

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710111406.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 33/549 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 1 月 2 日

[11] 公开号 CN 101097216A

[22] 申请日 2007.6.18

[21] 申请号 200710111406.7

[71] 申请人 曹健荣

地址 100176 北京市经济技术开发区运城街 7 号

共同申请人 张 誌

[72] 发明人 曹健荣 张 誌 王宇帆 王建丽
张海燕

[74] 专利代理机构 北京华科联合专利事务所
代理人 王 为

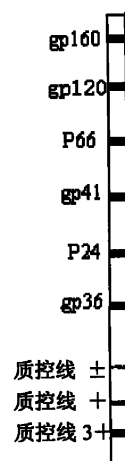
权利要求书 6 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称

人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂

[57] 摘要

本发明涉及一种人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂，该诊断试剂采用基因工程重组 HIV - I 型特异性蛋白 gp160、gp120、gp41、p66、p24 以及 HIV - II 型特异性蛋白 gp36 独立包被的混合纤维素膜、酶结合物及其他组份组成，应用间接法的原理供 HIV - I 型和 HIV - II 型抗体确认用。



1、一种人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂,其特征在于,包括 HIV 抗体确认条,反应液,洗液,碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物,BCIP/NBT 显色底物,阳性参考血清,阴性参考血清,所述试剂采用 HIV-I 型特异性蛋白 gp160、gp120、gp41、p66、p24 以及 HIV-II 型特异性蛋白 gp36 与待测人类血清中的相应抗体特异结合,兔抗人 IgG 多克隆抗体与人类血清中的 IgG 结合,之后加入羊抗人 IgG-碱性磷酸酶结合物,其将与重组抗原结合的 HIV 特异抗体、与兔抗人 IgG 结合的抗体以及包被在膜上的人源 IgG 相结合,加入底物后发生反应导致显色反应的原理制备而成。

2、权利要求 1 的确认试剂,所述试剂由一组产品组成一个试剂盒,其中主要组成成分如下:

HIV 抗体确认条,反应液,洗液,碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物,BCIP/NBT 显色底物,阳性参考血清,阴性参考血清,另外还有,反应板,对比卡片,结果报告单,产品说明书。

3、权利要求 2 的确认试剂,每一试剂盒中包括以下组成:

1、HIV 抗体确认条	20 条
2、反应液	1 瓶
3、洗液	1 瓶
4、碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物	1 瓶
5、BCIP/NBT 显色底物	1 瓶
6、阳性参考血清	1 瓶
7、阴性参考血清	1 瓶
8、反应板	2 个
9、对比卡片	1 个
10、结果报告单	1 张
11、说明书	1 份。

4、权利要求 3 的确认试剂,其中

HIV 抗体确认条,组成为混合纤维素膜以及包被在该膜上的重组抗原,其制备方

法如下:

- A. 使用包被缓冲液将重组抗原以及兔抗人 IgG 和人源 IgG 稀释到合适的浓度;
- B. 使用流式划线仪以划膜速度为 20mm/s, 喷量为 0.2 μ l/mm 将各蛋白均匀包被于混合纤维素膜上;
- C. 包被完成的混合膜采用室温吹干 2 小时的方法进行干燥;
- D. 干燥后真空包装, 放在寒冷干燥处备用;

反应液, 组成为 0.8%NaCl、0.02%KCl 和 0.05%吐温-20 的 0.01M Tris-HCl, 其制备方法如下:

- A. 按照上述配方配制;
- B. 使用 NaOH 颗粒将 PH 值调到 7.4;
- C. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- D. 密封贮存于 2-8 $^{\circ}$ C 环境中,

洗液, 组成为 10mM CB 缓冲液添加 200PPM PEG, 500PPM Tween-20, 500PPM 甘油, 100PPM Proclin300, 其制备方法如下:

- A. 按照上述配方配制;
- B. 使用 NaOH 颗粒将 PH 值调到 9.8-10.0;
- C. 加入 100PPM 的指示剂, 使其在正常状态下呈蓝色
- D. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- E. 密封贮存于 2-8 $^{\circ}$ C 环境中,

碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物, 组成为碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物, 10mM Tris-cl, 20%胎牛血清, 100PPM PEG, 500PPM 甘油和 100PPM Proclin300 其制备方法如下:

- A. 按照上述配方配制;
- B. 使用 HCl 将 PH 值调到 6.4-6.7;
- C. 加入 100PPM 的指示剂, 使其在正常状态下呈红色
- D. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- E. 密封贮存于 2-8 $^{\circ}$ C 环境中,

BCIP/NBT 显色底物,

阳性参考血清, 其制备方法如下:

- A. 选用 ELISA 测定效价不低于 1: 200, HIV 抗体全病毒确认试剂检测结果为全条带阳性的血清 10 份;
 - B. 混合血清, 采用 60℃处理 1 小时;
 - C. 使用 0.45μm 滤膜过滤除菌;
 - D. 除菌过滤后密封贮存于 2-8℃环境中,
- 阴性参考血清, 其制备方法如下:

- A. 选用经两种 ELISA 试剂测定、一种确认试剂检测、一种核酸检测试剂同时检测结果为 HIV 抗体阴性血清 10 份;
- B. 混合血清, 采用 60℃处理 1 小时;
- C. 使用 0.45μm 滤膜过滤除菌;
- D. 除菌过滤后密封贮存于 2-8℃环境中。

5、权利要求 3 的确认试剂的使用方法, 包括以下步骤:

样品:

从测试者身上获得的血清或血浆,

仪器:

微量加样器, 摇床, 37℃烘箱,, 37℃水浴箱,

试剂准备:

第一次使用时将脱脂奶粉加入到反应液中, 温柔震荡使其混合均匀,

所有试剂在使用前在室温平衡半个小时或 37℃水浴 10 分钟,

所有试剂在使用前温柔震荡使其混合均匀, 使用后尽快将所用试剂放入 2-8℃环境中,

操作方法:

快速反应模式:

(1) 将待测样本及反应液在室温平衡半个小时, 或放入 37℃水浴箱中水浴 10 分钟

(2) 从管中取出所需数量的 HIV 抗体确认试纸条, 放在反应槽中, 有数字标记的一面朝上;

(3) 向每个槽内加入 1 毫升反应液, 置于摇床上室温摇动 5-10 分钟, 然后在反应槽的上方加入 10 微升待检样本;

- (4) 盖上反应槽，置于摇床上，室温孵育 45 分钟；
 - (5) 完全去除槽中反应液，用 1 毫升洗液洗膜，共进行 4 次，每次 5 分钟；
 - (6) 完全去除槽中洗液，向每个槽内加入酶结合物，1 毫升，盖上反应槽，置于摇床上，室温摇动孵育 30 分钟；
 - (7) 完全去除槽中酶结合物，用 1 毫升洗液将洗膜，共进行 4 次，每次 5 分钟；
 - (8) 完全去除槽中洗液，向每个槽内加入 1 毫升显色剂，盖上反应槽，室温摇动反应 10 分钟；
 - (9) 完全去除槽中显色剂，用蒸馏水冲 2 次，之后用蒸馏水浸泡 1 分钟终止反应；
 - (10) 取出确认条，置于吸水纸上，放入烘箱中，37°C 烘烤 15 分钟彻底干燥；
 - (11) 使用对比卡片读取结果，在室温避光条件下，结果可以长期保存，
- 过夜反应模式：

步骤（4）的反应时间为过夜反应，其他步骤与快速反应一致，

对实验结果的解释：

（1）右图为膜上相应固相化蛋白的位置，使用对比卡片读取确认条的实验结果信息，

（2）计算总得分，

HIV-2 型：满足以下 3 个条件可以初步判断为 HIV-2 型抗体阳性

满足阳性判定的条件：

gp36 的显色结果强于质控线+；

gp41 的显色结果不强于 gp36 的显色结果。

6、权利要求 3 的确认试剂的制备方法，包括以下步骤：

（1）重组抗原的生产

序列的获得和引物的构建

通过信息检索获得 HIV 病毒 gp160, gp120, gp41 和 gp36 的核酸编码序列；p66 的核酸编码序列以及 p24 的核酸编码序列，在广泛查阅国内外相关文献报道以及同行业厂家交流的基础上，选取了各个蛋白的多个免疫优势表位的核酸编码序列，根据其序列设计引物用于体外克隆，

序列扩增以及检定

以裂解的 HIV 病毒为模板,用上述引物通过聚合酶链式反应技术在体外克隆获得目的片段,使用 0.8%TBE-琼脂糖凝胶电泳检测目的片段的长度,

连接转化

经检测确认为正确的克隆子,用 E. coli R I, Bam. H I 双酶切处理之,使用 T4 连接酶,将其分别连接到 PUC 表达载体中,之后转化基因工程用大肠杆菌 JM109,用含有氨苄青霉素的培养基初筛含有表达载体的工程菌株,用双酶切检测出含有目的基因片段的工程菌株,用测序确认含有目的基因片段的菌株,

重组蛋白的表达和纯化

培养至对数生长期,使用 IM 的 IPTG 诱导其表达重组蛋白,采用溶菌酶结合超声波方法破碎菌体,经离心回收后,使用 TritonX-100 洗涤去除膜碎片和膜蛋白,用盐酸胍溶解包涵体蛋白,然后先后使用离子交换层析纯化和 Ni-NTA 亲和层析柱纯化重组蛋白,用 SDS-PAGE 的方法检测重组蛋白的纯度,应用 Western Blot 原理检测重组蛋白的特异性以及抗原性,

