



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103954756 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201410197677. 9

(22) 申请日 2014. 05. 12

(73) 专利权人 郑州伊美诺生物技术有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区
经北一路 84 号附 3 号

(72) 发明人 赵巧辉 黄学勇 许汴利 杜燕华
李桂林 付光宇 吴学炜

(74) 专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙) 41114

代理人 王霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 102070704 A, 2011. 05. 25,

CN 102778568 A, 2012. 11. 14,

CN 102809649 A, 2012. 12. 05,

Petrus Jansen van Vuren 等. Preparation
and evaluation of a recombinant Rift Valley

fever virus N protein for the detection
of IgG and IgM antibodies in humans and
animals by indirect ELISA.. 《Journal of
Virological Methods》. 2006, 第 140 卷

Yongjun Jiao 等. Preparation and
evaluation of recombinant severe fever
with thrombocytopenia syndrome virus
nucleocapsid protein for detection of
total antibodies in human and animal sera
by double-antigen sandwich enzyme-linked
immunosorbent assay.. 《Journal of Clinical
Microbiology》. 2011, 第 50 卷(第 2 期),

陈堃 等. 新型布尼亚病毒抗体检测方法的
建立及初步应用. 《生物技术通讯》. 2014, 第 25
卷(第 1 期),

刘艳 等. 发热伴血小板减少综合征患者血
清中核蛋白抗体的动态变化. 《现代生物医学进
展》. 2013, 第 13 卷(第 18 期),

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗
体 IgG 的试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种检测人发热伴血小板减少
综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒, 包括反应滴定微
孔板和包含有阴性对照、阳性对照, 样品稀释液,
HRP- 鼠抗人 IgG, 底物液、显色液和终止液的检
测试剂, 反应滴定微孔板上包被有 0. 2ug/ml~0. 4
ug/ml 的 rSFTSN 蛋白, 样品稀释液中含有 5ug/
ml~10ug/ml 的 rRVFN 重组蛋白, HRP- 鼠抗人 IgG
酶中含终浓度 5ug/ml~10ug/ml 的 rRVFN 重组蛋
白。本发明还公开了该试剂盒在制备用于人群感
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。使用本试剂盒检测人发
热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG, 灵敏度可
达 99. 8%; 分析内精密密度为 2. 5%(n=10), 分析间精
密度为 4. 5% (n=10); 特异性 :99. 5%。

1. 一种检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒,包括反应滴定微孔板和包含有阴性对照、阳性对照,样品稀释液,HRP-鼠抗人 IgG,底物液、显色液和终止液的检测试剂,其特征在于:所述反应滴定微孔板上包被有 0.2 ug/ml ~ 0.4ug/ml 的 rSFTSN 蛋白,所述样品稀释液中含有 5ug/ml ~10ug/ml 的 rRVFN 重组蛋白,HRP-鼠抗人 IgG 酶中含终浓度 5 ug/ml-10ug/ml 的 rRVFN 重组蛋白。

2. 根据权利要求 1 所述的检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒,其特征在于:所述 rSFTSN 蛋白的制备方法为:按照 NCBI :4J4R_A 中序列合成 SFTSN 蛋白读框序列,将扩增后的序列插入 PET30A 构建 PET30A-NP 表达质粒,然后用 PET30A-SFTSN 转化 BL21DE3,再采用常规 IPTG 诱导表达 6HIS-rSFTSN 重组蛋白,Hi trap 纯化 6HIS-rSFTSN 重组蛋白即可得到 rSFTSN 蛋白。

3. 根据权利要求 1 所述的检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒,其特征在于:所述 rRVFN 重组蛋白的制备方法为:按照 NCBI :EU574085 中序列合成 RVFN 蛋白读框序列,将扩增后的序列插入 PET30A 构建 PET30A-rRVFN 表达质粒,然后用 PET30A-rRVFN 转化 BL21DE3,再采用常规 IPTG 诱导表达 6HIS-rRVFN 重组蛋白,Hi trap 纯化 6HIS-rRVFN 重组蛋白即可得到 rRVFN 重组蛋白。

