结核杆菌 Hsp65 与人 IL-2 融合蛋白在耻垢杆菌表达 *

王丽梅[1] 师长宏[2] 柏银兰[1] 张 海[2] 康 健[1] 张 薇[1] 徐志凯[1△]

(第四军医大学 1 基础部微生物学教研室；2 实验动物研究中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的：构建能够分泌表达结核分枝杆菌热休克蛋白 65 (Hsp65) 与人 IL-2 融合蛋白的重组耻垢分枝杆菌 (recombinant Mycobacterium Smegmatis, rMs)。**方法：**用 *EcoR*Ⅴ和 *Hind*Ⅲ双酶切含 Hsp65-IL-2 融合基因的 pPRO-hsp65-IL-2 载体，回收目的基因片断 Hsp65-IL-2，并将其亚克隆入同样双酶切的大肠埃希菌 - 分枝杆菌穿梭分泌表达载体 pDE22 中。重组质粒 pDE22-hsp65-IL-2 酶切鉴定正确后，电穿孔转化 MS 感受态，潮霉素抗性压力筛选阳性 rMs。Western-blot 鉴定 rMs 培养上清蛋白中目的蛋白的表达。**结果：**重组 pDE22-hsp65-IL-2 质粒酶切后可获得约 2000 bp 片段，与预期大小一致。Western-blot 结果表明，rMs 培养上清蛋白中有特异性反应条带，大小为 78kD，与 Hsp65-IL-2 融合蛋白大小相一致。**结论：**成功构建了大肠埃希菌 - 分枝杆菌穿梭分泌表达载体 pDE22-hsp65-IL-2，为该 rMs 的免疫学特性及抗结核分枝杆菌感染的保护效果研究奠定了基础。

关键词：结核分枝杆菌；HSP65；IL-2；耻垢分枝杆菌

中图分类号：R378.911 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273 (2011) 18-3405-03

Expression of Heat Shock Protein 65 of Mycobacterium Tuberculosis and Human IL-2 Fused Gene in Mycobacterium Smegmatis*

WANG Li-mei[1], SHI Chang-hong[2], BAI Yin-Lan[1], ZHANG Hai[2], KANG Jian[1], ZHANG Wei[1], XU Zhi-kai[1△]

(1 Department of Microbiology, School of Basic Medicine; 2 Laboratory Animal Research Center, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To construct the recombinant Mycobacterium Smegmatis which can express the fused protein of the heat shock protein 65 of Mycobacterium tuberculosis with human IL-2. Methods: The *EcoR*Ⅴ/*Hind*Ⅲ fragment of the fused gene Hsp65-IL-2 digested from the plasmid pPRO-hsp65-IL-2 was subcloned into the E.coli-Mycobacterium shuttle vector pDE22 predigested by the same restrictive endoenzymes. The positive pDE22-hsp65-IL-2 recombinant plasmid was identified by restriction enzymatic digestion and then transformed into Ms cells by electroporation. The expression of the fusion protein Hsp65-IL-2 in the culture of recombinant Ms(rMs) was detected by Western-blot. Results: A 2000bp fragment was obtained from the shuttle vector pDE22-hsp65-IL-2 by restriction enzyme digestion, which was identical with the predicted. The Western-blot showed that there was a specific reactive band at the size of 78kD in the culture filtrate proteins of rMs, which was identical with the size of Hsp65-IL-2 fusion protein. Conclusion: The shuttle expression vector pDE22-hsp65-IL-2 was constructed successfully, which provided the foundation for the study of the immunogenicity and protective efficacy of rMs against MTB infection.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; HSP65; IL-2; Mycobacterium Smegmatis

Chinese Library Classification: R378.911 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2011)18-3405-03

前言

结核病 (TB) 死灰复燃，成为危害人类健康的主要疾病之一。卡介苗 (BCG) 是目前唯一用于预防 TB 的疫苗，其对儿童 TB 有较好的保护效果，但是对成人 TB 保护效果较差。因此，研究能够有效预防 TB 的新型疫苗成为一项迫切完成的任务[1]。

