

牛分枝杆菌 MPB63 基因的克隆 及其在大肠杆菌中的表达*

姜秀云^{1,2)} 王春风²⁾ 王春芳²⁾ 何昭阳^{2)**}

(¹⁾吉林农业大学生物技术学院, 长春 130118; ²⁾吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118)

摘要 以牛分枝杆菌 Vallee111 染色体 DNA 为模板, 以 MPB63 成熟蛋白基因特异性引物进行 PCR 扩增, 获得约 400 bp 的 DNA 片段. 通过 T-A 克隆技术, 将 PCR 产物克隆至 pGEM-T Vector 中, 成功地构建出克隆载体 pGEM-T-63. 以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pGEM-T-63 和 pET28a(+), 并将纯化的 MPB63 基因亚克隆至 pET28a (+) 中, 构建出原核表达载体 pET28a-63. 将 pET28a-63 转化至感受态 *E.coli* BL21(DE3) 中, 经 IPTG 诱导和 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 可见约 18 ku 外源蛋白带. 蛋白质印迹分析发现, 该蛋白质具有牛分枝杆菌抗原性, 从而为进一步研究 MPB63 的亚单位疫苗及 DNA 疫苗奠定基础.

关键词 牛分枝杆菌, MPB63 基因, 克隆, 原核表达

学科分类号 Q786, S855.2

牛结核病 (bovine tuberculosis) 主要是由牛分枝杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 引起的一种人兽共患传染病. 人结核病的 10% 以上是由牛分枝杆菌引起的. 世界卫生组织(WHO)指出: “在存在牛结核病的国家, 人类始终受它的威胁, 除非着手消灭牛结核病, 否则人类结核病的控制是不会成功的”. 目前, 一些较发达国家和地区, 如美国、澳大利亚和北欧等已基本消灭了牛结核病, 但由于人结核病和野生动物结核病存在, 致使这些国家对牛结核仍处于不断的检疫和高度的警惕之中. 而在广大的发展中国家, 该病仍严重流行. 牛结核病的防制主要是采用牛结核 PPD 进行变态反应检疫, 对检出的阳性牛进行隔离或捕杀, 以达到消灭该病的目的. 但是, 应用该防制措施并未达到控制该病的目的, 反而近年来呈上升趋势^[1].

目前, 预防人结核病普遍采用接种卡介苗 (BCG), 但是, BCG 在不同的人群和地域中保护力差异很大^[2], 尤其对成人的保护效果不佳. 对牛和其他动物而言, 注射 BCG 后, 变态反应检测均呈阳性, 导致人工免疫和自然感染不能区别, 影响牛的检疫和国际贸易. 因此, 研发预防牛结核病新型疫苗势在必行.

研究证实, 结核分枝杆菌培养滤液中存在大量能被 CD₄⁺、CD₈⁺ T 细胞所识别的蛋白质抗原, 对实验动物具有保护作用^[3,4]. MPB63 是结核分枝杆菌培养滤液中的一种主要分泌蛋白, 其表达量在分泌蛋白中居第三位, 且与感染结核杆菌的豚鼠阳性血

清产生强烈的免疫反应^[5,6], 是结核分枝杆菌的主要保护性抗原. 因此, 我们对牛分枝杆菌 MPB63 的成熟蛋白基因进行克隆, 构建其原核表达质粒并在大肠杆菌中进行表达, 旨在为研究新型疫苗奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株. 牛分枝杆菌 Vallee111 购于中国兽医药品监察所; *E.coli* JM109 由作者所在实验室保存; *E.coli* BL21 (DE3) 由解放军军需大学杨连玉博士惠赠.

1.1.2 载体. pGEM-T Vector System 为 Promega 公司产品; pET28a(+)由解放军军需大学张艳宇博士惠赠.

