

【论著摘要】

文章编号: 1000-7423(2001)-06-0375-01

恶性疟原虫 FCC1/HN 株环孢子蛋白基因在 BCG 中的表达

郑春福¹ 吴少庭¹ 陈雅棠² 高世同¹ 林敏¹ 梁驹卿³

中图分类号: R382.312

文献标识码: A

卡介苗(BCG)由于其广泛应用的安全性和免疫佐剂作用,因而近年来以 BCG 为载体的重组疫苗研究日益受到重视^[1]。环孢子蛋白(circumsporozoite protein, CSP)分子量为 40~60 kDa,是一种覆盖于子孢子表面的蛋白,是目前已鉴定的子孢子特异性抗原分子,也是疟疾疫苗候选抗原之一^[2]。本研究将克隆有 CSP 基因的重组大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG/CSP 通过电穿孔转化法导入 BCG,观察其在 BCG 中的表达情况。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、载体及宿主菌 丙烯酰胺、N,N'-丙烯酰胺亚甲双、考马斯亮蓝、二巯基苏糖醇、过硫酸胺等为 Sigma 产品。恶性疟原虫阳性血清采集自海南省疟疾病人,HRP 酶标羊抗人 IgG 购自上海生物制品研究所, Middle Brook 7H9 (M7H9)培养基购自美国 Difco 公司, ADC Enrichment 为美国 BD 公司产品。pBCG5.6 为本实验室保存质粒,重组大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG/CSP 为自行构建,BCG 为兰州生物制品研究所产品。

1.2 分枝杆菌的培养与转化 将 BCG 接种于含 10% ADC 的 M7H9-Tween80 (含 0.05%)液体培养基中,37℃ 培养至对数生长期(OD₆₀₀ 为 0.5~1.0),冰浴 2.5 h;4℃ 4 500 g 离心 10 min,收集细菌,沉淀悬浮于 100 ml 预冷的 10%甘油中,4℃ 2 700 g 离心 10 min,沉淀悬浮于 50 ml 预冷的 10%甘油中,4℃ 1 800 g 离心 10 min,沉淀悬浮于 25 ml 预冷的 10%甘油中,4℃ 1 350 g 离心 10 min,沉淀悬浮于 1.5 ml 预冷的 10%甘油中,用于电转化。取 100 μl 细菌于 Ep 管中,加入约 0.1~1.0 μg 的重组质粒 pBCG-CSP,混匀后转移至电穿孔杯中,置冰浴 10~15 min;置 electroporator(Eppendorf)进行电转化,转化时间约为 5 s,转化后立即加入 1 ml M7H9ADC 培养基中,混匀,转入玻璃试管,37℃ 温育 2 h,取 0.1~0.2 ml 涂布于含 25 μg/ml 卡那霉素的 M7H9ADC 培养基平板上,37℃ 孵育,4~6 wk 后长出菌落。

1.3 BCG 的诱导表达 从含 25 μg/ml 卡那霉素的 M7H9ADC 培养基平板上挑取转化有 pBCG-CSP 的 BCG 重组子接种于 M7H9ADC 液体培养基中,37℃ 培养 4 wk 至对数生长期,收菌前 3 天每天 45℃ 热诱导 45 min,离心收集菌体,沉淀悬浮于预

冷的 PBS 中进行超声粉碎,然后加入等体积 2×SDS 加样缓冲液(0.1 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 10% 二巯基苏糖醇, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20% 甘油)100℃, 4~8 min。

1.4 SDS-PAGE 参考文献[3,4],取 25 μl 上述处理后的菌液用于 SDS-PAGE 分析,用 0.25% 考马斯亮蓝 R250 染色。

1.5 Western blotting 参考文献[3,4],菌体蛋白经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,用电泳转移装置将蛋白区带转移至硝酸纤维素膜上进行 Western blotting 分析。

2 结果

2.1 CSP 基因在 BCG 中表达产物的 SDS-PAGE 分析 含重组大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG/CSP 的重组 BCG 培养 4 wk 后,经 45℃ 诱导,在分子量接近 42 kDa 处有明显的表达蛋白带。

2.2 CSP 基因在 BCG 中表达产物的 Western blotting 分析 含重组大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG/CSP 的重组 BCG 表达产物经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至硝酸纤维素膜上,用于 Western blotting 分析,发现在近 42 kDa 处有一特异性的反应区带。

3 讨论

本实验室将恶性疟原虫的 CSP 基因按正确的阅读框顺序插入到 pBCG5.6,受控于人结核杆菌 hsp70 启动子,构建成重组 pBCG-CSP,在大肠杆菌-分枝杆菌两个系统中均能稳定复制,从而提高插入基因片段的高效表达。通过电穿孔转化法获得含有 pBCG-CSP 的重组 BCG,经培养和诱导表达后的产物进行 SDS-PAGE 及免疫印迹分析,均发现分子量约为 42 kDa 的 CSP 蛋白,可见恶性疟原虫环孢子蛋白在分枝杆菌中得到表达。

参 考 文 献

- [1] 郑春福. 基因重组卡介苗. 国外医学:预防、诊断、治疗用生物制品分册, 1999, 22: 193-195.
- [2] Lal AA, de la Cruz VF, Welsh JA, et al. Structure of the gene encoding the circumsporozoite protein of *Plasmodium yoelii*. A rodent model for examining antimalarial sporozoite vaccines. *J Biol Chem*, 1987, 262: 2937-2940.
- [3] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 第 1 版. 北京: 高等教育出版社, 1993: 101-113.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989, 173-189.

(收稿日期: 2001-01-11 编辑: 庄兆农)

作者单位: 1 深圳市卫生防疫站, 深圳 518020; 2 重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所, 重庆 400016; 3 广东省妇幼保健院, 广州 510001
· 现工作单位: 重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所, 重庆 400016