

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)13-1189-04

结核杆菌 Hsp65 和 hGM-CSF 双顺反子表达质粒的构建与表达

李君武, 周曙光, 黄泽棋, 李晓栋, 宋东, 王珊, 黄清华

(暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室, 广东广州 510632)

Construction and expression of bicistronic expression plasmid containing Hsp65 of *Mycobacterium tuberculosis* and hGM-CSF

Li Jun-Wu, ZHOU Shu-Guang, HUANG Ze-Qi, LI Xiao-Dong, SONG Dong, WANG Shan, HUANG Qing-Hua

Department of Microbiology and Immunology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China

【Abstract】 AIM: To construct and express the bicistronic eukaryotic expression plasmid pIHsp65GM by molecular-biological methods. METHODS: We used *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv genome as template to amplify Hsp65 gene and used plasmid pORF-hGM-CSF as template to amplify gene adjuvant hGM-CSF gene (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) by PCR, and then recombined them with the two multiple cloning sites (MCSA and MCSB) of pIRES vector to construct a bicistronic eukaryotic expression plasmid pIHsp65GM. The plasmid was finally transfected into HepG-2 cells to detect the expression of Hsp65 and hGM-CSF proteins by immunohistochemistry and ELISA respectively. RESULTS: Restriction enzyme digestion demonstrated that the inserted gene fragments were 1.64 kb and 0.47 kb. DNA sequencing revealed that the cloned Hsp65 and hGM-CSF sequences were consistent with the GeneBank reported. The Hsp65-positive cells were found by immunohistochemistry. hGM-CSF expression from pIHsp65GM transfected cells was detected by ELISA, and the difference between pIHsp65GM transfected cells and pIRES transfected cells was statistically significant. CONCLUSION: The successful construction and expression of a bicistronic eukaryotic expression vector containing Hsp65 gene and gene adjuvant hGM-CSF are fulfilled, which lays a foundation for the further research on a new DNA vaccine that is better than BCG vaccine in the prevention of tuberculosis.

【Keywords】 *Mycobacterium tuberculosis*; Hsp65; hGM-CSF; bicistronic; gene adjuvant

【摘要】目的:应用分子生物学技术,构建 pIHsp65GM 双顺反子真核表达质粒,并在真核细胞中表达。方法:以结核分枝杆菌 H37Rv 株基因组为模板经聚合酶链反应(PCR)扩增出 Hsp65 基因,同时从质粒 pORF-hGM-CSF 中扩增出基因佐剂 hGM-CSF,分别克隆到真核表达载体 pIRES 的多克隆位点 A (MCSA)和 B (MCSB)中,构建 pIHsp65GM 真核表达质粒,并转染 HepG-2 细胞中表达和检测。结果:酶切鉴定提示插入的基因片段大小分别为 1.64 kb 和 0.47 kb,测序分析表明克隆的 Hsp65 和 hGM-CSF 序列与 GenBank 上公布序列完全一致;免疫组织化学方法检测到表达 Hsp65 的阳性细胞,ELISA 方法检测到 pIHsp65GM 转染组细胞培养上清中 hGM-CSF 的表达,与空载体对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论:成功构建和表达了 pIHsp65GM 质粒,为研制优于卡介苗的新型抗结核病 DNA 疫苗奠定基础。

