维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)06-0657-04

结核分枝杆菌重组 Bb-MPT64 疫苗的构建、鉴定及表达

谢 婷,李文桂

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所,重庆 400016)

【摘 要】目的:构建和鉴定结核分枝杆菌重组双歧杆菌(Bifidobacteria bifidum,Bb)-MPT64 疫苗。方法:以结核分枝杆菌 H37Rv 标准株基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增得到 MPT64 抗原编码基因序列,定向克隆入大肠埃希菌 - 双歧杆菌穿梭表达载体 pGEX-1λT 中,构建重组质粒 pGEX-MPT64;用电穿孔法将该质粒导入 Bb 及 BL21(DE3),构建结核分枝杆菌重组双歧杆菌 -MPT64 疫苗。用 IPTG 诱导重组 BL21(DE3)菌表达 MPT64/GST 融合蛋白;SDS-PAGE 及 Western blot 对表达产物进行鉴定。结果:PCR 成功扩增出 688bp 的 MPT64 目的基因;双酶切证实 MPT64 目的基因成功插入 pGEX-1λT 中;PCR 证实 rBb-MPT64 疫苗构建成功。免疫印迹分析发现重组质粒 pGEX-MPT64 的表达产物在相对分子量(50ku)处有明显的蛋白表达条带,且能被活动性结核病人血清特异识别。结论:成功构建了结核分枝杆菌 rBb-MPT64 疫苗,为发展新型结核病疫苗奠定了基础。

【关键词】结核分枝杆菌;rBb-MPT64 疫苗;构建;鉴定;表达

【中国图书分类法分类号】R378.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-06

Construction, identification and expression of recombinant Bb-MPT64 vaccine of mycobacterium tuberculosis

XIE Ting, et al

(*Institute of Infectious and Parasitic Diseases, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To construct and identify recombinant Bb-MPT64 vaccine of mycobacterium tuberculosis. *Methods*: MPT64 antigen gene were amplified by PCR from mycobacterium tuberculosis H37Rv, then the gene was cloned into Escherichia coli-Bifidobacteria shuttle plasmid pGEX-1λT to construct pGEX-MPT64. The recombinant plasmid was electroporated into Bifidobacteria bifidum(Bb) to construct rBb-MPT64 vaccine. The expression of pGEX-MPT64 was induced with isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid(IPTG) and protein MPT64/GST was examined by SDS-PAGE and Western blotting techniques. *Results*: 688bp MPT64 gene was successfully amplified by PCR and cloned into pGEX-1λT by restriction endonuclease analysis. rBb-MPT64 vaccine was successfully constructed by PCR. SDS-PAGE and Western blotting demonstrated that the protein MPT64/GST were expressed in E.coli, BL21. *Conclusion*: rBb-MPT64 vaccine of mycobacterium tuberculosis is successfully constructed, which may provide basis for the development of new anti-tuberculosis vaccine.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis; Recombinant Bb-MPT64 vaccine; Construction; Identification; Expression

目前广泛用于预防结核病的唯一疫苗是卡介苗,但其免疫保护效果在不同地区人群中存在显著差异(0~80%)[1,2]。对患艾滋病等免疫功能严重受损的患者接种卡介苗后,可能引起致死的播散性疾病,所以改造卡介苗和开发安全有效的新疫苗势在必行。结核分枝杆菌有多种分泌性蛋白,MPT64 已被证实是具有较强免疫保护作用的蛋白成分,在一些 BCG 菌株中缺乏[3]。本研究将结核分枝杆菌 MPT64 基因插入大肠埃希菌 - 双歧杆菌穿梭表达载体 pGEX-1λT,构建 pGEX-MPT64,用电穿孔法转化两歧双歧杆菌,构建重组 Bb-MPT64 疫苗,为结核病的防治提供一种有价值的疫苗。

作者介绍:谢 婷(1979-),女,硕士,
研究方向:分子生物学和分子免疫学研究。
通讯作者:李文桂,男,教授,E-mail:li_wengui@yahoo.com.cn。

基金项目:重庆市卫生局科研基金(05-2-203)资助项目。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

高保真即用 PCR 扩增试剂盒(SK2073)、UNIQ-10 柱式质粒小量抽提试剂(SK1191)、高效感受态细胞制备试剂盒(SK2303)和 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(SK1142)购自上海生工公司;T4DNA 连接酶、DNA Marker、*BamH* Ⅰ

