

## 肾综合征出血热 IMMS-ELISA 检测方法建立\*

苏旭<sup>1</sup>, 赵凤玲<sup>2</sup>, 吕莉琨<sup>1</sup>, 李力<sup>1</sup>, 杨东靖<sup>1</sup>, 陈锦英<sup>3</sup>

**摘要:**目的 建立一种用于检测肾综合征出血热(HFRS)特异性抗体 IgG 的 ELISA 方法—免疫磁性微球(IMMS)ELISA。方法 利用重组菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET32a-L99S 诱导表达 SEO 型汉坦病毒(HV)重组核蛋白(rNP), 并进行镍亲和层析纯化, 以纯化 rNP 为抗原, 分别建立检测 HFRS 特异性抗体 IgG 的 3 种 ELISA 法: 间接 ELISA、捕获 ELISA 和 IMMS-ELISA, 并进行方法学比较。结果 新建立的 3 种 ELISA 的检测灵敏度和特异度为  $\geq 90\%$ , 总符合率  $\geq 95\%$ 。其中间接 ELISA 的灵敏度达 100%, 而假阳性率为 10%; 捕获 ELISA 特异度达 100%, 灵敏度较低(92.5%), 且假阴性率为 7.5%; IMMS-ELISA 的灵敏度和特异度均达到 100%。结论 IMMS-ELISA 较其他 2 种 ELISA 检测方法更为简单、安全和准确, 易于在基层公共卫生和临床医疗机构推广使用。

**关键词:** 肾综合征出血热; 汉坦病毒; 免疫磁性微球; 酶联免疫吸附测定

中图分类号: R 373.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0074-03

**IMMS-ELISA: a test method for hemorrhagic fever with renal syndrome** SU Xu ZHAO Feng-ling, LÜ Li-kun, et al. Tianjin Municipal Center for Disease Control and Prevention(Tianjin 300011, China)

**Abstract: Objective** To establish a novel enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method, namely immunomagnetic microspheres (IMMS) -ELISA, to detect specific IgG in hemorrhagic fever patients with renal syndrome (HFRS). **Methods** The recombinant nucleocapsid protein (rNP) of SEO hantavirus was expressed by the recombinant strain *E. coli* BL21 (DE3) /pET32a-L99S. Purified rNP was used as an antigen to establish three ELISA methods, including indirect ELISA, capture ELISA and IMMS-ELISA for the detection of specific IgG in HFRS patients. The results of the three methods were compared with each other. **Results** The sensitivity and specificity of the three ELISA methods were all higher than 90% and their coincidence rates were all higher than 95%. The sensitivity of indirect ELISA was 100%, but its false positive rate was 10%. The specificity of capture ELISA was 100%, but its sensitivity was lower (92.5%) than that of other two methods. The sensitivity and specificity of IMMS-ELISA were all 100%. **Conclusion** IMMS-ELISA is a simpler, safer and more accurate than indirect and capture ELISA method, and easy to use in grassroots public health and clinical medical institutions.

**Key words:** hemorrhagic fever with renal syndrome; hantavirus; immunomagnetic microsphere; enzyme-linked immunosorbent assay

肾综合征出血热(hemorrhagic fever with renal syndrome, HFRS)是一种以发热、出血和肾功能损伤为主要特征的急性病毒性传染病,在全世界流行广泛,危害严重。中国是 HFRS 高发国家,年发病人数 4~6 万,且农村发病率明显高于城市<sup>(1)</sup>。该病起病急,临床表现错综复杂,尚无特效的治疗方法,早期诊断及对症支持治疗,是改善预后、降低病死率的关键<sup>(2)</sup>。汉坦病毒(hantavirus, HV)是 HFRS 病原体,其 S 基因编码的核蛋白(nucleocapsid protein, NP)具有很强的免疫原性,适用于 HFRS 血清学诊断<sup>(3)</sup>。本研究利用原核表达 SEO 型 HV 的重组 NP(recombinant NP, rNP)建立 HFRS 特异性抗体 IgG 的 3 种 ELISA 检测方法,间接 ELISA、捕获 ELISA 和免疫磁性微球 ELISA (immunomagnetic microsphere ELISA, IMMS-ELISA), 并进行检测效果比较,旨在建立一种适于基层公共卫生和临床医疗机构使用的准确便捷的检测方法,提高 HFRS 检测能力。

