

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510071806.0

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

[43] 公开日 2006年4月5日

[11] 公开号 CN 1755365A

[22] 申请日 2005.5.24

[21] 申请号 200510071806.0

[30] 优先权

[32] 2004.9.29 [33] CN [31] 200410009616.1

[71] 申请人 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

[72] 发明人 张贺秋 宋晓国 陈坤 王国华
凌世淦

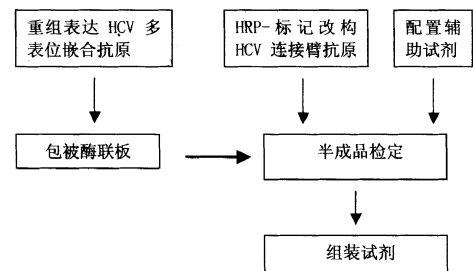
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

[54] 发明名称

一种检测丙型肝炎病毒抗体的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种采用酶联免疫技术检测丙型肝炎病毒抗体的方法，还公开了该方法中采用的丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原与酶标记连接臂。本发明的检测方法包括丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原的制备，嵌合抗原与酶标记连接臂的制备，嵌合抗原标记辣根过氧化物酶复合物的制备，嵌合抗原包被酶联板检测板，加入待测抗体及酶标记抗原复合物等步骤。本发明的方法特异性强、敏感性高，重复性好、早期检测，用于检测丙肝病毒抗体可获得满意的结果，可广泛用于献血员筛选和临床诊断。



1. 一种检测丙型肝炎病毒抗体的方法，包括如下步骤：
 - (1) 丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原的制备；
 - (2) 丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原与酶标记连接臂的制备；
 - (3) 丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原标记辣根过氧化物酶；
 - (4) 用丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原包被酶联免疫检测板；
 - (5) 加入待测抗体和(3)所制备的酶标抗原；
 - (6) 加入显色剂，酶底物显色；
 - (7) 终止显色反应，测定光密度，根据光密度判断结果。
2. 根据权利要求1所述方法，其特征在于所述丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原的制备包括如下步骤：
 - (1) 确定抗原性强的HCV不同区段抗原的氨基酸位置；
 - (2) 分别合成基因，构建pBVIL-1载体，并将抗原连接成多表位嵌合抗原；
 - (3) 在*E. coli*中以包涵体形式表达HCV多表位抗原；
 - (4) 通过离子交换层析纯化，SDS-PAGE鉴定纯度。
3. 根据权利要求2所述的方法，其中抗原性强的HCV不同区段抗原的氨基酸位置为HCV-C:10-53aa；NS3:1192-1457aa；NS4:1916-1947aa。
4. 根据权利要求1所述方法，其特征在于丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原与酶标记连接臂的制备包括如下步骤：
 - (1) 合成引物，进行PCR扩增，获得基因片段；
 - (2) 酶切基因片段，插入到载体中，制备表达质粒；
 - (3) 转化大肠杆菌，进行表达，提取包涵体，进行纯化。

5. 根据权利要求4所述方法，其中所合成的引物的核苷酸序列如序列表中序列1—6所示。

6. 根据权利要求4所述方法，其中的载体为 pIL1。

7. 根据权利要求1所述方法，其中丙型肝炎病毒多表抗位嵌合抗原标记辣根过氧化物酶包括如下步骤：

- (1) 辣根过氧化物酶 (HRP) 活化；
- (2) 丙型肝炎病毒多表抗位嵌合抗原 (HCVAg) 活化；
- (3) 脱盐；
- (4) 结合；
- (5) 终止；
- (6) 保存。

一种检测丙型肝炎病毒抗体的方法

技术领域

本发明涉及一种检测丙型肝炎病毒抗体的方法，具体地说涉及一种采用酶联免疫技术检测丙型肝炎病毒抗体的方法，还涉及该方法中所采用的丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原与酶标记连接臂。

