



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101556284 B

(45) 授权公告日 2013.12.04

(21) 申请号 200910094508.1

(22) 申请日 2009.05.22

(73) 专利权人 中国医学科学院医学生物学研究所

地址 650000 云南省昆明市五华区茭菱路379号

(72) 发明人 龙润乡 谢忠平 李华 宋霞
陈洪波 洪超 白惠珠 杨蓉
黄铠

(74) 专利代理机构 昆明正原专利商标代理有限公司 53100

代理人 徐玲菊

(51) Int. Cl.

G01N 33/576 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2004/0265937 A1, 2004.11.30, 全文.

CN 101187666 A, 2008.05.28, 全文.

Bertrand Poirier 等. In Vitro Potency Assay for Hepatitis A Vaccines: Development of a Unique Economical Test.

《Biologicals》. 2000, 第28卷第247-256页.

审查员 刘洋

权利要求书1页 说明书9页

(54) 发明名称

甲型肝炎病毒抗原检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种甲型肝炎病毒抗原检测方法。即采用长臂生物素标记 HAV-IgG, 以辣根过氧化物酶标记链霉亲和素作放大系统, 对甲型肝炎病毒抗原进行检测时, 由于长臂生物素比一般生物素有更长的间臂, 能减少空间位阻, 使几个生物素化分子能同时与一个亲和素复合物结合, 加之长臂生物素为水溶性生物素, 直接标记抗甲型肝炎病毒抗体可减少免疫检测中的步骤, 缩短检测时间, 即由通常的2天缩短为全程检测只需3.5小时, 并可通过降低交叉反应而降低背景, 提高检测灵敏度; 另外, 由于辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素与亲和素不同, 其分子量大约为60000, 不含碳水化合物, 非特异性结合较亲和素低, 所以具有提高灵敏度及特异性的效果。

1. 一种甲型肝炎疫苗生产检定中对甲型肝炎病毒抗原进行检测的方法,其特征在于经过下列步骤:

A、按 50 ~ 150 μ l / 孔的量,将待检甲型肝炎病毒抗原、抗原阳性对照和抗原阴性对照分别加入酶标板的孔中,并留空白调零孔,放入湿盒中,于 37 $^{\circ}$ C 保温 1 ~ 3 小时后,洗板 3 ~ 5 次;

B、按 50 ~ 150 μ l / 孔的量,在 A 步骤的酶标板的各孔中,加入稀释度为 1 :500 ~ 3000 的长臂生物素标记 HAV 抗体使用液,放入湿盒中,于 37 $^{\circ}$ C 保温 0.5 ~ 1 小时后洗板 3 ~ 5 次;

C、按 50 ~ 150 μ l / 孔的量,在 B 步骤的酶标板的各孔中,加入稀释度为 1 :2000 ~ 10000 的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素使用液,放入湿盒中,于 37 $^{\circ}$ C 保温 0.5 ~ 1 小时后洗板 3 ~ 5 次;

D、在 C 步骤的酶标板的各孔中,分别加入 TMB 显色液 A 和 B 各 50 μ l / 孔,混匀,放入湿盒中,37 $^{\circ}$ C 保温 10 ~ 15 分钟;

E、在 D 步骤的酶标板的各孔中,按 50 ~ 100 μ l / 孔的量加入终止液后置于酶标仪上,在 450nm 波长下,用空白孔调零后检测吸光度 A 值,即得检测结果;

所述 B 步骤的长臂生物素标记 HAV 抗体经下列方法制备:

a、按长臂生物素 :甲型肝炎病毒抗体 =1 :5 ~ 20 克分子比的比例,将市购的长臂生物素用注射用水溶解后,与甲型肝炎病毒抗体混合,得混合物,于室温下放置 0.5 ~ 1.0 小时,或 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 温度下放置 1 ~ 3 小时;

b、用磷酸盐缓冲液于 2 ~ 8 $^{\circ}$ C 温度下透析上述 a 步骤的混合物并过夜,加等体积甘油混匀,得长臂生物素标记 HAV 抗体,-20 $^{\circ}$ C 以下保存备用;

