

Mycobacterium Tuberculosis Rv1987, TB7.7 Protein's Prokaryotic Expression, Purification and Identification

Xiangru Li, Jifu Ma, Ying Xu, Lijie Chen, Jinmeng Song, Feng Shi*

College of Life Science, Shihezi University, Shihezi, China

Email address:

blli_li@163.com (Xiangru Li), jfayq130110@163.com (Jifu Ma), 958755148@qq.com (Ying Xu), 15199589961@163.com (Lijie Chen), 1634086986@qq.com (Jinmeng Song), Shifeng2314@yeah.net (Feng Shi)

*Corresponding author

To cite this article:

Xiangru Li, Jifu Ma, Ying Xu, Lijie Chen, Jinmeng Song, Feng Shi. Mycobacterium Tuberculosis Rv1987, TB7.7 Protein's Prokaryotic Expression, Purification and Identification. *Science Discovery*. Vol. 6, No. 6, 2018, pp. 529-534. doi: 10.11648/j.sd.20180606.34

Received: November 5, 2018; **Accepted:** December 5, 2018; **Published:** December 12, 2018

Abstract: Mycobacterium tuberculosis is a pathogen of tuberculosis and has relatively high epidemic and mortality among human. It is the second most life-threatening infectious disease second only to AIDS, so it is very important for the prevention and control of tuberculosis. In our experiment, RV1987 and TB7.7 recombinant plasmids of mycobacterium tuberculosis were constructed. The specific protein RV1987 and TB7.7 of mycobacterium tuberculosis were prokaryotic expressed, purified and identified in *Escherichia coli*. Our experiment lay a sound foundation for the subsequent serological diagnosis of tuberculosis as to obtain the high-purity target protein. Methods: use the genome of H37Rv as template to amplify the target gene and cloned it into prokaryotic expression vector, then transformed it into *E. coli* C43 (DE3) strain. After that, go through induced, expressed and purified in order to obtain recombinant protein. Results: the recombinant plasmid of RV1987 protein and TB7.7 protein was successfully constructed and expressed to obtain purified products, which were purified by affinity chromatography with a purity greater than 90%. The concentrations of RV1987 and TB7.7 proteins were 413 microns /mL and 1693 microns /mL. Rv1987 protein was expressed in inclusion body. TB7.7 protein was expressed in both supernatant and inclusion body, and the expression in supernatant was slightly higher than In inclusion body. Western Blot showed that all the above proteins could react with the positive serum of tuberculosis and had good reactivity. Conclusion: *Escherichia coli* is the most common system for gene engineering to express heterogenous proteins and widely used by researchers because of its relatively high expression efficiency. The experimental results showed that we obtained by prokaryotic expression and purification of two specific protein has good response to the original, in the subsequent experiments is obtained by testing several protein specificity and sensitivity, we can on the basis of the existing stimulus antigen screen is suitable for our country crowd IGRAs stimulus antigen, as rapid auxiliary diagnosis of tuberculosis (TB), thus improve the serum antibody detection of TB case detection and reduce the misdiagnosis rate.

Keywords: Mycobacteria, Rv1987, TB7.7, Protein Expression, Purification, WB Identification

结核分枝杆菌Rv1987、TB7.7蛋白的原核表达、纯化及鉴定

李相如, 马继福, 徐影, 陈丽洁, 宋金梦, 石峰*

石河子大学生命科学学院, 石河子, 中国

邮箱

blli_li@163.com (李相如), jfayq130110@163.com (马继福), 958755148@qq.com (徐影), 15199589961@163.com (陈丽洁), 1634086986@qq.com (宋金梦), Shifeng2314@yeah.net (石峰)

摘要: 结核分枝杆菌是结核病的病原菌, 具有较高传染性, 因此对于结核病的防控非常重要。本实验通过对结核分枝杆菌的特异性蛋白RV1987、TB7.7进行原核表达、纯化及鉴定, 获得高纯度的目的蛋白, 为后续对结核病血清学诊断奠定基础。方法: 以H37Rv标准株的基因组为模板扩增目的基因并克隆至原核表达载体, 转化至大肠杆菌C43(DE3)菌株中, 经诱导, 表达, 纯化获得重组蛋白。结果: 成功构建RV1987蛋白和TB7.7蛋白的重组质粒并表达获得纯化产物, 其中Rv1987蛋白以包涵体形式表达, TB7.7蛋白在上清液和包涵体中均表达, 上清液表达略多于包涵体。

