View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Xiamen University Institutional Repository

学校编码：10384　　　　　　　　　　　　　　分类号______密级______
学号：21720061152234　　　　　　　　　　　　　　　UDC__________

厦门大学

学　位　论　文

基于全血培养 IFN-γ 体外释放试验的新型结核诊断试剂的建立及初步应用

A new Diagnostic Test for Detecting Infection of Mycobacterium Tuberculosis based on in vitro IFN-γ Release Assay by Whole Blood Culture: its Establishment and Primary Application

林春鑫

指导教师姓名：夏宁邵教授
专　业　名　称：生物化学与分子生物学
论文提交日期：2009 年 6 月
论文答辩时间：2009 年 6 月
学位授予日期：2009 年　月

答辩委员会主席：曾　定　教　授
评　　　阅　　　人：周　珮　教　授
孙　慧　副教授

2009 年 6 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行)》。

另外,该学位论文为(　　　　　　　　　　　　　　　　)课题(组）的研究成果，获得（　　　　　　　　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　　　　　　　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）:

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于　　年　　月　　日解密，解密后适用上述授权。

（　　）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

摘要 I

第一章 概论 1

第 1 节 IFN-γ 的发现与结核病的关系 2

1 IFN-γ 的发现 2

2 IFN-γ 与结核病 3

第 2 节 结核分枝杆菌抗原的细胞递呈及 IFN-γ 的产生 3

1 结核分枝杆菌抗原的细胞递呈过程 3

1.1 CD4+T 细胞 5

1.2 CD8+T 细胞 5

1.3 非常规 T 细胞的免疫反应 5

2 IFN-γ 的产生 6

第 3 节 利用免疫细胞体外释放 IFN-γ 实验来诊断结核感染 6

第 4 节 现有的结核诊断方法的横向比较及完成本研究的重要性与必要性 8

1 目前已有的结核诊断方法比较： 8

2 在我国进一步深入研究该项技术的重要性及必要性 10

3 该研究的主要技术方法及技术路径 11

第二章 材料与方法 12

第一节 材料 12

1 主要仪器 12

2 菌株与质粒 13

3 常用试剂的配制 13

第二节 方法 16

1 基因克隆 16

2 工程菌的大量表达 19

3 SDS-聚丙烯胺凝胶电泳（SDS－PAGE）见《分子克隆实验指南》第二版。 19

4 包涵体的洗涤纯化 19

5 蛋白复性方法——透析复性 20

6 重组蛋白的柱层析 HPLC 纯化方法 20

7 NTA-Ni+亲和法纯化蛋白 20

8 蛋白胶 SDS-PAGE 银染 21

9 样品检测 21

10 小鼠的免疫与鼠源单克隆抗体的制备 22

11 鲎试剂检测内毒素 24

12 ELISPOT 试验 25

13 统计分析 25

厦门大学博硕士论文摘要库

第三章 结果与分析 26
第一节 结核新型管式培养系统诊断试剂的建立 26
1 特异性蛋白 ESAT-6、CFP-10 的基因克隆与表达纯化 26
1.1 PCR 引物的设计 26
1.2 表达载体的克隆 26
1.3 蛋白的表达与纯化 27
1.3.1ESAT-6 的表达与纯化 27
1.3.2CFP-10 的纯化 28
1.4 蛋白的纯度及内毒素的控制 30
1.5 ESAT-6 与 CFP-10 的活性鉴定 30
2 培养条件的摸索 31
2.1 培养方式 31
2.2 最佳蛋白使用浓度的选择 33
3 ELISA 定量 IFN-γ 试剂盒的构建 33
3.1 人 IFN-γ 鼠源克隆抗体的制备 33
3.2 试剂盒调整及优化 36
4 小结 39
第二节 TB-IGRA 试剂的临床应用与结果分析 39
1 本试剂盒临界值（Cut Off 值）的确定 39
2 本试剂 TB-IGRA 在肺外结核病人中的结果 41
3 结核病人接受治疗后不同时间 TB-IGRA 结果分析 42
4 TB-IGRA 用于提示个体接触结核的风险 43
5 TB-IGRA 对亚临床结核感染的筛查 44
6 小结 46
第四章 讨论 47
1 结核 IFN-γ 体外释放实验（TB-IGRA）对结核感染的诊断价值 47
1.1 TB-IGRA 的出现及发展 47
1.2 结核体外 IFN-γ 释放实验在特殊人群中的检测情况 48
1.3 结核体外 IFN-γ 释放实验结果随病情发展的动态变化 49
1.4 TB-IGRA 结果同结核接触程度呈正相关 50
2 寻找新的刺激蛋白 50
2.1 结核分枝杆菌分泌蛋白 50
2.2 现有的研究结果及未来的热点 51
3 寻找新的检测手段——用 IP-10 代替 IFN-γ 52
第五章 总结与展望 53
参考文献 54
致谢 59
在学期间发表的论文 60

