



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1871518 B

(45) 授权公告日 2010.08.25

---

(21) 申请号 200480030936.3 *C07K 16/10* (2006.01)

(22) 申请日 2004.10.28 (56) 对比文件

(30) 优先权数据 JP 1151940 A, 1999.02.26, 第 0015 段~第  
367783/2003 2003.10.28 JP 0073 段, 附图 1~7.

(85) PCT 申请进入国家阶段日 JP 2001462 A, 2001.01.12, 全文.  
2006.04.20 JP 11108932 A, 1999.04.23, 全文.

(86) PCT 申请的申请数据 审查员 李冰  
PCT/JP2004/016377 2004.10.28

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/040815 JA 2005.05.06

(73) 专利权人 株式会社先端生命科学研究所

地址 日本埼玉县

(72) 发明人 青柳克己 饭田久美子 松原直子

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

*G01N 33/576* (2006.01)

*G01N 33/531* (2006.01)

*C12N 7/00* (2006.01)

*C12N 5/18* (2006.01)

---

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图 2 页

(54) 发明名称

丙型肝炎病毒的检测方法

(57) 摘要

本发明提供了含有 HCV 样品的处理方法等, 其特征在于: 将含有 HCV (丙型肝炎病毒) 的样品通过用含有 (1) 酸化剂, 以及 (2) 蛋白质变性剂, 或在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂的处理剂处理, 使 HCV 抗原游离和将与 HCV 抗原结合的抗体破坏。

1. 含有 HCV(丙型肝炎病毒)的样品的处理方法,其特征是:通过将含有 HCV 的样品用含有(1)酸化剂,以及(2)在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的阳离子型表面活性剂的处理剂处理,进行 HCV 抗原的游离和破坏与 HCV 抗原结合的抗体。

2. 含有 HCV 的样品的处理方法,其特征是:通过将含有 HCV 的样品用含有(1)酸化剂,(2)在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的阳离子型表面活性剂,以及含有下面的(3)、(4)、(5)中任一项所述的处理剂处理,进行 HCV 相关抗原的游离和破坏针对 HCV 相关抗原的抗体:

- (3) 还原剂;
- (4) 单糖类或二糖类;
- (5) 柠檬酸或柠檬酸盐类。

3. 含有 HCV 的样品的处理方法,其特征是:通过将含有 HCV 的样品用含有下面的(1)中的至少一种或一种以上物质和(2)中的至少一种或一种以上的物质的处理剂处理,进行 HCV 抗原的游离和破坏针对 HCV 抗原的抗体:

- (1) 酸化剂,
- (2) 还原剂。

4. HCV 抗原的免疫学检测方法,其包括:

- (1) 进行权利要求 1~3 中任一项所述的处理步骤,
- (2) 使用与 HCV 抗原结合的探针对 HCV 抗原进行检测的步骤。

5. 权利要求 1~3 中任一项所述的方法,其中上述酸化剂是盐酸、硫酸、乙酸、三氯乙酸、三氟乙酸或柠檬酸。

6. 含有 HCV 的样品的处理方法,其特征是:通过将含有 HCV 的样品用含有(1)酸化剂,以及(2)在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂的处理剂处理,进行 HCV 抗原的游离和破坏与 HCV 抗原结合的抗体,在所述含有 HCV 的样品的处理方法中所述在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂选自 N-十二烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸(N-Dodecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N-十四烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸(N-Tetradecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸(N-Hexadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N-十八烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸(N-Octadecyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)。

7. 权利要求 1 或 2 所述的方法,其中所述在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的阳离子型表面活性剂是氯化癸基三甲基铵(Decyltrimethylammonium Chloride)、氯化十二烷基三甲基铵(Dodecyltrimethylammonium Chloride)、氯化十四烷基三甲基铵(Tetradecyltrimethylammonium Chloride)、氯化十六烷基三甲基铵(Hexadecyltrimethylammonium Chloride)、溴化癸基三甲基铵(Decyltrimethylammonium Bromide)、溴化十二烷基三甲基铵(Dodecyltrimethylammonium Bromide)、溴化十四烷基三甲基铵(Tetradecyltrimethylammonium Bromide)、溴化十六烷基三甲基铵

(Decyltrimethylammonium Bromide)、氯化月桂基吡啶鎓 (Laurylpyridinium Chloride)、氯化十四烷基吡啶鎓 (Tetradecyl pyridinium Chloride)、氯化十六烷基吡啶鎓 (Cetyl pyridinium Chloride)。

8. 权利要求 2 或 3 所述的方法,其中上述还原剂是半胱氨酸、半胱胺、二甲氨基乙硫醇、二乙氨基乙硫醇或二异丙氨基乙硫醇。

9. 权利要求 2 所述的方法,其中上述单糖类或二糖类是麦芽糖、蔗糖、海藻糖、甘露糖、果糖、葡萄糖、山梨糖醇、半乳糖、右旋糖。

10. 权利要求 2 所述的方法,其中上述柠檬酸或柠檬酸盐类是柠檬酸、柠檬酸水合物、柠檬酸钠盐、柠檬酸钾盐。

11. 为了检测 HCV 抗原而在处理样品的处理剂中包含下述 (1) 和 (2) 中的至少一种或一种以上物质的诊断药或诊断试剂盒:

(1) 酸化剂,

(2) 在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的阳离子型表面活性剂。

12. 为了检测 HCV 抗原而在处理样品的处理剂中包含下述 (1)、(2) 中的至少一种或一种以上物质以及 (3) 中的至少一种或一种以上物质的诊断药或诊断试剂盒:

(1) 酸化剂,

(2) 在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的阳离子型表面活性剂,

(3) 还原剂。

13. 为了检测 HCV 抗原而在处理样品的处理剂中包含下述 (1) 中的至少一种或一种以上物质以及 (2) 中的至少一种或一种以上物质的诊断药或诊断试剂盒:

(1) 酸化剂;

(2) 还原剂。

14. 权利要求 11 ~ 13 中任一项所述的诊断药或诊断试剂盒,其中所述酸化剂是盐酸、硫酸、乙酸、三氯乙酸或三氟乙酸。

15. 为了检测 HCV 抗原而在处理样品的处理剂中包含下述 (1) 以及 (2) 中的至少一种或一种以上物质的诊断药或诊断试剂盒:

(1) 酸化剂;

(2) 在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基、叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂,其中所述两性离子型表面活性剂是选自 N- 十二烷基 -N, N- 二甲基 -3- 铵 -1- 丙磺酸 (N-Dodecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N- 十四烷基 -N, N- 二甲基 -3- 铵 -1- 丙磺酸 (N-Tetradecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N- 十六烷基 -N, N- 二甲基 -3- 铵 -1- 丙磺酸 (N-Hexadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N- 十八烷基 -N, N- 二甲基 -3- 铵 -1- 丙磺酸 (N-Octadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate) 的一种或两种以上的表面活性剂。

16. 权利要求 11 或 12 所述的诊断药或诊断试剂盒,其中所述在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的阳离子型表

面活性剂是氯化癸基三甲基铵 (Decyltrimethylammonium Chloride)、氯化十二烷基三甲基铵 (Dodecyltrimethylammonium Chloride)、氯化十四烷基三甲基铵 (Tetradecyltrimethylammonium Chloride)、氯化十六烷基三甲基铵 (Hexadecyltrimethylammonium Chloride)、溴化癸基三甲基铵 (Decyltrimethylammonium Bromide)、溴化十二烷基三甲基铵 (Dodecyltrimethylammonium Bromide)、溴化十四烷基三甲基铵 (Tetradecyltrimethylammonium Bromide)、溴化十六烷基三甲基铵 (Decyltrimethylammonium Bromide)、氯化月桂基吡啶鎓 (Laurylpyridinium Chloride)、氯化十四烷基吡啶鎓 (Tetradecyl pyridinium Chloride)、氯化十六烷基吡啶鎓 (Cetyl pyridinium Chloride)。

17. 权利要求 12 或 13 所述的诊断药或诊断试剂盒,其中上述还原剂是半胱氨酸、半胱胺、二甲氨基乙硫醇、二乙氨基乙硫醇、二异丙氨基乙硫醇。

## 丙型肝炎病毒的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及对血清中的丙型肝炎病毒 (HCV) 相关抗原进行检测或定量的方法、以及在這些检测和定量中使用的极简易且操作性高的样品处理法。

### 背景技术

[0002] 由于 HCV 在体内的病毒量少以及在体外的增殖体系还未确立,现在还不能使用天然的病毒粒子和纯化病毒蛋白得到免疫血清。在人血清中,由于个体差异对抗原的抗体产生也不同,也存在着含有针对某区域的抗原的抗体,但完全不含有针对其它区域的抗原的抗体的个体。另外由于是多克隆抗体,也含有针对 HCV 以外的物质的抗体,所以必须充分考虑到交叉反应等后再对 HCV 抗体检查的结果进行判定。

[0003] 由于刚感染 HCV 后不能产生抗体,所以在直至抗体出现在血中之前的称为窗口期的期间检查抗体时,完全不能检测到。另外对于丙型肝炎患者的治疗,虽然多种干扰素和病毒唑 (ribavirin) 有效,但在该治疗方法的选择和过程观察中仅测定抗体是不充分的。在这样的状况下,包括确定诊断在内的检测病毒抗原和基因的方法引人注目。

[0004] HCV 基因的检测方法中有 NAT (核酸扩增法) 和 DNA 探针法,现在广泛运用于临床现场。在 NAT 检查法中,虽然具有灵敏度高特点,但另一方面还存在着几个困难问题。例如,为了实施 PCR (聚合酶链反应) 法,由于 HCV 是 RNA 病毒,所以必须逆转录为 DNA,由 RNA 向 DNA 转录时,由于容易发生损失,容易引起污染,所以需要特殊的扩增设备等,而且操作繁杂,一次不能处理大量样品,另外检查费用也高等。在其它的 NAT 中,例如也需要特殊的扩增设备等,检查费用也高等。DNA 探针法检测灵敏度低,直至得到结果需要约 20 小时 (医学与药学 31 :961-970,1994)。

[0005] 另外,要指出的是检测 HCV 基因的方法的一个大问题是样品中 HCVRNA 的稳定性低,由于获取血清工序、中长期保存、冻融操作使得定量值降低等。认为这是由于 HCV 粒子表面稍微受到一点伤害,血液中的 RNA 分解酶就起作用,容易分解 HCV RNA 的缘故。由于这些原因,为了程序化使用,在其操作和保存中需要细心注意。

[0006] 作为检测 HCV 自身的方法,除了 HCV RNA 以外,检测 HCV 抗原的方法也引人注目。

[0007] 作为 HCV 抗原检测法,就像特开平 8-29427 所述的那样,尝试使用对 HCV 核心抗原上的表位具有特异性的单克隆抗体,对来自血清中的核心抗原进行检测。这个测定方法与 PCR 法比较,虽然费用低,在短时间 (约 3 小时) 就可得到结果,但另一方面有几个实用性上的大问题。

[0008] 即为了处理样品 (血清),需要进行聚乙二醇处理 (4℃ 1 小时)、离心操作 (15 分钟)、除去上清、尿素处理、碱处理 (30 分钟)、添加中和剂等多步骤处理工序。因此由于操作繁杂,为了获得再现性,需要熟练度,另外由于需要约 2 小时的处理时间,所以一次不能处理大量的样品。

[0009] 由于有离心操作、除去上清等工序,所以自动化非常困难。另外与 PCR 法比较,由于灵敏度低 10 ~ 100 倍,所以临床上利用性低。在 (Journal of Hepatology 23 :42-45,1995)

