

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)17-1562-04

# 结核分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白的原核表达、纯化、鉴定及活性初步测定

杨登科<sup>1,2</sup> 靳风烁<sup>2</sup> 张 勇<sup>2</sup>( <sup>1</sup> 解放军第 159 中心医院泌尿外科, 河南 驻马店 463000 ; <sup>2</sup> 第三军医大学大坪医院野战外科研究所泌尿外科, 重庆 400042 )

## Prokaryotic expression, purification and identification of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B/IL-2 fusion protein and detection of its biological activity

YANG Deng-Ke<sup>1,2</sup>, JIN Feng-Shuo<sup>2</sup>, ZHANG Yong<sup>2</sup><sup>1</sup>Department of Urology, PLA 159 Hospital, Zhumadian 463000, China, <sup>2</sup>Department of Urology, Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

**【 Abstract 】** AIM: To express *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B/IL-2 fusion protein in *E. coli*, to purify and identify it, and to detect its biological activity. **METHODS:** By using genetic engineering techniques, we constructed a recombinant expression plasmid pGEX-Ag85B/IL-2, and expressed Ag85B/IL-2-GST fusion protein in *E. coli* BL21 under the induction of IPTG. Moreover, we also studied the optimal expression conditions concerning IPTG concentration and induction time. After renatured by urea in a concentration gradient, and purified by GST-Sepharose affinity chromatography and digested by thrombin, the Ag85B/IL-2 fusion protein was further purified by anion-exchange chromatography and RP-HPLC and identified with Western blot. Its N-terminal amino acid sequence and IL-2 bioactivity were measured as well. **RESULTS:** A novel fusion protein Ag85B/IL-2-GST was expressed in *E. coli* in a way of inclusion body, accounting for 30% of total lysate protein of bacteria. After purified by GST-Sepharose affinity chromatography, anion-exchange chromatography and RP-HPLC, the desired Ag85B/IL-2 fusion protein with purification degree of 98.32% was acquired and confirmed by Western blot. Its N-terminal amino acid sequence was identical to the anticipation, and its specific IL-2 bioactivity was 2500 u/mg. **CONCLUSION:** Ag85B/IL-2 fusion protein was successfully expressed in *E. coli* and purified. This results established a groundwork for the further researches of Ag85B/IL-2 fusion protein in the immunotherapy of bladder tumor.

**【 Keywords 】** Ag85B; interleukin-2; prokaryotic expression; fusion protein; purification

**【 摘 要 】**目的:在大肠杆菌中表达结核分枝杆菌 Ag85B/IL-2 融合蛋白,并对其进行纯化、鉴定和活性初步测定。方法:将构建的 pGEX-Ag85B/IL-2 重组菌 BL21 扩增后接种于 LB 培养基中,异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)诱导重组融合蛋白的表达,筛选最适诱导剂浓度和最适诱导时间,梯度浓度尿素复性包涵体,经 GST-Sepharose 亲和层析、凝血酶切、阴离子交换层析和反相-高效液相(RP-HPLC)层析纯化 Ag85B/IL-2 融合蛋白,免疫印迹(Western blot)鉴定,并测定其 N-末端氨基酸序列和 IL-2 比活性。结果:成功在大肠杆菌中高效表达带有 GST 的 Ag85B/IL-2 融合蛋白,占菌体总蛋白的 30%,主要以包涵体形式表达,于诱导后 6 h 表达量达最高峰。对包涵体复性,纯化获得纯度为 98.32% 的 Ag85B/IL-2 融合蛋白,Western blot 鉴定阳性,N-末端氨基酸测序与理论预期完全一致,IL-2 比活性为 2500 u/mg。结论:高效表达并纯化了 Ag85B/IL-2 融合蛋白,为进一步研究其在膀胱肿瘤免疫治疗中的作用奠定了基础。

