



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 116027033 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 24

(21) 申请号 202211540684.5

US 2014093532 A1, 2014. 04. 03

(22) 申请日 2022. 12. 02

WO 2019228032 A1, 2019. 12. 05

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2022207645 A1, 2022. 10. 06

申请公布号 CN 116027033 A

WO 2022220603 A1, 2022. 10. 20

(43) 申请公布日 2023. 04. 28

余珊珊. 猪圆环病毒2型抗原的GEM纯化技术研究. 中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑. 2017, 第39-80页.

(73) 专利权人 吉林大学

王丹丹. 以细菌样颗粒为载体的肺炎链球菌表面蛋白A肺炎疫苗的研究. 中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑. 2019, 第18-23, 42页.

地址 130000 吉林省长春市前进大街2699号

(72) 发明人 吴永革 谷铁军 朱世东

(74) 专利代理机构 北京专赢专利代理有限公司

11797

专利代理师 李斌

Feihu Yan等. Characterization of Two Heterogeneous Lethal Mouse-Adapted SARS-CoV-2 Variants Recapitulating Representative Aspects of Human COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 2022, 第13-15页. (续)

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/554 (2006. 01)

G01N 33/58 (2006. 01)

审查员 马蕊

(56) 对比文件

CN 112661849 A, 2021. 04. 16

CN 114276969 A, 2022. 04. 05

权利要求书1页 说明书8页 附图7页

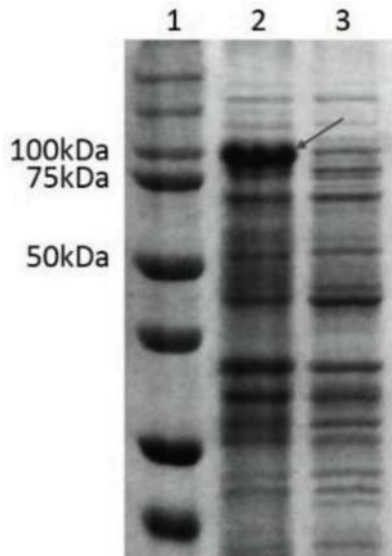
(54) 发明名称

一种基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法

(57) 摘要

本发明适用于免疫学技术领域, 提供了一种基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法, 本发明以细菌蛋白 (BP) 或病毒蛋白 (VP) 为检测目标, 利用细菌样颗粒 (BLP) 为固相载体, 检测内容包括: 通过BLP与锚定蛋白 (PA) 间的非共价结合作用固定重组表达的抗原BP (VP) -PA, 产生BLP/BP (VP) -PA抗原复合物, 检测血清中抗BP (VP) 的IgG效价; 通过BLP与锚定蛋白 (PA) 间的非共价结合作用固定重组表达的单链抗体scFV-BP (VP) -PA, 产生BLP/scFV-BP (VP) -PA复合物, 检测BP (VP) 蛋白抗原的含量。本发明实现了快速检测, 降低检测费用的效果, 并且能够提高检测灵敏度。

CN 116027033 B



[接上页]

**(56) 对比文件**

向开军,曾其毅,丁勇强,朱冰,周荣.SARS病

毒N蛋白的表达与DNA疫苗的构建.细胞与分子免疫学杂志.2005,(第06期),全文.

1. 一种基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法,其特征在于,包括:

a. 检测肺炎链球菌抗体效价的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组抗原PspA-PA进行结合,形成BLP/PspA-PA抗原复合体,以此抗原复合体去结合待测血清中的抗PspA的IgG,再利用酶标记的二抗对其进行定量检测;

b. 检测肺炎链球菌抗原的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组单链抗体scFV-PspA-PA进行结合,形成BLP/scFV-PspA-PA单链抗体复合体,以此单链抗体复合体去结合待测样品中的抗原PspA或肺炎链球菌细胞,再利用抗PspA的IgG和酶标记的二抗对抗原PspA或肺炎链球菌细胞进行定量检测;

c. 检测新型冠状病毒SARS-CoV-2抗体效价的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组抗原S-PA进行结合,形成BLP/S-PA抗原复合体,以此抗原复合体去结合待测血清中的抗S蛋白的IgG,再利用酶标记的二抗对其进行定量检测;

d. 检测新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组单链抗体scFV-S-PA进行结合,形成BLP/scFV-S-PA单链抗体复合体,以此单链抗体颗粒去结合待测样品中的抗原S蛋白或病毒颗粒,再利用抗S蛋白的IgG和酶标记的二抗对抗原S蛋白或病毒颗粒进行定量检测;

所述重组抗原PspA-PA的制备方法为:选择PspA家族2亚类4的 $\alpha$ 螺旋区和脯氨酸富集区序列,并在其脯氨酸富集区的C端融合表达锚定蛋白PA,通过化学合成基因序列,在合成前对序列进行优化,选择大肠杆菌偏爱的密码子,使其在大肠杆菌中高表达,然后将其克隆构建于pET20b原核表达载体上,转化入大肠杆菌BL21中进行表达,优化蛋白的表达条件,并进行诱导表达候选蛋白,通过His Trap亲和纯化柱获得目的蛋白PspA-PA;

所述重组抗原S-PA的制备方法为:SARS-CoV-2的S蛋白抗原为S蛋白的部分序列,通过基因工程技术在原核系统中进行表达和制备,作为含量测定的目标抗原;

所述重组单链抗体scFV-S-PA的制备方法为:选择一种抗S蛋白的单克隆抗体为母体,以其重链可变区为N端,轻链可变区为C端,通过连接肽相连,在单克隆抗体的C端融合表达锚定蛋白PA,通过化学合成基因序列,在合成前对序列进行优化,选择大肠杆菌偏爱的密码子,使其在大肠杆菌中高表达,然后将其克隆构建于pET20b原核表达载体上,转化入大肠杆菌BL21中进行表达,优化蛋白的表达条件,并进行诱导表达候选蛋白,通过His Trap亲和纯化柱获得目的蛋白scFV-S-PA。

2. 根据权利要求1所述的基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法,其特征在于,所述BLP的制备方法为:将培养的乳酸乳球菌与三氯乙酸进行加热处理,通过洗涤纯化去除杂质,留下无生命力的肽聚糖壳,即为BLP。

## 一种基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于免疫学技术领域,尤其涉及一种基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法。

### 背景技术

[0002] 细菌和病毒是人类和动物各类传染病的主要病源体,其引起的传染病给人类的健康带来了严重威胁,因此,对这些传染病的快速诊断和识别,对阻止其传播和防治尤为重要。对这些病源体的诊断主要包括抗原诊断和抗体诊断,从原理上,这些检测方法主要是PCR法检测其核酸、ELISA法检测其抗原和抗体等。这些检测方法往往有其各自的缺点,如:ELISA法需要进行封闭、多次洗涤,费时费力,步骤比较繁琐,还需要96孔板,费用较高,这些缺点都需要加以改进。为此我们提出一种基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法,旨在解决上述背景技术中提出的问题。

