维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0014-05

空肠弯曲菌 Pen:19 cadF 基因真核表达重组质粒的构建与表达

郑 惠,蔡方成,邓 兵,钟 敏

(重庆医科大学儿童医院神内科,重庆 400014)

【摘 要】目的:构建空肠弯曲菌 Pen:19 cadF 基因真核表达重组质粒,并证实其能在 COS-7 细胞中表达。方法:以含有 *Kpn*I 和 *EcoR*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:21 cadF 基因 DNA 片段。并选择与格林-巴利综合征最为相关的空肠弯曲菌 Pen:19 PCR 产物为目的基因片段,插入到真核表达载体 pcDNA3.1(+)中,以构建重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF。重组质粒经双酶切、PCR 反应鉴定和 DNA 双向测序确认后转染至 COS-7 细胞。运用 RT-PCR 方法检测重组质粒在细胞 mRNA 水平的表达。结果:双酶切反应、PCR 反应和 DNA 双向测序证实 cadF 基因插入成功。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。结论:空肠弯曲菌 Pen:19 cadF 基因真核表达重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 构建成功,并能在 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;CadF 基因;重组质粒;DNA 疫苗

【中国图书分类法分类号】Q784,Q786 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-09-18

Construction and Expression of the eukaryotic expression recombinant plasmid of CadF gene of Campylobacter jejuni Pen: 19

ZHENG Hui, et al

(*Department of Neurology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct the eukaryotic expression recombinant plasmid of cadF gene of Campylobacter jejuni Pen: 19 and to identify its express in COS-7 cells. *Methods*: Total DNA of Campylobacter jejuni Pen:2、Pen:8、Pen:19 and Pen: 21 were used as templates respectively and cadF gene DNA with *Kpn*I and *EcoR*I sites were amplified by PCR reactions using same primer. Because of its closest association with Guillain-Barré syndrome,the PCR product of Pen:19 was selected as target gene and inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+) and the recombinant plasmid pcDNA3.1(+)-cadF was constructed. The recombinant plasmid was identified by restriction enzyme digestion and PCR reaction and was confirmed by sequencing. The recombinant plasmid was then transfected into mammalian cell COS-7 for mRNA expression and the expression were investigated by RT-PCR reaction. *Results*: It was confirmed with restriction enzyme digestion and PCR reaction and sequencing that cadF gene was cloned into pcDNA3.1(+) successfully . The objective gene was amplified from COS-7 cell transfected with the recombinant plasmid pcDNA3.1 (+)-cadF by RT-PCR. *Conclusion*: The eukaryotic expression recombinant plasmid pcDNA3.1 (+)-cadF is constructed and expressed in COS-7 cell successfully. The results obtained lay the foundation for research on development of Campylobacter jejuni DNA vaccine.

【Key words】 Campylobacter jejuni; CadF gene; Recombinant plasmid; DNA vaccine

空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni, CJ)属微需氧革兰氏阴性鞭毛螺旋菌,为人及动物胃肠道共同易感菌。许多家禽和家畜为该菌宿主,人类主要通过饮用被污染的水源、乳制品及食物或与动物直接接触而感染。目前 CJ 感染已成为全球范围内急性胃肠炎最常见的病因之一[1],即使在工业化国家,由 CJ 引起的腹泻也已超过沙门氏菌。在发展中国家,CJ 更是儿童腹泻死亡的重要病原。CJ 感染除引起急性胃肠炎外,更具严重后果的是该菌与格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome, GBS)有非常密切的关

作者介绍:郑 惠(1961-),女,博士生,副主任医师,主要研究方向:小儿神经疾病。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371500)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

系，是导致儿童发生急性迟缓性瘫痪的重要病因[2]。由于目前对 CJ 的遗传学特性、毒力因子和致病作用了解甚少，故至今尚无有效的预防和治疗措施。因此，研究有效措施来预防和控制 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。使用安全有效的 DNA 疫苗可能是控制和预防 CJ 感染的最佳途经。