所述 A 步骤的酶标板预先经过下列方法制备:

1) 酶标板包被 :将纯化的 HAV-IgG 用碳酸盐缓冲液稀释至 5-20 μ g / ml,按 50 ~ 150 μ l / 孔的量加入到聚苯乙烯板中,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 过夜,洗板 3 ~ 5 次;

2) 酶标板封闭 :按 150 ~ 250 μ l / 孔的量加入封闭液,2 ~ 8 $^{\circ}$ C 过夜,对酶标板进行封闭,洗板 3 ~ 5 次,晾干,冰箱保存备用 ;所述磷酸盐缓冲液为 PBS,洗液为 PBS。

2. 如权利要求 1 所述的甲型肝炎疫苗生产检定中对甲型肝炎病毒抗原进行检测的方法,其特征在于所述 C 步骤的辣根过氧化物酶标记链霉亲和素为市购产品。

3. 如权利要求 1 所述的甲型肝炎疫苗生产检定中对甲型肝炎病毒抗原进行检测的方法,其特征在于所述洗板用 PBS 洗液在洗板机上洗板或者手工洗板。

甲型肝炎病毒抗原检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及甲型肝炎病毒 (HAV) 抗原的检测方法,属于生物学技术领域。

背景技术

[0002] 在甲型肝炎减毒活疫苗、甲型肝炎灭活疫苗及相关病毒的研究工作中,均需进行甲型肝炎病毒抗原的检测,并且由于甲型肝炎病毒 HAV 不能产生细胞病变 (CPE),所以在病毒感染性滴度检测时,待检测病毒在细胞上增殖完成后,必须用物理或化学方法使病毒释放,再用相关方法进行甲型肝炎病毒抗原 (HAAg) 检测。目前市面上并没有专门的甲型肝炎病毒抗原检测试剂盒出售,对抗原的检测均由各生产厂家或各科研机构根据自身需要使用不同的方法。根据文献检索,目前的甲型肝炎病毒抗原检测法有:逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法,固相杂交酶联显色法 (RT-PCR-ELISA),使用单克隆抗体的双抗体夹心法,将甲型肝炎病毒 IgM 抗体诊断试剂盒改良后用于甲型肝炎病毒抗原检测的间接法 (ELISA),生物素-亲和素-生物素标记辣根过氧化物酶复合物法 (ABPC 法)。

[0003] RT-PCR、RT-PCR-ELISA 法检测虽然检测灵敏度好,但需要专门的仪器设备,检测成本较高,且特异性受到诸多因素的影响;双抗体夹心法 (ELISA) 操作方便,但需要用不同株单克隆抗体分别包被和标记,而单克隆抗体筛选制备不易,普通实验室很难建立;将甲型肝炎病毒 IgM 抗体诊断试剂盒改良后用于甲型肝炎病毒抗原检测的间接法 (ELISA),则不是专门针对甲型肝炎病毒抗原的检测方法,灵敏度不高,检测时间相对较长,检测步骤多,影响因素也多。而有报道的生物素-亲和素-生物素化辣根过氧化物酶法,虽然使用了生物素来标记抗体,但其使用的是普通脂溶性生物素,需要用有机溶剂溶解后才能用于标记,且其使用亲和素结合的生物素化辣根酶复合物作为酶放大系统,复合物的浓度配比麻烦,步骤多,检测时间长。

发明内容

[0004] 针对甲型肝炎病毒抗原检测存在的上述现状,以及甲型肝炎疫苗生产检定中要对甲型肝炎病毒抗原进行大量检测的情况,本发明利用长臂生物素标记 HAV-IgG,以辣根过氧化物酶标记链霉亲和素作放大系统,提供一种特异性高、灵敏度高、使用方便、用途广泛的甲型肝炎病毒抗原检测方法,应用于甲型肝炎疫苗生产及质量检定,获得了较好的效果,本方法也可应用于甲型肝炎病毒的其他科研工作及临床检验。

[0005] 本发明通过下列技术方案完成:一种甲型肝炎病毒抗原检测方法,其特征在于经过下列步骤:

[0006] A、按 $50 \sim 150 \mu\text{l}$ /孔的量,将待检甲型肝炎病毒抗原、抗原阳性对照和抗原阴性对照分别加入酶标板的孔中,并留空白调零孔,放入湿盒中,于 37°C 保温 $1 \sim 3$ 小时后,洗板 $3 \sim 5$ 次;

[0007] B、按 $50 \sim 150 \mu\text{l}$ /孔的量,在 A 步骤的酶标板的各孔中,加入稀释度为 $1:500 \sim 3000$ 的长臂生物素标记 HAV 抗体使用液,放入湿盒中,于 37°C 保温 $0.5 \sim 1$ 小时后洗板 $3 \sim$

5 次；

[0008] C、按 50 ~ 150 μ l/ 孔的量，在 B 步骤的酶标板的各孔中，加入稀释度为 1 : 2000 ~ 10000 的辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素使用液，放入湿盒中，于 37°C 保温 0.5 ~ 1 小时后洗板 3 ~ 5 次；

[0009] D、在 C 步骤的酶标板的各孔中，分别加入 TMB 显色液 A 和 B 各 50 μ l/ 孔，混匀，放入湿盒中，37°C 保温 10 ~ 15 分钟；

[0010] E、在 D 步骤的酶标板的各孔中，按 50 ~ 100 μ l/ 孔的量加入终止液后置于酶标仪上，在 450nm 波长下，用空白孔调零后检测吸光度 A 值，即得检测结果。

[0011] 根据检测结果进行下列判定：

[0012] 阳性对照平均 A 值 - 阴性对照平均 A 值 \geq 0.4 时，则试验成立，反之应重试。

[0013] Cutoff 值 = 阴性对照的平均 A 值 \times 2.1 (阴性对照的平均 A 值大于 0.05，按实际值计算；若阴性对照的平均 A 值小于 0.05 时，按 0.05 计算)。

[0014] 样品 A 值 \geq Cutoff 值，该样品孔判定为 HAV 阳性，样品 A 值 $<$ Cutoff 值，该样品孔判定为 HAV 阴性。

[0015] 所述 B 步骤的长臂生物素标记 HAV 抗体经下列方法制备：

[0016] a、按长臂生物素：甲型肝炎病毒抗体 = 1 : 5 ~ 20 克分子比的比例，将市购的长臂生物素用注射用水溶解后，与甲型肝炎病毒抗体混合，得混合物，于室温下放置 0.5 ~ 1.0 小时，或 2 ~ 8°C 温度下放置 1 ~ 3 小时；

[0017] b、用磷酸盐缓冲液于 2 ~ 8°C 温度下透析上述 a 步骤的混合物并过夜，加等体积甘油混匀，得长臂生物素标记 HAV 抗体，-20°C 以下保存备用。

[0018] 所述 C 步骤的辣根过氧化物酶标记链霉亲和素为市购产品。

[0019] 所述酶标板预先经过下列方法制备：

[0020] 1) 酶标板包被：将纯化的 HAV-IgG 用碳酸盐缓冲液稀释至 5-20 μ g/ml，按 50 ~ 150 μ l/ 孔的量加入到聚苯乙烯板中，2 ~ 8°C 过夜，洗板 3 ~ 5 次；

[0021] 2) 酶标板封闭：按 150 ~ 250 μ l/ 孔的量加入封闭液，2 ~ 8°C 过夜，对酶标板进行封闭，洗板 3 ~ 5 次，晾干，冰箱保存备用。

