

梅毒螺旋体重组蛋白 rTpN17 或 rTpN47 为抗原的 ELISA 与 TRUST 和 TPHA 血清学检测效果的比较

孙爱华^{1,2}, 范兴丽¹, 毛亚飞², 彭敏峰³, 范春红¹, 严杰²

(1. 浙江医学高等专科学校, 浙江 杭州 310053; 2. 浙江大学医学院 病原生物学系, 浙江 杭州 310058; 3. 杭州市中医院检验科, 浙江 杭州 310007)

[摘要] 目的: 克隆并构建梅毒螺旋体 tpn17、tpn47 基因原核表达系统, 建立基于 rTpN17、rTpN47 的 ELISAs, 并对其用于梅毒血清学诊断的敏感性和特异性进行评价。方法: 采用 PCR 扩增 tpn17 和 tpn47 基因并构建 tpn17 和 tpn47 基因原核表达系统。采用 SDS-PAGE 检测目的重组蛋白 rTpN17 和 rTpN47 表达情况, Ni-NTA 亲和层析法提纯 rTpN17 和 rTpN47, Western blot 检测 rTpN17 和 rTpN47 免疫反应性。分别以 rTpN17 和 rTpN47 为包被抗原, 建立检测血清标本中梅毒抗体的 ELISAs (rTpN17-ELISA 和 rTpN47-ELISA), 检测 200 例健康人、25 例类风湿关节炎 (RA) 和 17 例系统性红斑狼疮 (SLE) 患者血清样本, 并与甲苯胺红不加热血清试验 (TRUST) 和梅毒螺旋体间接血凝试验 (TPHA) 检测效果进行比较。结果: 克隆的 tpn17 和 tpn47 基因与 GenBank 中相关序列相似性为 100%。rTpN17 和 rTpN47 表达量分别为细菌总蛋白的 37.2% 和 26.8%。提纯后的 rTpN17 和 rTpN47 能与梅毒抗体阳性血清发生明显的结合反应。TPHA 检测阳性率最高 (99.1%, $P < 0.001$), rTpN17-ELISA 和 rTpN47-ELISA 检测阳性率相近 (85.3% 和 84.3%, $P = 0.427$), TRUST 检测阳性率低于 rTpN17-ELISA ($P = 0.001$), 但与 rTpN47-ELISA 相近 ($P = 0.014$)。所有健康人血清、RA 和 SLE 患者血清标本的 rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA 和 TPHA 检测结果均为阴性, 但有 7.1% (3/42) RA 和 SLE 患者血清标本 TRUST 检测结果阳性。结论: 以 rTpN17 和 rTpN47 为抗原的 ELISAs 可作为快速、简便、敏感性和特异性较高的梅毒血清学筛查方法, 而且 rTpN17 和 rTpN47 仍保持原有免疫反应特异性。

[关键词] 酶联免疫吸附测定/方法; 梅毒; 密螺旋体, 苍白/免疫学; 敏感性与特异性; 基因表达; 抗原, 细菌/血液; 梅毒血清诊断/方法; 免疫显性表位/生物合成; 免疫显性表位/遗传学; 重组, 遗传

[中图分类号] R 377 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2008)01-0067-06

Comparison of serological detection effects of ELISA using rTpN17 or rTpN47 of *Treponema pallidum* as antigen with that of TPHA and TRUST

SUN Ai-hua^{1,2}, FAN Xin-li¹, MAO Ya-fei², PENG Min-feng³, FAN Chun-hong¹, YAN Jie²
(1. Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China; 2. Department of Medical Microbiology

收稿日期: 2006-10-26 修回日期: 2007-07-25

基金项目: 浙江省医药卫生科研基金 (2004A018)。

作者简介: 孙爱华 (1968—), 女, 硕士, 副教授, 主要从事分子医学检验学研究。

通讯作者: 严杰 (1956—), 男, 博士, 教授, 博导, 主要从事医学细菌学研究; E-mail: Med_bp@zju.edu.cn.