背景技术

丙型肝炎病毒 (Hepatitis C virus, HCV) 是引起输血后病毒性非甲非乙型肝炎的主要病原，主要通过输血、静脉吸毒传播，也可通过密切接触和母婴传播。目前全世界约有 1.7 亿 HCV 感染者。受感染者中约有一半可发展为慢性肝炎，进而部分可发展成为肝硬化和肝细胞性肝癌。由于目前还没有确实有效的治疗方法和疫苗以防止其进一步传播，因此危害极大。据最近报道，仅美国每年约有 5 万 HCV 新感染病例发生，全球每年约有 25120 万人新发肝癌病人，除 HBV 感染外，HCV 是引起肝细胞肝癌的主要致病因素之一。

一般地，15~20%左右的 HCV 感染者为自限性感染，可以很快的康复。但是，也有 80~85%的感染者发展为慢性丙型肝炎，其中又有 20%的可发展为肝纤维化，最终有 4~5%的肝纤维化患者发生肝细胞性肝癌，危害十分严重。

目前，慢性丙型肝炎除了干扰素有确切的疗效外，尚无其它有效的治疗药物。国际上近来报道，PEG 修饰的干扰素加利巴韦林联合治疗可在 40~50%左右的患者获得较好的反应，但也有疗程长、价格昂贵、毒副作用大以及易

反弹等缺点。此外，丙型肝炎疫苗的研制也因 HCV 高度变异而困难重重，短期内难有突破性进展。因此，尽早检出 HCV 感染者，阻断 HCV 的传播是当务之急。

HCV 检测技术的现状

HCV 一般通过被 HCV 污染的血液和血液制品传播，现在常用的 HCV 检测技术有两种方式：（1）间接检测，主要检测抗 HCV 抗体和抗原；（2）直接检测，通过定性或定量检测 HCV 病毒粒子的组成成分确定病毒的存在，例如 HCV RNA。这两种检测方式在确诊 HCV 感染，选择 HCV 感染者的治疗方案以及评价抗 HCV 治疗的疗效方面起到了关键作用。

上世纪九十年代初，利用重组 HCV 抗原开发出了抗 HCV 抗体检测技术，即酶免疫分析（enzyme immunoassays, EIAs）技术，已经发展到第三代。该技术可检测样本中针对不同 HCV 抗原（如 C 区、NS3 区、NS4 区和 NS5 区等）的混合抗体，目前检测的特异性已高达 99%以上。

第一代试剂：使用 HCV-C100（511）为抗原，应用间接法原理检测 HCV 抗体。第二代试剂：使用基因工程表达重组或化学合成多肽（HCV-C, NS3 NS4）HCV 抗原，应用间接 ELISA 法原理检测 HCV 抗体，特异性和敏感性高于第一代试剂。第三代试剂：使用基因工程表达重组 HCV 抗原（HCV-C, NS3, NS4, NS5）用间接 ELISA 法原理检测 HCV 抗体。

1993 年 3 月，国家卫生部下发文件要求对献血员 HCV 抗体的检测，随后有十几家检测 HCV 抗体的 ELISA 试剂上市，并进行批批检定。但全是间接 ELISA 法，但由于间接法技术自身的缺陷及各生产厂家的产品存在一定的质量问题，导致了一些误诊和漏检，从而造成了不良的社会影响和社会一定的危害。为此，应从根本上解决试剂本身的质量问题。

目前，双抗原夹心法成功用于检测抗 HIV 和 Tp 抗体，此类试剂的敏感性和特异性均优于标记抗人免疫球蛋白的间接法。而丙型肝炎病毒抗体的检测仍采用间接 ELISA 技术，主要由于过氧化物酶直接标记丙型肝炎病毒抗原，其灵敏度达不到要求，尤其是标记丙型肝炎病毒核心抗原后使抗原活性降低。但国内外有快速金标试剂采用双抗原夹心法原理，通过免疫层析检测抗 HCV 抗体。但灵敏度较低，不能用于献血员的筛选。

