

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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

G01N 33/53

G01N 33/535 G01N 33/569



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03154287.5

[43] 公开日 2005 年 2 月 23 日

[11] 公开号 CN 1584593A

[22] 申请日 2003.8.20 [21] 申请号 03154287.5

[71] 申请人 香港神农有限公司

地址 香港永乐街 131 号 4 楼

[72] 发明人 吴文翰 陈泓霖 陈国雄 吴子柏

[74] 专利代理机构 广州三环专利代理有限公司

代理人 刘孟斌

权利要求书 4 页 说明书 29 页 附图 5 页

[54] 发明名称 EB 病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及采用特定的 EB 病毒蛋白作为靶抗原检测血清中抗体水平的试剂盒以及 EB 病毒重组多肽制备酶联免疫吸附试剂盒的方法。选择血清学诊断鼻咽癌(或传染性单核细胞增多症)最具临床诊断价值的 EB 病毒蛋白 EBNA1(BKRF1)蛋白、Zta(BZLF1)蛋白和 VCA-p18 蛋白作为靶抗原,用以检测血清中的抗体水平,并通过在谷胱甘肽转移酶基因融合系统对 EB 病毒蛋白进行克隆、表达和纯化,创制出诊断试剂盒,从而使重组 EB 病毒抗原在 EB 病毒的原发性感染、确立 EB 病毒感染的抗体谱和鉴别诊断各种 EB 病毒感染、鉴别传染性单核细胞增多症和传染性单核细胞综合症、协助诊断疑为鼻咽癌、早期发现和评估患鼻咽癌的风险度等诊断方面得以应用。

1、一种 EB 病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒，包括有：阳性对照血清、阴性对照血清、酶底物、终止反应液、稀释缓冲液、冲洗缓冲液以及 EB 病毒靶抗原，其特征在于 EB 病毒抗原蛋白为：EBNA1 (BKRF1) 蛋白、Zta (BZLF1) 蛋白和 VCA-p18 蛋白 (即 18Kd 的 VCA 或 BFRF3 蛋白)。

2、根据权利要求 1 所述试剂盒，其特征在于所选择的 EBNA1 氨基酸序列与以下序列有 95% 的同源性：

MSDEPGTGPNGLGKGDTSGPEGSGGSGPQRRGGDNHGRGRG  
 RGRGRGGRRPGAPGGSGSPRHRDGVRRPQKRPSICGCKGTHGGTGAGAGAGGAGAGG  
 AGAGGGAGAGGGAGGAGGAGAGGGAGAGGGAGGAGAGGGAGAGGGAGGAGAGG  
 GGAGGAGGAGAGGGAGAGGGAGGAGAGGGAGGAGAGGGAGAGGAGGAGGAGAGGA  
 GAGGGAGGAGGAGAGGAGAGGAGAGGAGGAGAGGAGGAGAGGAGGAGAGGGAG  
 GAGAGGGAGGAGGAGGAGAGGAGAGGAGGAGAGGGAGAGGAGAGGGGRGRGGS  
 GGRGRGSGGRGRGSGRRGRGRERARGGSRRERARGRGRGRGEKRPRSPSSQSSSSG  
SPPRRPPPGRRRPFFHPVGEADYFEYHQEGGPDGEPDVPPGAIEQGPADDPGEGPSTGP  
RGQGDGRRRKKGGWFGKHRGQGGSNPKFENIAEGLRALLARSHVERTTDEGTWVAGVF  
VYGGSKTSLYNLRRGTALAIQCRLTPLSRLPFGMAPGPGPQPGPLRESIVCYFMVFL  
QTHIFAEVLKDAIKDLVMTKPAPTCNIRVTVCSEFDDGVDLPPWFPPMVEGAAAEGDDG  
DDGDEGGDGDEGEEGQE

其中最具特征性的为后一截，即：

PVGEADYFEYHQEGGPDGEPDVPPGAIEQGPADDPGEGPSTGP  
 RGQGDGRRRKKGGWFGKHRGQGGSNPKFENIAEGLRALLARSHVERTTDEGTWVAGVF  
 VYGGSKTSLYNLRRGTALAIQCRLTPLSRLPFGMAPGPGPQPGPLRESIVCYFMVFL  
 QTHIFAEVLKDAIKDLVMTKPAPTCNIRVTVCSEFDDGVDLPPWFPPMVEGAAAEGDDG  
 DDGDEGGDGDEGEEGQE

3、根据权利要求 1 所述试剂盒，其特征在于所选择的 Zta 氨基酸序列与以下序列有 95% 的同源性：

MMDPNSTSEdVkfTPDPYQVPFVQAFDQATRvYQDLGGPSQAPL

PCVLWPVLPEPLPQGLTAYHVSTAPTGSWFSAPQPAPENAYQAYAAPQLFPVSDITQ

NQQTnQAGGEAPQPGDNSTVQTAAAVVFACPGANQGGQLADIGVPQPAPVAAPARRTR

KPQQPESLEECdSELEIKRYKnrVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSSENDRLRLLL  
KQMCPSLDVDSIIIPRTPDVLHEDLLNF

- 4、根据权利要求 1 所述试剂盒，其特征在于所选择的 VCA-p18 氨基酸序列与以下序列有 95%的同源性：

MARRLPKPTLQGRLEADFPDSPLLPKFQELNQNLPNDVFREAQ

RSYLVLFTSQFCYEEYVQRFTGVPRRQRRAIDKRQRASVAGAGAAHLGGSSATPVQQA

QAAASAGTGALASSAPSTAVAQSATPSVSSSISSLRAATSGATAAASAAAAVDTGSGG

GGQPHDTAPRGARKKQ

- 5、根据权利要求 1 所述试剂盒，其特征在于它还包括有相当于优化临界光密度值的诊断参考血清。
- 6、根据权利要求 5 所述试剂盒，其特征在于参考血清以灵敏度曲线和特异度曲线交接点的相对光密度值（rOD）为最佳临界值。
- 7、EB 病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒的制备方法，包括重组抗原的制备、纯化标记、效价滴定、包被板制备、封闭、干燥及包装、酶标抗体浓缩液制备、稀释液制备、阳性对照制备、正常对照制备、底物分装、终止液及浓缩液置备等步骤，其特征在于它还包括参考血清的制备。
- 8、根据权利要求 7 所述试剂盒的制备方法，其特征在于以灵敏度曲线和特异度曲线交接点的相对光密度值（rOD）为最佳临界值制备参考血清。
- 9、根据权利要求 7 所述试剂盒的制备方法，其特征在于 EB 病毒蛋白重组抗原的制备为：

A、 选定 EBNA1 (BKRF1) 蛋白的后一截, 即:

PVGEADYFEYHQEGGPDGEPDVPPGAIEQGPADDPGEGPSTGP  
 RGQGDGRRKKGWFGKHRGQGSNPKFENIAEGLRALLARSHVERTTDEGTWVAGVF  
 VYGGKTSLYNLRRGTALAIQCRLTPLSRLPFGMAPGPGPQPGPLRESIVCYFMVFL  
 QTHIFAEVLKDAIKDLVMTKPAPTCNIRVTVCSEFDDGVDLPPWFPPMVEGAAAEAGDDG  
 DDGDEGGDGDEGEEGQE

以及 Zta (BZLF1) 蛋白和 VCA-p18 蛋白 (即 18Kd 的 VCA 或 BFRF3 蛋白) 这三种 EB 病毒蛋白在基因库 (V01555, B95-8 细胞株的序列) 中的 mRNA 序列, 逆转录酶将之转为 cDNA 序列;

B、 设计可以扩增该 cDNA 序列的引物、 序列扩增;

C、 将 PCR 扩增子与谷胱甘肽转移酶 (GST) 基因克隆到 Eco R1/Bam HI 消化的原核细胞表达 pGEX2T 质粒载体上, 将重组的质粒转至大肠杆菌, 诱导已经转到了重组质粒的大肠杆菌, 然后收获并裂解细菌, 细菌裂解产物经离心后除去碎片而澄清, 含融合蛋白的上清液采用谷胱甘肽琼脂糖 4B 经谷胱甘肽转移酶-谷胱甘肽亲和色谱仪纯化。

10、 根据权利要求 7 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于 EBNA-1 (BKRF1) 引物设计为:

5' -TAC GGA TCC CCT GTA GGG GAA GCC GAT TA-3'  
 BamHI

5' -TAC GAA TTC TCA CTC CTG CCC TTC CTC CAC-3'  
 EcoRI

11、 根据权利要求 7 所述试剂盒的制备方法, 其特征在于 Zta (BZLF1)

引物设计为:

5' -TAC GGA TCC ATG ATG GAC CCA AAC TCG AC-3'  
 BamHI

5' -TAC GAA TTC TTA GAA ATT TAA GAG ATC CTC-3'  
 EcoRI

12、根据权利要求7所述试剂盒的制备方法，其特征在于

VCA-p18 (BFRF3) 引物设计为：

5' -TAC GGA TCC ATG GCA CGC CGG CTG CCC AAG-3'

BamHI

5' -TAC GAA TTC CTA CTG TTT CTT ACG TG-3'

EcoRI

13、EBNA1 (BKRF1) 蛋白、Zta (BZLF1) 蛋白单独或联合应用于鼻咽癌的血清学诊断。

14、EBNA1 (BKRF1) 蛋白、Zta (BZLF1) 蛋白和 VCA-p18 蛋白联合应用于鼻咽癌的血清学诊断。

15、VCA-p18 蛋白在传染性单核细胞增多症的血清学诊断上的应用。

16、EBNA1 (BKRF1) 蛋白和 VCA-p18 蛋白在 EB 病毒近期感染的血清学诊断上的联合应用。

## EB 病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒及其制备方法

### [技术领域]

本发明涉及对鼻咽癌及其他 EB 病毒相关疾病进行血清学诊断的试剂盒及其制备方法，特别是采用特定的 EB 病毒蛋白作为靶抗原检测血清中抗体水平的试剂盒以及 EB 病毒重组多肽制备酶联免疫吸附试剂盒的方法。

### [背景技术]

在我国，几乎 100% 四岁以上的人群均已感染了 EB 病毒，80% 以上的健康成人是 EB 病毒携带者。EB 病毒携带者血清中可以存在一种或 2 至 3 种 (不是多种，即不是 3 种以上) 低水平的 (不是高水平的) 抗 EB 病毒抗体。我国南方，特别是珠江三角洲及香港地区，是世界上鼻咽癌的高发区，而鼻咽癌的发生与 EB 病毒感染密切相关。我国南方及香港地区也是其他 EB 病毒相关疾病，例如鼻腔、鼻窦的 NK/T 细胞淋巴瘤、肺的淋巴上皮瘤样癌和传染性单核细胞增多症等的高发区。前两者患者血清 EB 病毒抗体谱与鼻咽癌患者的类同，而传染性单核细胞增多症患者血清 EB 病毒抗体的出现有一定的先后规律性。

