

計畫編號：DOH88-TD-1119

行政院衛生署八十八年度科技研究發展計畫

發展愛滋病之特殊檢驗

研究報告

執行機構：國立台灣大學醫學院

計畫主持人：李君男

研究人員：陳忻怡

執行期間：87年7月1日至88年6月30日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

目 錄

目錄：	i
中文摘要.....	ii
英文摘要.....	iii
前言	1
材料及方法：	
I. HIV p24 重組蛋白之製備與純化.....	3
II. SDS-PAGE.....	6
III. 西方墨點試驗.....	6
IV. 酶連免疫法.....	8
V. 酶連免疫點試驗 (ELISPOT)	9
結果	10
討論	13
參考文獻.....	15
圖表	19

摘 要

台灣地區感染愛滋病毒的人數持續在增加中，女性感染的人數亦不斷上升，這些女性不免會懷孕生子，由其所出生之新生兒是否感染了愛滋病毒，是我們所關切的問題，但由傳統之抗體測定方法無法判斷是否確實受到感染。為了解決此項愛滋病毒檢驗上的難題，本研究建立了酶連免疫點試驗，此試驗可以偵測血液中是否有分泌愛滋病毒特異之抗體的細胞存在，只有感染愛滋病毒後體內才會出現此種細胞，故可以之證實新生兒是否受到愛滋病毒之感染。

本研究利用 HIV-1p24 蛋白質做為抗原，首先大量表現此蛋白質並純化之，接著以之進行酶連免疫法篩檢出具有 p24 抗體之感染者，再取這些感染者之周邊血液單核血球來進行酶連免疫點試驗。經測試酶連免疫點試驗中的兩項變數，分別為覆被抗原之濃度與周邊血液單核血球之濃度，得到最多免疫反應點之 p24 抗原用量為每孔 1 μ g 蛋白質，而周邊血液單核血球濃度為每孔 5×10^5 細胞。反應點之數目與抗原之量成正比，且與細胞之數目成正比，與病毒負荷量之高低則無一定關係。

由本研究之結果，酶連免疫點試驗用以偵測分泌抗體之細胞應是可行的，將可應用於新生兒感染之確認及一些特殊的情況，即某些人可能受到感染而以傳統之抗體測定無法測得抗體而無法確定是否感染。

關鍵詞：愛滋病毒、新生兒感染、酶連免疫點試驗、p24 抗原

Abstract

The number of HIV-1 infection is still increasing in Taiwan. HIV-1 infection is also increasing in the female population. Mother to child transmission will become a problem in Taiwan. The diagnosis of HIV-1 infection is difficult in newborn babies by traditional antibody assays. To solve this problem, this study established the ELISPOT assay that could detect HIV-1-specific antibody-secreting cells. HIV-1-specific antibody-secreting cells are present only in HIV-1 infected individuals. Using ELISPOT assay the infection of HIV-1 in newborns could be confirmed.

HIV-1 p24 protein was expressed and purified. The purified p24 antigen was first applied in ELISA test to screen the plasma that contained p24 antibodies. Then p24 antibody positive individuals were selected. Their peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were used in ELISPOT assay. Two parameters, the concentration of coating antigen and PBMC, were tested to find the appropriate condition for the assay. More antibody-secreting cells could be detected in the wells with 1 µg p24 antigen and 5×10^5 cells. The number of antibody-secreting cells is proportional to the concentration of antigen and number of PBMC, is irrelevant to the level of HIV-1 viral load.

This study successfully established the ELISPOT assay. In the future, our laboratory will be able to provide this assay to help confirm the HIV-1 infection in newborns and individuals whose infection can not be diagnosed by traditional antibody assay.

Keywords: HIV-1, neonatal infection, ELISPOT, p24 antigen

前 言

愛滋病(AIDS)是由人類免疫缺乏病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)引起的。HIV 是一種反錄病毒(Retrovirus)，它和一般反錄病毒相似，其遺傳物質主要包含 gag、pol、env 三個部分，但 HIV 還多了一些輔助性的基因。由 gag 所生成之蛋白質，與病毒之核心結構有關，核心之主要成份為 p24，其他如 p17、p7 等之含量較少。pol 主要與病毒複製、嵌入及蛋白質之切割所需之酵素之生成有關，生成之蛋白質如反轉錄酵素、蛋白酵素、嵌入酵素(p31)等。env 基因生成一個前趨蛋白質 gp160，經細胞之蛋白酵素切割後成為 gp120 和 gp41 兩個糖蛋白質，gp120 位於病毒粒子之表面，gp41 穿透外套膜，與 gp120 之間有非共價鍵之結合。

自 1981 年發現第一個愛滋病病例，歷經十多年，迄今尚未發展出一個有效的疫苗以抑制愛滋病感染之擴散，其與致病機轉仍無法明確瞭解外，病毒之變異性是一大因素。HIV-1 基因體中變異性最大之部位為 env，gag 次之，pol 之保守性較高。由 env 核酸序列上之差異，可以將 HIV-1 區分為 M 群與 O 群，M 群又可細分為至少十種亞型，即 A 至 J 亞型。台灣地區盛行之亞型以 B 亞型為主，E 亞型次之。

HIV 已造成世界各地的流行，亞洲地區之感染人數直線上升，世界衛生組織預估在西元 2000 年亞洲地區之感染人數將會佔了全世界感染人數的四分之一。台灣地區的 HIV-1 感染人數亦是持續在增加，我們應加強對於 HIV 之防治工作，HIV 的檢驗在防疫工作上是很重要的一環。HIV 的檢驗以抗體之偵測為主，目前仍有一些情況以市售之檢驗試劑無法解決問題，如 HIV-1 抗體陽性的母親所產下的新生兒是否受到 HIV-1 之感染，由血清抗體的測試無法分辨新生兒體內之 HIV-1 抗體是來自母親或是本身因感染而產生的。此時可利用特殊檢驗之方法，如 ELISPOT，偵測新生兒之周邊血液單核白血球是否會分泌與 HIV-1 蛋白質產生反應之抗體，以了

解新生兒感染之狀況。

探討 HIV-1 感染者體內所產生之抗體，95%以上的人會產生針對 gp41 之抗體，針對 p24 或 p31，則分別有 70%以上的人會產生抗體。偵測 HIV-1 抗體時所使用之抗原主要有三類不同之來源，早期是利用培養病毒，再經純化溶解而得，亦即完整病毒之溶解物 (Whole viral lysate)，此為第一種來源。第二種來源是以遺傳工程的方法製造之重組蛋白質 (Recombinant protein)，第三種來源是以人工合成之蛋白質片段 (Synthetic peptide)。完整病毒之溶解物因在製造過程中有潛在之危險性，現使用者日益減少。重組蛋白質因製造過程安全、價格較低廉，故逐漸取代完整病毒之溶解物，而成為普遍使用之抗原。人工合成之蛋白質片段亦常被使用，但其缺點為價格昂貴，且其所含之抗原決定位 (Epitope) 較為有限。

重組蛋白質之表現系統大致可分為原核 (Prokaryotic) 細胞表現系統與真核 (Eukaryotic) 細胞表現系統，原核細胞表現系統，尤以大腸菌 (E. Coli) 最為廣泛使用，因擇殖較為快速方便，已有多種載體在市面上可購得，原核細胞表現系統之缺點為缺少轉譯後之修飾 (Post-translational modification)，對於一些醣蛋白質之表現來說，可能會影響了蛋白質之結構或是抗原性。真核 (Eukaryotic) 細胞表現系統常用者如酵母菌 (Yeast)、桿狀病毒 (Baculovirus)、牛痘病毒 (Vaccinia virus) 等，此類表現系統之優點為所表現之蛋白質會有轉譯後之修飾，但多數之擇殖過程較為複雜困難，且較為費時。

