维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)03－0284－04

结核分枝杆菌 lhp－esat6 融合基因原核表达载体的构建和表达

陈 全，朱道银，骆旭东，蒋 英，江 山

(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)lhp－esat6 融合基因及其原核表达载体并进行表达。方法：用 Gene SOEing 法，将 lhp 基因和 esat6 基因体外重组，构建融合基因，克隆入 pQE30 质粒中进行表达。结果：构建的融合基因经测序证实完全正确，重组体转化表达菌 DH5α 后，经过 IPTG 诱导，表达出 26kDa 左右的 CFP10－ESAT6 融合蛋白。SDS－PAGE 分析显示，IPTG 诱导 4h 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 40%，Western blotting 证实其有良好的抗原性。表达蛋白经过 Ni－NTA 柱纯化后，获得了纯度为 98% 的重组蛋白。结论：成功构建 MTb lhp－esat6 融合基因，成功构建原核表达载体 pQE30－CFP10－ESAT6，并获得重组 CFP10－ESAT6 融合蛋白，为 MTb 重组抗原的应用奠定了基础。

【关键词】结核分枝杆菌；lhp－esat6 融合基因；重组 CFP10－ESAT6；原核表达

【中国图书分类法分类号】R392.11 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－09－02

Construction and expression of the prokaryotic expression vector of MTb lhp－esat6 fusion gene

CHEN Quan, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To construct lhp－esat6 fusion gene and its prokaryotic expression vector and express it in E. coli. *Methods*: By Gene SOEing techniques, a fusion gene was constructed by splicing lhp gene and esat6 gene, then cloned into pQE30 plasmid and expressed in DH5a. *Results*: The fusion gene was identified by DNA sequencing. A fusion protein about 26kDa was expressed in the E. coli. In presence of 1mM IPTG for 4h, the fusion protein was expressed to the maximum. The fusion protein existed in cytoplasm in soluble form and represented about 40% total bacterial protein of E. coli. Its antigenicity was confirmed by Western blotting. The fusion protein was purified through the Ni－NTA resin and the purity reached 98%. *Conclusion*: The lhp－esat6 fusion gene and the prokaryotic expression vector (pQE30－CFP10－ESAT6) were constructed successfully, and the fusion protein CFP10－ESAT6 was obtained, so that it can provide an experimental basis for application of the recombinant CFP10－ESAT6.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis(MTb); Lhp－esat6 fusion gene; Recombinant CFP10－ESAT6; Prokaryotic expression

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)和培养滤液蛋白 10(culture filtrate protein 10, CFP10)都是具有良好抗原性的小分子量蛋白[1,2]。本研究构建含其编码序列的融合基因，克隆表达 CFP10－ESAT6 融合蛋白，为 MTb 重组抗原在诊断试剂和疫苗研制方面的应用奠定基础，目前尚未见有类似报道。

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。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 质粒 pQE30 及宿主菌 Top10、DH5α 由本校肝炎研究所黄爱龙教授惠赠，重组 pQE30－CFP10 质粒和重组 pQE30－ESAT6 质粒为前期构建，结核分枝杆菌(H37Rv)为本室收藏。

1.1.2 其它主要试剂 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、胶回收试剂均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和非结

维普资讯 http://www.cqvip.com

核病人血清取自重庆市肺科医院。硝酸纤维素(NC)膜、HRP 标记的羊抗人 IgG 及 DAB 显色试剂盒购自北方同正公司。Ni-NTA 蛋白纯化树脂购自 Novagen 公司。

