

• 论 著 •

多表位融合蛋白对减少梅毒抗体测定假反应性的作用*

雷 雪¹, 林勇平¹, 向 波¹, 杜丽枝¹, 邓湘雪², 刘斯琦², 林润培², 刘忠民^{1△}

1. 广州医科大学附属第一医院检验科, 广东广州 510000; 2. 广州医科大学金城检验学院, 广东广州 510000

摘 要:目的 针对梅毒低流行率人群, 采用多表位融合片段策略以提高苍白密螺旋体(Tp)筛查试验的特异性, 减少 Tp 假反应性结果。方法 通过原核表达系统获得包含 Tp47 蛋白多个优势 B 细胞表位的多表位融合蛋白。随后将该多表位融合蛋白作为抗原用于建立双抗原夹心酶联免疫吸附试验(ELISA)法并检测 96 份梅毒阳性血清($1 \leq S/CO \leq 10$)。将梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA)结果作为标准, 将多表位融合蛋白的灵敏度和特异性与 Tp47 蛋白进行比较。结果 多表位融合蛋白双抗原夹心 ELISA 法检测的灵敏度和特异性分别为 90.32% 和 94.12%, Tp47 蛋白双抗原夹心 ELISA 法检测的灵敏度为 93.55%, 特异性较低, 为 79.41%。多表位融合蛋白双抗原夹心 ELISA 法与 TPPA 结果的符合率为 91.67%, 高于 Tp47 蛋白的 88.54%。结论 多表位融合蛋白可有效提高梅毒血清学诊断的特异性。该研究为开发新一代具有较高特异度的梅毒诊断方法提供了思路。

关键词: B 细胞表位; 梅毒; 假反应性; Tp47 蛋白; 酶联免疫吸附试验; 多表位融合蛋白

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.02.016 **中图法分类号:**R446.61

文章编号:1673-4130(2021)02-0197-05 **文献标志码:**A

Effect of multi-epitope fusion protein for resolving false reactivity in syphilis antibody test*

LEI Xue¹, LIN Yongping¹, XIANG Bo¹, DU Lizhi¹, DENG Xiangxue²,
LIU Siqi², LIN Runpei², LIU Zhongmin^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 2. KingMed School of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China

Abstract: **Objective** To adopt the multiple-epitope fusion fragment strategy to increase the specificity of anti-treponema pallidum (Tp) screening test for decreasing the Tp false reactivity results by aiming at the population of syphilis low prevalence rate. **Methods** The multi-epitope fusion protein containing multiple dominant B-cell epitopes of Tp47 protein were obtained by the prokaryotic expression system. Subsequently, the multi-epitope fusion protein was used as an antigen to establish an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) double antigen sandwich to detect 96 cases of syphilis positive serum ($1 \leq S/CO \leq 10$). Then, the TPPA results were used as the standard, and the sensitivity and specificity of the multi-epitope fusion protein were compared with Tp47 protein. **Results** The sensitivity and specificity of double antigen sandwich ELISA were 90.32% and 94.12% respectively. The sensitivity of Tp47 protein detected by ELISA double antigen sandwich was 93.55%, while the specificity was low, which was 79.41%. The coincidence rate with multiple-epitope fusion protein TPPA double antigen sandwich with the results of TPPA was 91.67%, which was higher than 88.54% in Tp47 protein. **Conclusion** The multi-epitope fusion protein can effectively increase the specificity of syphilis serum diagnosis, and provide an ideas for the development of a new generation of syphilis diagnostic methods with higher specificity.

Key words: B cell epitope; syphilis; false reactivity; Tp47 protein; ELISA; multi-epitope fusion protein

* 基金项目: 广州医科大学大学生实验室开放项目(B185004171)。

作者简介: 雷雪, 女, 技师, 主要从事分子生物学研究。△ 通信作者, E-mail: gylzm08@126.com。

本文引用格式: 雷雪, 林勇平, 向波, 等. 多表位融合蛋白对减少梅毒抗体测定假反应性的作用[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(2): 197-

