 抗体,存在于磁微粒稀释液中;

[0013] (b) 酶标记物:标记酶标记的 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/0 特异的抗原、HIV-2gp36 抗原和 HIV p24 抗体,存在于酶标记物稀释液中;

[0014] (c) 样本处理液:含有非离子表面活性剂;和

[0015] (d) 测试稀释液:用于稀释待测试样本的缓冲液。

[0016] 本发明另一方面涉及上述检测试剂盒在联合检测生物样本中的人类免疫缺陷病毒抗原和抗体中的用途。

[0017] 本发明再一方面涉及联合检测生物样本中的人类免疫缺陷病毒抗原和抗体的方法,包括:将上述检测试剂盒中的组分(a)和(c)与样本接触并进行孵育反应,磁分离反应产物;然后加入组分(b)和(d)并继续进行孵育反应,再次磁分离反应产物;最后加入化学发光底物,测量反应所产生的光子数并计算出所述样本中人类免疫缺陷病毒抗原和抗体的含量。

[0018] 本发明的人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒能够实现对人类免疫缺陷病毒抗原和抗体的联合检测,即抗原和抗体有一项为阳性即报告 HIV 检测结果阳性。由于 HIV p24 抗原在 HIV 感染的早期出现,抗原和抗体的联合检测与单独检测 HIV-1/2 抗体相比能够缩短窗口期,提高早期检出率。同时本发明还实现了对于较罕见的 HIV-1/0 组病毒抗体的检测。另外,本发明采用磁微粒作为固相载体,具有较大的比表面积,能够增大免疫反应发生面积,提高反应的灵敏度;磁微粒球形和均一的表面减少了化学性粘附和非特异性结合,提高了特异性;酶促化学发光系统能够实现对反应信号的有效放大;同时,通过对组分配方的优化,尤其是使用含有非离子表面活性剂的酸性缓冲液作为样本处理液,实现了免疫反应的低本底和高信号。因此,本发明的试剂盒不仅特异性好,而且使抗原和抗体都达到了很高的检出灵敏度。此外,本发明的试剂盒可以配合全自动化学发光仪使用,降低了人为操作对测试结果的影响,使检测结果更可靠、准确、快速,更具有可重复性。

附图说明

[0019] 图1为本发明中使用的辛基苯基醚聚乙二醇(Triton)结构通式;

[0020] 图2为本发明中使用的聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯类非离子型表面活性剂 Tween80 结构通式;

[0021] 图3为本发明中使用的聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯类非离子型表面活性剂 Tween60 结构通式；

[0022] 图4为本发明中使用的聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯类非离子型表面活性剂 Tween20 结构通式；

[0023] 图5为本发明中使用的 4-壬基苯基聚乙二醇 (Nonidet P) 结构式；

[0024] 图6为本发明中的人类免疫缺陷病毒抗原和抗体检测的原理示意图；

[0025] 图7为本发明中的碱性磷酸酶水解 AMPPD 原理图；

[0026] 图8为本发明一个实施例中抗体通过戊二醛作为交联剂与磁微粒（氨基磁珠）交联在一起形成磁珠包被物的原理示意图。

具体实施方式

[0027] 下面通过具体实施方式结合附图对本发明作进一步详细说明。

[0028] 人类免疫缺陷病毒检测中,重要而难以达到的性能指标是特异性和灵敏度,一方面与体系中使用的抗原或抗体的种类和数量有关,另一方面与体系中各组分的配方有关。本发明的人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒对这两方面都进行了探索和优化,从而使得特异性和灵敏度均取得优异的结果。

[0029] 根据本发明的一个实施方案,检测试剂盒包括如下组分：

[0030] (a) 磁微粒包被物：在磁微粒上包被有 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/O 特异的抗原、HIV-2gp36 抗原和 HIV p24 抗体,存在于磁微粒稀释液中；

[0031] (b) 酶标记物：标记酶标记的 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/O 特异的抗原、HIV-2gp36 抗原和 HIV p24 抗体,存在于酶标记物稀释液中；

[0032] (c) 样本处理液：含有非离子表面活性剂；和

[0033] (d) 测试稀释液：用于稀释待测试样本的缓冲液。

[0034] 下面分别对上述四种组分进行具体说明。需要说明的是,在没有其它特别指明的情况下,本发明中的含量百分比(%)均是指重量体积百分比(W/V%),例如 1.0%是指 1.0W/V%,其中重量(W)和体积(V)的单位可以分别是克(g)和毫升(mL)。

[0035] 1、磁微粒包被物

[0036] 分别包被有 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/O 特异的抗原、HIV-2gp36 抗原和 HIV p24 抗体的四种顺磁性微球的混合悬浮液,用于捕获样本中的 HIV-1/2 抗体(包括 HIV-1/O 病毒产生的抗体)和 HIV p24 抗原。

[0037] 其中,磁微粒可以是表面基团为氨基、羧基、苯丙磺酰基或环氧基的磁微粒中的一种磁微粒或多种磁微粒的组合。发明人研究发现,表面用于交联的官能基团为氨基的磁微粒(简称氨基磁珠)相比其它类型的磁微粒具有明显更低的本底水平,因此,优选表面基团为氨基的磁微粒。

[0038] 磁微粒包被物中的“抗原”可以是完整的抗原,也可以是包含抗原决定簇的部分抗原或多肽,或具有这些抗原或多肽的融合蛋白。这些抗原、多肽或融合蛋白可以来源于 HIV 病毒本身,也可以来源于根据目前的重组技术生产的人工抗原,从生物安全性和特异性更高的要求的角度,优选重组抗原。也就是说,HIV-1/M 特异的抗原选自 HIV-1/M gp41、HIV-1/M gp41 多肽、HIV-1/M gp120、HIV-1/M gp120 多肽中的一种、或两种以上的组合或具有这

些蛋白或多肽的融合蛋白 ;HIV-1/0 特异的抗原选自 HIV-1/0 gp41、HIV-1/0 gp41 多肽、HIV-1/0 gp120、HIV-1/0 gp120 多肽中的一种、或两种以上的组合或具有这些蛋白或多肽的融合蛋白 ;HIV-2 抗原选自 HIV-2gp36、HIV-2gp36 多肽中的一种、几种的组合或具有这些蛋白或多肽的融合蛋白。HIV p24 抗体可以为单克隆或多克隆抗体,优选的 p24 抗体为两种以上不同来源的 p24 单克隆抗体,以检出其他方法漏检的样本。

[0039] 本发明的实施方案中,HIV-1 抗原除包含 HIV-1/M 特异抗原外,还包含 HIV-1/0 特异抗原,用以捕获待测样本中可能存在的 HIV-1/0 组病毒抗体。这一点是本发明的检测试剂盒优于现有的这类检测试剂盒的特征之一。

[0040] 本发明的一个实施方案中,磁微粒包被物存在于磁微粒稀释液中,形成磁微粒包被物工作液。常规的用于保存磁微粒包被物的溶液均可使用,只要能保持磁微粒包被物稳定且干扰测定即可。一般来说,该磁微粒稀释液可以是含有 50 ~ 300mM NaCl,0.2 ~ 1.0% BSA 和 0.05 ~ 0.2% ProcIn300 的 10 ~ 50mM HEPES 缓冲液, pH 值为 7.2 ~ 7.6。在本发明的一个实施例中,所采用的磁微粒稀释液是含有 150mM NaCl,0.5% BSA 和 0.1% ProcIn300 的 20mM HEPES 缓冲液, pH 值为 7.4。

[0041] 2、酶标记物

[0042] 包含标记酶标记的 HIV-1/M 特异的抗原、HIV-1/0 特异的抗原、HIV-2gp36 抗原和 HIV p24 抗体,用于实现对超顺磁微粒捕获的 HIV-1/2 抗体和 HIV p24 抗原的检测。

[0043] 与磁微粒包被物类似,酶标记物中的“抗原”可以是完整的抗原,也可以是包含抗原决定簇的部分抗原或多肽,或具有这些抗原或多肽的融合蛋白。这些抗原、多肽或融合蛋白可以来源于 HIV 病毒本身,也可以来源于根据目前的重组技术生产的人工抗原,从生物安全性和特异性更高的要求的角度,优选重组抗原。也就是说,HIV-1/M 特异的抗原选自 HIV-1/M gp41、HIV-1/M gp41 多肽、HIV-1/M gp120、HIV-1/M gp120 多肽中的一种、或两种以上的组合或具有这些蛋白或多肽的融合蛋白 ;HIV-1/0 特异的抗原选自 HIV-1/0 gp41、HIV-1/0 gp41 多肽、HIV-1/0 gp120、HIV-1/0 gp120 多肽中的一种、或两种以上的组合或具有这些蛋白或多肽的融合蛋白 ;HIV-2 抗原选自 HIV-2gp36、HIV-2gp36 多肽中的一种、几种的组合或具有这些蛋白或多肽的融合蛋白。HIV p24 抗体可以为单克隆或多克隆抗体,优选的 p24 抗体为两种以上不同来源的 p24 单克隆抗体,以检出其他方法漏检的样本。