[0004] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0005] 一种基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法,包括:

[0006] a.检测肺炎链球菌抗体效价的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组抗原PspA-PA进行结合,形成BLP/PspA-PA抗原复合体,以此抗原复合体去结合待测血清中的抗PspA的IgG,再利用酶标记的二抗对其进行定量检测;

[0007] b.检测肺炎链球菌抗原的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组单链抗体scFV-PspA-PA进行结合,形成BLP/scFV-PspA-PA单链抗体复合体,以此单链抗体复合体去结合待测样品中的抗原PspA或肺炎链球菌细胞,再利用抗PspA的IgG和酶标记的二抗对抗原PspA或肺炎链球菌细胞进行定量检测;

[0008] c.检测新型冠状病毒SARS-CoV-2抗体效价的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组抗原S-PA进行结合,形成BLP/S-PA抗原复合体,以此抗原复合体去结合待测血清中的抗S蛋白的IgG,再利用酶标记的二抗对其进行定量检测;

[0009] d.检测新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组单链抗体scFV-S-PA进行结合,形成BLP/scFV-S-PA单链抗体复合体,以此单链抗体颗粒去结合待测样品中的抗原S蛋白或病毒颗粒,再利用抗S蛋白的IgG和酶标记的二抗对抗原S蛋白或病毒颗粒进行定量检测。

[0010] 进一步的,所述BLP的制备方法为:将培养的乳酸乳球菌与三氯乙酸进行加热处理,通过洗涤纯化去除杂质,留下无生命力的肽聚糖壳,即为BLP。

[0011] 进一步的,所述PspA-PA重组抗原的制备方法为:选择PspA家族2亚类4的部分序列( $\alpha$ 螺旋区和脯氨酸富集区),并在其脯氨酸富集区的C端融合表达锚定蛋白PA,通过化学合

成基因序列,在合成前对序列进行优化,选择大肠杆菌偏爱的密码子,使其在大肠杆菌中高表达,然后将其克隆构建于pET20b原核表达载体上,转化入大肠杆菌BL21中进行表达,优化蛋白的表达条件,并进行诱导表达候选蛋白,通过His Trap亲和纯化柱获得目的蛋白PspA-PA。

[0012] 进一步的,所述BLP/PspA-PA抗原复合体的制备方法为:取冻存的BLP与PspA-PA蛋白,待其融化后充分混匀,向含有50mg PspA-PA的蛋白溶液中加入10mg BLP,室温震荡结合1h后,8000rpm离心20min,回收结合上清液,吸取6.5mL无菌PBS溶液重悬沉淀样品,分别取样进行SDS-PAGE电泳检测。

[0013] 进一步的,所述S-PA重组抗原的制备方法为:SARS-CoV-2的S蛋白抗原为S蛋白的部分序列,通过基因工程技术在原核系统中进行表达和制备,作为含量测定的目标抗原。

[0014] 进一步的,所述scFV-S-PA单链抗体的制备方法为:选择一种抗S蛋白的单克隆抗体为母体,以其重链可变区为N端,轻链可变区为C端,或者以其轻链可变区为N端,重链可变区为C端,通过连接肽相连,在单链抗体的C端融合表达锚定蛋白PA,通过化学合成基因序列,在合成前对序列进行优化,选择大肠杆菌偏爱的密码子,使其在大肠杆菌中高表达,然后将其克隆构建于pET20b原核表达载体上,转化入大肠杆菌BL21中进行表达,优化蛋白的表达条件,并进行诱导表达候选蛋白,通过His Trap亲和纯化柱获得目的蛋白scFV-S-PA。

[0015] 进一步的,所述BLP/scFV-S-PA单链抗体复合体的制备方法为:向含有50mg scFV-S-PA的蛋白溶液中加入10mg BLP,室温震荡结合1h后,8000rpm离心20min,回收结合上清液,吸取6.5mL无菌PBS溶液重悬沉淀样品,分别取样进行SDS-PAGE电泳检测。

[0016] 进一步的,所述BLP/scFV-S-PA固相法测抗原的最佳工作浓度为:scFV-S-PA用量为1 $\mu$ g,抗S蛋白血清浓度为1:100。

[0017] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0018] 该基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法,无需进行封闭,抗体孵育后的洗涤次数更少,孵育时间更短,简化了检测步骤,且无需96孔板,大大地降低了检测费用,并且能够保证准确率等指标;该方法对较低浓度的抗原、抗体具有富集作用,可以提高检测灵敏度。

## 附图说明

[0019] 图1为本发明中大肠杆菌诱导表达PspA-PA蛋白SDS-PAGE (Lane1:预染蛋白marker;Lane2:PspA-PA蛋白在大肠杆菌系统中的诱导表达;Lane3:诱导前大肠杆菌系统中蛋白的表达)。

[0020] 图2为本发明中Western-blot验证PspA-PA蛋白的表达(一抗为anti-PspA4多抗;Lane1:预染蛋白marker;Lane2:PspA-PA蛋白在大肠杆菌系统中的诱导表达;Lane3:诱导前大肠杆菌系统中蛋白的表达)。

[0021] 图3为本发明中BLP的SDS-PAGE鉴定(Lane1:预染蛋白marker;Lane2:乳酸乳球菌的全菌体;Lane3:乳酸乳球菌用酸处理后(BLP))。

[0022] 图4为本发明中BLP标准品OD600光吸收标准曲线图。

[0023] 图5为本发明中BLPs/PspA-PA的制备与定量。

[0024] 图6为本发明中BLP/PspA-PA用量对抗体效价检测的影响(BLP/PspA-PA用量:(A)

38.6 $\mu$ g/mL, (B) 77.2 $\mu$ g/mL, (C) 154.4 $\mu$ g/mL)。

[0025] 图7为本发明中封闭与否对抗体效价检测的影响((A)使用3%牛血清白蛋白进行封闭,200 $\mu$ L/管,(B)不进行封闭)。

[0026] 图8为本发明中多抗血清孵育后PBS-T洗涤次数对抗体效价检测的影响(洗涤次数:(A)1次,(B)2次,(C)3次)。

[0027] 图9为本发明中酶标二抗孵育后PBS-T洗涤次数对抗体效价检测的影响(洗涤次数:(A)1次,(B)2次,(C)3次)。

[0028] 图10为本发明中大肠杆菌诱导表达S蛋白的SDS-PAGE和Western Blot鉴定(一抗为抗His标签单克隆抗体;左Lane1:诱导前;右Lane1:阳性对照;左Lane2:诱导后;右Lane2:诱导前;左Lane3:超声后上清;右Lane3:诱导后;左Lane4:破碎沉淀;右Lane4:超声后上清;Lane5:破碎沉淀)。

