

结核分枝杆菌持续感染期抗原 Rv1733c 的表达、纯化和鉴定 *

张 薇¹ 柏银兰² 康 健² 王 平² 徐志凯² 王丽梅^{2△}

(1 第四军医大学唐都医院儿科 陕西 西安 710032 ; 2 第四军医大学微生物学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的:克隆结核分枝杆菌持续感染期抗原 Rv1733c 基因,构建其原核表达载体,并在大肠杆菌中进行表达和纯化。方法:采用聚合酶链反应(PCR)方法从结核分枝杆菌 H37Rv 基因组中扩增出 Rv1733c 基因片段,克隆入 pMD18-T 载体,序列测定正确后将其亚克隆入原核表达载体 pPro-EXHTb,并在大肠杆菌 DH5α 中进行表达,表达蛋白经 SDS-PAGE 及 Western-blot 分析后,以 Ni-NTA 亲和层析纯化蛋白。结果:成功克隆了 Rv1733c 基因片段并构建了其原核表达载体 pPro-EXHTb-1733c,转化 E.Coli DH5α 后能表达大小约 30 KD 的蛋白,Western-blot 分析表明表达产物正确。通过亲和层析获得纯化蛋白。结论:成功构建结核分枝杆菌持续感染期抗原 Rv1733c 原核表达载体 pPro-EXHTb-1733c,并获得纯化蛋白,为研究新型结核疫苗的靶抗原奠定了基础。

关键词: 结核分枝杆菌;持续感染期抗原 Rv1733c;原核表达;纯化

中图分类号 R378.911 文献标识码 A 文章编号:1673-6273(2012)10-1868-04

Expression, Purification and Identification of the Mycobacterium tuberculosis Protein Latency Antigen Rv1733c*

ZHANG Wei¹, BAI Yin-lan², KANG Jian², WANG Ping², XU Zhi-ka², WANG Li-mei^{2△}

(1 Department of Pediatric, TangDu Hospital, Fourth Military Medical University;

2 Department of Microbiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To clone the Rv1733c gene of Mycobacterium tuberculosis and express and purify the fusion protein.

Methods: The Rv1733c gene was firstly amplified by PCR from genome of M. tuberculosis H37Rv strain and cloned into pMD18-T vector. After sequencing, the gene fragment was subcloned into the prokaryotic expression vector pPro-EXHTb and expressed in E.coli DH5α. The expressed protein was identified by SDS-PAGE analysis and Western-blot by using monoclonal antibody against 6× His, and the recombinant 6× His fused protein was purified by Ni-NTA purification system. **Results:** The gene of Rv1733c was cloned and expressed in E.coli DH5α. The relative molecular mass of this protein was consistent with the predicted. In Western-blot analysis, a specific binding band of this protein with 6× His mAb could be detected at the corresponding site with relative molecular mass of 30 kDa. **Conclusion:** The Rv1733c was successfully expressed and purified, which may be used as the target antigen for the novel vaccine against TB.

Key words: Mycobacterium tuberculosis (MTB); Latency antigen Rv1733c; Prokaryotic expression; Purification

Chinese Library Classification(CLC): R378.911 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2012)10-1868-04

前言

结核病(Tuberculosis, TB)是结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis, MTB)感染所致的慢性传染病。目前全球约 1/3 人口持续感染结核分枝杆菌(MTB),其中 5%-10%有可能发展为 TB,是 TB 传播的重要来源和传染源,控制 MTB 持续感染对于 TB 的防治具有重要意义^[1-3]。持续感染期的 MTB 其基因组中由休眠调节子 DosR(dormancy regulon)调控的 48 个编码基因特异性的上调转录表达,表达的蛋白称为持续感染期抗原(latency antigens)^[4],认为这些蛋白对 MTB 以休眠状态在体内存活具有重要意义。在持续感染人群中可检测到针对这些抗原

的特异性免疫应答,而在 BCG 免疫人群中未能检测到^[5],因此认为以这些蛋白为靶抗原设计疫苗,可能获得能针对持续感染期抗原的保护性免疫应答,这种免疫应答可能有助于清除处于持续感染期的 MTB 防止复发。因此,本研究纯化了持续感染期抗原之一的 Rv1733c 蛋白,以便于进一步研究其生物学特性、免疫学特性及与 MTB 休眠的关系,并为 TB 的诊断和防治的靶抗原筛选奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

