

·基础研究·

结核分枝杆菌 Rv1759c 结构域与 IL-2 融合蛋白的表达与鉴定*

师长宏 江 鹰 毛峰峰 赵 勇 张彩勤 赵善民 白 冰 陈 涛

(第四军医大学实验动物中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的 构建结核分枝杆菌 (MTB) Rv1759c 结构域 (Rv1759cD domain, Rv1759cD) 与人 IL-2 (hIL-2) 融合基因,并在大肠杆菌中表达获得重组的融合蛋白 Rv1759cD-IL-2。方法 用 PCR 方法从 MTB H37Rv 基因组扩增 Rv1759cD 基因片段,测序后与 hIL-2 基因构建融合基因,并克隆到表达载体 pProEX HTa。融合基因在大肠杆菌 DH5 α 中诱导表达,经 SDS-PAGE 分析后,分别与 His mAb、IL-2mAb 和结核病人血清进行 Western-blot 鉴定,采用 Ni-NTA 亲和层析纯化蛋白。结果 获得的 Rv1759cD 基因经测序与 GenBank 公布的序列完全一致,与 hIL-2 基因连接后,构建的融合基因在大肠杆菌中有效表达。表达蛋白相对分子量为 30KDAa,与预测值相符;Western-blot 结果显示,在相对分子量 30KDAa 处分别与 His mAb 和鼠抗 IL-2 mAb 形成结合带,并与结核病人血清出现特异性结合。通过 Ni-NTA 亲和层析,可得到纯化的目的蛋白。结论 成功表达、纯化和鉴定了 Rv1759cD-IL-2 融合蛋白,并有可能作为新型结核病疫苗的靶抗原。

关键词 结核分枝杆菌 Rv1759c IL-2 潜伏感染

中图分类号 Q51, Q93, R378.911 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 06-1001-04

Expression and identification of Rv1759c domain of mycobacterium tuberculosis and IL-2 fusion protein*

SHI Chang-hong, JIANG Ying, MAO Feng-feng, ZHAO Yong, ZHANG Cai-qin, ZHAO Shan-min, BAI Bing, CHEN Tao

(Laboratory Animal Center, Fourth Military Medical University, 710032, Xi'an, China)

ABSTRACT Objective: To construct the fused gene of Rv1759c domain (Rv1759cD) gene of Mycobacterium tuberculosis H37Rv (MTB) and human IL-2 (hIL-2), and to express the Rv1759cD-IL-2 fusion protein in E.coli DH5 α . **Methods:** The Rv1759cD gene was amplified by PCR from the genome of MTB H37Rv strain. The fused gene of Rv1759cD and hIL-2 was constructed, which was cloned into expression vector pPRO EX HTa. The Rv1759cD-hIL-2 fused gene was expressed in E.coli DH5 α induced by IPTG. The recombinant protein was identified by SDS-PAGE analysis and by Western-blot with His mAb, IL-2 mAb and sera from TB patients respectively. The fused protein was purified by Ni-NTA purification system. **Results:** The PCR product was 435bp and the sequence was the same with those of Rv1759cD gene in GenBank. The fused protein with 30KDAa relative molecular mass was consistent with that had been reported, which reacted with the specific monoclonal antibody against His mAb and IL-2 mAb respectively at 30KDAa bandings. It also had an apparent affinity bandings with the sera of TB patients. **Conclusion:** The fused protein Rv1759cD-IL-2 was expressed and purified successfully, and it would be a target antigen of new tuberculosis vaccines.

Key words: Mycobacterium tuberculosis (MTB); Rv1759c; IL-2; latent infection

Chinese Library Classification: Q51, Q93, R378.911 **Document code:** A

Article ID : 1673-6273(2011)06-1001-04

前言

处于潜伏感染 (latent tuberculosis infection, LTB) 的结核分枝杆菌 (MTB) 能抵抗巨噬细胞的吞噬杀灭^[1],并能耐受通常对生长繁殖的 MTB 具有杀灭效果的抗结核药物的作用,在体内持续存在数月甚至数年^[2-3]。当机体免疫力降低时持留菌又开始生长繁殖导致疾病发生^[4]。传统的 BCG 强化免疫并不能阻止成年人 TB 的发生,但值得考虑的一个疫苗策略就是选择在潜伏感染中诱导 Th1 细胞免疫反应的抗原进行强化免疫^[5-6], MTB

