论著

文章编号:1000-5404(2006)07-0644-04

空肠弯曲菌 Pen:19 peblA 基因序列分析及其真核表达重组质粒的构建

郑 惠,蔡方成,邓 兵,钟 敏 (重庆医科大学儿童医院神经内科,重庆 400014)

提 要:目的 针对空肠弯曲菌基因组序列为一超变量序列,测序比较空肠弯曲菌 Pen:2 和 Pen:19 peblA 基因的同源性,以证实 peblA 基因的保守性。在此基础上,构建空肠弯曲菌 Pen:19 peblA 基因真核表达重组质粒。**方法** 以含有 *Kpn* Ⅰ和 *Eco*R Ⅰ酶切位点的同一对引物行 PCR 反应,获得空肠弯曲菌 Pen:2、Pen:8、Pen:19 和 Pen:21peblA 基因 DNA 片段,测序比较 Pen:2 和 Pen:19 peblA 基因的同源性。并选择与格林-巴利综合征最为相关的空肠弯曲菌 Pen:19 peblA 基因 PCR 产物为目的片段,插入到真核表达载体 pcDNA3.1(+),以构建重组质粒。重组质粒经双酶切鉴定、PCR 鉴定和测序确认后转染至 COS-7 细胞,RT-PCR 方法检测其瞬时表达。对阳性克隆培养基上清中 PEB1 蛋白的表达用 ELISA 分析。**结果** 测序证实空肠弯曲菌 Pen:19 peblA 基因序列与 Pen:2 peblA 基因序列一致。采用 RT-PCR 方法能够从重组质粒转染的 COS-7 细胞中扩增出与目的基因大小一致的 DNA 片段。ELISA 分析表明 PEB1 蛋白在 COS-7 细胞上清中获得表达。**结论** 空肠弯曲菌 peblA 基因具有良好保守性,以此成功构建的重组质粒能在 COS-7 细胞中表达,为空肠弯曲菌 DNA 疫苗的研究奠定了良好的基础。

关键词:空肠弯曲菌;peblA 基因;重组质粒;DNA 疫苗

中图法分类号:Q755;Q782;Q939.121 **文献标识码**:A

Analysis of peblA gene sequence and construction of eukaryotic expression recombinant plasmid of peblA gene of *Campylobacter jejuni* Pen:19

ZHENG Hui, CAI Fang-cheng, DENG Bing, ZHONG Min (Department of Neurology, Children's Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective As the genome sequence of *Campylobacter jejuni* is a hypervariable sequence, the peblA gene sequence of *Campylobacter jejuni* Pen:19 was sequenced and the peblA gene conservative was identified. To construct the eukaryotic expression recombinant plasmid of the peblA gene of *Campylobacter jejuni* Pen:19. **Methods** Total DNA of *Campylobacter jejuni* Pen:2, Pen:8, Pen:19 and Pen:21 as templates respectively, peblA gene DNA with *Kpn* Ⅰ and *Eco*R Ⅰ sites was amplified by PCR using the same primer and the PCR product of Pen:19 was sequenced. Because most close association with Guillain-Barre syndrome, the PCR product of Pen:19 was selected as target gene and cloned into pcDNA3.1(+) and constructed the recombinant plasmid that was identified by endonuclease digestion and PCR and confirmed by sequencing. The recombinant plasmid was then transfected into mammalian cell COS-7 for expression. The transient expression was investigated by RT-PCR. The expression of peblA gene in the culture supernatant of positive clones was analyzed by ELISA. **Results** The peblA gene sequence of *Campylobacter jejuni* Pen:2 and Pen:19 was identical. The target gene was amplified from COS-7 cells transfected with recombinant plasmids by RT-PCR. PEBl protein could express in the culture supernatant in the transfected COS-7 cells by ELISA. **Conclusion** The peblA gene of *Campylobacter jejuni* was conservative. The recombinant plasmid was constructed and expressed in COS-7 cells successfully. The results obtained lay the foundation for research on development of *Campylobacter jejuni* DNA vaccine.

