

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/546

G01N 33/531



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410070147.4

[43] 公开日 2005 年 8 月 31 日

[11] 公开号 CN 1661372A

[22] 申请日 2004.8.3

[21] 申请号 200410070147.4

[30] 优先权

[32] 2004.2.25 [33] CN [31] 200410003420.1

[71] 申请人 中国科学院动物研究所

地址 100080 北京市海淀区北四环 25 号

[72] 发明人 陈 仨 杨建国 朱玉山 顾 莹

邢 娟 金海京 王晓惠

[74] 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司

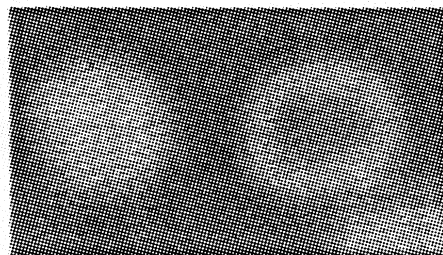
代理人 王凤华

权利要求书 1 页 说明书 21 页 附图 2 页

[54] 发明名称 一种用于检测 SARS 抗体的免疫微球及其制备方法和用途

[57] 摘要

本发明涉及一种用于检测 SARS 抗体的免疫微球, 及其制备方法和用途。该免疫微球是以表面有羧基修饰的聚苯乙烯微球为内核, 其表面的羧基通过多聚赖氨酸化学偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒 S, N, M 或 E 蛋白。该免疫微球可以作为检测试剂检测抗 SARS 抗体。本发明提供的用于检测 SARS 抗体的免疫微球与现有技术相比, 其敏感性和特异性好, 准确性高, 避免了 PCR 诊断试剂盒的假阳性的缺点; 整个检测过程快速; 检测不需要任何仪器设备, 经济实用, 适合广大基层卫生防疫单位使用。



1、一种用于检测 SARS 抗体的免疫微球，其为以聚苯乙烯微球为内核，其表面的羧基通过多聚赖氨酸偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒 S, N, M 或 E 蛋白，所述的聚苯乙烯微球为表面直径为 200~900 纳米，其表面有羧基修饰。

2、一种权利要求 1 所述的用于检测 SARS 抗体的免疫微球的制备方法，是采用化学偶联法将 SARS 冠状病毒 S, N, M 或 E 蛋白作为抗原偶联到微球，包括如下的步骤：

1) 将聚苯乙烯微球 15~20mg/ml，用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤后，重悬于 0.01~0.05M 的 pH4~5 的磷酸缓冲液，然后加入 2~4mg/ml 的碳二亚胺，于室温反应完全后，离心，用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤，重悬于 0.01~0.05M 的 pH 7.5~8.5 的碳酸盐缓冲液；所述的聚苯乙烯微球直径为 200~900 纳米，其表面有羧基修饰；

2) 向步骤 1) 得到的混合液中加入 0.2~2.4mg/ml 的多聚赖氨酸，于室温反应完全；用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤后，重悬于 0.01~0.05M 的 pH4~5 的磷酸缓冲液，然后加入 2~4mg/ml 的碳二亚胺，于室温反应完全；用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤，重悬于 0.01~0.05M 的 pH 7.5~8.5 的碳酸盐缓冲液；

3) 向步骤 2) 得到的混合液中加入作为抗原的 SARS 冠状病毒 S, N, M 或 E 蛋白 0.2~2.4mg/ml，于室温反应完全；用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤后，重悬于 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液；加入 50~200 微升 0.25M 乙酰胺，于室温反应完全后，离心分出固体；

4) 重悬于 1g/ml 牛血清 (BSA) 和 0.01~0.05M 的 pH 7.5~8.5 的碳酸盐缓冲液，于室温反应完全后，离心分出固体，得到用于检测 SARS 抗体的免疫微球。

3、一种权利要求 1 所述的用于检测 SARS 抗体的免疫微球的用途，该免疫微球可以作为检测试剂检测抗 SARS 抗体。

一种用于检测 SARS 抗体的免疫微球及其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及一种用于检测 SARS 抗体的免疫微球，及其制备方法和用途。

技术背景

SARS（严重急性呼吸综合症）冠状病毒是一种新发现的冠状病毒，其引起的这种新型疾病发病快，传播速度快，若不及时诊断治疗，病死率非常高。

目前在科研和临床上常用的检测方法是酶联免疫法（ELISA）。使用酶联免疫法（ELISA）检测抗体，即将抗原包被酶标板上，加小牛血清或脱脂奶封闭，再加待测血清后温育 1 小时，经反复冲洗后加酶标第二抗体，温育，再冲洗多次后加显色的底物。此法虽然敏感性和特异性很好，但是要完成全部试验需要 2 小时以上。

而使用免疫微球法检测抗体是一种简便、快速的方法，只需 1 分钟就可得到结果。该方法是将抗原偶联或交联到有机聚合物制备的微球上，制成免疫微球试剂来检测抗体。但是现有的免疫微球试剂的制备方法，无论是物理或是化学方法，得到的免疫微球均不是通过共价键结合的，因此免疫微球本身很不稳定，受温度和盐浓度影响很大，容易造成假阳性的实验误差。

发明内容

本发明的目的在于克服现有酶联免疫法不够简便、快速；而免疫微球法的免疫微球本身很不稳定，容易造成假阳性实验误差的缺陷，从而提供一种既可以快速、简便的检测，又很稳定的用于检测 SARS 抗体的免疫微球。

本发明的另一目的在于提供一种所述的用于检测 SARS 抗体的免疫微球的制备方法。

本发明的再一目的在于提供一种所述的用于检测 SARS 抗体的免疫微球的用途。

本发明的目的是通过如下的技术方案实现的：

本发明提供的用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）抗体的免疫微球，其为以聚苯乙烯微球为内核，其表面的羧基通过多聚赖氨酸偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒

S, N, M 或 E 蛋白, 所述的聚苯乙烯微球为表面直径为 200~900 纳米, 其表面有羧基修饰。

本发明提供一种所述的用于检测 SARS 抗体的免疫微球的制备方法, 是采用化学偶联法将 SARS 冠状病毒 S, N, M 或 E 蛋白作为抗原偶联到微球, 包括如下的步骤:

1) 将聚苯乙烯微球 15~20mg/ml, 用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤后, 重悬于 0.01~0.05M 的 pH4~5 的磷酸缓冲液, 然后加入 2~4mg/ml 的碳二亚胺, 于室温反应完全后, 离心, 用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤, 重悬于 0.01~0.05M 的 pH 7.5~8.5 的碳酸盐缓冲液; 所述的聚苯乙烯微球直径为 200~900 纳米, 其表面有羧基修饰;

2) 向步骤 1) 得到的混合液中加入 0.2~2.4mg/ml 的多聚赖氨酸, 于室温反应完全; 用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤后, 重悬于 0.01~0.05M 的 pH4~5 的磷酸缓冲液, 然后加入 2~4mg/ml 的碳二亚胺, 于室温反应完全; 用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤, 重悬于 0.01~0.05M 的 pH 7.5~8.5 的碳酸盐缓冲液;

3) 向步骤 2) 得到的混合液中加入作为抗原的 SARS 冠状病毒 S, N, M 或 E 蛋白 0.2~2.4mg/ml, 于室温反应完全; 用 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液洗涤后, 重悬于 0.1~0.5M 的 pH8.8~9.8 的碳酸盐缓冲液; 加入 50~200 微升 0.25M 乙酰胺, 于室温反应完全后, 离心分出固体;

4) 重悬于 1g/ml 牛血清 (BSA) 和 0.01~0.05M 的 pH 7.5~8.5 的碳酸盐缓冲液, 于室温反应完全后, 离心分出固体, 得到用于检测 SARS 抗体的免疫微球。

所述的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的氨基酸序列为:

MetPheIlePheLeu	LeuPheLeuThrLeu	ThrSerGlySerAsp	LeuAspArgCysThr
ThrPheAspAspVal	GlnAlaProAsnTyr	ThrGlnHisThrSer	SerMetArgGlyVal
TyrTyrProAspGlu	IlePheArgSerAsp	ThrLeuTyrLeuThr	GlnAspLeuPheLeu
ProPheTyrSerAsn	ValThrGlyPheHis	ThrIleAsnHisThr	PheAspAsnProVal
IleProPheLysAsp	GlyIleTyrPheAla	AlaThrGluLysSer	AsnValValArgGly
TrpValPheGlySer	ThrMetAsnAsnLys	SerGlnSerValIle	IleIleAsnAsnSer
ThrAsnValValIle	ArgAlaCysAsnPhe	GluLeuCysAspAsn	ProPhePheAlaVal
SerLysProMetGly	ThrGlnThrHisThr	MetIlePheAspAsn	AlaPheAsnCysThr

PheGluTyrIleSer	AspAlaPheSerLeu	AspValSerGluLys	SerGlyAsnPheLys
HisLeuArgGluPhe	ValPheLysAsnLys	AspGlyPheLeuTyr	ValTyrLysGlyTyr
GlnProIleAspVal	ValArgAspLeuPro	SerGlyPheAsnThr	LeuLysProIlePhe
LysLeuProLeuGly	IleAsnIleThrAsn	PheArgAlaIleLeu	ThrAlaPheSerPro
AlaGlnAspThrTrp	GlyThrSerAlaAla	AlaTyrPheValGly	TyrLeuLysProThr
ThrPheMetLeuLys	TyrAspGluAsnGly	ThrIleThrAspAla	ValAspCysSerGln
AsnProLeuAlaGlu	LeuLysCysSerVal	LysSerPheGluIle	AspLysGlyIleTyr
GlnThrSerAsnPhe	ArgValValProSer	GlyAspValValArg	PheProAsnIleThr
AsnLeuCysProPhe	GlyGluValPheAsn	AlaThrLysPhePro	SerValTyrAlaTrp
GluArgLysLysIle	SerAsnCysValAla	AspTyrSerValLeu	TyrAsnSerThrPhe
PheSerThrPheLys	CysTyrGlyValSer	AlaThrLysLeuAsn	AspLeuCysPheSer
AsnValTyrAlaAsp	SerPheValValLys	GlyAspAspValArg	GlnIleAlaProGly
GlnThrGlyValIle	AlaAspTyrAsnTyr	LysLeuProAspAsp	PheMetGlyCysVal
LeuAlaTrpAsnThr	ArgAsnIleAspAla	ThrSerThrGlyAsn	TyrAsnTyrLysTyr
ArgTyrLeuArgHis	GlyLysLeuArgPro	PheGluArgAspIle	SerAsnValProPhe
SerProAspGlyLys	ProCysThrProPro	AlaLeuAsnCysTyr	TrpProLeuAsnAsp
TyrGlyPheTyrThr	ThrThrGlyIleGly	TyrGlnProTyrArg	ValValValLeuSer
PheGluLeuLeuAsn	AlaProAlaThrVal	CysGlyProLysLeu	SerThrAspLeuIle
LysAsnGlnCysVal	AsnPheAsnPheAsn	GlyLeuThrGlyThr	GlyValLeuThrPro
SerSerLysArgPhe	GlnProPheGlnGln	PheGlyArgAspVal	SerAspPheThrAsp
SerValArgAspPro	LysThrSerGluIle	LeuAspIleSerPro	CysSerPheGlyGly
ValSerValIleThr	ProGlyThrAsnAla	SerSerGluValAla	ValLeuTyrGlnAsp
ValAsnCysThrAsp	ValSerThrAlaIle	HisAlaAspGlnLeu	ThrProAlaTrpArg
IleTyrSerThrGly	AsnAsnValPheGln	ThrGlnAlaGlyCys	LeuIleGlyAlaGlu
HisValAspThrSer	TyrGluCysAspIle	ProIleGlyAlaGly	IleCysAlaSerTyr
HisThrValSerLeu	LeuArgSerThrSer	GlnLysSerIleVal	AlaTyrThrMetSer
LeuGlyAlaAspSer	SerIleAlaTyrSer	AsnAsnThrIleAla	IleProThrAsnPhe
SerIleSerIleThr	ThrGluValMetPro	ValSerMetAlaLys	ThrSerValAspCys
AsnMetTyrIleCys	GlyAspSerThrGlu	CysAlaAsnLeuLeu	LeuGlnTyrGlySer
PheCysThrGlnLeu	AsnArgAlaLeuSer	GlyIleAlaAlaGlu	GlnAspArgAsnThr
ArgGluValPheAla	GlnValLysGlnMet	TyrLysThrProThr	LeuLysTyrPheGly

GlyPheAsnPheSer	GlnIleLeuProAsp	ProLeuLysProThr	LysArgSerPheIle
GluAspLeuLeuPhe	AsnLysValThrLeu	AlaAspAlaGlyPhe	MetLysGlnTyrGly
GluCysLeuGlyAsp	IleAsnAlaArgAsp	LeuIleCysAlaGln	LysPheAsnGlyLeu
ThrValLeuProPro	LeuLeuThrAspAsp	MetIleAlaAlaTyr	ThrAlaAlaLeuVal
SerGlyThrAlaThr	AlaGlyTrpThrPhe	GlyAlaGlyAlaAla	LeuGlnIleProPhe
AlaMetGlnMetAla	TyrArgPheAsnGly	IleGlyValThrGln	AsnValLeuTyrGlu
AsnGlnLysGlnIle	AlaAsnGlnPheAsn	LysAlaIleSerGln	IleGlnGluSerLeu
ThrThrThrSerThr	AlaLeuGlyLysLeu	GlnAspValValAsn	GlnAsnAlaGlnAla
LeuAsnThrLeuVal	LysGlnLeuSerSer	AsnPheGlyAlaIle	SerSerValLeuAsn
AspIleLeuSerArg	LeuAspLysValGlu	AlaGluValGlnIle	AspArgLeuIleThr
GlyArgLeuGlnSer	LeuGlnThrTyrVal	ThrGlnGlnLeuIle	ArgAlaAlaGluIle
ArgAlaSerAlaAsn	LeuAlaAlaThrLys	MetSerGluCysVal	LeuGlyGlnSerLys
ArgValAspPheCys	GlyLysGlyTyrHis	LeuMetSerPhePro	GlnAlaAlaProHis
GlyValValPheLeu	HisValThrTyrVal	ProSerGlnGluArg	AsnPheThrThrAla
ProAlaIleCysHis	GluGlyLysAlaTyr	PheProArgGluGly	ValPheValPheAsn
GlyThrSerTrpPhe	IleThrGlnArgAsn	PhePheSerProGln	IleIleThrThrAsp
AsnThrPheValSer	GlyAsnCysAspVal	ValIleGlyIleIle	AsnAsnThrValTyr
AspProLeuGlnPro	GluLeuAspSerPhe	LysGluGluLeuAsp	LysTyrPheLysAsn
HisThrSerProAsp	ValAspLeuGlyAsp	IleSerGlyIleAsn	AlaSerValValAsn
IleGlnLysGluIle	AspArgLeuAsnGlu	ValAlaLysAsnLeu	AsnGluSerLeuIle
AspLeuGlnGluLeu	GlyLysTyrGluGln	TyrIleLysTrpPro	TrpTyrValTrpLeu
GlyPheIleAlaGly	LeuIleAlaIleVal	MetValThrIleLeu	LeuCysCysMetThr
SerCysCysSerCys	LeuLysGlyAlaCys	SerCysGlySerCys	CysLysPheAspGlu
AspAspSerGluPro	ValLeuLysGly	ValLysLeuHisTyr	Thr

