

梅毒螺旋体硫氧还原蛋白 TP0100 的原核表达和鉴定

林勇平, 俞 辉, 刘忠民[△] (广州医学院第一附属医院检验科, 广州 510120)

【摘要】 目的 构建梅毒硫氧还原蛋白 TP0100 基因的原核表达载体, 在大肠埃希菌中表达重组蛋白, 并评价其在梅毒血清学诊断中的价值。**方法** 构建 pET-28b-TP0100 重组表达质粒, 转化大肠埃希菌 BL21(DE3) 后诱导表达。经镍柱纯化, 重组蛋白通过质谱和 Western blot 进行鉴定。以重组蛋白为抗原建立酶联免疫吸附试验 (ELISA) 间接法, 并检测临床收集的梅毒血清。**结果** 成功构建表达载体 pET-28b-TP0100, 测序结果表明质粒中的插入序列与 GenBank 中 TP0100 的基因序列相同。重组蛋白表达约占菌体总蛋白的 40%, 相对分子质量约为 23×10^3 。质谱和 Western blot 分别证实重组蛋白的酶解片段来自于 TP0100 蛋白, 重组蛋白能与梅毒 TPPA 阳性血清发生特异性反应。ELISA 检测 20 份梅毒螺旋体明胶凝集试验 (TPPA) 阳性血清和 20 份 TPPA 阴性血清, 与 TPPA 方法的符合率分别为 95% (19/20) 和 100% (20/20)。**结论** 重组硫氧还原蛋白 TP0100 能够与梅毒患者阳性血清发生特异性反应, 是一个潜在的梅毒血清学诊断抗原。

【关键词】 梅毒; 硫氧还原蛋白; TP0100; 原核表达

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.08.004 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)08-0904-03

Prokaryotic expression and identification of thioredoxin TP0100 protein of Treponema pallidum LIN Yong-ping, YU Hui, LIU Zhong-min[△] (Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China)

【Abstract】 Objective To construct the prokaryotic expression plasmid containing thioredoxin TP0100 gene of *Treponema pallidum*, express recombinant TP0100 protein in *E. coli* and to investigate the application in serodiagnosis of syphilis. **Methods** TP0100 gene was amplified by PCR and cloned into plasmid vector pET-28b. The recombinant plasmid pET-28b-TP0100 was transformed into *E. coli* BL21(DE3) for protein expression on IPTG induction. The expressed protein was purified using Ni²⁺ affinity chromatography and then identified by mass spectrometry and Western blotting. The indirect ELISA method was developed by using TP0100 protein as antigen. Twenty TPPA positive sera and twenty TPPA negative sera were tested by TP0100-ELISA. **Results** The recombinant plasmid pET-28b-TP0100 was constructed correctly. The sequencing result confirmed that the sequence of the fragment inserted in the plasmid was the same as the coding sequence of TP0100 protein recorded in GenBank. Protein with relative molecular mass of 23×10^3 was expressed in about 40% of total bacterial proteins. The result of mass spectrometric analysis demonstrated that the fragment was from TP0100 protein which could react with syphilitic sera. The coincidence rate was 95% in TPPA positive sera and 100% in TPPA negative sera with the result of TP0100-ELISA. **Conclusion** The recombinant thioredoxin TP0100 has specific reactivity with TPPA positive sera and could be an alternative antigen for serological diagnosis of syphilis.

【Key words】 syphilis; thioredoxin; TP0100; prokaryotic expression

根据全国和各省市的研究调查报告显示, 目前我国的梅毒发病率处于不断上升的趋势^[1-3]。由于梅毒感染人体后的症状和体征并不特异, 临床诊断需依靠梅毒血清学的试验结果。传统的梅毒血清学诊断方法存在固有缺点, 梅毒非特异性抗体检测如快速血浆反应素试验 (RPR) 的敏感性和特异性较低, 特异性抗体的检测如梅毒螺旋体明胶凝集试验 (TPPA) 其试剂成本较高。传统方法以手工操作为主, 结果判读受主观影响, 难以满足目前临床上大样本的快速筛查工作。近年来, 以梅毒重组蛋白为抗原所建立的检测方法开始在临床上推广应用。为了进一步丰富梅毒螺旋体的特异性抗原库, 有学者从梅毒全蛋白质表达库中筛选可与梅毒螺旋体感染的兔血清和患者血清结合的蛋白抗原, 成功鉴定出硫氧还原蛋白 TP0100 能够与梅毒感染后的各期血清发生特异性反应^[4-5]。因此作者拟通过原

