

計劃編號：DOH86-TD-040
行政院衛生署八十六年度科技研究發展計畫

後天免疫缺乏病毒抗體之提前及更靈敏的檢驗方法研究
Early and Sensitive Detection of Anti-HIV-1 Antibodies

研究報告

執行機構：國立陽明大學生命科學院微生物免疫研究所
計畫主持人：許萬枝
執行期間：85年7月－86年6月

目錄

中文摘要3
英文摘要4
一、前言5
二、材料與方法7
(1)、HIV-gp41重組基因的製備7
(2)、合成胜肽7
(3)、二級抗體與寡核酸模板的共價連結7
(4)、重組蛋白的製備7
(5)、抗原的粘附8
(6)、以酵素免疫法偵測 HIV抗體8
(7)、Immuno-PCR8
三、結果與討論10
四、誌謝12
五、參考文獻12
六、圖14

中文摘要

後天免疫缺乏病毒感染後會有兩個月的空窗期，在這段空窗期中抗體的量甚低，並不能以現有的方法檢測出來，若為輸血之血源，極可能造成感染。因此如果能夠把檢測靈敏度提高十至百倍，應可提前檢測到感染的假陰性者，Immuno-PCR基本上是檢測抗體，但其信號的放大是以PCR方式來放大，文獻中此方式可以比酵素免疫法增加萬倍以上的靈敏度。因此我們利用此一模式嘗試在 HIV-1抗體的檢測，方法上我們先以一段寡核酸化學鍵結連於兔子抗人體 IgG免疫球蛋白上，而以 HIV-1 gp41 的抗原附著於 96 孔軟膠盤上去吸附 HIV-1 患者血中的 anti-gp41 抗體，之後，寡核酸經由免疫化合物體連粘附在盤子上，再以 PCR 放大，由此方法得知，靈敏度確屬為甚高，但專一性卻相對減低很多，為解決背景值的問題，我們合成生物素標記的蛋白質片段當抗原，再配合以卵蛋白吸附在細磁顆粒方便清洗的方式，重作類似的實驗，結果發現類似的結果，靈敏度升高了，但專一性卻不足，因此，Immuno-PCR 雖於理論上有極高的偵測能力，但由於太過靈敏，些許的殘留，極易被放大，整個系統的最適條件仍有進一步改進的必要。

關鍵詞：愛滋病毒；檢測；抗體

Abstract

Human immunodeficiency virus (HIV) infects individuals that usually give a window period of about 2 months without significant antibody response. Within this period the HIV-specific antibodies are so low that regular HIV screening could give a result of negative detection. It is these people that may contaminate the blood bank and potentially transmit HIV to the recipients. Therefore, if methods that can improve the antibody detection sensitivity 10 to 100 fold, then it would be possible to reduce the window period and facilitate the early detection of HIV infection. As a result, it may further reduce the risk of transfusion transmission. Immuno-PCR was a newly documented method that could increase the antibody detection over 10^4 fold. Therefore, we evaluated this method in the HIV-specific antibody detection. We first synthesized defined-length oligonucleotides and conjugated them to rabbit specific to human IgG. This DNA-2nd Ab conjugate was then bound to HIV-specific antibodies which were previously adhered to recombinant HIV-gp41 absorbed on 96-well plates. After extensively washing, the DNA was PCR amplified and monitored. We found the Ab-detecting sensitivity was readily increased. However, the detection specificity was seriously lost. We reasoned that the recombinant gp41 may have contaminated bacterial proteins to give the undesired background. Therefore, a synthetic peptide of the reputed immunodominant HIV epitope was used as antigen. In that peptide, a biotin was incorporated in the N-terminus so that the peptide could be bound to streptavidin-magnetic beads to facilitate the washing and to reduce the background. Other procedures were followed as above. However, results of good sensitivity but poor reproducibility and specificity were observed. Therefore, we concluded that immuno-PCR is a theoretically sensitive detection method but it is too sensitive to be of practical usage and the whole system needs to be improved.

