维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0576－04

结核分枝杆菌 mtb8.4/hIL12 嵌合基因的克隆及真核表达质粒的构建

李 晖[1], 任小华[2], 钟 森[2], 任 红[1]

(1.重庆医科大学第二临床学院感染科,重庆 400010;2.泸州医学院附属医院感染病科,四川泸州 646000)

【摘 要】目的:克隆结核分枝杆菌 mtb8.4/hIL12 嵌合基因,构建其真核表达质粒,并进行鉴定。方法:采用基因工程技术,首先以 pcDNA 3.1(+)－mtb 8.4 为模板,经聚合酶链反应(PCR)扩增出 mtb 8.4－linker 基因,与 pCl－neo 载体进行连接重组,构建成 pCl－neo－mtb 8.4－linker(pML)重组质粒,然后以 pORF－hIL12 质粒为模板,经 PCR 扩增出 hIL－12 基因,将 hIL－12 基因与 pML 质粒进行连接重组,构建成 mtb 8.4/hIL12 嵌合基因真核表达质粒,用限制性内切酶消化、PCR 及 DNA 序列测定等多种分子生物学方法进行鉴定。结果:mtb 8.4/hIL12 嵌合基因重组真核表达质粒经证实构建成功。结论:mtb 8.4/hIL12 嵌合基因重组真核表达质粒的成功构建,为进一步研究其免疫保护效果及制备结核病 mtb 8.4/hIL12 嵌合基因疫苗奠定了基础。

【关键词】结核病;Mtb8.4;hIL－12;嵌合基因

【中国图书分类法分类号】R378.91⁺1 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－12－07

Construction and identification of the chimeric mtb8.4/hIL12 eukaryotic expression plasmid

LI Hui, et al

(*Department of Infectious Disease, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construct and identify the chimeric mtb8.4/hIL12 eukaryotic expression plasmid. *Methods*: Firstly mtb8.4－linker was amplified by PCR and cloned into the single Nhe Ⅰ and Mlu Ⅰ cloning sites of pCl－neo, so pCl－neo－mtb8.4－linker(pML) plasmid was constructed. Secondly hIL－12 was amplified by PCR and cloned into the single Mlu Ⅰ and Sal Ⅰ cloning sites of pML. Finally correct pCl－neo－mtb8.4/hIL12 (pMl) plasmid was identified by PCR, RE digestion and DNA seguencing. *Results*: The accuracy of pMl plasmid construction was confirmed by a number of molecular biological techniques. *Conclusion*: The construction of mtb8.4/hIL12 chimera by linkage of M. tuberculosis mtb8.4 gene to human IL12 gene provides the possibility for investigating a new tuberculosis vaccine.

【Key words】Tuberculosis;Mtb8.4;hIL－12;Chimeric gene

卡介苗(BCG)作为预防结核病的措施,免疫效果不确定,保护效率波动大(0～80%)[1],而目前 DNA 疫苗,尤其是嵌合 DNA 疫苗和 DNA 疫苗的联合免疫在结核病的预防上最具吸引力。本研究将人结核杆菌 mtb 8.4 和人白细胞介素 12(hIL－12)的编码基因进行连接重组,构建成 mtb 8.4/h IL12 嵌合基因真核表达质粒,为进一步研究其免疫保护效果及制备结核病 mtb 8.4/h IL12 嵌合 DNA 疫苗奠定了基础,可望通过基因免疫,获得免疫原性强、以低剂量即可有效刺激机体产生 T 细胞和 B 细胞应答、安全可靠的新型结核病疫苗。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒 pcDNA 3.1(+)－mtb 8.4(含人结核分枝杆菌 H37Rv 株 mtb 8.4 基因,不含信号肽),由本室构建[2];质粒 pORF－hIL12(含人 IL12 编码基因及两侧调控基因)购自美国 Invivogen 公司;质粒 pCl－neo 为重庆医科大学肝炎研究所惠赠,E. coli Top 10F' 购于晶美公司。Tag plus Ⅰ DNA

