

结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白在毕赤酵母中的融合表达 及其活性研究

刘 林 赵志安 王洪海 宋大新*

(复旦大学生命科学院,上海 200433)

摘 要 为了获得结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白在毕赤氏酵母中的高效表达,将人 α -2a 干扰素基因、结核分枝杆菌 *esat-6* 基因经 PCR 扩增并加上相应的酶切位点,两基因之间的 DNA 接头编码肠激酶识别的多肽, DNA 经酶切连接插入分泌型载体 pPIC9K,将重组表达质粒 pPIC9K- α 2a-*esat6* 用 *Sal* I 单酶切之后,电击转入 *Pichia pastoris* SMD1168 中,采用 G418 梯度筛选获得高抗性转化子。以甲醇作为诱导物,发酵 4d 后取上清,进行 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定并分析表达产物的干扰素活性。结果表明,重组菌株成功地分泌表达了分子量大小约为 30kD 的融合蛋白,表达产物不仅具有较高的干扰素活性,而且可以和结核病人血清发生特异性结合,为结核病的特异性诊断和结核病新型疫苗的研制打下了基础。

关键词 ESAT-6 蛋白, 人 α -2a 干扰素, 分泌型载体, 酵母 SMD1168, 融合表达

中图分类号 Q786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0958-05

结核病是一种人畜共患传染病,严重危害着人类的健康和畜牧业的发展,尤其是近年来结核分枝杆菌多重耐药性菌株的产生和卡介苗(BCG vaccine)免疫效果的下降,使结核病疫情再度加重,给结核病的防治提出了新的挑战。虽然卡介苗一直广泛应用于人类结核病的预防,但不少文献报道其预防效果极不稳定,尤其是对艾滋病人和 HIV 携带者等免疫功能受损的患者接种后可能导致严重的播散性结核病^[1]。因此,发展安全、高效的新型结核病疫苗势在必行。

ESAT-6 蛋白是从结核分枝杆菌短期培养滤液(ST-CF)中纯化出的一种含有 95 个氨基酸残基的分子量为 9.9kD 的分泌性蛋白^[2],有特异的免疫原性。ESAT-6 蛋白仅存在于结核杆菌群及少数几种致病性分枝杆菌中,BCG 所有菌株均缺乏该蛋白^[2,3];90% 以上的非致病性分枝杆菌菌株缺失 *esat-6* 基因^[4]。牛型结核分枝杆菌的四种分泌性蛋白 MPB59、MPB64、MPB70 和 ESAT-6 中,仅 ESAT-6 蛋白能够区分出 BCG 所免疫的动物和牛型结核分枝杆菌所感染的动物^[5];对 ESAT-6 蛋白的特异性 IFN- γ 应答仅在结核分枝杆菌所引起的肺疾病患者中存在,鸟型分枝杆菌群(MAC)引起的肺疾病患者及健康对照者均未观察到该反应^[6]。因此,ESAT-6 蛋白可以作为诊断动物和人致病性结核分枝杆菌感染的特异性诊断试剂。

抗结核分枝杆菌的免疫回忆反应是由免疫回忆效应细

胞所介导,在远交系豚鼠模型^[7]和牛 TB 动物模型^[8]中,ESAT-6 蛋白是这种效应性 T 细胞的主要靶抗原之一,可在再次结核感染的早期,诱导其迅速增殖和释放高水平的 IFN- γ ,从而有效地激活巨噬细胞。而将 ESAT-6 蛋白辅以佐剂一磷酰基脂质 A(MPL)制成亚单位疫苗,可诱导产生强烈的特异性 T 细胞反应和与 BCG 相当的保护效应^[9,10,7]。因此,ESAT-6 蛋白可作为亚单位疫苗的组分或成为 DNA 疫苗的候选抗原以达到对结核病长期、有效的预防^[11,7]。

本研究将人 α -2a 干扰素基因和结核分枝杆菌 *esat-6* 基因串联起来,linker 为人肠激酶识别的序列,插入 *Pichia pastoris* 的表达载体 pPIC9K 中,电击导入毕赤氏酵母蛋白分泌缺陷型菌株 SMD1168(*pep4*, *his4*)中,实现了重组融合蛋白的高效分泌表达。经过初步纯化,研究其生物学活性,发现其不仅具有较高的干扰素活性,而且对于结核病人血清也可以发生特异性结合,为结核病的特异性诊断和结核病新型疫苗的研制打下了基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌菌株 TOP10 为本实验室保藏;毕赤氏酵母 SMD1168(*pep4*, *his4*)由复旦大学遗传学研究所李育阳教授提供;载体 pPIC9 和 pPIC9K 为本实验室保藏;含有 *esat-6* 基因