[0044] 需要说明的是,酶标记物中的抗原或抗体最好与磁微粒包被物中的抗原或抗体相对应,以满足免疫学反应的专一性。因此,在磁微粒包被物上的 HIV-1/M 特异的抗原为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原的情况下,相应的酶标记物上的 HIV-1/M 特异的抗原也为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原 ;在磁微粒包被物上的 HIV-1/M 特异的抗原为 HIV-1/M 特异的 gp120 抗原的情况下,相应的酶标记物上的 HIV-1/M 特异的抗原也为 HIV-1/M 特异的 gp120 抗原 ;在磁微粒包被物上的 HIV-1/M 特异的抗原为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原和 gp120 抗原的情况下,相应的酶标记物上的 HIV-1/M 特异的抗原也为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原和 gp120 抗原。

[0045] 类似地,在磁微粒包被物上的 HIV-1/0 特异的抗原为 HIV-1/0 特异的 gp41 抗原的情况下,相应的酶标记物上的 HIV-1/0 特异的抗原也为 HIV-1/0 特异的 gp41 抗原 ;在磁微粒包被物上的 HIV-1/0 特异的抗原为 HIV-1/0 特异的 gp120 抗原的情况下,相应的酶标记物上的 HIV-1/0 特异的抗原也为 HIV-1/0 特异的 gp120 抗原 ;在磁微粒包被物上的 HIV-1/0 特异的抗原为 HIV-1/0 特异的 gp41 抗原和 gp120 抗原的情况下,相应的酶标记物上的

HIV-1/0 特异的抗原也为 HIV-1/0 特异的 gp41 抗原和 gp120 抗原。

[0046] 在本发明的一个实施例中,磁微粒包被物上的 HIV-1/M 特异的抗原为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原,相应的酶标记物上的 HIV-1/M 特异的抗原为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原;磁微粒包被物上的 HIV-1/0 特异的抗原为 HIV-1/0 特异的 gp41 抗原,相应的酶标记物上的 HIV-1/0 特异的抗原为 HIV-1/0 特异的 gp41 抗原。

[0047] 酶标记物上的标记酶可以是碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶,在本发明的一个实施例中,优选碱性磷酸酶。

[0048] 本发明的一个实施方案中,酶标记物存在于酶标记物稀释液中,形成酶标记物工作液。常规的酶标记物稀释液均可用于本申请,只要能保持酶标记物稳定且干扰测定即可。一般而言,酶标记物稀释液可以含有 50 ~ 300mM NaCl,0.2 ~ 1.0% BSA,0.1 ~ 0.5mM MgCl₂,0.005 ~ 0.02mM ZnCl₂和 0.05 ~ 0.2% Procln300 的 25 ~ 100mM Tris 缓冲液,pH 值为 7.0 ~ 7.6。在本发明的一个实施例中,所采用的酶标记物稀释液含有 150mM NaCl,0.5% BSA,0.2mM MgCl₂,0.01mM ZnCl₂,0.1% Procln300 的 50mM Tris 缓冲液,pH 值为 7.4。

[0049] 发明人经研究发现,酶标记物稀释液再加入非离子表面活性剂,优选 Triton 类(例如 TritonX-100 或 TritonX-405)和/或 Tween 类(Tween 20、Tween 60 或 Tween 80),制备的酶标记工作液,与不使用表面活性剂的酶标记物工作液相比,在测试阴性样本时本底更低,测试部分阳性的样本时有更高的信号,因此能够大大提高信噪比。优选的,酶标记稀释液中含有 1.0% ~ 5.0% 的 TritonX-405 和/或 1.0% ~ 5.0% Tween 80,更优选的,含有 2.0% 的 TritonX-405 和/或 2.0% Tween80。

[0050] Triton,又称曲拉通,其化学名称为辛基苯基醚聚乙二醇,具有如图 1 所示结构通式,其中,n 为 9、10、30 或 40。

[0051] Tween,又称吐温,其化学名称为聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯类。Tween80 具有如图 2 所示结构通式,其中 w、x、y 和 z 之和等于 20。Tween60 具有如图 3 所示结构通式,其中 w、x、y 和 z 之和等于 20。Tween20 具有如图 4 所示结构通式,其中 w、x、y 和 z 之和等于 20。

[0052] 3、样本处理液(Rc)

[0053] 含有至少一种选自 Triton 类(例如 TritonX-100 或 TritonX-405)和/或 Nonidet P 类(例如 Nonidet P10 或 Nonidet P40)的非离子表面活性剂,尤其是 Triton X-100 和 Nonidet P40,用于裂解样本中病毒颗粒,释放 p24 抗原。样本处理液为酸性缓冲液,pH 范围可以在 2.0 ~ 6.0 范围内,优选的 pH 范围在 3.0 ~ 5.0 范围内。发明人研究发现,酸性的样本处理液,可以显著降低本底,从而实现了免疫反应的低本底和高信号。

[0054] 发明人研究发现,Triton 类或 Nonidet P 类非离子表面活性剂,特别是 Triton X-100 或 Nonidet P40 在裂解病毒的同时,还有助于减少非特异反应,降低检测本底,提高灵敏度。样本处理液中含有 Triton X-100 和 Nonidet P40 这两种非离子表面活性剂中的至少一种,可以单独使用也可以混合使用两种,优选单独使用。优选的,样本处理液的例子中含有 1.5 ~ 4.0% 的 Triton X-100 或 0.5 ~ 1.5% 的 Nonidet P40,更优选的,含有 2.8% 的 Triton X-100 或 1.0% 的 Nonidet P40。

[0055] Triton,又称曲拉通,其化学名称为辛基苯基醚聚乙二醇,具有如图 1 所示结构通式,其中,n 为 9、10、30 或 40。

[0056] Nonidet P, 其化学名称为 4-壬基苯基聚乙二醇, 具有如图 5 所示结构式, 其中, $n = 1, 10$ 。

[0057] 样本处理液中还可以含有常规的缓冲液成分。发明人经研究还发现, 样本处理液与磁微粒包被物工作液混合后的 pH 值对检测本底有较大影响, 酸性的 pH 值 (3.5 ~ 6.0) 会有效地降低本底, 优选的, pH 为 4.0 ~ 5.0。虽然不希望受理论的约束, 磁微粒包被物工作液的 pH 值最好接近中性, 才有利于磁微粒包被物的稳定, 样本处理液的 pH 变化对裂解病毒影响不大。因此, 在本申请中, 将样本处理液 pH 值调整为酸性, 例如 3.0 ~ 4.0, 其与中性的磁微粒包被物工作液混合的反应体系中, 非特异性的结合会降低, 检测本底较低。在本发明的一个实施例中, 使用 50mM 柠檬酸钠缓冲液 (pH3.5), 其与等体积的磁微粒包被物工作液 (pH7.4) 混合后的 pH 为 4.5。本领域技术人员能够理解, 样本处理液的 pH 值可以因其与磁微粒包被物工作液的混合比例, 以及磁微粒包被物工作液的 pH 值的不同而设定不同的值, 只要能够使混合反应体系的 pH 值出于 3.5 ~ 6.0, 优选 4.0 ~ 5.0 即可。

[0058] 样本处理液中还可以含有其他非关键成分, 如防腐剂, 只要能维持体系稳定且不影响检测即可。

[0059] 4、测试稀释液 (Rd)

[0060] 含有脱脂乳粉, 用于封闭磁微粒固相表面, 阻止免疫反应中的杂物沉积和非特异性反应引起的本底升高和假阳性, 降低阴性样本的本底, 提升试剂的灵敏度和特异性, 减少 HIV 抗原和 p24 抗体等活性原材料的使用量。

[0061] 发明人研究发现, 测试稀释液中加入脱脂乳粉可以显著降低本底, 提高灵敏度。可以采用喷雾干燥脱脂乳粉。测试稀释液中脱脂乳粉的合适浓度范围在 0.1 ~ 20%, 优选 0.2 ~ 10%, 更优选 0.4 ~ 5%。在本发明的一个优选实施例中, 测试稀释液含有 5% 脱脂乳粉。

