

牛分枝杆菌哺乳动物细胞侵袭蛋白 4E 的原核表达、纯化及其圆二色谱分析

徐广贤,赵德明*,周向梅,尹晓敏,杨建民

(中国农业大学动物医学院 国家动物传染性海绵状脑病实验室,北京 100094)

摘要: 为了阐明牛分枝杆菌侵入宿主细胞和在肺泡巨噬细胞长期存活的机理,本研究以牛分枝杆菌的 DNA 为模板,通过 PCR 的方法扩增克隆牛分枝杆菌哺乳动物细胞侵袭蛋白 4E(Mammalian cell-entry protein 4E,mce4 E) 基因,将所扩增基因克隆于原核表达载体 pET30a(+) 并进行测序,结果显示该基因与 GenBank 上所公布的牛分枝杆菌和人分枝杆菌 mce4 E 基因同源性为 100%。将重组表达载体转入宿主菌 BL21 进行诱导表达,表达蛋白经 SDS-PAGE 分析和 Western-blotting 免疫印迹鉴定,结果证明目的蛋白获得高效表达,表达量占菌体总量的 53.3%,分子量约为 45 ku;利用 Ni-NTA 琼脂糖柱对表达蛋白进行纯化,纯化率大于 95%;纯化的蛋白经过透析复性、圆二色谱(CD)测定,结果表明重组蛋白为典型的 α 螺旋型结构,经 Jascow32 软件分析计算,mce4E 蛋白含有 39.1%的 α 螺旋,60.9%的无规卷曲,无 β -折叠和转角,为进一步开展牛分枝杆菌致病机理的研究和寻找新的药物作用靶位点奠定了基础。

关键词: 牛分枝杆菌;哺乳动物细胞侵入蛋白;原核表达;圆二色谱(CD)

中图分类号:S852.618

文献标识码:A

文章编号:0366-6964(2007)01-0084-05

Prokaryotic Expression and Purification of Mammalian Cell-entry Proteins 4 E (mce4 E) of *Mycobacterium bovis* and Analysis of Circular Dichroism Spectrum

XU Guang-xian,ZHAO De-ming*,ZHOU Xiang-mei,YIN Xiao-min,YANG Jian-min

(National Animal TSE Laboratory,

College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The genome DNA of *Mycobacterium bovis* (C68-2) was extracted by CTAB method. A pair of primers was designed and synthesized according to the sequences of mammalian cell-entry proteins 4E(mce4 E) gene of *M. bovis* in GenBank. The PCR product was inserted into pGEM-T vector. Then the expression plasmid was constructed by inserting the target gene fragment into pET30a(+) vector. By transforming recombinant pET30a-mce4E into BL21, the mce4E protein of *M. bovis* was expressed in *E. coli*. The expressed truncated His-tagged proteins accumulated in inclusion bodies. Purification was performed on a nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose column, and renaturation was performed by dialysis. Final refolded protein was identified by SDS-PAGE and western blotting assay. The protein conformation was analyzed by circular dichroism (CD) analysis. The content of secondary structure was α -helix (39.1%) and freedom curl (60.9%), without β -sheet and turn. Our research give some new insights into the pathology for mammali-

收稿日期:2006-04-04

基金项目:973 项目(2005CB523000)

作者简介:徐广贤(1973-),男,宁夏盐池人,兽医师,博士生,主要从事病原微生物分子免疫学与病理学的研究,E-mail: guangxianxu2004@yahoo.com.cn

* 通讯作者:赵德明,男,教授,博士生导师,E-mail: zhaodm@cau.edu.cn; Tel/Fax: 010-62732975

an, and provide good approach for further research for the target site of medicine action.

