

# 应用斑点金免疫渗滤试验快速同步检测抗 HIV-1 , HIV-2 IgG 抗体

翟建新, 王业富<sup>\*\*</sup>, 段炼炼, 徐争辉, 万志香, 杨 永<sup>\*</sup>

(武汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430072)

## Rapid and Simultaneous Detection of IgG Antibodies to HIV-1 and HIV-2 by Dot Immunogold Filtration Assay

ZHAI Jian-xin, WANG Ye-fu<sup>\*\*</sup>, DUAN Lian-lian, XU Zheng-hui, WAN Zhi-xiang, YANG Yong  
(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract :** A simple rapid detection of HIV-1 and HIV-2 antibodies was developed by using dot immunogold filtration assay. Five recombinant proteins derived from HIV *env* and *gag* regions of HIV-1 and HIV-2 (P24, GP41, GP120C, GP120V3 and GP36) were expressed in *E. coli*. The proteins were purified, immobilized onto the nitrocellulose membrane and used for detecting anti-HIV IgG antibodies. Human IgG was used as internal control. Anti-HIV antibodies detected in sera by these antigens were observed with the naked eye with the aid of colloidal gold labeled SPA. A total of 51 sera were tested by ELISA and by our rapid HIV assay. A total of 21 HIV positive samples (containing one HIV-1 positive control serum and one HIV-2 positive control serum) confirmed by Western blots exhibited a positive reaction when tested by our assay. HIV negative sera (30 samples) were also negative by our test. These results suggested that our method can be used for detecting anti-HIV antibodies and has the advantage of quickness, simplicity and cost effectiveness. In addition, simultaneous detection and discrimination among four HIV markers (anti-P24, GP41, GP120 and GP36 antibodies) by the rapid HIV test would be useful for increasing the sensitivity and accuracy of this rapid test and for evaluating and monitoring infected individuals and identifying the risk of imminent progression to AIDS.

**Key words :** HIV-1/2; Dot immunogold filtration assay; Recombinant protein; P24; GP41

**摘要:** 应用斑点金免疫渗滤试验(dot immunogold filtration assay, DIGFA)建立了一种同步快速检测四种抗 HIV-1/2 IgG 抗体的 HIV 诊断试纸。通过基因工程技术在大肠杆菌中表达了 5 种 HIV 抗原蛋白片段(P24, GP41, GP36, GP120V3, GP120C)。这 5 种抗原蛋白首先被固定在硝酸纤维素膜上,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,再加胶体金标记的葡萄球菌蛋白 A (SPA),待其渗过膜片后,洗涤,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-1 标准阳性血清和 1 份 HIV-2 标准阳性血清)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,整个检测过程不超过 5 分钟。与传统的 ELISA 法相比,具有方便快捷,成本低廉,应用范围广等优点。同时,此 HIV 快速诊断试纸可以同步检测并区分针对 HIV-1 和 HIV-2 感染的不同检测标志物(抗 P24、GP41、GP120 和 GP36 抗体),这对提高快速检测的灵敏度和准确性,以及对判断 HIV 感染者是否临近或已进入 AIDS 期有着较高的应用价值。

**关键词:** HIV-1/2; 斑点金免疫渗滤试验(DIGFA); 融合蛋白; P24; GP41

收稿日期: 2005-09-12, 修回日期: 2005-12-07

\* 基金项目: 湖北省科技攻关项目(2002AA303B01)

作者简介: 翟建新(1980 - ), 男, 河北省籍, 硕士研究生。

\*\* 通讯作者. Corresponding author. Tel: 86-27-68754627; E-mail: wangyefu@hotmail.com