作者介绍:李 晖(1970－),女,博士生,主治医师,主要研究方向:感染性疾病的分子生物学和免疫学防治。

基金项目:四川省青年科技基金资助(批准号:川青科基[2002]1 号)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

polymerase、dNTP、限制性内切酶购自上海生工生物工程公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。小量质粒提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自 Promega 公司。胶回收试剂盒购自 Omega 公司。核酸分子量标准采用上海生工公司的 λPUC－mix 和 PUC19DNA/Msp Ⅰ。PCR 仪为英国 HYBAID 产品,型号 OMN－E。

1.1.2 寡核苷酸引物设计:根据发表的人结核分枝杆菌 H37Rv 株 mtb 8.4 的基因序列[3,4]和人 IL12 序列(GenBank 登录号 AF180562 和 AF180563)设计。P1 位于 mtb 8.4 基因的开放读码框架起始处,含 Nhe Ⅰ位点、起始密码 ATG 和 KOZAK 序列[3];P2 含接头,即 linker 和 Mlu Ⅰ位点,不含终止密码;P3 含 Mlu Ⅰ位点,不含起始密码;P4 含 Sal Ⅰ位点和终止密码 TTA,位于 hIL－12 基因的开放读码框架末端。以上引物均由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方法

1.2.1 mtb 8.4/hIL12 嵌合 DNA 真核表达质粒的构建

(1)pcDNA3.1(＋)－mtb 8.4 和 pORF－hIL12 质粒 DNA 的提取:采用 Promega 公司的小量质粒提取试剂盒,按试剂盒说明书操作。

(2)获取目的基因:以 pcDNA3.1(＋)－mtb 8.4 质粒为模板,P1、P2 为引物,扩增 mtb 8.4－linker 基因片段;PCR 条件参数为 94℃ 预变性 5min,热启动后转为 94℃ 变性 1min,57℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1.5min,进行 30 个循环后,72℃ 延伸 10min。以 pORF－hIL12 质粒为模板,P3、P4 为引物,扩增 hIL－12 基因;PCR 条件参数为 94℃ 预变性 5min,热启动后转为 94℃ 变性 1min,50℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1.5min,进行 30 个循环后,72℃ 延伸 10min。

(3)PCR 产物的纯化:采用 Promega 公司的 PCR 产物纯化试剂盒,按试剂盒说明书操作。

(4)PCR 和酶切产物的胶回收:采用 Omega 公司的小量胶回收试剂盒、按试剂盒说明书操作。

(5)限制性内切酶消化:使用上海生工公司的限制性内切酶,按试剂说明书操作。

(6)载体与目的基因连接,分别构建 pML 质粒和 mtb 8.4/hIL12 嵌合基因真核表达质粒。采用 Promega 公司的 T4 连接酶,按说明书操作,连接产物可直接用于转化。

(7)转化用上述连接产物转化 *E. coli* Top10F' 感受态细胞,按《分子克隆》[5]的方法进行。

1.2.2 mtb8.4/hIL12 重组嵌合质粒的鉴定:分别用限制性内切酶消化、PCR 及 DNA 序列分析等多种方法进行鉴定。

2 结 果

2.1 mtb 8.4/h IL12 嵌合 DNA 真核表达质粒(pMI)的构建

2.1.1 mtb 8.4－1inker 基因片段的准备:以 pcDNA3.1(＋)－mtb 8.4 质粒为模板的 PCR 产物取样电泳,获得约 300bp 的 mtb8.4－linker 片段,见图 1。

