

• 论 著 •

免疫印迹法测定 Tp47 蛋白与梅毒患者血清的免疫反应性*

郑和平, 覃晓琳, 黄进梅, 薛耀华, 白 顺, 吕 萍, 杨 斌[△]

(广东省皮肤性病防治中心, 广东广州 510091)

摘要:目的 克隆 Tp47 基因、构建原核表达载体、表达并纯化 Tp47 蛋白,通过免疫印迹法(Western-Blot)检测其免疫反应活性。**方法** 聚合酶链反应扩增 Tp47 基因,将 Tp47 克隆至 pGEX-6P-1 载体,构建重组表达质粒 pGEX-6P1-Tp47,经测序鉴定正确后,转化大肠埃希菌 BL21(DE3),经诱导表达后,用亲和层析方法纯化重组蛋白,鉴定正确后采用 Western-Blot 检测重组蛋白与梅毒阴性、阳性血清的免疫反应性。**结果** 成功构建 pGEX-6P1-Tp47 原核表达质粒,表达、纯化后获得了相对分子质量约为 71×10^3 的重组蛋白;Western-Blot 检测显示其能与梅毒阳性患者血清发生特异性反应,而与梅毒阴性患者血清无交叉反应性。**结论** 成功克隆、表达、纯化 Tp47 重组蛋白,其与临床各期梅毒患者血清具有较好的免疫反应性,为 Tp47 重组蛋白用于梅毒早期诊断提供了理论依据。

关键词:梅毒; 重组蛋白; 免疫印迹法

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.10.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)10-1327-03

Immunoreactivity analysis of Tp47 recombinant protein of *Treponema Pallidum* by Western-Blot assay*Zheng Heping, Qin Xiaolin, Huang Jinmei, Xue Yaohua, Bai Shun, Lv Ping, Yang Bin[△]

(Guangdong Provincial Centre for Skin Diseases and STIs Control and prevention, Guangzhou, Guangdong 510091, China)

Abstract: Objective To clone, construction, express and purify Tp47 of *Treponema pallidum* (Tp), and assess the immunoreactivity by Western-Blot. **Methods** Tp47 was amplified by polymerase chain reaction, and then cloned to the vector pGEX-6P-1. The correct sequence of the recombinant plasmids pGEX-6P1-Tp47 was transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and induced. The expression product was analyzed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis and Western-Blot. The expression protein was purified. Serum of different clinical stages of syphilis was used as the antibody to detect the immunoreactivity of the protein by Western-Blot. **Results** A fusion protein with molecular weight about 71×10^3 was attained. Western-Blot proved that the recombinant protein can react with Tp IgG positive sera. And the specificities and sensitivities of the diagnostic reagent detected by sera were 100%. **Conclusion** The recombinant protein Tp47 was expressed and purified with good antigen activity, which could provide the basis of theory and practice for the development of early diagnostic kit applying to detect Tp infection.

Key words: *Treponema pallidum*; recombinant protein; Western-Blot

梅毒是由梅毒螺旋体(Tp)感染引起的性传播疾病,病程漫长,早期侵犯生殖器和皮肤,晚期侵犯全身各器官,几乎能累及全身各个脏器,危害极大^[1]。Tp 潜伏感染时间长,可很长时间无明显临床症状。因此,早期诊断对控制梅毒的传播具有重要意义。目前,诊断 Tp 感染主要通过血清学方法检测 Tp 非特异性抗体和特异性抗体。这些试验均采用 Tp 天然抗原作为诊断抗原,而 Tp 目前还不能在体外持续培养,从而导致制备天然抗原较困难。因此,多采用基因重组方法制备 Tp 抗原代替天然抗原以建立酶联免疫吸附试验(ELISA)或免疫印迹法(Western-Blot)检测血清中的抗 Tp 抗体^[2]。目前已重组的 Tp 抗原有多,其中 Tp47 是 Tp 外膜脂蛋白^[3],重组 Tp47 不仅具有高免疫原性,而且能够作为 Tp 诊断抗原,在梅毒诊断中具有重要意义^[4]。本研究利用分子克隆技术获得 Tp47 重组蛋白,并通过 Western-Blot 对其免疫反应性进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 一般资料 Tp Nichols 标准株、载体 pGEX-6P-1 由本院

保存,表达宿主菌大肠埃希菌(*E. coli*)BL21(DE3)购自广州科昂公司。18 例不同临床分期梅毒患者阳性血清标本、10 例梅毒阴性血清标本为本院临床检测标本。

