



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110343707 A

(43)申请公布日 2019.10.18

(21)申请号 201910460579.2

(22)申请日 2019.05.30

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 王祥喜 饶子和 朱凤才 崔仑标
郑滨洋 胡月梅 张黎 王康

(74)专利代理机构 北京德恒律治知识产权代理
有限公司 11409

代理人 章社杲 卢军峰

(51) Int. Cl.

C12N 15/38(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C07K 14/035(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

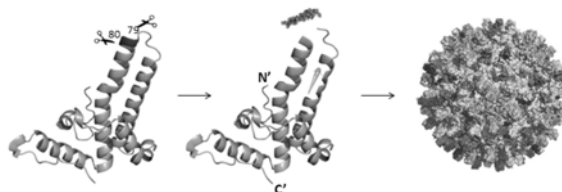
权利要求书1页 说明书10页
序列表1页 附图9页

(54)发明名称

基于乙肝核心抗原的HSV分型用蛋白、试剂盒及方法和应用

(57)摘要

本发明提供了基于乙肝核心抗原的HSV分型用蛋白、试剂盒及方法和应用。获得基于乙肝核心抗原的HSV分型用蛋白的方法包括：分别将HSV-1蛋白抗原表位的一段表位和HSV-2蛋白抗原表位的一段表位嵌入HBCag骨架基因序列中，形成HSV-1的重组序列和HSV-2的重组序列，分别将HSV-1的重组序列和HSV-2的重组序列插入原核表达载体中，得到HSV-1的重组序列表达载体和HSV-2的重组序列表达载体；将HSV-1的重组序列表达载体和HSV-2的重组序列表达载体转入细胞中进行表达，获得蛋白颗粒；以及蛋白颗粒的纯化。本发明获得的蛋白颗粒能够非常良好地应用于HSV分型诊断。



1. 一种获得基于乙肝核心抗原的HSV分型用蛋白的方法,包括:

分别将HSV-1蛋白抗原表位的一段表位和HSV-2蛋白抗原表位的一段表位嵌入HBCag骨架基因序列中,形成HSV-1的重组序列和HSV-2的重组序列,分别将HSV-1的重组序列和HSV-2的重组序列插入原核表达载体中,得到HSV-1的重组序列表达载体和HSV-2的重组序列表达载体;

将HSV-1的重组序列表达载体和HSV-2的重组序列表达载体转入细胞中进行表达,获得蛋白颗粒;以及

所述蛋白颗粒的纯化。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述HSV-1蛋白抗原表位的所述一段表位为58-93aa。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述HSV-2蛋白抗原表位的所述一段表位为545-574aa。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,分别将HSV-1蛋白抗原表位的一段表位和HSV-2蛋白抗原表位的一段表位嵌入HBCag骨架基因序列中包括:分别将HSV-1蛋白抗原表位的一段表位和HSV-2蛋白抗原表位的一段表位嵌入HBCag骨架基因序列的79-80aa之间。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法获得的蛋白颗粒。

6. 根据权利要求5所述的蛋白颗粒在用于HSV分型诊断中的应用。

7. 一种ELISA试剂盒,包括:

根据权利要求5所述的蛋白颗粒,所述蛋白颗粒包被在ELISA板的孔中。

8. 根据权利要求7所述的ELISA试剂盒,其中,所述蛋白颗粒的包被量为5ng/孔。

9. 根据权利要求7或8所述的ELISA试剂盒在用于HSV分型诊断中的应用。

基于乙肝核心抗原的HSV分型用蛋白、试剂盒及方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,更具体地,涉及基于乙肝核心抗原的HSV分型用蛋白、试剂盒及方法和应用。

背景技术

[0002] 单纯疱疹病毒(HSV)属于疱疹病毒科 α 病毒亚科,病毒质粒大小约180纳米。在性病医院临床上根据抗原性的差别目前把该病毒分为1型和2型。1型主要由口唇病灶获得,2型可从生殖器病灶分离到。感染是由于人与人的接触。从发生后四个月到数年被感染的人数可达人口总数的50%-90%,是最易侵犯人的一种病毒,但在临床仅有一部分发病。此病可分为:口唇性疱疹、疱疹性角膜炎、疱疹性皮肤炎、阴部疱疹、卡波西病等,有时也是脑膜炎、脑炎的病因。

[0003] HSV-1在成人中超过90%呈现阳性,在感觉性神经节中终生潜伏。在工业化国家中约12%-20%的成人呈现HSV-2阳性,在发展中国家中高达80%的成人呈现HSV-2阳性。另外,研究显示,HSV-2感染与HIV感染之间存在较强的相关性。

[0004] HSV-1在中国人群中的感染率大于90%,HSV-2在中国人群中的感染率大于10%至30%。因此,HSV分型诊断试剂在中国有巨大的商业前景,目前有一些公司在销售此类试剂,例如,爱尔兰的Trinity Biotech以及一些国内公司。然而,目前的HSV分型诊断试剂并非完全令人满意。

发明内容

[0005] 本发明提供了基于乙肝核心抗原的HSV分型用蛋白、试剂盒及其制备方法。该蛋白用于HSV分型诊断的灵敏度、特异性、稳定性方面均较好,在HSV-1和HSV-2之间基本没有交叉抗原性,也不会受到乙肝核心抗原的骨架的干扰,非常适合于HSV分型诊断。

[0006] 本发明提供了一种获得基于乙肝核心抗原的HSV分型用蛋白的方法,包括:分别将HSV-1蛋白抗原表位的一段表位和HSV-2蛋白抗原表位的一段表位嵌入HBCag骨架基因序列中,形成HSV-1的重组序列和HSV-2的重组序列,分别将HSV-1的重组序列和HSV-2的重组序列插入原核表达载体中,得到HSV-1的重组序列表达载体和HSV-2的重组序列表达载体;将HSV-1的重组序列表达载体和HSV-2的重组序列表达载体转入细胞中进行表达,获得蛋白颗粒;以及所述蛋白颗粒的纯化。

[0007] 在上述方法中,其中,所述HSV-1蛋白抗原表位的所述一段表位为58-93aa。

[0008] 在上述方法中,其中,所述HSV-2蛋白抗原表位的所述一段表位为545-574aa。

[0009] 在上述方法中,其中,分别将HSV-1蛋白抗原表位的一段表位和HSV-2蛋白抗原表位的一段表位嵌入HBCag骨架基因序列中包括:分别将HSV-1蛋白抗原表位的一段表位和HSV-2蛋白抗原表位的一段表位嵌入HBCag骨架基因序列的79-80aa之间。

[0010] 本发明还提供了通过上述方法获得的蛋白颗粒。

[0011] 本发明还提供了上述蛋白颗粒在用于HSV分型诊断中的应用。

[0012] 本发明还提供了一种ELISA试剂盒,包括上述蛋白颗粒,所述蛋白颗粒包被在ELISA板的孔中。

[0013] 在上述ELISA试剂盒中,其中,所述蛋白颗粒的包被量为5ng/孔。

[0014] 本发明还提供了上述ELISA试剂盒在用于HSV分型诊断中的应用。

[0015] 将本发明获得的蛋白颗粒用于HSV分型诊断,能够获得非常高的灵敏度、良好的特异性以及稳定性,相对于目前的HSV分型诊断产品或方式,体现出显著的优势,具有非常好的应用前景。