MTB 毒株 H37Rv 基因组 DNA、E.coli DH5α 均为本实验

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30801055)

作者简介:张薇(1977-),女,博士,讲师,主治医师,主要研究方向:儿童感染性疾病

电话:13909247509, E-mail: ziva691017@hotmail.com

△通讯作者:王丽梅,博士,讲师, E-mail: microbio@fmmu.edu.cn。

(收稿日期:2011-12-26 接受日期:2012-01-21)

室保存。克隆载体 pMD18-T 购自 Takara 公司, 表达载体 pPro-EX HTb 质粒为本实验室保存。

1.2 试剂

限制性内切酶 *Hind* III, *Bam*HI, *rTaq* DNA 聚合酶, dNTPs, T4 DNA 连接酶, DNA Marker DL2000 均购自 Takara 公司; DNA 片段回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒购自 Omega 公司; Ni-NTA 亲和层析柱购自 QIAGEN 公司。辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG、6× His 单克隆抗体购自北京天根公司。

1.3 Rv1733c 基因的原核表达载体的构建、表达及纯化

1.3.1 引物设计 根据已发表的 MTB Rv1733c 全基因序列设计引物, 上游: CG GGATCC ATG ATC GCC ACA ACC, 含 *Bam*HI 酶切位点(下横线); 下游: AGC AAGCTT TCA CCG CTG CGT GCA, 含 *Hind* III 酶切位点(下横线)。均由北京鼎国公司合成。

1.3.2 Rv1733c 基因的扩增、克隆及测序 以 MTB H37Rv 菌株的基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: 10× PCR buffer 5μl, dNTPs 2μl (2.5 mmol/L), DNA 模板 1μl, 上下游引物各 1μl 及 *rTaq* 酶 0.5μl, 加水至 50μl。PCR 条件: 94℃ 预变性 5min, 95℃ 变性 15sec, 58℃ 复性 30sec, 72℃ 延伸 50sec, 30 个循环, 末次循环后 72℃ 延伸 10min。所获得 PCR 扩增片段经琼脂糖凝胶电泳回收后克隆入 pMD18-T 载体, *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 阳性克隆命名为 pMD18-T-Rv1733c, 序列测定由北京奥科生物技术有限公司完成。

1.3.3 目的基因的原核表达载体构建、表达及鉴定 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切 pMD18-T-Rv1733c, 凝胶回收 Rv1733c 目的片段及 pPro-EX HTb 载体, 并用 T4 DNA 连接酶连接并转化到 *E. Coli* DH5α 感受态细胞。随机挑选 2 个菌落, 分别接种于 5ml 含 100μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液, 37℃ 振荡培养过夜, 碱裂解法提取质粒 DNA, 用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切鉴定, 阳性

克隆命名为 pPro-EX HTb-Rv1733c。将含重组质粒 pPro-EX HTb-Rv1733c 的单个菌落接种于含氨苄青霉素 (100 mg/L) 的 LB 培养液中, 37℃ 振荡培养过夜。次日取 50μl 加到 5ml 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37℃ 振荡至 A600nm=0.6, 留下诱导前对照样本, 加入 IPTG 至终浓度为 1mmol·L⁻¹, 37℃ 诱导 3h 后 12000rpm·min⁻¹ 离心 5min 集菌, 重悬于 50μl 1× SDS 样品缓冲液, 煮沸变性, 离心后取上清进行 12% SDS-PAGE 分析, 观察 Rv1733c 蛋白的表达情况。将上述制备的样品进行 12% SDS-PAGE 后以 0.15mA 恒流电转 2h 转至硝酸纤维素膜上。用 50g/L 脱脂奶封闭 2h, PBS 洗涤后加抗 His 的单克隆抗体 (1:5000 稀释) 4℃ 过夜, PBS 洗涤后加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 抗体, 37℃ 孵育 1h。PBS 洗涤后 DAB 显色观察结果。

