

• 论 著 •

HIV-1/2/O 抗体联合诊断试剂盒的制备及其检测效果的研究

何国坚, 黄震, 张韶斌, 陈斯亮
(广东省深圳市龙岗中心医院 518116)

摘要:目的 制备 HIV-1/2/O 抗体检测试剂盒并评估其检测效果。方法 采用 RT-PCR 分别获取 HIV-1 型 M、O 组的 gp41 以及 HIV-2 gp36 的优势表位基因, 并通过柔性链将各表位基因嵌合, 重组表达, 亲和纯化、辣根过氧化酶标记, 与包被抗原配对筛选, 获取检测 HIV 抗体的双抗原试剂。结果 成功嵌合各表位基因并获得表达, 纯化后的抗原具有很高的抗原活性, 检测灵敏度与国外试剂相当。结论 采用柔性链技术嵌合表达制备的 HIV-1/2/O 抗体联合诊断试剂盒对 HIV O 组病毒株的检测具有较高灵敏度。

关键词: HIV O 亚型; 酶联免疫诊断; 柔性链; 双抗原夹心
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.05.014 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)05-0562-03

Prepare the diagnosis kits with combined antibody of HIV-1/2/O and evaluate its application

He Guojian, Huang Zhen, Zhang Shaobing, Chen Siliang
(Longang Central Hospital, Shenzhen, Guangdong 518116, China)

Abstract:Objective To prepare HIV-1/2/O test kits and to evaluate their test results. Methods RT-PCR for HIV-1 type were M, O groups of the gp41 and HIV-2 gp36 epitope gene of the advantages, and through flexible chain to the epitope chimeric gene, recombinant expression, affinity purified, horseradish off oxidase marker, paired with the coating antigen screening for detection of HIV antibodies in double antigen reagents. Results The chimeric gene and the epitope was expressed, purified antigen with high antigenicity, sensitivity and considerable foreign agent. Conclusion flexible chain technology chimeric antibodies prepare HIV1/2/O joint diagnostic kit for HIV O Group virus strains detected with high sensitivity.

Key words: Human Immunodeficiency Virus 1 group O; ELISA diagnosis; Flexible chain; Double antigen sandwich

人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)在病毒分类中属逆转录病毒科慢病毒属中的人类免疫缺陷病毒, 可分为 HIV-1 型和 HIV-2 型, 由于 HIV-1 的遗传变异, 目前已经有 A 至 J 10 种基因亚型^[1]。HIV-1 型可进一步分为 3 个组: M 亚型组(main, 即主要组)、O 亚型组^[2](outline, 即外围组)和 N 亚型组(new, non-M, non-O, 新组或非 M 非 O 组)。目前, 国外绝大多数及国内全部的 HIV 检测试剂都只能检测 HIV-1 亚型 M 组和 HIV-2 亚型, 而对于 O 组 HIV-1 病毒株无检测能力, 直接导致了 HIV-1 型 O 组病毒株的漏检^[3-4]。而国内尚未有此类试剂成功开发的报道。本研究的目的就是开发此类产品, 打破国外产品的垄断。

1 材料与方法

1.1 菌株、表达质粒和基因模板 菌株 BL21(DE3)购自深圳源动力科技有限公司。表达质粒 PGEX-4T-1、pET-32a 为基因酷保藏中心(www.genecool.com)提供。HIV 阳性血清为本院收集的门诊标本。

1.2 工具酶和试剂 病毒 RNA 提取试剂盒、RT-PCR 试剂盒、质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、IPTG 以及 HRP 购自上海生工生物工程技术有限公司; Taq 酶、dNTP mixture、限制性内切酶、T4 连接酶、DNA 分子量标准 DL2000 购自大连宝生物工程有限公司; Ni-NTA 亲和柱为 Qiagen 公司产品; HIV 确认试剂为 Genelab 公司产品。

1.3 克隆、表达及纯化

1.3.1 参照 NCBI 上的中国地区 HIV env 基因序列, 辅以生物软件分析 HIV env 基因的优势表位基因, 由上海英骏生物技术有限公司合成下列引物。

HIV-1 M env(gp41)

