



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107247144 B

(45)授权公告日 2019.12.24

(21)申请号 201710344706.3

G01N 33/553(2006.01)

(22)申请日 2017.05.16

G01N 33/535(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107247144 A

G01N 21/76(2006.01)

(43)申请公布日 2017.10.13

(73)专利权人 上海科华生物工程股份有限公司

地址 200233 上海市徐汇区钦州北路1189号

(56)对比文件

CN 106456725 A,2017.02.22,

CN 103630690 A,2014.03.12,

CN 1755365 A,2006.04.05,

CN 103674657 A,2014.03.26,

Eleftherios P. Diamand et al.The

Biotin-(Strept)Avidin System:

Principlesand Applicationsin

Biotechnology.《CLINICALCHEMISTRY》.1991,第37卷(第5期),

(72)发明人 陈超 夏泽 张巍佳 罗紫臣

彭珊 姚姣妮

审查员 李倩

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司

公司 31266

代理人 崔佳佳 陆凤

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页 附图1页

(54)发明名称

一种预处理丙肝抗原的方法和检测试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种预处理丙肝抗原及生物素化丙肝抗原制备方法和包括所述生物素化丙肝抗原的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒。本发明对丙肝抗原进行预处理,改变了蛋白构象,再与生物素反应,从而制得生物素化丙肝抗原。本发明的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒采用预处理后的丙肝抗原与生物素反应,制备生物素化丙肝抗原,能够大幅度提高丙肝抗体的检测能力,同时提高特异性,具有稳定性好、易于生产控制等优点;从而可以大规模适用于丙型肝炎病毒的辅助诊断与血液筛查。

1. 一种预处理丙肝抗原的方法,其特征在于,所述方法包括利用预处理剂处理丙肝抗原的步骤;

所述预处理剂是2-巯基乙烷磺酸钠。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,在利用预处理剂处理丙肝抗原后,还包括利用生物素交联经处理的丙肝抗原,从而得到生物素化的丙肝抗原。

3. 一种经预处理的丙肝抗原,其特征在于,所述经预处理的丙肝抗原采用权利要求1或2所述方法制备。

4. 一种丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒装有:权利要求3所述的预处理的丙肝抗原,或权利要求1或2所述的方法制备的预处理的丙肝抗原。

5. 一种丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒装有:权利要求3所述的预处理的丙肝抗原,或权利要求1或2所述的方法制备的预处理的丙肝抗原。

6. 权利要求3所述的预处理的丙肝抗原或权利要求1或2所述的方法制备的预处理的丙肝抗原在制备丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒或丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒中的用途。

7. 如权利要求4所述的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒或如权利要求5所述的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述方法包括将权利要求3所述的预处理的丙肝抗原,或权利要求1或2所述的方法制备的预处理的丙肝抗原制备成所述试剂盒。

8. 一种检测丙型肝炎病毒抗体的方法,其特征在于,所述方法包括利用权利要求3所述的预处理的丙肝抗原或权利要求1或2所述的方法制备的预处理的丙肝抗原或如权利要求4所述的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒或如权利要求5所述的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒检测血液样本中的丙型肝炎病毒抗体,所述方法不用于诊断目的。

一种预处理丙肝抗原的方法和检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断医学检验领域。具体地说,本发明涉及一种预处理丙肝抗原的方法、用这种预处理方法得到的丙肝抗原、用于对丙肝抗原实施这种预处理方法的试剂盒、包含用该方法预处理的丙肝抗原的检测试剂盒以及它们在检测丙型肝炎中的用途。

背景技术

[0002] HCV是一种血源性病毒,其感染发病呈现世界性分布。据世界卫生组织统计,全球丙型肝炎病毒(HCV)的感染率约为3%,每年新发HCV病例约315万例。主要通过输血或血制品、血透析、单采血浆、肾移植、静脉注射毒品、性传播、母婴传播等方式传播。

[0003] 丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus, HCV)是单股正链的RNA病毒,属黄病毒科(Flaviviridae)。在受感染者血清及肝组织内数量少,不易通过电镜观测到。通过微滤技术判断其大小约为30-60nm,沉淀系数140S,浮密度1.1g/cm³。HCV基因组全长9.4-9.6kb,由编码区、5'-非编码区和3'-非编码区组成。编码区能编码一段含3011个氨基酸的多蛋白,在特异的细胞和病毒蛋白酶的作用下可以裂解为各个不同功能区的产物,包括结构基因和非结构(NS)基因,其中结构基因分为C区(编码核心蛋白)和E区(编码包膜蛋白),并由它们组装病毒颗粒;非结构基因分别为NS1、NS2、NS3、NS4a、NS4b、NS5a和NS5b基因,并编码相应的蛋白。

[0004] HCV虽然在感染者体内滴度较低,但其几乎所有结构和非结构蛋白都能够诱发机体的免疫应答,并产生相应的抗体。Anti-HCV是人体免疫细胞对HCV感染做出免疫反应而产生的抗体。人在感染HCV后大约40-70天后血清中会出现anti-HCV,抗体在血液中循环而且经常性检测到存在,是HCV感染的重要临床标志。Anti-HCV从病毒感染到在体内出现有一定时间的窗口期,但是anti-HCV的检测对于筛查目标是否感染HCV仍旧有重要的作用。抗C区抗体在HCV感染后出现较早,并具有较高的阳性率。NS2、NS3、NS4、NS5所编码的四种蛋白,除NS2外其余均可以有效诱导HCV抗体应答。其中抗NS3抗体免疫原性较强,相应抗体滴度也较高,并且其出现早于其他抗体。但是与抗NS4和NS5抗体不同的是,使用NS3的合成多肽不能检出相应的特异性抗体,可能与其相应的构象依赖性有关;NS4区则含有至少2个免疫优势序列位点,抗原性较强,绝大多数HCV感染者都会产生针对该区的抗体反应,但是通常在感染后延期出现,其持续呈现阳性可能与慢性化有关;而针对NS5中RNA聚合酶区域所产生的抗体,可以在感染者抗NS3和抗NS4抗体阴性时依旧呈阳性。其血清转换较早,可用于急性期感染的诊断。

