

结核分枝杆菌 Lsr2 蛋白原核重组表达及其多克隆抗体制备

孙卫国¹, 侯江厚², 李改平³, 杨栗坤¹, 孙雯娜¹, 张灵霞¹

1. 解放军总医院第八医学中心, 全军结核病防治重点实验室, 结核病诊疗新技术北京市重点实验室, 北京 100091;
2. 昆明市妇幼保健院, 云南 昆明 650013; 3. 解放军第 309 医院呼吸科, 北京 100091

摘要: **目的** 利用原核系统获得重组结核分枝杆菌 Lsr2 蛋白, 制备抗 Lsr2 多克隆抗体。 **方法** 以临床标准株 H37Rv DNA 为模板, 合成引物 PCR 扩增 Lsr2 核酸序列, 插入原核表达载体 pET28a, 转化大肠杆菌 Rosetta (DE3), 经 IPTG 诱导表达, 柱上复性纯化后, 重组蛋白免疫新西兰大白兔, 制备并纯化抗 Lsr2 多克隆抗体, 采用间接 ELISA 和 Western-blotting 实验对抗体进行验证。 **结果** 成功构建 pET28a-Lsr2 表达质粒, 重组蛋白 Lsr2 经 SDS-PAGE 电泳鉴定分子量为 14 kD。亲和层析及柱上复性后, 纯化的重组蛋白纯度在 95% 左右。制备的抗 Lsr2 多克隆抗体效价在 $1:5.5 \times 10^6$ 以上, 并能特异性识别纯化的重组蛋白和结核分枝杆菌菌体蛋白。 **结论** 成功在原核系统内表达并纯化了重组结核分枝杆菌 Lsr2 蛋白, 制备了高效价的抗 Lsr2 多克隆抗体, 为进一步研究 Lsr2 蛋白的功能, 筛选其下游相互作用蛋白以及相关分子机制研究奠定了基础。

关键词: 结核分枝杆菌; Lsr2 蛋白; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: R378 文献标识码: A 文章编号: 1006-3110(2019)04-0400-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.04.005

Prokaryotic recombinant expression of *Mycobacterium tuberculosis* Lsr2 protein and its polyclonal antibody preparation

SUN Wei-guo¹, HOU Jiang-hou², LI Gai-ping³, YANG Li-kun¹, SUN Wen-na¹, ZHANG Ling-xia¹

1. Army Tuberculosis Prevention and Control Key Laboratory, Beijing Key Laboratory of

New Techniques of Tuberculosis Diagnosis and Treatment,

Institute for Tuberculosis Research, the Eighth Medical Center of General Hospital of PLA, Beijing 100091, China

2. Maternal and Child Health Care Hospital of Kunming City, Kunming, Yunnan 650013, China

3. Department of Respiratory Medicine, the 309th Hospital of Chinese PLA, Beijing 100091, China

Corresponding author: ZHANG Ling-xia, E-mail: zhanglingxia7@163.com

Abstract: **Objective** To obtain recombinant *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) protein Lsr2 in prokaryotic expression system, and to prepare its polyclonal antibody. **Methods** Primers of Lsr2 sequence were synthesized according to the sequence of the *M. tuberculosis* H37Rv genome. Lsr2 was amplified by PCR and cloned into prokaryotic expression vector pET-28a. The recombinant plasmid pET-28a-Lsr2 was transformed into *Escherichia coli* Rosetta (DE3). The expression of the recombinant protein was induced with isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG), then renatured and purified by metal chelate chromatography. New Zealand rabbits were immunized to prepare polyclonal antibody against Lsr2. The antibody was identified by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blotting assay. **Results** pET-28a-Lsr2 was constructed successfully. Recombinant Lsr2 protein had a relative molecular mass of about 14 kD according to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After affinity purification and on-column refolding, the purity of the recombinant protein reached about 95%. The titer of the prepared polyclonal antibody was more than $1:5.5 \times 10^6$, and the antibody could recognize the purified recombinant Lsr2 protein or Lsr2 protein in *M. tuberculosis* H37Rv lysate. **Conclusion** The recombinant *M. tuberculosis* protein Lsr2 is successfully expressed and purified in prokaryotic expression system, and anti-Lsr2 polyclonal antibody with high specificity is obtained, which lays a foundation for further studying the function of Lsr2, screening its interaction proteins and investigating its related molecular mechanisms.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Lsr2 protein; prokaryotic expression; polyclonal antibody

