

稳定表达结核分枝杆菌 ESAT-6 蛋白的 RAW264.7 细胞系的建立

李浩, 殷瑛, 董大勇, 张军, 付玲, 蔡晨光, 王猛, 徐俊杰, 陈薇

军事医学科学院微生物流行病学研究所 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

摘要: 为研究结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* 分泌蛋白 ESAT-6 (Early secreted antigenic target of 6 kDa) 对巨噬细胞相关功能的影响, 将正确构建的重组质粒 pEGFP-C1-ESAT-6 和空载体 pEGFP-C1 以脂质体介导的方法转染至小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中, 经过 G418 筛选后建立稳定表达 EGFP-ESAT6 融合蛋白以及 EGFP 的细胞系, 并通过 RT-PCR、荧光显微镜及 Western blotting 方法, 在基因和蛋白两个水平对所建立的稳转细胞系进行鉴定。结果证实 EGFP-ESAT6 融合基因成功整合入 RAW264.7 细胞基因组并能够稳定表达, 为后续的 ESAT-6 调控巨噬细胞机理研究提供了平台。

关键词: ESAT-6, RAW264.7, 稳定转染, 表达

Establishment of RAW264.7 cell line stably expressing *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6

Hao Li, Ying Yin, Dayong Dong, Jun Zhang, Ling Fu, Chenguang Cai, Meng Wang, Junjie Xu, and Wei Chen

State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

Abstract: For studying the effects of *Mycobacterium tuberculosis* secretory protein ESAT-6 on the related functions of macrophages, RAW264.7 cells were transfected with pEGFP-C1-ESAT-6 and pEGFP-C1 by liposome respectively. After screening with a high level of G418, the macrophage cell lines that stably expressed EGFP-ESAT-6 fusion protein or EGFP were established. The gene and protein expression levels were further analyzed by RT-PCR, fluorescence microscopy and Western blotting. The results indicated that the EGFP-ESAT6 fusion gene was integrated into the chromosome and the protein could be stably expressed in the selected macrophage cell line. These results gave us a tool for the future study in the mechanisms of ESAT-6 protein in modulating the macrophage cells.

Keywords: ESAT-6, RAW264.7, stable transfection, expression

Received: November 23, 2010; **Accepted:** January 20, 2011

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30972772).

Corresponding author: Junjie Xu. Tel: +86-10-66948491; E-mail: xujunjiel@gmail.com

Wei Chen. E-mail: chewei0226@yahoo.com.cn

国家自然科学基金 (No. 30972772) 资助。

结核 (Tuberculosis, TB) 目前仍是威胁人类的三大感染性疾病之一, 每年约 170 万人病死。多重耐药结核分枝杆菌的大量出现以及艾滋病 (AIDS) 蔓延, 导致全球结核病疫情呈现急剧的上升趋势^[1-2]。结核菌如此猖獗的一个主要原因是其能够入侵和调控机体的防御系统。了解结核分枝菌如何改变机体的防御将有助于研发用于结核防治的更有效的疫苗和药物。

结核分枝杆菌的上清滤液中存在许多具有高度免疫原性的小分子蛋白。其中 ESAT-6 蛋白是这些蛋白分子的代表, ESAT-6 蛋白具有 Trp-Xaa-Gly (WXG) 氨基酸结构域, 由 95 个氨基酸组成^[3]。研究发现, ESAT-6 与结核分枝杆菌的毒力相关, 可通过多种方式调节巨噬细胞的功能。如 Ganguly 等^[4-5]发现分泌蛋白 ESAT-6 参与到调节巨噬细胞内有丝分裂原激活蛋白 (MAP) 激酶途径。ESAT-6 能够下调依赖 ERK 1/2 的脂多糖 (LPS) 诱导基因 *c-myc* 的表达。同时 ESAT-6 能够通过下调氧化自由基 (ROS) 的水平来抑制依赖 NF-kappaB 基因的表达。另外有研究表明 ESAT-6 作用于巨噬细胞能够有效地激活 caspase-1 和促进 IL-1 β 因子的释放^[6]。