发明内容

为解决目前对 HCV 抗体检测中特异性和敏感性的问题，本发明公开了一种采用双抗原夹心 ELISA 技术检测抗 HCV 抗体的方法。本发明在多原表位 HCV 嵌合抗原的基础上，以不同连接方式融合上 4 个赖氨酸（4K），用于标记辣根过氧化物酶（HRP）的连接臂；本发明改进了抗原标记辣根过氧化物酶（HRP）工艺，并建立双抗原夹心（ELISA）检测丙型肝炎病毒抗体方法。

本发明的方法包括如下步骤：

一. 丙型肝炎病毒多表抗位嵌合抗原与酶标记连接臂的制备：

首先制备丙型肝炎病毒多表抗位嵌合抗原：用 Goldkey 计算机辅助软件对 HCV 抗原表位进行分析。确定抗原性强的 HCV 不同区段抗原的氨基酸位置（分别为 HCV-C：10-53aa；NS3：1192-1457aa；NS4：1916-1947aa；），分别合成基因，构建 pBVIL-1 载体，并将抗原连接成多表位嵌合抗原，在 *E. coli* 中以包涵体形式表达 HCV 多表位抗原（HCV-C、NS3、NS4），通过离子交换层析纯化，SDS-PAGE 鉴定纯度。

然后，在上述克隆表达的 HCV 融合抗原基础上，分别在抗原的 5' 端、3' 端及中间引入酶标记连接臂即 4 个赖氨酸（4K）。

首先合成引物，引物序列见序列表中序列 1—6。然后以 pIL1a-NS₄CNS₃ 质粒为模板，进行 PCR 扩增，获得基因片段，酶切后分别插入到载体中，得到表达质粒。

以 pIL1-HCV/C 质粒为模板，用 F3/R3 引物进行 PCR 扩增，获得基因片段，再以 EcoR I、BamH I 双酶切后，插入到 pIL1 载体中，得到表达质粒 pIL1-4K+HCV/C，利用 pIL1 可将多个目的基因方便连接的特点，把 pIL1-HCV/NS₄、pIL1-4K+HCV/C、pIL1-HCV/NS₃ 连接，构建成 pIL1-NS₄-4KC-NS₃ 表达质粒。

将以上获得的三个表达质粒转化到大肠杆菌受体菌中，进行高效表达，提取包涵体，用过 Q-Sepharose-FF 阴离子交换柱、S-Sepharose-FF 阳离子交换柱、凝胶过滤柱等进行层析，SDS-PAGE 鉴定，Lowy 法测定蛋白含量，冰冻干燥，-25℃保存。

二、丙型肝炎病毒多表抗位嵌合抗原标记辣根过氧化物酶的制备：

(7) HRP 活化：辣根过氧化物酶(HRP)加 SMPB 轻微搅拌。

(8) 抗原活化：二硫苏糖醇(DTT)活化丙型肝炎病毒多表抗位嵌合抗原(HCVAg)轻微搅拌。

(9) 脱盐：对上述活化的抗原和 HRP 脱盐。

(10) 结合：脱盐后的抗原和 HRP 结合。

(11) 终止：加碘乙酰胺轻微搅拌。

(12) 保存：分装，-20℃保存。

三、双抗原夹心法检测丙肝病毒抗体

1、双抗原夹心检测丙型肝炎病毒抗体的基本原理：

丙型肝炎病毒抗体的酶联检测试剂(双抗原夹心)：用丙型肝炎病毒表位嵌

合抗原包被酶联板，加入待测样品及酶标记的型肝炎病毒表位嵌合抗原，如样品中存在抗体，形成抗原抗体复合物，洗涤后，酶底物显色，测定光密度，根据光密度判断结果。

2、检测丙型肝炎病毒抗体方法的研究程序：见附图 1。

3、检测丙型肝炎病毒抗体试剂盒组成：包括 HCV 抗原包被酶联板；HCV 抗体阳性对照血清；HCV 抗体阴性对照血清；酶结合物；显色剂 A；显色剂 B；终止液；洗涤液等。

