



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101805397 A

(43) 申请公布日 2010.08.18

(21) 申请号 200910046316.3

C12R 1/32(2006.01)

(22) 申请日 2009.02.18

C12R 1/19(2006.01)

(71) 申请人 上海市公共卫生临床中心

地址 201508 上海市金山区漕廊公路 2901 号

(72) 发明人 范小勇 郭建 卢水华 吴文娟

(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司
31200

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C07K 14/35(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12N 15/74(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属生物工程和诊断医学领域。具体涉及一种结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体及其制备方法、抗原性分析及其在结核病血清学诊断中的应用。本发明以含有两个 esat-6 拷贝的嵌合基因核酸疫苗 HG856A 质粒 DNA 为模板,通过 PCR 扩增获得了 2×esat-6 基因片段,并在 *E. coli* 中克隆、表达并纯化了 ESAT-6 重组二聚体蛋白。该蛋白在 2 个 ESAT-6 单体之间通过 *AccI* 酶切位点 GTC TAC 编码的氨基酸 Tyr、Val 连接, N 端携带有 6×His 标签,可通过镍螯合亲和层析进行纯化。实验证实纯化的重组二聚体具有良好的反应原性和抗原特异性。可作为抗原用于结核病的早期诊断,包括 ELISA 或 ELISPOT 等血清学诊断或者作为皮肤试验用抗原。

1. 一种结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体,其特征是通过下述方法制备:以含有两个 esat-6 拷贝的嵌合基因核酸疫苗 HG856A 质粒 DNA 为模板,通过 PCR 扩增获得 $2 \times$ esat-6 基因片段,并在 *E. coli* 中克隆、表达并纯化制得 ESAT-6 重组二聚体蛋白。

2. 按权利要求 1 所述的结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体,其特征是所述重组二聚体蛋白中,2 个或 2 个以上的单体 ESAT-6 进行串联。

3. 按权利要求 1 所述的结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体,其特征是所述重组二聚体蛋白的融合方式为 $6 \times$ His 标签或 MBP 或 GST 的融合方式。

4. 按权利要求 1 或 2 所述的结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体,其特征是所述的重组二聚体蛋白在 2 个 ESAT-6 单体之间通过 AccI 酶切位点 GTC TAC 编码的氨基酸 Tyr、Val 连接, N 端携带有 $6 \times$ His 标签。

5. 权利要求 1 的 ESAT-6 重组二聚体的制备方法,其特征是通过下述步骤:

1) 构建含有 $2 \times$ esat-6 基因的原核表达载体;

2) 融合基因 $2 \times$ esat-6 在大肠杆菌或其他细菌中诱导表达;

3) 纯化结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体;

采用含 $6 \times$ His 标签或 MBP 或 GST 标签的亲和层析的纯化方式纯化所述的重组二聚体;

4) Western-blot 鉴定重组二聚体的抗原特性。

6. 按权利要求 5 的方法,其特征是所述步骤 1) 的构建含有 $2 \times$ esat-6 基因的原核表达载体是以 DNA 疫苗 HG856A 为模板, PCR 扩增得 $2 \times$ esat-6 基因,经 BamHI-HindIII 双酶切消化后克隆至 pET28a 质粒得到原核表达质粒 pET2E6。

7. 按权利要求 5 的方法,其特征是所述步骤 1) 的表达载体是 T7 启动子的 pET 系列或其他 tac 启动子的载体。

8. 按权利要求 5 的方法,其特征是所述步骤 2) 的融合基因 $2 \times$ esat-6 在大肠杆菌中诱导表达:将重组表达质粒 pET2E6 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),接种于含卡那霉素 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 LB 培养基中, 37°C 培养过夜,次日以 2% 的比例转种于含卡那霉素的 LB 培养基中,振荡培养至 $A_{600} 0.4$ 时,加入 IPTG 至终浓度 $1\text{mmol}/\text{L}$, 37°C 诱导 4h,离心收集菌体;取 $100 \mu\text{L}$ 菌体超声波裂解细胞,并加入等体积 $2 \times$ SDS 样品缓冲液, 95°C 煮沸 5min,离心后取上清 $20 \mu\text{L}$ 进行 15% SDS-PAGE 分析目的蛋白表达情况。