维普资讯 http://www.cqvip.com

和 *EcoR* Ⅰ购自 Fermentas 公司;MRS 培养基、LB 培养基由本室制备;中分子量蛋白标准购自重庆百萃公司;硝酸纤维素膜(NC 膜)及辣根过氧化物酶标记羊抗人 IgG 购自北方同正;活动性结核病人血清由本院肺科提供。

1.2 DNA 模板

结核分枝杆菌 H37Rv 标准株购自重庆市肺科医院。

1.3 质粒和宿主菌

大肠埃希菌—双歧杆菌穿梭表达载体 pGEX-1λT 购自华西医科大学微生物学教研室,Bb 购自武汉大学菌种保存中心,BL21 大肠埃希菌由本室保存。

1.4 结核分枝杆菌 MPT64 基因的扩增

1.4.1 PCR 扩增 MPT64 基因 根据 GeneBank MPT64 的 DNA 序列设计 2 对引物,P1:5'-CGGGATCCATGGTGCGCATCAAGATCTT-3'为 MPT64 上游引物,5'端引入 *BamH* Ⅰ位点,P2:5'-TCTGAATTCCTAGGCCAGCATCGAGTC-3'为 MPT64 下游引物,5'端引入 *EcoR* Ⅰ位点。引物由上海生工公司合成。以 H37Rv 基因组 DNA 为模板,P1 和 P2 为引物,PCR 扩增 MPT64 基因,扩增条件:95℃预变性 5min,94℃变性 1min,55℃退火 50s,72℃延伸 1min,共 33 个循环,最后 72℃延伸 6min。

1.4.2 PCR 产物纯化及电泳鉴定 MPT64 基因 PCR 产物纯化按照试剂盒说明书操作,然后取 3μl 纯化产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4.3 PCR 产物测序 以 P1 和 P2 为测序引物对克隆的基因进行测序,由上海生工公司完成。

1.5 大肠埃希菌-双歧杆菌穿梭表达载体 pGEX-1λT 的制备

1.5.1 BL21 感受态细菌的制备 按照高效感受态细胞制备试剂盒说明书进行操作。

1.5.2 pGEX-1λT 质粒的制备 将 pGEX-1λT 质粒转化的 BL21 感受态细菌接种在含 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37℃孵育 16~18h,挑取单个菌落至含 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃ 200r/min 振摇培养 12~18h,然后用质粒抽提试剂盒提取 pGEX-1λT 质粒。

1.6 重组质粒 pGEX-MPT64 的构建

1.6.1 目的基因的制备 MPT64 基因 PCR 产物用 *BamH* Ⅰ及 *EcoR* Ⅰ双酶切,酶切体系共 60μl:目的基因 42μl、*BamH* Ⅰ1.3μl、*EcoR* Ⅰ1.3μl、10×Buffer 6μl、灭菌去离子水 9.4μl。置 37℃水浴 2h,取 3μl 酶切产物进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳,余下的酶切产物用 PCR 纯化试剂盒纯化。

1.6.2 载体大片段的制备 与上述目的基因的制备相同,酶切产物用 PCR 纯化试剂盒纯化。

1.6.3 连接 按照酶切后载体与目的基因约 1:5 摩尔比例及 T4DNA 连接酶说明建立 20μl 的连接体系:目的基因 3μl、载体大片段 13μl、10×Buffer 2μl、T4DNA 连接酶 2μl。4℃过夜后,置 70℃10min,灭活 T4DNA 连接酶。

1.6.4 连接产物的扩增 将连接产物转化 BL21 感受态细菌,37℃ 200r/min 振摇培养 1h,随即接种在含 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 固体培养基上,37℃孵育 16~18h,挑取单个菌落至含 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养液中,37℃ 200r/min 振摇培养 12~18h,然后用质粒抽提试剂盒提取重组质粒 pGEX-MPT64。

