

大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG-2100 的构建及应用*

程继忠 郑波 海涛** 皇甫永穆

(同济医科大学实验医学研究中心医学分子生物学研究室 武汉 430030)

摘 要 利用分子生物学方法,构建了大肠杆菌-分枝杆菌(*E. coli-Mycobacterium*)穿梭表达质粒 pBCG-2100,研究了编码日本血吸虫中国大陆株谷胱甘肽 S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST)抗原基因在卡介苗(*Bacillus Calmette-Guerin*, BCG)中的表达。以含人结核杆菌热休克蛋白(Heat shock protein, hsp)70 基因全长序列的质粒 pMT-70 为模板,扩增出 hsp70 启动子,测序选出无错配的启动子,将其定向克隆入 *E. coli-Mycobacterium* 穿梭质粒 pBCG-2000 中,构建成 *E. coli-Mycobacterium* 穿梭表达质粒 pBCG-2100。再将编码 GST 的 cDNA 按正确的阅读框顺序,克隆到 pBCG-2100 中 hsp70 启动子的下游,得到分枝杆菌表达质粒 pBCG-GST。将 pBCG-GST 电转化入 BCG 中,筛选出重组 BCG 疫苗,经热诱导后所表达的重组 GST(rGST)抗原,为可溶性蛋白,经纯化后,在 SDS-PAGE 上分子量为 26kD 处可见明显的表达蛋白带,其表达量占 BCG 菌体总蛋白的 13%。Western blot 提示 rGST 能与抗 GST 的抗体反应。

关键词 BCG 穿梭表达质粒, GST, 基因表达, 纯化, Western blot

分类号 R378.91 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)02-0225-29

重组 BCG 疫苗的研究近年日益受到重视。Rauzier 为重组 BCG 的发展奠定了理论基础^[1], Stover^[2]及 O'Donnel 等^[3]推动了重组 BCG 疫苗的进一步发展,这其中的关键是能有一个合适的质粒做载体。在中国,虽然对重组 BCG 疫苗的研究起步较晚,但已先后构建了 *E. coli-Mycobacterium* 穿梭载体 pBCG-8000^[4]和 pBCG-2000^[5]。本研究构建了较前两代载体更为完善的 pBCG-2100,并利用 pBCG-2100 在 BCG 中表达了新抗原。

1 材料和方法

1.1 材料

质粒 pBCG-2000^[5]由本室构建。BCG 丹麦株,由北京生物制品研究所提供;质粒 pBluescript-GST(含日本血吸虫中国大陆株 GST 全长 cDNA 序列)和表达质粒 pBV220-GST 由同济医科大学寄生虫学教研室提供;质粒 pMT-70(含人结核杆菌 hsp70 的启动子序列)由英国 D. B. Lowrie 提供。GST 检测纯化试剂(XY-045-00-07)为 Pharmacia Biotech 公司产品;酶标兔抗山羊二抗,为 Sigma 公司产品;T7DNA 聚合酶测序试剂盒(Q5780S)

* 总理基金(No. 94-Y-19)和国家自然科学基金资助项目(No. 39480022)。

** 同济医科大学职业医学研究所。

收稿日期:1997-10-13, 修回日期:1998-10-15。

为 Promega 公司产品; [³⁵S]dATP 为 DuPont 公司产品; *E. coli*DH5 α 、ABC 试剂盒 (R2526)、DNA 限制酶和修饰酶、dNTP、以及 DNA 和蛋白质分子量标准,均购于北京华美生物工程公司;Taq DNA 聚合酶购于 Gibco 公司。hsp70 启动子寡核苷酸引物由上海 Sangon 生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 *E. coli* 的重组 DNA 技术参照文献[6]。

1.2.2 hsp70 启动子序列的扩增和序列分析:以 pMT-70 为模板,热启动,循环条件为:94℃ 45s→47℃ 45s→60℃ 45s 最后一次延伸时间为 10min,共 20 次循环;测序主要参考 Tabor 的方法^[7]。

1.2.3 BCG 培养与转化:BCG 培养基为 M7H9-ADC-Middlebrook(Gibco 公司产品,含 Tween80),将菌体用 4℃ 10% 甘油洗涤 3 遍,最后沉淀悬浮于该液中用于转化;电转化条件:2500V,25 μ F,1000 Ω (Gene pulser 和 Gene control 均为 Bio-Rad 产品);转化子于 4~6 周出现,用于筛选及培养转化子的培养基含 25 μ g/mL 卡那霉素。