尽管目前对 ESAT-6 调控巨噬细胞功能的研究已有一些数据, 但其具体的调控机理仍需进一步探索。特别是已有结果主要是以结核杆菌野生型和突变株感染巨噬细胞而获得, 对 ESAT-6 功能的分析很难排除其他细菌蛋白的影响。为进一步探讨 ESAT-6 蛋白本身对巨噬细胞的作用, 本研究构建了真核表达载体 pEGFP-C1-ESAT-6, 并将其转染小鼠巨噬细胞系 RAW264.7, 经筛选获得稳定表达 ESAT-6 的稳转巨噬细胞系, 为后续试验提供了研究平台。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pET21a(+)-ESAT-6 为本实验室构建。Universal Genomic DNA Extraction kit ver.3.0 以及

Probest[®] DNA 聚合酶 II 购自 TaKaRa 公司。限制性核酸内切酶 *Xho* I、*Bam*H I 以及 T4 DNA 连接酶均购自 New England Biolabs 公司。Endo-free plasmid mini kit I 质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司。感受态大肠杆菌 DH5 α 细胞、Quantscript RT kit Quant cDNA 第一链合成试剂盒以及 RNA simple Total RNA kit 购自 Tiangen 公司。真核细胞转染试剂 Lipofectamine[™] LTX and PLUS[™] Reagents 购自 Invitrogen 公司。Anti-ESAT-6 antibody 购自 abcam 公司, Anti-GFP antibody 购自 ebioscience 公司, HRP 标记的 Goat anti-Mouse IgG 购自 Santa Cruze 公司。DMEM 培养基、胎牛血清购自 Gibco 公司, GFP 标签蛋白裂解液 (分子量: 35 kDa) 购自北京康为世纪公司, RIPA 裂解缓冲液购自普利莱公司。小鼠巨噬细胞 RAW264.7 和 pEGFP-C1 载体为本实验保存。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。其他试剂均为国产和进口分析纯。

1.2 方法

1.2.1 ESAT-6 基因的扩增

以 pET21a(+)-ESAT-6 为模板, 使用引物 (F1, R1) 利用 PCR 方法扩增出 ESAT-6 基因 (引物见表 1)。PCR 条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。

1.2.2 质粒的构建和鉴定

通过 *Xho* I 和 *Bam*H I 限制酶切位点将 PCR 产物双酶切后连入表达载体 pEGFP-C1, 将连接产物转化入大肠杆菌 DH5 α 进行扩增, 随机挑选菌落进行菌落 PCR 鉴定, 并进行酶切鉴定, 送上海英骏生物技术有限公司测序。测序正确的质粒命名为 pEGFP-C1-ESAT-6。

1.2.3 细胞转染和筛选

转染前 1 d 接种 RAW264.7 细胞于 24 孔板 (每孔约 2.0×10^5 个), 待细胞汇合度达到 60%~80% 时用于转染。转染当天, 先给细胞换液, 向每孔加入 0.5 mL 完全培养基 (不加抗生素)。转染时分为脂质体对照组、pEGFP-C1 组和 pEGFP-C1-ESAT-6 组, 每

组设置 2 个复孔。pEGFP-C1 和 pEGFP-C1-ESAT-6 质粒均转染 1.2 μg , PLUS 和 LTX 的用量均分别为 1 μL 和 3 μL 。转染 24 h 后加入 G418 至终浓度为 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每 2 天更换培养液, 同时以未转染的 RAW264.7 细胞作为阴性对照。培养 14 d 后, 转染细胞有抗 G418 的克隆长出, 而阴性对照细胞全部死亡。将转染细胞有限稀释并克隆化培养于 96 孔培养板中。培养 6 d 后, 挑选单克隆细胞生长孔于倒置荧光显微镜下观察, 有绿色荧光的细胞为阳性细胞。将挑选的阳性单克隆传代同时命名为 RAW-EGFP 和 RAW-E6。

1.2.4 ESAT-6 基因整合的 PCR 检测

分别收集 RAW-EGFP 和 RAW-E6 细胞。按 Universal Genomic DNA Extraction kit ver.3.0.试剂盒操作说明提取全基因组, 根据 pEGFP-C1 的特征在 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切位点附近设计 2 条引物 (F2, R2)。若 pEGFP-C1-ESAT-6 整合入细胞染色体, 则扩增出 *EGFP-ESAT6* 的全长约为 1 173 bp, 相反只能扩增出 *EGFP* 的长度约 888 bp。