1.1.3 主要试剂. Ex Taq DNA 聚合酶、*Bam*H I、*Eco*R I 及核酸分子质量标准为 TaKaRa 公司产品; 蛋白酶 K 为 Merck 公司产品; 琼脂糖为 Spanish 公司产品; 溶菌酶、dNTPs、X-Gal 为 Bebcos 公司产品; 氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG、DTT、RNase A 为 Sigma 公司产品; T4 DNA 连接酶为 Promega 公司产品; DNA 凝胶回收纯化试剂盒为杭州维特洁生化技术有限公司产品; 酵母浸出粉、

*国家自然科学基金资助项目(30270986), 国家高技术“863”计划资助项目(2003AA241121002)和吉林农业大学科研启动基金资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 0431-4532813, E-mail: hzyhezhao@hotmall.com

收稿日期: 2004-09-01, 接受日期: 2004-10-28

胰蛋白胨为 Oxoid 公司产品; 低分子质量蛋白质标准为上海生物化学与细胞生物研究所产品; PVDF 转移膜为 Geman 公司产品; 牛结核多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗牛 IgG 的抗体由作者所在实验室自制与保存。

1.2 方法

1.2.1 牛分枝杆菌染色体 DNA 的提取. 将牛分枝杆菌 Vallee111 接种于改良罗氏培养基中培养. 7 周后参照文献[7]方法提取染色体 DNA.

1.2.2 引物的设计与合成. 根据 GenBank 中 (AB048799) *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株的 MPB63 基因的序列, 自行设计一对扩增该成熟蛋白基因的 PCR 引物: P1 为 5' TTAGGATCCAACATGGCCTATCCCATCACC 3'; P2 为 5' GCGGCGAATTCTTACGGCTCCCAAA 3'. P1、P2 的 5' 端分别引入 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切位点. 该引物由 TaKaRa (大连) 有限公司合成.

1.2.3 目的基因的 PCR 扩增及产物的纯化. 以牛分枝杆菌染色体 DNA 为模板, 以 P1、P2 为引物, 对 MPB63 成熟蛋白基因进行 PCR 扩增. PCR 反应条件为: 95℃ 5 min; 94℃ 1 min、56℃ 1 min、72℃ 1 min, 共 32 个循环; 72℃ 延伸 10 min. PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 并以 DNA 凝胶回收纯化试剂盒进行纯化, 操作方法按产品说明书进行.

1.2.4 目的基因的连接与转化. 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 于 20℃ 连接 1 h 后, 4℃ 连接过夜, 构建重组质粒 pGEM-T-63. *E.coli* JM109 感受态的制备(CaCl₂ 法)和连接产物的转化参照文献[8]进行. 转化产物于 37℃ 200 r/min 培养 90 min, 涂布于含有 X-Gal 和 IPTG 的 LB(100 mg/L 氨苄青霉素)培养基中, 37℃ 培养过夜.

1.2.5 重组子的筛选与鉴定. 根据 α -互补法, 从含氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上以灭菌牙签挑取白色菌落, 接种于 5 ml 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 振荡培养过夜. 以碱裂解法小量提取质粒, 并对提取的质粒进行 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切鉴定及 PCR 鉴定.

1.2.6 重组子的序列分析. 选取阳性克隆送至大连宝生物有限公司测序.

1.2.7 原核表达质粒的构建及重组子的筛选. 对重组质粒 pGEM-T-63 和 pET28a(+)均以 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切, 切胶纯化后, 以 T4 DNA 连接酶

于 20℃ 连接 1 h 后, 4℃ 过夜. 将连接产物转化至感受态 *E.coli* BL21(DE3)中, 转化产物涂布于 LB (含 50 mg/L 卡那霉素) 琼脂平板中. 重组子的筛选与鉴定方法同前.

1.2.8 目的基因的诱导表达. 将原核表达阳性克隆接种于 5 ml 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 200 r/min 培养过夜. 取 2 ml 接种于 100 ml 含卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37℃ 250 r/min 培养至 A_{600} 为 0.6~0.8, 加 IPTG 至 1 mmol/L 诱导表达. 每隔 1 h 取菌液, 取至 10 h. 以同样的方法诱导含空质粒 pET28a 的 *E.coli* BL21(DE3)10 h 作对照. 进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)观察表达结果.