## 1 材料与与方法

1.1 仪器与试剂 AKTA prime 蛋白纯化系统和 His Trap HP 镍亲和层析预装柱(美国 GE 公司); SE260 垂直电泳仪(美国 Amersham 公司); GS-71 型电泳凝胶成像仪(美国 BIO-RAD

公司);酶标仪和洗板机(瑞士 TECAN 公司);蛋白分子量标准(大连 TaKaRa 公司);咪唑、甘氨酸(美国 AMRESCO 公司);聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(美国 BIO-RAD 公司);辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗人 IgG(北京鼎国生物工程公司);直径 50~100  $\mu\text{m}$  聚苯乙烯磁性微球为南开大学白钢教授提供;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 试验材料 rNP 表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET32a-L99S 及对照菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET32a 均由本室构建<sup>(4)</sup>。临床诊断为 HFRS 患者血清 40 份,且免疫荧光法(immunofluorescence assay, IFA)检测 HFRS 特异性抗体 IgG 滴度均  $>1:1280$ , 其中男性 22 份,女性 18 份,年龄 17~62 岁。体检健康人血清 40 份,免疫荧光检测 HFRS 特异性抗体 IgG 均为阴性,其中女性 21 份,男性 19 份,年龄 20~58 岁。

1.3 重组蛋白 rNP 的表达与鉴定 利用表达菌株 *E. coli* BL21(DE3)/pET32a-L99S 进行 rNP 诱导表达,并进行镍亲和层析纯化,获得纯化蛋白 rNP<sup>(5)</sup>, 然后进行免疫印迹(western blotting)鉴定。鉴定所用一抗和二抗分别为 1:100 稀释的 HFRS 患者混合血清(免疫荧光法检测效价 1:1280)和 1:500 稀释的 HRP-羊抗人 IgG, 采用 4-氯 1-萘酚显色。试验设立空白对照菌株为 *E. coli* BL21(DE3)/pET32a。

1.4 间接 ELISA 方法 利用包被缓冲液[20 mmol/L 碳酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS), pH 9.6]将纯化 rNP 稀释至 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 进行包被, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜; 弃去包被

\* 基金项目: 天津市科技支撑计划重大项目(07SYSYSF05100)

作者单位: 1. 天津市疾病预防控制中心, 300011; 2. 北京市通州区疾病预防控制中心; 3. 天津医科大学

作者简介: 苏旭(1970-) 男, 天津人, 副主任医师, 硕士, 主要从事病原微生物学检验研究工作。

通讯作者: 陈锦英, E-mail: jinyingchen1@163.com

液, 洗涤缓冲液(20 mmol/L PBS  $\rho$ . 0.05% Tween 20, pH 7.2) 洗板 5 次, 甩干; 加入封闭缓冲液(含 10% 牛血清的洗涤缓冲液) 37 °C 封闭 2 h; 弃去封闭液, 洗板 5 次, 甩干; 分别加入阴阳性对照血清或 1:100 稀释的待检血清, 100  $\mu$ L/孔, 37 °C 孵育 30 min; 洗板 5 次, 甩干; 加入 1:1 000 稀释的 HRP-羊抗人 IgG, 37 °C 孵育 30 min; 洗板 5 次, 甩干; 加入显色剂 A 液(1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、B 液(0.4 mg/mL 四甲基联苯胺(tetramethylbenzidine, TMB))各 50  $\mu$ L/孔, 37 °C 避光反应 15 min; 各孔加终止液(2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 50  $\mu$ L, 酶标仪检测 A450 nm 值, 以 P/N  $\geq$  2.1 为阳性判定标准, 进行结果判定。

1.5 捕获 ELISA 方法 利用含羊抗人 IgG(5  $\mu$ g/mL) 的包被缓冲液进行包被, 100  $\mu$ L/孔, 4 °C 过夜; 弃去包被液, 洗板 5 次, 甩干; 加入封闭缓冲液 37 °C 封闭 2 h; 弃去封闭液, 洗板 5 次, 甩干; 分别加入阴阳性对照血清或 1:100 稀释的待检血清, 37 °C 孵育 30 min; 洗板 5 次, 甩干; 加 1:1 000 稀释的 HRP-rNP(HRP-rNP 为采用过碘酸法标记 HRP 的纯化 rNP), 37 °C 孵育 30 min; 洗板 5 次, 甩干; 加 A、B 显色液各 50  $\mu$ L/孔, 37 °C 避光反应 15 min; 各孔加终止液 50  $\mu$ L, 酶标仪检测 A450nm 值, 以 P/N  $\geq$  2.1 为阳性判定标准, 进行结果判定。

