文章编号: 1001-0580(2009)05-0513-03　中图分类号: R 378.91+1　文献标识码: A　【专题报道】

结核杆菌 PEPCK表达及保护性免疫反应效果*

柏雪莲[1], 魏庆宽[2], 李瑾[2], 李桂萍[2], 韩广东[2], 崔勇[2], 刘克义[3]

摘　要: 目的　研究结核杆菌磷酸烯醇型丙酮酸羧激酶(PEPCK)的表达, 并观察此融合蛋白使机体产生的保护性免疫反应。方法　将含有结核杆菌磷酸烯醇型丙酮酸羧激酶(*pckA*)基因的重组质粒转化大肠埃希菌 HB_{101}, 表达出融合蛋白 PEPCK, 并进行蛋白质印迹(Western blot)分析; 选 BALB/c小鼠 60只, 随机分为实验组和对照组。实验组每只小鼠用表达的 PEPCK 10 μg加弗氏不完全佐剂进行腹腔免疫注射, 对照组小鼠仅用弗氏不完全佐剂注射。每隔 2周免疫 1次, 共免疫 3次。末次免疫 2周后, 分别取小鼠脾脏、血清, 检测 $CD4^+$ T细胞和 $CD8^+$、T细胞及各细胞因子。结果　成功表达出融合蛋白 PEPCK, 并能够与小鼠抗卡介苗(BCG)血清反应; 实验组小鼠的脾脏明显增大, 粘连严重; $CD4^+$ T细胞增殖明显(73.5±3.69), $CD4^+$/$CD8^+$ 比值显著升高(5.1±0.98)($P<0.01$); 血清中 γ干扰素(IFN-γ)、白介素 12(IL-12)和 α肿瘤坏死因子(TNF-α)均有不同程度的升高。结论　PEPCK能够诱发小鼠产生细胞免疫和体液免疫反应, 是很好的抗结核疫苗候选分子之一。

关键词: 结核杆菌; 磷酸烯醇型丙酮酸羧激酶; 免疫保护

Expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Mycobacterium bovis* BCG and relative immune responses in mice

BAI Xue-lian, WEI Qing-kuan, LI Jin, et al. Department of Pathogen and Biology, Binzhou Medical University (Binzhou 256603, China)

Abstract Objective To express the recombinant protein of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) of Mycobacterium bovis and research the protective immune responses induced by the protein. **Methods** The recombinant plasmid of pHF/pckA which included pckA gene of Mycobacterium bovis was transformed into Escherichia coli HB_{101} (E. coli HB_{101}). The recombinant protein of PEPCK was expressed and identified by SDS-PAGE and Western blot. Sixty BALB/c mice were divided into two groups. Each mouse in experimental group was injected with emulsion containing 10 μg PEPCK antigen(Ag) in PBS and equal volumes of incomplete Freund's adjuvant(Difco) through the peritoneal. In control group, each mouse was only injected with equal volumes of incomplete Freunds adjuvant. All mice were immunized for three times at an interval of two weeks. Spleens and blood were taken for the detection of $CD4^+$, $CD8^+$ T cells and cytokines 2 weeks after the final immunization. **Results** The recombinant PEPCK was expressed and identified by Western blot. The spleen of mouse in PEPCK immunized group was much bigger than that of control group. The number of $CD4^+$ T cells and the ratio of $CD4^+$/$CD8^+$ in the PEPCK immunized group were significantly higher than that of control group ($P<0.01$). The amount of interferon-gamma, interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha in PEPCK immunized mice was higher than that of control group ($P<0.05$). **Conclusion** PEPCK can induce strong cellular and humoral immune responses and may be a good candidate for TB vaccine.

