



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113624965 B

(45) 授权公告日 2024.02.09

(21) 申请号 202110895268.6

CN 112034174 A, 2020.12.04

(22) 申请日 2021.08.05

CN 112625136 A, 2021.04.09

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 112798678 A, 2021.05.14

申请公布号 CN 113624965 A

CN 112946261 A, 2021.06.11

CN 112964873 A, 2021.06.15

(43) 申请公布日 2021.11.09

黄炎等. 新型冠状病毒(COVID-19)的检测和诊断. 化学进展. 2020, 第32卷(第09期), 1241-1251.

(73) 专利权人 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

GEMMA E. HARTLEY等. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. SCIENCE IMMUNOLOGY. 2020, 第5卷(第54期), 1-14.

地址 100071 北京市海淀区太平路27号院

(72) 发明人 李林 李韩平 郭垚霖 李天一 刘永健 韩婧婉 贾磊 王晓林 李敬云

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 白艳

王宇航; 蔡芸; 梁蓓蓓; 王瑾; 王睿. COVID-19 细胞因子风暴的预警与治疗进展. 中国新药杂志. 2020, (13), 78-83.

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

张家佳; 蒋磊; 芮贝贝; 陈毅; 刘锋. 19例新型冠状病毒肺炎患者用药分析. 中国药业. 2020, (第07期), 第60-63页.

(56) 对比文件

CN 112630428 A, 2021.04.09

Jennifer L. Yates等. Serological analysis reveals an imbalanced IgG subclass composition associated with COVID-19 disease severity. 《Cell Reports Medicine》. 2021, 第2卷第1-11, e1-e4页及支撑材料.

CN 112920278 A, 2021.06.08

CN 112305218 A, 2021.02.02

CN 111351927 A, 2020.06.30

CN 111549177 A, 2020.08.18

WO 2021022256 A1, 2021.02.04

CN 111562369 A, 2020.08.21

CN 111999507 A, 2020.11.27

审查员 石维平

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

N蛋白特异性IgG4在甄别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中的应用

(57) 摘要

本发明公开了N蛋白特异性IgG4在甄别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中的应用。本发明提供了用于检测新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4的物质在制备鉴别新型冠状病毒感染者和新型冠状病毒疫苗接种者的产品中的应用。IgG4在鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中的新用途及能够用于ELISA、Western Blot法、快速检测

试纸条等抗体检测方法中,具有极好的特异性和抗原亲和力,应用前景十分广阔。本发明的ELISA方法在新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中实现了良好的区别能力,能快速将新冠肺炎感染者从疫苗接种群中鉴别出来,弥补现有技术不能区分新冠病毒感染者和疫苗接种者的缺陷。

CN 113624965 B

1. 用于检测新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4的物质在制备筛查或辅助筛查新型冠状病毒感染者的产品中的应用;所述筛查的待测群体为候选新型冠状病毒感染者和新型冠状病毒疫苗接种者。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述物质包括可以为诱导新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4产生的抗原及与IgG4特异结合的抗体。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于:所述抗原为新冠肺炎病毒N蛋白;  
和/或,所述抗体为IgG4的抗体。

4. 根据权利要求1-3任一所述的应用,其特征在于:  
所述产品为ELISA试剂盒、Western Blot检测试剂盒、试纸条、免疫荧光试剂盒或免疫印迹试剂盒。

## N蛋白特异性IgG4在甄别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测领域,具体涉及N蛋白特异性IgG4在甄别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中的应用。

### 背景技术

[0002] 2019年底爆发的新型肺炎(现称为COVID-19)是由冠状病毒SARS-CoV-2引起的。COVID-19患者多表现为发热、咳嗽等轻度或中度症状,重度患者可发展为急性呼吸窘迫综合征、急性心脏损伤、多器官衰竭和继发性感染。治愈的患者也会存在不可逆转的肺部纤维化,生殖系统和造血系统也会发生潜在损害。