DNA 疫苗就是把外源基因克隆到真核表达载体质粒上，然后将重组的质粒 DNA 导入动物体内，使外源基因在活体内表达，产生的抗原激活机体免疫系统，引起细胞和体液免疫反应。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，所选择的抗原基因应具有高度的保守性。而 Parkhill 等[3]对 CJNCTC11168 基因组序列分析发现：该基因组序列为一超变量序列。CJ 基因组序列的高变异，尤其是编码膜表面抗原性蛋白的基因序列的高变异，可能与 CJ 逃逸宿主免疫系统的清除和 CJ 感染后引起不同疾病有关。因此，对 CJ 这种抗原基因和表型多样的细菌，抗原基因的正确选择显得尤为重要。研究发现，CJ cadF 基因编码表达一种 37kd 的膜蛋白[4]，该蛋白介导 CJ 与宿主肠道细胞表面的纤维连结蛋白结合，从而促进 CJ 与宿主肠道细胞的结合。Datta 等[5]采用 PCR 方法分析来自临床、禽肉、家畜家禽排泄物共 111 株 CJ，结果发现在所测试的 111 株 CJ 中 cadF 基因的检出率为 100%，提示 CJ cadF 基因具有高度的保守性。以此构建的 CJ Pen:19 pcDNA3.1(+)-cadF DNA 疫苗，应具有预防不同 CJ 血清型感染的免疫保护力，为空肠弯曲菌 DNA 疫苗的实验研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

PCR 试剂、各种限制性内切酶、T_4DNA 连接酶、DNA marker 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。

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 pcDNA 3.1(+)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 根据 Gene Bank 中登录的空肠弯曲菌 Pen:2 标准株 cadF 基因的编码序列，设计引物 P1（5-ggggtaccATGAAAAAAATATTCTTATGTTTAGG-3）和 P2（5-ggaattcTTATCTTAAAATAAATTTAGCATCC-3），其酶切位点分别为 *Kpn*I 和 *EcoR*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，当需要观察菌落形态时，划线接种于 Stir-row 培养基，置于含 85% N_2、10% CO_2、5% O_2 的 CO_2 培养箱，恒温 42℃培养 24h~48h，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 1μg/μl，以此为模板进行 PCR 反应。反应条件为 94℃ 5min，60℃ 40s，60℃ 45s，62℃ 40s，72℃ 1min，循环 30 次，72℃延伸 5min 结束反应。分别取 5μl 上述 PCR 反应产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳。采用 PCR 产物纯化试剂盒纯化后，用于 pcDNA3.1（+）-cadF 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高效表达载体质粒 pcDNA3.1（+）的 E.Coli.Top10 细菌冻存液，接种于 3ml LA（LB 中含 100ug/ml Amp）培养基中，37℃、230r/min 振荡过夜。次日参照质粒小量抽提试剂盒说明书进行载体质粒 pcDNA3.1（+）的小量提取，并取 5μl 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 cadF 基因 PCR 纯化产物与载体质粒 pcDNA3.1（+）分别经 *Kpn*I 和 *EcoR*I 双酶切回收后进行连接反应，转化感受态细菌 E.Coli.Top10，并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（EndoFree Plasmid Giga Kit）说明书进行重组质粒 pcDNA 3.1（+）-cadF 的大量提取。紫外分光光度仪定量后，无菌生理盐水将其稀释为 1μg/μl。同时，收获处于指数生长期细胞数约为 1×10^5~1×10^6 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 24h，使 70%~80%细胞汇片。设立空细胞、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 24h。由于重组质粒 DNA 进入宿主细胞后，先在细胞核内转录为 mRNA，再在细胞浆中翻译成蛋白质。因此，参照组织 / 细胞 RNA 抽提试剂盒的操作步骤，分别收集实验孔和对照孔细胞，提取 RNA，用于检测重组质粒 pcDNA3.1（+）-cadF 在 COS-7 细胞中的瞬时表达。

1.3.6 RT-PCR 法检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达 采用紫外分光光度仪测定所提 RNA 的 A260/A280 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℃ 30min，99℃ 5min，

维普资讯 http://www.cqvip.com

5℃ 5min;PCR 反应条件为 94℃ 5min,60℃ 40s,60℃ 45s,62℃ 40s,72℃ 1min,循环 30 次,72℃延伸 5min 结束反应。取 5ul PCR 反应产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳。