1.3.4 目的蛋白的可溶性分析及纯化 阳性重组菌的诱导表达方法按上述步骤进行, 体积扩大至 1L。取 2ml 诱导后的菌液 10000rpm 离心 1min 集菌, PBS 100μl 重悬, 超声裂解后 10000rpm 离心 10min, 分别收集上清及沉淀制样, 进行 12% SDS-PAGE 分析目的蛋白的可溶性。根据目的蛋白的可溶性分析结果, 首先经超声裂解及 2M 尿素和 Tison-100 洗涤获得较高纯度的包涵体, 随后使用 QIAGEN 公司的 Ni-NTA 纯化试剂盒在变性条件下分别应用 pH 梯度洗脱及咪唑浓度梯度洗脱方法进行亲和层析纯化蛋白。

2 结果

2.1 Rv1733c 基因的克隆及测序

以 MTB H37Rv 基因组 DNA 为模板, 应用所设计的引物进行 PCR 扩增, 获得与预期大小一致的基因片段, 大小为 633bp (图 1)。将 PCR 扩增产物与 pMD18-T 载体连接并进行测序 (图 2), 测序结果表明目的基因序列与 GenBank 公布的序列完全一致。

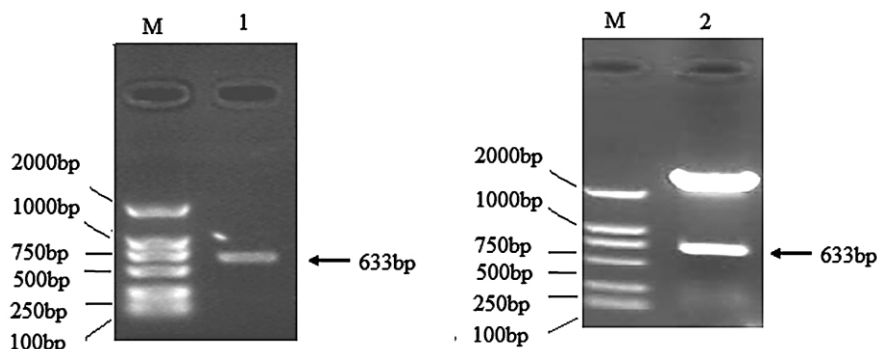


图 1 Rv1733c 基因 PCR 产物和重组质粒 pMD18-T-Rv1733c 酶切鉴定 M: DNA maker DL2000; 1: Rv1733c 基因的 PCR 产物 2: *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pMD18-T-Rv1733c

Fig. 1 PCR amplification product of Rv1733c gene and identification of recombinant plasmid pMD18-T-Rv1733c by *Bam*HI and *Hind* III digestion M: DNA maker DL 2000; 1: PCR product s of Rv1733c gene; 2: Recombinant plasmid pMD18-T-Rv1733c digested by *Bam*HI and *Hind* III

2.2 原核表达载体的构建及表达

将测序正确的阳性克隆质粒经酶切后与同样酶切的原核表达载体 pPro-EX HTb 连接, 转化 *E. Coli* DH5α 感受态细胞, 随机挑选 2 个阳性克隆进行酶切鉴定, 结果均可切出与预期一致的 633bp 基因片段, 将阳性重组质粒命名为 pPro-EX

HTb-Rv1733c (图 2)。用 IPTG 诱导蛋白表达, 含 Pro-EX HTb-Rv1733c 质粒的重组菌诱导后在蛋白分子量约为 30kD 处有明显的特异性蛋白条带, 与预期大小一致, 而空载体菌和未诱导菌均无此特异性表达条带 (图 3)。

2.3 目的蛋白的 Western-blot 分析

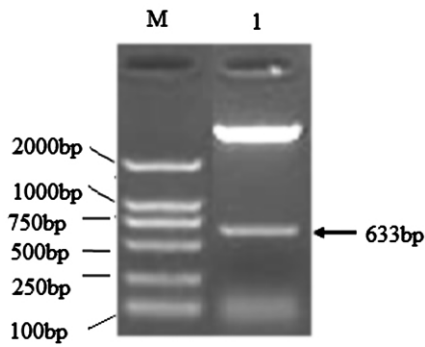


图2 重组质粒 pPro-EXHTb-Rv1733c 双酶切鉴定 M: DNA marker DL2000 ;1: *BamH* 和 *Hind* III 双酶切重组质粒 pPro-EXHTb-Rv1733c
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid pPro-EXHTb-Rv1733c by *BamH* and *Hind* III digestion: M: DNA maker DL2000; 1: Recombinant plasmid pPro-EXHTb-Rv1733c digested by *BamH* and *Hind* III