**【 关键词 】** Ag85B; IL-2; 原核表达; 融合蛋白; 纯化

**【 中图分类号 】** Q782 **【 文献标识码 】** A

## 0 引言

膀胱肿瘤是泌尿系统最常见的肿瘤,具有发病率高、复发率高、治疗难度大等临床特点。卡介苗(BCG)膀胱灌注是治疗表浅型膀胱肿瘤及预防其复发最有效的方法之一,BCG 联合白介素-2(IL-2)治疗膀胱肿瘤具有更好的临床疗效<sup>[1-2]</sup>。但无论是 BCG 还是 IL-2 在临床治疗膀胱癌均存在着剂量大、疗程长、毒副作用大等缺点。Ag85B 是 BCG、结核杆菌及其他分枝杆菌最主要的分泌蛋白<sup>[3]</sup>,也是 BCG 在体外和体内发挥生物学作用的主要成分,能够诱导机体强烈的 Th1 免疫反应<sup>[4-5]</sup>。利用分枝杆菌 Ag85B 的免疫原性,在膀胱肿瘤免疫治疗中的应用近年引起人们关注<sup>[6-7]</sup>。为了探寻新的免疫治疗膀胱肿瘤的药物,我们前期利用基因工程技术,将结核分枝杆菌 Ag85B 与人 IL-2 融合,成功构建了 Ag85B/IL-2 融合蛋白的表达质粒,为了进一步研究该融合蛋白体内外生物学活性,我们对其进行了原核表达、纯化和活性的初步测定。

收稿日期 2006-02-21; 接受日期 2006-04-17

作者简介:杨登科,博士,副主任医师。Tel (0396)2957396 Email:

ydk36@263.net

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 重组菌大肠杆菌 BL21/pGEX-Ag85B/IL-2 由本室构建,其表达产物带有 GST 标签. AkTA Explore 100 中高压层析系统、GST-Sepharose 4B 层析柱、Q Sepharose Fast Flow 柱、Resource RPC 层析柱均为瑞典 Pharmacia 公司产品. 凝血酶为 Sigma 公司产品. CTLL-2 细胞株、重组 hIL-2 标准品来源于第三军医大学免疫学教研室. 兔抗结核分枝杆菌 Ag85B 多克隆抗体由本室张勇制备<sup>[8]</sup>. 常规试剂为分析纯.

**1.2 GST-Ag85B/IL-2 融合蛋白的表达** 挑取重组菌 BL21/pGEX-Ag85B/IL-2 单菌落接种于含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基中,经 37 $^{\circ}\text{C}$  过夜活化,以 1:50 稀释转种于 100 mL 含 Amp 的 LB 中,继续振荡培养至  $A_{600\text{nm}}$  为 0.6 时,加入不同浓度异丙基硫代半乳糖苷(IPTG) 37 $^{\circ}\text{C}$  诱导培养,筛选最适诱导剂浓度和最适诱导时间,然后进行扩大培养表达. SDS-PAGE 分析表达产物.

**1.3 GST-Ag85B/IL-2 融合蛋白的复性** 收集 1 L 诱导表达的工程菌体,用 Buffer A(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA; 2 mmol/L DTT; 0.1 mmol/L PMSF)重悬,加入 1 g 溶菌酶,冻溶 3 次,冰浴中超声破菌,4 $^{\circ}\text{C}$  8000 r/min 离心 20 min,收集沉淀. 用 2 mol/L 尿素反复洗涤包涵体后,溶于变性液(8 mol/L 尿素, 2 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇, 10 mmol/L PBS pH 7.5),以磁力搅拌器轻柔搅拌,放置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱溶解过夜(12 h),次日以 15000 r/min 离心 20 min 吸取上清,装入透析袋以 4 mol/L 尿素 2 mol/L 尿素, 1 mol/L 尿素和 20 mmol/L PBS(pH 7.5)逐步透析,透析完成后收集透析袋中蛋白溶液,浓缩后 -20 $^{\circ}\text{C}$  贮存备用.

### 1.4 Ag85B/IL-2 融合蛋白的纯化

**1.4.1 GST-Sepharose 亲和层析及凝血酶切** 层析柱为 XK 2b 柱床体积 50 mL. 样品流速 10 mL/min, 10 mmol/L 谷胱甘肽 GSH 溶液洗脱,收集蛋白峰. 将重组蛋白样品用 10 mmol/L PBS(pH 7.5)稀释至 1 mg/mL,每 mL 样品溶液中加入凝血酶 0.2 u 混匀,室温下作用 5 h. 取 20  $\mu\text{L}$  样品行 SDS-PAGE,分析酶解率.

**1.4.2 阴离子交换层析** 采用 5 mL Q Sepharose Fast Flow 柱对凝血酶切后的融合蛋白进一步纯化. 用缓冲液 A(10 mmol/L PBS pH 7.5)平衡柱后上样,流速 2.5 mL/min. 先以 0~100% 缓冲液 B(1 mol/L NaCl + 10 mmol/L PBS pH 7.5)连续浓度梯度洗脱以确定最适洗脱条件,再行 NaCl 分步洗脱,收集 280 nm 紫外吸收峰样品,取 20  $\mu\text{L}$  样品行 SDS-PAGE 分

析纯度.