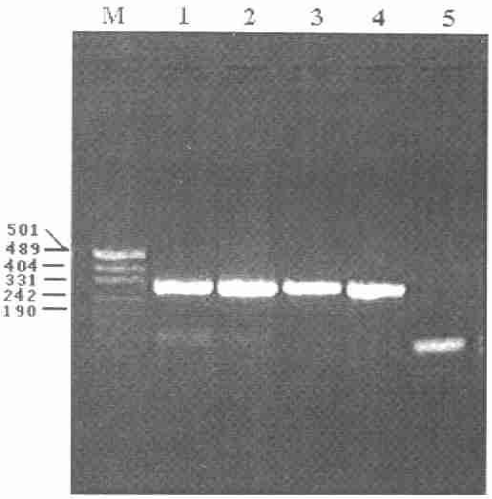


图 1 mtb8.4－linker PCR 扩增图

M pUC19DNA/Msp Ⅰ.Marker 1、2、3、4 mtb8.4－linker PCR 产物 5 空白对照(以灭菌双蒸水为模板)

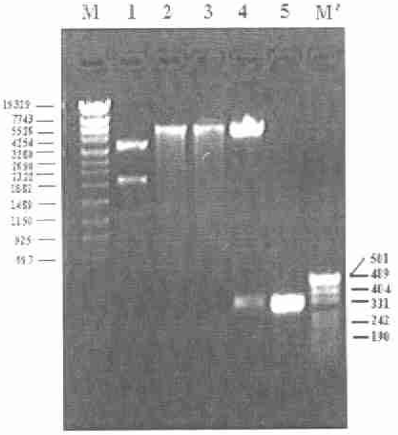


图 2 hIL－12 基因 PCR 扩增图

M Lamb da－p UC mix Marker 1、2、3 hIL－12 PCR 产物 4 灭菌双蒸水空白对照

2.1.2 pCI－neo 质粒载体的准备 首先提取 pCI－neo 质粒 DNA,然后用 Nhe Ⅰ和 Mlu Ⅰ双酶切该质粒,37℃,4h 后取全部酶切产物电泳,见质粒被切成线性,电泳速率较未酶切者低,位置靠后,胶回收大片段作为载体。

2.1.3 pCI－neo 质粒载体与 mtb 8.4－linker 目的基因连接,构建 pCI－neo－mtb 8.4－linker(pML)重组质粒,连接产物直接用于转化 *E. coli* Top10F' 感受态细胞,转化成功的细菌能在含氨苄青霉素的 LB(Luria－Bertani)固体培养基上长成菌落。从转化平板上选取生长良好的菌落,增菌后用 Promega 公司的小量质粒提取试剂盒提取质粒,所提质粒用

维普资讯 http://www.cqvip.com

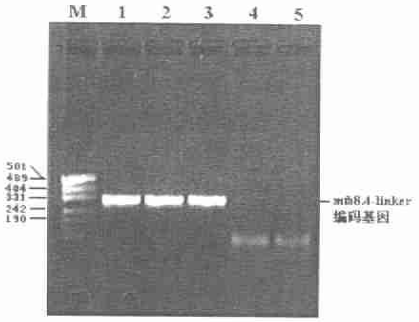


图 3 pML 质粒酶切鉴定图

M Lamb da－p UC mix Marker 1 pML 质粒经 Pau Ⅰ酶切产物 2 pCI－neo 质粒经 Pau Ⅰ酶切产物 3 pCI－neo 质粒经 Nhe Ⅰ/MIu Ⅰ酶切产物 4 pML 质粒经 Nhe Ⅰ/MIu Ⅰ酶切产物 5 以 pcDNA3.1(＋)－mtb8.4 质粒为模板的 PCR 产物 M'pUC19DNA/Msp Ⅰ marker