苍白密螺旋体(Tp)感染引起的梅毒对人体可造成组织损伤和多器官功能障碍^[1-2]。梅毒引起的早期皮损极大增加了人类免疫缺陷病毒(HIV)的感染概率^[3],该病还可以通过母婴传播威胁下一代健康,已成为严重的公共卫生问题。随着 DNA 技术的发展,高通量、自动化、易于标准化的筛查试验大量出现^[4],酶联免疫吸附试验(ELISA)和化学发光免疫分析(CLIA)广泛应用于人群疾病的筛查和诊断,这些试验将多种重组蛋白组合作为抗原,灵敏度可高达 100%,但是特异度尚不理想^[5-6]。近年来,国内外较多实验室采用反向筛查方法发现,在梅毒低流行率人群中,ELISA/CLIA 结果出现了较高的假反应性^[7-8]。这不仅给检验工作带来了错误的结果、影响临床诊断,而且还会增加患者的心理负担和医疗支出,甚至引起医疗纠纷。Tp47 蛋白是检测梅毒的特异性抗体中的主要抗原之一,但有研究报道,Tp47 蛋白中有一段氨基酸序列与人纤维连接蛋白序列有较高的同源性,这可能是梅毒筛查结果出现假反应性的原因之一^[9]。因此,本研究拟利用生物信息学技术预测 Tp47 蛋白的 B 细胞表位,利用重叠 PCR 技术连接含多个表位基因的片段,去掉抗原性差的部分构建、表达出多表位融合蛋白,使用辣根过氧化物酶(HRP)标

记该多表位融合蛋白,建立双抗原夹心 ELISA 法对临床标本进行评估。本研究还比较多表位融合蛋白和 Tp47 蛋白分别作为抗原的检测性能,以期能够提高方法的特异度,从根本上解决梅毒特异性抗体血清筛查假反应性高的共性问题。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 3 月至 2018 年 3 月广州医科大学附属第一医院雅培全自动免疫分析仪 Architect i2000(简称 Architect i2000)梅毒检测阳性血清标本 96 份(1≤S/CO≤10),健康人标本 50 份。血清分装后保存于-80℃超低温冰箱。

1.2 仪器与试剂 质粒提取和胶回收试剂盒购自天根公司;Premix Ex Taq DNA 聚合酶购自 TAKARA 公司;内切酶 XhoI、NcoI、T4 DNA 连接酶和蛋白标准相对分子质量购自 Thermo Fisher 公司;HRP 购自 Sigma 公司;His Trap FF 亲和层析柱购自 GE 公司。

1.3 方法

1.3.1 重叠 PCR 基因扩增 根据 Genbank 中的 Tp47 基因序列,使用 IEDB 等预测软件进行 B 细胞表位预测,选定优势表位基因片段。应用 Primer Premier V5.0 软件设计引物,委托上海生物工程有限公司合成引物。引物序列见表 1。

表 1 Tp47 基因优势抗原表位的引物设计

DNA 片段	引物	引物序列(5′~3′)
A(80~120aa)	F1	CATGCCATGGGCATGGCGTTCCGTCAGCAATC
Nco I	R1	ATCTTGATTTCCTCGCTGTCA <u>ACGCTTGGGTCAGTCTC</u>
B(160~260aa)	F2	GAGACTGACCCAAGCGTTGACAGCGAGGAATACAAGAT
	R2	TACCACACGAAATGCGAG <u>AGCCATCAGCCCTTTTCA</u>
C(300~390aa)	F3	TGAAAAGGGCTGATGGCTCTCGCATTTCGTGTGGTA
Xho I	R3	CCGCTCGAGCTTAGGCTGTCCATCGGCA

注:下划线的引物为重叠互补序列。

使用质粒提取试剂盒提取 Tp47 基因组 DNA,以其为模板,PCR 扩增、融合 3 个基因片段获得多表位融合蛋白基因。反应体系共 50.0 μL:2×Ex Taq Master Mix 25.0 μL,引物 F1 和 R3 10.0 μmol/L,其余引物各 1.0 μmol/L,模板 40.0 ng。反应条件:94℃ 5 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.2 构建重组质粒 将 PCR 产物与 pET-28b 载体进行双酶切,回收目的 DNA 片段后于 22℃下连接 3 h,将连接片段转导至感受态细胞 DH5α 中,经卡那霉素筛选阳性克隆,提取质粒双酶切鉴定并测序。测序阳性质粒导入 BL21(DE3)感受态细胞中准备诱导。

