

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2005)03-0193-03

## 结核分枝杆菌 *esat6-cfp10* 融合基因疫苗的构建及表达

张海, 师长宏, 薛莹, 姜泓, 高雪, 柏银兰, 王丽梅, 徐志凯

(第四军医大学基础部微生物学教研室, 陕西西安 710033)

### Construction and expression of fused gene vaccine *esat6-cfp10* of *Mycobacterium tuberculosis*

ZHANG Hai, SHI Chang-Hong, XUE Ying, JIANG Hong, GAO Xue, BAI Yin-Lan, WANG Li-Mei, XU Zhi-Kai

Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

**【Abstract】** AIM: To construct and express fused gene vaccine *esat6-cfp10* of *Mycobacterium tuberculosis*. METHODS: *cfp10* gene was amplified by PCR from H37Rv virulent strain of MTB and was then inserted into pGEM-7zf(+ ) cloning vector containing *esat6* gene. After sequenced, the *esat6-cfp10* fused gene was cloned into eukaryotic vector pcDNA3.1(+ ). This recombinant plasmid was transfected into Chinese Hamster Ovary (CHO) cells by cation liposome. The expression of mRNA and the fused protein were detected by RT-PCR and indirect immunofluorescence technique. RESULTS: The length of PCR product was 350 bp, identical with that reported by GenBank. The 630 bp fragment of the fused *esat6-cfp10* gene was obtained by restriction enzyme digestion. RT-PCR suggested that the mRNA was expressed in CHO cells and the positive cells were stained positively by indirect immunofluorescence technique. CONCLUSION: *cfp10* gene was successfully cloned and the eukaryotic recombinant plasmid fused *esat6-cfp10* was constructed successfully and expressed in CHO cells.

**【Keywords】** *Mycobacterium tuberculosis*; *esat6*; *cfp10*; gene vaccine; eukaryotic expression

**【摘要】**目的 构建结核分枝杆菌 *esat6-cfp10* 融合基因疫苗并对其在体外进行表达。方法 用 PCR 技术从 MTB 毒株 H37Rv 基因组 DNA 中扩增 *cfp10* 基因,以 *Hind* III 和 *Eco* R I 双酶切后克隆入含 *esat6* 基因的 pGEM-7zf(+ )载体中,将测序正确的 *esat6-cfp10* 融合基因按照 *Bam* H I 和 *Eco* R I 酶切位点亚克隆入真核表达载体 pcDNA3.1(+ ),重组质粒酶切鉴定正确后以脂质体转染 CHO 细胞,分别以 RT-PCR 方法检测

收稿日期 2004-11-09; 修回日期 2004-12-01

基金项目:国家“863”课题(2001AA215201);国家自然科学基金(30400381)

通讯作者 徐志凯, Tel.(029)83374523 Email. Zhikaixu@fmmu.edu.cn  
作者简介 张海(1971-)男(汉族),陕西省武功县人,博士生(导师徐志凯), Tel.(029)83374527 Email. hzhang@fmmu.edu.cn

mRNA 表达和间接免疫荧光技术检测目的蛋白的表达。结果 PCR 获得的 *cfp10* 基因序列与文献报道一致,大小约为 350 bp。重组真核表达质粒酶切后可获得约 630 bp 的融合 *esat6-cfp10* 基因片段。RT-PCR 可获得大小约为 350 bp 的 *cfp10* 基因,间接免疫荧光检测后表达有 Esat6-Cfp10 蛋白的阳性细胞着染。结论 成功克隆结核分枝杆菌 *cfp10* 基因,构建了融合有 *esat6-cfp10* 基因的真核表达质粒并对其在体外进行了表达。

