[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/576 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03127756.X

[45] 授权公告日 2006 年 11 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1287154C

[22] 申请日 1998.8.4 [21] 申请号 03127756.X
分案原申请号 98801322.3
[30] 优先权
[32] 1997. 8. 4 [33] JP [31] 209515/97
[32] 1997. 8. 4 [33] JP [31] 209522/97
[32] 1998. 7.31 [33] JP [31] 218136/98
[71] 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 大植千春 饭田久美子
村木达治 八木慎太郎
审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 程 泳

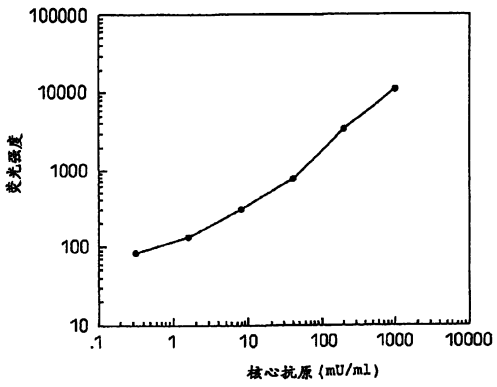
权利要求书 1 页 说明书 48 页 附图 17 页

[54] 发明名称

用于检测或者测定病毒的方法

[57] 摘要

一种用于处理含病毒样品的方法，其特征在于以处理溶液处理含病毒样品，该处理溶液包含(1)阴离子型表面活性剂和(2)两性表面活性剂、非离子型表面活性剂或者蛋白质变性剂；一种利用所说处理方法的病毒测定方法；一种用于处理含病毒样品的方法，其特征在于用处理溶液处理溶液含病毒样品，该处理溶液包含(1)离液序列高的离子和(2)酸化剂；一种利用所说处理方法的病毒测定方法；一种病毒测定方法，其特征在于：在具有十个或更多个碳原子的烷基以及仲铵，叔胺或季胺的表面活性剂或者非离子型表面活性剂或者两者均存在时，基于它们各自与其探针的结合，测定病毒抗原和病毒抗体；用于实施上述方法的一种单克隆抗体和一种产生该抗体的杂交瘤。



1. 一种检测或测量样品中丙型肝炎病毒的方法，其特征在于，在可暴露丙型肝炎病毒核心区所述氨基酸序列部分的至少一种表面活性剂或表面活性剂与蛋白质变性剂的组合的存在下，使用可结合丙型肝炎病毒核心区第 100 至第 120 位氨基酸的氨基酸序列或者丙型肝炎病毒核心区第 111 至 130 位氨基酸的氨基酸序列的抗体，

其中表面活性剂选自：

1）a)阴离子表面活性剂，和 b)两性表面活性剂，或非离子表面活性剂的组合；

2）具有至少 10 个碳原子的烷基和仲、叔或季铵基的表面活性剂；和

3）具有亲水/亲酯平衡值 12－14 的非离子表面活性剂。

2. 一种用于权利要求 1 的方法的试剂盒，含有 I）可结合丙型肝炎病毒核心区第 100 至第 120 位氨基酸的氨基酸序列或者丙型肝炎病毒核心区第 111 至 130 位氨基酸的氨基酸序列的抗体，和 II）至少一种表面活性剂或表面活性剂与蛋白质变性剂的组合，其可暴露丙型肝炎病毒核心区所述氨基酸序列部分，其中表面活性剂选自：

1）a)阴离子表面活性剂，和 b)两性表面活性剂，或非离子表面活性剂的组合；

2）具有至少 10 个碳原子的烷基和仲、叔或季铵基的表面活性剂；和

3）具有亲水/亲酯平衡值 12－14 的非离子表面活性剂。

3. 一种检测或测量样品中丙型肝炎病毒的方法，其特征在于在可暴露丙型肝炎病毒核心区所述氨基酸序列部分的离液序列高的离子和酸化剂存在下，使用可结合丙型肝炎病毒核心区第 100 至第 120 位氨基酸的氨基酸序列或者丙型肝炎病毒核心区第 111 至 130 位氨基酸的氨基酸序列的抗体。

4. 一种用于权利要求 1 的方法的试剂盒，含有 1）可结合丙型肝炎病毒核心区第 100 至第 120 位氨基酸的氨基酸序列或者丙型肝炎病毒核心区第 111 至 130 位氨基酸的氨基酸序列的抗体，和 2）可暴露丙型肝炎病毒核心区所述氨基酸序列部分的离液序列高的离子和酸化剂。

用于检测或者测定病毒的方法

发明所属技术领域

本发明涉及检测或者测定病毒的方法及所用的试剂。

背景技术

当前，已经利用各种病毒检测方法来检测传染性病毒在血液或者血制品中的存在，并用来确定病毒在患病患者中的存在。然而，尽管敏感性和特异性随所要检测的病毒类型而变化，但这些方法并非总是高度敏感或者特异性的。即使当它们具有足够的敏感性和特异性时，它们也经常是昂贵的，并且如在病毒的培养与分离中需要冗长的过程。作为本发明的背景，C型肝炎(丙型肝炎)将在下面得到详尽的陈述。

丙型肝炎病毒的病原体长期是未知的，但是，当病毒基因得到克隆(科学，244：359-362，1989)，以及经由利用基于所说的基因产生的重组抗原的抗体测定的诊断方法得到发展(科学，244：362-364，1989；日本专利出版物(Kohyo)，2(1990)-500880)时，人们发现丙型肝炎是病原体为丙型肝炎病毒(HCV)的传染病，该病毒通过血液和血制品作为其主要传染途径传播。随着所谓的第二代抗体检验方法(其中的重组核心抗原和重组NS3 抗原已得到增加)的产生，现在已有可能通过检验他们的血清来事实上确定所有HCV的患者。这已使得在日本根除几乎所有通过献血传播的HCV感染成为可能。

然而，至于其它普通的病毒感染，如通过人免疫缺损病毒(HIV)的病毒感染，在感染之后有一定的时间长度直到抗体出现，或者所谓的窗口时期，其中病毒不可由现有的检验方法所检测。这意味着，在卖血是合法的区域或者在日本的一些地区，第二次感染的风险仍然存在，因为血液传播的组分不能为抗体检验方法所确定。抗体检验方法也有弊端，即它不能区别已从感染恢复的人和处于感染活动阶段的人，这是由于其检

验原理所致。

当前，干扰素(IFN)用于丙型肝炎的治疗。然而，一些研究者强调，通过仅仅测量 HCV 的抗体滴度就可以评价治疗效果，因为在 HCV 为 IFN 消除之后第 6 个月滴度降低。然而，由于仅仅在抗原刺激降低之后或者在抗原消除之后的几个月，抗体滴度才开始降低，因此不可能在所需的时间与以所需的准确度，单独地由抗体检验方法确定 IFN 的施用是否导致 HCV 的消除。因此，微为了监测治疗，除检测 HCV 抗体外还需要检测 HCV 本身。

困难的是建立直接检测 HCV 病毒微粒(病毒抗原)的方法，因为与其它病毒如肝炎 B 病毒(HBV)相比，该病毒的血液水平非常低，还因为该病毒不能体外传播或者利用动物等作为宿主。因此，代之以检测病毒抗原，检测病毒基因组 RNA 的方法得到发展，如聚合酶链式反应(PCR)方法(科学，230：1350-1354，1985)以及支链 DNA 探针方法。但是，与检测病毒抗原的方法相比，检测病毒基因组的方法存在几个问题。

首先，有人已指出，由于所要检测的物质是在存储期间极不稳定的 RNA，血清的冻结和解冻过程可以造成测量值的降低。因此，所要检验的血清样品必须比当它们用于其它测定方法时更小心地得到存储。在样品的运输过程中也必须给以最大限度的小心。

虽然包含利用 PCR 方法的检验方法对检测基因片段是最敏感的，但是它们存在一定的问题，即：从基因组 RNA 到模板 DNA 的逆转录经常伴随着损失，因此这要求好的技巧以便获得精确的定量值，并且：由于扩增是该方法的重要原理，在污染的情况下可能产生高发生率的假阳性，因此同时进行大量样品的处理是不可能的。再者，即使这些方法(假定其为简单方法)利用 2 个或 2 个多小时来预处理样品，但是将由于需要离心等等的重复过程而变得复杂化。此外，如此复杂的过程污染的可能性增加，并由此获得假阳性的结果。另一方面，支链 DNA 探针方法在检测敏感性方面是低的，此外在获得检验结果之前要花费大约 20 小时(Igaku to Yakugaku［医学和药学］31：961-970，1994)，因而该方法在敏感性和处理时间方面有待作许多所需的改进。

为了解决上述与病毒基因组检测方法有关的问题，人们发展了包括直接检测病毒抗原在内的方法。正如日本未审专利出版物(Kokai)第 8 号(1996)-29427 所显示的，人们发展了这样一种方法，即利用核心抗原特异性的单克隆抗体检测血清中的 HCV 的核心抗原。正如有关文献(Tanaka 等，肝脏病学杂志 23：742-745，1995；Fujino 等，Igaku to Yakugaku [医学和药学] 36：1065-1070，1996)所报道的，检测血清中的核心抗原的方法如同上述的检测病毒基因组的方法一样，已经显示出有临床用途。然而，如同检测病毒基因组的方法一样，检测血清中的核心抗原的方法仍然存在几个需要解决的主要问题。

这样的问题之一即，与 PCR 方法相比，检测病毒基因组的方法的敏感性低，以致它不能用作为血清筛选的最后检验方法。Tanaka 等(Journal of Hepatology，23：742-745，1995)指出其检测限制为 10^4-10^5 拷贝/ml 的 HCV RNA。Fujino 等(Igaku to Yakugaku [医学和药学] 36：1065-1070，1996)报道，对 102 例已由最敏感的 CRT(竞争性逆转录)-PCR 检测方法检测出为 RNA 阳性的、接受慢性丙型肝炎治疗之前的患者血清的检测显示，该方法的阳性率为 67%。也就是说，就敏感性来说，该方法远落后于最敏感的 CRT-PCR 方法。

其次，当该方法用于筛选时，处理测量样品的复杂过程以及所需的长时间使问题出现。因此，该方法需要多步样品(血清)处理过程，这些过程包括：浓缩病毒微粒和除去血清组分的聚乙烯乙二醇处理(4℃，1 小时)；离心(15 分钟)；除去上清液；尿素处理；碱处理(37℃，30 分钟)；加入中和剂等等。此外，利用尿素的分散方法，由于 PEG 处理而使粘度有所增加的沉淀要求极大的技巧。因此，为了获得再现性结果，要求极大的技巧，此外，最小为 2 小时的处理是必需的。此外，诸如离心、上清液除去等方法不适于自动化处理，并且很难同时进行大量样品的处理。因此，从处理的难易性方面来看，该方法也不适于需要处理大量样品的应用(如在筛选检验中)。

另一方面，在下列几点上，病毒抗原检测系统优于高度敏感的 PCR 方法。由此，它极为耐受污染，因为它在检测步骤中不包括任何额外扩

增过程。此外，因为意在检测相对稳定的抗原蛋白质而不是很不稳定的RNA，所以样品存储过程中不需要给以任何额外关照，它不需要诸如 PCR 检测样品所需的深度冷藏箱之类的特殊设备，并且样品的运输也更容易。

这些特性使该方法适于应用于其中需要进行大量样品测定的检测中，如在血液工业或者健康检查检验中。然而，正如以上所指出的，由于检测核心抗原的公开方法不适于自动化，并且其敏感性低，以致它不能在要求高敏感性的应用(如在血液工业中)中作为金标准(gold standard)，因此，它不能运用于处理大量样品(如筛选)的检验，并且不能最好地利用其优于 PCR 方法的有利特性。此外，临床上有用的测定方法常常必须面对敏感性、特异性、再现性、易于处理以及低成本的挑战，并且需要不断努力以尽可能地满足这些挑战。就不同于 HCV 的病毒抗原的检测而论，尤其是用于处理大量样品的筛选中的病毒抗原检测，有许多由于它们的低敏感性(与 PCR 方法相比)或者所需抗原未能充分暴露而未投入实际应用的方法。

发明的说明

本发明的目的是提供用于检测各种病毒抗原的方法，包括用于检测 HCV 抗原的方法，该方法适于处理大量样品，如在血液工业与健康检查中的筛选。换句话说，本发明的目的是提供用于检测各种病毒抗原的检测系统，包括与那些 PCR 方法具有同等敏感性和特异性的 HCV 抗原检测方法，该系统允许进行简单的预处理，或者无需预处理就可以容易地自动化。下文将主要参照 HCV 来说明本发明的优选实施方案。

按照本发明的第一实施方案(1)，本发明提供了检测或者测定 HCV 的方法，该方法包含：破坏病毒微粒，充分暴露病毒抗原，破坏抗病毒抗原的抗体(如果存在的话)，以及检测或者测定病毒抗原。

因此，本发明提供了(I)用于处理包含病毒的样品的方法，其特征在于用包含下列组分的处理溶液处理包含病毒的样品：(1)阴离子型表面活性剂和(2)兼性表面活性剂、非离子型表面活性剂或者蛋白质变性剂。

本发明也提供了(II)用于处理包含病毒的样品的方法，其特征在于

用包含下列组分的处理溶液处理包含病毒的样品：(1)阴离子型表面活性剂，(2)兼性表面活性剂，和(3)非离子型表面活性剂或者蛋白质变性剂。

本发明也提供了(III)用于处理包含病毒的样品的方法，其特征在于用包含下列组分的处理溶液处理包含病毒的样品：(1)阴离子型表面活性剂，(2)兼性表面活性剂，(3)非离子型表面活性剂，和(4)蛋白质变性剂。

本发明也提供了(IV)用于检测或者定量病毒抗原的存在的病毒测定方法，其特征在于：利用按照(I)至(III)之任一的方法处理的样品，以及使样品与特异性识别病毒抗原的探针反应。

本发明也提供了用于确定病毒在样品中存在或者不存在的试剂盒、测定试剂盒或者诊断试剂，其用于上述(IV)的免疫测定方法，并包含阴离子型表面活性剂。

本发明也提供了用于确定病毒在样品中的存在或者不存在的试剂盒、测定试剂盒或者诊断试剂，其用于上述(IV)的免疫测定方法，并包含下文描述的单克隆抗体。

按照本发明的第一实施方案(2)，本发明提供了检测或者测定病毒的方法，该方法包含：破坏病毒微粒，充分暴露病毒抗原，破坏抗病毒抗原的抗体(如果存在的话)，以及检测或者测定病毒抗原。

因此，本发明提供了(V)用于处理包含病毒的样品的方法，其特征在于用包含下列组分的处理溶液处理包含病毒的样品：(1)离液序列高的离子和(2)酸化剂。

本发明还提供了(VI)用于处理包含病毒的样品的方法，其特征在于用包含下列组分的处理溶液处理包含病毒的样品：(1)离液序列高的离子，(2)酸化剂和(3)非离子型表面活性剂。

本发明还提供了(VII)用于检测或者定量病毒抗原的存在的病毒测定方法，其特征在于利用按照上述(V)和(VI)处理方法，并使样品与特异性地识别病毒抗原的探针反应。

本发明还提供了用于测定病毒在样品中的存在或者不存在的试剂盒、测定试剂盒或者诊断试剂，其用于上述(VII)方法中并包含离液序列高的试剂。

本发明还提供了用于测定 HCV 在样品中的存在或者不存在的试剂盒、测定试剂盒或者诊断试剂，其用于上述(VII)方法中，并包含由杂交瘤 HC11-14(FERM BP-6006)、HC11-10(FERM BP-6004)或 HC11-11(FERM-BP-6005)产生的单克隆抗体。

按照本发明的第二实施方案，本发明提供了在窗口期间(其中抗上述病毒的抗体还没有产生)检测或者测定病毒抗原的方法。在这一方法中，暴露病毒抗原的病毒微粒的破坏是足够的，并且不需要破坏抗血液中的病毒抗原的抗体。

因此，本发明提供了病毒测定方法，其特征在于：在具有 10 个或多个碳原子的烷基以及仲铵、叔铵或季铵的表面活性剂或者具有 12-14 的亲水/亲脂平衡值(HLB)的非离子型表面活性剂存在或者二者都存在的条件下，基于它与探针的结合来测量病毒抗原。

本发明还提供了杂交瘤细胞系，该细胞系选自由 HC11-11(FERM-BP-6005)、HC11-14(FERM BP-6006)、HC11-10(FERM BP-6004)、HC11-3(FERM-BP-6002)以及 HC11-7(FERM-BP-6003) 组成的组中。

本发明也提供了由杂交瘤细胞系产生的单克隆抗体，该细胞系选自由 HC11-11(FERM BP-6005)、HC11-14(FERM BP-6006)、HC11-10(FERM BP-6004)、HC11-3(FERM BP-6002)以及 HC11-7(FERM BP-6003)组成的组中。

此外，作为 RNA 病毒的 HCV 以及作为 DNA 病毒的 HBV，都是形成病毒颗粒的病毒，所说颗粒具有包含被囊化基因组 RNA 或 DNA 的结构蛋白和围绕它的膜蛋白或脂质膜的结构。在任何实施方案中，通过利用本发明的处理方法，本发明提供了病毒的检测或者测定方法，该方法的特点是：不仅破坏 HCV 或 HBV 的病毒微粒，而且也破坏具有类似结构的病毒的病毒微粒，充分暴露病毒抗原，以及检测或者测定所说的抗原。