1.2 试剂 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自亚能公司;DNA 分子标记物、Taq DNA 聚合酶、T4 连接酶、限制性内切酶、GST 纯化柱均购自大连 Takara 公司;蛋白分子标记物购自 Fermentas 公司;质粒提取试剂盒、聚合酶链反应(PCR)扩增产物快速回收试剂盒和 DNA 纯化试剂盒购自碧云天公司;异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)、氨苄西林购自上海生工生物工程技术有限公司,三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙烯酰胺、LB 培养基购自 Sigma 公司。PCR 产物合成及 DNA 测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 Tp47 重组质粒的构建 根据 GenBank 中的 Tp47 基因序列(M88769.1),去除信号肽序列,设计引物,委托上海生工生物工程技术有限公司合成。使用基因组 DNA 提取试剂

* 基金项目:广东省科技计划项目(2011B031800225,2012B031800175)。作者简介:郑和平,男,主任技师,主要从事性传播疾病实验室诊断研究。△ 通讯作者,E-mail:yangbin101@hotmail.com。

盒提取 Tp Nichols 株基因组 DNA, 操作步骤按照试剂盒说明书进行。以提取的 DNA 为模板, PCR 扩增 Tp47 基因。反应体系如下: 模板 2 μL, 引物 0.1 μmol/L, dNTP 200 μmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Ex Taq 酶 2 U; 反应条件: 94 °C 10 min, 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 1 min 循环 40 次, 72 °C 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。PCR 产物纯化后经 PCR 产物快速回收试剂盒纯化回收, 将纯化后的 PCR 产物和 pGEX-6P-1 质粒进行双酶切, 将纯化后的酶切 PCR 产物插入到质粒 pGEX-6P-1 中, 获得重组表达质粒 pGEX-6P1-Tp47, 通过测序鉴定获得阳性克隆。

1.3.2 重组蛋白的表达及纯化 将构建正确的重组质粒 pGEX-6P1-Tp47 转化至宿主菌 E. coli BL21(DE3), 挑取单个阳性克隆至含有氨苄西林的 LB 液体培养基, 37 °C 摇床培养过夜, 次日按照 1 : 20 的比例接种至新的含氨苄西林的培养基中, 继续培养 2~3 h, 菌液 600 nm 光密度值为 0.6~1.0 时加入 1 mmol/L IPTG, 37 °C 诱导表达 4~6 h, 同时设未诱导组。离心收集菌体, 用磷酸盐缓冲液重悬后, 在冰浴中超声破碎细菌, 离心, 取上清用 GST 标签蛋白纯化树脂进行纯化, 具体操作参照纯化说明书。表达及纯化产物进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western-Blot 鉴定。

1.3.3 Tp47 重组蛋白的鉴定 经 IPTG 诱导后收集细菌加入 SDS-PAGE 上样缓冲液, 煮沸 3 min, 冷却后离心, 取上清 10 μL 进行 12% SDS-PAGE 电泳, 考马斯亮蓝染色后拍照记录结果。将诱导前、诱导后和纯化的重组蛋白分别上样, 进行 SDS-PAGE 电泳后, 转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜, 先用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 然后加入一抗(GST 标签单克隆抗体, 1 : 2 000)室温孵育 2 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 再加入二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG, 1 : 3 000)室温孵育 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, 增强化学发光法(ECL)显影, TANTEN 成像仪拍照记录结果。

1.3.4 Western-Blot 分析重组蛋白的免疫反应性 将纯化的重组蛋白上样进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 制备成含重组蛋白的膜条, 以 18 例不同期梅毒患者血清作为一抗(1 : 1 000), 以辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG(1 : 3 000)作为二抗, 进行 Western-Blot 检测, ECL 显影, TANTEN 成像仪拍照记录结果。随后, 将该膜条经 0.2 mol/L NaOH 作用 30 min, 以 10 例临床梅毒阴性患者血清作为一抗(1 : 1 000), 以羊抗人 IgG(1 : 2 000)作为二抗, 进行 Western-Blot 检测, ECL 显影, TANTEN 成像仪拍照记录结果。

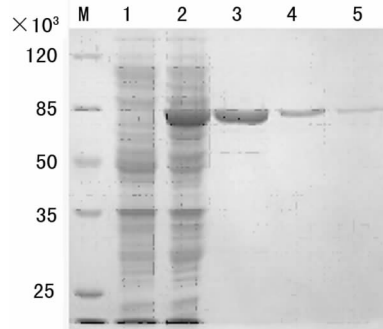
2 结 果

2.1 Tp47 重组质粒的构建 经 PCR 从 Tp 标准株 DNA 中扩增得到 Tp47 基因片段, 酶切, 切胶回收 PCR 产物, 将回收产物连接到载体 pGEX-6P-1 中, 经测序鉴定证实插入片段为 Tp47 基因片段, 测序结果与 GenBank 收录的序列完全一致。