Key words: *Mycobacterium bovis*; mammalian cell-entry proteins 4 E (mce4 E); prokaryotic expression; circular dichroism (CD)

牛结核病(Bovine tuberculosis)主要是由牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)引起的一种慢性、消耗性人兽共患传染病。目前全国有活动性肺结核患者约 450 万人,每年新发现活动性肺结核患者约 145 万人,每年约有 13 万人死于结核病,其中 15% 左右的人是因感染牛分枝杆菌引起的。我国牛结核病的发病率呈现上升趋势,一些省区阳性率已达到 10%^[1];目前发现很多野生动物(如獾、水牛、狮子、羚羊、白尾鹿等)都能感染牛分枝杆菌,这对控制和根除牛结核构成严重的威胁^[2]。

结核杆菌 mce4 E 蛋白是由美国康奈尔大学医学院研究人员发现的哺乳动物细胞侵袭蛋白(Mammalian cell-entry proteins, mce)家族中的成员之一,该家族蛋白质能使分枝杆菌侵入哺乳动物细胞,主要与分枝杆菌进入宿主细胞和在其内部存活有关。分枝杆菌中有 4 个 mce 操纵子(mce1、mce2、mce3、mce4),每个操纵子编码 6 个蛋白,在牛分枝杆菌中没有 mce3 操纵子^[3]。结核分枝杆菌 mce1 A 蛋白能够使无致病性的大肠杆菌(*Escherichia coli*)进入非吞噬细胞^[4],用该蛋白包被的微磁珠能够进入非吞噬性的 HeLa 细胞,并使 HeLa 细胞的细胞膜骨架发生重排^[5,6]。Shimono 等人利用基因敲除技术使 mce1 基因断裂,与野生型毒株比较,重组突变体能够在小鼠体内持续复制和更加迅速地杀死小鼠^[7]。Kumar 等利用 RT-PCR 方法证实,编码 mce1、mce2、mce3、mce4 蛋白均可以在细菌稳定生长期表达,而只有 mce2 编码的蛋白可以在细菌生长的对数期表达^[8]。Andrea 等将结核杆菌的 mce1、mce2、mce3 基因敲除,用构建的突变株感染 BALB/c 小鼠发现结核杆菌的毒力明显降低^[9],并且用缺失 mce2、mce3 操纵子的分枝杆菌突变株免疫 BALB/c 小鼠,保护率比用 BCG 免疫小鼠高^[10]。Ahmad 等研究表明,重组的 Mce3E 蛋白能够与 93% 的结核病人血清发生反应,可以用来诊断自然感染结核病人^[11]。有关 mce4 E 蛋白的研究国内外尚未见报道,利用基因重组技术表达牛分枝杆菌 mce4 E 蛋白,并对该蛋白进行纯化、复性以及对该蛋白进行圆二色谱(CD 谱)测定,从牛分枝杆菌哺乳动物细胞侵袭蛋白的结构着手,以期寻找新

的药物作用靶位点,在蛋白水平上研究侵入宿主细胞和在肺泡巨噬细胞长期存活的机理,为进一步研究牛分枝杆菌致病机理奠定了基础,对研究牛分枝杆菌的演化和致病机理以及控制该病具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 牛分枝杆菌菌株(C68-2)由中国科学院疾病控制中心(CDC)细菌研究所提供。

1.1.2 质粒与宿主菌 PGEM-T easy 载体购自 promega, pET30a(+), DH5 α 和 BL21(DE3)由本实验室保存。

1.1.3 主要试剂及试剂盒 *Sac* I 酶、*Kpn* I 酶、T₄ DNA 连接酶(大连 TAKARA 生物公司), DNA 凝胶回收试剂盒(EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction Kit), 质粒快速提取试剂盒(Plasmid Rapid Isolation Kit, BioDev)(博大泰克), Ni-NTA 琼脂糖纯化柱 Ni-NTA Purification System(Invitrogen)。低分子量蛋白质标准 Mark(上海生物化学研究所), PVDF 转移膜(Gleman), 5KD 超滤浓缩管(MILLIPORE 公司)。

