

• 基础论著 •

## 结核分枝杆菌抗原 ESAT-6 和 CFP-10 及 rCFP10-ESAT6 融合基因在大肠埃希菌中的表达及比较

张斌 伦文辉 成军 赵龙凤 毛羽 李兴旺 王琦 梁赞磊 向天新

**【摘要】 目的** 构建结核早期分泌抗原靶分子(ESAT-6)、培养滤液蛋白 10(CFP-10)及重组 CFP10-ESAT6(rCFP10-ESAT6)融合蛋白的原核表达载体,获得纯化蛋白并比较三者表达特点。**方法** 应用聚合酶链反应(PCR)技术,扩增 ESAT-6、CFP-10 基因片段,融合 PCR 技术扩增 rCFP10-ESAT6 片段,分别连接到 pGEM-T 载体,测序正确后插入原核表达载体 pET-32a(+ )或 pET-28a(+ )中,转化大肠埃希菌 BL21(DE3),IPTG 诱导表达,亲和层析法纯化 3 种蛋白;十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、Western blot 分析验证目的蛋白的抗原特异性。**结果** pET-32a(+ )-ESAT6 融合蛋白以包涵体形式表达,分子量为 31 kD,目的蛋白约占菌体总蛋白的 42%;pET-32a(+ )-CFP10、pET-28a(+ )-CFP10-ESAT6 重组蛋白以可溶性形式表达,分子量分别为 33 kD 和 28 kD,目的蛋白分别占菌体总蛋白的 73% 和 48%;Western blot 证实其均具有良好的抗原性。亲和层析法获得了纯度较高的重组蛋白。**结论** 利用大肠埃希菌 BL21(DE3)成功表达了具有良好抗原性的 ESAT-6、CFP-10 融合蛋白及 rCFP10-ESAT6 重组蛋白,为深入研究其免疫原性和生物学特性奠定了基础。

**【关键词】** 结核抗原;早期分泌抗原靶分子;培养滤液蛋白 10;原核表达

### Prokaryotic expression and bioinformatics comparison of tuberculosis antigen ESAT - 6 and CFP - 10 recombinant protein and rCFP 10 - ESAT 6 fusion protein

ZHANG Bin, LUN Wen-hui, CHENG Jun, ZHAO Long-feng, MAO Yu, LI Xing-wang, WANG Qi, LIANG Yun-lei, XIANG Tian-xin. Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Beijing 100011, China

Corresponding author: LUN Wen-hui, Email: lunwenhui@163.com

**【Abstract】 Objective** To construct prokaryotic expression vector of ESAT-6, CFP-10 and rCFP 10-ESAT6 gene, then obtain recombinant protein and compare their expression characteristics. **Methods** ESAT-6, CFP-10 and rCFP10-ESAT6 genes were ligated into pGEM-T cloning vector. After inserted fragments were sequenced,

作者单位:100011 北京市,北京大学北京地坛医院传染病研究所(张斌、成军、王琦、梁赞磊、向天新);北京大学北京地坛医院(伦文辉、毛羽、李兴旺);山西医科大学第一临床医院感染病科(张斌、赵龙凤)

通讯作者:伦文辉 Email: lunwenhui@163.com

the three genes were cloned into inducible prokaryotic expression vector pET-32a (+)/28a(+) and transfected into *E. coli* BL21(DE3). After IPTG induction, the product were verified with sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Western blot was carried out to verify the antigenicity of the three proteins. **Results** The ESAT-6 recombinant protein existed in inclusion body and accounted for 42% in total bacterial protein of *E. coli* and the molecular weight is 31 kD; while the CFP-10, rCFP10-ESAT6 fusion proteins existed in soluble form and account for 73% and 48% in total bacterial protein, the molecular weight is 33 kD and 28 kD, respectively. Western blot confirmed all the three recombinant proteins have high antigenicity. Highly purified proteins were obtained through affinity chromatograph purification. **Conclusions** The recombinant ESAT-6, CFP-10 and rCFP10-ESAT6 genes can be expressed in prokaryotic expression system of *E. coli* successfully and recombinant proteins with high antigenicity were obtained, which will set foundation for further study on their immunogenicity and bioinformatics.

