

## 血清学诊断中结核杆菌磷酸烯醇型丙酮酸羧激酶的应用

柏雪莲<sup>1</sup>, 魏庆宽<sup>2</sup>, 李瑾<sup>2</sup>, 李桂萍<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>山东省滨州医学院病原生物学教研室, 滨州 256603)

(<sup>2</sup>山东省寄生虫病防治研究所, 济宁 272033)

**摘要:**【目的】在原核系统中表达结核杆菌磷酸烯醇型丙酮酸羧激酶 (phosphoenolpyruvate carboxykinase PEPCK), 并研究该蛋白在诊断结核病人血清抗体中的应用价值。【方法】应用基因重组技术表达重组蛋白结核杆菌磷酸烯醇型丙酮酸羧激酶, 经亲和层析法纯化表达产物。用表达的重组蛋白免疫小鼠, 研究其免疫学特性。间接酶联免疫吸附试验 (Enzyme link immunosorbent assay, ELISA) 检测结核病人血清中特异性 IgG 抗体, 并与结核杆菌抗体胶体金法诊断试剂盒检测结果对比。【结果】试验表明转化入大肠杆菌中的重组质粒能够表达并纯化出相对分子量为 72 kDa 的重组蛋白; Western blot 证实重组蛋白能够与小鼠抗 BCG 血清发生特异性反应; 重组蛋白免疫小鼠后, 小鼠血清中的抗体滴度可达 1:1280 以上; 重组蛋白用作 ELISA 包被抗原检测病人血清阳性率为 17.3% (30/173), 其中排菌病人的阳性率为 32.5% (13/42), 不排菌病人的阳性率为 12.9%。该方法结果与结核杆菌抗体胶体金法诊断试剂盒的检测结果相比, 敏感性为 51.0%, 特异性为 96.7%。【结论】结核杆菌 PEPCK 具有较好的免疫原性和抗原性, 有可能作为结核病血清学诊断的一组抗原之一。

**关键词:** 结核杆菌; 磷酸烯醇型丙酮酸羧激酶 (PEPCK); 血清学诊断; 酶联免疫吸附试验

**中图分类号:** Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1383-04

结核病 (Tuberculosis) 是由结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis M.tb*) 感染所致的对人类健康危害最大的慢性传染病。世界上约有 1/3 的人感染, 每年约 8 百万人发病, 2 百万人死亡。近年来随着结核病的再次回升, 及时、正确的诊断结核病对于控制结核病的流行非常重要。由于传统的结核菌素实验不能区分现行感染和既往感染, 因此众多的学者在积极的寻找一种特异性强、灵敏度高的诊断方法以代替传统的结核菌素实验。前期研究发现结核杆菌磷酸烯醇型丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 是结核杆菌生长所必需的关键酶<sup>[1,2]</sup>, 且能诱导很强的细胞免疫反应。本研究利用生物技术, 在大肠杆菌中表达出结核杆菌 PEPCK, 用其免疫小鼠, 研究其诱导抗体产生能力, 并将 PEPCK 用作抗原, 通过 ELISA 检测结核病人的血清, 以评价

PEPCK 在结核病诊断中的应用价值, 为寻找新的结核病诊断方法提供线索。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 质粒和菌株:** 带有 pckA 基因片断的重组质粒 pHF/pckA 由美国康耐尔大学提供; 大肠杆菌 *HB<sub>101</sub>* (*Escherichia coli HB<sub>101</sub>*, *E. coli HB<sub>101</sub>*) 购于中国科学院微生物研究所。

