

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/576

G01N 33/535



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310111147. X

[43] 公开日 2004 年 11 月 17 日

[11] 公开号 CN 1547029A

[22] 申请日 2003.12.3

[21] 申请号 200310111147. X

[71] 申请人 昆明克莱森生物科技有限责任公司

地址 650118 云南省昆明市高新技术产业开发区生物创新中心

[72] 发明人 谢忠平 董少忠 王 群 董少华  
李琦涵

[74] 专利代理机构 云南协立专利事务所

代理人 旃习涵 卢汉章

权利要求书 1 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 一种检测丙型肝炎病毒抗原的方法及其装置

[57] 摘要

本发明公开了一种检测丙型肝炎病毒抗原的方法及其装置。其设计了一个由 10 个特异性抗原表位组成的丙型肝炎病毒复合抗原，利用此抗原及所诱导抗体构建的丙型肝炎病毒抗原检测试剂盒，经检测能识别多种基因型丙型肝炎病毒感染血清及血浆中的丙型肝炎病毒抗原。该试剂盒具有较高特异性和较低的假阴性率及假阳性率，预示着良好的应用前景。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种检测丙型肝炎病毒抗原的方法，该方法包括下列步骤：

(1) 利用重组的对各个型别丙型肝炎病毒均具有代表意义的复合多表位抗原，免疫动物，获取高效价免疫血清；

(2) 经亲和层析纯化得到高纯度的抗丙型肝炎病毒抗体，将该抗体包被在酶标板上，其可以特异性地与人血清或血浆中的来自各种丙型肝炎病毒型别的丙型肝炎病毒抗原结合，经反复清洗去除非特异性结合；

(3) 再加入上述相同的标记了过氧化物酶的抗体，使之与被包被的酶标板特异结合的丙型肝炎病毒抗原结合，清洗去除非特异性结合物之后，以酶底物显色；

(4) 根据其底物的颜色变化程度来确定与包被抗体结合的抗原含量的大小。

2. 一种用于检测丙型肝炎病毒抗原的的装置，所述装置包括：已包被丙型肝炎病毒-IgG的96孔板1块，酶结合物1瓶，样品稀释液1瓶，显色液A1瓶，显色液B1瓶，阴性参考品1瓶，阳性参考品1瓶；是采用双抗体夹心ELISA法，包被物是丙型肝炎病毒-IgG，包被缓冲液是pH为9.50的0.05M碳酸盐缓冲液、抗体浓度为25ug/ml，每孔加量100ul；指示抗体为过氧化物酶标记的丙型肝炎病毒-IgG，使用效价1:1000-1:2000；显色体系为TMB体系。

## 一种检测丙型肝炎病毒抗原的方法及其装置

### 技术领域

本发明涉及病毒抗原的检测方法以及实现该方法的装置。本发明的方法和装置特别适于检测丙型肝炎病毒。

### 背景技术

丙型肝炎病毒（HCV）是继甲型肝炎病毒（HAV）和乙型肝炎病毒（HBV）之后被确认的人类肝炎病毒，它和以前2个病毒一样，是引起人类传染性肝炎的病原体。丙型肝炎病毒的病原学、传染病学、流行病学分析已表明，它的感染常常导致慢性迁延性肝炎，这些慢性肝炎中大约50%患者可能出现肝硬化与肝癌。因此，它是在HAV、HBV所导致的病毒性感染得到了疫苗的有效控制之后，人类所面临的另一种重要的感染性疾病。十多年来对丙型肝炎的治疗情况表明，目前除干扰素对丙型肝炎的治疗有一定的非特异性作用外，尚无针对丙型肝炎病毒的特异药物。

