

梅毒螺旋体四种膜蛋白 克隆重组表达和 ELISA 法建立的应用研究*

房笃智¹, 阳建², 杨荣志², 唐诚² (1. 深圳市宝安区人民医院检验科, 广东深圳 518109;
2. 深圳市宝安区沙井人民医院检验科, 广东深圳 518104)

摘要:目的 克隆 Tp0821, Tp0319, Tp0971 和 Tp0663 基因, 构建原核表达质粒, 进行重组蛋白的表达、纯化并用于检测梅毒病人血清抗体, 从而探讨 Tp0821, Tp0971, Tp0319 和 Tp0663 重组蛋白在 Tp 感染诊断中的作用, 丰富梅毒血清学诊断的候选抗原库。方法 从 Tp 库中筛选 Tp0821, Tp0319, Tp0971 和 Tp0663 四种膜蛋白, 通过生物信息学软件分析挑选优势抗原表位, 与 pQE32 载体进行连接分别构建 pQE32/Tp0821, pQE32/Tp0319, pQE32/Tp0971 和 pQE32/Tp0663 原核表达重组体; 进行体外克隆表达与纯化, 并分别以单一的 Tp0821, Tp0319, Tp0971, Tp0663 及四种重组蛋白嵌合抗原 (Tp0821-Tp0319-Tp0971-Tp0663) 为包被抗原建立间接 Tp-ELISA 方法, 以 TRUST 和 TPPA 法为对照, 检测 2013 年 1 月~2014 年 6 月深圳市宝安区人民医院门诊及住院 Tp 阴性患者 160 例和 Tp 阳性 83 例临床标本, 评价其在梅毒血清学诊断中的应用。结果 成功构建原核表达载体 pQE32/Tp0821, pQE32/Tp0319, pQE32/Tp0971 和 pQE32/Tp0663; 高效表达和纯化出各自相对分子质量的重组蛋白。建立的间接 Tp-ELISA 法检测 160 例 Tp 阴性和 83 例 Tp 阳性临床标本, 与 TPPA 相比, 敏感度分别为 85.5% (71/83), 84.3% (70/83), 89.2% (74/83), 81.9% (68/83) 及 95.2% (79/83), 特异度均为 100% (160/160), 符合率为 82.6%~95.7%。单一的 Tp0821, Tp0319, Tp0971 和 Tp0663 重组蛋白建立的 TP-ELISA 的阳性检出率 (85.5%, 84.3%, 89.2% 及 81.9%) 与 TPPA 法的阳性检出率 (100%) 比较差异有统计学显著性意义 ($\chi^2 = 24.5 \sim 31.8$, P 均 < 0.01), 而四种重组蛋白嵌合抗原建立的 TP-ELISA 的阳性检出率与 TPPA 法的阳性检出率比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.95$, $P < 0.05$)。结论 制备的 Tp0821, Tp0319, Tp0971 和 Tp0663 重组蛋白具有良好的免疫活性, 为进一步研究其在梅毒血清学诊断中的应用奠定一定的基础, 但以四种重组蛋白嵌合抗原建立的间接 Tp-ELISA 法进行 Tp 血清学诊断, 能提高其检测敏感度。

关键词:梅毒螺旋体; Tp0821; Tp0319; Tp0971; Tp0663; 酶联免疫吸附试验; 血清学试验

中图分类号:R377.1; R446.61 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2015)01-075-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2015.01.020

Cloning Recombinant Expression of Treponema Pallidum Four Kinds of Membrane Protein and Application of Establishing ELISA Method

FANG Du-zhi¹, YANG Jian², YANG Rong-zhi², TANG Cheng²

(1. Department of Clinical Laboratory, the Baoan District People's Hospital
of Shenzhen, Guangdong Shenzhen 518109, China; 2. Department of Clinical Laboratory,
the Shajing People's Hospital of Baoan District, Guangdong Shenzhen 518104, China)