[0062] 除了脱脂乳粉以外, 测试稀释液中还可以包含其他封闭剂, 如牛血清白蛋白或酪蛋白等。

[0063] 测试稀释液中还可以含有常规的缓冲液成分, 能将 pH 值稳定在中性的缓冲液均可以使用。例如, 25 ~ 100mM MES 缓冲液, pH 值为 6.0 ~ 6.8。样本处理液中还可以含有其他非关键成分, 如防腐剂, 只要能维持体系稳定且不影响检测即可。

[0064] 根据人类免疫缺陷病毒抗原和抗体试剂盒的设计原理, 磁微粒包被物、酶标记物、样本处理液和测试稀释液四种组分可以分别单独存在, 也可以按照磁微粒包被物与样本处理液组合或酶标记物与测试稀释液组合的形式存在。然而, 从试剂的体系稳定性的角度考虑, 优选四种组分分别单独存在。

[0065] 上述人类免疫缺陷病毒抗原和抗体测定试剂盒可以与全自动化学发光仪配套使用, 例如在迈瑞全自动化学发光仪 CL2000、CL2000i 及 CL1000 上配套使用。其实现人类免疫缺陷病毒抗原和抗体检测的原理和流程如下 (见图 6) :

[0066] 第一步: 将样本、样本处理液 (Rc) 和磁微粒包被物工作液 (Ra) 加入反应杯中, 在 37℃ 孵育 20 分钟, 样本处理液中的表面活性剂将 HIV 病毒裂解, 释放出 HIV p24 抗原; 磁微粒包被物上包被的 HIV-1/2 抗原、HIV p24 抗体与样本中的 HIV 抗体、HIV p24 抗原充分结合; 孵育完成后, 固相置于一个磁场内被吸住, 结合在固相上的物质被保留, 而其他未结合的物质被冲洗除去。样本处理液和磁微粒包被物工作液可以同时与样本混合, 也可以先后

加入。

[0067] 第二步:将测试稀释液(Rd)和酶标记物工作液(Rb)添加到反应管;在37℃孵育20分钟,酶标记物(如碱性磷酸酶标记物)上的HIV p24抗体、HIV-1/2抗原与磁微粒包被物上被捕获的HIV p24抗原、HIV抗体结合,形成夹心复合物。在反应管内孵育完成后,该复合物被一个磁场吸住,而其他未结合的物质被冲洗除去。酶标记物工作液与测试稀释液可以同时加入反应管,也可以先加测试稀释液再加入酶标记物工作液。

[0068] 第三步:将化学发光底物添加到反应管内,发光底物(如3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷,AMPPD)被碱性磷酸酶所分解,脱去一个磷酸基,生成不稳定的中间产物,该中间产物通过分子内电子转移产生间氧苯甲酸甲酯阴离子,处于激发态的间氧苯甲酸甲酯阴离子从激发态至基态时,产生化学发光(图7)。再通过光电倍增管对反应所产生的光子数进行测量。所产生的光子数与样本内HIV p24或/和HIV抗体的含量成正比。

[0069] 样本中是否含有HIV抗原或/和抗体,首先需要测定迈瑞配套校准品相对发光值(RLU),通过计算得到Cutoff RLU值,然后测定样本相对发光值(RLU),该发光值与Cutoff RLU的比值即为COI。样本测试的最终结果以COI值形式给出。样本中是否含有HIV抗原或/和抗体,需要将样本的测试结果COI值与参考值(参考值为1.00)进行比较,如果小于1.00,表示样本中的HIV抗原和抗体均为阴性;如果大于或等于1.00,表示样本中的HIV抗原或抗体为阳性,或者两者皆为阳性。

[0070] 综上,本发明的试剂盒增加了p24抗原的检测,以及HIV-1/0组HIV抗体的检测,这样在一次测试中引入了至少四个免疫反应。随着在一次测试中引入的抗原/抗体对的增加,每一个抗原/抗体对以及不同抗原/抗体对之间都可能发生非特异性反应,使测试结果本底升高,影响试剂的灵敏度或是使假阳性样本数增多。特别是使用酶催化信号体系,如碱性磷酸酶信号体系、辣根过氧化物酶信号体系,随着免疫反应对的增加,本底会升高,对测试结果影响很大。而碱性磷酸酶信号体系技术成熟,成本低,如何在该信号体系下,实现同时检测HIV-1/0、HIV-1/M抗体、HIV-2抗体和HIV p24抗原这四个目标物是个很大的挑战,本申请通过各项发明措施(如各组分中关键成分的加入),解决了这一难题,制备的试剂盒达到了很高的灵敏度和特异性。

[0071] 本发明的试剂盒采用化学发光与磁微粒分离技术结合,同时检测HIV抗原和抗体,其优势在于:(1)实现了抗原和抗体联合检测。与抗体检测试剂相比,增加抗原检测可以缩短窗口期,检出HIV早期感染;对与HIV感染的防治有积极意义。此外,本发明的试剂盒还能检出HIV-1/0组病毒抗体。(2)灵敏度高,特异性好。传统的酶联免疫吸附法采用酶标板为固相载体,酶加底物为显色系统。该方法免疫反应发生的面积有限,吸光度变化缓慢,信号无法放大,限制了该方法的灵敏度。本发明的试剂盒采用磁微粒作为固相载体,具有较大的比表面积,能够增大免疫反应发生面积,提高反应的灵敏度;磁微粒球形和均一的表面减少了化学性粘附和非特异性结合,提高了特异性;酶促化学发光系统能够实现对反应信号的有效放大;同时,通过对缓冲液配方的优化,本发明的试剂盒实现了免疫反应的低本底和高信号。因此,本发明的试剂盒不仅特异性好,而且使抗原和抗体都达到了很高的检出灵敏度。(3)实现了全自动测定。传统酶联免疫法人工操作步骤多,过程复杂,自动化程度低,耗时长,容易在各个环节引入污染,造成结果的准确性和可靠性问题。本发明的试剂

盒可以配合全自动化学发光仪使用,降低了人为操作对测试结果的影响,使检测结果更可靠,更准确,快速,更具有可重复性。

[0072] 实施例

[0073] 以下所提供的实施例仅用于对本申请做出进一步的举例说明,而无意于对说明书作出任何限定。

[0074] 除非另有声明,否则以下实施例中所用的样本分析仪为深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司生产的全自动化学发光仪 CL2000i。

[0075] 除非另有声明,以下实施例中用的试剂为分析纯,牛血清白蛋白购自罗氏公司,脱脂奶粉购自美国 Amresco 公司。

[0076] 本实施例中的除非另有声明,检测步骤如下:

[0077] 取待测血样 50 μ I,与 50 μ I 样本处理液和 50 μ I 磁微粒包被物工作液加入反应杯中,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟。孵育完成后,混合液通过仪器的磁分离部件,洗涤收集结合了目标物的磁微粒。然后,加入 85 μ I 测试稀释液和 50 μ I 酶标记物工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 20 分钟,混合液经磁分离,洗涤收集结合了酶标记物的磁微粒。然后,加入发光底物液,记录化学发光信号 (RLU 值)。

[0078] 实施例 1:

[0079] 本实施例的 HIV 抗原和抗体联合检测试剂盒含有以下成分:磁微粒包被物工作液 (Ra)、酶标记物工作液 (Rb)、样本处理液 (Rc) 和测试稀释液 (Rd)。试剂盒制备的过程如下:

[0080] 一、磁微粒包被物的制备

[0081] 将特异性抗体或者抗原通过共价偶联的方式连接到磁珠上的过程,称为磁微粒包被;制备得到的磁微粒与抗体或者抗原的结合物称为磁微粒包被物。

[0082] 本实施例的 HIV 试剂盒制备中,用于包被磁微粒的抗原或抗体包括 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原、HIV-1/0 特异的 gp41 抗原、HIV-2gp36 抗原和 HIV p24 抗体四种,其中, HIV p24 抗体是两种来源的单抗 (分别为鼠源和人源的抗体)。包被的基本原理为,抗原或抗体表面的氨基或羧基或巯基与磁珠表面的化学基团,在化学交联剂的作用下,发生化学反应,形成抗原/抗体-磁微粒的共价结合物,该共价结合物经过洗涤和封闭,去除未反应的抗原或抗体,以及封闭非特异性结合的位点,最终制备成 HIV 试剂盒磁珠包被物。

