



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111978378 A

(43) 申请公布日 2020.11.24

(21) 申请号 202010794514.4

(22) 申请日 2020.08.10

(71) 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山
武汉大学

(72) 发明人 徐可 郑雨澄 唐笛霄 宋坤

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务
所(特殊普通合伙) 42222

代理人 彭劲松

(51) Int. Cl.

C07K 14/165 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

序列表1页 附图6页

(54) 发明名称

SARS-CoV-2抗原多肽及其应用

(57) 摘要

本发明公开了SARS-CoV-2抗原多肽及其应用。涉及4种SARS-CoV-2多肽抗原及其应用,其氨基酸序列为SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4或者其衍生序列。本发明筛选出的抗原表位可用于检测SARS-CoV-2病毒抗体,具有高特异性和准确性,具有临床诊断的应用价值,在防控SARS-CoV-2病毒感染方面起到积极有效的作用。

1. 一种SARS-CoV-2抗原多肽,其特征在于,其氨基酸序列如SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3、SEQ ID NO.4所示;或者具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4经过一个或多个氨基酸残基取代、缺失或添加而形成的氨基酸序列。
2. 一种用于检测SARS-CoV-2抗体的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒以权利要求1所述的SARS-CoV-2抗原多肽中的1种或者多种为检测抗原。
3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒以权利要求1中氨基酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的抗原多肽联合作为检测抗原。
4. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒以权利要求1中氨基酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的抗原多肽联合作为检测抗原。
5. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒以权利要求1中4种抗原多肽联合作为检测抗原。
6. 根据权利要求2-5任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包含一个或多个固体载体。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒为ELISA检测试剂盒,所述固体载体为酶标板。
8. 根据权利要求7所述检测试剂盒,其特征在于,还包含以下试剂:酶标抗体、10X洗涤液、阳性对照、阴性对照、TMB底物溶液和终止液。
9. 权利要求1所述的SARS-CoV-2抗原多肽在制备检测SARS-CoV-2抗体的试剂中的应用。
10. 一种检测SARS-CoV-2抗体的检测方法,其特征在于,利用权利要求1所述一种或多种SARS-CoV-2抗原多肽包被酶标板,以ELISA法检测抗SARS-CoV-2抗体。

SARS-CoV-2抗原多肽及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫生物学技术领域,具体涉及SARS-CoV-2抗原多肽及其应用。

背景技术

[0002] 新型冠状病毒肺炎 (COVID-19) 是由2019新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 所引起。2020年1月30日,世界卫生组织宣布COVID-19为国际关注的第六次公共卫生突发事件。SARS-CoV-2是一种有包膜的单股正链RNA病毒,属于冠状病毒家族的β属。SARS-CoV-2的基因组大小从29.8kb到29.9kb不等,其基因组结构遵循已知冠状病毒的特定基因特征。5'中超过三分之二的基因组为orf1ab,编码orf1ab多蛋白,而3'三分之一由编码结构蛋白的基因组成,包括刺突蛋白 (spike protein, S), 包膜蛋白 (envelope protein, E), 膜糖蛋白 (membrane glycoprotein, M) 和核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N)。此外, SARS-CoV-2包含6个辅助蛋白,分别由ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b和ORF8基因编码。(Khailany et al. Genomic characterization of a novel SARS-CoV-2. Gene Reports. 2020, 19:100682)

[0003] 截至2020年7月4日,全球累计报告了超过1092万例确诊的COVID-19病例。该病最常见的临床表现是发烧,乏力和干咳,有些患者可能出现鼻塞,流鼻涕和腹泻。呼吸困难通常发生在发病后的一个星期,部分患者可迅速进展为感染性休克,急性呼吸窘迫综合征 (ARDS), 难治性代谢性酸中毒和凝血功能障碍。随着时间的推移,随着监测和接触筛查的增加,越来越多的无症状个体被发现。无症状个体的出现增加了筛查的难度,并且无症状患者已被证明具有传染性,因此构成了重大的感染控制挑战。(Ma et al. Characteristics of asymptomatic patients with SARS-CoV-2 infection in Jinan, China. Microbes Infect. 2020, S1286-4579 (20) 30078-2)

[0004] 病毒感染的可靠诊断是公共卫生管理的最紧迫事项之一。目前用于诊断COVID-19的标准实验室测试是逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR), 用于检测病毒RNA。但是,如果采样不正确以及感染前期病毒滴度过低,可能会造成RT-PCR的假阴性结果。RT-PCR还需要复杂的设备和高标准的实验室质量保证,操作不够方便且得到结果所需时间长。(Martinelli et al. Application of a portable instrument for rapid and reliable detection of SARS-CoV-2 infection in any environment. Immunol Rev. 2020, 10.1111)

