

# 梅毒螺旋体 47 ku 抗原的分段表达及抗原表位分析

郭清顺,李廷栋,熊君辉,周国梁,  
葛胜祥,李少伟,张 军,夏宁邵\*

(厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心,生命科学学院,福建 厦门 361005)

**摘要:** 通过大肠杆菌表达系统表达了梅毒螺旋体 47 ku 膜蛋白及其 N 端和/或 C 端缺失的重组蛋白共 15 个,经亲和层析纯化,并通过免疫印迹和酶联免疫实验检测这组蛋白与梅毒病人血清的反应性. 结果发现所有包含 D 结构域的重组蛋白的免疫反应性显著高于不含 D 结构域的蛋白,提示 D 结构域中可能包含 47 ku 膜蛋白上的一个免疫优势表位.

**关键词:** 梅毒螺旋体;47 ku 膜蛋白;免疫反应性;表位

**中图分类号:** Q 365.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479(2008)06-0874-05

梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*) 是梅毒的病原体,其基因组大小约为 1 138 kb,包括 1 041 个开放阅读框架<sup>[1-2]</sup>. 其中,梅毒螺旋体 47 ku 膜蛋白 (TP47) 含量高、免疫原性强,是病原体特异性膜蛋白之一,感染后其抗体出现早,持续时间长,在梅毒的致病机理研究和诊断中具有重要的意义<sup>[3-4]</sup>.

目前普遍认为 TP47 的免疫优势表位位于近 N 端. 1989 年, Hsu 等<sup>[5]</sup> 利用计算机软件对 TP47 进行亲疏水性分析,认为 TP47 N 端至少存在一个潜在的免疫优势表位. 1997 年, Norgard 等<sup>[6]</sup> 的专利也指出 TP47 免疫优势表位位于近 N 端. 2001 年, 军事医学科学院凌世淦等<sup>[7]</sup> 报导了其在梅毒螺旋体表位抗原及多表位抗原嵌合表达方面的研究成果,并将其应用到梅毒螺旋体抗体的血清学检测中,其中, TP47 采用的是 78~101 aa 的肽段.

1990 年左右, Norgard 等<sup>[8-10]</sup> 一系列研究表明, TP47 为两亲性膜蛋白, N 端乙酰化后与膜脂共价结合锚定在质膜上. 2002 年, Deka 等<sup>[11]</sup> 利用 X 射线晶体衍射测定了其晶体结构, 并发现 TP47 主要由片层结构组成, 包括 A、B、C、D 4 个结构域, 其中 A 由 7~34 aa 和 156~204 aa 组成, B、C、D 分别为 44~155 aa, 205~332 aa, 333~414 aa (图 1), A、B、C 3 个结构域之间紧密联系而 D 结构域相对独立, 普遍接受的免疫优势表位 78~101 aa 也相对独立. 从空间结构而言, N 端的 A 结构域与质膜共价结合, 而 D 结构域远

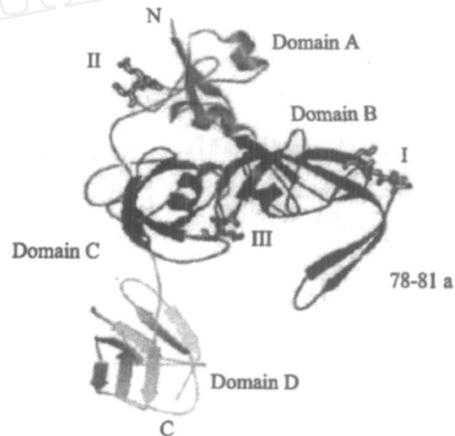


图 1 TP47 单体的空间结构<sup>[11]</sup>

Fig. 1 Stereoview of TP47 monomer<sup>[11]</sup>, I, II, III represent penicillin-binding sites

离质膜. 据此我们设计了一系列的分段克隆, 并在大肠杆菌中进行表达, 纯化后通过免疫印迹、ELISA 验证各区段的活性, 进而对其免疫优势表位进行初步分析.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

(1) 菌株、质粒: 大肠杆菌 DH5<sup>+</sup>、ER2566 为本中心保存. 载体 pMD18-T 购自 Takara 公司, PET-30a 购自 Invitrogen 公司, pGEX-2T 购自 Pharmacia.