(2) 其他组分的制备:

HIV 抗体确认条,组成为混合纤维素膜以及包被在该膜上的重组抗原,其制备方法如下:

- A. 使用包被缓冲液将重组抗原以及兔抗人 IgG 和人源 IgG 稀释到合适的浓度;
- B. 使用流式划线仪以划膜速度为 20mm/s, 喷量为 0.2 μ l/mm 将各蛋白均匀包被于混合纤维素膜上;
- C. 包被完成的混合膜采用室温吹干 2 小时的方法进行干燥;
- D. 干燥后真空包装,放在寒冷干燥处备用,

反应液,组成为 0.8%NaCl、0.02%KCl 和 0.05%吐温-20 的 0.01M Tris-HCl,其制备方法如下:

- A. 按照上述配方配制;
- B. 使用 NaOH 颗粒将 PH 值调到 7.4;
- C. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- D. 密封贮存于 2-8 $^{\circ}$ C 环境中,

洗液,组成为 10mM CB 缓冲液添加 200PPM PEG, 500PPM Tween-20, 500PPM 甘油, 100PPM Proclin300, 其制备方法如下:

- A. 按照上诉配方配制;
 - B. 使用 NaOH 颗粒将 PH 值调到 9.8-10.0;
 - C. 加入 100PPM 的指示剂, 使其在正常状态下呈蓝色
 - D. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
 - E. 密封贮存于 2-8℃环境中,
- 碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物, 组成为碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物, 10mM Tris-cl, 20%胎牛血清, 100PPM PEG, 500PPM 甘油和 100PPM Proclin300 其制备方法如下:

- A. 按照上诉配方配制;
- B. 使用 HCl 将 PH 值调到 6.4-6.7;
- C. 加入 100PPM 的指示剂, 使其在正常状态下呈红色
- D. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- F. 密封贮存于 2-8℃环境中,

BCIP/NBT 显色底物,

阳性参考血清, 其制备方法如下:

- A. 选用 ELISA 测定效价不低于 1: 200, HIV 抗体全病毒确认试剂检测结果为全条带阳性的血清 10 份;
- B. 混合血清, 采用 60℃处理 1 小时;
- C. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- D. 除菌过滤后密封贮存于 2-8℃环境中,

阴性参考血清, 其制备方法如下:

- A. 选用经两种 ELISA 试剂测定、一种确认试剂检测、一种核酸检测试剂同时检测结果为 HIV 抗体阴性血清 10 份;
- B. 混合血清, 采用 60℃处理 1 小时;
- C. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- D. 除菌过滤后密封贮存于 2-8℃环境中,

分装: 半成品检定合格后及时分装, 分装后保存于 2-8℃,

组装: 按试剂盒组成成份进行组装。

人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂

技术领域：

本发明涉及一种医药诊断试剂，特别是一种人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂，该诊断试剂采用基因工程重组 HIV-I 型特异性蛋白 gp160、gp120、gp41、p66、p24 以及 HIV-II 型特异性蛋白 gp36 独立包被的混合纤维素膜、酶结合物及其他组份组成，应用间接法的原理供 HIV-I 型和 HIV-II 型抗体确认用。

背景技术：

人类获得性免疫缺陷综合症（AIDS，艾滋病）传播的广泛性和危害性已成为全球关注的公共卫生和社会热点问题。艾滋病的传播在我国已经进入了快速增长期，除了在沿海经济发达的地区 HIV 感染的人较多外，在一些经济不发达、医疗卫生较差的部分地区尤其农村地区，由于劳务输出流动人口不断增加以及部分由采浆感染 HIV 的人群，给我国的 HIV 预防和控制增加了不少的压力。提高 HIV 诊断试剂水平显得尤为重要。目前国内对艾滋病的诊断方法主要采用 ELISA 方法检测，该方法有较高的灵敏度和特异性，但其操作方法复杂，测定时间较长，并且需要一定的操作经验和仪器设备，在一些医疗条件差的部分地区尤其是在边远的农村地区限制了该方法的使用，因此开发一种快速简便的检测试剂十分必要。本发明提供一种快速，简便的人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂。

发明内容：

本发明提供一种人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂，该试剂由一组产品组成一个试剂盒，其中主要组成成分如下：

HIV 抗体确认条，反应液，洗液，碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物，BCIP/NBT 显色底物，阳性参考血清，阴性参考血清，另外还有，反应板，对比卡片，结果报告单，产品说明书等。

每一试剂盒中包括以下组成：

- | | | |
|-------------|-------------|-------------|
| 1、HIV 抗体确认条 | （避光，防潮） | 20 条 |
| 2、反应液 | （配置完成后为乳白色） | 1 瓶（20 毫升） |
| 3、洗液 | （蓝色） | 1 瓶（200 毫升） |

