



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112505330 B

(45) 授权公告日 2024.03.29

(21) 申请号 202011242706.0

C07K 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.09

G12N 9/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112505330 A

(56) 对比文件

CN 111607002 A, 2020.09.01

CN 111239394 A, 2020.06.05

(43) 申请公布日 2021.03.16

CN 101955969 A, 2011.01.26

(73) 专利权人 昆明市妇幼保健院

CN 109266674 A, 2019.01.25

地址 650021 云南省昆明市五华区华山西路5号

CN 111825762 A, 2020.10.27

专利权人 中国人民解放军总医院第八医学中心

CN 111217920 A, 2020.06.02

(72) 发明人 侯江厚 孙卫国 张灵霞 黄国红 杨奕梅 李夏南 翟斐

CN 111239392 A, 2020.06.05

CN 111366734 A, 2020.07.03

CN 1829736 A, 2006.09.06

(74) 专利代理机构 北京东方灵盾知识产权代理有限公司 11506

WO 2004092360 A2, 2004.10.28

WO 2017189964 A2, 2017.11.02

专利代理师 苏向银

KR 20190035542 A, 2019.04.03

KR 102019008 B1, 2019.09.05

JP 2017145246 A, 2017.08.24

(续)

(51) Int. Cl.

审查员 陈亚文

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页  
序列表4页 附图3页

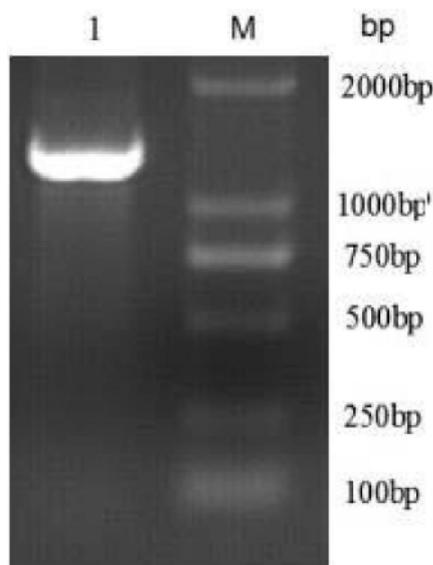
(54) 发明名称

诊,能够有效避免疫情的扩散。

基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒

(57) 摘要

本发明提出一种基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒,所述试剂盒包括用于新型冠状病毒检测的抗原,所述用于新型冠状病毒检测的抗原包括基于核衣壳蛋白的融合蛋白。上述基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒,通过融合技术获得含有新型冠状病毒的核衣壳蛋白的融合蛋白,使融合蛋白具有新型冠状病毒核衣壳蛋白的天然空间结构特征,用于新型冠状病毒检测时灵敏度高、特异性强,利用该基于核衣壳蛋白的融合蛋白进行新型冠状病毒检测能够有效提高新型冠状病毒的检出率,确保新型冠状病毒肺炎的及时确



CN 112505330 B

[接上页]

**(56) 对比文件**

Liyun Zh 等. Discovery of sandwich type COVID-19 nucleocapsid protein DNA aptamers. Chem Commun (Camb). 2020, 56(70), 全文.

Haiyang Zhang 等. Proteasome activator PA28  $\gamma$ -dependent degradation of coronavirus disease (COVID-19)

nucleocapsid protein. Biochem Biophys Res Commun . 2020, 529(2), 全文.

王振飞; 武颖彩; 贾永峰. 分子诊断技术在新型冠状病毒肺炎防控中的应用进展. 重庆医学 . 2020, (17), 全文.

高原; 陈川; 王晶. 2019新型冠状病毒的抗原抗体检测. 计量学报. 2020, (05), 全文.

1. 一种基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括用于新型冠状病毒检测的抗原,所述用于新型冠状病毒检测的抗原包括基于核衣壳蛋白的融合蛋白,所述基于核衣壳蛋白的融合蛋白为核衣壳蛋白的核苷酸序列与二硫化物氧化还原酶A的核苷酸序列融合表达生成的融合蛋白;或,核衣壳蛋白的核苷酸序列与二硫化物氧化还原酶C的核苷酸序列融合表达生成的融合蛋白;

所述二硫化物氧化还原酶A的核苷酸序列为如SEQ ID No.1所示的核苷酸序列;

所述二硫化物氧化还原酶C的核苷酸序列为如SEQ ID No.2所示的核苷酸序列;

所述核衣壳蛋白的核苷酸序列为如SEQ ID No.3所示的核苷酸序列。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述核衣壳蛋白的核苷酸序列与所述二硫化物氧化还原酶A的核苷酸序列的C端直接连接或通过接头连接;所述核衣壳蛋白的核苷酸序列与所述二硫化物氧化还原酶C的核苷酸序列的C端直接连接或通过接头连接。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为胶体金试剂盒,所述融合蛋白通过胶体金标记后喷涂在金标垫上,所述胶体金的粒径为18 nm~28 nm,胶体金标记后的融合蛋白在金标垫上的喷涂量为1.4  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ~2.0  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

4. 根据权利要求1至3任意一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为酶联免疫吸附试剂盒,所述试剂盒包括抗原酶标板,所述抗原酶标板为所述融合蛋白被包被的酶标板,所述融合蛋白在所述酶标板上的包被浓度10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,包被体积为80  $\mu\text{L}$ ~120 $\mu\text{L}$ 。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括以下组成成分:

抗原酶标板、阳性抗体效价人血清、阳性抗体效价酶标试剂、阳性抗体效价样品稀释液、显色剂A液、显色剂B液、浓缩洗涤液、终止液、封板膜以及阴性对照品。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒组成成分的规格数量如下:

抗原酶标板	8*12孔,1板;
阳性抗体效价人血清,添加有稳定剂和防腐剂	20 U/mL,0.1mL/支,1支;
阳性抗体效价酶标试剂	15mL/瓶,1瓶;
阳性抗体效价样品稀释液	50mL/瓶,1瓶;
显色剂A液	6mL/瓶,1瓶;
显色剂B液	6mL/瓶,1瓶;
浓缩洗涤液20*	50mL/瓶,1瓶;
终止液	6mL/瓶,1瓶;
封板膜	3个;
阴性对照品	0.5mL $\times$ 1瓶。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,

所述阳性抗体效价酶标试剂为辣根过氧化物酶标记的抗人IgG抗体;

所述阳性抗体效价人血清为标定的含抗新型冠状病毒人血清;

所述阳性抗体效价样品稀释液为含蛋白的缓冲液;

所述浓缩洗涤液为含10%的表面活性剂的水溶液;

所述显色剂A液含不低于0.3 g/L的过氧化物;

所述显色剂B液含不低于0.2g/L的TMB;

所述终止液含硫酸,所述硫酸浓度不高于2.0 mol/L。

8. 根据权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述抗原酶标板的制备方法为将融合蛋白的水溶液包被在酶标板上,室温放置1.5 h~2.5 h后用PBST缓冲液洗板;以10%小牛血清于4℃封闭10 h~15 h后用PBST缓冲液洗板,制得所述抗原酶标板。

## 基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药检测领域,特别是涉及一种基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 新型冠状病毒肺炎(Corona Virus Disease 2019,COVID-19)是由感染新型冠状病毒(SARS-CoV-2,亦称2019-nCoV)引起的以肺部病变为主的新发传染病,可引起消化系统和神经系统的损伤,严重者可导致死亡。目前针对 2019-nCoV 的还没有特效治疗药物,疫苗也处于临床试验阶段,患者的早诊断、及时收治和隔离对有效控制疫情至关重要。新冠病毒感染的大量排查主要还是采用核酸检测,核酸检测因其敏感性强成为疑似病例确诊的金标准,但该技术对实验场所及人员要求高、操作繁琐、受环境条件影响比较大,容易受气溶胶的污染出现假阳性。传统的抗原抗体反应是临床实验室检测的重要补充,利用抗原去检测感染者血清中的抗体是快速筛查和核酸辅助诊断的重要手段。目前很多公司已经开发出通过血清学诊断方法用于COVID-19临床诊断的检测试剂盒,如胶体金法和传统ELISA方法,筛选出SARS-CoV-2中保守的具有优势表位的抗原或联合抗原是血清学诊断成功的关键。SARS-CoV-2 基因大小约为29.8kb,基因组被注释为含有14 个开放阅读框(Opening reading frame,ORF),共编码27~28 个蛋白质。核衣壳蛋白(N 蛋白)是SARS-CoV-2 的一种主要的结构蛋白,序列如SEQ ID No.4所示,其位于病毒内部,是干扰素(Interferon, IFN)的拮抗剂和病毒编码的RNA 干扰抑制因子,与病毒的复制有关,N 蛋白在 $\beta$ 属冠状病毒之间相对比较保守,合成数量众多,具有很强抗原性,在诱导宿主免疫应答甚至发病机制中发挥重要作用,常被用作冠状病毒诊断的抗原位点。但是现有的直接基于N蛋白作为抗原用于检测SARS-CoV-2的方法检出率低,影响COVID-19的确诊效率及疫情的控制。

### 发明内容

[0003] 基于此,有必要针对现有的直接基于N蛋白作为抗原用于检测新型冠状病毒的方法检出率低,影响新型冠状病毒肺炎的确诊效率及疫情的控制的问题,提供一种基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒。

[0004] 本发明提出的一种基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒,所述试剂盒包括用于新型冠状病毒检测的抗原,所述用于新型冠状病毒检测的抗原包括基于核衣壳蛋白的融合蛋白。

