

• 基础实验研究论著 •

## 梅毒血清学诊断用抗原 Gpd 蛋白的重组表达及鉴定

林勇平<sup>1</sup>, 陆中奎<sup>2</sup>, 俞 辉<sup>1</sup>, 刘忠民<sup>1</sup>

(1. 广州医学院第一附属医院检验科 510120; 2. 广东省佛山市顺德区龙江医院检验科 528318)

**摘要:**目的 利用基因工程技术重组表达梅毒螺旋体 Gpd 蛋白, 探讨其在梅毒血清学诊断中的应用。方法 PCR 扩增 Gpd 基因序列, 构建表达载体 pET-28b-Gpd, 将表达载体转化感受态细胞 E. coli BL21(DE3) 并以 IPTG 诱导蛋白表达, 经镍柱亲和层析纯化后, 利用质谱和免疫印迹法鉴定重组蛋白。以重组蛋白建立间接 ELISA 法, 并检测 20 份 TPPA 阳性和 20 份 TPPA 阴性血清去评价其在梅毒血清学诊断中的应用。结果 PCR 扩增出约 1.1 kb 的 Gpd 片段, 成功构建重组质粒 pET-28b-Gpd。表达的重组蛋白的相对分子质量约  $41 \times 10^3$ , 主要以包涵体形式存在, 占菌体总蛋白的 40%。质谱和免疫印迹分析证实重组蛋白为 Gpd 蛋白, 并能够与梅毒患者血清发生免疫学反应。间接 ELISA 法测定 TPPA 阳性血清和 TPPA 阴性血清的符合率分别为 95% (19/20) 和 100% (20/20)。结论 重组 Gpd 蛋白能够与梅毒患者血清发生特异性的免疫学反应, 是一种可潜在应用于梅毒血清学诊断的新抗原。

**关键词:**梅毒; 重组 Gpd 蛋白; 基因工程; 血清学诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.14.001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)14-1665-03

## Recombinant expression and identification of Gpd protein for serologic diagnosis of syphilis

Lin Yongping<sup>1</sup>, Lu Zhongkui<sup>2</sup>, Yu Hui<sup>1</sup>, Liu Zhongmin<sup>1</sup>

(1. Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 2. Department of Laboratory Medicine, Longjiang Hospital in Shunde District of Foshan City, Foshan, Guangdong 528318, China)

**Abstract: Objective** To express recombinant Gpd protein of *Treponema pallidum* by genetic engineering technology and investigate its application in serodiagnosis of syphilis. **Methods** Gpd gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into plasmid vector pET-28b. The recombinant plasmid was transformed into competent cell *Escherichia coli* (E. coli) BL21 (DE3) for protein expression under isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) induction. The expressed protein was purified by Ni<sup>2+</sup> affinity chromatography and then identified by mass spectrometry. The immunoreactivity was identified by Western blotting. An indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) method with Gpd protein was developed and applied to test 20 *Treponema pallidum* particle agglutination (TPPA) positive and 20 negative cases. **Results** Gpd gene fragment with a length of 1.1 kb was amplified. The prokaryotic expression plasmid pET-28b-Gpd was constructed correctly. Recombinant protein with a relative molecular mass of  $41 \times 10^3$  was highly expressed about 40% of total bacterial proteins in inclusion body. The result of mass spectrometry and Western blotting analysis demonstrated that the recombinant protein was Gpd protein which could react with syphilitic sera. The coincidence rate was 95% (19/20) in TPPA positive sera and 100% (20/20) in TPPA negative sera with the result of Gpd-ELISA. **Conclusion** Recombinant Gpd protein could react with syphilitic sera and could be an alternative antigen for serodiagnosis of syphilis.

**Key words:** syphilis; Gpd recombinant protein; genetic engineering; serodiagnosis

梅毒是一种由苍白螺旋体感染引起的性传播疾病, 其患病率在中国有不断上升的趋势<sup>[1-2]</sup>。由于梅毒感染人体后的症状和体征并不特异, 临床诊断和治疗需依靠梅毒血清学的实验结果。传统的梅毒血清学诊断方法存在自身缺陷, 且以手工操作为主, 结果判读受主观影响, 不易实现标准化和自动化, 难以满足目前临床上大量样本的快速筛查工作。随着梅毒螺旋体基因组 DNA 全序列的解析, 基因工程重组的梅毒抗原已开始应用于临床, 推进了梅毒血清学的高通量检测和快速筛查<sup>[3]</sup>。目前, 梅毒诊断试剂主要应用 TP15、TP17、TP44.5 和 TP47 重组蛋白这 4 种梅毒螺旋体抗原, 因此需要扩大梅毒血清学诊断的候选抗原库, 以利于建立特异性和敏感性更高的梅毒血清学诊断方法。有研究报道, 从梅毒螺旋体蛋白质的表达库中筛选与梅毒患者阳性血清结合的蛋白质抗原, 成功鉴定出可与各期梅毒患者血清发生特异性反应的 Gpd 蛋白<sup>[4]</sup>。本研究通过原