4、碱性磷酸酶—羊抗人 IgG 结合物（红色）	1 瓶（20 毫升）
5、BCIP/NBT 显色底物（淡黄色）	1 瓶（20 毫升）
6、阳性参考血清（生物危险品）	1 瓶（50 微）
7、阴性参考血清	1 瓶（100 微升）
8、反应板（每板 10 个反应槽）	2 个
9、对比卡片	1 个
10、结果报告单	1 张
11、说明书	1 份

其中的各组成说明如下：

HIV 抗体确认条，组成为混合纤维素膜以及包被在该膜上的重组抗原，其制备方法如下：

- A. 使用包被缓冲液（0.01M Tris-HCl, pH 7.4）将重组抗原以及兔抗人 IgG 和人源 IgG 稀释到合适的浓度（gp160、gp120、P66、gp41、P24、gp36 的包被浓度分别为 80 μ g/ml、80 μ g/ml、50 μ g/ml、60 μ g/ml、80 μ g/ml 和 5 μ g/ml；兔抗人 IgG 的浓度分别为 4.5 μ g/ml 和 100 μ g/ml；人源 IgG 的浓度为 50 μ g/ml）；
- B. 使用流式划线仪以划膜速度为 20mm/s，喷量为 0.2 μ l/mm 将各蛋白均匀包被于混合纤维素膜上；
- C. 包被完成的混合膜采用室温（16-25 $^{\circ}$ C）吹干 2 小时的方法进行干燥；
- D. 干燥后真空包装，放在寒冷干燥处（2-8 $^{\circ}$ C，相对湿度不高于 45%）备用。

反应液，组成为 0.8%NaCl、0.02%KCl 和 0.05%吐温-20 的 0.01M Tris-HCl，其制备方法如下：

- A. 按照上诉配方配制；
- B. 使用 NaOH 颗粒将 PH 值调到 7.4；
- C. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌；
- D. 密封贮存于 2-8 $^{\circ}$ C 环境中。

洗液，组成为 10mM CB 缓冲液添加 200PPM PEG，500PPM Tween-20，500PPM 甘油，100PPM Proclin300，其制备方法如下：

- A. 按照上诉配方配制；
- B. 使用 NaOH 颗粒将 PH 值调到 9.8-10.0；

C. 加入 100PPM(质量体积比)的指示剂(溴百里酚蓝),使其在正常状态下(2-30℃, PH=9.9)呈蓝色

D. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;

E. 密封贮存于 2-8℃环境中。

碱性磷酸酶—羊抗人 IgG 结合物, 组成为碱性磷酸酶—羊抗人 IgG 结合物 (1:4000), 10mM Tris-cl, 20%胎牛血清, 100PPM PEG, 500PPM 甘油和 100PPM Proclin300 其制备方法如下:

A. 按照上述配方配制;

B. 使用 HCl 将 PH 值调到 6.4-6.7;

C. 加入 100PPM(质量体积比)的指示剂(氯酚红),使其在正常状态下(2-30℃, PH=6-7)呈红色

D. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;

E. 密封贮存于 2-8℃环境中。

BCIP/NBT 显色底物, BCIP/NBT PURPLE LIQUID SUBSTRATE FOR MEMBRANES)购自 Sigma 公司(125K1189)。

阳性参考血清, 其制备方法如下:

A. 选用 ELISA 测定效价不低于 1:200, HIV 抗体全病毒确认试剂检测结果为全条带阳性的血清 10 份;

B. 混合血清, 采用 60℃处理 1 小时;

C. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;

D. 除菌过滤后密封贮存于 2-8℃环境中。

阴性参考血清, 其制备方法如下:

A. 选用经两种 ELISA 试剂测定、一种确认试剂检测、一种核酸检测试剂同时检测结果为 HIV 抗体阴性血清 10 份;

B. 混合血清, 采用 60℃处理 1 小时;

C. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;

D. 除菌过滤后密封贮存于 2-8℃环境中。

本发明的试剂盒配套包装, 配套使用, 使用方法如下:

样品:

从测试者身上获得的血清或血浆。

仪器：

微量加样器，摇床，37°C 烘箱。，37°C 水浴箱。

试剂准备：

第一次使用时将脱脂奶粉加入到反应液中，温柔震荡使其混合均匀。

所有试剂在使用前在室温（16—25°C）平衡半个小时或 37°C 水浴 10 分钟。（显色底物请取所需量分装入配液瓶中水浴）

所有试剂在使用前温柔震荡使其混合均匀。使用后尽快将所用试剂放入 2—8°C 环境中。

操作方法：

快速反应模式：

（1）将待测样本及反应液在室温（16—25°C）平衡半个小时，或放入 37°C 水浴箱中水浴 10 分钟

（2）从管中取出所需数量的 HIV 抗体确认试纸条，放在反应槽中，有数字标记的一面朝上；

（3）向每个槽内加入 1 毫升反应液（乳白色），置于摇床上室温摇动 5—10 分钟，然后在反应槽的上方加入 10 微升待检样本；

（4）盖上反应槽，置于摇床上，室温（16—25°C）孵育 45 分钟；

（51）完全去除槽中反应液，用 1 毫升洗液（蓝色）洗膜，共进行 4 次，每次 5 分钟；

（6）完全去除槽中洗液，向每个槽内加入酶结合物，（红色）1 毫升，盖上反应槽，置于摇床上，室温摇动孵育 30 分钟；

（7）完全去除槽中酶结合物，用 1 毫升洗液（蓝色）将洗膜，共进行 4 次，每次 5 分钟；

（8）完全去除槽中洗液，向每个槽内加入 1 毫升显色剂（淡黄色），盖上反应槽，室温摇动反应 10 分钟；

（9）完全去除槽中显色剂，用蒸馏水冲 2 次，之后用蒸馏水浸泡 1 分钟终止反应；

（10）取出确认条，置于吸水纸上，放入烘箱中，37°C 烘烤 15 分钟彻底干燥；

(11) 使用对比卡片读取结果，在室温避光条件下，结果可以长期保存。

过夜反应模式：

步骤（4）的反应时间为过夜反应，其他步骤与快速反应一致。

对实验结果的解释：

(1) 图 1 为膜上相应固相化蛋白的位置。使用对比卡片读取确认条的实验结果信息。

(2) 参照以下 2 个表格计算总得分。

表 1 符号及其对应含义

符号	含义
R	Env, Gag, Pol
Env	env 基因编码蛋白 (gp160, gp120, gp41, gp36)
Gag	gag 基因编码蛋白 (p24)
Pol	pol 基因编码蛋白 (p66)

表 2 确认条总得分计算方法

	检测线的显色强度	得分
R<±	条带显色弱或无法与背景明显区分或显色强度未达到质控线±	0
Env=±	env 基因编码蛋白的显色强度与质控线±基本相同	0.25
±<Env<+	env 基因编码蛋白的显色强度介于质控线±与质控线+之间	0.5
±<Gag<+	gag 基因编码蛋白的显色强度介于质控线±与质控线+之间	0.25
±<pol<+	pol 基因编码蛋白的显色强度介于质控线±与质控线+之间	0.25
Env=+	env 基因编码蛋白的显色强度与质控线+基本相同	1
Gag=+	gag 基因编码蛋白的显色强度与质控线+基本相同	0.5
Pol=+	pol 基因编码蛋白的显色强度与质控线+基本相同	0.5
+<R<3+	条带显色强度介于质控线+与质控线 3+ 之间	2
R≥3+	条带显色强度不弱于质控线 3+	3

(3) 请参照下表判断实验结果：

表 3 试结果判读表

结果判断	总得分
------	-----

阴性结果	$A \leq 0.5$	(总得分不超过 0.5)
不确认结果	$0.75 \leq A \leq 1.25$	(总得分介于 0.75 至 1.25 之间)
阳性结果	$A \geq 1.5$	(总得分不少于 1.5)

(4) 确认条失效：(在确认所有组份均合理使用的情况下，出现下列任意一种情况判定为失效)

无任何可辨认的条带出现。

显色 20min 后，质控线 3+ 的显色仍然没有达到明显可见的强度。

(5) 特殊情况及可能原因：(质控线 ± 的显色结果强于质控线 +)

当样本使用量比较大以及样本中抗体含量比较大时有可能出现这种情况。这种情况下以质控线 ± 作为阳性条带的平均显色标准，质控线 + 作为条带是否存在的判定标准。

(6) HIV-2 型：(满足以下 3 个条件可以初步判断为 HIV-2 型抗体阳性)

满足阳性判定的条件：

gp36 的显色结果强于质控线 +；

gp41 的显色结果不强于 gp36 的显色结果。

(异常检测结果及可能原因)

质控线 3+	未加入酶结合物
未显色	未加入显色底物
	显色底物 PH 值过低
	酶结合物活性完全丧失

质控线 +	未加入人类血清
未显色	显色时间过短
	显色底物 PH 值过低
显色底物温度过低	

背景太高，所有	显色时间过长
有条带显色结果	未用蒸馏水终止反应
均达到质控	未烤干试纸条
线 3+ 的水平	使用回收的显色底物

背景较脏	用手/手套直接拉触确认条表面
	确认条潮湿
	确认条表面被污染

(该试验方法的局限性)