Key words: *Campylobacter jejuni*; peblA gene; recombinant plasmid; DNA vaccine

目前,格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome,GBS)已成为引起小儿急性迟缓性瘫痪的首位疾病[1]。GBS 是一种免疫性周围神经病,主要表现为肢体的急性迟缓性瘫痪,病程进展不超过 4 周,重者可累及患者的呼吸肌导致呼吸麻痹,甚至死亡。空肠弯

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371500)
Supported by National Natural Science Foundation of China (30371500)

作者简介:郑 惠(1961-),女,广东省广州市人,博士,副主任医师,主要从事小儿神经疾病方面的研究。电话:(023) 60792635

通讯作者:蔡方成,E-mail: caifange@sina.com

收稿日期:2005-09-19;**修回日期**:2006-01-16

曲菌(*Campylobacter jejuni*, CJ)是其最常见的前驱感染原。GBS 的诱发,常与 CJ 的某些特定血清型有关。其中,Pen: 19 与急性运动轴索性神经病(acute motor axonal neuropathy, AMAN)的关系最为密切[2]。目前 CJ 诱发 GBS 的详细机制尚不完全清楚,同时,CJ 又是人畜胃肠道共同易感菌,是儿童与旅行者腹泻的主要致病菌。因此,研究有效的措施来预防和控制 CJ 感染及其相关疾病成为国内外学者关注的一项重要课题。研究安全有效的 DNA 疫苗应是控制和预防 CJ 感染的理想途径。

大量研究表明,DNA 疫苗的有效性与抗原基因的正确选择密不可分。因此,对 CJ 这种抗原基因和表型多样的细菌而言[3],抗原基因的正确选择显得尤为重要。PeblA 基因编码的 PEB1 蛋白质是 CJ 主要的粘附分子。我们已探讨了 CJ peblA 基因在原核细胞中的表达及其表达产物的免疫原性和免疫保护性[4]。本研究将在对 CJ Pen: 2 和 Pen: 19 peblA 基因碱基序列进行对比分析,证实其在具有高度保守性的基础上,构建 CJ Pen: 19 peblA 基因真核表达重组质粒,为空肠弯曲菌 DNA 疫苗的研究奠定基础。

1　材料与方法

1.1　试剂

PCR 试剂、各种限制性内切酶、T_4 DNA 连接酶、DNA 标准和 RT-PCR 一步法试剂盒等购自大连宝生生物公司。细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒、质粒小量抽提试剂盒和组织/细胞 RNA 抽提试剂盒等购自上海华瞬生物有限公司。质粒大量抽提试剂盒和 PolyFect 转染试剂购自 QIAGEN 公司。HRP-羊抗大鼠 IgG 购自美国 Southern Bio 公司。

1.2　菌种、质粒和细胞

空肠弯曲菌 Pen: 2、Pen: 8、Pen: 19 和 Pen: 21 菌株均由本研究室保存。*E. Coli*. Top10 菌株和真核表达载体质粒 pcDNA3.1(+)由重庆医科大学微生物研究室朱道银教授惠赠。COS-7 细胞由重庆医科大学病理生理研究室提供。

1.3　实验方法

1.3.1　引物设计与合成　　根据 GenBank 中登录的空肠弯曲菌 Pen: 2 标准株 peblA 基因的编码序列,设计引物 P1(5′-ggggtaccATGGTTTTTAGAAAATCTTTG-3′) 和 P2(5′-ggaattcTTATAAACCCCATTTTTTCG-3′),其酶切位点分别为 *Kpn* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ。上述引物由赛百盛生物工程公司合成。

