

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200610018769.1

[51] Int. Cl.

G01N 33/544 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月8日

[11] 公开号 CN 1858594A

[22] 申请日 2006.4.14

[21] 申请号 200610018769.1

[71] 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 王业富 翟建新

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所

代理人 黄瑞棠

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 4 页

[54] 发明名称

人类免疫缺陷病毒抗体多指标快速检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种人类免疫缺陷病毒抗体多指标快速检测方法，涉及人类免疫缺陷病毒抗体检测技术。包括下列步骤：1. 通过基因工程技术在大肠杆菌中表达五种 HIV 抗原蛋白片断——p24，gp41，gp36，gp120V3，gp120C；2. 将上述五种抗原蛋白固定在硝酸纤维素膜上；3. 然后滴加待测血清，其中的病毒抗体通过免疫反应与抗原结合，再加纳米金标记的葡萄球菌蛋白 A (SPA)；4. 待其渗过膜片后，洗涤；5. 再加纳米金标记的抗 SPA 抗体加强放大即可形成肉眼可见的红色斑点。本发明检测灵敏度高、特异性强、成本低廉，全过程只需 5 分钟左右，适合疾病现场、基层医疗机构和中心城市大医疗机构使用。

1、一种人类免疫缺陷病毒抗体多指标快速检测方法，其特征在于包括下列步骤：

①通过基因工程技术在大肠杆菌中表达五种 HIV 抗原蛋白片段——p24, gp41, gp36, gp120V3, gp120C;

②将上述五种抗原蛋白固定在硝酸纤维素膜上；

③然后滴加待测血清，其中的病毒抗体通过免疫反应与抗原结合，再加纳米金标记的葡萄球菌蛋白 A；

④待其渗过膜片后，洗涤；

⑤再加纳米金标记的抗葡萄球菌蛋白 A 抗体加强放大即可形成肉眼可见的红色斑点。

人类免疫缺陷病毒抗体多指标快速检测方法

技术领域

本发明涉及一种人类免疫缺陷病毒抗体检测技术，具体地说，涉及一种人类免疫缺陷病毒抗体多指标快速检测方法。

背景技术

人类免疫缺陷病毒(HIV，俗称艾滋病毒)是引起获得性免疫缺陷综合症(AIDS，俗称艾滋病)的病原体。HIV感染早期可检测到病毒抗原(p24，gp41)，但检测到的时间非常短，通常不超过于2周，且抗原浓度很低，诊断难度较大。故大部分HIV血清学诊断依靠检测抗HIV抗原的抗体，大约感染后4~6周可测到抗-HIV。通常抗*gag*编码蛋白p24的抗体先出现，而针对*env*编码蛋白(gp41，gp120)和*pol*编码蛋白(p66，p51，p31)的抗体则稍微晚些出现。对大量HIV阳性样本的免疫印迹分析表明，在血清中抗包膜蛋白抗体和抗核心蛋白p24抗体与其他HIV抗体相比含量较高，是主要的HIV抗体。抗包膜蛋白抗体(抗gp41)反应在整个感染期间高水平出现，抗体稳定而持久，是当前抗体初筛试验的主要靶抗体。抗p24抗体浓度可能随着疾病的进展或因与p24形成抗原抗体复合物而降低。当AIDS相关综合症发展后，p24抗体下降，可测定的p24抗原又出现，在此阶段既可检测到gp41抗体，也可检测到p24抗原，是临近或进入AIDS恶性发展期的征兆。因此，对上述抗体的同步检测有助于医生对病人是否临近或已进入AIDS期做出大致的判断。

迄今为止，根据血清学反应和病毒核酸序列测定，全球流行的HIV可分为2种类型：HIV-1型和HIV-2型。HIV-1与HIV-2核心蛋白有较强的交叉反应，但包膜蛋白有明显差别，如gp41与gp36。据此，可以通过同步检测核心蛋白和包膜蛋白抗体的组合实现对2种类型HIV的分型检测。IgG类抗体阳性的时间一般为感染后1~3个月内出现，IgM类抗体一般感染后2周出现，3个月后消失。检测IgM抗体有助于早期诊断。