所述的 SARS 冠状病毒 N 蛋白的氨基酸序列为:

MetSerAspAsnGly	ProGlnSerAsnGln	ArgSerAlaProArg	IleThrPheGlyGly
ProThrAspSerThr	AspAsnAsnGlnAsn	GlyGlyArgAsnGly	AlaArgProLysGln
ArgArgProGlnGly	LeuProAsnAsnThr	AlaSerTrpPheThr	AlaLeuThrGlnHis
GlyLysGluGluLeu	ArgPheProArgGly	GlnGlyValProIle	AsnThrAsnSerGly
ProAspAspGlnIle	GlyTyrTyrArgArg	AlaThrArgArgVal	ArgGlyGlyAspGly

LysMetLysGluLeu	SerProArgTrpTyr	PheTyrTyrLeuGly	ThrGlyProGluAla
SerLeuProTyrGly	AlaAsnLysGluGly	IleValTrpValAla	ThrGluGlyAlaLeu
AsnThrProLysAsp	HisIleGlyThrArgAsn	ProAsnAsnAsnAla	AlaThrValLeuGln
LeuProGlnGlyThr	ThrLeuProLysGly	PheTyrAlaGluGly	SerArgGlyGlySer
GlnAlaSerSerArg	SerSerSerArgSer	ArgGlyAsnSerArg	AsnSerThrProGly
SerSerArgGlyAsn	SerProAlaArgMet	AlaSerGlyGlyGly	GluThrAlaLeuAla
LeuLeuLeuLeuAsp	ArgLeuAsnGlnLeu	GluSerLysValSer	GlyLysGlyGlnGln
GlnGlnGlyGlnThr	ValThrLysLysSer	AlaAlaGluAlaSer	LysLysProArgGln
LysArgThrAlaThr	LysGlnTyrAsnVal	ThrGlnAlaPheGly	ArgArgGlyProGlu
GlnThrGlnGlyAsn	PheGlyAspGlnAsp	LeuIleArgGlnGly	ThrAspTyrLysHis
TrpProGlnIleAla	GlnPheAlaProSer	AlaSerAlaPhePhe	GlyMetSerArgIle
GlyMetGluValThr	ProSerGlyThrTrp	LeuThrTyrHisGly	AlaIleLysLeuAsp
AspLysAspProGln	PheLysAspAsnVal	IleLeuLeuAsnLys	HisIleAspAlaTyr
LysThrPheProPro	ThrGluProLysLys	AspLysLysLysLys	ThrAspGluAlaGln
ProLeuProGlnArg	GlnLysLysGlnPro	ThrValThrLeuLeu	ProAlaAlaAspMet
AspAspPheSerArg	GlnLeuGlnAsnSer	MetSerGlyAlaSer	AlaAspSerThrGln Ala

所述的 SARS 冠状病毒 M 蛋白的氨基酸序列为：

MetAlaAspAsnGly	ThrIleThrValGlu	GluLeuLysGlnLeu	LeuGluGlnTrpAsn
LeuValIleGlyPhe	LeuPheLeuAlaTrp	IleMetLeuLeuGln	PheAlaTyrSerAsn
ArgAsnArgPheLeu	TyrIleIleLysLeu	ValPheLeuTrpLeu	LeuTrpProValThr
LeuAlaCysPheVal	LeuAlaAlaValTyr	ArgIleAsnTrpVal	ThrGlyGlyIleAla
IleAlaMetAlaCys	IleValGlyLeuMet	TrpLeuSerTyrPhe	ValAlaSerPheArg
LeuPheAlaArgThr	ArgSerMetTrpSer	PheAsnProGluThr	AsnIleLeuLeuAsn
ValProLeuArgGly	ThrIleValThrArg	ProLeuMetGluSer	GluLeuValIleGly
AlaValIleIleArg	GlyHisLeuArgMet	AlaGlyHisSerLeu	GlyArgCysAspIle
LysAspLeuProLys	GluIleThrValAla	ThrSerArgThrLeu	SerTyrTyrLysLeu
GlyAlaSerGlnArg	ValGlyThrAspSer	GlyPheAlaAlaTyr	AsnArgTyrArgIle
GlyAsnTyrLysLeu	AsnThrAspHisAla	GlySerAsnAspAsn	IleAlaLeuLeuVal Gln

所述的 SARS 冠状病毒 E 蛋白的氨基酸序列为：

MetTyrSerPheVal	SerGluGluThrGly	ThrLeuIleValAsn	SerValLeuLeuPhe
LeuAlaPheValVal	PheLeuLeuValThr	LeuAlaIleLeuThr	AlaLeuArgLeuCys
AlaTyrCysCysAsn	IleValAsnValSer	LeuValLysProThr	ValTyrValTyrSer
ArgValLysAsnLeu	AsnSerSerGluGly	ValProAspLeuLeu	Val

将此用于检测 SARS 抗体的免疫微球依次分别用 1%BSA、5%甘油、0.01%NaN₃、0.01M 的 pH8.0 的 PBS 缓冲液重悬，并用 400w 超声波处理 20 秒，备用。

本发明提供一种所述的用于检测 SARS 抗体的免疫微球的用途。该免疫微球可以作为检测试剂检测抗（SARS）抗体，其检测方法如下：

将被测血清样品滴在洁净的玻片或透明塑料片上，加入本发明提供的用于检测 SARS 抗体的免疫微球，其中，偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒 S,N,M 或 E 蛋白的免疫微球各占 1/4，用竹签、牙签、塑料棒或其他物体搅拌，将待测样品和免疫微球混匀并呈圆斑状。

在黑色背景下，用肉眼或在显微镜下直接观察凝集反应，并用下列符号记录结果：

- （一）无肉眼可见凝集颗粒；
- （+）肉眼可见细的凝集颗粒，背景混浊；
- （++）肉眼可见大的凝集颗粒，背景稍混浊；
- （+++）肉眼可见大而清晰凝集颗粒，背景清楚；
- （++++）肉眼可见大而清晰的凝集块，背景清楚。

也可进行半定量测定抗体滴度，将被测血清倍比稀释，按上法测定，以稀释度为抗体滴度。

SARS 病是一种严重的传染性极强的烈性传染病，需要快速、准确地进行诊断。本发明提供的用于检测 SARS（严重急性呼吸综合症）抗体的免疫微球是将基因重组的 SARS 冠状病毒 S,N,M,E 蛋白通过化学方法偶联到(乳胶)聚苯乙烯微球上。该免疫微球与现有技术相比，其有益效果为：

第一，准确性高。因为使用的基因工程重组抗原，其纯度达到 99%，为此，避免了 PCR 诊断试剂盒的假阳性的缺点；

第二，快速。整个检测过程仅需要数分钟，避免了酶联免疫诊断试剂盒需要数小

时的费时的缺点;

第三, 经济实用。检测不需要任何仪器设备, 适合广大基层卫生防疫单位使用。

总之, 该免疫微球能够快速检测血清抗 SARS 抗体, 且敏感性和特异性均好。

附图说明

图 1 为免疫微球检测 SARS 抗体: 左(阴性), 右(阳性);

图 2 为免疫前、后兔血清与 SARS CoV 的基因重组蛋白免疫微球反应(40X); 其中: A. 免疫前兔血清; B. 免疫后兔血清;

图 3 为正常人和病人血清与 SARS CoV 基因重组蛋白免疫微球反应; 其中: A. 正常人血清(10X); B. SARS 病人血清(强反应(10X); C. SARS 病人血清(强反应 40X); D. SARS 病人血清(1:200 稀释 40X)。

具体实施方式

实施例 1、偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的免疫微球的制备

SARS 冠状病毒 S 蛋白抗原的制备及鉴定:

制备——用基因重组技术克隆、表达和纯化 SARS 冠状病毒 S 蛋白作为抗原: 用 RT-PCR 方法扩增 SARS 冠状病毒 S 的基因片段, 将该基因片段经测序证实基因序列正确无误后, 再将其克隆到表达载体如原核表达载体 pQE30, 或酵母表达载体 pPICZαA, 然后进行表达和蛋白纯化。

鉴定——抗原纯化后, 通过以下试验进行鉴定:

1) 抗原蛋白含量测定: 取抗原 1 毫升用分光光度计测其蛋白含量, 在其 260nm 和 280nm 处分别测 OD 值后, 用公式 $280\text{nm OD} \times 1.45 - 260\text{nm OD} \times 0.74$ 即可计算抗原的蛋白含量 1mg/ml 左右;

2) 抗原蛋白纯度测定: 取抗原 20 微升(含蛋白量 5 微克)走蛋白电泳即 SDS-PAGE 电泳, 结果显示为一条带。

3) 酶联免疫试验(ELISA): 以 2.5 微克/毫升抗原 200 微升包被酶标微孔板, 置 4℃ 20 小时后, 弃去抗原包被液, 加入 5%小牛血清以封闭未被抗原包被的部分, 置 37℃ 1 小时, 经 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤后, 加阳性病人血清, 置 37℃ 2 小时, 经 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤后加入最适工作浓度 HRP 标记的羊抗人 IgG 200 微升, 置室温 2 小时后, 分别用 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤各 3 次, 加入反应底物 200 微升, 再 495 nm 测定吸光度。

4) 对照实验: 用免疫微球 10 微升加入 10 微升抗体阳性血清和阴性血清, 混匀后, 阳性血清有凝集颗粒, 阴性血清则无凝集。

免疫微球的制备:

1) 将直径为 200 纳米的聚苯乙烯微球 15mg/ml, 用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次后, 重悬于 0.01M 的 pH4 的磷酸缓冲液, 然后加入 0.2mg/ml 的碳二亚胺, 置室温上下摇动 4 小时, 以 12000 转/分离心 10 分钟, 用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次, 重悬于 0.01M 的 pH 7.5 的碳酸盐缓冲液;

2) 向步骤 1) 得到的混合液中加入 0.1mg/ml 的多聚赖氨酸, 置室温上下摇动 12 小时, 用 0.5M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次, 重悬于 0.01M 的 pH4 的磷酸缓冲液, 然后加入 0.2mg/ml 的碳二亚胺, 置室温上下摇动 4 小时; 用 0.5M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次, 重悬于 0.01M 的 pH 7.5 的碳酸盐缓冲液;

3) 向步骤 2) 得到的混合液中加入作为抗原的 SARS 冠状病毒 S 蛋白 0.2mg/ml, 置室温上下摇动 12 小时, 用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次后, 重悬于 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液; 加入 50 微升 0.25M 乙酰胺封闭多聚赖氨酸上未被抗原结合的羧基部分, 加入乙酰胺后, 置室温上下摇动 30 分, 以 13000 转/分离心 10 分钟, 分出固体;

4) 重悬于 1g/ml 牛血清(BSA)和 0.015M 的 pH 7.5 的碳酸盐缓冲液, 置室温上下摇动 30 分, 离心分出固体, 得到用于检测 SARS 抗体的、偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒 S 蛋白的免疫微球。

将此用于检测 SARS 抗体的免疫微球依次分别用 1%BSA、5%甘油、0.01%NaN₃、0.01M 的 pH8.0 的 PBS 缓冲液重悬, 并用 400w 超声波处理 20 秒, 备用。

实施例 2、偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒 N 蛋白的免疫微球的制备

SARS 冠状病毒 N 蛋白抗原的制备及鉴定:

制备——用基因重组技术克隆、表达和纯化 SARS 冠状病毒 N 蛋白作为抗原: 用 RT-PCR 方法扩增 SARS 冠状病毒 N 的基因片段, 将该基因片段经测序证实基因序列正确无误后, 再将其克隆到表达载体如原核表达载体 pQE30, 或酵母表达载体 pPICZαA, 然后进行表达和蛋白纯化。

鉴定——抗原纯化后，通过以下试验进行鉴定：

1) 抗原蛋白含量测定：取抗原 1 毫升用分光光度计测其蛋白含量，在其 260nm 和 280nm 处分别测 OD 值后，用公式 $280\text{nm OD} \times 1.45 - 260\text{nm OD} \times 0.74$ 即可计算抗原的蛋白含量 1mg/ml 左右；

2) 抗原蛋白纯度测定：取抗原 20 微升（含蛋白量 5 微克）走蛋白电泳即 SDS-PAGE 电泳，结果显示为一条带。

3) 酶联免疫试验（ELISA）：以 2.5 微克/毫升抗原 200 微升包被酶标微孔板，置 4℃ 20 小时后，弃去抗原包被液，加入 5% 小牛血清以封闭未被抗原包被的部分，置 37℃ 1 小时，经 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤后，加阳性病人血清，置 37℃ 2 小时，经 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤后加入最适工作浓度 HRP 标记的羊抗人 IgG 200 微升，置室温 2 小时后，分别用 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤各 3 次，加入反应底物 200 微升，再 495 nm 测定吸光度。

4) 对照实验：用免疫微球 10 微升加入 10 微升抗体阳性血清和阴性血清，混匀后，阳性血清有凝集颗粒，阴性血清则无凝集。

免疫微球的制备：

1) 将直径为 200 纳米的聚苯乙烯微球 15mg/ml，用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次后，重悬于 0.01M 的 pH4 的磷酸缓冲液，然后加入 0.2mg/ml 的碳二亚胺，置室温上下摇动 4 小时，以 12000 转/分离心 10 分钟，用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次，重悬于 0.01M 的 pH 7.5 的碳酸盐缓冲液；

2) 向步骤 1) 得到的混合液中加入 0.1mg/ml 的多聚赖氨酸，置室温上下摇动 12 小时，用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次，重悬于 0.01M 的 pH4 的磷酸缓冲液，然后加入 0.2mg/ml 的碳二亚胺，置室温上下摇动 4 小时；用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次，重悬于 0.01M 的 pH 7.5 的碳酸盐缓冲液；

3) 向步骤 2) 得到的混合液中加入作为抗原的 SARS 冠状病毒 N 蛋白 0.2mg/ml，置室温上下摇动 12 小时，用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次后，重悬于 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液；加入 50 微升 0.25M 乙酰胺封闭多聚赖氨酸上未被抗原结合的羧基部分，加入乙酰胺后，置室温上下摇动 30 分，以 13000 转/分离心 10 分钟，分出固体；

4) 重悬于 1g/ml 牛血清(BSA)和 0.015M 的 pH 7.5 的碳酸盐缓冲液，置室温上下摇动 30 分，离心分出固体，得到用于检测 SARS 抗体的、偶联了作为抗原的 SARS 冠

状病毒 N 蛋白的免疫微球。

将此用于检测 SARS 抗体的免疫微球依次分别用 1%BSA、5%甘油、0.01%NaN₃、0.01M 的 pH8.0 的 PBS 缓冲液重悬，并用 400w 超声波处理 20 秒，备用。

实施例 3、偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒 M 蛋白的免疫微球的制备

SARS 冠状病毒 M 蛋白抗原的制备及鉴定：

制备——用基因重组技术克隆、表达和纯化 SARS 冠状病毒 M 蛋白作为抗原：用 RT-PCR 方法扩增 SARS 冠状病毒 M 的基因片段，将该基因片段经测序证实基因序列正确无误后，再将其克隆到表达载体如原核表达载体 pQE30，或酵母表达载体 pPICZαA，然后进行表达和蛋白纯化。