1.3.3 重组蛋白的诱导表达与纯化 将重组工程菌按 1:100 的比例接种于含卡那霉素的 LB 培养基中,待菌液 A 值为 0.6~0.8 时,加入异丙基 β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)至水平为 1.0 μmol/L。诱导 6 h 后收集菌液进行超声碎菌(150 W,超声 4 s,暂停 4 s,共 100 次),4℃ 12 000 r/min 离心 10 min 后分别收集上清液和沉淀,聚丙烯酰胺凝胶电泳分析目的蛋白。使用 ATKA 系统(镍离子亲和层析柱法)纯化蛋白后对纯化后的蛋白进行透析除盐和复性。

1.3.4 质谱鉴定和免疫印迹试验(WB) 使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱分析(MALDI-TOF-MS)得到蛋白质指纹图谱,与 Blast 数据库进行对比。进行梅毒螺旋体颗粒凝集试验(TPPA),阳性血清为

一抗,HRP 标记的羊抗人 IgG 为二抗,评估重组蛋白的免疫反应性。

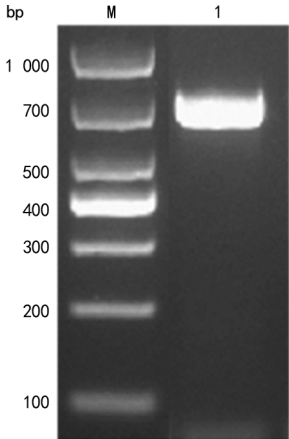
1.3.5 HRP 标记 采用过碘酸钠法,使用商品化的 HRP 标记重组蛋白,作为双抗原夹心 ELISA 法的酶标二抗。

1.3.6 双抗原夹心 ELISA 法的建立 以纯化、透析后的多表位融合蛋白作为包被抗原,HRP 标记的多表位融合蛋白作为酶标二抗建立双抗原夹心 ELISA 法。通过棋盘法优化包被抗原和酶标抗原水平、血清稀释度、包被条件、封闭条件和封闭方式等。

1.3.7 ELISA 法检测临床血清 采用优化后的 ELISA 检测体系对 50 份阴性血清进行检测,以 $\bar{x} \pm 3s$ 作为临界值,大于该值则判定为阳性。对 96 份 Architect i2000 梅毒检测阳性的标本($1 \leq S/CO \leq 10$)再次进行检测,以 TPPA 结果为标准,比较 Tp47 蛋白和多表位融合蛋白 ELISA 法的灵敏度和特异度。

2 结 果

2.1 重叠 PCR 基因扩增结果 经重叠 PCR 技术获得多表位融合蛋白基因,琼脂糖凝胶电泳分析结果见图 1。基因扩增产物为 700 bp,与预计相符。



注:M 为 DL1000 DNA 标志物;1 为多表位融合蛋白基因 PCR 产物。

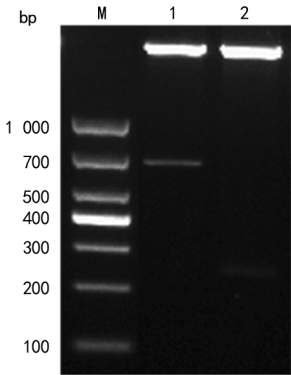
图 1 扩增产物的电泳分析

2.2 重组质粒载体构建结果 重组载体的双酶切鉴定结果见图 2,酶切后的基因片段约为 700 bp,符合预期。取阳性质粒送样测序,与数据库中 Tp47 基因组一致。

