

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610013151.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月2日

[11] 公开号 CN 1811451A

[22] 申请日 2006.1.27

[21] 申请号 200610013151.6

[71] 申请人 天津市卫生防病中心

地址 300011 天津市河东区华龙道70号天津市卫生防病中心

共同申请人 天津医科大学 南开大学

[72] 发明人 王擷秀 陈锦英 白钢 杨东靖

[74] 专利代理机构 天津市学苑有限责任专利代理事务所

代理人 李明

权利要求书3页 说明书11页 附图1页

[54] 发明名称

检测肾综合征出血热抗体的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种检测肾综合征出血热(HFRS)抗体的方法,属于生物技术领域,涉及利用免疫磁性捕获技术和酶标记重组病毒的抗原蛋白,对由汉坦病毒所致HFRS抗体检测技术。其目的是为HFRS的早期诊断提供一种简便、快速、灵敏、特异的适于基层单位使用的检测方法。本发明将pET原核表达系统表达的汉坦病毒代表株Z10和L99的S基因重组蛋白纯化,标记生物素或辣根过氧化物酶。将磁性微球连接羊抗人IgM(μ 链)或羊抗人IgG抗体,使其致敏,得到用于检测汉坦病毒汉城型或汉滩型的特异性IgM/IgG抗体的免疫磁性微球,建立检测血清标本中HFRS特异性IgM/IgG抗体的快速、灵敏的免疫磁性微球-ELISA方法。

1. 检测肾综合征出血热抗体的方法, 其特征在于它采用羊抗人 IgM (μ 链) 或羊抗人 IgG 抗体与磁性微球相连, 制备免疫磁性微球作为固相吸附载体, 建立检测肾综合征出血热病人血清 IgM/IgG 抗体的新型免疫磁性微球-ELISA 方法, 其主要步骤如下:

1) 生物素或辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的汉坦病毒 (HV) S 基因重组蛋白的制备;

2) 用于捕获人血清抗体 IgM/IgG 的免疫磁性微球的制备;

3) 检测肾综合征出血热病人抗体。

2. 按照权利要求 1 所述的检测肾综合征出血热抗体的方法, 其特征在于: 制备的酶标记重组蛋白是汉坦病毒 S 基因表达的重组蛋白, 其制备工艺包括下述过程:

1) 病毒的培养及 RNA 提取:

选取的汉坦病毒 S 基因来源于我国优势流行型标准病毒株 Z10 和 L99, 保藏单位是中国疾病预防控制中心 (CDC) 病毒病预防与控制所, 将 Z10、L99 病毒株按常规接种 Vero-E6 细胞, 间接免疫荧光法 (IFA) 检查细胞感染程度, 在 75%~100% 细胞已感染时, 收取细胞, 细胞总 RNA 的提取使用 Qiagen 公司的 RNeasy Mini Kit, 按说明书的步骤提取;

2) 利用 RT-PCR 技术获取编码目的蛋白的 S 基因:

将提取感染细胞的总 RNA 作为逆转录的模板合成 cDNA, 逆转录合成 cDNA 的引物序列为 P14 (TAGTAGTAGACTCC), 使用 TaKaRa 公司的 RNA Kit (AMV) 试剂盒按说明操作, 逆转录产物直接用于 PCR 扩增, 扩增 Z10 株 S 基因的引物序列 P1 和 P2 分别为 GGGGTACCGCAACTATGGAGGAACTAC 和 CGCTCTAGAAGTTTTAAAGGCTCTTGG; PCR 扩增 L99 株 S 基因的引物序列 P3 和 P4 分别为 CGCATCGATGGCAACTATGGAAGAAATC 和 TCGGGTACCAATTCATAGGTTCTTGG, 上述引物序列均由英骏生物技术有限公司合成, 反应条件为: 94°C 2 min 预变性; 94°C 50 sec, 50°C~62°C, 50~75 sec, 72°C 90 sec, 共 30~35 个循环; 72°C 延伸 5~10 min, 上述 PCR 扩增产物经序列分析, 其结果分别与 GenBank 登录的 Z10 株序列 (AF184987) 和 L99 株序列 (AF288299) 相一致, 测序工作由英骏生物技术有限公司提供服务;

3) 基于大肠杆菌 BL21 菌株的汉坦病毒 S 基因 pET-32a 表达系统的构建:

用内切酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 分别双酶切 L99 病毒株的 S 基因 PCR 纯化产物及 pET-32a 载体, 用 *SacI* 和 *XhoI* 分别双酶切 Z10 病毒株的 S 基因 PCR 纯化产物及 pET-32a 载体,

回收目的片段, T4 连接酶连接后转入 *E. coli*BL21 菌株的感受态细胞, 重组质粒经 PCR 及双酶切鉴定, 获得含有 pET32a-L99S 及 pET32a-Z10S 重组质粒的 *E. coli*BL21 原核表达系统;

4) 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的表达和鉴定:

将重组菌株接种于 2~5mL 含有氨苄青霉素 100 μ g/mL 的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时, 用终浓度为 0.1~2mmol/L 的 IPTG 诱导 4 小时, 收集的菌体用 2 \times 凝胶上样缓冲液重悬, 100 $^{\circ}$ C 处理 1~10min, 使菌体裂解, 裂解物进行 SDS-PAGE 电泳分析; 并采用全湿或半干转印法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 进行 Western-blot 鉴定, 其中一抗和二抗分别为 HFRS 患者混合血清和 1:100~500PBS 稀释的辣根过氧化酶标记羊抗人 IgG, 其中 PBS 浓度在本方法中皆为 0.01mM, pH 为 7.4, SDS-PAGE 结果显示构建的重组菌株 pET32a-L99S/*E. coli*BL21 及 pET32a-Z10S/*E. coli*BL21 均表达一个 67.1 kDa 目的蛋白, Western-blot 的结果为该重组蛋白与 HV 感染病人血清反应出现特异性条带, 表明其具有良好的抗原性;

5) 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的提取和纯化:

将诱导后的发酵菌液经 5000r/min 离心 10min, 收集菌体用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗三遍, 菌体沉淀用 PBS 重悬, 超声破碎菌体, 12000r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 1 小时, 收集上清, 最后用镍离子亲和层析柱 (Ni-NTA) 纯化表达的蛋白, 收集洗脱液, 经过真空冷冻干燥, 制备出汉坦病毒 S 基因重组蛋白纯品, 经 SDS-PAGE 或 HPLC 色谱法测定重组蛋白的纯度为 95~98%;

6) 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的标记, 它包括生物素和 HRP 标记两种方法:

(A) 标记生物素的实施步骤如下: 取纯化后的表达蛋白 10~30mg, 溶于 0.05~0.2M/L NaHCO₃ (pH8.5) 缓冲液 2~10mL 中, 加入活化生物素 3~5mg, 搅拌, 室温反应 1~4 小时, 加入甘氨酸 50~100mg, 终止反应, 生物素标记的重组蛋白经饱和硫酸铵沉淀 2 次后, 沉淀物以 2~5mLPBS 溶解, 透析后, 真空冷冻干燥保存;

(B) 利用过碘酸钠法标记 HRP 的实施步骤如下: 将 1~5mg HRP 溶于 1~10mL 蒸馏水中, 加入新鲜配制的 0.06M NaIO₄ 溶液 0.1~1mL, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 放置 30min, 加入 0.16M 乙二醇-NaCl 溶液 0.5~1mL, 预冷无水乙醇 1~10 mL 室温放置 30min, 离心, 取沉淀物用蒸馏水使之完全溶解, 即为醛化 HRP, 加入 5~20mg 表达蛋白的溶液 1mL, 混匀并装透析袋, 用 0.05M 碳酸盐缓冲液 pH9.5, 4 $^{\circ}$ C 缓慢搅拌透析 6~18 小时, 使之结合, 然后吸出加入 NaBH₄ 或 KBH₄ 溶液 (5mg/mL) 0.05~0.2mL, 4 $^{\circ}$ C 放置 2 小时, 加入等体积饱和硫酸铵, 使沉淀物完全溶于 PBS 中, 并透析过夜, 次日再离心, 除去不溶物即得酶标记物, 用 PBS 加至 1~5mL 进行测定后, 真空冷冻干燥保存。

3. 按照权利要求 1 所述的检测肾综合征出血热抗体的方法, 其特征在于: 制备用于捕获人血清抗体 IgM/IgG 的免疫磁性微球, 是将中国专利 ZL03144274.9 活化的磁

性微球与羊抗人 IgM (μ 链) /羊抗人 IgG 的抗体连接, 致敏为免疫磁性微球; 具体作法是: 在 2~8℃ 下, 取上述活化好的磁性微球 1~5 mL, 加入经 pH9.6, 0.1M 碳酸盐缓冲液稀释过的羊抗人 IgM (μ 链) /羊抗人 IgG 5~10 mL, 充分反应后经 PBS 淋洗, 加入 10% 兔血清 (RSA) 5~10 mL 于 37℃ 封闭 1 小时后, 用 PBS 洗净即可得到用于 IgM/IgG 检测的免疫磁性微球。

4. 按照权利要求 1 所述的检测肾综合征出血热抗体的方法, 其特征在于: 检测肾综合征出血热病人抗体的方法, 具体实验步骤为: 分别在含有 15 μL 已被羊抗人 IgM (μ 链) /羊抗人 IgG 致敏的免疫磁性微球的离心管中加入 1:50~100 PBS 稀释的待测病人血清 1 mL, 阴性和阳性对照各 1 mL, 37℃ 振荡反应 1 小时, 在离心管壁外以磁铁聚集固定微球, 弃去反应液, 用 PBS 反复清洗 3 次, 然后进行酶标重组抗原显色判定, 方法是在实验离心管中加入 80~100 倍 PBS 稀释的 HRP 或生物素标记的重组蛋白 1 mL, 37℃ 振荡反应 1 小时, 清洗后再加入新配制的显色底物 1 mL, 反应 10 min, 肉眼观察颜色变化, 空白和阴性对照无色, 阳性对照显蓝色, 则结果成立, 检测管显色深于或等于阳性对照颜色则表明实验结果呈阳性, 或者测定 OD_{450} 值计算 $P/N \geq 2.1$ 的判定为阳性; $P/N < 2.1$ 的判定为阴性, 其中 $P/N = (\text{待测血清 } OD_{450} \text{ 值} - \text{空白对照 } OD_{450} \text{ 值}) / (\text{阴性对照 } OD_{450} \text{ 值} - \text{空白对照 } OD_{450} \text{ 值})$ 。

