

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/533 G01N 33/569

G01N 33/577



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03146846.2

[43] 公开日 2005 年 3 月 23 日

[11] 公开号 CN 1598581A

[22] 申请日 2003.9.17 [21] 申请号 03146846.2

[71] 申请人 广州市达瑞抗体工程技术有限公司

地址 510070 广东省广州市广州高新技术产业开发区科技城广州国际企业孵化器 A 区 1210 房

共同申请人 第一军医大学热带病研究所

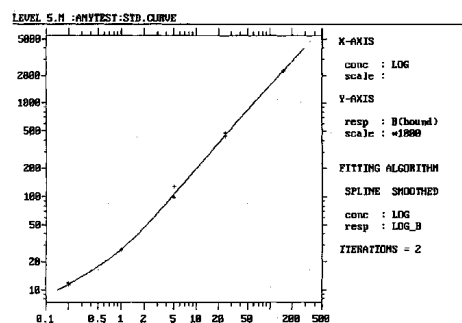
[72] 发明人 李 明 吴英松 宁云山 程 钢

权利要求书 1 页 说明书 13 页 附图 3 页

[54] 发明名称 检测 SARS 病毒抗原的方法

[57] 摘要

本发明涉及检测 SARS 病毒的方法，特别是涉及使用具有高敏感性的时间分辨荧光免疫检测技术实时监测临床样品中的 SARS 病毒的方法。



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

1、一种检测生物学体液样品中的 SARS 病毒的方法，一种方法是采用双抗体夹心法包括：（1）提供可与 SARS 病毒蛋白结合的第一抗体并用所说的抗体包被固相载体；（2）向步骤（1）的被包被的固相内加入待检生物学体液样品和对照样品并于适当的条件下孵育足够长的时间；（3）反应后充分洗涤所说的固相并加入适当量镧系金属离子标记的、可与 SARS 病毒蛋白结合的第二抗体并再次孵育；（4）反应后充分洗涤所说的固相并检测与第二抗体结合的镧系金属离子发射的荧光值；（5）将所测得的荧光值与平行测得的已知量标准品的荧光相比较以确定样品中 SARS 病毒的存在及其相对量。

2、根据权利要求 1 的方法，所说的第一抗体和第二抗体是可分别与 SARS 病毒蛋白的不同抗原表位特异性结合的单克隆抗体。

3、根据权利要求 1 的方法，其中所说的镧系金属离子是铕。

4、根据权利要求 1 的方法，其中所说的生物学体液样品选自血浆、全血、嗽口液、咽拭子、尿液、粪便和支气管灌流液。

5、根据权利要求 1 的方法，其中所说的固相是免疫球蛋白吸附能力约为 50-200ng/cm² 的微量滴定板。

6、根据权利要求 1 的方法，其中所说的检测是使用时间分辨荧光免疫技术完成的。

7、用于权利要求 1 的检测方法的抗 SARS 病毒抗体，特征在于所说的抗体可与 SARS 病毒蛋白的特定抗原决定基区域结合，并可与镧系金属离子形成络合物。

8、根据权利要求 7 的抗体，所说的抗体是用 SARS 全病毒免疫动物制备的。

9、根据权利要求 7 的抗体，所说的抗体是用人工合成的肽序列与大分子载体结合物免疫动物制备的。

10、根据权利要求 1 的抗体，如上限定的抗体包括可与 SARS 病毒蛋白的不同抗原决定基特异性结合的第一和第二抗体。

11、用于检测生物学体液样品中 SARS 病毒的时间分辨荧光免疫检测方法的试剂盒，其中包括可同时与固相和 SARS 病毒结合的第一抗体，以及可与 SARS 病毒结合并且偶联了镧系金属离子的第二抗体。

检测 SARS 病毒抗原的方法

发明的所属领域

本发明涉及检测 SARS 病毒的方法，特别是涉及使用具有高敏感性和特异性的时间分辨荧光免疫检测技术实时监测血液样品中 SARS 病毒的方法。

发明的背景

严重急性呼吸综合症（SARS）是一种新的致死性传染病。2002 年底在中国广东省部分地区首先发现，三个月内即很快传播到世界二十五个国家和地区以及中国其他许多省市，累计报告病例数达 8202 人。该病毒传染性强，起病急，在人群中传播率高，容易导致疫情爆发且死亡率较高（5-6%）。

自从世界卫生组织于 2003 年 3 月 12 日向全球发出该传染病的警报后，中国、德国、加拿大、法国、美国等 10 个国家和地区的 13 个实验室的科学家与世界卫生组织合作，很快确定该传染病的病原体为 SARS 冠状病毒。当年 4 月中旬，加拿大和美国科学家等相继公布 SARS 病毒的基因组序列。病原体的发现及全基因组序列测定的成功，使科学家能够集中研究病毒，为追踪冠状病毒的来源、研制 SARS 病毒检测试剂、疫苗和治疗药物奠定了基础。

目前世界上许多实验室都在研制快速和早期检测 SARS 病毒的方法，已建立的方法主要包括酶联免疫吸附法（ELISA），免疫荧光法（FAT）和聚合酶链反应方法（PCR）。其中，ELISA 方法和 FAT 方法由于受其灵敏度和特异性的限制，无论是检测抗原还是抗体，都很难满足早期诊断的需要。相反，TR-FIA 检测方法则具有高灵敏度、特异性和选择性，是对 SARS 病毒抗原和病毒核酸进行多指标检测并实现 SARS 的早期诊断的一种优选方法。

