

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/535

G01N 33/566 G01N 33/569



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03126893.5

[43] 公开日 2003 年 11 月 5 日

[11] 公开号 CN 1453590A

[22] 申请日 2003.6.18 [21] 申请号 03126893.5

[71] 申请人 广州万孚生物技术有限公司

地址 510640 广东省广州市天河区五山路 381  
号华南理工大学校园内

[72] 发明人 王继华

[74] 专利代理机构 广州粤高专利代理有限公司

代理人 何燕玲 李本祥

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称 SARS 冠状病毒抗体 IgG 免疫印迹诊断试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及 SARS 冠状病毒抗体 IgG 免疫印迹诊断试剂盒，由固相膜、酶标记的抗抗体和相应的显色底物组成；所述固相膜由纯化 SARS 冠状病毒全病毒裂解液抗原或重组混合抗原经凝胶电泳分离、转印在薄膜上得到；所述酶标记的抗抗体通过下述方法制备：用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗人 IgG、或碱性磷酸酶标记的羊 - 抗人 IgG 抗体，加保护剂 0.01% 硫柳汞和 1% 牛血清白蛋白重量和 0.01M pH7.4 PBS 配制而成。本发明主要用于临床检验部门和卫生防疫部门对病原的确认，可同时检测多种抗原或抗体，将不同病原引起的流行病快速鉴别出来。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种 SARS 冠状病毒抗体 IgG 免疫印迹诊断试剂盒，其特征在于由固相膜、酶标记的抗抗体和相应的显色底物组成；所述固相膜由纯化 SARS 冠状病毒全病毒裂解液抗原或重组混合抗原经凝胶电泳分离、转印在薄膜上得到；所述酶标记的抗抗体通过下述方法制备：用辣根过氧化物酶（HRP）标记的兔抗人 IgG、或碱性磷酸酶标记的羊-抗人 IgG 抗体，加保护剂 0.01% 硫柳汞和 1% 牛血清白蛋白重量和 0.01M pH7.4 PBS 配制而成。

2、根据权利要求 1 所述的 SARS 冠状病毒抗体 IgG 免疫印迹诊断试剂盒，其特征在于固相膜由下述方法制备得到：将纯化 SARS 冠状病毒全病毒裂解液抗原或重组混合抗原通过凝胶电泳进行抗原分离；再通过转印仪将凝胶上抗原转移至薄膜，薄膜作封闭处理；将人 IgG 采用喷涂方式固定在薄膜上，作封闭处理，作为质控线。

3、根据权利要求 2 所述的 SARS 冠状病毒抗体 IgG 免疫印迹诊断试剂盒，其特征在于所述薄膜是硝酸纤维素膜、或尼龙膜。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 冠状病毒抗体 IgG 免疫印迹诊断试剂盒，其特征在于辣根过氧化物酶（HRP）对应的显色底物由 0.03%（w/v）过氧化氢和 0.07% 重量/体积二氨基联苯胺组成。

5、根据权利要求 1 或 2 所述的 SARS 冠状病毒抗体 IgG 免疫印迹诊断试剂盒，其特征在于碱性磷酸酶对应的显色底物至少包括 5-溴-4-氯-3-吡啶磷酸盐及 4-氮唑蓝。

## SARS 冠状病毒抗体 IgG 免疫印迹诊断试剂盒

### 技术领域

本发明涉及一种用免疫印迹方法检测人的抗 SARS 冠状病毒抗体(IgG)，进行非典型性肺炎流行病学调查和临床诊断的试剂盒。

### 背景技术

非典型肺炎（又称严重急性呼吸系统综合症，Severe Acute Respiratory Syndrome，缩写 SARS）在全世界肆虐已近五个月，4月16日世界卫生组织正式宣布一种人类过去从未发现的新型冠状病毒为 SARS 的病原。冠状病毒(Corona Virus)是在1968年由 Almeida 等发现，命名为“冠状病毒”，是因其形态，该病毒在电子显微镜下包膜上有形状类似日冕的棘突。冠状病毒分类广泛，可感染人和家禽家畜，可引起家禽的传染性支气管炎，鼠肝炎，猪脑脊髓炎，猫传染性腹膜炎等；人冠状病毒可引起上呼吸道感染，婴幼儿哮喘及细支气管炎，急性胃肠炎等。

