

梅毒螺旋体 TpN17 与 TpN47 表位肽融合抗原的重组表达及其酶联免疫吸附试验的建立和应用

孙爱华¹, 范兴丽¹, 沈香娣¹, 汤仁仙², 严杰³

1 浙江医学高等专科学校基础医学部, 杭州 310053

2 徐州医学院 病原生物学教研室, 徐州 221002

3 浙江大学医学院病原生物学系, 杭州 310058

摘要: 以重组 TpNs 为抗原的 ELISAs 已被证明是具有较高敏感性和特异性的梅毒血清学检测方法, 若 ELISAs 使用多种 TpNs 抗原, 可进一步提高检测敏感性和特异性。根据抗原表位分析结果, 本研究首先采用连接引物 PCR 获得了 TpN17 和 TpN47 抗原表位序列融合成的人工基因片段 tpE17-47, 然后构建了全长 tpN17、tpN47 基因以及 tpE17-47 融合基因的原核表达系统。SDS-PAGE 和 BioRad 凝胶图象分析系统检查结果显示, 所构建的原核表达系统能稳定表达目的重组蛋白 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47, 其产量分别约占细菌总蛋白的 36%、20%和 28%。采用 Ni-NTA 亲和层析法提纯的 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47 蛋白经 SDS-PAGE 分析, 均显示为单一的蛋白条带。Western blotting 结果表明, rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47 蛋白均可被梅毒抗体阳性的病人血清所识别。以 rTpE17-47 为包被抗原的 rTpE17-47-ELISA 检测 630 例临床确诊梅毒患者血清标本的阳性率为 98.6%, 仅略高于 TPPA(97.9%)($P>0.05$), 但明显高于 rTpN17-ELISA(83.8%)、rTpN47-ELISA(83.3%)和 RPR(72.1%)($P<0.01$)。上述 ELISAs 和 TPPA 对 25 例 SLE、36 例 RA 患者和 250 例健康体检者的血清标本检测结果均为阴性, 但 RPR 分别有 1、2 和 2 例标本检测结果为阳性。本试验成功地构建了 rTpE17-47 抗原表位融合基因及其高效原核表达系统, 所建立的 rTpE17-47-ELISA 可作为一种快速、简便、安全、敏感和特异的梅毒血清学筛查或诊断新方法。

关键词: 梅毒螺旋体, 抗原表位, 融合基因, 重组表达, 酶联免疫吸附试验

Recombinant expression of the fusion antigen based on *Treponema pallidum* TpN17 and TpN47 epitope peptides and establishment and application of the associated ELISA

Aihua Sun¹, Xingli Fan¹, Xiangdi Shen¹, Renxian Tang², and Jie Yan³

1 Department of Basic Medicine, Zhejiang Medical College, Hangzhou 310053, China

2 Department of Pathogenic Microbiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China

3 Department of Medical Microbiology and Parasitology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China

Abstract: Using recombinant TpNs proteins of *Treponema pallidum* as antigens, ELISAs are proved to be of higher sensitivity and

Received: March 31, 2009; **Accepted:** June 18, 2009

Supported by: Science and Technique Research Project of Health Department of Zhejiang Province (No. 2004A018).

Corresponding author: Jie Yan. Tel: +86-571-88208297; E-mail: Med_bp@zju.edu.cn

浙江省医药卫生科学研究基金(No. 2004A018)资助。

specificity. However, they can be further increased by using multiple TpNs antigens. According to the epitope analysis, we firstly used linking primers PCRs to obtain an artificial fusion gene segment tpE17-47 containing epitopes of both TpN17 and TpN47. Subsequently, we conducted the prokaryotic expression systems of entire tpN17 and tpN47 genes and tpE17-47 fusion gene. SDS-PAGE analysis and BioRad Gel Image Analysis System showed that the recombinant proteins rTpN17, rTpN47 and rTpE17-47 expressed stably, with 36%, 20% and 28% yields of total bacterial protein, respectively. After purified by Ni-NTA affinity chromatography, all the three recombinant proteins could be recognized by *T. pallidum* antibody positive sera from syphilis patients. The positive rate of rTpE17-47-ELISA for detecting serum specimens in clinically 630 cases with syphilis was 98.6%. This rate was slightly higher than that by *Treponema pallidum* particle agglutination (TPPA) (97.9%) ($P>0.05$), but significantly higher than those by rTpN17-ELISA (83.8%), rTpN47-ELISA (83.3%) and rapid plasma reagin (RPR)(72.1%)($P<0.01$). Furthermore, both ELISAs and TPPA for detecting the serum specimens in 25 cases with SLE, 36 cases with RA and 250 healthy cases were all negative. RPR showed positive in 1 case with SLE, 2 cases with RA and 2 healthy cases. This could be a novel serological screening or diagnostic method of syphilis with advantages of quickness, convenience, safety, sensitivity and specificity.

