

## 人工合成多肽检测抗 HIV-1 和 HIV-2 抗体的研究

洪世雯 何红霞 朱凤兰 林涛

(中国人民解放军三〇二医院,北京 100039)

R512.910.4

**A 摘要** 采用固相法合成 HIV-1 和 HIV-2 两个多肽,建立了用混合多肽为包被抗原检测 HIV-1 和 HIV-2 感染的间接酶联免疫吸附法。检测 46 份抗 HIV-1 和 HIV-2 抗体阳性血清标本以及 94 份对照血清标本,与 UBI 试剂比较,其阳性符合率为 97.8%,阴性符合率为 100%,总符合率为 99.3%。实验结果表明,此法可用于 HIV-1 和 HIV-2 感染的检测。

**关键词** 合成多肽,间接酶联免疫吸附法,人免疫缺陷病毒 1 型,人免疫缺陷病毒 2 型

艾滋病(AIDS)在全球流行。现已确定,人免疫缺陷病毒 1 型(HIV-1)和 2 型(HIV-2)为该病病原。我国 HIV 感染者正日趋增多,对人类健康造成严重威胁。建立灵敏、特异的检测方法,对控制 AIDS 的传播十分重要。用灭活全病毒或重组抗原做包被抗原的 ELISA 法,既不安全,周期又长,难于分离、纯化。目前,人工合成多肽抗原已广泛用于对多种病毒(如 HCV, HEV, HIV)感染的检测。据报道, HIV-1 流行范围较为广泛,而 HIV-2 则主要在西非流行,两者的抗原性有差异,但也有部分交叉反应<sup>[1]</sup>。根据发表的 HIV-1<sup>[2]</sup>和 HIV-2<sup>[3]</sup>的核苷酸和氨基酸序列,依据抗原性的强弱与蛋白质分子的亲水性、移动性、电荷分布相关,我们采用固相法分别合成了 HIV-1 和 HIV-2 的两个多肽。用混合多肽包被酶标板,建立了检测 HIV-1 和 HIV-2 感染的间接 ELISA 法,其灵敏度高、特异性强、重复性好且简便、快速,为 HIV-1 和 HIV-2 感染提供了安全、可靠的检测方法。

## 材料和方法

## 1 多肽的合成

用 ABI 公司 431A 型多肽合成仪,以固相法合成。多肽 1(SP1)位于 HIV-1 穿膜糖蛋白 gp41 区域。多肽 2(SP)位于 HIV-2 穿膜糖蛋白 gp36 区域。

## 2 血清来源

46 份抗 HIV 阳性血清从北京、云南、美国、非洲等地收集。经卫生部生物制品检定所及军事医学科学院艾滋病确认实验室等单位用 Western Blot 法检测为抗 HIV 阳性者的血清。56 份梅毒 RPR 阳性,6 份红斑狼疮阳性,13 份 RF 阳性,20 份抗 HAV-IgM 阳性,20 份 HBsAg 阳性以及 20 份抗 HCV 阳性血清均来自北京等地区医院。94 份健康人血清来自本院体检健康者。

## 3 ELISA 法

采用丹麦产 96 孔可拆式 Nunc Maxi Sorp 聚苯乙烯酶标板。每孔加 100 $\mu$ l 包被抗原,包被缓冲液为 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液,置 37 $^{\circ}$ C 1 小时后,于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜。弃包被液后,每孔加 100 $\mu$ l 封闭液(含

30%灭活小牛血清的 PBST; 0.02mol/L pH7.4 PBS, 含 0.05%吐温 20)。置 37°C 封闭 1 小时后,弃封闭液。加 50 $\mu$ l 1:10 稀释的血清标本,标本稀释液为含 10%灭活小牛血清及防腐剂的 PBST,置 37°C 保温 30 分钟。用 PBST 洗板 5 次。加 50 $\mu$ l 辣根过氧化物酶标记的抗人 IgG(用滴定法选择最适酶浓度),于 37°C 保温 15 分钟后,洗板 5 次。加 50 $\mu$ l 底物液(0.05mol/L pH5.0 柠檬酸缓冲液中含 0.01% $H_2O_2$ ,1mg/ml 邻苯二胺),于 37°C 避光显色 15 分钟后,加 2mol/L 硫酸终止反应。用 BIO-RAD 450 型酶标仪测 OD<sub>492</sub>值。被检标本的 OD 值 $\geq$ 0.2(临界值)为阳性,<0.2 为阴性。