and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** To clone *tpn17* and *tpn47* genes of *Treponema pallidum* and then construct their prokaryotic expression systems, to establish ELISAs based on rTpN17 and rTpN47 as antigens and to evaluate the sensitivity and specificity of the ELISAs for detection of serological diagnosis of syphilis. **Methods:** The whole length of *tpn17* and *tpn47* genes was amplified by PCR and then their prokaryotic expression systems were constructed. SDS-PAGE was used to measure the expression of the target recombinant proteins rTpN17 and rTpN47. Ni-NTA affinity chromatography was applied to extract rTpN17 and rTpN47, while Western blot was performed to determine the specific immunoreactivity of rTpN17 and rTpN47. By using rTpN17 and rTpN47 as the coated antigen, respectively, ELISAs (rTpN17-ELISA and rTpN47-ELISA) were established to detect serum samples from 200 healthy individuals, 25 RA patients, 17 SLE patients and 211 syphilis patients. The detection effects of the ELISAs were compared to those of TRUST and TPHA. **Results:** The sequence similarity of the cloned *tpn17* and *tpn47* genes was 100% compared with the corresponding sequences in GenBank. The expression outputs of rTpN17 and rTpN47 were approximately 37.2% and 26.8% of the total bacterial proteins, respectively. Both the extracted rTpN17 and rTpN47 could take place remarkable conjugation reactions to the sera with positive antibody against *Treponema pallidum*. The positive detection rate of TPHA (99.1%) was the highest ($P < 0.001$). The positive detection rates of rTpN17-ELISA (85.3%) and rTpN47-ELISA (84.3%) were similar ($P > 0.05$). The positive detection rates of TRUST (72.5%) was lower than that of rTpN17-ELISA ($P = 0.001$) but similar to that of rTpN47-ELISA ($P = 0.014$). The detection results of all the serum samples from healthy individuals, RA patients and SLE patients were negative, whereas 7.1% (3/42) of the samples from RA or SLE patients were positive. **Conclusions:** rTpN17 and rTpN47 are still maintaining their original immunoreactivity. The ELISAs using rTpN17 or rTpN47 as the antigen are rapid, simple and convenient, higher sensitivity and specificity methods for serological screening and detection of syphilis.

[Key words] Enzyme-linked immunosorbent assay/methods; Syphilis; *Treponema pallidum*/immunol; Sensitivity and specificity; Gene expression; Antigens, bacterial/blood; Syphilis serodiagnosis/methods; Immunodominant epitopes/biosyn; Immunodominant epitopes/genet; Recombination, genetic

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2008, 37(1):67-72.]

梅毒是由梅毒螺旋体也称苍白密螺旋体(*Treponema pallidum*, Tp)感染引起的传染性强、危害较大的人类性传播性疾病^[1]。近年我国梅毒发病率逐年上升,已成为严重的公共卫生问题^[2]。目前梅毒的实验室诊断主要依赖血清学方法,常用的有甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)和梅毒螺旋体间接血凝试验

(TPHA)等。TRUST 简便、快速,用于梅毒初筛,但特异性不强,系统性红斑狼疮(SLE)和类风湿关节炎(RA)等疾病的血清标本也可呈阳性反应^[3]。TPHA 敏感、特异是梅毒确诊试验,但需培养Tp以制备抗原^[4]。因此,建立快速、简便、敏感而特异的梅毒血清学诊断新方法仍有其现实意义。

目前已知Tp全基因组序列及其主要表面蛋白抗原^[5],其中有高度免疫原性的膜蛋白主要是相对分子量为17 000的TpN17和相对分子量为47 000的TpN47^[6],可作为梅毒血清学检测的抗原^[7-8]。由于Tp至今难以体外人工培养,本研究从梅毒患者硬性下疳分泌物中扩增、克隆了Tp tpn17基因(471 bp)和tpn47基因(1 305 bp),并构建了原核表达系统,建立分别以重组蛋白rTpN17和rTpN47抗原的ELISAs(rTpN17-ELISA和rTpN47-ELISA),检测了211例梅毒血清标本,而且对其检测敏感性和特异性与TPHA和TRUST进行了比较。