1.6 IMMS-ELISA 方法 (1) 免疫磁性微球的致敏: 取 2 mL 聚苯乙烯磁性微球(直径 50 ~ 100  $\mu$ m), 加入 5 mg/mL 纯化 rNP 溶液 2 mL, 4 °C 放置 24 h, 用 20 mmol/L PBS 清洗 3 次, 然后置于 PBS 中 4 °C 保存。(2) IMMS-ELISA 步骤: 取 rNP 致敏的免疫磁性微球 10  $\mu$ L 置于 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL 1% 明胶封闭过夜; 以磁力聚集固定微球, 弃上清, 清洗 3 次, 加入 1:100 稀释的待检血清, 37 °C 振荡反应 1 h; 以磁力聚集固定微球, 弃上清, 清洗 3 次, 加入 1:2 000 稀释的 HRP-羊抗人 IgG 1 mL, 37 °C 振荡反应 1 h; 以磁力聚集固定微球, 弃上清, 清洗 3 次, 加入 TMB 显色液 500  $\mu$ L, 反应 5 min, 加入 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应, 酶标仪检测 A 450nm 值, 以 P/N  $\geq$  2.1 为阳性判定标准, 进行结果判定。

1.7 ELISA 检测方法的评价 取 HFRS 患者血清和健康人血清, 分别利用 3 种 ELISA 法进行检测, 并以灵敏度、特异度和总符合率 3 项真实性指标对 ELISA 检测结果进行评价。

1.8 统计分析 采用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 组间数据比较采用  $\chi^2$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rNP 的表达与鉴定(图 1) rNP 表达菌株 *E. coli* BL21(DE3) / pET32a-L99S 经诱导表达和纯化, 获得的重组蛋白

rNP 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 显示其蛋白分子质量为 67.1 kD, Western blot 结果显示, rNP 与 HFRS 患者阳性混合血清反应呈现特异性条带, 表明其具有良好的抗原性。

2.2 间接 ELISA 检测 利用间接 ELISA 检测 HFRS 患者及健康人特异性 IgG 抗体。结果显示, 检测 40 份患者血清均为阳性, 40 份健康人血清中的 36 份为阴性, 4 份为阳性, 假阳性率为 10%。

2.3 捕获 ELISA 检测 利用捕获 ELISA 检测 HFRS 患者及健康人特异性 IgG 抗体。结果显示, 检测 40 份患者血清, 37 份为阳性, 3 份为阴性, 假阴性率为 7.5%, 40 份健康人血清均为阴性。

2.4 IMMS-ELISA 检测 利用 IMMS-ELISA 检测 HFRS 患者及健康人特异性 IgG 抗体。结果显示, 检测 40 份患者血清均为阳性, 40 份健康人血清均为阴性。

2.5 3 种 ELISA 方法检测结果比较(表 1) 3 种 ELISA 的检测灵敏度和特异度均  $\geq$  90%, 总符合率  $\geq$  95%。其中间接 ELISA 的灵敏度达 100%, 而假阳性率为 10%; 捕获 ELISA 特异度达 100%, 灵敏度较低(92.5%), 且假阴性率为 7.5%; 只有 IMMS-ELISA 的灵敏度和特异度均达到 100%, 组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 3 种 ELISA 方法检测结果的比较

检测方法	患者血清组		健康人血清组		灵敏度 (%)	特异度 (%)	总符合率 (%)
	阳性数	阴性数	阳性数	阴性数			
间接 ELISA	40	0	4	36	100.0	90.0	95.00
捕获 ELISA	37	3	0	40	92.5	100.0	96.25
IMMS-ELISA	40	0	0	40	100.0	100.0	100.00
$\chi^2$ 值	6.15		8.28				

