

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)11-0987-04

结核分枝杆菌重组蛋白的制备及抗原性分析

苏明权¹, 岳乔红¹, 周萍², 段艳³, 杨柳¹, 杨军兰¹, 刘家云¹, 郝晓柯¹ (¹第四军医大学西京医院检验科, 陕西西安 710033; ²西安交通大学第一医院检验科, 陕西西安 710061; ³西安市结核病胸部肿瘤医院, 陕西西安 710058)

Preparation and antigenicity assay of recombinant proteins of *Mycobacterium tuberculosis*

SU Ming-Quan¹, YUE Qiao-Hong¹, ZHOU Ping², DUAN Yan³, YANG Liu³, YANG Jun-Lan¹, LIU Jia-Yun¹, HAO Xiao-Ke¹

¹Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ²Department of Clinical Laboratory, First Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, ³Xi'an Tuberculosis and Thoracic Tumor Hospital, Xi'an 710058, China

【Abstract】 AIM: To clone and express the $M_r 16 \times 10^3$ and $M_r 38 \times 10^3$ proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in *E. coli*, and to characterize its antigenicity and specificity. **METHODS:** The $M_r 16 \times 10^3$ and $M_r 38 \times 10^3$ antigen genes were amplified from *Mycobacterium tuberculosis* genome DNA by polymerase chain reactions and cloned into pGEX-4T-2 expression vector after sequencing. BL21 strain of *E. coli* was transformed with the recombinant vectors and induced to express recombinant proteins. The proteins were purified by affinity column chromatography. The antigenicity and specificity of purified proteins were estimated by enzyme-linked immunoabsorbant assay. **RESULTS:** The BL21 strains of *E. coli* with recombinant vectors showed 42% and 18% of $M_r 16 \times 10^3$ (688 mg/L) and $M_r 38 \times 10^3$ (217 mg/L) gene expressions after induction. The sensitivity of $M_r 16 \times 10^3$ and $M_r 38 \times 10^3$ proteins were 67.0% and 79.8%, specificity were 100% and 99% accuracy were 84.0% and 89.7% respectively. **CONCLUSION:** The expressions and purifications of recombinant $M_r 16 \times 10^3$ and $M_r 38 \times 10^3$ antigens with good antigenicity and specificity facilitate their research and clinical application in the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis*.

【Keywords】 *Mycobacterium tuberculosis*; antigen; gene expression; enzyme-linked immunoabsorbant assay

【摘要】目的:克隆表达结核分枝杆菌 $M_r 16 \times 10^3$ 和 $M_r 38 \times 10^3$ 重组蛋白,测定其抗原性和特异性。方法:利用聚合酶链反应自结核分枝杆菌基因组 DNA 扩增 $M_r 16 \times 10^3$ 和 M_r

38×10^3 抗原基因,经测序鉴定后克隆于 pGEX-4T-2 表达载体,转化于大肠杆菌 BL21 菌株进行诱导表达,利用 GSTrapFF 蛋白柱纯化表达产物,通过酶联免疫吸附测定(ELISA)检测其抗原性与特异性。结果:携带重组质粒的菌株经诱导产生的表达量分别为 42% 和 18%, $M_r 16 \times 10^3$ 和 $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白量分别为 688 mg/L 和 217 mg/L。其中 $M_r 16 \times 10^3$ 蛋白作为包被抗原 ELISA 法检测的灵敏度为 67.0%, 特异性为 100%, 准确性为 84.0%。 $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白作为包被抗原 ELISA 检测的灵敏度为 79.8%, 特异性为 99%, 准确性为 89.7%。结论:以 $M_r 16 \times 10^3$ 、 $M_r 38 \times 10^3$ 重组蛋白为抗原具有良好的抗原性和特异性,可用于结核分枝杆菌诊断方法的建立及临床诊断。