(2) 试剂: 限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶购自 Takara 公司, 胶回收试剂盒购自上海华舜公司, 亲和层析介质购自 BD Biosciences 公司, AP 标记的羊抗人 IgG 特异性抗体购自 Dako 公司, 其它试剂购自 Sigma 公司.

收稿日期: 2008-01-06

基金项目: 国家 863 重点项目 (2006AA020905), 福建省科技重大专项 (2004 YZ01) 资助

\* 通讯作者: nsxia@xmu.edu.cn.

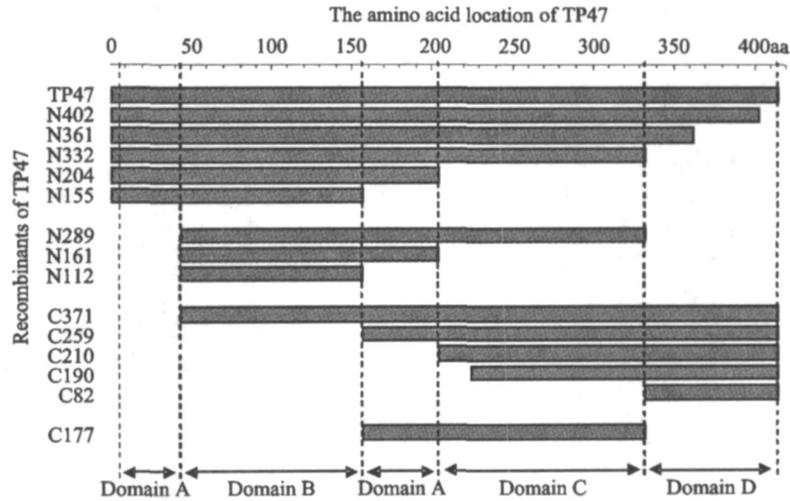


图 2 TP47 蛋白片段及其定位

Fig. 2 TP47 protein fragments and their location

(3) 梅毒全基因:梅毒螺旋体全基因组由本中心从一份梅毒病人血清中提取并保存.

(4) 血清:12 份梅毒患者血清及 400 份 TPPA 阴性血清均由北京万泰生物药业有限公司提供.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 PCR 分段扩增梅毒螺旋体 47 ku 蛋白各段基因

根据 TP47 蛋白基因序列,用 Oligo 软件设计了 10 条引物(表 1),由上海英骏生物工程公司合成.引物经不同组合扩增出 15 个 TP47 片段(图 2).

PCR 条件:94 预变性 10 min,94 变性 1 min,56 复性 50 s,72 延伸 90 s,20 个循环后,72 补充延伸 10 min.胶回收 PCR 产物,连进 pMD18-T 载体.

#### 1.2.2 表达载体的构建

用 *Bgl* II/*Eco*R I 或 *Bgl* II/*Xho*I 双酶切,将目

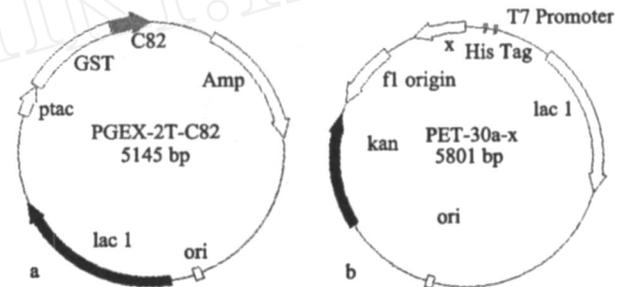


图 3 表达质粒图

Fig. 3 The map of expression plasmid, X represents for any one of the 15 target gene fragments except C82

的片段从 pMD18-T 上切下,胶回收,C82 连入 pGEX-2T,其余均连入 PET-30a,得到系列表达质粒(图 3).

