[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)

[12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 03126146.9

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100401067C

[22] 申请日 2003.5.9 [21] 申请号 03126146.9

[73] 专利权人 李晨阳

地址 450008 河南省郑州市金水区农业路东段 12 号豫新公寓 4－3－32 号

共同专利权人 郑州金科隆生物工程有限公司
河南省生物工程技术研究中心

[72] 发明人 王云龙 李晨阳 李玉林

[56] 参考文献

US5436126A 1995.7.25

HCV 核心蛋白片段的表达、纯化及免疫原性检测. 吴娴波等. 热带医学杂志，第 3 卷第 2 期. 2003

丙型肝炎病毒核心蛋白基因的克隆及其高效表达. 张彦明等. 第一军医大学学报，第 23 卷第 10 期. 2003

生物素化 HCV 多抗原表位融合基因的克隆及可溶性表达. 李保昌，孙萍，杨淑华，王全立. 中国实验血液学杂志，第 12 卷第 3 期. 2004

以抗原半乳糖苷酶融合蛋白为酶结合物检测丙型肝炎抗体. 曹诚，李平，石成华，马清钧. 中华医学检验杂志，第 22 卷第 6 期. 1999

审查员 汪妍瑜

权利要求书 1 页 说明书 4 页

[54] 发明名称

丙型肝炎病毒抗体桥式双抗原夹心 ELISA 检测法

[57] 摘要

本发明涉及一种丙型肝炎病毒(Hepatitis C virus 简称 HCV)抗体检测方法，。属疾病诊断领域中血清(浆)中抗体的 ELISA 检测方法。通过基因工程方法或化学偶联方法将 HCV 抗原(简称 HCVAg)与一段肽或蛋白质(桥蛋白)进行连接，桥蛋白可与和其有亲和力的酶标记物进行反应，HCVAg 抗原通过桥蛋白与酶标记物可形成 HCV 抗原－桥蛋白－酶标记物的复合物，实现 HCVAg 的间接酶标记，与包被抗原一起可以对血清(浆)中的 HCVAb 进行双抗原夹心法 ELISA 检测。

1. 一种丙型肝炎病毒抗体酶联免疫检测方法，其特征是标记抗原为融合蛋白，融合蛋白由 HCVAg 和桥蛋白通过基因工程方法或化学偶联方法连接而成，桥蛋白是一段肽或蛋白质，与酶标记物具有亲和力，桥蛋白具有抗原或抗原决定簇或配基性质，酶标记物是通过酶标记桥蛋白的抗体或配体而获得的，HCVAg 通过桥蛋白与酶标记物形成如下复合物：HCVAg—桥蛋白—酶标记物，从而实现 HCVAg 的间接酶标记，复合物与包被 HCVAg 一起，可实现对血清和血浆中的抗体进行双抗原夹心法 ELISA 检测。

丙型肝炎病毒抗体桥式双抗原夹心 ELISA 检测法

本发明涉及双抗原夹心法检测血清（浆）中抗体时标记抗原的制备方法及标记方法。属疾病诊断领域中血清（浆）中抗体的 ELISA 检测方法。

已知酶联免疫固相分析（ELISA）双抗原夹心法检测抗体时，标记抗原需进行酶标记，普遍使用的方法是：将标记抗原的游离氨基与酶被活化后的醛基进行偶联反应，或通过双功能基团如戊二醛将标记抗原和酶的游离氨基进行偶联反应形成共价结合的酶标抗原，酶标抗原与包被抗原组成双抗原夹心法试剂，可以对血清（浆）中的 IgG、IgM 同时进行检测，其优点是：一、灵敏度高，血清（浆）不需稀释或稀释倍数少（通常只需 1：1 或 1：2 稀释）；二、检出率高，IgM 通常在感染早期出现，可实现早期诊断，缩短检测的窗口期；三、特异性强，与间接 ELISA 相比，包被与标记抗原全为特异性的抗原，可减少非特异性反应。目前用该方法制备的商品化试剂盒有乙肝表面抗体双抗原夹心法 ELISA 试剂、人类免疫缺陷病毒抗体（I+II 型）双抗原夹心法 ELISA 试剂等。

