维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0276－03

结核分枝杆菌 Ag85B 与 MPT64 真核共表达质粒的构建及表达

江 山，朱道银，骆旭东，陈 全，蒋 英

(重庆医科大学微生物学及免疫学教研室，重庆 400016)

【摘 要】目的：构建结核分枝杆菌 Ag85B 和 MPT64 编码基因的共表达载体 pBud85B－MPT。方法：将结核分枝杆菌 Ag85B、MPT64 基因同时克隆进多启动子共表达载体 pBudCE4.1 中，得到真核共表达质粒 pBud85B－MPT；将 pBud85B－MPT 转染 COS－7 细胞，通过 RT－PCR 方法检测目的基因的表达。结果：在 COS－7 细胞中同时检测到 Ag85B、MPT64 的表达。结论：pBud85B－MPT 共表达质粒构建成功，为进一步研究新型结核病疫苗奠定基础。

【关键词】结核分枝杆菌；Ag85B；MPT；共表达载体

【中国图书分类法分类号】R378.91 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－09－08

Construction and expression of the eukaryotic coexpression plasmid of Mycobacterium tuberculosis Ag85B and MPT64 gene

JIANG Shan, et al

(*Department of Microbiology and Immunology, College of Basic Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct an eukaryotic coexpression plasmid containing Mycobacterium tuberculosis Ag85B and MPT64 gene. *Methods*: Mycobacterium tuberculosis Ag85B and MPT64 gene were cloned into pBudCE4.1 to construct recombinant plasmid pBud85B－MPT. The recombinant plasmid was transfected into COS－7 cells, and its expression of Ag85B and MPT64 was assesed by RT－PCR. *Results*: Mycobacterium tuberculosis Ag85B and MPT64 were detected in transfected COS－7 cells. *Conclusion*: The recombinant plasmid pBud85B－MPT can express Ag85B and MPT simultaneously in COS－7 cells which provides the basis for further investigation of DNA vaccine against tuberculosis.

【Key words】Mycobacterium tuberculosis; Ag85B; MPT; Coexpression vector

目前全球的结核病疫情再度增高，由于 BCG (卡介苗)免疫保护效果极不稳定，因此寻找安全、稳定、高效的新型结核病疫苗成为研究热点。基因疫苗是疫苗研制的第三次革命，为 TB 的防治提供一新思路。我们将结核分枝杆菌(MTB)保护性抗原 Ag85B、MPT64 的基因同时克隆进真核表达质粒 pBudCE4.1 中，并在 COS－7 细胞中进行表达，为新型结核病基因疫苗的研制提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、细胞和菌株

COS－7 细胞由本实验室保存，结核分枝杆菌 H37Rv 购自中科院微生物研究所，*E. coli* Top10 为本室保存。多启动子共表达载体 pBudCE4.1 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂

Taq plus 酶、pfu 酶、细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、RNA 提取试剂盒、CDNA 逆转录试剂盒、琼脂糖等购自上海生工，限制性内切酶、快速连接试剂盒购自 TakaRa 公司，质粒纯化抽提、胶回收、PCR 产物纯化试剂盒购自上海华舜生物公司产品。1640 和胎牛血清购自 Hyclone 公司，Lipofectin 购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 pBud85B 质粒的构建

根据 GeneBanK 登录的 Ag85B 编码序列设计 P1、P2 引物，分别含有 *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ 酶切位点。P1：GCAAGCTT－ATGACAGACGTGAGCCGA；P2：GCGGATCC－CTAGGCAGCATCGAGTC 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 Ag85B 基因，反应体系：ddH_2O 38μl，10×buffer 5μl，dNTP2μl，模板 2μl，P_1、P_2 各

作者介绍：江 山(1975－)，女，博士生，主要研究方向：结核分枝杆菌基因疫苗的研制。

基金项目：重庆市卫生局重点项目(00－1006)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1μl, pfu 酶 1μl; 条件: 95℃ 3min, 94℃ 1min, 61℃ 50s, 72℃ 1min, 72℃ 7min, K=30, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。用 *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ酶切 PCR 产物, 并用相应的酶消化载体质粒 pBudCE4.1, 回收后将 Ag85B 基因定向克隆进载体质粒 pBudCE4.1 中, 筛选重组质粒并酶切鉴定。

