文章编号：0253－3626(2003)01－0004－04

结核分枝杆菌 esat6 基因原核表达载体的构建和表达

陈　全，骆旭东，蒋　英，江　山，朱道银

（重庆医科大学基础医学院微生物学教研室，重庆　400016）

【摘　要】目的：构建结核分枝杆菌（MTb）esat6 基因原核表达载体并进行表达。方法：PCR 扩增 MTb esat6 基因，克隆入 pQE30 质粒，测序正确后，再亚克隆入 pET32a(＋)质粒，构建 pQE30－ESAT6 和 pET32a(＋)－ESAT6 重组体。结果：重组体分别转化 DH5α 和 BL21(DE3)菌后，经 IPTG 诱导，pQE30－ESAT6 未表达目的蛋白，而 pET32a(＋)－ESAT6 表达出 19kDa 左右重组蛋白。SDS－PAGE 分析显示，IPTG 诱导 4h 重组蛋白表达量最高，表达蛋白以可溶性非包涵体形式存在于胞浆中，表达量占全菌蛋白质的 42%，用 Western blotting 证实其有良好的抗原性。经过 Ni－NTA 柱纯化，获得了纯度为 92% 的重组蛋白。结论：成功构建原核表达载体 pET32a(＋)－ESAT6，并获得重组 ESAT6 蛋白，为 MTb 重组抗原的应用奠定基础。

【关键词】结核分枝杆菌；esat6 基因；重组 ESAT6

【中国图书分类法分类号】R378.91＋1；Q753　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－05－20

Construction and expression of the prokaryotic expression vector of MTb esat6 gene

CHEN Quan, et al

(*Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To construct prokaryotic expression vector carrying esat6 gene and express in E. coli. *Methods*: The MTb esat6 gene was amplified by PCR, then cloned into pQE30 plasmid, sequenced and then cloned into pET32a(＋) plasmid. Thus two kinds of prokaryotic expression vectors were constructed. *Results*: After being transformed into the E. coli and inducted with 1mM IPTG, no protein was expressed in the pQE30－ESAT6 system, but a recombinant protein, about 19 kDa, was expressed in the pET32a(＋)－ESAT6 system. In the presence of 1mM IPTG for 4h, the protein was expressed to the maximum. The protein existed in cytoplasm in soluble form and represented 42% total protein of E. coli. It's antigenicity was confirmed by Western blotting. The protein was purified through the Ni－NTA resin and the purity reached 92%. *Conclusion*: The prokaryotic expression vector (pET32a(＋)－ESAT6) was constructed successfully, and the rESAT6 was obtained, providing an experimental basis for application of rESAT6.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis(MTb); ESAT6 gene; Recombinant ESAT6

结核分枝杆菌有多种分泌性蛋白，6kDa 早期分泌性抗原靶（6kDa early secretory antigenic target，ESAT6）是从短期培养滤液中分离出的一种低分子量蛋白质，具有良好的抗原性[1]。本研究构建 ESAT6 高效原核表达载体，表达、鉴定和纯化重组 ESAT6 蛋白，目前国内尚未见类似报道。

1　材料和方法

1.1　材料

结核分枝杆菌（H37Rv）为本室收藏。质粒 pQE30、pET32a(＋)和宿主菌 Top10、DH5α、BL21(DE3)由本校肝炎研究所黄爱龙教授惠赠。工具酶 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ、pfu DNA 聚合酶、异丙基硫代－β－D－半乳糖苷（isopropyl－β－D－thiogalactoside，IPTG）、基因组提取试剂、胶回收试剂由上海生工公司提供。质粒提取试剂、DNA 连接试剂、反应产物回收试剂购自宝生物公司。活动性肺结核病人血清取自重庆市肺科医院检验科。硝酸纤维素（NC）膜、HRP 标记的羊抗人 IgG 及 DAB 显色试剂购自北方同正公司。Ni－NTA 蛋白纯化树脂购自 Novagen 公司。

