

大肠杆菌-分枝杆菌分泌型穿梭表达质粒 pBCG-SP-HSP65 的构建及人结核杆菌 HSP65 的表达

戴五星* 陈智浩 高 红 黄海浪 梁 靓 程继忠 皇甫永穆

(华中科技大学同济医学院生物化学与分子生物学系,武汉 430030)

摘 要 用 PCR 技术从 *Bacillus Calmette-guérin* (BCG) 基因组中扩增出抗原 85B (Ag85B) 的信号肽 (SP) DNA 序列,从 pCMVMTHSP65 质粒中扩增出人结核杆菌 HSP65 全长基因。利用 DNA 重组技术将以上两个片段插入质粒 pBCG-2100 的人结核杆菌 HSP70 启动子下游,构成分泌型原核穿梭表达质粒 (pBCG-SP-HSP65)。酶切鉴定、PCR 和测序分析结果均表明分泌型原核穿梭表达质粒 pBCG-SP-HSP65 构建成功。利用电穿孔将该质粒转入耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*, MS) 中,用卡那霉素筛选出阳性重组子。经热诱导后用 SDS-PAGE 观察到在耻垢分枝杆菌中 65kD 蛋白占总蛋白的 20%,而在重组耻垢分枝杆菌表达的 65kD 蛋白占菌体总蛋白的 34.46%,占裂解物上清总蛋白的 68.56%,表明重组的 HSP65 基因能在耻垢分枝杆菌中高效表达,表达的蛋白大部分以可溶状态存在。通过 Western-blot 证实分泌的该蛋白能与结核杆菌 HSP65 的抗体特异性结合,说明该重组蛋白具有 HSP65 的生物活性。

关键词 信号肽,结核杆菌 HSP65,分泌型原核穿梭表达质粒,重组耻垢分枝杆菌
中图分类号 R378.91 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0170-05

结核病是由结核杆菌引起的严重威胁人类健康的头号传染病。现在全世界已有近 20 亿人感染结核杆菌,每年新发病人约 1000 万,死亡人数约 300 万^[1]。随着结核杆菌耐药菌株的持续增加,加之人类免疫缺陷病毒 (HIV) 所致艾滋病的流行,致使 BCG 这一传统疫苗的效价降低。据世界各国报道,其保护效率为 0~85%,平均为 50%。因此急需研究一种比 BCG 更好的疫苗来控制该病的传播与蔓延^[2]。

热休克蛋白 65 是一种高度保守的应急蛋白。在结核杆菌感染过程中,HSP 65 是机体对抗其入侵的最重要的免疫保护性抗原之一。在被结核杆菌感染的小鼠体内,20% 的反应性 T 细胞能够识别 HSP65^[3]。因此 HSP65 可能是结核病预防和治疗的关键。

重组蛋白在细胞内高水平表达时多以包涵体形式存在,影响生物效应的发挥。为此,我们采用分子生物学技术构建分泌型的大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒,并将人结核杆菌 HSP65 的全长基因克隆

到此质粒中,研究其在耻垢分枝杆菌中的表达效率及生物学活性,为耻垢分枝杆菌的应用和结核病疫苗的发展提供实验依据。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5 α 由本室保存,pCMVMTHSP65 质粒由英国的 Lowrie 惠赠,耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*) mc² 155 由美国 Jacobs 博士赠送,大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG-2100 由本室构建。

1.2 酶与主要试剂

限制性内切酶、DNA 连接酶、DNA 聚合酶、DNA 和蛋白质分子量标准、羊抗兔 IgG-AP 以及 NBT/BCIP 显色试剂盒均购自华美生物工程公司。分枝杆菌培养基 (Middlebrook 7H9 broth) 和添加剂 (ADC) 购自 DIFCO 公司。结核杆菌 HSP65 单克隆抗体由英国的 Lowrie 惠赠。

