

SARS病人 SARS 冠状病毒核壳抗原抗体的变化规律

车小燕¹ 郝卫¹ 袁立文¹ 袁玉先¹ 袁志勇¹ 袁余华¹ 袁金军² 袁金林² 袁PatrickCYWoo³ 袁Susanna KP Lau³ 袁 Kwok Yung Yuen³ 袁震⁴ 渊第一军医大学珠江医院中心实验室袁东 广州 510282 渊第一军医大学南方医院 感染内科袁东 广州 510515 渊香港大学微生物系袁香港 渊第一军医大学珠江医院袁东 广州 510282 冤

摘要目的 通过监测 SARS 冠状病毒感染患者的抗体水平阐明 SARS 冠状病毒感染机体免疫应答的机制并探讨血清学诊断的意义与方法 采用基因重组 SARS 冠状病毒核壳抗原建立间接 ELISA 法检测健康人和 SARS 患者急性期和恢复期多点血清中特异性 IgG 和 IgM 抗体以 D₄₅₀ 值 = 2.1 伊 00 例健康人血清中特异性 IgG 和 IgM 抗体均值作为抗体阳性判断的临界值结果 IgM 和 IgG 的阳性临界值分别为 0.233 和 0.239 因此对 13 例 SARS 病人急性期和恢复期 IgM 和 IgG 抗体检测结果进行判断结果发现发病 1 周内 IgM 和 IgG 抗体检测均为阴性 发病第 2 周 IgM 和 IgG 检出阳性率分别为 83.3% 和 66.7% 第 3 周均为 100% 发病第 2 个月 IgM 检出阳性率为 61.5% 至第 3 个月 IgM 检出阳性率为 38.5% IgG 至第 1 个月时达到高峰 第 3 个月仍维持在高水平 结论 机体产生针对 SARS 冠状病毒核壳抗原的抗体持续时间长 提示 SARS 冠状病毒核壳抗原具有强免疫原性 在 SARS 冠状病毒致病机制中可能起重要的作用 在 SARS 的血清学诊断方面具有重要的价值

关键词 严重急性呼吸道综合征 SARS 冠状病毒 核壳蛋白 血清学试验

中图分类号 R373.1 文献标识码 A 文章编号 000-2588 渊 2003 冤 7-0637-03

Antibody response of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) to nucleocapsid antigen of SARS-associated coronavirus

CHE Xiao-yan¹, HAO Wei¹, QIU Li-wen¹, PAN Yu-xian¹, LIAO Zhi-yong¹, XU Hua¹, CHEN Jin-jun², HOU Jin-lin², Patrick CY Woo³, Susanna KPLau³, Kwok Yung Yuen³, HUANG Zhen⁴

¹Central Laboratory, Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China; ²Department of Infectious Diseases, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ³Department of Microbiology, University of Hong Kong, Hong Kong, China; ⁴Zhujiang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510282, China

Abstract: Objective To assess serum antibody responses of patients with severe acute respiratory syndrome (SARS) to nucleocapsid (N) antigen of SARS-associated coronavirus. Methods The serum level of IgM and IgG antibody to N antigen were measured in 200 healthy blood donors and 13 SARS patients at different time points of acute and convalescent phases using indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with N fusion proteins of SARS-associated coronavirus. Results The IgM positive critical value of 0.233 and IgG of 0.239 were selected as the threshold value for positive results that equal the product of 2.1 and the mean IgM and IgG level of 200 healthy blood donors. In 13 patients with SARS, the antibody responses to N antigen were not detectable in the first week after the onset of symptoms. The IgM and IgG seroprotection rates were 83.3% and 66.7% respectively in the second week, both reaching 100% at the third week. IgM seroprotection rates was 61.5% in the second month, and 38.5% at third month. The IgG peaked one month after the onset and remained at high levels in the following 2 months. Conclusion The antibody responses suggest that N protein of SARS is immunodominant and plays an important role in viral pathogenesis. This ELISA-based test for detecting anti-N antigen may be of significant value for SARS diagnosis.

