

# 结核分枝杆菌体内特异表达基因 *mshA* 的克隆表达及免疫组织化学分析

李自慧 杜博平 贾红彦 张海青 周丽娟 邢爱英 曹廷明 郑晓静 陈曦 张宗德

**【摘要】 目的** 克隆、表达结核分枝杆菌体内特异表达基因 *mshA*, 并制备多克隆抗体进行免疫组织化学分析, 研究其免疫原性、免疫反应性及体内表达情况。**方法** 采用高保真 PCR 法扩增结核分枝杆菌 *mshA* 基因, 将基因克隆入表达载体 pET30a(+), 证实序列正确后转化入大肠埃希菌 BL21 (DE3), 并采用 IPTG 诱导表达。将重组蛋白大量表达纯化后免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗体并进行亲和纯化, 用重组 MSHA 蛋白与其多克隆抗体进行 Western blot 鉴定。制备感染结核分枝杆菌的小鼠肺组织病理切片, 尝试用免疫组织化学和抗酸染色法检测感染小鼠肺组织中结核分枝杆菌 MSHA 蛋白的表达。**结果** 成功扩增片段大小为 1443 bp 的 *mshA* 基因, 构建了 pET30a(+); *mshA* 重组表达载体, 对 57 kD 的重组蛋白进行了大量表达及纯化, 浓度为 4 mg/ml。重组蛋白免疫新西兰大白兔后获得效价达 25 600 的多克隆抗体, 纯化后的多克隆抗体浓度为 5.58 mg/ml, 效价仍达 25 600。免疫组织化学和抗酸染色显示, 小鼠肺组织切片中结核分枝杆菌分布处有深棕色 MSHA 免疫组织化学反应颗粒。**结论** 结核分枝杆菌 MSHA 蛋白具有良好的免疫原性和免疫反应性, 小鼠肺组织内的结核分枝杆菌中存在该蛋白的表达。

**【关键词】** 结核分枝杆菌; 抗体; 免疫组织化学

**The cloning expression and immunohistochemistry analysis of *mshA* in *Mycobacterium tuberculosis* in vivo** LI Zi-hui, DU Bo-ping, JIA Hong-yan, ZHANG Hai-qing, ZHOU Li-juan, XING Ai-ying, CAO Ting-ming, ZHENG Xiao-jing, CHEN Xi, ZHANG Zong-de. Beijing Chest Hospital, Capital Medical University; Beijing Tuberculosis and Thoracic Tumor Research Institute, Beijing 101149, China  
Corresponding author: ZHANG Zong-de, Email: zzd417@163.com

**【Abstract】 Objective** To clone, express and purify *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) in vivo-induced antigen *mshA*, and prepare its polyclonal antibody to study on its immunogenicity, immunoreactivity and its expression in vivo. **Methods** *M. tuberculosis mshA* gene was amplified by high fidelity PCR and cloned into vector pET30a(+). The vector was then transformed into *E. coli* BL21 (DE3) and induced to express with IPTG. The fusion protein was purified and applied to immunize the rabbit to get specific antibody. Then the protein was used to interact with purified polyclonal antibody by Western blot. Lung tissue sections of mice infected with *M. tuberculosis* were prepared. Immunohistochemical staining and Ziehl-Neelsen staining were performed to detect the expression of *M. tuberculosis* MSHA protein in infected mouse lung tissue. **Results** *M. tuberculosis mshA* gene was successfully amplified and the fragment size was 1443 bp. The recombinant expression vector was constructed correctly, in which the 57 kD MSHA fusion protein was expressed and purified (4 mg/ml). Polyclonal antibody of the protein was obtained and purified with the concentration as 5.58 mg/ml and the titer as 25 600. The fusion protein could interact with polyclonal antibody, and brown immuno-peroxidase staining could be seen in the area of bacilli in the section of *M. tuberculosis*-infected mouse lung tissue after immuno-staining with anti-MSHA antibodies and further Ziehl-Neelsen staining. **Conclusions** *M. tuberculosis* MSHA protein had good immunogenicity and immunoreactivity, which was expressed in *M. tuberculosis* in vivo.