[0083] 二、酶标记物的制备

[0084] 本实施例的试剂盒所采用的工艺中,分别将 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原、HIV-1/0 特异的 gp41 抗原、HIV-2gp36 抗原和 HIV p24 抗体通过共价偶联的方式结合到碱性磷酸酶上的过程,称为酶标记;通过酶标记制备得到 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-1/0 特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-2gp36 抗原-碱性磷酸酶标记物和 HIV p24 抗体-碱性磷酸酶标记物的四种碱性磷酸酶标记物。四种酶标记物统称为 HIV 试剂盒酶标记物。

[0085] 碱性磷酸酶标记物的制可以通过常规的酶标记的方法获得。一种常规操作过程如下:

[0086] (1) 取待标记的抗原/抗体以及碱性磷酸酶,加入到酶标记缓冲液 A (MES 缓冲体系, pH4.5) 中,混合均匀;

[0087] (2) 取待标记的抗原 / 抗体, 以 50 ~ 100 倍体积的抗体缓冲液 B (PBS 缓冲液) 对其进行 3 次离心超滤操作, 将待标记抗原 / 抗体的缓冲液置换为抗体缓冲液 B;

[0088] (3) 取处理后的抗原 / 抗体以及碱性磷酸酶, 加入到酶标记缓冲液 A (MES 缓冲液) 中, 混合均匀;

[0089] (4) 称取交联剂 EDC, 以酶标记缓冲液 A 将其配制为 10mg/mL 的 EDC 溶液;

[0090] (5) 称取交联剂 NHS, 以酶标记缓冲液 A 将其配制为 10mg/mL 的 NHS 溶液;

[0091] (6) 在待标记的抗原 / 抗体与碱性磷酸酶的混合液中加入 EDC 溶液, 混合均匀;

[0092] (7) 在待标记的抗原 / 抗体与碱性磷酸酶的混合液中加入 NHS 溶液, 混合均匀;

[0093] (8) 将上述酶标记反应物置于恒温箱中 ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), 静置反应 150 分钟, 使抗原 / 抗体与碱性磷酸酶发生活化、交联反应;

[0094] (9) 待交联反应完毕, 在上述酶标记反应物中加入 1/10 体积的酶标记终止反应液 (TBS 缓冲液, 含 Proclin300 和 NaN_3), 混合均匀;

[0095] (10) 将酶标记反应物置于恒温箱中 ($26 \pm 1^\circ\text{C}$), 静置反应 30 分钟, 终止抗原 / 抗体和碱性磷酸酶之间的交联反应;

[0096] (11) 终止反应完毕, 以 50 ~ 100 倍体积的酶标记终止反应液对酶标记物进行 3 次离心超滤操作, 以除去未反应的交联剂等小分子杂质。

[0097] (12) 回收纯化后的酶标记物, 加入等体积的蛋白保护剂, 混合均匀;

[0098] (13) 用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤器将酶标记物进行过滤除菌, 置于 -20°C 保存备用。

[0099] 三、样本处理液 (Rc) 的制备

[0100] 按下表组分配制样本处理液 (Rc)

[0101]

组分	含量
NaCl	150mM
Nonidet P40	3%
Proclin300	0.1%
HEPES缓冲液	20mM
调节pH值为7.4	

[0102] 四、测试稀释液 (Rd) 的制备

[0103] 按下表的组分配制测试稀释液 (Rd)

[0104]

组分	含量
----	----

[0105]

Proclin300	0.1%
MES缓冲液	50mM
调节pH值到6.5	

[0106] 五、磁微粒包被物工作液 (Ra) 的制备

[0107] 按下表的组分配制磁微粒稀释液

[0108]

组分	含量
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.5%
Proclin300	0.1%
HEPES缓冲液	20mM
调节pH值到7.4	

[0109] 取适量羧基磁珠,分散于磁微粒稀释液中,获得磁微粒包被物工作液 (Ra)。

[0110] 六、酶标记物工作液 (Rb) 的制备

[0111] 按下表的组分配制酶标记物稀释液

[0112]

组分	含量
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.5%
MgCl ₂	0.2mM
ZnCl ₂	0.01mM
Proclin300	0.1%
Tris	50mM
用HCL调整pH值为7.4	

[0113] 取适量制备的酶标记物,溶于该酶标记物稀释液中,获得酶标记物工作液 (Rb)。酶标记物为HIV-1/M特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-1/O特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-2gp36 抗原-碱性磷酸酶标记物和 HIV p24 抗体-碱性磷酸酶标记物。

[0114] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品,阴阳性参考品符合率,精密度、灵敏度等各项指标结果如表 1a、表 1b 和表 2 所示。

[0115] 表 1a HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0116]

测试项目	测试结果	标准
------	------	----

[0117]

阴性参考品	符合率: 17/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 18/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1~S4为阴性, S5~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	5.27%	$\leq$ 15%

[0118] 表 1b HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0119]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 17/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 9/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L3~L10为阴性, L1~L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)
精密度	5.22%	$\leq$ 15%

[0120] 用该试剂盒测定 579 例 HIV 阴性样品, 本申请试剂检出 538 例阴性, 临床特异性 92.92%; 对 359 例 HIV- 抗体阳性的样品进行测试, 本申请试剂盒检出 342 例阳性, 临床灵敏度为 95.26%。结果见表 2。

[0121] 表 2 实施例 1 的试剂盒临床灵敏度和临床特异性

[0122]

试剂盒	阳性样本数	临床灵敏度	阴性样本数	临床特异性
实施例 1	359	95.26%	579	92.92%

[0123] 说明, 该试剂盒能基本满足检测要求, 但灵敏度和特异性不够理想。

[0124] 实施例 2

[0125] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。磁微粒包被物工作液 (Ra)、酶标记物工作液 (Rb) 和测试稀释液 (Rd) 组分与实施例 1 相同。

[0126] 按照下表组分配制样本处理液 (Rc)

[0127]

组分	含量
NaCl	150mM
Nonidet P40	3.0%
Proclin300	0.1%
柠檬酸钠	50mM
调节pH值为3.5	

[0128] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品, 阴阳性参考品符合率, 精密度、灵敏度等各项指标结果如表 3 和表 4 所示。此外, 测试 10 例 HIV-1/0 抗体阳性样本, 10 例均检出阳性。

[0129] 表 3 HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0130]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 18/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 18/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1~S3为阴性, S4~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	4.27%	$\leq$ 15%

[0131] 表 4 HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0132]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 19/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 9/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L3~L10为阴性, L1~L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)
精密度	4.22%	$\leq$ 15%

[0133] 为了说明样本处理液与磁微粒包被物工作液混合反应体系的 pH 值对检测的影响, 用实施例 1 和 2 的试剂盒同时测定 100 例新鲜阴性样本, 结果见表 5; 用这两个试剂盒同时测定 58 例新鲜 HIV 抗体阳性样本, 结果见表 6。结果显示, 在测试新鲜阴性样本时, 两者的标准差和检测本底信号非常接近; 但在测试新鲜阳性样本时, 实施例 2 的信号值明显高于实施例 1, 说明使用酸性的反应体系能够提高试剂盒的灵敏度。

[0134] 表 5 使用两种 pH 值的样本处理液测试新鲜阴性样本的 RLU 值对比

[0135]

158 例阴性样本 RLU	实施例 1	实施例 2 试剂盒
平均值	512, 662	47, 129
SD	119, 817	102, 531

[0136] 表 6 使用两种 pH 值的样本处理液测试新鲜阳性样本的 RLU 值对比

[0137]

样本	实施例 1 的试剂盒	实施例 2 的试剂盒
58 例阳性样本平	2, 034, 619	8, 452, 406

[0138]

均值		
----	--	--

[0139] 实施例 3

[0140] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。磁微粒包被物工作液 (Ra)、酶标记物工作液 (Rb) 和测试稀释液 (Rd) 组分与实施例 1 相同。

[0141] 按照下表组分配制样本处理液 (Rc)

[0142]

组分	含量
NaCl	150mM
Triton X-100	2.8%
Proclin300	0.1%
柠檬酸钠	50mM
调节pH值为3.5	

[0143] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品, 阴阳性参考品符合率, 精密度、灵敏度等各项指标结果如表 7 和表 8 所示。此外, 测试 10 例 HIV-1/0 抗体阳性样本, 10 例均检出阳性。

[0144] 表 7 HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0145]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 18/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 18/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1~S3为阴性, S4~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	3.29%	$\leq$ 15%

[0146] 表 8 HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0147]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 19/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 9/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L3~L10为阴性, L1~L2检出阳性(即最低检出量不超过10.0IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)
精密度	3.42%	$\leq$ 15%

