



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101694495 A

(43) 申请公布日 2010.04.14

(21) 申请号 200910236383.1

G01N 33/543 (2006.01)

(22) 申请日 2009.10.21

G01N 21/76 (2006.01)

(71) 申请人 北京市卫生局肝炎研究所

地址 100069 北京市丰台区右安门外西头条
8 号

(72) 发明人 谢立 官月平 时红波 闫丽

武志明 娄金丽 韩大康 董培玲

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 周国城

(51) Int. Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 5 页

(54) 发明名称

有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球
及制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球及制备方法,涉及诊断试剂技术,是用于磁性免疫体外诊断的试剂,和对人血清中超微量丙肝 NS3 抗原检测的方法。本发明利用亲和素-生物素系统,以超顺磁性微球为载体,合成表面偶联丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性免疫微球,再与被测人血清中丙肝 NS3 抗原和酶标记的丙肝 NS3 单克隆抗体一起恒温反应,磁性分离,洗涤后进行测量。本发明是一种检测丙肝 NS3 抗原的新型免疫反应多级放大系统,其检测步骤少,可在 1 小时内完成;操作简单;成本低;实验条件要求简单;灵敏度高,检测浓度可达到 pg/ml 水平,适合在我国广泛应用。

1. 一种有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球,其特征在于:表面偶联亲和素的超顺磁性微球的外层包覆有已与丙肝 NS3 单克隆抗体偶联的生物素分子;所述亲和素分子与生物素分子有高亲和力,形成牢固结合物;其与生物素分子偶联的丙肝 NS3 单克隆抗体有高免疫活性。

2. 根据权利要求 1 所述的有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球,其特征在于:含有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球的直径为 $0.03 \sim 80 \mu\text{m}$ 。

3. 一种根据权利要求 1 所述的有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球的制备方法,其特征在于:包括步骤:

(1) 取 $50\sim 200 \mu\text{l}$ 表面已偶联亲和素的超顺磁性微球;

(2) 用洗涤液进行洗涤:

a. 将表面已偶联亲和素的超顺磁性微球加入 $400\sim 800 \mu\text{l}$ 洗涤液,并使之分散;

b. 磁性分离,弃上清液;

(3) 加入浓度为 $0.5 \sim 3\text{mg/ml}$ 的已偶联丙肝 NS3 单克隆抗体的生物素溶液,恒温振荡反应;

(4) 磁性分离,弃上清液;

(5) 用相同洗涤液进行洗涤:

a. 每次加入洗涤液 $400\sim 800 \mu\text{l}$,并使之分散;

b. 磁性分离,弃上清液;

c. 用步骤 a)、b) 重复洗 3 次;

d. 加入 $0.5 \sim 2\text{ml}$ 贮存液, 4°C 保存备用。

4. 根据权利要求 3 所述的复合微球的制备方法,其特征在于:所述洗涤液为 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的磷酸盐缓冲液, $\text{PH} = 7.0 \sim 7.6$;或 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, $\text{PH} = 7.0 \sim 7.6$,均含有 0.15M 的 NaCl 和 $0.01 \sim 0.5\%$ 的 Tween-20。

5. 根据权利要求 3 所述的复合微球的制备方法,其特征在于:所述已偶联丙肝 NS3 单克隆抗体的生物素溶液,为 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的磷酸盐缓冲液, $\text{PH} = 7.0 \sim 7.6$;或 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液, $\text{PH} = 7.0 \sim 7.6$,均含有 0.15M 的 NaCl 缓冲液。

6. 根据权利要求 3 所述的复合微球的制备方法,其特征在于:所述贮存液为 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 PBS, $\text{PH} = 7.0 \sim 7.6$,或 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 Tris-HCl, $\text{PH} = 7.0 \sim 7.6$,均加入防腐剂和保护剂;所述防腐剂为 $0.01 \sim 0.2\%$ 的 NaN_3 或者 $0.01 \sim 0.2\%$ 的硫柳汞;所述保护剂为 $0.01 \sim 10\%$ 的 BSA 或者 $0.01 \sim 10\%$ 的动物血清。