收稿日期:2004-05-08,修回日期:2004-08-16。

基金项目:国家“863”计划项目基金资助(No. 2001AA215201)。

* 通讯作者。 Tel: 86-21-55664535; E-mail: dxsongl@etang.com

序列的质粒 E1f 由复旦大学遗传学研究所王洪海教授提供; 含人 α -2a 干扰素基因序列的质粒 α F9 由复旦大学遗传学研究所李育阳教授提供。

1.2 培养基和主要试剂

LB, LBA, YPD, RDB, MD, YPD, BMGY, BMMY 等培养基均按照美国 INVITROGEN 公司毕赤氏酵母的 MANUAL 配制; 限制性内切酶 *Xho* I、*Not* I、*Eco* R I、*Bam* H I、*Sal* I 与 T4 DNA Ligase, RNaseA 等均购自 TAKARA 公司; YNB、Peptone 和酵母粉为 DIFCO 公司产品; 所有氨基酸、生物素、甘油、甲醇、山梨醇均为华美生物公司产品; 鼠抗人 α 干扰素单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 抗体与 G418 均购自华舜公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG 抗体购自北京鼎国生物技术发展中心; 结核病人血清取自上海市肺科医院。

1.3 重组表达质粒的构建

1.3.1 *esat-6* 基因和人 α -2a 干扰素基因的 PCR 扩增: 引物由上海博亚生物有限公司合成。以 α F9 质粒为模板, 上游引物: 5' CTCTCCAGAAAAGATCTGATCTGCCTCAAACCCAC3', 引入 *Xho* I 位点, 下游引物: 5' CGGCGGCCGCTTCCTTACTTCTTAACTTTC3', 引入 *Not* I 位点; 以 E1f 质粒为模板, 上游引物: 5' CGGCGGCCGCT GATGACGATGACAAA ATGACCGAGCAGCAGTGGAAAT3', 引入 *Not* I 位点, 下游引物: 5' CGGAATCTTACTATGCGAACATCCAGTGCAGTTG3', 引入 *Eco* R I 位点, 方框中的 DNA 序列编码人肠激酶识别的多肽。循环参数为: 94℃ 5min, 然后 94℃ 变性 30s, 58℃ 复性 30s, 72℃ 延伸 1min, 共 30 个循环, 末次循环 72℃ 自动延伸 5min。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3.2 重组表达质粒的构建和鉴定: 质粒 pPIC9 用 *Xho* I 和 *Eco* R I 双酶切, 含有 α -2a 干扰素基因的 PCR 产物用 *Xho* I 和 *Not* I 双酶切, 含有 *esat-6* 基因的 PCR 产物用 *Not* I 和 *Eco* R I 双酶切。然后用 T4 DNA 连接酶进行连接, 转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 提取重组质粒 pPIC9- α 2a-*esat6*, 酶切鉴定。然后再将该重组质粒用 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切并回收小片段, 质粒 pPIC9K 亦用 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切并回收大片段, 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 TOP10, 提取重组质粒 pPIC9K- α 2a-*esat6*, 酶切鉴定, 并由上海博亚生物有限公司作 DNA 序列测定。

1.4 电转化

接种毕赤氏酵母 SMD1168 于 40mL YPD 中, 30℃ 培养至 OD_{600} 为 1.3 ~ 1.5, 4℃, 5 000r/min 离心 5min, 收集菌体, 用预冷的无菌水 50mL 和 1mol/L 的山梨醇 2mL 各洗 1 次, 最后用 1mol/L 的山梨醇 160 μ L 悬浮, 即得到 SMD1168 感受态细胞。取 80 μ L SMD1168 感受态细胞与 5 μ g 以 *Sal* I 单酶切的线性化的重组质粒混合后, 在 1300V、25 μ F、200 Ω 的条件下电击转化, 用 1mol/L 的山梨醇 1mL 悬浮后, 30℃ 保温 1h, 涂布于 RDB 平板上, 30℃ 培养 3 ~ 5d。

