维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)02－0125－02

结核分枝杆菌 MPT64 真核表达质粒的构建及其表达

骆旭东，陈　全，蒋　英，江　山，朱道银

(重庆医科大学微生物教研室,重庆　400016)

【摘　要】目的:构建结核分枝杆菌 MPT64 真核表达质粒,并在真核细胞中表达。方法:从 H37Rv 基因组中扩增出 MPT64 基因,经限制性内切酶消化后,定向插入 pcDNA3.1(＋)中,用脂质体法将 pcDNA－MPT64 转染 COS－7 细胞,采用 RT－PCR、ELISA 和斑点印迹法检测其表达。结果:扩增出的 MPT64 基因正确插入 pcDNA3.1 中,DNA 序列测定无突变产生。重组质粒在 COS－7 细胞中表达了 MPT64。结论:成功地构建了 pcDNA－MPT64 质粒,其真核表达的蛋白具有良好的抗原性,为进一步研究 MPT64 在抗结核菌感染中的预防作用奠定了基础。

【关键词】结核分枝杆菌;MPT64;真核表达质粒

【中国图书分类法分类号】R378.91＋1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－06－17

Construction and expression of the eukaryotic expression plasmid encoding mycobacterium tuberculosis MPT64

LUO Xudong, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To construct the recombinant eukaryotic plasmid encoding Mycobacterium tuberculosis MPT64 and detect its expression in COS－7 cell lines. *Methods*: The gene encoding MPT64 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from H37Rv genome, and the fragment was inserted into pcDNA3.1(＋) after restriction endonuclease digestion. The recombinant plasmid pcDNA MPT64 was transfected into COS－7 cell lines with liposome, and expressed MPT64 in COS－7 cell was detected by RT－PCR, ELISA and dot blotting. *Results*: The sequence of MPT64 gene in recombinant plasmid was the same as that of reported, and recombinant MPT64 protein was expressed in COS－7 cell lines. *Conclusion*: The recombinant plasmid pcDNA MPT64 was constructed successfully, and MPT64 protein expressed in COS－7 cell has antigenicity. The results established the basis for further studies on MPT64 function.

【Key words】 Mycobacterium tuberculosis; MPT64; Eukaryotic expression plasmid

结核病仍是严重威胁人类健康的传染病。由于卡介苗(BCG)对不同人群的保护效果差异较大(0～80%)[1,2],因此人们正致力于寻找较 BCG 更有效的疫苗。MPT64 是结核分枝杆菌早期培养基滤液中具有较强免疫原性的蛋白质之一,一些 BCG 菌株中缺乏该成分[3]。本研究从 H37Rv 基因组中扩增出 MPT64 编码基因,构建其真核表达质粒并在 COS－7 细胞中表达,为进一步确定 MPT64 在预防结核菌感染中的作用奠定了基础。

作者介绍:骆旭东(1964－),男,副教授,博士生,
主要研究方向:耐多药结核的生物治疗及其 DNA 疫苗。

基金项目:重庆市卫生局重点项目(00－1006)。

1　材料和方法

1.1　材料

H37Rv 购自中国微生物菌种保藏中心,pfuTaq DNA 聚合酶、dNTP、T4DNA 连接酶、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自上海生工,PCR 纯化试剂盒为 Omega 产品,*BamH*I、*Hind*III 购自 NEB 公司,1640 和胎牛血清为 Hyclone 产品;PVDF 膜、HRP 标记的羊抗人 IgG、二氨基联苯胺(DAB)等购自北方同正,人结核杆菌抗血清由重庆市结核病院检验科提供。pcDNA3.1(＋)、Ecoli,Top10 为本室保存。

1.2　真核表达质粒的构建

根据 H37Rv MPT64 基因全序列设计引物,P_1 5′－AAGCTTATG－GTGCGCATCAAGATCTT－3′ 含 *Hind*III 酶切位点和 ATG 起始密码子;P_2 5′GGA TCC CTA GGC CAG CAT CGA GTC－3′ 含 *BamH*I 酶切位点和 TGA 终止

维普资讯 http://www.cqvip.com

密码子,由上海生工合成。以 H37Rv 基因组 DNA 为模板,PCR 反应体系:10×buffer5μl,dNTPs2μl(2.5mmol/L),模板 DNA2μl,P_1 和 P_2 各 1μl(20mol/L)及 Taq 酶 1μl(5μ),加水至 50μl。反应条件为:95℃ 5min,94℃ 60s,55℃ 50s,72℃ 60s,共 33 次循环,再延伸 6min。用 *Hind*III 和 *BamH*I 分别酶切 pcDNA3.1 空载和 MPT64PCR 产物,载体经 1% 琼脂糖凝胶电泳,回收大片段,PCR 产物酶切后用纯化试剂盒回收。MPT64 酶切回收产物和载体大片段按摩尔比 4:1 混合,T4 连接酶连接 4℃ 过夜,转化于用 $CaCl_2$ 制备的 E. coli Top10 感受态细胞。涂布 LA 平板。随机挑选 20 个克隆于 3ml LA 中增菌,用酚氯仿快速抽提,1% 琼脂糖电泳筛选,选 5 个可疑阳性克隆提取质粒进行 *Hind*III 和 *BamH*I 双酶切鉴定,有 3 个克隆切出 700bp 左右大小片段,即为阳性克隆。对阳性克隆进一步用 *Hind*III 和 *BamH*I 单双酶切,PCR 鉴定。

