

结核分枝杆菌 CFP-10 蛋白的克隆及表达

张丹^{1,2}, 朱中元^{1*}, 王海波¹

摘要 **目的** 通过构建结核分枝杆菌 CFP-10 蛋白表达载体,在大肠杆菌表达,为探索重组多肽在结核病血清学诊断的应用奠定前期实验基础。 **方法** 用 PCR 法从结核分枝杆菌 H37Rv 基因组中扩增出 CFP-10 基因片段,连接到表达载体 PET30a 上,在大肠杆菌中表达,组氨酸标签(His-Tag)镍柱层析纯化重组蛋白。 **结果** 构建了含 CFP-10 重组质粒的大肠杆菌工程菌,发现目的蛋白主要以可溶性蛋白形式存在。 **结论** CFP-10 蛋白基因克隆入宿主菌中并表达成功。

关键词 结核分枝杆菌;CFP-10 蛋白;表达

中图分类号 R521 **文献标识码** A **文章编号** :1009-9727(2011)10-1180-03

Cloning and expression of CFP-10 protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Zhang Dan Zhu Zhong-yuan, Wang Hai-bo.(Hainan Provincial Nong Ken Hospital, Haikou 570311, Hainan, P. R. China)

Abstract; Objective To evaluate the potential of the antigens in serodiagnosis of TB, CFP-10 gene was cloned and expressed in *Escherichia coli*. **Methods** The gene coding CFP10 protein was amplified by PCR from genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and then inserted into expression vector PET30a and expressed fusion proteins CFP10 in *E.coli* BL21 (DE3). The recombinant proteins were purified by affinity chromatography. **Results** The target protein was expressed in *E.coli* after induction with IPTG. The solubility analysis showed that the recombinant protein existed as soluble protein. **Conclusion** The gene sequence of CFP10 was obtained and the protein was expressed in *E.coli* BL21.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; CFP-10 protein; Expression

结核病是当今世界上由单一致病菌感染引起的死亡率最高的疾病,严重威胁着人类的健康。全世界大约有三分之一的人感染了结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*),并且感染人数在以每年 700~800 万的速度增加。因此,结核病快速准确的早期诊断成为控制结核病流行的重要手段之一。目前我国结核病诊断主要由临床表现、影像学诊断结合痰涂片镜检,或细菌培养,或结核菌素皮肤试验(PPD 皮试)进行。但是由于常规细菌学检查方法的灵敏性差,而且细菌培养费时长(6~8 周),以及受人为操作影响等原因,这些方法对于结核病快速、准确诊断的帮助有限^[1]。ELISA 方法测定结核分枝杆菌抗体水平具有简单、低廉、快速的特点,作为结核病的辅助诊断方法之一,为众多研究者所重视。结核分枝杆菌分泌许多蛋白到细胞外,在结核病人的免疫反应中起了很重要的作用。研究表明 CFP-10 是 T 细胞的靶抗原,能诱导皮肤迟发型超敏反应并刺激外周血单核细胞产生特异性 IFN- γ ^[2,3]。本实验通过构建结核菌 CFP-10 蛋白表达载体,在大肠杆菌 BL21(DE3)中进行诱导表达,并对表达产物进行纯化,以获得大量 CFP-10 抗原,为探索重组蛋白在结核病血清学诊断的应用奠定前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 菌种和载体 结核分枝杆菌 H37Rv、大肠杆菌 BL21(DE3)、表达载体 pET-30a 均为海南省农垦总医院保存、提供。

1.2 试剂 IPTG、硫酸卡那霉素(Kan)购自上海生工生物工程

技术有限公司。DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性内切酶和 DNA Marker 购自宝生物(大连)有限公司。预染蛋白 Marker 购自北京百泰克生物技术有限公司。普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自北京天根生物科技有限公司。6 \times His-tagged Ni-NTA 琼脂糖蛋白纯化柱是 Qiagen 公司产品。常用高纯度生化试剂均为 Biosharp 公司产品,其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 引物 根据 Genbank 中结核分枝杆菌标准株 H37Rv 的 CFP-10 基因序列,设计 CFP-10 基因 5' 端引物为:5'-CCGGAATTCATGCGAGAGATGAAGACCGAT-3',3' 端引物为:5'-CCCAAGCTTTCAGAAGCCCATTTGCGAGGAC-3'。 、的酶切位点分别为 EcoR 和 Hind^{III}。引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。