[0003] 接种疫苗被视为防控疫情、保障大众生命健康最有效的手段,目前,全球多款新型冠状病毒疫苗通过审批并投入使用。伴随新型冠状病毒疫苗接种范围的扩大,可能存在某些不良分子假借接种疫苗之名隐瞒感染史,危害公共安全等潜在问题。因此建立一种快速鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者的新方法对今后追溯感染源和公共卫生监测具有重大意义。

### 发明内容

[0004] 本发明一个目的是提供用于检测新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4的物质的用途。

[0005] 本发明提供的用于检测新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4的物质在制备鉴别或辅助鉴别新型冠状病毒感染者和新型冠状病毒疫苗接种者的产品中的应用。

[0006] 本发明还提供了用于检测新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4的物质在制备筛查或辅助筛查新型冠状病毒感染者的产品中的应用。

[0007] 上述筛查的待测群体为候选新型冠状病毒感染者和新型冠状病毒疫苗接种者。

[0008] 上述应用中,所述物质可以为诱导新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4产生的抗原及与IgG4特异结合的抗体;

[0009] 在本发明的实施例中,所述物质包括抗原和抗体;

[0010] 所述抗原为新冠肺炎病毒N蛋白;

[0011] 所述抗体为IgG4的抗体,具体为HRP-小鼠抗人IgG4。

[0012] 上述应用中,所述产品为ELISA试剂盒、Western Blot检测试剂盒、试纸条、免疫荧光试剂盒或免疫印迹试剂盒。

[0013] 上述新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4在作为鉴别或辅助鉴别新型冠状病毒感染者和新型冠状病毒疫苗接种者的标志物中的应用也是本发明保护的范畴。

[0014] 本发明另一个目的是提供鉴别或辅助鉴别新型冠状病毒感染者和新型冠状病毒疫苗接种者的产品,或,筛查或辅助筛查新型冠状病毒感染者的产品。

[0015] 本发明提供的产品,包括用于检测离体血清中新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4的物质。

- [0016] 上述产品中,所述物质可以为诱导新冠肺炎病毒N蛋白特异性IgG4产生的抗原及与IgG4特异结合的抗体;
- [0017] 在本发明的实施例中,所述物质包括抗原和抗体;
- [0018] 所述抗原为新冠肺炎病毒N蛋白;
- [0019] 所述抗体为IgG4的抗体,具体为HRP-小鼠抗人IgG4。
- [0020] 上述物质还包括阴性对照和阳性对照以及记载用于ELISA检测的判断标准的可读载体:
- [0021] 1) 阴性对照为NEGATIVE CONTROL,具体为蛋白稳定缓冲液(对COVID-IgG无反应);
- [0022] 2) 阳性对照为POSITIVE CONTROL,具体为新冠N蛋白特异性抗体(可以商购,如来华美·科赛格推出的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)抗原N蛋白,CSB-DP701B);
- [0023] 3) 用于ELISA检测的判断标准为
- [0024] 根据IgG4抗体检测对应的cut-off值来判断每孔阴阳性,其中cut-off值=阴性对照( $OD_{450nm} - OD_{630nm}$ )+0.15,待测样本的 $OD_{450nm} - OD_{630nm}$ 值高于cut-off值为阳性,待测样本的 $OD_{450nm} - OD_{630nm}$ 值低于或等于cut-off值为阴性。
- [0025] 上述新冠肺炎病毒N蛋白和IgG4的抗体在制备鉴别或辅助鉴别新型冠状病毒感染者和新型冠状病毒疫苗接种者的产品中的应用也是本发明保护的范围。
- [0026] 上述新新冠肺炎病毒N蛋白和IgG4的抗体在制备筛查或辅助筛查新型冠状病毒感染者的产品中的应用也是本发明保护的范围。
- [0027] 上述筛查的待测群体为候选新型冠状病毒感染者和疫苗接种者。
- [0028] 上述产品可以为ELISA试剂盒、Western Blot检测试剂盒、试纸条、免疫荧光试剂盒或免疫印迹试剂盒。
- [0029] 本发明还提供一种鉴别或辅助鉴别新冠肺炎感染者和新冠肺炎疫苗接种者的方法,检测待测样本血清中新冠肺炎病毒N蛋白特异性抗体IgG4,若呈阳性,则待测样本为或候选为新冠肺炎感染者;若呈阴性,则待测样本为或候选为新冠肺炎疫苗接种者。
- [0030] 本发明还提供一种筛查或辅助筛查新型冠状病毒感染者的方法,检测待测样本血清中新冠肺炎病毒N蛋白特异性抗体IgG4,若呈阳性,则待测样本为或候选为新冠肺炎感染者;若呈阴性,则待测样本为或候选为新冠肺炎疫苗接种者。待测样本来自于候选新型冠状病毒感染者和疫苗接种者群体。
- [0031] IgG4抗体可以用于ELISA法鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者。
- [0032] IgG4抗体可以用于Western Blot法鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者。
- [0033] IgG4抗体可以用于快速检测试纸条鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者。
- [0034] IgG4抗体可以用于免疫荧光技术鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者。
- [0035] IgG4抗体可以用于免疫印迹法鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者。
- [0036] IgG4抗体在ELISA法鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中可以用作二抗。
- [0037] IgG4抗体在Western Blot法鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中可以用作二抗。
- [0038] IgG4抗体在快速检测试纸条鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中可以用作胶体金标记的抗体。
- [0039] IgG4抗体在免疫荧光技术鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中可以用作二