【关键词】 结核分枝杆菌; 热休克蛋白-65; 人粒巨噬细胞集落刺激因子; 双顺反子; 基因佐剂

【中图分类号】 R378.91+1 **【文献标识码】** A

0 引言

卡介苗(bacille calmette-guerin, BCG)是已被广泛应用于预防结核病(tuberculosis, TB)的减毒活疫苗。由于结核 DNA 疫苗的制备简便、免疫效果好,目前已经成为 TB 的热门候选疫苗之一^[1]。结核杆菌热休克蛋白 65KD 基因(heat shock protein 65KD, Hsp65)是研究最早的结核抗原之一,可以在动物体内对结核分枝杆菌的感染产生强烈的保护性免疫反应^[2]。粒细胞-吞噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)作为良好的基因佐剂,可以利用其上调机体免疫水平的作用增强 DNA 疫苗的效能^[3-4]。虽然 Hsp65 抗原和 GM-CSF 分别在感染免疫中的作用已经被研究证实有效,但对人 GM-CSF 协同 Hsp65 抗原在结核杆菌感染中的免疫应答特点和保护力尚不清楚^[5]。我们将两者同时克隆到同一载体上,构建含结核杆菌 Hsp65 和基因佐剂 hGM-CSF 的双顺反子真核质粒,旨在为进一步了解结核 DNA 疫苗的免疫效果奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 结核分枝杆菌 H37Rv 株基因组,大肠杆

收稿日期 2006-11-20; 接受日期 2007-02-28

基金项目 广东省科学计划引导项目基金(粤科计字 2004B31201019)

通讯作者 李君武, 博士, 教授, Tel (020)31308208 Email ljw6610@

163.com

菌 DH5 α , 载体 pIRES 和质粒 pORF-hGM-CSF(暨南大学医学院微生物学与免疫学教研室提供); Ex Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶, 限制性内切酶 *Nhe* I, *Eco*R I, *Xba* I 和 *Not* I, DL-1 kb marker, 质粒提取试剂盒, DNA 凝胶回收纯化试剂盒(大连宝生物公司); 两对 PCR 引物、重组质粒上目的基因的序列测定由上海生工生物工程公司完成; Transmaster 转染试剂(广州博理生物科技公司); 即用型免疫组化 Biotin SP-HRP 试剂盒, DAB 酶底物显色试剂盒(北京鼎国生物科技公司); 鼠抗人 Hsp65 蛋白单克隆抗体和人 hGM-CSF 蛋白 ELISA 检测试剂盒(深圳市晶美生物科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 目的基因 Hsp65 和 hGM-CSF 的 PCR 扩增

参照 GenBank 上结核分枝杆菌 H37Rv 株 Hsp65 基因 CDS 序列 (NCBI 登陆号 M15467) 分别设计引物进行 PCR 扩增。

1.2.2 pIHsp65 真核载体的构建与鉴定

将 Hsp65 的 PCR 产物经过回收纯化后与载体 pIRES, 同时用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切, 酶切后进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 并经过凝胶回收纯化试剂盒回收酶切产物, 将两者酶切纯化的产物按照 3:1 的摩尔比混合, 用 T4 DNA 连接酶连接 24 h。转化用低温 CaCl₂ 制备的 *E. coli* DH5 α 感受态细菌, 然后涂布于含氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 LB 固体培养基中。次日, 随机挑取 10 个单菌落, 分别接种于 3 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 下 150 r/min 振荡培养过夜。先取少量菌液煮沸作为模板进行菌落 PCR 检测是否有 Hsp65 的存在, 将菌落 PCR 筛选呈阳性的菌落用质粒提取试剂盒抽提质粒 DNA。将提取的质粒 DNA 用 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切, 进行电泳检测, 以 DL-1 kb marker 为分子量参照, 将筛选出的阳性克隆产物的菌液进行测序鉴定。测序采用 Sanger 双脱氧链终止法, 对插入序列的两端进行测定, 测序工作由上海生物工程公司完成。

1.2.3 pIHsp65GM 真核表达质粒的构建与鉴定

同构建 pIHsp65 载体方法一样, 将 hGM-CSF 的 PCR 产物经过回收纯化后与载体 pIHsp65 同时用 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切, 酶切产物经凝胶回收纯化后, 将两者酶切纯化的产物按照 3:1 的摩尔比混合, 用 T4 DNA 连接酶连接 24 h, 然后转化感受态细菌 *E. coli* DH5 α , 涂布于含氨苄青霉素 50 μ g/mL 的 LB 固体培养基中。次日, 随机挑取 10 个单菌落, 分别接种于 3 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中, 37 $^{\circ}$ C 下 150 r/min 振荡培养过夜。将菌落 PCR 筛选呈阳性的菌落用质粒提取

