



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00130292.2

[45] 授权公告日 2004 年 1 月 28 日

[11] 授权公告号 CN 1136450C

[22] 申请日 2000.11.3 [21] 申请号 00130292.2

[71] 专利权人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明区思明南路
422 号

[72] 发明人 夏宁邵 罗文新 张 军 谢小燕
李少伟

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 唐伟杰

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 6 页

[54] 发明名称 具有荧光共振能量转移特征的成对
蛋白及其用途

[57] 摘要

本发明涉及具有荧光共振能量转移 (FRET) 特征的由蛋白 A 和蛋白 B 组成的成对蛋白, 蛋白 A 是作为能量供体且带有荧光物质或化学发光物质的抗原, 蛋白 B 是作为能量受体且带有荧光物质的抗原, 而且蛋白 A 和蛋白 B 具有能与同一抗体分子特异结合的共同抗原决定簇, 由蛋白 A、B 和适当的缓冲液组成的均相免疫检测药盒, 及它们用于检测标本中抗体存在的用途, 尤其在艾滋病毒抗体、乙型肝炎病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体的检测方面的用途。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、具有荧光共振能量转移特征的由蛋白A和蛋白B组成的成对蛋白，其中蛋白A是作为能量供体且带有荧光物质或化学发光物质的抗原，蛋白B是作为能量受体且带有荧光物质的抗原，而且蛋白A和蛋白B分别与同一抗体分子的两臂特异性结合，并具有共同抗原决定簇。

2、根据权利要求1的成对蛋白，其中蛋白A选自病毒、细菌、真菌、支原体、衣原体或肿瘤相关抗原。

3、根据权利要求1的成对蛋白，其中蛋白B选自病毒、细菌、真菌、支原体、衣原体或肿瘤相关抗原。

4、根据权利要求1-3任一要求的成对蛋白，其中荧光物质选自荧光蛋白、荧光素、稀土元素或淬灭物质。

5、根据权利要求1-3任一要求的成对蛋白，其中化学发光物质选自发光蛋白和选自鲁米诺或过氧草酸盐的化学合成发光物质。

6、根据权利要求4的成对蛋白，其中荧光蛋白选自绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白或红色荧光蛋白。

7、根据权利要求5的成对蛋白，其中发光蛋白选自水母发光蛋白及它的各种变异型。

8、一种用于检测标本中抗体存在的方法，该方法包括：(a) 权利要求1-7任一要求的成对蛋白与待测标本中的抗体相互接触，形成抗原-抗体复合物；(b) 检测该抗原抗体复合物的存在，该抗原抗体复合物的存在指示该标本中与该成对蛋白共同抗原特异结合的抗体的存在。

9、权利要求8的方法，其中待测抗体为艾滋病毒抗体、乙型肝炎病毒抗体或丙型肝炎病毒抗体。

10、一种检测盒，其包括(1) 权利要求1-7任一要求的成对蛋白，(2) 缓冲液，及(3) 供选择使用的离子溶液和/或表面活性剂。

具有荧光共振能量转移特征的成对蛋白及其用途

本发明涉及具有荧光共振能量转移 (FRET) 特征的由蛋白 A 和蛋白 B 组成的成对蛋白, 蛋白 A 是作为能量供体且带有荧光物质或化学发光物质的抗原, 蛋白 B 是作为能量受体且带有荧光物质的抗原, 而且蛋白 A 和蛋白 B 具有能与同一抗体分子特异结合的共同抗原决定簇, 由蛋白 A、B 和适当的缓冲液组成的均相免疫检测药盒, 及它们用于检测标本中抗体存在的用途, 尤其在艾滋病毒抗体、乙型肝炎病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体的检测方面的用途。

免疫测定利用抗原抗体反应检测标本中的微量物质, 基于抗原抗体反应的特异性和敏感性, 免疫测定的应用范围遍及医学检验的各个领域, 由于它在医学检验中的地位日益重要, 近年来新方法、新技术不断出现, 从总体上说, 其进展主要在自动化和简便化两个方面。目前基因工程、细胞工程和酶工程技术开发的重组抗原、单克隆抗体及酶技术已逐步取代原有免疫诊断试剂, 为各种疾病的诊断增加了新型的有效试剂盒。在现有的免疫检测方法中, 固相免疫法以放射免疫检测法 (RIA) 和酶免疫检测法 (EIA) 的应用最为广泛, 通常包括包被 (抗原或抗体)、封闭、多次孵育和洗涤以及检测等过程, 最快的也需 2 小时以上。而液相法的免疫反应和信号测定在溶液中一步完成, 没有固相的参与, 因此反应速度比固相法快得多, 操作程序也简单得多, 其中均相荧光免疫测定 (Homogeneous Fluoroimmunoassay, hFIA) 应用最为广泛, 但目前多只限于小分子药物的测定, 这主要是由于自然标本通常存在较广泛、复杂的荧光背景以及化学标记技术的不成熟导致的。Ulman 等人首先提出基于荧光共振能量传递 (FRET) 的 hFIA, 即均相荧光共振免疫测定 (Homogeneous Fluorescence resonance immunoassay, hFRIA), 实现了抗原-抗体反应的均相测定。

光谱重叠的两个荧光分子之间存在着一种荧光共振能量转移

(FRET)过程,即一个受激发的荧光物质(能量供体, energy donor)将其激发态能量转移给一个光吸收分子(能量受体, energy acceptor)的过程。如果受体的激发波长与前者的发射波长重叠,那么用供体的激发光激发,检测到的就会是受体的发射光,同时供体自身的发射光强度就会大大减弱。这一过程与它们之间的距离密切相关,只有当距离足够近时才能发生。

目前均相荧光共振免疫测定已应用于检测血清中的抗原。Ueda等[Ueda H, Kubota K, Wang Y, et al. *Biotechniques*, 27(4): 738-742 (1999)]用琥珀酰亚胺脂和荧光黄-X分别标记抗体的重链和轻链,两者在比色杯中混合后再加入抗原,抗原抗体的特异结合,使琥珀酰亚胺脂与荧光黄-X靠近,用490nm波长激发琥珀酰亚胺脂,检测到520nm发射光减弱,605nm的发射光增强,随着抗原量的增加,605nm的荧光亦增强。Stenroos等[Stenroos K, Hurskainen P, Eriksson S, et al. *Cytokine*, 10(7): 495-499 (1998)]用铈的螯合物标记重组人白介素2(IL-2)、用Cy5标记单克隆抗体,进行时间分辨荧光免疫测定。Blomberg等分别用铽和罗丹明标记抗体,检测血清中人绒毛膜促性腺素的 β CG,结果能量转移信号与样品中的 β hCG浓度成正比。

现有的均相荧光共振免疫测定都必须用有机合成荧光染料或稀土元素对检测试剂进行标记,将作为能量供受体对的两种荧光物质分别偶联在抗体的不同部位上或不同的抗体分子上,更多的是将它们分别偶联在抗原和抗体上,在溶液中,通过抗原抗体的特异性结合而拉近两个荧光分子之间的距离,从而发生FRET现象。这些方法虽然满足了快速检测的需要,但都要求获得高纯度的抗体和抗原,使检测前期工作繁杂,由于无法达到百分之百的纯度,荧光标记时难免产生非特异标记,在检测中极易出现假阳性,而针对每种免疫反应都提取到抗体是极其困难的。而且到目前为止的诊断试剂对抗原的纯度要求都很高,因而对生产工艺的要求也相应很高。这些不足给它们的实际推广应用带来了许多局限。为改变以上不足,本发明建立了一类新型的均相荧光共振免疫测定试剂及方法,以使生产工艺简单,抗体检测中假阳性