1.2.9 SDS-PAGE 分析. 将诱导各时间收获的菌液 A_{600} 均调至 0.68, 取菌液 1.5 ml, 4℃ 离心收集菌体. 沉淀菌体中加入 100 μ l 去离子水裂解细菌, 再加入等量的 2 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液, 混匀后, 于沸水中煮沸 5 min, 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清 15 μ l 按文献[8]进行 12% SDS-PAGE, 考马斯亮蓝 R250 染色并脱色, 观察结果.

1.2.10 蛋白质印迹分析. 表达产物经 12% SDS-PAGE 后, 按文献[8]方法以 BIO-RAD 系统电转移至 PVDF 转移膜上, 经牛血清白蛋白封闭后, 依次加入牛结核多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记兔抗牛 IgG 的抗体, 最后在联苯胺 (DAB) 溶液中显色并观察结果.

2 结 果

2.1 牛分枝杆菌染色体 DNA

提取的牛分枝杆菌染色体 DNA 经 0.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 于 23 kb 处可见较浓的染色体 DNA 带.

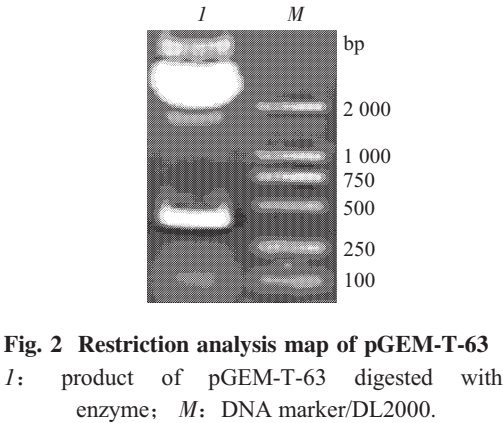
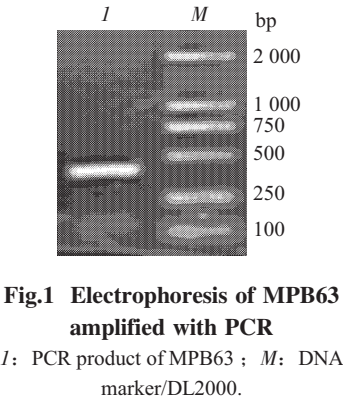
2.2 目的基因的 PCR 扩增产物

以牛分枝杆菌染色体 DNA 为模板, 以 MPB63 的成熟蛋白基因 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增. 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 可见 1 条约 400 bp 的 DNA 片段(图 1), 与预期 DNA 片段大小一致.

2.3 目的基因的克隆与重组子的鉴定

纯化的 MPB63 PCR 产物与 pGEM-T Vector 连接, 构建重组质粒 pGEM-T-63. 通过 α -互补、酶切分析及序列分析鉴定重组质粒. 以 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切 pGEM-T-63, 得到约 3 000 bp 的 pGEM-T 线性片段和 400 bp 的插入片段(图 2). 序

列分析证实, 该 DNA 片段大小为 390 bp, 与 GenBank 中 *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 株 MPB63 成熟蛋白基因序列的同源性为 100%.



2.4 原核表达质粒的构建及重组子的鉴定

pGEM-T-63 和 pET28a(+)均以 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切和纯化后, 在 T4 DNA 连接酶的作用下连接, 构建重组质粒 pET28a-63. 通过酶切分析鉴定重组子. pET28a-63 经 *Bam*H I、*Eco*R I 双酶切, 得到约 5 300 bp 的 pET28a 线性片段和 400 bp 的插入片段. 成功地构建出 MPB63 成熟蛋白基因的原核表达质粒.

2.5 SDS-PAGE 分析

经 IPTG 诱导的 pET28a-63 于 *E.coli* BL21 (DE3) 中在各时间的表达情况如图 3 所示. 由图 3 可见, MPB63 成熟蛋白基因获得了表达, 其表达量随诱导时间的延长而增加, 诱导 4h 达到高峰, 蛋白质分子质量约为 18 ku, 与 MPB63 成熟蛋白一致. 而对照的含空质粒 pET28a 的 *E.coli* BL21 (DE3) 则未见该蛋白质表达.

