



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1800854 B

(45) 授权公告日 2012.04.25

(21) 申请号 200510099746.3

(22) 申请日 2005.09.05

(73) 专利权人 福建省疾病预防控制中心
地址 350001 福建省福州市津泰路 76 号

(72) 发明人 严延生 吴守丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2005049851 A2, 2005.06.02, 全文.

CN 1267831 A, 2000.09.27, 全文.

CN 1152030 A, 1997.06.18, 全文.

WO 2005049851 A3, 2009.04.16, 全文.

CN 1267831 A, 2000.09.27, 全文.

CN 1076865 A, 1993.10.06, 全文.

US 6391558 B1, 2002.05.21, 全文.

审查员 杨冀川

权利要求书 4 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

肾综合征出血热快速金标诊断试纸条

(57) 摘要

本发明公开了一种用于肾综合征出血热诊断的重组抗原及其快速金标诊断试纸条。其主要针对子 HFRS 诊断的截短 NP 重组抗原 e112 及可同时检测 HFRS 病人血清中 IgM、IgG 抗体的 HFRS 快速金标诊断试纸条。利用基因克隆技术获得汉坦病毒的截短 NP 重组抗原,纯化后即可用于免疫学诊断。快速金标诊断试纸条克服了现有 HFRS 诊断方法的局限性,可同时检测 HFRS 病人血清中 IgM、IgG 抗体,可判断患者的感染状态,并对患者作出早期诊断,能够降低病死率,提高治愈率。此外,由于金标试纸条无需特殊仪器,无需训练有素的专业人员,可以满足基层医院、农村卫生院等临床检测的需要,而且大大的降低了成本,方便了患者,适用于大规模的血清流行病学调查。

1. 一组肾综合征出血热快速金标诊断试纸条的溶液组分,其特征是:

(1) 重组抗原溶解液:	SDS	0.1%
	甘氨酸	25mmol/L
	Tris.Cl	25mmol/L

其中,重组抗原为重组抗原 e112,其核酸序列及其所编码的氨基酸序列为:1 ATG
GAG GAA CTG CAG AGG GAA ATC AAT GCC CAT GAG GGT CAA CTG 451 Met Glu Glu Leu
Gln Arg Glu Ile Asn Ala His Glu Gly Gln Leu 1546 GTG ATA GCC AGG CAG AAG GTG
AGG GAT GCA GAA AAA CAA TAT GAA 9016 Val Ile Ala Arg Gln Lys Val Arg Asp Ala
Glu Lys Gln Tyr Glu 3091 AAG GAT CCA GAT GAG CTG AAT AAA AGA ACA TTA ACA GAC
AGA GAA 13531 Lys Asp Pro Asp Glu Leu Asn Lys Arg Thr Leu Thr Asp Arg Glu
45136 GGG GTT GCA GCA TCT ATC CAG GCC AAG ATT GAT GAA TTG AAA AGG 18046 Gly
Val Ala Ala Ser Ile Gln Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Arg 60181 CAG TTA GCA GAT
AGG ATT GCA ACC GGA AAG AAC CTT GGG AAA GAA 22561 Gln Leu Ala Asp Arg Ile
Ala Thr Gly Lys Asn Leu Gly Lys Glu 75226 CAG GAT CCC ACA GGG GTT GAG CCT GGA
GAC CAT CTG AAA GAG AGA 27076 Gln Asp Pro Thr Gly Val Glu Pro Gly Asp His
Leu Lys Glu Arg 90271 TCA ATG CTT AGT TAT GGA AAT GTA TTG GAT TTG AAC CAC
CTG GAT 31591 Ser Met Leu Ser Tyr Gly Asn Val Leu Asp Leu Asn His Leu Asp
105316 ATT GAT GAG CCT TAA 330106
Ile Asp Glu Pro End 110

(2) 胶体金溶液:0.03~0.05%的四氯金酸,加1~2%柠檬酸三钠制备成胶体金颗粒;

(3) 二抗:羊抗人 IgG 单抗、羊抗人 μ 链单抗,羊抗鼠 IgG 单抗;

(4) 包被缓冲液:含1~3%蔗糖的磷酸盐缓冲液;

(5) 基础缓冲液:由厦门波生生物技术有限公司研制,主要含牛血清白蛋白的缓冲液;

(6) 反应缓冲液:0.01~0.05% NaN_3 的磷酸盐缓冲液;

(7) 磷酸盐缓冲液:为在800ml蒸馏水中溶解8g NaCl 、0.2g KCl 、1.44g Na_2HPO_4 和0.24g KH_2PO_4 ,用盐酸调节溶液的pH值至7.2~7.6,加水定容至1L。

2. 制备肾综合征出血热快速金标诊断试纸条重组抗原 e112 的工艺流程,其特征是:

(1) 从一黑线姬鼠肺组织中应用 Vero E6 细胞直接分离出汉坦病毒株 A_{537} ;

(2) 以汉坦病毒株 A_{537} 基因组为模板,以 P_{14} 为逆转录引物、 S_1/S_2 为 PCR 扩增引物,用逆转录 PCR 法常规扩增得到 S 基因全长片段,其大小为 1696bp,用 TA 克隆技术将此片段克隆入 TA 载体 pMD 18-T 中,获得重组质粒 TA- A_{537} ;

(3) 以该重组质粒 TA- A_{537} 为模板,以 P_1 、 P_{112} 为引物,从中扩增出长度约 330bp 的截短片段 p1-112,将片段定向插入原核表达载体 pET-30a,构建重组表达质粒 pET-112,转化大肠杆菌 BL21 (DE3),IPTG 诱导表达;蛋白免疫印迹实验证实该重组抗原 e112 能被 HFRS 患者阳性血清所识别;