1.5 G418 抗性转化子的筛选

将在 RDB 平板上长出的酵母转化子菌落点种到含 G418 浓度为 1.5、3.0、4.0mg/mL 的 YPD 平板上, 逐级筛选 G418 抗

性菌株。

1.6 酵母转化子的诱导表达及表达产物的检测

将 G418 高抗性转化子接种于 50mL BMGY 培养基中, 30℃ 振荡培养过夜。菌液于室温离心 6000r/min, 6 min, 收集菌体。用 15mL BMMY 培养基悬浮, 30℃ 振荡培养 96h, 每 24 h 补加一次甲醇, 使甲醇终浓度为 1%。取发酵第 4 天的发酵液上清, 用 15% SDS-PAGE 检测。

1.7 ESAT-6 蛋白的特异性检测

发酵液上清样品经 15% SDS-PAGE 后, 用 BIO-RAD 公司的 TRANS-BLOT[®] SD SEMI-DRY TRANSFER CELL 电转移到 NC 薄膜上, 200mA 恒流电转移 2h; 以 5% 脱脂奶粉室温封闭电转移后的 NC 薄膜 1h, 用 TBS 室温振荡洗 3 次, 每次 5min; 将结核病人的血清 2mL 作为一抗, 室温孵育 1h, 用 TBS 室温振荡洗 3 次, 每次 5min; 用辣根过氧化物酶标记的山羊抗人 IgG 抗体 (以 5% 脱脂奶粉稀释 10000 倍) 作为二抗, 孵育 1h, TBS 室温振荡洗 3 次, 每次 5min; 加入 0.1mol/L Tris-HCl (pH7.5) 5mL, 100 μ L DAB 贮存液 (40mg/mL), 25 μ L NiCl₂ 贮存液 (40mg/mL) 和 3% H₂O₂ 15 μ L, 闭光显色 5min 后, 用水洗终止反应。以未插入外源基因的酵母 SMD1168 发酵液上清作为对照。

1.8 α -2a 干扰素特异性检测

方法基本同 1.7。以鼠抗人 α 干扰素单克隆抗体 (以 5% 脱脂奶粉稀释 500 倍) 作为一抗, 用辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 抗体 (以 5% 脱脂奶粉稀释 10 000 倍) 作为二抗, 于暗室中加入 DAB 缓冲液 10mL (DAB 6mg, 0.01mol/L Tris-HCl 9mL, 0.03% CoCl₂ 1mL) 后, 再加入 Peroxide Buffer 700 μ L 和 Enhancer Solution 700 μ L, 荧光显色。

1.9 表达产物的干扰素生物活性测定

分别取第 2、3、4 天发酵液上清和经初步纯化后的样品由上海万兴生物制药有限公司测定干扰素生物活性, 以未插入外源基因的酵母 SMD1168 发酵液上清作为对照。

2 结果

2.1 重组质粒 pPIC9K- α 2a-*esat6* 的构建及鉴定

重组质粒的构建如图 1。所得的重组表达质粒 pPIC9K- α 2a-*esat6* 经 DNA 序列测定证明克隆正确。

2.2 酵母转化子的筛选

电转化受体菌 SMD1168 后, 在 RDB 平板上得到的转化子点种在含 G418 的 YPD 平板上, 最终获得抗 G418 浓度为 4mg/mL 的转化子若干。

2.3 酵母转化子的表达产物的 SDS-PAGE 检测

取酵母转化子的发酵液上清直接上样, 15% SDS-PAGE。由图 2 可知, 表达产物有 3 条带, 其中一条主带大小为 30kD 左右, 另两条大小分别为 22kD 和 17kD 左右, 而未插入外源基因的酵母 SMD1168 发酵液上清对照未出现相应的条带。用 DNASTAR 软件分析插入 DNA 序列所编码蛋白的分子量为 29856.72 D, 因此初步认为上述 30kD 大小的表达产物即为目的蛋白。目的蛋白的产量约为 60mg/L 发酵液。