[0005] 由于anti-HCV检测灵敏度较高且特异性较好,因而是针对HCV感染初步筛选的重要且普遍的手段。由于HCV以血源传染为主要途径,因此在与血液相关的临床应用中,anti-HCV的检测对于防止HCV的传播有着重要的意义。

[0006] 由于丙肝抗原独特的蛋白空间结构,使其将主要的检测位点置于蛋白结构的内部,不易被检测。传统的HCV多使用多肽进行交联,但是会造成特异性不好等缺点;近些年来使用表达的基因工程抗原取代HCV多肽,但处理过程难控,且处理后的抗原稳定性较差,不

利于商业化,批间差异难控,且灵敏度较低。

[0007] 因此,本领域急需一种简便的预处理丙肝抗原的方法,该方法得到的预处理丙肝抗原稳定并且在检测丙型肝炎时能够具备高灵敏度。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种简便的预处理丙肝抗原的方法,该方法得到的预处理丙肝抗原稳定并且在检测丙型肝炎时能够具备高灵敏度。

[0009] 在第一方面,本发明提供一种预处理丙肝抗原的方法,所述方法包括利用预处理剂处理丙肝抗原的步骤;

[0010] 所述预处理剂选自:4-硝基苯磺酚或2-巯基乙烷磺酸钠;优选2-巯基乙烷磺酸钠。

[0011] 在具体的实施方式中,在利用预处理剂处理丙肝抗原后,还包括利用生物素交联经处理的丙肝抗原,从而得到生物素化的丙肝抗原。

[0012] 在优选的实施方式中,所述方法还包括将交联后的生物素化丙肝抗原保存于含所述预处理剂的稀释液中。

[0013] 在优选的实施方式中,对丙肝抗原的预处理是在丙肝抗原中按照一定比例加入预处理剂,例如2-巯基乙烷磺酸钠,并于2~8℃下反应30分钟。

[0014] 在优选的实施方式中,利用预处理剂,例如2-巯基乙烷磺酸钠预处理丙肝抗原时,所述丙肝抗原与2-巯基乙烷磺酸钠的反应浓度分别为0.5~5mg/mL、0.5%~5% (w/v),优选1mg/mL、1% (w/v)。

[0015] 在优选的实施方式中,利用预处理剂,例如2-巯基乙烷磺酸钠预处理丙肝抗原时,所述丙肝抗原与2-巯基乙烷磺酸钠溶液的体积比为1:5~1:20,优选1:10。

[0016] 在优选的实施方式中,用生物素交联经处理的丙肝抗原时,所述生物素的功能基团是氨基、羧基、羟基、或者巯基,优选巯基。

[0017] 在优选的实施方式中,用生物素交联经处理的丙肝抗原是将预处理的丙肝抗原与生物素按照一定比例进行反应,置于2~8℃,10mM PBS透析16~24小时。

[0018] 在优选的实施方式中,用生物素交联经处理的丙肝抗原时,所述预处理的丙肝抗原与生物素的反应浓度分别为0.5~5mg/mL、0.5~5mg/mL,优选1mg/mL、2mg/mL。

[0019] 在优选的实施方式中,用生物素交联经处理的丙肝抗原时,所述预处理的丙肝抗原与生物素的摩尔浓度比例为1:5~1:50,优选1:15。

[0020] 在第二方面,本发明提供一种经预处理的丙肝抗原,其特征在于,所述经预处理的丙肝抗原采用本发明第一方面所述方法制备。

[0021] 在第三方面,本发明提供一种丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒,所述试剂盒装有:本发明第二方面所述的预处理的丙肝抗原,或本发明第一方面所述的方法制备的预处理的丙肝抗原。

[0022] 在优选的实施方式中,所述丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒还装有:包被丙肝抗原的微孔板;辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素;阴性对照;阳性对照;显色液A;显色液B;洗涤液。

[0023] 在优选的实施方式中,所述显色剂A的主要成分为过氧化氢溶液,显色剂B的主要成分为3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)。

[0024] 在优选的实施方式中,所述的生物素化丙肝抗原稀释液的配方为:10~100mM pH 7.2~7.8PBS、50~300mM KCl、5~40%牛血清、5~25mM EDTA·2Na、0.05~0.2%2-巯基乙烷磺酸钠、0.05~0.2%ProClin-300。

[0025] 在优选的实施方式中,辣根过氧化酶标记的链霉亲和素的稀释液的配方为:10~100mM pH 7.2~7.8Tris-HCl、50~300mM NaCl、0.5~2%BSA、5~15%甘油、0.05~0.5%吐温-20、0.05~0.2%ProClin-300。

[0026] 在优选的实施方式中,所述的洗涤液配方为:10~100mM pH 7.2~7.8Tris-HCl, 50~300mM NaCl,0.1~1%吐温-20,0.05~0.2%ProClin-300。

[0027] 在第四方面,本发明提供一种丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒,所述试剂盒装有:本发明第二方面所述的预处理的丙肝抗原,或本发明第一方面所述的方法制备的预处理的丙肝抗原。

[0028] 在优选的实施方式中,所述丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒还装有:链霉亲和素磁微粒;碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgG抗体;定标品;化学发光底物;洗涤液。

[0029] 在优选的实施方式中,所述化学发光底物的主要成分为1,2-二氧杂环丁烷衍生物作为酶促化学发光底物。

[0030] 在优选的实施方式中,所述1,2-二氧杂环丁烷衍生物为:AMPPD(3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酸氧基)苯-1,2-二氧杂环丁烷)、CDP-star。

[0031] 在优选的实施方式中,所述的磁微粒试剂的主要成分是超顺磁性微粒,其粒径为800nm~3 μ m,主要的活性功能基团为羧基、氨基或苯甲磺酰基。

[0032] 在优选的实施方式中,所述的磁微粒试剂稀释液的配方为:10~100mM pH7.2~7.8Tris-HCl、50~300mM NaCl、0.5~2%BSA、2~15%甘油、0.05~0.2%ProClin-300。

[0033] 在优选的实施方式中,碱性磷酸酶标记鼠抗人IgG抗体的制备方法为戊二醛偶联法,具体操作为:将碱性磷酸酶溶于终浓度5%戊二醛溶液中,室温静置过夜,生理盐水透析后,加入鼠抗人IgG抗体,50mM pH9.6碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中透析过夜,加入甘氨酸,室温反应2小时,等体积加入饱和硫酸铵,2~8℃2小时,4000rpm离心去上清,沉淀溶于50mM pH7.40磷酸缓冲液中,对其透析过夜,加入等体积甘油,置于-20℃保存。