#### 1.2.3 重组蛋白的表达

接种 5 μL 的甘油菌至 3 mL LB 抗性培养基中,

表 1 TP47 蛋白基因分段克隆引物

Tab. 1 The primers for amplification of TP47 protein gene fragments

引物	序列*	位置
F1	<span style="border: 1px solid black;">AGATCT</span> GGCTCGTCTCA TCA TG	1 ~ 16
F44	<span style="border: 1px solid black;">AGATCT</span> CTCGACGCA GGCA TG	130 ~ 134
F156	<span style="border: 1px solid black;">AGATCT</span> TTTGTCCCA GTTGCG	466 ~ 480
F205	<span style="border: 1px solid black;">AGATCT</span> A TGGA GA GCCCGC	613 ~ 625
F225	<span style="border: 1px solid black;">AGATCT</span> GGTTCGGACGCA GA	673 ~ 686
F333	<span style="border: 1px solid black;">AGATCT</span> AAGTACGA GGGGAACA	997 ~ 1012
R155	<span style="border: 1px solid black;">GAATTC</span> TTA <span style="border: 1px solid black;">GGATCC</span> CTTCA TACCGTGAACCTTT	447 ~ 465
R204	<span style="border: 1px solid black;">GAATTC</span> TTA <span style="border: 1px solid black;">GGATCC</span> GCTGCTTACCTTACGTGC	595 ~ 612
R332	<span style="border: 1px solid black;">GAATTC</span> TTA <span style="border: 1px solid black;">GGATCC</span> GGGAA GGAA GCGCA	983 ~ 996
R414	<span style="border: 1px solid black;">CTCGAG</span> TTA <span style="border: 1px solid black;">GGATCC</span> CTGGGCCACTACCTT	1228 ~ 1242

\*酶切位点用方框标出.

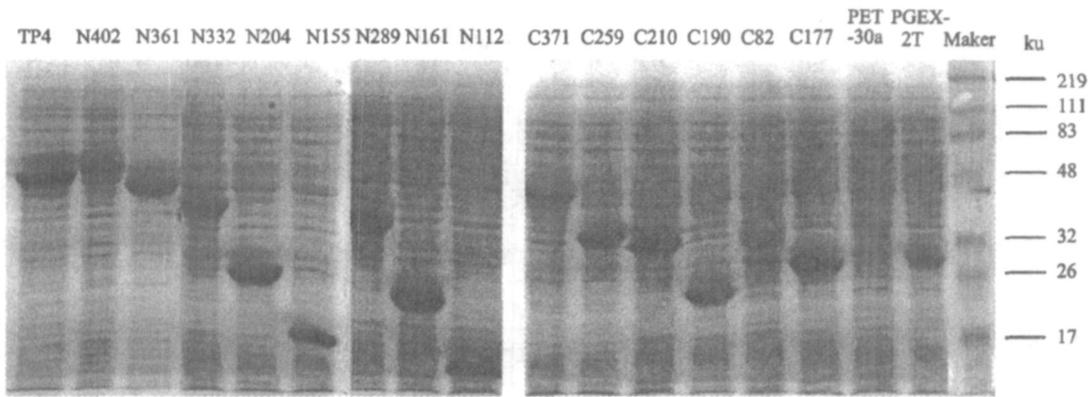


图 4 SDS-PAGE 分析 TP47 重组蛋白在大肠杆菌中的表达

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the TP47 recombinant protein expression in *E. Coli*

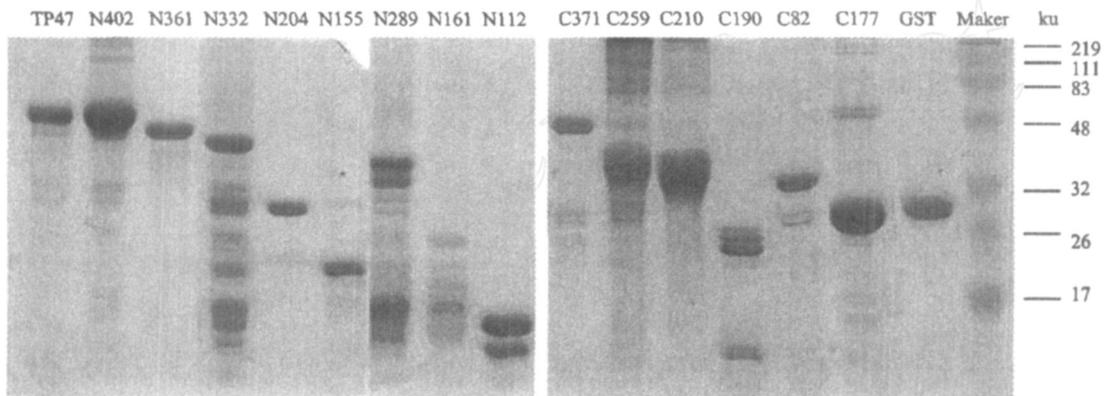


图 5 SDS-PAGE 分析纯化后的 TP47 重组蛋白

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the purified recombinant TP47 proteins

37 活化过夜,第 2 天早上按 1 : 1 000 的比例将活化的甘油菌接种至 500 mL 的抗性培养基中,37 培养至  $OD_{600}$  0.6 ~ 0.8,0.5 mmol/L IPTG 25 诱导 6 h. 8 000 r/min 离心收集菌体,超声破碎后 12 000 r/min 离心.通过 13.5 % SDS-PAGE 鉴定.