【关键词】 结核分枝杆菌; 抗原; 基因表达; ELISA

【中图分类号】 R378

【文献标识码】 A

0 引言

结核病仍是目前危害全球人类健康的重要传染病,我国每年约有 13 万人因结核病而死亡。对结核病的实验诊断主要依据细菌学检查和血清学检测,细菌学检查繁琐费时,培养周期长,达不到快速诊断的目的,血清学检测是一种方便快捷的实验室诊断方法,血清学检查的关键是结核分枝杆菌特异性抗原的提呈。我们利用基因工程重组方法,通过大肠杆菌表达结核分枝杆菌的 $M_r 16 \times 10^3$ 和 $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白,以 $M_r 16 \times 10^3$ 和 $M_r 38 \times 10^3$ 重组蛋白为抗原,通过酶联免疫吸附试验测定两种抗原的反应性和特异性,以期证实其在血清学诊断中的价值。

1 材料和方法

1.1 材料 结核分枝杆菌 H37RV 标准株(菌株号: ATCC27294)购自卫生部国家菌种保存中心。*E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21 由第四军医大学西京医院检验科保存, T4 连接酶、限制性核酸内切酶 *Bam*H I、*Eco*R I DNA 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均购自 Vitagene 公司, GST 亲和层析柱 GSTrapFF 购自 Pharmacia 公司, pGEX-4T-2 表达载体购自 Pharmacia 公司。

1.2 方法

1.2.1 结核分枝杆菌 $M_r 16 \times 10^3$ 、 $M_r 38 \times 10^3$ 抗原基因的 PCR 扩增 结核分枝杆菌 H37Rv 培养物经煮沸灭活,蛋白酶 K 消化过夜,经酚、氯仿抽提、乙醇

收稿日期 2005-12-13; 接受日期 2006-03-10

作者简介 苏明权, 副主任技师, Tel (029) 84775959 Email sjksmq@fmmu.edu.cn

沉淀纯化 DNA. 通过 PCR 扩增 M_r 16 × 10³, M_r 38 × 10³ 基因. M_r 16 × 10³ 抗原基因引物为: 5'-AGG GGATCC ATGCCACCACCCTTCCCGTTCAG-3' 含 BamH I 酶切位点和起始密码子 5'-TCAG CTCGAG CCCAGTGGTCAGTTGGTGGACCG-3' 含 Xho I 酶切位点和终止密码子, 预期扩增产物 435 bp. M_r 38 × 10³ 基因引物为: 5'-AGG GGATCC GTGAAAATTCGTTG-CATACGCT-3' 含 BamH I 酶切位点和起始密码子 5'-GAT GAATTC ACGGAGGTTGCTGTCGCGTGCTG-3' 含 Xho I 酶切位点和终止密码子, 预期扩增产物 1122 bp. PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min. 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 结果.

1.2.2 基因的克隆与鉴定 用胶回收试剂盒回收目的片段, 将 M_r 16 × 10³, M_r 38 × 10³ 抗原基因与质粒 pGEX-4T-2 同时用 BamH I 与 Xho I 双酶切, T4 连接酶连接, 重组质粒转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞. 利用 Vitagene 公司提供的小量质粒提取试剂提取质粒 DNA, 序列测定由上海生工生物工程公司完成.

1.2.3 表达载体的构建 将携带 M_r 16 × 10³, M_r 38 × 10³ 抗原基因的重组质粒进行双酶切, 琼脂糖凝胶电泳分离, 切胶回收基因片段, Vitagene 公司凝胶抽提试剂盒纯化, 连接于双酶切的 pGEX-4T-2 表达载体, T4 DNA 连接酶连接, 转化于 *E. coli* DH5 α 感受态细胞. 挑选单菌落, 抽提质粒, 酶切检测, 并进行序列测定以证实插入序列是否正确. 挑选测序正确的重组表达载体质粒, 再转化于 BL21 菌株.