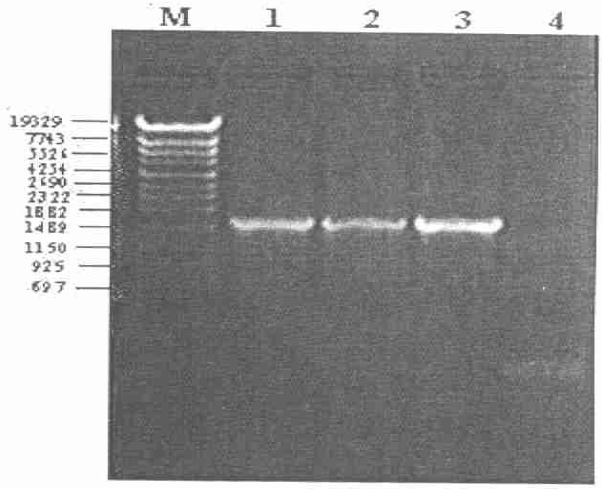


图 4 pML 质粒 PCR 鉴定图

M marker (pUC19DNA/Msp Ⅰ) 1、2、3 以 pML 质粒为模板的 PCR 产物 4 空白对照(以灭菌以蒸水为模板) 5 阴性对照(以 pCI－neo 质粒为模板)

于鉴定。

2.1.4 pML 质粒载体的准备 首先提取 pML 质粒 DNA，然后用 Mlu Ⅰ 和 Sal Ⅰ 双酶切该质粒，37℃，4h 后取全部酶切产物电泳，见质粒被切成线性，电泳速率较未酶切者低，位置靠后，胶回收大片段作为载体。

2.1.5 hIL－12 基因片段的获取 以 pORF－hIL12 质粒为模板的 PCR 产物取样电泳，获得约 1600bp 的 hIL－12 基因片段，见图 2。

2.1.6 pML 质粒载体与 hIL－12 目的基因连接，构建 mtb 8.4/hIL12 重组嵌合质粒，连接产物直接用于转化 *E. coli* Top10F' 感受态细胞，转化成功的细菌能在含氨苄青霉素的 LB(Luria－Bertani)固体培养基上长成菌落。从转化平板上选取生长良好的菌落，增菌后用 Promega 公司的小量质粒提取试剂盒提取质粒，所提质粒用于鉴定。

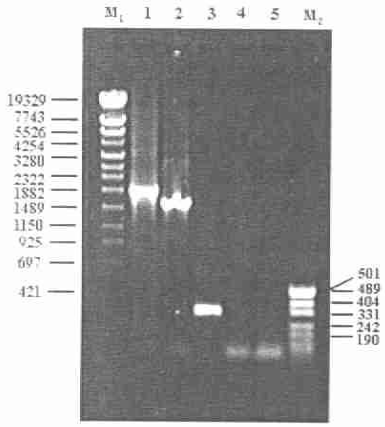


图 5 pMI 嵌合质粒酶切鉴定图

M_1 Lamb da－p UC mix Marker 1 pMI 嵌合质粒经 Mun Ⅰ酶切产物 2 pMI 嵌合质粒经 Kpn Ⅰ酶切产物 3 pMI 嵌合质粒经 Nhe Ⅰ/Sal Ⅰ双酶切产物 4 pMI 嵌合质粒经 Mlu Ⅰ/Sal Ⅰ双酶切产物 5 pMI 嵌合质粒经 Nhe Ⅰ/Mlu Ⅰ双酶切产物 M_2 pUC19DNA/Msp Ⅰ Marker

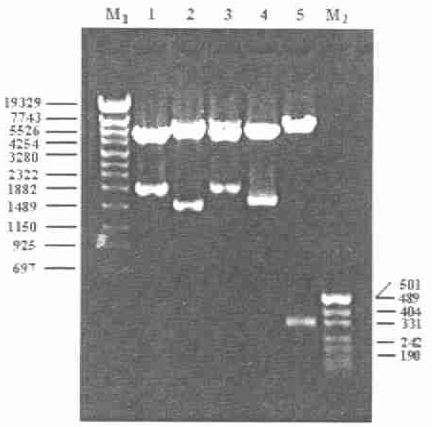


图 6 PMI 嵌合质粒的 PCR 鉴定图

M_1 Lambda－p UC mix Marker 1 以 pMI 嵌合质粒为模板，P1 和 P4 为引物的 PCR 产物 2 以 pMI 嵌合质粒为模板，P3 和 P4 为引物的 PCR 产物 3 以 pMI 嵌合质粒为模板，P1 和 P2 为引物的 PCR 产物 4 阴性对照(以 pCI－neo 质粒为模板) 5 灭菌双蒸水空白对照 6 pUC19DNA/Msp Ⅰ Marker

