

·基础研究·

结核分枝杆菌分泌蛋白 Ag85B、Hsp16.3 和 ESAT6 在血清学检测中的初步应用*

张彩勤 张 海 赵 勇 毛峰峰 赵善民 杨 巍 白 冰 师长宏[△]

(第四军医大学实验动物中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 探讨结核分枝杆菌分泌蛋白 Hsp16.3、Ag85B 以及融合蛋白 ESAT6-CFP10、Ag85B-Hsp16.3 和 Ag85B-ESAT6 用于 TB 病人血清学检测的意义。**方法:** 将已构建的含 5 种目的基因的表达载体(pProEXHTb-Hsp16.3、pProEXHTa-Ag85B、pProEXHTb-ESAT6-CFP10、pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3、pProEXHTa-Ag85B-ESAT6), 分别转入宿主菌 E.coli DH5 α 中, 诱导表达后分别获得 Hsp16.3、Ag85B、ESAT6-CFP10、Ag85B-Hsp16.3 和 Ag85B-ESAT6 五种蛋白, 采用 Ni²⁺ 亲和层析柱进行纯化, 并用透析方法进行蛋白的复性。将经过复性的 5 种蛋白分别作为抗原, 采用间接 ELISA 方法检测待测的血清样本, 经 OPD 显色, 测定各孔 OD490 值并判定结果。**结果:** 五种蛋白被成功纯化并复性, 通过 ELISA 方法共检测了 22 例 TB 病人血清、10 例非结核病人血清和 6 例正常对照血清, Hsp16.3、Ag85B、ESAT6-CFP10、Ag85B-Hsp16.3 和 Ag85B-ESAT6 这 5 种抗原的灵敏度分别为 36.4 %、90.9 %、77.3 %、95.5 %、100 %, 特异性分别为 100 %、75 %、100 %、93.8 %、93.8 %。统计分析显示, ESAT6-CFP10 和 Ag85B、Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6 这三种蛋白 ELISA 检测的结果无差异, 而与 Hsp16.3 和痰涂片检测结果有显著差异。**结论:** Ag85B-Hsp16.3 和 Ag85B-ESAT6 可作为结核分枝杆菌 ELISA 检测的初选抗原。

关键词: 结核分枝杆菌; Ag85B; Hsp16.3; ESAT6; 酶联免疫吸附测定

中图分类号: R378.911, Q93.331, Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)03-401-04

Application of Ag85B, Hsp16.3 and ESAT6 of Mycobacterium Tuberculosis in Serological Detection*

ZHANG Cai-qin, ZHANG Hai, ZHAO Yong, MAO Feng-feng, ZHAO Shan-min, YANG Wei, BAI Bing, SHI Chang-hong[△]

(Laboratory Animal Center of the Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the significance of Hsp16.3, Ag85B, ESAT6-CFP10, Ag85B-Hsp16.3 and Ag85B-ESAT6 of Mycobacterium tuberculosis (MTB) in the serological detection. **Methods:** The five recombinant plasmids (pProEXHTb-Hsp16.3, pProEXHTa-Ag85B, pProEXHTb-ESAT6-CFP10, pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3 and pProEXHTa-Ag85B-ESAT6) were transferred into E.coli DH5 α , respectively. The five proteins were induced by IPTG and purified by Ni-NTA purification system under denaturing condition. Following by renaturation of dialysis, the five proteins were used as antigen to detect sera of 22 TB patients, 10 non-TB patients and 6 controls by indirect ELISA. OPD was chromogenic agent, and OD490 were detected. **Results:** The sensitivities of Hsp16.3, Ag85B, ESAT6-CFP10, Ag85B-Hsp16.3 and Ag85B-ESAT6 to 22 TB patients were 36.4 %, 90.9 %, 77.3 %, 95.5 %, 100%, respectively, while the specificity to 16 non-TB patients were 100 %, 75 %, 100 %, 93.8 %, 93.8 %, respectively. There was no difference for the ELISA detection result between ESAT6-CFP10 and Ag85B, Ag85B-Hsp16.3, Ag85B-ESAT6, while there was difference between ESAT6-CFP10 with Hsp16.3 and sputum-smear. **Conclusion:** Ag85B-Hsp16.3 and Ag85B-ESAT6 could be used as the original selective antigens in detecting MTB by ELISA.

