

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 16/10

C12N 5/06

G01N 33/569

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310115244.6

[43] 公开日 2005 年 6 月 1 日

[11] 公开号 CN 1621416A

[22] 申请日 2003. 11. 26

[21] 申请号 200310115244.6

[71] 申请人 北京科兴生物制品有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地西路 39 号北大生物城

[72] 发明人 高 强 张建三 李 静

李 晶 胡良湘 李淑芬 公雪杰

尹卫东

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 2 页

[54] 发明名称 用于重度急性呼吸综合症病毒抗原检测的方法

[57] 摘要

本发明主要涉及 SARS 病毒抗原的检测。具体的, 本发明涉及 SARS 病毒抗体、抗 SARS 病毒 IgG 致敏红细胞、它们的制备方法、和 SARS 病毒抗原检测方法和试剂盒等。本发明通过反向间接血凝法来检测 SARS 病毒抗原。反向间接血凝法是用抗 - SARS 病毒 IgG (例如兔抗 - SARS 病毒 IgG) 致敏的红细胞 (例如人 “O” 型红细胞) 检测待检样品中的 SARS 病毒抗原。反向间接血凝方法可用于检测 SARS 灭活疫苗制备过程中的 SARS 病毒抗原含量。

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

1. 特异性结合 SARS 病毒抗原的抗体,特别是多克隆抗体,优选 IgG,更优选人 IgG、猴 IgG、兔 IgG,最优选兔 IgG。

2. 制备特异性结合 SARS 病毒抗原的抗体的方法,包括

(a)用纯化的 SARS 病毒抗原免疫动物(例如哺乳动物,如家兔或猴),例如,采用 0, 14, 21 天三针免疫程序,将纯化 SARS 抗原与弗氏完全佐剂等比混合后, 2ml/次/只,肌肉注射;

(b)从免疫动物采血,分离出血清;

(c)任选的,将血清灭活,例如经 56℃, 30min 灭活;和

(d)任选的,用蛋白 A 法提取 SARS 抗体阳性血清中的 IgG。

3. 制备经抗 SARS 病毒 IgG 致敏的红细胞的方法,包括如下步骤:

(a)制备醛化红细胞,优选双醛化红细胞;

(b)将醛化红细胞鞣化;

(c)用抗 SARS 病毒 IgG 致敏鞣化红细胞;和

(d)任选地,加入适当的保护剂,冻干。

4. 权利要求 3 的方法,其中,

步骤(a)的红细胞是 O 型红细胞,依次采用戊二醛和甲醛进行醛化;和/或

步骤(b)包括用 1: 20000 (质量比)等体积新鲜配制鞣酸 37℃作用 15 分钟;和/或

步骤(c)包括将适当浓度的抗 SARS 病毒 IgG 和适当浓度的步骤(b)的鞣化红细胞在足以致敏红细胞的时间和条件下接触;优选地,步骤(c)包括将 4 倍体积 0.15mol/L pH6.4 的 PBS、1 倍体积适当浓度的 IgG、1 倍体积 2.5%鞣化红细胞混合均匀后,室温振荡结合 1 小时;和/或

步骤(c)还可以包括用 1%灭活正常兔血清-PBS 洗涤 2 次,任选地,用 0.15mol/L pH7.2 的 PBS 配成 1.25%的致敏红细胞;和/或

步骤(d)的保护剂是蔗糖和吐温-20,优选终浓度为 10% (质量比)蔗糖和万分之三 (体积比)吐温-20。

5. 权利要求4的方法, 其中,
步骤(c)的IgG优选人IgG、猴IgG或兔IgG, 更优选兔IgG; 和/或
步骤(c)的IgG的浓度为0.01-2.0mg/ml, 更优选0.05-0.5mg/ml, 最优选0.1-0.2mg/ml.
6. 经抗SARS病毒IgG致敏的红细胞。
7. 权利要求6的红细胞, 其可通过权利要求3-5任意一项的方法制备。
8. 用于测定SARS病毒抗原的方法, 包括如下步骤:
 - (a) 获得待测样品; 和
 - (b) 采用权利要求5的致敏红细胞通过反向间接血凝方法测定所述样品是否存在SARS病毒抗原, 优选地, 定量测定该样品的血凝效价。
9. 权利要求8的方法, 还包括用血凝抑制试验测定非特异性反应。
10. 权利要求9的方法, 其中血凝抑制试验包括: 每次检测样品时, 增加SARS抗体阳性血清(例如SARS病人恢复期血清)的抑制; 当样品稀释液检测待测样品血凝效价 $\geq 1:4$, 优选 $\geq 1:8$, SARS抗体阳性血清抑制后结果较抑制前低至少4倍时判定为SARS抗原阳性; 未出现SARS抗体阳性血清抑制, 判定为SARS病毒抗原阴性。
11. 检测SARS抗原的试剂盒, 包含经抗SARS病毒IgG致敏的红细胞和任选的SARS抗体阳性血清。

