

结核分枝杆菌4种新抗原的克隆表达及血清学评价

罗巧 李霜君 肖彤洋 李马超 刘海灿 楼永良 万康林

325035 温州医科大学检验医学院生命科学学院(罗巧、李霜君、楼永良、万康林);
102206 北京, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所 传染病预防控制国家重点实
验室 感染性疾病诊治协同创新中心(肖彤洋、李马超、刘海灿、万康林)

通信作者:万康林, Email:klwan1217@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2018.04.026

【摘要】 目的 初步评价结核分枝杆菌4种新抗原Rv0432、Rv0674、Rv1566c和Rv1547的血清学诊断价值。方法 以结核分枝杆菌实验室标准参照菌株H37Rv全基因组DNA为模板PCR扩增Rv0432、Rv0674、Rv1566c基因的完整序列,Rv1547基因分为两段(Rv1547-1和Rv1547-2)扩增,与PET-32a表达载体构建重组质粒,重组蛋白利用亲和层析的方法进行纯化。待检测血清和BL21(DE3)菌体蛋白孵育进行预处理。各重组抗原用ELISA对151份待检血清(41份健康组血清和110份细菌学阳性结核患者组血清)进行IgG抗体检测。检测结果用受试者工作特征曲线对其诊断效能进行分析和评价。采用t检验比较目的蛋白在结核患者组和健康组的差异性。结果 成功克隆表达和纯化了蛋白Rv0432、Rv0674、Rv1566c、Rv1547-1和Rv1547-2,ELISA结果显示Rv0432、Rv0674、Rv1566c、Rv1547-1和Rv1547-2的敏感性、特异性、阳性预测值、阴性预测值、约登指数和曲线下面积分别为43.64%~92.73%、80.49%~92.68%、0.92~0.94、0.38~0.80、0.363~0.732和0.649~0.915。目的蛋白在结核组检测到的IgG抗体水平平均大于健康组($P<0.0001$)。结论 结核分枝杆菌新抗原Rv0432、Rv0674、Rv1566c、Rv1547-1和Rv1547-2具有良好的血清学检测价值,可作为结核病免疫学诊断的候选抗原。

【关键词】 结核分枝杆菌; 抗原; 免疫学诊断; 酶联免疫吸附试验

基金项目: 国家科技重大专项(2013ZX10003006-002-001)

Cloning expression and serological evaluation on *Mycobacterium tuberculosis* four new antigens

Luo Qiao, Li Shuangjun, Xiao Tongyang, Li Machao, Liu Haican, Lou Yongliang, Wan Kanglin

School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China (Luo Q, Li SJ, Lou YL, Wan KL); State Key Laboratory for Infectious Diseases Prevention and Control, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China (Xiao TY, Li MC, Liu HC, Wan KL)

Corresponding author: Wan Kanglin, Email: wankanglin@icdc.cn

【Abstract】 **Objective** To evaluate the serological diagnostic value of *Mycobacterium (M.) tuberculosis* four new antigens Rv0432, Rv0674, Rv1566c and Rv1547. **Methods** Rv0432, Rv0674, Rv1566c and Rv1547 were amplified from *M. tuberculosis* strain H37Rv genomic DNA by using PCR, among which Rv1547 was divided into two segments for amplification (Rv1547-1 and Rv1547-2). The segments were cloned into expression vector PET-32a while the recombinant proteins were purified by affinity chromatography. Serums were incubated with BL21 (DE3) proteins. Antibodies IgG against *M. tuberculosis* were tested with 151 serum samples (41 healthy people and 110 TB patients) by using ELISA. The diagnostic efficiency of antigens was analyzed by means of receiver operating characteristic curve. Difference of the objective proteins in TB patients and healthy controls was compared by t-test. **Results** Recombinant antigens Rv0432, Rv0674, Rv1566c, Rv1547-1 and Rv1547-2 were successfully expressed and purified. Results from ELISA showed that the sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, Youden index and area under the curve of Rv0432, Rv0674, Rv1566c, Rv1547-1 and Rv1547-2, as 43.64%-92.73%, 80.49%-92.68%, 0.92-0.94, 0.38-0.80, 0.363-0.732 and 0.649-0.915. All the objective proteins showed significantly higher antibody levels in TB patients, when compared to the healthy controls ($P<0.0001$). **Conclusion**