1.2 方法

1.2.1 目的基因的克隆与表达载体的构建 根据 GenBank 中 H37Rv 株和 *Mycobacterium bovis* AF2122/97 株的 mce4 E 基因序列设计一对扩增该成熟蛋白基因的 PCR 引物(由上海生工生物公司合成)。mce4 E-S: 5'-ATATGGTACCGCAGTGCTGACTTATCTTTCGT-3'(划线处为 *Kpn* I 酶切位点)。mce4 E-AS: 5'-TTAAGAGCTCTCA-GAAGTCGTCCCGTTCCGCG-3(划线处为 *Sac* I 酶切位点)。采用 CTAB 方法提取牛分枝杆菌基因组 DNA^[12]。以牛分枝杆菌染色体 DNA 为模板,以 mce4 E-S、mce4 E-AS 为引物,参照 TaKaRa Ex Taq PCR 试剂盒对 mce4 E 成熟蛋白基因进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 50 μ L, 模板 DNA 添加量为 5 μ g。PCR 程序:98 $^{\circ}$ C 热变性 8 min, 加入 Ex Taq 酶;再 94 $^{\circ}$ C 热变性 1 min, 然后 62 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10

min。反应产物经 1% 琼脂糖电泳,用 EZ-10 Spin Column DNA Gel Extraction 试剂盒回收 1 000 bp 左右 DNA 片段后,与 PGEM-T easy 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞;再用 Plasmid Rapid Isolation 试剂盒纯化重组质粒,用 *EcoR* I 酶切鉴定和测序,测序正确后的阳性质粒经 *Sac* I/*Kpn* I 双酶切后,与用经过 *Sac* I/*Kpn* I 双酶切的 pET 30a (+) 连接过夜,转化到 BL21(DE3) 菌株,用合成的 PCR 引物做菌落 PCR,快速筛选克隆,所得克隆经 *Sac* I/*Kpn* I 双酶切及 DNA 测序鉴定。

1.2.2 重组蛋白的表达及纯化 将含有表达载体的宿主菌接种到 LB 液体培养基,待菌生长到 A₆₀₀ 约 0.8 时,加终浓度为 0.2 mmol/L IPTG,26 °C 诱导 6 h 后,取出菌液离心,菌体用裂解缓冲液(50 mmol/L Tris HCl,0.5 mmol/L EDTA,50 mmol/L NaCl,5% 甘油,pH = 8.0)重悬,在冰浴条件下超声破碎,离心,上清和沉淀用 SDS-PAGE 电泳检测。将获得的包涵体蛋白依次用洗涤液 I(含 10 mmol/L Tris HCl,0.2 mol/L 尿素,0.5% Triton X-100,10 mmol/L EDTA,pH = 8.0)和洗涤液 II(10 mmol/L Tris HCl,0.5% Triton X-100,10 mmol/L EDTA,pH = 8.0)洗涤。然后用变性缓冲液(8 mol/L 尿素,0.5 mol/L NaCl,20 mmol/L Tris HCl,pH = 7.8)溶解,离心,取上清,将上清加入经 pH = 7.8 的 8 mol/L 变性缓冲液平衡的 Ni-NTA 琼脂糖柱,4 °C 条件下,结合 30 min,然后依次用 10~20 倍柱床体积的 pH 7.8、pH 6.0、pH 5.3 缓冲液洗涤 Ni-NTA 柱,洗去杂蛋白,最后用 pH 4.0 洗脱缓冲液洗脱含有 His-tag 的重组蛋白,分管收集,洗脱流速控制在 5~7 mL/h。

1.2.3 蛋白质的透析复性 将洗脱的蛋白放入透析袋,依次在加有 8、6、4、2、0 mol/L 尿素的基础缓冲液(50 mmol/L Tris HCl,1 mmol/L EDTA,1 mmol/L GSSG,5 mmol/L GSH,10% 甘油,10 mmol/L PMSF)中进行透析复性,每个浓度在 4 °C 透析 4~8 h,最后在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中透析过夜。

