

结核分枝杆菌 Mtb81 蛋白的表达及应用研究

朱中元^{1*}, 杨倩¹, 王海波¹, 肖劲逐¹, 刘爱国², 邱一帆², 颜磊², 陈德², 杨欣²

摘要:目的 克隆结核分枝杆菌 Mtb81 蛋白的编码基因 Rv1837c,并在大肠杆菌中表达、纯化,获得重组蛋白 Mtb81。**方法** 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组为模板,PCR 扩增 Rv1837c 基因序列,克隆入原核表达载体 pET-28a,构建重组表达质粒,转化大肠杆菌后用 IPTG 诱导表达,纯化表达产物,获得重组 Mtb81。ELISA 检测重组 Mtb81 蛋白的敏感性和特异性。**结果** 重组质粒 pETRv1837c 测序表明具有正确的编码序列,质粒构建成功,重组蛋白 Mtb81 在大肠杆菌中以包涵体和可溶性形式稳定表达。以 Mtb81 为抗原 ELISA 检测结核病患者血清抗体总敏感性为 20.83%,特异性为 95.83%。**结论** 结核分枝杆菌 Mtb81 重组蛋白能在大肠杆菌工程菌种成功表达,为进一步的应用研究奠定基础。

关键词:结核分枝杆菌 Mtb81 克隆 表达

中图分类号:R378.91¹ 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2013)1-5-03

Prokaryotic expression of Mtb81 protein of *Mycobacterium tuberculosis* application. ZHU Zhong-yuan¹, YANG Qian¹, WANG Hai-bo¹ et al. (1. Hainan Provincial Nongken Hospital, Haikou 570311, Hainan.; 2. Potomac Bio-Technology Co., Ltd. Nanjing, 211800, Jiangsu, P. R. China)

Abstract: Objective To obtain the recombinant Mtb81 protein of *M. tuberculosis*. **Methods** By the utilization of PrimerPremier 5.0 software and according to the DNA sequences of the Mtb81 protein, a pair of primers was designed for amplification of the target gene from H37Rv. Mtb81 was inserted into the expressional plasmids pET-28a. The recombinant plasmid was transformed into the competent cells of *E. coli* BL21(DE3) strains. The positive transformant was selected with IPTG inducement. **Results** The recombinant expression plasmid was constructed. The Mtb81 protein existed in the inclusion bodies of *E. coli*. ELISA results showed that the sensitivity and specificity of the antibody to the recombinant fusion protein Mtb81 were 20.83% and 95.83% respectively. **Conclusion** The recombinant protein has successfully been expressed and purified.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Mtb81 protein; Prokaryotic expression

结核病是由结核分枝杆菌(结核菌)引起的一种慢性传染病。近年来在许多国家,结核病感染率增高,我国每年新增感染人数多达130万,成为单一病菌引起死亡率最高的传染病^[1]。研究结核病预防、诊断的新技术和新试剂成为当务之急。结核菌有大量的抗原在免疫方面具有重要作用,尤其是特异性抗原在诊断方面具有很大的潜力,可以作为结核菌诊断试剂开发的候选抗原来。从结核菌培养滤液或细胞提取物中提纯分枝杆菌抗原^[2]非常繁琐,严重阻碍了结核菌抗原在辅助免疫诊断方面的研究和应用。近年来随着结核菌全基因组DNA序列的公布,部分编码蛋白质的功能基因业已明确。利用基因工程技术克隆、表达结核菌蛋白是稳定获得批量蛋白的途径。目前已经筛选出一些免疫性较强且稳定的蛋白,如38KD蛋白^[3],Ag85复合物,ESAT-6,CFP-10等。我们通过基因工程技术,在大肠杆菌表达结核菌 Mtb81 蛋白,并对其检测性能进行了评估。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 结核菌标准菌株 H37Rv、大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 和 BL21 (DE3) 菌株由海南省农垦总医院提供。pET-28a 表达载体由中国热带科学院生物技术研究所在 A401 实验室提供。