世界各国的研究者们正在研究快速而准确的 SARS 冠状病毒实验室诊断性的测试方法。然而在有了用于病毒和抗体测试的标准试剂和充分的测试方法之后，SARS 疾病的诊断仍然是基于临床和流行病学的证据。目前 SARS 冠状病毒的实验室测试方法有：①分子测试（简称 PCR 法）；②抗体测试，目前包括 ELISA 法和 IFA 法；③细胞培养。

#### 1. 分子测试（PCR 法）

PCR 法能够在不同的样品中测定 SARS 冠状病毒的基因物质(包括血液、

粪便、呼吸道分泌物或身体组织等样品)。引物是 PCR 测试方法中的主要片段, 已经由世界卫生组织的实验室网络在世界卫生组织网站上公布。已经研制出了包括引物、阳性和阴性控制器的 PCR 测试工具。

总的来说, 现有的 PCR 测试方法有非常好的特异性, 但是缺乏灵敏性。这就意味着阴性的测试结果并不能排除病人中有 SARS 病毒的存在。而且, 由于缺乏实验室质量控制而导致的实验室样品的污染, 能够导致假阳性结果的出现。

对于存在有必要的质量控制程序的 PCR 测试的阳性结果: 推荐用于 SARS 冠状病毒的实验室测试是有非常好的特异性的, 阳性结果意味着在样品中有 SARS 冠状病毒的基因物质 (即 RNA) 的存在。但并不意味着有活病毒的存在或者是存在着大量的病毒足够感染其他人。PCR 测试的阴性结果并不能够排除 SARS 病毒的存在。用 PCR 方法对 SARS 冠状病毒进行测试, 由于以下几方面的原因结果可能出现阴性:

- ① 病人没有被 SARS 冠状病毒所感染; 病例是由其它的病原体 (病毒、细菌和真菌) 感染引起的, 或者是由于非感染性的原因引起的。
- ② 测试结果是不正确的 (假阴性)。目前的测试方法需要进一步的改进以提高其灵敏性。
- ③ 样品并不是在有病毒或基因物质存在的时候收集到的。病毒和基因物质有可能仅仅存在于一个较短的时期内, 取决于用于测试的样品的种类。

PCR 法仅用于病毒核酸的检测, 要求具备 PCR 扩增仪及凝胶电泳设备, 实验时间较长 (两小时以上), 需专业技术人员操作和判断检测结果。

## 2. 抗体测试

冠状病毒感染人体后, 机体将产生相应抗体 (人抗冠状病毒抗体), 用以

抵抗病毒的增殖。当人体被“非典”病毒感染并产生抗体之后，即用病人的血清(抗体)与检测试剂进行反应，呈阳性反应的说明受试者已受病毒感染，并产生了抗体(免疫反应)。但对于发病早期还未产生抗体的病人，阴性结果不能说明受试者未受病毒感染。

特异性地检测患者体内抗体 IgM 和 IgG 的水平，有这两种抗体产生的患者即可确定为“非典”感染者。对阴性结果仍需进行跟踪检测，如果超过“非典”潜伏期之后仍没有检测出抗体则可排除患病的可能。

### ① ELISA (酶联免疫吸附反应)

ELISA 法根据抗原抗体特异性免疫反应原理设计，采用间接法或双抗原夹心法检测 SARS 病例的血清中的抗 SARS 冠状病毒抗体 IgG 和 IgM，大约在疾病开始后的 10 天出现可靠的阳性结果。该法特点是特异性强、反应灵敏、检出率高，是世界卫生组织(WHO)推荐的病原抗体临床检测的主要方法。

