

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00122

## 结核杆菌抗原 Ag85A 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达

王庆敏<sup>1,2</sup>, 孙树汉<sup>1\*</sup>

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

**[摘要]** **目的:**将结核分枝杆菌 Ag85A 抗原基因克隆并在大肠杆菌中表达。**方法:**用 PCR 方法从结核分枝杆菌基因组中扩增 Ag85A 抗原基因, 然后将其插入到原核表达载体 pGEX5T 中, 构建成 pGEX5T-Ag85A 重组质粒。经 IPTG 诱导使该基因在 *E. coli* k802 菌中表达, 亲和层析法纯化蛋白, Western 印迹法验证表达蛋白的抗原性。**结果:**扩增出了约 0.9 kb 的单一一条带, 并成功地构建了 pGEX5T-Ag85A 重组子; 经 IPTG 诱导后, Ag85A 蛋白在 k802 菌中获得了表达, 表达的蛋白条带大小约 58 000, 与预期结果相符; 纯化后获得了较单一的蛋白条带。蛋白纯化前后均可被结核病患者血清特异性地识别。**结论:**成功地克隆了 Ag85A 抗原基因, 并将其在大肠杆菌中进行了表达、纯化, 为将其应用于结核病诊断和防治的研究奠定了基础。

**[关键词]** 结核分枝杆菌; Ag85A 抗原; 分子克隆; 基因表达

**[中图分类号]** R 378.911 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0122-04

### Clone of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A gene and its prokaryotic expression

WANG Qing-min<sup>1,2</sup>, SUN Shu-han<sup>1\*</sup>

1. Department of Medical Genetics, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Warship Health Division, Institute of Naval Medicine Research, Shanghai 200433

**[ABSTRACT]** **Objective:** To clone the Ag85A antigen gene of *Mycobacterium tuberculosis* and express it in *E. coli* k802. **Methods:** The Ag85A gene was amplified from the genome of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and was inserted into prokaryotic expressing vector pGEX5T to construct pGEX5T-Ag85A recombinant plasmid. The expression of Ag85A protein in *E. coli* k802 was induced by IPTG. The expressed protein was purified by affinity chromatography and the antigenicity of the expressed protein was confirmed by Western blotting assay. **Results:** A band about 0.9 kb in length was obtained by PCR and the recombinant plasmid pGEX5T-Ag85A was successfully constructed. A new band about 58 000 in length was observed after IPTG induction in *E. coli*. The relative molecular weight of the expressed protein was consistent with that expected. A single protein band of 58 000 in length was obtained after purification. The expressed protein could be specifically recognized by the sera of patients with tuberculosis patients. **Conclusion:** The Ag85A gene of *Mycobacterium tuberculosis* has been successfully cloned and expressed in *E. coli* k802, which paves a way for further studies on diagnosis and therapy of tuberculosis.

**[KEY WORDS]** *Mycobacterium tuberculosis*; Ag85A antigen; molecular cloning; gene expression

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2):122-125]

结核病仍然是威胁人类健康的重要疾病。现在全世界每年大约有 300 万人死于结核病, 约 900 万人患结核病<sup>[1]</sup>。BCG 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%)<sup>[2]</sup>, 所以迫切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。Havlir 等<sup>[3]</sup>发现大多数保护性抗原存在于结核杆菌

培养滤液蛋白中, 如 ESTA6、Ag85 复合蛋白、MPT63、MPT51、MPT64 等。Ag85 复合蛋白由抗原性有交叉的蛋白质组成, 包括 Ag85A、Ag85B、Ag85C<sup>[4]</sup>; Ag85 复合蛋白能和人的纤维结合蛋白质结合, 因此可能与结核杆菌的致病机制相关。相关研究表明, Ag85A 可使小鼠的 CD8<sup>+</sup> 细胞毒性 T 细胞(CTL)的细胞毒活性增强<sup>[5-6]</sup>, 可刺激机体 Th<sub>1</sub> 型

**[收稿日期]** 2007-10-19 **[接受日期]** 2007-11-29

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(30530660). Supported by National Natural Science Foundation of China(30530660).

