基础研究 文章编号：0253-3626（2011）06-0907-03

结核分枝杆菌 PPE68 基因真核表达质粒的构建及鉴定

靳志栋，何永林，徐 蕾，佘 茜，张 丹，张壮苗，杨 春
（重庆医科大学病原生物学教研室、重庆医科大学神经科学研究中心、重庆市重点实验室，重庆 400016）

【摘 要】目的：构建结核分枝杆菌（Mycobacteria tuberculosis，Mtb）PPE68 基因的真核表达质粒，观察 PPE68 基因在小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 中的表达。方法：将 MtbPPE68 基因克隆亚至真核表达质粒 pBudCE4.1 中，构建真核表达质粒 pBudCE4.1-PPE68。以真核表达质粒 pBudCE4.1-PPE68 体外转染小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞，通过 RT-PCR 及 Western blot 法分别在转录水平及翻译水平检测 PPE68 基因的表达。结果：重组表达质粒经双酶切所切下的片段大小与理论值相符，测序结果与Genbank 注录的 PPE68 基因序列一致。重组质粒瞬时转染小鼠巨噬细胞株 RAW264.7，用 RT-PCR 及 Western blot 法分别在转录水平及翻译水平检测 PPE68 基因的表达。结论：成功构建了 PPE68 基因的重组真核表达质粒 pBudCE4.1-PPE68，并在小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 中得到了成功表达。为对其免疫原性、免疫反应性及免疫保护作用的进一步研究奠定了基础。

【关键词】Mtb；PPE68；巨噬细胞
【中国图书分类法分类号】R337 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-03-08

Construction and identification of eukaryotic expression plasmid pBudCE4.1-PPE68 of Mycobacterium tuberculosis

JIN Zhi-dong, HE Yong-lin, XU Lei, SHE Qian, ZHANG Dan, ZHANG Zhuang-miao, YANG Chun
(*Department of Pathobiology, Institute of Neuroscience Chongqing Medical Univercity, Chongqing Key Laboratory of Neurobiology*)

【Abstract】*Objective*: To construct and identify eukaryotic expression plasmid pBudCE4.1-PPE68 and observe its expression in murine macrophage RAW264.7 cells. *Methods*: MTB PPE68 gene was subcloned into pBudCE4.1 to construct recombinant plasmid pBudCE4.1-PPE68. The recombinant plasmid was transiently transfected into RAW264.7 cells, and the expression of PPE68 gene was detected by RT-PCR and Western blot. *Results*: The accurate eukaryotic recombinant plasmid pBudCE4.1-PPE68 was identified by restrict endonuclease. The PPE68 gene expression product in RAW264.7 cells was detected by RT-PCR、Western blotting. *Conclusion*: The recombinant plasmid pBudCE4.1-PPE68 was successfully constructed. The protein can be expressed in murine macrophage RAW264.7. The present study provides an experimental basis for further study of the PPE68 protein of Mycobacterium tuberculosis.

【Key words】mycobacterium tuberculosis; PPE68; macrophage

结核病（Tuberculosis，TB）是一种由结核分枝杆菌（Mycobacteria tuberculosis，Mtb）引起的严重传染病，目前全球 Mtb 染者约占总人口的 1/3，每年有 170 多万人死于结核病[1]。如果控制策略没有新的突破，未来 25 年将有 4 000 万人死于结核感染[2]。因而寻找更为有效的防治手段是控制 TB 的流行与蔓延的关键。