间接法主要用于检测体液中的抗体成份。该方法是将特异性抗原包被在固相载体的表面，形成固相抗原，加入待检样品，使其中的相应抗体结合到固相载体的抗原上，再加入酶标记的抗抗体，形成抗原-抗体-酶标记抗抗体复合物，最后加入底物溶液显色。固相载体上的酶催化底物成为有色产物，通过比色测知样品中抗体的含量。间接法的优点是只要变换包被抗原，就可利用同一酶标记抗抗体建立检测相应抗体的方法。该法试验成败的关键在于包被抗原的纯度。特别注意要除去能与一般健康人血清发生免疫学反应的杂质，包被抗原中也不能含有可与酶标记得抗人 Ig(s)反应的物质。间接法中另一个干扰因素是正常血清中所含有的高浓度非特异性 IgG。由于 IgG 的吸附性很强，非特异性 IgG 可直接吸附在固相载体上，有时也可吸附在包被抗原的表面；故在间接法实验中，抗原包被后一般要用无关的蛋白质进行封闭固

相载体上的剩余空间。检测的血清样本一般也不能直接使用，需经稀释后再加入与包被抗原进行反应，以减少高浓度的 IgG 对实验结果的干扰。

双抗原夹心法的反应模式与双抗体夹心法相类似。将特异性抗原结合在某种固相载体上，将指示剂标记在特异性抗原上，加入酶作用底物，酶与底物发生反应后，底物显色，根据底物显色的深浅定性或定量地检测待检样本中抗体的量。它与间接法测定抗体的不同之处是以酶标记抗原代替酶标记抗体，其敏感性和特异性均高于间接法。本法的关键在于酶标记抗原的制备应根据抗原结构的不同来寻找合适的标记方法。

ELISA 法要求抗原纯度高、特异性好，否则会出现非特异性反应，操作程序较复杂，需反复洗涤，若洗涤次数不够或过多易造成假阳性和假阴性，并易造成操作者受害和环境污染，实验时间较长，需两小时以上得出检测结果。该法必须具备酶标仪和洗板机，这在基层实验室和小型门诊较难达到，且试验受温度等条件限制，给检测带来不便。

## ② IFA（荧光免疫检验法）

IFA 法同样根据抗原抗体特异性免疫反应原理设计，把感染病毒的细胞固定在玻片上，将待检测病人的血清滴于上面，带有病毒的病人血清中含有相应抗体，结合于玻片上，加入荧光试剂，即可显示出荧光。在荧光免疫显微镜下可直接观察检测结果。IFA 用于 SARS 病例的血清中的 IgG 抗体的测定，大约在疾病开始后的 10 天出现阳性结果。这种测试方法也可用于 IgG 抗体的测定。这也是一种经典的测定方法，需要借助于荧光免疫显微镜进行测定。

IFA 法灵敏度高，但必须具备荧光免疫显微镜和暗室条件，为获得良好荧光观察效果必须配备合适的滤光片，实验时间需两小时，结果检测于荧光

免疫显微镜下进行，必须由有经验的专业人员判定检测结果。

阳性的抗体测试结果显示以前曾有过 SARS 冠状病毒的感染。从急性期到恢复期发生了从阴性到阳性的血清转化，或者是抗体滴度增长了四倍，显示近期有感染。

阴性的抗体测试结果：在疾病发生的 21 天后没有检查到抗体，表明没有受到 SARS 冠状病毒的感染。

### 3. 细胞培养

来自 SARS 病例的样品中的病毒（例如呼吸道分泌物、血液或者粪便），通过接种细胞培养和病毒增殖也能测到。一旦分离到了病毒，将做进一步的通过电镜观察或血清学反应等方法鉴别以证实是否是 SARS 病毒。细胞培养是条件非常苛刻的测试，但目前（除了动物测试外）仅仅表明了有活病毒的存在。阳性的细胞培养结果表明在所测试的样品中有活的 SARS 冠状病毒的存在。阴性的细胞培养结果并不能排除 SARS 冠状病毒的存在（见阴性的 PCR 结果）。

细胞培养是一种无菌操作技术，要求具备很高的实验工作环境和条件（无菌操作间、超净工作台、操作间等），需要大量仪器设备（培养箱、离心机、显微镜、离心机等），需要大量专业实验器材（多种培养器皿），实验技术复杂，需要有经验的专业人员操作，且实验周期很长（需数月），不适宜疾病的快速检测。

