

文章编号:1007-4287(2013)05-0793-06

潮州地区人乳头瘤病毒 52 型 L1 基因多态性分析

罗招云^{1*}, 陈 强², 杨立业¹, 林 敏¹, 陈默蕊¹

(1. 南方医科大学附属潮州中心医院 检验实验中心, 广东 潮州 521000; 2. 吉林大学公共卫生学院)

摘要:目的 研究潮州地区优势型别人乳头瘤病毒(HPV)52 型 L1 基因多态性。为基于 L1 基因工程疫苗的设计和应提供理论依据。**方法** 采用核酸分子快速导流杂交分型技术(HybriMax)检出 HPV52, 提取 101 例 HPV52 单纯感染者宫颈脱落细胞 DNA, 通过 4 对特异性引物分别扩增 HPV52-L1 编码区全序列, 进行测序及 BLAST 多态性分析。**结果** 本研究成功获得 73 条 HPV52 L1 基因全序列(1590 bp)。该序列与天津参考株(GQ472848)的一致性为 99%。在潮州地区发现的所有 L1 基因序列中有 31 个碱基是可发生变异的, 其中 25 种为同义突变, 6 种为有义突变。根据基因多态性分东亚群和欧洲群 2 群。东亚群有 13 组, 其中 CZ52A105 是本地最常见的变异株, 占 61.64% (45/73), 该组称为潮州地方株, 其编码序列与泰国清迈报道的 IN141070 株(HQ537743)完全匹配, 其余各组(21/73)多态性国际上均尚未报道, 他们均与天津报道的 TJ49-52(GQ472848)株以及泰国报道的 IN141070(HQ537743)株亲缘关系最近, 有 1~6 个碱基不同。欧洲群有 2 组为 CZ52E928(2/73)和 CZ52E136(5/73), 其基因序列分别与德国 REF(X74481)株和北美洲 Qv03719(HQ537745)株的 L1 全序列完全匹配。**结论** 潮州地区 HPV52-L1 基因多态性与中国东南部和东南亚国家报道的类似, CZ52A105 是潮州地方株。

关键词:人乳头瘤病毒; 52 型; L1 基因; 序列分析; 多态性**中图分类号:**R694.13**文献标识码:**A

Analysis of L1 gene polymorphism of human papillomavirus type 52 from Chaozhou area of China LUO Zhao-yun¹, CHEN Qiang², YANG Li-ye¹, et al. (1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Chaozhou Central Hospital, South Medical University, Chaozhou 521000, China; 2. Jilin University, School of Public Health)

Abstract: **Objective** Purpose To study the polymorphism of L1 gene of human papillomavirus(HPV)subtype 52 in Chaozhou area, and provide the useful data for designing and applying of L1 gene relied vaccine. **Methods** HPV-52 was detected by HybriMax. The DNA was extracted from the cervical exfoliated cells of 101 cases of simple infection of HPV 52. The complete L1 gene sequence was amplified with four pairs of primers, and then sequenced in Invitrogen Biotechnology Co. Ltd. The BLAST 2.0 software online were used to analyze and identify mismatches. **Results** Totally, 73 complete L1 genes were successfully amplified and sequenced. The similarity was 99% compared with reference strain (GQ472848). 31 nucleotide acids were variable, 25 of them were nonsense mutation, the other 6 were sense mutation. All of 73 cases were divided into East Asian and Europe lineage according to the polymorphism of L1 gene. East Asian cluster include 13 variants, CZ52A105 represent the most common variant(61.64%, 45/73), this variant was named "Chaozhou isolate", its sequence was completely matched with isolate IN141070(HQ537743) reported in Thailand, while the other 12 variants have never been reported worldwide so far, their sequence was the closest homology with sequence reported in Tianjin TJ49-52(GQ472848) and Thailand IN141070(HQ537743), one to six mismatches was found. Europe cluster included two kinds of variants, which were isolate CZ52E928(2/73) and CZ52E136(5/73), their sequence were completely matched with sequence reported in German REF (X74481) and Guanacaste Qv03719(HQ537745) respectively. **Conclusion** The most common polymorphism of HPV52 L1 genes was similar with that reported in the south-east China or other south-east Asia countries, CZ52A105 was named the predominant sequence in Chaozhou area. This study provided molecular evidence for gene vaccine exploration in Chaozhou.