1 材料与方法

1.1 血清标本及主要诊断试剂 211份临床诊断为Ⅰ或Ⅱ期梅毒患者血清及部分硬性下疳分泌物,由杭州市第三人民医院皮肤科提供。17例SLE和25例RA无梅毒病史者血清标本由杭州市中医院提供。200份无梅毒病史的健康人血清标本来自杭州市第三人民医院和杭州市中医院正常体检者。TRUST试剂购自上海荣盛生物工程有限公司(批准文号:国药准字S10940058),TPHA购自日本富士公司。

1.2 目的基因扩增、克隆和测序 采用基因组DNA快速制备试剂盒(BioColor)提取硬性下疳分泌物中的DNA。参考GenBank中登录序列(No:TP0435,TP0574)及其内切酶图谱分析结果,设计含合适内切酶位点,用于扩增全长tpn17和tpn47基因的引物。tpn17引物序列:上游5'-CGC GGA TCC (BamH I)ATG AAA GGA TCT GTC CGC GCG-3',下游5'-CGC CTC GAG (Xho I)CTA TTC CTG TGT TTC TTC GAG-3'。tpn47引物序列:上游5'-CGC GGA TCC (BamH I)ATG aaa gtg aaa tac gca cTA-3',下游5'-CGC CTC GAG (Xho I)CTA CTG GGC CAC TAC CTT CGC-3'。PCR总体积100 μ l,内含2.5 mol/L各dNTP、250 nmol/L各引物、15 mol/L MgCl₂、2.5 U EX Taq酶(TaKaRa),300 ng DNA模板、1 $\times$ PCR缓冲液(pH 8.3)。PCR参数:扩增tpn17基因为94 $^{\circ}$ C 3 min, $\times$ 1;94 $^{\circ}$ C 30 s,52 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 45 s, $\times$ 30;72 $^{\circ}$ C 7 min, $\times$ 1;扩增tpn47基因为

94 $^{\circ}$ C 5 min, $\times$ 1;94 $^{\circ}$ C 30 s,54 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 120 s, $\times$ 30;72 $^{\circ}$ C 10 min, $\times$ 1。采用溴乙锭预染的1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。按TaKaRa公司T-A克隆试剂盒操作说明书,将目的扩增片段克隆至pMD19-T载体中,委托Invitrogen公司测序。

1.3 原核表达系统构建及其产物表达和提纯

碱变性法提取有正确序列插入片段的pMD19-T重组质粒,BamH I和Xho I双酶切,获得的目的基因片段克隆至表达载体pET32a,转化于表达宿主菌*E. coli* BL21DE3中,提取重组质粒双酶切后再次测序。在LB培养液中使用0.5 mmol/L IPTG诱导目的重组蛋白rTpN17和rTpN47表达。采用BioRad凝胶图象分析系统估计rTpN17和rTpN47表达产量,Ni-NTA亲和层析法提纯目的表达产物并用紫外分光光度法测定其浓度^[9]。

1.4 rTpN17和rTpN47免疫反应性鉴定

rTpN17和rTpN47提取物经SDS-PAGE后转膜,分别以5份1:100稀释的经TPHA确认梅毒抗体阳性血清为一抗,1:4 000稀释的HRP标记羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch)为二抗,DAB为显色底物,用Western bolt检测rTpN17和rTpN47免疫反应性。

1.5 TRUST和TPHA检测 分别根据TRUST和TPHA检测试剂盒说明书,对211份梅毒患者血清、17份SLE和25份RA患者血清,以及200份健康人血清标本进行检测和结果判定。

1.6 rTpN17-ELISA和rTpN47-ELISA的建立及检测 用pH 9.6、0.01 mol/L碳酸盐缓冲液稀释提纯的重组蛋白rTpN17或rTpN47,分别至50 μ g/ml,96孔聚苯乙烯反应板每孔包被100 μ l,37 $^{\circ}$ C温育2 h后4 $^{\circ}$ C过夜。次日用0.05% Tween 20-0.01 mol/L PBS(pH 7.4)洗涤3次后用5% BSA封闭。分别以1:1 600和1:400稀释的200份正常人血清为一抗,HRP标记羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch)为二抗,TMB为显色底物,终止反应后用BioRad酶标仪测定各孔OD₄₅₀值,了解健康人血清OD₄₅₀值范围并计算其OD₄₅₀均值和标准差。分别采用rTpN17-ELISA和rTpN47-ELISA,对211份