附图说明

[0016] 图1A示出了HSV-1和HSV-2的部分序列。

[0017] 图1B示出了分子构建的示意图。

[0018] 图2A示出了HBCag颗粒的SDS-PAGE以及透射电镜图片。

[0019] 图2B示出了嵌入HSV-1特异性表位(58-93aa)后得到的HBCag颗粒的SDS-PAGE以及透射电镜图片。

[0020] 图2C示出了嵌入HSV-2特异性表位(545-574aa)后得到的HBCag颗粒的SDS-PAGE以及透射电镜图片。

[0021] 图3和图4分别示出了采用本发明制备的ELISA的测试结果的ROC曲线。

[0022] 图5A和图5B分别示出了本发明的ELISA与一些国产ELISA试剂盒的HSV-1IgG和HSV-2IgG的ROC分析。

[0023] 图6示出了本发明的ELISA测定的结果、Trinity试剂盒测定的结果与IFA测定的结果的比较。

[0024] 图7示出了HSV-1和HSV-2之间的交叉反应率。

[0025] 图8A示出了OD450随着抗原包被量的变化的图;图8B示出了包被抗原为HBCag的OD450;图8C和图8D分别示出了不同血清对不同抗原的OD450,其中,1-12为本发明中的HSV-1表位抗原,2-12为本发明中的HSV-2表位抗原;1-H-12为嵌入HSV-1表位抗原的颗粒,2-H-12为嵌入HSV-2表位抗原的颗粒。

具体实施方式

[0026] 如图1A和图1B所示,本发明选取HSV-gG蛋白的1、2型相关特异性抗原表位,并将其嵌入乙肝核心抗原单体的免疫优势区域,让其发生自组装形成颗粒(particle)。

[0027] 具体地,首先进行分子构建:分别将HSV-1gG蛋白抗原表位的一段表位(58-93aa)和HSV-2gG蛋白抗原表位的一段表位(545-574aa)嵌入HBCag骨架基因序列中(79-80aa之间),形成HSV-1&2各自的重组序列。将重组序列在Nco1和Xho1两个酶切位点处插入原核表达载体pET-28a,完成1型和2型各自的分子构建。其中,HBCag、HSV-1和HSV-2的序列参见序列表部分,序列1为HBCag的完整序列,序列2和3分别为嵌入的HSV-1和HSV-2的相关表位信息。

[0028] 之后进行质粒转化:从-80℃冰箱立即将BL21(DE3)感受态细胞置于冰上,让其融化5-10分钟。向感受态细胞中加入1-2μl质粒,再将其放回冰上30分钟。然后将其42℃水浴90秒。再次置于冰上2分钟,加入800μl LB培养基。然后置于恒温振荡培养箱中,37℃,

220rpm培养1小时左右。吸出100 μ l菌液,均匀涂布于含有卡那抗性的固体培养皿。将固体培养皿置于37 $^{\circ}$ C的培养箱中并孵育过夜。

[0029] 接着进行试表达:从固体培养皿中挑取单一菌株,接种于5ml液体培养基(含卡那霉素,终浓度50 μ g/ml)中于37 $^{\circ}$ C和220rpm培养至OD值为0.6左右,加入异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导靶蛋白表达,终浓度为1mM,于37 $^{\circ}$ C和220rpm继续培养5h。将培养后的菌液4000rpm离心20min,用800 μ l PBS(配制方法:NaCl 8.0g,KCl 0.2g,Na₂HPO₄ 1.44g,KH₂PO₄ 0.24g,加蒸馏水至1000ml,调节pH至7.4)重悬菌体,超声破碎细菌(功率200w,超声4s,间隔8s)。破碎后,12000rpm,离心5min,上清取出,沉淀用800 μ l PBS重悬,上清和沉淀重悬液分别制样进行SDS-PAGE鉴定,得到目的蛋白,确定为可溶性表达。

[0030] 之后进行病毒样颗粒的表达:将试表达的菌液1:100接种于1L培养基(含卡那霉素,终浓度50 μ g/ml)中,37 $^{\circ}$ C震荡培养至OD值为0.6左右,加入IPTG(终浓度为1mM)进行诱导,改为16 $^{\circ}$ C,220rpm培养16-18h。

[0031] 病毒样颗粒的纯化:将培养过后的菌液于3800rpm、4 $^{\circ}$ C离心40min,菌体用适量常规PBS buffer悬起,再用超声波破碎菌体(功率200W,超声4s,间隔8s,200个循环)。破碎完成后,于12000rpm、4 $^{\circ}$ C离心20min,离心后取上清,将上清进行饱和硫酸铵沉淀,于4 $^{\circ}$ C环境中,搅拌下向上清中逐滴加入饱和硫酸铵直至上清开始变浑浊,继续搅拌0.5h。搅拌结束后于12000rpm、4 $^{\circ}$ C离心10min,离心后将沉淀用1-2ml PBS悬起。然后进行蔗糖密度梯度离心,蔗糖梯度由15%-45%,上样后于30000rpm、4 $^{\circ}$ C离心5h,离心后分层取样,自上而下600 μ l/管取于EP管中,保存于4 $^{\circ}$ C冰箱。

[0032] 病毒样颗粒的鉴定:对得到的病毒样颗粒进行浓度测定,并通过SDS-PAGE电泳进行初步鉴定,随后通过电镜观察病毒样颗粒形态,确定形成了预期的病毒样颗粒。其中,图2A示出了HBCag颗粒的SDS-PAGE以及透射电镜图片,图2B示出了嵌入HSV-1特异性表位(58-93aa)后得到的HBCag颗粒的SDS-PAGE以及透射电镜图片,图2C示出了嵌入HSV-2特异性表位(545-574aa)后得到的HBCag颗粒的SDS-PAGE以及透射电镜图片。其中,在SDS-PAGE图中,左边泳道是marker,右边为目标蛋白泳道。

[0033] 之后,可以将选取的HSV-1和HSV-2特异性表位得到的多肽以及将特异性表位嵌入HBCag得到的颗粒固定于基材中,制备ELISA板用于检测。应该理解,以下间接ELISA检测方法仅为示例性实例,可以采用任何合适的方法制备任何合适结构的ELISA板。间接ELISA检测方法的建立(IgG)包括:包被:用PBS稀释抗原,按照0.05 μ g/ml包被96孔酶标板,100 μ l/孔,过夜包被;封闭:1%BSA溶液(质量体积比,溶液为PBS)300 μ l/孔于37 $^{\circ}$ C封闭2h;孵育一抗:将待测血清按照1:21的稀释比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,设空白1孔、阴性、阳性对照(TRINIYT检测试剂盒中提供的阴、阳性对照,即HSV-1或HSV-2阴、阳性血清,下同)各2孔,将稀释后的待测血清样本100 μ l/孔加入对应反应孔中,于37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:用洗板机洗板,PBST缓冲液(配制方法:NaCl 8.0g,KCl 0.2g,Na₂HPO₄ 1.44g,KH₂PO₄ 0.24g,Tween-20 1ml,加蒸馏水至1000ml,调节pH至7.4)300 μ l/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;孵育二抗:将酶标二抗按照1:3000的比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,100 μ l/孔加入各孔,37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:洗板机洗板,PBST缓冲液300 μ l/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;显色:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液100 μ l/孔加入各孔,室温反应8min;终止:2mol/L硫酸溶液100 μ l/孔加入各孔,终止反应;读数:用酶标仪450nm单波长检

测各孔的吸光值。可以采用如表1所示的反应条件,当然,也可以采用其他合适的条件。

[0034] 表1

[0035]

	包被量	封闭剂	反应条件	血清稀释比例	反应条件	二抗稀释比例	反应条件
HSV-1 表位肽	5ng	1%BSA 溶液	RM, 2h	1:21	RM, 0.5h	1:3000	RM, 0.5h

[0036]

段							
HSV-2 表位肽 段	3ng	1%BSA 溶液	RM, 2h	1:21	RM, 0.5h	1:3000	RM, 0.5h
嵌入 HSV-1 表位的 颗粒 (VLP)	5ng	1%BSA 溶液	37℃, 2h	1:21	37℃, 0.5h	1:3000	37℃, 0.5h
HSV-2 表位肽 段(VLP)	5ng	1%BSA 溶液	37℃, 2h	1:21	37℃, 0.5h	1:3000	37℃, 0.5h