Key words: SARS; SARS-associated coronavirus; nucleocapsid protein; serologic test

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 壳壳壳 RNA 聚合酶及 (3CL) 蛋白水解酶等 6 种主要蛋白 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 冠状病毒核壳蛋白建立间接 ELISA 法检测血清标本中 IgM 和 IgG

收稿日期 2003-06-15

基金项目 广东省防治非典型肺炎科技攻关项目 渊 科社字院 2003-80 号文 冤

Supported by the Research Project of Guangdong Province for SARS Prevention and Treatment

作者简介 车小燕 渊 962- 冤 袁女 袁河北玉田人 袁研究员 袁-mail: linche@pub.guangzhou.gd.cn

抗体降解 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 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 诊断标准执行

1.2 方法

1.2.1 SARS 病毒核壳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 0% 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 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 反应过夜 洗涤膜后加入 1:100 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG 置室温反应 1 h 洗涤膜后 AEC 显色 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 0.05 μl/孔 包被聚苯乙烯微孔板 用含 3% BSA 封闭液 200 μl/孔 4 益 6 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 益 孵育 20 min 洗涤后加入 HRP 标记羊抗人 IgG 1:1000 或 HRP 标记羊抗人 IgM 1:1000 置 37 益 孵育 20 min 洗涤后 MB 100 μl/孔 显色 10 min 2 mol/L H₂SO₄ 100 μl/孔 终止反应 BioRad-550 型酶联免疫检测仪读取 D₄₅₀ 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 74000 预期的结果相符 纯化融合蛋白经 SDS-PAGE 鉴定纯度达 95% 以上

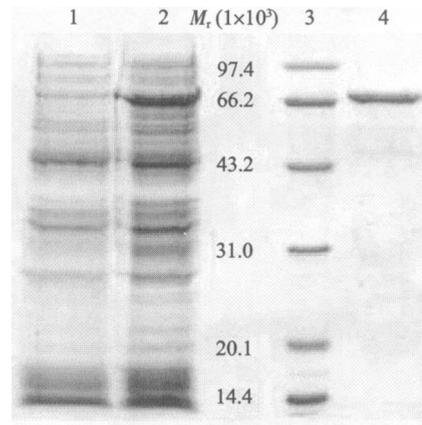


图 1 N 融合蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳分析

Fig.1 SDS-PAGE analysis of N fusion protein
Lane1:UninducedpGEX-5X-3/Ncelllysates;Lane2:Induced pGEX-5X-3/Ncelllysates;Lane3:Molecularweightmarker; Lane4:PurifiedNfusionprotein

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 与健康人血清不产生免疫反应 未显示

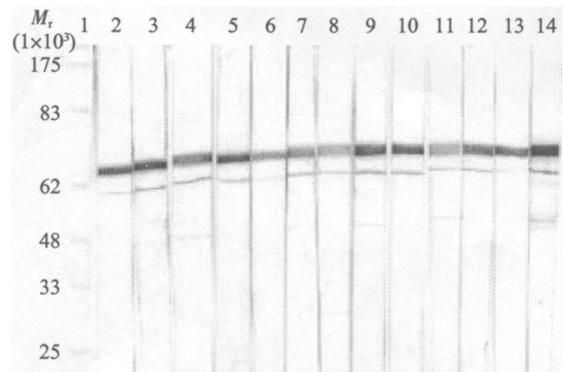


图 2 SARS 病人血清与 N 融合蛋白反应的免疫印迹结果

Fig.2 Western blotting of convalescent-phase sera and N fusion protein in SARS patients
Lane1:Pre-stainedmolecularweightmarker;Lanes2-14: Convalescentseraatdilutionof 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} 的均值依标准差为 0.111 依 0.0377 以 D_{450} 值 = 2.1 健康献血员均值 = 0.233 作为 IgM 阳性判断的临界值 (Cut-off) 遥 IgG 测定的 D_{450} 的均值依标准差为 0.114 依 0.041 以 D_{450} 值 = 2.1 健康献血员均值 = 0.239 作为 IgG 阳性判断的临界值 遥大于或等于临界值为阳性 小于临界值为阴性 遥

