



HIV-1 p24 和 SIV p27 两种 ELISA 试剂盒检测 SIV p27 抗原的比较

金光, 王卫丛, 喆蒋虹, 陈霆, 魏强

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 由于检测 SIV p27 抗原试剂盒来源困难, 有时不稳定, 鉴于 HIV-1 p24 与 SIV p27 有较强的交叉抗原, 本研究比较 HIV-1 p24 和 SIV p27 两种 ELISA 试剂盒检测 SIV p27 抗原得出的结果是否存在一定的相关性。方法 HIV-1 p24 和 SIV p27 两种 ELISA 试剂盒定性和定量检测样品中 SIV p27 抗原, 并对检测结果进行回归和相关分析。结果 HIV-1 p24 和 SIV p27 两种 ELISA 试剂盒检测 SIV p27 抗原的灵敏度分别是 150 pg/mL 和 62.5 pg/mL。两种试剂盒检测病毒液和血浆中 SIV p27 抗原的定性结果一致。定量结果的统计分析得出病毒液的直线回归决定系数 $R^2 = 0.857$, 直线相关系数 $r = 0.926$, $P < 0.01$, 直线正相关程度较高; 血浆的直线回归决定系数 $R^2 = 0.512$, 直线相关系数 $r = 0.716$, $P < 0.05$, 直线正相关程度较低。结论 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒能够替代 SIV p27 ELISA 试剂盒定性检测病毒液和血浆中 SIV p27 抗原, 但只能定量检测病毒液中 SIV p27 抗原。

【关键词】 HIV-1 p24; SIV p27

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)02-0026-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.02.07

Comparison of the Efficacy of HIV-1 p24 ELISA Kit and SIV p27 ELISA Kit in Detection of SIV p27 Antigen

JIN Guang, WANG Wei, CONG Zhe, JIANG Hong, CHENG Ting, WEI Qiang

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory
Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models,
State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective The ELISA kit for HIV-1 p24 is sometimes used for SIV p27 detection. The aim of this study was to clarify whether there is any dependence and correlation between the results of detecting SIV p27 antigen by HIV-1 p24 ELISA kit and SIV p27 ELISA kit. **Methods** SIV p27 antigens were detected qualitatively and quantitatively by HIV-1 p24 ELISA kit and SIV p27 ELISA kit, respectively, and the results were compared by regression and correlation analysis. **Results** The sensitivity of detecting SIV p27 antigen was 150 pg/mL by HIV-1 p24 ELISA kit while 62.5 pg/mL by SIV p27 ELISA kit. The qualitative results obtained by HIV-1 p24 kit consisted with those by SIV p27 kit on detecting SIV p27 antigen in virus stock and plasma. The statistical analysis of quantitative results indicated linear regression $R^2 = 0.857$, linear correlation $r = 0.926$, $P < 0.01$ in virus stock, while $R^2 = 0.512$, $r = 0.716$, $P < 0.05$ in plasma. The quantitative results turned out to be positive linear regression, which was higher in virus stock and lower in

[基金项目] “十一五”国家科技重大专项课题 (2009ZX10004-402, 2009ZX10004-307)。

[作者简介] 金光, 男, 硕士研究生, 从事实验动物病毒学研究工作。

[通讯作者] 魏强, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

plasma. **Conclusions** HIV-1 p24 ELISA kit can be used for detecting SIV p27 antigen in virus stock and plasma qualitatively replacing SIV p27 ELISA kit, but quantitatively was appropriate in virus stock only.

【Key words】 HIV-1 p24; SIV p27; Detection; ELISA kit

HIV-1 p24 抗原和 SIV p27 抗原分别是 HIV-1 和 SIV 的 gag 基因编码的高度保守的衣壳蛋白,是 HIV-1 和 SIV 的特异性抗原,但两者在血清学上存在一定程度的交叉反应。目前艾滋病研究中通常使用 HIV-1 p24 试剂盒检测 HIV-1 p24 抗原和 SIV p27 试剂盒检测 HIV-2 及 SIV p27 抗原^[1-5]。虽然也有使用 HIV-1 p24 试剂盒检测细胞感染上清中 SIV p27 抗原报道^[6],这样可以缩短实验周期和降低实验成本,但尚无研究表明两种 ELISA 试剂盒检测结果的关系和这种替代使用的可行性。因此本研究从两种衣壳蛋白在血清学上的交叉反应出发,比较两种试剂盒检测 SIV p27 抗原的结果的相关性。