抗。

[0040] IgG4抗体在免疫印迹法鉴别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中可以用作二抗。

[0041] 本发明的实验证明,本发明通过对所收集的79例新冠肺炎感染者和29例新冠肺炎疫苗接种者的血清利用ELISA进行新型冠状病毒N蛋白特异性抗体IgA、IgM、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4阴阳性的测定,检测结果发现新冠肺炎病毒N蛋白的特异性抗体IgG4在疫苗接种者中均呈阴性,而67.01%新冠肺炎感染者的N蛋白特异性抗体IgG4呈阳性,即一旦样本血清的新冠肺炎病毒N蛋白特异性抗体IgG4呈阳性,该样本一定来源于新冠肺炎感染者。因此,本发明的ELISA方法在新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中实现了良好的区别能力,能快速将新冠肺炎感染者从疫苗接种群中鉴别出来,弥补现有技术不能区分新冠病毒感染者和疫苗接种者的缺陷。

### 附图说明

[0042] 图1为用于区别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者的鉴定方法流程图。

[0043] 图2为在29例新冠肺炎疫苗接种者中抗N蛋白特异性抗体阴阳性分布图。

[0044] 图3为在79例新冠肺炎感染者中抗N蛋白特异性抗体阴阳性分布图。

### 具体实施方式

[0045] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0046] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0047] 下面结合实施例对本发明作进一步的阐述,但本发明的保护内容不仅限于这些实施例。

[0048] 本发明基于包被有新型冠状病毒N蛋白的ELISA板(北京科卫公司购买),通过更改带有HRP标记的二抗(购自苏州博奥龙公司)种类检测样本血清的抗体类型,以证明新冠肺炎病毒N蛋白的特异性抗体类型在新冠肺炎感染者和疫苗接种者中存在差异,提供一种用于区别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者的鉴定方法。

[0049] 实施例1、N蛋白特异性IgG4在甄别新型冠状病毒感染者和疫苗接种者中的应用

[0050] 1、样本的收集

[0051] (1) 本发明的研究设计如图1所示,研究及部分相关实验均经北京佑安医院研究伦理委员会批准,并根据《赫尔辛基宣言》取得每位参与者信息收集和研究方案的知情同意书,他们的临床样本被储存并用于研究,使用的方法符合批准的指南和规定。

[0052] (2) 收集每位参与者的血清样本,将样本在56℃灭活30min。

[0053] 临床样本参与者的信息:29例未感染过新冠病毒的疫苗接种者血清样本,79例新冠病毒感染者血清样本。

[0054] 2、ELISA检测抗体类型

[0055] 下面方法中的试剂如无特殊说明均来自北京科卫公司的检测抗N蛋白抗体的试剂盒。

[0056] (1) 包被新冠肺炎病毒N蛋白

[0057] 检测抗N蛋白抗体的试剂盒(COVID-19 IgG ELISA Test,北京科卫公司新型冠状病毒IgG酶联免疫试剂盒(COVID-19IgG ELISA Test,货号:601340),其中ELISA板上每个孔