Keywords: *Treponema pallidum*, antigen epitope, fusion gene, recombinant expression, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*, Tp)感染引起的梅毒(Syphilis)是最为重要的人类性传播性疾病(Sexual transmission diseases, STD)之一^[1]。梅毒潜伏期长、病情进展缓慢、病灶中梅毒螺旋体的分离阳性率低,故检测梅毒螺旋体特异性抗体的血清学试验成为临床上梅毒实验室诊断的常用方法^[2],如快速血浆反应素试验(Rapid plasma regain, RPR)和梅毒螺旋体明胶颗粒凝集试验(*Treponema pallidum* particle agglutination, TPPA)^[3]。

有文献报道,早期梅毒患者血清中存在TpN30、TpN33和TpN37等梅毒螺旋体抗原的抗体,中期梅毒患者血清中此等抗体水平往往明显下降甚至消失,TpN15、TpN17、TpN34和TpN47抗原的抗体在早、中期梅毒患者血清中均可检出^[4-5]。由于TpN17和TpN47抗体水平较高且稳定、维持时间较长,故TpN17和TpN47被认为是最有临床应用前景的梅毒螺旋体抗原^[6-8]。

至今尚不能用无生命的人工培养基培养梅毒螺旋体,因而建立基于重组TpNs抗原的梅毒血清学检测方法倍受人们重视^[5]。目前以单一重组表达TpNs(rTpNs)为抗原的血清抗体检测方法已有不少研究报道,但单一抗原的灵敏度和特异性较低^[9-11]。若采用融合基因技术表达同时含2种TpN抗原的重组抗原,往往因分子量较大而表达效率较低。此外,任何蛋白抗原的免疫原性主要取决于抗原表位(Epitope)。本研究根据TpN17和TpN47抗原表位预测结果,构建了tpN17及tpN47表位肽融合基因

tpE17-47原核表达系统,建立了基于rTpE17-47的ELISA并检测了630例梅毒患者血清标本,以了解该方法在临床梅毒血清学诊断中的应用前景。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种与质粒

T-A克隆质粒及其试剂盒购自TaKaRa公司,原核表达载体pET42a和表达宿主菌*E. coli* BL21DE3均购自Novagen公司。

1.1.2 标本来源

630例临床确诊为I或II期梅毒患者的血清标本及部分硬性下疳分泌物标本、25例SLE和36例RA无梅毒病史患者血清标本、250例无梅毒病史健康体检者血清标本由杭州市第三人民医院皮肤科、杭州市中医院、金华中心医院和浙江嘉兴市妇幼保健院提供,其中72.1%(454/630)和97.9%(617/630)的梅毒血清标本分别RPR和TPPA检测结果阳性。上述标本采集时均获得患者或体检者的知情同意。

1.2 方法

1.2.1 抗原表位预测

根据Propred HLA-DR binding peptide prediction-ProPred预测服务器(<http://www.imtech.res.in/raghava/propred/>)以及EMBOSS软件包中ANTIGENIC程序(<http://bioinfo.hku.hk/EMBOSS/>)分析TpN17和TpN47分子中的抗原表位。结果显示,TpN17除N端为疏水信号肽序列而无抗原表位外,其余部分(22~156位,

135 个氨基酸残基)存在多个优势抗原表位(TpE17), TpN47 中第 97~120 位(VLSKQETEDSRGRKKWE YETDPSV)是优势抗原表位(TpE47)。

1.2.2 基因的扩增和克隆

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^[12]。根据 GenBank 中梅毒螺旋体相关基因序列(Accession No. TP0435, TP0574)及其内切酶图谱分析结果^[13-14], 设计扩增全长 tpN17 和 tpN47 基因的引物(表 1)。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)、200 ng DNA 模板、1 \times PCR 缓冲液(pH 8.3)。tpN17 基因 PCR 参数: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。tpN47 基因 PCR 参数: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。采用溴乙锭预染的 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。tpN17 和 tpN47 基因扩增片段预期大小分别为 468 bp 和 1302 bp。采用 T-A 克隆试剂盒(BioColor)将上述目的基因扩增片段克隆至 pUCm-T 载体中, 转化入 *E. coli* DH5 α 并在 LB 培养液中扩增后, 用小量碱变性法提取重组质粒^[12], 委托 Invitrogen 公司测定重组质粒 pUCm-T-tpN17 和 pUCm-T-tpN47 中插入片段的序列。