**【Key words】** *Mycobacterium tuberculosis*; Antibody; Immunohistochemistry

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.01.002

基金项目:“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项(No. 2008ZX10003-006, 2012ZX10003002-003);北京市优秀人才培养资助(No. 20081D0301300095)

作者单位:101149 北京,首都医科大学附属北京胸科医院(北京市结核病胸部肿瘤研究所)

通讯作者:张宗德, Email: zzd417@163.com

结核病目前仍是严重威胁人类健康的传染病之一。根据 2012 年世界卫生组织(WHO)报告,2011 年全球新发结核病患者 870 万例,约 140 万人死于结核病<sup>[1]</sup>。结核病的早发现和早期规范治疗,对患者的预后以及控制结核病的流行至关重要,而缺乏针对结核病的早期、灵敏和快速的诊断技术仍然困扰着当今临床中结核病防控工作。细菌的体内诱导抗原是细菌感染宿主后被诱导表达的抗原,其与细菌逃避宿主免疫反应及最终致病密切相关,这些体内特异表达的抗原同样也是结核病早期诊断的良好候选抗原。结核分枝杆菌 *mshA* (Rv0486) 基因编码蛋白(MSHA)是本实验室采用基于抗原-抗体反应的体内诱导抗原技术(in vivo-induced antigen technology, IVIAT)鉴定出的体内诱导抗原之一<sup>[2]</sup>。本研究对 MSHA 蛋白进行克隆表达与纯化,制备其多克隆抗体并行免疫组织化学分析,旨在了解结核分枝杆菌 MSHA 蛋白的免疫原性、免疫反应性及其体内表达情况,为探讨其能否作为结核病的诊断性分子标识奠定理论基础。

## 材料与方法

### 一、主要实验材料和试剂

结核分枝杆菌标准株 H37Rv 为本研究室保存,培养基采用含有 10% OADC 和 0.05% Tween 80 的 7H9 液体培养基(Difco)。大肠埃希菌 BL21(DE3)感受态购自北京鼎国生物技术有限责任公司,采用 LB(Luria-Bertani)培养基,含 pET-30a(+)质粒(Novagen 公司)的大肠埃希菌培养基中需加入卡那霉素(30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。PCR 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。新西兰白兔为清洁级、雌性、体重 2.5 kg,购自北京大学医学部实验动物中心。柠檬酸盐抗原修复液购自福州迈新生物技术开发有限公司,免疫组织化学试剂盒采用 NovoLink™ Polymer Detection System(RE7140-CE, Leica 公司)。

### 二、方法

1. *mshA* 基因的扩增及纯化:常规培养并提取结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA。根据 GenBank 公布的结核分枝杆菌 *mshA* 全基因序列设计引物,上游 5'-GGAATTCGGTGGTGGTATGGCAGGTGTGCGGCACGATG-3'(下划线为 *EcoR* I 酶切位点),下游 5'-CCCAAGCTTTTCACGCGCCACCCCGCGACG-3'(下划线为 *Hind* III 酶切位点)。以 DNA 为模板,采用 Pfu 高保真 DNA 聚合酶 PCR 扩增 *mshA* 基因。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 1 min,60℃ 1 min,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳,并切胶回收目的片段。

2. 重组表达载体 pET30a(+):将纯化的 *mshA* 基因产物和表达载体 pET-30a(+)用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别双酶切,纯化后连接,将连接产物转化 BL21(DE3)感受态细胞,保留双酶切鉴定阳性和测序正确的菌株。

3. MSHA 的表达和纯化:将阳性克隆用异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(IPTG, 0.4 mmol/L)诱导表达 3 h,离心收集菌体,常规超声破碎并离心,取上清及沉渣进行 SDS-PAGE 电泳,鉴定蛋白表达形式。大量洗涤包涵体纯化蛋白,将包涵体的沉淀用 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液洗涤 2 遍,用含 2 mol/L 尿素的 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液洗涤 1 次,用 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液洗涤 2 次,最后用含 8 mol/L 尿素的 10 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)溶液重新溶解沉淀,离心后留取上清,进一步用普通镍柱纯化。

4. MSHA 多克隆抗体的制备和纯化:新西兰白兔于 0、3、4 周进行皮下免疫,蛋白免疫剂量为 200  $\mu\text{g}/\text{次}$ 。免疫结束后 1 周取血测定效价,效价达到标准后颈动脉取血,收集血清,采用 IgG 亲和层析柱纯化。采用分光光度计检测纯化抗体的浓度,分别用 SDS-PAGE 和 ELISA 法检测抗体纯度和抗体效价。