7. 根据权利要求 3 所述的复合微球的制备方法,其特征在于:所述第 (3) 步中恒温振荡反应的温度为 $4 \sim 40^\circ\text{C}$,反应时间 $10 \sim 60$ 分钟。

8. 一种使用权利要求 1 所述的有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球检测丙肝 NS3 抗原的方法,其特征在于:包括步骤:

(1) 将试管置于试管架上,设阳性对照试管孔 2 孔,阴性对照试管孔 3 孔,空白对照孔 1 孔;

(2) 在待检样品试管中加入 $10 \sim 50 \mu\text{l}$ 样品稀释液和 $5 \sim 100 \mu\text{l}$ 的待检样品,阳性对照管和阴性对照管中各加入阳性对照和阴性对照 $50 \sim 100 \mu\text{l}$,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2$ 小时;

(3) 上下颠倒混匀已加贮存液的含有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球后,向各管加入 $5 \sim 50 \mu\text{l}$ 该微球,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2$ 小时;

(4) 各管加入 $5 \sim 50 \mu\text{l}$ 已偶联丙肝 NS3 单克隆抗体的酶标记物,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2$ 小时;

(5) 用相同洗涤液洗涤各管至少 2 次:

a. 每次加入洗涤液 $400\sim 800 \mu\text{l}$,并使之分散;

b. 磁性分离,弃上清液;

(6) 各管加入 $50 \sim 200 \mu\text{l}$ TMB 显色液,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $10 \sim 30$ 分钟;

(7) 各管加入 $50 \sim 200 \mu\text{l}$ 终止液,混匀,磁性分离,将上清液移至专用于酶标仪上进行 OD 值测量的酶标板孔中,在酶标仪上用 450nm 和 630nm 进行双波长测定各孔 OD 值。

9. 一种使用权利要求 1 所述的有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球检测丙肝 NS3 抗原的方法,其特征在于:还可采用化学发光法,包括步骤:

(1) 将试管置于试管架上,设阳性对照试管孔 2 孔,阴性对照试管孔 3 孔,空白对照孔 1 孔;

(2) 在待检样品试管中加入 $10 \sim 50 \mu\text{l}$ 样品稀释液和 $5 \sim 100 \mu\text{l}$ 的待检样品,阳性对照管和阴性对照管中各加入阳性对照和阴性对照 $50 \sim 100 \mu\text{l}$,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2$ 小时;

(3) 上下颠倒混匀已加贮存液的含有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球后,向各管加入 $5 \sim 50 \mu\text{l}$ 该微球,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2$ 小时;

(4) 各管加入 $5 \sim 50 \mu\text{l}$ 已偶联丙肝 NS3 单克隆抗体的酶标记物,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2$ 小时;

(5) 用相同洗涤液洗涤各管至少 2 次:

a. 每次加入洗涤液 $400\sim 800 \mu\text{l}$,并使之分散;

b. 磁性分离,弃上清液;

(6) 各管加入 $50 \sim 200 \mu\text{l}$ 化学发光物质 AMPPD;

(7) 用化学发光仪器检测各孔的信号值。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的检测丙肝 NS3 抗原的方法,其特征在于:所述样品稀释液为 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 PBST, $\text{PH} = 5.0 \sim 8.0$,或 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 Tris-HCl, $\text{PH} = 4.0 \sim 7.8$,或 $0.001 \sim 10\text{M}$ 的 CBS, $\text{PH} = 9.0 \sim 11.0$,或 $0.001 \sim 10\text{M}$ 的醋酸盐缓冲液, $\text{PH} = 3.0 \sim 7.0$,或 $0.001 \sim 10\text{M}$ 的柠檬酸缓冲液, $\text{PH} = 3.0 \sim 8.0$;

