

结核分枝杆菌特异性蛋白片段 Rv3388 和 6 种 特异抗原在结核抗体检测中的应用价值

周 鹏¹, 丁莹莹², 林子玉¹, 冯娇娇², 高彩霞², 王锦红², 杨 华¹, 温宗梅¹, 潘 卫², 邓松华^{1,3}

摘要 目的 对结核分枝杆菌(MTB) PE 家族的所有成员的结构进行分析, 预测其抗原表位, 截取 Rv3388 蛋白的优势抗原片段, 对重组 Rv3388 蛋白及其它 6 种 MTB 特异性抗原进行评估, 探讨不同结核特异性抗原与血清抗体的反应模式, 评价血清学检测在结核病诊断中的价值。**方法** 利用基因合成技术重叠延伸 PCR 扩增 Rv3388 蛋白 637 ~ 731 位的编码基因片段, 原核表达并纯化重组蛋白 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁, 将纯化的重组蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 采用间接 ELISA 法对该抗血清进行免疫原性分析。同时对这 7 种 MTB 特异性蛋白的特异性及敏感性进行评价。**结果** 重组蛋白 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 在大肠杆菌中的表达量占全菌蛋白的 80%, ELISA 显示有较强的免疫原性。7 种 MTB 特异性抗原具有不同的反应模式, 单个抗原检测敏感性较差。**结论** 对 MTB PE 家族的蛋白结构分析, 表达并纯化重组蛋白 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁, 7 种蛋白在血清抗体检测中具有抗原互补性, 不同抗原与机体反应存在不同反应模式, 提高结核抗体检测敏感性应多种抗原联合检测。

关键词 结核分枝杆菌; Rv3388; ELISA; 特异性; 敏感性

中图分类号 R 392.1

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2015) 10 - 1404 - 06

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 俗称结核杆菌, 是引起结核病的致病菌, 目前仍然是一种高死亡率的慢性传染性疾病。2011 年统计数据^[1] 显示全球新发结核病患者达 900 万之多, 约有 140 万人死于结核病。目前常用的肺结核诊断技术如痰涂片、结核菌培养都很难满足临床需要, 早期、快速、精确诊断结核病是一个难点, 也是一

个热门课题。1998 年 MTB 全基因组测序工作完成^[2], 通过对 MTB 蛋白质组学的研究^[3], 各种 MTB 特异性蛋白抗原不断被研究发现, 为结核抗体的检测奠定了良好的基础。在血清抗体检测中, ELISA 法以其简单、快速、灵敏等优点在临床检验方面被推广应用^[4]。该研究旨在通过分析 MTB 家族蛋白结构特性, 预测其优势抗原表位, 表达其具有抗原表位的片段, 评价与其它 6 种 MTB 特异性蛋白(16KD、38KD、ESAF-6、CFP-10、MPT64、11488) 作为血清学检测靶标的应用价值, 探讨其反应模式。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 血清与蛋白来源 80 例结核病患者血清来自上海市肺科医院, 96 例健康者血清来自第二军医大学附属长海医院血液科。16KD、38KD、ESAF-6、CFP-10、MPT64、11488 蛋白来自上海市肺科医院。

1.1.2 载体和菌株 宿主菌大肠杆菌 (*E. coli*) TOP10, *E. coli* BL21 (DE3) 及其原核表达载体 pET32a 均由第二军医大学病原生物学教研室保存。pMD-18T 载体 (T 载体) 购自日本 TaKaRa 公司。

1.1.3 酶与主要试剂 Taq DNA 聚合酶购自上海申能博彩公司羊抗人 IgG-HRP 和羊抗鼠 IgG-HRP 购自上海华美生物公司; 质粒抽提试剂盒、DNA 凝胶回收纯化试剂盒均购自上海生工生物有限公司; 限制性内切酶 EcoR I 和 Sal I、DNA 分子量 Marker DL 2 000、TA 克隆试剂盒均购自日本 TaKaRa 公司; 高效连接液 (ligation high, LH) 购自日本 TOYOBO 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用 DNASTAR (7.1.0) 软件对 MTB PE 家族 99 个成员的氨基酸结构进行分析, 显示其家族氨基酸序列富含了大量 GGXGG 序列, 本研究选取了其中一个家族成员 Rv3388 进行分析, 截取了亲水性高的以 GGNGG 为主的一段序列进行全基因合成。序列如下: VGATGGNGSGI GPASVGGNGGKGGVGAAGGLAGQIGNCGSGSGGA-GGNGGTGDTAGNGGNGGAGAVGGNAQLIGNGGNG-