试剂盒抽提质粒 DNA。将提取的质粒 DNA 用 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切, 进行电泳检测, 以 DL-1 kb marker 为分子量参照, 将筛选出的阳性克隆产物的菌液进行测序鉴定。

1.2.4 细胞转染

取对数生长期的 HepG-2 细胞接种在 12 孔板内, 待细胞生长至 70% ~ 80% 时, 加入阳离子多聚体转染试剂 Transmaster 和质粒 pIHsp65GM 的混合物。饥饿培养 1 h, 加入含 100 mL/L 小牛血清的完全培养基, 培养 24 h 后, 检测 Hsp65 和 hGM-CSF 蛋白的表达。

1.2.5 Hsp65 蛋白表达的免疫组化检测

采用未转染细胞为空白对照和转染了空质粒 pIRES 的细胞为阴性对照, 将空质粒 pIRES 和重组质粒 pIHsp65GM 转染 HepG-2 细胞 48 h, 去除培养液, 用磷酸盐缓冲盐水 PBS 冲洗。经 40 g/L 的多聚甲醛固定后, 依次滴加过氧化酶阻断剂, 正常动物非免疫血清, 1:1000 鼠抗人 Hsp65 蛋白抗体, 生物素标记二抗和链霉素抗生物素蛋白。最后加入新鲜配制的 DAB 工作液染色, 显微镜下观察结果, Hsp65 蛋白的表达以细胞质染呈棕黄色者为阳性。

1.2.6 ELISA 法检测 hGM-CSF 蛋白表达水平

分别收集 pIRES 和质粒 pIHsp65GM 转染 24 h 和 48 h 的 HepG-2 细胞的细胞培养的上清液, 采用 ELISA 双抗体夹心法检测 hGM-CSF 蛋白的表达量, 按照试剂盒说明进行操作。用酶标仪在吸光度 A_{450 nm} 下测定样品和试剂盒提供的标准品的 A 值。根据标准品所测 A 值绘制的蛋白浓度与 A 值相关标准曲线计算各样品中 hGM-CSF 蛋白的含量(以空白孔调零)。

统计学处理: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件包进行分析, 组间比较采用两样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Hsp65 和 hGM-CSF 基因 PCR 扩增产物电泳分析

琼脂糖凝胶电泳结果显示, PCR 产物分别为 1.64 kb 和 0.47 kb 的特异性片段, 与预期 Hsp65 和 hGM-CSF 基因大小相符(图 1)。

2.2 重组质粒限制性内切酶消化鉴定

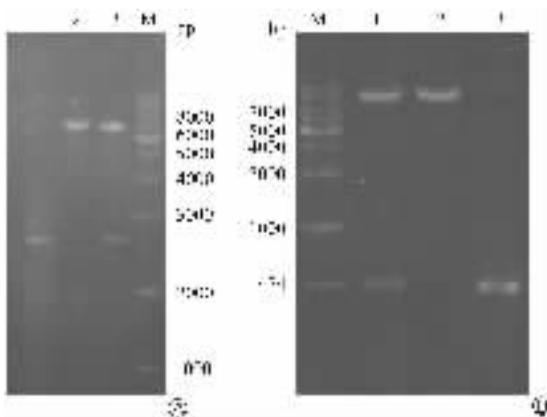
质粒 pIHsp65 经 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切后, 电泳可见大小约 6.1 kb 与 1.64 kb 两片段, 与载体 pIRES 经 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切产物和 Hsp65 基因 PCR 产物的 2 条特异性条带对比, 大小相符(图 2A)。重组质粒 pIHsp65GM 经 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切后, 电泳可见大小约为 7.74 kb 与 0.47 kb 两片段, 与质粒 pIHsp65 经 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切产物和 hGM-CSF 基因 PCR 产物的 2