Key Words: Mycobacterium tuberculosis; Ag85B; Hsp16.3; ESAT6; ELISA

Chinese Library Classification(CLC): R378.911, Q93.331, Q75 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)03-401-04

前言

结核病是目前威胁人类健康的重大传染病之一^[1-2], 其临床检测的主要方法是痰液涂片镜检, 结合胸部 X 射线检查综合判断。该方法灵敏度不高, 阳性检出率很低, 有必要建立敏感、

特异性的检测方法。本实验室尝试选择结核分枝杆菌(MTB)特异性分泌抗原, 采用血清学的方法, 建立研究结核分枝杆菌 ELISA 检测方法。Ag85B 是 MTB 在生长早期分泌的蛋白之一, 与 MTB 的细胞壁合成有关, 且具有多个 T 细胞表位能诱导机体产生保护性细胞免疫^[3]。ESAT6 和 CFP10 基因仅存在于

* 基金项目: 国家 "863" 专项课题 (2007AA02Z473); 国家自然科学基金 (30972767); 陕西省自然科学基金 (SJ08C203) 联合资助

作者简介: 张彩勤 (1981-), 女, 硕士, 助教, 电话: 029-84774789, E-mail: zhangcaiqin-beibei@163.com

[△]通信作者: 师长宏, 副教授, E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2010-11-10 接受日期: 2010-11-30)

少数致病性分枝杆菌中,且同是分枝杆菌早期分泌的低分子量蛋白,能诱导机体产生强烈的T细胞免疫应答,并释放出高水平的IFN- γ ^[4]。热休克蛋白16.3(Hsp16.3)是MTB在休眠期表达量增加最多的蛋白,且在MTB稳定生长的过程中起关键作用^[5]。因此本研究选用Hsp16.3、Ag85B以及融合蛋白ESAT6-CFP10、Ag85B-Hsp16.3和Ag85B-ESAT6作为抗原,进行临床血清学初步研究,以期为进一步研究开发结核分枝杆菌的ELISA检测方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌E.coli DH5 α , 五种表达质粒pProEXHTb-Hsp16.3^[6]、pProEXHTa-Ag85B^[3]、pProEXHTb-ESAT6-CFP10^[4]、pProEXHTa-Ag85B-ESAT6^[7]和pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3^[8]均由本室构建。

1.1.2 试剂 IPTG购自Sigma公司;含有Ni²⁺螯合剂的Ni-NTA His纯化试剂盒购自Invitrogen公司;Bradford蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术研究所;其余的试剂均为国产分析纯。

1.1.3 分组 实验共分3组,结核组:于2009年12月在甘肃省武威市的某区、县医院采集到的22例病人血清,均经过临床痰检、胸部X射线、PPD等检验,并确诊为结核病患者,已在当地医院接受一定时间的规范抗结核治疗。非结核疾病组:10例患有感冒、糖尿病等其他疾病的病人血清,结核病诊断为阴性。正常对照组:6例由第四军医大学西京医院血站馈赠健康献血者的血清。

1.2 方法

1.2.1 五种目的蛋白的诱导表达 分别将包含pProEXHTb-Hsp16.3、pProEXHTa-Ag85B、pProEXHTb-ESAT6-CFP10、pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3和pProEXHTa-Ag85B-ESAT6重组质粒的5种菌株,接种于含氨苄青霉素的LB培养基中,37℃过夜震荡培养,转接入100 ml含有氨苄青霉素的LB液体培养基中,培养至OD600值达到0.6~1.0,加入终浓度为1 mmol/L的诱导剂IPTG,诱导培养4 h后收集菌体沉淀。取100 μ l的菌样,加入等量的2 $\times$ 上样缓冲液,沸水煮10 min,离心后取10 μ l上清,进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,观察目的蛋白的诱导表达状况。