所述洗涤液为 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 PBST, $\text{PH} = 7.0 \sim 8.0$,或 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 Tris-HCl, $\text{PH} = 7.0 \sim 7.6$;

所述终止液为 $0.01 \sim 4\text{M}$ 的 H_2SO_4 ,或 $0.01 \sim 4\text{M}$ 的 HCl,或 $0.01 \sim 4\text{M}$ 的柠檬酸。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的检测丙肝 NS3 抗原的方法,其特征在于:所述超顺磁性复合微球上偶联的丙肝 NS3 单克隆抗体与酶标记物上偶联的丙肝 NS3 单克隆抗体识别不同的 HCAg-NS3 抗原表位。

有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球及制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及诊断试剂技术领域,属于磁性免疫体外诊断试剂领域,是表面偶联有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球及制备方法,和采用超顺磁性复合微球的双抗体夹心 ELISA 法或化学发光法检测丙肝 NS3 抗原的方法。

背景技术

[0002] 丙型肝炎是由丙型肝炎病毒(HCV)引起的一种严重威胁人类健康的重大流行性传染病。目前 HCV 的检测指标主要是丙肝抗体(抗 HCV)和丙肝核酸(HCV RNA)。

[0003] HCV 感染后到抗 HCV 的检出,平均“窗口期”为 70 天,有的患者“窗口期”可延长至 6~9 个月或更长,约 1~3% 的患者抗 HCV 可持续阴性,甚至终身不产生抗 HCV,因此检测抗 HCV 存在一定的漏检率。

[0004] HCV RNA 是 HCV 复制活跃的可靠指标,在感染 1~2 周内血清中可检测到 HCV RNA,但是检测 HCV RNA 在技术、设备和标本采集方面要求较高,且费时,检出率较低,在检测 HCV RNA 的多步骤实验中容易因污染而出现假阳性,因此限制了 HCV RNA 的检测在常规工作或基层实验室的推广应用。

[0005] 丙肝病毒 NS3 抗原(HCAg-NS3)是 HCV 复制的一个直接标志物,大约感染一周即可检出,其平均检出时间比 HCV RNA 的检出时间晚一天左右,可应用于 HCV 感染患者的早期发现。目前国内还没有检测 HCAg-NS3 的试剂,国外已有公司生产检测 HCV 核心抗原的试剂盒,但是价格昂贵,无法在国内推广使用。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一是提供一种有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球及制备方法,其偶联的丙肝 NS3 单克隆抗体有高免疫活性。

[0007] 本发明的目的之二是提供一种采用有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球检测丙肝 NS3 抗原的方法,能够用于 HCV 感染的早期诊断。

[0008] 为达到上述目的,本发明的技术解决方案是:

[0009] 一种有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球,其表面偶联亲和素的超顺磁性微球的外层包覆有已与丙肝 NS3 单克隆抗体偶联的生物素分子;所述亲和素分子与生物素分子有高亲和力,形成牢固结合物;其与生物素分子偶联的丙肝 NS3 单克隆抗体有高免疫活性。

[0010] 所述的有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球,其含有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球的直径为 $0.03 \sim 80 \mu\text{m}$ 。

[0011] 一种根据权利要求 1 所述的有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球的制备方法,其包括步骤:

[0012] A) 取 $50\text{--}200 \mu\text{l}$ 表面已偶联亲和素的超顺磁性微球;

[0013] B) 用洗涤液进行洗涤;