**【Key words】** Tuberculosis antigen; ESAT-6; CFP-10; Prokaryotic expression

结核病是世界上主要的传染病之一。近10年结核分枝杆菌感染有抬头之势,全球60亿人口中约有20亿人感染过结核分枝杆菌,有2000万人为结核患者。现在每年仍有800万~1000万新结核病例出现<sup>[1]</sup>。2000年全国结核病流行病学调查显示,我国目前结核感染率为44.5%,约6亿人口,每年因结核病死亡的人数已达13万。结核病再度成为危及人类健康和生命的主要传染病之一,对结核分枝杆菌的研究也成为全球研究的热点,而结核分枝杆菌相关特异性抗原的研究更是焦点之一。20世纪90年代末,学者们将结核分枝杆菌基因组与卡介苗(BCG)的基因序列进行比较,发现了一个仅存在于致病性分枝杆菌包括人型结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌及某些非典型分枝杆菌,但不存在于BCG及其他非致病性分枝杆菌中的RD1区<sup>[2,3]</sup>。自Andersen等<sup>[4]</sup>研究发现早期分泌抗原靶分子(early secretory antigenic target, ESAT-6),培养滤液蛋白10(culture filter protein 10, CFP-10)以来,人们认为此为结核病免疫学诊断中两个很有前景的抗原,这两个抗原均由RD1区编码。Dillon等<sup>[5,6]</sup>研究发现:编码CFP-10的基因RV3874的3'-端位于ESAT-6基因RV3875上游34 bp处,两个基因40%的同源性,它们由一个启动子和操纵子调控,同时进行转录。有学者<sup>[7]</sup>为提高诊断效率,以ESAT-6和CFP-10的混合抗原来诊断结核病并得出结论:混合抗原较单抗原的检出敏感度增加,且不会降低其特异性。本文通过在大肠埃希菌中克隆并表达结核分枝杆菌ESAT-6、CFP-10基因及rCFP10-ESAT6融合基因,获得3种特异性蛋白进而获得结核临床诊断抗原,为发展新型结核病疫苗、临床血清学检测及艾滋病合并结核感染的诊断研究奠定了实验基础。

## 材料与方法

### 一、主要材料和试剂

结核分枝杆菌(HR37v)的全基因组由北京市胸科医院张教授惠赠;大肠埃希菌 DH5 $\alpha$ 、BL21 为本实验室保存;抗-His 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自 NEB 公司;化学发光底物购自 Pierce 公司;Amersham Biosciences 蛋白纯化仪(型号 AKTA purifier 100),其余化学试剂均为国产试剂。引物合成及 DNA 测序由北京奥科生物公司完成。

### 二、方法

1. 目的基因的扩增:ESAT6、CFP10 基因及 rCFP10-ESAT6 融合基因在 Gen-Bank 中的基因序列号、扩增编码区的引物序列及酶切位点和 PCR 扩增条件见表 1 和表 2。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果,切胶玻璃奶法纯化回收。

表 1 ESAT6、CFP10 基因及 rCFP10-ESAT6 融合基因 GenBank 号及引物序列

基因	GenBank 号	P1	P2
ESAT-6	DQ451157	5'-GCGGATCC ATGACAGAG CAGCAGTGGAA TTTCG-3'	5'-GCGCCTCG AGCTATGCCA ACATCCCAGTGACGTTG-3'
CFP-10	AF419854	5'-CCGGATCC ATGGCAGAGA TGAAGAC-3'	5'-CCAAGCTT TCAGAAGCC CATTTCG-3'
rCFP10-ESAT6	-	5'-CCGGATCC ATGGCAGAGA TGAAGAC-3'	5'-GCTGCCGCCACCGCGCT TCCGCCACCGCGCTTC ACCGCCACCGAAGCCCAT TTCCGAGCACGCGCT-3'

基因	P3	P4	酶切位点
ESAT-6	-	-	Bam H I / Xho I
CFP-10	-	-	Bam H I / Hind III
rCFP10-ESAT6	5'-GGTGGCGGTGGAAGCGCGGT GGCGGAAGCGCGGTGCGCGCA GCATGACAGACGACGAGTGAAT TTCGCGG-3'	5'-CCAAGCTTCTATGCGAACATCC CACTGA-3'	Bam H I / Hind III

注:横线标记序列为相应的酶切位点

表 2 ESAT6、CFP10 基因及 rCFP10-ESAT6 融合基因 PCR 扩增条件

基因	模板	引物	扩增条件					
			预变性	变性	退火	延伸	延伸 A 尾	循环数
ESAT-6	HR37V	P1、P2	94℃	94℃	70℃	-	72℃	35
	全基因组 DNA		5 min	30 s	50 s	-	10 min	
CFP-10	HR37V	P1、P2	94℃	94℃	64℃	72℃	72℃	35
	全基因组 DNA		5 min	30 s	45 s	40 s	10 min	
	ESAT6 段	P1、P2	94℃	94℃	70℃	70℃	72℃	35
	全基因组 DNA		5 min	1 min	1 min	40 s	1 min	
rCFP10-ESAT6 的融合 PCR 条件	CFP10 段	P3、P4	94℃	94℃	65℃	72℃	72℃	35
	全基因组 DNA		5 min	1 min	1 min	40 s	1 min	
	最后融合	P1、P4	94℃	94℃	68℃	72℃	72℃	35
	全基因组 DNA		5 min	1 min	30 s	40 s	10 min	