1 材料和方法

1.1 病毒株

SIV_{mac239}、SHIV-1157ipd3N4、SHIV-KB9、RT-SHIV 和 SHIV_{SF}162p3 通过感染中国恒河猴外周血单核淋巴细胞进行体外扩增,收集感染上清后 0.2 μm 滤膜过滤, -80℃ 保存。

1.2 血浆

上述病毒株感染中国恒河猴后,在不同时间采集 EDTA 抗凝血,分离血浆, -80℃ 保存。

1.3 血浆病毒 RNA 载量的测定

TRIzol 法提取 EDTA 抗凝血浆中病毒 RNA,使用 SYBR Green I 实时荧光定量 RT-PCR 方法测定血浆病毒 RNA 载量 检出的最低值为 10³ copies/mL^[7]。

1.4 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒检测 SIV p27 抗原

试剂盒 Vironostika HIV-1 antigen microelisa systemV9 (BioMerieux) 平衡至室温,每孔加入 25 μL 裂解液后加入 100 μL 阴性对照、标准品和样品, 37℃ 孵育 60 min,洗板 6 次,每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的抗体, 37℃ 孵育 60 min,洗板 6 次,加入底物后室温避光孵育 30 min,终止反应后,酶标仪读取吸光度值(检测波长 450 nm,参考波长 630 nm)。根据得到的吸光度值做出标准曲线并计算样品中 SIV p27 抗原的浓度。阴性对照吸光度值 +0.07 作为临界值,当吸光度值大于临界值时判定为阳性,小于临界值时判定为阴性。

1.5 SIV p27 ELISA 试剂盒检测 SIV p27 抗原

试剂盒 SIV p27 antigen ELISA (ZeptoMetrix

Corporation) 平衡至室温,每孔加入 25 μL 裂解液后加入 200 μL 阴性对照、标准品和样品, 37℃ 孵育 2 h 或过夜,洗板 6 次,每孔加入 100 μL 生物素连接的多克隆抗体, 37℃ 孵育 60 min,洗板 6 次,每孔加入 100 μL 辣根过氧化物酶标记的链霉菌抗生物素蛋白, 37℃ 孵育 30 min,洗板 6 次,加入底物后室温避光孵育 30 min,终止反应后,酶标仪读取吸光度值(检测波长 450 nm)。根据得到的吸光度值做出标准曲线并计算样品中 SIV p27 抗原的浓度。阴性对照吸光度值 +0.05 作为临界值,当吸光度值大于临界值时判定为阳性,小于临界值时判定为阴性。

1.6 统计分析

使用 SPSS 17.0 软件进行回归和相关分析^[5]。

2 结果

2.1 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒检测 SIV p27 抗原的灵敏度

HIV-1 p24 试剂盒定性检测 SIV p27 抗原的最低检出浓度为 200 pg/mL,定量检测的最低检出浓度为 150 pg/mL,更低浓度的抗原判定为阴性或不在标准曲线范围内。另外,当 SIV p27 抗原浓度大于等于 20 000 pg/mL 时,酶标仪读取的吸光度值达到最大值(3.700),即 HIV-1 p24 试剂盒检测 SIV p27 抗原的浓度范围是 150 pg/mL 到 20 000 pg/mL。“+”表示定性检测结果为阳性,“-”表示定性检测结果为阴性(表 1)。

2.2 HIV-1 p24 和 SIV p27 两种 ELISA 试剂盒定性检测 SIV p27 抗原

两种试剂盒 3 次定性检测的结果一致,病毒液随着稀释倍数的升高,逐渐变为阴性。RT-SHIV 病毒原液中 SIV p27 抗原浓度最高而 SHIV-KB9 病毒原液中浓度最低,这与几株病毒血浆病毒 RNA 载量的关系相符。上述几株病毒液中 SHIV_{SF}162p3 和 SHIV-KB9 为 B 亚型,SHIV-1157ipd3N4 为 C 亚型,而除 SHIV-KB9 为 CCR5 和 CXCR4 双嗜性外,其他都为 CCR5 嗜性。病毒嗜性的亚型的差异对 SIV p27 抗原的检测无明显影响。“+”表示定性检测结果为阳性,“-”表示定性检测结果为阴性(表 2)。

