

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/569

G01N 33/536 G01N 33/534

G01N 33/535 G01N 33/534

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03116661.X

[43] 公开日 2004 年 1 月 21 日

[11] 公开号 CN 1469126A

[22] 申请日 2003.4.26 [21] 申请号 03116661.X

[71] 申请人 杭州华大基因研发中心

地址 310007 浙江省杭州市西湖区西山路 19 号

共同申请人 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所

[72] 发明人 汪建 祝庆余 方健秋 秦鄂德
文洁 于曼 牟峰 司炳银
陈唯军 刘斯奇 胡咏武 殷剑宁
王俊 杨焕明

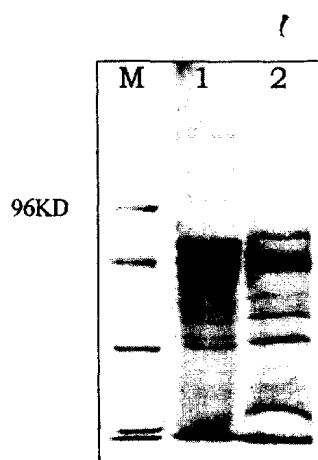
[74] 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司
代理人 张法高

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称 检测 SARS 冠状病毒抗体的方法及其试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了公开了一种检测 SARS 冠状病毒抗体的方法及其试剂盒。具体检测步骤如下：(1) 利用纯化的全病毒裂解液包被一种固相支持物；(2) 将待检测的生物学样本加入经包被的固相支持物上，在适合形成抗原抗体免疫结合复合物的条件下孵育；(3) 适度清洗去除任何未结合的 SARS 冠状病毒抗体；(4) 加入经标记的针对人抗体的第二抗体，在适合形成抗原抗体免疫复合物的条件下孵育；(5) 适度清洗去除任何未结合的第二抗体；(6) 定量检测孵育混合物中抗原抗体免疫结合复合物的存在。本发明解决了临床对 SARS 冠状病毒感染者的快速诊断问题，具有较高的准确性，为临床检测该病提供了快速、准确的诊断方法。



ISSN 1008-4274

1. 一种检测SARS冠状病毒抗体的方法，其特征在于具体检测步骤如下：
 - 1) 利用纯化的全病毒裂解液包被一种固相支持物；
 - 2) 将待检测的生物学样本加入经包被的固相支持物上，在适合形成抗原抗体免疫结合复合物的条件下孵育；
 - 3) 清洗去除任何未结合的SARS冠状病毒抗体；
 - 4) 加入经标记的针对人抗体的第二抗体，在适合形成抗原抗体免疫复合物的条件下孵育；
 - 5) 清洗去除任何未结合的第二抗体；
 - 6) 检测孵育混合物中抗原抗体免疫结合复合物的存在。
2. 根据权利要求1所述的一种检测SARS冠状病毒抗体的方法，其特征在于所说的生物学样本是指来自受试者的血液、血清、血浆、尿样、体液、唾液和其它分泌物或排泄物以及组织或细胞提取物。
3. 根据权利要求1所述的一种检测SARS冠状病毒抗体的方法，其特征在于所说的固相支持物包括有机和无机多聚物。
4. 根据权利要求1所述的一种检测SARS冠状病毒抗体的方法，其特征在于所说的适合形成抗原抗体免疫复合物的条件，是指可以孵育抗原与含抗体的样品的混合物的适当的温度及时间条件，其中温度为0-50摄氏度，时间约20分钟至约48小时。
5. 根据权利要求4所述的一种检测SARS冠状病毒抗体的方法，其特征在于所说的权利要求4中所述的条件，其中温度为4-30摄氏度，时间为20分钟至4小时。
6. 根据权利要求1所述的一种检测SARS冠状病毒抗体的方法，其特征在于所说的第二抗体是抗IgG抗体和/或抗IgM或IgA抗体。
7. 根据权利要求1所述的一种检测SARS冠状病毒抗体的方法，其特征在于所说的第二抗体是用放射性同位素标记的，或者是用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶进行标记。
8. 一种检测SARS冠状病毒抗体的试剂盒，其特征在于：其试剂盒组成为：
 - 1) 包被抗原：SARS冠状病毒全病毒裂解液；
 - 2) 抗原包被板：采用为国产96孔可拆板，并包被SARS冠状病毒全病毒裂解液；