中,作为HCV RNA量,检测限界处于 $10^4 \sim 10^5$ 拷贝/ml,在(医学与药学6:1065-1070,1996)中,使用慢性丙型肝炎患者102例的治疗前血清的测定结果,相对于用CRT(竞争性逆转录(competitive reverse transcription))-PCR法的阳性率100%,只不过表现出实质上与上述DNA探针法大致同等的阳性率(67%)。因此,在灵敏度方面有很大的研究余地。

[0010] 专利第3176570号和专利第3171827号给出的2种HCV抗原检测法不需要上述特开平8-29427的HCV抗原检测法中作为缺点的包括离心操作等在内的多步骤处理工序,只通过30分钟的1~2个工序,就可以处理含有HCV的样品,另外还可以高灵敏度地对HCV抗原进行检测。另外由于操作简化,一次可以处理大量的样品,而且再现性和精度都提高了。另外该测定方法与NAT比较,费用低,在短时间就可得到结果。

[0011] 然而在临床中利用性更高的测定方法在灵敏度、特异性、再现性、操作性、短时间化、低费用等方面必须进行不断深入研发以满足以上所有要求。

[0012] 在专利第3176570号和专利第3171827号给出的2种HCV抗原检测法中,虽然样品的处理时间做到需要30分钟,但希望将时间进一步缩短。

[0013] 特别是现在,POCT(point of care testing)检查在推进医院经营合理化的美国正急速扩大,即使从以日本为首的世界范围看,预测今后会采用。这是在患者身边进行检查,对检查结果由医师立即进行判断,实施迅速处置,作为对治疗过程和直至预后的监测的诊疗质量提高方面起到很大作用的引人注目的方法。POCT与在中央检查室进行检查相比,可以削减样品的运输和花在设备上的费用,患者来一次医院时,接受检查和迅速的处置,可以减轻患者负担。今后为了适应这样的要求,必须要将样品的处理时间尽可能缩短。

[0014] 另外,由于在HCV感染患者血液内HCV粒子自身极少,因此HCV抗原也少,希望有更高灵敏度的检测方法。

[0015] 专利文献1 特开平8-29427号公报

[0016] 专利文献2 专利第3176570号

[0017] 专利文献3 专利第3171827号

[0018] 专利文献4 特开平8-29427号公报

[0019] 专利文献5 专利第3176570号

[0020] 非专利文献1 医学与药学31:961-970,1994

[0021] 非专利文献2 Journal of Hepatology 23:42-45,1995

[0022] 非专利文献3 医学与药学6:1065-1070,1996

## 发明内容

[0023] HCV在感染患者内,病毒粒子自身极少,因此患者血中含有的HCV抗原也少。另外,据推断很多感染者(携带者)在10~30年内向肝硬变或肝癌转移,所以早期发现和早期治疗很重要。另外对于HCV感染者的治疗和予后的推断重要的是病态的把握,热切期盼更有意义的HCV相关标志(抗原)的测定。而作为临床上利用性更高的测定方法,灵敏度、特异性、再现性、短时间化、操作性(全自动化)、低费用作为课题,需要进行不断开发以满足所有这些要求。

[0024] 就是说,希望开发能够更简便而且高收率地获得血清中的HCV粒子、特别是HCV抗原的方法,以及其高灵敏度检测和定量法。

[0025] 因此,本发明的目的在于提供适合通过一般的全自动测定仪器等利用可使用的温度对健康诊断等所谓筛选用途的很多样品在更短时间(简易)内进行处理的高灵敏度 HCV 抗原检测和定量法。

[0026] 即,提供与 NAT 同等或以上的高灵敏度,使样品中的 HCV 抗原在更短时间内简易而且不用高温游离的处理方法,可适用于一般的全自动测定仪器的 HCV 抗原检测以及定量法。另外,提供了特异识别 HCV 抗原的单克隆抗体以及产生该单克隆抗体的杂交瘤和使用它们高灵敏度地进行检测和测定的方法。

[0027] 用于解决课题的手段

[0028] 由于在感染者血中 HCV 浓度 ( $10^2 \sim 10^7$  拷贝 /ml) 极低,为了检测病毒抗原,要求极高灵敏度。一般认为作为用于捕捉靶抗原的探针而使用抗体的代表性免疫测定法等中使检测灵敏度提高的方法有 1) 使靶抗原分子数增加,2) 使与靶抗原结合的探针的结合性提高以及使探针量增加,3) 减少非特异性反应,4) 使用于检测的信号强度增加,通过这些方法组合,可以使灵敏度上升。

[0029] HCV 本身,到现在它的构造还不清楚,由相关黄病毒的结构和一般病毒的有关情报可推定血中 HCV 粒子以其基因组 RNA 被核心抗原包裹,核心抗原再由锚在脂膜上的包膜抗原 (E1, E2) 构成的外壳蛋白包围的状态存在。另外,有报道称血中 HCV 粒子与 LDL (低密度脂蛋白) 等缔合的状态存在,另外由于血中存在来自宿主的针对包膜抗原的抗体,所以人们推测也存在 HCV 粒子与抗包膜抗原抗体结合的免疫复合物。

[0030] 另外,推测血中也许还存在来自宿主的抗 HCV 抗原的抗体,当检测 HCV 抗原时,该抗体会与捕捉用探针或检测用探针竞争。在本申请中所谓 HCV 抗原只要没有特别说明,指的是被 HCV 基因组 RNA 编码的蛋白质。即包括被认为是结构蛋白的核心抗原、E1 抗原、E2 抗原、或被认为是非结构蛋白的 NS2、NS3、NS4、NS5 抗原等。

[0031] 在含有 HCV 抗原的样品中,可看到由于 HCV 抗原和抗体导致的病毒粒子或免疫复合物的形成。为了检测其中的例如 HCV 核心抗原,需要 I) 破坏 HCV 粒子,在使核心抗原从 HCV 粒子游离出来的同时尽可能使核心抗原单分子化,II) 对来自宿主的抗 HCV 抗原抗体进行钝化或除去,III) 使核心抗原从与抗 HCV 抗原抗体以外的其它血中成分的相互作用中游离。为了除去抗 HCV 抗原抗体,可以通过离心操作或亲和柱操作等除去,但由于处理工序增加,所以最好进行钝化。

[0032] 就是说,在确定的检测体系中使有限样品量中含有的核心抗原从 HCV 粒子、抗 HCV 抗原抗体、其它血中成分等最大限度地游离为单分子的状态可使与探针反应的抗原分子数增加。在本发明中,通过短时间而且简易的样品处理,使最大限度游离为单分子状态,可使与探针的反应性变得更高。

[0033] 因此,本发明提供的发明之一是对样品中的 HCV 核心抗原只在短时间内进行简单操作,使其成为适合使用探针检测状态的处理方法。以及为了利于样品中 HCV 核心抗原的检测,通过对与捕捉用探针或检测用探针竞争的来自宿主的抗 HCV 核心抗原抗体在短时间进行简单处理,同时使其钝化的处理方法。

[0034] 利用本发明,通过使用给出的处理方法,样品中存在的 HCV 核心抗原从病毒粒子或免疫复合物游离,同时通过使样品中存在的抗 HCV 核心抗原的人抗体钝化,通过使用例如象抗体那样的探针的免疫测定法,可以容易而且高灵敏度地进行检测。

[0035] 另外,本发明还提供为了自含有 HCV 相关抗原的样品做成适合 HCV 核心抗原与探针例如与抗体形成免疫复合物的状态,通过使 HCV 核心抗原从病毒粒子游离,同时用使样品中存在的抗 HCV 相关抗原的人抗体钝化的处理剂对样品进行处理的工序,对游离的 HCV 相关抗原使用例如象抗体那样的探针的免疫测定法进行检测以及定量的方法、和检查试剂盒。

[0036] 检测使用的探针例如抗体是与 HCV 核心抗原特异结合的抗体,只要是表现出一定的高亲和性的就可以,希望捕捉被处理样品中 HCV 核心抗原的一种探针可以识别并结合 HCV 核心抗原的 C 端侧。这里所谓的核心抗原的 C 端侧指的是自 HCV 核心抗原的氨基酸序列第 81 位至 160 位的序列、或其中的一部分。特别是识别 HCV 核心抗原的氨基酸序列编号的 100-120、111-130、即 100-130 的抗体有用。

[0037] 这里所说的探针指的是免疫小鼠、大鼠、土拨鼠、兔、鸡、山羊、绵羊、牛等实验动物后得到的多克隆抗体;从免疫的个体分离脾细胞等,通过与骨髓瘤细胞等融合得到的杂交瘤产生的单克隆抗体;或使脾细胞、血中白血球通过 EB 病毒转染导致不断增殖的细胞产生的单克隆抗体;HCV 感染的人、黑猩猩等产生的单克隆抗体;从小鼠、人等的免疫球蛋白的 cDNA、染色体 DNA 得到的可变区基因片段、或免疫球蛋白的 cDNA、染色体 DNA 的一部分与人工制备的序列组合构成的可变区基因片段、使用人工基因序列构成的可变区基因片段、或用将它们作为材料通过基因重组手法制作的与免疫球蛋白恒定区基因片段组合而构成的重组抗体基因转化细胞而产生的重组抗体;上述可变区基因片段与例如噬菌体的结构蛋白融合后制作的噬菌体抗体;用通过将上述可变区基因片段与其它合适基因片段例如 myc 基因的一部分等组合构成的重组抗体基因转化细胞而产生的重组抗体;与受体等蛋白质特异结合的分子或对它进行改变得到的探针;此外通过组合化学技术制作的探针等,只要是对 HCV 核心抗原表现出高特异性、亲和性的分子,都可以使用。

[0038] 在本申请发明中,作为上述探针之一,获得了与 HCV 核心抗原结合的单克隆抗体。单克隆抗体可以象以下那样制备。例如将含有 HCV 核心区的融合多肽或多肽单独或与 BSA、KLH 等结合后作为抗原,与各种佐剂混合后定期对 BALB/c 小鼠等的腹腔内或皮内进行免疫。在血中抗体效价上升的时间点,作为加强免疫将本抗原注入到尾静脉内,无菌摘出脾脏后,与适当的小鼠骨髓瘤细胞株进行细胞融合,得到杂交瘤。本方法可以根据 Kehler 与 Milstein 的方法 (Nature 256 :495-497,1975) 进行。

[0039] 将通过上述方法得到的杂交瘤细胞株在适当的培养液中进行培养,然后选择对本抗原显示出特异反应的产生抗体的杂交瘤细胞株进行克隆。对于产生抗体的杂交瘤的克隆,除了极限稀释法之外还可以利用软琼脂法 (Eur. J. Immunol. 6 :511-519,1976) 等。然后通过蛋白 A 等的柱层析等方法纯化产生的单克隆抗体。另外除上述单克隆抗体以外,也可以制作作为探针使用的分子。例如,关于重组抗体在 Hoogenboon 的综述等中有详细记载 (Trends in Biotechnology, 15 :62-70,1997)。

[0040] 根据本发明制备的单克隆抗体可以在 HCV 核心抗原的检测和定量用中作为酶联免疫吸附测定 (ELISA)、酶免疫斑点测定、放射免疫测定、基于凝集的测定、或其它熟知的免疫测定法中的检查试剂使用。另外,在检测中使用标记抗体时,作为标记化合物可以使用例如荧光物质、化学发光物质、放射性物质、酶、染色物质等。

[0041] 例如,为了检测样品(血清)中来自 HCV 的结构蛋白,使用以夹心反应体系为原理

的方法时,要使用的诊断试剂盒包括包被于固体支持体(例如微量滴定孔的内壁)的本发明1种或以上的单克隆抗体和与标记物质结合的1种或以上的单克隆抗体或它们的片段。固相化于固体支持体的单克隆抗体和标记的单克隆抗体的组合任意,可以选择能够获得高灵敏度的组合。