截短片段 p1-112 表达的重组抗原 e112 的核酸序列及其所编码的氨基酸序列为:1 ATG
GAG GAA CTG CAG AGG GAA ATC AAT GCC CAT GAG GGT CAA CTG 451 Met Glu Glu
Leu Gln Arg Glu Ile Asn Ala His Glu Gly Gln Leu 1546 GTG ATA GCC AGG CAG AAG

GTG AGG GAT GCA GAA AAA CAA TAT GAA 9016 Val Ile Ala Arg Gln Lys Val Arg Asp
 Ala Glu Lys Gln Tyr Glu 3091 AAG GAT CCA GAT GAG CTG AAT AAA AGA ACA TTA ACA
 GAC AGA GAA 13531 Lys Asp Pro Asp Glu Leu Asn Lys Arg Thr Leu Thr Asp Arg Glu
 45136 GGG GTT GCA GCA TCT ATC CAG GCC AAG ATT GAT GAA TTG AAA AGG 18046 Gly
 Val Ala Ala Ser Ile Gln Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Arg 60181 CAG TTA GCA GAT
 AGG ATT GCA ACC GGA AAG AAC CTT GGG AAA GAA 22561 Gln Leu Ala Asp Arg Ile Ala
 Thr Gly Lys Asn Leu Gly Lys Glu 75226 CAG GAT CCC ACA GGG GTT GAG CCT GGA GAC
 CAT CTG AAA GAG AGA 27076 Gln Asp Pro Thr Gly Val Glu Pro Gly Asp His Leu
 Lys Glu Arg 90271 TCA ATG CTT AGT TAT GGA AAT GTA TTG GAT TTG AAC CAC CTG GAT
 31591 Ser Met Leu Ser Tyr Gly Asn Val Leu Asp Leu Asn His Leu Asp 105316 ATT
 GAT GAG CCT TAA 330106 Ile Asp Glu Pro
 End 110

(4) 采用电洗脱方法纯化重组蛋白:对大量诱导时收集的菌体进行超声破碎后,将超声上清先经过饱和硫酸铵溶液沉淀粗纯后,取饱和硫酸铵沉淀物进行 SDS-PAGE 电泳,用 0.3mol/L CuCl_2 进行染色确定目标蛋白带 e112 在凝胶中的位置,切下目标蛋白带 e112,置于透析袋中进行电洗脱;纯化蛋白进行 SDS-PAGE,确定纯度并进行蛋白定量。

3. 根据权利要求 2 所述的 RT-PCR 反应体系,其特征是:

逆转录:20 μ l 反应体系包含以下成份

反 应 成 份	体 积(μ l)
5 \times AMV buffer	4.0
dNTP, 10mmol/L	1.0
p14, 10 μ mol/L	1.0
RNA 酶抑制剂	0.5
AMV 逆转录酶	1.0
RNA 模板	5.0
H ₂ O	7.5

逆转录反应条件:室温 10min,42 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 1h,96 $^{\circ}\text{C}$ 5min,置冰上 5min,cDNA 冻存于 -20 $^{\circ}\text{C}$

PCR:50 μ l 反应体系包含以下成份

反应成份	体积(μ l)
10 \times PCR buffer	5.0
dNTP, 2.5mmol/L	4.0
S1, 10 μ mol/L	0.5
S2, 10 μ mol/L	0.5
EX-Taq 酶, 5u/ μ l	0.5
cDNA	3.0
H ₂ O	36.5

PCR 扩增反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 5min;94 $^{\circ}\text{C}$ 45s,55 $^{\circ}\text{C}$ 45s,72 $^{\circ}\text{C}$ 2min,35cycles;72 $^{\circ}\text{C}$ 10min。

4. 根据权利要求 2 所述的汉坦病毒克隆、表达所应用的引物, P₁ 为正向引物,添加了 Nco I 酶切位点;P₁₁₂ 为反向引物,添加了 Sal I 酶切位点和终止密码子 tta,其特征是:

引物	序 列	方向	定 位
P ₁₄	5'- tagtagtagactcc-3'	M+	1-14
S ₁	5'- tagtagtagactccctaaaga-3'	M+	1-21
S ₂	5'- tagtagtagtagtatgctccctaa-3'	M-	1679-1696
P ₁	5'-gctaccatggcaactatggaggaactg-3'	M+	37-57
P ₁₁₂	5'-atcgtcgacattaaggctcatcaatatccaggtgg-3'	M-	351-372

5. 根据权利要求 2 所述的重组蛋白 e112,其重组蛋白 e112 诱导表达:

(1) 挑取含重组表达质粒 pET-112 的单菌落于 5ml 含 Kanamycin, 30 μg/ml 的 LB 培养液中, 37°C 250r/min 过夜培养;

(2) 将过夜培养的含重组质粒的表达菌以 1 : 100 扩种;

(3) 表达菌生长到 OD 值约 0.8 时, 加入 IPTG 使其终浓度为 1mM, 37°C 诱导 4h;

(4) 菌液用 4°C 8000r/min, 离心 5min 收集菌体, 沉淀倒置扣干, 备用。

6. 根据权利要求 2 所述的用电洗脱方法纯化重组抗原, 其特征是:

(1) 用超声波破碎法裂解细菌

①将 1500ml 表达菌液于 4°C, 6000r/min, 离心 10min;

② Buffer I 100ml 悬浮沉淀, 置冰浴上, 350W 超声破碎 20min, 2s 超声, 5s 间隔;