本确认试剂盒专供 HIV-I 型和 HIV-II 型抗体确认用。

(产品性能指标)

试验完成后质控线 $\pm$ ，质控线 3+ 的显色结果必须明显可辨认；背景颜色不超过质控线 $\pm$ 的颜色；否则实验不成立。

本发明的试剂，其反应原理如下：

固定在混合纤维素膜上的基因工程重组 HIV-I/HIV-II 特异性蛋白将与待测人类血清中的相应抗体特异结合，兔抗人 IgG 多克隆抗体将与人类血清中的 IgG 结合：之后加入羊抗人 IgG-碱性磷酸酶结合物，其将与重组抗原结合的 HIV 特异抗体、与兔抗人 IgG 结合的抗体以及包被在膜上的人源 IgG 相结合，加入底物后发生反应导致显色。如果待测样本中含有 HIV-I/HIV-II 特异性抗体，在固定有相应重组蛋白的地方将出现特异性显色的条带，反之将不出现。无论待测样本中是否含有 HIV-I/HIV-II 特异性抗体，固定兔抗人 IgG、人源 IgG 的条带均将显色。

本 HIV 抗体确认条的检测线共包括 6 条，从上至下依次为 gp160、gp120、p66、gp41、p24 和 gp36，用于检测人类血清中的 HIV 特异抗体；其质控线共包括 3 条，从上至下依次为质控线 $\pm$ 、质控线+和质控线 3+。质控线 $\pm$ （兔抗人 IgG）用于指示样品中免疫球蛋白 IgG 的含量；质控线+（兔抗人 IgG）用于指示阳性条带的平均显色强度；质控线 3+（人源 IgG）用于指示碱性磷酸酶的活性。质控线 $\pm$ 和质控线+为动态质控线，不同待测样本中的人源 IgG 含量的差别将导致这两条质控线显色强度的差别；质控线 3+为标准质控线，其显色强度与待测样本无关。

用于本试剂盒的抗原均为通过基因工程制备的、体外表达获取的重组蛋白，这些重组蛋白均不具有生物危险性。

反应模式

本确认试剂盒的反应模式共有三种：间接法、夹心法以及免疫反应。

HIV-I/HIV-II 特异性抗体的检测采用的是间接法。将 gp160 gp120 p66 gp41 p24 和 gp36 重组抗原独立包被在混合膜上；加入待测样本，其中的相应抗体将与这些抗原发生特异性的免疫反应；之后加入的羊抗人 IgG（碱性磷酸酶

标记)将与这些 HIV 特异抗体相结合;加入显色底物,在碱性磷酸酶的催化下,结合特异抗体的条带将出现肉眼可见的显色。

人类血清中的免疫球蛋白 IgG 的含量检测采用的是夹心法。将兔抗人 IgG 多克隆抗体分别以不同的浓度包被在混合膜上作为质控线 $\pm$ 和质控线 $+$,加入待测样本,其中的人类血清免疫球蛋白 IgG 将与兔抗人 IgG 多克隆抗体发生免疫反应;之后加入的羊抗人 IgG (碱性磷酸酶标记)将与人源 IgG 相结合;加入显色底物,在碱性磷酸酶的催化下,结合人源 IgG 的条带将出现肉眼可见的显色。在同一待测样本中,包被浓度的不同将此两条质控线导致显色深度的不同;在不同待检测样本中,人源 IgG 含量的差别将同时导致这两条质控线显色强度的差别。

碱性磷酸酶活性的检测采用的是特异性免疫反应。将人源 IgG 包被在混合膜上作为质控线 $3+$,羊抗人 IgG (碱性磷酸酶标记)将与其相结合;加入显色底物,在碱性磷酸酶的催化下,该位置将出现肉眼可见的显色。其显色强度与待测样本无关,仅用于指示碱性磷酸酶的活性。

重组抗原的选择

目前在世界范围内广泛应用于诊断 HIV 感染的确认试验一般都要求检测三类抗原(即 env 基因编码的外膜蛋白抗原、pol 基因编码的聚合酶抗原和 gag 基因编码的核心抗原)。根据广东省卫生防疫站艾滋病监测检测中心 HIV 确认实验室对 1991 至 1995 年间 HIV 初筛阳性和可疑的 103 份样本进行确认试验的结果以及湖北省疾病预防控制中心对 1995 至 2001 年间 289 例 HIV-1 确认阳性样本带型分析的结果;同时在参照了美国 CDC,美国 FDA,WHO 以及中国卫生部标准的基础上,确定用于本 HIV 确认试剂盒的抗原分别为 env 基因编码产物 gp160, gp120, gp41 和 HIV-2 型特异抗原 gp36; pol 基因编码产物 p66; gag 基因编码产物 p24。