1.3.2　扩增目的基因　　将空肠弯曲菌 Pen: 2、Pen: 8、Pen: 19 和 Pen: 21 分别接种于心脑浸液肉汤(Brain-Heart infusion broth, BHIB)培养基中,置于含 85% N_2、10% CO_2、5% O_2 的 CO_2 培养箱,恒温 42 ℃培养 24 ~ 48 h,收获细菌。采用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒分别提取空肠弯曲菌 Pen: 2、Pen: 8、Pen: 19 和 Pen: 21 基因组 DNA,测其质量浓度为 1 μg/μl,以此为模板进行 PCR 反应。反应条件为 94 ℃ 5 min,56 ℃ 40 s,58 ℃ 40 s,60 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,循环 30 次,72 ℃延伸 5 min 结束反应。分别取 5 μl 上述 PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,可见其 DNA 片段均约为 767 bp 大小。采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后,将 Pen: 19 部分 PCR 纯化产物送大连宝生生物公司测序分析。待测序证实空肠弯曲菌 Pen: 19 peblA 基因 PCR 产物序列与 Pen: 2 标准株 peblA 基因的序列一致后,将另一部分 Pen: 19 PCR 纯化产物用于 pcDNA3.1(+)-peblA 重组质粒的构建。

1.3.3　载体质粒 pcDNA3.1(+)的小量提取　　用接种环沾取少许含 pcDNA3.1(+)质粒的 *E. Coli* . Top10 细菌冻存液,接种于 3 ml LA(LB 中含 100 μg/ml Amp)培养基中,37 ℃、230 r/min振荡过夜。次日参照质粒小量抽提试剂盒说明书进行质粒 pcDNA3.1(+)的小量提取,并取 5 μl 洗脱液进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.3.4　重组质粒的构建　　将 CJ Pen: 19 PeblA 基因 PCR 纯化产物与高效表达载体质粒 pcDNA3.1(+)经 *Kpn* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切回收后进行连接反应,转化感受态细菌 *E. Coli* . Top10,以氨苄青霉素进行筛选。选取生长良好的阳性克隆菌落,增菌后小量提取重组质粒用于双酶切鉴定、PCR 鉴定和 DNA 双向测序确认。

1.3.5　重组质粒转染 COS-7 细胞　　参照质粒大量抽提试剂盒(Qlafilter Plasmid Qiga Kit)说明书进行重组质粒的大量提取,紫外分光光度仪定量,用无菌生理盐水将其稀释为 1 μg/μl。同时,收获处于指数生长期细胞数 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 的 COS-7 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养24 h,使细胞 70% ~ 80% 汇片。设空细胞、空质粒对照孔和重组质粒实验孔,采用 PolyFect 转染试剂介导的转染法进行细胞转染,置 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。由于重组质粒 DNA 进入宿主细胞后,先在细胞核内转录为 mRNA,再在细胞质中翻译成蛋白质。因此,收集空细胞、空质粒对照孔和重组质粒实验孔细胞的培养液上清用于检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达产物。参照组织/细胞 RNA 抽提试剂盒的操作步骤分别收集实验及对照孔细胞,提取 RNA,用于检测重组质粒在 COS-7 细胞的瞬时表达。

1.3.6　RT-PCR 法检测重组质粒在 COS-7 细胞中的瞬时表达　　采用紫外分光光度仪测定所提取 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 比值后,按照 RT-PCR 一步法试剂盒的操作步骤,进行逆转录反应和多聚酶链反应。逆转录反应条件为 42 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min;PCR 反应条件为 94 ℃ 5 min,56 ℃ 40 s,58 ℃ 40 s,60 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,循环 30 次,72 ℃延伸 5 min 结束反应。取 5 μl PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

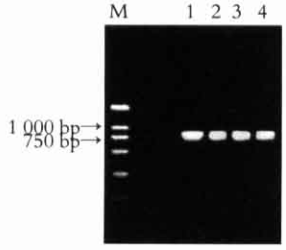
1.3.7　ELISA 分析重组质粒在 COS-7 细胞中的表达产物　　收集未转染组、空质粒组和重组质粒表达组细胞的培养液上清,按 1∶1 比例与包被液混匀后取 100 μl/孔加样,每组 12 孔。4 ℃过夜包被酶标板后,PBST 洗 3 次;以 1% BSA-PBS 封闭,37 ℃ 2 h,洗 3 次;加入 100 μl 1∶100 稀释的大鼠抗小鼠 PEB1 抗血清,37 ℃ 2 h,洗 3 次;加入 100 μl 1∶5 000 稀释 HRP-羊抗大鼠 IgG,37 ℃ 1.5 h,洗 4 次;加入 100 μl 底物液 OPD,避光显