**[作者简介]** 王庆敏, 博士, 助理研究员.

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel:021-25070331, E-mail:shsun888@yahoo.com

细胞因子的产生。因此,Ag85A 是一种理想的疫苗候选抗原<sup>[7-8]</sup>。本研究克隆了编码 Ag85A 蛋白的基因并将其在大肠杆菌谷胱甘肽 S-转移酶(GST)融合体系中进行了表达、纯化,为将其应用于结核病的诊断和防治研究奠定基础。

## 1 材料和方法

1.1 实验材料 质粒 pVAX、pGEX5T 购自 Pharmacia 公司;结核病血清由河北省胸科医院张巧敏提供,正常人血清来自健康体检者;*E. coli* k802 菌株由本教研室保存。结核菌培养基成分购自上海生化试剂站;限制性内切酶、 $T_4$  连接酶、*Taq* 酶、 $\beta$ -硫代半乳糖苷(IPTG)购自华美生物工程公司;羊抗人辣根过氧化物酶二抗购自 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 Ag85A 抗原基因引物通过 PCGENE 软件设计,由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物 1 和引物 2 是针对 pVAX 载体设计的,扩增出来的序列将包括 129 bp 的信号肽序列。引物 1:5'-cg gaattc gccacc atg cag ctt gtt gac agg gtt cgt gg-3'(gaattc 为 *EcoR* I 酶切位点,cg 为保护性碱基);引物 2:5'-gc tctaga tgt tcg gag cta ggc gcc ctg g-3'(tctaga 为 *Xba* I 酶切位点,gc 为保护性碱基)。引物 3 和引物 4 是针对 pGEX5T 载体设计的,扩增出来的序列将不包括 129 bp 的信号肽序列。引物 3:5'-gc ggatcc atg ttt tcc cgg ccg ggc ttg ccg g-3'(ggatcc 为 *Bam*H I 酶切位点,gc 为保护性碱基);引物 4:5'-cg gaattc cta ggc gcc ctg ggg cgc ggg c-3'(gaattc 为 *EcoR* I 酶切位点,cg 为保护性碱基)。

1.3 结核分枝杆菌的培养及基因组的抽提 选用 Lowenstein-Jensen 培养基<sup>[9]</sup>,于 37℃ 培养 2~4 周,菌落长出后,按常规方法抽提基因组。

1.4 Ag85A 抗原编码区的扩增、克隆及转化 以抽提的结核分枝杆菌基因组为模板,加入引物 1 和引物 2 进行 PCR 反应(94℃ 5 min;94℃ 50 s,66℃ 50 s,72℃ 50 s,30 个循环;72℃ 10 min)扩增包含信号肽序列的片段。试剂盒回收,进行 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切,然后与经同样酶切的 pVAX 载体连接,转化 DH5 $\alpha$  菌,挑取转化子进行酶切筛选,测序。以上述验证正确的 pVAX-Ag85A 重组质粒以模板,加

入引物 3 和引物 4 扩增(PCR 条件同上)不包含信号肽的序列,进行 *Bam*H I 和 *EcoR* I 双酶切,然后与经同样酶切的 pGEX5T 载体连接,转化 k802 菌,挑取转化子进行酶切筛选,测序。测序由 TaKaRa 公司完成。

1.5 Ag85A 蛋白的表达及纯化 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 IPTG,使其终浓度为 1 mmol/L,然后继续培养 5 h,含有 pGEX5T 空载体的菌作为阴性对照。5 h 后收集菌体,样品按  $0.2 \times D_{600}$  量进行 SDS-PAGE 电泳。然后将 GST-Ag85A 用 Glutathione sepharose 4B 进行纯化,具体方法参见文献<sup>[10]</sup>。