2. 重组表达载体的构建:将纯化回收的3个目的基因片段分别与 pGEM-T 载体 16℃ 条件下 T4 DNA 连接酶连接过夜,转化大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞,铺于含氨苄青霉素的 LB/IPTG/X-Gal 的培养平板上,37℃ 孵育 16 h。挑取白色菌落行菌落 PCR 检测,阳性菌落增菌,应用碱裂解法提取质粒 DNA 后进行相应的双酶切鉴定,验证目的基因片段已插入 pGEM-T 载体中后,送奥科公司测序。测序正确后玻璃奶法纯化回收双酶切后目的片段,与经相应酶切的 pET-32a(+)/pET-28a(+ )表达质粒连接,转化表达菌株大肠埃希菌 BL21,铺于含有氨苄青霉素(ESAT-6、CFP-10)、卡那霉素(rCFP10-ESAT6)的 LB 培养平板上 37℃ 孵育 16 h,行菌落 PCR 鉴定,阳性菌落增菌,碱裂解法提取质粒 DNA 后进行酶切鉴定,奥科公司测序鉴定。

3. 重组蛋白的诱导表达:分别挑取单个阳性菌落及 pET-32a(+ )或 pET-28a(+ )空载体接种于含有氨苄青霉素、卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 培养过夜;次日按 1:100 扩大培养,37℃ 培养至菌密度为  $A_{600}=0.6$  时,加入 IPTG 至终浓度为 1 mmol/L,继续 37℃ 培养 2 h、4 h、5 h、6 h 及过夜诱导,次日离心集菌,100  $\mu$ l 1 mol/L Tris-HCl(pH 6.8)悬浮沉淀,加 100  $\mu$ l 2  $\times$  SDS 凝胶上样缓冲液及 5  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇,煮沸 10 min,离心后取 20  $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 分析。

4. 重组蛋白的抗原性检测(Western blot):His 单克隆抗体与羊抗鼠 HRP-IgG 按 1:200、1:2500 分别稀释作为第一抗体、第二抗体。SDS-PAGE 凝胶转膜,5% 脱脂奶粉封闭过夜,分别经第一抗体、第二抗体孵育,ECL 化学发光显色;结核病患者血清按 1:200(CFP-10 的最佳稀释度),1:400(ESAT-6、rCFP10-ESAT6 的最佳稀释度)与羊抗人 HRP-IgG 1:2500 分别稀释作为第一抗体、第二抗体,正常人血清以相同的稀释度作为对照。SDS-PAGE 凝胶转膜,5% 脱脂奶粉封闭过夜,分别经第一抗体、第二抗体孵育,ECL 化学发光显色。

5. 重组蛋白表达形式和溶解性分析及大量获得:(1)ESAT-6 重组蛋白:大量诱导表达 ESAT-6 重组蛋白,将离心所得菌体反复冻融 4 次,称重后每克湿菌体加入 10 ml 超声缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、5 mmol/L EDTA);混匀置冰上超声破碎菌体,取 1 ml 破碎菌液 4℃ 分离上清、沉淀,常规制样后取 15  $\mu$ l 进行 SDS-PAGE 分析;离心收集超声裂解产物的沉淀部分后配制尿素浓度分别为 0.5 mol/L、1 mol/L、2 mol/L、3 mol/L 的包涵体洗液(其余成分为 20 mmol/L Tris-HCl pH 8.0、5 mmol/L EDTA、100 mmol/L NaCl、1% Triton),探索最佳洗液条件并依此条件洗涤沉淀 3 次;收集洗涤后的包涵体以 A 液(8 mol/L 尿素、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L PB、20 mmol/L 咪唑)充分溶解(置摇床低速转摇助溶);离心收集上清,经 0.45  $\mu$ m 滤膜滤过后进行复性和纯化,具体步骤如下:样品加入经 A 液洗涤的亲和层析柱,用 B 液(20 mmol/L 咪唑、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L PB)逐渐按线性梯度降低尿素浓度至零进行蛋白柱上复性(共 40 ml 复性液,流速为 5 ml/min),最后以 20 ~ 500 mmol/L 的咪唑线性梯度洗脱已经复性的融合蛋白,分别收集洗脱峰,得到融合蛋白纯品。纯化的蛋白后以 SDS-PAGE 和软件分析其纯



度,用BCA法测定其浓度;(2)CFP-10重组蛋白、rCFP10-ESAT6融合蛋白:收集菌体反复冻融4次,称重后每克菌体中加入10 ml D液(0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L PB)充分溶解菌体;混匀置冰上,用超声法破碎菌体,以SDS-PAGE分析重组蛋白的表达形式;收集超声裂解产物的上清部分,经0.22  $\mu$ m滤膜滤过后进行纯化,具体步骤如下:样品加入经B液洗涤的亲和层析柱,然后用C液(500 mmol/L 咪唑、0.5 mol/L NaCl、20 mmol/L PB)以20~500 mmol/L的咪唑线性梯度洗脱柱上结合的融合蛋白,分别收集洗脱峰,得到融合蛋白纯品。Amersham Biosciences蛋白纯化仪纯化超声碎菌后上清中的重组蛋白。收集纯化的蛋白后经SDS-PAGE和软件分析其纯度,用BCA法测定其浓度。