2015 - 06 - 02 接收

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) (编号: ss2014AA021403); 国家自然科学基金项目 (编号: 30872405, 30472050, 30972632)

作者单位: ¹安徽医科大学病理生理学教研室, 合肥 230032

²第二军医大学病原生物学教研室, 上海 200433

³安庆医药高等专科学校, 安庆 246052

作者简介: 周 鹏, 男, 硕士研究生;

潘 卫, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: weipan@yahoo.com;

邓松华, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: desoh@126.com

GGGGNGGTGADGT。

1.2.2 引物设计与合成

1.2.2.1 全基因体外合成引物序列 根据 GeneBank (GeneBank: YP_177968.1 GI: 57117101) 中 MTB 标准株序列以及大肠杆菌的偏好密码子设计并且合成了 4 对重叠互补引物,用以重叠延伸 (over-lap extension, OE-PCR) 体外合成 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 序列。上游引物分别命名为 U1、U2、U3、U4; 下游引物分别命名为 D1、D2、D3、D4; 每条引物长约 51 bp, 引物之间相互重叠区域包含 18 个互补碱基, 全基因序列全长 282 bp^[5]。

1.2.2.2 表达载体构建用引物设计 将 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 序列经大肠杆菌密码子优化后, 设计一对用于 PCR 扩增目的序列的上下游引物, 同时分别在上游引物 (F1) 增加了 EcoR I 的酶切位点 (GAATTC) 和 6 个酶切位点保护碱基。下游引物 (R1) 在末端增加 Sal I 的酶切位点 (GTCGAC) 和 6 个酶切位点保护碱基。以上所有引物采用 DNAMAN V6 软件进行分析和评价, 由上海杰李生物有限公司合成。具体引物序列见表 1。

表 1 全基因合成 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 和扩增编码 DNA 的引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
U1	GTTGCTGCTACCGCTGGGAACGGGGGCTCTGGATCGGGCCGCTTCTGTT
U2	AAAGGTGTTGTTGCTGCTGCTGGTCTGGCTGCTCAGATCGGTAACGGT
U3	GGAGGAGCTGGAGGAAACGGAGAACCCGGAGACACCGCTGGAAACGGAGGA
U4	GCTTTGGGGGAAACCGCTCAGCTGATCGGGAACGGGGAAACGGCCGAGGA
D1	AGCACCAACACCACCTTTACCACCGTTACCACCAACAGAAGCCGCCCGAT
D2	GTTTCTCCAGCTCCTCCAGAACCAACCAACACCGTTACCGATCTGACC
D3	AGCGTTCGCCCAACAGCACCAGCACCGTTTCTCCGTTTCCAGCGGT
D4	GGTACCGTCAGCACCGGTACCACCGTTACCACCTCCTCCGCGTTTCCGCC
F1	GCGAGCGAATTCGTTGCTGCTACCGGTGGGAACGGGGGCTCTGGCATCGGG
R1	CGTGCCGTCGACTTAGGTACCGTCAAGCACCGGTACCGCTTACCACCTCC

斜体字为酶切位点

1.2.3 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ DNA 的全基因合成, 克隆及序列测定 采用设计合成的 4 对重叠互补引物, 利用 OE-PCR 的方法, 分三轮体外合成编码 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 的序列。第一轮 PCR 反应体系, 总反应体积 25 μ l 包括: 每对互补重叠引物, U1/D1, U2/D2, U3/D3, U4/D4, 引物浓度为 20 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶以及对应反应 Buffer。OE-PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 总共 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 第一轮反应产物分别命名为 U1D1、U2D2、U3D3、U4D4。第二轮 PCR 以第一轮产物两两为模板, 采用片段头尾

