

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/569

G01N 33/533



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03124299.5

[43] 公开日 2003 年 10 月 1 日

[11] 公开号 CN 1445549A

[22] 申请日 2003.5.9 [21] 申请号 03124299.5

[71] 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

地址 100071 北京市丰台区东大街 20 号

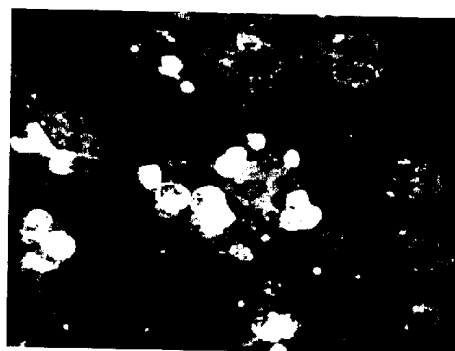
[72] 发明人 祝庆余 秦鄂德 杨保安 司炳银
于曼 刘洪 吕富双

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 1 页

[54] 发明名称 一种检测 SARS 病毒抗体的试剂盒，其制备方法及其用途

[57] 摘要

本发明公开了一种检测 SARS 病毒抗体的试剂盒，其制备方法及其用途。本发明将感染 SARS 病毒的细胞固定在玻片上制成抗原片，采用间接免疫荧光法原理检测人血清标本中 SARS 病毒抗体，为非典型肺炎的临床诊断提供参考。本发明的试剂盒具有使用简便，快捷，灵敏度和特异性高，稳定性好的优点，有着广阔的市场前景。



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

1、一种检测 SARS 病毒抗体的试剂盒，包括以下部分：

SARS 病毒感染细胞抗原片

SARS 病毒抗体阳性对照血清

正常人血清阴性对照

抗人荧光素标记抗体

荧光抗体稀释液

标本血清稀释液

2、制备权利要求 1 所述的试剂盒的方法包括以下步骤：

SARS 病毒感染细胞抗原片的制备；

SARS 病毒抗体阳性对照血清的制备；

正常人血清阴性对照的制备；

抗人荧光素标记抗体的制备。

3、根据权利要求1所述的试剂盒，其中的所述的SARS病毒为严重急性呼吸系统综合征（SARS）的病原体，为一种或多种新的冠状病毒。

4、根据权利要求1所述的试剂盒，其中的所述的抗人荧光素标记抗体为抗人IgG抗体或抗人IgM μ 链抗体。

5、根据权利要求1所述的试剂盒，其中所述的SARS病毒抗体为抗SARS病毒IgG抗体或IgM抗体。

6、根据权利要求 2 所述的方法，其中 SARS 病毒感染细胞抗原片的制备包括以下步骤：

(1) 制备 SARS 病毒感染细胞悬液；

(2) 将细胞悬液滴加在镀膜玻片上培养；

(3) 洗去悬浮细胞，晾干；

(4) 固定、晾干、密封后-20℃冻存。

7、根据权利要求2所述的方法，其中SARS病毒抗体阳性对照血清的制备包括以下步骤：选用经灭活处理后的SARS病毒IgG或IgM抗体阳性血清，按适当的比例稀释混匀。