目前常规地在临床上应用的血清 EB 病毒抗体的检测 (免疫荧光法或免疫酶标法)在一定程度上欠客观性 (凭个人在显微镜下计算阳性细胞的百分率)、指标较粗 (采用几何级数的滴度，例如 1:20, 1:40, 1:80 等，尚未采用目前数码时代的十分具体的数字表示)，且对 EB

病毒感染的特征针对性不强。例如鼻咽癌主要是潜伏感染伴少量溶解性感染,鼻咽癌患者血清中大多具有广谱的高水平的抗 EB 病毒抗体,特别是 IgA 抗体。又例如不能确切地显示传染性单核细胞增多症患者血清中具特征性的抗体水平 (包括: p18 VCA IgM、低亲和性 p18 VCA IgG、p18 VCA IgG 和 EBNA1 IgG)。

酶联免疫吸附法可用于鉴别 EB 病毒的各种感染状态,在血清学诊断 EB 病毒相关疾病时,具有十分潜在的优势。目前虽已有采用酶联吸附试剂盒血清学诊断 EB 病毒相关疾病的研究报告,但缺乏处理 EB 病毒抗体水平的一套新方法。如何区分高、低水平,尚无比较客观的标准。此外,应用酶联免疫吸附法时,如何克服各批号之间的差异和采用同一批号试剂盒每次检测之间的差异,目前尚无良方。

#### [发明内容]

本发明的目的在于克服现有技术的不足之处,提供一种 EB 病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒,其优化的酶联免疫吸附法(ELISA)具有客观性和 EB 病毒抗原的特异性,它提供了定量检测针对个体 EB 病毒抗原的不同免疫球蛋白抗体的亚型。这种优化的酶联免疫吸附法(ELISA)完全是新的,是传统的血清学检测法做不到的,因为传统的血清学检测法并不能明确抗原的特异性。而且,新的优化的酶联免疫吸附法(ELISA)采用了参考血清,可以纠正每批检测间的差异,保证了诊断的可靠性。

本发明选择血清学诊断鼻咽癌 (或传染性单核细胞增多症)最具临床诊断价值的 EB 病毒蛋白(相关氨基酸序列 95%的同源性)为

**EBNA1 (BKRF1) 蛋白的后一截，即：**

```
PVGEADYFEYHQEGGPDGEPDVPPGAIEQGPADDPGEGPSTGP
RGQGDGRRKKGWFGKHRGQGGSNPKFENIAEGLRALLARSHVERTTDEGTWVAGVF
VYGGSKTSLYNLRRGTALAIQCRLTPLSRLPFGMAPGPGPQGPLRESIVCYFMVFL
QTHIFAEVLKDAIKDLVMTKPAPT CNIRVTVCSFDDGVDLPPWFPPMVEGAAAEGDDG
DDGDEGGDGEDEEGQE
```

以及 Zta (BZLF1) 蛋白和 VCA-p18 蛋白 (即 18Kd 的 VCA 或 BFRF3 蛋白)。采用这三种 EB 病毒蛋白作为靶抗原，用以检测血清中的抗体水平，并通过在谷胱甘肽转移酶基因融合系统中对 EB 病毒蛋白进行克隆、表达和纯化，创制出诊断试剂盒，从而使重组 EB 病毒抗原在以下诊断方面得以应用：

- 1、 EB 病毒的原发性感染；
- 2、 确立 EB 病毒感染的抗体谱和鉴别诊断各种 EB 病毒感染；
- 3、 鉴别传染性单核细胞增多症 (Infectious mononucleosis) 和传染性单核细胞综合症 (Infectious mononucleosis syndrome)；
- 4、 血清学协助诊断疑为鼻咽癌；
- 5、 早期发现和评估患鼻咽癌的风险度。

这三种蛋白(六种抗体检测)的试剂盒可以相互互补。可以单独使用，也可以组合使用。例如：EBNA1-IgA 和 Zta-IgG 的组合检测大大地提高了血清学诊断鼻咽癌的可靠性。即：绝大多数鼻咽癌患者既呈 EBNA1-IgA 阳性，又呈 Zta-IgG 阳性；少数鼻咽癌患者即使是 EBNA1-IgA 阴性，也会呈 Zta-IgG 阳性。而少数鼻咽癌患者即使是 Zta-IgG 阴性，也会呈 EBNA1-IgA 阳性，两者有互补作用。

许多临床上疑有鼻咽癌的人，经此组合检测后，如果 EBNA1-IgA 和 Zta-IgG 均为阴性，则 90%以上可以有把握地排除是鼻咽癌患者。这对鼻咽癌高发区的医院和人群来说，无疑贡献良多。

如何在鼻咽癌高发区人群中早期发现患者，以便早期治疗，获得最佳的预后？本试剂盒的组合使用，提供了可能性。同时做 EBNA1-IgA、EBNA1-IgG 和 Zta-IgG 后显示：三者阳性是高风险人群；两者阳性是中风险人群；仅单阳者是低风险人群。这对鼻咽癌高发区人群早期发现鼻咽癌患者，又是一重大贡献。

组合使用本试剂盒也有助于传染性单核细胞增多症的诊断和判别各种类型的 EB 病毒感染。

总之，选择这三种 EB 病毒蛋白作为试剂盒的靶抗原，不但有单独使用的价值，更是一个整体性的、具有互补性的设计和临床实践(见下表)，可以组合使用，非其他试剂盒可以比拟，具有创新性，应获得权利保护。请见下表。

| 酶联免疫吸附法                     | 应用于                  |
|-----------------------------|----------------------|
| EBNA1-IgA                   | 鼻咽癌的血清学诊断            |
| EBNA1-IgG                   | 鼻咽癌和传染性单核细胞增多症的血清学诊断 |
| Zta-IgA                     | 鼻咽癌的血清学诊断            |
| Zta-IgG                     | 鼻咽癌的血清学诊断            |
| P18 VCA IgG                 | 传染性单核细胞增多症的血清学诊断     |
| P18 VCA IgM                 | 传染性单核细胞增多症急性期的血清学诊断  |
| P18 VCA IgG+EBNA1-IgG       | EB 病毒近期感染的血清学诊断      |
| EBNA1-IgA+Zta-IgG<br>或      | 鼻咽癌的血清学诊断            |
| EBNA1-IgA+Zta-IgA           |                      |
| EBNA1-IgA+EBNA1-IgG+Zta-IgG | 患鼻咽癌的风险性评估           |

利用谷胱甘肽转移酶基因融合系统克隆、表达和纯化的这三种 EB 病毒蛋白。融合克隆蛋白的大小分别为：

EBNA-1=40Kd; BFRF3=44Kd; BZLF1=53Kd。

但披覆在检测板上的抗原，已采用凝血酶(Thrombin)法从融合蛋白中脱离，因此是去除了谷胱甘肽转移酶(GST)的抗原。这就避开了在抗原抗体反应时由谷胱甘肽转移酶所引起的非特异性反应。

这三种 EB 病毒蛋白的特征可以概括如下表：

| EB 病毒蛋白 | 分子量(氨基酸数) | EB 病毒基因 | 核苷酸(相当坐标)          |
|---------|-----------|---------|--------------------|
| EBNA1   | 40Kd(234) | BKRF1   | 705(109171-109875) |
| Zta     | 53Kd(245) | BZLF1   | 738(102210-103155) |
| P18VCA  | 44Kd(176) | BFRF3   | 531(61507-62037)   |

[附图说明]

图 1:采用 ELISA 检测 EBNA1-IgA 抗体水平时血清的稀释度。

图 2:鼻咽癌患者与健康供血者的 BNA1-IgA 抗体水平比较。

图 3:优化体外诊断鼻咽癌的 EB 病毒 ELISA 法。

图 4:血清中具有高水平广谱的抗体是鼻咽癌患者的一种特异性的特征。

图 5:鼻咽癌诊断和风险评估的 EB 病毒抗体谱。

[具体实施方式]

一、EB 病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒，包括有：阳性对照血清、对照血清、酶底物、终止反应液、稀释缓冲液、冲洗缓冲液以及 EB 病毒靶抗原，其中 EB 病毒蛋白为：EBNA1 (BKRF1) 蛋白的后一截、Zta (BZLF1) 蛋白和 VCA-p18 蛋白 (即 18Kd 的 VCA 或 BFRF3 蛋白)。

试剂盒还包括有相当于优化临界光密度值的诊断参考血清。参考血清以灵敏度曲线和特异度曲线交接点的相对光密度值 (rOD) 为最佳临界值。

EB 病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒的制备方法, 包括重组抗原的制备、纯化标记、效价滴定、包被板制备、封闭、干燥及包装、酶标抗体浓缩液制备、稀释液制备、阳性对照制备、正常对照制备、参考血清制备、底物分装、终止液及浓缩液置备等步骤。

## 二、EB 病毒蛋白在谷胱甘肽转移酶基因融合系统中的克隆、表达和纯化

### 2.1 选择血清学诊断鼻咽癌 (或传染性单核细胞增多症) 的 EB 病毒蛋白

最具临床诊断价值的 EB 病毒蛋白为: EBNA1 (BKRF1) 蛋白 的后一截、 Zta (BZLF1) 蛋白和 VCA-p18 蛋白 (即 18Kd 的 VCA 或 BFRF3 蛋白)。因此我们采用这三种 EB 病毒蛋白作为靶抗原, 用以检测血清中的抗体水平。

### 2.2 三种 EB 病毒蛋白的制备

采用现代分子生物学方法在谷胱甘肽转移酶基因融合系统中克隆、表达和纯化这三种 EB 病毒蛋白。

2.2.1 选定这三种 EB 病毒蛋白在基因库 (V01555, B95-8 细胞株的序列) 中的 mRNA 序列, 逆转录酶将之转为 cDNA 序列。

### 2.2.2 设计可以扩增该 cDNA 序列的引物

在引物 5' 端加 BamHI 酶切序列 (GGATCC) 或 EcoRI 序列 (GAATTC), 以便在 Bam HI 和 EcoR1 切割后, 将之插入物连结至质粒 pGEX DNA (4948bp, Amersham Biosciences)。而引物 5' 端再加 TAG, 既有利插入, 又经限制性酶消化后不出现在克隆中。

### 2.2.3 具体的引物设计、序列扩增过程

#### 2.2.3.1 关于 EB 病毒 EBNA1 蛋白 (又称 BKRF1 蛋白)

##### 2.2.3.1.1 EBNA-1 (BKRF1) 引物设计

5' -TAC GGA TCC CCT GTA GGG GAA GCC GAT TA-3'