关键词: 结合分枝杆菌, Rv1987, TB7.7, 蛋白表达, 纯化, WB鉴定

1. 引言

全球每年新增约860万人感染活动性结核杆菌, 每年约有130万人死于结核病, 中国现有约500万活动性肺结核患者, 病例数居世界首位[1]。据最新统计, 我国是结核病高负担国家, 每年新发结核病患者90多万, 年死亡人数大于3.5万, 是导致死亡人数最多的传染病[2]。面对如此高的死亡率和发病率, 结核感染的快速诊断方法的建立正确与及时的治疗, 对于目前结核病的防控起着至关重要的作用[3,4]。其中抗酸染色痰涂片检查、细菌培养仍是结核病诊断中常用的细菌学检查方法, 而镜检阳性率低、痰液或其他分泌物的菌培养耗时长, 加之菌阴性结核病患者的大量存在, 因此筛选可用于结核病抗体检测的抗原不仅为涂阳、菌阳患者的辅助诊断提供参考, 对于菌阴患者的诊断具有重要意义[5]。

通过筛选出具有高灵敏度和特异性的抗原蛋白, 可以有效的本研究根据文献报道选取了结核分枝杆菌部分RD区[6]免疫原性较强的特异性抗原, 其中Rv1987蛋白是RD2区基因编码的一种具有免疫效力的分泌蛋白, 有研究表明, Rv1987蛋白可以调节宿主免疫反应向Th2型细胞应答转化, 这可能有助于细菌逃逸宿主免疫识别[7]。通过已有的目的蛋白基因, 构建编码蛋白的重组表达质粒, 进行原核表达与重组蛋白纯化。通过得到的蛋白, 在后续研究中可以通过建立的间接ELISA方法检测健康人及结核病患者血清中的IgM、IgG抗体水平, 计算每种蛋白在诊断结核病上的灵敏度与特异性, 通过绘制ROC曲线与计算曲线下面积(AUC)评价每种抗原蛋白在检测IgM及IgG抗体的诊断能效与价值, 为结核病的血清学诊断奠定基础。同时我们通过得到的高灵敏度以及高特异性的抗原蛋白, 进行酶联免疫吸附试验(ELISA), 该试验方法因具有快速、简便、高灵敏度等优点被广泛应用于农药残留、食品安全检测。由于该技术所需设备简单、操作容易、一次可检测多个样

品, 现已成为部分抗体检测的首选方法, 因此在我们的实验基础上, 有望将这一方法成功应用于结核病的检测。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 主要菌株和载体(质粒)来源

结核分枝杆菌, 大肠杆菌, C43 (DE3), pET-28a, pET-32a, 其中C43 (DE3) 购自美国Sigma公司, 其余均为石河子大学人畜共患病实验室保存。

2.1.2. 试剂

分枝杆菌DNAout试剂盒购自北京天恩泽公司、2xTaq Master Mix购自康为世纪公司、限制性内切酶EcoRI、HindIII、BamH I、XhoI、NotI、DNA Ligation Kit、DNA Marker、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒均购自TaKaRa, 蛋白胨、酵母提取物购自OXOID公司、琼脂糖购自Biowest公司His标签/GST标签蛋白纯化预装柱购自GE公司, 蛋白质微量PAGE胶回收试剂盒购自生工生物、蛋白定量试剂盒购于Thermo、还原性谷胱甘肽购自Sigma公司、氨苄青霉素、卡那霉素、IPTG、尿素、NC膜、pH9.6碳酸盐包被液、TMB单组份显色液、ELISA终止液等均购自北京索莱宝生物技术公司, 其余试剂为国产分析纯。

2.2. 方法

2.2.1. 原核表达载体的构建

登录结核分枝杆菌数据库 TB Database (<http://genome.tdb.org>) 分别查找Rv1987蛋白(登录号Rv3804c)、TB7.7蛋白(登录号: Rv2654c)的基因全序列, 通过Primer5.0软件设计引物, 斜体为加入的保护性碱基、下划线部分为加入的酶切位点, 详见表1。其中TB7.7蛋白表达工程菌由本实验室构建与保存。

