

结核分枝杆菌 Rv3369 基因的表达和纯化

吕 冲, 姜 昕, 顾晓玲, 王洪海*

(复旦大学生命科学院 遗传学研究所 遗传工程国家重点实验室 上海 200433)

摘 要 在大肠杆菌中高效表达结核分枝杆菌 Rv3369 蛋白, 获得纯化的重组蛋白 rRv3369。通过聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 扩增 Rv3369 基因, 以质粒 pET28a 为表达载体, 构建重组质粒, 转化大肠杆菌 BL21 (DE3); 以异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达目的蛋白, 通过 SDS-PAGE 鉴定 rRv3369 在大肠杆菌中的表达, 确定 rRv3369 在大肠杆菌中的表达形式; 采用 Ni-NTA His·Bind Resin 来纯化重组蛋白。重组质粒 pET28a-Rv3369 中目的基因测序结果与报道序列相同。分子量约 19.5kDa, 表达量约占菌体总蛋白的 18%, 纯化后的重组蛋白样品经 SDS-PAGE 和激光密度扫描分析表明其纯度为 90% 以上, 每 100mL 培养菌可获得 1.56mg 左右的重组蛋白。用亲和层析法纯化的重组蛋白纯度较好。

关键词: 结核分枝杆菌; Rv3369; 基因表达

中图分类号: R392 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2006)05-0835-03

结核病至今仍是世界上一个严重的公共卫生问题, 威胁着人类的生活质量和生命健康。据世界卫生组织 (WHO) 统计, 目前世界上约有 2000 万以上的结核病人, 每年约有 800 万人新发生结核病, 近 300 万结核病人死亡^[1]。近年来, 由于人口流动普遍增加、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 与结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, 简称 MTB) 伴发感染以及耐药菌株的出现等原因, 使 MTB 感染和结核病发生率有上升趋势, 给全球结核病防治提出了新的挑战^[2]。因此及时进行结核病的早期诊断, 研究更有效的结核病免疫诊断试剂或者疫苗对治疗结核非常重要。

本文通过在大肠杆菌中克隆、表达结核杆菌 Rv3369 蛋白, 获得纯化的 rRv3369 蛋白, 为更深入研究该蛋白的免疫学特性, 研究更有效的结核病免疫诊断试剂或者制作疫苗打下基础, 同时也为该蛋白是否可以作为复合抗原的一个组分提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株: 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、大肠杆菌 BL21(DE3) 质粒 pET28a 均为本实验室保存, MTB H₃₇Rv 菌株由上海市肺科医院提供。

1.1.2 酶和试剂: 限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶购自美国 New England BioLabs; Taq plus DNA 聚合酶购自上海申能博彩生物科技有限公司。Ni-NTA His·Bind Resin 购自美国 Novagen 公司; PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、细菌 DNA 抽提试剂盒均购自上海华舜公司; 蛋白分子量标准为中国科学院上海生物化学研究所产品。

1.1.3 引物的合成与测序: 引物的合成由北京奥科生物技术有限公司完成, 重组质粒上目的基因的序列测定由英骏生物技术有限公司完成。

1.2 引物设计

根据 GenBank 库中报道的基因序列设计两对引物, 引物序列为: 上游引物 P1 序列为 5'-AAAGAATTCATGTGGCAGGCTACCGTTGG-3'; 下游引物 P2 序列为 5'-AATAAGCTTTCAGCCCCTGGCGTCTCC-3'。P1、P2 中划线部分分别为 *EcoR* I、*Hind* III 酶切位点。

1.3 目的基因的获得

以 MTB H₃₇Rv 基因组 DNA 为模板, 用 PCR 技术获取目的基因。PCR 反应条件为 96°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 30 个循环。

1.4 表达载体的构建

目的基因片段与 pET28a 质粒载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , PCR 扩增及酶切鉴定重组质粒。用 *EcoR* I 及 *Hind* III 酶切处理阳性重组质粒及 pET28a 质粒, 琼脂糖凝胶回收后进行连接反应, 转化大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞。酶切及测序两种方法双重鉴定重组质粒。

1.5 目的基因的诱导表达和 SDS-PAGE 分析

在平板上挑阳性克隆转种 LB 培养基, 37°C 培养至 A₆₀₀ = 0.6 ~ 0.8 时, 0.2mmol/L IPTG 诱导表达 3 ~ 4h 收获菌体。适量菌体悬浮于 2 \times SDS 样品缓冲液中, 煮沸处理, 离心后取上清, SDS-PAGE 鉴定目的蛋白的表达。