2.6 蛋白质印迹分析

表达产物经 SDS-PAGE 后, 电转移至 PVDF 转移膜上, 以牛结核多克隆抗体为一抗, 辣根过氧

化物酶标记的兔抗牛 IgG 的抗体为二抗, 联苯胺 (DAB)为底物, 进行蛋白质印迹分析, 其结果如图 4 所示. 从图 4 中可见 18 ku 处有一条明显的蛋白质印迹带, 由此说明该表达产物具有牛分枝杆菌抗原性.

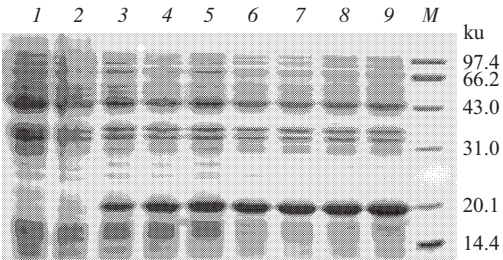


Fig.3 pET28a-63 expression in *E.coli* BL21

I: pET28a expression result in *E.coli* BL21 with IPTG induced 10 h, as control; 2: pET28a-63 expression result in *E.coli* BL21 with non IPTG induced; 3~9: pET28a-63 expression results in *E.coli* BL21 with IPTG induced 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, respectively; M: low molecular mass protein marker.

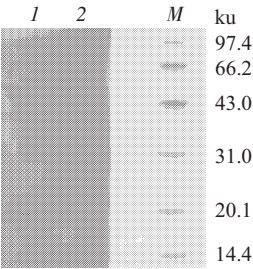


Fig.4 Western blotting analysis of the expression product of the recombinant plasmid pET28a-63

I, 2: expression product of the recombinant plasmid pET28a-63 in *E.coli* BL21; M: low molecular mass protein marker.

3 讨 论

多年来, 在牛结核病的控制方面, 尽管采取不断检疫、隔离与淘汰等措施, 但仍未能从根本上得以控制, 反而近年来在全球范围内呈上升趋势. 其根本原因是目前尚无可实用的疫苗应用所致. 因此, 开发新型、安全、高效抗牛结核病的疫苗已成为控制牛结核病的研究热点.

MPB63 是牛分枝杆菌培养滤液中的主要分泌蛋白, 据报道, 编码 MPT63 的核酸疫苗能有效地诱发小鼠产生强烈的细胞免疫反应和体液免疫, 且免疫小鼠 γ -干扰素含量明显上升^[9-11], 是开发新型疫苗的理想候选抗原.

本研究以牛分枝杆菌 Vallee111 的染色体 DNA 为模板, PCR 扩增 MPB63 成熟蛋白基因, 选用 pGEM-T Vector System 成功地克隆了牛分枝杆菌 MPB63 成熟蛋白基因, 通过酶切鉴定和 PCR 鉴

定,证实了所克隆的基因与目的基因大小一致.通过序列测定及 DNASTAR 分析发现,所克隆的 MPB63 成熟蛋白基因序列与 *Mycobacterium bovis* BCG Tokyo 的 MPB63 成熟蛋白基因序列同源性为 100%,表明该基因在牛分枝杆菌中是十分保守的.进一步将克隆至 pGEM-T 中的 MPB63 成熟蛋白基因亚克隆至 pET28a(+)表达系统中,构建了高效原核表达质粒.该表达质粒在与之相匹配的 *E.coli* BL21(DE3)中,经 IPTG 诱导 4 h 后,表达量达到了高峰.且表达的蛋白质 N 端融合有 6 个组氨酸的多肽标签,有利于进一步纯化.经免疫印迹分析证实,所表达的蛋白质具有牛分枝杆菌的抗原性.关于牛分枝杆菌 MPB63 成熟蛋白基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达研究国内外尚未见到报道,因此,本研究为进一步研究牛分枝杆菌 MPB63 基因工程亚单位疫苗及核酸疫苗奠定了基础.