1.2.2 五种目的蛋白的纯化 由于pProEXHTb-Hsp16.3、pProEXHTa-Ag85B、pProEXHTb-ESAT6-CFP10、pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3、pProEXHTa-Ag85B-ESAT6这5种目的蛋白的表达载体都带有6 $\times$ His的标签,采用含Ni²⁺螯合剂的Ni-NTA His纯化试剂盒进行纯化。将收集到的每种菌体沉淀用含有8 M尿素的Binding buffer重悬,超声裂解,按照产品说明书进行纯化操作。最后将纯化到的目的蛋白进行透析,透析液是分别含有6 M、4 M、2 M、1 M尿素的PBS溶液,每步透析至少4 h。将复性的5种目的蛋白-20℃冻存备用。

1.2.3 蛋白浓度的测定 根据Bradford蛋白浓度测定试剂盒的说明书进行操作,绘制标准曲线,并计算出每种待测蛋白质的浓度。

1.2.4 五种抗原板的包被和封闭 根据测得的5种蛋白的浓度,

用配制好的pH9.6的0.05 M碳酸盐(Na₂CO₃、NaHCO₃)包被缓冲液,分别将各蛋白按相同终浓度为10 μ g/ml包被96孔酶标抗原板,4℃过夜。用洗涤液PBST洗涤3~5次。用含0.5% BSA的PBS液37℃封闭2 h。同上洗涤后,-20℃保存备用。

1.2.5 血清的间接ELISA检测 摸索病人血清的稀释比例,最后确定用稀释液(0.1%BSA的PBS)将每组血清依次分别按1:320的最佳比例稀释,将共38份稀释好的血清依次分别对应加入5种包被的抗原板中,每个样本设3个复孔同时设置稀释液空白对照孔。37℃孵育1 h,用PBST洗涤三次,用稀释液将HRP标记的山羊抗人IgG 1:5000稀释,37℃孵育1 h,再次用PBST洗涤三次,加入邻苯二胺和H₂O₂底物显色液,37℃显色10~20 min,用2 M的H₂SO₄终止反应,测定490 nm吸光度。取3孔平均值作为每个样本的终结果。

2 结果

2.1 五种目的蛋白的表达和纯化

ESAT6-CFP10、Hsp16.3、Ag85B、Ag85B-Hsp16.3和Ag85B-ESAT6这五种目的蛋白的分子量分别约为27 kDa、16.3 kDa、32 kDa、48 kDa和45 kDa。用IPTG诱导重组宿主菌,分别表达了相应大小的目的蛋白,并通过Ni-NTA His纯化试剂盒分别得到了纯度90%以上的5种目的蛋白,如图1、2所示。

2.2 蛋白浓度的测定

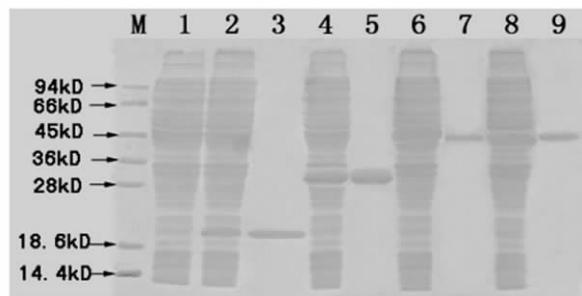


图1 四种目的蛋白的诱导表达和纯化电泳图:M:蛋白分子量;1:未诱导的DH5 α ;2:pProEXHTb-Hsp16.3的表达产物;3:pProEXHTb-Hsp16.3的纯化产物;4:pProEXHTa-Ag85B的表达产物;5:pProEXHTa-Ag85B的纯化产物;6:pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3的表达产物;7:pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3的纯化产物;8:pProEXHTa-Ag85B-ESAT6的表达产物;9:pProEXHTa-Ag85B-ESAT6的纯化产物

Fig.1 SDS-PAGE analysis of expressed and purified products;M: Protein marker; 1: DH5 α without induction; 2: expression product of pProEXHTb-Hsp16.3; 3: purified product of pProEXHTb-Hsp16.3; 4: expression product of pProEXHTa-Ag85B; 5: purified product of pProEXHTa-Ag85B; 6: expression product of pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3; 7: purified product of pProEXHTa-Ag85B-Hsp16.3; 8: expression product of pProEXHTa-Ag85B-ESAT6; 9: purified product of pProEXHTa-Ag85B-ESAT6