用于重度急性呼吸综合症病毒抗原检测的方法

相关申请的引用

特此将申请号为 200310114341.3、申请日为 2003 年 11 月 12 日的中国专利申请完整地引入本申请作为参考。

技术领域

本发明主要涉及 SARS 病毒抗原的检测。具体的,本发明涉及 SARS 病毒抗体、抗 SARS 病毒 IgG 致敏红细胞、它们的制备方法、和 SARS 病毒抗原检测方法等。

背景技术

重度急性呼吸综合症 (sever acute respiratory syndrome, SARS) 是 2002 年底开始影响世界上几个国家和地区的一种传染性极强的疾病。根据目前的研究,这种疾病是由一种新的冠状病毒引起的。这种疾病的传染性强,严重影响患者的身体健康,并且有较高的致死率。要很好地预防这种疾病,只有通过接种疫苗来实现。疫苗主要分为减毒活疫苗(例如甲肝减毒活疫苗),灭活疫苗(例如甲肝灭活疫苗),基因工程疫苗,亚单位疫苗。而研制快而有效的就是灭活疫苗,在灭活疫苗的制备过程中需要一种检测 SARS 病毒的方法。现有技术中迫切需要能快速且灵敏的测定样品中的 SARS 病毒,以便能对疫苗的纯化工艺及疫苗本身作出评价的方法。

本发明提供了评价疫苗纯化工艺及疫苗本身的方法,从而满足了现有技术中的这一需求。

发明内容

本发明的一个目的是提供一种测定 SARS 病毒抗原的方法。为此，本发明提供如下技术方案。

一方面，本发明涉及特异性结合 SARS 病毒抗原的抗体，特别是多克隆抗体，优选 IgG，更优选人 IgG、猴 IgG、兔 IgG，最优选兔 IgG。在另一个实施方案中，所述抗体是单克隆抗体。优选的，所述抗体具有高效价。

本发明还涉及制备特异性结合 SARS 病毒抗原的抗体的方法，该方法包括：

(a) 用纯化的 SARS 病毒抗原免疫动物(例如哺乳动物，如家兔或猴)，例如，采用 0，14，21 天三针免疫程序，将纯化 SARS 抗原与弗氏完全佐剂等比混合后，2ml/次/只，肌肉注射；

(b) 从免疫动物采血，分离出血清；

(c) 任选的，将血清灭活，例如经 56℃，30min 灭活；和

(d) 任选的，用蛋白 A 法提取 SARS 抗体阳性血清中的 IgG。

另一方面，本发明制备经抗 SARS 病毒 IgG 致敏的红细胞的方法，包括如下步骤：

(a) 制备醛化红细胞，优选双醛化红细胞；

(b) 将醛化红细胞鞣化；

(c) 用抗 SARS 病毒 IgG 致敏鞣化红细胞；和

(d) 任选地，加入适当的保护剂，冻干。

红细胞可采用本领域已知的任何方法进行醛化。例如，可将红细胞配成 10% (体积比) 红细胞悬液。缓慢加入等体积 1% (体积比) 戊二醛，室温振荡 30 分钟，进行单醛化。经过洗涤之后加入百分之一体积的甲醛溶液双醛化。对于醛化后的红细胞，可加入终浓度 1: 10000 (质量比) 的 NaN_3 ，2-8℃ 保存备用。

在优选的实施方案中，步骤 (a) 的红细胞是 O 型红细胞，依次采用戊二醛和甲醛进行醛化；和/或

步骤 (b) 包括用 1: 20000 (质量比) 等体积新鲜配制鞣酸 37℃ 作

用 15 分钟；和/或

步骤(c)包括将适当浓度的抗 SARS 病毒 IgG 和适当浓度的步骤(b)的鞣化红细胞在足以致敏红细胞的时间和条件下接触；优选地，步骤(c)包括将 4 倍体积 0.15mol/L pH6.4 的 PBS、1 倍体积适当浓度的 IgG、1 倍体积 2.5%鞣化红细胞混合均匀后，室温振荡结合 1 小时；和/或

步骤(c)还可以包括用约 1%灭活正常兔血清-PBS 洗涤 2 次，任选地，用 0.15mol/L pH7.2 的 PBS 配成约 1.25%的致敏红细胞；和/或

步骤(d)的保护剂是蔗糖和吐温-20，优选终浓度为 10%（质量比）蔗糖和万分之三（体积比）吐温-20。

在另一个的实施方案中，本发明方法步骤(c)的 IgG 优选人 IgG、猴 IgG 或兔 IgG，更优选兔 IgG；和/或

步骤(c)的 IgG 的浓度为 0.01-2.0mg/ml，更优选 0.05-0.5mg/ml，最优选 0.1-0.2mg/ml。

在一个具体实施方案中，本发明方法步骤(c)使用 0.1-0.2mg/ml 的兔 IgG 致敏红细胞。

另一方面，本发明涉及经抗 SARS 病毒 IgG 致敏的红细胞，优选“O”型红细胞。该红细胞可以是任何来源的，优选哺乳动物红细胞，更优选人红细胞，特别是人“O”型红细胞。本发明的红细胞可通过本发明的方法制备。优选地，按照本发明的方法或相当的方法，本发明敏化红细胞检测 SARS 病毒抗原对照的效价不低于 1: 16，优选不低于 1: 32，更优选不低于 1: 40，不低于 1: 50，不低于 1: 60，甚至更优选不低于 1: 80，不低于 1: 96，最优选不低于 1: 128 或更高。