Abstract: **Objective** To clone Tp0821, Tp0319, Tp0971 and Tp0663 gene, construct prokaryotic expression plasmid, the expression of recombinant proteins, purification and used to detect syphilis patients serum antibodies. To explore Tp0821, Tp0971, Tp0319 and Tp0663 recombinant protein in the diagnosis of Tp infection, rich library of candidate antigens syphilis serology diagnosis. **Methods** From Tp library screening Tp0821, Tp0319, Tp0971 and Tp0663 four kinds of membrane protein, through the analysis of the bioinformatics software selection advantage antigen epitope, connected with pQE32 carrier respectively built pQE32/Tp0821, pQE32/Tp0319, pQE32/Tp0971 and pQE32/Tp0663 prokaryotic expression recombinant; In vitro cloning, expression and purification and on single Tp0821, Tp0319, Tp0971, Tp0663 and four kinds of recombinant protein chimeric antigen (Tp0821-Tp0319-Tp0971-Tp0663) in order to establish the indirect Tp-envelope antigen ELISA method, based on TRUST and TPPA method comparison, detection collected from January 2013 to June 2014 in Shenzhen Baoan District People's Hospital outpatient and hospitalization Tp negative patients, 160 cases of positive specimens of 83 cases of clinical and Tp, and evaluated its application in the syphilis serology diagnosis. **Results** Successful constructed of prokaryotic expression vector pQE32/Tp0821, pQE32/Tp0319, pQE32/Tp0971 and pQE32/Tp0663. Efficient expressed and purified their relative molecular mass of recombinant proteins. Seted up Tp-indirect ELISA method to detect 160 cases of Tp negativepositive clinical specimens and 83 cases of Tp, and compared with TPPA, the sensitivity were 85.5% (71/83), 84.3% (70/83), 89.2% (74/83), 81.9% (68/83) and 95.2% (79/83) respectively, specificity was 100%

* 基金项目:深圳市宝安区科技局资助, 项目编号:2013151。

作者简介:房笃智(1981-),男,本科,主管技师,主要从事临床检验与免疫血库工作, E-mail:curious1997@163.com。

(160/160), and the coincidence rate was 82.6%~95.7%. Single Tp0821, Tp0319, Tp0971 and Tp0663 recombinant protein positive rate of TP-ELISA was established (85.5%, 84.3%, 89.2% and 81.9%) compared with TPPA method of positive detection rate (100%) had significant difference statistically significant ($\chi^2 = 24.5 \sim 31.8, P < 0.01$), and four kinds of recombinant protein chimeric antigen positive rate of TP-ELISA was established with the TPPA method the positive detection rate of comparative difference was statistically significant ($\chi^2 = 7.95, P < 0.05$). **Conclusion** Preparation Tp0821, Tp0319, Tp0971 and Tp0663 recombinant protein had good immune activity, for the further study of its application in the diagnosis of syphilis serology lay a certain foundation, but in four kinds of recombinant protein chimeric antigen based Tp Tp-indirect ELISA method for serological diagnosis, can improve the detection sensitivity.

Keywords: treponema pallidum; Tp0821; Tp0319; Tp0971; Tp0663; enzyme-linked immunosorbent assay; serological test

随着基因工程技术的迅速发展,使得基于重组抗原的血清学方法成为梅毒实验室诊断方法的发展趋势。但目前所建立的类似的检测方法无论在敏感度还是在特异度方面均无法和基于全菌抗原的梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)法相比。其主要原因就是覆盖的Tp抗原表位太少(目前用的主要为TpN47, TpN17, TpN15和TmPA四种抗原)。本研究瞄准这一症结所在,从Tp全基因库中挑选出经分析编码膜蛋白的四种候选基因:Tp0821, Tp0319, Tp0971和Tp0663作为我们的研究对象,选择其优势抗原表位区,进行新的Tp诊断候选抗原的筛选,丰富梅毒血清学诊断的候选抗原库,为研究特异度和敏感度更高的Tp血清学诊断方法打下基础,为早期梅毒的实验室诊断提供新的手段,提高早期梅毒的检出率,对于控制和预防梅毒蔓延至关重要。目前尚未见该四种重组蛋白的应用报道,我们对此进行了初步研究,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集2013年1月~2014年6月份本院体检科无梅毒病史的健康人血清160份,经梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(TPPA)和梅毒甲基红不加热血清反应素试验(TRUST)检测均为阴性;TPPA阳性的Ⅰ期或Ⅱ期梅毒患者血清83份,均来自本院门诊及住院患者。

1.2 主要试剂 TRUST试剂盒为上海荣盛生物技术有限公司产品,TPPA试剂盒为日本富士瑞必欧株式会社产品,M15由南华大学病原生物研究所提供。

1.3 方法

1.3.1 重组质粒的构建及鉴定:从GenBank中获取Tp0821, Tp0319, Tp0971和Tp0663基因的碱基序列及氨基酸序列,用TMPred在线程序作跨膜区分析,用ExPasy网上软件作抗原表位分析,综合两个指标,选择抗原性较强的外膜优势抗原表位区。设计扩增引物(由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。根据GenBank序列设计PCR扩增Tp0821, Tp0319, Tp0971和Tp0663基因引物。PCR扩增后,将扩增产物纯化、克隆至原核表