**1.4.3 反相-高效液相(RP-HPLC)层析** 选用 3 mL Resource RPC 反相柱对离子交换层析后的融合蛋白进一步纯化. 先用缓冲液 A(100 mL/L 三氟乙酸 TFA)平衡柱子,离子交换层析后的样品稀释 5 倍后上柱,流速 1 mL/min. 在 10 倍柱床体积内用 0%~60% 缓冲液 B(乙腈 + 1 g/L TFA)连续浓度梯度洗脱,收集蛋白主峰. SDS-PAGE 和 RP-HPLC 分析融合蛋白纯度.

**1.5 免疫印迹鉴定** 纯化产物按常规进行 SDS-PAGE, PVDF 膜电转印,30 g/L 牛血清白蛋白(BSA)封闭 2 h,并依次加入兔抗 Ag85B 多克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(1:2000)各孵育 2 h,OPD-H<sub>2</sub>O 显色.

**1.6 Ag85B/IL-2 融合蛋白 N-末端氨基酸测序** 将纯化的目的蛋白行 SDS-PAGE,电转印至 PVDF 膜,进行 N 末端氨基酸序列测定,由北京大学生命科学院完成.

**1.7 Ag85B/IL-2 融合蛋白 IL-2 比活性的测定** 利用 IL-2 依赖性细胞株 CTLL-2 细胞,测定 Ag85B/IL-2 融合蛋白中 IL-2 比活性(MTT 法).

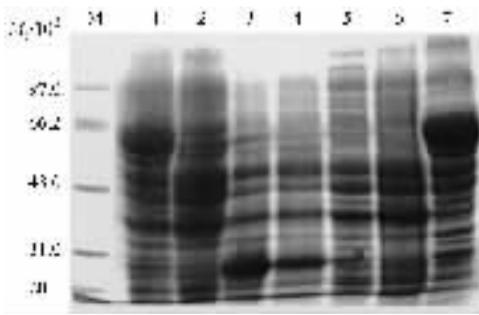
样品的 IL-2 活性(U/mL) = (待测样品 A 值最大值的 50% 所需稀释度 / 标准品 A 值最大值的 50% 所需稀释度)  $\times$  标准品活性(U/mL).

## 2 结果

**2.1 融合蛋白的表达** SDS-PAGE 结果显示,在分子量( $M_r$ )约 66 000 处出现了一条新的蛋白,与带有 GST 蛋白标签的 Ag85B/IL-2 融合蛋白(Ag85B/IL-2-GST)理论大小相符,薄层扫描分析融合蛋白占菌体总蛋白的 30%,主要以不可溶的包涵体形式表达(图 1). 采用 0.05, 0.1, 0.5 和 1.0 mmol/L 四种浓度的 IPTG 诱导表达,表达量无明显差异,各浓度组均以诱导 6 h 时表达量达到最高峰(图 2).

**2.2 融合蛋白的复性和纯化** 经不同浓度的尿素透析复性后的融合蛋白呈可溶澄清状. 上样行 GST-Sepharose 亲和层析,收集洗脱蛋白峰,SDS-PAGE 表明纯度为 70% 左右,可能有部分杂蛋白发生了非特异性吸附. 对其行凝血酶切后,显示出  $M_r$  约 66 000, 45 000 和 26 000 三条主要蛋白条带(图 3),根据分子量大小判定分别为未切开的 GST-Ag85B/IL-2, 切开后的 Ag85B/IL-2 和 GST, 中间 45 000 左右蛋白条带与 Ag85B/IL-2 融合蛋白理论大小相符,因此是我们需要进一步纯化的目的蛋白. 进一步行离子交换层析,去除了大量杂蛋白,目的蛋白纯度达 85%. 经

反相-高效液相层析 (RP-HPLC) 柱后, 纯度进一步提高, SDS-PAGE 行薄层凝胶扫描纯度大于 95% (图 3) RP-HPLC 鉴定, 用峰面积计算, 目的蛋白纯度为 98.32%.



M: 低分子蛋白 Marker; 1: IPTG 诱导后的重组菌 BL21/pGEX-Ag85B/IL-2 裂解产物; 2: 未诱导的重组菌 BL21/pGEX-Ag85B/IL-2 裂解产物; 3: IPTG 诱导后的重组菌 BL21/pGEX-4T-1 裂解产物; 4: 未诱导的重组菌 BL21/pGEX-4T-1 裂解产物; 5: IPTG 诱导后的 BL21 裂解产物; 6: 未诱导的 BL21 裂解产物; 7: IPTG 诱导后的重组菌 BL21/pGEX-Ag85B/IL-2 裂解产物沉淀.