1.2.3 抗原表位融合基因的构建和克隆

以 pUCm-T-tpN17 和 pUCm-T-tpN47 模板, 采用连接引物 PCR 构建 tpE17-47 表位肽融合基因。设计并合成用于扩增 tpE17 片段(起始密码 ATG+405 bp tpE17+30 bp 柔性肽序列)引物及 tpE47 片段(72 bp

+30 bp 柔性肽序列)引物(表 1), 按上法分别用 PCR 扩增 tpE17 和 tpE47 片段, 小量 DNA3S 柱快速离心纯化试剂盒(BioColor)回收目的扩增产物, 分光光度法测定其 DNA 浓度^[3]。将回收的 tpE47 和 tpE17 扩增片段等摩尔混合(DNA 总量<500 ng), 除不加引物外, 其余反应成分及含量与上述 PCR 相同, 反应参数: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 45 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 10 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min; 利用 tpE17 下游及和 tpE47 上游引物中互补的柔性肽序列形成复合模板。然后加入 tpE17 上游及和 tpE47 下游引物各 250 nmol/L, PCR 参数: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 52 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。采用溴乙锭预染的 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 目的扩增片段预期大小为 510 bp(起始密码 ATG+405 bp tpE17+GGGGSGGGGS 柔性肽序列 30 bp+72 bp tpE47)。采用 T-A 克隆试剂盒(BioColor)将上述目的基因扩增片段克隆至 pUCm-T 载体中, 转化入 *E. coli* DH5 α 并用 LB 培养基扩增, 小量碱变性法提取重组质粒^[12], 委托 Invitrogen 公司测定重组质粒 pUCm-T-tpE17-47 中插入片段的序列。

1.2.4 目的原核表达系统的构建

采用 *Nde* I 和 *Xho* I 双酶切重组质粒 pUCm-T-tpN17、pUCm-T-tpN47、pUCm-T-tpE17-47 和表达质粒 pET42a, 琼脂糖凝胶电泳分离目的片段。在 T4 DNA 连接酶作用下, 回收的 tpN17、tpN47 和 tpE17-47 分别与线性化 pET42a 连接, 然后转化入表达宿主菌 *E. coli* BL21(DE3), 分别构建成目的原核表达系统 *E. coli* BL21(DE3)^{pET42a-tpN17}、*E. coli* BL21(DE3)^{pET42a-tpN47}、*E. coli* BL21(DE3)^{pET42a-tpE17-47}。

表 1 PCR 引物序列及产物大小

Table 1 Information about the PCR primer sequences and product sizes

Genes	Primer sequences (5'-3')	Product sizes (bp)
<i>tpN17</i>	F: cgc <u>cat atg</u> (<i>Nde</i> I) aaa gga tct gtc cgc gcg R: cgc <u>ctc gag</u> (<i>Xho</i> I) ttc ctg tgt ttc ttc gag	468
<i>tpN47</i>	F: cgc <u>cat atg</u> (<i>Nde</i> I) gag gta ttg ggc gaa aag R: cgc <u>ctc gag</u> (<i>Xho</i> I) ggc acg cac cat ctt agt aac	1302
<i>tpE17</i>	F: cgc <u>cat atg</u> (<i>Nde</i> I) tgt gtc teg tgc aca acc R: GCT ACC GCC ACC GCC GCT ACC GCC ACC GCC ctt ctt tgt ctt gag cac	438
<i>tpE47</i>	F: GGC GGT GGC GGT AGC GGC GGT GGC GGT AGC gtt ctc tcg aag cag gag R: cgc <u>cat atg</u> (<i>Xho</i> I) aac gct tgg gac agt ctc	102
<i>tpE17-47</i>	F: cgc <u>cat atg</u> (<i>Nde</i> I) tgt gtc teg tgc aca acc R: cgc <u>ctc gag</u> (<i>Xho</i> I) gtt ctc tcg aag cag gag	510

F: forward primers; R: reverse primers. The sequences in capital indicate the flexible peptide link.

