

## 应用时间分辨荧光免疫分析技术检测 SARS 病毒抗原的初步研究

王蕾<sup>1</sup>, 吴英松<sup>1</sup>, 汤永平<sup>2</sup>, 李明<sup>1</sup> (<sup>1</sup>南方医科大学热带医学研究所, 广东广州 510515; <sup>2</sup>广州抗体技术研究中心, 广东广州 510070)

**摘要:**目的 建立定量检测 SARS 冠状病毒 N 蛋白的时间分辨荧光免疫分析 (TRFIA)。方法 采用经 SARS-CoV N 蛋白和配对实验筛选的两株抗 SARS N 蛋白单克隆抗体, 以双抗体夹心法为基础建立检测 SARS-CoV N 抗原的时间分辨荧光免疫分析技术, 进行方法学的评价, 并与相应 ELISA 试剂盒进行比较。结果 该法的测量范围为 (0.02~150) ng/ml, 灵敏度为 0.02 ng/ml; 批内、批间 CV 分别为 (3.3~6.2)% 和 (5.3~9.6)%, 与采用 ELISA 试剂盒检测灭活 SARS-CoV N 蛋白情况比较的结果一致。结论 本研究建立的检测 SARS N 蛋白的时间分辨荧光免疫分析技术灵敏度高, 特异性好, 具有潜在的临床应用价值。

**关键词:** 时间分辨荧光免疫分析技术; SARS N 蛋白; 单克隆抗体

中图分类号: R392.33 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2005)04-0429-03

## Detection of SARS-associated coronavirus N protein by time-resolved fluoroimmunoassay

WANG Lei<sup>1</sup>, WU Ying-song<sup>1</sup>, TANG Yong-ping<sup>2</sup>, LI Ming<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Tropical Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Antibody Research Center, Guangzhou 510070, China

**Abstract:** **Objective** To develop a method for quantitative detection of severe acute respiratory syndrome (SARS)-associated coronavirus (SARS-CoV) N protein by time-resolved fluoroimmunoassay (TRFIA). **Methods** Using a monoclonal antibody (mAb) against SARS-CoV N protein, screened by SARS-CoV N protein and matching experiment, a method for quantitative detection of SARS-CoV N protein by TRFIA was established on the basis of double sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and evaluated against the ELISA kit. **Result** The measurement range of the assay was 0.02-150 ng/ml with a sensitivity of 0.02 ng/ml, the coefficient of variability within runs of 3.3%-6.2%, and coefficient of variability between days of 5.3%-9.6%. The results of detection were consistent between ELISA and TRFIA. **Conclusion** TRFIA is a new, sensitive and specific immunoassay for detecting SARS N protein with potential value in clinical applications.

**Key words:** time-resolved fluoroimmunoassay; SARS N protein; monoclonal antibody

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, 3 个月内即很快传播到世界 25 个国家和地区以及中国其他许多省市, 累计报告病例数达 8 202 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%)<sup>[1,2]</sup>。

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 (IFA) 和 RT-PCR。但这些方法, 无论是检测抗原或者抗体, 都很难满足早期诊断的需要<sup>[3-7]</sup>。时间分辨免疫荧光分析 (time-resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 是上个世纪 80 年代兴起的一种新型检测手段, 它除了具有高灵敏

度、特异性外, 还有检测范围宽, 对标记物分子生物活性影响小, 无放射性污染, 标记物保存时间长等优点, 是对 SARS 病毒抗原进行多指标检测并实现 SARS 的早期诊断的一种优选方法<sup>[8-13]</sup>。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

SARS-CoV N 蛋白由南方医科大学珠江医院车小燕教授提供 (0.70 mg/ml); 抗 SARS 病毒 N 蛋白的单克隆抗体, 由本实验室制备; SARS 灭活病毒由本室提供, 经荧光定量 PCR 检测确定拷贝数为  $8.1 \times 10^4$  copies/ml; 用肺炎克雷伯菌、纯化流感病毒、副流感病毒、丙型肝炎病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体抗体检测试剂盒为康润生物制品公司产品; 正常人血清由南方医院血液科提供。