The newly identified antigens Rv0432, Rv0674, Rv1566c, Rv1547-1 and Rv1547-2 all performed well when being used for TB serological diagnosis, thus were expected to be new candidate antigens used for TB diagnosis.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Antigen; Immunological diagnosis; ELISA

Fund program: National Science and Technology Major Project of China (2013ZX10003006-002-001)

结核病诊断缺乏有效特异方法是其防控的主要问题之一。血清学诊断由于简便、快捷、成本低、灵敏性和特异性较高广泛用于结核病的早期诊断^[1]。目前市购血清学诊断试剂盒敏感性和特异性存在很大差异,分别为10%~90%和47%~100%^[2]。因此筛选结核分枝杆菌高灵敏性和高特异性抗原成分,是解决结核病早期发现、快速诊断的关键途径。本研究通过分子克隆的方法表达结核分枝杆菌抗原Rv0432、Rv0674、Rv1566c、Rv1547-1和Rv1547-2,并采用ELISA对其抗原性进行初步评价,为结核病早期诊断和疫苗研制提供相关数据。

材料与方

1. 材料:

(1)菌种和载体:结核分枝杆菌标准株H37Rv、PET-32a质粒由传染病预防控制国家重点实验室提供,感受态细胞DH5α、BL21(DE3)购自北京全式金生物技术有限公司。

(2)血清来源:41份健康志愿者(健康组)阴性血清由中国CDC传染病预防控制所提供;110份结核病患者(结核组)血清分别由北京市朝阳区结核病防治所(45份)和北京市昌平区结核病防治所(65份)提供。本研究以纳入的肺结核病患者痰细菌学阳性(痰涂片和/或痰培养阳性)为金标准。

(3)主要试剂:限制性内切酶及T4 DNA连接酶购自New England Biolabs公司;各种纯化回收试剂盒、可溶性单组分TMB底物溶液购自天根生化科技有限公司;异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)购自Amresco公司;XK-26层析柱、Streamline Chelating购自GE

公司;BCA蛋白定量试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

2. 方法:

(1)目的蛋白的基因重组:通过NCBI网站检索下载目的基因Rv0432、Rv0674、Rv1566c和Rv1547的DNA序列,使用Primer 5.0软件设计引物(北京擎科新业生物技术有限公司合成)见表1。其中Rv1547基因片段过长,不易克隆表达,用在线的表位序列预测软件对原始的氨基酸序列进行预测,在遵守33制编码原则的基础上,将该抗原分段表达,编号为Rv1547-1和Rv1547-2。以结核分枝杆菌标准株H37Rv全基因组DNA为模板,对经PCR扩增到的目的基因和质粒PET-32a分别进行双酶切,在T4 DNA连接酶的作用下16℃过夜连接,重组质粒转化到DH5α感受态细胞,接种于含氨苄青霉素(100 μg/ml)的LB固体培养基上。挑取生长良好的单菌落PCR和测序验证。对测序比对结果100%的阳性克隆提取重组质粒,转化到BL21(DE3)感受态细胞,培养重组菌,待A值达到0.6~0.8时,加入IPTG(终浓度1 mmol/L),37℃诱导表达3 h或16℃过夜诱导,收集菌体进行SDS-PAGE验证。

(2)目的蛋白的表达纯化:大量诱导重组菌,菌体超声破碎后采用GE公司的XK纯化柱和层析填料对目的蛋白进行纯化,目的蛋白的纯化采用咪唑梯度洗脱的方式,对纯化后的目的蛋白用SDS-PAGE验证,并用BCA定量试剂盒测定浓度,经0.22 μm滤器过滤后-70℃低温保存。