中的 Rv1759cD 抗原在维持潜伏感染的免疫反应中起重要作用^[7],是新发现的抑制 TB 复发的候选疫苗。本研究构建了 MTB Rv1759c 结构域与 IL-2 融合基因表达载体,获得了相应的融合蛋白,以期对 LTB 的强化免疫提供有效的靶抗原。

1 材料和方法

1.1 材料

MTB H37Rv 株由陕西省结核病防治研究所王瑞副主任技师惠赠。含有人 IL-2 基因的 pGEM-Teasy-IL-2 质粒由本室保存

* 基金项目 国家 "863" 专项课题 (2007AA02Z473) 国家自然科学基金 (NO.30972767) 陕西省自然科学基金 (2007C224, 2004C125)

作者简介 师长宏 男,博士,副教授,研究方向 感染性疾病模型。Email: changhong@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2010-12-08 接受日期 2010-12-31)

[8]。pMD18-T 克隆载体, Taq DNA 聚合酶, 限制性内切酶, DNA 标准分子量 DL2000 均来自 Takara 公司; 表达质粒载体 pProEX HTb 质粒购自 Promega 公司, 抗 hIL-2 单抗 (monoclonal antibody, mAb) 购自 Lab Vision 公司。6× His mAb 来自武汉博士德公司。2 份活动期 TB 病人血清由第四军医大学附属西京医院呼吸内科史皆然博士提供。

1.2 Rv1759cD 结构域基因引物的设计与合成

根据 GenBank 公布的 MTB H37Rv 的 Rv1759c (NC_000962.2, ID: 385325) 结构域编码基因序列设计引物, P1 5'CAGTGAATTCCTTCGACGCGCTTCGGCGGCGC3', (GAATTC 为 EcoR I 酶切位点), P2 5'ACCATCGATCGTCAAGCCGTGCTGCCCATC3', (ATCGAT 为 Cla I 酶切位点), P2 的 3' 端引物中去除了终止码 TGA。

1.3 hIL-2 基因引物的设计与合成

参照 GenBank hIL-2 (NC_000004.11, ID: 3558) 基因序列设计引物, 为了保证这两种蛋白融合表达时具有各自的空间构象和正确折叠, 在 IL-2 基因上游引物中引入了 48bp 的疏水 linker。引物设计如下 P3 5' GC ATCGAT GGT GGC TCA GGT GGC TCC GGT GGA GGC GGA AGC GGC GGT GGA GGA TCA CCT ACT TCA AGT TCT ACA AAG 3', (ATCGAT 为 Cla I 酶切位点) P4 5'GCG AAGCTT TCA AGT CAG TGT TGA GATG3', (AAGCTT 为 HindIII 酶切位点, TCA 为终止密码子), 引物 P1、P2、P3 和 P4 均由上海博亚生物技术有限公司合成。

1.4 目的基因的扩增

参考文献^[9]方法获取 MTB H37Rv DNA, 以 P1 和 P2 为引物, 扩增 Rv1759cD 基因; 以 pGEM-Teasy-IL-2 质粒为模板, P3 和 P4 为引物, 扩增 linker-hIL-2 片段。PCR 反应体系: 10× buffer 5μl, dNTPs 5μl, DNA 模板为 1μl, P1、P2 引物或 P3、P4 各 1μl (25μmol/L) 及 Pfu 酶 1μl, 加水至 50μl。PCR 条件: 95℃ 预变性 5min, 95℃ 变性 15s, 65℃ 复性 30s, 72℃ 延伸 50s, 30 个循环, 末次循环后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物与 pMD18-T 载体连接后, 测序。

1.5 Rv1759cD-IL-2 融合基因的构建

将测序正确的 Rv1759cD 基因与含有 linker-hIL-2 的 pMD18-T 重组载体相连接, 转化 E.coli DH5α, 挑取克隆进行酶切鉴定, 获得 Rv1759cD-IL-2 融合基因的克隆载体 pMD-18-T-Rv1759cD-IL-2。

