



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103995120 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 20

(21) 申请号 201410193592. 3

(22) 申请日 2014. 05. 08

(71) 申请人 北京玖佳宜科技有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地信息路 12
号 2 层 D204 室

(72) 发明人 侯淑霞 王万霞

(74) 专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限
公司 11228

代理人 张瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/576 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54) 发明名称

丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒及其制备

(57) 摘要

本发明提供一种丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒,所述试剂盒基于胶体金免疫比浊法,包括试剂 R2,所述试剂 R2 为含有标记了丙型肝炎病毒核心抗原抗体的金纳米颗粒的溶液,其特征在于,所述金纳米颗粒的粒径为 62. 2nm-79. 1nm,所述金纳米颗粒和抗体质量比为 50 :20 - 60。还本发明还提供该试剂盒的制备方法。本发明试剂盒具有灵敏度高,特异性强,反应迅速,稳定性好的特点,反应后不产生沉淀,便于生化仪的清洗,延长了生化仪的使用寿命。

1. 一种丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒,所述试剂盒基于胶体金免疫比浊法,包括试剂 R2,所述试剂 R2 为含有标记了丙型肝炎病毒核心抗原抗体的金纳米颗粒的溶液,其特征在于,所述金纳米颗粒的粒径为 62.2nm-79.1nm,所述金纳米颗粒和抗体质量比为 50 : 20 - 60。

2. 权利要求 1 所述试剂盒,其特征在于,所述金纳米颗粒的粒径为 67.2nm-72.4nm。

3. 权利要求 1 所述试剂盒,其特征在于,所述金纳米颗粒和抗体质量比为 50 :40-60。

4. 权利要求 2 或 3 任意一项所述试剂盒,其特征在于,所述试剂 R2 为 PH 值 5.0-9.5 的溶液。

5. 权利要求 4 所述试剂盒,其特征在于,所述试剂 R2 为 PH 值 6.0-8.5 的溶液。

6. 权利要求 5 所述试剂盒,其特征在于,所述试剂 R2 还含有促凝剂、稳定剂、蔗糖和甘油,其中,所述稳定剂为蛋白质、PEG、糖和可溶性的碱金属和碱土金属的无机盐中的一种或多种;所述蛋白质为牛血清白蛋白或明胶;所述糖为单糖、二糖或者多糖;所述无机盐为卤素碱金属和碱土金属的无机盐;试剂 R2 为是磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、柠檬酸-磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液和 HEPES 缓冲液中的一种或多种的组合。

7. 权利要求 6 所述试剂盒,其特征在于,所述促凝剂为重量体积比 0.4% 以内的 PEG20000,所述稳定剂为重量体积比 2% 以内的牛血清白蛋白,所述蔗糖的重量体积比为 20% 以下,所述甘油的重量体积比为 20% 以下。

8. 权利要求 7 所述试剂盒,其特征在于,所述试剂 R2 为含有粒径为 $72.4 \pm 1.5\text{nm}$ 且标记了丙型肝炎病毒核心抗原抗体的金纳米颗粒、重量体积比 20% 蔗糖、重量体积比 0.2% PEG20000、重量体积比 0.5% BSA 和重量体积比 5% 甘油, pH7.2 的磷酸盐缓冲液,其中,金纳米颗粒和抗体的重量比为 50 :40-60。

9. 权利要求 7 所述试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括试剂 R1,所述试剂 R1 为含有重量体积比 0.2% BSA、重量体积比 0.1% 的 NaN_3 和重量体积比 0.05% Tween20 的, pH7.2 的磷酸盐缓冲液。

10. 制备权利要求 1-9 任意一项所述试剂盒的方法,其特征在于,所述方法包括:

制备金纳米颗粒;

将抗体偶联到金纳米颗粒,得偶联抗体的纳米金颗粒溶液;

偶联抗体的纳米金颗粒溶液中加入稳定剂和促凝剂;

2800rpm 离心 2 小时;

离心沉淀用含重量体积比 20% 蔗糖、重量体积比 0.2% PEG20000、重量体积比 0.5% BSA 和重量体积比 5% 甘油, pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲液重悬,调整浓度至 $\text{OD}_{540\text{nm}}$ 为 0.2。

丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒及其制备

技术领域

[0001] 本申请涉及一种基于胶体金免疫比浊法的丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒及其制备。

背景技术

[0002] 丙型肝炎病毒 (HCV) 是诱发丙型肝炎的罪魁祸首,其通过血液传播。全世界约有 1.7 亿感染了 HCV, 其中中国有不下 3800 万的感染者,这个数字还在上升。与乙肝相比,丙肝更容易转成慢性,约有 70% 的丙肝患者发展成慢性肝炎,20% 发展成肝硬化,12% 发展成肝癌,危害严重。因此,目前,慢性丙肝除了干扰素有确切的疗效外,尚没有其它有效的治疗方法,而且疫苗的研制在短期内难有突破性的进展,因此,早发现、早诊断、早治疗对于丙肝患者有十分重要的意义。