1.2 方法

1.2.1 lhp-esat6 融合基因的构建 构建模式见图 1。用含 100μg/ml 氨苄青霉素(Amp)的 LB 培养基分别培养带有重组 pQE30-CFP10 质粒和 pQE30-ESAT6 质粒的 Top10 菌,提取质粒作 PCR 模板。设计 4 条引物:lhp 上游引物 P1、lhp 下游重叠引物 P2、esat6 上游重叠引物 P3、esat6 下游引物 P4。其中 P1 的 5′端引入 *BamH* Ⅰ酶切位点,P4 的 5′端引入 *Hind* Ⅲ酶切位点,P2 删除终止密码 tga,在 P2 的 5′端和 P3 的 5′端分别引入互补的 Linker$(Gly_4Ser)_3$DNA 序列:5′-ggtggcggtggaagcggcggtggcggaagcggcggtggcggcagc-3′。引物序列为 P1:5′-ccggatccatggcagagatgaagac-3′,P2:5′-gctgccgccaccgccgcttccgccaccgccgcttccaccgccaccgaagcccatttgcgaggacagcgcct-3′,P3:5′-ggtggcggtggaagcggcggtggcggaagcggcggtggcggcagcatgacagagcagcagtggaatttcgcgg-3′,P4:5′-ccaagcttctatgcgaacatcccagtga-3′。首先以 pQE30-CFP10 质粒为模板,以 P1 和 P2 为引物,用 pfu DNA 聚合酶扩增 lhp-linker 片段,条件是 95℃ 180s、95℃ 60s、60℃ 60s、72℃ 60s、72℃ 300s,25 个循环;再以 pQE30-ESAT6 质粒为模板,以 P3 和 P4 为引物,以上述条件扩增 linker-esat6 片段。1% 琼脂糖凝胶电泳后分别胶回收这两片段,各取回收产物 1μl(0.05μg)作为模板,以 P1、P4 为引物扩增 lhp-esat6 融合基因(退火 63℃ 60s,30 个循环,其余条件同上)。

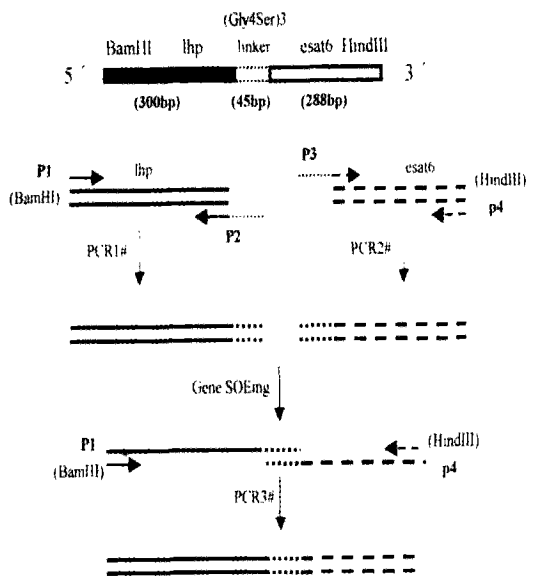


图 1 上图.lhp-esat6 融合基因构建模式图

下图.运用 Gene SOEing 技术进行基因拼接示意图

1.2.2 重组 pQE30-CFP10-ESAT6 质粒的构建 提取 pQE30 质粒,用 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ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,于 37℃ 水浴反应 4h,1% 的琼脂糖凝胶电泳后胶回收载体 3400bp 大片段。胶回收 lhp-esat6 融合基因 PCR 产物 633bp 片段,用 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切,用反应产物回收试剂盒回收酶切混合物中两端分别带有相应粘端的目的基因。取上述 8μl(0.8μg)lhp-esat6 融合基因和 2μl(0.1μg)载体大片段,与 10μl 连接试剂Ⅰ混匀后置 16℃ 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。

1.2.3 重组 pQE30-CFP10-ESAT6 质粒的鉴定 用 *BamH* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ对 pQE30-CFP10-ESAT6 质粒作双酶切鉴定;对重组质粒中目的基因作序列测定,由大连宝生物公司完成。

1.2.4 lhp-esat6 融合基因的诱导表达 将重组质粒转化 DH5α 菌,用含 100μg/ml Amp 和 25μg/ml 卡拉霉素的 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 1mM 的 IPTG 诱导 1~4h,收集菌体。

1.2.5 重组 CFP10-ESAT6 表达水平的鉴定 将菌体沉淀悬浮于适量 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,用凝胶分析软件分析其表达量。

1.2.6 融合蛋白表达形式分析 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℃ 8000rpm 离心 20min,分别收集上清和沉淀,各留取 100μl 作 SDS-PAGE,以分析 rCFP10-ESAT6 融合蛋白的表达形式,余下上清液用于提取纯化重组蛋白。