另一方面，本发明涉及测定 SARS 病毒抗原的方法，包括如下步骤：

(a) 获得待测样品；和

(b) 采用本发明的致敏红细胞通过反向间接血凝方法测定所述待测样品是否存在 SARS 病毒抗原，优选地，定量测定该样品的血凝效价。

所述待测样品可以是任何样品，例如制备 SARS 疫苗过程中的中间产品、过程液及疫苗原液：灭活液、澄清液、超滤液、超滤原滤过液、纯化液、纯化二峰等等，也可以是动物或人的分泌物、排泄物、血液样品、

组织样品、或任何临床样品。而且，如果需要，这些样品可以经过适当处理，例如离心、裂解、破碎、纯化、灭活等。

反向间接血凝方法是用抗-SARS 病毒 IgG (兔抗-SARS 病毒 IgG) 致敏的红细胞(例如人“O”型红细胞)检测待检样品中的 SARS 病毒抗原。反向间接血凝方法可用于检测 SARS 灭活疫苗制备过程中的 SARS 病毒抗原含量。

反向间接血凝方法是本领域熟知的，可以由本领域普通技术人员按照常规方法进行合理的设计和和实施。例如，可以按照实施例中提供的方法进行。

反向间接血凝方法应用时，出现的非特异反应可通过增加 SARS 病人恢复期血清的抑制而确定。

在一个实施方案中，该方法还包括用血凝抑制试验测定非特异性反应。在一个具体实施方案中，血凝抑制试验包括：每次检测样品时，增加 SARS 抗体阳性血清（例如 SARS 病人恢复期血清）的抑制；当样品稀释液检测待测样品血凝效价 $\geq 1:4$ ，优选 $\geq 1:8$ ，更优选 $\geq 1:16$ ，例如 $\geq 1:32$ 甚至更高，SARS 抗体阳性血清抑制后结果较抑制前低至少 4 倍时判定为 SARS 抗原阳性；未出现 SARS 抗体阳性血清抑制，判定为 SARS 病毒抗原阴性。

另一方面，本发明还涉及用血凝抑制试验测定反向间接血凝中非特异性反应的方法。

再一方面，本发明涉及检测 SARS 抗原的试剂盒，包含经抗 SARS 病毒 IgG 致敏的红细胞和任选的 SARS 抗体阳性血清。该试剂盒还可以包含样品稀释液、阳性对照、阴性对照、微量血凝板、和/或说明书等等。

反向间接血凝方法应用时，出现的非特异反应可通过增加 SARS 病人恢复期血清的抑制而确定。

在本发明的特别具体的实施方式中，如果适当的话，本发明所有方面都使用以下 SARS 病毒毒株：Sino 1, Sino 2, Sino 3, Sino4, 和 Sino5。所述病毒毒株分别于 2003 年 6 月 26 日保藏在国际保藏单位中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心（CGMCC，中国北京市海淀区中关村北一条 13 号），保藏号分别为 CGMCC No.0962、0963、0964、0965

和 0966。分类命名为冠状病毒属 (Coronavirus) SARS 病毒。

本发明所用的病毒抗原和病毒抗原阳性对照可通过以下方法制备。通过 Vero 细胞培养 SARS 病毒，并用甲醛或 β -丙内酯进行灭活而得病毒灭活液；将病毒灭活液进行离心后即得病毒澄清液；病毒澄清液通过一定截留直径的膜包进行超滤，滤出的称为超滤滤过液，未滤出的称为病毒超滤液；将病毒超滤液进行分子筛层析，层析第一峰即是纯化液，层析第二峰称为纯化二峰。具体地，灭活和纯化方法可参见实施例所述。

以下通过实施例对本发明进行举例说明，这些实施例对本发明的范围没有任何限制作用。参考这些实施例，本发明的上述方面和其他方面对于本领域技术人员而言是明显的。

附图说明

图 1. 选择不同福尔马林溶液浓度进行灭活对 SARS 病毒感染滴度的影响。

图 2. 选择不同 β -丙内酯溶液浓度对 SARS 病毒感染滴度的影响。

实施例

材料和方法

1. SARS 病人恢复期血清——北京、张家口、内蒙古地区，北京科兴临床医学部提供。经 56°C ，30min 灭活后， $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用 0.15mol/L pH7.2 的 PBS 1: 25 稀释，用于血凝抑制试验。

2. 阴性血清

2. 1 健康人血清

购自北京市红十字血液中心。SARS 中和抗体阴性。经 56°C ，30min 灭活后， $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存备用。用 0.15mol/L pH7.2 的 PBS 1: 25 稀释，用于血凝抑制试验。

2. 2 正常兔血清

采自健康家兔，分离出血清。经 56°C ，30min 灭活后， $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存备