Key words: human papillomavirus; 52 subtype; L1 gene; sequence analysis; polymorphism

(Chin J Lab Diagn, 2013, 17: 0793)

基金项目:国家自然科学基金(81101329); 广东省医学科研基金(A2011760)

* 通讯作者

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤, 仅次于乳腺癌占恶性肿瘤的第二位^[1]。研究证实高危型人乳头瘤病毒(high risk human papillomavirus, HR-HPV)持续感染是宫颈癌及其癌前病变发生的最重要危险

因素^[2]。目前关于 16 及 18 型 HPV 的报道很多,对 52 型的研究较少见。HPV52 作为 HPV16 簇群中的成员,具有高度致癌性的 HPV 型别,在亚洲等地呈现特殊的流行状况,逐渐引起人们的关注。HPV52 是潮州地区 HR-HPV 优势基因型别(30.55%,1005/3290)^[3]。由于 HPV52 与不同遗传背景的宿主相互作用会引起病毒的变异,影响 HPV 感染和转归,了解 HPV52 基因多态性将为明确宫颈癌的发生和运用免疫学策略预防 HPV52 相关疾病提供新的思路。由于源于中国内地的 HPV52 基因序列较少,本研究在潮州地区采集女性宫颈脱落细胞标本,进行 HPV 分型和 HPV52 L1 测序,将所获得的 HPV52 L1 序列与 GenBank 基因库中的联合进行系统全面分析,探讨 HPV52 L1 基因多态性。

1 材料与方法

1.1 样本来源 取自 2009 年 8 月至 2010 年 8 月间潮州地区农村女性宫颈癌筛查的 49458 份宫颈脱落细胞标本(年龄 35~60 岁,平均 46.98 岁,均为生育女性,先前均无宫颈手术史)。先进行 HR-HPV 13 种高危型别的实时荧光定量 PCR 筛查(杭州博日),阳性者再进行 21 型核酸分子快速导流杂交分型检测(凯普生物技术有限公司)。HR-HPV 阳性者同时进行液基薄层细胞学检查(LCT)。LCT 检查采用广州安必平医药公司提供的制片仪器(LBP-2801)及其配套试剂,以 The Bethesda System (TBS)报告系统为诊断标准。选择单纯 HPV52 型感染阳性的标本为研究对象。

1.2 标本的采集 此次宫颈癌筛查活动通过了潮州市中心医院伦理委员会的批准。标本采集前由受检者签署知情同意书。由专科医生使用凯普公司专用宫颈刷完成。扩阴器暴露宫颈口后,棉拭子擦去分泌物,宫颈刷顺时针刷转 3~5 圈后将宫颈刷保存于样品管的保存液中。

1.3 DNA 模板的制备 DNA 提取试剂盒(凯普公司生物技术有限公司),标本制备按说明书操作。

1.4 目的序列 PCR 扩增和测序 HPV52 L1 PCR 以上述提取 DNA 为模板。HPV52 L1 引物设计根据 GenBank 基因库天津参考株(TJ49-52, ACCSSION: GQ472848)序列设计特异性引物,并经 Primer5.0 分子生物学软件分析优化。参考 GenBank 基因库中 HPV52 L1 区通用型引物 MY09/MY11, MY09: 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3', MY11: 5'-GCMCAGGGWCATA-

AYAATGG-3';因 L1 基因序列全长 1590 bp 较长,故将 L1 分为 4 个区段,自行设计 HPV52 L1 区段特异引物正反向 4 对,分别为

HPV52-L1-1,

F:5'-CCATTACCTTCGTTACCCACA-3',

R:5'-AGGATGCCCCACTAATACCC-3'

HPV52-L1-2,

F:5'-GCTTGGAATCGGTAGGG-3',

R:5'-GCAGTATTGCCAGAGTTAGACC-3'

