

esat6 基因表达载体的构建及其在戈登链球菌中的表达

贾 平 杜先智*

(重庆医科大学附属第二医院 重庆 400010)

摘 要: 为了构建结核分枝杆菌(MTb)esat6 基因表达载体并在戈登链球菌 GP251 中进行分泌表达, 以结核杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板扩增 esat6 基因, 将 esat6 基因 TA 克隆到 pMD18-T, 构建 pMD18-esat6 重组载体。酶切消化 pMD18-esat6, 将 esat6 基因亚克隆到质粒 PSMB104, 生成 PSMB104-esat6 重组载体, 用于转化感受态戈登链球菌表达菌株 GP251。用 Tricine-SDS-PAGE 和 Western 印迹检测 esat6 蛋白的表达, 并用 ELISA 技术检测该蛋白的分泌表达量。结果表明, 酶切、PCR、测序及蛋白表达测定证实 esat6 基因表达载体构建成功, 转化戈登链球菌表达菌株 GP251 后可分泌表达出相对分子质量约 10 kD 的 esat6 蛋白, Western 印迹证明蛋白有较好的免疫原性。esat6 基因表达载体的成功构建并能在戈登链球菌 GP251 中进行分泌表达, 为研究 esat6 的免疫原性奠定了一定的基础。

关键词: 戈登氏链球菌, 黏膜疫苗, esat6 基因

Construction of the Recombinant Plasmid with esat6 Gene and Its Expression in *Streptococcus gordonii*

JIA Ping DU Xian-Zhi*

(The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: To construct expressing vector carrying esat6 gene and express this protein in *Streptococcus gordonii* GP251. esat6 gene was amplified by PCR with specific primer from genome of *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)H37Rv. Inserted esat6 into the pMD18-T vector by T/A clone to get recombinant vector pMD18-esat6. Then digested pMD18-esat6 with restriction enzyme, esat6 was cloned to vector PSMB104 and expressed in *Streptococcus gordonii* GP251. The expression of esat6 protein was detected by Tricine-SDS-PAGE and Western-blot, ELISA technique was also used to detect its secretory volume. Restriction endonuclease, PCR, Tricine-SDS-PAGE and Western-blot confirmed that esat6 gene was cloned into expressing vector successfully, and a 10 kD protein secreted in *Streptococcus gordonii* GP251, this protein has a good immunogenicity. The expression vector of esat6 gene was constructed, and esat6 protein expressed in *Streptococcus gordonii*1 successfully, it will be benefit for future study.

基金项目: 国家自然科学基金专项基金项目(No. 30540051); 重庆市科委重大科技攻关项目(No. CSTC, 2005AC5061)

* 通讯作者: ✉ dxzdjy868@sina.com

收稿日期: 2008-08-25; 接受日期: 2008-11-18

Keywords: *Streptococcus gordonii*, Mucosa vaccine, *esat6* gene

结核病(TB)是结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)引起的一种流传广、危害大的传染病,近年来发病率和死亡率不断上升。卡介苗(BCG)是目前世界上唯一可应用的抗结核疫苗,具有安全、廉价、可有效预防儿童型结核感染的优点,但不能预防常见的成人型肺结核,且效果呈现一个较大范围(0~80%)的波动^[1]。为此迫切需要研制新型结核疫苗。

与传统疫苗相比,黏膜疫苗有许多优势,它能持续表达目的抗原,可望通过一次局部黏膜接种,通过持续激活机体局部和系统双重免疫反应,实现对病原菌长期的免疫应答,因而具有更好的免疫效果。戈登氏链球菌是存在于人类口腔的一种非致病性黏膜共生菌,该菌具有在人体持续增殖的潜力,并能稳定表达外源蛋白,是较有前景的黏膜疫苗载体^[2]。*esat6* 是结核分枝杆菌的早期分泌性低分子量蛋白,具有良好的抗原性^[3]。*esat6* 仅存在于致病性分枝杆菌中,在 BCG 和环境分枝杆菌中均缺失,能诱导机体产生强烈的 T 细胞免疫应答和释放高水平 IFN- γ 。本研究旨在构建结核分枝杆菌(Mtb) *esat6* 基因表达载体,并期望其在戈登氏链球菌中分泌表达,为研制结核黏膜疫苗奠定一定的实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

