

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)01-0059-03

结核分枝杆菌 RD1 区 PPE68/GST 融合蛋白表达质粒的构建及表达

曾林子¹ 陈建平² 刘成君¹ 李红霞² 姚卫³ 杨志荣¹ (四川大学¹ 生物资源与生态环境教育部重点实验室,² 华西医学中心基础医学与法医学院寄生虫教研室, 四川 成都 610052;³ 绵阳市疾病预防控制中心, 四川 绵阳 621000)Construction and expression of *Mycobacterium tuberculosis* PPE68/GST fusion protein expression plasmidZENG Lin-Zi¹, CHEN Jian-Ping², LIU Cheng-Jun¹, LI Hong-Xia², YAO Wei³, YANG Zhi-Rong¹¹Key Laboratory of Ministry of Education for Biological Resources and Ecological Environment, ²Department of Parasitology, College of Preclinical and Forensic Medicine, West China Medical Center, Sichuan University, Chengdu 610052, China, ³Mianyang Center for Disease Control and Prevention, Mianyang 621000, China

【Abstract】 AIM: To construct the *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) PPE68/GST fusion protein expression vector and induce its expression in *E. coli* JM109. **METHODS:** *Rv3873* gene was amplified from MTB H37Rv by PCR and directionally cloned into expression plasmid pGEX-4T-1. Construct the recombinant expression plasmid pGEX-4T-1-*Rv3873* and express it in *E. coli* JM109 under the induction of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). The fusion protein was purified by GST affinity chromatography and confirmed by SDS-PAGE and Western Blot. **RESULTS:** The desired PPE68/GST fusion protein (M_r63 000) was successfully expressed, accounting for 40% of the total bacteria. Western bolt revealed that the fusion protein could react with the polyvalent antiserum of tuberculosis patients. **CONCLUSION:** Prokaryotic expression plasmid pGEX-4T-1-*Rv3873* was successfully cloned and expressed in *E. coli* JM109.

【Keywords】 *Mycobacterium tuberculosis*; PPE68/GST; expression

【摘要】目的:构建结核分枝杆菌 PPE68/GST 融合蛋白表达质粒,并在大肠杆菌 JM109 中诱导表达。方法:利用 PCR 技术从结核杆菌 H37Rv 中扩增 *Rv3873* 基因,并将其定向克隆 pGEX-4T-1 中,构建重组表达质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* 并转化

收稿日期 2006-07-11; 接受日期 2006-10-30

基金项目 国家自然科学基金(30300302);四川省学术和技术带头人培养基金(4200316)

通讯作者 杨志荣。Tel (028)85410362 Email bioyang@163.com

作者简介:曾林子,硕士生(导师杨志荣)。Tel (028)89659600

Email forest0832@126.com

E. coli JM109 异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导表达。采用 GST 蛋白纯化试剂盒进行重组融合蛋白纯化,SDS-PAGE 和 Western Blot 鉴定重组表达产物。结果:成功构建原核表达质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* 并表达出约 M_r63 000 大小的 PPE68/GST 融合蛋白,占总菌体的 40%。Western Blot 检测该融合蛋白能和结核患者多价抗血清发生反应。结论:成功地构建了原核表达质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* 并在大肠杆菌得到表达。

【关键词】 结核分枝杆菌 RD1 区 PPE68/GST 融合蛋白 表达
【中图分类号】 52104 **【文献标识码】** A

0 引言

世界卫生组织的最新研究报告指出,由于艾滋病蔓延及结核杆菌耐药菌株的产生,使结核病的流行日益盛行。结核病的快速准确诊断,是全球控制结核病的重要措施。*Rv3873* 编码的 PPE68 蛋白是结核分枝杆菌(MTB)PPE 蛋白家族的一员,它可能与结核分枝杆菌抗原变异和逃避免疫机制有关,具有重要的免疫学意义,是一种免疫优势抗原^[1]。我们克隆表达并纯化 PPE68 蛋白,以期待进一步研究其免疫特性,评价其是否可作为结核诊断试剂的候选蛋白。

