



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102809649 A

(43) 申请公布日 2012. 12. 05

(21) 申请号 201210121489. 9

(22) 申请日 2012. 04. 24

(83) 生物保藏信息

CCTCC V201211 2012. 03. 01

(71) 申请人 万里明

地址 214121 江苏省无锡市滨湖区万科城市
花园二区 282-1702 室

(72) 发明人 承静 张晨炜 许定花 张欢欢
王建梅 吴亭亭

(51) Int. Cl.

G01N 33/543 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

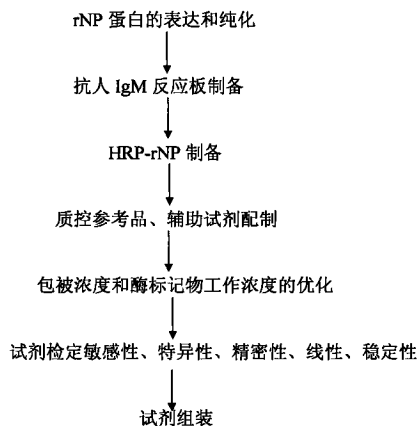
序列表 1 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种检测发热伴血小板减少综合征病毒抗体
IgM 的 ELISA 试剂盒的制备和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种检测发热伴血小板减少综合征病毒特异性抗体的 ELISA 试剂盒的制备和应用。试剂盒包含抗人 IgM 包被的 ELISA 反应板、HRP 偶联的 NP 蛋白、TMB 显色试剂。本发明公开采用反转录 PCR 方法扩增新布尼亚病毒 JS-2007-001 病毒株的核衣壳蛋白开放读框序列插入 pQE30 构建 pQE30-NP 表达质粒,用 pQE30-NP 转染 M15 菌株,并用 IPTG 诱导表达 6His-NP 重组蛋白,Hitrap 纯化 6His-NP 重组蛋白,并标记为 HRP 偶联的 NP (HRP-rNP)。反应板常规与待测样本孵育可结合样本中的抗新布尼亚病毒抗体 (IgM),后续检测使用 HRP-rNP 孵育,形成“抗人 IgM- 抗体 - 酶标抗原”的捕获法检测系统,加入酶底物 TMB 显色剂后产生的颜色反应,用酶标仪进行分析,根据显色程度得出新布尼亚病毒特异性的抗体 (IgM) 的含量。



1. 一种用于检测新布尼亚病毒抗体 IgM 的 ELISA 试剂盒,所述试剂盒包括:抗人 IgM 包被的反应板、HRP-rNP 蛋白、酶底物四甲基联苯胺显色剂;其中所述的 rNP 蛋白包被的反应板通过如下方法制备:采用 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 作为扩增引物,通过反转录 PCR 方法扩增保藏号为 CCTCC V201211 的新布尼亚病毒 JS-2007-001 的 NP 蛋白开放读框序列,随后将扩增后的序列插入 pQE30 构建 pQE30-NP 表达质粒,随后用 pQE30-NP 转染 M15 菌株,再采用常规 IPTG 诱导表达 6His-NP 重组蛋白,Hitrap 纯化 6His-NP 重组蛋白,并包被于 ELISA 反应板。

2. 如权利要求 1 所述的试剂盒,其对新布尼亚病毒特异性抗体 IgM 的最低检出量为 5mIU/mL。

3. 权利要求 1 所述的试剂盒在制备用于对新布尼病毒的早期感染情况进行评估的诊断试剂中的应用。

4. 权利要求 1 所述的试剂盒在制备用于用于人群感染的流行病学观察和疫苗免疫后抗体水平进行评估的诊断试剂中的应用。

5. 一种制备如权利要求 1 所述的用于检测新布尼亚病毒抗体 IgM 的 ELISA 试剂盒的制备方法。

一种检测发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgM 的 ELISA 试剂盒的制备和应用

1. 发明领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种检测新布尼亚病毒抗体 IgM 的 ELISA 试剂盒的制备和应用。

