



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102558319 A
(43) 申请公布日 2012. 07. 11

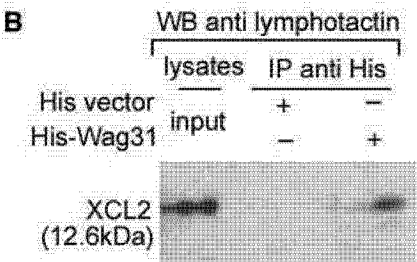
(21) 申请号 201210012165. 1 *A61K 39/04* (2006. 01)
(22) 申请日 2012. 01. 16 *A61K 48/00* (2006. 01)
(71) 申请人 复旦大学 *A61P 31/06* (2006. 01)
地址 200433 上海市杨浦区邯郸路 220 号 *C12R 1/19* (2006. 01)
(72) 发明人 王洪海 徐文玺 张鹭 吕红 *C12R 1/32* (2006. 01)
曹炜 郝珂威
(74) 专利代理机构 上海正旦专利代理有限公司
31200
代理人 陆飞 盛志范
(51) Int. Cl.
C07K 14/35 (2006. 01)
C12N 15/70 (2006. 01)
C12N 15/85 (2006. 01)
C12Q 1/68 (2006. 01)
G01N 33/68 (2006. 01)
G01N 33/53 (2006. 01)
C12N 15/31 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称
结核分枝杆菌 Wag31 基因及其应用

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,具体涉及结核分枝杆菌 Wag31 基因及其用途。Wag31 是结核分枝杆菌抗原,以标准毒株 H37Rv 的基因组 DNA 作为模板,用 PCR 法扩增 Wag31 的基因片段,并插入到原核表达质粒 pET30a 中,表达纯化可获得 Wag31 的高纯度蛋白;用 PCR 法扩增 Wag31 的基因片段,并插入到真核表达质粒 pcDNA3. 1 中。将重组质粒 pcDNA3. 1 转染至 THP1 细胞中,发现 Wag31 蛋白不但可以引起趋化因子 XCL2 高表达,也可以结合 XCL2,这表示了 Wag31 可能对结核分枝杆菌,细菌-宿主相互作用起到重要作用,是一种可用于 DNA 疫苗,亚单位疫苗和重组 BCG 疫苗的候选基因。



1. 一种重组蛋白,其特征是将结核分枝杆菌 wag31 的基因片段插入 pET30a 质粒中,转化大肠杆菌表达株 BL21 中,表达出的含有 wag31 蛋白序列的重组蛋白。
2. 一种重组质粒,其特征是含有原核生物的启动子序列和结核分枝杆菌 wag31 的基因片段。
3. 一种在原核细胞中表达如权利要求 1 中所述结核分枝杆菌 Wag31 蛋白的方法,其特征是将基因片段 Wag31 插入表达质粒 pET30a,表达结核分枝杆菌 Wag31 的重组工程菌。
4. 一种在真核细胞中表达结核分枝杆菌 Wag31 蛋白的方法,其特征是在 THP1 细胞中表达的结核分枝杆菌蛋白 Wag31。
5. 一种在真核细胞中,检验结核分枝杆菌 Wag31 引起巨噬细胞 XCL2 分泌并结合 XCL2 的方法,其特征是在转录水平和蛋白表达水平检验 XCL2 的分泌,利用免疫共沉淀法检验 Wag31 与 XCL2 的结合。
6. 一种融合 DNA 片段,其特征是含有真核生物的启动子序列和结核分枝杆菌 Wag31 的基因片段。
7. 如权利要求 1 所述的重组蛋白在构建重组 BCG 疫苗方面的应用,其特征是利用结核分枝杆菌 Wag31 的蛋白,作为疫苗组分,构建重组 BCG 疫苗。
8. 一种 DNA 疫苗配方,其特征是利用结核分枝杆菌 Wag31 的基因片段,作为 DNA 疫苗基因片段的一部分,构建 DNA 疫苗。
9. 一种亚单位疫苗配方,其特征是利用表达结核分枝杆菌 Wag31 蛋白,作为亚单位疫苗组分。