[0022] 所述洗板用 PBS 洗液在洗板机上洗板或者手工洗板。

[0023] 所述磷酸盐缓冲液 PBS、PBS 洗液、碳酸盐缓冲液、终止液、TMB 显色液 A 和 B、封闭液均为现有技术的常规用液。

[0024] 本发明具有下列优点和效果：采用上述方案，即采用长臂生物素标记 HAV-IgG，以辣根过氧化物酶标记链霉亲和素作放大系统，对甲型肝炎病毒抗原进行检测时，由于长臂生物素比一般生物素有更长的间臂，能减少空间位阻，使几个生物素化分子能同时与一个亲和素复合物结合，加之长臂生物素为水溶性生物素，直接标记抗甲型肝炎病毒抗体可减少免疫检测中的步骤，缩短检测时间，即由通常的 2 天缩短为全程检测只需 3.5 小时，并可通过降低交叉反应而降低背景，提高检测灵敏度；另外，由于辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素与亲和素不同，其分子量大约为 60000，不含碳水化合物，非特异性结合较亲和素低，所以具有提高灵敏度及特异性的效果。本发明所建立的检测方法是一种特异性好、灵敏度高、方便快捷的甲型肝炎病毒抗原检测方法。

具体实施方式

[0025] 下面通过实施例对本发明做进一步描述。

[0026] 实施例

[0027] 一、抗 HAV 血清的制备

[0028] 1) 用一次性注射器吸取 1ml 组织培养的 HAV 抗原 (520EU/ml), 排净空气后对猴或其它适宜动物进行免疫注射;

[0029] 2) 在 2、3、4 周采血, 并用甲型肝炎病毒抗体诊断试剂盒进行 HAV 抗体效价检测。效价低于 1 : 4000 时, 须进行加强免疫;

[0030] 3) 当抗 -HAV 的效价达 1 : 4000 以上时, 即可通过颈动脉采血, 分离血清, -20°C 以下保存待用。

[0031] 二、HAV-IgG 分离纯化

[0032] 1) 取市购蛋白 A 或蛋白 A/G 亲和层析柱, 室温放置平衡 30 分钟, 用 5 倍柱体积的平衡液对层析柱进行平衡;

[0033] 2) 将待纯化的上述步骤 3) 的血清与常规平衡液按 1 : 1 的体积比混合后上样, 用 10 倍柱体积的平衡液洗脱杂蛋白, 留下目的蛋白;

[0034] 3) 用 10 倍柱体积的洗脱液将目的蛋白从亲和柱上洗脱下来, 收集洗脱峰, 用磷酸盐缓冲液 PBS 透析过夜;

[0035] 4) 用 lowry 法测定蛋白含量, -20°C 以下保存待用。

[0036] 三、长臂生物素标记 HAV 抗体的制备

[0037] 1) 按长臂生物素 : 甲型肝炎病毒抗体 = 1 : 10 克分子比的比例, 将市购的长臂生物素用注射用水溶解后, 与甲型肝炎病毒抗体混合, 得混合物, 于室温下放置 0.5 小时;

[0038] 2) 用磷酸盐缓冲液 PBS 于 5°C 温度下透析上述 a 步骤的混合物并过夜, 加等体积甘油混匀, 得长臂生物素标记 HAV 抗体, -20°C 以下保存备用。

[0039] 四、甲型肝炎病毒抗原的检测

[0040] 1) 酶标检测板包被 : 将纯化的 HAV-IgG 用碳酸盐缓冲液稀释至 $10\mu\text{g/ml}$, 按 $100\mu\text{l/孔}$ 的量加入到聚苯乙烯板中, 5°C 过夜, 用 PBS 洗液在洗板机上洗板 5 次;

[0041] 2) 酶标检测板封闭 : 按 $200\mu\text{l/孔}$ 的量加入封闭液, 5°C 过夜, 对酶标板进行封闭, 用 PBS 洗液在洗板机上洗板 5 次, 晾干, 冰箱保存备用;

[0042] 3) 将长臂生物素标记抗体按 1 : 100、1 : 200、1 : 400..... 1 : 5000 的稀释度进行稀释, 同时将辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素按上述相同稀释度进行稀释, 用常规棋盘法试验确定它们的最佳使用稀释度, 即长臂生物素标记 HAV 抗体使用液的稀释度为 1 : 500 ~ 3000, 辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素使用稀释度为 1 : 2000 ~ 10000;