1.6 Rv1759cD-IL-2 融合基因原核表达载体的构建、表达和鉴定

以 EcoR I 和 HindIII 双酶切 pMD18-T-Rv1759cD-IL-2 质粒, 克隆到经同样双酶切的原核表达载体 pPRO EX HTa 中, 重组质粒转化 E.coli DH5α, 挑取克隆进行酶切鉴定, 并用 IPTG 诱导表达。将表达产物进行 12% SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜上, 用 10g/L BSA 封闭过夜, 分别加鼠抗人的 IL-2 mAb 和鼠抗人的 his mAb 作用 1h, 以 10mmol/L PBS (pH7.2) 洗涤后, 加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠 IgG 作用 1h, 以邻苯二胺 (OPD) 显色观察结果, 并采用 Invitrogen 的 Ni-NTA 纯化试剂盒纯化目的蛋白。

1.7 Rv1759cD-IL-2 融合蛋白的鉴定

表达蛋白与结核病人血清进行 Western-blot 分析, 病人血清为一抗, HRP 标记的羊抗人 IgG 为二抗, 操作步骤与上述的 Western-blot 步骤一致。

2 结果

2.1 MTB H37Rv 株 Rv1759cD 基因的扩增、克隆及鉴定

以 H37Rv 株基因组 DNA 为模板, 成功扩增出 Rv1759cD 基因片段。琼脂糖凝胶电泳显示片段为 282bp, 与预期大小相符 (图 1, 条带 1)。测序证实目的基因片段与 GenBank 报道 Rv1759c 基因结构域序列完全一致。

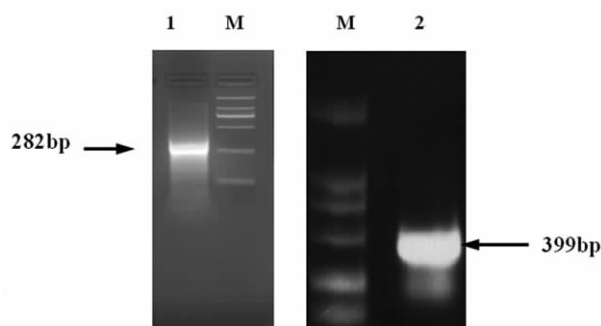


图 1 Rv1759c 结构域基因和人 IL-2 基因的 PCR 扩增结果 M DL 2000 Marker, 1 Rv1759cD 基因的 PCR 扩增结果 (282bp), 2 hIL-2 基因的 PCR 扩增结果 (399bp)

Fig.1 Amplification of the fragments of Rv1759cD gene by PCR: M DNA marker DL2000, 1 Rv1759cD gene, 2 hIL-2 gene

2.2 疏水性 linker 与 hIL-2 融合基因片段的扩增、克隆及鉴定

以含有 hIL-2 基因的 pGEM-Teasy-IL-2 质粒为模板, 成功的扩增出在 IL-2 基因上游带有 48bp 疏水性 Linker 的 hIL-2 基因片段 (图 1, 条带 2)。IL-2 基因全长 399bp, 加 48bp Linker, 共有 447bp, 测序证实扩增的基因片段与 GenBank 报道的人源性 IL-2 基因序列完全一致^[3]。

2.3 Rv1759cD-IL-2 融合基因原核表达载体构建

将 Rv1759cD 目的基因片段, 与含 hIL-2 的 pMD18-T 重组载体相连接, 阳性重组质粒命名为 pMD18-T-Rv1759cD-IL-2。以 EcoR I 和 HindIII 双酶切 pMD18-T-Rv1759cD-IL-2 重组载体, 克隆到经同样双酶切的原核表达载体 pPRO EX HTa 中, 阳性克隆命名为 pPRO-Rv1759cD-IL-2。酶切结果显示, 切出 729bp 的基因片段, 与 Rv1759cD-IL-2 融合基因片段大小一致, 表明成功地构建了 Rv1759cD-IL-2 融合基因的原核表达载体 (图 2)。

2.4 Rv1759cD-IL-2 融合蛋白的诱导表达及可溶性分析

含 pPRO-Rv1759cD-IL-2 质粒的重组菌诱导后在相对分子量约为 30 kDa 处有特异性蛋白表达条带。由于 Rv1759cD-IL-2 融合基因表达产物为 27kDa, pPRO EX HTa 载体中 His 标签的表达产物为 3 kDa, 该条带应为 Rv1759cD 与 hIL-2 的融合表达蛋白。重组菌诱导表达后进行冰浴超声裂解, 用 SDS-PAGE 检测裂解产物的上清和沉淀中融合蛋白的含量, 结果发现表达