1.2.5 ESAT-6 基因的转录水平的 RT-PCR 检测

收集 RAW-EGFP 和 RAW-E6 细胞。按 RNA 全基因组提取试剂盒进行细胞总 RNA 的提取, 在 0.25 mL 的 Eppendorf 管进行反转录, 获得 cDNA 第一链。反转录反应体系为 20 μL , 其中随机引物 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 2 μL , dNTPs (DEPC 水溶解) 2 μL , RNase-free 水 12 μL , Quant 反转录酶 1 μL , 模板

RNA 1 μL 。反应条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$, 60 min。-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取 5 μL cDNA 用于 PCR 扩增 *ESAT-6*, *β -actin* 基因作为内参, 扩增引物为(F3, R3)。

1.2.6 荧光显微镜观察

使用 6 孔板培养转入 RAW-EGFP 和 RAW-E6 细胞系, 待细胞的汇合度为 60% 时, 置于荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达, 并采集图像。

1.2.7 Western blotting 检测 ESAT-6 的表达

分别收集 RAW-EGFP 和 RAW-E6 细胞, 使用 RIPA 裂解缓冲液裂解细胞后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清获得细胞总蛋白产物。同时使用分级抽提法^[7]分别抽提 RAW-EGFP 和 RAW-E6 细胞系的可溶性蛋白和难溶蛋白。

使用抗 GFP 抗体对 RAW-EGFP 细胞系进行 Western blotting 鉴定。样品制备成功后进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后恒流 300 mA, 60 min 将蛋白转移至 NC 膜上。使用丽春红染色检验蛋白是否已经转移至 NC 膜上, 将膜置于 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 以 1:2 000 浓度稀释抗 GFP 抗体, 热封, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST (20 mmol/L Tris-HCl, 500 mmol/L NaCl, 0.1% (V/V) Tween 20) 洗 3 次, 每次 10 min。以 1:2 000 浓度稀释二抗, 热封, 室温下摇动 1.5 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min。加入化学发光剂, 去暗室显影。使用抗 ESAT-6 抗体按照上述同样的步骤进行 RAW-E6 细胞系的鉴定, 其中一抗稀释度为 1:2 000, 二抗的稀释度为 1:2 000。

表 1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

| Primer name | Primer sequence (5'-3') | Size (bp) |
|-------------|---|-----------|
| F1 | AGACCTCGAGCTACAGAGCAGCAGTGGAAATTCGC | 35 |
| R1 | AGACGGATCCTACTATGCGAACATCCCAGTGACGTTGCC | 39 |
| F2 | CCGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC | 28 |
| R2 | CCGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGG | 32 |
| F3 | GTACGCCAACACAGTGCT | 18 |
| R3 | TCCTGCTTGCTGATCCAC | 18 |

2 结果

2.1 表达载体的构建

ESAT-6 基因全长 288 bp(含终止密码子 TAG), pEGFP-C1 载体全长约为 4.7 kb。扩增 *ESAT-6* 基因后(图 1A)连入 pEGFP-C1 载体后,使用 *Xho* I 和 *Bam*H I 对所提的质粒进行双酶切鉴定(图 1B)分别得到大小分别约为 4 700 bp 和 300 bp 的基因条带。将重组质粒 pEGFP-C1-*ESAT-6* 送往英潍捷基(上海)有限公司测序,测序结果与 GenBank (ID: 886209) 序列相同,证明重组真核表达质粒 pEGFP-C1-*ESAT-6* 构建成功。

2.2 稳定表达 *ESAT-6* 蛋白的 RAW264.7 细胞系的获得

转染细胞常规培养于含 800 μ g/mL G418 的 DMEM 完全培养基中,培养 15 d 左右,对照组细胞全部死亡,而 pEGFP-C1 和 pEGFP-C1-*ESAT-6* 转染的细胞随培养时间延长死亡细胞逐渐减少,培养 30 d 后无细胞死亡,提示筛选成功,将培养液更换为含 200 μ g/mL G418 的 DMEM 完全培养基进行维持和克隆化。经 2 次克隆化后获得的稳转细胞系分别命名为 RAW-EGFP 和 RAW-E6。

