

DOI: 10.3969/cjz.j.issn.1002-2694.2012.12.011

# 结核分枝杆菌 CFP-10 与 Rv2626c 蛋白的表达及血清学诊断研究\*

朱中元<sup>1</sup>, 张丹<sup>2</sup>, 王海波<sup>1</sup>, 肖劲逐<sup>1</sup>, 邱一帆<sup>3</sup>, 颜磊<sup>3</sup>, 陈德<sup>3</sup>, 刘爱国<sup>3</sup>, 杨欣<sup>3</sup>

**摘要:** 目的 通过构建结核分枝杆菌(结核菌)CFP-10 和 Rv2626c 蛋白表达载体, 并在大肠杆菌表达, 对其免疫反应性进行鉴定评价。方法 用 PCR 法从结核菌 H37Rv 基因组 DNA 分别扩增出 CFP-10、Rv2626c 基因, 连接到表达载体 PET30a 上, 在大肠杆菌中表达; 组氨酸标签(His-Tag)镍柱层析纯化重组蛋白; 用 ELISA 方法进行检测。结果 构建了含 CFP-10、Rv2626c 重组质粒的大肠杆菌工程菌, 发现目的蛋白主要以可溶形式存在; 用重组 CFP-10、Rv2626c 蛋白组成联合抗原, ELISA 方法检测 214 份血清, 阳性率达 77.1%。结论 目的基因克隆入宿主菌中并成功表达, 重组的 CFP-10、Rv2626c 蛋白组成联合抗原可能成为结核病血清学诊断的组合抗原之一。

**关键词:** 结核分枝杆菌; CFP-10 蛋白; Rv2626c 蛋白; 表达; ELISA

中图分类号: R378.91<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2694(2012)12-1212-04

## Expression and application of CFP-10 and Rv2626c proteins of *Mycobacterium tuberculosis*

ZHU Zhong-yuan<sup>1</sup>, ZHANG Dan<sup>2</sup>, WANG Hai-bo<sup>1</sup>, XIAO Jin-zhu<sup>1</sup>, QIU Yi-fan<sup>3</sup>, YAN Lei<sup>3</sup>, CHEN De<sup>3</sup>, LIU Ai-guo<sup>3</sup>, YANG Xin<sup>3</sup>

(1. Hainan Provincial Nongken Hospital, Haikou 570311, China;

2. College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, China;

3. Nanjing Potomac Biotechnology Co LTD, Nanjing 200800, China)

**ABSTRACT:** In order to evaluate the potential of the antigens in serodiagnosis of TB, CFP-10 and Rv2626c genes were cloned and their proteins were expressed in *Escherichia coli* (*E. coli*). The gene encoding CFP-10 and Rv2626c proteins were amplified by PCR from genome of *M. tuberculosis* H37Rv, and then inserted into expression vector PET30a and expressed fusion proteins CFP-10 and Rv2626c in *E. coli* BL21(DE3). The two recombinant proteins were purified by affinity chromatography and detected by ELISA. Results showed that the two target proteins were expressed in *E. coli* after induction with IPTG. The solubility analysis indicated that the two recombinant proteins existed as soluble protein. And ELISA results showed the sensitivities of recombinant CFP-10, Rv2626c protein and CFP-10 combined with Rv2626c were 75.4%, 44.1% and 77.1%, respectively. The specificities of the antibodies to CFP-10, Rv2626c and CFP-10 with Rv2626c were 85.4%, 75.0 and 82.3%, respectively. There was no significant difference between the reactive rates of smear positive and negative TB patients. The gene sequences of CFP-10 and Rv2626c were obtained and the antigens were expressed in *E. coli* BL21. The results suggest that the CFP-10 protein combined with Rv2626c protein is a potential candidate as diagnostic reagent for the early detection of TB infection.

**KEY WORDS:** *Mycobacterium tuberculosis*; CFP-10 protein; Rv2626c protein; expression; ELISA

Supported by the Key Program Science and Technology of Hainan Province (No. 080209).