1.3 引物设计与模板制备

参照 BCG Ag85B 信号肽 DNA 序列设计一对引

物,上游引物 P1 :5'-GAAAAGGATCCTACAGACGTGAGCCGAAAG-3'(画线部分为加入的 *Bam*H I 酶切位点),下游引物 P2 :5'-ATAAATTATGCATGAACGCGCCCGCGGTTG-3'(画线部分为加入的 *Nsi* I 酶切位点)。参照人结核杆菌 HSP65 全长基因设计一对引物,上游引物 P3 :5'-GACTGATGCATGCCAAGATTGCGTACGAC-3'(画线部分为加入的 *Nsi* I 酶切位点),下游引物 P4 :5'-GAATCGGTACTCAGAAATCATGCCAC-3'(画线部分为加入的 *Kpn* I 酶切位点)。以上引物由上海生工生物工程有限公司合成。参照文献[4]制备 BCG 基因组 DNA ;参照文献[5]制备 pCMVMTHSP65 质粒 DNA。

1.4 PCR 扩增

以提取的 BCG 基因组 DNA(10ng)为模板,利用 BCG Ag85B 信号肽 DNA 片段的上、下游引物 P1 ,P2 各 1 μ mol/L,及 1/10 体积的 10 \times PCR 缓冲液,1.5mmol/L MgCl₂,0.2mmol/L dNTP 和 2.1 u Taq DNA 聚合酶,以 50 μ L 体系(加 50 μ L 灭菌石蜡油)于 PCR 仪(480 ,PE 公司)中扩增(94 $^{\circ}$ C 变性 1min,61 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45s,循环数为 30,72 $^{\circ}$ C 延伸 5min),产物经测序、电泳鉴定后,纯化待用。以 pCMVMTH-SP65 质粒(20ng)为模板,利用人结核杆菌 HSP65 全长基因的上、下游引物 P3 ,P4 各 1 μ mol/L,及 1/10 体积的 10 \times PCR 缓冲液,0.2mmol/L dNTP 和 2 u Pfu DNA 聚合酶,以 50 μ L 体系(加 50 μ L 灭菌石蜡油)于 PCR 仪(480 ,PE 公司)中扩增(94 $^{\circ}$ C 变性 1min,61 $^{\circ}$ C 退火 40s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,循环数为 28 ;72 $^{\circ}$ C 延伸 5min),产物经测序、电泳鉴定后,纯化待用。

1.5 pBCG-SP-HSP65 分泌型穿梭表达质粒的构建

将 PCR 扩增的信号肽 DNA 片段用 *Bam*H I 和 *Nsi* I 分别消化,PCR 扩增的 HSP65DNA 片段用 *Nsi* I 和 *Kpn* I 分别消化。同时制备大量载体 pBCG-2100,用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 消化,回收大片段。利用 T4 DNA 连接酶依次连接,构建一个分泌型穿梭表达质粒(pBCG-SP-HSP65),然后转化大肠杆菌,筛选出阳性克隆并进行鉴定。质粒提取、DNA 片段的回收、连接、转化及筛选均按文献[5]进行。

1.6 重组 HSP65 的诱导表达

将 pBCG-SP-HSP65 质粒转化到耻垢分枝杆菌中方法按文献[6]约 5d 出现转化子。挑取转化子,于 M7H9 培养基(含卡那霉素 50 μ g/mL)中 37 $^{\circ}$ C 培养 3d。42 $^{\circ}$ C 诱导 30min 后破菌。冰浴 10min,室温下 4000r/min 离心 20min。弃上清,沉淀悬浮于 3mL 裂解液 A(50mmol/L Tris-HCl pH8.0,1mmol/L EDTA)中。

加入 8 μ L 50mmol/L PMSF 和 16 μ L 5% 溶菌酶,冰浴 10min。在冰浴中用超声细胞破碎仪进行超声破菌,功率为 300W,每次时间为 25s,共 6 次。室温下 12000r/min 离心 20min。收集上清和沉淀,沉淀悬浮于 200 μ L 裂解液 A 中。-20 $^{\circ}$ C 存放。