- 3) 酶标抗体：辣根过氧化物酶标记的第二抗体（IgG或IgM或IgA）；
 - 4) 阴性对照及阳性对照血清：含0.05%硫柳汞，0.01%叠氮钠；
 - 5) 酶标抗体工作液：用含20%羊血清，0.05%硫柳汞的稀释液将酶标抗体稀释至适当的效价；
 - 6) 底物液A：0.06%过氧化脲的0.01M pH 4.5柠檬酸缓冲液；
底物液B：0.06%TMB0.01M pH 4.5柠檬酸缓冲液；
 - 7) 终止液：1M硫酸；
 - 8) 洗涤液：PBS，含0.1%吐温-20；
 - 9) 间接法检测SARS冠状病毒抗体试剂盒说明书一份。
9. 根据权利要求8所述的一种检测SARS冠状病毒抗体的试剂盒，其特征在于所说的SARS冠状病毒全病毒裂解液是采用Vero-E6细胞接种病毒后培养，经超声裂解纯化而得到的。

检测 SARS 冠状病毒抗体的方法及其试剂盒

技术领域

本发明涉及人类医学卫生领域，尤其涉及一种检测 SARS 冠状病毒抗体的方法及其试剂盒。

背景技术

2002年底在世界各地爆发了导致全球150多人死亡的非典型肺炎，这次流行的非典型肺炎是一种急性呼吸道传染病，国外称其为重症急性呼吸综合征（Severe Acute Respiratory Syndrome, SARS），主要通过近距离空气飞沫和密切接触传播，起病急、传播快，病死率高达4.9%。目前涉及到世界近30个国家和地区，全球患者已达3389多例，且发病人数仍有不断增加的趋势。

美国疾病控制和预防中心的专家利用“非典”患者的组织样本，借助电子显微镜分离并判定“非典”病原体可能是新型冠状病毒。几乎同时，包括中国、新加坡、加拿大、德国在内的几个实验室也都确认了这种新型冠状病毒的存在。

2003年4月16日，世界卫生组织宣布，经过全球10个国家和地区13个实验室的通力合作，在全球多个国家快速传染的非典型肺炎（英文名称为SARS，下文简称“非典”）的病原体最终被确认。这是一种冠状病毒，以前从未在人体中发现过。非典型肺炎病原，即SARS病毒的分离和确证，对于该病的临床诊断、治疗及预防至关重要，这也是本发明所要解决的问题。

发明内容

本发明的目的是提供一种检测 SARS 冠状病毒抗体的方法及其试剂盒。

其具体步骤如下：

- 1) 利用纯化的全病毒裂解液包被一种固相支持物；
- 2) 将待检测的生物学样本加入经包被的固相支持物上，在适合形成抗原抗体免疫结合复合物的条件下孵育；
- 3) 清洗去除任何未结合的SARS冠状病毒抗体；
- 4) 加入经标记的针对人抗体的第二抗体，在适合形成抗原抗体免疫复合物的条件下孵育；
- 5) 清洗去除任何未结合的第二抗体；
- 6) 检测孵育混合物中抗原抗体免疫结合复合物的存在。

其试剂盒组成为：

- 1) 包被抗原: SARS冠状病毒全病毒裂解液;
- 2) 抗原包被板: 采用国产96孔可拆板, 并包被SARS冠状病毒全病毒裂解液;
- 3) 酶标抗体: 辣根过氧化物酶标记的第二抗体 (IgG或IgM);
- 4) 阴性对照及阳性对照血清: 含0.05%硫柳汞, 0.01%叠氮钠;
- 5) 酶标抗体工作液: 用含20%羊血清, 0.05%硫柳汞的稀释液将酶标抗体稀释至适当的效价;
- 6) 底物液A: 0.06%过氧化脲的0.01M pH 4.5柠檬酸缓冲液;
底物液B: 0.06%TMB0.01M pH 4.5柠檬酸缓冲液;
- 7) 终止液: 1M硫酸;
- 8) 洗涤液: PBS, 含0.1%吐温-20;
- 9) 间接法检测SARS冠状病毒抗体试剂盒说明书一份。

本发明解决了临床对SARS冠状病毒感染者的快速诊断问题, 具有较高的准确性, 为临床检测该病提供了快速、准确的诊断方法。

附图说明

图1是SARS冠状病毒全病毒裂解液抗原的SDS-PAGE 结果示意图;

