

结核分枝杆菌 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因真核表达载体的构建

袁 伟,刘江宁,向志光,林树柱,张丽芳,秦 川

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

【摘要】 目的 构建结核分枝杆菌 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因,并对其在体外真核细胞中进行表达。方法 用 PCR 法从结核分枝杆菌 H37Rv 株基因组中分别扩增 Ag85B、Esat6、HspX 基因,插入到 pUC19-T 载体,序列测定正确后,将融合基因再次克隆到真核表达载体 pcDNA3.1(-)。重组质粒经酶切鉴定并测序正确后,用 MegaTran 1.0 转染 293T 细胞,并用 Western-Blot 检测目的蛋白的表达。结果 Western-blot 检测到分子量大小约 65 kDa 的目的蛋白。结论 成功地构建了结核分枝杆菌 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因的真核表达载体,且该重组载体可在体外真核细胞中获得特异性的表达。

【关键词】 结核分枝杆菌;Ag85B;Esat6;HspX

【中图分类号】 R521;R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)04-0052-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2011.04.012

Construction of an Eukaryotic Expression Vector Encoding the Ag85B-Esat6-HspX Fusion Protein against *Mycobacterium Tuberculosis*

YUAN Wei, LIU Jiang-ning, XIANG Zhi-guang, ZHANG Li-fang, QIN Chuan

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and
Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To construct fused gene Ag85B-Esat6-HspX of *Mycobacterium tuberculosis* and investigate its expression in eukaryotic cells in vitro. **Methods** The gene encoding Ag85B, ESAT6 and HspX protein was amplified by PCR from genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain, and was inserted into cloning vector pUC19-T. After the sequence was confirmed, the fused gene was subcloned to eukaryotic expression vector pcDNA3.1(-). After identified by restriction enzyme digestion and verified by DNA sequencing again, the recombinant plasmid pcDNA-Ag85B-Esat6-HspX was transfected into 293T cells with MegaTran 1.0. Western blot was used to detect the expression of goal protein. **Result** A 65 kDa protein was detected with specific antibodies. **Conclusion** The eukaryotic expression vector pcDNA-Ag85B-Esat6-HspX has been constructed successfully and the fusion protein could be expressed specifically in 293T cells.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Ag85B; Esat6; HspX

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种传染性
疾病。据世界卫生组织报道,目前全球有近 1/3 的

人感染了结核杆菌。随着多重耐药菌、极度耐药株
的出现,艾滋病与结核共感染人群的增加使得活动

[基金项目] 十一五重大专项支持(2009ZX1004-402)。

[作者简介] 袁伟(1977-), 博士研究生。Email: docyw@sohu.com。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师。Email: chuanqin@vip.sina.com。

性结核病人日益增多^[1]。卡介苗(BCG)是法国科学家 Camille Guerin 和 Charles Calmette 在上世纪第一个 10 年中开发出来的,1921 年开始应用于人类,迄今已使用了 80 多年。在世界卫生组织免疫接种扩大方案中,卡介苗作为目前唯一的结核病疫苗正在广泛使用。接种后可预防儿童发生结核病,但卡介苗对成人肺结核的保护效率差别很大(0-80%)。抗原 85 复合体是一组具有较强细胞免疫及体液免疫活性的分枝杆菌分泌性蛋白。该复合体由 Ag85a、Ag85b、Ag85c 构成。抗原分析表明 3 者中以 Ag85a 和 Ag85b 最具有免疫原性。EAST6 (6kD early secretory antigenic target)即 6KD 早期分泌性抗原性蛋白,是从结核杆菌短期培养滤液中纯化分离出的一种低分子量的分泌性蛋白,具有较强的细胞免疫活性。HspX 为结核菌休眠期调控子(DosR Regulon)中的基因 hspX (Rv2301)编码的 16kD 蛋白,属于小分子热休克蛋白家族。有研究表明 HspX 在结核分枝杆菌感染后短时间内减缓其在体内生长速度方面可能起到某种关键作用^[2]。休眠状态结核杆菌在人体内是普遍存在的。感染机体的结核杆菌可能有处于休眠状态的。结核杆菌被巨噬细胞吞噬后,受到天然免疫物质 NO 等的攻击,可能转入休眠状态。同时,处在结核结节低氧环境中的细菌,也大多转入休眠状态。卡介苗(BCG)免疫机体后,由于休眠期抗原表达量低,不能针对休眠期细菌产生免疫反应,导致对休眠状态结核杆菌没有免疫保护。然而在与结核病患者密切接触的健康人群中,发现对休眠期抗原存在很强的免疫应答^[3]。由于 HspX 是结核分枝杆菌潜伏感染期机体免疫反应的重要靶抗原,所以含有该抗原或抗原基因的疫苗可能会增强潜伏感染人群体内的细胞免疫,进而清除结核菌。本研究构建了 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因的真核表达载体,为下一步结核新型疫苗的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和细胞系

