维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)06－0697－04

用结核分枝杆菌 HSP70 启动子构建分枝杆菌穿梭表达质粒的研究

陈　全，朱道银，骆旭东，蒋　英，江　山

(重庆医科大学基础医学院微生物学教研室，重庆　400016)

【摘　要】目的：用结核分枝杆菌 HSP70(Heat shock protein70，HSP70)启动子改建分枝杆菌穿梭质粒 pJEM11 为分枝杆菌穿梭表达质粒。方法：利用聚合酶链反应(Polymerase chain reaction，PCR)扩增 H37Rv 基因组 419607～419835 位的 HSP70 启动子及调控序列，末端引入一个多克隆位点(Multiple clone sites，MCS)，再定向克隆入 pJEM11 的 ApaI 位点与 XbaI 位点之间，构建 pJCH02 载体，并对载体进行酶切鉴定及序列测定。将 lhp－esat6 融合基因克隆入 pJCH02 载体，评价其在 BCG 中的表达情况。结果：HSP70 启动子、调控序列及引入的多克隆位点完全正确，lhp－esat6 基因在 BCG 中成功表达。结论：成功改建穿梭质粒 pJEM11 为穿梭表达质粒 pJCH02。本研究为构建 BCG 多价疫苗奠定了基础。

【关键词】结核分枝杆菌；热休克蛋白；启动子；基因表达

【中国图书分类法分类号】R378.91^{+1}；R34　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2003－03－19

Construction of the Mycobacterium shuttle expression plasmid with Mycobacterium tuberculosis heat shock protein 70 promoter

CHEN Quan, et al

(*Department of Microbiology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To reconstruct Mycobacterium shuttle expression plasmid with Mycobacterium tuberculosis HSP70 promoter based on shuttle plasmid pJEM11. *Methods*: The cDNA fragment of 229bp promoter and its correlative sequence was amplified by PCR. Multiple clone sites was added to the end of amplified fragment, and then it was cloned into the pJEM11 to construct the plasmid pJCH02. The pJCH02 was identified by digestion with restriction endonuclease and sequence analysis. The lhp－esat6 fusion gene was cloned into the pJCH02, then its expression in BCG was confirmed by SDS－PAGE. *Results*: The sequence of HSP70 promoter and its correlative sequence was in accordance with the predicted sequence. The lhp－esat6 fusion gene was expressed in BCG. *Conclusion*: The shuttle expression plasmid pJCH02 is constructed successfully. The study provides the basis for BCG polyvaccine.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis(MTB); Heat shock protein; Promoter; Gene expression

BCG 是牛型分枝杆菌的减毒株，在全世界已经广泛用于预防结核病，迄今已半个多世纪。由于其还有免疫佐剂的作用[1]，因此国内外科学家正致力于将 BCG 发展成为一种重组多价活疫苗，使它成为一种能携带多种外源免疫保护抗原的疫苗载体，不仅能预防结核病，同时也能预防其它感染性疾病，甚至具有抗肿瘤的活性[2]。要在 BCG 中表达外源基因，首先要一个能被 BCG DNA 依赖的 RNA 聚合酶识别、可控的强启动子。因为 HSP70 具有高度的保守性，能在多种应激反应下大量表达，因此利用 HSP70 的启动子作为 BCG 中调控外源基因表达的启动子，既有利于启动外源基因的表达，又易于通过应激对其转录进行调控。程继忠等用结核分枝杆菌 HSP70 的启动子在耻垢分枝杆菌中就表达了多种外源基因[3]。我们用结核分枝杆菌 HSP70 启动子将穿梭质粒 pJEM11 改建成分枝杆菌穿梭表达质粒，为今后构建以 BCG 为载体的疫苗提供一可供选择的工具载体。

作者介绍：陈　全(1969－　)，男，讲师，博士，主要研究方向：MTB 感染与免疫。

1　材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 pfu DNA 聚合酶、dNTP、XbaI、ApaI 由上海生工公司提供，DNA Marker 由大连宝生物公司提供。

