

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104090101 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 08

(21) 申请号 201410346920. 9

(22) 申请日 2014. 07. 21

(71) 申请人 威海威高生物科技有限公司

地址 264209 山东省威海市世昌大道 312 号

(72) 发明人 姚继承 李晓燕 饶志明 闻雯

刘海光

(74) 专利代理机构 青岛高晓专利事务所 37104

代理人 宋文学

(51) Int. Cl.

G01N 33/571(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

人类免疫缺陷病毒检测试剂盒及其制备
方法

(57) 摘要

本发明属于免疫诊断技术领域，具体涉及一种微粒子化学发光法人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒及其制备方法。试剂盒由测 HIV 抗体磁微粒、测 HIV 抗体示踪结合物、阴性对照、I 型阳性对照、II 型阳性对照、分析缓冲液组成，本发明还公开了该检测试剂盒的制备方法，其采用的是微粒子化学发光免疫分析技术，比 ELISA 具有更高的灵敏度和特异性，适合于临床艾滋病毒的辅助诊断。

1. 一种人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒,其包括测 HIV 抗体磁微粒、测 HIV 抗体示踪结合物、阴性对照、I 型阳性对照、II 型阳性对照、分析缓冲液,其特征是 :所述测 HIV 抗体磁微粒为分别标记有 HIV 抗原 gp41 和 HIV 抗原 gp36 的磁性微粒子混合物 ;测 HIV 抗体示踪结合物为分别标记有 HIV 抗原 gp41 和 HIV 抗原 gp36 的异鲁米诺混合物 ;I 型阳性对照为含有 HIV-1 抗体的人血清 / 血浆 ;II 型阳性对照为含有 HIV-2 抗体的兔血清 / 血浆 ;分析缓冲液为含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

2. 一种制备权利要求 1 所述人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒的制备方法,其特征是具体步骤如下 :

(1) 制备测 HIV 抗体磁微粒 将带羧基磁微粒与 EDC 按质量比 1 : 2, 磁微粒与 HIV 抗原 gp41 的比例为每毫克磁微粒标记 20 μ g 的 HIV 抗原 gp41, 磁微粒与 HIV 抗原 gp36 的比例为每毫克磁微粒标记 25 μ g 的 HIV 抗原 gp36, 在 22~26℃ 条件下进行混匀标记, 标记时间 1 小时 ; 标记后采用甘氨酸封闭多余的位点, 使之浓度达到 25mM, 反应 0.5 小时, 洗涤三次, 加入磁微粒保存液, 所述磁微粒保存液为含 1% 牛血清白蛋白的 0.01M PBS 缓冲系统, 使之终浓度达到每 20 μ L 测 HIV 抗体磁微粒中分别含有 60 μ g 的磁微粒标记 HIV 抗原 gp41 和 50 μ g 的磁微粒标记 HIV 抗原 gp36, 2~8℃ 保存 ;

(2) 制备测 HIV 抗体示踪结合物 HIV 抗原 gp41、HIV 抗原 gp36 与异鲁米诺的标记, 反应体系为 : 戊二醛浓度为 1.0~2.0%, HIV 抗原 gp41 与异鲁米诺的质量比为 1 : 5, 在 22~26℃ 反应 1.5 小时, 用 pH7.2~7.4 的 0.01M PBS 进行透析, 透析后加入等体积甘油 -20℃ 存放 ; 戊二醛浓度为 1.0~2.0%, HIV 抗原 gp36 与异鲁米诺的质量比为 1 : 5, 在 22~26℃ 反应 1.5 小时, 用 pH7.2~7.4 的 0.01M PBS 进行透析, 透析后加入等体积甘油 -20℃ 存放 ; 将异鲁米诺标记 HIV 抗原用示踪结合物稀释液, 所述示踪结合物稀释液为含 20% 小牛血清的 0.01M PBS 缓冲系统, 分别按稀释比例为异鲁米诺标记 gp41 抗原 1 : 4000 稀释, 异鲁米诺标记 gp36 抗原 1 : 3000 稀释, 最终组成测 HIV 抗体示踪结合物 ;

(3) 制备阴、阳性对照 选用 5 份以上 HIV 抗体检测为阴性的人血清或血浆混合, 经 60℃、1 小时处理后, 除菌过滤, 于 2~8℃ 保存, 作为阴性对照 ; 选用 5 份以上 HIV-1 抗体检测为阳性的人血清或血浆混合, 经 60℃、1 小时处理后, 除菌过滤, 于 2~8℃ 保存, 作为 I 型阳性对照 ; 选用 HIV-2 抗体检测为阳性的兔血清或血浆稀释后, 经 60℃、1 小时处理后, 除菌过滤, 于 2~8℃ 保存, 作为 II 型阳性对照 ;