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract I

Chapter Ⅰ Introduction 1

Section 1 The discovery of IFN-γ and its relationship with TB 2

1 The discovery of IFN-γ 2

2 The relationship between IFN-γ and tuberculosis 3

Section 2 MTB antigen presenting pathways and the secretion of IFN-γ 3

1 MTB antigen-presenting 3

1.1CD4$^+$T cells 5

1.2CD8$^+$T cells 5

1.3Non-conventional T cell immune response 5

2 The secretion of IFN-γ 6

Section 3 In vitro IFN-γ release assay for detecting tuberculosis infection 6

Section 4 The importance and necessary of this study 8

1 The advantage and disadvantage of different diagnostic methods.. 8

2 The importance and necessary for futher investigation in TB-IGRA 10

3 The main techniques and research path of this study 11

Chapter Ⅱ Materials and Methods 12

Section 1 Materials. 12

1 Instruments 12

2 Bacilli strains and plasmids 13

3 Preparation of reagents 13

Section 2 Methods 16

1 Gene cloning 16

2 The protein expression 19

3 SDS－PAGE 19

4 The purification of inclusion body 19

5 Dialysis renaturation of protein 20

6 Purifying recombinant protein purified with HPLC 20

7 NTA-Ni+ affinity purification 20

8 Silver staining of SDS-PAGE gel 21

9 Clinical sample testing 21

10Immunization and murine monoclonal antibodies’ preparaion 22

11 Testing endotoxin with LAL 24

12 ELISPOT 25

13 Statistical analysis 25

Chapter Ⅲ Results and analysis 26

Section 1 The establishment of whole blood IGRA 26

1Gene cloning, expression and purification of ESAT-6 and CFP-10 26

1.1PCR primers design 26

1.2Expression vectors construction 26

1.3Protein expression and purification 27

1.3.1ESAT-6 27

1.3.2CFP-10 28

1.4The purification of protein and the removal of endotoxin 30

1.5The activity identification of ESAT-6 and CFP-10 30

2 Exploring the culture conditions 31

2.1Culture mode 31

2.2The optimum protein concentration 33

3 Preparation of IFN-γ quantitative ELISA kit 33

3.1Anti-human-IFN-γ monoclonal antibody preparation 33

3.2Optimization of the ELISA kit 36

4 Preliminary summary 38

Section 2 Clinical primary application 39

1 Cut off value definiton of TB-IGRA 39

2 The extra-pulmonary tuberculosis patients in Yancheng city 41

3 The different results between before and after TB treatments 42

4 TB-IGRA for revealing the risk of contact 43

5 TB-IGRA for sub-clinical screening 44

6 Preliminary summary 46

Chapter Ⅳ Discussion 47

1 The value of TB-IGRA for the diagnosis of tuberculosis infection 47

1.1The invention and the development of TB-IGRA 47

1.2The results of detecting special population using IGRA 48

1.3The IGRA results dynamic changes with the progression of the diseases 49

1.4The TB-IGRA results has a positive correlation with the exposure to tuberculosis 50

2 Looking for the new stimulation protein 50

2.1Secretory protein of Mycobacterium tuberculosis 50

2.2Existing research results and future hot spots 51

3 Detecting IP-10 instead of IFN-γ 52

Chapter Ⅴ Summary and expection 53

References 54

Acknowledgements 59

厦门大学博硕士论文摘要库

Appendix **60**

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

结核病是由结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis，MTB)感染所致的以呼吸系统感染为主的慢性传染病，严重威胁着人类健康。目前结核病呈现出扩大蔓延的趋势。统计显示，全球 1/3 的人感染过结核分枝杆菌，但现有的用于诊断结核感染的方法都存在或多或少的缺陷，突出问题是灵敏度、特异性低下。因此需要一种新的诊断技术以祢补现有方法的不足。