表1 目的基因扩增所需引物。

基因名称	引物序列 (5'to3')	退火温度	产物长度
Rv1987-F	CGGGATCCATGGCCGACTGAACATTTA (BamH I)	69°C	429bp
Rv1987-R	TTGCGGCCGCCTAGGTGCAAGGATATTG (Not I)		
tb7.7-F	CGGGATCCATGAGCGGCCACGCGTTGG (BamH I)	70°C	246bp
tb7.7-R	CCCTCGAGGTCACGGCGGATCACCCC (XhoI)		

以H37Rv标准株的基因组为模板, 扩增上述目的基因的全长, PCR体系25ul: ddH₂O 9.7ul, 2×Es Taq Master Mix 12.5ul, Forward Primer 0.4ul, Reverse Primer 0.4ul, DNA Template 2ul。反应条件: 96°C预变性5min, 95°C变性40s,

52°C退火30s循环35次, 72°C延伸1min, 72°C终延伸10min, 16°C保存。

PCR结束后, 根据目的基因片段长度选择1%(长度在500bp以上)或2%(长度在500bp以下)的琼脂糖凝胶电泳进

行结果鉴定。使用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0 试剂盒对产物纯化回收, 操作过程参照说明书进行。

使用 DNA Ligation Kit (Mighty Mix) 将 PCR 胶回收目的基因片段连接至 pMD-19T 载体, 连接体系 10 μ l: Target gene 4.5 μ l, pMD-19T (Simple) Vector 0.5 μ l, DNA Ligation Kit 5 μ l。混合连接反应的各个组分至 0.2 ml 无菌 PCR 管中, 充分混匀, 瞬离后 16 $^{\circ}$ C 30 min 即可完成整个连接反应。将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞内, 为方便阳性克隆菌落的鉴定, 使用蓝白斑筛选的方法进行阳性克隆的筛选。取 100 μ M 的 IPTG 25 μ l、20 mg/ml 的 X-Gal 50 μ l 涂布在氨苄青霉素抗性的固体 LB 平板, 随后立即取 200 μ l 活化的菌液均匀铺板至固体 LB 平板, 封板后置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱内避光倒置培养 16-22 h。

观察固体 LB 培养基上白色菌落生长状态。挑取 5 个白色单克隆菌落放入 800 μ l 含有氨苄抗性的液体 LB 的 EP 管中, 标记后封口膜封口置于 37 $^{\circ}$ C 摇床以 200 rpm/min 培养 4 h。取 2 μ l 的菌液作为模板进行菌液 PCR 验证。菌液 PCR 结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测条带位置是否正确。然后将 PCR 条带对应的单克隆菌液吸取 400 μ l 至灭菌的 EP 管内, 再加入相同体积的 30% 高压灭菌的丙三醇, 将剩余菌液的 EP 管内也加入相同体积的甘油混匀后编号, 最后将菌液送至生工生物公司测序, 使用 DNAMAN 分析结果。

2.2.2. 重组蛋白的表达

将表达 RV1987、TB7.7 蛋白的重组质粒 pET-32a(+) 和 pET-28a(+) 转化到大肠杆菌 C43(DE3) 中。取保存的菌液 20 μ l 接种至液体 LB 中, 加入与载体相应的抗性 10 μ l (100 mg/mL) 置于恒温摇床 37 $^{\circ}$ C 200 rpm 过夜培养。次日, 在超净台内吸取 2 mL 菌液转接至新的 20 mL 液体 LB 培养基中并加入抗性, 置于恒温摇床培养至菌液 OD 至约为 0.6 左右时加入终浓度为 1 mmol/L⁻¹ 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG), 完全混匀后吸取 1 mL 菌液 1200 rpm/min 离心 1 min, 弃去上清后加入 80 μ l 去离子水和 20 μ l 5x 蛋白 Loading Buffer, 作为诱导 0 h 样本于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