结核分枝杆菌 Wag31 基因及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种结核分枝杆菌基因 Wag31 及其应用。

背景技术

[0002] 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)是人类健康的严重威胁。近年来,中国结核分枝杆菌感染形式不容乐观,有愈演愈烈的趋势。结核分枝杆菌感染人体后,可侵入巨噬细胞并长期存活,引起肺部肉芽肿的形成,并与巨噬细胞为主的免疫细胞存在复杂的细菌-宿主相互作用。解析它们之间相互作用机理,对于理解结核分枝杆菌感染机制,提出新的控制结核分枝杆菌感染的方法意义重大。

[0003] Wag31,是 DivIVA 同源蛋白,在结核分枝杆菌中保守存在。近期研究表明,wag31 广泛参与到结核分枝杆菌的极点生长与细胞壁合成,对菌体生长分裂和菌体形态的维持有重要影响。我们在实验中发现,wag31 可以结合淋巴细胞趋化因子 XCL2。XCL2 由巨噬细胞产生,可以趋化影响树突状细胞、T 细胞等多种免疫细胞。进一步的研究表明,Wag31 可以诱导 XCL2 在巨噬细胞中的表达,这提示我们 wag31 可能在细菌-宿主相互作用、肺部肉芽肿的形成起到关键作用。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种重组表达结核分枝杆菌 Wag31 的方法,得到含有 wag31 蛋白序列的重组蛋白 Wag31。本发明还提供相应的重组质粒。

[0005] 本发明提供一种重组蛋白 Wag31,该重组蛋白是将结核分枝杆菌 wag31 的基因片段插入 pET30a 质粒中,构建表达结核分枝杆菌 Wag31 的重组工程菌,转化大肠杆菌表达株 BL21 (DE3)中,表达出的含有 wag31 蛋白序列的重组蛋白。具体步骤为:以标准毒株 H37Rv 的基因组作为模板,用 PCR 法扩增 Wag31 的基因片段,并将该基因重组到表达型质粒 pET30a 中,该重组质粒转化至大肠杆菌表达株 BL21 (DE3)中表达蛋白 Wag31。本发明提供的重组蛋白 Wag31 与 NCBI 中 NP_216661.1 蛋白序列相比,加入了表达标签 His tag 和表达载体上的一小段序列。表达的 Wag31 蛋白携带 6X his-tag,分子质量 29.7kd,用亲和纯化法得到的蛋白 Wag31 蛋白纯度好,得率高,可为进一步的生物学研究创造条件。

[0006] 本发明所用的宿主细胞应当与表达质粒相匹配,可使用原核细胞或者真核细胞等,例如常用的大肠杆菌(*Escherichia coli*)。可用于转化的宿主细胞可以是 BL21 (DE3)菌株,本发明的一个实施例中用的是 BL21 (DE3)菌株。

[0007] 本发明还提供一种重组质粒,该重组质粒是含有原核生物的启动子序列和结核分枝杆菌 wag31 的基因片段。具体是将 Wag31 基因序列插入一般的商用表达质粒中。Wag31 基因的 NCBI 登录号为 NC_000962.2,蛋白的 NCBI 登录号为 NP_216661.1。

[0008] 本发明所述的“Wag31 基因序列”也包括对 NC_000962.2 中一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后产生的序列。由于密码子的简并性,所以与 NC_000962.2 核苷酸序列同源性低至约 70% 的兼并序列也能编码出相同的氨基酸序列,该

术语还包括能在中度严紧条件下,更佳地在高度严紧条件下,与 NC_000962.2 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。该术语还包括与 NC_000962.2 的核苷酸序列的同源性至少 70%,较佳的至少 80%,更佳的至少 90% 的核苷酸序列。

[0009] 本发明的重组质粒,通常将 Wag31 基因插入表达质粒的多克隆位点即得。重组质粒制备过程中,可选用本领域已知的各种载体,如市售的载体,然后将编码本发明的核苷酸序列可操作的连于表达调控序列,可以形成蛋白表达载体。本发明所采用的载体有 pET32a, pET28a, pET30a 等。在本发明的一个实施例中,所用的质粒是 pET30a。

