

变形链球菌表面蛋白真核表达载体 pDNA3-PAc 的构建

I. 质粒DNA pPC41和pDNA3的提取与纯化

刘建国 刘天佳 周学东 刘 莉 贾文祥 詹 玲

摘要 目的: 从大肠杆菌克隆子中提取和纯化质粒DNA pPC41和pDNA3。方法: 采用碱裂解法将质粒DNA从菌体细胞中分离出来, 进一步用聚乙二醇沉淀法、透析袋电洗脱法、低熔点胶回收法、玻璃纤维柱层析法纯化质粒DNA。用分光光度法测其 A_{260} 、 A_{280} 值, 确定其浓度和纯度。通过酶切分析确定其质粒大小。结果: 4种方法获得的质粒DNA浓度为0.12~0.24 g/L, 聚乙二醇沉淀法、透析袋电洗脱法、低熔点胶回收法和玻璃纤维柱层析法的 A_{260}/A_{280} 比值依次为1.9、2.2、2.2、2.6。酶切鉴定质粒pPC41大小为10.6 kb, pDNA3大小为5.4 kb。结论: 4种方法均能有效地从大肠杆菌克隆子中提取和纯化得到质粒DNA。其中玻璃纤维柱层析法获得的质粒DNA纯度最高, 是获取高纯度质粒DNA的有效方法之一。

关键词 变形链球菌 表面蛋白抗原 质粒DNA 纯化

变形链球菌是龋病的主要致病菌¹。表面蛋白PAc(又被称之为Ag I/II、P1)是变形链球菌致龋的主要毒力因子之一, 它具有良好的免疫原性。PAc的亚单位疫苗、多肽疫苗和基因工程疫苗免疫动物, 均观察到明显的抗龋作用^{2~4}。编码表面蛋白PAc的基因已被成功地克隆, 其核酸和氨基酸序列以及蛋白分子中各功能区的生物学特性与功能之间的关系有了较深入的研究, 为研究防龋基因疫苗提供了理论依据^{5~7}。

本实验拟从大肠杆菌克隆子中提取和纯化带有变形链球菌表面蛋白PAc结构基因(pac)的质粒pPC41、真核表达载体pDNA3, 并对其浓度、纯度及分子量进行测定, 为进一步构建防龋基因疫苗提供实验依据和物质基础。

1 材料和方法

1.1 菌种

E. coli MC1061(含质粒pPC41, 湖北医科大学口腔医学院樊明文教授惠赠), E. coli JM103(含pDNA3, 法国国家科学研究中心W. Hahen教授惠赠)。

1.2 主要试剂

RNase A、溶菌酶(美国Sigma公司), 层析柱式质粒抽提试剂盒(德国BM公司), DNA/HindIII分子量Marker(华美生物工程公司), 低熔点琼脂糖(美国Promega公司), 其余试剂为国产分析纯级(AR)产品。

1.3 细菌培养

将甘油-20°保种的E. coli MC1061(pPC41)和JM103(pDNA3)接种于3 ml含氨苄青霉素(100 μg/ml)的SOB培养基中, 37°活化。再次转种于含相同抗生素的400 ml SOB培养基中增菌(37°, 振荡过夜至培养液 A_{600} =1.0~1.5)。

1.4 细菌的收集和裂解

收集菌液于50 ml离心管中, 冰浴30 min, 离心(5000 g × 10 min), 弃上清, 控干。每管加4 ml溶液I、100 μl溶菌酶(50 mg/ml), 充分混匀后加新配制的溶液II 8 ml, 温和振荡, 室温放置10 min, 加6 ml预冷的溶液III, 混匀, 冰浴10 min后高速离心(13000 g × 10 min), 上清转入另一离心管中, 加2倍体积预冷无水乙醇混匀, -20°下过夜, 高速离心(13000 g × 10 min), 弃上清, 沉淀悬浮于Tris/EDTA(TE)缓冲液中。

1.5 质粒DNA的分离和纯化^{8~10}

1.5.1 聚乙二醇沉淀法 取15 ml核酸溶液, 加15 μl RNase A(10 mg/ml), 37°水浴30 min, 加375 μl 20% SDS, 65°水浴30 min, 加3.5 ml 5 mol/L乙酸钾(KAc), 冰浴2 h, 离心(10000 g × 10 min), 取上清, 每毫升上清加0.5 ml 13%聚乙二醇(PEG8000)-NaCl溶液, 4°过夜, 离心(10000 g × 10 min), 弃上清, 5 ml TE缓冲液溶解沉淀。等体积的酚、氯仿-异戊醇各抽提1次, 吸取上层水相, 加5 mol/L

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号39770797)

作者单位: 610041 华西医科大学口腔医学院(刘建国, 刘天佳, 周学东, 詹玲), 基础医学院(刘莉, 贾文祥)