本計畫為發展 HIV-1 之特殊檢驗 ELISPOT，首先以大腸菌表現 HIV-1 之 gp41、p24 及 p31 等蛋白質，表現出之蛋白質，以西方墨點法測試其與感染者之血清反應之狀況，選擇可以與感染者之血清產生良好反應之蛋白質，進而大量表現並加以純化，利用這些蛋白質作為抗原，來建立 ELISPOT 之檢驗方法。

材 料 與 方 法

I. HIV p24 重組蛋白之製備與純化

本實驗主要是利用 pREST 表現載體及 BLR 勝任細菌在加入 IPTG 後，誘發菌體內 T7 RNA polymerase 大量表現，以啟動 pREST 載體上的 T7 promoter，而大量轉錄目標基因的 RNA，促使目標基因所轉譯的蛋白被大量表現。

1.1 HIV p24 重組蛋白之誘發表現

挑選本實驗是以構築好之帶有經過核酸定序確認之表現載體的單一菌落，培養在 4 ml 含有用來篩選載體之 100 μ g/ml Ampicillin 以及用來篩選細菌的 12.5 μ g/ml Tetracyclin 之 LB medium 中，在 37°C 過夜培養 16 小時。再取出 1ml 菌液，加入 50ml 含 100 μ g/ml Ampicillin、12.5 μ g/ml Tetracyclin 之 LB medium 中，過夜培養 16 小時。取出菌液，以分光光度計 (Novaspec II, Pharmacia Biotech) 測定 OD₆₀₀ 之吸光值。取適量之菌液，以 5000g 離心 1 分鐘後，真空抽引 (suction) 掉上清液，加入 750 ml 含抗生素的 LB medium 重新混合菌體。測定吸光值，確認 OD₆₀₀=0.1。以錐形瓶做 37°C 250rpm 搖動培養至 OD₆₀₀=0.6。取 2.5 ml 培養菌液當做未加 IPTG 誘發蛋白表現之對照組。剩餘之菌液加入適量之 IPTG (Sigma) 至濃度為 1 mM/ml。繼續 37°C 培養 5 小時後，回收菌液。

將菌液在 4°C 下以 5000g 離心 5 分鐘，真空抽引掉上清液，以培養菌液 0.25 倍體積之無菌 PBS (25 mM NaH₂PO₄, 72 mM Na₂HPO₄, 0.1453 M NaCl, pH 7.2) 清洗菌塊。重新離心與真空抽引掉上清液，加入適量含溶菌酵素 100 μ g/ml Lyso-zyme (Sigma) 及蛋白分解酵素抑制劑 1 mM PMSF (phenyl-methylsulfonyl fluoride) (Sigma) 之 PBS 充分打散菌塊並調至 OD₆₀₀=50。將菌體均勻混合後置於冰上，以細胞擊破裝置打破細菌。再以 4°C，15000g 離心 30 分鐘。將上清液取出另置於一新的離心管中，管底沉澱物以 1X Urea 緩衝液 (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 8 M Urea) 溶掉，保存在 -20°C 以供後續之分析純化。

1.2 HIV p24 重組蛋白之純化

由表現載體 pREST 所轉譯出的蛋白，是屬於重組蛋白的型式。其在蛋白質的 N 端加入六個連續的 Histidine 胺基酸做為標記 (6X His tagged)，而此胺基酸序列可和金屬二價離子如： Ni^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Co^{2+} 等，進行非共價鍵結。利用此種特性，可方便繼續進行蛋白質的純化。而本實驗選擇利用 Novagen Quick9000 column 做為純化的工具，參考廠商建議之方法並稍做改變，再以 imidazole 競爭反應置換出目標蛋白。再將所得之蛋白利用透析法，以無菌之 PBS 置換出其中所含之 imidazole 等不純物，即可得到較純之蛋白。

Novagen Quick9000 column 的原理，是利用鍵結在樹脂上的二個金屬 Ni^{2+} 與重組蛋白之 6X His tagged 結合。其方法為：將管柱直立，加入 6 ml 1×Binding 緩衝液(5mM imidazole, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 6M urea pH 7.9)潤濕管柱，再將預先處理好的蛋白質溶液緩慢的通入管柱內，分別 20ml 1×Binding 緩衝液(5mM imidazole, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 6M urea pH 7.9)以及 10ml 1×Wash 緩衝液 (60mM imidazole, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl, 6M urea pH 7.9)清洗管柱。每次沖洗流出液 (wash) 均收集起來以供分析。最後以 4ml elution 緩衝液 (1M imidazole, 500 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 8 M Urea pH 7.9) 將被金屬離子抓住的蛋白沖出來，並以每管 500 μl 沖出液收集之。將所收集之溶液以 15% SDS-PAGE 進行分析。一般而言，在第二、三管的蛋白沖出液可得到純度較高的蛋白。

1.3 蛋白質透析

利用透析膜進行透析的原理，是利用透析膜上孔洞的大小，來篩選一定分子量的東西。較小的分子，可依膜內外之濃度差而自由移動，進而達到稀釋的目的。本實驗選用之透析袋(Dialyer Tubing, Arthur H. Thomas, U.S.A.) 孔洞大小為篩選分子量大於 12 KD 的分子，故 p24 蛋白質即可被保留在膜內。

透析膜在使用前需經過處理，以除去膜上殘留的金屬離子、甘油(glycerin)、硫酸根離子的污染。先剪取適當長度之透析膜（約 14 cm長），放入事先煮沸之 5% NaHCO_3 溶液中，繼續煮沸溶液 20 分鐘，同時以玻棒緩緩攪動之，重覆此步驟一次。以乾淨之二次去離子水充分清洗煮過之透析袋數次。將清洗過之透析袋放入 4°C 之 1 mM EDTA 過夜，以便完全去除膜上之離子。隔天，取出透析袋以二次去離子水沖洗數次，放入 4°C 含有 1 mM EDTA 及 50% ethanol 之保存液中保存。待需要使用時，取出透析袋以 121°C 15 分鐘高壓蒸氣滅菌後，即可使用。

取出處理過之透析袋，確認並無破洞即可使用。加入欲透析之蛋白質溶液，並保留適當體積之空氣後將透析袋密封。同時，將袋子的一端夾上透析膜夾，放入裝有預冷在 4°C 之無菌 PBS 溶液，以磁攪拌子 (stir bar) 攪拌，以加速透析速度。每隔 4 小時，即換一次透析液，重覆三次。將透析膜剪開，小心取出透析後之蛋白溶液裝入一乾淨之離心管中。

1.4 蛋白質定量

以 Bio-Rad Protein Assay 試劑 (Bio-Rad Laboratories, U.S.A.) 定量蛋白質。其原理為利用酸性染料 coomassie brilliant blue G-250 與胺基酸，特別是鹼性或帶有芳香環之胺基酸做結合。而使其吸光值由 465nm 轉移到 595nm，藉由分光光度計測定後換算，即可知蛋白質。