都包被有N蛋白。

[0058] 每块包被有新冠肺炎病毒N蛋白(MN908947.3,update:2020年1月23日)的ELISA板(MICROPLATE)分别设置阴性对照孔2个、阳性对照孔1个,其余作为检测孔。

[0059] (2) 加样:

[0060] 检测孔:100 $\mu$ L样品稀释液(SAMPLE DILUENT:)和10 $\mu$ L的样本,混匀;

[0061] 阴性对照孔:加入100 $\mu$ L NEGATIVE CONTROL,具体为蛋白稳定缓冲液(对COVID-IgG无反应);

[0062] 阳性对照孔:加入100 $\mu$ L阳性对照为POSITIVE CONTROL,具体为新冠N蛋白特异性抗体(可以商购,如来华美·科赛格推出的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)抗原N蛋白,CSB-DP701B)。

[0063] (3) 温育:用封板膜封板后,置于37 $^{\circ}$ C温育30min。

[0064] (4) 洗涤:孵化结束后,小心揭掉封板膜。配置洗涤液(WASH BUFFER),用洗板机洗涤5次,每次浸泡30-60秒,最后一次尽量扣干。

[0065] (5) 加酶:

[0066] 每孔分别加入1:1000稀释的HRP-小鼠抗人IgG4(博奥龙,BF03068X,作为二抗)100 $\mu$ L,检测特异性IgG4,轻轻振荡混匀。

[0067] (6) 温育:用封板膜封板后,置于37 $^{\circ}$ C温育30min。

[0068] (7) 洗涤:小心揭掉封板膜,用洗板机洗涤5次,最后一次尽量扣干。

[0069] (8) 显色:加入100 $\mu$ L可溶性TMB(博奥龙,BF06007),避光孵育15min。

[0070] (9) 终止:加入50 $\mu$ L终止液(博奥龙,BTYA0106-100ml)。

[0071] (10) 读数:立即于450nm和630nm双波长下测定OD值。

[0072] 为了检测不同二抗的结合情况,在重复上述实验,仅在步骤(5)中将HRP-小鼠抗人IgG4替换为如下:HRP-小鼠抗人IgA(博奥龙,BF03070X)、HRP-小鼠抗人IgM(博奥龙,BF03074)、HRP-小鼠抗人IgE(博奥龙,BF03055)、HRP-小鼠抗人IgG1(博奥龙,BF03069X)、HRP-小鼠抗人IgG2(博奥龙,BF03066X)、HRP-小鼠抗人IgG3(博奥龙,BF03070X)100 $\mu$ L,分别检测特异性IgA、IgM、IgE、IgG1、IgG2、IgG3,轻轻振荡混匀。

[0073] 根据不同二抗的cut-off值来判断每孔阴阳性,其中cut-off值=阴性对照平均 $OD_{450nm} - OD_{630nm} + 0.15$ ,待测样本的 $OD_{450nm} - OD_{630nm}$ 值高于cut-off值为阳性,待测样本的 $OD_{450nm} - OD_{630nm}$ 值低于或等于cut-off值为阴性。

[0074] 在本发明的实施例中的样本中,不同二抗的cut-off值为0.191(IgA)、0.1745(IgM)、0.152(IgE)、0.2865(IgG1)、0.191(IgG2)、0.269(IgG3)、0.171(IgG4)。

[0075] 用GraphPaD软件,根据 $OD_{450nm} - OD_{630nm}$ 值将各个样本的不同抗体做阴阳性分布图,具体如下:

[0076] 29例新冠肺炎疫苗接种者中抗N蛋白特异性抗体阴阳性分布图结果如图2和表1所示,可以看出,新冠肺炎病毒N蛋白的特异性抗体IgG4在疫苗接种者中均呈阴性。

[0077] 79例新冠肺炎感染者中抗N蛋白特异性抗体阴阳性分布图结果如图3和表1所示,可以看出,67.01%新冠肺炎感染者的N蛋白特异性抗体IgG4呈阳性。

[0078] 表1为新冠肺炎感染者和疫苗接种者7种抗体阳性例数

[0079]