8、根据权利要求2所述的方法，其中正常人血清阴性对照的制备包括以下步骤：选用经灭活处理后的SARS病毒抗体阴性血清，按适当的比例稀释。

9、根据权利要求2所述的方法，其中抗人荧光素标记抗体的制备包括以下步骤：

(1) 抗人荧光素标记抗体的制备；

(2) 抗人荧光素标记抗体的纯化。

10、根据权利要求1所述的试剂盒在检测人血清标本中SARS病毒抗体中的应用。

一种检测 SARS 病毒抗体的试剂盒，其制备方法及应用

技术领域

本发明涉及一种检测 SARS 病毒抗体的试剂盒，还涉及其制备方法及应用。

背景技术

免疫荧光技术 (immunofluorescence technic) 是根据抗原抗体反应具有高度的特异性，以荧光色素 (常用的有异硫氰酸荧光黄 fluorescein isothiocyanate, FITC 和罗丹明 Lissamine rhodamine B, RB₂₀₀) 作为标记物，与已知抗体结合，但不影响其免疫学特性。然后将荧光素标记的抗体作为标准试剂，用于鉴定未知的抗原，可在荧光显微镜下检查呈现荧光的特异性抗原抗体复合物及其存在部位。因此，免疫荧光技术是将免疫反应的特异性与灵敏性和显微镜术的精确性相结合，成为现代医学和生物学研究中广泛应用的标记免疫检测方法之一。荧光抗体法在医学实践中主要用于各类病原微生物快速诊断，以及组织切片中特异性抗原的检测。在理论研究方面，本法可在细胞水平上直接观察和鉴定抗原或抗体、或抗原抗体复合物。因此，在微生物学、免疫学、生物学、肿瘤学、内分泌学、变态反应及自身免疫性疾病的基础理论研究及临床诊断等方面也被广泛采用。

根据抗原抗体反应的不同安排，荧光抗体技术有下列三种方法。

(一) 直接法：这是荧光抗体技术基本的方法。滴加荧光抗体于待检标本上，一定时间后，用缓冲液充分冲洗，然后在显微镜下观察。若有相应的抗原存在。即与荧光标记的抗体结合，在镜下可见有荧光的抗原抗体复合物。

本法优点是特异性高，受非特异荧光干扰少。缺点是每检查一种抗原，必须制备与其相应的荧光标记抗体，且灵敏度较低。

（二）间接法：系根据抗球蛋白试验的原理。用荧光色素标记抗球蛋白抗体（或称抗抗体）。试验过程分为两部：第一步，将未标记的抗体加到有抗原的标本片上，作用一定时间后，洗去未结合的抗体；第二步，加入荧光素标记的抗球蛋白抗体，如果第一步中的抗原抗体已发生结合，此时加入的标记抗抗体就和已固定在抗原上的抗体分子（已知的未标记的）发生结合，形成抗原—抗体—标记抗抗体复合物。本法的优点是灵敏度高于直接法，而且只需制备一种荧光色素标记的抗球蛋白抗体，即可用于检测同种动物的多种抗原抗体系统，可用来检测抗原和抗体。

（三）补体法：这是间接荧光抗体法的一种变型。系利用补体结合反应的原理，用荧光色素标记抗补体抗体（常用抗豚鼠补体 C3 的荧光抗体）。试验过程也可分为两步：第一步，将未标记的抗体和补体加到抗原标本片上，作用一定时间后，洗去游离的抗体和补体；第二步，加上荧光色素标记的抗补体抗体，如果在第一步中抗原抗体发生特异的结合，则补体被固定，此时加入标记的抗补体抗体，即与补体发生结合，形成抗原—抗体—补体—标记的抗补体抗体的大分子免疫复合物。

本发明中的 SARS 病毒是指严重急性呼吸系统综合征（SARS）的病原体，它是最近出现的一种新病毒，为冠状病毒的变种，与已知的冠状病毒基因序列的同源性约为 60%，但在抗原性上二者没有交叉。所以虽然正常人群中存在已知的冠状病毒的抗体，但对此种病毒却没有保护作用，导致人群的普遍易感。此病毒引发严重的呼吸系统疾病，病死率目前在 5% 左右，严重危害人类的健康，世界卫生组织将其定义为严重急性呼吸系统综合征，我国称之为“非典型肺炎”。目前在世界数十个国家已经发现了此病，感染人数达数千人，并有继续蔓延的趋势。因此快速检测 SARS 病毒感染的方法对于 SARS 的

诊断，控制疾病的蔓延有重要意义。

到目前为此，尚无间接免疫荧光技术用于检测 SARS 病毒感染的报道。

发明内容

本发明的目的是提供一种用于人血清标本中 SARS 病毒抗体的快速检测试剂盒。

本发明提供的试剂盒包含以下内容：

SARS 病毒感染细胞抗原片

SARS 病毒抗体阳性对照

正常人血清阴性对照

抗人荧光素标记抗体

荧光抗体稀释液

标本血清稀释液

试剂盒使用说明书

本发明公开的试剂盒系用正常 Vero E₆ 细胞感染 SARS 病毒经培养后，将感染细胞固定在 10 孔镀膜玻片后制成抗原片，采用间接免疫荧光法原理检测人血清标本中 SARS 病毒抗体。其中 SARS 病毒为严重急性呼吸系统综合征（SARS）的病原体，为一种或多种新的冠状病毒；抗人荧光素标记抗体为抗人 IgG 抗体或抗人 IgM μ 链抗体；SARS 病毒抗体为抗 SARS 病毒 IgG 抗体或 IgM 抗体。

