

[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 200510099746.3

[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)

[43] 公开日 2006年7月12日

[11] 公开号 CN 1800854A

[22] 申请日 2005.9.5

[21] 申请号 200510099746.3

[71] 申请人 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

权利要求书6页 说明书10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。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配方，其特征是：

- |              |         |            |
|--------------|---------|------------|
| (1) 重组抗原溶解液： | SDS     | 0.1%       |
|              | 甘氨酸     | 250 mmol/L |
|              | Tris.Cl | 25 mmol/L  |

(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  $\mu$  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<sub>3</sub>的磷酸盐缓冲液；

(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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>和 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>，用盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2~7.6，加水定容至 1L。

2、肾综合征出血热快速金标诊断试纸条的重组抗原工艺流程，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<sub>537</sub>；

(2) 以汉坦病毒株 A<sub>537</sub> 基因组为模板，以 P<sub>14</sub>为逆转录引物、S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub>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<sub>537</sub>；

(3) 以该重组质粒 TA-A<sub>537</sub> 为模板，以 P<sub>1</sub>、P<sub>112</sub>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，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；

(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<sub>2</sub> 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  $\mu$ l 反应体系包含以下成份

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

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

PCR: 50  $\mu$ l 反应体系包含以下成份

反应成份	体积( $\mu$ l)
10 $\times$ PCR buffer	5
dNTP(2.5mmol/L)	4
S1(10 $\mu$ mol/L)	0.5
S2(10 $\mu$ mol/L)	0.5
EX-Taq 酶(5u/ $\mu$ l)	0.5
cDNA	3
H <sub>2</sub> O	36.5

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.

4、根据权利要求 2 所述的长度约 330bp 的截短片段 p1-112, 其特征是:

克隆基因 p1-112 的核酸序列及其所编码的氨基酸序列:

1	ATG GAG GAA CTG CAG AGG GAA ATC AAT GCC CAT GAG GGT CAA CTG	45
1	Met Glu Glu Leu Gln Arg Glu Ile Asn Ala His Glu Gly Gln Leu	15
46	GTG ATA GCC AGG CAG AAG GTG AGG GAT GCA GAA AAA CAA TAT GAA	90
16	Val Ile Ala Arg Gln Lys Val Arg Asp Ala Glu Lys Gln Tyr Glu	30
91	AAG GAT CCA GAT GAG CTG AAT AAA AGA ACA TTA ACA GAC AGA GAA	135
31	Lys Asp Pro Asp Glu Leu Asn Lys Arg Thr Leu Thr Asp Arg Glu	45
136	GGG GTT GCA GCA TCT ATC CAG GCC AAG ATT GAT GAA TTG AAA AGG	180
46	Gly Val Ala Ala Ser Ile Gln Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Arg	60

181	CAG TTA GCA GAT AGG ATT GCA ACC GGA AAG AAC CTT GGG AAA GAA	225
61	Gln Leu Ala Asp Arg Ile Ala Thr Gly Lys Asn Leu Gly Lys Glu	75
226	CAG GAT CCC ACA GGG GTT GAG CCT GCA GAC CAT CTG AAA GAG AGA	270
91	Gln Asp Pro Thr Gly Val Glu Pro Gly Asp His Leu Lys Glu Arg	105
271	TCA ATG CTT AGT TAT GGA AAT GTA TTG GAT TTG AAC CAC CTG GAT	315
91	Ser Met Leu Ser Tyr Gly Asn Val Leu Asp Leu Asn His Leu Asp	105
316	ATT GAT GAG CCT TAA	330
106	Ile Asp Glu Pro End	110

5、根据权利要求 2 所述的汉坦病毒克隆、表达所应用的引物，其特征是：  
(p1 为正向引物，添加了 NcoI 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)

