

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.03.02

牛结核杆菌 MPB70-ESAT-6 融合蛋白的原核表达及抗原反应性分析

姜秀云^{1,3}, 董 阳², 包艳红¹, 张建宁¹, 方诗文², 金海玲¹, 王 宁³, 马红霞^{2*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2. 吉林农业大学动物科技学院, 长春 130118; 3. 长春科技学院生物食品学院, 长春 130600)

[收稿日期] 2019-01-11 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 03-0007-06 [中图分类号] S855.2

[摘要] 为增强单个蛋白的抗原性, 利用 (Gly₄Ser)₃ 柔性连接肽将牛结核杆菌 MPB70 和 ESAT-6 融合。采用重叠延伸 PCR 技术将牛结核杆菌 *mpb70* 与 *esat-6* 基因连接, 获得融合基因 *mpb70-esat-6*, 连接至 T-Vector pMD19 中, 获得克隆质粒 pMD-70-esat-6。经 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切、纯化, 并与 pET28a(+) 载体连接, 构建了 pET-70-esat-6 重组表达质粒。SDS-PAGE 发现, 在 27.2 ku 处表达了融合蛋白 MPB70-ESAT-6, Western blotting 证实, MPB70-ESAT-6 与牛结核阳性血清反应性良好。MPB70-ESAT-6 融合蛋白的研究为牛结核病诊断抗原及相关疫苗研究奠定了基础。

[关键词] 牛结核杆菌; *mpb70* 基因; *esat-6* 基因; 融合蛋白; 原核表达

Prokaryotic Expression of MPB70-ESAT-6 Fusion Protein of *Mycobacterium bovis* and Its Antigen Reactivity Analysis

JIANG Xiu-yun^{1,3}, DONG Yang², BAO Yan-hong¹, ZHANG Jian-ning¹,FANG Shi-wen², JIN Hai-ling¹, WANG Ning³, MA Hong-xia^{2*}

(1. College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3. Changchun University of Sci-Tec, Changchun 130600, China)

Corresponding author: MA Hong-xia, E-mail: hongxia0731001@163.com

Abstract: To enhance the antigenicity of individual protein, *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) strain MPB70 was fused with ESAT-6 via a flexible linker, (Gly₄Ser)₃. The fusion gene *mpb70-esat-6* was obtained using overlap extension PCR and linked to pMD19 T-Vector. After *Bam*H I and *Eco*R I restriction enzyme digestion, the cloned plasmid pMD-70-esat-6 was connected with pET28a(+) vector to construct a recombinant plasmid pET-70-esat-6. SDS-PAGE showed that fusion protein MPB70-ESAT-6 was expressed at 27.2 ku. MPB70-ESAT-6 exhibited good reactivity with *M. bovis* positive serum confirmed by Western blotting analysis. The current study

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No.31572555); 吉林省科技发展计划项目 (No.20170101025JC); 吉林省教育厅科学技术研究项目 (No.201441, No.JJKH20170315KJ)

作者简介: 姜秀云, 博士研究生, 从事动物免疫学研究。

通讯作者: 马红霞。E-mail: hongxia0731001@163.com

provides experimental basis for research of fusion protein MPB70-ESAT-6 as bovine tuberculosis diagnostic antigen and vaccine.

Key words: *Mycobacterium bovis*; *mpb70* gene; *esat-6* gene; fusion protein; prokaryotic expression

牛结核病 (Bovine tuberculosis) 主要是由牛结核杆菌 (*Mycobacterium bovis*) 引起的牛、鹿等多种动物及人共患的慢性细菌性疫病,是世界动物卫生组织 (Office International Des Epizooties, OIE) 规定的 B 类疫病之一。人通过与患病动物的密切接触^[1] 及饮用未消毒的乳制品^[2] 而患病。另外,人结核分枝杆菌也可传播给牛和其他动物^[3-4],从牛乳^[5] 和不同动物组织^[6-7] 中可广泛地分离出结核分枝杆菌。可见,致病性结核杆菌可在人和动物之间的相互传播,给结核病的控制带来了相当的困难。目前,检测牛结核病唯一的方法是 OIE 指定的牛结核菌素 (Purified Protein Derivative, PPD) 变态反应^[8], 但是该方法存在较高的非特异性反应,由此造成不必要的经济损失令许多发展中国家难以承担。而现有的临床上唯一应用的疫苗——卡介苗 (Bacillus of Calmette and Guerin, BCG) 又不能用于牛的接种。因此,畜牧业生产中亟需适于牛结核病诊断和预防的新型抗原和疫苗。