HPV52-L1-3,

F:5'-AGGGTCTAACTCTGGCAATAC-3',

R:5'-CCTGTAGCCCTGCCTGTA-3'

HPV52-L1-4,

F:5'-ATGAAAATTTTAAGGAATACC-3',

R:5'-ACATACATAACATGCAAACAAC-3'

上述引物均由 Invitrogen 生物技术有限公司(上海)合成。PCR 扩增仪为 ABI2700 热循环仪。L1 基因 PCR 反应条件:50 μ l 反应体系(包含 2 μ l 模板 DNA,灭菌去离子水 34.0 μ l,10 $\times$ PCR Buffer 5.0 μ l,dNTPs 4.0 μ l(0.2 mmol/L),DMSO 为 1 μ l,引物 P1,P2 各 1.6 μ l(0.4 μ mol/L),Taq DNA 聚合酶 1 U/0.8 μ l);L1-1 反应条件为:93 $^{\circ}$ C 5 min 后进行循环,93 $^{\circ}$ C 1 min,52 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min,36 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 10 μ l PCR 反应产物在 2.0%琼脂糖凝胶电泳检测,观察结果并照相。L1-2、L1-3、L1-4 的反应条件与 L1-1 只有第三步的退火温度不同,分别为 L1-2(52 $^{\circ}$ C),L1-3(57 $^{\circ}$ C),L1-4(57 $^{\circ}$ C),其它步骤与 L1-1 完全一致。HPV52 L1 PCR 反应产物送广州英潍捷基(上海)贸易有限公司双向测序,对测序结果进行分析。Taq 酶、dNTPs、PMD18-T 载体为 TakaRa 公司产品。

1.5 HPV52 L1 区段序列测定 因 L1 序列全长 1 590 bp 较长,故将 L1 分为 4 个区段,分别用 L1-1、L1-2、L1-3、L1-4 进行 DNA 测序,测序后再拼接。利用 BLAST 将所测序列与 GenBank 基因库中 HPV52 序列进行比对。

1.6 序列分析 通过 BioEdit 软件工具向 GenBank 核酸数据库提交,利用 BLAST 和 DNA STAR 等在线分析工具对所获得序列进行分析,将所测序列与 GenBank 基因库中天津参考株(ACCESSION:GQ472848)的 HPV52 L1 编码区序列进行比对。对出现的变异进行多态性分析。本研究获得的 73 株组成数据集,合并全同序列,然后分组。将潮州地区的 HPV52 L1 变异株基因序列上交

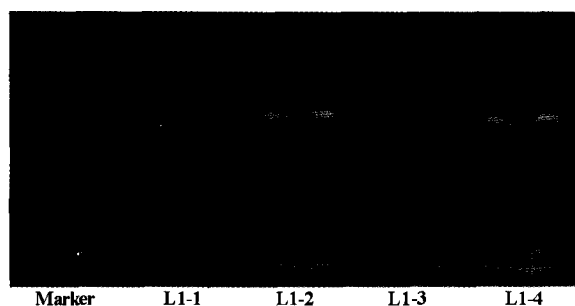
NCBI GenBank 基因库。

1.7 建立 HPV52-L₁ 进化树 通过 BioEdit、Clustal-1.8 和 Mega-5.05 软件工具,以及利用 NCBI→BLAST 在线分析工具,按照构建系统进化树的步骤操作。

2 结果

2.1 HPV52 L₁ 基因的 PCR 扩增结果及初步鉴定

以选取的 101 例 HPV52 单纯感染者宫颈脱落细胞 DNA 为模板,成功获得 L1-1、L1-2、L1-3、L1-4 各 83 份 PCR 扩增阳性产物,PCR 扩增产物长度分别为:L1-1 为 526 bp、L1-2 为 547 bp、L1-3 为 596 bp、L1-4 为 560 bp。PCR 扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳后,分别在相应位置附近显示一条特异 DNA 条带,其大小与预期值一致,见图 1。



