

梅毒螺旋体重组蛋白 Tp0608 的表达与鉴定

刘小军¹,牛淑会²,蔡嘉怡³,赵飞骏³,余 坚³,
姚 玲³,吴移谋³,曾铁兵³

(1. 南华大学附属第一医院血液科,湖南 衡阳 421001;2. 北京万泰生物药业股份有限公司;
3. 南华大学病原生物学研究所)

摘要: **目的** 表达梅毒螺旋体(Tp)重组蛋白 Tp0608(rTp0608)并鉴定其抗原性,为深入探讨其在梅毒血清学诊断中的价值奠定基础。 **方法** PCR 扩增 Tp0608 全长基因,构建原核表达重组体 pET-28a(+)/Tp0608,转化宿主菌诱导表达 rTp0608, Ni-NTA 亲和层析法纯化蛋白, SDS-PAGE 分析蛋白表达形式与纯度, Western blot 鉴定 rTp0608 的抗原性。 **结果** 原核表达重组体 pET-28a(+)/Tp0608 在宿主菌内经诱导表达了分子量大约为 38 kDa 的重组蛋白,以包涵体表达形式为主,纯化蛋白的纯度 >95%; Western blot 结果显示纯化蛋白能被梅毒患者混合血清特异性识别。 **结论** PET-28a(+)表达载体高效表达了 rTp0608,该重组抗原有良好的抗原性。

关键词: 梅毒; 梅毒螺旋体; Tp0608; 重组抗原; 抗原性

中图分类号: R377.1 **文献标识码:** A

Expression and Identification of Recombinant Protein Tp0608 of Treponema Pallidum

LIU Xiaojun, NIU Shuhui, CAI Jiayi, et al

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital, University of South China,
Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To express and identify antigenicity of recombinant protein Tp0608 (rTp0608) of Treponema pallidum (Tp), providing a basis for further investigation of its significance in syphilis serodiagnosis. **Methods** Full length of Tp0608 gene was amplified by using PCR. The prokaryotic expression recombinant pET-28a(+)/Tp0608 was constructed and transformed into E. coli BL21 to express rTp0608, and rTp0608 was purified with Ni-NTA affinity chromatography. Expression and purity of rTp0608 were analysed by SDS-PAGE. Antigenicity of rTp0608 was tested by Western blot. **Results** The prokaryotic recombinant pET-28a(+)/Tp0608 was constructed successfully and an approximate 38 kDa recombinant protein was expressed efficiently as inclusion body in E. coli and the protein purity was over 95%. Western blot indicated that the purified proteins were able to be recognized specifically by sera from syphilis patients. **Conclusions** The efficiently expressed recombinant Tp0608 has good antigenicity.

Key words: syphilis; Treponema pallidum; Tp0608; recombinant antigen; antigenicity

我国梅毒发病率已连续多年稳居各类性传播疾

病(STDs)首位,尤其是胎传梅毒和男男同性接触伴艾滋病性梅毒成直线上升的趋势。由于缺乏有效疫苗,早期诊断成为梅毒防控的重要措施^[1]。梅毒临床表现十分复杂,实验室诊断主要依靠血清学方法。近年来随着梅毒螺旋体(Treponema pallidum, Tp)全基因组的解析^[2],以重组蛋白为诊断抗原的血清学方法有逐渐取代传统血清学方法的趋势,但这些抗原并不能检测出临床各期梅毒的特异性抗体,有待

收稿日期:2013-04-01

基金项目:国家自然科学基金(81273322);湖南省自然科学基金重点项目(11JJ2044);湖南省研究生科研创新项目(CX2011B380)。

作者简介:刘小军,硕士,主管检验师,研究方向:梅毒螺旋体诊断, E-mail:787501538@qq.com. 通讯作者曾铁兵,博士,教授,硕士生导师,研究方向:梅毒螺旋体诊断, E-mail:nhdxtzb@126.com. 牛淑会为并列第一作者。