9. 按权利要求 5 的方法,其特征是所述步骤 3) 的纯化是采用 Ni^{2+} -NTA 结合树脂亲和层析纯化重组蛋白:将上述菌体沉淀加入裂解液重悬,冰浴中超声破菌;离心收集包涵体沉淀;用包涵体洗涤液洗涤沉淀两次;将洗涤好的包涵体用包涵体溶解液溶解,离心收集上清,加到平衡的 Ni^{2+} -NTA His-Bind Resin 柱子内,混匀,收集流穿液;用包涵体溶解液充分洗涤 Ni^{2+} 柱;用不同 pH 值洗脱液洗脱目的蛋白;SDS-PAGE 分析收集的洗脱液,并将纯化的重组蛋白经透析、超滤后,用 Bradford 法进行蛋白定量, -80°C 冰箱保存备用。

10. 按权利要求 9 的方法,其特征是所述洗脱液的 pH 值为 5.0、4.5 或 4.25。

11. 结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体在制备结核病早期诊断制剂中的用途。

12. 按权利要求 11 所述的用途,其中所述的诊断为血清学诊断或皮肤试验诊断。

一种结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属生物工程和诊断医学领域。具体涉及一种结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6) 及其制备方法、抗原性分析及其在结核病血清学诊断中的应用。

背景技术

[0002] 结核病是全世界关注的一种主要的公众传染性疾病。早在 1993 年,世界卫生组织 (WHO) 就因为全球的结核病例日趋增多而宣布结核病疫情进入紧急状态。据统计,目前,全世界约有 1/3 人口 (18.6 亿) 携带有结核杆菌,每年约有 800 万新增病例,200 万人死于结核病;我国大约有活动性结核病人 600 万,每年有 25 万人死于结核病。根据卫生部公布的 2005 年传染病疫情,在 27 种法定甲、乙类传染病中,肺结核的发病数已经超过乙型肝炎,肺结核的死亡数也已超过了狂犬病,发病数和死亡数均居第一位。而且,结核病的控制也因为多重抗药性 (Multidrug-resistant, MDR) 菌株和艾滋病的出现使得本就越来越严重的结核病疫情变得更加复杂化。

[0003] 现有技术公开了结核分支杆菌早期分泌蛋白 ESAT-6 的编码基因由 288bp 组成,含 95 个氨基酸,理论相对分子质量为 9.9kD。Morten 等 (Morten H, Thomas O, Harald GW, et al. *Infect Immun*, 1996 ;64 :16-22) 利用 ESAT-6 的单抗 HYB76-8 对 11 个不同样品进行 SDS-PAGE 和免疫印迹检测,发现只有结核杆菌 H37Rv 株、牛分支杆菌 AN5 和 Ravenel 株 3 个样品在 6kD 处出现目的条带,对其他 8 个不同来源的 BCG 菌株及一些环境分支杆菌的不同菌株进行 PCR 和 Southern-blotting 分析,结果均证明 ESAT-6 抗原是区别结核杆菌 (MTB) 和非结核分支杆菌 (NTM) 的最佳候选抗原。该实验结果极大地推动了 ESAT-6 作为结核杆菌诊断试剂的研究进展。研究表明,ESAT-6 在 MTB 增殖期和非增殖期都高水平地转录,无论是活动性结核患者还是 MTB 潜伏感染者,ESAT-6 均可有效诱导机体的免疫应答反应。Sorensen 等 (Sorensen AL, Nagai S, Houen G, et al. *Infect Immun*, 1995 ;63 :1710-7) 发现 ESAT-6 可能是通过一种非信号肽依赖的形式分泌到细胞外,但效率不高,而 B 细胞的激活和增生需较大量抗原的刺激,再加上 ESAT-6 的分子量较小,免疫原性较差,这些可能是导致结核病人血清中抗 ESAT-6 抗体水平不高的重要原因。含有 *esat-6* 基因的核酸疫苗在动物实验中显示出来的免疫保护效果,证明了 *esat-6* 基因作为疫苗组分的重要性 (Li Z, Song D, Zhang H, et al. *DNA Cell Biol*, 2006 ;25 :25-30. Pollock JM, Andersen P. *Infect Immun*, 1997 ;65 :2587-92. Fan X, Gao Q, Scand J. *Immunol*, 2007 ;66 :523-8)。然而,由于 ESAT-6 分子量小,免疫原性差,在小动物中虽可诱导产生免疫应答,但在大动物 (如猴子) 中却很难诱导出令人满意的免疫应答效果 (Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, et al. *Infect Immun*, 2000 ;68 :791-5)。有研究将 *esat-6* 插入 *ag85a* 的 *AccI* 位点,构建了含有两个 *esat-6* 拷贝的嵌合基因 DNA 疫苗 HG856A。与只含一个拷贝 ESAT-6 的核酸疫苗相比,两个拷贝 ESAT-6 的插入增加了其抗原表位,增强了核酸疫苗的免疫原性,因而使得 ESAT-6 也能在大动物中诱导出良好的免疫应答反应 (Li Z, Song D, Zhang H, et al. *DNA Cell Biol*, 2006 ;25 :25-30)。