附图简要描述

图 1 显示的是所加入的 SDS 的浓度对样品处理的影响图。使用了得自正常健康人受试者(正常)的血清和 HCV-RNA-阳性组血清 13 以及 50。

图 2 显示的是所加入的 CHAMPS 的浓度对样品处理的影响图。使用了得自正常健康人受试者(正常)的血清和 HCV-RNA-阳性组血清 13 以及 50。

图 3 显示的是所加入的尿素的浓度对样品处理的影响图。使用了得自正常健康人受试者(正常)的血清和 HCV-RNA-阳性组血清 13、44 以及 50。

图 4 显示的是所加入的 Triton X100 的温度对样品处理的影响图。使用了得自正常健康人受试者(正常)的血清和 HCV-RNA-阳性组血清 13、44 以及 50。

图 5 是显示样品处理期间的温度的作用图。使用了得自正常健康人受试者(正常)的血清和 HCV-RNA-阳性组血清 13、44 以及 50。

图 6 是显示夹心免疫测定系统的稀释标准曲线和检测限的图，其中对标准组血清 50(定义为 1U/ml)进行系列稀释，并对其实施样品处理方法，然后利用本发明的单克隆抗体测量之。

图 7 是显示夹心免疫测定系统的标准曲线和检测限的图，其中对标准组血清 50(定义为 1U/ml)进行系列稀释，并对其实施样品处理方法，然后测量之。

图 8 显示所获得组分中的核心抗原的免疫活性，该组分由血清组 13 的凝胶过滤柱分级分离获得，其中该血清组已为样品处理方法处理过。IgG 和白蛋白的分子量分别为大约 150 kD 和大约 68 kD。

图 9 是显示所释放的核心抗原的活性与利用 PCR-阳性样品的 Amplicore HCV 监测器(PCR 方法)测定的 HCV-RNA 数量之间的相互关系的图，其中该样品已用本发明的样品处理方法处理过。

图 10 是显示所加入的氯化胍的浓度对样品处理的影响图。使用了得自正常健康人受试者的血清(正常)和 HCV-RNA-阳性组血清 13 和 50。

图 11 是显示所加入的 Triton X100 的浓度对样品处理的影响图。使用了得自正常健康人受试者的血清(正常)和 HCV-RNA-阳性组血清 13 和 50。

图 12 是显示所加入的 Tween 20 的浓度对样品处理的影响图。使用了得自正常健康人受试者的血清(正常)和 HCV-RNA-阳性组血清 13 和 50。

图 13 是显示样品处理期间的温度的影响的图。使用了得自正常健康人受试者的血清(正常)和 HCV-RNA-阳性组血清 13 和 50。

图 14 是显示夹心免疫测定系统标准曲线和的检测限的图，其中对标准组血清 50(定义为 1U/ml)进行系列稀释，并对其实施样品处理方法，然后测量之。

图 15 显示所获得组分中的核心抗原的免疫活性，该组分由利用血清组 13 的凝胶过滤柱分级分离获得，其中该血清已为样品处理方法处理过。IgG 和白蛋白的分子量分别为大约 150 kD 和大约 68 kD。

图 16 是显示所释放的核心抗原的活性与利用 PCR-阳性样品的 Amplicore HCV 监测器(PCR 方法)测定的 HCV-RNA 数量之间的相互关系的图，其中该样品已用本发明的样品处理方法处理过，并已为 Amplicore HCV 监测器(PCR 方法)检验为阳性。

图 17 显示按照本发明通过测定重组乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原而获得的标准曲线。

优选实施方案的详尽描述

本发明的目标病毒是形成病毒微粒的病毒，所说的颗粒具有包含被囊化基因组 RNA 或 DNA 的结构蛋白和围绕它的膜蛋白或脂质膜的结构。

具有基因组 RNA 的上述病毒的代表性例子包括丙型肝炎病毒(HCV)和与 HCV 有关的病毒。

与 HCV 有关的病毒包括丁型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、G 型肝炎病毒、手-足-口病病毒、黄病病毒(黄热病病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、登革热病毒)、披膜病毒(α-病毒、风疹病毒属病毒、动脉炎病毒、风疹病毒)、瘟病毒属(猪霍乱病毒、牛腹泻病毒)、副粘病病毒(副流感病毒 1、2、3、4，犬温病病毒，新城病病毒，RS 病毒，牛瘟病毒，猿副流感病毒，麻疹病毒，流行性腮腺炎病毒)、正粘病毒(人流感病毒、鸟流感病毒、马流感病毒、猪流感病毒)、弹状病毒(狂犬病病毒、水泡性口炎病毒)、小 RNA 病毒(脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、欧可病毒、牛肠道病毒、猪肠道病毒、猿肠道病毒、小鼠脑炎病毒、人鼻病毒、牛鼻病毒、马鼻病

毒、足及口病病毒、甲型肝炎病毒)、冠状病毒(人冠状病毒、鸟传染性支气管炎病毒、小鼠肝炎病毒、猪可传递胃肠炎病毒)、沙粒病毒(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、拉萨病毒、朝鲜出血热病毒)、逆转录病毒(HTLV: 成年人白血病病毒, HIV: 获得性免疫缺损综合症病毒、猫白血病肉瘤病毒、牛白血病病毒、鲁斯氏肉瘤病毒)、呼肠病毒(轮状病毒)、杯状病毒(诺沃克病毒)、布尼病毒(肾部综合征出血热病毒)、叶病毒(埃博拉病毒)、马堡病毒等等。

上述具有基因组 DNA 的病毒的代表性例子包括乙型肝炎病毒 HBV 和与 HBV 有关的病毒。与 HBV 有关的病毒包括痘病毒(痘苗病毒、类天花病毒、牛痘病毒、天花病毒)、小 DNA 病毒(人小 DNA 病毒、猪小 DNA 病毒、牛小 DNA 病毒、狗小 DNA 病毒、猫白细胞减少症病毒、阿留中貂病病毒)、乳多空病毒(乳头瘤病毒、多瘤病毒)、腺病毒、疱疹病毒(单纯性疱疹病毒、巨细胞病毒、水痘性带状疱疹病毒、EB 病毒、马疱疹病毒、猫疱疹病毒、马莱克氏病病毒)、非洲猪霍乱病毒等等。

除上述病毒外, 还有许多已知的致病病毒和许多现存的未知病毒。很明显, 如果这样的病毒具有上述结构, 即被囊化基因组 RNA 或 DNA 的包含结构蛋白和围绕它的膜蛋白或者脂质膜, 那么可以利用本发明的样品处理方法以适于免疫测定的形式将它们释放出来。

下面参照 HCV, 说明用于实现本发明的实施方案。由于 HCV 的血液水平为 10^2-10^6 拷贝/ml, 该水平低于 HBV 的血液水平(10^9 拷贝/ml), 因此要求检测病毒抗原的测定法具有很高的敏感性。

一般地, 在由利用抗体作为探针的免疫学方法代表的检测方法中, 提高检测敏感性的可能方法包括: I)增加所要检测的抗原分子的数量, II)增加与抗原结合的探针(如抗体)的分子数量, III)减少限制检测敏感性的非特异性反应, 该敏感性限制由探针(如抗体)与不同于抗原的其它物质的结合所致, 以及 IV)增加用于检测的标记的检测限, 并且这些方法的适当结合将能够使敏感性增加。

作为增加抗原分子数量的方法之一, I-1)样品量的增加是最容易构想的。但是, 由于所加入的、用于反应系统中的最大总量(如 96-孔免疫

平板)不能超过大约 300μl，I-1)，因此增加所要加入至反应系统中的分子数量的浓缩方法得到应用。

为了增加探针的数量，例如与抗原结合的抗体分子的数量，最容易构想的方法包括：II-1)增加利用若干探针例如抗体识别的抗原决定簇数量，例 II-2)通过增加探针（例如抗体）与抗原的亲和性(亲和性和亲合力)增加每单位时间内结合的抗体数量。偶然地，用以提高例如，抗体亲和性的可能的方法包括改变反应系统中的缓冲液的组成的方法，改变探针的方法，以及这些相结合的方法。II-3)还构想这样的方法，其中通过把大量抗体结合到有一个宽的表面区域的载体（例如珠粒，磁性的微粒等）上俘获许多抗原，来扩大有限量的抗原的反应面积。

在传染病的情况下，预期有结合到抗原上的高亲和性的人类抗体存在于样品中。因此，可以预期这些抗体的抗原决定簇与用于检测的探针（如抗体）重叠，这将导致用于检测的抗体的数量上减少的竞争性反应。因此，可以预测样品中这些干扰抗体的减少将导致用于检测的结合到抗原上的抗体分子数量上的增加（II－3）。

笼统讲减少非特异性反应的方法确实困难，但是可以构想减少非特异性反应的策略 III-1)通过改变缓冲液的组成增加探针（例如抗体）与抗原的亲和性(亲和性和亲合力)减少非特异性反应，III-2)除去非特异性反应的病原体等。

提高检测敏感性的可能的方法包括：IV-1) 使用有高的检测敏感性的标记(放射性同位素等)；IV-2) 通过使用酶或者催化剂作为标记来扩增信号；IV-3) 把酶底物变成有更高的敏感性的物质；IV-4) 通过电学或力学手段来扩增酶促反应或者化学反应的信号；IV-5) 增加每个抗体标记的数量；IV-6) 提高用于信号检测的仪器的敏感性等。

在公开的用于检测 HCV 核心抗原的方法中对预处理步骤的分析揭示：这种方法包含了通过向样品中加入聚乙二醇然后离心获得 HCV 沉淀 (I-2)，并且同时除去一部分血清组分(II-2) 的抗原浓缩步骤，其后为重悬沉淀在包含尿素和碱试剂的溶液中以灭活其中的人抗体，借此从 HCV 释放核心的抗原(II-3)的步骤，以及加入包含非离子型表面活性剂(Triton

X100)和中和试剂以准备与单克隆抗体进行反应的溶液的步骤。

如上所述，沉淀的离心和重悬是程序上复杂的步骤，并且要求高的技巧。这样，本发明的一个目的是解决有关上述程序问题的核心抗原检测系统。

HCV 本身的性质目前还没有被阐明。但是，基于基因组的结构，与病毒微粒相关的结构，以及关于病毒的一般信息，估计 HCV 颗粒有被包装在核心抗原之内的基因组 RNA，其依次包被在包含 E1 和 E2/NS1 抗原的外被蛋白内，所说抗原锚定在上述包被周围的脂质膜上。

因此，为了检测核心抗原必须除去包被物从而允许对探针的结合，所说的探针例如用于所说的核心抗原的检测的抗体。此外，据报道，血液中的病毒微粒呈现复杂的结构，其中颗粒被 LDL(低密度脂蛋白)包围等等，并且，由于对抗外被蛋白质的抗体也存在，估计病毒微粒可以作为带有抗包被蛋白质抗体的免疫复合物存在。这样，为了增加要检测的抗原分子的数量，有效地从病毒微粒除去围绕病毒微粒的包被和污染物并且有效地释放核心抗原分子是重要的。

对于不同于 HCV 的病毒情况也如此，病毒的结构蛋白质必须有效地被释放。

这样，本发明涉及一种处理的方法，这种处理方法能将样品(血清)中的病毒抗原变成一种适合于用探针检测的状态，且这种处理方法不用通过一个复杂的过程诸如离心浓缩抗原。

此外，如上所述，由于人抗体可以以与探针（如抗体）竞争结合的高滴度存在，因此除去所说的抗体的过程对于提高敏感性是重要的。

这样，本发明的一个方面涉及一种处理方法，这种处理方法在样品中容易释放病毒抗原，同时灭活在样品中可能存在的人体抗体。

通过利用本发明的处理方法，样品中的病毒抗原以适合于与探针（如抗体）形成免疫复合物的形式从病毒微粒或者免疫复合物中释放，并且同时灭活样品中干扰检测反应的人抗体，一种高度敏感的检测可以由利用探针（诸如抗体）的免疫测定容易达到。

按照本发明的第一实施方案(1)，用于检测的探针（诸如抗体）可以

是任何探针，只要它与病毒抗原以特异性的形式结合，它有一定的高亲和性，同时当把它加入反应系统中时不引起非特异性反应。例如，象在实施例 4 中所描述的在 HCV 核心抗原的检测中，用于主要反应的探针之一优选地含有可以识别和结合 HCV 核心抗原的 C 端的探针。这里所用的核心抗原的 C 端是指在 SEQ ID No: 2 中显示的 81 至 160 的序列或者它的一部分。它还可以含有 HCV 核心抗原的 N 端的探针。这里所用的核心抗原的 N 端是指在 SEQ ID No: 2 中显示的 10 至 70 的序列或者它的一部分。

按照本发明的第一实施方案(2)，用于检测的探针（诸如抗体）可以是任何探针，只要它与病毒抗原以特异性的形式结合，它有一定的高亲和性，同时当把它加入反应系统中时不引起非特异性反应。例如，在 HCV 核心抗原的检测中，用于主要反应的探针之一优选地含有可以识别和结合 HCV 核心抗原的 N 端的探针。这里所用的核心抗原的 N 端是指在 SEQ ID No: 2 中显示的 10 至 70 的序列或者它的一部分。它还可以含有 HCV 核心抗原的 C 端的探针。这里所用的核心抗原的 C 端是指在 SEQ ID No: 2 中显示的 81 至 160 的序列或者它的一部分。

在上述任何实施方案中，对核心抗原有高特异性和亲和性的任何分子可以用作探针，包括：通过使实验动物（例如小鼠，兔，小鸡，山羊，绵羊，牛，等等）免疫所获得的单克隆抗体，由骨髓瘤细胞与脾细胞的融合获得的杂交瘤产生的单克隆抗体，这些细胞是从免疫个体分离的，由脾细胞或者由EB病毒无限增殖化的血液中的白细胞产生的单克隆抗体，及以HCV感染的人或者黑猩猩产生的抗体；由重组抗体基因转化的细胞产生的重组抗体，这种重组抗体基因由组合从小鼠、人等的免疫球蛋白的cDNA或者染色体DNA获得的可变区基因片段，通过把免疫球蛋白的cDNA或者染色体DNA的一部分与一种人工所构建的序列相结合所构建的可变区基因片段，利用人工基因序列所构建的可变区基因片段，或者利用上述作为构件通过基因重组技术构建的可变区基因片段，与免疫球蛋白恒定区的基因片段所产生；由上述可变区的基因片段与结构蛋白(例如噬菌体的)融合产生的噬菌体抗体，重组体抗体基因（通过上述可变区域的

基因片段与另一合适的基因片段(例如myc基因)组合产生）转化的细胞产生重组抗体，通过把一个可变区人工引入胰蛋白酶基因产生的探针，通过人工改变特异地结合到蛋白质(例如受体)的分子获得的探针，通过组合化学技术等构建的探针。

本发明进一步提供了利用处理溶液处理样品的步骤，这种处理溶液能够从病毒颗粒或者免疫复合物中释放病毒抗原，同时能够灭活样品中干扰检测反应的抗体（即使是人抗体）以产生一种适合于从包含病毒抗原的样品中形成上述病毒抗原和它的探针(如抗体)的免疫复合物的状态，提供了通过利用探针(如抗体)进行免疫测定的检测与定量释放的核心抗原的测定方法和测定试剂盒。

本发明提供的样品处理溶液和样品处理方法

这里所用的样品包括生物学液体如全血，血浆，血清，尿，唾液，脑脊液，肝组织等。

按照本发明，最重要的需要是病毒抗原(例如样品中核心抗原)的处理方法，以便不需要经过样品的复杂的加工产生一种适合于与探针(例如单克隆抗体)结合反应的状态。这样，为了增加抗原分子的数量，有效地释放病毒抗原(如在病毒颗粒中所包含的核心抗原)是重要的。

正如就十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)已知的，大多数蛋白质在SDS的存在的情况下通过热处理会变性，同时除了共价键分子结合的那些分子会转变成为单体。这样，加入包含阴离子型表面活性剂(如SDS)这样的处理剂，造成病毒的破裂及对抗样品中病毒抗原(如核心抗原)的抗体的变性，使能够释放样品中病毒抗原(如核心抗原)。对HCV核心抗原来说，正如在实施例7中显示的那样，这一点也已经被确认，即，当在HCV感染的样品中的核心抗原用包含SDS的处理剂处理，利用凝胶过滤进行分子量分析时，在理论上被预料为单体的位置检测它。

据Kashiwakuma等人在免疫学方法杂志 190：79-89，1996上的报道，当对利用SDS-PAGE从包含细胞表达重组HCV的抽提物的样品分离的核心抗原通过Western印迹分析进行检测时，在被认为是单体的位置检测到了免

疫学活性。对于本领域技术人员来说，在样品中加入包含SDS变性剂会造成抗原的有效的释放和抗原分子在数量上的增加，这一点容易理解。

然而，众所周知，阴离子型表面活性剂(如SDS)有一种很强的蛋白质变性作用，因此当在与抗体形成免疫复合物的反应中加入它们时，它们也使抗体变性并且因此破坏其功能，从而导致在敏感性上的降低。我们也知道，通过阴离子型表面活性剂处理的抗原决定簇的结构的破坏造成与抗体结合键的削弱与敏感性的降低。为了除去造成在敏感性上降低的因素，SDS处理的变性作用需要用某种方法或其它方式来削弱。

我们知道，包含阴离子型表面活性剂的表面活性剂可以通过以下手段除去，透析，超滤，凝胶过滤，电泳，离子交换，沉淀，膜转换，等等。如上所述，抗原可以用Western印迹法或者凝胶过滤法检测的事实表明在SDS处理后利用一个特定的过程可以完成抗原-抗体反应。然而，这些方法需要时间和复杂的过程，这不适合于本发明的目的。