Buffer I, pH 7.2: 5mM EDTA
 20mM Tris. Cl
 150mM NaCl

③ 4°C, 12000r/min, 离心 10min, 取少量沉淀和上清进行 SDS-PAGE, 确定目标蛋白位置及纯度, 可溶性蛋白存在于上清中;

(2) 饱和硫酸铵沉淀:

①将上述细菌裂解上清转移到烧杯中, 置冰浴上, 放在磁力搅拌器上边搅拌边加饱和硫酸铵溶液, S_终为 10%, 流速控制在 1ml/min; 混合液置 4°C 冰箱静置过夜或 > 4h; 以防因局部硫酸铵浓度过高而使蛋白在局部浓缩沉淀;

$$\text{饱和硫酸铵加样量 } Y = X * \frac{S_{\text{终}} - S_{\text{初}}}{100\% - S_{\text{终}}}$$

X 为细菌裂解液体积, S 为饱和硫酸铵浓度

②取出混合液, 4°C, 12000r/min, 离心 10min; 留取上清, 沉淀用少量去离子水重悬, 于 4°C 冰箱保存;

③测量上清体积, 并将上清移到烧杯中, 按上述公式计算所需加入的饱和硫酸铵的量, S_终为 20%; 置冰浴上, 边搅拌边缓慢地加入饱和硫酸铵, 混合液置 4°C 冰箱静置过夜或 > 4h;

④重复 2 ~ 3 步骤, 但 S_终为 30%, 以此类推, 每次饱和硫酸铵加样量递增 10%。直到几乎所有目标蛋白出现沉淀为止;

(3) 电洗脱

①配制分离胶 8 块, 积层胶不加梳子, 留出位置用于加样;

②对大量诱导时收集的菌体进行超声破碎;

③超声上清先经过饱和硫酸铵沉淀粗纯后, 取饱和硫酸铵沉淀物加 6× 加样缓冲液上

样,每板加 6ml,注意不要有气泡;

④ SDS-PAGE:先 80V 电泳,当样品电泳入分离胶后,将电压升至 110-120V,电泳过夜;

⑤切胶:取下胶,约在胶的纵向 1/3 处切一小条胶进行 CuCl_2 染色;约 3min 后,将凝胶小条取出,重新放置于原来的位置,观察目标条带在凝胶中的位置,切下目标条带,置于 $1\times$ SDS 电泳缓冲液中;

CuCl_2 染色:

染色液: 0.3M CuCl_2

脱色液, pH 9.0: 0.25M EDTA

0.25M Tris.Cl

⑥将胶条分成 3 段,置于透析袋中,并加入 $1\times$ SDS 电泳缓冲液,以浸没胶为宜,置于水平电泳槽上电泳;电洗脱 12h,每 4h 吸出透析袋中的溶液,更换新的电泳缓冲液,共 3 次,吸出的液体即为洗脱出的纯化蛋白溶液;

⑦纯化样品进行 SDS-PAGE,确定纯度;

⑧蛋白定量:

a. 选择蛋白分析程序;

b. 选择 UV280 方法测定蛋白浓度;

c. 以牛血清白蛋白为参考蛋白,以溶解待测蛋白的溶液配制一系列浓度的牛血清白蛋白溶液,测定其 OD 值,建立标准曲线;

d. 以溶解待测蛋白的溶液调零,取 $50\mu\text{l}$ 待测蛋白溶液,测定其蛋白浓度。

7. 肾综合征出血热快速金标诊断试纸条的制作工艺,其特征是:

(1) 取 0.03%四氯金酸 1000ml,加热至沸腾,加入 1%柠檬酸三钠溶液 25ml,继续煮沸 5min,待胶体金溶液颜色由有蓝经紫变红后,自然冷却后备用;

(2) 取胶体金溶液 1ml,加入 0.2M K_2CO_3 $10\mu\text{l}$ 、 $50\mu\text{g}$ 根据权利要求 2 所述工艺制备的纯化重组抗原 e112,搅匀后静置 1h;

(3) 加入 20%牛血清白蛋白 $25\mu\text{l}$ 、20% PEG 20,000 $15\mu\text{l}$ 、8,000r/min,离心 8min,弃上清;

(4) 将沉淀悬浮于 1ml 基础缓冲液中,即为金标抗原溶液;

(5) 同法标记鼠 IgG;

(6) 两种金标抗原溶液混合后充分浸润玻璃纤维纸,置冻干机冻干;

(7) 羊抗鼠 IgG 单抗 3.0mg/ml、羊抗人 μ 链单抗 2.0mg/ml、羊抗人 IgG 单抗 2.0mg/ml,分别在 NC 膜的上、中、下位置包被 NC 膜,自然晾干;

(8) 在约 10cm 宽的底板上,将吸水纸、NC 膜、吸附了金标抗原的玻璃纤维和未吸附抗原的玻璃纤维组装成检测 IgM 与 IgG 的试纸条。

肾综合征出血热快速金标诊断试纸条

技术领域

[0001] 本发明涉及疾病诊断的抗原,具体说是一种用于肾综合征出血热诊断的重组抗原及其快速金标诊断试纸条。

背景技术

[0002] 汉坦病毒 (Hantaviruses, HV) 流行范围广泛、危害严重,已成为一个全球性的公共卫生问题。由 HV 感染引起的肾综合征出血热 (hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS) 是一组以发热、出血和肾脏损害为主要临床表现的急性传染病。疫区分布于亚洲、欧洲、非洲和美洲 32 个国家和地区,但主要流行于亚洲的我国和韩国,次为欧洲的俄罗斯、芬兰和前南斯拉夫等国,非洲和美洲的病例较少;疫源地则遍及世界五大洲 70 余个国家。在中国, HFRS 是除病毒性肝炎之外危害最大的病毒性传染病,其发病人数占世界发病总数 90% 以上。