pPro-EX HTb 是含有 $6 \times \text{His}$ 的原核表达载体, 因此 pPro-EX HTb-Rv1733c 重组载体所表达的目的蛋白是含有 $6 \times \text{His}$ 的融合蛋白。用小鼠 $6 \times \text{His}$ 单克隆抗体为一抗, 羊抗鼠 IgG 为二抗进行 Western-blot 分析, 结果在蛋白分子量约 30kD 处有特异性印迹条带(图 4)。

2.4 目的蛋白的纯化

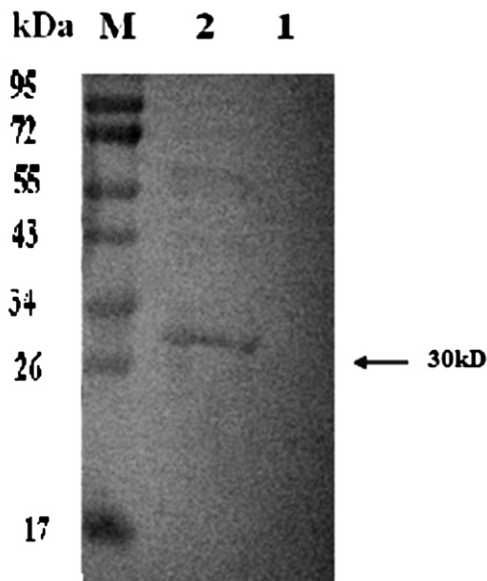


图4 表达产物的 Western-blot 鉴定 M: 蛋白分子量 marker ;1: 空载体菌 2: 诱导表达产物

Fig. 4 Western-blot analysis of expression product M: Marker; 1: Negative control of empty pPro-EXHT-b plasmid in DH5 α ; 2: Banding of expression product with $6 \times \text{His}$ mAb

蛋白可溶性分析表明, 目的蛋白主要以包涵体形式表达(图 5)。用 Ni-NTA 亲和层柱在非变性条件下成功纯化了带 His 标签的 Rv1733c 目的蛋白(图 5)。

3 讨论

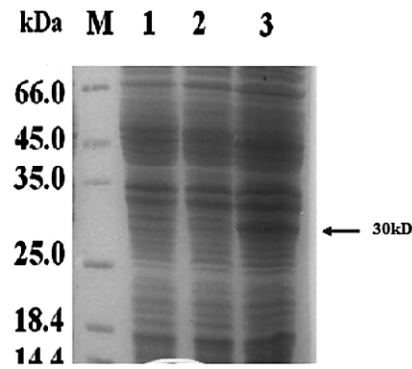


图3 诱导表达产物的 SDS-PAGE 分析 M: 蛋白分子量 marker ;1: 空载体菌 2: 未诱导的 pPro-EXHTb-Rv1733c 质粒重组菌 3: 诱导的 pPro-EXHTb-Rv1733c 质粒重组菌。

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of expression product M: Protein marker 1: expression product of induced empty plasmid; 2: expression product of pPro-EXHTb-Rv1733c without induction; 3: expression product of induced pPro-EXHTb-Rv1733c.

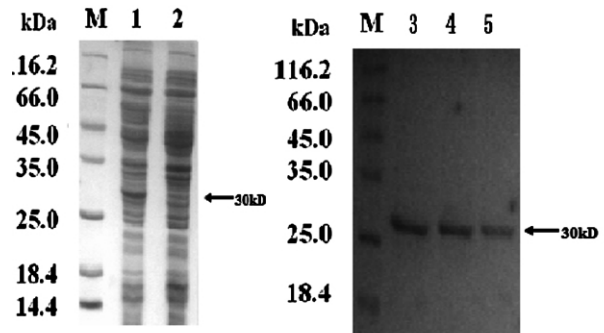


图5 融合蛋白的可溶性分析和纯化 M: 蛋白分子量 marker ;1: 诱导菌超声裂解后沉淀 2: 诱导菌超声裂解后上清 3-5 Rv1733c 纯化蛋白

Fig.5 SDS-PAGE analysis of solubility of Rv1733c protein and purified protein M: Protein marker; 1: precipitation of induced DH5 α with pPro-EXHTb-Rv1733c; 2: supernatant of induced DH5 α with pPro-EXHTb-Rv1733c; 3-5 purified proteins of expression product of pPro-EXHTb-Rv1733c