条特异性条带对比,大小相符(图2B)。



M: DNA marker (DL1000); 1: Hsp65 扩增产物; 2: hGM-CSF 扩增产物。

图1 结核分枝杆菌 Hsp65 基因及 hGM-CSF 基因 PCR 产物结果



A M: DNA marker (DL1000); 1: Hsp65 扩增产物; 2: pIRES *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切产物; 3: pIHsp65 *Nhe* I 和 *Eco*R I 双酶切产物。

B M: DNA marker (DL1000); 1: hGM-CSF 扩增产物; 2: pIHsp65 *Xba* I 和 *Not* I 双酶切产物; 3: pIHsp65GM *Xba* I 和 *Not* I 双酶切产物。

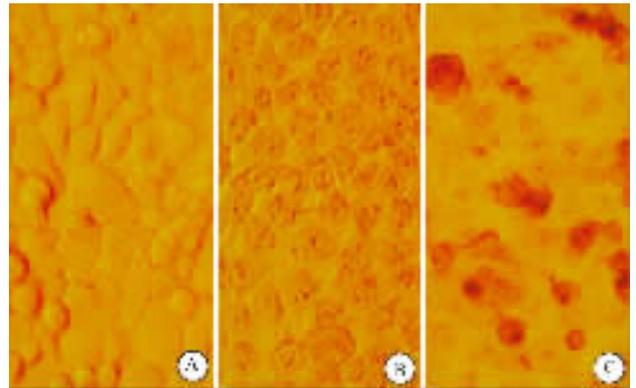
图2 结核分枝杆菌 Hsp65 基因 PCR 及 pIHsp65 双酶切结果(A)和 hGM-CSF 基因 PCR 及 pIHsp65GM 双酶切结果(B)

2.3 序列分析鉴定 对质粒 pIHsp65 上的多克隆位点 A (multiple cloning sites A, MCSA) 内的 DNA 序列进行序列分析鉴定, 结果与结核分枝杆菌 H37Rv 株的 Hsp 65 的基因序列完全相同。对质粒 pIHsp65GM 上的多克隆位点 B (multiple cloning sites B, MCSB) 内的 DNA 序列进行序列分析鉴定, 结果与 hGM-CSF 的基因序列完全相同。

2.4 Hsp65 蛋白在 HepG-2 细胞中的表达 显微镜下观察, 与未转染细胞的空白对照和转染空质粒 pIRES 细胞的阴性对照对比, pIHsp65GM 转染的部分 HepG-2 细胞中胞质染呈棕黄色, 表明 Hsp65 表达呈阳性(图3)。

2.5 ELISA 检测 pIRES 对照组在转染 24 和 48 h 时细胞上清液 hGM-CSF 的表达量分别为(1.371 ±

0.083) pg/mL 和(1.782 ± 0.127) pg/mL ($n = 3$), 而 pIHsp65GM 在转染 24 和 48 h 时细胞上清液 hGM-CSF 的表达量分别为(271.103 ± 4.731) pg/mL 和(253.124 ± 3.943) pg/mL, pIHsp65GM 转染组在转染 24 和 48 h 时 hGM-CSF 的表达量与 pIRES 对照组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。



