论著

文章编号:1000-5404(2008)10-0890-04

分枝杆菌穿梭表达质粒 pJHSP70 的构建及鉴定

吕 琳[1],曹红丹[1],王丕龙[1],刘少宁[1],王丽娟[1],向廷秀[2] (重庆医科大学附属第一医院:[1]消化内科,[2]实验研究中心,重庆 400016)

摘 要:目的 用结核分枝杆菌热休克蛋白70(heat shock protein70, HSP70)启动子改建分枝杆菌穿梭质粒 pJEM11 为分枝杆菌穿梭表达质粒 pJHSP70,并对其功能进行鉴定。**方法** 以卡介苗(BCG)基因组 DNA 为模板,利用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增 HSP70 启动子,克隆至 pMD18-T 载体,经鉴定后,再定向克隆入 pJEM11 的 *Apa* Ⅰ位点与 *Sna*BⅠ位点之间,构建 pJHSP70 载体,并对载体进行 PCR 及酶切鉴定,然后再将幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *HP*)尿素酶 B 亚单位(urease B subunit, UreB)基因克隆入 pJHSP70 载体,评价其在耻垢分枝杆菌(*Mycobacteria smegmatis*, *M. smegmatis*)mc^2 155 中的表达情况。**结果** 从 BCG 基因组中扩增出 160 bp 的基因片段,所构建的穿梭质粒经酶切和 PCR 鉴定与预期结果一致。测序结果证实插入片段正确,UreB 基因在 *M. smegmatis* 中成功表达。**结论** 成功改建穿梭质粒 pJEM11 为穿梭表达质粒 pJHSP70。

关键词: 结核分枝杆菌;热休克蛋白 70;启动子;基因表达

中图法分类号: Q75;Q781;Q939.131 **文献标识码:** A

Construction and identification of Mycobacterium shuttle expression plasmid pJHSP70

LU Lin[1], CAO Hong-dan[1], WANG Pi-long[1], LIU Shao-ning[1], WANG Li-juan[1], XIANG Ting-xiu[2] ([1]Department of Gastroenterology, [2]Experiment Research Center, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To reconstruct shuttle plasmid pJEM11 into Mycobacterium shuttle expression plasmid (pJHSP70) with Mycobacterium tuberculosis HSP70 promoter and identify the function of pJHSP70. **Methods** The HSP70 promoter was amplified from the BCG DNA by PCR and cloned into pMD18-T vector. After identified by enzyme digestion analysis and sequencing, HSP70 promoter was subcloned into pJEM11 that was digested with *Apa* Ⅰ and *Sna*BⅠ, to form the plasmid pJHSP70. After pJHSP70 was amplified by PCR and identified with enzyme digestion analysis, *Helicobacter pylori* UreB (Hp UreB) gene was cloned into pJHSP70. The expression of Hp UreB protein in the *Mycobacteria smegmatis* mc^2 155 was detected by SDS-PAGE. **Results** The fragment of 160 bp was amplified from the BCG DNA by PCR. Sequencing and homologous analysis showed that the homology between the cloned HSP70 gene and related genes in GenBank was 100%. SDS-PAGE analysis showed that Hp UreB protein expressed in *Mycobacteria smegmatis* mc^2 155. **Conclusion** The Mycobacterium shuttle expression plasmid pJHSP70, which was based on shuttle plasmid pJEM11, has been constructed successfully.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; heat shock protein 70; promoter; gene expression

耻垢分枝杆菌(*Mycobacteria smegmatis*, *M. smegmatis*)是一种生长快速、转化效率较高的分枝杆菌突变株,1~3 h 繁殖 1 代。国内外的研究证明 *M. smegmatis* 的 RNA 聚合酶可以有效识别卡介苗(BCG)的启动子,细菌本身是一种非致病菌和强的细胞免疫佐剂。随着研究的深入,很多外源蛋白在 *M. smegmatis* 中获得表达,并获得了较好的免疫效果[1-4]。近年来,国内

基金项目: 国家自然科学基金(30371318);重庆市卫生局重点项目(07-1-007) Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371318) and the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (07-1-007)

