

论著 ·

文章编号: 1007 - 8738(2004)04 - 0444 - 05

抗 HBV 中和抗体 MA18/7 轻链可变区 V_L 与 GFP 融合蛋白的表达及生物活性测定

管宝全, 张 军,* 罗文新, 顾 颖, 朱子恒, 夏宁邵

(厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005)

Expression and bioactivity analysis of the fusion protein GFP- V_L of the neutralizing monoclonal antibody MA18/7 against HBV

GUAN Bao-quan, ZHANG Jun*, LUO Wen-xin, GU Ying, ZHU Zi-heng, XIA Ning-shao

Ministry of Education, Key Lab of Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China

Abstract

AIM: To express the fusion protein of enhanced green fluorescent protein (EGFP) with the light chain variable domain of the neutralizing monoclonal antibody MA18/7 (mAb) against hepatitis B virus in *E. coli*, and determine its bioactivity. **METHODS:** The EGFP gene was cloned into vector pTO-T7 to construct an expression vector. And then according to ORF gene, MA18/7- V_L was inserted into the 5' terminal of EGFP gene free of terminal code TAA to construct expression vector of fusion protein. The fusion protein was expressed in *E. coli* and its bioactivity was detected with ELISA and relative fluorescence intensity. **RESULTS:** The expression vector EGFP- V_L was constructed. SDS-PAGE analysis showed that expressed fusion protein was mainly in the form of inclusion body. The fusion protein retained the property of EGFP and it could bind to V_H to form Fv which had binding activity to pre-S1. **CONCLUSION:** The obtained fusion protein had good bioactivity and could be applied to further studies.

Keywords: V_L ; GFP; fusion protein

摘要

目的: 在大肠杆菌中表达抗 HBV 中和抗体 MA18/7 轻链可变区基因(V_L)与增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的融合蛋白, 并测定其生物学活性。方法: 应用基因工程技术, 将 EGFP 基因克隆到载体 pTO-T7 中构建原核表达载体。然后将 MA18/7 的 V_L

基因按照读码框插入到无终止密码子 TAA 的 EGFP 基因的 5' 末端, 构建融合蛋白表达载体。通过 ELISA 和相对荧光强度测定在大肠杆菌中表达的融合蛋白的活性。结果: 构建了 EGFP-MA18/7- V_L 表达载体。SDS-PAGE 表明, 融合蛋白主要以包涵体的形式存在。荧光测定显示, 融合蛋白保持了 GFP 的荧光性质。ELISA 的结果表明, 融合蛋白与重链可变区(V_H)片段结合成的 Fv, 能特异性地识别 HBV pre-S1 抗原。结论: 成功地获得具有良好生物学活性的融合蛋白, 可用于进一步的研究。

关键词: 轻链可变区; GFP; 融合蛋白

中图分类号: R392.11 文献标识码: A

完整抗体的 Fv 为由 V_H 和 V_L 借非共价键而形成的具有抗原结合活性的最小抗体片段。将该抗体片段的基因与其他蛋白的基因融合表达, 可得到既具有抗体活性又具有其他蛋白活性的多功能抗体融合蛋白。绿色荧光蛋白(GFP)常以融合蛋白的形式广泛应用于研究之中。目前, 对抗体 Fv 融合蛋白的研究大都偏重于单链抗体(scFv), 而对更小的抗体片段 V_H 和 V_L 融合蛋白的研究则相对少见。由于 V_H 和 V_L 对特异性抗原具有结合的能力, 研究抗体可变区的融合蛋白就显得很有意义。我们在研究抗 HBV pre-S1 单克隆抗体(mAb)MA18/7 的小分子抗体片段时, 发现单独的 V_H 和 V_L 片段都不具有结合 pre-S1 抗原的能力, 只有两者结合形成完整的 Fv 片段后, 才能保持亲本抗体对 pre-S1 抗原的结合活性。在此基础上, 我们构建了 EGFP 与 MA18/7 的 V_L 基因融合表达的原核表达载体, 并在大肠杆菌中获得以包涵体形式表达的融合蛋白。应用 ELISA 和荧光测定法证实, 经过变性复性过程后得到的融合蛋白, 既保持了 EGFP 的特性, 又具有与 V_H 片段形成 Fv 后特异性结合 pre-S1 抗原的活性, 有可能进一步应用于免疫荧光和免疫检测等多个领域。