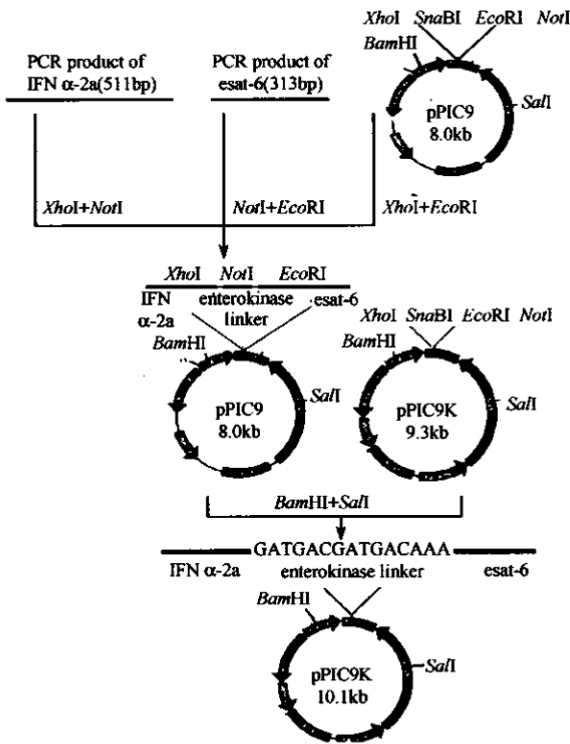


图 1 重组表达质粒 pPIC9K-α2a-esat6 的构建

Fig.1 Construction of recombinant plasmid pPIC9K-α2a-esat6

2.4 免疫印迹分析

2.4.1 ESAT-6 蛋白的免疫印迹分析: 免疫印迹反应如图 3 所示。在 30kD 左右的位置有一个明显的特异性反应条带, 阴性对照没有反应, 说明发酵液中的无关蛋白不能与结核病人的血清发生特异性反应。

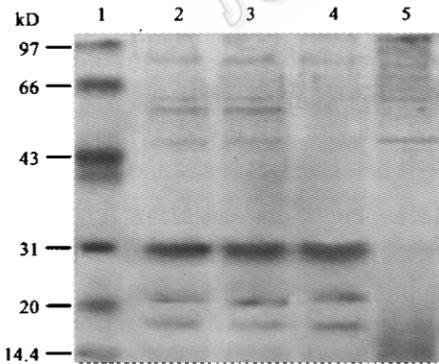


图 2 表达产物的 SDS-PAGE 检验

Fig.2 SDS-PAGE of the expression product

1: protein marker; 2~4: supernatant of SMD1168/pPIC9K-α2a-esat6; 5: supernatant of SMD1168

2.4.2 α-2a 干扰素的免疫印迹分析: 由图 4 可见, 表达产物可以与干扰素抗体发生特异性反应, 出现大小分别为 30kD、22kD 和 17kD 左右的 3 个条带, 阴性对照没有反应。

2.5 表达产物的干扰素生物活性分析

用不同发酵天数的发酵液上清样品测得的干扰素活性如表 1。

由上表可知: 从发酵第 2 天到第 4 天, α-2a 干扰素的活性逐渐升高, 其中第 3 天和第 4 天的活性差别不大。对照没有活性。通过对多批发酵液的干扰素活性分析, 发现数据很稳定, 差异不大, 上表所列数据是活性水平居中的一次实验结果。

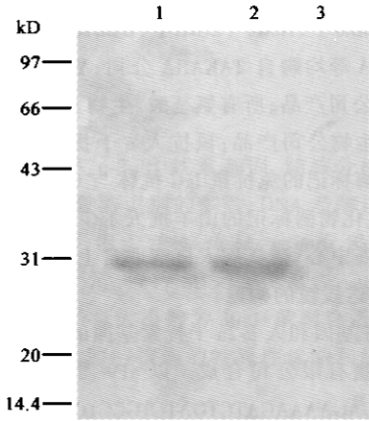


图 3 ESAT-6 蛋白的免疫印迹分析

Fig.3 Western blot with the tuberculosis patients' serum

1~2: supernatant of SMD1168/pPIC9K-α2a-esat6; 3: supernatant of SMD1168

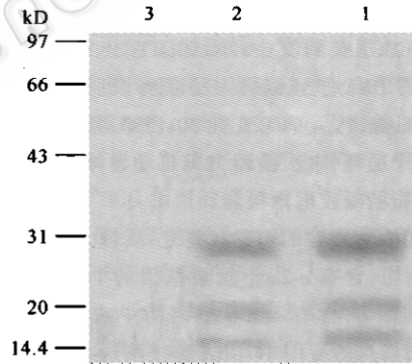


图 4 α-2a 干扰素免疫印迹分析

Fig.4 Western blot with anti-α-IFN antibody

1~2: supernatant of SMD1168/pPIC9K-α2a-esat6; 3: supernatant of SMD1168

表 1 发酵液上清样品的干扰素活性

Table 1 The biological activity of supernatant of SMD1168/pPIC9K-α2a-esat6

Sample	Second day	Third day	Fourth day	Partial purified Sample	Control
Activity of IFN/ (u/mL)	3.15 × 10 ⁵	1.24 × 10 ⁶	2.10 × 10 ⁶	2.97 × 10 ⁶	0