的融合蛋白大多以可溶的形式存在于上清中,表明该融合蛋白以可溶形态存在(图3)。

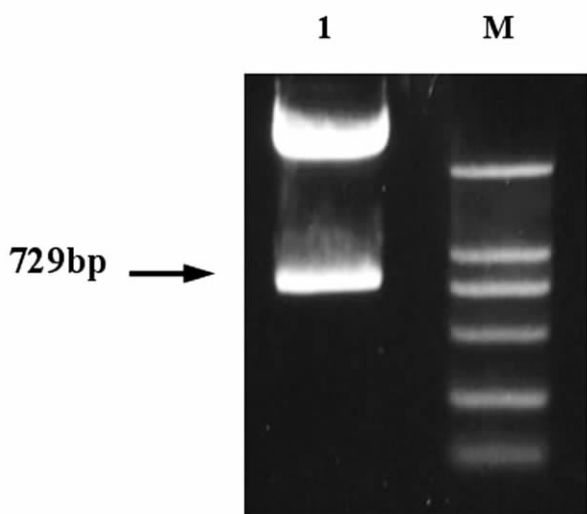


图2 Rv1759cD-IL-2 融合基因酶切鉴定结果 M DL2000 Marker, 1 重组质粒 pPRO-Rv1759cD-IL-2 用 EcoRI 和 HindIII 双酶切结果 (729bp)

Fig.2 Identification of Rv1759cD-IL-2 fused gene Note: M DNA marker DL2000, 1 pPRO-Rv1759cD-IL-2 digested with EcoRI/HindIII

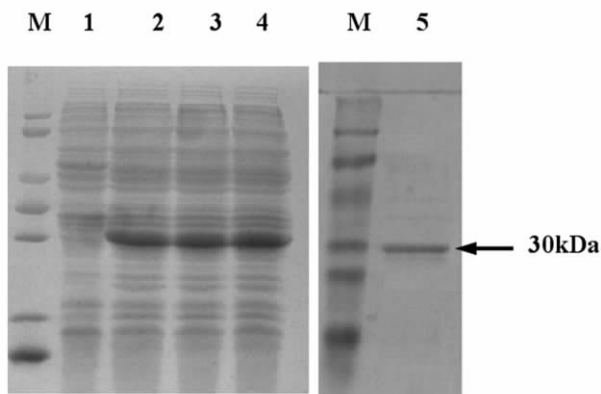


图3 表达产物的 SDS-PAGE 分析及纯化结果 M 低分子量 Marker, 1 未诱导重组细菌总蛋白, 2-4 IPTG 诱导后重组细菌总蛋白, 5 纯化洗脱的 Rv1759cD-IL-2 融合蛋白

Fig.3 SDS-PAGE analysis of the expression production and purified protein: M protein markers, 1 Expression product without induction in *E. coli* DH5 α , 2-4 Expression product induced by IPTG in *E. coli* DH5 α , 5 the purified expression protein

2.5 亲和色谱纯化融合蛋白及 Western-blot 鉴定

由于 Rv1759cD-IL-2 融合蛋白在 pPRO EX HTa 表达载体中与 6 个组氨酸一起融合表达,且在 *E. coli* 中主要以可溶形式存在,所以我们采用自然非变性条件下的 Ni²⁺-NTA 亲和色谱柱进行目的蛋白的纯化。结果如图3所示(条带5),可获得初步纯化的 Rv1759cD-IL-2 融合蛋白。分别用鼠抗人的 IL-2 mAb 和抗 his mAb 对目的蛋白进行 Western-blot 分析,结果如图4所示(条带1和2),在相对分子质量约为 30kDa 处呈现