1 材料和方法

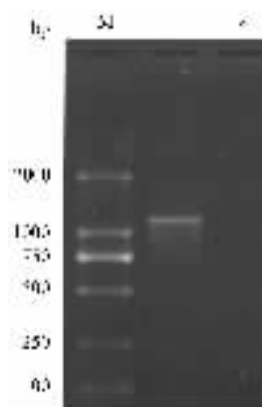
1.1 材料 结核分支杆菌标准株 H37Rv 由四川省疾病预防控制中心结核病预防控制所提供,结核患者血清抗体由绵阳市疾病预防控制中心所提供,*E. coli* JM109 质粒 pGEX-4T-1 由本室保存。pfu DNA 聚合酶, dNTP, 核酸相对分子量标准 DL2000, Marker VI 均购于天为时代有限公司;限制性内切酶 *Bam*HI, *Eco*RI, 蛋白质质量标准均购于晶美公司;T4 DNA 连接酶购于上海生工生物工程有限公司;质粒微量抽提试剂盒、硝酸纤维素膜素滤膜、DAB 试剂盒购于西安宝信生物有限公司;胶回收试剂盒、EB(溴化乙锭)琼脂糖、DAB 试剂盒、溶菌酶、丙烯酰胺、N-N-亚甲基双丙烯酰胺、SDS(十二烷基磺酸钠)、二硫苏糖醇(DTT)、异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)均购自成都涪海生物科技有限公司;GST 融合蛋白纯化试剂盒购自上海杰美基因公司;辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 购自北京中山生物技术有限公司。其余试剂

均为国产或进口分装分析纯级产品。

1.2 方法 基因组 DNA 提取参照文献 [2] 的方法稍加修改后进行。根据 GeneBank 中 Cole 等^[3]报道的结核杆菌 H37Rv 株 *Rv3873* 基因序列设计引物。引物序列：P1：5'-ATA GGA TCC ATC ACC ATG CTG TGG CAC-3'；P2：5'-TAT GAA TTC CAT TAC GGG AGC TCA CCA GT-3'。引物 P1 及 P2 的 5' 末端分别引入 *Bam*HI 和 *Eco*RI 酶切位点(用下划线表示)。上述引物由上海生工生物工程有限公司合成。*Rv3873* 基因的 PCR 扩增以结核分支杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板，反应条件为 94℃ 预变性 5 min，94℃ 变性 1 min，59℃ 复性 1 min，72℃ 延伸 2 min，72℃ 5 min 共 30 个循环，72℃ 继续延伸 5 min。反应结束后取 5 μL 扩增产物于 8 g/L 琼脂糖凝胶中电泳检测结果。将 PCR 产物及载体 pGEX-4T-1 用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Eco*RI 分别进行双酶切后用胶回收试剂盒回收。用 T4 DNA 连接酶将回收后的目的片段与载体在 16℃ 连接过夜。取连接反应物 5 μL 转化感受态大肠杆菌(氯化钙法制备^[4])JM109，取转化菌液 200 μL 涂布于含氨苄青霉素(50 mg/L)的 LB 固体培养基上，37℃ 培养过夜。随机挑取阳性转化子培养并提取质粒 DNA 进行酶切及 PCR 鉴定。将鉴定含有目的基因的重组质粒保种菌液送至宝生物工程有限公司进行测序。挑取含有重组质粒的 JM109 单菌落 37℃ 振荡培养过夜，以 1:100 转种于含有氨苄青霉素(50 mg/L)的 LB 液体培养基中，继续振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.6 时，加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L，诱导表达 4 h。同时用 JM109 菌和含空载体 pGEX-4T-1 的 JM109 菌作对照。取菌液 1 mL 离心，PBS 洗涤 3 次后用 PBS 重悬菌体，加入溶菌酶(10 g/L)至终浓度为 10 mg/L，室温放置 30 min，反复冻融，12 000 r/min 离心 5 min 分别取上清和沉淀加入 1 × SDS 上样缓冲液，煮沸 5 min 后，进行 SDS-PAGE。大量诱导表达蛋白，方法同前，处理菌体分为上清和沉淀，每克沉淀重悬于 2 mL 含 8 mol/L 尿素的 0.1 mol/L Tris-Cl (pH 8.5) 中，室温静置 30 min，离心，转移上清，以透析法除去蛋白样品中尿素，透析后的样品于 -20℃ 保存^[4]。按照 GST 亲和层析柱所提供的方法纯化融合蛋白。将上述纯化产物和 JM109 对照菌表达产物进行 SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜上，50 g/L 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜，加入结核患者血清(1:100)，37℃ 孵育过夜，TTBS 洗涤 3 次，加入辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG(1:500)，37℃ 孵育 1 h，TTBS 洗涤 3 次，DAB 试剂显色。