核酸为引物, 如以 U1D1 和 U2D2 为模板, 以 U1 和 D2 作为上下游引物扩增片段 U1D2, PCR 程序和反应体系同第一轮, 具体合成步骤见图 1, 将最后一轮 PCR 产物经 DNA 凝胶回收并纯化后克隆到 pMD-18T 载体中, 按照试剂盒说明书进行操作。16 h 后转化至大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* TOP10, 转化后固体培养基上的单克隆 (任意挑取 10 个) 进行 PCR 鉴定及测序鉴定 (由上海杰李生物有限公司进行序列测定, 下同)。

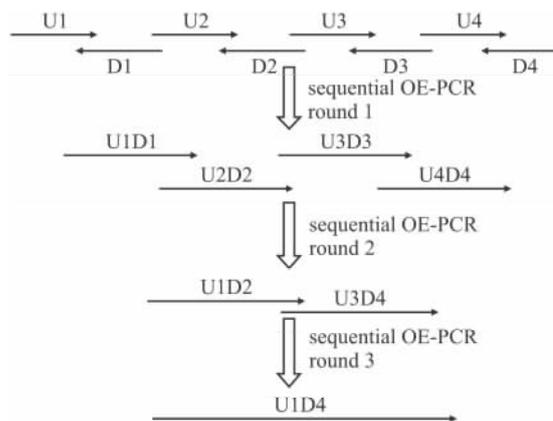


图 1 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 的全基因合成示意图

1.2.4 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 的扩增以及克隆 以上述测序正确的阳性质粒为模板, 分别以 F1/R1 为上下游引物 (引物浓度 10 μ mol/L), PCR 扩增 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 目的序列, PCR 反应条件同上。将 DNA 凝胶回收纯化后的产物克隆至 pMD-18T 载体中。对转化后固体培养基上的单克隆 (任意挑取 10 个) 进行 PCR 鉴定及测序鉴定后, 测定正确的质粒命名为 pMD-18T-Rv3388₆₃₇₋₇₃₁。

1.2.5 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 原核表达载体的构建 分别以鉴定正确的 pMD-18T-Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 为模板, 以 F1 和 R1 为上下游引物进行 PCR 扩增, 反应体系条件均同前。PCR 产物回收纯化后使用限制性内切酶 EcoR I 和 Sal I 进行双酶切, 37 $^{\circ}$ C 作用 3 h, DNA 胶回收纯化酶切后产物。与此同时, 原核表达质粒 pET32a 用同样方法进行双酶切, 纯化回收酶切产物。将两种酶切产物在 LH 的作用下 16 $^{\circ}$ C 连接反应 16 h。将连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* TOP10, 取 200 μ l 涂布于含 Amp (100 μ g/ml) 的 2YT 平板上。挑取平板上 5 个单克隆扩大培养, 用 S. Tag 和 T7ter 两种通用引物行 PCR 鉴定, 挑选鉴定正确的质粒进行 DNA 测序, 将测序正确的质粒命名为 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁。

1.2.6 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 融合蛋白的诱导表达及纯化 选取测序正确的 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 重组阳性质粒转化至感受态细胞 *E. coli* BL21(DE3) 中, 任意挑取固体培养基上 3 个单克隆培养过夜, 次日分别转接 50 μ l 至 3 ml 2 \times YT 培养液(Amp 100 mg/ml + Kana 35 mg/ml) 中, 设置 1 管对照, 4 h 后每管 3 μ l 加入 IPTG(1 mmol/L) 小量诱导表达(对照管不加), 诱导 4 h 后收集细菌培养液 1 ml, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃去上清液, 沉淀中加入 100 μ l 2 \times SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 10 min 后 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清液上样。收集未经 IPTG 诱导的菌液以相同的方法制成 SDS 样品。12% SDS-PAGE 鉴定表达结果。经 SDS-PAGE 证实的阳性表达菌种用作大量诱导表达。取表达菌 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁/BL21, 以 1 : 1 000 转接于 50 ml LB 培养液(Amp 100 g/ml + Kana 35 g/ml), 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 过夜后, 以 1 : 100 转接于 450 ml LB 培养液, 培养至吸光度(absorbance, A) 值 A₆₀₀ 为 0.6 时, 加 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 继续培养 4 h 后离心, 弃上清液, 菌体用 PBS(pH = 7.2) 溶解, 超声破碎后 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液与沉淀, 上清液过 Ni-NTA 柱进行蛋白纯化, 分别用 10、20、100、300 mmol/L 咪唑进行洗脱, 分别收集洗脱液, 进行 SDS-PAGE 电泳检测。