3 讨论

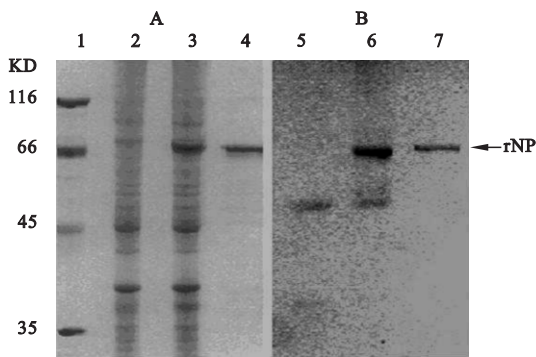
HFRS 的早期临床表现较为复杂, 差异较大, 无特异的临床指征。因此其早期诊断还需依靠实验室的病原学诊断、综合分析、方可确诊。而现有 HFRS 的病原学诊断方法中, 酶联免疫吸附试验因其方法特异、敏感、快速, 操作简单, 适于临床检验<sup>[6-7]</sup>。其他如病毒分离、免疫荧光检测和分子生物学检测, 均因耗时费力、专业技术要求高、生物安全和实验设备要求较高等原因不能为临床诊断广泛应用。

IMMS 因其抗原-抗体识别反应的特异性高, 操作简便快速, 在免疫学检测领域具有较好的应用前景<sup>[8]</sup>。IMMS-ELISA 将 IMMS 捕获技术与 ELISA 检测技术相结合, 对常规 ELISA 灵敏限以下无法检测到的抗原或抗体也可获得较高的检出率<sup>[9-10]</sup>。本研究利用 rNP 建立 3 种检测 HFRS 特异性 IgG 的 ELISA 方法, 其中 IMMS-ELISA 较传统的 ELISA 方法更为简单、安全和准确, 对实验条件及设备要求低, 操作简便, 易于在乡镇基层公共卫生和临床医疗机构推广使用。IMMS-ELISA 的建立和应用为搭建和完善汉坦病毒快速检测技术平台, 科学有效地防治 HFRS 提供了有效的实验室检测技术保障。

志谢 南开大学药学院白钢教授和曹宇博士提供磁性微球, 以及在制备方法上所提供的技术帮助

参考文献

(1) McCaughey C, Hart CA. Hantavirus [J]. J Med Microbiol, 2000, 49: 587 - 599.



注: 1 蛋白分子量标准; 2 对照菌株 *E. coli* BL21(DE3) / pET32a; 3 *E. coli* BL21(DE3) / pET32a-L99S; 4 纯化 rNP; 5-7 为 2-4 的 wblot 鉴定。

图 1 纯化 rNP 的 SDS-PAGE(A) 和 Western blot(B)

- (2) 李健, 王志强, 胡茂红, 等. 山东省肾综合征出血热死亡病例分析[J]. 中国公共卫生 2007 23(4): 490-491.
- (3) 余鹏博, 王敬军, 张家驹, 等. 汉坦病毒核蛋白原核表达纯化及其单抗制备[J]. 中国公共卫生 2005 21(12): 1445-1447.
- (4) 徐昭, 陈锦英, 李力, 等. 汉坦病毒 S 基因在大肠埃希菌中的克隆及表达[J]. 天津医药 2006 34(2): 324-327.
- (5) 赵凤玲, 陈锦英, 吕莉琨, 等. 汉坦病毒重组核蛋白抗体用于鼠肺组织病毒抗原的检测[J]. 中国人兽共患病学报, 2008 24(6): 510-513.
- (6) 苏凤菊, 曾令兰. 肾综合征出血热的实验室早期诊断[J]. 中国医学文摘·检验与临床 2006 20(3): 23-25.
- (7) Tai PW, Chen LC, Huanq CH. Hanta hemorrhagic fever with renal

syndrome: a case report and review [J]. J Microbiol Immunol Infect 2005 38:221-223.

- (8) 李鹤, 马力, 李黎. 免疫磁性微球的研究进展[J]. 食品工程, 2007 3:33-36.
- (9) Safarik I, Safarikova M. Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptides [J]. Biomagn Res Technol, 2004 2:7.
- (10) 许学斌, 顾宝柯, 金汇明, 等. 免疫磁珠法检测食品中的沙门菌及分离菌株的耐药性[J]. 中国食品卫生杂志, 2006 18(3): 202-204.

