

DOI:10.13350/j.cjpb.231109

• 论著 •

结核分枝杆菌 MPT64 双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立及初步应用*

谢燕玲^{1,2}, 宁唤唤^{2,3}, 路廷之², 康健², 白鹭^{1,2}, 代婷^{1,2}, 胡家豪⁴, 徐子晴⁴, 刘博^{1**}, 柏银兰^{2**}

(1. 延安大学生命科学学院, 陕西延安 716000; 2. 空军军医大学基础医学院微生物与病原生物学教研室;

3. 空军军医大学军事医学创新中心; 4. 空军军医大学基础医学院学员第五大队)

【摘要】 目的 建立结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)分泌蛋白 MPT64 的双抗体夹心 ELISA 检测方法并评价初步应用效果。方法 采用间接 ELISA 和 ELISA 叠加试验在各株抗 MPT64 mAb 中筛选出亲和力和较高的识别不同抗原表位的配对抗体; Protein A 亲和层析纯化配对的 2 株 mAb 腹水, 其中 1 株 mAb 偶联生物素(Biotin)作为检测抗体, 另 1 株作为捕获抗体, 棋盘滴定法优化捕获抗体和检测抗体的工作浓度, 建立双抗体夹心 ELISA 方法; 以常规条件作为初始反应条件, 依次优化包被、封闭、抗原、抗体以及底物反应环节的条件; 以 MPT64 抗原检测评估建立的 ELISA 方法的检测限、线性范围、精确性、准确性和特异性; 采用该方法检测 Mtb H37Ra 不同阶段培养上清中 MPT64 含量, 初步评价应用效果。结果 ELISA 法成功筛选出配对抗体 H2F4 和 A5B2 mAb; 液相色谱法从腹水中纯化获得的 mAb 滴度分别为 1:102 400、1:51 200。以生物素偶联的 A5B2 mAb 作为检测抗体, 以 H2F4 mAb 为捕获抗体, 建立并优化 MPT64 双抗体夹心 ELISA 方法, 确定的试验条件为: 1. 25 μg/mL H2F4 mAb 包被酶标板, 4 °C 静置过夜, 洗涤; 2% BSA 室温封闭 1 h, 洗涤; 加入待测样品室温孵育 2 h, 洗涤; 加入 2.5 μg/mL Biotin-A5B2 mAb 室温孵育 2 h, 洗涤; 加入 0.5 μg/mL Avidin-HRP 室温孵育 1 h, 洗涤; 加入 TMB 显色检测。该 ELISA 方法对 MPT64 蛋白的检测下限为 39 ng/mL, 线性范围为 39~1 250 ng/mL, 具有良好的特异性; 该方法检测 Mtb 培养物, 第 12 d 培养上清呈阳性反应。

结论 建立的 Mtb MPT64 双抗体夹心 ELISA 方法精确性、准确性、特异性良好, 可用于 MPT64 定量检测和 Mtb 生长检测, 为 TB 快速诊断试剂的研制提供了实验依据。

【关键词】 结核分枝杆菌; 分泌抗原; MPT64; 单克隆抗体; 双抗体夹心 ELISA

【中图分类号】 R378.91

【文献标识码】 A

【文章编号】 1673-5234(2023)11-1284-07

[*Journal of Pathogen Biology*. 2023 Nov.; 18(11):1284-1290.]

Establishment and preliminary application of *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 double-antibody sandwich ELISA

XIE Yanling^{1,2}, NING Huanhuan^{2,3}, LU Yanzhi², KANG Jian², BAI Lu^{1,2}, DAI Ting^{1,2}, HU Jiahao⁴, XU Ziqing⁴, LIU Bo¹, BAI Yinlan² (1. School of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an 716000, China; 2. Department of Microbiology and Pathogen Biology, School of Basic Medicine, Air Force Medical University; 3. Military Medical Innovation Center, Air Force Medical University; 4. Cadets of the 5th Brigade, School of Basic Medicine, Air Force Medical University) ***)

【Abstract】 **Objective** In order to establish a double-antibody sandwich ELISA for *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) secreted protein MPT64, and its preliminary application was explored. **Methods** Indirect ELISA and ELISA double antibody binding system were used to screen paired antibodies with high affinity and recognition of different epitopes from several anti-MPT64 mAbs. Protein A affinity chromatography purified paired two ascites mAbs. One of the two mAbs was conjugated with biotin and used as the detection antibody, and another mAb was used as the capture antibody. The checkerboard titration was used to optimize the concentration of capture antibody and detection antibody, and the double antibody sandwich ELISA was established. The conventional conditions were used as the initial reaction conditions, and the conditions of coating, blocking, antigen-antibody and substrate reaction links were optimized gradually. MPT64 antigen detection was used to evaluate the key parameters such as detection limit, linear range, precision, accuracy and specificity of the ELISA system established by this institute. The system was applied to analyse the content of MPT64 in the cul-

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81971560, 82272343); 国家“十三五”重大传染病专项课题(No. 2018ZX10302302002004); 陕西省重点课题(No. 2022ZDLSF01-07)。