收稿日期: 2003 - 09 - 23; 修回日期: 2003 - 11 - 10

基金项目: "863 计划海洋生物技术主题青年基金资助(Nb.2001AA628120)

作者简介: 管宝全(1978 -), 男, 河北丰润人, 硕士生。

*Corresponding author, Tel: (0592)2184110

Email: zhangj @jingxian. xmu. edu. cn

1 材料和方法

1.1 材料

可分泌抗 HBV pre-S1 mAb 4D11 的鼠杂交瘤细胞系和可分泌抗 HEV mAb 8C11 的鼠杂交瘤细

胞系,均由本实验室制备。大肠杆菌 DH5 株和 ER2566 株及质粒 pTO-T7,均由本室构建保存^[1]。载体 pMD18-T 购自大连宝生物工程有限公司。质粒 pEGFP 购自 Clontech 公司。限制性内切酶购自大连宝生物工程有限公司。T4 DNA 连接酶购自华美生物工程有限公司。DNA 柱式胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程公司。PCR 用 Taq 酶及 dNTP 购自上海生物工程公司。引物合成及测序均由上海博亚生物技术有限公司协助完成。

1.2 方法

1.2.1 EGFP 原核表达载体的构建 根据 EGFP 基因的序列合成两条引物。上游引物的序列为: GGA TCC ATG GTG AGC AAG GGC GAG (划线部分为引入的 BamH I 识别位点); 下游引物的序列为: GAA TTC CCC AGA TCT CTT GTA CAG CTC GTC (划线部分为引入 EcoR I 和 Bgl II 识别位点)。以 pEGFP 为模板扩增 EGFP 基因。扩增条件为: 94 预变性 5 min, 然后按 94 40 s, 55 35 s, 72 50 s, 共进行 28 个循环, 最后于 72 延伸 10 min。回收 PCR 产物, 接入 pMD18-T 载体中。提取阳性质粒, 用 BamH I 和 EcoR I 双酶切后, 回收酶切片段, 与经 BamH I 和 EcoR I 双酶切的 pTO-T7 载体连接, 即获得重组载体 pTO-T7-EGFP。

1.2.2 EGFP-V_L 融合表达载体的构建 根据 MA18/7 V_L 基因的序列 (GenBank 登录号: AJ002099) 合成两条引物。上游引物的序列为: GAA TTC GAC ATT GTG ACC CAG (划线为引入 EcoR I 识别位点), 下游引物的序列为: ΔAGCTT TTT CAG CTC CAG CTT G (划线为引入 Hind III 识别位点)。以 pTO-T7-MA18/7-V_L (含 MA18/7 的 V_L 基因) 为模板扩增 V_L 基因。扩增条件为: 94 预变性 5 min, 然后按照 94 35 s, 55 35 s, 72 40 s, 共进行 30 个循环, 最后再于 72 延伸 10 min。回收 PCR 产物, 与载体 pMD18-T 连接后用 EcoR I 和 Hind III 双酶切。回收酶切片段, 与用 EcoR I 和 Hind III 双酶切的 pTO-T7-EGFP 连接, 后即重组融合表达载体 pTO-T7-EGFP-V_L。

1.2.3 诱导条件的优化和融合蛋白的初步纯化 以重组质粒 pTO-T7-EGFP-V_L 转化 *E. coli* ER2566 菌株, 挑取单个菌落接种于 3 mL LB (含 Kan 100 mg/L) 培养基中, 于 37 振荡培养过夜。在菌液的 A₆₀₀ 值达 0.6 左右时, 加入 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导融合蛋白表达, 诱导温度分别为 15、20、25、30 和 37, 诱导时间分别为 12 h、10 h、8 h、6 h 和 4 h。表达后,