结核分枝杆菌感染人体后能激活机体免疫系统，产生针对结核分枝杆菌的效应性 T 淋巴细胞和记忆性 T 淋巴细胞，当这些特异性 T 淋巴细胞再次遇到结核分枝杆菌抗原时，则能被激活，分泌细胞因子（如 IFN-γ）。据此，并参考已有的文献报道，本研究建立了一种新型的结核体外诊断试剂——全血结核 IFN-γ 体外释放试验（TB IFN-γ release assay, TB-IGRA），包含有体外细胞培养系统和细胞因子定量系统，检测时间在 24 小时左右。经过初步临床验证，TB-IGRA 的灵敏度为 95.8%，特异性为 96.3%。

本试剂不仅对肺结核有较高的检出率，同时在肺外结核中的检出率达 92.9%。在对病人接受治疗的前后 TB-IGRA 结果变化的研究中发现，IGRA 检测值即刺激产生的 IFN-γ 浓度随着病人的康复而下降，阴转率 53.8%，提示本试剂结果同病人的病程发展具有一定的关系，可作为提示病程的一个指标。在一次结核爆发的调查研究中发现，本试剂的结果同结核暴露程度正相关，与结核菌素皮肤试验（TST）相比，由于 TST 的检测特异性受卡介苗大量接种的影响而降低，易产生假阳性，而 TB-IGRA 能祢补其不足。同时还发现，本研究建立的 TB-IGRA 试剂和对照试剂 QFT 在结核无症状携带者中具有相同的检出能力。

本研究成功建立了全血结核 IFN-γ 体外释放试验试剂盒，并验证了其相关参数已经符合使用要求。将本试剂盒应用于临床初步验证，发现在若干领域具备进一步深入研究的必要，将在后续研究中继续验证本试剂的可靠性及临床价值。

关键词：结核分枝杆菌；全血；体外培养；T 细胞免疫；γ-干扰素

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Tuberculosis (TB) is caused by Mycobacterium tuberculosis (MTB) infection, which is a serious threat to human health, it could lead to chronic respiratory diseases. At present, tuberculosis shows a trend to expand. About 1/3 people all over the world have been infected with MTB, but the existing diagnostic methods are more or less defective, and their main problem is the low sensitivity and specivity. So we need a new TB diagnostic method to overcome the existing methods deficiencies.

The immune system will be activated with mycobacterium tuberculosis infection. The body will generate specific effector T cells and memory T cells for MTB. T cell activation and cytokine secretion (such as IFN-γ) will be happened after the specific lymphocyte cells encountered with MTB. Based on this theory and also the references, this study established a new TB diagnostic test called "TB IFN-γ release assay, TB-IGRA". TB-IGRA contains in vitro cell culture system and cytokine quantification system, with time-cosuming of about 24hrs. After clinical trials, it shows that the sensitivity of TB-IFN-γ is 95.8%, and the specivity is 96.3%, which is better than former reagents.

This reagent has a high sensitivity in not only tuberculosis but also extra-pulmonary tuberculosis (EPTB). The sensitivity in EPTB is 92.9%. This study also shows that there is a certain relationship between TB-IGRA results and the patient physical conditions. TB-IGRA results decreased when patients got healed, the negative conversion ratio is 53.8%, so TB-IGRA might be the indicator of the progression of the disease. A study on one TB outbreak incident shows that the results of this reagent is positive correlated with the exposure to TB. At the same time, the study shows that TB-IGRA has the same capacity as QFT to detect the carriers of tuberculosis.

This study successfully established whole blood TB IFN-γ release assay kit, and we have verified the relevant parameters have been met with our requirements. We found that some areas should be further studied when we used this kit for primary clinical validation, and follow-up study will be continued to verify the reliability and

厦门大学博硕士论文摘要库

the clinical value of this reagent.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; Whole blood; In vitro culture; T cell immunology; IFN-γ

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 概论

结核病是由结核分枝杆菌(mycobacterium tuberculosis，MTB)感染所致的以呼吸系统感染为主的慢性传染病，是造成人类死亡最多的疾病之一，严重威胁着人类健康。在卡介苗和抗结核药物发明后，结核的疫情曾一度得到较好的控制，但近年来伴随 HIV 感染的流行、MTB 耐药菌株的出现以及人口流动的增加，全球疫情又急剧恶化。据统计全球约有 1/3 的人感染了 MTB，每年新发病例 800～1000 万，约 300 万人死于结核。我国结核患者数量居全球第二位，是结核高负担国家之一，全国结核感染率为 44.5 %[1]，结核病人 131.1 万人，其中 20.1 万人死于结核病或结核并发症[2]。