** **【通讯作者】** 柏银兰, E-mail: yinlanbai@fmmu.edu.cn; 刘博, E-mail: liubo4552@126.com

【作者简介】 谢燕玲(1996-), 女, 江西瑞金人, 在读硕士研究生。研究方向: 结核分枝菌感染与免疫。E-mail: 1461226322@qq.com

ture supernatant at different stages of Mtb H37Ra growth. **Results** The paired antibodies of anti-MPT64 H2F4 and A5B2 mAb were successfully screened by ELISA. The purified mAbs were obtained by liquid chromatography. The antibody titers of the mAbs were 1 : 102 400 and 1 : 51 200. The MPT64 double antibody sandwich ELISA method was established, with biotin-coupled A5B2 mAb as detection antibody and H2F4 mAb as trapping antibody. The conditions of ELISA method were optimized as follows, 1. 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ H2F4 mAb coated enzyme plate, 4 $^{\circ}\text{C}$ overnight, washed, 2% BSA blocked at room temperature for 1 h, washed, samples were incubated for 2 h at room temperature, washed, 2. 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Biotin-A5B2 mAb incubation at room temperature for 2 h, wash, 0. 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Avidin-HRP incubation at room temperature for 1 h, wash, TMB chromogenic detection. The lower limit of detection of MPT64 of ELISA system was 39 ng/mL, the linear range was 39-1 250 ng/mL, which had good specificity. This ELISA method was used to detected MPT64 of Mtb culture, and showed that was linearly positively correlated with the number of viable bacteria. 12 days culture of Mtb was tested positive of MPT64 by this ELISA method. **Conclusion** The Mtb MPT64 double-antibody sandwich ELISA established in this study has good accuracy, accuracy and specificity, which can be used for MPT64 quantification and Mtb growth detection, which provides a theoretical and experimental basis for the development of TB rapid diagnostic reagents.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; secreted antigen; MPT64; monoclonal antibody; double-antibody sandwich ELISA

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 感染引起的结核病 (tuberculosis, TB) 是危害严重的慢性传染病^[1]。据 WHO 发布的《结核病报告》，2021 年全球新发 TB 感染 1 060 万人，因病死亡约 160 万人^[2]。Mtb 培养阳性为 TB 诊断的“金标准”，但存在耗时长 (3~4 周)、阳性检出率低 (约 30%) 的局限性^[3]。抗酸染色可用于鉴定分枝杆菌，但无法区分 Mtb 或非结核分枝杆菌 (Non-tuberculous mycobacteria, NTM) 感染^[4]。结核菌素皮肤试验 (Tuberculin skin test, TST) 操作简单，但其敏感性和特异性不高，且无法区分卡介苗 (Bacille Calmette-Guerin, BCG) 接种与 Mtb 或 NTM 感染^[5]。近年来，WHO 推荐的 γ -干扰素释放试验 (Interferon- γ release assay, IGRA) 和核酸分子检测诊断方法 (Xpert) 显著提高了 TB 诊断阳性率^[6]。IGRA 敏感性和特异性较高，但操作复杂且需要专门设备检测，限制了其在欠发达地区的推广使用。Xpert 诊断可快速检出 Mtb 并同时分析是否为耐药菌的优点，但其敏感性仍有待提高^[7]。因此，仍需研制用于早期 Mtb 感染的快速诊断新方法和技术。

MPT64 为 Mtb 生长繁殖时期分泌的主要蛋白之一^[8]，由 Mtb H37Rv 差异编码区 2 (Regions of difference, RD2) 中 Rv1980c (mpt64) 基因编码。MPT64 仅存在于 Mtb 中，而不存在于 BCG 和绝大多数 NTM 中^[9]。基于偶联碱性磷酸酶的鼠源抗 MPT64 单克隆抗体 (Monoclonal antibody, mAb) 建立的超敏 ELISA，对 TB 患者痰液检测的敏感性和特异性分别可达 88. 0% 和 96. 7%^[10]。MPT64 抗原检测法 (SD Bioline Ag MPT64 Rapid?) 检测 Mtb 培养物的敏感性为 97%，特异性为 99%^[11]。在 I 期和 II 期临床研究中，以 MPT64 抗原固定于活动性 TB 患者前臂皮肤，其诊断敏感性和特异性分别为 85% 和 100%^[12]。

此外，MPT64 还可诱发 Mtb 感染豚鼠产生迟发型超敏反应，可用于 TST 辅助 TB 的诊断^[9]。因此，MPT64 被认为是具有应用潜能的 TB 早期诊断抗原之一。

本研究从已制备的小鼠抗 MPT64 mAb^[13] 中选择 2 株高亲和力抗体，建立 MPT64 双抗体夹心 ELISA 检测方法，并评价其初步应用效果，为 MPT64 mAb 用于 Mtb 感染诊断提供实验依据。

材料与方法

1 材料

鼠源抗 MPT64-A5B2 mAb、H2F4 mAb 由本实验室制备^[13]；HRP-Avidin 和生物素 (Biotin) 偶联试剂盒购自上海生工生物工程有限公司；TMB 显色液购自北京天根生物科技有限公司；脱脂奶粉，牛血清蛋白 (BSA)，Middlebrook 7H9，Middlebrook 7H10 及 OADC 购自美国 BD 公司；胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物工程有限公司；胰蛋白胍，酵母提取物和琼脂粉购自英国 Oxoid 公司。Mtb H37Ra、Mtb H37Rv、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*, Ms)、BCG、肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, Spn) 菌体蛋白，以及 MPT64 和 CnpB 重组蛋白均由本室制备^[14]。

2 方法

2.1 抗体亲和力、效价及亚类检测 采用 ELISA 方法。用 MPT64 蛋白包被浓度为 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，各株 mAb 作 2 倍梯度稀释，HRP-山羊抗小鼠 IgG 按试剂盒说明稀释，加入 TMB 显色后用酶标仪检测各孔 A_{450} 值，确定抗体效价，计算相对亲和力。相对亲和力为 mAb 饱和浓度检测时 A_{450} 最大值 50% 所对应的 mAb 浓度；抗体效价为显色阳性时的 mAb 最高稀释度。