## 结 果

### 一、目的基因的扩增

以HR37v全基因组DNA为模板,经过PCR扩增获得预期ESAT-6、CFP10及rCFP10-ESAT6的基因片段,大小分别为288 bp、300 bp、649 bp,且无非特异性扩增现象(图1)。

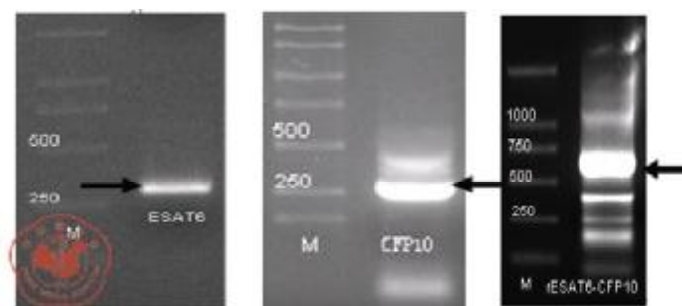


图1 ESAT6、CFP10及rCFP10-ESAT6 PCR扩增结果

M: Marker(100 bp, 250 bp, 500 bp, 750 bp, 1000 bp, 1500 bp, 2000 bp)

### 二、重组表达载体的构建

PCR扩增产物纯化回收后连接pGEM-T载体,经过双酶切和测序鉴定后,插入到相应酶切的pET-32a(+)/pET-28a(+ )中,经酶切鉴定表明重组表达载体pET-32a(+)-ESAT-6、pET-32a(+)-CFP-10及pET-28a(+)-rCFP10-ESAT6构建成功,奥科公司测序结果正确。

### 三、重组蛋白的表达

1. 不同诱导时间重组蛋白的表达:以1 mmol/L IPTG分别诱导3种重组蛋白表达,检测2 h、4 h、5 h、6 h及过夜诱导蛋白的表达水平并行SDS-PAGE分析。结果在37℃下,未诱导组无明显表达,而诱导组表达明显,且重组质粒pET-32a(+)-ESAT-6、pET-32a(+)-CFP-10及pET-28a(+)-rCFP10-ESAT6转化BL21分别于2 h、5 h和5 h表达量最高(图2)。

2. 不同IPTG浓度诱导重组蛋白的表达:在37℃下,用浓度分别为0.1

mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L 和 2.0 mmol/L 的 IPTG 诱导重组蛋白表达,分别检测 2 h 或 5 h 蛋白的表达水平,进行 SDS-PAGE 分析。结果显示在 37℃ 下,重组质粒 pET-32a(+)-ESAT-6 转化的 BL21 不同浓度 IPTG 诱导 2 h 后蛋白表达量无明显差别,而重组质粒 pET-32a(+)-CFP-10 和 pET-28a(+)-rCFP10-ESAT6 转化的 BL21 分别在 IPTG 浓度为 0.1 mol/L 和 1.0 mol/L 时诱导 5 h 后蛋白表达量最大(图 3)。

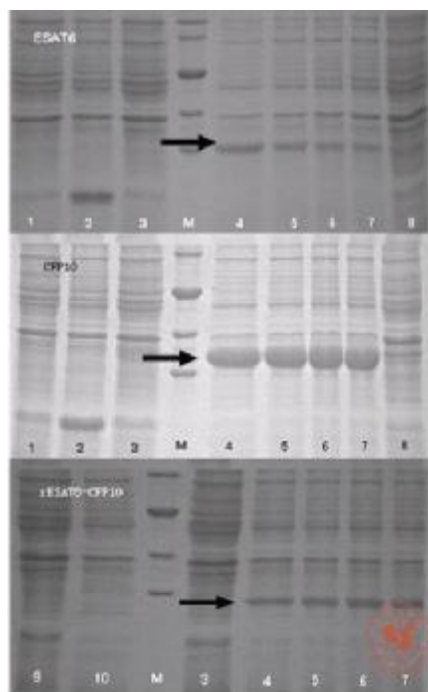


图2 ESAT-6、CFP-10 及 rCFP10-ESAT6 重组蛋白 37℃ 不同诱导时间的表达

注:1: BL21 空菌;2: 转化 pET-32a(+ )空载体的 BL21 菌;3: 转化了重组质粒未诱导的 BL21 菌;M: 标准蛋白 Marker(由下上为 25 kD、35 kD、50 kD、75 kD、100 kD);4、5、6、7、8 分别为转化了重组质粒的 BL21 在 37℃ 下诱导 2 h、4 h、5 h、6 h 及夜诱导蛋白的表达;9: 转化 pET-28a(+ )空载体经诱导的 BL21 菌;10: 转化了 pET-28a(+ )空载体未经诱导的 BL21 菌