[0148] 说明, 样本处理液中使用 Triton X-100 的试剂盒性能符合要求。

[0149] 实施例 4

[0150] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。磁微粒包被物工作液 (Ra)、样本处理液 (Rc) 和测试稀释液 (Rd) 组分与实施例 2 相同。

[0151] 按下表的组分配制酶标记物稀释液

[0152]

组分	含量
Triton X-405	2.0%
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.5%
MgCl ₂	0.2mM
ZnCl ₂	0.01mM
Proclin300	0.1%
Tris	50mM
用HCL调整pH值为7.4	

[0153] 取适量制备的酶标记物, 溶于该酶标记物稀释液中, 获得酶标记物工作液 (Rb)。酶标记物为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-1/O 特异的 gp41 抗原-碱性

磷酸酶标记物、HIV-2gp36 抗原 - 碱性磷酸酶标记物和 HIV p24 抗体 - 碱性磷酸酶标记物。

[0154] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品, 阴阳性参考品符合率, 精密度、灵敏度等各项指标结果如表 9a 和表 9b 所示, 符合要求。此外, 测试 10 例 HIV-1/0 抗体阳性样本, 10 例均检出阳性。

[0155] 表 9a HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0156]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 18/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1~S3为阴性, S4~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	4.01%	$\leq$ 15%

[0157] 表 9b HIV p24 抗原国家参考品测试结果

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 20/20	符合率: 20/20

[0158]

阳性参考品	符合率: 10/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L5~L10为阴性, L1~L4检出阳性(即最低检出量不超过2.5 IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)
精密度	3.59%	$\leq$ 15%

[0159] 为了说明 Rb 中含有非离子表面活性剂对检测性能的影响, 用实施例 2 和 4 的试剂盒同时测定 100 例新鲜阴性样本, 结果见表 10a; 用这两个试剂盒同时测定 58 例新鲜 HIV 抗体阳性样本, 见表 10b。结果显示, 在测试新鲜阴性样本时, Rb 含有非离子表面活性剂的试剂盒 (实施例 4) 具有更低的本底; 而在测试新鲜阳性样本时, 其产生更高的发光信号, 说明使用 Rb 添加非离子表面活性剂能够提高试剂盒的灵敏度。

[0160] 表 10a 实施例 2 和实施例 4 的试剂盒测试阴性样本的 RLU 值对比

[0161]

100 例阴性样本 RLU	实施例 4	实施例 2
平均值	17, 129	47, 129
SD	22, 938	102, 531

[0162] 表 10b 实施例 2 和实施例 4 的试剂盒测试新鲜阳性样本的 RLU 值对比

[0163]

58 例阳性样本 RLU	实施例 4	实施例 2
平均值	98, 652, 029	8, 452, 406

[0164] 实施例 5

[0165] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。磁微粒包被物工作液 (Ra)、样本处理液 (Rc) 和测试稀释液 (Rd) 组分与实施例 2 相同。

[0166] 按下表的组分配制酶标记物稀释液

[0167]

组分	含量
Tween 80	2.0%
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.5%
MgCl ₂	0.2mM
ZnCl ₂	0.01mM
Proclin300	0.1%

[0168]

Tris	50mM
用HCL调整pH值为7.4	

[0169] 取适量制备的酶标记物,溶于该酶标记物稀释液中,获得酶标记物工作液 (Rb)。酶标记物为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原 - 碱性磷酸酶标记物、HIV-1/O 特异的 gp41 抗原 - 碱性磷酸酶标记物、HIV-2gp36 抗原 - 碱性磷酸酶标记物和 HIV p24 抗体 - 碱性磷酸酶标记物。

[0170] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品,阴阳性参考品符合率,精密度、灵敏度等各项指标结果如表 11 和表 12 所示。此外,测试 10 例 HIV-1/O 抗体阳性样本,10 例均检出阳性。

[0171] 表 11 HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0172]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 18/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1~S3为阴性, S4~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	3.31%	$\leq$ 15%

[0173] 表 12 HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0174]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 20/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 10/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L4~L10为阴性, L1~L3检出阳性(即最低检出量不超过5.0 IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)
精密度	3.73%	$\leq$ 15%

[0175] 说明,酶标记物工作液中使用 Tween80 的试剂盒的性能符合要求。

[0176] 实施例 6

[0177] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。磁微粒包被物工作液(Ra)、样本处理液(Rc)和酶标记物工作液(Rb)组分与实施例 2 相同。

[0178] 按下表的组分配制测试稀释液(Rd)

[0179]

组分	含量
----	----

[0180]

喷雾干燥的脱脂奶粉	5.0%
Proclin300	0.1%
MES缓冲液	50mM
调节pH值到6.5	

[0181] 奶粉与缓冲液混合后,在 4℃,以 10000g 的离心力离心 2 小时后用 0.22 μ m 滤膜过滤,即得到测试稀释液(Rd)。

[0182] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品,阴阳性参考品符合率,精密度、灵敏度等各项指标结果如表 13a 和 13b 所示。此外,测试 10 例 HIV-1/0 抗体阳性样本,10 例均检出阳性。

[0183] 表 13a HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0184]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 18/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 19/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1和S3为阴性, S4~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	3.86%	$\leq$ 15%

[0185] 表 13b HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0186]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 20/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 10/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L6~L10为阴性, L1~L5检出阳性(即最低检出量不超过1.25IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)
精密度	3.03%	$\leq$ 15%

[0187] 为了说明脱脂奶粉对试剂盒性能的影响,用实施例 2 和实施例 6 的试剂盒同时测定 100 例新鲜阴性样本,结果见表 14a;用这两个试剂盒同时测定 58 例新鲜 HIV 抗体阳性样本,结果见表 14b。结果显示,在测试新鲜阴性样本时,Rd 含有脱脂奶粉的试剂盒(实施例 6)具有更低的本底;而在测试新鲜阳性样本时,其产生更高的发光信号,说明使用 Rd 添加脱脂奶粉能够提高试剂盒的灵敏度。

[0188] 表 14a 实施例 6 和实施例 2 的试剂盒测试阴性样本的 RLU 值对比

[0189]

100 例阴性样本 RLU	实施例 6	实施例 2
平均值	19, 180	47, 129
SD	23, 157	102, 531

[0190] 表 14b 实施例 6 和实施例 2 的试剂盒测试新鲜阳性样本的 RLU 值对比

[0191]

58 例阳性样本 RLU	实施例 6	实施例 2
平均值	102, 361, 723	8, 452, 406

[0192] 实施例 7

[0193] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。

[0194] 按照下表组分配制样本处理液 (Rc)

[0195]

组分	含量
NaCl	150mM
Triton X-100	1.5%
Proclin300	0.1%
柠檬酸钠	50mM
调节pH值为3.5	

[0196] 按下表的组分配制磁微粒稀释液

[0197]

组分	含量
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.2%
Proclin300	0.1%
HEPES缓冲液	20mM
调节pH值到7.4	

[0198] 取适量羧基磁珠,分散于磁微粒稀释液中,获得磁微粒包被物工作液 (Ra)。

[0199] 取配制好的 Rc 和 Ra 适量,等体积混合后,测定 pH 值为 4.5。

[0200] 按下表的组分配制酶标记物稀释液

[0201]

组分	含量
Triton X-405	0.5%
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.2%
MgCl ₂	0.2mM

[0202]

ZnCl ₂	0.01mM
Proclin300	0.1%
Tris	50mM
用HCL调整pH值为7.4	

[0203] 取适量制备的酶标记物,溶于该酶标记物稀释液中,获得酶标记物工作液(Rb)。酶标记物为HIV-1/M特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-1/O特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-2gp36 抗原-碱性磷酸酶标记物和 HIV p24 抗体-碱性磷酸酶标记物。

[0204] 按下表的组分配制测试稀释液(Rd)

[0205]

组分	含量
喷雾干燥的脱脂奶粉	1.0%
Proclin300	0.1%
MES缓冲液	50mM
调节pH值到6.5	

[0206] 奶粉与缓冲液混合后,在4℃,以10000g的离心力离心2小时后用0.22 μm滤膜过滤,即得到测试稀释液(Rd)。

[0207] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品,阴阳性参考品符合率,精密度、灵敏度等各项指标结果如表 15 和 16 所示。此外,测试 10 例 HIV-1/O 抗体阳性样本,10 例均检出阳性。

[0208] 表 15 HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0209]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 18/20	符合率≥18/20
阳性参考品	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1和S3为阴性, S4~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	3.16%	≤15%