[0029] 图11为本发明中大肠杆菌诱导表达scFV-S-PA蛋白的SDS-PAGE和Western Blot鉴定(一抗为抗His标签单克隆抗体;Lane1:预染蛋白marker;Lane2:PspA-PA蛋白在大肠杆菌系统中的诱导表达;Lane3:诱导前大肠杆菌系统中蛋白的表达)。

[0030] 图12为本发明中BLP/scFV-S-PA固相抗体复合物的制备(Lane1:BLP;Lane2:scFV-S-PA;Lane3:BLP与scFV-S-PA结合上清液;Lane4:BLP/scFV-S-PA固相抗体)。

[0031] 图13为本发明BSA标准品浓度与灰度值标准曲线图。

[0032] 图14为本发明SDS-PAGE与Western Blot鉴定BLP/scFV-S-PA捕获S蛋白(Lane1:阳性对照;Lane2:BLP;Lane3:scFV-S-PA;Lane4:S;Lane5:S-PA;Lane6:BLP/scFV-S-PA;Lane7:BLP/S;Lane8:BLP/S-PA;Lane9:BLP/scFV-S-PA+S;Western Blot鉴定中一抗为抗His标签单克隆抗体)。

[0033] 图15为本发明BLP/scFV-S-PA固相法检测抗原标准曲线图(A、B组scFV-S-PA铺板量为0.25 $\mu$ g/孔,多抗血清稀释倍数为1:100;A组初始抗原浓度为66667ng/mL,三倍系列稀释;B组初始抗原浓度为100000ng/mL,四倍系列稀释)。

## 具体实施方式

[0034] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0035] 以下结合具体实施例对本发明的具体实现进行详细描述。

[0036] 本发明一个实施例提供的一种基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法,包括:

[0037] a.检测肺炎链球菌抗体效价的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组抗原PspA-PA进行结合,形成BLP/PspA-PA抗原复合体,以此抗原复合体去结合待测血清中的抗PspA的IgG,再利用酶标记的二抗对其进行定量检测;

[0038] b.检测肺炎链球菌抗原的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组单链抗体scFV-PspA-PA进行结合,形成BLP/scFV-PspA-PA单链抗体复合体,以此单链抗体复合体去结合待测样品中的抗原PspA或肺炎链球菌细胞,再利用抗PspA的IgG和酶标记的二抗对抗原PspA或肺炎链球菌细胞进行定量检测;

[0039] c.检测新型冠状病毒SARS-CoV-2抗体效价的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组抗原S-PA进行结合,形成BLP/S-PA抗原复合体,以此抗原复合体去结合待测血清中的抗S蛋白的IgG,再利用酶标记的二抗对其进行定量检测;

[0040] d.检测新型冠状病毒SARS-CoV-2抗原的具体操作为:通过以BLP为载体,对原核表达的重组单链抗体scFV-S-PA进行结合,形成BLP/scFV-S-PA单链抗体复合体,以此单链抗体颗粒去结合待测样品中的抗原S蛋白或病毒颗粒,再利用抗S蛋白的IgG和酶标记的二抗对抗原S蛋白或病毒颗粒进行定量检测。

[0041] 在本发明实施例中,PspA蛋白和S蛋白可以是全序列、截短序列或其组合。将革兰氏阳性菌(如乳酸乳球菌)在高温环境酸解,可降解其自身的核酸与蛋白,留下无生命活性且疏松的肽聚糖壳,因其仍保有细菌原有的颗粒形态,故称为细菌样颗粒(缩写为BLP)。BLP通过一种独特的蛋白连接器(PA)可将抗原与BLP连接起来。PA是细菌细胞壁水解酶AcmA的C端的肽聚糖结合区域,AcmA对乳酸乳球菌的肽聚糖结构有很强的结合能力。通过基因重组的方法将抗原与PA融合表达,然后与BLP混合,这样抗原就很容易结合到BLP上。PA与BLP的结合是很稳定的,结合后不易分离。

[0042] 肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)是一种有荚膜的革兰氏阳性菌,该菌通常定植于健康人群的口腔和鼻咽部,是正常菌群中的一种。当人体免疫力低下时,肺炎链球菌局部浸润引起鼻窦炎、中耳炎,吸入肺引起肺炎,还可以侵袭机体引起菌血症和脑膜炎等疾病。肺炎链球菌自身蛋白有很多种,肺炎链球菌表面蛋白A(Pneumococcal surface protein A,PspA)就是其中之一。PspA是一种胆固醇结合蛋白,分布在肺炎链球菌表面,是肺炎链球菌关键的毒力因子和生存必需的蛋白质,至今在所有的临床分离到的肺炎链球菌菌株中都能检测到PspA的表达。PspA在肺炎链球菌与宿主相互作用中起到关键作用。PspA蛋白分子在所有肺炎链球菌中并不完全保守,存在着结构变异性,分子量从67-100KD不等。PspA分子分为5个区域:信号肽区、 $\alpha$ 螺旋区、脯氨酸富集区、胆碱结合区和C端17个氨基酸尾。基因和蛋白图谱研究结果显示,关键的交叉保护性抗原表位位于 $\alpha$ 螺旋区中靠近脯氨酸富集区的大约100个氨基酸左右的序列,被称为亚类决定区(clade defining region,简称CDR)。根据CDR区的不同,PspA被分为3个家族(家族1、家族2和家族3)、6个亚类(Clade1、Clade2、Clade3、Clade4、Clade5和Clade6),6个亚类分别属于3个家族;其中Clade1和Clade2属于家族1,Clade3、Clade4和Clade5属于家族2,Clade6属于家族3。每个家族内亚类间CDR区基因序列相似度大于80%;各家族间CDR区基因序列间相似度大于50%。在三个家族中,家族1与家族2流行率大于95%,而家族3很少出现。尽管PspA的结构和抗原性具有多变性,但是针对PspA产生的抗体具有高度的交叉反应性与交叉保护性。

[0043] 新型冠状病毒(Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)被世界卫生组织命名为SARS-CoV-2,是新发现的 $\beta$ 冠状病毒属成员,目前正在全球流行,造成了严重的全球健康威胁。SARS-CoV-2有四种主要结构蛋白:刺突蛋白(Spike protein,S)、膜蛋白(Membrane protein,M)、包膜蛋白(Envelope protein,E)和核蛋白(Nucleocapsid protein,N),其中,S蛋白(Spike protein)是四种结构蛋白中最主要的参与感染和免疫的蛋白质。S蛋白可分为多个功能域,首先,球状头部包含了S1区的N端受体结合结构域(Receptor-binding Domain,RBD)。其次,茎部包含C末端膜融合结构域S2区,末端是两个七肽区域,即跨膜结构域和胞质尾。S1区由大约200个氨基酸编码,S1区与人类的血管