梅毒患者血清、17 份 SLE 和 25 份 RA 患者血清进行检测,被检标本 OD₄₅₀ 值 ≥ 阴性对照 OD₄₅₀ 均值 + 3 标准差者为阳性^[10]。

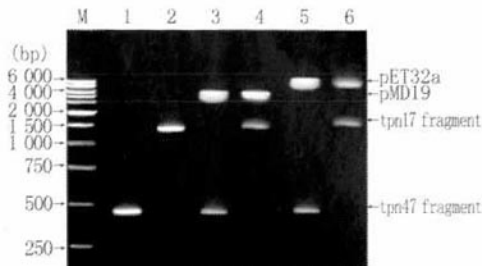
1.7 统计学处理 采用 Stata 8.0 统计学软件中的 χ^2 检验,对不同检测方法检测结果先进行阳性率行 × 列检验,若有显著性差异则应用 χ^2 分割法再行两两比较, α 作以下调整 $\alpha' = \frac{0.05}{4(4-1)/2+1} = 0.0071$ 。

2 结果

2.1 目的基因扩增、克隆和测序结果 从硬性下疳分泌物 DNA 中扩增获得预期大小的目的片段,并获得预期的 pMD19-T 和 pET32 重组质粒双酶切图谱(图 1)。pMD19-T 和 pET32 重组质粒中的 tpn17、tpn47 基因核苷酸和氨基酸序列与 GenBank 中登录序列(No: TP0435, TP0574)完全相同。

2.2 rTpN17 和 rTpN47 表达、提纯效果及其免疫反应性 rTpN17 和 rTpN47 表达量分别为细菌总蛋白的 37.2% 和 26.8%,提纯的 rTpN17 和 rTpN47 经 SDS-PAGE 后均显示为单一的蛋白条带(图 2)。Western blot 结果显示, rTpN17 和 rTpN47 均可与 5 份梅毒抗体阳性血清结合并出现明显的杂交条带(图 3)。

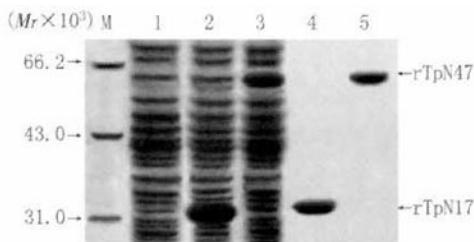
2.3 不同方法检测阳性率的比较 rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA 和 TPHA 对 200 例健康人、17 例 SLE 和 25 例 RA 患者血清标本的检测结果均阴性, TRUST 对 200 例健康人血清标本检测结果为阴性,但有 2 例 RA、1 例 SLE 患者血清标本阳性。rTpN17-ELISA 和 rTpN47



M:Marker; 1 和 2:PCR 扩增的全长 tpn17 和 tpn47 基因; 3 和 4:pMD19-tpn17 和 pMD19-tpn47 内酶切图谱; 5 和 6:pET32a-tpn17 和 pET32a-tpn47 内酶切图谱

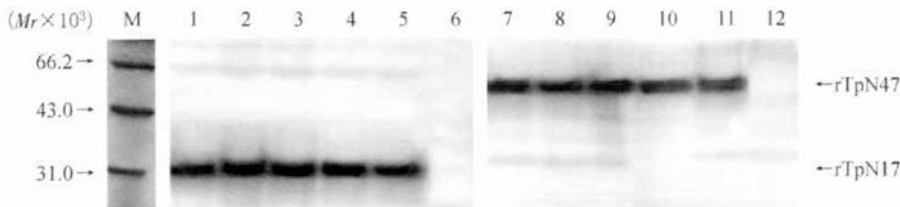
图 1 tpn17 和 tpn47 基因目的扩增条带及其重组质粒酶切图谱

Fig. 1 Target amplification fragments of tpn17 and tpn47 genes and endonuclease digestion maps of the recombinant plasmids



M:Marker; 1:pET32a 质粒; 2 和 3:rTpN17 和 rTpN47; 4 和 5:提纯的 rTpN17 和 rTpN47

图 2 rTpN17 和 rTpN47 表达及提纯效果
Fig. 2 Effects of rTpN17 and rTpN47 expression and their purification