引物	序 列	方 向	定 位
P <sub>14</sub>	5'- tagtagtagactcc-3'	M(+)	1-14
S <sub>1</sub>	5'- tagtagtagactccctaaaga-3'	M(+)	1-21
S <sub>2</sub>	5'- tagtagtagtagtatgctccctaa-3'	M(-)	1679-1696
P <sub>1</sub>	5'-gctaccatggcaactatggaggaactg-3'	M(+)	37-57
P <sub>112</sub>	5'-atcgtcgacattaaggctcatcaatatccaggtgg-3'	M(-)	351-372

6、根据权利要求 2 所述的重组蛋白，其特征是：其重组蛋白诱导表达：

- (1)挑单菌落于 5ml 含 Kanamycin(30ug/ml)的 LB 培养液中,37℃ 250rpm/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℃ 诱导 4h。
- (4) 菌液用 4℃ 8 000rpm/min，离心 5min 收集菌体，沉淀倒置扣干备用。

7、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) 用超声波粉碎法裂解细菌

- ① 将 1500ml 表达菌液于 4℃，6 000r/min，离心 10min；
- ② Buffer I 100ml 悬浮沉淀，置冰浴上，350W 超声粉碎 20min (2sec 超声，

5sec 间隔);

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

③ 4℃, 12 000r/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 ( $S_{\text{终}}$  为 10%), 流速控制在 1ml/min; 混合液置 4℃ 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℃, 12 000r/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;

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 ( $S_{\text{终}}$  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;

④ 重复 2~3 步骤, 但  $S_{\text{终}}$  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粉碎;



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；

(2) 取胶体金溶液 1ml，加入 0.2M  $K_2CO_3$  10  $\mu$  l、50  $\mu$  g 纯化抗原，搅匀后静置 1h；

(3) 加入 20%牛血清白蛋白 25  $\mu$  l、20% PEG 20,000 15  $\mu$  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  $\mu$  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。

9、根据权利要求 8 所述的金标诊断试纸条的判断原则，其特征是：

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

## 肾综合征出血热快速金标诊断试纸条

### 技术领域

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

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。

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。

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。

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。

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

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。

本发明解决其技术问题所采用的技术方案是：

#### 一. 溶液配方：

(1) 重组抗原溶解液：	SDS	0.1%
	甘氨酸	250 mmol/L
	Tris.Cl	25 mmol/L

(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  $\mu$  链单抗，羊抗鼠 IgG 单抗由厦门波生生物技术有限公司研制；

(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: 含 0.01~0.05%NaN<sub>3</sub> 的磷酸盐缓冲液;

(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<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 0.24g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 用盐酸调节溶液的 pH 值至 7.2~7.6, 加水定容至 1L。

## 二. 本发明重组抗原的工艺流程:

(1) 本研究所用的汉坦病毒株 A<sub>537</sub> 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<sub>537</sub>;

(2) 以汉坦病毒株 A<sub>537</sub> 基因组为模板, 以 P<sub>14</sub> 为逆转录引物、S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub> 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<sub>537</sub>;

(3) 以该重组质粒 TA-A<sub>537</sub> 为模板, 以 P<sub>1</sub>、P<sub>112</sub> 为引物 (p<sub>1</sub> 为正向引物, 添加了 NcoI 酶切位点; p<sub>112</sub> 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<sub>1</sub>-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;

表 1 汉坦病毒克隆、表达所应用的引物

引物	序 列	方 向	定 位
P <sub>14</sub>	5'- tagtagtagactcc-3'	M(+)	1-14
S <sub>1</sub>	5'- tagtagtagactccctaaaga-3'	M(+)	1-21
S <sub>2</sub>	5'- tagtagtagtagtatgctccctaa-3'	M(-)	1679-1696
P <sub>1</sub>	5'-gctaccatggcaactatggaggaaactg-3'	M(+)	37-57
P <sub>112</sub>	5'-atcgtcgacattaaggctcatcaatatccaggtg-3'	M(-)	351-372