基金项目: 国家传染病重大项目 (2013ZX-10003-006); 解放军第 309 医院面上课题 (No. 2016MS-001)

作者简介: 孙卫国 (1973-), 男, 安徽怀宁人, 博士, 助理研究员, 研究方向: 传染性疾病临床诊断标志物筛选。

通信作者: 张灵霞, E-mail: zhanglingxia7@163.com。

根据 2016 年 WHO 发布的报告,我国是全球结核病高发率的国家之一,患病总人数居世界第三位^[1],结核病的防治和新型疫苗的研发愈发紧迫^[2]。在感染结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tuberculosis*) 携带者中,只有很少一部分人群因为免疫力低下或者是合并其他感染发展成为活动性结核病 (active tuberculosis, ATB), 一部分感染者因为结核分枝杆菌在体内长期存在,成为无症状的潜伏感染人群 (latent tuberculosis infection, LTBI)。对 LTBI 人群的早诊断,采取新预防和治疗措施对阻止结核病扩散和进行治疗都具有重大意义。Lsr2 在 *M. tuberculosis* 潜伏感染中发挥重要作用,它作为 *M. tuberculosis* 的拟核结合蛋白,对诸多 *M. tuberculosis* 潜伏感染相关蛋白的基因表达进行调控,从而对 *M. tuberculosis* 起到保护作用^[3]。作为转录调控因子,目前发现受 Lsr2 调控的 *M. tuberculosis* 基因有 401 个^[4],它往往采用固化和折叠的方式与 DNA 片段形成 Lsr2-DNA 复合物,导致相关基因的表达受到抑制从而达到调控作用。Lsr2 主要调控 *M. tuberculosis* 在潜伏感染状态适应氧浓度的变化,使 *M. tuberculosis* 在相对缺氧的条件下长期存活并可能发展成为致病菌。目前针对 Lsr2 的生物学特性已有阐述^[4],但其详细的功能作用以及分子作用机制尚未有确切的实验结果支撑,与其相互作用的下流蛋白和调控网络有待新的发现。本研究通过原核表达系统对 Lsr2 蛋白进行重组表达与纯化,分析重组蛋白的免疫原性,并制备能特异识别 Lsr2 蛋白的多克隆抗体,为更深研究该蛋白的分子作用机制,寻找下游相互作用蛋白以及网络通路奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株 原核质粒 pET-28a、菌种 Rosetta (DE3) 系本室保存,其感受态细胞由本室制作,活动性肺结核患者血清样本由本室临床实验室收集保存。

1.1.2 实验动物 雄性新西兰大白兔,体重约 2 kg,由本室实验动物中心购买并饲养。

1.1.3 仪器与试剂 结核分枝杆菌 H37Rv 标准株 DNA 本室提取保存;引物由华大基因公司合成,常规分子生物学实验试剂盒购自 OMEGA 公司,限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司(美国);PCR 所需试剂来自天根生化生物公司(国产);蛋白质相对分子质量 marker (美国 Sigma 公司);HRP 标记羊抗人 IgG 购自华美生物技术公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 和化学发光检测试剂盒购自天根生化;Ni-Sephrose

chelating Sepharose Fast Flow 亲和树脂填料购自美国 GE 公司,本室装填纯化柱;Protein A 亲和层析预装柱为 GE 公司;其它试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 引物合成 通过 NCBI 查 Lsr2 的 Gene ID 号为 NC_000962.3,根据其全基因序列设计引物为:正 5'-ccccatattggcgaagaagaagtaac-3',反 5'-ccgctcgagtttagtcgc-cgcgtgggt-3',为了便于后期的克隆实验,在上下游 5' 和 3' 端分别加入限制酶 NdeI (CATATG) 和 Xho I (CTC-GAG) 酶切位点,并在 3' 端加入大肠杆菌终止密码子 taa。

1.2.2 重组原核表达载体构建 以结核分枝杆菌 H37Rv 标准株 DNA 为模板进行 PCR 扩增,优化 PCR 反应条件直至获得单一条带,扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定,切胶回收 PCR 产物。用内切酶 NdeI 和 Xho I 分别双酶切 pET-28a 载体和 PCR 产物,按摩尔比 3:1 的比例混合回收的双酶切产物,16 ℃ 连接过夜。连接产物转化感受态大肠杆菌 Rosetta (DE3),菌落 PCR 筛选阳性克隆,筛选测序正确的工程菌进行保存和诱导鉴定,获得表达菌株 pET28a-Lsr2。