的出现减少，检测能够快速、准确地进行。这一新型的均相荧光共振免疫测定方法利用了荧光蛋白及发光蛋白的光学特性。

目前报道的荧光蛋白主要有绿色荧光蛋白 (GFP)、黄色荧光蛋白 (YFP)、蓝色荧光蛋白 (BFP)、紫外激发绿色荧光蛋白 (GFPuv) 等，它们都衍生自来源于水母的绿色荧光蛋白。绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 是一个非常稳定的蛋白质，全长 238 肽，分子量约为 27kDa，第 65-67 位的三个氨基酸能够形成一种独特的丝氨酸-脱氢酪氨酸-甘氨酸 (Ser65-dehydroTyr66-Gly67) 环化结构，这一结构使得 GFP 具有较强的荧光性。GFP 荧光结构的形成是一个自催化的过程，仅由其一级结构决定，而无需特殊的酶或辅助因子参与，因此可以进行多种异源表达。GFP 的 N 端和 C 端都可以与其他蛋白进行嵌合表达而保留其荧光活性，与 GFP 融合表达对许多蛋白的活性基本上也没有影响。GFP 的荧光很稳定，不易被光漂白。这些优点使得 GFP 成为监测活细胞内基因表达、蛋白定位、细胞分化发育的良好标记。Heim 等通过突变筛选出了几株荧光强度更强的和/或荧光光谱改变的 GFP 变异型，这些变异型与野生型 GFP 只有几个氨基酸的差别。在其它物种中也分离并克隆表达出了一些荧光蛋白，如来自珊瑚虫的红色荧光蛋白 DrFP583 (DsRed) [Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, et al, Nat Biotechnol, 17(12):969-973(1999)]。1996 年 Mitro 等成功地观察到两个 GFP 变异型 BFP5 和 RSGFP4 之间的 FRET 现象 [Mitra RD, Silva CM, Youvan DC, Gene 173: 13-17 (1996)]。BFP 和 GFP 之间的 FRET 已被应用于检测细胞编程死亡、线粒体中 Bcl-2 和 Bax 之间的相互作用等研究中 [Mahajan NP, Linder K, Berry G, et al, Nat Biotechnol, 16(6): 547-552 (1998)]。

GFP 的各种变异型可组成多组能量供受体对：S65G/V68L/S72A/T203Y 变异型 (激发峰 513nm，发射峰 527nm 的黄色荧光蛋白，YFP) 和 F64L/S65T 变异型 (激发峰 488nm，发射峰 507nm，EGFP)；Y66H 变异型 (激发峰 382nm，发射峰 448nm 的蓝色荧光蛋白，BFP) 和 EGFP，T203I/S72A/Y145F 变异型 (激发峰 395nm，发射峰 509nm，GFPuv) 和

S65G/S72A/K79R/T203Y 变异型（激发峰 513nm，发射峰 527nm，EYFP）等 [Heim R, Prasher DC and Tsien RY, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91: 12501-12504 (1994), Heim R, Cubitt AB, Tsien RY, Nature, 373: 663-664 (1995)]。将它们分别与一种抗原嵌合表达，其产物既有免疫原性又具备荧光特性，在体系中是特异存在的，经过初步纯化就不会出现干扰检测、造成假阳性的因素，可以应用为检测试剂。

在维多利亚水母体内自然存在着一种 FRET 现象，即水母发光蛋白（apoaequorin）和绿色荧光蛋白（wtGFP）之间的能量转移。水母发光蛋白是一种生物发光蛋白，当 Ca^{2+} 达到足够的浓度并与之发生结合后，它将发生氧化反应并发射蓝光，其最大发射波长是 466nm，与 wtGFP 的最大发射波长 470nm 临近，在水母体内，由于两种蛋白之间距离极小，必然发生能量的转移，最后以 wtGFP 发射绿色荧光（最大发射波长 504nm）的形式体现出来。目前这两种蛋白都得到了分离并在多种异源生物种活性表达，在 GFP 被改造利用的同时，发光蛋白也出现了多种变异型，包括生物活性提高的类型 [Casadei J, Powell MJ, Kanten JH, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87: 2047-2051 (1990), Zenno S, Inouye S, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171: 169-174 (1990), Nomura M, Inouye S, Ohmiya Y, et al. FEBS Lett., 295: 63-66 (1991), Shimomura O, Inouye S, Musicki B, et al. Biochem., J. 270: 309-312 (1990), Kurose K, Inouye S, Sakaki Y, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86: 80-84 (1989)]，将二者分别与一种抗原嵌合表达，加入 Ca^{2+} 作为诱发剂，其产物既有免疫原性又具备荧光特性，在体系中是特异存在的，经过初步纯化就不会出现干扰检测、造成假阳性的因素，而且还需要加入诱导剂才能检测 FRET，使检测反应更加精确，也能构成一套灵敏的检测试剂。

蛋白质、酶、核酸、糖等生物大分子，可通过双功能交联剂，在生物大分子之间或与药物、半抗原等生物小分子进行共价连接，可以制备酶标抗体、人工抗体、酶标抗原、抗体导向药物、免疫毒素、核酸探针、固定化酶、生物亲和色谱材料、修饰性酶分子等。各种同型

和异型双功能交联剂都已陆续开发出来。化学合成的荧光物质经交联剂修饰后可标记在纯化抗原的氨基、羧基或巯基上；以双功能基团螯合剂与稀土离子 Eu^{3+} 等形成螯合物，可与纯化抗原结合得到荧光抗原 [Evangelista RA, et al, Clin. Biochem, 21: 173 (1988), Diamandis EP, Clin. Biochem., 21: 139 (1988), Diamandis EP, et al, J. Immunol. Methods, 112: 43 (1988), Diamandis EP, et al, Anal. Chem., 61: 48 (1989)]。标记蛋白配合融合表达荧光蛋白的蛋白构成能量供受体对。虽然这一步操作较为复杂、存在非特异性，但荧光蛋白/发光蛋白融合蛋白的存在将使非特异性大大降低，试剂生产工艺简单化，并仍保持抗原、抗体的特异反应和 FRET 距离依赖性，检测结果灵敏而特异。

本发明的目的是寻找并提供具有 FRET 特征的检测试剂。

本发明人经研究发现具有荧光共振能量转移该检测 (FRET) 特征的由蛋白 A 和蛋白 B 组成的成对蛋白，其可用于检测标本中抗体的存在，且该检测具有简单、快速，特异性高的特点，因此，该成对蛋白可用于疾病的检测中。

本发明第一方面涉及具有荧光共振能量转移特征的由蛋白 A 和蛋白 B 组成的成对蛋白，其中，蛋白 A 是作为能量供体且带有荧光物质或化学发光物质的抗原，蛋白 B 是作为能量受体且带有荧光物质的抗原，而且蛋白 A 和蛋白 B 具有能与同一抗体分子特异结合的共同抗原决定簇。

本发明第一方面涉及由蛋白 A 和蛋白 B 组成的成对蛋白作为检测试剂的用途。

本发明还涉及用于疾病检测的试剂盒，其包括 (1) 由蛋白 A 和蛋白 B 组成的成对蛋白，(2) 缓冲液，及 (3) 供选择使用的离子溶液和/或表面活性剂。

本发明另一方面涉及用于检测标本中抗体存在的方法，该方法包括：
(a) 将本发明所提供的任一成对蛋白与待测标本中抗体相互接触，形成抗原抗体复合物；
(b) 检测该抗原抗体复合物的存在，该抗原抗体复合物的存在指示该标本中与该成对蛋白共同抗原特异结合的抗体的存在。

根据本发明，本发明的成对蛋白中的蛋白 A 可选自病毒、细菌、真菌、支原体、衣原体、肿瘤相关抗原或其它具有抗原决定簇的物质。

根据本发明，本发明的成对蛋白中的蛋白 B 可选自病毒、细菌、真菌、支原体、衣原体、肿瘤相关抗原或其它具有抗原决定簇的物质。

根据本发明，本发明的荧光物质可选自荧光蛋白、荧光素、稀土元素、淬灭物质等。

根据本发明，本发明的化学发光物质可选自发光蛋白或鲁米诺、过氧草酸盐等化学合成发光物质。

根据本发明，本发明的荧光蛋白可选自绿色荧光蛋白、黄色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白、红色荧光蛋白及其它荧光蛋白。

根据本发明，本发明的发光蛋白可选自水母发光蛋白及它的各种变异型。

根据本发明，本发明的成对蛋白中融合荧光蛋白或发光蛋白与抗原决定簇片段的融合蛋白既保留了与原抗体分子特异结合的抗原决定簇，又具有荧光蛋白或发光蛋白的光学特性，纯化要求简单，成对蛋白与特异抗体反应后将导致荧光光谱的明显变化，易检测发现。加入特殊的均相荧光免疫反应添加剂的缓冲液还有助于扩大光谱变化的程度，因此可以作为检测试剂，用于检测标本中的特异抗体，如艾滋病病毒抗体、乙型肝炎病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体。

以基因工程的各种方法可以将荧光蛋白或发光蛋白基因与编码某种抗原的基因嵌合在一起，置于合适的载体中进行表达。该抗原可以是病毒、细菌、真菌、支原体、衣原体、肿瘤相关抗原或其它有抗原决定簇的物质。在基因工程中，利用大肠杆菌生产外源蛋白的技术已十分成熟，嵌合蛋白可以通过调整表达条件，以可溶性蛋白形式出现，而且是表达体系中唯一既有免疫原性、又能发射荧光或进行化学发光的抗原蛋白，略加纯化就可用作检测试剂。在均匀液相体系中，光学特性恰好构成一对能量供受体对的成对蛋白其相同的抗原决定簇分别结合特异抗体的两臂，利用抗体本身的独特构相，使它们之间的距离拉近，达到发生 FRET 的距离要求以内，即 1-10nm 内，发生荧光共振