目前常用的 HIV 抗体检测方法有：酶联免疫吸附试验 (ELISA) 、免疫印迹试验 (Western Blot, WB) 、斑点免疫渗滤/层析试验。

ELISA、WB 需要昂贵的仪器，且检测过程繁琐耗时。采用此类方法的实验室通常需要 48 小时至 2 周方能报告检测结果，因此病人须再次回到医院诊所取检验结果。对许多病人而言，这一等待过程常常令人焦虑不安，而有些人永远也不会再回去取他们的检验结果。

因此，对快速、廉价而且操作简便的 HIV 快速检测技术的需求日益扩大。因为 HIV 快速检测应使病人可以在初次就诊时就得到检测结果和医生的诊治及建议，从而大大减少病人的花费和等待的时间。但现有的 HIV 快速检测技术（主要指免疫渗滤/层析技术）检测指标较为单一，存在着灵敏度、准确性不高等问题。ELISA 由于采用多种 HIV 抗原混合物，提高了灵敏度，但由于种种原因，其假阳性率也随之增高。特别在 HIV 感染的低危人群中，ELISA 得到的阳性结果，其中 50~90% 可被确证试验鉴定为假阳性。因此，同步分片段区别检测多种标志物对提高检测的灵敏度和准确性有着重要的意义。

发明内容

本发明的目的就在于克服现有技术存在的缺点和不足，而提供一种人类免疫缺陷病毒抗体多指标快速检测方法。

本发明的目的是这样实现的：

应用斑点金免疫渗滤试验 (Dot Immunogold Filtration Assay, DIGFA) 的基本原理，结合有自主知识产权的纳米生物探针制备和检测信号二次纳米放大技术建立的一种同步快速检测多种抗 HIV-1/2 IgG 抗体的方法。

具体地说，包括下列步骤：

- ①通过基因工程技术在大肠杆菌中表达五种 HIV 抗原蛋白片段——p24, gp41, gp36, gp120V3, gp120C;
- ②将上述五种抗原蛋白固定在硝酸纤维素膜上；
- ③然后滴加待测血清，其中的病毒抗体通过免疫反应与抗原结合，再加纳米金标记的葡萄球菌蛋白 A (SPA)；
- ④待其渗过膜片后，洗涤；
- ⑤再加纳米金标记的抗 SPA 抗体加强放大即可形成肉眼可见的红色斑点。

用已确证的 21 份 HIV 阳性血清（其中包括 1 份 HIV-2 标准血清）和 30 份阴性血清进行了试验，结果表明该快速检测方法与 ELISA 方法在准确性和灵敏度上无显著差异。该检测方法不需任何仪器，仅凭肉眼即可判定结果，整个检测过程不过 5 分钟。

本发明与现有 HIV 诊断试剂相比具有如下特点或创新性：

- (1) 可以同步诊断和区分 HIV1 和 HIV2 型感染；
- (2) 引入 P24 抗体与其它抗体指标组合模式可用于指示病程发展；
- (3) 阳性信号由于使用了两种纳米金标记探针的二次放大效应使检测灵敏度达到 ELISA 水平；
- (4) 操作简便，检测耗时只有 5 分钟左右；
- (5) 结果目视化，无需配套仪器，适合各类诊疗机构；
- (6) 设置有阴阳性内控指标，使检测结果更加准确。

附图说明

图 1—重组表达载体的构建。

图 2—检测点模式图。

图 3—重组质粒 pET-p24, pET-41, pET-36, pET-120C 和 pET-120V3 的双酶切分析图谱；

泳道 1, DNA Marker DL 2000; 2a, 3a, 4a, 5a, 6a 分别为重组质粒 pET-p24, pET-41, pET-36, pET-120C, pET-120V3 的双酶切产物 (EcoR I + Xho I) ; 2b, 3b, 4b, 5b, 6b 分别为 p24, gp41, gp36, gp120C, gp120V3 的 PCR 产物; 7, 载体+EcoR I 。

图 4—重组蛋白表达图谱；

含有各重组质粒的 BL21 (DE3) 诱导后全蛋白的 SDS-PAGE 分析。泳道 1, pET-120V3; 2, pET-120C; 3, pET-36; 4, pET-41; 5, pET-p24; 6, pET28a; 7, 蛋白分子量标准物。