4、操作程序：

(1) 取出干包酶联板，每孔加待测样品；加入酶标记抗原结合物，阴阳性对照加双孔，空白孔不加任何试剂，混匀后水浴。

(2) 用洗涤液洗板，最后一次拍干。

(3) 洗板同 2。

(4) 先加入显色剂 A 液，再加入显色剂 B 液，避光显色。

(5) 每孔加终止液。

5、结果判定：

(1) 仪器测定：以酶联仪 450nm 测定各孔 OD 值(减去空白对照计算)阳性对照 OD >0.8 ，阴性对照 OD <0.10 试剂盒有效，终止后 10 分钟以内测 OD 值。

(2) 临界值：阴性对照平均 OD 值+0.05。若阴性对照 OD 值 <0.05 时，按 0.05 计算；若 >0.05 ，按实际 OD 值计算。

按连接方式分为四组，其中

A: 5' -KKKK-NS3-C-NS4; B: NS3-C-NS4- KKKK-3'; C: 5' -KKKK-NS3-C-NS4-KKKK-3'; D: NS3-KKKK-C-NS4

四种不同连接方式多表位嵌合抗原标记辣根过氧化物酶双抗原夹心检测丙型肝炎病毒抗体的活性测定结果表明四组不同连接方式与 HCV 血清反应性明显差别, A 组连接方式与 HCV 血清反应性好于 B、C、D 组。用 A 组标记 HRP, 用于双抗原夹心检测丙型肝炎病毒抗体。

HRP 标记改构抗原双抗原夹心法对国家第三代标准血清检测结果表明: 双抗原夹心 ELISA 技术检测抗 HCV 抗体可大大提高检测试剂的特异性和敏感性。

研制双抗原夹心 ELISA 检测抗 HCV 抗体比间接法有以下优点:

(1) 抗原夹心法可同时检测 HCV 感染者的所有型别的 IgG 亚型和 IgM, 可早期诊断。间接法仅能捕获 IgG, 不能捕获 IgM。并且二抗使用抗人 IgG 酶标记抗体, 仅发生一次抗原抗体特异性反应, 对有些 IgG 的亚型或 IgM 常造成漏检; (2) 双抗原夹心对抗体进行二次特异性反应, 降低间接法的仅一次特异性反应的酶标抗体引起的假阳性。

本发明的方法特异性强、敏感性高, 重复性好、早期检测、可检测 IgG 亚型和 IgM 亚型, 用于检测丙肝病毒抗体可获得满意的结果, 可广泛用于献血员筛选和临床诊断。

附图说明

图 1 为检测丙型肝炎病毒抗体方法的研究程序示意图。

具体实施方式

实施例一 丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原与酶标记连接臂的制备

一. 材料:

pIL1 载体及 pIL1a-NS₄CNS₃ 质粒：已经申请中国专利并获得授权，专利号：ZL00100695.9，专利名称：“表达载体 PBVIL1 及其构建方法和用途”，并已经进行保藏，保藏号：CGMCC No:0437。

pIL1-HCV/C 质粒：

E. coli HB101：

Q-Sepharose- FF 阴离子交换柱：

S-Sepharose- FF 阳离子交换柱：

辣根过氧化物酶 (HRP)：

SMPB：

二硫苏糖醇 (DTT)：

HCV-Ag：

碘乙酰胺：

酶联仪：

EcoR I、 BamH I 酶：

二、方法结果：

1. 丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原的研制：

用 Goldkey 计算机辅助软件对 HCV 抗原表位进行分析。确定了抗原性强的 HCV 不同区段抗原的氨基酸位置（分别为 HCV-C：10-53aa；NS3：1192-1457aa；NS4：1916-1947aa；），分别合成基因，构建 pBVIL-1 载体，并将抗原连接成多表位嵌合抗原，在 E. coli 中以包涵体形式表达 HCV 多表位抗原（HCV-C、NS3、NS4），通过离子交换层析纯化，SDS-PAGE 鉴定纯度。具体操作过程参见文献(1)。宋晓国，凌世淦，张贺秋，陈坤。重组丙型肝炎病毒抗原的研究。军事医学科学院院刊；2001；25(2)：91-95。(2)。宋晓国，凌世淦，