1.6 Ag85A 基因表达蛋白的鉴定 将 pGEX5T-Ag85A 表达的菌体蛋白、空载体表达的菌体蛋白及纯化后的 GST-Ag85A 进行 SDS-PAGE 电泳,按  $0.65 \text{ mA/cm}^2$  的电流强度转膜。将结核病患者及正常人血清以 1:100 稀释作为一抗,以 1:1000 稀释的羊抗人血清作为二抗,37℃ 温育,加入底物联苯氨显色,出现棕色条带后,2 mol/L 硫酸终止显色。

## 2 结果

2.1 Ag85A 基因的扩增 将 PCR 扩增产物行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,可见约 1.0 kb 大小的片段,与预期结果相符(图 1)。

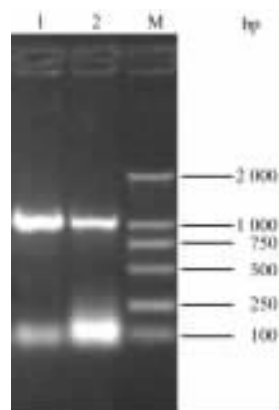


图 1 PCR 扩增 Ag85A 基因的电泳分析

Fig 1 Electrophoretic analysis of Ag85A gene by PCR amplification  
1,2:Ag85A gene;M:DL2000 marker

2.2 pVAX-Ag85A 重组子的获得 从带有信号肽的转化后的重组子中挑取重组克隆质粒经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切后,得到 5.0 kb 和 1.0 kb 两条片

段,5.0 kb 为线形载体,1.0 kb 为含信号肽序列的线形目的片段(图 2)。测序结果表明,PCR 扩增的结核分枝杆菌 Ag85A cDNA 序列与 GenBank 中登录的该序列完全相同。

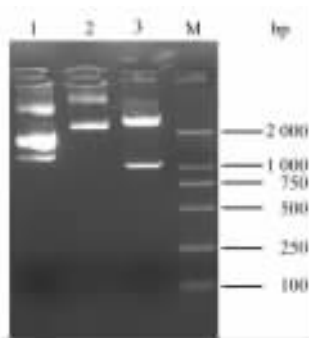


图 2 重组质粒 pVAX-Ag85A 的酶切鉴定结果  
Fig 2 Endonuclease digestion of recombinant plasmid pVAX-Ag85A

1: pVAX plasmid; 2: pVAX-Ag85A recombinant plasmid; 3: pVAX-Ag85A digested by *EcoR* I and *Xba* I; M: DL2000 marker

2.3 pGEX5T-Ag85A 重组子的获得 从不带信号肽的转化后的重组子中挑取的重组克隆质粒经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切后,得到约 5.0 kb 和 0.9 kb 两条片段,5.0 kb 为线形载体,0.9 kb 为不含信号肽的线形目的片段(图 3)。测序验证正确。

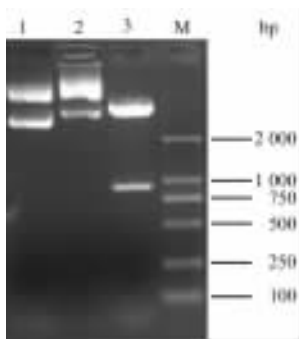


图 3 重组质粒 pGEX5T-Ag85A 的酶切鉴定结果  
Fig 3 Endonuclease digestion of recombinant plasmid pGEX5T-Ag85A

1: pGEX5T plasmid; 2: pGEX5T-Ag85A recombinant plasmid; 3: pGEX5T-Ag85A digested by *Bam*H I and *Eco*R I; M: DL2000 marker

2.4 Ag85A 基因在 k802 菌株中的表达及纯化 将含有 pGEXT-Ag85A 质粒的诱导前菌体及诱导后菌体和空载体表达物进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,发现诱导菌中有一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 58 000,大小约为 GST 和 Ag85A 融合蛋白之和;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一条较单一的蛋白条带,大小为 58 000 左右,与预期结果一致(图 4)。