1.2.7 小鼠免疫及抗血清制备 选 BALB/c 小鼠 5 只, 第 1 次免疫使用 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 蛋白样品(含量 0.35 ~ 0.40 mg) 与弗氏完全佐剂等体积混合, 多点注射小鼠皮下及四肢, 每只小鼠注射 0.5 ml。2 周后将蛋白样品(蛋白含量 0.30 mg) 与弗氏不完全佐剂等体积混合进行 2 次免疫。以后每隔 2 周免疫 1 次, 方法及剂量均同第 2 次。4 次免疫后, 经眼球动脉大量取血, 约 1 ml/只, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上层血清, -40 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.2.8 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 蛋白的免疫原性分析 采用 ELISA 法, 将 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁, PEP-TIDE/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 和 pET32a 3 种蛋白分别用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH = 9.6) 包被于 96 孔酶联反应板上, 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h, 用 10% 脱脂奶粉于 37 $^{\circ}$ C(200 μ l/孔) 封闭过夜后, 每孔加入倍比稀释的免疫小鼠抗 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 血清(工作浓度 1 : 20), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, Tris-Tween 洗板 3 次; 加入羊抗鼠 IgG-HRP(1 : 2 000 稀释) 100 μ l/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, Tris-Tween 漂洗 5 次后经四甲基联苯胺(TMB) 显色后用酶标仪于 450 nm 波长处测

定 A₄₅₀ 值, 以高于空白对照 A₄₅₀ 值 2 倍的数值作为阳性判断标准, 使用免疫前小鼠血清作为空白对照。

1.2.9 7 种 MTB 特异性蛋白的血清学分析 为了分析 pET32a-Rv3388₆₃₇₋₇₃₁、16KD、38KD、ESAF-6、CFP-10、MPT64、11488 这 7 种蛋白在血清学检测中的特异性、敏感性以及各抗原的反应模式, 将这 7 种蛋白及载体蛋白 pET32a 分别用 50 mmol/L 碳酸盐缓冲液(pH = 9.6) 包被于 96 孔酶联反应板上, 0.5 mg/孔, 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h, 用 10% 脱脂奶粉于 37 $^{\circ}$ C(200 μ l/孔) 封闭过夜后, Tris-Tween 洗板 4 次; 分别以健康者血清和结核患者血清为一抗(工作浓度 1 : 20), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, Tris-Tween 洗板 3 次; 以 HRP 标记的羊抗人 IgG 为二抗(工作浓度 1 : 2 000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, Tris-Tween 漂洗 5 次后经 TMB 显色后用酶标仪于 450 nm 波长处测定 A₄₅₀ 值。将每一份待检血清的 A₄₅₀ 值与临界值比较, 以阴性血清的平均值 + 2 倍标准差为临界值, 以 A₄₅₀ 值 > 临界值作为阳性判断标准进行结果判定^[6]。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 17.0 软件进行分析, 敏感性(%) = (真阳性) / (真阳性 + 假阴性) \times 100%, 特异性(%) = (真阴性) / (真阴性 + 假阳性) \times 100%。

2 结果

2.1 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 的体外全基因合成、克隆及序列测定 利用 OE-PCR 的方法, 体外成功合成了 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 基因序列, 经过 3 轮 PCR 扩增出与理论值 282 bp 大小相符合的目的片段(图 2), 该目的片段切胶回收纯化后, 产物克隆至 pMD-18T 载体中, 挑取 10 个单克隆用通用引物 RVM 和 M13-47 进行序列测定, 测序结果经 DNASTAR(7.1.0) 软件分析, 结果表明该合成的目的基因编码的氨基酸序列与 MTB 基因组中对应区段的氨基酸序列完全一致。