取欲定量之待測蛋白質與一已知量之 BSA 蛋白質，以 PBS 做序列稀釋。每 100 μl 蛋白質稀釋液，加入 25 μl Protein Assay 試劑，在室溫下反應 5 分鐘後，於 1 小時內以 ELISA reader SPECTRA MAX340 (Molecular Devices, U.S.A.) 測定吸光值，由電腦軟體進行濃度換算。

II. SDS-PAGE

取適量之蛋白質萃取液與 5 倍 sample buffer (50% glycerol, 10% SDS, 125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% bromophenol blue, 10% β -mercaptoethanol, 100 mM dithiothreitol) 均勻混合，以沸水煮沸 2 分鐘後，即可準備跑膠分析。本實驗用來分析蛋白質的 SDS-PAGE 是由上層 5% 的 stacking gel [5% polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide = 37.5 : 1, 0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% ammonium persulfate, 0.1% TEMED, ddH₂O)] 及下層的 15% 的 running gel [15% polyacrylamide (acrylamide : bisacrylamide = 37.5 : 1), 0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% ammonium persulfate, 0.04% TEMED, ddH₂O) 所組成的。加入要分析之蛋白質樣本，以固定電壓 200 V 跑膠 1 小時。小心拆除膠片，以 0.05% coomassie blue 染液 (0.005% coomassie brilliant blue R (Sigma), 50% methanol, 10% acetic, 40% ddH₂O) 染色約 5~10 分鐘。再以脫色液 (5% methanol, 7% acetic acid, 88% ddH₂O) 脫色過夜。隔天以玻璃紙封片保存。

III. 西方墨點試驗

本實驗將蛋白質轉印至轉印膜上 (transfer membrane)。利用單株抗體或病人之血漿抗體與其反應，再以連接有過氧化酵素 (peroxidase) 之二次抗體與之反應，以呈色法觀察結果。

3.1 蛋白質轉印—重物壓片法

將跑好 SDS-PAGE 電泳的膠片，利用重物壓片法或是電泳法將膠片內的蛋白轉移至 nitrocellulose (NC) membrane (Schleicher & Schuell, Germany) 或 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P transfer membrane) (Millipore, M.A., USA) 轉印膜上。一般而言，以 PVDF membrane 與蛋白的

結合性較強，偵測的敏感度亦較高。

準備與 SDS-PAGE 電泳凝膠片同大小的轉印膜及 3MM 濾紙 (Whatman, England) 及兩片較厚之玻璃板。先將轉印膜及 3MM 濾紙及 SDS-PAGE 電泳凝膠片以轉印緩衝液-transfer buffer (0.5 M NaCl, 10 mM EDTA, 100 mM Tris) 充分浸潤。若是轉印膜為 PVDF membrane, 需先以甲醇 (methanol) 浸泡 15 秒, 再以二次去離子水浸泡 2 分鐘處理後, 浸於轉印緩衝液 5 分鐘。在兩片玻璃板間, 依順序由下往上放入兩張 3MM 濾紙、一張轉印膜、SDS-PAGE 電泳凝膠片、一張轉印膜、兩張 3MM 濾紙。在確認無氣泡存在的情況下, 先以保鮮膜包住, 再以錫箔紙包裹住, 並以適當重量之重物加壓, 平放靜置 12 小時以上即可。

3.2 以單株抗體偵測 p24 蛋白質

將已轉印上蛋白質的轉印膜取出, 以含 3% bovine serum albumin (BSA) 之 PBS 緩衝液輕輕搖晃做 blocking, 在 37°C 下作用 1 小時或於 4°C 下過夜反應。以含有 0.2% Tween-20 之 PBS 清洗緩衝液 (washing buffer) (0.2% Tween-20 in PBS), 搖晃清洗三次。每次作用時為 5 分鐘、7 分鐘及 9 分鐘。接著加入以含 1% BSA 之清洗緩衝液做 1000 倍稀釋之老鼠對抗愛滋病毒 p24 蛋白質之單株抗體 (mouse anti-HIV p17 monoclonal antibody) (Chemicon, CA., U.S.A.) 在 37°C 下輕輕搖晃作用 1 小時。再以清洗緩衝液, 搖晃清洗三次, 時間分別為 5、7、9 分鐘。加入以含 1% BSA 之清洗緩衝液做 1000 倍稀釋之連結有過氧化酶的山羊對抗老鼠 IgG 免疫球蛋白之單株抗體 [peroxidase-goat anti-mouse IgG (gamma chain-specific), Zymed, CA., U.S.A.] 在 37°C 下做抗體結合反應 1 小時。結束後使用清洗緩衝液, 以每次分別為 5、7、9 分鐘的時間, 搖晃清洗三次。最後以 DAB 呈色劑 (每 10 ml 呈色劑含 5 mg diaminobenzidine tetrahydrochloride, 10 μ l 30% H₂O₂, 150 μ l 1% NiCl₂, 1 $\times$ PBS) 呈色, 並立即觀察有無顏色變化反應。

3.3 偵測愛滋病人血漿 p24 蛋白質之抗體

將已轉印上 p24 蛋白質的轉印膜取出，以含 3% bovine serum albumin(BSA) 之 PBS 緩衝液輕輕搖晃做 blocking，在 37°C 下作用 1 小時或於 4°C 下過夜反應。以含有 0.2% Tween-20 之 PBS 清洗緩衝液 (washing buffer) (0.2% Tween-20 in PBS)，搖晃清洗三次。每次作用時間分別為 5、7 及 9 分鐘。接著加入以含 1% BSA 之清洗緩衝液做 10~100 倍稀釋之愛滋病毒感染患者血漿抗體在 37°C 下輕輕搖晃作用 1.5 小時。小心吸除病人血漿後，使用清洗緩衝液，分別以 5、7、9 分鐘，搖晃清洗三次。加入以含 1% BSA 之清洗緩衝液做 1000 倍稀釋之連結有過氧化酶的山羊對抗人類 IgG 免疫球蛋白之單株抗體 (peroxidase-goat anti-human IgG (H+L), Zymed, U.S.A.) 在 37°C 下做抗體結合反應 1 小時。結束後以清洗緩衝液，做 5、7、9 分鐘的搖晃清洗三次。最後以 DAB 呈色劑 (每 10 ml 呈色劑含 5mg diaminobenzidine tetrahydrochloride, 10 μ l 30% H₂O₂, 150 μ l 1% NiCl₂, 1X PBS) 呈色，並立即觀察有無顏色變化反應。

IV. 酶連免疫法

將愛滋病毒 p24 重組蛋白或載體對照組加入 96 孔微量滴定盤中，和稀釋過的病人血漿反應後，再與連接有過氧化酶 (peroxidase) 之二次抗體反應，以呈色法觀察結果。

4.1 用酶連免疫法偵測病人血中 p24 蛋白質抗體

將透析過的蛋白質溶液以碳酸鹽緩衝液稀釋成 1ng/ μ l，取 100 μ l 加入 96 孔微量滴定盤中，置於 4°C 過夜反應。輕甩盤子去除上清液，再加入含 3% BSA 之 PBSA 緩衝液於 37°C blocking 一小時。再分別用含有 0.2% Tween 20 之清洗緩衝液(PBST)以及 PBSA 緩衝液各清洗一次並甩掉附著於管壁之多餘液體。接著加入以含 1% BSA 之清洗緩衝液做 20~160 倍稀釋之愛滋病毒感染患者血漿抗體，在 37°C 下輕輕搖晃作用 1.5 小時或 4°C 作用隔夜。經 PBST 以及 PBSA 緩