收稿日期: 2011-02-26

(宋艳萍编辑 郭薇校对)

## 【检验技术】

# 辽宁省水痘-带状疱疹病毒基因型分析\*

王艳, 马艳, 韩悦, 郭军巧

**摘要:** 目的 了解辽宁省水痘-带状疱疹病毒(VZV)基因型别。方法 选取水痘患者临床确诊病例 7 例, 采集血清和咽拭子标本, 分别检测 VZV IgM 抗体、扩增 ORF22 基因 VZV 核酸片段, 进行核苷酸序列测定分析, 测序结果与 GenBank 的 VZV 参考株基因序列进行比较。结果 7 例临床确诊病例 VZV IgM 抗体均阳性(编号为 VZV001~VZV007); 其中 3 例的咽拭子标本扩增到目的片段(VZV001、VZV-002、VZV-005), 测序结果证实为水痘-带状疱疹病毒; ORF22 基因的单核苷酸多态性(SNP)分析显示, VZV-002 与 VZV-005 基因序列完全一致, 且在同一位点的碱基由 C 代替了 A; VZV-001 序列 2 个位点出现碱基代替, 提示其基因可能发生点突变; 与 Dumas 株序列比较, 3 株分离株在 6 个关键位点上有 4 个核苷酸不同, 与 P-Oka 株则完全一致, 3 株 VZV 分离株的 ORF22 基因均鉴定为 J 基因型, 与水痘-带状疱疹病毒 P-Oka 株的同源性为 99.56%~99.78%。结论 辽宁省检测到的 3 株 VZV 基因型均为 J 型。

**关键词:** 水痘-带状疱疹病毒; 基因型; 单核苷酸多态性(SNP)分析

中图分类号: R 373.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)01-0076-03

**Genotype analysis of varicella-zoster virus in Liaoning province** WANG Yan, MA Yan, HAN Yue et al. Department of Planned Immunization, Liaoning Provincial Center for Disease Control and Prevention(Shenyang 110005, China)

**Abstract: Objective** To examine the genotype of varicella-zoster virus in Liaoning province. **Methods** The serum and throat swabs specimens were collected from 7 patients clinically diagnosed with varicella for the detection varicella-zoster virus(VZV) IgM and the amplification of DNA of the open reading frame(ORF) 22. The DNA was sequenced and analyzed with the data of VZV reference strains downloaded from GenBank. **Results** All the 7 patients were VZV IgM positive and the amplification and sequencing of 3 throat swabs(VZV001, VZV-002, VZV-005) confirmed the VZV. The results of ORF22 single nucleotide polymorphism(SNP) analyses showed that VZV-002 and VZV-005 had the same sequence and the single base transversion was A→C. The sequence of VZV-001 had 2 changed bases, suggesting the point mutation of the gene. Compared with Dumas strain, the 3 strains had 4 bases different on 6 key site and completely matched with P-Oka strain. The 3 strains were identified as J genotype and the nucleotide homology was 99.56%~99.78% with P-Oka. **Conclusion** The genotype of 3 VZV strains detected in Liaoning province belongs to J genotype.

**Key words:** varicella-zoster virus(VZV); genotype; SNP analysis

水痘病毒是儿童期水痘的病原体, 其潜伏后再感染表现为带状疱疹, 因而水痘病毒又称水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster-virus, VZV)。近年来从基因学上探索不同毒株间的差异及基因分类很受关注, VZV 病毒虽然只有一个血清型, 但是不同毒株之间仍存在着变异, 其基因组变异率为 0.05%~0.06%, 与人类基因组变异率 0.078% 相近<sup>[1]</sup>。为了解辽宁地区 VZV 基因型别的分布特点, 本研究对 7 例临床诊断为水痘患者的咽拭子进行了聚合酶链反应(PCR)分析和

序列测定。现将结果报告如下。

## 1 对象与方法

1.1 对象 2009 年 12 月份选取沈阳市传染病院临床诊断为水痘患者 7 例, 分别采集咽拭子标本, 编号为 VZV-001~VZV-007; 同时采集患者血清标本进行 VZV IgM 抗体检测。所有标本均置于 -80℃ 保存。

## 1.2 方法

1.2.1 主要试剂 ELISA 试剂盒(德国维润(塞润)试剂公司); DNA 提取试剂盒、Taq<sup>TM</sup> 试剂盒、质粒 pMD19-T、大肠埃希菌 JM109 感受态细胞(日本 TaKaRa 公司); PCR 纯化试剂盒(美国 Qiagen 公司); 2% 琼脂糖凝胶(美国 Promega 公司)。

1.2.2 水痘 IgM 抗体检测 采用抗体捕捉酶联免疫吸附实

\* 基金项目: 辽宁省博士科研基金(20052135)

作者单位: 辽宁省疾病预防控制中心免疫规划所 沈阳 110005

作者简介: 王艳(1978-), 女, 辽宁沈阳人, 主管技师, 学士, 主要从事病毒检验工作。

通讯作者: 郭军巧, E-mail: guojunqiao@lncdc.com