本发明中各成分的含量可根据实际需要加减，检测一定人份数的标本。如 SARS 病毒感染细胞抗原片 5 张，SARS 病毒抗体阳性对照 100 μ l，正常人血清阴性对照 100 μ l，抗人荧光素标记抗体 30 μ l（抗人 IgG 抗体）或 40 μ l（抗人 IgM μ 链抗体），荧光抗体稀释液 1000 μ l，标本血清稀释液 2000 μ l 可检测 20 人份的血清标本。

本发明的另一个目的是提供该试剂盒的制备方法。

试剂盒中各成分的制备方法如下：

SARS 病毒感染细胞抗原片：将 SARS 病毒感染的细胞培养液稀释并接种 Vero E₆ 细胞，吸附后加入维持液培养。显微镜下观察 CPE，当有细胞出现 CPE 时，制成细胞悬液。

将细胞悬液滴加在镀膜玻片上，培养后漂洗去除悬浮细胞，晾干。-20℃ 丙酮固定后晾干、密封，-20℃ 冻存。

SARS 病毒抗体阳性对照血清：选用经灭活处理后的 10 份 SARS 病毒 IgG 或 IgM 抗体阳性血清混合，按适当的比例稀释阳性血清并混匀，-20℃ 冻存。

正常人血清阴性对照：选用经灭活处理后的 10 份 SARS 病毒抗体阴性血清混匀后，按适当的比例稀释阴性血清，-20℃ 冻存。

抗人荧光标记抗体：FITC 荧光素标记用抗人 IgG 或 IgM μ 链抗体经检定合格后，采用直接法进行荧光素标记，然后将 FITC 标记抗体进行纯化，并进行浓度选择。

荧光抗体稀释液：采用伊文思兰，加入蒸馏水配制。

标本血清稀释液：为 PBS 溶液。

SARS 病毒抗体免疫荧光检测试剂盒使用说明书。（详见实施例）

将上述各成分装于外包装盒中，组成整个试剂盒。

本发明中的试剂盒的制备按中国《药品生产质量管理规范》要求实施，具有阳性血清处理、分装的隔离实验室。

本发明公开的原料及辅料符合现行《中国生物制品主要原辅料质控标准》要求，未纳入上述标准的化学试剂，不低于分析纯。

本发明还有一个目的，就是公开该试剂盒在检测人血清中 SARS 病毒抗体上的应用。通过一百余例的临床病例检测，本发明的试剂盒检测时间短，使用方便，灵敏度高、特异性好，易于保存。在 SARS 病毒的检测上，具有良好

的市场前景和社会效益。

附图说明

图 1 为 SARS 病毒感染细胞抗原片的示意图。

图 2 为 SARS 病毒感染细胞间接免疫荧光法染色结果，图中的细胞胞浆内形态特异的白色部分（实际观察中为黄绿色）即为荧光素标记抗体的特异染色部位。

具体实施方式

实施例一 SARS 病毒抗体免疫荧光检测试剂盒组成

SARS 病毒 IgG 抗体检测试剂盒（20 人份）组成如下：

SARS 病毒感染细胞抗原片	5 张
SARS 病毒抗体阳性对照	100 μ l
正常人血清阴性对照	100 μ l
抗人 IgG 荧光素标记抗体	30 μ l
荧光抗体稀释液	1000 μ l
标本血清稀释液	2000 μ l
试剂盒使用说明书	1 份
外包装盒	1 个

SARS 病毒 IgM μ 链抗体检测试剂盒（20 人份）组成如下：

SARS 病毒感染细胞抗原片	5 张
SARS 病毒抗体阳性对照	100 μ l
正常人血清阴性对照	100 μ l
抗人 IgM μ 链荧光素标记抗体	40 μ l
荧光抗体稀释液	1000 μ l
标本血清稀释液	2000 μ l