2.3 *ESAT-6* 基因整合及转录水平的检测结果

利用 pEGFP-C1 上设计的引物(表 1)对细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增,核酸电泳结果显示 RAW-EGFP 细胞系仅扩增出大小约为 900 bp 的片段,而 RAW-E6 细胞系扩增出大小为 1 200 bp 的基因片段,与预测相符,表明 *ESAT-6* 基因整合入 RAW-E6 细胞系(图 2A)。

采用 RT-PCR 分析 mRNA 水平,RAW-EGFP 稳转细胞系和 RAW-E6 稳转细胞系均可扩增出片段大小为 204 bp 的内参基因 β -*actin*(图 2B),相反在 RAW-E6 细胞系中能扩增出大小为 288 bp 左右的条带,大小与 *ESAT6* 相符,但 RAW-EGFP 细胞系则无目的片段的存在(图 2C)。这表明在 RAW-E6 细胞系中有 *ESAT-6* 的 mRNA 表达。

2.4 在转染并经筛选的 RAW264.7 细胞中观察融合蛋白的表达

将 *ESAT-6* 基因使用 *Xho* I 和 *Bam*H I 酶切后连入 pEGFP-C1 载体,与上游的 *EGFP* 报告基因在同一阅读框中共同表达融合蛋白。在荧光显微镜下观察 RAW-E6 以及 RAW-EGFP 巨噬细胞系,发现 2 种细胞系均显示稳定均匀的绿色荧光,表明 EGFP-*ESAT-6* 融合蛋白和 EGFP 均能够分别稳定表达于 RAW-E6 和 RAW-EGFP 巨噬细胞系(图 3)。

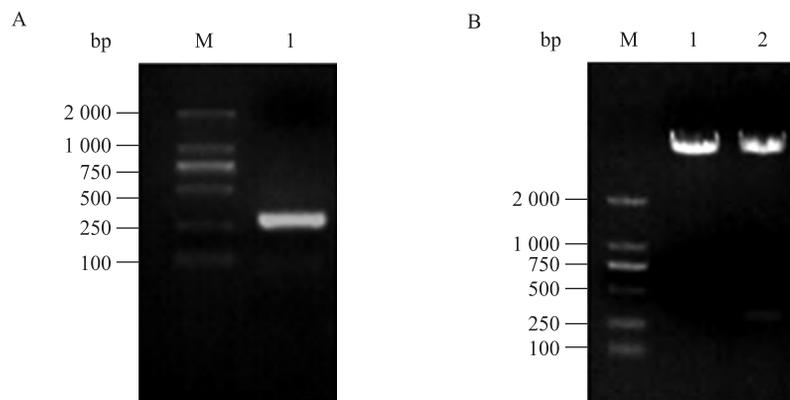


图 1 pEGFP-C1-*ESAT-6* 重组载体的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids pEGFP-C1-*ESAT-6*. (A) 1: *ESAT-6*; M: DNA marker (DL2000). (B) 1: pEGFP-C1-*ESAT-6* digested with *Bam*H I; 2: pEGFP-C1-*ESAT-6* digested with *Xho* I and *Bam*H I; M: DNA marker (DL2000).

