

可示踪防龋基因疫苗的构建及其体外表达

刘 莉 贾文祥 李学如 张再容 马巨辉 周绍兵 陈 恬

【摘要】 目的 构建一含绿荧光蛋白报告基因(*gfp*)的防龋基因疫苗,利用绿荧光蛋白特有的发光性质,示踪防龋基因疫苗在体外的表达情况。方法 采用 PCR 方法,以质粒 pPC41 为模板,扩增变形链球菌表面蛋白质抗原(PAC)分子的氨基端 A 区(*pacA*),以此作为基因防龋疫苗的目的基因片段,与质粒 pEGFP-C1 重组构建重组质粒 pEGFPC1-*pacA*,并经酶切、测序鉴定;重组质粒瞬时转染 COS1 细胞后,通过荧光显微镜直接观察发绿色荧光的细胞,流式细胞仪检测转染细胞的荧光强度,RT-PCR 扩增 *pacA* 基因片段检测重组质粒的体外表达情况。结果 重组质粒中的 *pacA* 片段完全来自 *pac* 全基因序列, pEGFPC1-*pacA* 构建正确;荧光显微镜直接观察到了发绿色荧光的细胞,重组质粒转染细胞的荧光强度明显高于未转染细胞的荧光强度,并证实了重组质粒 *pacA* 片段能在哺乳动物细胞中被转录。结论 重组质粒中的绿荧光蛋白基因以及置于 *gfp* 基因之后的防龋基因片段均能在体外同时正确表达,为深入研究防龋基因疫苗的安全性及有效性提供了较好的材料。

【关键词】 绿荧光蛋白; 防龋; 基因疫苗; 转染

Construction and Expression of Traceable DNA Vaccine for Prevention of Caries

LIU Li^{*}, JIA Wenxiang, LI Xueru, et al. (^{*} Department of Microbiology, West China Basic Medicine and Forensic College, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

【Abstract】 Objective *Streptococcus mutans* has been proved as a causative bacteria of human dental caries. The surface protein antigen is one of the important pathogenic factors. The A region of the surface protein antigen *pac* gene (*pacA*) can enrich T-cells and B-cells epitope. In this study, a DNA vaccine carrying *pacA* and *gfp* gene (a reporter gene) for caries prevention was constructed. The DNA vaccine was liable to be traced *in vitro* and *in vivo*. **Methods** The fragment of *pacA* (1.3 kb) was amplified by PCR with the plasmid pPC41 as template, and inserted into a pEGFP-C1 vector. The recombinant plasmid produced was named as pEGFPC1-*pacA*. After the COS1 cell line was transfected by the recombinant plasmid, the expression of *gfp* was detected by observing the green fluorescence and measuring the fluorescence intensity, and the expression of *pacA* was detected by RT-PCR. **Results** Restricted analyzing, sequencing and PCR technique were employed to identify the recombinant plasmid. The phase and orientation of the *pacA* gene inserted into the vector pEGFPC1 were correct and no changes of their open reading frames were discovered. The transfected COS1 carrying green fluorescent protein (GFP) was observed; the GFP expression level of transfected cells was higher than that of controlled cell. The transcript of *pacA* gene was confirmed by RT-PCR. **Conclusion** Construction of the recombinant plasmid was successful. The *gfp* gene and *pacA* gene in the plasmid was transcribed and expressed simultaneously in the transfected cells. Moreover, detection of GFP is simple, safe and effective for living cells.

【Key words】 green fluorescent protein; prevention of caries; DNA vaccines; transfect

基因疫苗是近几年发展起来的新型疫苗,是病毒、细菌、寄生虫及肿瘤等疫苗研制的热点之一。变形链球菌是龋病的主要致病菌,其表面蛋白质抗原是主要毒力因子之一^{1,2}。来源于 C 型血清型链球菌的表面蛋白质抗原 PAC 分子的氨基端 A 区为富集 T、