Corresponding author: Zhu Zhong-yuan, Email: zhu\_zhongyuan@hotmail.com

\* 海南省 2008 年度重点科技项目(080209)

作者单位: 1. 海南省农垦总医院, 海口 570311;

2. 海南大学环境与植物保护学院, 海口 570228;

3. 南京大渊生物技术有限责任公司, 南京 200800

Email: zhu\_zhongyuan@hotmail.com

结核病是当今世界上由单一病菌感染引起的死亡率最高的疾病, 严重威胁着人类的健康。全世界大约有三分之一的人感染了结核菌, 并且感染人

数在以每年 700 万~800 万的速度增加。因此,结核病快速准确的早期诊断成为控制结核病流行的重要手段之一。目前我国结核病诊断主要由临床表现、影像学诊断结合痰涂片镜检、细菌培养或 PPD 皮试进行。但是由于常规细菌学检查方法的灵敏性差,而且细菌培养费时长(6~8 周),以及受人为操作影响等原因,这些方法对于结核病快速的帮助有限<sup>[1]</sup>。ELISA 方法测定结核菌抗体水平具有简单、低廉、快速的特点,作为结核病的辅助诊断方法之一,正逐渐被众多研究者所重视。结核菌分泌许多蛋白到细胞外,在结核病人的免疫反应发挥了很重要的作用。研究表明 CFP-10 是 T 细胞的靶抗原,能诱导皮肤迟发型超敏反应并刺激外周血单核细胞产生特异性 IFN-γ<sup>[2]</sup>。Rv2626c 抗原是 MTB 休眠期特异表达的蛋白之一,有较强的抗原性,可激发宿主机体产生较高的抗体水平<sup>[3]</sup>。本实验通过构建结核菌 CFP-10、Rv2626c 蛋白表达载体,在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达,并对表达产物进行纯化,以获得大量 CFP-10 抗原、Rv2626c 抗原,同时将重组的 CFP-10、Rv2626c 蛋白组成联合抗原进行 ELISA 实验,为探索重组蛋白在结核病血清学诊断的应用奠定前期实验基础。

## 1 材料和方法

**1.1 菌种和载体** 结核菌 H37Rv、大肠杆菌 BL21 (DE3)、表达载体 pET-30a 均为海南省农垦总医院保存。

**1.2 试剂** β-硫代半乳糖苷(IPTG)、硫酸卡那霉素(Kan)购自上海生工生物工程技术服务有限公司。DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶和 DNA Marker 购自宝生物(大连)有限公司。预染蛋白 Marker 购自北京百泰克生物技术有限公司。普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物科技有限公司。 $6 \times$  His-tagged Ni-NTA Agarose 蛋白纯化柱是 QIAGEN 公司产品。常用高纯度生化试剂均为 Biosharp 公司产品,其他试剂均为国产分析纯试剂。HRP 标记抗人 Ig 购自 Solarbio 公司。显色底物购自英科新创科技有限公司。

**1.3 血清来源** 118 份肺结核患者血清由海口市结核病防治所提供的,其中痰涂阳性患者血清 20 份,痰涂阴性患者血清 98 份;96 份健康查体者血清由海南省农垦总医院提供。

**1.4 引物** 根据 GenBank 中结核菌标准株 H37Rv 的 CFP-10、Rv2626c 基因序列,设计 CFP-

10 基因 5' 端引物为 I: 5'-CCGAATTCTATG-GCAGAGATGAAGACCGAT-3', 3' 端引物为 II: 5'-CCCAAGCTTCAGAACCCCATTGCGAG-GAC-3'。I、II 的酶切位点分别为 EcoR I 和 Hind III; Rv2626c 基因 5' 端引物 III: 5'-CCGAATTCTATGACCACCGCACGCGACA-3', 3' 端引物 IV: 5'-CCGCTCGAGCTAGCTGGCGAGGCCAT-3'。III、IV 酶切位点分别为 EcoR I 和 Xho I。引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。

**1.5 CFP-10、Rv2626c 基因的扩增与克隆** 以 H37Rv 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 CFP-10、Rv2626c 基因片段。反应条件:95 °C, 5 min; 95 °C, 30 s, 53 °C, 30 s, 72 °C, 1 min, 36 个循环; 72 °C, 7 min; 4 °C, 保存。扩增产物经纯化试剂盒处理后,经双酶切,酶切后扩增产物经切胶回收与同样方式处理的表达质粒 pET30a 在 T4 DNA 连接酶作用下连接,连接产物转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞,挑选阳性重组子送南京金斯瑞生物工程有限公司测序。