中图分类号: R511

文献标识码: A

文章编号: 1003-5125(2006)02-0116-05

人类免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)主要分为两大类型, HIV-1 和 HIV-2。大部分 HIV 血清学诊断依靠检测抗 HIV 抗原的抗体, 尤其是抗 *gag* 和 *env* 基因产物的抗体。对大量 HIV 阳性样本的免疫印迹分析表明<sup>[1]</sup>, 在血清中抗跨膜蛋白抗体和抗核心蛋白 P24 抗体与其他抗 HIV 抗体相比含量较高, 是主要的 HIV 抗体。抗膜蛋白抗体反应在整个感染期间持续高水平出现, 而抗 P24 抗体随病程的发展, 由于 P24 抗原浓度增高和免疫抑制作用, 其浓度持续下降直到无法检测出。因此, 对上述抗体的免疫学检测有助于医生对病人是否临近或已进入 AIDS 期做出较可靠的判断<sup>[2, 3]</sup>。

对 GP41 和 GP36 的氨基酸序列分析表明, 两者氨基酸序列的差异高达 50%, 这使得我们可以分别检测其抗体来区分两种类型病毒的感染。但同时, 两者之间又存在一定的交叉反应<sup>[4]</sup>。

传统的抗 HIV 抗体检测方法, 如酶联免疫吸附试验(ELISA), 需要专用的仪器, 且检测过程较繁琐耗时, 通常需要 48h 至 2 周方能报告检测结果。而 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。

现有的 HIV 快速检测技术(主要基于免疫渗滤和免疫层析技术), 检测指标较为单一, 存在着灵敏度较低, 准确性不高等问题。ELISA 法由于采用多种 HIV 抗原, 提高了灵敏度, 但由于种种原因, 其假阳性率也随之增高<sup>[5, 6]</sup>。因此, 同步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。

基于以上的需要, 本文在大肠杆菌中表达了 5 种 HIV 抗原蛋白, 并制备了一种可以同步检测不同种类抗 HIV-1 和 HIV-2 抗体的 HIV 快速诊断试纸。此方法不需要任何仪器, 整个操作均在室温下进行, 耗时不超过 5min。此诊断试纸可以同步检测并区分 HIV-1 和 HIV-2 感染, 并为了解 HIV 感染者的病情及其预后提供较为可靠的诊断依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

大肠杆菌 (*E.coli*) DH5 $\alpha$ 、BL21(DE3) 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。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。葡萄球菌蛋白 A 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。

引物由上海生物工程公司合成, (引物序列见表 1)。

表 1 引物序列及其在 HIV 基因组中的位置  
Table 1 Primer sequences and their location in HIV-1/2 genomes

Primer	Sequence (5' ~ 3')	Location in HIV-1(HXB2) and HIV-2 (ROD) genomes
P24a	CAAGAATTCCTATAGTGCAGAACCTC	1186~1203bp
P24b	ATTCTCGAGTTAGCTCAATTGCTTCAGC	1879~1893bp
P41a	GAAGAATTCGAGTGGGAATAGGAG	7758~7773bp
P41b	TTATCTCGAGCAGCCAATTTGTTATGTT	8244~8261bp
P120Ca	GACGAATTCACACTCCCATGCAGAATAA	7467~7485bp
P120Cb	AAGCTCGAGAGCTCCTATCCCACTGC	7758~7775bp
P120V3a	ATTGAATTCATTATTGTGCCCCGG	6870~6885bp
P120V3b	TAGCTCGAGGTTATAAAGTGGCATTCC	7237~7250bp
P36a	TTAGAATTCGTGTTCTGCTAGGGTTC	7683~7700bp
P36b	AATCTCGAGGACCCAGGAGGTTAAGTCA	8150~8168bp

### 1.2 HIV 抗原表达载体的构建

基因操作参照文献<sup>[7]</sup>。

### 1.3 重组蛋白的表达与抗原性鉴定

按照常规方法进行 IPTG 诱导表达及纯化。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。

### 1.4 胶体金与金标 SPA 的制备

参照 Frens 等<sup>[8]</sup>的方法制备粒径约在 15nm 的胶体金溶液。金标 SPA 的制备参照文献<sup>[9]</sup>。

### 1.5 胶体金免疫渗滤检测试纸的设计和制备

检测试纸的模式设计和结果示意如图 1 所示。各取 2  $\mu$ L 不同 HIV 抗原蛋白(浓度约 1mg/mL, gp120 为蛋白 gp120C 和 gp120V3 的混合溶液)及 1mg/mL 人 IgG, BSA 溶液按图 1A 所示阵列点在 1.5 $\times$ 1.5cm 的硝酸纤维素膜上, 分别作为检测点和质控点。室温下放置, 待其干燥后用脱脂奶封闭。洗涤、干燥后将其装入免疫渗滤装置板内。