(3)血清预处理:血清样本通过和大肠埃希菌(*E. coli*)蛋白吸附,去除非特异性抗体。*E. coli* BL21

表1 目的基因引物信息

目的基因	引物序列(5'~3')	酶切位点	基因长度(bp)	退火温度(℃)
Rv0432	F:CGCGGATCCATGCCAAAGCCCGCCGATCACC R:CCAAGCTTCTAGCCGGAACCAATGACACCGC	BamH I Hind III	723	61.9
Rv0674	F:CGCGGATCCATGCCGGCCATGACCGCCCGTTCCG R:CCAAGCTTTCATGTCACCTCCAGGAGTTGAG	BamH I Hind III	723	58.0
Rv1566C	F:CGCGGATCCATGAAACGCAGCATGAAAAG R:CCAAGCTTTTAGCGTGAGCGCGCGGTGC	BamH I Hind III	693	66.1
Rv1547-1	F:CCGGAATTCATGAGCGGTTTCATCTGCGGG R:CCAAGCTTGGCCTCGCACGCCGGGTAATCCCA	EcoR I Hind III	1 740	58.0
Rv1547-2	F:CGCGGATCCATCGGTCTGCTGAAAATGGACTT R:CCAAGCTTCTAACTCCCCAGACATCCAG	BamH I Hind III	1 815	58.0

注:F为上游引物,R为下游引物,下划线部分为目的基因酶切位点

(DE3)在无抗生素的LB液体培养基中37℃摇菌150 ml。收集菌体后,溶解在5 ml TE(pH 8.0)缓冲液中,超声破碎后离心收集上清,取151份待检血清各45 μl,分别加入405 μl PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)和250 μl BL21菌体溶液,室温孵育5 h,孵育后的血清-20℃存放。

(4)ELISA评价目的蛋白的抗原性:用包被缓冲液把目的蛋白稀释成5 μg/ml和10 μg/ml,每孔100 μl,4℃包被过夜。PBST(0.01 mol/L PBS, 0.05% Tween-20, pH 7.4)洗板后3% BSA封闭酶标板,37℃反应2 h。PBST洗板后,阴阳性血清稀释度参考Li等^[3]的方法,用PBS稀释到最终浓度为1:400,每孔200 μl,同时设定空白对照孔,37℃反应1 h。PBST洗板后将二抗(HRP标记的羊抗人IgG)用PBS做1:5 000、1:7 500、1:10 000、1:12 500和1:15 000梯度稀释后每孔100 μl与不同的抗原包被浓度组成方阵,37℃反应50 min。PBST洗板后每孔100 μl TMB显色液,37℃避光显色15 min,每孔100 μl硫酸(2 mol/L)终止反应。用主波长450 nm、副波长630 nm的酶标仪测定各孔的A值。使用测得的A值计算每个方阵组的P/N值,选择P/N值最大时对应的抗原包被浓度和二抗稀释度为最佳的抗原包被浓度和二抗稀释度。采用最佳的抗原包被浓度和二抗稀释度检测151份血清的A值。

3. 统计学分析:运用MedCalc 15.10软件分析151份血清的A值,绘制受试者工作特征曲线(ROC);计算不同抗原的最佳临界值(cut-off value)并以此判断重组蛋白的敏感性和特异性;用Prism 5.0软件绘制目的蛋白健康组与结核组的血清IgG抗体散点图,用t检验比较两组血清IgG水平。

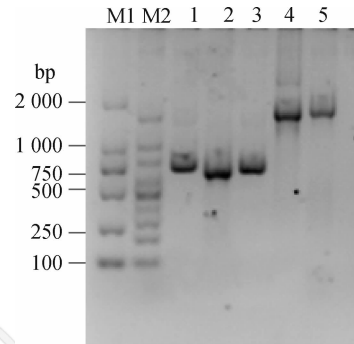
结 果

1. 目的蛋白的基因重组:以结核分枝杆菌标准株H37Rv全基因组DNA为模板,特异性扩增得到目的基因产物,如图1所示,特异性条带与目的基因大小相符。挑选经PCR鉴定为阳性的单克隆菌落,培养后送测序,测序结果与NCBI基因库中标准序列进行BLAST(basic local alignment search tool)比对,结果均为100%。

2. 目的蛋白的表达和纯化:图2显示将基因序列比对结果100%的重组质粒导入BL21(DE3),经IPTG诱导,获得了高效表达;经大量诱导表达超声破碎细菌后,采用镍离子亲和层析,获得纯化目的蛋白。