## 结 果

### 1 多肽抗原包被浓度的选择

用 0.5 $\mu$ g/ml—10 $\mu$ g/ml 的多肽抗原 SP1 或 SP2 单独包被酶标板,测定 2 份 HIV 阳性血清 S1 和 S2,结果如图 1 所示。S1 为抗 HIV-1 阳性血清,S2 为抗 HIV-2 阳性血清,每份血清均检测 1:10 和 1:20 两个稀释度的吸收值。从图 1 可见,包被抗原浓度从 0.5 $\mu$ g/ml 增加至 5 $\mu$ g/ml 时,吸收值逐步增加,再增加至 10 $\mu$ g/ml 时,吸收值无明显增加。以 5 $\mu$ g/ml SP1 及 5 $\mu$ g/ml SP2 为最适抗原包被浓度。

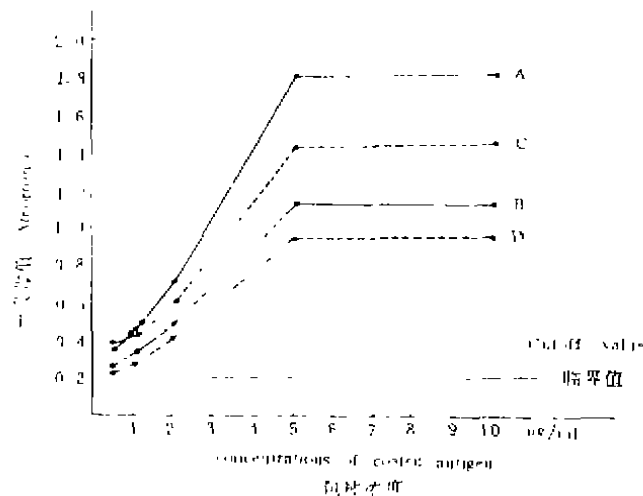


图 1 不同浓度的 SP1 和 SP2 单独包被对 2 份 HIV 阳性血清的检测结果

- A: SP1 单独包被检测 HIV-1 阳性血清 S1(1:10 稀释度)  
 B: SP1 单独包被检测 HIV-1 阳性血清 S1(1:20 稀释度)  
 C: SP2 单独包被检测 HIV-2 阳性血清 S2(1:10 稀释度)  
 D: SP2 单独包被检测 HIV-2 阳性血清 S2(1:20 稀释度)

Fig 1 Detection results of 2 positive sera for anti-HIV by different concentrations of SP1 or SP2 as coated antigen

- A. Detection of positive serum S1(1:10 dilution) for HIV-1 by SP1.  
 B. Detection of positive serum S1(1:20 dilution) for HIV-1 by SP1.  
 C. Detection of positive serum S2(1:10 dilution) for HIV-2 by SP2.  
 D. Detection of positive serum S2(1:20 dilution) for HIV-2 by SP2.

用 SP1 和 SP2 混合抗原包被酶标板,检测 S1 和 S2 血清,结果见图 2。从图 2 可见,用  $5\mu\text{g/ml}$  SP1 和  $5\mu\text{g/ml}$  SP2 混合包被,与  $5\mu\text{g/ml}$  单独包被时检测 S1 和 S2 血清的最高稀释度相同,故选用混合抗原浓度为最适浓度。

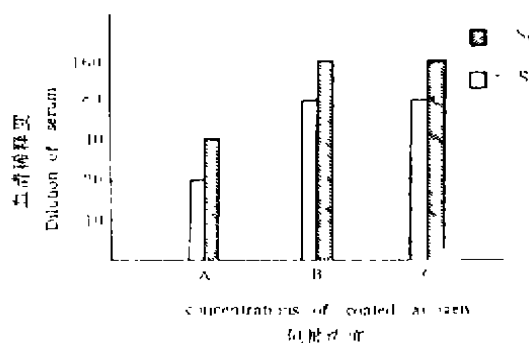


图 2 不同浓度 SP1 和 SP2 单独或混合包被检测 2 份 HIV 阳性血清 S1 和 S2 的稀释度

A: SP1 和 SP2 混合包被,各  $2\mu\text{g/ml}$

B: SP1 和 SP2 混合包被,各  $5\mu\text{g/ml}$

C: SP1 或 SP2 单独包被,  $5\mu\text{g/ml}$

Fig. 2: Dilutions of 2 positive sera S1 and S2 for anti-HIV by different concentrations of SP1, SP2 or mixed SP1 and SP2 as coated antigen.