2　结　果

2.1　目的基因片段的 PCR 扩增

革兰氏染色光镜检查证实,BHIB 培养基中的空肠弯曲菌 Pen:2,Pen:8,Pen:19 和 Pen:21 菌株生长良好,无杂菌污染(图 1)。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,紫外灯下可见四条长度均约为 960bp 的 DNA 片段(图 2)。

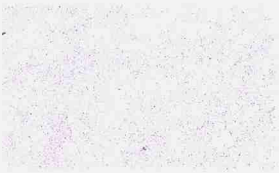


图 1　CJ Pen:19 革兰氏染色(×1000)

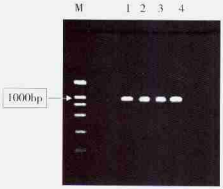


图 2　cadF 基因的 PCR 扩增产物

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

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 *EcoR*I 双酶切后,可见重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 切出的两条片段中,一条约为 5400bp,为线形化的 pcDNA3.1(+)载体;另一条约为 960bp,为 cadF 基因的 DNA 片段。而分别对重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 行 *Kpn*I 或 *EcoR*I 单酶切和对 pcDNA3.1(+)载体质粒行 *Kpn*I 和 *EcoR*I 双酶切后,未见 cadF 基因的 DNA 片段,此与预期的结果相符(图 3)。重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 行 PCR 反应也可扩增出 960bp 的 DNA 片段(图 4)。并且,重组质粒 pcDNA 3.1(+)-cadF DNA 双向测序结果显示:所插入的 cadF 基因片段与 Gene Bank 中登录的空肠弯曲菌 Pen:2 标准株 cadF 基因的编码序列一致(图 5)。以上结果表明,重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 构建成功。

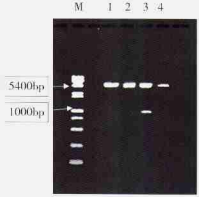


图 3　重组质粒的双酶切分析

1:pcDNA3.1(+)-cadF digested with *Kpn*I; 2:pcDNA3.1(+)-cadF digested with *EcoR*I; 3:pcDNA3.1(+)-cadF digested with *Kpn*I and *EcoR*I; 4:pcDNA3.1(+)digested with *Kpn*I and *EcoR*I; M: DNA marker

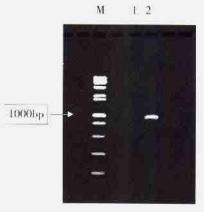


图 4　重组质粒的 PCR 鉴定

1:pcDNA3.1(+);　2:pcDNA3.1(+)-cadF;　M:DNA marker

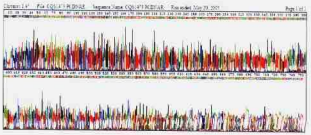


图 5　重组质粒 DNA 序列分析

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.3 RT-PCR 法检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

紫外分光光度仪测定所提 RNA 的 A260/A280 比值均在 1.9~2.0 之间，说明所提 RNA 的纯度较高。逆转录反应和多聚酶链反应结果显示，只有重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 转染的 COS-7 细胞能够扩增出相应的目的条带（图 6）。表明重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 转染成功，并能在 COS-7 细胞中表达。