直接对试管中的培养基进行相对荧光强度的测定, 然后离心收集菌体进行 SDS-PAGE 分析, 以确定最佳的表达条件。再挑取单个菌落接种于 500 mL LB (含 Kan 100 mg/L) 培养基中, 于 37 振荡培养过夜。在菌液的 A₆₀₀ 值达 0.8 左右时, 加入 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导, 按照上述优化的诱导温度和时间进行表达。离心收集菌体, 超声破碎后离心分离包涵体沉淀和上清。将沉淀先后用 Buffer I (0.1 mol/L NaCl、5 mmol/L EDTA 及 20 mmol/L Tris-Cl, pH 8.5) 和 20 mL/L 的 Triton 洗涤后, 溶于 4 mol/L 尿素中, 稀释至蛋白浓度约为 100 mg/L, 对 2 mol/L 尿素进行透析, 并不断减少尿素的含量直至将蛋白对 PBS 透析。以 PEG20 000 浓缩透析后的样品, 即得 EGFP-V_L 融合蛋白的初步纯化产物。对纯化过程中各部分的样品, 用 SDS-PAGE 进行分析。

1.2.4 融合蛋白的荧光测定 采用紫外分光光度计, 分别测定 EGFP-V_L 和纯化的 EGFP 蛋白的浓度。分别取 EGFP-V_L、EGFP 以及 EGFP-V_L 与 V_H 的等量混合物, 以 PBS 调整使三者 EGFP 的摩尔浓度相当。然后对调整后的上述 3 种样品做梯度倍比稀释, 应用荧光和化学发光检测仪 (labsystem fluoroskan ascent FL), 以激发波长 485 nm、发射波长 510 nm, 测定系列稀释物的相对荧光强度 (relative fluorescence intensity, RFI)。

1.2.5 融合蛋白抗原结合活性的测定 采用竞争抑制 ELISA 法。以 1 mg/L HBV pre-S1 21~47 多肽包被聚苯乙烯板, 经 10 g/L BSA 封闭后, 每孔加入 50 μL 各种待测样本, 包括: 抗体片段 MA18/7-V_H、MA18/7-V_L、V_H 和 V_L 等量混合物、V_H 和 EGFP-V_L 等量混合物。以 PBS、抗 HBV pre-S1 mAb 4D11 和抗戊型肝炎 (HEV) mAb 8C11 作为对照, 再加上 50 μL 11 000 HRP 标记的 mAb 4D11, 于 37 温育 1 h。以 PBST 洗涤后, 加 TMB 显色, 用酶标仪测定 A_{450/620} 值。

1.2.6 融合蛋白活性的间接 ELISA 测定 将 V_H 和 EGFP-V_L 等量混合后进行倍比稀释, 分别加到以 1 mg/L HBV pre-S1 21~47 多肽包被的聚苯乙烯板中, 每孔 100 μL, 于 37 孵育 1 h。以 PBST 洗涤 5 次后, 再加入 12 500 HRP 标记的抗 His 抗体, 每孔 100 μL, 于 37 孵育 0.5 h, 以后步骤同上述。

2 结果

2.1 融合基因表达载体 EGFP-V_L 的构建 EGFP 基因存在终止密码子 TAA, 由于对该基因进行 5' 末端融

合时,可阻止其后插入的 V_L 基因的转录和表达,为此,在下游引物中将 TAA 替换为酶切位点,以保证大肠杆菌对融合基因的正确转录。在表达载体 pTO-T7 的多克隆位点后有 His 标签,通过引物设计对读码框进行选择,可使融合蛋白正确表达后能继续表达 6 个 His,以有利于对表达产物的纯化。分别以 *Bam*H I、*Eco*R I 和 *Hind* III、*Eco*R I 双酶切鉴定的结果证明,720 bp 的 EGFP 基因和 321 bp 的 V_L 基因被克隆到表达载体 pTO-T7 中,构建为重组质粒 pTO-T7-EGFP- V_L (图 1)。对 pTO-T7-EGFP- V_L 进行序列测定表明,EGFP、 V_L 基因及读码框均正确无误。