BamHI

5' -TAC GAA TTC TCA CTC CTG CCC TTC CTC CAC-3'

EcoRI

引物 5' 端的 3 个碱基 TAC 经限制性酶消化后不出现在克隆中。

GGATCC 为 BamHI 限制性酶切序列 (Bam HI restriction site), GAATTC 则为 EcoRI 限制性酶切序列 (Bam HI restriction site)。

##### 2.2.3.1.2 扩增的 EBNA-1 编码序列 (cDNA)

B95-8 细胞的 EBNA1 (BKRF1) 的核苷酸编码序列应为 107950-109875。现在扩增的序列为 109171-109875。即无需 107950-109170 甘氨酸(Gly)重复区截取的 EBNA-1 编码序列。所克隆的编码 DNA 序列与 B95-8 细胞的完全一致, 共 705 碱基。以下划线表示。

```
107950→ a tgtctgacga ggggccaggt acaggacctg gaaatggcct aggagagaag
108061 aaccatggac gaggacgggg aagaggacga ggacgaggag gcggaagacc aggagccccg
108121 ggcggctcag gatcagggcc aagacataga gatggtgtcc ggagacccca aaaacgtcca
108001 ggagacacat ctggaccaga aggctccggc ggcagtggac ctcaaagaag aggggggtgat
```

108061 aaccatggac gaggacgggg aagaggacga ggacgaggag gcggaagacc aggagcccc  
 108121 ggcggtcag gatcagggcc aagacataga gatggtgtcc ggagaccca aaaactcca  
 108181 agttgattg gctgcaaagg gaccacggt ggaacaggag caggagcagg agcgggaggg  
 108241 gcaggagcag gaggggcagg agcaggagga ggggcaggag caggaggagg ggcaggaggg  
 108301 gcaggagggg caggaggggc aggagcagga ggaggggcag gacgaggagg aggggcagga  
 108361 ggggcaggag gggcaggagc aggaggaggg gcaggagcag gaggaggggc aggaggggca  
 108421 ggagcaggag gaggggcagg aggggcagga ggggcaggag caggaggagg ggcaggagca  
 108481 ggaggagggg caggaggggc aggagcagga ggaggggcag gaggggcagg aggggcagga  
 108541 gcaggagggg gggcaggagc aggaggggca ggaggggcag gaggggcagg agcaggaggg  
 108601 gcaggagcag gaggaggggc aggaggggca ggaggggcag gacgaggagg ggcaggagca  
 108661 ggaggggcag gacgaggagg ggcaggagca ggaggggcag gaggggcagg agcaggaggg  
 108721 gcaggagggg caggagcagg aggggcagga ggggcaggag caggaggagg ggcaggaggg  
 108781 gcaggagcag gaggaggggc aggaggggca ggagcaggag gggcaggagg ggcaggagca  
 108841 ggaggggcag gaggggcagg agcaggaggg gcaggagggg caggagcagg aggaggggca  
 108901 ggagcaggag gggcaggagc aggaggtgga gcccggggtc gaggagggcag tggaggcccg  
 108961 ggtcaggagg gtagtgagg ccggggtcga ggaggtagt gaggccgcc gggtagagga  
 109021 cgtgaaagag ccaggggggg aagtcgtgaa agagccaggg ggagaggtcg tggacgtgga  
 109081 gaaaagaggc ccaggagtcc cagtagtcag tcacatcat cgggtctcc accgcgagg

109171

↓

109141 ccccctccag gtagaaggcc attttccac cctgtagggg aagccgatta tttgaatac  
 109201 caccaagaag gtggcccaga tggtagcct gacgtgccc cgggagcag agagcaggc  
 109261 ccgcagatg acccaggaga aggcccaagc actggacccc ggggtcaggg tgatggaggc  
 109321 agcgcaaaa aaggaggtg gtttgaaag catcgtggtc aaggaggtc caacccaaa  
 109381 tttgagaaca ttgcagaagg ttaagagct ctctggcta ggagtcacgt agaaaggact  
 109441 accgacgaag gaacttggg cggcgtgtg ttcgtatatg gaggtagtaa gacctcctt  
 109501 tacaacctaa ggcgaggaac tgcccttgc attccacaat gtcgtcttac accattgagt  
 109561 ctctcccct ttggaatggc ccctggacce ggcccacaac ctggcccgt aagggagtcc  
 109621 attgtctgtt atttcatggt ctttttaca actcatatat ttgctgaggt ttgaaggat  
 109681 gcgattaagg acctgttat gacaaagccc gtcctacct gcaatatac ggtgactgtg  
 109741 tcagctttg acgatggagt agattgcct cctggttcc cacctatggt ggaagggct  
 109801 gccgaggagg gtgatgacgg agatgacgga gatgaaggag gtgatggaga tgagggtgag  
 109861 gaagggcagg agtga←109875

\*>为终止密码子

### 2.2.3.1.3 所翻译形成的氨基酸序列 (amino acid sequenc)

除 109873-109875 的 tga 为终止密码子外，实际翻译到

234 个氨基酸，以下划线表示。

MSDEPGTGPNGLGKGDTSPEGSGGSGPQRRGGDNHGRGRG  
 RGRGRGGRRPAGGSGSPRHRDGVRRPQKRPSICGCKGTHGGTGAGAGAGGAGAGG



三段拼接而成的序列完全一致，共 738 碱基。以下划线表示。

```

                                102210
                                ↓
102181 tgaagcaggc gtggttcaa taacgggagt tagaaattta agagatcctc gtgtaaaca
102241 tctgggtgcc gggggataat ggagtaaca tccaggcttg ggcacatctg ctcaacagg
102301 aggcgcagcc tgtcattttc agatgatttg gcagcagcca cctgcggaca aaaatcaggc
                                ↑
                                102338
102361 gtttagatgg ggcatttatg tttgggacgc tagccgcctg ggcattcgtg ttagtatata
                                102423
                                ↓
102421 ctgacctcac ggtagtgcg cagcagttgc ttaaacttgg cccggcattt tctggaagcc
102481 acccgattct tgtatcgctt tatttctagt tcagaatcgc attcctccag ctgcgagcaa
                                ↑
                                102530
102541 gggaatgcgt tactacaagt ggtgcctagt cagttgaaac aagccccacc atccgctgcc
                                102655
                                ↓
102601 gcccctccat gagccccacc gtccgctgcc gcccctcctt gagccccctc ttaccgattc
102661 tggctgttgt ggtttccgtg tgcgtcgtgc cggggcagcc actggtgcag gctgtggaac
102721 accaatgtct gctagctggt gtccttggtt agccccgggg caagcaaca cactgctgc
102781 tgetgtttga acagtagaat tgtctccagg ttgaggtgct tctccccggg cttggttagt
102841 ctgttgattc tgggttatgt cggagactgg gaacagctga ggtgctgcat aagcttgata
102901 agcatttctc ggagcaggct gaggggcaga aaaccacgac ccagtcggag cggttgaaac
102961 atgataggea gttagctggc cttgtggcag aggcctctggc agcaccggcc acagcacaca
103021 aggcaaagga gcttgcatg gccctcccag gtctgatag actctggtag cttggtcaaa
103081 agcttgtaca aaaggcacct ggtatgggtc aggtgtaaat ttacatctt cagaagtcga
103141 gtttgggtcc atcatcttca gcaaagatag caaaggtggc cggcaaggtg caatgtttag
                                ↑
                                103155

```

三段拼接而成的序列如下：

\*>为终止密码子

```

t tagaaattta agagatcctc gtgtaaaca
tctgggtgcc gggggataat ggagtaaca tccaggcttg ggcacatctg ctcaacagg
aggcgcagcc tgtcattttc agatgatttg gcagcagc
gacctcac ggtagtgcg cagcagttgc ttaaacttgg cccggcattt tctggaagcc
acccgattct tgtatcgctt tatttctagt tcagaatcgc attcctccag
cgattc

```

tggctgttgt ggtttccgtg tgcgtcgtgc cggggcagcc actggtgcag gctgtggaac  
 accaatgtct gctagctgtt gtccttggtt agccccgggg caagcaaaca cactgtctgc  
 tgtgtttga acagtagaat tgtctccagg ttgagtgct tctccccgg cttggttagt  
 ctgttgattc tgggttatgt cggagactgg gaacagctga ggtgctgcat aagcttgata  
 agcattctca ggagcaggct gaggggcaga aaaccacgac ccagtcggag cggttgaaac  
 atgataggca gttagctggc cttgtggcag aggctctggc agcaccggcc acagcacaca  
 aggcaaagga gcttgcgatg gccctcccag gtctgatag actctggtag cttggtcaaa  
 agcttgata aaagcacct ggtatgggtc aggtgtaaattttacatctt cagaagtcga  
 gtttgggtcc atcat

### 2.2.3.2.3 所翻译形成的氨基酸序列 (amino acid sequenc)

除 102212-102210 的 taa) 为终止密码子外, 实际翻译到 245 个氨基酸, 以下划线表示。

MMDPNSTSEDKFTDPYQVPFVQAFDQATRVYQDLGGPSQAPL  
PCVLWPVLPPELPQQLTAYHVSTAPTGSWFSAPQPAPENAYQAYAAPQLFPVSDITQ  
NQQTNQAGGEAPQPGDNSTVQTAAAVVFACPGANQGQLADIGVPQPAPVAAPARRTR  
KPQQPESLEECDSELEIKRYKNRVASRKCRAKFKQLLQHYREVAAAKSENDRLRLLL  
KQMCPSLDVDSIIPRTPDVLHEDLLNF

### 2.2.3.3 关于EB病毒VCA-p18蛋白 (又称BFRF3蛋白), 即18kd的VCA蛋白

#### 2.2.3.3.1 VCA-p18(BFRF3)引物设计

5' -TAC GGA TCC ATG GCA CGC CGG CTG CCC AAG-3'

BamHI

5' -TAC GAA TTC CTA CTG TTT CTT ACG TG-3'

EcoRI

引物5'端的3个碱基TAC经限制性酶消化后不出现在克隆中。GGATCC为BamHI限制性酶切序列 (Bam HI restriction site), GAATTC则为EcoRI限制性酶切序列 (Bam HI restriction site)。