2.2 重组质粒的鉴定

2.2.1 pCI－neo－mtb8.4－linker(pML)重组质粒的鉴定

(1)限制性内切酶消化鉴定：pML 重组质粒经 Pau Ⅰ酶切后，电泳可见 2025bp 和 3739bp 两片段，原质粒 pCI－neo 经 Pau Ⅰ酶切后，仅见 5.4kb 片

维普资讯 http://www.cqvip.com

段;pML 重组质粒经 Nhe Ⅰ和 Mlu Ⅰ双酶切后,电泳可见 300bp 和 5.4kb 两片段,原质粒 pCI－neo 经 Nhe Ⅰ和 Mlu Ⅰ双酶切后,仅见 5.4kb 片段。结果见图 3。

(2)PCR 鉴定:以 P1、P2 为引物,pML 质粒为模板者扩增出约 300bp 的产物,而以 pCI－neo 质粒为模板的阴性对照和灭菌双蒸水空白对照均未能扩增出相应产物,见图 4。

(3)DNA 序列分析鉴定:上海基康公司对重组 pML 质粒 Nhe Ⅰ和 Mlu Ⅰ酶切位点之间的碱基序列进行测序,结果与所设计的人结核杆菌 H37Rv 株的 mtb 8.4 基因加 45bp 接头序列完全相同[3,4],表明 pML 重组质粒构建成功。

2.2.2 mtb 8.4/h IL12 重组嵌合质粒(pMI)的鉴定:

(1)限制性内切酶消化鉴定:pMI 嵌合质粒经 Mun Ⅰ酶切后,电泳可见 1920bp 和 5.4kb 两片段;经 Kpn Ⅰ酶切后,可见 1510bp 和 5.8kb 两片段;经 Nhe Ⅰ和 Sal Ⅰ双酶切后,可见 1923bp 和 5.4kb 两片段;经 Mlu Ⅰ和 Sal Ⅰ双酶切后,电泳可见 1614bp 和 5.7kb 两片段;经 Nhe Ⅰ和 Mlu Ⅰ双酶切后,电泳可见 300bp 和 7kb 两片段。见图 5。

(2)PCR 鉴定:以 P1、P4 为引物,pMI 嵌合质粒为模板者扩增出约 1.9kb 的产物,即 mtb 8.4/hIL12 嵌合基因而以 pCI－neo 质粒为模板的阴性对照和灭菌双蒸水空白对照未能扩增出相应产物;以 P3、P4 为引物,pMI 嵌合质粒为模板者扩增出约 1.6kb 的产物,即 hIL－12 基因;以 P1、P2 为引物,pMI 嵌合质粒为模板者扩增出约 300bp 的产物,即 mtb 8.4－linker 基因。见图 6。

2.4 测序鉴定

上海基康公司测 pMI 重组嵌合质粒 Nhe Ⅰ和 Sal Ⅰ酶切位点之间的碱基序列,结果与人结核分枝杆菌 H37Rv 株的 mtb 8.4[3,4] 及人 IL－12(GenBank 登录号 AF180562 和 AF180563)的基因序列完全相同,二者之间包括 45bp 的接头,表明 pMI 嵌合真核表达质粒构建成功。

3 讨 论

由于耐药分支杆菌的广泛传播、HIV/AIDS 的大量流行和人口流动等因素,使结核病再次成为目前全球性的严重公共卫生问题,引起了国际社会的极大关注[6]。本研究旨在寻找对结核有良好免疫保护效果的安全、有效、廉价的新一代疫苗。