对丙型肝炎病毒的病原学分析提供了丙型肝炎病毒的分子生物学结构及生物学特性的资料。实验表明，丙型肝炎病毒属于黄病毒属，是单股正链RNA病毒。该基因RNA长约10000个核苷酸（不同序列长度有差异），编码三种结构蛋白C、E和E2，及非结构蛋白。目前，已知的丙型肝炎病毒基因共有6个，而血清型数量更多。造成这种众多的亚型及血清型原因是丙型肝炎病毒基因的多型性及多变性，例如，作为丙型肝炎病毒主要抗原成分的膜蛋白（即E蛋白）其变异度高达30%，丙型肝炎病毒这种特性，决定了其在疫苗研究中的困难，即一种型别的丙型肝炎病毒感染获得的免疫应答，对其他型别丙型肝炎病毒的感染基本上无保护作用，而利用一种型别丙型肝炎病毒制备的免疫诊断试剂，难以对另一种丙型肝炎病毒的感染做出有意义的诊断。同时，丙型肝炎病毒至今都不能在体外组织细胞培养上生长。因此，传

统的疫苗开发研究难以进行，而使用基因工程技术研制的以结构和非结构多肽为主的疫苗又受到基因易变性的影响。因而丙型肝炎病毒自 1989 年首次报导以来，至今尚无疫苗问世。同时，其诊断试剂亦仅有抗体检测试剂问世，这一技术限制使临床诊断丙型肝炎病毒感染只能提供患者是否有丙型肝炎病毒感染的经历，即抗体的存在，而无法证实哪一段时期病人体内是否有丙型肝炎病毒复制增殖，即病人体内抗原存在与否。这些技术障碍使得丙型肝炎病毒导致的丙型肝炎的检测存在较大的困难。

### 发明内容

本发明的目的是针对现有技术的不足，避免现有检测方法的局限性，提供一种检测丙型肝炎病毒抗原的方法。同时，本发明的目的还在于提供一种实现所述方法的装置，即丙型肝炎病毒抗原检测试剂盒。

本发明的目的通过下述技术方案予以实现。

本发明提供了一种检测丙型肝炎病毒抗原的方法，该方法包括下列步骤：

(1) 利用重组的对各个型别丙型肝炎病毒均具有代表意义的复合多表位抗原，免疫动物，获取高效价免疫血清；

(2) 经亲和层析纯化得到高纯度的抗丙型肝炎病毒抗体，将该抗体包被在酶标板上，其可以特异性地与人血清或血浆中丙型肝炎病毒抗原（来自各种丙型肝炎病毒型别）结合，经反复清洗去除非特异性结合；

(3) 再加入上述相同的标记了过氧化物酶（HRP）的抗体，使之与被包被的酶标板特异结合的丙型肝炎病毒抗原结合，清洗去除非特异性结合物之后，以酶底物显色；

(4) 根据其底物的颜色变化程度来确定与包被抗体结合的抗原含量的大小。

用于实现本发明的方法的装置包括：

已包被丙型肝炎病毒 - 免疫球蛋白 G (IgG) 的 96 孔板 1 块，酶结合物 1 瓶，样品稀释液 1 瓶，显色液 A 1 瓶，显色液 B 1 瓶，阴性参考品 1 瓶，阳

性参考品 1 瓶；

上述装置采用双抗体夹心 ELISA 法，包被物是丙型肝炎病毒 - IgG，包被缓冲液是 pH 为 9.50 的 0.05M 碳酸盐缓冲液、抗体浓度为 25ug/ml，每孔加量 100ul；指示抗体为过氧化物酶（HRP）标记的丙型肝炎病毒 - IgG，使用效价 1: 1000 - 1: 2000；显色体系为 3, 3', 5, 5' - 四甲基联苯胺(TMB) 体系。

与现有技术相比，本发明具有以下突出优点：

1. 本发明经过对丙型肝炎病毒分子生物学全面分析，以复合型多表位抗原为基础，通过对抗丙型肝炎病毒型别表位的分析，寻找多型别丙型肝炎病毒在这些表位上的保守位点，经过蛋白结构的分析，组合成一个多表位复合抗原结构，它可以在一定程度上表现多个丙型肝炎病毒型别的抗原性，从而使其在临床诊断的中具有实际应用价值。