图 1 诱导表达 GST-Ag85B/IL-2 融合蛋白的 SDS-PAGE

2.3 Western blot 鉴定结果 将纯化的蛋白行 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜, 用兔抗 Ag85B 多克隆抗体进行免疫鉴定, 结果呈现清晰的阳性反应条带, 间接证实纯化的蛋白即为预期的 Ag85B/IL-2 融合蛋白 (图 4).



1 3: 空白对照; 2: 纯化后的蛋白.

图 4 纯化的蛋白融合蛋白免疫印迹分析

2.3 融合蛋白 N-末端氨基酸测序 共测了 N-末端 10 个氨基酸, 序列为 Gly-Ser-Pro-Glu-Phe-Met-Phe-Ser-Arg-Pro (GSPEFMFSRP), 与理论预测的 Ag85B/IL-2 融合蛋白 N-末端氨基酸序列完全一致.

2.4 融合蛋白 IL-2 比活性的测定 用 IL-2 依赖性细胞株 CTIL-2 细胞测得 Ag85B/IL-2 融合蛋白 IL-2 比活性为 2500 U/mg.

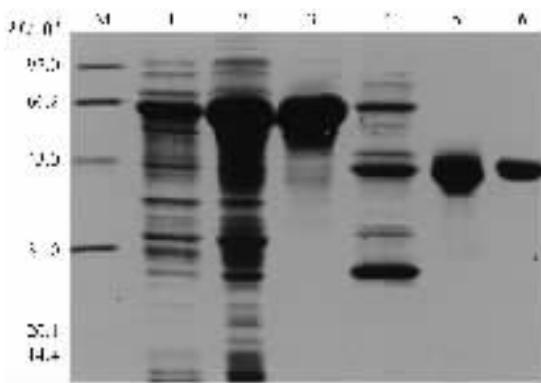
### 3 讨论

Ag85B 又称为  $\alpha$ -Ag 或 MPB59, 是 BCG, 结核杆菌及其他分枝杆菌最主要的分泌蛋白. Ag85B 结构基因长 855 bp, 编码 285 个氨基酸残基, 分子量约 30 000<sup>[2]</sup>. Ag85B 能够促进膀胱癌患者外周血单个核细胞 (PBMC) 的增殖, 且这种作用高于 BCG, 热休克蛋白 65 (HSP65) 等, 并能诱导 Th1 细胞分泌 IFN- $\gamma$  和 IL-12 等细胞因子<sup>[6]</sup>. 利用转染 Ag85B 基因的膀胱肿瘤细胞疫苗免疫动物后, 抗原递呈细胞 (APC) 分别通过 MHC I 类和 II 类分子, 既能递呈 CTL 表位肽, 又能递呈 Th 表位肽, 从而比其他的基因修饰的肿瘤细胞疫苗具有更大的抗肿瘤优势<sup>[7]</sup>.

为了探寻新的免疫治疗膀胱肿瘤的药物, 我们利用基因工程技术, 将结核分枝杆菌 Ag85B 与人 IL-2 融合, 成功构建 Ag85B/IL-2 融合基因及其原核表达载体, 期望通过原核表达获得 Ag85B/IL-2 融合蛋白, 并进一步研究其在体内外对膀胱肿瘤的生物学作用. 理论预测 Ag85B/IL-2 融合蛋白可能在运用于膀胱肿

M: 低分子蛋白 Marker; 1 ~ 8: 重组菌 BL21/pGEX-Ag85B/IL-2 IPTG 诱导不同时间后 (0 ~ 7 h) SDS-PAGE 分析.

图 2 IPTG 不同诱导时间对 BL21/pGEX-Ag85B/IL-2 工程菌表达的影响



M: 低分子蛋白 Marker; 1: IPTG 诱导后的重组菌 BL21/pGEX-Ag85B/IL-2 裂解产物; 2: 洗涤后的包涵体; 3: 融合蛋白 GST-Sepharose 亲和层析后; 4: 融合蛋白凝血酶切后; 5: 酶切产物阴离子交换层析; 6: 反相-高效液相层析 (RP-HPLC).