1.1.2 材料 Taq DNA 聚合酶、dNTP 等 PCR 相关试剂, EcoR I, Hind III 限制性内切酶、克隆载体 pMD-19T 试剂盒和核酸标准分子量 Marker(DL2000)购自宝生物工程(大连)有限公司。PCR 胶回收试剂盒购自北京天根生物科技有限公司,蛋白质 Marker 购自北京百泰克生物技术有限公司。常用生化试剂为 BIOSHARP 公司产品,实验室常用试剂为国产分析纯试剂。HRP 标记羊抗人免疫球蛋白购自索莱宝科技有限公司。

1.1.3 17 份痰涂阳性和 31 份痰涂阴性结核病患者血清由海口市结核病防治所提供。48 份健康体检者血清由海南省农垦总医院提供。

1.2 实验方法

1.2.1 结核菌 H37Rv 基因组 DNA 提取 在改良罗氏培养基上接种标准菌株 H37Rv, 37℃ 培养 3W; 刮取

基金项目:海南省 2008 年度重点科技项目(No. 080209)

作者单位:1. 海南省农垦总医院检验科, 海南 海口 570311; 2. 南京大洲生物技术工程有限责任公司, 江苏 南京 211800

作者简介:朱中元(1962~),男,博士,主任技师,研究方向:检验医学和结核病实验诊断。

细菌,悬于1mL生理盐水中,充分研磨菌苔,分装到1.5mL离心管中;14 000rpm离心10min,弃上清;在沉淀中加入50 μ l DNA裂解液,混匀后14 000rpm离心5min;留上清备用。

1.2.2 引物设计 根据基因库 Mtb81 蛋白的基因序列,使用PremierPrimer 5.0设计1对特异性引物。由上海生工生物技术有限公司合成。上游:5'-CGCGAATTCATGACAGATCGCGTGTCTCGG-3',下游:5'-CGCAAGCTTGGCGGCCGCATCGTCACC-3'。

1.2.3 Mtb81 蛋白基因的扩增 以MTB H37Rv基因组DNA为模板,94℃变性5min。94℃ 30s,53℃ 30s,复性72℃ 1min,35个循环,最后72℃维持7min。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 表达载体的构建 将双酶切的目的片段用胶回收试剂盒回收,并与相同酶切的pET-28a,按4:1的比例混合,T4连接酶16℃连接14h,转化制备的大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。从含KAN的LB培养平板上挑选单个菌落在LB液体培养基中,37℃震荡培养,通过PCR和酶切鉴定阳性克隆。并将该重组菌株送南京金斯瑞生物公司测序。

1.2.5 重组蛋白的表达与纯化 构建好的表达菌株经过1mmol/L IPTG终浓度37℃诱导5h,各取1ml菌液离心集菌,离心弃上清,加入终浓度为1% SDS上样缓冲液,100℃煮沸5min SDS-PAGE分析,观察结果。其余菌液经超声波裂解后,用6 \times His-tagged Ni-NTA Agarose 蛋白纯化柱按照其说明书进行纯化。纯化物用SDS-PAGE进行检测。

1.2.6 ELISA 检测临床标本抗体 先将抗原Mtb81蛋白包被(4℃过夜)到酶标板上,洗涤,用脱脂奶粉37℃封闭1h后洗涤,加入稀释的血清37℃孵育1h,洗涤,HRP标记的羊抗人IgG稀释2 000倍,37℃孵育1h。显色反应15min后终止,OD450读数。

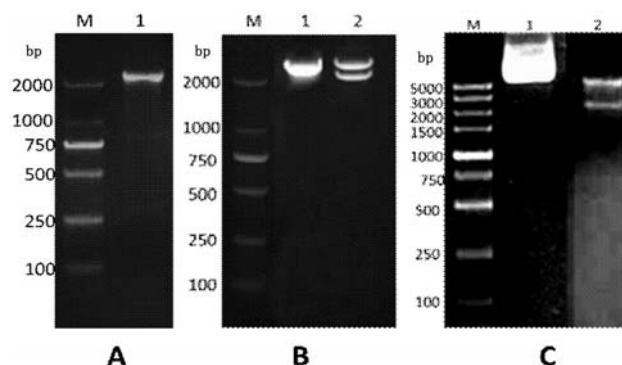
2 结果

2.1 目的基因的扩增 用上述合成的特异性引物,以MTB H37Rv基因组DNA为模板,进行PCR扩增,获得目的片段,与基因库中公布的MTB Mtb81蛋白基因大小一致。见图1 A。

