

结核分枝杆菌 CFP10、ESAT6 蛋白的原核表达、纯化及 ELISPOT 检测方法的建立与应用

王晓玮¹, 程筱雯¹, 张 焰¹, 徐东芳², 王东萍², 韦 薇², 王 庆², 徐元宏¹

摘要 以结核分枝杆菌 CFP10、ESAT6 蛋白原核表达、纯化体系为基础, 建立稳定的 ELISPOT 方法; 检测 164 份疑似结核患者标本的外周血 ELISPOT, 与临床诊断及 T-SPOT·TB 结果对比。表达所得重组蛋白浓度和纯度如下: CFP10 为 0.5 mg/ml 84%; ESAT6 为 4 mg/ml 98%。ELISPOT 方法最佳实验条件为每孔细胞密度 2×10^5 /孔, CFP10、ESAT6 蛋白抗原浓度分别为 10 μ g/孔, 细胞孵育时间 20 h。ELISPOT 的灵敏度与特异度分别为 88.50%、82.35%, 检测结果与 T-SPOT·TB 方法结果一致 ($\chi^2 = 0.57$)。

关键词 结核病诊断; γ -干扰素; ELISPOT; CFP10; ESAT6

中图分类号 R 446.61

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1347-05

据最新统计, 全球每年新增约 860 万人感染活动性结核杆菌, 每年约有 130 万人死于结核病, 中国现有约 500 万活动性肺结核患者, 病例数居世界首位^[1]。目前我国结核患者的诊断主要依据痰涂片查找抗酸杆菌、影像学检查、临床表现等, 阳性率普遍偏低。ELISPOT 是一种通过抗体捕获培养中的细胞分泌的细胞因子从而定量检测细胞因子生成细胞的方法^[2]。T-SPOT·TB 是美国 FDA 批准的 2 种 γ 干扰素释放试验 (interferon gamma release assays, IGRAs) 的商品化试剂盒之一, 可辅助诊断结核感染, 其基本原理为 ELISPOT^[3], 由于试剂检测成本昂贵, 至今未在国内普及。该研究通过构建 ELISPOT 实验方法, 摸索 ELISPOT 技术检测结核分枝杆菌感染的条件, 验证该方法的灵敏度与特异度, 初步评价本实验室建立的 ELISPOT 方法在结核病诊断中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取安徽省胸科医院 2014 年 164

2015-05-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81171606); 安徽省临床检测技术公共服务平台 (编号: PT20081011)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院检验科, 合肥 230022

²安徽省胸科医院检验科, 合肥 230022

作者简介: 王晓玮, 女, 硕士研究生;

徐元宏, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xy-hong1964@163.com

例疑似结核住院患者, 其中男 117 例, 女 47 例; 最终确诊结核患者 137 例, 年龄 17 ~ 71 (40.8 \pm 19.6) 岁。结核明确诊断根据临床表现、影像学检查、病原学检查、组织病理学以及对抗痨治疗反应等。采用双盲法进行 T-SPOT·TB 实验与 ELISPOT 实验。

1.2 实验试剂与仪器 PCR 试剂、预染蛋白 Marker、CO₂ 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); DNA Marker、限制性内切酶 Hind III、BamH I (日本 TaKaRa 公司); DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、异丙基硫代-D-半乳糖苷 (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside, IPTG)、高纯度质粒小提中量试剂盒 (上海生工生物工程公司); Ni-NTA 树脂 (德国 QIAGEN 公司); GST 亲和层析系统 (德国 MERCK 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (美国 Pierce 公司); 淋巴细胞分离液、96 孔 ELISPOT 试剂盒 (北京达科为); T-SPOT·TB 结核试剂盒 (英国 Oxford Immunotec 公司); RPMI-1640 培养基、AIM V 培养基 (美国 GIBCO 公司); 胎牛血清 (杭州四季青公司); 高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司)。