[0005] 在其中的一个实施例中,所述基于核衣壳蛋白的融合蛋白为核衣壳蛋白的氨基酸序列或部分氨基酸序列与二硫化物氧化还原酶A的氨基酸序列或部分氨基酸序列融合表达生成的融合蛋白;或,核衣壳蛋白的氨基酸序列或部分氨基酸序列与二硫化物氧化还原酶C的氨基酸序列或部分氨基酸序列融合表达生成的融合蛋白。

[0006] 在其中的一个实施例中,所述二硫化物氧化还原酶A的氨基酸序列为如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列或如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列的突变序列;

[0007] 所述二硫化物氧化还原酶C的氨基酸序列为如SEQ ID No.2所示的氨基酸序列或如SEQ ID No.2所示的氨基酸序列的突变序列；

[0008] 所述核衣壳蛋白的氨基酸序列为如SEQ ID No.3所示的氨基酸序列或如SEQ ID No.3所示的氨基酸序列的突变序列。

[0009] 在其中的一个实施例中,所述核衣壳蛋白的氨基酸序列与所述二硫化物氧化还原酶A的氨基酸序列的C端直接连接或通过接头连接;所述核衣壳蛋白的氨基酸序列与所述二硫化物氧化还原酶C的氨基酸序列的C端直接连接或通过接头连接。

[0010] 在其中的一个实施例中,所述试剂盒为胶体金试剂盒,所述融合蛋白通过胶体金标记后喷涂在金标垫上,所述胶体金的粒径为18 nm~28 nm,所述金标标记的融合蛋白在金标垫上的喷涂量为1.4  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ~2.0  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。

[0011] 在其中的一个实施例中,所述试剂盒为酶联免疫吸试剂盒,所述试剂盒包括抗原酶标板,所述抗原酶标板为所述融合蛋白被包被的酶标板,所述融合蛋白在所述酶标板上的包被浓度10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,包被体积为80  $\mu\text{L}$ ~120 $\mu\text{L}$ 。

[0012] 在其中的一个实施例中,所述试剂盒包括以下组成成分:

[0013] 抗原酶标板、阳性抗体效价人血清、阳性抗体效价酶标试剂、阳性抗体效价样品稀释液、显色剂A液、显色剂B液、浓缩洗涤液、终止液、封板膜以及阴性对照品。

[0014] 在其中的一个实施例中,所述试剂盒组成成分的规格数量如下:

[0015]	抗原酶标板	8*12孔,1板;
[0016]	阳性抗体效价人血清,添加有稳定剂和防腐	20 U/mL,0.1 mL/支,1支;
[0017]	阳性抗体效价酶标试剂	15mL/瓶,1瓶;
[0018]	阳性抗体效价样品稀释液	50 mL/瓶,1瓶;
[0019]	显色剂A液	6 mL/瓶,1瓶;
[0020]	显色剂B液	6 mL/瓶,1瓶;
[0021]	浓缩洗涤液(20*)	50mL/瓶,1瓶;
[0022]	终止液	6mL/瓶,1瓶;
[0023]	封板膜	3个;
[0024]	阴性对照品	0.5 mL $\times$ 1瓶。

[0025] 在其中的一个实施例中,所述阳性抗体效价酶标试剂为辣根过氧化物酶标记的抗人IgG抗体;

[0026] 所述阳性抗体效价血清为标定的含抗新型冠状病毒人血清;

[0027] 所述阳性抗体效价样品稀释液为含蛋白的缓冲液;

[0028] 所述浓缩洗涤液为含10%的表面活性剂的水溶液;

[0029] 所述显色剂A含不低于0.3 g/L的过氧化物;

[0030] 所述显色剂B含不低于0.2g/L的TMB;

[0031] 所述终止液含硫酸(浓度不高于2.0 mol/L)。

[0032] 在其中的一个实施例中,所述抗原酶标板的制备方法为将融合蛋白的水溶液包被在酶标板上,室温放置1.5 h~2.5 h后用PBST缓冲液洗板;以10%小牛血清于4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭10 h~15 h后用PBST缓冲液洗板,制得所述抗原酶标板。

[0033] 上述基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒,通过融合技术获

得含有新型冠状病毒的核衣壳蛋白的融合蛋白,使融合蛋白具有新型冠状病毒核衣壳蛋白的天然空间结构特征,用于新型冠状病毒检测时灵敏度高、特异性强,利用该基于核衣壳蛋白的融合蛋白进行新型冠状病毒检测能够有效提高新型冠状病毒的检出率,确保新型冠状病毒肺炎的及时确诊,能够有效避免疫情的扩散。

[0034] 进一步地,上述基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒,基于核衣壳蛋白的融合蛋白为可溶性蛋白,该可溶性蛋白可以以上清的形式存在,在用于血清学检测时可有效提高新型冠状病毒抗体的检出率,确保检测的准确性。

[0035] 更进一步地,上述基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒,将新型冠状病毒的核衣壳蛋白与二硫化物氧化还原酶A或二硫化物氧化还原酶C进行融合表达,充分利用二硫化物氧化还原酶C的二硫键异构酶和分子伴侣的生物特性,有效促使融合蛋白在重组表达过程中以上清的形式存在,进而提高新型冠状病毒抗体的检出率,为血清学检测试剂盒打下物质基础。

### 附图说明

[0036] 图1为本发明实施例1的SARS-CoV-2 N 蛋白核苷酸分子量凝胶电泳鉴定结果图;

[0037] 图2为本发明实施例1 DsbC-N 融合蛋白在原核系统内表达形式鉴定结果图;

[0038] 图3为本发明实施例1纯化后DsbC-N融合蛋白的纯度鉴定结果图;

[0039] 图4为本发明DsbC-N融合蛋白用于ELISA实验的检测结果图。

### 具体实施方式

[0040] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合具体实施方式对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施方式仅仅用以解释本发明,但并不用于限定本发明。

[0041] 在早期检测中,核酸检测发挥了巨大作用,达到了早诊断、早隔离的目的。随着新冠病毒的基因组序列的解析出来,各个结构蛋白的表达序列被测序,重组诊断抗原开始发挥作用。病毒感染机体时,在机体血清抗体中,IgM抗体出现最早,是急性期感染的诊断指标,但IgM浓度低、维持时间只有一周左右并且亲和力低;IgG抗体产生较晚,能提示染中后期或者是具有既往感染的产生,并且IgG抗体具有浓度高、维持时间长、亲和力高。目前已有多家生物公司研发出检测SARS-CoV-2 IgM和IgG抗体的诊断方法,为新型冠状病毒感染的辅助诊断和流行病学调查提供了一个极好的检测手段。抗体检测的特异性与抗原位点的保守性密切相关,SARS-CoV-2的N蛋白是COVID-19 检测的主要抗原位点,目前临床新冠病毒检测试剂盒大多采用N蛋白抗原或者刺突蛋白(S蛋白)抗原或者联用方法去检测血清抗体。但是采用N蛋白抗原或者刺突蛋白(S蛋白)抗原或者联用方法去检测血清抗体在敏感性和特异性方面仍有待进一步提高,以提高SARS-CoV-2的检出率。

[0042] 为了提高N蛋白抗原在血清学诊断中的敏感性和特异性,同时提高N蛋白在原核重组中表达量,在本发明中,采用N蛋白与DsbA或DsbC融合表达的方法,由于在原核重组中,可溶性表达往往代表重组蛋白正确的空间折叠方式,为了保证检测抗原的空表表位,本发明利用DsbA和DsbC蛋白分子伴侣和二硫键异构酶的生物学特性,获得了SARS-CoV-2 N蛋白的上清表达,很好保证了在血清学诊断中的检出率。

[0043] 本发明提出的一种基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒,试剂盒包括用于新型冠状病毒检测的抗原,用于新型冠状病毒检测的抗原包括基于核衣壳蛋白的融合蛋白。该试剂盒中用于新型冠状病毒检测的抗原,通过融合技术获得含有新型冠状病毒的核衣壳蛋白的融合蛋白,使融合蛋白具有新型冠状病毒核衣壳蛋白天然空间结构特征的同时改善其性质,用于新型冠状病毒检测时灵敏度高、特异性强,更适宜用于新型冠状病毒检测以提高新型冠状病毒的检出率,确保新型冠状病毒肺炎的及时确诊,能够有效避免疫情的扩散。

[0044] 优选的,基于核衣壳蛋白的融合蛋白为可溶性蛋白,该可溶性蛋白可以以上清的形式存在,在用于血清学检测时能够有效提高新型冠状病毒抗体的检出率,确保检测的准确性。

[0045] 作为一种可选实施方式,基于核衣壳蛋白的融合蛋白为核衣壳蛋白的氨基酸序列或部分氨基酸序列与二硫化物氧化还原酶A(DsbA)的氨基酸序列或部分氨基酸序列融合表达生成的融合蛋白;或,核衣壳蛋白的氨基酸序列或部分氨基酸序列与二硫化物氧化还原酶C(DsbC)的氨基酸序列或部分氨基酸序列融合表达生成的融合蛋白。蛋白质中二硫键的形成是原核生物和真核生物的重要过程,重组的融合蛋白的可溶性表达往往代表着蛋白正确的空间折叠方式、保持着蛋白的天然空间结构,为了保证新冠病毒核衣壳蛋白融合纯化过程的天然构想,本发明将新型冠状病毒的核衣壳蛋白与二硫化物氧化还原酶A或二硫化物氧化还原酶C进行融合表达,充分利用二硫化物氧化还原酶A和二硫化物氧化还原酶C的二硫键异构酶和分子伴侣的生物特性,提高融合蛋白可溶性,促使融合蛋白在重组表达过程中以上清的形式存在,进而提高新型冠状病毒抗体的检出率,为血清学检测试剂盒打下物质基础。