1.7 SDS-PAGE 及蛋白密度测定

SDS-PAGE 参照文献[5],电泳结果用图像分析系统扫描分析。

1.8 Western-blot

SDS-PAGE 结束后进行电转移至硝酸纤维素滤膜(NC 膜)。100g/L 脱脂奶粉封闭,抗人结核杆菌 HSP65 单克隆抗体(1:2000)以及羊抗兔 IgG-AP(1:500)先后标记、洗膜,加 NBT/BCIP 底物于室温温育,直到蛋白条带处形成紫色沉淀。将膜转到终止液(20mmol/L Tris-HCl pH8.0,5mmol/L EDTA)中,终止显色反应。

2 结 果

2.1 重组质粒的鉴定

2.1.1 限制性内切酶分析:挑选阳性克隆,抽提质粒,分别用 *Nsi* I、*Kpn* I、*Bam*H I、*Nsi* I + *Kpn* I、*Kpn* I + *Bam*H I、*Nsi* I + *Bam*H I 酶切,产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。重组质粒上有 *Nsi* I、*Kpn* I 的单一酶切位点,将该质粒切割成长约 7500bp 的片段;*Nsi* I + *Kpn* I 双酶切可得到长约 1600bp 的 HSP65 DNA 片段和 4900bp 的片段;*Kpn* I + *Bam*H I 双酶切可得到长约 300bp、1444bp 和 5750bp 的 3 条 DNA 片段;*Nsi* I + *Bam*H I 双酶切可得到长约 150bp 的信号肽 DNA 片段和 7350bp 的片段。其酶切图谱与预期的一致(见图 1)。

2.1.2 PCR 扩增鉴定:分别以 BCG Ag85B 信号肽 DNA 片段的上游引物和下游引物、人结核杆菌 HSP65 全长基因的上游引物和下游引物、BCG Ag85B 信号肽 DNA 片段的上游引物和人结核杆菌 HSP65 全长基因的下游引物作为一对引物,以筛选的阳性质粒为模板进行 PCR 扩增,产物分别经过 1% 和 0.7% 琼脂糖凝胶电泳,可以发现约 150bp、1600bp、1700bp 的 DNA 片段分别扩增出来(如图 2、3 所示),与文献报道相符。结果说明,该阳性克隆含有 SP、HSP65 和 SP-HSP65 的 DNA 片段,并且连接方向是正确的。

2.1.3 DNA 序列测定:测序结果表明,该质粒上的信号肽 DNA 序列和 HSP65 的基因序列无突变,连接方向正确,阅读框无移位。BCG-SP-HSP65 穿梭表达

质粒构建成功。

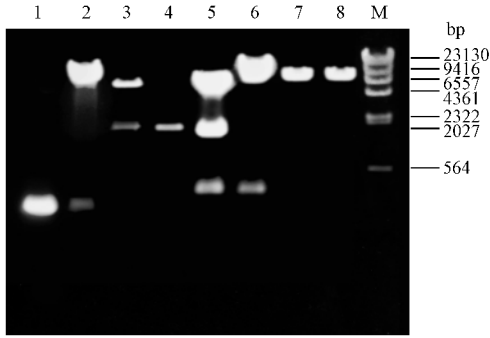


图 1 重组质粒酶切鉴定结果

Fig.1 Restriction analysis of recombinant pBCG-SP-HSP65 plasmid

1 : signal peptide DNA segment ; 2 : pBCG-SP-HSP65/ BamH I + Nsi I ; 3 : pBCG-SP-HSP65/ Nsi I + Kpn I ; 4 : HSP65 DNA segment 5 : pBCG-SP-HSP65/ BamH I + Kpn I ; 6 : pBCG-SP-HSP65/ BamH I ; 7 : pBCG-SP-HSP65/ Kpn I ; 8 : pBCG-SP-HSP65/ Nsi I ; M : λDNA/ Hind III