2. 发明背景

[0003] 新布尼亚病毒 (Novel Bunyavirus, SFTS Bunyavirus), 是发热伴血小板减少综合征 (Fever with Thrombocytopenia Associated Syndrome, SFTS) 的病原, 为布尼亚病毒科白 蛉热病毒属的一种新型病毒, 于 2009 年在中国首先发现, 也是中国首例发现的新型病毒。患者出现以高热、血小板减少、白血球降低、多器官功能紊乱、出血等为特征的严重急性传染病, 严重影响着人民的健康和生命安全。到目前为止, 全国已有河南、江苏、湖北、山东、安徽和辽宁等 16 个省发现 300 多病例, 造成 40 余人死亡。国家疾控中心、江苏省疾控中心先后成功的分离到该病病毒, 并对其进行了病原学、流行病学、临床医学等研究。目前该病毒序列已经阐明, 基于 RT-PCR 的检测标准已经建立, 但是对 SFTS 的免疫学检测试剂还未完善, 使得评价该病毒感染缺乏一个对 PCR 结果的印证方法, 也无法评估群体的既往感染水平以及疫苗的保护作用。

3. 发明内容

[0004] 本发明的目的之一在于提供了一株新的, 用于检测发热伴血小板减少综合征病毒的新布尼亚病毒 JS-2007-001, 该病毒分类命名为新布尼亚病毒 (Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus; Novel Bunyaviridae), 其保藏号为 CCTCC V201211; 保藏时间为 2012 年 3 月 1 日; 保藏单位为: 中国典型培养物保藏中心; 保藏地址为: 武汉大学生命科学院武汉市武昌珞珈山。

[0005] 本发明的目的之二在于提供了利用上述新布尼亚病毒 JS-2007-001 制备检测发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgM 的 ELISA 试剂盒。

[0006] 本发明的优点在于, 经过适应性培养、免疫原性鉴定和免疫保护作用鉴定发现, 本发明中涉及的 JS-2007-001 病毒毒种具有最佳的生长特性和适应特性, 在较短时间内达到生长高峰, 可稳定获得较高滴度病毒, 免疫动物获得抗体水平较高, 从而能开发成为一种稳定的可商业化应用的检测发热伴血小板减少综合征病毒的试剂盒。

[0007] 本发明公开一种检测新布尼亚病毒抗体 IgM 的 ELISA 试剂盒的制备和应用, 试剂盒包含抗人 IgM 包被的 ELISA 反应板、HRP-rNP、TMB 显色剂。本发明公开采用反转录 PCR 方法扩增新布尼亚病毒 JS-2007-001 病毒株核衣壳蛋白 (NP) 开放读框序列插入 pQE30 构建 pQE30-NP 表达质粒, 用 pQE30-NP 转染 M15 菌株, 并用 IPTG 诱导表达 6His-NP 重组蛋白, Hitrap 纯化 6His-NP 重组蛋白, 经纯化后偶联辣根过氧化物酶 (HRP)。将抗人 IgM 包被于 ELISA 反应板, 该反应板常规与待测样本孵育可结合样本中的人抗体 IgM, 后续检测使用 HRP-rNP 孵育, 形成捕获法检测系统 (抗人 IgM-抗新布尼病毒 IgM-HRP-rNP), 用酶底物 TMB 显色, 并用酶标仪分析得出抗体滴度。用于对新布尼病毒的早期感染情况的评价, 用于人群

感染的流行病学观察和疫苗免疫后抗体水平的评价。进一步,本发明涉及一种用于检测新布尼亚病毒抗体 IgM 的 ELISA 试剂盒,所述试剂盒包括:抗人 IgM 包被的反应板、HRP-rNP 蛋白、酶底物四甲基联苯胺(TMB)显色剂;其中所述的 rNP 蛋白包被的反应板通过如下方法制备:采用 SEQ ID No. 1 和 SEQ ID No. 2 作为扩增引物,通过反转录 PCR 方法扩增保藏号为 CCTCC V201211 的新布尼亚病毒 JS-2007-001 的 NP 蛋白开放读框序列,随后将扩增后的序列插入 pQE30 构建 pQE30-NP 表达质粒,随后用 pQF30-NP 转染 M15 菌株,再采用常规 IPTG 诱导表达 6His-NP 重组蛋白,Hitrap 纯化 6His-NP 重组蛋白,并包被于 ELISA 反应板。

