

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/531 G01N 33/543

G01N 33/569 C12Q 1/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03126278.3

[43] 公开日 2005 年 2 月 16 日

[11] 公开号 CN 1580772A

[22] 申请日 2003.8.4 [21] 申请号 03126278.3

[71] 申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450008 河南省郑州市高新技术开发区
瑞达路 96 号

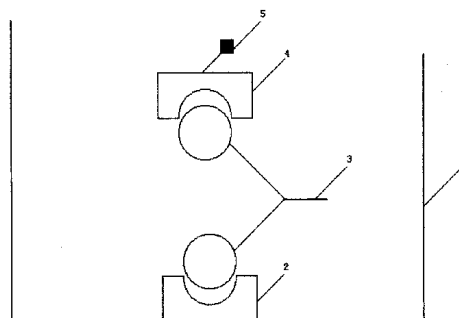
[72] 发明人 王云龙 曹 诚

权利要求书 1 页 说明书 3 页 附图 1 页

[54] 发明名称 SARS 病毒抗体双抗原夹心 ELISA 检测法

[57] 摘要

本发明涉及一种 SARS 病毒抗体检测方法。属疾病诊断领域中血清(浆)中抗体的 ELISA 检测方法。通过基因工程方法制备出 SARS 病毒的基因工程抗原,抗原与酶偶连形成酶标抗原,抗原可吸附于酶联反应板上,与酶标抗原一起可以对血清(浆)中的 SARS 病毒抗体进行双抗原夹心法 ELISA 检测。



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

一种 SARS 病毒抗体酶联免疫检测方法，其特征是包被用抗原和（或）酶标用抗原为基因工程方法制备；包被抗原和酶标抗原包括 SARS 病毒的 N 蛋白（核衣壳蛋白）、M 蛋白（膜蛋白）和 S 蛋白（辐条样蛋白）、E 蛋白（外膜蛋白），四种蛋白（抗原）可单独组成双抗原夹心试剂，也可组合形成双抗原夹心试剂，实现对血清（浆）中的抗体进行双抗原夹心法 ELISA 检测。

SARS 病毒抗体双抗原夹心 ELISA 检测法

所属技术领域

本发明涉及血清（浆）中 SARS 病毒抗体检测方法，属疾病诊断领域中血清（浆）中抗体的 ELISA 检测方法。

技术背景

非典型肺炎（SARS）的流行给人民的身体健康和社会、经济发展带来了巨大的威胁，建立快速、准确的早期诊断方法可以使疑似病人尽早确诊，从而减少交叉感染和社会负担。SARS 病毒得到确认以后，国内外相继推出了一系列该病的诊断试剂，其中包括基因诊断试剂（RT-PCR 法）和免疫诊断试剂（SARS 病毒抗体诊断试剂）。但到目前为止，免疫诊断试剂主要为间接 ELISA 法和间接免疫荧光法。使用的抗原的为全病毒裂解抗原，可以对血清（浆）中的 IgG 或 IgM 分别进行检测，SARS 病毒抗体的检测还未使用双抗原夹心法，其主要原因是全病毒裂解抗原需要在 P3 实验室进行病毒的培养、增殖、纯化和裂解，成本极其高昂，并且非常危险，同时全病毒裂解抗原为病毒的全组份，成份复杂，裂解时需要使用变性剂如 SDS 等，使得抗原难于进行标记。使用全病毒裂解抗原的间接 SARS 病毒抗体检测法本身又有不可克服的缺点：首先，灵敏度低，因为酶标记物为酶标抗人 IgG 或酶标抗人 IgM，为了避免非特异性吸附，血清（浆）标本必须 1:10 或 1:20 以上进行稀释，反应灵敏度与不需稀释血清（浆）标本的双抗原夹心法比自然低 10~20 倍，容易造成漏检；第二，特异性差，即使血清（浆）经过 1:10~1:20 稀释，个别标本中的 IgG 或 IgM 仍对包被反应板有非特异性吸附或对包被反应板中的杂蛋白有特异性吸附。而抗人 IgG 或抗人 IgM 酶标对特异性吸附的 SARS 病毒抗体和其它方式吸附的人 IgG 或 IgM 无分辨能力，必然造成一部分假阳性；第三，一般情况下不能或不方便使用一套试剂同时检测 IgG 和 IgM，目前商品化间接 ELISA 法检测试剂盒绝大多数只检测 IgG，这样有可能造成一部分单独 IgM 阳性标本的漏检。