检测肾综合征出血热抗体的方法

技术领域:

本发明涉及肾综合征出血热(HFRS)病原——汉坦病毒(HV)S基因重组蛋白的制备和标记及免疫磁性微球的制备,利用免疫磁球捕获技术,建立新型、快速、灵敏的免疫磁性微球-ELISA法,检测肾综合征出血热病人血清标本中特异性IgM/IgG抗体。属于生物技术领域。

技术背景:

我国是受肾综合征出血热危害最为严重的国家,每年发病人数占世界报道总数的90%以上,病死率极高,为我国法定报告传染病病死率居前五位传染病之一,引起国内外的关注。该病的诊断和防治工作的研究大多由我国学者进行。该病起病急,临床表现错综复杂,肾脏损害突出,尚无特效的药物,危害严重,因此早期诊断和早期治疗是改善病人预后降低病死率的关键。为此,该病的实验室辅助诊断的研究就显得极为重要。

对肾综合征出血热的早期采用RT-PCR方法进行病毒核酸的检测仅限于发病后3~5天的病人,而病人血清抗体则随着病程的延长逐渐升高并持续较长时间,故检测病人血清中的特异性IgM/IgG抗体的方法辅助临床诊断占有很重要的地位,并可用于疾病监测。现临床上大多采用间接免疫荧光法(IFA)或ELISA检测特异性IgM/IgG抗体。从方法学上讲,IFA方法特异性强,相对灵敏度稍差,常用来做确证实验;ELISA方法采用酶学级联放大效应,灵敏度有所提高,但是在检测IgM抗体时需用捕获法以排除血中其它成分(如类风湿因子等)的干扰,否则容易出现假阳性。并且两者都需要一定的仪器设备,难以推广,而且现有的ELISA方法使用进口的酶标板体积较大不便于携带,且成本较高,这无疑就影响了基层医疗单位使用该方法进行早期诊断,所以研究一种提高试验的灵敏度、而且操作简单、便于携带、快速、灵敏、特异、利于推广的检测方法,以适合基层开展HFRS的诊断和疾病监测工作,是当务之急。

发明内容:

针对上述问题,本发明的目的是为肾综合征出血热的早期诊断和疾病监测提供一种便于携带、简便、快速、灵敏、特异的检测方法,涉及汉坦病毒S基因重组蛋白的制备和标记、免疫磁性微球的制备,免疫磁性微球-ELISA方法的建立。

本发明采用基因工程技术将国内优势流行型汉坦病毒标准株:SEO型(汉城型)L99株及HTN型(汉滩型)Z10株的S基因定向克隆入pET32a载体,转入*E. coli*BL21

感受态，经 IPTG 诱导表达，用镍离子亲和层析 (Ni-NTA) 纯化，获得高纯度的蛋白抗原，标记辣根过氧化物酶 (HRP) 或生物素，作为标记抗原；并对琼脂糖、聚乙烯醇、纤维素等不同材质的磁性微球进行活化，连接羊抗人 IgM (μ 链) 或羊抗人 IgG 抗体，得到可以用于检测特异性 IgM/IgG 抗体的免疫磁性微球。用上述的免疫磁性微球代替传统 ELISA 的酶标板作为固相吸附载体建立 ELISA 检测方法，用于肾综合征出血热诊断或疾病监测。

检测肾综合征出血热抗体的方法，其具体方案是采用羊抗人 IgM (μ 链) 或羊抗人 IgG 抗体与磁性微球相连制备免疫磁性微球作为固相吸附载体，建立检测肾综合征出血热病人血清 IgM/IgG 抗体的新型免疫磁性微球-ELISA 方法，其主要步骤如下：

- 1) 生物素或 HRP 标记的汉坦病毒 S 基因重组蛋白的制备；
- 2) 用于捕获人血清抗体 IgM/IgG 的免疫磁性微球的制备；
- 3) 检测肾综合征出血热病人抗体。

需要说明的是：

制备的酶标记重组蛋白是汉坦病毒 S 基因表达的重组蛋白，其制备工艺包括下述过程：

- 1) 病毒的培养及 RNA 提取：

选取的汉坦病毒 S 基因来源于我国优势流行型标准病毒株 Z10 和 L99，保藏单位是中国疾病预防控制中心 (CDC) 病毒病预防与控制所，将 Z10、L99 病毒株按常规接种 Vero-E6 细胞，间接免疫荧光法 (IFA) 检查细胞感染程度。在 75%~100% 细胞已感染时，收取细胞。细胞总 RNA 的提取使用 Qiagen 公司的 RNeasy Mini Kit，按说明书的步骤提取。