1.2.5 目的重组蛋白表达、提纯和鉴定

所构建的各原核重组表达系统分别在含 0.5 mmol/L IPTG 的 LB 培养基中 30°C 振荡培养, 以诱导目的重组蛋白 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47 表达。采用 12% SDS-PAGE 和 BioRad 凝胶图象分析系统检查各目的重组蛋白表达情况和产量。离心收集菌体超声破碎(300 V, 5 s × 3), 采用 Ni-NTA 亲和层析法提纯 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47, SDS-PAGE 测定其提纯效果。分别以 1:100 稀释的 5 份 TPPA 阳性梅毒抗体阳性患者血清为一抗、1:3000 稀释的 HRP 标记羊抗人 IgG (Jackson ImmunoResearch) 为二抗, 用 Western blotting 检测上述目的重组蛋白的免疫反应性。

1.2.6 ELISAs

采用紫外分光光度法测定提纯的 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47 浓度^[12]。用 pH 9.6、0.01 mol/L 碳酸盐缓冲液配制蛋白浓度为 50 μg/mL 的 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47 溶液, 96 孔聚苯乙烯反应板每孔包被 100 μL, 37°C 温育 2 h 后 4°C 过夜。次日以 0.05% Tween20-0.01 mol/L PBS(pH 7.4) 洗涤 3 次后用 5% BSA 封闭。根据预试验结果, 以 1:800 稀释的 250 例正常人血清为一抗, 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 SD 值。分别采用 rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA 和 rTpE17-47-ELISA, 对 1:800 稀释的 630 份梅毒患者血清、25 例 SLE 和 36 例 RA 患者血清进行检测, 若被检标本 OD₄₅₀ 值 阴性对照 OD₄₅₀ 均值 +3SD 者为阳性^[15]。

2 结果

2.1 PCR 扩增及测序结果

从梅毒患者硬性下疳分泌物标本中扩增出全长 tpN17 和 tpN47 基因片段, 采用连接引物 PCR 获得了 tpE17 和 tpE47 抗原表位序列融合基因的扩增片段 tpE17-47(图 1)。与报道的相应序列(GenBank Accession No. TP0435, TP0574) 比较, 所克隆的 tpN17、tpN47 基因核苷酸和氨基酸序列相似性均为 100%。测序结果还表明, 获得的 tpE17-47 抗原表位

融合基因序列完全正确(图 2), 各 T-A 克隆及其亚克隆序列也完全相同。

2.2 目的重组蛋白表达和提纯效果

在 IPTG 诱导下, 所构建的原核表达系统 *E. coli* BL21(DE3)^{pET42a-tpN17}、*E. coli* BL21(DE3)^{pET42a-tpN47}、*E. coli* BL21(DE3)^{pET42a-tpE17-47} 能稳定地分别表达 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47, 其产量分别约占细菌总蛋白的 36%、20% 和 28%, 提纯的各目的重组蛋白经 SDS-PAGE 后均显示为单一的蛋白条带(图 3)。

2.3 Western blotting 检测结果

Western blotting 结果显示, rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47 均可与梅毒抗体阳性患者血清结合并出现明显的杂交条带(图 4)。

2.4 不同血清学检测方法的阳性率

RPR 和 TPPA 检测 630 例梅毒病人血清标本阳性率分别为 72.1%(454/630) 和 97.9%(617/630)。rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA 和 rTpE17-47-ELISA 检测上述 250 例健康人血清标本的 OD₄₅₀ 均值和 SD 值分别为 0.13 和 0.05、0.14 和 0.06、0.12 和 0.06, 故阳性判断参考值为 0.28、0.32 和 0.30。根据上述阳性判断参考值, rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA 和 rTpE17-47-ELISA 对 630 例梅毒病人血清标本检测

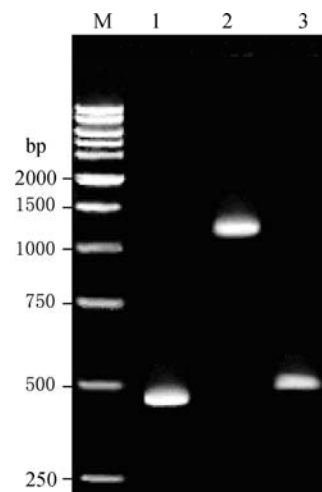


图 1 tpN17、tpN47 基因和 tpE17-47 抗原表位融合基因扩增片段

Fig. 1 Amplification fragments of tpN17 and tpN47 genes and tpE17-47 epitope fusion gene. M: DNA marker (BioAsia); 1,2: the amplification fragments of tpN17 and tpN47 genes, respectively; 3: the amplification fragment of tpE17-47 epitope fusion gene.

