

三种结核分枝杆菌重组蛋白抗原血清学诊断价值的研究

阳幼荣 吴雪琼 赵卫国 张俊仙 梁艳 张翠英 李洪敏 王兰

【摘要】 目的 研究重组 ESTA6 (rESTA6)、CFP10 (rCFP10)、CFP10-ESTA6 (rCFP10-ESTA6) 三种结核分枝杆菌重组抗原在结核病血清学诊断中的应用价值。**方法** 检测 230 例肺结核、70 例非结核疾病及 200 例健康血清标本中抗结核抗体,应用 SPSS 18.0 对检测结果进行方差分析。**结果** 方差分析表明,rCFP10、rESAT6、rCFP10-ESAT6 三种抗原对肺结核、非结核疾病及健康人血清标本的检测结果显示有统计学意义 ($P < 0.05$),三种抗原检测肺结核病患者血清标本的敏感性分别为 31.3%、25.2%、34.8%,特异性分别为 94.8%、97.8%、95.6%。rCFP10 和 rESAT6 联合检测敏感性及特异性分别为 40.0% 和 93.0%;rCFP10 和 rESAT6 联合检测的 92 例阳性标本中,有 23 例 rCFP10-ESAT6 检测呈阴性;rCFP10-ESAT6 检测的 80 例阳性标本中,有 26 例 rCFP10 和 rESAT6 联合检测呈阴性。**结论** rCFP10-ESTA6 的结构与 rCFP10 和 rESTA6 的单体的结构可能不完全相同,rCFP10-ESTA6 抗原不能完全代替 rESTA6、rCFP10 两种抗原进行结核病的血清学实验室诊断。

【关键词】 抗原; 抗体; 血清学试验; 分枝杆菌,结核

Research on serodiagnostic value of three recombinant antigens from *M. tuberculosis* YANG You-rong, WU Xue-qiong, ZHAO Wei-guo, ZHANG Jun-xian, LIANG Yan, ZHANG Cui-ying, LI Hong-min, WANG Lan. Army Tuberculosis Key Laboratory, Institute of Tuberculosis Research, The 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China
Corresponding author: WU Xue-qiong, Email: wu-xueqiong@263.net

【Abstract】 Objective To evaluate the value of rESTA6, rCFP10 and rCFP10-ESTA6 protein from *M. tuberculosis* on the serodiagnosis of tuberculosis (TB). **Methods** The recombinant protein was expressed and purified by biotechnology. 230 cases of pulmonary tuberculosis patients, 70 cases of non tuberculous patients and 200 cases of healthy subjects sera were detected the antibodies against the antigens by ELISA. The data obtained were analyzed for ANOVA using SPSS 18.0 software package. **Results** The One-Way ANOVA showed that the level of anti-TB antibodies had significant difference ($P < 0.05$) between the three groups' serum. The sensitivities of rESTA6, rCFP10 and rCFP10-ESTA6 were 31.3%, 25.2% and 34.8%, the specificities were 94.8%, 97.8% and 96.0%, respectively. The sensitivities and specificities of combination antigens (rCFP10 and rESAT6) were 40.0% and 93.0%. In 92 combination antigens-IgG positive case there were 23 rCFP10-ESAT6-IgG negative ones, and 26 cases combination antigens-IgG negative in 80 CFP10-ESAT6-IgG positive. **Conclusions** The structure of rCFP10-ESTA6 is not completely as same as the rESTA6 and rCFP10, hence it can't replace the rCFP10 and rESTA6 in the serodiagnosis of TB.

【Key words】 Antigen; Antibody; Serodiagnosis; Mycobacterium tuberculosis

结核病是常见的呼吸道传染病之一,全球约有 20 亿人感染了结核分枝杆菌,其中有 2000 万人为结核病

患者。结核病血清学检测是目前临床上常用的辅助诊断方法^[1],其相关抗原的研究是目前研究的热点之一^[2-4]。研究证明编码早期分泌抗原靶 6 (early secretory antigenic target 6, ESTA6) 和培养滤液蛋白 10 (culture filter protein 10, CFP10) 两种蛋白的编码基因位于致病性分枝杆菌的 RD1 区,而 BCG 及其他非致病性分枝杆菌此分区缺失。因此,该两种抗原在结核病免疫学诊断中可能具有比较重要的意义。本文用基因工程方法获得 rESTA6、rCFP10、rCFP10-ESTA6 三种特异性蛋白并进行结核病临床诊断研究,为结核病血清学诊

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.02.024

基金项目:北京市科技计划研发攻关类科研基金 (D08050700640802);国家重大传染病防治科技重大专项基金 (2008ZX10003-001)

作者单位:100091 北京,解放军第 309 医院全军结核病研究所 军队结核病防治重点实验室(阳幼荣、吴雪琼、张俊仙、梁艳、张翠英、李洪敏、王兰),呼吸科(赵卫国)