1.1.2 质粒和菌株 质粒 pJEM11 由巴斯德研究所 Jean Rauzier 博士惠赠，质粒 pQE30 - CFP10 - ESAT6 为本室购建，H37Rv 结核分枝杆菌为本室收藏，Top10 大肠杆菌由本校肝炎研究所黄爱龙教授惠赠，BCG 由重庆市防疫站提供。

1.2 方法

1.2.1 HSP70 启动子及调控序列的扩增

1.2.1.1 DNA 模板的制备 取 H37Rv 固体培养物少许和 1 滴含 0.5% 吐温 80 的生理盐水共同碾磨成悬液，1.5ml PBS 洗涤，离心后去上清，用基因组提取试剂提取 MTB DNA。

1.2.1.2 引物合成及 PCR 扩增 根据 H37Rv 基因组 419607～419835 位的 HSP70 启动子序列及调控序列自行设计一对引物：P1：5′ - ATGGGCCC - GCACTGCTCTC-CGGGCTTGAC - 3′；P2：5′ - GTCTAGA - GTCGAC - TACGTA - TCCGGA - GGATCC - CCGCGG - GGTACC - CATGGTGAATCCTCCTGAATATGT - 3′。P1 的 5′端引入 ApaI 酶切位点，P2 的 5′端引入 1 MCS(包括 XbaⅠ、SalⅠ、SnaBⅠ、BspEⅠ、SacⅡ、KpnⅠ等酶切位点)。PCR 扩增条件为：95℃ 预变性 3min，95℃ 变性 50s，57℃ 退火 50s，72℃ 延伸 50s，共循环 30 次，最后 72℃ 继续延伸 5min。

1.2.2 质粒 pJCH02 的构建(图 1)

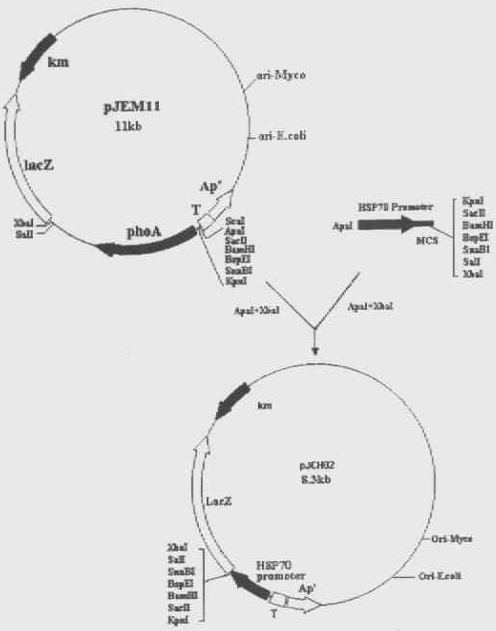


图 1 质粒 pJCH02 构建示意图

1.2.2.1 目的基因和载体大片段的制备 PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳后，用胶回收试剂盒回收目的基因片段，用 XbaⅠ及 ApaⅠ酶对回收产物作双酶切，然后用回收试剂盒回收酶切混合物中两端分别带有相应粘端的目的基因。用质粒提取试剂盒提取 pJEM11 质粒，用 XbaⅠ及 ApaⅠ酶对质粒作双酶切，酶切混合物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后，胶回收 8kb 载体大片段。

1.2.2.2 连接与转化 取上述 8μl HSP70 启动子基因片段及 2μl 载体大片段，与 10μl 连接试剂Ⅰ混匀后置 16℃ 连接 1h，然后转化已制备的 Top10 感受态细菌，用含 25μg/ml 的卡拉霉素筛选重组子。