1.4 CFP-10 基因的扩增与克隆 以 H37Rv 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增 CFP-10 基因片段。反应条件:95 $^{\circ}$ C,5min;95 $^{\circ}$ C,30s,53 $^{\circ}$ C,30s,72 $^{\circ}$ C,1min,36 个循环;72 $^{\circ}$ C,7min;4 $^{\circ}$ C,保存。扩增产物经纯化试剂盒处理后,经双酶切,酶切后扩增产物经切胶回收与同样方式处理的表达质粒 pET30a 在 T4 DNA 连接酶作用下连接,连接产物转化入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞,挑选阳性重组子送南京金斯瑞生物工程有限公司测序。

1.5 目的蛋白的诱导表达 将通过测序验证正确的重组子接种于含 50mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中,待 37 $^{\circ}$ C 振荡培

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,海南 海口 570311; 2. 海南大学环境与植物保护学院,海南 海口 570208

作者简介 张丹(1985~),女,汉族,湖北麻城市人,硕士,主要从事病原分子生物学研究。

* 通信作者 E-mail: zhu_zhongyuan@hotmail.com

养至吸光度 A600) 值为 0.6~0.8, 加入 β -硫代半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1mmol/L, 继续 37℃ 振荡培养, 从开始诱导表达 1h 起每隔 1h 留样待检, 至开始诱导表达 6h 时停止, 收集菌体, 进行 SDS-PAGE 分析。

1.6 重组蛋白表达形式鉴定及纯化 收集按最佳诱导表达条件诱导的菌体, 冰浴超声破碎后离心, 分别收集沉淀和上清, SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达形式; 亲和层析纯化蛋白。

2 结果

2.1 重组 CFP-10 质粒的鉴定 从构建阳性重组菌中挑取重组克隆, 摇菌后提取质粒经双酶切鉴定 (图 1)。两者重组质粒酶切片段和 PCR 扩增片段相同, 分别约为 303 bp、432bp。重组质粒测序后, 其构建序列与 GenBank 中结核分枝杆菌 H37Rv 的基因完全相同。

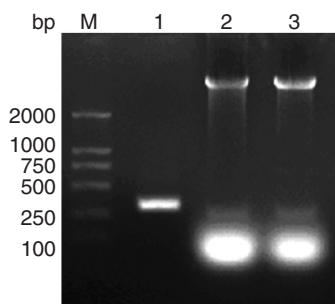


图 1 重组质粒 PET30a-CFP-10 的酶切鉴定结果 M: DNA marker; 1: CFP-10 基因 PCR 产物; 2-3: PET-30a-CFP-10 双酶切。

图 1 重组质粒 PET30a-CFP-10 的酶切鉴定结果

2.2 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达 将筛选到的工程 pET-30a-CFP-10 BL21 (DE3) 经 IPTG 诱导后, 取菌体沉淀进行 SDS-PAGE 分析 (图 2), 可见明显的特异表达产物条带。重组 CFP-10 蛋白相对分子质量比预计分子质量 16.2KD 大, 可能是附加表达了载体上多余的序列, 而未诱导的菌体没有明显的条带。

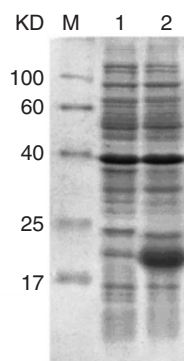


图 2 重组工程菌表达产物的 SDS-PAGE 电泳图 M: 预染蛋白质 Marker; 1: 未诱导的重组 CFP-10 菌株; 2: 诱导 6h 后的重组 CFP-10 菌株。

图 2 重组工程菌表达产物的 SDS-PAGE 电泳图

2.3 重组 CFP-10 蛋白的可溶性分析 诱导后的菌体经超声波破碎, 离心, 分别取上清和沉淀进行 SDS-PAGE。结果见图 3, 重组 CFP-10 蛋白主要存在于上清部分, 主要以可溶性蛋白形式存在。

2.4 重组 CFP-10 蛋白的纯化 收集诱导表达的菌体沉淀, 经超声波破碎, 离心, 取上清通过镍琼脂糖凝胶纯化柱分离纯化。收集洗脱峰溶液进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 4。

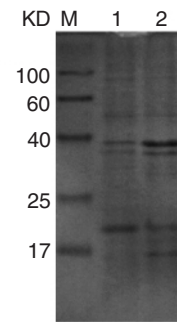


图 3 重组 CFP-10 肽段表达形式分析 SDS-PAGE 电泳图 M: 蛋白质分子量标准; 1: 重组 CFP-10 蛋白菌体超声波破碎后的上清; 2: 重组 CFP-10 蛋白菌体超声波破碎后的沉淀。