最大限度清除休眠状态的 MTB 预防 MTB 持续感染复发是近年来 TB 疫苗研究的一个热点^[6]。MTB 持续感染期抗原是 MTB 以休眠菌形式在机体内存活时所表达的包括 48 个基因产物在内的一组蛋白^[4],在体外可被微氧,厌氧或低浓度的 NO 所诱导表达^[7-9],在持续感染人群和持续感染动物模型中可检测到针对该蛋白的特异性免疫应答^[10-13]。持续感染期抗原具体的作用及功能尚不明确,但研究表明其对 MTB 在机体内以休眠状态长期存活起着重要作用^[14-15],并可能与 MTB 的耐药相关^[16]。Rv1733c 是 MTB 在休眠期表达量比较高的一个 MTB 持续感染期抗原,为跨膜蛋白,Gillian FB 等研究了非洲的三个 TB 高负担人群对于持续感染期抗原的免疫应答情况,发现 Rv1733c 是这三个人群中被识别频次最高的一个持续感染期抗原^[17]。Yasuhiro Y 等的研究也证实了这一点^[18]。

与此相反的是 BCG 中虽含有完整的持续感染期抗原的编码序列,但 Lin 等的研究表明 BCG 免疫的人群及动物并不

产生针对持续感染期抗原的免疫应答,即提示 BCG 免疫过程中可能不表达持续感染期间抗原,这可能也是为何 BCG 免疫不能完全清除处于休眠状态的 MTB,获得更好免疫保护力的原因^[5]。Chunwei 及 Stephen T 等的研究均表明表达持续感染期抗原的重组 BCG 可获得较 BCG 更好的免疫保护力^[19-20],进一步提示持续感染期抗原可作为针对 MTB 持续感染疫苗设计的靶抗原,研究包括 Rv1733c 蛋白在内的持续感染期抗原的生物学特性及免疫学特性等有着重要的意义。

本研究采用 pProEX HTb 原核表达载体在 *E.coli* DH5 α 中表达了持续感染期抗原 Rv1733c 蛋白。本研究曾尝试使用 PET-32a 原核表达载体表达 Rv1733c 蛋白,但诱导后几乎无表达。同时也尝试更换宿主菌 *E.coli* DH5 α 为 *E.coli* BL21,蛋白表达量也几乎无变化。可能与 Rv1733c 自身结构有关,Rv1733c 为跨膜蛋白,在 *E.coli* 中表达后可能对宿主菌本身的复制产生影响,进而影响了蛋白的表达。包涵体的形成主要是蛋白在诱导表达过程中无法复制天然的表达过程,如缺乏某些蛋白质折叠的辅助因子,或环境不适,无法形成正确的次级键等原因造成^[21]。除更换表达载体以及宿主菌外,改变诱导温度以及 IPTG 浓度也有可能改变蛋白的表达形式。本研究在 Rv1733c 的表达中同样尝试了不同温度、不同 IPTG 浓度的诱导条件,但是都未获得可溶性表达的 Rv1733c 蛋白。在蛋白的纯化过程中,采用两步法纯化,先回收包涵体,再利用 His 标签进行亲和层析法纯化以提高蛋白的回收率和纯度。在变性条件下以 pH 梯度洗脱时,发现蛋白吸附于 Ni-NTA 柱不易洗脱,因此本研究采用了在变性条件下进行咪唑浓度梯度洗脱的方法纯化目的蛋白,得到了较好的纯化效果。