达载体pQE32上,然后将重组质粒pQE32/Tp0821, pQE32/Tp0319, pQE32/Tp0971和pQE32/Tp0663原核表达重组体转化至大肠埃希菌M15,挑取阳性克隆提取质粒进行PCR筛选,双酶切和测序(上海生工生物工程技术服务有限公司)鉴定。

1.3.2 重组蛋白的表达和纯化:将经确证的重组质粒pQE32/Tp0821, pQE32/Tp0319, pQE32/Tp0971和pQE32/Tp0663转化至大肠埃希菌M15中,挑取阳性克隆接种于含有100 mg/L氨苄西林和50 mg/L卡那霉素的LB培养液中,于37℃水浴振荡至 $A_{500\text{ nm}}$ 为0.4~0.6时,加入异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为1 mol/L进行诱导。5 h后离心收集菌体,加入溶菌酶于4℃过夜;反复冻融后超声裂菌,收集沉淀,用包涵体洗涤液洗涤3次;离心后取沉淀加入包涵体溶解液(0.1 mol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素, 5 mmol/L 二硫苏糖醇(DTr), pH8.0),室温孵育3 h,使包涵体充分溶解。待充分溶解后离心收集上清液上Ni-NTA亲和层析柱对重组蛋白进行纯化,纯化的重组蛋白采用SDS-PAGE分析。

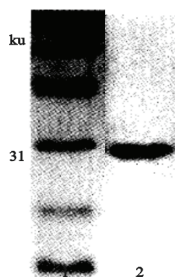
1.3.3 ELISA建立及临床标本的检测:将纯化后的Tp0821, Tp0319, Tp0971和Tp0663重组蛋白用pH9.6, 0.05 mol/L碳酸盐缓冲液配制至合适浓度(由棋盘滴定法确定)包被液,分别包被微孔酶标板(Corning公司产品),每孔100 μ l, 37℃温育2 h, 4℃过夜,次日用PBST(pH7.4)洗涤4次后用1 ml/dl的牛血清清蛋白4℃封闭过夜,真空干燥后4℃保存备用。加入待测血清37℃反应30 min,用PBS-0.2 TritonX-100洗涤5次,加入酶标记抗人IgG单克隆抗体37℃反应20 min,洗涤5次,经酶底物TMB显色,避光显色10 min,加终止液50 μ l终止反应。测 $A_{450\text{ nm}}$ 值,以160份健康人血清平均 $A_{450\text{ nm}} + 2s$ 为阳性临界值(cutoff)^[8]。用建立的Tp-ELISA法检测83份TPPA阳性梅毒患者血清和160份TPPA阴性血清,以 $A_{450\text{ nm}}$ 值>阳性界值为阳性。所有血清同时做TPPA试验,计算两种方法的检出率。

1.4 统计学分析 采用SPSS13.0统计软件分

析,检出率比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

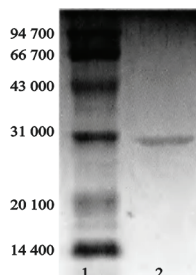
2 结果

2.1 纯化重组蛋白 SDS-PAGE 分析结果 将纯化后的 Tp0821, Tp0319, Tp0971 和 Tp0663 重组蛋白分别经 SDS-PAGE 电泳分析,各显示出单一清晰条带,分子质量与各预期值相符合,结果见图 1,图 2,图 3 和图 4。



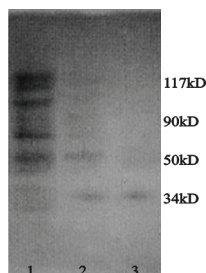
(1:蛋白质量标准;2:纯化 Tp0971 重组蛋白)

图 1 TP0971 重组蛋白 SDS-PAGE 分析



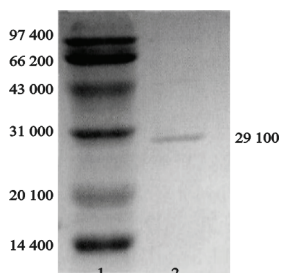
(1:标准参照物;2:纯化 TP0319 重组蛋白)

图 2 TP0319 重组蛋白 SDS-PAGE 分析



(1:纯化的 Tp0663 重组蛋白;2:buffer1 洗脱液;3:buffer2 洗脱液)

图 3 Tp0663 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析



(1:低分子标准参考物;2:纯化的 Tp0821 重组蛋白)