2. 本发明在前期工作的基础上，设计了一个由 10 个特异性抗原表位组成的丙型肝炎病毒复合抗原，利用此抗原及所诱导抗体构建的丙型肝炎病毒抗原检测试剂盒，经检测能识别多种基因型丙型肝炎病毒感染血清及血浆中的丙型肝炎病毒抗原。该试剂盒具有较高特异性和较低的假阴性率及假阳性率，取得了令人鼓舞的试验结果，预示着良好的应用前景。

3. 本发明的试剂盒基于酶联免疫吸附的基本原理，建立丙型肝炎病毒抗原（丙型肝炎病毒 Ag）双抗体夹心法 ELISA 检测试剂盒，主要用于检测丙型肝炎病毒感染者血清或血浆中存在的丙型肝炎病毒抗原，为临床判断丙型肝炎病毒感染的人的病程进展情况提供相应指标。本发明弥补了现有丙型肝炎病毒诊断试剂中仅能检测丙型肝炎病毒抗体的不足。为临床诊断、健康检查，献血员筛选等提供一种可靠的检测方法，缩短窗口期，减少输血后丙型肝炎的发生；同时为丙型肝炎的早期临床诊断提供依据，有利于早期诊断及早期治疗。

4. 本发明提供的试剂盒的灵敏度、特异度、CV 值、稳定性等指标均符合《中国生物制品规程》2000 版的相关要求，能够检出血清及血浆中的丙型肝炎病毒，操作简单，使用方便，是血站对献血员的筛选及临床对丙型肝炎

病人的诊断的灵敏、特异的检测方法。

### 具体实施方式

通过下面给出的具体实施例，可以进一步清楚地了解本发明。但它们不是对本发明的限定。

#### 实施例 1

检测丙型肝炎病毒抗原方法，所述方法包括以下步骤：（1）抗体包被：I-丙型肝炎病毒-IgG；（2）样品中的抗原与包被抗体结合：I-丙型肝炎病毒-IgG—丙型肝炎病毒；（3）酶标记的丙型肝炎病毒抗体与抗原结合：I-丙型肝炎病毒-IgG—丙型肝炎病毒—IgG-HRP；（4）加入过氧化物酶（HRP）的底物液显色；（5）用 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  终止反应；（6）酶标仪检测。

#### 实施例 2

丙型肝炎病毒抗原检测试剂盒的制备方法：

（1）免疫用抗原：所述的检测试剂盒制备抗体所用的抗原，是利用分子生物学技术重组的含有 10 个丙型肝炎病毒高度保守区基因，利用大肠杆菌表达、并经过高度纯化的丙型肝炎病毒多表位复合抗原。该抗原具有较好的免疫原性，能诱导动物产生针对丙型肝炎病毒的高效价特异性抗体应答。由于免疫原的高度高保守性，所制备的抗体能识别不同型的丙型肝炎病毒。

（2）特异性抗体制备：使用清洁级日本大白兔，体重 1.8-2.0 Kg，注射剂量为 1mg/ml 复合抗原与等量的不完全福氏佐剂充分乳化混匀，肌肉多点注射。免疫程序为 0、1、3 个月共 3 次免疫；第三次免疫后 7 天验血，抗体特异性检测采用科华公司及华美公司生产的丙型肝炎病毒抗体检测试剂盒进行检测，效价  $\geq 1: 6400$  时，颈动脉放血，分离血清。

（3）抗体纯化：所用抗体是经过三次硫酸胺粗纯化、并用 Printon A/G 亲和层析而得，达到电泳级纯度。①取一定体积的特异型血清，加入等量的生理盐水混匀，再加入 2 倍血清体积的饱和硫酸胺，使之成为 50%浓度，放 4℃ 冰箱过夜。② 5000r/min 离心 30 分钟，弃上清，沉淀用 10ml 0.01M 的