1.7 重组质粒 pGEX-MPT64 的酶切鉴定

用 *BamH* Ⅰ及 *EcoR* Ⅰ对重组质粒 pGEX-MPT64 进行双酶切鉴定,酶切体系与上述目的基因的制备相同。

1.8 Bb 的培养及转化

取 Bb 菌种,加入 0.2ml 含 0.5mol/L 蔗糖的 MRS 液体培养基,振荡混匀,使冻干粉溶解,将其接种于 100ml 上述 MRS 液体培养基中,37℃厌氧培养 24~72h,冰浴 2.5h。4℃ 5 000r/min 离心 10min,弃上清;加入预冷的 10%甘油 50ml,4℃ 3 000r/min 离心 10min,弃上清;加入预冷的 10%甘油 25ml,4℃ 2 000r/min 离心 10min,弃上清;加入预冷的 10%甘油 10ml,4℃ 1 500r/min 离心 10min,弃上清;加入预冷的 10%甘油 1.5ml,混匀,此细菌可直接用于电转化。取 80μl 细菌加入含 20μl 重组质粒 pGEX-MPT64 的 1.5mlEp 管中,混匀,冰浴 1min 后转移至电穿孔杯中(规格为 0.1cm);电穿孔参数设置:电压为 1.2kV、转化时间为 5ms、转化次数为 2 次,转化完毕后 rBb 在电穿孔杯中停留 5~10min,加入 1ml 含 0.5mol/L 蔗糖的 MRS 液体培养基,轻轻混匀,转入 1.5mlEp 管中,37℃厌氧培养 2h。取全部菌液涂布于含 50μg/ml 氨苄青霉素的 MRS 琼脂平板上,37℃厌氧培养 72h。

1.9 重组质粒的鉴定

取上述筛选培养基上单一的 rBb 菌落,加入 100ml 含 0.5mol/L 蔗糖的 MRS 液体培养基中厌氧培养 24~72h,然后用质粒抽提试剂盒提取质粒。取 3μl 抽提的质粒为模板,以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增,扩增条件为 95℃预变性 5min,94℃变性 1min,55℃退火 50s,72℃延伸 1min,共 33 个循环,最后 72℃延伸 6min。PCR 产物纯化后取 3μl 进行 1.2%琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2.0 诱导表达及 SDS-PAGE 电泳

将经鉴定含有重组质粒 pGEX-MPT64 的 BL21(DE3)单菌落接种于含 Amp 的 LB 培养基中,经 37℃过夜活化,将细菌分别培养于 6ml 含 Amp 的 LB 中,继续 37℃ 250r/min 振摇培养至 OD_{600} 为 0.5~0.8 时,加入 1mol/L 异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)每管 5μl,至终浓度为 1mmol/L,37℃继续诱导培养 1h、3h、5h、7h、9h、11h、13h。分别收集 1ml 未诱导及 IPTG 诱导后的菌液,加入 50μl 的 1×蛋白上样缓冲液重悬后煮沸 5min;取 20μl 进行聚丙烯酰胺凝胶(10%分离胶及 5%积层胶)电泳分析,考马斯亮蓝染色。染色后凝胶置 Bio Rad Gel Doc1000 凝胶成像仪成像,结果用图像分析系统进行分析。

2.1 免疫印迹分析(Western-blotting)

将 IPTG 诱导后的菌体蛋白作 SDS-PAGE 电泳后,用半干转移系统将凝胶上的蛋白质转印到 NC 膜上,于封闭液中室温摇床封闭 3h;用 PBS 洗涤 4 次,每次 5min;用封闭液稀释的 1:100 活动性结核病人抗血清室温摇床孵育 2h;用 PBS

维普资讯 http://www.cqvip.com

洗涤 4 次,每次 10min;用封闭液稀释的 1∶1 000 辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG,室温摇床孵育 2h;用 150mmol/L NaCl 和 50mmol/L Tris-CL(pH7.5)的洗涤液洗涤 3 次,每次 10min;用 DAB 显色剂对 NC 膜避光反应 10～15min,蒸馏水终止反应。

2 结 果

2.1 PCR 扩增 MPT64 基因

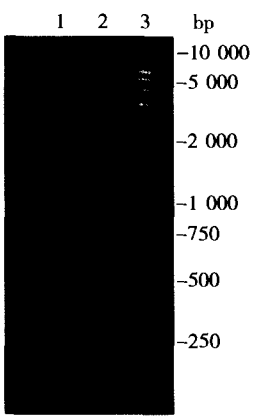
以 H37Rv 基因组 DNA 为模板,P1 和 P2 为引物,PCR 可扩增出 MPT64 基因,在 700bp 左右可见扩增的目的条带,见图 1。扩增的目的条带送上海生工公司测序发现其长度为 688bp,序列分析表明其序列与预期的序列完全相同。