**1.1.2 小鼠:** 6~8 周龄, 18~22 g 清洁级纯种 BALB/c 小鼠, 购于山东大学医学院实验动物中心。

**1.1.3 血清:** 结核病人血清 173 例, 其中排菌病人 42 例, 不排菌病人 131 例, 正常体检者血清 20 例, 以上血清由山东省胸科医院和济宁市结核病防治研究所提供。

**1.1.4 主要试剂:** 日常型质粒 DNA 小量快速制备试剂盒为 V-gene 公司产品; BBST NTA Resin 蛋白质纯化试剂盒购自上海博彩生物公司; 还原型谷胱甘肽, 氧化型谷胱甘肽等购自华美生物工程公司; 弗氏不完全佐剂、BCG 免疫鼠血清均为本实验室配制; 小牛血清(BSA)为上海复旦天呈公司产品; AP 标记的羊抗鼠 IgG 结合物为美国 Sigma 公司产品; AP 标记的羊抗人 IgG 结合物购于华美生物工程有限公司, 为 Promega 公司产品; 结核分枝杆菌抗体胶体金法诊断试剂盒为上海奥普生物医药有限公司产品。

## 1.2 PEPCK 蛋白在大肠杆菌中的表达

将重组质粒 pHF/pckA 转化大肠杆菌 *HB<sub>101</sub>*, 于含氨基青霉素的 LB 培养板上培养, 挑取阳性克隆, 按 1:50 的比例接种于含氨基青霉素的 LB 培养基中, 37°C 摇菌至 OD 值约 0.5~0.6 时, 加入 IPTG, 终浓度为 1 mmol/L, 继续摇菌 5 h。收集菌液, 8000×g, 离心 5 min, 在沉淀中加入适量的 PBS 和等量的 3×SDS-PAGE 上样缓冲液, 剧烈震荡至细菌沉淀完全溶解, 沸水浴 3~5 min, 12000×g 离心 5 min, 取上清备用。

## 1.3 SDS-PAGE

取上述样品 20 μL, 用 11% 的分离胶和 3% 的浓缩胶对表达产物进行 SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 脱色液脱色后观察结果。

## 1.4 表达产物的纯化和复性<sup>[3]</sup>

收集 IPTG 诱导表达的转化菌 *HB<sub>101</sub>*, 按 BBST NTA Resin 蛋白质纯化试剂盒说明在非变性条件下纯化重组的融合蛋白, 将纯化好的蛋白质装入透析袋, 复性液 (含有 pH8.3 20 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 2 mmol/L 还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol/L 氧化型谷胱甘肽) 中 4°C, 24 h, 然后用 PEG2000 进行浓缩, 用 UV3000 测定蛋白质含量。

## 1.5 Western blot

表达产物经 SDS-PAGE 电泳后以恒温电流电转移至硝酸纤维素膜上, 加 1% 的 BSA 封闭, 室温摇床振荡 3 h, 用 pH7.4 的 TBS 溶液漂洗 3 次, 加入 BCG 免疫的小鼠血清 (1:50, 本实验室制备), 室温振荡 2 h, 冲洗 3 次, 加入 1:5000 羊抗鼠抗体, 室温振荡 2 h, 加入 4-氯萘酚显色, 37°C 显色。

## 1.6 动物免疫实验

选清洁级 BALB/c 小鼠 20 只, 雌雄各半, 分实验组和对照组。实验组每只小鼠腹腔注射表达的目的

蛋白 10 μg 加相同体积的弗氏不完全佐剂, 对照组小鼠仅腹腔注射相同量的弗氏不完全佐剂, 隔 2 周免疫 1 次, 共免疫 3 次, 每次免疫 2 周后, 杀死 5 只小鼠, 眼眶采血分离血清, ELISA 法检测小鼠免疫血清的抗体效价。

## 1.7 ELISA

将重组 PEPCK 用底物稀释液稀释到 10 μg/mL, 每孔 100 μL 包被 96 孔反应板, 173 例病人血清和 20 例正常体检者血清按 1:100 稀释, 每孔 100 μL 加入已经包被好的 96 孔反应板, 建立间接 ELISA 法检测 IgG 抗体。按 1:15000 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗人 IgG 结合物为二抗, 并设阴、阳性对照, 底物 PNPP 显色。用酶标仪检测  $A_{405}$  值。测定孔  $A_{405}$  值 > 阳性界值为阳性, 否则判为阴性。并将结果与结核分枝杆菌抗体胶体金法诊断试剂盒的检测结果进行比较。