结核分枝杆菌 H37Rv 株由重庆医科大学微生物学教研室朱道银教授惠赠,戈登链球菌表达株 GP251 和表达质粒 PSMB104 由美国 SIGA 生物技术公司 Kevin F Jones 教授惠赠, *E. coli* DH5 α 菌株由重庆医科大学检验系实验室保存。工具酶 *Kpn* I、*Eco*RI, PCR *Taq* 酶, T 载体 pMD18-T Simple Vector, T4 DNA 连接酶等由宝生物大连公司提供。基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、反应产物回收试剂盒、胶回收试剂盒购自上海华舜公司。ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物公司。核酸分子量标准品,蛋白分子量标准品分别购自宝生物公司和 fermentas 公司,鼠单克隆抗体 ESAT6(HYB 076-08, 编号 sc-57730)购自 Santa 公司。

1.2 结核杆菌 H37Rv 株基因组 DNA 的提取与纯化
将结核分枝杆菌 H37Rv 株接种于 7H9 培养基中,

于 37°C 培养 4 周, DNA 的提取与纯化参照基因组提取试剂盒说明书进行。

1.3 目的基因 *esat6* 的 PCR 扩增

按 *esat6* 的基因序列设计一对引物,上游引物 P1(GGTACCACAGAGCAGCAGTGG, 起始密码已去除,下划线为 *Kpn* I 酶切位点),下游引物 P2(GAA TTCCTATGCGAACATCCCAG, 下划线为 *Eco*RI 酶切位点),引物由宝生物公司合成。PCR 扩增体系中所用模板为结核杆菌 H37Rv 株基因组 DNA,反应条件为:94°C 5 min; 94°C 30 s, 53°C 30 s, 72°C 40 s, 30 个循环; 72°C 5 min。

1.4 重组质粒 PSMB104-*esat6* 的构建及鉴定

将 PCR 纯化产物和 pMD18-T Simple 载体在 16°C 水浴中连接过夜,并转化已制备的感受态 DH5 α , 挑选阳性单个菌落经培养后提取重组质粒 pMD18-*esat6*。用 *Kpn* I 和 *Eco*RI 双酶切重组质粒 pMD18-*esat6*, 经 1%琼脂糖凝胶电泳后回收 285 bp *esat6* 基因小片段。将 *esat6* 基因亚克隆至质粒 PSMB104, 构建成含有 *esat6* 的重组表达质粒 PSMB104-*esat6*。TA 克隆、质粒提取、DNA 片段回收、连接均按试剂盒说明书进行。感受态大肠杆菌的制备、转化按标准程序进行。用 *Kpn* I 和 *Eco*RI 双酶切 PSMB104-*esat6*, 以 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定重组质粒; 测序鉴定:由大连宝生物公司对 *esat6* 基因片段进行测序鉴定。

1.5 *esat6* 在戈登链球菌 GP251 中的表达

1.5.1 戈登链球菌 GP251 感受态的制备:将戈登链球菌 GP251(氯霉素抗性)单个菌落培养物接种于 THY 液体培养基(Todd-Hewitt 培养基+1%酵母抽提物),并加入 5 μ g/mL 氯霉素,于 37°C 孵箱培养过夜。取过夜培养物重新接种于 THY 液体培养基,培养至 OD₅₉₀ 为 0.06~0.12(对数生长期)时停止培养,菌液中分别加入 10%甘油和 10 μ g/mL 感受态诱导肽(CIP)^[4],按 100 μ L/管分装至 1.5 mL 离心管,于 -80°C 保存。

1.5.2 戈登链球菌 GP251 的转化:取 100 μ L 感受态 GP251,分别加入 900 μ L THY 培养基和 500 ng 重组质粒 PSMB104-*esat6*,于 37°C 培养 3 h 取 450 μ L 培养物涂布于含 5 μ g/mL 红霉素和 5%羊血的 BHI(brain-heart infusion, 脑心浸液)多层倾注平

<http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>

板^[5], 设阴性对照, 于 37°C 孵箱培养 2 d。

1.5.3 *esat6* 的表达和鉴定: 挑取 6 个克隆分别做菌落 PCR, 鉴定是否能扩增出 *esat6* 基因, 将鉴定正确的阳性克隆接种于含 5 $\mu\text{g/mL}$ 红霉素的 BHI 液体培养基进行扩大培养, 37°C 孵箱培养过夜。取菌液 10000 r/min 离心 2 min, 收集培养上清, 经丙酮沉淀法浓缩沉淀上清蛋白, 用分离小分子量蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 分离样品^[6], 并进行 Western blotting 分析, Western blotting 按标准程序进行。