参 考 文 献

- 1 Tollefsen S, Vordermeier M, Ulsen I, *et al.* DNA injection in combination with electroporation a novel method for vaccination of farmed ruminants. *Scand J Immunol*, 2003, **57** (3): 229~238
- 2 Colditz G A, Brewer T F, Berkey C S, *et al.* Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. Meta analysis of the published literature. *J Am Med Assoc*, 1994, **271** (9): 698~702
- 3 Andersen P, Askgaard D, Gottschau A, *et al.* Identification of immunodominant antigens during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand J Immunol*, 1992, **36** (6): 823~831
- 4 Andersen P. Effective vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection with a soluble mixture of secreted mycobacterial proteins. *Infect Immun*, 1994, **62** (6): 2536~2544
- 5 Manca C, Iyashchenko K, Wiker H G, *et al.* Molecular cloning, purification, and serological characterization of MPT63, a novel antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1997, **65** (1): 16~23
- 6 Harth G, Lee B Y, Horwitz M A. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infect Immun*, 1997, **65** (9): 2321~2328
- 7 蔡 宏,李君莲,武 坚,等.结核分枝杆菌中插入序列的研究.微生物学报,1999, **39** (2): 121~125
Cai H, Li J L, Wu J, *et al.* *Acta Microbiol Sin*, 1999, **39** (2): 121~125
- 8 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 W D. 黄培堂等译.分子克隆实验指南.第三版.北京:科学出版社,2002. 8
Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T, *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. Beijing: Science Press. 2002. 8
- 9 潘 怡,蔡 宏,李淑霞,等. MPT63 核酸疫苗的制备及其免疫原性.中国生物化学与分子生物学学报,2003, **19** (2): 205~209
Pan Y, Cai H, Li S X, *et al.* *Chin J Biochem Mol Biol*, 2003, **19** (2): 205~209
- 10 潘 怡,蔡 宏,李淑霞,等.结核分枝杆菌组合 DNA 疫苗的免疫效果.生物化学与生物物理学报,2003, **35** (1): 71~76
Pan Y, Cai H, Li S X, *et al.* *Acta Biochem Biophys Sin*, 2003, **35** (1): 71~76
- 11 蔡 宏,田 霞,呼西旦,等.结核分枝杆菌四联核酸疫苗免疫原性和保护效率.中国科学(C 辑),2003, **33** (3): 240~245
Cai H, Tian X, Hu X D, *et al.* *Sci Chin (series C)*, 2003, **33** (3): 240~245

Cloning and Expression of *Mycobacterium bovis* Secreted Protein MPB63 in *E. coli**

JIANG Xiu-Yun^{1,2)}, WANG Chun-Feng²⁾, WANG Chun-Fang²⁾, HE Zhao-Yang^{2)**}

¹⁾College of Biotechnology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

²⁾College of Animal Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract The purpose of the study is to clone, identify, and express the mature secreted protein MPB63 from *Mycobacterium bovis* (MB) and to play a foundation for diagnosis of MB, for applying MB vaccine into clinic practice, and for detecting of immunity effectiveness. The gene encoding MPB63 was amplified from *M. bovis* Vallee111 chromosomal DNA by using PCR technique, PCR product was approximately 400 bp. Clone vector pGEM-T-63 was successfully constructed by the PCR product that was cloned into pGEM-T vector by using T-A clone technique. pGEM-T-63 and pET28a(+) were digested by *Bam*H I and *Eco*R I double enzymes. The prokaryotic expression vector pET28a-63 was constructed by using the purified MPB63 gene that was subcloned into the expression vector pET28a(+). Plasmid containing pET28a-63 was transformed into competence *E.coli* BL21 (DE3). The bacterium was induced by IPTG and its lysates were loaded directly onto SDS-PAGE. An approximately 18ku exogenous protein was observed on the SDS-PAGE. The protein was analyzed by using Western-blotting and it had antigenic activity of MB. These results could serve as a basis for further studies on the usefulness of the gene and its expression product in the development of subunit vaccine and DNA vaccine against bovine tuberculosis.

Key words *Mycobacterium bovis*, MPB63 gene, cloning, prokaryotic expression

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30270986), State 863 High Technology R&D Project of China (2003AA241121002) and Jilin Agricultural University Science Fund.

**Corresponding author. Tel: 86-431-4532813, E-mail: hzyhezhaoayang@hotmail.com

Received: September 1, 2004 Accepted: October 28, 2004