以多肽为抗原的 HIV ELISA 检测试剂的研究与开发

吴君荣, 李 山, 申卫东, 丁佩明, 魏勋斌, 闭柳燕, 秦 雪,
王 建, 黄 珊, 伍惠玲, 李海炜, 陈学杰, 邓 燕

基金项目: 广西科学研究与技术开发项目(编号:桂科攻 1140003A-1)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院检验科(吴君荣, 李 山, 秦 雪, 王 建, 黄 珊, 伍惠玲, 李海炜, 陈学杰, 邓 燕); 530003 广西, 南宁市中心血站(申卫东); 536000 广西, 北海新升技术开发有限责任公司(丁佩明, 闭柳燕); 200032 上海, 上海复旦大学生物医学研究院(魏勋斌)

作者简介: 吴君荣(1985-), 男, 硕士研究生, 初级检验技师, 研究方向: 临床实验诊断学。E-mail: wjr4455321@163.com

通讯作者: 李 山(1962-), 男, 教授, 博士, 博士研究生导师, 研究方向: 临床检验和细胞免疫学。E-mail: lis8858@126.com

[摘要] 目的 采用四种特异性化学合成多肽抗原(HIV-I gp41、gp120、p24 和 HIV-II gp36)作为包被主要原材料, 制备成检测 HIV-I/II 抗体的试剂盒。方法 用棋盘滴定法选择合适的抗原包被浓度及酶标抗原的工作浓度, 经过优化检测系统后, 对本试剂盒进行相关的性能验证, 并以上海科华、厦门英创及珠海丽珠试剂作为对照。结果 研究得出合适包被抗原浓度为 $5 \mu\text{g/ml}$, 酶标抗原工作浓度为 1:160。经过优化检测系统试剂的检测, CUT-OFF 值为 0.207, 灵敏度为 97.2%, 特异性为 98.6%。试剂主要活性成分的稳定性及检测的重复性良好, 与对照试剂检测结果一致。结论 以化学合成多肽抗原为主要包被原材料制备成检测 HIV 抗体的试剂盒具有可行性, 试剂盒主要活性成分稳定, 且具有较好的检测敏感度和特异性。

[关键词] 化学合成肽; 抗原; ELISA; HIV-I/II 抗体

[中图分类号] R 44 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)10-0899-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.10.01

Development of method of detecting HIV antibody with chemically synthesized polypeptide antigen WU Jun-rong, LI Shan, SHEN Wei-dong, et al. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China.

[Abstract] **Objective** To prepare diagnostic kit for HIV-I/II antibodies with mixed polypeptide antigen including HIV-I gp41, gp120, p24 and HIV-II gp36. **Methods** The appropriate concentration of coated antigen and HRP-Ag were selected by checkerboard titration, and the sensitivity and specificity of the kit were conducted. **Results** The appropriate concentration of coated antigen was $5 \mu\text{g/ml}$, and the appropriate concentration of HRP-Ag was 1:160. After optimizing the detection system, the CUT-OFF value, sensitivity and specificity of the kit were 0.207, 97.2% and 98.6%, respectively. **Conclusion** It is feasible that detect HIV infection via polypeptide antigen coated in polystyrene plate with high sensitivity and specificity.

[Key words] Chemically synthesized polypeptide; Antigen; ELISA; HIV-I/II antibodies

人类免疫缺陷病毒(HIV)通过性接触传播、血液传播及母婴传播三种方式引起人类免疫缺陷综合征,即艾滋病(AIDS)。AIDS 仍然是目前世界范围内一种严重传染病,病死率极高^[1]。早期检测 HIV 感染并控制其传播,是控制 AIDS 流行的重要环节^[2]。本研究采用化学合成四种特异性多肽(HIV-1 gp41、gp120、p24 和 HIV-2 gp36)作为包被抗原,

探讨 ELISA 检测 HIV 感染的可行性、敏感度和特异性。

1 材料与amp;方法

1.1 酶标板条 英科新创(厦门)技术有限公司产品。

1.2 包被抗原及酶标抗原 北海新升技术开发有限责任公司提供,包括 HIV-1 gp41、gp120、p24 和 HIV-2 gp36 共 4 个区段。

1.3 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗原 以上述四种多肽抗原为主要原材料,采用改良过碘酸钠氧化法标记 HRP。

1.4 血清 广西疾病预防控制中心提供 HIV-1 型抗体阳性血清 20 份和 HIV-2 型抗体阳性血清 2 份;由南宁市中心血站提供 HBsAg 阳性血清 40 份,HCV 抗体阳性血清 30 份和献血员血浆 400 份。

