



## SARS病人SARS冠状病毒核壳抗原抗体的变化规律

2003年4月16日,WHO正式宣布一种新的冠状病毒是引起严重急性呼吸道综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)的病原体,其后,SARS冠状病毒的基因组与蛋白质组学研究很快就取得了突破性进展。目前已确定SARS冠状病毒S、M、N、E、RNA聚合酶及(3CL)蛋白水解酶等6种主要蛋白[1],但尚不清楚其致病机制以及机体对这组病毒蛋白的免疫反应机制。

本研究用基因重组SARS冠状病毒核壳(N)蛋白建立间接ELISA法,检测血清标本中IgM和IgG抗体,了解SARS冠状病毒结构蛋白在人体内的免疫原性,旨在阐明SARS冠状病毒感染机体免疫应答的机制,为研究SARS冠状病毒感染的发病机制和有效的诊断试剂提供依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 质粒 携带SARS冠状病毒核壳抗原融合蛋白质粒pGEX-5X-3/N由香港大学微生物系提供。

1.1.2 主要试剂 羊抗人IgG-HRP、AEC为ZYMED公司产品;Glutathione Sepharose 4B、还原型谷胱甘肽、E.coli BL21为Pharmacia Biotech产品;羊抗人IgM-HRP为Sigma产品。

1.1.3 血清标本 本院健康献血员的血清标本200份,南方医院感染内科住院13例确诊SARS患者不同期采集的血清标本47份。SARS病例诊断按我国卫生部2003年4月15日颁布的SARS诊断标准(试行)执行。

#### 1.2 方法

1.2.1 SARS病毒核壳(N)融合蛋白表达和纯化 用电转方法将pGEX-5X-3/N转化至E.coli BL21中,挑取8个单菌落,用IPTG诱导培养2 h;分别取诱导前、后样品,10% SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色后观察;挑取诱导后融合蛋白表达量高的1号菌落,进行大量培养诱导后,超声破碎裂解细菌处理,用Glutathione Sepharose 4B纯化后,还原型谷胱甘肽洗脱,SDS-PAGE电泳,考马斯亮蓝染色后观察纯度。

1.2.2 免疫印迹 10% SDS-PAGE电泳分离N融合蛋白,电转印至硝酸纤维素膜上,转印膜用PBS含10%脱脂奶,4℃封闭6 h;将转印膜剪成数根小条,分别加入1:100稀释的SARS病人恢复期血清或正常血清中,4℃反应过夜;洗涤膜后,加入1:500稀释的HRP标记羊抗人IgG,置室温反应1 h,洗涤膜后,AEC显色后,用去离子水终止显色。

1.2.3 间接ELISA检测血清标本中IgM和IgG抗体以纯化N融合蛋白1 μg/ml,100 μl/孔,4℃、16 h包被聚苯乙烯微孔板;用含3%BSA封闭液200 μl/孔,4℃、16 h封闭;洗涤后,每孔加入待测血清1:100稀释至100 μl/孔,同时设相同稀释度的正常血清对照,置37℃孵育20 min,洗涤后加入HRP标记羊抗人IgG 1:3 000或HRP标记羊抗人IgM 1:200,置37℃孵育20 min;洗涤后,TMB 100 μl/孔显色10 min;2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 100 μl/孔终止反应;BioRad-550型酶联免疫检测仪读取D<sub>450</sub>吸光度值。

### 2 结果

## 2.1 SARS冠状病毒N蛋白的表达和纯化

pGEX-5X-3/N 融合表达载体在BL21受体菌中经IPTG诱导表达GST-N融合蛋白，用Glutathione Sepharose 4B纯化，相对分子质量约为74 000，与预期的结果相符，纯化融合蛋白，经SDS-PAGE鉴定纯度达95%以上(图1)。

