

• 临床检验研究论著 •

HBHA 截短体蛋白的表达纯化及其诊断活性研究*

周 珊,徐修礼,马越云,刘家云,程晓东,张 倩,郝晓柯[△]
(第四军医大学西京医检验科,陕西西安 710032)

摘 要:目的 原核表达 HBHA Δ C 及 HBHA Δ N 蛋白,比较 HBHA 系列蛋白活性。为进一步研究 HBHA 临床诊断价值提供实验依据。方法 克隆 HBHA Δ C 和 HBHA Δ N 目的基因,用于大肠杆菌(E. coli)BL-21 系统表达纯化。将蛋白通过 CL-6B 柱检测肝素结合能力。并加入到培养 BCG 的 7H9 液体培养基中,观察其诱导 BCG 聚集情况。结果 nHBHA, rHBHA 及 HBHA Δ N 蛋白均具有肝素结合能力。nHBHA、rHBHA 和 HBHA Δ C 蛋白具备诱导 BCG 聚集的作用。结论 成功获得 HBHA 截短体蛋白;证实 HBHA 蛋白碳端参与肝素结合功能;蛋白氮端参与诱导 BCG 聚集反应。该实验结果为进一步研究 TB 感染分子机制及临床诊断应用奠定基础。

关键词:结核分枝杆菌; HBHA 蛋白; HBHA Δ C; HBHA Δ N
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2014. 24. 029 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2014)24-3366-03

Expression and diagnostic value of HBHA truncated protein*

Zhou Shan, Xu Xiuli, Ma Yueyun, Liu Jiayun, Cheng Xiaodong, Zhang Qian, Hao Xiaoke[△]

(Department of Clinical Laboratory, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shanxi 710032, China)

Abstract: **Objective** To express recombinant HBHA Δ C and HBHA Δ N protein, and compare the HBHA series protein activity with each other. It will be provide a experimental basis for the research on clinical diagnostic of HBHA. **Methods** The HBHA Δ C and HBHA Δ N gene fragments were cloned and expressed by transforming E. coli BL-21. Test the protein heparin binding ability by CL-6B column. And then added protein to the BCG 7H9 culture medium, to observe the induced BCG aggregation. **Results** nHBHA, rHBHA and HBHA Δ N protein have heparin binding ability. Meanwhile nHBHA, rHBHA and HBHA Δ C protein have induced BCG aggregation effect. **Conclusion** The HBHA Δ C and HBHA Δ N protein were successfully obtained. It was proved that the HBHA C-terminal could be combined with heparin and the N-terminal involved could induce the aggregation of BCG. This results provide a basis for further study on molecular mechanism of TB infection and clinical application.

Key words: TB; HBHA; HBHA Δ C; HBHA Δ N

肝素结合血凝素(heparin-binding hemagglutinin adhesion, HBHA)是由结核分枝杆菌分泌产生的一种糖蛋白型黏附素。报道显示非吞噬细胞上的肝素受体可以与 HBHA 蛋白 C 末端功能区结合,从而介导肺外结核播散及肺结核的发生^[1]。为进一步探讨 HBHA 蛋白诱导的自身保护机制以及其临床诊断价值,本研究表达纯化 HBHA 蛋白碳缺末端(HBHA Δ C)和氮缺末端(HBHA Δ N)截短体蛋白,并测定了重组 HBHA(rHBHA),天然 HBHA(nHBHA),HBHA Δ C 和 HBHA Δ N 蛋白的肝素结合活性及诱导 BCG 聚集效应,证实了 HBHA 蛋白活性功能区所在。

1 材料与方法

1.1 材料 结核分枝杆菌 H37Rv(ATCC27294)标准株、大肠埃希菌 DH5 α 、BL-21 株、载体 pQE-801 均由本室保存。rHBHA 及 nHBHA,兔源抗 HBHA 多克隆抗体由本室制备^[1]。Heparin Sepharose CL-6B 柱及 His Gravitrap 标签纯化柱购自美国 GE Healthcare。质粒抽试剂盒为 Promega 公司产品;基因组 DNA 提取及胶回收试剂盒为德国 Qiagen 公司,异丙基硫代-B-D-半乳糖苷(IPTG)、TapMix、T4 连接酶、及内切酶 HindⅢ、BamHⅠ为 TaKaRa 公司产品。