能量转移，出现荧光光谱的明显变化，这种明显的变化在 20 分钟内就可以发生，通过相应的荧光检测仪器如荧光全谱仪或肉眼进行判定，证实待测样品中特异抗体的存在，以此为检测指标对疾病作出诊断。由于成对蛋白存在的特异性，只有存在特异抗体的体系中才能出现 FRET，在非阳性的样品溶液中，成对蛋白游离在溶液中，它们之间的距离不足以发生 FRET。本发明的这一对蛋白中至少有一个涉及融合表达的荧光蛋白或发光蛋白，避免了使用化学方法进行标记操作的繁杂和以往免疫检测中难以避免的假阳性，因此保证了检测试剂生产的简易性和应用的简单、快速和准确性。

本发明采用的均相荧光免疫反应添加剂基于抗体本身具有极性，在溶液中加入离子或表面活性剂后轻微改变溶液的极性，相应改变抗体的构相，使抗体两臂之间的距离更加接近，结合在抗体两臂上的荧光抗原之间的距离也更近，从而提高能量传递效率和检测的灵敏度。

本发明根据检测对象—血清的自身荧光特性，选择最大发射波长在 500nm 以上的荧光蛋白来构建成对蛋白。例如，为验证血清中的绿色荧光蛋白 GFPuv 的抗体的存在，将绿色荧光蛋白 GFPuv 和黄色荧光蛋白 EYFP 分别定作蛋白 A 和蛋白 B，它们之间 95.8% 的同源性确保了它们相似的免疫原性，而前者的最大发射波长（509nm）与后者的最大激发波长（513nm）十分接近，可以作为一对能量供受体对，它们与血清中的特异抗体反应后，形成免疫复合物，其中 GFPuv-antiGFPuv-EYFP 的形式将会发生 FRET，以 GFPuv 的激发光（395nm）激发，20 分钟内，其最大发射波长 509nm 处的荧光强度将比加入血清前的大大降低而 EYFP 最大发射波长 527nm 处的荧光强度将增强。

根据本发明的一个具体实施方案，为检测血清中是否存在 HIV 病毒抗体，选择重组 HIV-1 包膜蛋白 ENV2 与荧光蛋白 GFPuv、EYFP 的嵌合蛋白 ENV2-GFPuv、ENV2-EYFP 分别作为蛋白 A 和蛋白 B，由它们构成检测试剂，当加入存在 HIV-1 病毒抗体的待测血清时，20 分钟内将检测到 FRET 现象，即以 GFPuv 的最大激发光 395nm 激发，GFPuv 的 509nm 处最大发射光强度较加入血清前降低而 EYFP527nm 处的最大发射光强

度较加入血清前升高。而加入 HIV-1 抗体阴性血清观察不到这种变化。上述蛋白 A 和蛋白 B 构成的成对蛋白因此可以应用在艾滋病检测中。

根据本发明的另一个优选实施方案，本发明还构建另一套 HIV-1 抗体检测试剂，其以嵌合蛋白 ENV2-GFPuv 作为蛋白 A，标记荧光素 BODIPY507/545 的蛋白作为蛋白 B，它们都有共同的抗原决定簇——重组 HIV-1 包膜蛋白 ENV2，GFPuv 的最大发射波长（509nm）与 BODIPY507/545 的最大激发波长（507nm）十分接近，是一对能量供受体对，当加入存在 HIV-1 病毒抗体的血清时，20 分钟内将检测到 FRET 现象，出现极其显著的光谱变化，即以 GFPuv 的最大激发光 395nm 激发，液相系统最大发射波长由加入血清前的 507nm 左右移至 530nm 左右，而加入 HIV-1 抗体阴性血清的体系最大发射波长几乎不移动。这一系统在艾滋病检测中具有更高的灵敏度和准确性。

本发明中应用的成对蛋白都是基因工程产物，利用大肠杆菌构建和表达质粒 pGFPuv、pEYFP、pRSETB-env2、pRSETB-env2-gfpuv、pRSETB-env2-eyfp，分别得到蛋白 GFPuv、EYFP、ENV2、ENV2-GFPuv、ENV2-EYFP。以基因工程中常用的或熟知的纯化技术纯化表达产物，ENV2 通过巯基反应标记上 BODIPY507/545，就可以分别配对，组成成对蛋白中的蛋白 A 和蛋白 B。

本发明提供的药盒选择极性缓冲液（10%牛血清，0.5%酪蛋白，2%BSA，1%TritonX-100，1ppm 氨基吡啉），可以轻微改变抗体的构象和有机荧光物质的量子产率，有利于蛋白 A、B 和特异抗体反应、形成免疫复合物后 FRET 的检测。根据本发明，优选以缓冲液稀释等摩尔蛋白 A 和蛋白 B，即可作为试剂盒检测样品中特异抗体的存在。

免疫检测的对象一般都是血清，对多份血清进行荧光全谱扫描发现以紫外光激发常常会出现最大发射波长在 450nm 左右的发射峰并有很长的尾峰。在本发明中为避免血清中的背景的干扰，选择检测试剂的最大发射光谱都在 500nm 以上。在现有的 GFP 各种突变型以及化学合成的荧光试剂中，选择了 GFPuv 和 EYFP，GFPuv 和 BODIPY507/545 作为能量供受体对。

GFPuv 的发射光波长 (509nm) 与 EYFP 的激发光波长 (513nm) 几乎相重叠, 二者在足够近的距离内 (10nm) 可以发生荧光共振能量传递 (FRET), 即以 GFPuv 的激发光 (395nm) 激发, GFPuv 获得的能量以无辐射的方式传递给近距离的 EYFP, 作为后者的激发能量, 最后这一能量以 527nm 的光辐射形式发射, 表现为黄色荧光。GFPuv 与 EYFP 之间有 95.8% 的同源性, 以 GFPuv 为免疫原免疫动物获得的抗血清对 EYFP 也有良好的免疫反应。阳性抗血清中抗体的两臂能将这两种荧光蛋白拉近, 发生 FRET。检测荧光光谱的变化情况可以反映免疫反应的强弱。将同一种抗原分别与这两种荧光蛋白嵌合表达, 利用抗体两臂将两种荧光抗原拉近的作用, 使它们之间发生 FRET 现象。检测这时液相中荧光光谱的变化可以测定抗原抗体间是否发生了结合。

Molecular probe 公司的荧光物质 BODIPY 507/545 能与蛋白质中的巯基发生反应, 共价结合标记于蛋白质上, 使后者获得最大激发波长 507nm 和最大发射波长 530nm 的荧光性质并保留大部分生物活性。以 BODIPY 507/545 标记纯化抗原。这一荧光抗原与 GFPuv 嵌合表达的同种抗原构成一对能量供受体对, 共同结合于同一抗体的两臂上后, 以 GFPuv 的激发光 (395nm) 激发, GFPuv 获得的能量以无辐射的方式传递给近距离的 BODIPY 507/545, 则可发生 FRET, 检测到 530nm 的光强的增加。以 FRET 的发生与否可以作为特异抗体存在与否乃至疾病是否发生的标准。

以基因工程表达荧光蛋白/发光蛋白融合抗原的技术已十分成熟, 它们一般以上清的形式出现, 纯化便利, 活性高, 易生产, 检测时利用抗体本身的特殊构象将它们拉近而发生 FRET, 反应快速而准确, 适合大规模检测的需要, 是一种很有应用前景的检测方法。

pGFPuv、pEYFP 分别是两种荧光蛋白 GFPuv 和 YFP 的表达载体, 将这两种质粒分别转化 *E. coli* 表达菌株 BL21, 低温诱导表达以保证荧光蛋白的正确折叠和荧光活性。表达上清为可溶性成分, 荧光明显。由于 GFPuv、EYFP、EGFP、EBFP 四者有高于 95% 的同源性, 取经分子排阻高效液相层析纯化的 GFPuv 免疫小鼠, 可获得对这些荧光蛋白都

有很强的免疫反应的抗体。

例如，将 GFPvu 和 EYFP 等摩尔混合，稀释后加入免疫小鼠的血清，检测前后的荧光变化，可以验证被免疫的小鼠是否产生了抗体及抗体产生的强弱。当两种荧光蛋白与荧光蛋白抗体的比例恰好是 1: 1: 2 时，应该有 50% 的抗原、抗体复合物以 GFPuv-antiGFPuv-EYFP 的形式存在，抗体的两臂将 GFPuv 和 EYFP 的距离拉近，产生 FRET。以 395nm 光对整个液相系统进行激发，荧光光谱的变化在 20 分钟内达到稳定。可以看到，加入 GFPvu 抗体阳性血清的系统里，GFPuv 的发射光峰值明显下降，而阴性血清中没有特异的抗体将两种荧光蛋白拉近，不发生 FRET。由于加入血清造成荧光背景的变化一般都在 500nm 之前，可以忽略。