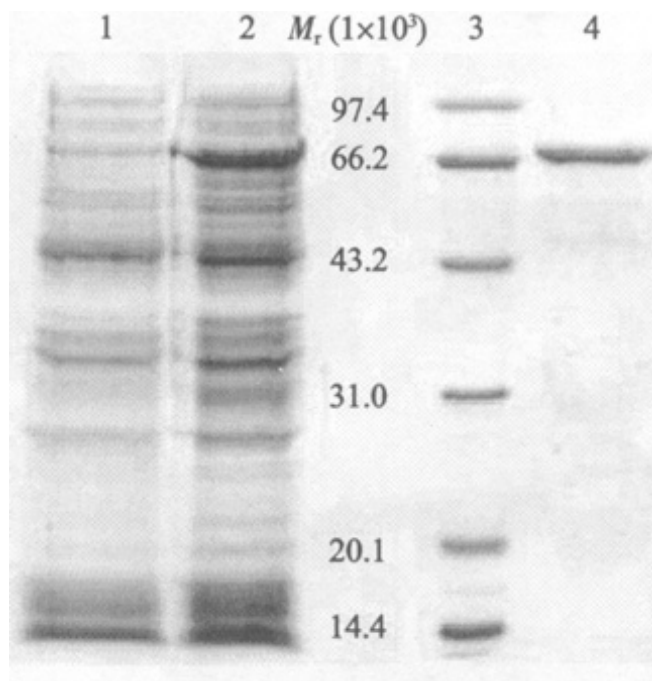


图1 N融合蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of N fusion protein

Lane 1: Uninduced pGEX-5X-3/N cell lysates; Lane 2: Induced pGEX-5X-3/N cell lysates;  
Lane 3: Molecular weight marker; Lane 4: Purified N fusion protein

## 2.2 免疫印迹鉴定SARS冠状病毒N蛋白的特异性

分别对9例健康人和13例SARS病人的恢复期血清进行Western blotting 检测，结果表明纯化后的GST-N融合蛋白被非典型肺炎病人的恢复期血清特异性识别，在相应的位置可见一条单一的蛋白质免疫结合带(图2)，与健康人血清不产生免疫反应(结果未显示)。

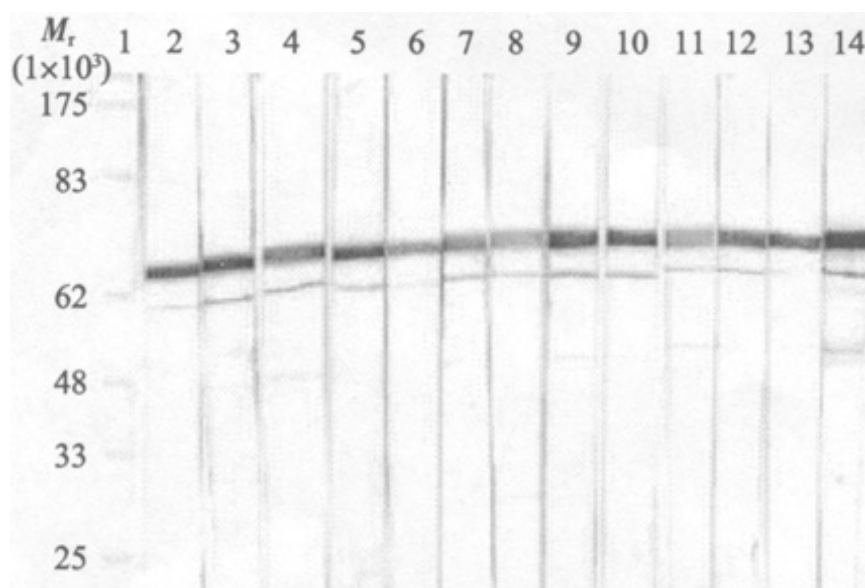


图2 SARS病人血清与N融合蛋白反应的免疫印迹结果

Fig.2 Western blotting of convalescent-phase sera and N fusion protein in SARS patients Lane 1: Pre-stained molecular weight marker; Lanes 2-14: Convalescent sera at dilution of 1:100

### 2.3 建立间接ELISA法检测健康献血员血清中抗体，确定临界值

用纯化GST-N融合蛋白建立间接ELISA法，检测200例健康献血员血清中抗体，IgM测定的 $D_{450}$ 的均值±标准差为 $0.111 \pm 0.0377$ ，以 $D_{450}$ 值 $=2.1 \times$ 健康献血员均值 $=0.233$ 作为IgM阳性判断的临界值(Cut-off)。IgG测定的 $D_{450}$ 的均值±标准差为 $0.114 \pm 0.041$ ，以 $D_{450}$ 值 $=2.1 \times$ 健康献血员均值 $=0.239$ 作为IgG阳性判断的临界值。大于或等于临界值为阳性，小于临界值为阴性。

### 2.4 SARS病人IgM和IgG产生的规律

分别对13例临床确诊为SARS病人急性期和恢复期的多点血清IgM和IgG抗体进行追踪观察，结果发现：在临床症状出现1周内，IgM和IgG抗体检测均为阴性；在出现症状的第2周，IgM抗体检出阳性率为83.3%，第3周为100%，第2个月IgM开始下降，检出阳性率为61.5%，至第3个月时，检出阳性率为38.5%；特异性IgG在第2周检出阳性率为66.7%，第3周100%，至1个月时达到高峰，第3个月时仍维持在高水平(图3)。