### 1.2.4 重组蛋白的纯化

N 端融合表达 His 标签的重组蛋白可以用 BD Biosciences 公司的 Metal Affinity Resins 纯化. N 端融合表达 GST 标签的重组蛋白通过 BD Biosciences 公司的 Glutathione Uniflow Resins 纯化.

### 1.2.5 重组蛋白的免疫印迹检测

纯化后目的蛋白经 13.5 % 的 SDS-PAGE 分离,然后转移到硝酸纤维膜,用 5 % 脱脂奶室温封闭 2 h,加入 100 倍稀释后的一梅毒患者血清,室温反应 1 h;用 TNT 洗涤 3 次,每次 10 min;后加 AP 标记的羊抗人 IgG 抗体室温反应 1 h;用 TNT 洗涤 3 次,每次 10 min;用 NBT/BCIP 显色 15 min.

### 1.2.6 双抗原夹心法酶联免疫吸附实验

纯化后的目的蛋白用 CB 稀释至  $5 \times 10^{-4}$  mg/mL,每孔加入 100  $\mu$ L,4 过夜;平衡至室温,以 PBST

洗涤一次,扣干,每孔加入 200  $\mu$ L 2 % 的 BSA,37 封闭 2 h;之后扣干,并在 25 的抽干室中抽干 2 h 备用.

每孔加入 20  $\mu$ L 梅毒患者血清或正常人血清和 100  $\mu$ L 稀释好的 HRP 标记的 GST 融合表达的 TP47 抗原,混匀,37 温育 1 h,PBST 洗涤 5 次,扣干,每孔加入 100  $\mu$ L TMB 显色剂,37 温育 15 min 后加入 50  $\mu$ L 2 mol/L 的  $H_2SO_4$  终止反应,测定  $OD_{450/600}$ .

## 2 实验结果

### 2.1 重组蛋白的表达鉴定

图 4 表示表达的样品经 13.5 % 的 SDS-PAGE 后,考马斯亮兰染色结果,以 PET-30a 和 pGEX-2T 空载为阴性对照,均可以看到较大表达量.

### 2.2 重组蛋白的亲亲和层析纯化

15 个重组蛋白均在上清表达.利用表达载体 PET30a 和 pGEX-2T 分别携带的 His 标签和 GST 标签进行亲和层析,获得了较纯的目的蛋白,经 SDS-PAGE 后,可以看到较纯的目的蛋白带(图 5).

