

牛分枝杆菌 MPB83 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达

李晶晶 赵德明 徐广贤 周向梅 尹晓敏

(中国农业大学 动物医学院/国家动物海绵状脑病实验室,北京 100094)

摘要 为观察重组 MPB83 蛋白的免疫活性,揭示该蛋白在牛结核病的诊断和防治中的作用,克隆了牛分枝杆菌 *MPB83* 基因,构建了克隆载体 pGEM-MPB83 和表达载体 pET30a-MPB83,经 IPTG 诱导在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中表达,用 SDS-PAGE 和免疫印迹分析表达产物并进行蛋白纯化。试验结果表明:牛分枝杆菌 *MPB83* 基因体外扩增产物与预期值相符,约 600 bp;所构建表达质粒 pET30a-MPB83 经测序,结果与预期一致;SDS-PAGE 分析表明,该融合蛋白以包涵体的形式表达,其分子质量约为 26 ku,蛋白表达量占菌体总蛋白的 20%;该蛋白经电洗脱纯化后,纯度达 95%以上;免疫印迹分析表明,原核表达的融合蛋白可与兔抗牛分枝杆菌多克隆抗体结合,并且具特异的免疫反应性。

关键词 牛分枝杆菌; *MPB83* 基因;克隆;原核表达;免疫印迹;蛋白纯化

中图分类号 Q 78; S 855.2

文章编号 1007-4333(2006)06-0019-04

文献标识码 A

Cloning and expression of Mycobacterium bovis secreted protein MPB83 in Escherichia coli

Li Jingjing, Zhao Deming, Xu Guangxian, Zhou Xiangmei, Yin Xiaomin

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University/National Animal TSE Laboratory, Beijing 100094, China)

Abstract In order to determine the function of the MPB83 in the prevention and diagnosis of tuberculosis in cattle, the *MPB83* gene of *Mycobacterium bovis* was cloned. Then vector pGEM-MPB83 and prokaryotic expression vector pET30a-MPB83 were constructed. Recombinant *E. coli* BL21 (DE3) was induced by IPTG to express the fusion protein. The expressed and purified product was analyzed by SDS-PAGE and Western Blot. The result showed that PCR product was about 600 bp as expected. Expression vector pET30a-MPB83 was confirmed by sequencing. The results of SDS-PAGE showed that the fusion protein was produced abundantly as inclusion body and the molecular weight of expressed protein was about 26 ku. SDS-PAGE analysis also showed that the recombinant protein expressed could reach 20 percent of the whole bacterial protein. Purified protein was obtained after being eluted from the gel by electrophoresis. The Western blotting analysis showed the fusion protein had the antigenic activity of *Mycobacterium bovis*.

Key words *Mycobacterium bovis*; *MPB83* gene; cloning; prokaryotic expression; western blotting; protein purification

牛结核病是牛结核分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 引起的以呼吸道病变为主的人畜共患慢性进行性传染病。近年来,随着耐药性菌株的产生及个体养牛户的增加,牛结核病的阳性检出率在逐年上升。1996 年有报告称,结核病人中 10.6% 为牛分枝杆菌感染^[1],说明牛结核病菌严重威胁着人类的健

康。目前,牛结核病的诊断主要通过变态反应来进行,但该诊断方法有严重的交叉反应(不能区分卡介苗免疫牛和自然感染牛),而且需时较长(72 h);因此,牛结核新型诊断方法的研究成为当前研究的热点^[2-4]。

牛分枝杆菌分泌多种蛋白到细胞外,对抗结核

收稿日期: 2006-05-24

基金项目: 国家重点基础研究发展计划专项(2005CB523000); 国家自然科学基金资助项目(30500371); 博士点基金资助项目(20050019031)

作者简介: 李晶晶, 硕士研究生; 赵德明, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事动物海绵状脑病和牛结核病研究,