特异性染色条带,表明该蛋白不仅具有 His 的特异性结合位点,还有 IL-2 结合位点。

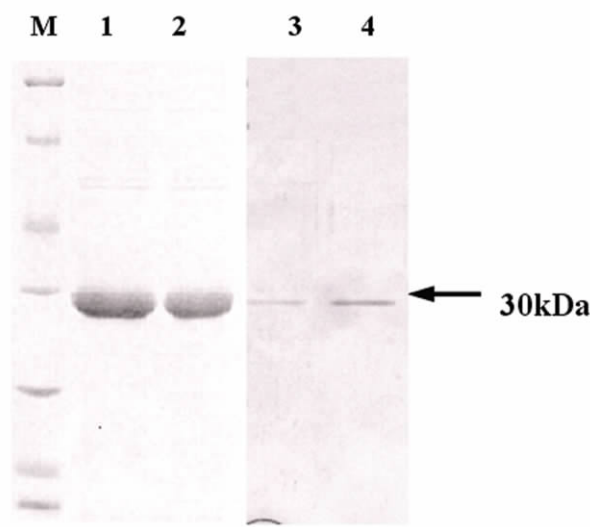


图4 表达产物的 Western-blot 结果 M 低分子量 Marker, 1 与 IL-2 mAb 的结合条带, 2 与 IL-2 mAb 的结合条带, 3-4 与 TB 病人血清的结合条带

Fig4 Western-blot analysis of expression protein: M, Molecular weight markers 1, Analysis of fusion protein with anti-his mAb 2, Analysis of the fusion protein by anti-hIL-2 mAb, 3-4 Banding of fusion protein with the sera of TB patients

2.6 表达蛋白与病人血清 Western-blot 分析

Rv1759cD-IL-2 融合表达蛋白与 2 份活动期病人血清均出现了特异性的结合条带,见图4(条带3和4)。

3 讨论

MTB 中的 Rv1759c 蛋白是 PE-PGRS (the proline-glutamic acid polymorphic guanine-cytosine-rich sequence) 家族的代表蛋白,它不受以前是否暴露于分枝杆菌的影响,可以诱导高水平的 IFN- γ ,有效抑制 TB 的复发,对持续性感染具有明确的治疗效果^[7]。其相应抗体存在于 MTB 潜伏感染的个体中,免疫组化显示 Rv1759cD 一般在细菌的细胞膜中表达,在肉芽肿中被感染的巨噬细胞内(持续性感染)有着较高表达,其与 LTBI 的持续存在密切相关。PE-PGRS 蛋白家族与 TB 细胞壁相关,可诱导 T 细胞和 B 细胞反应,在调节宿主免疫反应中起重要作用^[10]。当细胞进入肉芽肿或被巨噬细胞吞噬后,PE-PGRS 同源基因开始表达。缺失 PE-PGRS 基因的突变株在巨噬细胞中不能复制,在肉芽肿中存活减缓^[11]。Rv1759c 结构域分子量为 282bp,编码的蛋白具有与 Rv1759c 相似的功能。Rv1759c 抗原免疫慢性感染的小鼠后,用皮质酮诱导 TB 的复发,肺脏 CFU 无明显变化;而未用 Rv1759c 免疫的小鼠用皮质酮诱导后,肺脏 CFU 明显增加,这说明 Rv1759c 在控制潜伏感染免疫中起重要作用^[9]。尽管如此,Rv1759c 单一靶抗原缺乏佐剂的呈递,用于 LTBI 治疗效果有限,诱导的免疫应答有引起免疫病理损伤的风险。

在实验中单独使用 Hsp65-DNA 疫苗治疗 MTB 感染小

鼠,虽然组织荷菌数明确减少^[12],但诱导产生的免疫反应可使肺部形成肉芽肿,表现为严重的组织免疫病理损伤^[13]。当 Hsp65 与 IL-2 的融合基因疫苗治疗 MTB 时可有效缓解组织的病理损伤,增强 Hsp65 基因疫苗的治疗效果,显著减少脾肺荷菌数^[14]。因此推测 IL-2 在增强对胞内菌的细胞免疫中起着重要作用,包括①平衡体内 Th1 型和 Th2 型免疫应答水平,包括控制 Th2 型免疫反应,降低 IL-10 和 TNF- α 的水平,减轻组织病理损伤^[15];②诱导静止及活化的 NK 及 T 细胞产生 IFN- γ ,促进 NK 及 T 细胞的增殖,增强巨噬细胞对入侵 MTB 的杀伤作用,降低组织荷菌数^[16]。