注:Marker 为 100 bp,L1-1 为 526 bp,L1-2 为 547 bp,L1-3 为 596 bp,L1-4 为 560 bp

图 1 HPV52-L₁ 中 4 片段 PCR 扩增产物琼脂糖电泳图

2.2 HPV52-L₁ 序列测定和分析 将 83 份 L1-1、L1-2、L1-3、L1-4 PCR 扩增阳性产物进行正、反双向测序,成功获得正、反各 73 条 L1-1、L1-2、L1-3、L1-4 基因序列,利用 BioEdit 和 DNA STAR 等在线分析软件将 L1-1、L1-2、L1-3、L1-4 再拼接成 HPV52 L₁ 全序列。利用 DNA STAR/Edit Seq 软件分析,以天津参考株 L₁ 编码区序列中起始密码和终止密码处小片段,找到相对应的起始密码和终止密码,起始密码和终止密码之间的基因序列就是所测的 L₁ 编码区序列,再利用 BLAST 在线分析工具,将 HPV52 L₁ 基因序列与 GenBank 收录的天津参考株 L₁ 编码区序列进行比对,一致性均为 99%。对 73 条 HPV52 L₁ 核苷酸序列进行同源性分析,L₁ 基因型内核苷酸同源性为 99.1%~99.9%,符合分型规律^[4]。

2.3 HPV52 L₁ 基因多态性 HPV52 L₁ 基因测序结果与天津参考株 L₁ 编码区序列比对,73 条 L₁

基因序列与参考株 L₁ 序列比对,其中 2 处核苷酸变异是所有 L₁ 序列所共有的,即所有 L₁ 基因在第 725(C725T)和第 1539(C1539T)处碱基均发生变异,其编码的氨基酸分别由丝氨酸(TCG)变为亮氨酸(TTG),为有义突变,CCC→CCT 脯氨酸为同义突变。最为常见组(CZ52A105)中 45 条 L₁ 基因序列仅存在这 2 处碱基变异,被定为潮州地方株。根据碱基的变异进行分类,在 CZ52A105 变异的基础上潮州地区 73 条 L₁ 基因序列共发现 31 处碱基变异,25 种为同义突变,6 种为有义突变,引起所编码氨基酸改变。6 种有义突变分别为:天门冬酰胺→苏氨酸(N207T),谷氨酸→天门冬氨酸(E468D),天门冬氨酸→天门冬酰胺(416),丝氨酸→甘氨酸(S83G),谷氨酸→赖氨酸(E398K),亮氨酸→丝氨酸(L5S)。根据 L₁ 的基因多态性进行分组,本研究测序结果与天津参考株比对,将 L₁ 全同序列合并为一组,合并后的 L₁ 序列分为 15 组,分别命名为:CZ52A105、CZ52A207、CZ52A620、CZ52A1404、CZ52A1230、CZ52A375、CZ52A1569、CZ52A264、CZ52A247、CZ52A277、CZ52A1023、CZ52A921、CZ52E928、CZ52E136、CZ52D416。根据基因谱系分 2 群:东亚群和欧洲群。东亚群有 13 组,其中 CZ52A105 组是突变的主流模式占 61.64%(45/73),该组称为潮州地方株,其编码序列与泰国清迈报道的 IN141070 株(HQ537743)完全匹配;CZ52D416 组(2 例)多态性国际上尚未报道,与天津报道的 TJ49-52(GQ472848)株亲缘关系最近,与北美洲哥斯达黎加报道的 Qv03594(HQ537740)株亲缘关系较近;其余各组(19/73)的多态性国际上均尚未报道,他们均与天津报道的 TJ49-52(GQ472848)株以及泰国报道的 IN141070(HQ537743)株亲缘关系最近,有 1~6 个碱基不同。欧洲群有 2 组,CZ52E928 组(2/73)基因序列与德国 REF(X74481)株、与北美洲哥斯达黎加 Qv26382(HQ537732)株和非洲卢旺达 RW846(HQ537735)株的 L₁ 全序列完全匹配;CZ52E136 组(5/73)基因序列与北美洲哥斯达黎加株 Qv03719(HQ537745)的 L₁ 全序列完全匹配。总之,与 GenBank 中天津参考株进行 BLAST 比对发现,本研究获得的 HPV52 L₁ 序列多与泰国、印度、香港、台湾、日本和菲律宾等东南亚报道的株同源,少数株与哥斯达黎加和德国等欧美国家报道的株亲缘关系最近,见表 1 和图 2。