作者简介: 吕 琳,女,四川省广安市人,博士研究生,主要从事幽门螺杆菌方面的研究。电话:(023)60821820, E-mail: lin-miaomiao@126.com

通信作者: 向廷秀,电话:(023)89012715,E-mail: beautifulgift@163.com

收稿日期: 2007-09-28;**修回日期:** 2007-12-06

外科学家正致力于将 *M. smegmatis* 发展成为一种重组多价活疫苗,期望能预防结核病,同时也能预防其他感染性疾病。

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一类在原核和真核细胞中高度保守的蛋白质。从细菌到人体细胞的 HSP 序列有很高的同源性,能在高温、射线、氧化物和毒物等多种不同应激条件下大量产生,具有多种重要的生理功能。因此可利用分枝杆菌 HSP70 的启动子作为在分枝杆菌中调控外源基因表达的启动子,既有利于启动外源基因的表达,又易于通过应激对其转录进行调控。本研究用结核分枝杆菌 HSP70 启动子将穿梭质粒 pJEM11 改建成分枝杆菌穿梭表达质粒 pJHSP70,并对其表达外源基因的功能进行鉴定,为下一步构建 *M. smegmatis* 疫苗提供载体工具。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　质粒和菌株　　质粒 pJEM11 由巴斯德研究所 Jean Rauzier 博士惠赠,质粒 pET32a(+)-UreB 为本室购建, pMD18-T vector 购自 TaKaRa 公司,JM109 大肠杆菌为本实验室保存,BCG 由重庆市防疫站提供,*M. smegmatis mc*^{2} 155 为本室保存。

1.1.2　主要试剂　　*Pfu* DNA 聚合酶,*Kpn* Ⅰ、*Sna*BⅠ、*Apa* Ⅰ、T_4 DNA 连接酶,DNA 标准由 TaKaRa 公司提供;柱离心式胶回收试剂盒、质粒小抽试剂盒购自 Omega 公司;DNA 基因组提取试剂盒购自北京天为时代生物工程公司;中分子量蛋白分子标准物购自晶美生物工程公司。

1.2　方法

1.2.1　HSP70 启动子的扩增　　DNA 模板的制备:取分枝杆菌液体培养物 2~5 mg,用 TE 溶液洗涤 2 次,离心后去上清,沉淀加入 1×Tris-EDTA 溶液 100 μl,50 mg/ml 溶菌酶 10 μl,蛋白酶贮存液 10 μl,10% SDS 溶液 50 μl,56 ℃孵育 2 h 后用常规酚氯仿法提取 BCG DNA。引物合成及 PCR 扩增:根据 BCG 基因组的 HSP70 启动子序列设计引物,上游 P1 5′-ATAGGGC-CCGAATTCCGACCCGCA-3′, 5′端引入 *Apa* Ⅰ酶切位点;下游 P2 5′-ACGTACGTAGGATCCCATGGTGAATCCTCCTGA-3′,5′端引入 *Sna*BⅠ和 *Bam*HⅠ酶切位点。以 BCG 基因组 DNA 为模板,反应总体积为 50 μl,其中 10×PCR 缓冲液 5 μl,dNTP 混合物 5 μl,$MgCl_2$(25 mmol/L)2.5 μl,引物各 2.5 μl,模板 DNA 1 μl,灭菌三蒸水 29.5 μl,高保真聚合酶 2 U。反应参数为:94 ℃ 预变性 5 min ,94 ℃变性 30 s,56 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环。最后 1 次延伸时间为 72 ℃ 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖电泳,溴化乙锭染色后置凝胶分析系统中观察、拍照。

1.2.2　T 载体重组质粒的构建及鉴定　　将纯化后的 HSP70 启动子基因片段与克隆载体 pMD18-T 连接,连接比例参照 TaKaRa 公司 pMD18-T 载体系统产品说明,与 5 μl 连接试剂Ⅰ混匀后置 16 ℃连接 12 h, 然后转化入 JM109 感受态细胞,氨苄青霉素及 X-gal 筛选后,进一步以双酶切和 PCR 法鉴定,送上海基康公司测序,命名为 pMD-HSP70。