[0046] 作为一种可选实施方式,二硫化物氧化还原酶A的核苷酸序列为如SEQ ID No.1所示的核苷酸序列或如SEQ ID No.1所示的核苷酸序列的突变序列;二硫化物氧化还原酶C的核苷酸序列为如SEQ ID No.2所示的核苷酸序列或如SEQ ID No.2所示的核苷酸序列的突变序列;核衣壳蛋白的核苷酸序列为如SEQ ID No.3所示的核苷酸序列或如SEQ ID No.3所示的核苷酸序列的突变序列。

[0047] 其中,在实际进行核衣壳蛋白与二硫化物氧化还原酶A或二硫化物氧化还原酶C的融合表达过程中,可根据需要使核衣壳蛋白核苷酸序列进行突变以改善融合表达后的融合蛋白的特征,其中可选的突变方式包括增加、删除或替换核苷酸序列中的某一个或某几个核苷酸;同理,也可根据需要使二硫化物氧化还原酶A核苷酸序列或二硫化物氧化还原酶C核苷酸序列进行突变以改善融合表达后的融合蛋白的特征,同样可选的突变方式包括增加、删除或替换核苷酸序列中的某一个或某几个核苷酸。例如,二硫化物氧化还原酶A的核苷酸序列如SEQ ID No.1所示,而其一个突变序列如SEQ ID No.7所示。

[0048] 作为一种可选实施方式,核衣壳蛋白的核苷酸序列与二硫化物氧化还原酶A的核苷酸序列的C端直接连接或通过接头连接;核衣壳蛋白的氨基酸序列与二硫化物氧化还原酶C的氨基酸序列的C端直接连接或通过接头连接。例如,可通过核苷酸序列为GGGGSGGGGS软性接头将核衣壳蛋白与二硫化物氧化还原酶A或二硫化物氧化还原酶C连接起来。

[0049] 可选的,基于核衣壳蛋白的融合蛋白通过原核表达系统表达生成,优选的表达菌株为大肠杆菌。

[0050] 可选的,本发明试剂盒采用的用于新型冠状病毒检测的抗原的制备方法可采用但不限于以下方法制备而成。

[0051] 一种用于新型冠状病毒检测的抗原的制备方法包括以下步骤:

[0052] 根据如SEQ ID No.3所示的核苷酸序列合成核衣壳蛋白基因片段;

[0053] 通过内切酶SalI以及内切酶NheI将核衣壳蛋白基因片段从克隆载体上切下;

[0054] 将核衣壳蛋白基因片段克隆到载体PET-DsbA或PET-DsbC上,转化到原核表达系统中诱导表达生成基于核衣壳蛋白的融合蛋白。

[0055] 进一步可选的,合成核衣壳蛋白基因片段的上游引物的核苷酸序列如SEQ ID No.5所示;合成核衣壳蛋白基因片段的下游引物的核苷酸序列如SEQ ID No.6所示。

[0056] 本发明根据GenBank: MN908947.3报道的新型冠状病毒核衣壳蛋白的核酸序列,参照载体pET-DsbA和pET-DsbC多克隆位点,设计合成了针对核衣壳蛋白核苷酸的特异引物,在下游引物的5端引入大肠杆菌偏性的终止密码子TAA。具体的,上游引物的核苷酸序列为5-ACGCGTCTGACTCTGATAATGGACC-3;下游引物的核苷酸序列为5-CTAGCTAGCTTAGGCCTGAGTTGAGTCAGC-3,并且上游引物以及下游引物的末端分别引入了内切酶SalI的酶切位点GCTAG和内切酶NheI的酶切位点GCTAG(序列中粗体部分)以便通过切酶SalI以及内切酶NheI将核衣壳蛋白基因片段从克隆载体切下。

[0057] 可选的,本发明以载体pUC18-SARS-CoV-2核衣壳蛋白核苷酸序列为模板,在热激TaqDNA聚合酶作用下,通过上游引物和下游引物以常规PCR方法扩增SARS-CoV-2核衣壳蛋白核苷酸序列。

[0058] 可选的,PCR方法扩增条件如下:

[0059] 94℃预变性5 min,98℃变性20 s,68℃退火20 s,72℃延伸80 s进行30个循环,72℃延伸5 min。

[0060] PCR扩增产物以1%琼脂糖电泳验证产物分子量后,对PCR扩增产物进行胶回收,回收的扩增产物和表达载体pET-DsbA或pET-DsbC均以SalI和NheI进行双酶切,通过1%的琼脂糖电泳切胶回收酶切后的产物,在T4DNA连接酶的作用下,把酶切回收产物(包括N蛋白基因片段和表达质粒pET-DsbA或pET-DsbC)中的N蛋白基因片段克隆连接到表达质粒pET-DsbA或pET-DsbC中,克隆连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞BL21(DE3),筛选阳性克隆产物进行测序。

[0061] 取经测序正确的DsbA-N融合蛋白或DsbC-N融合蛋白工程菌接种于含卡那霉素浓度为50 ng/ml的LB培养基中,置于摇床内在37℃条件下震荡培养激活,次日按1:50的比例转接到同样体系的LB培养基中,在37℃条件下进行震荡培养至菌液OD600达0.4 h,加入IPTG使得终浓度为0.3 mmol,37℃条件下继续震荡培养诱导5 h。诱导后菌液在4℃条件下、5000 rpm离心收集菌体,沉淀菌体加入1×PBS缓冲液混匀后,冰育转态下进行超声破碎,4℃条件下、12000 rpm离心30 min,收集上清和沉淀,以12%的SDS-PAGE鉴定DsbA-N融合蛋白或DsbC-N融合蛋白在原核系统内表达形式。

[0062] 作为一种可选实施方式,制备方法还包括以下步骤:

[0063] 对基于核衣壳蛋白的融合蛋白进行亲和纯化和/或凝胶纯化。

[0064] 例如,DsbA-N融合蛋白和DsbC-N融合蛋白的N端带有6×HIS标签,可利用chelating sephrose进行亲和层析对融合表达后生成的收集上清和沉淀,纯化方便且纯化

后融合蛋白的纯度较高。

[0065] 利用亲和层析对表达后的超声上清蛋白进行目的蛋白纯化,在4℃条件下取离心上清按2 mL/min的速度过镍离子亲和柱,以1×PBS平衡4个柱积后,以100 mmol/L咪唑洗脱杂蛋白3个柱积,再用200mmol/L咪唑洗脱目的融合蛋白,收集目的蛋白,以15%的 SDS-PAGE 对纯化后融合蛋白进行纯度测定。

[0066] 作为一种可选实施方式,试剂盒为胶体金试剂盒,融合蛋白通过胶体金标记后喷涂在金标垫上,胶体金的粒径为18 nm~28 nm,金标标记的融合蛋白在金标垫上的喷涂量为1.4 μL/cm~2.0 μL/cm。

[0067] 具体的,胶体金试剂盒的组成、制备方法以及使用方法可参照传统的胶体金试剂盒。

[0068] 作为一种可选实施方式,试剂盒为酶联免疫吸试剂盒,试剂盒包括抗原酶标板,抗原酶标板为融合蛋白被包被的酶标板,融合蛋白在酶标板上的包被浓度10 μg/mL~20 μg/mL,包被体积为80 μL~120μL。优选的,融合蛋白在酶标板上的包被浓度15 μg/mL,包被体积为100μL。

[0069] 作为一种可选实施方式,试剂盒包括以下组成成分:

[0070] 抗原酶标板、阳性抗体效价人血清、阳性抗体效价酶标试剂、阳性抗体效价样品稀释液、显色剂A液、显色剂B液、浓缩洗涤液、终止液、封板膜以及阴性对照品。

[0071] 更进一步地,试剂盒组成成分的规格数量如下:

[0072]	抗原酶标板	8*12孔,1板;
[0073]	阳性抗体效价人血清,添加有稳定剂和防腐	20 U/mL,0.1 mL/支,1支;
[0074]	阳性抗体效价酶标试剂	15mL/瓶,1瓶;
[0075]	阳性抗体效价样品稀释液	50 mL/瓶,1瓶;
[0076]	显色剂A液	6 mL/瓶,1瓶;
[0077]	显色剂B液	6 mL/瓶,1瓶;
[0078]	浓缩洗涤液(20*)	50 mL/瓶,1瓶;
[0079]	终止液	6mL/瓶,1瓶;
[0080]	封板膜	3个;
[0081]	阴性对照品	0.5 mL× 1瓶。

[0082] 其中,可选的,阳性抗体效价酶标试剂为辣根过氧化物酶标记的抗人IgG抗体;阳性抗体效价血清为标定的含抗新型冠状病毒人血清;阳性抗体效价样品稀释液为含蛋白的缓冲液;浓缩洗涤液为含10%的表面活性剂的水溶液;显色剂A含不低于0.3 g/L的过氧化物;显色剂B含不低于0.2g/L的TMB;终止液含硫酸(浓度不高于2.0 mol/L)。

[0083] 优选的,抗原酶标板的制备方法为将融合蛋白的水溶液包被在酶标板上,室温放置1.5 h~2.5 h后用PBST缓冲液洗板;以10%小牛血清于4℃封闭10 h~15 h后用PBST缓冲液洗板,制得抗原酶标板。