但是，到目前为止，HCVAb 的酶免检测仍然使用间接 ELISA 法，酶标记物为酶标抗人 IgG 或酶标抗人 IgM，其主要原因是 HCV 核心区抗原富含赖氨酸和精氨酸（提供游离氨基的氨基酸），如果按 HCVAg：酶=1：1 的比率进行标记， HCVAg 与酶的偶联位置绝大多数发生在 HCVAg 的核心区，而不是象其它抗原那样随机分布，酶与 HCVAg 核心区的游离氨基结合后形成空间位阻，妨碍 HCVAg 核心区抗原决定簇与其相对应的这一部分抗体结合，而 HCVAg 核心区又是 HCVAg 的优势抗原决定簇，这样，直接标记 HCVAg 组成的双抗原夹心法 HCVAb ELISA 检测试剂通常会漏检 HCVAg 核心区抗体阳性标本，而 HCVAb 间接 ELISA 试剂本身又有不可克服的缺点：首先，灵敏度低，因为酶标记物为酶标抗人 IgG 或酶标抗人 IgM，为了避免人 IgG 或 IgM 非特异性吸附，血清（浆）标本必须 1：10 或 1：20 以上进行稀释，反应灵敏度与不需稀释血清（浆）标本的双抗原夹心法比自然低 10~20 倍，容易造成漏检；第二，特异性差，即使血清（浆）经过 1：10~1：20 稀释，个别标本中的 IgG 或 IgM 仍对包被反应板有非特异性吸附或对包被反应板中的杂蛋白有特异性吸附。而抗人 IgG 或抗人 IgM 酶标对特异性吸附的 HCV 抗体和其它方式吸附的人 IgG 或 IgM 无分辨能力，必然造成一部分假阳性；第三，一般情况下不能或不方便使用一套试剂同时检测 IgG 和 IgM，目前商品化 HCVAb 间接 ELISA 法检测试剂盒绝大多数只检测 IgG，这样有可能造成一部分单独 IgM 阳性标本的漏检。

本发明的目的是：研制出 HCVAb 双抗原夹心法 ELISA 试剂替代间接 ELISA 试剂，克服间接 ELISA 法灵敏度低、特异性差及 IgG、IgM 不能同时检出的弊

端。

本发明是这样实现的：通过基因工程方法或化学偶联法获得一种融合蛋白，该融合蛋白由两部分组成：一部分是HCVAg，可与血清（浆）中HCVAb特异性反应，一部分是一段肽或蛋白质，称之为桥蛋白，桥蛋白种类繁多，可以是某种抗原（或抗原决定簇），也可以是某种配基。对桥蛋白的抗体或配体进行辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酶等标记可形成酶标记物。由于抗原与抗体之间，配体与配基之间有亲和力，桥蛋白与HCVAg为融合蛋白，通过一步或多步反应，可形成HCVAg—桥蛋白—酶标记物的复合物，实现HCVAg的间接标记，克服直接标记造成的HCVAg核心区抗体漏检的缺点，上述复合物与HCV包被抗原一起可组成HCVAb双抗原夹心法ELISA检测试剂。

本发明的积极效果：

一、 灵敏度高：血清（浆）标本不稀释或仅需1：1、1：2稀释，比间接ELISA灵敏度提高十倍左右。

二、 缩短窗口期：IgM、IgG可同时检测，IgM一般出现在感染的早期或病毒繁殖活动期，一般比IgG早出现7至10天，双抗原夹心法可提高7至10天检出感染者。

三、 特异性强：由于包被抗原和桥式标记抗原均是特异性的，间接ELISA一些不可避免的非特异性标本绝大多数可被排除，提高临床诊断的准确度。

四、 社会效益好：我国目前HCV感染率在1%~2%，即有上千万HCV携带者，HCVAb是临床用血或血液制品必检项目之一。由于间接ELISA固有弊端的存在，即使经过了HCVAb间接ELISA的检测，临床输血（或血液制品）造成的输血后丙型肝炎仍时有发生。双抗原夹心法可极大地减少这部分丙型肝炎。