[0037] 之后,采用被称为行业标准的Trinity HSV分型检测试剂盒对超过1000份的血清进行了检测。区分出了哪些是阳性,哪些是阴性;然后选取部分血清人为地分为两组:一组用于HSV1型的检测,另一组用于HSV2型的检测。操作均按照试剂盒记载的说明书进行,检测结果如表2所示:

[0038] 表2

	数量
仅 HSV-1 IgG 阳性	628
仅 HSV-2 IgG 阳性	14
HSV-1 和 HSV-2 IgG 均阳性	86
HSV-1 IgG 阴性	78
HSV-2 IgG 阴性	695

[0039] 之后,采用先前描述的方法将嵌入HSV-1或HSV-2表位的HBCag颗粒包被在ELISA板中,用先前描述的操作步骤对血清进行检测。最后使用Medcalc软件,对所得数据进行ROC曲线分析,并计算嵌入HSV-1或HSV-2表位的HBCag颗粒的反应结果与Trinity反应结果的Kappa系数。

[0041] 测定的HSV-1的结果如表3和图3所示,测定的HSV-2的结果如表3和图4所示。

[0042] 表3

[0043]

HSV-1	统计	HSV-2	统计
Cut-off	0.148	Cut-off	0.16
灵敏度	93.75% (60/64)	灵敏度	98.44% (23/24)
特异性	100.00% (24/24)	特异性	100.00% (64/64)
AUC	0.990	AUC	0.999
95%置信区间	0.940-1.000	95%置信区间	0.956-1.000
P	<0.0001	P	<0.0001
Kappa	0.891	Kappa	0.972

[0044] 由表3可知,本发明制备的ELISA的灵敏度大于93%,特异性接近100%,AUC为0.99以上,Kappa值为0.891以上。通常,AUC和Kappa值越接近1表明结果越趋近于一致,因此,结果还是比较稳定和理想的。

[0045] 另外,申请人将本发明的试剂盒的结果跟一些现有试剂盒的平行实验所得到结果进行了比对,一方面用试剂盒本身所推荐的cut-off值得到的结果进行了比对,另一方面申请人也对这些产品的数据做了ROC曲线分析,然后与本发明的产品的数据进行比对。如图5A和图5B所示,结果都表明采用本发明制备的试剂盒明显优于现有的一些试剂盒。

[0046] 之后,将78份经Trinity检测鉴定为1/2型双阴性的血清用金标间接免疫荧光(IFA)进行判定。操作步骤:1.将Vero细胞铺于96孔板中,分别用HSV-1和2去感染细胞(HSV-1或HSV-2与Vero细胞的质量比为1:1000),并设置空白对照(只接种细胞,不接种病毒);2.待细胞病变后,将上清液吸出,并用80%乙醇于-20℃冰箱固定1-2h后倒掉乙醇,保存于-20℃;3.将接种有HSV-1和HSV-2的96孔板以及空白板用PBS缓冲液(含0.05%Triton)于600rpm,洗涤3min,清洗3遍;4.将78份血清按照1:21的比例稀释,稀释液为含0.05%Triton的PBS,并设置空白、阳性对照孔,稀释后分别加入至三个96孔板,于37℃反应2h;5.去掉

ELISA板中液体,用PBS缓冲液(含0.05%Triton)于600rpm,洗涤3min,清洗5遍;6.每孔加入稀释后的FITC标记的抗人IgG二抗,稀释比例为1:100,稀释液为含0.05%Triton的PBS,室温反应1h,注意整个过程在避光条件下进行;7.去掉ELISA板中液体,用PBS缓冲液(含0.05%Triton)于600rpm,洗涤3min,清洗5遍,注意整个过程在避光条件下进行;8.用荧光显微镜观察,并统计结果。另外,也按照前述方法用本发明的ELISA试剂盒进行测定。

[0047] 结果如图6所示,其中有50%的血清表现为阳性,也就是说Trinity的灵敏度并不高,39份本应该是阳性的血清被误判成了阴性。然后申请人又将这些血清用本发明的蛋白包被制备的ELISA板也进行了检测,结果显示1、2型与IFA的符合率分别为64%和53%,且其中阴性符合率为100%。也就是说,IFA判定为阴性的结果,本发明和Trinity的检测结果都为阴性,但IFA判定为阳性的39份血清,Trinity未检测到,而本发明的1、2型方法分别能检测出其中的11份和3份,这些数据表明相比于Trinity,本发明的ELISA试剂盒的灵敏度更高。

[0048] 为了证明本发明所建立的方法不存在1、2型之间的交叉反应,申请人选取了56份1型阳性2型阴性的血清,对本发明的1、2型的颗粒进行了间接ELISA的反应。选取56份HSV1-IgG(+)且HSV2-IgG(-)的血清,将这些血清分别与HSV-1表位抗原(1-H-12)和HSV-2表位抗原(2-H-12)作用,检验其是否存在交叉反应性。

[0049] 具体操作步骤如下:包被:用PBS稀释抗原(1-H-12,2-H-12),按照0.05 μ g/ml包被96孔酶标板,100 μ l/孔,过夜包被;封闭:1%BSA溶液(质量体积比,溶液为PBS)300 μ l/孔于37 $^{\circ}$ C封闭2h;孵育一抗:将待测血清按照1:21的稀释比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,设空白1孔、阴性、阳性对照(TRINIYT检测试剂盒中提供的阴、阳性对照,即HSV-1或HSV-2阴、阳性血清)各2孔,将稀释后的待测样本100 μ l/孔加入对应孔中,于37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:用洗板机洗板,PBST缓冲液300 μ l/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;孵育二抗:将酶标二抗按照1:3000的比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,100 μ l/孔加入各孔,37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:洗板机洗板,PBST缓冲液300 μ l/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;显色:TMB显色液100 μ l/孔加入各孔,室温反应8min;终止:2mol/L硫酸溶液100 μ l/孔加入各孔,终止反应;读数:用酶标仪450nm单波长检测各孔的吸光值。

[0050] 结果如图7所示,仅1型阳性的血清与2型抗原的交叉率仅为3.57%。

[0051] 此外,经证实:HBCag的骨架蛋白对实际检测结果基本没有影响。首先分别选取了4份HBCag的阳性血清和阴性血清,对不同包被量的乙肝核心抗原HBCag进行了间接ELISA的检测。1-H-12/1-12、2-H-12/2-12的ELISA检测实验步骤:选取血清HBCag(+)/HSV-1(-)、HBCag(+)/HSV-1(+)、HBCag(+)/HSV-2(-)、HBCag(+)/HSV-2(+);包被:用PBS稀释抗原(1-H-12/1-12;2-H-12/2-12),分别按照0.05 μ g/ml包被96孔酶标板,100 μ l/孔,过夜包被;封闭:1%BSA溶液(质量体积比,溶液为PBS)300 μ l/孔于37 $^{\circ}$ C封闭2h;孵育一抗:将待测血清按照1:21的稀释比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,设空白1孔,阴性、阳性对照(TRINIYT检测试剂盒中提供的阴、阳性对照,即HSV-1或HSV-2阴、阳性血清)各2孔,将稀释后的待测样本100 μ l/孔加入对应反应孔中,于37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:用洗板机洗板,PBST缓冲液300 μ l/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;孵育二抗:将酶标二抗按照1:3000的比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,100 μ l/孔加入各孔,37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:洗板机洗板,PBST缓冲液300 μ l/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;显色:TMB显色液100 μ l/孔加入各孔,室温反

