

论著 • 基础研究

铁蛋白笼形纳米颗粒应用于 HIV-1 P24 抗原高灵敏检测的研究*

张利沙¹, 曾德军^{2△}

(1. 德阳市第二人民医院检验科, 四川德阳 618000; 2. 德阳市疾病预防控制中心微生物
检验所, 四川德阳 618000)

摘要:目的 构建以铁蛋白笼形纳米颗粒为基础的分子展示平台, 并应用于 HIV-1 P24 抗原检测, 实现低丰度、高灵敏检测。**方法** 采用分子生物学手段, 构建生物素耦联的铁蛋白笼形纳米颗粒, 基于链霉亲和素与生物素特异性结合, 将其应用于 HIV-1 P24 抗原的酶联免疫吸附测定(ELISA)检测中, 并测试其检测灵敏度。**结果** 构建出具有链霉亲和素特异性结合能力的生物素化铁蛋白笼形纳米颗粒, 应用到 HIV-1 的 P24 抗原 ELISA 检测中, 实现 0.1 ng/mL 的检测下限, 显著提高检测灵敏度。**结论** 成功建立基于铁蛋白笼形纳米结构的分子展示平台, 以 HIV-1 P24 抗原 ELISA 检测为例, 该平台能够应用于低丰度、高灵敏检测。

关键词:铁蛋白; 纳米颗粒; HIV-1 P24 抗原; 高灵敏检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.21.004 **中图法分类号:**R446.61

文章编号:1673-4130(2019)21-2572-04 **文献标识码:**A

Application of ferritin cage nanoparticles in high sensitivity detection of HIV-1 P24 antigen*

ZHANG Lisha¹, ZENG Dejun^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Deyang Second People's Hospital, Deyang, Sichuan 618000, China; 2. Department of Microbiological Testing, Deyang Center for Disease Control and Prevention, Deyang, Sichuan 618000, China)

Abstract: **Objective** To construct a molecular display platform based on ferritin cage nanoparticles and apply it to HIV-1 P24 antigen detection to achieve low abundance and high sensitivity. **Methods** Biotin-coupled ferritin cage nanoparticles were constructed by molecular biology. Based on the specific binding of streptavidin and biotin, they were applied to the detection of HIV-1 P24 antigen by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the detection sensitivity was tested. **Results** The cage-shaped biotinylated ferritin nanoparticles with the specific binding ability of streptavidin were constructed and applied to the detection of HIV-1 P24 antigen by ELISA. The detection limit was 0.1 ng/mL, and the detection sensitivity was significantly improved. **Conclusion** A molecular display platform based on ferritin cage nanostructure was successfully established. Taking ELISA detection of HIV-1 P24 antigen as an example, the platform can be applied to low abundance and high sensitivity detection.

Key words: ferritin; nanoparticle; HIV-1 P24 antigen; highly sensitive detection

医学检验技术在疾病的预防和诊断中发挥重要作用, 特别是低丰度指标的检测具有重要价值。生物自组装纳米材料引入生物传感系统并应用于医学检验, 能够实现低丰度、高灵敏度的检测^[1-4]。铁蛋白作为一种生物自组装纳米材料, 操控性好, 应用于生物传感系统具有实际意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 PCR 仪、蛋白电泳装置购自美国

Bio-Rad 公司; 离心机购自德国 Thermo Electron 公司; 冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司; 核酸电泳仪购自中国北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统购自美国 Alpha 公司; 超声细胞粉碎仪购自美国 Sonics 公司; 微孔板检测仪购自美国 Bio-Tek 公司; 超微量样本分光光度计购自美国 Thermo 公司; 透视电子显微镜购自日本日立公司, 型号 H7000。

DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、

* 基金项目: 德阳重点科学技术研究项目(2018SZS061)。

作者简介: 张利沙, 女, 主管检验师, 主要从事医学检验方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: zdj1033@163.com。

本文引用格式: 张利沙, 曾德军. 铁蛋白笼形纳米颗粒应用于 HIV-1 P24 抗原高灵敏检测的研究[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(21):

dNTPs 等均购自日本 Takara 公司;PCR 产物回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、核酸胶回收试剂盒等均购自美国 Omega Bio-Tek 公司;所用抗体均购自中国上海优宁维生物科技股份有限公司;蛋白质 Marker(Fermentas)、DNA Marker (TransGen Biotech)、BCA Protein Assay Kit(Pierce)、HIV-1 P24 抗原酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒等均购自中国上海起发实验试剂有限公司。