[0008] 本发明所述的试剂盒,其对新布尼亚病毒特异性抗体 IgM 的最低检出量为 5mIU/nL。

[0009] 本发明所述的试剂盒在制备用于对新布尼病毒的早期感染情况进行评估的诊断试剂中的应用。

[0010] 本发明所述的试剂盒在制备用于用于人群感染的流行病学观察和疫苗免疫后抗体水平进行评估的诊断试剂中的应用。

[0011] 本发明所述的试剂盒的主要质量指标为:试剂质量指标达到 2010 版《中国药典》第三部,体外诊断类规程中的要求。其中包括灵敏性、特异性、精密性、稳定性。

[0012] 以本发明制备的试剂其检测灵敏度:5mIU/mL;特异性验证:与其它同科布尼亚病毒抗体 IgM 无交叉反应;精密性验证:试剂批间差异(CV%)不高于 15%。

4. 附图说明

[0013] 图 1 为新布尼病毒 IgM 抗体 ELISA 检测试剂盒制备流程图

5. 具体实施方式

[0014] 以下结合具体实施例,对本发明做进一步说明。本实施例权用于对本发明的说明,不构成对本发明的限制。

[0015] 实施例 1:rNP 的表达和纯化

[0016] 取灭活的保藏号为 CCTCC V201211 新布尼亚病毒 JS-2007-001 毒株,采用常规 QIAamp RNA viral RNA mini kit(Qiagen, Germany) 制备病毒 RNA 模板;采用如下引物作为扩增引物:

[0017] SEQ ID No. 1:

[0018] 引物 1 5'-ggatccgcatgcATGTCAGAGTGGTCCAGGATTG-3';

[0019] SEQ ID No. 2:

[0020] 引物 2 5'-gccaaagcTTACAGATTCCTGTAAGCAGCAGCAG-3';

[0021] 用 Invitrogen One step RT-PCR kit(Invitrogen, USA) 扩增新布尼亚病毒 NP 蛋白开放阅读框;采用常规分子生物学方法将该阅读框插入细菌表达质粒 pQE30(Qiagen, Germany) 的位点 SphI 和 HindIII 之间,得到细菌表达质粒 pQE30-NP。将该质粒常规转化 E. coli M15 菌株(Qiagen, Germany),按厂商推荐的方法诱导表达 rNP 重组蛋白,并用 Hitrap(Qiagen, Germany) 常规纯化 rNP 重组蛋白,SDS-PAGE 检测蛋白质分子量和纯度,常规蛋白定量备用。

[0022] 实施例 2:HRP-rNP 制备。

[0023] 采用改良过碘酸钠法(医学基础免疫学实验,金伯泉,李恩善。北京世界图书出版社,1990)标记 rNP。将 5mg HRP 溶于 0.5mL 蒸馏水中,加入新鲜配制的 0.06M 的 NaIO₄ 水溶液 0.5mL,混匀置 4℃冰箱 30 分钟,取出加入 0.16M 的乙二醇水溶液 0.5mL,室温放置 30 分钟后加入含纯化 rNP 的水溶液 1mL,混匀并装透析袋,以 0.05M、pH9.5 的碳酸盐缓冲液于 4℃冰箱中慢慢搅拌透析 6 小时使之结合,然后吸出,加 NaBH₄ 溶液 (5mg/mL) 0.2mL,置 4℃冰箱 2 小时,将上述结合物混合液加入等体积饱和硫酸铵溶液,置 4℃冰箱 30 分钟后离心,将所得沉淀物溶于少许 0.02M、pH7.4PBS 中,并 4℃透析过夜,次日离心除去不溶物,即得到 HRP-rNP 蛋白,用 0.02M、pH7.4PBS 稀释至 5mL,加入含有稳定剂的甘油,终浓度 50%,混匀后置低温保存备用。

[0024] 实施例 3:抗人 IgM 包被 ELISA 反应基板制备。

[0025] 将抗人 IgM 抗体用 0.05M pH 9.6 碳酸盐包被缓冲液稀释到浓度 (1-10 μg/mL)。将稀释好的抗体液加入反应板孔内,每孔 100 微升,4℃包被 18-20 小时,弃去孔内液体,洗板数次,用含有酶稳定剂(山东,泰天和生物)加入各板孔内,每孔 150-200 微升。4℃反应 4-6 小时。弃去孔内酶稳定剂,采用冻干法干燥包被板,用密封袋封装反应基板,置 2-8℃保存备用。