用。用 0.15mol/L pH7.2 的 PBS 1: 100 稀释, 得到 1%灭活正常兔血清-PBS, 用作样品稀释液。

3. SARS 病毒抗原参比品

用 Vero 细胞培养、收获 SARS 病毒, 经灭活、离心、超滤、分子筛层析而得。

4. 样品

北京科兴生物制品有限公司通过 Vero 细胞培养 SARS 病毒, 并用甲醛或 β -丙内酯进行灭活而得病毒灭活液; 将病毒灭活液进行离心后即得病毒澄清液; 病毒澄清液通过一定截留直径的膜包进行超滤, 滤出的称为超滤滤过液, 未滤出的称为病毒超滤液; 将病毒超滤液进行分子筛层析, 层析第一峰即是纯化液, 层析第二峰称为纯化二峰。具体灭活和纯化方法同以下实施例所述。

5. Vero 细胞冻融液

将 Vero 细胞培养至致密单层, 弃培养液。加入维持液, -20°C 冻融三次。 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存备用。蛋白含量: 2.5mg/ml。

6. Vero 蛋白纯化液

将 Vero 细胞培养、收获, 用 SARS 病毒同一提纯工艺提纯而得。蛋白含量: 28 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

实施例 1 SARS 病毒灭活

在本发明中, 采用选自福尔马林溶液和 β -丙内酯的灭活剂, 对含有 SARS 病毒的样品进行灭活。

1) 福尔马林溶液灭活

分别以等体积向待处理的 SARS 病毒样品中加入经 1: 100 (体积比) 稀释的福尔马林溶液, 在 37°C 下用工作浓度分别为 1: 1000、1: 2000、1: 4000 (体积比) 稀释的福尔马林溶液处理 SARS 病毒液, 得到 SARS 病毒推算灭活时间分别为 2.9 小时、6.0 小时和 12.5 小时。结果详见表 1 灭活动力学曲线参见图 1。

表 1 不同浓度福尔马林溶液灭活 SARS 病毒时间

福尔马林	灭活前 CCID50/ml	斜率	推算灭活时间 (hr)
1: 1000	6.7	-2.4	2.9
1: 2000	6.7	-1.13	6.0
1: 4000	6.7	-0.53	12.5

2) β -丙内酯溶液灭活

分别以等体积向待处理的 SARS 病毒样品中加入经 1: 10 (体积比) 稀释的 β -丙内酯溶液, 在 4℃ 下用工作浓度分别为 1: 4000、1: 6000、1: 8000 (体积比) 稀释的 β -丙内酯溶液处理 SARS 病毒液, 得到 SARS 病毒推算灭活时间分别为 2.9 小时、7.2 小时和 11.6 小时, 结果见表 2。在此基础上延长至少 2 倍时间即为首次灭活时间。灭活动力学曲线参见图 2。

表 2 不同浓度 β -丙内酯灭活 SARS 病毒时间

β -丙内酯浓度	灭活前 CCID50/ml	斜率	推算灭活时间 (hr)
1: 4000	7.2	-2.4	2.9
1: 6000	7.2	-1.025	7.2
1: 8000	7.2	-0.63	11.6

实施例 2 在规模化制备 SARS 病毒的细胞工厂中原位灭活 SARS 病毒

在本发明中还可以在规模化制备 SARS 病毒的细胞工厂中原位灭活 SARS 病毒。

将制备好的灭活剂, 即经 1: 100 (体积比) 稀释的福尔马林溶液, 等量加入盛有待灭活 SARS 病毒的细胞工厂 (购自丹麦 NUNC 公司) 内, 混匀, 在搅拌下, 经 37℃ 原位灭活 2.9~12.5 小时后收获。

或者当采用 β -丙内酯溶液作为灭活剂时, 将 1: 10 稀释后加入, 使

得 β -丙内酯溶液与总样品体积比为 1: 6000 ~ 1: 8000。灭活温度 2 ~ 8 °C 16 ~ 24 小时。

实施例 3 SARS 病毒超时灭活或二次灭活

1) 对由实施例 2 所得采用福尔马林为灭活剂处理得到的病毒灭活液，将其在与如实施例 2 所述相同的灭活条件下以首次灭活时间的 3 倍进行超时灭活。

2) 对由实施例 2 所得采用 β -丙内酯为灭活剂处理得到的灭活病毒液，进行二次灭活。再次加入与病毒样品总体积比为 1: 4000-1: 6000 (为两次加 β -丙内酯工作浓度之和) 的量进行二次灭活，第二灭活条件是在 2-8 °C 下灭活 SARS 病毒 16-24 小时，室温作用 2 天或 37 °C 水浴作用 2 小时，以将 SARS 病毒彻底灭活。

实施例 4 灭活 SARS 病毒的纯化

将如实施例 3 所得病毒灭活液进行如下操作，以纯化所得病毒灭活液：

1) 离心澄清，即以 2000 ~ 4000g 离心力在 2-8 °C 离心 10 ~ 35 分，吸上清，得到病毒澄清液；

2) 超滤浓缩：将病毒澄清液用 100-500kd (截留分子量) 的膜包进行超滤浓缩 10 倍以上，等体积透析 3-7 次，透析液用 0.01M PBS (pH7.0 ~ 7.6)，获得病毒超滤液；滤出的称为超滤滤过液；