2.2 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 原核表达载体的鉴定 将 Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 片段与 pET32a 原核表达载体连接, 获得重组表达质粒, 挑取 5 个单克隆, 用 S. Tag 和 T7ter 两种通用引物 PCR 鉴定, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测测序结果证明质粒构建正确。见图 3。

2.3 pET32a-Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 的表达及纯化 将 pET32a-Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 重组质粒转化至宿主菌 *E. coli* B121(DE3), 用 IPTG 小量诱导表达, 12% SDS-PAGE 鉴定结果显示: 与对照管(未诱导) 条带比较, pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 诱导表达的条带中出现相对分子质量为 28 ku 的条带(图 4), 符合理论值。用 Ni-

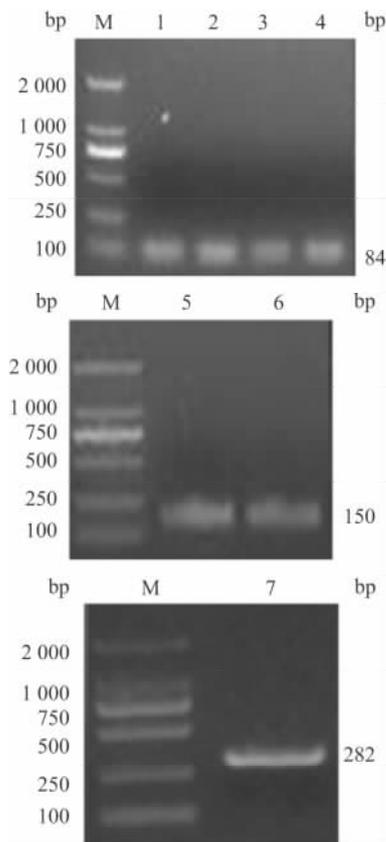


图2 RV3388的全基因合成3轮PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳图
M: DNA Marker DL 2 000; 1、2、3、4: 第一轮 PCR 产物 U1D1、U2D2、U3D3、U4D4; 5、6: 第二轮 PCR 产物 U1D2、U3D4; 7: 第三轮 PCR 产物 U1D4

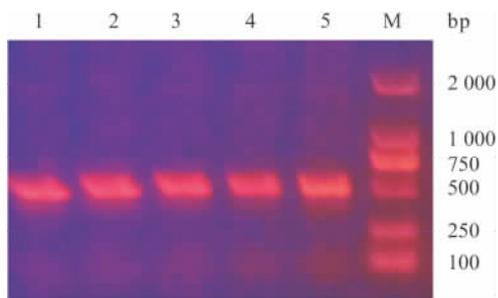


图3 重组表达质粒的PCR鉴定
M: DNA Marker DL 2 000; 1~5: 阳性克隆 pET32a-Rv3388

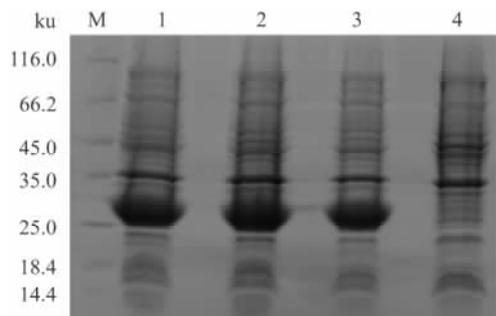


图4 在大肠杆菌中诱导表达 pET32a-Rv3388 的 SDS-PAGE 分析
M: Marker; 1、2、3: 诱导后的 pET32a/ Rv3388; 4: 未诱导的 pET32a/ Rv3388

NTA 柱纯化 pET32a/ Rv3388 蛋白, 经 12% SDS-PAGE 鉴定, 纯化后 pET32a/ Rv3388 蛋白为相对分子量为 28 ku 的条带(图 5), 与理论值相符。