E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

免疫起着重要作用。MPB83 蛋白是牛分枝杆菌培养早期分泌到上清中的一种分泌性脂蛋白,在牛分枝杆菌中高水平表达,在卡介苗(BCG)中表达量极低^[5],它在体内可同时引发细胞免疫和体液免疫,具有免疫原性和免疫保护性^[6]。研究表明,作为牛主要的免疫反应阳性蛋白,在多种抗原中,MPB83 蛋白作为抗原检测结核病的效果最好^[7],并且具有鉴别诊断结核病感染牛和卡介苗(BCG)接种牛的潜力。本研究旨在针对牛结核病检测方法存在交叉反应及需时较长等缺点,对牛分枝杆菌 MPB83 蛋白进行克隆、原核表达、纯化及免疫印迹分析,为进一步研究其在牛结核病诊断中的应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株和载体

牛分枝杆菌 C68-2 购于中国兽药监查所; *E. coli* DH5、*E. coli* BL21 (DE3) 和 pET-30a 质粒均由本实验室保存; pGEM-T Vector System 为 Promega 公司产品。

1.2 主要试剂

Ex-Tag DNA 聚合酶、*Kpn*、*Sac*、T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品;基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒为 Promega 公司产品;溶菌酶、卡那霉素、IPTG、二硫苏糖醇(DTT)为 Merck 公司产品。兔抗牛分枝杆菌多克隆抗体购自中国疾病预防控制中心传染病预防控制所结核科,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物技术公司;其他均为国产分析纯。

1.3 牛分枝杆菌的培养和 DNA 的提取

将牛分枝杆菌接种于改良罗氏培养基,7 周后刮取细菌,溶于 TE 缓冲液中,100℃ 灭活 2 h,加入溶菌酶 37℃ 孵育过夜后,按基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取牛分枝杆菌 DNA。

1.4 目的基因的 PCR 扩增与纯化

根据已发表的牛分枝杆菌 AF2122/97 MPB83 蛋白的特异性序列设计引物(由上海生工合成),扩增牛分枝杆菌 MPB83 基因,引物序列如下,上游引物:5'-ATGCGGTACCACCAAACCCGTGTCGCAAGACA-3';下游引物:5'-AATTGAGCTCT-TACTGTGCCGGGGGCA TCA GC-3'。在上、下游引物两端分别引入 *Kpn* 和 *Sac* 酶切位点。PCR 反应条件为:98℃ 5 min;94℃ 1 min、62℃ 1 min、

72℃ 1 min,共 30 个循环;72℃ 延伸 10 min。取 50 μL PCR 产物进行 1%(质量分数)琼脂糖凝胶电泳,按 DNA 凝胶回收试剂盒说明进行目的产物的回收。

1.5 原核克隆载体的构建与鉴定

将纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体在 16℃ 过夜连接,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 DH5。转化后的细菌涂布于含 X-Gal、IPTG 和氨苄青霉素的 LB 固体培养基中,37℃ 过夜培养后,经蓝白斑筛选挑取白色菌落,接种于含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中^[8],37℃ 振荡过夜,按质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒,经 PCR、酶切鉴定,将阳性克隆进行测序。

1.6 MPB83 原核表达载体构建及重组质粒筛选

将测序正确的重组质粒 pGEM-MPB83 和载体 pET-30a 同时进行 *Kpn* / *Sac* 双酶切,按 DNA 凝胶回收试剂盒说明分别回收目的片段。将 2 段目的 DNA 在 T4 DNA Ligase 的作用下于 16℃ 连接过夜,连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* BL21 (DE3),转化产物涂布于含卡那霉素(100 μg/mL)的 LB 固体培养基,于 37℃ 过夜培养后挑取阳性克隆,接种于含卡那霉素(100 μg/mL)的 LB 液体培养基中,37℃ 振荡过夜,按质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒,经酶切鉴定,将阳性克隆测序。