5. 检测多克隆抗体能否与重组蛋白发生抗原-抗体反应:以 MSHA 重组蛋白为抗原,以纯化的多克隆抗体为一抗(1:1000),HRP 标记羊抗兔 IgG 为二抗(1:5000),行 Western blot 分析,检测该重组蛋白能否与纯化后的多克隆抗体发生抗原-抗体反应。

6. 免疫组织化学:常规制备感染结核分枝杆菌的小鼠肺组织石蜡切片。将切片二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后,浸泡于蒸馏水中。采用柠檬酸盐抗原修复液高温高压抗原修复法处理 90 s,蒸馏水冲洗 3 次,3 min/次。然后按照 NovoLink™ Polymer Detection System 试剂盒说明对切片进行封闭、滴加一抗、二抗和染色,阴性对照组将一抗替换为磷酸盐缓冲液(PBS),其余操作同样本组,最后行常规脱水、透明、干燥、封片,显微镜下观察结果。免疫组织化学染色的片再行苏-尼氏抗酸染色<sup>[3]</sup>,以确定结核分枝杆菌的存在及其具体位置。

## 结 果

### 一、结核分枝杆菌 *mshA* 基因的扩增

GenBank 中 *mshA* 基因的大小为 1443 bp,以结核分枝杆菌基因组 DNA 为模板,用 PCR 方法扩增得到了目的片段(图 1)。

### 二、重组表达载体的鉴定

重组载体 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切结果显示有

约 1443 bp 的目的条带和较大的载体条带(图 2)。测序结果也证实目的基因序列正确,重组表达载体 pET30a(+):*mshA* 基因构建成功。

### 三、重组蛋白 MSHA 的表达、鉴定及纯化

SDS-PAGE 结果显示,57 kD 处有目的蛋白的表达,且表达的重组蛋白 MSHA 主要在沉淀中,以不溶性包涵体形式表达(图 3)。大量洗涤包涵体并用镍柱纯化蛋白后效果良好(图 4),蛋白浓度为 4 mg/ml。

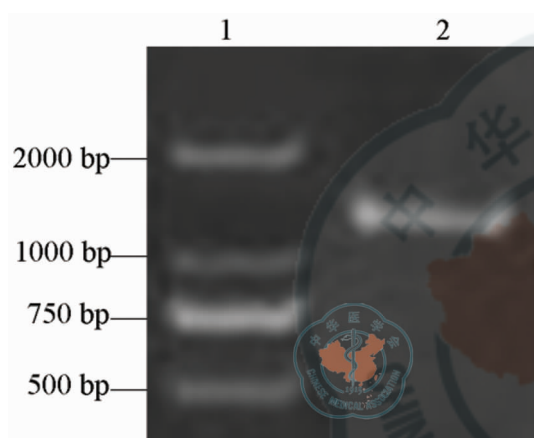
### 四、MSHA 多克隆抗体的制备、纯化和鉴定

ELISA 法测定 MSHA 多克隆抗体的效价为

25 600(图 5)。经亲和纯化后抗体浓度为 5.58 mg/ml,效价检测仍达到 25 600,纯度如图 6 所示。Western blot 结果显示 57 kD 目的蛋白位置处有条带(图 7),证实此多克隆抗体能够与重组蛋白 MSHA 发生抗原-抗体反应。

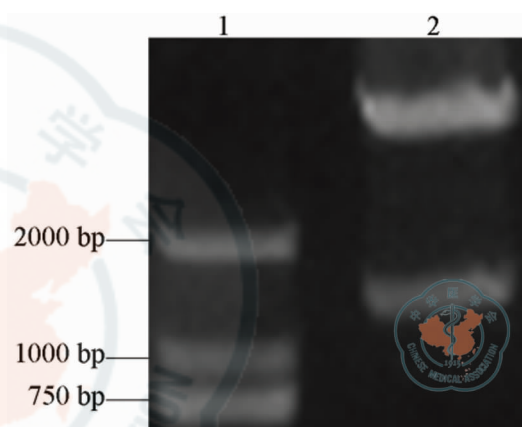
### 五、免疫组织化学结果

与阴性对照组相比,以 MSHA 多克隆抗体为一抗的感染结核分枝杆菌的小鼠肺组织切片免疫组织化学结果显示,部分巨噬细胞及细胞外有许多棕色颗粒沉积,进一步的姜-尼抗酸染色发现棕色颗粒处有大量结核分枝杆菌存在(图 8)。