图 5—纯化蛋白的 SDS-PAGE 及 Western blot 分析；

A, 蛋白变性后经 15%SDS-PAGE 分离，考马斯亮蓝染色；1~5 依次为融合蛋白 gp120V3, gp120C, gp36, gp41 和 p24; 6, 蛋白分子量标准; B, Western blot 鉴定；1, 蛋白分子量标准；2, p24；3, gp41；4, gp120V3；5, gp120C；6, gp36。

图 6—胶体金和金标 SPA 的电镜照片；

a, 胶体金 (15nm)；b, 金标 SPA (磷酸钨染色)。

图 7—胶体金 (15nm) 与 SPA 用量比确定曲线。

图 8—HIV 抗体快速检测结果

a, HIV-1 阳性质控 (检测点 1, 2, 4 显色分别表示抗 gp41, p24, gp120 抗体为阳性)；b, HIV-2 阳性质控 (检测点 3 显色表示抗 gp36 抗体为阳性)；c, 阴性结果 (仅点 6 显色)；d, e, HIV-1 阳性结果。

具体实施方式

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α (克隆宿主), BL21 (DE3) (表达宿主) 及 pNL4-3 (含 HIV-1 的全基因组序列), 表达载体 pET28-a 均为本实验室保存。

1.1.2 引物及工具酶 引物由上海生物工程公司合成。Taq 酶购自 promega 公司。限制性内切酶, T4 连接酶购自华美生物工程公司。

1.1.3 主要试剂和材料 葡萄球菌蛋白 A (SPA) 及抗 SPA 抗体购自北京本元正阳基因技术股份有限公司。硝酸纤维素膜购自武汉生命科技有限公司。氯金酸购自上海试剂一厂。

1.2 方法

1.2.1 HIV 抗原表达载体的构建

基因操作参照文献 (Sambrook J and Russell D W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000)。重组质粒的构建如图 1 所示。

1.2.2 重组蛋白的表达、纯化与抗原性鉴定

按照常规方法进行 IPTG 诱导表达及纯化。重组表达载体转化 *E. coli* BL21 (DE3)。按 1: 100 取过夜培养物转接至 100mL 含 25 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基中, 培养至 OD_{600nm} 约为 0.6-0.8。加 IPTG 至浓度 1mmol/L, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 5h。。离心收获菌体, 超声裂解, 12000g 离心 20min, SDS-PAGE 分析上清与沉淀, 结果表明各表达蛋白均存在于沉淀中。将沉淀用 PBS 溶液洗涤 2 次,

溶于含 6mol/L 盐酸胍的磷酸缓冲液 (pH 8.0), 12000g 离心 20min, 取上清上镍离子亲和树脂柱。结合、洗涤后用 pH 值 5.0~3.0 的含 8M 尿素的磷酸缓冲液洗脱。SDS-PAGE 分析表达产物及纯化蛋白。以 HIV 阳性血清为一抗, 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG 为二抗, 用 Western blotting 和 ELISA 方法鉴定重组蛋白的抗原性。

1.2.3 胶体金, 金标 SPA 和金标抗 SPA 抗体的制备

参照 Frens 等人的方法 (Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution. Nature, 1973, 241:20-22) 分别制备粒径约在 15nm 和 25nm 的胶体金溶液。

取 15nm 胶体金溶液 1ml, 用 0.1 mol/L K_2CO_3 调 pH 分别至 6.0, 加入已确定的 SPA (1mg/ml) 最佳标记量约 14 μ l, 混匀, 室温静置 15min 后, 加小牛血清白蛋白 (BSA) 至终浓度为 1%, 3000 \times g 离心 5min, 取上清液 20000 \times g 离心 45min, 弃上清, 沉淀用含 1%BSA 的 PBS 溶液重悬, 4 $^{\circ}$ C 下避光保存。用 25nm 胶体金标记抗 SPA 抗体, 方法同上。

1.2.4 胶体金免疫渗滤检测试纸的制备

各取 2 μ l 不同 HIV 抗原蛋白 (浓度约 1mg/mL) 及 1mg/mL 人 IgG, BSA 溶液按图 2 所示阵列点在 1.5 \times 1.5cm 的硝酸纤维素膜上 (其中 gp120 为蛋白 gp120V3 和 gp120C 的混合溶液), 分别作为检测点和质控点。室温下放置, 待其干燥后用含 5% 脱脂奶粉的 PBS 溶液封闭 45min。再用 PBS 溶液洗涤 3 次, 每次 5 min。干燥后将其装入免疫渗滤装置板内。