1.7 目的基因的诱导表达

挑取测序正确的重组菌单菌落,接种于 5 mL 含卡那霉素(100 μg/mL)的 LB 固体培养基中,37℃ 活化过夜后,按 1%接种到含卡那霉素(100 μg/mL)的 LB 液体培养基中,37℃ 225 r/min 振荡培养至对数生长期($D_{600} = 0.6 \sim 0.7$),加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG,继续于 37℃ 振荡培养 4 h。分别于诱导前和诱导后 4 h 取出 1 mL 细菌培养物,5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,弃上清后加入 2 ×SDS 上样缓冲液,煮沸 5 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清 10 μL 用 12%的聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 检查。

1.8 Western Blot 分析

Western Blot 按分子克隆方法进行^[8]。SDS-PAGE 完成后,通过电转印系统将凝胶中的蛋白转到 PVDF 膜上,经脱脂牛奶封闭后,依次加入兔抗牛分枝杆菌的阳性血清,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗,最后用 DAB 显色。

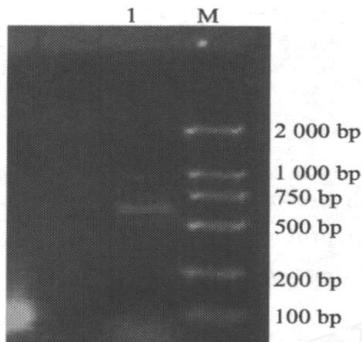
1.9 重组蛋白的纯化

超声波破碎菌体,沉淀经过包涵体洗涤液洗涤后,用含 8 mol/L 尿素的包涵体溶解液溶解。溶解后的上清经梯度透析复性后进行 SDS-PAGE,最后切下目的条带,进行电洗脱收获目的蛋白。

2 结果

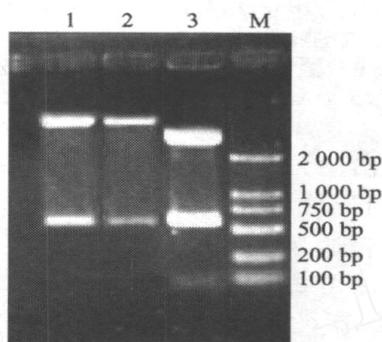
2.1 目的基因的 PCR 扩增产物

以牛分枝杆菌 C68-2 菌株染色体 DNA 为模板,以已发表的 *MPB83* 基因序列设计特异性引物进行 PCR 扩增。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,



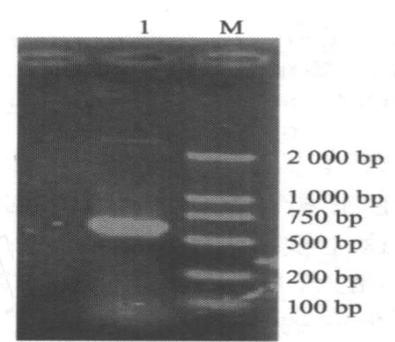
1 为 PCR 产物;M 为 DNA Marker/DL2000

图 1 *MPB83* 基因的 PCR 扩增
Fig. 1 Amplification of *MPB83* gene by PCR



1~2 为重组质粒 PET30a-*MPB83* 的双酶切鉴定;3 为重组质粒 pGEM-*MPB83* 的双酶切鉴定;M 为 DNA Marker/DL2000

图 2 重组质粒的酶切鉴定
Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by digestion with *Kpn* and *Sac*



1 为质粒 PCR 鉴定;M 为 DNA Marker/DL2000

图 3 重组质粒 pGEM-*MPB83* 的 PCR 鉴定
Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by PCR

2.3 *MPB83* 基因原核表达载体的构建与鉴定

重组质粒 pGEM-*MPB83* 经 *Kpn*、*Sac* 双酶切后,亚克隆到 pET-30a 中,构建出重组表达质粒 pET30a-*MPB83*。对重组表达质粒进行 *Kpn*、*Sac* 双酶切鉴定,结果用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析,出现了 1 条约 5400 bp 的 pET-30a 载体线性片断和约 600 bp 的插入片段(图 2),表明 *MPB83* 基因已正确克隆到表达载体中。