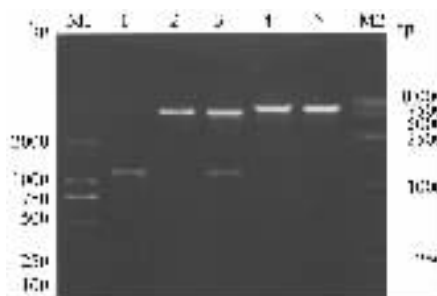
2 结果

2.1 重组质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* 的鉴定 用 PCR 方法以 MTBH37Rv 基因组 DNA 为模板进行扩增，经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳后，得到约为 1125 bp 的 DNA 条带，与预计目的基因片段大小相符，而空白对照未扩增出条带(图 1)分别用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 对重组质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* 进行单酶切，均见一约 3775 bp 片段，比空质粒双酶切约大 1125 bp；用 *Bam*HI 和 *Eco*RI 对重组质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* 进行双酶切，见与空质粒和 PCR 产物等大约 4900 bp 和 1125 bp 两个片段，对酶切正确的重组质粒进行 PCR 扩增鉴定，扩增出约为 1125 bp 的目的片段(图 2)。重组质粒经测序，结果显示，重组质粒所含目的基因片段与 GenBank 中报道的结核分支杆菌 H37Rv 株 *Rv3873* 基因序列同源性为 100%，表明 pGEX-4T-1-*Rv3873* 重组质粒构建成功。



M DNA marker 1 *Rv3873* PCR 扩增 2 阴性对照。

图 1 *Rv3873* PCR 产物电泳图

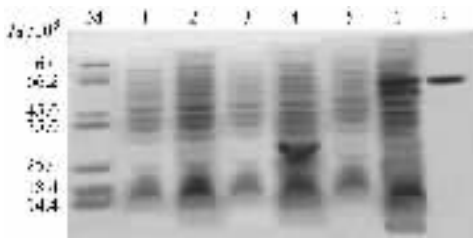


M1 DNA marker(DL2000) 1 *Rv3873* 的 PCR 扩增 2 pGEX-4T-1 *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切 3 重组质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* *Eco*RI 和 *Bam*HI 双酶切 4 重组质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* *Bam*HI 单酶切 5 重组质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* *Eco*RI 单酶切 M2 DNA marker(marker VI)。

图 2 重组质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* 酶切和 PCR 鉴定电泳图

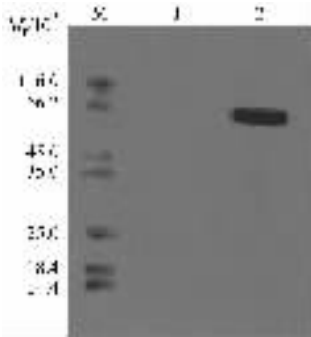
2.2 融合蛋白表达和纯化 含重组表达质粒 pGEX-4T-1-*Rv3873* 的 *E. coli* JM109 经 IPTG 诱导后，能够表达 1 条约为 M_r 63 000 的融合蛋白条带，其中 PPE68

约为 $M_r 37\ 330$, GST 约为 $M_r 27\ 000$, 凝胶扫描分析融合蛋白占菌体总蛋白的 40%。该蛋白存在于裂解菌体的沉淀中, 说明该蛋白主要以不可溶的包涵体形式表达。空菌和空载体组未见此蛋白条带。纯化后的蛋白经薄层扫描分析融合蛋白纯度可达 85% 以上(图 3)。纯化蛋白在约 $M_r 63\ 000$ 处出现明显杂交信号, 而 JM109 对照菌在该处未出现杂交信号(图 4)。