[0005] 由于RT-PCR的局限性,免疫测定法可以提供另一条途径来减少未确诊的COVID-19病例,其优点是快速的检测形式可以在相对较短的时间内和较低的成本下提供结果,这些测定主要针对免疫原性结构蛋白:S蛋白和N蛋白。冠状病毒是一个大型病毒家族,其中, hCoV-229E、hCoV-OC43、hCoV-NL63和hCoV-HKU1致病性相对较弱,在人群中持续存在,分布于全世界各个地区,常于冬季和早春引起人呼吸道感染系列症状,包括高发病率的肺炎和支气管炎。目前已有大量研究提示,不同种冠状病毒N蛋白或S蛋白存在免疫交叉反应。尤其是COVID-19暴发于上感流行季节,大量的hCoV-229E、hCoV-OC43、hCoV-NL63和hCoV-HKU1病毒感染引起的上感患者可影响SARS-CoV-2抗体的检测结果。因此验证当前针对SARS-CoV-2的免疫测定的特异性和敏感性至关重要 (Lee et al. Serological Approaches for

COVID-19: Epidemiologic Perspective on Surveillance and Control. *Front Immunol.* 2020, 11: 879)。由于目前批准的抗体 (IgM/IgG) 检测试剂盒的特异性 (与其他冠状病毒的交叉反应) 和灵敏度仍有待提高。将抗原进行分解, 鉴定出优势的B细胞表位, 以这些表位作为多肽抗原进行抗原抗体反应, 可以进一步提高免疫反应的特异性和灵敏度。到目前为止, 尚未发现优化后的特异性多肽用于SARS-CoV-2患者的检测报道。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种具有高抗原性的SARS-CoV-2特异抗原多肽。使用DiscoTope 2.0软件, 通过分析从PDB数据库中获得的S蛋白三维结构信息, 得到7个预测的S蛋白构象表位。使用Bepipred Linear Epitope Prediction 2.0服务器, 通过分析从NCBI数据库中获得的S蛋白和N蛋白氨基酸序列, 得到34个预测的S蛋白线性表位和11个预测的N蛋白线性表位。再使用Emini Surface Accessibility Prediction服务器, 通过分析从NCBI数据库中获得的S蛋白和N蛋白氨基酸序列, 得到19个预测的S蛋白线性表位和11个预测的N蛋白线性表位。分析比对三种软件预测出的S蛋白抗原表位结果中重叠的序列, 并控制多肽长度为11-15个氨基酸, 根据抗原表位的打分最高原则, 选择最有优势的四段B细胞表位, 分别命名为S1和S2, 以及N1和N2。通过比对其他人患冠状病毒对应氨基酸序列的同源性发现, S1多肽与SARS-CoV序列同源性较高为67%, 与其他冠状病毒的同源性较低, 为25%-31%不等。S2多肽与其他人患冠状病毒序列同源性较低, 与SARS-CoV、HCoV-229E、HCoV-HKU1和HCoV-OC43同源性为45%, 与其他冠状病毒同源性为27% (表1)。N1多肽与SARS-CoV序列同源性很高, 为91%, 与MERS-CoV序列同源性为45%, 与其他人患冠状病毒同源性较低, 为0-18%不等。N2多肽与SARS-CoV序列同源性很高为82%, 与其他冠状病毒的同源性较低, 为0-18%不等 (表2)。综上, 这些抗原多肽具有适合检测抗体的免疫原性, S1和S2肽段提供了针对SARS-CoV-2的特异性表位, 而N1和N2虽然可能与SARS-CoV产生交叉反应, 但对其他冠状病毒同源性较低, 也可以提供相对特异的抗原表位。因此, 上述肽段适用于SARS-CoV-2血清抗体的ELISA检测技术。

[0007] 表1 S1和S2多肽与其他人患冠状病毒序列同源性比较

人患冠状病毒	与 SARS-CoV-2 S1 氨基酸同源性	与 SARS-CoV-2 S2 氨基酸同源性
SARS-CoV	67%	45%
HCoV-229E	31%	45%
[0008] HCoV-HKU1	31%	45%
MERS-CoV	31%	27%
HCoV-OC43	25%	45%
HCoV-NL63	25%	27%

[0009] 表2 N1和N2多肽与其他人患冠状病毒序列同源性比较

	人患冠状病毒	与 SARS-CoV-2 N1 氨基酸同源性	与 SARS-CoV-2 N2 氨基酸同源性
[0010]	SARS-CoV	91%	82%
	MERS-CoV	45%	18%
	HCoV-HKU1	18%	18%
	HCoV-OC43	9%	9%
[0011]	HCoV-229E	9%	0
	HCoV-NL63	0	9%

[0012] 为了达到上述目的,本发明的技术方案如下:

[0013] 本发明提供了一种SARS-CoV-2特异抗原多肽,其中S1和S2位于S蛋白上,其氨基酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示,N1和N2位于N蛋白上,其氨基酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示;或者具有SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4经过一个或多个氨基酸残基取代、缺失或添加而形成的氨基酸序列;上述抗原多肽的氨基酸序列分别如下:

[0014] SEQ ID NO.1:PLQSYGFQPTNGVGY

[0015] SEQ ID NO.2:KQIYKTPPIKD

[0016] SEQ ID NO.3:EPKKDKKKKAD

[0017] SEQ ID NO.4:QALPQRQKKQQ。

[0018] 与本发明有关的多肽序列,可通过任何已有的体外多肽合成设备和不同技术原理人工合成。其获得方法主要有以下步骤,包括多肽的合成,纯化以及最后产品的收集,这些技术已经成熟并程式化,在相关领域被广泛应用。

[0019] 本发明提供一种用于特异性检测SARS-CoV-2抗体的试剂盒,所述试剂盒以权利要求1所述的SARS-CoV-2抗原多肽中的1种或者多种为检测抗原。

[0020] 优选地,上述试剂盒以权利要求1中氨基酸序列如SEQ ID NO.1和SEQ ID NO.2所示的抗原多肽联合作为检测抗原。

[0021] 优选地,上述试剂盒以权利要求1中氨基酸序列如SEQ ID NO.3和SEQ ID NO.4所示的抗原多肽联合作为检测抗原。

[0022] 优选地,上述试剂盒以权利要求1中全部抗原多肽联合作为检测抗原。

[0023] 优选地,上述试剂盒还包含一个或多个固体载体。

[0024] 在本发明中,对固体载体没有特殊限制,只要是作为固体或不溶性材料(例如是可以通过过滤、沉淀、磁性分离等从反应混合物中分离的材料)的载体即可。

[0025] 构成固体载体的材料包括但不限于:硅胶(聚二甲基硅氧烷,PDMS)、纤维素、特氟隆TM、硝基纤维素、琼脂糖、葡聚糖、壳聚糖、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚酯、聚碳酸酯、聚酰胺、聚丙烯、尼龙、聚偏二氟乙烯、胶乳、二氧化硅、玻璃、玻璃纤维、金、铂、银、铜、铁、不锈钢、铁氧体、硅晶片、聚乙烯、聚乙烯亚胺、聚乳酸、树脂、多糖类、蛋白(白蛋白等)、碳或它们的组合等。

[0026] 固体载体的形状包括但不要限于:珠子、磁珠、薄膜、微细管、滤膜、板、微量板、碳

纳米管、传感器芯片等。正如本技术领域公知的那样，薄膜或板等平坦的固体载体上可以设置凹坑、沟槽、滤膜底部等。

[0027] 磁珠可以具有约25nm~约1mm范围的球体直径。在优选的实施方式中，磁珠具有约50nm~约10 μ m范围的直径。磁珠的尺寸可以根据特定的用途来进行选择。由Sepharose等高交联球形琼脂糖制成的珠子具有约24 μ m~约165 μ m范围的直径。优选地，高交联球形琼脂糖珠具有约24 μ m~约44 μ m范围的直径。高交联球形琼脂糖珠的尺寸可以根据特定的用途来进行选择。

[0028] 具有疏水性表面的固体载体的例子包括可从Polysciences, Warrington, PA或Spherotech, Liberville, IL购买的制品等聚苯乙烯胶乳珠。

[0029] 二氧化硅(SiO₂)-处理或二氧化硅(SiO₂)基的固体载体的例子包括可从Polysciences, Warrington, PA购买的超常磁性二氧化硅珠等。或者，还可以使用可从DynaL Biotech购买的M-280等。

[0030] 具有亲水性表面的磁珠，作为磁珠的例子，可以列举出Polysciences, Warrington, PA销售的珠子(名称: Biomag (注册商标) 羧基)、或者Bangs Laboratory, Inc., Fishers, IN的名称为MC02N/2928的珠子，或者可以使用DynaL Biotech销售的M-270等。

[0031] 优选地，所述试剂盒为ELISA检测试剂盒，包含包被上述特异性反应性抗原多肽中的1种或者多种的固体载体，所述固体载体优选为酶标板。

[0032] 优选地，所述检测试剂盒还包含以下试剂：酶标抗体、10X洗涤液、阳性对照、阴性对照、TMB底物溶液和终止液。

[0033] ELISA法即酶联免疫吸附测定，利用抗原多肽与待测溶液中的SARS-CoV-2抗体特异性地结合，然后加入酶标二抗，酶标二抗与待测抗体结合，加入酶底物呈色，最后读取波长为450nm的OD值，即可得出待测抗体含量。具体步骤包括：

