



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112724247 A

(43) 申请公布日 2021. 04. 30

(21) 申请号 202011565164.0

(22) 申请日 2020.12.25

(71) 申请人 江苏中方基因生物医学科技有限公司

地址 226100 江苏省南通市海门临江镇洞庭湖路100号A10栋

申请人 武汉菲沙基因信息有限公司

(72) 发明人 戴方平 陈东生 程艳兵 张韦唯

(74) 专利代理机构 南京正联知识产权代理有限公司 32243

代理人 沈留兴

(51) Int. Cl.

C07K 16/10 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体及其在ELISA检测试剂盒中的应用

(57) 摘要

本发明公开一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体,一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体及其在ELISA检测试剂盒中的应用,包括下列技术措施:1)根据SARS-CoV-2冠状病毒侵入人体后自身产生的所有抗体全长序列信息与未感染SARS-CoV-2冠状病毒者体内抗体序列进行比对分析;2)并进行了原核密码子优化,并将pET32a-IgA质粒转化至E.coli BL21 (DE3)感受态中,在E.coli BL21 (DE3)菌株中高效表达并纯化,最后获得纯化的IgA蛋白。3)鉴定人群是否感染SARS-CoV-2冠状病毒或者检测人血清中是否含有SARS-CoV-2冠状。具有灵敏度高,特异性好以及纯度高等特点,本发明的ELISA试剂盒灵敏度较高,特异性较强,操作简单,检测时间短,临床实用性强。

1. 一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体,其特征在于: IgA抗体蛋白其序列号为MNWVRQAP GEGLEWLSYISTSSNNIFYADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAGHTGSNWFYWGQGLTVTS SASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGVTARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPAT QCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGSEANLTCTLTG LRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFR PEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFAVTSILRVAEE DWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY*。

2. 根据权利要求1所述的一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体在ELISA检测试剂盒中的应用,其特征在于,包括下列技术措施:

1) 根据SARS-CoV-2冠状病毒侵入人体后自身产生的所有抗体全长序列信息与未感染SARS-CoV-2冠状病毒者体内抗体序列进行比对分析,比对出抗SARS-CoV-2冠状病毒特异性抗体IgA全长序列;

2) 并进行了原核密码子优化,优化后的序列为SEQ ID NO.2所示,嵌入pET32a质粒中、合成了pET32a-IgA原核表达质粒,并将pET32a-IgA质粒转化至E.coli BL21 (DE3)感受态中,在E.coli BL21 (DE3) 菌株中高效表达并纯化,最后获得纯化的IgA蛋白;

3) 鉴定人群是否感染SARS-CoV-2冠状病毒或者检测人血清中是否含有SARS-CoV-2冠状病毒抗原,IgA蛋白作为包被抗体,建立ELISA抗原检测方法。

一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体及其在ELISA检测试剂盒中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,具体一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体及其在ELISA检测试剂盒中的应用。

背景技术

[0002] 冠状病毒 (Coronaviruses, Co Vs) 属冠状病毒科 (Coronaviridae), 其下包括4属: Alpha Coronavirus (α-CoV)、Beta Coronavirus (β-CoV)、Gamma Corona virus (γ-CoV)、Delta Coronavirus (δ-CoV)。目前为止,已知的人类冠状病毒共有六种。其中两种冠状病毒传染率高、病死率高,分别是导致2003年于中国广东省暴发SARS、2012年于沙特暴发MERS的病原体严重急性呼吸综合征冠状病毒 (SARS-CoV) 和中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV), 它们均属于B冠状病毒。MERS症状通常包括发热、咳嗽和呼吸急促,甚至发展为肺炎,病死率约为34.4%。SARS症状通常包括发热、畏寒和身体疼痛,甚至发展为肺炎,病死率约为9.6%。

发明内容

[0003] 为了解决上述问题,本发明公开了一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体及其在ELISA检测试剂盒中的应用。

[0004] 本发明的技术方案为:一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体, IgA抗体蛋白其序列号为

MNWVRQAPGEGLEWLSYISTSSNNIFYADSVKGRFTVSRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCAGHTG
SNWFDYWGGTLTVSSASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGGFFPQEPLSVTWSESGQGV TARNFPSPQDA
SGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPPTPSPSTPPTPSPSCCHPRLSLHRPALE
DLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVFTWTPSSGKSAVQGPPELDLCGYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPES
KTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYL TWASRQEPSQ
GTTTFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY*。

[0005] 一种SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体及其在ELISA检测试剂盒中的应用,包括下列技术措施:

1) 根据SARS-CoV-2冠状病毒侵入人体后自身产生的所有抗体全长序列信息与未感染SARS-CoV-2冠状病毒者体内抗体序列进行比对分析,比对出抗SARS-CoV-2冠状病毒特异性抗体IgA全长序列;

