

结核分枝杆菌 CFP10-ESAT6 重组融合蛋白抗原血清学诊断价值

阳幼荣, 吴雪琼, 张俊仙, 梁艳, 张翠英, 王兰, 李洪敏

(中国人民解放军第 309 医院军队结核病防治重点实验室 结核病研究室, 北京 100091)

[摘要] **目的** 研究重组 CFP10-ESAT6 蛋白的抗原性, 评价其在结核病血清学诊断中的价值, 探寻更有效的结核病诊断试剂。**方法** 应用基因工程技术表达、纯化 rCFP10-ESAT6 蛋白, 通过酶联免疫吸附试验检测 192 例健康者和 210 例结核病患者血清与纯化 rCFP10-ESAT6 的抗体反应。**结果** rCFP10-ESAT6 蛋白在大肠埃希菌细胞内以包涵体形式高效表达, 表达量约占菌体总蛋白的 25%, 分子量约为 28 kD, 具有良好的抗原特异性。在 210 例结核病患者血清中, 103 例菌阳患者和 107 例菌阴患者抗 rCFP10-ESAT6 抗体的阳性率分别为 30.10% (31/103) 和 28.97% (31/107), 总的灵敏度为 29.52% (62/210); 在 192 例健康者血清中, 95 例 PPD 阴性者和 97 例 PPD 阳性者抗 rCFP10-ESAT6 抗体的阳性率分别为 2.11% (2/95) 和 6.19% (6/97), 总的特异性为 95.83% (184/192)。**结论** rCFP10-ESAT6 蛋白可能成为结核病血清学诊断的组合抗原之一。

[关键词] 结核; 结核分枝杆菌; rCFP10-ESAT6; 诊断; 实验室技术和方法

[中图分类号] R52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)04-0241-04

Serodiagnostic value of recombinant CFP10-ESAT6 protein from *Mycobacterium tuberculosis*

YANG You-rong, WU Xue-qiong, ZHANG Jun-xian, LIANG Yan, ZHANG Cui-ying, WANG Lan, LI Hong-min (Army Tuberculosis Key Laboratory, Tuberculosis Research Institute, the 309th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective** To evaluate the value of recombinant culture filter protein10-early secretory antigenic target 6 (rCFP10-ESAT6) protein from *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) on the serodiagnosis of tuberculosis (TB), and to develop more effective diagnostic reagents for tuberculosis. **Methods** The rCFP10-ESAT6 protein was expressed and purified by metal chelation chromatography. Sera of 192 healthy persons and 210 TB patients were detected the antibodies against *M. tuberculosis* rCFP10-ESAT6 antigens by ELISA. **Results** The rCFP10-ESAT6 protein existed in inclusion bodies of *Escherichia coli*, and amounted to 25% of total bacterial protein, its molecular weight was estimated about 28 kD. Of sera from 210 TB patients, the sensitivity of antibody detection using rCFP10-ESAT6 protein was 30.10% (31/103) and 28.97% (31/107) in 103 bacterium-positive patients and 107 bacterium-negative patients, overall sensitivity was 29.52% (62/210); of 192 healthy subjects, the sensitivity of antibody detection using rCFP10-ESAT6 protein was 2.11% (2/95) in 95 PPD-negative persons and 6.19% (6/97) in 97 PPD-positive persons, respectively, overall specificity was 95.83% (184/192). **Conclusion** The recombinant CFP10-ESAT6 might be used as one of multiple antigens in the serodiagnosis of tuberculosis.

[Key words] tuberculosis; *Mycobacterium tuberculosis*; rCFP10-ESAT6; diagnosis; laboratory technique and methods

[Chin Infect Control, 2011, 10(4):241-243, 247]

结核病 (tuberculosis, TB) 是严重危害人类健康的一种慢性传染性疾病, 早期诊断、有效治疗是控

制其疫情的重要手段。目前血清学诊断方法已成为 TB 重要的辅助诊断手段, 许多重组结核分枝杆菌

[收稿日期] 2010-12-29

[基金项目] 国家重大传染病防治科技重大专项基金资助项目 (2008ZX10003-001)

北京市科技计划研发攻关类科研基金资助项目 (D08050700640802)

[作者简介] 阳幼荣 (1981-), 男 (汉族), 广西桂林市人, 主管技师, 主要从事结核病实验室诊断研究。

[通讯作者] 吴雪琼 E-mail: wu-xueqiong@263.net

抗原已被用于快速血清学诊断试验或已被评价^[1-3],但国内尚未见关于结核分枝杆菌 rCFP10-ESAT6(recombinant culture filter protein10-early secretory antigenic target 6)蛋白抗原的血清学诊断价值的研究报道。本研究应用基因工程技术表达、纯化结核分枝杆菌 rCFP10-ESAT6 蛋白,并通过酶联免疫吸附试验(ELISA)研究 192 例健康者和 210 例 TB 患者血清与纯化 rCFP10-ESAT6 的抗体反应,评价 rCFP10-ESAT6 抗原在 TB 免疫反应中的作用及其在 TB 血清学诊断中的价值,寻找更有效的 TB 血清学诊断组合抗原。