Keywords: HIV; detection; antibody

一、前言：

HIV的感染造成人類後天免疫不全症 (AIDS)，目前雖有雞尾酒療法壓抑住體內病毒的繁衍，但其經濟及社會成本之大，仍是衛生防疫甚大的挑戰。國內 HIV病毒的感染，增加速度並未減少，但感染的途徑，已由同性戀者轉變為異性戀者為主要族群。當然，偶發性的輸血危險亦沒有完全斷除，這些傳染途徑，也非一時能完全阻絕，如酒廊、三溫暖、應召站等色情行業，由嫖妓至回傳到家庭的夫妻、母子感染、均是隱憂、然而令社會不能接受者，就是輸血性的感染，此一途徑，往往是高危險群仍繼續捐血，而目前的酵素免疫法配合西方點墨法仍不足以篩選出那感染而在空窗期的捐血者。這些假陰性者的血液若為受血者使用，則是偶發性輸血感染的主因。

空窗期是就檢驗技術而言，實際上病毒入侵後，細胞性免疫反應及體液性免疫均陸續在啟動，然而免疫反應需要時間，目前使用的酵素免疫法配合西方點墨法就因而需要感染後約兩個月才能檢測出來。如果能提檢測的靈敏度，必可縮短無法偵知的空窗期。

當然，要提早檢測到病毒的感染，理想上可以不用等待被感染者產生足夠被檢測到的抗體，直接檢測抗體或病毒的 RNA 或嵌入寄主細胞染色體的 proviral DNA 亦可，然而普遍測量抗原的困難性遠高於目前使用的抗體檢測方法。而檢測病毒的核酸，就像 PCR 用於醫學檢驗的複雜性一用。技術上的品質控管，阻礙其成為例行的檢驗工作。

1992年，Sano 等人 (5) 發表了用抗體與 PCR 合用來檢驗蛋白質抗原的方法，其靈敏度聲稱為酵素免疫法的 10^5 倍，其原理是以抗體結合抗原，而抗體為 protein A-streptavidin 的融合蛋白所認得。最後，生物素 (biotin) 標定的特殊 DNA 片段連結於 streptavidin 上，而 DNA 片段以 PCR 的方式放大來分析，因為這種方法 DNA 的放大，並不是來自複雜的 DNA 混合物，理論推想，訊號應是非常清晰的。陸續地，Zhou 等人 (8) 及 Ruzicka 等人 (3) 發展出不需使用特性試劑的 Immuno-PCR，Sanna 等人 (4) 更實際使用類似的方法來測量經刺激後 TNF α (Tumor necrosis factor α) 在脊髓液中的產生，若用傳統的酵素免疫法能偵測到

TNF α 產生的最短刺激時間是90分鐘，但靈敏度則僅為 ELISA 的15倍，縮短能偵測的時間為刺激後的15分鐘。

由以上的文獻，我們推測 Immuno-PCR的靈敏度，應是很高，但實際應用上，可能只有比較保守的10-100倍(4)，若果能如此，抗體檢測時間的空窗期應可從大約二個月(8週)往前推為四至六週，誤用空窗期的血袋可以進一步地避免。

爲了發展適合於 HIV 抗體檢驗的 Immuno-PCR，我們首先挑選抗原性極高的。同時也是保守性極高的 HIV gp41片段(1,7)以 *E. coli* 表現之。但考慮到 *E. coli* 來的抗原，有時會由於純度不純，容易產生背景的非專一性反應，因此我們亦使用合成的胜肽，此胜肽亦落於 gp41之內，爲商業診斷試劑使用的免疫主要抗原區，以此兩種不同型式的抗原作爲測試 Immuno-PCR 的基礎。

二、材料與方法

(1)、HIV-gp41重組基因的製備：

以定點突變的方法在 HXB2 proviral DNA上 gp41 與 gp120 之間製造了一個 *EcoRI* site，因此將 *EcoRI*與 *XhoI*含 gp41基因的片段殖入 pbluescript KSII(+)中，所得質體，再以 *HindIII*與 *XhoI*切割，再用 klenow polymerase 處理端點，連接回後，得到 pHX14，此段重組蛋白，包涵了 gp41的 N端 1/4的長度，涵蓋了免疫主要區 (Immunodominant region)，亦即胺基酸 598至 604之間。