[0042] 作为可使用的固体支持体如聚苯乙烯或聚碳酸酯、聚丙烯、聚乙烯制的微量滴定板、试管、毛细管、珠(乳胶粒子或红血球、金属化合物等)、膜(脂质体等)、滤器等。

[0043] 在本申请发明中使用免疫测定法对用酸化剂处理的样品的核心抗原进行了测定。此时使用抗HCV核心抗原的单克隆抗体进行测定。就像实施例所示那样,将固相化抗体使用2种单克隆抗体、用于检测的标记抗体使用2种单克隆抗体的检测体系与固相化抗体使用3种单克隆抗体、用于检测的标记抗体使用2种单克隆抗体的检测体系进行比较。比较结果表明固相化抗体使用3种单克隆抗体、用于检测的标记抗体使用2种单克隆抗体的检测体系反应性上升。认为这是由于固相化抗体使用3种单克隆抗体产生的效果。因此,本发明还可以提供使用单克隆抗体的HCV核心抗原的免疫测定法。表明对于固相化抗体使用识别HCV核心抗原C末端的氨基酸编号100-120、或111-130的2种抗体相比,使用3种抗体的反应性提高了。

[0044] 附图的简单说明

[0045] 图1是表示对在样品处理中由于酸化剂(盐酸)浓度不同产生的效果进行研究的结果图。使用健康人样品(normal)和5种HCV-抗原阳性样品。

[0046] 图2是表示对在样品处理中由于添加浓度不同的非离子型表面活性剂(TritonX100)产生的效果进行研究的结果图。使用健康人样品(normal plasma)和3种HCV-抗原阳性样品。

[0047] 图3是表示HCV-抗原阳性样品与本发明的样品处理后游离的核心抗原活性的测定值以及使用现有方法在样品处理后游离的核心抗原活性的测定值的相关性的图。

[0048] 用于实施发明的最好方式

[0049] 作为本发明的样品,包括全血、血浆、血清、尿、唾液、脑脊髓液等生物学体液以及肝组织等。

[0050] 使样品中存在的抗体活性失活的条件已知有碱处理、酸处理等。对血清等进行酸处理时,一部分来自血清的蛋白质等不可逆变性,因场合不同有时会产生沉淀或白浊。因此,样品酸处理后,在处理样品的吸液操作中,往往出现堵住等障碍,另外,测定时在捕捉靶抗原的抗体等探针结合的担体或固相有时吸附裹入变性蛋白质等沉淀,呈假阳性。此外,有时在这些沉淀物中裹入靶抗原,由于可与探针结合的抗原量的减少,出现灵敏度降低的问题。

[0051] 本申请发明通过向酸化剂添加其它物质,可以达到防止由于酸处理引起的沉淀或白浊等不可逆变性或防止假阳性和使灵敏度提高。

[0052] 其中作为酸化剂,盐酸、硫酸、乙酸、三氟乙酸、三氯乙酸等合适。特别是酸化剂浓度在处理时浓度为0.13N或以上至1N以下好,优选0.5N~1N。此时加了酸化剂的样品在pH2.5以下处理,而在大部分样品中都是在pH2.0以下进行处理。

[0053] 作为向酸化剂添加的物质之一可考虑表面活性剂。已知多种表面活性剂具有破坏蛋白质高级结构的作用,具有使病毒粒子膜破坏和使样品中抗靶抗原的抗体变性,以及使

不溶性蛋白质可溶化的效果。然而,在这样的表面活性剂存在下,也存在靶抗原的结构表位被破坏,与捕捉抗原用抗体等探针的结合变弱,灵敏度降低的大问题。

[0054] 另外,表面活性剂的变性作用大多是可逆的,有时通过稀释或透析将表面活性剂浓度变稀,可将暂时变性的结构恢复。这表明存在与捕捉靶抗原的探针或检测用探针进行竞争的来自样品的抗体,结果使得灵敏度降低。即,表面活性剂的添加具有以上所述的二面性。表面活性剂可根据它们的结构和性质分为许多类型。离子型中有阴离子型、阳离子型、两性离子型、非离子型表面活性剂等。

[0055] 在这些表面活性剂中,本发明人发现通过将酸化剂与特别是在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂组合,表现出沉淀物等酸处理问题、样品中抗体的可逆变性等表面活性剂处理的问题均被消除,HCV 抗原检测灵敏度大幅上升的效果,使得本发明完成。

[0056] 另外发现在包含酸化剂和该表面活性剂的处理剂中添加 TritonX100 等聚氧乙烯异辛基苯基醚类或 NP-40 等聚氧乙烯壬基苯基醚类等非离子型表面活性剂、或添加尿素、硫脲等蛋白质变性剂、或添加半胱氨酸、半胱胺、二甲氨基乙硫醇、二乙氨基乙硫醇或二异丙氨基乙硫醇等还原剂更好。

[0057] 即本发明提供特征如下的含 HCV 样品的处理方法:通过将含有 HCV 的样品用含有 (1) 酸化剂,以及 (2) 在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂,以及 (3) 蛋白质变性剂、非离子型表面活性剂或还原剂的处理剂进行处理,使 HCV 抗原游离以及将与 HCV 抗原结合的抗体破坏。

[0058] 另外发现通过向 (3) 蛋白变性剂、非离子型表面活性剂或还原剂中添加,或取代它们添加单糖类、二糖类、柠檬酸、或柠檬酸盐类,可增强本发明的效果。

[0059] 作为在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂,N- 十二烷基 -N, N- 二甲基 -3- 铵 -1- 丙磺酸 (N-Dodecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N- 十四烷基 -N, N- 二甲基 -3- 铵 -1- 丙磺酸 (N-Tetradecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N- 十六烷基 -N, N- 二甲基 -3- 铵 -1- 丙磺酸 (N-Hexadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate)、N- 十八烷基 -N, N- 二甲基 -3- 铵 -1- 丙磺酸 (N-Octadecyl-N, N-dimethyl-3-ammonio-1-propanesulfonate) 等合适。

[0060] 作为在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的阳离子型表面活性剂,氯化癸基三甲基铵 (Decyltrimethylammonium Chloride)、氯化十二烷基三甲基铵 (Dodecyltrimethylammonium Chloride)、氯化十四烷基三甲基铵 (Tetradecyltrimethylammonium Chloride)、氯化十六烷基三甲基铵 (Hexadecyltrimethylammonium Chloride)、溴化癸基三甲基铵 (Decyltrimethylammonium Bromide)、溴化十二烷基三甲基铵 (Dodecyltrimethylammonium Bromide)、溴化十四烷基三甲基铵 (Tetradecyltrimethylammonium Bromide)、溴化十六烷基三甲基铵 (Hexadecyltrimethylammonium Bromide)、氯化月桂基吡啶鎓 (Laurylpyridinium Chloride)、氯化十四烷基吡啶鎓 (Tetradecyl pyridinium Chloride)、氯化十六烷基吡啶鎓 (Cetyl pyridinium Chloride) 等合适。

[0061] 在同一分子中具有这样的碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两

性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂浓度优选处理时浓度为 0.1%或以上至 15%以下,更优选 0.5%~10%。

[0062] 作为在酸化剂和在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂浓度存在下的非离子型表面活性剂, TritonX100 等聚氧乙烯异辛基苯基醚类,以及 NP-40 等聚氧乙烯壬基苯基醚类、吐温 80 等聚氧乙烯山梨糖醇酐烷基酯类等合适,它们的浓度,处理时浓度优选 1%或以上至 7.5%以下,更优选 1%或以上至 5%以下。本申请所述的百分率用重量/质量 $\times 100\%$ 表示。

[0063] 作为在酸化剂和在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂浓度存在下的蛋白质变性剂,尿素或硫脲等合适,它们的浓度在处理时浓度优选 0.5M 或以上,更优选 1M 或以上至 4M 以下,在溶解性等没有问题的场合,例如预先向样品处理用管添加粉末尿素等场合,可以使用到 10M 之前的浓度。

[0064] 作为在酸化剂和在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂浓度存在下的还原剂,半胱氨酸、半胱胺、二甲氨基乙硫醇、二乙氨基乙硫醇、二丙氨基乙硫醇等合适,它们的浓度在处理时浓度优选 0.25mM 或以上至 1000mM 以下,更优选 1.5mM 或以上至 200mM 以下。

[0065] 向酸化剂和在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂中添加的单糖类或二糖类,麦芽糖、蔗糖、海藻糖、甘露糖、果糖、葡萄糖、山梨糖醇、半乳糖、右旋糖合适。另外向酸化剂和在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂中添加的柠檬酸或柠檬酸盐类,柠檬酸、柠檬酸水合物、柠檬酸钠盐、柠檬酸钾盐合适。

[0066] 作为向酸化剂添加的其它物质可以考虑尿素等蛋白质变性剂。已知尿素等蛋白质变性剂通过削弱氢离子键,对蛋白质的高级结构具有部分破坏作用,所以可以使病毒粒子膜破坏和使样品中抗靶抗原的抗体变性。另外还具有使例如在大肠菌表达的重组蛋白质由不溶性级分包涵体变为可溶化等使不溶性沉淀物可溶化的效果。然而,在尿素等蛋白质变性剂存在下,也存在靶抗原的结构表位被破坏,与捕捉抗原用抗体等探针的结合变弱,灵敏度降低的大问题。

[0067] 另外,尿素等蛋白质变性剂的变性作用往往是可逆的,有时通过稀释或透析等将蛋白质变性剂浓度变稀,可将暂时变性的结构恢复。这表明存在与捕捉靶抗原的探针或检测用探针进行竞争的来自样品的抗体,结果使得灵敏度降低。即,尿素等蛋白质变性剂的添加具有以上所述的二面性。

[0068] 本发明人通过将酸处理和蛋白质变性剂处理组合,发现沉淀物等酸处理的问题、样品中抗体的可逆变性等蛋白质变性剂处理的问题被消除,使得本发明的另一个发明完成。

[0069] 本申请发明人通过在处理时添加 1M 或以上的蛋白质变性剂之一的尿素可以使酸处理导致的沉淀物形成大大减少。作为这样的蛋白质变性剂,尿素、硫脲等合适。另外蛋白质变性剂浓度在处理时浓度优选 1M 或以上,更优选 1.5M 或以上至 8M 以下。另外还发现通过向包含酸化剂和蛋白质变性剂的处理剂中添加 TritonX100 等聚氧乙烯异辛基苯基醚

类,以及 NP-40 等聚氧乙烯壬基苯基醚类等非离子型表面活性剂,具有使灵敏度上升等效果。另外也可以向包含酸化剂和蛋白质变性剂的处理剂中添加还原剂。

[0070] 如对上述实验进行概括,本发明提供含有 HCV 的样品的处理方法,其特征是:通过将含有 HCV(丙型肝炎病毒)的样品用含有

[0071] (1) 酸化剂,以及 (2) 蛋白质变性剂,或在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂的处理剂处理,使 HCV 抗原游离和破坏与 HCV 抗原结合的抗体。

[0072] 另外提供特征如下的对含 HCV 样品的处理方法:通过将含有 HCV 的样品用含有下面的 (1)、(2) 中的至少一种或一种以上物质和 (3) 中的至少一种或一种以上的物质的处理剂处理,使 HCV 抗原游离和破坏与 HCV 抗原结合的抗体。(1)、(2)、(3) 的物质是 (1) 酸化剂、(2) 蛋白质变性剂、(3) 非离子型表面活性剂或还原剂。另外,本申请发明的处理可以在高温下进行,优选在 20°C ~ 50°C,更优选在 25°C ~ 42°C 进行。