[0034] (1) 进行抗原多肽的包被；

[0035] (2) 加入待测的SARS-CoV-2抗体；

[0036] (3) 洗去多余待测抗体，加入酶标二抗，与待测抗体结合；

[0037] (4) 洗去多余未结合的酶标二抗，加入酶底物反应呈色；

[0038] (5) 在450nm处读取OD值。

[0039] 这些步骤并不是一成不变的，本领域的普通技术人员可以根据实际情况进行合理修改，使之符合应用要求。

[0040] 本发明还提供了上述SARS-CoV-2特异抗原多肽在制备检测SARS-CoV-2抗体的试剂盒中的应用。

[0041] 本发明的技术方案达到了如下的有益效果：

[0042] 本发明制备了4种SARS-CoV-2抗原多肽，其中2条位于S蛋白(S1和S2)，2条位于N蛋白(N1和N2)。根据氨基酸序列合成设计的4种多肽可以应用于SARS-CoV-2的抗体检测，与目前通常使用的SARS-CoV-2核酸检测手段相比，此方法具有快速安全可靠，降低检测成本，可操作性高的优点；此外，选取抗原性强的序列进行抗原多肽人工合成，克服了常规ELISA中包被抗原不纯而带来的非特异性反应，提高检测的特异性。作为优化后的特异性多肽，是将蛋白抗原进一步分解为B细胞表位多肽，可提高反应的特异性和灵敏性。本发明4种SARS-CoV-2抗原多肽可进行肽段自由组合，能提高针对COVID-19患者血清抗体检测的灵敏度。在

防控SARS-CoV-2病毒感染方面起到积极有效的作用。

附图说明

[0043] 图1不同稀释倍数的血清样品与S1多肽的反应。将病人#1和正常人的血清样品分别进行1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000稀释,再用S1多肽作为抗原包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0044] 图2不同稀释倍数的血清样品与S2多肽的反应。将病人#1和正常人的血清样品分别进行1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000稀释,再用S2多肽作为抗原包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0045] 图3不同稀释倍数的血清样品与N1多肽的反应。将病人#1和正常人的血清样品分别进行1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000稀释,再用N1多肽作为抗原包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0046] 图4不同稀释倍数的血清样品与N2多肽的反应。将病人#1和正常人的血清样品分别进行1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000稀释,再用N2多肽作为抗原包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0047] 图5以S1多肽为抗原检测COVID-19病人血清中的抗体。将病人#1、#2、#3和正常人的血清样品进行1:2000稀释。用S1多肽作为抗原包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0048] 图6以S2多肽为抗原检测COVID-19病人血清中的抗体。将病人#1、#2、#3和正常人的血清样品进行1:2000稀释。用S2多肽作为抗原包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0049] 图7以N1多肽为抗原检测COVID-19病人血清中的抗体。将病人#1、#2、#3和正常人的血清样品进行1:2000稀释。用N1多肽作为抗原包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0050] 图8以N2多肽为抗原检测COVID-19病人血清中的抗体。将病人#1的血清进行1:4000稀释,将病人#2、#3和正常人的血清样品进行1:2000稀释。用N2多肽作为抗原包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0051] 图9以S1多肽+S2多肽为抗原组合检测COVID-19病人血清中的抗体。将病人#1、#2、#3和正常人的血清样品进行1:2000稀释。用S1多肽和S2多肽作为抗原一起包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0052] 图10以N1多肽+N2多肽为抗原组合检测COVID-19病人血清中的抗体。将病人#1的血清进行1:4000稀释,将病人#2、#3和正常人的血清样品进行1:2000稀释。用N1多肽和N2多肽作为抗原一起包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0053] 图11以S1多肽+S2多肽+N1多肽+N2多肽为抗原组合检测COVID-19病人血清中的抗体。将病人#1的血清进行1:4000稀释,将病人#2、#3和正常人的血清样品进行1:2000稀释。用S1多肽、S2多肽、N1多肽和N2多肽作为抗原一起包被,分别进行ELISA测定OD450值。

[0054] 以上实验每组重复三次,结果以均值的形式展示。Control为正常人, Patient为COVID-19病人。*表示两组数据统计学上具有显著性差异 ($p < 0.05$); **表示两组数据统计学上具有极显著性差异 ($p < 0.01$); ***表示两组数据统计学上具有极其显著差异 ($p < 0.001$), ****表示两组数据统计学上具有特显著性差异 ($p < 0.0001$)。

具体实施方式

[0055] 通过以下详细说明结合附图可以进一步理解本发明的特点和优点。所提供的实施例仅是对本发明方法的说明,而不以任何方式限制本发明揭示的其余内容。

[0056] I材料和方法

[0057] ELISA板的预包被

[0058] 向96孔板每孔加入100 μ L 0.025mg/mL的链霉亲和素,37 $^{\circ}$ C孵育过夜。第二天每孔加250 μ L的0.05%的PBST,进行洗涤。洗涤5次,每次5分钟。再每孔加270 μ L的0.4%明胶,37 $^{\circ}$ C孵育2小时,进行封闭。每孔加250 μ L的0.05%的PBST,进行洗涤。洗涤5次,每次5分钟。