[0210] 表 16 HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0211]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 20/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 10/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L5~L10为阴性, L1~L4	L10为阴性, 至少L1和L2

[0212]

	检出阳性(即最低检出量 不超过2.50 IU/mL)	检出阳性(即最低检出量 不超过10IU/mL)
精密度	3.29%	≤15%

[0213] 说明,调整组分浓度的试剂盒性能符合要求。

[0214] 实施例 8

[0215] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。

[0216] 按照下表组分配制样本处理液 (Rc)

[0217]

组分	含量
NaCl	100mM
Triton X-100	5.0%
Proclin300	0.1%
柠檬酸钠	50mM
调节pH值为4.0	

[0218] 按下表的组分配制磁微粒稀释液

[0219]

组分	含量
NaCl	100mM
牛血清白蛋白 (BSA)	1.5%
Proclin300	0.1%
HEPES缓冲液	20mM
调节pH值到7.4	

[0220] 取适量羧基磁珠,分散于磁微粒稀释液中,获得磁微粒包被物工作液 (Ra)。

[0221] 取配制好的 Rc 和 Ra 适量,等体积混合后,测定 pH 值为 5.0。

[0222] 按下表的组分配制酶标记物稀释液

[0223]

组分	含量
Triton X-405	5.0%
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	1.5%
MgCl ₂	0.2mM
ZnCl ₂	0.01mM
Proclin300	0.1%

[0224]

Tris	50mM
用HCL调整pH值为7.4	

[0225] 取适量制备的酶标记物,溶于该酶标记物稀释液中,获得酶标记物工作液 (Rb)。酶标记物为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-1/0 特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-2gp36 抗原-碱性磷酸酶标记物和 HIV p24 抗体-碱性磷酸酶标记物。

[0226] 按下表的组分配制测试稀释液 (Rd)

[0227]

组分	含量
喷雾干燥的脱脂奶粉	10.0%
Proclin300	0.1%
MES缓冲液	50mM
调节pH值到6.5	

[0228] 奶粉与缓冲液混合后,在 4℃,以 10000g 的离心力离心 2 小时后用 0.22 μm 滤膜过滤,即得到测试稀释液 (Rd)。

[0229] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品,阴阳性参考品符合率,精密度、灵敏度等各项指标结果如表 17 和 18 所示。此外,测试 10 例 HIV-1/0 抗体阳性样本,10 例均检出阳性。

[0230] 表 17 HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0231]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 19/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1~S3为阴性, S4~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	3.47%	$\leq$ 15%

[0232] 表 18 HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0233]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 20/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 10/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L7~L10为阴性, L1~L6检出阳性(即最低检出量不超过0.625 IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)

[0234]

精密度	3.82%	$\leq$ 15%
-----	-------	------------

[0235] 说明, 调整组分浓度的试剂盒性能符合要求。另外, 可以调整样本处理液的 pH 值, 只要样本处理液和磁微粒包被物工作液与样本形成的混合体系的 pH 值在 3.5-6.0 之间即可。

[0236] 实施例 9

[0237] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。

[0238] 按照下表组分配制样本处理液 (Rc)

[0239]

组分	含量
NaCl	100mM
Nonidet P40	1.5%
Proclin300	0.1%
柠檬酸钠	50mM
调节pH值为3.0	

[0240] 按下表的组分配制磁微粒稀释液

[0241]

组分	含量
NaCl	100mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.2%
Proclin300	0.1%
HEPES缓冲液	20mM
调节pH值到7.4	

[0242] 取适量羧基磁珠,分散于磁微粒稀释液中,获得磁微粒包被物工作液 (Ra)。

[0243] 取配制好的 Rc 和 Ra 适量,等体积混合后,测定 pH 值为 4.0。

[0244] 按下表的组分配制酶标记物稀释液

[0245]

组分	含量
Tween 60	0.5%
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.2%
MgCl ₂	0.2mM
ZnCl ₂	0.01mM
Proclin300	0.1%

[0246]

Tris	50mM
用HCL调整pH值为7.4	

[0247] 取适量制备的酶标记物,溶于该酶标记物稀释液中,获得酶标记物工作液 (Rb)。酶标记物为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原 - 碱性磷酸酶标记物、HIV-1/O 特异的 gp41 抗原 - 碱性磷酸酶标记物、HIV-2gp36 抗原 - 碱性磷酸酶标记物和 HIV p24 抗体 - 碱性磷酸酶标记物。

[0248] 按下表的组分配制测试稀释液 (Rd)

[0249]

组分	含量
喷雾干燥的脱脂奶粉	1.0%
Proclin300	0.1%
MES缓冲液	50mM
调节pH值到6.5	

[0250] 奶粉与缓冲液混合后,在 4℃,以 10000g 的离心力离心 2 小时后用 0.22 μm 滤膜过滤,即得到测试稀释液 (Rd)。

[0251] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品, 阴阳性参考品符合率, 精密度、灵敏度等各项指标结果如表 19 和 20 所示。此外, 测试 10 例 HIV-1/0 抗体阳性样本, 10 例均检出阳性。

[0252] 表 19 HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0253]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 19/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1和S2为阴性, S3~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	3.37%	$\leq$ 15%

[0254] 表 20 HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0255]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 20/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 10/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L7~L10为阴性, L1~L6检出阳性(即最低检出量不超过0.625 IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)

[0256]

精密度	4.08%	$\leq$ 15%
-----	-------	------------

[0257] 说明, 调整组分浓度的试剂盒性能符合要求。另外, 可以调整样本处理液的 pH 值, 只要样本处理液和磁微粒包被物工作液与样本形成的混合体系的 pH 值在 3.5-6.0 之间即可。

[0258] 实施例 10

[0259] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。

[0260] 按照下表组分配制样本处理液 (Rc)

[0261]

组分	含量
NaCl	150mM
Nonidet P40	5.0%
Proclin300	0.1%
柠檬酸钠	50mM
调节pH值为3.5	

[0262] 按下表的组分配制磁微粒稀释液

[0263]

组分	含量
NaCl	100mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.5%
Proclin300	0.1%
HEPES缓冲液	20mM
调节pH值到7.4	

[0264] 取适量羧基磁珠,分散于磁微粒稀释液中,获得磁微粒包被物工作液 (Ra)。

[0265] 取配制好的 Rc 和 Ra 适量,等体积混合后,测定 pH 值为 4.7。

[0266] 按下表的组分配制酶标记物稀释液

[0267]

组分	含量
Tween 80	5.0%
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.5%
MgCl ₂	0.2mM
ZnCl ₂	0.01mM
Proclin300	0.1%

[0268]

Tris	50mM
用HCL调整pH值为7.4	

[0269] 取适量制备的酶标记物,溶于该酶标记物稀释液中,获得酶标记物工作液 (Rb)。酶标记物为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-1/O 特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-2gp36 抗原-碱性磷酸酶标记物和 HIV p24 抗体-碱性磷酸酶标记物。

[0270] 按下表的组分配制测试稀释液 (Rd)

[0271]

组分	含量
喷雾干燥的脱脂奶粉	5.0%
Proclin300	0.1%
MES缓冲液	50mM
调节pH值到6.5	

[0272] 奶粉与缓冲液混合后,在4℃,以10000g的离心力离心2小时后用0.22 μm滤膜过滤,即得到测试稀释液(Rd)。

[0273] 用该实施例的试剂盒检测HIV-1/2抗体国家参考品和HIV p24抗原国家参考品,阴阳性参考品符合率,精密度、灵敏度等各项指标结果如表21和22所示。此外,测试10例HIV-1/0抗体阳性样本,10例均检出阳性。

[0274] 表21 HIV-1/2抗体国家参考品测试结果

[0275]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 19/20	符合率≥18/20
阳性参考品	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1~S3为阴性, S4~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	3.67%	≤15%

[0276] 表22 HIV p24抗原国家参考品测试结果

[0277]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 20/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 10/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L6~L10为阴性, L1~L5检出阳性(即最低检出量不超过1.25IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)

[0278]

精密度	3.72%	≤15%
-----	-------	------

[0279] 说明,调整组分浓度的试剂盒性能符合要求。

[0280] 实施例11

[0281] 按照实施例1相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。本实施例中,使用的磁

微粒为表面用于交联的官能基团为氨基的磁微粒。包被的基本原理为磁微粒表面的氨基与蛋白质上的氨基通过交联剂戊二醛发生化学反应,形成共价结合物,即磁珠上的氨基在戊二醛的作用下活化成醛基,然后该醛基与抗体/抗原上的氨基反应并经过还原生成稳定的共价键,使磁微粒能够和生物分子形成牢固的连接(见图8)。样本处理液(Rc)、酶标记物工作液(Rb)和测试稀释液(Rd)组分与实施例2相同。