紧张素转换酶2(Angiotensin Converting Enzyme 2,ACE2)结合以介导病毒进入细胞。因此,目前研究的亚单位疫苗都是以S蛋白为主要免疫原,也是对其抗原、抗体检测的主要目标。

[0044] 作为本发明的一种优选实施例,所述BLP的制备方法为:将培养的乳酸乳球菌与三氯乙酸进行加热处理,通过洗涤纯化去除杂质,留下无生命力的肽聚糖壳,即为BLP。

[0045] 在本发明实施例中,BLP的定量操作为:取适量BLP冻干,完全去除水分后,将冻干样品系列稀释为0.1mg/mL、0.25mg/mL,0.5mg/mL,1mg/mL,分别测定不同浓度BLP悬液在600nm下的光吸收值,并以浓度-吸光值做线性回归,结果见图3-4。将制备的BLP混匀后,稀释10倍,测定OD600为0.6,带入线性回归方程 $y=0.6488x+0.0324$ ,得BLP浓度为118.3mg/mL。

[0046] 作为本发明的一种优选实施例,所述PspA-PA重组抗原的制备方法为(PspA4蛋白的部分序列):选择PspA家族2亚类4的部分序列( $\alpha$ 螺旋区和脯氨酸富集区),并在其脯氨酸富集区的C端融合表达锚定蛋白PA,通过化学合成基因序列,在合成前对序列进行优化,选择大肠杆菌偏爱的密码子,使其在大肠杆菌中高表达,然后将其克隆构建于pET20b原核表达载体上(命名为pET20b-PspA-PA),转化入大肠杆菌BL21中进行表达,优化蛋白的表达条件,并进行诱导表达候选蛋白,通过His Trap亲和纯化柱获得目的蛋白PspA-PA。

[0047] 在本发明实施例中,使用SDS-PAGE与Western Blot方法进行鉴定。结果见图1-2。动物免疫:用表达和纯化的PspA-PA蛋白对雌性Bal/c小鼠进行皮下免疫,共免疫四次,每次间隔一周,免疫前及每轮免疫一周后分别取小鼠血液,制备抗PspA-PA蛋白的血清。

[0048] 作为本发明的一种优选实施例,所述BLP/PspA-PA抗原复合体的制备方法为:取冻存的BLP与PspA-PA蛋白,待其融化后充分混匀,向含有50mg PspA-PA的蛋白溶液中加入10mg BLP,室温震荡结合1h后,8000rpm离心20min,回收结合上清液,吸取6.5mL无菌PBS溶液重悬沉淀样品,分别取样进行SDS-PAGE电泳检测。

[0049] 在本发明实施例中,固相BLP/PspA-PA抗原复合物中BLP与PspA-PA的定量:将BLP浓度稀释成0.1mg/mL,0.25mg/mL,0.5mg/mL,1mg/mL,分别测定不同浓度BLP悬液在600nm下的光吸收值,并以浓度-吸光值做线性回归,将BLP/PspA-PA结合物稀释10倍后,测定600nm下的光吸收值,代入标曲,计算BLP的浓度。灰度分析定量PspA-PA:将BSA标准品稀释成0.1mg/mL,0.2mg/mL,0.4mg/mL,0.6mg/mL,0.8mg/mL,1mg/mL,制成等体积的电泳样品后,与BLP/PspA-PA一同进行SDS-PAGE电泳,样品量均为10uL/孔。电泳后进行脱色,对条带清晰可见的聚丙烯酰胺凝胶进行灰度分析,使用Image Studio V2.1软件处理,以BSA浓度与灰度值做标准曲线,对BLP/PspA-PA结合物中的PspA-PA进行定量。结果见图5。

[0050] BLP/PspA-PA抗原用量探究:用PBS溶液将BLP/PspA-PA和BLP悬液稀释为(A)38.6 $\mu$ g/mL,(B)77.2 $\mu$ g/mL,(C)154.4 $\mu$ g/mL三个梯度,100uL/EP管。以无关蛋白为阴性对照组,以间接ELISA法的结果作为阳性对照。使用PBS将PspA-PA蛋白四次免疫小鼠的血清和阴性血清进行10倍系列稀释至10<sup>6</sup>,将系列稀释的血清各加入上述各管中,100uL/EP管,涡旋震荡以重悬BLP/PspA-PA微粒后,室温震荡孵育10min。使用PBS-T进行“洗涤-重悬-离心”的过程,共洗涤3次。8000rpm离心10min,弃去上清。向各管中加1:10000稀释的山羊抗小鼠IgG/HRP标记抗体,100uL/管,涡旋震荡以重悬BLP/PspA-PA微粒后,室温震荡孵育10min。使用PBS-T进行“洗涤-重悬-离心”的过程,共洗涤3次。8000rpm离心10min,弃去二抗,使用PBS-T



进行“洗涤-重悬-离心”的过程,共洗涤3次。向管中加入TMB底物,100uL/管,涡旋震荡以重悬BLP/PspA-PA微粒,避光震荡反应10min后,向管中加入2M硫酸终止反应,8000rpm离心10min,吸取上清于聚苯乙烯板中,测定OD450。结果见图6,由结果可知,BLP/PspA-PA的浓度大于77.2 $\mu$ g/mL即过量,与阳性对照一致,满足测定要求。

[0051] 封闭与否对于检测抗体效价的影响:在BLP/PspA-PA抗原用量探究中,加入PspA-PA蛋白四次免疫小鼠的血清和阴性血清前,(A)使用3%牛血清白蛋白进行封闭,200uL/管;(B)不进行封闭。其它步骤与上述相同。结果见图7,由结果可知,封闭与不封闭的检测结果一致,对检测结果没有影响,因此,该方法无需进行封闭。

[0052] PBS-T洗涤次数对检测抗体效价的影响:在BLP/PspA-PA抗原用量探究中,在加入血清和二抗后,分别对其洗涤一次、两次和三次。其它步骤与上述相同。结果见图8-9,由结果可知,在加入血清和二抗后,洗涤一次至三次检测结果相同,因此,该方法仅需要洗涤一次即可,不需要多次重复洗涤。