在 MtbH37Rv 全基因中有一个基因家族因其编码蛋白的 N 端富含脯氨酸-脯氨酸-谷氨酸（Pro-Pro-Glu）的基序，所以被命名为 PPE 家族基因（含 69 个蛋白序列），PPE68 是 PPE 家族中来源于 Mtb 的 Rv3873 的包膜蛋白，位于差别 1区（Region of difference，RD1）。MtbH37Rv 株与牛分枝杆菌卡介苗（Bacillus Calmette-Guérin，BCG）株的基因有 16 个差别区 RD1-RD16，其中 RD1 区的功能与细菌的毒力和免疫原性有关[3]。BCG 缺失 RD1 区，其免疫原性随着整合 RD1 区基因而明显增加，同时毒力也增强。PPE68 抗原是 RD1 区的主要成分之一，本实验将 Mtb 保护性抗原 PPE68 克隆入真核表达质粒 pBudCE4.1 中，并在小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 中成功表达，为 PPE68 重组 BCG 疫苗在活体内的应用打下前期实验基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株及细胞株

pMD19-T simple-PPE68 质粒、大肠杆菌 TOP10 株、小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 均由本实验室保存。多启动子共表达载体 pBudCE4.1 购自 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂

DNA marker、高保真 PCR 多聚酶、限制性内切酶 *Sal* I

作者介绍：靳志栋（1982-），男，硕士，研究方向：病原生物学。
通信作者：杨 春，女，教授，Email：yangchunim@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30771922、30901280）。

和 *Hind* Ⅲ、细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒、DNA 连接试剂盒及胶回收试剂盒、辣根过氧化物酶(Horseradish peroxidase,HRP)标记的羊抗小鼠 IgG、组织/细胞总 RNA 抽提试剂盒、聚偏二氟乙烯(Polyvinylidene difluoride,PVDF)、抗生素等均购自 TaKaRa 公司。RPMI1640 培养液购自 Gibco 公司，胎牛血清为郑州佰安产品；逆转录试剂盒 ReverTra Ace-α-TM（TOYOBA 公司）；真核细胞转染试剂 Lipofectamine2000（Invitrogen 公司）。BALB/c 小鼠 Mtb 感染血清由本实验室制备[4]。

1.3　引物设计及合成

根据 GenBank 中登录的 PPE68 基因序列(NC_000962.2)用Primer软件设计引物：上游P1：5'-TGACAAGCTT-ATGCT-GTGGCACGCAAT-3'（下划线为 *Hind* Ⅲ酶切位点），下游P2：5'-ATGCGTCGAC-CCAGTCGTCCTCTTCGTCC-3'（下划线为 *Sal* Ⅰ酶切位点）。

上述引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.4　PPE68 基因的扩增

以pMD19-T simple-PPE68质粒为模板，PCR扩增 PPE68 基因。反应体系：5×Buffer 10 μl，dNTP Mixture 4 μl，模板 1 μl，ddH_2O 32.5 μl，DNA Polymerase 0.5 μl，特异性引物对各 1 μl，共 50 μl。反应条件：94℃预变性 3 min；98℃ 10 s，55℃ 15 s，72℃ 90 s，共 30 个循环；最后 72℃延伸 6 min。取 5 μl PCR 产物，经 1%琼脂糖凝胶电泳检测，紫外灯下观察结果。

1.5　重组表达质粒的构建

回收 PCR 产物，与表达载体 pBudCE4.1 分别经 *Hind* Ⅲ和 *Sal* Ⅰ双酶切，胶回收 PPE68 基因片段和载体片段，以 DNA 链接试剂盒 16℃连接过夜。

将连接产物转化至感受态大肠杆菌 Top10，挑选阳性单菌落，提取质粒，进行 PCR、双酶切（*Hind* Ⅲ/*Sal* Ⅰ）鉴定，鉴定正确后送至上海生工测序。

1.6　重组质粒的细胞转染

小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液置 37℃、5%CO_2 培养箱进行培养，在细胞状态良好时常规胰酶消化转种至 6 孔板及预先放入 8 mm×8 mm 载玻片的 24 孔板中，待细胞状态良好及细胞汇片至70%时按转染试剂 Lipofectamine2000 操作步骤瞬时转染 pBud-CE4.1-PPE68 及空载体 pBudCE4.1，转染 24~48 h 后，检测目的基因的表达。

1.7　PPE68 基因表达的鉴定

1.7.1　以 RT-PCR 法对 PPE68 基因进行转录水平上的检测　24 h 后抽提 6 孔板细胞总 RNA：彻底弃净培养板孔中培养液，取 TRIpure 1 ml 直接加在培养皿中细胞上，立即用移液器吹打使细胞脱壁后，将裂解液移入离心管内。后续提取方法按说明书进行。