1.2.4 Western-blotting 鉴定 Western-blotting 按文献^[13]所述方法进行,通过电转移将胶中蛋白转到硝酸纤维素薄膜上进行免疫染色,一抗为兔抗牛分枝杆菌阳性血清,二抗采用辣根过氧化物酶

标记的山羊抗兔的抗体。显色剂为 3,3-二氨基联苯胺(DAB)。

1.2.5 mce 4 E 蛋白圆二色谱(CD 谱)测定 重组蛋白经纯化复性后,应用 J-715 圆二色谱仪(JASCO, JAPAN)在 25 °C 恒温下测定纯化蛋白的 CD 谱,波长范围为 190~250 nm,扫描速度 100 nm/min,灵敏度(Sensitivity):20 mdeg,带宽(Band width):1.0 nm,Reference:yang. jsr, Mode: Infinite,单蒸水为空白液,结果用摩尔椭圆度 $[\theta]$ m 表示,单位 deg · cm² · dmol⁻¹。二级结构用 Jascow32 软件分析计算。

2 结果

2.1 目的基因的克隆与表达载体的构建

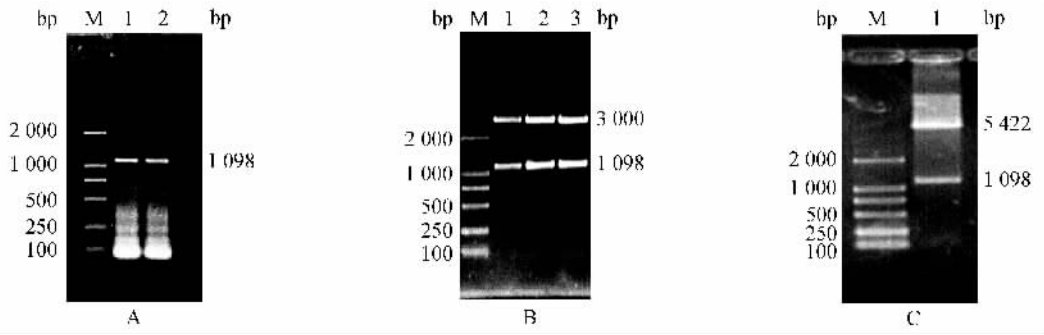
以牛结核杆菌基因组 DNA 为模板,用上、下游引物进行 PCR 扩增,产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,在 1 098 bp 左右处有一特异性条带,将扩增产物回收、纯化、插入 T 载体,经双酶切鉴定和基因测序,并输入 GenBank 进行 blast 比对分析,结果表明克隆的基因是牛分枝杆菌 mce 4 E 的基因,基因全长 1 098 bp,编码 366 个氨基酸,在 345 处含有 1 个糖基化位点。用 *Sac* I 酶、*Kpn* I 酶将插入 T 载体 mce 4 E 基因切下,插入表达载体 pET30a(+),经 PCR、双酶切鉴定,成功构建了 *M. bovis* mce4 E 表达载体。结果如图 1 所示。

2.2 重组蛋白的诱导表达与纯化

将构建好的表达载体 pET30a-mce4 E 转入宿主菌 BL21(DE3),加入 0.2 mmol/L IPTG 诱导 6 h 后,收集菌体进行 SDS-PAGE 分析,结果在预期的 45 ku 处出现特异的、大量表达的蛋白条带,表达量占菌体总蛋白 53.3%,经试验表明,重组蛋白表达的最佳温度是 26 °C, IPTG 的最小浓度为 0.2 mmol/L,而对照空载体质粒没有特异表达带,结果见图 2A;纯化的蛋白在 45ku 处出现单一的条带,纯化率在 95% 以上,结果见图 2B。

