

结核分枝杆菌蛋白 Rv0315 的克隆表达及其抗原性研究

陈苏芳¹, 周业成², 赵静¹, 赵俊伟³, 吴兴福¹, 孙战强³, 玄松花⁴, 张舒林^{3*}

摘要:目的 评价结核分枝杆菌重组蛋白 Rv0315 在结核病血清学诊断中的价值。方法 采用常规分子克隆方法获得重组 Rv0315 蛋白, 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 84 份确诊结核病人血清和 48 份健康人血清中相应的抗结核抗体水平, 并与结核分泌蛋白 ESAT-6 的检测结果进行比较。结果 成功构建了重组蛋白 Rv0315, 其在 *E. coli* BL21 plysS (DE3) 中主要以可溶性形式表达, 分子量(30.3kDa)与预期相符, ELISA 血清学活性评估显示其特异性和敏感性分别为 94.0%(45/48)和 35.7%(30/84)。结论 重组蛋白 Rv0315 有望成为新的结核病血清学诊断候选抗原。

关键词: 结核分枝杆菌; Rv0315; 克隆; 表达; 血清学诊断

中图分类号: R378.91¹ 文献标识码: A 文章编号: 1009-9727(2012)10-1172-04

Cloning and Expression of *M. tuberculosis* Rv0315 protein and evaluation of its immunogenicity. CHEN Su-fang, ZHOU Ye-cheng, ZHAO Jing et al. (Suzhou No.5 People's Hospital, Suzhou 215007, Jiangsu, P. R. China)

Abstract: **Objective** To evaluate the value of recombinant Rv0315 protein in serodiagnosis of TB. **Methods** The gene encoding Rv0315 protein was amplified and cloned and confirmed by sequencing. The expression vector pET32a-Rv0315 was constructed and expressed in *E. coli* BL21 plysS (DE3) strain. Recombinant Rv0315 protein was purified by Ni-NTA purification system and was used as antigen to screen the sera of tuberculosis (TB) patients (n=84) and healthy controls (n=48) by ELISA, compared with ESAT-6 protein to evaluate the value in serodiagnosis of TB. **Results** The ORF Rv0315 was expressed mainly as soluble protein in *E. coli* BL21 plysS (DE3), with the relative molecular weight of 30.3kDa in line with expectations. The immunogenic evaluation of recombinant Rv0315 protein by ELISA suggested that its specificity and sensitivity respectively reached 94.0 % (45/48) and 35.7 % (30/84). **Conclusion** The recombinant Rv0315 protein is expected to be a new candidate antigen for the serodiagnostic research in TB.

Key words: *M. tuberculosis*; Rv0315; Clone; Expression; Serodiagnosis

结核病仍是全世界范围内最严重的医疗卫生难题之一。据 2011 年世界卫生组织报道, 2010 年全球结核病例 880 万, 死亡 145 万人^[1]。结核病的早期诊断是结核病防控的关键, 其中血清免疫学诊断以其固有的操作简便、快速、可用肉眼判断结果、稳定性好、便于推广等优势, 已成为新形势下最可能满足经济不发达地区和结核病高发区所亟需的结核病诊断技术^[2]。获得尽可能多的与结核病相关的特异抗原是开发结核病血清免疫学诊断技术的前提。

结核分枝杆菌是引起结核病的病原体^[3]。2012 年, Eui-Hong Byu 等发现 Rv0315 是一个能刺激树突状细胞成熟的新型结核抗原, 并能诱导产生 Th1 细胞免疫反应^[4]。基于 Rv0315 蛋白的抗原性, 为验证其是否为结核病血清免疫学诊断试剂研究的候选抗原之一, 本研究成功构建重组质粒 pET21a-Rv0315, 对其进行体外诱导表达和蛋白纯化, 通过 ELISA 实验对结核分枝杆菌重组蛋白 Rv0315 进行血清学抗原活性评

价。

1 材料与方法

1.1 菌种与载体 *E. coli* BL21 plysS (DE3) 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司, pET-21a 载体来自上海交通大学医学院病原生物学教研室, 结核分枝杆菌 H37Rv 为本院保存。