通讯作者:吴雪琼,Email:wu-xueqiong@263.net

断研究奠定实验基础。

材料与方 法

1. 菌种和血清来源: rESTA6、rCFP10、rCFP10-ESAT6 大肠杆菌基因工程菌均由本课题组构建。230 例结核病患者血清来自全军结核病研究所经影像学或细菌学确诊肺结核的住院患者在抗结核治疗前的血清。其中,男 120 例,女 110 例,年龄 19 ~ 55 岁,平均年龄(33 ± 5)岁;70 例非结核病患者血清来自解放军第 309 医院呼吸科肺炎、支气管炎等非结核病的住院患者刚入院时的血清标本。其中,男 37 例,女 33 例,年龄 25 ~ 62 岁,平均年龄(37 ± 5)岁;200 例正常人血清来自入伍新战士的体检血清,均为男性,年龄 18 ~ 21 岁,平均年龄(19 ± 1)岁。

2. 重组蛋白的诱导表达及纯化:将 rESTA6、rCFP10、rCFP10-ESAT6 大肠杆菌工程菌接种于含卡那霉素 50 μg/ml 的 LB 液体培养基中,37 °C 培养至 600 nm 处光密度为 0.8 左右时,诱导表达 4 h 收集菌体,按《分子克隆实验指南》^[5]介绍的方法提取包涵体,用 Novagen 公司生产的 His. Bind 蛋白纯化试剂盒进行蛋白纯化。通过 Lowry 法^[6]测定蛋白含量,除菌过滤后置 -20 °C 贮存备用。

3. 应用 ELISA 方法检测血清中抗结核抗体:分别将三种重组结核分枝杆菌蛋白(10 μg/ml)包被于 96 孔酶标板上,4 °C 过夜;用含 1% 牛血清白蛋白的磷酸盐缓冲液(PBS),37 °C 封闭 1 h;用含 0.05% Tween 20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗液洗涤 3 次;加入 1:100 倍稀释的待检血清,37 °C 温育 1 h;用 PBST 洗液洗涤 3 次;加入 1:10 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG,37 °C 温育 1 h;再用 PBST 洗液洗涤 3 次;加入邻苯二胺和 H₂O₂ 底物显色 30 min,以 2 mol/L 硫酸终止反应。以空白对照调校零点,用酶联免疫检测仪测定 492 nm 的 OD 值,取两孔平均值作为终结果。

4. 统计学分析:应用 SPSS 18.0 统计软件处理数据。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。并计算敏感性和特异性。

5. 阳性界值确定:分别以三种抗原检测健康对照组血清标本的均值加 2 倍标准差为结核病诊断的阳性界值。

结 果

1. rESTA6、rCFP10、rCFP10-ESAT6 蛋白的纯化:纯化后的重组蛋白 SDS-PAGE 分析显示只见一条回收的蛋白带,未见其他杂带,经光密度扫描分析表明其纯度约为 95% 左右,见图 1。

2. 血清中抗结核抗体的检测:结核组三种抗体水平显著高于健康对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),非结核对照组三种抗体水平与健康对照组差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。rCFP10、rESAT6、rCFP10-ESAT6 融合蛋白检测结核的敏感性分别为 31.3% (72/230)、25.2% (58/230) 和 34.8% (80/230),特异性分别为 94.8% (256/270)、97.8% (264/270)% 和 95.6% (258/270);将 rCFP10 和 rESAT6 联合用于标本检测敏感性及特异性分别为 40.0% (92/230) 和 93.0% (251/270)。rCFP10 和 rESAT6 联合检测的 92 例阳性标本中,有 23 例 rCFP10-ESAT6 检测呈阴性;rCFP10-ESAT6 检测的 80 例阳性标本中,有 26 例 rCFP10 和 rESAT6 联合检测呈阴性。

讨 论

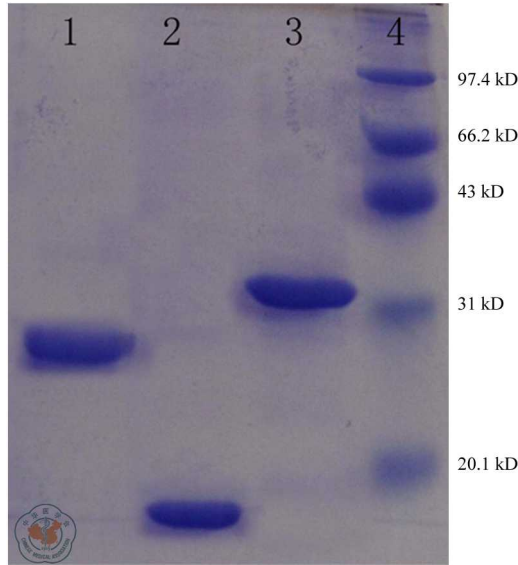
编码 CFP10 和 ESAT6 的基因都位于 RD1,仅存在致病性分枝杆菌,它们由一个启动子和操纵子调控,同时进行转录表达。由于 CFP10 和 ESAT6 都是小分子分泌蛋白,可被疾病早期的人和动物免疫系统识别,刺激机体产生较强的体液免疫,rCFP10、rESAT6、rCFP10-ESAT6 三种抗原的血清学诊断价值已有评价^[7-9],但将三者的应用价值进行比较尚未见报道,本文将 rCFP10、rESAT6、rCFP10-ESAT6 三种抗原用于检测血清中抗结核抗体以探索它们在血清学诊断中的价值。