通过用过量的反应溶液稀释，将变性作用减少到可以忽略的水平，在这种水平下不影响反应，这一点确实可能，但是这种方法不能运用于包括利用微量孔(如免疫测定)的方法，因为在其中要加入样品的量会受到限制。很明显，在这一点上这些方法不适合于本发明的目的。

这样，本发明的发明人在本发明的第一实施方案中曾研究了，包含阴离子型表面活性剂与一些添加剂的处理剂的加入是否能将阴离子型表面活性剂的变性作用降低到一种探针(如抗体)不受影响的水平，并且，同时提高阴离子型表面活性剂对核心抗原释放的作用。

本发明的发明人已经发现：包含除了阴离子型表面活性剂(如SDS)之外的表面活性剂的处理剂可以削弱SDS对固定化抗体的变性作用，并且，结果是与加入只包含SDS的处理剂相比，可以提高敏感性。发明人还发现，当能削弱氢离子键的试剂(例如除了SDS和尿素外的表面活性剂)，加入到包含阴离子型表面活性剂(如SDS)的处理剂中时，观察到了类似的作用，并且样品中病毒颗粒上核心抗原的释放和抗核心抗原的抗体的灭活得到提高，结果是核心抗原的释放进一步被提高。发明人还发现：在加入包含SDS和其它表面活性剂的处理剂后通过热处理能使核心抗原的检测具有

更高的敏感性，并且已经完成了本发明。

可以用于处理样品的非SDS阴离子表面活性剂包括：十六烷基硫酸钠或者其它烷基硫酸酯，烷基磺酸盐如十二烷基磺酸钠，烷基烯丙基磺酸盐等。可以添加的非阴离子表面活性剂的表面活性剂包括两性表面活性剂，例如CHAPS(3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基铵]-1-丙烷磺酸盐，CHAPSO(3-[胆酰氨基丙基(二甲基铵)]-2-羟基-1-丙烷磺酸盐，十二烷基-N-甜菜碱，3-(十二烷基二甲基铵)-1-丙烷磺酸盐；非离子型表面活性剂，例如聚氧乙烯异辛基苯基醚(如Triton X100)，聚氧乙烯壬基苯基醚(如NP40)，聚氧乙烯山梨醇酯(如吐温80)，聚氧乙烯十二烷基醚(如Brij 58)，以及辛基葡糖苷，两性表面活性剂(如CHAPS)和非离子型表面活性剂(如Triton X100)是优选的。加入破坏蛋白质高级结构的试剂(蛋白质变性剂)如尿素、硫脲等是有利的。

优选地用于处理的浓度：对于SDS是0.5 %或者更大；对于CHAPS是0.1 %或者更大；对于尿素是1M或者更大；对于Triton X100是0.1 %或者更大和0.75 %或者更小。

用于处理样品的温度可以是实验室常用的任何温度，即在4℃和100℃之间，但是，当加入非离子型表面活性剂应该注意它的浊点。优选地，应用37℃或者更高的温度，常用于血清灭活的50-60℃用于处理是更有效的。

血红蛋白的干扰的除去

当血清等用作样品进行测量时，所说的样品中的血红细胞在上述预处理期间经历溶血作用且血红蛋白被释放，同时变性血红蛋白能通过结合到病毒抗原(如HCV核心)上干扰测量。这样，在本发明的第一实施方案中，优选的是通过俘获在血红蛋白中的血红素除去干扰。作为这一目的的添加剂，我们已经发现：优选的是加入尿素和包含咪唑环的化合物中至少一种。

作为含咪唑环的化合物，可提到咪唑，组氨酸，咪唑丙烯酸，咪唑羧基乙醛，咪唑羧酰胺，咪唑二酮，咪唑二硫代羧酸，咪唑二羧酸，咪唑甲醇，咪唑啉硫酮，咪唑啉酮，组胺，咪唑并吡啶等。

作为含吲哚环的化合物，可提到色氨酸，吲哚丙烯酸，吲哚，吲哚乙酸，吲哚乙酰肼，吲哚乙酸甲酯，吲哚丁酸，吲哚乙腈，吲哚原醇，吲哚羧基乙醛，吲哚羧酸，吲哚乙醇，吲哚乳酸，吲哚甲醇，吲哚丙酸，吲哚丙酮酸，吲哚甲基酮，吲哚毒素，吲哚丙酮，吲哚美辛，吲哚洛芬，吲哚胺等。

优选地，加入的量对于尿素是0.5M-5M，对于吲哚丙烯酸是5mM-50mM，对于其它的添加剂是0.05M-0.5M。

另一方面，如HCV外被蛋白质的膜蛋白不会自发溶解，除非它们被处理到最后。为了使有疏水部分的蛋白质溶解在水中，众所周知的方法是把疏水部分通过表面活性剂转化成为亲水部分。然而，我们知道，某些盐如氯化胍具有将难溶性蛋白质变成水溶性的属性。具有上述属性的盐(离液序列高的试剂)所产生的离子称为离液序列高的离子，已知的有阴离子，胍离子，硫氰酸盐离子，碘离子，高碘酸盐离子，高氯酸盐离子等。产生这些离子的盐已经被用于难溶性蛋白质的增溶作用。有人预计离液序列高的离子具有使抗原从病毒颗粒有效地释放的功能。

然而，当加入离液序列高的离子时，蛋白质的二级结构被破坏，造成对表位结构的破坏。这样，在离液序列高的离子存在的情况下，当探针(如抗体)加入形成免疫复合物的反应中时，与抗体的结合将削弱，敏感性将降低，这被认为是一个严重的问题。

另一方面，离液序列高的离子的变性作用通常可逆，因此通过透析或者稀释降低离子强度使变性结构临时回到原来的结构。这就出现了另一个与处理剂(如离液序列高的离子)的利用相关的问题。即，按照本发明所需的处理方法，不仅存在于样品中的病毒颗粒有效地被释放，而且结合到存在于样品中的抗原上的高亲和性抗体必须同时被灭活。这样，离液序列高的离子的增溶作用并不能对存在于样品中的高亲和性抗体提供充分的灭活，并且，人们相信，抗体相反的会影响敏感性。

这样，使用离液序列高的离子的处理方法有两个冲突的问题：在离液序列高的离子能破坏其结构的条件下，抗原抗体反应被抑制，并且另一方面单独的离液序列高的离子的影响不足以灭活在样品中干扰反应的

抗体，且在抗原抗体反应不被抑制的条件下，污染的抗体可以抑制反应。

为了解决这些冲突的问题，有必要找到一种条件，在这种条件下抗原的抗原决定簇被破坏是可逆的，同时在样品中污染抗体的功能被破坏是不可逆的。

就抗体被灭活的条件而言，已知的处理方法有碱处理，酸处理等。血清的酸处理可以造成假阳性的结果，因为这种处理不可逆地使一部分血清蛋白变性，导致在大多数情况下样品处理后因阻碍移液管吸收而形成沉淀，且被变性蛋白质吞没的沉淀在测量时被吸附到固相上，因此可以以一种密度来检测。此外，出现了另一个问题，因为，目的抗原非特异性地被沉淀吞没，与探针进行反应的抗原的数量减少从而导致敏感性的降低。

本发明的发明人已经发现：胍处理与酸处理结合可以解决与酸处理有关的问题(例如沉淀的形成)及与胍处理相关的冲突问题，同时由此完成了本发明。我们还发现：向包含离液序列高的离子的处理剂(如胍和酸化剂)中加入表面活性剂是进一步优选的。作为酸化剂，优选的是盐酸，硫酸，乙酸，三氟乙酸，三氯乙酸等。

作为表面活性剂，优选的是两性表面活性剂(如例如CHAPS(3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基铵]-1-丙烷磺酸盐，CHAPSO (3-[胆酰氨基丙基)二甲基铵]-2-羟基-1-丙烷磺酸盐，十二烷基-N-甜菜碱，3-(十二烷基二甲基铵)-1-丙烷磺酸盐等，及非离子型表面活性剂，(例如聚氧乙烯异辛基苯基醚,如Triton X100；聚氧乙烯壬基苯基醚如NP40；聚氧乙烯山梨醇酯，如Tween 20，聚氧乙烯十二烷基醚,如Brij 58，辛基葡糖苷等。另外，通过削弱氢离子键部分破坏蛋白质的高级结构的试剂(如尿素)可以加入其中。

尤其是，更优选的是：在4-45℃下以2M或者更高浓度利用盐酸胍，以2%或者更高浓度利用Triton X100，以0.02%或者更高浓度利用Tween 20。

在任何实施方案中，很明显，通过利用本发明的处理方法，病毒抗原可以用探针的形式，从包含有类似于HCV或者HBV的结构的病毒颗粒的

样品释放，即适合于利用抗体作为探针的所谓的免疫测定的状态。本文所使用的有类似于HCV或者HBV的结构的病毒是形成病毒颗粒的病毒，所说的颗粒具有由蛋白质组成的结构，其中基因组RNA或者DNA已被包装并且膜蛋白或者脂质膜围绕着它。这种病毒包括，例如，与HCV有关的黄病病毒，反录病毒如人类免疫缺损病毒(HIV)等。此外，象HBV一样，那些有作为基因组的DNA的病毒，当它们有类似的结构时，也被包括在内。

病毒抗原的暴露

按照涉及在窗口时期所收集的样品中检测病毒抗原的方法的本发明的第二实施方案，病毒抗原的抗体还没有形成，因此为暴露病毒抗原的病毒颗粒的破裂就足够，没必要破坏存在于样品中的抗体。这样，以上所描述的样品的预处理就不必要了，同时破裂病毒颗粒的试剂的存在对于暴露病毒颗粒已足够。尤其是，破裂病毒颗粒的试剂对存在于病毒颗粒中的病毒抗原来说是必需的。

人们相信，一般的病毒颗粒有一种结构，其中作为基因组的核酸和核心抗原形成一种复合物，这种复合物形成一种微粒，所说的微粒被包含脂质膜和包膜蛋白质的外被所包被。人们还相信，在血液中它们以具有低密度脂蛋白，病毒的抗体等的复合物的形式出现。这样，探针不能识别或者结合病毒抗原，特别是病毒颗粒中的抗原。因此，为了检测病毒抗原，它们必须被处理，通过例如，除去这些围绕病毒颗粒的结构以便使探针能识别病毒颗粒。

这样，本发明还提供了一种反应条件(在这种反应条件下，为了使探针能识别病毒颗粒，暴露在样品中所包含的病毒颗粒中的病毒抗原以便使探针能识别)，和反应的方法(包括完成反应的系统，以及完成反应的系统的试剂)。

本发明提供的适合于系统中抗原检测的反应系统该系统包括一种条件，这种条件很温和足以保持对抗病毒抗原中抗原决定簇的抗体的功能，但是这种条件可以从存在于样品中具有复杂结构的病毒颗粒充分暴露抗原被抗体(识别病毒抗原的探针)识别的面积。

对于HCV，已经证明，核心抗原通过处理超离心分离的病毒颗粒可以

被检测到(Takahashi 等 .,1992,普通病毒学杂志 73: 667-672),并且HCV微粒可利用非离子型表面活性剂(如吐温80或Triton X100)与聚乙二醇通过聚集作用沉淀(Kashiwakuma等., 1996, 免疫学方法杂志 , 190: 79-89)。然而，在前者中，检测敏感性不够高并且仍然留下了抗原是否充分被暴露的问题。在后者中，曾通过加入另一种处理剂灭活抗体，并且没有论及各种表面活性剂的影响。

按照本发明，首先研究的条件集中在表面活性剂上。由此发现，通过利用基于表面活性剂的组合物，不使用任何预处理的过程(如离心或者加热)，仅仅通过稀释在反应溶液中的样品，实现了病毒颗粒中抗原的有效检测。

从病毒颗粒中有效地抽提病毒抗原，并且抑制与血清中各种物质的相互作用是必要的，由此提供了一种条件，在这种条件下探针可以有效地与抗原进行反应。作为在这种情况下使用的有效的表面活性剂，可以提到在一个分子中同时具有一个含有10个或更多碳原子的烷基以及仲铵，叔铵，或季铵的表面活性剂，或者非离子型表面活性剂。

在上述有一个烷基以及仲铵，叔铵，或季铵的表面活性剂中，优选的烷基是直链烷基，同时其中的碳原子的数量是10或者更多，更优选地是10-20，作为胺，叔铵或者季铵(铵)是优选的。具体的表面活性剂包括十二烷基-N-肌氨酸，十二烷基三甲基铵，十六烷基三甲基铵，3-(十二烷基二甲基铵)-1-丙烷磺酸盐，3-(十四烷基二甲基铵)-1-丙烷磺酸盐，十二烷基吡啶翁，鲸蜡基吡啶翁，癸酰-N-甲基葡糖酰胺(MEGA-10)，十二烷基-N-甜菜碱等。十二烷基-N-肌氨酸和十二烷基三甲基铵是优选的。

作为上面提到的非离子型表面活性剂，有在12-14之间的亲水-亲脂平衡值的那些是优选的，同时聚氧乙烯异辛苯基醚(如Triton X100和TritonX114)，或者聚氧乙烯壬基苯基醚(如Nonidet P40，TritonN101和Nikkol NP)是优选的。

按照本发明，上述两种类型的表面活性剂可以单独地使用，但是组合使用它们更优越和可以由组合使用获得协同作用。

可以加入能改变含水的环境的附加组分(如尿素)。

在本发明中作为探针的单克隆抗体

本文所使用的HCV的结构蛋白的基因片段是指包含HCV结构蛋白核心区和具有编码包含HCV的N端的1-160的氨基酸序列的多肽的至少有一个碱基序列的DNA片段的基因片段。具体地说，它是包含编码SEQ ID No：2的氨基酸序列的碱基序列的基因片段。

有本文所使用的具有HCV抗原活性的多肽是指在免疫学上与抗HCV抗体进行反应的融合多肽或者多肽，并且可以用作构建本发明的杂交瘤和由此获得的单克隆抗体的抗原。具体地说，它是具有包含SEQ ID No：1的氨基酸序列的HCV抗原活性的多肽或者具有包含SEQ ID No：1的部分氨基酸序列的HCV抗原活性的多肽，或者具有附加到它的N端或者C端上的额外的氨基酸序列的多肽。

抗上述具有SEQ ID No：3-6中显示的氨基酸序列的融合多肽和多肽的本发明的单克隆抗体可以由本领域技术人员容易地构建。杂交瘤产生单克隆抗体是众所周知的。例如，BALB/c小鼠周期性地以上述融合多肽或者多肽(下文中称为本发明的抗原）作为单一抗原或者与BSA，KLH等的组合抗原单独地或与佐剂(例如Freund完全佐剂)混合腹膜内或者皮下免疫。当在血清中的抗体滴度增加时，本发明的抗原作为加强剂被用于尾静脉中。在无菌分离脾之后，将它与合适的骨髓瘤细胞系融合以便获得杂交瘤。这一方法可以按照Kohler和Milstein的方法(自然，256：495-497，1975)进行。

用上述方法所获得的杂交瘤细胞系可以在合适的培养液中培养，产生显示与本发明的抗原发生特异性反应的抗体的杂交瘤细胞系被选择和克隆。对于产生抗体的杂交瘤的克隆，除了有限的抗体的稀释法之外，可以使用软琼脂方法(欧洲免疫学杂志．6：511-5198，1976)。这样产生的单克隆抗体通过利用蛋白质A的柱层析之类的方法纯化。

除上述单克隆抗体之外，可以产生用作探针的分子。例如，重组抗体在Hoogenboon的综述中作了详尽的描述(生物技术动向，15：62-70，1997)。

利用探针的检测系统

按照本发明产生的单克隆抗体在以下测定中被用作HCV结构蛋白的检测和定量的检验试剂;酶联免疫吸附测定，酶免疫测定，酶免疫印迹测定，放射免疫测定，基于聚集作用的测定，或者其它已知的免疫测定。当标记抗体用于检测时，荧光化合物，化学发光化合物，酶，产色物质等，可以用作标记化合物。

例如，当基于夹心反应系统的方法被用于检测样品(血清)中病毒抗原时，所利用的诊断试剂盒包含涂在固相支持体(例如，微滴板孔的内壁)上的一种或多种单克隆抗体。结合至标记物质上的一种或多种单克隆抗体或者片段。任何固定化在固相支持体上的单克隆抗体和标记的单克隆抗体都可以使用，并且可选择提供高敏感性的组合。

能被利用的固相支持体包括，例如，微量滴定板，试管，和由聚苯乙烯，聚碳酸酯，聚丙烯，或者聚乙烯制造的毛细管，小珠(胶乳小珠，血红细胞，金属化合物等等)，膜(脂质体等等)，滤器等。

本发明的效果

依据本发明的方法，利用抗体作为探针，在适合于进行检测的免疫测定的状态下，病毒抗原从病毒颗粒中可以方便地被释放。此外，依据本发明通过处理含有病毒颗粒的样品，病毒抗原的简单和敏感的检测和定量可以通过免疫测定来进行，其中抗原利用抗体作为探针检测。还可能制备试剂盒，测定试剂盒以及诊断试剂，其确定病毒存在或者不存在。采用使用本发明的样品处理方法的免疫测定法定量样品中的病毒也是可能的。

