

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2796(2007)02-0097-03

结核分枝杆菌 *Rv2389* 基因真核表达质粒的构建及表达

薛莹, 柏银兰, 高辉, 王丽梅, 徐志凯 (第四军医大学基础部微生物学教研室 陕西 西安 710033)

Construction and expression of eukaryotic expression vector of *Mycobacterium tuberculosis Rv2389*

XUE Ying, BAI Yin-Lan, GAO Hui, WANG Li-Mei, XU Zhi-Kai
Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】AIM: To construct the eukaryotic expression vector encoding *Mycobacterium tuberculosis Rv2389* and express it in CHO cells. **METHODS:** The gene encoding *Rv2389* protein were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. After sequenced, *Rv2389* gene segments were subcloned into eukaryotic expression vector pCDNA3.1(-). The recombinant plasmid pCDNA-*Rv2389* were transfected into CHO cells with liposome. The expressions of mRNA and protein encoded by this gene were detected respectively with RT-PCR and indirect immunofluorescent technology. **RESULTS:** *Rv2389* was cloned into pCDNA3.1(-) correctly, and its expression at mRNA and protein levels was detected in CHO cells. **CONCLUSION:** Recombinant eukaryotic plasmid encoding *Rv2389* was constructed successfully. The experiment established the basis for further study on the function of *Rv2389*.

【Keywords】 mycobacterium tuberculosis; *Rv2389*; gene expression

【摘要】目的: 构建结核分枝杆菌 *Rv2389* 基因真核表达载体。方法: PCR 扩增 *Rv2389* 基因, 测序正确后克隆入真核表达载体 pCDNA3.1(-), 重组质粒酶切鉴定正确后以阳离子聚合物转染 CHO 细胞后, 分别以 RT-PCR 方法检测 mRNA 表达和间接免疫荧光技术检测目的蛋白的表达。结果: 构建了重组质粒 pCDNA-*Rv2389*, RT-PCR 结果证明 *Rv2389* 可在 CHO 细胞中转录, 间接免疫荧光检测证明, 表达有 *Rv2389* 蛋白的细胞着染。结论: 成功构建了结核分枝杆菌 *Rv2389* 基因的真核表达载体 pCDNA-*Rv2389*, *Rv2389* 基因可以在 CHO 细胞中表达。

【关键词】 分枝杆菌 结核 *Rv2389* 基因表达

【中图分类号】R378.911 **【文献标识码】**A

收稿日期 2006-07-10; 接受日期 2006-08-21

基金项目 国家自然科学基金(30470097, 30500432)

通讯作者 薛莹, 博士, 讲师. Tel: (029) 84774527 Email: x.ying@yeah.net

0 引言

结核病是目前危害全球人类健康的重要传染病。这主要是因为①卡介苗(BCG)对成年人结核病的预防效果不稳定, 保护力为 0%~70%; ②没有特异性的诊断试剂; ③艾滋病等免疫缺陷个体的出现加快了本病的严重后果; ④耐药菌株的大量出现^[1]。因而寻找更有效的替代卡介苗的疫苗已成为当务之急。*Rv2389* 蛋白是结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)复活促进因子(resuscitation-promoting factor, Rpf)样蛋白家族的一员, 序列分析发现, 它不仅与细菌的增殖有关, 还有可能是宿主免疫系统识别的一个靶抗原^[2]。为此, 我们在 *Rv2389* 原核表达和纯化的基础上, 构建了真核表达载体并在 CHO(中国仓鼠卵巢)细胞中进行表达, 同时从其表达水平和基因转录两方面进行鉴定, 为其功能研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料 MTB H37Rv 菌株, P815 细胞由本室保存; 真核表达载体 pCDNA3.1(-)由本室保存; 含有 *Rv2389* 基因的重组质粒 pPro EX HT-*Rv2389* 由本室构建保存; *Rv2389* 蛋白多抗由本实验室制备; AMV, RNA 酶抑制剂和 TRIzol(Promega 公司)限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和核酸分子质量标准品(宝泰克公司)质粒提取试剂盒(Omega 公司); 梭华 soft 阳离子聚合物(厦门太阳马公司); 羊抗鼠荧光抗体(宝信公司)。

1.2 方法

1.2.1 *Rv2389* 基因片段的扩增与测序 结核分枝杆菌 *Rv2389* 全基因序列的特异性引物序列为: P1: 5'-gga tcc gcc acc atg acc ccg ggt ttg ctt ac-3', 含 *Bam*H I 酶切位点, 起始码和 *cozak* 序列; P2: 5'-ccg aag ctt atc gtc cct gct ccc cga tga-3', 含 *Hind* III 酶切位点和终止码。PCR 反应条件: 94℃ 40 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。回收 PCR 产物, 用 T4 连接酶将 PCR 产物与 pGEM-T-easy 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 α , 随机挑取 5 个克隆提取质粒进行双酶切鉴定, 取 2 个鉴定正确的克隆进行测序^[3]。

1.2.2 重组质粒的构建及鉴定 将测序正确的

Rv2389 基因克隆至真核表达载体 pCDNA3.1(-), 构建重组质粒 pCDNA-*Rv2389*. 连接转化、质粒提取均按文献进行^[3]. 以 *Bam*HI 和 *Hind*III 酶切 pCDNA-*Rv2389* 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒.