PBS (pH7.40) 溶解, 再加入 5 ml 饱和硫酸胺, 使之成为 33% 浓度, 室温放置 60 分钟。③重复步骤②, 沉淀用适量体积的 0.01M PBS 溶解备用。④亲和层析: 按 Printon A/G (PIEREC 公司产品) 使用说明书要求进行操作, 收集洗脱峰部分, 合并、浓缩。⑤亲和层析后的抗体经过效价检测、纯度检测及含量检测后分装冻存于-70℃冰箱备用。

(4) 抗体标记: 采用过氧化物酶 (HRP), 改良过碘酸法进行标记。① 19mgHRP 用 1.5ml 去离子水溶解, 加入 1.5ml 过碘酸钠混匀, 4℃避光放置 30 分钟。②加入 1.5ml 0.16M 乙二醇液, 混匀, 室温 30 分钟。③加入 19mg 丙型肝炎病毒-IgG, 装入透析袋中, 用 0.05 M 碳酸盐缓冲液 (pH9.50), 4℃冰箱透析过夜, 中途换透析液 2 次。④加 5mg/ml  $\text{NaBH}_4$  0.3ml, 混匀, 放 4℃冰箱保存 3 小时, 加入相同体积的饱和硫酸胺, 使之成为 50%硫酸胺, 放 4℃冰箱保存 2 小时, 12000 r/min 离心 20 分钟, 弃上清, 沉淀用 0.01M 的 PBS (pH7.40) 溶解。⑤将上述溶解物装入透析中, 对 0.01M 的 PBS (pH7.40) 透析过夜。⑥加入相同体积的甘油, 混匀, 分装, 冻存于-70℃冰箱备用。

(5) 备好一块 96 孔聚苯乙烯板。

(6) 判定: 所述的检测试剂盒以 Cutoff 值作为判定依据, Cutoff 值是在检测 800 多份样品基础上确定,  $\text{Cutoff 值} = \text{阴性参考品 OD 值} + 0.150$ 。样品 OD 值 > Cutoff 值判为阳性; 样品 OD 值 ≤ Cutoff 值判为阴性。

### 实施例 3

丙型肝炎病毒抗原检测试剂盒的灵敏度及特异度测试: 是以丙型肝炎病毒-RNA 检测复核作为依据。用实施例 2 所述试剂盒检测为丙型肝炎抗原 (HCAg) 阴性及阳性的样品, 用小量病毒 RNA/DNA 提取试剂盒提取丙型肝炎病毒-RNA, 再用 RT-PCR 检测试剂盒进行丙型肝炎病毒-RNA 检测, 以确定其灵敏度 (真阳性率)、特异度 (真阴性率)、假阳性率、假阴性率、粗一致性、调整一致性、约登指数、阳性预示值及阴性预示值。共比较样品 400 份, 结果见表 1。

表 1.

试剂盒HCAg检测结果	RT-PCR法检测结果		合计
	阳性	阴性	
阳性	34	3	37
阴性	5	258	363
合计	39	361	400

其中:

- (1) 灵敏性 =  $A \div (A + C) \times 100\% = 87.18\%$
- (2) 特异性 =  $D \div (B + D) \times 100\% = 99.17\%$
- (3) 假阳性率 =  $B \div (B + D) \times 100\% = 0.83\%$
- (4) 假阴性率 =  $C \div (A + C) \times 100\% = 12.83\%$
- (5) 粗一致性 =  $(A + D) \div (A + B + C + D) \times 100\% = 98.00\%$
- (6) 约登指数 =  $[A \div (A + C)] + [D \div (B + D)] = 0.86$
- (7) 阳性预示值 =  $A \div (A + B) \times 100\% = 91.89\%$
- (8) 阴性预示值 =  $D \div (C + D) \times 100\% = 98.62\%$
- (9) 调整一致性 =  $[A \div (A + B)] + [A \div (A + C)] + [D \div (B + D)] + [D \div (C + D)] \times 100\% \times 0.25 = 94.22\%$

#### 实施例 4

丙型肝炎病毒抗原检测试剂盒的阳性检出率, 见表 2。

表 2.