1.2.2 pBud85B-MPT 质粒的构建

根据 GeneBank 登录的 MPT64 编码序列设计 P3、P4 引物, 分别含有 Not I/Kpn Ⅰ酶切位点。P3: ATGCGGCCGC-ATGGTGCGCATCAAGATC; P4: GCGGTACC - CTAG-GACAGCATCGAGTC; 以结核分枝杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板 PCR 扩增 MPT 基因, 反应体系: ddH_2O 38μl, 10 × buffer 5μl, dNTP 2μl, 模板 2μl, P_3、P_4 各 1μl, Taq plus 酶 1μl; 条件: 95℃ 3min, 94℃ 1min, 57℃ 50s, 72℃ 1min, 72℃ 4min, K=33, 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。用 Not Ⅰ/Kpn Ⅰ酶切 PCR 产物, 并用相应的酶消化质粒 pBud85B, 回收后将 MPT64 基因定向克隆进质粒 pBud85B, 筛选重组质粒并酶切鉴定。

1.2.3 细胞转染

COS-7 细胞在含 10% 胎牛血清的 1640 培养基生长至 70%~80% 汇片, 用重组 pBud85B-MPT 质粒进行转染, 以 pBudCE4.1 空质粒和 COS-7 空细胞作为对照, 转染试剂为阳离子脂质体 Lipofectin, 具体方法参照说明书和《分子克隆》进行。

1.2.4 RT-PCR 分析转染细胞的表达产物

分别收集实验及对照孔细胞提取 RNA 进行逆转录, 以各自的 cDNA 为模板, 分别以 P_1、P_2、P_3、P_4 为引物按照上述条件进行 PCR 扩增。

2 结 果

2.1 目的基因的 PCR 扩增

P_1、P_2 为引物 PCR 扩增得 1Kb 大小的特异条带(Ag85B 为 987bp), P_3、P_4 为引物扩增得一约 700bp 的特异条带(MPT64 为 687bp)(图 1)。

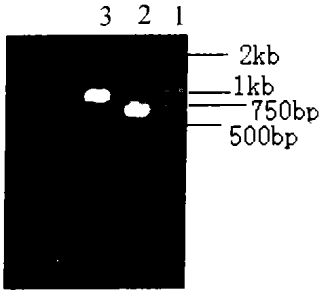


图 1 目的基因的 PCR 扩增

1. Marker; 2. MPT64; 3. Ag85B

2.2 pBud85B、pBud85B-MPT 质粒的构建

Ag85B PCR 产物用 *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ酶切与相应载体 pBudCE4.1 连接, 构建重组质粒 pBud85B, *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ双酶切鉴定切出目的片段(图 2)。MPT64PCR 产物用 Not Ⅰ/Kpn Ⅰ酶切与 pBud85B 连接, Not Ⅰ/Kpn Ⅰ双酶切鉴定切出目的片段(图 2)。pBud85B-MPT 测序结果表明 Ag85B 基因未发生突变, MPT64 基因序列与文献报道一致。

2.3 RT-PCR 法分析 pBud85B-MPT 质粒在 COS-7 细胞表达

分别用转染有 Bud85B-MPT、pBudCE4.1 空质粒的 COS-7 细胞的 cDNA 作模板行 PCR 扩增, 只有转染有 pBud85B-MPT 的 COS-7 细胞分别扩增出 Ag85B、MPT64 的基因(图 3)。

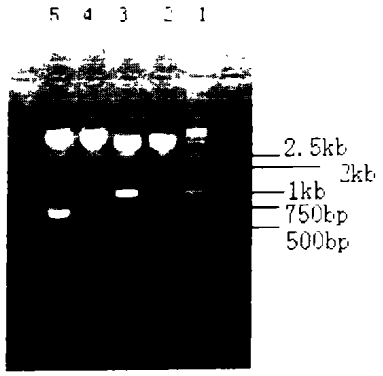


图 2 pBud85B、pBud85B-MPT 的酶切鉴定

1. Marker; 2. pBud4.1 *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ; 3. pBud85B *Hind* Ⅲ/*BamH* Ⅰ; 4. pBud85B Not/Kpnl; 5. pBud85B - MPT Notl/Kpnl