表 1 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒检测 SIV p27 抗原标准品

Tab. 1 Detection of SIV p27 antigen standard by HIV-1 p24 ELISA kit

SIV p27 抗原标准品 Antigen standard	定性检测 Qualitative detection		定量检测 Quantitative detection
	SIV p27	HIV-1 p24	HIV-1 p24
	2000 pg/mL	+	+
1000 pg/mL	+	+	33.825 ± 0.199 pg/mL
500 pg/mL	+	+	18.393 ± 1.993 pg/mL
250 pg/mL	+	+	8.749 ± 1.808 pg/mL
200 pg/mL	+	+	6.723 ± 0.684 pg/mL
150 pg/mL	+	-	5.546 ± 0.562 pg/mL
125 pg/mL	+	-	不在标准曲线范围内 Out of the range of standard curve
100 pg/mL	+	-	不在标准曲线范围内 Out of the range of standard curve
62.5 pg/mL	+	-	不在标准曲线范围内 Out of the range of standard curve

两种 ELISA 试剂盒三次定性检测不同病毒株感染的血浆中 SIV p27 抗原的结果一致,血浆病毒 RNA 载量在 5.16×10^6 copies/mL 到 1.85×10^8 copies/mL 范围内的样品都为阳性,而血浆病毒 RNA 载量小于 1.19×10^6 copies/mL 的样品都为阴性。“+”表示定性检测结果为阳性,“-”表示定性检测结果为阴性(表 3)。

2.3 HIV-1 p24 和 SIV p27 两种 ELISA 试剂盒定

量检测 SIV p27 抗原

RT-SHIV 病毒液中 SIV p27 抗原浓度较高,其他几株病毒液中浓度较低,两种试剂盒定量检测病毒液中 SIV p27 抗原浓度的高低呈对应关系(图 1),但血浆中 SIV p27 抗原浓度的高低并没有呈现出这种对应关系(图 2)。

使用 SPSS 17.0 对 SIV p27 和 HIV-1 p24 两种试剂盒得出的 SIV p27 抗原检测结果进行回归分析表明,病毒液: $Y = 0.031X + 0.069$, $R^2 = 0.859$, $P < 0.01$; 血浆: $Y = 0.023X$, $R^2 = 0.512$, $P < 0.05$ (X 代表 p27, Y 代表 p24)。相关分析表明,病毒液 $r = 0.926^{**}$, $P < 0.01$, **表示在 0.01 水平(双侧)上显著相关;血浆 $r = 0.716^*$, $P < 0.05$, *表示在 0.05 水平(双侧)上显著相关。即两种试剂盒定量检测病毒液和血浆中 SIV p27 抗原的结果呈直线正相关,病毒液呈直线正相关程度较高,血浆的直线正相关程度较低(图 3)。

3 讨论

虽然 HIV-1 和 HIV-2 的基因同源性只有 55% ~ 60%,但在血清学反应中,Gag 和 Pol 蛋白上仍存在一定程度的交叉反应;同时 SIVmac 和 HIV-2 的基因同源性接近 90%,血清学上也存在一定程度的交

表 2 SIV p27 试剂盒和 HIV-1 p24 试剂盒定性检测病毒液中 SIV p27 抗原

Tab. 2 The results of qualitative detection of SIV p27 antigen in the virus stocks by SIV p27 kit and HIV-1 p24 kit

病毒液 Virus	病毒原液 Virus stock		1:100 稀释病毒液 Virus suspension, 1:100 dilution		1:1000 稀释病毒液 Virus suspension, 1:1000 dilution		血浆病毒 RNA 载量 (copies/mL) Plasma virus load
	p27	p24	p27	p24	p27	p24	
	SIVmac239	+	+	+	+	-	
SHIVSF162p3	+	+	+	+	-	-	4.39×10^7
SHIV-1157ipd3N4	+	+	+	+	-	-	1.59×10^8
SHIV-KB9	+	+	-	-	-	-	2.01×10^7
RT-SHIV	+	+	+	+	+	+	1.64×10^8