1.2 引物与测序 DNA 测序由中国华大基因测序公司完成,引物合成由中国上海生工生物工程股份有限公司完成,见表 1。

表 1 引物序列		
目的基因	引物名	引物序列(5'-3')
BAP-linker-rHF	FF1	5'-TGG ATC GGG TGG AGG TGG ATC GGA ATT CGG AGG TGG TAC CAT GAC GAC CGC GTC C-3'
	FF2	5'-GAA GCT CAG AAA ATC GAA TGG CAC GAA GGT GGA GGT GGA TCG GGT GGA GGT GGA TCG-3'
	FF3	5'-TTT TCC ATG GGA GGC CTG AAC GAT ATT TTC GAA GCT CAG AAA ATC G-3'(NcoI)
	FR	5'-TTT TCT CGA GCT AGC TTT CATT ATC ACT GTC-3'(XhoI)
	BF	5'-TTT TCC ATG GGA ATG AAG GAT AAC ACC GTG CC-3'(NcoI)
	BR	5'-TTT TGT CGA CTT ATT TTT CTG CAC TAC GCA GGG-3'(SalI)
BirA		

1.3 菌种及质粒 菌种:大肠杆菌 DH5α 作为目标质粒复制菌种;大肠杆菌 BL21(DE3)作为目标质粒表达菌种;大肠杆菌 BL21 基因组 DNA 作为扩增生物素连接酶基因序列(BirA)的模板。质粒:pET28a-F-H-Chain 作为扩增铁蛋白基因序列(rHF)的模板;pET28a 作为承载耦联生物素结合肽(BAP)的铁蛋白基因序列原核表达质粒载体;pCDFDuet 作为承载 BirA 的原核表达质粒载体。所用菌种和质粒均来源于本实验室保存。

1.4 方法

1.4.1 质粒构建 以 pET28a-F-H-Chain 为模板,分别以 FF1、FF2、FF3 为正向引物,以 FR 为反向引物,经 3 次 PCR 扩增出耦联生物素结合肽的铁蛋白基因序列 BAP-linker-rHF, Nco I /Xho I 酶切并插入 pET28a,构成 pET28a-rHF-BAP;以大肠杆菌 BL21 (DE3)基因组为模板,BF、BR 为正反向引物,PCR 扩增 BirA, Nco I /Sal I 酶切并插入 pCDFDuet,构成 pCDFDuet-BirA。

1.4.2 生物素化铁蛋白的表达 pET28a-rHF-BAP、pCDFDuet-BirA 共转化大肠杆菌 BL21 (DE3)

获得目标工程菌,以终浓度 1 mmol/L 的异丙基-β-D 硫代半乳糖苷(IPTG),25 ℃,190 r/min,诱导培养 10 h;以未经诱导的工程菌为对照,全菌裂解液通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)观察目标蛋白表达情况。

1.4.3 生物素化铁蛋白的纯化和表征 诱导表达的工程菌经超声破碎,并以 40%蔗糖为基质,270 000 r/min 超速离心 4 h,上清透析去糖,获得纯化的生物素化铁蛋白。分别针对铁蛋白和生物素进行免疫印迹试验(Western blot)验证分析;同时以 2%,pH7 的磷钨酸负染,透视电子显微镜观察自组装结果,并用 Image J 图像软件分析处理。采用 BCA 法蛋白浓度测定试剂盒测定提取纯化的生物素化铁蛋白浓度。

1.4.4 生物素化铁蛋白应用于 P24 检测 以 5 μg/mL HIV-1 P24 抗体包被酶标板,并以 0.5%脱脂奶粉封闭;按照 ELISA 操作步骤,分别依次加入 10 倍梯度稀释的 HIV-1 P24 抗原(1 000~0.001 ng/mL),每个浓度设 3 个重复,生物素化 HIV-1 P24 抗体,链霉亲和素,生物素化铁蛋白(24 μg/mL),链霉亲和素耦联的辣根过氧化物酶;最后以现配 TMB 显色,2 mol/L 硫酸铵终止反应,450 nm 读取吸光度;以蛋白浓度为横坐标,吸光度为纵坐标作线性回归曲线,并与商业 HIV-1 P24 抗原 ELISA 试剂盒作对比。