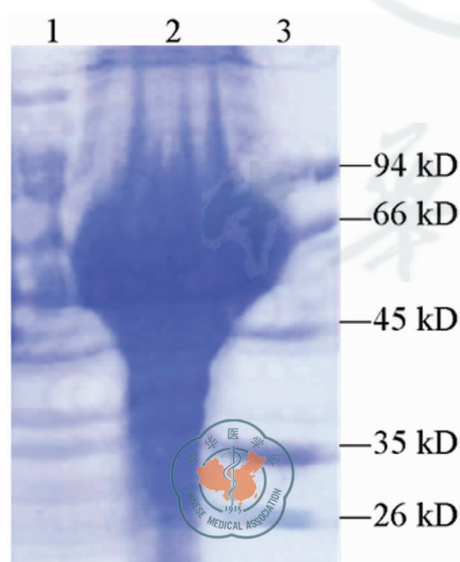
注:1 泳道:DNA 分子标准,2 泳道:PCR 产物

图 1 *mshA* 基因 PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳



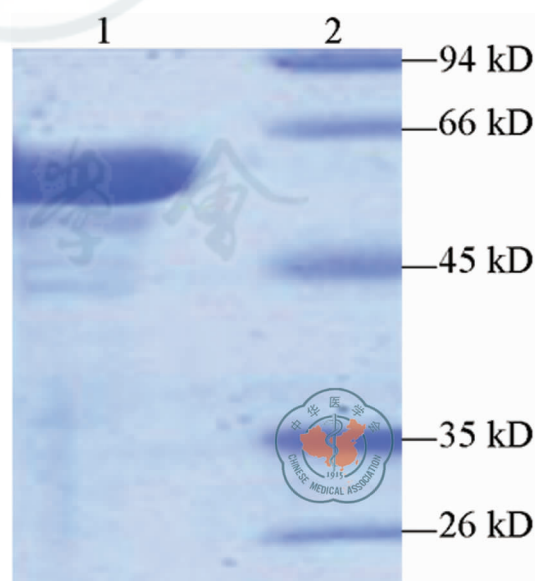
注:1 泳道:DNA 分子标准,2 泳道:重组载体酶切产物

图 2 pET30a(+):*mshA* 基因双酶切产物 1% 琼脂糖凝胶电泳



