

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102236020 A

(43) 申请公布日 2011. 11. 09

(21) 申请号 201010152498. 5

(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 33/576(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

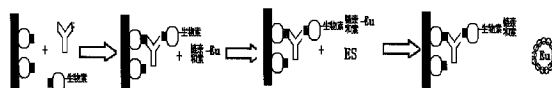
权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

(54) 发明名称

丙型肝炎病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法
及试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了丙型肝炎病毒抗体诊断时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒,其选用多片段融合 HCV 重组抗原作为包被抗原,用碳酸钠缓冲溶液稀释至 1-10ug/mL 作为包被液;配对 HCV 重组抗原用生物素标记作为标记抗原;链亲和素用镧系元素标记;实验时用反应缓冲液按 1 : 21 稀释使用;在包被抗原的反应板上,每孔依次加入 25uL 的 HCV 阴阳性对照或待测样品、以及稀释的生物素标记抗原,孵育洗板后在加入稀释好的链亲和素标记,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. 丙型肝炎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HCV重组抗原用碳酸盐缓冲溶液稀释至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生物素标记抗原的制备:用生物素对对抗原进行标记;

③镧系元素离子标记抗体制备:链亲和素用常规方法进行镧系元素离子标记;

④在步骤①制得的具有固相抗体的反应板上,每孔加入HCV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,洗板后加入稀释好的镧标记链亲和素再次进行孵育,最后进行荧光测定。

2. 根据权利要求1所述丙型肝炎病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法,其特征是步骤②中配对抗原和步骤③链亲和素用反应缓冲液以体积比为1:21稀释。

3. 根据权利要求1所述丙型肝炎病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法,其特征是步骤③中的镧系元素离子为 Eu^{3+} 。

4. 根据权利要求1或2所述丙型肝炎病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法,其特征是所述的反应缓冲液为pH 7.8的50mmol/L Tris-HCl,内含0.9% NaCl,1% BSA,0.5%酪蛋白,0.08%吐温20和0.1% NaN_3 。

5. 根据权利要求1所述丙型肝炎病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法,其特征是步骤④在时间分辨荧光免疫分析仪器上自动完成。

6. 丙型肝炎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HCV重组抗原,生物素标记抗原和镧系元素离子标记的链亲和素。

7. 根据权利要求6所述的丙型肝炎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2%的BSA,

反应缓冲液:pH 7.8的50mmol/L Tris-HCl,内含0.9% NaCl,1% BSA,0.5%酪蛋白,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。

丙型肝炎病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒

技术领域：

[0001] 本发明涉及丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒,属于时间分辨免疫荧光分析法检测领域。

背景技术：

[0002] 丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) 是引起输血后非甲非乙型肝炎 (Post-transfusion non-A non-B Hepatitis, PT-NANBH) 的主要病原因子。HCV 感染者急性期的症状不如 HAV 或 HBV 感染后的症状明显,黄疸比例较低,但 HCV 感染者比 HBV 感染更易慢性化,约有 50% 的 HCV 感染者发展成慢性肝炎,其中的 20% 的患者最终变成肝硬化和肝癌。全世界目前约有 1.7 亿以上的 HCV 感染者;我国将近 4000 万,为 HCV 的高流行区,感染率在 0.9%~5.1% 之间,平均为 3.1%。

[0003] HCV 传播最主要的途径是输血和输入血液制品,此外,目前认为可能的传播方式还包括:共用针头及注射器(如通过静脉注射吸毒者)、性接触及家庭成员的密切接触、母婴垂直传播、医源性传播等;我国 HCV 感染的主要途径是通过输血及血液制品传播。

[0004] 丙型肝炎病毒 (HCV) 自从 1989 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。我国的抗 HCV 试剂自 1994 年问世以来,已逐步完善并被普遍用于血源筛查和临床诊断。当前 HCV 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,但是在早期诊断和低危人群的诊断方面仍有一些不足。

[0005] 时间分辨免疫荧光分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 利用具有独特荧光特性的镧系元素,代替酶、同位素等,做为发光免疫分析中的一种重要方法,具有灵敏度高、示踪物稳定、不受样品自然荧光干扰、无放射性污染等许多优点。

发明内容：

[0006] 本发明的目的是提供一种用于丙型肝炎病毒 (HCV) 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。本发明采用钕标记技术,提供钕标记试剂盒,以提高方法的灵敏度及稳定性。

[0007] 本发明的技术方案是:丙型肝炎病毒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 HCV 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 2% (W/V) 的牛血清白蛋白 (BSA)) 封闭;

[0009] ②生物素标记抗原的制备:用生物素对配对抗原进行标记;

[0010] ③镧系元素离子标记抗体制备:链亲和素用常规方法进行镧系元素离子标记;