96 孔微孔板 (8×12) 为 labsystem 公司产品; Eu<sup>3+</sup> 标记试剂试剂盒购自 Perkin Elmer 公司; Sephadex G50 为 Pharmacia 产品; 超滤离心管为美国 Millipore

收稿日期: 2004-10-23

基金项目: 军队非典防治紧急研究课题

Supported as a Urgent Research Work for SARS control sponsored by Chinese PLA

作者简介: 王蕾 (1979-), 女, 2001 年毕业于第一军医大学本科, 现为在读硕士, 电话: 020-61640114-89133

公司产品; 荧光测量仪为 Auto-Delfia 1235 全自动时间分辨免疫荧光检测仪; Multiskan Ascent 酶标仪及 Wellwash AC 洗板机购自 Thermo Lab system 公司。SARS 荧光定量 PCR 检测试剂盒购自中山大学达安股份有限公司; SARS ELISA 试剂盒由南方医科大学珠江医院车小燕教授惠赠。

## 1.2 方法

1.2.1 抗 SARS N 蛋白单克隆抗体配对实验 按文献 [14] 方法制备抗 SARS N 蛋白单克隆抗体 (本室自制)。将制备得到的这些抗 SARS N 蛋白单克隆抗体经过半饱和硫酸铵沉淀后, 离心去上清, 再溶解透析并测蛋白含量, 最后按改良过碘酸钠法标记上辣根过氧化物酶 (HRP)。

将抗 SARS N 蛋白单克隆抗体按  $2 \mu\text{g/ml}$  的浓度包被微孔板, 每孔  $100 \mu\text{l}$ ,  $4^\circ\text{C}$  过夜, 洗板, 在每株抗体包被板中均加入 1:5, 1:500, 1:5 000, 1:50 000 不同稀释度的 SARS 灭活病毒和阴性血清,  $100 \mu\text{l}$ /孔, 室温孵育 30 min, 洗板, 再分别加入 HRP 标记的抗体, 同样孵育 30 min, 加底物显色液, 最后在酶标仪上测  $D(\lambda)$  值。根据  $D(\lambda)$  值选择出两株亲和力高、稳定性强的单抗, 并将该包被的单抗作为最佳包被单抗, HRP 标记的单抗作为最佳标记单抗。

1.2.2 固相包被抗体的制备 将上述筛选出来的最佳包被单抗用  $50 \text{ mmol/L}$ 、 $\text{pH}9.6$  的碳酸盐缓冲液稀释至  $5 \mu\text{g/ml}$ , 然后每孔  $100 \mu\text{l}$  加入 96 孔微孔板中,  $4^\circ\text{C}$  过夜, 弃包被液, 加入封闭液 (去金属离子 2% BSA), 每孔  $250 \mu\text{l}$ , 封闭过夜或  $37^\circ\text{C}$  2 h, 弃封闭液, 洗涤后真空抽干  $-20^\circ\text{C}$  冷冻保存。

1.2.3  $\text{Eu}^{3+}$  标记抗体的制备及纯化 用上述筛选出来的最佳标记单抗参照  $\text{Eu}^{3+}$  标记试剂盒说明书进行标记。标记完成后上 Sephadex G50 层析柱 ( $1 \times 30 \text{ cm}$ ) 分离纯化, 洗脱液 ( $50 \text{ mmol/L}$  Tris-HCl, 0.9% NaCl) 洗脱, 同时收集洗脱液 (1 ml/管), 逐管测量吸光度 ( $D_{280}$ ), 合并峰管, 测定蛋白含量, 同时以 PerKin Elmer 公司  $\text{Eu}^{3+}$  标记试剂盒中的  $\text{Eu}^{3+}$  标准测定合并峰管的  $\text{Eu}^{3+}$  浓度。所得标记率 ( $\text{Eu}^{3+} \text{ mol/IgG}$ ) 是 8.96, 蛋白回收率为 84%。