[0073] 显然通过使用本发明的处理方法,可以从含有具有与 HCV 同样构造的病毒粒子的样品使病毒抗原游离为适合使用探针的测定方法的状态。其中所谓具有与 HCV 同样构造的病毒是可形成具有这样结构的病毒粒子的病毒,所述病毒粒子由包装基因组 RNA、DNA 的蛋白质和包围该蛋白的膜蛋白质与脂膜构成;或是可形成具有这样结构的病毒粒子的病毒,所述病毒粒子由包装基因组 RNA、DNA 的蛋白质和包围该蛋白的脂膜构成;或是可形成具有这样结构的病毒粒子的病毒,所述病毒粒子由内包基因组 RNA、DNA 的蛋白质与脂膜构成。

[0074] 例如,作为 HCV 的类似病毒,包括黄病毒类、人免疫缺陷病毒等逆病毒等。另外还包括象具有基因组 DNA 的乙型肝炎病毒那样的具有基因组 DNA 的病毒,或虽然不带包膜蛋白质,但具有包装基因组 DNA 的蛋白质的人细小病毒等。

[0075] 实施例

[0076] 以下实施例给出了本发明的例证,但本发明的范围并不限于这些实施例。

[0077] 实施例 1. 杂交瘤的制作方法

[0078] 将根据专利第 3171827 号所述的方法制备的融合 HCV 核心蛋白质 (Trp C11) 溶解于 6M 尿素后,按照终浓度 0.2 ~ 1.0mg/mL 用含有 0.15MNaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.3) 稀释,与等量的  $\text{タ イ タ ー マ ツ ク ス}$  混合,作为 Trp C11 悬浮液。将 Trp C11 浓度调整到终浓度 0.1 ~ 0.5mg/mL 的该悬浮液注射到 4 ~ 6 周龄的 BALB/c 品系小鼠腹腔内。2 周后进行同样的免疫,再于约 2 周后,向尾静脉内注射将 Trp C11 调整到 0.01mg/mL 的生理盐水溶液。

[0079] 在最后的加强免疫后第 3 天,在无菌条件下从该免疫动物摘出脾脏,用剪刀剪成切片,再用筛过滤使脾脏成为一个一个细胞,用 RPMI-1640 培养基洗 3 次。在 8-氮杂鸟嘌呤存在下培养数日,将完全除去回复突变体的对数增殖期小鼠骨髓瘤细胞株 SP2/OAg14 经上述同样洗净后,就该细胞  $1.8 \times 10^7$  个与脾细胞  $1.0 \times 10^8$  个加入到 50mL 容量的离心管中,并混合。于  $200 \times g$  下离心分离 5 分钟,除去上清,加入保温在 37°C 的含有 50% 聚乙二醇 4000 (PEG4000;Merck 公司生产) 的 RPMI-1640 培养基 1mL,进行细胞融合。

[0080] 融合细胞经离心分离 ( $200 \times g$ , 5 分钟) 除去 PEG4000 后,使用 96 孔板,在含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷 (以下省略为 HAT) 的 RPMI-1640 培养基中培养 1 ~ 2 周,只使杂交瘤增殖。然后在不含有 HAT 的培养基中使其成长发育,约 2 周后对产生目的抗体的克隆用 ELISA 法进行检测,得到产生具有所期望反应特异性的本发明单克隆抗体的杂交

瘤。

[0081] 对于得到的杂交瘤,根据常规的极限稀释法,对产生目的抗体的株进行检测和单一克隆化,将得到的杂交瘤分别命名为 HC11-14、HC11-10、HC11-15、HC11-3、HC11-11、HC11-7、HC11-9、以及 HC11-21。HC11-14(FERM BP-6006)、HC11-10(FERM BP-6004)、HC11-3(FERM BP-6002)、HC11-11(FERM BP-6005)、以及 HC11-7(FERM BP-6003) 的杂交瘤于平成 9 年 7 月 4 日,HC11-15(FERM BP-6782) 于平成 11 年 7 月 16 日,HC11-9(FERM BP-08493)、HC11-21(FERM BP-08494) 的杂交瘤于平成 15 年 9 月 25 日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)。

[0082] 实施例 2. 单克隆抗体的制作法

[0083] 将通过实施例 2 所述方法得到的杂交瘤移植到用降植烷等处理后小鼠腹腔,取得腹水中产生的单克隆抗体。该单克隆抗体的纯化利用结合了蛋白 A 的琼脂糖凝胶柱分离 IgG 级分。

[0084] 由上述 8 种杂交瘤产生的分别的单克隆抗体 C11-15、C11-14、C11-10、C11-7、C11-9、C11-11、C11-21 以及 C11-3 的同种型通过使用小鼠的 Ig 各个同种型试剂盒(Zymed 公司生产),阐明了 C11-10、C11-7 是 IgG2a ;C11-14、C11-3、C11-9、C11-21、C11-11、C11-1 是 IgG1。对于得到的各种单克隆抗体,使用根据来自 HCV 核心区的序列每 10 个氨基酸重复而合成的约 20 个氨基酸的肽进行表位解析。C11-14、C11-10、C11-7 和 C11-3 识别专利第 3171827 号所述的序列。C11-9、C11-21 分别识别 <sup>21</sup>DVKFPGGGQIVGGVYLLPRR<sup>40</sup> 和 <sup>100</sup>PRGSRPSWGPTDPRHRSRNVG<sup>120</sup> 的序列。即 C11-9 是识别 HCV 核心抗原氨基酸编号 21-40 的序列的单克隆抗体,C11-21 识别 HCV 核心抗原氨基酸编号 100-120 的序列的单克隆抗体。

[0085] 实施例 4. 样品处理条件研究

[0086] (处理条件研究)

[0087] 1) 酸化剂浓度:向 HCV 抗原阴性样品或 HCV 抗原阳性样品(#19、#86、#89、#92-4、#96) 100  $\mu$  L 中添加各种盐酸浓度的水溶液 50  $\mu$  L,于 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟,将其中的 100  $\mu$  L 作为测定样品,使用以下所述的测定法进行研究。

[0088] 向 96 孔微量培养板(Costar High Binding Plate)加 200  $\mu$  L 的 4  $\mu$  g/mL 浓度的抗 HCV 核心抗原单克隆抗体(c11-3 和 c11-7 等量混合),于 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。

[0089] 用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 pH7.3 洗 2 次后,加 350  $\mu$  L 的含有 0.5% 酪蛋白钠的 10mM 磷酸缓冲液 pH7.1,温育 2 小时。除去封闭液后,将含有中和剂的反应缓冲液 100  $\mu$  L 和各个用样品处理法得到的测定样品加到各个孔中,边搅拌,边于室温反应 1 小时,用含有 0.05%吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液 pH7.3(洗净液)350  $\mu$  L 清洗 6 次,再添加辣根过氧化物酶(HRP)标记的单克隆抗体(C11-10 和 C11-14 等量混合)200  $\mu$  L,于室温反应 30 分钟。用洗净液洗 6 次,加底物溶液(含有 2mg/ml 的邻苯二胺、30%过氧化氢水 0.9  $\mu$  l/ml 的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液 pH5.0)200  $\mu$  L,温育 30 分钟。

[0090] 加 5N 硫酸 50  $\mu$  L 停止酶反应,用微量培养板读数仪(コナ MTP32)测定 492nm(参考波长 630nm)的吸光度,结果如图 1 所示。另外,图 1 所示的盐酸浓度用将样品(Sample)和处理剂混合后的处理时浓度表示。

[0091] HCV 阳性样品(#19、#86、#89、#92-4、#96)在不含有盐酸的溶液中即使于 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟,也几乎检测不到核心抗原活性,从处理时的盐酸浓度 0.167N 开始证实核心抗原

活性,在 0.5 ~ 0.867N 为峰。当使用硫酸替代盐酸进行研究时,几乎得到同样结果。

[0092] 2) 在酸化剂共存下的各种表面活性剂浓度:向 HCV 抗原阴性样品或 HCV 抗原阳性样品 (#110、#120、#117、#89) 100  $\mu$  L 添加将各种表面活性剂溶解于 1.5N 盐酸浓度的水溶液后的该溶液 50  $\mu$  L,于 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟,将其中的 100  $\mu$  L 作为测定样品,用上述 1) 中方法进行研究(表 1 ~ 表 4)。

[0093] 就像表 1 ~ 表 4 表示的那样,判断 4 例样品中的 2 例表现出比各个样品判定基准高的反应性,具有表面活性剂添加效果。该结果证实如果与盐酸或硫酸这样的酸化剂一起添加各种表面活性剂,表面活性剂可使 HCV 核心抗原阳性样品中的核心抗原免疫活性有很大上升。添加效果已被证实了的是在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂。

[0094] 在同一分子中具有碳数 8 个以下的单链烷基和叔胺或季铵盐的表面活性剂没有观察到添加效果。另外在同一分子中具有 10 个碳数的单链烷基和仲胺的象 MEGA-10 这样的非离子型表面活性剂效果弱。象 TritonX100 或吐温 20 这样的非离子型表面活性剂或象 CHAPS 这样的具有类固醇骨架的表面活性剂没有表现出反应性的提高。十二烷基硫酸钠(SDS)几乎不能确认效果,2.5%或以上的高浓度下在与样品反应中生成白色沉淀。此外,对 N-十二烷酰基肌氨酸钠或脱氧胆酸等也进行了研究,在与酸化剂共存时,溶解性差,不能进行研究。

[0095] 通过向酸化剂中添加在同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂,已经证实测定灵敏度提高。从该酸化剂和表面活性剂的处理剂中除去酸化剂,只用有效果的表面活性剂进行处理,测定灵敏度大大降低。由此可以认为测定灵敏度的上升是以酸化剂作为基础,通过添加表面活性剂大大上升的结果。

[0096]

表 1

[0097]

向 0.5N HCl 中添加的洗剂	浓度 %	HCV 核心抗原阳性样品			
		#110	#120	#117	#89
无添加	0.00	0.031	0.128	0.123	0.322
洗剂添加效果的判定基准					
	0.053	0.217	0.209	0.547	
氯化月桂基吡啶鎓	0.50	0.069	0.305	0.598	0.542
	1.25	0.086	0.362	1.120	0.611
	1.67	0.128	0.304	1.038	0.559
	2.50	0.025	0.232	0.823	0.660
	3.33	0.064	0.062	0.757	0.415
$[\text{C}_5\text{H}_5\text{NCH}_2(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3]\text{Cl}$	5.00	0.010	0.015	0.123	0.227
氯化十六烷基吡啶鎓	0.50	0.057	0.159	0.222	0.342
	1.25	0.274	0.135	0.445	0.503
	2.50	0.106	0.405	0.768	0.586
氯化癸基三甲基铵	0.50	0.074	0.303	0.449	0.686
	1.25	0.139	0.355	1.241	0.904
	1.67	0.112	0.347	1.291	0.661
	2.50	0.180	0.375	0.660	0.464
	3.33	0.122	0.317	1.185	0.504
$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	5.00	0.101	0.228	0.953	0.462
氯化十二烷基三甲基铵	0.50	0.117	0.280	0.810	0.705
	1.25	0.159	0.306	1.416	0.771
	1.67	0.159	0.332	1.265	0.846
	2.50	0.199	0.445	0.672	0.921
	3.33	0.106	0.300	1.151	0.468
$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	5.00	0.054	0.206	0.746	0.253
氯化十四烷基三甲基铵	0.50	0.048	0.219	0.389	0.450
	1.25	0.130	0.282	0.965	0.636
	1.67	0.104	0.274	0.729	0.409
	2.50	0.102	0.326	0.818	0.552
	3.33	0.057	0.154	0.436	0.284
$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	5.00	0.035	0.108	0.472	0.225

[0098]

表 2

[0099]