[0003] 现在常规检测 HCV 的技术主要是抗体检测和 RNA 检测,各有缺陷。自 1989 年,HCV 抗体诊断试剂确诊出第一例 HCV 阳性感染者以来,抗体诊断试剂已经发展到了第四代,尽管检测灵敏度在不断提高,但是窗口期(即从病毒感染起直到可以检测出该病毒标志物之前的时期)仍然存在,并成为输血安全的重大威胁之一。抗体检测也不能区分感染活动期患者和病情康复者,不能用于患者的疗效监测;RNA 检测分为定性和定量两种,HCV RNA 检测直接检测 HCV 病毒是否存在,其基本原理是转录聚合酶链反应(RT-PCR)。虽然 RNA 检测可以早期诊断 HCV 感染,而且特异性好灵敏度高,但该方法在设备和技术上要求较高,且人员需要专职培训,操作繁琐,假阳性高,因此难以在常规工作和基层实验室中推广,限制了其应用 a

[0004] HCV 病毒核心抗原是 HCV 基因编码的结构蛋白之一,氨基酸序列十分保守,有研究表明其在血清中的滴度与 HCV RNA 水平密切地相关,而核心抗原与 RNA 动力学变化密切相关,因此可做为病程进展或抗病毒治疗的疗效监测的指标。HCV 核心抗原的检测是一新型的检测方法,研究始于上世纪九十年代中期,应用最广泛的是酶免疫方法和化学发光法。美国 Ortho 公司已经推出了双抗体夹心 >法定性和定量检测血清样品中总的或游离的 HCV 核心抗原 ELISA 试剂盒,于 2004 年已经在欧洲上市,中国仅有湖南景达制药有限公司于 2005 年推出的核心抗原的 ELISA 检测试剂盒。中国专利 CN101419238L 公开了一种基于化学发光法的酶联免疫试剂盒,但该方法操作也较为繁琐,且灵敏度低,因此,发明一种既操作简便又灵敏度高的试剂盒具有非常重要的临床意义。

[0005] 丙型肝炎病毒核心抗原的常用检测有免疫比浊法和酶联免疫吸附法等。由于酶联免疫吸附法检测耗时且操作复杂,已经不能满足大型医院快速定量检测的要求,而免疫比浊法随着全自动生化仪的普及,已经发展出来多种快速免疫比浊检测技术。

[0006] 乳胶增强免疫透射比浊法的基本原理是,首先将抗体吸附在一种胶乳颗粒上,当遇到相应的抗原时,抗原抗体结合而出现乳胶凝集。单个乳胶颗粒的大小在入射波长之内,光线可透过,当两个以上的乳胶颗粒凝集时,可阻碍光线透过,使得透射光减少,其减少程度与抗原的量成正比。此法提高了检测的灵敏度和准确度,得到了广泛的应用。然而,乳胶

增强免疫比浊法反应后会产生沉淀,不利于生化仪的清洗,干扰试验结果,且乳胶制造成本较高,导致免疫比浊试剂盒价格和检测成本偏高。因此又出现了纳米颗粒增强的免疫比浊法,如专利 CN101680890 便公开了一种通过比浊法测量人抑半胱氨酸蛋白酶蛋白 C 的比浊免疫测定方法和试剂组合,以及中国专利 CN101819208 中公开了一种利用微球免疫比浊法检测脑钠肽试剂盒。专利 CN101680890 中具体公开了,表面修饰了抗体的由聚苯乙烯、聚氯乙烯、环氧树脂、聚偏 1,1-二氯乙烯、聚- α -萘基甲基丙烯酸酯、聚乙烯萘以及它们相应的共聚物制成的粒径在 80-105nm 的有机高分子胶体纳米颗粒。

[0007] 本发明研究表明,许多纳米颗粒此范围之内并不满足试验的要求,比如:氧化铁等磁性纳米颗粒在 40nm 以上时由于顺磁性和比重等因素而容易聚沉无法达到应有的稳定性;金纳米颗粒在粒径 80-150nm 的范围内稳定性太差而不合适等。根据中国专利 CN102749454 的教导,本发明以直径为 35nm-60nm 的胶体金颗粒进行试验,发现,灵敏度较差,无法满足临床中对灵敏度小于 1ng/mL 的要求,和最低检测限 5ng/mL 的要求,且线性范围不覆盖临床中正常生理和病理情况的浓度区间,因此常常造成假阴性的结果;同时还存在反应时间长(平衡时间 5-10min),无法达到快速检验的要求。

发明内容

[0008] 为了克服现有技术存在的错误教导,解决现有技术中存在的上述缺陷,本发明提供一种基于胶体金免疫比浊法的丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒。该试剂盒线性范围宽、灵敏度高,制造成本低,反应后不产生沉淀,方便生化仪清洗。

[0009] 根据本发明的一方面,提供一种基于胶体金免疫比浊法的丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒,该试剂盒包括试剂 R2,所述试剂 R2 为含有标记了丙型肝炎病毒核心抗原抗体的金纳米颗粒的溶液,所述金纳米颗粒的粒径为 62.2nm-79.1nm,优选 67.2nm-72.4nm;所述金纳米颗粒和抗体质量比在 50:20-60,优选 50:40-60。

[0010] 具体来讲,所述试剂 R2 为 PH 值 5.0-9.5,优选 6.0-8.5 的溶液。

[0011] 进一步地,所述试剂 R2 还含有促凝剂、稳定剂、蔗糖和甘油,其中,促凝剂为重量体积比 0.4% 以内的 PEG20000,稳定剂为重量体积比 2% 以内的 BSA,蔗糖的重量体积比为 20% 以下,甘油的重量体积比为 20% 以下。