图 4 Tp0821 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

2.2 临床标本 Tp 特异度抗体检测结果 用单一 Tp0821, Tp0319, Tp0971 及 Tp0663 重组蛋白和四种重组蛋白嵌合抗原建立的 Tp-ELISA 检测 160 份健康人血清中 Tp 的 $A_{450\text{ nm}}$ 值为 0.122 ± 0.026 , 阳性临界值为 0.174。以此为标准,单一 Tp0821, Tp0319, Tp0971 和 Tp0663 重组蛋白及四种重组蛋白嵌合抗原建立的 Tp-ELISA 检测 83 例 TPPA 阳性的梅毒患者血清和 160 例 TPPA 和 TRUST 均为阴性的健康人血清,敏感度分别为 85.5% (71/83), 84.3% (70/83), 89.2% (74/83), 81.9% (68/83) 及 95.2% (79/83), 特异度均为 100% (160/160), 符合率为 82.6%~95.7%。单一 Tp0821, Tp0319, Tp0971 和 Tp0663 重组蛋白建立的 TP-ELISA 的阳性检出率 (85.5%, 84.3%, 89.2% 及 81.9%) 与 TPPA 法的阳性检出率 (100%) 比较差异有统计学显著性意义 ($\chi^2 = 24.5 \sim 31.8$, P 均 < 0.01), 而四种重组蛋白嵌合抗原建立的 TP-ELISA 的阳性检出率 (95.2%) 与 TPPA 法的阳性检出率比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.95$, $P < 0.05$)。

3 讨论 目前 Tp 体外培养尚未成功, 抗原来源困难, 限制了 Tp 诊断及致病机制的研究。近年来, 随着基因工程技术的迅速发展和 Tp 全基因序列的解析^[1], 几种 Tp 主要抗原已经被相继克隆表达出来, 为 Tp 的诊断和功能研究开辟了一条新的思路^[2,3]。

Tp 外膜蛋白和脂蛋白是 Tp 主要免疫原, 能诱导机体产生较强的免疫应答, 在 Tp 的致病中具有重要作用。Tp0821 为一种抗原性较强的 Tp 膜脂蛋白, 位于细胞外膜, 基因全长 807 bp, 编码 268 个氨基酸, 可能参与 Tp 蛋氨酸的转运系统; Tp0663 蛋白 (即 Tromp2 蛋白) 属跨膜外膜蛋白^[4], 位于细胞外膜, 基因全长 729 bp, 编码 242 个氨基酸, 可能有助于促进 Tp 感染后获得免疫, 具有较好的免疫原性和抗原性^[5,6]; Tp0971 是周质膜脂蛋白^[7,8], 属胞浆膜蛋白, 基因全长 615 bp, 编码 305 个氨基酸, 分子质量单位约为 22 ku; Tp0319 是 Tp 的特异度外膜蛋白。经 BLAST 分析以上四种不同膜蛋白均与其他细菌无同源性, 且抗原性较强, 均存在多个强抗原表位, 可避免诊断过程中的交叉反应。因此, 可以作为梅毒抗体检测的抗原候选分子。

pQE32 是一种可使所表达的外源重组蛋白都带上一个 6×组氨酸纯化标签的表达载体, 该组氨酸标签对表达的蛋白的合成、分泌、空间构象, 特别是免疫原性影响极小, 不会影响重组蛋白的结构和功能^[9]。本研究成功构建原核 (下转 81 页)

- intestinal bleeding[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2006, 22(5): 223-228.
- [5] 芦宏凯, 韩呈武, 刘海霞. 两种便潜血检测方法的评价与应用[J]. 现代检验医学杂志, 2011, 26(1): 114-116.
- Lu HK, Han CW, Liu HX. Evaluations and applications on two kinds detection methods of fecal occult blood[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2011, 26(1): 114-116.
- [6] 周强, 王忠英, 谢彩修, 等. 模拟消化道出血时大便潜血试验金标法的研究[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(24): 2689-2691.
- Zhou Q, Wang ZY, Xie CX, et al. Research on collo-

idal gold method of fecal occult blood testing in simulating gastrointestinal hemorrhage [J]. Laboratory Medicine and Clinic, 2010, 7(24): 2689-2691.

- [7] 杨有业, 张秀明. 临床检验方法学评价[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 142-167.
- Yang YY, Zhang XM. Clinical testing methodology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 142-167.
- [8] Linnet K, Kondratovich M. Partly nonparametric approach for determining the limit of detection[J]. Clin Chem, 2004, 50(4): 732-740.