向 0.5N HCl 中添加的洗剂	浓度 %	HCV 核心抗原阳性样品			
		#110	#120	#117	#89
无添加	0.00	0.031	0.128	0.123	0.322
洗剂添加效果的判定基准		0.053	0.217	0.209	0.547
氯化十六烷基三甲基铵	0.50	0.021	0.204	0.147	0.388
	1.25	0.188	0.180	0.624	0.537
	1.67	0.138	0.088	0.446	0.373
	3.33	0.066	0.144	0.316	0.182
$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Cl}$	5.00	0.034	0.100	0.211	0.236
溴化己基三甲基铵	1.67	0.019	0.056	0.092	0.180
	3.33	0.018	0.032	0.087	0.122
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$	5.00	0.015	0.028	0.082
溴化辛基三甲基铵	1.67	0.047	0.115	0.402	0.349
	3.33	0.039	0.078	0.429	0.317
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$	5.00	0.007	0.063	0.322
溴化癸基三甲基铵	1.67	0.122	0.427	1.253	0.779
	3.33	0.143	0.441	1.308	0.730
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$	5.00	0.153	0.341	1.126
溴化十二烷基三甲基铵	0.50	0.100	0.274	0.955	0.628
	1.67	0.147	0.259	1.206	0.597
	3.33	0.141	0.317	1.326	0.639
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$	5.00	0.133	0.341	1.374
溴化十四烷基三甲基铵	1.67	0.105	0.146	0.499	0.567
	3.33	0.076	0.325	0.793	0.522
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$	5.00	0.057	0.215	0.532
溴化十六烷基三甲基铵	1.67	0.178	0.063	0.293	0.285
	3.33	0.311	0.349	0.799	0.600
	$[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$	5.00	-0.109	0.298	0.610

[0100]

表 3

[0101]

向 0.5N HCl 中添加的洗剂	浓度 %	HCV 核心抗原阳性样品			
		#110	#120	#117	#89
无添加	0.00	0.031	0.128	0.123	0.322
洗剂添加效果的判定基准		0.053	0.217	0.209	0.547
3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基铵]-1-丙磺酸	1.67	0.022	0.014	0.049	0.081
	3.33	0.026	-0.009	0.016	0.060
	5.00	0.027	0.000	0.033	0.082
N-十二烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸	1.67	0.107	0.288	1.044	0.748
	2.00	0.059	0.278	0.853	0.705

[0102]

CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> [(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	3.33	0.122	0.372	1.353	0.802
	5.00	0.115	0.360	1.335	0.860
	10.00	0.071	0.234	1.048	0.746
N-十四烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸	1.67	0.103	0.301	0.626	0.808
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> [(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	3.33	0.146	0.376	1.149	0.890
	5.00	0.171	0.467	1.277	0.893
N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸	1.67	0.135	0.198	0.301	0.577
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>15</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> [(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	3.33	0.150	0.488	0.643	1.104
	5.00	0.147	0.459	0.877	1.471
N-十八烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸	1.67	0.086	0.147	0.195	0.483
CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> [(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ]	3.33	0.096	0.206	0.211	0.863
	5.00	0.067	0.189	0.259	1.448
MEGA10	1.67	0.048	0.058	0.163	0.333
n-癸酰基-N-甲基葡糖酰胺	3.33	0.046	0.022	0.160	0.330
	5.00	0.033	0.006	0.148	0.422

[0103]

表 4

[0104]

向 0.5N HCl 中添加的洗剂	浓度 %	HCV 核心抗原阳性样品			
		#110	#120	#117	#89
无添加	0.00	0.031	0.128	0.123	0.322
洗剂添加效果的判定基准		0.053	0.217	0.209	0.547
TritonX-100	1.67	0.016	0.069	0.086	0.365
	3.33	0.026	0.047	0.149	0.380
	5.00	0.060	0.053	0.166	0.388
TritonX-114	1.67	0.030	0.097	0.164	0.364
	3.33	0.022	0.065	0.166	0.351
	5.00	0.169	0.023	0.139	0.169
吐温 20	1.67	0.033	0.097	0.137	0.352
	3.33	0.035	0.087	0.142	0.368
	5.00	0.038	0.069	0.164	0.353
吐温 80	1.67	0.033	0.118	0.176	0.436
	3.33	0.026	0.096	0.174	0.425
	5.00	0.017	0.078	0.148	0.461
十二烷基硫酸钠	0.50	0.023	0.085	0.210	0.476
	1.25	-0.044	-0.085	0.130	0.237
溴化十二烷基三甲基铵	1.67	0.146	0.150	0.808	0.469
使用 0.5N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 代替 0.5N HCl	3.33	0.102	0.174	0.835	0.418
	5.00	0.030	0.134	0.633	0.290

[0105] 3) 酸化剂共存下的蛋白质变性剂

[0106] 向 HCV 抗原阴性样品或 HCV 抗原阳性样品 (#86、#96、#117、#89) 100 μ L 添加将蛋

白质变性剂之一的尿素溶解于 1.5N 盐酸浓度水溶液后的该溶液 50  $\mu$ L, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟, 将其中的 100  $\mu$ L 作为测定样品, 用 1) 上述的方法进行研究 (表 5)。

[0107] 如果添加蛋白质变性剂之一的尿素, 以仅使用酸化剂作为对照, 确认上升约 1.4 ~ 2 倍的样品。另外, 在仅以酸化剂处理时, 有时血清蛋白等变性沉淀或产生白浊, 往往变成了吸液管操作障碍或沉淀物所致大的假阳性的原因。另外, 认为由于这些沉淀物中裹入目的抗原导致灵敏度降低。在处理时通过添加 1M 或以上尿素, 判明可大大减少这样的沉淀物, 特别是在处理时通过添加 1.5M 或以上至 8M 以下尿素, 确认效果更好。尿素可溶解至约 10M, 由于也存在因保存条件引起的析出等问题, 所以作为溶液使用时, 处理时浓度和处理液量与样品量的比有关。

[0108]

表 5

[0109]

	对照		
HCl (N)	0.5	0.5	
尿素 (M)	-	2.67	
	吸光度	吸光度	相对于对照的%
正常血清	0.012	0.011	91.3
HCV 抗原阳性样品			
#117	0.111	0.267	240.5
#89	0.256	0.357	139.5
#96	0.403	0.594	147.4
#86	0.575	0.614	106.8

[0110] 4) 在酸化剂和同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂共存下的非离子型表面活性剂的研究:

[0111] 向 HCV 抗原阴性样品 (正常血浆) 或 3 例 HCV 抗原阳性样品 (#120、#117、#97) 100  $\mu$ L 添加使非离子型表面活性剂 Triton X100 与含有 1.0N 盐酸与 5.0% 溴化十二烷基三甲基铵 (略为 C12TAB) 的溶液混合后的溶液 100  $\mu$ L, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟, 将其中的 100  $\mu$ L 作为测定样品, 用 1) 所述方法进行研究 (图 5)。

[0112] 图 5 所示的非离子型表面活性剂 Triton X100 的浓度用处理样品时的浓度表示。在 HCV 抗原阴性样品 (正常血浆) 中即使添加 Triton X100, 也几乎看不到其信号的变化, 而在 HCV 抗原阳性样品 (#120、#117、#97) 中, 当处理样品时添加 1% ~ 7.5% 的浓度时, 确认反应性提高。特别是 Triton X100 为 1% ~ 5% 时表现出高的反应性。

[0113] 5) 在酸化剂和同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂共存下的蛋白变性剂的研究:

[0114] 向 HCV 抗原阴性样品 (正常血浆) 或 4 例 HCV 抗原阳性样品 (#120、#118、#117、#97) 100  $\mu$ L 添加使非离子型表面活性剂 Triton X100 与含有 1.0N 盐酸与 5.0% C12TAB 的溶液混合后的溶液 100  $\mu$ L, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟, 将其中的 100  $\mu$ L 作为测定样品, 用 1) 所述方法进行研究, 求各个 HCV 抗原阳性样品的免疫活性对 HCV 抗原阴性样品的免疫活性的

比率 (HCV 抗原阳性样品的吸光度 /HCV 抗原阴性样品的吸光度), 如表 6 所示。

[0115]

表 6

[0116]

尿素(M)	正常血浆	HCV 抗原阳性样品			
		#97	#117	#118	#120
0.0	1.0	22.3	23.1	3.4	9.7
0.5	1.0	31.7	35.1	4.5	13.7
1.0	1.0	28.0	45.0	4.3	11.4
1.5	1.0	52.8	77.3	8.3	21.9
2.0	1.0	65.2	82.4	7.8	25.4
2.5	1.0	94.6	96.2	9.7	30.4
3.0	1.0	155.8	142.0	13.8	36.7
3.5	1.0	232.3	216.3	16.0	49.3

[0117] 表 6 所示的作为蛋白质变性剂之一的尿素 (Urea) 浓度用处理样品时的浓度表示。HCV 抗原阳性样品 (#120、#117、#97) 的免疫活性对 HCV 抗原阴性样品 (正常血浆) 的免疫活性的比确认从添加 0.5M 尿素开始显著上升, 随着尿素浓度增加, 至少在添加到 3.5M 尿素之前一直上升。在本次研究中, 预处理液中尿素浓度达到 8M 的话, 由于溶解性差, 所以不能进行预处理时 4M 或以上尿素的研究。

[0118] 因此, 确认通过与作为蛋白质变性剂使用的试剂共存, HCV 核心抗原的免疫活性上升。当然, 可以认为这些共存效果如果是尿素以外的蛋白质变性剂, 也能够确认同样的效果。

[0119] 6) 在酸化剂和同一分子中具有碳数 10 个或 10 个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂共存下的还原剂的研究:

[0120] 向 HCV 抗原阴性样品 (正常血浆) 或 3 例 HCV 抗原阳性样品 (#120、#117、#97) 100  $\mu$  L 添加含有 1.0N 盐酸和 5.0% C12TAB 的溶液与作为还原剂的二乙氨基乙硫醇盐酸混合后的溶液 100  $\mu$  L, 于 37°C 温育 10 分钟, 将其中的 100  $\mu$  L 作为测定样品, 用 1) 所述方法进行研究 (表 7)。

[0121] 其中使用的还原剂二乙氨基乙硫醇盐酸浓度用处理样品时的浓度表示。在 HCV 抗原阴性样品 (正常血浆) 中即使添加二乙氨基乙硫醇盐酸, 也几乎看不到该样品信号的变化, 而在 HCV 抗原阳性样品 (#120、#117、#97) 中, 当处理样品时从 0.25mM 或以上的还原剂浓度开始确认信号上升, 特别是还原剂浓度在 10mM 或以上时, 确认 3 例样品都上升了 30% 或以上, 而在 #117 中添加 20mM 还原剂时, 信号增加到 2 倍或以上。

[0122]

表 7

[0123]

		HCV 抗原阳性样品					
二乙氨基乙 硫醇盐酸盐		正常血浆	#117		#97		
(mM)	OD	OD	相对于对照 的 %	OD	相对于对照 的 %	OD	相对于对照 的 %
0(对照)	0.034	0.382	100 %	0.927	100 %	0.473	100 %
0.25	0.045	0.436	114 %	1.258	136 %	0.538	114 %
0.50	0.029	0.454	119 %	N.T	N.T	0.543	115 %
1.0	0.037	0.483	126 %	N.T	N.T	0.611	129 %
1.5	0.033	0.503	132 %	1.222	132 %	0.692	146 %
10.0	0.024	0.507	133 %	1.303	141 %	0.687	145 %
15.0	0.030	0.550	144 %	1.831	198 %	0.729	154 %
20.0	0.022	0.549	144 %	1.930	208 %	0.752	159 %
30.0	0.023	0.509	133 %	N.T	N.T	0.774	164 %
40.0	0.024	0.557	146 %	1.462	158 %	0.723	153 %
50.0	0.033	0.570	149 %	1.650	178 %	0.748	158 %

[0124]