1.2 生化试剂与耗材 T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、Nde I、Xho I 等限制性内切酶购自 Takara 公司; 蛋白质质量标准购自 Ferments 公司; Ni-NTA 亲和纯化柱购自 Bio-Rad 公司; 10 kDa 超滤浓缩管购自 Millipore 公司。

1.3 血清标本 48 份健康血清来源于苏州市健康体检人员, 平均年龄 20.7 岁; 48 份肺结核涂片阳性病人和 36 份肺结核涂片阴性病人血清来源于本院门诊和住院结核病人, 平均年龄 43.2 岁。

1.4 PCR 引物的设计和合成 通过 NCBI 检索结核分枝杆菌 Rv0315 基因序列, Primer 5.0 设计引物, 上

陈苏芳、周业成为并列第一作者

基金项目: 十一五 国家科技重大专项(No.2009ZX10004-313); 十一五 国家科技重大专项(No.2009ZX10003-017)

作者单位: 1. 苏州市第五人民医院, 江苏 苏州 215007; 2. 四川大学生命科学院, 四川 成都 610065; 3. 上海交通大学基础医学院, 上海 200025; 4. 河南中医学院, 河南 郑州 450008

作者简介: 陈苏芳(1972~), 女, 汉族, 主管检验师, 主要从事临床检验学研究。

*通讯作者 E-mail: shulinzhang@sjtu.edu.cn

游 :5 - GGGCCCCCATATGCCGTCCCGGCCGGCCGC-GCCGG-3 (Nde I);下游 :5 - CCGCTCGAGGTTGT-GCCAACCACCGTCC-3 (Xho I)送 Invitrogen 公司合成。

1.5 目的基因扩增与载体构建 常规方法获得结核分枝杆菌 H37Rv 菌株基因组 DNA,按照参考文献^[5]的方法扩增 Rv0315 基因片段。PCR 反应条件 :94℃ 5 min,94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 1min,共 30 个循环,最后 72℃延伸 5 min。限制性内切酶 Nde I 和 Xho I 分别酶切 pET-21a 质粒和 PCR 产物后,T4 DNA 连接酶连接,转化表达菌株 *E. coli* BL21 plysS (DE3),接种于 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上,37℃培养过夜,挑选阳性克隆进行测序鉴定(由上海杰李生物技术有限公司完成测序)。

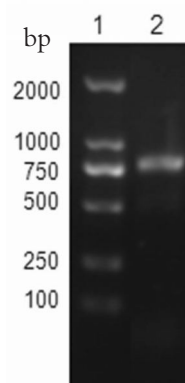
1.6 蛋白诱导表达与纯化 按照参考文献^[6,7]的方法将测序正确的阳性克隆菌接种于 200 ml 含 50μg/ml 氨苄青霉素的营养肉汤 LB 培养液中,37℃振荡培养至 OD₆₀₀=0.5,加入β-硫代半乳糖苷(IPTG)至终浓度为 1.0 mmol/L,37℃振荡培养 3 h,菌液于 8 000 g 4℃离心 20 min。加入破碎缓冲液(KCl 300 mmol/L;KH₂PO₄ 50 mmol/L;咪唑 5mmol/L,pH 8.0)重悬菌体,超声波破碎(250W,5s x 5s x 100 次),12 000 g 4℃离心 30min,收取上清,0.22μm 滤膜过滤后按操作说明用 Ni-NTA 柱在 Biologic LP 纯化仪上亲和纯化。12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,合并目标蛋白峰,用截流量为 10kDa 的超滤管 12 000 g,4℃离心 30 min 后,0.02 mol/L Tris-HCl (pH 8.0)溶解,BCA 法测定蛋白浓度后于-20℃保存。