1.2.7 融合蛋白的纯化及含量测定 取超声碎菌的上清,用 His-Band 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 法测定纯化融合蛋白浓度。

1.2.8 融合蛋白的抗原性鉴定 采用 Western blotting 法,将重组表达菌全菌蛋白及纯化重组蛋白作 SDS-PAGE,用半干转移系统以 0.8mA/cm^2 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(对照组加同样稀释度的非结核血清)室温反应 2h,同上洗膜;再加 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。

2 结 果

2.1 lhp-linker 片段的扩增

以 pQE30-CFP10 质粒为模板,以 P1 和 P2 为引物,清晰扩增出 345bp lhp-linker 片段,与预计结果(300bp+45bp)一致(图 2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

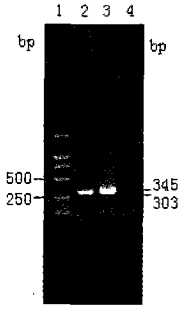


图 2 PCR 扩增 lhp－linker 基因片段

1. DNA marker；2. lhp 基因片段；3. lhp－linker 基因片段；4. 灭菌水对照

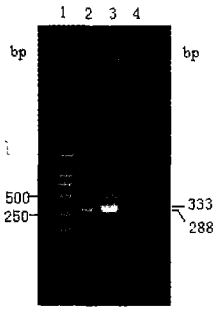


图 3 PCR 扩增 linker－esat6 基因片段

1. DNA marker；2. esat6 基因片段；3. linker－esat6 基因片段；4. 灭菌水对照

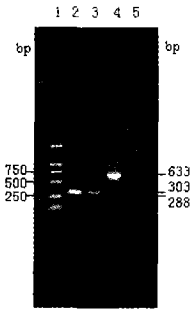


图 4 PCR 扩增 lbp－esat6 基因

1. DNA marker；2. lhp 基因片段；3. esat6 基因片段；4. lhp－esat6 基因片段；5. 灭菌水对照

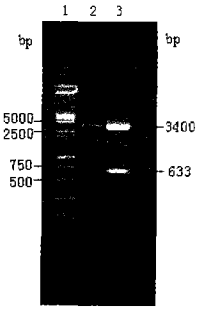


图 5 重组 pQE30－CFP10－ESAT6 质粒双酶切鉴定

1. DNA marker；2. pQE30/*BamH* Ⅰ + *Hind* Ⅲ；3. pQE30－CFP10－ESAT6/*BamH* Ⅰ + *Hind* Ⅲ

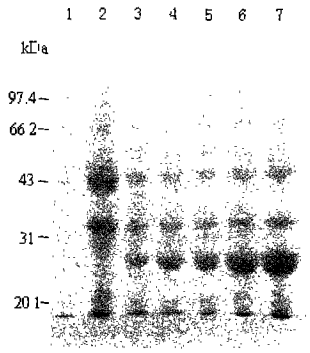


图 6 SDS－PAGE 分析重组蛋白在 DH5α 菌中的表达

1. 蛋白质分子量标准；2. pQE30DH5α 菌；3. pQE30－CFP10－ESAT6 DH5α 菌 IPTG 诱导前；4～7. 分别为 pQE30－CFP10－ESAT6 DH5α 菌 IPTG 诱导后 1～4h

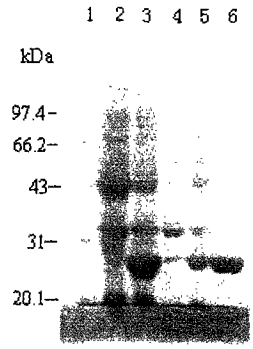


图 7 超声碎菌上清、沉淀、及纯化重组蛋白的 SDS－PAGE

1. 蛋白质分子量标准；2. pQE30 DH5α 菌；3. pQE30－CFP10－ESAT6 DH5α 菌；4. pQE30－CFP10－ESAT6 DH5α 菌超声碎菌的沉淀；5. pQE30－CFP10－ESAT6 DH5α 菌超声碎菌的上清；6. 纯化的重组蛋白