Mgp41-F: GGG GGA TCC GGT GGT TCT GGT GGT ACT ATG GGC TG(划线部分为 BamH I 酶切位点, 黑框内为柔性链基因)。

Mgp41-R: CCC GAA TTC TTA AGA TCT CAG CCA ATT TGT TAT GTT AAA C(划线部分分别为 EcoR I 和 Bgl II 酶切位点)。

HIV-1 O env(gp41)

Ogp41-F: GGG GGA TCC GGT GGT AGT GGT GGT GCC TTA GAA ACC TTT TAT CAG A(划线部分分别为 BamH I 酶切位点, 黑框内为柔性链基因)。

Ogp41-R: GGG GAA TTC TTA AGA TCT CCA TGT ATC GTT CCA TTT TAC(划线部分分别为 EcoR I 和 Bgl II 酶切位点)。

HIV-2 env(gp36)

2gp36-F: TTT GGA TCC GGT GGT TCT GGT GGT GAT GTG GTC AAG AGA CAA CAA(划线部分为 BamH I 酶切位点, 黑框内为柔性链基因)。

2gp36-R: CCC GAA TTC TTA AGA TCT AAC ATC CCA GCT ATT TAA TTT T(划线部分分别为 EcoR I 和 Bgl II 酶切位点)。

从 HIV 阳性患者血清中提取总 RNA, 再以上述引物, 进行 RT-PCR 反应, 得到的 HIV-1 型 M、O 组的 gp41 基因以及 HIV-2 型的 gp36 基因, 分别命名为 HIV-1、HIV-O、HIV-2。

1.3.2 基因克隆 PCR 产物回收之后, 连接 PGEX-4T-1 载体(简称 4T), 转化 BL-21, 涂板, 37℃培养过夜, 次日挑取单菌落, PCR 鉴定, 阳性克隆转接于 2 mL LB 培养基中, IPTG 诱导 4 h, 12% SDS-PAGE 电泳表达鉴定, 正确表达的菌测序。测

序正确的进行多表位嵌合抗原表达质粒的构建:p4T-HIV-1 质粒用 Bgl II 和 EcoR I 双酶切之后,回收载体,连接经过 BamH I 和 EcoR I 双酶切之后的 HIV-2 片段,得到 4T-HIV-1-2。HIV-O 片段也依此法构建,最后获得表达质粒 4T-HIV-1-2-O,其表达的抗原用作包被抗原,简称 4T-1/2/O。BamH I 和 EcoR I 双酶切质粒 4T-HIV-1-2-O,切下目的片段 HIV-1-2-O,连接到 pET-32a (简称 32a) 载体,最后获得表达质粒 pET-32a-HIV-1-2-O,其表达的抗原作为标记抗原,简称 32a-1/2/O。

1.3.3 抗原纯化 将含有 4T-HIV-1-2-O 质粒的菌株,接种于 500 mL 含有 100 mg/L 氨苄西林钠的 LB 培养基中,37 ℃ 恒温摇床 200 rpm 培养过夜(14 h)IPTG 诱导 4 h,收集菌液,以离心半径 8 cm,5 000 r/min 离心 20 min,弃上清液,沉淀用 10 mL 裂解液裂解,超声破碎菌体,12 000 r/min 离心 20 min,SDS-PAGE 电泳,发现目的蛋白分布在裂解液上,弃沉淀,上清液通过硫酸铵饱和梯度(20%~40%)沉淀目的蛋白,沉淀用 20 mM PBS 复溶,用 Glutathione Sepharose 4B 亲和层析柱纯化蛋白,SDS-PAGE 电泳检测纯度,此蛋白命名为 4T-HIV Ag。将含有 pET-32a-HIV-1-2-O 质粒的菌株,接种于 500 mL 含有 100 mg/L 氨苄西林钠的 500 mL LB 培养基中,后续纯化步骤同 4T-HIV Ag,最后上 Ni-NTA 亲和层析柱纯化蛋白,SDS-PAGE 电泳检测纯度,此蛋白命名为 32a-HIV Ag。