保存条件及时间	样本数	阳性数		阴性数	符合率		
		中强阳性	弱阳性		中强阳性	弱阳性	阴性
4℃2个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
4℃4个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
4℃6个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
4℃8个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
4℃10个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
-20℃6个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
-20℃8个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
-20℃10个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
-20℃12个月	16	4	4	8	100%	100%	100%

37°C1d	16	4	4	8	100%	100%	100%
37°C2d	16	4	4	8	100%	100%	100%
37°C3d	16	4	4	8	100%	100%	100%

### 实施例 5

丙型肝炎病毒抗原检测试剂盒的检出下限，见表 3。

表 3.

保存条件及时间	检测下限	保存条件及时间	检测下限
-20°C2 天	1: 128	-20°C6 个月	1: 128
4°C2 个月	1: 128	-20°C8 个月	1: 128
4°C4 个月	1: 128	-20°C10 个月	1: 128
4°C6 个月	1: 128	-20°C12 个月	1: 128
4°C8 个月	1: 128	37°C1d	1: 128
4°C10 个月	1: 64	37°C2d	1: 128
		37°C3d	1: 128

### 实施例 6

丙型肝炎病毒抗原检测盒的变异系数(CV 值): 板间 CV 值: 经 3 次试验, 进口板 CV 值在 0.71%-3.70%; 国产板 CV 值在 0.92%-8.24%。

### 实施例 7

两步检测法: 样品(血清或血浆) 100ul、样品稀释液 20ul, 37°C 保温 2 小时→洗板 5 次→每孔加入酶结合物 100 ul (或 2 滴), 37°C 保温 1 小时→洗板 5 次→显色液 A、B 各 50 ul (或各 1 滴), 室温显色 15-30 分钟→450nm 波长检测。

### 实施例 8

样品稀释液: 所用样品稀释液为 6%浓度的 Triton X100, 具有裂解病毒包膜释放丙型肝炎病毒核心抗原的作用。

### 实施例 9

显色体系: 采用 TMB 显色体系, 终止液为 2mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

### 实施例 10

寻找并设计由 10 个特异性抗原表位组成的丙型肝炎病毒的复合抗原，利用基因工程手段获得该抗原，并在动物体内制备该抗原的特异性抗体，再通过双抗体夹心 ELISA 法来实现对丙型肝炎病毒的检测。主要用于监测丙型肝炎病毒感染者血清或血象中存在的丙型肝炎病毒抗原，并为临床判断丙型肝炎病毒感染者的病程进展情况提供客观指标。从而为临床诊断，健康检查提供一种可靠的检测方法。

专利名称(译)	一种检测丙型肝炎病毒抗原的方法及其装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN1547029A</a>	公开(公告)日	2004-11-17
申请号	CN200310111147.X	申请日	2003-12-03
[标]发明人	谢忠平 董少忠 王群 董少华 李琦涵		
发明人	谢忠平 董少忠 王群 董少华 李琦涵		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/576		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测丙型肝炎病毒抗原的方法及其装置。其设计了一个由10个特异性抗原表位组成的丙型肝炎病毒复合抗原，利用此抗原及所诱导抗体构建的丙型肝炎病毒抗原检测试剂盒，经检测能识别多种基因型丙型肝炎病毒感染血清及血浆中的丙型肝炎病毒抗原。该试剂盒具有较高特异性和较低的假阴性率及假阳性率，预示着良好的应用前景。

表2.

保存条件及时间	样本数	阳性数		阴性数	符合率		
		中强阳性	弱阳性		中强阳性	弱阳性	阴性
4℃2个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
4℃4个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
4℃6个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
4℃8个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
4℃10个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
-20℃6个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
-20℃8个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
-20℃10个月	16	4	4	8	100%	100%	100%
-20℃12个月	16	4	4	8	100%	100%	100%