(2)、合成胜肽：

Gnann 等人(1)發現 HIV 的患者有100%的比率含有抗 HIV gp41上的一段 12個胺基酸的胜肽，類似的區域，AGEN公司應用為抗原，配合特殊單株抗體，作成全血檢測 HIV 感染系統。因此，我們完全採用 AGEN由文獻中使用的秩列(2)，在其 N-terminus 的胺基上，加上生物素便成下面的直接合成胜肽

biotin-RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGK。

(3)、二級抗體與寡核酸模板的共價連結：

取 200 μ l Antibody (rabbit anti-human IgG; Sigma I-2011)加入 2 μ l 1M Tris, pH8.0, 及少量 Sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) 粉末，於 37 $^{\circ}$ ，反應 30分鐘，此溶液經離心去掉些許不溶物，通過 Desalting column (Pierce)，收集抗體的部份，約 370 μ l。再將此溶液加入 5'端含有 SH的 核酸模板 HS--TTCATTA⁺CCTAT⁺TCACT⁺CTGTT⁺TTACCC⁺TATCG⁺TAATA，兩者完全溶解後，液面油封，於 4 $^{\circ}$ 放置過夜。

將上述 Ab-oligo DNA的反應液通過 Sephadex G-100 柱層 (40x1cm)，並以 PBS清洗，收 Ab-oligo DNA部份。

(4)、重組蛋白的製備：

大腸桿菌含有 pHX14質體者，養在 LB培養基中，至吸光約 0.5 OD_{570nm}時，加入 IPTG (1mM)，繼續培養 2小時，以 French Press 將菌體壓破，可溶物離心掉後，不溶物中的 inclusion body 以 8M urea 萃取出來的蛋白質，含有 gp41的重組蛋白，純度約 80%以上。

(5)、抗原的粘附：

曾使用不同種類的 96 孔軟性平板，如 U-型的 Costar plate，Falcon 的 391 MicroTest III 平板，Hybaid 的 V-Shaped polycarbonate 平板，取等量重組蛋白 gp41 以 0.1M Tris-pH9.0, 0.15 M NaCl，溶液作不同稀釋度稀釋。加入 96孔中，在室溫放置過夜後，再以 TBS (0.1 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 NaCl) 清洗三次，再以 3% BSA的 TBS飽和平板一小時，Wells 再以 TBS 清洗三次備用。

(6)、以酵素免疫法偵測 HIV 抗體：

HIV+ 的患者血清以商業試劑 Serodio-HIV (Fujirebio) 的凝膠試劑再測試，呈陽性者以 3% BSA之 TBS連續稀釋後，加入自行以 gp41 吸附的平板一小時。此平板以 TBS清洗三次，再以 Horseradish peroxidase-conjugated anti-human IgG 的免疫球蛋白 (1 μ g/ml 於 TBS-1% BSA 中) 反應 1 小時，之後再以 TBS清洗 5 次，最後再以 100 μ l 呈色液，(10mg o-phenyldiamine 加 4 μ l 30% H₂O₂ 於 10ml 的 0.1 M citrate buffer, pH5.0) 中呈色，呈色完後以 50 μ l 0.5 N HCl 停止反應。

(7)、Immuno-PCR

方法 (A)：在 96 孔盤上直接反應。

用在酵素免疫法的抗原平板，先以 20 倍稀釋的 non-immune rabbit serum (於 3% BSA-TBS 中) 作 non-specific Ab 佔堵處理 30 分鐘，平板內再加入稀釋於 3% BSA-TBS 的人血清，反應一個小時之後，再以 TBS 加 0.1% Tween 20 (TTBS) 清洗 5 次，再加入 50 倍稀釋於 TBS-3% BSA 的 Ab-oligo DNA conjugate，一小時後，此 plate 再以 TTBS 加 3% 脫脂奶粉清洗 15 次，後以無菌蒸餾水洗兩次。