表 3 HIV-1 p24 ELISA 试剂盒和 SIV p27 ELISA 试剂盒定性检测血浆中 SIV p27 抗原

Tab. 3 The results of qualitative detection of SIV p27 antigen in the plasma by HIV-1 p24 ELISA kit and SIV p27 ELISA kit

猴号 Monkey number	感染病毒 Virus infection	第一批 1st series		第二批 2nd series		第三批 3rd series		血浆病毒 RNA 载量 (copies/mL) Plasma Virus RNA load
		p27	p24	p27	p24	p27	p24	
		296	SIVmac239	+	+	+	+	
G0805V	SHIVSF162p3	+	+	+	+	+	+	5.70×10^6
G0806V	SHIVSF162p3	+	+	+	+	+	+	7.35×10^6
G0605V	SHIVCHN19p7	+	+	+	+	+	+	5.16×10^6
G0606V	SHIVCHN19p7	+	+	+	+	+	+	5.42×10^6
G1004V	SHIV-1157ipd3N4	+	+	+	+	+	+	5.39×10^6
7-1	SHIV-1157ipd3N4	-	-	-	-	-	-	1.00×10^3
A425	SHIV-KB9	-	-	-	-	-	-	8.25×10^3
G1102V	RT-SHIV	-	-	-	-	-	-	1.19×10^6

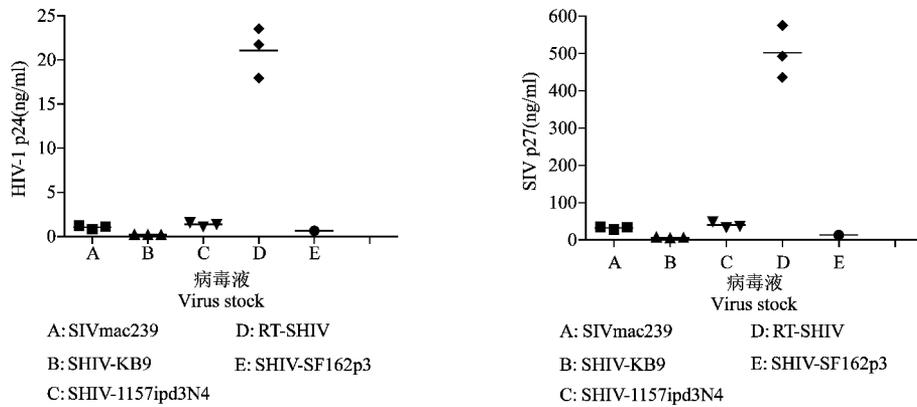


图 1 HIV-1 p24 和 SIV p27 两种试剂盒定量检测病毒液中的 SIV p27 抗原

Fig. 1 Quantitative detection of SIV p27 antigen in the virus stock by SIV p27 kit and HIV-1 p24 kit

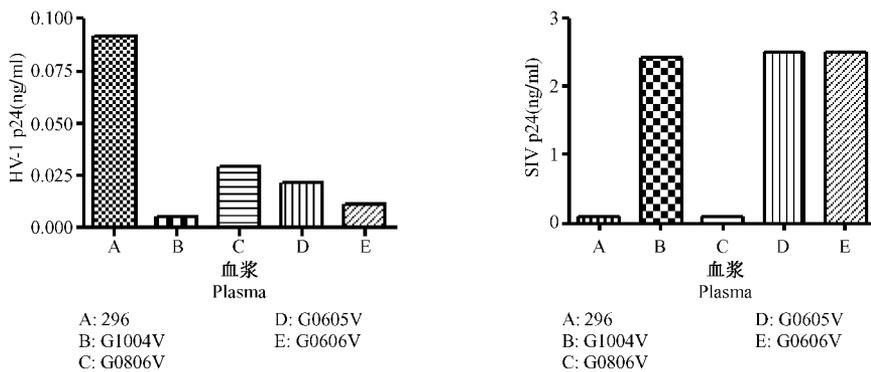


图 2 HIV-1 p24 和 SIV p27 两种试剂盒定量检测血浆中的 SIV p27 抗原

Fig. 2 Quantitative detection of SIV p27 antigen in the plasma by SIV p27 kit and HIV-1 p24 kit