2.2 MPT64 基因及质粒 pGEX-1λT 的双酶切鉴定



1. MPT64 PCR 产物; 2. DNA 标志物

图 1 MPT64 PCR 扩增产物鉴定



1. 双酶切的 MPT64 基因; 2. 双酶切的 pGEX-1λT; 3. DNA 标志物

图 2 MPT64 基因及质粒 pGEX-1λT 的双酶切鉴定

MPT64 基因及质粒 pGEX-1λT 分别经 *BamH* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ双酶切后均产生唯一条带,见图 2。

2.3 重组质粒 pGEX-MPT64 的酶切鉴定

重组质粒经 *BamH* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ双酶切后产生约 4.9×10^3bp 的载体片段和 700bp 左右的目的基因片段,见图 3。

2.4 rBb-MPT64 疫苗的 PCR 鉴定

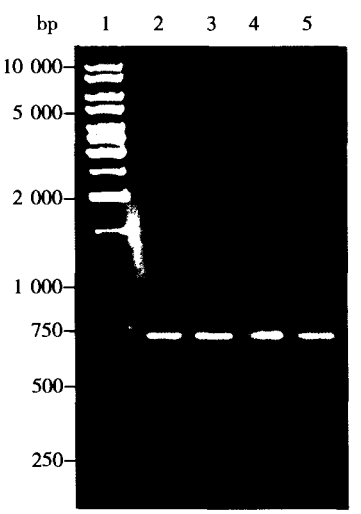
从具有氨苄青霉素抗性的 rBb 中抽提质粒,以此为模板,PCR 可扩增出 700bp 左右的 MPT64 基因片段,见图 4。

2.5 重组质粒 pGEX-MPT64 在 BL21(DE3)大肠埃



1. DNA 标志物; 2. 双酶切的 pGEX-MPT64

图 3 重组质粒 pGEX-MPT64 的双酶切鉴定



1. DNA 标志物; 2～5. MPT64PCR 扩增产物

图 4 rBb 的 PCR 鉴定

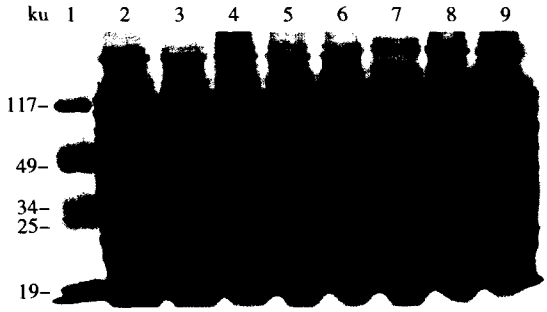
维普资讯 http://www.cqvip.com

希菌中表达产物的 SDS-PAGE 分析

SDS-PAGE 蛋白电泳结果显示 pGEX-MPT64 重组质粒在大肠埃希菌 BL21(DE3)中能高效表达 MPT64 蛋白。其分子量与预期分子量大小相符,约 50ku(24+26=50ku)。图像软件系统对凝胶上的蛋白带进行分析表明,MPT64 蛋白占全菌总蛋白的 21%,且在 IPTG 诱导 3～5h 蛋白表达量最高。而没有用 IPTG 诱导的含重组质粒 pGEX-MPT64 的 BL21(DE3)大肠埃希菌没有相应的目蛋白条带,见图 5。

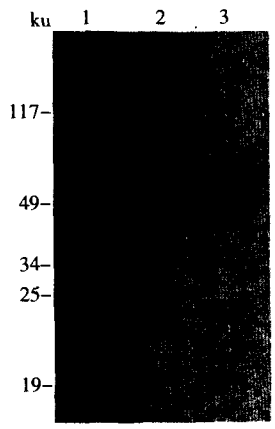
2.6 Western-blotting 分析

在大肠埃希菌中表达的 MPT64 蛋白与活动性结核病人血清反应后,在分子量约为 50ku 处产生一特异反应带,而非诱导的双歧杆菌中表达产物无此特异条带,见图 6。



1. 蛋白标志物; 2. 无 IPTG 诱导的大肠杆菌(pGEX-MPT64); 3～9 分别诱导 1、3、5、7、9、11、13h的大肠杆菌(pGEX-MPT64)