NaCl 至终浓度0.3 mol/L, 加2倍体积预冷无水乙醇沉淀DNA, -70 放置1 h, 离心(10000 g × 10 min), 弃上清, 真空干燥去水份, 100 μl TE 缓冲液溶解沉淀。

1.5.2 透析袋电洗脱法 将核酸样品在含有0.5 mg/L 溴化乙锭(EB)的0.8% 琼脂糖中电泳, 紫外分析仪下切取含有质粒DNA 条带的琼脂糖置于预处理过的透析袋中, 将透析袋浸泡于盛有1倍的 Tris-乙酸缓冲液的电泳槽内, 电泳2~3 h 后倒转电泳极性, 电泳1 min, 将从凝胶中释放到袋内壁, 又从袋内壁进入缓冲液中的DNA 按酚-氯仿法抽提纯化。

1.5.3 低熔点琼脂糖凝胶回收法 灌制一块含1% 浓度低熔点琼脂糖的凝胶, 将核酸样品加入样品槽中, 电泳1~2 h, 紫外分析仪下切取含质粒DNA 条带的凝胶, 加5倍体积 TE 缓冲液65 温育10 min, 自然冷却至室温后加等体积酚混匀, 离心(5000 g × 10 min), 回收上相, 按酚-氯仿法纯化。

1.5.4 玻璃纤维柱层析纯化法 将核酸溶液加至过滤管内, 高速离心(13000 g × 1 min), 然后, 依次加入500 μl 清洗缓冲液(washing buffer) I、700 μl 清洗缓冲液 II, 分别高速离心(13000 g × 1 min), 最后加100 μl 洗脱缓冲液, 高速离心(13000 g × 1 min), 收集的洗脱液即为纯化的DNA。

1.6 质粒DNA 浓度、纯度及大小鉴定

1.6.1 浓度、纯度测定 在UV-265型分光光度计上测定质粒DNA 的A₂₆₀/A₂₈₀, 鉴定核酸样品的纯度并计算其含量。

1.6.2 质粒大小鉴定 将纯化所得的质粒用在pPC41和pDNA 3中均只有一个酶切位点, 产生单一片段的核酸内切酶BamHI酶切, 以λDNA/HindIII作为Marker, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外分析仪下观察其迁移距离以确定质粒大小。

2 结 果

2.1 质粒DNA pPC41、pDNA 3分离纯化

4种纯化方法均获得了纯化的质粒DNA, 电泳图谱呈现清晰的质粒DNA 条带, 未见有拖尾现象(图1、2)。

2.2 质粒DNA 浓度、纯度及质粒大小测定

经紫外分光光度法测定pPC41紫外吸光光谱呈标准的DNA 吸收曲线, 在260 nm 处有一吸收高峰, 不同方法获得的核酸浓度为0.12~0.24 g/L, 聚乙二醇沉淀法、透析袋电洗脱法、低熔点胶回收法和玻璃纤维柱层析法的A₂₆₀/A₂₈₀ 比值分别为1.9 2.2 2.2 2.6

pPC41和 pDNA 3经 BamHI 酶切后呈单一条带, pPC41位于 10.6 kb 处, pDNA 3位于5.4 kb 处

(图3)。

3 讨 论

3.1 质粒pPC41和pDNA 3

质粒 pPC41是日本学者 Okahashi 等⁶ 构建的携带有变形链球菌表面蛋白 PAc 编码基因 pac 的克隆, 全长10.6 kb。它是经 Pst I 酶切变形链球菌 MT8148染色体DNA, 通过 T4 DNA 连接酶, 将酶切片段与经相同酶切, 并经碱性磷酸酶处理的 pUC118连接而成。经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 显示携带嵌合质粒的大肠杆菌产生 1.9 × 10⁵ u 的多肽, 免疫扩散分析显示克隆表达的 PAc 和变形链球菌产生的 PAc 具有相同的特异性抗原决定簇。

pDNA 3是目前比较常用的真核表达质粒, 已由美国 Invitrogen 公司商品化供应。它具有真核表达质粒所必备的功能元件: 真核表达启动子 CMV、多克隆位点、终止信号、牛生长激素 pby(A)、真核表达抗性标志——SV 40启动子启动的新霉素抗性基因、原核复制子和选择性基因——氨苄青霉素抗性基因^{11、12}。