[0012] 作为优选,上述 R2 为含有粒径为 72.4 ± 1.5 nm 且标记了丙型肝炎病毒核心抗原的金纳米颗粒、重量体积比 20% 蔗糖、重量体积比 0.2% PEG20000、重量体积比 0.5% BSA 和重量体积比 5% 甘油的, pH7.2 的磷酸盐缓冲液,其中,金纳米颗粒和抗体的重量比为 50:40-60。

[0013] 更进一步地,所述基于胶体金免疫比浊法的丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒还包括起缓冲和稳定作用的试剂 R1,所述试剂 R1 为含有重量体积比 0.2% BSA、重量体积比 0.1% 的 NaN_3 和重量体积比 0.05% Tween20 的, pH7.2 的磷酸盐缓冲液。在本发明的试剂盒中,发明点主要在试剂 R2,试剂 R1 也可以使用现有免疫比浊法中检测试剂盒的试剂 R1。

[0014] 上述试剂 R2 通过如下方法制备:

[0015] 制备金纳米颗粒;

[0016] 将抗体偶联到金纳米颗粒,得偶联抗体的纳米金颗粒溶液;

[0017] 偶联抗体的纳米金颗粒溶液中加入稳定剂和促凝剂;

[0018] 2800rpm 离心 2 小时；

[0019] 离心沉淀用含重量体积比 20% 蔗糖、重量体积比 0.2% PEG20000、重量体积比 0.5% BSA 和重量体积比 5% 甘油, pH 值 7.2 的磷酸盐缓冲液重悬, 调整浓度至 OD_{540nm} 为 0.2。

[0020] 抗体的活性容易受到蛋白酶的分解、高温变性、渗透压等影响, 可加入稳定剂来稳定抗体的结构和活性。所述稳定剂可以是蛋白质、PEG、糖和可溶性的碱金属和碱土金属的无机盐中的一种或多种; 其中, 所述蛋白质优选牛血清白蛋白 (BSA) 或明胶; 所述糖可以是单糖、二糖或者多糖, 其中, 单糖优选甘露糖、半乳糖和 / 或葡萄糖; 二糖优选乳糖和 / 或蔗糖; 多糖优选海藻糖、葡聚糖、甘露糖和葡萄糖中的一种或多种; 所述无机盐优选卤素碱金属和碱土金属的无机盐, 更优选氯化钠、氯化钾、氯化钙中的一种或多种。

[0021] 本发明的试剂盒中, 试剂 R2 还可以加入促凝剂, 以增加抗原抗体反应速率。

[0022] 本发明所提供试剂盒中 R2 可以是磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液、甘氨酸缓冲液、柠檬酸-磷酸盐缓冲液、Tris 缓冲液和 HEPES 缓冲液中的一种或多种缓冲液体系; 优选磷酸盐缓冲液体系。

[0023] 本发明至少实现了如下有益效果:

[0024] 本发明试剂盒具有灵敏度高, 特异性强, 稳定性好的特点, 反应时间短, 显色反应时间小于 30s, 平衡时间小于 2min, 可用于检测血清或血浆中丙型肝炎病毒核心抗原含量, 适用于临床全自动生化分析仪。本发明试剂盒检测丙型肝炎病毒核心抗原的灵敏度可以达到 20ng/L, 检测线性范围达 0.0 ~ 20.0ug/L。

[0025] 本发明试剂盒反应后不产生沉淀, 便于生化仪的清洗, 延长了生化仪的使用寿命。

[0026] 本发明的试剂盒采用胶体金标记抗体, 降低了胶体金免疫比浊法的丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒的制造成本, 具有较大的市场竞争力。

附图说明

[0027] 图 1: 本发明实施例 1-7 检测的标准曲线。

[0028] 图 2: 本发明实施例 9-15 检测的标准曲线。

具体实施方式

[0029] 以下, 将详细说明本发明的具体实施例, 以便本领域技术人员能够更详细地理解本发明。

[0030] 金纳米颗粒以类似胶体状态存在, 又称胶体金。

[0031] 本发明所提供基于胶体金免疫比浊法的丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒中, 试剂 R1 可以使用现有技术中免疫比浊法检测试剂盒中的试剂 R1, 即已有的商品。具体来讲, 试剂 R1 可以是含有 0.2% BSA (w/v) 作为稳定剂、0.1% NaN_3 (w/v) 作为防腐剂和 0.05% Tween20 (w/v) 作为促凝剂的, 50mM 的磷酸盐缓冲液 (pH7.2), 是一种促使抗原位点暴露促进抗原抗体反应的缓存液。

[0032] 以下各实施例仅制备试剂 R2。

[0033] 实施例 1

[0034] 本实施例试剂 R2 的制备分为三步, 首先制备胶体金溶液, 然后将抗体偶联到金纳米颗粒上, 最后和缓冲盐、促凝剂和防腐剂等混溶成完整的体系。

[0035] 具体过程如下：

[0036] 1) 50nm 的胶体金的制备按如下步骤：

[0037] 在清洗干净的 1000ml 圆底烧瓶中放入磁力搅拌子 1 枚，加入 500ml 超纯水；

[0038] 加入 5ml 浓度为 1% (w/v) 氯金酸，600rpm 左右高速搅拌，并加热至溶液沸腾，然后迅速将 6ml 浓度为 1% (w/v) 柠檬酸钠溶液快速加入到烧瓶中，保持加热和剧烈搅拌 10min，溶液颜色先变黑色，然后逐渐变紫红色；