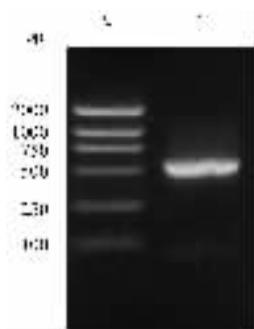
1.2.3 细胞转染 将 5×10^5 个 CHO 细胞接种于 6 孔板 细胞数量达孔底约 2/3 时进行转染. 转染前用不含抗生素的 1640 培养液洗 2 次, 以 0.5 mL 1640 培养液重悬细胞. pCDNA-*Rv2389* 重组质粒 10 μ L 和阳离子聚合物 5 μ L 各用 80 μ L 无血清的 1640 培养液稀释, 两者混匀后室温作用 20 min 缓慢加入到细胞中. 培养 24 h 后收集细胞 同时设正常细胞对照.

1.2.4 RT-PCR 检测 mRNA 表达 收集重组质粒转染的 CHO 细胞 2000 r/min 离心 10 min. 参照 Gibco 的 TRIzol 试剂盒说明书提取细胞 mRNA. 在上述 10 μ L mRNA 溶液中, 加入 1 μ L Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 引物, 70 $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后立即置于冰上, 加 10 \times buffer 4 μ L, MgSO₄ 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, RNA inhibitor 0.6 μ L, AMV 0.8 μ L H₂O 10.4 μ L. 混匀 42 $^{\circ}$ C 作用 1 h, 70 $^{\circ}$ C 15 min 终止反应. PCR 反应时加入 cDNA 第 1 链 2 μ L, 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共进行 30 个循环, 末次循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 扩增产物以 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.5 间接免疫荧光检测目的基因表达 将转染 pCDNA-*Rv2389* 质粒的 CHO 细胞爬片, 用纯化的 *Rv2389* 融合蛋白制备的免疫血清作为一抗, 间接免疫荧光法检测 CHO 细胞中融合蛋白的表达^[4].

2 结果

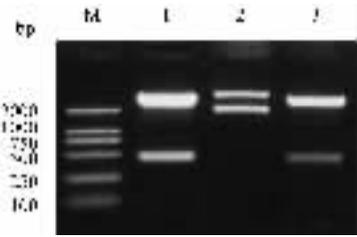
2.1 目的基因的扩增、克隆及酶切鉴定 用 PCR 方法从 H37Rv 中扩增出 *Rv2389* 的 DNA 片段, 被顺利克隆入 pGEM-T-easy 载体, 测序证实所克隆的基因完全正确. 序列分析与 GenBank 报道的一致(图 1).



M DL2000 marker 1 PCR 产物.

图 1 *Rv2389* 基因的 PCR 结果

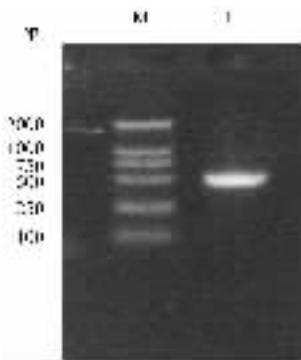
2.2 重组质粒的酶切鉴定 重组质粒 pCDNA-*Rv2389* 被 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后可得到约 475 bp 的片段, 与预期的大小相一致(图 2).



M DL2000 marker; 1~3: pCDNA-*Rv2389* 被 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切.

图 2 重组质粒的酶切鉴定

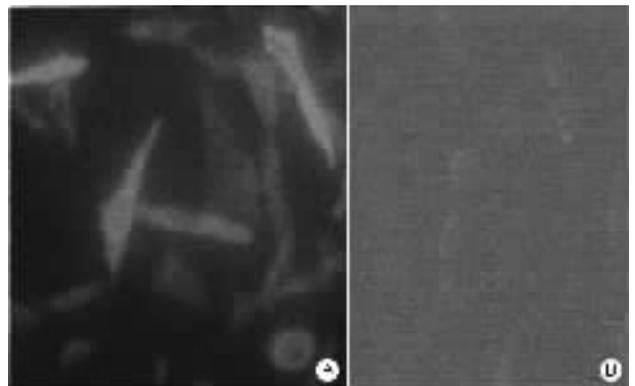
2.3 RT-PCR 检测 mRNA 表达 在约 475 bp 处扩增出特异性基因(图 3)表明 pCDNA-*Rv2389* 重组质粒可以在 CHO 细胞中转录.