- 2) 利用 RT-PCR 技术获取编码目的蛋白的 S 基因：

将提取感染细胞的总 RNA 作为逆转录的模板合成 cDNA，逆转录合成 cDNA 的引物序列为 P14 (TAGTAGTAGACTCC)，使用 TaKaRa 公司的 RNA Kit (AMV) 试剂盒按说明操作，逆转录产物直接用于 PCR 扩增，扩增 Z10 株 S 基因的引物序列 P1 和 P2 分别为 GGGGTACCGCAACTATGGAGGAACTAC 和 CGCTCTAGAAGTTTTAAAGGCTCTTGG；PCR 扩增 L99 株 S 基因的引物序列 P3 和 P4 分别为 CGCATCGATGGCAACTATGGAAGAAATC 和 TCGGGTACCAATTTTCATAGGTTTCCTGG，上述引物序列均由英骏生物技术有限公司合成，反应条件为：94°C 2 min 预变性；94°C 50 sec，50°C~62°C 50~75 sec，72°C 90 sec，共 30~35 个循环；72°C 延伸 5~10 min，上述 PCR 扩增产物经序列分析 (由英骏生物技术有限公司提供测序服务)，其结果分别与 GenBank 登录的 Z10 株序列 (AF184987) 和 L99 株序列 (AF288299) 相一致；

- 3) 基于大肠杆菌 BL21 菌株的汉坦病毒 S 基因 pET-32a 表达系统的构建：

用内切酶 *EcoRI* 和 *XhoI* 分别双酶切 L99 病毒株的 S 基因 PCR 纯化产物及 pET-32a

载体,用 *SacI*和 *XhoI* 分别双酶切 Z10 病毒株的 S 基因 PCR 纯化产物及 pET-32a 载体,回收目的片段,T4 连接酶连接后转入 *E. coli*BL21 菌株的感受态细胞,重组质粒经 PCR 及双酶切鉴定,获得含有 pET32a-L99S 及 pET32a-Z10S 重组质粒的 *E. coli*BL21 原核表达系统;

4) 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的表达和鉴定:

将重组菌株接种于 2~5mL 含有氨苄青霉素 100 μ g/mL 的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.6~0.8 时,用终浓度为 0.1~2mmol/L 的 IPTG 诱导 4 小时,收集的菌体用 2 \times 凝胶上样缓冲液重悬,100 $^{\circ}$ C 处理 1~10min,使菌体裂解,裂解物进行 SDS-PAGE 分析;并采用全湿或半干转印法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上,进行 Western-blot 鉴定,其中一抗和二抗分别为 HFRS 患者混合血清和 1:100~500PBS 稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG,其中 PBS 浓度为 0.01mM,pH 为 7.4 (以下 PBS 皆使用该浓度),SDS-PAGE 结果显示构建的重组菌株 pET32a-L99S/*E. coli*BL21 及 pET32a-Z10S/*E. coli*BL21 均表达一个 67.1 kDa 目的蛋白,Western-blot 的结果为该重组蛋白与 HV 感染病人血清反应出现特异性条带,表明其具有良好的抗原性;

5) 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的提取和纯化:

将诱导后的发酵菌液经 5000r/min 离心 10min,收集菌体用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗三遍,菌体沉淀用 PBS 重悬,超声破碎菌体,12000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 1 小时,收集上清,最后用镍离子亲和层析柱 (Ni-NTA) 纯化表达的蛋白,收集洗脱液,经过真空冷冻干燥,制备出汉坦病毒 S 基因重组蛋白纯品,经 SDS-PAGE 或 HPLC 色谱法测定重组蛋白的纯度为 95~98%;

6) 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的标记,它包括生物素和 HRP 标记两种方法:

(A) 标记生物素的实施步骤如下:取纯化后的表达蛋白 10~30mg,溶于 0.05~0.2M/L NaHCO₃ (pH8.5) 缓冲液 2~10mL 中,加入活化生物素 3~5mg,搅拌,室温反应 1~4 小时,加入甘氨酸 50~100mg,终止反应,生物素标记的重组蛋白经饱和硫酸铵沉淀 2 次后,沉淀物以 2~5mLPBS 溶解,透析后,真空冷冻干燥保存;

(B) 利用过碘酸钠法标记 HRP 的实施步骤如下:将 1~5mg HRP 溶于 1~10mL 蒸馏水中,加入新鲜配制的 0.06M NaIO₄ 溶液 0.1~1mL,混匀,4 $^{\circ}$ C 放置 30min,加入 0.16M 乙二醇-NaCl 溶液 0.5~1mL,预冷无水乙醇 1~10 mL 室温放置 30min,离心,取沉淀物用蒸馏水使之完全溶解,即为醛化 HRP,加入 5~20mg 表达蛋白的溶液 1mL,混匀并装透析袋,用 0.05M 碳酸盐缓冲液 pH9.5 4 $^{\circ}$ C 缓慢搅拌透析 6~18 小时,使之结合,然后吸出加入 NaBH₄ 或 KBH₄ 溶液 (5mg/mL) 0.05~0.2mL,4 $^{\circ}$ C 放置 2 小时,加入等体积饱和硫酸铵,沉淀物用 PBS 使之完全溶解,并透析过夜,次日再离心,除去不溶物即得酶标记物,用 PBS 加至 1~5mL 进行测定后,真空冷冻干燥保存。