1.2.3 Lsr2 重组蛋白原核表达与纯化 将阳性工程菌株转接含有 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 培养基中,37 ℃ 活化过夜,转种扩大增菌。37 ℃ 恒温震荡培养至菌液生长 A₆₀₀ 值为 0.5 时加入 IPTG 至终浓度为 0.6 mmol,于 37 ℃ 继续诱导过夜,离心收集菌体,冰浴状态下超声破菌后,分别收集上清和沉淀,行 SDS-PAGE 电泳分析重组蛋白的表达形式。考虑 Lsr2 蛋白结合 DNA 结构域特点,选择载体时,将利于纯化的 6 个组氨酸标签安置重组蛋白的 N 端,由于 Lsr2 绝大部分以包涵体的形式存在,采用柱上复性的方法对重组蛋白进行复性和纯化,复性和纯化的整个过程在 PBS 缓冲液体系中进行。沉淀包涵体以 1% Triton X-100 洗涤 2 次,以 7 mol/L 尿素溶液对洗涤后的包涵体进行充分溶解,上清过镍离子螯合的亲亲和层析柱,PBS 缓冲液缓慢平衡四个柱积,以 50 mmol/L 咪唑除去结合力差的杂蛋白,150 mmol/L 咪唑洗脱收集复性后重组蛋白,以 15% SDS-PAGE 电泳鉴定纯化后蛋白纯度。

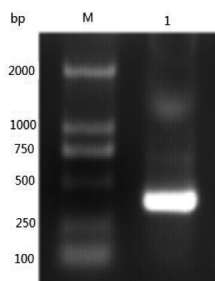
1.2.4 抗 Lsr2 多克隆抗体的制备 以 PBS 将 Lsr2 蛋白稀释成 1 mg/ml 备用,取 0.5 ml 加入等体积弗氏完全佐剂混合,完全乳化后,经背部脊柱两侧、皮下多点注射免疫新西兰大白兔;然后在第 14 d 和第 28 d 以同样剂量的重组蛋白进行加强免疫两次,其中后两次免疫以弗氏不完全佐剂进行乳化。第 3 次免疫一周后,经兔耳缘静脉采血,间接 ELISA 法测定抗血清效

价,同时再加强免疫 1 次。符合要求后心脏穿刺取血,分离血清,用 protein A Sepharose 预装柱纯化抗 Lsr2 多克隆抗体,方法见文献[5]。纯化产物 SDS-PAGE 电泳鉴定、分装后-70℃冰箱保存。

1.2.5 抗 Lsr2 多克隆抗体的鉴定 (1)抗体的效价测定:用纯化的 Lsr2 重组蛋白以 10 μg/ml 包被 96 孔板,每孔 100 μl 包被过夜,然后于 37℃条件下封闭 2 h,用 PBS-Tween(0.05%)洗板 5 次,分别加入不同稀释度的纯化后 IgG 多克隆抗体,以 PBST 作为空白对照,37℃再孵育 2 h 后;重新洗板若干次,每孔再加入用 PBST 按 1:1 000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgG 100 μl,37℃孵育 1 h,PBST 洗涤后加入 TMB 底物显色,加入 2 mol/L 的 H₂SO₄ 终止反应。酶标仪测定 495 nm 波长处吸光值。(2)Western blotting 实验:重组蛋白的抗原性检测:重组 Lsr2 蛋白配制成 1 mg/ml 的母液,取 2 μl 行常规 15% SDS-PAGE 电泳,半干法电转到硝酸纤维素膜上,5%的脱脂奶粉室温封闭 2 h,分别以 1:20 稀释的结核患者或健康人血清 37℃孵育 2 h,PBST 缓冲液洗涤后、以 HRP 标记的羊抗人 IgG 37℃孵育 1 h,漂洗干净,通过 ECL 暗室自动曝光显影,分析该重组蛋白的抗原性。(3)多克隆抗体生物学活性检测:重组 Lsr2 蛋白、*M. tuberculosis* 菌体蛋白不同泳道 15% SDS-PAGE 电泳后,以制备的多克隆抗体为一抗(1:500),HRP 标记山羊抗兔 IgG 为二抗,其它方法同常规 Western blotting 实验步骤,暗室曝光显影验证,多克隆抗体重组蛋白以及菌体蛋白发生免疫反应的特异性。