M:Marker; 1~5 和 7~11:分别为 rTpN17 或 rTpN47 与 5 份梅毒阳性血清标本; 6 和 12:空白对照
图 3 rTpN17 和 rTpN47 与梅毒阳性血清 Western blot 结果

Fig. 3 Western blot results of rTpN17 and rTpN47 to *T. pallidum* antibody positive sera

-ELISA 检测上述健康人血清标本的OD₄₅₀值分别为0.23±0.04和0.21±0.03,阳性结果判断参考值分别为0.35和0.30。rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA、TRUST和TPHA对211例梅毒患者血清标本的检测阳性率分别为85.3%、84.3%、72.5%和99.1%,TPHA检测阳性率显著高于rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA和TRUST($P<0.01$,表1)。4种方法两两比较中,根据检验水准 $\alpha=0.0071$, P 值 ≤ 0.001 具有统计学意义,因此TPHA检测阳性率均高于其它3种检测方法($P<0.001$),rTpN17-ELISA和rTpN47-ELISA检测阳性率相近($P=0.427$),TRUST检测阳性率低于rTpN17-ELISA($P=0.001$),但与rTpN47-ELISA比无显著性差异($P=0.014$,表1)。58例TRUST检测结果阴性的梅毒患者血清标本中包含了所有rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA和TPHA检测结果阴性者,该58例TRUST阴性梅毒患者血清标本经rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA和TPHA检测,分别有36、33和56例呈阳性结果(表2)。

表1 四种方法对211例梅毒患者血清的检测结果

Table 1 Detection results of the syphilis patients' sera by four different assays

检测方法	阳性例数	阴性例数
rTpN17-ELISA	180	31
rTpN47-ELISA ¹	174	37
TPHA ^{2,3}	209	2
TRUST ^{4,5,6}	153	58

vs rTpN17-ELISA,¹ $\chi^2=0.63$, $P=0.427$,² $\chi^2=27.65$, $P<0.001$;vs rTpN47-ELISA,³ $\chi^2=34.61$, $P<0.001$,⁴ $\chi^2=10.38$, $P=0.001$,⁵ $\chi^2=5.99$, $P=0.014$,⁶ $\chi^2=60.93$, $P<0.001$

3 讨论

有文献报道,TpN17和TpN47是Tp特异性含量丰富的外膜蛋白抗原^[6,11]。TpN17抗原存在于各期梅毒患者病灶中^[12]。TpN47具有高度免疫原性,能与I、II期梅毒患者血清发生强烈反应,晚期梅毒也可检测到高效价的TpN47

表2 58例TRUST阴性血清标本ELISA及TPHA的检测结果

Table 2 Detection results of 58 cases of TRUST negative sera by ELISAs and TPHA

检测方法	阳性例数	阳性率/%
rTpN17-ELISA	36	62.1
rTpN47-ELISA	33	56.9
TPHA	56	96.6

抗体^[13-14]。近年来,单用Tp表面蛋白为抗原的酶免疫试验(EIA)用于筛查或诊断梅毒,取得了与TRUST和/或TPHA相似的检测效果,WHO建议Tp表面蛋白为抗原的EIA可作为梅毒筛查方法。由于Tp培养困难,故本研究采用基因工程技术表达的rTpN17和rTpN47作为ELISA的抗原。

本研究成功地从硬性下疳分泌物标本中扩增、克隆了序列完全正确的tpn17及tpn47基因,并建立了高效原核表达系统,rTpN17和rTpN47表达量分别达细菌总蛋白的37.2%和26.8%。提纯的rTpN17和rTpN47经SDS-PAGE后均显示为单一的蛋白条带,表明我们采用的Ni-NTA亲和层析法可快速、高效地获得纯度很高的rTpN17和rTpN47。rTpN17和rTpN47均可与5份梅毒抗体阳性血清呈现阳性,Western blot结果表明,rTpN17和rTpN47仍保持特异的免疫反应性,可用作检测梅毒患者血清标本ELISA的可靠抗原。