ELISA 检测 mAb 抗体亚型,各株 mAb 作 1 : 500 稀释,二抗分别为 HRP 标记的 IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3。

2.2 ELISA 叠加试验筛选配对抗体 用 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ MPT64 蛋白包被酶标板,分别加入单株饱和 mAb 或等量两两组合的 mAb,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗涤;加入 HRP-羊抗鼠 IgG,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h,洗涤;加入 TMB,显色后加入 2 mol/L H_2SO_4 终止反应,用酶标仪测定吸光度值 A_{450} 值,计算叠加系数(Additivity index, AI)。AI = $[2A_{(1+2)} / (A_1 + A_2) - 1] \times 100\%$ 。式中 A_1 和 A_2 分别为单一 mAb 孵育测得的 A_{450} 值, $A_{(1+2)}$ 为 2 株 mAb 组合共孵育测得的 A_{450} 值。AI 值小于 10%,表示 2 株 mAb 识别 MPT64 抗原的表位相近;AI 值在 10%~40% 之间表示 2 株 mAb 识别 MPT64 抗原的表位有差异;AI 值大于 40% 表示 2 株 mAb 识别 MPT64 抗原的不同抗原表位,即为配对抗体。

2.3 抗体的纯化及生物素标记 分别将配对抗体的 2 株 mAb 杂交瘤细胞腹腔接种雌性 BALB/c 小鼠,待诱发生腹水后收集腹水,采用快速蛋白液相色谱系统(AKTA-FPLC)纯化腹水中的 mAb^[13]。将 A5B2 mAb 浓度调整至 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。取 500 μL mAb、250 μL 活化 Biotin 和 250 μL 偶联液混匀,室温反应 2 h。用 25 mL Biotin 偶联液平衡脱盐柱,然后加入偶联混合产物,750 r/min(离心半径 20 cm)离心 8 min,收集上层液体即为 Biotin-A5B2 mAb。

2.4 双抗体夹心 ELISA 的建立 以 H2F4 mAb 为捕获抗体、Biotin-A5B2 mAb 为检测抗体,采用棋盘滴定法优化 2 株 mAb 的组合作浓度:将捕获抗体作梯度稀释(0.156~5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)后包被酶标板,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;实验组(S)各孔加入 MPT64 抗原,阴性对照组(N)加入样品稀释液,室温孵育 2 h;加入梯度稀释的检测抗体(0.156~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$),室温孵育 1 h;加入 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ HRP-Avidin 孵育 1 h;加入 TMB 显色后检测 A_{450} 值,计算值。S/N = 实验组 A_{450} 值/阴性对照组 A_{450} 值。实验组 A_{450} 值接近 1, S/N 较高孔对应的浓度即为捕获抗体和检测抗体的最适工作浓度。

2.5 双抗体夹心 ELISA 的优化 分别以碳酸盐缓冲液(CBS)、磷酸盐缓冲液(PBS)、Tris-HCl(pH 6.6)和 Tris-HCl(pH 8.8)稀释捕获抗体至 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h、2 h,或室温孵育 1 h、2 h,或 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育;分别以 BSA(5%、2%、1%)、脱脂奶粉(5%、2%、1%)和 FBS(20%、10%、5%、1%)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h、2 h,或室温 1 h、2 h 孵育;加入 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抗原,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h、2 h,或室温孵育 1 h、2 h;加入 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 检测抗体,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h、2 h,或室温孵育 1 h、2 h;加入 HRP-Avidin(0.016~1 $\mu\text{g}/\text{mL}$),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30、60、90

min,或室温孵育 30、60、90 min;加入 TMB 显色后检测 A_{450} 值;S/N 较高孔对应的条件即为最适反应条件。

2.6 检测限和线性范围评估 以 H2F4 mAb 为捕获抗体包被 ELISA 板,加入不同浓度 MPT64 为标准品,再加入 Biotin-A5B2 mAb 检测抗体。2% BSA 为阴性对照(N组),以阴性对照组 A_{450} 值的 2.1 倍为 Cut-off,当检测值 \geq Cut-off 时为阳性,判断为阳性的最低 MPT64 浓度为检测限。绘制以 A_{450} 值为纵坐标、MPT64 浓度为横坐标的标准曲线,做直线回归分析。

2.7 精确性和准确性测定 以不同浓度的 MPT64(理论值)测定双抗 ELISA 检测方法的精确性和准确性,根据标准曲线计算实验组的 MPT64 浓度(检测值)及其 Mean、SD、SEM 和变异系数(CV)。CV 检验方法的精确性,回收率反映检测方法的准确性,回收率(%) = (检测值/理论值) \times 100%。

2.8 特异性检测 分别以 MPT64 制备过程中的原辅助材料和不同种菌体蛋白为待测样品,以纯化的 MPT64 蛋白为阳性对照,以 Mtb CnpB 重组蛋白为阴性对照进行 ELISA,评价方法的特异性。原辅助材料包括 LB 液体培养基成分(胰蛋白胍、酵母提取物)和纯化液成分(咪唑、NaCl、甘油、Tris),菌体蛋白包括 Mtb H37Rv、Mtb H37Ra、BCG、Ms、Spn。