图 3 重组 CFP-10 肽段表达形式分析 SDS-PAGE 电泳图

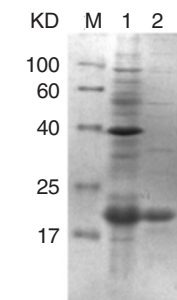


图 4 纯化重组 CFP-10 蛋白 SDS-PAGE 电泳图 M: 蛋白质分子量标准; 1: 重组 CFP-10 蛋白菌株诱导产物; 2: 纯化重组 CFP-10 蛋白。

图 4 纯化重组 CFP-10 蛋白 SDS-PAGE 电泳图

3 讨论

CFP-10 是 1998 年鉴定出来的低分子量蛋白, 又名 mtbll, 是一种短期培养滤液蛋白, 由 *hsp* 基因编码, 属于 ESAT-6 家族^[4]。CFP-10 基因大小为 303bp, 编码 100 个氨基酸, 分子量为 10kDa。CFP-10 只存在于结核分枝杆菌复合菌群及其它几种致病性分枝杆菌中, BCG 及其它非致病性分枝杆菌不表达 CFP-10^[5]。因此 CFP-10 作为抗原可以将结核病与 BCG 免疫以及非结核分枝杆菌感染区别开来。Renshaw 等^[6]研究表明, CFP-10 表现出与 ESAT-6 相当的 T 细胞性免疫反应, 诱导的 IFN- γ 的释放水平与 ESAT-6 相当, 具有潜在的诊断应用价值。

关于 CFP-10 蛋白的研究应用国内外都有相关报道。李红霞^[7]等对 CFP-10 基因进行克隆及序列分析。Vordermeier^[8]用 ESAT-6 和 CFP-10 复合抗原诊断结核分枝杆菌感染获得了较高的特异性和敏感性。本实验采用基因工程的手段来获得目的基因, 构建了 CFP-10 蛋白的原核表达载体, 并在大肠杆菌中成功表达了重组蛋白, 通过镍琼脂糖凝胶纯化柱对表达产物的纯化, 这为探究 CFP-10 蛋白在结核病血清学诊断的应用奠定了前期抗原基础。

参考文献:

- [1] Karin W, Rosenkrands I, Okkels LM, et al. Assessing the serodiagnostic potential of 35 Mycobacterium tuberculosis proteins and identification of four novel serological antigens [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43 (1): 57-65.
- [2] Dillon DC, Alderson MR, Day CH, et al. Molecular and Immunological characterization of mycobacterium tuberculosis CFP10, an immunodiagnostic antigen missing in Mycobacterium bovis BCG [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38 (9): 3285-3290.

(下转第 1216 页)

1.2.4 评价指标 MDR-TB 纳入情况,不良反应的处理,6 个月末痰涂片转阴率和痰培养转阴率,追踪到位率。

1.2.5 数据的分析 耐多药项目报表数据的处理和分析。

2 结果

2.1 可疑 MDR-TB 患者筛查与确诊情况 截至 2010 年 8 月 31 日推荐的可疑 MDR-TB 患者共有 159 例, 确诊为 MDR-TB 患者为 41 例,其中 37 例为流动人口,占 90.2%。

2.2 纳入治疗情况 41 例确诊的 MDR-TB 患者, 有 30 例已经纳入治疗,其中 1 例已经转到外省继续治疗。正在等待治疗的 11 例患者中,3 例丢失, 8 例待项目药品到位后再纳入治疗。

2.3 治疗效果评估

2.3.1 不良反应发生情况 在纳入治疗的 30 例 MDR-TB 患者中,有 4 例出现不良反应,不良反应发生率为 13.34%。其中 2 例出现轻度肝功能损害,1 例肾功能损害,经处理 3 例患者均已恢复正常;1 例出现严重肝功能损害,疑似肝硬化,目前已停止项目药物治疗。

2.3.2 治疗效果 在治疗满 6 个月的 8 例 MDR-TB 患者中,痰涂片阴性 7 例,6 个月末转阴率为 87.5%。痰培养阴性 4 例,6 个月末痰培养转阴率 50%。

2.4 追踪到位情况 纳入治疗的 30 例 MDR-TB 患者均进行追踪随访,追踪到位率为 100%。

3 讨论

耐多药结核病的治疗难度大,疗程长,疗效差,使用一个疗程的标准抗结核药物的成本约为 20 美元, 而治疗一例耐多药结核病患者的药物成本则高达 5 000 美元, 折合人民币约为 4~5 万元。根据 2000 年全国第四次结核病流调估算福建传染性结核病患者有 1.8 万例, 按照耐多药率为 5%~8% (平均为 7.5%) 来估算,MDR-TB 患者大概有 1 350 例, 治疗这些 MDR-TB 患者需要 5~6 千万。这么昂贵的成本仅靠省本级政府提供的经费是远远不够的,政府部门应当积极争取国家资金或国际项目资金或民间及社会团体资金,这种多渠道融资模式为开展我省耐多药结核病治疗与管理提供有力保障。