**1.6 目的蛋白的诱导表达** 将通过测序验证正确的重组子接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中,待 37 °C 振荡培养至吸光度(A600)值为 0.6~0.8,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续 37 °C 振荡培养,从开始诱导表达 1 h 起每隔 1 h 留样待检,至诱导表达 6 h 时止,收集菌体,进行 SDS-PAGE 分析。

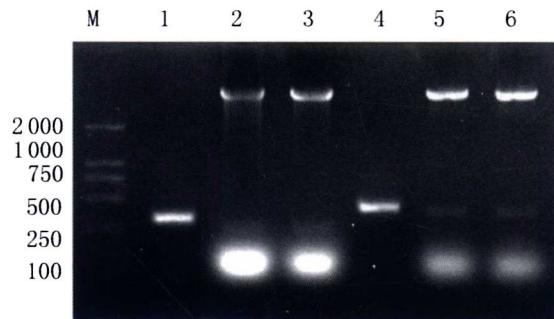
**1.7 重组蛋白表达形式鉴定及纯化** 收集按最佳诱导表达条件诱导的菌体,冰浴超声破碎后离心,分别收集沉淀和上清,SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达形式;采用 QIAGEN 公司  $6 \times$  His-tagged Ni-NTA Agarose 蛋白纯化柱分离纯化带 His 标签的重组蛋白。

**1.8 重组 CFP-10、Rv2626c 蛋白抗原 ELISA 检测** 通过方阵法确定抗原的最适包被浓度和最适第二抗体稀释倍数。用 pH9.6 包被缓冲液将重组 CFP-10 蛋白、Rv2626c 蛋白以及 2 种蛋白的混合物,按 2、1、0.5、0.1 和 0.01 μg/孔进行稀释,每孔 100 μL 加样,4 °C 包被过夜;次日将孔内剩余液体甩干,洗涤液洗 3 次;将小牛血清稀释 10 倍,以每孔 200 μL 加样,37 °C 下封闭 1 h;甩干,洗涤液洗 3 次;待测血清样本用 PBS 进行 1:50 稀释,取 100 μL 加入反应孔,37 °C 下放置 1.5 h,将孔内剩余液体甩干,洗涤液洗 3 次;将 HRP-二抗按 1:500, 1:1000 和 1:1500 进行稀释,以每孔 100 μL 加样,37 °C 下放置 1 h;洗涤液洗 3 次,每孔加底物液 A、B 各 50 μL,

避光反应 15 min; 加入 1 mol/L HCl 终止反应; 酶标仪测定 OD<sub>450</sub> 值, 结果判定以待测样本的 OD<sub>450</sub> 值于阴性对照的 OD<sub>450</sub> 值之比 ≥ 2.1 为阳性, 计算其敏感性与特异性。

## 2 结 果

**2.1 重组 CFP-10、Rv2626c 质粒的鉴定** 从构建阳性重组菌中挑取重组克隆, 摆菌后提取质粒经双酶切鉴定(图 1)。两者重组质粒酶切片段和 PCR 扩增片段相同, 分别约为 303 bp、432 bp。重组质粒测序后, 其构建序列与 GenBank 中结核菌 H37Rv 的基因完全相同。



**图 1 重组质粒 PET30a-CFP-10、PET30a-Rv2626c 的酶切鉴定结果**

M: DNA marker; 1: CFP-10 基因 PCR 产物. 2-3: PET-30a-CFP-10 双酶切. 4: Rv2626c 基因 PCR 产物. 5-6: PET-30a-Rv2626c 双酶切片段。

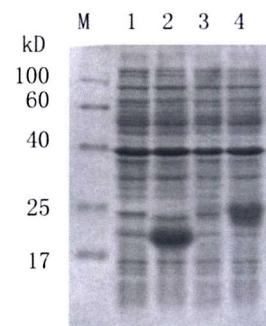
**Fig. 1 Endonuclease digestion results of expressing plasmid pET30a-CFP-10 and pET30a-Rv2626c**

M: DNA marker; 1: PCR product of MTB CFP-10 gene; 2-3: Products of EcoR I and Hind III digestion of pET-30a-CFP-10; 4: PCR product of MTB Rv2626c gene; 5-6: Products of EcoR I and Xho I digestion of pET-30a-Rv2626c