图 5 pGEX-MPT64 在大肠杆菌 BL21 中表达的 SDS-PAGE 鉴定



1. 蛋白标志物; 2. 非诱导的 pGEX-MPT64 表达产物对照; 3. 重组质粒 pGEX-MPT64 诱导表达产物与活动性结核病人抗血清免疫印迹结果

图 6 pGEX-MPT64 在双歧杆菌中表达产物的免疫印迹分析

3 讨 论

MPT64[4,5]是存在于 MTB 早期培养滤液中的一种分泌蛋白,具有超氧化物岐化酶活性,其编码基因长 688bp,可编码分子量为 24ku 的蛋白质,它可诱导小鼠产生特异性细胞毒性 T 淋巴细胞(Cytotoxic T-lymphocytes;CTLs),并可诱导肺结核患者的外周血单核细胞(Peripheral blood mononuclear cells;PBMC)增殖并产生高水平的 IFN-γ。本研究将 MPT64 基因定向克隆入穿梭表达载体 pGEX-1λT,构建重组质粒 pGEX-MPT64,双酶切鉴定证实 MPT64 基因成功插入 pGEX-1λT 中。将重组质粒 pGEX-MPT64 用电穿孔法转化 Bb,构建重组 Bb-MPT64 疫苗,从具有氨苄青霉素抗性的 rBb 中抽提质粒为模板行 PCR 能够扩增出 688bp 的基因片段,提示本研究成功构建了重组 Bb-MPT64 疫苗。

本研究 IPTG 诱导表达不同时间,表达产物 MPT64/GST 融合蛋白经 SDS-PAGE 分析发现,只有 IPTG 诱导的 BL21(DE3)大肠埃希菌在分子量约为 50ku 处有目的蛋白条带,与预期表达蛋白大小相符;而非诱导的 BL21(DE3)大肠埃希菌无目的蛋白条带,可能是表达的目的蛋白较少,导致 SDS-PAGE 不能检测。图像软件系统分析发现,MPT64/GST 融合蛋白占双歧杆菌全菌总蛋白的 21%,且在 IPTG 诱导 3～5h 蛋白表达量最高,提示重组质粒 pGEX-MPT64 能在 BL21(DE3)大肠埃希菌中高效表达,不同的诱导时间蛋白表达效率不同。免疫印迹发现 BL21(DE3)大肠埃希菌中表达的 MPT64/GST 融合蛋白可被活动性结核病人血清特异识别,提示 BL21(DE3)大肠埃希菌中表达的重组抗原能够正确地折叠,保持着具有活性的免疫功能区,具有特异抗原性。

两歧双歧杆菌是人肠道微生物的自然宿主菌,是人肠道中的有益菌和优势菌,它具有抑菌、防癌、免疫调节、营养等多种生理功能,在维持肠道微生态平衡和宿主健康方面发挥举足轻重的作用,目前临床上主要用于肠道疾病和肝脏疾病的辅助治疗[6]。为了将外源基因有效引入双歧杆菌,需构建大肠埃希菌－双歧杆菌穿梭表达载体,本研究采用的穿梭表达质粒 pGEX-1λT 含有双歧杆菌复制起点、大肠埃希菌复制起点、1 个多克隆位点和 1 个氨苄青霉素抗性基因,使重组 DNA 在大肠埃希菌中操作,

(下转第 729 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

降更为明显，这可能与丙泊酚的镇静作用、轻微的循环抑制作用加上速眠新的镇痛镇静及轻微肌松作用有关。随着麻醉时间的延长，血中丙泊酚的药物浓度的上升，可以看出同等剂量的 HIFU 照射肝脏时 A 组动物的血流动学比单用速眠新更为稳定，说明术中动物对高温的伤害性刺激的反应被抑制。以上结果表明，丙泊酚复合速眠新Ⅱ使整个手术过程更为平稳，麻醉效果较单用速眠新Ⅱ更为可靠。

以往 HIFU 照射羊肝实验时常采用单独肌肉注射速眠新Ⅱ，因手术时间长，动物在术中常有体动影响实验效果而需追加药物，造成速眠新Ⅱ的用量增加，同时反复追加药物可导致动物术后呼吸抑制、苏醒延迟、麻醉后呕吐和反流误吸增加，容易导致动物术后因呼吸抑制而死亡，本实验结果显示手术结束后 A 组动物的苏醒时间及拔管时间较 C 组明显缩短，可以减少因为麻醉时间过长后导致术毕动物呼吸抑制，对动物术毕的恢复有帮助，可以更加迅速安全的将动物送回动物房，为动物的术后恢复提供更为安全的保证。