### 发明内容

本发明的目的在于针对现有技术存在的问题，研制出一种免疫印迹法检测 SARS 冠状病毒抗体（IgG）试剂盒，主要用于临床检验部门和卫生防疫部门对病原的确认，可同时检测多种抗原或抗体，将不同病原引起的流行病

快速鉴别出来。

本发明的 SARS 冠状病毒抗体 (IgG) 免疫印迹诊断试剂盒由固相膜、酶标记的抗抗体和相应的显色底物组成；其中固相膜由纯化 SARS 冠状病毒全病毒裂解液抗原或重组混合抗原经凝胶电泳分离、转印在薄膜上得到。

所述固相膜更具体的制备方法如下：将纯化 SARS 冠状病毒全病毒裂解液抗原或重组混合抗原通过凝胶电泳进行抗原分离；再通过转印仪将凝胶上抗原转移至薄膜，薄膜作封闭处理；将人 IgG 采用喷涂方式固定在薄膜上，同样作封闭处理同上，作为质控线。

所述薄膜是医学领域通用薄膜，例如是硝酸纤维素膜、或尼龙膜。

所述酶标记的抗抗体通过下述方法制备：用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗人 IgG，或高纯度的碱性磷酸酶 (ALP) 标记的羊-抗人 IgG 抗体，加保护剂 0.01% 硫柳汞和 1% 牛血清白蛋白 (重量百分比) 和 0.01M pH7.4 PBS 配制而成。

所述显色底物通过下述方法制备：

辣根过氧化物酶 (HRP) 对应的显色底物由 0.03% (w/v) 过氧化氢和 0.07% (w/v) 二氨基联苯胺组成。

碱性磷酸酶 (ALP) 对应的显色底物至少包括 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐 (BCIP) 及 4-氮唑蓝 (NBT)。

本发明试剂盒的工作原理如下：

免疫印迹技术 (IBT) 是凝胶电泳技术，固定化技术及分子亲和技术三者融为一体的综合性生物技术。通过电泳分离 SARS 冠状病毒抗原组分，将分离得到的抗原组分，印迹转移到固相膜上，封闭固定，制备好抗原膜条。操作者在不需要特殊仪器设备下，只要按一般的 ELISA 操作便可完成人抗

SARS 冠状病毒抗体的检测。当待检血清样本中含有 SARS 冠状病毒抗体时，与膜上的抗原发生抗原抗体结合反应，加入酶标记抗抗体后结合成 Ag-Ab-抗 Ab-E（复合物），加入显色底物，出现阳性条带。

试剂盒的使用方法如下：

- (1) 加待检样品：用 0.01M pH7.4 PBS 适当稀释待检样品，取 50  $\mu$ l 加入抗原反应槽内，充分混匀，缓缓摇动，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。取出，用 0.01M pH7.4 PBS 洗涤 3-5 次，每次一分钟。
- (2) 酶标记的抗抗体：用 0.01M pH7.4 PBS 适当稀释酶标记的抗抗体，取 50  $\mu$ l 加入抗原反应槽内，充分混匀，缓缓摇动，37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。取出，用 0.01M pH7.4 PBS 洗涤 3-5 次，每次一分钟。
- (3) 显色底物和终止反应：取显色底物共 100  $\mu$ l 加入槽内，室温反应 5-10 分钟。每槽加入 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 或 1M NaOH 终止液 50  $\mu$ l，终止反应，1 分钟后弃去液体。
- (4) 结果判断：阴性：仅在质控线上有色带。阳性：除质控线有色带，检测线有 1 条或多条色带。

本发明与现有技术相比具有如下优点：本发明抗原全面，灵敏度高，特异性强，不但可以作为临床确证试验，还可以为科研发现新的特异性抗体，适用于流行病学调查以及对病原体的研究。本试剂盒于 4 $^{\circ}$ C 保藏，有效期达 9-12 个月，简便，试剂配套，使用方便，结果不需任何特殊仪器，可目测判断，易于普及，适宜于批量生产。