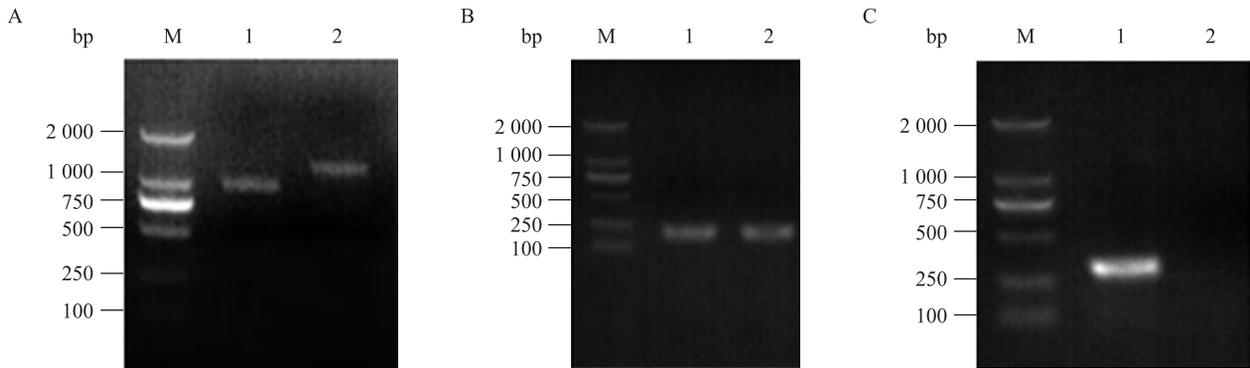


图2 *ESAT-6* 基因整合以及转录水平的分析

Fig. 2 Analysis of *ESAT-6* gene integration and transcription in the cell lines RAW-EGFP and RAW-E6. (A) PCR analysis of genomic DNA extracted from the transfected cell lines. 1: PCR fragment amplified from genomic DNA of RAW-EGFP; 2: PCR fragment amplified from genomic DNA of RAW-E6; M: DNA marker. (B–C) RT-PCR analysis of total RNA extracted from the transfected cell lines. (B) β -actin was used as an internal control for RT-PCR. 1: RT-PCR fragment of β -actin amplified from RNA extracted from RAW-E6; 2: RT-PCR fragment of β -actin amplified from RNA extracted from RAW-EGFP. (C) RT-PCR of *ESAT-6* gene. 1: PCR fragment of *ESAT-6* amplified from RNA of RAW-E6; 2: PCR result of *ESAT-6* amplified from RNA of RAW-EGFP. M: DNA marker.

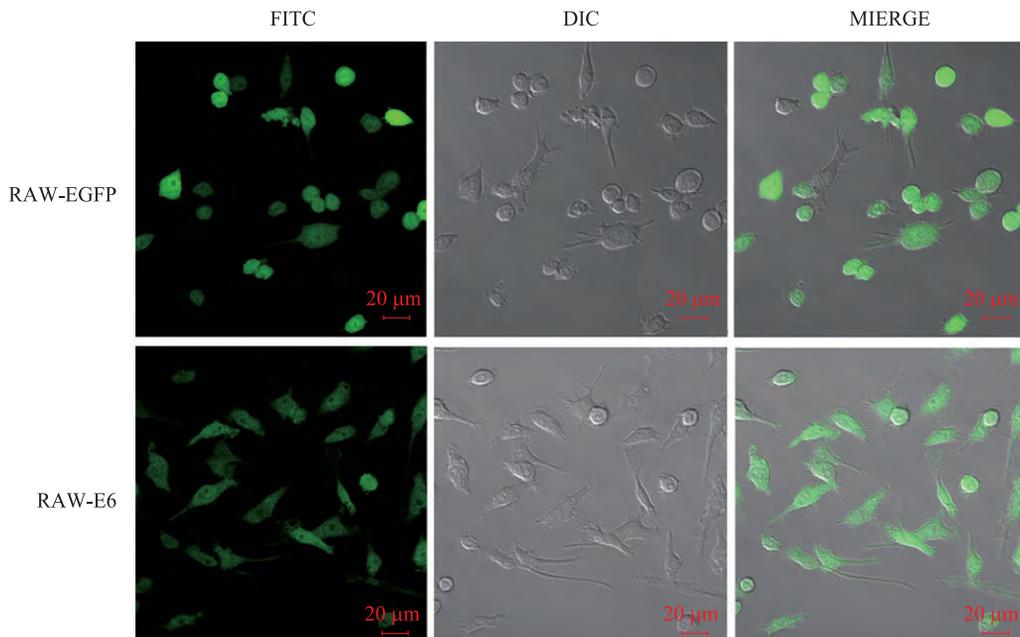


图3 荧光显微镜下观察 EGFP 以及 EGFP-ESAT-6 蛋白的表达

Fig. 3 Stable expression of EGFP and EGFP-ESAT-6 proteins in transfected cell lines was observed by fluorescence microscopy. The cell lines RAW-EGFP and RAW-E6 were plated and examined by fluorescence microscopy under DIC and FITC optics to evaluate the expression of proteins. Merged images represented regions of overlap between the EGFP fluorescence (green) and DIC image.