1.2.4 检测过程

取 50 μ l PBST 溶液 (含有 0.5% Tween 20 的 PBS 溶液) 滴加在检测膜上, 润洗膜片。待溶液完全渗过后, 均匀、缓慢滴加 40 μ l 待检血清 (若有聚集物必须先离心除去)。待其渗过后, 再加 2~3 滴 PBST 溶液洗膜。然后滴加 50 μ l 金标 SPA 溶液, 待其渗过后, 再加 2~3 滴 PBST 溶液洗膜。最后滴加 50 μ l 金标抗 SPA 抗体溶液, 待其渗过后, 加 2~3 滴 PBST 溶液洗膜, 观察检测结果。检测点显红色者, 其对应 HIV 抗体为阳性; 只阳性质控点 (人 IgG) 显色者为 HIV 抗体阴性。

2 结果

2.1 重组质粒的构建与鉴定

四种 HIV-1 基因片段来自质粒 pNL4-3; HIV-2 跨膜蛋白 gp36 基因来自 HIV-2 毒株(HIV-2 MVP-15132) cDNA。各基因片段通过 PCR 扩增得到, 引物序列见表 1。扩增产物及表达载体 pET28-a 用 EcoR I 和 Xho I 双酶切、回收和连接分别得到重组质粒 pET-p24、pET-41、pET-120C、pET-120V3 和 pET-36。各重组质粒经 EcoR I 和 Xho I 酶切后, 所得片段大小与预期结果相符(见图 3), 证明载体构建成功。

Table 1 Primer sequences and their location in HIV-1/2 genomes

Primer	Sequence (5'~3')	Location in HIV-1 (HBX2) and HIV-2 (ROD) genome
P24a	CAAGAATTCCCTATAGTGCAGAACCTC	1186~1203bp
P24b	ATTCTCGAGTTAGCTCATTTGCTTCAGC	1879~1893bp
P41a	GAAGAATTCGCAGTGGGAATAGGAG	7758~7773bp
P41b	TTATCTCGAGCAGCCAATTTGTTATGTT	8244~8261bp
P120Ca	GACGAATTCACACTCCCATGCAGAATAA	7467~7485bp
P120Cb	AAGCTCGAGAGCTCCTATTCCCACTGC	7758~7775bp
P120V3a	ATTGAATTCCATTATTGTGCCCCGG	6870~6885bp
P120V3b	TAGCTCGAGGTTATAAAGTGGCATTCC	7237~7250bp
P36a	TTAGAATTCGTGTTTCGTGCTAGGGTTC	7683~7700bp
P36b	AATCTCGAGGACCCAGGAGGTTAAGTCA	8150~8168bp

2.2 各 HIV 基因片段在 *E.coli* 中的表达及纯化

对表达产物的 SDS-PAGE 分析结果(图 4)表明各表达蛋白均存在于沉淀中。其中 gp120V3 表达菌体不能完全溶于 SDS-PAGE 上样缓冲液, 但可溶于 6M 盐酸胍溶液。p24 的纯化则还可采用柱上复性技术, 最后用含 250mmol/L 咪唑的磷酸缓冲液(pH8.0)洗脱, 可得到无变性剂存在的可溶性蛋白溶液。纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析见图 5A。

2.3 HIV 基因表达产物的鉴定

Western blot 结果表明 5 种重组蛋白与 HIV 阳性血清可发生特异性反应(图 5B)。HIV-1 的四种抗原中, 以 p24 和 gp41 反应最强, gp120C 次之, gp120V3 反应最弱。gp36 与 gp41 序列相当, 也有较强的反应。

将各抗原稀释至 10 $\mu\text{g/ml}$ 包被酶标板, 分别检测 100 倍稀释的四份 HIV 阳性血清和三份阴性血清, 结果显示各融合蛋白均能与 HIV 阳性血清反应, 但反应

强度有所差异。

2.4 胶体金及胶体金标记 SPA 的透射电镜鉴定结果

取 10 μ l 胶体金 (15nm) 滴于铜网上, 滤纸吸干水分, 在透射电镜 (TEM) 下进行观察 (电镜照片见图 6a), 所制胶体金大约为 15nm \pm 2nm, 颗粒为圆形, 较为均匀, 且单分散性较好。