核基因工程技术重组表达梅毒螺旋体 Gpd 蛋白, 为优化现有梅毒血清学诊断方法提供新的抗原。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 菌株和载体: 梅毒螺旋体 Nichols 株基因组由南华大学病原微生物研究所惠赠; 原核表达载体 pET-28b 以及宿主菌 E. coli DH5a 和 E. coli BL21 (DE3) 为本实验室保存。梅毒血清样本由广州医学院第一附属医院和佛山市顺德区龙江医院收集。主要试剂: 质粒提取和 PCR 产物回收试剂盒购自 QIAGEN 公司, 蛋白质标志物和 DNA 标志物购自 fermentas 公司; Premix Ex Taq DNA 聚合酶购自 TAKARA 公司; 限制性内切酶 Nde I、Xho I 和 T<sub>4</sub> DNA 连接酶购自 New England BioLabs 公司; 30% 丙烯酰胺 (1:29)、Tris、SDS、IPTG 和透析袋购自 Sigma 公司; 镍离子层析柱 GravityTrap 购自 GE Healthcare 公司; HRP 标记羊抗人 IgG 购自北京博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 Gpd 基因的扩增 以梅毒螺旋体 Nichols 株基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 Gpd 基因。引物序列如下: 上游引物: 5'-GGA ATT CCA TAT GAT GCG GGG AAC ATA TTG TG-3', 下游引物: 5'-CCG CTC GAG TCA ATA GCG GGC GGG TTT G-3'。反应体系: 模板 0.3 ng, 引物 0.2 μmol/L, 2×Premix Ex Taq 25 μL, 补充水至 50 μL。反应条件: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 30 s, 57 °C 45 s, 72 °C 90 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 再延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖电泳鉴定。

1.2.2 表达质粒的构建 PCR 产物纯化回收并使用 Nde I 和 Xho I 双酶切, 酶切片段与同样处理的 pET-28b 载体在 16 °C 连接 4 h 后, 将连接产物转化入 E. coli DH5a 中, 经卡那霉素抗性筛选阳性重组子, 使用 pET 载体通用引物菌落 PCR 鉴定重组质粒后, 送公司测序。

1.2.3 蛋白的诱导表达和纯化 将重组质粒 pET-28b-Gpd 导入 E. coli BL21(DE3) 中进行诱导表达。在 IPTG 终浓度为 1.2 mmol/L 的条件下进行诱导, 在不同时段收集诱导产物, 同时以诱导的含有 pET-28b 空载体菌作为对照。分别收集诱导表达的上清和沉淀, SDS-PAGE 分析鉴定目的蛋白的表达形式。大量诱导重组菌并收集菌体沉淀, 提取包涵体蛋白, 经 8 mol 尿素溶解后将上清液上柱层析纯化, 使用 500 mmol 咪唑洗脱目的蛋白, 使用透析法逐步将溶液置换为 PBS(pH7.5)。

1.2.4 基质辅助激光解析电离化飞行时间质谱分析(MALDI-TOF) 蛋白样品经胰酶作用后与基质混合并上样, 在 4800 plus MALDI-TOF Analyzer 串联飞行时间质谱仪上进行检测。每个样品首先进行一次一级质谱分析, 再选择一级质谱中信噪比大于或等于 50、信号由强到弱的 5 个前体离子进行二级质谱分析。获得的二级质谱数据通过 GPS Explore 软件 MASCOT 蛋白质数据库中检索, 找出相匹配的蛋白。

1.2.5 蛋白的免疫印迹分析 重组蛋白经 SDS-PAGE 后, 电转移至 PVDF 膜上, 使用含 5% 脱脂牛奶的封闭液过夜封闭, 以 TPPA 阳性梅毒血清为一抗, HRP 标记的羊抗人 IgG 为二抗, 进行 Western blot 分析。

1.2.6 ELISA 间接法的建立与测定 建立间接 ELISA 法, 将 4 μg/mL 的 Gpd 蛋白包被 ELISA 板, 37 °C 包被方式 2 h, 再 4 °C 过夜。封闭液为 1% BSA 并在 4 °C 过夜, 反应条件为 37 °C 温育 45 min, 酶标抗体工作浓度为 1:20 000, 用于检测临床收集的 TPPA 阳性和 TPPA 阴性血清各 20 例。