发明内容

本发明的目的是：研制出 SARS 病毒抗体双抗原夹心法 ELISA 试剂替代间接 ELISA 试剂，克服间接 ELISA 法灵敏度低、特异性差及 IgG、IgM 不能同时检出的弊端。

本发明是这样实现的：通过基因工程方法制备出 SARS 病毒基因工程抗原，基因工程抗原用于包被酶联反应板时称为包被抗原，基因工程抗原经酶标记，形成酶标抗原，包被抗原和酶标抗原一起可组成 SARS 病毒抗体双抗原夹心法 ELISA 检测试剂。

本发明的积极效果:一、灵敏度高:血清(浆)标本不稀释或仅需 1:1、1:2 稀释,比间接 ELISA 灵敏度提高十倍左右。二、缩短窗口期:IgM、IgG 可同时检测,IgM 一般出现在感染的早期,一般比 IgG 早出现 7 至 10 天,双抗原夹心法可提高 7 至 10 天检出感染者。三、特异性强:由于包被抗原和标记抗原均是特异性的,间接 ELISA 一些不可避免的非特异性标本绝大多数可被排除,提高临床诊断的准确度。四、成本低、安全性好:由于使用基因工程方法,整个抗原生产及试剂生产操作不需在 P3 实验室进行,成本低。表达的抗原不含 SARS 病毒核酸,对人和环境不会造成污染,安全性好。五、社会效益好:SARS 病毒由于是通过近距离飞沫传播,极容易传染,目前尚无疫苗防治,发烧是 SARS 症状之一,将疑似 SARS 的发烧病人进行隔离是阻止该病传播的有效方法,但成本极高,SARS 病毒抗体双抗原夹心 ELISA 检测试剂,可对疑似病人进行早期诊断,减少 SARS 的传播几率,降低社会防治成本。

附图说明

附图是本发明的原理示意图。图中 1.酶联反应板 2. 基因工程包被抗原 3. SARS 病毒抗体 4. 基因工程标记抗原 5.酶

具体实施方式

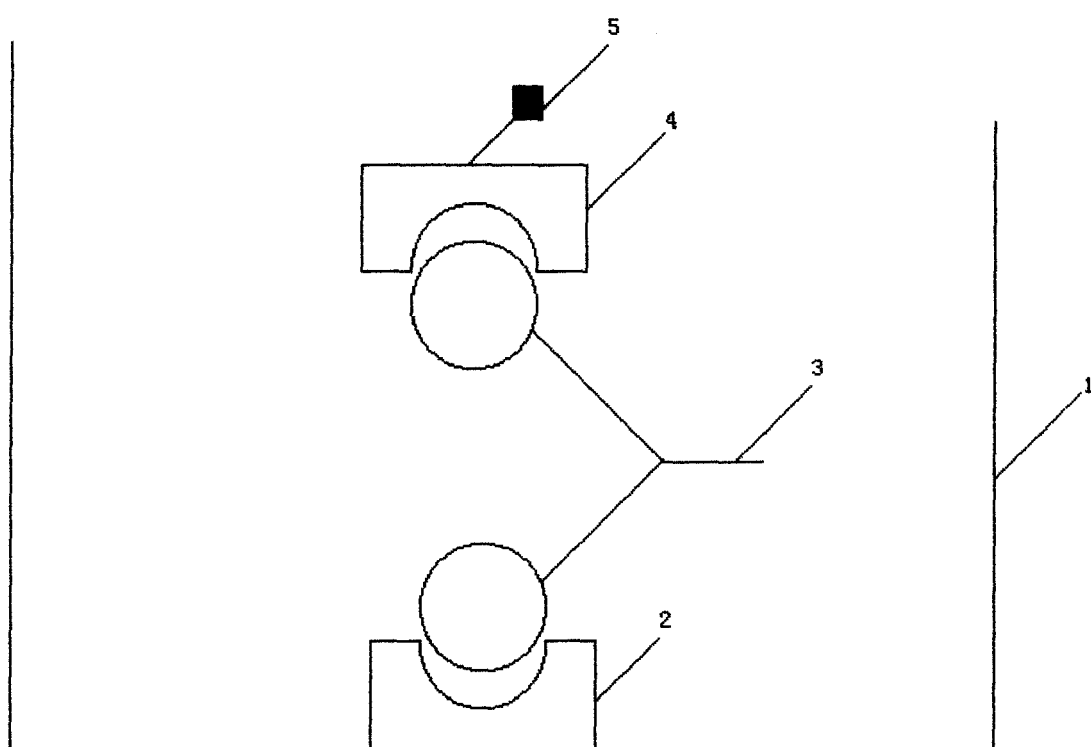
以下实例详述本发明:

包被抗原的获得:含有 SARS 病毒的基因克隆到 pET-22b(+)(美国 Novagen 公司产品)表达质粒中,将重组质粒转化大肠杆菌 BL21(DE3),涂布含氨苄青霉素的 LB 平板,37℃生长,待菌斑长出后,挑取单个克隆接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基试管中,37℃,200 rpm 生长过夜。第二天,1:100 接种于新鲜含氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃生长到 OD₆₀₀=0.6~0.9 之间。按终浓度 0.5mmol/L 加入 1mol/L IPTG,37℃ 200rpm,诱导 4 小时,5000rpm,4℃离心 10 分钟,菌体反复冻融三次,超声波破碎。10000rpm,4℃离心 10 分钟,弃上清,沉淀为包涵体,包涵体用含 1%的 Triton-X100 洗涤一次,离心同上,用适量 pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L 尿素缓冲液溶解包涵体,离心同上,用 pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L 尿素缓冲液平衡 CM 纤维素离子交换柱,已溶解的包涵体过柱,SARS 病毒抗原被吸附,用含 0.1mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L 尿素的缓冲液洗涤除去杂蛋白,用含 0.5mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L 尿素的缓冲液洗脱,Ni-金属亲和柱用 0.5mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L 尿素的缓冲液平衡,合并 CM 柱洗脱的 SARS 病毒抗原,上 Ni-亲和柱,用含 25mmol/L 咪唑的 0.5mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L 尿素缓冲液洗涤去除杂蛋白;用含 100mmol/L 咪唑的 0.5mol/L NaCl pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L 尿素缓冲液洗脱获得纯 SARS 病毒抗原,用适量 pH8.0 0.02mol/L PB 8mol/L 尿素缓冲液稀释至 0.5mg/ml,-20℃冻存。

SARS 病毒可溶性抗原的获:含有 SARS 病毒的基因克隆到 pET-32a (美国 Novagen 公司产品) 中, 将重组质粒转化 BL21(DE3), 涂布含氨苄青霉素的 LB 平板, 37℃ 生长, 待菌斑长出后, 挑取单个克隆于含氨苄青霉素的 LB 培养基试管中, 37℃, 200 rpm 生长过夜。第二天, 1: 100 接种于新鲜含氨苄青霉素 LB 培养基中, 37℃ 生长到 OD₆₀₀=0.6~0.9 之间。按终浓度 0.5mmol/L 加入 1mol/L IPTG, 30℃ 200rpm, 诱导 8 小时, 5000rpm, 4℃ 离心 10 分钟, 用 pH8.0 0.02mol/LpB 0.5mol/L NaCl 缓冲液将菌体洗涤一次, 离心同上, 菌体反复冻融三次, 超声波破碎, 离心后上清过 Ni-金属亲和柱, 用含 50mmol/L 咪唑的 pH8.0 0.02mol/LPB 0.5mol/L NaCl 缓冲液洗涤去除杂蛋白, 用含 100mmol/L 咪唑的 pH8.0 0.02mol/LPB 0.5mol/L NaCl 缓冲液洗脱获得纯 SARS 病毒可溶性抗原, 分装后-20℃冻存。