图2是酶标第二抗体为IgG时cut-off正态分布示意图。

具体实施方式

本发明所述的生物学样本是指来自受试者 (包括患者和阴性对照) 的血液、血清、血浆、尿样、体液、唾液和其它分泌物或排泄物以及组织或细胞提取物。

针对人抗体的第二抗体可以用放射性同位素标记的 (即RIA), 也可以是用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶进行标记的 (即ELISA)。

所述第二抗体可以是抗人-IgG或 / 和-IgM或 / 和-IgA抗体。这些第二抗体可以从市场上购得, 如绵羊抗人-IgG或 / 和-IgM、山羊抗人-IgG或 / 和-IgM、小鼠抗人-IgG或 / 和-IgM、大鼠抗人-IgG或 / 和-IgM、兔抗人-IgG或 / 和-IgM等。

利用不同的第二抗体可以检测出样本中特定的抗体是否存在, 以及不同抗体的相对存在量。由于在SARS冠状病毒感染的不同时期IgG和IgM在人体内的相对量不同, 利用不同的第二抗体进行多次检测有助于判定患者的病程。

所述的“固相支持物”包括本领域周知的有机和无机多聚物, 诸如包括但不限于: 葡聚糖、天然或经修饰的纤维素、聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺, 琼脂糖, 乳胶, 容器内壁如试管、滴定板、玻璃杯等。

可使用本领域周知的多种方法包被固相支持物。例如: 利用双功能试剂活

化，参见美国专利5399501。

所述的“适合形成抗原抗体免疫复合物的条件”为本领域周知，是指在适当的温度及时间条件下孵育抗原与含抗体的样品的混合物，例如在约0-50摄氏度，优选约4-30摄氏度下，标记约20分钟至约48小时，优选标记约20分钟至约4小时。

经孵育形成抗原抗体免疫复合物后，用本领域常用的适当洗涤溶液洗涤检测板数次，以清除未结合的经标记的抗原。所用清洗液一般为pH约5-8，优选为pH约7.4的磷酸盐缓冲溶液。

可采用多种本领域周知的方法定量检测抗原抗体复合物的形成。根据标记第二抗体所使用的方法，选择适当的定量检测方案。本发明一个优选的实施方案中，标记抗原时使用辣根过氧化物酶，所以使用以过氧化物溶液为A液及联苯胺类物质为B液的底物与带有含标记的辣根过氧化物酶的抗原抗体免疫复合物作用，显色后在波长为450nm（参比波长630nm）酶标仪读取吸光值。将所得读数与阴性对照的读数加以比较，判断所测样本的结果。

利用本发明的SARS冠状病毒全病毒裂解液作为抗原，通过免疫法检测个体生物学样本中SARS冠状病毒抗体的方法还包括本领域中常规使用的利用特定抗原检测抗体的其它方法。

本发明也涉及用于这些方法检测SARS冠状病毒抗体的检测试剂盒。根据本发明检测SARS冠状病毒抗体的试剂盒包括：用纯化的本发明经修饰的重组非典型性肺炎病毒蛋白质作为抗原包被的固相支持物；和使用该试剂盒的说明。还包括如上文所述标记的第二抗体。该第二抗体可以是抗IgG抗体和/或抗IgM和/或抗IgA抗体。在上述检测试剂盒中，还可以含有提供判断检测结果的相应的范围。SARS冠状病毒全病毒裂解液是采用Vero-E6细胞接种病毒后培养，经超声裂解纯化而得到的。

下列实施例详细解释本发明，但这并不限制本发明的范围。

实施例1、SARS冠状病毒全病毒裂解液的制备及鉴定

1、将病毒直接接种Vero E6后，每天观察病变，当表现为聚集，圆形细胞，折光，并出现散在细胞脱落时，将细胞在-20C反复冻溶2此，离心取上清。

2、SARS冠状病毒纯化过程，得到SARS冠状病毒全裂解液。

1) 上述上清进行超声破碎（功率150W，超声时间2秒，间歇时间4秒，60个循环）；

2) 13000RPM离心20分钟；

- 3) 置入透析袋进行透析 (cut-off10000);
- 4) 采用PEG20000浓缩样品约6-7倍;
- 5) 将浓缩样品转移至洁净试管;
- 6) 超声破碎 (功率150W, 超声时间2秒, 间歇时间4秒, 60个循环);
- 7) 13000RPM离心10分钟; 除去不溶物;
- 8) 加入固体尿素至浓度为6M;
- 9) 超声破碎 (功率150W, 超声时间2秒, 间歇时间4秒, 60个循环);
- 10) 13000RPM离心10分钟, 除去不溶物。得到SARS冠状病毒全病毒裂解液。