2.2.3. 蛋白的可溶性鉴定及纯化

在超净台内取上述表达相应蛋白的工程菌 20 μ l 至相应抗性的液体 LB 内, 37 $^{\circ}$ C 200 rpm 过夜培养。次日, 取扩繁的菌液 6 mL 转接至 600 mL 新鲜的液体 LB 中, 加入相对应的抗生素 600 μ l (100 mg/mL), 按照上述培养条件培养至 OD 值 0.6 左右, 随后加入终浓度为 1 mM 的 IPTG 进行蛋白诱导表达。根据前期实验结果确定的最佳诱导时间 6 小时进行诱导后以 12000 rpm 离心 3 min 收集所有菌液, 弃去上清后加入 20 mL PBS 洗涤菌体 2 次, 加入 15 mL 裂解液置于 4 $^{\circ}$ C 过夜裂解菌体。次日, 将装有菌液的 50 mL 离心管放入液氮中冷冻 5 min, 拿出后置于 42 $^{\circ}$ C 水浴锅内快速融化, 如此反复 3 次, 此时的菌液应成粘稠状。随后对菌液进行超声破碎, 打碎反复冻融后释放出的 DNA 等细胞内物质。取 500 μ l 各蛋白表达破碎菌体后的菌液置于 1.5 mL 离心管中 12000 rpm/min 离心 10 min, 分离可溶性蛋白与包涵体蛋白, 进行 SDS-PAGE 鉴定可溶性表达情况。

在确定各蛋白以上清或包涵体表达后, 将大离心管中超声破碎后的菌液 12000 rpm/min 离心 30 min。若该蛋白以上清表达, 则留取上清, 弃去沉淀。反之, 若蛋白为包涵体, 则在离心后弃去上清, 保留沉淀。随后使用 His 标签/GST 标签蛋白纯化预装柱亲和纯化目标蛋白。

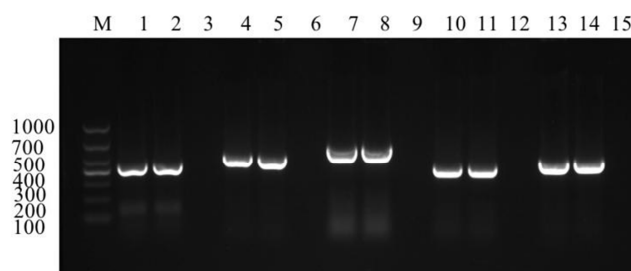
2.2.4. 重组蛋白 Western Blot 验证

将所有纯化的重组蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 在 SDS-PAGE 电泳后将收集的产物转移到硝酸纤维素膜中, 然后用 5% 脱脂乳封闭 2 小时。使用 1:50 稀释的作为第一抗体的阳性结核血清和作为第二抗体的绵羊抗人 IgG-HRP (1:8000 稀释) 进行蛋白质印迹。使用 ECL 化学发光底物进行化学发光, 将 PierceTM ECL Western Blotting Substrate A 液与 B 液 1:1 混合后均匀地覆盖至 NC 膜上, 用保鲜膜包裹后避光孵育 1 min, 然后在化学发光成像仪内进行成像, 挑选最佳曝光时间的照片保存分析。

3. 结果

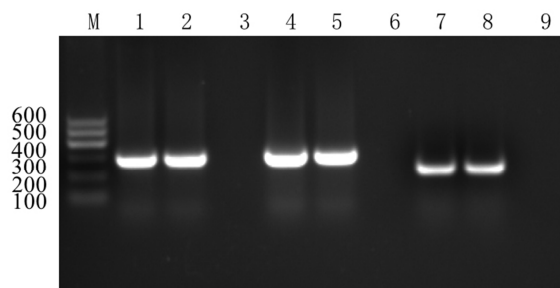
3.1. 结核分枝杆菌基因的扩增

以结核分枝杆菌标准株 H37RV 基因组为模板进行目的基因的扩增, 扩增出的目的基因大小与理论值相符见图 1。



(A)

(A) M: 1000bp DNA Marker; 泳道 10-11: RV1987 基因扩增;



(B)

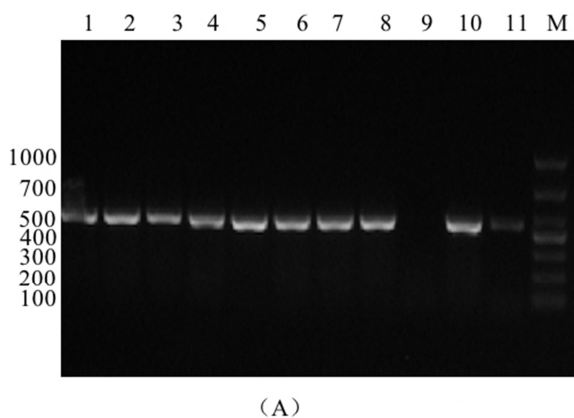
(B) M: 600bp DNA Marker; 泳道 7-8: tb7.7 扩增