注:1、2 泳道:菌液超声破碎离心后的上清和沉淀;3 泳道:蛋白分子标准

图 3 重组 MSHA 蛋白的 12% SDS-PAGE 鉴定



注:1 泳道:纯化后重组 MSHA 蛋白;2 泳道:蛋白分子标准

图 4 重组 MSHA 蛋白纯化后 12% SDS-PAGE



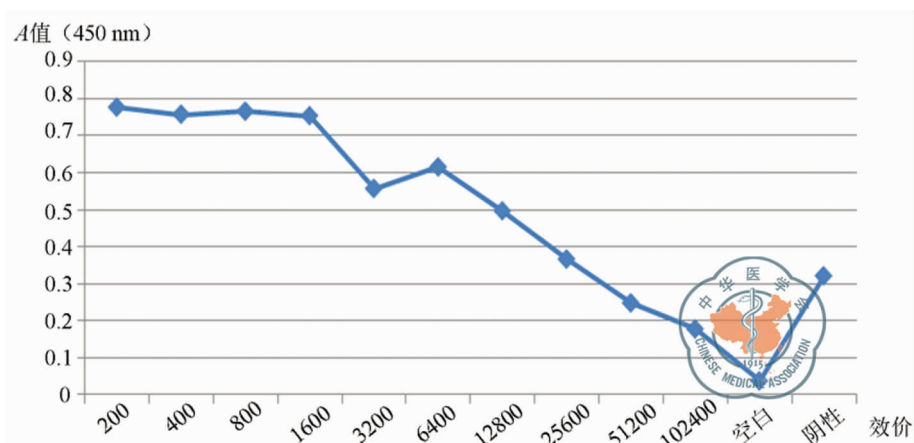
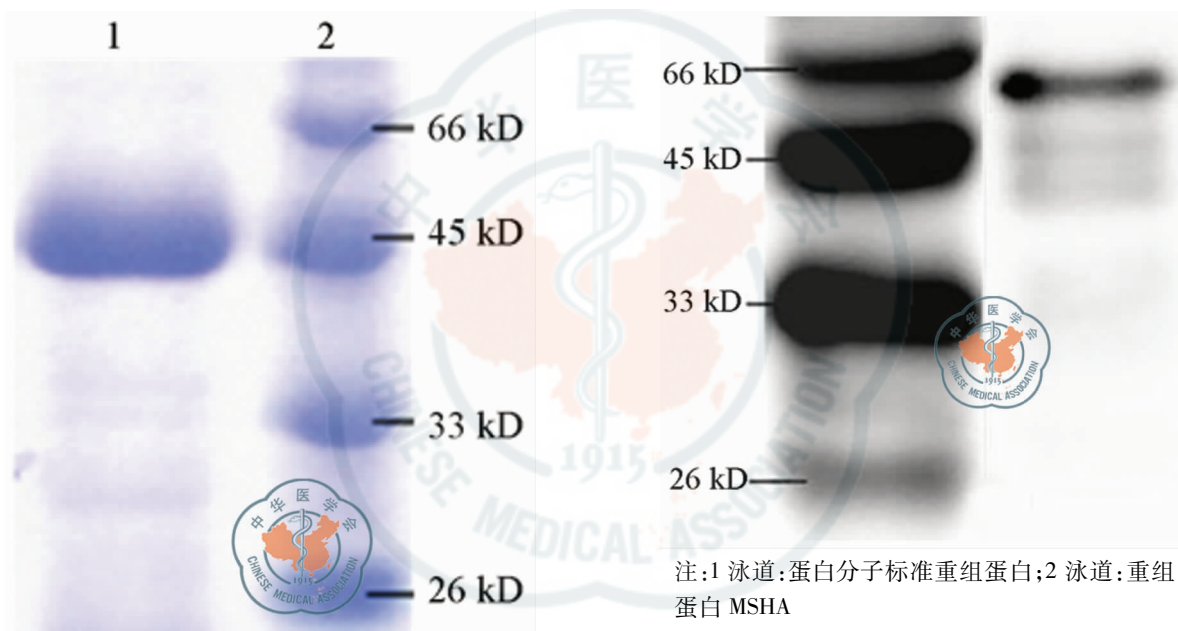