结核分枝杆菌热休克蛋白 65 (Hsp65)是热休克蛋白 60 家族成员之一，由 groEL2 基因编码，具有高度保守性[2]。Hsp65 可被人和小鼠体内的 T 细胞广泛识别，如在 MTB 感染的小鼠体内，20%的反应性 T 细胞能够识别 Hsp65[3,4]。在结核分枝杆菌 (MTB) 感染过程中，Hsp65 是机体对抗其入侵的重要的免疫保护性抗原之一。其刺激机体可产生 TH1 型的细胞免疫反应，如 CD44(hi)CD4+ 和 CD44(hi)CD8+T 细胞的产生，IL-2 和 IFN-γ 等的释放，这些免疫反应在机体控制 MTB 感染中起着重要作用[5]。本课题组的前期工作也表明，用编码 Hsp65-IL-2 的质粒 DNA 免疫的小鼠对 MTB 感染具有一定的保护效果，能够明显减少感染小鼠的脾肺荷菌数[6]。

IL-2 是一种广泛使用的 Th1 型的细胞因子佐剂，可提高机

* 基金项目：国家自然科学基金项目 (No. 30801055)；"十一五"传染病重大专项项目 (No. 2008ZX10003-013)

作者简介：王丽梅 (1979-)，女，博士，讲师，主要研究方向：新型疫苗，结核病快速诊断技术

△通讯作者：徐志凯 Tel: 029-84774523; E-mail: zhikaixu@fmmu.edu.cn

(收稿日期：2011-03-18 接受日期：2011-04-12)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

体的细胞免疫应答，并可诱导 CTL、NK 等多种杀伤细胞的分化和效应功能，促进 IFN-γ 的产生。研究发现，在结核病（TB）患者中 IL-2 的产生较正常人减少，重型患者尤其明显[7-9]。Sutherland JS 等研究了 TB 患者和 MTB 隐性感染人群中细胞因子表达谱的变化，发现在 TB 患者中，分泌 IL-2 的 T 细胞数及 IL-2 的水平均低于 MTB 隐性感染者中的，并表明针对 MTB 感染的 IL-2 应答的减少在 TB 复发和恶化中起着重要作用[7]。动物实验表明，外源性 IL-2 可提高机体 IL-2 水平，并使 IL-2R 的表达增高，明显降低受感染动物的死亡率，具有较强的抗菌能力及免疫恢复能力[8]。目前临床已开始将 IL-2 用于难治性 TB 患者的辅助治疗，并且疗效较好[8,9]。

因此，鉴于 Hsp65 作为抗 MTB 感染的重要保护性抗原，及 IL-2 作为 Th1 型细胞因子佐剂的应用和其在 TB 治疗中的应用前景，本研究构建了能够分泌表达 Hsp65-IL-2 融合蛋白的重组耻垢分枝杆菌（recombinant Mycobacterium Smegmatis, rMs），为下一步评价其作为 TB 新型疫苗的免疫学特性和抗 MTB 感染的保护效果研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 E.coli DH5α 由本室保存，耻垢分枝杆菌（Ms）购自中国药品生物制品鉴定所。质粒 pPRO-hsp65-IL-2[10] 和大肠埃希菌 - 分枝杆菌穿梭分泌表达载体 pDE22 由本教研室构建、保存。

1.1.2 培养基与试剂 7H9、7H10 培养基购自 Difico 公司。EcoR Ⅴ和 HindⅢ 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA marker DL2000 和蛋白质分子量标准品购自 Takara 公司；潮霉素购自 Sigma 公司；质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司；抗 HSP65-IL-2 融合蛋白免疫小鼠血清由本室制备[6]。

1.2 实验方法

1.2.1 Hsp65-IL-2 融合基因大肠埃希菌 - 分枝杆菌穿梭分泌表达载体的构建

将 pPRO-hsp65-IL-2 质粒[10]用 *EcoR*Ⅴ和 *Hind*Ⅲ 双酶切，回收目的基因片段，与同样双酶切的大肠埃希菌 - 分枝杆菌穿梭分泌表达载体 pDE22 相连接，转化 E.coli DH5α 感受态细胞后，铺于含潮霉素抗性的 LB 平板中进行筛选，随机挑取克隆进行酶切鉴定，阳性克隆命名为 pDE22-hsp65-IL-2。