- [0014] a. 将表面已偶联亲和素的超顺磁性微球加入 400-800 μ l 洗涤液,并使之分散;
- [0015] b. 磁性分离,弃上清液;
- [0016] C) 加入浓度为 0.5 ~ 3mg/ml 的已偶联丙肝 NS3 单克隆抗体的生物素溶液,恒温振荡反应;
- [0017] D) 磁性分离,弃上清液;
- [0018] E) 用相同洗涤液进行洗涤;
- [0019] a. 每次加入洗涤液 400-800 μ l,并使之分散;
- [0020] b. 磁性分离,弃上清液;
- [0021] c. 用步骤 a)、b) 重复洗 3 次;
- [0022] d. 加入 0.5 ~ 2ml 贮存液,4°C 保存备用。
- [0023] 所述的复合微球的制备方法,其所述洗涤液为 0.01 ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲液,PH = 7.0 ~ 7.6;或 0.01 ~ 0.2M 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,PH = 7.0 ~ 7.6,均含有 0.15M 的 NaCl 和 0.01 ~ 0.5% 的 Tween-20。
- [0024] 所述的复合微球的制备方法,其所述已偶联丙肝 NS3 单克隆抗体的生物素溶液,为 0.01 ~ 0.2M 的磷酸盐缓冲液,PH = 7.0 ~ 7.6;或 0.01 ~ 0.2M 的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液,PH = 7.0 ~ 7.6,均含有 0.15M 的 NaCl 缓冲液。
- [0025] 所述的复合微球的制备方法,其所述贮存液为 0.01 ~ 0.2M 的 PBS, PH = 7.0 ~ 7.6,或 0.01 ~ 0.2M 的 Tris-HCl,PH = 7.0 ~ 7.6,均加入防腐剂和保护剂;所述防腐剂为 0.01 ~ 0.2% 的 NaN_3 或者 0.01 ~ 0.2% 的硫柳汞;所述保护剂为 0.01 ~ 10% 的 BSA 或者 0.01 ~ 10% 的动物血清。
- [0026] 所述的复合微球的制备方法,其所述第 (3) 步中恒温振荡反应的温度为 4 ~ 40°C,反应时间 10 ~ 60 分钟。
- [0027] 一种使用所述的有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球检测丙肝 NS3 抗原的方法,其包括步骤:
- [0028] A) 将试管置于试管架上,设阳性对照试管孔 2 孔,阴性对照试管孔 3 孔,空白对照孔 1 孔;
- [0029] B) 在待检样品试管中加入 10 ~ 50 μ l 样品稀释液和 5 ~ 100 μ l 的待检样品,阳性对照管和阴性对照管中各加入阳性对照和阴性对照 50 ~ 100 μ l,混匀,4 ~ 40°C 反应 0.5 ~ 2 小时;
- [0030] C) 上下颠倒混匀已加贮存液的含有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球后,向各管加入 5 ~ 50 μ l 该微球,混匀,4 ~ 40°C 反应 0.5 ~ 2 小时;
- [0031] D) 各管加入 5 ~ 50 μ l 已偶联丙肝 NS3 单克隆抗体的酶标记物,混匀,4 ~ 40°C 反应 0.5 ~ 2 小时;
- [0032] E) 用相同洗涤液洗涤各管至少 2 次;
- [0033] a. 每次加入洗涤液 400-800 μ l,并使之分散;
- [0034] b. 磁性分离,弃上清液;
- [0035] F) 各管加入 50 ~ 200 μ l TMB 显色液,混匀,4 ~ 40°C 反应 10 ~ 30 分钟;
- [0036] G) 各管加入 50 ~ 200 μ l 终止液,混匀,磁性分离,将上清液移至专用于酶标仪上进行 OD 值测量的酶标板孔中,在酶标仪上用 450nm 和 630nm 进行双波长测定各孔 OD 值。

[0037] 一种使用所述的有丙肝 NS3 单克隆抗体超顺磁性复合微球检测丙肝 NS3 抗原的方法,其还可采用化学发光法,包括步骤:

[0038] (1) 将试管置于试管架上,设阳性对照试管孔 2 孔,阴性对照试管孔 3 孔,空白对照孔 1 孔;