	新冠感染者抗体阳性例数	疫苗接种者抗体阳性例数
--	-------------	-------------

IgA	76 (96.20%)	29 (100%)
IgM	76 (96.20%)	29 (100%)
IgE	0	0
IgG1	70 (88.61%)	29 (100%)
IgG2	0	0
IgG3	30 (37.97%)	29 (100%)
IgG4	53 (67.09%)	0
总数	79	29

[0080] 上述结果表明,N蛋白特异性抗体IgG4可以作为鉴别或辅助鉴别新冠肺炎疫苗接种者和新冠肺炎感染者,具体如下:

[0081] 检测待测样本血清中新冠肺炎病毒N蛋白特异性抗体IgG4,若呈阳性,则待测样本为或候选为新冠肺炎感染者;若呈阴性,则待测样本为或候选为新冠肺炎疫苗接种者。

[0082] N蛋白特异性抗体IgG4可以作为筛查或辅助筛查新冠肺炎感染者,具体如下:

[0083] 检测待测样本血清中新冠肺炎病毒N蛋白特异性抗体IgG4,若呈阳性,则待测样本为或候选为新冠肺炎感染者;若呈阴性,则待测样本为或候选为新冠肺炎疫苗接种者。

[0084] 上述筛查群体为候选新型冠状病毒感染者和疫苗接种者。



图1

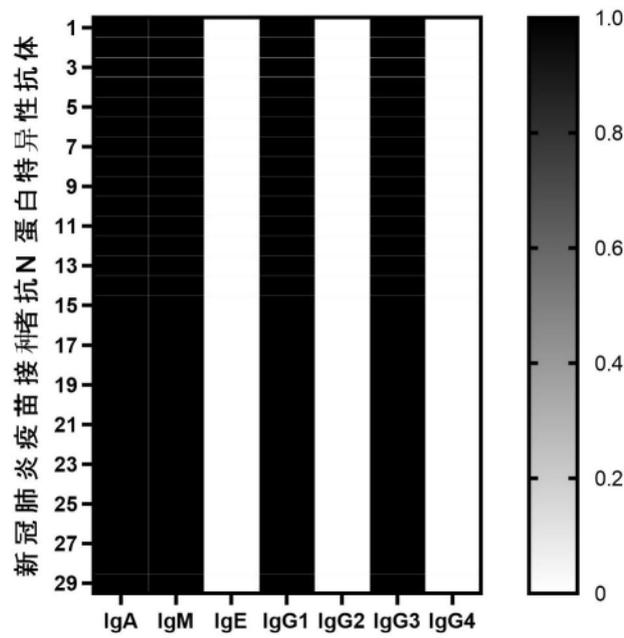


图2

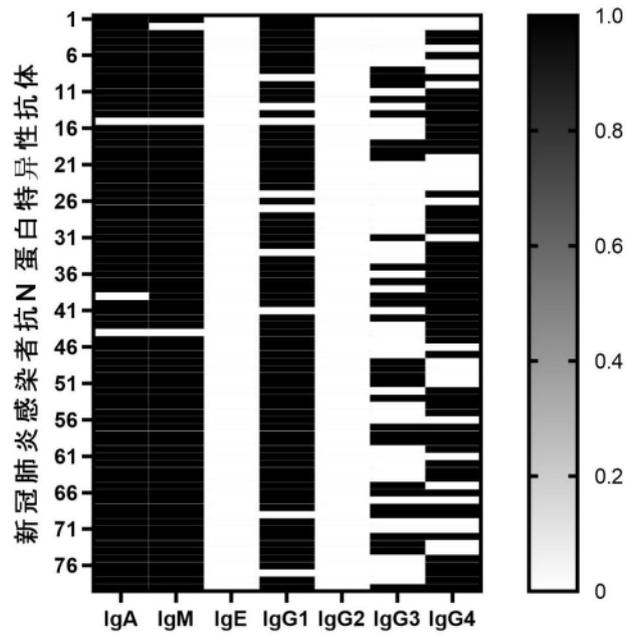


图3