2.3 多表位融合蛋白的表达与纯化 重组工程菌在 IPTG 的诱导下表达,主要以包涵体形式存在,可使用亲和层析柱进行纯化,电泳结果见图 3。

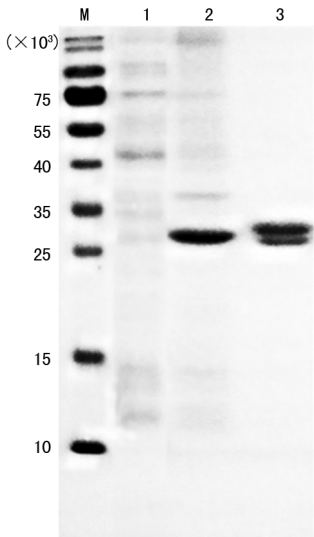
2.4 质谱鉴定与 WB 结果 目的蛋白进行 MALDI-TOF-MS 后,利用 Mascot 软件在 MSDB 数据库对质谱结果进行检索。检索结果显示,多表位融合蛋白的肽段序列(GSHMASMTGGQQMGR)与梅毒螺旋体 Tp47 蛋白相匹配,得分 103 分,高于阈值分数 60 分

($P < 0.05$),证明多表位融合蛋白为梅毒螺旋体 47×10^3 脂蛋白片段。WB 结果表明,多表位融合蛋白能与 TPPA 阳性血清发生特异性反应,见图 4。



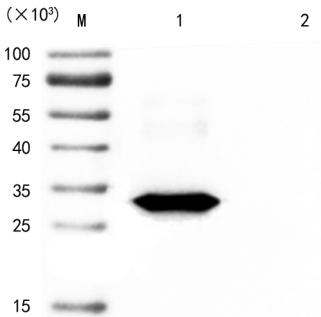
注:M 为 DL1000 DNA 标志物;1 为 pET-28b-多表位融合蛋白基因双酶切产物;2 为 pET-28b 双酶切产物。

图 2 重组质粒的双酶切鉴定



注:M 为蛋白标准相对分子质量;1 为诱导蛋白上清液;2 为诱导蛋白沉淀;3 为纯化后的诱导蛋白;3 号条带中多表位融合蛋白在包涵体变性纯化阶段可能存在降解,降解片段在后续复性过程中出现沉淀而被分离;聚丙烯酰胺凝胶电泳后,凝胶使用考马斯亮蓝进行染色,脱色后使用 Tanon 凝胶成像系统进行拍照,故为黑色。

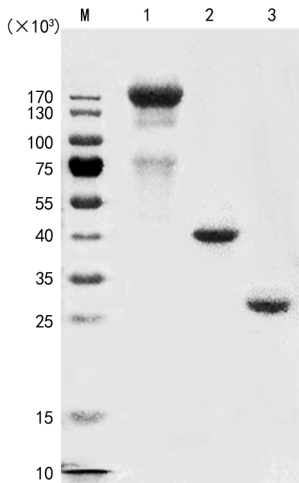
图 3 多表位融合蛋白的纯化



注:M 为蛋白标准相对分子质量;1 为多表位融合蛋白诱导菌体蛋白;2 为 pET-28b 诱导菌体蛋白(空载诱导蛋白)。

图 4 多表位融合蛋白的 WB 结果

2.5 HRP 标记 使用过碘酸钠法进行 HRP 标记,电泳结果显示在 170×10^3 上出现蛋白条带,表明标记成功,见图 5。



注:M 为蛋白标准相对分子质量;1 为 HRP-多表位融合蛋白;2 为 HRP;3 为多表位融合蛋白;条带使用考马斯亮蓝进行染色,脱色后使用 Tanon 凝胶成像系统进行拍照,故为黑色。

图 5 HRP 标记多表位融合蛋白电泳结果

2.6 血清检测结果

2.6.1 多表位融合蛋白双抗原夹心 ELISA 法检测结果 50 份 Architect i2000 梅毒检测阴性 ($S/CO < 1$) 且 TPPA 为阴性结果的标本,平均 A 值为 0.107, s 为 0.051,计算得出临界值为 0.258。将 $A \text{ 值} \geq 0.26$ 的血清标本判读为阳性,以此临界值作为标准,对 96 份 Architect i2000 梅毒检测阳性血清 ($1 \leq S/CO \leq 10$) 再次进行检测,其中 58 份为阳性,38 份为阴性。以 TPPA 的结果为标准,多表位融合蛋白双抗原夹心 ELISA 法的灵敏度和特异度为 90.32% (56/62) 和 94.12% (32/34),与 TPPA 结果的符合率为 91.67% (88/96),见表 2。