取 10 μ l Au-SPA 探针滴于铜网上, 滤纸吸干水分, 再滴加 10 μ l 磷钨酸复染处理, 滤纸吸干水分, 透射电镜观察。胶体金标记 SPA 的透射电镜照片 (图 6b) 显示胶体金颗粒周围有明显的灰黑色晕环, 表明颗粒表面吸附有蛋白质。此时胶体金的标记并未导致胶体金-SPA 形成聚集, 金颗粒仍然稳定存在, 分散性较好。

同样方法鉴定 25nm 胶体金及金标物 (结果未示出)。

2.5 胶体金与 SPA 用量比的确定

以 15nm 胶体金为例, 胶体金用 0.1mol/L 的 K_2CO_3 溶液调节 pH 值至 6.0。取 10 管各加 1ml 的胶体金, 分别加入系列体积的 1mg/mL SPA, 混匀, 室温下静置 15 分钟后各加入 100 μ l 10% NaCl 溶液, 混匀, 分别测定 A_{520nm} (520nm 为紫外可见分光光度计扫描得到的胶体金最大吸收波长), 以各管所加入 SPA 的体积数为横坐标, A_{520nm} 值为纵坐标作图 (图 7)。从图中可以看出, 当 SPA 蛋白溶液的体积达到 12 μ l 时, 此时胶体金颗粒已被饱和, 加入高盐溶液后, 胶体金颗粒不会产生聚沉。当加入的蛋白量进一步增加时, 曲线基本趋于平和, 吸收值改变不大。实际应用时, 以此量增加 10%-20%为实验用量。同样方法确定 25nm 胶体金与 SPA 抗体的用量比 (结果未示出)。

2.6 抗原最佳包被浓度的确定

用 SPA 模拟抗原, 将不同浓度的 SPA 溶液 (3, 2, 1, 0.75, 0.5, 0.25mg/ml) 固定在硝酸纤维素膜上, 对梯度稀释的正常血清 (含有不同浓度的 IgG) 进行胶体金免疫渗滤试验。结果显示当 IgG 浓度较高时, 随抗原包被浓度的提高, 其显色强度逐渐增加, 当抗原浓度高于 1mg/ml 时, 斑点颜色无明显加深; 当 IgG 浓度较低时, 随抗原浓度增加, 各斑点显色强度无明显改变。

2.7 DIGFA 同步检测多种抗 HIV-1/2 抗体

我们对 20 份 HIV-1 阳性血清, 1 份 HIV-2 阳性血清和 30 份阴性血清进行了试验 (所有血清已通过 ELISA 检测, 阳性血清经 W.B.确证)。所有阴性血清

经此 HIV 快速诊断试验结果均为阴性，特异性为 100%。HIV-1 阳性结果的判定为抗 gp41/gp120 抗体阳性或与抗 p24 抗体同时阳性。HIV-2 阳性结果的判定为抗 gp36 抗体阳性。其它非阴性结果则判为疑似。结果 20 份 HIV-1 阳性血清的检出率为 100%。其中，抗 gp41 抗体的阳性率为 100% (20/20)；抗 p24 抗体的阳性率为 80% (16/20)；抗 gp120 抗体的阳性率为 30% (6/20)。其中有 5 份 HIV-1 阳性血清与 gp36 有着不同程度的交叉反应。一份 HIV-2 阳性血清被 HIV 快速诊断试验检出为抗 gp36 抗体阳性，其他抗 HIV-1 抗体均为阴性（结果见表 2）。对 HIV-1, HIV-2 标准阳性血清的检测结果表明，此检测试纸可以同步检测并区分 HIV-1/2 感染（见图 8）。

Table 2 Comparison of HIV rapid assay with ELISA

No. of positive results of each detection marker	Rapid anti-HIV antibodies detection assay			
	gp41	p24	gp120	gp36
ELISA HIV-1 positive sera(20)	20	16	6	5
HIV-2 positive serum(1)	0	0	0	1
negative sera (30)	0	0	0	0

3 优势

1、市场广阔。由于引入多个 HIV 检测标志物结合纳米放大技术提高了 HIV 感染检测的灵敏度和准确性，可以用于早期诊断、病程示踪、区分 1/2 型，解决了我国艾滋病毒感染的多指标快速检测难题，其产品市场容量巨大。