艾滋病（AIDS，获得性免疫缺陷综合症）对人类的威胁正在激增，检测试剂的研制也显得及其重要。EIA 是目前最普及的 HIV 检测手段，主要是基于 HIV env 基因编码的镶嵌于包膜的糖蛋白 gp120、gp41 和 gag 基因编码的衣壳蛋白 p24 的免疫原性来研制的。根据本发明，本发明可以荧光共振能量传递均相检测法来检测艾滋病。

具体讲，以分子克隆的方式构建出能够融合表达荧光蛋白和抗原蛋白的融合蛋白表达质粒。质粒 pRSETB-env2 能在大肠杆菌中表达出具有较强抗原活性的重组艾滋病毒包膜蛋白，从含有 gfpuv 基因的质粒 pGFPuv(购自 Clonetech 公司)中以限制性内切酶切出 750bp 的 gfpuv 基因片段，连入 env2 基因 3' 端，获得重组质粒 pRSETB-env2-gfpuv(2U)。同样，连接来自于质粒 pEYFP 的 750bp eyfp 基因于 env2 基因的 3' 端，获得重组质粒 pRSETB-env2-eyfp(2Y)。

构建的质粒 2U、2Y 转化大肠杆菌表达菌株 BL21，低温诱导表达 2U、2Y 以保证融合表达的荧光蛋白和 ENV2 构相和功能的正确，取超声裂解的菌体上清用于检测。荧光检测及免疫检测发现，融合蛋白保存了荧光蛋白和重组艾滋病毒包膜蛋白的生物学和化学活性，但略低于单独表达的这两种蛋白质。

将 2Y 和 2U 等摩尔混合，稀释后加入血清，检测前后的荧光变化。

当两种荧光抗原 2U、2Y 与包膜蛋白抗体的比例恰好为 1: 1: 2 时, 理论上将有 50%的抗原、抗体结合形式为 2U-Ig-2Y, 其余 50%是等比例的 2U-Ig-2U 和 2Y-Ig-2Y, 也就是将有 50%的抗原、抗体复合物会发生 FRET。以 GFPuv 的激发光对整个液相系统进行激发, 荧光光谱的变化在 20min 内达到稳定。加入 HIV-1 抗体阳性血清的体系中, GFPuv 的发射光峰值明显下降, 这是其吸收的激发光能量传递给 EYFP 所引起的。加入 HIV-1 阴性血清的体系测不到 GFPuv 发射光峰值的明显下降, 也即没有特异的抗体将两种荧光抗体拉近, 不发生 FRET。以稀释液取代血清加入到检测体系中, 观察由于加入血清造成的整个反应体积的变大、蛋白浓度降低, 从而降低荧光强度的影响。但实验发现这一影响很小, 低于 1%, 可以忽略。

另外对纯化的 HIV-1 重组包膜蛋白 ENV2 进行了化学荧光标记。Molecular probe 公司生产的荧光探针可对蛋白质、多肽、核酸等进行标记, 形成稳定的共价键。BODIPY 507/545 是该公司生产的巯基反应荧光探针, 以 DMSO 溶解成 10mmol/l 的储备液。已纯化的 HIV-1 重组包膜蛋白 ENV2, 标记前先对 PB (pH=7.3) 透析, 并以 PEG10000 浓缩成 2mg/ml 存于 PB 中的溶液, 在室温、避光、不停震荡的条件下以 1: 100 (V/V) 的比例缓慢加入 BODIPY507/545 储备液 (现配现用), 隔绝氧气, 维持室温、避光、震荡反应 3 小时, 最后对 PB (pH=7.3) 透析终止反应, 获得 ENV2-BODIPY507/545 (2D)。检测得知其荧光光谱不变, 荧光强度及抗原活性略有下降, 可作为 FRET 检测试剂。

根据本发明, 在合适的反应缓冲液中按相等的抗原活性加入 2U 和 2D 组成检测体系, 再加入相应滴度的血清, 以 GFPuv 的激发光激发, 扫描 500-550nm 的发射光, 对比加入血清前后发射光谱的变化, 发现 20 分钟后, 加入 HIV-1 抗体阳性血清的体系最大发射波长由 507nm 左右移至 530nm 左右, 而加入 HIV-1 抗体阴性血清的体系最大发射波长几乎不移动。即以 FRET 检测到了 HIV-1ENV2 的特异性抗原、抗体反应, 可应用于艾滋病检测中 (见图 3、图 4)。

绿色荧光蛋白现已发展出多种变异型, 它们的特性包括激发光谱、

发射光谱的移动, 量子产率的变化以至荧光强度的变化, 更易于表达等 [(Heim R, Prasher DC, Tsien RY, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91:12501-12504 (1994), Heim R, Cubitt AB, Tsien RY, Nature, 373:663-664 (1995)]. 随着生物学技术的发展, X-衍射分析、蛋白质结构的预测、定点突变、DNA shuffling 等技术应用于蛋白质的设计和改造中, 可能产生出更多的 GFP 突变型, 以供选择成为 FRET 能量供受体对。从其它物种中也分离并克隆出了一些荧光蛋白, 如珊瑚虫荧光蛋白等。将荧光蛋白基因和抗原的核苷酸序列以分子克隆技术在氨基末端或羧基末端相连, 可以制备融合蛋白, 获得荧光抗原。生物表达的荧光抗原, 荧光蛋白作为分子探针高度特异地标记在特定的抗原上, 可以避免纯化工艺不足造成的检测时的干扰, 其理化性质也是很稳定的。

对于化学合成荧光物质和稀土元素的研究已有很长的历史, 许多基团或稀土元素的荧光特性都已得到了充分的了解, 经双功能交联剂修饰后即可对病毒蛋白或多肽的氨基、羧基或巯基等基团进行标记, 纯化后获得荧光抗原。它们的特点是荧光的量子产率高, 反应后荧光光谱的变化很明显, 易于检测。

根据本发明, 可以荧光抗原为检测试剂, 建立一个均匀液相反应体系, 加入可能含有特异抗体的血清, 一旦发生抗原、抗体的特异反应, 抗体两臂将检测试剂中的这对荧光能量供受体拉近, 就能观察到 FRET。加入某些特殊的添加剂, 如 Triton、金属离子等, 可能轻微改变溶液的电性从而改变蛋白质的构相, 将抗体两臂间的距离拉得更近。由于 FRET 的发生与距离的六次方成反比, 更近的距离将使 FRET 的发生更加明显, 从而提高检测的灵敏度。

根据本发明, 可以化学发光的抗原和荧光抗原为检测试剂, 建立均匀液相反应体系, 加入可能含有特异抗体的血清, 一旦发生抗原、抗体的特异反应, 抗体两臂将检测试剂中的这对荧光能量供受体拉近, 只要加入合适的诱发剂, 就能观察到 FRET。由于化学发光需要诱导条件, 可以用于设定检测时间、控制测量值的大小, 更有利于标准化操作和

测定。

以下参照表格、附图及描述实例以更详细地说明本发明。

表格中：

表格 1 显示检测试剂 GFPuv、EYFP 体系中加入阴、阳性血清前后 GFPuv 荧光强度的比较

表格 2 显示检测试剂 2U、2Y 体系中加入阴、阳性血清前后 GFPuv 荧光强度的比较

表格 3 显示检测试剂 2U、2D 体系中加入阴、阳性血清前后体系的荧光高峰比较

附图说明：

图 1 显示 GFPuv、EYFP 检测体系中加入阳性血清前后的荧光强度变化

图 2 显示 GFPuv、EYFP 检测体系中加入阴性血清前后的荧光强度变化

图 3 显示检测试剂 2U、2Y 体系中加入阳性血清前后的荧光强度变化

图 4 显示检测试剂 2U、2Y 体系中加入阴性血清前后的荧光强度变化

图 5 显示检测试剂 2U、2D 体系中加入阳性血清前后荧光光谱的变化

图 6 显示检测试剂 2U、2D 体系中加入阴性血清前后荧光光谱的变化

术语解释

荧光共振能量传递 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 指一对合适的荧光物质可以构成一个能量供体 (Donor) 和能量受体 (Acceptor) 对, 它们之间的距离达到 1-10nm 的范围内时, 由于偶极-偶极的相互作用, 激发供体分子的光子能量 $h\nu$ 可能被传递至受体分子, 而后受体分子通过发射出光子 $h\nu'$ ($h\nu > h\nu'$) 而松弛。由 Förster 于 1948 年首先提出该理论。