[0011] ④在步骤①制得的具有固相抗体的反应板上,每孔加入 HCV 阴阳性对照或待测样品,以及用反应缓冲液稀释的标记抗体进行孵育,经荧光增强液解离后,最后进行荧光测定。

[0012] 步骤①中包被液中 HCV 重组抗原的浓度为 1-10ug/mL, 步骤②中配对抗原和步骤③链亲和素需用反应缓冲液 (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, 0.5% 酪蛋白, 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 1 : 21 稀释。步骤③中的镧系元素离子优选为 Eu^{3+} 。步骤④中的反应缓冲液同步骤②, 步骤④在时间分辨荧光免疫分析仪器上自动完成, 荧光增强液为 β 二酮体。

[0013] 丙型肝炎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 (碳酸盐缓冲液)、封闭液 (磷酸盐缓冲液及 2% (W/V) 的 BSA)、反应缓冲液 (pH 7.8 的 50mmol/L Tris-HCl, 内含 0.9% NaCl, 1% BSA, 0.5% 酪蛋白, 0.08% Tween20 和 0.1% NaN_3)、工作洗涤液 (磷酸盐缓冲液)、荧光增强液, 作为包被 HCV 重组抗原, 生物素标记抗原和镧系元素离子标记的链亲和素。

[0014] 本发明使用双抗体夹心法, 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。

[0015] 本发明的有益效果是: 分析灵敏度高 (符合或者超过 HCV 国家参比品的要求), 检测时间短 (60min), 特异性好, 与干扰物质的交叉反应小。

附图说明:

[0016] 图 1 为本发明的反应原理图

[0017] 本发明采用双抗原夹心法。HCV 重组抗原包被于 96 孔荧免板, 阴阳性对照或样品中的 HCV 抗体与包被抗原和生物素标记抗原于微孔内表面发生免疫反应; 洗涤后, 加入镧离子 (Eu^{3+}) 标记的链亲和素, 免疫反应后, 微孔表面的夹心免疫复合物与游离标记链亲和素通过洗涤分离。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 HCV 抗体浓度呈正比例, 通过 Cutoff 值计算公式判断阴阳性结果。

[0018] 图 2 为本发明操作流程图

[0019] 第一步: 复融生物素标记抗原, 第二步: 稀释生物素标记物, 第三步: 加入阴阳性对照和待测样品, 第四步: 加入稀释后的生物素标记抗原, 第五步: 孵育, 第六步: 洗板, 第七步: 加入稀释后镧标记物, 第八步: 孵育, 第九步: 洗板, 第十步: 加入增强液, 第十一步: 检测。

具体实施方式:

[0020] 下面参照图 1、2 通过实施例对本发明作进一步说明。

[0021] 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, 所用的包被板为重组抗原包被的板, HCV 包被板条的制备包括以下步骤:

[0023] (1) 将纯化的 HCV 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 HCV 重组抗原包被板条;

[0024] (2) 将 HCV 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。

[0025] 其次是 HCV 生物素标记抗原的制备, 包括以下步骤:

[0026] (1) 取待标记抗原加入透析袋中,放入配制好的 pH 9.5 碳酸盐缓冲液的中,室温透析过夜 (pH 9.5 碳酸盐缓冲液);

[0027] (2) 次日,取出抗原,将透析过的抗原用 pH 9.5 碳酸盐缓冲液稀释至 0.2-5mg/mL,按质量比为 2 : 1 的比例 (生物素 :抗原) 边振荡边加入生物素,室温下在振荡板上慢速振荡 1 小时,然后去除后在 pH7.5 的磷酸盐缓冲液 (pH7.5 的磷酸盐缓冲液) 中透析过夜;

[0028] (5) 用孔径 0.2um 的过滤器过滤;

[0029] (6) 加入 0.3% (W/V) 优级纯 BSA,2-8℃ 保存。

[0030] 实施例 :丙型肝炎病毒抗体检测

[0031] 1、生物素标记抗原

[0032] 用碳酸盐缓冲液将 HCV 重组抗原透析过夜,之后加入生物素反应 1 小时,取出在 pH7.5 的磷酸盐缓冲液中透析过夜。分装,于 +2 ~ +8℃ 保存。

[0033] 2、操作步骤

[0034] 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 2% (W/V) 的 BSA)、反应缓冲液 (pH 7.8 的 50mmol/L Tris-HCl,内含 0.9% NaCl,1% BSA,0.5% 酪蛋白,0.08% Tween20 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),作为包被 HCV 重组抗原,生物素标记抗原和镧系元素离子标记的链亲和素。