ATGTGTGTCTCGTGCACAACCGTGTGTCCGCACGCCGGGAAGGCCAAAGCGGAAAAGGTA
 M C V S C T T V C P H A G K A K A E K V

 GAGTGC CGCTGAAGGGAGGTATCTTTGGGGTACGCTACCTGCGGCCGATTGCCCGGGA
 E C A L K G G I F R G T L P A A D C P G

 ATCGATACGACTGTGACGTTCAACGCGGATGGCACTGCGCAAAAGGTAGAGCTTGCCCTT
 I D T T V T F N A D G T A Q K V E L A L

 GAGAAGAAGTCGGCACCTTCTCCTTACGTATCGCGGTACGTGGATGGTACGTGAAGAC
 E K K S A P S P L T Y R G T W M V R E D

 GGAATTGTGCAACTCTCGCTTGTGTCTCGGAGCAATCGAAGGCACCGCACGAGAAAAGAG
 G I V E L S L V S S E Q S K A P H E K E

 CTGTACGAGCTGATAGACAGTAACCTCCGTTGCTACATGGGCGCTCCCGCGCAGGAAAG
 L Y E L I D S N S V R Y M G A P G A G K

 CCTTCAAAGGAGATGGCGCCGTTTTACGTGCTCAAGAAGACAAAGAAGGGCGGTGGCGGT
 P S K E M A P F Y V L K K T K K G G G G

AGCGCGGTGGCGGTAGCGTTCTCTCGAAGCAGGAGACCGAAGACAGCAGGGGAAGAAAA
S G G G G SV L S K Q E T E D S R G R K

AAGTGGGAGTACGAGACTGACCCAAGCGTT
 K W E Y E T D P S V

图 2 tpE17-47 抗原表位融合基因核苷酸和氨基酸序列

Fig. 2 Nucleotide and putative amino acid sequences of tpE17-47 antigen epitopes fusion gene. The underlined and squared areas indicate the positions of primers and flexible peptide, respectively.

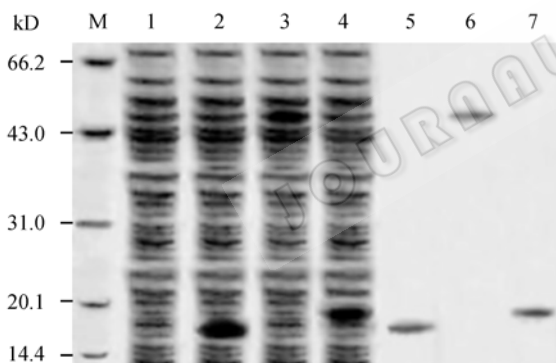


图 3 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47 表达和纯化效果

Fig. 3 Effects of expression and purification of rTpN17, rTpN47 and rTpE17-47. M: protein marker (BioColor); 1: pET42a without any inserted fragments; 2-4: the expression of rTpN17, rTpN47 and rTpE17-47 induced with IPTG, respectively; 5-7: the purified rTpN17, rTpN47 and rTpE17-47, respectively.

阳性率分别为 83.8%(528/630)、83.3%(525/630)和 98.6%(621/630) (表 2)。

2.5 不同血清学检测方法特异性和敏感性比较

与 TPPA 和 rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA、rTpE17-47-ELISA 检测结果比较, RPR 对 630 例临床确诊梅毒患者血清标本的检测阳性率最低($P < 0.01$);

表 2 不同血清学方法对梅毒患者血清标本的检测结果
Table 2 Detection results of the syphilis patients' sera by different serological assays

Methods	Cases (n)	Positive cases (n)	Positive rates (%)
rTpN17-ELISA	630	528	83.8
rTpN47-ELISA	630	525	83.3
rTpE17-47-ELISA	630	621	98.6
RPR	630	454	72.1
TPPA	630	617	97.9

rTpN17-ELISA 和 rTpN47-ELISA 检测阳性率相似 ($P > 0.05$), 但均低于 rTpE17-47-ELISA 和 TPPA ($P < 0.01$); rTpE17-47-ELISA 检测阳性率与 TPPA 相似 ($P > 0.05$)。与梅毒确诊试验 TPPA 检测结果比较, RPR、rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA、rTpE17-47-ELISA 检测结果阳性的符合率分别为 73.6%、85.6%、85.1%、99.3%。实验中未发现 TPPA 检测结果阴性而 RPR、rTpN17-ELISA 或 rTpN47-ELISA 检测结果阳性的情况, 但有 4 份梅毒患者血清标本 TPPA 阴性而 rTpE17-47-ELISA 结果阳性, 提示 rTpE17-47-ELISA 较 TPPA 有更高的检测敏感性。在 25 例 SLE