1.2.3 重组质粒 pJCH02 的鉴定

1.2.3.1 酶切鉴定 用 XbaI 及 ApaI 酶对 pJCH02 进行双酶切鉴定。

1.2.3.2 DNA 序列分析 以质粒 pJEM11 XbaI 位点下游的一段序列为测序引物对克隆的 HSP70 启动子及 MCS 进行测序，由上海博亚生物公司完成。

1.2.3.3 pJCH02 表达功能的鉴定 以 pQE30 - CFP10 - ESAT6 为模板，用 PCR 扩增 633bp lhp - esat6 融合基因，然后定向插入质粒 pJCH02 的 KpnI 及 XbaI 位点之间，构建 pJCH02 - CFP10 - ESAT6 质粒。经酶切鉴定及序列分析后，再取 10μl 重组质粒用基因导入仪转化进对数生长期 BCG 菌中，用含 25μg/ml 卡拉霉素的 Sauton's 固体培养基筛选重组子，再通过 PCR 鉴定转化成功的 BCG 菌。于含 10% 的牛血清白蛋白和 0.05% Tween 80 的 Sauton's 液体培养基培养 BCG 表达菌。37℃ 培养至对数生长期(A_{600}为 0.5～1.0，培养大约 20 天)后，每天 45℃ 热诱导 45min，3 天后收集菌体，经超声碎菌后，加入等体积 2×SDS 加样缓冲液，100℃ 水浴处理 6min，用 12% 的分离胶和 5% 的积层胶作 SDS - PAGE(1.2.3.3 详细情况另文报道)。

2 结 果

2.1 HSP70 启动子及调控序列的扩增

以 H37Rv DNA 为模板，扩增出 280bp 基因片段，与预计值相符(HSP70 启动子及调控序列 229bp，上游引入的酶切位点及保护碱基 8bp + 下游引入的酶切点及保护碱基 43bp，合计 280bp)(图 2)。

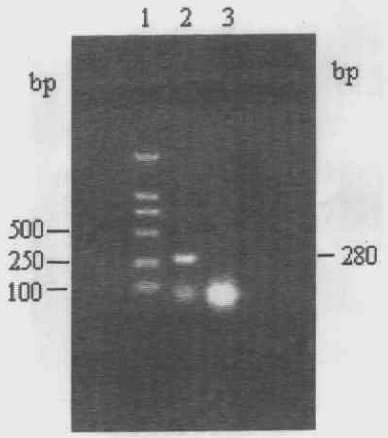


图 2 PCR 扩增 HSP70 启动子片段

1. DNA marker 2. HSP70 启动子扩增片段 3. 灭菌水对照

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 重组质粒 pJCH02 的双酶切鉴定

由于 HSP70 启动子及 MCS 是插入 11kb 的 pJEM11 质粒的 ApaI 及 XbaI 酶切位点之间，取待了原有的约 3kb 的碱性磷酸酶基因和 MCS，用 ApaI 及 XbaI 酶切后产生约 8kb 和 280bp 片段，初步表明重组质粒构建成功，将该重组质粒命名为 pJCH02 (图 3)。

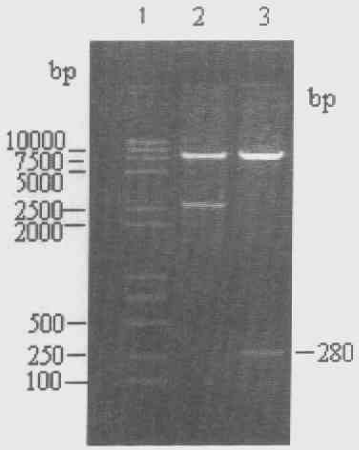


图 3 重组质粒 pJCH02 的双酶切鉴定

1. DNA marker 2. pJEM11/ApaI + XbaI 3. pJCH02/ApaI + XbaI

2.3 重组质粒 pJCH02 的序列分析

对启动子及 MCS 测序的结果表明，229bp 的 HSP70 启动子以及位于起始密码后的 42bp 的 MCS 序列与预计序列完全一致。序列如下：

GGGCCCGCACTGCTCTCCGGGCTTGACCGG
GGCCTCTCCCAGCTACGCCCCGAGCGTGTGCCC
TGCCGACACGCGGGAACAAGACCCGCACGACC
AGCGTTAGCATGCTCAGTAAG TTGAG TGCATC
−35
AGGCTCAGCTCTGAATTGACAGCACACCGCCG
TCGAGGCAAGCTTGAGCGGGGTGCACTCATCAT
−35 → −10
AGTGCAGGAAAGAAGCTCTACATATTCAGGAG
← SD
G ATTCACC ATG GGTACC CCGCGG GGATCC
Met KpnI SacII BamHI
TCCGGATACGTAGTCGACTCTAGA(SD 为 Shine
BspEI SnaBI SalI XbaI
−Dalgarno 位点；Met 为起始密码；−35 和 −10 为 E. coli 启动子中的相应区域；→和←为反向重复序列)