[0053] 重复性验证:选取PspA-PA蛋白免疫小鼠的二免、三免、四免的PspA-PA蛋白抗血清和PBS血清,共五份样品,进行重复性验证。用PBS溶液将BLP/PspA-PA复合物稀释为77.2 $\mu$ g/mL,100uL/管,其它检测步骤与上述步骤5相同。结果见表1。结果表明:该方法检测PspA-PA蛋白免疫小鼠的抗血清重复性很好,方法稳定。

[0054] 表1BLP/PspA-PA检测血清效价重复性验证结果

	血清					
	二免血清 (S)	PBS血清	三免血清 (S)	PBS血清	四免血清 (S)	PBS血清
[0055] 样品1	0.679	0.117	0.823	0.155	0.891	0.158
样品2	0.746	0.186	0.886	0.166	0.926	0.187
样品3	0.741	0.150	0.965	0.159	0.819	0.189
样品4	0.710	0.210	0.856	0.178	0.912	0.173
样品5	0.772	0.110	0.89	0.192	0.890	0.163
平均值	0.7296	0.1546	0.884	0.17	0.8876	0.174
标准差	0.032	0.039	0.048	0.013	0.037	0.012
[0056] CV%	4.38%	5.23%	5.42%	7.60%	4.17%	6.90%

[0057] 作为本发明的一种优选实施例,所述S-PA重组抗原的制备方法为:SARS-CoV-2的S蛋白抗原为S蛋白的部分序列,通过基因工程技术在原核系统中进行表达和制备,作为含量测定的目标抗原。

[0058] 作为本发明的一种优选实施例,所述scFV-S-PA单链抗体的制备方法为:选择一种抗S蛋白的单克隆抗体为母体,以其重链可变区为N端,轻链可变区为C端,或者以其轻链可变区为N端,重链可变区为C端,通过连接肽相连,在单链抗体的C端融合表达锚定蛋白PA,通过化学合成基因序列,在合成前对序列进行优化,选择大肠杆菌偏爱的密码子,使其在大肠杆菌中高表达,然后将其克隆构建于pET20b原核表达载体上(命名为pET20b-scFV-S-PA),转化入大肠杆菌BL21中进行表达,优化蛋白的表达条件,并进行诱导表达候选蛋白,通过His Trap亲和纯化柱获得目的蛋白scFV-S-PA。

[0059] 在本发明实施例中,使用SDS-PAGE与Western Blot方法进行鉴定。结果见图10-11。

[0060] 作为本发明的一种优选实施例,所述BLP/scFV-S-PA单链抗体复合体的制备方法为:向含有50mg scFV-S-PA的蛋白溶液中加入10mg BLP,室温震荡结合1h后,8000rpm离心20min,回收结合上清液,吸取6.5mL无菌PBS溶液重悬沉淀样品,分别取样进行SDS-PAGE电泳检测。

[0061] 在本发明实施例中,电泳检测结果如图12。Lane2为scFV-S-PA蛋白溶液,总浓度为0.25mg/mL,Lane3为回收结合上清液,测定其蛋白浓度为0.18mg/mL,回收率为72%,Lane4为制备的BLP/scFV-S-PA,可以看到scFV-S-PA已被BLP捕获。BLP/scFV-S-PA固相抗体已成功制备,将BSA标准品系列稀释,制备成等体积的电泳样品,与BLP/scFV-S-PA结合物一同进行电泳,图片经Image Studio V2.1软件处理,以BSA浓度与蛋白条带灰度值做标准曲线,结果如图13,待测样品信号值为18176.054,代入标准曲线,得出BLP/scFV-S-PA结合物的浓度为54 $\mu$ g scFV-S-PA/mg BLP。

[0062] BLP/scFV-S-PA与S蛋白结合功能鉴定:为了展示BLP/scFV-S-PA固相抗体捕获S蛋白的功能,使用SDS-PAGE和Western Blot进行表征,结果如图14,Lane7中,BLP无法与S蛋白直接结合,但使用Lane6中的BLP/scFV-S-PA结合S蛋白后,取沉淀样品进行电泳,Lane9中出现一条27kD的蛋白条带,经Western Blot鉴定,此条带为S蛋白,这展示了BLP无法直接与S蛋白结合,但BLP/scFV-S-PA固相抗体能够通过scFV-S-PA与S蛋白间的特异性结合能力,捕获溶液中游离的S蛋白,这为后续BLP/scFV-S-PA固相抗体检测重组抗原S提供了依据。

[0063] 作为本发明的一种优选实施例,所述BLP/scFV-S-PA固相法测抗原的最佳工作浓度为:scFV-S-PA用量为1 $\mu$ g,抗S蛋白血清浓度为1:100。

[0064] 在本发明实施例中,最佳工作浓度确定的具体操作为:将BLP/scFV-S-PA结合物充分混匀,PBS作为稀释液,将BLP/scFV-S-PA结合物稀释梯度为:8 $\mu$ g/管,4 $\mu$ g/管,2 $\mu$ g/管,1 $\mu$ g/管,0.5 $\mu$ g/管,0.25/管,8000rpm离心20min,弃去上清液,无需进行封闭,加入40 $\mu$ g S蛋白,阴性对照组加入40 $\mu$ g无关蛋白,涡旋振荡以重悬BLP微粒,室温震荡孵育10min。8000rpm离心20min,回收抗原,使用PBS-T进行“洗涤-重悬-离心”的过程,共洗涤三次。以1% BSA为稀释液,将鼠源抗S蛋白血清稀释为1:10,1:100,1:1000,1:10000四个梯度,涡旋振荡以重悬BLP微粒,室温震荡孵育10min。8000rpm离心15min,弃去上清,以PBS-T,重复“洗涤-重悬-离心”的过程,共洗涤三次。向管中加入1:10000稀释的山羊抗小鼠IgG/HRP标记抗体,100 $\mu$ L/管,涡旋震荡,室温震荡孵育10min。显色与终止:8000rpm离心15min,弃去上清,使用PBS-T进行“洗涤-重悬-离心”的过程,共洗涤3次。加入TMB底物,100 $\mu$ L/管,涡旋震荡以重悬BLP/S-PA微粒,避光震荡反应10min后,加入2M硫酸终止反应,8000rpm离心15min,吸取上清于聚丙烯板中,测定OD450并计算实验组与阴性组间的P/N。结果显示:scFV-S-PA用量为1 $\mu$ g,多抗血清浓度为1:100稀释的检测效果最佳,抗原浓度与吸光度间有较好的线性关系。

[0065] BLP/scFV-S-PA固相法检测抗原检测限确定:根据检测结果,绘制蛋白浓度对数与OD450的曲线,蛋白浓度与OD450的曲线如图15所示,在一定范围内,蛋白浓度与OD450呈线性关系,检测的抗原浓度范围为:30-7400ng/mL。