1.3 重组表达质粒的构建及鉴定 以结核分枝杆菌 H37Rv 株基因组为模板, 针对目的基因的开放阅读框区域, 设计 4 条特异性引物如表 1。PCR 扩增片段酶切后分别连接到原核表达载体 pGEX-6p-1 和 pET-32a(+), 原核表达重组质粒。分别对其 PCR 结果鉴定后取菌液 PCR 检测阳性的菌液克隆, 提取质粒送上海生工生物工程公司测序鉴定。

表 1 CFP10 与 ESAT6 特异性引物保护碱基及酶切位点

基因	保护碱基	限制性内切酶	引物序列(5'-3')
CFP10	CGC	BamH I	F: CGCGGATCCGAAGCCCATTTGCCAGGA
	CCG	Hind III	R: CCGAAGCTTATGGCAGAGACTAAGACCGA
ESAT6	CGC	BamH I	F: CGCGGATCCATGACAGAGCAGCACTGGAA
	CCG	Hind III	R: CCGAAGCTTCTATGCCAACATCCCAGTGAC

下划线为酶切位点

1.4 目的基因在大肠杆菌的表达和纯化 将鉴定后的重组表达质粒转化宿主大肠杆菌 BL21 (DE3), 加 IPTG 诱导, 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分析目的蛋白, 表达结果以表达量最高的阳性质粒保存。分别将筛选出的高表达质粒转入宿主菌诱导后大量表达特异性目的蛋白, 分别通过 GST 融合蛋白和 Ni-NTA

介质金属螯和亲和层析法纯化 CFP-10 与 ESAT-6。后经 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定目的蛋白纯度,用 BCA 法测定蛋白浓度。

1.5 外周血单个核淋巴细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 的分离 收集 5 ml 患者血液,加入 5 ml RPMI-1640 培养基等体积混匀,加至 5 ml 淋巴细胞分离液的上层;2 300 r/min 水平梯度离心 20 min。吸取淋巴细胞分离层,加入 RPMI-1640 培养基至 10 ml;1 500 r/min 离心 10 min 后弃上清液,重复一次;加入 0.4 ml AIM V 培养基,混匀;细胞计数并将细胞浓度调整为 5×10^7 个/ml 备用。

1.6 建立 ELISPOT 检测结核分枝杆菌感染的条件 调整不同的实验条件如下:① PBMC 浓度分别为 1×10^5 、 2×10^5 、 3×10^5 /孔;② 孵育时间分别为 15、20、25、30 h;③ CFP10 及 ESAT6 重组抗原蛋白浓度分别为 7.5、10.0、12.5 μg /孔。根据细胞斑点数及斑点大小确定 ELISPOT 方法的适宜实验条件。

1.7 T-SPOT · TB 实验与 ELISPOT 实验步骤及结果判断标准 T-SPOT · TB 实验严格根据试剂盒说明书步骤,按每个测定样本需 4 孔(空白对照、A 测试孔/B 测试孔及阳性质控对照)取出测试所需的微孔板条;分别每个检测孔加入 100 μl 细胞终溶液(含有 25 万个活细胞) 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育处理约 20 h;次日分别加抗体工作液及底物显色液,洗板后进行斑点计数。ELISPOT 实验步骤:在已包被 IFN- γ 抗体微量板的 4 个孔中,分别加入不同的阳性对照物:植物血凝素、阴性对照细胞培养液、ESAT6 以及 CFP-10。然后依次加入 2×10^5 个/孔 PBMC,于 37 $^{\circ}\text{C}$ CO₂ 培养箱内孵育处理,洗脱处理后再加入抗 γ -干扰素抗体,孵育处理后显色,用去离子水充分洗涤孔的内部,自然晾干,计数斑点数。

按以下两种计数结果定为阳性:① 空白对照孔斑点为 0~5 个时(一个蛋白刺激孔斑点数 - 空白对照孔斑点数) ≥ 6 ;② 空白对照孔斑点数为 6~10 个时,一个蛋白刺激孔斑点数 $\geq 2 \times$ 空白对照孔斑点数。如果不符合上述标准且阳性质控孔正常时,检测结果为无反应。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 17.0 软件进行分析,ELISPOT 与 T SPOT · TB 结果采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 目的基因 CFP10 及 ESAT6 重组质粒的鉴定 CFP10、ESAT6 引物中引入酶切位点和保护性碱