[0003] 1978 年韩国学者李镐汪等率先成功地分离到 HFRS 的病原——HV,并建立了检测抗原和抗体的特异性免疫荧光技术,使 HFRS 防治的研究进入了一个新的阶段。在血清学检测和实验研究中,目前已经建立了一系列技术方法,如间接免疫荧光法 (IFA)、免疫酶联吸附实验 (ELISA)、血凝抑制试验 (HI)、空斑减少中和试验 (PRNT) 等。但是,就实验室诊断而言,目前在国内应用最普遍的仍属 IFA。IFA 具有很好的敏感性和特异性,但需要荧光显微镜和训练有素的专业人员,难以在农村、基层医院及现场使用。总的来说,近年问世的各种 HV 基因、抗原和抗体的检测新技术尚不够稳定,有些方法较为复杂,操作流程长,难以在基层单位或工作现场应用;此外,国内 HFRS 检测试剂或药盒的标准化和商品化率还较低。因此,急需建立一种快速、简便、特异、敏感、稳定和规范的,并能满足不同需要的早期诊断方法。

[0004] 研究发现汉坦病毒核衣壳蛋白上含有属特异性、型特异性、组特异性和病毒株特异性抗原位点。N 蛋白的 N 末端 100aa (氨基酸) 主要是亲水性的,具有免疫优势,存在交叉反应性的线性抗原表位。近年来随着分子生物学技术的发展,新的病毒学检测方法不断被应用于 HFRS 防治研究中,如应用重组 HV 核衣壳蛋白 (NP) 替代从细胞培养或乳鼠脑制备的病毒抗原,具有安全、省时、易于纯化和标化等优点,而且汉坦病毒的核衣壳蛋白同源性最高,抗原性最保守,免疫原性强,且容易表达,患者对该蛋白的抗体应答产生早而且滴度高。因而,可以运用重组的 NP 抗原进行 HFRS 血清学诊断。

[0005] 胶体金是一种处于半还原状态的悬浮颗粒,能迅速吸附蛋白质等大分子而不影响其活性,胶体金具有易分辨的红至紫红色,在与大分子结合后,易于用肉眼识别,不需二级放大即可直接观察结果,胶体金诊断产品因而可直接进入没有复杂检测设备的诊所甚至家庭里。近年来,以早孕检测试纸为代表的胶体金免疫诊断试剂已进入千家万户,给人们的生活带来很大的方便。

[0006] 从包括中国专利等有关资料检索表明,目前尚未有利用基因工程方法获得高表达、高活性的截短 NP 重组抗原用于肾综合征出血热的诊断及可同时检测 HFRS 病人血清中

IgM、IgG 抗体的 HFRS 金标快速诊断试纸条的相关报道。

发明内容

[0007] 为了弥补现有技术的不足,本发明的目的是要提出一种用于 HFRS 诊断的截短 NP 重组抗原 e112 及可同时检测 HFRS 病人血清中 IgM、IgG 抗体的 HFRS 快速金标诊断试纸条。

[0008] 本发明解决其技术问题所采用的技术方案是:

[0009] 一. 溶液配方:

[0010] (1) 重组抗原溶解液: SDS 0.1%

[0011] 甘氨酸 250mmol/L

[0012] Tris. Cl 25mmol/L

[0013] (2) 胶体金溶液: 0.03 ~ 0.05% 的四氯金酸, 加 1 ~ 2% 柠檬酸三钠制备成胶体金颗粒;

[0014] (3) 二抗: 羊抗人 IgG 单抗、羊抗人 μ 链单抗, 羊抗鼠 IgG 单抗由厦门波生生物技术有限公司研制;

[0015] (4) 包被缓冲液: 含 1 ~ 3% 蔗糖的磷酸盐缓冲液;

[0016] (5) 基础缓冲液: 由厦门波生生物技术有限公司研制, 主要含牛血清白蛋白的缓冲液;

[0017] (6) 反应缓冲液: 含 0.01 ~ 0.05% NaN_3 的磷酸盐缓冲液;

[0018] (7) 磷酸盐缓冲液 (PBS): 为在 800ml 蒸馏水中溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na_2HPO_4 和 0.24g KH_2PO_4 , 用盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2 ~ 7.6, 加水定容至 1L。

[0019] 二. 本发明重组抗原的工艺流程:

[0020] (1) 本研究所用的汉坦病毒株 A_{537} 是 1985 年在福建省周宁县 HFRS 疫区捕获的一黑线姬鼠肺组织中应用 Vero E6 细胞直接分离出汉坦病毒株 A_{537} ;

[0021] (2) 以汉坦病毒株 A_{537} 基因组为模板, 以 P_{14} 为逆转录引物、 S_1/S_2 为 PCR 扩增引物, 用逆转录 PCR 法常规扩增得到 S 基因全长片段, 其大小为 1696bp, 用 TA 克隆技术将此大片段克隆入 TA 载体 pMD 18-T 中, 获得重组质粒 TA- A_{537} ;

[0022] (3) 以该重组质粒 TA- A_{537} 为模板, 以 P_1 、 P_{112} 为引物 (p_1 为正向引物, 添加了 NcoI 酶切位点; p_{112} 为反向引物, 添加了 Sal I 酶切位点和终止密码子 tta), 从中扩增出长度约 330bp 的截短片段 p_1 -112, 将此片段定向插入原核表达载体 pET-30a, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3), IPTG 诱导表达; Western blot 证实该重组抗原 e112 能被 HFRS 患者阳性血清所识别, 以上所用引物见表 1;