[0043] 4) 先将待检的甲型肝炎病毒抗原样品用 PBS 稀释液进行下列不同稀释度的系列稀释 : 1 : 2、1 : 4、1 : 8..... 1 : 2048, 具体稀释如下 : 取 1ml 待检甲型肝炎病毒抗原样品加入 1ml PBS 稀释液, 混匀, 即成 1 : 2 样品 ; 取 1ml 1 : 2 样品加入 1ml PBS 稀释液即成 1 : 4 样品, 依次对倍稀释至 1 : 2048 ; 用微量移液器将稀释好的甲型肝炎病毒抗原待检样品从高稀释度 (1 : 2048) 开始依次加入酶标板中, $100\mu\text{l/孔}$, 同时在酶标板的另外的孔中加入抗原阳性对照、抗原阴性对照, 每个对照各加 2 孔, 并留 1 孔作为空白调零孔, 放入湿盒中, 37°C 保温 2 小时, 用 PBS 洗液在洗板机上或用手洗板 5 次 ;

[0044] 5) 在上述酶标板的各孔中加入稀释度为 1 : 800 的长臂生物素标记 HAV 抗体使用液, 100 μ l/ 孔, 放入湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 保温 0.5 小时, 用 PBS 洗液在洗板机上或手工洗板 5 次;

[0045] 6) 在上述酶标板的各孔中加入稀释度为 1 : 5000 辣根过氧化物酶标记链霉亲和素使用液, 100 μ l/ 孔, 放入湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 保温 0.5 小时, 用 PBS 洗液在洗板机上或手工洗板 5 次;

[0046] 7) 在上述酶标板的各孔中分别加入 TMB 显色液 A 和 B 各 50 μ l/ 孔, 混匀, 放入湿盒中, 37 $^{\circ}$ C 保温 10 分钟;

[0047] 8) 在上述酶标板的各孔中加入终止液, 50 μ l/ 孔, 置于酶标仪在 450nm 波长下, 用空白孔调零后检测吸光度 A 值, 结果见表 1。

[0048] 9) 结果判定:

[0049] 阳性对照平均 A 值 (1.848) - 阴性对照平均 A 值 (0.052) = 1.796, 大于 0.4, 本次试验成立。

[0050] Cutoff 值 = 0.052 \times 2.1 = 0.109, (阴性对照的平均 A 值大于 0.05, 按实际值计算)。按照样品 A 值 \geq Cutoff 值, 该样品判定为 HAV 阳性样品, 样品 A 值 < Cutoff 值, 为阴性, 该样品判定为 HAV 阴性样品。则该样品 1 : 2-1 : 1024 稀释度均为阳性、1 : 2048 为阴性, 故该甲型肝炎病毒抗原效价检测为 1 : 1024。

[0051] 所用溶液如下:

[0052] 1、磷酸盐缓冲液 PBS: 磷酸氢二钠 2.9g, 磷酸二氢钾 0.2g, 氯化钠 8g, 加注射用水至 1000ml。

[0053] 2、PBS 洗液: 在 1000ml 磷酸盐缓冲液 PBS 中, 加入 0.05% 吐温 20。

[0054] 3、碳酸盐缓冲液: 无水碳酸钠 1.6g, 碳酸氢钠 2.93g, 加注射用水至 1000ml。

[0055] 4、终止液: 浓硫酸 54ml, 加注射用水至 500ml。

[0056] 5、TMB 显色液 A: TMB 50mg, 二甲基亚砷 50ml, 加注射用水 50ml。

[0057] 6、TMB 显色液 B: 醋酸钠 6g, 冰醋酸 0.2ml, 双氧水, 2.5ml, 加注射用水至 500ml。

[0058] 7、封闭液: 在 1000ml 磷酸盐缓冲液 PBS 中, 加入 20 克牛血清白蛋白, 溶解混匀。

本实施例的优点

[0059] (1) 从检测时间方面分析, 本发明检测方法与现行检测试剂法相比, 检测时间由通常的 2 天缩短为全程检测只需 3.5 小时, 见表 2。

[0060] (2) 两种检测方法特异性与灵敏性综合分析

[0061] 1) 用本发明检测方法进行甲型肝炎病毒抗原滴度检测时, 特异性显示为所有 HAV 阳性样品 P/N 值明显高于现有的检测试剂法, 阴阳性对比明显, 梯度、线性较好 (表 3)。两者有显著性差异 ($t = 5.123, p = 0.007 < 0.01$); 且用本发明方法对其他相关病毒进行检测无交叉情况出现 (表 4)。