## 2 结果

### 2.1 PEPCK 融合蛋白的表达

将重组克隆转化大肠杆菌 *HB<sub>101</sub>*, 通过 IPTG 诱导后, 对细胞裂解液通过 SDS-PAGE 进行分析, 与未转化的大肠杆菌比较发现, 此克隆可表达出约 72 kDa 的蛋白, 与理论预测的 PEPCK 分子量大小一致 (图 1)。

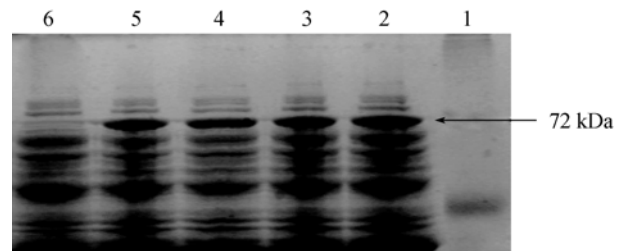


图 1 宿主菌 *HB<sub>101</sub>* 裂解物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis for the lysate of host cell. 1. Protein molecular marker; 2, 3, 4, 5. Expressed recombinant protein PEPCK in *E. coli*; 6. *E. coli* without recombinant plasmid.

### 2.2 重组蛋白的免疫反应性

将纯化的 PEPCK 重组蛋白经亲和层析法纯化后, 通过 Western blot 分析与 BCG 免疫的鼠血清的反应性, 发现在分子量为 72 kDa 处有一条明显的反应带, 而空菌在此位置未出现相应的带 (图 2)。

### 2.3 重组蛋白的免疫原性检测

用 PEPCK 免疫小鼠后, 检测抗体的产生, 发现抗体滴度随免疫次数的增加而增强, 滴度可达 1:1280; 只有佐剂的对照组不产生抗体。两者存在显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (图 3)。

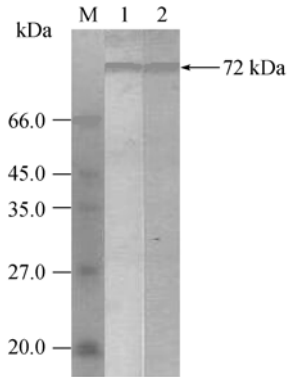


图2 纯化重组融合蛋白 PEPCK 的 Western blot 鉴定

Fig. 2 Western blot analysis of recombinant protein. 1, 2. recombinant protein.

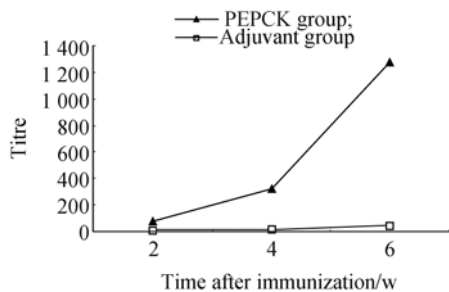


图3 小鼠血清 IgG 抗体的变化

Fig. 3 Change of IgG in mice serum.

#### 2.4 PEPCK 检测结核病人血清的结果

以 PEPCK 为抗原, 通过 ELISA 法检测结核病人血清. 发现在排菌的病人中阳性率为 32.5% (13/42), 非排菌病人中阳性率为 12.9% (17/131), 总的阳性率为 17.3% (30/173). 在 20 例正常体检者血清中 1 人为抗体阳性. 此方法的敏感性为 51.0%, 特异性为 96.7%. 与结核分枝杆菌抗体胶体金法诊断试剂盒的检测结果相比, 两种方法的符合率为 83.24% (表 1).