SARS 病毒可溶性抗原的辣根过氧化物酶 (HRP) 的标记:纯 SARS 病毒可溶性抗原对 pH9.5 0.01mol/L 碳酸缓冲液 (CB) 透析过夜, 按 Ag:HRP=1:1 质量比, 取适量 HRP, 用高碘酸钠法将 HRP 活化后, 对 1mmol/LpH4.0 醋酸缓冲液透析过夜。第二天, 按 IgG:HRP=1:1 质量比将 SARS 病毒可溶性抗原和活化后的 HRP 混和, 用适量 pH9.5 0.2mol/L CB 调整混合物 pH=9.2, 用 pH=9.5 0.01mol/LCB 调整体积至 SARS 病毒可溶性抗原反应浓度等于 1.0mg/ml, 25℃ 暗处反应 2 小时, 然后将反应混匀物降至 4℃, 按 1mg HRP 加入 51ul 的量加入 0.1mol/L NaBH₄, 4℃ 反应 2 小时终止连接反应。装透析袋对 pH7.0 0.02mol/L PB 0.2mol/L NaCl 透析 48 小时, 中间每 6 小时换液一次。透析完成后加入等体积甘油混匀, -20℃存放, 即获得 SARS 病毒酶标抗原。

双抗原夹心法检测 SARS 病毒抗体:0.5mg/ml 的 SARS 病毒 包被抗原 1: 1000 用 pH9.5 0.05mol/L CB 稀释, 100ul/孔加入酶标反应板, 4℃包被过夜, 第二天, 洗涤液 (pH7.0 0.01mol/L PB 0.1mol/L NaCl 0.1% tween-20) 洗板一次, 按 115ul /孔加入含 5%小牛血清的 pH7.0 0.01mol/L PB 封板, 4℃封闭过夜, 然后吸净封板液, 37℃干燥 2 小时, 加干燥剂封装于铝箔袋中, 包被完毕。检测时在包被反应孔中先加入 50 ul pH7.0 0.01mol/L PB 0.1mol/L NaCl 的 PBS, 然后加入 50ul 待检血清、阴性、阳性对照, 37℃温育 20 分钟, 用洗涤液洗板五次, 拍干后加入 1: 3000 用含 20%小牛血清 PBS 稀释的 SARS 病毒酶标抗原, 37℃温育 20 分钟, 洗板同前, 加入显色剂 A、B 液各 1 滴, 37℃显色 10 分钟, 显色剂 A 含 H₂O₂, 显色剂 B 含 TMB, 显色完成后, 每孔加入 1 滴 2mol/L H₂SO₄ 终止反应, 用酶标仪在 450nm 波长读取结果, OD_{450nm}≥2.1×阴性对照 OD 平均值者为阳性, OD_{450nm}<2.1×阴性对照平均值为阴性。



专利名称(译)	SARS病毒抗体双抗原夹心ELISA检测法		
公开(公告)号	CN1580772A	公开(公告)日	2005-02-16
申请号	CN03126278.3	申请日	2003-08-04
[标]申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	河南省生物工程技术研究中心		
[标]发明人	王云龙 曹诚		
发明人	王云龙 曹诚		
IPC分类号	C12Q1/04 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种SARS病毒抗体检测方法。属疾病诊断领域中血清(浆)中抗体的ELISA检测方法。通过基因工程方法制备出SARS病毒的基因工程抗原，抗原与酶偶连形成酶标抗原，抗原可吸附于酶联反应板上，与酶标抗原一起可以对血清(浆)中的SARS病毒抗体进行双抗原夹心法ELISA检测。