[0059] 多肽的包被

[0060] 用0.4%明胶稀释抗原多肽,使终浓度为1 μ g/mL,再向96孔酶标板的各孔加入100 μ L,使每孔最终含有100ng抗原多肽。37 $^{\circ}$ C孵育2小时。每孔加250 μ L的0.05%的PBST,进行洗涤。洗涤5次,每次5分钟。再向每孔加入270 μ L的5%脱脂牛奶,进行封闭,37 $^{\circ}$ C孵育2小时。

[0061] 血清样品的稀释

[0062] 用5%脱脂牛奶对血清样品进行不同倍数的稀释。

[0063] 用血清样品进行ELISA反应

[0064] 稀释血清样品,并将正常人的血清稀释相同倍数作为对照。每孔加入100 μ L已经稀释的血清,在37 $^{\circ}$ C孵育2小时。每孔加250 μ L的0.05%的PBST,进行洗涤。洗涤5次,每次5分钟。

[0065] 再用5%脱脂牛奶将酶标二抗1:6000稀释,每孔加入100 μ L,在37 $^{\circ}$ C孵育1小时。每孔加250 μ L的0.05%的PBST,进行洗涤。洗涤5次,每次5分钟。

[0066] 再向每孔加入100 μ L的酶作用底物(Hcm TMB One),避光,室温放置至明显变蓝,加入1N HCl终止反应。放入酶标仪中检测OD450的值。

[0067] II 实施例

[0068] 实施例1本发明特异抗原多肽具有极高的抗原性

[0069] 为了验证设计的四种特异抗原多肽具有极高的抗原性,即和对应抗体结合的能力,将设计的四种特异抗原多肽与不同稀释倍数的血清样品进行ELISA反应。

[0070] 取1号新冠病人(#1)的血清样品,分别进行1:500、1:1000、1:2000、1:4000和1:8000稀释。用正常人的血清作为对照,也按相应倍数稀释。然后分别与S1、S2、N1、N2四种抗原多肽进行抗原抗体反应,使用酶联免疫反应(ELISA)检测抗体对四种多肽的反应强度。

[0071] 实验结果如图1-4所示。可以看出,在上述相应的稀释倍数下,四种抗原多肽与病人#1血清反应的OD450值和与正常人血清反应的OD450值之间存在显著性差异。将病人血清稀释至1:8000时,多肽对病人血清的反应强度显著高于多肽与正常人血清的反应强度,这说明四种抗原多肽具有较高的抗原性,可以应用于高灵敏度检测COVID-19病人血清中的抗体。

[0072] 实施例2本发明特异抗原多肽应用于检测新冠病人抗体水平具有较好的普遍性

[0073] 为了验证本发明设计的四种抗原多肽能对于不同患者血清都产生普遍性的抗原抗体反应,本实施例使用来自三名患者的血清样品进行实验。

[0074] 取1号、2号、3号新冠病人(#1、#2、#3)的血清样品进行实验,并用正常人血清作为对照。除了与N2抗原多肽反应时将1号新冠病人(#1)的血清样品按1:4000稀释,其他的病人

血清样品和正常人血清都按1:2000稀释。

[0075] 实验结果如图5-8所示。可以看出,来自三名新冠病人的血清样品与四种抗原进行ELISA检测,与正常人血清ELISA结果相比都有显著性差异,说明四种多肽抗原可普遍性识别不同病人的感染血清,四种抗原肽可普遍应用于检测COVID-19患者的血清抗体。

[0076] 实施例3本发明特异抗原多肽的相互组合能用于抗体检测

[0077] 为了验证将本发明设计的四种抗原多肽之间相互组合也能用于抗体检测,本实施例将四种抗原多肽进行组合,再与三名患者的血清样品进行实验。

[0078] 组合1:S1抗原多肽和S2抗原多肽组合,如图9所示。

[0079] 组合2:N1抗原多肽和N2抗原多肽组合,如图10所示

[0080] 组合3:S1、S2、N1、N2抗原多肽一起组合,如图11所示。

[0081] 为保证与单独使用多肽的可比性,实验中每种抗原多肽组合以后的总质量与单独使用一种多肽的质量相同,即每孔抗原多肽总质量为100ng。多肽组合与三位病人血清样品都要进行反应,并用正常人血清作为对照。其中,与抗原多肽的组合1进行反应时,将病人血清样品和正常人血清都按1:2000稀释。与抗原多肽的组合2或组合3进行反应时,将1号新冠病人(#1)的血清样品按1:4000稀释,其他新冠病人血清样品和正常人血清都按1:2000稀释。