[0034] 在优选的实施方式中,碱性磷酸酶标记鼠抗人IgG抗体的稀释液的配方为:10~100mM pH 7.2~7.8Tris-HCl、50~300mM NaCl、0.5~2%BSA、5~15%甘油、0.05~0.5%吐温-20、0.05~0.2%ProClin-300。

[0035] 在优选的实施方式中,所述的丙型肝炎病毒抗体定标品的浓度分别约为2NCU/mL。

[0036] 在优选的实施方式中,所述的丙型肝炎病毒抗体定标品的稀释液配方为:10~100mM pH7.2~7.8PB,50~300mM NaCl,3~8%BSA,3%~10%蔗糖,0.05~0.2%ProClin-300。

[0037] 在优选的实施方式中,所述的洗涤液配方为:10~100mM pH 7.2~7.8Tris-HCl, 50~300mM NaCl,0.1~1%曲拉通X-100,0.05~0.2%ProClin-300。

[0038] 在第五方面,本发明提供本发明第二方面所述的预处理的丙肝抗原或本发明第一方面所述的方法制备的预处理的丙肝抗原在制备丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒或丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒中的用途。

[0039] 在第六方面,本发明提供本发明第三方面所述的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检

测试剂盒或本发明第四方面所述的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒的制备方法,所述方法包括将本发明第二方面所述的预处理的丙肝抗原,或本发明第一方面所述的方法制备的预处理的丙肝抗原制备成所述试剂盒。

[0040] 在第七方面,本发明提供一种检测丙型肝炎病毒抗体的方法,所述方法包括利用本发明第二方面所述的预处理的丙肝抗原或本发明第一方面所述的方法制备的预处理的丙肝抗原或本发明第三方面所述的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒或本发明第四方面所述的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒检测血液样本中的丙型肝炎病毒抗体。

[0041] 在优选的实施方式中,所述方法不限于诊断目的。

[0042] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

[0043] 图1显示了丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法试剂的反应原理;

[0044] 图2显示了丙型肝炎病毒抗体化学发光法试剂的反应原理。

具体实施方式

[0045] 发明人经过广泛而深入的研究,出乎意料地发现利用特定的预处理剂对丙肝抗原进行预处理,并对预处理的丙肝抗原作生物素化后,得到的预处理丙肝抗原可以应用于酶联免疫法和化学发光分析法的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒。采用本发明的方法预处理丙肝抗原,使得利用丙型肝炎病毒抗体进行检测的灵敏度显著提高,同时也显著提升了丙肝抗原的长期稳定性。在此基础上完成了本发明。

[0046] 发明人在实践中发现,现有技术中丙型肝炎病毒抗体检测灵敏度不足的主要原因在于,丙肝抗原自身蛋白结构造成反应的主要位点隐藏于内部,不易于暴露。解决该问题的常规方法采用,例如添加二硫苏糖醇来打开蛋白的空间结构。但该方法存在稳定性差,且有气味等缺陷。因此,现有技术中的方法一方面对于试剂盒的灵敏度没有太大的改善,另一方面还会造成试剂的不稳定,此外,较大的气味对于试剂使用者以及环境,均有一定的伤害。

[0047] 然而,发明人发现,采用特定的预处理剂进行丙肝抗原预处理,并将其生物素化后,丙型肝炎病毒抗体的检测灵敏度大大提高了,同时也确保了试剂的稳定性。

[0048] 本发明的预处理丙肝抗原及生物素化丙肝抗原及其制备方法

[0049] 基于以上的发现,本发明提供一种预处理的丙肝抗原,所述丙肝抗原经预处理剂处理一段时间,所述丙肝抗原预处理剂是4-硝基苯磺酚、或2-巯基乙烷磺酸钠;优选2-巯基乙烷磺酸钠。

[0050] 在另一优选的实施方式中,所述丙肝抗原预处理是在丙肝抗原中按照一定比例加入2-巯基乙烷磺酸钠反应,置于2~8℃,反应30分钟。

[0051] 在另一优选的实施方式中,进行丙肝抗原和2-巯基乙烷磺酸钠预处理反应时,所述丙肝抗原与2-巯基乙烷磺酸钠的反应浓度分别为0.5~5mg/mL、0.5%~5% (w/v),优选1mg/mL、1% (w/v)。

[0052] 在另一优选的实施方式中,进行丙肝抗原和2-巯基乙烷磺酸钠预处理反应时,所述丙肝抗原与2-巯基乙烷磺酸钠溶液的反应的体积比为1:5~1:20,优选1:10。

[0053] 相应地,本发明还提供了生物素化上文所述预处理的丙肝抗原的制备方法,所述方法包括以下步骤:

[0054] 1) 在丙肝抗原中加入预处理剂,反应一段时间;

[0055] 2) 利用生物素交联处理后的丙肝抗原;

[0056] 3) 将交联后的生物素化丙肝抗原保存于含预处理剂的稀释液中。

[0057] 在具体的实施方式中,具备优异的丙型肝炎病毒抗体检测灵敏度和稳定性的本发明生物素化预处理丙肝抗原的制备过程中采用以下工艺参数。

[0058] 在具体的实施方式中,所述丙肝抗原预处理剂是4-硝基苯磺酚、或2-巯基乙烷磺酸钠;优选2-巯基乙烷磺酸钠。

[0059] 在另一优选的实施方式中,所述丙肝抗原预处理是在丙肝抗原中按照一定比例加入2-巯基乙烷磺酸钠反应,置于2~8℃,反应30分钟。

[0060] 在另一优选的实施方式中,进行丙肝抗原和2-巯基乙烷磺酸钠预处理反应时,所述丙肝抗原与2-巯基乙烷磺酸钠的反应浓度分别为0.5~5mg/mL、0.5%~5% (w/v),优选1mg/mL、1% (w/v)。

[0061] 在另一优选的实施方式中,进行丙肝抗原和2-巯基乙烷磺酸钠预处理反应时,所述丙肝抗原与2-巯基乙烷磺酸钠溶液反应的体积比为1:5~1:20,优选1:10。