图 1B 中检测点 1 2 4 显色分别表示抗 gp41, p24 和 gp120 抗体为阳性, 即 HIV-1 阳性结果。图

1c 中，检测点 3 显色表示抗 gp36 抗体为阳性，即 HIV-2 阳性结果。此结果表明该检测试纸可以同步检测并区分 HIV-1/2 感染。

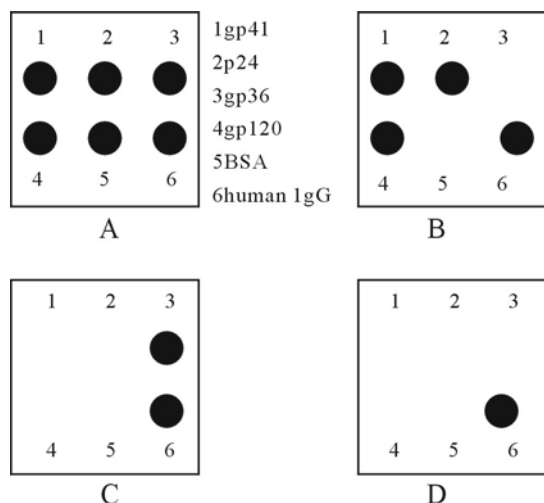


图 1 检测点及结果模式图

Fig.1 Formats of Detection dots and results

A : Detection dots: 1, gp41; 2, p24; 3, gp36; 4, gp120; 5, Negative control; 6, Positive control; B : HIV-1 positive format; C : HIV-2 positive format; D : Negative result format.

### 1.6 检测过程

PBST 溶液润洗膜片 然后均匀、缓慢滴加 40μL 待检血清 (若有聚集物必须先离心除去)。渗过后，用 PBST 溶液洗膜，再滴加 50μL 金标 SPA 溶液，质控点显色后立即加 PBST 溶液 2~3 滴洗膜。检测点显红色者，其对应 HIV 抗体为阳性；仅阳性质控点 (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。扩增产物及表达载体 pET28-a 用 *EcoR* 和 *Xho* 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 (如图 2 所示)。

### 2.2 各 HIV 基因片段表达产物及纯化后蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

对表达产物的 SDS-PAGE 分析结果 (图 3) 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 4A。