[illegible]

2.4 HPV52 L1 15 组序列进化树之间的关系 进化树中上部分的潮州地区的 12 组编码序列与广州的、天津的、浙江等国内的和泰国、印度等东南亚国报道株亲缘关系最近;进化树中下部分的 CZ52D416 组编码序列与 TJ49-52(GQ472848)株和 Qv03594(HQ537740)株亲缘关系最近;进化树下部分的 2 组(CZ52E928、CZ52E136)编码序列与哥斯达黎加和德国等美欧国家报道的株亲缘关系最近,见图 2。

研究表明 HPV52 在中国和亚洲妇女中常见^[5]。某些地区甚至高于 HPV16 和 HPV18, 在上海、四川、广东等地, 高发态势尤为明显^[6]。HPV52 作为 HPV16 簇群中的成员, 是具有高度致癌性的 HPV 型别之一^[7], 在亚洲等地呈现特殊的流行状况。L1 基因是 HPV 晚期结构蛋白基因, 有较强的抗原性和免疫原性, 能诱导机体 B 细胞产生中和抗体, 从而阻断病毒感染, 因而 L1 蛋白是防治 HPV 感染基因工程疫苗研究的重要靶抗原^[8]。研究证实, 不同地域间 HPV L1 基因存在变异现象^[9]。国内研究发现扬

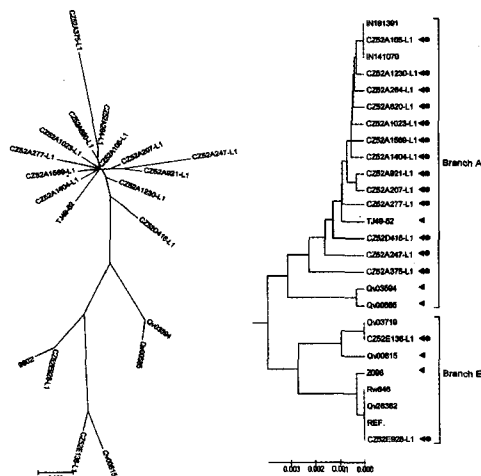


图 2 HPV52-L1 15 组序列进化树

表 2 HPV52 不同突变株的 Accession 号和 LCT 结果 (n=73)

Isolate	n	Accession No. for L1	LCT results					
			NILM	ASC-US	ASC-H	LSIL	HSIL	SCC
CZ52A105	45	JN874416	22	15	1	6	1 ^a	0
CZ52A207	8	JN874417	4	4	0	0	0	0
CZ52A620	1	JN874420	1		0	0	0	0
CZ52A1404	1	JN874421	0		0	1	0	0
CZ52A1230	1	JN874422	0	1	0	0	0	0
CZ52A375	1	JN874423	0	1	0	0	0	0
CZ52A1569	1	JN874425	1		0	0	0	0
CZ52A264	2	JN874426	0	1	0	1	0	0
CZ52A247	1	JN874427	0		0	1	0	0
CZ52A277	1	JN874428	0		0	0	0	1 ^b
CZ52A1023	1	JN874430	0		0	1	0	0
CZ52A92	1	JN874436	1		0	0	0	0
CZ52E928	2	JN874419	1	1	0	0	0	0
CZ52E136	5	JN874424	2	3	0	0	0	0
CZ52D416	2	JN874434	1	1	0	0	0	0

注:a and b further received the histopathology biopsy.