制备用于捕获人血清抗体 IgM/IgG 的免疫磁性微球,是将中国专利 ZL03144274.9

活化的磁性微球与羊抗人 IgM (μ 链) /羊抗人 IgG 的抗体连接, 致敏为免疫磁性微球; 具体作法为: 在 2~8℃ 下, 取活化好的磁性微球 1~5 mL, 加入经 pH9.6, 0.1M 碳酸盐缓冲液稀释过的羊抗人 IgM (μ 链) /羊抗人 IgG 5~10 mL, 充分反应后经 PBS 淋洗, 加入 10% 兔血清 (RSA) 5~10 mL 于 37℃ 封闭 1 小时后, 用 PBS 洗净即可得到用于 IgM/IgG 检测的免疫磁性微球。

检测肾综合征出血热病人抗体的方法, 具体实验步骤为: 分别在含有 15 μL 已被羊抗人 IgM (μ 链) /羊抗人 IgG 致敏的免疫磁性微球的离心管中加入 1:50~100 PBS 稀释的待测病人血清 1 mL, 阴性和阳性对照各 1 mL, 37℃ 振荡反应 1 小时, 在离心管壁外以磁铁聚集固定微球, 弃去反应液, 用 PBS 反复清洗 3 次, 然后进行酶标重组抗原显色判定, 方法是在实验离心管中加入 80~100 倍 PBS 稀释的 HRP/生物素标记的表达蛋白 1 mL, 37℃ 振荡反应 1 小时, 清洗后再加入新配制的显色底物 1 mL, 反应 10 min, 肉眼观察颜色变化, 空白和阴性对照无色, 阳性对照显蓝色, 则结果成立, 检测管显色深于或等于阳性对照颜色则表明实验结果呈阳性, 或者测定 OD₄₅₀ 值计算 $P/N \geq 2.1$ 的判定为阳性, $P/N < 2.1$ 的判定为阴性, 其中 $P/N = (\text{待测血清 OD}_{450} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{450} \text{值}) / (\text{阴性对照 OD}_{450} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{450} \text{值})$ 。

传统 ELISA 法与免疫磁球捕获 ELISA 方法灵敏度的比较: 将 HFRS 病人血清用 PBS 按 1:10 连续倍比稀释至 1:10000, 每个稀释度作 3 份平行样。利用传统 ELISA 法 (见全国临床检验操作规程, 南京: 东南大学出版社, 1991, P345) 和本发明的免疫磁球捕获 ELISA 方法, 分别对不同稀释度的血清进行检测, 结果见表 1。

表 1 传统 ELISA 法与免疫磁球捕获 ELISA 法灵敏度比较

稀释倍数	平行样	传统 ELISA 法	免疫磁球捕获 ELISA 法
1:10	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
1:100	1	+	+
	2	+	+
	3	+	+
1:1000	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+
1:10000	1	-	+
	2	-	+
	3	-	+

注: +表示试验结果为阳性, -表示试验结果为阴性。

表 1 结果显示免疫磁球捕获 ELISA 方法同传统 ELISA 法相比,当血清稀释度低于 1:100 时,两种方法都可以检测到阳性结果。当血清稀释度达到 1:1000 和 1:10000 时,本发明的免疫磁球捕获 ELISA 方法检测阳性,而传统 ELISA 法则为阴性,从而证明免疫磁球捕获 ELISA 方法较传统 ELISA 法灵敏度提高了 100 倍以上。

本发明的有益效果是:

利用本发明的免疫磁性微球技术建立的免疫磁球捕获 ELISA 方法,代替传统 ELISA 方法的酶标板作为固相吸附抗体/抗原的载体,不仅大大地增加了吸附的面积,而且以便于携带、有盖的 1.5 mL 离心管,替代体积较大的酶标板,从而使检测操作简便、快速,对传统 ELISA 灵敏限以下无法检测到的抗体有较高的检出率。其灵敏度较传统 ELISA 法提高了 100 倍以上。本发明适用于临床实验室检测和疾病监测工作,尤其适用于基层单位的使用。本发明为临床实验检测提供了一种新型、快速、简便和易于推广的检测方法,对肾综合征出血热的早期诊断和防治工作,具有较大的经济效益和社会效益。

附图说明

图 1: 扩增汉坦病毒 Z10 和 L99 株 S 基因序列的电泳图;

图 2: 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的 Western-blot 分析。

具体实施方式:

实施例 1:

一、汉坦病毒 S 基因重组表达蛋白的制备和标记:

1. 病毒的培养及 RNA 提取:

将 Z10、L99 病毒株按常规接种 Vero-E6 细胞,间接免疫荧光法 (IFA) 检查细胞感染程度。在 75%以上细胞已感染时,收取细胞。细胞总 RNA 的提取,使用 Qiagen 公司的 RNeasy Mini Kit,并按说明书的步骤进行提取。

2. 利用 RT-PCR 技术获取编码目的蛋白的 S 基因:

将提取感染细胞的总 RNA 作为逆转录的模板合成 cDNA,使用 TaKaRa 公司的 RNA Kit (AMV) 试剂盒按说明操作。逆转录产物直接用于 PCR 扩增。反应条件为: 94°C 2 min 预变性; 94°C 50 sec, 58°C 50 sec, 72°C 90 sec, 共 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳鉴定,结果见图 1,图中 1 为 DL2000 marker, 2 为 Z10 株 S 基因片段, 3 为 L99 株 S 基因片段。