2.9 Mtb 培养上清中 MPT64 的检测 取 Mtb H37Ra 接种于 7H9+10% OADC 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、80 r/min 震荡培养。分别于培养的不同时间检测菌落形成单位(Colony forming unit, CFU)。收集培养上清,冷冻干燥浓缩后以双抗体夹心 ELISA 检测 MPT64 浓度。以 Mtb 培养时间为横坐标、 A_{450} 值或活菌数为纵坐标绘制生长曲线。以 Mtb 活菌数为纵坐标、以 MPT64 浓度为横坐标绘图,做线性回归分析。

2.10 统计学分析 以 GraphPad Prism 9 软件作图,实验结果以 Mean \pm SEM 表示。其中“*”表示 S/N \geq 2.1,即为 ELISA 检测阳性。

结 果

1 抗 MPT64 mAb 的鉴定

采用间接 ELISA 法检测 9 株杂交瘤培养上清中 mAb 的效价、亚类、相对亲和力,结果如表 1。A2E7、A3D9、A5B2、C4F5、C8H9、D7G6、F5E2、H2F4、H4A11 的抗体效价分别为 1 : 2 560、1 : 2 560、1 : 2 560、1 : 2 560、1 : 640、1 : 320、1 : 1 280、1 : 1 280、1 : 1 280,相对亲和力分别为 3.13、6.25、3.13、6.25、12.5、25、6.25、12.5、12.5 $\times 10^{-6}$ g/mL。抗体亚类检测显示 D7G6 mAb 为 IgG2a,其他株 mAb 均为 IgG1。

表 1 9 株 MPT64 mAb 的抗体效价及亚类

细胞株编号 The number of the cell	抗体效价 Antibody titer	相对亲和力 ($\times 10^{-6}$ g/mL) Relative affinity	抗体亚类 Antibody subclass
A2E7	1:2 560	3.13	IgG1
A3D9	1:2 560	6.25	IgG1
A5B2	1:2 560	3.13	IgG1
C4F5	1:2 560	6.25	IgG1
C8H9	1:640	12.50	IgG1
D7G6	1:320	25.00	IgG2a
F5E2	1:1 280	6.25	IgG1
H2F4	1:1 280	12.50	IgG1
H4A11	1:1 280	12.50	IgG1

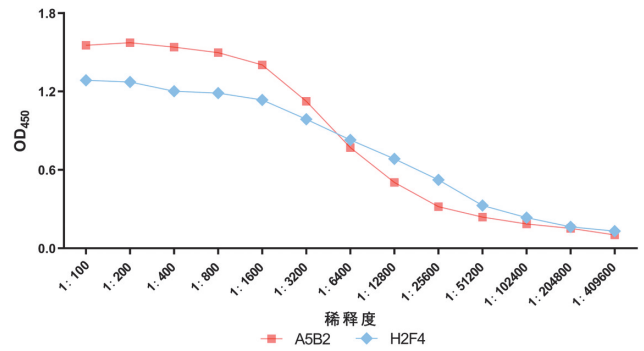


图 2 ELISA 检测抗 MPT64 mAb 配对抗体的效价
Fig. 2 Antibody titer detection against MPT64 mAb

2 抗体配对检测

根据相对亲和力结果选择 A5B2 mAb,并筛选与其配对的其他株 mAb,结果如图 1。有 3 株抗 MPT64 mAb 与 A5B2 mAb 的叠加系数 AI 值大于 40%,分别是 C8H9、F5E2、H2F4,表明其识别的 MPT64 抗原表位与 A5B2 mAb 不同,可组合为配对抗体。因此选择 H2F4 和 A5B2 株 mAb 用于后续试验。

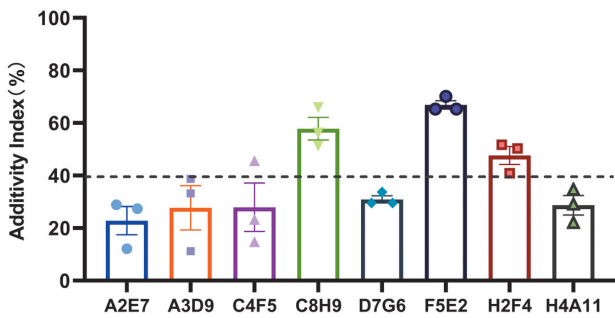


图 1 8 株 mAb 与抗 MPT64-A5B2 mAb 的配对检测
Fig. 1 Each mAb was paired with an anti-MPT64-A5B2 mAb

3 配对抗体的效价检测

取 H2F4 与 A5B2 株杂交瘤细胞株注射小鼠腹腔,成功制备腹水。通过 Protein A 亲和层析纯化腹水 mAb,检测配对抗体的效价。结果显示,H2F4 和 A5B2 株纯化 mAb 的抗体效价分别为 1:102 400 ($0.020 \mu\text{g/mL}$)和 1:51 200 ($0.039 \mu\text{g/mL}$) (图 2),表明 2 株 mAb 均能较好地与 MPT64 蛋白结合。

4 捕获抗体与检测抗体组合浓度选择

将偶联生物素的抗 MPT64-A5B2 mAb 命名为 Biotin-A5B2 mAb,作为双抗体夹心 ELISA 的检测抗体。然后以 H2F4 为捕获抗体,棋盘滴定法确定抗体组合的浓度,结果如表 2。当 H2F4 mAb 浓度为 $1.25 \mu\text{g/mL}$,Biotin-A5B2 mAb 为 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 时,实验组 A_{450} 值接近 1,S/N 较高。因此采用该浓度组合进行后续试验。