[0084] 实施例1

[0085] 1. 材料

[0086] 质粒pET-DsbC、表达菌种BL21 (DE3) 由本申请人保存;SARS-CoV-2 N蛋白表达序列核酸载体pUC18-SARS-CoV-2 N由北京万域美澜科技公司沈春奇老师惠赠;质粒提取试剂

盒、DNA凝胶回收试剂盒购于天根生物科技公司;内切酶、T4 DNA 连接酶、购自NEB公司;kapa保真DNA 聚合酶和dNTP购自北京阅微基因公司;亲和树脂购自友谊中联生物科技公司;羊抗人IgG,TMB显色液购自索莱宝生物公司;对照样品新型冠状病毒IgG抗体检测试剂盒(酶联免疫法)为北京华大吉比爱生物技术公司,酶标板条上包被有SARS-CoV-2全病毒裂解液;30例临床确诊COVID-19患者血清,50例健康人血清由生物公司收集,ELISA实验委托公司完成;ELISA实验严格按照生物安全有关规定操作,遵循实验室操作的常规规定。

## [0087] 2. 方法

### [0088] 2.1 SARS-CoV-2 N蛋白核苷酸扩增引物的制备

[0089] 根据GenBank: MN908947.3报道的SARS-CoV-2 N蛋白核酸序列,参照载体pET-DsbC多克隆位点,设计合成了针对 N蛋白核酸的特异引物,并在下游引物的5端引入大肠杆菌偏性的终止密码子TAA。上下游引物设计序列如下:

[0090] 上游引物核苷酸序列P1: 5-ACGCGTCGACTCTGATAATGGACC-3;

[0091] 下游引物核苷酸序列P2:5-CTAGCTAGCTTAGGCCTGAGTTGAGTCAGC-3。

[0092] 上下游引物末端分别引入SalI和NheI酶切位点(斜线表示)。

[0093] 以载体 pUC18-SARS-CoV-2 N 核酸为模板,在热激TaqDNA聚合酶作用下,通过引物P1和P2,常规 PCR方法扩增SARS-CoV-2 N 核酸,条件如下:94℃预变性5 min,98℃变性20 s,68℃退火20 s,72℃延伸80 s 进行30 个循环,72℃延伸5 min。扩增的产物以1%琼脂糖电泳验证产物分子量,结果如图1所示,其中,序号1为本发明扩增产物SARS-CoV-2 N蛋白核酸序列;M为 DL2000。在目的分子量大约为 1260 bp处存在清晰单一的条带,SARS-CoV-2 N蛋白全长420个氨基酸,对应分子量为1260bp,实验结果符合理论值。

### [0094] 2.2 pET-DsbC-N蛋白融合表达质粒的制备

[0095] 对PCR扩增产物进行胶回收,回收的产物和表达载体pET-DsbC均以SalI和NheI进行双酶切,通过1%的琼脂糖电泳切胶回收酶切后的产物,在 T4DNA 连接酶的作用下,把回收片段克隆到表达质粒pET-DsbC中,连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3),筛选阳性克隆进行测序。

### [0096] 2.3 DsbC-N 融合蛋白的原核系统表达

[0097] 取经测序正确的pET-DsbC-N 融合蛋白工程菌接种于含卡那霉素浓度为50 ng/mL的 LB 培养基中,置于摇床内在37℃条件下震荡培养激活,次日按1:50的比例转接到同样体系的LB培养基中,在37℃条件下进行震荡培养至菌液OD600 达 0.4 h,加入 IPTG使得终浓度为0.3 mmol,37℃条件下继续震荡培养诱导5 h。诱导后菌液在4℃条件下、5000 rpm离心收集菌体,沉淀菌体加入1×PBS缓冲液混匀后,冰育转态下进行超声破碎,4℃条件下、12000 rpm 离心 30 min,收集上清和沉淀。

[0098] 以12%的 SDS-PAGE 鉴定融合蛋白DsbC-N 在原核系统内表达形式,结果如图2所示,其中,M为低分子量蛋白标准;1为无诱导对照;2为表达的全菌体蛋白;3为表达菌体超声破碎后的上清;4为表达菌体超声破碎后的沉淀。

[0099] 从图2中可以看出,DsbC-N融合蛋白在原核系统内获得较高表达,融合蛋白占菌体总蛋白的30%以上,经过超声破碎后发现,DsbC-N融合蛋白主要以包涵体的形式存在超声沉淀中,其中约30%的DsbC-N融合蛋白以上清的形式存在,蛋白的上清的表达往往代表蛋白的天然状态,故在后续步骤中收集超声破碎后的上清准备亲和纯化。

[0100] 2.4 DsbC-N 融合蛋白的亲纯化

[0101] DsbC-N 融合蛋白的N端带有6×HIS标签,利用亲和层析对表达后超声上清蛋白进行目的蛋白纯化,在4℃条件下取离心上清按2 mL/min的速度过镍离子亲和柱,以1×PBS平衡4个柱积后,以100 mmol咪唑洗脱杂蛋白3个柱积,再用200 mmol咪唑洗脱目的融合蛋白,收集目的蛋白。

[0102] 以15%的 SDS-PAGE 对纯化后融合蛋白进行纯度测定,结果如图3所示,其中,M为低分子量蛋白标准;1、2、3为纯化后的DsbC-N融合蛋白。

[0103] 从图3中可以看出,融合蛋白经亲和纯化后,纯度可达92%以上,高纯度的融合蛋白是后续开展血清学实验获得高特异性的保证。

[0104] 进一步检测,获得的融合蛋白相对分子量为 $68 \times 10^3$ 。

[0105] 2.5 DsbC-N 融合蛋白血清抗体ELISA实验

[0106] 纯化的DsbC-N 融合蛋白经水充分透析后,采用BCA方法进行浓度测定,以包被液将重组蛋白稀释为15 $\mu$ g/mL,酶标板每孔包被100 $\mu$ L,室温放置2 h,PBST 缓冲液洗板4次;10%小牛血清在4℃冰箱内封闭过夜,次日以 PBST 洗板5次,待测样本血清和健康人血清均以1:50倍稀释,每孔加入100 $\mu$ L,置于37℃温箱内孵育1 h,洗板5次,拍干,以1:1000倍稀释的 HRP 标记的羊抗人IgG于37℃条件下孵育1 h,PBST 洗板5次,TMB显色,酶标仪检测A450 nm波长处的A值,检测结果如图4所示。

[0107] 对待测的30份经核酸检测阳性血清和50份健康者血清以对照样品新型冠状病毒IgG抗体检测试剂盒进行对比检测,实验方法严格按照试剂盒说明书进行。结果为出现1例假阴性,检出率为96%;出现假阳性2例,特异性为96%。

[0108] 从图4中可以看出,SARS-CoV-2感染者阳性血清相对健康人血清而言,ELISA实验中A450值具有显著性差异。其中 30例明确新冠肺炎血清阳性检出例数为 29例,检出率为96%,与对照样品-现有IgG检测试剂盒符合率为100%;50例健康人对对照血清检出1例,检出率为2%,特异性为98%。本实施例设定 cut-off 值为健康人血清检测平均A值+3倍标准差。

[0109] 其中,在30例阳性样本中漏检一例,推测该样本来源患者可能处于“窗口期”,虽然核酸检测为阳性,但患者血液内还无法检测血液中的病毒抗体,或者是血清在长时间保存过程中,出现抗体聚集或降解,没有被抗原捕捉。

[0110] 本发明获得的可溶性SARS-CoV-2 N蛋白的融合蛋白用于血清学诊断,敏感性高,特异性高。

[0111] 2.6 基于DsbC-N 融合蛋白制备新型冠状病毒检测的试剂盒

[0112] 按照如表1所示的规格数量制备试剂盒产品。

[0113] 表1 试剂盒组成成分的规格数量

[0114]

组成成分	规格数量
抗原酶标板	8*12孔,1板
阳性抗体效价人血清,添加有稳定剂和防腐剂	20 U/mL,0.1mL/支,1支
阳性抗体效价酶标试剂	15 mL/瓶,1瓶
阳性抗体效价样品稀释液	50 mL/瓶,1瓶
显色剂A液	6 mL/瓶,1瓶
显色剂B液	6 mL/瓶,1瓶

浓缩洗涤液 (20*)	50 mL/瓶, 1瓶
终止液	6 mL/瓶, 1瓶
封板膜	3个
阴性对照品	0.5 mL × 1瓶

[0115] 2.6.1 试剂盒检验原理

[0116] 本试剂盒应用间接法原理 (ELISA) 定量检测人血清或血浆中的新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) IgG 抗体, 在酶标板条上预包被结合样品相关抗体的新型冠状病毒 DsbC-N 融合蛋白抗原, 加入待测标本进行温育, 标本中的 IgG 抗体与之结合, 洗板去除不与包被抗原结合的物质; 加入酶标试剂进行第二次温育, 当样品中存在新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) IgG 抗体时, 将形成“包被抗原-IgG 抗体抗人 IgG 酶联物”复合物, 再次洗板后加入显色剂, 复合物上连接的 HRP 催化显色剂反应, 生成蓝色产物, 终止反应后, 变为黄色; 若样品中无 SARS-CoV-2 病毒 IgG 抗体时, 不显色。在酶标仪或酶免系统上测定 OD 值, 根据 OD 值判定有无以及 OD 值从而测定新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) IgG 抗体的含量。