发明目的

本发明的一个目的是提供一种检测生物学体液样品中可能存在的 SARS 病毒的方法，该方法包括：（1）提供可与 SARS 病毒蛋白结合的第一抗体并用所说的抗体包被固相载体；（2）向步骤（1）的被包被的固相内加入待检生物学体液样品和对照样品并于适当的条件下保温；（3）反应后充分洗涤所说的固相并加入适当量镧系金属离子标记的、可与 SARS 病毒蛋白结合的第二抗体并再次保温；（4）反应后充分洗涤所说的固相并检测与第二抗体结合的镧系金属离子发射的荧光值；（5）将所测得的荧光值与平行测得的已知量标准品的荧光相比较以确定样品中 SARS 病毒的存在及其相对量。

或者，也可以基于竞争抑制法，按以下步骤完成上述检测：（1）提供可与 SARS 病毒蛋白结合的抗体并用所说的抗体包被固相载体；（2）向步骤（1）的被包被的固相内加入待检生物学体液样品和对照样品、镧系金属离子标记的可与抗 SARS 病毒蛋白单克隆抗体结合的抗原；（4）反应后充分洗涤所说的固相并检测与抗原结合的镧系金属离子发射的荧光值；（5）将所测得的荧光值与平行测得的已知量标准品的荧光相比较以确定样品中 SARS 病毒的存在及其相对量。

根据本发明的一个优选实施方案，所说的第一抗体和第二抗体是可分别与 SARS 病毒蛋白的不同抗原表位结合的单克隆抗体。

根据本发明的一个优选实施方案，其中所说的镧系金属离子是铕。

根据本发明的另一个优选实施方案，其中所说的生物学体液样品选自血浆、全血、嗽口液、咽拭子、尿液、粪便和支气管灌流液。

根据本发明的再一个优选实施方案，其中所说的固相是具有足够的免疫球蛋白吸附能力的微量滴定板。

根据本发明的再一个优选实施方案，其中所说的检测是使用时间分辨荧光免疫技术完成的。

本发明的另一个目的是提供用于本发明的检测方法的抗 SARS 病毒抗体，特征在于所说的抗体可与 SARS 病毒蛋白的特定抗原决定基区域结合，并可与镧系金属离子形成络合物。

根据本发明的再一个优选实施方案，如上限定的抗体包括可与 SARS 病毒蛋白的不同抗原决定基特异性结合的第一和第二抗体。

根据本发明的再一个优选实施方案，如上限定的抗体是单克隆抗体。

本发明的再一个目的是提供用于检测生物学体液样品中 SARS 病毒的时间分辨荧光免疫检测方法的试剂盒，其中包括可同时与固相和 SARS 病毒蛋白结合的第一抗体，以及可与 SARS 病毒蛋白结合并且偶联了镧系金属离子的第二抗体。

附图简要说明

图 1 是 SARS 病毒的电镜显微图像记录。

图 2 显示 SARS 病毒感染的 VeroE6 细胞的间接免疫荧光检测结果。其中所使用的抗体是抗 SARS 病毒的单克隆抗体。

图 3 显示抗 SARS 病毒单克隆抗体的亚型分析结果

图 4 是纯化的抗 SARS 病毒单克隆抗体的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 图谱：其中 A 是 5B8，B 是 12D4。

图 5 显示按本发明方法检测已知病毒蛋白量的 SARS 病毒得到的标准曲线。

发明的详细描述

TR-FIA 技术是利用能够发射长寿命荧光的荧光化合物作为示踪物，标记被检分子（配体或配基）并形成络合物例如镧系金属离子络合物，通过免疫学反应即可在具有较短寿命的本底荧光消失后对被标记物发出的荧光信号进行时间分辨检测。其中被标记物可以是参与反应体系（如抗原抗体反应、核酸探针杂交、生物素亲和素反应以及靶细胞对效应细胞的杀伤反应等）的任何一种配体或配基。待反应体系形成并发生配体与其配基的反应后，可使用时间分辨荧光免疫方法检测反应结合物的荧光强度。基于对反应结合物的荧光强度与已知量分析物所产生的相对荧光强度的比较，即可利用标准曲线确定反应体系中分析物的浓度。

在常规荧光测定中，由于样品检测体系中含有多种荧光成分（例如来自样品中的胶体颗粒和溶剂分子引起的散射光，以及血清中蛋白质和其他化合物发出的非特异性荧光），导致本底荧光过大，从而限制了荧光分析方法的广泛使

用。与常规免疫荧光方法不同，时间分辨荧光免疫检测技术（TR-FIA）则是基于镧系金属元素（特别是铕）能够发射具有较长衰变期（约为传统荧光的 10³—10⁶ 倍）和较大 Stokes 位移（为普通荧光素 Stokes 位移的 10 倍以上）的特殊荧光（发射波波长为 615nm）这一性质，以其标记构成检测体系的配体或配基。因此，可以几乎完全避免体系中与某些类型的蛋白质有关的激发波（波长为 340nm）和瞬时本底荧光（波长为 350–600nm）的干扰，从而可借助时间延迟和波长分辨，大大提高检测的准确性和灵敏度。