实施例

下列实施例说明本发明，但是不应该将它们理解为对本发明范围的限制。

实施例1. HCV来说的多肽的表达和纯化

(A) 表达质粒的构建

对应于HCV的核心区的质粒被构建如下：将通过把C11-C21克隆和

C10-E12克隆分别整合进pUC119所获得的质粒pUC.C11-C21和pUC.C10-E12(日本未审专利出版物(Kokai)6号(1994)-38765)的DNA各1微克，在20μl限制酶反应溶液[50 mM Tris-HCl，pH 7.5，10 mM $MgCl_2$，1 mM二硫苏糖醇，100 mM NaCl，15单位EcoRI以及15单位ClaI酶]，以及限制酶反应溶液[10 mM Tris-HCl，pH 7.5，10 mM $MgCl_2$，1 mM二硫苏糖醇，50 mM NaCl，15单位ClaI以及15单位KpnI]中在37℃下消化1小时，然后进行0.8%琼脂糖凝胶电泳以纯化大约380 bp的EcoRI-ClaI片段以及大约920 bp的ClaI-KpnI片段。

将通过以EcoRI和KpnI消化pUC119所获得的两个DNA片段和载体加入至5μl 10X连接酶缓冲溶液[660 mM Tris-HCl，pH 7.5，66 mM $MgCl_2$，100 mM二硫苏糖醇，1 mMATP]中，加入1μl T4的连接酶(350 单位/μl)，以及水使总体积达到50μl，然后于16℃温育过夜以便进行连接反应。利用这一质粒，转化大肠杆菌JM109以获得质粒pUC• C21-E12。

质粒pUC•C21-E12的一纳克DNA，利用两引物进行PCR：5′-GAATTCATGGGCACGAATCCTAAA-3′(SEQ ID No: 7)，及5′-TTAGTCCTCCAGAACCCGGAC-3′(SEQ ID No: 8)。利用GeneAmpTM实施PCR，(DNA扩增试剂盒，由Perkin Elmer Cetus制造)其条件是在95℃下 DNA变性1.5 min,在50℃变性2min,在70℃下DNA合成3分钟。这样获得的DNA片段在0.8%琼脂糖凝胶电泳上分离，并且用玻璃粉法(Gene Clean)纯化。

另一方面,pUC19以SmaI消化,同时由PCR获得的DNA片段加入至5μl 10X连接酶缓冲液[660 mM Tris-HCl，pH 7.5，66 mM $MgCl_2$，100 mM二硫苏糖醇，1 mMATP]中，加1μl T4连接酶(350 units/μl)，及水达到总体积50μl，然后在16℃下培养过夜以进行连接反应。利用这一质粒，转化大肠杆菌JM109以获得质粒pUC•C21-E12 •SmaI。将这一质粒DNA一微克在20μl限制酶反应溶液[150 mM NaCl，6 mM Tris-HCl，pH 7.5，6 mM $MgCl_2$，15单位EcoRI以及15单位BamHI酶]中消化，然后进行0.8 %琼脂糖凝胶电泳以分离大约490 bp的EcoRI-BamHI片段,其通过玻璃粉法纯化。

然后,将表达载体Trp•TrpE的 1μg DNA(日本未审专利出版物(Kokai)5号(1993)-84085)在20μl限制酶反应溶液[150 mM NaCl，6 mM Tris-HCl，

pH 7.5, 6 mM $MgCl_2$, 15单位EcoRI以及15单位BamHI酶]中在37℃下消化1小时。向反应混合物加入39μl的水，并且在70℃下加热5分钟。此后，加入1μl的细菌碱性磷酸酶(BAP)，在37℃下温育1小时。

为了进行苯酚抽提,向反应混合物中加入苯酚。这样获得的水层以乙醇沉淀，将获得的沉淀干燥。将一微克获得的EcoRI-BamHI处理过的载体的DNA和上述核心140片段加入到5μl的10X连接酶缓冲液[660 mM Tris-HCl, pH 7.5, 66 mM $MgCl_2$, 100 mM二硫苏糖醇, 1 mMATP]中，加入1μl T4连接酶(350 units/μl)，及水达到总体积50μl，然后在16℃下温育过夜以便进行连接酶反应。

利用10μl的这一反应混合物，转化大肠杆菌菌株HB101。用于转化的敏感大肠杆菌菌株可以由氯化钙方法构建[Mandel, M. 和 Higa, A.，分子生物学杂志., 53, 159-162(1970)]。将转化了的大肠杆菌涂在包含25μg/ml氨苄青霉素的LB平板上(1%色氨酸, 0.5 %NaCl, 1.5 %琼脂)，并且在37℃下培养过夜。利用接种环将在平板上形成的一铂环量的细菌菌落转移到包含25μg/ml氨苄青霉素的LB培养介质上并在37℃下培养过夜。将1.5 ml的细菌培养物离心,收集细胞，然后将质粒DNA利用碱法进行小量制备[Manniatis 等., 分子克隆:实验室手册(1982)]。

然后，将这样获得的质粒DNA的1μg DNA在20μl限制酶反应溶液[150 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl, pH 7.5, 6 mM $MgCl_2$, 15单位EcoRI以及15单位BamHI酶]中在37℃下消化1小时，然后进行琼脂糖凝胶电泳中。选择产生大约490 bp EcoRI-BamHI片段的Trp•TrpE核心160表达质粒。

(B) 由克隆核心160编码的多肽的表达和纯化

将具有Trp•TrpE核心160表达质粒的大肠杆菌菌株HB101接种到3 ml包含50μg/ml氨苄青霉素的2YT上(1.6%胰蛋白胨, 1%酵母提取物, 0.5% NaCl)，在37℃下培养9小时。将1 ml的培养物转移到包含50μg/ml氨苄青霉素的100 ml M9-CA培养基(0.6% Na_2HPO_4, 0.5% KH_2PO_4, 0.5% NaCl, 0.1% NH_4Cl, 0.1 mM $CaCl_2$, 2 mM$MgSO_4$, 0.5%酪蛋白氨基酸, 0.2 %葡萄糖)上，并在37℃下培养。在OD600=0.3时以最终浓度40 mg/l 加入吲哚丙烯酸酯，并且培养16小时以上。离心培养物收集细胞。

向收集的细胞中加入20 ml缓冲液A[50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mMEDTA, 30 mM NaCl]以使细胞悬浮。再一次离心悬浮液获得2.6g表达细胞。将这样获得的细胞悬浮在10 ml的缓冲液中。在用超声处理破坏大肠杆菌的膜之后，将它离心获得包含由HCV cDNA和TrpE编码的多肽的融合多肽的不能溶解的组分。向该组分中加入包含6 M尿素的10 ml缓冲液A且抽提融合多肽。将增溶的抽提物进行利用S-琼脂糖凝胶的离子交换柱层析，以纯化融合多肽。

实施例2.构建杂交瘤的方法

将上述方法所制备的融合多肽(TrpC11)溶解在6 M尿素中，然后用10 mM磷酸缓冲液(pH 7.3，包含0.15M NaCl且最终浓度介于0.2-1.0 mg/ml之间)稀释，并且与相等量的佐剂(Titermax)混合以便使TrpC11悬浮。向4-6周龄的BALB/c小鼠的腹膜内注入所制备的浓度在0.1-0.5 mg/ml之间的TrpC11的悬浮液。类似的免疫每两周进行一次，在超过两周以后，通过尾静脉施用溶解在生理盐水中的10μg的TrpC11。

在最后一次注射三天之后，从免疫的动物的身上无菌分离脾，并且利用剪刀剪成碎片，然后弄碎成单个细胞并用RPMI-1640介质洗涤三次。在洗涤之后，小鼠骨髓瘤细胞系SP2/OAg14在以上描述的对数生长期，将2.56×10^{7}个所说的细胞和1.64×10^{8}个脾细胞在50 ml离心管中混合。混合物在200 x g下离心5分钟，除去上清液，同时向沉淀中加入1 ml包含50%聚乙二醇(PEG)4000(由Merck制造)的RPMI-1640介质，并且进一步加入10 ml RPMI-1640介质以便进行细胞融合。

在PEG由离心(200 x g，5分钟)除去之后，所融合的细胞在包含10%牛血清，次黄嘌呤，氨基蝶呤，以及胸苷(以下指HAT)的RPMI-1640介质中在96-孔平板上培养10天来仅仅培育杂交瘤。然后，产生兴趣抗体的克隆用ELISA方法检测，以便获得产生具有本发明所需的反应特异性的单克隆抗体的杂交瘤。

这样获得的杂交瘤按照常规有限稀释法进行单克隆，并且所获得的杂交瘤被称作HC11-11，HC11-14，HC11-10，及HC11-3和HC11-7。所说的

四种杂交瘤分别以FERM BP-6005, FERM BP-6006, FERM BP-6004, FERM BP-6002以及FERM BP-6003于1997年7月4日保藏于工业科学和技术机构国家生物科学和人类技术研究所。

实施例3. 单克隆抗体的构建

以实施例2的方法所获得的杂交瘤接种到利用去甲植烷等处理的小鼠的腹腔中，同时在腹水中收集单克隆抗体。单克隆抗体通过利用蛋白质A-结合的琼脂糖凝胶柱分离IgG组分来纯化。

通过利用兔抗鼠Ig同形抗体(由Eymed制造)的免疫测定发现: 由上述五种杂交瘤所产生的C11-14, C11-11, C11-10, C11-7和C11-3的每个单克隆抗体的同种型，分别地对于C11-10, C11-7是IgG2及对于C11-11, C11-14, C11-3是IgG1。对于获得的五种单克隆抗体，利用合成多肽实施表位分析，这种合成多肽是按照从HCV核心区来源的序列由20个合成氨基酸组成的。如表1中显示的结果，它们是特异性地识别部分核心区的单克隆抗体。

表 1

抗体	识别位点
C11-14	^{41}Gly-^{50}Arg(SEQ ID NO: 4)
C11-10	^{21}Asp-^{40}Arg(SEQ ID NO: 3)
C11-3	^{100}Pro-^{120}Gly(SEQ ID NO: 5)
C11-7	^{111}Asp-^{130}Phe(SEQ ID NO: 6)
C11-11	^{100}Pro-^{120}Gly(SEQ ID NO: 5)

实施例4. 样品处理条件的研究

1) SDS浓度

向100μl正常人血清与HCV-RNA-阳性血清中加入包含不同浓度的SDS和0.6% CHAPS的100μl处理溶液。然后将混合物放置在56℃的温箱中，处理30分钟，并且每种所处理的混合物的80μl用作为样品。利用下述的测

定方法获得的结果以处理时间时SDS的浓度作为横坐标在图1中显示。

2) CHAPS的浓度

向100μl正常人血清与HCV-RNA-阳性血清中加入包含不同浓度的CHAPS和SDS 5% 的100μl处理溶液。然后将混合物放置在56℃的温箱中，处理30分钟，并且每种所处理的混合物的80μl用作为样品。利用下述的测定方法获得的结果以处理时间时CHAPS的浓度作为横坐标在图2中显示。

3) 尿素浓度

向100μl正常人血清与HCV-RNA-阳性血清中加入包含不同浓度的尿素的100μl处理溶液(5% SDS, 0.6% CHAPS)。然后将混合物放置在56℃的温箱中，处理30分钟，并且每种所处理的混合物的80μl用作为样品。利用下述的测定方法获得的结果以处理时间时尿素的浓度作为横坐标在图3中显示。

4) Triton X100的浓度

向100μl正常人血清与HCV-RNA-阳性血清中加入包含不同浓度的Triton X100 的100μl处理溶液(5% SDS, 0.6% CHAPS 6 M尿素)。然后将混合物放置在56℃的温箱中，处理30分钟，并且每种所处理的混合物的80μl用作为样品。利用下述的测定方法获得的结果以处理时间时Triton X100的浓度作为横坐标在图4中显示。

5) 反应温度

向100μl正常人血清与HCV-RNA-阳性血清中加入100μl的处理溶液(5% SDS, 0.6% CHAPS 6 M尿素0.75%Triton)。然后将混合物置于4℃，室温(23℃)，37℃，45℃，56℃及70℃下处理30分钟，并且每种所处理的混合物的80μl用作为样品。利用下述的测定方法获得的结果在图5中显示。

测定方法

利用如下所描述的各种测定方法对在血清处理条件的研究中所获得的样品进行逐一评价。这样，将抗-HCV核心抗原的单克隆抗体(相等量的抗体C11-3和C11-7的混合物)在0.1M, pH 9.6的碳酸盐缓冲液中稀释成最终浓度为6μg/ml，同时100μl 每种稀释液被分配在96-孔微量滴定板(由

Nunc 制造)的每个孔上。平板在4℃下温育过夜之后，以0.35 ml pH 7.3，包含0.15M NaCl的10 mM磷酸钠的缓冲液洗涤两次。然后，加入0.35 ml pH 7.35，包含0.5%酪蛋白钠(在下文称作封闭溶液)的磷酸钠缓冲液，同时平板在室温下进一步温育2小时。

在除去封闭溶液之后，将160μl pH 7.3，包含0.15M NaCl，1% BSA，0.5%的酪蛋白钠及0.05%的Tween 20的100 mM磷酸钠的缓冲液，以及用血清处理方法获得的待测样品同时加入各自的孔。平板在室温下进一步温育2小时，用300μl洗涤液洗涤五次。然后，加入100μl 过氧化物酶(POD)标记的单克隆抗体(相等量的抗体C11-10和C11-14的混合物)并在室温下温育30分钟。在温育结束之后，平板用上述洗涤液300μl洗涤五次。向平板中加入一百微升底物(邻亚苯基二胺，在下文称作OPD)溶液，同时在加入100μl 2N硫酸溶液之后将平板在室温下温育30分钟。以在630 nm处的吸收作为参比测量在波长492 nm处的吸收(OD492)。

正如在图1至图4中显示的那样对每一个处理条件进行优化。在未处理样品中检测核心抗原是困难的，但是这样一种简单的处理却使核心抗原的检测成为可能。尤其是，结果显示，核心抗原通过应用下列条件：SDS在0.5%或者更大，CHAPS在0.1%或者更大，尿素在1M或者更大，以及Triton X100在0.1%-0.75%以及4℃-70℃的温度范围可以满意地检测核心抗原。

实施例5. 在结构区中的核心抗原的检测与测定方法(1)

向100μl血清中加入100μl的处理溶液(5% SDS，0.6% CHAPS 6 M尿素0.75%Triton)。然后将混合物置于在56℃下处理30分钟，并且每种所处理的混合物的120μl用作为样品。

将抗-HCV核心抗原的单克隆抗体(相等量的抗体C11-3和C11-7的混合物)在0.1M，pH 9.6的碳酸盐缓冲液中稀释成最终浓度为6μg/ml，同时100μl 每种稀释液被分配在96-孔微量滴定板的每个孔上(由Nunc制造)。平板在4℃下温育过夜之后，以0.35 ml pH 7.3，包含0.15M NaCl的10 mM磷酸钠的缓冲液洗涤两次。然后，加入0.35 ml封闭溶液，同时平板在室温下进一步温育2小时。

在除去封闭溶液之后，将120μl反应缓冲液以及在上述处理方法中获

得的待测样品同时加入各自的孔，同时平板在室温下温育2小时。平板用300μl洗涤液洗涤五次，然后，向平板中加入100μl过氧化物酶(POD)标记的单克隆抗体(相等量的抗体C11-10和C11-14的混合物)并在室温下培养30分钟。平板用洗涤液300μl 洗涤五次并向平板中加入100μl(OPD)底物溶液，同时在加入100μl 2N硫酸溶液之后将平板在室温下温育45分钟。以630 nm处的吸收作为参比测量在波长492 nm处的吸收(OD492)。作为一种标准的血清，血清组50，被定义作1 U/ml，用包含1%的BSA pH 7.3的10mM磷酸钠缓冲液系列稀释。这种标准血清进行同样的处理和测定。

图6显示了用作标准的血清的血清组50的一条稀释线。样品中的核心抗原以剂量依赖性方式测定，并且能检测到大约0.5 mU/ml的水平。因此，证明了通过将本发明的十分简单的样品处理方法和单克隆抗体结合，可以检测或者定量HCV核心抗原。

实施例6. HCV核心抗原的检测和定量(2)

利用碱性磷酸酶标记的单克隆抗体的方法

96-孔黑色微量滴定板(Nunc)作为固相载体，碱性磷酸酶标记的单克隆抗体作为标记抗体，以及CDPstar(Emerald II作为敏化剂)作为底物被利用。用作标准的血清的血清组50的一条稀释线在图7中显示，其中样品中的核心抗原以剂量依赖性方式测定，并且能检测到大约0.5 mU/ml的水平。因此，证明了利用碱性磷酸酶标记的单克隆抗体的方法也可以检测或者定量HCV核心抗原。

实施例7. 在溶血血清中抑制敏感性降低的添加剂的研究

当试验血清组分对敏感性的作用时发现：血红蛋白的加入极大地降低了敏感性。有人认为，降低是由从变性血红蛋白中释放的血红素所造成的，这种血红蛋白是利用包含SDS，CHAPS，或者Triton X100的预处理试剂进行预处理时产生的。这样，能减少变性血红蛋白作用的添加剂可以通过将它们加入到预处理试剂中进行试验。

加入尿素的影响通过将尿素加入模型样品中并且按照实施例6通过测定核心抗原进行研究，而这种模型样品是通过将高浓度的血红蛋白(由Kokusai Shiyaku : Kansho Check制造)加入到HCV核心抗原的阳性血清

中制成的(血清组 3号)。在430 mg/dl血红蛋白加入组相对于100 %无血红蛋白加入组(作为对照)的核心抗原的活性水平在表2中显示。当不加入尿素时，在血红蛋白加入组中的核心抗原的活性水平降低30%，并且通过增加加入的尿素的量，血红蛋白加入组的核心抗原的活性水平就升高且受血红蛋白的干扰降低，这一点已经被证实。