[0039] 关闭加热开关并继续搅拌 10min，然后停止搅拌冷却至室温，用超纯水恢复到原体积 500ml；

[0040] 使用透射电镜观察制得的胶体金颗粒的大小，对 1000 粒进行统计后直径约为 50.4 ± 1.2 nm，超滤除掉小分子后备用。

[0041] 2) 将抗体偶联到金纳米颗粒上，具体过程如下：

[0042] 将待标记的抗体移入透析袋内，在 10mM 的磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 中透析，以除去抗体溶液中的其他小分子物质；

[0043] 透析后的抗体转移到离心管内，15000rpm 离心 60min，收集上清；

[0044] 在紫外-可见分光光度计上测量溶液 OD_{260nm} 吸收值，计算出溶液中抗体的浓度，并用 10mM 磷酸盐缓冲液将抗体稀释至 1mg/ml (w/v)；

[0045] 取 10 支 1.5 毫升的离心管，加入 1 毫升制备好的胶体金溶液；

[0046] 用 10% 的碳酸钾溶液将离心管内的胶体金溶液调至 pH9；

[0047] 将 1、2、4、8、10、20、40、60、80、100 μ l 的抗体分别加到上述 10 支离心管中，震荡 30 分钟，此时每支试管中金纳米颗粒和抗体的质量比分别为 50 : 1、50 : 2、50 : 4、50 : 8、50 : 10、50 : 20、50 : 40、50 : 60、50 : 80、50 : 100；

[0048] 向上述溶液中加入 100 μ l 浓度为 10% 的 NaCl 溶液，混匀，静置 2h 后观察各管，发现在金纳米颗粒和抗体的质量比达到 50 : 100 时，有颜色改变和少量的沉淀析出，这表明当比例达 50 : 100 时，是标记蛋白的最大需求量，金纳米颗粒和抗体的质量比小于 50 : 100 无颜色改变和无沉淀析出；

[0049] 根据以上结果，将 500ml 胶体金溶液加入三角瓶中，边搅拌边用 10% 的碳酸钾调整溶液的 pH 值至 9；

[0050] 将小于 50ml 的抗体加入到上述溶液中，继续搅拌 30 分钟，在此过程中抗体同纳米颗粒在库仑力和范德华力的作用下，突破胶体颗粒表面的水化层实现接触，在静电力和范德瓦尔德力的相互作用，胶体颗粒同蛋白质分子实现偶联；

[0051] 3) 试剂 R2 的配制按如下步骤进行：

[0052] 在偶联后的胶体金溶液中加入一定量的 BSA 作为稳定剂，终浓度为 1% (w/v)，搅拌 5min 使之完全溶解；

[0053] 在上述溶液中加入一定量的 PEG20000，终浓度为 0.2% (w/v)，搅拌 10 分钟；

[0054] 将上述溶液移至离心管中，用 2800rpm 离心 2h，弃上清，保留沉淀；

[0055] 用浓度为 20% 蔗糖作为稳定剂、0.2% PEG20000 作为促凝剂、0.5% BSA 作为稳定剂、和 5% 甘油作为稳定剂的 10mmol 的磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 重悬沉淀物，调整浓度至 OD_{540nm} 为 0.2；

[0056] 得到 R2 溶液，分装备用。

[0057] 实施例 2

[0058] 实施例 2 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 2 制备的胶体金颗粒粒径为 55nm。

[0059] 制备 55nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 5.6ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为 56.2 ± 1.5 nm。

[0060] 实施例 3

[0061] 实施例 3 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 3 制备的胶体金颗粒粒径为 62.2nm。

[0062] 制备 62.2nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 5.4ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为 62.2 ± 1.1 nm。

[0063] 实施例 4

[0064] 实施例 4 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 4 制备的胶体金颗粒粒径为 67nm。

[0065] 制备 67nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 5.2ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为 67.2 ± 1.5 nm。

[0066] 实施例 5

[0067] 实施例 5 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 5 制备的胶体金颗粒粒径为 72nm。

[0068] 制备 72nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 5.1ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为 72.4 ± 1.5 nm。

[0069] 实施例 6

[0070] 实施例 6 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 6 制备的胶体金颗粒粒径为 79nm。

[0071] 制备 79nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 4.9ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为 79.1 ± 1.6 nm。

[0072] 实施例 7

[0073] 实施例 7 与实施例 1 的差别仅在于,通过调整所加入还原剂的量,使得实施例 7 制备的胶体金颗粒粒径为 83nm。

[0074] 制备 83nm 颗粒加入还原剂 1% 柠檬酸钠为 4.7ml。透射电镜观察制得的胶体金颗粒,直径约为 83.5 ± 1.6 nm。

[0075] 实施例 8

[0076] 基于胶体金免疫比浊的丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒的临床使用效果测定:

[0077] (1) 本发明试剂盒的测试条件及参数如下

[0078] a) 测定步骤:先加入 240 μ l 试剂 R1,然后加入 3 μ l 样本,37 $^{\circ}$ C 孵育 5min 后加入 60 μ l 试剂 R2,在 540nm 波长测量吸光度,三秒后读取第一点数据,反应 5 分钟后读取另一点,得到吸光度值的差值。