表 2 捕获抗体与检测抗体组合的优化

捕获抗体 H2F4 ($\mu\text{g/mL}$) Capture antibody H2F4	检测抗体 Biotin-A5B2($\mu\text{g/mL}$) Detect antibodies Biotin-A5B2						
	10.000	5.000	2.500	1.250	0.625	0.313	0.156
5.000(S)	1.287	1.1963	1.129	0.941	1.008	0.774	0.619
5.000(N)	0.238	0.219	0.210	0.210	0.211	0.210	0.209
2.500(S)	1.23	1.1606	1.083	0.84	0.694	0.541	0.576
2.500(N)	0.225	0.211	0.208	0.206	0.204	0.203	0.201
1.250(S)	1.202	1.136	1.049	0.943	0.758	0.628	0.581
1.250(N)	0.222	0.214	0.206	0.201	0.197	0.195	0.193
0.625(S)	1.117	1.025	0.989	0.894	0.572	0.579	0.484
0.625(N)	0.226	0.215	0.204	0.199	0.194	0.191	0.189
0.313(S)	0.997	0.873	0.642	0.561	0.506	0.365	0.465
0.313(N)	0.229	0.216	0.203	0.197	0.190	0.188	0.185
0.156(S)	0.577	0.548	0.514	0.507	0.45	0.366	0.388
0.156(N)	0.223	0.212	0.201	0.196	0.191	0.185	0.180

注:S为实验组,N为阴性对照组;表内数据为 A_{450} 值。

5 双抗体夹心 ELISA 试验条件的优化

对 ELISA 检测方法的各反应步骤或条件进行优化,优化的反应步骤或条件如表 3。

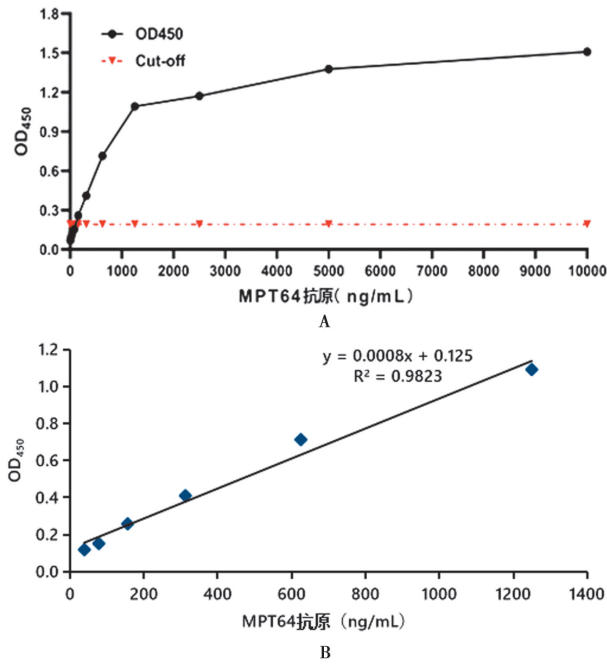
表 3 双抗体夹心 ELISA 试验条件的优化

反应体系 Reaction system	试剂及浓度 Reagents and concentrations	温度 Temperature	时间 Time
捕获抗体	$1.25 \mu\text{g/mL}$ H2F4 mAb	$4 \text{ }^\circ\text{C}$	$>12 \text{ h}$
封闭	2% BSA	室温	1 h
抗原	待测样品	室温	2 h
检测抗体	$2.5 \mu\text{g/mL}$ Biotin-A5B2 mAb	室温	2 h
底物	$0.5 \mu\text{g/mL}$ HRP-Avidin	室温	1 h

6 双抗体夹心 ELISA 方法的敏感性验证

检测下限是可检测阳性的最低检测物浓度,也是反映 ELISA 敏感性的一个指标,检测下限越低,敏感性越好。用建立的 ELISA 方法检测 MPT64 重组蛋白,Cut-off 值为 $A_{450} = 0.191$,MPT64 为 39 ng/mL 时,仍为阳性,即检测下限为 39 ng/mL (图 3 A)。线性范围是根据标准曲线量化检测抗原的最高至最低浓

度的区间。经直线回归分析,当 MPT64 在 39~1 250 ng/mL 范围内时,MPT64 浓度与 A_{450} 检测值呈线性相关,其回归方程为 $y = 0.0008x + 0.125$ (x 为 MPT64 浓度, y 为 A_{450}), $R^2 = 0.9823$ (图 3B)。



A 检测限验证 B 线性范围验证
图 3 双抗体夹心 ELISA 的检测限和线性范围验证
A Detection limit verification B Linear range verification
Fig. 3 Minimum detection limit and linear range verification of the double antibody sandwich ELISA

7 双抗体夹心 ELISA 方法的精准性验证

精确性是对同一样品多次重复检测结果的一致性评估,变异系数(CV)越小,精确性越好。本研究建立的 ELISA 方法的 CV 为 5.353%~9.459%,表明变异程度低,可重复性高,精确性良好。准确性是检测值与理论值之间的一致性评估,回收率越接近 100%,准确性越好。本研究建立的 ELISA 方法的回收率检测均值为 89.177%~104.390%,表明检测值与理论值接近程度高,准确性良好(表 4)。