1.2.4 TRFIA 检测 SARS 病毒 采用平衡饱和法中的两步法, 在上述的包被板中加入 0.02, 0.1, 0.5, 1.00, 10.00, 50.00, 150.00 ng/ml 梯度稀释的 SARS 重组 N 蛋白各  $100 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  震荡孵育 1 h 后, 洗涤液洗板 4 次, 再每孔中加入 1:50 稀释的铕标记抗体  $100 \mu\text{l}$ , 室温震荡孵育 2 h, 洗涤液洗板 6 次后加入  $200 \mu\text{l}$  增强液振摇 5 min 后检测荧光值, 以上全部操作过程均在 Auto-Delfia 1235 荧光检测仪上进行。

## 1.3 方法学评价

1.3.1 灵敏度和特异性检测 将 SARS-CoV N 蛋白稀释成不同浓度进行测定, 并以 SARS N 蛋白稀释浓度为横坐标, 荧光反应单位为纵坐标, 绘制标准曲线。

以零剂量当作被测样品进行 20 次重复测量, 计算其均值及标准差, 将均值加上 2 倍的标准差所得的荧光值代入标准曲线, 得到相应的浓度即为其最低检测量<sup>[15]</sup>。

特异性检测: 用肺炎雷伯菌、纯化流感病毒、副流感病毒、丙型肝炎病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体全抗原代替 SARS-CoV N 蛋白进行特异性检测。

1.3.2 准确度和精密度检测 将 SARS N 蛋白加入正常人血清中, 制备低 ( $5.6 \text{ ng/ml}$ )、中 ( $28 \text{ ng/ml}$ )、高 ( $56 \text{ ng/ml}$ ) 3 个浓度, 进行回收实验。

用低、中、高 (同上) 3 个浓度 SARS N 蛋白分别进行批内和批间精密度测试, 重复次数为 8 次, 并对测定结果进行分析。

1.3.3 与 ELISA 试剂盒进行比较检测 将本室自制的 SARS 灭活病毒 (荧光定量 PCR 确定其拷贝数为  $8.1 \times 10^4 \text{ Copies/ml}$ ) 按 1:2-1:256 倍比稀释, 使用 ELISA 试剂盒检测, 同时进行 TRFIA 对照检测, 并对检测结果进行分析。

## 1.4 数据分析

TRFIA 测量所得数据经 Auto DEFIA 1235 自带的 Log-Logit 函数处理程序处理绘制 SARS-TRFIA 标准曲线。其他数据均采用统计软件 SPSS 10.0 进行  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 SARS 单抗的配对筛选实验

经夹心 ELISA 配对实验测定, 得到两株特异性好、亲和力高的抗 SARS N 蛋白的单克隆抗体 (C039 和 C008), 两株抗体均达到临床诊断试剂的亲和力要求, 并确定最佳包被抗体为 C039, 最佳标记抗体为 C008。

### 2.2 方法学评价

2.2.1 灵敏度及特异性结果 由数据分析所得的标准曲线可知, 测量的线性范围在  $0.02 \sim 150 \text{ ng/ml}$ 。以零剂量点发光值均值加 2s 后的发光值在标准曲线上得到相应的 SARS 病毒最小可测值为  $0.02 \text{ ng/ml}$  (图 1)。将肺炎雷伯菌、纯化流感病毒、副流感病毒、丙型肝炎病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体全抗原全抗原代替 SARS-CoV N 蛋白进行 TRFIA 检测, 均无明显交叉反应。