### 2.2.3.3.2 扩增的 BFRF3 编码序列 (cDNA)

B95-8 细胞的 BFRF3 的核苷酸编码序列应为 61507-62037。

所克隆的编码 DNA 序列与 B95-8 细胞的完全一致,共 531 碱基。

以下划线表示。

```

          61507
          ↓
61501 cgcgttatgg cacgcccggct gcccaagccc accctccagg ggaggctgga ggcggatttt
61561 ccagacagtc cctgcttcc taaatttcaa gagctgaacc agaataatct cccaatgat
61621 gtttttcggg aggctcaaag aagttacctg gtatttctga catcccagtt ctgctacgaa
61681 gagtacgtgc agaggacttt tggggtgcct cggcgccaac gcgcataga caagaggcag
61741 agagccagtg tggctggggc tgggtctcat gcacaccttg gcgggtcadc gcgccacccc
61801 gtccagcagg ctccagccgc cgcacccgct gggaccgggg ccttggcadc atcagcggc
61861 tccacggccg tagcccagtc cgcgacccc tctgtttctt catctattag cagcctccgg
61921 cccgcgactt cggggggcgac tgcgcccgc tccgcccgc cagccgtcga taccgggtca
61981 ggtggcgggg gacaaccca cgacaccgcc ccacgcgggg cacgtaagaa acagtagagg
                                     ↑
                                     62037
61507→atgg cacgcccggct gcccaagccc accctccagg ggaggctgga ggcggatttt
ccagacagtc cctgcttcc taaatttcaa gagctgaacc agaataatct cccaatgat
gtttttcggg aggctcaaag aagttacctg gtatttctga catcccagtt ctgctacgaa
gagtacgtgc agaggacttt tggggtgcct cggcgccaac gcgcataga caagaggcag
agagccagtg tggctggggc tgggtctcat gcacaccttg gcgggtcadc gcgccacccc
gtccagcagg ctccagccgc cgcacccgct gggaccgggg ccttggcadc atcagcggc
tccacggccg tagcccagtc cgcgacccc tctgtttctt catctattag cagcctccgg
cccgcgactt cggggggcgac tgcgcccgc tccgcccgc cagccgtcga taccgggtca
ggtggcgggg gacaaccca cgacaccgcc ccacgcgggg cacgtaagaa acagtag← 62037

```

\*>为终止密码子

### 2.2.3.3.3 所翻译形成的氨基酸序列 (amino acid sequenc)

除 62035-620370 的 tag 为终止密码子外,实际翻译到 176 个氨基酸,以下划线表示。

MARRLPKPTLQGRLEADFPDSPLLPKFQELNQNNLPNDVFREAQ  
RSYLVFLTSQFCYEEYVQRTFGVPRRQRAIDKRQRASVAGAGAHHLGGSSATPVQQA

QAAASAGTGALASSAPSTAVAQSATPSVSSSISSLRAATSGATAAASAAAAVDTGSGG

GGQPHDTAPRGARKKQ

总结关于 EB 病毒 EBNA1 蛋白、Zta 蛋白、和 VCA-p18 蛋白的基因片段、基因库序列大小、扩增克隆序列大小和表达多肽的氨基酸数如下。

表 1

| EB 病毒蛋白   | EBNA 1 | Zta   | VCA-p18 |
|-----------|--------|-------|---------|
| 基因片段      | BKRF1  | BZLF  | BFRF3   |
| 基因库序列大小   | 1926bp | 738bp | 531bp   |
| 扩增克隆序列大小  | 705bp  | 738bp | 531bp   |
| 表达多肽的氨基酸数 | 234aa  | 245aa | 176aa   |

**2.3** 将 PCR 扩增子与谷胱甘肽转移酶 (GST) 基因克隆到 Eco RI/Bam HI 消化的原核细胞表达 pGEX2T 质粒载体 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) 上系在一起。采用氯化钙技术将重组的质粒转至大肠杆菌。加乳糖类似物异丙基硫代半乳糖苷诱导已经转到了重组质粒的大肠杆菌数小时, 然后收获细菌并以去垢 triton (一系列有机的非离子型表面活性剂的商品名) X-100 和超声波裂解细菌。细菌裂解产物经离心后除去碎片而澄清, 含融合蛋白的上清液采用谷胱甘肽琼脂糖 4B 经谷胱甘肽转移酶-谷胱甘肽亲和色谱仪纯化。纯度达 94.0% 以上。融合克隆蛋白的大小为: EBNA-1 = 40 Kd; BFRF3 = 44 Kd; BZLF1 = 53 Kd。具体步骤如下。

### 2.3.1. cDNA 的扩增

#### 2.3.1.1 RNA 的制备。

2.3.1.1.1 根据 Rnaid Plus 试剂盒 (BIO 101) 说明书的要求从培养细胞中分离 RNA。

采用 Rnaid Plus 试剂盒从悬浮的细胞中抽提 RNA。培养的细胞用 PBS 洗一次, 然后每  $10^6$  细胞加 1ml guanidine thiocyanate 溶解液, 并与 vortex 混合。再加等容积酸性酚 (acid phenol), 并混合。加 1ml chloroform isoamyl alcohol (BDH) 至溶液中, 再次混合。溶解产物在冰块上孵 15 min 后, 在  $4^{\circ}\text{C}$  下旋转  $10,000\times g$  20 min。将上层转移至一新管, 再用 1/2 容积的 chloroform isoamyl alcohol (BDH) 旋转 2min。将上层再转移至一新管。加入 15  $\mu\text{l}$  RNAMATRIX, 并在室温下孵育 5 min, 孵育中偶加混合, 使 RNA 吸附。RNA/RNAMATRIX 复合物在  $10,000 \times g$  下 1 min 形成小球, 在  $500 \mu\text{l}$  RNA 洗液中洗两次。小球再次悬浮在  $30\text{-}100 \mu\text{l}$  Diethylpyrocarbonate (DEPC, Sigma) 处理过的水中。RNA 在  $55^{\circ}\text{C}$  下洗提 5 min, 并适合于光谱分析。

2.3.1.1.2 . 采用 RT PCR 扩增 RNA 转录物。

2.3.1.2 在 Bam HI 和 EcoRI 切割后, 将插入物连结至质粒 pGEX DNA (4948bp, Amersham Biosciences)。

2.3.2 将连结产物转至 XL1 反应潜能细胞。

2.3.3 采用摘取个别克隆法使质粒小孔化。

2.3.4 小孔化 DNA 的限制性酶切。

2.3.5 从 pGEX 重组物中筛选融合蛋白表达。

2.3.6 SDS PAGE 分析。

2.3.7 采用抗谷胱甘肽转移酶抗体做 Western blot。

2.3.8 大量纯化融合蛋白。

2.3.9 如果需要的话用凝血酶将谷胱甘肽转移酶融合蛋白中的谷胱甘肽转移酶除去。

### 3. 所选三类 EB 病毒抗原的特点

所选三类 EB 病毒抗原的 ELISA 法对测定 EB 病毒抗体既敏感、特异、又客观。

表 2 EB 病毒抗原的 ELISA 法对测定 EB 病毒抗体既敏感、特异、又客观

| 血清号   | EB 病毒感染状态    | VCA IgG | VCA IgA | Zta IgG | Zta IgA | EBNA1 IgG | EBNA1 IgA |
|-------|--------------|---------|---------|---------|---------|-----------|-----------|
| N11   | 未感染婴儿        | <200    | 未测定     | 未测定     | 未测定     | <1k       | 未测定       |
| N31   | 传染性单核细胞增多症患者 | >3k     | <100    | <200    | <20     | <1k       | <100      |
| MIN   | 健康 EB 病毒携带者  | >3k     | <100    | <200    | <20     | 3k        | 阴性        |
| PG495 | 取自鼻咽癌患者血清库   | >3k     | 1.6k    | >3k     | 100     | >6k       | 800       |
| PA196 | 取自鼻咽癌患者血清库   | >3k     | >1.6k   | >3k     | 400     | >6k       | >800      |

临界值 = 所测血清的平均光密度值 / 血清空白的平均光密度值 = S / N = 3

为了检测 Zta IgA，开始的血清稀释度是 1:20；为了检测 p18 VCA IgA 和 EBNA1 IgA，开始的血清稀释度是 1:100；为了检测 p18 VCA IgG 和 Zta IgG，开始的血清稀释度是 1:200；为了检测 EBNA1 IgG，开始的血清稀释度是 1:1 000。滴度 = 高于临界值的最大血清稀释度。

从表 2 可知：

- (1)取自 1 例从未感染过 EB 病毒的婴儿血清 (N11)，没有检测到 VCA IgG；而在一例传染性单核细胞增多症患者急性感染期所取的血清样本中 (N31)，VCA IgG 抗体很早就产生了。可以为了客观地作抗体的定量。
- (2)在急性时期的传染性单核细胞增多症患者血清样本中 (N31) 无 EBNA1 IgG 抗体。在产生 VCA IgG 抗体 8 个月或更长时期后才产生 EBNA1 IgG (Chan KH 等)。
- (3)因此，同时出现 VCA IgG 和 EBNA1 IgG 是过去感染 EB 病毒的指标。
- (4)与健康携带者相对比，鼻咽癌患者血清中具有广谱的抗 EB 病毒抗体。
- (5)EBNA1 IgG 的抗体水平高于其他的抗体水平。这说明，EBNA1 是 EB 病毒感染，特别是鼻咽癌患者的一种重要抗原。这也是与 EBNA1 是寄生在肿瘤细胞中的 EB 病毒所表达的主要抗原相一致的。
- (6)总之，上述结果显示，酶联免疫吸附法可用于鉴别 EB 病毒的各种感染状态。
- (7)所以，针对 EB 病毒特异性抗原而创建的酶联免疫吸附法，在血清学诊断 EB 病毒相关疾病时，确实具有十分潜在优势的可用性。

#### 4. 优化血清学诊断鼻咽癌的 ELISA 法

## (1) 创建了以灵敏度和特异度曲线的交界点为临界光密度值

由于鼻咽癌患者血清中抗 EB 病毒抗体水平与健康携带者血清中抗 EB 病毒抗体水平有相互重叠，不会具有能回答“阳”或“阴”的绝对标准（见附图 2），我们所创建的以灵敏度和特异度曲线的交界点为临界光密度值（见附图 3）的方法，区分“高”和“低”，就能客观地反映鼻咽癌患者血清中抗 EB 病毒抗体的特征。

## (2) 创建了根据鼻咽癌患者组和健康成人组的滴度曲线确定检测血清的稀释度（见图 1）。

表 3 优化血清学诊断鼻咽癌的 ELISA 法

|                      | VCA IgG | VCA IgA | Zta-IgG | Zta IgA | EBNA1 IgG | EBNA1 IgA |
|----------------------|---------|---------|---------|---------|-----------|-----------|
| 抗免疫球蛋白，稀释度           | zG, 50k | zA, 2k  | zG, 50k | zA, 2k  | zG, 50k   | zA, 2k    |
| 血清稀释* [n=81C, 74NPC] |         | 100     | 200     | 20      | 2000      | 100       |
| 临界光密度值               |         | 1.25    | 0.83    | 1       | 1         | 0.62      |
| 灵敏度                  |         | 65%     | 86%     | 83%     | 72%       | 83%       |
| 特异度                  |         | 65%     | 86%     | 83%     | 72%       | 83%       |