2.5 Western 印迹验证蛋白表达的特异性 用正常人血清作为捕获抗体对表达及纯化的蛋白进行鉴定时,均未检测到阳性条带。用结核病人的血清作为捕获抗体对表达及纯化的蛋白进行鉴定时(图 4),发现在与蛋白电泳相对应的 58 000 处有一特异的棕色条带,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 Ag85A 蛋白特异性结合患者血清而产生的条带,而不是 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。上述结果表明 GST-Ag85A 蛋白在纯化前后均保持了原来的免疫原性。

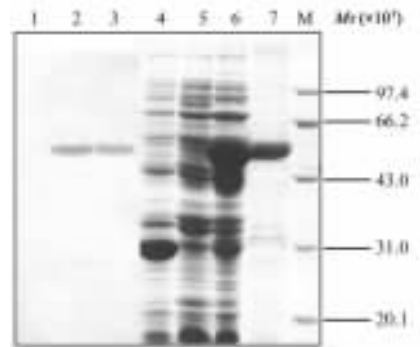


图 4 Ag85A 基因表达产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳及 Western 印迹分析

Fig 4 SDS-PAGE electrophoresis and Western blotting analysis of Ag85A expression product

1-3: Western blotting (1: Crude lysate of k802 transformed by pGEX5T after induction; 2: Crude lysate of k802 transformed by pGEX5T-Ag85A after induction; 3: Purified GST-Ag85A proteins). 4-7: SDS-PAGE electrophoresis (4: Crude lysate of k802 transformed by pGEX5T after induction; 5, 6: Crude lysate of k802 transformed by pGEX5T-Ag85A before/after induction; 7: Purified proteins of GST-Ag85A); M: Middle molecular weight (MMW) protein marker

### 3 讨论

本研究选用大肠杆菌 GST 融合表达系统进行表达及纯化结核杆菌的 Ag85A 抗原。选用该系统主要出于下列几个原因:(1)从结核菌中纯化 Ag85A 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)GST 融合体系是一种较好的在大肠杆菌中表达蛋白的工具。融合蛋白的表达是可诱导的,并通常水平较高,可用商品化的谷胱甘肽琼脂糖通过亲和层析方便地从细菌裂解物中纯化。融合分子内的 GST 部分还可通过

蛋白酶消化被释放, 所获得的蛋白适合于大多数应用, 包括抗体的制备、疫苗的研制等。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。姜燕等<sup>[1]</sup>将 Ag85A 基因克隆并在大肠杆菌 TOP1 中表达, 该研究是将带有信号肽的 Ag85A 全长基因进行表达, 但表达量较低。本研究在实验初期也发现带有信号肽序列的 Ag85A 在大肠杆菌中的表达量很低, 因此推测大肠杆菌和分枝杆菌是两种不同的表达体系, 分枝杆菌中的信号肽序列不一定会被大肠杆菌所识别, 所以将信号肽序列去掉, 结果表明 Ag85A 基因在大肠杆菌中的表达量大大增加而没有影响其免疫原性。为了进一步验证在大肠杆菌中表达的 Ag85A 蛋白的抗原性, 将结核患者的血清作为一抗, 进行 Western 印迹法检测, 结果表明空载体表达菌体蛋白无阳性条带, 而 GST-Ag85A 融合蛋白可以被特异地捕获, 提示结核患者血清识别的是 Ag85A 蛋白而不是 GST 蛋白, 说明 Ag85A 基因在大肠杆菌中表达的 Ag85A 蛋白的抗原性没有改变。经亲和层析后的 GST-Ag85A 蛋白也可以被血清所识别。上述结果表明选用大肠杆菌 k802 来作为结核分枝杆菌 Ag85A 基因的表达体系是可行的。

Ag85A 蛋白是一种外分泌蛋白, 同时也是一种较理想的保护性抗原, 它在大肠杆菌中的成功表达为今后将其应用于结核病的诊断和防治研究奠定了基础。

## [参考文献]

[1] Harries A D, Dye C. Tuberculosis[J]. Ann Trop Med Parasitol, 2006, 100(5-6):415-431.