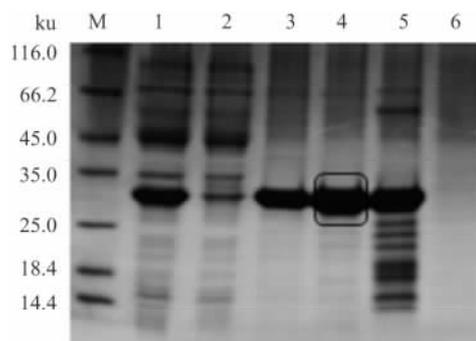


图5 纯化后 pET32a/ Rv3388 蛋白的 SDS-PAGE 分析
M: Marker; 1: 超声上清; 2: 流穿液; 3: 10 mmol/L 咪唑洗脱; 4: 20 mmol/L 咪唑洗脱; 5: 100 mmol/L 咪唑洗脱; 6: 300 mmol/L 咪唑洗脱

2.4 pET32a/Rv3388 蛋白的免疫原性分析

ELISA 分析表明, 抗鼠 pET32a/Rv3388 抗血清与 pET32a/Rv3388 蛋白和 PEPTIDE/Rv3388 蛋白均呈特异反应, 其抗体滴度分别为 1 : 32 000 和 1 : 16 000, 与 pET32a 表达蛋白反应较弱(图 6), 说明该抗血清抗体主要是针对 Rv3388 特异性片段。

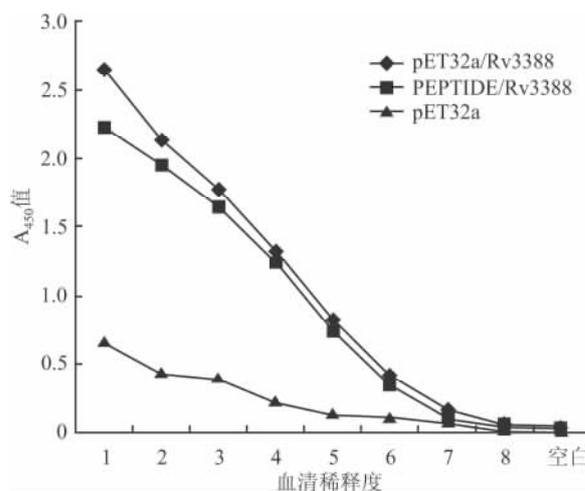


图6 抗鼠 pET32a/Rv3388 抗血清与 pET32a/Rv3388 蛋白、PEPTIDE/Rv3388 蛋白和 pET32a 蛋白的间接 ELISA 分析
1: 1 : 500; 2: 1 : 1 000; 3: 1 : 2 000; 4: 1 : 4 000; 5: 1 : 8 000; 6: 1 : 16 000; 7: 1 : 32 000; 8: 1 : 64 000

2.5 MTB 7 种蛋白间接 ELISA 分析

以 pET32a/ Rv3388、16KD、38KD、ESAF-6、CFP-10、MPT64、11488 这 7 种蛋白为抗原分别检测 80 例结核患者血清以及 96 例正常者血清, 测定 A_{450} 值 > 阴性血清

的平均值 +2 倍标准差作为阳性结果(表 2)。

表 2 单个抗原和多个抗原联合检测血清敏感性与特异性结果

抗原及抗原组合	结核病患者 (n=80)		健康者 (n=96)	
	阳性	敏感性	阳性	特异性
	例数	(%)	例数	(%)
pET32a/Rv3388 ₆₃₇₋₇₃₁	30	37.5	2	97.9
16KD	35	43.8	1	98.9
38KD	37	46.2	0	100.0
ESAF-6	20	25.0	3	96.8
CFP-10	18	22.5	5	94.7
MPT64	25	31.3	4	95.8
11488	9	11.3	6	93.8
16KD-38KD	45	56.3	1	98.9
pET32a/Rv3388 ₆₃₇₋₇₃₁ -16KD	39	48.8	2	97.9
pET32a/Rv3388 ₆₃₇₋₇₃₁ -38KD	43	53.8	2	97.9
pET32a/Rv3388 ₆₃₇₋₇₃₁ -16KD-38KD	49	61.3	3	96.8

3 讨论

目前结核病实验室诊断的金标准是细菌学检测,但检出率低,培养周期长,繁琐费时,不能用于快速诊断。血清学检测是一种快速简便的实验室诊断方法,本实验利用这种方法对 7 种 MTB 特异性抗原进行检测,显示不同类型的抗原在宿主体内表达的数量、种类各不相同,这是由于 MTB 抗原多而复杂,表现出不同的反应模式,单一抗原用于检测不能符合临床诊断要求。