1.2　方法

1.2.1　DNA 的提取　取 H37Rv 固体培养物少许和一滴含 0.5% 吐温 80 的生理盐水共同碾磨成悬液，1.5ml PBS 洗

作者介绍：陈　全（1969－　），男，讲师，博士生，主要研究方向：MTb 感染与免疫。

基金项目：重庆市卫生局科学基金（00－1006）。

涤,离心后去上清,用基因组提取试剂提取 MTb DNA。

1.2.2 esat6 基因的扩增 设计一对引物(5′端分别引入 *BamH* Ⅰ 和 *Hind* Ⅲ 酶切位点):5′ - ccggatcc - atgacagagcagcagtg - 3′和 5′ - ccaagctt - ctatgcgaacatcccagtga - 3′。以 H37Rv DNA 为模板,用 pfuDNA 聚合酶扩增 288bp esat6 基因片段,扩增条件为:95℃ 180s、95℃ 30s、57℃ 30s、72℃ 30s、72℃ 300s,共 30 个循环。

1.2.3 重组 pQE30 - ESAT6 质粒的构建

1.2.3.1 载体大片段的制备 提取 pQE30 质粒,用 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ作双酶切。由 30μl(2μg)质粒,20U *BamH* Ⅰ、20U *Hind* Ⅲ、4μl 10×buffer、2μl 去离子水组成 40μl 反应体系,置 37℃ 水浴反应 4h,1% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收载体 3400bp 大片段。

1.2.3.2 esat6 基因的制备 胶回收 esat6 基因 PCR 产物 288bp 片段,用 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ作双酶切,用反应产物回收试剂回收酶切混合物中两端分别带有相应粘端的目的基因。

1.2.3.3 连接和转化 取上述 8μl(0.8μg)esat6 基因片段和 2μl(0.1μg)载体大片段,与 10μl 连接试剂Ⅰ混匀后置 16℃ 连接 1h,然后转化已制备的 Top10 感受态细菌,用含 100μg/ml Amp 的 LB 固体培养基筛选重组子。

1.2.4 重组 pQE30 - ESAT6 质粒的鉴定

1.2.4.1 酶切鉴定 用 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ对 pQE30 - ESAT6 重组质粒进行双酶切鉴定,反应全体同 1.2.3.1。

1.2.4.2 DNA 序列分析 提取 Top10 菌中的重组质粒,对目的基因作序列测定,由大连宝生物公司完成。

1.2.5 亚克隆构建 pET32a(+) - ESAT6 质粒

1.2.5.1 目的基因的制备 将测序正确的重组 pQE30 - ESAT6 质粒 Top10 菌用含 100μg/ml Amp 的 LB 培养基进行增菌,提取质粒,用 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ对其作双酶切,1% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收 288bp esat6 基因小片段。

1.2.5.2 pET32a(+)质粒载体大片段的制备 用 *BamH* Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切 pET32a(+)质粒,胶回收 5900bp 质粒载体大片段。

1.2.5.3 连接与转化 同 1.2.3.3。

1.2.5.4 双酶切鉴定 pET32a(+) - ESA6 质粒 同 1.2.4.1。

1.2.6 esat6 基因的诱导表达 将重组 pQE30 - ESAT6 质粒和 pET32a(+) - ESAT6 质粒分别转化 DH5α 和 BL21(DE3)菌,分别用含 100μg/ml Amp + 25μg/ml 卡拉霉素和 100μg/ml Amp 的 LB 培养基筛选和增菌。取过夜培养菌重新于 37℃ 培养至 A_{600} = 0.6 左右时,用终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导 1~4h,收集菌体。

1.2.7 表达水平的鉴定 将菌体悬浮于适量 1×SDS 蛋白上样缓冲液中,置沸水浴中 5~10min,离心后取上清,用 5% 的浓缩胶和 12% 的分离胶作 SDS - PAGE。凝胶经考马斯亮蓝染色和甲醇/冰乙酸脱色后,采集图象,用凝胶分析系统分析其表达量。