本研究构建 表达 Rv1759cD 与 IL-2 的融合蛋白就是为了强化 Rv1759cD 单一靶抗原在 LTBI 中诱导 Th1 细胞免疫应答,利用 IL-2 的免疫学功能,能减少单一靶抗原引起的组织病理损伤,提供有效的佐剂呈递作用。表达的目的蛋白与载体中 6 $\times$ his 融合表达,不仅具有 IL-12 的结合位点,同时还可以与 His 单抗发生反应,说明融合蛋白成功表达^[17]。为了进一步确认该融合蛋白的反应性,我们选择了 2 例活动期 TB 病人血清对表达蛋白进行 Western-blot 分析,病人血清与 Rv1759cD-IL-2 融合蛋白具有特异性的结合条带。该融合蛋白有可能为 LTBI 的强化免疫提供有效的靶抗原。

参考文献 (References)

- [1] Loch C, Rouanet C, Hougardy JM, et al. How a different look at latency can help to develop novel diagnostics and vaccines against tuberculosis[J]. Expert Opin Biol Ther, 2007, 7:1665-1677
- [2] Santin M, Casas S, Saumoy M, et al. Detection of latent tuberculosis by the tuberculin skin test and a whole-blood interferon- γ release assay, and the development of active tuberculosis in HIV-seropositive persons[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011,69:59-65
- [3] Sterling TR. New approaches to the treatment of latent tuberculosis[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2008,29:532-541
- [4] Cox HS, Morrow M, Deutschmann PW. Long term efficacy of DOTS regimens for tuberculosis: systematic review [J]. BMJ, 2008, 36: 484-487
- [5] Wozniak TM, Saunders BM, Ryan AA, et al. Mycobacterium bovis BCG-specific Th17 cells confer partial protection against Mycobacterium tuberculosis infection in the absence of gamma interferon[J]. Infect Immun, 2010, 78:4187-4194
- [6] Marin ND, Paris SC, Vélez VM, et al. Regulatory T cell frequency and modulation of IFN-gamma and IL-17 in active and latent tuberculosis [J]. Tuberculosis (Edinb), 2010,90:252-261
- [7] Campuzano J, Aguilar D, Arriaga K, et al. The PGRS domain of Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS Rv1759cD antigen is an efficient subunit vaccine to prevent reactivation in a murine model of chronic tuberculosis [J]. Vaccine, 2007, 25:3722-3729
- [8] Shi C, Hai Z, Limei W, et al. Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of Mycobacterium tuberculosis and the human interleukin 2 fusion gene [J]. Tuberculosis (Edinb), 2009,89:54-61
- [9] Shi C, Yuan S, Zhang H, et al. Cell-mediated immune responses and protective efficacy against infection with mycobacterium tuberculosis induced by Hsp65 and hIL-2 fusion protein in mice [J]. Scand J Immunol, 2009, 69: 140-149
- [10] Roupie V, Romano M, Zhang L, et al. Immunogenicity of eight dormancy regulon-encoded proteins of Mycobacterium tuberculosis in DNA-vaccinated and tuberculosis-infected mice [J]. Infect Immun, 2007, 75: 941-949
- [11] Koh KW, Soh SE, Seah GT. Strong antibody responses to Mycobacterium tuberculosis PE-PGRS62 protein are associated with latent and active tuberculosis[J]. Infect Immun, 2009,77:3337-3343
- [12] Baek KM, Ko SY, Lee M, et al. Comparative analysis of effects of cytokine gene adjuvants on DNA vaccination against Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 65[J]. Vaccine, 2003,21:3684-3689
- [13] Taylor JL, Ordway DJ, Troudt J, et al. Factors associated with severe granulomatous pneumonia in Mycobacterium tuberculosis-infected mice vaccinated therapeutically with hsp65 DNA [J]. Infect Immun, 2005, 73:5189-5193
- [14] Shi C, Hai Z, Limei W, et al. Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of Mycobacterium tuberculosis and the human interleukin 2 fusion gene [J]. Tuberculosis (Edinb), 2009, 89:54-61
- [15] Barouch DH, Letvin NL, Seder RA. The role of cytokine DNAs as vaccine adjuvants for optimizing cellular immune responses[J]. Immunol Rev, 2004, 202:266-274
- [16] Li H, Li R, Zhong S, et al. The immunogenicity and protective efficacy of Mtb8.4/hIL-12 chimeric gene vaccine [J]. Vaccine, 2006,27: 1315-1323
- [17] Wang LM, Bai YL, Shi CH, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a DNA vaccine encoding the fusion protein of mycobacterium heat shock protein 65 (Hsp65) with human interleukin-2 against Mycobacterium tuberculosis in BALB/c mice [J]. APMIS, 2008,116: 1071-1081