1.2.2 Ms 感受态的制备 接种 Ms 于 5 mL 7H9 液体培养基，37℃振荡培养。3~4d 后以 1∶100 的比例转接至 500 mL 7H9 液体培养基培养 3 d ~ 4 d，OD600 达到 0.5~1.0。收集细菌前 24 h 加 0.1 倍体积的 2 mol/L 甘氨酸于培养物中。将培养物置冰浴中 1.5 h，3,000 r/min 离心 10 min，沉淀用冰预冷的 10%甘油洗三次，最后重悬于原培养物体积 1/100~1/500 的冰预冷的 10% 甘油中，置 -70℃保存备用。

1.2.3 rMs 的构建 提取质粒 pDE22-hsp65-IL-2，无菌沉淀，溶于无菌水中，浓度为 1 μg/μL。取 5μl 质粒 DNA 和 400 μLMS 感受态细胞置于 0.2 cm 直径的电穿孔杯中混匀，冰浴 10 min 后，电穿孔转化 Ms，电穿孔参数为 2.5 kV、25 μF、1000 Ω。电穿后，冰浴 10 min，将细胞转入 5 mL 的 7H9 液体培养基，37℃振荡培养 3 h，然后涂布于含 50 μg/mL 潮霉素的 7H10 平板筛选，室温静置至水分渗入培养基中，封口膜封闭平板，倒置于 37℃培养。3 d ~ 4 d 后，可见白色，表面干燥的单个菌落。挑取单菌落分别接种于 5 mL 含 50 μg/mL 潮霉素的 7H9 液体培养基，37℃振荡培养 3d ~ 4 d。PCR 鉴定筛选阳性克隆。

1.2.4 rMs 基因型鉴定 用 Hsp65 基因的上游引物 P1：5'GC GAATTC GATATC ATG GCC AAG ACA ATT GCG TAC3' 和 IL-2 基因下游引物 P2：5'GCG AAGCTT TCA AGT CAG TGT TGA GATG3' 扩增 rMs 中的 Hsp65-IL-2 融合基因。PCR 反应体系：10× buffer 5 μL，dNTPs 5 μL（2.5 mmol/L），DNA 模板为 1 μL，P1、P2 引物各 1 μL（25 μmol/L），Tag 酶 1μL，加水至 50 μL。PCR 条件：95℃预变性 5 min，95℃变性 15 s，65℃复性 30 s，72℃延伸 50 s，30 个循环，末次循环后 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。

1.2.5 Hsp65-IL-2 融合蛋白在 rMs 的分泌表达及其 Western-blot 鉴定 将 Ms、rMs 的单个菌落分别接种于 5 mL 含潮霉素（50 μg/mL）的 7H9 液体培养基中，37℃振荡培养 3 d ~ 4 d。然后按 1∶100 的比例转接至 500 mL 7H9 液体培养液中，37℃振荡培养 3 d ~ 4 d。42℃诱导 30 min，3,000 r/min 离心 20 min，收集上清，过滤除菌后，蒸馏水透析除盐，真空冻干，即为 Ms 和 rMs 的 CFP。将两种 CFP 进行 10% SDS-PAGE 后转移至 PVDF 膜上，用 0.1% BSA 封闭过夜，加 Hsp65-IL-2 融合基因免疫小鼠血清（本室制备保存）作用 1 h，以 PBS 洗涤后，加 HRP-羊抗鼠 IgG 作用 1 h，DAB 显色观察结果。

2 结果

2.1 分泌表达 Hsp65-IL-2 融合蛋白大肠埃希菌 - 分枝杆菌穿梭载体的构建

重组质粒 pDE22-hsp65-IL-2 用 *EcoR*Ⅴ和 *Hind*Ⅲ双酶切鉴定，如图 1 所示，1-3 泳道在 DL 2000 bp 位置处均有一特异性酶切片段，与 Hsp65-IL-2 融合基因大小一致，Hsp65-IL-2 融合基因大小为 2063 bp，表明分泌表达 Hsp65-IL-2 融合蛋白的大肠埃希菌 - 分枝杆菌穿梭载体构建成功。