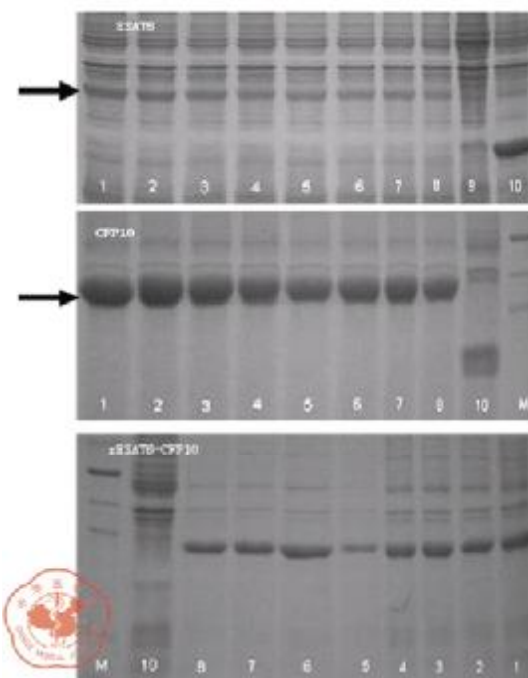


图3 不同 IPTG 诱导浓度下 ESAT-6、CFP-10 及 rCFP10-ESAT6 重组蛋白的表达

注:1~8 为转化了重组质粒的 BL21 于 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.4 mmol/L、0.6 mmol/L、0.8 mmol/L、1.0 mmol/L、1.5 mmol/L、2.0 mmol/L 的 IPTG 诱导下蛋白表达;9: 转化了 pET-32a(+ )或 pET-28a(+ )空载体的 BL21 的诱导表达;M 为标准蛋白 Marker(从下往上为 25 kD、35 kD、50 kD、75 kD、100 kD)

#### 四、Western blot 结果

1. 以 pET-32a(+ )或 pET-28a(+ )空载体表达的含 His 的标签蛋白做为阳性对照,最适 IPTG 浓度诱导组获得大小约 21 kD 的目的蛋白,未诱导组为阴性;pET-32a(+ )-ESAT-6、pET-32a(+ )-CFP-10 及 pET-28a(+ )-rCFP10-ESAT6 组获得了 31 kD、33 kD 重组蛋白及 28 kD 的融合蛋白,与预期蛋白分子量大小相符,未诱导组为阴性;BL21 空菌组无目的蛋白,阴性对照良好(图 4)。

2. 正常人血清最佳稀释后作为阴性对照,结核病患者血清最佳稀释后作为一抗,最适 IPTG 浓度诱导的重组蛋白 Western blot 结果表明 pET-32a(+)-ESAT-6、pET-32a(+)-CFP-10 及 pET-28a(+)-rCFP10-ESAT6 组获得了 31 kD、33 kD 重组蛋白及 28 kD 的融合蛋白,与预期蛋白分子量大小相符,正常血清组均为阴性(图 5)。

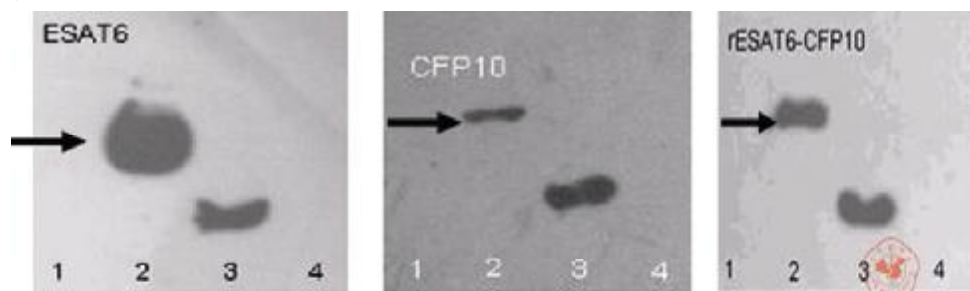


图 4 抗-His 抗体对 ESAT-6、CFP-10 及 rCFP10-ESAT6 重组蛋白的 Western blot 鉴定  
注:1,2 分别为未诱导和诱导的转化了重组质粒的 BL21 菌;3,4 分别为诱导和未诱导的 pET-32a(+ )空载体表达的 His 蛋白