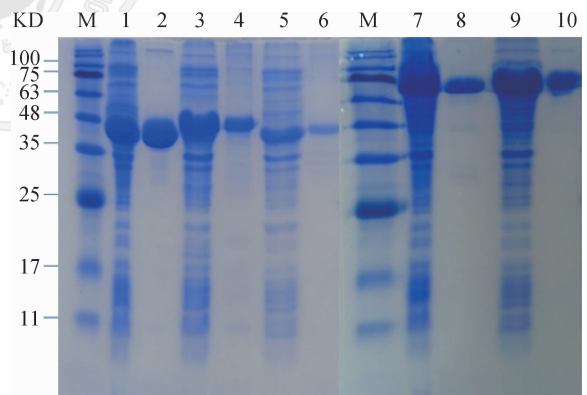
3. 重组目的蛋白的抗原性评价:纯化后的蛋白

用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。综合棋盘滴定的结果,蛋白的最佳包被浓度为10 μg/ml,二抗的最佳稀释度为1:5 000。用纯化重组的蛋白作抗原,ELISA检测血清IgG抗体,结果经MedCalc软件分析得到ROC、cut-off值、敏感性、特异性、约登指数及曲线下面积(AUC)(图3、表2)。Rv0674的敏感性、阴性预测值、约登指数和AUC为最大,分别为92.73%、0.8、0.732、0.915;Rv1566c的特异性最大为92.68%;Rv1566c和Rv1547-1的阳性预测值最大为



注:M1(bp)为DNA Marker;M2从自上至下依次为1 500、1 000、800、600、500、400、300、200、100 bp;1~5分别为Rv0432、Rv1566c、Rv0674、Rv1547-1、Rv1547-2

图1 目的基因PCR扩增



注:M为蛋白分子Marker;1、3、5、7、9分别为诱导表达的重组蛋白Rv0674、Rv1566c、Rv0432、Rv1547-1、Rv1547-2;2、4、6、8、10分别为纯化后的重组蛋白Rv0674、Rv1566c、Rv0432、Rv1547-1、Rv1547-2

图2 5个重组蛋白的克隆表达和纯化结果

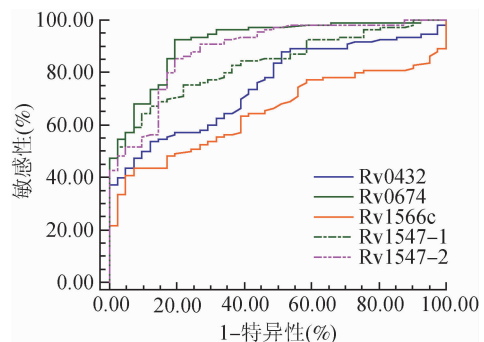


图3 目的蛋白的血清IgG抗体ELISA检测结果

表2 目的蛋白的血清IgG抗体ELISA检测结果

抗原	cut-off值	敏感性(%) ^a	特异性(%) ^a	阳性预测值 ^a	阴性预测值 ^a	约登指数	AUC($\bar{x}\pm s$)
Rv0432	0.159	53.60(59/110)	87.80(36/41)	0.92(59/64)	0.40(36/87)	0.414	0.751(0.193±0.157)
Rv0674	0.118	92.73(102/110)	80.49(33/41)	0.93(102/110)	0.80(33/41)	0.732	0.915(0.244±0.147)
Rv1566c	0.159	43.64(48/110)	92.68(38/41)	0.94(48/51)	0.38(38/101)	0.363	0.649(0.147±0.091)
Rv1547-1	0.243	67.27(74/110)	87.80(36/41)	0.94(74/79)	0.50(36/72)	0.551	0.834(0.307±0.190)
Rv1547-2	0.179	85.45(94/110)	80.49(33/41)	0.92(94/102)	0.67(33/49)	0.659	0.885(0.302±0.191)