图 5 重组 MSHA 蛋白兔抗血清的效价测定

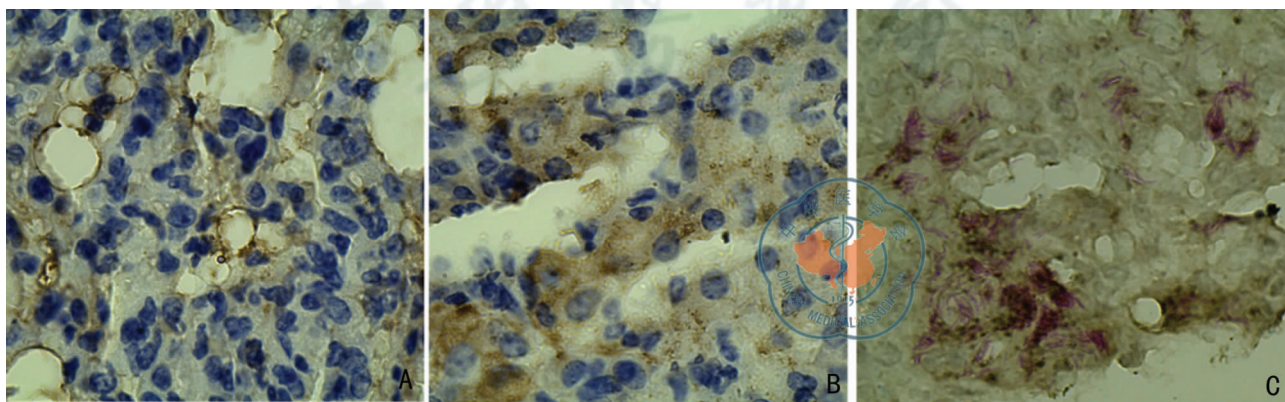


注:1 泳道:多克隆抗体;2 泳道:蛋白分子标准

图 6 SDS-PAGE 电泳检测抗体纯度

注:1 泳道:蛋白分子标准重组蛋白;2 泳道:重组蛋白 MSHA

图 7 多克隆抗体与重组蛋白 MSHA 的 Western blot 检测



注:A:阴性对照;PBS 代替一抗;B:实验样本,MSHA 多克隆抗体为益康;C:萆-尼氏抗酸染色;紫红色部位为结核分枝杆菌

图 8 感染结核分枝杆菌的小鼠肺组织切片免疫组织化学(1000 ×)

## 讨 论

结核分枝杆菌从侵入宿主到最终致病是一个复杂的动态过程,菌体为适应体内复杂的环境,抵御人体免疫系统的攻击,从而得以生存和繁殖,会启动一系列基因的表达,这些基因被称为体内诱导基因,其表达的抗原即为体内诱导抗原。这些基因无疑和细菌的繁殖及致病密切相关,因而有可能作为诊断,疫苗及药物研发的候选分子靶位。筛选体内诱导基因的方法有体内表达技术(in vivo expression technology, IVET)、信号标签诱变(signature-tagged mutagenesis, STM)、差异荧光诱导(differential fluorescence induction, DFI)和 IVIAT 等,其中 IVIAT 技术不依赖于动物模型、摆脱了动物模型数据拓展到人体上存在差异的问题,能直接获得病原体真实进入人体后特异表达的基因,故近年来备受研究者的青睐<sup>[4-8]</sup>。本实验室曾采用此方法筛选出部分结核分枝杆菌进入人体后特异表达的基因<sup>[2]</sup>。

*mshA* (Rv0486) 基因为本实验室筛选到的结核分枝杆菌体内诱导基因之一,其编码产物是糖基转移酶 MSHA,主要参与分枝硫醇(MSH, mycothiol, acetyl-Cys-GlcN-Ins)合成的第一步。分枝硫醇是分枝杆菌和其他多数放线菌中主要的低分子量硫醇,具有重要的抗氧化和解毒的功能<sup>[9]</sup>,而 MSH 合成所需的酶类在人体内是缺失的,因此 MSH 合成的关键酶有可能成为新的药物靶位<sup>[10]</sup>。目前 MSH 合成的生化途径已经阐明,至少涉及 4 个酶(*mshA*、*mshB*、*mshC* 和 *mshD*)<sup>[11]</sup>,但这些编码基因是否为结核分枝杆菌必需基因,现有的研究报道并不一致。初期研究表明,MSH 对于结核分枝杆菌的生长是必需的<sup>[12]</sup>,其合成所需的 *mshA*<sup>[13]</sup> 和 *mshC*<sup>[12,14]</sup> 为必需基因,而 *mshB*<sup>[15]</sup> 和 *mshD*<sup>[14,16]</sup> 则为非必需基因。但之后有研究证实,MSH 对于结核分枝杆菌在体内及体外的生长并非必需,通过构建可以得到 *mshA* 缺失突变株,该突变株的特点是生长需要过氧化氢酶,并且菌株对乙硫异烟胺发生耐药,这也提出了一个结核分枝杆菌对乙硫异烟胺耐药的另一个新机制<sup>[17]</sup>。

本研究对 MSHA 重组蛋白进行了表达及镍柱纯化,SDS-PAGE 电泳分析可见单一条带位于 57 kD 处,与预期重组蛋白分子量一致。将该蛋白免疫新西兰大白兔,能够获得相应的多克隆抗体,将该抗体纯化后进行免疫印记分析,发现此多克隆抗体可以与重组蛋白发生免疫反应,提示此重组蛋白有良好的免疫原性和免疫反应性。