A: Coated by mixed SP1 and SP2,  $2\mu\text{g/ml}$  per each.

B: Coated by mixed SP1 and SP2,  $5\mu\text{g/ml}$  per each.

C: Coated by SP1 or SP2,  $5\mu\text{g/ml}$  per each.

## 2 临界值的确定

检测 94 份健康人血清,阴性平均值为 0.07,  $SD=0.04$ ,标准临界值定为阴性对照平均值  $+3SD=0.07+3\times 0.04=0.19$ 。阳性对照血清选择 OD 值约为 1.60,阴性对照血清 OD 值约为 0.03,实验临界值=阳性对照平均值  $\times 0.1$  + 阴性对照平均值。本实验临界值  $=0.16+0.04=0.20$ 。

## 3 SP1 和 SP2 对 HIV-1 和 HIV-2 感染者血清检测结果的比较

表 1 列出 SP1 和 SP2 单独或混合包被检测 HIV 感染者血清的结果。用 SP1 单独包被,检测 44 份 HIV-1 感染者血清,43 份为阳性,阳性率为 97.7%,检测 2 份 HIV-2 感染者血清,1 份为阳性,阳性率为 50%,总阳性率为 95.7%。SP2 单独包被,检测 44 份 HIV-1 感染者血清,1 份为阳性,阳性率为 2.3%,检测 2 份 HIV-2 感染者血清,2 份均为阳性,阳性率为 100%,总阳性率为 6.5%。SP1 和 SP2 混合包被,检测 44 份 HIV-1 感染者血清,43 份为阳性,阳性率为 97.7%,检测 2 份 HIV-2 感染者血清,2 份均为阳性,阳性率为 100%,总阳性率为 97.8%。

表1 SP1 和 SP2 单独或混合包被检测 HIV-1 和 HIV-2 感染者血清的结果  
Table 1 Results of anti-HIV-1 and HIV-2 by SP1, SP2 or mixed SP1 and SP2 as coated antigen

多肽 Peptide	血清 Serum				总阳性率(%) General Positive rate (%)
	Anti-HIV-1		Anti-HIV-2		
	阳性(n=44)阳性率(%) Positive(n=44) (%)		阳性(n=2)阳性率(%) Positive(n=2) (%)		
SP1	43	97.7	1	50	95.7
SP2	1	2.3	2	100	6.5
SP1+SP2	43	97.7	2	100	97.8

#### 4 灵敏度和特异性

用 SP1 和 SP2 混合抗原包被,检测 46 份 HIV 感染者血清及 94 份健康人血清,与 UBI 试剂检测结果比较,列于表 2。从表 2 看出,46 份 UBI 检测阳性血清,用本试剂检测,45 份为阳性,94 份 UBI 检测阴性血清,本试剂检测均为阴性。以 UBI 试剂为对照标准,本试剂的灵敏度为 97.8%,特异性为 100%,总符合率为 99.3%。

表2 本试剂与 UBI 试剂检测结果的比较  
Table 2 Comparison of results of our reagent with UBI reagent

SP1+SP2	UBI 试剂 UBI reagent		总符合率(%) General coincident rate (%)
	阳性数 Positive number	阴性数 Negative number	
	阳性数 Positive number	45	
阴性数 Negative number	1	94	99.3

本试剂检测其它几种疾病患者血清标本的结果列于表 3。检测 56 份梅毒 RPR 阳性血清,2 份为阳性。13 份 RF 阳性、6 份红斑狼疮阳性、20 份抗 HAV-IgM 阳性、20 份 HBsAg 阳性、20 份抗 HCV 阳性血清,均为阴性。结果表明,该试剂特异性高。

#### 5 重复性和稳定性

检测 1 份 HIV-1 阳性和 1 份 HIV-2 阳性血清,批间变异系数为 9.1%,批内变异系数为 7.3%,试剂的重复性好。将试剂于 37°C 放置 5 天或在 4°C 放置 4 个月,阳性对照值无明显变化。该试剂在 4°C 至少可存放 6 个月。