M DL2000 marker 1: RT-PCR 产物.

图 3 重组质粒转染 CHO 细胞的 RT-PCR 结果

2.4 间接免疫荧光检测目的基因表达 转染细胞在经过间接免疫荧光染色后, 阳性细胞有较强的荧光着染, 表达蛋白定位于细胞膜上, 而对照组细胞没有着染(图 4).



A *Rv2389* 融合蛋白在 CHO 细胞内表达; B 对照.

图 4 间接免疫荧光测定融合蛋白在 CHO 细胞中的表达 $\times 400$

3 讨论

Mukamolova GV 等^[5]研究发现藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*, *M. luteus*)可分泌一种 Rpf, 该因子可刺激该菌休眠体复活和生长, 也可促进繁殖体生长, 研究证实 Rpf 作用与真核细胞的细胞因子相似, 具有自我刺激作用又称细菌因子。同时进一步研究证实该因子也可以刺激其他种类的高(G + C)% 的革兰阳性菌, 包括结核分枝杆菌。结核分枝杆菌全基因序列分析表明, 其中 Rv1884c, Rv2450c, Rv0867c, Rv1009, Rv2389c 和基因与 *M. luteus* 菌 Rpf 基因同源, 其中 4 个基因编码的蛋白是分泌蛋白, 推测结核杆菌这些基因编码的蛋白可能也具有 Rpf 作用, 但尚无直接证据^[5-6]。Sasseti 等^[7]采用大规模插入突变分析发现 Rpf 样蛋白并不是 H37Rv 株生长所必需, 而且这 5 种 Rpf 样蛋白在功能上有一定的重叠。因为突变 Rv1009 基因可明显减缓 MTB 的生长速度, 提示其在 MTB 的生长中可能发挥着较为重要的作用。以往研究^[8]表明, MTB H37Rv 株的几种 Rpf 样蛋白与 *M. luteus* 的 Rpf 蛋白一样, 都属于膜蛋白, 因而这些蛋白(或者这些蛋白中的某个或某几个蛋白)有可能会被宿主的免疫系统所识别, 从而有可能作为亚单位疫苗的备选组分。

近年来, 国外在 TB 新型疫苗或增强 BCG 免疫效果方面已作了大量的研究工作, 并正在进行大规模的候选疫苗筛选工作。由于结核分枝杆菌 Rpf 家族蛋白不仅可以促进结核休眠菌复活, 而且还具有多种生物学活性如自溶素和/或青霉素结合蛋白的功能、细胞学方面的功能等^[9], 此外这几种 Rpf 样蛋白与 *M. luteus* 的 Rpf 蛋白一样, 都属于膜蛋白, 因而这些蛋白(或者这些蛋白中的某个或某几个蛋白)有可能会被

宿主的免疫系统所识别, 从而有可能作为亚单位疫苗的备选组分。在本实验中, 我们在 Rv2389 原核表达和纯化的工作基础上构建了真核表达载体并在 CHO 细胞中进行表达, 同时从其表达水平和基因转录两方面进行鉴定, 为其在新型疫苗的应用中奠定了基础。

【参考文献】

- [1] Kumar H, Malhotra D, Goswami S, et al. How far have we reached in tuberculosis vaccine development? [J]. Crit Rev Microbiol, 2003 29(4) 297 - 312.
- [2] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, et al. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Mol Microbiol, 2002 46(3) 623 - 635.
- [3] 高雪, 薛莹, 姜泓, 等. 结核分枝杆菌 furA 基因片段的克隆、表达和分离纯化 [J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(18) : 1637 - 1640.
- [4] 师长宏, 范雄林, 徐志凯, 等. 融合表达 Ag85B-ESAT6 的结核分枝杆菌真核表达载体的构建及其免疫原性 [J]. 第四军医大学学报, 2004 25(2) 121 - 124.
- [5] Mukamolova GV, Kaprelyants AS, Young DI, et al. A bacterial cytokine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(15) 8916 - 8921.
- [6] Martin CG, Nicholas HK, Angharad PD, et al. Resuscitation-promoting factors possess a lysozyme-like domain [J]. Trends Biochem Sci, 2004 29(1) 7 - 10.
- [7] Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis [J]. Mol Microbiol, 2003 48(1) 77 - 86.
- [8] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed JD, et al. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: A genome-based survey of the secretome [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2000, 64(3) : 515 - 547.
- [9] Smith TJ, Blackman SA, Foster SJ. Peptidoglycan hydrolases of *Bacillus subtilis* 168 [J]. Microb Drug Resist, 1996 2(1) 113 - 118.

编辑 王睿