本实验制备了感染结核分枝杆菌的小鼠肺组织

切片,用此多克隆抗体检测结核分枝杆菌的 MSHA 抗原,与不含多克隆抗体的阴性对照组比较,发现部分巨噬细胞和细胞外有较多棕色颗粒沉积,萋-尼抗酸染色也证实深棕色沉淀处有大量的结核分枝杆菌,提示制备的 MSHA 多克隆抗体可与肺组织内结核分枝杆菌表达的 MSHA 抗原结合。但由于结核分枝杆菌菌体很小,需提高分辨率利用免疫电镜等方法才能确定其结合的具体部位。本研究证实了 MSHA 蛋白具有良好的免疫原性和免疫反应性,感染结核分枝杆菌的小鼠肺组织内有 MSHA 蛋白的表达,并且能与所制备的 MSHA 多克隆抗体相结合。MSHA 蛋白有可能作为结核病诊断的特异性候选抗原。

## 参 考 文 献

- 1 World Health Organization. Global tuberculosis report 2012. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html).
- 2 张宗德,李自慧,杜博平,等. 结核杆菌体内诱导基因的筛选及初步分析. 中华医学杂志,2008,88(3):189-193.
- 3 Davies AP, Dhillon AP, Young M, et al. Resuscitation-promoting factors are expressed in Mycobacterium tuberculosis-infected human tissue. Tuberculosis (Edinb), 2008,88(5):462-468.
- 4 Handfield M, Brady LJ, Progulsk-Fox A, et al. IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections. Trends Microbiol, 2000,8(7):336-339.
- 5 Vigil PD, Alteri CJ, Mobley HL. Identification of in vivo-induced antigens including an RTX family exoprotein required for uropathogenic Escherichia coli virulence. Infect Immun, 2011,79(6):2335-2344.
- 6 Lowry JE, Goodridge L, Vernati G, et al. Identification of Brucella abortus genes in elk (Cervus elaphus) using in vivo-induced antigen technology (IVIAT) reveals novel markers of infection. Vet Microbiol, 2010,142(3-4):367-372.
- 7 Lee HR, Rhyu IC, Kim HD, et al. In-vivo-induced antigenic determinants of Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum. Mol Oral Microbiol, 2011,26(2):164-172.
- 8 Zou YX, Mo ZL, Hao B, et al. Screening of genes expressed in vivo after infection by Vibrio anguillarum M3. Lett Appl Microbiol, 2010,51(5):564-569.
- 9 Buchmeier N, Fahey RC. The msh A gene encoding the glycosyltransferase of mycothiol biosynthesis is essential in Mycobacterium tuberculosis Erdman. FEMS Microbiol Lett, 2006,264(1):74-79.
- 10 Carthy AA, Peterson NA, Knijff R, et al. Crystal structure of MshB from Mycobacterium tuberculosis, a deacetylase involved in mycothiol biosynthesis. J Mol Biol, 2004,335(4):1131-1141.
- 11 Newton GL, Ta P, Bzymek KP, et al. Biochemistry of the initial steps of mycothiol biosynthesis. J Biol Chem, 2006,281(45):33910-33920.
- 12 Sareen D, Newton GL, Fahey RC, et al. Mycothiol is essential for growth of Mycobacterium tuberculosis Erdman. J Bacteriol, 2003,185(22):6736-6740.

- 13 Buchmeier N, Fahey RC. The *mshA* gene encoding the glycosyltransferase of mycothiol biosynthesis is essential in *Mycobacterium tuberculosis* Erdman. FEMS Microbiol Lett, 2006, 264(1):74-79.
  - 14 Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol Microbiol, 2003, 48(1):77-84.
  - 15 Buchmeier NA, Newton GL, Koledin T, et al. Association of mycothiol with protection of *Mycobacterium tuberculosis* from toxic oxidants and antibiotics. Mol Microbiol, 2003, 47(6):1723-1732.
  - 16 Buchmeier NA, Newton GL, Fahey RC. A mycothiol synthase mutant of *Mycobacterium tuberculosis* has an altered thiol-disulfide content and limited tolerance to stress. J Bacteriol, 2006, 188(17):6245-6252.
  - 17 Vilchèze C, Av-Gay Y, Attarian R, et al. Mycothiol biosynthesis is essential for ethionamide susceptibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2008, 69(5):1316-1329.
- (收稿日期:2012-10-07)  
(本文编辑:孙荣华)

李自慧,杜博平,贾红彦,等. 结核分枝杆菌体内特异表达基因 *mshA* 的克隆表达及免疫组织化学分析 [J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版, 2013, 7(1):5-10.