我们采用rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA、TRUST和TPHA检测211例梅毒患者血清标本的结果表明,TPHA检测阳性率最高($P<0.001$),rTpN17-ELISA和rTpN47-ELISA检测阳性率相近($P=0.427$),TRUST检测阳性率低于rTpN17-ELISA($P=0.001$),但与rTpN47-ELISA相近($P=0.014$)。此外,有3例RA和SLE患者血清标本,TRUST检测结果也呈阳性,rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA和TPHA无类似假阳性结果,表明rTpN17-ELISA和rTpN47-ELISA具有与TPHA相似的检测特异性。因此我们认为,本研究中建立的

分别以 rTpN17 和 rTpN47 为抗原的 ELISAs, 有望成为一种快速、简便、敏感性和特异性较高的梅毒血清学筛查方法。

不可否认的是, rTpN17-ELISA 和 rTpN47-ELISA 对梅毒血清标本的检测敏感性还有相当距离。已有国外文献报告, 联合使用数个 Tp 外膜蛋白作为抗原, 可明显提高相关血清学检测的敏感性^[15]。但使用多个重组 Tp 外膜蛋白为抗原则会不可避免地提高检测成本, 为此, 我们拟构建 Tp tpn17-tpn47 融合基因, 并原核表达同时含有以柔性短肽连接的 rTpN17-TpN47, 建立有望明显提高检测敏感性的 rTpN17-TpN47-ELISA。

References:

- [1] WORKOWSKI K A, BERMAN S M. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2006 [J]. *MMWR Recomm Rep*, 2006, 55(36): 997-1002.
- [2] XIONG LI-kuan, ZHOU Hua (熊礼宽, 周 华). Advance on molecular biological research of partial *Treponema pallidum* antigens [J]. *Journal of Preventive Medicine Information* (国外医学·流行病学·传染病学分册), 1999, 26(6): 270-273. (in Chinese)
- [3] CASTRO R, PRIETO E S, SANTO I, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum* [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(1): 250-253.
- [4] SERWIN A B, KOHL P K, CHODYNICKA B. The centenary of Wassermann reaction-the future of serological diagnosis of syphilis, up-to-date studies [J]. *Przegl Epidemiol*, 2005, 59(3): 633-640.
- [5] FRASER C M, NORRIS S J, WEINSTOCK G M, et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete [J]. *Science*, 1998, 281(5375): 375-388.
- [6] ARROL T W, CENTURION-LAVA A, LUKEHART S A, et al. T-Cell responses to *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* antigens during the course of experimental syphilis infection [J]. *Infect Immun*, 1999, 67(9): 4757-4763.
- [7] RIEDNER G, DEHNE K L, GROMYKO A, et al. Recent declines in reported Syphilis rates in eastern Europe and central Asia: are the epidemics over? [J]. *STI*, 2000, 76(5): 363-365.
- [8] SATO N S, HIRATA M H, HIRATA R D C, et al. Analysis of *Treponema pallidum* recombinant antigens for diagnosis of syphilis western blotting technique [J]. *Rev Inst Med Trop S Paulo*, 1999, 41(2): 115-118.
- [9] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning, a laboratory manual [M]. New York: Gold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] LEWIS S M, OSEI-BIMPONG A. Haemoglobinometry in general practice [J]. *Clin Lab Haematol*, 2003, 25(6): 343-346.
- [11] SAMBRI V, MARANGONI A, SIMONE M A, et al. Evaluation of recombinant *Treponema*, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2001, 7(4): 200-205.
- [12] HANLEY J P, HAYDON G H. The biology of interferon-alpha and the clinical significance of anti-interferon antibodies [J]. *Leuk Lymphoma*, 1998, 29(3-4): 257-268.
- [13] GERBER A, KRELL S, MORENZ J, et al. Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology [J]. *Immunobiology*, 1996-1997, 196(5): 535-549.
- [14] YOUNG H, MOYES A, DE STE CROIX I, et al. A new recombinant antigen latex agglutination test (Syphilis Fast) for the rapid serological diagnosis of syphilis [J]. *Int J STD ADIS*, 1998, 9(4): 196-200.
- [15] YOUNG H, MOYES A, SEAGER L, et al. Novel recombinant antigen enzyme immunoassay for serological diagnosis of syphilis [J]. *J Clin Microbiol*, 1998, 36(4): 913-917.

[责任编辑 黄晓花]