因此,本研究克隆了 Rv1733c 基因构建了其原核表达载体,并成功地在 *E.coli* 表达,获得了纯度较高的纯化蛋白。Rv1733c 蛋白的成功表达和纯化为我们下一步将之用于 TB 的新型疫苗研究和诊断试剂等方面奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] Wright A, Zignol M, Van Deun A, et al. Epidemiology of antituberculosis drug resistance 2002-2007: an updated analysis of the global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance [J]. Lancet, 2009, 373: 1861-1873
- [2] Flynn JL, Chan J. Tuberculosis: latency and reactivation [J]. Infect Immun, 2001, 69(7): 4195-4201
- [3] Christopher Dye. Global epidemiology of tuberculosis [J]. Lancet 2006; 367: 938-940
- [4] Wayne LG, Sohaskey CD. Nonreplicating persistence of mycobacterium tuberculosis [J]. Annu Rev Microbiol, 2001, 55: 139-163
- [5] Lin MY, Geluk A, Smith SGL. Lack of immune responses to mycobacterium tuberculosis DosR regulon proteins following mycobacterium bovis BCG vaccination [J]. Infect. Immun, 2007, 75(7): 3523-3530
- [6] Tyagi AK, Nangpal P, Satchidanandam V. Development of vaccines against tuberculosis[J]. Tuberculosis, 2011, 91: 469-478
- [7] Voskuil MI, Schnappinger D, Visconti KC, et al. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program[J]. J Exp Med, 2003, 198(5): 705-713
- [8] Muttucumaru DGN, Roberts G, Hinds J, et al. Gene expression profile of mycobacterium tuberculosis in a non-replicating state [J]. Tuberculosis, 2004, 84: 239-246
- [9] Voskuil MI, Visconti KC, Schoolnik GK. Mycobacterium tuberculosis gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy[J]. Tuberculosis, 2004, 84: 218-227
- [10] Leyten EM, Lin MY, Franken KL, et al. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of Mycobacterium tuberculosis[J]. Microbes Infect, 2006, 8(8): 2052-2060
- [11] Roupie V, Romano M, Zhang L, et al. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of Mycobacterium tuberculosis in DNA-Vaccinated and tuberculosis-infected mice [J]. Infect. Immun, 2007, 75(2): 941-949
- [12] Lerisa Govender, Brian Abel, E. Jane Hughes, et al. Higher human CD4 T cell response to novel Mycobacterium tuberculosis latency associated antigens Rv2660 and Rv2659 in latent infection compared with tuberculosis disease [J]. Vaccine, 2011, 19:51-57
- [13] Maytal BB, May YL, Suzanne MB, et al. Pulmonary delivery of DNA encoding mycobacterium tuberculosis latency antigen Rv1733c associated to PLGA-PEI nanoparticles enhances T cell responses in a DNA prime/protein boost vaccination regimen in mice [J]. Vaccine, 2009, 27: 4010-4017
- [14] Starck J, Kallenius G, Marklund BI. Comparative proteome analysis of mycobacterium tuberculosis grown under aerobic and anaerobic conditions[J]. Microbiology, 2004, 150: 3821-3829
- [15] Ying Y, Deborah D, Crane. The 16-kDa- α Crystallin (Acr) protein of mycobacterium tuberculosis is required for growth in macrophages[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(8): 9578-9583
- [16] Bartek IL, Rutherford R, Gruppo C. The DosR regulon of M. tuberculosis and antibacterial tolerance [J]. Tuberculosis, 2009, 89: 310-316
- [17] Gillian FB, Bonnie AT, Martin OO, et al. Immunogenicity of novel dosR regulon-encoded candidate antigens of mycobacterium tuberculosis in three high-burden populations in Africa [J]. Clinical and Vaccine Immunology, 2009, 16(8): 1203-1212
- [18] Yasuhiro Y, Kunio T, Shintaro S, et al. Immunogenicity of latency-associated antigens of mycobacterium tuberculosis in dna-vaccinated mice [J]. Procedia In Vaccinology, 2010, 3:19-26
- [19] Chunwei S, Lingxia C, Zhenhua C, et al. Enhanced protection against tuberculosis by vaccination with recombinant BCG over-expressing Hspx protein[J]. Vaccine, 2010, 28:5237-5244
- [20] Stephen TR, Ali NE, Jes D. Improved long-term protection against Mycobacterium tuberculosis Beijing/W in mice after intra-dermal inoculation of recombinant BCG expressing latency associated antigen [J]. Vaccine, 2011, 9: 8740-8744
- [21] Fischer B, Sumner I. Isolation, renaturation and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *E.coli* as inclusion bodies [J]. Biotech Bio, 1993, 41,1: 63-66