表2. 尿素对血红蛋白干扰的抑制作用

添加剂	相对于对照的百分比(%)
不加	30.0
0.5 M尿素	36.3
1 M尿素	39.7
2 M尿素	43.0
3 M尿素	48.8
4 M尿素	53.7

另一方面，由于有各种氨基酸与血红素相互作用的可能性的，及氨基和羧基基团的缓冲作用，加入各种氨基酸并检验其影响程度。结果显示在表3中。

表3 各种氨基酸对血红蛋白干扰的抑制作用

添加剂	相对于对照的百分比(%)
不加	22.7
0.1 M组氨酸	53.7
0.1 M色氨酸	70.8
0.1 M苯基丙氨酸	45.8
0.1 M亮氨酸	25.9
0.1 M谷氨酰胺	36.1
0.1 M赖氨酸	42.1
0.1 M精氨酸	31.4
0.1 M谷氨酸	49.8
0.1 M甘氨酸	39.1
0.1 M脯氨酸	31.2
0.1 M丝氨酸	32.5

色氨酸和组氨酸显示了对干扰的最有力的抑制作用。研究了对干扰的抑制作用的剂量依赖性，结果显示在表4中。

表4.组氨酸和色氨酸对血红蛋白添加剂干扰的抑制作用

添加剂	相对于对照百分比(%)
无添加剂	24.2
0.05M组氨酸	49.7
0.1M组氨酸	59.4
0.15组氨酸	74.5
0.2组氨酸	77.0
0.05色氨酸	58.7
0.1色氨酸	71.5
0.15色氨酸	77.9
0.2色氨酸	89.0

由于在血红蛋白中血红素由侧链配位，并且保留在血红蛋白中，所以说明该作用归因于侧链。因此，研究组氨酸的侧链中咪唑，色氨酸侧链中含吲哚环的吲哚丙烯酸的作用，结果如表5中所示。

表5.咪唑和吲哚丙烯酸对血红蛋白干扰的抑制作用

添加剂	相对于对照百分比(%)
无添加剂	22.1
0.05咪唑	35.2
0.1咪唑	42.0
0.15咪唑	58.8
0.2咪唑	70.7
0.05吲哚丙烯酸	50.4
0.1吲哚丙烯酸	69.0
0.15吲哚丙烯酸	90.3
0.2吲哚丙烯酸	96.8

当将吲哚或者吲哚丙烯酸加至反应物中时，观察到的对血红蛋白干扰的剂量依赖性抑制作用，类同于加入氨基酸观察到的结果。这一现象表明通过给反应物加入含咪唑环的物质，例如组氨酸，或者含吲哚环的物质，例如色氨酸，即使是含血红蛋白的样品，也可进行核心抗原的敏感检测。

研究添加剂的组合效应，结果如表8中所示。通过组氨酸和色氨酸的组合，活性恢复90%或更大，加入尿素可进一步增加检测敏感性。

表6

添加剂	相对于对照百分比(%)
0.1M组氨酸/0.1M色氨酸	91.1
4M尿素/0.1M Tris/0.1M组氨酸	112.6

实施例8.分析在血清处理和测定方法中识别的分子形式

用每一种血清处理方法来处理0.25 ml血清组13。在凝胶过滤柱(Superdex 200HR)上分级分离所处理的血清，同时测定组分中的抗核心免疫活性。结果如表8中所示。数据说明可识别分子量约为20-30 kDa的分子，在上述预处理后的血清中,通过病毒的破裂和抗核心抗体的失活已经释放出病毒中核心抗原。

实施例9. 测定血清中HCV结构域中核心抗原的方法

通过上述方法，将由AmpliCore HCV监测试剂盒(Roche)测定的含有10^3-10^7拷贝数/ml HCV-RNA的血清，PCR方法，以及正常人血清用来定量血清中HCV核心抗原。

作为标准血清的血清组50(被定义为1U/ml)，用10mM的磷酸钠缓冲液(pH 7.3，包含1%BSA)系列稀释，并用类似的方法处理。结果如表7中所示。在所有的试验样品中，正常人血清中的核心抗原均在检测限度以下，在所有的PCR-阳性样品中均可检测到。图9 显示其相互关系，揭示了其与PCR方法的相互关系值高达0.8 或更大。

表7. HCV-RNA和核心抗原水平

样品	RNA(千拷贝/ml)	核心抗原(mU/ml)
正常人类血清1	-	N.D.
2	-	N.D.
3	-	N.D.
4	-	N.D.
5	-	N.D.
血清组81	1.6	2.1
80	8	2.1
82	8	8.5
33	16	3.7
31	30	37.0
26	87	266.7
39	97	63.8
41	170	116.1
16	400	133.7
50	1000	1000
45	1300	277.3
13	1600	1806

N.D.: 未检测出

实施例10. 研究样品处理的条件及处理方法的条件

1)盐酸胍浓度

向100μl正常人血清与HCV-RNA-阳性血清中，加入100μl含不同浓度盐酸胍和0.5 N HCl的处理液。在室温下处理混合物30分钟，80μl每种处理混合物用作样品。用下述测定方法获得的结果如图10中所示，以不同处理时间时的盐酸胍浓度作为横坐标。

2) Triton X100 浓度

向100μl正常人血清和HCV-RNA-阳性血清中，加入100μl含不同浓度

Triton X100(6M盐酸胍，0.5 NHCl)的处理液。在室温下处理混合物30分钟，80μl每种处理混合物用作样品。用下述测定方法获得的结果如图11中所示，以不同处理时间时的Triton X100浓度作为横坐标。

3) Tween 20浓度

向100μl正常人血清和HCV-RNA-阳性血清中，加入100μl含不同浓度Triton X100(6M盐酸胍，0.5 NHCl，12.5 %Triton X100)的处理液。在室温下处理混合物30分钟，80μl每种处理混合物用作样品。用下述测定方法获得的结果如图12中所示，以不同处理时间时的Tween 20浓度作为横坐标。

4) 反应温度

向100μl正常人血清和HCV-RNA-阳性血清中，加入100μl含不同浓度Triton X100(6M盐酸胍，0.5 NHCl，12.5 %Triton X100，0.75 %Tween 20)的处理液。分别在4℃、室温(23℃)、37℃和45℃条件下处理混合物30分钟，80μl每种处理混合物用作样品。用下述测定方法获得的结果如图13中所示。

测定方法

处理血清条件下的研究中所获得的每一份样品，用如下所述的各种分析方法进行测定。这样，稀释抗-HCV核心抗原单克隆抗体(等量抗体C11-14和C11-11的混合物)，使其在pH为9.6的0.1M 碳酸盐缓冲液中的最后总浓度为6μ g/ml，将每100μl的稀释液分布在96-孔的微量滴定板上(Nunc 制造)。在4℃条件下过夜温育该平板后，用0.35 ml的10mM磷酸钠缓冲液洗涤两次(pH 7.3，含0.15M NaCl)。然后，加入0.35 ml pH为7.35，含0.5 %酪蛋白钠(在此之后称之为封闭溶液)的10 mM磷酸钠缓冲液，进一步在室温下温育平板2小时。

除去封闭溶液之后，将160μl混合物(由140μl的pH为7.3，含0.15M NaCl，1%BSA，0.5 %酪蛋白钠和0.05 %Tween 20的100 mM磷酸钠缓冲液，和20μl的1M Tris(在此之后称之为反应缓冲液)组成)以及用上述血清处理方法获得的待测样品加入到各自的板孔，并在室温下温育2小时，用300μl的洗涤液洗涤五次，然后加入100μl的过氧化物酶(POD)-标记的单克隆

抗体(C11-10)，在室温下温育30分钟。温育结束后，用300μl的上述洗涤液洗涤平板五次。将一百微升底物(邻甲苯基亚二胺，在此之后称之OPD)溶液加到平板上，并将平板在室温下温育30分钟，其后再加入100μl 2N的硫酸溶液。以底物在630 nm波长处的吸光值作为参比值，测定其在492 nm(OD492)波长处的吸光值。

如图10-13中所显示的，优化每一处理条件。检测未处理样品中的核心抗原十分困难，但经这样一种简单的处理后就能够检测到核心抗原。在任何情况下，在健康的人体中观察不到加强信号。这也表明在盐酸胍浓度为2M或者更大及Triton X100浓度为0.2%或更大时，温度范围为4-45℃的条件下，可明显地检测到核心抗原。

实施例11. 检测与测定核心抗原的方法

向100μl血清加入100μl的处理液(6M盐酸胍，0.5 NHCl，12.5%Triton X100，0.75%Tween 20)。在室温下处理30分钟，100μl每种处理混合物用作为样品。

稀释抗-HCV核心抗原单克隆抗体(等量抗体C11-14和C11-11的混合物)，使其在pH为 9.6的0.1M碳酸盐缓冲液中的最后总浓度为6μ g/ml，将每100μl的稀释混合物分布在96-孔的微量滴定板(Nunc制造)上。

在4℃条件下过夜温育该平板后，用0.35 ml 10mM磷酸钠缓冲液洗涤两次(pH 7.3，含0.15M NaCl)。然后，加入0.35 ml的封闭溶液，进一步在室温下温育平板2小时。除去封闭溶液之后，将150μl的反应缓冲液和以上述处理方法获得的测量样品加入到各自的孔中，在室温下温育2小时。

用300μl的洗涤液洗涤平板五次，随后将100μl的过氧化物酶(POD)-标记的单克隆抗体(C11-10)加到平板上，在室温下温育30分钟。用300μl的洗涤液洗涤平板五次，加入100μl的底物溶液(OPD)。室温下温育平板45分钟后，再加入100μl 2N的硫酸溶液。以底物在630 nm波长处的吸光值作为参比值，测定其在492 nm(OD492)波长处的吸光值。作为标准血清的血清组50，定义为1U/ml，用pH为7.3，含1%BSA的10 mM磷酸钠缓冲液中

系列稀释，其也经过类似的处理和测定过程。

图14 显示作为标准血清的血清组50的稀释线。通过剂量依赖性方式确定样品中核心抗原含量，可检测低至大约0.5 mU/ml水平的抗原。因此，该实施例证明了将本发明的十分简单的样品处理方法和单克隆抗体结合起来，可以检测或定量HCV核心抗原。

实施例12.分析血清处理和测定方法中识别的分子形式

每一种处理血清的方法都用来处理0.25 ml血清组13。用凝胶过滤柱(Superdex 200HR, 1X30)分级分离所处理的血清，测定各组分的抗-核心免疫活性。结果如表15中所示。数据表明分子量大约为20-30 kDa的分子可被识别，在以上的提到的预处理过的血清中，病毒中的核心抗原由于病毒的破裂和血清中抗核心抗体的灭活已从各种相互作用中释放出来。

实施例13. 测定血清中核心抗原的方法

通过上述方法，将由AmpliCore HCV监测试剂盒(Roche)测定的具有10^3-10^7 拷贝/ml HCV-RNA的血清，PCR方法，以及正常人血清用来定量血清中的HCV核心抗原。

作为标准血清的血清组50(被定义为1U/ml)，用10mM的磷酸钠缓冲液(pH 7.3, 包含1%BSA)系列稀释，并用类似的方法处理。结果如表8中所示。在所有的试验样品中，正常人血清中的核心抗原均在检测限度以下，在所有的PCR-阳性样品中均可检测到。图16显示其相互关系，揭示了与PCR方法的相关值高达0.8或更大。

表8. HCV-RNA和核心抗原水平

样品#	RNA(千拷贝/ml)	核心抗原(mU/ml)
正常人血清1	-	N.D.
2	-	N.D.
3	-	N.D.
4	-	N.D.
5	-	N.D.
6	-	N.D.
7	-	N.D.
血清组1	50	166.4
7	830	471.1
8	26	61.5
11	240	107.4
13	1600	1426
15	25	40.1
16	400	240.3
19	840	1369
26	87	1093
31	30	45.8
33	16	58.5
39	97	89.0
41	170	43.9
44	180	57.5
49	33	47.7
50	1000	1005
84	8.7	63.5

N.D. 未检测出

实施例14. 检测乙型肝炎病毒(HBV)核心抗原

迄今为止，我们已经解释了检测HCV核心抗原的方法。我们也曾研究了这一处理方法是否适用于对其它病毒中结构蛋白的检测。

HBV核心抗原的单克隆抗体(Tokushu Menneki Kenkyuusho [特殊免疫学研究学院])用pH为9.6的 0.1M 碳酸盐缓冲液稀释成，浓度为3μg/ml，并且分散成100μl的小份。在4℃条件下过夜温育后，用磷酸缓冲液洗涤平板，并将一份350μl的 1% BSA 溶液分布于平板上。在放置在室温下2小时后，吸出1%的BSA 溶液，同时加入200μl的反应溶液。

以重组HBV核心抗原作为标准，将五位经检测HBe呈阳性、抗-HBe抗体呈阴性的患者血清及十位正常人血清作为样品。，向100μl样品加入50μl 处理试剂(7.5 %SDS，0.75 %CHAPS，0.15 %Triton X100，2M尿素，0.1M 组氨酸，0.1M 色氨酸)，在56℃下处理30分钟。在进行处理之后，将其中的50μl 加至充有反应溶液的板孔，并且在室温下温育90分钟。

作为对照(没有经过预处理)，每一种样品各100μl，以50μl纯水稀释，并将50μl的稀释样品用于进行反应。用洗涤溶液洗涤五次之后，加入生物素标记的抗-HBV核心单克隆抗体(等量HBc-2，HBc-5，HBc-14的混合物)，在室温下温育30分钟。再用洗涤溶液洗涤五次之后，加入抗生物素蛋白标记的的碱性磷酸酶，同时使混合物在室温下反应30分钟。

用洗涤溶液洗涤五次之后，加入CDPstar(Emerald II作为敏化剂)，在室温下反应15分钟，并测定其相对化学发光性。连续稀释重组HBV核心抗原的标准曲线如图17中所示，所测定样品中核心抗原的数量如表9中所示。检测限是21ng/ml。当定义核心抗原阳性与阴性的界限值为60 ng/ml时，所有10种正常人的血清，无论经过或未经过预处理，均显示核心抗原阴性，而携带乙型肝炎病毒的患者血清，在未经过预处理情况下检测不到核心抗原，经过预处理的血清，所有试验的血清核心抗原均呈阳性。

可以认为在携带乙型肝炎病毒的患者血清中，预处理破坏了病毒颗粒并且灭活了抗-HBc抗体，所以能够检测出核心抗原。以上所述内容证明了这种样品处理方法对检测除HCV之外的病毒的结构蛋白十分有用，如有作为基因组的DNA的HBV。不必说，该方法同样适合于与HCV有关的病毒，象黄热病毒和逆转录病毒，例如HIV。

表9.

样品#	未处理		预处理	
	HBV核心抗原 (ng/ml)	判断结果	HBV核心抗原 (ng/ml)	判断结果
正常人血清				
样品1	<21	阴性	<21	阴性
2	<21	阴性	<21	阴性
3	<21	阴性	<21	阴性
4	<21	阴性	<21	阴性
5	<21	阴性	46	阴性
6	<21	阴性	<21	阴性
7	<21	阴性	47	阴性
8	<21	阴性	<21	阴性
9	<21	阴性	26	阴性
10	<21	阴性	56	阴性
HBV样品11	<21	阴性	98	阳性
15	<21	阴性	94	阳性
20	<21	阴性	780	阳性
21	<21	阴性	270	阳性
46	<21	阴性	630	阳性

实施例15. 检测未经预处理抗原的有效方法

将含HCV颗粒的样品用加有表面活性剂的反应溶液稀释，研究检测HCV抗原的有效性。

检测HCV核心抗原可利用HCV核心抗原的单克隆抗体通过酶免疫分析法(EIA)进行。在实施例3中获得的单克隆抗体中，C11-3和C11-7用作捕获核心抗原的抗体，C11-10和C11-14用作检测所捕获的核心抗原的抗体。

EIA基本上在以下条件下进行。将单克隆抗体C11-3和C11-7的溶液，各用乙酸盐缓冲液稀释至浓度为4μg/ml，加至微量滴定板上，在4℃下温

育一整夜。用磷酸缓冲液洗涤之后，加入含1% BSA的磷酸缓冲液以进行封闭。往平板上加100μl反应溶液和100μl样品。然后在室温下搅拌和温育平板1.5小时。通过用磷酸缓冲液洗涤除去未反应物质，并向底物加入低浓度的表面活性剂。然后再加入碱性磷酸盐标记的单克隆抗体C11-10与C11-14，在室温下反应30分钟。反应结束之后，通过用磷酸缓冲液洗涤除去未反应物质，加入低浓度的表面活性剂。然后加入底物溶液(CDP-Star/Emeraldll)，在室温下反应20分钟。测量其发光值。

对于上述反应，加入各种表面活性剂以研究它们的作用。通过利用HCV-阳性血清，其中对HCV的抗体滴度在检测限之下，并且实际上不包含任何对HCV的抗体，基于发光值的核心抗原的活性，按相对于正常人血清发光值(定义为1.0)的比来表示。结果如表10和11所示。

表10. 相对正常人血清的反应性(S/N比)