4. 如权利要求 1 所述的检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒在制备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。

一种检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其是涉及一种检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒,本发明还涉及该试剂盒在制备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。

背景技术

[0002] 布尼亚病毒科 (Bunyaviride) 是一类有包膜的负链 RNA 病毒,目前已知的病毒至少有 350 种,是虫媒病毒中病毒数最多的一科,包括能感染人和动物的布尼亚病毒属 (Orthobunyavirus)、白蛉病毒属 (Phlebovirus)、内罗毕病毒属 (Nairovirus)、汉坦病毒属 (Hantavirus) 和感染植物的番茄斑萎病毒属 (Tospovirus)。其中白蛉病毒属目前国际上公认分成两大组,一组是致病性的白蛉热组 (Sandfly fever group),如立夫特谷热病毒 (Rift Valley Fever Virus) 等,另一组是非致病性的乌库病毒组 (Uukuniemi group),一般对人类不致病,如乌库病毒 (Uukuniemi Virus) 等。近年来,河南、江苏、湖北、安徽、山东、辽宁、浙江等地相继发生发热伴血小板减少综合征 (severe fever with thrombocytopenia Syndrome, SFTS) 病例,经证实其病原体为一种新布尼亚病毒,被称为发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 (severe fever with thrombocytopenia Syndrome bunyavirus, SFTSV)。新发现的 SFTSV 为白蛉病毒属的第三组病毒。SFTSV 电镜下病毒颗粒呈球形或椭圆形,直径约 80 nm ~ 100 nm,其基因组由大 (L)、中 (M)、小 (S) 3 个单股负链 RNA 片段组成。病人感染 SFTSV 后引起 SFTS,主要表现为急性起病、发热、恶心、呕吐、腹泻、乏力、全身不适、肌肉酸痛、头痛、头晕, WBC、PLT 进行性下降等,可因多器官功能衰竭死亡。SFTSV 可以通过蜱虫叮咬传播,也可通过接触病人血液等传播。

[0003] 国家疾控中心对其进行了病原学、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及疫苗的保护作用。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于针对上述现有技术存在的不足,提供一种检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒,该试剂盒适用于流行病学调查,也可作为临床诊断中发热伴血小板减少综合征病毒感染的辅助诊断。

[0005] 为实现上述目的,本发明可采取下述技术方案:

[0006] 本发明所述的检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒,包括反应滴定微孔板和包含有阴性对照、阳性对照,样品稀释液, HRP-鼠抗人 IgG, 底物液、显色液和终止液的检测试剂,所述反应滴定微孔板上包被有 0.2 ug/ml ~ 0.4ug/ml 的 rSFTSV 蛋白,所述样品稀释液中含有 5ug/ml ~ 10ug/ml 的 rRVFV 重组蛋白, HRP-鼠抗人 IgG 酶中含

终浓度 5 ug/ml-10ug/ml 的 rRVFN 重组蛋白。

[0007] 所述 rSFTSN 蛋白的制备方法为 :按照 NCBI :4J4R_A 中序列合成 SFTSN 蛋白读框序列,将扩增后的序列插入 PET30A 构建 PET30A-rSFTSN 表达质粒,然后用 PET30A-rSFTSN 转化 BL21DE3,再采用常规 IPTG 诱导表达 6HIS-rSFTSN 重组蛋白,Hitrap 纯化 6HIS-rSFTSN 重组蛋白即可得到 rSFTSN 蛋白,并包被于反应滴定微孔板上。

[0008] 所述 rRVFN 重组蛋白的制备方法为 :按照 NCBI :EU574085 中序列合成 RVFN 蛋白读框序列,将扩增后的序列插入 PET30A 构建 PET30A-rRVFN 表达质粒,然后用 PET30A-rRVFN 转化 BL21DE3,再采用常规 IPTG 诱导表达 6HIS-rRVFN 重组蛋白,Hitrap 纯化 6HIS-rRVFN 重组蛋白即可得到 rRVFN 重组蛋白,并添加到样品稀释液和酶稀释液中。