重组抗原的生产

序列的获得和引物的构建

通过信息检索获得 HIV 病毒 gp160, gp120, gp41 和 gp36 (HIV-II) 的核酸编码序列; p66 的核酸编码序列以及 p24 的核酸编码序列。在广泛查阅国内外相关文献报道以及与同行业厂家交流的基础上,选取了各个蛋白的多个免疫优势表位的核酸编码序列。根据其序列设计引物(引物含有接头,正向引物含有 EcoRI 位

点；反向引物含有 Bam. HI 位点）用于体外克隆。

序列扩增以及检定

以裂解的 HIV（病毒为模板，用上述引物通过聚合酶链式反应（PCR）技术在体外克隆获得目的片段。使用 0.8%TBE—琼脂糖凝胶电泳检测目的片段的长度。

连接转化

经检测确认为正确的克隆子，用 E. coli IR I, Bam. HI 双酶切处理之。使用 T4 连接酶，将其分别连接到 PUC 表达载体中。之后转化基因工程用大肠杆菌 JM109。用含有氨苄青霉素的培养基初筛含有表达载体的工程菌株，用双酶切检测出含有目的基因片段的工程菌株，用测序确认含有目的基因片段的菌株。

重组蛋白的表达和纯化

培养至对数生长期，使用 IM 的 IPTG 诱导其表达重组蛋白。采用溶菌酶结合超声波方法破碎菌体，经离心回收后，使用 TritonX-100 洗涤去除膜碎片和膜蛋白，用盐酸胍（6mol/l）溶解包涵体蛋白。然后先后使用离子交换层析纯化和 Ni-NTA 亲和层析柱纯化重组蛋白。用 SDS—PAGE 的方法检测重组蛋白的纯度（图 2），应用 Western Blot 原理检测重组蛋白的特异性以及抗原性。

附图说明：

图 1 为测试结果比较使用的对比图，为膜上相应固相化蛋白的位置

具体实施方式：

以下通过实施例进一步说明本发明。

实施例 1

（1）确认试纸条的制备及检测

用包被缓冲液。按一定的浓度用流试划膜仪将检测线和质控线均匀，整齐的固定于混合纤维素膜上。

确认试纸条的干燥

包被完成后置于超净工作台上室温吹风干燥 2 小时。保存于室温干燥环境中（16—25℃，相对湿度不高于 45%）。

半成品检定

用 HIV 抗体确认试剂国家参考品进行检定。

HIV 抗体阳性参考品符合率 10 份，要求阳性符合率为 10/10。

HIV 抗体阴性参考品符合率 12 份，要求阴性符合率为 12/12。

HIV 抗体不确定型样品符合率 5 份，检测结果不能为阴性。

无菌试验

液体组分按照<中国生物制品规程>中<生物制品无菌试验规程>第 A3.2.3 项进行。

稳定性试验

试剂各组分 37°C 放置 6 天，检定结果应达到标准。

分装

半成品检定合格后及时分装，分装后保存于 2—8°C。（相对湿度不高于 45%）。

（2）其他组分的制备：

HIV 抗体确认条，组成为混合纤维素膜以及包被在该膜上的重组抗原，其制备方法如下：

A. 使用包被缓冲液（0.01M Tris-HCl, pH 7.4）将重组抗原以及兔抗人 IgG 和人源 IgG 稀释到合适的浓度（gp160、gp120、P66、gp41、P24、gp36 的包被浓度分别为 80µg/ml、80µg/ml、50µg/ml、60µg/ml、80µg/ml 和 5µg/ml；兔抗人 IgG 的浓度分别为 4.5µg/ml 和 100µg/ml；人源 IgG 的浓度为 50µg/ml）；

B. 使用流式划线仪以划膜速度为 20mm/s，喷量为 0.2µl/mm 将各蛋白均匀包被于混合纤维素膜上；

C. 包被完成的混合膜采用室温（16-25°C）吹干 2 小时的方法进行干燥；

D. 干燥后真空包装，放在寒冷干燥处（2-8°C，相对湿度不高于 45%）备用。

反应液，组成为 0.8%NaCl、0.02%KCl 和 0.05%吐温-20 的 0.01M Tris-HCl，其制备方法如下：

A. 按照上诉配方配制；

B. 使用 NaOH 颗粒将 PH 值调到 7.4；

C. 使用 0.45µm 滤膜过滤除菌；

D. 密封贮存于 2-8°C 环境中。

洗液，组成为 10mM CB 缓冲液添加 200PPM PEG，500PPM Tween-20，500PPM 甘油，100PPM Proclin300，其制备方法如下：