试剂盒使用说明书	1 份
外包装盒	1 个

实施例二 SARS 病毒抗体免疫荧光检测试剂盒的制备

一、SARS 病毒感染细胞抗原片的制备

SARS 病毒：从广州非典型肺炎病人尸解肺组织中新分离的 SARS 病毒 GZ1 株。

SARS 病毒鉴定：采用细胞培养和乳鼠接种法，从非典型肺炎病例标本中分离致病病原体，通过电镜形态学、血清学和动物致病性观察及 RT-PCR 扩增、基因序列分析对分离的病原体进行鉴定。

细胞：为 Vero E₆ 细胞，经无菌检测合格后使用。

10 孔镀膜玻片经处理并检定合格后使用。

首先制备 SARS 病毒感染细胞悬液：将 SARS 病毒感染的细胞培养液稀释为 10^{-2} ，取 1.0 毫升接种 Vero E₆ 细胞 37℃ 吸附 1h 后加入维持液，37℃ 培养。显微镜下观察 CPE，当有 25% 细胞出现 CPE 时，制成细胞悬液，细胞浓度为 10^7 个 / ml。

将细胞悬液滴加在镀膜玻片上 20μl / 孔，37℃ 培养 6h，用 PBS 漂洗去除悬浮细胞，晾干，-20℃ 丙酮固定 4h 后晾干、密封，-20℃ 冻存储备用。

抗原片每孔应均有细胞，无漏空，细胞分布均匀。

二、抗人荧光素标记抗体（FITC 荧光素标记）的制备

1. 荧光素标记用抗人抗体 IgG (或 IgM μ 链) 经检定合格后用于荧光素标记。抗人抗体的纯度用 SDS-PAGE 测定，在上样量为 10μg 条件下应为一条带。

2. 来源：FITC (异硫氰酸荧光素) 购自 Sigma 公司。

3. 标记方法：采用直接法进行荧光素标记。

3.1 步骤:

3.1.1 以 0.01mol/l pH7.1 PBS 调整蛋白浓度到 20mg/ml, 放于称量瓶中;

3.1.2 取相当于蛋白量 1/100 的 FITC, 溶解于相当蛋白溶液 1/10 体积的 0.5mol/l, pH9.5 碳酸盐缓冲液;

3.1.3 在搅拌条件下将 FITC 缓慢的加入 IgG (或 IgM μ 链) 蛋白液内, 室温 20℃左右。磁力搅拌标记 4h;

3.1.4 将标记溶液对 10~50 倍 PBS 充分透析 2~4h。

4. FITC 标记抗体的纯化:

4.1 步骤:

4.1.1 Sephadex G-50 凝胶过滤去除游离 FITC;

4.1.1.1 层析柱: 2×30cm 玻璃层析柱, 柱内底部垫尼龙网;

4.1.1.2 洗脱液: 0.01mol/l pH7.1 PBS;

4.1.1.3 流速: 0.1~1ml/min;

4.1.1.4 加样量: 凝胶柱床体积的 10~15%;

4.1.1.5 当样品加入到柱中后将在柱中被分为三个区带, 柱上部荧光区带为结合 FITC 较强的蛋白及游离 FITC; 中部为无色的洗脱液; 柱下部为 FITC 标记的抗体, 收集这部分即是荧光素标记抗体。

4.1.2 DEAE-纤维素柱层析纯化标记 IgG (或 IgM μ 链)

4.1.2.1 层析柱: 要求同上, 内装充分容涨及平衡的纤维素 (根据需要装柱床体积)。

4.1.2.2 洗脱液: 0.01mol/l pH 7.1 PBS;

4.1.2.3 流速: 1ml/min;

4.1.2.4 加样量: 根据纤维素的蛋白吸附容量计算。

4.1.2.5 洗脱时, 将柱中第一个色带 (标记抗体) 洗脱完毕为止。

4.2 保存: -20℃。

5. 荧光素标记抗体的外观检定：黄绿色、澄清、无混浊、无沉淀。

6. FITC 标抗体的浓度选择：FITC 标抗体分别在 1:20~1:640 的范围进行滴定，根据滴定结果确定 FITC 标记抗体的浓度，选择荧光亮度及形态均好的浓度作为使用浓度。

三、荧光抗体稀释液的制备

准确称取 0.2g 伊文思兰，加入蒸馏水配制成为 0.2%储存液。使用时稀释至 0.02%，室温保存备用。

四、标本血清稀释液的制备

0.005mol/l PBS pH 7.2（配方为：NaCl 29.2g， $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3.9g， Na_2HPO_4 7.1g，加蒸馏水至 5000ml）