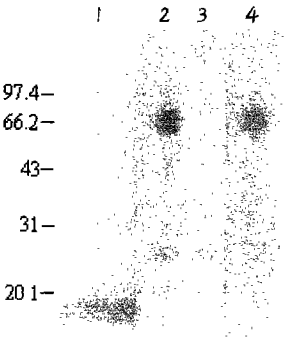


图 8 Western blotting 分析重组蛋白的抗原性

1. 蛋白质分子量标准；2. pQE30－CFP10－ESAT6 DH5α 菌与活动性肺结核病人血清的免疫印迹反应；3. 纯化的 rCFP10－ESAT6 与活动性肺结核病人血清的免疫印迹反应；4. pQE30－CFP10－ESAT6 DH5α 菌与非结核血清的免疫印迹反应

2.2 Linker－esat6 片段的扩增

以 pQE30－ESAT6 质粒为模板，以 P3 和 P4 为

维普资讯 http://www.cqvip.com

引物，清晰扩增出 333bp linker－esat6 片段，与预计结果(288bp＋45bp)一致(图 3)。

2.3 lhp－esat6 融合基因的扩增

以前二次 PCR 345bp 片段和 333bp 片段胶回收产物为模板，以 P1 和 P4 为引物，清晰扩增出 633bp lhp－esat6 融合基因片段，与预计结果(300bp＋45bp＋288bp)一致(图 4)。

2.4 重组质粒的双酶切鉴定

由于 lhp－esat6 融合基因插入表达载体 pQE30 的多克隆位点的 *BamH* Ⅰ与 *Hind* Ⅲ位点之间，pQE30 质粒含 3400bp，lhp－esat6 融合基因含 633bp，双酶切后产生约 3400bp 和 633bp 大小两片段(图 5)。

2.5 重组质粒 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，lhp－esat6 融合基因序列与预计序列(lhp＋linker＋esat6，其中 lhp、esat6 基因分别见 Gene Bank AF004671、AF420491)完全一致。

2.6 重组质粒在大肠杆菌中的诱导表达

重组质粒在 DH5α 菌中经 1mM IPTG 诱导 1～4h 后，SDS－PAGE 可见 26kDa 特异表达产物带，与 633bp 融合基因编码产物的理论分子量基本相符，诱导 4h 重组融合蛋白表达量最多，占菌体总蛋白的 40%。(图 6)。

2.7 融合蛋白表达形式和溶解性分析

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 rCFP10－ESAT6 融合蛋白大多以可溶性非包涵体形式存在于胞浆中(图 7)。

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，对第 1ml 洗脱液分析后表明，其纯度为 98%(图 7)，用 Bradford 法测定其浓度为 1.2mg/ml。

2.9 重组蛋白的抗原性鉴定

表达的 rCFP10－ESAT6 融合蛋白可与活动性肺结核病人血清在 26kDa 处产生特异性免疫反应条带，但非结核血清对照组却无相应反应带出现，说明 rCFP10－ESAT6 有与 MTb 天然抗原相同的抗原特异性(图 8)。

3 讨 论

ESAT6 和 CFP10 都是从 MTb 短期培养滤液中分离出的低分子量分泌性蛋白。ESAT6 由 esat6 基因(288bp)编码，含 95 个氨基酸，分子量为 6kDa[3]。CFP10 由 lhp 基因(303bp)编码，含 100 个氨基酸，分子量为 10kDa[2]。lhp 和 esat6 基因都位于 MTb RD1 位点上，BCG 及其它非致病性分枝杆菌缺乏这两个基因。由于 lhp 和 esat6 基因位置相互邻近，又是同时转录，因此有学者认为这两种蛋白不仅是协同表达，而且在功能上可能是相互作用的[4,5]。Vordermeier 等用 ESAT6 和 CFP10 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[6,7]，ESAT6 和 CFP10 作为特异性 MTb 感染的诊断抗原有无法比拟的优势[8]。