**【关键词】** 结核分枝杆菌 *esat6-cfp10* 基因疫苗;真核表达

**【中图分类号】** R378.911 **【文献标识码】** A

## 0 引言

ESAT6 抗原是结核杆菌早期分泌性低分子量蛋白,能诱导机体产生强烈 T 细胞免疫应答和释放高水平 IFN- $\gamma$ 。许多研究表明 ESAT6 蛋白具有良好的抗原刺激性。近年来又发现另一种低分子量结核杆菌培养滤液蛋白 CFP10,CFP10 与 ESAT6 同属于 ESAT6 家族,且由同一操纵子调控,与结核分枝杆菌毒力有关,也能释放高水平的 IFN- $\gamma$ <sup>[1]</sup>。传统用于预防结核病的 BCG 疫苗免疫效果不稳定,因此有必要研究一种比 BCG 更好的疫苗来控制该病的传播与蔓延<sup>[2]</sup>。我们构建了 *esat6-cfp10* 融合基因疫苗并对其进行了体外表达,为进一步探讨其在 MTB 中的作用奠定基础。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 结核杆菌 H37Rv 毒株由本校基础部微生物学教研室保存。克隆载体 pGEM-7zf(+),真核表达载体 pcDNA3.1(+),含 *esat6* 基因的重组质粒 pGES6 和 *E. coli* DH5 $\alpha$  菌株由本室保存。*pfu* Taq 酶购自上海博亚生物公司。TRIzol 为 Promega 公司产品,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和核酸分子量标准品由宝泰克公司提供。质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。梭华 soft 脂质体为厦门太阳马公司产品。Superscript<sup>TM</sup> 逆转录试剂盒购自 Gibco 公司。羊抗鼠荧光抗体购自宝信公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 结核杆菌 H37Rv 株基因组 DNA 的提取与纯化** 结核杆菌 H37Rv 株接种于 7H9 培养基于 37 $^{\circ}$ C

培养 7 wk, DNA 的提取与纯化参照文献 [3] 进行。

1.2.2 PCR 引物设计及目的基因扩增 参照 GenBank 发表的 *cfp10* 基因序列设计一对引物, 为了保证这两种蛋白具有各自的空间构像, 在上游引物中引入了 48 bp 的 linker。上游引物 P1: GCC AAGCTTGGTGGCTCAGGTGGCTCCGGTGGAGCGGGAAGCGCGGTGGAGGATCAATGGCAGAGATGAAGACCG (下划线为 *Hind* III 酶切位点, 斜体为 linker), 下游引物 P2: CGC GAATTCTCAGAAGCCCCATTGCGAGGAQ (下划线为 *Eco*R I 酶切位点)。PCR 扩增体系中所用模板为结核杆菌 H37Rv 基因组 DNA, 反应条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 共进行 30 个循环, 末次循环后 72℃ 延伸 2 min, 扩增产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 重组质粒的构建及鉴定 以 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切 pGES6 质粒获得 *esat6* 基因, 凝胶回收后亚克隆至 pGEM-7ZK(+), 命名为 pGEM-e6。再分别以 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切 pGEM-e6 和 PCR 产物, 经 *T4* 连接酶作用后构建成含有 *esat6* 和 *cfp10* 基因的重组质粒 pGEM610。测序正确后以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pGEM610 和真核表达载体 pcDNA3.1(+), 回收连接后获得重组质粒 pcDNA610。质粒提取、DNA 片断回收、连接转化均按文献 [2] 进行。以 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切 pcDNA610, 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒。

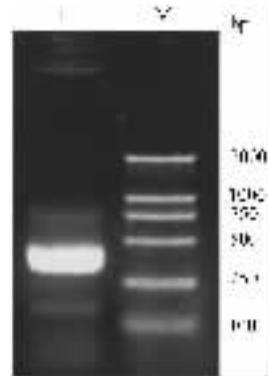
1.2.4 脂质体转染 将  $2 \times 10^5$  CHO 细胞接种于 24 孔板, 转染前用不含抗生素的 1640 培养液洗 2 次, 以 0.5 mL 1640 培养液重悬细胞。pcDNA610 重组质粒 5  $\mu$ L 和脂质体 2  $\mu$ L 各用 30  $\mu$ L 无血清的 1640 培养液稀释, 两者混匀后室温作用 20 min, 缓慢加入到细胞中, 继续培养 24 h 后收集细胞进行 RT-PCR 和间接免疫荧光检测。同时设不加任何处理的 CHO 细胞作对照。