1.5 参考品 由中国药品生物制品检定所提供 Panel 阴性血清 20 份,Panel 阳性血清 13 份。

1.6 固相抗原的制备 用 0.05 mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液将混合多肽抗原做一系列倍比稀释,每孔 100 μ l 加入酶标板条内,放置 4 $^{\circ}$ C 过夜;甩干孔内液体,用洗涤液(PBST)洗涤一次,甩净拍干后,每孔加入 150 μ l 封闭液,放置 4 $^{\circ}$ C 过夜;甩干孔内液体,用 PBST 洗涤一次,拍干后风干真空密封保存。

1.7 棋盘滴定法选择包被抗原浓度及酶标抗原工作浓度 HIV 抗体阳性标本作 1:10 稀释后加入抗原板条内,每孔 100 μ l,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min;甩净孔内液体,用 PBST 洗涤 5 次后每孔加 100 μ l 不同稀释

倍数的酶标抗原液,37 $^{\circ}$ C 反应 60 min;同上述步骤洗涤后,加入显色底物液 50 μ l,37 $^{\circ}$ C 显色 15 min,每孔加入 2 mol/L 硫酸 50 μ l,检测 OD 450 nm 值。以阳性 OD 450 nm 在 1.0 左右,阴性 OD 450 nm < 0.1 为合适包被抗原浓度及酶标抗原工作浓度。

1.8 检测体系的优化 (1)固相抗原与样品反应时间的优化:设置反应时间分别为 45 min、60 min、75 min,以阳性 OD 450 nm 在 1.0 左右,阴性 OD 450 nm < 0.1 为合适时间。(2)酶标抗原作用时间的优化:设置酶标抗原的作用时间为 30 min、45 min、60 min,以阳性 OD 450 nm 在 1.0 左右,阴性 OD 450 nm < 0.1 为合适时间。(3)显色时间的优化:设置显色时间分别为 10 min、15 min、30 min,以阳性 OD 450 nm 在 1.0 左右,阴性 OD 450 nm < 0.1 为合适时间。

2 结果

2.1 包被抗原浓度及酶标抗原工作浓度的确定 检测结果可知,合适的抗原包被浓度为 5 μ g/ml,酶标工作浓度为 1:160。见表 1。

表 1 棋盘滴定选择合适抗原包被浓度及酶标抗原工作浓度

混合抗原包被浓度		酶标抗原浓度							
		1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640
10 μ g/ml	空白	0.04	0.03	0.03	0.02	0.02	0.03	0.02	0.02
	(+)	1.95	1.88	1.63	1.56	1.34	1.21	0.85	0.61
	(-)	0.43	0.35	0.3	0.27	0.11	0.06	0.04	0.04
5 μ g/ml	空白	0.02	0.03	0.02	0.03	0.01	0.02	0.02	0.02
	(+)	1.54	1.31	1.25	1.16	1.09	1.02	0.61	0.43
	(-)	0.22	0.15	0.13	0.13	0.09	0.08	0.03	0.02
2 μ g/ml	空白	0.02	0.03	0.02	0.02	0.01	0.03	0.02	0.02
	(+)	1.22	1.18	0.90	0.71	0.63	0.32	0.21	0.11
	(-)	0.13	0.11	0.08	0.06	0.04	0.05	0.03	0.02
1 μ g/ml	空白	0.01	0.02	0.02	0.03	0.02	0.03	0.01	0.02
	(+)	0.88	0.61	0.42	0.22	0.21	0.13	0.15	0.13
	(-)	0.09	0.06	0.05	0.03	0.04	0.03	0.01	0.02

注:(+)表示阳性参考血清;(-)表示阴性参考血清

2.2 固相抗原与样品反应时间、酶标抗原作用时间及显色时间 检测系统经过优化后,选择固相抗原与样品反应时间为 60 min,酶标抗原作用时间为 45 min,显色时间为 15 min。

2.3 CUT-OFF 值的确定 检测 400 份健康献血员血浆,OD 450 nm 均值为 0.144,SD 为 0.021,Cut-off 值 = 0.144 + 3SD,即 0.207。HIV 抗体阴性参考血清 OD 450 nm 控制在 0.06 ~ 0.13,为便于计算我们

采用常数(0.10)加上阴性对照平均值作为 Cut-off 值判定结果。

2.4 特异性检测结果 由中国药品生物制品检定所提供的 Panel 阴性血清 20 份,献血员血浆 400 份,HCV 抗体阳性血浆 30 份,HBsAg 阳性血清 40 份;由新创、科华、珠海丽珠试剂对检定所提供的 Panel 血清 20 份,HCV 抗体阳性血浆 30 份和 HBsAg 阳性血浆 40 份全部为阴性;对 1 份献血员血浆呈弱阳性