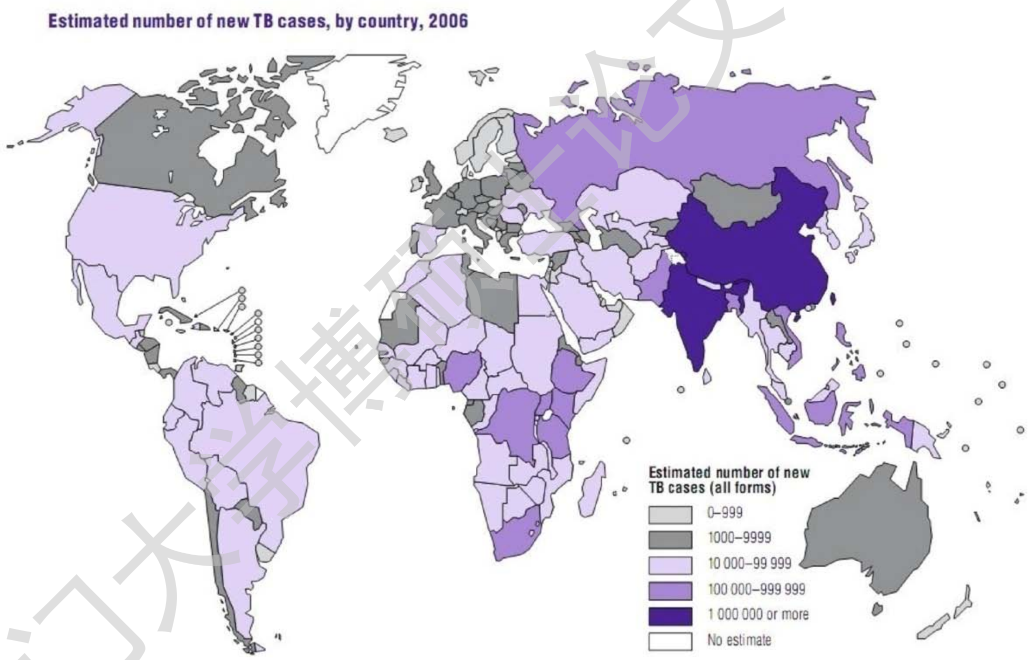

图 1　　世界范围的结核病流行情况[2]

Fig.1　 Worldwide prevalence of tuberculosis

结核感染后大部分成为无症状感染者，约 10%会发展为活动性结核。无症状感染者如果免疫能力低下（免疫系统发育不全、衰退、或免疫抑制等）则较易发展成活动性结核，是隐形感染者中的高危人群。因此，对潜伏性结核感染的病患（Latent tuberculosis infection, LTBI）的检出，将极大地影响着全球结核病预防控制的效果。

现有结核诊断方法的种种缺陷，需要一种替代的结核诊断方法[3-5]。科学家后

厦门大学博硕士论文摘要库

来发现，细胞因子 γ-干扰素（IFN-γ）和结核病之间有极密切的联系[6-8]，并基于此开发了一种新型的结核诊断试剂。

本研究将通过介绍细胞因子 IFN-γ 和结核病之间的关系，进一步深入研究了这种新型的基于 IFN-γ 的结核诊断技术。该项技术将祢补现有诊断方法的不足，为结核病的防控及结核病人的及早治疗提供帮助。

第 1 节　IFN-γ 的发现与结核病的关系

1　IFN-γ 的发现

Isaass 等[9]在病毒干扰现象的过程中发现，将灭活的流感病毒植入鸡胚毛尿囊膜，能使鸡胚获得抗流感病毒的能力，并且释放了一种干扰病毒活性的因子，遂将这种因子命名为干扰素（Interferon, IFN）。随着研究的深入，现在干扰素比较完善的定义是：干扰素是由多种诱导剂（如病毒、细胞、上游细胞因子等）诱导产生的具有广谱抗病毒、抗肿瘤、具有免疫调节功能的一类蛋白质。人体体内至少含有 3 种干扰素，分别是 IFN-α，IFN-β，IFN-γ。