1.6 重组蛋白的纯化

采用 Ni-NTA His·Bind Resin 来亲和纯化重组蛋白, 具体操作步骤如下: (1) 收集超声后的沉淀, 加入 20mL 裂解液 Buffer B (100mmol/L NaH₂PO₄, 10mmol/L Tris-HCl, 5mmol/L 咪唑, 8mol/L 尿素) 裂解 30min; (2) 将上述裂解产物 10000r/min 离心 30min, 弃去沉淀, 收集上清; (3) 将收集的上清加到含有树脂的柱子内, 混匀, 收集上清; (4) 用 5mL 洗脱液 Buffer C (100mmol/L NaH₂PO₄, 10mmol/L Tris-HCl, 20mmol/L 咪唑, 8mol/L 尿素) 冲洗树脂几次, 收集上清; (5) 加入 1mL 洗提液 Buffer E (100mmol/L NaH₂PO₄, 10mmol/L Tris-HCl, 1mol/L 咪唑, 8mol/L 尿

基金项目: 国家十五攻关项目(2004BA705B03)

* 通讯作者。Tel 86-21-65643777; Fax 86-21-65648376; E-mail jhwang@fudan.edu.cn

作者简介: 吕 冲(1980-)男, 南京人, 硕士研究生, 主要从事分子免疫学方面的研究。E-mail lvchong0426@sohu.com

收稿日期 2005-11-23 接受日期 2006-02-28, 修回日期 2006-03-11

素), 混匀, 收集上清; (6) SDS-PAGE 分析收集的各种上清中的成分, 确定加入 Buffer E 后收集的上清即为纯化的重组蛋白, 再经透析、超滤后保存于 -80°C 冰箱。

2 结果

2.1 目的基因的获得

以 P1、P2 为上下游引物, 通过 PCR 方法从 MTB H₃₇Rv 基因组 DNA 中获得 435bp Rv3369 DNA 片段, 与预计结果相符。

2.2 目的基因的克隆与鉴定

将目的基因片段与 pET28a 连接, 酶切鉴定证实有一大小为 435bp 的片段插入载体, 初步确认为正确的重组载体, EcoRI 及 HindIII 酶切处理重组子后得到目的基因片段。测序结果表明, 该重组表达载体 pET28a 上插入的目的基因序列全长与 GenBank 基因库中发表的序列完全一致, 命名为 pET28a-Rv3369。

2.3 pET28a-Rv3369 工程菌诱导表达及产物的鉴定

SDS-PAGE 分析结果表明, 与未经 IPTG 诱导的 pET28a-Rv3369-BL21(DE3) 相比, 经过 IPTG 诱导的 pET28a-Rv3369-BL21(DE3) 菌体在相对分子质量约 22kDa 位置附近有浓重的表达条带出现。采用 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 和 1.2mmol/L 不同浓度的 IPTG 诱导 pET28a-Rv3369 工程菌的蛋白表达量无明显区别 (图 1)。经激光密度扫描测定占菌体总蛋白的 20% 左右。由于 37°C 高温诱导且 SDS-PAGE 分析后证实重组蛋白大部分以包涵体形式表达。同时发现 SDS-PAGE 反映重组蛋白 His6 Tag-Rv3369 的相对分子质量为 22kDa, 这与理论计算的分子质量 19.5kDa 有差异, 需要将纯化好的重组蛋白进行质谱分析来证实是否正确。

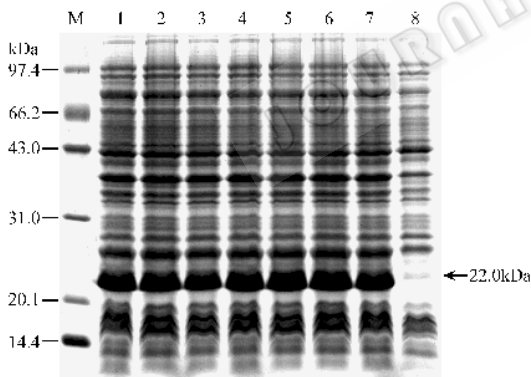


图 1 重组表达产物的 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE of gene products. M. Protein molecular weight marker; 1 ~ 7. Recombinant plasmid pET28a-Rv3369 induced by 0.1mmol/L, 0.2mmol/L, 0.4mmol/L, 0.6mmol/L, 0.8mmol/L, 1.0mmol/L, 1.2mmol/L IPTG respectively for 4h at 37°C ; 8. Recombinant plasmid pET28a-Rv3369 not induced.

