

结核分枝杆菌三种基因重组质粒的构建及原核表达*

丁淑琴¹, 师志云², 董 辉², 杨风琴¹, 朱佳佳¹ (1. 宁夏医科大学检验学院, 宁夏银川 750004; 2. 宁夏医科大学总医院医学实验中心, 宁夏银川 750004)

【摘要】 目的 构建结核分枝杆菌 ESAT-6、CFP10、phoS2/pET28a 表达重组质粒, 并原核表达重组蛋白。**方法** 将目的基因亚克隆到 pET-28a 表达载体, 转化入大肠埃希菌 BL21(DE3)plysS, 诱导表达重组蛋白 ESAT-6、CFP10、phoS2。**结果** 成功构建基因工程菌株 ESAT-6、CFP10、phoS2/pET-28a/BL21(DE3)plysS, 表达重组蛋白 ESAT-6、phoS2, 因以包涵体形式存在, 无法纯化。**结论** 成功构建结核分枝杆菌 ESAT-6、CFP10、phoS2/pET28a 重组质粒, 分别表达分子量约 10×10^3 、 31×10^3 的 ESAT-6、phoS2 重组蛋白, 但无法纯化, CFP10 不表达。

【关键词】 结核分枝杆菌; ESAT-6; CFP10; phoS2; 重组质粒; 原核表达

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.04.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)04-0388-02

Construction of recombinant plasmid of three kind of gene from mycobacterium tuberculosis and its prokaryotic expression* DING Shu-qin¹, SHI Zhi-yun², DONG Hui², YANG Feng-qin¹, ZHU Jia-jia² (1. College of Laboratory Medicine NingXia Medical University, YinChuan, Ningxia 750004, China; 2. Medical Laboratory Center, General Hospital of NingXia Medical University, YinChuan, Ningxia 750004, China)

【Abstract】 Objective To construct a recombinant plasmid of ESAT-6, CFP10, phoS2 from mycobacterium tuberculosis, and study on prokaryotic expressing of recombinant protein. **Methods** Target gene was subcloned into expression vector pET-28a, then transferred into escherichia coli BL21(DE3)plysS, and inducible expressed the recombinant protein of ESAT-6, CFP10, phoS2. **Results** We constructed genetic engineering strain ESAT-6, CFP10, phoS2/pET28a of Mycobacterium tuberculosis and expressed fusion protein ESAT-6, CFP10 and phoS2. But the fusion protein could not be purifying because they were inclusion bodies. **Conclusion** The recombinant plasmid ESAT-6, CFP10, phoS2/ pET28a of Mycobacterium tuberculosis were successfully constructed and expressed. The proteins were about 10×10^3 and 31×10^3 . Because the fusion proteins are inclusion bodies so they cannot be purified.

【Key words】 mycobacterium tuberculosis; ESAT-6; CFP10; phoS2; recombinant plasmid; prokaryotic expression

结核病是由结核分枝杆菌长期感染引起的最古老的传染病, 严重危害着人类的健康。我国目前结核病疫情依然相当严重, 部分地区有蔓延趋势。估算全国现有传染性肺结核病患者 200 万人, 是当前农村中因病致贫、因病返贫的主要原因之一^[1]。因此, 早期发现、早期诊断是防治结核病最关键的问题。传统的细菌学检查仍是结核病实验室诊断的金标准。但由于该法涂片阳性率低, 细菌培养费时间。近年来, 多种血清学和分子生物学诊断方法已用于结核分枝杆菌的直接检测、菌种鉴定和药物敏感实验, 极大地缩短了诊断时间。分子生物学检查虽然快速、灵敏, 但操作烦琐, 技术要求高, 难以广泛运用。而血清学实验由于其敏感、快速的特点是诊断结核病的一种有效手段, 因此, 寻找特异性强、纯度高的结核分枝杆菌抗原成为人们关注的焦点^[2-4]。本研究拟将 ESAT-6、CFP-10、phoS2 基因克隆到原核表达载体 pET28a 中, 并进行原核表达, 为后续蛋白纯化等结核病诊断和防治研究工作奠定基础并提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌种 pET-28a 表达载体购自 Novagen 公司。E. coli BL21(DE3)plysS 由本室保存, ESAT-6、CFP10、phoS2/pGEM-T/JM109 质粒由本教研室构建^[5-7]。