2 结果

2.1 pET-28a-Lsr2 原核表达载体构建 以临床标准株 H37Rv DNA 为模板进行 PCR 扩增获得 Lsr2 核酸序列,通过分子克隆技术插入到 pET-28a 表达载体上,PCR 产物经 1%的琼脂糖电泳鉴定,大小在 340 bp 左右,与报道的一致,见图 1。

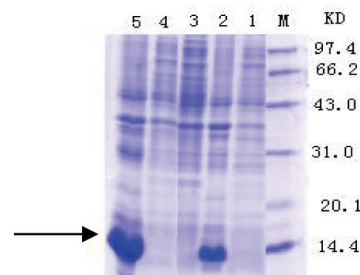


注:M:marker DNA 2000;1: Lsr2 核酸 PCR 产物。

图 1 Lsr2 核酸 PCR 产物凝胶电泳鉴定结果

2.2 Lsr2 原核重组表达、纯化与鉴定 Lsr2 表达菌株经活化与 IPTG 诱导后,重组蛋白主要以包涵体的

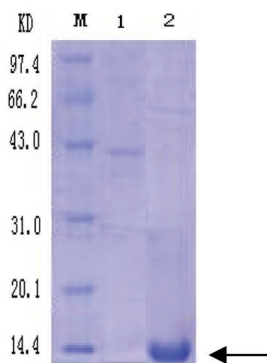
形式存在,其分子量大约在 14 KD,同预期一致。表达的包涵体蛋白占沉淀蛋白 50%以上,见图 2。



注:M:低分子量蛋白标准;1:无诱导对照;2:表达的全菌体;3~4:超声后上清;5:超声后沉淀。

图 2 Lsr2 原核表达产物表达形式 SDS-PAGE 分析

包涵体经柱上复性后纯度可达 95%以上,高纯度的重组蛋白有利于获得多克隆抗体的特异性,纯化后收集蛋白样品电泳结果见图 3,复性后蛋白样品经水透析冰干保存。



注:M:低分子量蛋白标准;1:洗脱的杂蛋白;2:纯化的 Lsr2。

图 3 Lsr2 包涵体柱上复性产物 SDS-PAGE 分析

2.3 Lsr2 多克隆抗体的制备、纯化及效价测定 获得免疫后的分离血清,用 Protein A Sepharose 预装柱对抗 Lsr2 多克隆抗体进行了纯化,SDS-PAGE 电泳结果见图 4,获得的 IgG 条带清晰,纯度高,无杂带和降解。

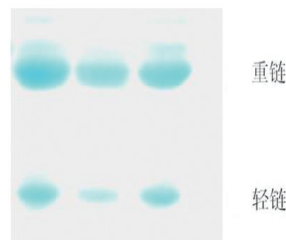


图 4 纯化 Lsr2 多克隆抗体的 SDS-PAGE 分析

以纯化后的重组 Lsr2 蛋白为包被抗原,运用间接 ELISA 实验测定经免疫并纯化获得的多克隆 IgG 抗体的效价,滴度曲线见图 5,以 A_{450 nm} 值大于 1.0 的最高稀释度判断抗体效价为 1:5.5×10⁵ 以上。

2.4 重组 Lsr2 蛋白免疫原性及其多克隆抗体的

Western blot 鉴定 将 TB 患者和健康人的血清分别与重组蛋白进行印记实验,实验结果显示结核患者的血清抗体能与纯化的重组蛋白发生特异抗原抗体反应,而对照组健康人血清抗体没有出现条带。表明纯化后的重组蛋白结核患者血清而言具有强的抗原性以及特异性,见图 6。

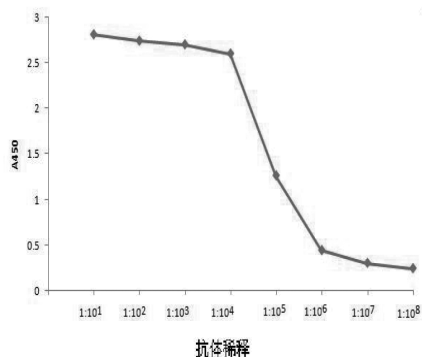


图 5 ELISA 检测多克隆抗体效价



注: 1、2: TB 患者血清; 3: 健康人血清对照。

图 6 Lsr2 重组蛋白与 TB 患者血清 Western Blot 抗原性分析
将纯化的重组 Lsr2 蛋白、*M. tuberculosis* 菌体超声破碎总蛋白与纯化的 Lsr2 多克隆抗体进行反应, Western blot 结果显示,纯化后的多克隆抗体能与重组 Lsr2 蛋白以及菌体蛋白发生特异性反应,在相对分子质量处可见特异单一的反应条带,由于重组蛋白 N 端带有标签蛋白,电泳行为上分子量大于 *M. tuberculosis* 自身 Lsr2 蛋白,同预期一致。见图 7。