利用Bradford蛋白浓度测定试剂盒测得的五种蛋白抗原,ESAT6-CFP10、Hsp16.3、Ag85B、Ag85B-Hsp16.3和Ag85B-ESAT6的浓度分别为0.44 mg/ml、1.13 mg/ml、0.58 mg/ml、0.44 mg/ml、0.49 mg/ml。

2.3 间接ELISA法检测的结果分析

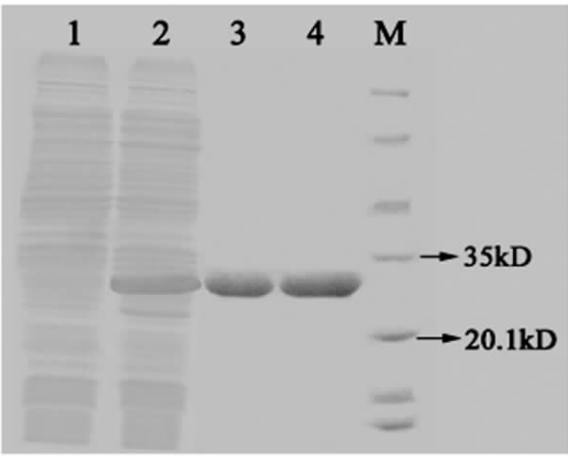


图2 ESAT6-CFP10 蛋白的诱导表达和纯化电泳图:M:蛋白分子量;
1:未诱导的 DH5α ;2:pProEXHTb-ESAT6-CFP10 的表达产物;3、4:
pProEXHTb-ESAT6-CFP10 的纯化产物
Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed and purified ESAT6-CFP10;M:
Protein marker; 1: DH5α without induction; 2: expression product of
pProEXHTb-ESAT6-CFP10; 3、4: purified product of
pProEXHTb-ESAT6-CFP10

2.3.1 ELISA 检测的结果 根据 ELISA 检测判定标准，最终判 3 讨论

表 1 五种抗原分别对各组血清进行 ELISA 检测的结果
Table 1 The ELISA result of all groups with five antigens

groups	total	antigens				
		ESAT6-CFP10	Ag85B	Ag85B-Hsp16.3	Ag85B-ESAT6	Hsp16.3
		(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
TB patients	22	17(77.3 %)	20(90.9 %)	21(95.5 %)	22(100 %)	8(36.4 %)
non-TB patients	10	10	0	3	0	0
controls	6	0	1	1	1	0

Note: "+" is positive cases.

表 2 结核病组用抗原 ESAT6-CFP10 与 Ag85B、Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6、Hsp16.3 通过 ELISA 检测以及痰涂片镜检结果的比较
Table 2 Comparison of 22 TB patients detected by ESAT6-CFP10 with Ag85B, Ag85B-Hsp16.3, Ag85B-ESAT6, Hsp16.3 and sputum-smear

ESAT6-C	Ag85B		Ag85B-Hsp16.3		Ag85B-ESAT6		Hsp16.3		Sputum-smear		total
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
Positive	15	2	17	0	17	0	8	9	5	12	17
Negative	5	0	4	1	5	0	0	5	2	3	5
total	20	2	21	1	22	0	8	14	7	15	22

Note: "+" is positive cases; "-" is negative cases.

痰液镜检是临床 TB 诊断的金标准,但检出效率低,必须结合 X 射线检查,以及结核菌素试验(PPD)等多种检测方法进行综合诊断。采用 PCR 扩增技术和结核菌特异性探针,酶显色联合检测结核分枝杆菌需要高精密度仪器^[9],技术要求高,一般的实验室和临床科室的条件很难达到。而 ELISA 方法简便易行、快速、又不需要特殊精密的仪器,是目前较为成熟的血清学诊断方法,其临床应用价值较高。为了建立 MTB 临床检测 ELISA