1.4 抗原标记生物素及亲和素标记 HRP 标记方法(过碘酸钠法)参考文献^[5]操作,得到的标记物命名为 32a-HIV Ag - HRP。

1.5 双抗原夹心法检测 HIV 抗体 将 4T-HIV Ag 抗原以 1:2 000 的比例用碳酸盐缓冲液(50 mM,pH 9.51)稀释,100 μL/孔加入酶标板,4 ℃ 包被 24 h,次日用 PBS-T,pH 7.4)洗涤液洗板二次,拍干,120 μL/孔加入含 30%新生牛血清,8%蔗糖,5%酪蛋白,150 mM NaCl 的 pH 7.4,10 mM PB 封闭液,37 ℃ 封闭 2 h,甩掉孔内液体,拍干,置室温 20~25 ℃、湿度 55%~65%、有通风设备的房间内风干。

在包被酶标板中先加入 100 μL 待测样品、阴性参照样品、阳性参照样品对照,37 ℃ 温育 30 min;用 PBST 洗涤液洗板 5 次,拍干。再 100 μL/孔加入含有 20%新生牛血清,以 1:2 000 稀释的 32a-HIV Ag-Biotin 标记物,以及 1:1 000 稀释的 Avidin-HRP 标记物的 pH 7.4 的 20 mM PB 缓冲液,37 ℃ 温育 30 min;用 PBST 洗涤液洗板 5 次,拍干。

每孔加入含 0.5%过氧化氢尿素、4.76%三水合乙酸钠、0.9%冰醋酸的显色剂 A 及含 0.32%TMB、5 mM 柠檬酸、0.5 mM EDTA-2Na、5%甲醇、2%二甲基甲酰胺的显色剂 B 各 50 μL,37 ℃ 避光显色 10 min。每孔加 50 μL,含 2M 硫酸的终止液终止反应,酶标仪 450 nm 波长(参考波长 630 nm)空白孔校正后读取 OD 值。

截值(COV)计算:COV=阴性对照平均 OD 值×2.0,阴性对照 OD 值低于 0.075 按 0.075 计算,高于 0.075 按实际 OD 值计算;待测样品 OD 值大于或等于 COV 为阳性,待测样品 OD 值小于 COV 为阴性。

1.6 对照试剂盒 选取国外某厂家的 HIV-1/2/O 检测试剂盒,以及 2 种国内 HIV 抗体检测试剂盒作为对照,检测 10 份经过 Genelab 公司的确认试剂盒验证阳性的 HIV 感染者血清,以及 10 份阴性血清,来测试本实验室建立的 HIV-1/2/O 抗体联合检测测试方法的效果。

2 结 果

2.1 多表位基因的嵌合 通过 RT-PCR 扩增获得 HIV-1 型 M、O 组的 gp41 基因片段。通过酶切、连接等分子克隆实验手段构建多表位嵌合抗原表达质粒 4T-32a-HIV-1-2-O 以及 pET-32a-HIV-1-2-O,利用上述引物,PCR 扩增鉴定,表达质粒均可扩增出相应的基因片段,证明该表达质粒均已构建成功。将两株表达质粒拿去测序,结果正如预期设想。

2.2 抗原表达及纯化 将构建的含有目的基因的表达质粒转化到 BL21(DE3)受体菌中,经 IPTG 诱导后,SDS-PAGE 鉴定,嵌合抗原以上清形式表达,4T-HIV Ag 抗原表达量约占菌体蛋白总量的 10%,32a-HIV Ag 抗原表达量约占菌体蛋白总量的 15%。

2.3 抗原标记 表达上清经过硫酸铵浓缩后的样品,采用亲和纯化之后,经 SDS-PAGE 鉴定,均可达到电泳纯,纯度达到 95%以上。

2.4 双抗原试剂调试及试剂盒优化 本试剂盒以及对照试剂盒检测 5 例 HIV 阳性标本,5 例为抗 HIV-1 O 组病毒株血清、10 例 HIV 阴性标本的结果,见表 1。