1.1.2 酶与主要试剂 限制性内切酶 BamH I、XhoI I 及 T4 连接酶均购自 Promega 公司; DNA 回收试剂盒、200 bp DNA 分子标记物、低分子量蛋白质分子标记物、购自北京赛百盛生物工程公司; 卡那霉素购自 AMRESCO; DNA 回收试剂盒购自天根生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 重组表达质粒的构建 经蓝白斑筛选白色菌落扩增培养, 碱裂解法提取重组质粒 ESAT-6、CFP10、phoS2/pGEM-T。取重组质粒和表达载体 pET-28a, 两者分别用 BamHI 和 XhoI I 进行双酶切处理, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离带有双黏性末端的目的片段和表达载体, 经 DNA 切胶回收试剂盒纯化目的片段及载体。目的片段与表达载体在 T4 连接酶的作用下, 4℃ 连接反应过夜。以空载体作为对照, 其产物转化入 BL21 菌, 用含卡那霉素(终浓度为 50 μg/mL)的选择培养基筛选出阳性菌落。

1.2.2 重组表达质粒的鉴定 挑取白色阳性菌落, 采用菌落 PCR 法对阳性质粒进行鉴定。菌落 PCR 反应组成为: 10×缓冲液(含 Mg²⁺) 2.5 μL, 10 mmol dNTP 0.5 μL, 引物 1 和引物 2 各 0.5 μL, TaqDNA 酶 0.5 μL, ddH₂O 20.5 μL, 挑取白色菌落一个为 DNA 模板, 同时以蓝色菌落做对照。反应条件为: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃

* 基金项目: 宁夏自然基金项目(编号: NZ1196), 宁夏医科大学校级项目(编号: XM200907, XM201012)。

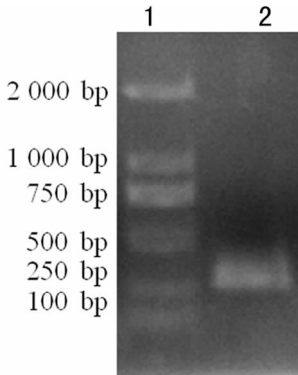
℃ 7 min。反应结束, 1.5% 琼脂糖胶进行鉴定。

1.2.3 重组蛋白的表达 将重组质粒转化至感受态细胞 BL21(DE3) 中; 次日早上, 在转化皿中挑取单菌落接种含卡那霉素的 5 mL 5052 自诱导液体培养基 (50 mmol/L Na_2HPO_4 , 50 mmol/L KH_2PO_4 , 50 mM NH_4Cl , 5 mM Na_2SO_4 , 2 mM MgSO_4 , 0.2% 微量金属, 0.5% 甘油, 0.06% 葡萄糖, 0.20% 乳糖)^[8], 于 37 ℃ 振荡培养过夜; 培养 4~5 h, 按 1:200 比例接种含相应抗生素新鲜的 5052 液体培养基; 振荡培养, 过夜诱导表达^[9]。分别在 20 ℃、25 ℃、30 ℃ 条件下以诱导表达选择最优表达条件。

1.2.4 重组蛋白的鉴定 6 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 收集细菌沉淀。将样本经 SDS-PAGE、180 V 电压电泳 1 h, 用 0.2% 考马斯亮蓝 R250 染色后, 用脱色液脱至本底无色为止。