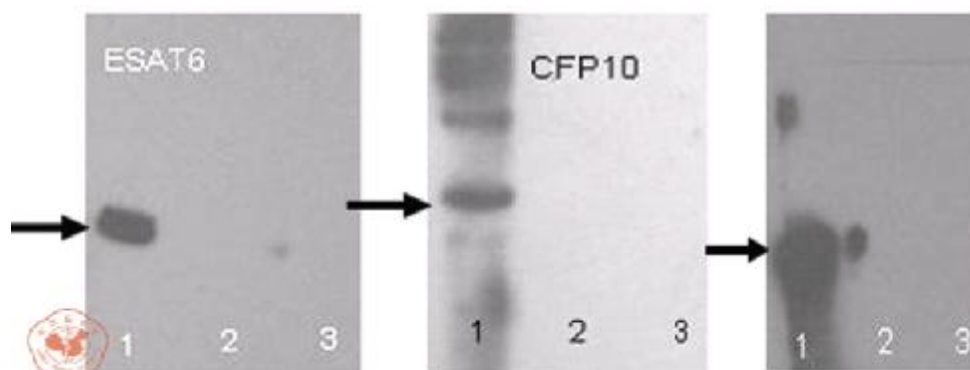


图 5 ESAT-6、CFP-10 及 rCFP10-ESAT6 的血清 Western blot 鉴定  
注:1,2 分别为未诱导和诱导的转化了重组质粒的 BL21 菌;3 正常人血清的阴性对照

## 五、表达形式和溶解性分析

诱导菌经超声破碎后取上清和沉淀处理液分别进行 SDS-PAGE 电泳,结果显示: ESAT-6 重组蛋白电泳后沉淀部分可见大量特异性蛋白表达带,而 CFP-10 重组蛋白和 rCFP10-ESAT6 融合蛋白沉淀部分只见极少量的特异性蛋白表达带,相反其上清液部分电泳后可见明显的特异性蛋白表达带,说明 ESAT-6 重组蛋白大多以细胞内不可溶性的包涵体形式存在,而 CFP-10 和 rCFP10-ESAT6 重组蛋白大多以可溶性非包涵体形式存在于胞质中(图 6)。

## 七、重组蛋白纯化和浓缩

诱导菌超声破碎离心后的上清液或 A 液(8 mmol/L 尿素)溶解包涵体后的溶解液过滤后用蛋白纯化仪纯化,用洗脱液洗脱吸附在 Ni-NTA 树脂上的蛋白,出现单峰后收集并经 SDS-PAGE 和软件分析,结果表明其纯度均大于 90%。以

10 kD 超滤浓缩柱(centrifugal filter devices)浓缩蛋白并用 PBS 置换缓冲液,以 BCA 法测定得到 ESAT-6、CFP-10 及 rCFP10-ESAT6 重组蛋白浓度分别为 26.57 mg/L、20.45 mg/L 和 22.34 mg/L(图 7)。

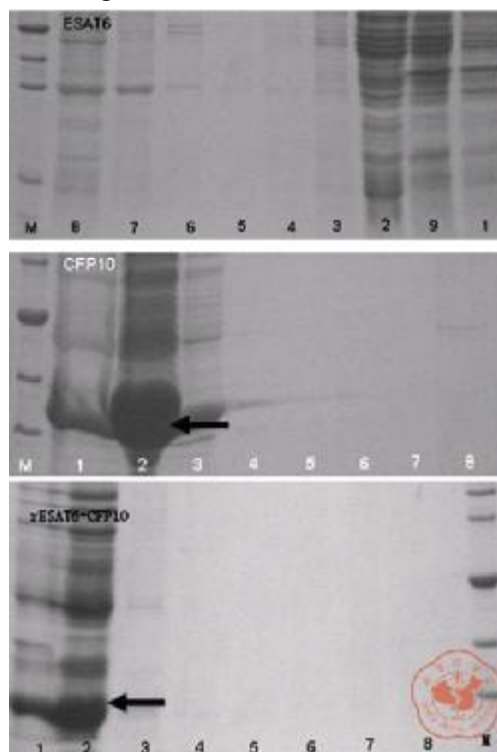


图 6 ESAT6、CFP10 重组蛋白及 rCFP10-ESAT6 融合蛋白表达形式分析

注: M: 标准蛋白 Marker(由下至上依次为 25 kD, 35 kD, 50 kD, 75 kD, 100 kD); 1: 重组质粒转化 BL21 大量诱导菌液; 2: 重组质粒转化 BL21 大量诱导超声裂解上清液; 3, 4, 5 分别为重组质粒转化 BL21 大量诱导超声裂解沉淀于第 1 次, 第 2 次, 第 3 次洗涤液洗涤后离心上清; 6, 7 分别为第 3 次洗涤液洗涤沉淀之后于第 1 次, 第 2 次 ddH<sub>2</sub>O 洗涤后离心上清; 8: A 液(8 mol/L 尿素)第 2 次溶解 ddH<sub>2</sub>O 洗涤后沉淀; 9: 未诱导的重组质粒转化 BL21

