

变形链球菌表面蛋白 *pac* 基因 A 区片段 在减毒鼠伤寒沙门氏菌的表达

陈 罕, 凌均[✉], 杨国平

(中山医科大学口腔医学院口腔内科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】检测携带变形链球菌表面蛋白 *pac* 基因 A 区片段的重组质粒 pET-17b/A 在减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 的表达情况。【方法】应用 SDS-PAGE 技术检测重组减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 中是否有新的蛋白条带, Western blot 检测条带的抗原性。【结果】SDS-PAGE 显示重组减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 中有 35 ku 的新蛋白条带, Western blot 显示在相应的位置上有特异的条带。【结论】重组减毒鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 表达的变形链球菌表面蛋白 *pac* 基因 A 区片段具有抗原性。

关键词: 变形链球菌; 沙门氏菌, 鼠伤寒; 表面蛋白 *Pac*

中图分类号: R378.1; R781.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0068-04

Expression of *Streptococcus mutans pac* Gene Region A in Attenuated *Salmonella typhimurium*

CHEN Han, LING Jun-qi, YANG Guo-ping

(Department of Oral Medicine College of Stomatology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510080, China)

Abstract: 【Objective】To examine the expression of *Streptococcus mutans pac* gene A region in attenuated *Salmonella typhimurium*. 【Method】SDS-PAGE and Western blot were used to detect the new protein band and its antigenic property in *Salmonella typhimurium* SL3261. 【Result】There was a 35 ku new protein band showed in SDS-PAGE and specific reaction band also showed in Western blot band. 【Conclusion】The new expression products of recombinant *Salmonella typhimurium* SL3261 had antigenic property.

Key words: *Streptococcus mutans*; *Salmonella typhimurium*; surface protein *Pac*

变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, *S. mutans*) 被认为与龋病的发生、发展密切相关, 是主要致龋菌^[1]。变形链球菌的表面有多种细胞表面多聚物, 例如壁相关蛋白、血清特异性抗原、壁磷脂酸以及肽聚糖等^[2]。在这些多聚物中, 一种 190 ku 的细胞表面蛋白抗原(曾被称为 Ag I / II, B, IF, P1, SR, MSL-1 或 *Pac*^[3], 在本论文中用 *Pac* 专门指称这种蛋白)被认为是介导变形链球菌与牙齿表面获得性膜结合的重要成分之一。龋病的免疫学研究始于 20 世纪 70 年代, 开始的研究是用变形链球菌灭活全菌注射或口服进行免疫防龋, 以后

的研究尝试了变形链球菌的毒力抗原成分如表面蛋白 *Pac*, 葡糖基转移酶(GTF), 根据毒力成分合成的多肽片段等多种途径。随着粘膜免疫学研究的进展, Michalek^[4] 等的研究发现, 唾液中的 SIgA 是免疫防龋的关键因素, 有效的提高唾液中针对变形链球菌毒力因子的特异性 SIgA 抗体的滴度(含量)能够达到防龋的效果。实验证明, 以减毒鼠伤寒沙门氏菌携带外源抗原进入机体后, 能激发机体产生针对沙门氏载体菌和外源抗原的体液免疫, 细胞免疫和粘膜免疫。本实验选用变形链球菌表面蛋白 *pac* 基因上的 A 区序列作为目的基因片段构建

收稿日期: 2000-03-20

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(970105)

作者简介: 陈 罕(1967-)男, 江苏扬州人, 博士, 讲师, 研究方向: 龋病病因学

的表达质粒 pET-17b/A 在大肠杆菌中克隆后转入减毒鼠伤寒沙门氏菌中表达,用 Western blot 检测转化后减毒鼠伤寒沙门氏菌中目的基因的表达和表达产物的免疫学活性。

1 材料与方 法

1.1 菌种与质粒

pET-17b/A 质粒(4.2 kb, Amp^r)由本研究构建(构建过程另文发表),*S. typhimurium* LB5000、*S. typhimurium* SL3261 复旦大学任大明教授、黄建生博士赠送。

1.2 主要试剂

试剂均购自华美生物工程公司,兔抗 PAc 抗血清由 University of Alabama at Birmingham 的 Dr Russell 赠送,羊抗兔 IgG(HRP 标记)为北京中山生物技术公司产品,显色底物 Western blot 显色试剂盒为 ECL 公司产品,SDS-PAGE 标准分子质量蛋白购自宝泰克公司。

1.3 质粒 pET-17b/A 的提取与纯化

应用 Qiaprep plasmid miniprep kit 进行,操作按厂家提供的说明书进行。

1.4 *S. typhimurium* LB5000, SL3261 感受态细胞的制备

氯化钙法,参照参考文献进行^[9]。

1.5 转化

将 pET-17b/A 顺序转化 *S. typhimurium* LB5000、SL3261 后,以 LB-Amp 琼脂平板为选择性培养基,质粒小剂量快速抽提进行重组子的挑选,含 pET-17b/A 质粒的 *S. typhimurium* 即为重组减毒鼠伤寒沙门氏菌防龋疫苗 SL3261(pET-17b/A)。直接从 SL3261(pET-17b/A)菌中抽提质粒 DNA,经 *Bam*HI, *Eco*RV 双酶切后经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后,紫外灯下观察电泳结果,照像记录。

1.6 pET-17b/A 在 SL3261 中的表达

常规培养细菌 *S. typhimurium* SL3261(pET-17b/A),将待测的细菌培养至 $A_{460}=0.6$ 左右时,5 mL 菌体 2 000 r/min 离心收集菌体,生理盐水洗涤菌体一次后,用 0.1 mL PBS 重悬菌体,立即加入 2 × SDS 上样缓冲液,室温裂解 5 min 后,100 °C 加热 5 min,冷却后上样进行 SDS-PAGE 电泳。