[0117] 2.6.2 试剂盒的储存条件及效期

[0118] 试剂盒于 2-8℃ 保存, 有效期为 1 年。使用前请将试剂盒平衡至室温 (约 30min)。实验前将液体试剂轻轻震荡混匀, 使用后应立即密闭放回 2-8℃ 保存。未用完的酶标板条须与干燥剂一起用自封袋密封 2-8℃ 保存。

[0119] 2.6.3 试剂盒的适用仪器

[0120] 加样器、温箱、洗板机、含波长 450nm, 490nm 的酶标仪。

[0121] 2.6.4 试剂盒的样本要求

[0122] 样本类型: 人血清、血浆。

[0123] 样本采集: 病人血样的采集及检测过程须按照国家卫生健康委发布的《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南》(第三版) 进行操作。“样本保存: 血样采集后应及时分离样本进行检测: 如不能及时检测样本保存按照国家卫生健康委发布的《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南》(第三版) 要求执行。

[0124] 样本安全性: 所有样本均视为有潜在感染性的物品, 严格按照国家相关标准和指南执行。

[0125] 使用前请将样品室温平衡 30min 以上, 冷冻样品实验前需解冻混匀。

[0126] 2.6.5 试剂盒的检验方法

[0127] 试剂准备: 所有试剂在使用前应在室温 (10-30℃) 平衡 30min, 应确认使用前其表面潮气已干尽。

[0128] 包被板: 可直接使用。必须在包被板平衡至室温后才可打开外包装铝筒袋, 以防止板条吸收空气中水蒸气。请将剩余板条立即放回含干燥剂的铝筒袋 (或塑料袋)、密封。

[0129] 阴、阳性对照: 可直接使用, 使用前充分混匀。

[0130] 酶工作液: 可直接使用, 使用前充分混匀。20 倍浓缩洗涤液: 用干净吸管从瓶中吸取需要量, 用纯化水 1:19 稀释成为洗液待用。如: 取 1mL 浓缩洗涤液用 19mL 纯化水稀释。

[0131] 稀释后缓冲液: 2-8℃ 最多可稳定一周。如果 20 倍浓缩洗涤液出现结晶, 稀释前应至 37℃ 加热、充分溶解混匀。

[0132] 中底物液 A, B: 可直接使用。因底物液对光敏感, 使用后应立即盖好瓶盖并尽量避

光储存。终止液：可直接使用。

[0133] 封口胶：直接使用。封口胶仅限一次使用，以避免交叉污染。

[0134] 2.6.6 检测程序

[0135] 1. 配液：将浓缩洗涤液用蒸馏水或去离子水20倍稀释。

[0136] 2. 编号：将样品对应酶标板按序编号，每板应设参比品孔及空白对照1孔（双波长检测可不设空白对照孔）。

[0137] 3. 阳性标准品，样品稀释：20倍，40倍，80倍，160倍，320倍比稀释。

[0138] 4. 加样：稀释后样品100 $\mu$ l/孔，至少两孔平行（待测样品也可梯度稀释检测）。

[0139] 5. 洗板，手工洗操作：每孔加入300 $\mu$ l洗液，静置5-10秒后弃尽，重复冲洗5次后、拍干；洗板机操作：每孔加入300-350 $\mu$ l洗液，每次洗涤间隔5.10秒，重复冲洗5次后、拍干。

[0140] 6. 加酶工作液温育每孔加入酶工作液100 $\mu$ l，贴上封口胶，置37C温育20分钟。

[0141] 7. 洗板，手工洗操作：每孔加入300 $\mu$ l洗液，静置5-10秒后弃尽，重复冲洗5次后、拍干；洗板机操作：每孔加入300-350 $\mu$ l. 洗液，每次洗涤间隔5.10秒，重复冲洗5次后、拍干。

[0142] 8. 显色反应，每孔分别加入底物液A 50 $\mu$ l、底物液BS50 $\mu$ l，轻拍混匀，置37C避光显色10分钟。

[0143] 9. 终止反应，显色完毕后，每孔加入终止液50 $\mu$ l，轻拍混

[0144] 10. 读取结果，终止反应后，10分钟内测定结果，置于酶标仪450nm, 490nm波长后测定各孔A值。

[0145] 质量控制，每次试验应同时满足阳性对照OD值>0.50，阴性对照OD值 $\leq$ 0.10；否则试验结果视为无效。

[0146] 2.6.7 结果判定

[0147] 被检样本OD值大于临界值应判为新型冠状病毒(SARS-CoV-2) IgG抗体阳性，小于临界值判为阴性，临界值附近建议重新检测，复测阳性则判为阳性，否则判为阴性。对本品检测弱阳性的样本，应用其他方法检测以排除假阳性。

[0148] [阳性判断值]

[0149] 临界值(cutoff值) 计算：

[0150] cut off值= 0.10+阴性对照OD均值

[0151] (阴性对照OD均值，如小于0.05按0.05计算)

[0152] 正常人群该项指标检测应为阴性反应，如阳性则可能是新型冠状病毒(SARS-CoV-2)感染，应结合临床症状和其它诊断方法进行确认。

[0153] 2.6.8 检验结果的解释

[0154] 以标准品血清(0.63U/ml ~ 20.00U/ml)的SARS-CoV-2抗体含量及其对应的吸光度A值做曲线，求出四参数回归方程，将待测样品吸光度的A值代入回归方程，再乘以待测样品的稀释系数即为待测样品抗SARS-CoV-2-IgG效价(U/ml)。1U/ml相当于1IU/ml。

[0155] 例：以SARS-CoV-2-IgG含量为自变量(X)，以其对应的吸光度为因变量(Y)，求出四参数回归方程为： $y = -2.321 / (1 + (x/8.325)^{1.069}) + 2.322$ 。

[0156] 数据如表2所示。

[0157] 表2 四参数回归方程数据

[0158]

抗SARS-CoV-2 IgG抗体阳性(U/ml)	1.563	3.125	6.25	12.50	25.00	50.00	样品
---------------------------	-------	-------	------	-------	-------	-------	----

450nm/490nm 吸光值	0.22	0.28	0.54	0.96	1.14	1.32	0.82
-----------------	------	------	------	------	------	------	------

[0159] 2.6.9 注意事项

[0160] 1. 本产品仅用于体外诊断,操作应按说明书严格进行。封板膜不能重复使用,不同批号酶标板、酶标试剂和参比品不可混用,不能与其他厂家试剂混用。

[0161] 2. 避免在挥发性物质及次氯酸类消毒剂(如84消毒液)的环境下操作。

[0162] 3. 使用前请将试剂平衡至室温(平衡30min),实验前将试剂轻轻振荡混匀,使用后立即放回2~8℃。未用完的微孔板条与干燥剂一起用自封袋密封2~8℃保存。过期试剂请勿使用。

[0163] 4. 加液时必须用加样器,并经常校对加样器的准确性。加入不同样品或不同试剂组份时,应更换加样器吸头和加样槽,以防出现交叉污染。

[0164] 5. 洗涤时各孔均需加满洗液,防止孔内有游离酶不能洗净。在洗板结束后,必须立即进行下一步,不可使酶标板干燥。避免长时间的中断实验步骤,以确保每孔实验条件的均一。

[0165] 6. 结果判定必须以酶标仪读数为准。读取结果时,应擦干酶标板底部,且孔内不能有气泡。不要触碰孔底部的外壁,指印或划痕都可能影响板孔的读值。

[0166] 7. 本品参比品已进行灭活处理,且HBsAg、抗HIV、抗HCV和抗TP均为阴性,但不能保证其不具有潜在病毒等微生物的传染性,阴阳性对照及检测用样本应严格按照生物安全有关规定操作,遵循实验室操作的常规规定,按具有潜在生物传染性样本进行使用和处理。所用样品、废液和废弃物都应按传染物处理。终止液为硫酸,使用时必须注意安全。

[0167] 8. 显色时必须先加显色剂A液后加显色液剂B液,以免显色过低。

[0168] 9. 每次实验均需带阳性标准品,实验结果必须用当次标准曲线求得,否则可能会导致定量结果误差过大。

[0169] 10. 标准曲线中的异常点可能会引起整板实验结果的偏差,因此建议双孔检测参比品,以提高实验准确度。

[0170] 11. 当标准曲线拟合优度 $R^2 \geq 0.99$ 时,实验视为有效,否则实验无效

[0171] 12. 本检测方法样品稀释倍数较大,故样品稀释对结果影响。建议样品采用梯度稀释,每步骤不超过5倍,稀释体积不小于0.5 mL。

[0172] 2.6.10 检验方法局限性

[0173] 1. 根据机体感染后产生抗体的基础理论,机体被病毒感染后,特异性IgM抗体产生较早,持续时间较短; IgG 抗体产生较晚,持续时间较IgM抗体长。另外,由于从病毒感染到机体产生特异性抗体需经一定时间、抗体的强度存在个体差异,与感染抗原的量及抗原的抗原性强度相关。所以应将本品IgG抗体检测结果、IgM抗体检测结果采样时间、临床指征及出现时间等综合起来考虑。抗体检测呈阳性者也应结合其他临床指征综合判断。

[0174] 2. 本试剂盒只能用于血清或血浆样本的测定而不能用于其它体液样本。

[0175] 采用上述制备的试剂盒对待测的30份经核酸检测阳性血清和50份健康者血清进行新型冠状病毒IgG抗体检测,检测结果与DsbC-N 融合蛋白血清抗体ELISA实验一致。