1.5.4 ELISA 法检测上清液 *esat6* 水平: 采用 ELISA 法检测细菌培养上清液中 *esat6* 的表达水平。将重组菌接种于 BHI 液体培养基, 在培养后的第 3、6、9、12 小时 4 个时间点分别取菌液离心后收集上清液样品。抗 *esat6* IgG(1:500)包被及后续步骤按 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 设立空白对照。测定值均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS10.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 *esat6* 基因的扩增

以结核杆菌 H37Rv 基因组 DNA 为模板, 成功扩增出约 285 bp 大小的 *esat6* 基因(图 1)。

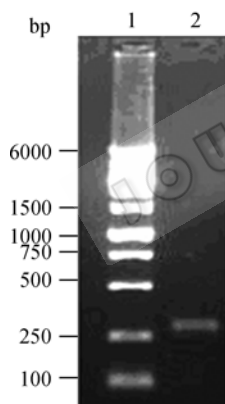


图 1 *esat6* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 The amplification of *esat6* gene by PCR

1: 核酸标准品; 2: 扩增的 *esat6* 基因.

1: DNA marker; 2: *esat6* gene by PCR.

2.2 *esat6* 基因的 TA 克隆

将 PCR 纯化产物和 pMD18-T Simple 载体连接并转化感受态 DH5 α 后, 提取重组质粒 pMD18-*esat6*, *Kpn* I 和 *Eco* R I 双酶切鉴定。经 1% 琼脂糖凝胶电泳后得到约 2692 bp 的 pMD18-T 和约 285 bp 的 *esat6* 两片段, 提示 TA 克隆成功(图 2)。

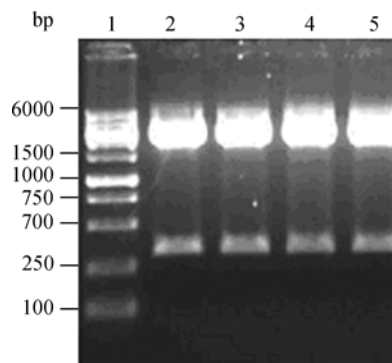


图 2 pMD18-*esat6* 载体的酶切鉴定

Fig. 2 The confirmation of pMD18-*esat6* vector by restriction enzyme

1: 核酸标准品; 2-5: pMD18-*esat6* 的双酶切产物.

1: DNA marker; 2-5: pMD18-*esat6*/*Kpn* I+*Eco* R I.

2.3 重组质粒 PSMB104-*esat6* 的酶切及测序鉴定

重组质粒 PSMB104-*esat6* 经 *Kpn* I 和 *Eco* R I 双酶切后, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 获得两个大小分别约为 5.6 kb 和 285 bp 的基因片段(图 3), 初步表明重组质粒构建成功。经测序, *esat6* 基因正确连接于 PSMB104 的多克隆位点。

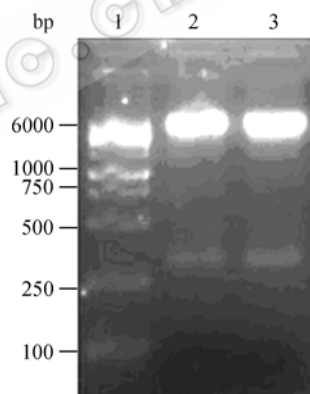


图 3 PSMB104-*esat6* 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 3 The confirmation of PSMB104-*esat6* recombinant vector by restriction enzyme

1: 核酸标准品; 2, 3: PSMB104-*esat6* 的双酶切产物.

1: DNA marker; 2, 3: PSMB104-*esat6*/*Kpn* I+*Eco* R I.

2.4 *esat6* 在戈登链球菌 GP251 的表达鉴定

阳性克隆经 37°C 孵箱培养过夜, 无需诱导。收集 20 mL 培养上清, 经丙酮沉淀法浓缩后进行 Tricine-SDS-PAGE, 发现在约 10 kD 处有表达条带, 与 *esat6* 蛋白大小基本相符(图 4)。

2.5 目的蛋白 *esat6* 的 Western blotting 分析

表达蛋白可与鼠单克隆抗体 *esat6*(HYB 076-08)及辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠 IgG 进行 Western 印迹反应, 在相对分子质量约 10 kD 处有一条显色带(图 5)。

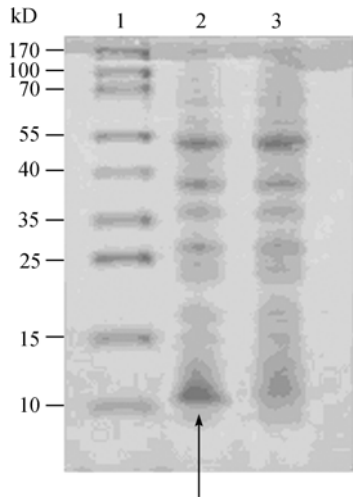


图 4 重组戈登氏链球菌表达蛋白的 Tricine-SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Tricine-SDS-PAGE analysis of protein expressed by recombinant *Streptococcus gordonii*

1: 蛋白标准品; 2: 重组戈登氏链球菌表达产物; 3: GP251 表达产物.