[0062] 在另一优选的实施方式中,进行生物素化丙肝抗原制备时,所述生物素(Biotin)的功能基团是氨基、羧基、羟基、或者巯基,优选巯基。

[0063] 在另一优选的实施方式中,所述生物素化丙肝抗原制备是将预处理丙肝抗原与Biotin按照一定比例进行反应,置于2~8℃,10mM PBS透析16~24小时。

[0064] 在另一优选的实施方式中,进行预处理丙肝抗原和Biotin交联时,所述预处理丙肝抗原与Biotin的反应浓度分别为0.5~5mg/mL、0.5~5mg/mL,优选1mg/mL、2mg/mL。

[0065] 在另一优选的实施方式中,进行预处理丙肝抗原和Biotin交联时,所述预处理丙肝抗原与Biotin的反应的摩尔浓度比例为1:5~1:50,优选1:15。

[0066] 本发明的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒

[0067] 本发明的生物素化预处理丙肝抗原可以用于检测丙型肝炎病毒抗体或制备丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒,从而显著提高检测丙型肝炎病毒抗体时的灵敏度和稳定性。因此,本发明还提供了一种丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒,所述试剂盒装有本发明的生物素化预处理丙肝抗原试剂。

[0068] 鉴于本发明的教导和现有技术,本领域普通技术人员可以确定所述肌钙蛋白I检测试剂盒中的其它组分,例如,在具体的实施方式中,本发明的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒还可装有:包被丙肝抗原的微孔板;辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素;阴性对照;阳性对照;显色液A;显色液B;洗涤液。

[0069] 相应地,本发明的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒中的所述显色剂A的主要成分为过氧化氢溶液,显色剂B的主要成分为3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)。

[0070] 本发明的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒可如下所示进行制备,包括:将本发明的生物素化预处理丙肝抗原,或本发明方法制备的生物素化预处理丙肝抗原制成

丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒。

[0071] 在具体的实施方式中,所述的生物素化丙肝抗原稀释液的配方为:10~100mM pH 7.2~7.8PBS、50~300mM KCl、5~40%牛血清、5~25mM EDTA·2Na、0.05~0.2%2-巯基乙烷磺酸钠、0.05~0.2%ProClin-300。

[0072] 在具体的实施方式中,辣根过氧化酶标记的链霉亲和素的稀释液的配方为:10~100mM pH 7.2~7.8Tris-HCl、50~300mM NaCl、0.5~2%BSA、5~15%甘油、0.05~0.5%吐温-20、0.05~0.2%ProClin-300;所述的在另一优选的实施方式中,所述的洗涤液配方为:10~100mM pH 7.2~7.8Tris-HCl、50~300mM NaCl、0.1~1%吐温-20、0.05~0.2%ProClin-300。

[0073] 本发明的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒

[0074] 本发明的生物素化预处理丙肝抗原可以用于检测丙型肝炎病毒抗体或制备丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒,从而显著提高检测丙型肝炎病毒抗体时的灵敏度和稳定性。因此,本发明还提供了一种丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒,所述试剂盒装有本发明的生物素化预处理丙肝抗原试剂。

[0075] 鉴于本发明的教导和现有技术,本领域普通技术人员可以确定所述肌钙蛋白I检测试剂盒中的其它组分,例如,在具体的实施方式中,本发明的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒还可装有:链霉亲和素磁微粒;碱性磷酸酶标记的鼠抗人IgG抗体;定标品;化学发光底物;洗涤液。

[0076] 相应地,本发明的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒中的所述化学发光底物的主要成分为1,2-二氧杂环丁烷衍生物,为酶促化学发光底物。在另一优选的实施方式中,所述1,2-二氧杂环丁烷衍生物为AMPPD(3-(2'-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3"-磷酰氧基)苯-1,2-二氧杂环丁烷)、CDP-star。

[0077] 相应地,本发明的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒中的所述的磁微粒试剂的主要成分是超顺磁性微粒,其粒径为800nm~3 μ m,主要的活性功能基团为羧基、氨基或苯甲磺酰基。

[0078] 本发明的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒可如下所示进行制备,包括:将本发明的生物素化预处理丙肝抗原,或本发明方法制备的生物素化预处理丙肝抗原制成丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒。

[0079] 在具体的实施方式中,所述的生物素化丙肝抗原稀释液的配方为:10~100mM pH 7.2~7.8PBS、50~300mM KCl、5~40%牛血清、5~25mM EDTA·2Na、0.05~0.2%2-巯基乙烷磺酸钠、0.05~0.2%ProClin-300。

[0080] 在具体的实施方式中,碱性磷酸酶标记鼠抗人IgG抗体的制备方法为戊二醛偶联法,具体为:将碱性磷酸酶溶于终浓度5%戊二醛溶液中,室温静置过夜,生理盐水透析后,加入鼠抗人IgG抗体,50mM pH 9.6碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中透析过夜,加入甘氨酸,室温反应2小时,等体积加入饱和硫酸铵,2~8℃2小时,4000rpm离心去上清,沉淀溶于50mM pH 7.40磷酸缓冲液中,对其透析过夜,加入等体积甘油,置于-20℃保存。

[0081] 在具体的实施方式中,所述的磁微粒试剂稀释液的配方为:10~100mM pH7.2~7.8Tris-HCl、50~300mM NaCl、0.5~2%BSA、2~15%甘油、0.05~0.2%ProClin-300;所述的碱性磷酸酶标记鼠抗人IgG抗体的稀释液的配方为:10~100mM pH 7.2~7.8Tris-

HCl、50~300mM NaCl、0.5~2%BSA、5~15%甘油、0.05~0.5%吐温-20、0.05~0.2% ProClin-300；所述的丙型肝炎病毒抗体定标品的浓度分别约为2NCU/mL；所述的丙型肝炎病毒抗体定标品的稀释液配方为：10~100mM pH7.2~7.8PB, 50~300mM NaCl, 3~8%BSA, 3%~10%蔗糖, 0.05~0.2%ProClin-300；所述的洗涤液配方为：10~100mM pH 7.2~7.8Tris-HCl, 50~300mM NaCl, 0.1~1%曲拉通X-100, 0.05~0.2%ProClin-300。