鉴定——抗原纯化后，通过以下试验进行鉴定：

1) 抗原蛋白含量测定：取抗原 1 毫升用分光光度计测其蛋白含量，在其 260nm 和 280nm 处分别测 OD 值后，用公式 $280\text{nm OD} \times 1.45 - 260\text{nm OD} \times 0.74$ 即可计算抗原的蛋白含量 1mg/ml 左右；

2) 抗原蛋白纯度测定：取抗原 20 微升（含蛋白量 5 微克）走蛋白电泳即 SDS-PAGE 电泳，结果显示为一条带。

3) 酶联免疫试验（ELISA）：以 2.5 微克/毫升抗原 200 微升包被酶标微孔板，置 4℃ 20 小时后，弃去抗原包被液，加入 5%小牛血清以封闭未被抗原包被的部分，置 37℃ 1 小时，经 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤后，加阳性病人血清，置 37℃ 2 小时，经 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤后加入最适工作浓度 HRP 标记的羊抗人 IgG 200 微升，置室温 2 小时后，分别用 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤各 3 次，加入反应底物 200 微升，再 495 nm 测定吸光度。

4) 对照实验：用免疫微球 10 微升加入 10 微升抗体阳性血清和阴性血清，混匀后，阳性血清有凝集颗粒，阴性血清则无凝集。

免疫微球的制备：

1) 将直径为 200 纳米的聚苯乙烯微球 15mg/ml，用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次后，重悬于 0.01M 的 pH4 的磷酸缓冲液，然后加入 0.2mg/ml 的碳二亚胺，置室温上下摇动 4 小时，以 12000 转/分离心 10 分钟，用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓

冲液洗涤3次,重悬于0.01M的pH 7.5的碳酸盐缓冲液;

2) 向步骤1)得到的混合液中加入0.1mg/ml的多聚赖氨酸,置室温上下摇动12小时,用0.1M的pH8.8的碳酸盐缓冲液洗涤3次,重悬于0.01M的pH4的磷酸缓冲液,然后加入0.2mg/ml的碳二亚胺,置室温上下摇动4小时;用0.1M的pH8.8的碳酸盐缓冲液洗涤3次,重悬于0.01M的pH 7.5的碳酸盐缓冲液;

3) 向步骤2)得到的混合液中加入作为抗原的SARS冠状病毒M蛋白0.2mg/ml,置室温上下摇动12小时,用0.1M的pH8.8的碳酸盐缓冲液洗涤3次后,重悬于0.1M的pH8.8的碳酸盐缓冲液;加入50微升0.25M乙酰胺封闭多聚赖氨酸上未被抗原结合的羧基部分,加入乙酰胺后,置室温上下摇动30分,以13000转/分离心10分钟,分出固体;

4) 重悬于1g/ml牛血清(BSA)和0.015M的pH 7.5的碳酸盐缓冲液,置室温上下摇动30分,离心分出固体,得到用于检测SARS抗体的、偶联了作为抗原的SARS冠状病毒M蛋白的免疫微球。

将此用于检测SARS抗体的免疫微球依次分别用1%BSA、5%甘油、0.01%NaN₃、0.01M的pH8.0的PBS缓冲液重悬,并用400w超声波处理20秒,备用。

实施例4、偶联了作为抗原的SARS冠状病毒E蛋白的免疫微球的制备

SARS冠状病毒E蛋白抗原的制备及鉴定:

制备——用基因重组技术克隆、表达和纯化SARS冠状病毒E蛋白作为抗原:用RT-PCR方法扩增SARS冠状病毒E的基因片段,将该基因片段经测序证实基因序列正确无误后,再将其克隆到表达载体如原核表达载体pQE30,或酵母表达载体pPICZαA,然后进行表达和蛋白纯化。

鉴定——抗原纯化后,通过以下试验进行鉴定:

1) 抗原蛋白含量测定:取抗原1毫升用分光光度计测其蛋白含量,在其260nm和280nm处分别测OD值后,用公式 $280\text{nm OD} \times 1.45 - 260\text{nm OD} \times 0.74$ 即可计算抗原的蛋白含量1mg/ml左右;

2) 抗原蛋白纯度测定:取抗原20微升(含蛋白量5微克)走蛋白电泳即SDS-PAGE电泳,结果显示为一条带。

3) 酶联免疫试验(ELISA):以2.5微克/毫升抗原200微升包被酶标微孔板,置

4℃ 20 小时后, 弃去抗原包被液, 加入 5%小牛血清以封闭未被抗原包被的部分, 置 37℃1 小时, 经 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤后, 加阳性病人血清, 置 37℃2 小时, 经 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤后加入最适工作浓度 HRP 标记的羊抗人 IgG 200 微升, 置室温 2 小时后, 分别用 PBS-吐温和 PBS 缓冲液洗涤各 3 次, 加入反应底物 200 微升, 再 495 nm 测定吸光度。

4) 对照实验: 用免疫微球 10 微升加入 10 微升抗体阳性血清和阴性血清, 混匀后, 阳性血清有凝集颗粒, 阴性血清则无凝集。

免疫微球的制备:

1) 将直径为 200 纳米的聚苯乙烯微球 15mg/ml, 用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次后, 重悬于 0.01M 的 pH4 的磷酸缓冲液, 然后加入 0.2mg/ml 的碳二亚胺, 置室温上下摇动 4 小时, 以 12000 转/分离心 10 分钟, 用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次, 重悬于 0.01M 的 pH 7.5 的碳酸盐缓冲液;

2) 向步骤 1) 得到的混合液中加入 0.1mg/ml 的多聚赖氨酸, 置室温上下摇动 12 小时, 用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次, 重悬于 0.01M 的 pH4 的磷酸缓冲液, 然后加入 0.2mg/ml 的碳二亚胺, 置室温上下摇动 4 小时; 用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次, 重悬于 0.01M 的 pH 7.5 的碳酸盐缓冲液;

3) 向步骤 2) 得到的混合液中加入作为抗原的 SARS 冠状病毒 E 蛋白 0.2mg/ml, 置室温上下摇动 12 小时, 用 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液洗涤 3 次后, 重悬于 0.1M 的 pH8.8 的碳酸盐缓冲液; 加入 50 微升 0.25M 乙酰胺封闭多聚赖氨酸上未被抗原结合的羧基部分, 加入乙酰胺后, 置室温上下摇动 30 分, 以 13000 转/分离心 10 分钟, 分出固体;

4) 重悬于 1g/ml 牛血清(BSA)和 0.015M 的 pH 7.5 的碳酸盐缓冲液, 置室温上下摇动 30 分, 离心分出固体, 得到用于检测 SARS 抗体的、偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒 E 蛋白的免疫微球。

将此用于检测 SARS 抗体的免疫微球依次分别用 1%BSA、5%甘油、0.01%Na₂S₂O₃、0.01M 的 pH8.0 的 PBS 缓冲液重悬, 并用 400w 超声波处理 20 秒, 备用。

实施例 5、用本发明提供的免疫微球检测试剂检测抗 (SARS) 抗体
实验方法:

将被测血清样品 10 微升滴在洁净的玻璃片或透明塑料片上,加入 5 微升本发明提供的用于检测 SARS 抗体的免疫微球,其中,实施例 1~4 制备的偶联了作为抗原的 SARS 冠状病毒 S,N,M 或 E 蛋白的免疫微球各占 1/4,用竹签、牙签、塑料棒或其他物体搅拌,将待测样品和免疫微球混匀并呈直径 1 厘米的圆斑状。

在黑色背景下,用肉眼或在显微镜下直接观察凝集反应,并用下列符号记录结果:

- (-) 无肉眼可见凝集颗粒;
- (+) 肉眼可见细的凝集颗粒,背景混浊;
- (++) 肉眼可见大的凝集颗粒,背景稍混浊;
- (+++) 肉眼可见大而清晰凝集颗粒,背景清楚;
- (++++) 肉眼可见大而清晰的凝集块,背景清楚。