州地区 L1 基因存在 7 处变异^[10]。本研究发现,潮州地区 HPV52 L1 基因序列有 31 处碱基分别出现变异,其中 6 处由于核苷酸的改变,其编码氨基酸也相应发生变化;另外 25 处为同义突变,未影响氨基酸的改变。提示 HPV52 L1 编码基因中可能存在一系列中国地区的高频率突变位点;结果也提示潮州地区不同 L1 基因序列之间存在差异,特别是氨基酸的改变,可能会造成 HPV52 L1 蛋白免疫原性的差异。有学者报道 HPV 不同的变异株与子宫颈鳞状上皮内瘤变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN)程度相关^[11]。HPV16 的亚美或非洲变异株比欧洲变异株具有更强的发生宫颈癌的危险性^[12]。本研究分析了潮州地区 HPV52 L1 基因的突变谱及主流型,并预测了其功能变化。L1 蛋白的改变将导致病毒的组装、感染以及抗原表位的改变,使病毒逃避机体免疫识别,从而造成病毒的持续和重复感染,促进宫颈癌的发生^[13]。提示 L1 基因突变为 HPV52 型种系发生提供了确凿的资料,也为 HPV52 型预防性疫苗研制提供新的思路和基本条件。潮州地区的 L1 基因多态性形成 15 种突变模式,分为东亚和欧洲 2 种谱系。主流突变的东亚群 L1 基因序列多与国内的(广州、天津、浙江等)和东南亚地区(泰国、印度、香港、台湾等)报道的 HPV52 株同源;欧美群 L1 基因序列与哥斯达黎加和德国等欧美国家报道的株亲缘关系最近。说明不仅在不同国家之间,即便在我国不同地区之间和不同检测对象之间, L1 基因多态性也存在较大的差异。

综上所述,HPV52 在亚洲 CIN 发生中可能占据

重要地位。本研究探明了潮州地区 HPV52 L1 基因结构特点和变异规律,为制备适合中国人群的 HPV 宫颈癌疫苗提供流行病学资料和理论依据。

作者简介:罗招云(1973-),男,潮州市中心医院检验实验中心,主任检验技师,研究方向:细胞分子诊断学。

参考文献:

- [1] Renshaw AA, Young NA, Birdsong GG, et al. Comparison of performance of conventional and ThinPrep gynecologic preparations in the College of American Pathologists Gynecologic Cytology Program[J]. Arch Pathol Lab Med, 2004, 128(1): 17.
- [2] 赵戴君, 龚向真, 胡争光, 等. 上海市社区子宫颈人乳头瘤病毒感染现状及危险因素研究[J]. 现代预防医学, 2010, 37(10): 1867.
Zhao DJ, Gong XZ, Hu ZG, et al. The prevalence study on the human papillomavirus (HPV) infection and the risk factors of the community female population in Shanghai[J]. Modern Preventive Medicine, 2010, 37(10): 1867.
- [3] 罗招云, 杨立业, 翁妙珊, 等. 潮州地区人乳头瘤病毒型别分布特征分析[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2011, 3(3): 177.
Luo ZY, Yang LY, Weng MS, et al. Analysis of subtypes distribution of human papillomavirus in Chaozhou area[J]. Journal of Molecular Diagnostics and Therapy, 2011, 3(3): 177.
- [4] Bernard HU, Burk RD, Chen Z, et al. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments[J]. Virology, 2010, 401: 70.
- [5] Onuki M, Matsumoto K, Satoh T, et al. Human papillomavirus infections among Japanese women: age-related prevalence and type-specific risk for cervical cancer[J]. Cancer Sci, 2009, 100(7): 1312.
- [6] Lai C H, Huang H J, Hsueh S, et al. Human papillomavirus genotype in cervical cancer: a population-based study[J]. Int J Cancer, 2007, 120(9): 1999.
- [7] Bouvard V, Baan R, Straif K, et al. A review of human carcinogens-Part B: biological agents[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(4):