2) 并进行了原核密码子优化,优化后的序列为SEQ ID NO.2所示,嵌入pET32a质粒中、合成了pET32a-IgA原核表达质粒,并将pET32a-IgA质粒转化至E.coli BL21 (DE3) 感受态中,在E.coli BL21 (DE3) 菌株中高效表达并纯化,最后获得纯化的IgA蛋白。

[0006] 3) 鉴定人群是否感染SARS-CoV-2冠状病毒或者检测人血清中是否含有SARS-CoV-2冠状。

[0007] 本发明的有益之处:1、本发明使用的抗体为抗SARS-CoV-2冠状病毒特异性抗体IgA,优化密码子后,嵌入到原核载体pet32a的重组抗原pET32a—IgA,该抗体为可溶性抗体并且经诱导表达纯化后,具有灵敏度高,特异性好以及纯度高特点。同时,pET32a—IgA具有免疫原性,因此是可作为检测试剂盒的包被抗体。

[0008] 2、本发明制备的ELISA抗原检测试剂盒能够准确检测样品中是否含有SARS-CoV-2冠状病毒抗原,本发明的ELISA试剂盒灵敏度较高,特异性较强,操作简单,检测时间短。该试剂盒用样品 OD_{630nm} /阳性对照 OD_{630nm} (S/P) 来判定样品是否为阳性,最终确定:当待检样品的S/P大于或等于0.25,则判为SARS-CoV-2冠状病毒抗原阳性;当S/P<0.25,则判为SARS-CoV-2冠状病毒抗原阴性。本发明的ELISA试剂盒灵敏度较高,特异性较强,操作简单,检测时间短。

[0009] 3、抗SARS-CoV-2冠状病毒特异性抗体IgA全长蛋白表达于上清且表达量高以及临床实用性强。

具体实施方式

[0010] 为了加深对本发明的理解,下面详细描述本发明的具体实施方式,该实施例仅用于解释本发明,并不构成对本发明的保护范围的限定。

[0011] 实施例1:SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体蛋白的获得:

1. 重组质粒的获得

对抗SARS-CoV-2冠状病毒特异性抗体IgA全长序列进行PCR靶向扩增,同时将扩增的IgA完整序列嵌入pET32a载体中,获得重组质粒pET32a-IgA。将重组质粒pET32a—IgA转化至E.coliBL21 (DE3) 感受态中,获得重组菌pET32a-IgA。

[0012] 2. 重组蛋白的表达与纯化

挑取单菌落接种于5ml含50 μ g/ml氨苄的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200r/min振荡培养8小时,再按1%的比例将菌液接种于400ml含50 μ g/ml氨苄的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C,200r/min振荡培养至菌液 OD_{600} 值为0.5时,加入IPTG至终浓度为0.8mmol/L,诱导表达3小时,离心收集菌体,收集的菌体,用原培养液1/10体积的Binding Buffer重悬菌体,在低温高压破碎仪中破碎菌体,重复破碎3次,菌体裂解液10000r/min,离心15分钟,收集上清。用0.22 μ m滤器过滤收集的上清,2 $^{\circ}$ C保存备用。

[0013] 亲和层析纯化具体步骤为:首先,用5个柱体积的Binding Buffer平衡层析柱,然后上样,上样结束后再用10个柱体积的Binding Buffer平衡层析柱,然后,用Elution Buffer进行洗脱,观察仪器屏幕上出现蛋白峰时开始收集,直至峰结束后停止收集,整个过程保持液体流速为1.0 ml/min,收集的蛋白用TE缓冲液透析36小时,每隔12小时换1次透析液,透析完成后收集抗体蛋白,并进行SDS-PAGE分析,同时经Image J软件计算分析蛋白纯度,所得蛋白纯度约为95%,蛋白的氨基酸序列为SEQ ID NO.1所示;超微量核酸蛋白检测仪测定蛋白浓度,所得蛋白浓度约为1.88 mg/mL。

[0014] 3. 重组蛋白pET32a—IgA的免疫原性检测

为了进一步验证所得的IgA全长蛋白的免疫原性,进行Western-blot检测以表明IgA全长蛋白具有生物学活性。

[0015] 实施例2:SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体蛋白构建ELISA检测试剂盒

1. 阳性对照的制备

采集SARS-CoV-2冠状病毒感染中后期患者血液,待血液充分凝固后,4000r/min离心10分钟,分离血清,60℃灭活30分钟,加入终浓度为0.01%的硫柳汞钠,置气-70℃以下保存备用。将制备的血清用保护剂稀释10倍,0.22μm滤器过滤除菌,即为阳性对照。

[0016] 2. 阴性对照的制备

采集未感染过SARS-CoV-2冠状病毒的健康人血液,待血液充分凝固后,4000r/min离心10分钟,分离血清,60℃灭活30分钟,加入终浓度为0.01%的硫柳汞钠,置气-70℃以下保存备用。将制备的血清用保护剂稀释10倍,0.22μm滤器过滤除菌,即为阴性对照。