Key words mycobacterium tuberculosis; phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK); immune protection

结核病是由结核杆菌感染所致的慢性传染病。现有使用的预防结核的卡介苗保护作用不稳定。所以寻找既可作为抗结核的疫苗, 又可作为抗结核药靶的候选分子是研究的热点。基因组分析发现, 结核杆菌含有磷酸烯醇型丙酮酸羧基酶基因。在很多微生物中, 磷酸烯醇型丙酮酸羧基酶(PEPCK)催化草酰乙酸和磷酸烯醇型丙酮酸之间的可逆性反应。所以, PEPCK在结核致病和诱导机体免疫中可能起重要作用。本研究在大肠埃希菌(E. coli HB_{101})中表达了结核杆菌 PEPCK, 并用其免疫小鼠, 观察其刺激小鼠产生的免疫反应, 研究其免疫原性, 为寻找更好的抗结核疫苗成分提供参考依据。

1　材料与方法

1.1　材料　带有 *pckA* 基因片断的重组质粒 pHF/*pckA*(美国康耐尔大学); 大肠埃希菌 HB_{101}(中国科学院微生物研究所); 18~22 g清洁级纯种 BALA/C小鼠(山东大学医学院实验动物中心), 6~8周龄。

1.2　主要试剂及仪器　日常型质粒 DNA小量快速制备试剂盒(杭州 V-gene公司); 镍金属螯合亲和层析(BBST NTA Resin)蛋白质纯化试剂盒(上海博彩生物公司); 还原型谷胱甘肽、氧化型谷胱甘肽等(华美生物工程公司); 弗氏不完全佐剂、卡介苗(BCG)免疫鼠血清均为本实验室配制; 小牛血清(BSA)(上海复旦天呈公司); 碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗鼠 IgG结合物, 碱性磷酸酶(AP)标记的大鼠抗小鼠 γ干扰素(IFN-γ)、白介素 12(IL-12)和 α肿瘤坏死因子(TNF-α)单抗及兔抗大鼠 IgG结合物(美国 Sigma公司); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG结合物、4-氯萘酚(北京中山生物技术有限公司); 异硫氰酸荧光素(FITC)标记的小鼠 IgG 2a, 藻红蛋白(PE)标记的 IgG 2a及两者的同型对照(美国 BD公司); FC500型流式细胞仪(美国 BECKMAN-COULTER公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　PEPCK蛋白在大肠埃希菌 HB_{101}中的表达　将重组质粒 pHF/*pckA* 转化大肠埃希菌 HB_{101}, 于含氨苄青霉素的固体琼脂培养板上培养, 挑取阳性克隆, 按 1∶50的比例接种于含氨苄青霉素的液体琼脂培养基中, 37℃摇菌, 加入异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG), 终浓度为 1 mmol/L, 继续摇菌 5

* 基金项目: 国家自然科学基金(30340073)
作者单位: 1. 滨州医学院病原生物学教研室, 山东 滨州 256603; 2. 山东省寄生虫病防治研究所; 3. 美国康乃尔大学
作者简介: 柏雪莲(1978-), 女, 山东章丘人, 讲师, 硕士, 研究方向: 病原生物的分子生物学及免疫学。
通讯作者: 刘克义

h。收集菌液, 8 000 r/min离心 5 min, 在沉淀中加入适量的磷酸盐缓冲液 (PBS)和等量的 3×电泳上样缓冲液, 剧烈震荡, 沸水浴, 12 000 r/min离心 5 min, 取上清进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE)分析。

1.3.2 表达产物的纯化和复性 收集异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG)诱导表达的转化菌, 按 BBST NAT Resin蛋白质纯化试剂盒说明在非变形条件下纯化重组的融合蛋白, 将纯化好的蛋白质装入透析袋, 复性液 (含有 pH 8.3 20 mmol Tris-HCl, 1 mmol乙二胺四乙酸, 2 mmol还原型谷胱甘肽, 0.2 mmol氧化型谷胱甘肽)中 4℃, 24 h, 然后用聚乙二醇 (PEG2000)进行浓缩, 用紫外线分光光度仪 (UV 3000)测定蛋白质含量。

1.3.3 蛋白印迹分析 (Western blot) 表达产物和从卡介苗中提取的蛋白经 SDS-PAGE电泳后转移至硝酸纤维素膜上, 加小牛血清封闭, 室温摇床振摇 3 h, 磷酸盐缓冲液漂洗 3次, 加入卡介苗免疫的小鼠血清 (1∶50), 室温振摇 2 h, 冲洗 3次, 加入 1∶5 000羊抗鼠抗体, 室温摇 2 h, 加入 4-氯萘酚, 37℃显色。

1.3.4 免疫接种 选 BALB/c小鼠 60只, 雌雄各半, 分为实验组和对照组。实验组每只小鼠腹腔注射表达的重组蛋白 PEPCK 10 μg 加相同体积的弗氏不完全佐剂; 对照组小鼠仅腹腔注射相同量的弗氏不完全佐剂, 隔 2周免疫 1次, 共免疫 3次。

