

牛分枝杆菌重组蛋白 TB10.4 对 RAW264.7 细胞 TLR2 表达和分布的影响

刘淑清 李平俊 鑫 婷 侯绍华 朱鸿飞 贾 红

中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京 100193

摘要 为探讨牛分枝杆菌 TB10.4 蛋白与 RAW264.7 细胞的相互作用关系, 表达纯化了 rTB10.4, 并采用 IFN- γ 释放试验和 Western blot 检测其细胞活性。使用不同剂量 rTB10.4 与 RAW264.7 细胞共孵育后, 采用实时无标记动态细胞分析技术检测 rTB10.4 对 RAW264.7 细胞生长影响的最佳时间点和最佳剂量。在此基础上, 采用量化流式细胞仪分析重组蛋白 rTB10.4 对 RAW264.7 细胞 TLR2 表达的影响。结果表明, 获得的 rTB10.4 具有较强的 T 细胞和 B 细胞活性, rTB10.4 对 RAW264.7 细胞的作用呈剂量依赖性, 作用起效时间为 12~24 h, 诱导作用在 16~18 h 达到最大效应值。量化流式分析仪分析结果表明, rTB10.4 刺激可显著增强 RAW264.7 细胞的细胞膜上 TLR2 的表达。

关键词 TB10.4 重组蛋白; 牛分枝杆菌; RAW264.7 细胞; 动态实时细胞分析检测技术; TLR2

中图分类号 S 816.73 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2015)01-0083-08

牛结核病(bovine tuberculosis)是一种主要由牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)感染引起的严重人畜共患慢性消耗性传染病, 也是世界动物卫生组织(OIE)规定必须强制报告的疫病, 在亚洲、北美、大洋洲、非洲、拉丁美洲和加勒比海均有发生^[1]。牛分枝杆菌与结核分枝杆菌在基因组上的同源性达 99.95%, 均为胞内寄生病原菌, 巨噬细胞(macrophage)是其在体内的主要宿主细胞, 也是杀伤入侵宿主的结核分枝杆菌的主要的效应细胞之一, 在机体对结核分枝杆菌免疫中发挥着重要的作用。

巨噬细胞表面表达一系列严格的吞噬型受体, 并通过这些受体识别不同细菌的保守基序^[2]。目前研究表明, 至少有 7~10 个典型的巨噬细胞受体, 包括 CR1、CR3、CR4、清道夫受体、甘露糖受体、CD14、CD43, Surfactant Protein A(Sp-A)受体和 substance P receptor (SPR)等。通过这些受体可以识别结合并介导结核分枝杆菌进入巨噬细胞^[2~4]。根据巨噬细胞不同的分化和激活状态, 巨噬细胞表面受体的激活和表达程度也不同, 例如在单核细胞分化为巨噬细胞过程中, CR4、清道夫受体、甘露糖

受体及 SPR210 表达量增加, 而 CR3 显著减少; IFN- γ 刺激巨噬细胞后, 其甘露糖受体表达量下调而 SPR210 显著增加。除此之外, 结核分枝杆菌的表面成分也十分精密复杂, 它们可以作为配体被不同类型的巨噬细胞表面的不同受体所识别, 将巨噬细胞作为长期存在及定居的场所。已有研究显示, 结核分枝杆菌利用不同的特异性受体进入巨噬细胞的方式可以影响其在细胞内的存在方式^[4]。

近年来, 巨噬细胞的 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)与结核分枝杆菌的相关性研究也是研究的热点。TLR 是一种跨膜蛋白, 表达于树突状细胞和巨噬细胞表面^[5]。TLR 主要通过识别结核分枝杆菌的病原相关分子模式激活免疫细胞, 导致多种细胞因子的表达和释放, 为机体抵抗结核分枝杆菌感染提供保护。结核分枝杆菌侵入机体后能够引起炎症反应, 并与机体抵抗力(免疫力)之间展开此消彼长的较量, 使病变过程十分复杂, 但有关结核分枝杆菌(抗原)-巨噬细胞-淋巴细胞之间相互作用的分子机制还尚未研究清楚。

TB10.4 是 ESAT6 家族成员, 由 291 个碱基编

收稿日期: 2014-04-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(31302130); “中国农业科学院科技创新工程”兽医公共卫生安全与管理创新团队(ASTIP-IAS-11); 国家“863”高技术研究与发展专项(2012AA101302)

刘淑清, 博士研究生。研究方向: 动物疫苗与分子免疫学。E-mail: liushuqing1986@126.com

通信作者: 贾 红, 助理研究员。研究方向: 动物疫苗与分子免疫学。E-mail: jiahong80@126.com

码的 97 个氨基酸构成,其编码基因在致病性结核分枝杆菌的基因组中有重复拷贝^[6],因此,推测 TB10.4 可能与结核分枝杆菌的致病机制相关。Billeskov 等^[7]报道, TB10.4 含有多个 CD4+ 和 CD8+T 细胞表位,结核病患者的 T 淋巴细胞能特异性识别 TB10.4,释放大量的 IFN- γ 。

