

# 牛分枝杆菌 MPB51 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

姜秀云<sup>1</sup> 王春风<sup>2</sup> 王春芳<sup>2</sup> 何昭阳<sup>2\*</sup>

(吉林农业大学 <sup>1</sup> 生物技术学院 <sup>2</sup> 动物科技学院 长春 130118)

**摘 要:** 以牛分枝杆菌 Vallee111 染色体 DNA 为模板,以 MPB51 成熟蛋白基因特异性引物进行 PCR 扩增,获得约 800bp 的 DNA 片段。通过 T-A 克隆技术,将 PCR 产物克隆至 pGEM-T Vector 中,成功地构建出克隆质粒 pGEM-T-51。以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pGEM-T-51 和 pET28a(+) 并将纯化的 MPB51 基因亚克隆至 pET28a(+) 中,构建出原核表达质粒 pET28a-51。将 pET28a-51 转化至感受态 *E. coli* BL21(DE3) 中,经 IPTG 诱导和 SDS-PAGE 分析,可见约 30kD 外源蛋白带。Western blot 分析发现,该蛋白具有牛分枝杆菌抗原性,从而为进一步研究 MPB51 的亚单位疫苗及 DNA 疫苗奠定基础。

**关键词:** 牛分枝杆菌, MPB51 基因, 克隆, 原核表达

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2005)02-0298-03

牛结核病(Bovine tuberculosis)主要是由牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)引起的一种人兽共患传染病。人结核病的 10% 以上是由牛分枝杆菌引起的。WHO 指出:“在存在牛结核病的国家,人类始终受它的威胁,除非着手消灭牛结核病,否则人类结核病的控制是不会成功的。”目前,一些较发达国家和地区,如美国、澳大利亚和北欧等已基本消灭了牛结核病,但由于人结核病和野生动物结核病的存在,致使这些国家对牛结核仍处于不断的检疫和高度的警惕之中。而在广大的发展中国家,该病仍严重流行,仅我国牛结核的阳性率就达 10% 以上。牛结核病的防制主要是采用牛结核 PPD 进行变态反应检疫,对检出的阳性牛进行隔离或捕杀,以达到消灭该病的目的。但是,应用该防制措施并未达到控制该病的目的,反而近年来呈上升趋势<sup>[1]</sup>。目前,预防人结核病普遍采用接种卡介苗(BCG),但是,BCG 在不同的人群和地域中保护力差异很大<sup>[2]</sup>,尤其对成人的保护效果不佳。对牛和其它动物而言,注射 BCG 后,变态反应检测均呈阳性,导致人工免疫和自然感染不能区别,影响牛的检疫和国际贸易。因此,研发预防牛结核病新型疫苗势在必行。研究证实,结核分枝杆菌培养滤液中存在大量能被 CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> T 细胞所识别的蛋白抗原,对实验动物具有保护作用<sup>[3,4]</sup>。MPB51 就是结核分枝杆菌培养滤液中的一种主要分泌蛋白<sup>[5,6]</sup>,是结核分枝杆菌的主要保护性抗原。因此,本文对牛分枝杆菌 MPB51 的成熟蛋白基因进行克隆,构建其原核表达质粒及在大肠杆菌中进行表达,旨在为研究新型疫苗奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株:牛分枝杆菌 Vallee111 购于中国兽药监察所;

*Escherichia coli* JM109 由笔者实验室保存;*E. coli* BL21(DE3) 由解放军军需大学杨连玉博士惠赠。

**1.1.2 载体:** pGEM-T Vector System 为 Promega 公司产品; pET28a(+) 由解放军军需大学张艳宇博士惠赠。

**1.1.3 主要试剂:** 蛋白酶 K 为 Merck 公司产品; *Ex Taq* DNA 聚合酶、*Bam*H I、*Eco*R I 为 TaKaRa 公司产品; 核酸分子量标准为 TaKaRa 公司产品; 琼脂糖为 Spanish 公司产品; 溶菌酶、dNTPs、X-Gal 为 Bebcos 公司产品; 氯霉素、卡那霉素、IPTG、DTT、RNase A 为 Sigma 公司产品; T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品; DNA 凝胶回收纯化试剂盒为杭州维特洁生化技术有限公司产品; 酵母浸出粉、胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品; 低分子量蛋白质标准为上海生物化学研究所产品; PVDF 转移膜为 Geman 公司产品; 牛结核多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 的抗体由笔者实验室自制与保存。