MPB70 和 ESAT-6 是结核分枝杆菌分泌到细胞外的主要蛋白质,MPB70 是菌体表面蛋白,但 BCG 中表达水平低下或不表达^[9], ESAT-6 是菌体的毒力因子,由 RD1 区基因编码,只存在于致病结核分枝杆菌中,但不存在于环境分枝杆菌和 BCG 中,已被提议作为区分感染和接种动物试验候选抗原^[10]。另外,MPB70 中存在多个 Th1 型细胞抗原表位^[11],能诱导免疫动物产生 IFN- γ ^[12], ESAT-6 能够引起显著的体液免疫和细胞免疫^[13] 及有效的保护作用^[14]。可见,MPB70 和 ESAT-6 均是结核病新型诊断抗原和疫苗的靶点。目前,人们越来越关注血清学方法与传统的细胞介导免疫技术相结合,以提高结核感染的检出率,尤其是利用融合蛋白或多重抗原来提高血清学诊断的敏感性^[15-18]。因此,将 MPB70 和 ESAT-6 两个特异性抗原基因通过重叠延伸 (Splicing by Overlapping Extension,

SOE) PCR 技术相融合,并进行原核表达及抗原反应性分析,为融合蛋白 MPB70-ESAT-6 用于牛结核病的诊断及疫苗研制打下基础。

1 材料与方法

1.1 基因、载体及菌株 pGEM-T-70 和 pGEM-T-esat-6 由吉林省新兽药研发与创制重点实验室构建;pET28a (+) 为 Novagen 公司产品;T-Vector pMD19 购于宝日医生物技术(北京)有限公司; *Escherichia coli* DH5 α 、*E. coli* JM109、*E. coli* BL21 (DE3) 为吉林省新兽药研发与创制重点实验室留存。

1.2 酶与主要试剂 *Bam*H I、*Eco*R I、T4 DNA Ligase、LA *Taq* DNA 聚合酶、Pyrobest DNA Polymerase、DNA Markers 及 DNA 凝胶回收试剂盒均为 TaKaRa 公司产品;卡那霉素 (Kanamycin, Kan)、氨苄青霉素 (Ampicillin, Amp) 均 Amresco 公司产品;异丙基硫代半乳糖苷 (Isopropyl β -D-Thiogalactoside, IPTG) 为 Invitroge 公司产品;Ni-NTA Agarose 为 QIAGEN 公司产品;牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 为 Roche 公司产品;牛结核阳性血清采自结核病变牛;HRP 标记羊抗牛 IgG 为北京百奥莱博科技有限公司产品。

1.3 引物的设计与合成 依据 *mpb70*、*esat-6* 的碱基序列,利用生物软件设计 PCR 引物,序列见表 1,由吉林省库美生物科技有限公司合成。引物 P1-₇₀、P2-_{esat-6} 中分别加入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点。

表 1 引物序列

Tab 1 Sequence of Primer

名称	序列
P1- ₇₀	5' TAGGATCCATGGCGATCTGGTGGGC 3'
P2- ₇₀	5' ACTACCTCCACCGCCGCTACCGCCTCCGCCG-TTCCACCGCCACCGCCGGAGGCATTAG 3'
P1- _{esat-6}	5' GGTGGCGGTGGAAGCGCGGAGCGCGTACG-GGCGGTGGAGGTAGTATGACAGAGCAGCAG 3'
P2- _{esat-6}	5' GCGAATTCCTATGCGAACATCCCACT 3'

1.4 融合基因的扩增 首先利用 pGEM-T-70、pGEM-T-esat-6 为模板,以 P1-70 和 P2-70、P1-esat-6 和 P2-esat-6 为引物,应用 Pyrobest DNA Polymerase 分别对 *mpb70* 与 *esat-6* 基因进行 PCR 扩增。再以 *mpb70* 和 *esat-6* 的扩增产物为模板,以 P1-70- 和 P2-esat-6 为引物,通过 LA Taq DNA 对 *mpb70-esat-6* 进行扩增。扩增产物利用凝胶回收纯化试剂盒纯化。