2.4 重组菌的诱导表达与 SDS-PAGE 分析

经 IPTG 诱导的重组菌进行 SDS-PAGE 分析,结果表明在约 26 ku 处有一特异条带,大小与预期融合蛋白分子质量一致,而含空质粒 pET-30a 的大肠杆菌 BL21 (DE3) 经诱导后未见蛋白表达(图 4)。用软件 AlphaImager2200 对表达的蛋白进行薄层扫描分析表明,蛋白表达量可占菌体蛋白的 20%,实现了 *MPB83* 蛋白在大肠杆菌中的高表达。

2.5 重组蛋白的 Western-Blot 分析

用兔抗牛分枝杆菌多克隆阳性血清对重组菌诱

在约 600 bp 处出现 1 条特异性条带,与预期的大小相符(图 1)。

2.2 *MPB83* 基因克隆载体的构建与鉴定

将纯化的 pGEM-*MPB83* 用 *Kpn*、*Sac* 双酶切,得到约 3000 bp 的 pGEM-T Easy 线性片断和约 600 bp 的插入片段(图 2)。将重组质粒作 PCR 鉴定,可以扩增出约 600 bp 的目的条带(图 3),表明 *MPB83* 基因克隆正确。测序结果表明,该序列大小为 582 bp,与 GenBank 中登陆的牛分枝杆菌 AF2122/97 的 *MPB83* 基因序列一致,同源率为 100%。

导后的全菌体蛋白进行 Western-Blot 检测,结果表明,诱导后重组菌的菌体蛋白与牛分枝杆菌多克隆阳性血清反应后,在约 26 ku 处出现 1 条清晰的反应条带(图 5),表明表达的重组蛋白能被牛分枝杆菌阳性血清所识别,具有良好的抗原性。

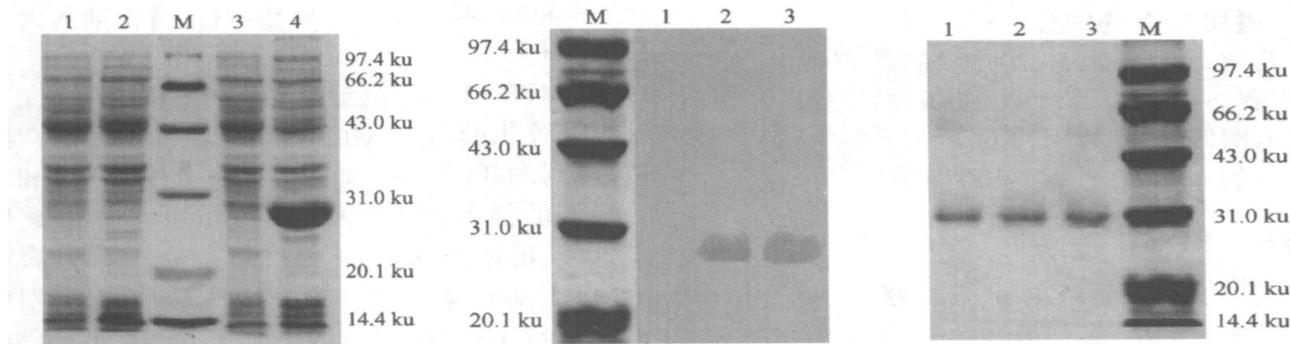
2.6 重组蛋白的纯化

超声波破碎后的菌体,经过 SDS-PAGE 检查,发现目的蛋白主要以包涵体的形式存在。重组蛋白经过电洗脱回收,用软件 AlphaImager2200 对纯化蛋白进行薄层扫描分析表明,蛋白的纯度可达 95% 以上(图 6),表明纯化后的目的蛋白纯度较高。

3 结论与讨论

1) 本试验测序结果表明,克隆的 *MPB83* 基因序列与 GenBank 中登陆的牛分枝杆菌 AF2122/97 的 *MPB83* 基因序列一致,同源率为 100%,表明该基因在牛分枝杆菌中十分保守。