1.3 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 pcDNA-MPT64 重组质粒进行转染,以 pcDNA3.1 空质粒和 COS-7 空细胞作为对照,转染试剂为阳离子脂质体 Lipofectamine Reagent 2000,具体方法参照说明书和《分子克隆》进行。

1.4 转染细胞的 RT-PCR、ELISA 和斑点印迹分析

于转染后 48h 分别收集各个细胞培养孔的上清液 50μl,点至经过处理的 PVDF 膜上,真空负压吸干,用 5% 脱脂奶粉封闭,与人抗结核杆菌抗体反应,经 HRP 酶标二抗及 DAB 显色观察反应结果。用细胞培养孔的上清包被酶标板,1% 牛血清白蛋白封闭各孔,先后加入结核病人抗血清(1:500)和 HRP 酶标羊抗人 IgG(1:1000),DAB 显色,在 DG5031 酶标仪于 490nm 测量吸光度(A)值,以 pcDNA3.1 空质粒和 COS-7 空细胞组作为对照,$A_{实验组}/A_{对照组} \geq 2.1$ 为阳性。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,P_1、P_2 为引物按照上述条件进行 PCR 扩增。

2 结 果

2.1 以 H37Rv 为模板,P_1、P_2 作引物,扩增出约 700bp 左右大小的特异性条带(图 1)。

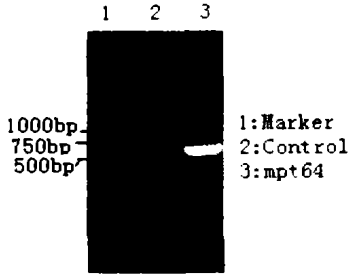


图 1 MPT64 编码基因的扩增

2.2 pcDNA-MPT64 的构建及鉴定

重组质粒 HindIII 单酶切较空质粒滞后,以重组质粒为模板 P_1、P_2 为引物行 PCR 扩增和用 *Hind*II、*BamH*I 双酶切均得到 700bp 左右片段,与 MPT64 基因大小相符(图 2)。

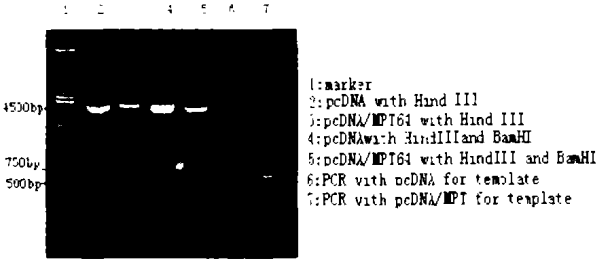


图 2 pcDNA-MPT64 的酶切及 PCR 鉴

2.3 COS-7 细胞表达 pcDNA-MPT64 的 RT-PCR、ELISA 和斑点印迹分析

分别用转染有 pcDNA-MPT64、pcDNA3.1 空质粒的 COS-7 细胞和 COS-7 对照细胞的 cDNA 作模板行 PCR 扩增,只有转染有 pcDNA-MPT64 的 COS-7 扩增出 700bp 条带,与 MPT-64 基因大小相符;分别用上述 3 组细胞上清作斑点印迹,结果表明,只有 pcDNA-MPT64 转染的 COS-7 细胞组呈现对抗结核抗体阳性;ELISA 结果显示,转染 pcDNA-MPT64 组呈阳性,而其他组呈阴性(图 3、图 4)。