收稿日期: 2014-05-20

修回日期: 2014-12-30

(上接 77 页) 表达载体 pQE32/Tp0821, pQE32/Tp0319, pQE32/Tp0971 和 pQE32/Tp0663, 并表达出相应蛋白, 将纯化后的 Tp0821, Tp0319, Tp0971 和 Tp0663 重组蛋白分别经 SDS-PAGE 电泳分析各显示出单一清晰条带, 分子质量与各预期值相符合。

TPPA 为梅毒实验室确诊常用方法。本研究用以上四种膜蛋白单一重组抗原及四种重组蛋白嵌合抗原包被液分别建立的各种 Tp-ELISA 检测临床标本, 并与 TPPA 法比较。本研究结果显示, 单一重组蛋白抗原建立的 Tp-ELISA 检测临床标本有良好的特异度、较高的灵敏度及较好的符合率, 但阳性检出率低于 TPPA, 差异有统计学意义, 这可能与 Tp-ELISA 以单一重组蛋白为诊断抗原, 覆盖抗原表位有限, 因而降低了检测的灵敏度, 而 TPPA 法以天然全螺旋体全抗原为诊断抗原及 TPPA 法检测的是总抗体(包括 IgM 和 IgG), 而本研究建立的 ELISA 法检测的是特异性 IgG 等有关, 而以四种重组蛋白嵌合抗原建立的 Tp-ELISA 法因覆盖抗原表位相对单一重组蛋白要多得多, 因此, 检测临床标本的灵敏度和符合率会更接近于 TPPA 法。因此, 构建多表位的嵌合重组蛋白能有效降低假阳性率和假阴性率, 若采用更为灵敏的检测方法(如双抗原夹心法检测总抗体), 更会提高梅毒感染的阳性检出率。

参考文献:

- [1] Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete[J]. Science, 1998, 281(5375): 375-388.
- [2] 赵飞骏, 吴移谋, 张晓红, 等. 梅毒螺旋体融合双价 DNA 疫苗的构建及其免疫活性的研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2006, 39(5): 250-253.
- Zhao FJ, Wu YM, Zhang XH, et al. Construction of fusion bivalent DNA vaccine of *Treponema pallidum* and its immune activity[J]. Chinese Journal Derma-

tology, 2006, 39(5): 250-253.

- [3] 严加林, 吴移谋, 赵飞骏, 等. 梅毒螺旋体 Gdp 重组蛋白的表达[J]. 中华皮肤科杂志, 2007, 40(5): 301-302.
- Yan JL, Wu YM, Zhao FJ, et al. *Treponema pallidum* Gdp expression of recombinant protein[J]. Chinese Journal Dermatology, 2007, 40(5): 301-302.
- [4] Champion CI, Blanco DRExner MM, Erdjument Brumage H, et al. Sequence analysis and recombinant expression of a 28-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* outer membrane protein (Tromp2) [J]. J Bacteriol, 1997, 179(4): 1230-1238.
- [5] Brinkman MB, McKevitt M, McLoughlin M, et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the *Treponema pallidum* proteome[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 888-891.
- [6] McKevitt M, Brinkman MB, McLoughlin M, et al. Genome scale identification of *Treponema pallidum* antigens[J]. Infect Immun, 2005, 73(7): 4445-4450.
- [7] Deka RK, Brautigam CA, Tomson FL, et al. Crystal structure of the Tp34(Tp0971) lipoprotein of *Treponema pallidum*; implications of its metal-bound state and affinity for human lactoferrin[J]. J Biol Chem, 2007, 282(8): 5944-5958.
- [8] 曾铁兵, 刘小军, 张跃军, 等. 梅毒螺旋体 Tp0971 重组蛋白的表达及其在梅毒血清学诊断中的初步评价[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 5(6): 411-413.
- Zeng TB, Liu XJ, Zhang YJ, et al. Expression of recombinant protein Tp0971 of *Treponema pallidum* and its assessment in syphilis serodiagnosis[J]. Chinese Journal of Pathogenic Biology, 2010, 5(6): 411-413.
- [9] 伍宁, 肖勇健, 顾伟鸣, 等. 梅毒螺旋体 Tp0821 基因的克隆、表达、纯化及免疫活性研究[J]. 中华皮肤科杂志, 2010, 43(7): 489-492.
- Wu N, Xiao YJ, Gu WM, et al. Gene cloning expression and purification of Tp0821, a membrane lipoprotein of *Treponema pallidum*[J]. Chinese Journal Dermatology, 2010, 43(7): 489-492.

收稿日期: 2014-11-16

修回日期: 2014-12-27