[0009] 本发明所述的试剂盒在制备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。

[0010] 本发明试剂盒适用于对人血清或血浆样品中 SFTSN-IgG 抗体的定性检测。由于机体受发热伴血小板减少综合征病毒刺激时,SFTS-IgG 抗体比 SFTS-IgM 抗体出现时间稍晚,在急性期过后,SFTS-IgM 抗体较快下降,而 SFTS-IgG 抗体可能长时间存在。

[0011] 本发明采用 ELISA 分析法对人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 进行检测,微孔条上包被 rSFTSN 抗原,可与样品中 rSFTSN 抗体反应,加入 HRP 标记的抗人 IgG 抗体后,将形成“包被抗原-抗体-酶标抗人 IgG”复合物。加入底物剂,复合物上连接的 HRP 使显色剂生成蓝色产物,终止后变为黄色。显色强度与 rSFTSN-IgG 抗体含量成正比,当待检样品中无 rSFTSN-IgG 抗体存在时,不显色。

[0012] 实验表明,使用本发明试剂盒检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG,各项指标可达到 :灵敏度 :99.8%;精密度 :分析内精密度为 2.5% (n=10),分析间精密度为 4.5% (n=10);特异性 :99.5%。

[0013] 本发明所述试剂盒的主要质量指标包括灵敏度、特异性、精密性、稳定性,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。

[0014] 以本发明制备的试剂其检测灵敏度 :4mIU/ml ;特异性验证 :与其它同科布尼亚病毒 IgG 抗体无交叉反应 ;精密性验证 ;试剂批间差异(CV%) 不高于 15%。

具体实施方式

[0015] 本发明试剂盒的具体制备方法如下 :

[0016] 一、rSFTSN 蛋白的表达和纯化

[0017] 参照 NCBI (4J4R_A) 中序列,合成其 N 蛋白的读码框并分别在 5' 添加酶切位点 NdeI,3' 添加酶切位点 XhoI。采用常规分子生物学方法,将该阅读框插入细菌表达质粒 PET30A(novagen) 的和之间,得到细菌表达质粒 PET30A-rSFTSN。将该质粒常规转化 E. Coli BL21DE3(novagen),按照厂商推荐的方法诱导表达 rSFTSN 重组蛋白,并用 Hitrap(novagen) 常规纯化 rSFTSN 重组蛋白,SDS-PAGE 检测蛋白分子量和纯度,常规蛋白定量备用。

[0018] 二、rRVFN 蛋白的表达和纯化

[0019] 参照 NCBI (EU574085) 中序列,合成其 N 蛋白的读码框并分别在 5' 添加酶切位点 NdeI,3' 添加酶切位点 XhoI。采用常规分子生物学方法,将该阅读框插入细菌表达质粒

PET30A(novagen) 的和之间,得到细菌表达质粒 PET30A-rRVFN。将该质粒常规转化 E. Coli BL21DE3(novagen), 按照厂商推荐的方法诱导表达 rRVFN 重组蛋白,并用 Hi trap(novagen) 常规纯化 rRVFN 重组蛋白, SDS-PAGE 检测蛋白分子量和纯度,常规蛋白定量备用。

[0020] 三、HRP-鼠抗人 IgG 制备

[0021] 抗体标记:取辣根过氧化物酶溶于三蒸水中,加入过碘酸钠溶液活化,加入乙二醇反应,将反应混合物装入透析袋,用醋酸缓冲液透析,加入待标记物(是鼠抗人 IgG 特异性抗体)混匀,碳酸缓冲液调 pH 至碱性,加入 NaHB₄ 溶液反应后,装入透析袋,用磷酸盐缓冲液透析,分装后加入蛋白保护剂(含终浓度 50% 的甘油), -20 度保存。