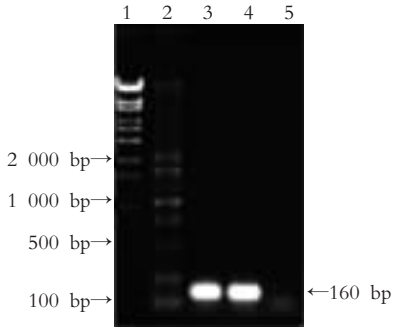
1.2.3　重组穿梭表达质粒 pJHSP70 的构建及鉴定　　采用 *Apa* Ⅰ和 *Sna*BⅠ双酶切 pMD-HSP70 载体和质粒 pJEM11,按胶回收试剂盒说明回收 HSP70 基因片段和 pJEM11 载体大片段,以 7∶1比例混合,并用 T_4 DNA 连接酶连接后,转化感受态大肠杆菌 JM109, 筛选卡那霉素阳性菌落,小量扩增,提取质粒,分别进行酶切,PCR 分析鉴定,命名为 pJHSP70。

1.2.4　重组穿梭表达质粒 pJHSP70 表达功能的鉴定　　pET32a(+)-UreB 通过 *Kpn* Ⅰ酶切后回收 UreB 片段,然后克隆入质粒 pJHSP70 的 *Kpn* Ⅰ位点,构建 pJHSP70-UreB 质粒。经 PCR 及酶切鉴定后,取 10 μl 重组质粒在电压 2.5 kV,电流 25 mA,电阻 200 Ω 的条件下电转化入 *M. smegmatis* mc^2 155 感受态细胞中。用含 100 μg/ml 卡那霉素的 LB 固体培养基筛选重组子,从平板上挑取单菌落接种于含 100 μg/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基中,37 ℃培养 2~3 d 后,45 ℃诱导 30 min、1 h、2 h ,分别取 1 ml 表达菌液,离心收集菌体。加入 100 μl 分枝杆菌裂解液,50 μg/ml 溶菌酶 10 μl,1% Triton-X 100 10 μl,于 37 ℃温育 30 min,超声破碎后加入等量 2×SDS-PAGE 上样缓冲液,100 ℃煮 5 min,取每份样品上清 10 μl 上样行聚丙烯酰胺凝胶电泳(5% 积层胶,12% 分离胶),快速考马斯亮蓝染色法分析表达产物。

2　结果

2.1　HSP70 启动子基因片段的扩增

以 BCG DNA 为模板,P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增。扩增产物 5 μl 经 2% 琼脂糖凝胶电泳后,在 160 bp 处出现清晰的阳性扩增带,与预期的扩增片段大小相符(图 1)。



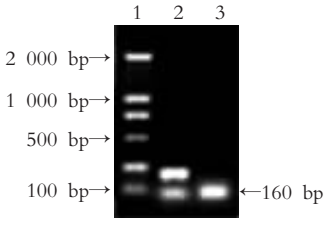
1: λ-*Eco* T14 Ⅰ digest DNA 标准; 2: DNA 标准; 3、4: HSP70 启动子 DNA; 5: 阴性对照