2 结 果

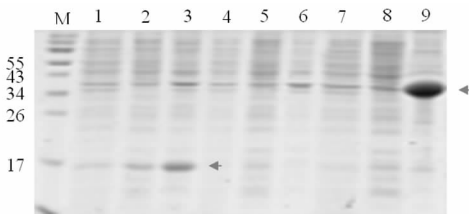
2.1 重组质粒的构建及鉴定 挑选阳性菌落, 用菌落 PCR 的方法对重组质粒进行鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示白色阳性菌落扩增出大小与预期一致的 DNA 片段, 如图 1、2、3 所示。初步表明重组表达质粒构建成功。重组质粒经测序表明 ESAT-6、CFP10、phoS2 目的片段完整开放阅读框与 GeneBank 中检索到的结核杆菌 H37Rv 株基因序列完全一致。



1. DNA 分子标记物; 2. 菌落 PCR 产物。

图 1 ESAT-6 /pET28a 菌落 PCR 鉴定

2.2 重组蛋白的原核表达及鉴定 分别将 20 ℃、25 ℃、30 ℃ 诱导表达菌超声破碎后的上清液和沉淀分别进行 SDS-PAGE 分析, 结果显示: 25 ℃ 时 ESAT-6 和 phoS2 表达产物量最大, 沉淀分别在 10 KDa、31 KDa 处可见较明显的特异蛋白表达带, 而上清液中只见极少量特异蛋白表达带, 说明表达的重组蛋白多数为沉淀, 说明以细胞内包涵体形式存在。而任何温度下 CFP10 都不表达。



1. ESAT-6 对照; 2. ESAT-6 上清; 3. ESAT-6 沉淀; 4. CFP10 对照; 5. CFP10 上清; 6. CFP10 沉淀; 7. PSTS 对照; 8. PSTS 上清; 9. PSTS 沉淀。

图 2 25 ℃ 诱导表达产物鉴定

3 讨 论

pET 系统是 E. coli 中克隆表达重组蛋白功能最强大的系统, 被广泛应用于重组蛋白的表达和纯化中。pET-28a 是其中

的一种具有高效表达的能力的表达载体^[10]。此外, 由于 pET28a 质粒在插入目的 DNA 后表达的蛋白 N 末端含 6 个组氨酸, 它可作为 His 标签蛋白, 可通过形成配位键与金属螯合亲和层析柱上固定化的某些二价金属离子 (如镍) 结合, 使得重组融合蛋白在变性或非变性状态下均可被含 Ni^{2+} 的 His-band 树脂亲和柱纯化, 即使被纯化的重组蛋白含量很低也能被有效地纯化出来。基于以上两点, 笔者选择了该表达载体, 质粒构建实验中笔者用菌落 PCR 的方法对阳性质粒进行鉴定, 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示白色阳性菌落扩增出大小与预期一致的 DNA 片段。初步表明重组表达质粒构建成功。重组质粒经测序表明 ESAT-6、CFP10、phoS2 目的片段完整开放阅读框与 GeneBank 中检索到的结核杆菌 H37Rv 株基因序列完全一致。

三种重组蛋白的原核表达实验, 笔者查阅了相关文献, 选用了 5052 自诱导培养基, 其自动诱导蛋白质合成的主要原因是 lactose 被降解成半乳糖从而诱导蛋白质合成。自诱导培养基的优势在于它无需监测培养基的混浊度, 无需添加诱导剂, 单位体积的培养基比传统的 IPTG 诱导法产出更高量的目的蛋白。我们改变诱导温度, 分别在 20 ℃、25 ℃、30 ℃ 条件下进行表达以选择最优表达条件。三种重组蛋白的原核表达结果显示, 25 ℃ 时 ESAT-6 和 phoS2 表达产物量最大, 上清液中只见极少量特异蛋白表达带, 表达的重组蛋白多数为沉淀, 说明以细胞内包涵体形式存在。故无法进行有效的纯化和分离。而任何温度下 CFP10 都不表达。这些为后续实验带来了很大的困难, 甚至可能影响其今后的实用价值。笔者也通过常规的稀释、透析等方法对包涵体进行复性, 但蛋白复性率均很低。鉴于此, 要想得到表达量更多、纯度更高的重组蛋白, 下一步方案是更换表达载体。本研究为后续表达质粒的重新构建、蛋白的表达及纯化提供了理论依据。