定各组样本中结核病阳性的结果见表 1。用稀释至同样浓度的 ESAT6-CFP10、Ag85B、Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6 和 Hsp16.3 五种抗原检测 22 例结核病组的灵敏度分别为 77.3 %、90.9 %、95.5 %、100 %和 36.4 %。另外,这 5 种抗原检测 16 例未患结核病组的特异性分别为 100 %(16/16)、75 %(12/16)、93.8 %(15/16)、93.8 %(15/16)和 100 %(16/16)。
2.3.2 统计学分析 根据统计学方法,采用配对四格表资料的 χ^2 检验,检验 5 种目的抗原对 22 位临床确诊 TB 患者的检测结果(见表 2)有无差别。 $P<0.05$ 为有差异,并有统计学意义。
通过间接 ELISA 方法,比较以上 5 种蛋白的检测结果显示;ESAT6-CFP10 和 Ag85B 比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.571,0.25<P<0.5$);ESAT6-CFP10 和 Ag85B-Hsp16.3 比较,差异无统计学意义($\chi^2=2.25,0.1<P<0.25$);ESAT6-CFP10 和 Ag85B-ESAT6 比较,差异并无统计学意义($\chi^2=3.2,0.05<P<0.1$);ESAT6-CFP10 和 Hsp16.3 比较,差异有统计学意义($\chi^2=7.111,0.005<P<0.01$)。另外,ESAT6-CFP10 和临床常用检测结核病的主要方法 -- 痰涂片镜检结果相比较(见表 2),差异有统计学意义($\chi^2=5.79,0.01<P<0.025$)。

方法,本研究选用 Hsp16.3、Ag85B、ESAT6 这三个结核分枝杆菌分泌蛋白,以及它们之间的融合蛋白,用于 MTB 感染的 ELISA 检测,以期筛选出敏感和特异的血清学检测抗原。为了建立 ELISA 检测方法,首先需要纯度和特异性较高的抗原,以减少其非特异性结合,所以本研究前期摸索纯化条件,采用变性条件下的纯化方法得到了纯度较高的 5 种目的蛋白,并采用透析复性的方法逐渐去除变性剂 - 尿素,使目的蛋白恢复天然

结构。

近年来,有关结核分枝杆菌的研究,都集中在了 MTB 相关蛋白抗原的 DNA 疫苗等的研究上^[3-4],而在 MTB 的临床检测应用方面,目前只见王雪琼等^[10]进行了结核分枝杆菌 17 种抗原在 ELISA 检测应用中的研究,其中 Ag85B 和 CFP10-ESAT6 的灵敏度分别为 72.9%和 66.7%,特异性分别为 72.9%和 81.8%。和本研究的结果虽然有些差别,但是相关数据的趋势一致,推测主要是由于检测的样本量有一定差别。在本研究中,ESAT6-CFP10、Ag85B、Ag85B-Hsp16.3、Ag85B-ESAT6 和 Hsp16.3 五种抗原检测 22 例结核病组的灵敏度分别为 77.3 %、90.9 %、95.5 %、100 %和 36.4 %;这 5 种抗原检测 16 例未患结核病组的特异性分别为 100 %、75 %、93.8 %、93.8 %和 100 %。灵敏度是反映检出能力的指标,而特异性是反映鉴别非患者能力的指标,这两个指标越大越有临床检测意义。本实验结果显示,Ag85B-Hsp16.3 和 Ag85B-ESAT6 的灵敏度(95.5 %、100 %)和特异性(93.8 %、93.8 %)均较好,可作为 ELISA 检测 MTB 感染的初选抗原。Ag85B 的特异性(75 %)较低,可能是由于,Ag85B 不是致病性结核分枝杆菌特有的分泌性蛋白,而在 BCG 中也有其分泌。所以,在接种过 BCG 疫苗的人群中,通过 ELISA 方法也可检测到 Ag85B。而 Hsp16.3 的灵敏度(36.4 %)较低,推测可能是因为 Hsp16.3 作为 MTB 休眠菌特异性蛋白^[9],在活动期表达量较低,所以,Hsp16.3 作为抗原进行 ELISA 检测,可能对 MTB 休眠菌比较敏感。

