

· 研究简报 ·

结核杆菌抗原MPT64 基因在大肠杆菌中的表达及纯化

Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* MPT64 antigen in *E. coli*王庆敏^{1,2}, 胡振林¹, 周凤娟¹, 殷明², 章建程², 孙树汉^{1*}

(1. 第二军医大学基础医学部医学遗传学教研室, 上海 200433; 2. 上海海军医学研究所舰艇卫生研究室, 上海 200433)

[关键词] 结核分枝杆菌; MPT64 抗原; 表达; 纯化

[中图分类号] R 378 911

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2004)10-1146-02

* 近几年来, 结核病的发病有上升的趋势, 全世界每年约有 300 万人死于结核病, 800 万人患结核病^[1]。尤其是多重耐药菌株的出现及与艾滋病共同感染更加重了结核病对人类健康的危害。卡介苗是目前预防结核病应用较广的疫苗, 但是它的保护效率波动很大(0~80%)^[2]; 所以人类迫切地需要一种新的安全有效的疫苗来防治结核病。研制有效疫苗的关键是选择理想的候选抗原。MPT64 蛋白存在于结核杆菌、毒性牛型杆菌及少数的卡介苗中, 该蛋白可以被大多数结核病患者和感染者的血清所识别, 因此 MPT64 是一种理想的疫苗候选抗原^[3,4]。本研究试图将编码 MPT64 的基因在大肠杆菌中进行表达、纯化, 现将研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂 质粒 pGEX5T 购自 Pharmacia 公司。结核病患者血清由河北省胸科医院提供。 *E. coli* K802 菌株由本教研室保存。限制性内切酶、T₄ 连接酶、Taq 酶、IPTG 购自华美生物工程公司; HRP-羊抗人二抗购自 Dako 公司。Glutathione sepharose 为 Pharmacia 公司产品。胶回收试剂盒购于华舜生物公司。

1.2 PCR 引物设计与合成 通过 PCGENE 软件设计针对 MPT64 抗原基因的引物, 由上海市生物工程服务有限公司合成。引物 1: 5'-GCG GAT CCA TGG CGC CCA AGA CCT AC T GCG AGG AG-3', 其中引入了限制性酶切位点 *Bam*H I (GGA TCC) 及保护性碱基 GC; 引物 2: 5'-GCG CCT CGA GCT A GG CCA GCA TCG AGT CGA TCG-3', 其中引入限制性内切酶位点 *Xho* I (CTC GAG) 及保护性碱基 GCGC。

1.3 MPT64 抗原编码区的扩增、测序 以 pVAX-ub-mpt64 为模板^[5], 进行 PCR 扩增反应。反应条件为 94 预变性 5 min, 94 45 s, 56 45 s, 72 45 s 反应 25 个循环, 最后 72 延伸 10 min。将扩增的片段用试剂盒回收, 进行 *Bam*H I 和 *Xho* I 双酶切, 然后与经同样酶切的 pGEX5T 载体连接, 转化 K802 菌, 挑取转化子进行筛选; 最后将阳性重组子进行全自动测序。测序服务由 TaKaRa 公司提供。

1.4 MPT64 蛋白的表达及纯化^[6] 将含有重组子的 K802 菌以 1:100 的比例接种到 400 ml 培养基中, 37 培养至 $D_{600} = 0.6 \sim 0.8$, 加入 100 mmol/L β 硫代半乳糖苷 (IPTG),

使其终浓度为 1 mmol/L, 然后继续培养 5 h, 以含有 pGEX 载体的 K802 菌同时表达作为阴性对照。收集菌体, 样品进行 SDS-PAGE 电泳。然后将 GST-MPT64 用 glutathione sepharose 4B 进行纯化。

1.5 MPT64 基因表达蛋白的鉴定 将 pGEX-MPT64 表达的菌体蛋白、空载体表达的菌体蛋白及纯化后的 GST-MPT64 进行 SDS-PAGE 电泳, 按 0.65 mA/cm² 的电流强度转膜。将结核病患者血清以 1:200 稀释作为一抗, 以 1:1000 稀释的羊抗人血清作为二抗, 37 温育, 加入底物联苯胺显色, 出现棕色条带后, 以 2 mol/L 硫酸终止显色。

2 结果

2.1 pGEX5T-MPT64 重组子的鉴定 从转化后的重组子中挑取的重组克隆经 *Bam*H I、*Xho* I 双酶切成 5.0 kb 线性载体和 0.6 kb 目的片段, 见图 1。全自动测序表明, PCR 扩增的结核分枝杆菌 MPT64 cDNA 序列与 GenBank 中登录的该序列完全相同。

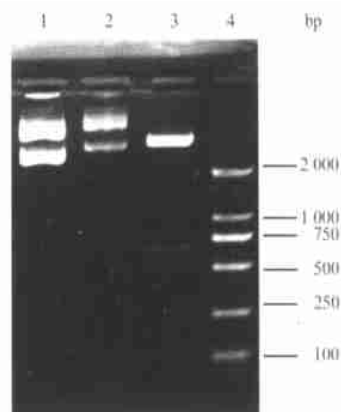


图 1 重组质粒 pGEX5T-MPT64 的酶切鉴定结果

1: pGEX5T 质粒; 2: pGEX5T-MPT64 重组质粒;
3: pGEX5T-MPT64/*Bam*H I + *Xho* I; 4: DL2000 marker

2.2 MPT64 基因在 K802 菌株中的表达及纯化 将含有 pGEX-MPT64 质粒的诱导前菌体及诱导后菌体和空载体

* [作者简介] 王庆敏(1973-), 女(汉族), 博士, 助理研究员

* Corresponding author. E-mail: shsun888@yahoo.com

Tel: 021-25070331, Fax: 021-25070331.