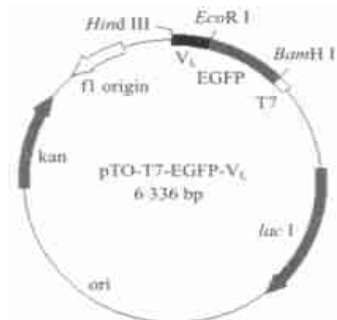


图 1 重组质粒 pTO-T7-EGFP- V_L 的构建

Fig 1 Construction of recombinant plasmid pTO-T7-EGFP- V_L

2.2 融合蛋白的表达与复性纯化 以重组质粒 pTO-T7-EGFP- V_L 转化大肠杆菌 ER2566, 分别于 15、20、25、30 和 37 用 IPTG 诱导表达。每隔 1 h 取样 1 次,用荧光和化学发光检测仪,在激发波长 485 nm、发射波长 510 nm 条件下,检测菌液的 RFI。结果表明,在同一温度下,随着诱导时间的增加,蛋白的表达量和菌液的荧光强度逐渐增加,但达到一定时间后,蛋白的表达量和菌液的荧光强度均稳定在一定水平不再继续增加。诱导温度与出现峰值的时间两者依次为: 37 4 h、30 6 h、25 8 h、20 10 h 和 15 15 h (图中未显示)。诱导后离心菌体发现,于 37 和 30 诱导后,菌体沉淀无肉眼可见的绿色荧光;而其他 3 个温度诱导后,菌体沉淀均呈明显的绿色荧光。荧光检测的结果也显示,诱导温度与菌液的荧光峰值之间呈现较明显的负相关 (图 2)。随着诱导温度的逐步提高,融合蛋白的表达产量也逐步提高,于 37 诱导时蛋白的表达量最高,而在 15 诱导时目的蛋白的表达量则相对较低 (图 3)。5 种温度诱导所产生的融合蛋白大部分以包涵体的形式存在,上清中蛋白的含量很低 (图中未显示)。于 15 诱导时菌体的荧光强度相对较高,但融合蛋白的产量很低,所以选用菌体的荧光强度较高而目的蛋

白的产量相对较高的诱导温度 (20), 作为最佳诱导温度。分离和洗涤在 20 条件下诱导的融合蛋白包涵体,目的蛋白主要溶解在 4 mol/L 尿素中,经逐步透析法可使变性蛋白复性 (图 4)。

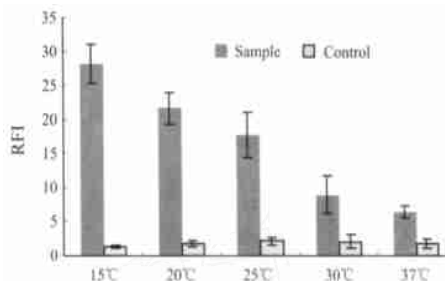


图 2 不同温度条件诱导后菌体的 RFI

Fig 2 RFI of thalluses after induction under the conditions of various temperatures

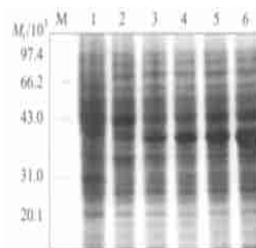


图 3 不同温度条件下诱导后表达的 EGFP- V_L 融合蛋白的 120 g/L SDS-PAGE

Fig 3 Identification of expressed fusion protein EGFP- V_L after induction under the conditions of various temperatures by 120 g/L SDS-PAGE

M: Protein marker; 1: pTO-T7 control; 2: Induction at 15; 3: Induction at 20; 4: Induction at 25; 5: Induction at 30; 6: Induction at 37.

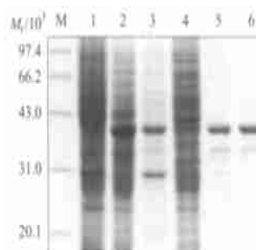


图 4 融合蛋白 EGFP- V_L 的表达和初步纯化

Fig 4 Expression and preliminary purification of the fusion protein EGFP- V_L (120 g/L SDS-PAGE)

M: Protein marker; 1: pTO-T7 control; 2: Induction at 20; 3: Precipitate after ultrasonication; 4: Supernatant after ultrasonication; 5: Fusion protein dissolved in 4 mol/L urea; 6: EGFP- V_L renatured after dialysis.