\*根据 74 例鼻咽癌患者和 81 例对照组的数据而得

z: 抗免疫球蛋白购自 Zymed, zG 表示 Zymed IgG, zA 表示 Zymed IgA

## (3) 为了诊断标准的判定，在试剂盒中提供一支相当于优化临界光密度值的诊断参考血清。这就使使用同一批号的试剂盒分批检测样本时，可以纠正每一批检测所应用的区分高、低水平的相对光密度值，得出更精确可靠的数据。

## (4) 由于鼻咽癌患者血清中大多具有广谱的高水平的抗 EB 病毒抗体，特别是 IgA 抗体的特征（见图 4），我们创建了两步检测法，即首先使用 EBNA IgA，如属“高”水平则再进

行第二步，使用 Zta IgG 以诊断，或同时使同 Zta-IgG 和 EBNA IgG 以筛选（见附图 5）。

总之，新的优化的酶联免疫吸附法(ELISA) 具有客观性和 EB 病毒抗原的特异性，它提供了定量检测针对个体 EB 病毒抗原的不同免疫球蛋白抗体的亚型。这种优化的酶联免疫吸附法(ELISA)完全是新的，是传统的血清学检测法做不到的，因为传统的血清学检测法并不能明确抗原的特异性。而且，新的优化的酶联免疫吸附法(ELISA)采用了参考血清，可以纠正每批检测间的差异，保证了诊断的可靠性。

## 5. 重组 EB 病毒抗原在诊断方面的应用

### 5.1 EB 病毒的原发性感染

5.1.1 免疫荧光显示存在 VCA 抗体；由于延迟的 EBNA 抗体转阳，所以采用抗补体免疫荧光显示无 EBNA 抗体。

5.1.2 EBV IgM 阳性。

5.1.3 低亲和性 VCA IgG 抗体

这里要强调的是：采用荧光免疫（IF）检测低亲和性 VCA IgG 不敏感，而采用 ELISA 则较敏感；采用荧光免疫（IF）检测 VCA IgM 不敏感，而采用 ELISA 较敏感。

为了测定低亲和性 VCA IgG 抗体，将一系列血清样本在平行的微板上起作用。一个板孔以 4M 尿素处理 30 min，而另一个板孔则不经处理。当尿素处理引起抗体水平下降 4 倍或 4 倍以上时，则显示低亲和性 VCA IgG 抗体存在。

## 5.2 确立 EB 病毒感染的抗体谱和鉴别诊断各种 EB 病毒感染

表 4 EB 病毒各种感染状态的抗体谱

| 感染状态  | 1       | 2        | 3       | 4               | 5   | 例数 |
|-------|---------|----------|---------|-----------------|-----|----|
|       | VCA IgG | EBNA IgG | VCA IgM | 低亲和性<br>VCA IgG | DNA |    |
| 原发性感染 | 阳性      | 阴性       | 阳性      | 阳性              |     | 30 |
|       | 阳性      | 阴性       | 阳性      | 阴性              |     | 1  |
|       | 阳性      | 阴性       | 阴性      | 阳性              |     | 15 |
| 小计    |         |          |         |                 | 37  | 46 |
| 近期感染  | 阳性      | 阴性       | 阴性      | 阴性              | 0   | 12 |
| 小计    |         |          |         |                 | 0   | 12 |
| 过去感染  | 阳性      | 阳性       | 阴性      | 阴性              |     | 14 |
|       | 阳性      | 阳性       | 阳性      | 阴性              |     | 1  |
| 小计    |         |          |         |                 | 1   | 15 |
| 未感染   | 阴性      | 阴性       | 阴性      | 阴性              | 0   | 8  |
| 合计    |         |          |         |                 | 38  | 69 |

表 5 各种 EB 病毒感染状态的鉴别诊断

| EB 病毒感染状态      | 免疫荧光法<br>VCA IgG 阳性和 EBNA IgG 阴性 | 酶联免疫吸附法  |                 | PCR 法<br>EB 病毒 DNA |
|----------------|----------------------------------|----------|-----------------|--------------------|
|                |                                  | 低亲和性 p18 | VCA IgG VCA IgM |                    |
| 急性原发性感染 (n=46) | 100%                             | 97.8%    | 67.4%           | 80.4%              |
| 近期感染 (n=12)    | 100%                             | 0        | 0               | 0                  |
| 过去感染 (n=15)    | 0*                               | 0        | 0.7%            | 0.7%               |
| 未感染 (n=8)      | 0**                              | 0        | 0               | 0                  |

\*所有过去感染过 EB 病毒的人, 经酶联免疫吸附法检测 VCA IgG 和 EBNA1 IgG, 均呈阳性。

\*\*所有过去未感染过 EB 病毒的人, 经酶联免疫吸附法检测 VCA IgG 和 EBNA1 IgG, 均呈阴性。

由此可见，由于 EBNA IgG 要在感染后一段时间血清抗体才转阳，采用传统的免疫荧光法不能鉴别急性原发性感染和近期感染；而采用酶联免疫吸附法检测血清低亲和性 p18 VCA IgG 和 VCA IgM，则大多数急性原发性感染患者（低亲和性 p18 VCA IgG 为 97.8%，VCA IgM 为 67.4%）可呈阳性。即，采用酶联免疫吸附法可鉴别急性原发性感染和近期感染。

### 5.3 鉴别传染性单核细胞增多症 (Infectious mononucleosis) 和传染性单核细胞综合症 (Infectious mononucleosis syndrome)

5.3.1 除症状、白细胞升高(12000-18000)、外周血涂片见不典型 CD4 T 淋巴细胞、异嗜抗羊红细胞抗体 (heterophil anti-sheep red blood cell antibodies)、涂片 EBERs 原位杂交等外。

5.3.2 首先出现传染性单核细胞增多症的急性表指，即 p18 VCA IgM 和低亲和性 VCA IgG，然后是 VCA IgG，8 个月后才出现 EBNA1 IgG。因此：

未感染 EB 病毒：VCA 阴性、EBNA1 为阴性。

传染性单核细胞增多症：VCA 阳性、EBNA1 阴性。

健康携带者：VCA 阳性、EBNA1 阳性。

VCA 阴性、EBNA1 为阴性，为未感染 EB 病毒。

因此，采用 ELISA 法检测 EBNA1 IgG 阳性和 p18 VCA IgM 阳性则为传染性单核细胞增多症；而传染性单核细胞综合症则否。

## 5.4 血清学协助诊断疑为鼻咽癌

### 5.4.1 鼻咽癌患者血清 EB 病毒抗体水平特征及血清学检测的应用范围

表 6 鼻咽癌患者血清 EB 病毒抗体水平特征及血清学检测的应用范围

| 鼻咽癌患者血清 EB 病毒抗体水平特征       | 血清学检测的应用范围                     |
|---------------------------|--------------------------------|
| 广谱的血清 EB 病毒抗体，特别是 IgA 的升高 | 1. 血清学诊断鼻咽癌<br>2. 人群普查以早期发现鼻咽癌 |
| 高拷贝量的血清/血浆中 EB 病毒 DNA     | 1. 预测治疗的疗效                     |

### 5.4.2 免疫荧光法和酶联免疫吸附法的单独使用

在香港玛丽医院 218 例连续检测的血清样本中（51 例鼻咽癌、4 例鼻咽以外的淋巴上皮瘤样癌、23 例其他癌和 140 例其他疾病）作了如下分析。

表 7 免疫荧光法和酶联免疫吸附法单独使用的比较

| 检测方法      | 鼻咽癌<br>真阳性/假阴性 | 对照组<br>假阳性/真阴性 | 阳性预测 | 阴性预测 | 实用性     |
|-----------|----------------|----------------|------|------|---------|
| 免疫荧光:     |                |                |      |      |         |
| VCA IgA   | 51/4           | 65/98          | 44%  | 96%  | 排除和(预测) |
| EA IgA    | 40/15          | 5/158          | 89%  | 91%  | 预测      |
| 酶联免疫吸附:   |                |                |      |      |         |
| EBNA1 IgA | 46/9           | 22/141         | 68%  | 94%  | (排除)和预测 |
| Zta IgG   | 41/14          | 28/135         | 59%  | 91%  |         |
| EBV DNA   | 31/24          | 3/160          | 91%  | 87%  | 预测      |

阳性预测 = 真阳性/真阳性 + 假阳性  $\times$  100% =  $A/(A + C) \times 100\%$

阴性预测 = 真阴性/假阴性 + 真阴性  $\times$  100% =  $D/(B + D) \times 100\%$

### 5.4.3 免疫荧光法和酶联免疫吸附法的联合使用的比较

在香港玛丽医院 218 例连续检测的血清样本中（51 例鼻咽癌、4 例鼻咽以外的淋巴上皮瘤样癌、23 例其他癌和 140 例其他疾病）同样作了如下分析。

表 8 免疫荧光法联合使用在血清学诊断鼻咽癌方面的比较

|                        | 鼻咽癌组 |     | 健康成人对照组 |     | 旧性预测  | 阴性预测  |
|------------------------|------|-----|---------|-----|-------|-------|
|                        | 真阳性  | 假阴性 | 假阳性     | 真阴性 |       |       |
| VCA IgA 阳性 + EA IgA 阳性 | 40   | 15  | 5       | 158 | 88.9% |       |
| VCA IgA 阳性 + EA IgA 阴性 | 11   | 44  | 64      | 99  | 14.7% |       |
| VCA IgA 阴性 + EA IgA 阳性 | 0    | 55  | 0       | 163 |       |       |
| VCA IgA 阴性 + EA IgA 阴性 | 51   | 4   | 89      | 94  |       | 95.9% |

阳性预测 = 真阳性 / (真阳性 + 假阳性) × 100% = TP / (TP + FP)

$$40 / (40 + 5) = 88.9\%$$

$$11 / (11 + 64) = 14.7\%$$

阴性预测 = 真阴性 / (假阴性 + 真阴性) × 100% = TN / (TN + FN)

$$94 / (94 + 4) = 95.9\%$$

值得指出的是，无论是鼻咽癌患者或健康成人，EA IgA 阳性者中没有一例呈 VCA IgA 阴性，这是因为所采用的 B95-8 细胞所产生的“VCA”中既有溶解晚期的抗原，又包含了溶解早期的抗原。所以，在免疫荧光法中所采用的 VCA IgA 的抗原特异性与 EA IgA 的抗原特异性相互重叠了。也就是说，虽然联合使用了两种免疫荧光法，却不能达到“1 + 1 = 2”的作用，即互补作用不强。而且，VCA IgA 和 EA IgA 双阴性 98 中，4 例为假阴性，假阴性率达 4.1% (4/4+94)，并不能在临床上起到有效的排除诊断鼻咽癌的作用。以下所述酶联免疫吸附法的联合使用却可以克服这一缺点。