IFN-γ 是一种能抗病毒、抗细菌、对靶细胞有免疫调节作用的二聚体蛋白[10]。人类的 IFN-γ 基因位于 12 号染色体长臂 1 区 4 带（12q14），全 长 6kb，包含 4 个外显子和 3 个内含子。IFN-γ 在 SDS-PAGE 上表现的分子量为 20～25kD，成熟的单体含有 127～143 个氨基酸。IFN-γ 没有二硫键，仅依靠范德华力相互作用，活性形式是二聚体或四聚体，单体没有活性。IFN-γ 有 2 个可能的糖基化位点（25，97），IFN-γ 有 2 个碱性氨基酸区（aa.86～90，aa.128～132），与其酸不稳定性有关。IFN-γ 没有 β-片层结构，每个单体有 10 个 α-螺旋（图 2）。

厦门大学博硕士论文摘要库

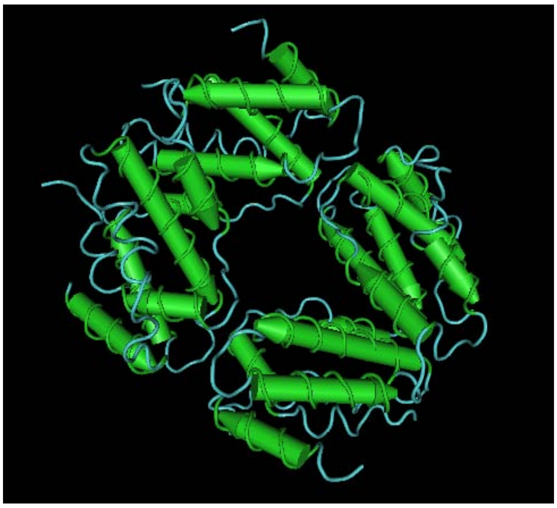

图 2　重组人 IFN-γ 的 X 射线晶体衍射结构模拟图[11]

Fig.2　X-ray crystal structure of recombinant human interferon-gamma

2　IFN-γ 与结核病

全世界结核的感染率极高，但是发病的个体只占感染人数的十分之一。这意味着人体能提供保护机制抑制、清除体内细菌。这些免疫保护主要由 Th1 细胞介导的，而 IFN-γ 也是关键的免疫保护因子。

有研究显示，当用 BCG（Mycobacterium bovis *Bacillus Calmette-Guerin*）感染 C57BL/6 小鼠，发现能分泌 IFN-γ 的 NK（$CD3^-NK1.1^+$）细胞无明显增加，而分泌 IFN-γ 的 T 细胞（$CD3^+NK1.1^-$）增加 6 倍[6]。进一步研究发现，不仅 $CD4^+$T 细胞并且 $CD8^+$T 细胞都能在结核分枝杆菌感染机体后分泌 IFN-γ[7, 8]。IFN-γ 在抑制结核分枝杆菌的感染与复制过程中的作用不可或缺。

第 2 节　结核分枝杆菌抗原的细胞递呈及 IFN-γ 的产生

1　结核分枝杆菌抗原的细胞递呈过程

抗原的递呈过程一般包含有两个途径（图 3，图 4）：

厦门大学博硕士论文摘要库

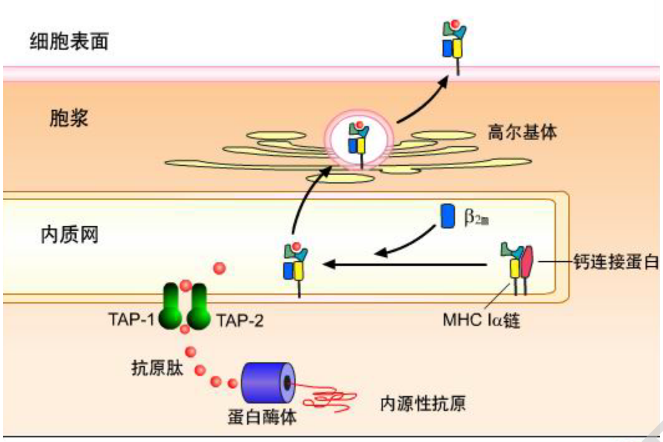

图 3　　内源性抗原的递呈过程

Fig.3　The presentation pathway of endogenous antigens

内源性抗原经蛋白酶体的降解，切割成约 9a.a.的短肽，短肽被 TAP-1/TAP-2 运输到内质网，与内质网内已表达好的 MHC-Ⅰ分子结合，形成 MHC/肽复合物，复合物经高尔基体的修饰后，经外吐小泡递呈到细胞表面。

