文章编号:1000-5404(2007)15-1473-04

论著

结核分枝杆菌 PstS1-U1 融合抗原的表达、纯化及其免疫活性测定

丛延广[1],刘 利[2],陈志瑾[1],饶贤才[1],胡晓梅[1],李 明[1],胡 勇[1],胡福泉[1] ([1]第三军医大学基础医学部微生物学教研室,重庆市微生物工程实验室,重庆 400038;[2]解放军324医院检验科,重庆 400020)

提 要:目的 为获得一种适于本地结核病临床诊断用抗原,将结核分枝杆菌 38×10^3 抗原——即磷酸盐传送蛋白1(phosphate transport system protein 1, PstS1)和尿蛋白1(urine protein 1, U1)进行融合表达、纯化并测定其抗原活性。**方法** 用基因拼接法将结核分枝杆菌编码 PstS1 和 U1 蛋白的基因拼接在一起,克隆到原核表达载体 pET28a 中,通过 IPTG 诱导实现其高效表达,采用亲和层析纯化表达产物。用纯化的融合抗原免疫家兔获得抗血清,用该血清以及活动性肺结核患者血清对纯化产物的抗原活性进行测定。**结果** 成功构建了原核表达质粒,对表达产物进行亲和层析纯化,获得相对分子质量为 57×10^3 的目的蛋白。经 Western blot 检测融合抗原能够与活动性肺结核患者血清中的抗体发生结合。**结论** 本研究表达并纯化出 PstS1-U1 融合抗原,为进一步的应用奠定基础。

关键词: 结核分枝杆菌;融合抗原;原核表达
中图法分类号: R378.911; R392-33; R392.11 **文献标识码:** A

Prokaryotic expression, purification and immunological activity determination of PstS1-U1 fused antigen of *Mycobacterium tuberculosis*

CONG Yan-guang[1], LIU Li[2], CHEN Zhi-jin[1], RAO Xian-cai[1], HU Xiao-mei[1], LI Ming[1], HU Yong[1], HU Fu-quan[1] ([1]Department of Microbiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Clinical Laboratory, No. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

Abstract: Objective To express and purify Mycobacterium tuberculosis 38kDa (phosphate transport system protein 1, PstS1)-U1(urine protein 1) fusion antigen and determine its immunological activity. **Methods** The PstS1-U1 fusion gene was amplified from genomic DNA of Mycobacterium tuberculosis by Gene SOEing methods and cloned into pET28a--a prokaryotic expression plasmid. The recombinant PstS1-U1 fusion protein was expressed and purified by affinity chromatography. The immunological activity of purified fusion protein was determined by Western blot with serum of active tuberculosis patients. **Results** The pET28a-PstS1-U1 expression plasmid was constructed successfully and the expressed fusion protein was 57 10^3 in molecular weight. Western blot indicated that the purified protein was able to react with antibody in serum of active tuberculosis patients. **Conclusion** The PstS1-U1 fusion antigen was expressed and purified, which lays the foundation for its potential application in the serodiagnosis of tuberculosis.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; fusion antigen; prokaryotic expression

目前肺结核病的临床诊断依赖于患者的临床症状和影像检查,并通过细菌培养和痰涂片等实验室检查手段加以证实。然而由于结核分枝杆菌的生长周期长达5~8周,细菌培养作为一线方法在临床上的应用价值不大。痰涂片虽然方法简单、可靠,但阳性率较低。因此,很早就有学者尝试应用血清学的方法来诊断结核病。血清学诊断方法简便快速,成本低,特别适用于基层卫生单位的推广。但目前血清学诊断方法存在的主要问题是诊断抗原的敏感性不够,阳性率低。这主要是因为结核患者抗体反应存在异质性,即不同患者针对结核分枝杆菌产生的抗体谱是不一致的[1]。因此,尽管到目前为止对结核分枝杆菌的研究已经发现

基金项目:第三军医大学中青年基金(XG200506)
Supported by the Research Fund for Young Scholars by Third Military Medical University (XG200506)
作者简介:丛延广(1973-),男,辽宁省盘锦市人,博士,副教授,主要从事细菌致病机制方面的研究。电话:(023)68752239
通讯作者:胡福泉,电话:(023)68752240,E-mail: hoofuquan@yahoo.com.cn
收稿日期:2006-09-10;修回日期:2006-11-26