[0082] 实验结果如图9-11所示。由图9可以看出,S1多肽和S2多肽组合之后进行ELISA检测,与三位新冠患者血清反应的OD450值和与正常人反应的OD450值之间都存在极大的显著性差异(和1号、3号病人之间 $P < 0.0001$,和2号病人之间 $p < 0.001$),与单独使用多肽S1或者S2相比,和正常人血清间的显著性差异增加,说明S1多肽和S2多肽组合之后再反应,具有更高的检测的灵敏度。而图10和图11表明的结论与图9一致,N1多肽和N2多肽组合,以及S1、S2、N1和N2四个多肽一起组合,与单独使用的多肽相比,和正常人血清间都有更高的显著性差异(和1号、3号病人之间 $P < 0.0001$,和2号病人之间 $p < 0.001$),说明将抗原多肽组合后再进行血清检测,灵敏度提高。

[0083] 综上所述,四种抗原多肽相互组合之后可以获得更优的检测效果,能够更显著的区分新冠病人血清和正常人血清,且这种更高灵敏度在不同病人间普遍存在。说明可以将四种抗原多肽进行组合,可普遍应用于高灵敏地检测COVID-19患者的血清抗体。

序列表

<110> 武汉大学
 <120> SARS-CoV-2抗原多肽及其应用
 <160> 4
 <170> SIPOSequenceListing 1.0
 <210> 1
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 1
 Pro Leu Gln Ser Tyr Gly Phe Gln Pro Thr Asn Gly Val Gly Tyr
 1 5 10 15
 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 2
 Lys Gln Ile Tyr Lys Thr Pro Pro Ile Lys Asp
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 3
 Glu Pro Lys Lys Asp Lys Lys Lys Lys Ala Asp
 1 5 10
 <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 4
 Gln Ala Leu Pro Gln Arg Gln Lys Lys Gln Gln
 1 5 10