应8min;终止:2mol/L硫酸溶液100u1/孔加入各孔,终止反应;读数:用酶标仪450nm单波长检测各孔的吸光值。

[0052] HBCag包被量验证实验步骤:选取HBCag阴性血清4份(23-7.15、103-7.14、102-7.16、9-7.17),阳性血清4份(73-7.16、55-7.16、161-7.16、75-7.16);包被:用PBS稀释抗原(HBCag),分别按照0.05、0.25、0.5、1、2、5 μ g/ml包被96孔酶标板,100 μ l/孔,过夜包被;封闭:1%BSA溶液(质量体积比,溶液为PBS)300 μ l/孔于37 $^{\circ}$ C封闭2h;孵育一抗:将待测血清按照1:21的稀释比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,设空白1孔,阴性、阳性对照(HBCag检测试剂盒中提供的阴、阳性对照,即HBCag阴、阳性血清)各2孔,将稀释后的待测样本100u1/孔加入对应反应孔中,于37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:用洗板机洗板,PBST缓冲液300u1/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;孵育二抗:将酶标二抗按照1:3000的比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,100u1/孔加入各孔,37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:洗板机洗板,PBST缓冲液300u1/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;显色:TMB显色液100u1/孔加入各孔,室温反应8min;终止:2mol/L硫酸溶液100u1/孔加入各孔,终止反应;读数:用酶标仪450nm单波长检测各孔的吸光值。

[0053] HBCag的阳性血清与HBCag反应实验步骤:选取HBCag阳性血清33份;包被:用PBS稀释抗原(HBCag),按照0.05 μ g/ml包被96孔酶标板,100 μ l/孔,过夜包被;封闭:1%BSA溶液(质量体积比,溶液为PBS)300 μ l/孔于37 $^{\circ}$ C封闭2h;孵育一抗:将待测血清按照1:21的稀释比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,设空白1孔,阴性、阳性对照(HBCag检测试剂盒中提供的阴、阳性对照,即HBCag阴、阳性血清)各2孔,将稀释后的待测样本100u1/孔加入对应反应孔中,于37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:用洗板机洗板,PBST缓冲液300u1/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;孵育二抗:将酶标二抗按照1:3000的比例进行稀释,稀释液为1%BSA溶液,100u1/孔加入各孔,37 $^{\circ}$ C反应30min;洗板:洗板机洗板,PBST缓冲液300u1/孔加入各孔,震板10s,洗涤5次后拍干;显色:TMB显色液100u1/孔加入各孔,室温反应8min;终止:2mol/L硫酸溶液100u1/孔加入各孔,终止反应;读数:用酶标仪450nm单波长检测各孔的吸光值。

[0054] 结果如图8A至图8D所示,结果显示阴性对照和阴性血清对不同包被量均为特异性反应,而随着包被量的两倍两倍的梯度降低,阳性血清OD值呈现两倍两倍的降低,表明它们之间是特异性的结合,而当包被量在25ng/孔及以下时,其OD值基本没有变化且与阴性血清的值几乎相同,因此申请人认为乙肝核心抗原的特异性抗体在包被量低于10ng的情况下基本不识别乙肝核心抗原,而本发明的包被量是5ng/well;为了进一步验证,申请人用33份HBCag的阳性血清对HBCag进行ELISA的检测,结果均为阴性;同时,申请人将HBCag阳性的血清进行进一步划分,分成HBCag阳性HSV1阳性HBCag阳性HSV1阴性,以及HBCag阳性HSV2阳性和HBCag阳性HSV2阴性,并分别对两组进行1-H-12/1-12;以及2-H-12/2-12的ELISA检测,结果显示它们的阴阳性结果均正常。因此可以得知,HBCag的骨架蛋白对实际检测结果基本没有影响。

[0055] 接着,又对几百份血清进行试验,选取Trinity筛查过的8盒血清(704份),分别用1-H-12与2-H-12与这些血清反应,实验步骤如先前所述,在此不再重复。测定结果如表4所示。

[0056] 表4

[0057]

HSV-1	R	N2	N3	N4
Cut-off	0.274	0.167	0.084	0.144
灵敏度	96.87% (62/64)	98.72% (77/78)	100.00% (80/80)	100.00% (73/73)
特异性	95.83% (23/24)	100.00% (10/10)	100.00% (8/8)	100.00% (15/15)
Kappa	0.915	0.946	1	1
HSV-2	R	N2	N3	N4
Cut-off	0.12	0.148	0.128	0.159
灵敏度	100.00% (24/24)	100.00% (9/9)	100.00% (7/7)	100.00% (8/8)
特异性	95.31% (61/64)	96.20% (76/79)	100.00% (81/81)	97.50% (78/80)
Kappa	0.917	0.838	1	0.876

[0058] 由表4可知,这几个重要参数始终维持在非常高的水平,表明其重复性较好,稳定性高。

[0059] 另外,申请人选取了一些血清做了批内重复和批间重复,得到了具体的标准差和离散值的参数。选取TRINITY筛查到的HSV-1&2IgG阴、阳性血清各5份,每个血清重复测定7次,进行批内测试。类似地,选取TRINITY筛查到的HSV-1&2IgG阴、阳性血清各5份,每个血清重复测定4次,进行批间测试。测定实验步骤如先前所述,在此不再重复。之后,利用得到的数据计算其平均值、标准方差及变异系数。

[0060] 关于HSV-1IgG的批内重复的结果如表5所示,关于HSV-2IgG的批内重复的结果如表6所示。关于HSV-1IgG的批间重复的结果如表7所示,关于HSV-2IgG的批间重复的结果如表8所示。

[0061] 表5

[0062]

Serum No.	OD450							平均值	标准偏差	cv (%)
	1	2	3	4	5	6	7			
positive 1	0.334	0.376	0.389	0.471	0.473	0.454	0.444	0.4201	0.0539	12.83
positive 2	0.88	0.891	0.919	0.945	0.966	0.965	0.955	0.9316	0.0353	3.79
positive 3	0.203	0.286	0.296	0.262	0.422	0.43	0.279	0.3111	0.0841	27.02
positive 4	0.494	0.558	0.599	0.656	0.705	0.716	0.587	0.6164	0.0805	13.06
positive 5	0.127	0.149	0.165	0.165	0.164	0.169	0.173	0.1589	0.0159	10.01
negative 1	0.055	0.057	0.058	0.057	0.058	0.059	0.058	0.0574	0.0013	2.22
negative 2	0.064	0.065	0.064	0.067	0.062	0.066	0.067	0.0650	0.0018	2.81
negative 3	0.055	0.058	0.057	0.057	0.059	0.059	0.059	0.0577	0.0015	2.59
negative 4	0.057	0.058	0.059	0.058	0.059	0.059	0.061	0.0587	0.0013	2.14
negative 5	0.057	0.052	0.053	0.052	0.053	0.055	0.055	0.0539	0.0019	3.46

[0063] 表6

[0064]

Serum No.	OD450							平均值	标准偏差	cv (%)
	1	2	3	4	5	6	7			
positive 1	0.256	0.288	0.253	0.253	0.258	0.253	0.322	0.2690	0.0265	9.87
positive 2	0.191	0.181	0.194	0.206	0.227	0.231	0.236	0.2094	0.0219	10.46
positive 3	0.315	0.339	0.339	0.361	0.363	0.377	0.345	0.3484	0.0204	5.85
positive 4	0.284	0.295	0.291	0.295	0.298	0.302	0.311	0.2966	0.0085	2.87
positive 5	0.419	0.422	0.462	0.417	0.434	0.545	0.551	0.4643	0.0592	12.75
negative 1	0.066	0.071	0.073	0.073	0.077	0.075	0.073	0.0726	0.0035	4.76
negative 2	0.06	0.062	0.062	0.06	0.063	0.062	0.067	0.0623	0.0024	3.79
negative 3	0.068	0.069	0.068	0.067	0.071	0.07	0.071	0.0691	0.0016	2.28
negative 4	0.061	0.062	0.061	0.062	0.06	0.064	0.062	0.0617	0.0013	2.03
negative 5	0.063	0.065	0.063	0.062	0.061	0.063	0.063	0.0629	0.0012	1.93