(4) 制备分析缓冲液 磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L, 按上述配方配制稀释液。

3. 根据权利要求 2 所述人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒的制备方法, 其特征在于 : 步骤(2) 中戊二醛使用浓度为 1.25%。

人类免疫缺陷病毒检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种免疫诊断技术,具体地说是一种磁微粒作为载体的人类免疫缺陷病毒检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 人类免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)是一种感染人类免疫系统细胞的慢病毒,属反转录病毒的一种。普遍认为,人类免疫缺陷病毒的感染导致艾滋病(AIDS, Acquired Immune Deficiency Syndrome, 后天免疫缺乏综合症,或译作“爱滋病”),艾滋病是后天性细胞免疫功能出现缺陷而导致严重随机感染及 / 或继发肿瘤并致命的一种疾病。艾滋病自 1981 年在美国被识别并发展为全球大流行,至 2003 年底,已累计导致两千余万人死亡。人类免疫缺陷病毒通常也俗称为“艾滋病病毒”或“艾滋病毒”。

[0003] HIV 病毒呈球形或卵圆形颗粒,直径 100–140nm,是带有包膜的 RNA 逆转录病毒,在分类上属于逆转录病毒科中的慢病毒亚科。HIV 病毒单拷贝基因组 RNA 长约 9.2–9.7Kb。目前发现有 HIV-1 和 HIV-2 两型,这两种类型在生物学特性上很相似,它们的基因组有 40%–50% 的同源性,其中两种病毒的核心蛋白具有高度的交叉反应。HIV 有三个主要的结构基因 :env、gag、pol,他们分别编码产生不同功能的蛋白质即抗原,抗原会引起机体免疫应答从而产生相应的抗体。

[0004] HIV 侵入机体后,一般在 6 周左右产生免疫应答,产生抗体。血清中首先出现 HIV 前体 p55 抗体和核心蛋白 p24;然后出现外膜蛋白 gp120 抗体,跨膜糖蛋白 gp41 抗体,其他的如 p66 和 p32 的抗体也陆续出现。经过几个月至几年后,当病毒再次出现在血液中,血清中的 p24、p55 抗体水平下降,而其他抗体持续存在或水平上升。通过检测这些不同抗体来诊断是否感染 HIV。在我国流行的主要昰 HIV-1 型。

[0005] 爱滋病毒是透过交换体液来传播的,特别是精液和血液。最常见的传染途径是:进行阴道或肛门性交,共用沾污了的针筒,受病毒感染的母亲传播给婴儿。另外,亦有越来越多的案显示,感染了病毒的母亲可经喂母乳而把病毒传给婴儿。

[0006] 如果不进行治疗,根据 HIV 不同亚型,感染艾滋病毒后的净存活时间平均为 9 至 11 年,而诊断为 AIDS 之后,如果在资源受限导致无法治疗的情况下,根据不同的研究表明,平均存活时间在 6 至 19 个月之间。而在医疗资源充足的地区,用高效抗逆转录药物(HAART)的作为有效治疗手段治疗 HIV 感染者和 AIDS 患者,可以让死亡率减少 80%,并能将新诊断出的 HIV 感染者的寿命延长最少 30 年。

[0007] 至今还没有研制成功可以预防艾滋的疫苗,防治艾滋只有早期进行诊断,才能在早期进行治疗并防治病情的进一步恶化,否则将会传染给他人和使自身病情加重、影响身体健康和传给后代。因此有必要开发出一种性能较好的诊断方法,能有效地在早期就将该疾病诊断出来,及时治疗,减少因艾滋带来的健康和财产的损失。

[0008] 人类免疫缺陷病毒抗体的传统检测方法包括酶联免疫法、胶体金法及化学发光检测试法,这些方法虽然具有很多优点,但在检测的灵敏度、特异性、稳定性等方面还有待进一

步提高。全自动微粒子化学发光免疫分析是在酶免疫分析基础上结合了高灵敏度的化学发光测定技术和磁性微粒分离技术,与其他方法相比,这种方法有许多独特的优点,首先它用顺磁性微粒作为固相载体,由于颗粒体积小,表面积大,扩大了反应面积,大大提高了检测灵敏度;其次由于使用全自动仪器及配套试剂,使人为因素减至最低,提高了方法的稳定性和结果的重复性,同时也使得批内差异与批间差异都较小。与放射免疫法相比,微粒子化学发光法除具有高灵敏度、高精确度、高可靠性等优点外,还具有如下优点:a. 无放射性污染,稳定性好;b. 特异性高;c. 试剂可随用随取,测定方便迅速,可作为急诊检测项目。根据大量的实验结果以及临床应用资料,从实用性、稳定性、准确性及其发展前景来看,该方法逐渐成为取代放射性免疫分析和酶免疫分析的首选。