了很多特异性抗原，但还没有一个单抗原能达到 WHO 对结核诊断抗原的阳性率要求，即总阳性率大于 80%，特异性大于 95%[2]。

目前认为，解决的办法有两个：一是将不同单个抗原组合起来的鸡尾酒法；二是将不同抗原嵌合在一起构建融合分子[3]。而后者无疑更具优势，因为其蛋白纯化过程、实际操作等均较鸡尾酒法简单。本实验室尝试利用第二种方法，从众多备选抗原出发，构建出一个适合本地区结核病诊断用的最佳组合。在目前已知的众多抗原中，38 × 10^3 抗原（即 PstS1）是公认最好的，已经发展了多个商品化试剂盒[4]。而 U1 蛋白则是最近发现的一个有较高阳性率的诊断抗原[5]。因此，本研究将编码 PstS1 和 U1 蛋白的基因片段融合，期望融合基因表达产生的双抗原融合蛋白能够提高诊断阳性率。

1 材料与方法

1.1 材料

结核分枝杆菌临床株和原核表达载体 pET28a 质粒为本实验室保存，扩增高 GC 含量基因用的 LP *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司（大连）。1 例活动性肺结核患者的血清收集于解放军 324 医院。

1.2 pstS1-u1 融合基因的扩增

参考陈全等[6]的方法，设计 4 条引物：pstS1 基因上游引物 P1、pstS1 基因下游重叠引物 P2、u1 基因上游重叠引物 P3、u1 基因下游引物 P4。其中 P1 的 5′端引入 *Nde* Ⅰ酶切位点，P4 的 5′端引入 *Hind*Ⅲ酶切位点，在 P2、P3 的 5′端引入互补的 linker 序列：5′-GGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAGCGGCGG-TGGCGGCAGC-3′。引物序列为 P1：5′-CAATTACCATGGGA-**CATCACCATCACCATCAC***GTGAAAATTCGTTTGCAT*-3′（斜体部分为 pstS1 基因 5′端序列，黑体为 6 个组氨酸序列，下划线为 *Nco* Ⅰ酶切位点）、P2：5′-GCTGCCGCCACCGCCGCTTCCGCCAC-CGCCGCTTCCACC-GCCACC*GCTGGAAATCGTCGCGA*-3′（斜体部分为 pstS1 基因 3′端序列）、P3：5′-GGTGGCGGTGGAAGCGGCG-GTGGCGGAAGCGG-CGGTGGCGGCAGCAT*GGCACAGATAAC-CCTG*-3′（斜体部分为 u1 基因 5′端序列）、P4：5′-CAATTA-AAGCTT*CTAGGCGCCCAGCGCGGC*-3′（斜体部分为 u1 基因 3′端序列，下划线为 *Hind*Ⅲ酶切位点）。

以结核分枝杆菌基因组 DNA 为模板，以 P1 和 P2 为引物，用 LP *Taq* 酶扩增 PstS1- linker 片段，再以 P3 和 P4 为引物，扩增 linker-u1 片段。1% 琼脂糖凝胶电泳后分别胶回收这两个片段，各取回收产物 1 μl 共同作为模板，以 P1、P4 为引物扩增 pstS1-linker-u1 融合基因。将 PCR 产物进行胶回收，与 pMD18-T 载体进行连接，转化到 JM109 感受态细菌中。对阳性克隆进行酶切、PCR 鉴定。

1.3 重组质粒 pET28a-pstS1-u1 的构建

经鉴定的 pMD18-T 载体克隆进行培养，提取的质粒用 *Nco* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切，并与相同酶切的 pET28a 质粒连接，然后转化已制备的 DH5a 感受态细菌，对获得的重组子进行酶切和测序鉴定。

1.4 融合抗原的诱导表达及纯化

将重组质粒转化大肠埃希菌 BL21（DE3），用 1 mmol/L 的 IPTG 诱导表达 5 h，收集细菌。加入 PMSF 和溶菌酶后进行超声破碎，12 000 × *g* 离心 20 min，沉淀溶解于含 8 mol/L 尿素的 0.1 mol/L Tris · Cl（pH 8.0）中，以 Ni-NTA 亲和层析柱纯化，取洗脱峰过 Sephdex G75 分子筛柱进一步纯化并除盐复性，洗脱流速 0.2 ml/min，洗脱缓冲液为 PBS（氯化钠 8 g，氯化钾 0.2 g，磷酸氢二钠 1.44 g，磷酸二氢钾 0.24 g，1 000 ml，pH 7.4）。取洗脱峰作 SDS-PAGE 分析纯化效果并冻存。

1.5 多克隆抗体的制备

取纯化样品用等体积弗氏不完全佐剂乳化。皮下多点注射家兔，每间隔 7 d 加强 1 次，共加强免疫 4 次，并于末次加强免疫 1 周后取心脏血。分离血清并测定效价，分装后于 -20 ℃ 冻存。