表达物进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 发现诱导菌中有 1 条诱导前及空载体对照菌中没有的蛋白条带, 相对分子质量约为 50 000, 大小与谷胱甘肽转移酶(GST)和 MPT64 融合蛋白之和相当; 凝胶成像系统分析表明表达量约占菌体蛋白的 30% 左右。将菌体蛋白超声后的上清用亲和层析的方法纯化后, 获得了 1 条较单一的蛋白条带, 大小为 50 000 左右, 与预期的结果一致(图 2)。

2.3 蛋白印迹分析 用结核病患者血清作为捕获抗体对表达及纯化的蛋白进行鉴定(图 2)。结果表明在与蛋白电泳相对应的 50 000 处有 1 条特异的棕色条带, 而空载体表达的 GST 蛋白对应泳道无条带出现, 表明该条带是 MPT64 蛋白特异性结合患者血清中的抗体而产生的条带, 而非 GST 蛋白结合产生的; 亲和层析后纯化的蛋白也可以被血清所识别。

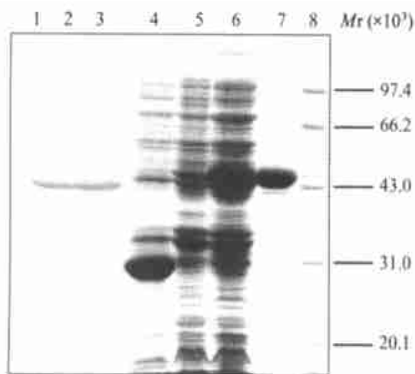


图 2 MPT64 基因表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳(4~ 8 条带)及 Western 印迹分析(1~ 3 条带)

- 1, 4: 转染 pGEX5T 的 K802 菌诱导后裂解液;
2, 5, 6: 转染 pGEX5T-MPT64 的 K802 菌诱导后裂解液;
3, 7: 纯化的 GST-MPT64 蛋白; 8: Marker

3 讨论

本研究选用大肠杆菌表达系统进行表达及纯化结核杆菌的 MPT64 抗原。选用该系统主要基于下列原因: (1) 从结核菌中纯化 MPT64 蛋白操作复杂, 费用较昂贵; 大肠杆菌表达系统操作较简单, 表达量较高; (2) 结核杆菌和大肠杆菌比较接近, 都属于原核生物; (3) 大肠杆菌表达系统与其他表达系统相比虽然没有蛋白修饰后的加工修饰功能, 但多数细胞抗原翻译后即使不被修饰也不影响抗原的免疫原性和(或)保护性。本实验选用大肠杆菌表达系统并选择 pGEX5T 载体进行

表达, 表达量较高, 达到菌体总蛋白的 30% 左右。

结核分枝杆菌的抗原基因 GC 含量较高, 能否在大肠杆菌中正确地转录和翻译一直是研究者所担心的问题。本实验成功地将 MPT64 抗原在大肠杆菌中进行了表达及纯化。为了进一步验证在大肠杆菌中表达的 MPT64 蛋白的抗原性, 将结核患者的血清作为一抗进行蛋白印迹分析, 结果表明空载体表达菌体蛋白无阳性条带, 而 GST-MPT64 融合蛋白可以被特异地捕获, 提示结核病患者血清识别的是 MPT64 蛋白而非 GST 蛋白, 说明 MPT64 在大肠杆菌中表达的 MPT64 蛋白的抗原性没有改变。经亲和层析后的 GST-MPT64 蛋白也可以被血清所识别。上述结果表明, 选用大肠杆菌 K802 作为结核分枝杆菌 MPT64 基因的表达体系是可行的。

MPT64 蛋白是一种外泌蛋白, 又有动物实验证明它也是一种较理想的保护性抗原^[7], 它在大肠杆菌中的成功表达为今后研究其在结核病中的诊断和防治奠定了基础。

[参考文献]

- [1] Xing Z. The hunt for new tuberculosis vaccines: anti-TB immunity and rational design of vaccines[J]. *Current Pharm Des*, 2001, 7(11): 1015-1037.
- [2] Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESA S-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein[J]. *M microbiology*, 1998, 114(Pt 11): 3159-3203.
- [3] Roche PW, Feng CG, Britton WJ. Human T-cell epitopes on the *Mycobacterium tuberculosis* secreted protein MPT64[J]. *Scand J Immunol*, 1996, 43(6): 662-670.
- [4] Roche PW, Triccas JA, A very DT, et al. Differential T cell responses to mycobacterial-secreted proteins distinguish vaccination with bacilli Calmette-Guerin from infection with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *J Infect Dis*, 1994, 170(5): 1326-1330.
- [5] 王庆敏, 胡振林, 孙树汉. 结核杆菌保护性抗原-遍在蛋白质系统的建立[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(1): 61-63.
- [6] 王庆敏, 胡振林, 孙树汉, 等. 结合抗原 ESA F-6 基因的克隆及在大肠埃希菌中的表达[J]. 中华传染病杂志, 2003, 21(1): 30-33.
- [7] Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, et al. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infect Immun*, 1999, 67(4): 1702-1707.

[收稿日期] 2004-03-20

[修回日期] 2004-07-30

[本文编辑] 尹 茶