[0079] b) 计算方法:6 点定标法,以样条函数为计算模式。根据吸光度与参考血清的值做工作曲线,样品含量可根据其吸光度值在工作曲线上算出。

[0080] (2) 检测标准曲线

[0081] 通过本发明的方法,采用日立 7180 型自动分析仪检测 6 种不同含量的丙型肝炎病毒核心抗原参考品,根据结果做标准曲线, X 轴表示丙型肝炎病毒核心抗原的含量, Y 轴表示吸光度差值。

[0082] (3) 通过上述的方法对上述实施例中制备的 7 个试剂盒测定标准曲线,分析最优粒径。结果如下:

[0083] 金纳米颗粒大小为 50.4nm 时, $y = -0.000003x + 1.5906$, $R^2 = 0.4855$;

[0084] 金纳米颗粒大小为 56.2nm 时, $y = -0.00003x + 1.6006$, $R^2 = 0.8164$;

[0085] 金纳米颗粒大小为 62.2nm 时, $y = -0.0005x + 1.647$, $R^2 = 0.9709$;

[0086] 金纳米颗粒大小为 67.2nm 时, $y = -0.0005x + 1.6663$, $R^2 = 0.9635$;

[0087] 金纳米颗粒大小为 72.4nm 时, $y = -0.0005x + 1.5893$, $R^2 = 0.9914$;

[0088] 金纳米颗粒大小为 79.1nm 时, $y = -0.0005x + 1.6713$, $R^2 = 0.9453$;

[0089] 金纳米颗粒大小为 83.5nm 时, $y = -0.0005x + 1.1475$, $R^2 = 0.595$ 。

[0090] (4) 对上述结果,进行灵敏度、线性相关系数、线性范围和稳定性分析。

[0091] 灵敏度定义为测试体系对不同浓度的标准样品测试值的差异,差异越大表明约灵敏,没有差异则表明体系过于稳定,不能引起比浊改变。灵敏度可以通过拟合后的标准曲线的斜率的绝对值表征。

[0092] 线性相关系数即相关性方程的 R 值,表明试验测试结果和拟合曲线的重合度, R 值越高,表明线性越好。

[0093] 线性范围即测试对应的结果中呈线性关系的区间,线性范围宽有利于测试更大范围浓度的样品。

[0094] 稳定性是指在该体系中胶体金稳定存在、不发生团聚或沉淀的程度,一般来讲颗粒越大越容易聚沉,引起浊度的改变,颗粒越小越稳定,对待测试剂浓度变化不敏感,即灵敏度差。将待测试剂放置在 40°C 的环境中,以稳定性时间的长短来表示稳定性的好坏,测试时间是 12 月。

[0095] 通过上述四个参数的对比,我们可以从中选出最适合的粒径范围,将各种金颗粒尺寸条件下的结果汇总于表 1。

[0096] 表 1

[0097]

金纳米颗粒粒径	灵敏度	线性相关系数	线性范围 (ng/L)	稳定性(月)
50.4 nm	0.000003	0.4855	0-2000	12
56.2 nm	0.00003	0.8164	0-2000	12
62.2 nm	0.0005	0.9709	0-2000	12
67.2 nm	0.0005	0.9635	0-2000	12
72.4 nm	0.0005	0.9914	0-2000	12
79.1 nm	0.0005	0.9453	0-2000	12
83.5 nm	0.0005	0.595	0-250	0.5

[0098] 综合比较以上结果,可发现,粒径大于等于 62.2nm 的纳米颗粒,灵敏度才能达到要求,可以选择 62.2nm-79.1nm 胶体金纳米颗粒,而大于 83.5nm 的胶体金颗粒由于太大,稳定性较差。

[0099] 实施例 9

[0100] 试剂 R2 的制备过程参照实施例 1。根据实施例 8 的测试结果,选择具有较优性质的 72.4nm 的胶体金纳米颗粒作为本体系,改变胶体表面偶联的抗体量。将抗体偶联到直径约为 72.4 ± 1.5 nm 金纳米颗粒上,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :100。

[0101] 实施例 10

[0102] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :80。

[0103] 实施例 11

[0104] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :60。

[0105] 实施例 12

[0106] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :40。

[0107] 实施例 13

[0108] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :20。

[0109] 实施例 14

[0110] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :10。

[0111] 实施例 15

[0112] 与实施例 9 的差别在于,金纳米颗粒和抗体的浓度 (w/v) 比为 50 :1。

[0113] 实施例 16

[0114] 采用实施例 8 中的方法,对实施例 9 至 15 中制备的试剂盒进行分析比较。测试结果如下。

[0115] 金纳米颗粒与抗体之比为 50:1 时, $y = -0.000002x + 1.58511$, $R^2 = 0.06458$

[0116] 金纳米颗粒与抗体之比为 50 :10 时, $y = -0.000003x + 1.5925$, $R^2 = 0.6816$

[0117] 金纳米颗粒与抗体之比为 50 :20 时, $y = -0.0002x + 1.5731$, $R^2 = 0.955$

[0118] 金纳米颗粒与抗体之比为 50 :40 时, $y = -0.0005x + 1.5602$, $R^2 = 0.9601$

- [0119] 金纳米颗粒与抗体之比为 50 :60 时, $y = -0.0005x + 1.4686$, $R^2 = 0.967$
 [0120] 金纳米颗粒与抗体之比为 50 :80 时, $y = -0.0005x + 1.1129$, $R^2 = 0.5233$
 [0121] 金纳米颗粒与抗体之比为 50 :100 时, $y = -0.0004x + 0.9253$, $R^2 = 0.3297$
 [0122] 将上述七种试剂盒结果汇总比较到表 2 :
 [0123] 表 2