图1 目的基因的PCR扩增。

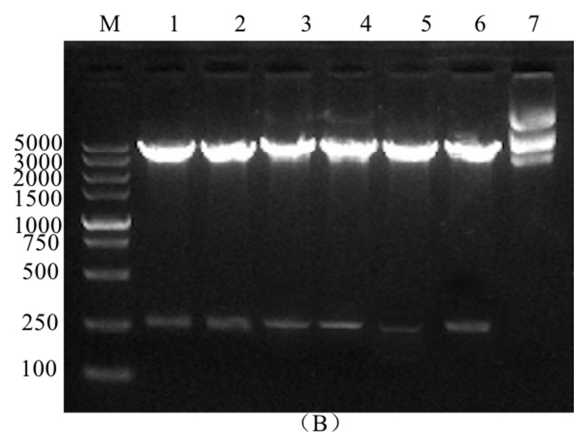
3.2. 目的基因与原核表达载体重组构建

挑取目的基因连接原核表达载体, 并转入大肠杆菌 DH5 α 细胞中的单克隆菌落, 用扩增目的基因的引物进行菌液 PCR 鉴定, 结果表明扩增基因条带与目的基因大小一致。表明该单克隆菌落为阳性克隆。提取该单克隆菌的质

粒,使用与设计引物加入酶切位点一致的限制性内切酶进行双酶切验证,结果表明切下的片段大小与理论值相符,表明原核表达载体构建成功如图2所示。将鉴定后的各表达载体重组质粒转入大肠杆菌感受态细胞C43(DE3)内,再进行菌液PCR验证,结果表明挑取的C43(DE3)单克隆菌落内含有转入的重组质粒,可以进行蛋白的原核表达及纯化实验。



图(A) M: 1000bp DNA Marker; 泳道1-10: Rv1987-pET28a菌液PCR扩增



图(B) M: 5000bp DNA Marker;泳道1-6: tb7.7-pET28a双酶切产物;泳道7: 质粒对照

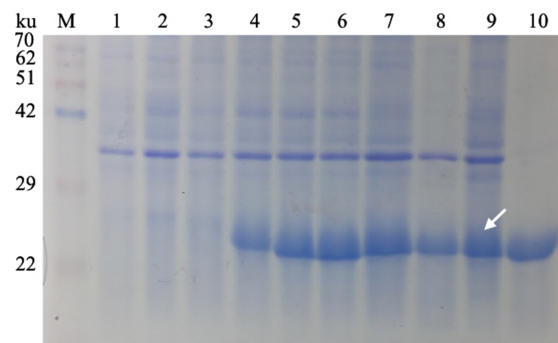
图2 目的基因连接表达载体的双酶切验证。

3.3. 目的蛋白的表达及纯化

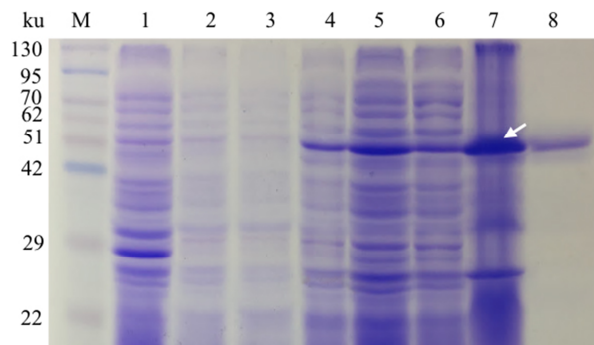
将IPTG诱导后的菌体经SDS-PAGE鉴定,菌株表达出与理论大小符合的目标蛋白,诱导结果显示诱导后的第6小时蛋白表达量较高,如图3所示。

超声破碎菌体后离心分离上清与沉淀,鉴定蛋白表达形式,聚丙烯酰胺凝胶电泳结果表明Rv1987蛋白以包涵体形式表达,TB7.7蛋白在上清液和包涵体中均表达,上清液表达略多于包涵体。

使用Ni²⁺亲和层析柱纯化上述蛋白,收集洗脱峰处的洗脱液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,结果表明上述蛋白均可通过亲和层析纯化,纯度大于90%。



(A)



(B)

图3 TB7.7与Rv1987蛋白的诱导表达。

M:蛋白预染Marker; 泳道1-2: DE3空菌与空载体; 泳道3-7: 0、2、4、6、8小时诱导菌体; 泳道8-9: 超声后上清与包涵体; 泳道10: 纯化的重组蛋白