1.2.4 BCG 的诱导表达,rGST 的纯化和 Western blot:转化子培养至对数生长期(约 4 周),每天 42℃ 诱导 1h,连续 3d,于最后一次诱导后 6h 离心收菌,用超声粉碎机破菌;加入 Triton X-100 至终浓度为 1%,12000g 离心,取上清,用 GST Sepharose 4B 柱分离纯化 rGST.再用 Western blot 的方法^[6]进一步鉴定。

1.2.5 蛋白质测定和 SDS-PAGE 蛋白质密度扫描:菌体总蛋白按 Lowry 法测定,蛋白质 SDS-PAGE 结果用图像分析系统和岛津薄层扫描仪在波长为 560nm 处扫描分析。

2 结 果

2.1 hsp70 启动子核苷酸序列的 PCR 扩增、克隆与测序

用引物:①5'-TACGAATTCTAGACCGCACG-3'②5'-CCCGACCGCAGGATCCATGG TG-3',通过 PCR 扩增出的 hsp70 启动子约 150bp,将其克隆到质粒 pBCG-2000 中,筛选出数个重组子,用 pUC/M13 通用引物对 hsp70 启动子 DNA 片段进行序列测定,在翻译起始密码子 ATG 上游-12~-8 核苷酸处可见 SD 顺序 GGAGG;同时在 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;以及在 hsp70 启动子-10 区两侧的反向重复序列 TGCACT。结果见图 1。

2.2 *E. coli*-*Mycobacterium* 穿梭表达质粒 pBCG-2100 和 pBCG-GST 的构建

穿梭质粒 pBCG-2000(5.6kb)的多克隆位点上有 *Xba* I 和 *Bam* H I 的单酶切位点,在引物上分别引入这两种酶的识别序列后,hsp70 启动子 PCR 产物可被定向地插入 pBCG-2000 中,这样,就构成了新一代的穿梭表达质粒 pBCG-2100(5.75kb)。位于 hsp70 启动子下游的 *Bam* H I 位点仍然存在,而且在 hsp70 启动子下游的剩余多克隆位点的远端存在一 *Kpn* I 的单酶切位点;用 *Bam* H I 和 *Kpn* I 可从质粒 pBluescript-GST 上切下约 650bp 的 GST 编码 DNA 片段,将其插入 pBCG-2100 后,就构成了能在分枝杆菌中表达 GST 的质粒载体 pBCG-GST(6.4kb)。以 pBCG-2100 为模板,用同样的 hsp70 启动子引物经 PCR 可扩增出 150bp 的 hsp70 启动子 DNA 片段,而以 pBCG-2000 为模板的对照

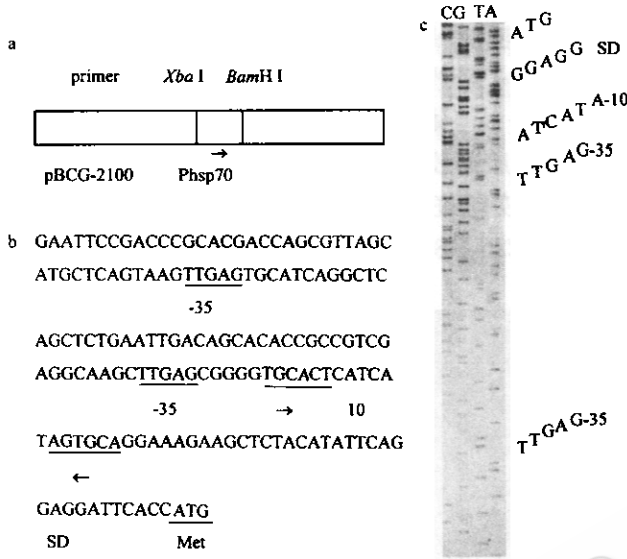


图 1 人结核杆菌热休克蛋白 70 启动子 DNA 序列测定

Fig.1 Sequence analysis of human *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 promoter

- a. Sequence strategy. Phsp70 indicates promoter of hsp70;
- b. DNA sequence of human *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 promoter. Sequences that are similar to *E. coli* consensus sequences are labeled with -35 and -10;SD marks a likely ribosome-binding site; ATG indicates initiation codon; The arrows indicate regions of dyad symmetry;
- c. Autoradiographic picture of hsp70 promoter sequence