#### 5.4.4 先做酶联免疫吸附法的 EBNA1 IgA，再做免疫荧光 VCA IgA

表 9

|     | 酶联免疫吸附法的<br>EBNA1 IgA | 免疫荧光 VCA IgA | 酶联免疫吸附法的 EBNA1 IgA<br>和免疫荧光 VCA IgA 联合 |
|-----|-----------------------|--------------|--|
| 灵敏度 | 89%                   | 86%          | 88%                                    |
| 特异度 | 78%                   | 91%          | 95%                                    |

表 10 酶联免疫吸附法联合使用的比较

|                           | 鼻咽癌组 |     | 健康成人对照组 |     | 阳性预测  | 阴性预测  |
|---------------------------|------|-----|---------|-----|-------|-------|
|                           | 真阳性  | 假阴性 | 假阳性     | 真阴性 |       |       |
| EBNA1 IgA 阳性 + Zta IgG 阳性 | 33   | 22  | 5       | 158 | 86.8% |       |
| EBNA1 IgA 阳性 + Zta IgG 阴性 | 13   | 42  | 17      | 146 | 43.3% |       |
| EBNA1 IgA 阴性 + Zta IgG 阳性 | 8    | 47  | 25      | 138 | 24.2% |       |
| EBNA1 IgA 阴性 + Zta IgG 阴性 | 54   | 1   | 47      | 116 |       | 99.1% |

阳性预测 = 真阳性 / (真阳性 + 假阳性) × 100% = TP / (TP + FP)

$$33 / (33 + 5) = 86.8\%$$

$$13 / (13 + 17) = 43.3\%$$

$$8 / (8 + 25) =$$

阴性预测 = 真阴性 / (假阴性 + 真阴性) × 100% = TN / (TN + FN)

$$116 / (1 + 116) =$$

比较后可知，酶联免疫吸附法联合使用 (EBNA1 IgA + Zta IgG) 的阴性预测值 (99.1%) 大大高于免疫荧光法联合使用 (VCA IgA + EA IgA)，即临床上联合使用 EBNA IgA 和 Zta IgG 时，如果是双阴性，则排除鼻咽癌诊断的可靠性达 99.1%。两种酶联免疫吸附法联合检测在血清学诊断鼻咽癌时具有很强的互补作用。

#### 5.4.5 采用免疫荧光和采用酶联免疫吸附血清学诊断鼻咽癌之间的关联

表 11 采用免疫荧光和采用酶联免疫吸附血清学诊断鼻咽癌之间的关联

| 免疫荧光血清学诊断 | 酶联免疫吸附血清学诊断 | 百分率   |
|-----------|-------------|-------|
| 相互吻合      | 100 例       | 64.5% |
| 旗鼓相当      | 51 例        | 32.9% |
| 相互不吻合     | 4 例         | 2.6%  |
| 总计        | 155 例       |       |

#### 5.4.6 酶联免疫吸附联合应用的血清学诊断鼻咽癌的预测和排除

表 12

| 例数  | EBNA1 IgA | Zta IgG | 预测      | 评论        |
|-----|-----------|---------|---------|-----------|
| 33  | 高         | 高       | 阳性, 87% | 恒定地符合鼻咽癌  |
| 30  | 高         | 低       | 阳性, 43% | 中度地符合鼻咽癌  |
| 33  | 低         | 高       | 阳性, 24% | 临界地符合鼻咽癌  |
| 117 | 低         | 低       | 阴性, 99% | 恒定地不符合鼻咽癌 |

#### 5.5 早期发现和评估患鼻咽癌的风险度

联合应用 EBNA1 IgA、EBNA1 IgG 和 Zta IgG 显示优势比大大增高。

表 13 联合应用 EBNA1 IgA、EBNA1 IgG 和 Zta IgG 显示优势比大大增高

| EB 病毒抗体谱  |           |         | 观察到的% (期待的%) |              |       |
|-----------|-----------|---------|--------------|--------------|-------|
| EBNA1 IgA | EBNA1 IgG | Zta IgG | 鼻咽癌(n=121)   | 健康成人 (n=332) | 优势比   |
| 低         | 低         | 低       | 0.83 (0.54)  | 59.3 (59.17) | 0.009 |
| 低         | 低         | 高       | 5.79 (2.01)  | 14.8 (14.79) | 0.13  |
| 低         | 高         | 低       | 1.65 (2.61)  | 8.73 (9.63)  | 0.28  |
| 高         | 低         | 低       | 3.31 (3.03)  | 10.2 (9.63)  | 0.31  |
| 低         | 高         | 高       | 6.61 (9.84)  | 3.01 (2.41)  | 3.98  |
| 高         | 低         | 高       | 6.61 (11.42) | 1.51 (2.41)  | 4.50  |
| 高         | 高         | 低       | 15.7 (14.82) | 1.51 (1.57)  | 9.54  |
| 高         | 高         | 高       | 59.5 (55.73) | 0.9 (0.39)   | 137.9 |
| 总数        |           |         | 100          | 100          | 1.0   |
|           |           |         | r = 0.990    | r = 0.999    |       |

两个层次的筛查:

第一层次: EBNA IgA

第二层次: Zta IgG + EBNA IgG

表 14 早期发现和评估患鼻咽癌的风险度的两个层次的筛查

| /1 000 | EBNA1 IgA | EBNA1 IgG | Zta IgG | 风险度水平 | 相对风险度 | 随访      |
|--------|-----------|-----------|---------|-------|-------|---------|
| 4      | 高         | 高         | 高       | 高     | 138   | 疑为鼻咽癌   |
| 16     | 高         | 高         | 低       | 中     | 9     | 宜监护的风险度 |
| 24     | 高         | 低         | 高       | 中     | 4     | 宜监护的风险度 |
| 96     | 高         | 低         | 低       | 低     | 0.3   | 微风险度    |
| 860    | 低         | 未做        | 未做      | 低     | 0.2   | 不必在意    |

在 1 000 人中 140 人 (14.0%, 140/1 000) 认为具有患鼻咽癌的风险度。在这 140 人中: 4 人 (2.86%, 4/140) 认为具有高风险度; 40 人 (28.57%, 40/140) 认为具有中等风险度; 96 人 (68.57%, 96/140) 认为具有微风险度。860 人 EBNA1 IgA 低, 未进一步做 Zta-IgG 和 EBNA1 IgG, 认为无风险度。

另香港某私人机构筛查了香港居民 2 000 人, 发现 6 例具有高风险度的人, 其中 1 人证实为鼻咽癌忠患者, 经治疗后 5 年无复发; 所有其他人均未患鼻咽癌。

## 5.6 协助诊断 Burkitt 淋巴瘤

应用 Zta IgG1.

EBV-1.ST25  
EB病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒及其制备方法  
序列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 香港神农有限公司 (Sinoclone Limited)

<120> EB病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒及其制备方法

<130> EBV Serological Diagnostic Kits

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 705

<212> DNA

<213> Epstein-Barr Virus

<400> 1

```
cctgtagggg aagccgatta ttttgaatac caccaagaag gtggcccaga tggtagcct    60
gacgtgcccc cgggagcgat agagcagggc cccgcagatg acccaggaga aggcccaagc   120
actggacccc ggggtcaggg tgatggaggc aggcgcaaaa aaggagggtg gtttgaaag    180
catcgtggtc aaggaggttc caaccgaaa tttgagaaca ttgcagaagg ttaagagct    240
ctcctggcta ggagtcacgt agaaaggact accgacgaag gaacttgggt cgccggtgtg   300
ttcgtatatg gaggtagtaa gacctcctt tacaacctaa ggcgaggaac tgccttctct   360
attccacaat gtcgtcttac accattgagt cgtctcccct ttggaatggc ccttgacc    420
ggcccacaac ctggcccct aaggagtcct attgtctgtt atttcatggt ctttttacia   480
actcatatat ttgctgaggt tttgaaggat gcgattaagg accttgttat gacaaagccc   540
gctcctacct gcaatatcag ggtgactgtg tgcagctttg acgatggagt agatttgcct   600
ccctggtttc cacctatggt ggaaggggct gccgcgagg gtgatgacgg agatgacgga   660
gatgaaggag gtgatggaga tgagggtgag gaagggcagg agtga                    705
```

<210> 2

<211> 234

<212> PRT

<213> Epstein-Barr Virus

<400> 2

Pro Val Gly Glu Ala Asp Tyr Phe Glu Tyr His Gln Glu Gly Gly Pro  
1                   5                   10                   15

Asp Gly Glu Pro Asp Val Pro Pro Gly Ala Ile Glu Gln Gly Pro Ala  
20                   25                   30

Asp Asp Pro Gly Glu Gly Pro Ser Thr Gly Pro Arg Gly Gln Gly Asp  
35                   40                   45

Gly Gly Arg Arg Lys Lys Gly Gly Trp Phe Gly Lys His Arg Gly Gln  
50                   55                   60

Gly Gly Ser Asn Pro Lys Phe Glu Asn Ile Ala Glu Gly Leu Arg Ala  
65                   70                   75                   80

Leu Leu Ala Arg Ser His Val Glu Arg Thr Thr Asp Glu Gly Thr Trp  
85                   90                   95

EBV-1. ST25

Val Ala Gly Val Phe Val Tyr Gly Gly Ser Lys Thr Ser Leu Tyr Asn  
100 105 110

Leu Arg Arg Gly Thr Ala Leu Ala Ile Pro Gln Cys Arg Leu Thr Pro  
115 120 125

Leu Ser Arg Leu Pro Phe Gly Met Ala Pro Gly Pro Gly Pro Gln Pro  
130 135 140

Gly Pro Leu Arg Glu Ser Ile Val Cys Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln  
145 150 155 160

Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val  
165 170 175

Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn Ile Arg Val Thr Val Cys Ser  
180 185 190

Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro Trp Phe Pro Pro Met Val Glu  
195 200 205

Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly  
210 215 220

Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln Glu  
225 230

- <210> 3
- <211> 531
- <212> DNA
- <213> Epstein-Barr Virus

<400> 3  
atggcagcc ggctgccc aa gcccaccctc caggggagc tggaggcga tttccagac 60  
agtcccctgc ttctaatt tcaagagctg aaccagaata atctcccaa tgatgtttt 120  
cgggaggctc aaagaagta cctggatatt ctgacatccc agttctgcta cgaagagtac 180  
gtgcagagga cttttgggt gcctcggcgc caacgcgcca tagacaagag gcagagagcc 240  
agtgtggctg gggctggtgc tcatgcacac cttggcgggt catccgccac cccgtccag 300  
caggctcagg cgcgccatc cgtgggacc gggccttg catcatcage gccgtccag 360  
gccgtagccc agtccgcgac ccctctgtt tttcatcta ttagcagcct cggggccg 420  
acttcgggg cgactccgc gcctccgcc gccgcagcc tcgataccgg gtcaggtggc 480  
gggggacaac cccacgacac cgccccagc ggggcacgta agaaacagta g 531

- <210> 4
- <211> 176
- <212> PRT
- <213> Epstein-Barr Virus

<400> 4

Met Ala Arg Arg Leu Pro Lys Pro Thr Leu Gln Gly Arg Leu Glu Ala  
1 5 10 15

Asp Phe Pro Asp Ser Pro Leu Leu Pro Lys Phe Gln Glu Leu Asn Gln  
20 25 30

## EBV-1. ST25

Asn Asn Leu Pro Asn Asp Val Phe Arg Glu Ala Gln Arg Ser Tyr Leu  
 35 40 45

Val Phe Leu Thr Ser Gln Phe Cys Tyr Glu Glu Tyr Val Gln Arg Thr  
 50 55 60

Phe Gly Val Pro Arg Arg Gln Arg Ala Ile Asp Lys Arg Gln Arg Ala  
 65 70 75 80

Ser Val Ala Gly Ala Gly Ala His Ala His Leu Gly Gly Ser Ser Ala  
 85 90 95

Thr Pro Val Gln Gln Ala Gln Ala Ala Ala Ser Ala Gly Thr Gly Ala  
 100 105 110

Leu Ala Ser Ser Ala Pro Ser Thr Ala Val Ala Gln Ser Ala Thr Pro  
 115 120 125

Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Arg Ala Ala Thr Ser Gly Ala  
 130 135 140

Thr Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ala Val Asp Thr Gly Ser Gly Gly  
 145 150 155 160

Gly Gly Gln Pro His Asp Thr Ala Pro Arg Gly Ala Arg Lys Lys Gln  
 165 170 175

<210> 5  
 <211> 738  
 <212> DNA  
 <213> Epstein-Barr Virus

<400> 5  
 atgatggacc caaactcgac ttctgaagat gtaaaattta cacctgacct ataccaggtg 60  
 ccttttgtac aagcttttga ccaagctacc agagtctatc aggacctggg agggccatcg 120  
 caagctcctt tgccttgtgt gctgtggcgg gtgctgccag agcctctgcc acaaggccag 180  
 ctaactgcct atcatgttcc aaccgctccg actgggtcgt ggttttctgc ccctcagcct 240  
 gtcctgaga atgcttatca agcttatgca gcacctcagc tgttcccagt ctccgacata 300  
 acccagaatc aacagactaa ccaagccggg ggagaagcac ctcaacctgg agacaattct 360  
 actgttcaaa cagcagcagc agtgggtgtt gcttgccccg gggctaacca aggacaacag 420  
 ctagcagaca ttggtgttcc acagcctgca ccagtggctg ccccgccacg acgcacacgg 480  
 aaaccacaac agccagaatc gttggaggaa tgcgattctg aactagaaat aaagcgatac 540  
 aagaatcggg tggcttccag aaaatgccgg gccaaagtta agcaactgct gcagcactac 600  
 cgtgaggtgg ctgctgcaa atcatctgaa aatgacagc tgcgcctcct gttgaagcag 660  
 atgtgcccac gcttgatgt tgactccatt atccccgga caccagatgt tttacacgag 720  
 gatctcttaa atttctaa 738

<210> 6  
 <211> 245  
 <212> PRT  
 <213> Epstein-Barr Virus

## EBV-1. ST25

&lt;400&gt; 6

Met Met Asp Pro Asn Ser Thr Ser Glu Asp Val Lys Phe Thr Pro Asp  
 1 5 10 15  
 Pro Tyr Gln Val Pro Phe Val Gln Ala Phe Asp Gln Ala Thr Arg Val  
 20 25 30  
 Tyr Gln Asp Leu Gly Gly Pro Ser Gln Ala Pro Leu Pro Cys Val Leu  
 35 40 45  
 Trp Pro Val Leu Pro Glu Pro Leu Pro Gln Gly Gln Leu Thr Ala Tyr  
 50 55 60  
 His Val Ser Thr Ala Pro Thr Gly Ser Trp Phe Ser Ala Pro Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Ala Pro Glu Asn Ala Tyr Gln Ala Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Phe Pro  
 85 90 95  
 Val Ser Asp Ile Thr Gln Asn Gln Gln Thr Asn Gln Ala Gly Gly Glu  
 100 105 110  
 Ala Pro Gln Pro Gly Asp Asn Ser Thr Val Gln Thr Ala Ala Ala Val  
 115 120 125  
 Val Phe Ala Cys Pro Gly Ala Asn Gln Gly Gln Gln Leu Ala Asp Ile  
 130 135 140  
 Gly Val Pro Gln Pro Ala Pro Val Ala Ala Pro Ala Arg Arg Thr Arg  
 145 150 155 160  
 Lys Pro Gln Gln Pro Glu Ser Leu Glu Glu Cys Asp Ser Glu Leu Glu  
 165 170 175  
 Ile Lys Arg Tyr Lys Asn Arg Val Ala Ser Arg Lys Cys Arg Ala Lys  
 180 185 190  
 Phe Lys Gln Leu Leu Gln His Tyr Arg Glu Val Ala Ala Ala Lys Ser  
 195 200 205  
 Ser Glu Asn Asp Arg Leu Arg Leu Leu Leu Lys Gln Met Cys Pro Ser  
 210 215 220  
 Leu Asp Val Asp Ser Ile Ile Pro Arg Thr Pro Asp Val Leu His Glu  
 225 230 235 240  
 Asp Leu Leu Asn Phe  
 245