2.4 pJCH02 表达功能的鉴定

将 lhp−esat6 融合基因定向克隆入 pJCH02 构建 pJCH02−CFP10−ESAT6 质粒，用电穿孔法将其转化入 BCG 中进行表达，经 SDS−PAGE 分析表明，BCG 表达菌经 45℃ 热诱导后表达出了 26kDa 的目的蛋白(与 633bp 的 lhp−esat6 融合基因编码产物的理论分子量基本相符)，证实了以 pJEM11 为基础的重组分枝杆菌穿梭表达质粒 pJCH02 具有在 BCG 中表达外源基因的功能(图 4)。

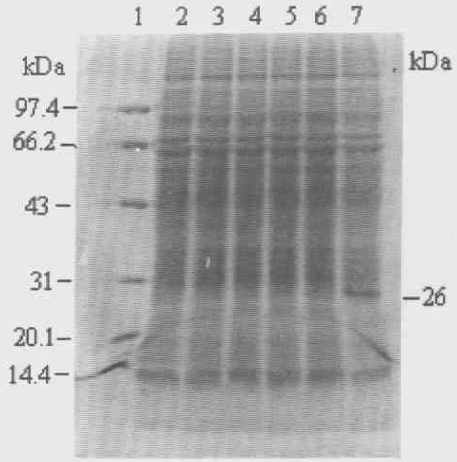


图 4 lhp−esat6 融合基因在 BCG 中的表达

1. 蛋白质分子量标准 2. BCG 菌 3. 热诱导的 BCG 菌 4. pJCH02BCG 菌 5. 热诱导的 pJCH02 BCG 菌 6. pJCH02−CFP10−ESAT6 BCG 菌 7. 热诱导的 pJCH02−CFP10−ESAT6BCG 菌

3 讨 论

基因工程技术的应用促进疫苗研究的发展，目前已得到多种重组 BCG 疫苗，实验证明有较好的保护力[4]。要构建重组 BCG 疫苗，可以通过同源重组和分枝杆菌穿梭表达质粒的方法来实现。外源基因要在 BCG 中高效表达是由高效可控的启动子、适当的 SD 序列等因素共同决定的。HSP70 启动子属于细菌中高度保守的高效启动子，且在巨噬细胞吞噬后能诱导 HSP70 的高水平表达，正如在 E. coli 中的 tac 启动子可用异丙基硫代−β−D−半乳糖苷(IPTG)来控制外源基因的表达水平一样，分枝杆菌 HSP70 启动子也可通过加热或过氧化物诱导等来调控目的基因的表达[5]。本研究选用 HSP70 启动子及相关序列作为分枝杆菌穿梭表达质粒的调控元件，在其下游引入起始密码和 MCS 构建 pJCH02 载体，并以 lhp−esat6 融合基因在 BCG 中的表达为例，评价该载体在 BCG 中表达外源基因的功能。结果表明，含有 pJCH02−CFP10−ESAT6 的 BCG 菌经 45℃ 热诱导成功表达了 26kDa 的融合蛋白，而非

维普资讯 http://www.cqvip.com

热诱导 rBCG 及对照的 BCG 菌没出现相应蛋白条带(图 4),说明 HSP70 启动子通过热诱导的调控启动了外源基因在 BCG 中的大量表达,而非热诱导的 rBCG 菌由于融合蛋白表达量少,不能通过 SDS-PAGE 检测出来。