- 321.
- [8]刘锡光,刘忠,田厚文,主编.人乳头瘤病毒感染及其防治[M].北京:人民卫生出版社,2009,225-229.
- Liu XG, Liu Z, Tian HW, chief editor. Infection and preventive of human papillomavirus[M]. First published. Beijing: People health publishing company, 2009, 225-229.
- [9]Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, et al. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16[J]. Virology, 1991, 184(1): 101.
- [10]Mayrand MH, Coutlee F, Hankins C, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in consecutive genital samples does not always represent persistent infection as determined by molecular variant analysis[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 3388.
- [11]Schiffman M, Rodriguez AC, Chen Z, et al. A Population-Based Prospective Study of Carcinogenic Human Papillomavirus Variant Lineages, Viral Persistence, and Cervical Neoplasia[J]. Cancer Res, 2010, 70: 3159.
- [12]Sichero L, Ferreira S, Trottier H, et al. High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18[J]. Int J Cancer. 2007; 120: 1763.
- [13]马正海,张富春,梅新娣,等.新疆南部地区维吾尔族妇女宫颈癌组织中乳头状瘤病毒 16 型 L1 基因突变谱分析[J].中华医学杂志, 2004, 84(12): 987.
- Ma ZH, Zhang FC, Mei XD, et al. Analysis of Human Papillomavirus 16 E6 Oncogene Mutation in Xinjiang Uygur Women with Cervical Carcinoma[J]. Chinese Medical Journal, 2004, 84(12): 987.

(收稿日期:2012-03-21)

文章编号:1007-4287(2013)05-0798-04

颗粒型环瓜氨酸肽抗原的制备及条件优化

付琳¹, 袁宇容¹, 姜云飞², 夏佳音², 王海芳¹

(1. 南方医科大学南方医院临床检验中心, 广东 广州 510515; 2. 广州市哈毕特实验仪器有限公司, 广东 广州 510730)

摘要:目的 探讨颗粒型环瓜氨酸肽抗原的制备方法, 并对实验条件进行优化。方法 通过碳二亚胺交联法将人工合成的 CCP 与 BSA 共价偶联, 使偶联产物蛋白大小在 70-170 KD 之间, 经紫外吸收光谱鉴定偶联成功。采用碳二亚胺两步法将偶联成功的 CCP 与 BSA 复合物又与聚苯乙烯微球偶联, 优化偶联条件, 根据蛋白偶联量和偶联效率判断偶联效果。结果 (1)BSA 与 CCP 偶联质量比为 1:1, EDC 与 NHS 用量比为 2:3, 偶联 pH 为 6.0, BSA 与 CCP 偶联可以达到较好的效果。BSA 与 CCP 偶联产物在 70 KD-170 KD 之间, 紫外吸收峰有明显左移。(2)微球与偶联蛋白的吸附效率随着 EDC 用量的增大而增大, 当 EDC 用量达到 7.5 mg/ml 时, 偶联蛋白最大效率达到 63.66%。(3)随着偶联时间的延长, 蛋白偶联微球的效率不断增加, 在偶联时间为 0.5-2 h 内, 偶联效率增加最快, 当反应时间 2 h 后, 反应趋于平衡。(4)对不同偶联反应 pH 值条件进行筛选, pH 为 7.5 时偶联效果最好, pH 7.0-8.0 为适宜偶联的 pH 范围。结论 CCP-BSA 偶联产物蛋白与胶乳颗粒偶联, 当 EDC 浓度为 7.5 mg/ml, 偶联时间为 2 h, 反应 PH 值为 7.5, 蛋白偶联效率可达到 63.66%。

关键词:环瓜氨酸肽; 胶乳颗粒; 化学偶联**中图分类号:**R392**文献标识码:**A

Preparation of particulate cyclic citrullinated peptide antigens and optimization of experimental conditions FULin¹, QIU Yu-rong¹, JIANG Yun-fei², et al. (1. Department of Clinical Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 2. Guangzhou Habit Experimental Instruments, Inc)

Abstract: Objective To investigate the preparation method of particulate cyclic citrullinated peptide antigens, and optimize the experimental conditions. **Methods** The artificially synthesized CCP was covalent coupled with BSA by the method of carbodiimide cross-linking, and the protein sizes of the coupled products were between 70 to 170 KD. The covalent coupling was tested by ultraviolet absorption spectrum. Then the successful coupling complex of BSA and CCP were covalently coupled to the microspheres, and the coupling conditions were optimized. The covalent coupling effect