均相荧光免疫测定 (Homogeneous Fluoroimmunoassay, hFIA) 指在同一个均匀溶液系统中一步完成免疫反应和信号的测定, 检测方法包括夹心法和竞争法两种, 都是由抗原、抗体复合物的形成导致其中的标记物荧光信号的改变而进行检测的。

实施例 1 GFPuv 和 EYFP 作为成对蛋白用于检测血清中抗体的是否存在 pGFPuv、pEYFP 分别是两种荧光蛋白 GFPuv 和 YFP 的表达载体, 将这两种质粒分别转化 *E. coli* 表达菌株 BL21, 挑取单克隆 30℃ 摇菌至 OD600=0.6, 加入 IPTG 至终浓度 0.5mmol/l, 15℃ 200rpm 震荡培养 24hr。离心菌体以裂解液 (20mM Tris-Cl, 5mM EDTA, 100mM NaCl, pH=8.0) 吹起, 超声破碎, 12000rpm 离心 10 分钟, 上清荧光明显, 用于检测。

以俄罗斯 Lumex 公司产荧光全谱仪 (FLUORAT-02 PANORAMA) 检测表达上清, GFPuv 激发波长 395nm, 发射波长 507nm; EYFP 激发波长 513nm, 发射波长 527nm, 荧光强度相当。

PSA 软件分析结果显示, GFPuv、EYFP、EGFP、EBFP 四者有很高的同源性, 都在 95% 以上 (GFPuv: EGFP 96.7%, GFPuv: EBFP 95.8%, GFPuv: EYFP 95.8%, EGFP: EBFP 99.2%, EGFP: EYFP 97.9%)。基于这一点, 取 GFPuv 免疫小鼠, 以获得荧光蛋白抗体。将 GFPuv 表达上清以饱和硫酸铵沉淀, 其中 50% 饱和硫酸铵沉淀中 GFPuv 的含量在 60% 以上。用 PBS (20mM NaCl, 2.68mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.76mM KH₂PO₄, pH7.4) 重悬浮后, 对 PBS 透析, 取透析产物进行分子排阻高效液相层析 (TSK-GEL HPLC, BECKMAN), 产物纯度在 95% 以上。以 MBA-2000 核酸、蛋白检测仪测定并调整浓度到 2mg/ml, 取 30 μl 与等体积的福氏佐剂混匀, 四肢肌肉等量注射免疫小鼠, 并在 2 周和 7 周后分别以同样剂量加强免疫一次。免疫前后都剪鼠尾采血, 分离血清用于免疫检测。EIA 测定发现, GFPuv、EYFP 表达上清以碳酸缓冲液 1: 2000 稀释包被, 仍有良好的免疫反应, 与阴性血清对比 P/N 值都在 10 以上, 适用于 FRET 检测。

将 GFPuv 和 EYFP 等量混合, 取 2ul 以 1:50 的比例稀释成 100ul (稀

释液: 10%牛血清, 0.5%酪蛋白, 2%BSA, 1%TritonX-100, 1ppm 氨基吡啉), 加入 5ul 血清, 检测前后的荧光变化。以 395nm 光对整个液相系统进行激发, 荧光光谱的变化在 20min 内达到稳定。可以看到, 加入 GFPvu 抗体阳性血清后, GFPuv 的发射光峰值明显下降, 达 17%以上, 这是其发射光能量被 EYFP 吸收所引起的。由于其尾峰的掩盖, 527nm 处 EYFP 的发射光峰值的增加一般不能看到。阴性血清中没有特异的抗体将两种荧光抗体拉近, 不发生 FRET。加入阴性血清后 GFPuv 发射光也有下降, 低于 5%, 这可能是由一些假阳性的抗原抗体反应引起。但可以体现出阴、阳性血清之间的差别。由于加入血清造成的整个反应体积的变大、蛋白浓度降低, 从而荧光强度降低的影响很小, 低于 1%, 可以忽略。(见表 1, 图 1、图 2)

实施例 2 ENV2-GFPuv (2U) 和 ENV2-EYFP (2Y) 作为成对蛋白检测血清中是否存在 HIV-1 抗体

已检测到多数血清都存在以紫外光激发后产生的 450nm 左右的发射光, 构建荧光抗原时避开了最大发射光在 448nm 的 EBFP; 同时为避免能量供体的激发光直接为能量受体提供激发能量, 也避开了最大激发光波长与最大发射光波长之间距离很近的 EGFP (EX=488nm, EM=507nm), 选择了 GFPuv (EX=395nm, EM=509nm) 作为能量供体, EYFP 作为能量受体 (EX=513nm, EM=527nm, 以分子克隆的方式构建出能够融合表达荧光蛋白和抗原蛋白的融合蛋白表达质粒。质粒 pRSETB-env2 能在大肠杆菌中表达出具有较强抗原活性的重组艾滋病病毒包膜蛋白, 以限制性内切酶 PstI/KpnI 处理, 切去其终止密码前的一小段碱基。同时将含有 gfpuv 基因的质粒 pGFPuv (购自 Clonetech 公司) 也以限制性内切酶 PstI/KpnI 处理, 回收 750bp 的 gfpuv 基因片段, 连入 env2 基因 3' 端, 获得重组质粒 pRSETB-env2-gfpuv (2U)。同样, 以限制性内切酶 BamHI/KpnI 同时处理质粒 pRSETB-env2 和 pEYFP, 连接 750bp 的 eyfp 基因于 env2 基因的 3' 端, 获得重组质粒 pRSETB-env2-eyfp (2Y)。

构建的质粒转化 Ecoli BL21 菌株, 30°C 摇菌至 OD600=0.6, 加入 IPTG

至终浓度 0.5mmol/l, 15°C 200rpm 震荡培养 24hr. 离心菌体以裂解液 (20mM Tris-Cl, 5mM EDTA, 100mM NaCl, pH=8.0) 吹起, 超声破碎, 12000rpm 离心 10 分钟, 取上清用于检测.

以 12%SDS-PAGE 观察, 2Y、2U 均为 43KD (ENV2 16KD, GFPuv、EYFP27KD), 含量约占上清的 20%. 以荧光全谱仪 FLUORAT-02 (俄罗斯产) 分别检测 2Y、2U 的荧光, 2U 最大激发光波长 $Ex=395\text{nm}$, 最大发射光波长 $Em=509\text{nm}$, 2Y 最大激发光波长 $Ex=513\text{nm}$, 最大发射光波长 $Em=527\text{nm}$, 与单独表达的 GFPuv、EYFP 相同, 但荧光强度相对减弱. EIA 检测二者均有较强的免疫学活性, 但低于单独的 ENV2.

将 2Y 和 2U 等量混合, 取 100ul 以 1:30 的比例稀释成 3ml (稀释液: 10%牛血清, 0.5%酪蛋白, 2%BSA, 1% TritonX-100, 1ppm 氨基吡啉), 加入 50ul 血清, 检测前后的荧光变化. 以 395nm 光对整个液相系统进行激发, 荧光光谱的变化在 20min 内达到稳定. 可以看到, 加入 HIV-1 抗体阳性血清后, GFPuv 的发射光峰值明显下降, 达 14%以上, 这是其发射光能量被 EYFP 吸收所引起的. 由于其尾峰的掩盖, 527nm 处 EYFP 的发射光峰值的增加一般不能看到, 但强阳性血清与抗原的反应比例合适而充分时, 也有增强的现象. 阴性血清中没有特异的抗体将两种荧光抗体拉近, 不发生 FRET. 加入阴性血清后 GFPuv 发射光也有下降, 低于 5%, 这可能是由一些假阳性的抗原抗体反应引起. 但可以体现出阴、阳性血清之间的差别. 由于加入血清造成的整个反应体积的变大、蛋白浓度降低, 从而荧光强度降低的影响很小, 低于 1%, 可以忽略. (见表 2, 图 3、图 4)

实施例 3 2u 和 ENV2-BODIPY 507/545 (2D) 作为成对蛋白用于检测血清中是否存在 HIV-1 抗体.

对纯化的 HIV-1 重组包膜蛋白 ENV2 进行了化学荧光标记. 荧光物质购于 Molecular probe 公司. BODIPY 507/545 为红色固体粉末, 避光、干燥、保存于 -20°C. 标记前挑取适量干粉, 溶于 200 μ l DMSO 成红色溶液, 测其在 507nm 激发光下的吸光值 A. 根据公式 $C=A/\epsilon$ ($\epsilon=69000$) 算出 BODIPY 507/545 的实际浓度, 再加 DMSO 调整浓度到 10mM.