[0023] 表 1 汉坦病毒克隆、表达所应用的引物

[0024]

引物	序列	方向	定位
P_{14}	5'- tagtagtagactcc-3'	M(+)	1-14
S_1	5'- tagtagtagactccctaaaga-3'	M(+)	1-21
S_2	5'- tagtagtagtagtatgctccctaa-3'	M(-)	1679-1696
P_1	5'-gctaccatggcaactatggaggaaactg-3'	M(+)	37-57
P_{112}	5'-atcgtcgacattaaggctcatcaatatccaggtgg-3'	M(-)	351-372

[0025] (4) 克隆基因 p1-112 的核酸序列及其所编码的氨基酸序列：

[0026]	1	ATG GAG GAA CTG CAG AGG GAA ATC AAT GCC CAT GAG GGT CAA CTG	45
[0027]	1	Met Glu Glu Leu Gln Arg Glu Ile Asn Ala His Glu Gly Gln Leu	15
[0028]	46	GTG ATA GCC AGG GAG AAG GTG AGG GAT GCA GAA AAA CAA TAT GAA	90
[0029]	16	Val Ile Ala Arg Gln Lys Val Arg Asp Ala Glu Lys Gln Tyr Glu	30
[0030]	91	AAG GAT CCA GAT GAG CTG AAT AAA AGA ACA TTA ACA GAC AGA GAA	135
[0031]	31	Lys Asp Pro Asp Glu Leu Asn Lys Arg Thr Leu Thr Asp Arg Glu	45
[0032]	136	GGG GTT GCA GCA TCT ATC CAG GCC AAG ATT GAT GAA TTG AAA AGG	180
[0033]	46	Gly Val Ala Ala Ser Ile Gln Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Arg	60
[0034]	181	CAG TTA GCA GAT AGG ATT GCA ACC GGA AAG AAC CTT GGG AAA GAA	225
[0035]	61	Gln Leu Ala Asp Arg Ile Ala Thr Gly Lys Asn Leu Gly Lys Glu	75
[0036]	226	CAG GAT CCC ACA GGG GTT GAG CCT GGA GAC CAT CTG AAA GAG AGA	270
[0037]	91	Gln Asp Pro Thr Gly Val Glu Pro Gly Asp His Leu Lys Glu Arg	105
[0038]	271	TCA ATG CTT AGT TAT GGA AAT GTA TTG GAT TTG AAC CAC CTG GAT	315
[0039]	91	Scr Met Leu Scr Tyr Gly Asn Val Lcu Asp Lcu Asn His Lcu Asp	105
[0040]	316	ATT GAT GAG CCT TAA	330
[0041]	106	Ile Asp Glu Pro End	110

[0042] (5) 采用电洗脱方法纯化重组蛋白：对大量诱导时收集的菌体进行超声粉碎后，将超声上清先经过饱和硫酸铵沉淀粗纯后，取饱和硫酸铵沉淀物进行 SDS-PAGE 电泳，用 0.3mol/L CuCl_2 进行染色确定目标蛋白带 e112 在凝胶中的位置，切下目标蛋白带 e112，置于透析袋中进行电洗脱；纯化蛋白进行 SDS-PAGE，确定纯度并进行蛋白定量。

[0043] 三. 本发明的试纸条制作工艺

[0044] (1) 以胶体金标记重组抗原 e112 和鼠 IgG；

[0045] (2) 两种金标抗原溶液混合后充分浸润玻璃纤维纸，置冻干机冻干；

[0046] (3) 羊抗人 μ 链单抗 1.0 ~ 5.0mg/ml、羊抗人 IgG 单抗 1.0 ~ 5.0mg/ml 与羊抗鼠 IgG 单抗 1.0 ~ 5.0mg/ml 包被 NC 膜，自然晾干；

[0047] (4) 将吸水纸、NC 膜和吸附了金标抗原的玻璃纤维组装成检测 IgM、IgG 的金标试纸条。

[0048] 用本发明制作的重组抗原 e112 及利用重组抗原制作成的 HFRS 快速金标诊断试纸条就可以用于 HFRS 临床诊断。

[0049] 本发明的有益效果是：本发明利用基因工程技术，克隆汉坦病毒的免疫优势抗原的结构基因，并在大肠杆菌内表达，以方便地获得大量廉价的重组抗原，纯化后即可用于免疫学诊断。由此方法得到的重组抗原及快速诊断试纸条克服了现有 HFRS 诊断方法的局限性，具有很高的灵敏度、特异度，而且可以同时检测 HFRS 病人血清中 IgM、IgG 抗体。这对判断患者的感染状态，及对患者作出早期诊断，以赢得最佳的治疗时间，降低病死率及提高治愈率无疑具有重要的意义。此外，由于金标试纸条无需特殊仪器，无需训练有素的专业人员，可以满足基层医院、农村卫生院等临床检测的需要，而且大大的降低了成本，方便了患者，适用于大规模的血清流行病学调查。

附图说明

[0050] 图 1 是本发明的快速金标诊断试纸条。

[0051] 图中 1 对照线, 2IgM, 3IgG, 4 加样处。

具体实施方式

[0052] 实施例 1 :

[0053] 一、重组抗原的制备

[0054] 1、本研究所用的汉坦病毒株 A₅₃₇ 是从 1985 年在福建省周宁县 HFRS 疫区捕获的一黑线姬鼠肺组织中应用 Vero E6 细胞直接分离的毒株 ;