图 1　HSP70 启动子 PCR 扩增结果

2.2　T 载体重组质粒 pMD-HSP70 的构建及鉴定

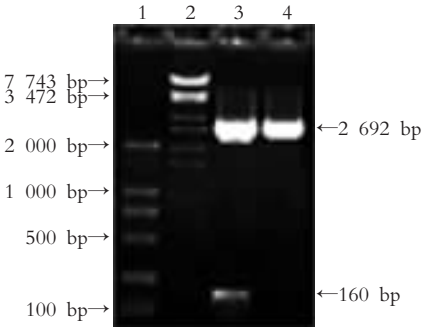
将纯化后的 HSP70 启动子基因片段与克隆载体 pMD18-T

连接构建质粒 pMD-HSP70。以质粒 pMD-HSP70 为模板,用 HSP70 启动子引物经 PCR 可扩增出 160 bp HSP70 启动子 DNA 片段,而以 pMD18-T 为模板的对照为阴性结果(图2)。将 T 载体重组质粒 pMD-HSP70 用 *Apa* Ⅰ和 *Sna*BⅠ进行双酶切 5 h,然后取 10 μl 酶切产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳,可见 T 载体重组质粒中包含了 HSP70 启动子 160 bp,空 T 载体经 *Apa* Ⅰ和 *Sna*BⅠ酶切仅见一大片段而未见小片段,进一步证实该重组质粒构建成功(图3)。将经 PCR 及酶切鉴定正确的重组质粒 pMD-HSP70 送上海基康公司测序,测序分析示插入片段与结核杆菌 H37Rv 株的 HSP70 启动子的基因序列完全相同。



1: DNA 标准(DL 2000); 2: pMD-HSP70 重组子 PCR 扩增产物; 3: pMD18-T PCR 扩增产物(阴性对照)

图2 pMD-HSP70 重组子的 PCR 扩增结果



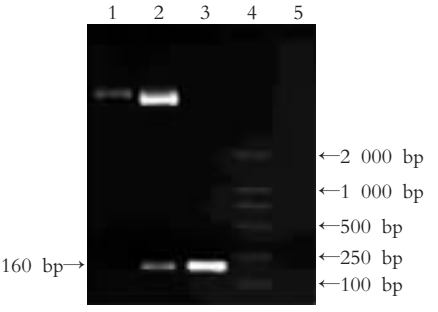
1: DNA 标准(DL 2000); 2: λ-*Eco* T14 Ⅰ digest DNA 标准; 3: pMD-HSP70 重组子经 *Apa* Ⅰ、*Sna*BⅠ双酶切; 4: pMD18-T 经 *Apa* Ⅰ、*Sna*BⅠ双酶切

图3 pMD-HSP70 重组子限制性酶切鉴定结果

2.3 重组穿梭表达质粒 pJHSP70 的鉴定

2.3.1 PCR 鉴定 PCR 扩增产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳后发现,以重组质粒为模板的待检样本出现阳性扩增带,大小为 160 bp,而以 pJEM11 为模板的阴性对照无扩增带(图4)。

2.3.2 酶切鉴定 选取 PCR 阳性的重组质粒,将其用 *Apa* Ⅰ和 *Sna*BⅠ酶切,酶切产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,出现约 12 kb 和 160 bp 2 条 DNA 带。大片段与用同样酶酶切的空载体 pJEM11 的大小相符,小片段为 HSP70 基因。空载体 pJEM11 经 *Apa* Ⅰ和 *Sna*BⅠ酶切仅见一大片段而未见小片段,表明 HSP70 已插入 pJEM11 质粒,进一步证实该重组穿梭表达质粒 pJHSP70 构建成功(图4)。

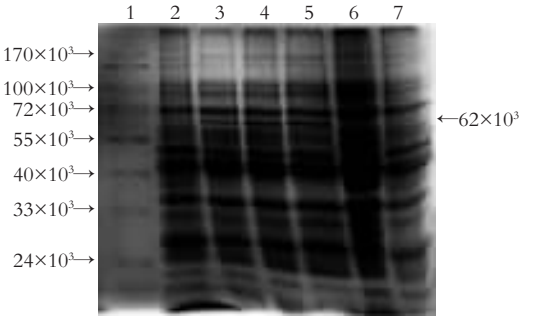


1: pJEM11 经 *Apa* Ⅰ、*Sna*BⅠ双酶切(阴性对照); 2: pJHSP70 重组子经 *Apa* Ⅰ、*Sna*BⅠ双酶切; 3: pJHSP70 重组子 PCR 扩增产物; 4: DNA 标准(DL 2000); 5: pJEM11 PCR 扩增产物(阴性对照)