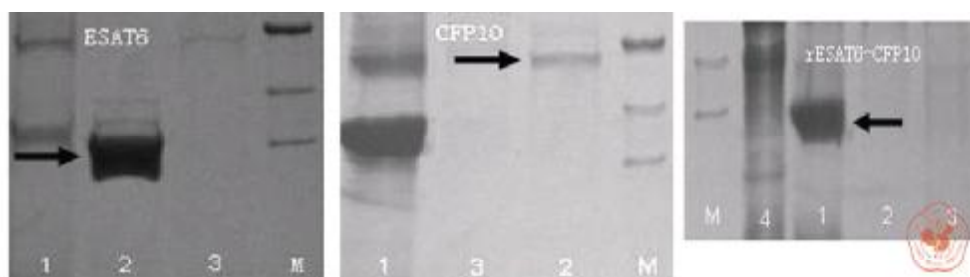


图 7 ESAT6、CFP10 重组蛋白及 rCFP10-ESAT6 融合蛋白表达形式分析

注: M: 标准蛋白 Marker(由下至上依次为 25 kD, 35 kD, 50 kD); 1: 重组质粒转化 BL21 大量诱导处理后上柱前样本; 2: 重组蛋白上柱纯化收集的洗脱峰样本; 3: 重组蛋白上柱纯化收集的穿透液; 4: 未诱导的重组表达菌



## 讨 论

结核病感染高危人群在我国的流动性增加、结核分枝杆菌变异菌株和耐药菌株的出现、人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的流行、以及目前人们对于结核分枝杆菌感染回升尚未给予足够的重视等原因,导致目前结核分枝杆菌感染在全国乃至全球范围内呈日益严重趋势<sup>[8]</sup>,因此,找到一种简便、快捷、灵敏度和特异度都很高的诊断方法已迫在眉睫。

目前,皮下注射结核菌素的纯化蛋白衍生物(purified protein derivative, PPD)是临床和科研中广泛采用的一种测定个体对分枝杆菌抗原是否具有免疫反应的方法。但由于PPD含有多种抗原成分,可被多亚型结核分枝杆菌所共有,包括非致病型结核分枝杆菌和既往牛型结核分枝杆菌疫苗即卡介苗(BCG)的接种者,因此可能出现交叉反应,降低试验的特异性,而且此试验极易受病人当时免疫状态的影响而出现假阴性和假阳性结果<sup>[9]</sup>。如果人体感染了人类免疫缺陷病毒(HIV),T细胞亚群中CD4<sup>+</sup>T细胞的数量大量减少,被测试者免疫功能急剧下降,导致大多数皮试结果呈假阴性,因此用它筛选和明确是否感染结核分枝杆菌比较困难。而且需要对被测试者进行回访,诊断者参阅其注射部位的结果作出相应的诊断,造成诊断者主观上的差异性和操作不便性,这就更使其在临床上的应用受到挑战。其他的细菌学检查、分子生物学检查、血清学检查等诊断方法亦存在特异性差、灵敏度低、操作复杂、不易标准化、耗时长等缺点<sup>[10]</sup>。

早期分泌抗原靶分子(ESAT-6)和培养滤液蛋白10(CFP-10)是结核分枝杆菌短期培养滤液分泌的两种低分子量的蛋白质,均由RD1区编码,共用一个上游启动子,同时转录表达。编码ESAT-6、CFP-10特异性蛋白的基因只存在于致病型结核分枝杆菌中,所有卡介苗(BCG)和非致病性结核分枝杆菌菌株的基因组中均缺乏此区域<sup>[11]</sup>,因此ESAT-6、CFP-10成为结核分枝杆菌感染诊断中很有前途的两个抗原。

研究发现,用ESAT6、CFP10抗原分别检测结核患者血清中的特异性抗体,虽然在PPD阳性及PPD阴性的健康对照者中均无阳性反应,表明这两种抗原具有较高的特异性,但其灵敏度低<sup>[12,13]</sup>。Van Pinxteren等<sup>[14]</sup>将两者联合使用诊断结核分枝杆菌感染时发现在不降低特异性的基础上,能提高检测的灵敏度,其灵敏度和特异度分别高达73%和93%。

大肠埃希菌是目前应用最广泛的原核表达系统,其表达目的蛋白具有快速、高效及经济等优点<sup>[15]</sup>。pET-32a(+)含有一段辅助蛋白基因,该辅助蛋白包括Trx. Tag、His. Tag和S. Tag有助于提高目的蛋白的表达效率。因此,我们选用pET-32a(+)作为表达载体,并且上游引物中碱基的设计与载体相匹配,表达蛋白时使辅助蛋白融合到目的蛋白的N-端。pET-28a(+)的启动子为T7启动子,有很强的启动转录能力,目的蛋白的表达量也很大,表达量占菌体蛋白的48%。这两种表达载体都携带6×组氨酸,可以通过形成配位键而与亲和层析柱上的二价金属镍离子结合,利于重组蛋白纯化。ESAT-6、CFP10及rCFP10-ESAT6蛋白