实验样品:

- 1) 正常兔血清和分别免疫 SARS 病毒的 S、N、M、E 蛋白兔血清;
- 2) 正常人血清和 SARS 患者血清;

实验结果:

如图 2 所示,在 40 倍显微镜下观察,正常的兔血清与免疫微球呈阴性反应,可见均匀的微球颗粒;感染了 SARS 病毒的兔血清与免疫微球呈阳性反应,可见微球颗粒凝集呈块。

如图 3 所示,在 10 倍显微镜下观察,正常人的血清与免疫微球(SARS CoV 基因重组蛋白免疫微球是偶联了 SARS-S 蛋白)呈阴性反应,可见均匀的微球颗粒;SARS 病人的血清与免疫微球呈阳性反应,可见微球颗粒凝集呈块。

对 SARS 患者样品进行半定量测定抗体滴度,将被测血清倍比稀释,按上法测定,以稀释度为抗体滴度。观察结果见图 3,其中,稀释度为 200 倍时,仍为阳性(如图 1 右图),稀释度为 1:200 时,呈阳性(如图 1 左图),因此,该 1:200 样品的抗体滴度(即稀释度)为 1:20。

SEQUENCE LISTING

<110> 中国科学院动物研究所

<120> 一种用于检测SARS抗体的免疫微球及其制备方法和用途

<130> FPI04040

<150> CN 200410003420.1

<151> 2004-02-25

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1255

<212> PRT

<213> corona virus

400> 1

Met Phe Ile Phe Leu Leu Phe Leu Thr Leu Thr Ser Gly Ser Asp Leu
1 5 10 15

Asp Arg Cys Thr Thr Phe Asp Asp Val Gln Ala Pro Asn Tyr Thr Gln
20 25 30

His Thr Ser Ser Met Arg Gly Val Tyr Tyr Pro Asp Glu Ile Phe Arg
35 40 45

Ser Asp Thr Leu Tyr Leu Thr Gln Asp Leu Phe Leu Pro Phe Tyr Ser
50 55 60

Asn Val Thr Gly Phe His Thr Ile Asn His Thr Phe Asp Asn Pro Val
65 70 75 80

Ile Pro Phe Lys Asp Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Thr Glu Lys Ser Asn
85 90 95

Val Val Arg Gly Trp Val Phe Gly Ser Thr Met Asn Asn Lys Ser Gln
100 105 110

Ser Val Ile Ile Ile Asn Asn Ser Thr Asn Val Val Ile Arg Ala Cys
115 120 125

Asn Phe Glu Leu Cys Asp Asn Pro Phe Phe Ala Val Ser Lys Pro Met
130 135 140

Gly Thr Gln Thr His Thr Met Ile Phe Asp Asn Ala Phe Asn Cys Thr
145 150 155 160

Phe Glu Tyr Ile Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Val Ser Glu Lys Ser
165 170 175

Gly Asn Phe Lys His Leu Arg Glu Phe Val Phe Lys Asn Lys Asp Gly
180 185 190

Phe Leu Tyr Val Tyr Lys Gly Tyr Gln Pro Ile Asp Val Val Arg Asp
195 200 205

Leu Pro Ser Gly Phe Asn Thr Leu Lys Pro Ile Phe Lys Leu Pro Leu

210	215	220
Gly Ile Asn Ile Thr Asn Phe Arg Ala Ile Leu Thr Ala Phe Ser Pro 225 230 235 240		
Ala Gln Asp Thr Trp Gly Thr Ser Ala Ala Ala Tyr Phe Val Gly Tyr 245 250 255		
Leu Lys Pro Thr Thr Phe Met Leu Lys Tyr Asp Glu Asn Gly Thr Ile 260 265 270		
Thr Asp Ala Val Asp Cys Ser Gln Asn Pro Leu Ala Glu Leu Lys Cys 275 280 285		
Ser Val Lys Ser Phe Glu Ile Asp Lys Glv Ile Tyr Gln Thr Ser Asn 290 295 300		
Phe Arg Val Val Pro Ser Gly Asp Val Val Arg Phe Pro Asn Ile Thr 305 310 315 320		
Asn Leu Cys Pro Phe Gly Glu Val Phe Asn Ala Thr Lys Phe Pro Ser 325 330 335		
Val Tyr Ala Trp Glu Arg Lys Lys Ile Ser Asn Cys Val Ala Asp Tyr 340 345 350		
Ser Val Leu Tyr Asn Ser Thr Phe Phe Ser Thr Phe Lys Cys Tyr Glv 355 360 365		
Val Ser Ala Thr Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Ser Asn Val Tyr Ala 370 375 380		
Asp Ser Phe Val Val Lys Gly Asp Asp Val Arg Gln Ile Ala Pro Gly 385 390 395 400		
Gln Thr Gly Val Ile Ala Asp Tyr Asn Tyr Lys Leu Pro Asp Asp Phe 405 410 415		
Met Gly Cys Val Leu Ala Trp Asn Thr Arg Asn Ile Asp Ala Thr Ser 420 425 430		
Thr Gly Asn Tyr Asn Tyr Lys Tyr Arg Tyr Leu Arg His Gly Lys Leu 435 440 445		
Arg Pro Phe Glu Arg Asp Ile Ser Asn Val Pro Phe Ser Pro Asp Glv 450 455 460		
Lys Pro Cys Thr Pro Pro Ala Leu Asn Cys Tyr Trp Pro Leu Asn Asp 465 470 475 480		
Tyr Gly Phe Tyr Thr Thr Thr Gly Ile Gly Tyr Gln Pro Tyr Arg Val 485 490 495		
Val Val Leu Ser Phe Glu Leu Leu Asn Ala Pro Ala Thr Val Cys Gly 500 505 510		

Pro Lys Leu Ser Thr Asp Leu Ile Lys Asn Gln Cys Val Asn Phe Asn
515 520 525

Phe Asn Gly Leu Thr Gly Thr Gly Val Leu Thr Pro Ser Ser Lys Arg
530 535 540

Phe Gln Pro Phe Gln Gln Phe Gly Arg Asp Val Ser Asp Phe Thr Asp
545 550 555 560

Ser Val Arg Asp Pro Lys Thr Ser Glu Ile Leu Asp Ile Ser Pro Cys
565 570 575

Ser Phe Gly Gly Val Ser Val Ile Thr Pro Gly Thr Asn Ala Ser Ser
580 585 590

Glu Val Ala Val Leu Tyr Gln Asp Val Asn Cys Thr Asp Val Ser Thr
595 600 605

Ala Ile His Ala Asp Gln Leu Thr Pro Ala Trp Arg Ile Tyr Ser Thr
610 615 620

Gly Asn Asn Val Phe Gln Thr Gln Ala Gly Cys Leu Ile Gly Ala Glu
625 630 635 640

His Val Asp Thr Ser Tyr Glu Cys Asp Ile Pro Ile Gly Ala Gly Ile
645 650 655

Cys Ala Ser Tyr His Thr Val Ser Leu Leu Arg Ser Thr Ser Gln Lys
660 665 670

Ser Ile Val Ala Tyr Thr Met Ser Leu Gly Ala Asp Ser Ser Ile Ala
675 680 685

Ile Ser Asn Asn Thr Ile Ala Ile Pro Thr Asn Phe Ser Ile Ser Ile
690 695 700

Thr Thr Glu Val Met Pro Val Ser Met Ala Lys Thr Ser Val Asp Cys
705 710 715 720

Asn Met Tyr Ile Cys Gly Asp Ser Thr Glu Cys Ala Asn Leu Leu Leu
725 730 735

Gln Tyr Gly Ser Phe Cys Thr Gln Leu Asn Arg Ala Leu Ser Gly Ile
740 745 750

Ala Ala Glu Gln Asp Arg Asn Thr Arg Glu Val Phe Ala Gln Val Lys
755 760 765

Gln Met Tyr Lys Thr Pro Thr Leu Lys Tyr Phe Gly Gly Phe Asn Phe
770 775 780

Ser Gln Ile Leu Pro Asp Pro Leu Lys Pro Thr Lys Arg Ser Phe Ile
785 790 795 800

Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Thr Leu Ala Asp Ala Gly Phe Met
805 810 815