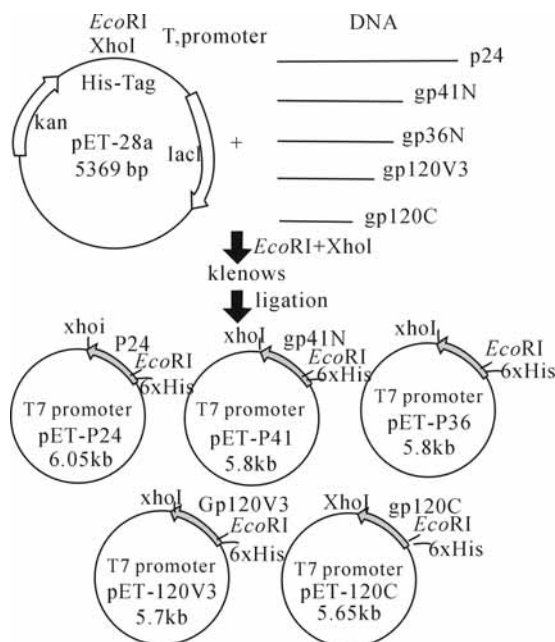


图 2 重组表达载体的构建

Fig.2 Construction of recombinant expression plasmids

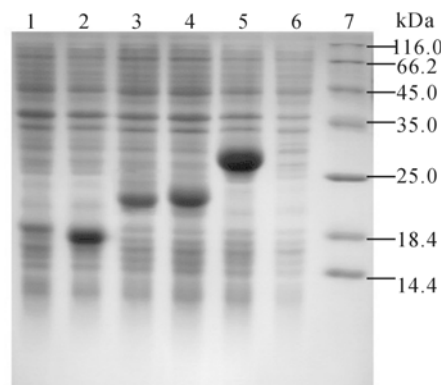


图 3 重组蛋白表达图谱

Fig.3 SDS-PAGE profile of products expressed by Recombinant plasmids

Proteins were expressed in *E.coli*. BL21(DE3) following induction with 1mM IPTG for 5h and subjected to SDS-PAGE(15% gel). Lane 1, pET-120V3; 2, pET-120C; 3, pET-36; 4, pET-41; 5, pET-p24; 6, pET28a; 7, standard Protein molecular weight marker.

### 2.3 HIV 基因表达产物的抗原性鉴定

将各纯化后的重组蛋白经 SDS-PAGE 分离后，从凝胶电转移至硝酸纤维素膜上。用 HIV-1 阳性血清与 HIV-1 重组蛋白 GP41 P24 ,GP120C ,GP120V3 反应，HIV-2 阳性血清与蛋白 GP36 反应，结果表明 5 种重组蛋白与相应血清可发生特异性反应 (图 4B)。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 μg/mL 包被酶标板，分别

检测 100 倍稀释的 3 份 HIV-1 阳性血清 (与 HIV-1 重组蛋白反应), 1 份 HIV-2 阳性血清 (与 gp36 反应) 和 3 份阴性血清, 结果显示各融合蛋白均能与相应 HIV 阳性血清反应, 但反应强度有所差异。

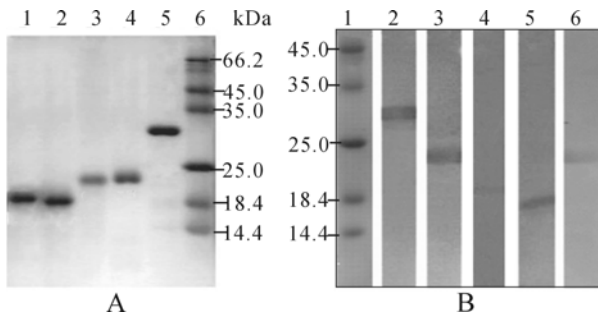


图 4 纯化蛋白的分析

Fig.4 Analysis of purified fusion proteins by reduced SDS-PAGE and Western blot assay

A: SDS-PAGE. Lanes 1~5 show fusion proteins gp120V3, gp120C, gp36, gp41 and p24 respectively; 6, standard protein molecular weight marker. B: Western blotting of Purified Proteine. 1, standard protein molecular weight marker; 2, P24; 3, GP41; 4, GP120V3; 5, GP120C; 6, GP36

#### 2.4 胶体金及胶体金标记 SPA 的透射电镜鉴定结果

取 10 $\mu$ L 胶体金滴于铜网上, 滤纸吸干水分, 在透射电镜(TEM)下进行观察(电镜照片见图 5a), 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  $\mu$ L Au-SPA 探针滴于铜网上, 滤纸吸干水分, 再滴加 10  $\mu$ L 磷酸钨染色, 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 5b)显示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。

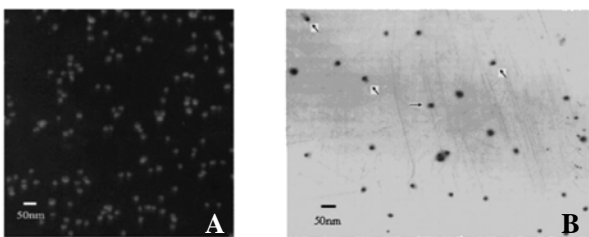


图 5 胶体金和金标 SPA 的电镜照片

Fig.5 TEM photos of colloidal gold and colloidal gold labeled SPA  
A: Colloidal gold; B: Colloidal gold labeled SPA (stained by phosphate tungstate)