2.2 目的基因的克隆及序列分析 将PCR产物纯化回收后,与pMD19-T Simple Vector连接,构建克隆载体pMD19-T-Mtb81,挑取阳性克隆菌落PCR鉴定。再经EcoR I和Hind III双酶切得到与插入片段大小一致的条带,为插入的目的片段。见图1 B。构建好的载体送南京金斯瑞公司测序,与Genbank公布的结核菌Mtb81基因序列一致。

2.3 表达载体的构建 分别经过EcoR I和Hind III

双酶切得到的目的片段与载体pET28a连接,转化DH5 α ,构建表达载体。酶切鉴定见图1 C。

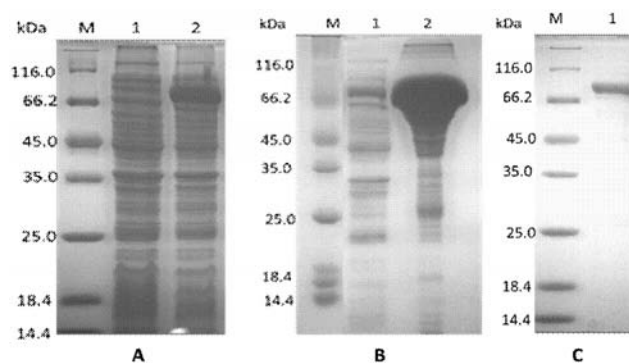


1: Mtb81 PCR 扩增产物。B: 1:克隆载体; 2:克隆载体双酶切鉴定。C: 1:表达载体; 2:表达载体双酶切鉴定。1: PCR product of mtb81. B, 1: Vector containing mtb81. 2: Fragments of the vector after EcoR I and Hind III digestion. C: Expressing vector containing mtb81. 2: Fragments of the expressing vector after EcoR I and Hind III digestion.

图1 mpt81基因产物及酶切电泳分析结果 A, M: DNA marker DL 2000

Fig 1 PCR product and fragments of the vector after endonuclease digestion. A, M: DNA marker DL 2000

2.4 重组蛋白的初步表达 将筛选到的工程菌进行37℃, 1mmol/L IPTG诱导,未诱导的菌株没有特异的表达条带,诱导后的菌种当中,在目的蛋白约81kDa对应区域有大小明显的特异条带。说明Mtb81在大肠杆菌中成功表达。见图2 A。



A, M: 蛋白Marker; 1 未诱导; 2 诱导后。B, 1 破碎上清; 2 破碎后沉淀。C: 1 纯化后的Mtb81重组蛋白。A, M: Protein markers. B, 1 and 2: SDS-PAGE results of the cultures without and with IPTG induction. B, 1: supernatant of the sonicated E. coli. 2, sediment of he sonicated E. coli. C, 1: purified mtb81.

图2 重组工程菌诱导表达及纯化后SDS-PAGE电泳图
Fig 2 SDS-PAGE analysis of E. coli transfected mtb81 expressing vector

2.5 Mtb81的可溶性分析 重组菌株诱导后冰上超声波破碎,离心后分别取上清和沉淀(沉淀用包涵体洗涤液洗涤)上样,SDS-PAGE凝胶电泳,分析Mtb81蛋白的可溶性。从图2 B可以看到,上清液和沉淀中都有目的条带。说明Mtb81蛋白以可溶性和包涵体