基,PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分离;与 DNA Marker 比对,片断大小符合;pGEX-6p-1 /CFP10 重组质粒与 pET-32a(+) /ESAT6 重组质粒酶切,可见符合预期大小的条带,表明 CFP10、ESAT6 已被插入到 pGEX-6p-1 及 pET-32a(+) 载体中。见图 1。基因序列分析测序结果进一步证实基因正确插入载体的 CFP10、ESAT6 序列与 GenBank 上的完全一致。

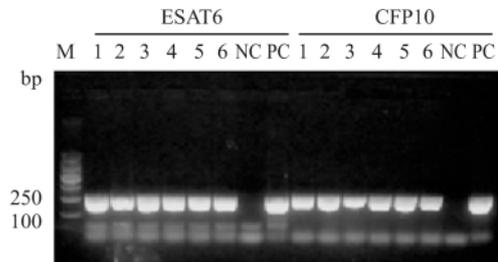


图1 EAST-6 及 CFP-10 重组表达质粒的 PCR 鉴定

M: DL2000 DNA; 1~6: 不同菌落的 PCR 产物; NC: 阴性对照; PC: 阳性对照

2.2 CFP10 及 ESAT6 融合蛋白的小量诱导表达检测及大量诱导表达纯化后蛋白浓度及纯度的测定

以 IPTG 分别诱导两种重组蛋白小量表达,检测诱导蛋白的表达水平并行 SDS-PAGE 分析。结果显示,未诱导组无明显表达,诱导组表达明显,GST-CFP10 明显以可溶性形式表达(图 2),His-ESAT6 主要以包涵体形式表达(图 3)。CFP10 载体表达的蛋白取上清液通过融合蛋白质的亲和层析方法纯化;ESAT6 经 Ni-NTA 介质金属螯和亲和层析方法纯化。CFP10 的蛋白浓度为 0.5 mg/ml,ESAT6 的蛋白浓度为 4 mg/ml。通过 SDS-PAGE 和软件分析,结果表明两种重组蛋白纯度 CFP10 为 85%,ESAT6 为 98%。见图 4、5。

2.3 建立 ELISPOT 检测结核分枝杆菌感染的方法及斑点形成情况 由于孵育梯度实验显示孵育 15 h 时细胞数较少,在 20 h 和 25 h 均可获得满意的结果,因此确定 20 h 为最佳孵育时间。应用细胞浓度 1×10^5 /孔时,结核病患者检测孔的斑点数较少,斑点较小,与非特异性斑点差异不明显;应用 2×10^5 /孔时,结核病患者检测孔的斑点数足够多又不很密集,适于计数;当细胞数为 3×10^5 /孔,结核病患者检测孔的斑点数多而密集,不适宜计数;且 2×10^5 /孔 1 的 PBMC 所需外周血量远小于 3×10^5 /孔,可减轻患者的抵触心理,因此确定采用 2×10^5 /孔的 PBMC 浓度为标准细胞数。以 20 h 为孵育时间,CFP10 抗原 /ESAT6 抗原梯度浓度分别为 7.5、