[0010] 本发明还提供在真核细胞中表达结核分枝杆菌 Wag31 蛋白的方法,具体步骤是以标准毒株 H37Rv 的基因组作为模板,用 PCR 法扩增 Wag31 的基因片段,并将该基因重组到真核表达质粒 pcDNA3.1/HisA 中,该重组质粒转染至 THP-1 细胞中表达蛋白 Wag31。表达的 Wag31 蛋白携带 6X his-tag。可使用 His 抗体,western blot 法检验细胞中 Wag31 蛋白表达水平。

[0011] 本发明的一个方面,提供了一种新的重组质粒,即将 Wag31 基因序列插入一般的商用真核表达质粒中。Wag31 基因的 NCBI 登录号为 NC_000962.2,蛋白的 NCBI 登录号为 NP_216661.1。本发明中的“Wag31 基因序列”也包括对 NC_000962.2 中一个或多个密码子被编码相同氨基酸的简并密码子所取代后产生的序列。由于密码子的简并性,所以与 NC_000962.2 核苷酸序列同源性低至约 70% 的兼并序列也能编码出相同的氨基酸序列,该术语还包括能在中度严紧条件下,更佳地在高度严紧条件下,与 NC_000962.2 的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。该术语还包括与 NC_000962.2 的核苷酸序列的同源性至少 70%,较佳的至少 80%,更佳的至少 90% 的核苷酸序列。

[0012] 本发明的重组质粒,通常将 Wag31 基因插入表达质粒的多克隆位点即得。

[0013] 本发明的重组质粒制备过程中,可选用本领域已知的各种载体,如市售的载体,然后将编码本发明的核苷酸序列可操作的连于表达调控序列,可以形成蛋白表达载体。

[0014] 本发明的另一方面,提供了一种结核分枝杆菌相关的重组蛋白,即重组蛋白是将插入 Wag31 基因片段的重组表达质粒转化入宿主细胞而得到的。

[0015] 在本发明的实施例中,Wag31 重组蛋白与 NCBI 中 NP_216661.1 蛋白序列相比,加入了表达标签 His tag 和表达载体上的一小段序列。

[0016] 所用的宿主细胞应当与表达质粒相匹配,可使用真核细胞等,例如常用的 THP-1 细胞。

[0017] 本发明还提供检验 Wag31 与 THP1 细胞中 XCL2 相互作用的方法,具体步骤如下:将以上的 pcDNA3.1/HisA-Wag31 重组质粒转染经 PMA 诱导分化的 THP1 细胞。在二氧化碳浓度 5% 的培养箱中,37 度培养,然后进行如下两种操作:1. 分时间梯度裂解细胞,并抽提 mRNA,使用 real-time PCR 法检测细胞中 XCL2 的 mRNA 水平变化;2. 分时间梯度裂解细胞,并使用 western blot 法检测细胞中 XCL2 蛋白的表达量变化。具体步骤可见实施例 3。

[0018] 本发明还提供所述的 wag31 重组蛋白在构建重组 BCG 疫苗方面的应用,即利用结核分枝杆菌 Wag31 的蛋白,作为疫苗组分,构建重组 BCG 疫苗。

[0019] 在该应用中,可将 wag31 基因片段由 H37Rv 基因组中扩增得到,作为唯一 DNA 片段或片段之一插入可在 BCG 菌株中稳定表达的质粒,并将该重组质粒转化入感受态 BCG 菌体中,表达 wag31 蛋白,获得过表达 wag31 蛋白的重组 BCG 疫苗。

[0020] 本发明还提供一种 DNA 疫苗配方,即利用结核分枝杆菌 Wag31 的基因片段,作为 DNA 疫苗基因片段的一部分,构建 DNA 疫苗。

[0021] 在该应用中,可将 wag31 基因片段由 H37Rv 基因组中扩增得到,作为唯一 DNA 片段或片段之一插入可在真核细胞中稳定表达的质粒(如 pVAX 系列质粒),并将该重组质粒转移入实验动物中,使其发挥免疫保护效果。