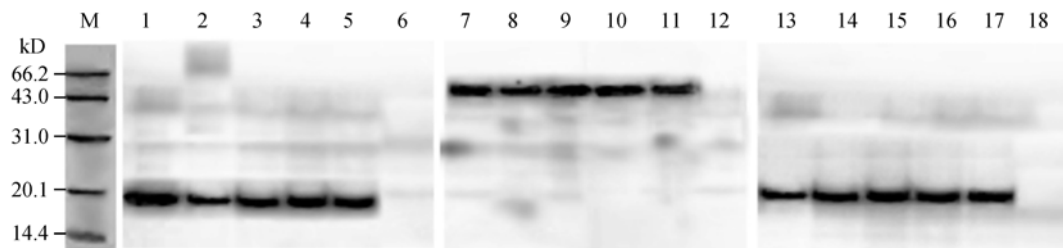


图4 rTpN17、rTpN47和rTpE17-47的Western blotting分析

Fig. 4 Western blotting analysis of rTpN17, rTpN47 and rTpE17-47. M: protein marker (BioAsia); 1-5, 7-11, 13-17: the positive Western hybridization bands of rTpN17, rTpN47 and rTpE17-47 to 5 *T. pallidum* antibody positive serum samples, respectively; 6, 12, 18: blank controls.

表3 不同梅毒血清学检测方法敏感性和特异性比较

Table 3 Comparison of sensitivity and specificity of different syphilis serological assays

Methods	Syphilis sera (<i>n</i> =630)			SLE sera (<i>n</i> =25)		RA sera (<i>n</i> =36)		Healthy sera (<i>n</i> =250)	
	Positive (<i>n</i>)	Negative (<i>n</i>)	Consistent rates (%)	Positive (<i>n</i>)	Negative (<i>n</i>)	Positive (<i>n</i>)	Negative (<i>n</i>)	Positive (<i>n</i>)	Negative (<i>n</i>)
TPPA	617	13	/	0	25	0	36	0	250
RPR	454	176	73.6	1	24	2	34	2	248
rTpN17-ELISA	528	102	85.6	0	25	0	36	0	250
rTpN47-ELISA	525	105	85.1	0	25	0	36	0	250
rTpE17-47-ELISA	621	9	99.3	0	25	0	36	0	250

和36例RA患者血清标本中,1例SLE和2例RA患者血清标本RPR检测结果阳性,但TPPA和ELISAs检测结果均为阴性,其检测特异性为100%。此外,TPPA和ELISAs对250例健康体检者血清标本检测结果均为阴性,RPR除2例阳性外,其余均为阴性,经查该2例RPR阳性的健康体检者虽无梅毒、SLE、RA病史,但有结核病史。不同血清学方法对梅毒、SLE、RA、健康体检者血清标本检测及比较结果见表3。

3 讨论

常见的梅毒血清学试验有非Tp抗原试验和Tp抗原试验2大类。前者如RPR和甲苯胺红不加热血清试验(TRUST)等,主要用于梅毒筛查和疗效监测;后者如荧光螺旋体抗体吸收试验(FTA-Abs)和TPPA等,主要作为梅毒确认试验^[2-3]。在非梅毒螺旋体抗原试验中,由于采用心磷脂抗原而使其特异性受到影响,有少数RA、SLE、慢性迁延性肝炎(CPH)等非梅毒患者血清也可呈现阳性检测结果^[10]。TPPA可测出病人血清中微量特异性抗体,有较高敏感性和特异性,但是需制备大量Tp抗原。由于至今仍不能体外培养梅毒螺旋体,梅毒螺旋体Nichols株虽可

在兔睾丸中传代和繁殖,但产量很低。因此,采用基因重组表达技术,是获得大量梅毒螺旋体表面蛋白抗原的有效途径。

研究发现,全长rTpN47表达量较低(约20%)。此外,用分子生物学和生物信息学软件对TpN17和TpN47的分析结果显示,TpN17分子中抗原表位虽较多,但均无优势;TpN47分子中第97~120位肽段(N-VLSKQETEDSRGRKKWEYETDPSV-C)是其优势抗原表位。鉴于上述原因,本研究构建了去除信号肽序列的TpN17基因片段和TpN47主要抗原表位肽(97~120)融合基因及其原核表达系统,用于建立以rTpE17-47为抗原、检测特异性抗体的血清学诊断方法。