### 1.2 目的基因 PCR 扩增和克隆

根据 GenBank 中(D26486) *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株 MPB51 的基因序列,自行设计一对扩增该成熟蛋白基因的 PCR 引物(由大连 TaKaRa 公司合成),序列为: P1: 5'-CTAGGATCCACCATGGCCCCATACGAGAA-3'; P2: 5'-ATGGAA TTCGCATCGGCACCTGGCTTAG-3' (划线序列分别为 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切位点)。按文献[7]的方法提取牛分枝杆菌 Vallee111 染色体 DNA。以牛分枝杆菌染色体 DNA 为模板,以 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 为引物,对 MPB51 成熟蛋白基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(总体积 50  $\mu$ L): 10 $\times$  *Ex Taq* Buffer 5  $\mu$ L, P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> (20 pmol/ $\mu$ L) 各 1  $\mu$ L, dNTPs (各 2.5 mmol/ $\mu$ L) 4  $\mu$ L, 模板 DNA 2  $\mu$ L, 灭菌去离子水 36.5  $\mu$ L, *Ex Taq* DNA 聚合酶 0.5  $\mu$ L (5U/ $\mu$ L)。反应条件: 98 $^{\circ}$ C 8min, 95 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 共 32

基金项目: 国家自然科学基金(30270986); 国家“863 计划”(2003AA241121002); 吉林农业大学科研启动基金

\* 通讯作者。Tel: 86-431-4532813; E-mail: jzyhezhaoayang@hotmail.com

作者简介: 姜秀云(1966-), 女, 吉林长春人, 博士研究生, 主要从事动物免疫学研究。E-mail: jxy1966@yahoo.com.cn

收稿日期: 2004-08-25, 修回日期: 2004-10-26

个循环,72℃ 10min。PCR 产物经纯化后,以 T4 DNA 连接酶连接于 pGEM-T 中,并转化至感受态 *E. coli* JM109 中。通过  $\alpha$ -互补法、质粒大小、酶切分析及 PCR 扩增鉴定重组克隆,获得重组质粒 pGEM-T-51,由大连 TaKaRa 公司进行测序。

1.3 原核表达重组质粒的构建和目的基因的表达

对重组质粒 pGEM-T-51 和载体 pET28a(+) 以 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切,切胶纯化后,以 T4 DNA 连接酶连接。连接产物转化至感受态 *E. coli* BL21(DE3)中,经筛选获得原核表达重组质粒 pET28a-51。

将原核表达重组克隆接种于 5mL(含 50 $\mu$ g/mL 卡那霉素)的 LB 培养基中,37℃ 200r/min 培养过夜。取 2mL 接种于 100mL LB 培养基中,37℃ 250r/min 培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.6~0.8,加 IPTG 至 1mmol/L 诱导表达。每隔 1h 取菌液,取至 10h。以同样的方法诱导含空质粒 pET28a(+) 的 *E. coli* BL21(DE3) 10h 作对照。

1.4 SDS-PAGE 分析

将诱导各时间收获的菌液 OD<sub>600</sub> 均调至 0.68,取菌液 1.5mL 4℃ 离心收集菌体。沉淀菌体中加入 100 $\mu$ L 去离子水裂解细菌,再加入等量的 2 $\times$  SDS 凝胶上样缓冲液,混匀后,于沸水中煮沸 5min,15000r/min 离心 10min,取上清 15 $\mu$ L 按文献[8]进行 12% SDS-PAGE。

1.5 Western blot 分析

表达产物经 SDS-PAGE 后,按文献[8]方法以 BIO-RAD 系统电转移至 PVDF 转移膜上,经牛血清白蛋白封闭后,依次加入牛结核多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 抗体,最后在联苯胺(DAB)溶液中显色并观察结果。

2 结果和分析

2.1 PCR 扩增产物的克隆和序列分析

以牛分枝杆菌染色体 DNA 为模板,以 MPB51 的成熟蛋白基因特异性引物进行 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,可见 1 条约 800bp 的 DNA 片段,与预期 DNA 片段大小一致。