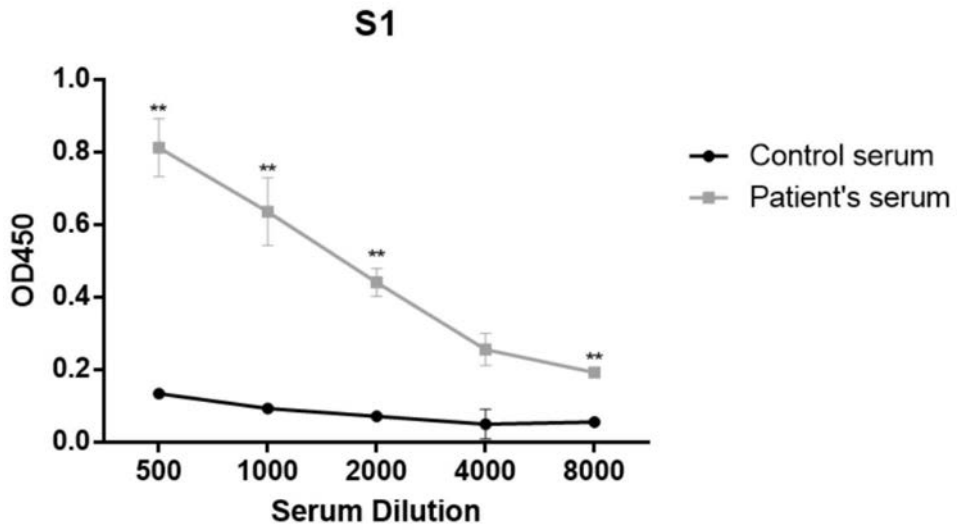


图1

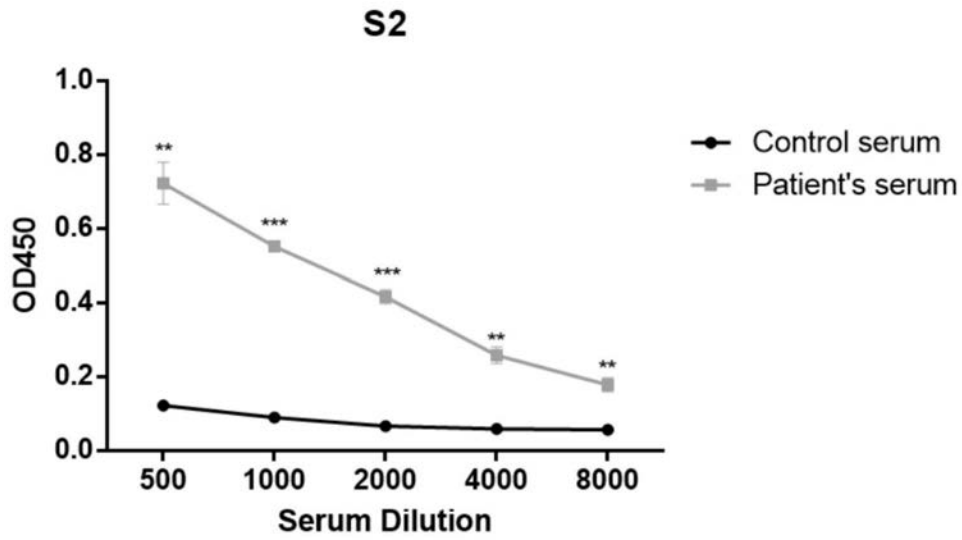


图2

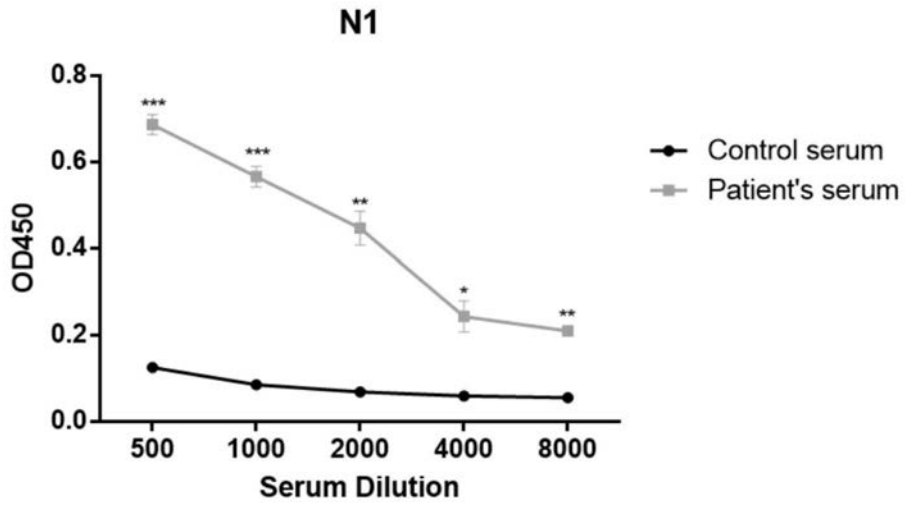


图3

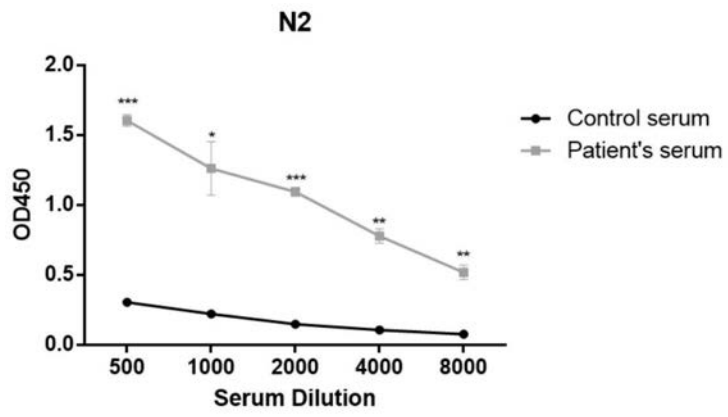


图4

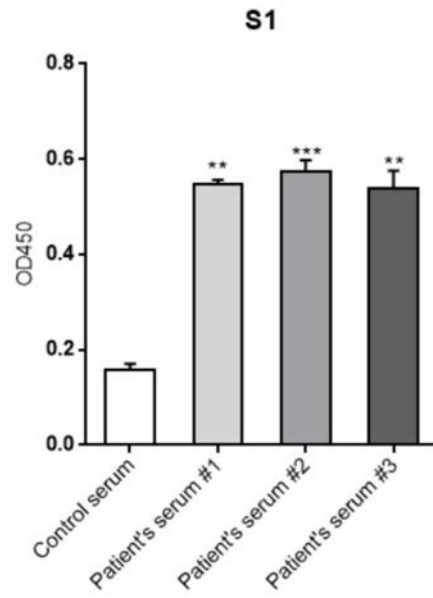


图5

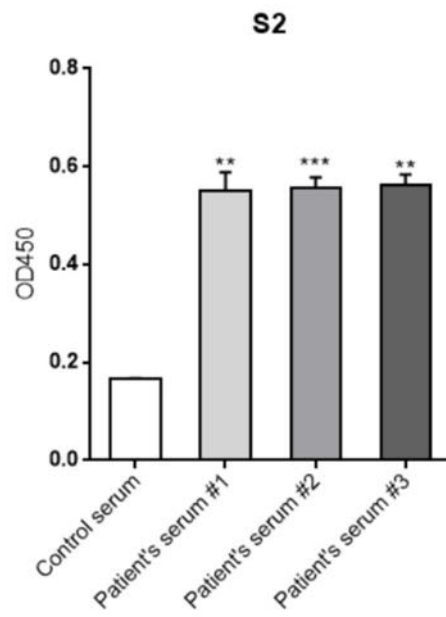