[0039] (2) 在待检样品试管中加入 $10 \sim 50 \mu\text{l}$ 样品稀释液和 $5 \sim 100 \mu\text{l}$ 的待检样品,阳性对照管和阴性对照管中各加入阳性对照和阴性对照 $50 \sim 100 \mu\text{l}$,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2$ 小时;

[0040] (3) 上下颠倒混匀已加贮存液的含有丙肝 NS3 单克隆抗体的超顺磁性复合微球后,向各管加入 $5 \sim 50 \mu\text{l}$ 该微球,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2$ 小时;

[0041] (4) 各管加入 $5 \sim 50 \mu\text{l}$ 已偶联丙肝 NS3 单克隆抗体的酶标记物,混匀, $4 \sim 40^\circ\text{C}$ 反应 $0.5 \sim 2$ 小时;

[0042] (5) 用相同洗涤液洗涤各管至少 2 次;

[0043] a. 每次加入洗涤液 $400\sim 800 \mu\text{l}$,并使之分散;

[0044] b. 磁性分离,弃上清液;

[0045] (6) 各管加入 $50 \sim 200 \mu\text{l}$ 化学发光物质 AMPPD;

[0046] (7) 用化学发光仪器检测各孔的信号值。

[0047] 所述的检测丙肝 NS3 抗原的方法,其所述样品稀释液为 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 PBST, $\text{PH} = 5.0 \sim 8.0$,或 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 Tris-HCl, $\text{PH} = 4.0 \sim 7.8$,或 $0.001 \sim 10\text{M}$ 的 CBS, $\text{PH} = 9.0 \sim 11.0$,或 $0.001 \sim 10\text{M}$ 的醋酸盐缓冲液, $\text{PH} = 3.0 \sim 7.0$,或 $0.001 \sim 10\text{M}$ 的柠檬酸缓冲液, $\text{PH} = 3.0 \sim 8.0$;

[0048] 所述洗涤液为 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 PBST, $\text{PH} = 7.0 \sim 8.0$,或 $0.01 \sim 0.2\text{M}$ 的 Tris-HCl, $\text{PH} = 7.0 \sim 7.6$;

[0049] 所述终止液为 $0.01 \sim 4\text{M}$ 的 H_2SO_4 ,或 $0.01 \sim 4\text{M}$ 的 HCl,或 $0.01 \sim 4\text{M}$ 的柠檬酸。

[0050] 所述的检测丙肝 NS3 抗原的方法,其所述超顺磁性复合微球上偶联的丙肝 NS3 单克隆抗体与酶标记物上偶联的丙肝 NS3 单克隆抗体识别不同的 HCAg-NS3 抗原表位。

[0051] 本发明具有的优点是:

[0052] 1、采用亲和素-生物素放大系统,大大提高了检测灵敏度。

[0053] 2、采用生物素标记的丙肝 NS3 单抗,在低温下可较长时间保存。

[0054] 3、采用超顺磁性微球增大了其表面丙肝 NS3 单抗的偶联量,加快了免疫反应速度,反应产物又容易磁性分离,进一步大幅度提高了检测灵敏度。

[0055] 4、采用两株识别不同 HCAg-NS3 抗原表位的丙肝 NS3 单克隆抗体分别偶联磁性微球和酶,可明显降低或避免可能存在的非特异性反应,使 HCAg-NS3 的检测有很好的特异性。

[0056] 5、本发明的检测对象是人血清中 HCAg-NS3 抗原,较人血清中 HCV RNA 稳定,按常规静脉穿刺采集血样,分离血清即可,与 HCV RNA 的检测比较,有较低的假阳性率和假阴性率。

[0057] 6、本发明的试剂性质稳定,可以批量生产应用。

具体实施方式

[0058] 本发明的原理:

[0059] 1、利用亲和素与生物素之间有很高反应亲和力,将丙肝 NS3 单抗通过先与生物素偶联再进一步偶联在磁性微球表面,制备磁性免疫微球 (MIB)。

[0060] 2、待检样品与磁性免疫微球在 37℃ 反应,若待检样品中含有 HCAg-NS3,则将与 MIB 表面的丙肝 NS3 单抗进行特异性免疫反应,被捕获在 MIB 表面。