发现其它蛋白抗原在诊断中的作用^[3]。Tp0608 是近年发现的一种假想蛋白,预测具有潜在的免疫诊断价值^[4]。本研究以 pET 表达载体高效表达了重组蛋白 rTp0608 并鉴定其抗原性,为深入探讨其免疫诊断价值奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 菌株和质粒 Tp (Nichols) 菌株、pET-28a (+) 质粒及 E. coli BL21 (DE3) 表达菌均为南华大学病原生物学研究所保存。

1.1.2 试剂和试剂盒 基因组 DNA 纯化提取试剂盒 (QIAamp DNA Mini Kit) 为德国 Qiagen 公司产品;DNA 高保真聚合酶为 Takara 工程(大连)有限公司提供;限制性核酸内切酶、T4 连接酶为 NEB(北京)有限公司产品;PCR 产物回收试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒为 AxyPrep 生物技术有限公司产品;DNA 分子量标准、蛋白质分子量标准为天根生化科技(北京)有限公司产品;HRP 标记羊抗人 IgG (二抗)为碧云天生物技术研究提供;Ni-NTA 亲和层析柱为德国 Qiagen 公司产品;ECL(增强化学发光)检测试剂盒为美国 PIERCE 公司产品。

1.1.3 血清标本 经 TPPA 与 TP-ELISA 确诊的梅毒标准阳性血清、梅毒标准阴性血清(健康人血清)由南华大学附属第一医院检验科提供。

1.2 方法

1.2.1 Tp0608 基因扩增 按 QIAamp DNA Mini Kit 说明提取 Tp (Nichols) 菌株的基因组 DNA。从 GenBank 获取 Tp0608 基因序列 (Access number: NC_000919),设计以下引物:上游引物:5'-GGAATTCATGGCGGATCCCTCGGCA-3' (斜体为 EcoR I 酶切位点);下游引物:5'-CCCAAGCTTCTTGCCGC-CAGAAACGACT-3' (斜体为 Hind III 酶切位点)。以 Tp 基因组 DNA 为模板(同时设 PBS 对照),PCR 扩增 Tp0608 全长基因。PCR 反应体系:10 × PCR Buffer 5 μL、50 fmol/L 引物各 0.25 μL、2.5 mmol/L dNTPs、DNA 高保真聚合酶 1U、Tp DNA 模板 1 μL、加水至 50 μL。扩增条件:94 °C 5 min;94 °C 50 s、64 °C 50 s、72 °C 1 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。用 PCR 产物回收试剂盒回收 PCR 产物。

1.2.2 重组表达质粒 pET28a(+) - Tp0608 的构建与鉴定 将回收 Tp0608 基因 PCR 扩增产物与质

粒 pET28a(+) 分别进行 EcoR I 与 Hind III 双酶切、纯化,连接酶连接,转化至表达菌 E. coli BL21 (DE3),筛选阳性克隆,经酶切及测序 (Invitrogen 公司进行) 鉴定,获得重组工程菌。

1.2.3 重组蛋白诱导表达与表达形式分析 重组菌接种于 LB 培养基培养,以 IPTG (终浓度 1.0 mmol/L) 诱导培养(设未诱导组及空质粒菌对照组)4 h。煮沸法提取全菌蛋白。收集经诱导表达的重组菌,冰浴超声破碎菌体,差速离心以去除残留全菌,再高速离心 30 min,收集上清和沉淀(即包涵体),SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达形式。

1.2.4 重组蛋白纯化与纯度分析 最佳优化条件下大量诱导表达重组菌,菌体经超声破碎,离心收集沉淀(包涵体),充分溶解,经 Ni-NTA 亲和层析柱纯化,纯化产物经 0、1、2、4 mol/L 尿素透析复性。纯化蛋白经 SDS-PAGE、UVP 扫描分析蛋白纯度。

1.2.5 Western blot 鉴定重组蛋白 纯化目的蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转印至硝酸纤维素膜,以 1:100 稀释的 10 份梅毒阳性混合血清或健康血清(阴性对照)为一抗,以 1:10 000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG 为二抗孵育,ECL 显色,暗室曝光显影。