3. 基于大肠杆菌 BL21 菌株的 pET-32a 表达系统的构建: 利用 *EcoRI* 和 *XhoI* 分别双酶切 L99 病毒株的 PCR 纯化产物及 pET-32a 载体,利用 *SacI* 和 *XhoI* 分别双酶切 Z10 病毒株的 PCR 纯化产物及 pET-32a 载体,回收目的片段, T4 连接酶相连后转入 *E. coli* BL21 菌株的感受态细胞,重组质粒 PCR 及双酶切鉴定,获得含有 ET32a-L99S 及 pET32a-Z10S 重组质粒的 S 基因的原核表达系统。

4. 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的表达和鉴定：挑取阳性重组菌株接种 5mL LB 培养液（含氨苄青霉素 100 μ g/mL），37 $^{\circ}$ C 振荡培养至 OD₆₀₀ 达 0.8 时，用终浓度为 2mM/L 的 IPTG 诱导 4 小时。收集的菌体用 2 \times 凝胶上样缓冲液重悬，100 $^{\circ}$ C 处理 10min，使菌体裂解，裂解物进行 SDS-PAGE 分析；并采用全湿转印法将蛋白转移到硝酸纤维素膜上，Western-blot 鉴定（一抗和二抗分别为 HFRS 患者混合血清和 1:500 稀释的辣根过氧化酶标记羊抗人 IgG），结果见图 2。由图中可见 1 为蛋白 marker；2 为 pET32a-L99S/*E. coli*BL21 表达目的蛋白的 Western blot 分析结果；3 为 pET32a-Z10S/*E. coli*BL21 表达目的蛋白的 Western blot 分析结果；表明其具有良好的抗原性。

5. 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的提取和纯化：将诱导后的发酵菌液经 5000r/min 离心 10min，收集菌体用 pH7.4 的磷酸盐缓冲液（PBS）洗三遍，菌体沉淀用 PBS 重悬，超声破碎菌体，12000r/min，4 $^{\circ}$ C 离心 1 小时，收集上清，最后用镍离子亲和层析柱（Ni-NTA）纯化表达的蛋白，收集洗脱液，经过真空冷冻干燥，制备出汉坦病毒 S 基因重组蛋白纯品备用。

6. 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的生物素标记：取纯化后的重组蛋白 10mg，溶于 0.05M/L NaHCO₃ (pH8.5) 缓冲液 5mL 中，加入活化生物素 3mg，搅拌，室温反应 1 小时，加入甘氨酸 50mg，终止反应。生物素标记的重组蛋白经饱和硫酸铵沉淀 2 次后，沉淀物以 2mL PBS 溶解，透析后，真空冷冻干燥保存。

二、免疫磁性微球的制备：

采用 1mL 活化磁性微球（选自中国专利 ZL03144274.9），加入 5mL 经 pH9.6，0.1M 碳酸盐缓冲液稀释好的羊抗人 IgM（ μ 链）；4 $^{\circ}$ C 反应过夜，经 PBS 洗涤后，加入 10% 兔血清（RSA）5mL 于 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 小时后，用 PBS 洗净即可得到用于 IgM 检测的免疫磁性微球。

三、检测肾综合征出血热病人特异性 IgM 抗体的方法：

分别在含有 15 μ L 已被羊抗人 IgM（ μ 链）致敏的免疫磁性微球的离心管中加入 1:100 PBS 稀释的待测病人血清 1mL，阴性和阳性对照各 1 mL，37 $^{\circ}$ C 振荡反应 1 小时，在离心管壁外以磁铁的磁场聚集固定微球，弃去反应液，用 PBS 反复清洗 3 次。酶标重组蛋白抗原进行显色判定，其方法是：在实验离心管中加入 80 倍 PBS 稀释（其中 PBS 浓度在以下各实施例中皆为 0.01mM，pH 为 7.4）的生物素标记的表达蛋白 1mL，37 $^{\circ}$ C 振荡反应 1 小时。清洗后再加入新配制的显色底物 1mL，反应 10min。观察颜色变化，空白和阴性对照无色，阳性对照显蓝色，则结果成立。检测管显色深于阳性对照颜色，表明实验结果呈阳性。

实施例2：

一、汉坦病毒 S 基因重组蛋白的制备和标记：（同实施例 1）

二、免疫磁性微球的制备：（同实施例 1）

三、检测肾综合征出血热病人特异性 IgM 抗体的方法：

分别在含有 15 μ L 已被羊抗人 IgM (μ' 链) 致敏的免疫磁性微球的离心管中加入 1:100PBS 稀释的待测病人血清 1mL, 阴性和阳性对照各 1 mL, 37 $^{\circ}$ C 振荡反应 1 小时, 在离心管壁外以磁铁的磁场聚集固定微球, 弃去反应液, 用 PBS 反复清洗 3 次。酶标重组蛋白抗原进行显色判定是在实验离心管中加入 100 倍 PBS 稀释的生物素标记的表达蛋白 1mL, 37 $^{\circ}$ C 振荡反应 1 小时。清洗后再加入新配制的显色底物 1mL, 反应 10min。观察颜色变化, 空白和阴性对照无色, 阳性对照显蓝色, 则结果成立。此时检测管显示无色, 表明实验结果呈阴性。