3、纯度鉴定以VERO-E6 CELL超声粉碎的细胞液和全病毒裂解液同时进行 SDS-PAGE电泳测定, 浓缩胶浓度5%, 分离胶浓度为10%, 样品上样量为 10 μ g。对照细胞及中毒细胞条带应有明显差异; 比活: 用1 μ g/ml 抗原包被的微孔板条, 用质控 P1号血清进行检定, 定义A值等于0.2时抗原比活为一个单位 (IU), 比活应大于10IU。SARS冠状病毒全病毒裂解液抗原的SDS-PAGE 结果见附图1。

实施例2、SARS冠状病毒全病毒裂解液包被固相支持物

96孔板条选用吸附性良好的聚苯乙烯板 (孔间, 板间和批间差 CV<10%), 选用 0.05M pH9.6 碳酸盐缓冲液(CB)为包被液, 每孔加入按照实验设计浓度配好抗原的包被液 100 微升, 室温包被过夜。然后弃去抗原液, 包被板用含有 0.5% TW-20 的 0.02M PBS 洗涤液(PBS-T)洗两次, 拍干, 加入 1%牛血清白蛋白 (BSA) 和 1%脱脂奶粉的 0.02M pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 室温封闭 2 小时。弃去封闭液, 风干包被板, 铝箔袋真空包装 4℃保存。用内控 SARS 冠状病毒血清进行效价滴定, 用间接法测定用于包被的 SARS 冠状病毒抗原效价, 结果见表 1, 结果确定用于包被的 SARS 冠状病毒抗原的效价为 1: 60。

表 1. 用于包被的 SARS 冠状病毒抗原效价滴定结果。

稀释度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:40	1:50	1:60	1:80	1:100
弱阳性血清	1.842	1.653	1.324	1.002	0.825	0.722	0.683	0.416	0.225	0.178
阴性血清	0.242	0.180	0.134	0.102	0.083	0.065	0.062	0.043	0.012	0.002

实施例3、酶标用抗人IgG、IgM的辣根过氧化物酶标记及鉴定

酶标用抗人 IgG、IgM 经检定合格后用于酶标记。辣根过氧化物酶购自 Sigma 公司, RZ>3.0。标记方法采用改良过碘酸钠法。

激活 HRP: 称取 5mg HRP, 溶于 1ml 0.2M pH5.6 醋酸盐缓冲液中, 加入新鲜配制的 0.1M NaIO₄ 0.25ml, 充分混匀, 置于磁力搅拌器上充分反应, 避光反

应 (150 rpm) 20 分钟, 用 1mM pH4.4 的醋酸盐缓冲液 4℃ 充分透析 24 小时以除去小分子的杂质。

与抗人 IgG/IgM 抗体的交联: 上述激活后的 HRP 中加入 1/4 体积 1.0M pH9.6 碳酸盐缓冲液, 调节 pH 值至 9.6 (HRP 浓度变为 4mg/ml)。取 1.25mg 抗人 IgG/IgM 加入 1/4 体积的 1.0M pH9.6 碳酸盐缓冲液调节 pH 值至 9.6, 将抗人 IgG/IgM 溶液缓慢加入到激活的 HRP 中, 室温, 避光反应 2 小时。

还原 Schiff 碱: 将上述交联后的产物中加入 0.01ml 5mg/ml 的 NaBH₄, 充分混匀后 4℃ 避光静置 2 小时。

除去小分子杂质: 将上述的交联产物对 0.01M pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 充分透析 16 小时。

去除游离未标记的 HRP: 从透析袋取出液体, 缓慢加入等体积的饱和 (NH₄)₂SO₄, 充分混匀后 4℃ 静置过夜, 离心 4000rpm 20 分钟, 收集沉淀, 用 0.01M pH7.4 的 PBS 溶解沉淀, 对 0.01M pH7.4 PBS 充分透析 16 小时。

标记抗体经 Sephadex G-50 柱层析, 收集第一峰, 合并样品管, 浓缩。

保存: 加入等体积灭菌甘油, -20℃ 保存备用。

酶标记抗体外观澄清、无混浊、无沉淀。活性检定用 HCV 系统检测酶标记抗体的敏感性和特异性, 结果见表 2。结果表明该酶标抗体敏感性和特异性良好, 可用于 SARS 系统。