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 结果发现院在临床症状出现 1 周内 IgM 和 IgG 抗体检测均为阴性 曰在出现症状的第 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% 第 3 个月时 检出阳性率为 38.5% 曰特异性 IgG 在第 2 周检出阳性率为 66.7% 第 3 周 100% 第 1 个月时达到高峰 第 3 个月时仍维持在高水平 图 3 免 遥

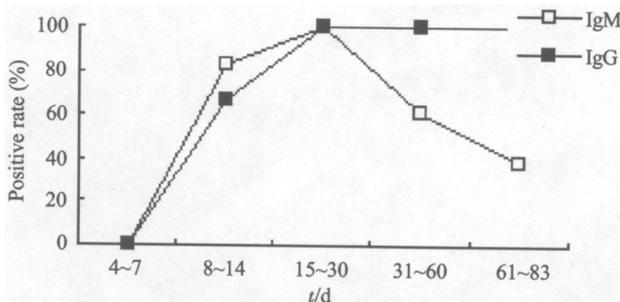


图 3 SARS 病人抗 N 融合蛋白抗体 IgM 和 IgG 产生的规律

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 尧 IgM 和 IgA 遥由于个体差异 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 曰~14 d 左右开始产生 IgG 抗体 免 遥

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 袁从我们对 13 例 SARS 的检测数据分析 袁发现 SARS 病人在临床症状出现第 2 周时 袁可以用 ELISA 检测到抗 SARS 冠状病毒核壳 渊 抗原抗体 IgM 或 IgG 袁发病第 3 周时 袁特异性 IgM 和 IgG 检出阳性率为 100% 袁 IgM 持续 1 个月后开始下降 袁在发病第 2 个月内 袁有 61.5% 的病人 IgM 抗体阳性 袁发病第 3 个月 袁仍有 38.5% 病人的 IgM 抗体维持阳性 遥特异性 IgG 抗体可在发病后第 2 周 IgG 抗体测出阳性 袁抗体滴度较低 袁恢复期 IgG 抗体滴度明显升高 袁而且持续时间较长 袁追踪观察到发病第 3 个月 袁特异性 IgG 抗体仍维持在较高的抗体水平 遥

以往对动物冠状病毒的结构蛋白的研究发现 袁冠状病毒的 N 蛋白在病毒复制和产生的病理反应中起重要的作用 袁在动物冠状病毒感染的细胞中发现 袁蛋白抗原性比病毒 S 蛋白强 免 遥尽管我们没有对 SARS 冠状病毒的 S 蛋白作对照研究 袁从目前所得到的实验检测数据推测 袁ARS 冠状病毒 N 蛋白具有很强的免疫原性和特异性 袁可诱发机体产生有效的免疫应答 袁可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 袁检测 SARS 冠状病毒 N 蛋白的特异性抗体 袁可用于 SARS 病人血清学诊断 遥

参考文献院

咱暂 Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, et al. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. 咱暂 Sciece, 2003, 300(5624):1394-9.

咱暂 龚非力. 医学免疫学 咱暂 北京: 科学出版社 2000. 280-2.

咱暂 King B, Brian DA. Bovine coronavirus structural proteins 咱暂 J Virol, 1982, 42(2):700-7.

咱暂 Daginakatte GC, Chard-Bergstrom C, Andrews GA, et al. Production, characterization, and uses of monoclonal antibodies against recombinant nucleoprotein of ELK coronavirus 咱暂 Clin Diagn Lab Immunol, 1999, 6(3):341-4.

欢迎邮购医学卫生图书 欢迎索取 免费 图书目录

地址 院北京市复兴路 22 号人民军医出版社邮购部
电话 院10-66885576 袁1927262 曰3801070199

邮编 院00036 经办人 院左代华
军线 院201-885576