3) 柱层析：将病毒超滤液用 Sepharose four fast flow 进行层析，收集第一穿流峰即为病毒纯化液。洗脱液 0.01M PBS。层析第二峰称为纯化二峰。

或者，将如实施例 3 所得病毒灭活液进行如下操作，以纯化所得病毒灭活液：

1) 将病毒灭活液进行离心澄清，具体的以 2000 ~ 4000g 离心力在 2-8 °C 离心 10 ~ 35 分，吸上清，即为病毒澄清液；

2) 超滤浓缩：将病毒澄清液用 100-500kd (截留分子量) 的膜包进

行超滤浓缩 10 倍以上,等体积透析 3-7 次,透析液用 0.01M PBS (pH7.0~7.6) 获得病毒超滤液;

3) 向步骤 2) 所经纯化的灭活病毒液中加入终浓度 10-100 单位 Benzonase (默克公司), 1-10mM Mg^{2+} 室温处理 4 小时以上, 消化体系中 Vero 细胞残留 DNA 和体系的 RNA; 消化体系中 Vero 细胞残留 DNA;

4) 再次超滤;

5) 柱层析: 将病毒超滤液用 Sepharose four fast flow 进行层析, 洗脱液 0.01M PBS, 收集第一穿流峰即为病毒精纯液。

或者, 将如实施例 3 所得病毒灭活液进行如下操作, 以纯化所得病毒灭活液:

1) 将病毒灭活液进行离心澄清, 具体的以 2000~4000g 离心力在 2-8℃ 离心 10~35 分, 吸上清, 即为病毒澄清液;

2) 超滤浓缩: 将病毒澄清液用 100-500kd (截留分子量) 的膜包进行超滤浓缩 10 倍以上, 等体积透析 3-7 次, 透析液用 0.01M PBS (pH7.0~7.6) 获得病毒超滤液;

3) 柱层析: 将病毒超滤液用 Sepharose four fast flow 进行层析, 洗脱液 0.01M PBS, 收集第一穿流峰;

4) 向步骤 3) 中收集的经纯化的灭活病毒液中加入终浓度 10-100 单位 Benzonase (默克公司), 1-10mM Mg^{2+} 室温处理 4 小时以上, 消化体系中 Vero 细胞残留 DNA 和体系的 RNA;

5) 再次超滤, 获得病毒精纯液。

将 SARS 病毒精纯液用作制备高效价抗体的免疫原和反向间接血凝试验的阳性对照。

将经过实施例 1-3 所述方法灭活的病毒灭活液依照实施例 4 所述方法纯化后, 将所得病毒纯化液进一步经过如下处理: 将病毒精纯液用选自 0.2 μm 滤器或 4-10 千戈瑞剂量的钴 60 照射样品 (体积不限) 60 分钟, 除菌, 获得疫苗原液。

实施例 5 高效价 SARS 病毒抗体的制备

1. SARS 抗原免疫兔血清

用北京科兴纯化的 SARS 病毒抗原免疫家兔，采用 0, 14, 21 天三针免疫程序，将纯化 SARS 抗原与弗氏完全佐剂（鼎国生物）等比混合后，2ml/次/只，后肢肌肉注射，28 天采血，分离出血清。经 56℃，30min 灭活后，2-8℃ 保存备用。

2. SARS 抗原免疫猴血清

用北京科兴纯化的 SARS 抗原免疫猴，采用 0, 14, 21 天三针免疫程序，1ml/次/只，后肢肌肉注射，28 天采血，分离出血清。经 56℃，30min 灭活后，2-8℃ 保存备用。

3. 血清中 IgG 提取方法

用蛋白 A 法提取 SARS 抗体阳性血清中的 IgG。

(1) 加入 1/10 体积的 1.0mol/L Tris (pH8.0)，调含抗体样品的 pH 值至 8.0。

(2) 将抗体溶液通过蛋白 A (Protein A SepharoseTM CL-4B, Amersham) 微球柱，流速 0.5ml/min。

(3) 用 10 倍柱体积的 100mmol/L Tris (pH8.0) 洗涤微球。

(4) 用 10 倍柱体积的 10mmol/L Tris (pH8.0) 洗涤微球。

(5) 用 50mmol/L 甘氨酸 (pH3.0) 洗脱微球柱，根据 OD280 值收集蛋白，即得纯化的 IgG (酶标 1:100)。

实施例 6 敏化红细胞的制备

单醛化

取人“O”型红细胞（购自北京市红十字血液中心），用生理盐水洗涤 6 次，用 0.15mol/L, pH7.2PBS 配成 10%（体积比）红细胞悬液。缓

慢加入等体积 1% (体积比) 戊二醛, 室温振荡 30 分钟。如上所述洗涤 6 次, 配成 10% (体积比, 下同) 红细胞悬液。

双醛化

10% 单醛化红细胞悬液中加入百分之一体积的甲醛溶液 (38%), 37℃ 作用 1 小时, 15 分钟摇一次。用生理盐水洗涤 6 次。用 0.15mol/L, pH7.2 PBS 配成 10% 红细胞悬液。加入终浓度 1: 10000 (质量比) 的 NaN_3 , 2-8℃ 保存备用。