分子量均较小,与载体蛋白形成融合蛋白后,稳定性好、表达量高,可以进一步通过纯化的方式得到目的蛋白。

ESAT-6、CFP-10 重组蛋白和 rCFP10-ESAT6 融合蛋白诱导表达时,温度、IPTG 浓度、诱导时间和抗生素浓度等对表达结果均会产生较大影响。一般情况下,提高表达温度、延长表达时间有利于诱导蛋白以包涵体形式表达。本实验通过摸索以上条件,得出最适的表达条件。三种重组质粒转化 BL21 表达菌后,均在 37℃ 条件下表达量最高,但是在 IPTG 浓度、诱导时间上三者尚存在差别:(1) ESAT-6 重组蛋白诱导 2 h 时表达量最高,不同 IPTG 浓度表达量无明显差别;(2) CFP-10 重组蛋白诱导 5 h、IPTG 为 0.1 mol/L 时表达量最高;(3) rEST6-CFP10 融合蛋白在诱导 5 h、IPTG 为 1.0 mol/L 时表达量最大。其中 ESAT-6 重组蛋白大多以细胞内不可溶性的包涵体形式存在,而后两种重组蛋白大多以可溶性形式存在于胞质中。

三种诱导表达的重组蛋白均采用 Amersham Biosciences 蛋白纯化仪进行纯化,处理完毕后均由 5 个柱长体积的蛋白溶解液通过亲和层析柱,由相应的洗脱液洗脱,分别收集洗脱峰,得到重组蛋白的纯品。三者在此过程中又略有差别:(1) ESAT-6 重组蛋白以包涵体形式存在,上柱前用 8 mol/L 尿素溶解,洗脱时首先经过 B 液线性梯度于柱上复性,之后才由洗脱液洗脱已经复性的重组蛋白得到洗脱峰,从而将蛋白纯化;(2) CFP-10、rEST6-CFP10 重组蛋白是以可溶性方式表达,不需要高浓度尿素的溶解,避免了蛋白的变性过程。因此,在其洗脱过程中无需柱上复性,直接一步洗脱即可得到纯化的重组蛋白。对于结合能力较强的重组蛋白,可以选择含有较高咪唑浓度(可达 40 mmol/L)的上柱缓冲液以减少非特异性蛋白的结合,而为了使结合能力较弱的重组蛋白最大限度的与层析柱结合,应选择低咪唑浓度(可达 0)的上柱缓冲液,本研究即合理利用了以上原则并获得了较好的纯化效果。

本研究成功表达了具有良好抗原性的 ESAT-6、CFP-10 融合蛋白及 rCFP10-ESAT6 重组蛋白,为深入研究其免疫原性和生物学特性奠定了基础。

## 参 考 文 献

- 1 李拯民. 艾滋病和结核病. 感染性疾病的进展, 2003, 2: 326.
- 2 Lewis KN, Liao R, Guinn KM, et al. Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis*, 2003, 187: 117-123.
- 3 Gordon SV, Brosch R, Billault A, et al. Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol Microbiol*, 1999, 32: 643-656.
- 4 Andersen P, Heron I. Specificity of a protective memory immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1993, 61: 844-851.
- 5 Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology*, 1998, 144: 3195-3203.
- 6 Dillon DC, Alderson MR, Day CH, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol*, 2000, 38: 3285-3290.
- 7 Van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10.

- Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7:155-160.
- 8 Zhang LX. The general situation of the epidemiology in world of *Mycobacterium tuberculosis*. Chin Prev Med, 2001, 2: 84.
  - 9 Zhou LR. New development of the serologic diagnosis techniques for *Mycobacterium tuberculosis*. Chin J Pract Intern Med, 2005, 25: 269.
  - 10 Wang SM. Pay more attention to laboratory diagnosis of tuberculosis. Chin J Lab Med, 2005, 28: 769-770.
  - 11 Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, et al. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J Bacteriol, 1996, 178: 1274-1282.
  - 12 Brusasca PN, Colangeli R, Lyashchenko KP, et al. Immunological characterization of antigens encoded by the RD1 region of the *Mycobacterium tuberculosis* genome. Scand J Immunol, 2001, 54: 448-452.
  - 13 Dillon DC, Alderson MR, Day CH, et al. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. J Clin Microbiol, 2000, 38: 3285-3290.
  - 14 Van Pinxteren LA, Ravn P, Agger EM, et al. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. Clin Diagn Lab Immunol, 2000, 7: 155-160.
  - 15 Swartz JR. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12: 195-201.

(收稿日期: 2007-12-08)

(本文编辑: 温少芳)

张斌, 伦文辉, 成军, 等. 结核分枝杆菌抗原 ESAT-6 和 CFP-10 及 rCFP10-ESAT6 融合基因在大肠埃希菌中的表达及比较[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2008, 2(1): 33-43.