为了初步探讨牛分枝杆菌 TB10.4 蛋白与 RAW264.7 细胞的相互作用关系,笔者通过原核表达系统表达和纯化了高纯度的 TB10.4 重组蛋白(rTB10.4),并检测了其对 T 细胞活性及 B 细胞活性的影响。使用不同剂量 rTB10.4 与 RAW264.7 细胞共孵育后,通过量化流式细胞分析仪准确分析了 TB10.4 蛋白刺激对 RAW264.7 细胞的 TLR2 表达及分布的影响,旨在为今后进一步探讨 TB10.4 蛋白功能及其在牛结核病诊断中的作用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灭活的牛分枝杆菌 Vallee III 菌株由中国兽医药品监察所丁家波副研究员惠赠。pET32a(+)原核表达载体由笔者所在实验室保存;Trans5 α 、BL21 (DE3) 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 血清、抗体与试剂

牛结核病阳性血清由笔者所在实验室采集保存。其中牛结核病阳性牛挑选条件是经皮内变态反应实验(GB/T 18645-2002)检出的阳性牛在 30 d 内,随机选择几头采集血样,用 BOVIGAMTM 牛 IFN- γ 检测试剂盒(*Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for cattle, Bovigam, Prionics AG, Schlieren, Switzerland)进行进一步鉴定所得。辣根过氧化物酶标记的二抗购自 Thermo Pierce 公司。IPTG 及尿素购自 Sigma 公司;pfu DNA Polymerase 购自 Fermentas 公司;限制性内切酶 *Hind* III、*Bam*H I 及 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 生物公司。PCR 纯化试剂盒、胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司,引物合成和 DNA 序列测定由上海生物工程有限公司完成;琼脂糖购自 Invitrogen 公司;DL 2000 plus DNA Marker 购自北京全式金生物技术有限公司;Triton X-114 购自 Sigma 公司;鲎试剂检测试剂盒购自厦门鲎试剂实验厂有限公司。0.22 μ m PVDF 膜购自 Bio-Rad 公

司;Hiprep 26/10 Desalting column 和 HisTrap FF crude column 1ml 购自 GE 公司;BCA 蛋白定量试剂盒购自 Pierce 公司。蛋白酶 K(protease K)和多粘菌素 PB 购自美国 BD Pharmingen 公司,质量浓度为 1 mg/mL, -20 $^{\circ}$ C 保存备用;TLR2 和 TLR4 的抗体均购自美国 Abcam 公司;AF488 荧光标记的羊抗兔 IgG 抗体 (# 4412) 为 Cell Signaling 产品;DAPI(4,6'-diamidino-2-Phenylindole):标记细胞核的荧光染料,购自 CST 公司;其他试剂均为分析纯,购自国内各试剂公司。

1.3 TB10.4 原核表达载体的构建

参照 GenBank 公布的 *Mycobacterium bovis* AF2122-97 菌株基因序列设计 Rv0288 引物,上下游分别含有 *Hind* III、*Bam*H I 酶切位点(黑体下划线部分)。

上游引物 (upper): 5' CGCGGATCCATGTCG-CAAATCATGTACAAC 3'

下游引物 (lower): 5' CCCAAGCTTCTAGCCGC-CCCATTG 3'

以 *Mycobacterium bovis* Vallee III 基因组 DNA 为模板,用 *Pfu* DNA 聚合酶进行 Rv0288 基因的扩增反应。反应总体积 50 μ L; ddH₂O 17.5 μ L, 2 \times GC buffer 25 μ L, 正向引物(10 μ mol/L)2 μ L, 反向引物(10 μ mol/L) 2 μ L, *Pfu* DNA 酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, DNA 模板 2 μ L。Rv0287 基因扩增的反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。分别取 8 μ L 的 PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶进行核酸电泳(110 V 电压, 30 min), 在紫外凝胶成像仪下观察电泳结果。使用 OMEGA 公司的 PCR 纯化试剂盒,按照产品说明书纯化 291 bp 的 PCR 产物。分别对纯化的 PCR 产物和 pET32a(+)载体用 *Bam*H I 和 *Hind* III 进行双酶切,胶回收目的片段,用紫外分光光度计定量,将 PCR 产物酶切片段与载体酶切片段按物质的量之比 5:1 的比例使用 T4DNA 连接酶连接,按照产品说明书转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,涂布 Amp 抗性平板进行培养,随机挑取单菌落加入 LB 液体培养基培养。菌液送至上海生工生物工程有限公司完成测序。