1.2.8 重组蛋白表达形式分析 收集 100ml 培养液的细菌沉淀,按 3ml/g 湿菌加入超声破碎缓冲液重悬,用 36% 强度的超声碎菌 10min,4℃ 8000r/min 离心 20min,分别收集上清和沉淀,SDS - PAGE 分析 rESAT6 的表达形式。

1.2.9 重组蛋白抗原性鉴定 采用 Western blotting 法:将重组表达菌全菌蛋白作 SDS - PAGE,用半干转移系统以 0.8mA/cm² 稳流转移 2h,将凝胶上的蛋白质转印到 NC 膜上,用封闭液室温封闭 2h,PBS 洗膜 3 次,每次 5min;然后加 1:100 的活动性肺结核病人血清室温反应 2h,同上洗膜;再与 1:1000 的 HRP 标记的羊抗人 IgG 室温反应 2h,同上洗膜;最后将 NC 膜浸入 DAB 显色液中染色,以蒸馏水冲洗终止反应。

1.2.10 重组蛋白的纯化及含量测定 取超声碎菌后的上清,用 His - Bind 蛋白纯化试剂(Ni - NTA 树脂)进行纯化,分段收集洗脱液,用 SDS - PAGE 和软件分析纯化效果 用 Braford 法测定纯化蛋白浓度。纯化蛋白置 - 20℃ 贮存备用。

2 结 果

2.1 esat6 基因的扩增

以 H37Rv DNA 为模板,清晰扩增出 288bp esat6 基因片段(图 1)。

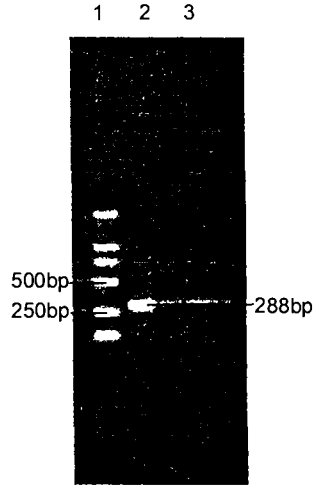


图 1 PCR 扩增 esat6 基因片段

1. DNA marker 2. east6 基因扩增片段 3. 灭菌水对照

2.2 重组 pQE30 - ESAT6 质粒的双酶切鉴定

由于 esat6 基因插入 pQE30 质粒多克隆位点的 *BamH* Ⅰ与 *Hind* Ⅲ位点之间,pQE30 质粒含 3400bp,esat6 基因含 288bp,双酶切后产生约 3400bp 和 288bp 大小两片段(图 2)。

2.3 重组 pQE30 - ESAT6 质粒 DNA 序列分析

分别以 T5 启动子和 lambda t_0 转录终止子为引物测定重组子基因序列，esat6 基因 CDS 与 GenBank（AF420491）报道序列完全一致。

2.4　重组 pET32a(+)－ESAT6 质粒的双酶切鉴定

由于 esat6 基因插入 pET32a(+)质粒多克隆位点的 *BamH* Ⅰ与 *Hind* Ⅲ位点之间，pET32a(+)质粒含 5900bp，esat6 基因含 288bp，双酶切后产生约 5900bp 和 288bp 大小两片段（图 3）。