[0082] 本发明的丙型肝炎病毒抗体的检测方法

[0083] 在本发明的生物素化预处理丙肝抗原以及包含其的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒的基础上,本发明还提供一种检测丙型肝炎病毒抗体的方法,所述方法利用本发明的生物素化预处理丙肝抗原,或本发明的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒检测血液样本中的丙型肝炎病毒抗体。

[0084] 本领域技术人员知晓,本发明的丙型肝炎病毒抗体的检测方法可以用于诊断目的,但不限于诊断目的,例如,可用于科研目的等等。

[0085] 本发明的优点

[0086] 1) 本发明的丙肝抗原预处理工艺采用预处理剂与丙肝抗原优先反应,打断丙肝抗原构象中的二硫键,改变空间结构,将包含在蛋白内部的结合位点暴露出来,提高结合丙型肝炎病毒抗体的能力,提高灵敏度;

[0087] 2) 本发明使用2-巯基乙烷磺酸钠作为预处理剂,在改变丙肝抗原的空间结构的前提下,可以有效长期保持位点的暴露,提高检测丙型肝炎病毒抗体的检测稳定性;

[0088] 3) 本发明使用生物素化预处理丙肝抗原,能够极大的避免钩状效应的产生,对于高浓度的丙型肝炎病毒抗体均无影响;

[0089] 4) 本发明的试剂盒特异性强;胆红素、血红蛋白、乳糜颗粒、类风湿因子(RF)、抗核抗体(ANA)、人抗鼠抗体(HAMA)对丙型肝炎病毒抗体检测结果均无明显干扰。

[0090] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0091] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明方法中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0092] 实施例

[0093] 材料与amp;方法

[0094] 材料

[0095] 以下实施例中所用的化学试剂购自国药试剂

[0096] 碱性磷酸酶购自Roche

[0097] 辣根过氧化酶购自Roche

[0098] 丙肝抗原购自Meridian

[0099] 生物素购自Thermo。

[0100] 实施例1.生物素化预处理丙肝抗原的制备

[0101] 1) 将丙肝抗原和2-巯基乙烷磺酸钠分别用pH7.4, 20mM PBS稀释至1mg/mL和1%

(w/v)；

[0102] 2) 按照1:10的比例在丙肝抗原中添加2-巯基乙烷磺酸钠溶液，混匀，置于2~8℃，反应30分钟；

[0103] 3) 用pH7.4, 20mM PBS稀释预处理的丙肝抗原至1mg/mL；

[0104] 4) 将含有巯基功能团的Biotin溶解于纯化水中，配制成2mg/mL Biotin溶液；

[0105] 5) 按照1:15的比例，在预处理的丙肝抗原中加入含有巯基功能团的Biotin溶液；

[0106] 6) 混匀，置于室温，反应30分钟；

[0107] 7) 置于pH7.4, 20mM PBS溶液透析过夜；

[0108] 8) 按体积比1:1加入甘油，混匀，置于-20℃保存，制得生物素化预处理丙肝抗原。

[0109] 实施例2. 丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒的制备

[0110] 1. 生物素化丙肝抗原试剂的制备

[0111] 生物素化丙肝抗原试剂稀释液配方：

物料	浓度
Tris	50 mM (摩尔浓度)
KCl	150 mM (摩尔浓度)
牛血清	20% (质量百分数)
EDTA · 2Na	10 mM(摩尔浓度)
2-巯基乙烷磺酸钠	0.1%(质量百分数)
ProClin-300	0.1% (质量百分数)
pH调至7.4	

[0113] 将生物素化丙肝抗原用稀释液稀释至0.2μg/mL，室温充分混匀至少30分钟，制得生物素化丙肝抗原试剂。

[0114] 2. 链霉亲和素酶试剂的制备

[0115] 链霉亲和素酶试剂稀释液配方：

物料	浓度
Tris	50 mM(摩尔浓度)
NaCl	150 mM(摩尔浓度)
BSA	1%(质量百分数)
甘油	10%(体积百分数)
吐温-20	0.1%(体积百分数)
ProClin-300	0.1%(体积百分数)
pH调至7.4	

[0117] 将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素用酶稀释液稀释至1:1000~1:5000，室温充分混匀至少30分钟，制得链霉亲和素酶试剂。

[0118] 3. 洗涤液的制备

[0119] 洗涤液配方：

物料	浓度
Tris	50 mM (摩尔浓度)

[0121]	NaCl	150 mM (摩尔浓度)
	吐温-20	0.1% (体积百分数)
	ProClin-300	0.1% (体积百分数)
pH调至7.4		

[0122] 按配方配制洗涤液,室温充分混匀至少30分钟,制得洗涤液。

[0123] 4. 丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法的检测方法

[0124] 1) 加入50 μ l血清或血浆样本、50 μ l生物素化丙肝抗原试剂至已包被抗原的微孔板中;

[0125] 2) 37 $^{\circ}$ C反应60分钟;

[0126] 3) 去上清液,加入300 μ l洗涤液;

[0127] 4) 重复步骤3) 4次;

[0128] 5) 去上清液,加入100 μ l酶试剂;

[0129] 6) 37 $^{\circ}$ C反应30分钟;

[0130] 7) 去上清液,加入300 μ l洗涤液;

[0131] 8) 重复步骤7) 2次;

[0132] 9) 去上清液,加入50 μ l显色剂A和50 μ l显色剂B;

[0133] 10) 37 $^{\circ}$ C下反应30分钟;

[0134] 11) 加入50 μ l终止液,读OD值。

[0135] 实施例3. 丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒的制备

[0136] 1. 链霉亲和素磁微粒试剂的制备

[0137] 链霉亲和素磁微粒试剂稀释液配方:

物料	浓度
Tris	50 mM (摩尔浓度)
NaCl	150 mM (摩尔浓度)
[0138] BSA	1% (质量百分数)
甘油	10%(质量百分数)
ProClin-300	0.1% (质量百分数)
pH调至7.5	

[0139] 将链霉亲和素磁微粒用磁微粒稀释液稀释至0.5mg/mL,室温充分混匀至少30分钟,制得肌钙蛋白I磁微粒试剂。

[0140] 2. 碱性磷酸酶标记鼠抗人IgG抗体的制备

[0141] 1) 将碱性磷酸酶溶于终浓度5%戊二醛溶液中,使得碱性磷酸酶的浓度为10mg/mL;