五、阳性对照血清的制备

选用经 56℃ 30min 灭活处理后的 10 份 SARS 病人抗体阳性血清混合，按适当的比例稀释阳性血清混匀后，-20℃冻存备用。

六、阴性对照血清的制备

选用经 56℃ 30min 灭活处理后的 10 份 SARS 病毒抗体阴性血清混匀后，按适当的比例稀释阴性血清，-20℃冻存备用。

七、反应时间的确定

选用三份 SARS 病人抗体阳性血清和一份阴性血清，分别在不同的反应时间进行反应。当检测待检样品 IgG 时，37℃孵育 30min，病人血清中 IgG 抗体与病毒抗原达最大结合状态，故确定 30min 为最佳反应时间。当检测待检样品 IgM 时，病人血清中 IgM 抗体与病毒抗原 37℃孵育 2h 达最大结合状态，故确定 2h 为最佳反应时间。

八、阴性参考品符合率

10 份阴性参考品不得出现假阳性。

九、阳性参考品符合率

10 份阳性参考品不得出现假阴性。

十、无菌试验

液体组分在加入防腐剂前，抽样进行无菌试验。

十一、稳定性试验

试剂各组在-20℃放置 24 个月。

十二、分装

各组分检定合格后进行分装，贴签。

十三、组装

按试剂盒组成成分组装。

实施例三 SARS 病毒抗体免疫荧光检测试剂盒使用说明书

本发明的 SARS 病毒抗体免疫荧光检测试剂盒其使用说明书包括以下内容：

一、用途与原理

用于病人血清中 SARS 病毒特异 IgG（或 IgM）抗体检测，为非典型肺炎的临床诊断提供参考。

本试剂盒利用免疫荧光抗体技术，通过荧光显微镜进行结果判断。

二、试剂盒内容

SARS 病毒感染细胞抗原片	5 张
SARS 病毒抗体阳性对照	100 μ l
正常人血清阴性对照	100 μ l
抗人 IgG（或 IgM μ 链）荧光素标记抗体	30 μ l(40 μ l)
荧光抗体稀释液	1000 μ l
标本血清稀释液	2000 μ l
试剂盒使用说明书	1 份

SARS 病毒感染细胞抗原片示意图见附图 1。

三、操作步骤

1. 首先将待检病人血清标本用血清标本稀释液进行 1:10 稀释，然后，56℃ 30min 灭活。

2. 将 SARS 病毒抗原片取出，室温放置 5min，使抗原片温度与室温平衡。

3. 将灭活后的待检病人血清再倍比稀释，使之成为 1:20。每份标本血清取 1:10 和 1:20 两个稀释度，每个稀释度取 10 μ l，分别滴加在抗原片的不同孔上（如图 1 所示）。