2.5 稳转细胞中重组蛋白的表达

使用抗 GFP 抗体的 Western blotting 检测结果 显示, RAW-EGFP 细胞系以及 RAW-E6 细胞系 分别能够稳定表达 EGFP 和 EGFP-ESAT-6 融合蛋白 (图 4A)。使用 ESAT-6 抗体的 Western blotting 检测结 果同样证实 RAW-E6 细胞系能够表达 EGFP-ESAT-6 融合蛋白 (图 4B), Western blotting 结果同时表明 EGFP-ESAT-6 融合蛋白主要是以可溶性蛋白的形式 存在于细胞质中 (图 4B)。

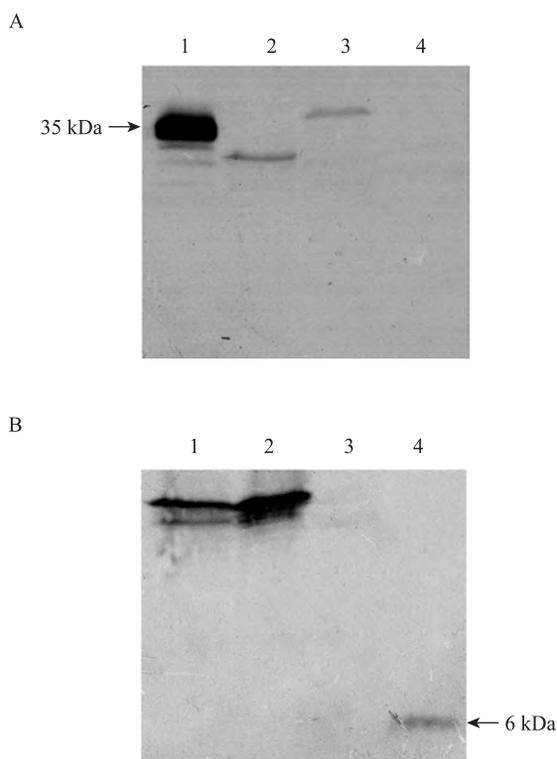


图 4 Western blotting 鉴定 EGFP 蛋白以及 EGFP-ESAT-6 蛋白在 RAW264.7 细胞系中的表达

Fig. 4 Identification of the expression of EGFP and EGFP-ESAT-6 proteins in stable transfected RAW264.7 cell lines by Western blotting. (A) Identification of the expression of EGFP and EGFP-ESAT-6 separately in RAW-EGFP and RAW-E6 cell lines by GFP polyclonal antibody. 1: an unrelated GFP-tagged protein (35 kDa) as a positive control; 2: RAW-EGFP cell lysate; 3: RAW-E6 cell lysate; 4: purified ESAT-6 as a negative control. (B) Identification of the expression of EGFP-ESAT-6 in RAW-E6 cell line by ESAT-6 monoclonal antibody. 1: RAW-E6 cell lysate; 2: cytosol fraction; 3: membrane fraction; 4: purified ESAT-6 as a positive control.

3 讨论

ESAT-6 是重要的 T 细胞抗原,能够引起体内持续的免疫反应^[8],许多研究显示 ESAT-6 与细菌的毒力相关,并且能够影响巨噬细胞和树突状细胞的相关功能^[9-12]。但是,这些研究所使用的蛋白均为纯化的 ESAT-6 蛋白,或者使用结核分枝杆菌野生型或突变株直接感染巨噬细胞后再探索 ESAT-6 与巨噬细胞之间的相互作用。这些研究方法具有一定的局限性:外源性加入纯化的 ESAT-6 蛋白可能不具备细胞内表达的 ESAT-6 的生物学功能;而由结核分枝杆菌感染细胞进行研究,虽然可以探讨 ESAT-6 调节巨噬细胞的作用,但难以排除其他结核分枝杆菌蛋白的影响,从而影响对 ESAT-6 蛋白本身功能的研究。因此,建立能够稳定表达 ESAT-6 蛋白的巨噬细胞系有助于对其调控巨噬细胞的分子机理进行更深入研究。众所周知,由于巨噬细胞转染效率较低,获得稳转巨噬细胞系一直是一个技术难题,但是通过对转染条件的摸索,我们成功建立了能够稳定表达融合有 EGFP 标签的 ESAT-6 蛋白的稳转巨噬细胞系,而国内外尚未有相关报道。