表 1 各 HIV-1/2/O 抗体联合检测试剂盒比较*

血清#	本试剂盒	进口试剂盒	国产试剂盒 1	国产试剂盒 2
P1	15.69	16.25	10.30	12.34
P2	14.21	13.94	11.87	12.30
P3	12.62	10.98	7.96	8.47
P4	10.26	8.12	5.84	6.91
P5	0.22	0.23	0.26	0.42
P6	5.54	5.23	0.31	0.43
P7	4.86	5.11	0.23	0.51
P8	5.77	5.64	0.28	0.57
P9	1.22	0.89	0.26	0.42
P10	0.45	0.19	0.46	0.39
N1	0.17	0.21	0.31	0.56
N2	0.34	0.28	0.34	0.34
N3	0.23	0.20	0.29	0.28
N4	0.31	0.13	0.54	0.47
N5	0.35	0.24	0.61	0.34
N6	0.24	0.29	0.34	0.38
N7	0.16	0.14	0.26	0.51
N8	0.45	0.23	0.17	0.24
N9	0.39	0.19	0.31	0.31
N10	0.28	0.18	0.41	0.38

*:表中数据为 OD/COV;#:血清已经事先用 Genelab 公司的确认试剂盒验证,其中 P1~P4 为 HIV-1 的 M 组阳性血清;P5 为 HIV-2 阳性血清;P6~P10 为抗 HIV-1 O 组病毒血清(其中 P9 为 P8 稀释 10 倍;P10 为 P8 稀释 100 倍);N1~N10 为 HIV 阴性血清。

如表 1 所示,本实验室制备的 HIV-1/2/O 双抗原夹心法 HIV 检测试剂盒,其灵敏度和特异性已经接近国外进口试剂盒的水平,灵敏度比国内试剂盒有较大优势;在针对 HIV-O 型标本的检测方面,国产试剂盒由于没有加入 HIV-O 组的抗原,所以出现了漏检(P6~P10),而国外试剂在 HIV-O 抗血清稀

释到一定倍数后灵敏度降低的较快,本试剂对于 HIV-O 病毒株的检测上具有更高的灵敏度。

3 讨 论

据 WHO 最新统计,全球 HIV 感染人数高达 3 300 余万,其中亚洲感染人数约 490 万,2007 年造成的死亡人数达 21 余万,并仍有 250 余万新发病例^[6-7]。中国 HIV 感染人数达 84 万,处于流行的高速增长期^[7]。HIV 感染已成为各国严重的社会问题及医学难题,其危害难以估量^[8-9]。HIV-1 的 M 组病毒呈全球性流行,我国也基本上是该组病毒株,而 HIV-1 的 O 组,N 组和 HIV-2 型只在非洲某些局部地区流行^[10]。目前,国外绝大多数及国内全部的 HIV 检测试剂都只能检测 HIV-1 亚型 M 组和 HIV-2 亚型,而对于 O 组 HIV-1 病毒株无检测能力,直接导致了 HIV-1 型 O 组病毒株的漏检^[3-4]。随着世界经济日益紧密,各国往来日益频繁,原本只存在于非洲局部地区的 HIV O 亚型在北美、欧洲和澳大利亚均有报道^[11],各国科学家也纷纷加强针对 O 组病毒检测试剂研究。目前,已有包括罗氏 (Ortho Clinical Diagnostics Inc)、生物梅里埃 (BioMerieux Inc) 和西门子 (Siemens) 在内的知名企业研发出试剂盒^[12-15]。

ELISA 技术是世界公认的,较成熟的生物分析技术,由于该技术产品具有使用方便、灵敏度高和较经济等优点,WHO 曾向各国推荐使用。目前以该技术已开发出了第三代 HIV 双抗原夹心法检测抗体诊断试剂,所以双抗原夹心法是目前主流的 HIV 检测方法。对于同时检测 HIV-1 O、M 亚型和 HIV-2 型病毒抗体的技术,国外已有此类产品的销售,技术上完全可行。