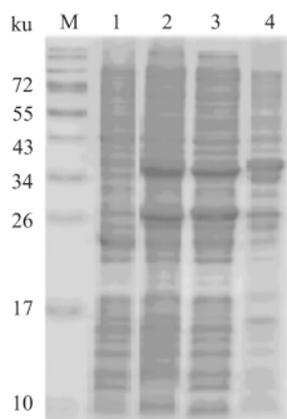


图2 GST-CFP10 的小量诱导表达结果

M: Marke; 1: 诱导前总蛋白; 2: 诱导后总蛋白; 3: 超声破碎后的上清液; 4: 超声破碎后的沉淀

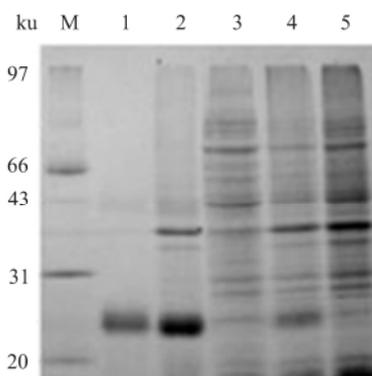


图3 His-ESAT6 的小量诱导表达结果

M: Marke; 1: 纯化后蛋白; 2: 超声破碎后的沉淀; 3: 超声破碎后的上清液; 4: 诱导后总蛋白; 5: 诱导前总蛋白

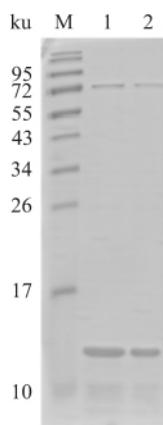


图4 CFP10 重组蛋白去除 GST 标签后的 SDS-PAGE 图谱

M: Marker; 1: 8 μg CFP10 重组蛋白; 2: 4 μg CFP10 重组蛋白

10.0、12.5 μg/孔时 浓度无明显区别。根据实验确定 ELISPOT 方法的实验条件: PBMC 浓度为 2×10^5 /孔, CFP10 重组蛋白浓度为 10 μg/孔, ESAT6 重组蛋白浓度为 10 μg/孔, 孵育时间为 20 h。阴性对照与阳性对照见图 6。

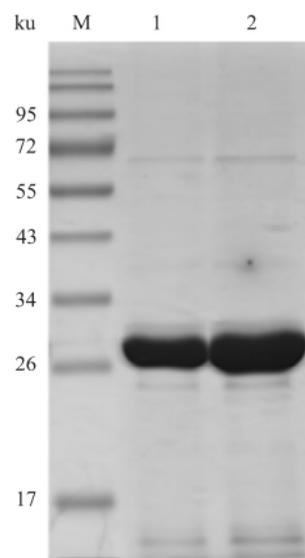


图5 ESAT6 融合蛋白经 Ni-NTA 介质金属螯和亲和层析及凝胶电泳纯化后的 SDS-PAGE 图谱

M: Marker; 1: 16 μg ESAT6 重组蛋白; 2: 32 μg ESAT6 重组蛋白



图6 ELISPOT 方法结果

A: 阴性对照; B: 阳性对照

2.4 T-SPOT · TB 与 ELISPOT 两种诊断试验的灵敏度和特异性 164 例住院患者病例中, 123 例患者检测结果为阳性, 30 例两种检测结果为阴性, 8 例患者 T-SPOT · TB 结果为阳性、ELISPOT 结果为阴性, 3 例患者 ELISPOT 结果为阳性、T-SPOT · TB 结果为阴性。临床诊断结果最终确诊结核病例 137 例, 其中 110 例肺部结核, 27 例肺外结核; 根据计算, ELISPOT 的灵敏度为 88.50%, 特异度为 82.35%, 阳性预测值为 96.25%, 阴性预测值为 85.71%; T-SPOT · TB 的灵敏度为 90.80%, 特异度为 76.00%, 阳性预测值为 92.11%, 阴性预测值为 85.71%; 本实验室 ELISPOT 和商品化试剂盒 T-SPOT · TB 的灵敏度差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.57$), 两种检测方法阳性检出率差异无统计学意义。

3 讨论

Mahairas et al^[4] 发现结核分枝杆菌中"RDI" 特异基因序列, 而检测卡介苗菌株和大部分环境中的分枝杆菌基因, 发现其特异性地缺乏此基因序列; 该序列可编码产生的两种蛋白: ESAT6 和 CFP10, 这两种蛋白作为特异性抗原可刺激机体特异性 T 细胞产生 IFN- γ 。自 RDI 编码区被发现至今, IFN- γ 检测方法的不断成熟。目前以 RDI 区域编码蛋白 ESAT6 和 CFP10 作为特异性抗原、以 T 淋巴细胞为基础的体外检测 IGRAS 实验逐渐成为早期结核诊断筛查的热点。