与目前普遍使用的放射免疫分析（RIA）、酶免疫分析（EIA）及化学发光免疫分析和电化学发光免疫分析（ECLIA）相比，TR-FIA 方法具有灵敏度高、示踪物稳定、不受样品自然荧光干扰、无放射性污染等多方面的优点，是各种生物医学研究和临床超微量生化检验手段中的一种优选方法。然而，虽然该技术已在病原体检测、内分泌检查、肿瘤检查、遗传学检查、血液学检测和细胞学检查等多方面得到普遍应用，但迄今尚未见用于 SARS 病毒检测的报道。

因此，本发明的一个目的是提供一种检测生物学体液样品中可能存在的 SARS 病毒的方法，一种方法是采用双抗体夹心法包括：（1）提供可与 SARS 病毒外壳蛋白结合的第一抗体并用所说的抗体包被固相载体；（2）向步骤（1）的被包被的固相内加入待检生物学体液样品和对照样品并于适当的条件下保温；（3）反应后充分洗涤所说的固相并加入适当量镧系金属离子标记的、可与 SARS 病毒蛋白结合的第二抗体并再次保温；（4）反应后充分洗涤所说的固相并检测与第二抗体结合的镧系金属离子发射的荧光值；（5）将所测得的荧光值与平行测得的已知量标准品的荧光相比较以确定样品中 SARS 病毒的存在及其相对量。

或者，亦可基于竞争抑制法，按以下步骤完成所说的检测：（1）提供可与 SARS 病毒蛋白结合的抗体并用所说的抗体包被固相载体；（2）向步骤（1）的被包被的固相内加入待检生物学体液样品和对照样品、镧系金属离子标记的可与抗 SARS 病毒蛋白单克隆抗体结合的抗原；（4）反应后充分洗涤所说的固相并检测与抗原结合的镧系金属离子发射的荧光值；（5）将所测得的荧光值与平行测得的已知量标准品的荧光相比较以确定样品中 SARS 病毒的存在及其相对量。

根据本发明的一个优选实施方案，所说的第一抗体和第二抗体是可分别与 SARS 病毒蛋白的不同抗原确定基特异性结合的单克隆抗体。

根据本发明的一个优选实施方案，其中所说的镧系金属离子是铕离子。

根据本发明的另一个优选实施方案，其中所说的生物学体液样品选自血浆、全血、嗽口液、咽拭子、尿液、粪便和支气管灌流液。

根据本发明的再一个优选实施方案，其中所说的固相具有足够免疫球蛋白吸附能力的微量滴定板。

根据本发明的优选实施方案，微量滴定板的免疫球蛋白吸附能力约为 50-200ng/cm²。

为了实现本发明的方法，必须首先提供方法中所需的能够与 SARS 病毒及参与检测体系的其他相关组分结合的第一和第二抗体。为此，首先从 SARS 病人尸检肺组织标本中分离并鉴定 SARS 病毒。使用 Vero E6 宿主细胞传代培养并增殖后，以免疫电镜、扫描电镜（负染）和 PCR 等技术观察并鉴定病毒（参见附图 1）。在无血清培养基中大规模化培养并灭活病毒后，以所得到的失活病毒悬液作为免疫原免疫动物（例如 Balb/C 小鼠）。被免疫动物体内产生足够的抗体后，处死动物并分离脾淋巴细胞，用于杂交瘤细胞和单克隆抗体的制备。

作为一种可替代的方法，也可以使用人工合成的 SARS 病毒蛋白的某一段肽序列或所说的肽与其它大分子载体蛋白的结合物作为免疫原免疫动物。所说的肽包括但不只限于表 1 的肽序列：

表 1: 人工合成的肽序列

所在区域	氨基酸序列	来源
170-188	LDVSEKSGNFKHLREFVFK	突起蛋白(E2)
337-350	VYAWERKKISNCVA	突起蛋白(E2)
387-400	FVVKGDDVRQIAPG	突起蛋白(E2)
751-766	GIAAEQDRNTREVFAQ	突起蛋白(E2)
788-803	LPD PLKPTKRSFI EDL	突起蛋白(E2)
963-979	LSRLDKVE AEVQIDRLI	突起蛋白(E2)
1124-1138	QPELDSFKEELDKYF	突起蛋白(E2)
154-168	LGRCDIKDLPKEIT	膜蛋白(E1)
32-46	GRNGARPKQRRPQGL	核衣壳蛋白(N)
89-105	RR ATRRVRGDGKMKE	核衣壳蛋白(N)
254-269	EASKKPRQKRTATKQY	核衣壳蛋白(N)
335-350	HGAIKLDDKDPQFKDN	核衣壳蛋白(N)
393-405	IETRLRKGGRTRC	ORF1a 多聚蛋白
787-800	GLMLLEIKDKEQYC	ORF1a 多聚蛋白
843-858	TFELDERVDKVLNEKC	ORF1a 多聚蛋白
3990-4005	YKQARSEDKRAKVTSA	ORF1a 多聚蛋白
187-200	GGYSEDRHSGVKDY	未知蛋白
173-186	DGISTPKLKEDYQI	未知蛋白
36-51	QHQNKKTKLVILR	未知蛋白
50-62	SELDDEEPMELDY	未知蛋白
86-98	LFIRQEEVQQELY	未知蛋白
81-93	KLATTEELPDEFV	未知蛋白
53-68	CRFQEKDEEGNLLDS	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
731-745	LYRNRDVDHEFVDEF	RNA 依赖的 RNA 聚合酶
456-471	YDNKLKAHKDKSAQC	螺旋酶