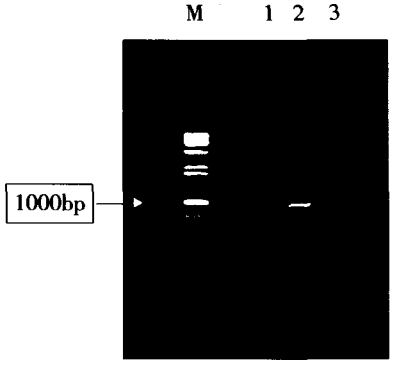


图 6 RT-PCR 检测重组质粒在 COS-7 细胞中的表达

1: pcDNA3.1(+); 2: recombinant plasmid; 3:negative control; M: DNAmarker

3 讨 论

空肠弯曲菌系人畜共同易感菌，该菌通常导致腹泻，然而可并发 GBS、肝炎、胆囊炎、溶血性尿毒症和脑膜炎等，其临床表现的不同可能反应了 CJ 不同血清型间基因表达的多样性。Dorrell 等[6]采用 DNA Microarrays 方法比较了 11 株 CJ 型间基因组水平的多样性。与 CJ 标准株基因组序列比较，1300（78.6%）基因存在于所测试的 11 株 CJ 中（核心基因），另有 345 个基因（21.4%）在至少一株 CJ 中缺失（可变基因）。核心基因主要编码具有管家功能的蛋白活性物质，与细菌代谢、生物合成及代谢调节过程相关。另外，编码细胞扩张毒素、鞭毛结构蛋白、磷脂酶 A、PEB 抗原表面蛋白和参与宿主病原体相互作用的蛋白编码基因（如 cadF、ciaB 和 cheY 基因），也存在于所测试的 11 株 CJ 中。即使在不同血清型 CJ 之间也未见其基因序列的多样性，提示这些基因编码的蛋白在 CJ 致病中是不可缺少的。而参与编码 CJ 表面结构的相关基因，如荚膜多糖生物合成基因群（Cj1413~Cj1448）、LOS 生物合成基因群（Cj1131~Cj1152）和鞭毛蛋白转录后修饰的基因群（Cj1305~Cj1345）等，均可在一个或多个 CJ 株中缺失或高变异[7]，提示编码 CJ 表面结构的相关基因随 CJ 生存环境的影响而产生变化，导致 CJ 型间基因和表型的多样性，引起宿主出现不同疾病。并且，CJ 基因组序列的多样性可能有助于其在动态环境里生存、定植和逃逸人类免疫系统的清除。同样也使当前预防 CJ 感染的措施难以奏效，迄今尚无安全有效的 CJ 疫苗正式在疾病防治中应用。

当前 CJ 疫苗研制的主要形式和存在问题包括：(1)亚单位疫苗：目前用于亚单位疫苗研究的 CJ 抗原主要有鞭毛抗原、PEB1 蛋白、外膜蛋白、趋化蛋白等。但是，由于亚单位疫苗诱导长期免疫反应的效果较差，并且不能进入 MHCI 类抗原呈递途经，故不能有效诱导细胞免疫反应。而细胞免疫反应对杀菌免疫或病原体的清除具有十分重要的作用。(2)灭活疫苗：采用灭活 CJ 制备的疫苗，尽管具有多种重要的保护性抗原，但因灭活的 CJ 全菌中可能包含有引起 GBS 的神经节苷脂模拟物，而存在潜在的神经毒性危险。并且，灭活疫苗的细胞免疫力弱，免疫效果有一定的局限性。(3)减毒活疫苗：使用人工同源重组 DNA 技术研制减毒活疫苗是近年常用的方法。尽管可通过人工同源重组 DNA 技术，有目的的仅消除 CJ 某种毒力因子而其余的抗原成分不发生缺失（如保留鞭毛抗原、PEB1 蛋白、外膜蛋白、趋化蛋白等多种有保护作用的抗原）来研制 CJ 减毒活疫苗。但是根据 Datta 等[5]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、侵袭、定植和毒素产生，以及 GBS 的发生有关。因此，对 CJ 这种抗原多样、致病因子和保护性抗原均不十分确定的细菌，要选择一种适当的 CJ 株作为减毒活疫苗的侯选株变得十分复杂。相比而言，DNA 疫苗以其安全、免疫保护性完全而备受重视。

尽管目前还未见有关 CJ DNA 疫苗的研究报道，但近十年国内外对其它致病菌 DNA 疫苗的成功研究工作[8]，为本研究打下了坚实的理论基础。本研究通过 PCR 扩增获得 CJ Pen:2、Pen:8、Pen:19 和 Pen:21 cadF 基因 PCR 产物，并选择与格林－巴利综合征最为相关的空肠弯曲菌 Pen:19 cadF 基因的 PCR 产物为目的基因片段。将目的基因片段与真核表达载体 pcDNA3.1(+)相连，以构建重组质

维普资讯 http://www.cqvip.com

粒 pcDNA3.1(+)-cadF。重组质粒经双酶切鉴定、PCR 反应鉴定和 DNA 测序，其结果表明真核表达重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 构建成功。为证实所构建的重组质粒具有应用价值，我们采用 PolyFect 转染试剂介导的转染法把重组质粒转入真核细胞 COS-7 进行表达，并采用 RT-PCR 法检测重组质粒在 COS-7 细胞中的瞬时表达。结果表明，重组质粒 pcDNA3.1(+)-cadF 转染成功，并能在 COS-7 细胞中表达，为进一步研究 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基础。

参 考 文 献

[1] O'Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world [J]. Semin Pediatr Infect Dis, 2005;16(2):125-136.