敏化红细胞

取双醛化红细胞, 用 1: 20000 (质量比) 等体积新鲜配制鞣酸 37℃ 作用 15 分钟, 洗涤 1 次, 配制成 2.5% 红细胞悬液。

将 SARS 病人恢复期血清、SARS 抗原免疫猴血清、SARS 抗原免疫兔血清提取的 IgG (以下简称人 IgG、猴 IgG、兔 IgG) 按蛋白浓度稀释, 用 0.15mol/L pH6.4 的 PBS 稀释为适宜的致敏浓度。

4 倍体积 0.15mol/L pH6.4 的 PBS, 1 倍体积 IgG, 1 倍体积 2.5% 鞣化红细胞混合均匀后, 室温振荡结合 1 小时。用 1% 灭活正常兔血清-PBS 洗涤 2 次, 然后用 0.15mol/L pH7.2 的 PBS 配成 1.25% 的致敏红细胞, 4℃ 保存备用。或加入终浓度为 10% (质量比) 蔗糖和万分之三 (体积比) 吐温-20 的保护剂, 冻干备用。

实施例 7 反向间接血凝方法的建立

反向间接血凝试验

1. 方法: 取洁净的 96 孔 “V” 型微量血凝板。将样品稀释液加于血凝板各孔中, 30 μl /孔。取待检的 SARS 抗原 30 μl , 从第 1 孔起顺序作倍比稀释。最后 1 孔留作空白对照。取阳性对照 30 μl , 从另一排的第 1 孔起顺序作倍比稀释。各孔中加入致敏红细胞悬液 (使用以前一定要摇匀) 30 μl , 室温静置 1-2 小时, 判定结果。

2. 结果判定: 100% 红细胞凝集为++++; 孔底均匀铺满一层红细胞; 75% 红细胞凝集为+++; 边缘滑下; 50% 红细胞凝集为++; 呈环状, 周围有凝集颗粒; 25% 红细胞凝集为+; 沉在孔底的红细胞周围有凝集颗粒。阴

性（—）：红细胞沉在孔底，呈圆点，周围光滑。以 50%凝集为终点。

阳性对照、阴性对照成立，实验成立。

3. 结果计算方法：

将结果整理为可判定结果孔的高一个稀释度为阴性，低一个稀释度为++++。根据可判定结果孔的四种凝集情况计算最终的血凝效价。血凝效价计算方法见表一。

表一：血凝效价计算方法

病毒稀释度 (C=2B=2A)			血凝效价 (1:)
1: A	1: B	1: C	
++++	+++	—	B ×5/4
++++	++	—	B
++++	+	—	B ×7/8
++++	—	—	(A+B) /2

血凝抑制试验

取洁净的 96 孔 “V” 型微量血凝板。将样品稀释液、4%阳性血清稀释液、4%阴性血清稀释液，加于血凝板各孔中，30 μl/孔，各一排。取待检的 SARS 抗原样品 30 μl，从每排第 1 孔起顺序作倍比稀释。最后 1 孔留做空白对照。取阳性对照 30 μl，从另一组每排的第 1 孔起顺序作倍比稀释。37℃作用半小时，各孔中加入致敏红细胞悬液（红细胞使用以前一定要摇匀）30 μl，室温静置 1-2 小时，判定结果。结果判定标准同反向间接血凝试验。

结果

1. 比较不同提纯 IgG 的致敏效果

人 IgG、猴 IgG、兔 IgG 致敏红细胞后，检测 SARS 病毒抗原对照。兔 IgG 测 SARS 病毒抗原对照为 1: 56，人 IgG 为 1: 2，猴 IgG 为 1: 3。结果见表二。选择兔 IgG 用于致敏。

表二：不同 IgG 致敏效果比较

IgG 类型	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	结果
人 IgG	++	—	—	—	—	—	—	1:2
兔 IgG	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	1:56
猴 IgG	++++	—	—	—	—	—	—	1:3

2. 比较不同批红细胞 IgG 的致敏浓度

20030811 批、20030923 批人 “O” 型红细胞分别用兔 IgG 致敏，检测 SARS 病毒抗原对照，比较最佳致敏浓度。

20030811 批红细胞的最佳致敏浓度为 0.1mg/ml，20030923 批红细胞的最佳致敏浓度为 0.2mg/ml，结果见表三。不同批红细胞的最佳 SARS 抗体致敏浓度不同。不是致敏浓度越大或越小就越好，每批红细胞都有一个最佳致敏浓度。

表三：不同批红细胞 IgG 的致敏浓度比较

红细胞 批号	IgG 致敏浓度 (Pr:mg/ml)	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	结果
20030811	0.1	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	1:64
20030923	0.2	++++	++++	++++	++++	++++	+	—	1:56