Lys Gln Tyr Gly Glu Cys Leu Gly Asp Ile Asn Ala Arg Asp Leu Ile
 820 825 830
 Cys Ala Gln Lys Phe Asn Gly Leu Thr Val Leu Pro Pro Leu Leu Thr
 835 840 845
 Asp Asp Met Ile Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Leu Val Ser Gly Thr Ala
 850 855 860
 Thr Ala Gly Trp Thr Phe Gly Ala Gly Ala Ala Leu Gln Ile Pro Phe
 865 870 875 880
 Ala Met Gln Met Ala Tyr Arg Phe Asn Gly Ile Gly Val Thr Gln Asn
 885 890 895
 Val Leu Tyr Glu Asn Gln Lys Gln Ile Ala Asn Gln Phe Asn Lys Ala
 900 905 910
 Ile Ser Gln Ile Gln Glu Ser Leu Thr Thr Thr Ser Thr Ala Leu Gly
 915 920 925
 Lys Leu Gln Asp Val Val Asn Gln Asn Ala Gln Ala Leu Asn Thr Leu
 930 935 940
 Val Lys Gln Leu Ser Ser Asn Phe Gly Ala Ile Ser Ser Val Leu Asn
 945 950 955 960
 Asp Ile Leu Ser Arg Leu Asp Lys Val Glu Ala Glu Val Gln Ile Asp
 965 970 975
 Arg Leu Ile Thr Gly Arg Leu Gln Ser Leu Gln Thr Tyr Val Thr Gln
 980 985 990
 Gln Leu Ile Arg Ala Ala Glu Ile Arg Ala Ser Ala Asn Leu Ala Ala
 995 1000 1005
 Thr Lys Met Ser Glu Cys Val Leu Gly Gln Ser Lys Arg Val Asp
 1010 1015 1020
 Phe Cys Gly Lys Gly Tyr His Leu Met Ser Phe Pro Gln Ala Ala
 1025 1030 1035
 Pro His Gly Val Val Phe Leu His Val Thr Tyr Val Pro Ser Gln
 1040 1045 1050
 Glu Arg Asn Phe Thr Thr Ala Pro Ala Ile Cys His Glu Gly Lys
 1055 1060 1065
 Ala Tyr Phe Pro Arg Glu Gly Val Phe Val Phe Asn Gly Thr Ser
 1070 1075 1080
 Trp Phe Ile Thr Gln Arg Asn Phe Phe Ser Pro Gln Ile Ile Thr
 1085 1090 1095
 Thr Asp Asn Thr Phe Val Ser Gly Asn Cys Asp Val Val Ile Gly
 1100 1105 1110

Ile Ile Asn Asn Thr Val Tyr Asp Pro Leu Gln Pro Glu Leu Asp
1115 1120 1125

Ser Phe Lys Glu Glu Leu Asp Lys Tyr Phe Lys Asn His Thr Ser
1130 1135 1140

Pro Asp Val Asp Leu Gly Asp Ile Ser Gly Ile Asn Ala Ser Val
1145 1150 1155

Val Asn Ile Gln Lys Glu Ile Asp Arg Leu Asn Glu Val Ala Lys
1160 1165 1170

Asn Leu Asn Glu Ser Leu Ile Asp Leu Gln Glu Leu Gly Lys Tyr
1175 1180 1185

Glu Gln Tyr Ile Lys Trp Pro Trp Tyr Val Trp Leu Gly Phe Ile
1190 1195 1200

Ala Gly Leu Ile Ala Ile Val Met Val Thr Ile Leu Leu Cys Cys
1205 1210 1215

Met Thr Ser Cys Cys Ser Cys Leu Lys Gly Ala Cys Ser Cys Gly
1220 1225 1230

Ser Cys Cys Lys Phe Asp Glu Asp Asp Ser Glu Pro Val Leu Lys
1235 1240 1245

Gly Val Lys Leu His Tyr Thr
1250 1255

<210> 2
<211> 422
<212> PRT
<213> corona virus

<400> 2

Met Ser Asp Asn Gly Pro Gln Ser Asn Gln Arg Ser Ala Pro Arg Ile
1 5 10 15

Thr Phe Gly Gly Pro Thr Asp Ser Thr Asp Asn Asn Gln Asn Gly Gly
20 25 30

Arg Asn Gly Ala Arg Pro Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn
35 40 45

Asn Thr Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Glu
50 55 60

Leu Arg Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Gly
65 70 75 80

Pro Asp Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Val Arg
85 90 95

Gly Gly Asp Gly Lys Met Lys Glu Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr
100 105 110

Tyr Leu Gly Thr Glv Pro Glu Ala Ser Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys
 115 120 125
 Glu Gly Ile Val Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys
 130 135 140
 Asp His Ile Gly Thr Arg Asn Pro Asn Asn Asn Ala Ala Thr Val Leu
 145 150 155 160
 Gln Leu Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Glv
 165 170 175
 Ser Arg Glv Glv Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg
 180 185 190
 Glv Asn Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Asn Ser Pro
 195 200 205
 Ala Arg Met Ala Ser Gly Gly Gly Glu Thr Ala Leu Ala Leu Leu Leu
 210 215 220
 Leu Asp Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Val Ser Gly Lys Gly Gln
 225 230 235 240
 Gln Gln Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser
 245 250 255
 Lys Lys Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Gln Tyr Asn Val Thr
 260 265 270
 Gln Ala Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Glv Asn Phe Gly
 275 280 285
 Asp Gln Asp Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln
 290 295 300
 Ile Ala Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg
 305 310 315 320
 Ile Gly Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr His Gly
 325 330 335
 Ala Ile Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Gln Phe Lys Asp Asn Val Ile
 340 345 350
 Leu Leu Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu
 355 360 365
 Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Thr Asp Glu Ala Gln Pro Leu Pro
 370 375 380
 Gln Arg Gln Lys Lys Gln Pro Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp
 385 390 395 400
 Met Asp Asp Phe Ser Arg Gln Leu Gln Asn Ser Met Ser Gly Ala Ser

```

                405                410                415

Ala Asp Ser Thr Gln Ala
420

<210> 3
<211> 221
<212> PRT
<213> corona virus

<400> 3

Met Ala Asp Asn Gly Thr Ile Thr Val Glu Glu Leu Lys Gln Leu Leu
1      5      10      15

Glu Gln Trp Asn Leu Val Ile Gly Phe Leu Phe Leu Ala Trp Ile Met
20     25     30

Leu Leu Gln Phe Ala Tyr Ser Asn Arg Asn Arg Phe Leu Tyr Ile Ile
35     40     45

Lys Leu Val Phe Leu Trp Leu Leu Trp Pro Val Thr Leu Ala Cys Phe
50     55     60

Val Leu Ala Ala Val Tyr Arg Ile Asn Trp Val Thr Gly Gly Ile Ala
65     70     75     80

Ile Ala Met Ala Cys Ile Val Gly Leu Met Trp Leu Ser Tyr Phe Val
85     90     95

Ala Ser Phe Arg Leu Phe Ala Arg Thr Arg Ser Met Trp Ser Phe Asn
100    105    110

Pro Glu Thr Asn Ile Leu Leu Asn Val Pro Leu Arg Gly Thr Ile Val
115    120    125

Thr Arg Pro Leu Met Glu Ser Glu Leu Val Ile Gly Ala Val Ile Ile
130    135    140

Arg Gly His Leu Arg Met Ala Gly His Ser Leu Gly Arg Cys Asp Ile
145    150    155    160

Lys Asp Leu Pro Lys Glu Ile Thr Val Ala Thr Ser Arg Thr Leu Ser
165    170    175

Tyr Tyr Lys Leu Gly Ala Ser Gln Arg Val Gly Thr Asp Ser Gly Phe
180    185    190

Ala Ala Tyr Asn Arg Tyr Arg Ile Gly Asn Tyr Lys Leu Asn Thr Asp
195    200    205

His Ala Gly Ser Asn Asp Asn Ile Ala Leu Leu Val Gln
210    215    220

<210> 4
<211> 76
<212> PRT
<213> corona virus