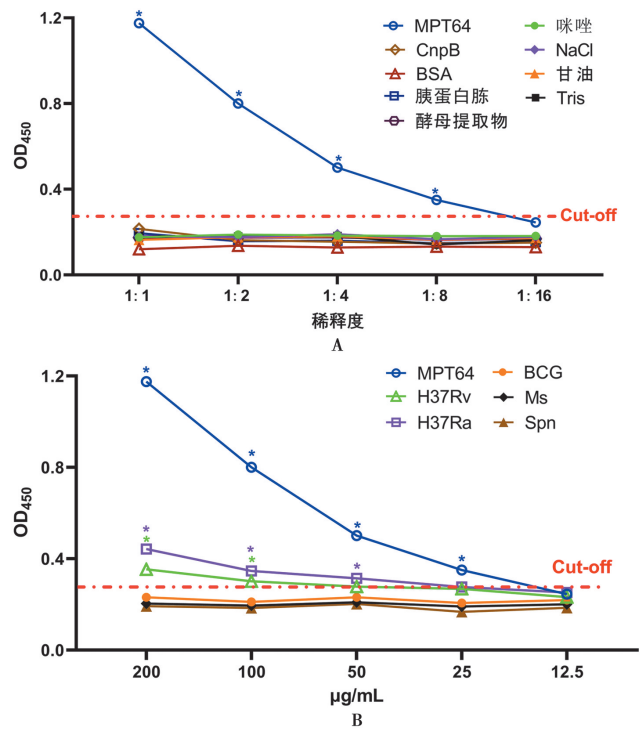
表 4 双抗体夹心 ELISA 的精确性和准确性验证
Table 4 Precision and accuracy verification of the double antibody sandwich ELISA

MPT64 浓度 (ng/mL) Concentration of MPT64	精确性验证 Accuracy verification			准确性验证 Verification of accuracy		
	Mean	SD	CV(%)	Mean	SD	CV(%)
1250	1122.188	60.072	5.353	89.775	4.806	1.699
625	652.435	52.851	8.101	104.390	8.456	2.990
313	306.692	19.354	6.311	98.142	6.193	2.190
156	139.338	13.180	9.459	89.177	8.435	2.982

8 双抗体夹心 ELISA 方法的特异性验证

以双抗体 ELISA 检测方法检测 MPT64 蛋白制

备过程中所用的材料以及不同细菌蛋白,结果显示所有辅助材料检测均为阴性,与 Mtb 另一种蛋白 CnpB 无交叉反应(图 4A)。Ms 属于 NTM,包含 MPT64 同源蛋白,其序列一致性为 43.6%^[13],Spn 为呼吸道常见病原体。以双抗体夹心 ELISA 方法检测 BCG、Ms 和 Spn 菌体蛋白,结果均为阴性。当 Mtb H37Rv 菌体蛋白浓度高于 50 $\mu\text{g/mL}$ 、H37Ra 菌体蛋白浓度高于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时检测阳性(图 4B)。因此,本研究建立的双抗体夹心 ELISA 检测方法可特异识别 Mtb 中的 MPT64,对不同毒力的 Mtb 菌株也有一定的识别能力,且不与无关蛋白反应,具有较好的特异性。



A 纯化蛋白制备环节中各组分的识别分析 B 细菌蛋白的识别分析

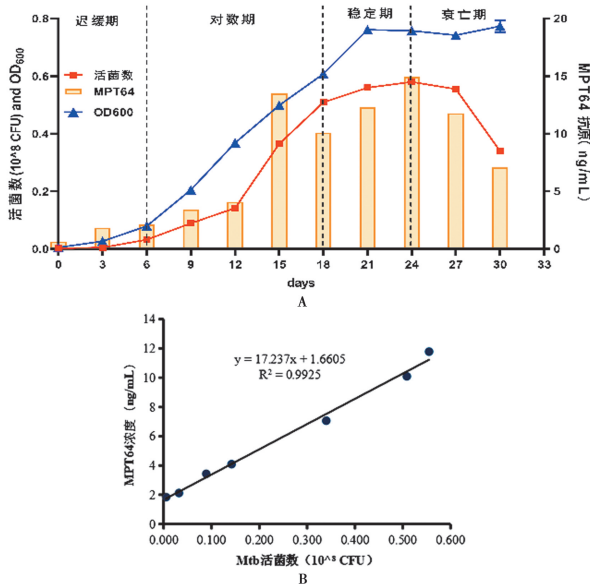
图 4 双抗体夹心 ELISA 的特异性验证

A Identification analysis of each component during the preparation of purified protein B Identification analysis of bacterial protein.

Fig. 4 Specificity verification of the double antibody sandwich ELISA

9 双抗体夹心 ELISA 方法的初步应用

绘制 Mtb H37Ra 菌株的生长曲线,呈现典型的“S”型,包含了迟缓期、对数期、稳定期、衰亡期 4 个阶段(图 5A)。MPT64 主要由对数生长期 Mtb 分泌,最早在培养的第 12 d MPT64 检测为阳性,与文献^[13]的研究结果一致。当 Mtb 活菌量为 $5.1 \times 10^5 \sim 5.55 \times 10^7$ CFU 时,细菌培养上清中 MPT64 的浓度与 Mtb 活菌数量成正相关,其线性回归方程为 $y = 17.237x + 1.6605$ (x 为 Mtb H37Ra 活菌数 CFU, y 为 MPT64 浓度 ng/mL), $R^2 = 0.9925$ (图 5B)。



A Mtb H37Ra 菌株生长曲线 B MPT64 与 Mtb H37Ra 活菌数的线性相关验证

图 5 Mtb 培养上清双抗体夹心 ELISA 检测分析

A Growth curve of Mtb H37Ra strain B Linear correlation verification of viable bacterial count between MPT64 and Mtb H37Ra

Fig. 5 Double antibody sandwich ELISA detection system to detect Mtb culture supernatant