当机体感染结核分枝杆菌后, 首先产生固有免疫反应, 但不能完全抑制细菌增殖, 机体感染后主要依靠细胞免疫抵抗感染, 在特异性 T 细胞介导的免疫反应中迅速释放各种细胞因子, 其中应用最广泛的为 IFN- γ 。当前可在单细胞水平检测细胞因子生成能力的方法主要有流式细胞术、ELISPOT 等, ELISPOT 方法操作简单、稳定、灵敏^[5]。目前国内使用的商品化试剂盒经美国 FDA 批准上市, 其原理来源于 ELISPOT 方法。其快速、灵敏的特征为结核的辅助诊断提供重要依据, 特别是一些肺外结核患者的病灶无法获得, 以及细菌学结果暂未获得时。但目前相关研究^[6] 分析报告指出, 在该项检测费用约 20.983 英镑/患者, 国内检测费用约为 800 元/人, 由于其高额的成本限制了在发展中国家应用。重组蛋白 CFP10 和 ESAT6 融合表达, 也起到了很好的检测的效果^[7]。本实验组选取两种蛋白分别刺激而非融合蛋白的原因主要有以下 3 点: ① Dillon et al^[8] 的研究显示 ESAT6 不仅存在于培养物滤液中, 同时存在于细胞质和细胞壁中, 而纯化后的重组 CFP10 的兔抗血清反应蛋白主要存在于细胞质和培养滤过液以及膜碎片中, 因此可能对细胞的刺激机制不完全相等; ② ESAT6 和 CFP10 是属于低分子量的两个分泌蛋白, 有很强的细胞免疫活性, 融合蛋白分子量增加, 细胞免疫活性可能会下降; ③ 由于不同个体 T 细

胞系对重组 ESAT6 和重组 CFP10 的反应不同, 对单个重组抗原或同时对两个重组抗原都有或高或低的反应。选取单个蛋白分别刺激对于不同的患者不同的反应均有体现, 可进一步探究不同种类的结核患者对不同蛋白的反应之间的相互关系^[9-10]。

参考文献

- [1] 张文宏, 李忠明. 全球结核病控制六十年规划的成果、现状和展望[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2013, 33(1): 47-55.
- [2] Handbook of ELISPOT: methods and protocols[M]. Springer Science & Business Media, 2005: 3-14.
- [3] Diel R, Goletti D, Ferrara G, et al. Interferon- γ release assays for the diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection: a systematic review and meta-analysis[J]. Eur Respir J, 2011, 37(1): 88-99.
- [4] Mahairas G G, Sabo P J, Hickey M J, et al. Molecular analysis of genetic differences between Mycobacterium bovis BCG and virulent M. bovis[J]. J Bacteriol, 1996, 178(5): 1274-82.
- [5] Harboe M, Oettinger T, Wiker H G, et al. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG[J]. Infect Immun, 1996, 64(1): 16-22.
- [6] 石利民, 王燕, 崔红莲, 等. Epidot-酶联免疫斑点检测方法应用于结核诊断的初步评价[J]. 江苏大学学报(医学版), 2012, 22(5): 444-7, 451.
- [7] Sutherland J S, Lalor M K, Black G F, et al. Analysis of host responses to Mycobacterium tuberculosis antigens in a multi-site study of subjects with different TB and HIV infection states in sub-Saharan Africa[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74080.
- [8] Dillon D C, Alderson M R, Day C H, et al. Molecular and immunological characterization of Mycobacterium tuberculosis CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in Mycobacterium bovis BCG[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(9): 3285-90.
- [9] Arend S M, Andersen P, van Meijgaarden K E, et al. Detection of active tuberculosis infection by T cell responses to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10[J]. J Infect Dis, 2000, 181(5): 1850-4.
- [10] 张晶, 刘威龙, 周伯平, 等. 结核分枝杆菌早期分泌抗原 ESAT-6 的高效表达及其在结核分枝杆菌特异细胞免疫检测中的应用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(1): 55-9.

Evaluation of an ELISPOT method developed based on the recombinant expression and purification of CFP10 and ESAT6 proteins from mycobacterium tuberculosis

Wang Xiaowei, Cheng Xiaowen, Zhang Yan, et al.