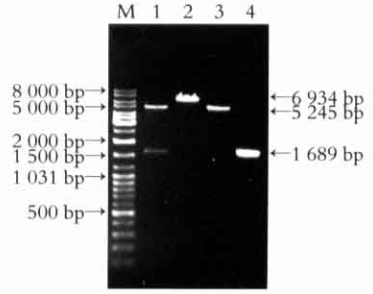
1.6 Western blot 检测融合蛋白的免疫学活性

将纯化的融合蛋白经 SDS-PAGE，转印至 PVDF 膜上。分别用上述制备的兔抗融合蛋白多抗以及活动性肺结核患者血清作为一抗，用 HRP 标记的羊抗兔 IgG 或 HRP 标记的羊抗人 IgG 作为二抗检测，DAB 法显色。

2 结果

2.1 pstS1-u1 融合基因的扩增

采用基因拼接法，从结核分枝杆菌基因组中扩增出 1 700 bp的 DNA 片段，与预期分子量大小一致。将 PCR 产物亚克隆到 pMD18-T 载体中，再进一步克隆到 pET28a 表达质粒中，经酶切、PCR 鉴定插入片段符合预期。鉴定结果见图 1。测序结果表明，pET28a 中的插入序列与设计一致，与已测序的结核分枝杆菌 H37Rv 株的序列比较，序列正确并保持正确的阅读框。在两个抗原基因之间，设计了一段 linker 序列，为一含有 15 个柔性氨基酸的多肽，具有良好的柔顺性和折叠性，并具有足够的长度保证融合蛋白中 PstS1 和 U1 形成与天然蛋白类似的空间构象。



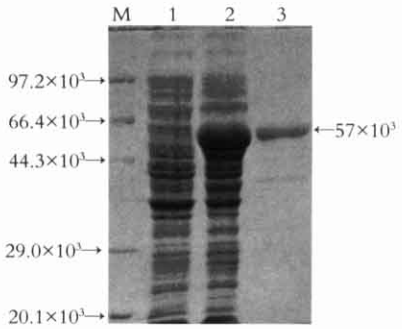
M：标准；1：重组质粒 *Nco* Ⅰ/*Hind*Ⅲ双酶切；2：重组质粒 *Hind*Ⅲ单酶切；3：pET28a 质粒 *Nco* Ⅰ/*Hind*Ⅲ双酶切；4：PCR 鉴定产物

图 1 重组质粒的鉴定

2.2　融合蛋白的原核表达及纯化

对携带 pET28a- pstS1-u1 表达质粒的大肠埃希菌 BL21 进行诱导表达，IPTG 终浓度为 1 mmol/L，37 ℃诱导 5 h。对诱导菌体的蛋白电泳图谱分析显示，在相对分子质量 57×10^3 左右有 1 条超量表达的蛋白条带，与预期相符。将诱导菌超声破碎后，对上清和沉淀进行电泳显示诱导的融合蛋白主要存在于包涵体沉淀中。

利用融合蛋白具有的 6 个连续组氨酸残基的特点，采用 Ni^{2+} 亲和层析柱进行纯化，再用 Sephdex G75 分子筛柱除盐复性，洗脱下来的重组蛋白在 PBS 中溶解性良好，提示重组蛋白得到较好的复性。纯化产物的电泳图谱显示：产物的纯度较高，杂蛋白较少。见图 2。

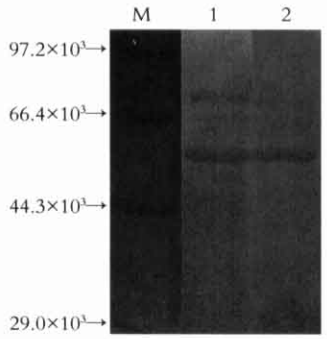


M：分子量标准；1：BL21/ pET28a-pstS1-u1 诱导前；2：BL21/ pET28a-pstS1-u1 诱导后；3：亲和纯化产物

图 2　融合抗原的表达纯化

2.3　免疫活性测定

为了进一步证实原核表达的融合蛋白具备免疫反应性，探索其作为诊断抗原的可能性。用纯化的融合蛋白制备了兔多克隆抗体，Western blot 结果表明，该抗体与融合蛋白能够特异性结合，见图 3。同时采用活动性肺结核患者血清作为一抗，结果显示融合蛋白同样可以与活动性肺结核患者血清中的相应抗体发生特异性结合，见图 3。