1.2 HBHA Δ C 及 HBHA Δ N 基因获得 用德国 Qiagen 公司的基因组 DNA 提取试剂提取 H37Rv 基因组 DNA^[2]。然后根

据 HBHA Δ C 及 HBHA Δ N 基因序列设计引物,由 TaKaRa 公司合成。以提取的基因组为模板,分别以 P1、P2 和 P3、P4 为引物(见表 1),在退火温度为 60℃的条件下进行 PCR 操作扩增目的基因。1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 结果。

表 1 HBHA Δ C 及 HBHA Δ N 引物
(下划线部分为酶切位点)

HBHA Δ C	P1 正义链 5'-CGGGATCCATGGCTGAAAACTCGAA-CA-3'
	P2 反义链 5'-CCCAAGCTTTTCCTCGAAGCTCT-GCTGG-3'
HBHA Δ N	P3 正义链 5'-CGGGATCCACTAGCCGGTACAACGAG-3'
	P4 反义链 5'-CCCAAGCTTCTACTTCTGGGTGAC-CTTC-3'

1.3 表达载体的构建 用 Qiagen 胶回收试剂回收目的片段,用 HindⅢ与 BamHⅠ37℃双酶切目的基因及质粒 pQE-801,用 T4 连接酶连接并转化 DH5 α 感受态细胞,步骤见文献^[2]。用 Promega 试剂提取重组质粒 pQE-801-HBHA Δ C, pQE-801-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30872358)。 作者简介:周珊,女,主管检验师,主要从事临床微生物学检验与细菌耐药机制研究。 [△] 通讯作者,E-mail:haoxkg@fmmu.edu.cn。

HBHAΔN,并送 TaKaRa 公司测序。

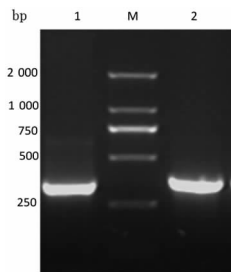
1.4 重组载体表达及蛋白纯化 将测序正确的 pQE-80l-HBHAΔC,pQE-80l-HBHAΔN,分别转化大肠杆菌 BL-21 感受态细胞,用 IPTG 诱导重组蛋白表达,具体步骤见文献^[1]。最终克隆株 pQE-80l-HBHAΔC 和 pQE-80l-HBHAΔN 分别以 IPTGP 终浓度 0.3 mmol/L 和 0.4 mmol/L 培养 3 h 的条件诱导大量重组蛋白表达。目的蛋白均以可溶性形式表达。将菌体超声裂解后的上清通过 His Gravitrapp 柱纯化蛋白。用 Western blot 方法鉴定 HBHAΔC 及 HBHAΔN 蛋白。

1.5 HBHA 系列蛋白肝素结合活性鉴定 分别将 nHBHA, rHBHA,HBHAΔC 以及 HBHAΔN 蛋白各 5 μg 通过已用 PBS 平衡的 Heparin Sepharose CL-6B,再用 100 mL PBS 冲洗柱子,然后用不同 NaCl 浓度梯度的 PBS 1 mL 将蛋白洗脱,收集各浓度梯度洗脱蛋白。取少量样品进行 SDS-PAGE 电泳,并检测不同 NaCl 浓度梯度洗脱液浓度,计算各梯度洗脱蛋白总量。

1.6 HBHA 系列蛋白诱导 BCG 聚集的活性的观察 将 BCG 菌株用 7H9 液体培养基培养至稳定期,见文献^[1]。每空加入的 nHBHA,rHBHA,HBHAΔC 以及 HBHAΔN 蛋白浓度分别为 0.0、0.2、0.5、2.0、5.0、10.0、20.0 μg/mL。37 ℃ 培养 36 h,观察 BCG 凝集情况。