1: Protein marker; 2: Expression product of recombinant *Streptococcus gordonii*; 3: Expression product of *Streptococcus gordonii* GP251.

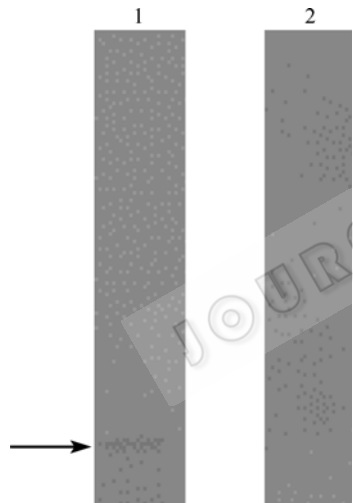


图 5 Western 印迹分析表达产物的抗原性

Fig. 5 Western blotting analysis of the immunogenicity of expression product

1: esat6 蛋白与单克隆抗体的免疫印迹反应; 2: GP251 阴性对照
1: esat6 protein; 2: Negative control of GP251.

2.6 不同时段上清液中 esat6 的表达量

ELISA 检测结果提示: 细菌生长 3 h 后, 已开始有 esat6 的表达, 约第 9 小时达高峰, 表达量为 96.8 ng/mL。各时间点实验组表达水平显著高于对照组, 与对照组的差异具有统计学意义(表 1)。

3 讨论

戈登氏链球菌是存在于人类口腔的一种非致病性黏膜共生菌, 该菌较易进行生物转化, 能通过构建重组菌稳定表达外源蛋白。更为重要的是, 该菌具有在人体持续增殖的潜力, 可望通过将表达特定蛋白的重组菌进行黏膜接种, 实现对病原菌长期的免疫应答, 是较有前景的黏膜疫苗载体。目前, 国外已有许多学者将该菌进行重组, 用于特定蛋白的表达, 并在动物实验中取得了较好的免疫效果^[2]。GP251 是由 Gianni Pozzi 教授等构建的具有表达外源蛋白功能的戈登氏链球菌重组菌株^[7], 含有固定的启动子 P230^[8], 可启动外源基因的转录, 和相应的质粒载体配合, 该系统可表达 15~440 个氨基酸大小的外源蛋白, 借助 M6 蛋白的特殊功能, 蛋白可被分泌表达, 或固定于菌体表面, 从而对宿主产生免疫刺激。

M6 蛋白是化脓性链球菌表面的一种纤丝状蛋白, 常作为表达抗原的辅助工具^[2]。该蛋白的作用在于其分泌和锚定的特殊功能, 其 N 端和 C 端具有各自的功能区, N 端功能区作用在于将目标蛋白分泌到细胞表面, C 端功能区可将其固定于细胞壁上, 如果去掉了 C 端功能区, 该蛋白就会直接分泌到细胞外。PSMB104 是含有 M6 蛋白 N 端和 C 端功能区编码区的重组大肠杆菌质粒, 可编码 16 个氨基酸大小的 N 端功能区区和 220 个氨基酸大小的 C 端功能区, 它不在戈登氏链球菌内复制, 但含有 GP251 的同源序列, 可通过同源重组的方式将 esat6 基因整合入 GP251 的染色体, 并由 GP251 的固有启动子 P230 启动表达, 无需诱导。

表 1 ELISA 定量检测 esat6 蛋白的表达($\bar{x} \pm s$)
Table 1 Quantitative detection of esat6 protein by ELISA

	3 h	6 h	9 h	12 h
实验组 Experimental group (ng/m)	8.3±1.4*	77.6±5.9*	96.8±7.8*	94.5±7.5*
对照组 Control group (ng/mL)	1.9±0.3	2.2±0.4	2.1±0.3	2.0±0.3

注: 分别与对照组相比较, 具有统计学意义 ($P < 0.01$) .

Note: There is statistical significance compared with control group respectively ($P < 0.01$) .