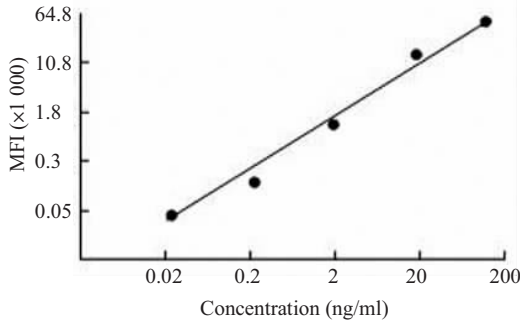


图 1 SARS TRFIA 标准曲线

Fig.1 Standard curve of TRFIA for SARS N protein detection

TRFIA: Timed-resolved fluoroimmunoassay

2.2.2 准确度和精密度检测结果 低、中、高(同上)三个浓度 SARS N 蛋白分别进行批内和批间精密度测试,重复次数为 8 次,得到批内和批间 CV 分别为 3.3%~6.2%,5.3%~9.6%(表 1);将 SARS N 蛋白加入正常人血清中,制备低(5.6 ng/ml)、中(28 ng/ml)、高(56 ng/ml)三个浓度,进行回收实验所得到的回收实验结果表明,回收率在 90.2%~106%之间(表 2)。

表 1 批内、批间精密度测试结果 (n=8)

Tab.1 Intra-and extra-assay precision of the test (n=8)

Group	Intra-assay		Extra-assay	
	N protein(ng/ml)	CV(%)	N protein (ng/ml)	CV(%)
Low	0.98±0.08	4.1	1.02±0.11	9.4
Medium	25.60±1.20	3.3	25.39±1.08	5.3
High	55.22±3.19	6.2	55.20±3.74	9.6

表 2 回收率实验

Tab.2 Recovery rate of the test

Sample concentration for quality control (ng/ml)	Actual measurement (ng/ml)	Mean recovery rate(%)
Low (5.60)	5.05 (4.86-5.94)	90.2
Intermediate (28.0)	29.8 (26.9-31.2)	106
High (56.0)	53.6 (51.2-60.3)	95.7

2.2.3 与 ELISA 的比较 将本室自制的 SARS 灭活病毒(荧光定量 PCR 确定其拷贝数为  $8.1 \times 10^4$  copies/ml)按 1:2~1:256 倍比稀释,使用 ELISA 试剂盒检测,同时进行 TRFIA 对照检测,并将测量结果进行比较(表 3)。对所得数据作 t 检验,两者测得结果间无显著差异 ( $P>0.05$ )。

### 3 讨论

本实验建立的检测 SARS CoV 的 TRFIA 是一种新型的体外超微量分析技术。它利用了具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物为示踪物来标记抗体、抗原、激素、多肽、蛋白质、核酸探针及生物素;待反应

表 3 灭活病毒稀释度和测定值的关系

Tab.3 Association between dilutions of the inactivated virus and detected value

Titer	TRFIA	ELISA
1:2	+	+
1:4	+	+
1:8	+	+
1:16	+	+
1:32	+	+
1:64	+	+
1:128	+	-
1:256	-	-

体系发生后,用时间分辨荧光免疫分析检测仪测定反应产物中的荧光强度。根据产物荧光强度和相对荧光强度的比值,判断反应体系中分析物的浓度,从而达到定量分析。稀土元素有两个特点,第一个是它的荧光激发光波长范围宽,因此 TRFIA 的检测范围也较宽;另一个特点是荧光衰变时间长,荧光衰变期在 500  $\mu$ s 以上,而非特异背景荧光的生存期仅为 0.01  $\mu$ s 左右,用时间分辨荧光分析仪进行延迟检测,可消除非特异荧光的干扰,提高方法的灵敏度。与传统的放免和酶免等标记免疫技术相比,TRFIA 具有标记物制备简单、示踪物稳定、多标记有效期长、不污染环境、不受样本自然荧光干扰、标准曲线量程宽、应用范围十分广泛,以及高精度、自动化、灵敏度高、大样本快速测定等技术优点<sup>[16]</sup>。