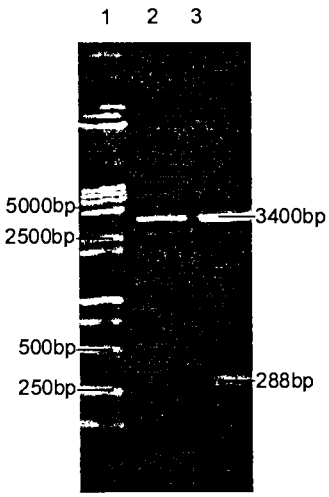


图 2　重组 pQE30－ESAT6 质粒双酶切鉴定

1. DNA marker　2. pQE30/*BamH* Ⅰ + *Hind* Ⅲ

3. pQE30－ESAT6/*BamH* Ⅰ + *Hind* Ⅲ

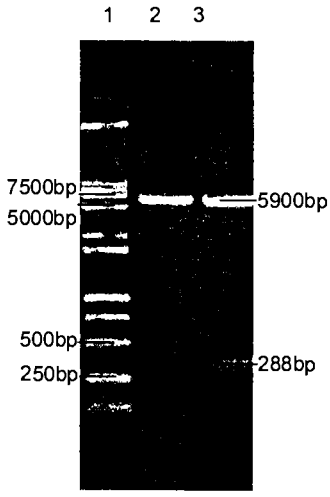


图 3　重组 pET32a(+)－ESAT6 质粒双酶切鉴定

1. DNA marker　2. pET32a(+)/*BamH* Ⅰ + *Hind* Ⅲ

3. pET32a(+)－ESAT6/*BamH* Ⅰ + *Hind* Ⅲ

2.5　重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

2.5.1　重组 pQE30－ESAT6 质粒在 DH5α 菌中表达　重组质粒在 DH5α 菌中经 1mmol/L IPTG 诱导 1～4h，SDS－PAGE 未见特异表达产物带。

2.5.2　重组 pET32a(+)－ESAT6 质粒在 BL21（DE3）菌中表达　重组质粒在 BL21（DE3）菌中经 1mmol/L IPTG 诱导 1～4h 后，SDS－PAGE 可见特异表达产物带，诱导 4h 重组蛋白表达量最多。凝胶图象分析表明，表达蛋白占菌体总蛋白的 42%。重组蛋白分子量约为 19kDa，与 Trx－ESAT6 预计理论值基本相符（图 4）。

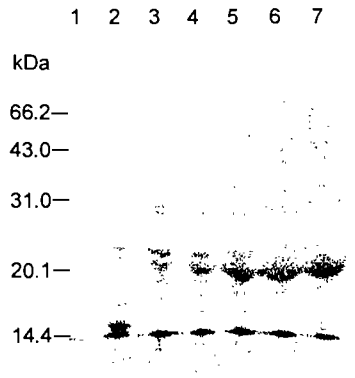


图 4　SDS－PAGE 鉴定重组蛋白在 BL21 菌中的表达

1. 小分子量蛋白质标准　2. pET32a(+)BL21 菌

3. pET32a(+)－ESAT6 BL21 菌 IPTG 诱导前

4.5.6.7. 分别为 pET32a(+)－ESAT6 BL21 菌 IPTG 诱导后 1、2、3、4h

2.6　重组蛋白表达形式和溶解性分析

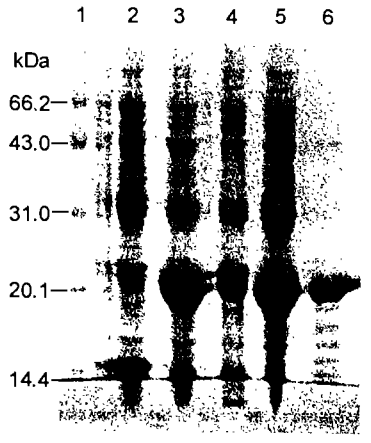


图 5　超声碎菌上清、沉淀及纯化重组蛋白的 SDS－PAGEH

1. 小分子量蛋白质标准　2. pET32a(+)BL21 菌

3. pET32a(+)－ESAT6 BL21 菌　4. 超声碎菌后的沉淀

5. 超声碎菌后的上清　6. 纯化的重组蛋白

将诱导菌超声破碎后的上清液和沉淀部份作 SDS－PAGE，上清液部份可见明显特异蛋白表达

带,而沉淀部份只见少量特异蛋白表达带,说明表达的重组蛋白大多以可溶性非包涵体形式存在于胞浆中(图 5)。

2.7 重组蛋白抗原性鉴定

表达的 rESAT6 可与活动性肺结核病人血清在 19kDa 处产生特异性免疫反应条带(图 6)。

2.8 重组蛋白的纯化及含量测定

收集 4×1ml 洗脱液,纯化后的蛋白主要存在于第 1ml 和第 2ml 洗脱液中,第 1ml 洗脱液经 SDS-PAGE 和软件分析后表明,其纯度为 92%(图 5),用 Bradford 法测定其浓度为 1.5mg/ml。

