

· 论著 ·

文章编号: 1007-8738(2013)05-0542-04

检测结核分枝杆菌蛋白抗原 b 夹心 ELISA 的建立及其应用

雷蕾^{1,2}, 宋波², 李琦³, 史明¹, 边婷¹, 杨毅宁¹, 李娜³, 宋朝君³, 赵钢^{1*}

(1第四军医大学西京医院神经内科, 陕西 西安 710032; 2中铁二十局中心医院, 陕西 咸阳 712000; 3第四军医大学免疫学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 建立定量检测脑脊液中结核分枝杆菌蛋白抗原 b 的夹心 ELISA, 以便于诊断结核性脑膜炎。方法 制备抗结核分枝杆菌蛋白抗原 b 鼠源性单克隆抗体 (mAb) 及兔多克隆抗体; 以单克隆抗体为包被抗体, 多克隆抗体为检测抗体, 建立检测结核分枝杆菌蛋白抗原 b 的双抗体夹心 ELISA; 应用此方法检测正常人 ($n=6$)、非结核性脑膜炎患者 ($n=26$) 及临床确诊结核性脑膜炎患者 ($n=42$) 的脑脊液标本中蛋白抗原 b 的含量, 并分析其与结核性脑膜炎活动性感染的相关性。结果 成功建立了检测蛋白抗原 b 的夹心 ELISA, 敏感度可达 $0.4 \mu\text{g/L}$ 。应用该方法在正常人及非结核性脑膜炎患者脑脊液中未检测到蛋白抗原 b; 在结核性脑膜炎患者脑脊液中蛋白抗原 b 含量显著升高。结论 建立了敏感、特异检测结核分枝杆菌蛋白抗原 b 含量的 ELISA, 为活动性结核性脑膜炎的诊断提供一种有效手段。

[关键词] 结核分枝杆菌蛋白抗原 b; 结核性脑膜炎; 抗体制备; 夹心 ELISA

[中图分类号] R392.33, R378.91*1 **[文献标志码]** B

结核性脑膜炎 (tuberculous meningitis, TBM) 是由结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 引起的脑膜非化脓性炎症, 是一种严重的中枢神经系统感染性疾病。约有 7% ~ 12% 的肺结核患者伴发 TBM。TBM 是单一致病菌死亡率最高的疾病, 可达 20% ~ 50%, 另外有 20% ~ 30% 有永久性后遗症。TBM 从临床表现分为活动性感染与潜伏性感染。结核活动性感染 (active tuberculosis infection, ATBI) 是有明显临床症状的新近感染结核; 结核潜伏感染 (latent tuberculosis infection, LTBI) 是体内存在 MTB, 但处于休眠状态。全世界每年有 1/3 的人为结核感染者^[1], 约 90% 为 LTBI, 但在一定条件下, 如免疫力低下等会转化为 ATBI。结核性脑膜炎与非结核性脑膜炎在临床表现、脑脊液生化检查及影像学检查等方面常存在诸多易混淆之处。如无明确结核接触史, 不明显的临床表现, 不典型的影像学以及脑脊液细胞学检测结果等, 给临床早期诊治带来困难。而感染 MTB 的 LTBI 患者第 1 年约有 3% ~ 5% 转变为 ATBI, 以后每年约有 5% ~ 15% 的 LTBI 转变为 ATBI^[2]。在 TBM 的诊断方面, 研究者把更多的目光集中在患者体内产生的针对 TB 抗原的抗体上, 这一类抗体具有很高灵敏度和特异性^[3]。而结核分枝杆

菌的蛋白抗原 b 因其具有的强免疫原性成为结核分枝杆菌抗原的研究热点^[1,3]。研究表明当 TBM 活动性感染时患者体内抗蛋白抗原 b 的抗体水平明显增高^[4]。