[0176] 实施例2

[0177] 1. 材料

[0178] 质粒pET-DsbA、表达菌种BL21 (DE3) 由本申请人保存;SARS-CoV-2 N蛋白表达序列

核酸载体pUC18-SARS-CoV-2 N由北京万域美澜科技公司沈春奇老师惠赠;质粒提取试剂盒、DNA凝胶回收试剂盒购于天根生物科技有限公司;内切酶、T4 DNA 连接酶、购自NEB公司;kapa保真DNA 聚合酶和dNTP购自北京阅微基因公司;亲和树脂购自友谊中联生物科技有限公司;羊抗人IgG,TMB显色液购自索莱宝生物公司;对照样品新型冠状病毒IgG抗体检测试剂盒(酶联免疫法)为北京华大吉比爱生物技术公司,酶标板条上包被有SARS-CoV-2全病毒裂解液;30例临床确诊COVID-19患者血清,50例健康人血清由生物公司收集,ELISA实验委托公司完成;ELISA实验严格按照生物安全有关规定操作,遵循实验室操作的常规规定。

## [0179] 2. 方法

### [0180] 2.1 SARS-CoV-2 N蛋白核苷酸扩增引物的制备

[0181] 根据GenBank: MN908947.3报道的SARS-CoV-2 N蛋白核酸序列,参照载体pET-DsbA多克隆位点,设计合成了针对 N蛋白核酸的特异引物,并在下游引物的5端引入大肠杆菌偏性的终止密码子TAA。上下游引物设计序列如下:

[0182] 上游引物核苷酸序列P1: 5-ACGCGTCGACTCTGATAATGGACC-3;

[0183] 下游引物核苷酸序列P2:5-CTAGCTAGCTTAGGCCTGAGTTGAGTCAGC-3。

[0184] 上下游引物末端分别引入SalI和NheI酶切位点(斜线表示)。

[0185] 以载体 pUC18-SARS-CoV-2 N 核酸为模板,在热激TaqDNA聚合酶作用下,通过引物P1和P2,常规 PCR方法扩增SARS-CoV-2 N 核酸,条件如下:94℃预变性5 min,98℃变性20 s,68℃退火20 s,72℃延伸80 s 进行30 个循环,72℃延伸5 min。扩增的产物以1%琼脂糖电泳验证产物分子量,经检测扩正的产物分子量大约为 1260 bp。

### [0186] 2.2 pET-DsbA-N蛋白融合表达质粒的制备

[0187] 对PCR扩增产物进行胶回收,回收的产物和表达载体pET-DsbA均以SalI和NheI进行双酶切,通过1%的琼脂糖电泳切胶回收酶切后的产物,在 T4DNA 连接酶的作用下,把回收片段克隆到表达质粒pET-DsbA中,连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞 BL21 (DE3),筛选阳性克隆进行测序。

### [0188] 2.3 DsbA-N 融合蛋白的原核系统表达

[0189] 取经测序正确的pET-DsbA-N 融合蛋白工程菌接种于含卡那霉素浓度为50 ng/mL的 LB 培养基中,置于摇床内在37℃条件下震荡培养激活,次日按1:50的比例转接到同样体系的LB培养基中,在37℃条件下进行震荡培养至菌液OD600 达 0.4 h,加入 IPTG使得终浓度为0.3 mmol,37℃条件下继续震荡培养诱导5 h。诱导后菌液在4℃条件下、5000 rpm离心收集菌体,沉淀菌体加入1×PBS缓冲液混匀后,冰育转态下进行超声破碎,4℃条件下、12000 rpm 离心 30 min,收集上清和沉淀。

[0190] 以12%的 SDS-PAGE 鉴定融合蛋白DsbA-N 在原核系统内表达形式,检测结果显示,DsbA-N融合蛋白在原核系统内获得较高表达,融合蛋白占菌体总蛋白的30%以上,经过超声破碎后发现,DsbA-N融合蛋白主要以包涵体的形式存在超声沉淀中,其中约30%的DsbA-N融合蛋白以上清的形式存在,蛋白的上清的表达往往代表蛋白的天然状态,故在后续步骤中收集超声破碎后的上清准备亲和纯化。

### [0191] 2.4 DsbA-N 融合蛋白的亲和纯化

[0192] DsbA-N 融合蛋白的N端带有6×HIS标签,利用亲和层析对表达后超声上清蛋白进行目的蛋白纯化,在4℃条件下取离心上清按2 mL/min的速度过镍离子亲和柱,以1×PBS平

衡4个柱积后,以100 mmol咪唑洗脱杂蛋白3个柱积,再用200 mmol咪唑洗脱目的融合蛋白,收集目的蛋白。

[0193] 以15%的 SDS-PAGE 对纯化后融合蛋白进行纯度测定,融合蛋白经亲和纯化后纯度达92%以上,高纯度的融合蛋白是后续开展血清学实验获得高特异性的保证。

[0194] 2. 5 DsbA-N 融合蛋白血清抗体ELISA实验

[0195] 纯化的DsbA-N 融合蛋白经水充分透析后,采用BCA方法进行浓度测定,以包被液将重组蛋白稀释为15 $\mu$ g/mL,酶标板每孔包被100 $\mu$ L,室温放置2 h,PBST 缓冲液洗板4 次;10%小牛血清在4 $^{\circ}$ C冰箱内封闭过夜,次日以 PBST 洗板5次,待测样本血清和健康人血清均以1:50倍稀释,每孔加入100 $\mu$ L,置于37 $^{\circ}$ C温箱内孵育1 h,洗板5次,拍干,以1:1000倍稀释的 HRP 标记的羊抗人IgG于37 $^{\circ}$ C条件下孵育1 h,PBST 洗板5次,TMB显色,酶标仪检测A450 nm波长处的A值。

[0196] 对待测的30份经核酸检测阳性血清和50份健康者血清以对照样品新型冠状病毒IgG抗体检测试剂盒进行对比检测,实验方法严格按照试剂盒说明书进行。结果为出现1例假阴性,检出率为96%;出现假阳性2例,特异性为96%。

[0197] 在实施例2中,SARS-CoV-2感染者阳性血清相对健康人血清而言,ELISA实验中A450值具有显著性差异。其中 30例明确新冠肺炎血清阳性检出例数为 29例,检出率为96%;50例健康人对照血清检出1 例,检出率为2%,特异性为98%。本实施例设定 cut-off 值为健康人血清检测平均A值+3倍标准差。

[0198] 2. 6 基于DsbA-N 融合蛋白制备新型冠状病毒检测的试剂盒

[0199] 按照如表3所示的规格数量制备试剂盒产品。

[0200] 表3 试剂盒组成成分的规格数量

组成成分	规格数量
抗原酶标板	8*12孔,1板
阳性抗体效价人血清,添加有稳定剂和防腐剂	20 U/mL,0.1 mL/支,1支
阳性抗体效价酶标试剂	15 mL/瓶,1瓶
阳性抗体效价样品稀释液	50 mL/瓶,1瓶
显色剂A液	6 mL/瓶,1瓶
显色剂B液	6 mL/瓶,1瓶
浓缩洗涤液 (20*)	50 mL/瓶,1瓶
终止液	6 mL/瓶,1瓶
封板膜	3个
阴性对照品	0.5 mL $\times$ 1瓶

[0202] 采用制备的试剂盒对待测的30份经核酸检测阳性血清和50份健康者血清进行新型冠状病毒IgG抗体检测,检测结果与DsbA-N 融合蛋白血清抗体ELISA实验一致。

[0203] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 昆明市妇幼保健院;中国人民解放军总医院第八医学中心
- [0003] <120> 基于核衣壳蛋白的融合蛋白的新型冠状病毒检测的试剂盒
- [0004] <130> 2020
- [0005] <160> 7
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 567
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <400> 1
- [0012] gcgcagtatg aagatggtaa acagtacact accctggaaa aaccggtagc tggcgcgccg 60
- [0013] caagtgctgg agtttttctc tttcttctgc ccgcaactgct atcagtttga agaagttctg 120
- [0014] catatttctg ataatgtgaa gaaaaaactg ccggaaggcg tgaagatgac taaataccac 180
- [0015] gtcaacttca tgggtgggtga cctgggcaaa gatctgactc aggcatgggc tgtggcgatg 240
- [0016] gcgctgggcg tggaagacaa agtactgtt ccgctgtttg aaggcgtaca gaaaaccag 300
- [0017] accattcggt ctgcttctga tatcccgat gtatttatca acgcaggtat taaagtgaa 360
- [0018] gactacgacg cggcgtggaa cagcttctgt gtgaaatctc tggtcgctca gcaggaaaa 420
- [0019] gctgcagctg acgtgcaatt gcgtggcgtt ccggcgatgt ttgttaacgg taaatatcag 480
- [0020] ctgaatccgc agggatgga taccagcaat atggatgttt ttgttcagca gtatgctgat 540
- [0021] acagtgaaat atctgtccga gaaaaaa 567
- [0022] <210> 2
- [0023] <211> 648
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> 人工序列
- [0026] <400> 2
- [0027] gatgacgagg caattcaaca aacgttagcc aaaatgggca tcaaaagcag cgatattcag 60
- [0028] cccgcgcctg tagctggcat gaagacagtt ctgactaaca gcggcgtgtt gtacatcacc 120
- [0029] gatgatggta aacatatcat tcaggggcca atgtatgacg ttagtggcac ggctccggtc 180
- [0030] aatgtcacca ataagatgct gttaaagcag ttgaatgcgc ttgaaaaaga gatgatcgtt 240
- [0031] tataaagcgc cgcaggaaaa acacgtcacc accgtgttta ctgatattac ctgttggttac 300
- [0032] tgccacaaac tgcatgagca aatggcagac tacaacgcgc tggggatcac cgtgcgttat 360
- [0033] cttgctttcc cgcgccaggg gctggacagc gatgcagaga aagaaatgaa agctatctgg 420
- [0034] tgtgcgaaag ataaaaacaa agcgtttgat gatgtgatgg caggtaaaag cgtcgacca 480
- [0035] gccagttgag acgtggatat tgccgacat tacgcacttg gcgtccagct tggcgtttagc 540
- [0036] ggtactccgg cagttgtgct gagcaatggc acacttgctc cgggttacca gccgccgaaa 600
- [0037] gagatgaaag aattcctcga cgaacaccaa aaaatgacca gcggtaaa 648
- [0038] <210> 3
- [0039] <211> 1269
- [0040] <212> DNA
- [0041] <213> 人工序列