用于制备人工合成免疫原的载体可以是匙孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、多聚赖氨酸(PLL)等。例如,可以根据已公布的 SARS 全序列(Genbank 登录号: NC_004718), 结合计算机软件分析结果, 从中筛选出氨基亲水性值较高的多肽(表 1)并使用所说的多肽与载体蛋白分子(例如 KLH 或 BSA)的连接产

物作为免疫原（参见实施例 1）。

然后于聚乙二醇（PEG）存在下，使被免疫动物的脾细胞与骨髓瘤细胞融合。细胞融合后，使用间接 ELISA 法检测阳性融合细胞克隆的培养物上清，并以有限稀释法对检出的阳性克隆进行亚克隆。经四次亚克隆后，共筛选出 73 个分泌抗 SARS 病毒蛋白的杂交瘤细胞株。经进一步的配对试验，得到两个分泌可与 SARS 病毒抗原的不同抗体结合部位或抗原决定基结合之单克隆抗体的杂交瘤细胞株（5B8 和 12D4）。实验表明，培养这些细胞株所得到的培养物上清均可与 SARS 病毒发生特异性反应（参见附图 2），并且效价分别为为 1：512 和 1：256。以所说的杂交瘤腹腔内接种动物，则所得腹水液的效价分别为 1：25600 和 1：12800。进一步的抗体分型实验证实，这两株细胞分泌的抗体类型均为 IgG1（参见附图 3）。

然后，纯化得自接种杂交瘤动物的腹水液（例如使用蛋白 G Sepharose 4 Fast Flow 柱，Amersham）。透析并浓缩后，将其中的抗体纯化至电泳纯（SDS-PAGE 显示出分别代表抗体分子之重链和轻链的两条带）（参见附图 4）。

在碱性（pH 8.0-9.0）条件和金属络合剂存在下，按常规方法使用铕离子（ Eu^{3+} ）（由 EuCl_3 提供）标记如上得到的单克隆抗体 12D4。经纯化并鉴定后，即可将所得到的标记产物作为第二抗体用于下述的时间分辨荧光免疫检测（TR-FIA）。

可以按照以下步骤，使用双抗体夹心法完成本发明的 TR-FIA 检测。为此，首先用已在缓冲液中稀释到适当浓度（ $5 \mu\text{g/ml}$ ）的上述抗 SARS 病毒抗体 5B8 包被 96 孔微量滴定板，然后向预包被的孔内分别加入含 0.1% Tween-20 的 1%FBSA 封闭，洗涤后加适当量的待检样品（血清）、阳性和阴性样品以及参考标准品，并保温适当时间。洗掉未反应的试剂后，再次加入适当量上述 Eu^{3+} 标记的第二抗体（12D4），并再次保温适当时间。反复洗涤后，加入增强液，使用时间分辨荧光检测装置检测并计量已与第二抗体结合的镧系金属铕发射的荧光。然后借助平行检测已知量标准品制作的标准曲线（参见附图 5），确定样品中 SARS 病毒的存在及其量（相应的病毒蛋白含量）。

或者，也可以利用竞争完成上述检测，该方法包括：（1）提供可与 SARS 病毒蛋白结合的抗体并用所说的抗体包被固相载体；（2）向步骤（1）的被包被的固相内加入待检生物学体液样品和对照样品、镧系金属离子标记的可与抗

SARS 病毒蛋白单克隆抗体结合的抗原；(4) 反应后充分洗涤所说的固相并检测与抗原结合的镧系金属离子发射的荧光值；(5) 将所测得的荧光值与平行测得的已知量标准品的荧光相比较以确定样品中 SARS 病毒的存在及其相对量。

使用本发明提供的抗 SARS 病毒抗体和已知的时间分辨荧光检测技术，可以在疾病发生的早期从极微量临床样品中准确地检测到 SARS 病毒的存在。因此，基于 TR-FIA 技术的高度灵敏度、特异性和选择性，本发明建立的 SARS 病毒检测方法为实现 SARS 的早期诊断提供了重要的临床判断依据。

在实验室研究的基础上，我们使用本发明的方法检测了得自包括 89 例已确诊病例、56 例疑似病例和 93 例正常人群的共 238 份临床血清样品。结果显示，得自 89 例临床病人的样品中，有 64 例确定为 SARS 病毒阳性（阳性检出率为 71.9%）；56 例疑似病人中，有 6 例检测为 SARS 病毒阳性（阳性检出率为 10.7%）；93 例健康自愿者的样品则全部为 SARS 病毒阴性。如果以所有 89 例临床确诊病例作为真阳性病例，并将所有 93 例正常人定为真阴性，由此可以计算出本发明方法的灵敏度为 78%，特异性为 100%，而且检测的灵敏度很高（可检测的病毒蛋白浓度下限在 0.2ng/ml 以下）。因此，本发明的方法足可以为严重急性呼吸综合症的早期临床诊断提供可靠的临床检验数据。