PCR 則直接在同一平板上進行，於 30 μ l 的反應液中，加入 50 ng 的引子 P1 及 P2 (P1: CATTAG $\overline{\text{CTATG}}$ 再CACTT $\overline{\text{CT}}$; P2: TATAGC $\overline{\text{ATACG}}$ 平GTAAA $\overline{\text{C}}$)，1 單位的 Taq polymerase，100 μ M dNTP，1 倍反應緩衝液 (Takara)，擴增的條件為 95 $^{\circ}$ 2 分鐘，然後 50 $^{\circ}$ 30 秒，72 $^{\circ}$ 30 秒，95 $^{\circ}$ 30 秒，如此重複 30 次，最後為 50 $^{\circ}$ 30 秒與 72 $^{\circ}$ 1 分鐘。反應完後，取 10 μ l 之 PCR 產物加入 2 μ l 的 loading dye (內含 ethidium bromide homodimer 0.25 μ g)，以 4% Agarose 電泳展開。

方法(B)：以合成胜肽配合磁顆粒子分離法。

Biotin-RILAVERYLKDQQLLGIWGCSGK溶於 0.1xTBS中 (0.84 $\mu\text{g}/\text{ml}$)然後以磁顆粒 - Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (Promega)吸附，於室溫中搖蕩 1小時，磁顆粒子再以簡易離心，收集下來後，以磁鐵吸附並以 TBS 清洗，磁顆粒子再以 3% BSA-TBS處理半小時，經 TBS清洗一次後，30 μl 的磁顆粒子再置於新的 1.5 ml離心管，並加入 200 μl 適當稀釋於 3% BSA-TBS內的人血清，旋轉桌上室溫 1 hr，加入 1 ml TTBS，vortex數秒鐘，離心後，磁顆粒子以磁鐵吸住，吸走上清液，如此重複 5次後，加入 200 μl 適當稀釋於 3%BSA-TBS的 Ab-DNA conjugate，反應 4hr後，以 3次 1 ml TTBS清洗，換到新的 1.5 ml試管以 1ml新的 TTBS置放 4 \circ 過夜，再以 5次 TTBS清洗，最後換至另一新的 1.5ml新管，以 PBS一次，一次無菌水各清洗一次，最後磁顆粒加入 15 μl 無菌水，100 \circ 1分鐘，取 10 μl 液體出來用 PCR擴增。

三、結果與討論

將寡核酸模版 (SCR-SH) 以 Sulfo-SMCC 連接於抗體上之化學反應式見圖一，其接上核酸的抗體複合物在 Agarose 跑的情形，蛋白質可經由作 blotting 到硝化纖維膜上，再以 Ponceau S 染色，其結果可從圖二看到，圖二 A 從 Lane 2 與 Lane 3 比較，與核酸反應後的抗體因帶了更多的負電，跑得比被活化的抗體快一些，而由圖二 B 可見沒有反應的核酸跑得最快，可以被 Ethidium bromide 染得最亮，Lane 3 亦可看見，有些核酸已經與抗體結合了，但有一大部份核酸則是多餘的。我們藉用 gel filtration 的方法可完全把多餘的核酸去除，只剩 Ab-DNA 的複合體 (圖二，Lane 4)。

爲了了解 SCR-SH 爲模版進行 PCR 的可行性，將 SCR-SH 經連續稀釋後進行 PCR (圖三)，結果顯示 0.01 pg 的 DNA 仍能清楚地測得，且電泳前 PCR 反應物先混以 ethidium bromide homodimer，此 dye 可牢固地連於雙股 DNA，對單股 DNA 則不甚具親和力，故 primer DNA 不會在電泳後顯現。

爲了知道我們自己製備的 96 孔抗原平板是否真能區分 HIV 感染的血液，我們以 50 倍、500 倍等 10 倍增加稀釋，做免疫酵素反應，結果如圖四，稀釋 50 倍尚可測試出來，但到 500 倍稀釋就無法看出。