纯化的 HIV-1 重组包膜蛋白 ENV2, 纯度达 95%, 浓度为 0.5mg/ml, 保存于 Tris-Cl 缓冲液中, 标记前先对 PB (pH=7.3) 透析, 并以 PEG10000 浓缩成为 2mg/ml 存于 PB 中的溶液。将抗原 ENV2 等分, 每 200 μ l 到一 0.5ml eppendorf 管中, 室温下避光、不停震荡、缓慢加入 2 μ l 稀释好的 BODIPY507/545 溶液 (现配现用), 盖好管盖, 维持室温、避光、震荡反应 3 小时。反应后, 溶液对 PB (pH=7.3) 透析终止反应, 获得 ENV2-BODIPY507/545 (2D)。检测其荧光光谱及抗原性。光谱为激发光 504nm, 发射光 530 nm, EIA 检测抗原活性下降 10%, 可作为 FRET 检测试剂。

在 100 μ l 反应缓冲液 (含 10%牛血清、0.5%酪蛋白、2%BSA、5% TritonX-100、1ppm 氨基吡啉) 中加入 5 μ l 2U 和 5 μ l 2D, 装入酶联免疫检测微孔板的微孔中, 再加入 3 μ l 血清, 检测前后的荧光光谱变化。以 395nm 光激发, 扫描 500-550nm 的发射光, 对比加入血清前后发射光谱的变化, 发现 20 分钟后, 体系的荧光强度整体提高, 可能是 TritonX-100 提高了荧光团的荧光效率的结果。加入 HIV-1 抗体阳性血清的微孔最大发射波长由 507nm 左右移至 530nm 左右, 而加入 HIV-1 抗体阴性血清的微孔最大发射波长几乎不移动, 在 510nm 左右。即以 FRET 检测到了 HIV-1ENV2 的特异性抗原、抗体反应, 可应用于艾滋病检测中, 以寻找最大发射波长的位置确定血清中是否含有阳性抗体 (见表 3、图 5、图 6)。

表 1. 加入不同血清前后 507nm 荧光强度的比较

加入样品		GFPuv 荧光强度		GFPuv 发射峰下降百分比
		加血清前	加血清后	
缓冲液		0.00561	0.00539	3.92
血清 抗GFPuv 阳性	G2531	0.00706	0.00577	18.27
	G3531	0.0076	0.00577	24.08
	G255	0.0066	0.00494	25.15
	G355	0.00687	0.00475	30.86
抗GFPuv 阴性血清	Co	0.00784	0.00747	4.72
	182	0.00795	0.00681	14.34
	183	0.00736	0.00708	3.80
	184	0.00687	0.00693	-0.87
	185	0.00731	0.00715	2.19
	186	0.00657	0.00675	-2.74
	187	0.00681	0.00679	0.294
	190	0.00615	0.00518	15.77

表 2. 加入阴、阳性血清的 509nm 荧光强度比较

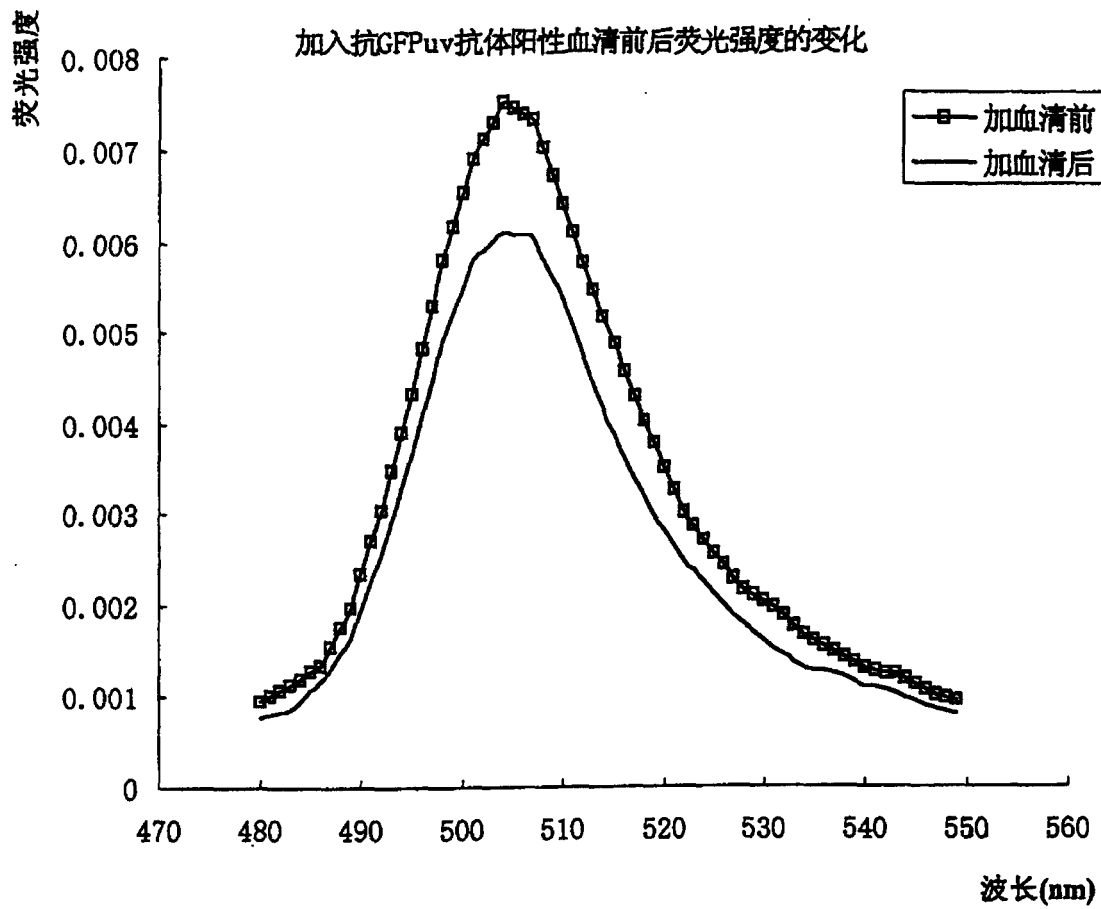
50ul 2Y+50ul2U 稀释 → 3000ul 激发光 Ex=395nm

加入样品	加入前	加入后	GFPuv 发射峰下降百分比
缓冲液	0.021569	0.021401	0.776
HIV-1(+)C46	0.028322	0.02468	12.9
HIV-1(-)BD15	0.025702	0.024084	6.29
HIV-1(-)BD23	0.0232	0.02216	4.48
HIV-1(-)BD33	0.02225	0.021739	2.30
HIV-1(-)BD35	0.023009	0.02253	2.08