参考文献

- [1] 张小飘. 浅谈结核病实验诊断技术的新进展[M]. 临床肺科杂志, 2011, 16(1): 90-91.
- [2] Doherty TM, Demissie A, Olobo J, et al. Immune responses to the Mycobacterium tuberculosis specific antigen ESAT-6 signal subclinical infection arroag contacts of tuberculosis patients[J]. J Clin Micmbiol, 2002, 40(6): 704-706.
- [3] Davin CD, Mark RA, Craig HD, et al. Molecular and immunological characterization of M ycobacterium tuberculosis CFP10, an immunodiagnostic antigen missing in Mycobacterium bivi BCG[J]. J ClinMicrobiolo, 2000, 38(9): 3285-3290.
- [4] Romano M, Roupie V, Hamard M. Evaluation of the immunogenicity of pBudCE4. 1 plasmids encoding mycolyl-transferase Ag85A and phosphate transport receptor PstS-3 f rom Mycobacterium tuberculosis[J]. Vaccine, 2006, 24(21): 4640-4643.
- [5] 朱佳佳, 刘宏鹏, 张爱君, 等. 结核分枝杆菌 ESAT-6 诊断抗原基因的克隆及同源性分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(3): 339-341.
- [6] 丁淑琴, 王淑静, 王洁, 等. 结核分枝杆菌 CFP10 特异性诊断抗原基因的克隆及特性分析[J]. 宁夏医学杂志, 2010, 32(5): 387-388.

(下转第 391 页)

小于 $20 \times 10^9/L$, 并伴有不同程度的出血表现。治疗组病例输注 1 个治疗量经 γ 射线辐照单采血小板, 对照组病例输血 1 个治疗量单采血小板。记录患者输前的小血小板计数和输血后 1 h 血小板计数。

1.6 临床疗效判断 血小板纠正增加指数(CCI)=(输后血小板计数-输前血小板计数) $\times$ 体表面积(m^2)/输入血小板总数(10^{11}), CCI >10 为输注有效^[3]。

1.7 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理, 两计量资料的比较用 t 检验, 计数资料率的比较用 χ^2 检验。

2 结 果

表 1 不同剂量照射前后淋巴细胞转化结果 (n=12)

辐照剂量(Gy)	平均转化率(%)	
	辐照前	辐照后
25	0.85	0.12
30	0.85	0.04
35	0.85	0.00
40	0.85	0.00

注:各辐照剂量组辐照前、后平均转化率比较, t 值分别为 76.3、91.2、87.0、87.0, $P<0.01$ 。

由表 1 可知, 经过 4 种不同的剂量辐照后, 淋巴细胞转化率均有显著性变化, 剂量为 35 Gy 时, 淋巴细胞的转化率开始为 0, 说明 35 Gy 能使淋巴细胞全部灭活。

表 2 35 Gy γ 射线辐照前后血小板 CD41a、CD62p 阳性率的比较 (n=80)

项目	平均阳性率(%)	
	辐照前	辐照后
CD41a	96.75 $\pm$ 13.35	97.34 $\pm$ 14.78*
CD62p	74.38 $\pm$ 23.12	75.46 $\pm$ 25.26**