反应。自制试剂对 1 份 HCV 抗体血浆呈弱阳性反应,对 1 份 HBsAg 阳性血清呈弱阳性反应,对 5 份献血员血浆结果呈弱阳性反应,包括对照试剂呈弱阳性反应的标本。上述弱阳性标本经 Westernblot 试验证实为 HIV 抗体阴性,自制试剂特异性为 98.6%。结果见表 2。

表 2 自建试剂盒特异性检测结果

样 品	例数	厦门新创		上海科华		珠海丽珠		自制试剂	
		+	-	+	-	+	-	+	-
Panel 阳性血清	20	0	20	0	20	0	20	0	20
HCV 阳性血浆	30	0	30	0	30	0	30	1	29
HBsAg 阳性血清	40	0	40	0	40	0	40	1	39
献血员血浆	400	1	399	1	399	1	399	5	395
总计	490	1	489	1	489	1	489	7	483
特异性		99.8%		99.8%		99.8%		98.6%	

注: + 表示检测结果为阳性的标本; - 表示检测结果为阴性的标本

2.5 灵敏度检测结果 以新创、科华和珠海丽珠 HIV 抗体 ELISA 试剂盒作为对照,检测 HIV 抗体阳性血清 24 份,中国药品生物制品检定所 Panel 阳性血清 13 份,结果与对照试剂基本一致,自制试剂具有较好的灵敏度(97.2%)。结果见表 3。

表 3 自建试剂盒灵敏度检测结果

试剂来源	HIV 抗体阳性(n=24)		Panel 阳性(n=13)		灵敏度 (%)
	+	-	+	-	
厦门新创	24	0	13	0	100
上海科华	24	0	13	0	100
珠海丽珠	24	0	13	0	100
自制试剂	23	1	13	0	97.2

注: + 表示检测结果为阳性的标本; - 表示检测结果为阴性的标本

2.6 稳定性检测结果 试剂盒的主要活性物质抗原板条、酶标抗体和底物经 4℃ 放置 6 个月或 37℃ 放置 7 d,试剂质量无明显变化,说明试剂盒稳定性良好。

2.7 重复性检测结果 用强、中、弱阳性和阴性血清各 1 份重复检测 10 孔,CV 值均 <10%。

2.8 临床标本检测结果 HIV 血清抗体初筛阳性 20 例,初筛阴性 50 例,本试剂与对照试剂厦门英科新创、上海科华及珠海丽珠检测结果一致。

3 讨论

3.1 早期检测并发现 HIV 感染对其治疗及控制传

播具有极其重要的意义。ELISA 检测试剂盒因其具有较好的检测灵敏度和特异性,且操作方便快捷,已经成为检测早期 HIV 感染的首选方法。目前实验室所使用的 HIV 感染检测 ELIAS 试剂多为基因重组固相抗原^[3],随着分子生物学技术的飞速发展,人工合成的多肽抗原的技术已经成熟^[4]。本研究采用人工合成的四种特异性多肽 HIV 抗原(HIV-1 gp41、gp120、p24 和 HIV-2 gp36)为主要包被原材料,并采用辣根过氧化物酶标记多肽抗原,建立 HIV- I / II 抗体检测试剂盒。

3.2 用本试剂检测的灵敏度为 97.2%,特异性达到 98.6%,变异系数 <10.0%,且重复性好,与国内主流产品检测结果基本一致,达到检定标准。其他病种血清的检测结果全部阴性,尚未发现本试剂与其他疾病具有交叉反应,特异性较高。试剂在 37℃ 放置 7 d 或 4℃ 放置 6 个月,主要活性成分质量未发生明显变化,说明本试剂的稳定性良好。本研究结果与文献^[5]报道一致,但本研究采用了双抗原夹心检测抗体的反应模式,具有更好的特异性,同时本试剂的主要活性成分在室温放置的时间延长到 7 d,稳定性更好。另外,本研究的酶标板条经紫外线照射后再进行抗原的包被,有研究^[6]表明经紫外线处理后的酶标板条的检测敏感性会明显提高。

3.3 现主流 HIV 抗体检测 ELISA 试剂盒多以基因重组抗原为包被抗原,但通过人工合成的 HIV 特异性多肽抗原除了不含宿主细胞成分之外,同时也不存在重组过程中细菌的混杂蛋白,因合成多肽分子量小,使包被在酶标板孔上的分子数量更多,从而能够结合更多的 HIV 抗体,提高检测的敏感性。同时采用双抗原夹心法检测 HIV 抗体,具有更高的特异性,有望替代重组抗原用于血清 HIV 抗体检测。但合成抗原是否与其他自身免疫性疾病产生交叉反应等问题有待今后进一步研究。

参考文献

- Blaser N, Wettstein C, Estill J, et al. Impact of viral load and the duration of primary infection on HIV transmission: systematic review and meta-analysis[J]. AIDS, 2014,28(7):1021-1029.
- Araya AX, Bravo P, Carrasco P, et al. Facilitators and barriers to HIV testing: a literature review[J]. Rev Chilena Infectol, 2013,30(6):638-643.
- Mehrdad R, Farzaneh S, Fereidoun M, 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 and gp36 Antigens[J]. Int J Med Sci, 2004,1(3):193-200.