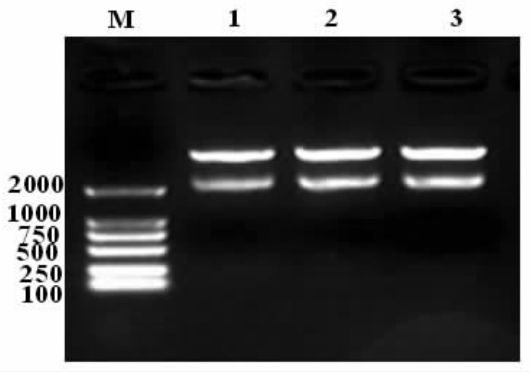

图 1 pDE22-hsp65-IL-2 重组质粒的酶切鉴定: M: 标准 DNA 分子量 marker DL2000; 1-3: 质粒 pDE22-hsp65-IL-2 经 *EcoR*Ⅴ和 *Hind*Ⅲ双酶切产物, 条带大小在 DNA marker 2000 bp 处是 hsp65-IL-2 融合基因片段

Fig.1 Restriction enzyme analysis of the plasmid pDE22-hsp65-IL-2.: M: DL2000 Marker; 1-3: Product of pDE22-hsp65-IL-2 plasmid digested with *EcoR*Ⅴ and *Hind*Ⅲ, The band at the size of DNA marker 2000 bp is the hsp65-IL-2 fused gene fragment

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 rMs 阳性克隆的筛选

在潮霉素抗性压力筛选下，随机挑选 3 个克隆进行 PCR 鉴定。结果表明,筛选出的 3 株 rMs 阳性克隆均能特异性地扩增得到约 2000bp 的片段,与 Hsp65- IL-2 融合基因大小相一致(图 2),而 Ms 阴性对照则无特异性扩增条带。

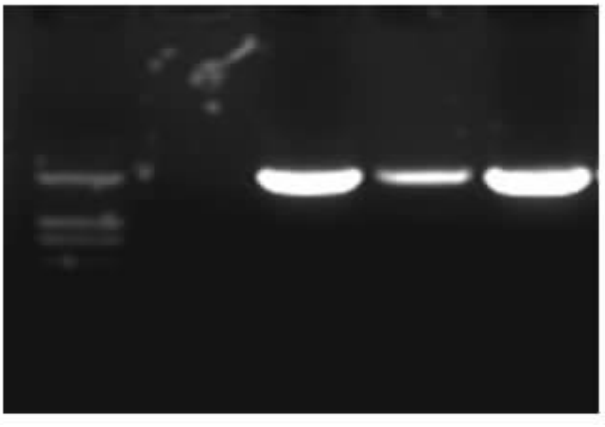

图 2 阳性 rMs 的 PCR 鉴定 :M 标准 DNA 分子量 marker DL2000; 1: Ms 的 PCR 产物; 2-4 : rMs 的 PCR 产物

Fig.2 PCR analysis of positive rMs : M: DL2000 Marker; 1: PCR product of Ms; 2-4 : PCR product of rMs.

2.3 rMs 分泌表达 Hsp65-IL-2 融合蛋白的 Western-blot

将 rMs 扩大培养,42℃诱导表达后,收集培养上清,过滤除菌后,蒸馏水透析除盐,真空冻干,用 Hsp65-IL-2 融合基因免疫小鼠的抗血清对 rMs 培养上清进行 Western-blot 鉴定。结果,在 rMs 培养上清蛋白中约 78 kD 处有一特异性的反应条带,与预期表达的 Hsp65-IL-2 融合蛋白分子量相符，表明 rMs 可特异性分泌表达 Hsp65-IL-2 融合蛋白(图 3)。

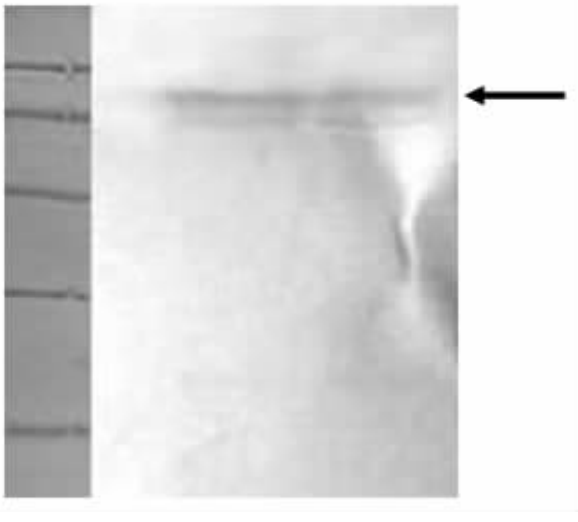

图 3 rMs 培养上清中 Hsp65-IL-2 融合蛋白的 Western-blot: M: 蛋白分子量 marker; 1-2: rMs 的培养滤液蛋白用抗 hsp65-IL-2 融合蛋白的免疫小鼠血清鉴定的特异性反应条带.