			45号	46号	3号	7号	19号
无添加剂			15.67	1.00	1.15	1.34	1.19
判断标准			>30.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
添加剂	HLB	(%)					
阴离子型表面活性剂	40.0						
十二烷基硫酸钠		0.5	5.42				
		2.0	5.73				
十二烷基-N-肌氨酸钠		0.5	12.79	2.70			
		2.0	125.43	7.27	3.83	3.70	6.71
全氟烷基羧酸		0.5	10.55	1.27			
S-113		2.0	6.72	0.91			
阳离子型表面活性剂							
溴化鲸蜡基三甲基铵		0.5	72.97	7.42	3.09	3.52	5.43
		2.0	44.55	5.35			
氯化月桂基吡啶镒		0.5	53.43	4.70	2.05	1.52	2.33
		2.0	12.44	2.49			
n-月桂基三甲基铵		0.5	66.84	4.43	2.41	1.63	2.67
		2.0	27.98	3.77			
溴化十四烷基铵		0.05	14.69				
氯化正辛基三甲基铵		0.5	12.57		1.00	0.74	0.99
		2.0	11.46				
氯化正癸基三甲基铵		0.5	17.50		0.88	0.80	0.72
		2.0	45.21		1.12	1.08	1.41
两性表面活性剂							
CHAPS		0.5	29.57				
		2.0	25.32		1.63	1.82	2.42
全氟烷基甜菜碱S-132 (得自ASAHI GLASS)		0.5	11.07	1.61			
		2.0	10.77	1.49			
3-(月桂基二甲基铵)-1-丙烷-磺酸		0.5	57.69				
		2.0	113.19		4.57	3.44	5.26

表11.相对正常人血清的反应性(S/N比)

			45号	46号	3号	7号	19号
无添加剂			15.67	1.00	1.15	1.34	1.19
判断标准			>30.0	>2.0	>2.0	>2.0	>2.0
添加剂	HLB	(%)					
非离子型表面活性剂							
MEGA-10		0.5	32.11	3.38			
		2.0	38.49	3.53	1.97	1.87	2.84
吐温20	16.7	0.5	16.88				
		2.0	12.36				
吐温40	15.6	0.5	14.96		1.02	0.99	1.41
		2.0	19.10		1.32	1.25	1.64
吐温80	15.0	0.5	12.45		1.33	1.23	1.10
		2.0	17.47				
NonidetP-40	13.1	0.5	43.14		3.09	2.95	4.58
辛基葡糖苷		0.5	12.48		0.90	0.60	0.97
		2.0	25.07		1.92	0.20	2.63
TritonN101	13.4	0.5	26.50		1.85	1.62	2.70
		2.0	60.84		2.23	2.28	3.81
Triton X100	13.5	0.5	27.72				
		2.0	71.08		2.90	2.34	3.86
TritonX114	12.4	0.5	31.49		2.04	1.65	2.77
		2.0	58.62		1.92	2.11	2.51
TritonX305	17.3	0.5	10.50		0.94	0.97	1.08
		2.0	25.91		1.30	1.24	1.87
TritonX405	17.9	0.5	12.54		0.86	0.78	1.04
		2.0	24.92		1.21	1.24	1.25
其它							
氯化苯甲基二甲基铵		0.5	5.54	1.00			
		2.0	7.01	1.12			
三乙基胺		0.5	3.89	1.12			
表面活性剂混合物							
2%月桂基-N-肌氨酸钠 +2%Triton X100			244.13		6.11	5.50	12.71

结果揭示加入含有12-14 HLB的非离子型表面活性剂，例如作为其代表物的Triton X100，引起发光值的增加，因而使得HCV-阳性血清的检测敏感性较正常人的血清有所提高。类似地，其也说明如十二烷基-N-肌氨酸钠和十二烷基三甲氨酸所代表的，加入结构中具有直链烷基团（该烷基同时具有十个或更多个碳原子和仲胺、叔胺或季胺）的表面活性剂引起HCV-阳性血清的检测敏感性增加。加入具有不超过8个碳原子的直链烷基的表面活性剂（氯化正辛基三甲基铵），观察不到敏感性的增加。同时也发现，通过混合和加入这两种表面活性剂（如表11中所示，将2%十二烷基-N-肌氨酸钠和2%Triton X100 混合），可进一步提高HCV-阳性血清的检测敏感性。

实施例16. 检测HCV感染之后和抗-HCV抗体出现之前时段（窗口期间）内样品中的核心抗原

通过加入2%的Triton X100和2%十二烷基-N-肌氨酸钠至主要反应溶液中，按照实施例15的方法测量市售的血清转化组PHV905（B.B.I公司）。当用抗-HCV抗体（Ortho EIA 3.0）试验测定时，使用的PHV905组在开始观察21天之后转变为阳性（血清号PHV905-7）。在试验过程中，抗体滴度以截止指标（S/CO）表示，其值为1.0或更大时判断为阳性。HCV核心抗原活性以相对于正常人血清的反应性表示，定义正常人血清反应性值为1.0。

如图12中所示的，抗-HCV抗体出现之前观察核心抗原的活性，加入表面活性剂，使核心抗原从病毒颗粒暴露出来，其与固定化的单克隆抗体进行反应，由此进行核心抗原的检测。

表 12

血清号	观察开始后天数	HCV核心抗原活性(S/N)	抗-HCV抗体滴度(S/CO)
PHV905-1	0	5.32	0.000
905-2	4	8.30	0.000
905-3	7	15.63	0.000
905-4	11	4.37	0.300
905-5	14	14.75	0.700
905-6	18	7.57	0.700
905-7	21	4.82	2.500
905-8	25	3.31	5.000
905-9	28	1.61	5.000

基于专利合作条约细则13-2中所定义的微生物的参考信息

保藏处名称: 工业科学和技术机构国家生物科学和人类技术研究所

保藏处地址: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba市, Ibalaki pref., 日本(邮政编码 305)

(1)微生物代号: HC11-3

保藏日期: 1997年7月4日

保藏号: FERM BP-6002

(2)微生物代号: HC11-7

保藏日期: 1997年7月4日

保藏号: FERM BP-6003

(3)微生物代号: HC11-10

保藏日期: 1997年7月4日

保藏号: FERM BP-6004

(4)微生物代号: HC11-11

保藏日期: 1997年7月4日

保藏号: FERM BP-6005

(5)微生物的代号: HC11-14

保藏日期: 1997年7月4日

保藏号: FERM BP-6006

序列表

<110> Tonen公司

<120> 用于检测或测定丙型肝炎病毒的方法

<160> 8

<210> 1

<211> 177

<212> PRT

<213> 丙型肝炎病毒

<400> 1

```
Met Lys Ala Ile Phe Val Leu Lys Gly Ser Leu Asp Arg Asp Pro Glu
                  5                  10                  15
Phe Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr
             20                  25                  30
Asn Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val
         35                  40                  45
Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg
     50                  55                  60
Ala Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg
 65                  70                  75                  80
Pro Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro
                 85                  90                  95
Gly Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly
            100                 105                 110
Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp
        115                 120                 125
Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr
    130                 135                 140
Cys Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe
145                 150                 155                 160
Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu
                165                 170                 175
Asp
```

<210> 2

<211> 160

<212> TRP

<213> 丙型肝炎病毒

<400> 2

```
Met Gly Thr Asn Pro Lys Pro Gln Arg Lys Thr Lys Arg Asn Thr Asn
                5                  10                  15
Arg Arg Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly
            20                  25                  30
Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala
        35                  40                  45
Thr Arg Lys Thr Ser Lys Arg Ser Gln Pro Arg Gly Gly Arg Arg Pro
    50                  55                  60
Ile Pro Lys Asp Arg Arg Ser Thr Gly Lys Ser Trp Gly Lys Pro Gly
65                  70                  75                  80
Tyr Pro Trp Pro Leu Tyr Gly Asn Glu Gly Leu Gly Trp Ala Gly Trp
                85                  90                  95
Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro
            100                 105                 110
Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys
        115                 120                 125
Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Phe Arg Val Gly Ala Phe Leu
    130                 135                 140
Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp
145                 150                 155                 160
```

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu
5 10 15
Leu Pro Arg Arg
20

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 4

Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg
5 10

<210> 5
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223>
<400> 5

Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg His Arg
1 5 10 15
Ser Arg Asn Val Gly
20

<210> 6
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223>

<400> 6

Asp Pro Arg His Arg Ser Arg Asn Val Gly Lys Val Lle Asp Thr Leu
1 5 10 15

Thr Cys Gly Phe
20

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220> 探针

<223> 合成DNA

<400> 7

gaattcatgg gcacgaatcc taaa 24

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220> 探针

<223> 合成DNA

<400> 8

ttagtcctcc agaacccgga c 21

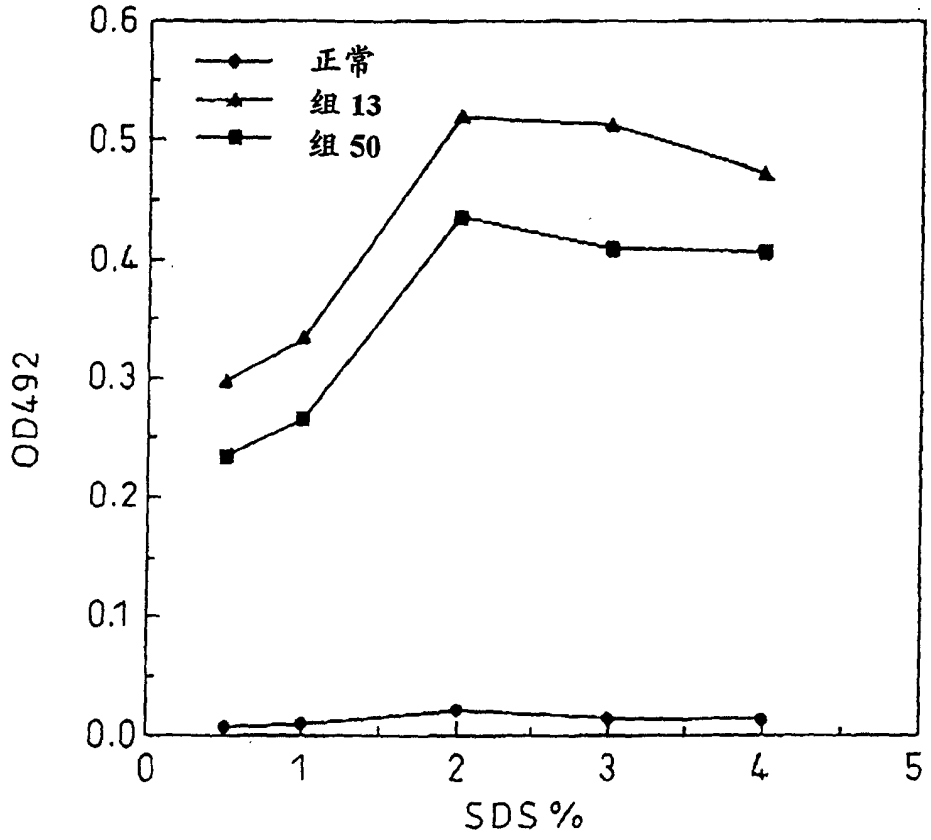


图 1

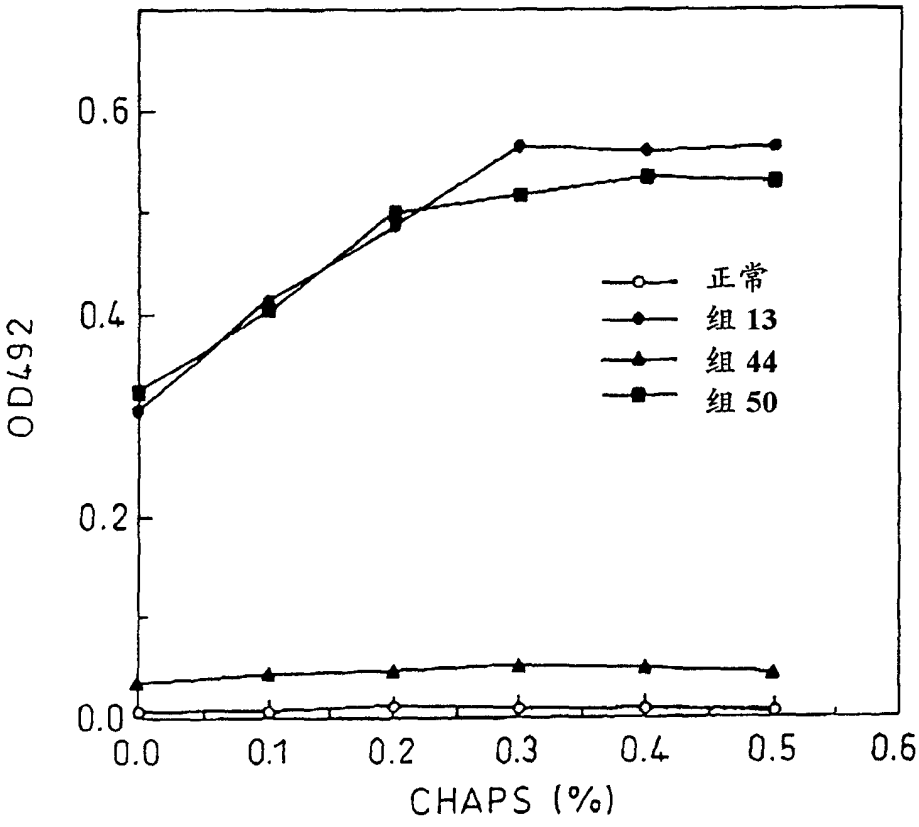


图 2

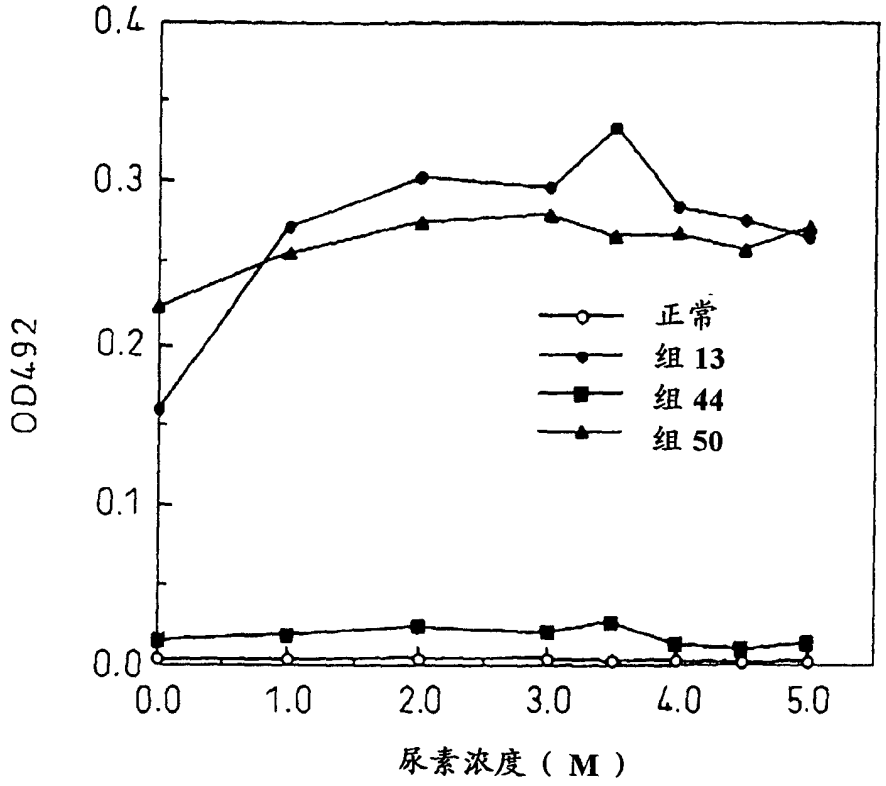


图 3

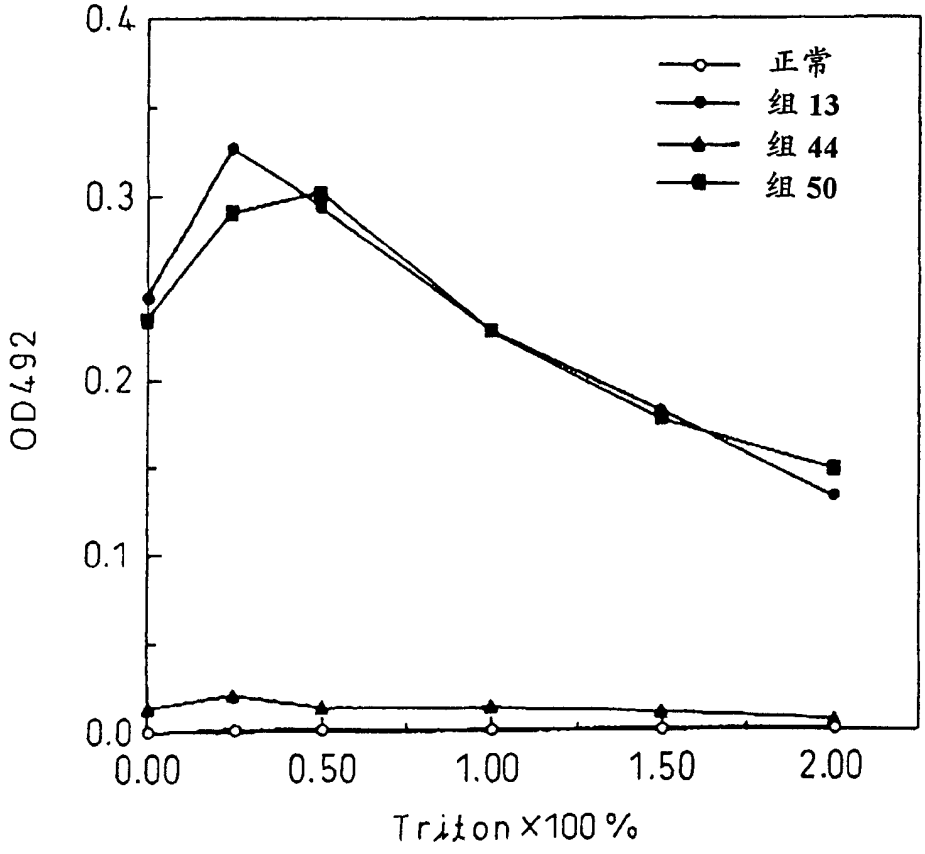

0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
OD492
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
Triton×100%
正常
组 13
组 44
组 50