本项目产品采用柔性链将 3 段表位基因嵌合在一起,一方面作为一个嵌合抗原能够顺利表达;另外一方面,表达后各自的抗原活性并没有丧失。我们也尝试过不加柔性链直接嵌合表达,但是嵌合在中间位置的 HIV-2 gp36 的抗原活性很低。我们分析,HIV-1 M gp41 C 端和 HIV-2 gp36 N 端刚性连接,而 HIV-2 gp36 C 端和 HIV-1 O gp41 N 端也是刚性连接,但重组抗原表达出来后,经过自然构像,两端的 gp41 把 gp36 的结构破坏,阻碍了 gp36 表位的暴露,造成 HIV-2 阳性标本的漏检。而柔性链,我们知道是几个可以自由旋转的氨基酸分子,3 段表位基因经过柔性连接后,在表达过程中都尽可能的保持了天然构造,较好的保持了各自的抗原活性,本研究对比试验也很好的说明了这点。

病毒传播是没有国界的,因此做好预防是阻止病毒扩散的有效途径。虽然我国没有 HIV-1 O 组感染者,但并不代表以后不会有,因此在 HIV 的检测中加入对 O 组病毒株的检测非常有意义。

参考文献

[1] Heyndickx L, Janssens W, Alary M, et al. Genetic variability of HIV type 1 in Benin[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1996, 12

(15):1495-1497

[2] Vanden Haesevelde M, Decourt JL, De Leys RJ, et al. Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate[J]. J Virol, 1994, 68 (3):1586-1596.

[3] Ondoa P, Willems B, Fransen K, et al. Evaluation of different V3 peptides in an enzyme immunoassay for specific HIV type 1 group O antibody detection[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1998, 14 (11):963-972.

[4] Zouhair S, Roussin-Bretagne S, Moreau A, et al. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection That Escaped Detection in Two Immunoassays[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(2):662-665.

[5] 郭春祥, 郭锡琼. 介绍一种简单、快速、高速的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J]. 上海免疫学杂志, 1983, 3(15):972-1000.

[6] UNAIDS/WHO. AIDS Epidemic Update[EB/OL]. [2008-06-30] <http://data.unaids.org/pub/EPISlides/2007/2007-epiupdata-en.pdf>

[7] Wang L. Overview of the HIV/AIDS Epidemic, scientific research and Government responses in China[J]. AIDS, 2007, 21(Suppl8):3-7.

[8] Sun X, Wang N, Li D. The development of HIV/AIDS surveillance in China[J]. AIDS, 2007, 21(Suppl8):33-38.

[9] Hladik W, Musinguzi J, Kirungi W, et al. The estimated burden of HIV/AIDS in Uganda 2005~2010[J]. AIDS, 2008, 22(4):503-510.

[10] Hunt JC, Golden AM, Lund JK, et al. Envelope sequence variability and serologic characterization of HIV type 1 group O isolates from equatorial guinea[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 1997, 13 (12):995-1005.

[11] Koolen Marcus Josephus Marle, Schielen Wilhelmus Joseph Gera [J]. Antigenes Specifiques Du VIH-1, Groupe O. Word Patent WO9627012.

[12] Pau CP, Hu DJ, Spruill C, et al. Surveillance for human immunodeficiency virus type 1 group O infections in the United States[J]. Transfusion, 1996, 36(5):398-400.

[13] De Leys R, Zheng J. Peptides for the detection of HIV-1 group O [J]. Japan Patent JP2000157268.

[14] Montagnier Luc, Quillent Caroline, Borman Andrew, Clavel Francois, Cohen Jacques H M, Guetard Denise, Charnequ Pierre, Donjon De Saint-Martin Jaquel [J]. Nucleotide sequences of HIV-1 type (or subtype) O retrovirus antigens, United States Patent US2003049604.

[15] Duncan Richard Julian Stuart. Dosage Du Groupe O Du VIH-1 A L' Aide D' Au Moins Un Peptide GP41 [J]. Word Patent WO9532293.

(收稿日期:2010-09-10)

(上接第 561 页)

[11] Suzuki M, Iizasa T, Ko E, et al. Serum endostatin correlates with progression and prognosis of non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2006, 35(1):29-34.

[12] Boehle AS, Kurdow R, Schulze M, et al. Human endostatin inhib-

its growth of human non-small-cell lung cancer in a murine xenotransplan model[J]. Int J Cancer, 2001, 94(3):420-428.

(收稿日期:2010-08-04)