[0065] 表7

[0066]

Serum No.	OD450												平均值	标准偏差	cv (%)
	1st test				2nd test				3rd test						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
positive 1	0.653	0.638	0.625	0.606	0.971	1.1	1.057	1.113	0.48	0.492	0.532	0.543	0.7342	0.2491	33.93
positive 2	0.382	0.371	0.377	0.419	0.406	0.402	0.419	0.433	0.373	0.382	0.415	0.404	0.3986	0.0209	5.25
positive 3	1.318	1.339	1.41	1.446	1.48	1.516	1.658	1.618	1.436	1.558	1.511	1.556	1.4872	0.1037	6.97
positive 4	0.293	0.298	0.298	0.335	0.452	0.453	0.484	0.484	0.351	0.387	0.383	0.377	0.3829	0.0713	18.63
positive 5	0.15	0.145	0.163	0.165	0.451	0.512	0.559	0.312	0.497	0.508	0.542	0.456	0.3717	0.1710	46.02
negative 1	0.057	0.059	0.062	0.061	0.087	0.074	0.09	0.08	0.07	0.072	0.072	0.074	0.0715	0.0106	14.83
negative 2	0.064	0.063	0.063	0.064	0.108	0.091	0.096	0.092	0.114	0.094	0.092	0.153	0.0912	0.0265	29.07
negative 3	0.069	0.069	0.071	0.071	0.089	0.078	0.082	0.079	0.088	0.078	0.083	0.137	0.0828	0.0184	22.21
negative 4	0.081	0.081	0.083	0.087	0.223	0.223	0.238	0.255	0.126	0.125	0.135	0.132	0.1491	0.0668	44.84
negative 5	0.067	0.069	0.069	0.071	0.082	0.081	0.086	0.089	0.083	0.084	0.082	0.09	0.0794	0.0082	10.32

[0067] 表8

[0068]

Serum No.	OU450												平均值	标准偏差	cv(%)
	1st test				2nd test				3rd test						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4			
positive 1	0.41	0.553	0.565	0.586	0.82	0.853	0.801	0.818	0.525	0.54	0.408	0.433	0.6168	0.1796	29.12
positive 2	0.361	0.38	0.417	0.431	0.527	0.535	0.533	0.528	0.369	0.366	0.355	0.381	0.4353	0.0794	16.85
positive 3	0.421	0.452	0.511	0.53	0.754	0.751	0.749	0.742	0.435	0.511	0.555	0.53	0.5784	0.1322	22.85
positive 4	0.242	0.24	0.243	0.287	0.406	0.397	0.398	0.405	0.244	0.24	0.254	0.259	0.3013	0.0752	24.96
positive 5	0.307	0.353	0.375	0.337	0.47	0.472	0.501	0.465	0.347	0.387	0.438	0.427	0.4066	0.0637	15.66
negative 1	0.068	0.072	0.072	0.073	0.087	0.092	0.091	0.11	0.074	0.08	0.08	0.081	0.0817	0.0118	14.48
negative 2	0.061	0.065	0.062	0.066	0.08	0.073	0.075	0.095	0.07	0.068	0.071	0.067	0.0714	0.0095	13.29
negative 3	0.073	0.074	0.073	0.075	0.111	0.105	0.112	0.107	0.086	0.083	0.085	0.085	0.0891	0.0154	17.27
negative 4	0.061	0.061	0.064	0.062	0.075	0.068	0.076	0.072	0.072	0.068	0.071	0.07	0.0683	0.0053	7.73
negative 5	0.06	0.06	0.061	0.061	0.069	0.068	0.072	0.074	0.073	0.068	0.07	0.072	0.0673	0.0054	7.99

[0069] 一般来说,离散值小于10%是比较理想的。表5至表8的结果也说明本发明所建立方法具有良好的重复性。

[0070] 因此,以上结果证明了本发明的ELISA测定重复性良好,并排除了HBCag的骨架蛋白潜在的背景干扰以及1、2型之间潜在的交叉反应之后,可以得知本发明提供的蛋白和由其制备的试剂盒能够很好地用于HSV-IgG的分型诊断。

序列表

<110>	中国科学院生物物理研究所	
<120>	基于乙肝核心抗原的HSV分型用蛋白、试剂盒及方法和应用	
<130>	HP181098LZ	
<160>	3	
<170>	SIPOSequenceListing 1.0	
<210>	1	
<211>	444	
<212>	DNA	
<213>	human	
<400>	1	
	atggacatcg atccgtacaa ggaattcggg gcgaccgtgg agctgctgag ctttctgccg	60
	agcgacttct ttccgagcgt tcgtgacctg ctggataccg cgagcgcgct gtatcgtgaa	120
	gcgctggaaa gcccggagca ctgcagcccc caccacaccg cgctgcgtca ggcgattctg	180
	tgctgggggtg aactgatgac cctggcgacc tgggtgggcg ttaacctgga ggacagccgt	240
	gatctgggtg ttagctacgt gaacaccaac atgggcctga aattccgtca actgctgtgg	300
	tttcacatca gctgcctgac cttcggtcgt gaaaccgtta tcgagtacct ggttagcttt	360
	ggcgtttgga ttcgtacccc gccggcgtat cgtccgccga acgcgccgat tctgagcacc	420
	ctgccggaaa ccaccgtggt ttaa	444
<210>	2	
<211>	108	
<212>	DNA	
<213>	human	
<400>	2	
	agccccaccg cgattagcct gaccaccccg gatcacacce cgccgatgcc gagcattggc	60
	ctggaggaag aggaagagga agagggtgcg ggcgacggtg aacatctg	108
<210>	3	
<211>	90	
<212>	DNA	
<213>	human	
<400>	3	
	gcgccccgg gcagccccgc tccgccccg ccggaacacc gtggtggccc ggaggaattt	60
	gagggtgcbg gtgacggtga accgccggag	90