2 结 果

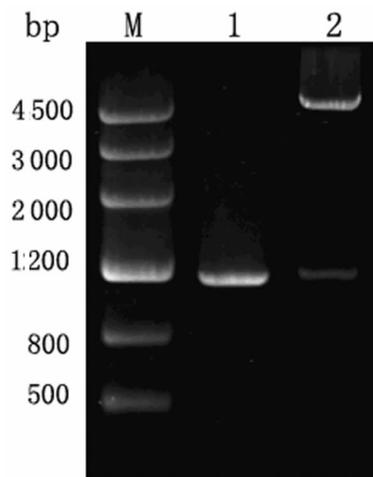
2.1 PCR 扩增结果 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 可见约 1.1 kb 的特异性条带, 见图 1。

2.2 重组质粒 pET28b-Gpd 的鉴定 重组质粒经 Nde I 和 Xho I 酶切, 产物经琼脂糖电泳分析可见约 1.1 和 5.3 kb 的目的条带, 见图 1。

2.3 重组质粒测序结果 提取双酶切鉴定成功的重组质粒送测序, 测序结果经 DNAMAN 软件多重序列对比分析, 结果 GenBank 中登录的 Gpd 基因序列一致。

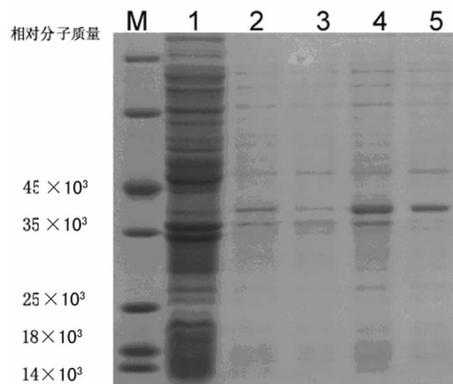
2.4 蛋白的表达和纯化 重组菌的表达产物经 SDS-PAGE 分析, 可见相对分子质量约 41×10<sup>3</sup> 的特异蛋白条带, 主要以包涵体形式表达。经 UVP 凝胶成像系统扫描分析, 目的蛋白分别约占菌体总蛋白的 40%, 纯化后见相对单一的蛋白条带,

见图 2。



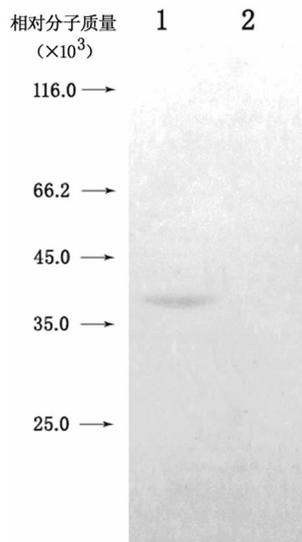
M: DNA 标志物; 1: Gpd 基因的 PCR 产物; 2: pET-28b-Gpd(Nde I/Xho I) 双酶切产物。

图 1 Gpd 基因扩增产物和表达质粒 pET-28b-Gpd 的双酶切鉴定



M: 蛋白质标志物; 1: 未诱导; 2: IPTG 诱导的全菌蛋白; 3: IPTG 诱导的上清; 4: IPTG 诱导的沉淀; 5: 纯化后。

图 2 梅毒螺旋体 Gpd 蛋白的重组表达与纯化



1: 纯化后的 Gpd 蛋白; 2: 经 IPTG 诱导的空载体 pET-28b 转化的 E. coli BL21(DE3) 细菌的裂解液。

图 3 重组蛋白 Gpd 的免疫印迹分析

**2.5 MALDI-TOF 分析** 纯化蛋白 MALDI-TOF 分析后,结果利用 MASCOT 软件查询 NCBI 数据库发现,酶解肽段中,相对分子质量  $1.561\ 79 \times 10^3$  的肽段,其氨基酸序列为 LHT-FEEELQFIR,表明酶解肽段来自克隆的目的蛋白,Gpd 的肽质量指纹图谱(PMF)和串联质谱(MS/MS)分析图。

**2.6 免疫印迹分析** Western blot 结果提示,在相对分子质量约为  $41 \times 10^3$  处可见特异性条带,即重组蛋白 Gpd 可与 TP-PA 阳性血清发生特异性反应,见图 3。

**2.7 ELISA 间接法的建立与测定** 利用建立的 ELISA 间接法测定 20 份 TPPA 阳性血清,发现 1 份标本的结果为阴性,测定 20 份 TPPA 阴性血清标本中全部为阴性,两种方法测定结果的符合率分别为 95%(19/20)和 100%(20/20)。

### 3 讨 论

传统的梅毒血清学诊断实验分为非特异性抗体和特异性抗体的检测。前者如快速血浆反应素实验(RPR)用于检测血清中的磷脂抗体,具有较高的生物假阳性<sup>[5]</sup>;后者如梅毒螺旋体明胶凝集实验(TPPA)用于检测血清中的梅毒特异性抗体,敏感性和特异性较高,但天然抗原制备困难,成本较高,不能自动化,结果判读受主观影响<sup>[6]</sup>。