Fig.3 Western-blot analysis of Hsp65-IL-2 fusion protein in culture filtrate proteins of rMs: M, molecular weight marker; 1-2: the specific reactive band of the culture filtrate proteins of rMs , detected by the sera of immunized mice against hsp65-IL-2 fusion protein.

3 讨论

一般认为活载体疫苗在刺激保护性免疫方面优于其他基因工程疫苗。目前常用的活疫苗载体有沙门氏菌、牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒等[11-13],而用分枝杆菌作为活疫苗的载体有以下的优越性:(1) 所表达的保护性抗原不需纯化，可直接用于免疫,免去了蛋白质处理的复杂过程;(2) 分枝杆菌可在体内长期存活并不断表达外源抗原,单次接种即可持续诱导对靶抗原的反应,维持机体的免疫反应;(3) 可对靶抗原(基因)进行修饰;(4) 分枝杆菌本身可作为一种强免疫佐剂,提高宿主的免疫力[13]。

目前研究较多的分枝杆菌载体有 BCG,Ms 和母牛分枝杆菌等。BCG 生长慢,周期长(增殖一代需 10 h~16 h),且 BCG 的细胞壁厚,富含脂质,对之进行基因操作比较困难;另外 BCG 在免疫力低下患者(如艾滋病患者)可引起严重的播散性感染,因此人们开始更加关注非致病性分枝杆菌作为基因表达宿主这一研究领域。Ms 对人体不致病,生长速率比 BCG 快 10 倍,表达外源蛋白产量高,为 BCG 的 5~10 倍;而且在 Ms 中表达的 MTB 蛋白与天然蛋白的生化免疫特性几乎完全相同，这对 MTB 保护性抗原生物学活性的发挥起着重要的作用[14]。因此,Ms 是一种很有优势的分枝杆菌表达载体,在抗 MTB 的新型疫苗研究中具有广阔的应用前景。

大肠埃希菌 - 分枝杆菌穿梭表达载体 pDE22 是本实验室在 pOLYG 经典穿梭载体的基础上构建的一种分泌表达载体。该载体以 MTB H37Rv 的 Hsp60 序列作为分枝杆菌特异性的启动子,该启动子是一种高效表达启动子,在遇到热及过氧化物等时能启动其下游基因的转录，它不仅可表达多种外来抗原,而且表达量较高;在 Hsp60 启动子的下游含有一段 α-ss 的信号肽序列,可将目的蛋白进行分泌表达,而分泌表达可增加细菌表面抗原识别途径,更有效地刺激机体的免疫应答[15]。

本研究利用 Ms 作为表达宿主,pDE22 载体分泌表达 Hsp65-IL-2 融合蛋白,不仅发挥了 Ms 作为活疫苗载体的优势,而且利用了 Hsp65 做为抗 MTB 感染的重要保护性抗原的特性。IL-2 因子的加入不仅可提高机体 IL-2 因子的水平,而且有助于改变机体细胞因子表达谱的变化,调整细胞免疫应答的方向,以期提高 rMs 对 MTB 感染的保护效果。本研究工作为下一步评价该 rMs 作为 TB 新型疫苗的免疫学特性和抗 MTB 感染的保护效果研究奠定了基础。

参 考 文 献 (References)

[1] Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity[J]. Lancet, 1995, 346 :1339-1345

[2] Shinnick TM. The 65-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis [J]. J Bacteriol, 1987, 169:1080-1088

[3] Oftung F, Mustafa AS, Shinnick TM, et al. Epitopes of the Mycobacterium tuberculosis 65-kilodalton protein antigen as recognized by human T cells[J]. J Immunol, 1988,141:2749- 2754

[4] Kaufmann SH, Vath U, Thole JE, et al. Enumeration of T cells reactive with Mycobacterium tuberculosis organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kD protein[J]. Eur J Immunol, 1987, 17: 351-357

(下转第 3430 页)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

negatively regulates T helper type 1 immunity [J]. Nat Immunol, 2005,6(12):1245-1252

[9] Sabatos CA, Chakravarti S, Cha E, et al. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance[J]. Nat Immunol, 2003,4(11): 1102-1110

[10] Sá nchez-Fueyo A, Tian J, Picarella D, et al. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance[J]. Nat Immunol, 2003, 4(11): 1093-1101

[11] Anderson DE. Tim-3 as a therapeutic target in human inflammatory diseases[J]. Expert Opin Ther Targets. 2007,11(8):1005-1009.