注:^a括号内数据为血清份数; AUC为曲线下面积

0.94。目的蛋白健康组与结核组的血清IgG抗体水平分布散点图如图4所示,目的蛋白在结核组检测到的IgG抗体水平均大于健康组($P<0.0001$)。

讨论

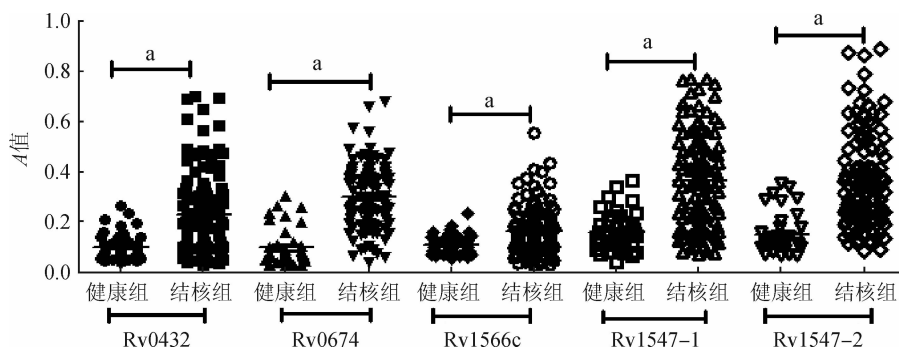
目前结核病的诊断方法有细菌学检查及分子、免疫学和临床诊断。其中痰涂片检查的含菌量必须 >5000 个/ml,才能获得阳性结果^[4];细菌培养检测敏感性稍高,可以达到100个活菌/ml,但耗时6~8周,且有10%~20%的阳性标本不能成功培养^[5];分子诊断方法灵敏性和特异性高,但费用高及实验室要求严格不利于基层推广。目前已有较多的结核抗原,如MPT-64、Ag85复合物和CFP-10/ESAT-6等用于血清学诊断和疫苗研究^[1,6-7],但灵敏性或特异性不理想,且也难以区分活动性肺结核、潜伏感染和卡介苗接种人群。因此亟需寻找更有效的抗原用于感染早期诊断和/或鉴别诊断。

本研究选取的结核分枝杆菌蛋白抗原均为经人B细胞表位预测筛选得出的新抗原,Rv0432编码蛋白SodC,是一种铜锌超氧化物歧化酶,在细胞内产生并对细胞有毒性;Rv0674编码蛋白Rv0674,其功能未知,可能为保守的假设蛋白;Rv1566c编码蛋白RipD,其功能未知,预测可能是外膜蛋白;Rv1547编码蛋白dnaE1,可能构成DNA聚合酶III(α 链),与信号通路有关^[8]。本研究克隆重组并纯化得到重组抗原SodC、Rv0674、RipD、Rv1547-1和Rv1547-2,纯化后的目的蛋白存在杂带,参考Li等^[3]研究,对151份

血清进行预处理,去除非特异性反应后,再用ELISA进行血清学评价。各重组抗原的AUC均 >0.5 ,Rv0674的约登指数为0.732,诊断效能较好。Rv1547-1和Rv1547-2约登指数分别为0.551和0.659,诊断效能一般。Rv0432和Rv1566c虽然敏感性和约登指数较低,但是特异性较高分别达到了87.80%、92.68%,仍具有一定的诊断价值。假阳性的发生可能与共同抗原所致的交叉反应、卡介苗接种、非结核分枝杆菌感染和结核分枝杆菌L型感染等因素有关,假阴性的发生可能与个体的免疫功能异常、患者体内产生特异性抗体与结核抗原形成免疫复合物和抗原本身敏感性低等因素有关。

有文献报道约1/3的结核病患者对任何单抗原的血清学反应为阴性^[9],如果将不同的抗原进行组合,理论上可以提高血清学的诊断效能^[7,10]。后期实验可以对重组蛋白进行联合诊断,提高诊断效能。由于本研究所用纯化蛋白杂带较多,虽然与大肠埃希菌蛋白吸附去除非特异性抗体,但是不利于后期血清学诊断试剂的开发或开展动物实验,应结合分子筛和离子交换等方法摸索实验条件得到更纯蛋白。由于血清样本有限,本文仅能对目的蛋白的血清反应进行初步评价,后续应扩大样本量同时加入其他肺部疾病患者血清,进一步评价重组蛋白的血清学诊断价值。

本研究对结核分枝杆菌Rv0432、Rv0674、Rv1566c、Rv1547-1和Rv1547-2重组蛋白进行克隆表达及血清学评价,诊断效能均较好,为结核分枝



注:^a $P<0.0001$

图4 目的蛋白健康组和结核组血清IgG水平分布

杆菌血清学诊断技术的研究提供了良好基础。

利益冲突 无

参 考 文 献

[1] Bekmurzayeva A, Sypabekova M, Kanayeva D. Tuberculosis diagnosis using immunodominant, secreted antigens of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Tuberculosis, 2013, 93 (4) : 381-388. DOI: 10.1016/j.tube.2013.03.003.