色 7 min，加入 50 μl 2 mol/L H_2SO_4 终止反应，测 D(450)值。设空白对照，各组减去空白对照后取均值，并按 P/N = 样品 D(450)/阴性对照组 D(450)进行分析。

2 结果

2.1 目的基因片段的 PCR 扩增和序列分析

革兰染色光镜观察生长于 BHIB 培养基中空肠弯曲菌 Pen:2、Pen:8、Pen:19 和 Pen:21 的生长情况，可见菌株生长良好，无杂菌污染。分别以空肠弯曲菌 Pen:2、Pen:8、Pen:19 和 Pen:21的基因组 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，PCR 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳，在紫外灯下可见 4 条长度均约为767 bp的 DNA 片段(图 1)。并且 Pen:19 PCR 纯化产物测序结果与 GenBank 中登录的空肠弯曲菌 Pen:2 标准株 peblA 基因的编码序列一致。

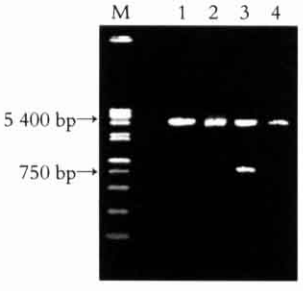


M：DNA 标准；1：Pen:2；2：Pen:8；3：Pen:19；4：Pen:21

图 1 PCR 扩增结果

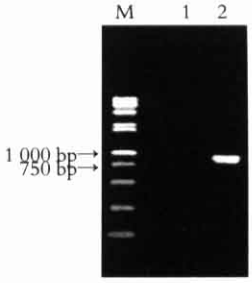
2.2 重组质粒的构建与鉴定

从阳性克隆菌落中提取重组质粒，经 *Kpn* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切后，可见重组质粒切出的 2 条片段中，一条约为 5 400 bp，为线形化的 pcDNA3.1(+)载体；另一条约为 767 bp，为 peblA 基因的 DNA 片段。而分别对重组质粒行 *Kpn* Ⅰ 或 *Eco*R Ⅰ 单酶切和对 pcDNA3.1(+)载体质粒行 *Kpn* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ 双酶切后，未见 peblA 基因 DNA 片段，此与预期的结果相符(图 2)。重组质粒的 PCR 鉴定也与预期的结果相符(图 3)。并且，重组质粒 DNA 双向测序结果显示：所插入的 peblA 基因片段与 GenBank 中登录的空肠弯曲菌 Pen:2 标准株 peblA 基因编码序列一致。以上结果均表明，重组质粒 pcDNA3.1(+)-peblA 构建成功。



M：DNA 标准；1：pcDNA3.1(+)-peblA/*Kpn* Ⅰ；2：pcDNA3.1(+)-peblA/*Eco*R Ⅰ；3：pcDNA3.1(+)-peblA/*Kpn* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ；4：pcDNA3.1(+)/*Kpn* Ⅰ 和 *Eco*R Ⅰ

图 2 重组质粒的双酶切分析

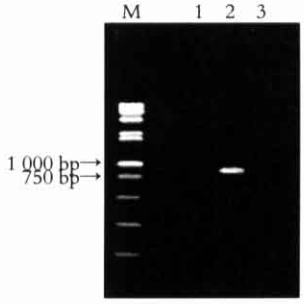


M：DNA 标准；1：pcDNA3.1(+)；2：重组质粒

图 3 重组质粒的 PCR 鉴定

2.3 重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

RT-PCR 法检测结果显示，只有重组质粒转染的 COS-7 细胞能够扩增出相应的目的条带(图 4)，而 pcDNA3.1(+)转染的 COS-7 细胞未能扩增出相应条带。表明重组质粒转染成功，并能在 COS-7 细胞中表达 mRNA。同时，ELISA 检测结果分析显示：重组质粒表达组转染的 COS-7 细胞培养液上清其 D(450)均值为(0.37 ± 0.02)，空质粒组和未转染组 D(450)均值分别为(0.03 ± 0.02)和(0.01 ± 0.00)。重组质粒表达组与对照组间比较有显著性差异(P/N > 2)，表明在重组质粒转染的 COS-7 细胞培养液上清中可获得重组质粒的表达产物。