实施例 3:

一、汉坦病毒 S 基因重组蛋白的制备和标记：（同实施例 1）

二、免疫磁性微球的制备：（同实施例 1）

三、检测肾综合征出血热病人特异性 IgM 抗体的方法：

分别在含有 15 μ L 已被羊抗人 IgM (μ' 链) 致敏的免疫磁性微球的离心管中加入 1:100PBS 稀释的待测病人血清 1mL, 阴性和阳性对照各 1 mL, 37 $^{\circ}$ C 振荡反应 1 小时, 在离心管壁外以磁铁的磁场聚集固定微球, 弃去反应液, 用 PBS 反复清洗 3 次。酶标重组蛋白抗原进行显色判定是在实验离心管中加入 100 倍 PBS 稀释的生物素标记的表达蛋白 1mL, 37 $^{\circ}$ C 振荡反应 1 小时。清洗后再加入新配制的显色底物 1mL, 反应 10min。观察颜色变化, 空白和阴性对照无色, 阳性对照显蓝色, 则结果成立。此时检测管显示浅于阳性对照颜色, 表明实验结果为阴性。

实施例 4:

一、汉坦病毒 S 基因重组蛋白的制备和标记：

1. 病毒的培养及 RNA 提取：（同实施例 1）

2. 利用 RT-PCR 技术获取编码目的蛋白的 S 基因：（同实施例 1）

3. 基于大肠杆菌 BL21 菌株的 pET-32a 表达系统的构建：（同实施例 1）

4. 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的表达和鉴定：（同实施例 1）

5. 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的提取和纯化：（同实施例 1）

6. 汉坦病毒 S 基因重组蛋白的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记: 将 2mg HRP 溶于 5mL 蒸馏水中, 加入新鲜配制的 0.06M NaIO₄ 溶液 1mL, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 放置 30min, 加入 0.16M 乙二醇-NaCl 溶液 1mL, 预冷无水乙醇 4 mL, 室温放置 30min, 离心, 取沉淀物用蒸馏水使之完全溶解, 即为醛化 HRP。加入 15mg 表达蛋白的溶液 1mL, 混匀并装透析袋, 用 0.05M pH9.5 碳酸盐缓冲液 4 $^{\circ}$ C 缓慢搅拌透析 10 小时, 使之结合。然后吸出加入 KBH₄ 溶液 (5mg/mL) 0.2mL, 4 $^{\circ}$ C 放置 2 小时, 加入等体积饱和硫酸铵。沉淀物用 PBS 使之完全溶解, 并透析过夜。次日再离心, 除去不溶物即得酶标记物。用 PBS 加至 5mL 透

析后,真空冷冻干燥保存。

二、免疫磁性微球的制备:

取 1mL 制备好的活化磁性微球 (选自中国发明专利 ZL03144274.9), 加入 5mL 经 pH9.6, 0.1M 碳酸盐缓冲液稀释好的羊抗人 IgG, 4℃ 反应过夜, 经 PBS 洗涤后, 加入 10%兔血清 (RSA) 8mL 于 37℃ 封闭 1 小时后, 用 PBS 洗净即可得到用于 IgG 检测的免疫磁性微球。

三、检测肾综合征出血热病人特异性 IgG 抗体的方法: 分别在含有 15 μL 已被羊抗人 IgG 致敏的免疫磁性微球的离心管中加入 1:80PBS 稀释的待测病人血清 1mL, 阴性和阳性对照各 1 mL, 37℃ 振荡反应 1 小时, 在离心管壁外以磁铁的磁场聚集固定微球, 弃去反应液, 用 PBS 反复清洗 3 次。酶标重组抗原进行显色判定是在实验离心管中加入 100 倍 PBS 稀释的 HRP 标记重组蛋白抗原 1mL, 37℃ 振荡反应 1 小时。清洗后再加入新配制的显色底物 1mL, 反应 10min。该测定 OD₄₅₀ 值结果经计算 $P/N > 2.1$ 故判定为阳性, 其中 $P/N = (\text{待测血清 OD}_{450} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{450} \text{值}) / (\text{阴性对照 OD}_{450} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{450} \text{值})$ 。

实施例5:

一、汉坦病毒 S 基因重组表达蛋白的制备和标记: (同实施例 1)

二、免疫磁性微球的制备:

取 1mL 制备好的活化磁性微球 (选自中国发明专利 ZL03144274.9), 加入 6mL 经 pH9.6, 0.1M 碳酸盐缓冲液稀释好的羊抗人 IgG, 4℃ 反应过夜, 经 PBS 洗涤后, 加入 10%兔血清 (RSA) 6mL 于 37℃ 封闭 1 小时后, 用 PBS 洗净即可得到用于 IgG 检测的免疫磁性微球。