核基因工程技术获得梅毒螺旋体重组 TP0100 蛋白, 并探讨其在梅毒血清学诊断中的初步应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料 菌株和载体: 梅毒螺旋体 (Nichols 株) 的基因组 DNA 由南华大学病原微生物研究所提供; 原核表达载体 pET-28b 以及大肠埃希菌 DH5a 和 BL21(DE3) 菌株为本实验室保存。梅毒血清样本由广州医学院第一附属医院收集。主要试剂: 质粒提取和 PCR 产物回收试剂盒购自天根生化公司, DNA 和蛋白 Marker 购自 Fermentas 公司; Premix Ex Taq 聚合酶购自大连宝生物公司; 限制性内切酶 Nco I、Sal I 和 T4 DNA 连接酶购自 New England Bio Labs 公司; 30% 丙烯酰胺 (1:29)、Tris、SDS、IPTG、Tricine 购自 Sigma 公司; 透析袋购自广州捷倍斯公司; 镍离子层析柱购自 GE Healthcare 公司;

[△] 通讯作者, E-mail: gylzm08@126.com。

辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗人 IgG 购自北京博奥森公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计和基因扩增 以梅毒螺旋体基因组 DNA 为模板,聚合酶链反应(PCR)扩增 TP0100 基因。引物序列如下:上游引物 5'-CAT GCC ATG GGC ATG AGT TGC TCC CGT ACG AC-3'和下游引物 5'-ACG CGT CGA CGT CAC GCG CCA GTT CCT TAA AG-3'。反应体系为:模板 0.2 ng,引物 0.3 μ mol/L,2 $\times$ Premix Ex Taq 25 μ L,补充水至 50 μ L。反应条件为:98 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.2 重组质粒的构建与测序 PCR 产物经 Nco I 和 Sal I 双酶切,将酶切片段与 pET-28b 载体在 16 $^{\circ}$ C 连接 4 h 后,将连接产物转化入大肠埃希菌 DH5a 中,经对卡那霉素的抗药性筛选阳性重组子,使用载体的通用引物进行菌落 PCR 鉴定,阳性克隆提取质粒后经双酶切鉴定,正确的重组质粒送公司测序。

1.2.3 蛋白表达和纯化 将重组质粒 pET-28b-TP0100 导入大肠埃希菌 BL21(DE3)中进行诱导表达。加入 IPTG 至终浓度 1.0 mmol/L 进行诱导,并以 IPTG 诱导的经空载体 pET-28b 转化的 BL21 菌为对照。离心收集诱导产物的上清液和沉淀,聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定目的蛋白的表达形式。大量诱导重组菌并收集菌体沉淀,提取包涵体蛋白,经 8 mol/L 尿素溶解后进行镍柱纯化,使用 500 mmol/L 咪唑洗脱目的蛋白并通过透析将溶液换为 1:1 的磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.5)。

1.2.4 基质辅助激光解析电离化飞行时间质谱分析(MALDI-TOF) 蛋白样品经胰酶作用后与基质混合并上样,在 4800 plus MALDI-TOF Analyzer 串联飞行时间质谱仪上进行检测。样品首先进行一次一级质谱分析,再选择一级质谱中信号比大于或等于 50、信号由强到弱的 5 个前体离子进行二级质谱分析。获得的二级质谱数据通过 GPS Explore 软件 MASCOT 蛋白质数据库中检索,找出相匹配的蛋白。

1.2.5 Western blot 分析 纯化的重组蛋白经 SDS-PAGE 后,电转移至 PVDF 膜上,与 TPPA 阳性梅毒血清孵育 1 h,%脱脂牛奶封闭后,加入 HRP 标记的羊抗人 IgG 孵育 1h,最后加入 TMB 显色。

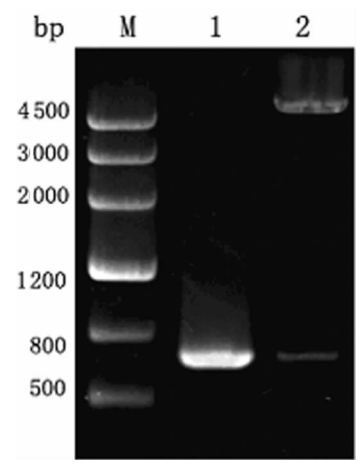
1.2.6 酶联免疫吸附试验(ELISA)间接法的建立 将浓度为 4 mg/L 的 TP0100 蛋白包被 ELISA 板,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。使用 2%BSA 在 4 $^{\circ}$ C 条件下过夜封闭。血清以 1:10 稀释后再加入反应孔并在 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min,洗涤后加入酶标抗体孵育 45 min 后,充分洗涤后加入 TMB 显色,在 450 nm 波长下检测吸光度值。检测临床收集的 TPPA 阳性和 TPPA 阴性血清各 20 份。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定可见约 600 bp 的特异性基因条带,见图 1。