1.5 *mpb70-esat-6* 的克隆和序列分析 将 *mpb70-esat-6* 和 T-Vector pMD19 用 Solution I 连接,构建重组质粒 pMD-70-esat-6,转化至感受态 *E. coli* JM109 中,振荡培养 1 h,于固体 LB 培养基 (100 mg/L Amp) 中培养。转化菌于液体 LB 培养基中培养过夜。提取质粒,进行 BamH I、EcoR I 双酶切,重组质粒由吉林省库美生物科技有限公司予以测序。

1.6 重组表达载体的构建与鉴定 以 BamH I、EcoR I 酶切 pMD-70-esat-6 和 pET28a(+),回收产物通过 T4 DNA Ligase 连接,构建 pET-70-esat-6。转化至 *E. coli* BL21 (DE3) 中,于 LB (50mg/L Kan) 固体培养基中培养过夜。转化菌经液体 LB 培养后,提取质粒并酶切分析。

1.7 *mpb70-esat-6* 的诱导表达及鉴定 将重组菌

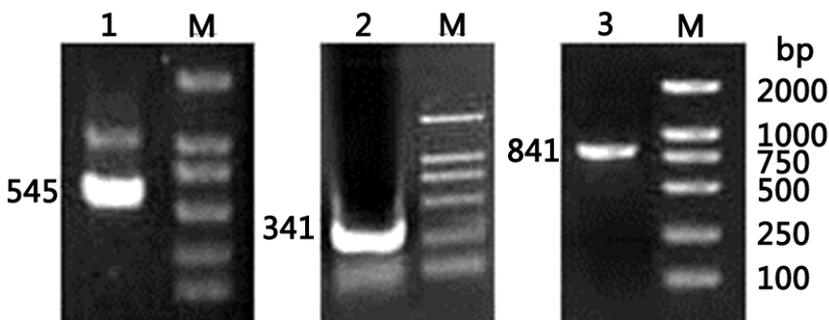
接种于含 Kan 的液体 LB 培养基中,37 °C 振荡培养至 OD_{600nm} ≥ 0.65,用 1 mmol/L IPTG 诱导,而后每小时留存少量菌液,共诱导 7 h。将留存的菌液 OD_{600nm} 调至 0.65,吸菌液 1.0 mL,离心后,于菌体中加双蒸水 80 μL。加上样缓冲液,煮沸处理后,进行 SDS-PAGE。

1.8 MPB70-ESAT-6 表达形式分析 将表达菌株接种于 200 mL 液体 LB 中培养,经 IPTG 诱导 4 h 后,离心收集菌体。超声破碎后,离心分离上清与沉淀,对上清和沉淀进行 SDS-PAGE。

1.9 MPB70-ESAT-6 的反应性分析 采用 Western blotting 分析 MPB70-ESAT-6 的反应性。诱导后的表达菌 → 超声破碎 → 裂解液上清 → Ni-NTA Agarose 柱纯化 → SDS-PAGE → 转膜 → BSA 封闭后,再依次进行如下反应:牛结核阳性血清 → HRP 标记羊抗牛 IgG → 联苯胺反应。

2 结果

2.1 融合基因扩增产物 *mpb70*、*esat-6* 及 *mpb70-esat-6* 扩增结果如图 1 所示。图中可见 *mpb70*、*esat-6* 和 *mpb70-esat-6* DNA 片段分别是 545 bp、341 bp、841 bp,与预期大小相一致。



1-3: 分别为 *mpb70*、*esat-6* 和 *mpb70-esat-6* 基因的 PCR 产物; M: DNA Marker

1-3: PCR products of *mpb70*, *esat-6* and *mpb70-esat-6* genes, respectively; M: DNA Marker /DL2000

图 1 *mpb70*、*esat-6* 和 *mpb70-esat-6* 的 PCR 扩增

Fig 1 PCR amplification of *mpb70*、*esat-6* and *mpb70-esat-6* genes

2.2 *mpb70-esat-6* 的克隆与鉴定 *mpb70-esat-6* 与载体 pMD19 连接,获得了 pMD-70-esat-6,经 BamH I、EcoR I 双酶切后,电泳结果见图 2。图中