发明内容

[0009] 本发明所要解决的技术问题是克服上述现有技术的不足,提供一种具有高灵敏度和特异性,适合于临床人类免疫缺陷病毒的辅助诊断的微粒子化学发光法HIV抗体检测试剂盒及其制备方法。

[0010] 本发明解决上述技术问题采用的技术方案是:一种人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒,其包括测HIV抗体磁微粒、测HIV抗体示踪结合物、阴性对照、I型阳性对照、II型阳性对照、分析缓冲液,所述测HIV抗体磁微粒为标记有HIV抗原(gp41、gp36)的磁性微粒子;测HIV抗体示踪结合物为标记有HIV抗原(gp41、gp36)的异鲁米诺;I型阳性对照为含有HIV-1抗体的人血清/血浆;II型阳性对照为含有HIV-2抗体的兔血清/血浆;分析缓冲液为含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0011] 本发明还提供了上述人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒的制备方法,其特征是:具体步骤如下:

(1) 制备测HIV抗体磁微粒 将带羧基磁微粒与EDC按质量比1:2,磁微粒与gp41的比例为每毫克磁微粒标记20 μ g的gp41,磁微粒与gp36的比例为每毫克磁微粒标记25 μ g的gp36,在22~26℃条件下进行混匀标记,标记时间1小时;标记后采用甘氨酸封闭多余的位点,使之浓度达到25mM,反应0.5小时,洗涤三次,加入磁微粒保存液(含1%牛血清白蛋白的0.01M PBS缓冲系统),使之终浓度达到每20 μ L测HIV抗体磁微粒中分别含有60 μ g的磁微粒标记gp41抗原和50 μ g的磁微粒标记gp36抗原,2~8℃保存。

[0012] (2) 制备测HIV抗体示踪结合物 HIV抗原(gp41、gp36)与异鲁米诺的标记,反应体系为:戊二醛使用浓度为1.0%-2.0%,其最佳使用浓度为1.25%,gp41与异鲁米诺的质量比为1:5,在22~26℃反应1.5小时,用pH7.2~7.4的0.01M PBS进行透析,透析后加入等体积甘油-20℃存放;戊二醛使用浓度为1.0%-2.0%,其最佳使用浓度为1.25%,gp36与异鲁米诺的质量比为1:5,在22~26℃反应1.5小时,用pH7.2~7.4的0.01M PBS进行透析,透析后加入等体积甘油-20℃存放;将异鲁米诺标记HIV抗原用示踪结合物稀释液(含20%小牛血清的0.01M PBS缓冲系统)分别按稀释比例为异鲁米诺标记gp41抗原1:4000稀释,异鲁米诺标记gp36抗原1:3000稀释,最终组成测HIV抗体示踪结合物。

[0013] (3) 制备阴、阳性对照 选用5份以上HIV抗体检测试剂盒为阴性的人血清或血浆混合,经60℃、1小时处理后,除菌过滤,于2~8℃保存,作为阴性对照;选用5份以上HIV-1抗体检测试剂盒为阳性的人血清或血浆混合,经60℃、1小时处理后,除菌过滤,于2~8℃保存,作

为 I 型阳性对照 ;选用 HIV-2 抗体检测为阳性的兔血清或血浆稀释后,经 60℃、1 小时处理后,除菌过滤,于 2 ~ 8℃保存,作为 II 型阳性对照。

[0014] (4) 制备分析缓冲液 磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液。

[0015] 本发明的原理是利用微粒子化学发光免疫分析技术,采用双抗原夹心法,在磁微粒固相标记上 HIV 抗原(gp41、gp36),加入待测样本,反应形成磁微粒标记抗原 - 抗体结合物,温育后加入异鲁米诺标记的 HIV 抗原,反应后形成磁微粒标记抗原 - 抗体 - 异鲁米诺标记抗原复合物,建立免疫反应与化学发光的联系。加入激发液催化标记抗原的异鲁米诺发出 425nm 的光,样本中 HIV 抗体的含量与发光值(RLU)呈正相关,根据 S/C0 值对样本检测结果进行判断。