N. T :未试验

[0125] 实施例 5. 使用本发明处理法和现有的处理法 (1) 对 HCV 核心抗原进行检测

[0126] 在专利第 3171827 号和青柳等人的报告中 (Journal of Clinical Microbiology, 37 :1802-1808, 1999), 表明通过用含有高浓度十二烷基硫酸钠等阴离子型表面活性剂和两性离子型表面活性剂的处理液进行 30 分钟的热处理, 可以高灵敏度地检测 HCV 核心抗原。用该样品处理法和本发明处理法检测各个样品中的 HCV 核心抗原, 并进行了比较。

[0127] (用本发明处理法测定 HCV 核心抗原)

[0128] 将样品 100  $\mu$ L 与处理液 (1N HCl, 7% C12TAB, 3.5% N-十六烷基-N, N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸、7% TritonX100、2M 尿素、10mM 二乙氨基乙硫醇盐酸) 100  $\mu$ L 混合, 于 37°C 进行 10 分钟预处理。

[0129] 向 96 孔微量培养板 (Costar High Binding Plate) 的各个孔加 200  $\mu$ L 的 4  $\mu$ g/mL 的抗 HCV 核心抗原单克隆抗体 (c11-3 和 c11-7 等量混合), 于 4°C 温育过夜。用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.3) 洗 2 次后, 加 350  $\mu$ L 的含有 0.5% 酪蛋白钠的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.1), 温育 2 小时。除去封闭液后, 将含有中和剂的反应缓冲液 100  $\mu$ L 和经处理的测定样品 100  $\mu$ L 加到各个孔中。

[0130] 边搅拌, 边于室温下反应 1 小时, 用含有 0.05% 吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.3) (洗净液) 350  $\mu$ L 清洗 6 次, 再添加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的单克隆抗体 (C11-10 和 C11-14 等量混合) 200  $\mu$ L, 于室温反应 30 分钟。用洗净液洗 6 次, 加底物溶液 (含有 2mg/ml 的邻苯二胺、30% 过氧化氢水 0.9  $\mu$ l/ml 的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液 pH5.0) 200  $\mu$ L, 温育 30 分钟。加 5N 硫酸 50  $\mu$ L 使酶反应停止, 用微量培养板读数仪 (コロナ MTP32) 测定 492nm (参考波长 630nm) 的吸光度。

[0131] (用现有处理法 (1) 测定 HCV 核心抗原)

[0132] 将样品 100  $\mu$ L 与处理液 (15% SDS、2% CHAPS、0.3% TritonX100、2M 尿素) 50  $\mu$ L 混合, 于 56°C 进行 30 分钟处理。然后恢复到室温, 作为测定样品。

[0133] 向 96 孔微量培养板 (Costar High Binding Plate) 的各个孔加 200  $\mu$ L 的 4  $\mu$ g/mL 的抗 HCV 核心抗原单克隆抗体 (c11-3 和 c11-7 等量混合) 于 4°C 温育过夜。用含有 0.15M

NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.3) 洗 2 次后,加 350  $\mu$ L 的含有 0.5% 酪蛋白钠的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.1),温育 2 小时。除去封闭液后,将反应缓冲液 100  $\mu$ L 和经处理的测定样品 100  $\mu$ L 加到各个孔中。

[0134] 边搅拌,边于室温反应 1 小时,用含有 0.05% 吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.3) (洗净液) 350  $\mu$ L 清洗 6 次。添加 HRP 标记的单克隆抗体 (C11-10 和 C11-14 等量混合) 200  $\mu$ L,于室温反应 30 分钟。用洗净液洗 6 次,加底物溶液 (含有 2mg/ml 的邻苯二胺、30% 过氧化氢水 0.9  $\mu$ l/ml 的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液 (pH5.0)) 200  $\mu$ L,温育 30 分钟。加 5N 硫酸 50  $\mu$ L 使酶反应停止,用微量培养板读数仪 (コロナ MTP32) 测定 492nm (参考波长 630nm) 的吸光度。

[0135] 表 8 和表 9 给出了使用以上 2 种预处理法检测 HCV 核心抗原的结果,它们的相关性如图 3 所示。就像表 8 和表 9 所示的那样,本发明处理法与现有方法比较,30 例 HCV-RNA 阳性样品中的反应性确认上升 1.85 ~ 6.7 倍,反应性平均上升 3.6 倍。特别是在 5 例样品 (No. 9, 11, 24, 25, 30) 中,用现有方法不能检测到,但使用本发明处理法可很容易检测到 HCV 核心抗原,灵敏度更高。另外,相关系数为 0.894,表现出高相关性。

[0136] 表 8

[0137]

处理法	现有处理法	本发明处理法	
健康人样品	吸光度	吸光度	本发明处理法相对于现有处理法
NS1	0.026	0.035	
NP1	0.012	0.026	
S222	0.019	0.005	
S223	0.010	0.008	
S225	0.011	0.008	
S226	0.089	0.022	

[0138]

S229	0.082	0.017	
S236	0.085	0.010	
S237	0.023	0.017	
S239	0.023	0.023	
平均值	0.038	0.017	0.45

[0139]

表 9

[0140]

处理法	现有处理法	本发明处理法	
HCV-RNA 阳性样品	吸光度	吸光度	本发明处理法相对于现有处理法
1	0.110	0.408	3.71
2	0.330	1.461	4.43
3	0.265	0.778	2.94
4	0.246	0.936	3.80
5	0.931	1.967	2.11
6	0.369	1.792	4.86
7	0.174	0.500	2.87
8	0.220	0.961	4.37
9	0.023	0.066	2.87
10	0.320	1.121	3.50
11	0.011	0.074	6.73
12	0.265	1.643	6.20
13	0.074	0.221	2.99
14	0.563	1.987	3.53
15	0.357	1.304	3.65
16	0.064	0.275	4.30
17	0.573	1.595	2.78
18	0.068	0.357	5.25
19	0.439	0.928	2.11
20	0.181	0.419	2.31
21	0.055	0.199	3.62
22	0.054	0.137	2.54
23	0.041	0.131	3.20
24	0.020	0.037	1.85
25	0.026	0.067	2.58
26	0.055	0.217	3.95
27	0.332	1.088	3.28
28	0.119	0.544	4.57
29	0.319	0.990	3.10
30	0.020	0.082	4.10
平均值			3.60

[0141] 实施例 6. 单克隆抗体组合的反应性

[0142] 将样品 100  $\mu$ L 与预处理液 (1N HCl, 7% C12TAB, 7% TritonX100、2M 尿素、10mM 二乙氨基乙硫醇盐酸) 100  $\mu$ L 混合, 于 37 $^{\circ}$ C 进行 10 分钟预处理。

[0143] 向 96 孔微量培养板 (Costar High Binding Plate) 的各个孔加 200  $\mu$ L 的 4  $\mu$ g/mL 的抗 HCV 核心抗原单克隆抗体 (c11-3、c11-7 和 c11-21 等量混合) 于 4 $^{\circ}$ C 温育过夜。用含

有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.3) 洗 2 次后,加 350  $\mu$ L 的含有 0.5%酪蛋白钠的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.1),温育 2 小时。除去封闭液后,将含有中和剂的反应缓冲液 100  $\mu$ L 和各个已进行预处理的测定样品 100  $\mu$ L 加到各个孔中。

[0144] 边搅拌,边于室温下反应 1 小时,用含有 0.05%吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液 pH7.3(洗净液)350  $\mu$ L 清洗 6 次。添加 HRP 标记的单克隆抗体 (C11-9 和 C11-14 等量混合)200  $\mu$ L,于室温反应 30 分钟。用洗净液洗 6 次,加底物溶液(含有 2mg/ml 的邻苯二胺、30%过氧化氢水 0.9  $\mu$ l/ml 的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液 pH5.0)200  $\mu$ L,温育 30 分钟。加 5N 硫酸 50  $\mu$ L 使酶反应停止,用微量培养板读数仪(コロナ MTP32)测定 492nm(参考波长 630nm)的吸光度,与使用实施例 5 的本发明处理法的 HCV 核心抗原检测中得到的结果进行比较(表 11 和表 12)。

[0145] 当固相中添加 c11-3、c11-7 以及 c11-21,以及作为酶标记抗体直接利用 c11-14,取代 c11-10 使用 c11-9 时,反应性平均上升约 1.31 倍,特别是 No. 19 反应性上升至 1.65 倍(表 12)。这可认为是在固相抗体中使用了 3 种识别 HCV 核心抗原 C 末端氨基酸编号 100-120、以及 111-130 的抗体产生的效果。即与在固相中使用 2 种识别 HCV 核心抗原氨基酸序列 100-130 的抗体相比,使用 3 种更容易捕捉核心抗原,可看到测定值上升。

[0146] 实施例 7. 单克隆抗体组合的反应性

[0147] 将样品 100  $\mu$ L 与预处理液(1N HCl,7% C12TAB,7% TritonX100、2M 尿素、10mM 二乙氨基乙硫醇盐酸)100  $\mu$ L 混合,于 37°C 进行 10 分钟预处理。

[0148] 向 96 孔微量培养板(Costar High Binding Plate)的各个孔加 200  $\mu$ L 的共计 4  $\mu$ g/ml 的抗 HCV 核心抗原单克隆抗体(c11-3 与 c11-7;或 c11-3、c11-7 和 c11-11;或 c11-3、c11-7 和 c11-21 等量混合)于 4°C 温育过夜。用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.3) 洗 2 次后,加 350  $\mu$ L 的含有 0.5%酪蛋白钠的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.1),温育 2 小时。除去封闭液后,将含有中和剂的反应缓冲液 100  $\mu$ L 和经预处理法处理的测定样品 100  $\mu$ L 加到各个孔中。

[0149] 边搅拌,边于室温反应 1 小时,用含有 0.05%吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液 (pH7.3) (洗净液)350  $\mu$ L 清洗 6 次。添加 HRP 标记的单克隆抗体 (C11-9 和 C11-14 等量混合)200  $\mu$ L,于室温反应 30 分钟。用洗净液洗 6 次,加底物溶液(含有 2mg/ml 的邻苯二胺、30%过氧化氢水 0.9  $\mu$ l/ml 的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液 pH5.0)200  $\mu$ L,温育 30 分钟。加 5N 硫酸 50  $\mu$ L 使酶反应停止,用微量培养板读数仪(コロナ MTP32)测定 492nm(参考波长 630nm)的吸光度,研究用于固相的抗体的添加效果(表 10)。

[0150] 通过向固相添加 c11-3、c11-7 以及 c11-11 和 c11-21,HCV-RNA 阳性样品的反应性上升。认为这是在固相抗体中使用了 3 种识别 HCV 核心抗原 C 末端氨基酸 100-120、以及 111-130 的抗体产生的效果。即与在固相中使用 2 种识别 HCV 核心抗原氨基酸序列 100-130 的抗体相比,可看到使用 3 种更容易捕捉 HCV 核心抗原,测定值上升。

[0151] 另外表 11 和表 12 给出了通过使用在实施例 6 的固相中固相化了 c11-3 与 c11-7(等量混合)的板和作为酶标记抗体使用的 c11-14 与 c11-10 的组合(抗体组合 1),以及使用固相化了 c11-3、c11-7 和 c11-21(等量混合)的板和作为酶标记抗体使用的 c11-14 与 c11-9 的组合(抗体组合 2),对多数 HCV-RNA 阳性样品进行测定的结果。在 HCV-RNA 阳性样品中抗体组合 2 相对于抗体组合 1 反应性平均上升约 1.31 倍,特别是 No. 19

反应性上升至 1.65 倍。

[0152]

表 10

[0153]

固相	C11-3 和 c11-7	C11-3、c11-7 和 c11-11	C11-3、c11-7 和 c11-21
标记抗体	C11-9 和 c11-14		
	吸光度	吸光度	吸光度

[0154]