41 例确诊的 MDR-TB 病例中有 11 例在等待项目药品到位后才能开始纳入治疗。这 11 例患者有 3 例因项目药品迟迟未到位而丢失。从某种程度上说,丢失的患者会导致耐多药结核病的传播,因此,项目药品的不间断供应是控制耐多药结核病的蔓延传播和患者得到有效治疗的关键。在纳入治疗的 30

例 MDR-TB 患者中, 出现 4 例不良反应, 不良反应发生率为 13.33%,略低于国内试点报告的发生率^[3],这一结果可能与临床医生严格遵循 MDR-TB 治疗方案,对出现不良反应的病人及时处理并继续治疗有关。另外临床专业心理医生对耐多药结核病患者进行心理辅导,从精神上给予关爱鼓励,使患者树立治疗的信心,配合医生进行治疗,也是提高 MDR-TB 治愈率必不可少的手段。

福建省是沿海省份,同时也是著名的侨乡,全省总人口约 3 600 多万,其中流动人口约 600 万,主要集中在经济发达的沿海城市。41 例确诊的 MDR-TB 患者中, 流动人口 MDR-TB 占 90.2% (37 例), 提示福建省耐多药结核病控制工作面临最主要的挑战是流动人口耐多药结核病。针对流动人口经济状况不好,生活条件差,对疾病的认知不足,治疗意识差,居无定所,联系常常中断等特点,今后应在落实流动人口 MDR-TB 患者的全程督导,减少病例丢失工作上,建议采用定点医院、疾控中心和社区卫生服务中心或乡镇卫生院“三位一体”的医防合作模式,同时探讨并建立流动人口 MDR-TB 患者跨区域管理办法,提高流动人口 MDR-TB 患者的发现,诊断和治疗管理水平及追踪到位率。

总而言之,医防合作有效运行离不开各级政府对耐多药结核病的高度重视和经费的保障。定点医院诊疗技术水平高,设备先进,感染控制措施严格,医院医护人员的责任心强等保证了耐多药患者诊断和治疗的质量。疾控机构对患者的关爱和督导管理等为耐多药结核病的治疗和控制提供了必要的支持。医防合作是福建省耐多药结核病治疗与管理模式的核心,在耐多药结核病病人的发现, 诊断治疗和管理过程中发挥重要的作用,为今后福建省乃至全国耐多药结核病的治疗与管理奠定良好的基础。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部. 2000 年全国结核病流行病学抽样调查资料汇编[M]. 北京:人民卫生出版社,2003;1.
- [2] 王岗玲,陈群,李学玲,等. 耐多药肺结核 141 例临床分析[J]. 海峡预防医学杂志,2002,8(2):76-77.
- [3] 王黎霞,成诗明,徐敏,等. 加强结防机构与医院的合作提高肺结核病人发现试点报告[J]. 中国防痨杂志,2007,29(6):479-483.

收稿日期 2011-05-06 编辑 崔宜庆

(上接第 1181 页)

- [3] Skjot RL,Oettinger T,Rosenkrands I. Comparative evaluation of low molecular mass Proteins from Mycobacterium tuberculosis identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T cell antigens [J]. Infect Immun,2000;68(1):214-220.
- [4] Berthet FX,Rasmussen PB,Rosenkrands I,et al. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low molecular mass culture filtrate protein (CFP-10) [J]. Microbiol,1998,144(11):3195-3203.
- [5] Lewis KN,Liao R,Guinn KM,et al. Deletion of RD1 from Mycobacterium tuberculosis mimics bacilli Calmette Guerin attenuation [J]. Infect Dis,2003,187(1):117-123.
- [6] Renshaw PS,Panagiotidou P,Whelan A,et al. CFP-10 complex implications for pathogenesis and virulence [J]. Biol Chem,2002,277(24):21598-21603.
- [7] 李红霞,陈建平,姚卫. 结核分枝杆菌 cfp10 基因的克隆及序列分析[J]. 寄生虫病与感染性疾病,2006,4(4):157-160.
- [8] Vordermeier HM,Whelan A,Cockle PJ,et al. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle [J]. Clin Diagn Lab Immunol,2001,8:571-578.

收稿日期 2011-06-01 编辑 崔宜庆