1998 年,MTB 全基因组测序完成后,富含甘氨酸和丙氨酸的酸性蛋白质家族 - PE 家族首次被发现,因其 N 端都含有 PE 基序,因而得名^[7]。RV3388 编码的 PE-PGRS52 属于 PE-PGRS 蛋白亚家族,可能存在于 MTB 的菌膜及菌壁中,在 MTB 的抗原变异方面起主要作用^[8-10]。本实验通过分析 PE 家族 99 个成员的蛋白结构,显示该家族富含大量以 GGXGG 基序的片段,但大部分以疏水性氨基酸组成,不利于原核表达,因此本实验选取了一段亲水性较高,以 GGNGG 为主的一段抗原表位集中区域,该片段能够覆盖整个 PE-PGRS 蛋白亚家族,原核表达此蛋白片段,纯化蛋白表达产物,间接 ELISA

显示有较高的免疫原性。以 80 例结核患者血清及 96 例正常者血清为样本,通过间接 ELISA 法检测该蛋白片段的抗原性,结果显示 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 的特异性为 97.9%,敏感性为 37.5%;与 16KD、38KD 联合检测后,敏感性明显提高;这表明 pET32a/Rv3388₆₃₇₋₇₃₁ 作为单一抗原用于血清学检测意义不大,但可以作为结核联合诊断的备选抗原。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global Tuberculosis Report [R]. 2012.
- [2] Cole S T, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence [J]. *Nature*, 1998, 396(6707): 190-8.
- [3] Alito A, McNair J, Girvin R M. Identification of *Mycobacterium bovis* antigens by analysis of bovin T-cell responses after infection with a virulent strain [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2003, 36(11): 1523-31.
- [4] 程国平, 李克生, 张润玲. 结核分支杆菌特异性抗原重组蛋白 MPT63 检测系统的建立 [J]. *中国实用医刊*, 2013, 40(2): 27-9.
- [5] 章萍萍, 潘卫, 曹洁, 等. 基孔肯雅病毒包膜蛋白 E2 的全基因合成及原核表达 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(6): 617-22.
- [6] 吴静希, 岳俊杰, 姜永强, 等. 结核分枝杆菌 Rv3425 特异性蛋白片段与 CFP10-ESAT6 融合蛋白在结核抗体检测中的应用价值 [J]. *生物技术通讯*, 2011, 22(3): 394-7.
- [7] Chakhiyar P, Hasnain S E. Defining the mandate of tuberculosis research in a post genomic era [J]. *Med Princ Pract*, 2004, 13(4): 177-84.
- [8] Abdallah A M, Savage N D, van Zon M, et al. The ESX-5 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response [J]. *J Immunol*, 2008, 181(10): 7166-75.
- [9] Willias E P, Lee J H, William R B, et al. *Mycobacterium tuberculosis* SigF regulates genes encoding cell wall-associated proteins and directly regulates the transcriptional regulatory gene phoY1 [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(11): 4234-42.
- [10] Ramakrishnan L, Federspiel N A, Falkow S. Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycerol-rich PE-PGRS family [J]. *Science*, 2000, 288(5470): 1436-9.

Assessment of the detection effect of specific protein fragment of Rv3388 and six kinds of antigens in tuberculosis antibody response

Zhou Peng¹, Ding Yingying², Lin Ziyu¹, et al

(¹Dept of Pathophysiology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Dept of Medical Microbiology and Parasitology, The Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract Objective To analyze the structure of all members in the PE family of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)