图4 重组穿梭表达质粒 pJHSP70 鉴定结果

2.4 重组质粒 pJHSP70 表达功能的鉴定

将 UreB 基因定向克隆入 pJHSP70 构建 pJHSP70-UreB 重组质粒,取 10 μl 质粒电转化入 *M. smegmatis* mc^2 155 中进行表达。经 SDS-PAGE 分析表明,*M. smegmatis* 经 45 ℃ 热诱导 30 min、1 h、2 h 后均表达出了相对分子质量 62×10^3 的目的蛋白,理论上与 UreB 基因的表达产物相对分子质量相符,证实了以 pJEM11 为基础的重组分枝杆菌表达质粒 pJHSP70 具有在 *M. smegmatis* 中表达外源基因的功能(图5)。



1: 中分子量蛋白质标准; 2: 含 pJHSP70-UreB 的 *M. smegmatis* mc^2 155 总蛋白; 3~5: 分别为热诱导 30 min、1 h、2 h 含 pJHSP70-UreB 的 *M. smegmatis* mc^2 155 总蛋白; 6: 含 pJHSP70 的 *M. smegmatis* mc^2 155 的总蛋白; 7: *M. smegmatis* mc^2 155 的总蛋白

图5 UreB 基因在 *M. smegmatis* mc^2 155 中表达的 SDS-PAGE 图谱

3 讨论

HSP 是从细菌到哺乳动物中广泛存在的一类热应急蛋白质。当有机体暴露于高温环境时,就会由热激发合成此种蛋白来保护有机体自身,并且许多 HSP 具有分子伴侣活性。HSP70 家族在结构上很保守,与 ATP 有高亲和性并有弱的 ATP 酶活性。HSP70 与靶蛋白结合或解离时,ATP 与 HSP70 结合而导致构象变化,从而对靶蛋白的未折叠构象起稳定作用。HSP70

一般作为单体与靶蛋白结合[5]。虽然分枝杆菌作为表达多种外源基因的活菌载体疫苗有很多优点,但要在分枝杆菌中表达外源蛋白,所用的表达质粒必须含有能被分枝杆菌 DNA 依赖的 RNA 聚合酶所识别的启动子。分枝杆菌 HSP60 和 HSP70 基因的调节序列被选中在分枝杆菌表达外源基因过程中发挥启动子作用[6]。HSP70 是一种高度保守的蛋白质,在原核和真核细胞均已发现,其主要生物功能是促进新生多肽链的正确折叠,对于分子重排、解离聚集蛋白和新生多肽的膜运输也具有重要的辅助作用,故本实验选择 HSP70 作为调节外源基因表达的启动子进行研究。HSP70 主要是热应激蛋白,其启动子也可以通过加热或过氧化物诱导的方法启动它的表达程序,利用人结核杆菌 HSP70 启动子可在分枝杆菌中表达多种外源基因[7]。

pJHSP70 是在 pJEM11 的基础上对穿梭载体的改进,插入了人结核杆菌 HSP70 启动子序列,使得穿梭载体能对外源基因进行表达。pJEM11 是巴斯德研究所开发的一种用于研究结核分枝杆菌基因组中某一段基因是否具有启动子、信号肽等序列的完整基因,具有大肠杆菌 - 分枝杆菌复制子和卡那霉素抗性基因。骨架质粒 pJEM11 由 pLA71 删除了启动子区核糖体结合位点完整的信号肽编码区和起始密码子得来,在 pJEM11 MCS 的下游有碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, PhoA)的编码序列(coding sequence, CDS),但是缺乏启动子和信号肽。将待分析的基因片段插入其 MCS 后,如果这段基因有启动子、信号肽及 CDS,则可以编码其蛋白与 PhoA 融合表达并分泌到细胞外,PhoA 可以分解 X-P 筛选培养基中的对硝基苯磷酸盐底物而呈现出有色菌落。因此含 PhoA 活性的克隆能很容易的通过蓝白斑筛选方法检测[8]。本研究将 HSP70 启动子克隆入 pJEM11 质粒的 *Apa* Ⅰ 和 *Sna*B Ⅰ 位点之间,经过 PCR、酶切鉴定及测序分析显示,所构建的穿梭表达质粒 pJHSP70 完全正确,与程继忠等[9]的报道相似。本研究还发现含 HSP70 启动子编码区 160 bp 的转化子没有明显的 PhoA 表达活性,可能是因为没有合适的调控序列和信号肽。