表 2 多表位融合蛋白双抗原夹心 ELISA 法和 TPPA 法的检测结果比较 (n)

多表位融合蛋白双抗原夹心 ELISA 法	TPPA 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	56	2	58
阴性	6	32	38
合计	62	34	96

2.6.2 Tp47 蛋白双抗原夹心 ELISA 法检测结果 50 份 Architect i2000 梅毒检测阴性 ($S/CO < 1$) 且 TPPA 为阴性结果的标本,平均 A 值为 0.072, s 为 0.041,计算得出临界值为 0.195。将 $A \text{ 值} \geq 0.195$ 的血清标本判读为阳性,以此临界值作为标准,对 96 份 Architect i2000 梅毒检测阳性血清 ($1 \leq S/CO \leq 10$) 再次进行检测,其中 65 份为阳性,31 份为阴性。以 TP-

PA 的结果为标准, Tp47 蛋白双抗原夹心 ELISA 法的灵敏度和特异度为 93.55% (58/62) 和 79.41% (27/34),与 TPPA 结果的符合率为 88.54% (85/96),见表 3。

表 3 Tp47 蛋白双抗原夹心 ELISA 法和 TPPA 法的检测结果比较 (n)

Tp47 蛋白双抗原夹心 ELISA 法	TPPA 法		合计
	阳性	阴性	
阳性	58	7	65
阴性	4	27	31
合计	62	34	96

3 讨 论

本研究利用多表位融合蛋白运用优化后的双抗原夹心 ELISA 法检测梅毒血清标本,该法与 TPPA 结果的符合率为 91.67%,特异度为 94.12%,而基于 Tp47 蛋白的双抗原夹心 ELISA 法与 TPPA 结果的符合率为 88.54%,特异度为 79.41%。与 Tp47 蛋白双抗原夹心 ELISA 法相比,多表位融合蛋白双抗原夹心 ELISA 法检测的特异度较高,说明通过应用优势表位融合蛋白作为抗原,提高临床梅毒筛查的特异度,解决临床假反应性的方案是可行的。

本研究结果发现,基于多表位融合蛋白的双抗原夹心 ELISA 法检测中有两份标本出现了假反应性结果,可能是因为血清中存在某些未知的因素引起的交叉反应,目前尚未得知。例如:有 6 份阳性标本漏检,可能是因为仅仅使用了 Tp47 的大部分优势表位,存在选择遗漏。TPPA 虽然作为目前诊断梅毒的金标准,但所用的诊断抗原为 Tp 裂解的全天然蛋白抗原,包含众多的复杂表位,因此也存在某些交叉反应而可能导致假反应性结果,在后续试验中应进一步使用多种诊断方法进行评估。

国内外的研究常使用表位预测的方法预测优势表位基因片段,并对其优势表位基因片段进行表达。目前梅毒抗体检测多采用 Tp47 (Tp0574)、Tp17 (Tp0453) 和 Tp15 (Tp0171) 等蛋白通过不同的组合作为抗原^[10-11],较少有研究针对优势表位基因片段进行融合表达,本研究的创新性在此。有研究通过表达伯氏疏螺旋体特有的表位短肽作为抗原靶标,通过消除非特异性表位,提高了莱姆病检测的特异度^[12]。LIN 等^[13]选用丙型肝炎病毒 (HCV) 基因组的型特异区段和优势抗原表位合成多表位融合重组抗原,与第二代 HCV 的血清学检测方法相比,灵敏度和特异度提高了 2~4 倍。因此,利用优势抗原表位融合蛋白作为抗原进行血清学检测,可能有助于提高诊断的特异度。鉴于以上情况,本研究利用生物信息技术预

测 Tp47 蛋白的 B 细胞表位,利用重叠 PCR 技术连接含多个表位基因的片段,去掉抗原性差的部分构建、表达出多表位融合蛋白,使用 HRP 标记该多表位融合蛋白,建立双抗原夹心 ELISA 法,对临床标本进行评估。