B 细胞表位区域,是理想的多肽疫苗选择区³,以此作为基因防龋疫苗的目的基因片段,可以有效激发保护性免疫反应。但 DNA 疫苗目前还存在一些潜在的安全性问题,例如染色体整合以及诱导免疫耐受等⁴,对 DNA 疫苗进入机体内的表达情况进行追踪、监测将有助于解决这些问题。本研究构建了含绿荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)报告基因(*gfp*)的防龋基因疫苗,并检测其在体外真核细胞中表达情况,为以后进一步示踪研究防龋疫苗在体内表达的情况奠定基础。

本课题为国家自然科学基金(编号 20004009)及“973”资助项目

作者单位:610041 四川大学基础医学与医学院微生物学教研室(刘莉,贾文祥,李学如,张再容,马巨辉,陈恬),中国科学院成都分院有机化学研究所(周绍兵)

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌 MC1061 (含质粒 pPC41, 四川大学华西口腔医学院赠), 大肠杆菌 HB101 (四川大学基础医学与法医学院微生物学教研室保存), 质粒 pEGFP-C1 (Clontech 公司, 美国), 细胞株 COS1 (四川大学基础医学与法医学院微生物学教研室保存), 质粒小量提取试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司), DNA 连接试剂盒 (TaKaRa 生命技术工程公司, 日本), 脂质体转染试剂 Lipofectin (Life-tech 公司, 美国), 高纯 RNA 分离试剂盒及所用限制性内切酶、DNA 分子量标记 (DNA/Hind 和 DL2000) (上海华舜生物工程有限公司), Titan™ 一步法 RT-PCR 试剂盒 (Takara 公司, 日本), 荧光倒置显微镜 IX70-SIF2 (Olympus 公司, 日本), Elite Esp 型流式细胞仪 (Coulter 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 质粒的扩增与提取 将 MC1061 (pPC41) 与 HB101 (pEGFP-C1) 接种至 LB 液体培养基中, 37℃ 振荡培养 16~18 h 后, 按质粒小量提取试剂盒操作说明书进行提取。

1.2.2 PAC 分子氨基端编码基因片段 *pacA* 的获取 根据变形链球菌 MT8148 *pac* 基因的全序列⁵ 以及 pEGFP-C1 载体的插入位点, 设计扩增 *pacA* (*pac*314~1 630 bp) 的一对引物, 并使用分子生物学软件包 (Oligo 5.0) 评价该引物。上游引物为 5'-GCCCGGTACCATGGATGAAACGACCACTACTAG-3', 下游引物为 5'-GGCCGGGCCCTATTATTCGATGCGCTTTAACTTA-3', 分别含有 *Kpn* 和 *Apa* 酶切位点。以质粒 pPC41 (含 *pac* 基因全序列) 为模板进行 PCR 扩增, 获得 *pacA* 基因片段。PCR 相关参数: 94℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30 次循环后 72℃ 延伸 5 min, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳 (60 V 电压) 1 h 后检测。

1.2.3 重组质粒的构建、筛选和鉴定 上述 PCR 产物与真核表达质粒 pEGFP-C1 经 *Kpn* 和 *Apa* 双酶切后, 用 DNA 连接试剂盒连接, 其操作按说明书进行, 但连接时间延长至 4 h。然后将连接产物转化感受态大肠杆菌 HB101, 从卡那霉素抗菌平板中初筛转化子。将转化子用质粒小量提取试剂盒提取并纯化重组质粒, 命名为质粒 pEGFPC1-*pacA*。DNA 测序工作由 Takara 大连公司完成。同时, 将上述所提取的质粒用 *Kpn* 和 *Apa* 双酶切进行进一步的鉴定, 以重组质粒为模板, 利用扩增时所设计的引物进行 PCR 扩增鉴定。

1.2.4 重组质粒的体外转染 将密度为 1×10^7 个/L 的 COS1 细胞接种于 6 孔板, 培养 24 h 后 (细胞汇片达 70%~80%) 用于转染。本研究采用脂质体转染法, 将小量提取并纯化的重组质粒 DNA 与脂质体按操作说明制备成 DNA/脂质体复合物后, 转染细胞。转染 48 h 后, 用荧光倒置显微镜直接观察自发荧光的转染细胞; 一部分孔中的细胞用 0.25% 胰酶消化后收集, 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗涤 2 次, 上流式细胞仪测定荧光强度; 其余孔中的细胞用高纯 RNA 分离试剂盒提取转染细胞的总 RNA, 并以此为模板, 引物同 1.2.2 中所用, 采用一步法 RT-PCR 试剂盒对重组质粒中目的基因在转染细胞中转录产物进行检测。相关参数: 50℃ 逆转录 30 min, 94℃ 变性