以上详述了本发明的原理、目的、实现路径和积极意义，由于抗原（或抗原决定簇）与对应抗体，配基与对应配体种类极其繁多，甚至在理论上无穷无尽，以以下实例详述本发明：

一、 包被抗原的获得：

含有HCVAg的基因克隆到pET-22b(+)（美国Novagen公司产品）表达质粒中，命名为pET-22b/HCV，将pET-22b/HCV转化大肠杆菌BL21(DE3)，涂布含氨苄青霉素的LB平板，37℃生长,待菌斑长出后，挑取单个克隆接种于含氨苄青霉素的LB培养基试管中，37℃，200 rpm生长过夜。第二天，1：100接种于新鲜含氨苄青霉素的LB培养基中，37℃生长到OD_{600}=0.6~0.9之间。按终浓度0.5mmol/L 加入1mol/L IPTG，37℃ 200rpm，诱导4小时，5000rpm，4℃离心10分钟，菌体反复冻融三次，超声波破碎。10000rpm，4℃离心10分钟，弃上清，沉淀为包涵体，包涵体用含1%的Triton-X_{100}洗涤一次，离心同上，用

适量pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L尿素缓冲液溶解包涵体，离心同上,用pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L尿素缓冲液平衡CM纤维素离子交换柱，已溶解的包涵体过柱，HCVAg被吸附，用含0.1mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L尿素的缓冲液洗涤除去杂蛋白，用含0.5mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L尿素的缓冲液洗脱，Ni-金属亲和柱用0.5mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L尿素 的缓冲液平衡，合并CM柱洗脱的HCVAg，上Ni-亲和柱，用含25mmol/L咪唑的0.5mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L尿素缓冲液洗涤去除杂蛋白：用含 100mmol/L 咪唑的 0.5mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/LPB 8mol/L尿素缓冲液洗脱获得纯HCVAg，用适量pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L尿素缓冲液稀释至0.5mg/ml，-20℃冻存。

二、 桥蛋白——铁硫氧还蛋白（trx）的获得

pET-32a（美国Novagen公司产品）转化BL21(DE3)，涂布含氨苄青霉素的LB平板，37℃生长,待菌斑长出后，挑取单个克隆于含氨苄青霉素的LB培养基试管中，37℃，200 rpm生长过夜。第二天，1：100接种于新鲜含氨苄青霉素LB培养基中，37℃生长到OD_{600}=0.6~0.9之间。按终浓度0.5mmol/L加入1mol/L IPTG，37℃ 200rpm，诱导4小时，5000rpm，4℃离心10分钟，用pH8.0 0.02mol/L PB 0.5mol/L NaCl缓冲液将菌体洗涤一次，离心同上，菌体反复冻融三次，超声波破碎，离心后上清过Ni-金属亲和柱，用含50mmol/L咪唑的pH8.0 0.02mol/L PB 0.5mol/L NaCl缓冲液洗涤去除杂蛋白，用含100mmol/L咪唑的pH8.0 0.02mol/L PB 0.5mol/L NaCl缓冲液洗脱获得纯铁硫氧还蛋白trx，分装后-20℃冻存。

三、 HCVAg-trx融合蛋白的获得

含有HCVAg的基因克隆到pET-32a（美国Novagen公司产品）中，转化BL21(DE3)，涂布含氨苄青霉素的LB平板，37℃生长,待菌斑长出后，挑取单个克隆于含氨苄青霉素的LB培养基试管中，37℃，200 rpm生长过夜。第二天，1:100接种于新鲜含氨苄青霉素LB培养基中，37℃生长到OD_{600}=0.6~0.9之间。按终浓度0.5mmol/L加入1mol/L IPTG，37℃ 200rpm，诱导4小时，5000rpm，4℃离心10分钟，用pH8.0 0.02mol/LpB 0.5mol/L NaCl缓冲液将菌体洗涤一次，离心同上，菌体反复冻融三次，超声波破碎，离心后上清过Ni-金属亲和柱，用含50mmol/L咪唑的pH8.0 0.02mol/LPB 0.5mol/L NaCl缓冲液洗涤去除杂蛋白，用含100mmol/L咪唑的pH8.0 0.02mol/LPB 0.5mol/L NaCl缓冲液洗脱获得纯HCVAg-trx融合蛋白，分装后-20℃冻存。