2.3 融合蛋白的荧光测定 以紫外分光光度计测得融合蛋白 EGFP- V_L 复性产物的浓度为 0.5 g/L, 纯化后 EGFP 蛋白的浓度为 1.0 g/L。由图 4 可见, EGFP- V_L 的复性产物中融合蛋白的含量在 80% 以上。以 PBS 稀释调整 EGFP- V_L 、EGFP 以及 EGFP- V_L 与 V_H 的等量混合物,使 3 种样品中 EGFP 的摩尔浓度均为 12

$\mu\text{mol/L}$ 。梯度稀释的荧光测定结果显示, EGFP 的摩尔浓度相同的 3 种样品的荧光强度, 均随蛋白浓度的下降而降低。EGFP- V_L 能保持荧光性质, 但与 V_L 融合之后, EGFP 的荧光强度与未融合表达的 EGFP 相比较有所下降。EGFP- V_L 与 V_H 等量混合后, 混合物仍能保持荧光性质, 且荧光强度并未因 V_H 的加入而降低(图 5)。

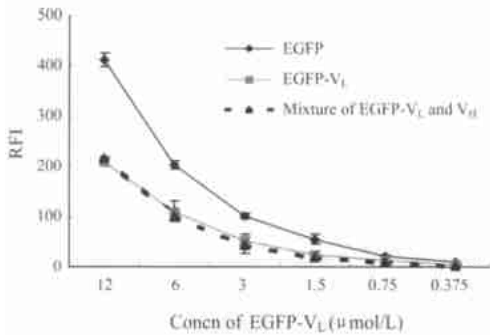


图 5 不同浓度的融合蛋白 EGFP- V_L 的 RFI

Fig 5 RFI of various concentrations of EGFP- V_L

2.4 融合蛋白抗原结合活性的竞争抑制 ELISA 测定

单独的 MA18/7 V_H 和 V_L , 以及单独的 EGFP- V_L , 均没有对 HBV pre-S1 抗原的结合活性; 而在 V_H 与 V_L 结合为 Fv 后, 即具有较好的抗原结合活性。融合蛋白 EGFP- V_L 与 V_H 的混合物也能与抗 pre-S1 mAb 竞争, 提示其可较好地结合 pre-S1。这说明 EGFP 与 V_L 基因的融合表达并不影响 V_L 与 V_H 的结合, 以及两者形成的 Fv 同抗原 pre-S1 的结合(图 6)。

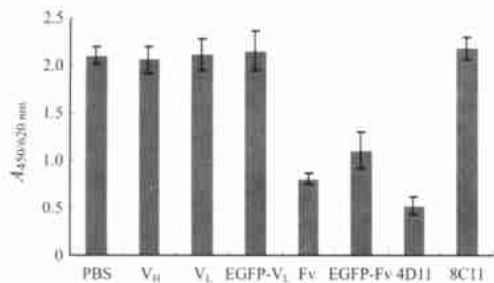


图 6 MA18/7 抗体 Fv 片段对 mAb 4D11 与 HBV pre-S1 抗原结合的竞争抑制作用

Fig 6 Competition of inhibition between Fv of MA18/7 and mAb 4D11 for binding to pre-S1 antigen

2.5 融合蛋白抗原结合活性的间接 ELISA 测定

将融合蛋白 EGFP- V_L (表达 6 个 His) 与 V_H (不表达 His tag) 混合后, 倍比稀释进行间接 ELISA 测定。结果表明, 原混合物的 A 值为 3.284, 提示其具有较好的结合抗原的活性。随着混合物的逐步稀释, 相应的 A 值也逐步降低, 说明混合物能够与 HBV preS1 21 ~ 47

表位特异性结合(图 7)。以上说明, 融合蛋白 EGFP- V_L 能够与 V_H 结合形成 Fv 片段; 而单独的 EGFP- V_L 则未显示出具有结合 HBV preS1 抗原的活性。