[0016] 本发明试剂盒的优点是采用了微粒子化学发光免疫分析技术,比 ELISA 具有更高的灵敏度和更好的特异性。

具体实施方式

[0017] 本发明试剂盒采用微粒子化学发光免疫分析技术,检测血清或血浆中是否存在 HIV 抗体。下面具体描述 HIV 抗体检测试剂盒及其制备方法。

[0018] 一种人类免疫缺陷病毒抗体检测试剂盒,其包括测 HIV 抗体磁微粒、测 HIV 抗体示踪结合物、阴性对照、I 型阳性对照、II 型阳性对照、分析缓冲液。所述测 HIV 抗体磁微粒为标记有 HIV 抗原(gp41、gp36)的磁性微粒子;测 HIV 抗体示踪结合物为标记有 HIV 抗原(gp41、gp36)的异鲁米诺;I 型阳性对照为含有 HIV-1 抗体的人血清 / 血浆;II 型阳性对照为含有 HIV-2 抗体的兔血清 / 血浆;分析缓冲液为含牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液。

[0019] 本发明上述 HIV 抗体检测试剂盒的制备方法,其具体步骤如下:

(1) 制备测 HIV 抗体磁微粒 将带羧基磁微粒与 EDC 按质量比 1 : 2,磁微粒与 gp41 的比例为每毫克磁微粒标记 20μg 的 gp41,磁微粒与 gp36 的比例为每毫克磁微粒标记 25μg 的 gp36,在 22~26℃ 条件下进行混匀标记,标记时间 1 小时;标记后采用甘氨酸封闭多余的位点,使之浓度达到 25mM,反应 0.5 小时,洗涤三次,加入磁微粒保存液(含 1% 牛血清白蛋白的 0.01M PBS 缓冲系统),使之终浓度达到每 20 μL 测 HIV 抗体磁微粒中分别含有 60μg 的磁微粒标记 gp41 抗原和 50μg 的磁微粒标记 gp36 抗原,2~8℃ 保存。

[0020] (2) 制备测 HIV 抗体示踪结合物 HIV 抗原(gp41、gp36)与异鲁米诺的标记,反应体系为:戊二醛使用浓度为 1.0%-2.0%,其最佳使用浓度为 1.25%,gp41 与异鲁米诺的质量比为 1 : 5,在 22~26℃ 反应 1.5 小时,用 pH7.2~7.4 的 0.01M PBS 进行透析,透析后加入等体积甘油 -20℃ 存放;戊二醛使用浓度为 1.0%-2.0%,其最佳使用浓度为 1.25%,gp36 与异鲁米诺的质量比为 1 : 5,在 22~26℃ 反应 1.5 小时,用 pH7.2~7.4 的 0.01M PBS 进行透析,透析后加入等体积甘油 -20℃ 存放;将异鲁米诺标记 HIV 抗原用示踪结合物稀释液(含 20% 小牛血清的 0.01M PBS 缓冲系统)分别按稀释比例为异鲁米诺标记 gp41 抗原 1 : 4000 稀释,异鲁米诺标记 gp36 抗原 1 : 3000 稀释,最终组成测 HIV 抗体示踪结合物。

[0021] (3) 制备阴、阳性对照 选用 5 份以上 HIV 抗体检测为阴性的人血清或血浆混合,经 60℃、1 小时处理后,除菌过滤,于 2 ~ 8℃ 保存,作为阴性对照;选用 5 份以上 HIV-1 抗体检测为阳性的人血清或血浆混合,经 60℃、1 小时处理后,除菌过滤,于 2 ~ 8℃ 保存,作

为 I 型阳性对照 ;选用 HIV-2 抗体检测为阳性的兔血清或血浆稀释后,经 60℃、1 小时处理后,除菌过滤,于 2 ~ 8℃保存,作为 II 型阳性对照。

[0022] (4) 制备分析缓冲液 磷酸二氢钠 0.39g/L、磷酸氢二钠 2.68g/L、氯化钠 8.50g/L、牛血清白蛋白 10g/L、硫柳汞 1.0g/L,按上述配方配制稀释液。

[0023] 本发明上述各种原材料的选择要求如下 :

1、标记用 HIV 抗原的选择 首先就抗原的外观、浓度、纯度和效价进行研究,抗原应为澄清透明的液体,不含异物,无摇不散的沉淀;用紫外吸收法检测其蛋白含量应不低于 1mg/mL;SDS-PAGE 检测纯度应主带清晰,无明显杂带;效价应不低于标示效价且不低于 1 : 10000,研究结果表明 HIV 抗原完全可用于本发明试剂盒的制备。