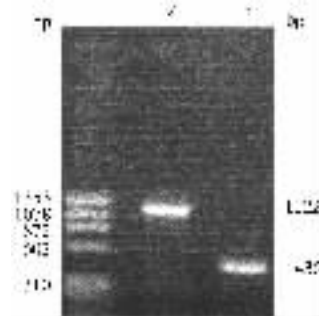
1.2.4 重组质粒的诱导表达及纯化 将携带重组表达载体的 BL21 菌株接种于含氨苄青霉素 0.1 g/L 的 LB 培养基, 37℃ 振荡培养过夜. 然后从中取 1 mL 接种于 100 mL 新鲜含氨苄青霉素的 LB 液体培养基, 37℃ 振荡培养 3 h, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度 0.1 mmol/L, 37℃ 继续培养 5 h. 离心收集菌体. 将诱导前后的样本各加入 2 × 样品缓冲液 100 μ L, 95℃ 沸水浴 10 min, 10 000 g 离心 10 min, 取 10 μ L 上清进行 120 g/L SDS-PAGE. 凝胶用考马斯亮蓝染色 2 h, 脱色 3 ~ 5 h, 观察目的蛋白, 用 CS-9000 薄层扫描仪在 580 nm 波长下对 SDS-PAGE 蛋白电泳凝胶上的蛋白条带进行扫描, 确定菌体总蛋白中目的蛋白比例. 用 GSTrap FF 蛋白纯化柱和凝血酶进行目的蛋白的纯化, 按试剂盒说明书进行, 得到纯化的重组结核杆菌 M_r 16 × 10³, M_r 38 × 10³ 蛋白用 SDS-PAGE 蛋白电泳进行检测.

1.2.5 M_r 16 × 10³, M_r 38 × 10³ 重组蛋白抗原的 ELISA 检测 对西安地区收集的 94 份血清样品进行

ELISA 检测, 其中肺结核患者血清 90 份(经集菌涂片染色法或培养实验证实为结核分枝杆菌阳性), 正常健康人血清 100 份为阴性对照. 将纯化 M_r 16 × 10³, M_r 38 × 10³ 抗原溶液稀释于 PBS 溶液, 37℃ 包被酶标板 2 h. PBST 溶液(PBS 内含 0.5 g/L Tween20)洗涤, 再用封闭液(PBST 内含 1 g/L 牛血清清蛋白)37℃ 封闭 1 h, 然后用 PBST 溶液洗涤. 加入 1 μ L 血清样品, 37℃ 温育 1 h, PBST 溶液洗涤. 加入 1:1000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG, 37℃ 温育 30 min. 加入四甲基联苯胺显色液, 室温显色 30 min 后终止反应. 450 nm 检测吸光度值.

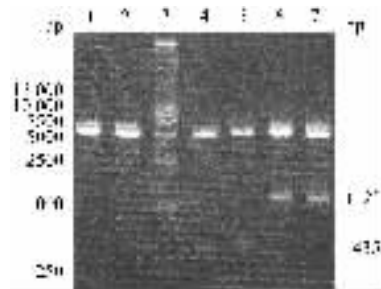
2 结果

2.1 目的基因的扩增与克隆 用蛋白酶裂解法提取的结核杆菌基因组 DNA 用特异的引物进行 PCR 扩增, 经琼脂糖凝胶电泳, 证实所得到的 PCR 产物为目的基因片段, 与在 GenBank 中查到的结核分枝杆菌 M_r 16 × 10³, M_r 38 × 10³ 蛋白的基因大小基本一致(图 1). 提取质粒, 分别经双酶切后, 得到 435 bp 和 1122 bp 的目的基因片段以及载体 pGEX-4T-2 的 4950 bp 片段, 而空质粒对照只得到一条 4970 bp 左右的片段(图 2). 经测序证实目的基因的序列完全正确, 未发生突变.



1: DNA 分子量标准; 2: M_r 38 × 10³ 蛋白基因的 PCR 扩增产物; 3: M_r 16 × 10³ 蛋白基因的 PCR 扩增产物.