为阴性结果; *Xba* I 和 *Bam* HI 的酶切位点在 3 种质粒上均为单一位点; pBCG-2000 可被 *Pvu* II 酶切割成由小到大依次为 286、368、445、4501bp 4 个片段, 当插入外源基因片段后, 原 445bp 的片段在 pBCG-2100 成为 598bp 的片段, 在 pBCG-GST 则为 1194bp 的片段。pBCG-2100、pBCG-GST 与 pBCG-2000 的酶切图谱及鉴定见图 2。

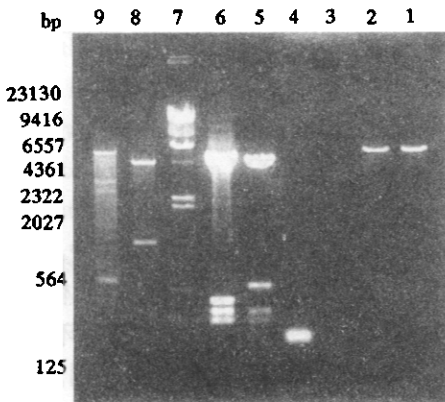


图 2 质粒 pBCG-2000 与 pBCG-2100 和 pBCG-GST 的酶切及鉴定图谱

Fig.2 Identification of pBCG-2100 and pBCG-GST by restriction analysis and PCR

- 1. pBCG-2100 digested with *Xba* I
- 2. pBCG-2100 digested with *Bam* HI
- 3. Control of PCR with pBCG-2000 as template
- 4. Product of PCR with pBCG-2100 as template
- 5. pBCG-2100 digested with *Pvu* II
- 6. pBCG-2000 digested with *Pvu* II
- 7. Molecular marker (λ DNA/*Hind* III)
- 8. pBCG-GST digested with *Pvu* II
- 9. pBCG-GST digested with *Bam* HI and *Kpn* I

2.3 GST 基因在 BCG 中的表达、纯化与 Western blot

GST 在 BCG 中表达与纯化结果见图 3:

可见在 SDS-PAGE 上分子量约 26kD 处有明显的表达条带;对凝胶的扫描和图像分析结果表明,所表达的 rGST 占菌体总蛋白的 13%。与 pBV220-GST 在 *E. coli* 中表达的 rGST 比较,两者在聚丙烯酰胺凝胶中的迁移率相同。用来自羊抗日本血吸虫菲律宾株 GST 的多克隆抗体进行免疫印迹反应,Western blot 结果显示,与来自于 pBCG-GST/BCG、pBCG-Sj26/BCG、pBV220-GST/DH₅ α 的 rGST 均能产生杂交条带,结果见图 4。

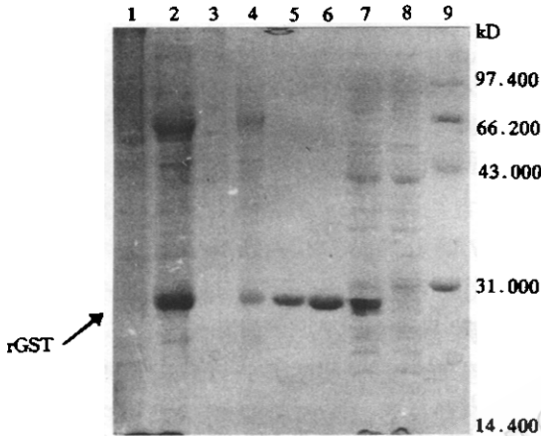


图 3 GST 在 BCG 中表达与纯化 SDS-PAGE 图谱
Fig. 3 SDS-PAGE of GST expressed in BCG and its purification

- 1,2. Total bacterial protein of BCG containing pBCG-2100(1) and pBCG-GST(2) induced by heating;
- 3,4. Supernatants of bacterial protein of BCG containing pBCG-2100(3) and pBCG-GST(4) induced by heating;
- 5,6. Purified rGST from BCG containing pBCG-GST induced by heating(5) and from *E. coli* TG1 containing pBV220-GST induced by heating(6);
- 7.Total bacterial protein of *E. coli* TG1 containing pBV220-GST induced by heating
- 8.Total bacterial protein of *E. coli* TG1 containing pBV220-GST
9. Molecular marker