[0055] 2、取病毒感染上清, 用 Viral RNA Mini Kit (QIAGEN 公司) 提取试剂盒提取病毒 RNA。

[0056] 3、用 P₁₄ 逆转录引物及 S₁/S₂PCR 扩增引物从汉坦病毒 A₅₃₇ 株基因组中扩增出全长的 S 基因共 1696bp。RT-PCR 反应体系如下 :

[0057] 逆转录 : 20 μ l 反应体系包含以下成份

[0058]

反应成份	体 积(μ l)
5 \times AMV buffer	4
dNTP(10mmol/L)	1
p14(10 μ mol/L)	1
RNA 酶抑制剂	0.5
AMV 逆转录酶	1
RNA 模板	5
H ₂ O	7.5

[0059] 逆转录反应条件 : 室温 10min, 42 $^{\circ}$ C 逆转录 1h, 96 $^{\circ}$ C 5min, 置冰上 5min, cDNA 冻存于 -20 $^{\circ}$ C

[0060] PCR : 50 μ l 反应体系包含以下成份

[0061]

反应成份	体积(μ l)
10 \times PCR buffer	5
dNTP(2.5mmol/L)	4
S1(10 μ mol/L)	0.5

[0062]

S2(10 μ mol/L)	0.5
EX-Taq 酶(5u/ μ l)	0.5
cDNA	3
H ₂ O	36.5

[0063] PCR 扩 增 反 应 条 件 : 94 $^{\circ}$ C 5min ; 94 $^{\circ}$ C 45s, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 35cycles ; 72 $^{\circ}$ C 10min

[0064] 4、采用 QIAquick Gel extraction 试剂盒对扩增产物进行纯化。用 TA 克隆技术

将纯化后的 PCR 产物直接克隆入 TA 载体 pMD 18-T 中, 获得重组克隆质粒, 命名为 TA-A₅₃₇ ;

[0065] 5、以该重组克隆质粒 TA-A₅₃₇ 为模板, 用 P₁/P₁₁₂ 引物扩增出长度约 330bp 的片段 p1-112, 将扩增得到的截短片段 p1-112 及原核表达载体 pET-30a 分别用 NcoI 和 Sal I 双酶切, 并用 QIAquick Gel extraction 试剂盒纯化回收产物。

[0066] 6、将目的基因片段与表达载体 pET-30a 进行定向连接, 从而构建重组表达质粒, 命名为 pET-112 :

[0067] 按 TaKaRa DNA 连接试剂盒 (Version2.1) 操作说明书进行。

[0068] ①将质粒载体 DNA (0.03pmol) 与插入 DNA 片段 (0.1 ~ 0.3pmol) 混合制备成体积为 5 μl ~ 10 μl 的 DNA 溶液。

[0069] ②向上述 DNA 溶液中加入等体积的 Solution I, 混合均匀。

[0070] ③ 16°C 反应 30min ~ 2h。

[0071] ④取 10 ~ 20 μl 上述连接反应液转化 100 μl 相应的感受态细胞 BL21 (DE3)。

[0072] 7、重组表达质粒的鉴定: 筛选阳性克隆, 以 Sal I 单酶切, Nco I、Sal I 双酶切对重组表达质粒进行酶切鉴定, 筛选阳性克隆。

[0073] 8、重组蛋白的诱导表达:

[0074] (1) 挑单菌落于 5ml 含 Kan+(30ug/ml) 的 LB 培养液中, 37°C 250rpm/min 过夜培养;

[0075] (2) 将过夜培养的含重组质粒的表达菌以 1 : 100 扩种。

[0076] (3) 表达菌生长到 OD 值约 0.8 时, 加入 IPTG 使终浓度为 1mM, 37°C 诱导 4h。

[0077] (4) 菌液用 4°C 8000rpm/min, 离心 5min 收集菌体, 沉淀倒置扣干备用。

[0078] 9、对诱导前后的表达产物进行 SDS-PAGE 鉴定表达效果

[0079] 10、对重组抗原进行 Western blot 鉴定表达产物的抗原活性

[0080] 11、用电洗脱方法纯化重组抗原:

[0081] (1) 细菌的裂解 (超声波粉碎法)

[0082] ①将 1500ml 表达菌液于 4°C, 6000r/min, 离心 10min。

[0083] ② Buffer I 100ml 悬浮沉淀, 置冰浴上, 350W 超声粉碎 20min (2sec 超声, 5sec 间隔)。

[0084] Buffer I (pH 7.2) : 5mM EDTA

[0085] 20mM Tris. Cl

[0086] 150mM NaCl

[0087] ③ 4°C, 12000r/min, 离心 10min, 取少量沉淀和上清进行 SDS-PAGE, 确定目标蛋白位置及纯度, 可溶性蛋白存在于上清中。

[0088] (2) 饱和硫酸铵沉淀:

[0089] ①将上述细菌裂解上清转移到烧杯中, 置冰浴上, 放在磁力搅拌器上边搅拌边加饱和硫酸铵 (S_终 为 10%), 流速控制在 1ml/min。混合液置 4°C 冰箱静置过夜或 > 4h。以防因局部硫酸铵浓度过高而使蛋白在局部浓缩沉淀。

[0090] 饱和硫酸铵加样量 $Y = X * \frac{S_{终} - S_{初}}{100\% - S_{终}}$

[0091] (X 为细菌裂解液体积, S 为饱和硫酸铵浓度)