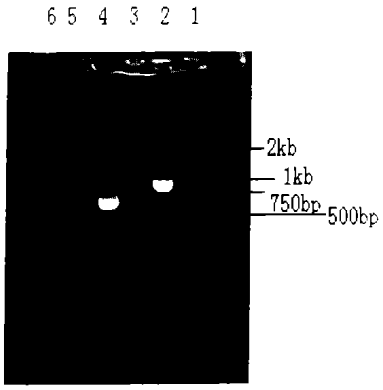


图 3 pBud85B-MPT RT-PCR 鉴定结果

1. Marker; 2. Ag85Bgene amplified from pBud85B - MPT; 3. RNA control; 4. MPT64gene amplified from pBud85B - MPT; 5. RNA control; 6. pBud4.1 control

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

基因疫苗是分子免疫学和分子生物学的新兴研究领域,由于制备简单、可持续诱导体液及细胞免疫反应等特点成为结核病疫苗研究中的优先领域和热点[1]。Ag85B、MPT64 属于 MTB 的分泌性蛋白,是结核病预防和治疗性疫苗研制的理想候选抗原[2]。Ag85B 又称 MPB59、α－Ag,与结核杆菌细胞壁的合成有关;Ag85B 具有多个 T 细胞表位,能诱导机体产生保护性的免疫应答从而抵抗 MTB 和 BCG 的攻击[3]。MPT64 也是重要的 T 细胞抗原,主要刺激特异性 CTL 形成和 IFN－γ 产生,同样也能诱导机体抵御 MTB 的攻击[4,5]。1999 年 Kamath 等发现,Ag85B、MPT64、ESAT－6 三种基因疫苗联合免疫较各自单独免疫的保护效果明显增强,由此可见 MTB 多个基因疫苗的联合应用可诱导更为有效的免疫保护作用[5]。

将多个携带不同基因的独立载体系统同时转染靶细胞,有着可以自由调节各表达载体比例的优点,但是其转染效率很低。而在同一载体上构建、表达多个基因可提高转染及表达效率,此种载体称为多基因共表达载体。多启动子表达载体由于其构建简便、方法可靠,是目前多基因共表达载体构建中最常用的方法,它将带有各自独立启动子的多个表达盒构建于一个载体上,能转录出多种不同的 mRNA 并翻译出不同的蛋白质[6]。pBudCE4.1 是一多启动子真核表达载体,含有双启动子、双克隆位点和双 polyA,可同时插入和表达两个外源基因。

我们将 MTB Ag85B、MPT64 基因同时克隆入 pBudCE4.1,构建共表达质粒 pBud85B－MPT,转染 COS－7 细胞,采用 RT－PCR 的方法在 mRNA 水平检测到 Ag85B、MPT64 基因的表达;为进一步对目标基因的表达进行检测,我们将纯化 Ag85B、MPT64 的原核表达产物,免疫动物制备多克隆抗体,在蛋白质水平检测 pBud85B－MPT 的表达情况为进一步研究 pBud85B－MPT 作为结核病基因疫苗的可能性打下基础。

参 考 文 献

[1] Tighe H, Corr M, Roman M, et al. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint[J]. Immunol Today, 1998;19(2):89－97.

[2] Orme IM, Mcmurray DN, Belisel JT. Tuberculosis vaccine development: recent progress[J]. Trends Microbiol, 2001;9(3):115－118.

[3] Huygen K, Content J, Denis O, et al. Imunogenocity and protective efficacy of tuberculosis DNA vaccine[J]. Nat Med, 1996;2(8):857－859.

[4] Wiker HG, Nagai S, Harboe M, et al. A family of cross－acting proteins secreted by Mycobacterium tuberculosis[J]. Scand J Immunol, 1992;36(2):307－319.

[5] Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, et al. Differential protective efficacy of DNA vaccines expression secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1999; 67:1702－1707.

[6] 曹慧青,丁金凤. 多基因共表达载体的构建策略[J]. 国外医学分子生物学分册,2002;24(1):1－4.

(上接第 275 页)

参 考 文 献

[1] Arbuthnot P, Kew M. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma[J]. Int J Exp Pathol, 2001;82(2):77－100.

[2] Koike K, Tsutsumi T, Fujie H, et al. Molecular mechanism of viral hepatocarcinogenesis[J]. Oncology, 2002;62 Suppl 1:29－37.

[3] Tong—chuan He, Shibin Zhou, Luis T. Da Csta, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc. Natl. Acad. SCi. USA, 1998; Vol. 95, pp. 2509－2514.