本发明的另一个目的是提供用于上述本发明的检测方法的抗 SARS 病毒抗体，特征在于所说的抗体可与 SARS 病毒蛋白的特定抗原决定基区域结合，并可与镧系金属离子形成络合物。所说的抗体是用得自 SARS 病人体内的纯化的 SARS 病毒、或与载体分子连接的人工合成多肽免疫动物，分离被免疫动物的脾细胞，然后按常规方法制备杂交瘤并在适当条件下培养所说的杂交瘤细胞得到的。

根据本发明的再一个优选实施方案，如上限定的抗体包括可与 SARS 病毒蛋白的不同抗原决定基特异性结合的第一和第二抗体。

根据本发明的再一个优选实施方案，如上限定的抗体是单克隆抗体。

本发明的再一个目的是提供完成上述检测的试剂盒，特征在于其中包括可同时与固相和 SARS 病毒结合的第一抗体，以及可与 SARS 病毒结合并且偶联了镧系金属离子的第二抗体。

根据本发明的一个优选实施方案，其中所说的镧系金属离子是铕离子。

除上述成分外,本发明的试剂盒还包括用于调节反应体系的 pH 的缓冲剂以及用于稀释临床样品的稀释剂和/或稳定剂等辅助试剂。

另外,还应指出的是,虽然用于本发明方法和试剂盒的第二抗体通常是与预先标记或结合了镧系金属离子(例如铕)的,但第二抗体也可以是与所说的镧系金属离子分立并在检测样品时临时偶连在一起的。

实施例

实施例 1

本实施例举例描述本发明的 SARS 病毒抗原检测法中所涉及的材料及其制备。

(1) SARS 病毒的分离和增殖

从病人尸检肺组织标本中分离并鉴定出一株 SARS 冠状病毒。用所得到的病毒接种作为宿主的 Vero E6 细胞(中国科学院上海细胞所细胞库)后,于常规条件下培养被感染的细胞。病毒感染性滴度(TCID₅₀/ml)达到 $10^{6.5}$ 以上后,荧光定量 PCR 方法检测培养物上清中 SARS 病毒 RNA 拷贝数约为 10^{12} /ml。免疫电镜观察到大小约为 60-120nm 的病毒颗粒(附图 1)。使用对冠状病毒聚合酶基因保守区特异的引物:

引物 1:TAGGCGTACTGACATTAGATAATCA(SEQ ID NO:1)

引物 2:ACAAAGTCTCTCTTCCGTAAAATCA(SEQ ID NO:2)

反转录引物:AATAAAGTCTAGCCTTACCCCATTT(SEQ ID NO:3)

进行 RT-PCR 分析,结果扩增得到具有预期大小(238bp)的片段。然后,使用无血清培养基大规模培养所得到的 SARS 病毒。使用 0.4%甲醛溶液对所得病毒进行灭活处理(24 小时),并以细胞病变法证实病毒完全失活后,离心(12000 转/分,30 分钟)收集灭活病毒的培养物上清(病毒原液),直接作为免疫原用于免疫动物。

或者,也可以根据已公布的 SARS 全序列(Genbank 登录号:NC_004718),结合计算机软件分析结果,从中筛选出氨基亲水性值较高的多肽(表 1)并使用所说的多肽与载体蛋白分子(KLH 或 BSA)的连接产物作为免疫原。可按下述方法制备多肽与载体分子的连接物:首先将 300mg KLH(或 BSA)溶于 15ml 双蒸水中,

搅拌下加入 400mg EDPC, 溶解后再加入 1ml 10% EDA, 然后用 1M HCl 调节 pH 至 5.5。将所得混合物室温下搅拌 2 小时后再加入 200mg EDPC, 同样用 1M HCl 调节 pH 至 5.5, 并将混合物 4℃保温过夜。对 PBS (7.2) 透析 2 天后, 冻干得到 EDA-KLH(或 BSA) 结合物。然后, 将 5mg 多肽溶解在 0.08ml 无水乙醇中并用 0.32ml 双蒸水稀释。将此溶液与 20mg EDA- KLH(或 BSA) 的水 (0.4ml) 溶液混合, 并调节 pH 至 5.0。然后在持续搅拌下将该溶液逐滴加入到 EDPC 溶液 (1.32g EDPC 溶于 1.5ml 双蒸水) 中。室温下保温 5 小时, 将反应混合物对 0.1M NaCl 透析 24 小时, 冻干后即得到用作免疫原的制备物。

(2) 抗 SARS 病毒抗体的制备

使用 19-21 周龄的 Balb/C 小鼠作为被免疫动物, 并以病毒原液作为免疫原。首先用病毒原液 (0.4ml) ($TCID_{50} \approx 6.5$, 病毒 RNA 拷贝数约为 10^{12}) 加等体积完全弗氏佐剂乳化后, 皮下多点注射以进行基础免疫。2 周后, 以在不同完全弗氏佐剂中乳化的同样剂量病毒进行追加免疫。追加免疫后 2 周, 再次用不含弗氏佐剂的病毒原液 (0.4ml) 腹腔注射, 以进行加强免疫。末次免疫后, 从动物的尾静脉采血并测试抗体效价。必要时, 可于处死动物分离脾细胞前 3 天, 再加强免疫一次。