### 具体实施方式：

#### 实施例 1

本实施例采用纯化 SARS 冠状病毒全病毒裂解液抗原经电泳、转印至硝

酸纤维素膜上，膜上还有抗人 IgG 线作为质量控制线，用以检验膜条是否失败。采用辣根过氧化物酶（HRP）标记的兔抗人 IgG 及相应显色底物进行检测。本实施例的制造方法如下：

#### **a、抗原制备**

纯化 SARS 冠状病毒全病毒抗原用 0.02M pH7.6 PBS 调节蛋白浓度至 10mg/ml。以 1: 2 体积加入裂解液，100℃裂解 5 分钟。

#### **b、抗原分离（凝胶电泳）**

- 1、配制 12%聚丙烯酰胺凝胶作为分离胶，2.5%凝胶作为浓缩胶。
- 2、负压抽气 5 分钟。
- 3、倒板：先倒分离胶，面积为  $15 \times 15 \text{cm}^2$ ，待分离胶聚合后，倒浓缩胶，浓缩胶面积为  $15 \times 2.5 \text{cm}^2$ 。
- 4、待浓缩胶聚合，记录好聚合时间。
- 5、按每块板加入 0.5ml 的量加入抗原，静置 10 分钟。
- 6、接好电极，开启电泳仪，在稳流状态下，浓缩胶中电流强度调至 10mA，分离胶中电流强度调节为 20mA 进行电泳，直至抗原前缘（溴酚兰线）在浓缩胶中走了 10cm，终止电泳。

#### **c、抗原转移（印迹转移）**

- 1、复温转移电泳液，将硝酸纤维素膜及滤纸提前 2 小时放于缓冲液中平衡。
- 2、将电泳后取出的聚丙烯酰胺凝胶切割为  $14 \times 10 \text{cm}^2$  大小，放于缓冲液中平衡 30 分钟。
- 3、按滤纸—凝胶—硝酸纤维素膜—滤纸的顺序依次放入上述材料于转印槽板上，每层之间用玻璃管排气泡和多余的水份。
- 4、盖上转印槽盖，接通电源，调 20 伏特，稳压转印 1 小时。

#### **d、抗原固定（封闭）**

- 1、洗涤转印膜一次，时间 15 分钟。
- 2、用 pH7.4, 0.02M PBS, 1.0%BSA 封闭液进行封闭，封闭硝酸纤维素膜上的未结合位点，37℃温育 2 小时或 4℃过夜。
- 3、洗涤转印膜两次，每次 15 分钟，晾干保存。

#### **e、二次印迹**

- 1、将纯化的人 IgG 配制成 20mg/ml。
- 2、调试喷膜机，采用机器划线将 IgG 印迹到膜零位线下约 2mm 处。
- 3、同 d 封闭、洗涤、晾干。

#### **f、酶标记的抗抗体制备**

选用进口的高纯度辣根过氧化物酶标记兔抗人 IgG，其效价应达到 1:1000 以上。采用高碘酸钠氧化法或其他适宜的方法进行辣根过氧化物酶标记。酶标记物应保存于-30℃。将标记好的酶标记抗抗体 1mg 依据滴配结果，用含 1.0%BSA、pH7.0 的 0.01M PBS 稀释到计划体积，置 4℃保存。

#### **g、显色系统制备**

- 1、显色剂 A: 0.03% (w/v) 过氧化氢。
- 2、显色剂 B: 0.07% (w/v) 二氨基联苯胺。
- 3、终止液: 1mol/L 硫酸溶液。

#### **h、其他试剂的配制**

- 1、浓缩洗涤液的配制：用双蒸水配制，调 pH 值至 7.4，使用时稀释 10 倍。  
1000ml 浓缩洗涤液配方：2.0g 磷酸二氢钾；23.3g 磷酸氢二钠；85g 氯化钠；20ml Tween-20；1000ml 双蒸水。
- 2、终止液的配制：2M 浓硫酸。