M: Marker 1 JM109 诱导前 2 JM109 诱导 1 h 3. 4 含 pGEX-4T-1 的 JM109 诱导前和诱导 1 h; 5. 6 含 pGEX-4T-1-Rv3873 的 JM109 诱导前和诱导 4 h 7 含 pGEX-4T-1-Rv3873 的 JM109 纯化蛋白。

图 3 Rv3873 融合蛋白 SDS-PAGE 分析



M: Marker 1 JM109 对照菌 2 纯化的融合蛋白。

图 4 纯化的融合蛋白 Western Blot 鉴定

3 讨论

找到结核分支杆菌的特异性抗原, 对于结核病的诊断及开发新疫苗均具有重要意义。RD1 区是 BCG 减毒传代过程中最先缺失的一段区域, 它与结核分支杆菌毒力相关, 因为该区基因所编码的蛋白能被宿主免疫系统高度识别, 目前大家对结核分支杆菌诊断试剂的研究主要集中在 RD1 区, RD1 区一共编码 9 个蛋白, PPE68 是由位于该区的 *Rv3873* 所编码^[5]。研究表明 PPE68 能够被 T 淋巴细胞所识别, 激发出强烈的细胞免疫, 刺激小鼠脾淋巴细胞增殖, 诱导大量 IFN- γ 产生, 可以认为 PPE68 是除 *esat-6* 和 *cfp-10* 以外的第 3 种重要的免疫优势抗原。由于编码 *Rv3873*,

cfp-10, *esat-6* 的 3 个基因相邻, 有学者称, 这 3 个基因形成的基因簇在结核分支杆菌中编码了一个新的传输系统, 这个新的功能单位与宿主免疫系统间有着紧密的联系, 这种功能单位不仅仅存在于 RD1 区, 同时也存在于其他跟 PPE 蛋白家族相毗邻的类 *esat-6* 和 *cfp-10* 蛋白的基因簇^[6]。

我们通过设计 MTB *Rv3873* 特异性引物, 用 PCR 方法从 MTBH37RvDNA 库中扩增出目的基因 *Rv3873*, 序列测定与 Genbank 完全一致。为使融合基因得到高效及稳定的表达以及考虑到纯化工作, 我们选择了 pGEX-4T-1 作为表达 GST 融合蛋白的原核高效表达载体, 它带有强的 *tac* 启动子, 构建的表达载体中, SD 序列下游是 GST 基因, 目的基因接在 GST 下游, 因此表达产物为带有 GST 的融合蛋白即 PPE68/GST。这种表达系统可以克服转录和转录后水平对外源基因表达可能带来的不利影响, 表达的 PPE68/GST 融合蛋白便于通过 GST 亲和层析纯化, 从而获得了纯化的 PPE68, 用结核患者血清进行 Western Blot 试验, 证实所获得的融合蛋白 PPE68/GST 可以与患者血清发生反应, 提示 PPE68 可作为结核病诊断用特异性抗原, 为进一步研究它在血清诊断中的作用奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Voskuil MI, Schnappinger D, Rutherford R, et al. Regulation of the *mycobacterium tuberculosis*[J]. *Tuberculosis* 2004 84 256 - 262.
- [2] Whipple DL, JeFebver RB, Andrews RE Jr, et al. Isolation and analysis of restriction endonuclease digestive patterns of chromosomal DNA from *mycobacterium paratuberculosis* and other *mycobacterium* species[J]. *J Clin Microbiol* 1987 25 1511 - 1515.
- [3] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence[J]. *Nature* 1998 393 537 - 544.
- [4] 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002 96 - 99, 1256 - 1259.
- [5] Behr M, Wilson M, Gill W, et al. Comparative genomics of BCG vaccines by wholegenome DNA microarray[J]. *Science*, 1999, 284: 1520 - 1523.
- [6] Okkels L, Brock I, Follmann F, et al. PPE protein (*Rv3873*) from DNA segment RD1 of *Mycobacterium tuberculosis*: strong recognition of both specific T-cell epitopes and epitopes conserved within the PPE family[J]. *Infect Immun* 2003 71 6116 - 6123.

编辑 许昌泰