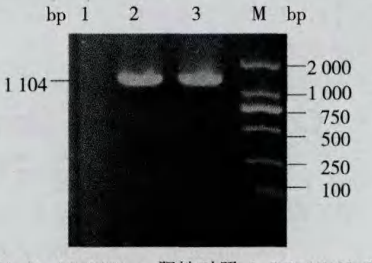
应用逆转录试剂 ReverTra Ace-α-TM 进行逆转录反应，反应条件为 30℃ 10 min，42℃ 20 min，99℃ 5 min，4℃ 5 min；PCR 条件为 94℃预变性 3 min；98℃ 10 s，55℃ 15 s，72℃ 90 s，共 30 个循环；最后 72℃延伸 6 min。1%琼脂糖凝胶电泳后，采集图像。

1.7.2　以 Western blot 法对 PPE68 基因进行翻译水平上的检测　48 h 后提取 6 孔板细胞总蛋白进行变性处理，处理产物经 SDS-PAGE 后，电转移至 PVDF 膜上用 5%脱脂奶粉封闭 2 h，加入 1:10 稀释的 Mtb 免疫小鼠血清，4℃孵育过夜；PBST 洗涤，加入 HRP 标记 1:300 稀释的羊抗鼠 IgG，室温下 1 h，等体积混合增强化学发光(ECL)试剂中的 A 液和 B 液，滴加于膜上，均匀覆盖，暗室静置 1 min，Bio-Rad 凝胶成像系统进行图像采集。

2　结　果

2.1　PPE68 基因扩增产物的鉴定

PPE68 基因 PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析，可见约 1 104 bp 的特异性条带，大小与预期相符(见图 1)。

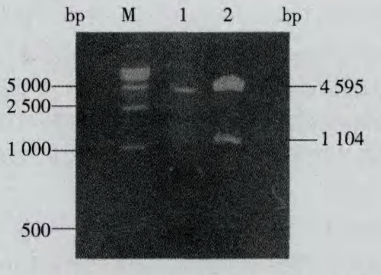


M. DNA Marker DL 2000；1. 阳性对照；2. PPE68PCR 产物；3. pBudCE4.1-PPE68 重组质粒 PCR 产物

图 1　PPE68 基因 PCR 扩增产物及重组表达质粒 PCR 扩增的鉴定

2.2　重组质粒 pBudCE4.1-PPE68 的鉴定

琼脂糖凝胶电泳分析显示，重组表达质粒 pBudCE4.1-PPE68 的 PCR 产物可见 1 104 bp 的目的基因条带(见图 1)。经 *Hind* Ⅲ和 *Sal* Ⅰ双酶切后的琼脂糖凝胶电泳分析显示酶切后产生一线性空载体条带及 1 条与理论预测值一致的目的片段(见图 2)。双向测序结果与 Genbank 注录的 PPE68 (1 104 bp)基因序列一致，获得正确的含 PPE68 基因的重组质粒 pBudCE4.1-PPE68。



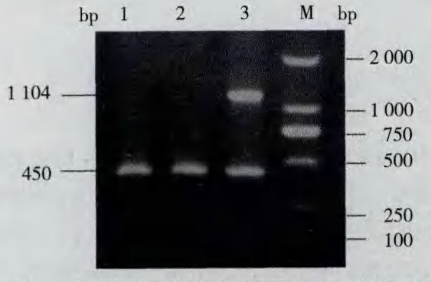
M. DNA Marker DL 15 000；1. pBudCE4.1 经 *Hind* Ⅲ/*Sal* Ⅰ酶切结果；2. pBudCE4.1-PPE68 重组质粒经 *Hind* Ⅲ/*Sal* Ⅰ酶切结果