2、开发难度小。由于为体外诊断，虽然也划入新药的范畴，但不要求作药理、毒理试验，对临床试验的要求也较低，因此，比较容易取得新药证书，产业化门槛较低。

3、投入产出比高。投资回报非常高，投入 300 万元研发资金在 2 年左右时间内即可取得新药证书，部分产品还可以在临床研究阶段取得收益。

4、多项专利技术确保项目技术先进。本项目产品对抗体等蛋白质检测灵敏度高、特异性强、成本低廉，全过程只需 5 分钟左右，适合疾病现场、基层医疗机构和中心城市大医疗机构使用。

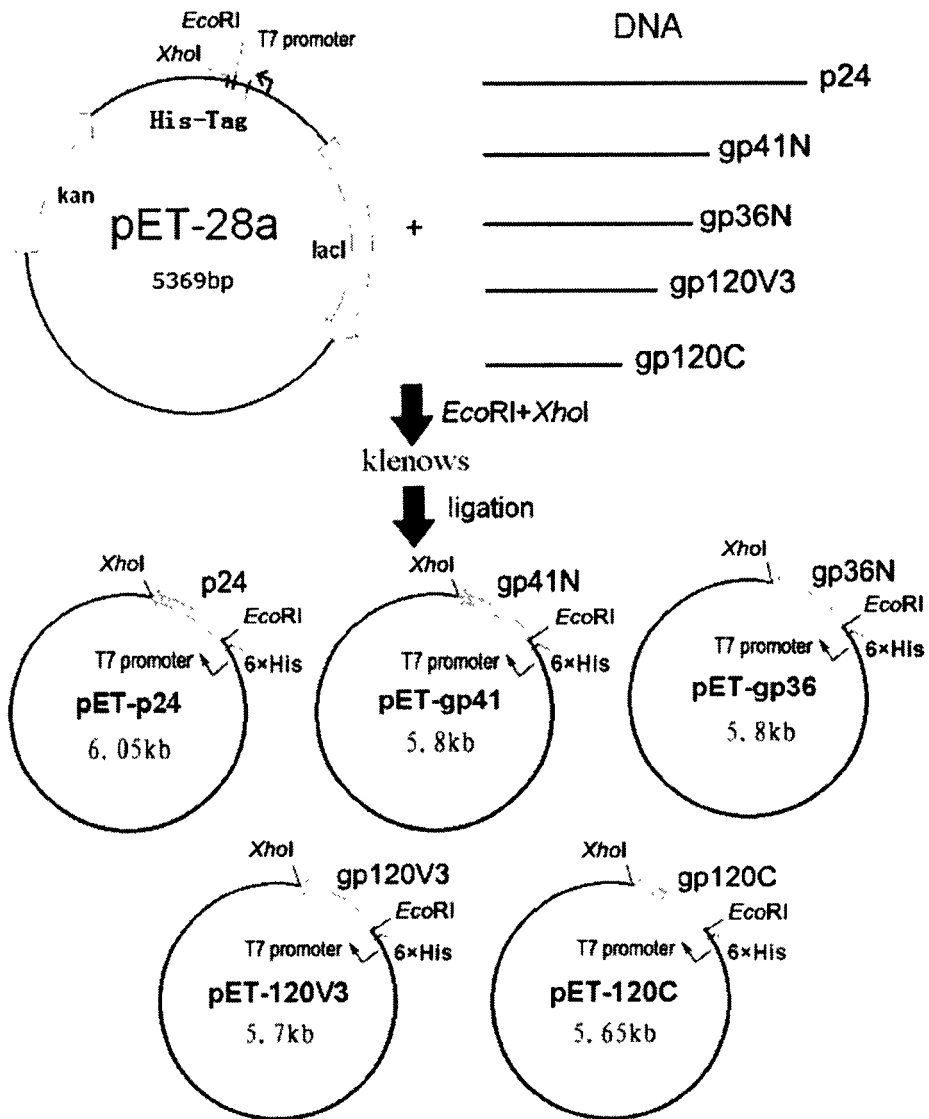


图 1

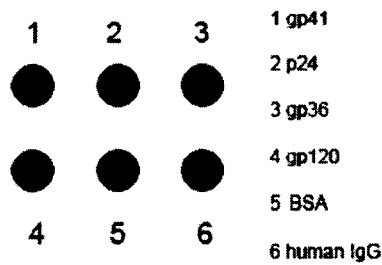


图 2

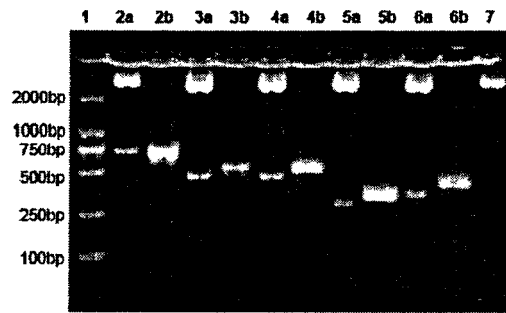


图 3