[12] Anderson AC, Anderson DE. TIM-3 in autoimmunity [J]. Curr Opin Immunol, 2006,18(6): 665-669

[13] Kelko Nagahara,Tomohiro Arikawa, et al. Galectin-9 Increases Tim-3- dendritic cells and CD8 T cells and enhances antitumor immunity via galectin-9-Tim-3 interactions [J]. J Immunol, 2008,181(11): 7660-7669

[14] Anderson AC, Anderson DE, Bregoli L, et al. Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells[J]. Science, 2007,318(5853): 1141-1143

[15] Zoltan Wiener, Barbara Kohalmi, Peter Pocza, et al. TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells[J]. J Invest Dermatol, 2007,127(4): 906-914

(上接第 3407 页)

[5] Bonato VLD, Lima VMF, Tascon RE, et al. Identification and Characterization of Protective T Cells in hsp65 DNA-Vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-Infected Mice [J]. Infect Immun, 1998,66: 169 - 175

[6] Wang LM, Bai YL, Shi CH, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding the fusion protein of mycobacterium heat shock protein 65 (Hsp65) with human interleukin-2 against Mycobacterium tuberculosis in BALB/c mice [J]. APMIS, 2008, 116: 1071-1081

[7] Sutherland JS, Adetifa IM, Hillet PC, et al. Pattern and diversity of cytokine production differentiates between Mycobacterium tuberculosis infection and disease[J]. Eur J Immunol, 2009, 39: 723-729

[8] 何炬斌. 白细胞介素 -2 在结核病治疗中的应用 [J]. 上海免疫学杂志, 1994, 14: 245-246
He Ju-bing. The usage of interleukine-2 in tuberculosis treatment [J]. Shanghai Immunology, 1994, 14: 245-246 (In Chinese)

[9] Johnson BJ, Ress SR, Willcox P, et al. Clinical and immune responses of tuberculosis patients treated with low-dose IL-2 and multidrug therapy[J]. Cytokines Mol Ther, 1995,1:185-196

[10] 王丽梅,师长宏,张海,等. 结核分枝杆菌 HSP65-IL-2 融合蛋白的表达和纯化[J]. 中国人兽共患病杂志. 2006, 22(9):801-804
Wang Li-mei, Shi Chang-hong, Zhang Hai, et al. The Mycobacteria tuberculosis HSP65-IL-2 fusion protein expression and purification [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2006, 22(9): 801-804 (In Chinese)

[11] Zhu X, Venkataprasad N, Ivanyi J, et al.Vaccination with recombinant vaccinia viruses protects mice against Mycobacterium tuberculosis infection[J]. Immunology, 1997, 92:6-9

[12] Hess J, Grode L, Hellwig J, et al. Protection against murine tuberculosis by an attenuated recombinant Salmonella typhimurium vaccine strain that secretes the 30-kDa antigen of Mycobacterium bovis BCG [J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2000, 27:283-289

[13] 赵宝华,张莉,石振华. 基因重组卡介苗的优点及应用[J].生物学通报,2002, 37:18-20
Zhao Bao-hua, Zhang Li, Si Zheng-hua. The advantage and applacation of Genetic recombinated BCG [J]. Bullitin of Biology, 2002, 37: 18-20 (In Chinese)

[14] Falcone V, Bassey E, Jacobs W Jr, et al. The immunogenicity of recombinant mycobacterium smegmatis bearing BCG genes [J]. Microbiology, 1995, 141: 1239-1245

[15] 史皆然,李元,戚好文,等. 利用 Hsp 基因调控元件构建胞内表达的 E.coli-BCG 穿梭载体 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23: 629-632
Shi Jie-ran, Li Yuan, Qi Hao-wen, et al. Using the Hsp gene control component to compose expressin shuttle vector in E.coli-BCG[J]. Journal of microbiology and immunology, 2003, 23: 629-632. (In Chinese)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net