图 2　重组表达质粒 pBudCE4.1-PPE68 经 *Hind* Ⅲ/*Sal* Ⅰ双酶切结果

2.3　重组质粒 pBudCE4.1-PPE68 在小鼠巨噬细胞株 RAW 264.7 细胞中表达产物的检测

分别以重组质粒 pBudCE4.1-PPE68 和空质粒 pBud-CE4.1瞬时转染RAW264.7细胞24 h后，表达产物的RT-PCR

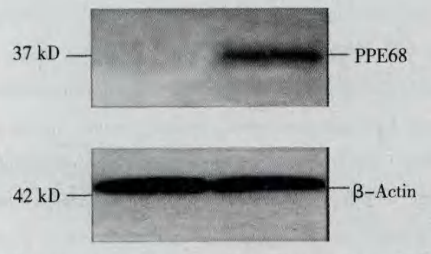
显示，只有重组质粒 pBudCE4.1-PPE68 转染组在 1 104 bp 左右出现条带，空载体组及未转染组在 1 104 bp 左右未见条带，表明 pBudCE4.1-PPE68 转染组 PPE68 基因在 RNA 水平上有表达（见图 3）。



1. RAW264.7 RT-PCR 产物；2. 转染了 pBudCE4.1 的 RAW264.7 RT-PCR 产物；3. 转染了 pBudCE4.1-PPE68 重组质粒的 RAW264.7 RT-PCR 产物；M. DNA Marker DL2000

图 3 重组表达质粒 pBudCE4.1-PPE68 转染 RAW264.7 细胞 RT-PCR 结果

重组质粒 pBudCE4.1-PPE68 转染小鼠巨噬细胞株 RAW264.7 细胞中表达产物的 Western blot 检测结果显示，pBudCE4.1-PPE68 转染组的 PPE68 蛋白在 37 kD 左右发生特异性免疫反应，空质粒 pBudCE4.1 则没有特异性免疫反应条带出现。表明 PPE68 基因的表达产物的分子量约为 37 kD（见图 4）。



1. 转染了 pBudCE4.1 的 RAW264.1 细胞 RT-PCR 结果；2. 转染了 pBudCE4.1-PPE68 重组质粒的 RAW264.1 细胞 RT-PCR 结果

图 4 pBudCE4.1-PPE68 转染 RAW264.7 的 Western blot 检测结果

3 讨 论

PPE68 是 Mtb 位于 RD1 区的主要抗原之一。BCG 缺失 RD1 区，其免疫原性随着整合 RD1 区基因而明显增加，同时毒力也增强。RD1 区可编码 9 种蛋白，常见的分泌性抗原有 ESAT-6 和 CFP-10。Brodin 等[5,6]发现 ESAT-6 修饰 BCG 后其免疫原性增强，BCG 在体内生存时间延长；但其毒力较 BCG明显升高，总体的免疫效果并未超过 BCG。RD1 区还有 PE35、PPE68、Rv3878、Rv3873c 等抗原，其中 PPE68 是免疫原性最好的一种蛋白，可引起 Th1 免疫应答和 IFN-γ 产生。同时 PPE68 免疫原性不受 ESAT-6 和 CFP-10 干扰，实验证明 PPE68 的表达与 RD1 区的毒力产生无关[7]。因此，利用BCG 中无 PPE68 的特性，一方面可以开发以 PPE68 抗原作为诊断试剂，检测病人血清中有无相应抗体（可以区别是感染 Mtb，还是接种 BCG），用于 TB 的诊断；Okkels 等[8]已经进行了用重组 PPE68 蛋白抗原在体外刺激外周血淋巴细胞，检测 γ-干扰素产生的研究，发现 PPE68 可被人类 T 细胞识别并以此来诊断 TB，但是效果不甚理想。原因是 PPE68 上的 T 细胞表位 Rv3873118.135 是一种高度保守序列，与多种 PPE68 蛋白家族成员存在交叉反应，与 BCG 也有交叉。但是 Liu 等[9]的研究中指出，去除保守序列的 Rv3873 的特异性片段在 Mtb的免疫诊断方面具有极高的应用价值。另一方面，构建 PPE68 重组 BCG，既可增强其免疫性，同时毒力不变，可用于 TB 的预防。