1.2.5 RT-PCR 检测 mRNA 表达 细胞总 RNA 提取按 TRIzol 试剂盒说明书进行。取 10  $\mu$ L mRNA 溶液, 加入 2  $\mu$ L Oligo(dT)<sub>12-18</sub> 引物, 70℃ 水浴 10 min 后, 立即置于冰上, 加 5  $\times$  First Strand Buffer 4  $\mu$ L, 0.1 mol/L DTT 2  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L, 混匀后, 42℃ 水浴 2 min, 再加 Superscript II 1  $\mu$ L, 42℃ 水浴 50 min 后, 70℃ 水浴 15 min, 灭活反转录酶。PCR 反应条件为在 50  $\mu$ L 的反应体系中, 加入 cDNA 第一链 2  $\mu$ L, 其余同前。

1.2.6 间接免疫荧光检测目的基因表达 按参考文献 [4] 进行。一抗采用抗 ESAT6-CFP10 多克隆抗体。

## 2 结果

2.1 目的基因的 PCR 扩增 PCR 产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳后发现, 其阳性扩增片断大约为 350 bp (Fig 1) 与 Berthet 等 [1] 的报道基本一致。

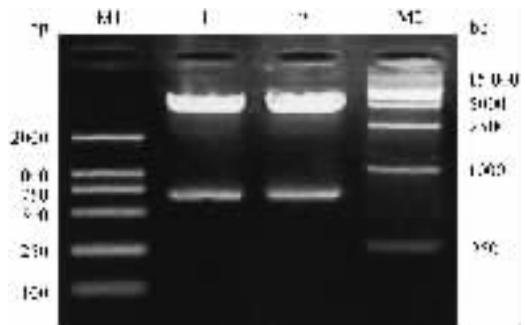


1: *cfp10* gene fragment; M: DL2000 marker.

Fig 1 PCR product of *cfp10*

图 1 *cfp10* 基因 PCR 扩增结果

2.2 重组质粒的酶切鉴定 重组质粒 pcDNA610 被 *Bam*H I, *Eco*R I 双酶切后可得到约 630 bp 的片段, 与 *esat6* 和 *cfp10* 的大小之和相一致 (Fig 2), 经测序后读框正确。



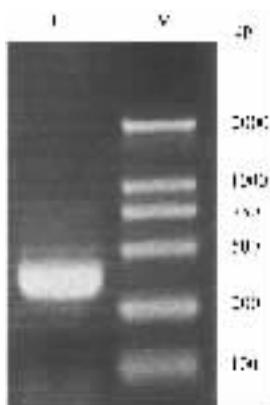
M1: DL2000 marker; 1, 2: pcDNA610 digested by *Bam*H I, *Eco*R I; M2: DL15000 marker.

Fig 2 Restriction enzyme digestion mapping of recombinant plasmid

图 2 重组质粒的酶切鉴定

2.3 重组质粒转染 CHO 细胞的 RT-PCR 结果 重组质粒转染 24 h 后提取转染细胞的 mRNA 进行 RT-PCR 反应, 结果可得到 350 bp 的片段, 与 *cfp10* 的大小一致 (Fig 3)。

2.4 间接免疫荧光检测融合蛋白表达 转染后 24 h 收集细胞, 进行间接免疫荧光检测。表达有 ESAT6-CFP10 融合蛋白的 CHO 细胞有荧光出现, 个别细胞呈现强阳性, 而对照细胞没有着染 (Fig 4)。



1: RT-PCR product; M: DL2000 marker.

Fig 3 RT-PCR product 图3 RT-PCR产物



A: Cells transfected with pcDNA610 plasmid; B: Control.