图 4

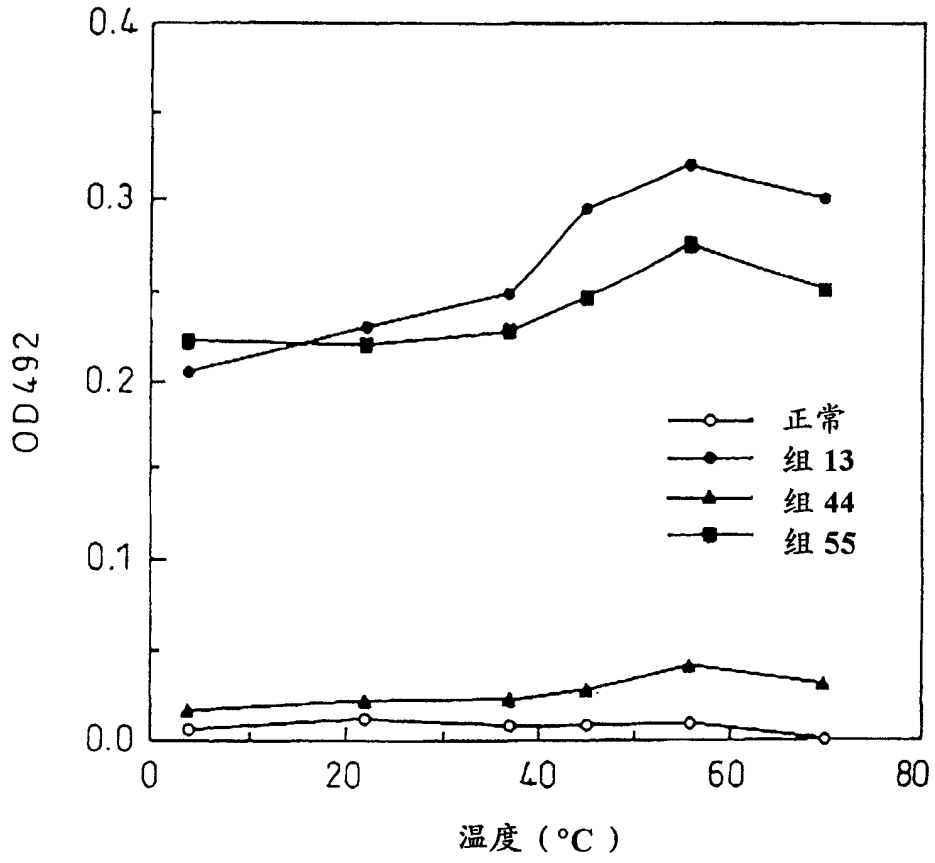


图 5

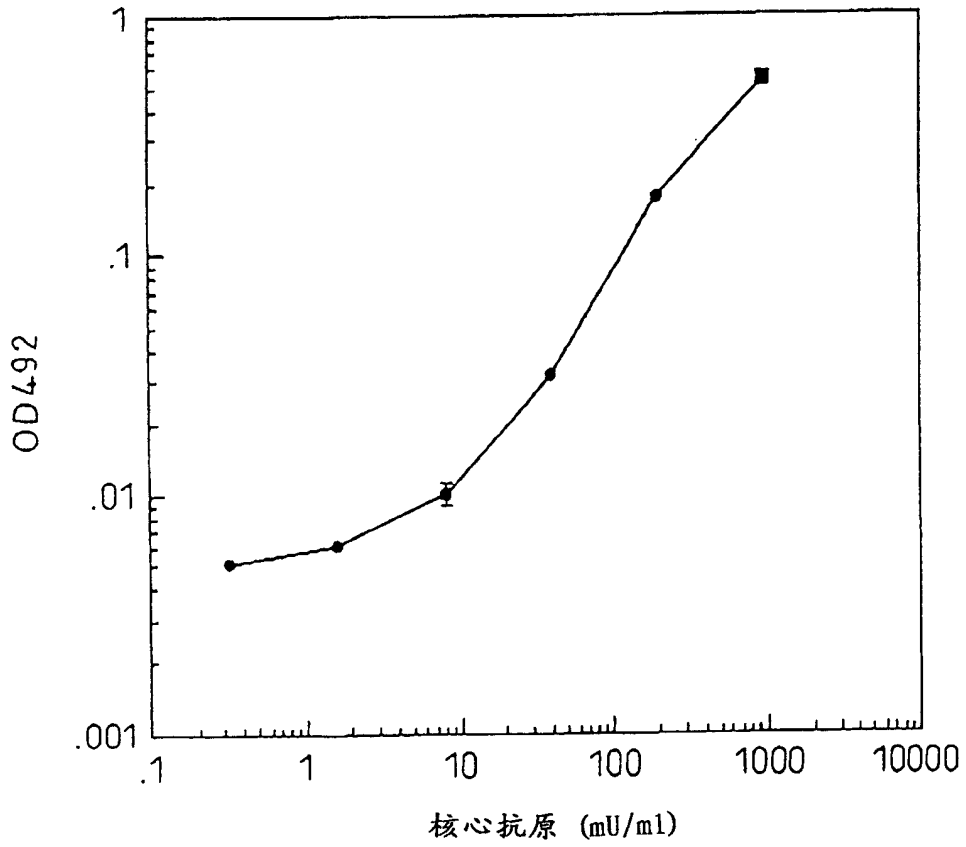


图 6

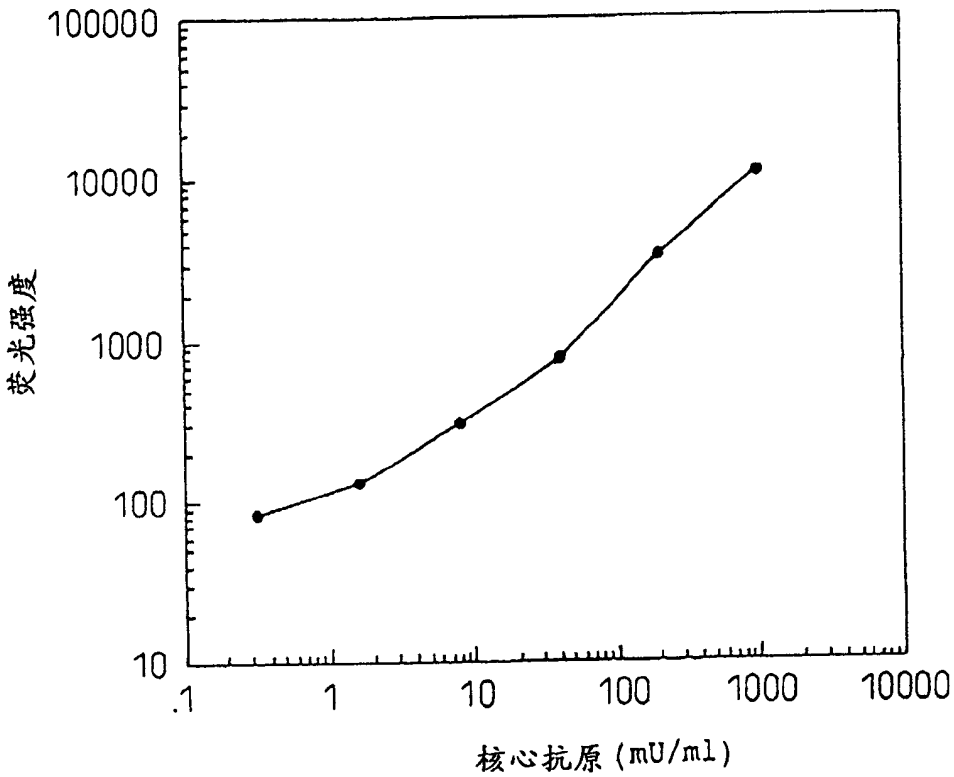


图 7

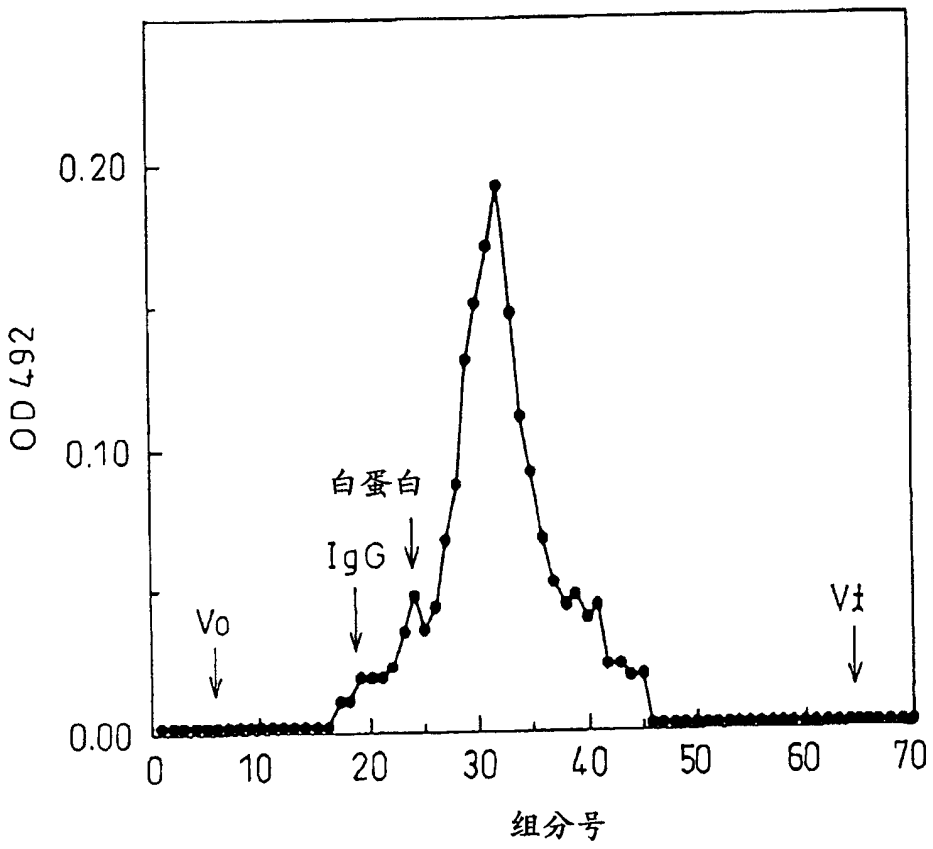


图 8

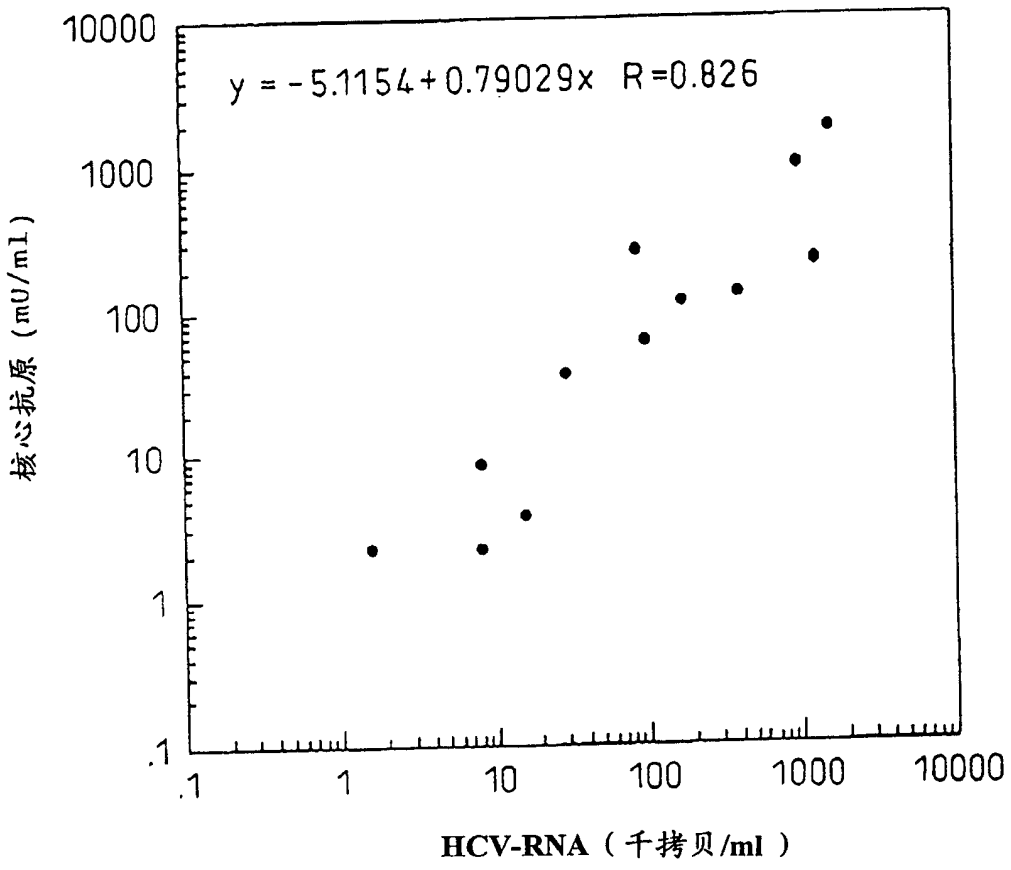

y = -5.1154+0.79029x R=0.826
10000
1000
100
10
1
.1
.1
1
10
100
1000
10000
核心抗原（mU/ml）
HCV-RNA（千拷贝/ml）