[0092] ②取出混合液,4℃,12000r/min,离心 10min。留取上清,沉淀用少量去离子水重悬,于 4℃冰箱保存。

[0093] ③测量上下清体积,并将上清移到烧杯中,按上述公式计算所需加入的饱和硫酸铵的量($S_{终}$ 为 20%)。置冰浴上,边搅拌边缓慢地加入饱和硫酸铵,混合液置 4℃冰箱静置过夜或 > 4h。

[0094] ④重复 2 ~ 3 步骤,但 $S_{终}$ 为 30%,以此类推,每次饱和硫酸铵加样量递增 10%。直到几乎所有目标蛋白出现沉淀为止。

[0095] (3) 电洗脱

[0096] ①配制分离胶 8 块,积层胶不加梳子,留出位置用于加样。

[0097] ②对大量诱导时收集的菌体进行超声粉碎。

[0098] ③超声上清先经过饱和硫酸铵沉淀粗纯后,取饱和硫酸铵沉淀物加 6× 加样缓冲液上样,每板加 6ml,注意不要有气泡。

[0099] ④ SDS-PAGE :先 80V 电泳,当样品后沿进入分离胶后,升至 110-120V,电泳过夜。

[0100] ⑤切胶 :取下胶,约在胶的纵向 1/3 处切一小条胶进行 CuCl_2 染色。约 3min 后,将凝胶小条取出,重新放置于原来的位置,观察目标条带在凝胶中的位置,切下目标条带,置于 1×SDS 电泳缓冲液中。

[0101] CuCl_2 染色 :

[0102] 染色液 : 0.3M CuCl_2

[0103] 脱色液 (pH 9.0) :0.25M EDTA

[0104] 0.25M Tris.Cl

[0105] ⑥将胶条分成 3 段,置于透析袋中,并加入 1×SDS 电泳缓冲液,以浸没胶为宜,置于水平电泳槽上电泳。电洗脱 12h,每 4h 吸出透析袋中的溶液,更换新的电泳缓冲液(共 3 次),吸出的液体即为洗脱出的纯化蛋白溶液。

[0106] ⑦纯化样品进行 SDS-PAGE,确定纯度。

[0107] ⑧蛋白定量 :参照 DU530 核酸蛋白分析仪说明书进行。

[0108] ①在主菜单上选择蛋白分析程序。

[0109] ②选择 UV280 方法测定蛋白浓度。

[0110] ③以牛血清白蛋白 (BSA) 为参考蛋白,以溶解待测定蛋白的溶液配制一系列浓度的 BSA 溶液,测定其 OD 值,建立标准曲线。

[0111] ④以溶解 BSA 的溶液调零。

[0112] 实施例 2 :

[0113] HFRS 金标快速诊断试纸条的制作

[0114] (1) 取 0.03%四氯金酸 1000ml,加热至沸腾,加入 1%柠檬酸三钠溶液 25ml,继续煮沸 5 分钟,待胶体金溶液颜色由有蓝经紫变红后,自然冷却后备用 ;

[0115] (2) 取胶体金溶液 1ml,加入 0.2M K_2CO_3 10 μl 、50 μg 纯化抗原,搅匀后静置 1h ;

[0116] (3) 加入 20%牛血清白蛋白 25 μl 、20% PEG 20,000 15 μl 、8,000r/min,离心 8min,弃上清 ;

[0117] (4) 将沉淀悬浮于 1ml 基础缓冲液中,即为金标抗原溶液 ;

[0118] (5) 同法标记鼠 IgG ;

[0119] (6) 两种金标抗原溶液混合后充分浸润玻璃纤维纸,置冻干机冻干;

[0120] (7) 羊抗鼠 IgG 单抗 3.0mg/ml、羊抗人 μ 链单抗 2.0mg/ml、羊抗人 IgG 单抗 2.0mg/ml,分别在 NC 膜的上、中、下位置包被 NC 膜,自然晾干;

[0121] (8) 在约 10cm 宽的底板上,将吸水纸、NC 膜、吸附了金标抗原的玻璃纤维和未吸附抗原的玻璃纤维组装成检测 IgM 与 IgG 的试纸条。

[0122] 评价:将血清或血浆 10 μ l+90 μ l PBS 进行 1:10 稀释后,取至少 60 μ l 的样本稀释液加到样品吸收处,5-10 分钟内观察金标抗原释放后 NC 膜上检测线和对照线的反应情况,检测线和对照线同时出现红色条带判为阳性,仅对照线出现红色条带判为阴性,对照线未出现条带为无效试验,具体判断方法见表 2。

[0123] 表 2 金标诊断试纸条的判断原则

[0124]

金标诊断试纸条			判断结果
对照线(最上面)	IgM 检测线(中间)	IgG 检测线(下面)	
+	+	+	阳性(现症病人)
+	—	+	阳性(既往感染/恢复期)
+	+	—	阳性(早期感染)
+	—	—	阴性
—	—	—	实验失败,需重新再做

[0125] 用 HFRS 金标试剂条对福建(家鼠型为主)、江苏(混合型)、山西(家鼠型为主)、陕西(姬鼠型为主)四省疾控中心保存的肾综合征出血热阳性、阴性血清共 828 份进行检测。以 IFAT/ELISA 为参照标准,HFRS 金标试剂条的敏感性为 97.9%,特异性为 98.2%,总一致率为 98.1%。这充分显示出该金标试剂条具有很高的灵敏度、特异度,而且具有操作简便、快速,不需要特殊仪器设备,结果易于观察,便于保存和运输等优点,非常适用于各种层次尤其是基层医疗单位、农村卫生院等缺乏实验条件和专业人员的地方开展此项工作。

[0126] p1-112. ST25. txt

[0127] SEQUENCE LISTING

[0128] <110> 福建省疾病预防控制中心

[0129] <120> 肾综合征出血热快速金标诊断试纸条

[0130] <130>Hujakka H, Koistinen V, Kuronen I, et al. Diagnostic rapid tests for acute hantavirus

[0131] infections: specific tests for

[0132] hantaan, Dobrava and Puumala viruses a hantavirus combination test[J]. J Virol Methods. 2003

[0133] Mar, 108(1): 117-22.