- 4 Corradin G, Spertini F, Verdini A. Medicinal application of long synthetic peptide technology [J]. Expert Opin Biol Ther, 2004, 4 (10):1629-1639.
- 5 貌盼勇, 洪世雯, 何红霞, 等. 合成肽抗原抗人免疫缺陷病毒 1/2 型抗体酶联试剂盒的研制 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 1997, 11(1):72-74.
- 6 王 哲, 强来英, 曾 毅. HIV-1 化学合成肽酶标试剂抗原包被的预处理方法 [J]. 中国生物制品学杂志, 1994, 7(1):4-5.
- [收稿日期 2014-06-23][本文编辑 黄晓红]

课题研究 · 论著

多囊卵巢综合征不孕患者血清生长素水平变化及其与胰岛素抵抗的关系

黄红艺, 何 冰, 莫 云, 刘杨桦, 张团英, 张凤兰

基金项目: 广西卫生厅科研课题(编号:桂卫 Z2013383)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院生殖中心(黄红艺, 何 冰, 莫 云, 刘杨桦); 524000 湛江, 广东医学院附属医院妇产科(张团英, 张凤兰)

作者简介: 黄红艺(1976-), 女, 博士学历, 博士学位, 副主任医师, 研究方向: 生殖内分泌学. E-mail: ellen9508@163.com

通讯作者: 刘杨桦(1974-), 男, 大学本科, 学士学位, 副主任医师, 研究方向: 胃肠肿瘤的诊治. E-mail: lyh9508319@163.com

[摘要] 目的 研究多囊卵巢综合征(PCOS)不孕患者血清生长素(Ghrelin)水平的变化及其与胰岛素抵抗(IR)的关系。方法 选择98例PCOS不孕患者(PCOS组)及72例非PCOS不孕患者(非PCOS组), 比较两组患者的体重指数(BMI)、血清Ghrelin、血糖、胰岛素、稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)间的相互关系。血清Ghrelin采用ELISA法测定, 空腹血浆葡萄糖(FPG)采用葡萄糖氧化酶法测定, 空腹胰岛素(FIns)采用化学发光法测定。结果 PCOS组血清Ghrelin水平(pg/ml)明显低于非PCOS组[(442.56 ± 221.71) vs (697.41 ± 157.84), $P < 0.05$]。PCOS组的HOMA-IR高于非PCOS组[(3.84 ± 1.23) vs (2.14 ± 0.77), $P < 0.05$]。Person相关分析表明, PCOS组血清Ghrelin水平与HOMA-IR呈负相关($r = -0.48, P < 0.01$)。结论 PCOS不孕患者血清Ghrelin水平降低, 并且其降低与IR密切相关。提示Ghrelin可能参与PCOS不孕患者胰岛素抵抗的发生与发展。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 胰岛素抵抗; 不孕; 生长素

[中图分类号] R 711 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2014)10-0902-03

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2014.10.02

Relation between serum Ghrelin level and insulin resistance in infertility patients with PCOS HUANG Hong-yi, HE Bing, MO Yun, et al. Department of Reproductive Medical and Genetic Center, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530000, China

[Abstract] **Objective** To explore the relationship between serum Ghrelin level and insulin resistance in infertility patients with PCOS. **Methods** Ninety-eight cases of PCOS (PCOS group) and seventy-two cases of non PCOS (non PCOS group) for first time visiting our hospital due to infertility from January 2010 to December 2012 were selected. The BMI, serum Ghrelin level, and the related anthropometric indexes were detected. **Results** The serum Ghrelin levels in PCOS patients were lower than non PCOS patients [(442.56 ± 221.71) pg/ml vs (697.41 ± 157.84) pg/ml, $P < 0.05$]. The HOMA-IR was higher in PCOS group compared to non PCOS group [(3.84 ± 1.23) vs (2.14 ± 0.77), $P < 0.05$]. Pearson correlation analysis showed that serum Ghrelin level was negatively correlated with HOMA-IR in PCOS patients ($r = -0.48, P < 0.01$). **Conclusion** The serum Ghrelin level in infertility patients with PCOS is evidently lower than that in non PCOS infertility patients. Ghrelin level was negatively correlated with HOMA-IR in PCOS patients. Thus indicated that Ghrelin may promote the development of IR in infertility pa-