本研究仅使用目前主要的诊断梅毒的抗原 Tp47 蛋白作为试验目标,较为局限,还可以考虑优化其他具有强免疫反应性的蛋白如 Tp15、Tp17 等,联合多个不同蛋白的多表位融合蛋白作为抗原,提高 ELISA 法检测的灵敏度和特异度。此外,WANG 等^[14]通过在 ELISA 法中添加尿素解离的步骤,选择合适的解离浓度和时间,使假阳性血清标本转为阴性,改进 ELISA 法的灵敏度(100.00%),为本试验中多表位融合蛋白检测灵敏度较低的情况提供了改进方案。

在未来的研究中,通过联合多种蛋白和改进试验步骤的方式,争取在高灵敏度的前提下,建立高特异度的梅毒血清学筛查方法。还可以利用多表位融合蛋白建立化学发光法以提高梅毒的筛查速度,该策略也可用于目前 HIV、HCV 等存在高假阳性标本的临床血清学筛查中。

本研究以多表位融合蛋白作为包被抗原,HRP 标记该蛋白作为酶标抗原,对临床标本进行检测,与 Tp47 蛋白相比,具有更好的检测性能。国内外较少有对优势表位基因片段进行融合表达后方法学的建立。本研究为解决梅毒血清学筛查中假反应性问题提供了思路,为新一代的梅毒血清学诊断方法的建立提供了重要的实验依据。

参考文献

[1] HOOK E W. Syphilis [J]. Lancet, 2017, 389 (10078): 1550-1557.

[2] PEELING R W, MABEY D, KAMB M L, et al. Syphilis [J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3(1): 170-173.

[3] NOVAK R M, GHANEM A, HART R, et al. Risk factors and incidence of syphilis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected persons: the HIV outpatient study, 1999—2015 [J]. Clin Infect Dis, 2018, 67(11): 1750-1759.

[4] KUBANOV A, RUNINA A, DERYABIN D. Novel treponema pallidum recombinant antigens for syphilis diagnostics: current status and future prospects [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 143680.

[5] WELLINGHAUSEN N, DIETENBERGER H. Evalua-

tion of two automated chemiluminescence immunoassays, the LIAISON Treponema screen and the ARCHITECT Syphilis TP, and the Treponema pallidum particle agglutination test for laboratory diagnosis of syphilis [J]. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(8): 1375-1377.

[6] LI L, CAI B, TAO C, et al. Performance evaluation of CLIA for treponema pallidum specific antibodies detection in comparison with ELISA [J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(3): 216-222.

[7] Centers for Disease Control and Prevention. Discordant results from reverse sequence syphilis screening: five laboratories, United States, 2006—2010 [J]. Morb Mortal Wkly Rep, 2011, 60(5): 133-137.

[8] WANG K D, XU D J, SU J R. Preferable procedure for the screening of syphilis in clinical laboratories in China [J]. Infect Dis, 2016, 48(1): 26-31.

[9] BAUGHN R E, JIANG A, ABRAHAM R, et al. Molecular mimicry between an immunodominant amino acid motif on the 47-kDa lipoprotein of Treponema pallidum (Tpp47) and multiple repeats of analogous sequences in fibronectin [J]. J Immunol, 1996, 157(2): 720-731.

[10] SUN A H, MAO Y F, 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.

[11] MCGILL M A, EDMONDSON D G, CARROLL J A, et al. Characterization and serologic analysis of the Treponema pallidum proteome [J]. Infect Immun, 2010, 78(6): 2631-2643.

[12] SIGNORINO G, ARNABOLDI P M, PETZKE M M, et al. Identification of OppA2 linear epitopes as serodiagnostic markers for Lyme disease [J]. Clin Vaccine Immunol, 2014, 21(5): 704-711.

[13] LIN S, ARCANGEL P, MEDINA-SELBY A, et al. Design of novel conformational and genotypespecific antigens for improving sensitivity of immunoassays for hepatitis C virus-specific antibodies [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3917-3924.

[14] WANG Q, LEI Y, LU X, et al. Urea-mediated dissociation alleviate the false-positive Treponema pallidum-specific antibodies detected by ELISA [J]. PLoS One, 2019, 14(3): e0212893.