我們以同樣 96 孔抗原平板，作 Immuno-PCR，如圖五所示在 HIV 病人血清稀釋 6400 倍的範圍內仍可清楚看到結果，而空白組，即以健康人血清爲一級抗體則無訊號，唯此方法仍甚易出現背景的訊號，如方法所述，需要清洗 15 次之多，而且在洗液中除了放 Tween 20 之外，更加入脫脂奶粉，操作手續相當難以控制。因爲抗原是從 *E. coli* 中純化的重組基因蛋白，唯恐少量的大腸桿菌抗原造成背景的來源，所以另一個方法我們使用了合成胜肽，這段胜肽是位於 gp41 中的非常主要的抗原區 (Immunodominant epitope)，合成時，在它的 N 端胺基酸上還加了生物素 (biotin)，因此此胜肽溶於 PBS 中之後，即可以磁顆粒—Streptavidin 的方式吸附住，因爲附著在磁顆粒上的 Streptavidin-biotin 的親和力很強，磁顆粒可以容易地離心，又可用磁鐵吸住，可以用大一點的體積 (1ml v.s. ELISA 上的 300 μ l) 來清洗，因此我們做了此方面的實驗。

圖六顯示出Ab-DNA的 conjugate 在此系統下，必須極端地稀釋，在 10^7 倍時才可分辨 HIV 陽性與陰性，在 10^5 倍稀釋時，則陰性樣品仍可看到一些較弱的訊號。

由上述的實驗，可知 Immuno-PCR 確實比一般的酵素免疫法靈敏，在直接以用於酵素免疫法的 96 孔平板來作 Immuno-PCR，我們很容易地看到上百倍的靈敏度 (6400 倍比 50 倍)，但由於利用的基因重組的蛋白無法達到極高的純度，因此有假陽性的出現，另外，如果用磁顆粒 - Streptavidin 的方法來進行的話，背景值卻來自另一層面，這磁顆粒的物理結構，似乎是造成很難清洗的原因，非光滑的表面。雖增加了吸附的面積，但也阻礙了清洗，我們甚至利用較大的體積清洗，併配合隔夜 4° 的擴散。再清洗，仍不能把 Background 清洗得很好，除非，一開始就把 Ab-DNA complexes 稀釋得很低。另外，我們也注意到第一次反應的 1.5ml 離心管，可能在 Vortex 清洗時有些 Ab-DNA 會跑到蓋子等難以清洗的腳落。因此換兩次新的離心管也是必須的。總結我們的實驗所發展出來的 Immuno-PCR，利用 96 孔平板仍是比磁顆粒吸附方式來的理想，背景上雖需經過透徹的清洗，但比較容易得到滿意的訊號，唯被覆平板的抗原純度一定要高，應可改善非專一性的問題，因為，沒有能像 ELISA 般有一個 Cut-off 值，因此在實際上應用，必須有良好的系統控管，才可正確的判斷，本方法雖非常靈敏，但整個系統的最適條件仍有進一步改進的必要。