健康人血浆	0.013	0.020	0.001
健康人血清 1	0.018	0.014	0.016
健康人血清 2	0.017	0.016	0.016
健康人平均值	0.016	0.017	0.011
HCV-RNA 阳性样品	吸光度	吸光度	吸光度
119	0.970	1.824	1.837
121	0.850	1.740	1.688
111	0.112	0.156	0.167
113	0.018	0.033	0.026
122	0.063	0.168	0.090

[0155]

表 11

[0156]

固相 标记抗体	抗体组合 (1) c11-3 和 c11-7 c11-10 和 c11-14	抗体组合 (2) c11-3、c11-7 和 c11-21 c11-9 和 c11-14	
			抗体组合 (2) / 抗体组合 (1)
健康人样品	吸光度	吸光度	
NS1	0.035	0.040	
S223	0.008	0.008	
S226	0.022	0.019	
S239	0.023	0.027	
平均值	0.022	0.024	1.07

[0157]

表 12

[0158]

固相 标记抗体	抗体组合 (1) c11-3 和 c11-7 c11-10 和 c11-14	抗体组合 (2) c11-3、c11-7 和 c11-21 c11-9 和 c11-14	
			抗体组合 (2) / 抗体组合 (1)
HCV-RNA 阳性样品	吸光度	吸光度	
1	0.408	0.591	1.45
2	1.461	1.636	1.12
3	0.778	1.088	1.40
4	0.936	1.327	1.42
5	1.967	2.683	1.36
6	1.792	2.300	1.28
7	0.500	0.670	1.34
8	0.961	1.311	1.36
9	0.066	0.076	1.15
10	1.121	1.493	1.33

[0159]

12	1.643	2.156	1.31
13	0.221	0.327	1.48
14	1.987	2.633	1.33
15	1.304	1.762	1.35
16	0.275	0.357	1.30
17	1.595	2.317	1.45
18	0.357	0.349	0.98
19	0.928	1.531	1.65
20	0.419	0.587	1.40
21	0.199	0.179	0.90
22	0.137	0.205	1.50
24	0.037	0.036	0.97
25	0.067	0.090	1.34
26	0.217	0.250	1.15
27	1.088	1.473	1.35
29	0.990	1.342	1.36
平均值			1.31

[0160] 实施例 8. 酸化剂必要性的研究

[0161] 将样品（健康人血清和 3 例 HCV 核心抗原阳性样品）100  $\mu$ L 与除去酸化剂的处理液（7% C12TAB, 3.5% N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸、7% TritonX100、2M 尿素、10mM 二乙氨基乙硫醇盐酸）100  $\mu$ L 混合，于 37°C 进行 10 分钟预处理。向 96 孔微量培养板（Costar High BindingPlate）的各个孔加 200  $\mu$ L 的 4  $\mu$ g/mL 的抗 HCV 核心抗原单克隆抗体（c11-3 与 c11-7 等量混合）于 4°C 温育过夜。用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液（pH7.3）洗 2 次后，加 350  $\mu$ L 的含有 0.5% 酪蛋白钠的 10mM 磷酸缓冲液（pH7.1），温育 2 小时。

[0162] 除去封闭液后，将含有中和剂的反应缓冲液 100  $\mu$ L 和经处理的测定样品 100  $\mu$ L 加到各个孔中。边搅拌，边于室温反应 1 小时，用含有 0.05% 吐温 20 的 10mM 磷酸缓冲液（pH7.3）（洗净液）350  $\mu$ L 清洗 6 次。添加 HRP 标记的单克隆抗体液（C11-10 和 C11-14 等量混合）200  $\mu$ L，于室温反应 30 分钟。用洗净液洗 6 次，加底物溶液（含有 2mg/ml 的邻苯二胺、30% 过氧化氢水 0.9  $\mu$ l/ml 的 0.1M 柠檬酸磷酸缓冲液（pH5.0））200  $\mu$ L，温育 30 分钟。加 5N 硫酸 50  $\mu$ L 使酶反应停止，用微量培养板读数仪（コロナ MTP32）测定 492nm（参考波长 630nm）的吸光度。得到的结果如表 13 所示。

[0163] 表 13

[0164]

预处理时的盐酸浓度(N)	0.00	0.13	0.25	0.38	0.50	0.63	0.75	1.00
健康人血清	0.125	0.018	0.016	0.011	0.007	0.008	0.013	0.006
HCV 核心抗原阳性样品								
#110	0.023	0.106	0.177	0.251	0.257	0.338	0.388	0.488
#120	0.153	0.078	0.389	0.587	0.738	0.832	0.918	0.545
#117	0.022	0.092	0.864	1.904	2.237	2.433	2.573	2.534

[0165] 由表 13 进一步确认各个 HCV 阳性样品（#110、#120、#117）在不含有盐酸的溶液中即使于 37°C 温育 10 分钟，也几乎检测不到核心抗原活性，但自处理时的盐酸浓度 0.13N 开始证实核心抗原活性，在 0.5 ~ 1.0N 确认存在非常高的核心抗原活性。

[0166] 实施例 9. 杂交瘤的制作方法 (2)

[0167] 将具有来自 HCV 基因型 1b 核心抗原 1 ~ 173 号序列的重组 HCV 核心蛋白质（I-C173）溶解于 6M 尿素后，用含有 0.15M NaCl 的 10mM 磷酸缓冲液（pH7.3）稀释至终浓度 0.2 ~ 1.0mg/mL，与等量的タイターマックス混合。将该悬浮液注射到 4 ~ 6 周龄的 BALB/c 品系小鼠腹腔内。每隔 2 周进行 3 次同样的免疫，再于 2 周后，将 I-C173 调整到 0.01mg/mL 的生理盐水溶液注射到尾静脉内。在最终加强免疫后第 4 天，在无菌条件下从该免疫动物摘出脾脏，用剪刀剪成碎片，再用筛将脾脏制成一个一个的细胞，用 RPMI-1640 培养基洗 3 次。在 8-氮杂鸟嘌呤存在下培养数日，与上述同样将完全除去了回复突变体的对数增殖期小鼠骨髓瘤细胞株 SP2 洗净后，将该细胞  $3.26 \times 10^7$  个与脾细胞  $2.28 \times 10^8$  个加入到 50mL 容量的离心管中，并混合。于  $200 \times g$  下离心分离 5 分钟，除去上清，加保温在 37°C 的含有 50% 聚乙二醇 4000 (PEG4000; Merck 公司生产) 的 RPMI-1640 培养基 1mL，进行细胞融合。融合细胞经离心分离（ $200 \times g$ , 5 分钟）除去 PEG4000 后，使用 96 孔板，在含有 HAT 的 RPMI-1640 培养基中培养 1 ~ 2 周，只使杂交瘤增殖。然后在不含有 HAT 的培养基中使其成

长发育,约2周后对产生目的抗体的克隆用ELISA法进行检索,得到产生具有所希望反应特异性的本发明单克隆抗体的杂交瘤。

[0168] 对于得到的杂交瘤,根据常规的极限稀释法,进行产生目的抗体株的检索和单一克隆化,将得到的杂交瘤命名为OT3,于平成16年6月1日保藏于独立行政法人产业技术综合研究所专利生物保藏中心(茨城县筑波市东1丁目1番地1中央第6)。(FERM BP-10032)。

[0169] 实施例10. 单克隆抗体的制作(2)

[0170] 将通过实施例5所述方法得到的杂交瘤移植到用降植烷处理后的小鼠腹腔,获得腹水中产生的单克隆抗体。该单克隆抗体的纯化利用结合了蛋白A的琼脂糖凝胶柱分离IgG级分。由上述杂交瘤产生的单克隆抗体AOT3的同种型使用小鼠的Ig各个同种型试剂盒(Zymed公司生产),阐明是IgG2b。对于得到的各个单克隆抗体,使用来自HCV核心区序列合成的20个氨基酸的肽进行表位解析。AOT3特异识别<sup>101</sup>RGSRPSWGPTDPRHRSRNVG<sup>120</sup>的序列。AOT3对于该序列比c11-21表现出更高的反应性。

[0171] 实施例11. 样品处理条件研究(2)

[0172] (处理条件研究)

[0173] 1) 麦芽糖浓度:向HCV抗原阴性样品或HCV抗原阳性样品100 $\mu$ L中添加含有各种浓度麦芽糖的预处理剂(1N HCl, 3.5% C12TAB, 3% N-十六烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸(C16APS)、3% N-十八烷基-N,N-二甲基-3-铵-1-丙磺酸(C18APS)、7% TritonX100、3M尿素、10mM二氨基乙硫醇盐酸)100 $\mu$ L,于37 $^{\circ}$ C温育10分钟,将其中的100 $\mu$ L作为测定样品,使用以下所述的测定法进行研究。

[0174] 向96孔微量培养板(Costar High Binding Plate)加200 $\mu$ L的4 $\mu$ g/mL的抗HCV核心抗原单克隆抗体(c11-3, c11-7, AOT3,以1:2:1的比率混合),于4 $^{\circ}$ C温育过夜。用含有0.15M NaCl的10mM磷酸缓冲液(pH7.3)洗2次后,加350 $\mu$ L的含有0.5%酪蛋白钠的10mM磷酸缓冲液(pH7.1),温育2小时。除去封闭液后,将含有中和剂的反应缓冲液100 $\mu$ L和各个通过样品处理法得到的测定样品加到各个孔中,边搅拌边于室温下反应1小时,用含有0.05%吐温20的10mM磷酸缓冲液(pH7.3)(洗净液)350 $\mu$ L清洗6次,再添加过氧化物酶(HRP)标记的单克隆抗体(C11-9和C11-14等量混合)200 $\mu$ L,于室温下反应30分钟。用洗净液洗6次,加底物溶液(含有2mg/ml的邻苯二胺、30%过氧化氢水0.9 $\mu$ l/ml的0.1M柠檬酸磷酸缓冲液pH5.0)200 $\mu$ L,温育30分钟。加5N硫酸50 $\mu$ L停止酶反应,用微量培养板读数仪(コロナMTP32)测定492nm(参考波长630nm)的吸光度,结果如表7所示。另外,表7所示的麦芽糖浓度用将样品和预处理剂混合后的预处理时浓度表示。

[0175] 各HCV阳性样品自添加麦芽糖的预处理时浓度2.5%开始证实存在高的核心抗原活性,即使10%或以上也可确认。另外,这样的添加效果除了麦芽糖以外,即使蔗糖、果糖、甘露糖、海藻糖等也可确认。

[0176] 2) 柠檬酸浓度:

[0177] 向HCV抗原阴性样品或HCV抗原阳性样品100 $\mu$ L添加含有各种浓度柠檬酸的预处理剂(1N HCl, 3.5% C12TAB, 3% C16APS、3% C18APS、7% TritonX100、3M尿素、5%麦芽糖、20mM二氨基乙硫醇盐酸)100 $\mu$ L,于37 $^{\circ}$ C温育10分钟,将其中的100 $\mu$ L作为测定样品,用上述1)中所述方法进行研究(表8)。但是,由于向预处理剂中添加了柠檬酸,预处理后的样品液的pH有些变化,所以要将反应缓冲液100 $\mu$ L的中和剂浓度进行适时变更使之

变成中性。另外,表 8 给出的柠檬酸浓度用样品与预处理剂混合后的预处理时浓度表示。

[0178] 就像表 8 所示的那样,各 HCV 阳性样品从添加柠檬酸的预处理时浓度 0.05M 开始证实高核心抗原活性,即使在 0.2M 或以上也可确认。另外这样的添加效果即使使用包括柠檬酸钠盐在内的多种柠檬酸盐类也可确认。

[0179] 表 14

[0180]