蛋白抗原 b (protein antigen b, pab) 是结核分枝杆菌一种相对分子质量 (M_r) 38 000 的蛋白, 是一种磷酸盐转运蛋白, 分子上有多个 b 抗原表位。1990 年 Andersen 等^[5]从 MTB 中克隆了该蛋白的基因, 认为蛋白抗原 b 可在致病的分枝杆菌中检出, 而在卡介苗中只能检出痕量。有研究显示, 检测针对蛋白抗原 b 的抗体在肺结核患者中灵敏度为 88%, 特异度在 96.5%^[6]。1992 年, Bothamley 等^[7]发现蛋白抗原 b 对诊断肺结核具有重要的价值。1997 年, Wilkinson 等^[8]观察 292 例结核患者及 58 例对照发现, 患者血清中抗蛋白抗原 b 抗体阳性者为 72.6%, 特异度为 94.9%。然而, Pottumarthy 等^[9]研究却显示, 蛋白抗原 b 的特异度在不同组分中从 27% ~ 89% 不等, 显示其特异度并不稳定; 但相比较单个分泌蛋白, 蛋白抗原 b 的抗原性较强。另外, Mark 等^[10]通过蛋白质芯片对患者血清进行筛查时发现, 蛋白抗原 b 是空洞性肺结核特有的抗原之一。以上结果均提示, 蛋白抗原 b 是机体感染 MTB 的一个

收稿日期: 2012-10-30; 接受日期: 2013-01-31

基金项目: 陕西省科技统筹创新工程计划 (2011KTCG03-12)

作者简介: 雷蕾 (1980-), 女, 陕西蓝田人, 硕士

Tel: 029-84775368; E-mail: yutian1112@163.com

* Corresponding author, 赵钢, E-mail: zhaogang@fimmu.edu.cn

重要标志。

然而,目前针对蛋白抗原 b 的研究侧重于检测结核患者血清中的抗蛋白抗原 b 抗体,尚未见有直接检测蛋白抗原 b 的方法。另外, TBM 患者脑脊液相关指标的变化明显早于血清学变化,可能是早期诊断 TBM 重要检材。本研究在建立定量检测蛋白抗原 b 夹心 ELISA 的基础上,定量检测结核患者脑脊液中蛋白抗原 b 的含量,以期对 TBM 患者的早期诊断提供有效的方法。

1 材料和方法

1.1 材料 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠由第四军医大学实验动物中心提供;蛋白抗原 b 为解放军 309 医院结核病防治中心惠赠; RPMI1640 干粉购自 HyClone 公司;新生牛血清(NCS)购自杭州四季青生物工程材料研究所;小鼠骨髓瘤细胞系 Sp2/0 细胞株由第四军医大学免疫学教研室保存; HAT、HT、弗氏完全和不完全佐剂购自 Sigma 公司;抗体亚类测定试剂盒购自 Pierce 公司; 96 孔 ELISA 板购自 Costar 公司; TMB 购于 eBioscience 公司;酶标仪为 Bio-Rad 公司产品。辣根过氧化物标记的小鼠抗兔酶标单克隆抗体(mAb, HRP-2F11)为第四军医大学免疫教研室制备。收集 42 例确诊结核性脑膜炎患者脑脊液标本(MTB 培养及抗酸染色阳性), 26 例非结核性脑膜炎患者,及 6 例正常人的脑脊液标本, 3 000 r/min 离心 5 min, 每管 120 μ L 分装后冻存于 -70°C 。

1.2 方法

1.2.1 分泌抗蛋白抗原 b mAb 杂交瘤细胞株的建立及初步鉴定 按照常规进行免疫、细胞融合、筛选、克隆化、腹水制备、抗体纯化和 Ig 亚类鉴定^[11-12]。简述如下:将重组蛋白抗原 b 纯化蛋白 100 μ g 溶于 1 mL 生理盐水中,与等量弗氏完全佐剂充分乳化,皮下多点注射 4 只雌性 BALB/c 小鼠。间隔 4 周再次免疫,剂量同前,与弗氏不完全佐剂充分乳化皮下多点注射。3 周后将重组蛋白抗原 b 纯化蛋白 100 μ g 溶于 2 mL 生理盐水中腹腔注射行第 3 次免疫。第 3 次免疫后 10 d 采集免疫血清用间接 ELISA 测定特异性抗体效价。融合前 3 d 加强免疫 1 次(20 μ g/只)。无菌取脾,按常规杂交瘤融合技术进行细胞融合, HAT 选择培养基筛选,用间接 ELISA 检测细胞上清,用有限稀释法进行克隆化。经过 3~4 次克隆化,得到稳定分泌特异性单克隆抗体的细胞株。常规制备腹水、纯化抗体和鉴定抗体亚类。

1.2.2 蛋白抗原 b 多克隆抗体的制备及鉴定 按 100 μ g/只的剂量,将重组蛋白抗原 b 蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,免疫 2 只健康雌性新西兰白兔,于双后腿足趾、双后腿窝淋巴结、背部皮内和背部皮下多点注射,共免疫 5 次,分别第 1、2、3、5 及 7 周免疫,末次免疫后 2 周采血,分离血清,以饱和硫酸铵盐析初步纯化 IgG。采用 ELISA 检测多克隆抗体效价。将抗体分装于 -80°C 冻存备用。