[0022] 四、制备人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒

[0023] 检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 的试剂盒,包括包被有 0.2 ug/ml~0.4 ug/ml rSFTSN 蛋白的 96 孔酶免透明聚苯乙烯白色反应滴定微孔板,工作浓度为 0.11μg/ml 的辣根过氧化物酶标记鼠抗人 IgG 特异性抗体(含 5ug/ml ~10ug/ml rRVFN 重组蛋白);96 孔酶免透明聚苯乙烯反应滴定微孔板包被 rSFTSN 重组蛋白:包被缓冲液采用 pH9.6, 0.05M 碳酸盐缓冲液;包被浓度 0.2ug/ml ~0.4μg/ml, 包被量 100μl/孔, 0℃~4℃包被过夜;弃去孔内液体,使用 PBS-Tween 洗液洗板孔 1 次;用 PH7.4 PBS-2% Casein(m/v), 100μl/孔,室温封闭 2h。

[0024] 样品稀释液: 0.02 mol PBS-2% Casein(m/v) PH7.4 (含 5ug/ml~10ug/ml rRVFN 重组蛋白)。

[0025] 阳性对照制备:用样品稀释液稀释,人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG 阳性的血清,到 OD 值 0.6 左右。

[0026] 阴性对照制备:正常人血清。

[0027] 五、本发明试剂盒的使用方法

[0028] 本试剂盒于 2-8℃保存,有效期 6 个月。使用前将试剂盒平衡至室温(约 30 分钟)。未用完的微孔板条须与干燥剂及其用自封袋密封 2-8℃保存。实验前将液体试剂轻轻振荡混匀,使用后立即密闭放回 2-8℃保存。

[0029] 适用仪器

[0030] 加样器、温箱、洗板机、含波长 450nm 酶标仪。

[0031] 样本要求

[0032] 1) 本试剂使用人血清或血浆,含有 EDTA、柠檬酸钠或肝素等抗凝剂的样品可用于本实验。

[0033] 2) 不能检测含悬浮纤维蛋白或聚集物、重度溶血的样品。

[0034] 3) 样品中应无微生物,无菌分离的样品可在 2-8℃存储一周,长期储存应低温冻存,避免反复冻融。

[0035] 4) 使用前请将样品室温平衡 30 分钟以上,冻存样品实验前需混匀。

[0036] 试验前准备

[0037] 1) 取 1 包固体洗液用 500ml 蒸馏水溶解后备用。

[0038] 2) 取出试剂盒及待测样品,将所有试剂及样品恢复至室温(18-25℃)。

[0039] 3) 将恒温箱或水浴锅调至反应温度。

[0040] 4) 提前 30 分钟将发光底物 A、B 液等比例混合至本次试验所需体积。

[0041] 实验步骤

[0042] 1) 配液 : 将固体洗涤剂用蒸馏水或去离子水 (5g 固体洗涤剂 /500ml 蒸馏水或去离子水) 倍稀释。

[0043] 2) 编号 : 将样品对应微孔板按序编号, 每板应设阴性对照 3 孔, 阳性对照 2 孔和空白对照 1 孔 (用双波长检测, 可不设空白对照孔)。

[0044] 3) 加稀释液 : 每孔加入样品稀释液 100 μ l, 空白孔除外。

[0045] 4) 加样 : 分别在相应孔中加入待测样品或阴、阳性对照 10 μ l, 轻轻振荡混匀。

[0046] 5) 温浴 : 用封板膜封板后, 置 37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟。

[0047] 6) 洗版 : 小心揭掉封板膜, 用洗板机洗涤 6 遍, 最后一次尽量扣干。

[0048] 7) 加酶 : 每孔加入酶标试剂 100 μ l, 空白孔除外, 轻轻振荡混匀。

[0049] 8) 温浴 : 操作同 5。

[0050] 9) 洗板 : 操作同 6。

[0051] 10) 显色 : 每孔加入底物液、显色液各 50 μ l 轻轻振荡混匀, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 10 分钟。

[0052] 11) 测定 : 每孔加终止液 50 μ l, 轻轻振荡混匀, 10 分钟内测定结果。设定酶标仪波长于 450nm 处 (建议用双波长 450nm/600nm 检测), 用空白孔调零点后测定各孔的值。