[0282] 按下表的组分配制磁微粒稀释液

[0283]

组分	含量
NaCl	150mM
牛血清白蛋白(BSA)	0.5%
Proclin300	0.1%
HEPES缓冲液	20mM
调节pH值到7.4	

[0284] 取适量氨基磁珠,分散于磁微粒稀释液中,获得磁微粒包被物工作液(Ra)。

[0285] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品,阴阳性参考品符合率,精密度、灵敏度等各项指标结果如表 23a 和表 23b 所示。此外,测试 10 例 HIV-1/0 抗体阳性样本,10 例均检出阳性。

[0286] 表 23a HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0287]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 18/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1~S3阴性, S4~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	3.92%	$\leq$ 15%

[0288] 表 23b HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0289]

测试项目	测试结果	标准
------	------	----

[0290]

阴性参考品	符合率: 20/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 10/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L5~L10为阴性, L1~L4 检出阳性(即最低检出量 不超过2.5 IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2 检出阳性(即最低检出量 不超过10IU/mL)
精密度	3.57%	≤15%

[0291] 为了说明磁微粒包被物中磁珠的选择对试剂盒性能的影响,用实施例 2 的试剂盒与实施例 11 的试剂盒同时测定 100 例新鲜 HIV 阴性样本,结果如表 24a 所示;用这两个试剂盒同时测定 58 例新鲜 HIV 抗体阳性样本,临床统计结果如表 24b 所示。结果显示,氨基磁珠比羧基磁珠有更低的本底更高的信号值。

[0292] 表 24a 实施例 11 和实施例 2 的试剂盒测试阴性样本的 RLU 值对比

[0293]

100 例阴性样本 RLU	实施例 11	实施例 2
平均值	19, 180	47, 129
SD	23, 157	102, 531

[0294] 表 24b 实施例 11 和实施例 2 的试剂盒测试新鲜阳性样本的 RLU 值对比

[0295]

58 例阳性样本 RLU	实施例 11	实施例 2
平均值	102, 361, 723	8, 452, 406

[0296] 实施例 12

[0297] 按照实施例 1 相同的方法制备磁微粒包被物和酶标记物。

[0298] 按照下表组分配制样本处理液 (Rc)

[0299]

组分	含量
NaCl	150mM
Triton X-100	2.8%
Proclin300	0.1%
柠檬酸钠	50mM
调节pH值为3.5	

[0300] 按下表的组分配制磁微粒稀释液

[0301]

组分	含量
NaCl	150mM

[0302]

牛血清白蛋白 (BSA)	0.5%
Proclin300	0.1%
HEPES缓冲液	20mM
调节pH值到7.4	

[0303] 取适量氨基磁珠,分散于磁微粒稀释液中,获得磁微粒包被物工作液 (Ra)。

[0304] 取配制好的 Rc 和 Ra 适量,等体积混合后,测定 pH 值为 4.5。

[0305] 按下表的组分配制酶标记物稀释液

[0306]

组分	含量
TritonX-405	2.0%
NaCl	150mM
牛血清白蛋白 (BSA)	0.5%
MgCl ₂	0.2mM
ZnCl ₂	0.01mM
Proclin300	0.1%
Tris	50mM
用HCL调整pH值为7.4	

[0307] 取适量制备的酶标记物,溶于该酶标记物稀释液中,获得酶标记物工作液 (Rb)。酶标记物为 HIV-1/M 特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-1/O 特异的 gp41 抗原-碱性磷酸酶标记物、HIV-2gp36 抗原-碱性磷酸酶标记物和 HIV p24 抗体-碱性磷酸酶标记物。

[0308] 按下表的组分配制测试稀释液 (Rd)

[0309]

组分	含量
喷雾干燥的脱脂奶粉	5.0%
Proclin300	0.1%
MES缓冲液	50mM
调节pH值到6.5	

[0310] 奶粉与缓冲液混合后,在 4℃,以 10000g 的离心力离心 2 小时后用 0.22 μm 滤膜过滤,即得到测试稀释液 (Rd)。

[0311] 用该实施例的试剂盒检测 HIV-1/2 抗体国家参考品和 HIV p24 抗原国家参考品, 阴阳性参考品符合率, 精密度、灵敏度等各项指标结果如表 25 和 26 所示。此外, 测试 10 例 HIV-1/0 抗体阳性样本, 10 例均检出阳性。

[0312] 表 25 HIV-1/2 抗体国家参考品测试结果

[0313]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 20/20	符合率 $\geq$ 18/20
阳性参考品	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值	符合率: 20/20, 且12号样本测试值大于11号样本测试值
灵敏度参考品	S1阴性, S2~S6为阳性	S1阴性, 至少S4~S6为阳性
精密度	3.13%	$\leq$ 15%

[0314] 表 26 HIV p24 抗原国家参考品测试结果

[0315]

测试项目	测试结果	标准
阴性参考品	符合率: 20/20	符合率: 20/20
阳性参考品	符合率: 10/10	符合率: 10/10
灵敏度参考品	L8~L10为阴性, L1~L7检出阳性(即最低检出量不超过0.32IU/mL)	L10为阴性, 至少L1和L2检出阳性(即最低检出量不超过10IU/mL)
精密度	2.61%	$\leq$ 15%

[0316] 用该试剂盒测定 1568 例 HIV 阴性样品, 本发明试剂检出 1565 例阴性, 临床特异性 99.81%; 对 674 例 HIV- 抗体阳性的样品 (包括 10 例 HIV-1/0 组抗体阳性样本) 进行测试, 本发明试剂盒全部检出阳性, 临床灵敏度为 100%; 对 45 例 HIV p24 阳性的窗口期样品进行测试, 测试结果全部为阳性, 临床灵敏度为 100%, 结果见表 27。以上结果表明本发明试剂盒具有良好的临床灵敏度和临床特异性。

[0317] 表 27 临床特异性和临床灵敏度测试结果

[0318]

测试项目	测试结果
1568例阴性样本	1565例阴性, 临床特异性99.81%
674例HIV抗体阳性样本 (10例HIV-1/O抗体阳性样本)	674例阳性, 临床灵敏度100%
45例HIV抗原阳性样本(窗口期样本)	45例阳性, 临床灵敏度100%

[0319] 本申请的 HIV 抗原抗体联合检测试剂盒能同时检测 HIV-1/M 抗体、HIV-1/O 抗体、HIV-2 抗体和 p24 抗原,特别是使用碱性磷酸酶信号报告体系中,能提供良好的临床灵敏度和特异性。研究发现,控制样本处理液与磁微粒包被物工作液混合反应体系的 pH 在酸性,或者在酶标记物工作液中添加非离子表面活性剂,或者在测试稀释液中添加脱脂奶粉,或者采用氨基磁微粒,有助于降低反应体系的本底,提高试剂盒的特异性。

[0320] 以上内容是结合具体的实施方式对本发明所作的进一步详细说明,不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干简单推演或替换,都应当视为属于本发明的保护范围。