三、检测肾综合征出血热病人特异性 IgG 抗体的方法: 分别在含有 15 μL 已被羊抗人 IgG 致敏的免疫磁性微球的离心管中加入 1: 100PBS 稀释的待测病人血清 1mL, 阴性或阳性对照各 1 mL, 37℃ 振荡反应 1 小时, 在离心管壁外以磁铁的磁场聚集固定微球, 弃去反应液, 用 PBS 反复清洗 3 次。酶标重组抗原进行显色判定是在各试验离心管中加入 80 倍 PBS 稀释的生物素标记表达蛋白 1mL, 37℃ 振荡反应 1 小时。清洗后再加入新配制的显色底物 1mL, 反应 10min。该测定 OD₄₅₀ 值结果经计算 $P/N < 2.1$ 故判定为阴性, 其中 $P/N = (\text{待测血清 OD}_{450} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{450} \text{值}) / (\text{阴性对照 OD}_{450} \text{值} - \text{空白对照 OD}_{450} \text{值})$ 。

序列表

SEQUENCE LISTING

<110> 天津市卫生防病中心、天津医科大学、南开大学

<120> 检测肾综合征出血热抗体的方法

<130> 051228

<160> 5

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> prim_bind

<222> (1)..(14)

<400> 1

tagtagtaga ctcc

14

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> prim_bind

<222> (1)..(27)

<400> 2

ggggtaccgc aactatggag gaactac

27

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> prim_bind

<222> (1)..(27)

<400> 3

cgctctagaa gttttaaagg ctcttgg

27

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> prim_bind

<222> (1)..(27)

<400> 4

cgcatcgatg gcaactatgg aagaaatc

28

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> prim_bind

<222> (1)..(14)

<400> 5

tcgggtacca atttcatagg ttcctgg

27

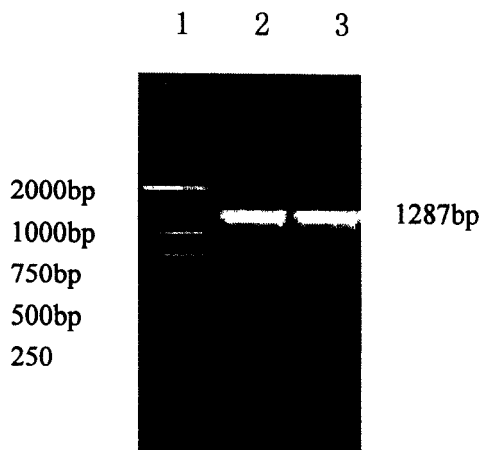


图 1

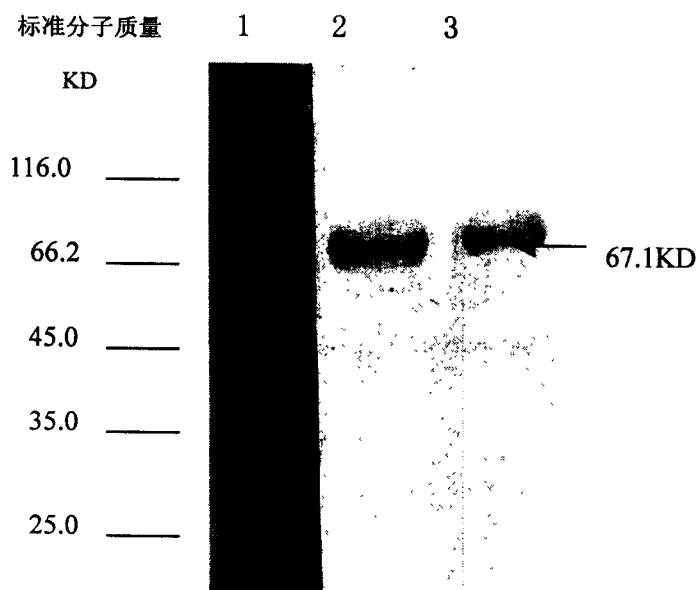


图 2

专利名称(译)	检测肾综合征出血热抗体的方法		
公开(公告)号	CN1811451A	公开(公告)日	2006-08-02
申请号	CN200610013151.6	申请日	2006-01-27
[标]申请(专利权)人(译)	天津医科大学 南开大学		
申请(专利权)人(译)	天津医科大学 南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	天津医科大学 南开大学		
[标]发明人	王擷秀 陈锦英 白钢 杨东靖		
发明人	王擷秀 陈锦英 白钢 杨东靖		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	李明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测肾综合征出血热(HFRS)抗体的方法,属于生物技术领域,涉及利用免疫磁性捕获技术和酶标记重组病毒的抗原蛋白,对由汉坦病毒所致HFRS抗体检测技术。其目的是为HFRS的早期诊断提供一种简便、快速、灵敏、特异的适于基层单位使用的检测方法。本发明将pET原核表达系统表达的汉坦病毒代表株Z10和L99的S基因重组蛋白纯化,标记生物素或辣根过氧化物酶。将磁性微球连接羊抗人IgM(μ 链)或羊抗人IgG抗体,使其致敏,得到用于检测汉坦病毒汉城型或汉滩型的特异性IgM/IgG抗体的免疫磁性微球,建立检测血清标本中HFRS特异性IgM/IgG抗体的快速、灵敏的免疫磁性微球-ELISA方法。