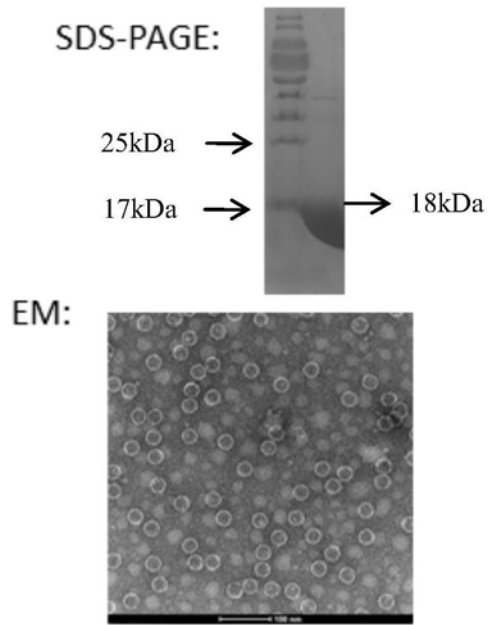


图2A

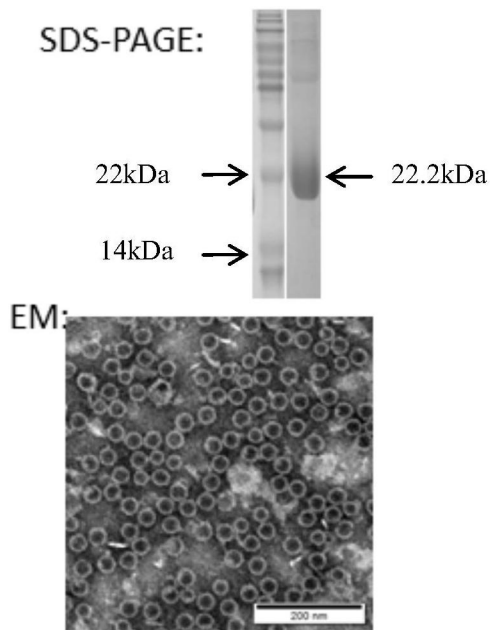


图2B

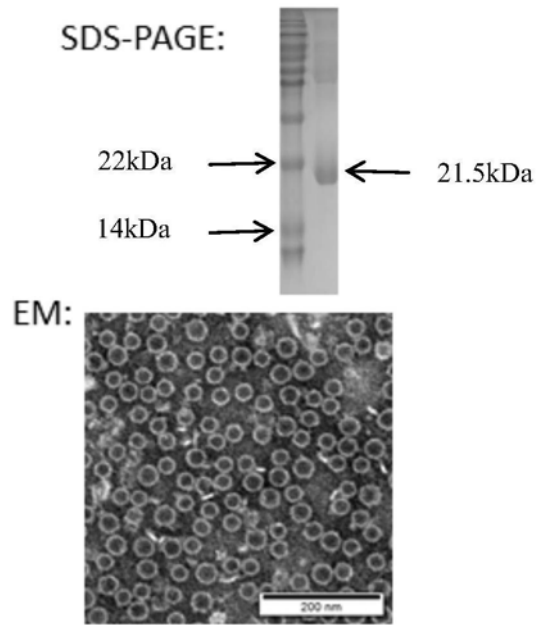


图2C

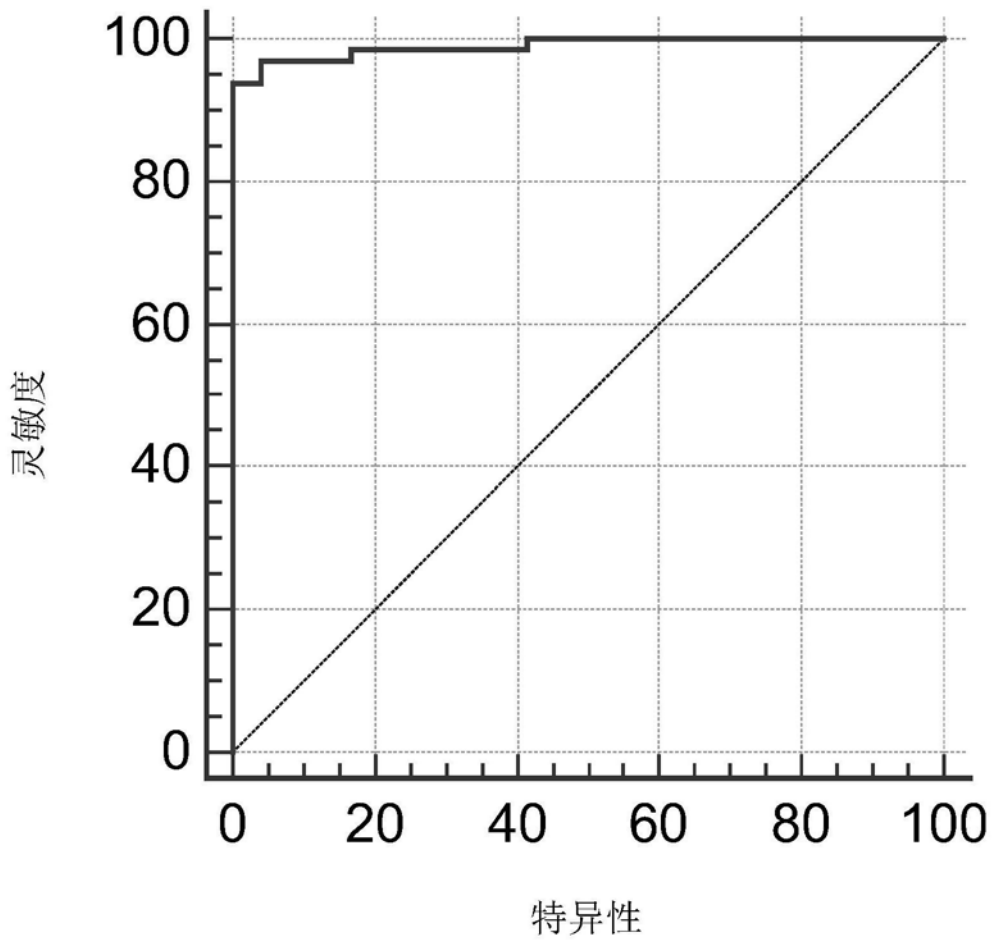


图3