pJEM11 是巴斯德研究所开发的一种用于研究结核分枝杆菌基因组中某一段基因是否是具有启动子、信号肽等序列的完整基因,具有大肠杆菌-分枝杆菌复制子和卡拉霉素抗性基因。在 pJEM 11 MCS 的下游有碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, PhoA)的编码序列(Coding sequence, CDS),但是缺乏启动子和信号肽。将待分析的基因片段插入其 MCS 后,如果这段基因有启动子、信号肽及 CDS,则可以编码其蛋白与 PhoA 融合表达并分泌到胞外,通过筛选培养基中的对硝基苯磷酸盐底物的作用而呈现出有色菌落。本研究将质粒 pJEM11 的 XbaI 与 ApaI 位点之间的 MCS、phoA 基因切除,由 HSP 启动子及重新分布的 MCS 替代。经过序列分析,在起始密码 ATG 的上游 -12 ~ -18 核苷酸处可见 SD 顺序 GGAGG,在 ATG 上游 -45 处可见与 E. coli -10 区 TATAAT 同源的序列 ATCATA,在 -64 和 -116 两处可见与 E. coli -35 位高度同源的序列 TTGAG,在 -10 区两侧存在着反向重复序列 TGCACT,与程继忠等报道一致[6]。由于存在这些表达必须的调控元件以及位于 MCS 下游的转录终止序列,lhp-esat6 融合基因在 BCG 中成功的表达了相应蛋白。本穿梭表达质粒的成功构建,为开发 BCG 为多价疫苗提供了一个可供选择的工具载体。

参 考 文 献

[1] Gheorghiu M, Lagranderie MR, Gicquel BM, et al. Mycobacterium bovis BCG priming induces a strong potentiation of the antibody response induced by recombinant BCG expressing a foreign antigen[J]. Infect Immun, 1994;62(10):4287-4295.

[2] Fujimoto T, O' Donnell MA, Szilvasi A, et al. Bacillus Calmette-Guerin plus interleukin-2 and/or granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor enhances immunocompetent cell production of interferon-gamma, which inhibits B16F10 melanoma cell growth in vitro[J]. Cancer Immunol Immunother, 1996;42(5):280-284.

[3] 程继忠,皇甫永穆,冯作化,等.人结核杆菌热休克蛋白 70 启动子对外源基因在分枝杆菌中表达的影响[J].中华微生物学和免疫学杂志,1997;17(6):410-415.

[4] Stover CK, Bansal GP, Hanson MS, et al. Protective immunity elicited by recombinant bacillus Calmette-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A(OspA) lipoprotein: a candidate Lyme disease vaccine[J]. J Exp Med, 1993;178(1):197-209.

[5] Aldovini A, Yong RA. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines[J]. Nature, 1991 Jun 6;351(6326):479-482.

[6] 程继忠,梁驹卿,肖 红,等.人结核杆菌热休克蛋白 70 和卡介苗 α 抗原基因启动子序列测定[J].同济医科大学学报,1997;26(5):331-335.

(上接第 687 页)

[3] 吴传新,刘长安,乔天愚,等.兔乳腺移植性鳞癌模型的建立及其生物学特征的观察[J].重庆医科大学学报,1999;24(2):137-140.

[4] Hart TG, Rivens I, Chen L, et al. High intensity focused ultrasoud for the treatment of rat tumors[J]. Phys Med Biol, 1991;36(10):1459-1462.

[5] Prat F, Centarti M, Sibille A, et al. Extracorporeal high intensity focused ultrasound for VX_2 liver tumors in the rabbit [J]. Hepatology, 1995;21(3):823-826.

[6] Sibille A, Prat F, Chapelon JR, et al. Characterization of extracorporeal ablation of normal and tumor-bearing liver tissue by high intensity focused ultrasound[J]. Ultrasound Med Biol, 1993;19(9):803-813.

[7] Oosterhof GOX; Cornel EB, Smits GAV, et al. Influence of high intensity focused ultrasound on the development of metastases[J]. EurUrol, 1997;32(1):91-95.

[8] Chapelon JY, Margonari J, Vernier F, et al. In vivo effects of high intensity focused ultrasound on prostatic adenocarcinoma Dunning R_{3327}[J]. Cancer Res, 1992;52(22):6353-6357.

[9] Bataille N, Vallancien G, Chopin D. Antitumoral local effect and metastatic risk of extracorporeal on Dunning R_{3327} tumors[J]. Eur Urol, 1996;29(1):72-77.