表3 其它疾病患者血清标本抗-HIV 的检测结果

Table 3 Results for anti-HIV in serum of patients with other diseases

标本 Specimens	检测数 Number	阳性数(阳性率%) Positive number(%)
梅毒 RPR 阳性 Syphilis	56	2(3.6)
RF 阳性 RF	13	0(0)
抗-HAV-IgM Anti-HAV-IgM	20	0(0)
HBsAg 阳性 HBsAg	20	0(0)
抗-HCV 阳性 Anti-HCV	20	0(0)
红斑狼疮阳性 Lulus erythematosus	6	0(0)

## 讨 论

艾滋病的流行对人类健康造成严重威胁。该病主要通过性、母婴及血液和血液制品传播。因此,建立灵敏、特异且简便的检测方法进行早期诊断和献血员筛选,对控制 AIDS 的传播具有十分重要的意义。国外试剂价格十分昂贵,不能广泛使用。本文介绍我们用自行设计、合成的两种多肽抗原混合包被酶标板建立的间接 ELISA 法,其成本低,重复性和稳定性好,与 UBI 试剂相比,灵敏度达 97.8%,特异性达 100%。初步试验结果表明,该法可用于临床 HIV-1 和 HIV-2 感染的检测。

根据 HIV 蛋白质疏水图及序列保守性,我们合成了 5 个 HIV-1 多肽 SP1,SP3,SP4,SP5,SP6 以及 1 个 HIV-2 多肽 SP2。5 个 HIV-1 多肽中,gp41 区的 SP1 对 HIV-1 感染者血清的检测灵敏度最高(结果另示)。

本试验结果显示,用 HIV-1 多肽 SP1 包被的 ELISA 不能检测 HIV-2 感染(阳性率为 50%),同样,用 HIV-2 多肽 SP2 包被的 ELISA 也不能检测 HIV-1 感染(阳性率为 2.3%),只有用 SP1 和 SP2 混合多肽包被才能同时检测 HIV-1 和 HIV-2 感染。该结果与 Gnann 等<sup>[1]</sup>关于二型 HIV 的抗原性有差异,但也有部分血清学交叉反应的报道一致。我们认为,这可能与 SP1 和 SP2 两个 27 个氨基酸组成的多肽中,有 13 个相应的氨基酸相同,14 个氨基酸不同有关。

该试剂与 UBI 试剂相比,灵敏度稍低。我们将通过进一步纯化多肽抗原、调整包被抗原浓度及包被条件等,使灵敏度提高。

表 3 列出检测几种其它疾病患者血清的结果。除梅毒 RPR 阳性血清中有 2 份为抗 HIV 阳性外,其它患者血清标本均为阴性,说明该试剂特异性高,与其它疾病无非特异性反应。这 2 份梅毒 RPR 阳性血清,用 UBI 试剂检测亦为抗 HIV 阳性。因此,我们认为这 2 份梅毒 RPR 阳性血清不是假阳性,而是梅毒和 HIV 重叠感染。

## 参 考 文 献

- 1 John W. Gnann, JR., Joseph B. McCormick, Sheila Mitchell, *et al.* Synthetic peptide immunoassay distinguishes HIV type 1 and type 2 infections. *Science*, 1987; 237: 1346-1349
- 2 Simon Wain-Hobson, Pierre Sonigo, Olivier Danos, *et al.* Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. *Cell*, 1985; 40: 9-17
- 3 Mireille Guyader, Micheal Emerman, Pierre Sonigo, *et al.* Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*, 1987; 326: 662-669

## A Study on the Detection of Antibodies to HIV Type 1 and Type 2 by Using Synthetic Peptides

Hong Shiwen   He Hongxia   Zhu Fenglan   Lin Tao

(302nd Hospital of PLA, Beijing 100039)

Two peptides of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 and type 2 were synthesized by solid-phase method. An indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) employing these peptides as an antigen adsorbent was developed to detect the infections of HIV-1 and HIV-2. A comparison of our reagent with UBI reagent in detection of 46 positive serum specimens and 94 negative control serum specimens for HIV-1 and HIV-2 showed that the coincident rate for positive was 97.8%, for negative was 100%, and the general coincident rate was 99.3%. The results indicated that this method can be used in detection for infections of HIV-1 and HIV-2.

**Key words** Synthetic peptide, Indirect enzyme-linked immunosorbent assay, Human immunodeficiency virus type 1, Human immunodeficiency virus type 2