[0062] 2. 用本发明之方法进行甲型肝炎抗原滴度检测时, 其灵敏度高于现行方法。

[0063] 用确立的程序对 HAV 抗原标准对照 (1 : 2048)、爱巴苏灭活疫苗 (24IU/0.5ml) 和现有疫苗样品进行检测, 并与现行检测法进行对比。比较结果显示, 本发明的甲型肝炎病毒抗原检测方法的结果高于现行检测法 1-3 个稀释度, 阴性对照低, 见表 5。

[0064] 表 1 实施例 1 的检测 A 值

[0065]

	1	2	3	4	5
A	HAV1 : 2 *	HAV1 : 512 0.291			
B	HAV1 : 4 *	HAV1 : 1024 0.176			
C	HAV1 : 8 3.247	HAV1 : 2048 0.087			
D	HAV1 : 16 2.584	阳性对照 1.837			
E	HAV1 : 32 1.833	阳性对照 1.858			
F	HAV1 : 64 1.152	阴性对照 0.051			
G	HAV1 : 128 0.789	阴性对照 0.053			
H	HAV1 : 256 0.534	空白孔 0.000			

[0066] 表 2 两种甲型肝炎抗原检测方法比较

[0067]

比较参数	本发明检测方法	现行检测法
检测时间	全程 3.5 小时	全程 48 小时
检测原理	直接对甲型肝炎病毒抗原检测	抗体检测试剂盒, 改良用于抗原检测, 间接检测甲型肝炎病毒抗原
检测灵敏度	高	低
特异度	高	高

[0068] 表 3 对比试验 P/N(P/C) 值比较

试验 次数	P ₀₀ /C ₀₀			P ₀₀ /N ₀₀		
	本发明 (A)	常规法 (B)	A-B	本发明 (a)	常规法 (b)	a-b
1	30.0	25.3	4.8	54.7	43.5	11.2
2	28.3	10.0	18.3	60.6	13.4	47.2
[0069] 3	24.5	11.8	12.6	60.6	13.4	47.2
4	43.0	21.2	21.8	70.0	34.8	35.2
5	78.0	21.6	56.4	41.5	11.7	29.8
平均	40.7	18.0	22.8	49.7	23.3	34.7
P 值	t=3.367, 0.01 < p=0.028 < 0.05			t=5.123, p=0.007 < 0.01		

[0070] 注:POD为阳性对照平均OD值;COD为细胞对照平均OD值;NOD为阴性对照平均OD值。

[0071] 用本发明之方法检测甲型肝炎病毒感染性滴度时,其特异性与灵敏性综合分析(POD/COD值)优于现行检测法(表6),两者有显著性差异($t = 3.367, p = 0.028 < 0.05$)。

[0072] 用本发明之方法检测20个感染性滴度样品,其中10个高于现行检测法,占50.0%,10个结果与现行检测法一致,占50.0%,两种方法所检测结果之间差异有统计学意义($t = 3.529, p = 0.002 < 0.01$);且本发明之方法阳性对照OD值高于现行检测法($t = 3.971, p = 0.017 < 0.05$),本发明之方法,细胞对照OD值低于现行检测法($t = 3.360, p = 0.028 < 0.05$)。

[0073] 用本发明方法检测18份抗原滴度样品,其中12份高于现行检测法(为总数的66.7%),4份与现行检测法相同(22.2%),1份样品全阴未测出、1份样品常规法有跳孔无法判断,无比较结果者占11.1,在检测灵敏度相同的情况下,检测结果显示:本发明方法明显优于现行检测法,两方法检测结果差异有统计学意义($t = 5.078, p = 0.0002 < 0.01$)。从线性相关度(R²)分析,本发明之方法也优于现行检测法,且差异有统计学意义($t = 6.321, p = 0.000 < 0.01$)。本发明之方法阳性对照的OD值高于现行检测法,差异有统计学意义($t = 5.926, p = 0.010 < 0.05$);同时本发明之方法,阴性对照的OD值现行检测法,差异有统计学意义($t = 4.119, p = 0.026 < 0.05$)。