1 材料与方法

1.1 菌种与血清来源 pET24b-CFP10-ESAT6 大肠埃希菌工程菌由本课题组构建。210 例 TB 患者血清来自全军结核病研究所已确诊为肺结核病的住院患者,所有血清均在患者入院时采集;192 例健康者血清为 2007 年入伍新兵的体检血清。

1.2 CFP10-ESAT6 基因的诱导表达 将 pET24b-CFP10-ESAT6 大肠埃希菌工程菌接种于含卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养至 $A_{600} = 0.8$ 左右时,诱导表达 4 h 收集菌体。

1.3 十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 以 SDS-PAGE 鉴定 rCFP10-ESAT6 的表达水平。将菌体悬浮于适量的 1 \times SDS 凝胶载样缓冲液中,置沸水浴中 5~10 min,离心后取上清,加于 4.5% 浓缩胶和 12% 分离胶中进行 SDS-PAGE。凝胶经考马斯亮蓝 G-250 染色和甲醇/冰乙酸脱色,之后观察结果并照相保存。

1.4 菌体破碎和包涵体提取 对诱导后的 pET24b-CFP10-ESAT6 大肠埃希菌工程菌按《分子克隆实验指南》^[4]介绍的方法提取包涵体。取部分上清液和包涵体沉淀进行 SDS-PAGE 分析,以确定 CFP10-ESAT6 在大肠埃希菌中的表达形式。

1.5 重组蛋白的回收、纯化及含量测定 采用 Novagen 公司生产的 His. Bind 蛋白纯化试剂盒纯化 rCFP10-ESAT6 蛋白,按试剂盒说明书介绍的步骤进行操作。通过 Lowry 法测定蛋白含量,除菌过滤后置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

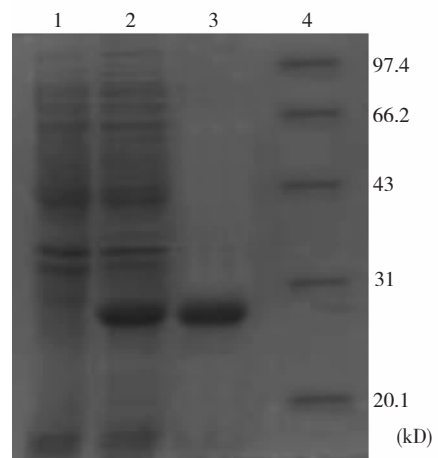
1.6 应用 ELISA 法检测血清中抗结核抗体 将结核分枝杆菌纯化的 rCFP10-ESAT6 蛋白(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)包被于 Costar 96 孔酶标板上,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;用

PBST 洗液洗涤 3 次;加入 1:100 倍稀释的待检血清,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h;用 PBST 洗液洗涤 3 次;加入 1:10 000 倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h;再用 PBST 洗液洗涤 3 次;加入邻苯二胺和 H_2O_2 底物显色 30 min,以 2 mol/L 硫酸终止反应。以空白对照调校零点,用酶联免疫检测仪测定 492 nm 的 OD 值,取 2 孔平均值作为终结果。

1.7 统计学分析 应用 SPSS10.0 软件对数据进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 t 检验, $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 rCFP10-ESAT6 蛋白的纯化 pET24b-CFP10-ESAT6 重组质粒在大肠埃希菌中经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)诱导 4 h 后,通过 SDS-PAGE 分析可见特异的蛋白表达带,分子量约为 28 kD,吸光度扫描分析显示约占菌体总蛋白的 25%。对诱导菌超声破碎后的上清液和沉淀部分分别进行 SDS-PAGE 分析,沉淀及上清都有较明显的特异蛋白表达带,说明表达的 rCFP10-ESAT6 蛋白以可溶性和包涵体 2 种形式存在。应用 His. Bind 蛋白纯化试剂盒在变性条件下纯化 rCFP10-ESAT6 蛋白,纯化后的样品经 SDS-PAGE 分析,显示只见 1 条回收的蛋白带(图 1),未见其他杂带,经吸光度扫描分析显示其纯度约为 95%。



Lane 1: rCFP10-ESAT6 before induced by IPTG; Lane 2: rCFP10-ESAT6 after induced by IPTG; Lane 3: Purified rCFP10-ESAT6 protein; Lane 4: Low molecular weight protein marker

图 1 rCFP10-ESAT6 蛋白的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 Analysis of rCFP10-ESAT6 by SDS-PAGE