衝液各清洗兩次後，加入以含 1% BSA 之清洗緩衝液做 2000 倍稀釋之連結有過氧化酶的山羊對抗人類 IgG 免疫球蛋白之單株抗體(peroxidase-goat anti-human IgG (H+L), Zymed, U.S.A.) 在 37°C 下進行抗體結合反應 1 小時。結束後以 PBST 與 PBSA 分別清洗三次並甩掉附著於管壁之多餘液體。最後以 OPD 呈色劑 (1mg/ml o-phenylenediamine, Sigma, U.S.) 避光下作用 30 分鐘，然後以 1M H₂SO₄ 終止呈色反應，兩小時內以酵素免疫分析測定儀測量 96 孔微量滴定盤在波長 490nm 的吸光度。

V. 酶連免疫點試驗 (ELISPOT)

先用西方墨點試驗和酶連免疫法篩檢病人的血漿中是否有抗 p24 之抗體，參考酶連免疫法之結果分別挑選 6 個 OD₄₉₀ 讀值 > 0.5 以及 7 個 OD₄₉₀ 讀值 < 0.5 之病人檢體做後續實驗，以測定出適合 ELISPOT 的反應條件。

將 HIV p24 之重組蛋白以碳酸鹽緩衝液分別稀釋為 10 ng/μl、5 ng/μl、1 ng/μl。取 100 μl 加在底盤為 nitrocellulose membrane 之 96 孔微量滴定盤中，置於 4°C 作用過夜。用無菌之 PBSA (25 mM NaH₂PO₄, 72 mM Na₂HPO₄, 0.1453 M NaCl, pH 7.2) 緩衝液清洗兩次後，加入 200 μl 含有 10% 胎牛血清[fetal bovine serum, FBS, GibcoBRL, Grand Island, NY, U.S.A.]以及 glutamine 之 RPMI 1640 培養基於 37°C, 5% CO₂ 之培養箱中 blocking 兩小時。經無菌之 PBSA 緩衝液清洗四次後，分別加入已定量之病人單核白血球細胞，過夜培養 18 小時。再用含有 0.2% Tween 20 之清洗緩衝液清洗四次，輕甩至無液體殘留後，加入以含 1% BSA 之清洗緩衝液做 3000 倍稀釋之連結有過氧化酶的山羊對抗人類 IgG 免疫球蛋白之單株抗體 (peroxidase-goat anti-human IgG (H+L), Zymed, U.S.A.) 在 37°C 下做抗體結合反應。3 小時後用含有 0.2% Tween 20 之清洗緩衝液充分清洗四次，再用 PBSA 緩衝液清洗兩次，以除去可能會影響過氧化酶作用之 Tween 20。最後再用 DAB 呈色劑 (每 10 ml 呈色劑含 10 mg diaminobenzidine tetrahydrochloride, 10 μl 30% H₂O₂, 150 μl 1% NiCl₂, 1X PBS) 呈色，數分鐘後，於立體顯微鏡 (dissecting microscope) 下觀察並記錄反應點的個數。

結 果

◆表現重組 p24 蛋白質

將本實驗室已構築好並確認過可以表現出全長 p24 蛋白質的質體，送入表現用之大腸桿菌 BLR 中。當細菌濃度達 OD₆₀₀ 為 0.4~0.6 之時，即可加入 1mM IPTG 誘發蛋白質表現。根據前人的測試，在加入 IPTG 後，隨著時間的增加，蛋白質產量亦會跟著增加。在誘發表現 4 小時後，蛋白質表現可達最大的量。故在這次的表現工作中，就選定加入 IPTG 後的 4 小時當作 p24 蛋白質回收的時間點。回收之後，用氮氣細胞擊破裝置，根據氮氣可以自由進出細胞的特性，在瞬間將密閉系統中的氮氣釋放出來，依照擴散原理，氮氣會從細胞內擴散至細胞外而使細胞炸開。這種方法的好處是不會產生熱而造成蛋白質的變性。之後再用離心的方式分出含可溶性蛋白質之上清液(supernatant)及含不可溶蛋白之菌塊(pellet)。根據 SDS-PAGE 蛋白質電泳分析圖的結果來看(圖一)，在 pellet 的部分可看到分子量為 30KD 的重組蛋白被表現出來。由於此大腸桿菌表現系統的設計是在欲表現的蛋白質前加上一個約 6KD 的融合蛋白 (Fusion protein)，故此 30KD 的蛋白質極有可能是愛滋病毒的 p24。經抗 p24 單株抗體以西方墨點試驗的方式確認表現出來之 30KD 的重組蛋白的確為 p24 之後，即開始進行蛋白質之純化。

◆純化重組 p24 蛋白

將經過 SDS-PAGE 及西方墨點試驗確認表現之重組 p24 蛋白質，利用 Novagen Quick 900 cartridge 蛋白質純化試劑組進行蛋白質純化，並分別用 SDS-PAGE 以及西方墨點試驗分析所得到的蛋白質。根據西方墨點試驗的結果顯示(圖二)，經此方法所純化出來的蛋白質的確是愛滋病毒之 p24 重組蛋白，且可和感染愛滋病毒之病人的血漿反應。除此之外，合併 SDS-PAGE 的結果，除了在 30KD 的位置可以看到一個清楚的 band 之外，幾乎看不到其他因純化不乾淨所引起之 background，故經此方法所純化出來的蛋白質的純度頗高，可以應用於後續的實驗，包括酶連免疫法、酶連免疫點試驗...等等。

◆用西方墨點試驗偵測感染者血漿之抗 p24 抗體

為了建立酶連免疫點試驗的反應條件，分別選用西方墨點試驗以及酶連免疫法的方式篩選出具抗 p24 抗體之血漿檢體。再將此檢體同時分離之單核白血球拿來進行後續酶連免疫點試驗。由西方墨點試驗的結果可知（圖三），具有抗 p24 抗體之血漿檢體約占總檢體數的三分之二。

◆用酶連免疫法偵測感染者血漿之抗 p24 抗體

由於西方墨點試驗在此所顯示的結果是有或無，而非量的多少，故在利用西方墨點試驗偵測病人檢體的同時，亦併用酶連免疫法以瞭解抗體量的多寡。為了建立一套最適合的反應條件，首先將純化過之 p24 抗原分別以每孔 1 μg 、400 ng、200 ng、100 ng、50 ng、10 ng 的量覆被於 96 孔微量滴定盤中，再和不同稀釋倍數之 HIV-1 陽性對照血漿反應，經連接有過氧化酵素（peroxidase）之二次抗體放大訊號後，以呈色法觀察結果。比較不同量之 p24 抗原和 HIV-1 陽性對照血漿反應的結果顯示（圖四），當每孔覆被之 p24 抗原的量大於 100ng 時不同稀釋倍數之 HIV-1 陽性對照血漿所得到的 OD₄₉₀ 讀值相似。亦即每孔只要覆被 100 ng 的 p24 抗原，即可達到最敏感之條件。經過反覆實驗亦得相同結果。故之後的酶連免疫試驗中，p24 抗原的覆被即採用 100 ng 的量。為了避免純化不完全所造成之偽陽性，將不含 p24 基因的質體同樣進行大量表現、純化與稀釋以做為酶連免疫試驗的對照組。p24 抗原和病人血漿反應所得之 OD₄₉₀ 讀值需扣除對照組的讀值，所得之結果才被視為實際反應之 OD₄₉₀ 讀值。合併西方墨點試驗以及酶連免疫法的結果，選取了 6 個病人的血漿檢體，它們在稀釋至 20 倍時其 OD₄₉₀ 值仍大於 0.5，另選取 7 個小於此範圍之病人檢體來進行後續之酶連免疫點試驗。