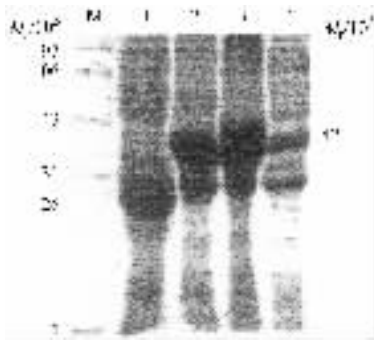
图 1 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳



1 2: 空质粒 pGEX-4T-2 的 BamH I 和 Xho I 双酶切结果; 3: DNA 分子量标准; 4 5: 重组质粒 pGEX-16 的 BamH I 和 Xho I 双酶切结果; 6 7: 重组质粒 pGEX-38 的 BamH I 和 Xho I 双酶切结果.

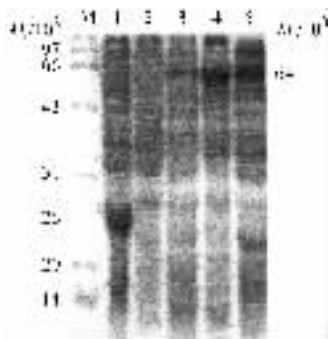
图 2 重组质粒 pGEX-16 和 pGEX-38 的酶切鉴定

2.2 表达载体构建与重组蛋白诱导表达 进一步测序表明, pGEX-16 及 pGEX-38 中的插入序列及读码框架正确. 将测序正确的 pGEX-16, pGEX-38 和 pGEX-4T-2 分别转化感受态 *E. coli* DH5 α , 在 37 $^{\circ}$ C 用 1.0 mmol/L IPTG 诱导后, 分别取菌株进行 120 g/L SDS-PAGE. 结果表明, pGEX-16 转化的菌株在 M_r 42 $\times 10^3$ 处出现一条新生蛋白条带, pGEX-38 在 M_r 64 $\times 10^3$ 处出现一条新生蛋白条带, 均与预期结果一致, 而 pGEX-4T-2 转化的菌株则只在 M_r 26 $\times 10^3$ 处有一新生条带, 说明插入的 M_r 16 $\times 10^3$ 蛋白和 M_r 38 $\times 10^3$ 蛋白基因已经成功地在大肠杆菌中表达, 并与 GST 形成了融合蛋白(图 3, 图 4). 对图 3, 图 4 中 SDS-PAGE 凝胶上菌体蛋白条带分别进行凝胶薄层扫描分析, 表达的融合蛋白 GST-16, GST-38 分别约占菌体总蛋白的 42% 和 18%.



M: 蛋白分子量标准; 1: GST 蛋白; 2: GST-16 融合蛋白; 3: GST-16 融合蛋白包涵体; 4: 可溶性的 GST-16 融合蛋白.

图 3 GST-16 融合蛋白的原核表达



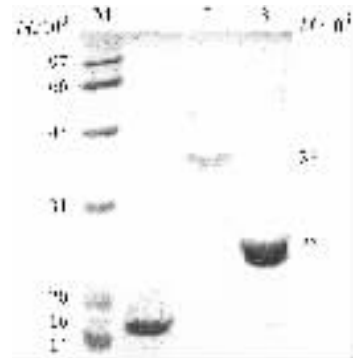
M: 蛋白分子量标准; 1: GST 蛋白; 2: GST-38 融合蛋白(未诱导); 3: 可溶性的 GST-38 融合蛋白; 4: GST-38 融合蛋白包涵体; 5: GST-38 融合蛋白包涵体.

图 4 GST-38 融合蛋白的原核表达

2.3 重组蛋白的纯化 经蛋白纯化后, 经 SDS-PAGE 蛋白电泳检测, 可看到单一的纯化蛋白泳带(图 5), 紫外分光光度仪测量纯化蛋白的浓度: M_r

16 $\times 10^3$ M_r 38 $\times 10^3$ 蛋白分别为 688 mg/L 和 217 mg/L.