M：分子量标准；1：一抗为肺结核患者血清；2：一抗为抗融合蛋白兔血清

图 3　Western blot 检测融合蛋白与抗体的结合能力

3　讨论

结核病是一种严重威胁人类健康的传染性疾病。据统计，目前全球人群中结核患者约 2 000 万，每年有 300 余万人死于本病[7]。2000 年我国结核病流行病学抽样调查报告表明，我国全人口结核感染率为 44.5%，有近半人口（约 5.5 亿人）感染了结核分枝杆菌，其中有活动性肺结核患者约 451 万[8]。随着艾滋病感染人数的剧增，结核与艾滋病的混合感染日趋严重，每年约有 15% 的艾滋病感染者死于结核。结核病的免疫和治疗仍是医学界的一大难题，唯一的疫苗卡介苗免疫效果不甚稳定，药物治疗亦被耐药性问题所困扰。因此针对结核病感染早期建立快速的诊断方法对于结核病的控制无疑具有举足轻重的作用。对结核病诊断方法的要求除了高特异性、高敏感性外，还必须快速简便、成本低，适合向基层推广。

虽然血清学诊断方法最适于结核病诊断，但如前言所述，目前血清学诊断方法的主要问题是诊断抗原的敏感度不够，阳性率低。如本研究中使用的目前公认最好的诊断抗原——PstS1（即 38×10^3 抗原），特异性很好，但诊断阳性率较低，其中对涂片阳性结核患者的诊断阳性率在 80% 左右，而对涂片阴性结核患者的诊断阳性率则很低，只有 40% 左右[9]。尽管已经有多个商品化的试剂盒采用了 PstS1 抗原，但较低的阳性率降低了它的使用价值。

造成这一现象的主要原因是结核患者抗体反应的异质性[1]，即疾病的发展阶段，患者的免疫背景，抗结核治疗，以及结核分枝杆菌菌株不同的基因表达情况等均会影响抗体的产生和抗体谱的构成。因此，学者们提出通过分子克隆技术，将编码不同特异性抗原的基因片段融合，融合基因在细胞内表达产生的多价抗原融合蛋白就能有效地提高诊断的阳性率。多价抗原融合蛋白已广泛应用于诊断抗原和亚单位疫苗的研究中，显示出独特的优越性。

在结核分枝杆菌已发现的特异性抗原中，PstS1 和 U1 抗原是比较适合用于血清学诊断的。其中 PstS1 抗原是目前公认的血清学诊断的最佳单抗原，并发展有多个商品化的试剂盒[4]。而 U1 蛋白是最近才发现的一种特异性抗原[5]，其单独用于血清学诊断，阳性检出率在 60% 以上，特异性也大于 95%。更为重要的是，研究表明 U1 与 PstS1 抗原在诊断上有互补作用，因此它们组合起来用于诊断，能够在不降低特异性的条件下，提高检出阳性率。

本研究中将 PstS1 抗原和 U1 蛋白基因融合，构建双抗原融合基因重组的原核表达质粒。用该质粒转化

大肠埃希菌，使融合基因在大肠埃希菌内表达，产生双抗原融合蛋白。Western blot 的结果表明：纯化的融合蛋白不但具有抗原性，能有效诱导抗体的产生，并且与结核患者血清中相应的抗体能够发生特异性结合。说明该融合蛋白具有应用于诊断的抗原特性。本研究为结核分枝杆菌的血清学诊断提供了一种新型抗原分子，但其是否适合于结核病的临床血清学诊断，还需要进一步研究。

参考文献：

[1] Lyashchenko K, Colangeli R, Houde M, *et al*. Heterogeneous antibody responses in tuberculosis[J]. Infect Immun, 1998, 66(8): 3936 - 3940.

[2] Julian E, Matas L, Alcaide J, *et al*. Comparison of antibody responses to a potential combination of specific glycolipids and proteins for test sensitivity improvement in tuberculosis serodiagnosis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(1): 70 - 76.

[3] Houghton R L, Lodes M J, Dillon D C, *et al*. Use of multiepitope polyproteins in serodiagnosis of active tuberculosis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2002, 9(4): 883 - 891.

[4] Chaudhary V K, Kulshreshta A, Gupta G, *et al*. Expression and purification of recombinant 38-kDa and Mtb81 antigens of Mycobacterium tuberculosis for application in serodiagnosis[J]. Protein Expr Purif, 2005, 40(1): 169 - 176.

[5] Mukherjee S, Daifalla N, Zhang Y, *et al*. Potential serological use of a recombinant protein that is a replica of a Mycobacterium tuberculosis protein found in the urine of infected mice[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2004, 11(2): 280 - 286.