两种形式存在于大肠杆菌中,其中主要以包涵体形式存在。

2.6 重组蛋白 Mtb81 的分离纯化 收集诱导后的菌体,超声波破碎后,洗涤收集到的包涵体,8M 尿素溶解,离心吸取上清液,用0.45um 的细菌过滤器过滤样品,上样于组氨酸标签柱,平衡液平衡后,用含有咪唑的洗脱液洗脱蛋白,收集洗脱液,凝胶电泳分析见图 2 C。表明成功纯化到 Mtb81 目的蛋白。

2.7 ELISA 检测结核病患者血清标本抗 Mtb81 抗体 其中痰涂阳患者、痰涂阴患者敏感性分别为 23.53%, 19.35%。平均敏感性为 20.83% (10/48), 特异性为 95.83%。痰涂阳患者敏感性略高于痰涂阴患者,见表 1。

表 1 ELISA 检测血清中抗 mtb81 抗体的阳性率比较

Tab 1 Positive rates of anti-mtb81 in sera

病人类型 Patient group	标本数 No.sample	阳性数 No.positive	阳性率(%) Positive rate(%)
痰涂阳性 Smear positive	17	4	23.53
痰涂阴性 smear negative	31	6	19.35
正常对照 Normal control	48	2	4.17

3 讨论

目前,被用来研究的 MTB 诊断性抗原虽然不少,但是真正具有免疫反应性强的且稳定的单一诊断抗原却不多见。其中 38KD 蛋白是迄今为止单项诊断结果最好的抗原^[4,5]。可引起机体的体液和细胞免疫,是主要的免疫原,具有较高的敏感性和特异性。现在用于血清学诊断的抗原越来越趋向于联合抗原,这就为我们发现和寻找具有优势的抗原提出要求。Mtb81 蛋白是为结核菌重要的分泌蛋白,在抗体检测中具有良好的敏感性和特异性。Ronald^[6]等研究 HIV-TB 复合感染患者时发现,结核菌 Mtb81 蛋白为抗原的 ELISA 敏感性优于其他的蛋白及 PPD 皮肤试验。

本实验中构建的结核菌 Mtb81 大肠杆菌工程菌株,重组质粒酶切图谱与预期结果一致。Mtb81 蛋白主要以包涵体形式表达,部分以可溶性形式存在。用 6×His-tagged Ni-NTA Agarose 蛋白纯化柱分离纯化到浓度为 0.13mg/ml 的重组 Mtb81 蛋白。ELISA 检测结核病患者血清抗体和健康体查者,结果显示其中痰涂阳患者、痰涂阴患者敏感性分别为: 23.53%, 19.35%。痰涂阳患者敏感性略高于痰涂阴患者。总敏感性为 20.83%, 特异性为 95.83%。该蛋白的优势是特异性很高,表明可同其他结核菌蛋白一起包被,以提高检测结核抗体的阳性率。

参考文献:

[1] Murray CJ, Lopez AD. Mortality by cause for eight regions of the world: Global burden of disease of study[J]. Lancet,1997,349(9061):1269-1276.

[2] Wu XQ, Zhang JX, Zheng Y, et al. Expression of Mycobacterium tuberculosis Ag85B in E. coli. Guangdong Med J. 2003,24(5):487-488.(In Chinese)
(吴雪琼,张俊仙,郑越,等.结核分支杆菌 Ag85B 在大肠杆菌中的高效表达[J].广东医学,2003,24(5):487-488.)

[3] Young D, Kent L, Rees A, et al. Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1986,54(1):177-183.

[4] Manca C, Lyashchenko K, Wiker HG, et al. Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun, 1997,65 (1):16-23

[5] Wu Y, Zhu ZY, Wang HB. Cloning of the gene coding for 38kd protein of Mycobacterium tuberculosis and its expression in E. coli. China Trop Med, 2005,5(9):1786-1789.(In Chinese)
(吴燕,朱中元,王海波.结核菌 38KD 蛋白基因克隆及在大肠杆菌中的表达[J].中国热带医学.2005,5(9):1786-1789.)

[6] Hendrickson RC, Douglass JF, Reynolds LD, et al. Mass spectrometric identification of Mtb81, a novel serological marker for tuberculosis[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(6): 2354-2361.

收稿日期:2012-11-30 编辑:崔宜庆