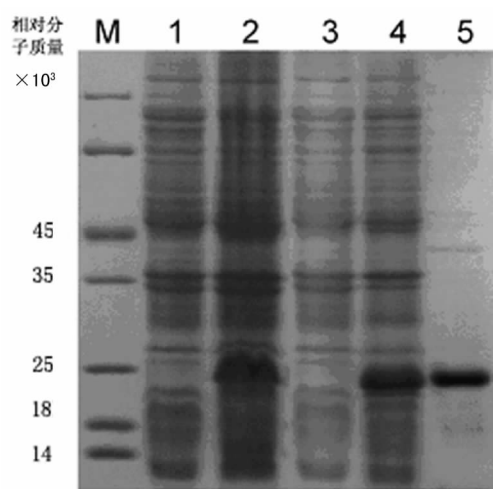
2.2 重组表达质粒的构建与测序 重组质粒 pET-28b-TP0100 经 Nco I 和 Sal I 双酶切,产物经琼脂糖凝胶电泳分析可见约 0.6 kb 和 5.3 kb 的目的基因条带,见图 1。将双酶切鉴定成功的重组质粒送测序,测序结果经 Blast 序列对比分析,结果表明质粒中插入序列与 GenBank 中登录的 TP0100 基因序列完全一致。

2.3 蛋白表达与纯化 重组菌的表达产物经 SDS-PAGE 分析,可见相对分子质量约 23×10^3 的特异蛋白条带,目的蛋白主要以包涵体的表达形式存在。经凝胶成像系统扫描分析,目的蛋白约占菌体总蛋白的 40%,见图 2。



注:M 为分子量标准;1 为 TP0100 基因的 PCR 产物;2 为 pET-28b-TP0100 Nco I /Sal I 双酶切产物。

图 1 TP0100 基因扩增产物和表达质粒 pET-28b-TP0100 双酶切鉴定



注:M 为分子量标准;1 为未诱导;2 为 IPTG 诱导的全菌蛋白;3 为 IPTG 诱导的上清液;4 为 IPTG 诱导的沉淀;5 为纯化后。

图 2 梅毒螺旋体 TP0100 蛋白的重组表达与纯化

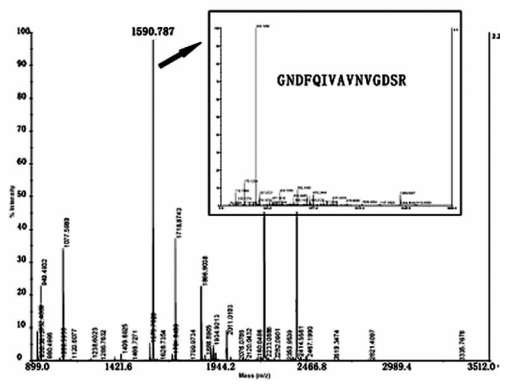
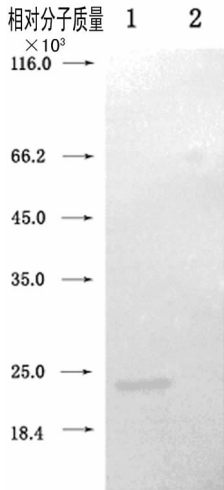


图 3 重组 TP0100 蛋白的肽质量指纹图谱(PMF)和质谱/质谱(MS/MS)分析图

2.4 MALDI-TOF 结果 纯化蛋白 MALDI-TOF 分析后,结

果利用 MASCOT 软件查询 NCBI 数据库发现,酶解肽段中,相对分子质量为 1 590. 78 的肽段,氨基酸序列为 GND-FQIVAVNVGDSR,来自 TP0100 蛋白,表明酶解肽段来自目的蛋白,TP0100 的肽质量指纹图谱(PMF)和质谱质谱(MS/MS)分析见图 3。