[0022] 本发明还提供一种亚单位疫苗配方,即利用所述表达结核分枝杆菌 Wag31 蛋白,作为亚单位疫苗组分。

[0023] 在该应用中,可利用由上述原核细胞表达体系中获得 wag31 蛋白,作为唯一蛋白或蛋白成分之一,伴同一般商用免疫佐剂,注射如实验动物中,使其发挥免疫保护效果。

附图说明

[0024] 图 1 原核表达 wag31 蛋白电泳图,泳道 7 显示纯化后的蛋白条带。

[0025] 图 2 显示内源性 XCL2 与 wag31 的免疫共沉淀实验。

[0026] 图 3 wag31 诱导 THP-1 细胞表达 XCL2。(β-actin 为内参)。

具体实施方式

[0027] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明,应当理解,这些实施例仅用于说明本发明,并不限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明阐述内容后,本领域技术人员对发明的各种改动或修改,同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0028] 实施例 1:原核表达结核分枝杆菌 Wag31 蛋白。

[0029] 1) 大肠杆菌感受态制备

大肠杆菌 DH5a 接种于 LB 培养基中,37 摄氏度,摇床转速 200rpm,培养过夜;培养结束收集菌体,12000rpm,4 摄氏度离心,10min。弃掉上清,轻轻振松菌块,慢慢加入预冷的 CaCl₂ 溶液重悬菌体,冰浴后离心,弃掉上清。重新使用 CaCl₂ 溶液重悬菌体,冰浴 2h,4 度保存。

[0030] 2) 原核表达质粒的构建

以标准毒株 H37Rv 的基因组作为模板,用 PCR 法扩增 Wag31 的基因片段,并将该基因重组到表达型质粒 pET30a 中,转化大肠杆菌 DH5a。测序鉴定 wag31 片段与 NCBI 序列 NC_000962.2 完全相同的质粒作为表达质粒。

[0031] 3) 表达质粒转化大肠杆菌感受态。

[0032] 将鉴定好的,携带 Wag31 基因片段的重组质粒加入到 1) 中所述感受态细胞中,冰浴 30min,之后 42 摄氏度水浴 45s,最后冰上静置 2min。向热转化后的感受态细胞中加入无抗生素的 LB 培养基中,37 摄氏度培养 45min,涂布携带相应抗性的 LB 平板,在 37 摄氏度温箱中倒置培养过夜。

[0033] 4) 表达并纯化 Wag31 蛋白

从转化的平板上挑取单菌落,接种于 LB 培养基中,37 摄氏度培养过夜,至对数期时,加入 IPTG,37 摄氏度诱导 4h,收集菌体破碎后,如果目的蛋白存在于上清中,16000rpm 离心 1 小时,收集上清。如果目的蛋白以不溶性的包涵体形式表达,菌体破碎后,离心收集包涵体,将包涵体溶于含有尿素的缓冲液中,完全溶解后,离心收集上清。

[0034] 使用镍柱纯化收集到的蛋白溶液,如果目标蛋白存在于上清中,则使用 Tris 缓冲液透析,如果目标蛋白以包涵体的形式存在,需要将收集到的目标蛋白在复性缓冲液中透析复性。

[0035] 实施例 2:在 THP-1 细胞中真核表达结核分枝杆菌蛋白 Wag31。

[0036] 一、细胞培养

THP-1 细胞均在 RPMI1640 (10% 胎牛血清) 培养液中培养。每隔 2 到 3 天换一次新鲜培养液。THP-1 细胞为悬浮培养,镜检达到 80% 以上后,吸取部分到新的培养液中传代。

[0037] 二、Wag31 真核表达质粒的构建

以标准毒株 H37Rv 的基因组作为模板,用 PCR 法扩增 Wag31 的基因片段,并将该基因重组到表达型质粒 pcDNA3.1/HisA 中,转化大肠杆菌 DH5a。测序鉴定 wag31 片段与 NCBI 序列 NC_000962.2 完全相同的质粒作为真核表达质粒,该质粒表达出的 wag31 蛋白携带 His tag。