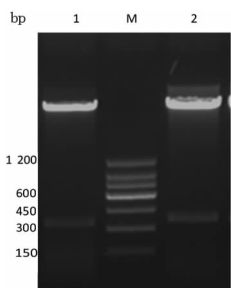
2 结 果

2.1 目的基因扩增及表达载体鉴定 用所设计的引物进行 HBHAΔC 及 HBHAΔN 基因 PCR 扩增获得特异性目的片段,其大小与文献报道相符^[3],HBHAΔC 约为 351 bp,HBHAΔN 约为 327 bp,见图 1。重组质粒,经 HindⅢ 与 BamHI 酶切鉴定证实分别有 351 bp 和 327 bp 的片段插入载体,分别命名为 pQE-80l-HBHAΔC,pQE-80l-HBHAΔN,如图 2。经 TaKaRa 测序证实均为正确重组质粒。



M:DNA 标记物;1:HBHAΔN 基因片段;2:HBHAΔC 基因片段

图 1 HBHAΔN 及 HBHAΔ 基因的 PCR 反应产物



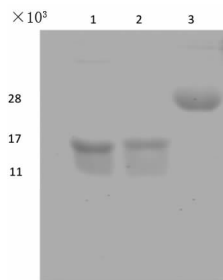
M: DNA 标记物;1: PQE80L-HBHAΔN domain 双酶切;2: PQE80L-HBHAΔdomain 双酶切。

图 2 质粒 PQE80L-HBHAΔN 及 PQE80L-HBHAΔC domain 的双酶切鉴定

2.2 目的蛋白诱导表达及纯化 含 pQE-80l-HBHAΔC 及含 pQE-80l-HBHAΔN 的重组菌分别在相对分子质量约 16×10^3

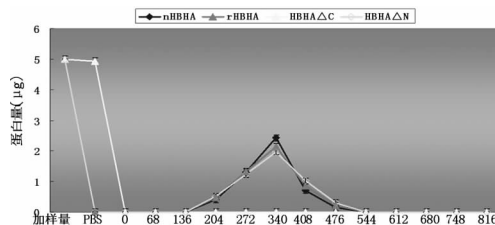
与 15×10^3 处有浓重的表达条带出现,与预期大小相符^[4]。Western blot 方法鉴定显示目的蛋白可以与抗 HBHA 抗体特异结合见图 3。

2.3 蛋白 rHBHA、nHBHA、HBHAΔC 及 HBHAΔN 肝素结合活性比较 不同 NaCl 浓度洗脱液的蛋白水平测定显示,rHBHA、nHBHA、HBHAΔN 均存在蛋白回收现象,且在 NaCl 的浓度是 340 mmol/L^{-1} 时,回收的蛋白浓度较大。而 HBHAΔC 组,在用 100 mL PBS 冲洗柱子时,蛋白随之全部流出,梯度洗脱时未测到任何蛋白。由此可见,HBHAΔC 蛋白未与 Heparin Sepharose CL-6B 柱中肝素结合。各蛋白组梯度洗脱情况见图 4。



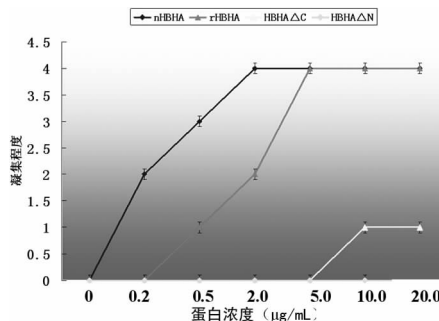
1:HBHAΔC;2:HBHAΔN;3:rHBHA

图 3 Western-blot 鉴定



各组蛋白加样量均为 5 μg,然后用 100 mL PBS 冲洗柱子,接着用含不同浓度 NaCl 的 PBS,从 0 mmol/L NaCl 到 816 mmol/L NaCl 洗脱 CL-6B 柱,HBHAΔC 组,在用 100 mL PBS 冲洗柱子时,蛋白随之全部流出,梯度洗脱时未测到任何蛋白。而 rHBHA,nHBHA,HBHAΔN 组,均存在蛋白回收现象,且在 204 mmol/L 时,开始有蛋白流出,到 340 mmol/L 时,蛋白浓度达最大,当 PBS 所含 NaCl 浓度大于 476 mmol/L 时,未见蛋白流出。