2.5 Western blot 分析 Western blot 分析证明,纯化的重组 TP0100 蛋白可与 TPPA 阳性的梅毒血清发生特异性反应,见图 4。



注:1 为纯化的 TP0100;2 为经 IPTG 诱导的空载体 pET-28b 转化的 E. coli BL21(DE3)细菌的裂解液。

图 4 重组 TP0100 蛋白的 Western blot 分析

2.6 ELISA 间接法测定 通过以重组 TP0100 蛋白建立的 ELISA 法检测 20 份 TPPA 阳性血清 19 份为阳性结果,20 份 TPPA 阴性血清全部为阴性结果,两种方法的符合率分别 95%和 100%。

3 讨 论

随着我国梅毒感染病例数的不断上升和积极落实梅毒患者诊治的规范化管理,传统的检测方法如 RPR、TPPA 已经难以满足目前临床大样本的快速筛查。以基因工程重组表达的抗原所建立的 ELISA 和化学发光法具有检测成本低、易于自动化和标准化,是目前梅毒血清学诊断方法发展的主要趋势,主要包括免疫化学发光法和 ELISA,以重组 TP15、TP17、TP47 等单个蛋白或其组合作为抗原^[6-7],方法的敏感性可以达到 95%以上^[8];但临床检测的实践中发现其结果与传统方法包括 TPPA 的结果具有一定比例的不一致性,出现部分假阳性结果^[9-11],已经引起临床对实验室结果判读的困惑,但其发生的真正原因目前尚不清楚。因此,急需进一步优化目前基于重组抗原的免疫化学发光法。但由于可供选择的特异性抗原非常有限,限制了对方法学的优化,所以迫切需要扩大梅毒螺旋体特异性抗原库,鉴定和研究潜在可用于梅毒血清学诊断的新抗原。

本研究利用原核基因工程技术成功获得了的重组硫氧还原蛋白 TP0100,通过 Western blot 分析证明其能与梅毒 TPPA 阳性的血清发生特异性反应。以重组 TP0100 蛋白建立的 ELISA 间接法,通过与 TPPA 的比较,其对 TPPA 阳性血清的检测符合率为 95%(19/20),对 TPPA 阴性血清的检测符合率

是 100%(20/20),表明基于重组 TP0100 抗原的 ELISA 间接法与传统的 TPPA 方法具有相当的检测性能,且灵敏、特异,操作简便和容易实现检测自动化和标准化,对进行高通量和自动化的梅毒血清学筛查具有明显优势。但由于本研究所测试的血清数量有限,需进一步通过大样本的临床考核去评价其在梅毒血清学诊断的应用价值。

参考文献

[1] Tucker JD, Cohen MS. China's syphilis epidemic: epidemiology, proximate determinants of spread, and control responses[J]. Curr Opin Infect Dis, 2011, 24(1): 50-55.

[2] 夏建晖,郭燕,郑敏娜,等. 天津市 2006~2008 年梅毒流行趋势分析[J]. 中国热带医学, 2010, 10(9): 1081-1082.

[3] 陈文静,王晓华,孙希凤,等. 广东省 2004~2008 年梅毒流行趋势分析[J]. 岭南皮肤性病科杂志, 2009, 16(3): 201-203.

[4] McKevitt M, Brinkman MB, McLoughlin M, et al. Genome scale identification of Treponema pallidum antigens[J]. Infect Immun, 2005, 73(7): 4445-4450.

[5] Brinkman MB, McKevitt M, McLoughlin M, et al. Reactivity of antibodies from syphilis patients to a protein array representing the Treponema pallidum proteome[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(3): 888-891.

[6] Sena AC, White BL, Sparling PF. Novel Treponema pallidum serologic tests; a paradigm shift in syphilis screening for the 21st century[J]. Clin Infect Dis, 2010, 51(6): 700-708.

[7] Sun AH, Mao YF, 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.

[8] Binnicker MJ, Jespersen DJ, Rollins LO. Treponema-specific tests for serodiagnosis of syphilis: comparative evaluation of seven assays[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(4): 1313-1317.

[9] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Syphilis testing algorithms using treponemal tests for initial screening—four laboratories, New York City, 2005-2006[J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2008, 57(32): 872-875.

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

[11] Park IU, Chow JM, Bolan G, et al. Screening for syphilis with the treponemal immunoassay: analysis of discordant serology results and implications for clinical management[J]. J Infect Dis, 2011, 204(9): 1297-1304.