[6] 陈 全，朱道银，骆旭东，等. 重组结核分枝杆菌 CFP10-ESAT-6 融合蛋白的制备及应用研究[J]. 中华结核和呼吸杂志，2004，27(4)：244 - 248.

[7] World Health Organization. Group at risk: WHO report on the tuberculosis epidemic[R]. Geneva: World Health Organization, 1996.

[8] 全国结核病流行病学抽样调查技术指导组. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨杂志，2002，24(2)：65 - 108.

[9] Samanich K M, Keen M A, Vissa V D, *et al*. Serodiagnostic potential of culture filtrate antigens of Mycobacterium tuberculosis[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7(4): 662 - 668.

（编辑 陈聪连）

个案与短篇

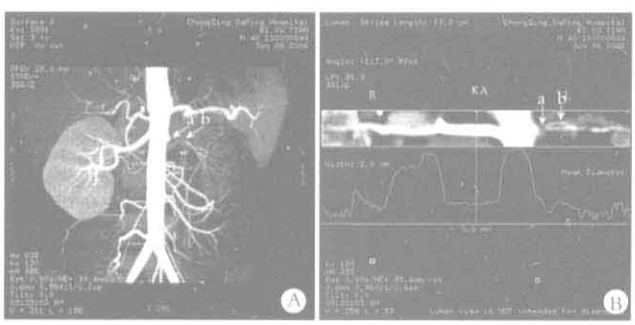
文章编号：1000-5404(2007)15-1476-01

左侧肾动脉闭塞合并双侧锁骨下动脉狭窄 1 例

李开龙[1]，何娅妮[1]，彭晓新[2]，张伟国[3]，丁涵露[1]，林利容[1]
（第三军医大学大坪医院野战外科研究所：[1]肾内科，[2]放射科，重庆 400042；[3]北京积水潭医院放射介入科，北京 100035）

1 临床资料

患者，男性，41 岁，发现血压高 3 年，左肾萎缩 1 d 入院。3 年前发现血压高，最高达到 140/110 mmHg，伴头昏、头痛。当时查双肾 B 超，血管紧张素、醛固酮、皮质醇节律均正常，予口服科素亚、美卡素等治疗，血压波动在 120 ~ 130/80 ~ 90 mmHg。因近 1 周内血压控制不好再次就诊，B 超发现左肾萎缩。门诊以左肾萎缩、左肾动脉狭窄收入。既往有酒精过敏史。入院时查 T 36 ℃，P 83 次/min，R 16 次/min，BP：130/90 mmHg。三大常规、肝肾功、血脂、补体、免疫球蛋白、立卧位醛固酮、血沉、C-RP、自身抗体等均正常。B 超：左肾 8.4 cm × 3.6 cm，右肾 11.0 cm × 5.2 cm。双肾 ECT 示：右肾血供正常，左肾血供明显减低，肾萎缩。64 排 CT 见左肾基本不显影，但可见左肾动脉基部，左肾动脉起始部闭塞，闭塞处远端分出 2 支动脉（图 1）。血管造影示：右肾显影正常，左肾不显影，双锁骨下动脉狭窄（图 2A、B）。分别在左肾动脉狭窄部和右锁骨下动脉狭窄部置入 5.0 mm × 17 mm（SPM14-17-05-B，ev3）和 6.0 mm × 18 mm（DRV40018X，Medtronic）动脉支架各 1 个（图 2C、D）。术后患者未再出现头昏，停用降压药物后血压稳定在 110 ~ 120/60 ~ 70 mmHg。1 周后复查肾功和尿常规正常。支架置入后 5 d 彩超检查：CDFI 示双肾血流灌注良好，四级血管显示清晰，弓状动脉 RI 值：左肾 0.67，右肾 0.57。左、右肾动脉起始部内径分别约为 6.6 mm 和 7.7 mm，可见平行强光带紧贴肾动脉壁（支架），CDFI 示：其内血流充盈良好，未见充盈缺损。



A：三维立体成像；B：曲面重建。箭头 a 示左肾动脉基部，左肾动脉起始部闭塞，箭头 b 示闭塞处远端分出 2 支动脉

图 1 双肾 64 排 CT 扫描结果

作者简介：李开龙（1966 - ），男，湖北省广水市人，博士，副主任医师，副教授，主要从事肾小管间质疾病和缺血性肾脏疾病的基础和临床方面的研究，发表论文 39 篇。电话：(023)68757446

收稿日期：2006-09-03；修回日期：2006-09-29

（下转 1481 页）