2.3 重组蛋白 Western-blotting 鉴定

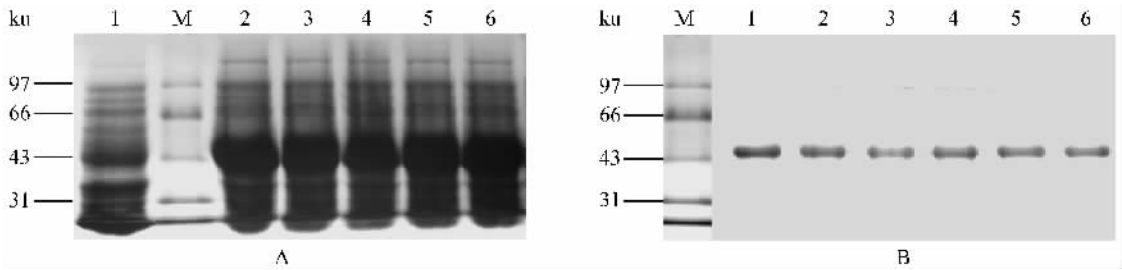
Western-blotting 结果显示,重组菌株在 45 ku 处出现深色的目的条带(如图 3 所示),由此证明,重组菌在 45 ku 处表达的特异性蛋白条带就是牛分枝杆菌 mce4E 重组蛋白。



A. Agarose gel electrophoresis of PCR amplification product; B. Recombinant T-easy-vectors digested with *EcoRI*; C. Recombinant pET 30a(+) vectors digested with *SacI* and *KpnI*

图 1 *M. bovis* mce4 E 基因的 PCR 扩增及重组质粒的酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification and enzyme identification of recombinant plasmids

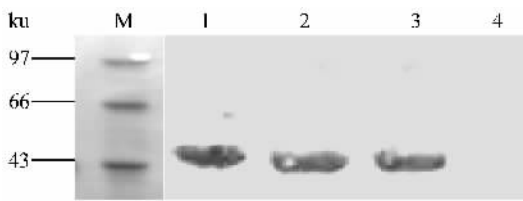


In FigA, Lane 1. pET30a(+) expression result in BL21 induced by IPTG for 6 h, as control; Lane M. Molecular weight protein marker; Lane 2-6, pET30a-mce4 E expression in BL21 cultured for 6 h with IPTG (0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mmol/L) respectively;

In FigB, Lane M. Molecular weight protein marker; Lane 1-6. Eluted with elution buffer (acidic pH 4.0), and migrated as a single band with estimated molecular mass of 45 ku

图 2 重组蛋白表达与纯化效果的鉴定

Fig. 2 Expression and purification of recombinant protein



M. Molecular weight protein marker; 1-3. Expression product of the recombinant plasmid pET30a-mce4E in *E. coli* BL21; 4. Control without recombinant protein

图 3 重组蛋白 mce4E 的 Western-blotting 分析

Fig. 3 Western-blotting analysis of recombinant protein mce4E

60.9%, 转角含量为 0%。

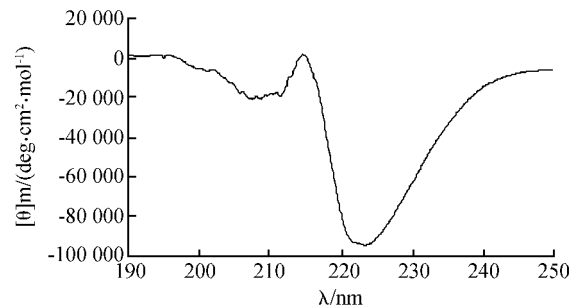


图 4 重组蛋白圆二色谱 (CD) 分析

Fig. 4 CD spectra of the purified recombinant protein

2.4 *M. bovis* mce4 E 蛋白圆二色谱 (CD) 测定

重组蛋白经纯化复性后,在 Jasco715 圆二色谱仪上经 190~250 nm 远紫外扫描显示,在 222 nm 附近出现一个最大负峰,为典型的 α 螺旋型结构(如图 4)。经 Yang-Chen 氏公式计算, α 螺旋含量为 39.1%, β -折叠含量为 0%,无规卷曲含量为