1.4 重组蛋白 TB10.4 的表达、纯化以及内毒素的去除及定量

将重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3), 重组菌以

终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h 后,采用 SDS-PAGE 检测,以测定重组蛋白的表达情况。采用梯度尿素洗脱法进行重组蛋白纯化。参照文献[9]的方法去除内毒素,使用鲎试剂检测试剂盒检测重组蛋白溶液中 LPS 含量。采用 BCA Protein Assay Kit(Pierce, Rockford, IL) 蛋白定量试剂盒测定重组蛋白含量。

1.5 重组蛋白的 T 细胞活性鉴定

采用皮内变态反应实验和牛 IFN- γ 释放实验检测后,筛选 3 头结核病阳性牛和 3 头健康牛全血,加入到 48 孔细胞培养中,4 孔/头,750 μ L 抗凝血/孔。重组蛋白用 PBS(pH 7.4)稀释到等浓度刺激全血,即 rTB10.4 的终质量浓度为 10 μ g/mL,重组融合蛋白 CE(rCE)为 1.33 μ g/mL, pET32a(+)载体标签蛋白 32a 为 0.67 μ g/mL。分别向各孔加入 50 μ L 的牛结核菌素(B-PPD)、禽结核菌素(A-PPD)、PBS、rTB10.4;轻轻振荡混匀后于 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h。收集上清,按照 BovigamTM 的牛 IFN- γ 检测试剂盒说明书检测 IFN- γ 释放水平。

结果判定标准:

a) 结果有效性: 阴性对照 < 0.130 , 阳性对照 > 0.700 ;

b) 阳性 = B-PPD 的 D_{450} 值 - PBS 的 D_{450} 值 ≥ 0.1 , 且 B-PPD 的 D_{450} 值 - A-PPD 的 D_{450} 值 ≥ 0.1 ;

阴性 = B-PPD 的 D_{450} 值 - PBS 的 D_{450} 值 < 0.1 , 或 B-PPD 的 D_{450} 值 - A-PPD 的 D_{450} 值 < 0.1 ;

P = 重组蛋白抗原刺激的 D_{450} 值 - pET32a 标签蛋白 32a 刺激的 D_{450} 值;

N = PBS 的 D_{450} 值;

阳性 = $P/N \geq 2.1$; 阴性 = $P/N < 2.1$ 。

1.6 重组蛋白的 B 细胞活性鉴定

将纯化的重组蛋白 TB10.4 经 12% SDS-PAGE 100 V 电泳 90 min, 100 V 恒压 PVDF 膜湿转 70 min, 洗涤封闭后, 加入 20 mL TBST 1:50 稀释的结核病阳性牛血清(经皮内变态反应和 IFN- γ 释放实验验证)一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育, TBST 洗涤 3 次后加入 20 mL 用 TBST 1:5000 稀释的 HRP 标记的兔抗牛的二抗, 25 $^{\circ}$ C 40 r/min 振荡封闭 1 h 后 TBST 洗涤 3 次, DAB 显色底物避光反应 10 min。

1.7 RTCA 实时动态检测重组蛋白 TB10.4 对 RAW264.7 细胞生长的影响

通过实时无标记动态细胞分析技术(real time cellular analysis, RTCA)实现实时、无标记、持续动

态检测细胞表型变化。E-Plate 电极板底部整合有微金电极,细胞的有无及形态会影响电阻抗的变化。电阻抗值以细胞指数(cell index, CI)的形式输出,可定量评估细胞生理状态包括细胞数量、存活率及细胞形态变化等。基于阻抗检测得到的动力学图谱能够提供诱导物引起的细胞作用的瞬时效应信息^[10]。E-Plate 96 电极板每孔接种 2 500~5 000 个 RAW264.7 细胞,待细胞达到 80% 的汇合度时(约 24 h),加入 TB10.4 重组蛋白刺激细胞,质量浓度分别是 0.5、1.5、3.0 和 5.0 μ g/mL。RTCA 实时监测细胞状态,每隔 5 min 检测 1 次。

1.8 量化流式细胞分析仪检测重组蛋白 TB10.4 对 RAW264.7 细胞 TLR2 表达的影响

以 5×10^5 个/mL 浓度的 RAW264.7 细胞接种于 24 孔细胞培养板上,37 $^{\circ}$ C 于 CO₂ 培养箱中继续培养 24 h 后,在 RAW264.7 细胞中加入重组蛋白 TB10.4(终质量浓度为 5 μ g/mL),共同培养 24 h 后将每孔的细胞用胰酶消化后置于 EP 管中,1 mL 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,2 000 r/min 离心 10 min,4 $^{\circ}$ C。弃去 PBS 后将细胞置于冰上加入 1 mL 的免疫染色固定液重悬细胞,室温 15 min 或者 4 $^{\circ}$ C 过夜;2 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清;免疫染色洗涤液洗涤 3 次,2 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 弃上清;加入免疫染色封闭液,25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,2 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后弃上清;使用 perm wash buffer 以 1:50~1:100 的比例稀释 TLR2 抗体,加入 100 μ L 稀释后的抗体重悬细胞,4 $^{\circ}$ C 过夜孵育;2 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 后,免疫染色洗涤液洗涤 3 次,2 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 弃上清;perm wash buffer 以 1:500~1:1 000 的比例稀释 AF488 荧光标记的羊抗兔 IgG 抗体,每个样品加入 100 μ L 重悬细胞,25 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,2 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清;perm wash buffer 以 1:5 000~1:10 000 的比例稀释 DAPI,上机前 5 min 加入样品中,每个样品 100 μ L 重悬细胞,室温避光孵育 5 min 后,使用免疫染色洗涤液洗涤 3 次后,2 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,弃上清;用 PBS 重悬细胞,置于 AMNIS 上样管中进行检测,每个样品采集 5 万个细胞进行分析。