[0024] 2、磁微粒的选择 通过对磁微粒的外观,标记蛋白的比率,磁响应性,磁微粒吸附一致性等方面进行分析,经过多次分析研究,将磁微粒混匀,在灯光下观察,易分散,无聚集,无异物;将蛋白采用不同的方法进行标记,标记率应大于 90%;将磁微粒置 370~380 特斯拉的磁铁上,观察磁微粒的聚集速度,分散均匀的磁微粒在 10 秒钟内完全聚集;磁微粒吸附一致性 CV ≤ 10%。研究结果表明直径为 0.90~1.10 μm 的磁微粒,含有羧基基团,标记率最高,可用于本发明诊断试剂盒的制备。

[0025] 3、异鲁米诺的选择 将异鲁米诺用 DMSO(二甲基亚砜)进行溶解,用纯化水进行稀释至 1.2×10^{-5} M 的量,加入 10 μL 异鲁米诺液体,各加入 200 μL 激发液,测定其发光值,发光值应 ≥ 160000,经过研究,符合要求的异鲁米诺可作为发光的原料。

[0026] 本发明 HIV 抗体检测试剂盒检测样品中 HIV 抗体的检测方法是:首先取出浓缩洗液,用纯化水按照倍数进行稀释。而后取出激发 A 液和 B 液,放置全自动化学发光测定仪合适的位置。激发 A 液为含有 4%NaOH 的缓冲液,激发 B 液为含有 0.12%H₂O₂ 的缓冲液。接着将试剂盒从冰箱中取出后,放于仪器试剂区至少混匀 30 分钟后方可使用,并严格按照设定的程序进行加样和温育。

[0027] 具体加样方法如下:50 μL 血清 / 血浆样本、100 μL 分析缓冲液以及 20 μL 测 HIV 抗体磁微粒在 37℃ 的条件下反应 20 分钟,加入 150 μL 测 HIV 抗体示踪结合物,37℃ 反应 20 分钟,再用稀释后的洗液洗涤 3 次,最终分别加入 200 μL 激发 A 液和激发 B 液,测定发光值,根据 S/CO 值对样本检测结果进行判断。

[0028] 本发明质量控制要求是:试剂盒中的阴、阳性对照用于试验过程控制。阴性对照检测结果(S/CO)不得高于 0.8,阳性对照检测结果(S/CO)不得低于 10。

[0029] 本发明试剂盒检测 HIV 抗体国家参考品,检测的结果显示:该试剂盒的阴、阳性参考品符合率、最低检出限、精密度、稳定性等各项质量指标均符合国家要求。阴性符合率:20 份阴性参考品符合率 20/20;阳性符合率:20 份阳性参考品符合率 20/20,且 P12 > P11;最低检出限检测:S1、S2 均为阴性, S3、S4、S5 和 S6 均为阳性;精密度:10 孔检测变异系数(CV) ≤ 15%;稳定性:试剂各组分于 37℃ 放置 6 天,检定结果达到标准。

[0030] 本发明试剂盒由河南中医学院第二附属医院、河南中医学院第三附属医院、中国人民解放军第一五三中心医院、中国人民解放军艾滋病检测确认实验室、北京市疾病预防控制中心五家临床检测机构进行临床考核,结果:

(1)河南中医学院第二附属医院考核 307 例阴性样本和 3 例阳性样本,本发明试剂盒阴性样本 307 例全部检出,阳性样本 3 例全部检出。该试剂盒阴性检出率为 100%,阳性检出率

为 100%。

[0031] (2)河南中医学院第三附属医院考核 312 例阴性样本和 3 例阳性样本,本发明试剂盒阴性样本 312 例全部检出,阳性样本 3 例全部检出。该试剂盒阴性检出率为 100%,阳性检出率为 100%。

[0032] (3)中国人民解放军第一五三中心医院考核 315 例阴性样本和 2 例阳性样本,本发明试剂盒阴性样本 315 例全部检出,阳性样本 2 例全部检出。该试剂盒阴性检出率为 100%,阳性检出率为 100%。

[0033] (4)中国人民解放军艾滋病检测确认实验室考核 89 例阴性样本和 355 例阳性样本,本发明试剂盒阴性样本 89 例全部检出,阳性样本 355 例全部检出。该试剂盒阴性检出率为 100%,阳性检出率为 100%。

[0034] (5)北京市疾病预防控制中心考核 32 例阴性样本和 64 例阳性样本,本发明试剂盒阴性样本 32 例全部检出,阳性样本 64 例全部检出。该试剂盒阴性检出率为 100%,阳性检出率为 100%。

[0035] 该检测试剂盒总的灵敏度为 100%,特异性为 100%。

[0036] 人类免疫缺陷病毒检测试剂盒(微粒子化学发光法)灵敏度为 100%,特异性为 100%,适合于临床艾滋病毒的辅助诊断。