Fig 4 Expression of ESAT6-CFP10 fused protein in CHO cells

图4 ESAT6-CFP10 融合蛋白在 CHO 细胞中的表达

### 3 讨论

近年来,国内外学者在发展新型结核病疫苗方面进行了一系列研究,其中包括基因工程亚单位疫苗和 DNA 疫苗,但这些研究大多是针对结核杆菌单个免疫保护性抗原进行的,其免疫保护效果不十分理想<sup>[5,6]</sup>。因此如何提高结核病基因工程亚单位疫苗和 DNA 疫苗的有效性成为当务之急。有学者认为,研制包含多个免疫保护性抗原的多价基因工程亚单位疫苗可能是提高其有效性的一种新策略<sup>[7]</sup>。有鉴于此,本研究对结核杆菌两种重要免疫保护性抗原 ESAT6 和 CFP10 进行融合表达,以便进一步研究其在结核病基因工程疫苗中的应用。

结核分枝杆菌有多种分泌性蛋白,其中早期分泌性抗原 ESAT6( $M_r$  6000)和培养滤液蛋白 CFP10( $M_r$  10 000)是从短期培养滤液中分离的两种低分子量蛋白,这两个蛋白同属于 ESAT6 家族,且由同一操纵子调控,与结核分支杆菌毒力有关。研究发现 *esat6* 家族中的成员 *esat6*, *cfp10*, *TB10.4* 均能诱导机体产生高水平的 IFN- $\gamma$ , *esat6* 和 *cfp10* 在结核病的防治中发

挥比较重要的作用<sup>[8]</sup>。在 BCG 传代过程中 *esat6* 和 *cfp10* 基因发生丢失,而在绝大多数毒株中这两个基因都存在,表明 BCG 保护率不佳可能与这两个基因有关<sup>[9]</sup>。DNA 疫苗不仅可诱导机体体液免疫反应,还可以激发特异的细胞免疫应答,因此结核 DNA 疫苗在结核病的防治中具有重要意义<sup>[10]</sup>。ESAT6 和 CFP10 都是非常重要的免疫优势抗原,可诱导和增强机体体液免疫和细胞免疫应答的发生<sup>[11]</sup>。因此,现认为 *esat6* 和 *cfp10* 基因是构建结核 DNA 疫苗的有效目的基因之一。本研究构建结核杆菌融合基因 *esat6-cfp10* 真核表达质粒并研究其在 CHO 细胞中表达,结果提示此重组质粒可在哺乳动物细胞中表达,为进一步研究结核 DNA 疫苗奠定了基础。

### 【参考文献】

- [1] Berthet F, Rasmussen P, Rosenkrands I, et al. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP10) [J]. *Microbiology*, 1998; 144(11): 3195-3203.
- [2] Kumar H, Malhotra D, Goswami S, et al. How far have we reached in tuberculosis vaccine development? [J]. *Crit Rev Microbiol*, 2003; 29(4): 297-312.
- [3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999: 584-590.
- [4] 徐志凯. 单克隆抗体技术 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1992: 54-55.
- [5] Morris S, Kelley C, Howard A, et al. The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis [J]. *Vaccine*, 2000; 18(20): 2155-2163.
- [6] Brandt L, Oettinger T, Holm A, et al. Key epitopes on the *esat6* antigen recognized in mice during the recall of protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Immunol*, 1996; 157(8): 3527-3533.
- [7] Orme IM. Beyond BCG: The potential for a more effective TB vaccine [J]. *Mol Med Today*, 1999; 5(11): 487-492.
- [8] Skjot R, Oettinger T, Rosenkrands I, et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the *esat6* family as immunodominant T-cell antigens [J]. *Infect Immun*, 2000; 68(1): 214-220.
- [9] Pym S, Brodin P, Brosch R, et al. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti* [J]. *Mol Microbiol*, 2002; 46(3): 709-717.
- [10] 范雄林, 王丽梅, 师长宏, 等. 结核杆菌 *cfp10* 真核载体的构建、表达与基因免疫 [J]. 第四军医大学学报, 2003; 24(10): 867-869.  
Fan XL, Wang LM, Shi CH, et al. Construction, expression and gene immunization of eukaryotic expression vector containing *cfp10* of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2003; 24(10): 867-869.
- [11] 师长宏, 范雄林, 柏银兰, 等. 结核分枝杆菌 Ag85B-ESAT6 融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答及其保护力 [J]. 第四军医大学学报, 2004; 25(18): 1633-1636.  
Shi CH, Fan XL, Bai YL, et al. Immunity responses and protective efficacy induced by *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B-ESAT6 fusion protein in mice [J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2004; 25(18): 1633-1636.