2) 本试验利用 pET-30a 载体,在 T7 强启动子



1 为 pET-30a/BL21 的菌体蛋白;2 为 pET-30a/BL21 (DE3) 诱导后 4 h;M 为低分子质量蛋白 Marker;3 为 pET30a-MPB83/BL21 (DE3) 诱导前 0 h 菌体蛋白;4 为 pET30a-MPB83/BL21 (DE3) 诱导后 4 h 菌体蛋白;

图 4 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the recombinant protein

M 为低分子质量蛋白预染 Marker;1 为 pET30a 在 *E. coli* BL21 中诱导后菌体蛋白检测呈阴性;2~3 为阳性重组质粒菌 pET30a-MPB83/BL21 (DE3) 诱导后菌体蛋白检测呈阳性;

图 5 重组蛋白的 Western-Blot 分析

Fig. 5 Analysis of the expressed fusion protein by Western-Blot

M 为低分子质量蛋白 Marker;1~3 为纯化的重组蛋白

图 6 重组蛋白纯化后 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of purified protein

的启动下高效表达了 MPB83 融合蛋白,经 SDS-PAGE 分析,该表达产物主要以包涵体的形式存在,推测这主要是由载体的性质所决定,但表达条件如 IPTG 的含量、诱导温度和诱导时间的长短等也可影响蛋白的表达形式。在进一步的试验中,将对表达条件进行摸索,以期获得可溶性表达的蛋白。

3) 本试验利用了电泳分离,然后割胶回收的方法纯化目的蛋白。该纯化方法与亲和层析回收蛋白的方法相比不仅大大地节约了成本,而且效果好、效率高、纯化抗原量大,能很好满足纯化蛋白作为诊断抗原的需求,是一种优良的蛋白纯化方法。

4) 本试验中通过割胶回收纯化的蛋白经 SDS-PAGE 分析,其纯度可达 95% 以上,在约 50 ku 处隐约有一条蛋白带。考虑到纯化方法为切下目的条带,然后进行电洗脱回收,因此 50 ku 处的蛋白带推测为蛋白纯化后形成的多聚体。

分枝杆菌生长缓慢,天然分泌蛋白丰度低且提取困难,并存在活菌感染的可能性,因此,无论从实用角度还是从技术角度,分离天然分泌蛋白都不太可行^[8-9]。本试验利用大肠杆菌表达系统高效、低廉、简单、易于操作等优点,克服了上述困难,实现了 MPB83 蛋白在体外安全、高效的表达,为实现高通量的牛结核病检测技术奠定了基础。

参 考 文 献

[1] 张高迪,杨醉宇,邢新华,等. 内蒙古哲里木盟人与牛结核相互传播关系的研究[J]. 内蒙古畜牧兽医,1996

(2): 47-49

- [2] Amadori M, Lyashchenko K P, Gennaro M L, et al. Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis[J]. *Veterinary Microbiology*, 2002, 85:379-389
- [3] Orme I M, McMurray D N, Belisle J T. Tuberculosis vaccine development: Recent progress[J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(3):115-118
- [4] Orme I M. Beyond BCG: the potential for a more effective TB vaccine[J]. *Mol Med Today*, 1999, 5(11): 487-492
- [5] Wiker H G, Nagai S, Hewinson R G, et al. Heterogeneous expression of the related MPB70 and MPB83 proteins distinguish various substrains of *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv [J]. *Scand J Immunol*, 1996, 43(4): 374-380
- [6] Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins [J]. *Infect Immun*, 1994, 62(6): 2356-2544
- [7] Water W R, Palmer M V, Bannantine J P, et al. Antigen recognition by serum antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*[J]. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, Sept, 2004, 11(5):849-855
- [8] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂,王嘉玺,朱厚础,等译. 北京:科学出版社,2002
- [9] Chambers M A, Vordermeier H, Whelan A, et al. Vaccination of mice and cattle with plasmid DNA encoding the *Mycobacterium bovis* antigen MPB83[J]. *Clin Infect Dis*, 2000, 30(Suppl 3):S283-287