质粒 pPC41和 pDNA 3经单一酶切证实大小与预测的一致, 结果提示所获得的质粒即大小为 10.6 kb 的 pPC41和5.4 kb 的 pDNA 3。

3.2 质粒提取和纯化的方法

从大肠杆菌细胞中分离质粒DNA 的方法主要有碱裂解法、煮沸法、SDS 裂解法、Triton-溶菌酶裂解法。本实验选用碱裂解法。它是利用染色体DNA 和质粒DNA 的变性和复性的不同来进行分离的。在pH 高达12.6的碱性条件下, 染色体DNA 的氢键断裂, 双螺旋结构解开而变性。同时, 质粒DNA 的大部分氢键也断裂, 但超螺旋共价闭环结构的两条互补链不会完全分离, 当用pH4.8的乙酸钠(NaAc)调节pH 至中性时, 变性的质粒DNA 又恢复到原来的构型, 而染色体DNA 不能复性, 呈缠连的网状结构。通过离心, 染色体DNA 与不稳定的大分子RNA、蛋白质-SDS 复合物等一起沉淀下来被除去^{7、9}。

质粒DNA 的纯化方法较多, 目前常用的有聚乙二醇沉淀法、柱层析法、氯化铯-溴化乙锭梯度平衡超速离心法、透析袋电洗脱法、低熔点琼脂糖电泳回收法等。当A₂₆₀/A₂₈₀ 比值在1.9~2.0时, 表

明核酸样品达到要求的纯度, 当有蛋白质或酚污染时比值下降⁷⁻⁹。本研究采用聚乙二醇沉淀法、透析袋电洗脱法、低溶点胶回收法及玻璃纤维柱层析法4种方法获得的质粒DNA A_{260}/A_{280} 比值在1.9~2.6之间, 均达到要求的纯度。聚乙二醇沉淀法所得核酸纯度虽然比另3种方法低, 而且费时, 但便于大量质粒DNA的纯化, 成本低。透析袋电洗脱法和低溶点胶回收法均能获得较纯的质粒DNA, 但二者必须经过电泳, 纯化质粒DNA的量受到一定限制, 而且成本较聚乙二醇沉淀法高。玻璃纤维柱层析法获得的质粒DNA最纯。玻璃纤维层析柱在柱底有两层羊毛绒状的玻璃纤维, 核酸能在数秒钟内吸附至玻璃纤维上, 经不同洗液清洗, 最后, 用pH8.0的TE缓冲液洗脱, 使吸附在玻璃纤维上的核酸解离⁸。但每个层析柱最多只能承受700 μ l含10~15 μ gDNA的样品液, 成本较高, 不便于大量制备DNA。

(本文图见中心插页16)

4 参考文献

- 1 Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev*, 1986, 50(4): 353~380
- 2 Lehner T, Russell MW, Caldwell J, et al. Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys. *Infect Immun*, 1981, 34(3): 407~415
- 3 Iwaki M, Okahashi N, Takahashi J, et al. Oral immuniza-

tion with recombinant *Streptococcus lactis* carrying the *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene. *Infect Immun*, 1990, 58(12): 2929~2934

- 4 Lehner T, Haron J, Bergmeier LA, et al. Local oral immunization with synthetic peptides induces a dual mucosal IgG and salivary IgA antibody response and prevents colonization of *Streptococcus mutans*. *Immunology*, 1989, 67(5): 419~424
- 5 刘建国. 变链球菌表面蛋白P1和P1样蛋白分子结构研究概况. *国外医学口腔医学分册*, 1998, 25(5): 261~264
- 6 Okahashi N, Koga T, Hamada S. Purification and immunochemical properties of a protein antigen from serotype g *Streptococcus mutans*. *Microbiol Immunol*, 1986, 30(1): 35~37
- 7 Lee SF, Ann PF, Bleiv eis AS, et al. Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen P1(I/II) in *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 1988, 56(11): 2114~2119
- 8 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 21~40
- 9 李尹雄. 核酸的分离与纯化. 见: 卢圣栋主编. *现代分子生物学实验技术*. 北京: 高等教育出版社, 1993: 95~134
- 10 Chen CW, Thomas CA. Recovery of DNA segments from agarose gels. *Anal Biochem*, 1980, 101(6): 339~341
- 11 Whalen RG. DNA vaccines cyberspace and self-help programs. *Intervirology*, 1996, 39(1): 120~125
- 12 Aguado MT, Bazin H, Rabinovich R, et al. International meeting on nucleic acid vaccines for the prevention of infectious diseases. *Vaccine*, 1997, 15(12): VII

(1999-07-01收稿)

Construction of *Streptococcus mutans* Surface Protein Antigen Eukaryotic Expression Vector pDNA3-Pac