[0061] 3、加入酶标记的丙肝 NS3 另一株单抗,将与 MIB 表面的 HCAg-NS3 进行特异性免疫反应,形成抗体-抗原-抗体三明治夹心复合物,通过洗涤除去游离的未参与反应的抗原、抗体等其他杂质。

[0062] 4、加入显色液 A、B 或化学发光底物,在三明治夹心复合物中的酶的催化作用下,产生的有色产物在波长 450nm 处有最高吸收峰,可用酶标仪进行测量或用化学发光检测仪检测产生的光学信号。测量值与被检 HCAg-NS3 的浓度成正相关。

[0063] 实施例:

[0064] 1、偶联丙肝 NS3 单抗磁性免疫微球的制备及保存:

[0065] 取 100 μ l 已偶联亲和素的磁性微球于 2ml 离心管中,磁性分离,弃上清,每次用洗涤液 (0.02M Tris-HCl, 含 0.02% Tween 20, PH = 7.4) 300 μ l 洗涤,至少洗 2 次后,磁性分离,弃上清液,加入 200 μ l 浓度为 1mg/ml 的生物素化丙肝 NS3 单抗,混匀,室温振荡反应 20 ~ 30 分钟,振荡速度为 180rpm。磁性分离,弃上清液,用上述洗涤液洗 3 次,加入 0.5 ~ 2ml 贮存液 (0.2M PBS, 含 10% BSA, PH = 7.4),置 4℃ 保存备用。

[0066] 2、血清中 HCAg-NS3 的检测:

[0067] 各试管中分别加入 50 μ l 样品稀释液 (0.02M PBS, 含 0.1% Tween 20, PH = 7.4),再加入 50 μ l 待检样品,阳性对照孔中加入 50 μ l 基因工程 HCAg-NS3 溶液 (缓冲液为 0.1M PBS),阴性对照孔中加入 50 μ l 正常人血清,空白孔中不加样品稀释液。混匀,37℃ 反应 15 分钟后取出,各试管分别加入 20 μ l 磁性免疫微球 (空白孔不加),混匀,37℃ 反应 15 分钟后取出,各试管分别加入 50 μ l 酶标丙肝 NS3 单抗 (空白孔不加),混匀,37℃ 反应 15 分钟,磁性分离,弃上清液,每管加入 400 μ l 洗涤液 (0.02M Tris-HCl, 含 0.02% Tween 20, PH = 7.4),磁性分离,弃上清液,如此洗 3 次。每试管中分别加入 50 μ l 显色液 A 和 50 μ l 显色液 B,混匀后置 37℃ 避光反应 5 分钟,每试管中均加入 100 μ l 2M H₂SO₄ 进行终止,磁性分离 2 分钟,取各试管上清液 100 μ l 移至酶标孔中,用酶标仪在波长 450nm 处测量各孔的 OD 值 (参考波长为 630nm)。

[0068] 3、血清中 HCAg-NS3 的检测还可采用化学发光法:

[0069] 各试管中分别加入 50 μ l 样品稀释液 (0.02M PBS, 含 0.1% Tween 20, PH = 7.4),再加入 50 μ l 待检样品,阳性对照孔中加入 50 μ l 基因工程 HCAg-NS3 溶液 (缓冲液为 0.1M PBS),阴性对照孔中加入 50 μ l 正常人血清,空白孔中不加样品稀释液。混匀,37℃ 反应 15 分钟后取出,各试管分别加入 20 μ l 磁性免疫微球 (空白孔不加),混匀,37℃ 反应 15 分钟后取出,各试管分别加入 50 μ l 酶标丙肝 NS3 单抗 (空白孔不加),混匀,37℃ 反应 15 分钟,磁性分离,弃上清液,每管加入 400 μ l 洗涤液 (0.02M Tris-HCl, 含 0.02% Tween 20, PH = 7.4),磁性分离,弃上清液,如此洗 3 次。各管加入 200 μ l 化学发光物质 AMPPD,用化学发光检测仪检测产生的光学信号。