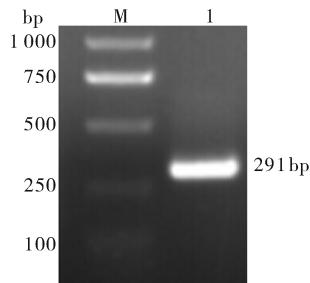
1.9 统计分析

所有试验数据检测均采用 *t* 检验计算组间差异。P 值小于 0.05 判为差异显著。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建和鉴定

以牛分枝杆菌 Valley III 菌株基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 反应, 琼脂糖凝胶电泳显示 PCR 产物大小与预期相符, 为 291 bp, 见图 1。测序结果与 GenBank 数据库所收录的 Rv0288 基因一致。



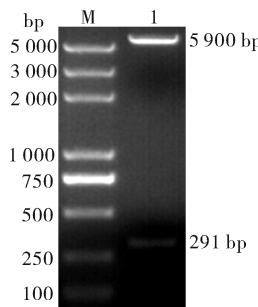
M: DL 2 000 marker; 1: PCR 产物 Production of PCR.

图 1 Rv0288 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR product of Rv0288

2.2 重组质粒的双酶切鉴定

从转化后的重组子中抽提重组质粒 pET32a-Rv0288, 经 *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果, 大小与预期相符, 如图 2 所示。重组质粒经上海生工生物工程技术有限公司测序结果显示, 得到 Rv0288 基因的全长、无突变的阳性克隆, 且插入的序列和方向都正确, 可以用于进一步的诱导表达。



M: DL2000 marker; 1: pET32a-Rv0288 *Bam*H I and *Hind* III 酶切产物 pET32a-Rv0288 *Bam*H I and *Hind* III.

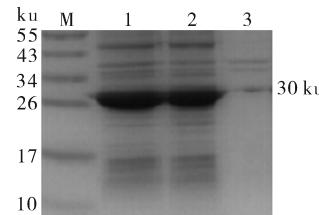
图 2 重组质粒的酶切产物

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of recombinant plasmid digested with restriction enzyme

2.3 重组蛋白的诱导表达与纯化

筛选到的阳性重组质粒转化到 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞后, 用 1 mmol/L IPTG 诱导表达。结果显示, TB10.4 以可溶形式表达, 重组蛋白

的分子质量同预计大小基本一致。利用亲和层析法纯化重组蛋白, 由 SDS-PAGE 的结果分析可知, 该纯化方法可得到纯度在 90% 以上的目的蛋白, 并且蛋白条带分子质量约为 30 ku, 与预期的结果一致 (图 3)。纯化后的蛋白脱盐置换到 PBS 缓冲体系中, 能够稳定存在。重组蛋白经 Triton X-114 处理后, LPS 含量均低于 2 EU/mg, 可以用于后续动物实验及细胞实验。



M: 蛋白标记 Protein marker; 1: IPTG 诱导后 rTB10.4 总蛋白 The lysate of total protein before IPTG induction; 2: IPTG 诱导后 rTB10.4 蛋白的裂解上清 Protein supernatant of lysate after IPTG induction; 3: IPTG 诱导后 rTB10.4 蛋白的裂解沉淀 Protein sediment of lysate after IPTG induction.

图 3 重组蛋白 TB10.4 的表达纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis the expression, purification of TB10.4 recombinant protein

2.4 重组蛋白 T 细胞活性鉴定

根据 BCA 法蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。根据定量结果, 重组蛋白用 PBS(pH 7.4)稀释到相同浓度刺激全血, 即 rTB10.4 的终质量浓度为 10 μ g/mL, rCE 为 1.33 μ g/mL, pET32a(+)载体标签蛋白 32a 为 0.67 μ g/mL。