血清抗体效价达到足够的水平后, 处死动物并分离脾细胞, 按适当比例将被免疫小鼠的脾细胞与 SP2/0 骨髓瘤细胞混合并在 PEG-4000 作用下融合之。

适当稀释 SARS 病毒原液后, 用所得稀释液包被微量滴定板, 然后以间接 ELISA 法检测杂交瘤阳性克隆, 并用有限稀释法对检出的阳性克隆进行亚克隆。经四次亚克隆后, 共筛选出 73 株分泌抗 SARS 病毒蛋白的杂交瘤细胞株。经进一步的配对试验, 得到两株可与病毒蛋白上的不同结合位点结合的单克隆抗体 (5B8 和 12D4)。

ELISA 试验表明, 在体外培养条件下, 得自杂交瘤培养物上清的抗体 5B8 和 12D4 的效价分别为 1: 512 和 1: 256。在体内培养条件下, 得自动物腹水液的抗体效价为分别 1: 25600 和 1: 12800。免疫荧光分析表明, 两株抗体均能与 SARS 病毒蛋白特异结合 (附图 2)。进一步的抗体分型实验结果显示, 两株杂交瘤细胞分泌的抗体类型均为 IgG1 (附图 3)。对两株杂交瘤细胞的形态学观察可

见，它们的染色体数目范围在 92—110 之间，并且大多数为端着丝点，少数为亚中部及中央着丝点。

(3) 抗 SARS 病毒抗体的纯化和 Eu^{3+} 标记

用蛋白 G Sepharose 4 Fast Flow 柱 (Amersham) 纯化腹腔内接种杂交瘤 (细胞株 12D4) 后得到的小鼠腹水液，然后于 4℃ 磁力搅拌下对过量 Na_2CO_3 溶液 (pH9.3, 50mmol/L) 充分透析 (12 小时)。最后将其中的蛋白质浓度调整到 5.0mg/ml。SDS-PAGE 分析可见，纯化后的抗体在电泳凝胶上显示为两条带 (轻链和重链，见附图 5)。ELISA 检测结果表明抗体效价与纯化前基本相同。

向 1mg (200 μL) 单抗 12D4 溶液中加入 0.5mg DTTA 并调整 pH 值至 8.5，然后于 4℃ 保温 4 小时。保温后将溶液对生理盐水透析 6 小时以上，然后加入 EuCl_3 溶液 (33mmol/L, 30 μL)，并于 4℃ 下继续保温 10 小时，以标记抗体蛋白质。

标记反应完成后，用 Superdex 200 柱 (Amersham) 纯化所得到的反应溶液，并用含 0.9% NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (50mmol/L, pH 7.6) 洗脱液洗脱。

参照 Eu^{3+} 标准品，计算标记产物中平均每个抗体蛋白分子所结合的 Eu^{3+} 离子数目。用 0.22 μm 超滤膜过滤如此得到的标记产物，并加入终浓度为 0.1% 胎牛血清白蛋白 (BSA)，于 -20℃ 或 -70℃ 保存备用。

实施例 2

本实施例举例描述使用本发明的抗 SARS 病毒抗体，以双抗体夹心时间分辨荧光检测技术 (TR-FIA) 检测血液样品中 SARS 病毒的方法。

实验采用标准的双抗体夹心法完成。其中所使用的参考标准品是分别有以下浓度的 SARS 病毒蛋白的溶液：0、0.2、1、5、25 和 150 ng/ml。所使用的洗涤液是含有 0.1% Tween-20 和 0.9% NaCl 的 Tris-HCl 缓冲液 (50mmol/L, pH 7.6)。

用 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 缓冲溶液 (50mmol/L, pH9.6) 将如上方法纯化的抗 SARS 抗体 5B8 (作为第一抗体) 蛋白浓度稀释至 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，并按每孔 200 μL 的体积加至 96 孔微量滴定板的各孔中，然后 4℃ 孵育 24 小时。孵育后，用洗涤液冲洗 3 次，并于每孔内各加入含 0.1% Tween-20 的 1% FBSA 250 μL 。37℃ 封闭孵育 8 小时后，再次用洗涤液洗 3 次，然后冻干即制成单克隆抗体包被的微量滴定板。

于 4℃或-20℃下保存备用。

实际检测时，按顺序分别向抗体预包被的小孔内加入阴性和阳性对照样品、参考标准品及待检样本各 100 μ l。用薄膜贴封后，缓慢振荡下室温孵育 1 小时。

孵育后，用洗涤液洗涤小孔 4 次并风干，然后每孔内再加入上述标记的抗 SARS 抗体 12D4 (100 μ l) (作为第二抗体)。用薄膜贴封各小孔，并在缓慢振荡下室温孵育 1 小时。孵育后再用洗涤液洗 6 次并风干，每孔各加入增强液 (Perkinelmer) 100 μ l，密封和缓慢振荡条件下继续室温孵育 5 分钟。

然后用时间分辨荧光检测仪 (ANYTEST2000 型, 上海新波生物技术公司生产) 检测荧光值 (CPS)。

根据平行检测的已知病毒蛋白浓度的参考标准品所制作的标准曲线 (附图 5)，由电脑程序自动计算出各样品的浓度值。其中同一样品平行孔间的变异系数 (CV) 应不高于 10%。蛋白浓度值 ≥ 0.2 ng/ml 的样品判断为 SARS 病毒阳性，小于 0.2 ng/ml 的样品则定为阴性。