### 2.3 Western Blot 检测目的蛋白活性

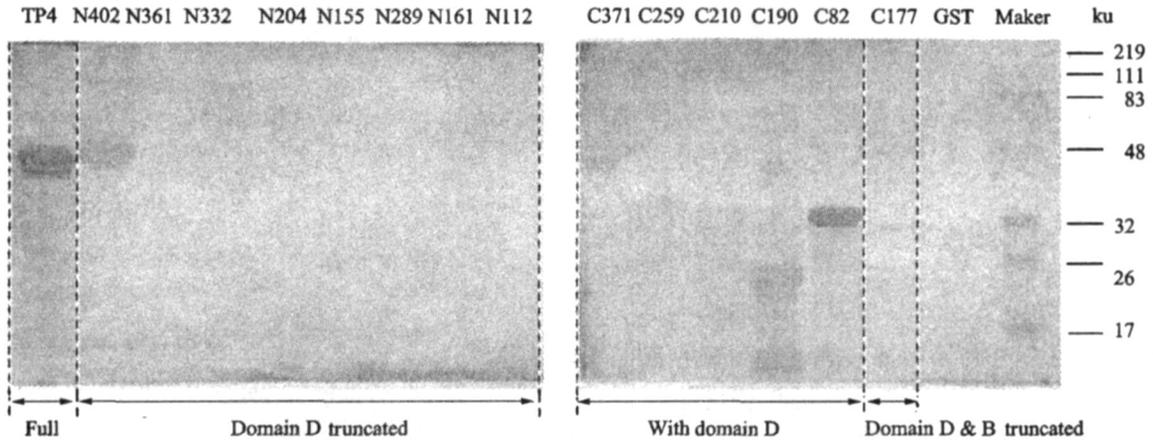


图 6 免疫印迹分析 TP47 重组蛋白的活性

Fig. 6 Western blot analysis of the reactivity of recombinant TP47 protein

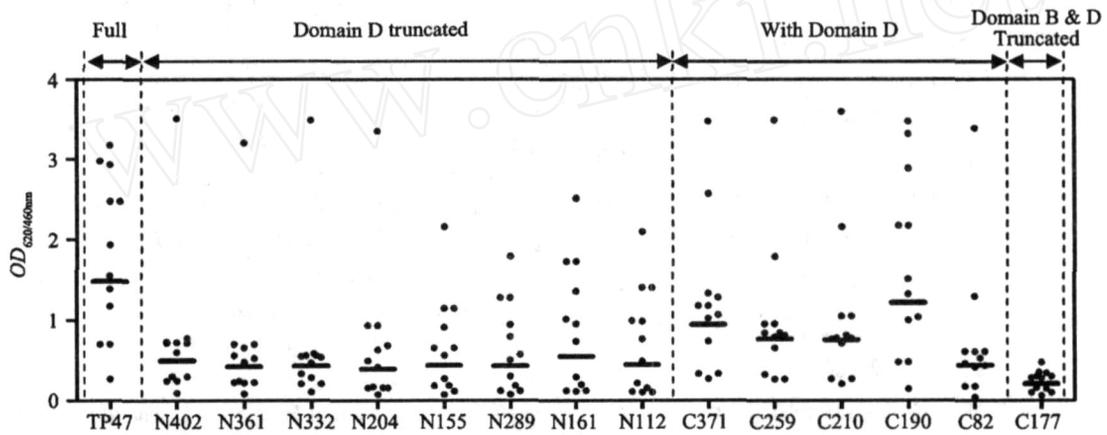


图 7 TP47 重组蛋白夹心法中对梅毒患者和正常人血清的反应性

Fig. 7 The reactivity of TP47 fragments to the serum of syphilitic and normal people

TP47 各重组蛋白与梅毒患者血清的免疫印迹反应如图 6 所示,包括 D 结构域的片段(C371、C259、C210、C190、C82)均具有一定的活性,特别是 C190 与全长的 TP47 活性相当;而不包含 D 结构域的片段(N402、N361、N332、N204、N155、N289、N161、N112)除了 N402 具有较强的活性,N361 只有微弱的活性,其余的片段与该血清均无反应;同时缺失 B 和 D 结构域的片段 C177 也没有活性。

### 2.4 ELISA 检测目的蛋白活性

以不同的重组蛋白分别包被,通过双抗原夹心法检测 12 份梅毒患者血清,各片段与梅毒患者血清有不同程度的反应(图 7)。C190 的活性与全长相当,且含有 D 结构域的片段活性明显高于 D 结构域部分或完全缺失的片段。而在不含 D 结构域的片段中,含有 B 结构域的活性高于不含 B 结构域的活性,同时缺失 B 和 D 两个结构域的片段 C177 几乎没有活性。

表 2 TP47 蛋白特异性的比较

Tab. 2 The comparison of TP47 protein specificity

血清号	C190	TP47	TPN15	TPN17
N1	-	+	-	-
N2	-	+	-	-
N3	-	+	-	-
N4	+	+	-	+
N5	+	+	+	+
N6	-	+	-	-
N7	+	+	-	+
N8	-	+	-	-

以 TP47 和 C190 分别为包被抗原,利用双抗原夹心法平行检测 400 份 TPPA 阴性的血清,有 8 份血清表现为 TP47 抗体阳性(表 2)。8 份 TP47 抗体阳性的血清中编号为 N4、N5、N7 的 3 份同时表现为针对 C190、TPN15 和 TPN17 梅毒抗原的抗体阳性(表 2)。