纯化的 MPB51 PCR 产物与 pGEM-T Vector 连接,构建重组质粒 pGEM-T-51。通过  $\alpha$ -互补法、质粒大小、酶切分析、PCR 扩增及序列分析鉴定重组质粒。以 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切 pGEM-T-51,得到约 3000bp 的 pGEM-T 线性片段和 800bp 的插入片段。序列分析证实,该 DNA 片段大小为 801bp,与 GenBank 中 *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株 MPB51 成熟蛋白基因序列的同源性为 99.8%。两者核苷酸序列在 151、591 位存在差异,在 *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株分别为 A、C,而在 Vallee111 中分别为 G、T。在氨基酸序列上,两者仅表现在 51 位存在差异,在 *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株为 M,而 Vallee111 则为 V。

2.2 原核表达重组质粒的构建和重组子的鉴定

pGEM-T-51 和 pET28a(+) 均以 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切和纯化后,由 T4 DNA 连接酶连接,构建重组质粒 pET28a-51。通过质粒大小、酶切分析及 PCR 扩增鉴定重组子。pET28a-

51 经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切,得到约 5300bp 的 pET28a 线性片段和 800bp 的插入片段,表明成功地构建出 MPB51 成熟蛋白基因的原核表达重组质粒。

2.3 SDS-PAGE 分析

经 IPTG 诱导的 pET28a-51 于 *E. coli* BL21(DE3) 中在各时间的表达情况如图 1 所示。MPB51 成熟蛋白获得了表达,其表达量随诱导时间的延长而增加,诱导 6h 达到高峰,蛋白质的相对分子量约为 30kD,与 MPB51 成熟蛋白一致。而含空质粒 pET28a(+) 的 *E. coli* BL21(DE3) 对照则未见该蛋白质表达。

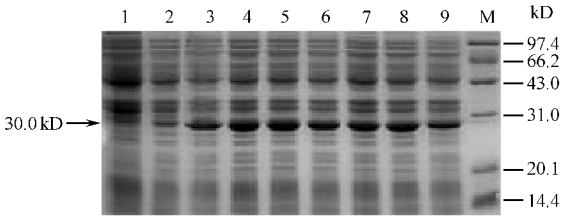


图 1 重组质粒 pET28a-51 在 *E. coli* BL21 中的表达

Fig. 1 pET28a-51 expression in *E. coli* BL21

1. pET28a expression result in *E. coli* BL21 with IPTG induced 10h, as control; 2. pET28a-51 expression result in *E. coli* BL21 with non IPTG induced; 3~9. pET28a-51 expression results in *E. coli* BL21 with IPTG induced 2h, 6h, 7h, 3h, 4h, 5h, 1h, respectively; M. Low molecular weight protein marker.

2.4 Western blot 分析

表达产物经 SDS-PAGE 后,电转移至 PVDF 转移膜上,以牛结核多克隆抗体为一抗,辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 的抗体为二抗,联苯胺(DAB)为底物,进行蛋白印迹分析(图 2)。图中可见 30kD 处有一条明显的蛋白印迹带,说明该表达产物具有牛分枝杆菌抗原性。

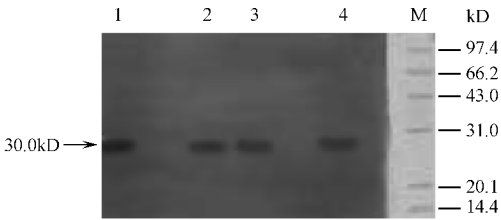


图 2 重组质粒 pET28a-51 表达产物的 Western blot 分析

Fig. 2 Western blot analysis of the expression product of the recombinant plasmid pET28a-51

1~4. Expression product of the recobinant plasmid pET28a-51 in *E. coli* BL21; M. Low molecular weight protein marker.

3 讨论

多年来,在牛结核病的控制方面,尽管采取不断检疫、隔离与淘汰等措施,但仍未能从根本上得以控制,反而近年来在全球范围内呈上升趋势。其根本原因是目前尚无实用的疫苗应用所致。因此,开发新型、安全、高效抗牛结核病的疫苗已成为控制该病的研究热点。