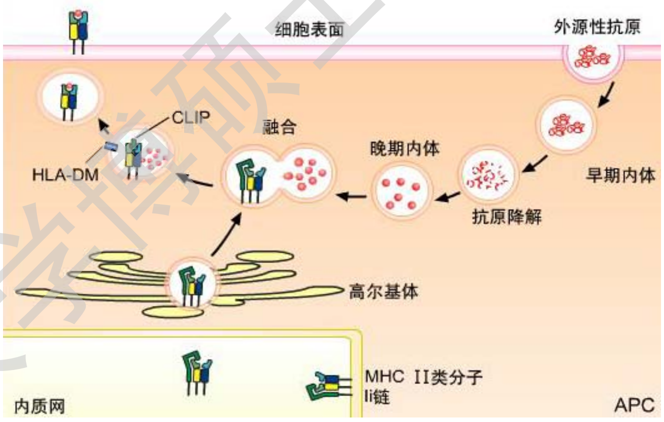

图 4　　外源性抗原的递呈过程

Fig.4　The presentation pathway of exogenous antigens

另一个途径是与 MHC-Ⅱ分子结合。因结核菌破碎后成为外原性抗原，被吞噬到细胞内后，在溶酶体内被降解为约 12a.a.的短肽，短肽在晚期内体内与分泌出来的 MHC-Ⅱ分子结合，复合体被递呈到细胞表面。

结核分枝杆菌作为一种兼性内生菌，主要寄生在巨噬细胞内。结核分枝杆菌的相关抗原不仅能作为外源抗原，还可以作为内源抗原进行递呈。结核分枝杆菌在巨噬细胞内，主要寄生于特定吞噬体中并能抑制吞噬体的成熟、吞噬体与溶酶体的融合、能抑制吞噬体的酸化和吞噬体肌动蛋白的组装。McDonough 等[12]就

厦门大学博硕士论文摘要库

验证了结核分枝杆菌能从吞噬溶酶体逃到未融合的空泡或细胞质中来逃避巨噬细胞的杀菌机制。

在抗结核分枝杆菌的细胞免疫过程中，主要起作用的抗原递呈细胞（Antigen presenting cells, APCs）是巨噬细胞和树突状细胞（Dendritic cells，DCs）。在APCs递呈结核分枝杆菌特异抗原之后，需要通过特定的激活通路激活下游T细胞。在T细胞的免疫识别过程中，TCR/CD3复合体可以识别APC递呈的MHC/肽复合物，并且在T细胞和APC细胞间形成了复杂的超分子活化簇（superamolecular activation cluster, SMAC）结构，称之为免疫突触（immunological synapse, IS）。T细胞活化需要同时拥有3种信号：①抗原递呈细胞（或靶细胞）表面的MHC/抗原肽复合物与T细胞的表面受体TCR结合；②抗原递呈细胞表面B7分子与T细胞表面CD28黏附分子结合形成第二信号；③一些细胞因子被认为是T细胞活化的第三信号。

1.1 CD4$^+$T 细胞

结核分枝杆菌是兼性内生菌，会通过MHC-Ⅱ途径激活CD4$^+$T细胞。CD4$^+$T细胞是T-辅助细胞（Th1），激活后主要产生的细胞因子是IFN-γ，IFN-γ是激活巨噬细胞吞噬结核分枝杆菌的中心细胞因子，因此对抑制结核病的发展有重大作用。

1.2 CD8$^+$T 细胞

Schaible等[13]证明了结核分枝杆菌感染了巨噬细胞后促进巨噬细胞凋亡，释放囊泡（vesicles），凋亡囊泡被未感染的抗原递呈细胞（APCs）吞噬后通过MHC-Ⅰ途径和CD-1b参与的激活过程从而激活CD8$^+$T细胞。这种特殊的抗原递呈途径有效地保证有足够的MHC-Ⅰ类系统对结核抗原进行递呈，抗原转运对于启动CD8$^+$T激活过程是十分重要的。

1.3 非常规 T 细胞的免疫反应

还有些非常规的T细胞，它们也参与了结核分枝杆菌的免疫过程。如，有研究表明某些非典型人类白细胞抗原(HLA)分子限定性 CD8$^+$T 细胞参与了人类抗

厦门大学博硕士论文摘要库

Degree papers are in the "Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database". Full texts are available in the following ways:
1. If your library is a CALIS member libraries, please log on http://etd.calis.edu.cn/ and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库