使用 IFN- γ 释放试验检测试剂盒对重组蛋白 TB10.4 的 T 细胞刺激活性进行鉴定 (表 1 和表 2), 结果显示, 重组蛋白 TB10.4 均能特异地刺激结核病阳性牛全血产生一定的 IFN- γ 。阴性对照 OD 值分别为 0.065 8 和 0.065 0, 均小于 0.130, 阳性对照 OD 值分别为 1.896 8 和 1.839 1 均大于 0.700, 表明本次试验数据有效。其按照 BOVIGAM 说明书进行判断可知, 1、2、3 号牛为牛分枝杆菌感染牛, 4、5、6 号牛为阴性牛。用重组蛋白 TB10.4 刺激全血, 培养 24 h 后经过牛 IFN- γ 检测试剂盒 (BOVIG-AMTM) 检测 IFN- γ 释放情况, 检测结果见表 1, 按照公式计算 (表 2), TB10.4 刺激牛分枝杆菌感染阳性牛的 P/N 值分别为 7.34、10.35、8.24, 均大于 2.1, 表明 TB10.4 可以刺激牛分枝杆菌感染牛产生 IFN- γ ; 刺激阴性牛的 P/N 值分别为 -0.18、0.12、0.29, 均小于 2.1, 表明 TB10.4 对阴性牛均无刺激

作用;该结果说明重组蛋白TB10.4能特异地刺激结核病阳性牛全血产生一定的IFN- γ ,具有一定的T细胞刺激活性。但刺激效果不及B-PPD和rCE,这与文献报道相符。

表1 IFN- γ 释放试验检测结果¹⁾Table 1 IFN- γ release test results

		编号 Num.	B-PPD	A-PPD	PBS	pET32a	rCE	rTB10.4
阳性牛 Positive	1	1.585 6	0.875 5	0.060 9	0.188 3	2.208 2	0.635 1	
	2	1.993 8	0.266 5	0.062 4	0.184 0	2.321 7	0.829 7	
	3	1.315 9	0.852 3	0.062 4	0.177 2	1.822 9	0.691 4	
阴性牛 Negative	均值 Mean value	1.631 8	0.664 8	0.061 9	0.183 2	2.117 6	0.718 7	
	4	0.155 3	0.125 4	0.071 4	0.106 6	0.174 4	0.094 0	
	5	0.123 5	0.115 4	0.063 2	0.152 4	0.153 2	0.160 0	
	6	0.158 6	0.120 4	0.064 1	0.133 2	0.145 5	0.151 6	
	均值 Mean value	0.145 8	0.120 4	0.066 2	0.130 7	0.157 7	0.135 2	
	阳性 Positive	1.896 8	1.839 1	阴性 Negative	0.065 0	0.065 8		

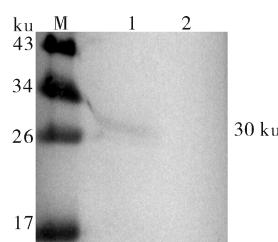
1)表中数值为450 nm处OD读数。The data in the table are D_{450} value.

表2 IFN- γ 释放试验结果判定Table 2 Determination of IFN- γ release test results

P/N	编号 Num.	PPD	rCE	rTB10.4
阳性牛 Positive	1	25.04	33.17	7.34
	2	30.95	34.26	10.35
	3	20.09	26.37	8.24
阴性牛 Negative	均值 Mean value	25.36	31.27	8.64
	4	1.18	0.95	-0.18
	5	0.95	0.01	0.12
	6	1.47	0.19	0.29
	均值 Mean value	1.20	0.38	0.08

2.5 重组蛋白B细胞活性鉴定

由图4可见,重组蛋白TB10.4能够与结核病阳性牛血清反应,并在30 ku处出现特异性条带,表明重组蛋白均能够被牛阳性血清中的抗体特异性识别,具有反应原性。



M:蛋白marker Protein marker; 1:纯化后的重组蛋白TB10.4 The purified recombinant protein; 2:阴性对照 Negative control.

图4 重组蛋白的Western blot鉴定

Fig.4 Western blot analysis of the recombinant protein

2.6 TB10.4对小鼠细胞生长的影响

由RTCA实时动态检测图谱(图5)可见,RAW264.7细胞于22 h后进入生长平台期,能够进行重组蛋白诱导;与空白细胞相比,重组蛋白TB10.4对RAW264.7细胞无细胞毒性作用,不会导致细胞死亡。不同剂量的rTB10.4对RAW264.7细胞的增

殖速率和动力学具有明显的影响。TB10.4对细胞的作用开始于0.5 h内,起效时间在12~24 h,诱导作用在16~18 h观察到最大效应值。高浓度的rTB10.4对细胞的作用效应更明显,细胞指数下降速率较快,而低浓度rTB10.4的细胞指数下降速率较慢,表明rTB10.4对细胞的作用呈现剂量依赖性。