M：DNA 标准；1：pcDNA3.1(+)；2：重组质粒；3：未转染

图 4 RT-PCR 检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

3 讨论

目前多数人认为[5]，CJ 感染导致 GBS 的主要致病抗原基团是 CJ 外膜上的脂寡糖(lipo-oligosaccharide，LOS)，CJ-LOS 外核的唾液酸糖基与人周围神经中的神经节苷脂 GM1 结构相似，通过交叉免疫导致周围神经损伤。但是，至今仍未成功构建 CJ-LOS 诱发急性轴索型 GBS 动物模型。加之，目前对 CJ 的毒性、遗传学特性和致病机制了解甚少，使预防 CJ 感染的措施难以得力，迄今尚无安全有效的 CJ 疫苗正式在疾病防治中应用。

对 CJ 预防性疫苗的研究虽然经历了灭活全菌疫苗、减毒活疫苗、亚单位疫苗和合成多肽疫苗等，但均未能得到理想和安全的效果。并且，根据 Datta 等[6]

采用 PCR 方法对来自临床、禽肉及家禽家畜排泄物共 111 株 CJ 进行的致病基因流行病学调查发现：有许多致病基因分别与 CJ 的粘附力、侵袭力、定植力，毒素产生，以及 GBS 的发生相关。因此，相比而言，DNA 疫苗以其制备和免疫的简单性、安全性和诱导免疫反应的全面性为研究 CJ 新型疫苗开辟了前景[7]。

针对 CJ 是一种抗原基因和表型多样的细菌。在前期研究的基础上，我们选择了 CJ peblA 基因为目的基因。其表达的可溶性粘附蛋白 PEBI 存在于所有 CJ 菌体表面，具有十分稳定而保守的免疫原性。在本研究中，我们通过 PCR 扩增获得 CJ Pen：2、Pen：8、Pen: 19和 Pen: 21peblA 基因 PCR 产物，并对 CJ Pen: 19 peblA 基因 PCR 产物进行 DNA 双向测序，全序列测序结果与 GeneBank 中登录的空肠弯曲菌 Pen: 2 标准株 peblA 基因的编码序列一致。表明 CJ peblA 基因具有高度的保守性。并且，在国内外首次成功构建了 CJ 真核表达重组质粒 pcDNA3. 1(+)-peblA。为了进一步证实所构建的重组质粒具有应用价值，我们首先检测其能否在真核细胞中表达。我们采用 PolyFect 转染试剂介导的方法，成功把重组质粒转染到真核细胞 COS-7，并借用 RT-PCR 法和 ELISA 检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达产物。结果表明，重组质粒 pcDNA3. 1 (+)-peblA 转染成功，并能在 COS-7 细胞中表达。这为深入研究 DNA 疫苗在预防和控制 CJ 感染及其相关疾病中的作用，奠定了良好的实验研究基础。

参考文献：

[1] RYAN M M. Guillain-Barre syndrome in childhood[J]. J Paediater Child Health, 2005, 41(5 - 6): 237 - 241.

[2] NACHAMKIN I. Chronic effects of Campylobacter infection[J]. Microbes Infect, 2002, 4(4): 399 - 403.

[3] PARKHILL J, WREN B W, MUNGALL K, *et al*. The genome sequence of the food-borne pathogen Campylobacter jejuni reveals hypervariable sequences[J]. Nature, 2000, 403(6770): 665 - 668.

[4] 冯永嘉，蔡方成，刘　杞，等. 空肠弯曲菌粘附蛋白 PEB1 的克隆表达及免疫保护性初步探索[J]. 中华微生物学和免疫学杂志，2003, 23(8): 640 - 641.