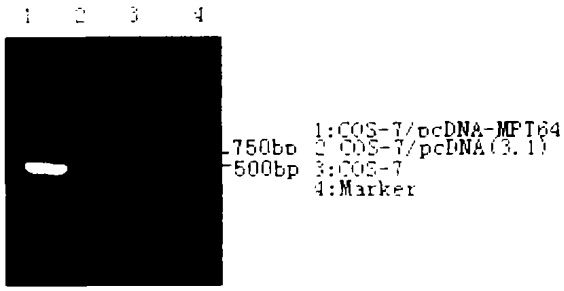


图 3 RT-PCR 检测转染的 COS-7

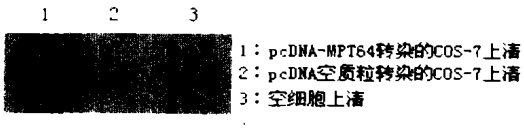


图 4 pcDAN-MPT64 转染 COS-7 Dot blotting

3 讨 论

(下转第 168 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

稀释法(MIC 法)以排除假耐药部分,来满足临床诊断和治疗的需要。

流感嗜血杆菌是较为常见的下呼吸道寄居菌之一。所致疾病的免疫性以体液免疫为主,婴幼儿血清中缺乏流感嗜血杆菌抗体,故感染率和发病率较高。本实验室采用含有 5% 的兔血巧克力琼脂培养基进行培养,分别含有嗜血杆菌生长需要的 X 因子(血红素)和 V 因子。从表 2 资料显示:流感、副流感嗜血杆菌检出率为 46.6%,对氨苄西林耐药率分别为 17.6%,28.9%,与国外的报道基本一致[4,5],氨苄西林在 70 年代曾作为治疗嗜血杆菌的首选药物,但现在一些国家和地区的耐药率已高达 35% 以上,并有逐年上升的趋势。对复方磺胺甲噁唑耐药率较高,均为 56.7%,对其它抗生素也有一定的耐药。故流感嗜血杆菌耐药性的监测不容忽视。

卡他莫拉菌又称卡他布兰汉菌,是呼吸道的正常菌群,过去一直认为无致病性,但 80 年代以来的观察发现已成为一种常见的致病菌,该菌可引起急性中耳炎、鼻窦炎、支气管肺部感染、脑膜炎、心内膜炎和败血症等各种感染,具有一定的耐药性,此种耐药与质粒无关,由染色体介导[5]。本资料表明,本院呼吸科检出 42 株,占苛养菌的 6.8%,对氨苄西林、复方磺胺甲噁唑也有较高的耐药率,均为 64.4%,在小儿呼吸道感染的细菌培养中应当引起高度重视。

总之,随着抗生素的广泛应用,呼吸道感染中肺炎链球菌、流感、副流感嗜血杆菌以及卡他莫拉菌的检出率与日俱增,且对多种抗生素耐药,加之这些细菌培养条件苛刻,一般医院未做常规分离培养与药敏,故给治疗带来了一定的困难,且又会造成新的耐药菌株的产生与流行。为克服上述弊端,医院应对上述苛养菌开展常规的分离培养与药敏试验,以指导临床医生正确选用抗生素,并可防止新的耐药菌株的产生与流行。

参 考 文 献

[1] 胡翼云. 儿童呼吸道病原菌的抗生素耐药问题[J]. 国外医学儿科学,1996;(23)2:57-60.

[2] 金发光. 肺炎球菌感染性疾病的研究进展[J]. 重庆医学,2001;23(4):363-365.

[3] 王 辉,谢秀丽,徐英春,等. 79 株肺炎链球菌的耐药测定[J]. 中华微生物和免疫杂志,1998;18(4):309-310.

[4] 李光辉. 耐药流感杆菌研究进展[J]. 国外医学内科学分册,1996;23:288-289.

[5] 李光辉. 呼吸道常见病原菌的耐药性及其机制[J]. 国外医学内科学分册,1997;4(5):188-189.

(上接第 126 页)机体抗结核杆菌感染的免疫主要依赖细胞免疫,MPT64 又称 MPB64,存在于结核分枝杆菌早期分泌蛋白之中,分子量为 24Kda,能诱导机体产生保护性细胞免疫应答,尤其是能诱导产生特异性 CD_8^+ CTL[4~6],是抗结核新型疫苗的侯选抗原之一,一些 BCG 菌株中缺乏该蛋白。本研究成功地构建了 MPT64 真核表达质粒,DNA 序列测定无碱基突变。重组质粒在 COS-7 细胞中表达,ELISA 和斑点印迹分析证实了其抗原性,这为进一步研究 MPT64 在抗结核杆菌感染中的免疫保护作用奠定了基础。由于未作 G418 压力筛选阳性克隆,表达量低,用 SDS-PAGE 未能检测到 MPT64 的表达。

参 考 文 献

[1] Centers for Disease Control and Prevention. Development of new vaccines for tuberculosis. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis (ACET) [J]. Morb. Mortal. Wkly. Rep. 1998;47:1-6.

[2] Fine P. E. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity [J]. Lancet, 1995; 345: 1339-1345.

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

[4] Feng CG, Blanchard TJ, Smith GL, et al. Induction of CD_8^+ T-lymphocyte responses to a secreted antigen of Mycobacterium tuberculosis by an attenuated vaccinia virus [J]. Immunol Cell Biol, 2001; 79(6): 569-575.

[5] Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, et al. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis [J]. Infect Immun, 1999; 67(4): 1702-1707.

[6] Roche P. W, Feng C. G, Britton W. J. Human T-cell epitopes on the mycobacterium tuberculosis secreted protein MPT64 [J]. Scand. J. Immunol, 1996; 43: 662-670.