[0035] A :工作洗涤液 :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。

[0036] B :生物素标记抗原工作液 :每瓶生物素标记 HCV 抗原的冻干粉加 1,000 μ L 纯水,静置 30 分钟,待其充分溶解。对每一条 12 孔板,取 75 μ L 复溶好的生物素标记 HCV 抗原 (21 倍浓缩液),加 1.5mL 反应缓冲液,充分混匀 (1 : 21 稀释)。实验前 1 小时内配制。

[0037] 2) 编号 :将样品对应微孔按序编号,每板应设抗 -HCV 阴、阳性对照各 2 孔。

[0038] 3) 加样 :分别在相应孔中加入抗 -HCV 阴性对照、阳性对照及待测样品 25 μ L。

[0039] 4) 加生物素标记抗原 :每孔加入稀释好的生物素标记抗原工作液 100 μ L。

[0040] 5) 第一步孵育 :室温 (20 ~ 25℃) 慢速振荡温育 45 分钟。

[0041] 6. 配 Eu 标记链亲和素工作液 :对每一条 12 孔板,取 75 μ L Eu 标记链亲和素 (21 倍浓缩液),加 1.5mL 反应缓冲液,充分混匀 (1 : 21 稀释)。第二步孵育前 45 分钟内配制。

[0042] 7) 洗涤 :用工作洗涤液充分洗板 5 遍,扣干。

[0043] 8) 加 Eu 标记链亲和素 :每孔加入 Eu 标记链亲和素工作液 100 μ L。

[0044] 9) 第二步孵育 :室温 (20 ~ 25℃) 慢速振荡温育 15 分钟。

[0045] 10) 洗涤 :用工作洗涤液充分洗板 5 遍,扣干。

[0046] 11) 加荧光增强液 :每孔加入荧光增强液 100 μ L,室温 (+20 ~ +25℃) 慢速振荡 5 分钟后测定荧光计数值。

[0047] 12) 测量荧光计数值 :用时间分辨荧光检测仪测定荧光计数值。

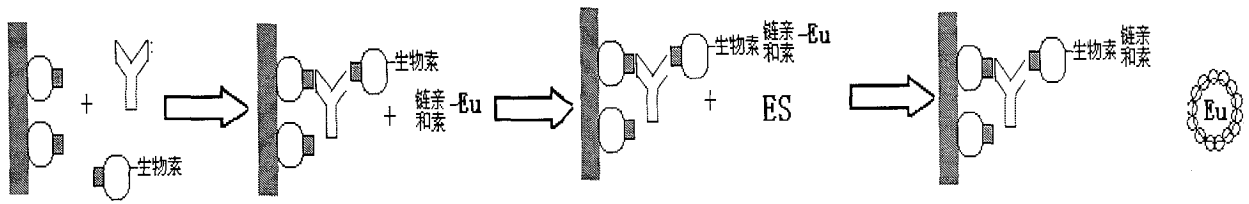


图 1

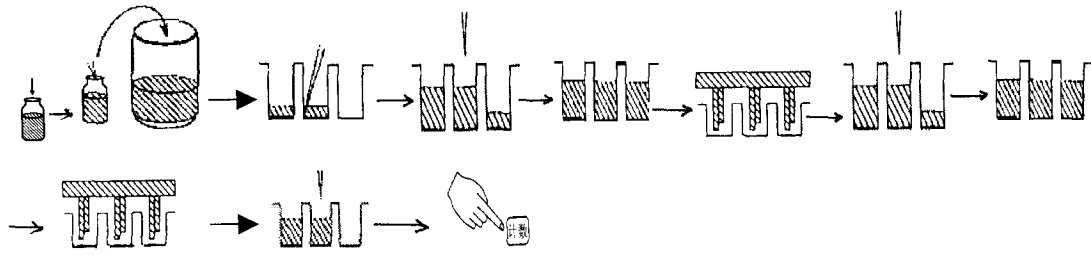


图 2

专利名称(译)	丙型肝炎病毒抗体时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒		
公开(公告)号	CN102236020A	公开(公告)日	2011-11-09
申请号	CN201010152498.5	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	G01N33/576 G01N33/533 G01N33/543		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了丙型肝炎病毒抗体诊断时间分辨免疫荧光分析法及试剂盒，其选用多片段融合HCV重组抗原作为包被抗原，用碳酸钠缓冲溶液稀释至1-10ug/mL作为包被液；配对HCV重组抗原用生物素标记作为标记抗原；链亲和素用镧系元素标记；实验时用反应缓冲液按1:21稀释使用；在包被抗原的反应板上，每孔依次加入25uL的HCV阴性对照或待测样品、以及稀释的生物素标记抗原，孵育洗板后在加入稀释好的链亲和素镧标记，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。