3 讨 论

毕赤氏酵母表达系统兼有原核细胞良好的可操作性和真核系统的翻译后加工特点, 发酵条件简单, 表达水平高, 适宜高密度培养, 如以分泌型表达还有利于产物的分离纯化, 因此得到了广泛的应用。我们选用毕赤氏酵母的蛋白酶缺

陷型菌株 SMD1168(*pep4*, *his4*)作为表达菌株,成功地实现了人 α -2a 干扰素基因和结核分枝杆菌 *esat-6* 基因在毕赤氏酵母表达系统中的融合表达。

王洪海等发现 α 干扰素在酵母中分泌表达会出现不均一性现象,出现大小分别为 21kD、19kD、14.5kD 的 3 个组分,经分析这是分泌蛋白中信号肽加工不完全以及内部降解的原因^[12]。我们在用 SDS-PAGE 检测表达产物和用免疫印迹法鉴定产物的干扰素特异性时,均发现有 3 条带存在,分子量分别为 30kD、22kD 和 17kD。而用结核病人血清做特异性检测时,仅有一条大小为 30kD 左右的条带存在。显然 30kD 左右的主条带是未降解的产物(ESAT-6 蛋白和 α -2a 干扰素的分子量分别为 9.9kD 和 19.2kD,融合蛋白的预期分子量约为 29.9kD),而 22kD 和 17kD 蛋白都是发生部分降解的产物,而且降解发生在表达产物 C 端的 ESAT-6 蛋白区域,故 N 端的 α -2a 干扰素未受破坏或大部分未受破坏,因此 α -2a 干扰素的免疫印迹检测未受到影响,出现 3 条带,而 ESAT-6 蛋白的免疫印迹检测仅出现 30kD 一条带。另外,从表达产物干扰素活性分析结果也证明表达产物 N 端的 α -2a 干扰素并未降解,其活性从发酵第 2 天到第 4 天逐渐升高。由此证明融合表达没有影响重组 α -2a 干扰素的生物活性,同时还保留了重组 ESAT-6 蛋白的免疫原性,但部分融合蛋白存在一定的降解。酵母分泌表达外源蛋白时,有时会发生降解现象,这种降解与酵母细胞膜上存在的某些蛋白水解酶有关^[12]。我们正在尝试在发酵液中添加蛋白酶抑制剂,改变培养基配方和发酵条件等,以避免和减少降解作用的发生。

Boesen 等指出,结核病的严重程度会影响对 ESAT-6 的识别,严重结核病人的 T 细胞对 ESAT-6 的识别能力不及轻微结核病患者,因为活动性结核病人的细胞免疫功能受到抑制,轻微结核病人则能产生较强的 IFN- γ 反应。^[13]我们在研究中也发现了类似的现象,在用发酵液上清做免疫印迹检测时,以不同结核病人的血清作为抗体,反应强弱有很大不同,轻症病人的血清反应一般比较灵敏,而很多重症病人的血清反应很弱甚至根本没有反应。

将 *esat-6* 和 α -2a 干扰素基因串联起来表达,所表达的融合蛋白有望成为结核病疫苗的候选物,既可以利用 ESAT-6 蛋白的免疫原性刺激人体产生抗体,又可以发挥干扰素的抗病毒和增强免疫力的功效。在本研究中,酵母所表达的融合蛋白的 N 端为重组 α -2a 干扰素,接头为肠激酶识别序列, C 端为重组 ESAT-6 蛋白,如果直接将融合蛋白导入体内,利用人体自身的肠激酶可分离 α -2a 干扰素和 ESAT-6 蛋白,也可以在体外通过酶切反应就实现分离。表达产物不仅具有较高的干扰素活性,而且可以和结核病人的血清发生特异性结合,因此在结核病的快速诊断和疫苗的研制上具有潜在的应用前景。