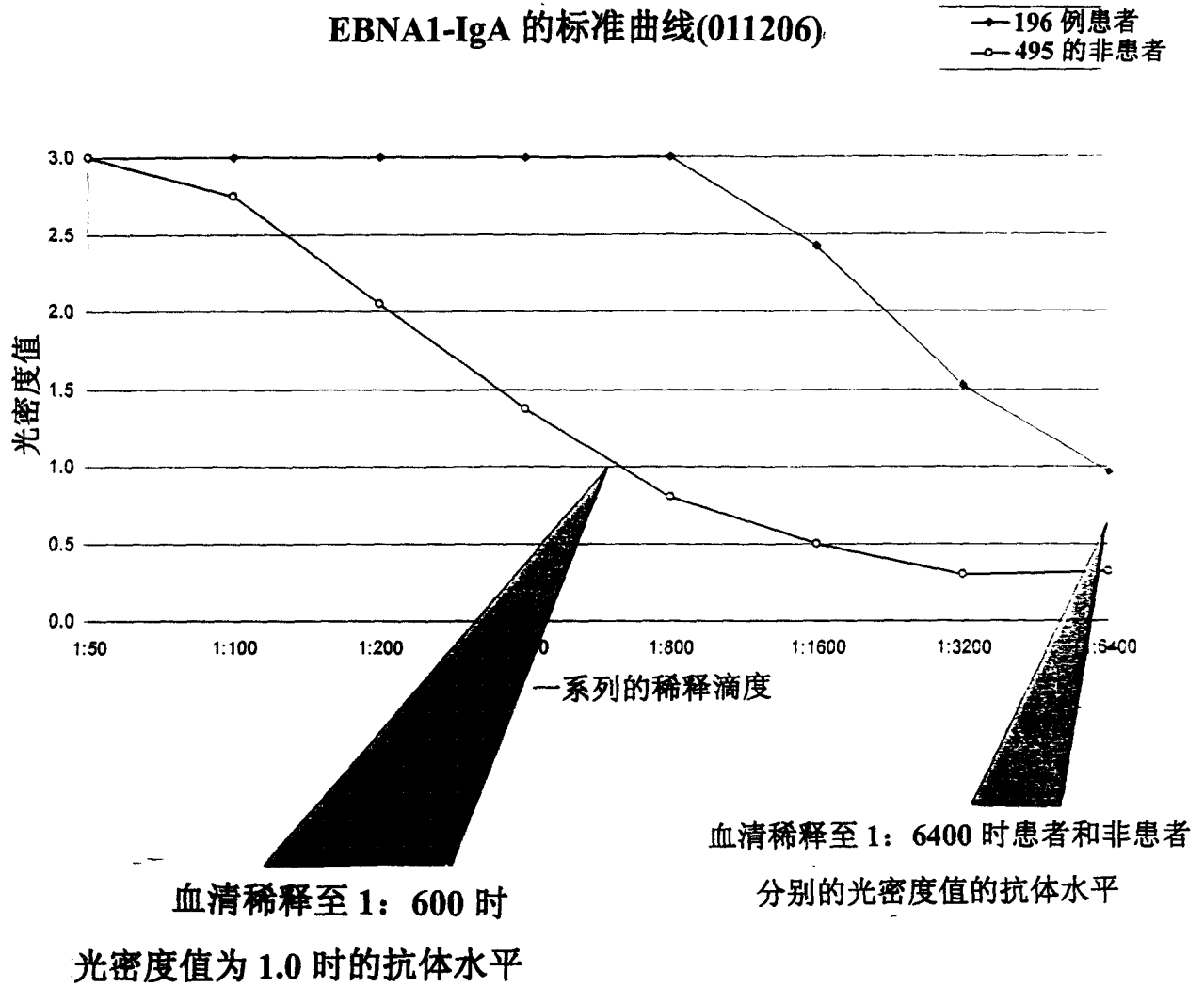


图 1

### EBNA-IgA 的光密度值分布

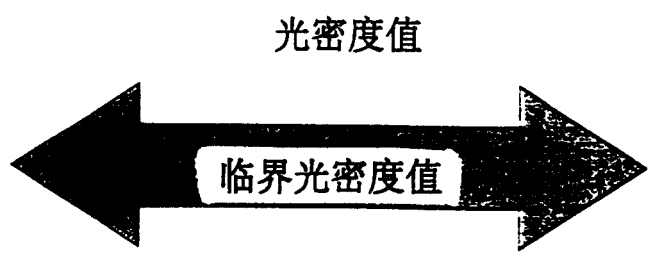
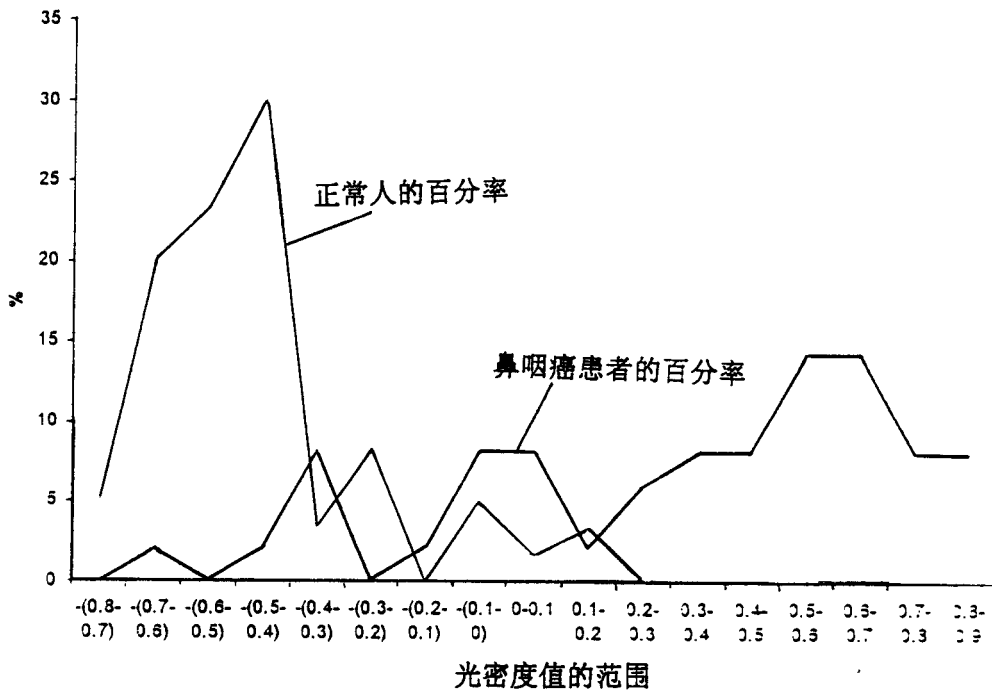


图 2

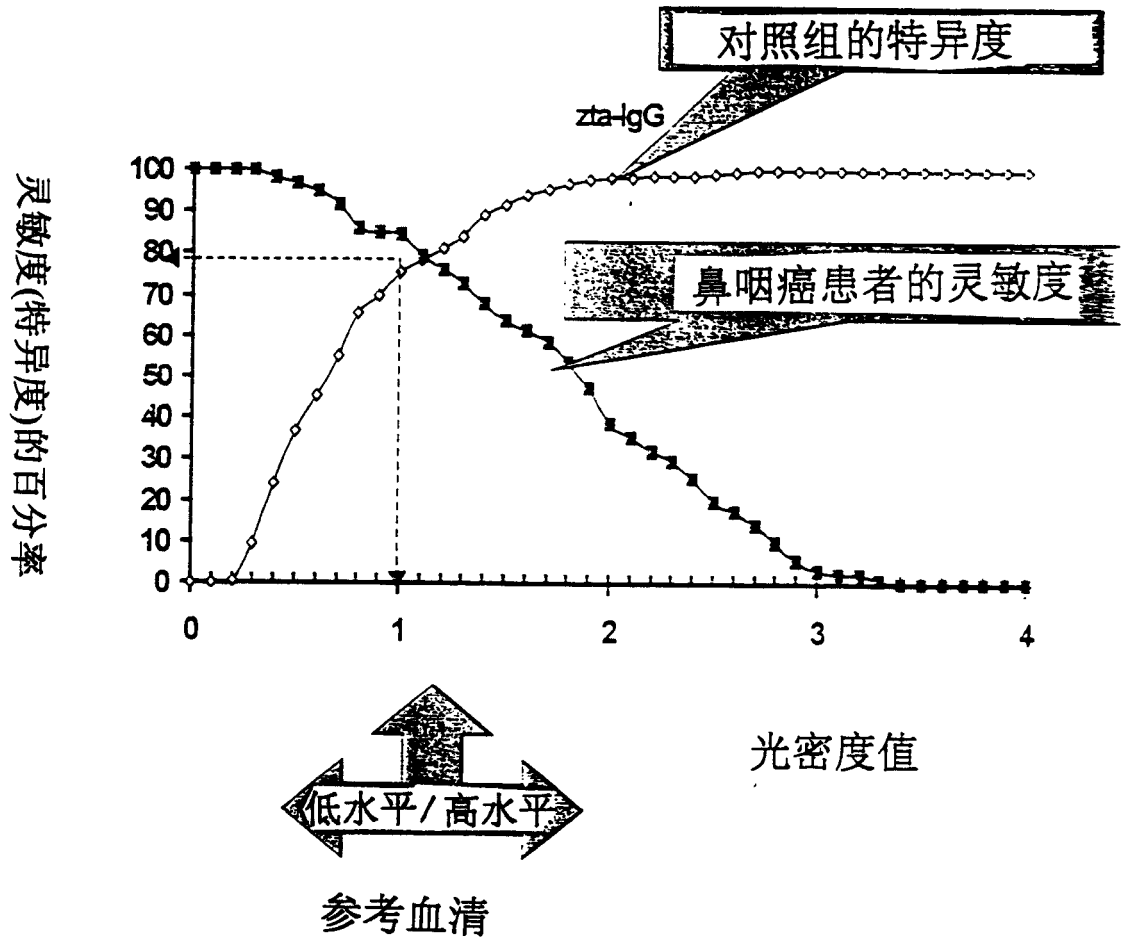
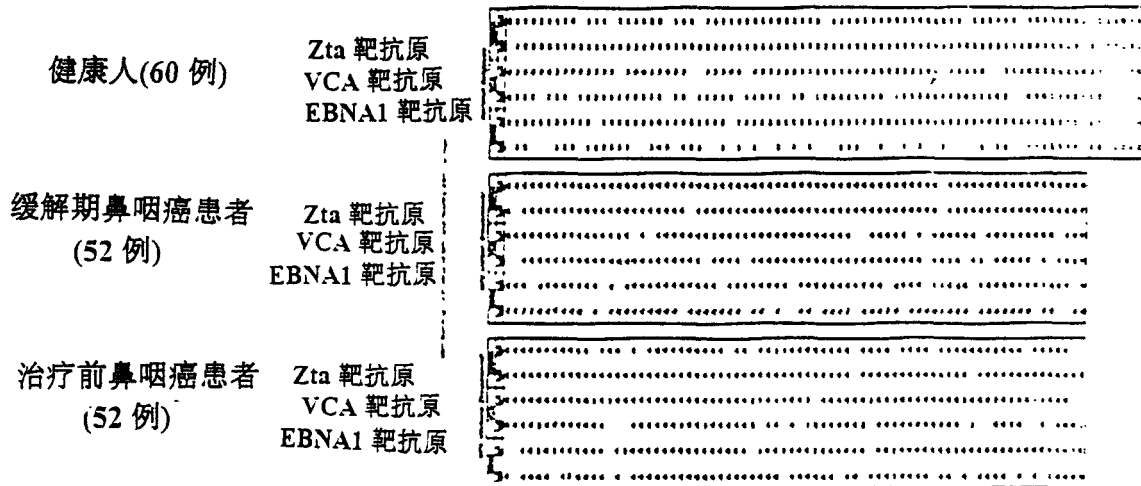


图3



明显的 ELISA 的特异度开拓了诊断鼻咽癌的特征

图 4

| 诊断    | EB 病毒抗体谱 |     |     | 所观察到的(期望获得的)<br>检测对象的百分率 |                 | 优势比          | 风险度级别 |              |
|-------|----------|-----|-----|--------------------------|-----------------|--------------|-------|--------------|
|       | No.      | ENA | ENG | ZG                       | NPC (n=121)     |              |       | 健康人 (n=332)* |
| 阴性    | 1        | L   | L   | L                        | 0.83 (0.54)     | 59.3 (59.17) | 0.009 | 低风险度         |
|       | 2        | L   | L   | H                        | 5.79 (2.01)     | 14.8 (14.79) | 0.13  |              |
|       | 3        | L   | H   | L                        | 1.65 (2.61)     | 8.73 (9.63)  | 0.23  |              |
|       | 4        | H   | L   | L                        | 3.31 (3.03)     | 10.2 (9.63)  | 0.31  |              |
| 阳性    | 5        | L   | H   | H                        | 6.61 (9.84)     | 3.01 (2.41)  | 3.98  | 中等风险度        |
|       | 6        | H   | L   | H                        | 6.61 (11.42)    | 1.51 (2.41)  | 4.5   |              |
|       | 7        | H   | H   | L                        | 15.7 (14.82)    | 1.51 (1.57)  | 9.54  |              |
|       | 8        | H   | H   | H                        | 59.5 (55.73)    | 0.9 (0.39)   | 137.9 |              |
| Total |          |     |     | 100                      | 100             | 1.00         |       |              |
|       |          |     |     | $r=0.990^{(d)}$          | $r=0.999^{(d)}$ |              |       |              |

\* 发病率 = 28.5

图 5

|         |  |         |            |
|---------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | EB病毒蛋白酶联免疫吸附诊断试剂盒及其制备方法                        |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN1584593A</a>                     | 公开(公告)日 | 2005-02-23 |
| 申请号     | CN03154287.5                                   | 申请日     | 2003-08-20 |
| [标]发明人  | 吴文翰<br>陈泓霖<br>陈国雄<br>吴子柏                       |         |            |
| 发明人     | 吴文翰<br>陈泓霖<br>陈国雄<br>吴子柏                       |         |            |
| IPC分类号  | G01N33/53 G01N33/535 G01N33/569                |         |            |
| 其他公开文献  | CN1300582C                                     |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

摘要(译)

本发明涉及采用特定的EB病毒蛋白作为靶抗原检测血清中抗体水平的试剂盒以及EB病毒重组多肽制备酶联免疫吸附试剂盒的方法。选择血清学诊断鼻咽癌(或传染性单核细胞增多症)最具临床诊断价值的EB病毒蛋白EBNA1(BKRF1)蛋白、Zta(BZLF1)蛋白和VCA - p18蛋白作为靶抗原，用以检测血清中的抗体水平，并通过在谷胱甘肽转移酶基因融合系统对EB病毒蛋白进行克隆、表达和纯化，创制出诊断试剂盒，从而使重组EB病毒抗原在EB病毒的原发性感染、确立EB病毒感染的抗体谱和鉴别诊断各种EB病毒感染、鉴别传染性单核细胞增多症和传染性单核细胞综合症、协助诊断疑为鼻咽癌、早期发现和评估患鼻咽癌的风险度等诊断方面得以应用。