[0142] 2) 室温静置过夜;

[0143] 3) 用生理盐水(体积比大于1:200)透析至少4小时;

[0144] 4) 取出透析后的碱性磷酸酶,按照质量1:1的比例加入鼠抗人IgG抗体,充分混匀;

[0145] 5) 50mM pH 9.6碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液中透析过夜;

[0146] 6) 取出透析液,按照体积比1:1000加入1M甘氨酸溶液,混匀,终止反应2小时;

- [0147] 7) 等体积加入饱和硫酸铵, 2~8℃保存2小时;
- [0148] 8) 4000rpm离心去上清, 沉淀溶于50mM pH 7.40磷酸缓冲液中;
- [0149] 9) 50mM pH 7.40磷酸缓冲液中透析过夜;
- [0150] 10) 取出透析液加入等体积的甘油, 制得碱性磷酸酶标记鼠抗人IgG抗体, 置于-20℃保存。

[0151] 3. 酶试剂的制备

[0152] 酶试剂稀释液配方:

物料	浓度
Tris	50 mM(摩尔浓度)
KCl	150 mM(摩尔浓度)
BSA	1%(质量百分数)
[0153] 甘油	10%(体积百分数)
吐温-20	0.2%(体积百分数)
ProClin-300	0.1%(体积百分数)
pH调至7.4	

[0154] 将碱性磷酸酶标记鼠抗人IgG抗体用酶稀释液稀释至1:1000~1:5000, 室温充分混匀至少30分钟, 制得酶试剂。

[0155] 4. 生物素化丙肝抗原试剂的制备

[0156] 生物素化丙肝抗原试剂稀释液配方:

物料	浓度
Tris	50 mM (摩尔浓度)
KCl	150 mM (摩尔浓度)
[0157] 牛血清	20% (质量百分数)
EDTA · 2Na	10 mM(摩尔浓度)
2-巯基乙烷磺酸钠	0.1%(质量百分数)
ProClin-300	0.1% (质量百分数)
pH调至7.4	

[0158] 将生物素化丙肝抗原用稀释液稀释至0.2μg/mL, 室温充分混匀至少30分钟, 制得生物素化丙肝抗原试剂。

[0159] 5. 洗涤液的制备

[0160] 洗涤液配方:

物料	浓度
Tris	75 mM (摩尔浓度)
[0161] NaCl	150 mM (摩尔浓度)
曲拉通X-100	0.1% (体积百分数)
ProClin-300	0.1% (体积百分数)
pH调至7.5	

[0162] 按配方配制洗涤液, 室温充分混匀至少30分钟, 制得洗涤液。

[0163] 6. 丙型肝炎病毒抗体化学发光法的检测方法

[0164] 1) 加入10 μ l血清或血浆样本、50 μ l磁微粒试剂、50 μ l生物化丙肝抗原试剂；

[0165] 2) 37 $^{\circ}$ C反应15分钟；

[0166] 3) 磁吸后去上清液，加入300 μ l洗涤液；

[0167] 4) 重复步骤3) 2次；

[0168] 5) 磁吸后去上清液，加入150 μ l酶试剂；

[0169] 6) 37 $^{\circ}$ C反应15分钟；

[0170] 7) 磁吸后去上清液，加入300 μ l洗涤液；

[0171] 8) 重复步骤7) 2次；

[0172] 9) 磁吸后去上清液，加入300 μ l化学发光底物；

[0173] 10) 37 $^{\circ}$ C下反应10分钟；

[0174] 11) 光电倍增管 (PMT) 读取相对发光单位 (RLU)，自动计算结果。

[0175] 实施例4. 丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒参考品结果

[0176] 利用实施例2制备的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒检测经国家参考品标化的丙型肝炎病毒抗体企业内部参考品，检测结果如下。

[0177]

阴性参考品	S/CO	阳性参考品	S/CO	Core	NS3-1	NS3-2	NS4	NS5
N1	0.05	P1	5.43	2+	-	-	-	-
N2	0.01	P2	6.12	2+	-	-	±	-
N3	0.03	P3	8.77	2+	-	-	±	±
N4	0.03	P4	10.54	2+	-	±	±	-
N5	0.01	P5	3.52	1+	-	±	±	-
N6	0.02	P6	2.17	±	1+	±	-	±
N7	0.04	P7	3.86	1+	±	-	-	-
N8	0.04	P8	12.82	3+	3+	±	-	-

[0178]

N9	0.02	P9	13.57	3+	3+	±	±	±
N10	0.04	P10	13.27	3+	3+	3+	±	-
N11	0.02	P11	13.08	3+	2+	1+	-	-
N12	0.02	P12	13.16	3+	3+	2+	3+	3+
N13	0.02	P13	12.99	3+	2+	2+	+	-
N14	0.01	P14	13.75	2+	2+	-	-	-
N15	0.02	P15	13.24	3+	3+	2+	2+	2+
N16	0.01	P16	12.99	3+	2+	1+	3+	-
N17	0.00	P17	2.87	1+	-	-	-	-
N18	0.00	P18	6.58	1+	-	-	-	-
N19	0.01	P19	13.44	3+	3+	2+	-	-
N20	0.01	P20	13.21	3+	1+	1+	-	-
N21	0.03	P21	2.54	±	±	±	±	-
N22	0.03	P22	13.65	3+	±	-	1+	±
N23	0.04	P23	13.08	3+	3+	3+	2+	3+
N24	0.01	P24	12.89	3+	-	-	-	-
N25	0.01	P25	9.21	±	2+	±	±	-
N26	0.01	P26	9.03	±	-	±	±	2+
N27	0.05	P27	8.53	2+	±	±	±	-
N28	0.00	P28	13.28	3+	3+	2+	2+	3+
N29	0.02	P29	13.06	3+	2+	2+	2+	-
N30	0.03	P30	13.35	3+	2+	2+	2+	-

[0179] 企业内部参考品的阴性符合率为30/30,阳性符合率为30/30。

[0180] 实施例5.丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒参考品结果

[0181] 利用实施例3制备的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒检测经国家参考品标化的丙型肝炎病毒抗体企业内部参考品,检测结果如下。