◆酶連免疫點試驗

將所選取的病人之單核白血球以三倍之序列稀釋(1×10^5 、 0.3×10^5 、 0.1×10^5)分別和不同濃度之 p24 重組蛋白反應，來偵測病人血中是否有會分泌抗愛滋病

毒 p24 抗體的細胞，並利用此反應結果來建立一套最佳的反應條件。根據反應結果(圖五)，當 p24 抗原的濃度越高，所得到的反應點數也越多。故日後如要發展酶連免疫點試驗之檢驗，其所需的 p24 重組蛋白的量約為 1 μ g/well。除此之外，加入不同量的細胞與 p24 反應後所得之反應點數有明顯之倍數關係，可見酶連免疫點試驗的再現性頗高，極有潛力發展成臨床檢驗的方法。

討 論

本研究以實驗室自行製造之 HIV-1 抗原，進行酶連免疫點試驗(ELISPOT)，結果成功的可由之偵測 HIV-1 感染者體內是否有 HIV-1 特異性的抗體分泌細胞，亦測試出反應最適當的抗原濃度與細胞濃度。

此次酶連免疫點試驗所用之抗原為 E 亞型之 p24 蛋白質，由反應結果看來，用以偵測 B 亞型感染者之抗體亦是可行的。為了要利用實驗室原已保存之周邊血液單核血球 (PBMC) 來進行酶連免疫點試驗，必須先確定此感染者血液中有 p24 抗體存在，如此才有機會偵測到 p24 抗原特異之抗體分泌細胞。以酶連免疫法 (ELISA) 先偵測血漿內是否有 p24 抗體，覆被 96 孔滴定盤所使用之 p24 抗原濃度以 1 ug/ml 最為恰當。在酶連免疫點試驗中，覆被之 p24 抗原以每孔 1ug 的量可以得到較多的免疫反應點，反應點之數目與抗原使用之量成正比關係，為了達到較高的敏感度，未來採用之量每孔至少必須加 1ug 之 p24 抗原。

反應之另一變數為周邊血液單核血球之數目，所測試的濃度中，以最高的濃度亦即每孔 1×10^5 細胞得到較多的免疫反應點，免疫反應點之數目與細胞濃度成正比之關係，故未來採用之量仍以每孔 1×10^5 細胞為宜。p24 是利用大腸桿菌表現系統來進行表現，人體中多有對抗大腸桿菌的抗體存在，為避免其他的細菌成份蛋白質可能造成酶連免疫點試驗的干擾，p24 蛋白質的純度非常的重要，會影響此試驗的特異性。本研究利用各種廠牌之純化蛋白質試劑組，結果以 Novagen 之純化效果最佳，純化步驟亦簡單快速。雖然如此，本研究仍利用不含 p24 基因之質體做為對照組，同樣的大量製造、純化，並以相當之稀釋濃度用於酶連免疫點試驗。由反應之結果看來，純化之 p24 抗原應已具有理想之純度，對照組之反應已是相當的低。對照組在每次試驗中仍是必須的，因每一批製造之抗原純度都不會完全相同，故實際反應點之數目應扣除對照組之反應點數。

酶連免疫反應點的數目與病毒負荷量 (Viral load) 之間之關係，過去之報

導指出在病毒負荷量較高時，刺激體內免疫反應，使得分泌抗體之細胞數目增加。而本研究之結果卻看不到這樣的關係，是否因為所使用之細胞均經過冰凍保存，而冰凍並非使用特殊之降溫裝置，而使得每次冰凍細胞之效果不一，亦即使得不同時間冰凍的細胞在解凍後活存的比例不盡相同，而影響到反應點之數目。故實際在應用此試驗時，最好能採用新鮮的血液，否則必須利用標準的降溫裝置來冰凍細胞，以保存高比例活存的細胞，如此才能維持此試驗之敏感度。

如同一般酶連免疫試驗，要瞭解反應之特異性必須測試大量的正常人的細胞，此部分的實驗尚待後續之研究完成。

本實驗已建立酶連免疫點試驗，此特殊檢驗未來將可適用於確定新生兒是否感染 HIV-1。對於一些可能感染 HIV-1 的人，其體內測不到抗體，而由病毒負荷量的測定卻為陽性之結果，或亦可利用酶連免疫點試驗以確定是否感染了 HIV-1。新生兒的抽血較為困難，如何能提高此試驗之敏感度，使得使用的血量能降至最低或較為實際之程度，將是未來必須努力之方向。另外，亦可利用其他的 HIV-1 蛋白質如 p31，p17 等做為覆被抗原，以應用於酶連免疫點試驗。

參考文獻

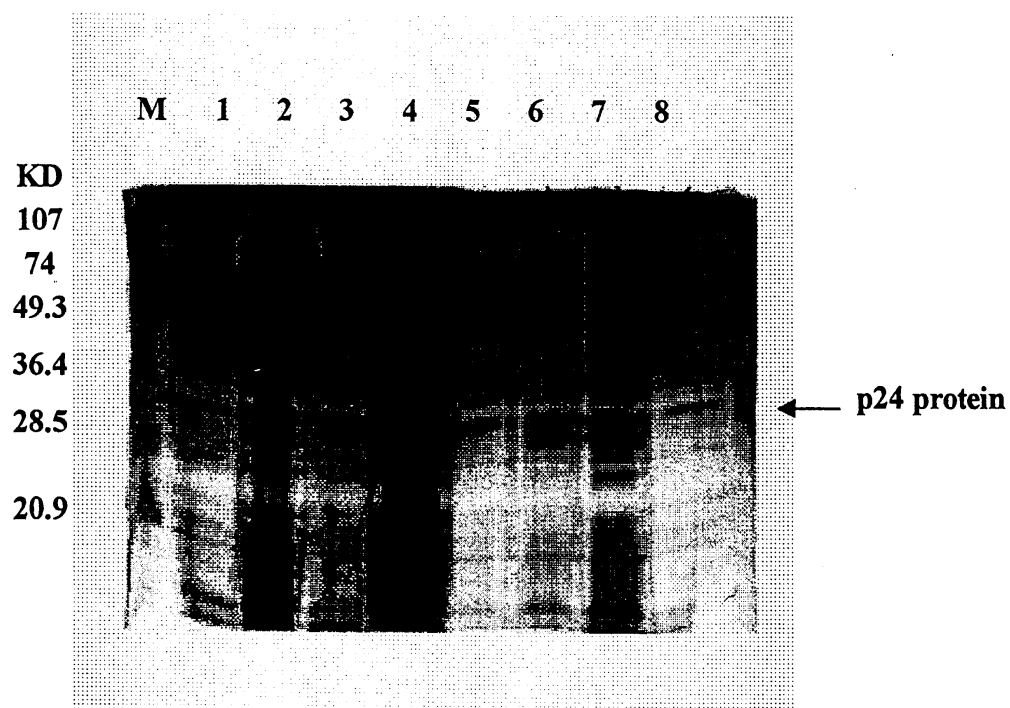
1. Aaiki Rk, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487-491.
2. Arroyo J, Boceta M, Gonzalez ME, Michel M, and Carrasco L. Membrane permeabilization by different regions of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein gp41. *J Virol* 1995;69:4095-4102.
3. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for AIDS. *Science* 1983;220:868-871.
4. Bernstein HB, Tucker SP, Kar SR, McPherson SA, McPherson DT, Dubay JW, Lebowitz J, Compans RW, and Hunter E. Oligomerization of the Hydrophobic Heptad Repeat of gp41. *J. Virol* 1995;69:2745-2750.
5. Bjorling E, Utter G, Stalhandske P, Norrby E, and chiodi F. Identification of a uniquely immunodominant, cross-reacting site in the human immunodeficiency virus endonuclease protein. *J. Virol* 1991;65:4543-4546.
6. Broliden P, Gegerfelt AV, Clapham P, Rosen J, Fenyo E, Wahren B, and Broliden K. Identification of human neutralization-inducing regions of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 1992;89:461-465.
7. Buratti E, Tisminetzky SG, D'Agaro P, and Baralle FE. A neutralizing monoclonal antibody previously mapped exclusively on human immunodeficiency virus type 1 gp41 recognizes an epitope in p17 sharing the core sequence IEEE. *J. Virol.* 1997;71:2457-2462.
8. Centers for Disease Control. Interpretation and use of the western blot assay for serodiagnosis of human immunodeficiency virus type 1 infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1989;38:1-7.
9. Chang KSS, Lin CI, Chen JH, Shih CH, Lin RY, TWu SC, and Salminen MO: HIV type 1 env gene diversity detected in Taiwan. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997;13:201-204.
10. Chong P, Sia C, Sydor M, and Klein M. Identification of a potent synthetic HIV 1 immunogen compromising gag-p24 tandem T- and B-cell epitopes. *FEBS Lett* 1990;264:231-234.
11. Consortium for Retrovirus Serology Standardization. Serological diagnosis of human immunodeficiency virus infection by western blot testing. *JAMA* 1988;260:674-679.
12. DeLeys RB, Vanderborcht B, Van den Haesevelde M. Isolation and partial

- characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of West Central African origin. *J Virol* 1990;64:1207-1216.
13. Devico AL, Veronese FDM, Stephanie L. Lee, Gallo RC, and Sarngadharan. High prevalence of serum antibodies to reverse transcriptase in HIV-1-Infected Individuals. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1988;4:17-22.
 14. Earl PL, Koenig S, and Moss B. Biological and immunological properties of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein: analysis of proteins with truncations and deletions expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol* 1991;65:31-41.
 15. Eriksson K, Nordstrom I, Horal P, Jeansson S, Svennerholm B, Vahlne A, Holmgren J, Czerkinsky C. Amplified ELISPOT assay for the detection of HIV-specific antibody-secreting cells in subhuman primates. *J Immunol Methods* 1992. 153:107-113.
 16. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984;224:500-503.
 17. Gallo RC, Wong-Staal F, Montagnier I, Haseltine WA, Yoshida M. HIV-HTLV gene nomenclature. *Nature* 1987;333:504
 18. Gurtler LP, Hauser H, Eberle J, et al. A new subtype of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1994;68:1581-1585.
 19. Haist S, Marz J, Wolf H, and Modrow S. Reactivities of HIV-1 gag-derived peptides with antibodies of HIV-1 infected and uninfected humans. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8:1909-1917.
 20. Hanke T, Blanchard TJ, Schneider J, Ogg GS, Tan R, Becker M, Gilbert SC, Hill AV, Smith GL. McMichael. Immunogenicities of intravenous and intramuscular administrations modified vaccinia virus Ankara-based multi-CTL epitope vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in mice. *J Gen Virol* 1998. 79:83-90.
 21. Hausdorf G, Gewieß A, Wray V, Porstmann T. A recombinant human immunodeficiency virus type-1 capsid protein (rp24) :its expression, purification and physico-chemical characterization. *J Virol* 1994;50:1-10.
 22. Holodniy M, Katzenstein DA, Sengupta S, et al. Detection and quantification of human immunodeficiency virus RNA in patient serum by use of the polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 1991;163:862-866.
 23. Howell DM, Feldman SB, Kloser P, Fitzgerald-Bocarsly P. Decreased frequency of functional natural interferon-producing cells in peripheral blood of patients with the acquired immune deficiency syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1994. 71:223-230.

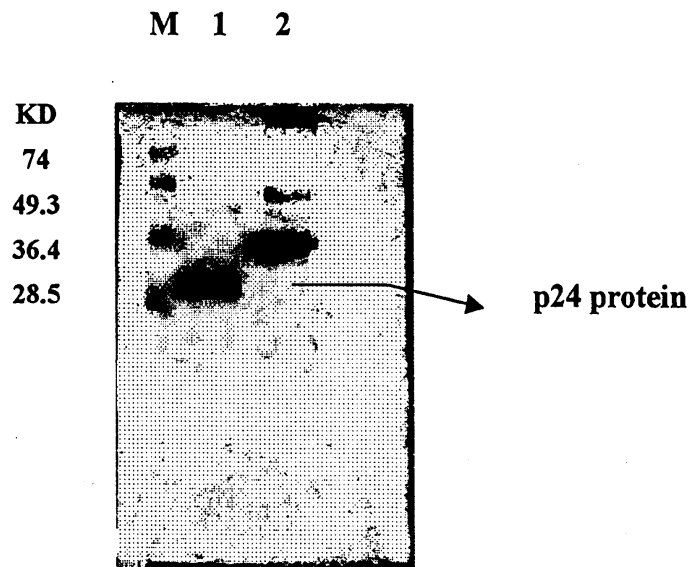
24. Jackson JB, Parsons JS, Nichols LS, Knoble N, Kennedy S, and Piwowar EM. Detection of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibody by Western blotting and HIV-1 DNA by PCR in patients with AIDS. *J.Clin Microbiol.* 1997;35:1118-1121.
25. Krust B, Laurent AG, Le Guern A. Characterization of a monoclonal antibody specific for the HIV-1 precursor glycoprotein. *AIDS* 1988;2(1):17-24.
26. Kusk P, Bugge TH, Lindhardt BO, Hulgaard EF, and Holmback K. Mapping of linear B-cell epitopes on the major core protein p24 of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992;8:1789-1794.
27. Lee, C. N., M. Y. Chen, C. L. Kao, H.S. Lin, M. C. Lee, S. J. Twu, R. Y. Lin, M. J. Sheng and C. Y. Chuang. Genetic characterization of HIV-1 strains in Taiwan. 4th International Conference on AIDS, December, 1996.
28. Moore JP, Sattentau QJ, Wyatt R, and Sodroski J. Probing the structure of the human immunodeficiency virus surface glycoprotein gp120 with a panel of monoclonal antibodies. *J.Virol* 1994;68:469-484.
29. Morikawa Y, Moore JP, and Jones IM. HIV-1 envelope protein gp120 expression by secretion in *E. coli.*: assessment of CD4 binding and use in epitope mapping. *J.Virol Meth* 1990;29:105-114.
30. Myers G, Pavlakis GN. Evolutionary potential of complex retroviruses. In: Levy JA, ed. *The retroviridae*. New York: Plenum Press; 1992:51-105.
31. Nakamura Y, Kameoka M, Tobiume M, Kaya M, Ohki K, Yamada T, and Ikuta K. A chain section containing epitopes for cytotoxic T, B and helper T cells within a highly conserved region found in the human immunodeficiency virus type 1 gag protein. *Vaccine* 1997;15:489-496.
32. Ou CY, Kwok S, Mitchell SW, et al. DNA amplifications for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells. *Science* 1988;239:295-297.
33. Peliska JA, Benkovic SJ. Mechanism of DNA strand transfer reactions catalyzed by HIV-1 reverse transcriptase. *Science* 1992;258:1112-1118.
34. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation, and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. *Science* 1984;224:497-500.
35. Sandstrom EG, Schooley RT, Ho DD, et al. Detection of human anti-HTLV-III antibodies by indirect immunofluorescence using fixed cells. *Transfusion* 1985;25:308-312.
36. Sarngadharan M, Popovic M, Bruch L, Schupbach J, Gallo RC. Antibodies reactive with human T-lymphotropic retroviruses.(HTLV-III) in the serum of