```

<400> 4

Met Tyr Ser Phe Val Ser Glu Glu Thr Gly Thr Leu Ile Val Asn Ser
1 5 10 15

Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Val Val Phe Leu Leu Val Thr Leu Ala
20 25 30

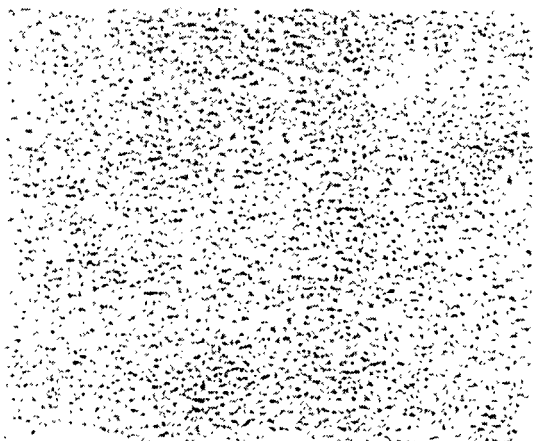
Ile Leu Thr Ala Leu Arg Leu Cys Ala Tyr Cys Cys Asn Ile Val Asn
35 40 45

Val Ser Leu Val Lys Pro Thr Val Tyr Val Tyr Ser Arg Val Lys Asn
50 55 60

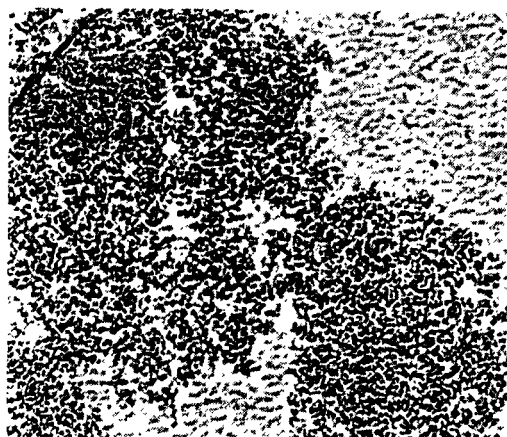
Leu Asn Ser Ser Glu Gly Val Pro Asp Leu Leu Val
65 70 75



图 1

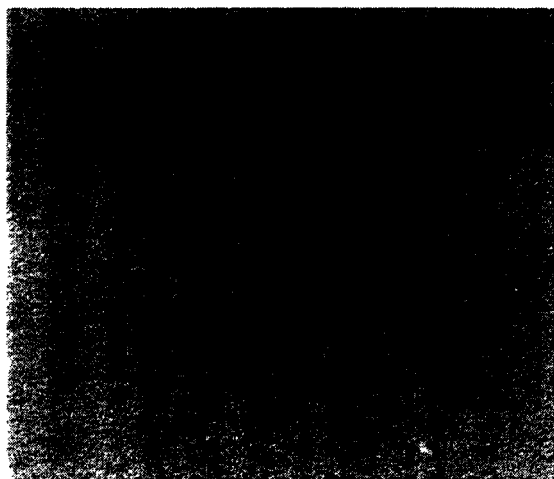


A

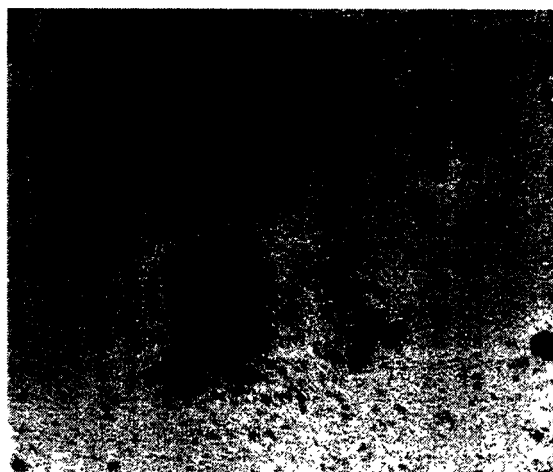


B

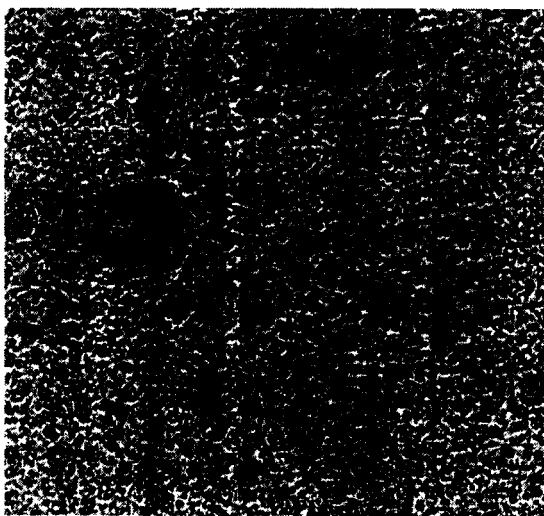
图 2



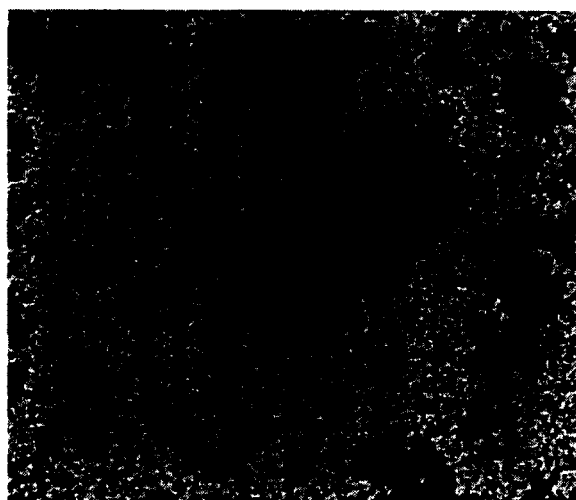
A



B



C



D

图 3.

专利名称(译)	一种用于检测SARS抗体的免疫微球及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN1661372A	公开(公告)日	2005-08-31
申请号	CN200410070147.4	申请日	2004-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院动物研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院动物研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院动物研究所		
[标]发明人	陈佳 朱玉山 顾莹 邢娟 金海京		
发明人	陈佳 杨建国 朱玉山 顾莹 邢娟 金海京 王晓惠		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/546		
代理人(译)	王凤华		
优先权	200410003420.1 2004-02-25 CN		
其他公开文献	CN100425991C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用于检测SARS抗体的免疫微球，及其制备方法和用途。该免疫微球是以表面有羧基修饰的聚苯乙烯微球为内核，其表面的羧基通过多聚赖氨酸化学偶联了作为抗原的SARS冠状病毒S，N，M或E蛋白。该免疫微球可以作为检测试剂检测抗SARS抗体。本发明提供的用于检测SARS抗体的免疫微球与现有技术相比，其敏感性和特异性好，准确性高，避免了PCR诊断试剂盒的假阳性的缺点；整个检测过程快速；检测不需要任何仪器设备，经济实用，适合广大基层卫生防疫单位使用。