E. coli DH5a 感受态细胞购自北京金全生物技术公司。MTB H37Rv 株由中国生物制品检定所惠赠。pUC19-T 载体、真核表达载体 pcDNA3.1(-)由本室保存。293T 细胞系冻存于本室。

1.2 试剂

Pyrobest DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、限制性

内切酶 BamH I、Hind III 及 DNA 分子量 marker 均购自 Takara 大连公司。质粒小量抽提试剂盒购于 Promega 公司。胶回收试剂盒购自 Qiagen 公司。脂质体 MegaTran 1.0 购自 OriGene Technologies 公司。胎牛血清及 DMEM 培养基为美国 Gibco 公司产品。Ag85B、Esat6 抗体为美国 Abcam 公司产品,HspX 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体及羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物公司。

1.3 MTB 基因组 DNA 提取

将生长 3~4 周 L-J 培养的结核杆菌刮下,90℃水浴 15 min 灭活细菌。4 000 r/min 离心 10 min。弃上清液,1×TE 溶液重悬细菌。加入溶菌酶 37℃振荡 2 h,再加入蛋白酶 K,37℃振荡过夜。加入等体积 Tris 饱和酚 8 000 r/min 离心 10 min。取上清液,加入等体积酚:氯仿:异戊醇,再次离心后,无水乙醇沉淀,溶于 100 μL TE 中。

1.4 融合基因的扩增及序列测定

根据已公布的 Ag85B、Esat6 和 HspX 基因的序列,设计引物,引物序列见表 1。PCR 反应体系为:

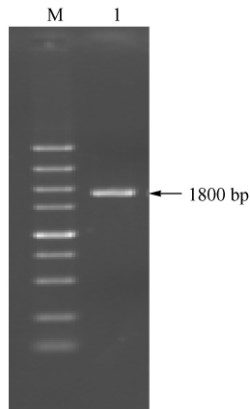
10×buffer 2 μL,dNTP 2 μL,DNA 模板 1 μL,P1、P2 引物各 1 μL,高保真酶 0.2 μL,加水至 20 μL。PCR 反应条件:95℃变性 5 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 3 min,共 30 个循环,再 72℃延伸 5 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳观察,回收 DNA 条带,按说明用凝胶 DNA 纯化试剂盒纯化扩增产物。取纯化的 PCR 产物与 pUC19-T 载体,在 T4 DNA 连接酶催化下,于室温连接 2 h,转化至 *E. coli DH5a* 感受态细胞,涂布于 LB 平板(含氨苄青霉素 100 mg/L)。用菌落 PCR 法挑选阳性克隆,接种于 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 中,37℃振荡培养过夜,小量提取质粒 DNA,经酶切鉴定后,进行序列测定,由 Invitrogen 公司完成。

1.5 重组质粒的构建及鉴定

用 BamH I 和 Hind III 双酶切 pUC19-Ag85B-Esat6-HspX 质粒,获得 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因,凝胶回收目的基因片段后再次克隆至同样双酶切的真核表达载体 pcDNA3.1(-),转化至 *DH5a* 感受态细胞。用菌落 PCR 法挑选阳性克隆,接种于 5 mL 含 100 mg/L 氨苄青霉素的 LB 培养液,37℃振荡培养过夜。提取质粒 DNA,用 BamHI 和 HindIII 双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒,并再次送 Invitrogen 公司进行序列测定。

表 1 H37Rv 基因组中扩增目的基因所需引物
Tab. 1 Primers for amplification of the genes from *M. tuberculosis* H37Rv