本研究所建立的方法适用于测量血清 SARS 的含量。我们曾把高含量的 SARS 灭活病毒血清样品经 1:5 至 1:500 稀释后用于本方法的测定,并用该系列稀释血清代替 SARS-CoV N 蛋白的参考标准作标准曲线,其斜率与 SARS 的标准曲线斜率基本一致,表明 SARS-TRFIA 有良好的健全性,血清基质对本方法没有明显影响。批内变异系数为 3.3%~6.2%,批间变异系数为 5.3%~9.6%,系统精确度较高,证明本方法是可靠的。同批试剂连续 5 个月应用分析,发现标准曲线基本重合,无明显漂移,可以用同批试剂单次标准曲线作为今后分析的固定参考。另外,SARS TRFIA 的分析时间仅为 1 h,而全自动时间分辨荧光测量仪的使用,使分析系统高度自动化,这样可提高临床检验速度,加大检验数据量,又可大幅度减低认为误差和增加检出结果的可靠性。

由于 SARS 病人样品的来源受限制,所以该试剂的一些性能指标还未评价,如在临床样品中的应用情况,试剂检测病毒数的阈值(N 蛋白量与活病毒数的关系)等。但该试剂能够与细胞培养的 SARS 病毒发生反应,表明该试剂具有潜在的应用价值。可用于非

(下转 434 页)

- patients with primary electrical disease who survived an episode of ventricular fibrillation[J]. *Circulation*, 1993, 88: 1021-9.
- [4] Viskin S, Fish R, Eldar M, *et al.* Prevalence of the Brugada sign in idiopathic ventricular fibrillation and healthy controls [J]. *Heart*, 2000, 84: 31-6.
- [5] 彭 健, 吴平生, 许顶立, 等. Brugada 综合征的家系调查[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4): 323-4.  
Peng J, Wu PS, Xu DL, *et al.* Familial study of Brugada syndrome [J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 1999, 19(4): 323-4.
- [6] Wilde AM, Antzelevitch C, Borggrefe M, *et al.* Proposed diagnostic criteria for the Brugada syndrome: consensus report[J]. *Circulation*, 2002, 106: 2514-9.
- [7] Chen Q, Kirsch GE, Zhang D, *et al.* Genetic basis and molecular mechanism for idiopathic ventricular fibrillation[J]. *Nature*, 1998, 392, 2293-6.
- [8] Yang GX, Antzelevitch C. Cellular basis for the Brugada syndrome and other mechanisms of arrhythmogenesis associated with ST segment elevation[J]. *Circulation*, 1999, 100:1660-6.
- [9] Dumaine R, Towbin JA, Brugada R, *et al.* Ionic mechanisms responsible for the electrocardiographic phenotype of the Brugada syndrome are temperature-dependent[J]. *Circ Res*, 1999, 85: 803-9.
- [10] Saura D, Garcia-Alberola A, Carrillo P, *et al.* Brugada-like electrocardiographic pattern induced by fever[J]. *PACE*, 2002, 25: 856-9.
- [11] Kum LC, Fung JW, Sanderson JE. Brugada syndrome unmasked by febrile illness[J]. *PACE*, 2002, 25: 1660-1.
- [12] Porres JM, Brugada J, Urbistondo V, *et al.* Fever unmasking the Brugada syndrome[J]. *PACE*, 2002, 25: 1646-48.
- [13] Antzelevitch C, Brugada R. Fever and Brugada syndrome[J]. *PACE*, 2002, 25: 1537-9.
- [14] Morita H, Nagase S, Kusano K, *et al.* Spontaneous T wave alternations and premature ventricular contractions during febrile illness in a patient with Brugada syndrome[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2002, 13: 816-8.