patients with AIDS. *Science* 1984;224:506-508.

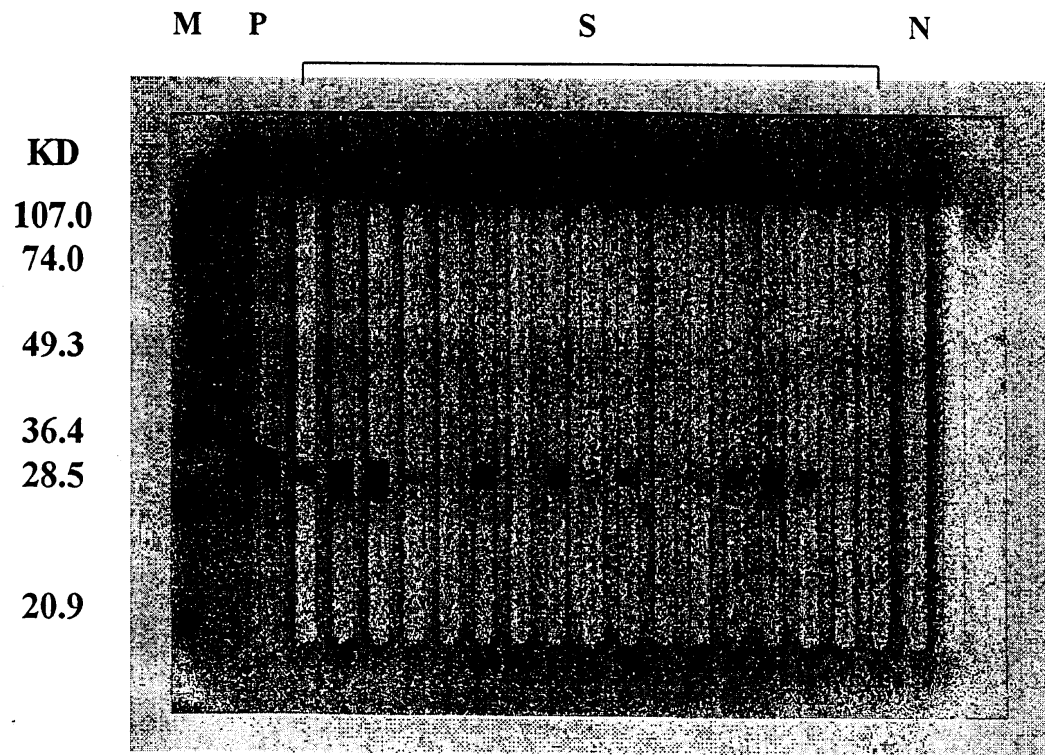
37. Starcich BR, Hahn BH, Shaw GM, McNeely PD, Modrow S, Wolf H, Parks ES, Parks WP, Josephs SF, Gallo RC, and Wong-Staal F. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell* 1986;45:637-648.
38. Steimer KS, Higgin KW, Powers MA, Stephans JC, Gyenes A, George-Nascimento C, Luciw P, Barr P J, Hallewell RA, and Sanchez-Pescador R. Recombinant polypeptide from the endonuclease region of the acquired immune deficiency syndrome retrovirus polymerase (*pol*) gene detects serum antibodies in most infected individuals. *J Virol* 1986;58:9-16.
39. Wan M, and Loh BN. Expression and purification of active from of HIV-1 protease from *E. coli*. *Biochemistry and Molecular Biology International* 1995;35:899-912.
40. Whitcomb JM, Kumar R, Hughes SH. Sequence of the circle junction of human immunodeficiency virus type 1: implications for reverse transcription and integration. *J Virol* 1990;64:4903-4906.



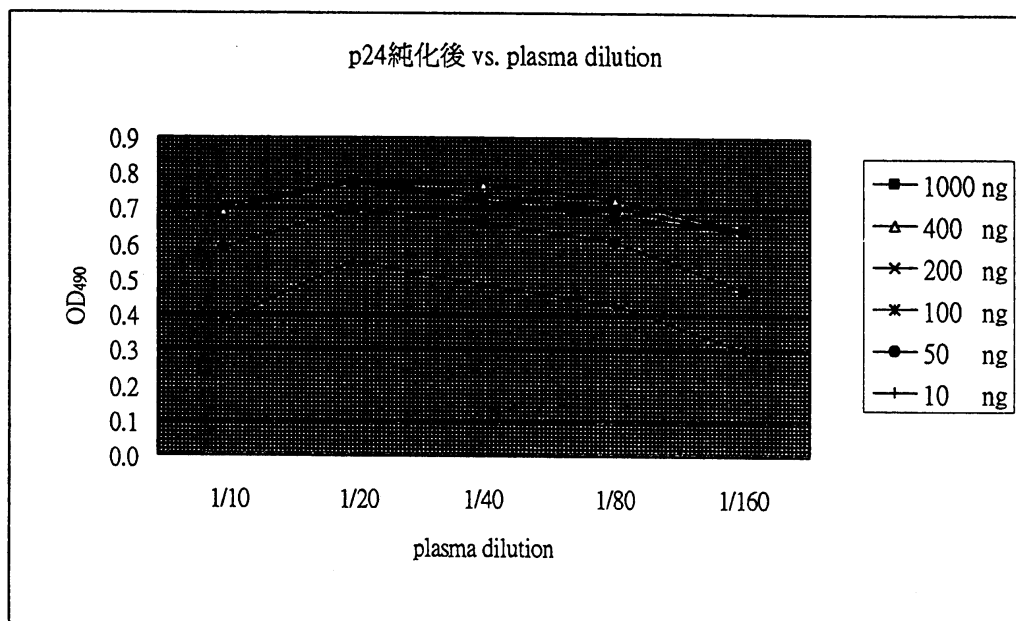
圖一、用大腸桿菌系統表現愛滋病毒 p24 重組蛋白之 SDS-PAGE 蛋白質電泳圖。M:Protein marker。Lane 1 及 Lane 2 分別為以 1mMIPTG 誘發不含 p24 重組蛋白基因之大腸桿菌株蛋白表現後 4 小時之分離後上清液及菌體沈澱物。Lane 3 及 Lane 4 分別為以 1mMIPTG 誘發 p24 重組蛋白基因之大腸桿菌株蛋白表現後 4 小時之分離後上清液及菌體沈澱物。Lane 5 及 Lane 6 分別為 Lane 1 及 Lane 2 十倍稀釋之蛋白質溶液。Lane 7 及 Lane 8 分別為 Lane 3 及 Lane 4 十倍稀釋之蛋白質溶液。