2.2 Tp47 重组蛋白表达、纯化及鉴定 将重组质粒转化至 E. coli BL21(DE3), 挑取阳性重组菌进行 IPTG 诱导表达, 经 12% SDS-PAGE 分析, 可见相对分子质量约为 71 × 10³ 的目的蛋白条带, 大小与理论值相符(见图 1)。将诱导后的蛋白进行 Western-Blot 鉴定, ECL 显影后得到 Western-Blot 结果(见图 2), 在约 71 × 10³ 处有一明显蛋白带, 未诱导的样品为

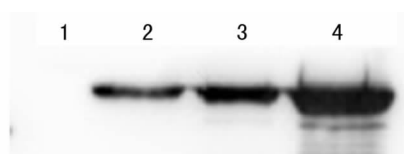
阴性。

2.3 Tp47 重组蛋白的免疫反应性 将纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜, 切成多份小膜条, 分别用 6 例一期、6 例二期和 6 例三期梅毒患者血清和 10 例梅毒阴性患者血清作为一抗, 以羊抗人 IgG 作为二抗进行免疫印迹分析, 结果显示 Tp47 重组蛋白可与一期至三期梅毒患者血清发生反应, 而与梅毒阴性患者血清无反应, 见图 3~4。



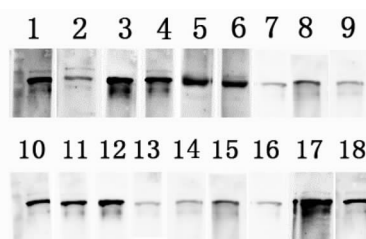
M: 蛋白分子标记物; 1: TP47 重组蛋白诱导前; 2: TP47 重组蛋白诱导后; 3~5: TP47 纯化蛋白。

图 1 SDS-PAGE 分析 TP47 蛋白的表达及纯化



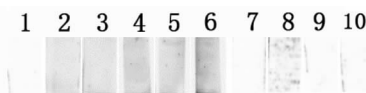
1: TP47 重组蛋白诱导前; 2~3: TP47 纯化蛋白; 4: TP47 重组蛋白诱导后。

图 2 Western-Blot 分析 TP47 重组蛋白的表达及纯化



1~6: 一抗为一期梅毒患者血清, 二抗为羊抗人 IgG; 7~12: 一抗为二期梅毒患者血清, 二抗为羊抗人 IgG; 13~18: 一抗为三期梅毒患者血清, 二抗为羊抗人 IgG。

图 3 Western-Blot 分析 Tp47 重组蛋白的免疫反应性



1~10: 一抗为梅毒阴性患者血清, 二抗为羊抗人 IgG。

图 4 Western-Blot 分析 TP47 重组蛋白的特异性

3 讨 论

研究发现有多种 Tp 外膜脂蛋白具有很强的反应原性, 其中 TP15、TP17、TP0453、TP47 已联合应用于 ELISA 梅毒检测试剂盒, 其中 TP47 蛋白被认为是 Tp 内丰度最高、抗原性强和特异性好的抗原^[5]。Lemos 等^[6]报道, 在梅毒初期 Tp47 蛋白的抗原反应性较其他抗原更敏感, 说明该蛋白为主要免疫原, 可作为梅毒的早期诊断指标。Sato 等^[7]也报道, Tp47 抗原表

位不仅可检测一期梅毒,也是活动性梅毒的一个标志,对于伴有免疫缺陷病毒(HIV)感染的梅毒患者,在 Tp 抗体滴度低于一般梅毒患者情况下,也可检测 Tp47 抗体。因此 Tp47 蛋白是梅毒诊断中的重要抗原。

本研究采用基因重组技术克隆了 Tp47 基因,成功构建了 Tp47 重组质粒,并获得了高浓度表达的以包涵体形式存在的 Tp47 重组蛋白。进一步采用 Western-Blot 分析纯化重组蛋白的免疫反应性,显示其能与临床各期梅毒阳性血清发生反应,而与梅毒阴性血清无交叉反应,说明 Tp47 重组蛋白具有良好的免疫反应性,同时敏感性较高,血清用量比商品化 Western-Blot 检测试剂盒用量(1:200)小 5 倍。

有研究通过 Western-Blot 检测,发现 Tp47 在一期梅毒、二期梅毒、潜伏梅毒和血清固定梅毒中阳性率分别为 87.5%、100.0%、93.3%和 92.3%^[8]。本研究选择的梅毒阳性血清包括一期、二期和三期梅毒血清,由于各血清标本梅毒螺旋体明胶凝集试验(TPPA)均为阳性(TPPA 滴度不小于 1:80),甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)为阳性(TRUST 滴度不小于 1:1),结果显示 Tp47 均呈现阳性反应,且敏感性未存在明显差异。