图 3 各纯化阶段目的蛋白行 SDS-PAGE 分析

瘤的治疗时具有以下优势:① Ag85B 能诱导机体的 Th1 型免疫反应, IL-2 能够激活 T 细胞、B 细胞、NK 细胞和巨噬细胞,两者融合后可能发挥免疫协同作用,达到类似于联合应用 BCG 和 IL-2 时的效果;② 作为一种蛋白质,具备 BCG 样的免疫原性,但又避免了 BCG 活菌疫苗的毒副作用;③ Ag85B 具有与膀胱壁纤维粘连蛋白(FN)结合的特性<sup>[9-10]</sup>,从而靶向性的引导该融合蛋白粘附于膀胱壁,延长作用时间;④可能会减少与剂量相关的副作用。

本研究利用前期构建的表达质粒 pGEX-Ag85B/IL-2,在大肠杆菌中成功高效表达出有 GST 的 Ag85B/IL-2 融合蛋白(GST-Ag85B/IL-2),该融合蛋白是以不可溶的包涵体形式存在的。经尿素逐级透析复性后的融合蛋白经 GST-Sepharose 柱进行亲和层析,纯度达到 70%,可能在过亲和层析柱时,有部分杂蛋白同时发生了非特异性吸附。由于 GST 与 Ag85B/IL-2 之间有可被凝血酶切割的氨基酸序列(Leu Val Pro Arg Gly Ser),因此通过凝血酶可将融合蛋白中的 GST 切下。用凝血酶酶切亲和层析产物,SDS-PAGE 出现了三条主要蛋白条带,根据分子量大小分析应该为未切开的 GST-Ag85B/IL-2, Ag85B/IL-2 和 GST 三种蛋白。对酶切产物进行了阴离子交换层析,使 Ag85B/IL-2 融合蛋白的纯度达到 85%;进一步经 RP-HPLC 层析后,纯度上升为 98.32%,达到蛋白质测序和生物活性测定要求。

纯化的融合蛋白用兔抗 Ag85B 多克隆抗体进行免疫鉴定,结果呈现清晰的阳性反应条带,间接证实纯化的蛋白为预期的 Ag85B/IL-2 融合蛋白。同时 N-末端氨基酸测序与理论预测的 Ag85B/IL-2 融合蛋白 N-末端氨基酸序列完全一致,表明在表达及纯化过程中,融合蛋白没有发生变异。用 CTLL-2 细胞株测得 Ag85B/IL-2 融合蛋白具有 IL-2 活性,初步说明在复性过程中,蛋白质可能正确折叠,恢复其天然构象,从

而保持了天然活性。这为我们进一步研究 Ag85B/IL-2 融合蛋白在体内外对膀胱肿瘤的治疗效应奠定了坚实的基础。

## 【参考文献】

- [1] 温儒民,周广臣,谢叔良,等.卡介苗联合白细胞介素-2 灌注预防膀胱癌复发机理的研究[J].中华外科杂志,1998,36(4):247-248.
- [2] Ikemoto S, Kamizuru M, Wada S, et al. Combined effect of interleukin 2 and bacillus Calmette-Guerin in the therapy of mice with transitional cell carcinoma[J]. Urol Int, 1991, 47(4):250-254.
- [3] Harth G, Lee BY, Wang J, et al. Novel insights into the genetics, biochemistry, and immunocytochemistry of the 30-kilodalton major extracellular protein of mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1999, 64(8):3038-3047.
- [4] Lin JH, Park JK, Jo EK, et al. Purification and immunoreactivity of three components from the 30/32-kilodalton antigen 85 complex in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Infect Immun, 1999, 67(11):6187-6190.
- [5] Kariyone A, Tamura T, Kano H, et al. Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN-gamma[J]. Int Immunol, 2003, 15(10):1183-1194.
- [6] Zlotta AR, Drowart A, Vooren JV, et al. Superficial bladder tumors and increased reactivity against mycobacterial antigens before bacillus Calmette-Guerin therapy[J]. J Urol, 1998, 159(6):1885-1891.
- [7] Kuromatsu I, Matsuo K, Takamuta S, et al. Induction of effective antitumor immune responses in a mouse bladder tumor model by using DNA of  $\alpha$  antigen from mycobacteria[J]. Cancer Gene Ther, 2001, 8(7):483-490.
- [8] 张勇,靳风烁,李黔生,等.分枝杆菌 Ag85B 多克隆抗体的研制[J].第三军医大学学报,2004,26(11):970-972.
- [9] Naito M, Ohara N, Matsumoto S, et al. The novel fibronectin-binding motif and key residues of mycobacteria[J]. J Bio Chem, 1998, 273(5):2905-2909.
- [10] Zlotta AR, Drowart A, Vooren JV, et al. Superficial bladder tumors and increased reactivity against mycobacterial antigens before bacillus calmette-guerin therapy[J]. J Urol, 1998, 159(6):1885-1891.

编辑 许福明