2 结果

2.1 目的基因 PCR 扩增

PCR 扩增所得目的基因片段长度约为 904 bp (含引物序列),与预期片段大小相符(图 1)。

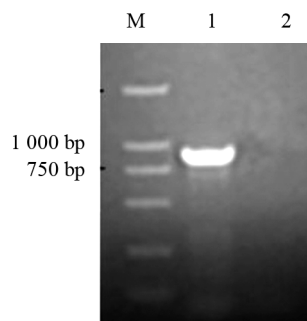


图 1 1.0%琼脂糖凝胶电泳下 PCR 扩增 Tp0608 产物 M: DNA Marker;1:Tp Nichols 株;2:PBS 对照

2.2 重组表达质粒的构建与鉴定

重组表达质粒经双酶切鉴定(图 2)和 DNA 测序鉴定(与 GenBank 上登录基因序列完全一致),表明插入片段为 Tp0608 基因。

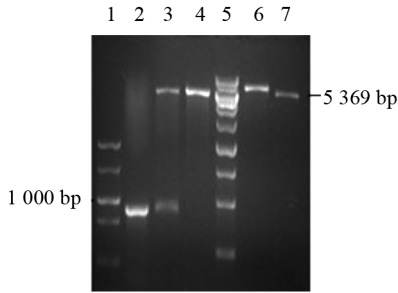


图 2 重组质粒的双酶切鉴定 1:DNA Marker1;2:Tp0608;3:双酶切 pET-28a(+) / Tp0608;4:双酶切 pET-28a(+);5:DNA Marker2;6:EcoRI酶切 pET-28a(+) / Tp0608;7:EcoRI酶切 pET-28a(+)

2.3 重组蛋白的表达形式、纯化及纯度分析

诱导菌体蛋白经 SDS-PAGE 电泳,在约 38 kDa 处可见一明显条带,与预期分子量大小相符,重组蛋白主要以包涵体形式存在,复性的纯化重组蛋白经 SDS-PAGE 显示出单一清晰条带(图 3),以 2 mol/L 尿素复性最佳。UVP 扫描分析蛋白纯度大于 95%。

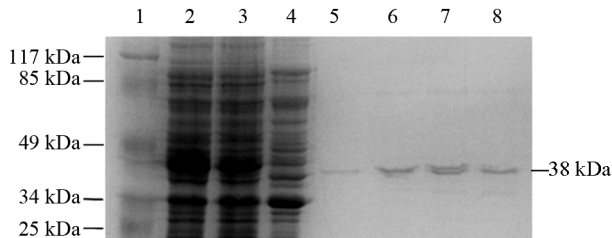


图 3 重组蛋白表达形式、纯化的 SDS-PAGE 图 1:蛋白分子量;2:E.coli BL21(DE3) / Tp0608 全菌蛋白;3:全菌蛋白沉淀(包涵体);4:全菌蛋白上清;5~8:0、1、2、4 mol/L 尿素复性纯化蛋白

2.4 重组抗原的 Western blot 鉴定

Western blot 结果显示,重组蛋白仅被梅毒患者混合血清识别,而不能被健康人血清所识别(图 4),即所表达的重组蛋白具有良好的抗原性和特异性。

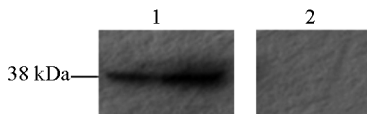


图 4 重组蛋白的 Western blot 鉴定 1:梅毒患者混合血清;2:健康人混合血清

3 讨 论

体抗体检测。前者敏感性和特异性较低,常作为初筛方法。后者敏感性和特异性均较高,但以 Tp 全天然蛋白的诊断抗原来来源困难(Tp 不能人工培养)而成本高、与其它螺旋体抗原交叉、难以避免蛋白污染。重组抗原克服了上述缺点,为提供 Tp 诊断抗原开辟了一条有效途径。近年来一系列抗原得到表达和评价,目前应用于梅毒感染诊断的重组抗原主要包括 TpN47(Tp0574)、TpN17(Tp0435)、TpN15(Tp0171)及 TpN44.5(TmpA/ Tp0768)多种抗原的组合^[5-8],但这些蛋白特异性和敏感性仍有待进一步提高,尤其对 I 期梅毒的敏感性较低^[3]。因此,有必要筛选其它 Tp 诊断抗原以弥补当前梅毒血清学诊断方法的不足。