图6

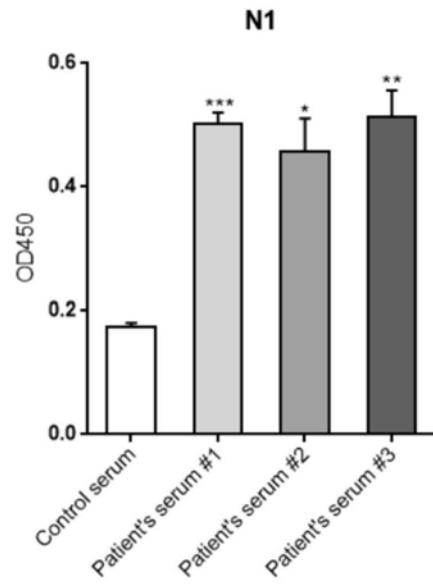


图7

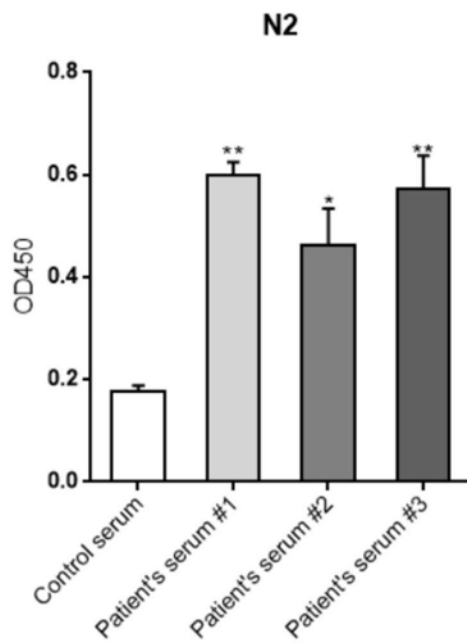


图8

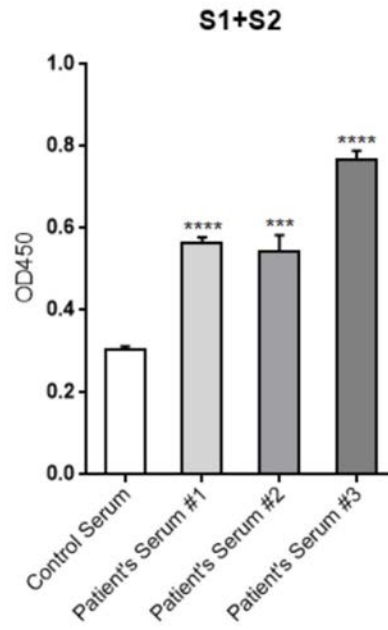


图9

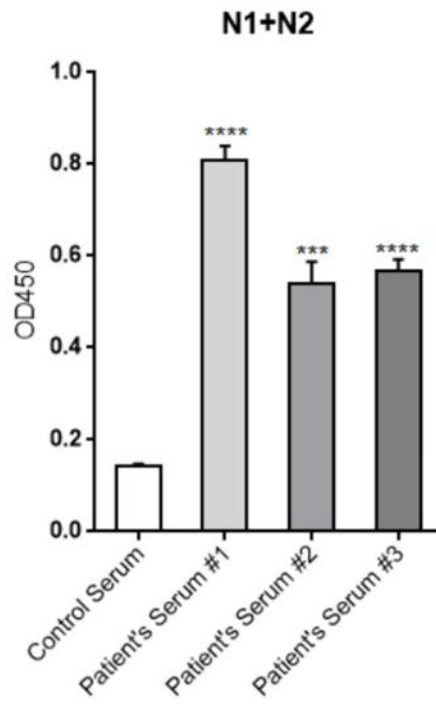


图10

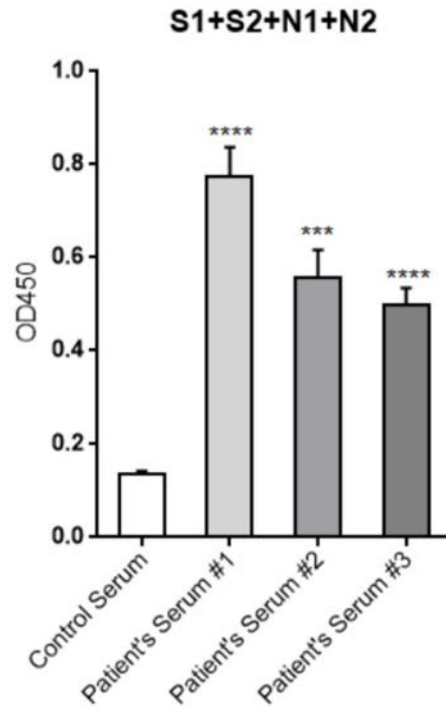


图11