致 谢 本研究得到复旦大学生命科学学院李育阳教授、钟江教授和袁汉英副教授以及上海万兴生物制药有限公司的帮助,谨此致谢。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Xie YE(谢勇恩), Bao L(鲍朗), Chen W(陈炜) *et al.* Construction of the fused expression vector of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85A and ESAT-6 antigens and its expression in *E. coli*. *Chinese Journal of Zoonoses* (中国人兽共患病杂志), 2002, 18(2): 28 - 31
- [2] Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL *et al.* Recall of long-lived immunized to *Mycobacterium tuberculosis* infect in mice. *Immunol*, 1995, 154(7): 3359 - 3372
- [3] Sorensen AL, Nagai S, Hoven G *et al.* Purification and characterization of a low-molecular-mass T cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis* infect in mice. *Infect Immun*, 1995, 63(5): 1710 - 1717
- [4] Pollock JM, Andersen P. The potential of the ESAT-6 antigens secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis. *Infect Dis*, 1997, 175(5): 1251 - 1254
- [5] Buddle BM, Parlane NA, Keen DL *et al.* Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG vaccinated and *M. bovis* infected cattle by using recombinant mycobacterial antigens. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, 6(1): 1 - 5
- [6] Lein AD, von Reyn CF, Ravn P *et al.* Cellular immune response to ESAT-6 discrimination between patients with pulmonary disease due to *Mycobacterium avium* complex and those with pulmonary disease due to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, 6(4): 606 - 609
- [7] Elhay MJ, Oettinger T, Andersen P *et al.* Delayed typed hypersensitivity responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the Guinea pig. *Infect Immun*, 1998, 66(7): 3454 - 3456
- [8] Pollock JM, Andersen P. Predominant recognition of the ESAT-6 protein in the first phase of interferon with *Mycobacterium bovis* in the cattle. *Infect Immun*, 1997, 65(7): 2587 - 2592
- [9] Brondt L, Elhay M, Rosenkrands I *et al.* ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 2000, 68(2): 791 - 795
- [10] Harboe M, Oettinger T, Wiker HG *et al.* Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*, 1996, 64(1): 16 - 22
- [11] Ravn P, Demissie A, Eguale T *et al.* Human T cell responses to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis*, 1999, 179(3): 637 - 645
- [12] Wang HH(王洪海), Gao BY(高卜渝), Li YY(李育阳) *et al.* Analysis of heterogeneity of gene products(interferon) expressed in yeast. *Science in China (series B)*(中国科学 B 辑), 1995, 38(8): 954 - 962
- [13] Boesen H, Jeansen BN, Wicke T *et al.* Human T cell response to secreted antigens fractions of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1995, 63(4): 1491 - 1497

Fusion Expression and Biological Activity Analysis of ESAT-6 Protein in *Pichia pastoris*

LIU Lin ZHAO Zhi-An WANG Hong-Hai SONG Da-Xin *

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract The object is to obtain the high-level expression of ESAT-6 protein secreted by *Mycobacterium tuberculosis* in *Pichia pastoris*. Human IFN α -2a and esat-6 genes were amplified by PCR. The DNA linker between the two genes encodes the polypeptide which is specifically recognized by enterokinase. The recombinant genes were inserted into *Pichia pastoris* expression vector pPIC9K containing AOX1 and α secreting signal peptides, the recombinant plasmid was constructed and transformed into *Pichia pastoris* SMD1168. The high expressed transformants obtained by G418 screening were fermented in flasks and induced by 1% methanol. After 4 days methanol induction, the recombinant protein was identified by SDS-PAGE, Western blot and biological activity of α -IFN. The SDS-PAGE and Western blot analysis showed that the molecular weight of expressed recombinant protein was about 30kD and the expressed protein could specifically react with the serum of tuberculosis patients. The expressed protein was also proved to react specifically with anti- α IFN antibody and have high biological activity of IFN. High-level expression of secreted IFN- α -2a-ESAT-6 fusion protein with good biological activity was successfully achieved in *Pichia pastoris* expression system, which could be applied to diagnose tuberculosis and develop TB new vaccine.

Key words ESAT-6, IFN α -2a, secretion vector, yeast SMD1168, fusion expression

Received: 05-08-2004

This work was supported by Grant from National "863" Project (No. 2001AA215201).

* Corresponding author. Tel: 86-21-55664535; E-mail: dxsong1@etang.com