本研究选择的 22 例 TB 病人为临床确诊的结核病患者,正在接受规范的抗结核病治疗,病人处于 MTB 感染的活动期,所以本实验结果中 Hsp16.3 抗原的灵敏度明显低于其他抗原。ESAT6 和 CFP10 基因仅存在于致病性结核分枝杆菌中,在疫苗株 BCG 和其他非致病性的分枝杆菌中不存在^[4],所以,ESAT6-CFP10 的灵敏度(77.3 %)相对较低,而特异性(100 %)则较高。因此可以将 ESAT6-CFP10 作为 MTB 感染的特异性诊断试剂。采用痰液镜检的方法显示,22 例 TB 病人 MTB 阳性检出率即灵敏度仅为 31.8 % (7/22),和本研究中采用 ESAT6-CFP10、Ag85B、Ag85B-Hsp16.3 和 Ag85B-ESAT6 的 ELISA 检测结果有显著差异。综上所述,Ag85B-Hsp16.3 和 Ag85B-ESAT6 均可作为 ELISA 检测结核病的初选抗原。而前者由于同时具有 Ag85B 和 Hsp16.3 结合位点,既可以检测出 MTB 活动期病人,也可以检测出 MTB 休眠期病人,有可能会进一步提高 MTB 感染检测的灵敏度和特异性。

参考文献(References)

[1] Sechi LA, Mara L, Cappai P, et al. Immunization with DNA vaccines encoding different mycobacterial antigens elicits a Th1 type immune

response in lambs and protects against *Mycobacterium avium* sub-species paratuberculosis infection[J]. Vaccine, 2006,24(3):229-235

[2] Vipond J, Vipond R, Allen-Vercos E, et al. Selection of novel TB vaccine candidates and their evaluation as DNA vaccines against aerosol challenge[J]. Vaccine, 2006,24(37-39):6340-6350

[3] Shi CH, Wang XW, Zhang H, et al. Immune responses and protective efficacy of the gene vaccine expressing Ag85B and ESAT6 fusion protein from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. DNA Cell Biol, 2008,27(4):199-207

[4] 张海,师长宏,薛莹,等.结核分枝杆菌 ESAT6-CFP10 融合蛋白诱导的小鼠免疫应答及其保护力 [J]. 细胞与分子免疫学杂志,2006,22(4):443-446

Zhang Hai, Shi Chang-hong, Xue Ying, et al. Immune response and protective efficacy induced by fusion protein ESAT6-CFP10 of *M. tuberculosis* in mice [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2006, 22 (4): 443-446(in Chinese)

[5] Shi C, Zhang H, Zhang T, et al. New alternative vaccine component against mycobacterium tuberculosis-heat shock protein 16.3 or its T-cell epitope [J]. Scand J Immunol, 2009,70(5):465-74

[6] 张廷芬,师长宏,朱德生,等.结核分枝杆菌 Hsp16.3 的表达、纯化和鉴定[J].中国人兽共患病学报,2007,23(10):964-967

Zhang Ting-fen, Shi Chang-hong, Zhu De-sheng, et al. Expression, purification and identification of Hsp16.3 protein from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2007,23 (10): 964-967(in Chinese)

[7] 刘建利,师长宏,靳亚平,等.结核分枝杆菌 Ag85B 和 ESAT6 融合蛋白的表达、纯化及抗原活性的初步研究[J].中国人兽共患病学报, 2009,25(5):449-452

Liu Jian-li, Shi Chang-hong, Jin Ya-ping, et al. Expression, purification of the fusion protein Ag85B-ESAT6 of *Mycobacterium tuberculosis* and its antigenic activity [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2009,25(5):449-452(in Chinese)

[8] 杨巍,师长宏,赵佐庆,等.结核分枝杆菌融合蛋白 Ag85B-Hsp16.3 的表达、纯化和鉴定[J].中国人兽共患病学报,2010,26(10):953-956

Yang Wei, Shi Chang-hong, Zhao Zuo-qing, et al. Expression, purification and identification of the fusion protein Ag85B-Hsp16.3 of *Mycobacterium tuberculosis*[J].Chinese Journal of Zoonoses, 2010,26 (10): 953-956

[9] 熊国亮,雷建平,张慧慧.聚合酶链反应-探针杂交-酶显色用于结核分枝杆菌的检测[J].中国实验诊断学,2004,8(2):150-152

Xiong Guo-liang, Lei Jian-ping, Zhang Hui-hui. Detection of mycobacterium tuberculosis with PCR-Probe Hybridization-ELISA [J]. Chin J Lab Diagn, 2004,8(2):150-152(in Chinese)

[10] Wu Xueqiong, Yang Yourong, Zhang Junxian, et al. Comparison of antibody responses to seventeen antigens from *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Clinica Chimica Acta, 2010,411:1520-1528