2.4 二种抗原的 ELISA 检测 根据棋盘滴定法选择包被抗原工作浓度, 以强阳性血清的 A 值为 0.8 左右, 阴性血清的 A 值小于 0.1 的包被抗原稀释度作为工作浓度. 选择 M_r 16 $\times 10^3$ 蛋白的工作浓度为 10 μ g/L, M_r 38 $\times 10^3$ 蛋白的工作浓度为 1 μ g/L. 以选择好工作浓度的蛋白抗原进行包被, 分别检测病例组和对照组血清标本. 结果判断: 以空白对照孔(只加蒸馏水 200 μ L)校零, 在波长 450 nm 处读取各孔的 A 值, 凡样品孔 A 值: 阴性对照孔 A 值 ≥ 2.1 , 该样品即为阳性. 按检测结果计算各个抗原检测的灵敏度, 即实际患病且被诊断试验诊断为患者的概率, 则 M_r 16 $\times 10^3$ 蛋白抗原作为包被抗原 ELISA 法检测的灵敏度为 67.0%(63/94), M_r 38 $\times 10^3$ 蛋白抗原灵敏度为 79.8%(75/94), 再计算各个抗原检测的特异性, 即实际未患病被诊断试验诊为非患者的概率, 则 M_r 16 $\times 10^3$ 蛋白抗原的特异性为 100%, M_r 38 $\times 10^3$ 蛋白抗原的特异性为 99.0%. 根据其各自的灵敏度和特异性计算其 ELISA 法检测的准确度, M_r 16 $\times 10^3$ 蛋白抗原的准确度为 84.0%, M_r 38 $\times 10^3$ 蛋白准确度为 89.7%.



M: 蛋白分子量标准; 1: 纯化的 M_r 16 $\times 10^3$ 蛋白; 2: 纯化的 M_r 38 $\times 10^3$ 蛋白; 3: GST 蛋白.

图 5 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析

3 讨论

结核菌抗体检测的关键是寻找有效的抗原成分. 目前发现的结核分枝杆菌特异性抗原最常用的是 M_r 38 $\times 10^3$ 抗原, 另外有 M_r 14 $\times 10^3$, M_r 16 $\times 10^3$ 抗原、ESAT-6 抗原与 mtb81 抗原等^[1-2], 上述几种抗原在结核杆菌抗体检测中的阳性率均各不相同^[3-5]. 所以用基因重组技术制备结核分枝杆菌基因抗原, 对结核病的诊断和方法学建立具有十分重要的意义.

M_r 16 $\times 10^3$ 蛋白是一种小分子热休克蛋白, 具有

家族性的共同特征^[6]。研究发现 MTB $M_r 16 \times 10^3$ 蛋白抗原与结核病的长期潜伏有着密切的关系。在培养条件下 $M_r 16 \times 10^3$ 蛋白从结核分枝杆菌生长对数期到稳定期具有很高的表达,在稳定期可成为优势生长蛋白,该蛋白在结核分枝杆菌感染宿主初期对于细菌的生长是必需的。 $M_r 16 \times 10^3$ 蛋白对结核分支杆菌的生存力和稳定性起着重要的调节作用,主要是因为它所含有的 α -crystallin 结构域是所有小分子热休克蛋白的同源序列,且高度保守。因此在人体感染 MTB 潜伏期时 $M_r 16 \times 10^3$ 蛋白被认为有利于结核菌的存活,在 85% 的肺结核病人的血清中都可查到 $M_r 16 \times 10^3$ 蛋白^[7]。TB $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白又叫抗原 b (Pab) 抗原 5 抗原 78,是 MTB 中主要的抗原,它是一种糖基化的脂蛋白。Andersen 等从 λ gt11 MTB DNA 基因文库中分离出编码 $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白的基因,该基因序列含 1122 个碱基对, $M_r 38.2 \times 10^3$ 。 $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白的氨基酸序列与大肠杆菌的磷酸盐结合蛋白(PstS)有 30% 的同源性,PstS 是大肠杆菌磷转运系统中的磷结合蛋白,当磷缺乏时 PstS 可被激活。其后 Andersen 证实 $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白果然也与磷代谢有关,因在磷饥饿培养条件下,该蛋白被大量诱导^[8]。MTB $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白是 MTB 中主要的抗原,它是一种糖基化的脂蛋白,是 MTB 特异性抗原,有两个 B 细胞抗原决定簇。