金纳米颗粒: 抗体	灵敏度	线性相关系数	线性范围 (ng/L)	稳定性 (月)
50: 1	0.00000 2	0.06458	0-2000	12
50: 10	0.00000 3	0.6816	0-2000	12
[0124] 50: 20	0.0002	0.955	0-2000	12
50: 40	0.0005	0.9501	0-2000	12
50: 60	0.0005	0.9367	0-2000	12
50: 80	0.0005	0.5233	0-500	10
50: 100	0.0004	0.3297	0-250	1

[0125] 综合以上结果, 金纳米颗粒和抗体浓度之比在 50 :20-60 之间时灵敏度高、线性关系好, 同时线性范围广以及稳定性较好, 可以选择, 更优选是 50 :40-60。

[0126] 实施例 17

[0127] 通过实施例 8 和实施例 16, 我们已经优化出了试剂盒 R2 的最佳条件, 现在对 R2 中稳定剂、促凝剂的条件进行优化。

[0128] 选用金纳米颗粒为 72.4 ± 1.5 nm, 金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :60, 试剂 R2 选择为磷酸盐缓冲液溶液, 分别选择 pH4.0、5.0、6.0、7.2、8.5、9.5、10.0 七个点, 表 3 为三个条件下灵敏度、线性相关系数、线性范围和稳定性试验结果。

[0129] 表 3

[0130]

pH	灵敏度	线性相关系数	线性范围 (ng/L)	稳定性 (月)
4.0	0.0002	0.362	0-500	3
5.0	0.0004	0.562	0-1500	8
6.0	0.0005	0.932	0-2000	12
7.2	0.0005	0.935	0-2000	12
8.5	0.0005	0.929	0-2000	12
9.5	0.0004	0.832	0-1500	10
10.0	0.0001	0.422	0-500	4

[0131] 从上表中得数据可以看出, 在 pH 为 4.0 和 10.0 时, 该试剂盒无论在灵敏度、线性相关系数、线性范围还是稳定性上都不满足试验室的要求, 因此 pH 的边界范围是 5.0-9.5, 其中在 6.0-8.5 范围内灵敏度、线性相关系数、线性范围和稳定性试验结果最好, 且数值相

近,表明该范围内 pH 影响不显著。

[0132] 同上,选择金纳米颗粒为 $72.4 \pm 1.5\text{nm}$,金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :60,促凝剂选择 PEG20000,浓度的范围为 0 ~ 0.4% (w/v),选择 0、0.1%、0.2%和 0.4% 4 个水平,见表 4。

[0133] 表 4

[0134]

PEG20000 浓度	灵敏度	线性相关系数	线性范围 (ng/L)	稳定性 (月)
0	0.0005	0.853	0-2000	12
0.1%	0.0005	0.955	0-2000	12
0.2%	0.0005	0.967	0-2000	12
0.4%	0.0004	0.832	0-1500	12

[0135] 从上表中得数据可以看出,在凝剂选择 PEG20000 在 0 ~ 0.4% (w/v) 范围内灵敏度、线性相关系数、线性范围和稳定性试验结果相近,表且在 0.2%最优。

[0136] 同上,选择金纳米颗粒为 $72.4 \pm 1.5\text{nm}$,金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :60,稳定剂选择 BSA、蔗糖和甘油,其中 BSA 浓度分别选择 0、0.5%、和 1%和 2% 4 个水平;蔗糖选择 0、5%、10%和 20% 4 个水平;甘油选择 0、5%、10%和 20% 4 个水平;对以上进行 3 因素和 4 水平的正交试验,建立 L16 (4³) 正交表,进行 16 次试验,从中选出最优条件,见表 5 和表 6。

[0137] 表 5 :稳定剂的 3 因素和 4 水平表

因素 \ 水平	A: BSA	B: 蔗糖	C: 甘油
1	0	0	0
2	0.5%	5%	5%
3	1%	10%	10%
4	2%	20%	20%

[0138]

[0139] 表 6 :正交试验方案及正交试验结果

试验 序号	组合方案	灵敏度	线性相关 系数	线性范围 (ng/L)	稳定性 (月)
1	A1 B1	0.0003	0.432	0-1000	1
2	A1 B2	0.0004	0.735	0-1500	8
3	A1 B3	0.0005	0.829	0-1500	3
4	A1 B4	0.0004	0.732	0-2000	12
5	A2 B2	0.0005	0.813	0-2000	4
6	A2 B1	0.0005	0.911	0-1500	5
[0140] 7	A2 B4	0.0005	0.832	0-2000	12
8	A2 B3	0.0005	0.835	0-1500	12
9	A3 B3	0.0005	0.819	0-1500	5
10	A3 B4	0.0004	0.732	0-2000	12
11	A3 B1	0.0004	0.735	0-2000	10
12	A3 B2	0.0005	0.929	0-1500	12
13	A4 B4	0.0005	0.832	0-2000	10
14	A4 B3	0.0005	0.935	0-2000	12
15	A4 B2	0.0005	0.929	0-2000	12
16	A4 B1	0.0003	0.832	0-1000	10