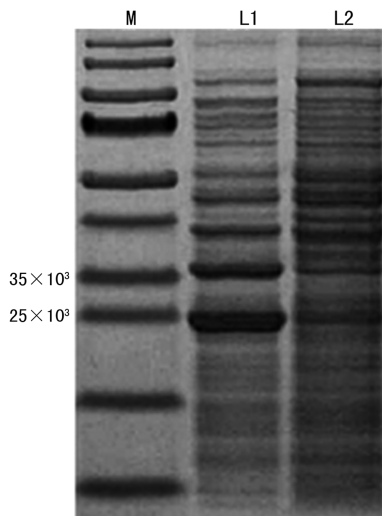
2 结果

2.1 质粒构建 通过基因重组手段将 597 bp 的 rHF-BAP 基因片段插入到质粒载体 pET28a 上,构建出 pET28a-rHF-BAP。将 966 bp 的 BirA 基因片段插入到质粒载体 pCDFDuet 上,构建出 pCDFDuet-BirA 原核生物表达载体。2 个表达载体均经限制性酶切和基因测序验证无误。

2.2 生物素化铁蛋白的表达 pET28a-rHF-BAP、pCDFDuet-BirA 共转化大肠杆菌 BL21(DE3)获得目标工程菌。在 IPTG 的诱导作用下,全菌裂解液经 SDS-PAGE 显示:在相对分子质量 25.0×10³ 和 35.0×10³ 大小左右出现 2 条明显蛋白条带,相对分子质量与耦联生物素结合肽的铁蛋白(23.5×10³)和生物素连接酶(32.0×10³)蛋白相对分子质量大小一致。见图 1。

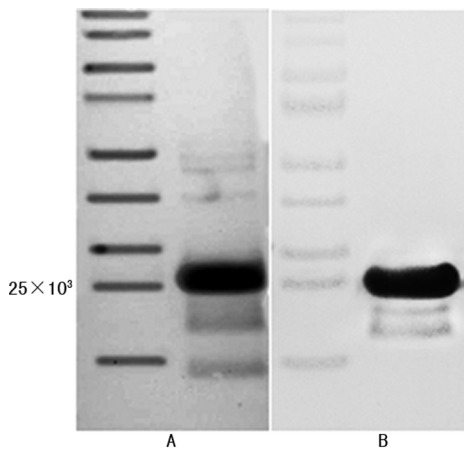
2.3 生物素化铁蛋白的表征 对提取纯化的生物素化铁蛋白进行 Western blot 验证分析显示:针对铁蛋白和生物素的蛋白印迹均在 25.0×10³ 左右处出现目标印迹条带,与耦联生物素结合肽的铁蛋白(23.5×10³)相对分子质量大小一致。透射电镜观察纯化的生物素化铁蛋白在体外自组装的情况,发现提取纯化的生物素化铁蛋白悬液存在大量直径为 12 nm 左右的颗粒状规则结构,与铁蛋白笼形纳米结

构一致。通过 BCA 法测定得出提取并纯化的生物素化铁蛋白浓度为 1.8 mg/mL。见图 2、3。



注:L1 泳道为诱导后的工程菌裂解液电泳;L2 泳道为未经诱导工程菌裂解液电泳

图 1 生物素化铁蛋白诱导表达电泳结果



注:A 表示针对铁蛋白的免疫印迹试验;B 表示针对生物素的免疫印迹试验

图 2 免疫印迹试验验证生物素化铁蛋白

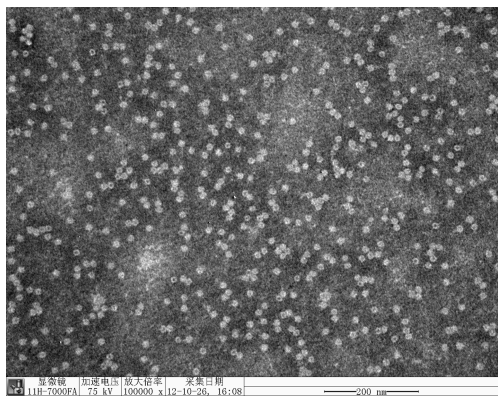


图 3 生物素化铁蛋白自组装电镜表征

2.4 生物素化铁蛋白应用于 P24 检测 将提取纯化所得的生物素化铁蛋白应用于 HIV-1 P24 抗原 ELISA 检测中,与商业化 HIV-1 P24 抗原 ELISA 检