4. 置玻片于湿盒中 37℃ 作用 30min（检测 IgM 时作用 2h）。将玻片取出，自来水冲洗，晾干。

5. 用荧光抗体稀释液将标记的抗人 IgG 荧光抗体进行 1:40（检测 IgM 时作用 1:20）稀释，然后滴加到抗原片上，每孔 10 μ l。

6. 置玻片于湿盒中 37℃ 作用 30min。冲洗同前，晾干。

7. 荧光显微镜下观察染色结果。根据胞浆或胞膜部位有无特异荧光染色来判断结果，如图 2 所示。

8. 检测要同时设阳性血清和阴性血清对照。

9. 结果判断：胞浆或胞膜部位有特异荧光染色为阳性，无特异荧光为阴性。阳性可依据荧光亮度和阳性细胞的多少综合判定分别记为“+~++++”，阴性记为“-”。

四、注意事项

1. 要自备 2—20 μ l 和 20—200 μ l 移液器各一支。

2. 荧光抗体要根据每次需要量现稀释。

3. 染色操作中，在往抗原片上滴加标本血清和标记抗体时，注意不要划掉玻片上的细胞。

4. 染色过程中，滴加样品时应防止液体外溢和干燥，冲洗要彻底。

5. 荧光显微镜下观察时要仔细，防止漏掉弱阳性，同时要注意区别非特异荧光颗粒与特异荧光染色。

五、规格：20 人份

六、储藏：-20℃保存

七、有效期：2 年

八、制造单位：军事医学科学院微生物流行病学研究所

实施例四 SARS 病毒抗体免疫荧光检测试剂盒临床使用效果

将各医院临床诊断为非典型肺炎病人的血清标本采用本发明的试剂盒进行 IgG/IgM 检测，结果如下表。

间接免疫荧光法（IFA）对临床诊断非典病人
血清抗体（IgG/IgM）检测结果

IFA	临床诊断		合计
	非典病人	其它病人	
阳性	99	1	100
阴性	14	68	82
合计	113	69	182

从表中数据可以得出：

$$\text{灵敏度} = (99/113) \times 100\% = 87.6\%$$

$$\text{特异性} = (68/69) \times 100\% = 98.6\%$$

$$\text{符合率} = [(99+68)/182] \times 100\% = 91.8\%$$

$$\text{阳性预测值} = [99/(99+1)] \times 100\% = 99.0\%$$

$$\text{阴性预测值} = [68/(14+68)] \times 100\% = 82.9\%$$

可以看出，本发明的试剂盒具有较好的灵敏度和特异性，符合率较高。

标本1 标本2 标本3 标本4 对照

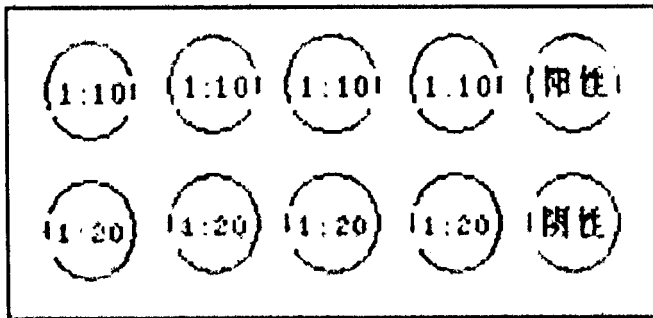


图 1

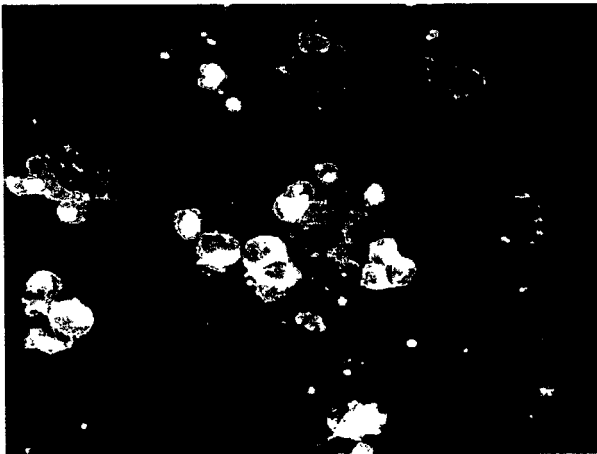


图 2

专利名称(译)	一种检测SARS病毒抗体的试剂盒，其制备方法及用途		
公开(公告)号	CN1445549A	公开(公告)日	2003-10-01
申请号	CN03124299.5	申请日	2003-05-09
[标]申请(专利权)人(译)	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)	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	祝庆余 秦鄂德 杨保安 司炳银 于曼 刘洪 吕富双		
发明人	祝庆余 秦鄂德 杨保安 司炳银 于曼 刘洪 吕富双		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/569		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测SARS病毒抗体的试剂盒，其制备方法及用途。本发明将感染SARS病毒的细胞固定在玻片上制成抗原片，采用间接免疫荧光法原理检测人血清标本中SARS病毒抗体，为非典型肺炎的临床诊断提供参考。本发明的试剂盒具有使用简便，快捷，灵敏度和特异性高，稳定性好的优点，有着广阔的市场前景。