张贺秋, 陈坤. 高效原核融合表达载体 (pBVIL1) 的构建及在 HCV 表达中的应用. 细胞与分子免疫学杂志; 2001; 17(3): 231-233.)。

在上述克隆表达的 HCV 融合抗原基础上, 分别在抗原的 5' 端、3' 端及中间引入酶标记连接臂即 4 个赖氨酸 (4K), 首先合成下列引物:

- 1、F₁ GC GAATTC ATG AAAAAAAAAAAA GCACCTGTACGATCACTG
EcoR I 4K IL1 5' 端
- 2、R₁ GC GGATCC TTA ACACGTATTGCAGTCTAT
BamH I 止 NS3 3' 端
- 3、F₂ 5' GC GAA TTC ATG GCA CCT GTA CGA TC
EcoR I IL1 5' 端
- 4、R₂ GCGGATCC TTA CTTCTTCTTCTT ACACGTATTGCAGTCTAT
BamH I 止 4 K NS3
- 5、F₃ 5' GC ACT AGT AAA AAA AAA AAA GAG GGT GGA TCT
Spe I KKKK 通用连接臂
- 6、R₃: 5' CGC GGA TCC TTA GGA AGA CAC AAA
BamH I IL1

以 pIL1a-NS₄CNS₃ 质粒为模板 (由军事医学科学院基础医学研究所疫苗工程研究室构建与保存), 分别用 F1/R1、F2/R2、F3/R3 引物进行 PCR 扩增, 获得三个基因片段, 再以 EcoR I、BamH I 双酶切后, 分别插入到 pIL1 载体中, 得到三个表达质粒 pIL1a/4K-NS₄-CNS₃、pIL1a/NS₄-C-NS₃-4K、pIL1a/4K-NS₄-C-NS₃-4K。

以 pIL1-HCV/C 质粒为模板, 用 F3/R3 引物进行 PCR 扩增, 获得基因片段, 再以 EcoR I、BamH I 双酶切后, 插入到 pIL1 载体中, 得到表达质粒 pIL1-4K+HCV/C, 利用 pIL1 可将多个目的基因方便连接的特点, 把 pIL1-HCV/NS₄、pIL1-4K + HCV/C、pIL1-HCV/NS₃ 连接, 构建成 pIL1-NS₄-4KC-NS₃ 表达质粒,

将以上获得的三个表达质粒转化到 E. coli HB101 受体菌中，进行高效表达，提取包涵体，用过 Q-Sepharose- FF 阴离子交换柱、S-Sepharose- FF 阳离子交换柱、凝胶过滤柱进行层析， SDS-PAGE 鉴定，Lowy 法测定蛋白含量，冰冻干燥，-25℃保存。

实施例二 丙型肝炎病毒多表抗位嵌合抗原标记辣根过氧化物酶的制备

一、材料：同实施例一。

二、方法结果：

- (1) HRP 活化：1ml (10mg HRP+1mlPBS PH7.6) 辣根过氧化物酶(HRP)，加 100 μ l SMPB 18-20℃轻微搅拌 20 分钟。
- (2) 抗原活化：DTT 活化丙型肝炎病毒多表抗位嵌合抗原(HCVAg) :5mg HCVAg 加 115 μ l (30.9mg/ml) 二硫苏糖醇(DTT) 18-20℃轻微搅拌 20 分钟。
- (3) 脱盐：用 PD-10 脱盐柱分别对上述活化的抗原和 HRP 脱盐，收集的体积各 1.5ml。
- (4) 结合：脱盐后的抗原和 HRP 结合 18-20℃轻微搅拌 45 分钟。
- (5) 终止：加 40 μ l 0.1M 碘乙酰胺 37℃轻微搅拌 30 分钟。
- (6) 保存：分装 100 μ l/支, -20℃保存。