研究表明将三种抗原用于抗体检测特异性都在 94% 以上,敏感性在 30% 左右,值得注意的是抗融合蛋白阳性标本并不是抗两个单体蛋白阳性标本的叠加,rCFP10、rESAT6 阳性标本中的一部分对 rCFP10-ESAT6

表 1 各组血清抗结核抗体检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	抗结核抗体(OD492)		
		CFP10	ESAT6	CFP10-ESAT6 融合
健康对照组	200	0.0448 ± 0.0351	0.0329 ± 0.0406	0.0487 ± 0.0435
结核组	230	0.1462 ± 0.2421 ^a	0.1024 ± 0.1531 ^a	0.1763 ± 0.2910 ^a
非结核疾病对照组	70	0.0504 ± 0.0412 ^b	0.0353 ± 0.0242 ^b	0.0634 ± 0.0682 ^b

注:与健康对照组比较,^a $P < 0.05$,^b $P > 0.05$;CFP10 阳性界值为 0.1150,ESAT6 阳性界值为 0.1141,CFP10-ESAT6 融合阳性界值为 0.1357



注: 1为rCFP10纯化蛋白; 2为rESTA6纯化蛋白;
3为rCFP10-ESTA6纯化蛋白; 4为蛋白质低分子量标准

图1 三种重组蛋白的SDS-PAGE

呈阴性;同样, rCFP10-ESTA6 阳性标本中的一部分对 rCFP10、rESAT6 呈阴性,由此可见 rCFP1-ESTA6 融合蛋白的结构与 rCFP10、rESTA6 的结构不完全相同。其原因可能是天然的 ESAT6 和 CFP10 以紧密的异二聚体形式存在^[10],而原核表达系统由于缺少一些与蛋白修饰相关的酶类,表达产物与天然存在的物质不会完全相同,但 CFP10 肽链部分与 ESAT6 肽链部分之间相互影响,可能会形成一些接近天然产物的正确结构,也可能原本正确的结构遭到破坏,其抗原表位可能会与单体抗原表位有一定的差别,从而导致血清中的抗体识别 rCFP10、rESTA6 和 rCFP10-ESAT6 的差别,由此可见 rCFP10-ESAT6 抗原不能完全替代 rCFP10、rESTA6 两种抗原。

参 考 文 献

[1] 张舒林,王洪海. 结核分枝杆菌特异性抗原检测的研究现状及展望. 中国热带医学, 2008, 2:299-301.
[2] 毕爱笑,丁元生,刘忠华,等. 结核分枝杆菌 Rv3872 基因的克隆、表达和纯化[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版,2008, 2:43-46.
[3] Wu X, Yang Y, Zhang J, et al. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from Mycobacterium tuberculosis. Clin Chim Acta,

2010, 411:1520-1528.
[4] 阳幼荣,吴雪琼,张俊仙,等. 结核分枝杆菌 38KD 重组蛋白的纯化及血清学诊断应用价值的研究. 中国现代医学杂志,2008, 18: 426-427.
[5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 2 版. 北京: 科学出版社,1992,358-360.
[6] 陈执中,章月华. 现代生化药物与基因工程药物分析. 上海:上海医科大学出版社,2000;265-266.
[7] Kumar G, Dagur PK, Singh PK, et al. Serodiagnostic efficacy of mycobacterium tuberculosis 30/32-kDa mycolyl transferase complex, ESAT-6, and CFP-10 in patients with active tuberculosis. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2010, 58:57-65.
[8] Wu X, Yang Y, Zhang J, et al. Humoral immune responses against the mycobacterium tuberculosis 38-Kilodalton, MTB48, and CFP-10/ESAT-6 antigens in tuberculosis. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17: 372-375.
[9] 郭旻,范学文. 结核分枝杆菌早期分泌抗原 ESAT-6 对结核性脑膜炎诊断价值的研究. 宁夏医学杂志,2011, 33:3-5.
[10] Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. EMBO J, 2005, 24:2491-2498.

(收稿日期:2011-06-23)

(本文编辑: 戚红丹)