[0017] 3. 酶标板的准备

通过方阵法确定抗体的包被浓度为1:5000,在2℃包被14小时。弃去包被液,加入1%牛血清白蛋白(BSA)作为封闭液37℃封闭2小时。弃去封闭液,自然风干后抽真空包装成成品试剂盒酶标板。

[0018] 4. 试剂盒其他组分的配备

包被液:碳酸钠(Na_2CO_3) 1.59g、碳酸氢钠(NaHCO_3) 2.93g,加注射用水至1000ml,调pH值至9.6,置2-8℃保存备用。

[0019] 封闭液:牛血清白蛋白(BSA) 5.0g、蔗糖10.0g、氯化钠(NaCl) 8.5g、Tween-20 0.5ml、硫柳汞钠0.10g,加注射用水至1000ml,置2-8℃保存备用。

[0020] 保护剂:取氯化钾(KCl) 0.2g、氯化钠(NaCl) 8.0g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.27g、十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 1.42g、牛血清白蛋白(BSA) 5.0g、硫柳汞钠0.1g、吐温20(Tween-20) 0.5ml、蔗糖2.0g,加注射用水至1000ml,置2-8℃保存备用。

[0021] 样品稀释液:氯化钠(NaCl) 8.0g、十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.9g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.2g、氯化钾(KCl) 0.2g、硫柳汞钠0.1g,加注射用水至1000ml。

[0022] 20倍浓缩洗涤液:吐温20(Tween-20) 10.0ml,氯化钠(NaCl) 160.0g、十二水磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 58.0g、磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 4.0g、氯化钾(KCl) 4.0g,加注射用水至1000ml。

[0023] 底物显色液:柠檬酸盐—磷酸盐缓冲液(pH 5.0) 配制0.1mol/L柠檬酸盐($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)和0.2mol/L磷酸盐($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)按6.1ml : 6.4ml混合配制而成,TMB贮存液配制TMB溶于二甲基亚砜(DMSO),终浓度为32mmol/L,取TMB贮存液用柠檬酸盐—磷酸盐缓冲液作1:20倍稀释,再加入终浓度7.5mmol/L聚乙二醇(PEG)、100mmol/L葡萄糖和2.94mmol/L H_2O_2 ,完全溶解后,避光保存,置2-8℃保存备用。

[0024] 终止液:2.5ml氢氟酸(HF)加到900ml去离子水中,定容至1000ml,分装,10ml/瓶,28℃保存备用。

[0025] 实施例3:SARS-CoV-2冠状病毒IgA抗体蛋白制备的ELISA检测试剂盒的使用方法:

样品处理:取全血,待血液凝固后4000转/分钟离心10分钟,收集上清。也可采集血液,待凝固后自然析出血清,要求血清清亮,无溶血。

[0026] 洗涤液配制:使用前,将浓缩的洗涤液从试剂盒中取出,平衡至室温(20℃),并摇动,使沉淀溶解(最好在37℃水浴中加热5分钟),然后用蒸馏水作20倍稀释,混匀,稀释好的洗涤液在2℃可以存放7日。

[0027] 样品初步稀释:将待检血清样品在血清稀释板中按1:40的比例稀释(例如:在血清

稀释板中先加入195 μ l样品稀释液,再加5 μ l待检血清),阳性对照和阴性对照在血清稀释板中按1:4倍稀释(如:180 μ l样品稀释液中加60 μ l阳性对照或阴性对照),不同的样品要注意换吸头,样品在稀释过程中要充分混匀。

[0028] 取适量的抗体包被板,每孔加入200 μ l 洗涤液,洗涤1 次,拍干。再将稀释好的待检血清、阳性对照和阴性对照各取100 μ l加至抗体包被板中,待检血清设1孔,阳性对照和阴性对照各设2孔,置37℃温育30分钟。

[0029] 2. 弃去孔中液体,每孔加入200 μ l洗涤液,重复洗涤5次,最后一次拍干。

[0030] 3. 每孔加入100 μ l 酶标记物,置37℃温育30分钟。

[0031] 4. 弃去孔中液体,洗涤方法同步骤2。

[0032] 5. 每孔加入100 μ l底物显色液,置20-25℃避光显色10分钟。

[0033] 6. 每孔加入50 μ l终止液,10分钟内读取OD_{630nm}值。

[0034] 试验成立条件是:阳性对照OD_{630nm}平均值与阴性对照OD_{630nm}平均值之差 ≥ 0.8 。S为样品OD_{630nm}值,P为阳性对照OD_{630nm}平均值,N为阴性对照OD_{630nm}平均值。若S/P值 ≥ 0.25 ,样品判定为阳性;若S/P值 < 0.25 ,样品判定为阴性。