注: * $t=0.98, P>0.05$, ** $t=1.47, P>0.05$ 。

表 3 观察组和对照组血小板输注有效率的比较

组别	n	有效输注(n)	无效输注(n)	有效率(%)
观察组	20	17	3	85
对照组	20	15	5	75

注: $\chi^2=0.625, P>0.05$ 。

3 讨 论

TA-GVHD 是因为输入的血液中 CD4 辅助 T 淋巴细胞识别宿主表达的异源性主要和次要组织相容性抗原(MHC)而激活, 进而分泌可溶性细胞因子如白细胞介素-2(IL-2), 促使宿主抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞活化增殖, 从而形成效应细胞, 诱导 TA-GVHD 的发生^[4-5]。大量的实验报道证实了辐照可以有效地诱导淋巴细胞的凋亡^[6-7]。

(上接第 389 页)

[7] 丁淑琴,王洁,张焱,等. 结核分枝杆菌 phoS2 基因的克隆及序列分析[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(6): 669-673.

[8] 冯杉. T7 表达系统及自诱导蛋白产出策略[J]. 北京教育学院学报(自然科学版), 2009, 4(3): 10-15.

[9] Studier FW,Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures[J]. Protein Exper Purif, 2005, 41

CD41a、CD62p 是血小板功能的检测指标, 检测 CD41a 可反映血小板的聚集功能, 检测 CD62p 可知血小板是否处于激活状态, 也反映血小板的释放功能^[8]。CD62p 在活化和非活化血小板间差别最显著, 而且不被血浆蛋白所掩盖, 不随时间的推移而在活化血小板表面消失, 是目前所知反映血小板活化与释放最特异性的标志物^[9]。

血液制品的最佳辐照剂量以既能灭活淋巴细胞又能维持其他血液成分的功能与活力和最小的损伤为选择。早期国外推荐剂量为 15 Gy, 后来分别报道了接受 15~20 Gy 辐照血液后仍产生 TA-GVHD 的报道^[10]。FDA 把辐照中心靶剂量定为 25 Gy, 其他部位不得低于 15 Gy, 欧洲学术委员会制定的辐照剂量为 25~40 Gy。本研究探讨了不同剂量辐照后淋巴细胞的灭活和对血小板功能的影响, 结果表明剂量达到 35 Gy 时, 对血小板功能没有明显的损伤, 可以有效地诱导淋巴细胞的凋亡, 减少活性淋巴细胞的数量, 起到预防 TA-GVHD 发生的效果, 是一个比较适合辐照剂量。

参考文献

[1] Moroff G,Luban NLC. The irradiation of blood and blood components to prevent graft-versus-host disease; Technical issues and guidelines[J]. Cancer, 1997, 11(1): 15.

[2] 王书奎,周振英. 实用流式细胞术彩色图谱[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2004: 43-44.

[3] 田兆嵩. 临床输血学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 35-36.

[4] 刘荷中. 移植物抗宿主病的研究进展[J]. 国外医学输血及血液分册, 1999, 1(22): 22.

[5] 陈志哲. 警惕输血相关性移植物抗宿主病[J]. 中华内科杂志, 1997, 5(36): 291.

[6] Klassen NV, Walker PR, Ross CK, et al. Two-stage cell shrinkage and the OER for radiation-induced apoptosis of rat thymocytes[J]. Int J Radiat Biol, 1993, 64: 571.

[7] 吴玮,孔宪淘,李莉,等. 亚致死量 γ 射线照射后小鼠脾脏 CD95 阳性淋巴细胞变化规律的研究[J]. 中华放射医学与防护杂志, 1997, 5(17): 305.

[8] 李家增,王鸿利,韩忠朝. 血液实验学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 302.

[9] MertenM, Thiagarajan P. P-selectin in arterial thrombosis [J]. J Cardiol, 2004, 93: 855-860.

[10] Sproul AM, Chalmers EA, Mills KI, et al. Use of a radiation-sensitive rejection Irradiation of blood products[J]. Br J Hamatol, 1992, 80: 251.

(收稿日期: 2012-06-11 修回日期: 2012-11-21)

(2): 207-234.

[10] Tabor S,Richardson CC. A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82(3): 1074-1078.

(收稿日期: 2012-08-07 修回日期: 2012-09-25)