## i、组装、包装

### 1、切割膜条，装板

将检定合格的膜，沿电泳垂直方向切割为 1.5mm 宽的膜条，编号为 1-8 号，放入槽板中，并固定两端，装入铝塑袋中，封口，铝塑袋外写上膜条批号。

### 2、试剂分装

酶标记的抗抗体：0.6ml/支；浓缩洗涤液：25ml/瓶；显色剂 A：25ml/瓶；显色剂 B：25ml/瓶；终止液：25ml/瓶。

### 3、装盒

膜条（8 人份）：5 块（合共 40T）；酶标记的抗抗体：2 支；浓缩洗涤液：2 瓶；显色剂 A：1 瓶；显色剂 B：1 瓶；终止液：1 瓶；标准图谱：1 份。

#### 实施例 2

本实施例采用纯化 SARS 冠状病毒全病毒裂解液抗原经电泳、转印至硝酸纤维素膜上，膜上还有抗人 IgG 线作为质量控制线，用以检验膜条是否失败。采用碱性磷酸酶（ALP）标记的羊-抗人 IgG 抗体及相应显色底物进行检测。本实施例的制造方法与实施例 1 基本相同，不同点如下：

#### a、酶标抗体制备

选用进口高纯度的碱性磷酸酶（ALP）标记的羊-抗人 IgG 抗体 1mg，依据滴配结果，用含 1.0%BSA、pH7.4 的 0.02M PBS 稀释到计划体积，置 4℃保存。

#### b、显色底物：

Tris	12.1g
MgCl <sub>2</sub>	0.475g
NaCl	5.8g

BCIP	0.4g
NBT	0.5g
二甲基甲酰胺	2ml

用纯化水定容到 1000ml, 4℃ 避光保存。

c、终止液：1M 氢氧化钠。

### 实施例 3

本实施例采用纯化 SARS 冠状病毒重组抗原混合物经电泳、转印至硝酸纤维素膜上, 膜上还有抗人 IgG 线作为质量控制线, 用以检验膜条是否失败。采用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗人 IgG 及相应显色底物进行检测。本实施例的制造方法如下与实施例 1 相同。

### 实施例 4

本实施例采用纯化 SARS 冠状病毒重组抗原混合物经电泳、转印至硝酸纤维素膜上, 膜上还有抗人 IgG 线作为质量控制线, 用以检验膜条是否失败。采用碱性磷酸酶 (ALP) 标记的羊-抗人 IgG 抗体及相应显色底物进行检测。本实施例的制造方法与实施例 2 相同。

检测 150 例 “非典” 可疑患者的血清样本, 用荧光免疫检验法 (IFA) 作对照, 对本发明进行特异性和敏感性检测 (见表 1)。本发明的特异性达 96% (96/100), 灵敏性达 96% (48/50)。

表 1 150 份 “非典” 可疑患者血清样本 SARS 冠状病毒抗体检测结果

		实验组 (本发明)		合计
		阳性数	阴性数	
对照组 (IFA)	阳性数	48	2	50
	阴性数	4	96	100
	合计	52	98	150

专利名称(译)	SARS冠状病毒抗体IgG免疫印迹诊断试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1453590A</a>	公开(公告)日	2003-11-05
申请号	CN03126893.5	申请日	2003-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州万孚生物技术有限公司		
[标]发明人	王继华		
发明人	王继华		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/566 G01N33/569		
代理人(译)	何燕玲 李本祥		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及SARS冠状病毒抗体IgG免疫印迹诊断试剂盒，由固相膜、酶标记的抗抗体和相应的显色底物组成；所述固相膜由纯化SARS冠状病毒全病毒裂解液抗原或重组混合抗原经凝胶电泳分离、转印在薄膜上得到；所述酶标记的抗抗体通过下述方法制备：用辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗人IgG、或碱性磷酸酶标记的羊-抗人IgG抗体，加保护剂0.01%硫柳汞和1%牛血清白蛋白重量和0.01M pH7.4 PBS配制而成。本发明主要用于临床检验部门和卫生防疫部门对病原的确认，可同时检测多种抗原或抗体，将不同病原引起的流行病快速鉴别出来。