[0038] 三、瞬时细胞转染

细胞以 $1 \sim 2 \times 10^5$ 每皿 (30mm) 的密度接种,培养过夜。加入适量 PMA,使其终浓度为 $10 \mu\text{M}/\text{ml}$,充分混匀, 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养 24 小时,诱导 THP-1 细胞贴壁。

[0039] 将 $3 \mu\text{l}$ FuGENE 放入预先置于室温的 $97 \mu\text{l}$ 无血清的培养液中,混匀,室温放置 5min。将 $1 \mu\text{g}$ pcDNA3.1/hisA-wag31 融合质粒加入到 FuGENE 和培养液的混合液中,充分混匀,室温静置 20 分钟。

[0040] 吸去 THP-1 贴壁细胞培养上清,用 PBS 洗 1 次,加入 1ml 无血清的培养液,加入上述转染质粒混合液。 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 培养。

[0041] 四、细胞总蛋白的提取

以 PBS 洗涤细胞一次,以 $100 \mu\text{l} \sim 200 \mu\text{l}$ 每皿 (30mm) 的量加入细胞总蛋白提取液 (组织裂解液 TPER+ 蛋白酶抑制剂 (终浓度为 $1.2 \text{mg}/\text{ml}$) + PMSF 终浓度为 $0.1 \text{mg}/\text{ml}$),用细胞刮子将细胞刮下,转移入 EP 管中,冰上放置 15 分钟。离心 (13000rpm , 2 分钟) 取上清,即为含有总蛋白的细胞裂解液。

[0042] 五、Western blotting

取适量细胞裂解液上样于 SDS-PAGE 胶, $80/120 \text{V}$ 电泳。电泳结束,将胶转移至电转缓冲液 (48mM Tris, 39mM 甘氨酸, 0.0375% w/v SDS) 中平衡 15 分钟。将 PVDF 膜用甲醇浸湿,去离子水冲洗,再转移到电转缓冲液中平衡 15 分钟。电转移使用干法,按照正极 -6 层滤纸 -PVDF 膜 -电泳胶 -6 层滤纸 -负极的顺序安放,电压 23v ,电转 $30 \sim 40$ 分钟。

[0043] 电转结束后,将 PVDF 膜置于 20ml 封闭液中 ($1 \times \text{PBS}$, 0.05% Tween20, 5% 脱脂奶粉),室温封闭 1 小时。

[0044] 使用 $1 \sim 2 \text{ml}$ 封闭液以 $1:1000$ 到 $1:5000$ 稀释一抗 His 抗体,使 PVDF 膜浸于一抗稀释液中,室温结合 1 小时。之后使用 PBST ($1 \times \text{PBS}$, 0.05% Tween20) 室温洗涤 5 次,每次 5min。

[0045] 使用 $1 \sim 2 \text{ml}$ 封闭液以 $1:20000$ 稀释二抗,将 PVDF 膜浸于二抗稀释液中,室温结合 1 小时,使用 PBST,室温洗涤 5 次,每次 5 分钟。

[0046] 将荧光底物 (supersigna west Femto Maximun Sensitiity Substrate) 按比例混合好,加在 PVDF 膜上,室温避光防止 5 分钟,之后吸去荧光底物,暗室压片适当时间,显影

在胶片上。根据显影条带确定 wag31-his tag 融合蛋白在 THP-1 细胞中的表达。

[0047] 实施例 3: 检验 Wag31 与 THP1 细胞中 XCL2 相互作用的方法。

[0048] 1) Wag31 和内源 XCL2 蛋白的免疫共沉淀实验。

[0049] 将 pcDNA3.1/HisA-wag31 转染到 THP-1 细胞中。方法同实施例 2 中, 瞬时细胞转染。

[0050] 转染后 48 小时, 将细胞裂解。在 600ul 细胞裂解液加入 15ul proteinA/GpLUS agarose 和 2ul 鼠抗 His 的抗体 (0.1mg/ml) 进行免疫沉淀。同时留取 50ul 细胞裂解液作为对照。4℃ 结合过夜。离心, 小心去除上清。加入 200ul 组织裂解液洗涤 1 次。离心 (5krpm, 2 分钟), 小心去除上清。重复四次。在沉淀中加入 30ul 1X 蛋白电泳上样缓冲液。在沸水浴中煮 3 分钟。离心 (13.2krpm, 1 分钟), 取上清以鼠抗人 XCL2 的抗体进行 western 检测。Western blot 方法同实施例 2 中 western blot 方法。(附图 2)。