[0004] 快速而准确的诊断是控制结核病的重要措施之一。免疫学诊断简单、快速且灵敏，有着较好的发展前景，但由于缺乏特异性抗原，其在结核病早期诊断中的应用受到了一定的限制。目前，用于诊断结核病的结核菌素精制蛋白衍生物 (PPD) 所包含的抗原为致病性分支杆菌、环境中的分支杆菌及 BCG (卡介苗疫苗株) 所共有，因而 PPD 不能明确区分 BCG 免疫、环境分支杆菌感染和致病性结核杆菌感染，鉴别诊断价值不高。因此，寻找结核杆菌敏感性高、特异性好的抗原对于结核病的早期诊断具有重要的意义。

[0005] 国内吴雪琼等曾表达与纯化略结核杆菌单个拷贝的 ESAT-6 蛋白，分析了其抗原特性 (吴雪琼, 张俊仙, 史迎昌等. 中国现代医学杂志, 2001 ;11 :14-8), 并进一步将其作为皮试诊断用抗原, 发现其诊断特异性要优于结核菌素 (Wu X, Zhang L, Zhang J, et al. Clin Exp Immunol. 2008 ;152 :81-7.)。

发明内容

[0006] 本发明的目的是克服现有技术的不足，提供一种结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6)，该重组蛋白以结核杆菌特异性抗原基因 *esat-6* 进行体外表达构建重组二聚体 rdESAT-6，作为结核病早期诊断用抗原具有较高的抗原特异性与诊断敏感性。

[0007] 本发明的另一目的是提供上述结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6) 的制备方法。

[0008] 本发明以 DNA 疫苗 HG856A 为模板，经 PCR 扩增获得 $2 \times \text{esat-6}$ 基因，克隆至 pET28a 质粒得到原核表达质粒 pET2E6；转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，以 IPTG 诱导目的基因表达，用 Ni^{2+} 亲和层析纯化重组蛋白；并用 Western-blot 鉴定其抗原性，ELISA 检测其抗结核抗体的敏感性和特异性。

[0009] 具体而言，本发明以含有两个 *esat-6* 拷贝的嵌合基因核酸疫苗 HG856A 质粒 DNA 为模板，通过 PCR 扩增获得了 $2 \times \text{esat-6}$ 基因片段，并在 *E. coli* 中克隆、表达并纯化得 ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6) 蛋白。

[0010] 所述蛋白在 2 个或 2 个以上的单体间通过可能的方式进行串联，连接序列为可允许范围内的氨基酸，以大肠杆菌或其他细菌作为工程菌表达 rdESAT-6，本发明不限于特定的表达载体，所述的表达载体可采用 T7 启动子的 pET 系列或其他 *tac* 启动子的载体，重组蛋白融合方式为 $6 \times \text{His}$ 标签或是其他诸如 MBP 或者 GST.....；利用含 $6 \times \text{His}$ 标签或 MBP、GST 标签的亲和层析的纯化方式纯化 rdESAT-6。

[0011] 本发明中，该蛋白在 2 个 ESAT-6 单体之间通过 *AccI* 酶切位点 GTC TAC 编码的氨基酸 Tyr、Val 连接，N 端携带有 $6 \times \text{His}$ 标签，可通过镍整合亲和层析进行纯化。Western-blot 实验则证实了纯化的 rdESAT-6 可与抗 ESAT-6 的小鼠血清发生特异性结合反应，表明 rdESAT-6 具有良好的反应原性。

[0012] 本发明的结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6) 通过下述方法和步骤制备：

[0013] 1、构建含有 $2 \times \text{esat-6}$ 基因的原核表达载体：

[0014] 以 DNA 疫苗 HG856A 为模板，经 PCR 扩增获得 $2 \times \text{esat-6}$ 基因，经 *Bam*HI-*Hind*III 双酶切消化后克隆至 pET28a 质粒得到原核表达质粒 pET2E6。