2010 年,McGill 等^[4]应用二维凝胶电泳(2D-GE)结合免疫蛋白质组学方法,发现了包括 Tp0608 在内的几种让其很感兴趣的蛋白,研究表明这些天然的假定蛋白能与免疫血清及包括早期梅毒在内的各期梅毒病人血清发生强烈的免疫反应却不与正常兔/人血清反应,作者推测这几种蛋白具有潜在免疫诊断价值^[4]。本研究应用生物信息学软件分析 Tp0608,也显示其存在多个优势 B 细胞抗原表位,同源性分析其与其它物种的蛋白无同源性,表明其作为诊断抗原具有潜在的敏感性和特异性。

评价诊断抗原首先是如何高效表达重组蛋白。为实现外源基因的重组表达,目前已经发展了一系列表达系统,包括原核和真核表达系统。本实验选择的是大肠埃希菌表达系统中的 pET 系列,该系统发展最为成熟,而且 pET 系列具有如下几个优点:(1)质粒载体上含有利于目的蛋白稳定、高效表达的 T7 启动子;(2)质粒上带有的组氨酸标签分子量较小,对目的蛋白功能的影响也不明显;(3)组氨酸标签上的咪唑环可以与 Ni^{2+} 形成金属螯合物,便于从细菌蛋白中分离出目的蛋白^[9]。本研究表明,使用 pET-28a(+) 表达载体高效表达了 Tp0608。其次,重组蛋白纯度对血清学诊断十分重要。如表达蛋白中混有较多的大肠埃希菌蛋白,会与人体血清中普遍存在的相应抗体结合,导致检测时背景颜色偏高,不利于结果判断。本研究通过纯化,获得了大于 95% 的纯度。Western blot 证实重组蛋白仅与梅毒患者血清反应,而不与正常人血清反应,表明其有良好抗原性和特异性。

(下转第 360 页)

梅毒血清学诊断方法包括非螺旋体抗体和螺旋

(上接第 343 页)

总之,本研究高效表达并获得了高纯度重组蛋白 Tp0608,该蛋白具有良好的抗原性和特异性,为深入探讨其免疫诊断价值奠定了基础。下一步试验将以其作为诊断抗原,建立 ELISA 方法,广泛检测临床标本,评价血清学检测的敏感性、特异性和重复性。

参考文献:

- [1] Lafond RE, Lukeart SA. Biological basis for syphilis [J]. Clin Microbiol Review, 2006, 19(1): 29-49.
- [2] Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete [J]. Science, 1998, 281(5375): 375-388.
- [3] Van Voorhis WC, Barrett LK, Lukehart SA, et al. Serodiagnosis of syphilis: antibodies to recombinant Tp0453, Tp92, and Gpd proteins are sensitive and specific indicators of infection by *Treponema pallidum* [J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(8): 3668-3674.
- [4] McGill MA, Edmondson DG, Carroll JA, et al. Characterization and serologic analysis of the *Treponema pallidum*

proteome [J]. Infect Immun, 2010, 78(6): 2631-2643.

- [5] Ebel A, Bachelart L, Alonso JM. Evaluation of a new competitive immunoassay (BioElisa Syphilis) for screening for *Treponema pallidum* antibodies at various stages of syphilis [J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(2): 358-361.
- [6] Woznicová V, Valisová Z. Performance of CAPTIA Select Syph-G Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Syphilis Testing of a High-Risk Population: Analysis of Discordant Results [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(6): 1794-1797.
- [7] Young H, Aktas G, Moyes A, et al. Enzywell recombinant enzyme immunoassay for the serological diagnosis of syphilis [J]. Int J STD AIDS, 2000, 11(5): 288-291.
- [8] van Dommelen L, Smismans A, Goossens VJ, et al. Evaluation of a rapid one-step immunochromatographic test and two immunoenzymatic assays for the detection of anti-*Treponema pallidum* antibodies [J]. Sex Transm Infect, 2008, 84(4): 292-296.
- [9] Panagiotidis CA, Silverstein SJ. pALEX, a dual-tag prokaryotic expression vector for the purification of full-length proteins [J]. Gene, 1995, 164(1): 45-47.

(此文编辑:蒋湘莲)