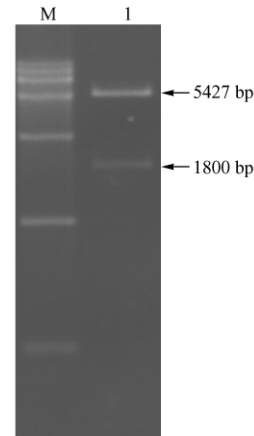
Names 名称	Primer sequences 引物序列	Restriction site 酶切位置
Ag85B	5' -AGGATCCGCCACCATGGCAGACGTGAGCCGAAAG-3' 5' -AGAACCACCACCACCAGAACCACCACCACCAGAACCACCACCACCGCCGGCGCCTAACGAACCTCTG-3'	BamH I
Esat6	5' -GGTGGTGGTGTCTTCTGGTGGTGGTGTCTTCTGGTGGTGGTGTCTATGACAGAGCAGCAGTGGAAATTC-3' 5' -TTCACCCGGCGGAGAAGCCTCTGCGAACATCCCAGTGACGTTG-3'	
HspX	5' -AGGATCCGCCACCATGGCCACCACCCTTCCCCTTC-3' 5' -AAAGCTTTCAGTTGGTGGACCGGATCTG-3'	BamH I HindIII
Linker	First linker between Ag85B and Esat6 is: (G ₄ S) ₃ Second linker between Esat6 and HspX is: EASPPGE	



M: DL5000 marker; 1: 融合基因

图 1 PCR 扩增融合基因

Fig. 1 Amplification of fusion gene by PCR



M: DL15000 marker; 1 质粒和融合基因

图 2 双酶切鉴定重组质粒

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by restriction enzyme digestion

1.6 细胞转染

将 2×10^5 个/孔细胞接种于 6 孔板,细胞数量达孔底 60% ~ 70% 时进行转染。转染前用不含抗生素的 DMEM 培养液洗 2 次。取 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的重组质粒 $6 \mu\text{L}$ 和 $2 \mu\text{L}$ MegaTran 1.0 脂质体混匀后缓慢加入到细胞中,继续培养 48 h 后收集细胞进行 Western blot 检测。同时设不加任何处理的 293T 细胞作阴性对照。

1.7 Western blot 检测融合基因的表达

收集转染后细胞, PBS 洗涤后, 加入裂解缓冲液充分裂解, 离心后收集上清液, 行免疫印迹分析。

一抗分别为抗 Ag85B 的多克隆抗体、抗 Esat6 的单克隆抗体和抗 HspX 的单克隆抗体。二抗为 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG 抗体及羊抗兔 IgG 抗体(稀释比例为 1:10 000)。

2 结果

2.1 融合基因的扩增

以 MTB H37Rv 基因组为模版, 用合成的融合基

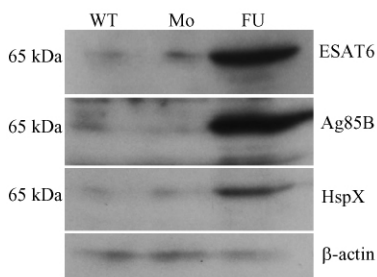
因引物 PCR 扩增, 经 30 个循环, 可扩增出与预计长度相等的 1 800 bp 左右片段(图 1)。将目的基因片段回收后再克隆入 pUC19-T 载体, 酶切鉴定后测序。测序结果证明所扩增的融合基因序列完全正确(资料未显示)。

2.2 重组质粒的构建及鉴定

将测序正确的 pUC19-Ag85B-Esat6-HspX 质粒经双酶切后与同样处理的 pcDNA3.1(-) 连接转化, 菌落 PCR 挑选阳性克隆, 用 BamHI 和 HindIII 双酶切后, 可切出约 1800 bp 的片段(图 2), 再次测序结果证明克隆正确。阳性克隆命名为 pcDNA-Ag85B-Esat6-HspX。

2.3 Western blot 检测融合蛋白表达

分别用抗 Ag85B 抗体、抗 Esat6 抗体和抗 HspX 的抗体与 SDS-PAGE 凝胶电泳后转移的 PVDF 膜杂交。结果显示: 每个抗体均能检测到大小为 65 kDa 的蛋白, 与预期的蛋白大小一致。证明重组质粒能够在真核细胞中稳定表达(图 3)。