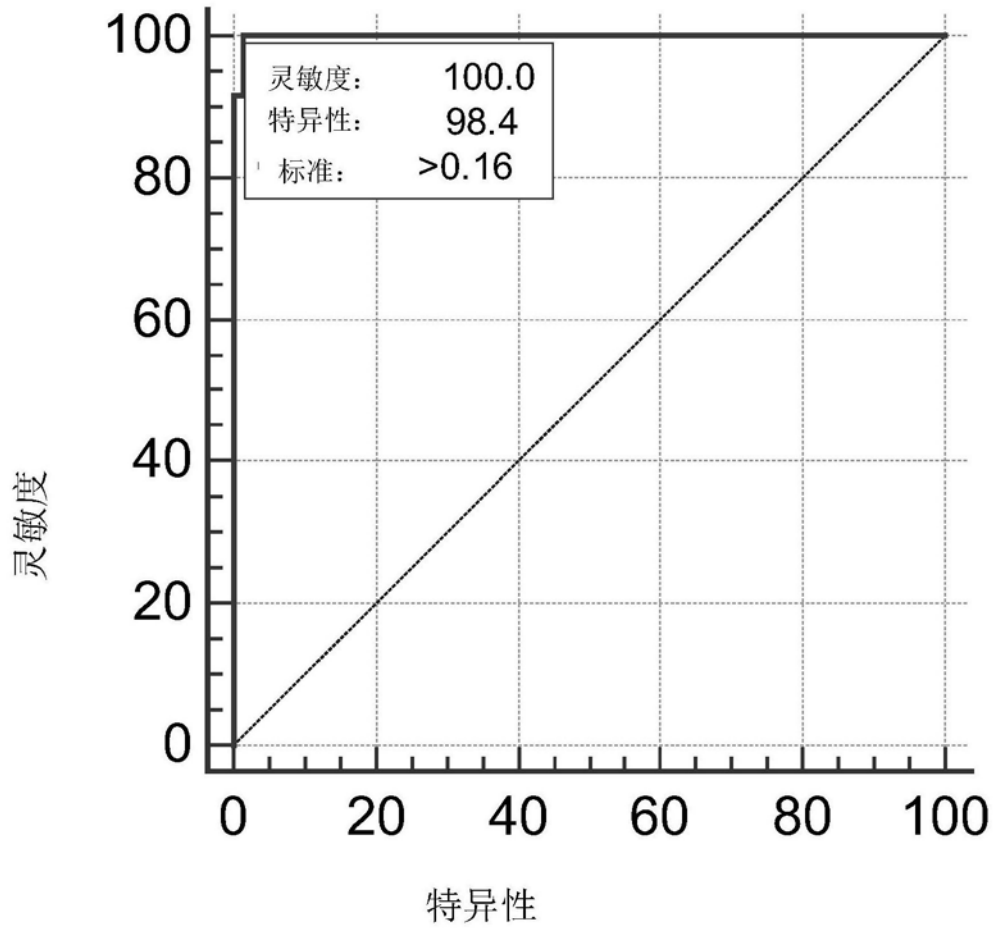


图4

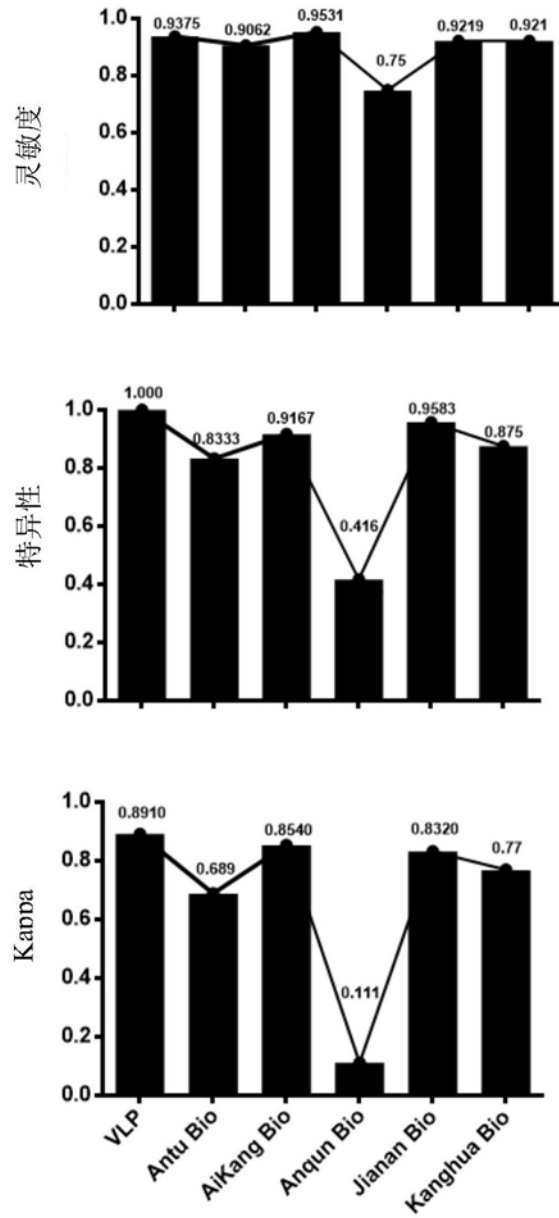


图5A

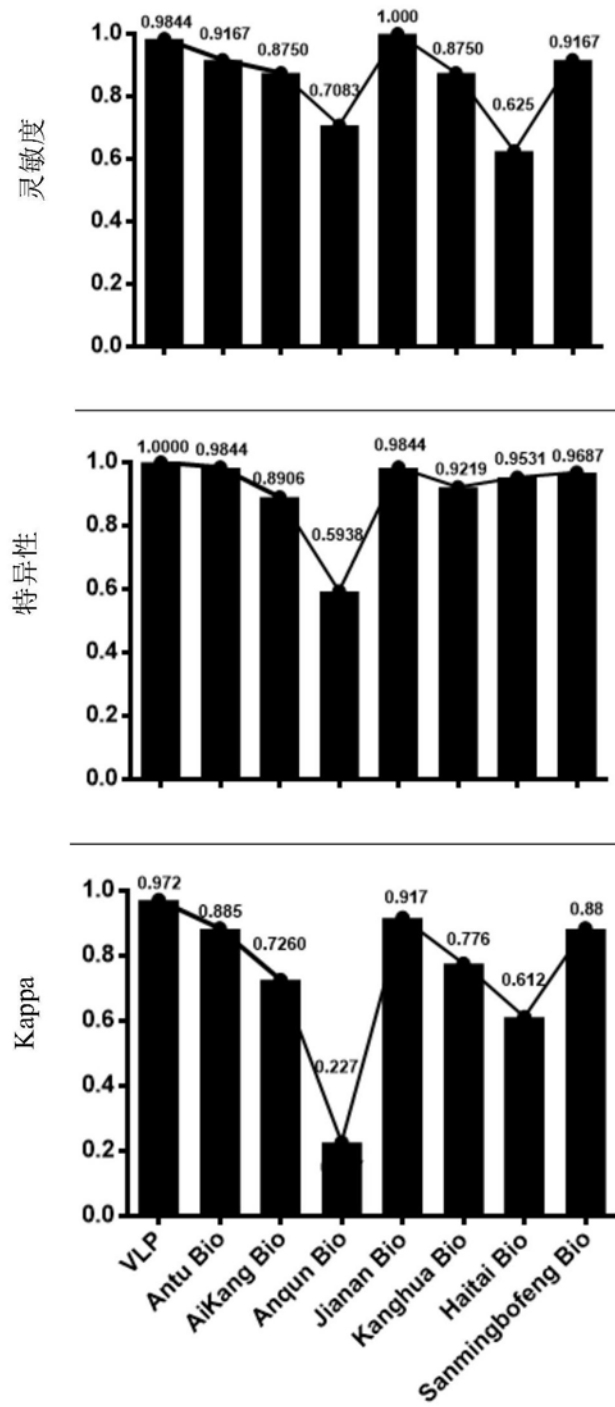


图5B

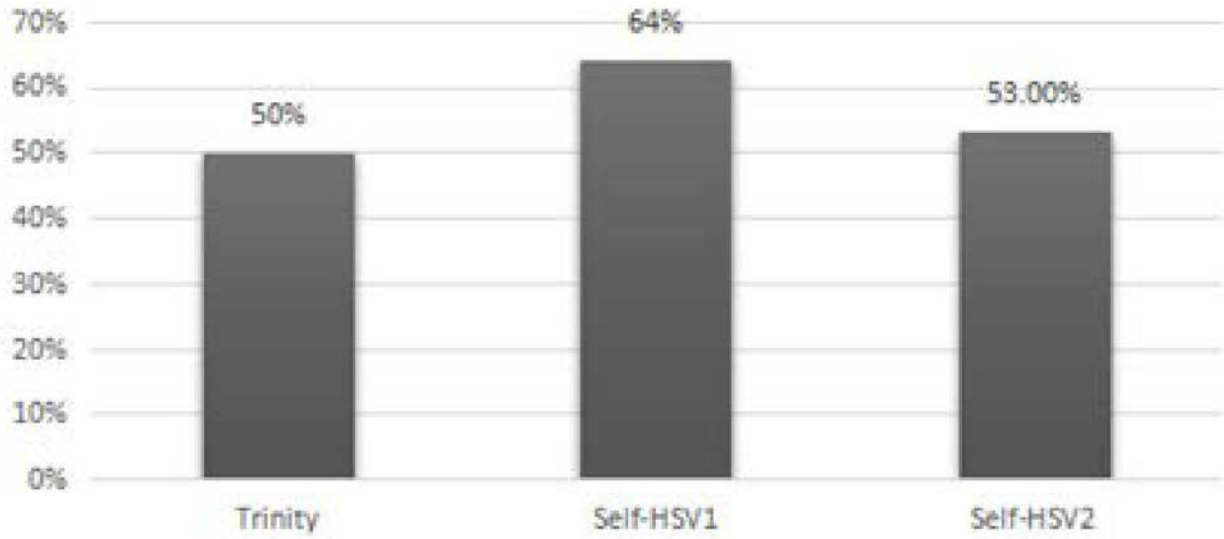


图6

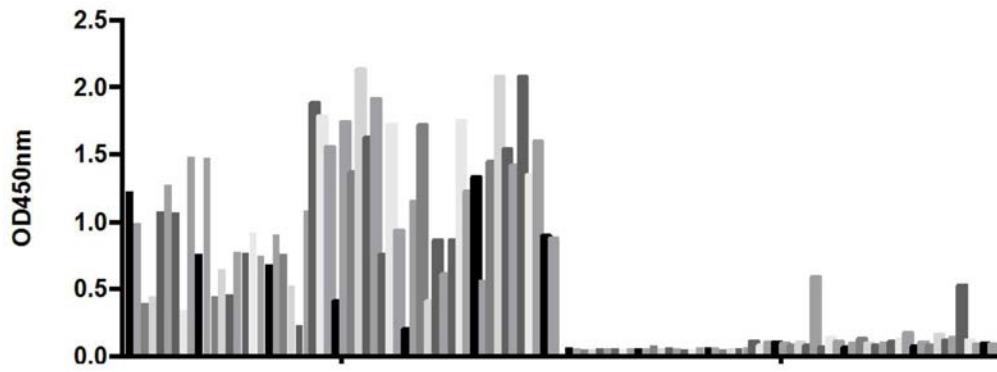