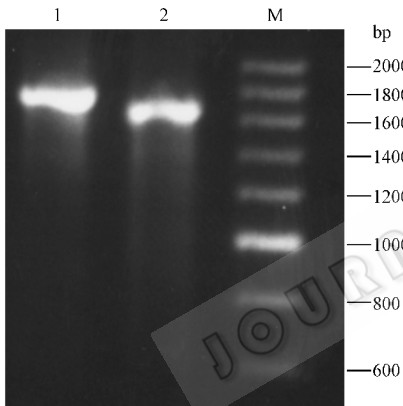


图 2 HSP65 和 SP-HSP65 DNA 序列的扩增产物

Fig.2 The DNA sequence amplification product of HSP65 and SP-HSP65

1 : SP-HSP65 DNA segment ; 2 : HSP65 DNA segment ; M : 200bp ladder

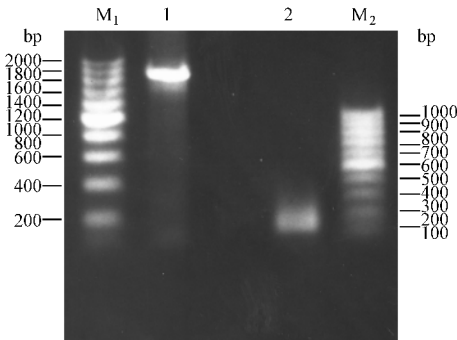


图 3 HSP65 和信号肽 DNA 序列的扩增产物

Fig.3 The DNA amplification product of HSP65 and signal peptide

M₁ : 200bp ladder ; 1 : HSP65 DNA segment ; 2 : signal peptide DNA segment ; M₂ : 100bp ladder

2.2 重组 HSP65 基因在耻垢分枝杆菌中的表达以及蛋白质的分布

将 pBCG-SP-HSP65 穿梭表达质粒用电穿孔的方法转入耻垢分枝杆菌中。培养 3d 42℃ 诱导 30min 后破菌。用 SDS-PAGE 方法鉴定 HSP65 的表达(见图 4)。

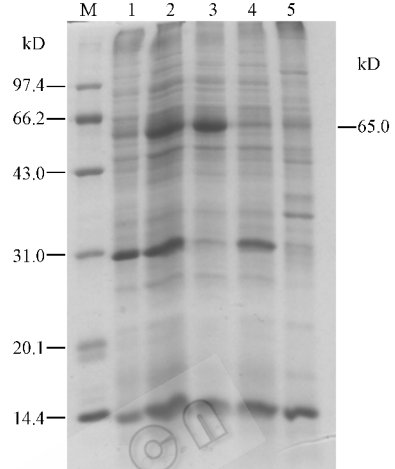


图 4 HSP65 在耻垢分枝杆菌中表达的 SDS-PAGE 分析

Fig.4 SDS-PAGE analysis of the protein expressed in recombinant *Mycobacterium smegmatis*

M : Protein molecular marker ; 1 : the total proteins of *Mycobacterium smegmatis* induced by heat 2 : the total proteins of recombinant *Mycobacterium smegmatis* induced by heat ; 3 : cell supernatant of recombinant *Mycobacterium smegmatis* induced by heat ; 4 : cell deposit of recombinant *Mycobacterium smegmatis* induced by heat ; 5 : the total proteins of *Mycobacterium smegmatis* with pBCG-2100 induced by heat

经过凝胶分析系统表明,在耻垢分枝杆菌(MS)中 65kD 蛋白占总蛋白的 20%,在重组耻垢分枝杆菌中占 34.46%,在重组耻垢分枝杆菌裂解物上清中占 68.56%,在重组耻垢分枝杆菌裂解物沉淀中占 20.65%,在含有空载体的耻垢分枝杆菌中占 23.30%。上述结果说明在重组耻垢分枝杆菌中 65kD 蛋白表达量明显增加,表明人结核杆菌 HSP65 基因在耻垢分枝杆菌中获有效表达。而且极大部分是以可溶的状态存在。