麦芽糖	健康人 血清	HCV 抗原阳性样品			
		#123		#114	
(%)	OD	OD	对照的 %	OD	对照的 %
0(对照)	0.007	0.059	100%	0.057	100%
2.5	0.016	0.081	137%	0.096	168%
5.0	0.012	0.122	207%	0.159	279%
7.5	0.022	0.162	275%	0.251	440%
10.0	0.025	0.336	569%	0.503	882%

[0181] 表 15

[0182]

柠檬酸	健康人 血清	HCV 抗原阳性样品			
		#123		#114	
(M)	OD	OD	对照的 %	OD	对照的 %
0(对照)	0.016	0.122	100%	0.159	100%
0.05	0.013	0.582	477%	0.927	583%
0.10	0.035	0.854	700%	1.032	649%
0.15	0.028	0.676	554%	0.852	536%
0.20	0.024	0.200	164%	0.341	214%

[0183] 产业上的可利用性

[0184] 通过本发明,可以简便、短时间使病毒抗原从 HCV 等病毒粒子中游离,使其为适于抗体等作为探针检测抗原的所谓免疫测定方法的状态。另外通过本发明给出的方法,通过对含有 HCV 等病毒粒子的样品进行处理,通过使用抗体等探针检测抗原的所谓免疫测定方法,可以简便、短时间内、而且高灵敏度地对病毒抗原进行检测和定量。另外,通过本发明可以简便、短时间使病毒抗原游离。

[0185] 另外,通过本发明得到的有用的单克隆抗体由于特异识别丙型肝炎患者血清中的 HCV 抗原,所以可以制作使用显示丙型肝炎的样品处理法和免疫测定方法判别样品中是否有 HCV 等病毒的试剂盒、定量试剂盒以及诊断试剂。另外通过利用本发明得到的单克隆抗体和使用非常简易的处理法的 HCV 检测以及定量方法,可以简单地、操作性好地进行丙型肝炎的确诊。

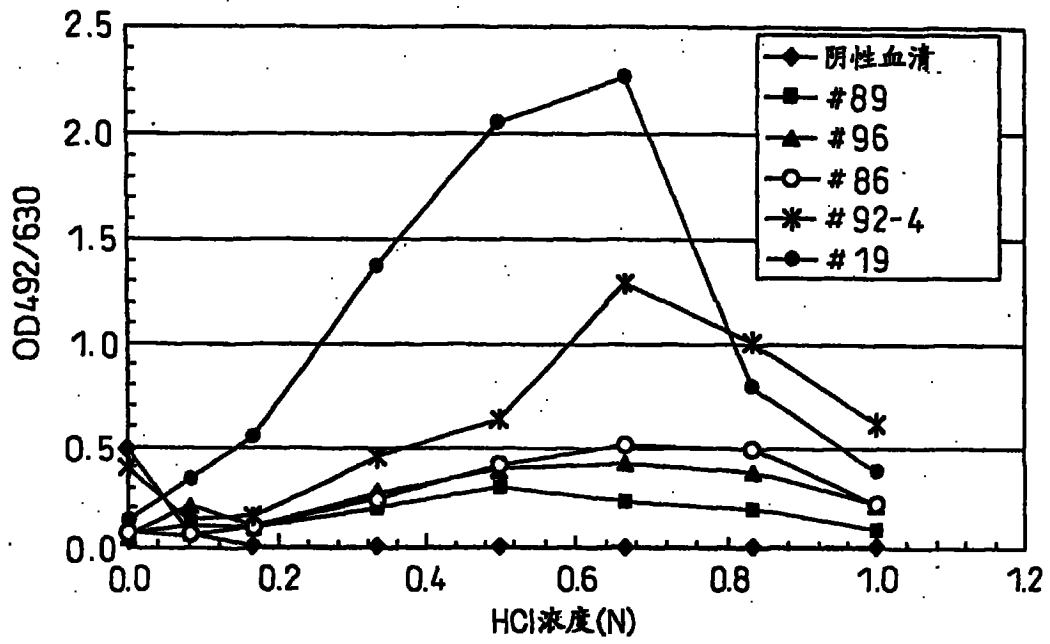


图 1

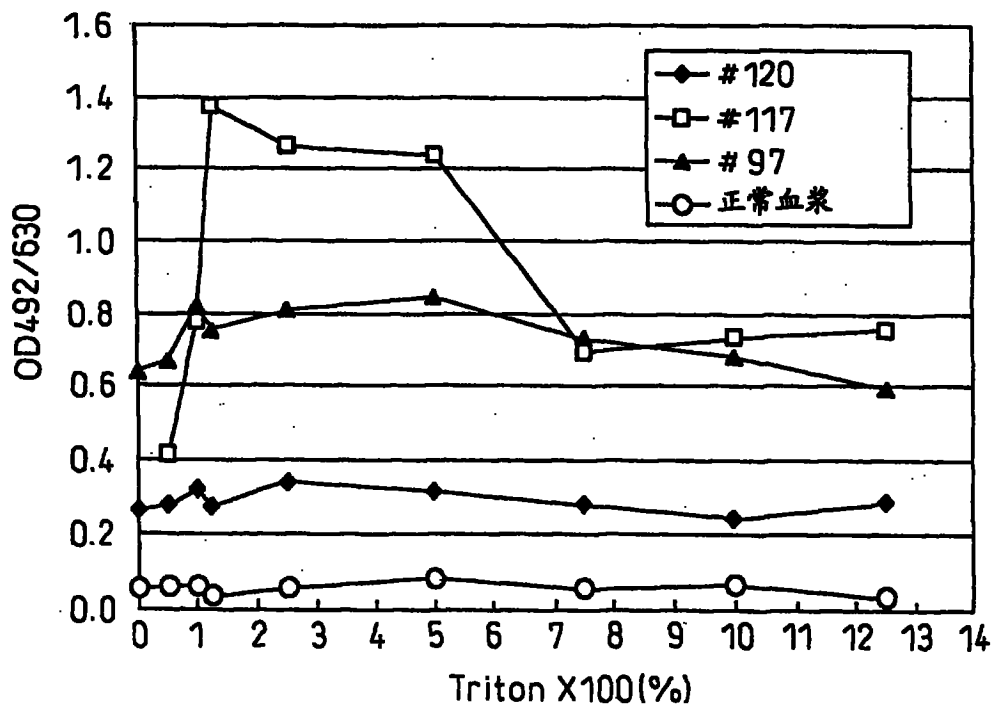


图 2

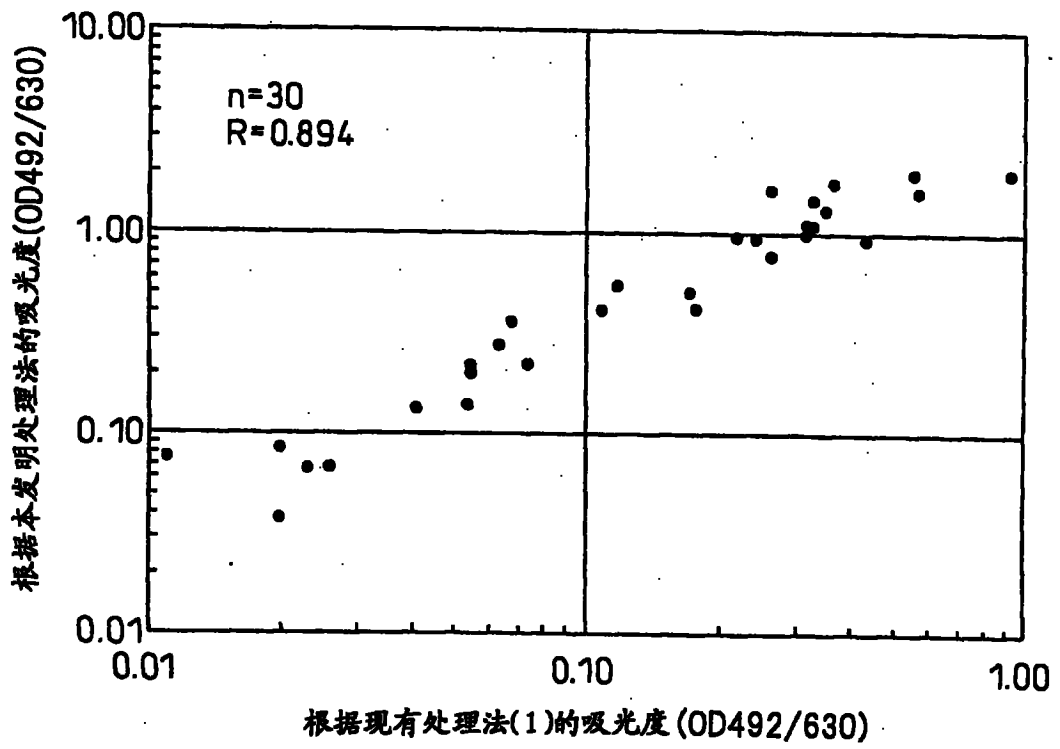


图 3

专利名称(译)	丙型肝炎病毒的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1871518B</a>	公开(公告)日	2010-08-25
申请号	CN200480030936.3	申请日	2004-10-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	青柳克己 饭田久美子 松原直子		
发明人	青柳克己 饭田久美子 松原直子		
IPC分类号	C12N5/18 G01N33/531 C07K16/10 C12N7/00 G01N33/576		
CPC分类号	C07K2317/34 G01N33/5767 G01N2333/18 C07K16/109 Y10T436/108331		
审查员(译)	李冰		
优先权	2003367783 2003-10-28 JP		
其他公开文献	CN1871518A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了含有HCV样品的处理方法等，其特征在于：将含有HCV(丙型肝炎病毒)的样品通过用含有(1)酸化剂，以及(2)蛋白质变性剂，或在同一分子中具有碳数10个或10个以上的单链烷基和叔胺或季铵盐的两性离子型表面活性剂或阳离子型表面活性剂的处理剂处理，使HCV抗原游离和将与HCV抗原结合的抗体破坏。

向 0.5N HCl 中添加的洗剂	浓度 %	HCV 核心抗原阳性样品			
		#110	#120	#117	#89
无添加	0.00	0.031	0.128	0.123	0.322
洗剂添加效果的判定基准		0.053	0.217	0.209	0.547
氯化月桂基吡啶鎓	0.50	0.069	0.305	0.598	0.542
	1.25	0.086	0.362	1.120	0.611
	1.67	0.128	0.304	1.038	0.559
	2.50	0.025	0.232	0.823	0.660
	3.33	0.064	0.062	0.757	0.415
[C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> CH <sub>3</sub> ]Cl	5.00	0.010	0.015	0.123	0.227
氯化十六烷基吡啶鎓	0.50	0.057	0.159	0.232	0.342
	1.25	0.274	0.135	0.445	0.503
	2.50	0.106	0.405	0.768	0.586
氯化癸基三甲基铵	0.50	0.074	0.303	0.449	0.686
	1.25	0.139	0.355	1.241	0.904
	1.67	0.112	0.347	1.291	0.661
	2.50	0.180	0.375	0.660	0.464
	3.33	0.122	0.317	1.185	0.504
[CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ]Cl	5.00	0.101	0.228	0.953	0.462
氯化十二烷基三甲基铵	0.50	0.117	0.280	0.810	0.705
	1.25	0.159	0.306	1.416	0.771
	1.67	0.159	0.332	1.265	0.846
	2.50	0.199	0.445	0.672	0.921
	3.33	0.106	0.300	1.151	0.468
[CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ]Cl	5.00	0.054	0.206	0.746	0.253
氯化十四烷基三甲基铵	0.50	0.048	0.219	0.389	0.450
	1.25	0.130	0.282	0.965	0.636
	1.67	0.104	0.274	0.729	0.409
	2.50	0.102	0.326	0.818	0.552
	3.33	0.057	0.154	0.436	0.284
[CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>13</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ]Cl	5.00	0.035	0.108	0.472	0.225