测试剂盒相比较;按照 $\text{cut-off} = 2.1 \times \text{阴性对照}$,商业化 HIV-1 P24 抗原 ELISA 检测试剂盒对 HIV-1 P24 抗原的检测下限为 1 ng/mL,展示有生物素的铁蛋白笼形纳米颗粒作桥联的 ELISA 检测对 HIV-1 P24 抗原下限达到 0.1 ng/mL,检测下限提高 10 倍。见图 4。

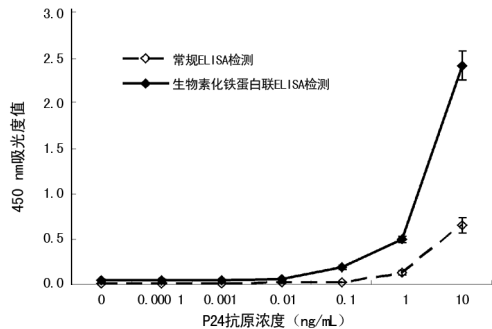


图 4 生物素化铁蛋白笼形纳米颗粒应用于 P24 ELISA 检测

3 讨 论

检测技术的更新与发展,特别是对低丰度指标的高灵敏检测的开发能够给临床医疗提供依据和指导,例如 HIV-1 P24 抗原的高灵敏检测能够提高艾滋病早期检出率,缩短检测窗口期,为临床诊治提供指导^[5-7];同时低丰度、高灵敏度的检测也深化和补充了目前医学检验技术中的不足。基于纳米材料的各种特性,将纳米材料引入到检验技术中得到了很好的效果^[8-9],特别是容易通过基因工程改造的生物源性纳米结构,例如病毒颗粒,大部分病毒由单体衣壳蛋白组装形成的规则结构,通过单体分子修饰可在病毒颗粒上展示多分子的功能基团,且这些新改造的病毒颗粒处于纳米水平,应用于生物传感能实现信号放大^[10-12]。

铁蛋白具有病毒衣壳蛋白的性质,在体外能自组装形成两种纳米结构,即大铁蛋白笼形纳米颗粒由 24 个基本元件形成八面体对称的中空结构,外径 12 nm,小铁蛋白笼形纳米颗粒由 12 个基本元件形成四面体对称的中空结构^[13]。以大铁蛋白笼形纳米颗粒为对象,通过分子生物学的手段对铁蛋白单体进行生物素化修饰,铁蛋白单体自组装时可将生物素展示于笼形纳米颗粒上,1 个纳米颗粒可展示 24 分子生物素,通过生物素与链霉亲和素的特异性结合,检测信号被放大,提高了检测相对灵敏度。经过验证,将生物素化铁蛋白应用到 HIV-1 P24 抗原 ELISA 的检测当中,与商业化 HIV-1 P24 抗原 ELISA 试剂盒检测比较,检测下限有明显提高,可以用于检测低丰度的分析指标。

铁蛋白笼形纳米颗粒上功能性分子展示不仅仅

局限于生物素,也可以将检测相关联的某种或多种分子展示于铁蛋白笼形纳米颗粒上,构建出单功能或多功能的铁蛋白笼形纳米颗粒^[14-15],实现其特定的检测指标的高灵敏甚至超灵敏检测。

4 结 论

通过基因工程技术,采用分子生物学的手段,成功构建生物素化铁蛋白单体,并在体外自组装形成表面展示有多分子生物素的铁蛋白笼形纳米颗粒。以 HIV-1 P24 抗原检测为例,将其应用到 ELISA 检测中,与商业化的 HIV-1 P24 抗原 ELISA 试剂盒检测相比,成功实现了检测信号的放大,具有相对较高的检测灵敏度,可用于检测相对丰度较低的分析指标。