2.4 重组蛋白的纯化

亲和层析纯化后的样品经 SDS-PAGE 分析显示, 只见一条回收的特异蛋白带, 未见其他杂带, 表明重组蛋白的纯度很高 (图 2)。经 Bradford 法测定, 每 100mL 培养菌可获得约 1.56mg 的重组蛋白。

2.5 质谱分析

经质谱分析 (图 3) 测得的分子质量 19.4kDa 与理论计算的分子质量 19.5kDa 有微小的差异, 最有可能是 N 端的甲

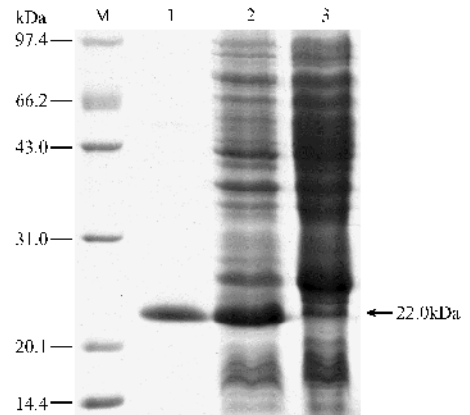


图 2 亲和层析分离纯化后的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE of affinity chromatography. M. Protein molecular weight marker; 1. Recombinant protein purified His6-tag; 2. Recombinant plasmid pET28a-Rv3369 induced by 0.1mmol/L IPTG for 4h at 37°C ; 3. Recombinant plasmid pET28a-Rv3369 not induced.

硫氨酸 (大小为 120Da) 降解所造成的^[3], 证明了表达产物是准确的, 进一步验证了我们对重组质粒的测序结果, 同时也解释了之前 SDS-PAGE 分析时发现的不正常现象, 具体原因有待进一步研究来证实。

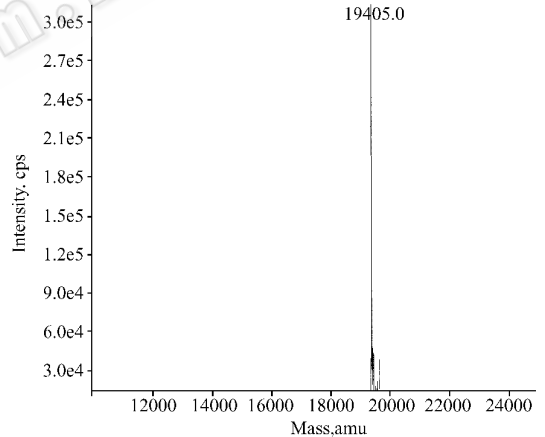


图 3 重组蛋白质谱分析

Fig.3 Mass spectrum analysis of recombinant protein.

3 讨论

早期发现和早期诊断结核病病人, 给予有效的治疗, 是减少传播机会、控制结核病疫情的关键^[4]。早期诊断问题非常复杂, 因为 MTB 能够长期处于“休眠”状态, 休眠状态的 MTB 可因为细胞介导的免疫反应的作用而减慢代谢, 以致能在感染组织中保持静息状态。当某种原因导致人体免疫力降低时, 这些细菌就很有可能“觉醒”, 重新活跃起来, 导致发病^[5]。

CFP-10 (Culture filtrate protein 10, CFP10) 自从 1998 年被 Berthet 等^[6]发现以来, 已经被广泛用于结核病的早期免疫诊断^[7-11], 由 RD1 区编码, 该区只存在于结核分枝杆菌复合群和少数致病性分枝杆菌基因组中, 所有卡介苗 (BCG) 菌株基因组中均缺乏该区域, 是致病的牛分枝杆菌减毒为弱毒卡介苗的过程中早期就被删除的区域^[12], Young 等^[13]在研究中

发现 结核患者和健康者的血清学诊断结果显示:rRv3369 和 CFP-10 的敏感性分别是 74% 和 60%, 同时特异性各自为 96% 和 97%。这表明 rRv3369 的敏感性高于 CFP-10, 但同时特异性的强度与 CFP-10 相当, 根据 GenBank 的信息得知 rRv3369 蛋白功能未知, 且是保守的假设蛋白, 通过与除了结核杆菌之外的细菌进行同源性比较表明, 此蛋白属于结核杆菌复合群特有的。这一切都说明 rRv3369 在结核病的免疫学诊断等方面具有很高的应用前景。