图 4 蛋白肝素结合活性比较



0.2 μg/mL^{-1} 时,nHBHA 组出现少量聚集,其他组未见聚集现象。 0.5 μg/mL^{-1} 时,nHBHA 组出现明显聚集,rHBHA 组才出现聚集; 2 μg/mL^{-1} 时,nHBHA 诱导 BCG 出现大块样聚集,浓度为 5 μg/mL^{-1} 时,nHBHA 组和 rHBHA 组均诱导出明显的聚集现象。但 HBHAΔC 组和 HBHAΔN 组仍未出现凝集现象。增加蛋白浓度至 10 μg/mL^{-1} 时,HBHAΔC 组出现微量凝集,HBHAΔN 组无凝集。当浓度达 20 μg/mL^{-1} 时,HBHAΔC 组的凝集无明显变化,而 HBHAΔN 组仍无凝集现象。

图 5 蛋白诱导 BCG 聚集

2.4 rHBHA 和 nHBHA 的诱导 BCG 聚集活性 结果显示 rHBHA, nHBHA, HBHA Δ C 均有诱导 BCG 聚集的作用, 而 HBHA Δ N 不具备诱导 BCG 聚集的能力。在蛋白浓度为 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 时, nHBHA 组出现少量聚集, 其它均未见聚集现象; 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 时, nHBHA 诱导 BCG 出现明显聚集, rHBHA 组才出现聚集; 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 时, nHBHA 组出现大块样聚集。浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 时, nHBHA 组和 rHBHA 组均诱导出明显的聚集现象, 且聚集效果基本相似。但 HBHA Δ C 组和 HBHA Δ N 组仍未出现凝集现象。增加蛋白浓度至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 时, HBHA Δ C 组出现微量凝集, HBHA Δ N 组无凝集。当浓度达 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ 时, HBHA Δ C 组的凝集无明显变化, 而 HBHA Δ N 组仍无凝集现象。分别以蛋白的浓度和 BCG 凝集程度为坐标做图, 如图 5。

3 讨 论

近几年, 结核分枝杆菌糖蛋白型黏附素在结核发病及播散中的作用, 越来越受到研究人员的关注^[5]。深入研究黏附素的免疫特性及致病机制, 能够为结核病的早期诊断研究提新的供试验依据。目前, 结核感染 T 淋巴细胞斑点试验 (T-spot) 已在国内多家医院广泛应用于临床检测, 并获得较好的临床诊断效果。该实验是基于结核杆菌早期分泌蛋白-6 (ESAT-6) 和培养滤过蛋白 (CFP-10) 刺激 T 细胞释放 γ -干扰素的原理而研发的新型诊断试剂。但由于该试剂盒中抗原 ESAT-6 及 CFP-10 成本较高, 致使该试验项目不易大范围临床开展。能够寻求成本廉价的抗原已成为试剂研发目标。文献显示肝素结合血凝素不仅具有抗原性, 而且同样具有诱导致敏 T 细胞分泌 IFN- γ 的特性^[6]。因此 HBHA 蛋白的临床诊断价值是值得关注的。

T-spot 诊断敏感性较高, 但其不能区分活动性结核与隐匿型结核, 为临床诊断带来很多不便。所以, 如何区分活动性与非活动性结核显得尤为重要。文献证明, HBHA 蛋白在隐匿性结核病 (LTBI) 的诊断中有着不容忽视的作用^[7]。Hougardy 等^[8]通过对比 PPD、ESAT-6、HBHA 诱导刺激活动性结核组, 隐匿型结核组, 以及健康对照组的 T 细胞释放 IFN- γ 的实验 (IGRAs)。研究表明, HBHA 在诊断 LTBI 时特异性 93.88%, 敏感性为 92.06%。并且 HBHA 做为刺激抗原的试验特异性和敏感性均明显高于 PPD 组和 ESAT-6 组。在 Corbierel 等^[9]的研究中证明, HBHA 做为刺激抗原在结核分枝杆菌活动期和感染消除状态时, IGRAs 试验 IFN- γ 呈低水平释放或不释放, 而在感染持续时期, IFN- γ 高水平释放。而 ESAT-6 蛋白诱导 IGRAs 试验 IFN- γ 释放与感染状态呈正相关^[10]。HBHA 蛋白有望成为 LTBI 诊断及鉴别诊断 IGRAs 试验的新兴诱导抗原。但是, 由于 HBHA 重组蛋白不如天然蛋白甲基化丰富, 从而使重组蛋白 rHBHA 在细胞黏附及诱导 T 淋巴细胞的能力明显下降^[11-12]。为此, 本研究旨在对 rHBHA, nHBHA, HBHA Δ C 和 HBHA Δ N 蛋白活性鉴定, 以确认 HBHA 主要诱导黏附功能结构区, 为其诊断试剂的研发提供基础试验依据。