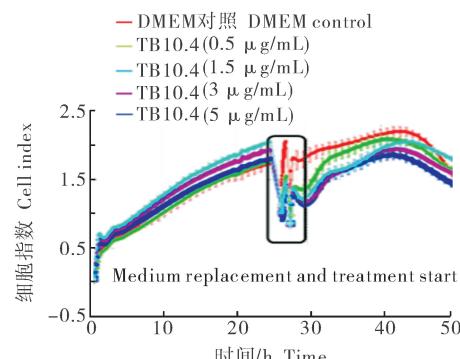


图5 rTB10.4对RAW264.7细胞影响的动力学图谱

Fig.5 Electrical impedance measured using a real-time cell electronic sensing (RT-CES) system

2.7 rTB10.4对小鼠细胞TLR2表达的影响

通过量化流式细胞分析仪检测RAW264.7细胞表面TLR2的分布及表达发现,巨噬细胞膜表面都有均匀分布的绿色荧光颗粒,说明RAW264.7细胞的细胞膜能够表达TLR2,且受体均匀分布于细胞表面(图6)。rTB10.4刺激后RAW264.7细胞可以诱导巨噬细胞TLR2表达增加(图7)。通过rTB10.4刺激的RAW264.7细胞TLR2表达的直方图及未刺激对照比较显示,rTB10.4刺激的RAW264.7细胞TLR2表达的平均荧光强度为52.4%,与未刺激对照组32.4%比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

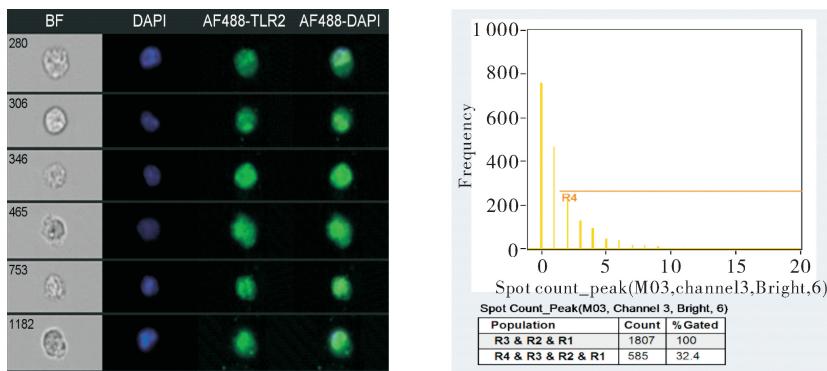


图 6 RAW264.7 细胞 TLR2 的表达及分布

Fig. 6 rTB10.4 induces the TLR2 expression and distribution in RAW264.7 measured by Image Stream 100

BF: 明场视野下的细胞形态; DAPI: DAPI 染料染色后细胞形态; AF488-TLR2: TLR2 抗体染色后细胞形态; AF488-DAPI: AF488-TLR2 和 DAPI 染色后细胞形态。下同。BF: The brightfield microscope images; DAPI: The DAPI staining cells microscope images; AF488-TLR2: AF488-TLR2 antibody staining cells microscope images; AF488-DAPI: AF488-TLR2 antibody and DAPI staining cells microscope images. The same as below.

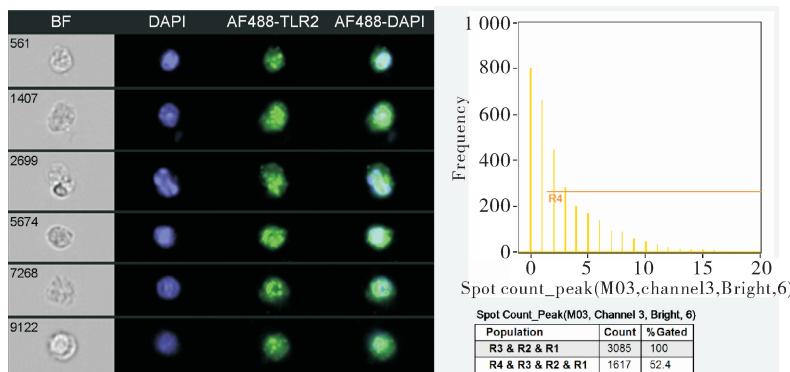


图 7 rTB10.4 对 RAW264.7 细胞 TLR2 表达及分布的影响

Fig. 7 Electrical impedance measured using a real-time cell electronic sensing (RT-CES) system

3 讨 论

在牛分枝杆菌的产物中,许多具有活性的分泌蛋白能够激发机体的免疫应答因而受到极大的关注。TB10.4 作为典型的分泌蛋白,是抗结核病免疫主导的蛋白质,与 ESAT-6 相比,它不仅被 BCG 免疫过的人血清所识别,而且更容易被 MTB 感染病人的血清所识别^[8]。TB10.4 是 MTB 表现其毒力必不可少的因子^[9],在分枝杆菌的感染过程中刺激机体产生抗体保守的存在于诸如 *M. tuberculosis* H37Rv、*M. bovis* MNC27、fiCGdanish 1331 等菌株中^[10]。同时,由于 TB10.4 在免疫应答中所表现出的强烈的免疫原性,人们对其在免疫学方面进行了深入的研究,而以 TB10.4 为基础的疫苗 CrucellAd35/Aeras-402、HyVac4/Aeras-404 已经