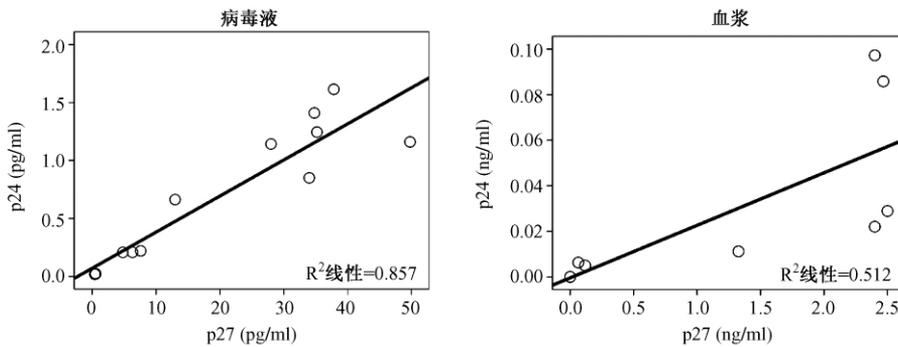


图 3 HIV-1 p24 和 SIV p27 两种试剂盒定量检测病毒液和血浆中 SIV p27 抗原结果的相关性

Fig. 3 Correlation between the results of quantitative detection of SIV p27 antigen in the virus stock and plasma by SIV p27 kit and HIV-1 p24 kit

叉反应。实际上, HIV-1 很可能就是由其他灵长类传播到人类的^[8,9]。由此可以推断 HIV-1 和 SIV 的 gag 区编码的衣壳蛋白之间在血清学上可能存在一定程度的交叉反应。本研究结果表明确实存在这种交叉反应, HIV-1 p24 试剂盒能够检测 SIV p27 抗原, 虽然特异性上不如 SIV p27 试剂盒且灵敏度也略低, 检出的抗原浓度值有一定程度下降, 但这种

下降有着良好的相关性, 并未改变样品性质, 而这种替代却可以缩短实验周期和降低实验成本。

本研究使用 HIV-1 p24 试剂盒检测不同浓度的 SIV p27 抗原标准品以确定其检测范围和灵敏度。定性检测时, 当 SIV p27 抗原标准品浓度小于 200 pg/mL 时, 不能判定为阳性结果; 定量检测时, 当 SIV p27 抗原标准品浓度小于 150 pg/mL 时, 不能检

出。另外,当 SIV p27 抗原标准品浓度大于等于 20 000 pg/mL 时,读取的吸光度值达到最大值。即 HIV-1 p24 试剂盒检测 SIV p27 抗原的浓度范围是 150 pg/mL 到 20 000 pg/mL。此外,本研究使用 HIV-1 p24 试剂盒检测有限的几个血浆样品得出的 SIV p27 抗原浓度范围为 0.006 到 0.029 ng/mL,而使用 SIV p27 试剂盒得出的范围为 0.06 到 2.5 ng/mL。而有报道说从 SIVmac 感染的血浆中检出的 SIV p27 抗原浓度范围为 0.5 到 7 ng/mL。

两种试剂盒对病毒液和血浆的定性检测结果完全一致;而对病毒液和血浆的定量检测结果进行直线回归和直线相关分析表明,病毒液直线正相关程度较高而血浆直线正相关程度较低。很显然血浆中存在一定的干扰因素影响了特异性抗原与抗体的结合,但这种影响并不大,不足以影响样品性质的判定,但确实降低了抗原定量检测结果的相关性。与病毒液相比,血浆中含有多种蛋白成份,容易导致非特异性的背景而影响定量检测结果。另外,由于血浆样品取自不同的中国恒河猴,个体间的差异和不同采样时间点的动物状态差异也会产生一定的影响。本研究选择了几种在艾滋病研究中广泛使用的毒株及其感染血浆进行检测,虽然几种毒株的亚型和嗜性不同,但这些毒株都是在 SIVmac239 克隆株的基础上直接或间接构建得到的,构建过程中大多数只是对 env 基因进行替换而没有改变 gag 和 pol 保守区,因此这几株病毒表达相似的 SIV p27 核心抗原,这使得我们的实验结果具有可比性,也可能是病毒液的定量检测结果具有较高相关性的原因,反之也表明毒株的亚型和嗜性的差异不会影响定量检测的结果。