**2.2 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达** 将筛选到的工程 pET-30a-CFP-10/BL21(DE3)、pET-30a-Rv2626c/BL21(DE3) 经 IPTG 诱导后, 取菌体沉淀进行 SDS-PAGE 分析(图 2), 可见明显的特异表达产物条带。重组 CFP-10 蛋白相对分子质量比预计分子质量大, 可能是附加表达了载体上多余的序列; 重组 Rv2626c 蛋白相对分子质量与预计相符, 而未诱导的菌体没有明显的条带。

**2.3 重组 CFP-10、Rv2626c 蛋白的可溶性分析** 诱导后的菌体经超声波破碎, 离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。结果见图 3, 重组 CFP-10、Rv2626c 蛋白主要存在于上清部分, 以可溶性蛋白形式存在。

**2.4 重组 CFP-10 蛋白的纯化** 收集诱导表达的菌体沉淀, 经超声波破碎, 离心, 取上清通过镍琼脂糖凝胶纯化柱分离纯化。收集洗脱峰溶液进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 4。

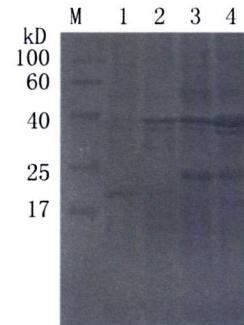


**图 2 重组工程菌表达产物的 SDS-PAGE 电泳图**

M: 预染蛋白质 Marker; 1: 未诱导的重组 CFP-10 菌株; 2: 诱导 6 h 后的重组 CFP-10 菌株; 3: 未诱导的重组 Rv2626c 菌株; 4: 诱导 6 h 后的重组 Rv2626c 菌株。

**Fig. 2 SDS-PAGE results of the pET-30a-CFP-10/BL21 (DE3) and pET-30a-Rv2626c/BL21 (DE3)**

M: Pre-stained protein MW marker; Lane 1: pET-30a-CFP-10/BL21 (DE3) without IPTG induction; Lane 2: pET-30a-CFP-10/BL21 (DE3) after 6 h of IPTG induction; Lane 3: pET-30a-Rv2626c/BL21 (DE3) without IPTG induction; Lane 4: pET-30a-Rv2626c/BL21 (DE3) after 6 h of IPTG induction.



**图 3 重组 CFP-10、Rv2626c 肽段表达方式分析**

M: 蛋白质分子量标准; 1: 重组 CFP-10 蛋白菌体超声波破碎后的上清; 2: 重组 CFP-10 蛋白菌体超声波破碎后的沉淀; 3: 重组 Rv2626c 蛋白菌体超声波破碎后的上清; 4: 重组 Rv2626c 蛋白菌体超声波破碎后的沉淀。

**Fig. 3 Peptide expression analysis of recombinant CFP-10 and Rv2626c**

M: pre-stained protein MW marker; 1: Supernatant of CFP-10 expressing *E. coli*; 2: Sediments of CFP-10 expressing *E. coli*; 3: Supernatant of Rv2626c expressing *E. coli*; 4: Sediments of Rv2626c expressing *E. coli*.

**2.5 ELISA 分析 通过方阵法确定 CFP-10 肽段**

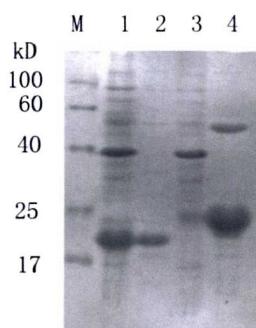


图 4 纯化重组 CFP-10 蛋白、重组 Rv2626c 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

M:蛋白质分子量标准; 1:重组 CFP-10 蛋白菌株诱导产物; 2:纯化重组 CFP-10 蛋白; 3 重组 Rv2626c 蛋白菌株诱导产物; 4:纯化重组 Rv2626c 蛋白。

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis figure on rCFP-10 and rRv2626 proteins before and after purification

M: Pre-stained protein MW marker; 1: Supernatant of CFP-10 expressing *E. coli*; 2: Purified rCFP-10; 3: Supernatant of Rv2626c expressing *E. coli*; 4: Purified rRv2626c.