2 min, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 1 min 共 10 次循环, 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 68℃ 65 s 共 30 次循环, 且每次循环的延伸时间较上一次循环延长 5 s, 68℃ 延伸 7 min, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳 (60 V 电压) 1 h 后检测。

2 结 果

2.1 *pacA* 基因片段的获取及重组质粒的鉴定

以 pPC41 为模板, PCR 扩增获得了一段长度为 1.3 kb 的富集 T、B 细胞表位的 *pacA* 基因片段。重组质粒 pEGFPC1-*pacA* 经 *Kpn* 和 *Apa* 双酶切得到了 1.3 kb 的片段 (图 1), 经测序证实其插入的核苷酸序列与报道的 *pac*314~1 630 bp 核苷酸序列完全相同。结果证实, 获得的 *pacA* 片段完全来自 *pac* 基因全序列, 并且定向插入了 pEGFP-C1 质粒, 置于 CMV 启动子下, *gfp* 基因之后, 未改变外源基因的阅读框架, 说明 pEGFPC1-*pacA* 构建正确。

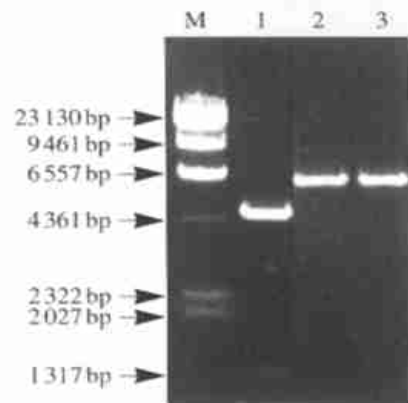


图 1 重组质粒 pEGFPC1-*pacA* 的酶切鉴定

M: DNA/Hind 分子质量 Marker, 1: *Kpn* + *Apa* 双酶切, 2: *Kpn* 酶切, 3: *Apa* 酶切

Fig 1 Identification of recombinant plasmid pEGFPC1-*pacA*

2.2 重组质粒的体外表达

重组质粒 pEGFPC1-*pacA* 瞬时转染 48 h 后, 通过荧光倒置显微镜直接观察到了发绿色荧光的细胞 (图 2)。

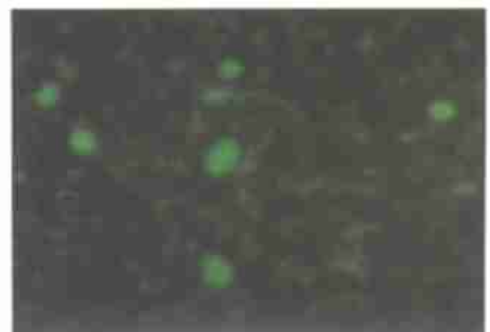


图 2 发绿色荧光的重组质粒转染细胞 荧光倒置显微镜 ×250

Fig 2 Transfected cells by DNA/Liposomes expressed EGFP photo of invert fluorescent microscope ×250

经流式细胞仪测定转染细胞的荧光强度平均为

2.16, 明显高于未转染细胞的荧光强度 1.04, 这些结果均表明重组质粒中的绿荧光蛋白基因能在真核细胞中正确表达。此外, 以提取的转染细胞的总 RNA 经 RT-PCR 扩增后电泳, 可获得 1.3 kb 的条带(图 3), 与目的基因 *pacA* 的相对分子质量一致, 这说明重组质粒中的防龋基因片段能与绿荧光蛋白基因同时正确转录、表达。