实施例三 双抗原夹心法检测丙肝病毒抗体

一、材料：同实施例一。

二、方法结果：

- 1、将纯化的丙型肝炎病毒多表位融合抗原，用 0.05M pH9.6 的碳酸盐缓

冲液稀释到 $0.33\mu\text{g}/\text{ml}$, $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 包被酶联测定板, 用缓冲液洗板 2 次, 3% BSA 封闭 2 小时, 室温晾干备用。酶标记 4 种不同连接臂的丙型肝炎病毒多表位融合抗原, 用特殊专用的酶标记抗原稀释液将标记抗原分别稀释成 1:2000 倍 4°C 备用。对 4 份丙型肝炎病毒抗体阳性和 4 份阴血清分别进行测定。

2、检测丙型肝炎病毒抗体方法的研究程序: 见附图 1。

3、试剂盒组成:

- (1) HCV 抗原包被酶联板 1 块
- (2) HCV 抗体阳性对照血清 2ml 1 瓶
- (3) HCV 抗体阴性对照血清 2ml 1 瓶
- (4) 酶结合物 12ml 1 瓶
- (5) 显色剂 A 6ml 1 瓶
- (6) 显色剂 B 6ml 1 瓶
- (7) 终止液 6ml 1 瓶
- (8) 洗涤液 50ml 1 瓶(20×浓缩)

4、操作程序:

(1) 取出干包酶联板, 每孔加 $50\mu\text{l}$ 待测样品; 加入 $100\mu\text{l}$ 酶标记抗原结合物, 阴阳性对照加双孔, 各加 $100\mu\text{l}$, 空白孔不加任何试剂, 混匀后 37°C 水浴 60 分钟。

(2) 用 1:20 稀释后的洗涤液洗板 5 次, 最后一次拍干。

(3) 洗板同 2。

(4) 先加入显色剂 A 液 $50\mu\text{l}$, 再加入显色剂 B 液 $50\mu\text{l}$, 37°C 水浴避光显色 20 ± 2 分钟。

(5) 每孔加 $50\mu\text{l}$ 终止液。

5、结果判定：

(1) 仪器测定：以酶联仪 450nm 测定各孔 OD 值(减去空白对照计算)阳性对照 OD> 0.8，阴性对照 OD<0.10 试剂盒有效，终止后 10 分钟以内测 OD 值。

(2) 临界值：阴性对照平均 OD 值+0.05。若阴性对照 OD 值<0.05 时，按 0.05 计算；若>0.05，按实际 OD 值计算。

表 1 四种不同连接方式多表位嵌合抗原标记辣根过氧化物酶双抗原夹心检测丙型肝炎病毒抗体的活性测定结果

标记抗原种类	测 定 结 果							
	P1	P2	P3	P4	N1	N2	N3	N4
A	1.238	1.096	2.259	0.275	0.047	0.051	0.079	0.046
B	0.618	0.656	1.507	0.089	0.042	0.058	0.066	0.052
C	1.459	1.234	2.330	0.191	0.052	0.052	0.081	0.054
D	0.402	0.294	0.583	0.066	0.042	0.054	0.065	0.047

A: 5' -KKKK-NS3-C-NS4;

B: NS3-C-NS4- KKKK-3';

C: 5' -KKKK -NS3-C-NS4-KKKK-3';

D: NS3-KKKK-C-NS4

结果证实：四组不同连接方式与 HCV 血清反应性明显差别，A 组连接方式与 HCV 血清反应性好于 B、C、D 组。用 A 组标记 HPR，用于双抗原夹心检测丙型肝炎病毒抗体。

表 2 HRP 标记改构抗原双抗原夹心对国家第三代标准血清检测结果

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	0.005	0.076	0.071	0.083	0.093	0.081	0.274	1.201	0.129	0.149	0.970
B	0.005	0.076	0.077	0.080	0.074	0.096	3.414	0.217	0.130	0.209	0.164
C	0.054	0.091	0.080	0.077	0.080	0.098	0.323	0.333	0.159	0.162	0.140
D	0.053	0.080	0.089	0.088	0.075	0.101	0.736	0.116	0.481	0.181	0.144
E	0.005	0.072	0.083	0.088	0.070	0.076	0.177	0.391	1.711	0.447	0.115
F	0.005	0.068	0.078	0.077	0.094	0.072	0.119	0.106	0.155	3.317	0.506
G	2.008	0.077	0.073	0.078	0.071	0.077	0.764	0.274	0.191	0.135	0.313
H	2.015	0.082	0.076	0.076	0.105	0.076	0.274	0.183	0.186	0.176	0.101