[2] Ryan MM. Guillain-Barr é syndrome in childhood [J]. J. Paediater Child Health, 2005;41(5-6):237-241.

[3] Parkhill J, Wren BW, 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] Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by Campylobacter jejuni requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization [J]. Microbiology, 2003;149(10):153-165.

[5] 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(4):345-348.

[6] Dorrell N, Mangan JA, Laing KG, et al. Whole genome comparison of Campylobacter jejuni human isolates using a low-cost microarray reveals extensive genetic diversity [J]. Genome Res, 2001; 11(10): 1706-1715.

[7] Dingle KE, Colles FM, Wareing DR, et al. Multilocus sequence typing system for Campylobacter jejuni [J]. J Clin Microbio, 2001;39(1):4-23.

[8] Cui Z. DNA vaccine [J]. Adv Genet, 2005;54:257-289.

（上接第 9 页）

fusion function[J]. J Virol, 1989;63:2941-2950.

[3] Crowe J, Firestone C, Crim R, et al. Monoclonal antibody-resistant mutants selected with a respiratory syncytial virus-neutralizing human antibody Fab fragment (Fab 19) define a unique epitope on the fusion (F) glycoprotein[J]. Virology, 1998; 262:373-375.

[4] Garcia-Barreno B, Portela A, Delgado T, et al. Frame shift mutations as a novel mechanism for the generation of neutralization resistant mutants of human respiratory syncytial virus[J]. EMBO J, 1990;9:4181-4187.

[5] 赵晓东，杨锡强，陈坤华. 呼吸道合胞病毒对单克隆抗体预防的抵抗 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005;25: 222-226

[6] 赵晓东，W. Sullender，杨锡强. 呼吸道合胞病毒逃逸株对单克隆抗体预防的抗性比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2005; 28:648-651.

[7] Johnson R, Prince G, Suffin S, et al. Respiratory syncytial virus infection in cyclophosphamide-treated cotton rats[J]. Infect. Immun, 1982;37:369-373.

[8] Anderson L, Hierholzer J, Bingham P, et al. Microneutralization test for respiratory syncytial virus based on an enzyme immunoassay[J]. J Clin Microbiol, 1985; 22:1050-1052.

[9] Boeckh M, Berrey M, Bowden R, et al. Phase 1 evaluation of the respiratory syncytial virus specific monoclonal antibody palivizumab in recipients of hematopoietic stem cell transplants[J]. J Infect Dis, 2001;184:350-354.

[10] Domingo E, Holland J. Mutation rates and rapid evolution of RNA viruses[M]. The evolutionary biology of viruses. S. Morse. New York, Raven Press: 1994;161-184.

[11] Fishaut M, Tubergen D , McIntosh K. Cellular response to respiratory viruses with particular reference to children with disorders of cell-mediated immunity [J]. J. Pediatr, 1980;96: 179-186.

[12] Carman W, Zanetti A, Karayiannis P, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus [J]. Lancet, 1990;336: 325-329.

[13] Hamre D, Loosli C, Gerber P. Antigenic variants of influenza A virus (PR8 strain). III. Serological relationships of a line of variants derived in sequence in mice given homologous vaccine[J]. J Exp Med, 1958;107:829-844.

[14] Hyslop N, Fagg R. Isolation of variants during passage of a strain of foot-and-mouth disease virus in partly immunized cattle [J]. J Hyg (Lond), 1965; 63:357-368.

[15] Protzer-Knolle U, Naumann U, Bartenschlager R, et al. Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation[J]. Hepatology, 1998;27:254-263.

[16] Taboga O, Tami C, Carrillo E, et al. A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants[J]. J Virol, 1997;71:2606-2614.