[0026] 实施例 4:质控参考品的配制,分装。

[0027] HRP-rNP 工作液:见实施例 2。

[0028] 抗体阳性对照:用含有酶保护剂的缓冲液,将纯化后的抗新布尼亚病毒 NP 蛋白抗体进行定量稀释,用本发明试剂盒进行标化,确定抗体含量。将定量后的参考品精确分装,冷冻干燥后压盖密封置 4℃保存。

[0029] 抗体阴性对照:正常人血清。

[0030] 洗涤缓冲液 (0.15M KH₂PO₄pH7.4PBS):0.2 克, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Tween-20 0.5mL,加蒸馏水至 1000mL。

[0031] 样品稀释液:BSA 0.1g,加洗涤缓冲液至 100mL。

[0032] 底物显色液 A 1:底物缓冲液 (pH5.0 磷酸枣柠檬酸):0.2M Na₂HPO₄25.7mL,0.1M 柠檬酸 24.3mL,加蒸馏水 50mL。

[0033] 底物显色液 B1:TMB(10mg/5mL 无水乙醇)0.5mL,底物缓冲液 (pH 5.5)10mL, 0.75% H₂O₂ 32 μL。

[0034] 2M H₂SO₄ 终止液:蒸馏水 178.3mL,逐滴加入浓硫酸 (98%)21.7mL

[0035] 分装:抗人 IgM 包被的酶联反应板 1 块 (96 孔);HRP-rNP 工作液 1 瓶 (10mL);抗体阳性对照 1 瓶 (0.5mL);抗体阴性对照 1 瓶 (0.5mL);样品稀释液 1 瓶 10mL (含 0.1% BSA 0.15M PBS 缓冲液 (pH7.4));10 倍洗涤液 (1.5M PBST 缓冲液, pH7.4) 1 瓶 200mL;底物显色液 A1 瓶 6mL;底物显色液 B1 瓶 6mL;2M H₂SO₄ 终止液 1 瓶 6mL。

[0036] 实施例 5:定性检测:每孔加入样品稀释液 50 μL 后,将阴性对照、阳性对照和待检样品分别加入相应孔内,50 μL/孔。

[0037] 定量检测:标本用样品稀释液在洁净小试管中做系列稀释,加入相应孔内,50 μL/孔。每次实验设空白对照 1 孔 (只加显色剂和终止液),将反应板用封板膜封闭,置 37℃水浴中孵育 30min。

[0038] 孵育终止后用洗涤液洗板 4 ~ 5 次,在洁净吸水纸上拍干孔内余液。

- [0039] 除空白孔外,于各孔内加入 HRP 标记抗原工作液 100 μ L/ 孔,在 37℃ 水浴中孵育 30min。
- [0040] 孵育终止后用洗涤液洗板 4 ~ 5 次,在洁净吸水纸上拍干孔内余液。
- [0041] 于各孔内加入显色剂 A、B 液各 50 μ L/ 孔,在 37℃ 水浴中孵育 10min。
- [0042] 每孔加终止液 50 μ L,轻柔震荡 20s 混匀。
- [0043] 将酶标板置酶标仪 450nm 波长下,以空白孔调零,测定各孔光吸收 A 值。
- [0044] 实验结果须满足以下有效参数,实验方可成立:阳性对照 A 值 ≥ 1.5 ;阴性对照 A 值 ≤ 0.1 。若试验数据不符合上述试验有效性标准,则需重复试验。
- [0045] 定性判定:若阴性对照平均 A 值 < 0.05 ,按 0.05 计算;若阴性对照平均 A 值 > 0.05 ,按实际 A 值计算。cutoff 值的计算:cutoff = 阴性对照平均 A 值 $\times 2.1$ 。检测结果 $\geq$ cutoff 值判为阳性,检测结果 $<$ cutoff 值判为阴性。
- [0046] 定量判定:标本经系列稀释后,测定各稀释度 A 值,以标本最高稀释度 A 值 $\geq$ cutoff 值判为抗体效价终点,以标本稀释度作为抗体水平的定量单位。
- [0047] 实施例 6:试剂盒质量控制。以本发明制备的试剂其检测灵敏度为 5mIU/mL;特异性验证,与其它同科布尼亚病毒抗体无交叉反应;精密性验证,试剂批间差异(CV%)应不高于 15%。

[0001]