1.7 酶联免疫吸附试验(ELISA) 用包被缓冲液分别把重组 Rv0315 和 ESAT-6(上海交通大学基础医学院病原生物学教研室)蛋白稀释成 5 μg/ml,每孔 100 μl,4℃包被过夜,PBST 洗板 5 次;用含 1%BSA 的 PBS 封闭,37℃孵育 1 h;PBST 洗板;用含 1% BSA 的 PBST 稀释血清(稀释比例 1:50),每孔 100 μl,37℃孵育 1 h;PBST 洗板;用含 1%BSA 的 PBST 稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG(稀释比例 1:20 000),每孔 100 μl,37℃孵育 1 h;PBST 洗板;加入 TMB 显色剂,每孔 100 μl,避光显色 10 min,然后加入 50 μl 的 2 M 硫酸终止反应,在 450 nm 读取各孔吸光度(OD 值)。结果判定:以健康对照者血清标本的平均 OD 值加上 2 倍标准方差(SD)作为判断标准,若血清标本 OD 值大于此标准,即判断为阳性,反之则为阴性。

2 结果

2.1 Rv0315 基因的扩增与重组质粒 pET21a-Rv0315 的构建 用 PCR 法从结核分枝杆菌 H37Rv 的

基因组 DNA 中扩增出 Rv0315 基因片段,如图 1 所示,目标位置显示出特异条带(789 bp)。从构建阳性重组菌中挑取重组克隆,摇菌后提取质粒进行测序,其构建序列经 BLAST 分析与 GenBank 中结核分枝杆菌 H37Rv 的 Rv0315 基因序列完全相同,没有发现突变,说明重组质粒 pET21a-Rv0315 构建成功。

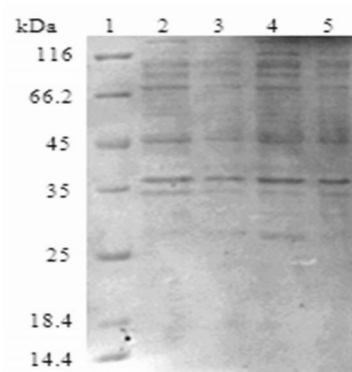


1.标志物;2.特异条带 1.Marker; 2.Specific band

图 1 Rv0315 基因 PCR 扩增产物

Fig 1 PCR product of Rv0315 gene

2.2 pET21a-Rv0315 重组菌的诱导表达与纯化 将阳性重组菌诱导前及诱导后表达物进行 SDS-PAGE 电泳分析,明显可见诱导重组菌较未诱导重组菌在 30.5 kDa 处多出一条表达带,其大小恰好为 pET-21a 质粒上表达的氨基酸分子量和天然 Rv0315 蛋白之和。SDS-PAGE 电泳结果显示表达的目的蛋白主要分布在上清中,以可溶性非包体状态存在(图 2)。最后目标蛋白单一存在于高浓度咪唑的洗脱缓冲液中(图 3)。

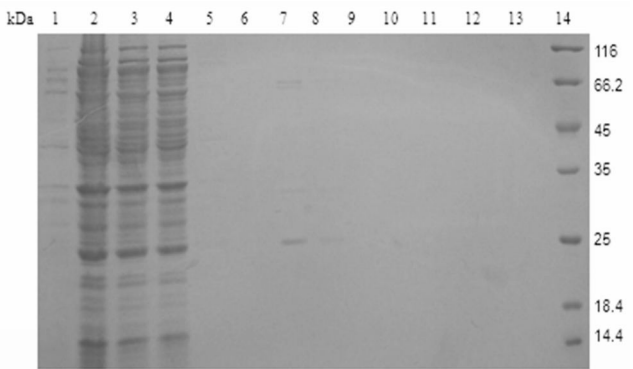


1.蛋白分子量标志物 2.未诱导的 3.诱导的 4.超声后上清 5.超声后沉淀

1.Protein molecular mass marker ;2.Uninduced ;3.Induced 4.Supernatant after ultrasonication 5.Precipitation after ultrasonication

图 2 重组质粒 pET21a-Rv0315 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig 2 SDS-PAGE analysis of the expression product of recombinant 1 DL2000 DNA Marker 2 Rv0315 plasmid pET21a-Rv0315