注: 1、2: 重组蛋白; 3: 无关对照蛋白; 4、5: *M. tb* 菌体蛋白。

图 7 Lsr2 多克隆抗体 Western Blot 鉴定

3 讨论

在世界感染 *M. tuberculosis* 的人口中,只有 8% 左右发展成为活动性结核病,大部分成为 LTBI, *M. tuberculosis* 这种长期处于潜伏感染状态为最终消灭结核病带来很大困难^[6]。在宿主免疫力低下时,处于这种潜伏感染状态的 *M. tuberculosis* 开始生长,导致组织损伤或死亡^[7]。Lsr2 蛋白作为 *M. tuberculosis* 全局性的转录调控因子,在 *M. tuberculosis* 潜伏感染状态发挥着极其重要作用,它参与调控结核分枝杆菌的诸多蛋白表达,如能量代谢、有氧呼吸、细胞壁肽聚糖合成

以及分枝菌酸的合成等^[8]。Lsr2 参与调控的基因主要是编码重要毒力因子的基因, Lsr2 与 *M. tuberculosis* 中多个基因区域相结合形成稳定的复合物,从而抑制参与毒力作用、代谢功能以及具有抗原性的基因的表达,使 *M. tuberculosis* 在宿主体内处于这种结核潜伏感染的状态。

阐明 Lsr2 蛋白结构、功能以及它作用的分子机制和调控通路网络具有重要意义,可以设计针对 Lsr2 靶标的作用分子,对 *M. tuberculosis* 这种潜伏状态进行阻止,达到对 LTBI 防控作用。为了更深层次的研究 Lsr2 扮演的角色,在原核系统内表达纯化了 Lsr2 蛋白。参照 Lsr2 的结构功能域特点,其属于组蛋白样的 DNA 结合蛋白,由 N 端聚合结构域和 C 端 DNA 结合结构域(DNA binding domain)组成,将亲和纯化的标签加入重组蛋白的 N 端,有利于保持蛋白的功能特性。在获得 Lsr2 重组蛋白后,本研究将其免疫新西兰白兔获得的多克隆抗体具有高效价,实验发现 Lsr2 重组蛋白具有良好的免疫原性和免疫学特性,其多克隆抗体能特异识别重组蛋白以及 *M. tuberculosis* 菌体蛋白。本研究为后续的 co-ip 实验、凝胶阻滞等实验的开展奠定工作基础,同时获得的重组蛋白不仅可以开展 *M. tuberculosis* 研究潜伏感染维持的分子机制,也可以作为针对活动性结核病和结核潜伏感染的候选的一种靶抗原。

参考文献

- [1] World Health Organization. Global tuberculosis report 2016 [EB/OL]. (2016-10-13) [2018-04-01]. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/.
- [2] 王巧智, 龚德华. 结核病疫情现状和控制策略[J]. 实用预防医学, 2017, 24(3): 257-259, 351.
- [3] Gordon BR, Li Y, Wang L, et al. Lsr2 is a nucleoid associated protein that targets AT-rich sequences and virulence genes in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(11): 5154-5159.
- [4] 肖佳妮, 陈颖盈, 王颖. 分支杆菌 Lsr2 蛋白的结果、功能及其与结核病防控[J]. 生命科学, 2017, 29(5): 415-420.
- [5] 钟丹, 易维京, 李淑慧, 等. 一种改良的高效单特异性兔多克隆抗体的制备方法[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(4): 315-316.
- [6] Kaufmann SHE. Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box[J]. Immunity, 2010, 33(4): 567-577.
- [7] Hamborg M, Kramer R, Schante CE, et al. The physical stability of the recombinant tuberculosis fusion antigens h1 and h56[J]. J Pharm Sci, 2013, 102(10): 3567-3578.
- [8] Albanna AS, Bachmann K, White D, et al. Serum lipids as biomarkers for therapeutic monitoring of latent tuberculosis infection[J]. Eur Respir J, 2013, 42(2): 547-550.

收稿日期: 2018-04-04