[0015] 2、融合基因 $2 \times \text{esat-6}$ 在大肠杆菌中的诱导表达：

[0016] 将重组表达质粒 pET2E6 转化大肠杆菌 BL21 (DE3)，接种于含卡那霉素 $50 \mu\text{g/mL}$ 的

LB 培养基中, 37℃ 培养过夜, 次日以 2% 的比例转种于含卡那霉素的 LB 培养基中, 振荡培养至 A600 约为 0.4 时, 加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L, 37℃ 诱导 4h, 离心收集菌体。取 100 μL 菌体超声波裂解细胞, 并加入等体积 2×SDS 样品缓冲液, 95℃ 煮沸 5min, 离心后取上清 20 μL 进行 15% SDS-PAGE 分析目的蛋白表达情况。

[0017] 3、纯化结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6) :

[0018] 采用 Ni²⁺-NTA 结合树脂亲和层析纯化重组蛋白。菌体沉淀加入裂解液重悬, 冰浴中超声破菌; 离心收集包涵体沉淀; 用包涵体洗涤液洗涤沉淀两次; 将洗涤好的包涵体用包涵体溶解液充分溶解, 离心收集上清, 加到平衡好的 Ni²⁺-NTAHis-Bind Resin 柱子内, 混匀, 收集流穿液; 用包涵体溶解液充分洗涤 Ni²⁺ 柱; 用不同 pH 值 (5.0, 4.5, 4.25) 的洗脱液洗脱目的蛋白; SDS-PAGE 分析收集的洗脱液, 并将纯化的重组蛋白经透析、超滤后, 用 Bradford 法进行蛋白定量, -80℃ 冰箱保存备用。

[0019] 4、Western-blot 鉴定 rdESAT-6 的抗原特性 :

[0020] 将纯化蛋白进行 SDS-PAGE 后, 将目的蛋白转移到 PVDF 膜上。用 10% 脱脂奶粉封闭 1h 后, 用抗 ESAT-6 的小鼠血清 (1 : 600) 37℃ 孵育 1h ; 1×TBS-T 缓冲液 (1×TBS, 0.05% Tween 20) 充分洗涤, 然后用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1 : 6000) 37℃ 孵育 45min ; 充分洗膜后加化学发光底物 ECL 显影。

[0021] 本发明利用 rdESAT-6 作为抗原用于结核病的早期诊断, 包括 ELISA 或 ELISPOT 等血清学诊断或者作为皮肤试验用抗原。

[0022] 本发明进行了 rdESAT-6 的血清学诊断应用 : 以 24 份正常人血清的平均 OD 值 +2S 为正常界限值, 以 rdESAT-6 纯化蛋白为抗原, 对 20 份结核病人血清和 24 份正常人血清进行常规 ELISA 检测。以 0.25 μg/mL rdESAT-6 纯化蛋白包被 96 孔酶标板 (Greiner Bio-one) 100 μL/孔, 将正常人和结核病人血清用含 0.5% BSA 的 1×PBS-T 缓冲液 1 : 1000 稀释, 以 HRP 标记的羊抗人 IgG (1 : 12500) 为二抗, 通过常规 ELISA 方法测定血清中所含抗结核抗体水平。

[0023] 结果表明 : rdESAT-6 纯化蛋白检测人血清中抗结核抗体的敏感性为 30%, 特异性为 95.8%。ELISA 检测结果证实了 rdESAT-6 具有良好的抗原特异性。

[0024] 表 1 是 rdESAT-6 作为抗原应用于结核病早期血清学诊断试验的结果。

[0025] 表 1

	病例 (n)	诊断结果		敏感性/特异性
		阳性	阴性	
[0026]	结核病人 (20)	6	14	敏感性 (30%)
	正常人 (24)	1	23	特异性 (95.8%)

[0027] 以上技术方案中所有基本实验材料均可市购, 及实验操作均参照本领域常规技术。

[0028] 本发明以结核杆菌 ESAT-6 抗原基因体外重组方式制备的重组二聚体 rdESAT-6, 可在保持较高抗原特异性的同时提高诊断的敏感性。

[0029] 本发明制备的 ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6), 可通过镍整合亲和层析进行纯化,

方法简便易行。

[0030] 本发明可将 rdESAT-6 和其它结核分支杆菌特异性抗原混合或融合,将提高诊断的敏感性。

[0031] 为了便于理解,以下将通过具体的附图和实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是,具体实例和附图仅是为了说明,显然本领域的普通技术人员可以根据本文说明,在本发明的范围内对本发明做出修正和改变,这些修正和改变也纳入本发明的范围内。