3. SARS 病毒抗原对照

反向间接血凝方法建立过程中，用 SARS 病毒抗原对照跟踪比较了每一批敏化红细胞。用多批兔 IgG 敏化红细胞检测 SARS 病毒抗原对照，结果都在 1:32 以上。结果见表四。敏化红细胞检测 SARS 病毒抗原对照效价在 1:32 以上，可确定该批敏化红细胞为合格批。

表四：不同批敏化红细胞检测 SARS 病毒纯化液结果

敏化红细胞 批号	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	结果
20030816	++++	++++	++++	++++	++	—	—	—	1:32
20030821	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	1:128
20030828	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	1:96
20031005	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	—	1:80
20031009	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—	1:64

平均值: 1:56

4. 血凝抑制

阳性血清稀释液和阴性血清稀释液同时检测抗原对照、Vero 细胞冻融液和 Vero 蛋白纯化液，并与样品稀释液的检测结果作对比。

样品稀释液检测抗原参比品为 1:32, Vero 细胞冻融液为 1:10, Vero 蛋白纯化液为阴性。4 份阳性血清都能抑制抗原参比品中的 SARS 病毒抗原，4 份阴性血清都不能抑制。4 份阳性血清和 4 份阴性血清对 Vero 细胞冻融液都未出现抑制。结果见表五和表六。

表五：阴阳性血清抑制 SARS 病毒纯化液检测结果

血清及浓度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	结果
样品稀释液	++++	++++	++++	++++	++	—	1:32
STS-D-京 05	++++	—	—	—	—	—	1:3
STS-D-京 06	++++	++++	—	—	—	—	1:6
STS-D-张 01(2)	++++	++	—	—	—	—	1:4
STS-D-张 03	++++	+	—	—	—	—	1:3.5
人阴性血清-1	++++	++++	++++	++++	++	—	1:32
人阴性血清-2	++++	++++	++++	++++	++	—	1:32
人阴性血清-3	++++	++++	++++	++++	++	—	1:32
人阴性血清-4	++++	++++	++++	++++	+++	—	1:40

表六： 阴阳性血清抑制 Vero 细胞冻融液检测结果

血清及浓度	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	结果
样品稀释液	++++	++++	+++	—	—	1:10
STS-D-京 05	++++	++++	+++	—	—	1:10
STS-D-京 06	++++	++++	+++	—	—	1:10
STS-D-张 01 (2)	++++	++++	+++	—	—	1:10
STS-D-张 03	++++	++++	+++	—	—	1:10
人阴性血清-1	++++	++++	+++	—	—	1:10
人阴性血清-2	++++	++++	+++	—	—	1:10
人阴性血清-3	++++	++++	+++	—	—	1:10
人阴性血清-4	++++	++++	++++	—	—	1:12

样品中所含 Vero 细胞的蛋白量较高时，检测过程中会出现非特异反应，这种非特异反应可通过增加 SARS 病人恢复期血清的抑制而确定。随着 Vero 细胞蛋白量的下降，非特异反应消失。

每次检测样品时，增加阳性血清的抑制。样品稀释液检测待检 SARS 抗原血凝效价 $\geq 1:8$ ，抑制后结果较抑制前低 4 倍时判定 SARS 抗原阳性。未出现阳性血清抑制，判定为 SARS 病毒抗原阴性。

实施例 8 反向间接血凝方法的应用

1. 检测 Sino1 株和 Sino3 株毒种制备的 SARS 灭活疫苗不同工序阶段产品，结果见表七。

表七：不同毒株的工序产品血凝效价

毒种	工艺产品	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	结果	抑制结果
								8		
Sino 1株	SARS 病毒灭活液	++++	++++	++++	++++	+++	—	—	1:40	1:4
	SARS 病毒纯化液	++++	++++	++++	++++	++++	+	—	1:56	1:6
	SARS 病毒纯化二峰	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sino 3株	SARS 病毒灭活液	++++	++++	++++	++++	++	—	—	1:32	1:3
	SARS 病毒纯化液	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	1:64	1:8
	SARS 病毒纯化二峰	—	—	—	—	—	—	—	—	—

2. 检测 SARS 病毒抗原参比品

20031009 批冻干敏化红细胞多次检测 SARS 病毒抗原参比品，阳性血清对 SARS 病毒抗原参比品的抑制结果低于抑制前四倍以上，SARS 病毒抗原参比品的血凝效价定为 1:75。结果见表八。

表八：SARS 病毒抗原参比品血凝效价

1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	结果
++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	1:96
++++	++++	++++	++++	++++	++	—	1:64
++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	1:80
++++	++++	++++	++++	++++	+	—	1:56
++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	1:80

平均值：1:75

3. 检测 SARS 疫苗原液

检测 20030709 批、20030904 批、20030906 批和 20030922 批 SARS 疫苗原液的血凝效价，分别为 1: 32、1: 22、1: 3 和 1: 28。结果见表九。