我们根据结核分枝杆菌的生长特性,以 $M_r 16 \times 10^3$ 、 $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白进行基因工程表达,在大肠杆菌中成功表达了结核杆菌两种基因重组蛋白,为研究其活性和建立以 $M_r 16 \times 10^3$ 和 $M_r 38 \times 10^3$ 基因抗原为目标的血清学检测方法提供条件。以 $M_r 16 \times 10^3$ 蛋白为抗原,经 ELISA 方法检测临床样品中的结核杆菌抗体灵敏度为 67.0%,特异性为 100%,准确性为 84.0%;以 $M_r 38 \times 10^3$ 蛋白为抗原,经 ELISA 方法检测临床样品中的结核杆菌抗体灵敏度为:

79.8%,特异性为:99.0%,准确性为:89.7%。实验结果证实,以两种基因重组蛋白为抗原建立结核分枝杆菌血清学检测方法,在结核病诊断上有一定的使用价值,为临床诊断结核病提供切实可行的手段。

【参考文献】

- [1] Aernd SM, Engelhard AC, Groot G, et al. Tuberculin skin testing compared with T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis* specific and nonspecific antigens for detection of latent infection in persons with recent tuberculosis contact [J]. Clin Diagn Lab Immunol 2001, 8(6): 1089-1096.
- [2] Doherty TM, Demissie A, Olobo J, et al. Immune responses to the *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection among contacts of tuberculosis patients [J]. J Clin Microbiol 2002, 40(4): 704-706.
- [3] Uma Devi KR, Ramalingam B, Brennan PJ, et al. Specific and early detection of IgG, IgA and IgM antibodies to *Mycobacterium tuberculosis* 38kDa antigen in pulmonary tuberculosis [J]. Tuberculosis, 2001, 81(2): 249-253.
- [4] Imaz MS, Comini MA, Zerblin E, et al. Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM and IgA antibodies to the recombinant 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood tuberculosis [J]. Int J Tuberc Lung Dis, 2001, 5(6): 1036-1043.
- [5] Hendrickson RC, Douglass JF, Reynolds LD, et al. Mass spectrometric identification of mtb81, a novel serological marker for tuberculosis [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(12): 2354-2361.
- [6] 毛启龙, 冯修光, 吕增益. 结核杆菌小分子热休克蛋白 Hsp16.3 的高效自发再折叠和再组装 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(1): 87-90.
- [7] Valdez MM, Clark JJ, Wu GJ, et al. Functional similarities between the small heat shock proteins *Mycobacterium tuberculosis* HSP 16.3 and human alphaB-crystallin [J]. Eur J Biochem, 2002, 269(7): 1806-1813.
- [8] Hu YM, Butcher PD, Sole K, et al. Protein synthesis is shutdown in dormant *Mycobacterium tuberculosis* and is reversed by oxygen or heat shock [J]. FEMS Microbiol Lett, 1998, 158(1): 139-145.

编辑 杨湘华

· 期刊文摘 · 小鼠心室肌细胞分离方法的改进

[徐明, 周士胜, 李龙天, 迟庆. 中国临床康复, 2006, 10(16): 112-113]

目的 探索更简单实用和重复性好的小鼠心室肌细胞分离技术。方法 实验于 2005-05/09 在大连大学医学院医学研究中心完成。选择 8~16 周龄昆明小鼠 150 只,雌雄不拘,体质量 30~40 g,由大连大学医学院动物中心提供。采用原位主动脉插管和动脉夹固定法酶解分离小鼠心室肌细胞,并在室温下进行全细胞膜片钳记录。结果 可将主动脉插管的时间控制在 1.5 min 内,所获心室肌细胞横纹清晰,一次性复钙可获得 50%~60% 的耐钙细胞,分离所得细胞可在全细胞膜片钳方式下记录到一过性外向钾电流(Ito)。结论 原位主动脉插管和动脉夹固定酶解分离心室肌细胞的方法简便易行,重复性好,克服了原有方法体外心脏插管时间长,每次插管时间差异较大,分离效果不稳定的弊端。