[0053] 六、检验结果

[0054] 1) 阴性对照的正常范围 : 正常情况下, 阴性对照孔 A 值 ≤ 0.10 。(若有 1 孔阴性对照 A 值大于 0.1 应舍弃, 若两孔或两孔以上阴性对照 A 值大于 0.1, 应重复实验)。

[0055] 2) 阳性对照的正常范围 : 正常情况下, 阳性对照孔 A 值 ≥ 0.4 。

[0056] 3) 临界值 (CUTOFF) 计算 : 临界值 = 0.1 + 阴性对照孔平均值 OD 值 (阴性对照孔低于 0.05 者按 0.05 计算)。

[0057] 有效性判断 : 阳性对照 OD 值 ≥ 0.4 , 阴性对照 OD 值 ≤ 0.1 。

[0058] 4) 阴性判定 : 样品 A 值 < 临界值 (CUTOFF) 者为发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 -IgG 抗体阴性。

[0059] 5) 阳性判定 : 样品 A 值 $\geq$ 临界值 (CUTOFF) 者为发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 -IgG 抗体阳性。

[0060] 6) 检测标本情况 (部分数据) :

[0061]

标本	OD 值
阳性对照	0.56
阴性对照	0.08
临床确认阳性标本	1.45
临床确认阳性标本	1.49
临床确认阳性标本	2.21
临床确认阳性标本	1.13
临床确认阳性标本	2.27
临床确认阳性标本	1.13
临床确认阳性标本	2.13
临床确认阳性标本	1.62
临床确认阳性标本	1.74
临床确认阳性标本	0.46
临床确认阳性标本	0.55
临床确认阳性标本	1.53

临床确认阳性标本	1.16
临床确认阴性标本	0.10
临床确认阴性标本	0.07

[0062] 七、结论

[0063] 本发明试剂盒检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体 IgG, 各项指标可达到 : 灵敏度 :99.8% ; 精密度 : 分析内精密度为 2.5% (n=10), 分析间精密度为 4.5% (n=10); 特异性 :99.5%。

专利名称(译)	一种检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体IgG的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN103954756B	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201410197677.9	申请日	2014-05-12
[标]申请(专利权)人(译)	郑州伊美诺生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州伊美诺生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州伊美诺生物技术有限公司		
[标]发明人	赵巧辉 黄学勇 许汴利 杜燕华 李桂林 付光宇 吴学炜		
发明人	赵巧辉 黄学勇 许汴利 杜燕华 李桂林 付光宇 吴学炜		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/56983 G01N33/6893 G01N2333/175		
代理人(译)	王霞		
其他公开文献	CN103954756A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体IgG的试剂盒，包括反应滴定微孔板和包含有阴性对照、阳性对照，样品稀释液，HRP-鼠抗人IgG、底物液、显色液和终止液的检测试剂，反应滴定微孔板上包被有0.2ug/ml~0.4 ? ug/ml的rSFTSN蛋白,样品稀释液中含有5ug/ml~10ug/ml的rRVFN重组蛋白,HRP-鼠抗人IgG酶中含终浓度5ug/ml-10ug/ml ? 的rRVFN重组蛋白。本发明还公开了该试剂盒在制备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。使用本试剂盒检测人发热伴血小板减少综合征病毒抗体IgG，灵敏度可达99.8%；分析内精密密度为2.5%（n=10），分析间精密密度为4.5%（n=10）；特异性：99.5%。

标本	OD 值
阳性对照	0.56
阴性对照	0.08
临床确认阳性标本	1.45
临床确认阳性标本	1.49
临床确认阳性标本	2.21
临床确认阳性标本	1.13
临床确认阳性标本	2.27
临床确认阳性标本	1.13
临床确认阳性标本	2.13
临床确认阳性标本	1.62
临床确认阳性标本	1.74
临床确认阳性标本	0.46
临床确认阳性标本	0.55
临床确认阳性标本	1.53