[0141] 通过以上的正交试验,最佳的灵敏度和精密度以及线性范围出现在,金纳米颗粒为 $72.4 \pm 1.5\text{nm}$,金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :40-60,10mmol 的磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 中含有 20%蔗糖作为稳定剂、0.2% PEG20000 作为促凝剂、0.5% BSA 作为稳定剂和 5%甘油作为稳定剂。

[0142] 实施例 18

[0143] 试剂 R2 金纳米颗粒为 $72.4 \pm 1.5\text{nm}$,金纳米颗粒和抗体的比例在 50 :60,10mmol 的磷酸盐缓冲液 (pH7.2) 中含有 20%蔗糖作为稳定剂、0.2% PEG20000 作为促凝剂、0.5% BSA 作为稳定剂和 5%甘油作为稳定剂。

[0144] (1) 灵敏度试验

[0145] 上述试剂盒的最佳灵敏度达 20ng/L。

[0146] (2) 线性测定

[0147] 取病人的异常高值血清 1 份 (①) 和正常人血清 1 份 (⑤),取等体积的①和⑤混合构成③,取等体积的①和③混合构成②,取等体积的③和⑤混合构成④。测定①~⑤血清中丙型肝炎病毒核心抗原的含量。测定结果表明,上述试剂盒血清稀释效应不明显,具有良好的线性。

[0148] (3) 精密度试验

[0149] 用检测蛋白定值质控、正常人混合血清和肾功异常病人混合血清一份,连续测定 20 天,每天测定三次,计算日内及日间精密度。测定结果表明定值质控的平均值为 12.2ng/L, 其日内不精密度为 2.1%,日间不精密度为 1.18%。正常人混合血清的平均值为 4.2ng/mL,日内不精密度为 3.7%,日间不精密度为 2.9%。肾功异常病人血清的平均值为 9.7ng/mL,日内不精密度为 1.18%,日间不精密度为 0.66%。这些测定结果表明此试剂盒的精密

度可满足临床要求。

[0150] (4) 干扰试验

[0151] 在正常人血清中各自添加一定量的胆红素、牛血红蛋白、脂肪乳剂和类风湿因子，使其达到表 7 中所示的浓度，同时加入同等体积的去离子水作为无干扰物血清，同时测定这些标本的浓度，结果见表 7。表 7 的结果表明以干扰程度为 10% 作为该测定系统对干扰物的最高忍受限，血清中抗坏血酸在 4.5g/L，胆红素在 500M 以下，血红蛋白在 5g/L 以下，脂肪乳剂在 0.3% 以下，肝素钠在 62.5U/ml 以下，类风湿因子在 100IU/mL 以下，不影响测定，结果见表 7。

[0152] 表 7

	干扰物种类及浓度	测量值	理论值	抗干扰程度 (%)
	抗坏血酸/L	0.75	0.75	0
	脂浊 0.3%	0.85	0.80	-6.16
	血红蛋白/L	0.75	0.70	-6.57
[0153]	胆红素 500umol/L	0.77	0.72	-5.4
	肝素钠 62.5U/ml	0.84	0.83	-2.0
	类风湿因子 (100IU/ml)	0.55	0.60	6.0

[0154] 尽管已参照优选实施例表示和描述了本发明，但本领域技术人员应该理解，在不脱离由权利要求限定的本发明的精神和范围的情况下，可以对这些实施例进行各种修改和变换。