3.4. 蛋白浓度测定

通过BCA法测定透析复性后的蛋白浓度,按照蛋白定量试剂盒的说明书制作BCA标准曲线及测定蛋白浓度。标准曲线方程为: $y=0.001087x+0.145$, 相关系数 $R^2=0.9979$, 见图4所示。

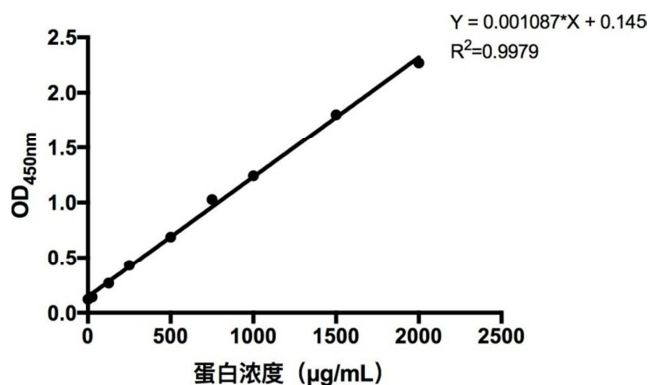


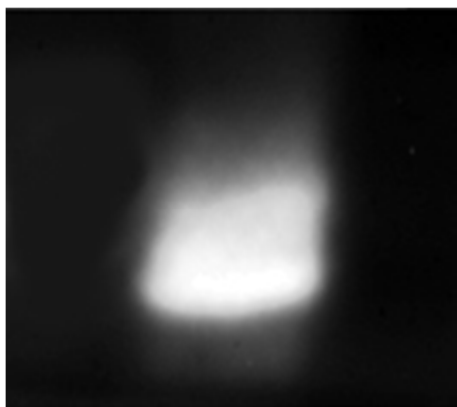
图4 蛋白浓度测定标准曲线。

将测定的OD值带入标准曲线内,计算蛋白浓度,其中Rv1987蛋白TB7.7蛋白的浓度分别为413μg/mL、1693μg/mL。

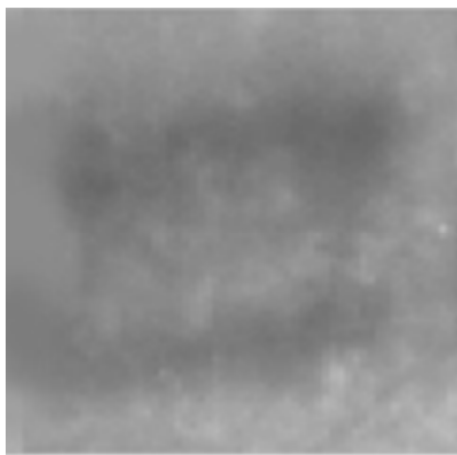
3.5. 蛋白Western Blot分析

纯化完成的蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至硝酸纤维素膜上,使用结核病阳性血清作为一抗,羊抗人

IgG-HRP作为二抗进行抗体的孵育,最后使用ECL显色液显色,曝光后记录条带位置。结果表明上述蛋白均能与结核病阳性血清反应,具有良好的反应原性,如图5所示。



(A) TB7.7



(B) Rv1987

图5 纯化后蛋白的Western Blot分析。

4. 讨论

结核分枝杆菌(*M.tuberculosis*),俗称结核杆菌,是引起结核病的病原菌。可侵犯全身各器官,但以肺结核为最多见。结核病至今仍为重要的传染病。近年来对结核病的血清学诊断抗原的研究主要集中于结核分枝杆菌的分泌蛋白及部分膜蛋白。研究表明,不同患者使用不同抗原检测抗体的方法具有较大的随机性,即使同一患者在疾病不同的发展阶段检测出的结果都有所差异。因此,若筛选出诊断价值高的抗原,提高血清抗体检测结核病检出率与降低误诊率,不仅需要将多种抗原进行组合,还需要筛选结核病致病菌特有的抗原表位并进行组合。截止目前,已有许多结核分枝杆菌特异性蛋白在结核病的血清学诊断中被深入研究。包括在菌株的毒力中起重要的作用的分泌性蛋白ESAT-6[8]和CFP-10[9]、Ag85复合物[10-12]、MPT64蛋白[13]、38kDa蛋白[14]等。这些蛋白的共同特征是具有T细胞和B细胞表位、富含芳香族氨基酸、免疫原性较强,可以诱导机体产生较强的免疫应答反应。所以通过筛选出诊断价值高的抗原,为结核病的血清学快速诊断