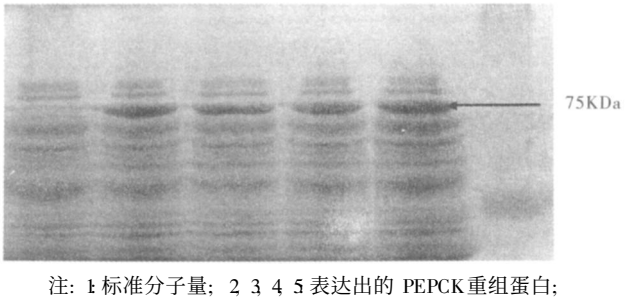
1.3.5 收集、检测 T淋巴细胞 末次免疫接种 2周后, 各组剖杀部分小鼠, 收集血清, 无菌取脾, 制备淋巴细胞悬液。将淋巴细胞悬液浓度调节至 5×10^6/mL, 检测 $CD4^+$的单抗为异硫氰酸荧光素 (FITC)标记的小鼠 IgG 2a, 测 $CD8^+$的单抗为藻红蛋白 (PE)标记的 IgG 2a, 两者配以同型对照, 用流式细胞仪测定。

1.3.6 细胞因子的检测 末次免疫 2周后杀死部分小鼠, 用收集到的血清作为抗原, 按 1∶64包被 ELISA反应板; 抗 IFN-γ、IL-12和 TNF-α的大鼠抗小鼠单克隆抗体 (McAb) (1∶3 000)为一抗, 兔抗大鼠 IgG-AP结合物 (1∶2 500)为二抗, 对硝基苯基磷酸钠 (pNPP)底物显色, 测吸光度 (A_{405})值, 实验组 A值/阴性对照组 A值 > 2.1为阳性, 并计算各细胞因子的平均几何滴度。

1.4 统计分析 采用 SPSS 10.0统计软件进行分析。

2 结 果

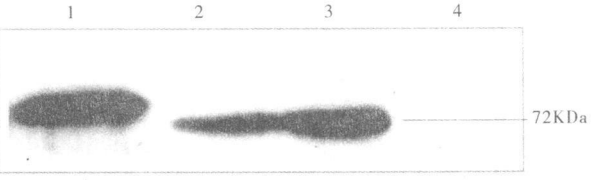
2.1 PEPCK融合蛋白的表达 (图 1) 将重组克隆转化大肠埃希菌 HB_{101}, 通过 IPTG诱导, 进行 SDS-PAGE分析, 发现此克隆表达出 72 KDa的蛋白, 与理论预测的 PEPCK分子量大小一致, 未转化的大肠埃希菌没有此蛋白的表达。



注: 1:标准分子量; 2, 3, 4, 5:表达出的 PEPCK重组蛋白; 6:正常大肠埃希菌对照。

图 1 PEPCK融合蛋白表达的 SDS-PAGE分析

2.2 重组蛋白的 Westem blot分析 (图 2) 纯化的重组蛋白经 Westem blot分析, 能够被卡介苗免疫的鼠血清识别; 由于组氨酸尾 (His Tag Protein)的存在, 表达的重组蛋白略 > 72 KDa。



注: 1:表达的重组蛋白; 2, 3:卡介苗中提取的 PEPCK蛋白; 4:正常大肠埃希菌对照。

纯化重组融合 PEPCK的 Western blot分析

2.3 PEPCK免疫对小鼠脾脏形态的影响 (表 1) PEPCK免疫小鼠后, PEPCK实验组小鼠的脾脏胀大, 明显大于对照组小鼠的脾脏, 在剥离时发现粘连也较严重。

表 1 不同组别小鼠脾脏淋巴细胞检测结果 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	$CD4^+$	$CD8^+$	$CD4^+/CD8^+$
对照组	35.0±4.56	13.4±1.82	2.6±1.22
实验组	73.5±3.69*	15.5±1.79	5.1±0.98*