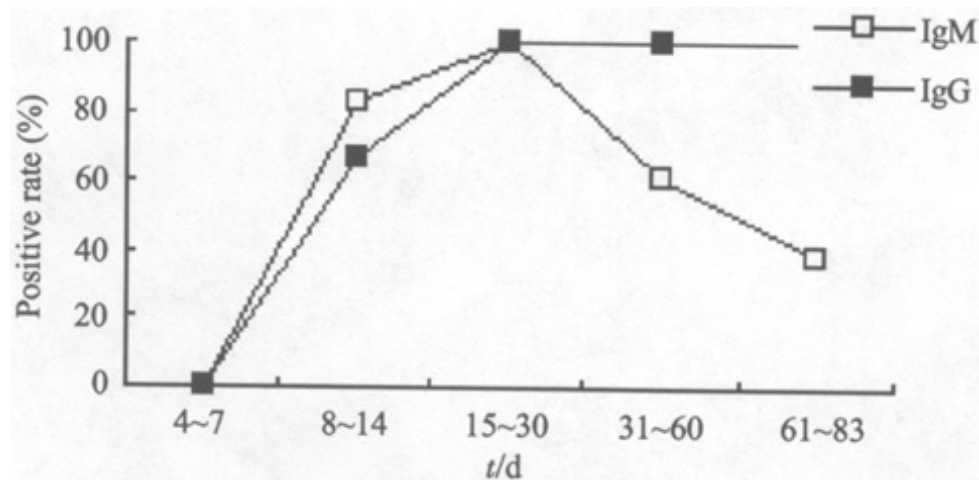


图3 SARS病人抗N融合蛋白抗体IgM和IgG产生的规律

Fig.3 IgM and IgG responses to N fusion antigen in SARS patients

## 3 讨论

机体在感染病毒或接种病毒疫苗后，能产生针对病毒多种抗原成分的各类特异性抗体，主要包括IgG、IgM和IgA。由于个体差异，不同个体感染病原微生物后产生抗体的时间有所不同，一般在3~7 d左右开始产生IgM抗体；7~14 d左右开始产生IgG抗体[2]。

目前，机体感染SARS冠状病毒后的免疫反应机制尚未完全清楚，从我们对13例SARS的检测数据分析，发现SARS病人在临床症状出现第2周时，可以用ELISA检测到抗SARS冠状病毒核壳(N)抗原抗体IgM或IgG，发病第3周时，特异性IgM和IgG检出阳性率为100%，IgM持续1个月后开始下降，在发病第2个月内，有61.5%的病人IgM抗体阳性，发病第3个月，仍有38.5%病人的IgM抗体维持阳性。特异性IgG抗体可在发病后第2周IgG抗体测出阳性，但抗体滴度较低，恢复期IgG抗体滴度明显升高，而且持续时间较长，追踪观察到发病第3个月，特异性IgG抗体仍维持在较高的抗体水平。

以往对动物冠状病毒的结构蛋白的研究发现，冠状病毒的N蛋白在病毒复制和产生的病理反应中起重要的

作用[3]，在动物冠状病毒感染的细胞中发现，N蛋白抗原性比病毒S蛋白强[4]。尽管我们没有对SARS冠状病毒的S蛋白作对照研究，但从目前所得到的实验检测数据推测，SARS冠状病毒N蛋白具有很强的免疫原性和特异性，可诱发机体产生有效的免疫应答，可能在抗病毒免疫机制和SARS冠状病毒致病机制中起重要的作用，检测SARS冠状病毒N蛋白的特异性抗体，可用于SARS病人血清学诊断。

#### 参考文献:

- [1] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. [J] Sciece, 2003, 300(5624): 1394-9.
- [2] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 280-2.
- [3] King B, Brian DA. Bovine coronavirus structural proteins[J]. J Virol, 1982, 42(2): 700-7.
- [4] Dagainakatte GC, Chard-Bergstrom C, Andrews GA, et al. Production, characterization, and uses of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of ELK coronavirus[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1999, 6(3): 341-4.

#### 参考文献:

- [1] Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. [J] Sciece, 2003, 300(5624): 1394-9.
- [2] 龚非力. 医学免疫学[M]. 北京: 科学出版社, 2000. 280-2.
- [3] King B, Brian DA. Bovine coronavirus structural proteins[J]. J Virol, 1982, 42(2): 700-7.
- [4] Dagainakatte GC, Chard-Bergstrom C, Andrews GA, et al. Production, characterization, and uses of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of ELK coronavirus[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 1999, 6(3): 341-4.