[5] WILLISON H J. The immunobiology of Guillain-Barre syndromes[J]. J Peripher Nerv Syst, 2005, 10(2): 94 - 112.

[6] DATTA S, NIWA H, ITOH K. Prevalence of 11 pathogenic genes of *Campylobacter jejuni* by PCR in strains isolated from humans, poultry meat and broiler and bovine faeces[J]. J Med Microbiol, 2003, 52(Pt 4): 345 - 348.

[7] CUI Z. DNA vaccine[J]. Adv Genet, 2005, 54: 257 - 289.

（编辑　王　红）

（上接 643 页）

3　讨论

特发性血小板减少性紫癜是巨核系造血异常性疾病，但多认为与自身免疫有关[1]。目前认为是病毒感染后由体液免疫介导的一种免疫反应。本组 ITP 患儿 ANA 明显高于对照组（$P<0.05$）。ANA 是以抗真核细胞核为靶抗原的自身抗体的总和。如果抗血小板抗体与机体的其他细胞的细胞核不存在交叉抗原，则 ANA 对 ITP 的发病机制无意义。如果存在交叉抗原，则 ANA 有可能是造成血小板减少的又一自身抗体。经观察 ANA 阳性与阴性的 ITP 患儿，其临床表现、治疗前后的血小板数量、TPO 水平无显著性改变，两种治疗方案的治疗效果与 ANA 无明显关系[2]。

血小板生成素（TPO）主要作用是促进巨核系细胞造血，本组 ITP 儿童 TPO 水平与正常对照组比较无显著性差异（表 1），与报道的成人 ITP 的 TPO 水平一致[3]。急慢性 ITP 时，血小板数量明显下降，而 TPO 水平处于正常水平，TPO 水平受哪些因素调控？经研究表明 TPO 的调控有以下两种机制：①TPO mRNA 的调控[4]。②特异性 TPO 受体 C-MPL（血小板生成素受体）介导的调节[5]。

本组 64 例急慢性 ITP 患儿骨髓巨核细胞明显高于正常，因此 ITP 时巨核细胞的增加是调节 TPO 水平的一个因素，增加的巨核细胞加速了 TPO 的降解，才使得 ITP 时 TPO 水平保持正常，提示儿童 ITP 时血清 TPO 水平的调控不是单一因素而是受到血小板数量的降低和骨髓巨核细胞数增多双重因素的调控。

综上所述，急慢性血小板减少性紫癜患儿，其血小板数明显降低，巨核细胞数明显增加，而 TPO 水平大致正常。ITP 经治疗后，血小板数升高明显，TPO 水平稍有下降，表明 TPO 水平受到血小板数量和巨核细胞数量的双重调控。抗核抗体阳性率高于正常，可能只是一种伴随现象，对阳性者应长期进行随访。

关键词：儿童；特发性血小板减少性紫癜；血小板生成素；抗核抗体

中图法分类号：R554.6　　**文献标识码**：B

参考文献：

[1] 沈　迪，王辨明，宋善俊，等. 临床血液学[M]. 北京：人民卫生出版社，1989：713 - 718.

[2] 罗晓菊，宪　莹. 儿童特发性血小板减少性紫癜抗核抗体、血小板生成素特征与治疗方案[J]. 儿科药学杂志，2005，11(6)：21 - 22，29.

[3] HIRAYAMA Y, SAKAMAKI S, MATSUNAGA T, *et al*. Concentrations of thrombopoietin in bone marrow in normal subjects and in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura, aplastic anemia, and essential thrombocythemia correlate with its mRNA expression of bone marrow stromal cells[J]. Blood, 1998, 92(1): 46 - 52.

[4] 张晓泉，杨耀明，史惠琳，等. 特发性血小板减少性紫癜患者血小板生成素相关基因表达的研究[J]. 中华血液学杂志，1998，19(11)：587 - 589.

[5] 杨　玲，章学忠，佟　力，等. 血小板减少症患者 TPO 水平及其受体 c-mpl 的检测及临床意义[J]. 中华临床医学研究杂志，2005，11(3)：305 - 308.

（编辑　薛国文）