2.3 重组 HSP65 的 Western-blot

重组耻垢分枝杆菌裂解物上清经过 SDS-PAGE 后,将蛋白质电转移到硝酸纤维素滤膜上,然后与结核杆菌 HSP65 单克隆抗体温育,经过洗涤后再与用碱性磷酸酶标记的二抗温育,然后加上生色底物,直到蛋白条带处形成紫色沉淀才终止染色(见图 5)。Western-blot 结果表明分泌的重组蛋白能与结核杆菌 HSP65 的抗体特异性结合,说明该重组蛋白具有 HSP65 的生物学活性,能够发挥其生物学作用。

耻垢分枝杆菌自身表达的 65kD 蛋白不与人结核杆菌 HSP65 结合。

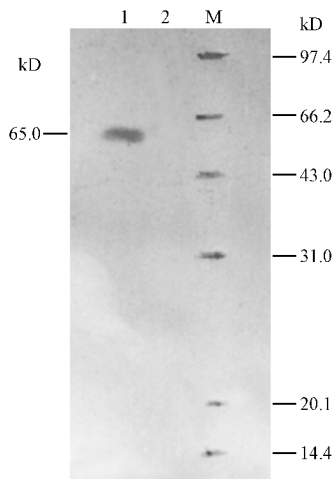


图 5 HSP65 在耻垢分枝杆菌中表达的 Western-blot 分析

Fig.5 Western-blot analysis of HSP65 gene expression in recombinant *Mycobacterium smegmatis*

1: Pellet of lysate of recombinant *Mycobacterium smegmatis* with HSP65 gene;

2: Pellet of lysate of *Mycobacterium smegmatis*;

M: Protein molecular mass marker

3 讨论

1997 年, Lowrie 等^[7]发现:先用结核杆菌 HSP65 DNA 质粒对 BALB/c 小鼠进行肌肉免疫,然后用结核杆菌 H37Rv 对其进行攻击后,小鼠体内 Th1/Tc1 型特异性细胞毒性反应占优势,并且该特异性 T 细胞克隆可将其免疫保护作用转移给无保护作用的试验小鼠。

HSP65 虽具有很强的免疫原性,但只有分泌到细胞外的 HSP65 被加工后才能发挥生物学效应,而重组 HSP65 在细胞内高水平表达时多以包涵体的形式存在,不具有生物学活性,所以本研究利用 DNA 重组技术将 BCG Ag85B 的信号肽 DNA 序列克隆到质粒 pBCG-2100 HSP70 启动子的下游,构建成分泌型大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒。人结核杆菌 HSP65 基因通过此质粒导入到耻垢分枝杆菌中表达,研究其表达效率及生物学活性。结果显示,重组耻垢分枝杆菌中 65kD 蛋白占菌体总蛋白的 34.46%,比耻垢分枝杆菌高 11%,而且极大部分存在于裂解物上清中(69.56%),形成的包涵体少,表明人结核杆菌 HSP65 基因在耻垢分枝杆菌中获得高效表达,表达的重组蛋白主要为分泌性蛋白,有利于排出细胞外,可以激活更多的 HSP65 特异性的 T

细胞,发挥其保护作用。Western-blot 结果证实表达的重组蛋白能够与结核杆菌 HSP65 的抗体特异性结合,提示该重组蛋白具有 HSP65 的生物学活性。

耻垢分枝杆菌(*M. smegmatis* mc²155)是一种生长快,转化效率高的突变株,是一种非致病菌和强的细胞免疫佐剂,可被发展成为一种疫苗载体。因 BCG 生长缓慢,需 15~18h 一代,培养时间长,而且 BCG 的效果在一些地区不均一,其作为一种活的微生物能在免疫力低下,包括 AIDS 患者身上诱发致命的散发性疾病等原因,人们期待着新的基因工程载体的出现,重组耻垢分枝杆菌疫苗的研究得以快速发展。Falcone 将 BCG 的抗原基因转入耻垢分枝杆菌中,发现重组耻垢分枝杆菌免疫动物后在组织中停留的时间增长。能保护 C57BL 小鼠抵抗结核杆菌 H37Rv 的攻击^[8]。将人结核杆菌 HSP65 基因导入耻垢分枝杆菌表达,构建重组耻垢分枝杆菌,可望发展成为一种防治结核病的疫苗。该重组耻垢分枝杆菌的免疫原性、抗感染作用以及临床应用前景有待于进一步研究。