四、誌謝

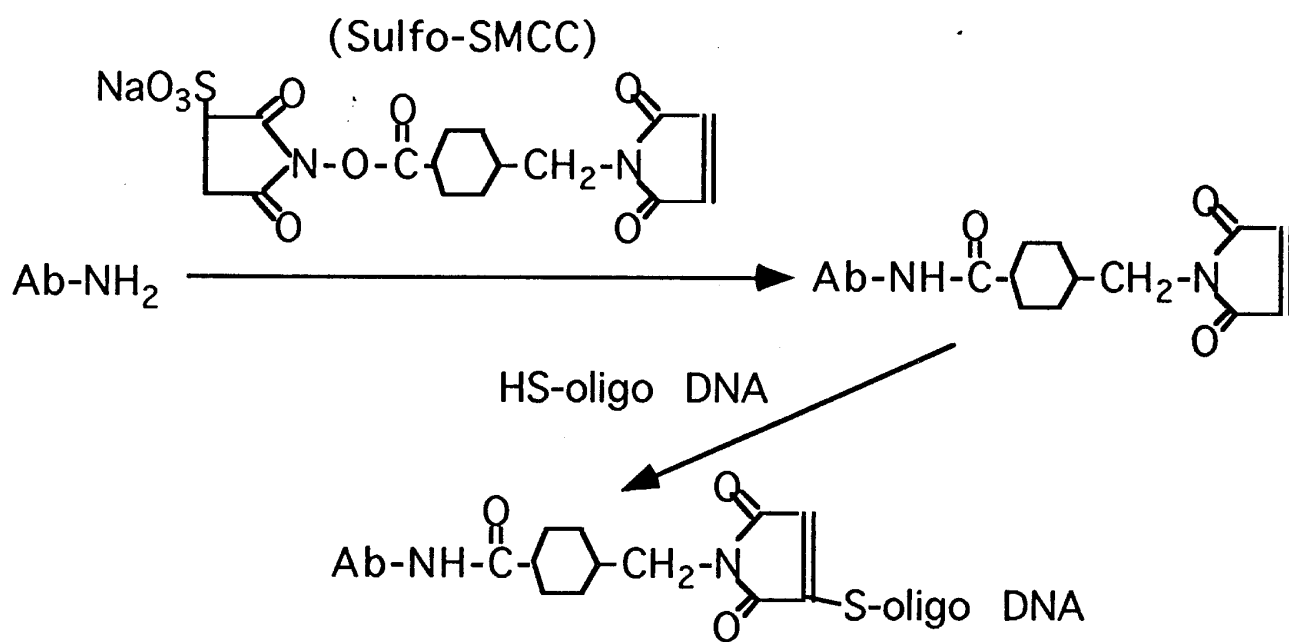
本實驗承衛生署的資助，台北榮總醫研部同仁及歐樂君、李君男、周民治等博士的協助，一併感謝。

五、參考文獻

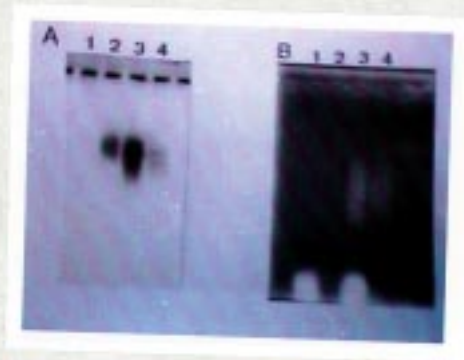
1. **Gnann, J.W. Jr., Schwimmbeck, P. L. and Nelson, J. A. Truax, B. and M. B. A. Oldstone (1987)** Diagnosis of AIDS by using a 12-amino acid peptide representing an immunodominant epitope of the human immunodeficiency virus. *J. Infectious diseases.* 156, 261-267.
2. **Kemp, B. E., Rylatt, D. B., Bundesen, P. G., Doherty, R. R., McPhee, D. A., Stapleton, D., Cottis, L.E., Wilson, K., John, M, A., Khan, J. M., Dinh, D. P., Miles, S., Hillyard, C. J. (1988)** Autologous red cell agglutination assay for HIV-1 antibodies: simplified test with whole blood. *Science*, 241, 1352-1354.
3. **Ruzika, V., Marz, W., Russ, A., and Gross, W. (1993)** Immuno-PCR with a commercially available avidin system. *Science* 260, 698-699.
4. **Sanna, P.P., Weiss, F., Samson, M.E., Bloom, F.E., and Pich, E.M. (1995)** Rapid induction of tumor necrosis factor α in the cerebrospinal fluid after intracerebroventricular injection of lipopolysaccharide revealed by a sensitive capture immuno-PCR assay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 272-275.
5. **Sano, T., Smith, C.L., and Cantor, C.R. (1992)** Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science* 258, 120-122.
6. **Sato, P.A., Maskill, W.J., Tamashiro, H., and Heymann (1994)** Strategies for laboratory HIV testing: an examination of alternative approaches not requiring Western blot. *Bulletin of the world Health Organization*, 172, 129-134.
7. **Yu, S.-L., Chou, M.J., Tam, M.F., Lee, T.H. and Syu, W.-J. (1993)** Expression and antigenicity of human immunodeficiency

virus type-1 transmembrane gp41 in insect cells. *Biochem. and Biophys. Res. Communications* 191, 207-213.