Mtb 8.4[7]是新近从结核杆菌 H37Rv 株培养滤液(CF)中纯化分离出的一种低分子量蛋白抗原,由于其成熟蛋白(不含信号序列)分子量为 8.4kD 而得名。重组 Mtb 8.4(rMtb 8.4)能诱导强烈的体液免疫反应;产生高水平的 IgG1 和 IgG2a;能诱导 C57BL/6 小鼠产生强烈的 Mtb 8.4 特异性 Th1 型细胞免疫反应,分泌高水平的 IFN－γ,产生对感染细胞有强溶解能力的细胞毒性 T 细胞(CTL),减少免疫鼠脾脏和肺中的细菌数,保护小鼠抵御毒性结核杆菌的攻击。从 Mtb 8.4 免疫鼠和结核杆菌感染鼠的脾脏和肺中均可检测到 Mtb8.4 的特异性 CTL,这与其它分枝杆菌疫苗候选抗原如 Ag85A 有所不同,结核杆菌感染鼠的脾和肺中无法检测到 Ag85A 特异性 CTL。通过免疫小鼠发现,rMtb8.4 能诱导出与 BCG 免疫相当的保护水平,且与 ESAT－6、MPT64、MPT63 和 KatG 四种 DNA 质粒联合免疫产生的免疫保护水平相同,显示该抗原有很大的开发潜力,可望成为结核病 DNA 疫苗的候选抗原或作为亚单位疫苗的组分,用于结核病的预防。

白细胞介素 12(interleukin－12,IL－12)又名细胞毒淋巴细胞成熟因子(cytotoxic lymphocyte maturation factor,CLMF),或自然杀伤细胞刺激因子(natural killer cell stimulation factor,NKSF),是一种分子量为 75KD 的糖蛋白,由 40kD 和 35kD 两个亚基组成的异二聚体。具有广泛的免疫效应,可促进自然杀伤细胞和 T 细胞的增殖及杀伤作用、促使细胞因子尤其是 IFN－γ 的分泌、诱导抗原特异性辅助性 T 细胞(Th)向 Th1 型分化[8]。Kim 等[8]将包含鼠 IL－12 基因的质粒与包含 HIV－1 抗原基因的质粒联合免疫小鼠,发现小鼠特异性 CTL 反应明显增强。另有研究表明[9],IL－12 在体内外均能高效激发并维持结核早期保护性的 Th1 型应答,因此 IL－12 可作为结核疫苗的佐剂。

为提高单一 Mtb 8.4DNA 疫苗的免疫保护效果,本研究将对结核分枝杆菌攻击具有明显保护作用的 Mtb 8.4 和 hIL－12 的编码基因借一中间接头 $(Gly_4Ser)_3$ 连接到一起,进行拼接重组,构建成 mtb 8.4/h IL12 嵌合质粒,该中间接头提供了足够的空间和柔软性,能使 mtb 8.4 和 hIL－12 不互相干扰,各自折叠成有活性的蛋白分子,从而(下转第 587 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

粘附复合物,使胚泡滋养层与子宫内膜的粘附得到加固。当有细胞角蛋白 8 和 18 存在时,三者之间的结合明显加强[9]。对 Trophinin 等粘附分子进一步的功能研究将有助于揭示胚泡着床机理和探索不孕机制。

参 考 文 献

[1] Fukuda MN, Sato T, Nakayama J, et al. Trophinin and tastin, a novel cell adhesion molecule complex with potential involvement in embryo implantation[J]. Genes Dev, 1995;9(10):1199-1210.

[2] Fukuda MN, Nozawa S. Trophinin, tastin, and bystin: a complex mediating unique attachment between trophoblastic and endometrial epithelial cells at their respective apical cell membranes[J]. Semin Reprod Endoerinol, 1999;17(3):229-234.