[0074] 本发明方法专门用于检测甲型肝炎病毒抗原,与现行检测法相比,检测灵敏度和特异性都有明显提高,全程检测时间3.5小时,比现行检测法所需的两天缩短为3.5小时,有利于疫苗生产,特别在疫苗稀配分装质量控制上有较强优势,能让稀释-分装之间的等待时间明显缩短,且P/N高,有利于结果判定。在保证质量的同时,还可提高产量。与普通方法相比,本发明之方法更适合于甲型肝炎疫苗检定工作,也可应用于甲乙肝联合疫苗的检测工作及相关的甲型肝炎病毒研究工作。目前市场上并没有甲型肝炎病毒检测试剂盒,可利用此方法开发为一种多用途诊断试剂产品,弥补市场空白。

[0075] 表5. 两种方法对HAAg同步检测对比分析

[0076]

		现行检测法				本发明检测方法					
所标	爱巴苏	样 1	样 2	样 3	样 4	所标	爱巴	样 1	样 2	样 3	样 4
0.794	2.730	1.276	0.94	0.850	0.649	2.958	*	*	*	1.116	1.039
0.599	1.744	0.778	0.56	0.457	0.346	1.771	2.637	2.191	2.290	0.622	0.578
0.476	1.019	0.424	0.29	0.250	<u>0.183</u>	0.916	1.608	1.189	1.241	0.362	0.346
0.254	0.6133	0.241	<u>0.16</u>	<u>0.140</u>	0.098	0.575	0.893	0.678	0.692	0.206	0.200
<u>0.166</u>	<u>0.399</u>	<u>0.117</u>	0.09	0.083	0.068	<u>0.325</u>	0.514	0.380	0.393	<u>0.147</u>	<u>0.146</u>
0.094	0.261	0.061	0.00	/	/	0.208	0.283	<u>0.224</u>	<u>0.221</u>	0.106	0.104
/	0.213	/	/	/	/	<u>0.171</u>	<u>0.151</u>	0.148	0.150	0.096	0.098
/	0.199	/	/	/	/	<u>0.121</u>	0.062	0.072	0.095	0.079	0.080
2048	512	512	256	256	128	<u>8192</u>	2048	1024	1024	512	512

[0077] 表 4 甲型肝炎病毒抗原检测法 (ELISA) 交叉试验结果

病毒名称	检测 OD 值		结果
HAV-L8 株	1.875	1.864	阳性
HAV-H2 株	1.821	1.843	阳性
Polio I 型	0.075	0.076	阴性
Polio II 型	0.078	0.088	阴性
Polio III	0.065	0.054	阴性
EV71	0.077	0.085	阴性
HBV	0.034	0.030	阴性
HCV	0.048	0.054	阴性
麻疹病毒	0.089	0.091	阴性
Cox A 7	0.055	0.079	阴性
Cox A 9	0.087	0.101	阴性
Cox A16	0.064	0.073	阴性
Cox B1	0.091	0.080	阴性
Cox B2,	0.078	0.065	阴性
Cox B4,	0.070	0.068	阴性
Cox B5,	0.099	0.105	阴性
Cox B6,	0.069	0.083	阴性
Echo 1	0.064	0.57	阴性
Echo2	0.079	0.087	阴性
Echo 3	0.061	0.068	阴性
Echo5	0.088	0.074	阴性
Echo 6	0.106	0.084	阴性
Echo7	0.051	0.057	阴性
Echo 8	0.079	0.084	阴性
Echo9	0.099	0.102	阴性
Echo 10	0.077	0.083	阴性
Echo11	0.086	0.072	阴性
Echo 12	0.077	0.080	阴性
Echo13	0.065	0.064	阴性
Echo 15	0.037	0.030	阴性
Echo16	0.102	0.105	阴性
Echo 17	0.062	0.067	阴性
Echo18	0.066	0.058	阴性
Echo 19	0.087	0.079	阴性
Echo20	0.095	0.081	阴性
Echo 21	0.071	0.072	阴性
Echo22	0.082	0.084	阴性
Echo 23	0.075	0.073	阴性
Echo24	0.072	0.083	阴性
Echo 25	0.101	0.092	阴性
Echo26	0.076	0.082	阴性
Echo 29	0.088	0.081	阴性
Echo30	0.095	0.086	阴性
Echo 31	0.074	0.073	阴性
Echo32	0.091	0.087	阴性
Echo 33	0.093	0.097	阴性