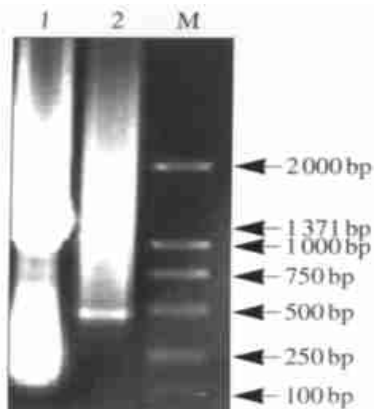


图 3 转染细胞中 *pacA* 的 RT-PCR 鉴定

1: 转染细胞中 *pacA* 的 RT-PCR, 2: 质控组 RT-PCR, M: DNA 分子量

Marker DL2000

Fig 3 Identification of transcribed of *pacA* in transfected cells by RT-PCR

3 讨 论

免疫学防治是控制龋病的有效手段之一。传统的防龋疫苗都不同程度地存在着制备成本高、制备过程复杂、周期长、诱导的抗体与人的心肾等组织发生交叉反应等缺点^{6,7}。近年来表位多肽疫苗已愈来愈受到关注, 成为免疫防龋的研究热点。目前的研究已证实, PAC 分子的氨基端 A 区富集 T、B 细胞表位是理想的多肽疫苗选择区。近几年发展起来的基因免疫已广泛应用于多种病原体的免疫防治研究。在本研究中, 笔者将表位多肽疫苗与基因疫苗的优势结合起来, 成功构建了可在真核细胞中表达的重组质粒 pEGFPC1-*pacA*。

DNA 疫苗尽管具有其他疫苗不可替代的优越性, 但作为将要面对大量计划免疫人群的新型疫苗, 其安全性评价是必不可少的。例如必须估计疫苗的组织特异性分布和全身的分布情况, 必须确定疫苗免疫原表达持续时间以及宿主细胞包含质粒 DNA 疫苗的持续周期, 以及是否会对疫苗编码的抗原产生耐受等⁸。生物发光系统作为基因表达分析的分子标记

和细胞生物学标记, 已倍受人们的重视。特别是近几年发展起来的绿荧光蛋白及其衍生物的发光基因, 由于其检测直观、方便、安全、有效, 已广泛应用于分子生物学的各个方面^{9,10}。在本研究中, 笔者将编码变形链球菌的表面蛋白 PAC 分子的氨基端基因片段重组到含绿荧光蛋白基因的真核表达载体中, 使之表达出 GFP-*pacA* 融合蛋白, 在荧光倒置显微镜下直接观察 *gfp* 的表达情况, 并在流式细胞仪上相对定量的检测 *gfp* 的表达, 从而间接反映 *pacA* 的表达。经 RT-PCR 检测表明, *gfp* 与 *pacA* 的表达是一致的。该重组质粒若用于动物体内实验, 可通过 *gfp* 的表达定期、定位、定量的指示目的抗原基因的表达, 为将来 DNA 防龋疫苗的临床应用提供更多的依据。

参考文献

- 1 Jenkinson HF, Demuth DR. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen / polypeptides. *Mol Microbiol*, 1997, 23 (3): 183-190
- 2 Jenkinson HF, Lamont RJ. Streptococcal adhesion and colonization. *Crit REV Oral Biol Med*, 1997, 8(3): 175-200
- 3 Kelly CG, Todryk S, Kendal HL, et al. T-cell, adhesion, B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen / . *Infect Immun*, 1995, 63(9): 3649-3658
- 4 Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. DNA vaccines. *Life Sci*, 1997, 60(3): 163-172
- 5 Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, et al. Molecular characterization of surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. *Mol Microbiol*, 1989, 3 (8): 673-678
- 6 Michalek SM, Childers NK. Development and out look for a caries vaccine. *Oral Biol Med*, 1990, 1(1): 37-45
- 7 Huang Y, Hajishengallis G, Michalek SM. Construction and characterization of a salmonella enterica serova typhimurium clone expressing a salivary adhesion of *Streptococcus mutans* under control of the anaerobically inducible *nirB* promoter. *Infect Immun*, 2000, 68 (3): 1549-1556
- 8 孙树汉. 核酸疫苗. 上海: 第二军医大学出版社, 2000: 207-208
- 9 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263(5148): 802-805
- 10 Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996, 173(1): 33-38

(2002-09-19 收稿, 2002-12-11 修回)

(本文编辑 王 晴)