[0070] 参见表 1,是生物素标记的丙肝 NS3 单抗溶液在偶联亲和素磁性微球前后在波长 280nm 处吸光度值的变化。

[0071] 表 1 数据显示本发明中制备的亲素磁性免疫微球对生物素化丙肝 NS3 单抗有较高的偶联效率。

[0072] 参见表 2, 是运用双抗体夹心 ELISA 法检测 HCAg-NS3 的血清标本与阳性对照和阴性对照以及空白孔的 OD 值。

[0073] 表 2 数据显示本发明中制备的试剂阴性对照孔和阳性对照孔存在明显的差别, 标本检测结果与验证实验 HCVRNA 的检测结果一致, 均为阳性, 表明本发明可用于检测血清标本中的 HCAg-NS3。

[0074] 本发明中所用两株丙肝 NS3 单抗和基因工程 HCAg-NS3 抗原均为自行制备, 亲素化磁性微球为商品化的产品。

[0075] 表 1 亲素磁性微球与生物素化丙肝 NS3 单抗的偶联

[0076]

生物素化抗 HCV 溶液吸光度值 (280nm)		偶联效率 (%)
偶联前	偶联后	
0.346	0.075	78.3

[0077] 注: 1. 偶联前生物素化抗 HCV 溶液用 0.1M PBS (PH = 7.4) 稀释 5 倍后测得 280nm 处吸光度值为 0.346。

[0078] 2. 偶联后上清液用 0.1M PBS (PH = 7.4) 稀释 5 倍后测得 280nm 处吸光度值为 0.075。

[0079] 3. 溶液中蛋白浓度计算公式为: $0.625 \times \text{吸光度值} \times \text{样品稀释倍数}$ 。

[0080]

$$4. \text{偶联效率} = \frac{\text{偶联前蛋白浓度} - \text{偶联后蛋白浓度}}{\text{偶联前蛋白浓度}} \times 100\%$$

[0081] 表 2 血清标本 HCAg-NS3 检测结果

[0082]

	阳性对照 2 孔均值	阴性对照 3 孔均值	空白孔	标本
OD 值	0.583	0.018	0.006	2.175
HCVRNA				+

专利名称(译)	有丙肝NS3单克隆抗体的超顺磁性复合微球及制备方法		
公开(公告)号	CN101694495A	公开(公告)日	2010-04-14
申请号	CN200910236383.1	申请日	2009-10-21
[标]发明人	谢立 官月平 时红波 闫丽 武志明 姜金丽 韩大康 董培玲		
发明人	谢立 官月平 时红波 闫丽 武志明 姜金丽 韩大康 董培玲		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/576 G01N33/531 G01N33/543 G01N21/76		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种有丙肝NS3单克隆抗体的超顺磁性复合微球及制备方法，涉及诊断试剂技术，是用于磁性免疫体外诊断的试剂，和对人血清中超微量丙肝NS3抗原检测的方法。本发明利用亲和素-生物素系统，以超顺磁性微球为载体，合成表面偶联丙肝NS3单克隆抗体的超顺磁性免疫微球，再与被测人血清中丙肝NS3抗原和酶标记的丙肝NS3单克隆抗体一起恒温反应，磁性分离，洗涤后进行测量。本发明是一种检测丙肝NS3抗原的新型免疫反应多级放大系统，其检测步骤少，可在1小时内完成；操作简单；成本低；实验条件要求简单；灵敏度高，检测浓度可达到pg/ml水平，适合在我国广泛推广应用。

生物素化抗 HCV 溶液吸光度值 (280nm)		偶联效率 (%)
偶联前	偶联后	
0.346	0.075	78.3