图7

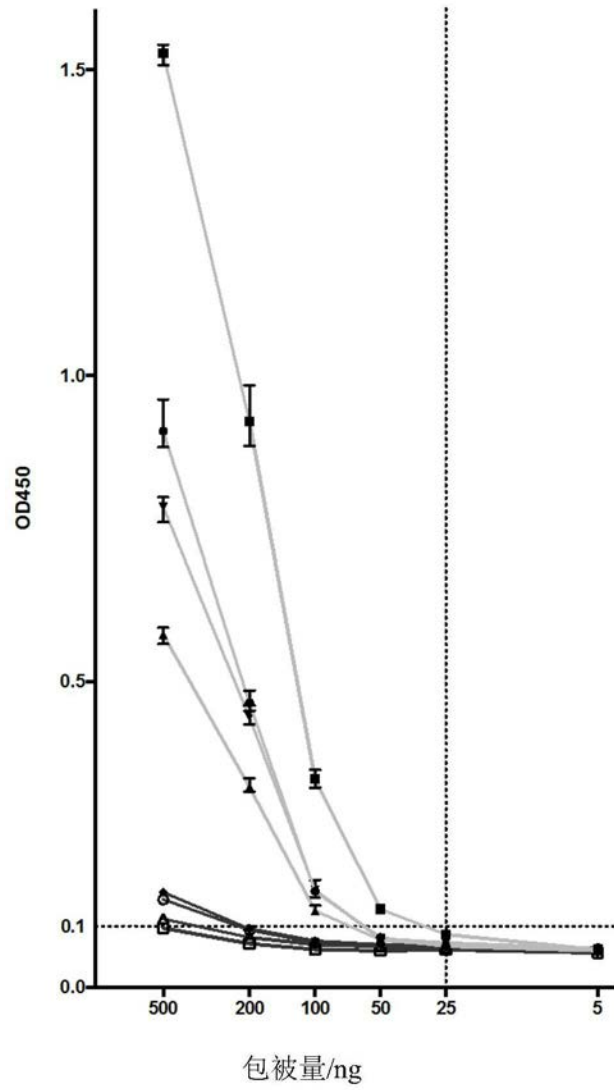


图8A

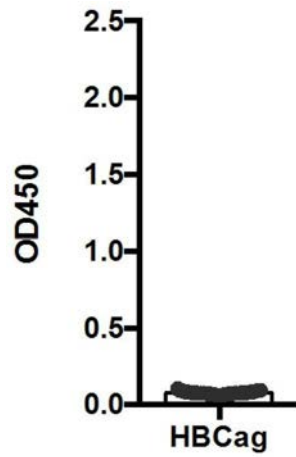


图8B

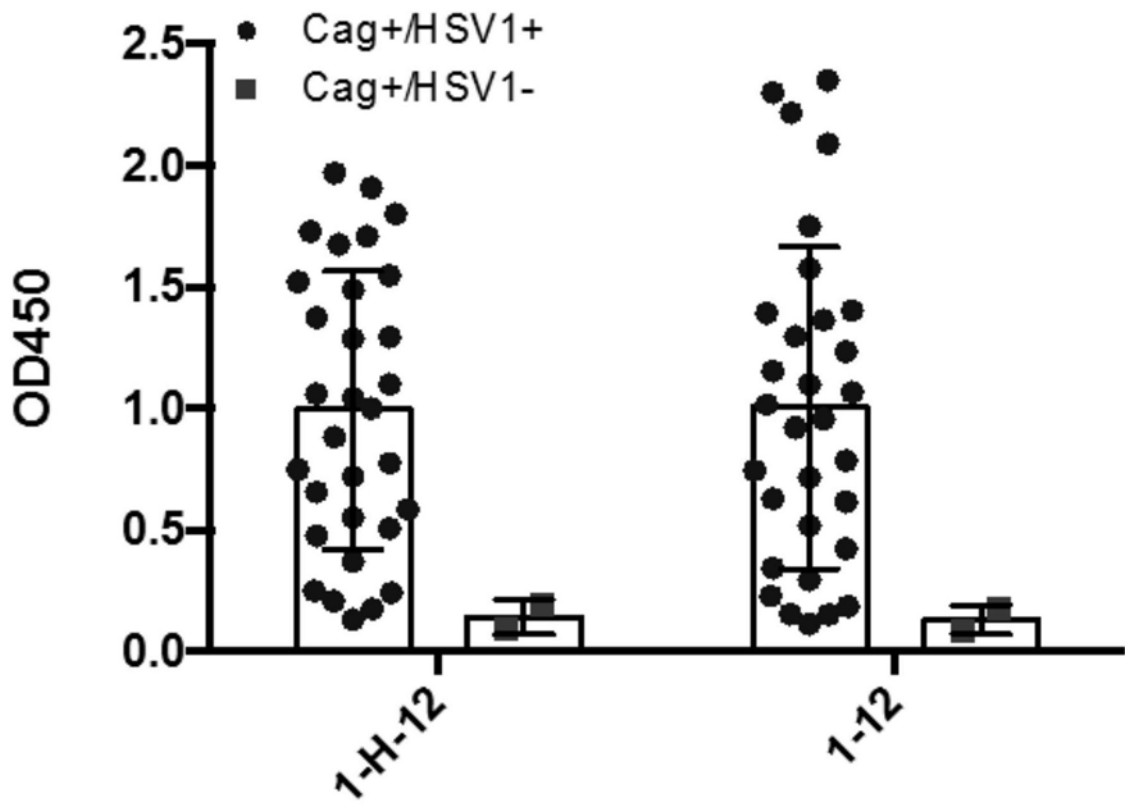


图8C

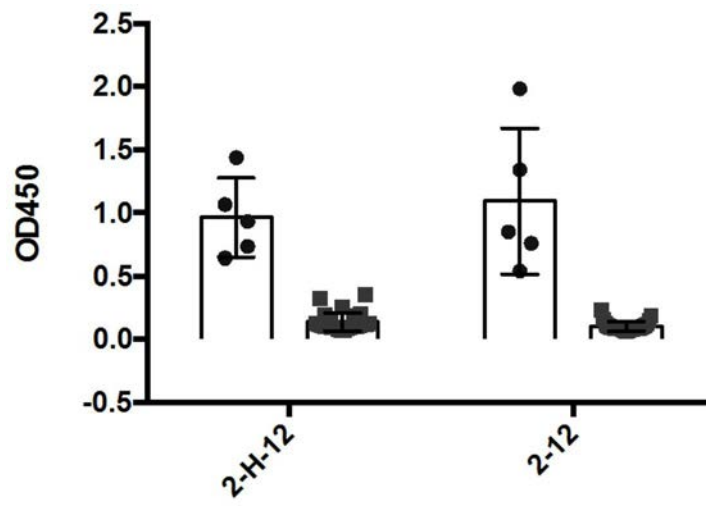


图8D