注: * $P<0.05$。

2.4 PEPCK对 T淋巴细胞的影响 用 PEPCK免疫小鼠 3周后取小鼠脾脏, 用流式细胞仪检测 T细胞, PEPCK实验组 $CD4^+/CD8^+$比值明显高于对照组 ($P<0.05$)。PEPCK实验组 $CD4^+$细胞明显高于对照组 ($P<0.05$)。2组 $CD8^+$ T细胞差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.5 PEPCK对细胞因子产生的影响 末次免疫 2周后取小鼠血清, ELISA法检测细胞因子, 单因素方差分析显示, 实验组和对照组的细胞因子差异有统计学意义, 实验组 IFN-γ平均几何滴度可达 46.0, 而对照组只有 7.5 ($P<0.05$); 实验组 IL-12平均几何滴度可达 36.0, 对照组只有 5.0 ($P<0.05$)。实验组 TNF-α平均几何滴度可达 52.4, 明显高于对照组 5.3 ($P<0.05$)。

3 讨 论

多种结核杆菌蛋白已经被克隆表达, 对结核杆菌 PEPCK的表达报道较少。PEPCK在从原核生物到脊椎动物中都是一个非常关键的酶[1], 催化磷酸烯醇型丙酮酸 (PEP)和草酰乙酸 (OAA)之间的可逆性反应。本研究在大肠埃希菌 HB_{101}中表达了重组蛋白 PEPCK。SDS-PAGE检测可见, 表达出一分子量约为 72 KDa的条带, 与理论预测的分子量一致, 且表达的蛋白为可溶性, 便于纯化。本实验中, 将表达的 PEPCK复性[2], Westem blot证明, 复性后的 PEPCK能够被小鼠抗卡介苗血清识别, 具有活性。

本实验中用 PEPCK免疫小鼠后, 实验组小鼠的 $CD4^+$ T细胞、$CD4^+/CD8^+$均明显高于对照组小鼠, 即 PEPCK能够刺激 $CD4^+$ T细胞增多、活化。$CD4^+$ T细胞是介导细胞免疫反应的主要的细胞, 也被认为是抗结核杆菌感染的主要细胞[3], $CD4^+$ T细胞的增多表明细胞免疫的增强, 对结核杆菌的杀伤作用增强。PEPCK引起机体产生免疫反应的另一个表现是刺激机体产生保护性细胞因子。本研究中实验组小鼠体内产生的 IFN-γ、IL-12、TNF-α明显高于对照组。这些细胞因子在抗结核的免疫反应中起重要作用[4-8]。实验组小鼠脾脏增大, 明显大于对照组, 而且与周围组织粘连严重。由

此可见, PEPCK不仅引起机体产生细胞免疫反应, 也引起体液免疫反应。

实验表明, 结核杆菌 PEPCK可以有效的刺激机体产生细胞免疫反应和体液免疫反应, 是很好的抗结核疫苗候选分子之一。

参考文献

〔1〕 Swaninathan S, Gong J, Zhang M, et al. Cytokine production in children with tuberculosis infection and disease[J]. Clin Infect Dis, 1999, 28(6): 1290-1293.

〔2〕 De la Barrera S, Aleman M, Musella R, et al. IL-10 down-regulate costimulatory molecule on *Mycobacterium* tuberculosis-pulsed macrophages and impair the lytic activity of CD4 and CD8 CTL in tuberculosis patients[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 138(1): 128-138.

〔3〕 Collins D M. New tuberculosis vaccines basesd on attenuated strains of the *Mycobacterium* tuberculosis complex[J]. Immunol Cell Biol, 2000, 78(4): 342-348.

〔4〕 Chen J, Dong D, Yang Y. The effect of interleukin-12 on the production of Th1(1) and Th(2) cytokines by peripheral blood mononuclear cells from patiertswith tuberculosis[J]. Zhonghua Jie He Hu Xi Za Zhi, 2002, 25(5): 292-295.

〔5〕 Hwang SA, Kruzel ML, Actor JK. Lactoferrin augements BCG vaccine efficacy to generate T helper response and subsequent protection against challenge with virulent *Mycobacterium* tuberculosis[J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(3): 591-599.

〔6〕 Feng CG, Jankovic D, Kullberg M. Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production[J]. J Immunol, 2005, 174(7): 4185-4192.