A. 按照上诉配方配制；

- B. 使用 NaOH 颗粒将 PH 值调到 9.8-10.0;
- C. 加入 100PPM(质量体积比)的指示剂(溴百里酚蓝),使其在正常状态下(2-30℃, PH=9.9)呈蓝色
- D. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- E. 密封贮存于 2-8℃环境中。

碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物, 组成为碱性磷酸酶-羊抗人 IgG 结合物 (1:4000), 10mM Tris-cl, 20%胎牛血清, 100PPM PEG, 500PPM 甘油和 100PPM Proclin300 其制备方法如下:

- A. 按照上诉配方配制;
- B. 使用 HCl 将 PH 值调到 6.4-6.7;
- C. 加入 100PPM (质量体积比)的指示剂 (氯酚红), 使其在正常状态下 (2-30℃, PH=6-7)呈红色
- D. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- F. 密封贮存于 2-8℃环境中。

BCIP/NBT 显色底物, BCIP/NBT PURPLE LIQUID SUBSTRATE FOR MEMBRANES)购自 Sigma 公司(125K1189)。

阳性参考血清, 其制备方法如下:

- A. 选用 ELISA 测定效价不低于 1:200, HIV 抗体全病毒确认试剂检测结果为全条带阳性的血清 10 份;
- B. 混合血清, 采用 60℃处理 1 小时;
- C. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- D. 除菌过滤后密封贮存于 2-8℃环境中。

阴性参考血清, 其制备方法如下:

- A. 选用经两种 ELISA 试剂测定、一种确认试剂检测、一种核酸检测试剂同时检测结果为 HIV 抗体阴性血清 10 份;
- B. 混合血清, 采用 60℃处理 1 小时;
- C. 使用 0.45 μ m 滤膜过滤除菌;
- D. 除菌过滤后密封贮存于 2-8℃环境中。

分装:

半成品检定合格后及时分装。分装后保存于 2-8℃。(相对湿度不高于 45%)。

组装

按试剂盒组成成份进行组装。

每一试剂盒中包括以下组成：

1、HIV 抗体确认条	(避光, 防潮)	20 条
2、反应液	(配置完成后为乳白色)	1 瓶(20 毫升)
3、洗液	(蓝色)	1 瓶(200 毫升)
4、碱性磷酸酶—羊抗人 IgG 结合物	(红色)	1 瓶(20 毫升)
5、BCIP/NBT 显色底物	(淡黄色)	1 瓶(20 毫升)
6、阳性参考血清	(生物危险品)	1 瓶(50 微)
7、阴性参考血清		1 瓶(100 微升)
8、反应板	(每板 10 个反应槽)	2 个
9、对比卡片		1 个
10、结果报告单		1 张
11、说明书		1 份

最后进行成品检定。

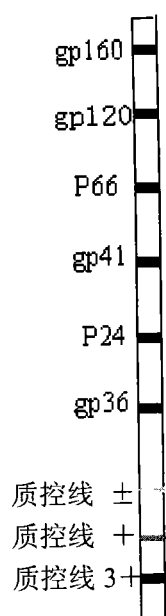


图 1

专利名称(译)	人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂		
公开(公告)号	CN101097216A	公开(公告)日	2008-01-02
申请号	CN200710111406.7	申请日	2007-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	曹健荣 张志		
申请(专利权)人(译)	曹健荣 张誌		
当前申请(专利权)人(译)	曹健荣 张誌		
[标]发明人	曹健荣 张誌 王宇帆 王建丽 张海燕		
发明人	曹健荣 张誌 王宇帆 王建丽 张海燕		
IPC分类号	G01N33/543 G01N21/78 G01N33/549 G01N33/53		
代理人(译)	王为		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种人类免疫缺陷病毒抗体确认试剂，该诊断试剂采用基因工程重组HIV-I型特异性蛋白gp160、gp120、gp41、p66、p24以及HIV-II型特异性蛋白gp36独立包被的混合纤维素膜、酶结合物及其他组份组成，应用间接法的原理供HIV-I型和HIV-II型抗体确认用。

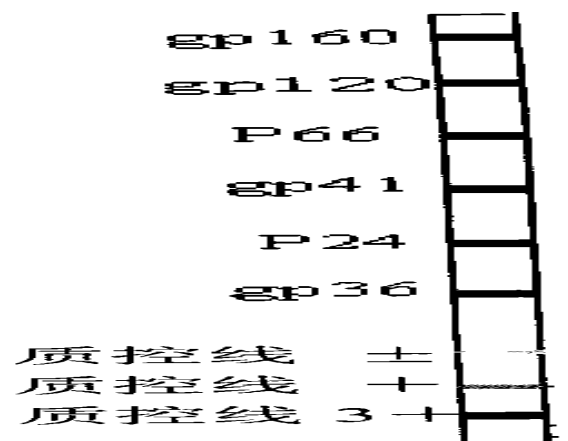


图 1