1.2.3 检测蛋白抗原 b 的双抗体夹心 ELISA 的建立 用包被缓冲液(0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH9.6)将蛋白抗原 b mAb 稀释至 10 mg/L, 每孔 100 μ L 加至酶标板, 4°C 放置 48 h。洗涤液(0.15 mol/L PBS 加入体积比为 0.5 mL/L 的 Tween-20)洗涤 3 次;用抗体稀释液(0.15 mol/L PBS 加入体积比为 30 mL/L 的胎牛血清)倍比稀释蛋白抗原 b 标准品(50 μ g/L 起始,共 8 个浓度,末孔浓度为 0.39 μ g/L)后加入酶标板,每孔 100 μ L, 37°C 孵育 1 h, 洗涤液洗涤 3 次;加入 1:1 000 倍稀释的蛋白抗原 b 多克隆抗体,每孔 100 μ L 加至酶标板, 37°C 孵育 1 h, 洗涤液洗涤 3 次;用抗体稀释液将小鼠抗兔酶标 mAb (HRP-2F11) 1:4 000 稀释^[13], 每孔 100 μ L 加至酶标板, 37°C 孵育 40 min, 洗涤 3 次后加入 TMB 底物显色液, 37°C 显色 15 min 后, 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 450 nm 波长下测定吸光度(A)值。绘制检测蛋白抗原 b 的标准曲线。

1.2.4 结核性脑膜炎患者脑脊液标本的检测及统计学分析 用建立的检测蛋白抗原 b 的 ELISA, 检测 TBM 脑脊液, 用非 TBM 和正常人脑脊液作为对照。在标准曲线上选取满足条件的数据(线性回归系数 $r > 0.999$) 进行回归分析, 建立线性回归方程。将样本吸光度值代入方程求出样本中蛋白抗原 b 浓度。检测结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间差异显著性比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分泌抗蛋白抗原 b mAb 杂交瘤细胞株的建立及 mAb 和多抗的特性鉴定 获得 1 株可稳定分泌抗蛋白抗原 b mAb 的杂交瘤细胞 FMU-38kDa, 间接 ELISA 测定腹水的效价为 10^{-7} , 为 IgG1(κ); 血清多克隆抗体通过间接 ELISA 测定的效价为 10^{-5} 。

2.2 检测 3 蛋白抗原 b 双抗体夹心 ELISA 方法的建立 以 FMU-38kDa mAb 作为包被抗体, 浓度为 10 mg/L, 多克隆抗体作为检测抗体配对, 以 HRF-鼠抗兔 mAb 进一步放大, 建立的夹心 ELISA, 敏感性可达 0.4 μ g/L, 标准曲线见图 1。

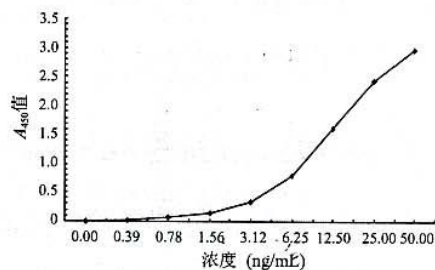


图 1 夹心 ELISA 检测蛋白抗原 b 的标准曲线

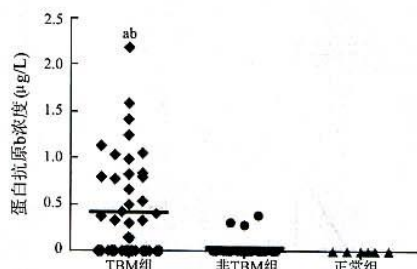
2.3 一般临床资料 TBM 组与非 TBM 组和正常对照组在年龄、性别以及合并症(高血压、高血脂、脑梗死)等方面见表 1。

表1 三组研究对象一般临床资料

	TBM组 (n=42)	非TBM组 (n=32)	正常组 (n=6)
年龄(岁)	29.7±1.6	32.4±3.3	30±2.4
男/女	20/22	16/10	2/4
合并症			
高血压, n(%)	2(4)	3(9)	0(0)
高血脂, n(%)	1(2)	2(6)	0(0)
脑梗死, n(%)	1(2)	1(3)	0(0)