1.未诱导的 2.诱导的 3.超声后上清 4.流动 5.冲洗1 6.冲洗2 7-13.纯化产物 ;14.蛋白分子量标志物
1.Uninduced ; 2.Induced ; 3.Supernatant after ultrasonication ; 4.Flow through ; 5.Wash -1 6.Wash-2 7-13.Purified product ; 14.Protein molecular mass marker

图3 Rv0315重组蛋白亲和纯化的SDS-PAGE电泳分析
Fig 3 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein Rv0315 purified by affinity chromatography

表1 重组蛋白Rv0315和ESAT-6抗原分别对健康对照血清和结核病人血清IgG反应结果
Table 1 Sensitivities and specificities of ELISA assays for IgG antibodies against Rv0315 and ESAT-6

抗原 Antigen	敏感性Sensitivity			特异性Specificity
	涂阳TB(n=48)Smear positive	涂阴TB(n=36)Smear negative	总TB(n=84)Total TB	健康对照(n=48)Health control
Rv0315	37.5% (18/48)	33.3% (12/36)	35.7% (30/84)	94.0% (45/48)
ESAT-6	31.2% (15/48)	25.0% (9/36)	28.5% (24/84)	94.0% (45/48)

3 讨论

寻找新的结核诊断标志物从而开发简单快速并可用于广大发展中国家和地区的新型结核病血清学诊断技术越来越受到世界各国的重视^[8-10]。2012年 ,Eui-Hong Byun 等研究发现 Rv0315 能刺激树突状细胞成熟 ,并诱导产生 Th1 细胞免疫反应 ,揭示了 Rv0315 是一个新的结核分枝杆菌免疫刺激抗原^[4]。但有关对 Rv0315 重组蛋白是否具有作为结核血清诊断抗原的潜在价值 国内外尚未见相关报道。

本实验在重组质粒构建策略上 ,采用常规的分子克隆方法。实验中使用的 pET-21a(+)质粒其 T7 启动子具有很强的启动转录能力 ,可使目的蛋白表达量很大 ,原则上通过克隆转化成功构建的 pET21a-Rv0315 重组质粒在大肠杆菌中 37℃震荡诱导培养 3h 后 ,表达量就可约占全菌蛋白的 30%以上 ,但本实验最终的目的蛋白表达量低 ,具体原因有待分析 ,表达条件有待优化。在对重组工程菌进行诱导后 ,电泳显示一条分子量为 30.5 kDa 的蛋白诱导条带 ,这和当初设计中形成重组蛋白的理论分子量一致。pET21a-Rv0315 重组质粒上携带 6 个组氨酸标签 (His-Tag) ,它的表达为后续的蛋白镍柱层析纯化提供了亲和位点 ,通过形成配位键与亲和层析柱上固定化的镍离子金属螯

合 ,从而获得的重组蛋白 Rv0315 具有较高的纯度 ,使其批量生产和临床应用成为可能。

1998 年 ,Cole ST 等对结核分支杆菌 H37Rv 进行了全基因组测序 ,发现结核菌共有仅 4000 个蛋白编码基因 ,其中 Rv0315 基因注释为 β-1,3 糖苷酶^[3]。2012 年 ,Eui-Hong Byun 等研究发现 Rv0315 通过加强共刺激分子 CD80、CD86 和 MHC I/II 的表达从而在功能上激活树突状细胞。而且它增加了促炎细胞因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 的树突状细胞分泌 ,与脂多糖不同的是 ,Rv0315 诱导 IL-12p70 的分泌而不是 IL-10。此外经 Rv0315 刺激的树突状细胞能加速结核感染小鼠体内 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞的增殖 ,其中伴随着 IFN-γ 的含量增加 ,表明 Rv0315 能促使免疫反应中 TH1 细胞分化 ,这揭示了 Rv0315 是一个新的结核分枝杆菌免疫刺激抗原^[4]。本实验首次对结核分枝杆菌 Rv0315 重组蛋白进行了克隆表达与抗原活性评价 ,其中 Rv0315 重组蛋白以可溶形式表达 ,省去了包涵体纯化过程中的变性、复性处理 ,很大程度上保护了 Rv0315 的生物学和免疫学活性 ,从而为进一步评价其和其他特异抗原组合在结核血清学诊断中的价值奠定了基础。