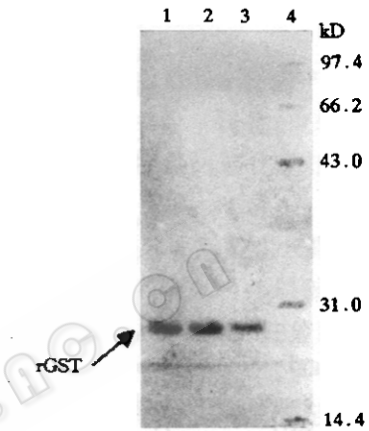


图 4 用免疫杂交检测重组 rGST 在 BCG 和 *E. coli* 中的表达

- Fig. 4 Immunoblot of rGST expressed in BCG and *E. coli*
1. Anti-GST polyclonal antibody reacted with rGST purified from BCG containing pBCG-GST
 2. Anti-GST polyclonal antibody reacted with rGST purified from BCG containing pBCG-Sj26
 3. Anti-GST polyclonal antibody reacted with rGST purified from *E. coli* TG1 containing pBV220-GST
 4. Molecular marker

3 讨 论

pBCG-2100 是在 pBCG-2000^[5] 的基础上对穿梭载体的改进。与后者相比较,新一代的载体在多克隆位点前插入了人结核杆菌 hsp70 启动子序列,使得通过穿梭载体表达外源基因更方便和容易。之所以选用 hsp70 启动子,是因为这种启动子能在应激环境下被活化,属强启动子,且具有高度的保守性,能被不同分枝杆菌的 RNA 聚合酶识别,可模拟应激环境对其下游基因转录进行调控。当 BCG 在体内被巨噬细胞吞噬后,hsp70 启动子被活化,诱导转录及外源蛋白的产生;通过抗原的递呈,激活机体的保护性免疫反应。

用重组 BCG 疫苗来预防曼氏血吸虫病国外已有报道^[8]。1996 年法国巴斯德研究所用重组的含曼氏血吸虫 GST 抗原基因的 BCG 免疫小鼠,可激发特异性抗体的产生。本研究利用构建的新载体 pBCG-2100,在 BCG 中表达了日本血吸虫 GST 抗原。所表达的蛋白质仍保持着免疫功能区的活性,这说明新载体构建是成功的,这为重组 BCG 疫苗的进一步发展奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] J. Rauzier, J. Moriz-Pereira, B. Gicquel-Sanzey. *Gene* 1988, 71:315.
- [2] C.K. Stover, de la Cruz V. F., T.R. Fuerst *et al.* *Nature*. 1991, 351:456.
- [3] M.A. O'Donnel, A. Aldovini, R.B. Duba *et al.* *Infection and Immunity*. 1994, 62(6):2508~2514.
- [4] Huangfu Y. M, Zhang D. J., Cheng J. Z. *et al.* *J. Tongji Med. Univ*, 1995, 15(3):138~142.
- [5] 程继忠,皇甫永穆,海涛. 生物化学与生物物理学进展. 1997, 24(3):249~253.
- [6] J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987.
- [7] S. Tabor, C.C. Richardson. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*. 1987, 84:4767~4771.
- [8] L. Kremet, G. Riveau, A. Baulard. *Journal of Immunology*, 1996, 156(11):4309~4317.

Construction and Application of *Escherichia coli*-*Mycobacterium* Shuttle Expression Plasmid pBCG-2100*

Cheng Jizhong Zheng Bo Hai Tao Huangfu Yongmu

(Department of Medical Molecular Biology, Research Center of Experimental Medicine,
Tongji Medical University, Wuhan 430030)

Abstract With cloning technique used, a new *E. coli*-*Mycobacterium* shuttle expression plasmid pBCG-2100 was constructed and a foreign gene was tried to expressed by this plasmid in BCG. Firstly, human *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein(hsp) 70 promoter in plasmid pMT-70 was amplified by PCR. After treated with *Xba* I and *Bam* HI, hsp 70 promoter was cloned into plasmid pBCG-2000 and the pBCG-2100 was constructed. Secondly, cut from pBluscript-GST with *Kpn* I and *Bam* HI, the gene encoding GST was inserted into downstream of hsp70 promoter in pBCG-2100. And then BCG was transformed with it by electrotransformation. The transformant was cultured and induced by heat and the expressed protein was significant at 26kD SDS-PAGE, which accounted for 13% of total proteins in BCG. The result of Western blot was positive. The conclusion was ready to be led that the construction of the new vector was successful.

Key words BCG vaccine, shuttle expression plasmid, GST, gene expression, Western blot, purification

* Supported by the Premier Reserve funds(No. 94-Y-19) and Chinese National Natural Science Fund(No. 3948022).