[0051] 2) wag31 诱导 THP-1 细胞表达 XCL2。

[0052] 将 pcDNA3.1/HisA-wag31 转染到 THP-1 细胞中。方法同实施例 2 中, 瞬时细胞转染。

[0053] 转染后 6h、12h 和 24h, 分别取细胞进行裂解。取等量的各时间的细胞样品用鼠抗人 XCL2 的抗体进行 western 检测。Western blot 方法同实施例 2 中 western blot 方法。转染后 24h, xCLZ 蛋白的表达量明显地提高(图 3)。

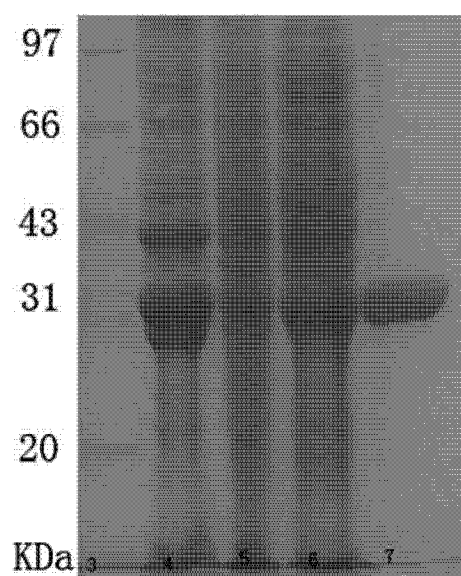


图 1

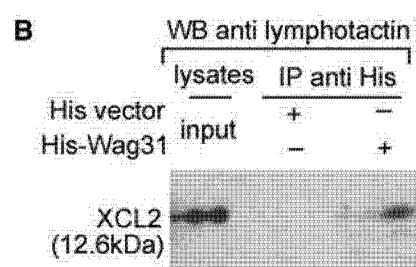


图 2

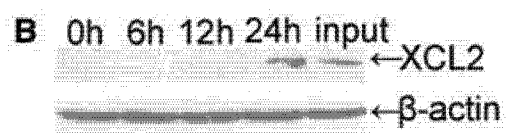


图 3

专利名称(译)	结核分枝杆菌Wag31基因及其应用		
公开(公告)号	CN102558319A	公开(公告)日	2012-07-11
申请号	CN201210012165.1	申请日	2012-01-16
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	王洪海 徐文玺 张鹭 吕红 曹伟 郝珂威		
发明人	王洪海 徐文玺 张鹭 吕红 曹伟 郝珂威		
IPC分类号	C07K14/35 C12N15/70 C12N15/85 C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 C12N15/31 A61K39/04 A61K48/00 A61P31/06 C12R1/19 C12R1/32		
代理人(译)	陆飞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物技术领域，具体涉及结核分枝杆菌Wag31基因及其用途。Wag31是结核分枝杆菌抗原，以标准毒株H37Rv的基因组DNA作为模板，用PCR法扩增Wag31的基因片段，并插入到原核表达质粒pET30a中，表达纯化可获得Wag31的高纯度蛋白；用PCR法扩增Wag31的基因片段，并插入到真核表达质粒pcDNA3.1中。将重组质粒pcDNA3.1转染至THP1细胞中，发现Wag31蛋白不但可以引起趋化因子XCL2高表达，也可以结合XCL2，这表示了Wag31可能对结核分枝杆菌，细菌-宿主相互作用起到重要作用，是一种可用于DNA疫苗，亚单位疫苗和重组BCG疫苗的候选基因。