[0042] <400> 3

[0043] gtcgactctg ataatggacc ccaaaatcag cgaaatgcac cccgcattac gtttgggtgga 60

[0044] ccctcagatt caactggcag taaccagaat ggagaacgca gtggggcgcg atcaaaacaa 120

[0045] cgtcggcccc aaggtttacc caataatact gcgtcttggg tcaccgctct cactcaacat 180

[0046] ggcaaggaag accttaaatt ccctcgagga caaggcgttc caattaacac caatagcagt 240

[0047] ccagatgacc aaattggcta ctaccgaaga gctaccagac gaattcgtgg tggtgacggt 300

[0048] aaaaatgaaag atctcagtc aagatgggat ttctactacc taggaactgg gccagaagct 360

[0049] ggacttcctt atgggtgctaa caaagacggc atcatatggg ttgcaactga gggagccttg 420

[0050] aatacaccaa aagatcacat tggcaccgc aatcctgcta acaatgctgc aatcgtgcta 480

[0051] caacttcctc aaggaacaac attgccaaaa ggcttctacg cagaagggag cagaggcggc 540

[0052] agtcaagcct cttctcgttc ctcatcacgt agtcgcaaca gttcaagaaa ttcaactcca 600

[0053] ggcagcagta ggggaacttc tctgctaga atggctggca atggcggtga tgctgctctt 660

[0054] gctttgctgc tgcttgacag attgaaccag cttgagagca aatgtctgg taaaggccaa 720

[0055] caacaacaag gccaaactgt cactaagaaa tctgctgctg aggcttctaa gaagcctcgg 780

[0056] caaaaacgta ctgccactaa agcatacaat gtaacacaag ctttcggcag acgtgggtcca 840

[0057] gaacaaacc aaggaatgtt tggggaccag gaactaatca gacaaggaac tgattacaaa 900

[0058] cattggccgc aaattgcaca atttgcccc agcgttcag cgttcttcgg aatgtcgcgc 960

[0059] attggcatgg aagtacacc ttcgggaacg tggttgacct acacaggtgc catcaaattg 1020

[0060] gatgacaaag atccaaatgt caaagatcaa gtcattttgc tgaataagca tattgacgca 1080

[0061] tacaaaacat tcccaccaac agagcctaaa aaggacaaaa agaagaaggc tgatgaaact 1140

[0062] caagccttac cgcagagaca gaagaacag caaactgtga ctcttcttcc tgctgcagat 1200

[0063] ttggatgatt tctccaaaca attgcaacaa tccatgagca gtgctgactc aactcaggcc 1260

[0064] taagctagc 1269

[0065] <210> 4

[0066] <211> 418

[0067] <212> PRT

[0068] <213> 人工序列

[0069] <400> 4

[0070] Ser Asp Asn Gly Pro Gln Asn Gln Arg Asn Ala Pro Arg Ile Thr Phe

[0071] 1 5 10 15

[0072] Gly Gly Pro Ser Asp Ser Thr Gly Ser Asn Gln Asn Gly Glu Arg Ser

[0073] 20 25 30

[0074] Gly Ala Arg Ser Lys Gln Arg Arg Pro Gln Gly Leu Pro Asn Asn Thr

[0075] 35 40 45

[0076] Ala Ser Trp Phe Thr Ala Leu Thr Gln His Gly Lys Glu Asp Leu Lys

[0077] 50 55 60

[0078] Phe Pro Arg Gly Gln Gly Val Pro Ile Asn Thr Asn Ser Ser Pro Asp

[0079] 65 70 75 80

[0080] Asp Gln Ile Gly Tyr Tyr Arg Arg Ala Thr Arg Arg Ile Arg Gly Gly

[0081] 85 90 95

[0082] Asp Gly Lys Met Lys Asp Leu Ser Pro Arg Trp Tyr Phe Tyr Tyr Leu

[0083] 100 105 110

[0084]	Gly Thr Gly Pro Glu Ala Gly Leu Pro Tyr Gly Ala Asn Lys Asp Gly
[0085]	115 120 125
[0086]	Ile Ile Trp Val Ala Thr Glu Gly Ala Leu Asn Thr Pro Lys Asp His
[0087]	130 135 140
[0088]	Ile Gly Thr Arg Asn Pro Ala Asn Asn Ala Ala Ile Val Leu Gln Leu
[0089]	145 150 155 160
[0090]	Pro Gln Gly Thr Thr Leu Pro Lys Gly Phe Tyr Ala Glu Gly Ser Arg
[0091]	165 170 175
[0092]	Gly Gly Ser Gln Ala Ser Ser Arg Ser Ser Ser Arg Ser Arg Asn Ser
[0093]	180 185 190
[0094]	Ser Arg Asn Ser Thr Pro Gly Ser Ser Arg Gly Thr Ser Pro Ala Arg
[0095]	195 200 205
[0096]	Met Ala Gly Asn Gly Gly Asp Ala Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Asp
[0097]	210 215 220
[0098]	Arg Leu Asn Gln Leu Glu Ser Lys Met Ser Gly Lys Gly Gln Gln Gln
[0099]	225 230 235 240
[0100]	Gln Gly Gln Thr Val Thr Lys Lys Ser Ala Ala Glu Ala Ser Lys Lys
[0101]	245 250 255
[0102]	Pro Arg Gln Lys Arg Thr Ala Thr Lys Ala Tyr Asn Val Thr Gln Ala
[0103]	260 265 270
[0104]	Phe Gly Arg Arg Gly Pro Glu Gln Thr Gln Gly Asn Phe Gly Asp Gln
[0105]	275 280 285
[0106]	Glu Leu Ile Arg Gln Gly Thr Asp Tyr Lys His Trp Pro Gln Ile Ala
[0107]	290 295 300
[0108]	Gln Phe Ala Pro Ser Ala Ser Ala Phe Phe Gly Met Ser Arg Ile Gly
[0109]	305 310 315 320
[0110]	Met Glu Val Thr Pro Ser Gly Thr Trp Leu Thr Tyr Thr Gly Ala Ile
[0111]	325 330 335
[0112]	Lys Leu Asp Asp Lys Asp Pro Asn Phe Lys Asp Gln Val Ile Leu Leu
[0113]	340 345 350
[0114]	Asn Lys His Ile Asp Ala Tyr Lys Thr Phe Pro Pro Thr Glu Pro Lys
[0115]	355 360 365
[0116]	Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp Glu Thr Gln Ala Leu Pro Gln Arg
[0117]	370 375 380
[0118]	Gln Lys Lys Gln Gln Thr Val Thr Leu Leu Pro Ala Ala Asp Leu Asp
[0119]	385 390 395 400
[0120]	Asp Phe Ser Lys Gln Leu Gln Gln Ser Met Ser Ser Ala Asp Ser Thr
[0121]	405 410 415
[0122]	Gln Ala
[0123]	<210> 5
[0124]	<211> 24
[0125]	<212> DNA

- [0126] <213> 人工序列  
[0127] <400> 5  
[0128] acgcgtcgac tctgataatg gacc 24  
[0129] <210> 6  
[0130] <211> 30  
[0131] <212> DNA  
[0132] <213> 人工序列  
[0133] <400> 6  
[0134] ctagctagct taggcctgag ttgagtcagc 30  
[0135] <210> 7  
[0136] <211> 566  
[0137] <212> DNA  
[0138] <213> 人工序列  
[0139] <400> 7  
[0140] gcgcagtatg aagatggtaa acagtacact accctggaaa aaccggtagc tggcgcgccg 60  
[0141] caagtgctgg agtttttctc tttcttcagc cgcacagct atcagtttga agaagttctg 120  
[0142] catatttctg ataatgtgaa gaaaaaactg ccggaaggcg tgaagatgac taaataccac 180  
[0143] gtcaacttca tgggtggtga cctgggcaaa gatctgactc aggcattggc tgtggcgatg 240  
[0144] gcgctgggcg tggaagacaa agtgactggt ccgctgttg aaggcgtaca gaaaaccag 300  
[0145] accattcggt ctgcttctga tatcccgat gtatttatca acgcaggtat taaagtgaa 360  
[0146] gagtacgacg cggcgtggaa cagcttcggg tgaaatctct ggtcgctcag caggaaaaag 420  
[0147] ctgcagctga cgtgcaattg cgtggcgctc cggcgatggt tgtaacggt aaatatcagc 480  
[0148] tgaatccgca gggatggat accagcaata tggatgtttt tgttcagcag tatgctgata 540  
[0149] cagtgaata tctgtccgag aaaaaa 566