四、 羊抗trx抗体的制备

纯化后的trx对生理水透析后，取0.2mg与等体积福氏完全佐剂混和，用乳

化器完全乳化，背部皮下多点免疫5Kg左右山羊一只，三周后，改用福氏不完全佐剂，0.4mg trx 背部皮下再次免疫，第二次免疫4周后，取2mg trx 耳静脉加强免疫，10天后从耳静脉取血，免疫扩散法测抗体效价，若效价大于32，则从颈动脉采血，获得 trx 多抗血清，若效价小于32，两周后再用同剂量 trx 加强免疫，直至获得满意效价。

五、 羊抗 trx IgG 的辣根过氧化物酶（HRP）的标记

羊抗 trx 多抗血清用 50%、33%硫酸铵盐析二次，沉淀对 0.01mol/LpH8.0 0.1mol/L NaCl 透析，用 DE52 离子交柱纯化，获得纯抗 trx IgG,将抗 trx IgG 浓缩至 5-6mg/ml,对 pH9.5 0.01mol/L 碳酸缓冲液(CB)透析过夜，按 IgG:HRP=1.5:1 质量比，取适量 HRP，用高碘酸钠法将 HRP 活化后，对 1mmol/LpH4.0 醋酸缓冲液透析过夜。第二天，按 IgG:HRP=1.5:1 质量比将 IgG 和活化后的 HRP 混和，用适量 pH9.5 0.2mol/L CB 调整混合物 pH=9.2,用 pH=9.5 0.01mol/LCB 调整体积至 IgG 反应浓度等于 2.0mg/ml，25℃暗处反应2小时，然后将反应混匀物降至4℃，按 1mg HRP 加入 51ul 的量加入 0.1mol/L $NaBH_4$，4℃反应2小时终止连接反应。装透析袋对 pH7.0 0.02mol/L PB 0.2mol/L NaCl 透析48小时，中间每6小时换液一次。透析完成后加入等体积甘油混匀，-20℃存放，即获得羊抗 trx-IgG-HRP 酶标记物。

六、 桥式双抗原夹心法检测 HCV Ab

0.5mg/ml 的 HCVAg 1：1000 用 pH9.5 0.05mol/L CB 稀释，100ul/孔加入酶标反应板，4℃包被过夜，第二天，洗涤液(pH7.0 0.01mol/L PB 0.1mol/L NaCl 0.1% tween-20 ）洗板一次，按 115ul /孔加入含 5%小牛血清的 pH7.0 0.01mol/L PB 封板，4℃封闭过夜，然后吸净封板液，37℃干燥2小时，加干燥剂封装于铝箔袋中，包被完毕。检测时在包被反应孔中先加入 50 ul pH7.0 0.01mol/L PB 0.1mol/L NaCl 的 PBS，然后加入 50ul 待检血清、阴性、阳性对照，37℃温育20分钟，用洗涤液洗板五次，拍干，用 pH7.0 PBS 1:500 稀释 0.5mg/ml HCVAg-trx, 100ul/孔加入反应板，37℃温育20分钟，洗板同前，拍干后加入 1：3000 用含 20%小牛血清 PBS 稀释的羊抗-trx-IgG-HRP，37℃温育20分钟，洗板同前，加入显色剂 A、B 液各1滴，37℃显色10分钟，显色剂 A 含 H_2O_2，显色剂 B 含 TMB，显色完成后，每孔加入1滴 2mol/L H_2SO_4 终止反应，用酶标仪在 450nm 波长读取结果，OD450nm≥2.1×阴性对照 OD 平均值者为阳性，OD450nm<2.1×阴性对照平均值为阴性。