图 9

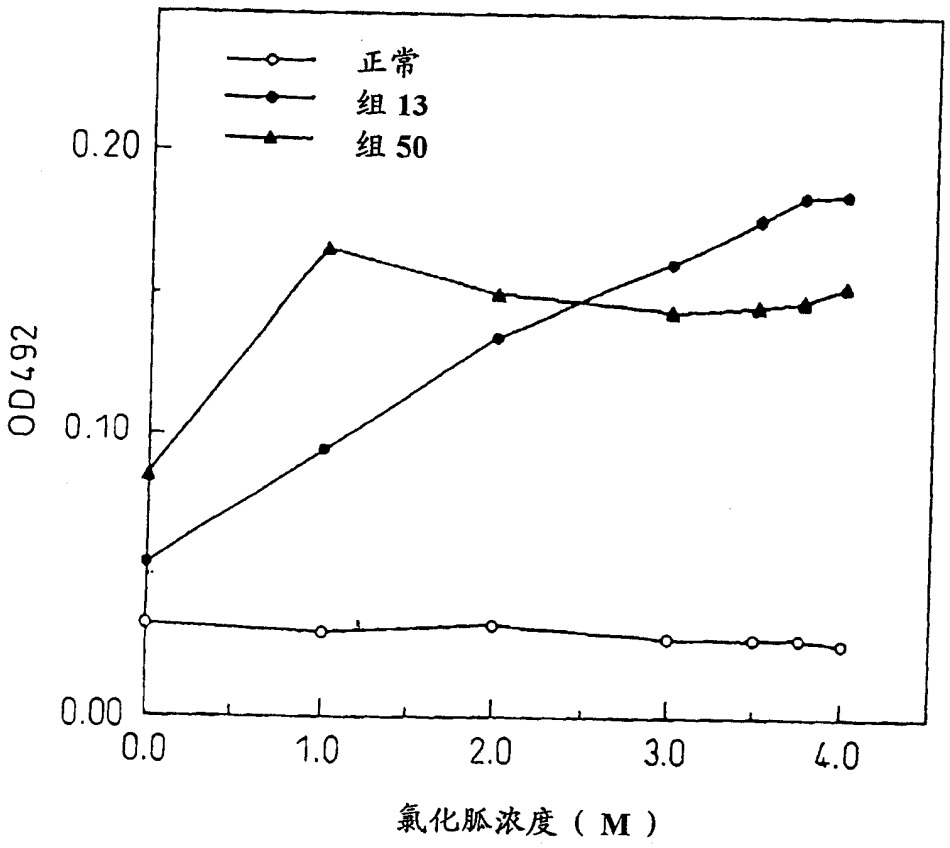


图 10

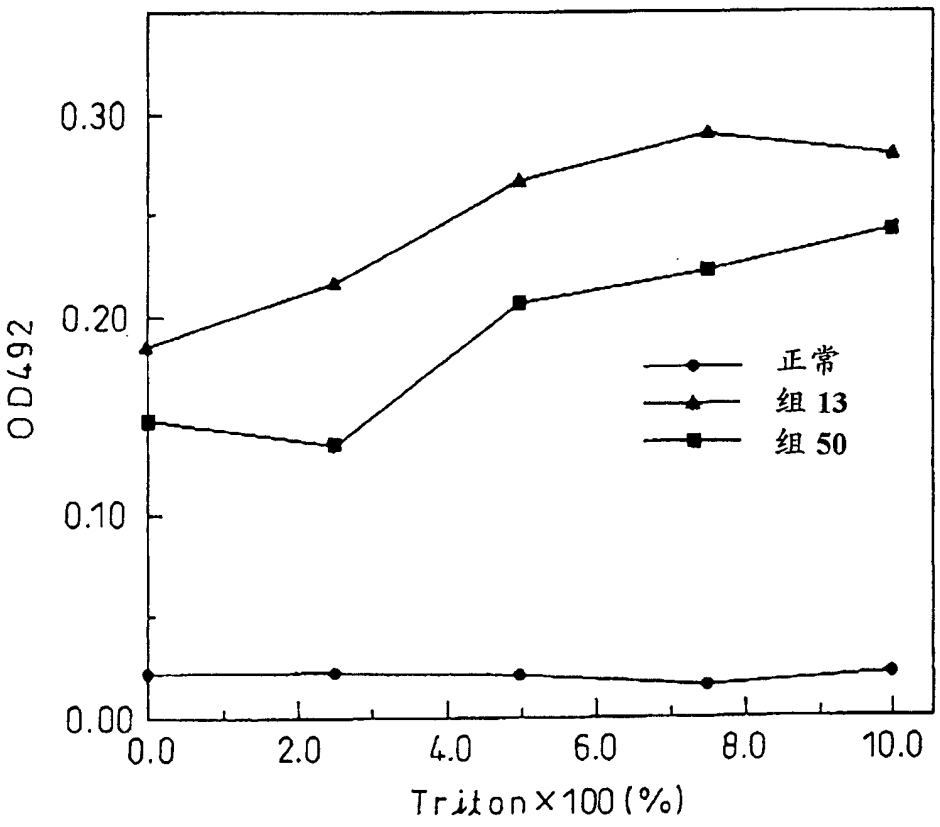


图 11

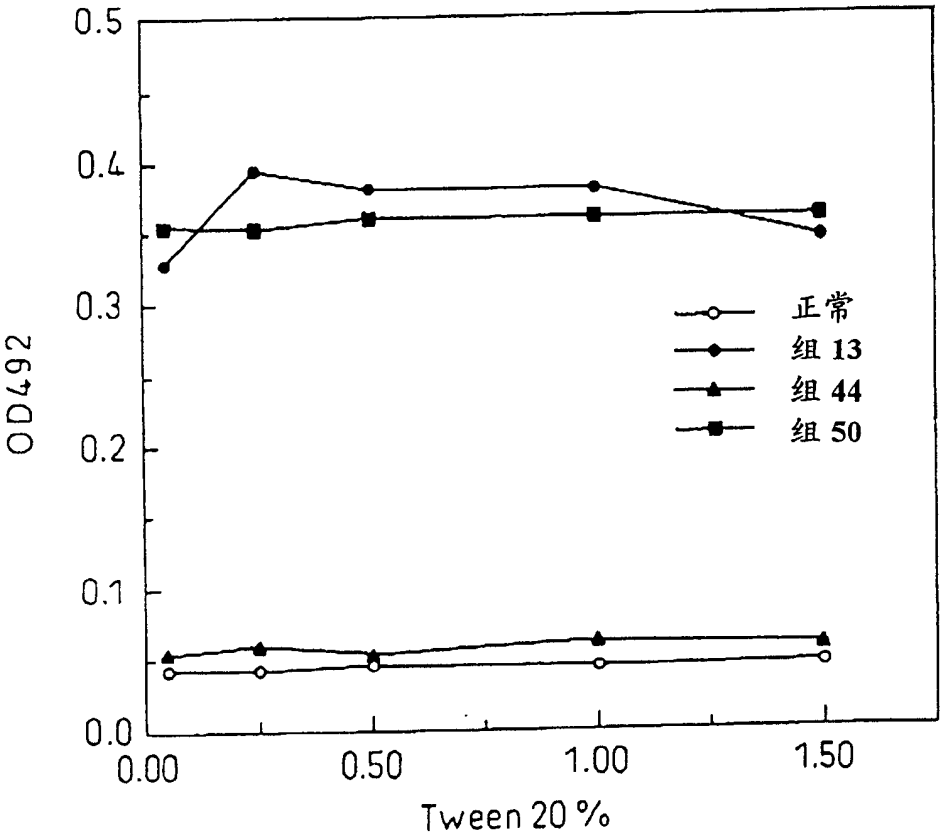


图 12

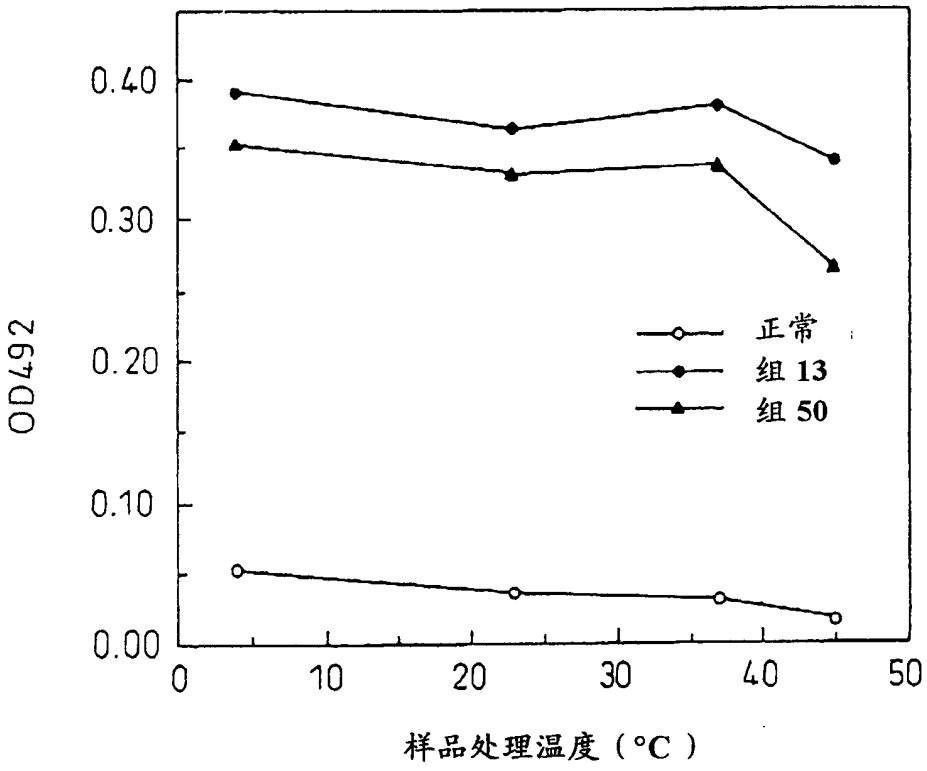


图 13

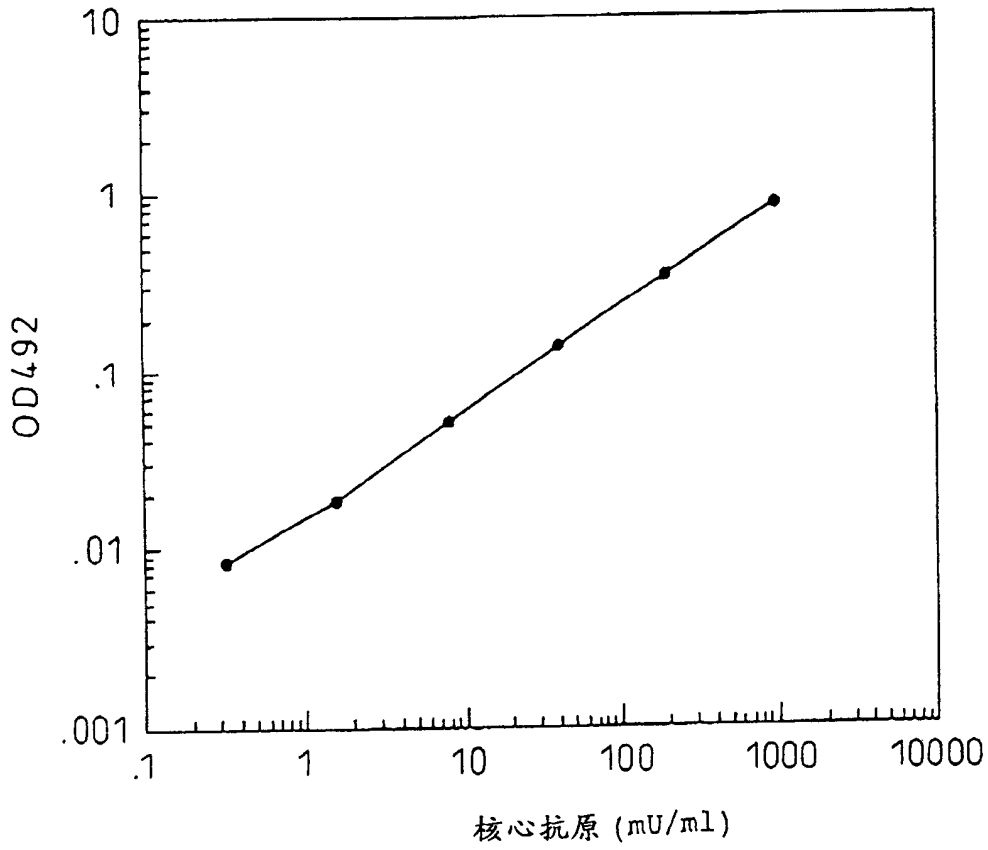


图 14

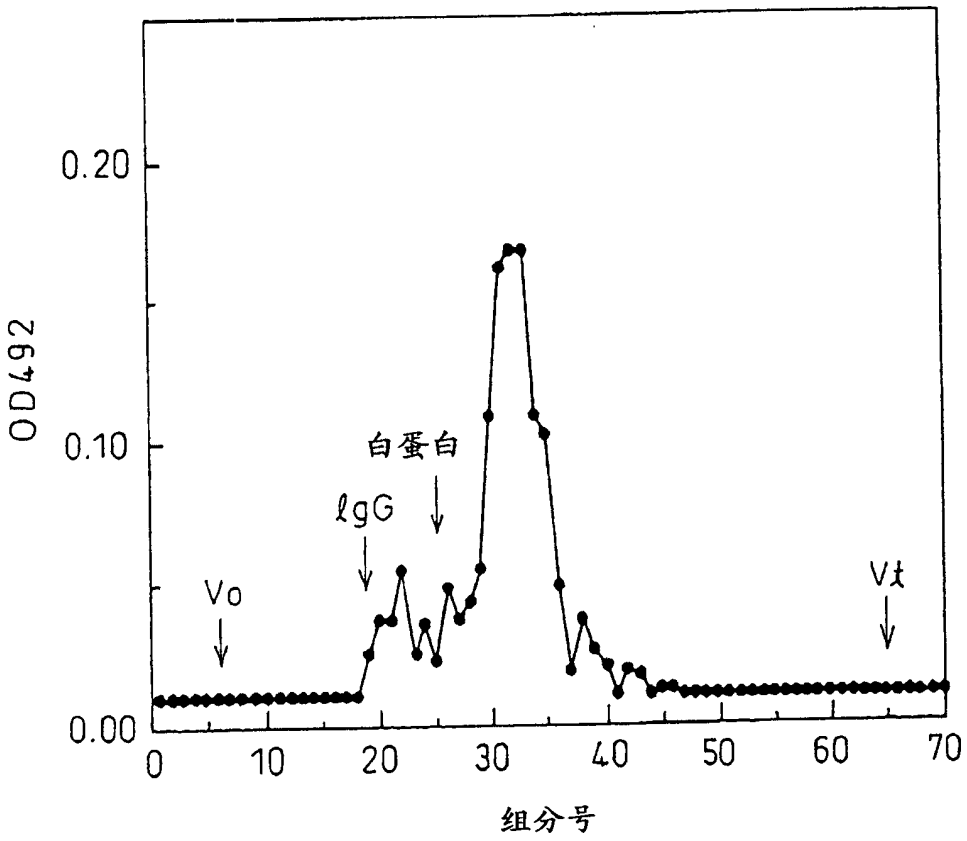


图 15

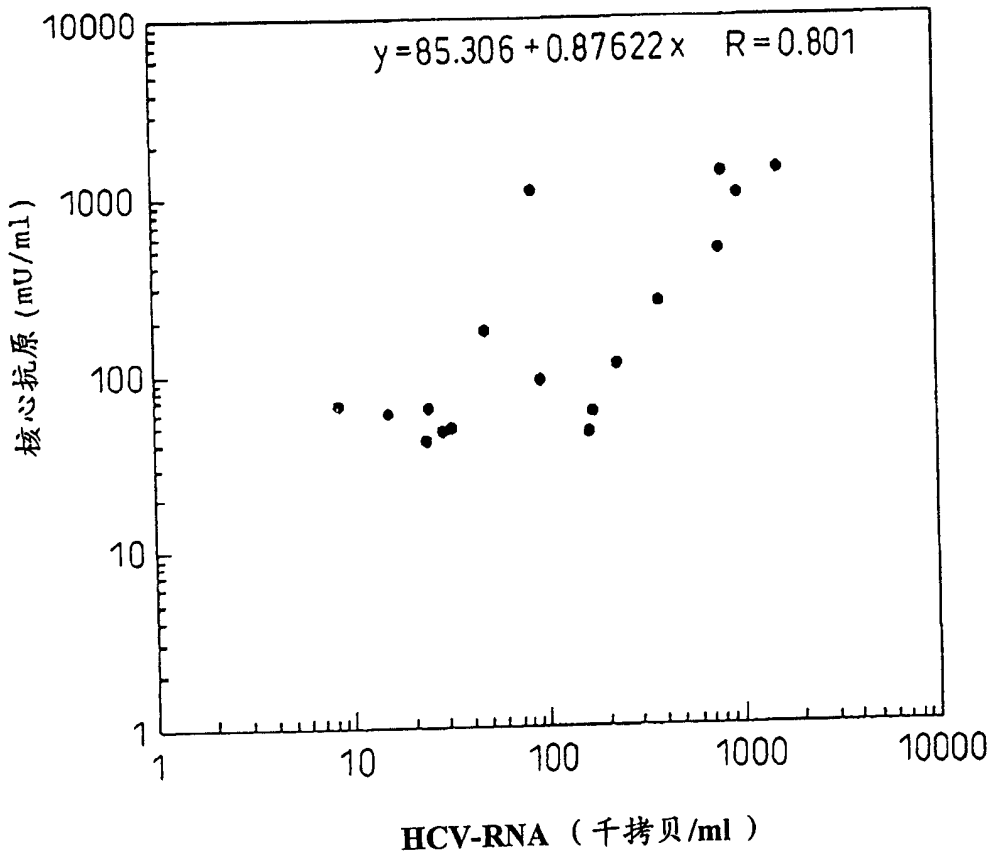

y=85.306+0.87622x R=0.801
10000
1000
100
10
1
核心抗原（mU/ml）
1
10
100
1000
10000
HCV-RNA（千拷贝/ml）

图 16

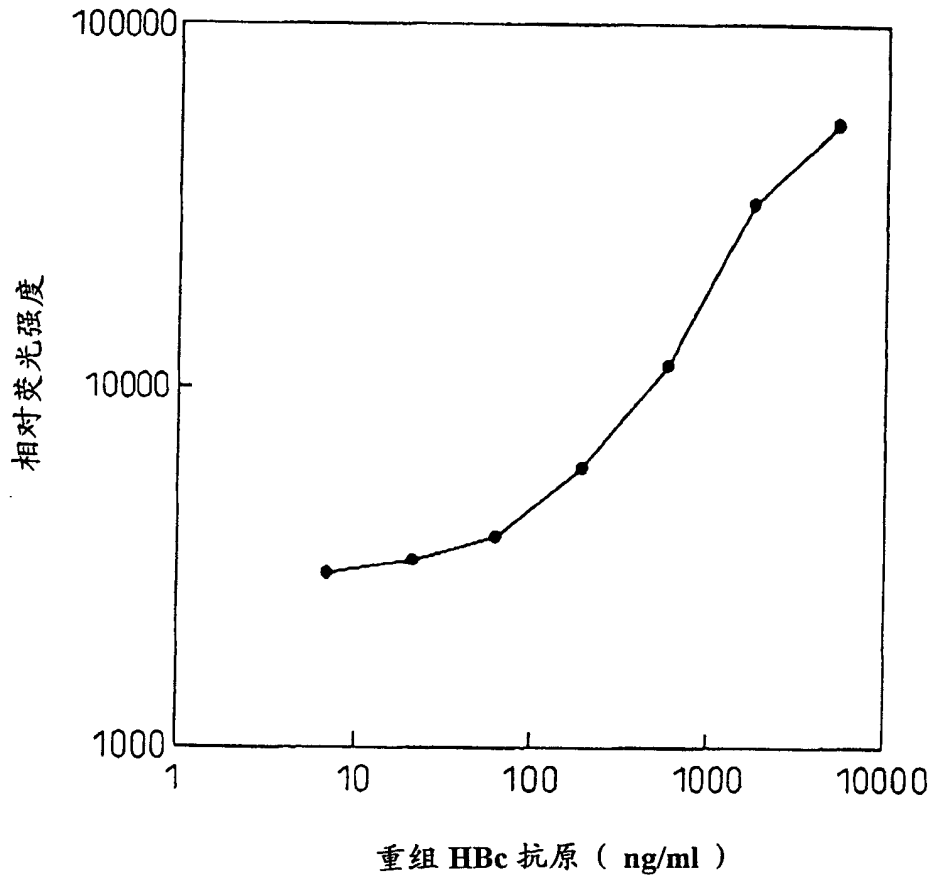


图 17