附图说明:

[0032] 图 1 是 2×esat-6 基因的 PCR 扩增产物电泳图,

[0033] 其中,泳道 1 为 PCR 扩增的 esat-6 基因对照,泳道 2 为 PCR 扩增的 2×esat-6 基因。

[0034] 图 2 是重组质粒 pET2E6 的酶切鉴定图,

[0035] 其中,泳道 1 为 pET28a 经 BamH I 和 Hind III 双酶切的产物,泳道 2 为 pET2E6 经 BamH I 和 Hind III 双酶切的产物。

[0036] 图 3 是重组蛋白 rdESAT-6 的 SDS-PAGE 分析图,

[0037] 图中显示,柱亲和层析纯化,重组蛋白纯度可达 95%;透析、超滤后经 Bradford 法测定,蛋白浓度约为 0.8mg/mL,即每 150mL 培养菌可获得 12mg 左右的重组蛋白,约占菌体总蛋白的 35%。

[0038] 图 4 是 Western-blot 分析重组蛋白 rdESAT-6 抗原特异性的鉴定图,

[0039] 图中显示,纯化的融合蛋白 rdESAT-6 经 SDS-PAGE 分离后,转移至 PVDF 膜上,与抗 ESAT-6 的小鼠血清反应,在相对分子质量约 22000 处可见有特异性结合条带,表明 rdESAT-6 具有良好的反应原性。

具体实施方式

[0040] 实施例 1.

[0041] 构建结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6) 原核表达载体 pET2E6

[0042] 以 DNA 疫苗 HG856A 为模板,经 PCR 扩增获得 2×esat-6 基因,经 BamHI-HindIII 双酶切消化后克隆至 pET28a 质粒得到原核表达质粒 pET2E6(图 1)。以 BamHI-HindIII 双酶切消化 pET2E6 重组质粒,将酶切鉴定正确的克隆测序(图 2)。

[0043] 实施例 2.

[0044] 表达、纯化与特异性鉴定结核杆菌 ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6)

[0045] 将重组表达质粒 pET2E6 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),接种于含卡那霉素 50 μg/mL 的 LB 培养基中,37℃ 培养过夜,次日以 2% 的比例转种于含卡那霉素的 LB 培养基中,振荡培养至 A600 约为 0.4 时,加入 IPTG 至终浓度 1mmol/L,37℃ 诱导 4h,离心收集菌体,15% SDS-PAGE 分析目的蛋白表达情况。大量诱导后,收集到的菌体沉淀加入裂解液重悬,冰浴中超声破菌;离心收集包涵体沉淀;用包涵体洗涤液洗涤沉淀两次;将洗涤好的包涵体用包涵体溶解液充分溶解,离心收集上清,加到平衡好的 Ni²⁺-NTAHis-Bind Resin 柱子内,混匀,收集流穿液;用包涵体溶解液充分洗涤 Ni²⁺ 柱;用不同 pH 值的洗脱液洗脱目的蛋白;

SDS-PAGE 分析收集的洗脱液,并将纯化的重组蛋白经透析、超滤后,用 Bradford 法进行蛋白定量(图 3)。各取等量蛋白(约 15 μ g)跑 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,20V \times 20min 半干转印,PVDF 膜在 10%脱脂奶粉中封闭 1 小时后与小鼠嵌合蛋白 ESAT-6 抗血清 1 : 1000 孵育 1 小时,再于 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 1 : 6000 孵育 45 分钟,最后用化学发光底物 ECL 反应 1 分钟后曝光于 X 光片(图 4)。

[0046] 实施例 3. ESAT-6 重组二聚体 (rdESAT-6) 的血清学诊断应用

[0047] 以 24 份正常人血清的平均 OD 值 +2S 为正常界限值,以 rdESAT-6 纯化蛋白为抗原,对 20 份结核病人血清和 24 份正常人血清进行常规 ELISA 检测。以 0.25 μ g/mL rdESAT-6 纯化蛋白包被 96 孔酶标板 (Greiner Bio-one) 100 μ L/孔,将正常人和结核病人血清用含 0.5% BSA 的 1 \times PBS-T 缓冲液 1 : 1000 稀释,以 HRP 标记的羊抗人 IgG (1 : 12500) 为二抗,通过常规 ELISA 方法测定血清中所含抗结核抗体水平。ELISA 检测结果表明:在 20 份结核病人血清中检出 6 份阳性,敏感性为 30%;在 24 份正常人血清中检出 1 份阳性,特异性为 95.8% (图 5)。