〔7〕 Lasco TM, Yamamoto T, Yoshimura T. Effect of *Mycobacterium* bovis BCG vaccination on Mycobacterium-specific cellular proliferation and tumor necrosis factor alpha production from distinct guinea pig leukocyte population[J]. Infect Immun, 2003, 71(12): 7035-7042.

〔8〕 Saunders BM, Briscoe H, Britton WJ. T cell-derived tumour necrodid factor is essential, but not sufficient, for protection against *Mycobacterium* tuberculosis infection[J]. Clin Exp Immunol, 2004, 137(2): 279-287.

收稿日期: 2008-09-16 (郭长胜编校)

文章编号: 1001-0580(2009)05-0515-02 中图分类号: R 378.91+1 文献标志码: A 【专题报道】

耐多药结核杆菌与药物敏感菌株蛋白质比较*

谢勇恩, 任碧轩, 胡为民, 唐恩洁, 敬保迁

摘 要: 目的 比较结核分支杆菌耐多药菌株与药物敏感菌株在蛋白表达水平的差异, 为进一步研究结核杆菌耐药的分子调控机制提供依据。方法 利用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(2-DE)分离耐多药结核分支杆菌和结核分支杆菌药物敏感菌株总蛋白质, 通过计算机图像分析软件比较分析电泳图谱, 切取部分差异蛋白质点进行肽质量指纹图谱分析。结果 发现 27个蛋白质点具有明显差异, 其中耐多药结核分支杆菌有 6个蛋白质点明显表达上调。质谱分析发现, 6个蛋白质点分别代表的蛋白质为无机焦磷酸酶、多肽脯氨酰基顺反同分异构酶 A、延伸因子 Tu、420个氨基酸的未知功能蛋白质、双加氧酶和转录调节蛋白(MoxR)。结论 耐多药结核杆菌与药物敏感菌株在蛋白表达水平存在明显差异。

关键词: 耐多药结核杆菌; 蛋白质组学; 双向电泳; 质谱分析

Comparison of proteins of multi-drug-resistant *Mycobacterium* tuberculosis isolate with drug-sensitive isolate

XIE Yong-en, REN Bi-xuan, HU Wei-min, et al. Reseach Unit of Immunology and Molecular Biology, North Sichuan Medical College (Nanchong 637007, China)

Abstract Objective To compare the protein expression profiles of multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolate with drug-sensitive isolate, and to provide basis for further study on molecular mechanisms of drug-resistant tuberculosis. **Methods** The bacterial proteins were analyzed with two dimensional electrophoresis. Computer software was used to compare the two dimensional electrophoretic maps. Some differential protein spots were cut off from the gel and subjected to mass spectrometer(MS) analysis. **Results** Twenty-seven differential protein spots were found between the multi-drug-resistant isolate and the drug-sensitive isolate. Six protein spots were obviously up-regulated in the multi-drug-resistant isolate. MS detection showed the six protein spots were inorganic pyrophosphatase, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A, elongation factor Tu, unnamed protein, dioxygenase and moxR protein. **Conclusion** Protein expression differences were discovered between multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis isolate and drug-sensitive isolate. Further study on the functions of these differential expression proteins might be helpful in elucidating the molecular mechanisms of drug-resistant tuberculosis.

Key words multi-drug-resistant Mycobacterium tuberculosis; proteome; two dimensional electrophoresis; MS analysis

目前, 耐药结核分支杆菌的感染已经成为结核病防治中面临的一大难题。耐多药结核病(MDR-TB)是指患者有关标本中分离的结核分支杆菌至少同时对异烟肼和利福平耐药[1]。耐多药结核分支杆菌对大多数一线抗结核药物耐药, 采用标准的结核化疗方案治疗无效。对耐多药结核分支杆菌耐药机制的研究, 可为抗结核新型药物的研制及建立简便快速的耐药性检测方法提供基础依据, 有利于促进对结核病的预防和控制。本研究分析了结核分支杆菌耐多药菌株和结核分支杆菌药物敏感菌株在蛋白表达水平的差异, 并利用质谱技术对部分差异表达蛋白进行了鉴定。

* 基金项目: 教育部重点项目资助(205138)

作者单位: 川北医学院免疫与分子生物学研究所, 四川 南充 637007
作者简介: 谢勇恩(1969-), 男, 四川南充人, 教授, 博士, 主要从事感染性疾病的分子生物学研究。

中国公共卫生 CPH