的优势抗原筛选提供参考价值,最终提高血清抗体检测结核病检出率与降低误诊率。

大肠杆菌是基因工程表达异源蛋白质最常见的系统,因其具有较高的表达效率而广泛应用。本实验成功构建了两种蛋白的原核表达载体,诱导、表达并纯化了两种蛋白,其中Rv1987蛋白以包涵体的形式表达,TB7.7蛋白在上清与包涵体中均表达。影响蛋白表达的因素很多,包括蛋白本身的性质、表达菌株的选择、诱导剂的浓度和菌体培养环境(温度、含氧量等、培养基营养情况等),因此我们在构建蛋白时需要考虑各方面的因素,来达到提起高纯度蛋白的目的。而通过对结核分枝杆菌的抗原蛋白的表达,我们在后续实验中可以通过建立的间接ELISA方法检测健康人及结核病患者血清中的IGM、IgG抗体水平,计算每种蛋白在诊断结核病上的灵敏度与特异性,然后在已有刺激抗原的基础上筛选出适用于我国人群的IGRAs刺激抗原,作为结核病的快速辅助诊断具有重要意义。

致谢

本文为国家大学生创新创业训练项目《诊断结核潜伏性感染的IGRA优势抗原组合的筛选》(201810759073)的阶段性成果之一。

参考文献

- [1] 张文宏,李忠明.全球结核病控制六十年规划的成果,现状和展望[J].中华微生物学和免疫学杂志,2013,33(1):47-55.
- [2] World Health Organization. Global tuberculosis report 2017.Geneva: World Health Organization, 2017: 23. http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr2017_main_text.pdf
- [3] Alcaide F, Galí N, Domínguez J, et al. Usefulness of a New Mycobacteriophage-Basd Technique for Rapid Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003,41(7):2867.
- [4] Wallis R, Doherty T, P, Vahedi M, et al. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse[J]. Lancet Infectious Diseases, 2010,10(2):70-71.
- [5] Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America: Published by The University of Chicago Press; 1992.
- [6] 李文彬,万康林.结核分枝杆菌RD区蛋白研究进展[J].中国人兽共患病学报,2018,34(04):362-371.
- [7] Sha S, Shi X, Deng G, et al. Mycobacterium tuberculosis Rv1987 induces Th2 immune responses and enhances Mycobacterium smegmatis survival in mice[J]. Microbiol Res, 2017,197: 74-80. DOI: 10.1016/j.mier.2017.01.004.
- [8] Yanzhi Lu,Jian Kang,Huanhuan Ning,Lifei Wang,Yanhui Xu,Ying Xue,Zhikai Xu,Xingan Wu,Yinlan Bai. Immunological characteristics of Mycobacterium tuberculosis subunit vaccines immunized through different routes [J]. Microbial Pathogenesis,2018.

- [9] Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, et al. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6 [J]. *Embo Journal*, 2005, 24(14):2491-2498.
- [10] 林楠, 余琴, 刘英杰, et al. Ag85A、Ag85B、16kDa和38kDa用于结核病血清学诊断的评价[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016(18):2585-2586.
- [11] Osadaoka M, Tateishi Y, Hirayama Y, et al. Antigen 85A and mycobacterial DNA-binding protein are targets of immunoglobulin G in individuals with past tuberculosis[J]. *Microbiology & Immunology*, 2013, 57(1):30.
- [12] 董恩军, 张灵霞, 张翠英. 结核分枝杆菌Ag85A和Ag85B蛋白在结核病诊断的价值 [J]. *中国热带医学*, 2011, 11(3):279-280.
- [13] Bai Y, Xue Y, Gao H, et al. Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 and MPT64 fusion protein and its immunoprophylactic potential in mouse model[J]. *Protein Expression & Purification*, 2008, 59(2):189-196.
- [14] 余琴, 林楠, 张爱洁, 徐伟, 刘英杰, 万康林. Rv2031c、38kDa及融合蛋白CFP10-ESAT6用于结核病血清学诊断的评价[J]. *中国病原生物学杂志*, 2017, 12(05):397-401.