#### 2.5 胶体金与 SPA 用量比的确定

胶体金用 0.1mol/L 的 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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 15min 后各加入 100  $\mu$ L 10% NaCl 溶液, 混匀, 分别测定 A<sub>520nm</sub>, 以各管所加入 SPA 的体积数为横坐标, A<sub>520nm</sub> 值为

纵坐标作图(图 6)。从图中可以看出, 当 SPA 蛋白溶液的体积达到 12 $\mu$ 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。

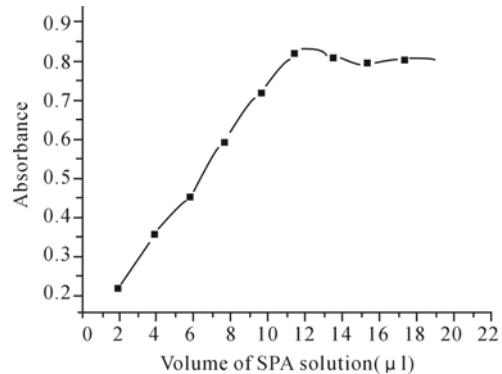


图 6 胶体金与 SPA 用量比确定曲线

Fig.6 Determination of colloidal gold to SPA ratio

#### 2.6 DIGFA 同步检测多种抗 HIV-1/2 抗体

我们根据图 1 模式对 20 份 HIV-1 阳性血清, 1 份 HIV-2 阳性血清和 30 份阴性血清进行了检测(所有血清已通过 ELISA 检测, 阳性血清经 W.B. 确证), 结果见表 2。阳性检出率为 100%。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%。其中有 5 份 HIV-1 阳性血清与 GP36 有着不同程度的交叉反应。

表 2 HIV 快速检测结果  
Table 2 Results of HIV rapid assay

No. of positive results of each detection marker	Rapid anti-HIV antibodies detection assay			
	GP41	P24	GP120	GP36
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 讨论

本文在大肠杆菌中表达了 5 种 HIV 抗原片段: HIV-1 的 P24 全片段, gp41 N 端片段和 GP120 的 V3 及 C 端片段, 以及 HIV-2 的 GP36 N 端片段。HIV-1 基因型为 M 族 B 亚型, 与我国的 HIV-1 流行株相符。HIV-2 基因型为 A 亚型。Western blot 和 ELISA 分析显示四种蛋白均具有良好的抗原性, 但 GP120 片段, 尤其是 V3 片段, 与阳性血清的反应强度明显低于 GP41 和 P24。DIGFA 结果也是如此,

显示了这两种 GP120 片段检测抗体的低灵敏度,其原因可能与 GP120 的高突变率有关<sup>[10-12]</sup>。

GP41 作为 HIV 抗体检测的主要抗原,其 N 端的三个主要抗原决定区可以识别几乎所有的 HIV-1 M 族阳性血清<sup>[4, 13-15]</sup>,具有极强的抗原性。本实验表明 GP41N 端片段可以和所有测试的 HIV-1 阳性血清反应(如表 2 所示),并且具有高的检测灵敏度。P24 抗原同样具有较高的灵敏度,但有少数样品无法检出其抗体。而 GP120 抗原片段显示了其较低检测灵敏度。同时发现,当 HIV-1 阳性血清的抗体滴度较高时,GP36 点有微弱的显色,ELISA 结果为弱阳性的血清中 GP36 点显色者则较少且更弱。这表明 HIV-1 与 HIV-2 于跨膜蛋白有较弱的交叉反应。尽管如此,仍可以通过各点显色的强弱来判断是哪一种病毒的感染。