本研究成功地从梅毒患者硬性下疳分泌物标本中扩增出全长tpN17和tpN47基因片段,同时应用连接引物PCR获得了tpE47和tpE17抗原表位融合基因。与报道的相应序列(GenBank Accession No. TP0435, TP0574)比较,所克隆的tpN17基因、tpN47基因核苷酸和氨基酸序列相似性均为100%,包括tpE17-47抗原表位融合基因在内的各T-A克隆及其亚克隆测序结果也完全相同。研究结果也表明,rTpN17、rTpN47和rTpE17-47表达稳定,其中

rTpE17-47 产量(约 28%), 明显高于 rTpN47(约 20%), rTpE17-47 高表达为研发相关检测试剂盒提供了有利条件。此外, 去除 tpN17、tpN47 基因和 tpE17-47 抗原表位融合基因序列终止密码后, 可利用 pET42a 自身序列, 在目的重组表达产物 C 端加上一个 6×His 标签后终止表达, 如此可利用 Ni-NTA 亲和层析快速提纯 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47。SDS-PAGE 结果显示, 所提取的 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47 有很高的纯度, 完全适合作为 ELISA 抗原。

有不少文献报道, 基于 TpNs 或 rTpNs 的 ELISAs 用于检测梅毒血清标本时, 具有很高的敏感性和特异性, 可作为梅毒血清学实验室诊断方法^[5,7,16]。本研究中, 分别建立以 rTpN17、rTpN47 和 rTpE17-47 为包被抗原的 ELISAs。通过对 630 例临床确诊梅毒病人的血清标本检测后, 发现 rTpE17-47-ELISA 检测阳性率(98.6%)明显高于 rTpN17-ELISA(83.8%)、rTpN47-ELISA(83.3%)和 RPR(72.1%)($P < 0.01$); 与 TPPA 检测阳性率(97.9%)比较, rTpE17-47-ELISA 检测阳性率虽略高, 但其差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述实验结果提示, 较之采用单一的 rTpN17 或 rTpN47 包被抗原, rTpE17-47 可明显增加检测敏感性。

本实验中应用 TPPA 及 ELISAs 对 SLE、RA 及健康体检者血清标本进行检测时, 未出现阳性检测结果, 而应用 RPR 对上述人群进行检测时, 分别有 4.0%(1/25)SLE、5.6%(2/36)RA 和 0.8%(2/250)健康体检者的血清标本检测结果阳性。此外在检测梅毒病人血清标本时, 与临床上作为梅毒确诊试验的 TPPA 检测结果比较, rTpE17-47-ELISA 的符合率最高(99.3%), rTpN17-ELISA 和 rTpN47-ELISA 的符合率也可达 80%以上, RPR 符合率最低(73.6%)。上述实验结果提示, rTpE17-47-ELISA 以及 rTpN17-ELISA、rTpN47-ELISA 有很高的检测特异性。

REFERENCES

[1] Workowski KA, Berman SM. Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR Recomm Rep*, 2006, **55**(36): 997-1002.