(Dept of Clinical Laboratories, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Building a stable method of ELISPOT by the expression and purification of the protein CFP10 and

替格瑞洛和氯吡格雷对急性冠脉综合征合并糖尿病患者 的血小板抑制作用

潘彩虹 胡泽平 王邦宁

摘要 将住院治疗的 120 例急性冠脉综合征(ACS)患者分为无糖尿病组(40 例)和有糖尿病组(80 例),观察糖尿病的凝血功能变化。在 80 例有糖尿病组中按照随机方法分为替格瑞洛组(48 例)和氯吡格雷组(32 例),治疗 5 d 后检测血小板功能,观察替格瑞洛和氯吡格雷对血小板抑制作用的情况。

关键词 替格瑞洛;氯吡格雷;ACS;糖尿病;血小板功能

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)09-1351-03

随着我国生活水平的快速提高,急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)合并糖尿病的患病率也在迅速上升,而且发病年龄明显提前。流行病学资料^[1]显示,血糖水平的升高和心血管疾病的风险之间呈线性相关性,因此在很多指南中都将 2 型糖尿病称为“冠心病的等危症”。临床研究^[2]证实,在阿司匹林基础上加用氯吡格雷可有效减少心脑血管缺血事件,已成为目前 ACS 抗血小板治疗的基石。但是氯吡格雷反应具有个体差异性,有多达三分之一患者存在血小板抑制不足,称为“氯吡格雷无反应者”^[3]。因此,替格瑞洛作为一种新型的腺苷二磷酸(adenosine diphosphate glucose pyrophos-

pheralase, ADP) P2Y₁₂ 受体抑制剂应运而生。该研究旨在观察糖尿病患者凝血活性是否增强,ACS 合并糖尿病患者中,替格瑞洛在血小板功能抑制方面是否优于氯吡格雷。

1 材料与方法

1.1 病例资料 选取 2013 年 1 月~2014 年 10 月在安徽医科大学第一附属医院接受住院治疗的 120 例 ACS 患者。

1.2 纳入和排除标准 纳入标准:① ACS:心电图提示有或无 ST 段抬高,并在此前 24 h 内出现一次症状发作,肌钙蛋白 I 升高或无变化。② 糖尿病:纳入标准参照 2 型糖尿病防治指南(2010 年版)。排除标准:① 入院前已接受氯吡格雷或替格瑞洛治疗患者;② 患有严重的肝肾功能损害;③ 研究者认为不适合参与此项临床试验。

1.3 仪器与试剂 血栓弹力图(thromboelastogram, TEG) 5000 型及血小板图试剂盒购自美国 Haemoscope 公司;替格瑞洛购自英国阿斯利康公司(批号:JX20110193,规格:90 mg);氯吡格雷购自深圳信立泰药业股份有限公司(批号:20110103,规格:75 mg)。

1.4 研究治疗 将入选的 120 例 ACS 患者,按照是否合并糖尿病分为无糖尿病组(40 例)和有糖尿病组(80 例)。在 80 例有糖尿病组中按照随机方法分为替格瑞洛组(48 例)和氯吡格雷组(32 例)。替格瑞洛组患者先接受 180 mg 的负荷剂量,接下来每天 2 次,每次 90 mg;氯吡格雷组患者先接受 300 mg

2015-04-29 接收

基金项目:安徽高校省级自然科学基金重点项目(编号:9021285201)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

作者简介:潘彩虹,女,硕士研究生;

王邦宁,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wangbangning@medmail.com.cn

ESAT6 from mycobacterium tuberculosis. 164 suspected tuberculosis cases were checked by ELISPOT and T-SPOT • TB with peripheral blood samples, compared with the clinical diagnosis. It was found that the concentration and purity of the recombinant ESAT6 were 0.5 mg/ml, 84%; the concentration and purity of recombinant of the CFP10 were 4 mg/ml, 98%. The most appropriate conditions of ELISPOT were 2×10^5 /well as cell concentration, 10 μ g/well ESAT6/CFP10 recombinant protein as stimulus and 20 hours of incubation period. There was no statistically significant difference between ELISPOT and T-SPOT • TB ($\chi^2 = 0.57$).

Key words diagnose of tuberculosis; IFN- γ ; ELISPOT; CFP10; ESAT6