A: 未转染的 HepG-2 细胞; B: 转染空载体 pIRES 的细胞; C: 转染质粒 pIHsp65GM 的细胞。

图3 结核杆菌 Hsp65 蛋白在 HepG-2 中表达的免疫组化染色检测 SP × 200

3 讨论

近年来, 对结核研究最多的抗原主要有 Hsp65, Ag85B, ESAT6 和 MPT64 等^[6-7]。其中 Hsp65 具有免疫优势抗原的特性, 能诱导和增强机体的体液免疫和细胞免疫的发生, 并可激活 $\gamma\delta$ T 细胞, 分泌高水平的 IFN- γ 和杀伤感染的细胞, 是人体感染结核杆菌以后免疫系统的主要靶抗原, 是 T 细胞攻击的主要对象^[8]。由于仅含有单抗原基因的 DNA 疫苗并不足以引发良好的免疫效果, 还需要结合其他的手段如基因佐剂, 特别是将细胞因子与 DNA 疫苗共表达才能产生更强的免疫保护力。GM-CSF 作为 DNA 疫苗的免疫佐剂, 能够调节树突状细胞的分化和成熟, 以及 MHC 和共刺激分子的表达水平, 并且通过调节抗原提呈细胞尤其是树突状细胞的数量和功能来调节免疫应答的强度。有研究认为将 GM-CSF 作为佐剂与基因疫苗共同免疫小鼠结果比单独应用基因疫苗产生更强烈的细胞免疫应答并可提供更强的免疫保护力^[3-5]。本实验采用载体 pIRES 为双顺反子真核表达质粒, 在上下游克隆位点之间的序列为内部核糖体进入位点, 此段序列在转录后能够自动断裂, 使上下游克隆位点插入的基因能够独立高效的表达, 从而避免了融合表达蛋白活性低下问题, 为两种蛋白表达、动物实验和结核疫苗研制提供较大方便。

与以往结核 DNA 疫苗的研究比较, 本实验具有

以下特点 ①实现了目的基因与细胞因子基因在同一载体上共同表达. 如果将 DNA 疫苗与编码 GM-CSF 的质粒混合注射会对 DNA 疫苗的免疫效果产生干扰作用, 若将 GM-CSF 与目的基因共同克隆到一个载体中, 由于两个基因具有相同的局部微环境, 往往可以获得较好的免疫效果^[9]. ②本研究使用双顺反子真核表达载体 pIRES, 将两个基因分别克隆到两个多克隆位点, 两者各自表达, 不相互影响蛋白表达的空间结构. 因为表达为融合产物的 DNA 疫苗可能破坏抗原的三维结构, 对抗体的生成产生负面影响^[10].

【参考文献】

- [1] Mustafa AS. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis [J]. Mol Immunol, 2002, 39: 113-119.
- [2] Baek KM, Ko SY, Lee M, et al. Comparative analysis of effects of cytokine gene adjuvants on DNA vaccination against mycobacterium tuberculosis heat shock protein 65 [J]. Vaccine, 2003, 21(25-26): 3684-3689.
- [3] Zhang XZ, Maziar D, Patricia N, et al. Intramuscular immunization with a monogenic plasmid DNA tuberculosis vaccine: Enhanced immunogenicity by electroporation and co-expression of GM-CSF trans-

- gene [J]. Vaccine 2007, 25(7): 1342-1352.
- [4] Qiu JT, Chang TC, Lin CT, et al. Novel codon-optimized GM-CSF gene as an adjuvant to enhance the immunity of a DNA vaccine against HIV-1 Gag [J]. Vaccine, 2007, 25(2): 253-263.
- [5] Hongxun S, Vladimir MP, Corey M, et al. Regional, but not systemic recruitment/ expansion of dendritic cells by a pluronic-formulated Flt3-ligand plasmid with vaccine adjuvant activity [J]. Vaccine, 2003, 21(26): 3019-3020.
- [6] 师长宏, 范雄林, 柏银兰, 等. 结核分枝杆菌 Ag85B-ESAT6 融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答及其保护力 [J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(18): 1633-1636.
- [7] 师长宏, 安家泽, 唐小凤, 等. 结核分枝杆菌 MPT64-ESAT6 融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答及其保护力 [J]. 第四军医大学学报, 2006, 27(9): 769-771.
- [8] Lima KM, Santos SA, Lima AM, et al. Single dose of a vaccine based on DNA encoding mycobacterial hsp65 protein plus TDM-loaded PLGA microspheres protects mice against a virulent strain of mycobacterium tuberculosis [J]. Gene Ther 2003, 10(8): 678-685.
- [9] 李忠明. 当代新疫苗 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2001: 163-164.
- [10] Hildegund CJE. DNA Vaccine [M]. Translated by Li QH, Liu LD, Che YC, Beijing: Chemistry Industry Press, 2005: 387-389.