(责任编辑:陈望忠)

(上接 431 页)

典疾病的诊断、SARS 病毒携带者的筛选、药物筛选过程中病毒含量的监测、疫苗注射后免疫效果的监测及基础医学研究等。

#### 参考文献:

- [1] Drosten C, Gunther S, Presler W, *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome [EB/OL]. <http://www.nejm.org>. 2003, 4.
- [2] Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, *et al.* SARS Working Group. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348:1953-66.
- [3] WHO. Severe acute respiratory syndrome(SARS):laboratory diagnostic tests[EB/OL]. <http://www.who.int/csr/sars/en/>.
- [4] Yu LS, Yi YP, Li P, *et al.* Diagnosis of severe acute respiratory syndrome (SARS)by detection of SARS coronavirus nucleocapsid antibodies in an antigen-capturing enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(12): 5781-2.
- [5] SARS virus close to conclusive identification, new tests for rapid diagnosis ready soon SARS-multi-country outbreak [EB/OL]. <http://www.who.int/csr/don>, 2003-03-27b, 2003-04-17.
- [6] 吴新伟,程 刚,狄 飏,等. 荧光聚合酶链反应检测严重急性呼吸综合征冠状病毒的方法建立及临床初步应用[J]. *中华检验医学杂志*, 2003, 26(5): 300-6.  
Wu XW, Cheng G, Di B, *et al.* Establishment of fluorescent PCR method for detection of SARS coronavirus and the clinical trial [J]. *Chin J Lab Med*, 2003, 26(5): 300-6.
- [7] Drosen C, Gunther S, Preiser W, *et al.* Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome [J]. *ew Engl J Med*, 2003, 348:1978-85.
- [8] Gailard O, Kapel N, Galli J, *et al.* Time-resolved fluorometry:principles and applications in clinical biology[J]. *Ann Biol Clin*, 1994, 52(11): 751.
- [9] Rasi S, uvanto E, Vilpo LM, *et al.* Time-resolved fluoroimmunoassay of 5-methyl-2-deoxycytidine employing europium-labeled antigen as tracer[J]. *J Immunol Methods*, 1998, 117(1): 33.
- [10] Wang GJ, Lapcik O, Hampl R, *et al.* Time-resolved floroimmunoassay of plasma daidzein and genistein[J]. *Steroids*, 2000, 65(6): 339-48.
- [11] Mehto P, Ankelo M, Hinkkanen A, *et al.* A time-resolved floroimmunoassay for the detection of microcystins,cyanobacterial peptede hepa to toxins[J]. *Toxin*, 2001, 39: 831-36.
- [12] Uehara M, Lapcik O, Hampl R, *et al.* Rapid analysis of phytoestrogens in human urine by time-resolved fluoroimmunoassay [J]. *Steroid Biochem Mol Biol*, 2000, 72(5): 273-82.
- [13] Fluoroimmunoassay of plasma and urine O-desmethy langolensin[J]. *Steroid Biochem Mol Biol*, 2002, 81(4-5): 353-61.
- [14] 车小燕,丘立文,潘玉先,等. SARS 冠状病毒 N 蛋白单克隆抗体的快速、高效制备的方法研究[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(7): 640-2.  
Che XY, Qiu LW, An YX, *et al.* Rapid and efficient preparation of monoclonal antibodies against SARS-associated coronavirus nucleocapsid protein by immunizing mice[J]. *J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2003, 23(7): 640-2.
- [15] 黄 飏,肖龙华,朱利国,等. HBeAg 时间分辨荧光免疫分析法的建立[J]. *标记免疫分析与临床*, 2002, 9(2): 96-8.  
Huang B, Xiao LH, Zhu LG, *et al.* Time-resolved fluoroimmunoassay of HBeAg[J]. *Labeled Immunoassays Clin Med*, 2002, 9(2): 96-8.
- [16] Mitunen K, Pettersson K, Piironen T, *et al.* Dual-label one-step immunoassay for simultaneous measurement of free and total prostate-specific antigen concentrations and ratios in serum[J]. *Clin Chem*, 1995, 41: 1115-20.