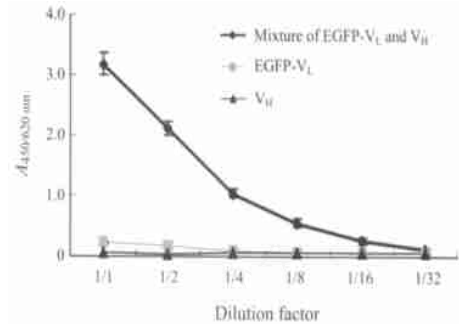


图 7 融合蛋白 EGFP- V_L 抗原结合活性的间接 ELISA 测定

Fig 7 Detection of antigen-binding activity of EGFP- V_L by indirect ELISA

3 讨论

本研究表明, GFP 基因与 MA18/7- V_L 融合表达的融合蛋白较好地保持了 GFP 的特性。GFP 的晶体结构显示, 其紧密的桶状型结构有助于保护其整体构象, 因此, 连接其他蛋白质分子后不易影响其自发荧光的特性^[2]。GFP 与 scFv 或其他多种不同的蛋白融合所产生的融合蛋白, 能较好地保持后者的生物学活性。GFP 的相对分子质量 (M_r) 为 27 000, 与之相比, scFv 的 M_r 很多要大于 GFP, 仅有部分与 GFP 相差不多。本研究中, MA18/7- V_L 片段的 M_r 仅为 12 000, 尚不足 GFP 的一半, 而其与 GFP 融合表达的小分子荧光抗体, 仍能较好地保持 V_L 与 V_H 形成的 Fv 与 HBV pre-S1 抗原的结合活性, 提示该融合蛋白的两个组成部分在融合表达后并没有产生明显的空间位阻, 使 V_L 的抗原结合位点得以很好的暴露。这也进一步证明 GFP 融合蛋白在应用上的广泛性。

抗体偶联 FITC 已被广泛应用于免疫荧光和流式细胞仪的荧光标记。但一方面 FITC 容易发生光漂白和非特异性标记, 另一方面由于抗原结合位点常有被 FITC 偶联的目标赖氨酸, 若偶联发生在抗原结合位点, 将会导致抗体部分或完全失去与抗原结合的能力。与之相比, GFP 的荧光效率高(可达 80%)、荧光稳定, 不易发生光漂白^[3], 而且抗体片段与 GFP 融合表达后抗体与荧光物之比是 1:1, 可最大限度地避免非特异性的荧光标记和游离荧光染料的存在。已有研究证实, GFP 与 scFv 融合表达所获融合蛋白 EGFP-scFv, 可应用在免疫荧光的研究中, 与目前最常用的荧光素标记抗体的免疫荧光方法相比较, 具有类似的灵敏度^[4]。我们以所获小分子荧光抗体作

为荧光反应物, 同样有可能在免疫荧光等方面获得理想的应用。在此基础上, 对抗体 F_V 分别与不同的目的基因融合表达, 既能使 V_L 、 V_H 结合获得特异性识别抗原的功能, 又能充分显示目的蛋白的生物学活性, 因此其具有重要的应用前景。

参考文献:

[1] 罗文新, 张 军, 杨海杰, 等. 一种带增强子的原核高效表达载体

的构建及初步应用[J]. 生物工程学报, 2000, 16(5): 578 - 581.

[2] Orm M, Cubitt AB, Kallio K, *et al.* Crystal structure of the aqueous victoria green fluorescent protein[J]. *Science*, 1996, 273: 1392 - 1395.

[3] Swaminathan R, Hoang CP, Verkman AS. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translation and rotational diffusion[J]. *Biophys J*, 1997, 72(4): 1900 - 1907.

[4] Casey JL, Coley AM, Tilley LM, *et al.* Green fluorescent antibodies: novel *in vitro* tools[J]. *Protein Eng*, 2000, 13(6): 445 - 452.