本文研究的 Rv3369 基因使用的表达载体是 pET28a, 其启动子为 T7 启动子^[14], 有很强的启动转录的能力。此外, 由于表达载体 pET28a 上携带 6× 组氨酸, 它可通过形成配位键而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, 使重组蛋白得到纯化^[15]。尽管该重组蛋白大部分以包涵体形式表达, 亲和纯化时需要进行复性处理, 但获得的重组蛋白纯度可达到 90% 以上。原核表达系统的优点是技术成熟, 产率较高。而 pET28a 大肠杆菌系统独特之处在于它利用 6× 组氨酸表位可以高效快速表达并纯化目的蛋白, 同时基本不影响其结构和生物活性。经 Bradford 法测定, 每 100mL 培养菌可获得约 1.56mg 的重组蛋白, 可见亲和层析纯化方法得到的产物得率不错、纯度较好, 操作简便, 为更深入研究该蛋白的免疫学特性等方面的研究打下坚实的基础。

参 考 文 献

- [1] Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Global burden of tuberculosis : estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA*, 1999, **282** : 677 - 686.
- [2] Johnson BJ, Estrada I, Shen Z, et al. Differential gene expression in response to adjunctive recombinant human interleuin-2 immunotherapy in multidrug-resistant tuberculosis patients. *Infect Immun*, 1998, **66** : 2425 - 2433.
- [3] Hirel PH, Schmitter MJ, Dessen P, et al. Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86** : 8247 - 8251.
- [4] 彭 丽, 罗永艾. 结核病的实验室快速诊断. 新医学, 2005, **36**(6) : 359 - 361.

- [5] Gay AV, Jamil S, Drews SJ. Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PkNB. *Infect Immun*, 1999, **67** : 5676 - 5682.
- [6] 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). *Microbiology*, 1998, **144**(pt 11) : 3195 - 3203.
- [7] Arend SM, Andersen P, van Meijgaarden KE, et al. Detection of active tuberculosis infection by T-cell response to early-secreted antigenic target 6-kDa protein and culture filtrate protein 10. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, **181** : 1850 - 1854.
- [8] Dillon DC, Alderson MR, Day CH, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol*, 2000, **38** : 3285 - 3290.
- [9] Laurens AH, Van Pinxtern. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2000, **3**(7) : 155 - 160.
- [10] Lein AD, von Reyn CF, Ravn P, et al. Cellular immune responses to ESAT-6 discriminate between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, **6**(4) : 606 - 609.
- [11] Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, et al. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2001, **5**(5) : 462 - 467.
- [12] Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *Bacteriol*, 1996, **178** : 1274 - 1282.
- [13] Bahk YY, Kim SA, Kim JS, et al. Antigens secreted from *Mycobacterium tuberculosis* : Identification by proteomics approach and test for diagnosis marker. *Proteomics*, 2004, **4**(11) : 3299 - 3307.
- [14] Belasco JG. mRNA degradation in prokaryotic cell : an overview. In: Belasco JG, Brawerman G. Control of messenger RNA stability. 2nd ed. San Diego, California : Academic press, 1993, 3 - 12.
- [15] 李 娟, 吴雪琼, 张俊仙, 等. 结核分枝杆菌 CFP10-ESAT6 融合蛋白在大肠杆菌中的高效表达. 中国防痨杂志, 2004, **26**(4) : 204 - 208.

Expression and purification of Rv3369 of *Mycobacterium tuberculosis*

LV Chong, JIANG Xin, GU Xiao-ling, WANG Hong-hai*

(State Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Genetics, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract : To obtain purified recombinant Rv3369 protein by means of expressing the Rv3369 protein of *Mycobacterium tuberculosis* in *E. coli*. The gene coding Rv3369 protein was amplified by polymerase chain reaction (PCR), then was inserted into an expression vector pET28a to get recombinant plasmid. The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) and induced by IPTG. The expressed product was indentified by SDS-PAGE and purified by Ni-NTA His-Bind Resin. The sequence of Rv3369 in recombinant plasmid was the same with GenBank's report. The molecular mass of the product is 19.5kDa, which accounts for about 20% in the thalli proteins, and its purity is more than 90% analyzed by SDS-PAGE and laser scanning. The yield of recombinant protein is 1.56mg from 100mL of culture. Compared with other methods, purity of the recombinant protein is higher through affinity chromatography.

Keywords : *Mycobacterium tuberculosis* ; Rv3369 ; Gene expression

Foundation item : The Technologies Research and Development Program (2004BA705B03)

* Corresponding author. Tel 86-21-65643777 ; Fax 86-21-65648376 ; E-mail jhhwang@fudan.edu.cn

Received : 23 November 2005 / Accepted 28 February 2006 / Revised : 11 March 2006