- [2] Andersen P, Doherty T M. The success and failure of BCG—implications for a novel tuberculosis vaccine[J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3:656-662.
- [3] Havlir D V, Wallis R S, Boom W H, Daniel T M, Chervenak K, Ellner J J. Human immune response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens[J]. Infect Immun, 1991, 59:665-570.
- [4] 吴传勇, 姜加陶, 蒋廷旺, 钱 琤, 周 晔, 陈 燕, 等. 结核杆菌抗原 Ag85C 的 HLA-A \* 0201 限制性 CD8<sup>+</sup> CTL 表位的预测及鉴定[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28:349-354.
- [5] Miki K, Nagata T, Tanaka T, Kim Y H, Uchijima M, Ohara N, et al. Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51[J]. Infect Immun, 2004, 72:2014-2021.
- [6] Tarrant J P, Walsh M J, Blanchard M C, Lee T D, Hoskin D W, Giacomantonio C A. Reduced tumorigenicity of B16-F10 mouse melanoma cells transfected with mycobacterial antigen 85A[J]. Int J Oncol, 2004, 25:l693-1699.
- [7] Sugawara I, Udagawa T, Taniyama T. Protective efficacy of recombinant (Ag85A) BCG Tokyo with Ag85A peptide boosting against *Mycobacterium tuberculosis*-infected guinea pigs in comparison with that of DNA vaccine encoding Ag85A[J]. Tuberculosis (Edinb), 2007, 87:94-101.
- [8] Lozes E, Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery D L, Yawman A M, et al. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex[J]. Vaccine, 1997, 15:830-833.
- [9] 谢正扬, 吴挹芳. 现代微生物培养和试剂手册[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1994:148-149.
- [10] 祝晓春, 姚智慧, 贺争鸣, 胡经畲, 董关木, 俞永新. 汉坦病毒核蛋白基因截短片在大肠杆菌中表达及其产物的初步应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2003, 16:1-4.
- [11] 姜 燕, Azuma Kalu, 吕昌龙, 单凤平. 结核分枝杆菌 Ag85A DNA 的克隆与原核表达[J]. 微生物学杂志, 2007, 27:16-20.

[本文编辑] 孙 岩

## · 消 息 ·

### 第二军医大学长征医院郁胜强博士成功建立新型基因敲入多囊肾病小鼠模型

在最新一期的国际权威学术期刊《美国科学院院刊》(PNAS)上, 我长征医院肾内科郁胜强博士以第一作者身份发表了关于多囊肾病的最新研究成果——新型基因敲入多囊肾病小鼠模型<sup>[1]</sup>, 这一研究成果为揭示多囊肾病的发病机制及药物治疗研究奠定了基础, 引起了国内外学者的广泛关注, 获得来自世界各国多囊肾病专家的一致好评。该研究成果——新型基因敲入多囊肾病小鼠模型目前已被引进回国, 落户我校, 继续为开展多囊肾病相关研究服务。

《美国科学院院刊》是国际公认的权威综合性学术期刊, 2006 年影响因子为 9.643, 其刊出论文主要有 3 个来源: 美国科学院院士的稿件、院士推荐稿件和自由稿件。其对自由稿件论文审稿过程极其严格, 约有 70% 左右的自由稿件会在第一轮编辑审查后就被退稿。郁胜强博士的这篇论文为自由稿件。

[1] Yu S, Hackmann K, Gao J, He X, Piontek K, García González M A, Menezes L F, Xu H, Germino G G, Zuo J, Qian F. Essential role of cleavage of Polycystin-1 at G protein-coupled receptor proteolytic site for kidney tubular structure[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 18688-18693.