进入了临床试验^[11-15]。对 TB10.4 蛋白表位分析发现,几乎所有的表位都可以刺激产生 IFN- γ 反应。其中 TB10.41-18 属于免疫主导表位,在大部分 MTB 感染病人和 BCG 免疫过的人中都可以产生明显的外周血单核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 反应^[16],但是对 TB10.4 功能的研究尚未清楚。而这些研究工作都必须建立在获得有较好的 T 细胞活性和免疫原性的 rTB10.4 蛋白的基础上。

考虑到原核表达系统利于大规模生产,本试验使用原核表达系统 pET32a(+) 构建 rTB10.4 抗原蛋白。pET32a(+) 含有促进二硫键形成和可溶性表达的 Trx 标签,使获得的蛋白最大程度上保持了天然构象,C 端终止密码子的引入保证了 C 端不受外源序列的干扰,保证了 C 端的正确构象。经

IPTG 诱导后的重组蛋白通过用亲和层析法纯化重组蛋白,可得到纯度较高的可溶性表达的目的蛋白。通过检测 IFN- γ 的释放水平,表明重组蛋白 TB10.4 能特异地刺激结核病阳性全血产生一定的 IFN- γ ,并且重组蛋白 TB10.4 中的标签蛋白 32a 无明显的 IFN- γ 诱导作用。表明本试验构建的重组蛋白 TB10.4 具有特异的 T 细胞活性。Western blot 显示,纯化后的重组蛋白 TB10.4 能够与牛分枝杆菌阳性血清特异反应,表明本试验构建的重组蛋白 TB10.4 具有较好的 B 细胞活性。因此,本研究获得的牛分枝杆菌抗原 TB10.4 具有较好的生物学活性,为牛结核病新型诊断方法及后续生物学功能研究奠定了基础。

本试验通过使用实时阻抗细胞分析技术(RTCA),能够无需任何标记实时连续检测 TB9.8 对 RAW264.7 细胞的真实形态变化,细胞作用动力学图谱显示,RAW264.7 细胞生长 22~24 h 后进行蛋白刺激为最佳诱导时间,TB10.4 对 RAW264.7 细胞的作用具有浓度依赖性,且 5 μ g/mL 高质量浓度的 TB10.4 对细胞的作用效应最明显。细胞的生物学反应具有瞬时性,借助 RTCA 技术检测细胞瞬时反应具有高灵敏性的特性,为识别 TB10.4 对细胞的作用的起始时刻,以及确定最大效应发生时间提供了有效的证据,为后续深入地揭示 TB10.4 的生物学功能及免疫学研究提供了理论依据。

结核杆菌及其复杂的细胞壁成分可以作为配体被巨噬细胞表面 TLRs 识别。Drennan 等^[10] 将 TLR2 缺陷小鼠和野生型小鼠的巨噬细胞分别分离出来后在体外用结核分枝杆菌刺激,结果表明 TLR2 缺陷小鼠分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 12(IL-12) p40 的水平显著下降;经气道感染结核分枝杆菌后,TLR2 缺陷型小鼠的致死率也显著高于野生型小鼠,这表明 TLR2 与结核分枝杆菌易感性密切相关。在感染初期,TLRs 就作为先天免疫细胞活化的调节剂发挥重要作用,并且 TLR 依赖的细胞反应也对随后发生的细胞免疫特性和程度产生影响。

量化流式细胞分析仪(Image Stream 100)是将流式分析的统计学和显微成像的形态学有机结合的高通量定量检测系统,在分析中,每个试验样本能够同时在几秒钟内检测 3 万到 5 万个活细胞,能够提出形态学标准化参数,使形态学分析具有统计学意义,弥补了传统显微镜技术肉眼主观观察分析结果