[0134] <140>200510099746. 3

[0135] <141>2005-09-05

[0136] <160>1

[0137] <170>PatentIn verslon3. 1

[0138] <210>1

[0139] <211>330
 [0140] <212>DNA
 [0141] <213>Hantaan virus
 [0142] <220>
 [0143] <221>exon
 [0144] <222>(1)..(330)
 [0145] <223>
 [0146] <400>1
 [0147] atg gag gaa ctg cag agg gaa atc aat gcc cat gag ggt caa ctg gtg 48
 [0148] Met Glu Glu Leu Gln Arg Glu Ile Asn Ala His Glu Gly Gln Leu Val
 [0149] 1 5 10 15
 [0150] ata gcc agg cag aag gtg agg gat gca gaa aaa caa tat gaa aag gat 96
 [0151] Ile Ala Arg Gln Lys Val Arg Asp Ala Glu Lys Gln Tyr Glu Lys Asp
 [0152] 20 25 30
 [0153] cca gat gag ctg aat aaa aga aca tta aca gac aga gaa ggg gtt gca 144
 [0154] Pro Asp Glu Leu Asn Lys Arg Thr Leu Thr Asp Arg Glu Gly Val Ala
 [0155] 35 40 45
 [0156] gca tct atc cag gcc aag att gat gaa ttg aaa agg cag tta gca gat 192
 [0157] Ala Ser Ile Gln Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Arg Gln Leu Ala Asp
 [0158] 50 55 60
 [0159] agg att gca acc gga aag aac ctt ggg aaa gaa cag gat ccc aca ggg 240
 [0160] Arg Ile Ala Thr Gly Lys Asn Leu Gly Lys Glu Gln Asp Pro Thr Gly
 [0161] 65 70 75 80
 [0162] gtt gag cct gga gac cat ctg aaa gag aga tca atg ctt agt tat gga 288
 [0163] Val Glu Pro Gly Asp His Leu Lys Glu Arg Ser Met Leu Ser Tyr Gly
 [0164] 85 90 95
 [0165] aat gta ttg gat ttg aac cac ctg gat att gat gag cct taa 330
 [0166] Asn Val Leu Asp Leu Asn His Leu Asp Ile Asp Glu Pro
 [0167] 100 105

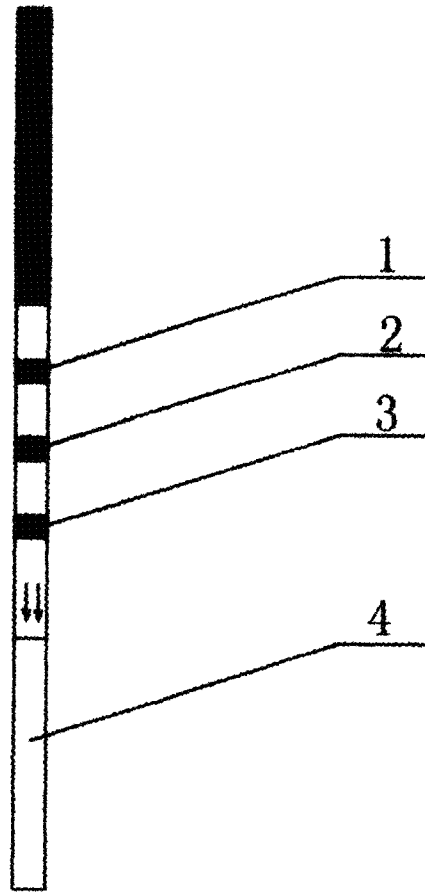


图 1

专利名称(译)	肾综合征出血热快速金标诊断试纸条		
公开(公告)号	CN1800854B	公开(公告)日	2012-04-25
申请号	CN200510099746.3	申请日	2005-09-05
[标]发明人	严延生 吴守丽		
发明人	严延生 吴守丽		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531 G01N33/52 C07H21/00 C07K16/00 G01N1/28		
其他公开文献	CN1800854A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于肾综合征出血热诊断的重组抗原及其快速金标诊断试纸条。其主要针对子HFRS诊断的截短NP重组抗原e112及可同时检测HFRS病人血清中IgM、IgG抗体的HFRS快速金标诊断试纸条。利用基因克隆技术获得汉坦病毒的截短NP重组抗原，纯化后即可用于免疫学诊断。快速金标诊断试纸条克服了现有HFRS诊断方法的局限性，可同时检测HFRS病人血清中IgM、IgG抗体，可判断患者的感染状态，并对患者作出早期诊断，能够降低病死率，提高治愈率。此外，由于金标试纸条无需特殊仪器，无需训练有素的专业人员，可以满足基层医院、农村卫生院等临床检测的需要，而且大大的降低了成本，方便了患者，适用于大规模的血清流行病学调查。

反应成份	体 积(μ l)
5×AMV buffer	4.0
dNTP, 10mmol/L	1.0
p14, 10 μ mol/L	1.0
RNA 酶抑制剂	0.5
AMV 逆转录酶	1.0
RNA 模板	5.0
H ₂ O	7.5