WT: 野生细胞组 Mo: 空质粒组 FU: 融合蛋白

图 3 Western blot 检测融合蛋白的表达

WT: wild type group, Mo: empty vector group,
FU: Fusion protein group

Fig. 3 The expression of fusion protein by determined by Western blot

3 讨论

DNA 疫苗是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新型疫苗。自 1996 年 WHO 将结核病 DNA 疫苗研究列为资助项目以来,其发展十分迅速。该疫苗有如下特点:①细胞内生成的抗原易于被 MHC I 类和 II 类分子呈递,可激活细胞毒性 T 淋巴细胞和辅助 T 淋巴细胞;②在一段时间里持续表达抗原,具有较强的免疫刺激作用;③操作技术简单。结核 DNA 疫苗能够很好地激发细胞免疫反应,是理想的结核疫苗形式。一些结核保护性抗原的 DNA 疫苗如 Mtb8.4, Ag85B, ESAT6, Hsp65 和 MPT83 等都能诱导小鼠细胞介导的免疫反应。

范雄林等^[4]在小鼠模型上将不同结核保护性抗原的 DNA 疫苗进行了免疫原性及保护效力的比较,发现 Ag85B 是比较理想的候选抗原。王清民等^[5]对融合泛素的 Esat6 核酸疫苗进行了研究,发现该 DNA 疫苗不仅增强了细胞免疫反应,而且对结核感染提供了很好保护。此外,细胞因子不仅可作为免疫佐剂增强 DNA 疫苗的免疫原性还可以诱导 DNA 疫苗刺激机体后所产生免疫应答的方向。将细胞因子和抗原嵌合表达或共同导入体内表达被证实有增强结核疫苗保护力的作用。师长宏等^[6]构建的人 IL-2 与 Hsp65 融合基因的 DNA 疫苗,对感染结核的小鼠有很好的预防保护效果。

结核病疫苗目标人群大体分为三类:正常人群(未感染结核分枝杆菌)、潜伏感染人群(已感染结核杆菌但未发病)、免疫低下人群(由于各种原因免疫功能低下)。随着人们对潜伏感染的认识,休眠期结核杆菌开始受到重视。休眠期结核杆菌为了

适应缺氧等恶劣生存环境部分基因表达上调。Leyten EM 等^[7]用 25 种 DosR Regulon 编码的休眠期抗原进行实验,发现与结核病人相比,健康的结核菌素实验阳性者外周血单个核细胞(PBMC)能识别更多的休眠期抗原,并产生更强烈的 IFN- γ 反应。HspX 抗原可以被致敏的 T 细胞识别,刺激 T 细胞分泌 IFN- γ ,具有细胞免疫和体液免疫原性。在健康的与肺结核患者密切接触的家人(80%)和医务工作者(90%)中,HspX 具有明显的 T 细胞刺激活性,比例明显高于普通人群(50%),提示 HspX 抗原具有免疫保护作用。

本研究将休眠期抗原与对数生长期抗原联合使用,成功构建了能够在真核细胞表达融合蛋白的重组质粒,为进一步研究该融合蛋白的免疫原性及保护作用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Gandhi NR, Shah NS, Andrews JR, et al. HIV coinfection in multidrug- and extensively drug-resistant tuberculosis results in high early mortality [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 181:80-86.
- [2] Hu Y, Movahedzadeh F, Stoker NG, et al. Deletion of the *Mycobacterium tuberculosis* alpha-crystallin-like HspX gene causes increased bacterial growth in vivo [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(2):861-868.
- [3] Vekemans J, Ota MO, Sillah J, et al. Immune responses to mycobacterial antigens in the Gambian population: implications for vaccines and immunodiagnostic test design [J]. *Infect Immun*, 2004, 72(1):381-388.
- [4] Fan XG, Gao Q, Fu RL. Differential immunogenicity and protective efficacy of DNA vaccines expressing proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in a mouse model [J]. *Microbiol Res*, 2009, 164:374-382.
- [5] Wang QM, Kang L, Wang XH. Improved cellular response elicited by a ubiquitin-fused Esat6 DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Microbiol Immunol*, 2009, 53:384-390.
- [6] Shi CH, Zhang H, Wang LM, et al. Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* and the human interleukin2 fusion gene [J]. *Tuberculosis*, 2009, 89:54-61.
- [7] Leyten EM. Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Micorbes Infect*, 2006, 8:2052-2060.

修回日期)2010-09-28