缺乏客观准确性这一缺点^[17]。本试验通过使用量化流式细胞分析仪 Image Stream 100,检测 TB10.4 对 RAW264.7 细胞荧光素酶标记 TLR2 表达的真实表达水平,结果表明,TLR2 在 RAW264.7 细胞表面有基础表达。本研究通过测定经 rTB10.4 诱导后细胞表面 TLR2 表达水平的变化,发现 rTB10.4 诱导作用后,TLR2 表达水平明显增加。试验同时还发现,rTB10.4 能诱导 RAW264.7 细胞表面 TLR2 发生功能性聚集的构象改变。试验结果说明 rTB10.4 可能在启动 RAW264.7 细胞中 TLR2 信号转导途径中发挥主要作用,为后续深入地揭示 TB10.4 的信号通路研究提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] 郭爱珍. 我国牛结核病的防控与净化[J]. 兽医导刊, 2010(8): 38-40.
- [2] ADEREM A, UNDERHILL D M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages[J]. Annu Rev Immunol, 1999, 17(1): 593-623.
- [3] 王晓蕾, 雷建强, 王洪海. 巨噬细胞摄取结核分枝杆菌相关的受体[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(5): 297-299.
- [4] ERNST J D. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*[J]. Infect Immun, 1998, 66(4): 1277-1281.
- [5] ZAREMBER K A, GODOWSKI P J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines [J]. J Immunol, 2002, 168(2): 554-561.
- [6] RINDI L, LARI N, GARZELLI C. Search for genes potentially involved in *Mycobacterium tuberculosis* virulence by mRNA differential display[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258(1): 94-101.
- [7] SKJOT R L, BROCK I, AREND S M, et al. Epitope mapping of the immunodominant antigen TB10.4 and the two homologous proteins TB10.3 and TB12.9, which constitute a subfamily of the esat-6 gene family[J]. Infect Immun, 2002, 70(10): 5446-5453.
- [8] THIBAULT V C, GRAYON M, BOSCHIROLI M L, et al. New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains; comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(8): 2404-2410.
- [9] DVORSKA L, BSRTOS M, OSTADAL O, et al. IS1311 and IS1245 restriction fragment length polymorphism analyses, serotypes, and drug susceptibilities of *Mycobacterium avium* complex isolates obtained from a human immunodeficiency virus-negative patient [J]. J Clin Microbiol, 2002, 40(10): 3712-3719.

- [10] DRENNAN M B, NICOLLE D, QUESNIAUX V J, et al. Toll-like receptor 2-deficient mice succumb to *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Am J Pathol, 2004, 164(1): 49-57.
- [11] SKJØT R L V, OETTINGER T, ROSENKRANDS I, et al. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the esat-6 family as immunodominant T-cell antigens [J]. Infect Immun, 2000, 68(1): 214-220.
- [12] HERVAS-STUBBS S, MAJLESSI L, SIMSOVA M, et al. High frequency of CD4+ T cells specific for the TB10.4 protein correlates with protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection [J]. Infect Immun, 2006, 74(6): 3396-3407.
- [13] BILLESKOV R, GRANDAL M V, POULSEN C, et al. Difference in TB10.4 T-cell epitope recognition following immunization with recombinant TB10.4, BCG or infection with *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Eur J Immunol, 2010, 40(5): 1342-1354.
- [14] BILLESKOV R, VINGSBO-LUNDBERG C, ANDERSEN P, et al. Induction of CD8 T cells against a novel epitope in TB10.4: correlation with mycobacterial virulence and the presence of a functional region of difference-1 [J]. J Immunol, 2007, 179(6): 3973-3981.
- [15] AXELSSON-ROBERTSON R, WEICHOLD F, SIZEMORE D, et al. Extensive major histocompatibility complex class I binding promiscuity for *Mycobacterium tuberculosis* TB10.4 peptides and immune dominance of human leucocyte antigen (HLA)-B* 0702 and HLA-B* 0801 alleles in TB10.4 CD8+ T-cell responses [J]. Immunology, 2010, 129(4): 496-505.
- [16] NIEMANN S, HARMSEN D, RUSCH-GERDES S, et al. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis [J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(9): 3231-3234.
- [17] GEORGE T C, FANNING S L, FITZGERAL-BOCARSLEY P, et al. Quantitative measurement of nuclear translocation events using similarity analysis of multispectral cellular images obtained in flow [J]. J Immunol Methods, 2006, 311: 117-129.

***Mycobacterium bovis* antigen protein rTB10.4 and its effects on expression and distribution of TLR2 in RAW264.7 cells**

LIU Shu-qing LI Ping-jun XIN Ting HOU Shao-hua ZHU Hong-fei JIA Hong

Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

Abstract To preliminarily explore the interaction between *Mycobacterium bovis* TB10.4 and RAW264.7 cells, recombinant TB10.4 was expressed and purified, and the cell activities were detected by IFN- γ release assays and Western blot. RAW264.7 cells were incubated with different doses of rTB10.4, then the best exposure condition was analysed by the RT-CES system. On this basis, the effects of rTB10.4 on the expression and distribution of TLR2 of RAW264.7 cells were detected and analyzed by Image-Stream fluorescence imaging. The results showed that the rTB10.4 has strong T cells and B cell response activities. The interaction of RAW264.7 with rTB10.4 was dose-dependent, and the onset time range was from 12 h to 24 h, and the maximum effect was observed from 16 h to 18 h. The results of Image-Stream fluorescence imaging showed that the stimulation of rTB10.4 could significantly enhance the expression of TLR2 on the cell membrane of RAW264.7 cells. In a word, this study provided a scientific basis for further exploring the TB10.4 protein function and its role on the diagnosis of bovine tuberculosis.

Key words rTB10.4; *Mycobacterium bovis*; RAW264.7; a real-time cell electronic sensing system; TLR2

(责任编辑:边书京)