由于 HIV 抗原,尤其是 *gag* 基因产物,可以与少数非 HIV 感染血清发生交叉反应<sup>[16]</sup>,是 ELISA 假阳性结果的主要原因,但这些假阳性血清很少能与两种或两种以上的 HIV 基因产物反应<sup>[12]</sup>。因此对多种抗 HIV 标志物的检测将有助于提高检测的准确性。另一方面,基于抗体滴度与显色强度正相关,可以直接观测或通过光密度扫描仪来比较 GP41 与 P24 点显色强度的关系,以此大致分析病人病情的状况及发展趋势<sup>[1-3]</sup>。P24 检测点与 GP41 点相比显色程度较强,即病人抗 P24 抗体水平较高,则表明病人还未出现抗原血症,症状未有明显发展。反之,若 P24 点显色微弱甚至无斑点出现,则说明病人很有可能临近或已进入 AIDS 期。由于抗 HIV 阳性样本有限,且对血清供体的病情不甚清楚,此方面的研究还需更加深入细致的临床实验予以验证。

致谢:本研究所用的 HIV 阳性血清由武汉进出口检验检疫局和武汉生物制品研究所提供,在此表示衷心的感谢。

## References

- [1] Schmidt G, Amiraian K, Frey H, *et al.* Densitometric analysis of Western blot (immunoblot) assays for human immunodeficiency virus antibodies and correlation with clinical status[J]. *J Clin Microbiol*, 1987, 25(10): 1993-1998.
- [2] Schmidt G, Amiraian K, Frey H, *et al.* Monitoring human immunodeficiency virus type 1-infected patients by ratio of antibodies to gp41 and p24 [J]. *J Clin Microbiol*, 1989, 27(5): 843-848.
- [3] Allain J P, Laurian Y, Paul D A, *et al.* Long-term evaluation of HIV antigen and antibodies to p24 and gp41 in patients with hemophilia. potential clinical importance [J]. *N Engl J Med*, 1987, 317 (18): 1114-1121.
- [4] Dorn J, Masciotra S, Yang C, *et al.* Analysis of genetic variability within the immunodominant epitopes of envelope gp41 from human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) group M and its impact on HIV-1 antibody detection [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 773-780.
- [5] Challakere K, Rapaport M H. False-positive human immunodeficiency virus type I ELISA results in low-risk subjects [J]. *West J Med*, 1993, 159 (5): 214-215.
- [6] Kleinman S, Busch M P, Hall L, *et al.* False-positive HIV-1 test results in a low-risk screening setting of voluntary blood donation [J]. *JAMA*, 1998, 280 (12): 1080-1085.
- [7] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A laboratory manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [8] Frens G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold solution [J]. *Nature*, 1973, 241: 20-22.
- [9] Horisberger M, Clerr M F. Labelling of colloidal gold with protein A [J]. *Histochemistry*, 1985, 82:219-221.
- [10] Moore J P, Ho D D. Antibodies to discontinuous or conformationally sensitive epitopes on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1 are highly prevalent in sera of infected humans [J]. *J Virol*, 1993, 67 (2): 863-875.
- [11] Moore J P, Sodroski J. Antibody cross-competition analysis of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 exterior envelope glycoprotein [J]. *J Virol*, 1996, 70 (3): 1863-1872.
- [12] Ravanshad M, Sabahi F, Mahboudi F, *et al.* An accurate confirmation of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and 2 (HIV-2) infections with a dot blot assay using recombinant p24, gp41, gp120 [J]. *Int J Med Sci*, 2004, 1:193-200.
- [13] Gnann J W, Nelson J A, Oldstone M B A. Fine mapping of an immunodominant domain in the transmembrane glycoprotein of human immunodeficiency virus [J]. *J Virol*, 1987, 61(8): 2639-2641.
- [14] Horal P, Svennerholm B, Jeansson S, *et al.* Continuous epitopes of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) transmembrane glycoprotein and reactivity of human sera to synthetic peptides representing various HIV-1 isolates [J]. *J Virol*, 1991, 65 (5): 2718-2723.
- [15] Muster T, Steindl F, Purtscher M, *et al.* A conserved neutralizing epitope on gp41 of human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 1993, 67 (11): 6642-6647.
- [16] Ng V L. Serological diagnosis with recombinant peptides/proteins [J]. *Clin Chem*, 1991, 37 (10): 1667-1668.