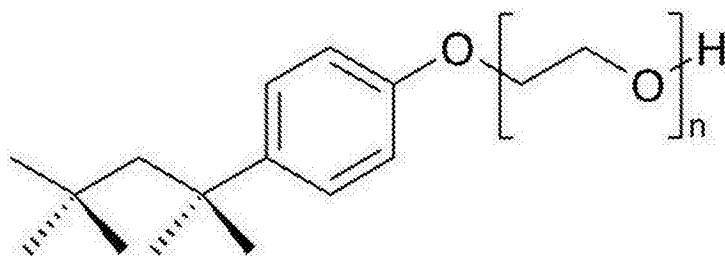


图 1

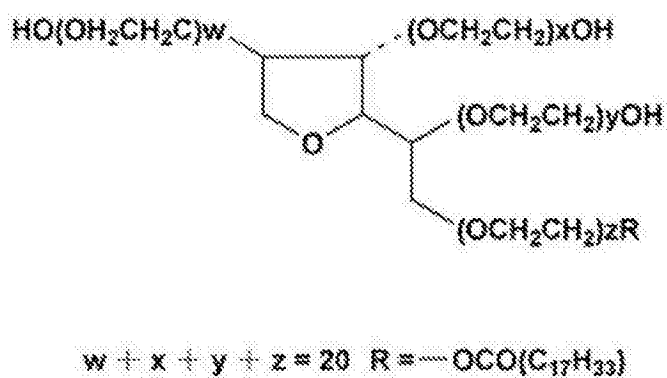


图 2

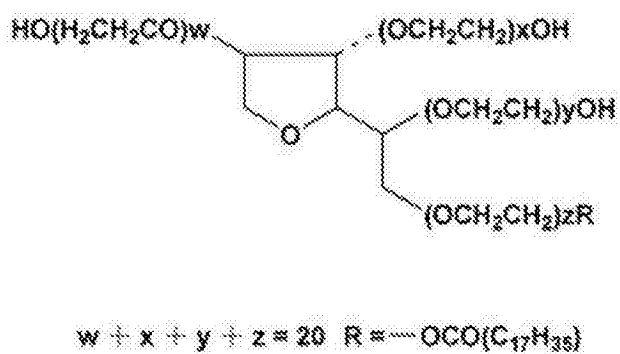
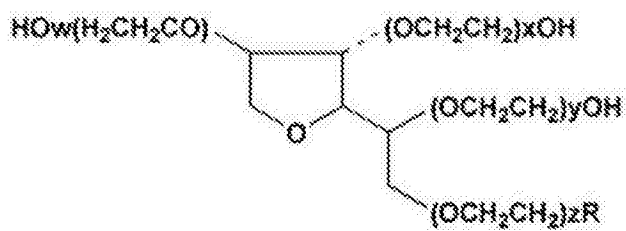


图 3



$$w + x + y + z = 20 \quad \text{R} = \text{---OCO(C}_{11}\text{H}_{23})$$

图 4

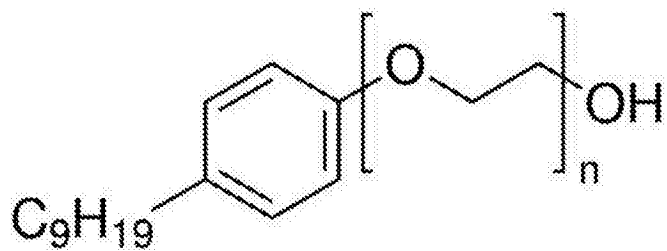


图 5

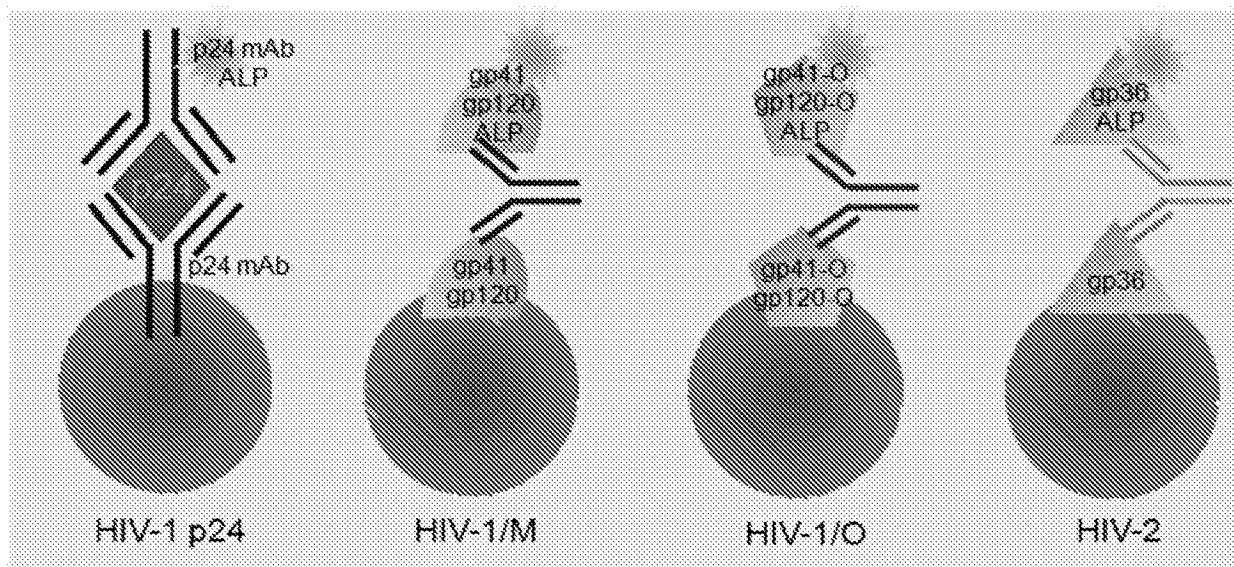


图 6

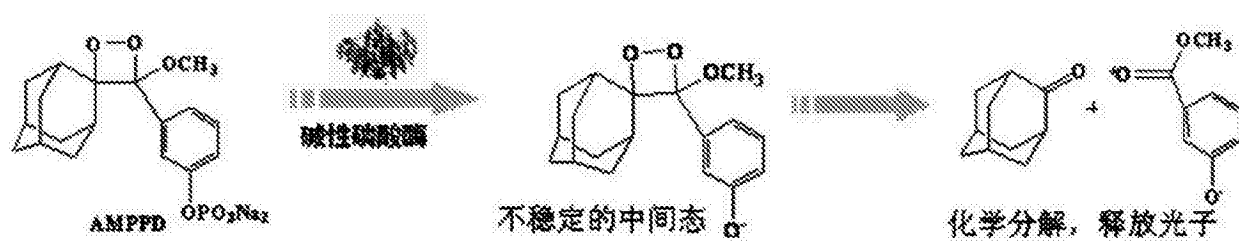


图 7

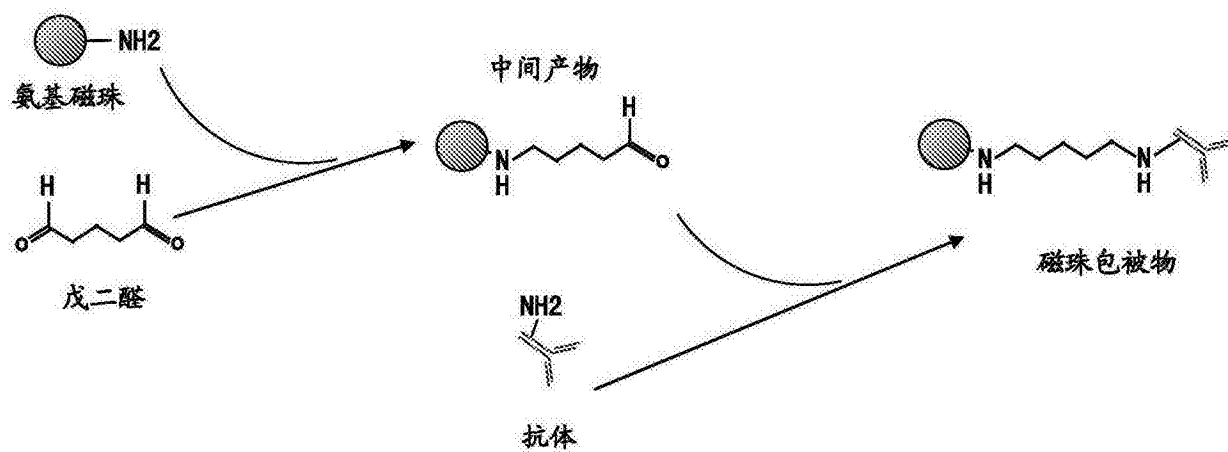


图 8

专利名称(译)	人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒及其用途和检测方法		
公开(公告)号	CN106546732A	公开(公告)日	2017-03-29
申请号	CN201510593406.X	申请日	2015-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司		
[标]发明人	吴令嘉 余枝广 姜德华 王頔 张强 杨薇		
发明人	吴令嘉 余枝广 姜德华 王頔 张强 杨薇		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/535		
代理人(译)	郭燕		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人类免疫缺陷病毒抗原和抗体联合检测试剂盒及其用途和检测方法。本发明的检测试剂盒，包括如下组分：(a) 磁微粒包被物：在磁微粒上包被有HIV-1/M特异的抗原、HIV-1/O特异的抗原、HIV-2 gp36抗原和HIV p24抗体，存在于磁微粒稀释液中；(b) 酶标记物：标记酶标记的HIV-1/M特异的抗原、HIV-1/O特异的抗原、HIV-2 gp36抗原和HIV p24抗体，存在于酶标记物稀释液中；(c) 样本处理液：含有非离子表面活性剂；和(d) 测试稀释液：用于稀释待测试样本的缓冲液。能够实现对人类免疫缺陷病毒抗原和抗体的联合检测，特异性好，灵敏度高。