### 3 讨 论

B 细胞免疫优势表位一般位于表面可及性较高的区域。在 TP47 中, A 结构域 N 端乙酰化修饰后与质膜共价结合, D 结构域向外延展, 同时 B 结构域的 78 ~ 101 aa 片段也充分暴露, 因此可能是潜在的免疫优势表位所在。这与实验中含有 D 结构域的片段活性较高, 含有 B 结构域的片段也有一定的活性, 而同时缺失 B 结构域和 D 结构域的片段几乎没有活性的结果是一致的。这说明, 除了目前公认的免疫优势表位 78 ~ 101 aa 之外, D 结构域中可能也存在一个免疫优势表位, 且其免疫反应性更强。

在选择检测试剂用抗原时应尽量避免那些会产生交叉反应的片段, 以提高检测的特异性。但是目前关于梅毒抗原同源性与交叉反应的研究还不是很深入, 免疫优势表位的分析还处于计算机软件预测阶段, 因此, 通过基因工程手段表达小片段的重组蛋白对免疫优势表位的分析和提高免疫检测的特异性都起着重要的作用。基于 C190 和 TP47 双抗原夹心法对 400 份 TPPA 阴性的血清平行比较结果显示, C190 特异性优于全长的 TP47。在 C190 和 TP47 同时检测为阳性的 3 份血清中, 15 ku 和/或 17 ku 抗原也均有反应, 不排除 TP-PA 漏检的可能性。因此, C190 代替全长 TP47 作为检测抗原, 对于提高梅毒抗体检测试剂的特异性具有一定的价值。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] Lafond R E, Lukehart S A. Biological basis for syphilis [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2006, 19(1): 29 - 49.
- [3] 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]. Journal of Clinical Laboratory Analysis, 1997, 11(6): 315 - 322.
- [4] Sato N S, Hirata M H, Hirata R D C, et al. Analysis of *Treponema pallidum* recombinant antigens for diagnosis of syphilis by western blotting technique [J]. Revista do Instituto de Medicina Tropical de So Paulo, 1999, 41(2): 115 - 118.
- [5] Hsu P L, Chamberlain N R, Orth K, et al. Sequence analysis of the 47-kilodalton major integral membrane immunogen of *Treponema pallidum* [J]. Infection and Immunity, 1989, 57(1): 196 - 203.
- [6] Norgard M V. 47 Kilodalton antigen of *Treponema pallidum*: USA, 5681943 [P]. 1997-10-28.
- [7] 凌世淦. 重组梅毒螺旋体表位抗原及多表位嵌合抗原: 中国, 01104427 [P]. 2001-09-25.
- [8] Norgard M V, Chamberlain N R, Swancutt M A, et al. Cloning and expression of the major 47-kilodalton surface immunogen of *Treponema pallidum* in *Escherichia coli* [J]. Infection and Immunity, 1986, 54(2): 500 - 506.
- [9] Chamberlain N R, Radolf J D, Hsu P L, et al. Genetic and physicochemical characterization of the recombinant DNA-derived 47-kilodalton surface immunogen of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* [J]. Infection and Immunity, 1988, 56(1): 71 - 78.
- [10] Chamberlain N R, Deogny L, Slaughter C, et al. Acylation of the 47-kilodalton major membrane immunogen of *Treponema pallidum* determines its hydrophobicity [J]. Infection and Immunity, 1989, 57(9): 2878 - 2885.
- [11] Deka R K, Machius M, Norgard M V, et al. Crystal structure of the 47-kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* reveals a novel penicillin-binding protein [J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(44): 41857 - 41864.

## Expression of *Treponema pallidum* 47 ku Fragments and Analysis of Its Epitope

GUO Qing-shun, LI Ting-dong, XIONG Jun-hui, ZHOU Guo-liang,  
GE Sheng-xiang, LI Shao-wei, ZHANG Jun, XIA Ning-shao\*

(National Institute of Diagnosis and Vaccine Development in Infectious Disease,  
School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** *Treponema pallidum* 47 ku antigen and its N or C terminal truncated mutants were expressed in *E. coli* and the recombinant proteins were purified by affinity chromatography. Western blot and ELISA were used to detect the reactivity of these recombinant proteins with the sera of syphilitic patients. The results show that the reactivity of TP47 proteins with domain D are significantly higher than that without domain D, which suggests that there is an immunodominant epitope within domain D of TP47.

**Key words:** *Treponema pallidum*; TP47; immuno-reactivity; epitope