[0066] 重复性验证:配制不同浓度的S蛋白,进行上述方法的重复测定验证。结果见表2。结果表明:该方法检测S蛋白重复性很好,方法稳定。

[0067] 表2BLP/scFV-S-PA检测血清效价重复性验证结果

测定 次数	S 蛋白 (mg/mL)	无关蛋白 (mg/mL)
1	0.736	0.112
2	0.739	0.120
[0068] 3	0.741	0.109
4	0.723	0.110
5	0.738	0.113
平均值	0.735	0.113
标准差	0.029	0.026
CV%	3.69%	3.23%

[0069] 本发明的工作原理是：

[0070] 该基于细菌样颗粒检测细菌和病毒抗原、抗体的方法，通过BLP与锚定蛋白(PA)间的非共价结合作用，可将重组表达的抗原BP(VP)-PA，或重组表达的单链抗体scFV-BP(VP)-PA固定在BLP表面，产生BLP/BP(VP)-PA抗原复合物，或BLP/scFV-BP(VP)-PA复合物，它们可以结合待测样品中的相应抗BP(VP)的IgG或BP(VP)蛋白，再利用酶标记的二抗对其进行定量检测，从而可用于检测血清中抗BP(VP)的IgG效价或BP(VP)蛋白含量，如疫苗的含量，以及细菌和病毒的含量等。

[0071] 以上仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本领域的技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以作出若干变形和改进，这些也应该视为本发明的保护范围，这些均不会影响本发明实施的效果和专利的实用性。