表 2. 酶标记的抗体活性检定结果。

稀释度	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000
弱阳性血清	1.448	0.835	0.355	0.212
阴性血清	0.203	0.141	0.054	0.042

实施例4 合适的抗原抗体反应条件及时间的确定

在上述实施例确定的包被抗原及酶标第二抗体浓度下, 采用如前述的酶标板和反应缓冲液, 研究适于抗原抗体反应形成免疫结合复合物的条件。选用弱、中、强3个阳性血清及阴性对照, 按照实施例6中详细描述的操作方法进行间接法实验。通过在 37℃ 条件下分别反应 20、30、60、90、120 分钟, 标记抗体反应 20、30、60 分钟, 显色 10 分钟。

1) 当酶标第二抗体为 IgM 时, 所测的 OD 值在 60 分钟时达到最高值。故选择反应时间为 60 分钟。

2) 当酶标第二抗体为 IgG 时, 所测的 OD 值在 30 分钟时达到最高值。故选择

反应时间为30分钟。

实施例5 间接法免疫检测样品的阳性阈值 cut-off 的确定

1) 酶标第二抗体为IgG:

按照实施例6所述免疫检测的方法,检测300份经间接ELISA法确定为阴性的正常义务献血员血清,取正态分布值进行统计分析。得均值为0.021,SD为0.004。设定阳性阈值为 $0.18 + \text{阴性对照均值}$ 。

检测 1000 份正常献血员随机血清标本,将 S/Co 比值进行正态统计分析,同时检测 10 份临床确诊 SARS 的患者血清标本,分析 S/Co 值,设定 Cut-off 值。检测 1000 份正常献血员随机血清标本,阴性对照 OD 值低于 0.05 按 0.05 计算,高于 0.05 按实际值计算,计算 A 值,将 A 值进行正态统计分析,均值为 0.05,标准差 (SD) 为 0.044。

以均值+3 倍标准差 = $0.05 + 3 \times 0.044 = 0.182$

Cut-off 值 = $0.13 + \text{阴性对照 A 值}$

其正态分布图见图 2。

据此设定 Cut-off 值为判定界值。如大于 Cutoff 为阳性,反之为阴性。同时检测 10 份临床确诊为 SARS 的患者血清标本,均大于 Cut-off 值。

2) 同理,酶标第二抗体为 IgM 时,计算得 Cut-off 值为 0.14。

实施例6、间接法检测SARS冠状病毒抗体

1) 每次试验设空白对照、阴性对照和阳性对照各 1 孔。空白孔不加液体;阴、阳性对照无需稀释直接取 $50 \mu\text{l}$ 加入阴、阳性对照孔中;其余检测孔加入样品稀释液,每孔 $100 \mu\text{l}$,再加入待测样品 $10 \mu\text{l}$ 。充分混匀,贴上封口胶,置 37°C 温育 30 分钟。

2) 将 50 倍浓缩洗板液用双蒸水 50 倍稀释后用于洗涤板孔。

3) 弃去各孔中样品,每孔加满洗液,静置数秒后弃去,重复 5 次,拍干。

4) 每孔加入酶标抗人 IgG 工作液 $100 \mu\text{l}$,贴上封口胶。置 37°C 温育 20 分钟。

5) 弃去各孔中液体,用洗板液反复洗涤 5 次,拍干。

6) 每孔加入底物液 A $50 \mu\text{l}$,再加入底物液 B $50 \mu\text{l}$,轻拍混匀,置 37°C 避光温育 10 分钟。

7) 显色完毕后,每孔加入终止液 $50 \mu\text{l}$,轻拍混匀,立即以空白孔调零,置酶标仪 450nm 波长下测定 OD 值 (参考波长为 630nm)。