2.4 TBM患者脑脊液蛋白抗原b水平明显升高

夹心ELISA结果显示, TBM患者脑脊液蛋白抗原b水平(0.42 ± 0.53) $\mu\text{g/L}$ 较之非TBM组(0.08 ± 0.03) $\mu\text{g/L}$ 显著升高($P < 0.05$, 图2), 正常人脑脊液中未检出。以蛋白抗原b为依据诊断TBM的灵敏度为57.1%, 特异度为93.7%。



* $P < 0.05$ vs 非TBM组; ^b $P < 0.01$ vs 正常组。

图2 TBM组、非TBM组与正常组脑脊液中蛋白抗原b含量的比较

3 讨论

目前虽有不少结核性脑膜炎诊断的方法, 如细菌学检查、PCR法和PCR斑点杂交法等。细菌学检查是发现传染源的主要途径和手段, 也是确定结核病诊断和化疗方案的重要依据。其中, 涂片找抗酸杆菌是最常用和经济的方法, 但敏感性低、特异性差, 无法辨别死菌与活菌, 通常需5 000~10 000菌/mL的浓度时才能得到阳性结果。结核杆菌培养仍是目前诊断TBM的金标准, 尤其是药敏实验结果在指导临床用药及耐药性监测等方面具有重要作用, 但其耗时太长。而PCR法和PCR斑点杂交法是以核酸扩增技术为基础的分子生物学诊断技术, 其具有快速、灵敏特异的优点, 非常适合结核分枝杆菌这类生长缓慢细菌的快速诊断; 但还存在一定程度的不稳定性^[14]。由于上述原因, 致使结核病细菌学检查一直不能满足临床诊治的需求。

研究表明, *M. 38 000*的蛋白(蛋白抗原b)是结核分枝杆菌一个重要蛋白分子, 与结核菌致病性密切相关^[3-4, 7, 10]。在本研究中, 通过建立蛋白抗原b夹心ELISA, 以快速灵敏地诊断活动性TBM。结果

发现, 蛋白抗原b检测TBM的灵敏度为57.1%, 特异度为93.7%。结合患者临床资料显示, 在TBM活动期蛋白抗原b含量明显升高, 而在正常人及非结核性脑膜炎患者脑脊液中呈低水平, 说明蛋白抗原b与结核菌活动性和致病性相关。另外, 在本研究中的检材是脑脊液而不是血清, TBM患者脑脊液是最早发生改变的体液, 所以更有利于TBM的早期诊断。

综上所述, 建立的检测结核分枝杆菌蛋白抗原b抗原夹心ELISA可在较短时间内快速诊断TBM, 同时所需脑脊液标本量少且简单实用。但此方法的灵敏度仍不够高, 有待进一步改进; 另外还可能与标本采集、保存方式的不一致有关。今后还需扩大临床样本, 并可结合化学发光酶免疫检测方法进一步提高敏感性。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2012 [EB/OL]. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75938/1/9789241564502_eng.pdf, 2012-06/2013-01-30.
- [2] Wright A, Zignol M, Van Deun A, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002-07: an updated analysis of the global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance [J]. *Lancet*, 2009, 373(9678): 1861-1873.
- [3] Laal S, Skeiky YA. Immune-based methods, in *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus* [M]. American Society for Microbiology Press, Washington, D. C. 2005: 71-83.
- [4] Silva VM, Kanaujia G, Gennaro ML, et al. Factors associated with humoral response to ESAT-6.38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis [J]. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2003, 7(5): 478-484.
- [5] Andersen AB, Ljungqvist L, Olsen M, et al. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism [J]. *J Gen Microbiol*, 1990, 136(3): 477-480.
- [6] 何秀云, 庄玉辉, 张晓刚, 等. 结核分枝杆菌重组38 000抗原蛋白的免疫原性特征 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2000, 23(8): 485-488.
- [7] Bothamley GH, Rudd R, Festenstein F, et al. Clinical value of the measurement of *Mycobacterium tuberculosis* specific antibody in pulmonary tuberculosis [J]. *Thorax*, 1992, 47(4): 270-275.
- [8] Wilkinson RJ, Haslov K, Rappueli R, et al. Evaluation of the recombinant 38-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* of fl potential immunodiagnostic reagent [J]. *J Clin Microbiol*, 1997, 35(3): 553-557.
- [9] Pottumarthy S, Wells VC, Morris AJ. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(6): 2227-2231.
- [10] Mark J, Sartain MJ, Slayden RA, Singh KK, et al. Disease state