本研究中,Tp47 蛋白纯化过程中洗脱的第一管浓度较大,在目的蛋白大小附近含有微量菌体杂蛋白,在免疫反应性检测时选用了浓度较高的第一管,因此结果中部分膜条显示有少量杂带现象。本研究表达 Tp47 重组蛋白表达量高,虽然含有 GST 标签,同时存在于包涵体中,但是仍然具有较好的免疫反应性,为下一步研究该蛋白在梅毒早期或合并 HIV 感染的诊断中奠定了良好基础。

参考文献

- [1] Cohen SE, Klausner JD, Engelman J. Syphilis in the modern era: an update for physicians[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 2013, 27(4):705-722.
- [2] Morshed MG. Current trend on syphilis diagnosis: issues and challenges[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 808(1):51-64.
- [3] 韦善求, 顾国龙. 梅毒螺旋体基因重组抗原及其血清学诊断研究进展[J]. *检验医学*, 2009, 24(9):700-703.
- [4] Castro R, Prieto ES, Santo I, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*[J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(1):250-253.
- [5] Miranda AP, Sato NS. Profile of anti-Tp47 antibodies in patients with positive serology for syphilis analyzed by Western Blot[J]. *Braz J Infect Dis*, 2008, 12(2):139-143.
- [6] Lemos EA, Belem ZR, Santos A, et al. Characterization of the Western blotting IgG reactivity patterns in the clinical phases of acquired syphilis[J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2007, 58(2):177-183.
- [7] Sato NS, Hirata MH, Hirata RDC, et al. Analysis of *Treponema pallidum* recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique[J]. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 1999, 41(2):115-118.
- [8] 米希婷. 梅毒螺旋体外膜蛋白 TP15、TP17、TP47 在梅毒免疫中的作用[D]. 太原:山西医科大学, 2010.
- [9] Ocampo Ancheta NF, Palacio Cantero A, Negrín Valdés T, et al. Concordancia en el diagnóstico clínico y patológico del infarto agudo de miocardio[J]. *CorSalud*, 2012, 4(4):236-245.
- [10] Li J, Yin FF, Hou YL. Early diagnosis of rats with acute myocardial infarction by measurement of brain natriuretic peptide[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(4):1201-1205.
- [11] Stojkovi A, Tomaevi M, Krsti N, et al. The effect of stress induced-hyperglycemia on hospital treatment outcome in patients with acute myocardial infarction with ST segment elevation[J]. *Acta Med Medianae*, 2012, 51(3):18-23.
- [12] Srensen JT, Stengaard C, Srensen CA, et al. Diagnosis and outcome in a prehospital cohort of patients with bundle branch block and suspected acute myocardial infarction[J]. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care*, 2013, 2(2):176-181.
- [13] Soeiro AM, Ruppert AD, Canzian M, et al. Postmortem diagnosis of acute myocardial infarction in patients with acute respiratory failure; demographics, etiologic and pulmonary histologic analysis [J]. *Clinics*, 2012, 67(3):213-217.
- [14] Gupta S, Singh KN, Bapat V, et al. Diagnosis of acute myocardial infarction: CK-MB versus cTn-T in Indian patients[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2008, 23(1):89-91.
- [15] Navarro E, Bañón R, Giner S, et al. Utilidad de la determinación de la fracción I de la Troponina cardíaca (cTnI), en el diagnóstico de la muerte súbita de origen cardíaco en autopsias forenses[J]. *Cuadernos de Medicina Forense*, 2007, 13(48/49):131-142.
- [16] Reyes DRA. Caracterización del infarto agudo de miocardio en Venezuela durante el ao 2008[J]. *CorSalud*, 2010, 2(1):45-54.
- [17] Ravkilde J, Nissen H, Hrder M, et al. Independent prognostic value of serum creatine kinase isoenzyme MB mass, cardiac troponin T and myosin light chain levels in suspected acute myocardial infarction: analysis of 28 months of follow-up in 196 patients[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1995, 25(3):574-581.
- [18] González L, Cartaza YS, Toledo O, et al. Management of acute myocardial infarction at Hermanos Ameijeiras Coronary Care Unit, 2006-2007[J]. *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular*, 2011, 17(2):452-459.
- [19] Kimm H, Yun J E, Lee S H, et al. Validity of the diagnosis of acute myocardial infarction in Korean national medical health insurance claims data; the Korean Heart Study (1)[J]. *Korean Circ J*, 2012, 42(1):10-15.

(收稿日期:2015-03-02)

(收稿日期:2015-01-02)

(上接第 1326 页)