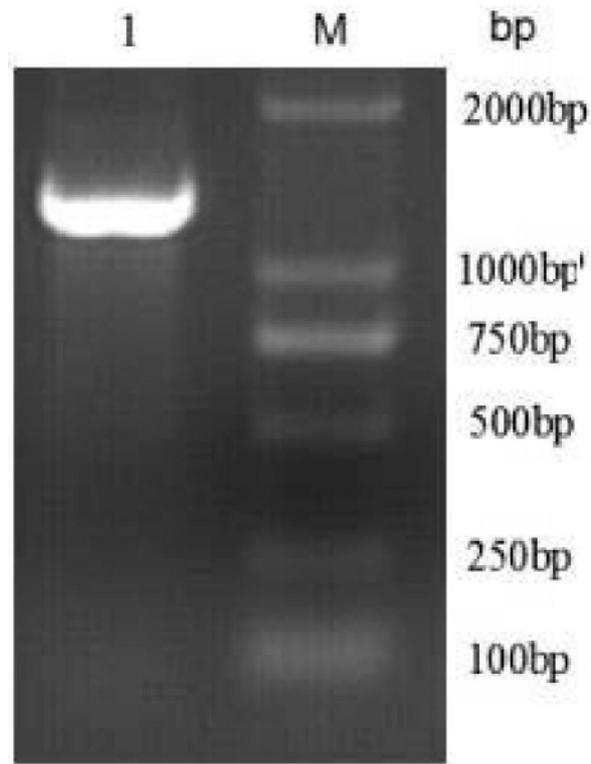


图1

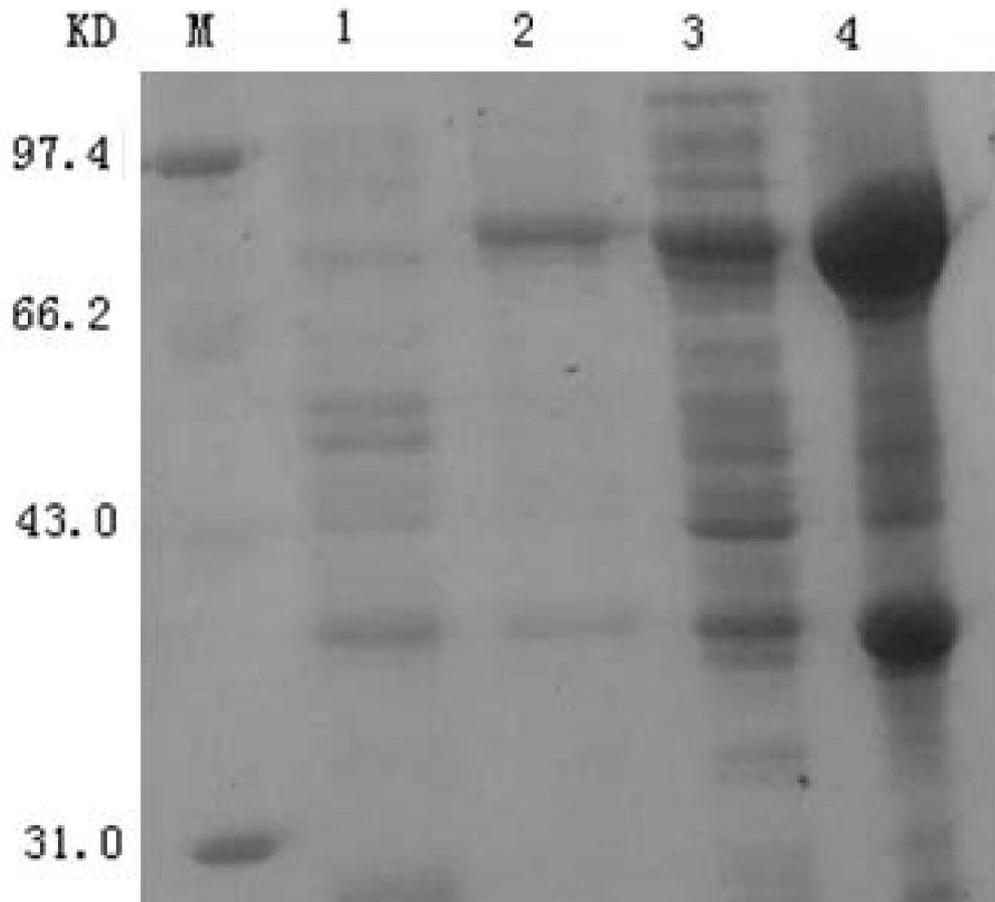


图2

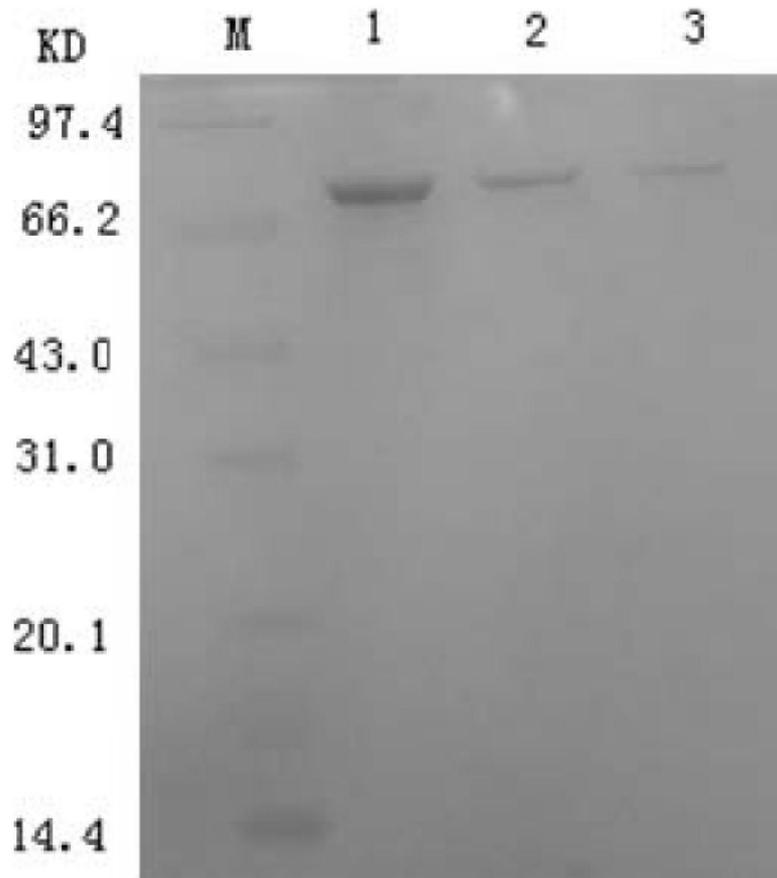


图3

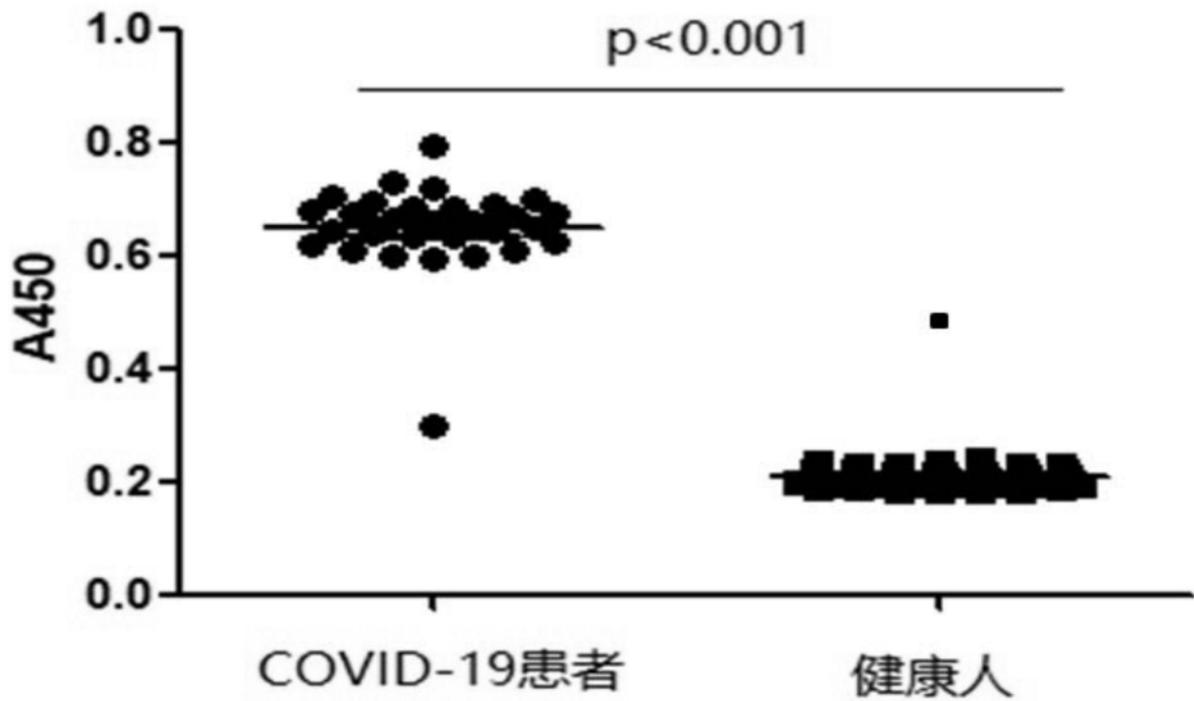


图4