3 讨论

经过基因测序、SDS-PAGE 分析、Western-blotting 鉴定和扫描分析,结果证明重组蛋白获得高效表达,并以包涵体的形式存在,表达量占菌体

总量的 53.3%,大小约为 45 ku。经免疫印迹分析证实,所表达的蛋白质能够与兔抗牛结核分枝杆菌阳性血清产生特异性反应,说明重组蛋白具有牛分枝杆菌的抗原性,为进一步研究牛分枝杆菌快速诊断试剂盒和研究亚单位疫苗奠定了基础。mce4E 是一个推定的膜糖蛋白,CD 结构显示,重组蛋白的 α 螺旋含量为 39.1%,无规卷曲含量为 60.9%,无 β 折叠,从而间接的证实这种推测是正确的,这个结果与用蛋白质二级结构在线预测软件 EXPASY 服务器(<http://www.expasy.ch/tools>)上的 GOR 法预测的结果是相吻合的,而细菌膜蛋白的结构改变可以改变细胞膜的通透性,从而影响细菌的生长,这就为进一步寻找新的药物作用靶位点和控制结核杆菌提供直接的理论依据,对研究牛分枝杆菌的演化和致病机理以及控制该病具有重要意义。

本研究利用基因重组技术,高效表达了牛分枝杆菌 mce 4 E 蛋白并进行了纯化、透析复性和圆二色谱分析,为进一步研究牛分枝杆菌 Mce 蛋白与宿主细胞的相互作用及其 Mce4E 蛋白在牛分枝杆菌致病机理中的作用奠定了基础。

致谢:本试验得到中国疾病预防控制中心传染病预防控制所万康林教授和中国兽医药品监察所细菌室毛开荣教授的帮助和支持,在此表示感谢。

参考文献:

- [1] 姜秀云,王春风,王春芳,等.牛分枝杆菌 MPB51 基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J].微生物学报,2005,45(2):298~300.
- [2] Garnier T, Eiglmeier K, Camus J C, *et al*.,The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis* [J]. Proc Natl Acad Sci, 2003,100(13):7 877~7 882.
- [3] Cole S T, Brosch R, Parkhill J, *et al*..Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence[J]. Nature,1998,393(6685):537~544.
- [4] Arruda S, Bomfim G, Knights R, *et al*..Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells[J]. Science,1993,261(5127):1 454~1 457.
- [5] Chitale S, Ehrt S, Kawamura I, *et al*..Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry[J]. Cell Microbiol,2001;3(4):247~254.
- [6] Casali N, Konieczny M, Schmidt M A, *et al*..Invasion activity of a *Mycobacterium tuberculosis* peptide presented by the *Escherichia coli* AIDA autotransporter [J]. Infect Immun,2002,70(12):6 846~6 852.
- [7] Shimono N, Morici L, Casali N, *et al*..Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the mce1 operon[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2003,100(26):15 918~15 923.
- [8] Kumar A, Chandolia A, Chaudhry U, *et al*..Comparison of mammalian cell entry operons of mycobacteria; in silico analysis and expression profiling [J]. FEMS Immunol Med Microbiol,2005,43(2):185~195.
- [9] AGioffrè, Eduardo I, Diana A, *et al*..Mutation in mce operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence[J]. Microbes and Infection,2005,7:325~334.
- [10] Aguilar L D,Infante E, Bianco M V, *et al*..Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis* mce-2 and mce-3 mutants in a Balb/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis[J]. Vaccine,2006,24(13):2 333~2 342.
- [11] Ahmad S E, Mustafa S, Attiyah A S. Mammalian cell-entry proteins encoded by the mce3 operon of *Mycobacterium tuberculosis* are expressed during natural infection in humans[J]. Scand J Immunol,2004,60(4):382~391.
- [12] Van Embden J D, Donald C M, Crawford J T, *et al*..Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting :Recommendations for a standardized methodology [J]. J Clin Microbiol,1993,31:2 446~2 450.
- [13] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W.分子克隆实验指南[M].第3版.北京:科学出版社,2003.1 723~1 726.