表九：四批 SARS 疫苗原液的血凝效价

疫苗原液批号	血凝效价（1: ）
20030709 批	32
20030904 批	22
20030906 批	3
20030922 批	28

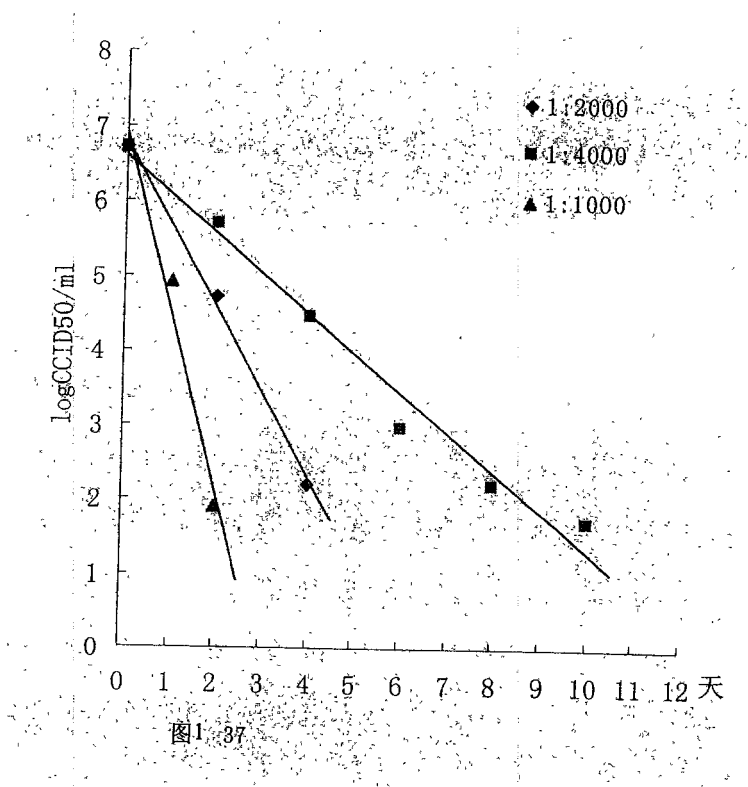


图1

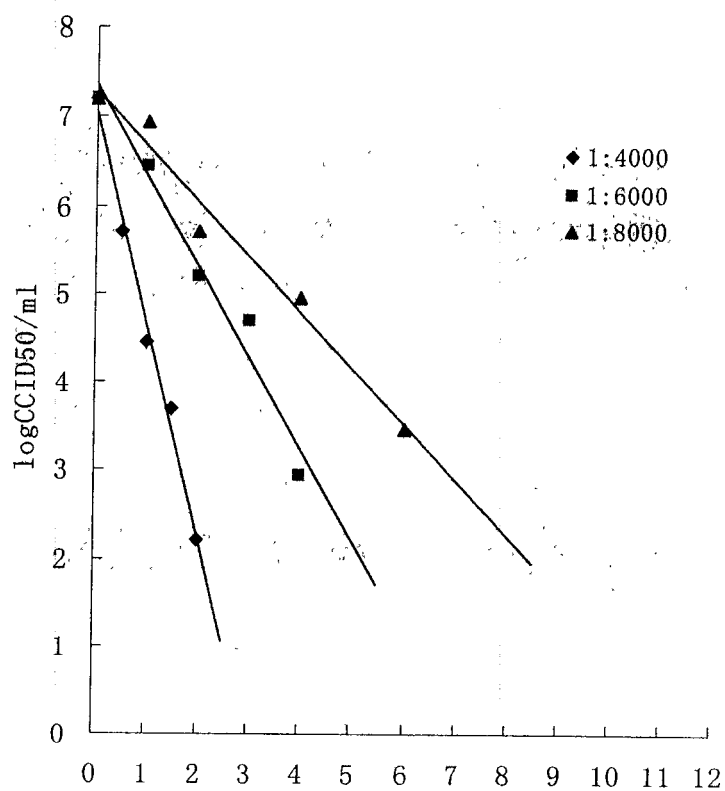


图 2

专利名称(译)	用于重度急性呼吸综合症病毒抗原检测的方法		
公开(公告)号	CN1621416A	公开(公告)日	2005-06-01
申请号	CN200310115244.6	申请日	2003-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	北京科兴生物制品有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京科兴生物制品有限公司		
[标]发明人	高强 张建三 李静 李晶 胡良湘 李淑芬 公雪杰 尹卫东		
发明人	高强 张建三 李静 李晶 胡良湘 李淑芬 公雪杰 尹卫东		
IPC分类号	C07K16/10 G01N33/53 G01N33/569 C12N5/06		
代理人(译)	唐伟杰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明主要涉及SARS病毒抗原的检测。具体的，本发明涉及SARS病毒抗体、抗SARS病毒IgG致敏红细胞、它们的制备方法、和SARS病毒抗原检测方法和试剂盒等。本发明通过反向间接血凝法来检测SARS病毒抗原。反向间接血凝法是用抗 - SARS病毒IgG(例如兔抗 - SARS病毒IgG)致敏的红细胞(例如人“O”型红细胞)检测待检样品中的SARS病毒抗原。反向间接血凝法可用于检测SARS灭活疫苗制备过程中的SARS病毒抗原含量。