(4) 克隆基因 p<sub>1</sub>-112 的核酸序列及其所编码的氨基酸序列:

1	ATG GAG GAA CTG CAG AGG GAA ATC AAT GCC CAT GAG GGT CAA CTG	45
1	Met Glu Glu Leu Gln Arg Glu Ile Asn Ala His Glu Gly Gln Leu	15
46	GTG ATA GCC AGG CAG AAG GTG AGG GAT GCA GAA AAA CAA TAT GAA	90
16	Val Ile Ala Arg Gln Lys Val Arg Asp Ala Glu Lys Gln Tyr Glu	30
91	AAG GAT CCA GAT GAG CTG AAT AAA AGA ACA TTA ACA GAC AGA GAA	135
31	Lys Asp Pro Asp Glu Leu Asn Lys Arg Thr Leu Thr Asp Arg Glu	45

136	GGG GTT GCA GCA TCT ATC CAG GCC AAG ATT GAT GAA TTG AAA AGG	180
46	Gly Val Ala Ala Ser Ile Gln Ala Lys Ile Asp Glu Leu Lys Arg	60
181	CAG TTA GCA GAT AGG ATT GCA ACC GGA AAG AAC CTT GGG AAA GAA	225
61	Gln Leu Ala Asp Arg Ile Ala Thr Gly Lys Asn Leu Gly Lys Glu	75
226	CAG GAT CCC ACA GGG GTT GAG CCT GGA GAC CAT CTG AAA GAG AGA	270
91	Gln Asp Pro Thr Gly Val Glu Pro Gly Asp His Leu Lys Glu Arg	105
271	TCA ATG CTT AGT TAT GGA AAT GTA TTG GAT TTG AAC CAC CTG GAT	315
91	Ser Met Leu Ser Tyr Gly Asn Val Leu Asp Leu Asn His Leu Asp	105
316	ATT GAT GAG CCT TAA	330
106	Ile Asp Glu Pro End	110

(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<sub>2</sub> 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。

### 三. 本发明的试纸条制作工艺

- (1) 以胶体金标记重组抗原 e112 和鼠 IgG；
- (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；
- (3) 羊抗人  $\mu$  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；
- (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。

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。

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

图 1 是本发明的快速金标诊断试纸条。

图中 1 对照线，2 IgM，3 IgG，4 加样处。

### 具体实施方式

#### 实施例 1:

#### 一、重组抗原的制备

- 1、本研究所用的汉坦病毒株 A<sub>537</sub> 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；
- 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。
- 3、用 P<sub>1</sub> 逆转录引物及 S<sub>1</sub>/S<sub>2</sub> PCR 扩增引物从汉坦病毒 A<sub>537</sub> 株基因组中扩增出全长的 S 基因共 1696bp。RT-PCR 反应体系如下：

逆转录：20 μl 反应体系包含以下成份

反应成份	体积(μl)
5×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 <sub>2</sub> O	7.5

逆转录反应条件：室温 10min，42℃ 逆转录 1h，96℃ 5min，置冰上 5min，cDNA 冻存于 -20℃

PCR：50 μl 反应体系包含以下成份

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

S2(10 $\mu$ mol/L)	0.5
EX-Taq 酶(5u/ $\mu$ l)	0.5
cDNA	3
H <sub>2</sub> O	36.5

PCR 扩增反应条件: 94°C 5min; 94°C 45s, 55°C 45s, 72°C 2min, 35cycles; 72°C 10min

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-A<sub>537</sub>;

5、以该重组克隆质粒 TA-A<sub>537</sub> 为模板, 用 P<sub>1</sub>/P<sub>112</sub> 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 *Nco* I 和 *Sal* I 双酶切, 并用 QIAquick Gel extraction 试剂盒纯化回收产物。

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:

按 TaKaRa DNA 连接试剂盒 (Version 2.1) 操作说明书进行。

- 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  $\mu$  l~10  $\mu$  l 的 DNA 溶液。
- ② 向上述 DNA 溶液中加入等体积的 Solution I, 混合均匀。
- ③ 16°C 反应 30min~2h。
- ④ 取 10~20  $\mu$  l 上述连接反应液转化 100  $\mu$  l 相应的感受态细胞 BL21(DE3)。

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。

8、重组蛋白的诱导表达:

- (1) 挑单菌落于 5ml 含 Kan<sup>+</sup> (30ug/ml) 的 LB 培养液中, 37°C 250rpm/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 使终浓度为 1mM, 37°C 诱导 4h。

(4) 菌液用 4℃ 8 000rpm/min, 离心 5min 收集菌体, 沉淀倒置扣干备用。

9、对诱导前后的表达产物进行 SDS-PAGE 鉴定表达效果

10、对重组抗原进行 Western blot 鉴定表达产物的抗原活性

11、用电洗脱方法纯化重组抗原:

(1) 细菌的裂解 (超声波粉碎法)

① 将 1500ml 表达菌液于 4℃, 6 000r/min, 离心 10min。

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

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

③ 4℃, 12 000r/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 ( $S_{终}$  为 10%), 流速控制在 1ml/min。混合液置 4℃ 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。

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

(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℃, 12 000r/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。

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 ( $S_{\text{铵}}$  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  $S_{\text{铵}}$  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粉碎。

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, 当样品后沿进入分离胶后, 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  $\text{CuCl}_2$  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。

$\text{CuCl}_2$  染色:

染色液: 0.3M  $\text{CuCl}_2$

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×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：参照 DU530 核酸蛋白分析仪说明书进行。

① 在主菜单上选择蛋白分析程序。

② 选择 UV280 方法测定蛋白浓度。

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。

④ 以溶解 BSA 的溶液调零。

实施例 2:

HFRS 金标快速诊断试纸条的制作

(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；

(2) 取胶体金溶液 1ml，加入 0.2M  $K_2CO_3$  10  $\mu$  l、50  $\mu$  g 纯化抗原，搅匀后静置 1h；

(3) 加入 20% 牛血清白蛋白 25  $\mu$  l、20% PEG 20,000 15  $\mu$  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  $\mu$  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。

评价：将血清或血浆 10ul+90ul PBS 进行 1:10 稀释后，取至少 60ul 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。

表 2 金标诊断试纸条的判断原则

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

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。

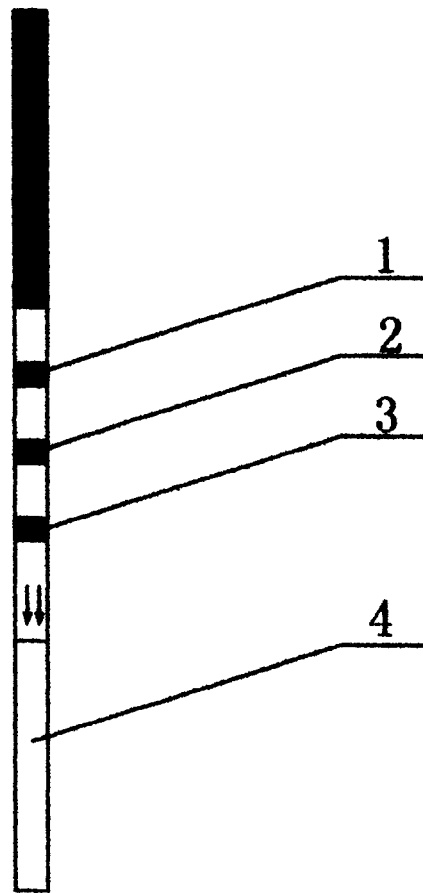


图 1

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	<a href="#">CN1800854A</a>	公开(公告)日	2006-07-12
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	CN1800854B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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。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。

$$\text{饱和硫酸铵加样量 } Y = X * \frac{S_2 - S_1}{100\% - S_2}$$