最适包被浓度为 0.1 μg/孔, Rv2626c 蛋白抗原为 0.1 μg/孔, 混合抗原最适工作浓度为 0.1 μg/孔, 二者比例为 1:1。酶标二抗最适工作浓度为 1:1500。然后在该条件下, 用重组 CFP-10 蛋白、Rv2626c 蛋白及二者组成的联合抗原对 118 份确诊病人血清和 96 份健康人血清进行检测。结果显示重组 CFP-10 蛋白抗原检测结核特异性抗体的总敏感性为 75.4% (痰涂阳 70.0%/痰涂阴 76.5%), 检测健康查体者对照血清特异性为 85.4% (82/96); 重组 Rv2626c 蛋白抗原检测结核特异性抗体的敏感性为 44.1% (痰涂阳 45.0%/痰涂阴 43.9%), 检测健康查体者对照血清特异性 75.0% (72/96); 联合抗原检测结核特异性抗体的总敏感性为 77.1% (痰涂阳 80.0%/痰涂阴 76.5%), 检测健康查体者对照血清特异性为 82.3% (79/96)。

### 3 讨 论

CFP-10 是 1998 年被鉴定出来的低分子量蛋白, 又名 mtbll, 是一种短期培养滤液蛋白, 由 *lhp* 基因编码, 属于 ESAT-6 家族<sup>[4]</sup>。CFP-10 基因大小为 303 bp, 编码 100 个氨基酸, 分子量为 10 kDa。只存在于结核分枝杆菌复合群及其它几种致病性分枝杆菌中, BCG 及其它分枝杆菌不表达 CFP-10<sup>[5]</sup>。因此 CFP-10 作为抗原可以将结核病与 BCG 免疫以及非结核菌感染区别开来。Renshaw 等研究表明, CFP-10 表现出与 ESAT-6 相当的 T 细胞性免疫反应, 诱导的 IFN-γ 的释放水平与 ESAT-6 相当, 具有潜在的诊断应用价值。

Rv2626c 抗原是 MTB 休眠期特异表达的蛋白之一, 其功能尚不清楚。Rv2626c 基因长 432 bp, 编码 143 个氨基酸, 受控于休眠调节子 DosR (dormancy regulon), 该基因的表达是 MTB 进入休眠期的重要标志之一。研究发现 Rv2626c 基因及其多个下游基因的表达, 可使 MTB 进入休眠状态, 抵御宿主免疫系统的杀伤。Rv2626c 抗原可激发宿主体产生较高的抗体水平, 因此, Rv2626c 抗原可作为鉴别 MTB 在宿主体中的感染状态的血清学诊断候选抗原。

本实验采用基因工程的手段来获得目的基因, 构建了 CFP-10、Rv2626c 蛋白的原核表达载体, 并在大肠杆菌中成功表达了重组蛋白, 通过对表达产物的纯化, 获得了大量 CFP-10、Rv2626c 抗原, 这为探究重组肽段在结核病血清学诊断的应用奠定了前期抗原基础。

通过酶联免疫吸附试验(ELISA)分别检测重组 CFP-10、Rv2626c 蛋白与两者组成的联合抗原的 IgG 抗体, 结果显示联合抗原检测结核特异性抗体的敏感性为 77.1%, 检测健康对照血清特异性为 82.3%。实验数据显示, 二者联合检测的敏感性和特异性较高。应进一步纯化这两种蛋白, 优化实验条件, 提高检测的稳定性。

### 参考文献:

- [1] Karin W, Rosenkrands I, Okkels LM, et al. Assessing the sero-diagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(1): 57-65. DOI: 10.1128/JCM.43.1.57-65.2005
- [2] Dillon DC, Alderson MR, Day CH, 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): 3285-3290. DOI: 10.1128/JCM.38.9.3285-3290.2000
- [3] Rosenkrands I, Slayden RA, Crawford J, et al. Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins [J]. J Bacteriol, 2002, 184(13): 3485-3491. DOI: 10.1128/JB.184.13.3485-3491.2002
- [4] Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10) [J]. Microbiology, 1998, 144 (11): 3195-3203. DOI: 10.1099/00221287-144-11-3195
- [5] Lewis KN, Liao R, Guinn KM, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacilli Calmette Guerin attenuation [J]. J Infect Dis, 2003, 187 (1): 117-123. DOI: 10.1086/345862