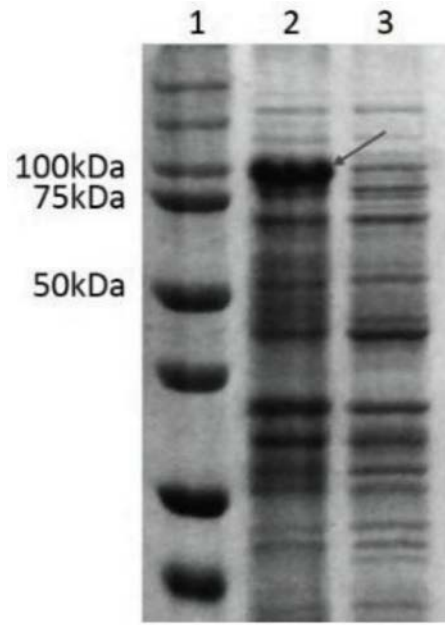


图1



图2

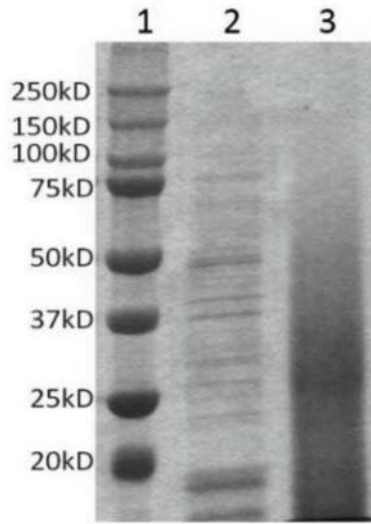


图3

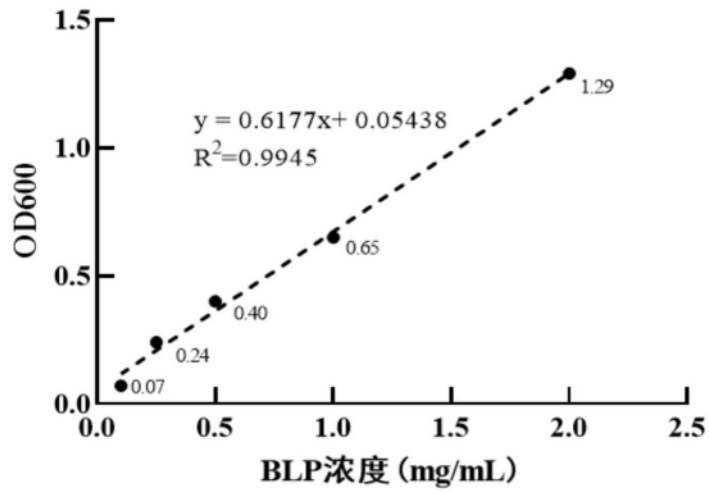


图4

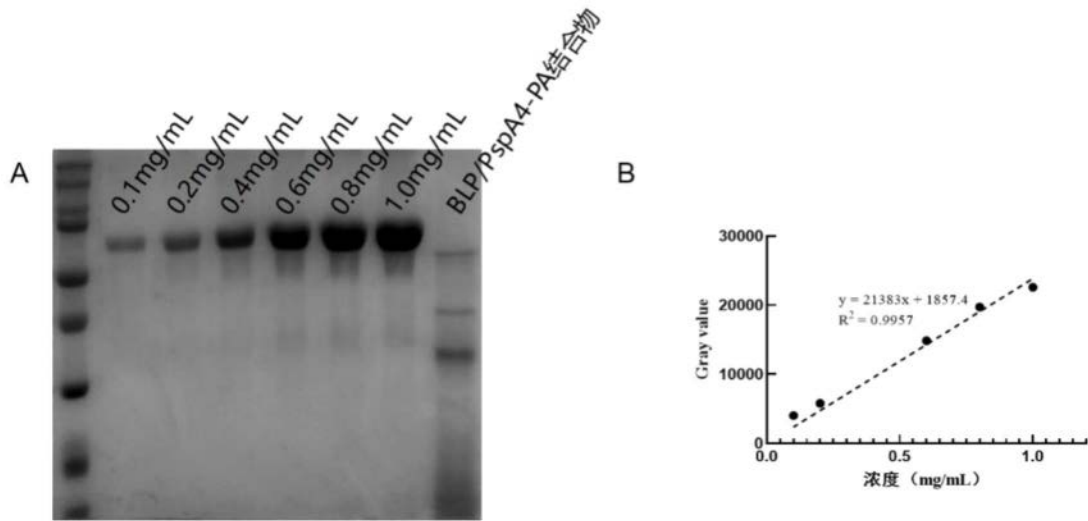


图5

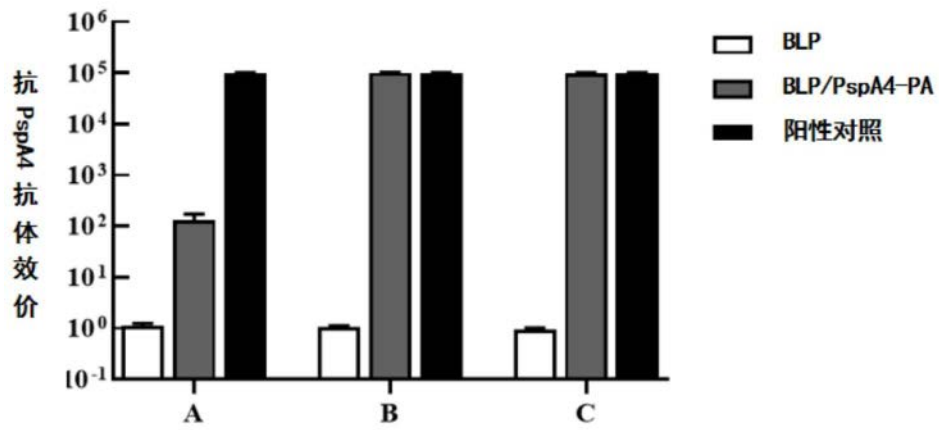


图6

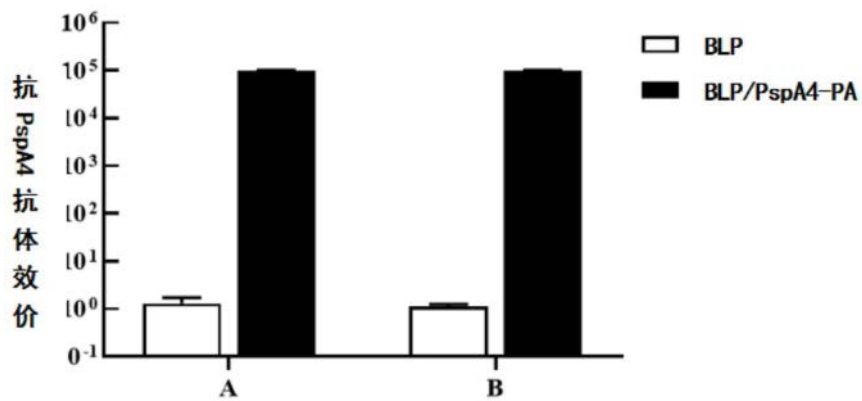


图7

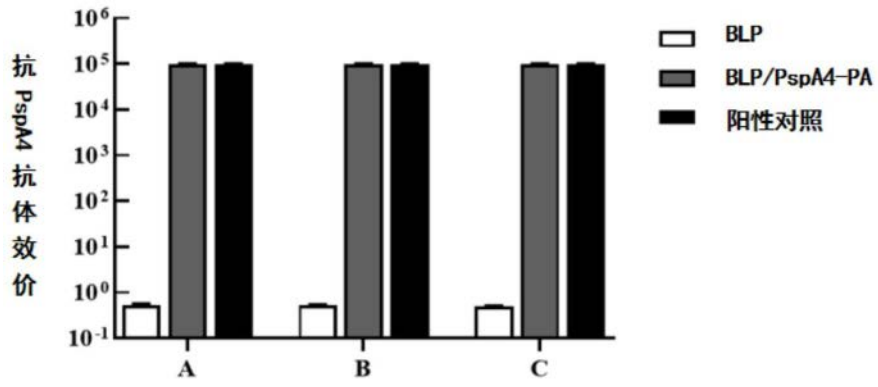


图8