MPB51 是牛分枝杆菌的主要分泌蛋白,是开发新型疫苗

的理想候选抗原。本研究以牛分枝杆菌 Vallee111 的染色体 DNA 为模板,PCR 扩增 MPB51 成熟蛋白基因,选用 pGEM-T Vector System 成功地克隆了牛分枝杆菌 MPB51 成熟蛋白基因,通过酶切鉴定和 PCR 鉴定,证实了所克隆的基因与目的基因大小一致。通过序列测定及 DNASTAR 分析发现,所克隆的 MPB51 成熟蛋白基因序列与 *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 的 MPB51 成熟蛋白基因序列同源性为 99.8%,氨基酸序列的同源性为 99.6%,表明该基因在牛分枝杆菌中是十分保守的。进一步将克隆至 pGEM-T 中的 MPB51 成熟蛋白基因亚克隆至 pET28a(+) 表达系统中,构建了高效原核表达重组质粒。该表达重组质粒在与之相匹配的 *E. coli* BL21 (DE3) 中,经 IPTG 诱导 6h 后,表达量达到了高峰。且表达的蛋白质 N-末端融合有 6 个组氨酸的多肽标签,有利于进一步纯化。经免疫印迹分析证实,所表达的蛋白质具有牛分枝杆菌的抗原性。关于牛分枝杆菌 MPB51 成熟蛋白基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达研究国内外尚未见到报道,因此,本研究为进一步研究牛分枝杆菌 MPB51 基因工程亚单位疫苗及核酸疫苗奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Tollefsen S, Vordemeier M, Ulsen I, *et al.* DNA injection in combination with electroporation a novel method for vaccination of farmed ruminants. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2003, **57**: 229 – 238.
- [ 2 ] Colditz G A, Brewer T F, Berkey C S, *et al.* Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta analysis of the published literature. *Journal of The American Medical Association*, 1994, **271**: 698 – 702.
- [ 3 ] Andersen P, Askgaard D, Gottschau A, *et al.* Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1992, **36**: 823 – 831.
- [ 4 ] Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infection and Immunity*, 1994, **62**: 2536 – 2544.
- [ 5 ] Tobias F, Wit R D, Bekelie S, *et al.* The *Mycobacterium leprae* antigen 85 complex gene family: Identification of the genes for the 85A, 85C, and related MPB51 proteins. *Infection and Immunity*, 1993, **61**: 3642 – 3647.
- [ 6 ] Ohara N, Kitaura H, Hotokezaka H, *et al.* Characterization of the gene encoding the MPB51, one of the major secreted protein antigens of *Mycobacterium bovis* BCG, and identification of the secreted protein closely related to the fibronectin binding 85 complex. *Scandinavian Journal of Immunology*, 1995, **41**: 433 – 442.
- [ 7 ] 蔡 宏,李君莲,武 坚,等. 结核分枝杆菌中插入序列的研究. *微生物学报*, 1999, **39**(2): 121 – 125.
- [ 8 ] Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南(上、下册). 黄培堂,王嘉宝,朱厚础,等译. 第三版. 北京:科学出版社, 2002, 8.

## Cloning and expression of *Mycobacterium bovis* secreted protein MPB51 in *Escherichia coli*

JIANG Xiu-yun<sup>1</sup> WANG Chun-feng<sup>2</sup> WANG Chun-fang<sup>2</sup> HE Zhao-yang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Biotechnology, <sup>2</sup> College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract**: The gene encoding MPB51 was amplified from *M. bovis* Vallee111 chromosomal DNA using PCR technique, and the PCR product was approximately 800bp DNA segment. Using T-A cloning technique, the PCR product was cloned into pGEM-T vector and cloning plasmid pGEM-T-51 was thus constructed successfully. pGEM-T-51 and pET28a(+) were digested by *Bam*H I and *Eco*R I double enzymes. The purified MPB51 gene was subcloned into the expression vector pET28a(+), and the prokaryotic expression vector pET28a-51 was thus constructed. Plasmid containing pET28a-51 was transformed into competence *E. coli* BL21 (DE3). The bacterium was induced by IPTG and its lysates were loaded directly onto SDS-PAGE, approximately 30kD exogenous protein was observed on the SDS-PAGE. The protein was analyzed using Western blot. The results indicate that the protein is antigenic activity of MB. The results are expected to lay foundation for further studies on the subunit vaccine and DNA vaccine of MPB51 gene in their prevention of bovine tuberculosis.

**Key words**: *Mycobacterium bovis*, MPB51 gene, Cloning, Prokaryotic expression

Foundation item: Chinese National Natural Science Foundation(30270986); Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2003AA241121002); Jilin Agricultural University Science Foundation

\* Corresponding author. Tel: 86-431-4532813; E-mail: hzyhezhaoayang@hotmail.com

Received date 08-25-2004