上述实验证明，使用本发明提供的分别作为第一和第二抗体的两种可与 SARS 病毒的不同抗原结合位点结合的抗体 (5B8 和 12D4)，以时间分辨荧光检测技术检测未知临床样品中可能存在的 SARS 病毒，其所能够检测到的最低病毒蛋白浓度可低至 0.2 ng/ml。统计学分析表明，该方法的灵敏度约为 78%，特异性达 100%。因此，本发明的基于时间分辨荧光检测技术的 SARS 病毒检测方法，是一种检测临床样品中 SARS 病毒存在的十分准确、灵敏和快捷的方法。该方法的推广使用必将为严重急性呼吸综合症的早期诊断作出贡献。

序 列 表

<110>广州达瑞抗体工程技术有限公司

<120>检测 SARS 病毒抗原的方法

<140>

<141>

<160>3

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 1

TAGGCGTACT GACAT TAGAT AATC

<210> 2

<211>25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作 PCR 扩增的引物。

<400> 2

ACAAAGTCTC TCTTCCGTAA AATCA

<210> 3

<211>25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 根据特定核苷酸序列设计，以用作反转录引物。

<400> 2

AATAA AGTCT AGCCT TACCC CATTT

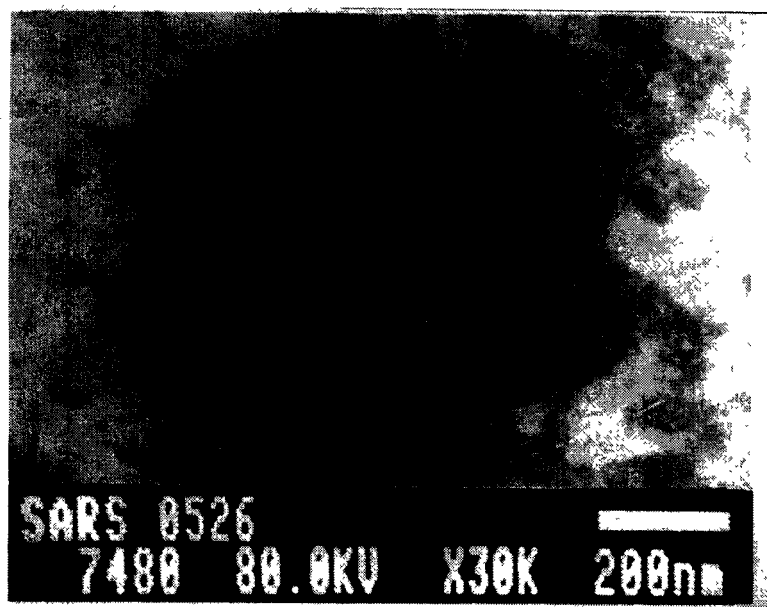


图 1

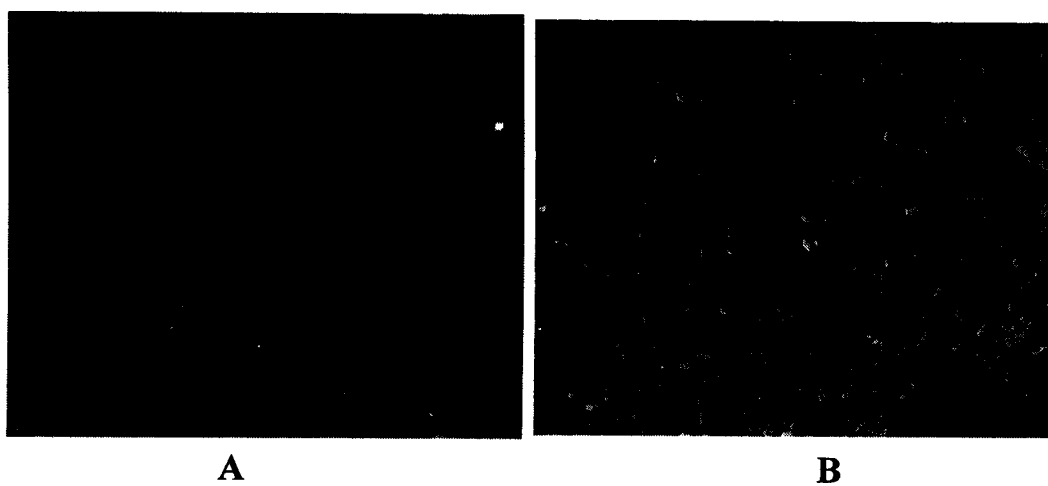


图 2

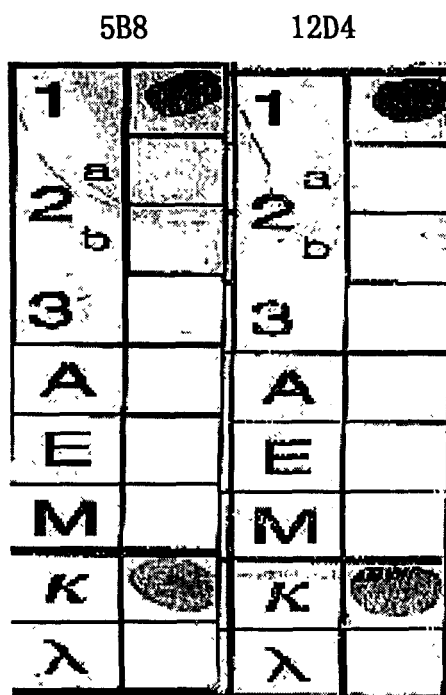


图 3

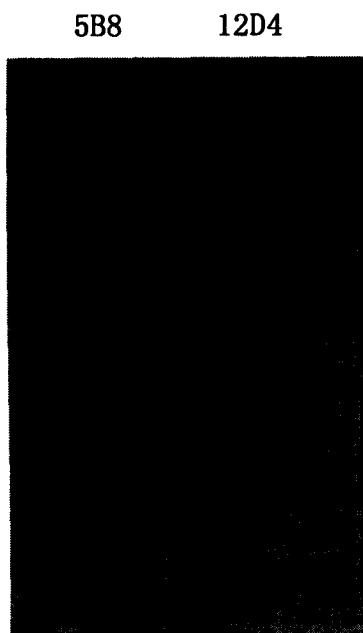


图 4

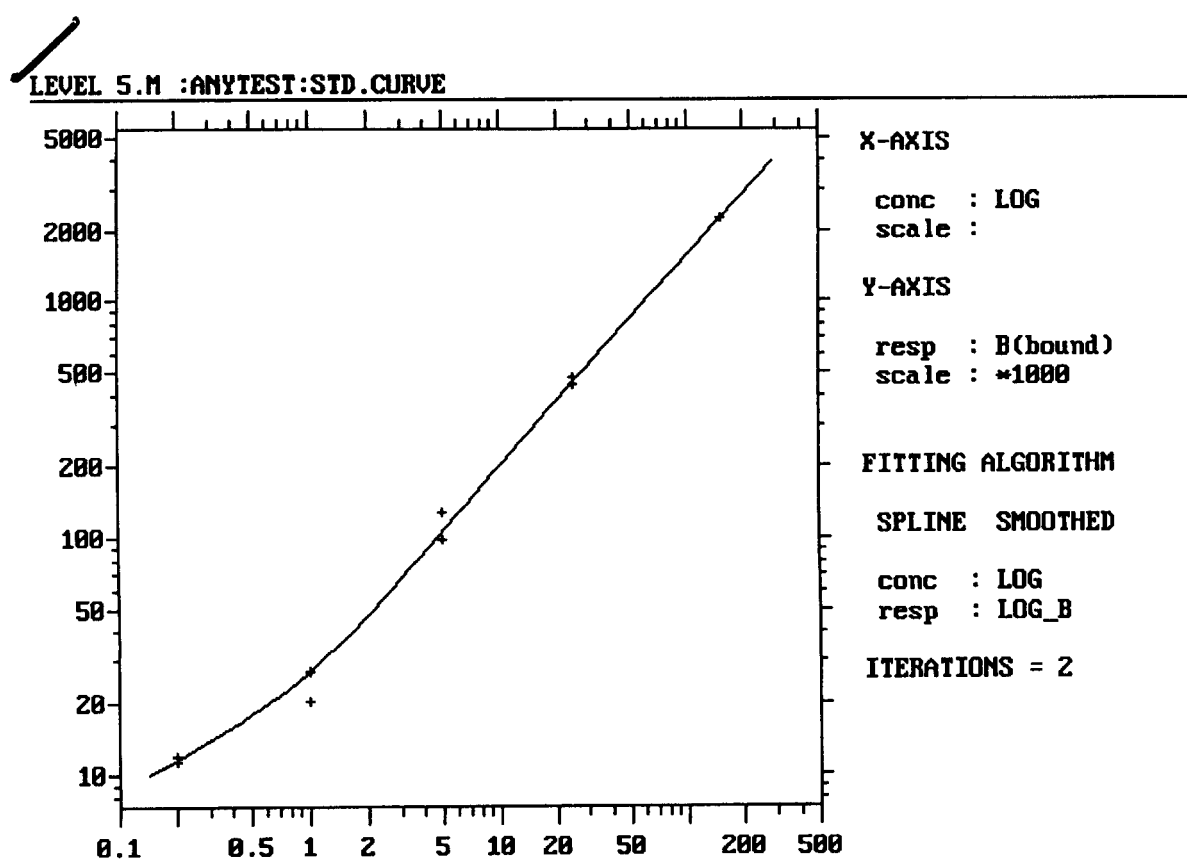


图 5

专利名称(译)	检测SARS病毒抗原的方法		
公开(公告)号	CN1598581A	公开(公告)日	2005-03-23
申请号	CN03146846.2	申请日	2003-09-17
[标]申请(专利权)人(译)	广州市达瑞抗体工程技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州市达瑞抗体工程技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州市达瑞抗体工程技术有限公司		
[标]发明人	李明 吴英松 宁云山 程钢		
发明人	李明 吴英松 宁云山 程钢		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/569 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及检测SARS病毒的方法，特别是涉及使用具有高敏感性的时间分辨荧光免疫检测技术实时监测临床样品中的SARS病毒的方法。