前列腺素 E1 预处理对大鼠 SMA 急性缺血再灌注损伤保护的研究

曹志新, 刘 斌, 赵德银

摘要 目的 研究前列腺素 E1 (PGE1) 预处理在大鼠肠系膜上动脉 (SMA) 急性缺血再灌注损伤 (IRI) 中对小肠细胞的保护作用。方法 18 只健康雄性 SD 大鼠随机平均分为对照组、假手术组、实验组。采用夹闭 SMA 1 h 再灌注 2 h 的方法建立大鼠急性肠 IRI 模型, 对照组仅暴露 SMA。假手术组标准建模。实验组于再灌注前从尾静脉注入 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的 PGE1。光镜下观察小肠变化并采用 Chiu 氏 6 级评分法评分。肠管黏膜细胞进行 HE 检查, 并检测相关凋亡蛋白 Bax、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2) 的表达, 同时检测血清中肠脂肪酸结合蛋白 (IFABP)、二胺氧化酶 (DAO) 的变化。结果 HE 检测显示对照组镜下未见明显变化; 假手术组绒毛上皮黏膜缺失、破溃并出血坏死; 实验组肠黏膜损伤较轻, 坏死、脱落少见, 与假手术组比较, 实验组 Chiu 氏评分明显低于假手术组。假手术组、实验组 Bax、Bcl-2 表达均高于对照组 ($P < 0.05$), 实验组表达明显低于假手术组 ($P < 0.05$)。假手术组、实验组血清 IFABP、DAO 含量均高于对照组 ($P < 0.05$), 实验组血清 IFABP 含量低于假手术组 ($P < 0.05$)。结论 PGE1 能减轻大鼠 SMA 急性 IRI 所致小肠的坏死程度, 保护受损的小肠黏膜。

关键词 肠系膜上动脉; 急性缺血; 缺血再灌注损伤; 前列腺素 E1

中图分类号 R 574

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)10-1409-04

肠道缺血再灌注损伤 (ischemic reperfusion injury, IRI) 是指严重的肠道动脉缺血一定时间后, 血供恢复造成组织损伤加重的一种现象。急性肠系膜上动脉 (superior mesenteric artery, SMA) 栓塞患者是外科急重症之一, 手术死亡率达 60% ~ 85%, 与小肠 IRI 密切相关^[1]。IRI 中肠黏膜肠绒毛顶部是对缺血低氧最敏感、最易损伤的部位^[2]。该实验通过建立大鼠 SMA 急性 IRI 模型, 予以前列腺素 E1 (prostaglandin E1, PGE1) 预处理, 从小肠黏膜病理学, 细胞凋亡及血清中大鼠肠脂肪酸结合蛋白 (intestinal fatty acid binding protein, IFABP) 和二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) 不同方面比较, 研究 PGE1 对 SMA 急性缺血后对小肠 IRI 损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要药物、试剂与仪器 PGE1 规格 10 μg ; 2 ml, 购自北京泰德制药有限公司; DAB 显色试剂盒、Bax 一抗、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2,

2015-05-22 接收

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院普通外科, 合肥 230022

作者简介: 曹志新, 男, 硕士研究生;

刘 斌, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: 13399519008@163.com

and predict the antigen epitope, we chose the dominant antigen fragments of Rv3388 protein and estimate the antigenicity of not only the recombinant Rv3388 protein but also the other six kinds of specific antigens of MTB. To investigate the reaction model between the different tuberculosis specific antigen and serum antibody, and to evaluate the value of serological detection in the diagnosis of tuberculosis. **Methods** The gene coding 637 ~ 731 amino acid fragment of Rv3388 was amplified by over-lap extension-PCR. The prokaryotic expressed and purified recombinant protein pET32a/Rv3388637-731 was utilized to immunize BALB/c mice, and the immunogenicity of the antiserum and the specificity and sensitivity of seven kinds specific proteins of MTB were analyzed by indirect ELISA. **Results** The amount of recombinant protein pET32a/Rv3388637-731 expressed in *E. coli* was 80% of the total protein. The results of ELISA showed strong immunogenicity. The reaction patterns of antigens were different with each other, and the detection sensitivity of single antigen was poorer. **Conclusion** The structure of all members in the PE family of MTB is analysed, and the recombinant protein pET32a/Rv3388637-731 is expressed and purified successfully. Seven kinds of proteins in the serum antibody are antigen complementary in the detection. Different antigen is different reaction pattern. A variety of antigens should be jointly detected to improve the sensitivity of antibody detection of tuberculosis.

Key words Mycobacterium tuberculosis; Rv3388; ELISA; specificity; sensitivity