值得一提的是,病毒 RNA 载量的高低与 HIV-1 p24 或 SIV p27 抗原的检出也有一定相关性。有研究表明当病毒 RNA 载量在 10^5 copies/mL 以上时, HIV-1 p24 试剂盒才能检出 293T 转染细胞上清中 SIV p27 抗原,且 SIV p27 抗原浓度与病毒 RNA 载量相关性很好 ($R^2 = 0.834$, $P < 0.001$)^[6]。也有研究表明 SIVagm 感染的非洲绿猴的血浆病毒 RNA 载量在 10^7 到 10^8 copies/mL 时能够检出约 5 ng/mL 的 SIV p27 抗原,血浆病毒 RNA 载量在 10^5 copies/mL 以下时不能检出 SIV p27 抗原。还有结果表明, SIVagm 感染的非洲绿猴血浆病毒 RNA 载量在大于

2×10^5 copies/mL 时才能检出 SIV p27 抗原。我们使用两种试剂盒都只能检出血浆病毒 RNA 载量在 10^6 copies/mL 以上的样品中的 SIV p27 抗原,而这样高的病毒 RNA 载量只会在感染的急性感染期内一过性出现。由于每个 HIV-1 或 SIV 病毒颗粒都含有主要由 p24 或 p27 抗原组成的衣壳及壳内包装的两个 RNA 单链,这种结构是血浆病毒 RNA 载量与特异性抗原之间的相关性的基础。因此,可以进一步研究两种试剂盒的检测方法与病毒 RNA 载量之间的相关性。

参考文献:

- [1] Imamichi T, Murphy MA, Adelsberger JW, et al. Actinomycin D induces high-level resistance to thymidine analogs in replication of human immunodeficiency virus type 1 by interfering with host cell thymidine kinase expression [J]. J Virol, 2003, 77:1011 - 1020.
- [2] Nakayama EE, Miyoshi H, Nagai Y, et al. A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5alpha determines species-specific restriction of simian immunodeficiency virus SIVmac infection [J]. J Virol, 2005, 79:8870 - 8877.
- [3] Wei Q, Stallworth JW, Vance PJ, et al. Simian immunodeficiency virus (SIV)/immunoglobulin G immune complexes in SIV-infected macaques block detection of CD16 but not cytolytic activity of natural killer cells [J]. Clin Vaccine Immunol, 2006, 13:768 - 778.
- [4] Workman S, Wells SK, Pau CP, et al. Rapid detection of HIV-1 p24 antigen using magnetic immuno-chromatography (MICT) [J]. J Virol Methods, 2009, 160:14 - 21.
- [5] Suthent R, Gaudart N, Chokpaibulkit K, et al. p24 Antigen detection assay modified with a booster step for diagnosis and monitoring of human immunodeficiency virus type 1 infection [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41:1016 - 1022.
- [6] 刘强,杨贵波,邵一鸣,等. 运用实时荧光定量 RT-PCR 和 ELISA 方法定量检测 SHIV 的对比分析 [J]. 中国艾滋病性病, 2006, 12(4):300 - 310.
- [7] 丛喆,李兆忠,魏强,等. SYBR Green 1 实时荧光定量 RT-PCR 测定猴免疫缺陷病毒 (SIV) RNA 拷贝数方法的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4):271 - 275.
- [8] 张兴权,范江,主编. 艾滋病病毒感染与艾滋病 [M]. 北京: 人发卫生出版社. 1999: 68 - 85.
- [9] Jay A. Levy, 著; 邵一鸣, 译. 艾滋病病毒与艾滋病的发病机制 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 3 - 6.

(修回日期)2010-09-29