8. **Zhou, H., Fisher, R.J., and Papa, T.S.** (1993) Universal immuno-PCR for ultra-sensitive target protein detection. *Nucleic acids Research* 21, 6038-6039.



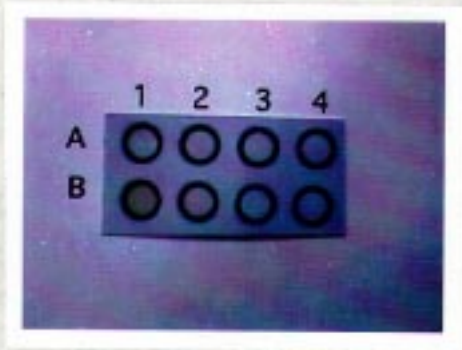
圖一、寡核酸模板與抗體鍵結之化學反應



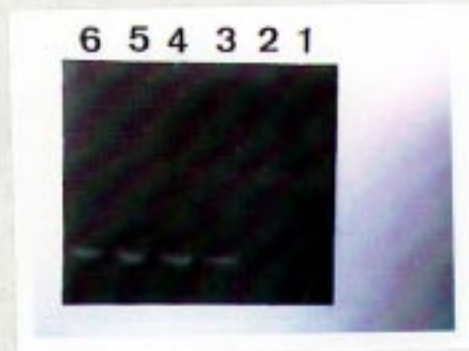
圖二、寡核酸模板與抗體鍵結後之分析與純化。
 鍵結前後之產物及以Sephadex G-100去除多餘之寡核酸，各步驟之樣本以洋菜膠電泳分析的結果，A圖部分是轉印至硝化纖維膜上，再以Ponceau S作蛋白質染色，B圖部分則是以ethidium bromide直接染洋菜膠上的DNA, Lane 1, SCR-SH DNA; Lane 2 抗體與 Sulfo-SMCC反應之後; Lane 3, 寡核酸與抗體鍵結之後; Lane 4, Lane 3 反應物經Sephadex G-100 分離，蛋白質部分。



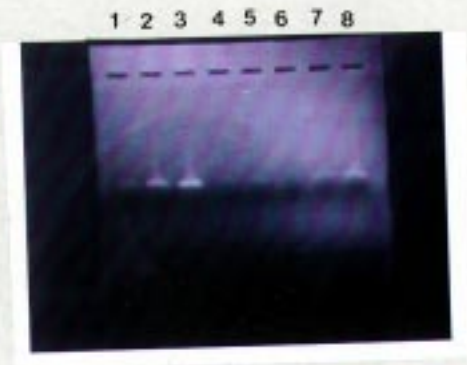
圖三、SCR-SH DNA 以PCR擴增的可行性。Lane 1至 lane 7分別為1 ng、0.1 ng、0.01 ng、1 pg、0.1 pg、0.01 pg、空白組，箭頭所指即擴增的47mer產物。



圖四、以酵素免疫法測量檢測的靈敏度，第A列為被附BSA，第B列為被附recombinant gp41，HIV-1病人血清稀釋度如標示：1, 50倍; 2, 500倍; 3, 5000倍



圖五、以96孔ELISA平板直接用於Immuno-PCR，測量是否HIV抗体陽性，Lane 1:未加血清及抗体-寡核酸；lane 2:未加血清；Lane 3:血清6400倍稀釋；lane 4: 3200倍稀釋；lane 5: 1600倍稀釋； lane: 6800倍稀釋°C



圖六、以磁顆粒吸附抗原然後再去吸附抗體的 Immuno-PCR，血清抗体固定稀釋200倍，Ab-寡核鹼則分別稀釋成 10^3 倍 (lanes 1, 6), 10^5 倍 (lanes 2, 7), 10^7 倍 (lanes 3, 8)倍，Lanes 1-3為HIV陽性；lane 4未加血清及Ab-寡核鹼；lane 5未加血清測量(Ab-寡核鹼 10^7 倍)，lanes 6-8為HIV陰性 $^{\circ}\text{C}$