编辑 杨湘华

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)13-1192-01

老年慢性阻塞性肺疾病急性期 66 例的循证护理

唱荣艳, 周晓兰, 周花

(解放军第 451 医院惠宾病房, 陕西 西安 710054)

【关键词】慢性阻塞性肺疾病, 老年人, 循证护理

【中图分类号】R563.1 【文献标识码】B

1 临床资料 2005-07/2007-03 我科治疗的慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 急性发作期患者 66 (男 40, 女 26) 例, 年龄 65 ~ 82 岁. 全部患者均符合 COPD 诊断标准, 并有急性期的临床表现. 呼吸困难, 咳嗽加重, 痰量增加或出现脓性痰和喘息加重. 将病例按入院顺序分为循证组 36 例, 对照组 30 例, 两组具有可比性, 均给予吸 O₂, 控制感染, 解痉平喘, 止咳化痰等治疗. 循证组在此基础上采用雾化吸入异丙托溴铵配合排痰训练. 即在雾化器内加异丙托溴铵 500 μg 用生理盐水稀释至 30 mL 雾化吸入 15 ~ 20 min 2 次/d 7 d. 俯卧位叩背排痰训练: 头部用软枕垫高 15 ~ 30 度, 双手向上, 放于头两侧, 在髌、膝、踝关节外垫软枕. 叩击者以空掌心, 从外向内, 从下向上有规律地叩击, 以 40 ~ 50 次/min 均匀叩击, 振动的相邻部位应重叠 1/3, 力量的强弱以患者能承受为宜. 同时指导患者进行有效的咳嗽排痰, 以利于提高疗效^[1]. 俯卧时个别患者会出现胸闷等不适, 要向患者及家属说明俯卧位可促进排痰, 消除不安

心理, 以取得其理解与配合. 多与患者交谈, 观察其表情, 根据患者的具体情况适当延长或缩短护理过程. 疗效评定: 显效 - 治疗 4 d, 咳嗽、喘、肺部罗音和/或哮鸣音消失; 有效 - 治疗 4 ~ 7 d, 咳嗽、喘、肺部罗音和/或哮鸣音减少或消失; 无效 - 治疗前后无变化或者加重. 结果循证组显效 15 例, 有效 19 例, 无效 2 例, 总有效率 94.4%; 对照组显效 7 例, 有效 18 例, 无效 7 例, 总有效率 78.79%.

2 讨论 COPD 急性期患者应在医生治疗的同时合理地采取氧疗、雾化及体位引流、及时清理呼吸道分泌物等. 循证组采用雾化吸入异丙托溴铵配合排痰训练的方法, 异丙托溴铵可以阻断 COPD 患者呼吸道平滑肌上 M 胆碱受体, 阻断由胆碱能神经引起的支气管痉挛, 使呼吸道扩张、阻力下降, 从而改善通气和氧合, 改善肺功能^[2]. 另外二级以上支气管的走向大多数朝后下方, 仰卧与侧卧均不能达到有效排痰, 由仰卧转为俯卧位, 可使肺内液体重新分布, 减轻肺后部的负担和改善通气, 改善肺前部的灌注, 使通气血流比率更匹配, 使萎缩的肺泡膨胀, 增加功能残气量^[3], 再通过叩背震动患者背部, 可使痰液及时咳出. 通过对 66 例 COPD 急性期患者采取较常规护理更为有效的方法, 增加护理干预的有效性, 提高整体护理水平, 使患者得到更快、更好的恢复.

【参考文献】

- [1] 张丽萍. 阻塞性呼吸道疾病患儿的体位引流及其护理研究 [J]. 中华护理杂志, 1997, 32(10): 559.
- [2] 李靖, 王红玉, 钟南山. 溴化异丙托品与沙丁醇雾化吸入对 COPD 患者的气管扩张作用 [J]. 中国实用内科杂志, 1996, 16(8): 465.
- [3] 王月君. 俯卧位在治疗脑卒中并肺部感染的临床价值 [J]. 实用护理杂志, 2003, 19(4): 15.

收稿日期 2007-04-11; 接受日期 2007-04-30

作者简介 唱荣艳, 本科, 主管护师, 护士长. Tel (029) 84734091

Email: zry2006@126.com

编辑 许昌泰