- [2] Sambri V, Maraangoni A, Eyer C, *et al.* Western immunoblotting with five *Treponema pallidum* recombinant antigens for serologic diagnosis of syphilis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, **8**(3): 534-539.
- [3] Nijmegen EO. *Treponema pallidum* membrane protein A ELISA: a new test for screening and diagnosis of syphilis. *Beitr Infusionsther*, 1992, **30**(1): 85-91.
- [4] Ijsselmuiden OE, Schouls LM, Stolz E, *et al.* Sensitivity and specificity of an enzyme-linked immunosorbent assay using the recombinant DNA-derived *treponema pallidum* protein TmpA for serodiagnosis of syphilis and potential use of TmpA for assessing the effect of antibiotic therapy. *J Clin Microbiol*, 1989, **27**(1): 152-157.
- [5] Sambri V, Marangoni A, Simone MA, *et al.* Evaluation of recomWell *Treponema*, a novel recombinant antigen-based enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of syphilis. *Clin Microbiol Infect*, 2001, **7**(4): 200-205.
- [6] Gerber A, Krell S, Morenz J. Recombinant *Treponema pallidum* antigens in syphilis serology. *Immunobiology*, **196**(5): 535-549.
- [7] Fujimura K, Ise N, Ueno E, *et al.* Reactivity of recombinant *Treponema pallidum* (r-Tp) antigens with anti-Tp antibodies in human syphilitic sera evaluated by ELISA. *J Clin Lab Anal*, 1997, **11**(6): 315-322.
- [8] Rostopira N, Tkacikova L, Rayevska G, *et al.* Elaboration of enzyme immunoassay based on recombinant antigens and intended for diagnostics of syphilis. *Folia Microbiol*, 2003, **48**(4): 549-553.
- [9] Tabidze IL, Lee FK, Tambe P, *et al.* Enzyme-linked immunospot assay for the diagnosis of active *Teponema pallidum* infection during the various stages of syphilis. *Sex Transm Dis*, 1999, **26**(8): 426-430.
- [10] Sun AH, Fan XL, Mao YF, *et al.* Comparison of serological detection effects of ELISA using rTpN 17 or rTpN47 of *Treponema pallidum* as antigen with that of TPHA and TRUST. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2008, **37**(1): 67-72.
- 孙爱华, 范兴丽, 毛亚飞, 等. 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. *浙江大学学报医学版*, 2008, **37**(1): 67-72.
- [11] Castro R, Prieto ES, Santo I, *et al.* Evaluation of an enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. *J Clin Microbiol*, 2003, **41**(1): 250-253.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, *et al.* Sequence analysis of the 47-kilodalton major integral membrane

- immunogen of *Treponema pallidum*. *Infect Immun*, 1989, **57**(1): 196–203.
- [14] Fraser CM, Norris SJ, Weinstock GM, *et al*. Complete genome sequence of *Treponema pallidum*, the syphilis spirochete. *Science*, 1998, **281** (5375): 375–388.
- [15] Lewis SM, Osei-Bimpong A. Haemoglobinometry in general practice. *Clin Lab Haematol*, 2003, **25**(6): 343–346.
- [16] Schmidt BL, Edjlalipour M, Luger A, *et al*. Comparative evaluation of nine different enzyme-linked immunosorbent assays for determination of antibodies against *Treponema pallidum* in patients with primary syphilis. *J Clin Microbiol*, 2000, **38**(3): 1279–1282.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

2009 工业生物技术发展报告

中国科学院生命科学与生物技术局 编著

978-7-0-024397-3 ¥28.00 2009年6月出版

本书是基于工业生物技术知识环境出版的信息产品之一，主要报道工业生物技术领域内的重大规划与政策、技术和产品的研发进展、产业发展等。本书在前两年工业生物技术发展报告的基础上，结合工业生物技术新进展以及读者的反馈信息，在内容和形式上都进行了新的尝试，展示了新的特点：新增了国际工业生物技术部分重大会议和研究机构介绍；突出了各领域的技术进展，采用专题的形式组织稿件，新增了英文摘要以及英文作者简介，并邀请海外华人科学家撰写文章；拓展了工业生物技术产业的报道领域，系统地为大家展现了国内工业生物技术企业发展的现状、面临的问题和挑战；此外，我们通过对2008年国内外工业生物技术领域重要事件的回顾，与读者一起梳理过去一年本领域发展的整体脉络。

本书可供相关科研院所、高等院校和企业等从事工业生物技术研究 and 开发工作的科研管理人员、科研工作者和研发生产人员借鉴与参考。



中国粮食与农业综合生产能力科技支撑研究

翟虎渠 刘旭 主编

978-7-03-023658-6 ¥129.00 2009年6月出版

本书是科技部科研院所社会公益研究专项“粮食与农业综合生产能力科技支撑研究”的成果。全书共分8章。第1章是对整个项目研究成果的系统概括和总结。第2章是对本研究使用的主要计量方法——科技进步贡献率测定方法的理论探讨。第3章到第5章，分别从全国、区域和重点农产品三个层次，主要从科技进步贡献率计量的角度，对各自的科技支撑现状和需求做了研究分析。第6章到第8章，分别从粮食、棉油、畜禽生产三个方面，各自选择了最具代表性的作物或畜禽品种，主要从生产技术、生产区域和未来技术需求三大内容，做了定性的研究和分析。附录是本研究成果的计算机集成和应用。

本书可供从事农业科研、教学、推广、管理人员，以及大专院校相关专业的师生阅读参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>