表 1 重组蛋白 PEPCK ELISA 法和结核杆菌抗体胶体金法对 173 例结核病人血清诊断结果

Table 1 The comparison between two different diagnosis methods for 173 tubercular patients

PEPCK ELISA test	<i>M. tb</i> antibody Colloidal Gold Diagnostic Kit		Total
	+	-	
+	26	4	30
-	25	118	143
Total	51	122	173

Concordance=(26+118)/(51+122)=83.24%.

### 3 讨论

近年来由于结核杆菌和人类免疫缺陷病毒的联

合感染及结核杆菌耐药株的出现使得结核病的发病率呈上升趋势. 正确诊断是及时、有效治疗结核病的重要前提. 目前还没有一种试剂能够有效的诊断结核病, 因此学者们试图克隆表达出多种结核杆菌蛋白, 如异柠檬酸裂解酶、Ag85、ESAT-6、MPT64 等, 对其进行诊断价值的研究. 然而对结核杆菌磷酸烯醇型丙酮酸激酶 (PEPCK) 的研究还未见报道. 本文将克隆有结核杆菌 *pckA* 基因的重组质粒转化入大肠杆菌 *HB101*, 在原核系统中表达了重组蛋白 PEPCK. SDS-PAGE 分析可见, 表达出的分子量为 72 kDa, 与理论预测的分子量一致. Western blot 证明复性后的 PEPCK 能够被小鼠抗 BCG 血清识别, 有活性. 用表达纯化的重组蛋白免疫小鼠, ELISA 检测小鼠血清抗体, 结果显示抗体滴度在 1:1280 以上, 这与结核分支杆菌 MPT64 免疫小鼠产生的抗体滴度相当<sup>[4]</sup>, 说明表达的重组蛋白有较好的免疫原性和抗原性.

结核病人血清特异性抗体的检测依赖于特异性抗原. 结核菌素 (PPD) 应用于临床结核病的诊断、筛选以及流行病学研究已有 50 多年, 但是 PPD 最大弱点是其中大多数蛋白质与其他分枝杆菌和无关细菌相同, 这就大大降低了其特异性. 众多的学者已经对多种结核杆菌抗原进行了研究. 如: 38 kDa 蛋白, 血清学诊断的阳性率为 67% 左右, 特异性为 96% 左右<sup>[5]</sup>, 但与 CFP-10 联合诊断的话, 阳性率可达 82.4%, 特异性达 98.1%<sup>[6]</sup>; Ag85, 解放军 309 医院吴雪琼等<sup>[7]</sup>自制纯化重组 Ag85, 应用 ELISA 法检测血清抗结核抗体, 其特异性为 93.9%, 敏感性为 15.6%; ESAT-6, 作为抗原检测抗结核抗体的阳性率只有 20%, 在各种结核分枝杆菌分泌性蛋白中也是较低的; MPT63 抗原, 检测血清抗体的敏感性和特异性分别为 15% 和 98.7%<sup>[8]</sup>. 最近一项研究发现结核杆菌 65 kDa 热休克蛋白检测结核病人的阳性率较高可达 82%, 但是特异性较低, 为 89%<sup>[9]</sup>.

本研究用重组表达的 PEPCK ELISA 检测结核病人血清, 总阳性率为 17.3%; 排菌结核病人血清的阳性率为 32.5%; 非排菌结核病人血清的阳性率为 12.9%; 敏感性为 51.0%, 特异性为 96.7%. 从结果可以看出, PEPCK 作为抗原检测排菌病人血清的阳性率要高于非排菌的病人, 这说明 PEPCK 对活动性结核病人的诊断更具有价值. 然而, PEPCK 对结核病人血清检测的阳性率仍较低, 原因可能是 PEPCK 刺激机体产生的抗体滴度不高或者稀释度过低等. 本文