表 3. 加入不同血清前后荧光最大发射波长的变化

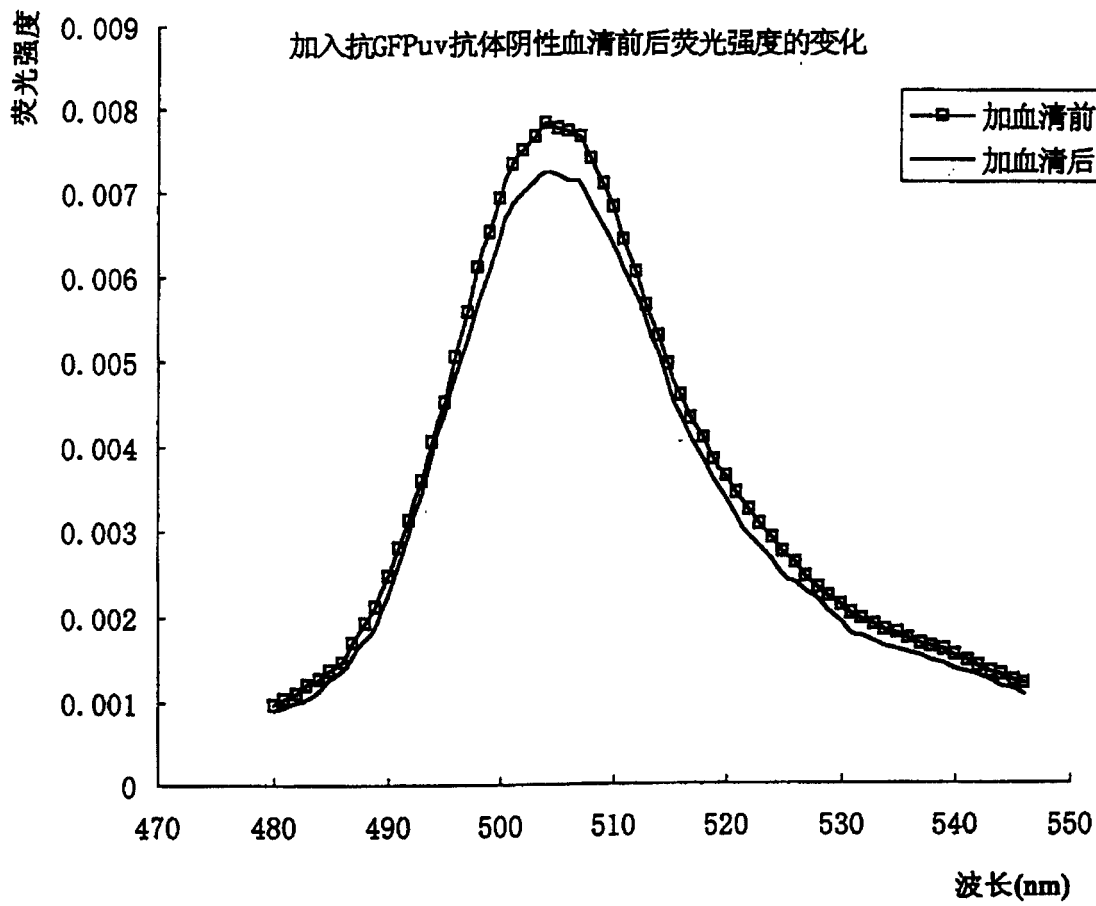
Ex=395nm 扫描 Em 480~550nm

加入血清		加血清前		加血清后	
		最大激发波长 (nm)	荧光强度	最大发射波长 (nm)	荧光强度
无血清对照		509	0.00315	509	0.00361
HIV-1 抗体阳 性血清	C46	510	0.00166	525	0.00425
	P/40	508	0.00298	529	0.00582
	FJ4	508	0.00344	528	0.00512
HIV-1 抗体阴 性血清	BD7	508	0.0029	513	0.00421
	BD8	508	0.0032	500	0.0111
	BD9	507	0.00313	504	0.00737
	158	510	0.00164	516	0.00647
	162	506	0.00196	513	0.0022
	180	510	0.00167	519	0.00746
	181	507	0.00167	519	0.00612
	182	510	0.00164	519	0.0063
	184	513	0.00163	519	0.00539
	185	507	0.00163	519	0.00586
	187	507	0.00166	480	0.0203
189	510	0.00164	519	0.00573	
191	510	0.00166	519	0.00598	