以基因工程重组表达的抗原所建立的 ELISA 法和免疫化学发光法具有检测成本低、易于自动化和标准化,是梅毒血清学诊断方法发展的主要趋势<sup>[7]</sup>,目前这些方法均以重组 TP15、TP17、TP44.5 和 TP47 等单个蛋白或其组合作为抗原<sup>[8]</sup>,方法的敏感性可以达到 95%以上<sup>[9]</sup>,但临床实践中已发现其结果与传统方法包括 TPPA 的结果出现了不一致性,主要是假阳性<sup>[10-11]</sup>,引起临床对结果解释的困惑,但其真正原因目前尚未阐明。所以需要优化目前基于重组抗原的梅毒血清学诊断方法。但目前非常有限的特异性抗原制约了对方法学的优化,必须积极扩大梅毒螺旋体特异性抗原库,广泛而深入地研究可用于梅毒血清学诊断的新抗原。

本研究通过在大肠杆菌表达系统中克隆表达 Gpd 基因,经纯化后通过 MALDI-TOF 分析证实表达的重组蛋白为 Gpd,其与梅毒阳性血清具有良好的免疫反应性。建立基于 Gpd 蛋白的 ELISA 间接法,并与 TPPA 法的比较,其对 TPPA 阳性血清的检测符合率为 95%(19/20),对 TPPA 阴性血清的检测符合率是 100%(20/20),表明基于重组抗原 Gpd 的 ELISA 间接法与传统的 TPPA 方法具有相当的检测性能,而且容易实现检测的自动化和标准化,在进行高通量和自动化的梅毒快速筛查上具有明显优势。本研究成功获得了重组梅毒螺旋体 Gpd 蛋白,为完善现有梅毒血清学诊断方法提供了新

的候选抗原。

### 参考文献

- [1] Chen ZQ, Zhang GC, Gong XD, et al. Syphilis in China: results of a national surveillance programme [J]. Lancet, 2007, 369 (9556): 132-138.
- [2] Tucker JD, Cohen MS. China's syphilis epidemic: epidemiology, proximate determinants of spread, and control responses [J]. Curr Opin Infect Dis, 2011, 24(1): 50-55.
- [3] Hoover KW, Radolf JD. Serodiagnosis of syphilis in the recombinant era: reversal of fortune [J]. J Infect Dis, 2011, 204(9): 1295-1296.
- [4] Brinkman MB, Mc Kevitt M, Mc Loughlin 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.
- [5] 张津萍, 王千秋, 龚匡隆, 等. 血清标本 10 546 份非梅毒螺旋体抗原血清学试验假阳性结果分析 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2010, 24(7): 638-639.
- [6] 孙慈惠, 邓红樱. 梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验不确定结果相关因素分析 [J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2007, 30(1): 18-19.
- [7] Sena AC, White BL, Sparling PF. Novel treponema pallidum serologic tests: a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century [J]. Clin Infect Dis, 2010, 51(6): 700-708.
- [8] Sun AH, Mao YF, Hu Y, et al. Sensitive and specific ELISA coated by TpN15-TpN17-TpN47 fusion protein for detection of antibodies to treponema pallidum [J]. Clin Chem Lab Med, 2009, 47 (3): 321-326.
- [9] Binnicker MJ, Jespersen DJ, Rollins LO. Treponema-specific tests for serodiagnosis of syphilis: comparative evaluation of seven assays [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1313-1317.
- [10] Centers for Disease Control and Prevention. Discordant results from reverse sequence syphilis screening-five laboratories, United States, 2006-2010 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2011, 60(5): 133-137.
- [11] Park IU, Chow JM, Bolan G, et al. Screening for syphilis with the treponemal immunoassay: analysis of discordant serology results and implications for clinical management [J]. J Infect Dis, 2011, 204(9): 1297-1304.

(收稿日期: 2012-02-12)

## 医学统计工作的基本内容

按工作性质及其先后顺序,可将医学统计工作分为实验设计、收集资料、整理资料、分析资料。实验设计是开展某项医学研究工作的关键,包括医学专业设计和统计学设计,医学专业设计的内容包括研究对象纳入和排除标准、样本含量、获取样本的方法、分组原则、观察(检测)指标、统计方法等。收集资料的方法包括各种试验、检测或调查,要求资料完整、准确、及时、有足够数量、具有代表性和可比性等。整理资料包括原始资料的检查与核对、对资料进行分组与汇总等。分析资料即对资料进行统计学分析,包括进行统计描述和统计推断。