[2] Steingart KR, Ramsay A, Pai M. Commercial serological tests for the diagnosis of tuberculosis: do they work? [J]. Future Microbiol, 2007, 2(4):355-359. DOI:10.2217/17460913.2.4.355.

[3] Li YQ, Zeng JM, Shi JF, et al. A proteome-scale identification of novel antigenic proteins in *Mycobacterium tuberculosis* toward diagnostic and vaccine development[J]. J Proteome Res, 2010, 9 (9):4812-4822. DOI: 10.1021/pr1005108.

[4] Yeager Jr YH, Lacy J, Smith LR, et al. Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva [J]. Am Rev Respirator Dis, 1967, 95 (6) : 998-1004. DOI: 10.1164/arrd.1967.95.6.998.

[5] Andersen P, Munk ME, Pollock JM, et al. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis [J]. Lancet, 2000, 356 (9235) : 1099-1104. DOI:10.1016/S0140-6736(00)02742-2.

[6] Hur YG, Kim A, Kang YA, et al. Evaluation of antigen-specific immunoglobulin G responses in pulmonary tuberculosis patients and contacts[J]. J Clin Microbiol, 2015, 53 (3) : 904-909. DOI: 10.1128/JCM.03050-14.

[7] Pukazhvanthen P, Anbarasu D, Basirudeen SAK, et al. Assessing humoral immune response of 4 recombinant antigens for serodiagnosis of tuberculosis [J]. Tuberculosis, 2014, 94 (6) : 622-633. DOI: 10.1016/j.tube.2014.09.006.

[8] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [J]. Nature, 1998, 393 (6685) : 537-544. DOI: 10.1038/31159.

[9] Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, et al. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis [J]. Infect Immun, 1998, 66 (8) : 3936-3940.

[10] Raja A, Ranganathan UD, Bethunaickan R. Improved diagnosis of pulmonary tuberculosis by detection of antibodies against multiple *Mycobacterium tuberculosis* antigens [J]. Diag Microbiol Infect Dis, 2008, 60 (4) : 361-368. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2007.11.006.

(收稿日期:2017-09-12)

(本文编辑:张林东)

中华预防医学会流行病学分会第七届委员会名单

(按姓氏笔画排序)



- | | | | | | | | | | | |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 主任委员 | 李立明 | | | | | | | | | |
| 副主任委员 | 刘天锡 | 杨维中 | 吴凡 | 何耀 | 汪华 | 胡永华 | 姜庆五 | 詹思延 | | |
| 常务委员 | 王岚 | 叶冬青 | 余宏杰 | 汪宁 | 沈洪兵 | 陆林 | 陈坤 | 周晓农 | 赵根明 | 段广才 |
| | 贺雄 | 唐金陵 | 曹务春 | 崔莹林 | | | | | | |
| 委员 | 于雅琴 | 么鸿雁 | 王岚 | 王蓓 | 王开利 | 王文瑞 | 王定明 | 王素萍 | 王效俊 | 仇小强 |
| | 叶冬青 | 冯子健 | 毕振强 | 吕筠 | 庄贵华 | 刘天锡 | 刘殿武 | 闫永平 | 许汴利 | 严延生 |
| | 杜建伟 | 李丽 | 李琦 | 李凡卡 | 李申龙 | 李立明 | 李亚斐 | 李俊华 | 李增德 | 杨维中 |
| | 吴凡 | 吴先萍 | 邱洪斌 | 何耀 | 何剑峰 | 余宏杰 | 汪宁 | 汪华 | 沈洪兵 | 张晋 |
| | 张颖 | 陆林 | 陈坤 | 陈可欣 | 陈维清 | 岳建宁 | 周宝森 | 周晓农 | 单广良 | 孟蕾 |
| | 项永兵 | 赵亚双 | 赵根明 | 胡东生 | 胡代玉 | 胡永华 | 胡志斌 | 胡国良 | 段广才 | 俞敏 |
| | 施榕 | 施国庆 | 姜晶 | 姜庆五 | 贺雄 | 贾崇奇 | 夏洪波 | 栾荣生 | 唐金陵 | 曹广文 |
| | 曹务春 | 崔莹林 | 董柏青 | 程锦泉 | 詹思延 | 蔡琳 | 戴江红 | 魏文强 | | |
| 秘书长 | 王岚 | | | | | | | | | |
| 副秘书长 | 吕筠 | | | | | | | | | |