讨论

TB 的微生物学诊断方法包括抗酸染色、分离培养,以及 TST、IGRA、Mtb 抗原检测和核酸检测等。其中 Mtb 抗原检测可用于 TB 早期快速诊断。双抗体夹心 ELISA 法将抗原-抗体特异性反应与酶高效催化反应相结合,实现了高特异性和高敏感性的组合,可用于抗原快速定量分析^[15]。MPT64 是 Mtb 活跃生长繁殖期分泌的一种蛋白^[9],在 BCG 和绝大多数 NTM 中缺失,作为诊断试剂具有良好的特异性和敏感性。课题组在前期研究中制备了,本研究从前期制备的抗 MPT64 mAb^[13] 中筛选出 MPT64 mAb 配对抗体,建立了双抗体夹心 ELISA 检测方法。

双抗体夹心 ELISA 检测方法的敏感性和特异性受抗原-抗体反应中多种因素的影响^[16]。在抗原-抗体反应中,若抗体或抗原过剩,则抗原-抗体复合物形成减少,使待测抗原量低于实际含量,导致假阴性率高,因此需确定抗原-抗体的最适工作浓度。孵育时间和缓冲体系等也会影响检测结果。因此,本研究选择 ELISA 常规试剂和孵育条件作为初始反应体系,再依次对各步骤或条件进行优化,最大程度降低非特异性结合的影响,确定了双抗体夹心 ELISA 的最适检测条件。

双抗体夹心 ELISA 参数主要包括检测限、精确性、准确性以及特异性^[17]。检测限是指可检测阳性的最低抗原浓度,也是反映 ELISA 敏感性的一个指标。

本研究以 mAb 捕获抗体与 mAb 检测抗体配对进行 ELISA,方法的检测下限为 39 ng/mL。杨航等^[18]报道以 mAb 捕获抗体与 pAb 检测抗体配对的 MPT64 抗原检测下限为 1.5 ng/mL。mAb 作为检测抗体可能仅识别一个抗原表位,而 pAb 中包含可识别多个 MPT64 表位的抗体,因此敏感性更高^[19]。但是采用 pAb 为检测抗体假阳性率高,且特异性较低。精确性是对重复检测结果一致性的评估,变异系数 CV 越小,精确性越好;准确性是检测值与理论值之间一致性的评估,回收率越接近 100%,准确性越好。国家规定,商品化的 ELISA 试剂盒需 CV 小于 10%、回收率为 80%~120%^[20]。本研究建立的 ELISA 参数均在参考值范围内,表明其精确性和准确性良好。临床结核病诊断常存在假阳性的问题,如抗酸染色涂片和 TST 试验就无法区分 Mtb 感染、BCG 接种和 NTM 感染。MPT64 主要存在于 Mtb,基于 MPT64 抗体的胶体金免疫层析法在 TB 患者尿液中的检测特异性为 100%^[21]。鼠源抗 MPT64 mAb 偶联碱性磷酸酶建立的超灵敏 ELISA 在 TB 患者痰液检测中的特异性为 96.7%^[10]。MPT64 抗原检测的电化学适体传感器法在 TB 患者血清^[22]和痰液^[23]检测中的特异性分别为 93.3%和 100%。本研究建立的 MPT64 双抗体夹心 ELISA 检测方法可特异识别 Mtb 不同毒力的 H37Rv 和 H37Ra 株,而与 BCG、NTM 中的 Ms 和常见呼吸道病原菌 Spn 的菌体蛋白均无交叉反应,因此该方法可区分 Mtb 与其他细菌感染,具有良好的特异性。

研究发现,MPT64 为 Mtb 培养早期滤液的主要抗原之一,其在营养匮乏时表达下调^[24]。用本研究建立的双抗体夹心 ELISA 检测 Mtb 生长各阶段培养上清,MPT64 含量在一定范围内与 Mtb 的活菌数成线性正相关,并证实 MPT64 最早在 Mtb 培养第 12 d 检测阳性。表明本研究建立的双抗体夹心 ELISA 检测系统也可用于 Mtb 生长特性的检测,如果用于临床诊断,其检测下限仍有待提高。建立双株 mAb 检测抗体或多株 mAb 检测抗体的双抗体夹心 ELISA 方法,同时结合多聚酶 HRP 增加底物载量放大检测信号等方法,可提高该方法的检测敏感性,以满足临床快速诊断 TB 的需要。

【参考文献】

- [1] Kay AW, Ness T, Verkuijl SE, et al. Xpert MTB/RIF Ultra assay for tuberculosis disease and rifampicin resistance in children[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2022, 9(9): CD013359.
- [2] 胡婧,周静,吴雯晶,等. 结核病诊断 T-SPOT. TB、Gene Xpert MTB/RIF 技术应用价值研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2022, 17(12): 1454-1458, 1474.
- [3] 王鑫鑫,杜伟鹏,杨柳. 荧光定量 PCR 检测尿沉渣 TB-DNA 在泌尿系结核病诊断中的应用[J]. 临床研究, 2023, 31(1): 113-115.