- A1、B1、E1、F1 为空白孔，C1、D1 为阴性对照，G1、H1 为阳性对照；
- A2、B2-H6 为 1~40 号阴性标准血清；A7、B7-H11 为 1~40 号阳性标准血清。
Cutoff=0.102

序列表

- <110> 中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所
- <120> 一种检测丙型肝炎病毒抗体的方法
- <130>
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.2
- <210> 1
 <211> 41
 <212> DNA
 <213>
- <400> 1
 gcgaattcat gaaaaaaaaa aaagcacctg tacgatcact g 41
- <210> 2
 <211> 29
 <212> DNA
 <213>
- <400> 2
 gcggatcctt aacacgtatt gcagtctat 29
- <210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213>
- <400> 3
 gcgaattcat ggcacctgta cgatc 25
- <210> 4
 <211> 41
 <212> DNA
 <213>
- <400> 4
 gcggatcctt acttcttctt cttacacgta ttgcagtcta t 41
- <210> 5
 <211> 32
 <212> DNA
 <213>
- <400> 5
 gcactagtaa aaaaaaaaaa gaggggtggat ct 32
- <210> 6

<211> 24
<212> DNA
<213>

<400> 6
cgcggtcct taggaagaca caaa

24

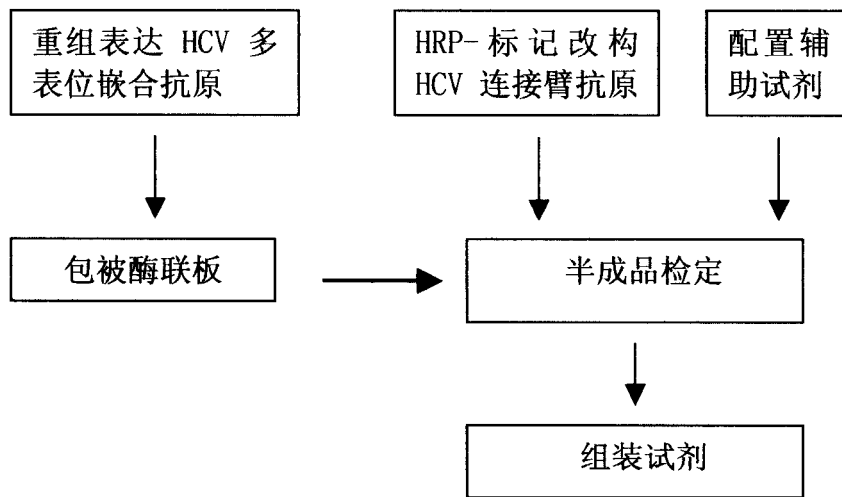


图 1

专利名称(译)	一种检测丙型肝炎病毒抗体的方法		
公开(公告)号	CN1755365A	公开(公告)日	2006-04-05
申请号	CN200510071806.0	申请日	2005-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所		
[标]发明人	张贺秋 宋晓国 陈坤 王国华 凌世淦		
发明人	张贺秋 宋晓国 陈坤 王国华 凌世淦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N21/78		
优先权	200410009616.1 2004-09-29 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种采用酶联免疫技术检测丙型肝炎病毒抗体的方法，还公开了该方法中采用的丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原与酶标记连接臂。本发明的检测方法包括丙型肝炎病毒多表位嵌合抗原的制备，嵌合抗原与酶标记连接臂的制备，嵌合抗原标记辣根过氧化物酶复合物的制备，嵌合抗原包被酶联板检测板，加入待测抗体及酶标记抗原复合物等步骤。本发明的方法特异性强、敏感性高，重复性好、早期检测，用于检测丙肝病毒抗体可获得满意的结果，可广泛用于献血员筛选和临床诊断。