总之，我们的研究表明，丙泊酚复合速眠新Ⅱ能够安全有效的应用于 HIFU 无创性定位辐照活体羊肝的麻醉，其优点表现在可更好的抑制气管插管反应，术中的血流动力学更为稳定，术毕苏醒快，拔管时间更短。

参 考 文 献

[1] 汪 伟.高强度聚焦超声－非侵入性肿瘤局部治疗技术[J].中国医疗器械信息，2002；8(5)：6-8.

[2] Lled ó Garc í a E，Jara Rasc ó n J，Herranz Amo F，et al. Current state of high intensity focused ultrasound(HIFU) as treatment of prostatic carcinoma[J]. Actas Urol ESP，2007；31(6)：642-650.

[3] Sasaki K，Medan MS，Azuma T，et al. Effect of echo-guided high-intensity focused ultrasound ablation on localized experimental tumors[J]. J Vet Med Sci，2006；68(10)：1069-1074.

[4] Song D，Hamza M，White PF，et al. The pharmacodynamic effects of a lower-lipid emulsion of propofol：a comparison with the standard propofol emulsion[J]. Anesth Analg，2004；98(3)：687-691.

[5] 赵在会，苗德胜，黄 燕.5 种麻醉药对牛的麻醉效果比较[J]. 中国兽医杂志，2001；37(9)：15.

（责任编辑：冉明会）

（上接第 660 页）

然后转化双歧杆菌，通过自动复制或同源整合与基因组进行基因交换，从而在双歧杆菌中稳定表达外源基因。重组双歧杆菌疫苗具有许多优点：所表达的靶抗原不需纯化，可直接用于免疫接种，免去了蛋白质后处理的复杂工序；单次接种后即可诱导机体产生针对靶抗原的免疫反应；运用分子生物学手段，通过对不同靶抗原的剪切和拼接，可使新型疫苗理想化；双歧杆菌本身作为一种益生菌，可提高宿主的免疫力；它价格低廉，易于保存，适于大量生产。

Missich 等[7]构建了重组质粒并转化到双歧杆菌，为发展双歧杆菌成为疫苗载体提供了有力的工具。重组双歧杆菌疫苗是一种新型疫苗，用于结核病的防治具有广阔的应用前景，但目前仍处于研究阶段，插入基因对双歧杆菌的体外生长是否有毒性作用及外源抗原的副作用在体内能否产生累加效应；双歧杆菌疫苗的安全性和有效性是值得关注的问题，有必要进行疫苗免疫多种动物的保护力实验，深入研究其保护性免疫机制，摸索最佳免疫途径和剂量，寻找最适配伍佐剂等等，同时也需建立一种简单有效的免疫学检测方法用于这些疫苗的效果评价，这些问题有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Fine PE.Variation in protection by BCG：implications of and for heterologous immunity[J]. Lancet，1995；346(8986)：1339-1345.

[2] Ten DHG.Research on BCG vaccination[J]. Adv Tuberc Res，1984；21(1)：79-106.

[3] Li H，Ulstrup JC，Jonassen TO，et al. Evidence for absence of the MPT64 gene in some substrains of Mycobacterium bovis BCG [J]. Infect Immun，1993；61(4)：1730-1734.

[4] Haslov K，Andersen A，Nagai S，et al. Guinea pig cellular immune responses to proteins secreted by Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immun，1995；63(3)：804-810.

[5] Oettinger T，Holm A，Haslov K.Characterization of the delayed type hypersensitivity-inducing epitope of MPT64 from Mycobacterium tuberculosis[J]. Scand J Immunol，1997；45(5)：499-503.

[6] 李文柱，陈雅棠.双歧杆菌生物学作用研究进展[J]. 地方病通报，2006；21(1)：85-88.

[7] Missich R，Sgorbati B，Donald JL，et al. Transfection of Bifidobacterium longum with pRM2，a constructed Escherichia coli-Bifidobacteria longum shuttle vector[J]. Plasmid，1994；32(2)：208-211.

（责任编辑：冉明会）