- [4] Acharya B, Acharya A, Gautam S, et al. Advances in diagnosis of Tuberculosis: an update into molecular diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(5): 4065-4075.
- [5] Duthie MS, Reed SG. Skin tests for the detection of Mycobacterial infections: achievements, current perspectives, and implications for other diseases [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2021, 105(2): 503-508.
- [6] 中华医学会结核病学分会. 结核分枝杆菌 γ -干扰素释放试验及临床应用专家意见(2021年版) [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2022, 2(1): 143-150.
- [7] Park M, Kon OM. Use of Xpert MTB/RIF and Xpert Ultra in extrapulmonary tuberculosis [J]. Expert Rev Anti-Infect, 2021, 19(1): 65-77.
- [8] Kusuma S, Parwati I, Subroto T, et al. Comparison of simple and rapid extracting methods of free-tags *Mycobacterium tuberculosis* protein 64 Recombinant Protein from polyacrylamide gel: Electroelution and the optimized passive elution [J]. J Adv Pharm Technol Res, 2021, 12(2): 180-184.
- [9] 付雨晗. 结核分枝杆菌 MPT64 蛋白促进巨噬细胞向 M1 型极化的机制研究 [D]. 芜湖: 皖南医学院, 2022.
- [10] Sakashita K, Takeuchi R, Takeda K, et al. Ultrasensitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of MPT64 secretory antigen to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* viability in sputum [J]. Int J Infect Dis, 2020, 96: 244-253.
- [11] Cao XJ, Li YP, Wang JY, et al. MPT64 assays for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. BMC Infect Dis, 2021, 21(1): 336-343.
- [12] Pope V, Sacksteder KA, Herrera JC, et al. MPT64 patch test for the diagnosis of active pulmonary tuberculosis: a randomised controlled trial in Peru [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2018, 22(6): 622-627.
- [13] 谢燕玲, 宁唤唤, 梁璇, 等. 结核分枝杆菌分泌蛋白 MPT64 单克隆抗体的制备及其特异性 [J]. 中国人兽共患病学报, 2022, 38(05): 387-393.
- [14] Ning H, Kang J, Lu Y, et al. Cyclic di-AMP as endogenous adjuvant enhanced BCG-induced trained immunity and protection against *Mycobacterium tuberculosis* in mice [J]. Front Immunol, 2022, 13: 943667.
- [15] Cui Y, Wang H, Guo F, et al. Monoclonal antibody-based indirect competitive ELISA for quantitative detection of Enterobacteriaceae siderophore enterobactin [J]. Food Chem, 2022, 391: 133241.
- [16] 朱琨莹. 水痘—带状疱疹病毒糖蛋白抗原含量双抗体夹心 ELISA 方法的建立与验证 [D]. 吉林大学, 2022.
- [17] 韩方方. 猪 δ 冠状病毒双抗体夹心 ELISA 抗原检测试剂盒的制备与初步应用 [D]. 河南农业大学, 2021.
- [18] 杨航, 努尔塞力克·努素甫, 杨亚军, 等. 结核分枝杆菌 rv1985c、rv3807c、rv1981c 基因编码蛋白生物信息学分析以及间接 ELISA 方法的建立 [J]. 中国病原生物学杂志, 2021, 16(2): 143-149.
- [19] 钱新杰. 非洲猪瘟病毒 P72 蛋白单克隆抗体的制备及双抗夹心 ELISA 检测方法的初步建立 [D]. 江西农业大学, 2022.
- [20] Shao S, Shang W, Bai Y, et al. Development of a highly sensitive and specific ic-ELISA and lateral flow immunoassay for diacetoxyscirpenol [J]. Foods, 2022, 11(11): 85-98.
- [21] Raheem TY, Ojo O, Adenipekun EO, et al. Performance assessment of SD Bioline TB MPT64 assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Lagos, Nigeria [J]. J Immunoassay Immunochem, 2021, 42(5): 543-558.
- [22] Li Y, Peng D, Guo S, et al. Aptasensor for *Mycobacterium tuberculosis* antigen MPT64 detection using anthraquinone derivative confined in ordered mesoporous carbon as a new redox nanoprobe [J]. Bioelectrochemistry, 2022, 147: 108209.
- [23] Yunus MH, Yusof NA, Ismail S, et al. Surface-enhanced carboxyphenyl diazonium functionalized screen-printed carbon electrode for the screening of tuberculosis in sputum samples [J]. Nanomaterials (Basel), 2022, 12(15): 514-523.
- [24] Betts JC, Lukey PT, Robb LC, et al. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling [J]. Mol Microbiol, 2002, 43(3): 717-731.
- 【收稿日期】 2023-05-26 【修回日期】 2023-08-17
-
- (上接 1283 页)
- [21] Zhou J, He Z, Ma S, et al. AST/ALT ratio as a significant predictor of the incidence risk of prostate cancer [J]. Cancer Med, 2020, 9(15): 5672-5677.
- [22] Knittelfelder O, Delago D, Jakse G, et al. The AST/ALT (De Ritis) ratio predicts survival in patients with oral and oropharyngeal cancer [J]. Diagnostics (Basel), 2020, 10(11): 973.
- [23] Wang Y, Qiu K, Song Q, et al. AST to ALT ratio and risk of hemorrhagic transformation in patients with acute ischemic stroke [J]. Neurol Res, 2020, 42(11): 980-986.
- [24] Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, St ger S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8+ T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections [J]. PLoS Pathog 2009, 5: e1000431.
- [25] Zhang CS, Wang H, Li J, et al. Involvement of TIGIT in natural killer cell exhaustion and immune escape in patients and mouse model with liver *Echinococcus multilocularis* infection [J]. Hepatology, 2021, 74: 3376-3393.
- [26] Zhang Q, Bi J, Zheng X, et al. Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity [J]. Nat Immunol, 2018, 19: 723-732.
- [27] Johnston RJ, Comps-Agrar L, Hackney J, et al. The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8+ T cell effector function [J]. Cancer Cell, 2014, 26: 923-937.
- [28] Stanitsky N, Simic H, Arapovic J, et al. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106: 17858-17863.
- 【收稿日期】 2023-05-15 【修回日期】 2023-08-09