在 TB 的预防方面，BCG 已有 80 多年的历史，但其免疫效果不一；同一标准治疗方案在不同免疫背景人群中的反应更是千差万别，对年龄为 15 岁以下的儿童组、15~24 岁青少年组和超过 25 岁成人组的保护效果分别为 82%、67%、20%[10]。对 BCG 进行改造，以达更好的效果是研究的方向，重组 BCG 具有广阔的发展前景[11]。在动物模型中已经证实，经 RD1 区蛋白整合的 BCG 比标准 BCG 有更持久和更强的保护作用。在 RD1 区具有免疫显性的几种编码蛋白中，PPE68 是唯一能够诱导感染了 Mtb 的 C57BL/6 小鼠细胞中 γ-干扰素升高的蛋白[7]，而 Mustafa A S 等[3]研究发现PPE68 能不仅能诱导 TB 患者发生强烈免疫反应也能使 BCG 免疫的健康人的细胞中 γ-干扰素升高。同时 PPE68 的表达与 RD1 区的毒力产生无关。因此，构建 PPE68 重组 BCG，一方面可增强 BCG 的免疫原性；另一方面 BCG 的毒力不受影响，为预防 TB 更有效的疫苗。由于 PPE68 蛋白能够诱导感染了 Mtb 的 C57BL/6 小鼠细胞中 γ-干扰素的升高，因此 PPE68 重组 BCG 较传统 BCG 具有更强的抗 Mtb 的能力，为预防 TB 的理想疫苗。但 PPE68 为原核基因，不易在真核细胞内表达，从而对 PPE68 重组 BCG 的研制造成了一定的困难，目前国内外的学者对 PPE68 抗原的研究，主要集中在抗原的原核表达、免疫原性及免疫保护性等方面。

pBudCE4.1 是一种真核共表达质粒，它含有双启动子、双克隆位点和双多聚腺苷酸（Polyadenylation，polyA），MtbH37Rv 株 PPE68 基因在真核启动子 Pcmv 的控制之下，能够在真核细胞宿主中表达；该质粒具有 Zeocin 抗性，该抗生素对真核细胞、原核细胞和分枝杆菌都具有杀伤作用，因此可以用作筛选标记；本实验以 pBudCE4.1 为载体，成功在真核细胞内表达出 PPE68 蛋白，为 PPE68 重组 BCG 在活体内的应用奠定了前期基础。

本实验首次构建了 MtbH37Rv 株 PPE68 基因真核重组表达质粒，转染 RAW264.7 细胞后，分别在转录水平及翻译水平检测 PPE68 基因的成功表达。PPE68 基因在真核细胞内成功表达为 PPE68 重组 BCG 疫苗的研制打下了坚实的实验基础，为 TB 的预防提供了新的思路。

参 考 文 献

[1] Young D B，Perkins M D，Duncan K，et al.Confronting the scientificobstacles to global control of tuberculosis[J].J Clin Ivest，2008，118

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)08-0910-03

急性分离大鼠心房肌细胞方法的改进及对钾、钠、钙电流的记录

龙 毅,周亚南,殷跃辉
(重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:介绍 1 种改进的成年 SD 大鼠心房肌细胞分离方法。方法:SD 大鼠麻醉后,快速取出心脏,将主动脉结扎在 Langendorff 灌流装置上,无钙台式液灌流 5 min 后换用酶液灌流 10~12 min,剪取心耳组织于 KB 液中剪碎并吹打,200 目细胞筛网过滤,将细胞滤液 500 r 离心 2 min,梯度复钙后将细胞悬液置于 4℃冰箱中静置 1 h,应用全细胞膜片钳技术记录大鼠心房肌细胞瞬时外向钾电流(I_{to})、快钠电流(I_{Na})以及 L 型钙电流(I_{Ca-L})。结果:本方法分离出的心房肌细胞存活率高,结构完整,具有良好的耐钙性,可成功记录出 I_{to}、I_{Na}、I_{Ca-L}。结论:改进的实验方法可获得大量耐钙心肌细胞,并具有正常的电生理特性。