参考文献:

- [1] WHO. Global tuberculosis control: WHO report 2011. Geneva, World Health Organization 2011:URL: http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr2011_full.pdf.
- [2] Zhang SL, Zhao JW, Sun ZQ, Yang EZ, Yan JH, Zhao Q, et al. Development and evaluation of a novel multiple-antigen ELISA for serodiagnosis of tuberculosis[J]. Tuberculosis 2009;89:278-284.
- [3] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence[J]. Nature 1998;393:537-544.
- [4] Byun EH, Kim WS, Shin AR, Kim JS, Whang J, Won CJ, et al. Rv0315, a novel immunostimulatory antigen of Mycobacterium tuberculosis, activates dendritic cells and drives Th1 immune responses[J]. J Mol Med 2012;90:285-298.
- [5] Sambrook J, Russell DW. Experimental guide for molecular clone[M] (Translated by Huang Gui-tng, et al.) (3rd edition)[M]. Beijing:Scientific Press, 2002, 611-616 (In Chinese). (Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂, 等译. 第3版 [M]. 北京: 科学出版社. 2002:611-616.)
- [6] Wu Y, Zhu ZY, Wang HB. Cloning and expression of 38 KD protein gene of Mycobacterium tuberculosis[J]. China Trop Med, 2005;5: 1786-1789 (In Chinese) (吴燕, 朱中元, 王海波. 结核分支杆菌 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: 1786-1789)
- [7] Lin XH, Xu SF, Yang YP, Wu JC, Wang HJ, Shen HB, et al. Purification and characterization of anthranilate synthase component I (TrpE) from Mycobacterium tuberculosis H37Rv[J]. Protein Expr Purif 2009, 64:8-15.
- [8] Kunnath-Velayudhan S, Salamon H, Wang HY, Davidow AL, Molina DM, Huynh VT, et al. Dynamic antibody responses to the Mycobacterium tuberculosis proteome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107: 14703-14708.
- [9] Wallis RS, Pai M, Menzies D, Doherty TM, Walzl G, Perkins MD, et al. Biomarkers and diagnostics for tuberculosis: progress, needs, and translation into practice[J]. Lancet 2010;375:1920-1937.
- [10] McNerney R, Daley P. Towards a point-of-care test for active tuberculosis: obstacles and opportunities[J]. Nat Rev Microbiol 2011;9: 204-213.

收稿日期 2012-07-23 编辑 崔宜庆

关于本刊启用 科技期刊学术不端检测系统(AMLC) 的通知

近年来,抄袭、伪造、剽窃、不当署名、一稿多投等学术不端事件时有发生,已引起社会各界的广泛关注。为规范学术行为,维护学术道德,保证稿件质量,净化学术研究环境,本刊编辑部已同意《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社提供的科技期刊学术不端检测系统(AMLC)对本刊已发表文献实行删除学术不端文献的办法,对疑似学术不端文献的论文在数据库中删除。另本刊也将使用 AMLC 系统对来稿加强初审,对检测出严重问题的稿件记录在案,并记入黑名单,望广大作者及读者照知,维护良好学术环境。

AMLC 系统经国家新闻出版总署、国家科技部、全国科研诚信管理委员会等单位指导,由《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社与清华同方知网(北京)技术有限公司共同研制开发。到目前为止,国家知识基础设施(National Knowledge Infrastructure, CNKI)通过网络正式出版期刊 9135 种(国内正式期刊共 9541 种),其中学术期刊 7460 种,期刊全文数据库 2480 万篇,出版的 63 万篇优秀硕士学位论文,8.7 万篇博士学位论文,重要会议论文 94.7 万篇,重要报纸 462 万篇,重要年鉴 787 万篇,学术引文索引数据 600 多万条,可有效检测来稿学术不端行为。

本刊编辑部