[3] Suzuki N, Nadano D, Paria BC, et al. Trophinin expression in the mouse uterus coincides with implantation and is hormonally regulated but not induced by implanting blastocysts[J]. Endocrinology, 2000;141(11):4247-4254.

[4] Tabibzadeh S. Molecule control of the implantation window[J]. Human Reprod Update, 1998;4(5):465-471.

[5] Aoki R, Fukuda MN. Recent molecular approaches to elucidate the mechanism of embryo implantation: trophimn, bystin, and tastin as molecules involved in the initial attachment of blastocysts to the uterus in humans[J]. Semm Reprod Med, 2000;18(3):265-271.

[6] 王华云,陈士玲. Trophinin、bystin、tastin 粘附分子复合体与着床[J]. 国外医学计划生育分册, 2002;21(2):80-82.

[7] 肖丽鹃,杨增明. Trophinin、bystin 和 tastin 在哺乳动物胚胎着床及早期胎盘形成中的作用[J]. 生殖医学杂志, 2002;11(2):120-123.

[8] Kimber SJ. Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation[J]. Semin Reprod Meal, 2000;18(3):237-253.

[9] Suzuki N, Zara J, Stto T, et al. A cytoplasmic protein, bystin, interacts with Trophinin, tastin, and cytokeratin and may be involed in trophinin-mediated cell adhesion between trophoblast and endometrial epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998;95(9):5027-5032.

(上接第 579 页)发挥高效的生物学活性[11]。mtb 8.4/h IL12 嵌合 DNA 质粒的构建成功,为进一步研制 mtb 8.4/h IL12 嵌合 DNA 疫苗奠定了基础,该嵌合 DNA 疫苗可望将宿主免疫反应向更强的 Th1 型细胞反应转化,诱导强烈的特异性 CTL 反应,以达到对结核病的良好预防作用[12]。mtb 8.4/hIL12 嵌合 DNA 质粒在真核细胞的表达及对感染小鼠的免疫保护效果将另文发表。

参 考 文 献

[1] Baldwin SL, D'Souza C, Roberts A D, et al. Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis [J]. Infect. Immun. 1998;66(6):2951-2959.

[2] 李 晖,钟 森,任 红,等. 结核分枝杆菌新抗原 mtb8.4 基因的克隆及真核表达载体的构建[J]. 四川医学, 2003;23(5):448-450.

[3] Coler. RN, Skeiky YAW, Vedvick T, et al. Molecular cloning and immunologic reactivity of a novel low molecular mass antigen of Mycobacterium tuberculosis[J]. J. Immunol, 1998;161:2356-2364.

[4] Coler. RN, Campos-Neto A, Ovendale P, et al. Vaccination with the T cell antigen Mtb8.4 protects against challenge with Mycobacterium tuberculosis[J]. J. Immunol, 2001;166:6227-6235.

[5] 金冬雁,黎孟枫,译. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社, 1992;(2):55-56.

[6] Orme IM. Progress in the development of new vaccines against tuberculosis[J]. Int. J. Tuberc. Lung. Dis, 1997;1(2):95-100.

[7] 李 晖. 一种新的分枝杆菌抗原 Mtb8.4[J]. 国外医学流行病学传染病学分册, 2002;29(1):35-36.

[8] Kim JJ, Ayyavoo V, Bagarazzi ML, et al. In vivo engineer of a celluar immune response by coadministration of IL-12 expression vector with a DNA immuogen[J]. J. Immunol, 1997;158:816-826.

[9] 陈 敬. 白细胞介素-12 与结核病[J]. 国外医学 呼吸系统分册, 2002;22(4):220-222.

[10] 吴秋茜,姜宇飞,陈慰峰,等. hIL-7-GM-CSF(7-127)融合蛋白的构建和 E. coli 表达[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 1998;18(1):52-57.

[11] Delogu G, Howard A, Collins FM, et al. DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberxulosis protein enhances antimycobacterial immunity[J]. Infect. Immun, 2000;68(6):3097-3102.