[0182]

阴性参考品	S/CO	阳性参考品	S/CO	Core	NS3-1	NS3-2	NS4	NS5
N1	0.18	P1	7.93	2+	-	-	-	-
N2	0.26	P2	11.08	2+	-	-	±	-
N3	0.20	P3	6.90	2+	-	-	±	±
N4	0.31	P4	13.53	2+	-	±	±	-
N5	0.15	P5	7.37	1+	-	±	±	-
N6	0.35	P6	5.89	±	1+	±	-	±
N7	0.14	P7	4.50	1+	±	-	-	-
N8	0.18	P8	106.55	3+	3+	±	-	-
N9	0.31	P9	190.09	3+	3+	±	±	±
N10	0.25	P10	133.92	3+	3+	3+	±	-
N11	0.26	P11	95.45	3+	2+	1+	-	-
N12	0.18	P12	178.24	3+	3+	2+	3+	3+
N13	0.23	P13	143.81	3+	2+	2+	+	-
N14	0.20	P14	40.56	2+	2+	-	-	-
N15	0.25	P15	101.39	3+	3+	2+	2+	2+

[0183]

N16	0.18	P16	134.10	3+	2+	1+	3+	-
N17	0.34	P17	3.97	1+	-	-	-	-
N18	0.24	P18	8.17	1+	-	-	-	-
N19	0.25	P19	145.15	3+	3+	2+	-	-
N20	0.23	P20	39.73	3+	1+	1+	-	-
N21	0.15	P21	3.60	±	±	±	±	-
N22	0.20	P22	24.68	3+	±	-	1+	±
N23	0.14	P23	176.55	3+	3+	3+	2+	3+
N24	0.15	P24	33.89	3+	-	-	-	-
N25	0.17	P25	9.32	±	2+	±	±	-
N26	0.22	P26	9.85	±	-	±	±	2+
N27	0.20	P27	5.82	2+	±	±	±	-
N28	0.16	P28	66.33	3+	3+	2+	2+	3+
N29	0.19	P29	110.00	3+	2+	2+	2+	-
N30	0.18	P30	88.92	3+	2+	2+	2+	-

[0184] 企业内部参考品的阴性符合率为30/30,阳性符合率为30/30。

[0185] 实施例6.本发明的试剂盒与现有进口试剂盒的临床比对结果

[0186] 本发明人利用本发明实施例2制备的丙型肝炎病毒抗体酶联免疫法检测试剂盒和实施例3制备的丙型肝炎病毒抗体化学发光法检测试剂盒以及市售可得的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒 (Abbott公司) 对共2059例临床样本进行了检测,并通过SPSS 19.0统计软件进行一致性分析。

[0187] 对2059例样本测定结果,按照统计学方法处理检测结果数据,将参比试剂 (Abbott公司丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒) 和考核试剂 (本发明所述酶联免疫法试剂盒、化学发光法试剂盒) 测定的结果进行四格表分析,统计分析如下:

丙型肝炎病毒抗体一致性		参比试剂		合计
		阳性	阴性	
考核试剂 (酶联免疫法)	阳性	652	0	652
	阴性	0	1407	1407
合计		652	1407	2059

[0188]

丙型肝炎病毒抗体一致性		参比试剂		合计
		阳性	阴性	
考核试剂 (化学发光法)	阳性	652	0	652
	阴性	0	1407	1407
合计		652	1407	2059

[0189] 考核试剂(酶联免疫法试剂盒)与参比试剂的阳性符合率(PPA)为100%(652/652)(95%置信区间为99.41%~100%),阴性符合率(NPA)为100%(1407/1407)(95%置信区间为99.73%~100%),总符合率(OPA)为100%(2059/2059)(95%置信区间为99.81%~100%)。

[0190] 本次测定结果的Kappa值为 $1 > 0.75$, $P < 0.05$,故可以认为两种试剂测定的结果存在较高的一致性。

[0191] 现有的Abbott公司的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒是目前临床上用于丙型肝炎病毒抗体检测市场份额最高的产品之一,其试剂盒的临床性能已被临床广泛接受。本发明所述的试剂盒在临床试验比对中,与进口试剂的结果一致性高度吻合,因此,本发明的试剂盒能满足目前市场上对丙型肝炎病毒抗体检测的需求,且生产成本远低于该试剂盒。

[0192] 对比例1. 预处理对检测结果的影响

[0193] 为验证本发明的使用预处理剂处理丙肝抗原的方法可以提高丙型肝炎病毒抗体弱阳性样本的检出能力,本发明人比较了预处理前后丙肝抗原对弱阳性样本的检测结果,结果明显发现,预处理后的丙肝抗原有着显著的提升效果,能提高试剂灵敏度,降低漏检风险。

[0194]

弱阳性样本	未预处理	预处理	片段				
	S/CO	S/CO	Core	NS3-1	NS3-2	NS4	NS5
1	0.58	3.58	1+	-	-	-	-
2	1.25	4.19	+	1+	±	±	-
3	2.49	6.78	1+	1+	-	±	±
4	0.32	1.54	-	-	±	1+	-
5	2.58	6.92	1+	-	±	±	-
6	0.87	3.05	-	1+	±	-	±
7	1.68	7.24	1+	±	-	-	-
8	0.74	3.47	-	1+	±	-	-
9	0.62	2.15	-	±	1+	±	±
10	1.27	5.41	-	1+	±	1+	-

[0195] 从上表所示结果可以看出,未利用2-巯基乙烷磺酸钠进行预处理的弱阳性样本进

进行检测得到结果出现显著的假阴性；而利用2-巯基乙烷磺酸钠进行预处理的弱阳性样本进行检测得到结果为阳性。

[0196] 因此,作为丙肝抗原的预处理剂,使用本发明的预处理剂预处理的弱阳性样本的检测灵敏度显著提高。

[0197] 对比例2.不同预处理剂预处理丙肝抗原对检测结果的影响

[0198] 本发明人进一步比较了本发明的预处理剂与传统的预处理剂对检测结果的影响。

[0199] 通过比较本发明的预处理剂,2-巯基乙烷磺酸钠与传统的预处理剂,二硫苏糖醇进行预处理的试剂稳定性结果,可以明显发现,使用2-巯基乙烷磺酸钠作为丙肝抗原预处理剂,能够持续保持弱阳性的检出,稳定性明显优于利用二硫苏糖醇进行预处理所得的结果。