还在 20 例正常体检者中检测到抗体阳性者, 可能是他们隐性感染过结核杆菌或者接种过卡介苗。我们将进一步研究接种卡介苗对诊断结果的影响。

由此可见, 结核杆菌各种蛋白单一抗原检测结核病人血清的阳性率都不是太高, 故筛选各种特异性强、灵敏度高的抗原组成混合抗原, 作为结核病血清学诊断试剂, 将会大大提高诊断效率。而 PEPCK 纯化蛋白可作为结核病血清学诊断的混合抗原之一。

### 参 考 文 献

- [1] Swanination S, Gong J, Zhang M, *et al.* Cytokine production in children with tuberculosis infection and disease. *Clin Infect Dis*, 1999, 28(6): 1290–1293.
- [2] 柏雪莲, 刘克义, 于进芝, 等. 敲除 *pckA* 基因的结核杆菌引起的免疫反应的研究. *微生物学杂志*(*Journal of Microbiology*), 2005, 25(6): 19–22.
- [3] Chen XG, Gong Y, Hua-Li, *et al.* High-level expression and purification of immunogenic recombinant SAG1 (P30) of *Toxoplasma gondii* in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*, 2001, 23(1): 33–37.
- [4] 柏银兰, 薛莹, 李元, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白 MPT64 的免疫学特性. 第四军医大学学报(*Journal of The Fourth Military Medical University*), 2004, 25(13): 1182–1184.
- [5] 张小刚, 何秀云, 熊志红, 等. 重组结核分枝杆菌 38000 蛋白抗原免疫学特性的研究. *实用医学杂志*(*The Journal of Practical Medicine*), 2002, 18 (1): 19–20.
- [6] Murthy MK, Parasa RR, Deenadayalan A, *et al.* Evaluation of the diagnostic potential of region of deletion-1-encoded antigen culture filtrate protein-10 in pulmonary tuberculosis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 59(3): 295–302.
- [7] 吴雪琼, 张俊仙, 王安生. 结核杆菌分泌蛋白 85 基因的克隆、表达及其诊断价值. *广东医学*(*Guangdong Medical Journal*), 2002, 23(2): 1258–1259.
- [8] Lyashchenko K, Chlangeli R, Houde M, *et al.* Heterogeneous antibody responses in tuberculosis. *Infect Immun*, 1998, 66(8): 3936–3940.
- [9] Rajan AN, Kashyap RS, Purohit HJ, *et al.* Serodiagnosis of tuberculosis based on the analysis of the 65 kDa heat shock protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007, 11(7): 792–797.

## Recombinant phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Mycobacterium tuberculosis* for sero diagnosis

Xuelian Bai<sup>1\*</sup>, Qingkuan Wei<sup>2</sup>, Jin Li<sup>2</sup>, Guiping Li<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Department of Pathogenic Biology, Binzhou Medical University, Binzhou 256603, China)

(<sup>2</sup> Shandong Institute of Parasitic Diseases, Ji'ning 272033, China)

**Abstract:** [Objective] To express phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) of tuberculosis and evaluate its immune diagnostic ability. [Methods] PEPCK was cloned and expressed in prokaryotic expression system. We analyzed immune response of recombinant PEPCK with Western blot and studied the immunity of it through mice immunization. We also investigated the sensitivity and specificity of immunodiagnosis of PEPCK via detecting the sera from tubercular patients by using ELISA. The results were evaluated by comparing with a *Mycobacterium tuberculosis* antibody Colloidal Gold Diagnostic Kit. [Results] The recombinant protein was 72 kDa and specifically reacted with anti-BCG antibody. Specific humoral immune response was elicited after mouse immunization with PEPCK protein and the high titer specific antibody was generated (1:1280). Antibodies were detected against *M. tuberculosis* 17.3% in all tuberculosis patients, 32.5% in patients harboring *Mycobacterium* currently and 12.9% in patients without *M. tuberculosis*. The sensitivity and specificity of ELISA were 51.0% and 96.7%. [Conclusion] These results indicated that the recombinant PEPCK might be one of the suitable antigens for serodiagnosis of tuberculosis.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK); serodiagnosis; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)