2.2 人血清中抗结核抗体的检测 见表 1。以 192 例健康对照者的吸光度平均值 + 2 倍标准差为正常界限值, PPD 阴性和 PPD 阳性者的特异性分别为 97.89% (93/95)、93.81% (91/97), 总的特异性为

95.83% (184/192); 菌阳和菌阴 TB 患者阳性率分别为 30.10% (31/103)、28.97% (31/107), 总的灵敏度为 29.52% (62/210)。

表 1 健康对照者与 TB 患者血清标本抗结核抗体检测结果

Table 1 Serum antibody responses to rCFP10-ESAT6 in healthy control and TB patients

Groups		No. of cases	A ₄₉₂ ($\bar{x} \pm s$)	Positive rate (%)
Healthy control group	PPD negative	95	0.042 ± 0.027	2.11
	PPD positive	97	0.059 ± 0.053	6.19
	Total	192	0.051 ± 0.043	4.17
TB group	M. tuberculosis negative	107	0.227 ± 0.380	28.97
	M. tuberculosis positive	103	0.129 ± 0.162	30.10
	Total	210	0.178 ± 0.293	29.52

A₄₉₂: PPD-negative vs PPD-positive, $t = 2.80$, $P < 0.01$; Healthy group (total) vs TB group (total), $t = 5.94$, $P < 0.01$; *M. tuberculosis* negative vs *M. tuberculosis* positive, $t = 2.45$, $P > 0.01$

3 讨论

结核分枝杆菌 ESAT-6 和 CFP-10 是从结核分枝杆菌早期培养滤液中分离的低分子量蛋白质。现有研究^[5-7]表明, ESAT-6 和 CFP-10 编码基因位于结核分枝杆菌 RD1 区, 并受同一操纵子控制协同表达; 该区仅存在于结核分枝杆菌复合群和少数致病性分枝杆菌中(如堪萨斯分枝杆菌、苏尔加分枝杆菌和海分枝杆菌), 所有卡介苗和非致病性分枝杆菌均缺失, 具有良好的抗原特性; 可诱发 PPD 皮肤试验阳性者的外周血单个核细胞出现增殖反应和产生 IFN- γ ^[8-9]。因此, 在细胞免疫方面, 近年以 ESAT-6、CFP-10 为基础的酶联免疫斑点试验在结核感染诊断中的应用价值已有许多相关研究^[10-12]。

本研究以 rCFP10-ESAT6 融合蛋白作为抗原检测 TB 患者体内抗体, 探索该抗原在体液免疫诊断方面的作用, 可与酶联免疫斑点试验进行相互补充。本研究通过基因工程技术高效表达、纯化重组的 CFP10-ESAT6 蛋白抗原, 其分子量约为 28 kD。通过 ELISA 方法检测 210 例 TB 患者血清, 结果表明该融合抗原无论在灵敏度还是在抗体水平方面都能较好地与健康者血清与 TB 患者血清区分开来 ($P < 0.01$); 而对 TB 菌阳与菌阴患者血清的灵敏度及血的抗体水平检测结果无明显差异 ($P > 0.01$); 该重组蛋白会与极个别健康者血清抗体存在交叉反应性, PPD 皮肤试验阳性者交叉反应率 (6.19%) 高于 PPD 皮肤试验阴性者 (2.11%), PPD 皮肤试验阳性者血清抗体水平也高于 PPD 皮肤试验阴性者 ($P < 0.01$)。与健康者血清抗体的交叉反

应可能源于结核菌潜伏感染刺激机体产生低水平的抗体。

总之, 不同 TB 患者可能对不同的结核分枝杆菌抗原产生抗体, CFP10-ESAT6 是结核分枝杆菌复合群特异的细胞外分泌蛋白, 可作为 TB 血清学诊断的组合抗原之一。我们将进一步研究 rCFP10-ESAT6 抗原与其他抗原联合检测结核抗体的互补性。

[参考文献]

- [1] 岳乔红, 苏明权, 杨军兰, 等. 以结核分枝杆菌 38kD 重组蛋白为抗原的血清学诊断[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(6): 633-635.
- [2] 张小刚, 庄玉辉, 何秀云, 等. 重组结核分支杆菌 38kD 和 16kD 蛋白用于结核病血清学诊断的价值[J]. 中国防痨杂志, 2001, 23(5): 281-283.
- [3] 吴雪琼, 张俊仙, 夏湘萱, 等. 结核分支杆菌 MPT63 抗原的表达及其血清学诊断价值的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2001, 11(4): 8-10.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1992: 845-848.
- [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] Sorensen A L, Nagai S, Houen G, et al. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 1995, 63(5): 1710-1717.
- [7] Van Pinxteren L A, Ravn P, Agger E M, et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(2): 155-160.