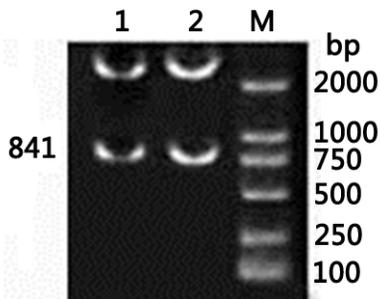
可见约 2690 bp 的 pMD19 和 841 bp 的 *mpb70-esat-6*。序列测定后分析显示,*mpb70-esat-6* 融合基因的大小为 841 bp,与预期大小一致,而且没有碱基的

插入、缺失及替换现象,成功地得到了牛结核杆菌 mpb70-esat-6 融合基因。

2.3 原核表达质粒的构建与鉴定 mpb70-esat-6 和载体 pET28a(+) 连接,构建了 pET-70-esat-6, 经 BamH I、EcoR I 酶切,获得了约 5300 bp 的 pET28a(+) 和 841 bp 的 mpb70-esat-6(图 3)。

2.4 SDS-PAGE 分析 E. coli BL21(DE3) 中的 pET-70-esat-6 经 IPTG 诱导各时间的表达结果如图 4 所示。图中可见 mpb70-esat-6 得到了表达, MPB70-ESAT-6 的相对分子量约为 27.2 ku, 诱导后表达量明显增加,4 h 后达到最高,在超声裂解液的上清和沉淀中均存在,说明 MPB70-ESAT-6 以可溶性和包涵体两种形式获得了表达,这种可溶性表达有利于后续的纯化。而 pET28a(+) E. coli BL21(DE3) 中则没有见到该蛋白的表达。

2.5 MPB70-ESAT-6 的反应性分析 mpb70-esat-6 融合基因表达的 MPB70-ESAT-6 融合蛋白 Western blotting 分析结果见图 5,图中 27 ku 处存在一条明显的蛋白印迹带,表明表达的 MPB70-ESAT-6 能够与牛结核阳性血清发生反应,且有着良好的反应性。

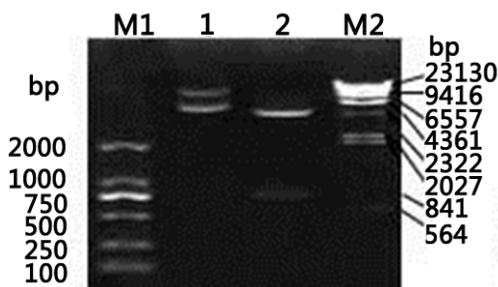


1-2: pMD-70-esat-6 的酶切产物; M: DNA Marker DL2000

1-2: Products of pMD-70-esat-6 digested by enzyme; M: DNA Marker DL2000

图 2 重组质粒 pMD-70-esat-6 的酶切鉴定

Fig 2 Restriction analysis map of pMD-70-esat-6



M1: DNA Marker DL2000; 1: pET-70-esat-6;

2: pET-70-esat-6 的酶切产物; M2: λ DNA digested with Hind III

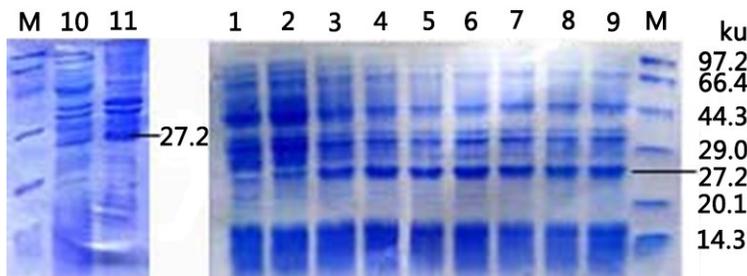
M1: DNA Marker DL2000; 1: pET-70-esat-6;

2: Products of pET-70-esat-6 digested by enzyme;

M2: λ DNA digested with Hind III

图 3 原核表达质粒的酶切鉴定

Fig 3 Restriction analysis map of pET-70-esat-6



1: pET-28a(+) 在 E.coli BL21 中诱导 7 h; 2-9: 分别是 pET-70-esat-6 在 E.coli BL21 中诱导 0~7 h; M: 蛋白质 Marker;

10: pET-70-esat-6 在 E.coli BL21 中诱导后裂解的沉淀; 11: pET-70-esat-6 在 E.coli BL21 中诱导后裂解的上清