- differentiation and identification of tuberculosis biomarkers via native antigen array profiling[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5(11): 2102-2113.
- [11] 刘莹,李德敏,徐小宁,等. 抗CD1d单克隆抗体的制备及其识别结构域的鉴定[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(10): 959-960.
- [12] 张葵,李永明,宋朝君,等. 抗大肠杆菌分子伴侣GroEL单克隆抗体的制备和鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2008, 24(2): 155-157.
- [13] 张葵,汪涛. 小鼠抗兔IgG单克隆抗体的制备与应用[J]. *标记免疫分析与临床*, 2008, 15(1): 47-49.
- [14] Shankar P, Manjunath N, Mohan KK, et al. Rapid diagnosis of tuberculosis meningitis by polymerase chain reaction[J]. *Lancet*, 1991, 337(8732): 5-7.

(上接 541 页)

B组和C组中,PHA具有刺激机体产生IL-2、干扰素以及非特异性抗体的能力^[7]。IL-12和IL-18均具有较强诱导IFN- γ 产生的能力,IFN- γ 再作用于免疫细胞产生肿瘤清除效应^[8-9];IL-18还能增强Fas介导的细胞毒作用从而表现出积极的抗肿瘤活性^[11-12]。

本实验结果表明,B组和C组的扩增倍数均显著高于A组。流式细胞仪分析结果显示,培养至第21天时,B组和C组的CIK细胞中CD3⁺CD8⁺细胞和CD3⁺CD56⁺细胞百分比明显高于A组。同时杀瘤活性与细胞表型变化具有正相关性,即随着时间的延长CD3⁺CD8⁺细胞和CD3⁺CD56⁺细胞百分比越高,对肿瘤细胞株的杀伤活性越高,并且B组和C组明显高于A组。

综上所述,采用改良法制备的CIK细胞,其扩增倍数、细胞毒活性以及体外杀瘤活性均有显著提高,此结果为今后制备高活性的CIK细胞提供了方法,为增强CIK细胞杀瘤活性和提高CIK细胞临床应用的疗效提供了实验依据。但其体内杀瘤活性以及机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Schmidt-Wolf IG, Negrin RS, Kiem HP, et al. Use of a SCID mouse/human lymphoma model to evaluate cytokine induced killer cells with potent antitumor cell activity[J]. *J Exp Med*, 1991, 174(1): 139-149.
- [2] 艾军,白引苗,李巧霞,等. CIK体内外抗HeLa宫颈癌细胞的作用及其荷瘤小鼠体内分布特点[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2012, 19(4): 374-380.
- [3] 张静,刘亮,于京浦,等. 细胞因子诱导的杀伤细胞治疗肾细胞癌临床疗效的评价[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(5): 480-484.
- [4] Mesiano G, Todorovic M, Gammaitoni L, et al. Cytokine-induced killer (CIK) cells as feasible and effective adoptive immunotherapy for the treatment of solid tumors[J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2012, 12(6): 673-684.
- [5] Llanes-Coronel DS, Gómez-Díaz LY, Suarez-Quintero LP, et al. New promising Euphorbiaceae extracts with activity in human lymphocytes from primary cell cultures[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2011, 33(2): 279-290.
- [6] 丛丽媛,杨海燕,周士吉,等. IFN- γ 与IL-12诱导CIK细胞生物学活性的比较研究[J]. *现代免疫学*, 2010, 30(5): 428-431.
- [7] 邹征云,刘宝瑞,钱晓萍,等. 从50 mL外周血中高效扩增CIK方法的探讨[J]. *肿瘤防治杂志*, 2005, 12(7): 515-518.
- [8] Munk RB, Sugiyama K, Ghosh P, et al. Antigen-independent IFN- γ production by human naive CD4 T cells activated by IL-12 plus IL-18 [J/OA]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e18553.
- [9] 刘季芳,刘枫,祁岩超,等. IFN- γ 逆转免疫编辑后人肺癌A549对CIK杀伤敏感性的研究[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(4): 354-356.
- [10] 杨新宇,肖佩玲,方亦兵,等. IL-21和IL-18对脐血来源的CIK细胞体外作用研究[J]. *湖南师范大学自然科学学报*, 2010, 33(3): 97-102.
- [11] 于满学,王晓非,陈涓涓. IL-12和IL-18对系统性红斑狼疮患者NKT细胞的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(7): 687-688.