同时本研究构建成功一种分泌型的原核穿梭表达质粒,为以后将多种同源或异源蛋白在分枝杆菌中进行表达并分泌到细胞外,构建一苗多用的疫苗打下了基础。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Martin E. Driving a stake into resurgent TB. *Science*, 2001, **293**: 234-235
- [2] Agger EM. A novel TB vaccine: Towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine*, 2002, **21**: 7-14
- [3] Kaufmann SH, Vath U, Thole JE *et al.* Enumeration of T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis* organisms and specific for the recombinant mycobacterial 64-kD protein. *Eur J Immunol*, 1987, **17**: 351-357
- [4] Jaber M, Rattan A, Verma A *et al.* A simple method of DNA extraction from *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis*, 1995, **76**: 578-81
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [6] Cheng J, Huangfu Y, Feng Z *et al.* Expression of foreign gene in *Mycobacterium regulated* by human *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 promoter. *J Tongji Med Univ*, 1997, **17**: 193-199
- [7] Lowrie DB, Silva CL, Colston MJ *et al.* Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine*, 1997, **15**: 834-838
- [8] Falcone V, Bassey E, Jacobs W *et al.* The immunogenicity of recombinant *Mycobacterium smegmatis* bearing BCG genes. *Microbi-*

Construction of a Secreting Prokaryotic Shuttle Expressing Plasmid pBCG-SP-HSP65 and Its Expression in *Mycobacterial smegmatis*

DAI Wu-Xing** CHEN Zhi-Hao GAO Hong HUANG Hai-Lang LIANG Liang CHENG Ji-Zhong HUANGFU Yong-Mu
(The Department of Biochemistry and Molecular Biology of Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract To construct the secretive prokaryotic shuttle expression plasmid pBCG-SP-HSP65, the signal peptide sequence of antigen 85B amplified from *Bacillus Calmette-guérin* (BCG) genome by PCR and the whole HSP65 DNA sequence of human *M. tuberculosis* obtained from the plasmid pCMV-MTHSP65 by PCR were cloned into the plasmid pBCG-2100 under the control of the promoter of Heat Shock Protein 70 (HSP70) from human *M. tuberculosis*. Recombinants were electroporated into *Mycobacterial smegmatis* and induced by heating. Results of the induced expression were detected by SDS-PAGE and the biological activity of the expressed protein was tested by Western-blot analysis. Results showed pBCG-SP-MTHSP65 was constructed successfully and confirmed by restriction endonuclease analysis, PCR detection and DNA sequencing analysis. After it was electroporated into *Mycobacterial smegmatis* and induced by heating, the percentage of expressed 65kD protein in *Mycobacterial smegmatis* detected by SDS-PAGE was 20% in total bacterial protein. But the percentage of expressed 65kD protein in recombinant *Mycobacterial smegmatis* was up to 34.46% in total bacterial protein and 68.56% in the total protein of cell lysate supernants, Which demonstrated the recombinant HSP65 gene could express in recombinant with high efficiency and the expressed proteins were mainly soluble. Western-blot showed that the secretive proteins could specially combine with antibody against human *M. tuberculosis* HSP65. Orally, pBCG-SP-HSP65 was successfully constructed; HSP65 gene could express in *Mycobacterial smegmatis* with high efficiency via it. And the expressed proteins possess the biological activity. So it provides experimental evidence for the application of the recombinant *Mycobacterial smegmatis* and the development of the vaccine against tuberculosis.

Key words signal peptide, HSP65 of human *Mycobacterium tuberculosis*, a secreting prokaryotic shuttle expressing plasmid, recombinant *Mycobacterial smegmatis*

Received: 07-25-2003

This work was supported by Grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No.30370075).

* Corresponding author. Tel : 86-27-83692635 ; E-mail : daiwuxing2002@sohu.com