[0078]

[0079] 表 6 两种方法检测 HAV 感染性滴度比较

[0080]

样品号	感染性滴度 (lg CCID ₅₀ /ml)			PCX		CCX	
	本发明 (A)	常规法 (B)	A-B	本发明	常规法	本发明	常规法
1	7.50	7.50	0.00	2.734	2.173	0.029	0.029
2	7.67	7.67	0.00	/	/	/	/
3	8.00	7.67	0.33	3.032	1.219	0.035	0.091
4	7.67	7.67	0.00	/	/	/	/
5	8.00	7.67	0.33	/	/	/	/
6	8.33	8.00	0.33	/	/	/	/
7	7.67	7.67	0.00	/	/	/	/
8	6.67	6.67	0.00	3.032	1.219	0.035	0.091
9	6.50	6.50	0.00	/	/	/	/
10	6.67	6.50	0.17	3.5	2.051	0.001	0.059
11	5.50	5.50	0.00	/	/	/	/
12	6.50	6.33	0.17	/	/	/	/
13	7.00	7.00	0.00	/	/	/	/
14	8.00	7.77	0.23	/	/	/	/
15	7.23	7.17	0.06	/	/	/	/
16	6.50	6.50	0.00	/	/	/	/
17	7.77	7.23	0.54	2.073	1.667	0.041	0.143
18	8.00	7.50	0.50	/	/	/	/
19	7.50	7.33	0.17	/	/	/	/
20	8.00	8.00	0.00	/	/	/	/
平均	/		0.14	2.874	1.666	0.028	0.083
统计分析	$t=3.529, p=0.002<0.01$			$t=3.971, p=0.017<0.05$		$t=3.360, p=0.028<0.05$	

专利名称(译)	甲型肝炎病毒抗原检测方法		
公开(公告)号	CN101556284B	公开(公告)日	2013-12-04
申请号	CN200910094508.1	申请日	2009-05-22
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院医学生物学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院医学生物学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院医学生物学研究所		
[标]发明人	龙润乡 谢忠平 李华 宋霞 陈洪波 洪超 白惠珠 杨蓉 黄铠		
发明人	龙润乡 谢忠平 李华 宋霞 陈洪波 洪超 白惠珠 杨蓉 黄铠		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	Y02A50/54		
审查员(译)	刘洋		
其他公开文献	CN101556284A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种甲型肝炎病毒抗原检测方法。即采用长臂生物素标记 HAV-IgG，以辣根过氧化物酶标记链霉亲和素作放大系统，对甲型肝炎病毒抗原进行检测时，由于长臂生物素比一般生物素有更长的间臂，能减少空间位阻，使几个生物素化分子能同时与一个亲和素复合物结合，加之长臂生物素为水溶性生物素，直接标记抗甲型肝炎病毒抗体可减少免疫检测中的步骤，缩短检测时间，即由通常的2天缩短为全程检测只需3.5小时，并可通过降低交叉反应而降低背景，提高检测灵敏度；另外，由于辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素与亲和素不同，其分子量大约为60000，不含碳水化合物，非特异性结合较亲和素低，所以具有提高灵敏度及特异性的效果。

比较参数	本发明检测方法	现行检测法
检测时间	全程 3.5 小时	全程 48 小时
检测原理	直接对甲型肝炎病毒抗原检测	抗体检测试剂盒，改良用于抗原检测，间接检测甲型肝炎病毒抗原
检测灵敏度	高	低
特异度	高	高