文章编号: 1007 - 8738(2004)04 - 0448 - 02

三种检测 SARS 抗体试剂盒的临床使用效果比较

石玉玲¹, 李林海¹, 李 平², 徐德兴¹, 马清钧², 曹 诚² (¹广州军区广州总医院检验科, 广东 广州 510010;²军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100850)

摘要

目的: 对重组双抗原夹心法 ELISA、全病毒间接法 ELISA 和免疫荧光分析法 3 种 SARS 抗体诊断试剂盒进行临床应用效果评价, 比较不同试剂的使用效果。方法: 使用 3 种试剂检测了 257 例临床确诊 SARS 患者的血清标本 279 例和其他非 SARS 患者标本 24 例、健康体检者血清标本 80 份。结果: 临床确诊 SARS 患者发病 1 ~ 20 d 的病例中双抗原夹心法 ELISA 检出率最高, 间接免疫荧光法与其接近, 全病毒间接法 ELISA 检出率最低。在发病 20 d 后, 三者检出率接近 (94% 左右), 3 种方法的符合率在 97% 以上。在 104 例非 SARS 病例中, 双抗原夹心法 ELISA 和免疫荧光法均未见出阳性结果, 全病毒间接法 ELISA 检出阳性结果 3 例, 假阳性率 2.9%。结论: 检测 SARS 抗体双抗原夹心法 ELISA 试剂盒、免疫荧光试剂盒具有类似的灵敏度和特异性, 其灵敏度和特异性高于全病毒间接法 ELISA。

关键词: 严重急性呼吸综合征 (SARS); 酶联免疫吸附试验 (ELISA); 免疫荧光分析

中图分类号: R563.803 文献标识码: B

严重急性呼吸综合征 (SARS) 的诊断具有重要意义, 抗体检测 (含 ELISA 和免疫荧光分析) 是目前主要的实验室诊断方法之一。本研究我们选用了通过国家检定的 3 种诊断试剂 (军事医学科学院微生物流行病学研究所研制的免疫荧光试剂

盒^[1]、华大基因生产的全病毒间接 ELISA 试剂及军事医学科学院生物工程研究所研制的双抗原夹心法 ELISA 诊断试剂盒), 进行 SARS 抗体的检测, 并比较了它们的使用效果。

1 材料和方法

1.1 材料来源 确诊 SARS 病例血清样本为我院、广州市第八人民医院、解放军第 177 医院及北京小汤山医院等收治的不同发病时间的 257 例患者的血清 279 例; 非 SARS 患者血清分别为我院收治的其他呼吸道患者血清 (24 例)、健康体检者血清 (80 例) 作为对照、另外收集到的血清标本包括密切接触 SARS 患者的医务人员 (109 例), 广州市儿童医院收治的非 SARS 儿童病例 259 例。

1.2 检测方法 全病毒间接法 ELISA 采用 GBI 试剂盒, 免疫荧光法检测使用军事医学科学院微生物流行病学研究所免疫荧光试剂检测, 双抗原夹心法 ELISA 使用军事医学科学院生物工程研究所研制的试剂。均严格按其说明书同时进行操作^[1-4]。

2 结果

2.1 双抗原夹心法 ELISA 试剂盒的使用效果 使用双抗原夹心法 ELISA 试剂检测临床上 SARS 患者及不同来源标本的检出结果如表 1 所示。表中发病时间指从发病到采血间的天数。结果表明, 在临床确诊 SARS 病例血清样本中, 发病 1 ~ 10 d, 检出率为 40%; 发病 11 ~ 20 d, 检出率近 90%; 发病 21 d 以上检出率达 93% 左右。在 472 例非 SARS 患者、健康人和密切接触者中, 仅在儿童患者中检出 2 例弱阳性, 非特异性 < 0.5%。回访早期检测为阴性或弱阳性病例 18 例, 除 1 例 13 d 复检时仍未阳转之外, 其他 17 例均转为阳性。

2.2 双抗原夹心法 ELISA、全病毒间接法 ELISA 和免疫荧光法的特异性比较 健康体检者 80 人, 非 SARS 呼吸道患者 24 例, 同时使用 3 种试剂检测。结果显示双抗原夹心法 ELISA 和免疫荧光法均为阴性; 全病毒间接法 ELISA 出现 3 例阳性, 假阳性率 2.9%。因此, 双抗原夹心法 ELISA 和免疫荧光法特异性高于全病毒间接法 ELISA。

收稿日期: 2004 - 04 - 23; 修回日期: 2004 - 05 - 10

作者简介: 石玉玲 (1953 -), 女, 云南昆明人, 主任医师。

Tel: (020) 61653462