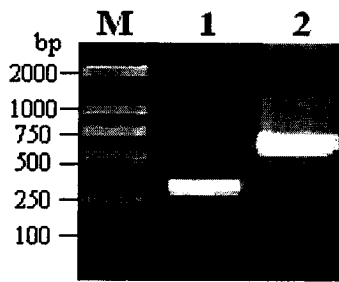


图 1

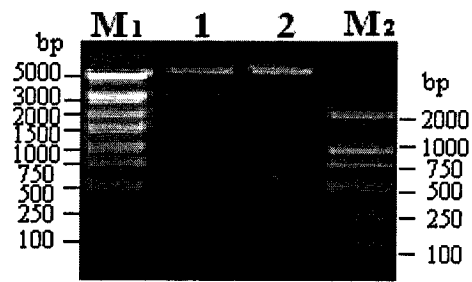


图 2

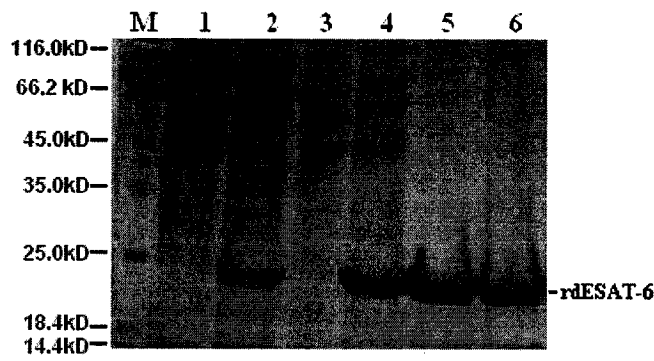


图 3

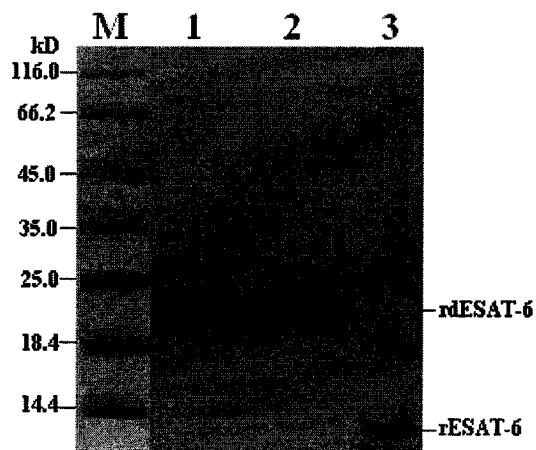


图 4

专利名称(译)	一种结核杆菌ESAT-6重组二聚体及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN101805397A	公开(公告)日	2010-08-18
申请号	CN200910046316.3	申请日	2009-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	上海市公共卫生临床中心		
申请(专利权)人(译)	上海市公共卫生临床中心		
当前申请(专利权)人(译)	上海市公共卫生临床中心		
[标]发明人	范小勇 郭建 卢水华 吴文娟		
发明人	范小勇 郭建 卢水华 吴文娟		
IPC分类号	C07K14/35 C12N15/70 C12N15/74 G01N33/53 C12R1/32 C12R1/19		
代理人(译)	吴桂琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属生物工程和诊断医学领域。具体涉及一种结核杆菌ESAT-6重组二聚体及其制备方法、抗原性分析及其在结核病血清学诊断中的应用。本发明以含有两个esat-6拷贝的嵌合基因核酸疫苗HG856A质粒DNA为模板，通过PCR扩增获得了2×esat-6基因片段，并在E.coli中克隆、表达并纯化了ESAT-6重组二聚体蛋白。该蛋白在2个ESAT-6单体之间通过AccI酶切位点GTC TAC编码的氨基酸Tyr、Val连接，N端携带有6×His标签，可通过镍螯合亲和层析进行纯化。实验证实纯化的重组二聚体具有良好的反应原性和抗原特异性。可作为抗原用于结核病的早期诊断，包括ELISA或ELISPOT等血清学诊断或者作为皮肤试验用抗原。

病例 (n)	诊断结果		敏感性/特异性
	阳性	阴性	
结核病人 (20)	6	14	敏感性 (30%)
正常人 (24)	1	23	特异性 (95.8%)