本研究用 Gene SOEing(Gene splicing by overlap extension)技术通过引入一 Linker 序列构建了 lhp－esat6 融合基因，并构建融合蛋白表达质粒 pQE30－CFP10－ESAT6。该技术对两个和多个基因的拼接十分有效，能保证重组基因片段的完整性和与原序列的一致性[9,10]。本文采用的 linker 为一 15 氨基酸的疏水性多肽接头 DNA 序列[11]，具有良好的柔顺性和折叠性，并具有足够的长度保证单链融合蛋白中 CFP10 和 ESAT6 形成与天然蛋白类似的空间构象，从而形成具有各自抗原性较大分子量的融合蛋白。

pQE30 质粒是一种高效原核表达载体，其特点是在外源蛋白的 N 端可编码 6 个组氨酸残基，6 个组氨酸对表达蛋白的活性和结构影响很少，但由于组氨酸的咪唑环能与金属 Ni^{2+} 形成螯合物，因此利用 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。

本研究成功表达出了具有良好抗原性的 rCFP10－ESAT6 融合蛋白，为开发更为特异和敏感的 MTb 感染检测试剂盒(ELISA 试剂和皮试试剂)、开发更为有效的亚单位疫苗提供了物质基础，进一步的研究正在实验中。

参 考 文 献

[1] Harboe M, Malin AS, Dockrell HS, et al. B－cell epitopes

(下转第 333 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

注意及时足量使用膀胱粘膜保护剂 mesna(美安),鼓励病人多饮水,勤排尿,减少尿液在膀胱内的停留时间。

综上所述,经临床治疗及随访观察,IFO 加 VDS 和 DDP 治疗晚期 NSCLC 有较好的疗效,特别是对复治病例也有较高的临床疗效,毒性反应耐受性较好,有较好的临床应用价值。

参 考 文 献

[1] Ganz PA, Figlin RA, Haskell CM, et al. Supportive care versus supportive care and chemotherapy in metastatic non-small cell lung cancer: Doses chemotherapy make a difference? [J]. Cancer, 1998; 6(1): 1271-1278.

[2] 蔡 莉,王 艳,陈公琰. NVP-IFO-DDP 联合治疗晚期非小细胞肺癌 56 例近期疗效观察[J]. 中国肺癌杂志, 2000; 3(1): 59-60.

[3] Pasquini E, Tassinari D, Niconlini M, et al. Gemcitabine in advanced NSCLC of elderly: A phase Ⅱ study[J]. Ann Oncol, 1998; 4(suppl): A154-157.

[4] Klastersky J, Seulier JP. Dose-finding study of paclitaxel plus cisplatin in patients with non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 1995; 12(suppl): 117-125.

[5] 刘光贤. 异长春花碱、异环磷酰胺、顺铂联合治疗晚期非小细胞肺癌[J]. 中国肺癌杂志, 2002; 5(2): 143-144.

(上接第 286 页)

and quantification of the ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immun, 1998; 66(2): 717-723.

[2] Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass cultrue filtrate protein(CFP-10)[J]. Micobiology, 1998; 144(11): 3195-3203.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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]. J Clin Microbiol, 2000; 38(9): 3285-3290.

[6] Vordermeier HM, Whelan A, Cockle PJ, et al. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT6 and CFP10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle [J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2001; 8(3): 571-578.

[7] Van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP-10[J]. Clin Diagn Lab Immunol, 2000; 7(2): 155-160.

[8] Munk ME, Orme IM, Saxena RK. Use of ESAT-6 and CFP-10 antigens for diagnosis of extrapulmonary tuberculosis [J]. Infect Dis, 2001; 183(1): 175-176.

[9] Horton RM, Hunt HD, Ho SN, et al. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension[J]. Gene, 1989; 77(1): 61-68.

[10] Horton RM. In vitro recombination and mutagenesis of DNA: SOEing together tailor-made genes. Method in molecular biology: PCR cloning protocols from molecular cloning to genetic engineering[M]. Edited by White BA. 1997; 67: 141-150.

[11] Huston JS, McCartney J, Tai ME, et al. Medical application of single chain antibodies [J]. Intern Rev Immuno, 1993; 10: 195-197.