本研究表明, nHBHA, rHBHA, HBHA Δ C 蛋白均具有诱导 BCG 聚集的作用, 但诱导聚集能力存在明显区别。说明蛋

白氮端结构在该活性中的作用为主要结构, 而甲基化并非必需。nHBHA, rHBHA, HBHA Δ N 均具有与肝素结合的能力, 证实蛋白碳端在肝素结合过程中起到了不可替代的作用。从而证实了 HBHA 蛋白的不同功能区域所在。

基于本实验室开展 T-spot 检测项目的临床基础, HBHA 蛋白及其截短体 HBHA Δ C 和 HBHA Δ N 获得, 为隐匿型结核病临床新的诊断方法建立奠定了坚实基础。

参考文献

- [1] 周珊, 马越云, 刘家云, 等. 重组和天然 HBHA 蛋白制备及其活性研究[J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(3): 271-275.
- [2] 周珊, 徐修礼, 马越云, 刘家云, 等. HBHA 蛋白在结核病诊断中应用研究[J]. 检验医学, 2011, 26(12): 806-810.
- [3] Biketov S, Potapov V, Ganina E, et al. The role of resuscitation promoting factors in pathogenesis and reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* during intra-peritoneal infection in mice[J]. BMC Infect Dis, 2007, 7(1): 146.
- [4] Franco DM, Venkata MR, Cayet D, et al. *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin adhesion (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions[J]. Microb Infect, 2006, 8(1): 1-9.
- [5] Franck B, Maria A, Maggy G, et al. *Mycobacterium smegmatis* produces an HBHA homologue which is not involved in epithelial adherence[J]. Microb Infect, 2007, 9(2): 175-182.
- [6] Gutierrez MG, Deretic G, Mizushima N, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages[J]. Cell, 2004, 119(6): 753-766.
- [7] Dessein R, Corbière V, Nortier J, et al. Heparin-binding haemagglutinin, a new tool for the detection of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection in hemodialysis patients. [J] PLoS One, 2013, 8(8): 71088.
- [8] Hougardy JM, Schepers K, Drowart A, et al. Heparin-binding-hemagglutinin-induced IFN- γ release as a diagnostic tool for latent tuberculosis[J]. PLoS One, 2007, 2(10): 926.
- [9] Corbierel V, Pottier G, Bonkain F, et al. Risk stratification of latent tuberculosis defined by combined interferon gamma release assays[J]. PLoS One, 2012, 7(8): 2485.
- [10] Wyndham-Thomas C, Corbière V, Dirix V, et al. Key role of effector memory CD4⁺ T lymphocytes in a short-incubation heparin-binding hemagglutinin gamma interferon release assay for the detection of latent tuberculosis[J]. Clin Vaccine Immunol, 2014, 21(3): 321-328.
- [11] Molicotti P, Bua A, Cubeddu M, et al. Tuberculosis patients are characterized by a low-IFN- γ /high-TNF- α response to methylated HBHA produced in *M. smegmatis*[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 71(4): 449-452.
- [12] Rouanet C, Debie AS, Lecher S, et al. Subcutaneous boosting with heparin binding haemagglutinin increases BCG-induced protection against tuberculosis[J]. Microb Infect, 2009, 11(13): 995-1001.

(收稿日期: 2014-11-10)