处理剂	二硫苏糖醇处理			2-巯基乙烷磺酸钠		
	0个月	6个月	12个月	0个月	6个月	12个月
弱阳性样本	S/CO	S/CO	S/CO	S/CO	S/CO	S/CO
1	1.78	1.01	0.73	3.58	3.50	3.38
2	3.21	1.93	1.39	4.19	4.18	4.07
3	4.25	2.86	2.25	6.78	6.65	6.52
[0200] 4	1.23	0.83	0.64	1.54	1.47	1.38
5	3.58	2.43	1.88	6.92	6.74	6.61
6	1.45	0.86	0.67	3.05	3.00	2.87
7	5.29	2.67	2.06	7.24	7.17	7.03
8	1.88	1.12	0.79	3.47	3.38	3.31
9	1.18	0.71	0.52	2.15	2.05	1.91
10	3.57	2.47	1.92	5.41	5.27	5.20

[0201] 从上表所示结果可以看出,利用二硫苏糖醇进行预处理的弱阳性样本在保持6个月,进行检测得到显著的假阴性结果;而利用2-巯基乙烷磺酸钠进行预处理的弱阳性样本在保持6个月,甚至12个月,进行检测得到结果均为阳性。

[0202] 因此,作为丙肝抗原的预处理剂,本发明使用的预处理剂相比于传统的处理剂(二硫苏糖醇),试剂稳定性显著更优。

[0203] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

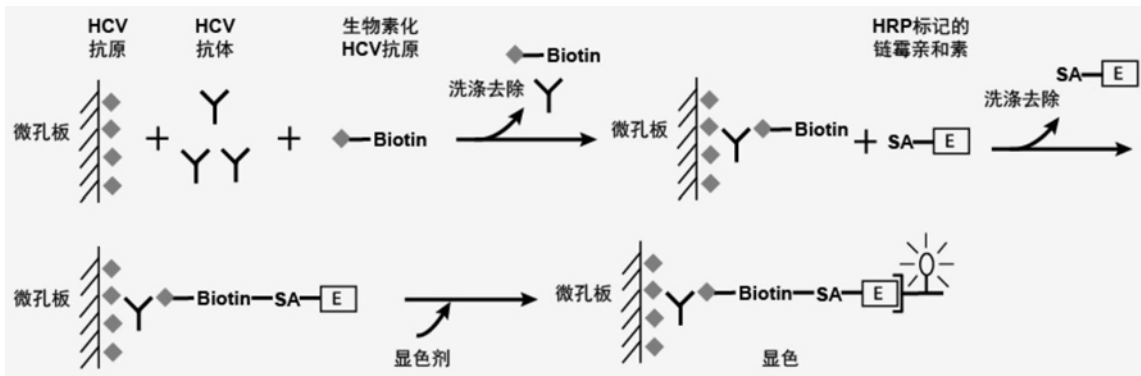


图1

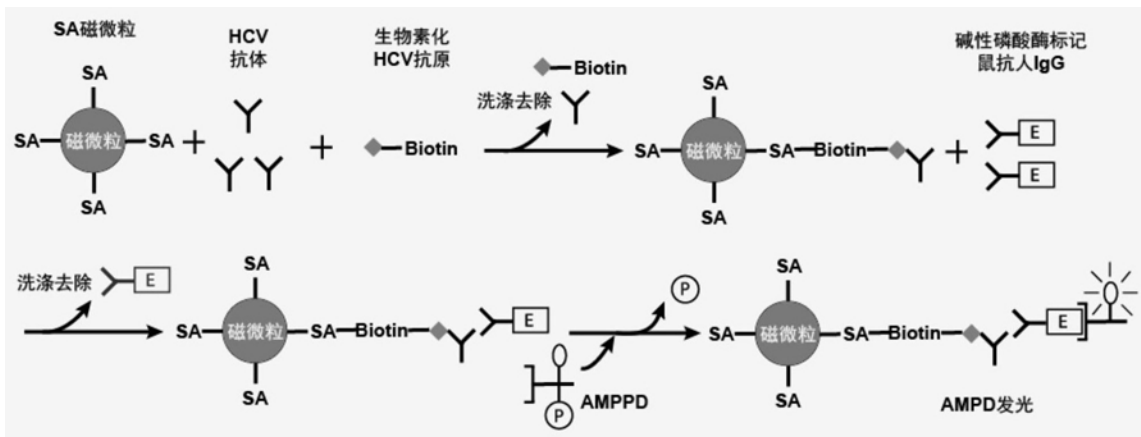


图2

专利名称(译)	一种预处理丙肝抗原的方法和检测试剂盒		
公开(公告)号	CN107247144B	公开(公告)日	2019-12-24
申请号	CN2017110344706.3	申请日	2017-05-16
[标]申请(专利权)人(译)	上海科华生物工程股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海科华生物工程股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海科华生物工程股份有限公司		
[标]发明人	陈超 夏泽 张巍佳 罗紫臣 彭珊 姚姣妮		
发明人	陈超 夏泽 张巍佳 罗紫臣 彭珊 姚姣妮		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/553 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/535 G01N33/553 G01N33/56983		
代理人(译)	崔佳佳 陆凤		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN107247144A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种预处理丙肝抗原及生物素化丙肝抗原制备方法和包括所述生物素化丙肝抗原的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒。本发明对丙肝抗原进行预处理，改变了蛋白构象，再与生物素反应，从而制得生物素化丙肝抗原。本发明的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒采用预处理后的丙肝抗原与生物素反应，制备生物素化丙肝抗原，能够大幅度提高丙肝抗体的检测能力，同时提高特异性，具有稳定性好、易于生产控制等优点；从而可以大规模适用于丙型肝炎病毒的辅助诊断与血液筛查。

物料	浓度
Tris	50 mM (摩尔浓度)
KCl	150 mM (摩尔浓度)
牛血清	20% (质量百分数)
EDTA • 2Na	10 mM (摩尔浓度)
2-巯基乙烷磺酸钠	0.1% (质量百分数)
ProClin-300	0.1% (质量百分数)
pH调至7.4	