基因工程技术的应用促进疫苗的研究发展。分枝杆菌作为疫苗载体有一定的优势,如:生产工艺简单,不需纯化及后期处理,性能稳定易保存,同时它还是一种很好的免疫佐剂。常用的分枝杆菌卡介苗生长缓慢,15 ~ 18 h 繁殖 1 代,培养周期长,给 BCG 的研究及应用带来一定的困难。*M. smegmatis* mc^2 155 是其中一种转化效率很高的突变株,生长快,1 ~ 3 h 繁殖 1 代。国内外的研究证明 *M. smegmatis* 的 RNA 聚合酶可以有效识别 BCG 的启动子,用它作为重组 BCG 研究的组织模型,将大大加快研究步伐。此外,外源基因在分枝杆菌中的有效表达是基因工程分枝杆菌多价疫苗发挥作用的基础。但提高外源基因在分枝杆菌的表达效率是制约分枝杆菌的因素之一。而外源基因在原核生物中的高效表达是由高效可控的启动子、适当的 SD 序列等因素共同决定的。为了鉴定所构建的重组穿梭表达质粒的表达功能,我们将幽门螺杆菌尿素酶 B 亚单位克隆入穿梭表达质粒 pJHSP70 中,并转化入 *M. smegmatis* 进行表达。结果显示,UreB 基因在 *M. smegmatis* 中成功的表达了相应蛋白,说明所构建的质粒 pJHSP70 具有在 *M. smegmatis* 中表达外源基因的能力。本穿梭表达质粒的成功构建,为开发分枝杆菌为多价疫苗提供了一个可供选择的工具载体。

参考文献:

[1] Harth G, Lee B Y, Horwitz M A. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major Mycobacterium tuberculosis extracellular proteins considered to be leading vaccine candidates and drug targets[J]. Infect Immun, 1997, 65(6): 2321 - 2328.

[2] Harth G, Maslesa-Galic S, Horwitz M A. A two-plasmid system for stable, selective-pressure-independent expression of multiple extracellular proteins in mycobacteria[J]. Microbiology, 2004, 150(Pt 7): 2143 - 2151.

[3] Garbe T, Harris D, Vordermeier M, *et al*. Expression of the Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton antigen in Mycobacterium smegmatis: immunological analysis and evidence of glycosylation[J]. Infect Immun, 1993, 61(1): 260 - 267.

[4] Cayabyab M J, Hovav A H, Hsu T, *et al*. Generation of $CD8^+$ T-cell responses by a recombinant nonpathogenic Mycobacterium smegmatis vaccine vector expressing human immunodeficiency virus type 1 Env [J]. J Virol, 2006, 80(4): 1645 - 1652.

[5] 聂忠清, 吴永刚, 蒙建洲. 分子伴侣的功能和应用[J]. 生命科学, 2006, 18(1): 84 - 89.

[6] 徐　蕾, 何永林, 张　黎, 等. 结核分枝杆菌复活促进因子 B 的原核表达、鉴定和纯化[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(3): 253 - 256.

[7] 程继忠, 皇甫永穆, 梁驹卿, 等. 日本血吸虫 26ku 抗原基因在分枝杆菌和大肠杆菌中的高效表达[J]. 同济医科大学学报, 1996, 25(3): 173 - 179.

[8] Lim E M, Rauzier J, Timm J, *et al*. Identification of mycobacterium tuberculosis DNA sequences encoding exported proteins by using phoA gene fusions[J]. J Bacteriol, 1995, 177(1): 59 - 65.

[9] 程继忠, 梁驹卿, 肖　红, 等. 人结核杆菌热休克蛋白 70 和卡介苗 α 抗原基因启动子序列测定[J]. 同济医科大学学报, 1997, 26(5): 331 - 335.

(编辑　陈聪连)