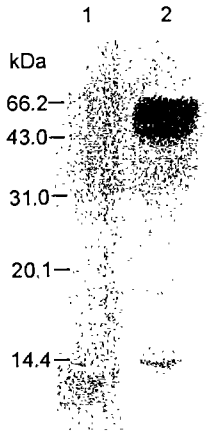


图 6 Western blotting 分析重组蛋白的抗原性

1. 小分子量蛋白质标准 2. pET32a(+)-ESAT6 BL21 菌与活动性肺结核病人血清的免疫印迹反应(19kDa 处呈弧形反应带)

3 讨 论

ESAT6 由 MTb RD_1 位点上的 esat6 基因(288bp)编码,含 95 个氨基酸,其理论分子量为 9904 Da,用 SDS-PAGE 测得天然 ESAT6 的迁移率与分子量为 6kDa 的多肽相等而得名[1]。ESAT6 主要在 MTb 中表达,所有 BCG 亚株和非致病分枝杆菌均不表达[2]。ESAT6 有多个 T 细胞、B 细胞及迟发型超敏反应(DTH)表位[3],是抗结核免疫反应的主要配体[4],有较强的免疫源性和免疫反应性。因此 ESAT6 有望成为检测 MTb 抗体的特异性抗原,其优势是能区分 MTb 自然感染和 BCG 接种以及非致病性分枝杆菌感染后产生的抗体。

在大肠杆菌中表达外源蛋白有两种形式,即非融合型蛋白和融合型蛋白[5]。pQE30 质粒是一种非融合表达载体,其特点是在外源蛋白的 N 端可编码 6 个组氨酸残基,利用 Ni-NTA 树脂可以很方便地将外源蛋白从细菌蛋白中分离出来。pQE30 质粒并不适合表达 ESAT6 这样的小分子量蛋白,尽管靶基因序列正确,但由于编码产物分子量小,表达产物不稳定,容易被细菌内的蛋白酶所降解,因此,本实验重组 pQE30-ESAT6 未见明显表达带。pET32a(+)质粒是一种融合表达质粒,其特点除了能够在外源蛋白 N 端编码 6 个组氨酸残基外,还能够编码硫氧还原蛋白(Thioredoxin, Trx)与外源蛋白融合表达。ESAT6 与 Trx 的融合表达不仅提高了表达产物的稳定性,而且由于重组蛋白的分子量变大,在 SDS-PAGE 分析时更容易鉴定。外源蛋白与 Trx 之间还具有肠激酶和凝血酶的识别位点,可以方便的切下 Trx,使 rESAT6 的构象及活性与天然 ESAT6 更接近。本研究建立了可获得大量高纯度、有免疫活性的 rESAT6 的方法,为开发以 rESAT6 为特异抗原的 MTb 感染诊断试剂(ELISA 试剂和皮试试剂)奠定了基础。

参 考 文 献

[1] Sorensen AL, Nagai S, Houen G, et al. Purification and characterization of a low molecular-mass T-cell antigen secreted by Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immun, 1995; 63(5): 1710-1717.

[2] Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, et al. Evidence of occurrence of the ESAT-6 protein in Mycobacterium tuberculosis and virulent Mycobacterium bovis and for its absence in Mycobacterium bovis BCG [J]. Infect Immun, 1996; 64(1): 16-22.

[3] Harboe M, Malin AS, Dockrell HS, et al. B-cell epitopes and quantification of the ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immun, 1998; 66(2): 717-723.

[4] Ravn P, Demissie A, Eguale T, et al. Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from Mycobacterium tuberculosis [J]. J Infect Dis, 1999; 179(3): 637-645.

[5] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 第 2 版, 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999; 378.