1: pET-28a(+) expression result in E.coli BL21 with IPTG induced 7 h, as control;

2-9: pET-70-esat-6 expression results in E.coli BL21 with IPTG induced 0~7 h, respectively;

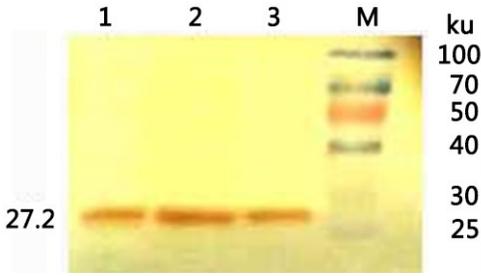
M: Protein Marker; 10: Cleavage liquid precipitate of pET-70-esat-6 in E.coli BL21 with IPTG induced;

11: Cleavage liquid supernatant of pET-70-esat-6 in E.coli BL21 with IPTG induced

图 4 mpb70-esat-6 在 E.coli BL21 中的表达

Fig 4 mpb70-esat-6 fusion gene recombinant expression plasmid

expressed by prokaryotic expression vector in E.coli BL21



1-3: MPB70-ESAT-6; M: 蛋白质 Marker

1-3: MPB70-ESAT-6; M: Protein Marker

图 5 MPB70-ESAT-6 的 Western blotting 分析

Fig 5 Western blotting analysis of the MPB70-ESAT-6 fusion protein

3 讨论

迄今为止,动物结核病一直在采取检疫-隔离-淘汰的防制策略,但始终未能从根本上得以控制。究其原因,一方面是在存在结核动物的漏检情况,另一方面尚无实用的疫苗。因此,新型、安全、高效结核病疫苗和敏感、特异检测抗原的研制,以及简便、快速、易行诊断方法的建立则一直倍受注目。

在结核病免疫学诊断研究中,有报道指出,牛结核杆菌 MPB70、MPB83、MPB63、ESAT-6 和 CFP10 等可能是结核病血清学诊断最为有用的抗原^[19]。MPB70、MPB83、ESAT-6、CFP10 四种抗原在多重 ELISA 分析中的敏感性为 74.2%,特异性为 94.9%^[15],MPB70 检测的阳性血清抗体效价有 50% 达 1 : 64000^[16]。MPB83/MPB70 融合蛋白对自然感染的结核牛血清检测的敏感性为 63%,特异性为 98%^[17]。p22(主要是 MPB70 和 MPB83 的复合物)ELISA 对赤鹿检测的敏感性和特异性分别为 99.02% 和 70.1%^[18]。

研究发现,与 ESAT-6 相比,PE/PPE 肽-ESAT-6 融合蛋白的免疫应答增强,攻毒后,能诱导 CD4⁺T 细胞分泌 IL-2⁺/IFN- γ ⁺,且脾脏中的菌落形成单位低于 ESAT-6^[20]。ESAT-6 与 IgG1 Fc γ 的融合能够靶向 APC 的 Fc γ R,从而增强免疫原性^[21]。可见,融合蛋白或多种抗原在结核病的诊断和疫苗的研究中有着良好的应用前景。

本研究利用 45 个核苷酸 Linker 将牛结核杆菌

mpb70 和 *esat-6* 两个保护性抗原基因融合,通过 (Gly₄Ser)₃ 的柔性肽将 MPB70 和 ESAT-6 连接并隔离,以防两个蛋白在空间结构折叠时产生干扰。本研究成功地获得了 *mpb70-esat-6* 融合基因,序列分析表明碱基序列准确无误。由此构建了 *mpb70-esat-6* 的原核表达重组质粒,并在 *E. coli* 中表达了 MPB70-ESAT-6,且具有良好的抗原反应性,为进一步研究 MPB70-ESAT-6 作为牛结核病的诊断抗原和亚单位疫苗奠定了基础。

参考文献:

[1] Gumi B, Schelling E, Berg S, et al. Zoonotic transmission of tuberculosis between pastoralists and their livestock in South-East Ethiopia[J]. *Ecohealth*, 2012, 9(2): 139-149.

[2] Firdessa R, Tschopp R, Wubete A, et al. High prevalence of bovine tuberculosis in dairy cattle in Central Ethiopia: implications for the dairy industry and public health[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e52851.