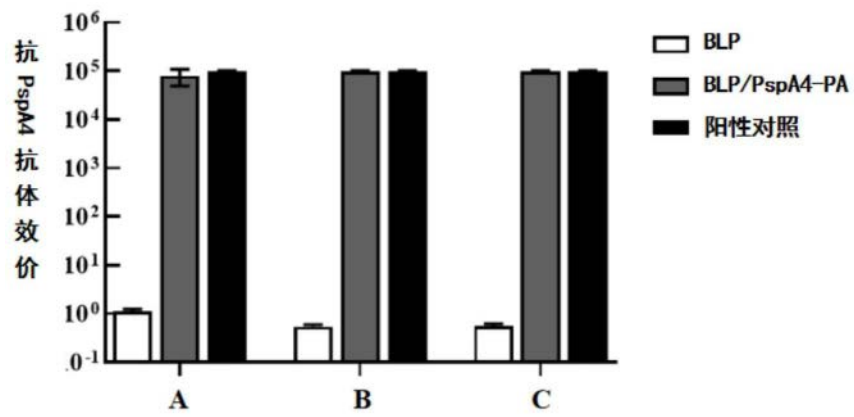


图9

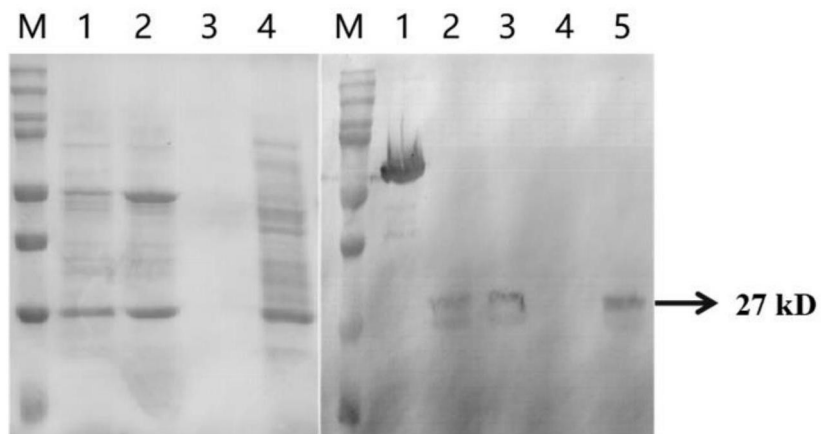


图10

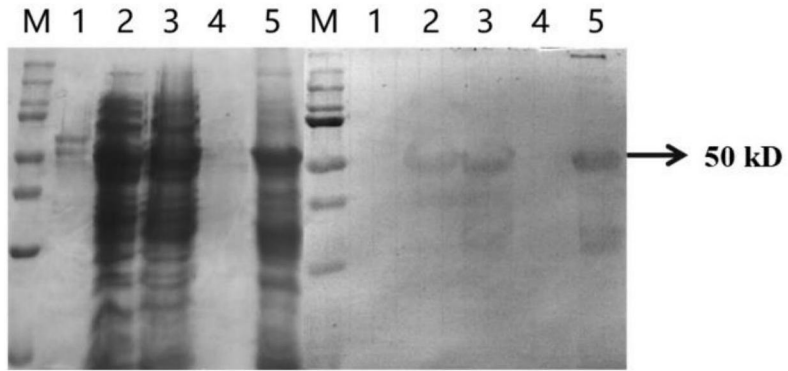


图11

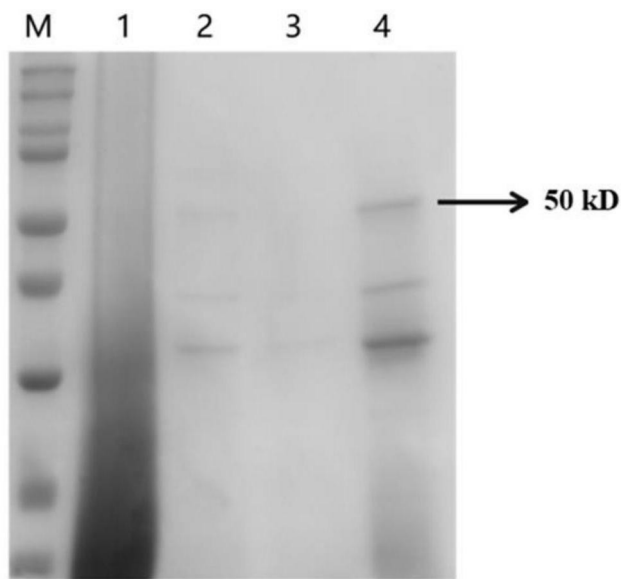


图12



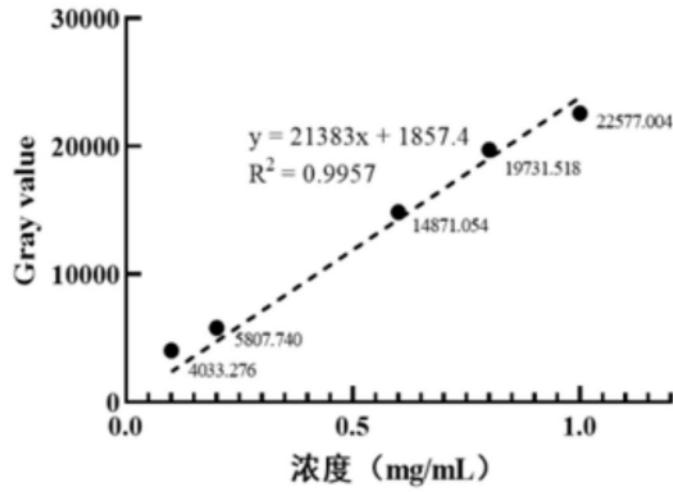


图13

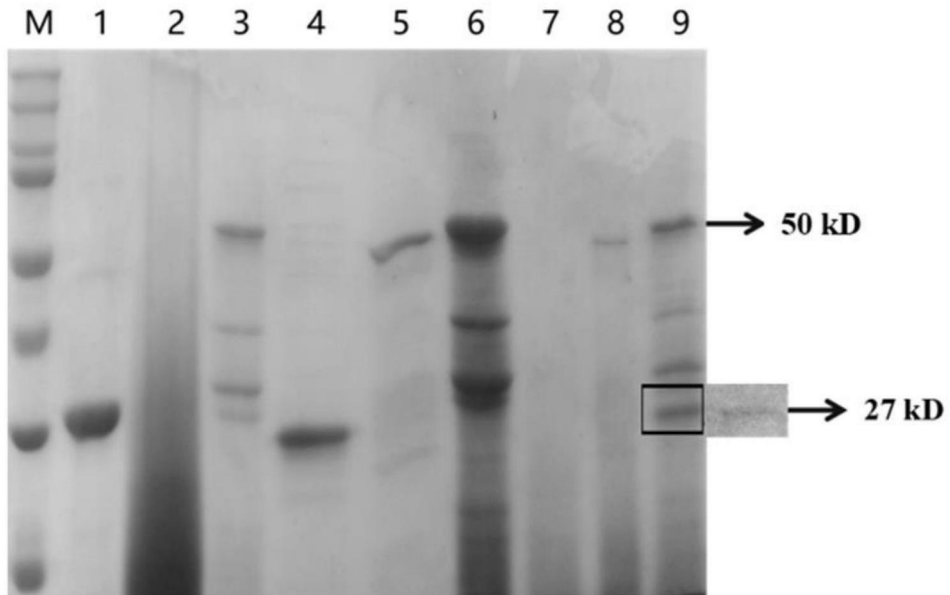


图14

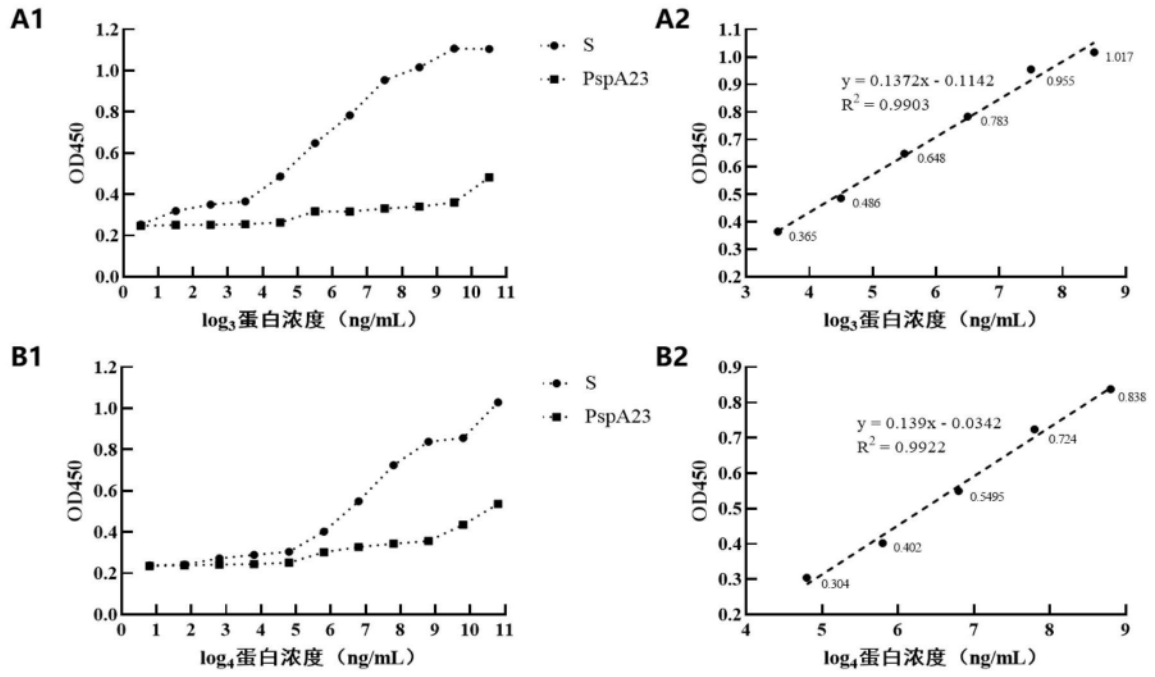


图15