圖二、純化後 B 亞型 p24 重組蛋白質與抗體反應陽性血漿之西方墨點法反應圖。M:Protein marker。Lane 1 為純化後 p24 重組蛋白質和 HIV-1 陽性血漿反應所得到之結果。Lane 2 為純化後 p17 重組蛋白質和 HIV-1 陽性血漿反應所得到之結果。

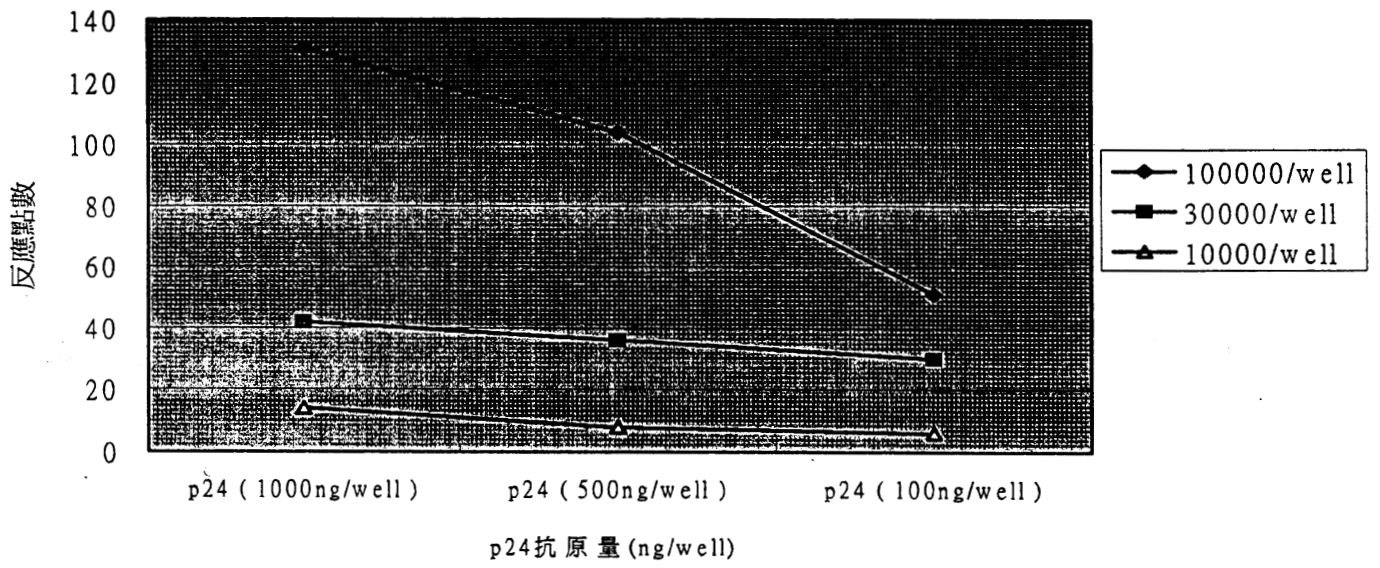


圖三、重組 p24 蛋白質和病人血漿之西方墨點法反應圖。M:Marker。P:重組 p24 蛋白質與單株抗體反應。S:重組 p24 蛋白質和愛滋病毒感染者之血漿抗體反應。N:未加入 p24 抗體與 p24 蛋白質反應。

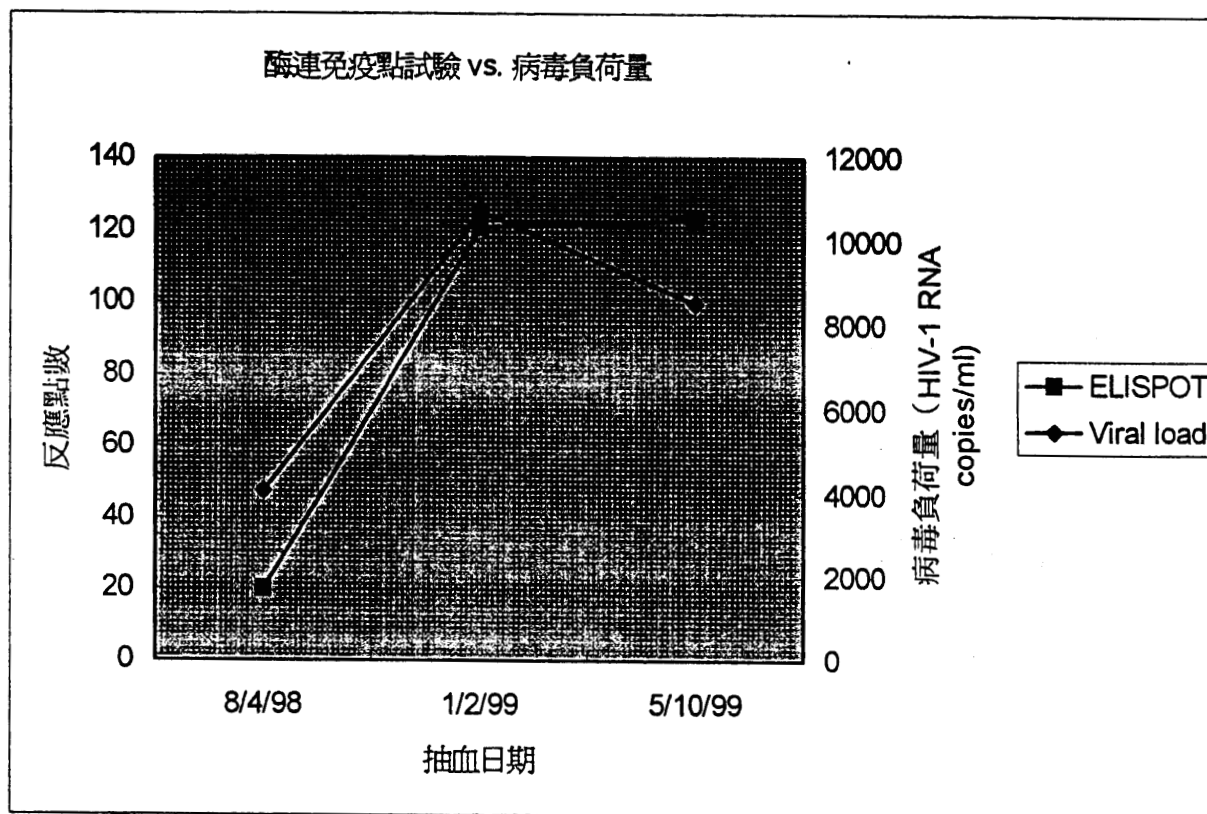


圖四、不同量 p24 抗原和 HIV-1 陽性血漿之酶連免疫試驗反應圖。橫軸為 HIV-1 陽性血漿之稀釋倍數。縱軸為反應後 OD_{490} 的讀值。圖例則為每孔所覆被之 p24 重組蛋白質的量。

p24 抗原量 vs. 反應點數



圖五、同一病人以不同抗原量以及細胞個數進行酶連免疫點試驗之結果比較圖。



圖六、同一病人，不同抽血日期之檢體之酶連免疫法與病毒負荷量之結果比較圖。