[3] Dawson K L, Bell A, Kawakami P R, et al. Transmission of *Mycobacterium orygis* (*M. tuberculosis* Complex Species) from a tuberculosis patient to a dairy cow in New Zealand[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(9): 3136-3138.

[4] Kassa G, Abebe, F, Worku Y, et al. Tuberculosis in goats and sheep in afar pastoral region of Ethiopia and isolation of *Mycobacterium tuberculosis* from goat[J]. *Vet Med Int*, 2012, 2012: 869146.

[5] Mariam S. Identification and survival studies of *Mycobacterium tuberculosis* within laboratory -fermented bovine milk[J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7: 175.

[6] Ameni G, Tadesse K, Hailu E, et al. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* between farmers and cattle in Central Ethiopia [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76891.

[7] Arega S, Conraths F J, Ameni G. Prevalence of tuberculosis in pigs slaughtered at two abattoirs in Ethiopia and molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from tuberculous-like lesions in pigs[J]. *BMC Vet Res*, 2013, 9: 97.

[8] 世界动物卫生组织. OIE 陆生动物诊断试验与疫苗手册: 哺乳动物、禽类与蜜蜂 2012[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014, 10.

OIE. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals Terrestrial Manual: Mammals, Birds and Bees, 7th Edition, 2012 [M]. Beijing: China Agricultural Publishing

- House, 2014, 10.
- [9] Wiker H G, Nagai S, Hewinson R G, *et al.* Heterogenous 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.
- [10] Vordermeier M, Gordon S V, Hewinson R G. *Mycobacterium bovis* antigens for the differential diagnosis of vaccinated and infected cattle[J]. *Vet Microbiol*, 2011, 151(1/2): 8-13.
- [11] Al-Attayah R, Shaban F A, Wiker H G, *et al.* Synthetic peptides identify promiscuous human Th1 cell epitopes of the secreted mycobacterial antigen MPB70[J]. *Infect. Immun*, 2003, 71(4): 1953-1960.
- [12] Vordermeier H M, Cockle P J, Whelan A O, *et al.* Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and MPB70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test[J]. *Vaccine*, 2000, 19(9/10): 1246-1255.
- [13] Lu Y, Kang J, Ning H, *et al.* Immunological characteristics of *Mycobacterium tuberculosis* subunit vaccines immunized through different routes[J]. *Microb Pathogenesis*, 2018, 125: 84-92.
- [14] Gupta N, VEDI S, Kunimoto D Y, *et al.* Novel lipopeptides of ESAT-6 induce strong protective immunity against *Mycobacterium tuberculosis*; Routes of immunization and TLR agonists critically impact vaccine's efficacy[J]. *Vaccine*, 2016, 34(46): 5677-5688.
- [15] Fontana S, Pacciarini M, Boifav M, *et al.* Development and evaluation of two multi-antigen serological assays for the diagnosis of bovine tuberculosis in cattle[J]. *J Microbio Methods*, 2018, 153: 118-126.
- [16] Shuralev E, Quinn P, Doyle M, *et al.* Application of the Enfer chemiluminescent multiplex ELISA system for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in goats[J]. *Vet Microbiol*, 2012, 154(3/4): 292-297.
- [17] Waters W R, Buddle B M, Vordermeier H M, *et al.* Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle[J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2011, 18(11): 1882-1888.
- [18] Thomas J, Infantes-Lorenzo J A, Moreno I, *et al.* A new test to detect antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in red deer serum[J]. *Vet J*, 2019, 244: 98-103.
- [19] Infantes-Lorenzo J A, Moreno I, Riscalde M A, *et al.* Proteomic characterization of bovine and avian purified protein derivatives and identification of specific antigens for serodiagnosis of bovine tuberculosis[J]. *Clini Proteomics*, 2017, 14: 36.
- [20] Choi S Y, Kwon K W, Kim H, *et al.* Vaccine potential of ESAT-6 protein fused with consensus CD4⁺ T-cell epitopes of PE/PPE proteins against highly pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* strain HN878[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 2195-2201.
- [21] Soleimanpour S, AliMohammadi M, Ghazvini K, *et al.* Construction of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 fused to human Fc γ of IgG1: To target Fc γ R as a delivery system for enhancement of immunogenicity[J]. *Gene*, 2016, 580(2): 111-117.

(编辑:李文平)