序列表

SEQ ID No 1

引物 1

5'-ggatccgcatgcATGTCAGAGTGGTCCAGGATTG-3'

SEQ ID No 2

引物 2

5'-gcccaagcTTACAGATTCCTGTAAGCAGCAGCAG-3'

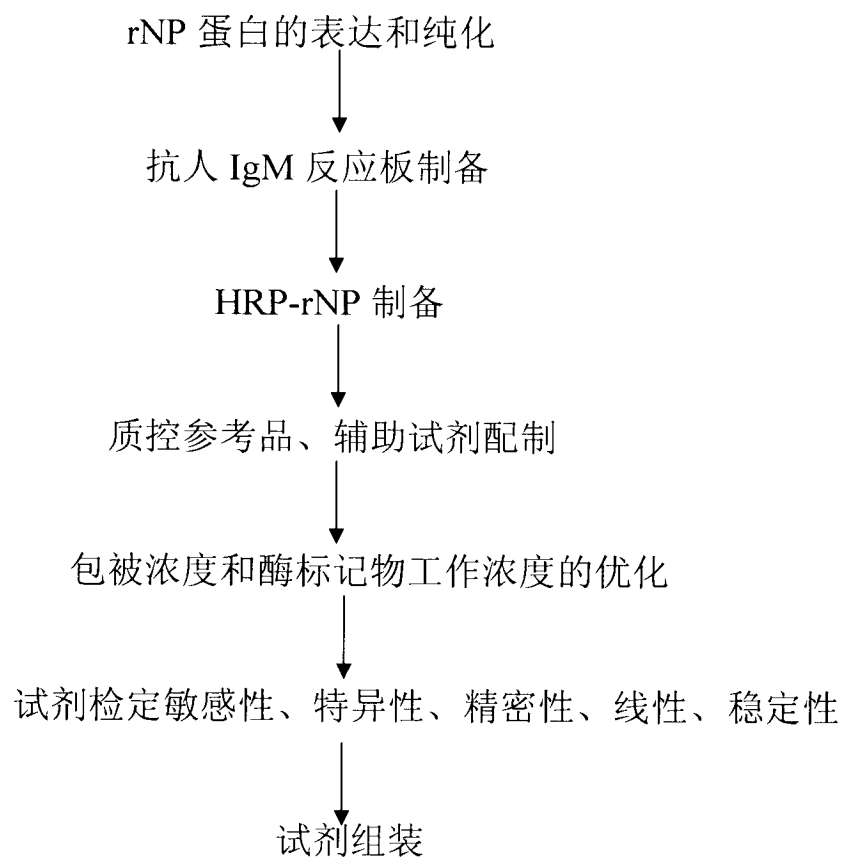


图 1

专利名称(译)	一种检测发热伴血小板减少综合征病毒抗体IgM的ELISA试剂盒的制备和应用		
公开(公告)号	CN102809649A	公开(公告)日	2012-12-05
申请号	CN201210121489.9	申请日	2012-04-24
[标]申请(专利权)人(译)	万里明		
申请(专利权)人(译)	万里明		
当前申请(专利权)人(译)	万里明		
[标]发明人	承静 张晨炜 许定花 张欢欢 王建梅 吴亭亭		
发明人	承静 张晨炜 许定花 张欢欢 王建梅 吴亭亭		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测发热伴血小板减少综合征病毒特异性抗体的ELISA试剂盒的制备和应用。试剂盒包含抗人IgM包被的ELISA反应板、HRP偶联的NP蛋白、TMB显色试剂。本发明公开采用反转录PCR方法扩增新布尼亚病毒JS-2007-001病毒株的核衣壳蛋白开放读框序列插入pQE30构建pQE30-NP表达质粒，用pQE30-NP转染M15菌株，并用IPTG诱导表达6His-NP重组蛋白，Hitrap纯化6His-NP重组蛋白，并标记为HRP偶联的NP(HRP-rNP)。反应板常规与待测样本孵育可结合样本中的抗新布尼亚病毒抗体(IgM)，后续检测使用HRP-rNP孵育，形成“抗人IgM-抗体-酶标抗原”的捕获法检测系统，加入酶底物TMB显色剂后产生的颜色反应，用酶标仪进行分析，根据显色程度得出新布尼亚病毒特异性的抗体(IgM)的含量。