实施例 7、SARS 冠状病毒检测试剂盒的组成

本发明优选的SARS冠状病毒检测试剂盒由以下几个部分组成：

包被抗原：SARS冠状病毒全病毒裂解液；

抗原包被板：为国产96孔可拆板，按照实施例4所述包被SARS冠状病毒全病毒裂解液；

酶标抗体：辣根过氧化物酶标记的第二抗体（IgG或IgM）；

阴性对照及阳性对照血清：各0.2毫升，含0.05%硫柳汞，0.01%叠氮钠；

酶标抗体工作液：用含20%羊血清，0.05%硫柳汞的稀释液将酶标抗体稀释至适当的效价。

底物液A：0.06%过氧化脲的0.01M pH 4.5柠檬酸缓冲液；

底物液B：0.06%TMB0.01M pH 4.5柠檬酸缓冲液；

终止液：1M硫酸

洗涤液：50× PBS，含0.1%吐温-20；

抗SARS冠状病毒阳性血清OD值当在0.13（IgG）阴性对照均值以上。

抗SARS冠状病毒阴性血清OD值当在0.13（IgG）以下。

抗SARS冠状病毒阳性血清OD值当在0.11（IgM）阴性对照均值以上。

抗SARS冠状病毒阴性血清OD值当在0.11（IgM）以下。

间接法检测SARS冠状病毒抗体试剂盒说明书一份。

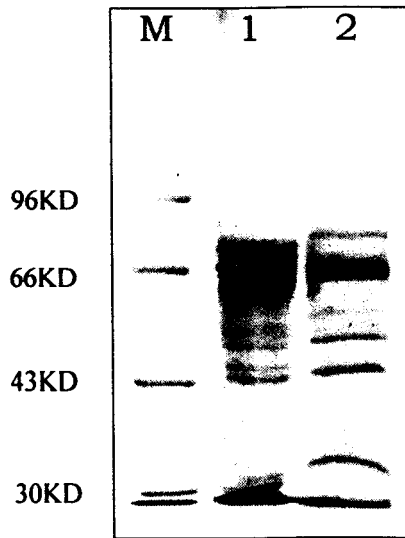


图 1

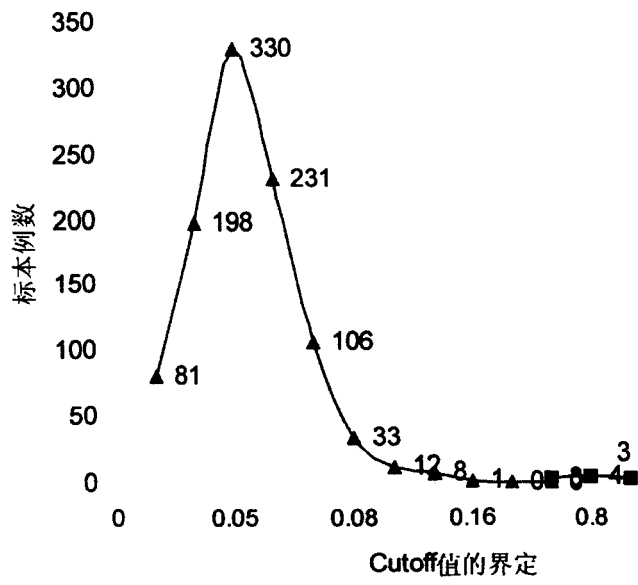


图 2

专利名称(译)	检测SARS冠状病毒抗体的方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN1469126A	公开(公告)日	2004-01-21
申请号	CN03116661.X	申请日	2003-04-26
[标]申请(专利权)人(译)	杭州华大基因研发中心 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
申请(专利权)人(译)	杭州华大基因研发中心 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	杭州华大基因研发中心 中国人民解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所		
[标]发明人	汪建 祝庆余 方健秋 秦鄂德 文洁 于曼 牟峰 司炳银 陈唯军 刘斯奇 胡咏武 殷剑宁 王俊 杨焕明		
发明人	汪建 祝庆余 方健秋 秦鄂德 文洁 于曼 牟峰 司炳银 陈唯军 刘斯奇 胡咏武 殷剑宁 王俊 杨焕明		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/534 G01N33/535 G01N33/536 G01N33/569		
其他公开文献	CN1177224C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了公开了一种检测SARS冠状病毒抗体的方法及其试剂盒。具体检测步骤如下：(1)利用纯化的全病毒裂解液包被一种固相支持物；(2)将待检测的生物学样本加入经包被的固相支持物上，在适合形成抗原抗体免疫结合复合物的条件下孵育；(3)适度清洗去除任何未结合的SARS冠状病毒抗体；(4)加入经标记的针对人抗体的第二抗体，在适合形成抗原抗体免疫复合物的条件下孵育；(5)适度清洗去除任何未结合的第二抗体；(6)定量检测孵育混合物中抗原抗体免疫结合复合物的存在。本发明解决了临床对

SARS冠状病毒感染者的快速诊断问题，具有较高的准确性，为临床检测该病提供了快速、准确的诊断方法。

96KD