阳性率($\chi^2 = 13.33, P = 0.00$)。在 202 例 PPD 皮肤试验阴性和 164 例 PPD 皮肤试验阳性者中, 分别有 53 例(26.24%)和 63 例(38.41%)ELISPOT 阳性, 两者的一致率为 57.92%, 但两者的检测结果差异具有统计学意义($P < 0.001$), 这与以往的报道^[9-10]相一致, PPD 试验与 ELISPOT 无相关性。

同时研究也发现, 在接种过 BCG 者中, PPD 皮肤试验阳性率为 58.53%, ELISPOT 阳性率为 29.03%; 在未接种过 BCG 者中, PPD 皮肤试验阳性率为 24.83%, ELISPOT 阳性率为 35.57%。前者说明 ELISPOT 的特异性比 PPD 皮肤试验高, 后者说明 ELISPOT 的敏感性比 PPD 皮肤试验好。

我们对 PPD 皮肤试验和 ELISPOT 检测均为阴性的入伍新兵采取了预防策略——接种 BCG, 10 个月后再进行 PPD 皮肤试验和 ELISPOT 检测, 发现 PPD 皮肤试验阳转率为 78.18%, 而 ELISPOT 检测均为阴性。这一结果再次证明了接种 BCG 可致 PPD 皮肤试验阳性, 同时也说明 ELISPOT 检测技术具有较好的特异性。我们对 PPD 平均直径 ≥ 15 mm 或 ELISPOT 阳性的新兵将监测 18~24 个月, 以及时发现发展为活动性结核者, 尽早给予治疗。

总之, 我们的研究表明, ELISPOT 具有较高的特异性和敏感性, 能更真实反映驻京部队入伍新兵的结核潜伏感染情况。ELISPOT 的普及和推广, 对于部队乃至全国的 TB 预防和控制工作具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] World Health Organization. WHO report 2005-Global tuberculosis control; surveillance, planning, financing[J]. NZ Med J, 2006, 119(1230): 1899.
 - [2] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 第四次全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(1): 3-7.
 - [3] 吴雪琼, 张宗德, 乐军. 分枝杆菌分子生物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2010: 115-125.
 - [4] Anderden P, Doherty T M, Pai M, *et al.* The prognosis of latent tuberculosis; can disease be predicted? [J]. Trends Mol Med, 2007, 13(5): 175-182.
 - [5] Mazurek G H, Jereb J, Lobue P, *et al.* Guidelines for using the QuantiFERON-TB-Glod test for detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection, United States [J]. MMWR Recomm Rep, 2005, 54(RR-15): 49-55.
 - [6] 中华人民共和国卫生部. 计划免疫技术管理规程[S]. 北京, 1987.
 - [7] Zhang C, Dong E, Zhu L, *et al.* Tuberculosis infection survey in new recruits to the army in Beijing (2003-2006) [J]. J Prev Med Chin PLA, 2007, 25(3): 188-189.
 - [8] Wu X, Li Q, Yang Y, *et al.* Latent tuberculosis infection among new soldiers in Chinese army; comparison of ELISPOT assay and tuberculin skin test [J]. Clin Chim Acta, 2009, 405(1-2): 110-113.
 - [9] Kang Y A, Lee H W, Yoon H I, *et al.* Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole blood interferon gamma assay for the diagnosis of latent tuberculosis infection in an intermediate tuberculosis burden country [J]. JAMA, 2005, 293(22): 2756-2761.
 - [10] Farhat M, Greenaway C, Pai M, *et al.* False-positive tuberculin skin tests; what is the absolute effect of BCG and non-tuberculosis mycobacteria? [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2006, 10(11): 1192-1204.
-
- (上接第 243 页)
- [8] Munk M E, Arend S M, Brock I, *et al.* Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis [J]. J Infect Dis, 2001, 183(1): 175-176.
 - [9] Wu X, Yang Y, Zhang C, *et al.* Latent tuberculosis infection among new recruits to the Chinese army; comparison of ELISPOT assay and tuberculin skin test [J]. Clin Chim Acta, 2009, 405(1-2): 110-113.
 - [10] Meier T, Eulenbruch H P, Wrighton-Smith P, *et al.* Sensitivity of a new commercial enzyme-linked immunospot assay (T SPOT-TB) for diagnosis of tuberculosis in clinical practice [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2005, 24(8): 529-536.
 - [11] Ferrara G, Losi M, D'Amico R, *et al.* Use in routine clinical practice of two commercial blood tests for diagnosis of infection with *Mycobacterium tuberculosis*; a prospective study [J]. Lancet, 2006, 367(9519): 1328-1334.
 - [12] Lalvani A, Pathan A A, Durkan H, *et al.* Enhanced contact tracing and spatial tracking of *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen specific T cells [J]. Lancet, 2001, 357(9273): 2017-2021.