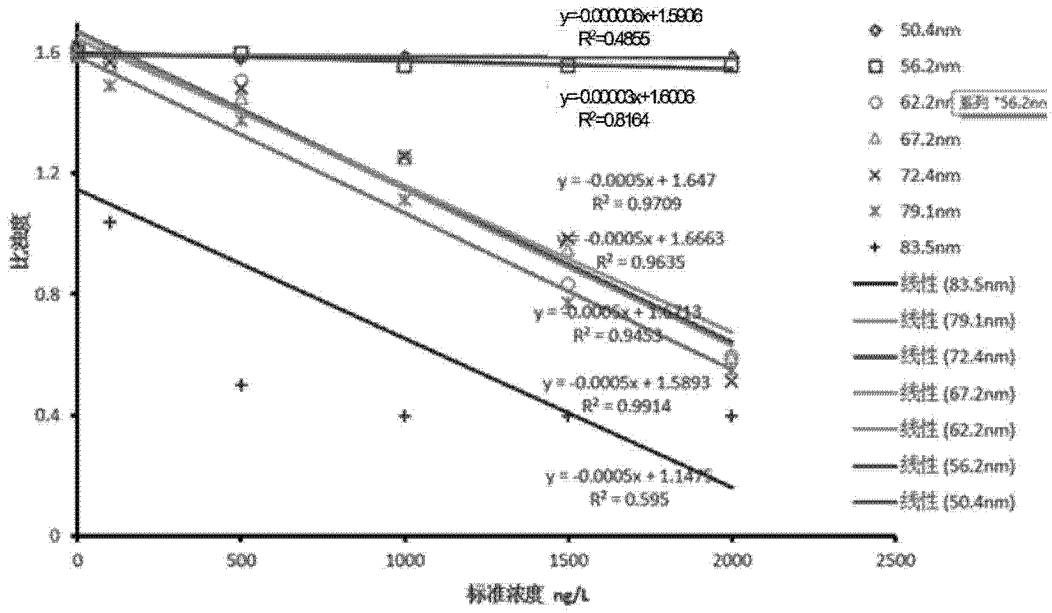


图 1

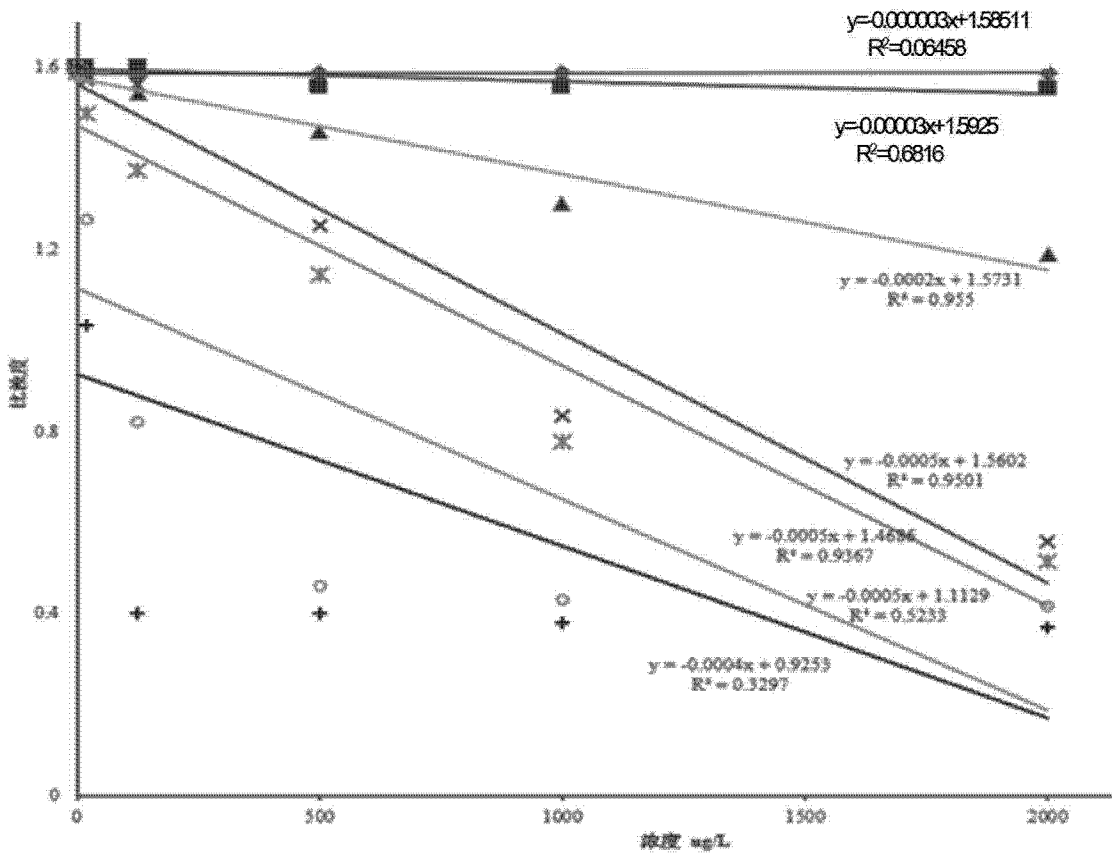


图 2

专利名称(译)	丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒及其制备		
公开(公告)号	CN103995120A	公开(公告)日	2014-08-20
申请号	CN201410193592.3	申请日	2014-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	北京玖佳宜科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京玖佳宜科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京玖佳宜科技有限公司		
[标]发明人	侯淑霞 王万霞		
发明人	侯淑霞 王万霞		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/54346 G01N33/54393 G01N33/56983 G01N33/5767 G01N2333/186		
代理人(译)	张瑾		
其他公开文献	CN103995120B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种丙型肝炎病毒核心抗原检测试剂盒，所述试剂盒基于胶体金免疫比浊法，包括试剂R2，所述试剂R2为含有标记了丙型肝炎病毒核心抗原抗体的金纳米颗粒的溶液，其特征在于，所述金纳米颗粒的粒径为62.2nm-79.1nm，所述金纳米颗粒和抗体质量比为50：20-60。还本发明还提供该试剂盒的制备方法。本发明试剂盒具有灵敏度高，特异性强，反应迅速，稳定性好的特点，反应后不产生沉淀，便于生化仪的清洗，延长了生化仪的使用寿命。

金纳米颗粒直径 (nm)	抗体质量比	灵敏度 (AU)	线性范围 (AU)	稳定性 (天)
50.4 nm	0.0005	0.4855	0-2000	12
56.2 nm	0.0005	0.8164	0-2000	12
62.2 nm	0.0005	0.9700	0-2000	12
67.2 nm	0.0005	0.9625	0-2000	12
72.4 nm	0.0005	0.9974	0-2000	12
79.1 nm	0.0005	0.9451	0-2000	12
83.2 nm	0.0005	0.905	0-2000	0.5