【关键词】膜片钳;心肌细胞;瞬时外向钾电流;钠电流;L 型钙电流;细胞分离
【中国图书分类法分类号】R331.3+8 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-01

A modified method for isolation of rat cardiomyocytes and recording of potassium, sodium and calium current

LONG Yi, ZHOU Ya-nan, YIN Yue-hui
(*Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To introduce a modified isolation method for acquiring rat atrial myocytes. *Methods*: The heart of adult sprague-dawley(SD) rat was rapidly excised after successful anesthesia and mounted on a Langendorff apparatus. It was perfused retrogradely via the aorta for five minutes with Ca^{2+}-free Tyrode's solution and then perfused with collagenase dissolved in Tyrode's solution for ten to twelve minutes, and then the atrial appendage was sheared and stored in a kraftbruhe(KB) solution. Thereafter tissue was minced and filtrated. After being centrifuged at 500 r for 2 min, the isolated myocytes were performed gradient calcium reintroduction and allowed to pellet via gravity for 1 hour in refrigerator, then the transient outward potassium current, sodium current and L-tpye calium current were recorded by the use of patch clamp whole cell recording technique. *Results*: The survival rate of atrial myocytes was high and the morphous and construction of atrial myocytes were fine and the property of calcium-tolerance was

作者介绍:龙 毅(1983-),男,硕士,
研究方向:心脏电生理与心律失常。
通信作者:殷跃辉,男,教授,Email:yinyuehui63@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30871075)。

(4):1255-1265.
[2] Small P M.Tuberculosis:a new vision for the 21st century[J]. Kekkaku,2009,84(11):721-726.
[3] Mustafa A S,Al-Attiyah R,Hanif S N,et al.Efficient testing of large pools of Mycobacterium tuberculosis RD1 peptides and identification of major antigens and immunodominant peptides recognized by human Th1 cells[J].Clin Vaccine Immunol,2008,15(6):916-924.
[4] Yang C,He Y L,Xu L,et al. GLS/IL-12-modified Mycobacterium smegmatis as a novel anti-tuberculosis immunotherapeutic vaccine [J].Int J Tuberc Lung Dis,2009,13(11):1360-1366.
[5] Majlessi L,Brldin P,Brosch R,et al.Influence of ESAT-6 secretion system 1(RD1) of Mycobacterium tuberculosis on the interaction between mycobacteria and the host immune system[J].Immune system.J Immunol,2005,174(6):3570-3579.
[6] Brldin P,Majlessi L,Marsollier L,et al.Dissection of ESAT-6 system 1 of Mycobacterium tuberculosis and impact on immunogenicity and virulence[J].Bottai Infect Immun,2006,74(1):88-98.
[7] Demangel C,Brodin P,Cockle P J,et al.Cell envelope protein PPE68 contributes to Mycobacterium tuberculosis RD1 immunogenicity independently of a 10-kilodalton culture filtrate protein and ESAT-6 [J].Infect Immun,2004,72(4):2170-2176.
[8] Okkels L M,Follmann F.PPE protein(Rv3873)from DNA segment RD1 of Mycobacterium tuberculosis:strong recognition of both specific T-cell epitopes and epitopes conserved with the PPE family[J]. Infect Immun,2003,71:6116-6123.
[9] Liu X Q,Dosanjh D,Varia H,et al.Evalution of T-cell response to novel RD1-and RD2-encoded Mycobacterium tuberculosis gene products for specific detection of human tuberculosis infection[J].Infect Immun,2004,72:2574-2581.
[10] Girard M P,Fruth U,Kieny M P.A review of vaccine research and development: tuberculosis[J].Vaccine,2005,23(50):5725-5731.
[11] Hernandez-Pando R,Castanon M,Espitia C,et al.Recombinant BCG vaccine candidates[J].Curr Mol Med,2007,7(4):365-372.

(责任编辑:张学颖)