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

戈登氏链球菌 GP251 和质粒 PSMB104 是通过重组构建的表达体系之一, 国外有学者已成功将它用于表达外源目的蛋白, 构建黏膜疫苗新构体^[9], 基于这些成功实验的启发和对 *esat6* 抗原性的认识, 本研究旨在构建结核分枝杆菌(Mtb) *esat6* 基因表达载体, 并期望其在戈登氏链球菌中分泌表达, 在实验设计 PCR 引物时去掉了 *esat6* 基因的起始密码子, 保留了终止密码子, 将 *esat6* 基因和 M6 蛋白 N 端区域融合表达, 这样 *esat6* 蛋白会被分泌出来发挥免疫作用, 并方便进行检测, N 端区域在蛋白穿过质膜时被切除掉。由分泌时相的检测可知, 该表达系统对目的蛋白的表达具有一定的效率, 表达的蛋白经 Western blot 验证具有良好的免疫原性。结核杆菌保护性抗原 *esat6* 表达载体的成功构建, 并能在戈登氏链球菌中分泌表达, 为抗结核黏膜疫苗的开发奠定了实验基础。

参考文献

- [1] Fine PEM. Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity. *Lancet*, 1995, **346** (8986): 1339–1345.
- [2] Oggioni MR, Medaglini D, Maggi T, *et al.* Engineering of the Gram-positive bacterial cell surface for the construction of bacterial vaccine vectors. *Methods*, 1999, **19**: 163–173.
- [3] Sorensen AL, Nagai S, Houen G, *et al.* Purification and characterization of a low molecular mass T—cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1995, **63**(5): 1710–1717.
- [4] Havarstein LS, Gaustad P, Nes IF, *et al.* Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Molecular Microbiology*, 1996, **21**(4): 863–869.
- [5] Pozzi G, Musmanno RA, Lievens J, *et al.* Method and parameters for genetic transformation of *Streptococcus sanguis* challis. *Res Microbiol*, 1990, **141**: 659–670.
- [6] Schagger H, von Jagow G. Tricine-SDS-PAGE for separation of 1–100kDa proteins. *Analytical Biochemistry*, 1987, **166**: 368–379.
- [7] Oggioni MR, Pozzi G. A host-vector system for heterologous gene expression in *Streptococcus gordonii*. *Gene*, 1996, **169**: 85–90.
- [8] Franke CA, Bolken TC, Hruby DE. Studies on the genomic organization of recombinant *Streptococcus gordonii* and the development of a novel intergenic integration site for foreign gene expression. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001, **3**(4): 545–555.
- [9] Byrd CM, Bolken TC, Jones KF, *et al.* Biological consequences of antigen and cytokine co-expression by recombinant *Streptococcus gordonii* vaccine vectors. *Vaccine*, 2002, **20**(17-18): 2197–2205.

征订启事

2009 年《腐植酸》杂志征订启事

《腐植酸》杂志于 1979 年创刊, 由中国腐植酸工业协会主办, 是全国唯一的腐植酸类专业科技期刊, 面向国内外公开发行人。本刊为国际标准大 16 开, 内设 60 页。《腐植酸》杂志为双月刊, 国际刊号: ISSN1671-9212; 国内刊号: CN11-4736/TQ。《腐植酸》杂志集学术性、专业性和实用性于一身, 内容广泛、指导性强、信息量大, 自 1979 年创刊以来, 深受广大读者的关注与好评。主要栏目包括: “卷首语” “专题评述” “研究论文” “译文” “腐植酸文摘” “腐植酸专利简介” “腐植酸环保应用” “协会(专业)标准讨论” “腐植酸质量检测” “‘两会’动态” “信息传真” “‘乌金杯’采风” 等。

在“腐植酸是关怀人类的新产业”主题思想的指引下, 我国腐植酸产业呈现了蓬勃发展的大好形势。《腐植酸》杂志在 2009 年将把更新的内容、更高的质量、更优的服务展现给广大读者。欢迎各位新老读者及时订阅! 如需要过刊, 请直接与编辑部联系。

2009 年《腐植酸》杂志每期定价 15.00 元(含邮费), 全年 6 期, 年定价 90.00 元(含邮费)。

《腐植酸》杂志订购时, 请从邮局汇款至编辑部。

地址: 北京市西城区六铺炕街 1 号《腐植酸》编辑部收 邮编: 100011

电话: 010-82784950 传真: 010-82784970

邮箱: chaia@126.com 网址: www.chinaha.org