本研究将绿色荧光蛋白 EGFP 与 ESAT-6 融合表达,期望获得的融合蛋白既能保持 ESAT-6 的生物活性,又具有自发荧光的特性便于实验观察。EGFP 作为被广泛使用的荧光标记物,不仅可以用于检测蛋白质分子的定位、迁移,还可以研究蛋白质分子的功能影响很小^[13-14]。因此,本研究获得的表达 EGFP-ESAT-6 融合蛋白的稳转细胞系一方面可用于 ESAT-6 蛋白调控巨噬细胞相关功能的研究,同时其荧光特点也为研究 ESAT-6 蛋白与细胞蛋白之间的相互作用提供了便利。在对 RAW-E6 和 RAW-EGFP 细胞系的进一步观察中,我们已经发现 2 种细胞系的形态并不完全一致 (图 3),这种形态学的改变很可能是 ESAT-6 调控巨噬细胞功能的一种表现,进一步的研究工作正在开展。

总之,为了阐明结核分枝杆菌分泌蛋白 ESAT-6 在调控巨噬细胞功能所起的作用和机理,以及 ESAT-6 与巨噬细胞蛋白之间的相互作用,我们首次建立了能够稳定表达 ESAT-6 蛋白的稳转 RAW264.7 细胞系,为后续的深入研究工作奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis (Edinb)*, 2003, 83(1/3): 4–14.
- [2] Fine PE. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*, 1995, 346(8986): 1339–1345.
- [3] Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PAD, et al. Type VII secretion-mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*, 2007, 5(11): 883–891.
- [4] Ganguly N, Giang PH, Basu SK, et al. *Mycobacterium tuberculosis* 6 kDa Early Secreted Antigenic Target (ESAT-6) protein down-regulates Lipopolysaccharide induced c-myc expression by modulating the extracellular signal regulated kinases1/2 (ERK1/2). *BMC Immunol*, 2007, 8: 24.
- [5] Ganguly N, Giang PH, Gupta C, et al. *Mycobacterium tuberculosis* secretory proteins CFP-10, ESAT-6 and CFP10:ESAT6 complex inhibit lipopolysaccharide induced NF- κ B transactivation by downregulation of reactive oxidative species (ROS) production. *Immunol Cell Biol*, 2008, 86(1): 98–106.
- [6] Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cell Microbiol*, 2010, 12(8): 1046–1063.
- [7] Molloy MP, Herbert BR, Walsh BJ, et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*, 1998, 19(5): 837–844.
- [8] Bennekov T, Dietrich J, Rosenkrands I, et al. Alteration of epitope recognition pattern in Ag85B and ESAT-6 has a profound influence on vaccine induced protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Immunol*, 2006, 36(12): 3346–3355.
- [9] Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P, et al. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors? *Trends Microbiol*, 2004, 12(11): 500–508.
- [10] Pathak SK, Basu S, Basu KK, et al. Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nat Immunol*, 2007, 8(6): 610–618.
- [11] Smith J, Manoranjan J, Pan M, et al. Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from vacuole. *Infect Immun*, 2008, 76(12): 5478–5487.
- [12] Li H, Xu JJ, Chen W. Progress on the ESX secretion system of *Mycobacteria tuberculosis*. *Sci China Ser C: Life Sci*, 2009, 39(10): 925–932.
李浩, 徐俊杰, 陈薇. 结核分枝杆菌 ESX 分泌系统研究进展. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2009, 39(10): 925–932.
- [13] Chalfie M. GFP: lighting up life. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(25): 10073–10080.
- [14] Lorang JM, Tuori RP, Martinez JP, et al. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(5): 1987–1994.