I. Extraction and Purification of Plasmid DNA pPC41 and pDNA3

Li u Jianguo, Li u Tianjia, Zhou Xuedong, et al

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Li u Li, Jia Wenxiang

College of Basic Medical Sciences, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: To Extract and purify plasmid DNA pPC41 and pDNA3. **Methods:** Bacteria were collected and lysed by the alkaline lysis method. The plasmid pPC41 carrying structural gene pac and clone expression vector pDNA3 were extracted and purified from *E. coli* clone by the polyethylene glycol precipitating method, the electroelution into dialysis bags method, the low melting-temperature agarose gel and glass fiber column chromatography. The concentration, purity and molecular weight were determined by spectrophotometry, restriction enzyme and agarose gel electrophoresis. **Results:** The concentration of plasmid DNA of this experiment in general was 0.12~0.24 g/L, and A_{260}/A_{280} of the polyethylene glycol precipitating method, the electroelution into dialysis bags method, the low melting-temperature agarose gel and glass fiber column chromatography were respectively 1.9, 2.2, 2.2 and 2.6. Molecular weight of pPC41 and pDNA3 was respectively 10.6 kb and 5.4 kb. **Conclusion:** The four methods can obtain pure plasmid DNA. Purity of plasmid DNA obtained by glass fiber column chromatography method is the highest in the four methods. Glass fiber column chromatography is one of the effective methods getting highly purified plasmid DNA.

Key words: *streptococcus mutans* surface protein antigen plasmid DNA purification

变形链球菌表面蛋白真核表达载体p cDNA3-PAc的构建

I. 质粒DNA pPC41和p cDNA3的提取与纯化

(正文见第361页)

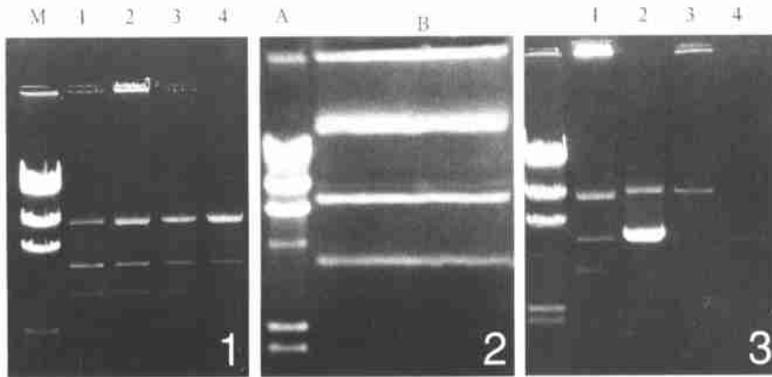


图1 质粒DNA pPC41的纯化
M: λDNA/HindIII酶切, 1: 柱层析法, 2: 聚乙二醇法, 3: 透析袋电洗脱法, 4: 低熔点胶回收法
图2 低熔点胶回收法纯化质粒pPC41
A: λDNA/HindIII酶切, B: 进入低熔点胶中的pPC41
图3 pPC41和pcDNA3质粒大小测定
M: λDNA/HindIII酶切, 1: pPC41, 2: pcDNA3, 3: pPC41/BamHI酶切, 4: pcDNA3/BamHI酶切

变形链球菌表面蛋白真核表达载体pcDNA3-PAc的构建

II. 玻璃纤维质粒分离纯化层析柱重复利用有效性的验证

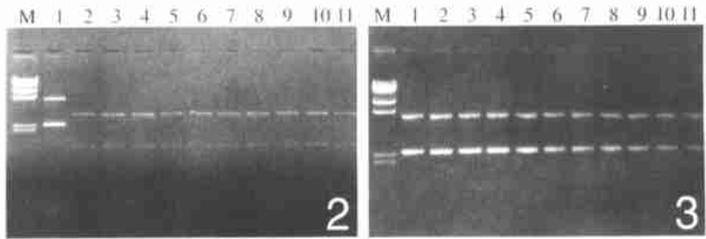
(正文见第364页)

图2 质粒RSV-BL酶切分析

M: λDNA3/HindIII酶切, 1: 质粒RSV-BL, 2-11: 代表1-10次抽提样品经EcoRI酶切

图3 质粒RSV-BL电泳图

M: λDNA3/HindIII酶切, 1-11: 代表1-11次抽提的样品



颌下淋巴结Burkitt's恶性淋巴瘤一例报告

(正文见第324页)

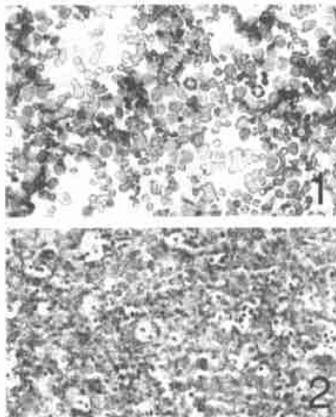


图1 细胞学涂片检查见肿瘤细胞大, 较一致, 几乎为裸核, 核分裂象易见 瑞氏 ×200

图2 镜检检查见肿瘤细胞中等大小, 形态一致, 巨嗜细胞分布于肿瘤细胞间, 呈“星空现象” HE ×100

多发性埋伏多生牙并先天缺牙一例报道

(正文见第354页)



图1 多发性埋伏多生牙并先天缺牙全口曲面断层片