参考文献

- [1] 门冬,张先恩,张治平. 自组装病毒样纳米结构与超灵敏生物传感[J]. 东南大学学报(医学版),2011,30(1):92-99.
- [2] LI H,LIU S,DAI Z,et al. Application of nanomaterials in electrochemical enzyme biosensors[J]. Sensors,2009,9(11):8547-8561.
- [3] MEN D,ZHANG Z P,GUO Y C,et al. An auto-biotinylated bifunctional protein nanowire for ultra-sensitive molecular biosensing[J]. Biosens Bioelectron,2010,26(4):1137-1141.
- [4] PARK J S,CHO M K,LEE E J,et al. A highly sensitive and selective diagnostic assay based on virus nanoparticles[J]. Nat Nanotechnol,2009,4(4):259-264.
- [5] 贾翠娥. 浅谈 HIV 实验室检测新技术的临床应用进展[J]. 当代医药论丛,2015,13(9):156-157.
- [6] 常俊峰. 三种 HIV 抗原/抗体检测方法对 HIV 早期感染

检测的诊断研究[J]. 中国免疫学杂志,2015,31(8):1082-1084.

- [7] 李德钧,刘大鹏,孙茂利,等. 多种方法对早期 HIV 核酸阳性者系列血清的跟踪检测[J]. 中国卫生检验杂志,2012,22(12):2880-2882.
- [8] 潘玉宁,颜春荣. 张蕾,等. 基于纳米材料的生物传感技术在食品安全检测中的应用[J]. 生物加工过程,2018,16(2):17-23.
- [9] 李家萌,曹颖,赵媛,等. 纳米金在生物医学技术应用的研究现状[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2016,34(2):166-170.
- [10] MAO C,LIU A,CAO B. Virus-based chemical and biological sensing[J]. Angew Chem Int Ed Engl,2009,48(37):6790-6810.
- [11] GUO Y C,LIANG X S,ZHOU Y F,et al. Construction of bifunctional phage display for biological analysis and immunoassay[J]. Anal Biochem,2010,396(1):155-157.
- [12] RONG J H,NIU Z W,LEE L A,et al. Self-assembly of viral particles[J]. Curr Opin Colloid Interface Sci,2011,16(6):441-450.
- [13] YU Z,BRENDAN P O. Self-assembly in the ferritin nano-cage protein superfamily[J]. Int J Mol Sci,2011,12(8):5406-5421.
- [14] 沈阳,边成原,詹家荣,等. 铁蛋白系统纳米粒子的构建及其相互作用[J]. 华东理工大学学报(自然科学版),2018,44(3):308-315.
- [15] 王玲,吴洋,张盛,等. 铁蛋白的生物工程应用[J]. 中国生物工程杂志,2018,38(6):77-85.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)

(上接第 2571 页)

- [8] 解春宝,罗江蓉,传良敏,等. 应用改良 Hodge 试验检测肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶的研究[J]. 国际检验医学杂志,2017,38(15):2034-2039.
- [9] 孙青阳,杨燕,韦文君,等. 抑制剂增强碳青霉烯类灭活法对革兰阴性杆菌碳青霉烯酶初步分类的评价[J]. 临床检验杂志,2018,36(1):14-18.
- [10] 余佳佳,刘瑛,俞静,等. 碳青霉烯类抗菌药物灭活试验筛查产碳青霉烯酶肠杆菌科细菌的效能评价[J]. 检验医学,2017,32(7):628-632.
- [11] 王坚铤,吴琼,庄亦晖,等. 耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药机制探讨[J]. 检验医学,2017,32(12):1080-1084.
- [12] 马玉兰,宋文杰,梁屹,等. CIM 与 mCIM 筛选肠杆菌科细菌产碳青霉烯酶能力比较[J]. 河北医科大学学报,2018,39(8):943-948.

- [13] 马玉兰,宋文杰,李继红,等. mCIM 与 eCIM 筛选肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的效果评价[J]. 临床检验杂志,2018,36(9):650-654.
- [14] RODRÍGUEZ-BAÑO J,GUTIÉRREZ-GUTIÉRREZ B,MACHUCA I,et al. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-,ampc-,and carbapenemase-producing enterobacteriaceae[J]. Clin Microbiol Rev,2018,31(2):e00079-17.
- [15] TORRES A,ZHONG N,PACHL J,et al. Ceftazidime-avibactam versus meropenem in nosocomial pneumonia, including ventilator-associated pneumonia (REPROVE): a randomized, double-blind, phase 3 non-inferiority trial[J]. Lancet Infect Dis,2018,18(3):285-295.

(收稿日期:2019-02-18 修回日期:2019-05-02)