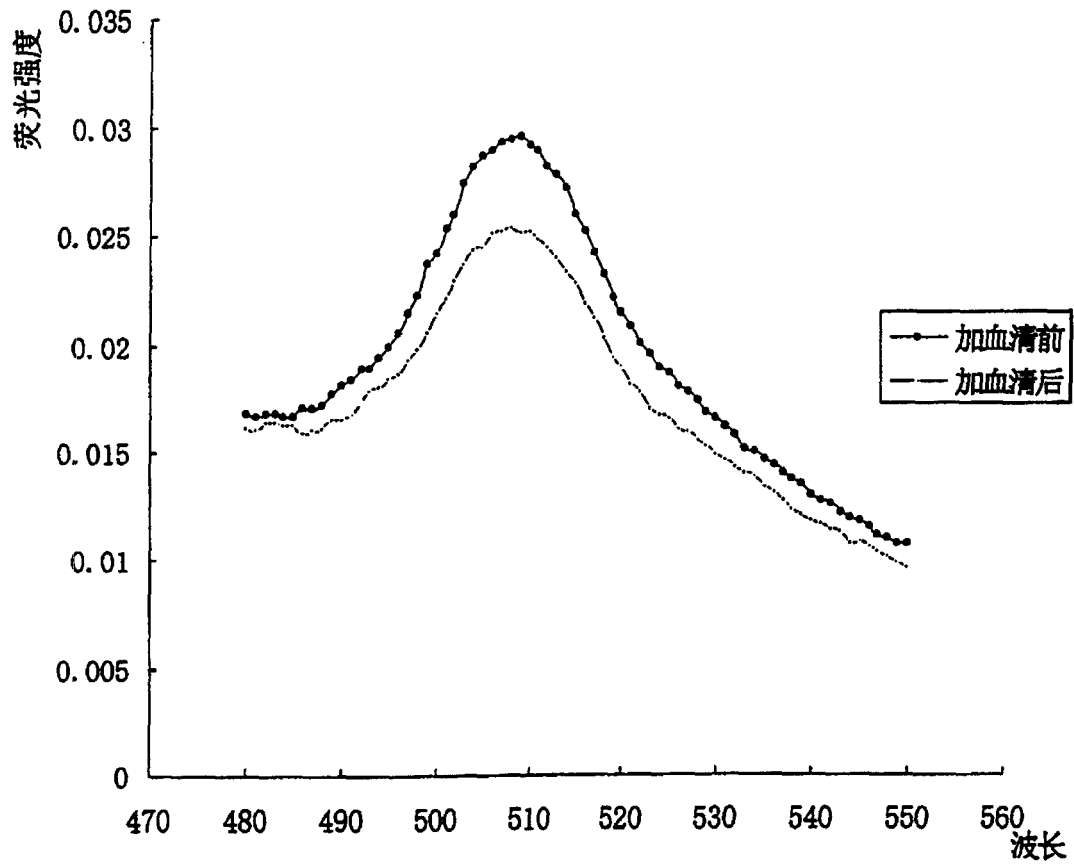
加入抗 GFPuv 抗体阳性血清前后荧光强度的变化

图 1



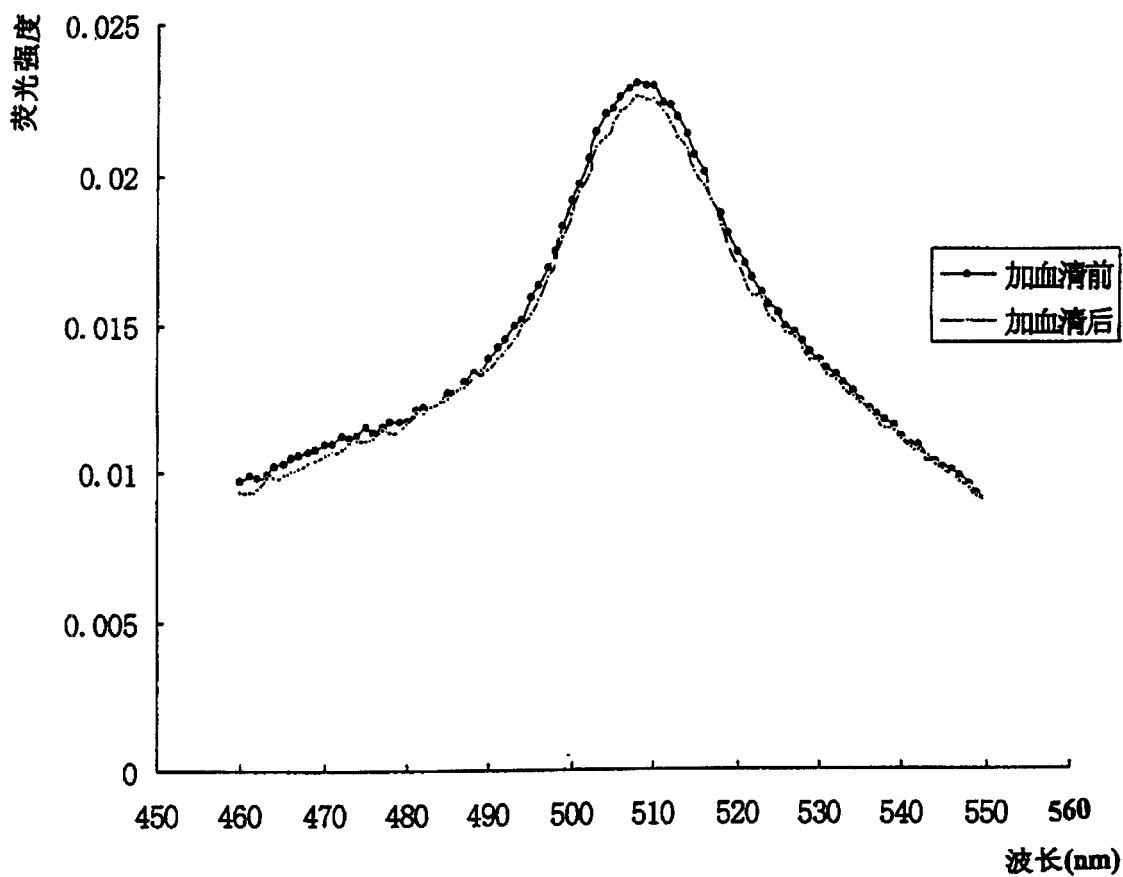
加入抗 GFPuv 抗体阴性血清前后荧光强度的变化

图 2



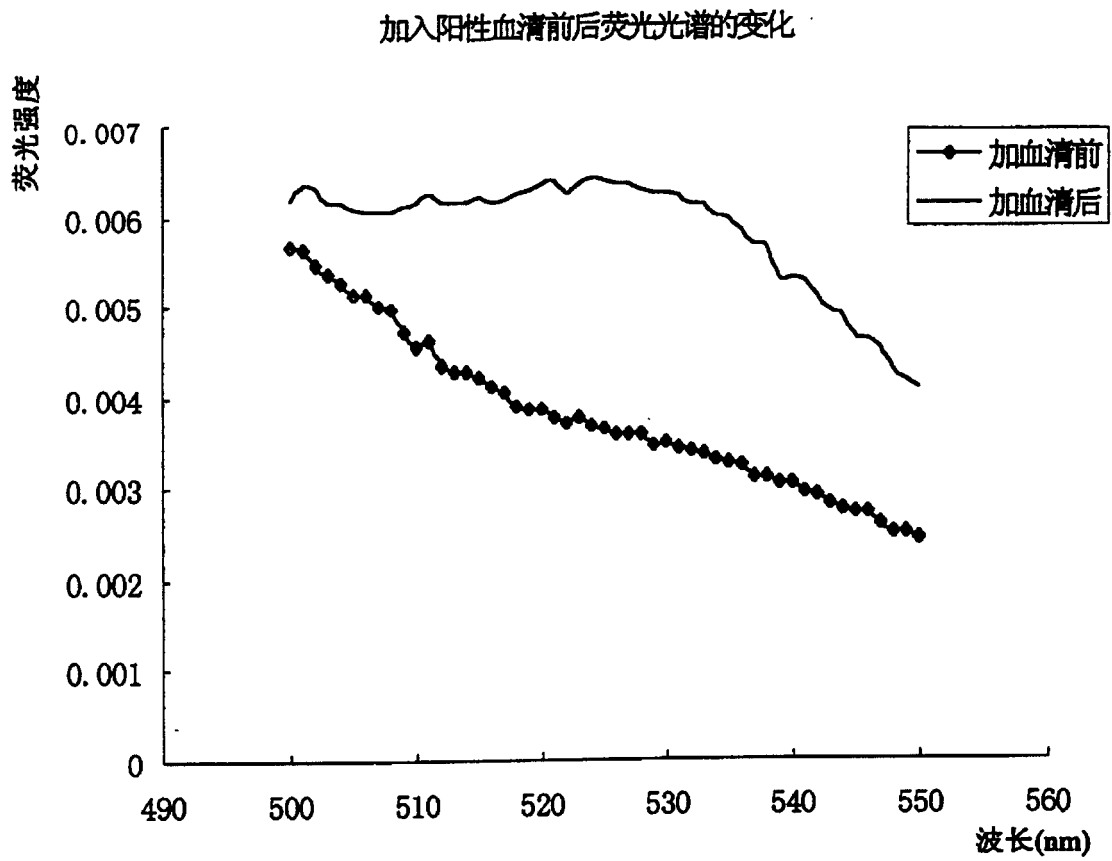
加入阳性血清前后的荧光强度变化

图 3



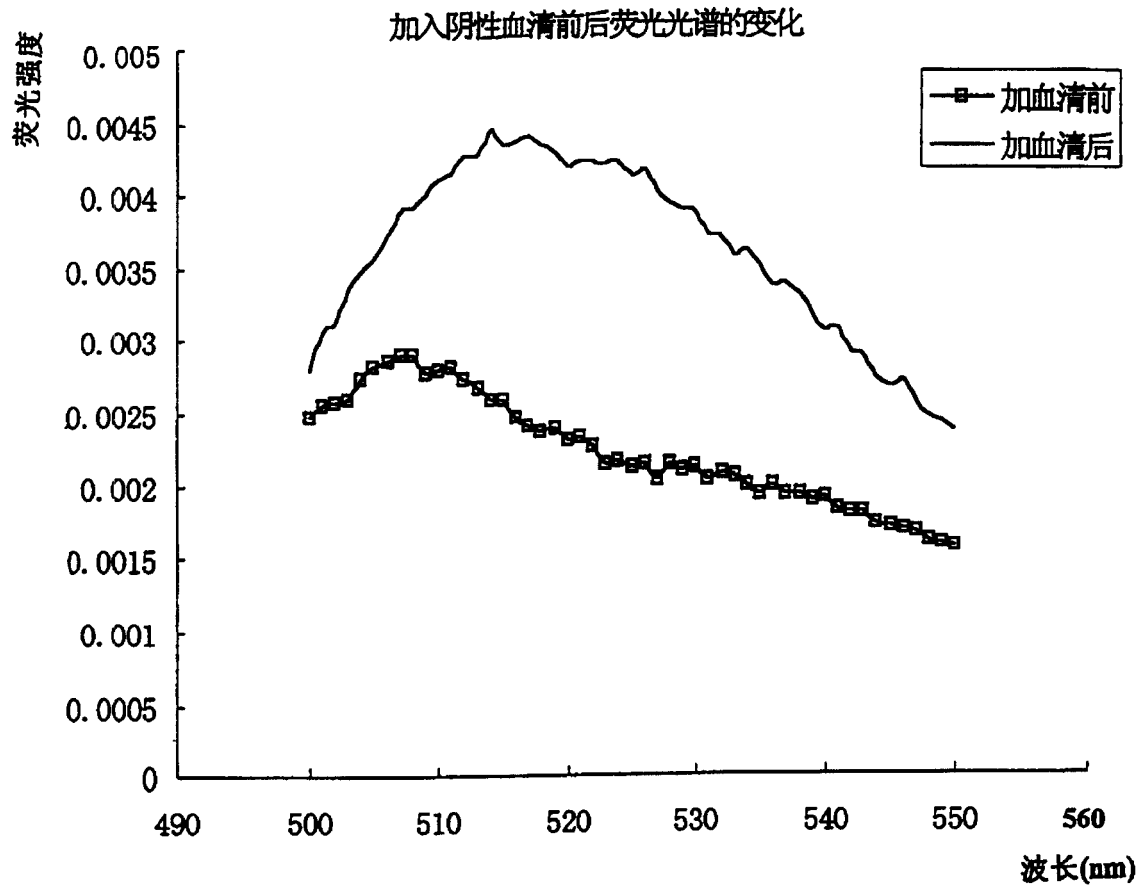
加入阴性血清前后荧光强度的变化

图 4



加入阳性血清前后荧光光谱的变化

图 5



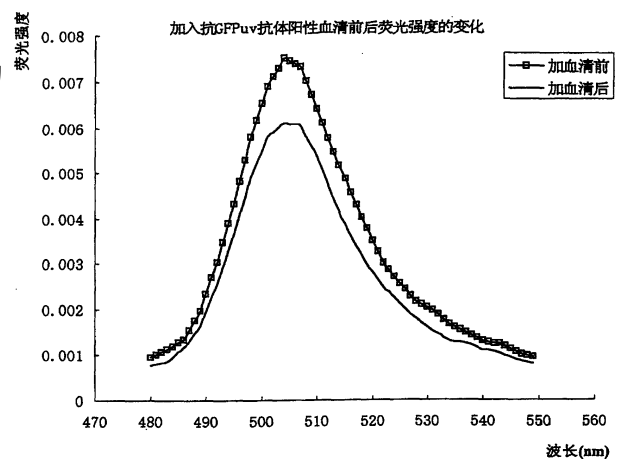
加入阴性血清前后荧光光谱的变化

图 6

专利名称(译)	具有荧光共振能量转移特征的成对蛋白及其用途		
公开(公告)号	CN1136450C	公开(公告)日	2004-01-28
申请号	CN00130292.2	申请日	2000-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	夏宁邵 罗文新 张军 谢小燕 李少伟		
发明人	夏宁邵 罗文新 张军 谢小燕 李少伟		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/569 G01N33/576 G01N33/68		
代理人(译)	唐伟杰		
其他公开文献	CN1353313A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及具有荧光共振能量转移(FRET)特征的由蛋白A和蛋白B组成的成对蛋白，蛋白A是作为能量供体且带有荧光物质或化学发光物质的抗原，蛋白B是作为能量受体且带有荧光物质的抗原，而且蛋白A和蛋白B具有能与同一抗体分子特异结合的共同抗原决定簇，由蛋白A、B和适当的缓冲液组成的均相免疫检测药盒，及它们用于检测标本中抗体存在的用途，尤其在艾滋病毒抗体、乙型肝炎病毒抗体、丙型肝炎病毒抗体的检测方面的用途。



加入抗GFPuv抗体阳性血清前后荧光强度的变化