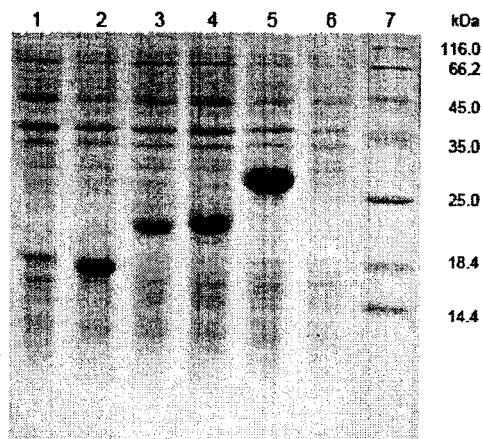


图 4

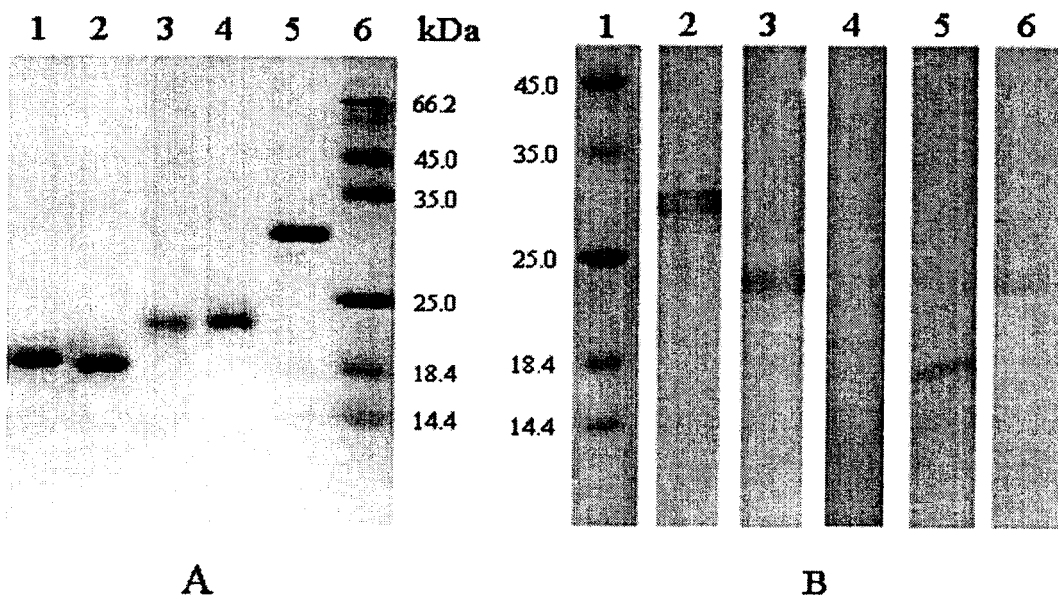


图 5

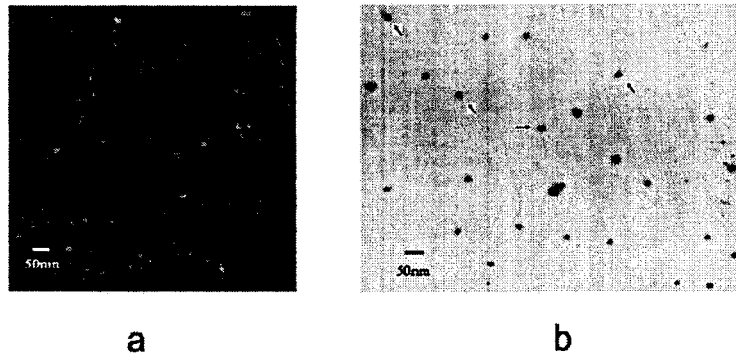


图 6

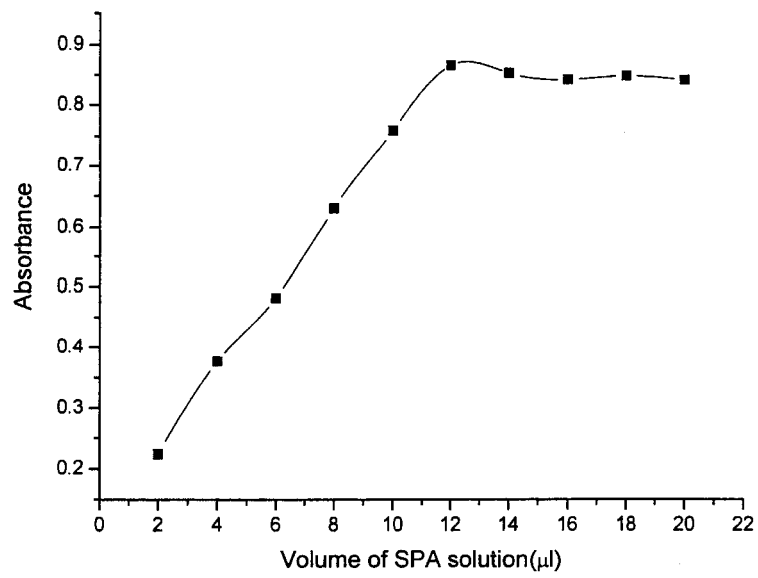


图 7

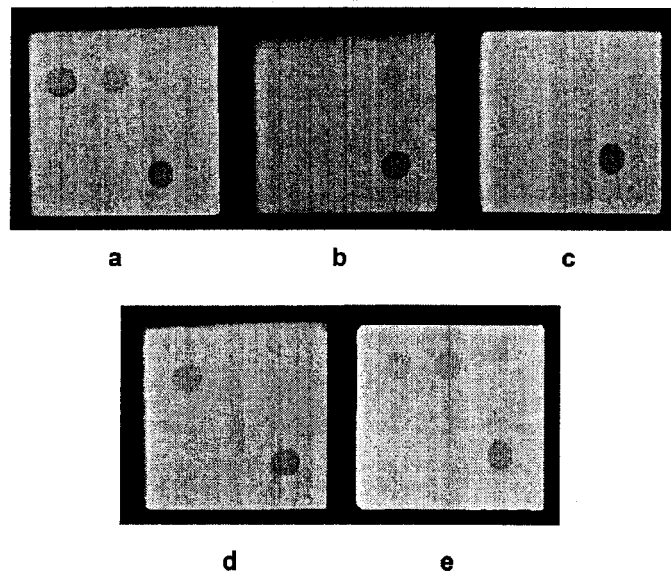


图 8

专利名称(译)	人类免疫缺陷病毒抗体多指标快速检测方法		
公开(公告)号	CN1858594A	公开(公告)日	2006-11-08
申请号	CN200610018769.1	申请日	2006-04-14
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	王业富 翟建新		
发明人	王业富 翟建新		
IPC分类号	G01N33/544 G01N21/78 G01N33/532		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人类免疫缺陷病毒抗体多指标快速检测方法，涉及人类免疫缺陷病毒抗体检测技术。包括下列步骤：1.通过基因工程技术在大肠杆菌中表达五种HIV抗原蛋白片断——p24，gp41，gp36，gp120V3，gp120C；2.将上述五种抗原蛋白固定在硝酸纤维素膜上；3.然后滴加待测血清，其中的病毒抗体通过免疫反应与抗原结合，再加纳米金标记的葡萄球菌蛋白A(SPA)；4.待其渗过膜片后，洗涤；5.再加纳米金标记的抗SPA抗体加强放大即可形成肉眼可见的红色斑点。本发明检测灵敏度高、特异性强、成本低廉，全过程只需5分钟左右，适合疾病现场、基层医疗机构和中心城市大医疗机构使用。