1.7 Western Blot

SDS-PAGE 电泳完成后,切出含待转移蛋白的凝胶。电转移蛋白到硝酸纤维素膜,进行 Western 杂交。将 ECL 免疫荧光显色试剂盒中的 1 号液,2 号液等量混合,取 0.5 mL 滴加在硝酸纤维素膜上,室温反应 5 min,去除反应液。将膜与 X 线胶片在暗盒中曝光 10 min(室温),X 线胶片常规显影及定影。

2 结 果

2.1 *S. typhimurium* SL3261(pET-17b/A)中质粒 DNA 的鉴定

经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳,可见从 SL3261(pET-17b/A)中抽提的质粒 DNA 与对照质粒 DNA 大小一致(图 1)。从 *S. typhimurium* SL3261(pET-17b/A)中提取的质粒 DNA 经 *Bam*HI, *Eco*RV 双酶切后,获得 3.2 kb、950 bp 的两片段(图 2)。说明质粒 pET-17b/A 已成功地转化入 *S. typhimurium* SL3261 中。

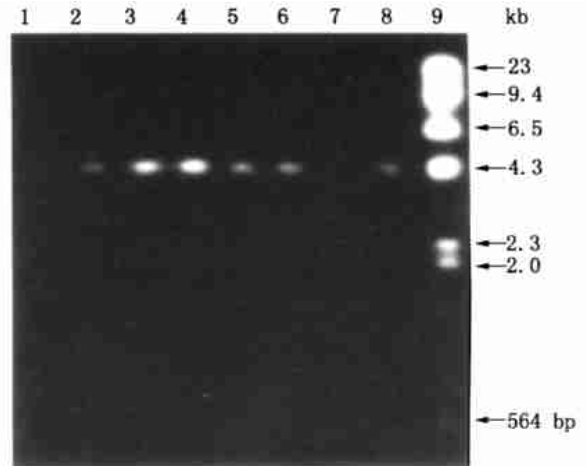


图 1 鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 转化子的质粒抽提结果

Fig. 1 Plasmid extraction results from *S. typhimurium* SL3261

Lane 1 ~ 8: Plasmid extraction from *S. typhimurium* SL3261pET-17b/A; Lane 9: Marker λ DNA/HindIII

2.2 pET-17b/A 在 *S. typhimurium* SL3261 中的表达

SDS-PAGE 电泳显示 pET-17b/A 在 *S. typhimurium* SL3261 中有较强的表达,有新蛋白的产生,分子质量约为 35 ku,与预期分子量一致(图 3)。

2.3 pET-17b/A 表达蛋白的免疫原性分析

Western blot 结果显示,在 35.0 ku 位置上

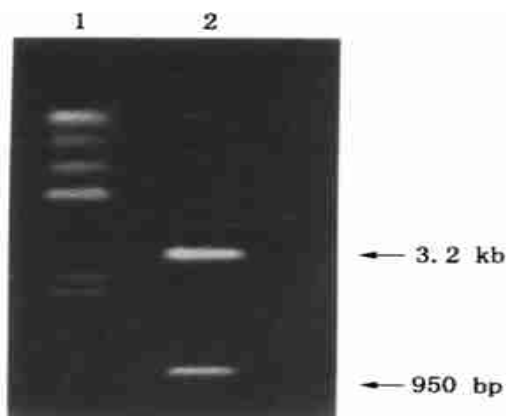


图2 鼠伤寒沙门氏菌 SL3261 转化子质粒抽提后 *EcoRV*、*BamHI* 双酶切结果

Fig. 2 Plasmid extraction from *S. typhimurium* SL3261 cut by *EcoRV*, *BamHI*

Lane 2: pET-17b/A cut by *EcoRV*, *BamHI*; Lane 1: Marker λ DNA/ *HindIII*

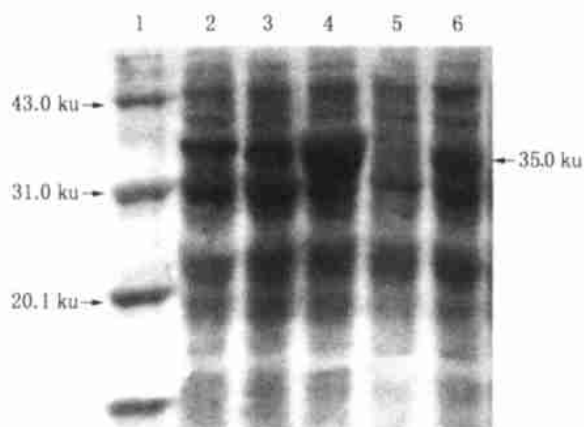


图3 鼠伤寒沙门氏菌 SL3261(pET-17b/A) 株 SDS-PAGE 电泳结果

Fig. 3 *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A) SDS-PAGE

Lane 1: Marker; Lane 2~4, 6: *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A); Lane 5: *S. typhimurium* SL3261

有相应的显色条带(图4)。初步说明 *S. typhimurium* SL3261(pET-17b/A)中表达的变形链球菌表面蛋白 A 区片段具有抗原性,能与抗表面蛋白 PAc 的多抗反应。

3 讨论

许多人类病原入侵的门户是通过粘膜感染,其中胃肠道和呼吸道疾病是影响人类健康的最常见传染病。龋病的自然免疫过程属于粘膜免疫。鉴于口服减毒活疫苗类似自然感染途径,有利于诱发大量 SIgA 产生,利用基因工程技术来生产各种口

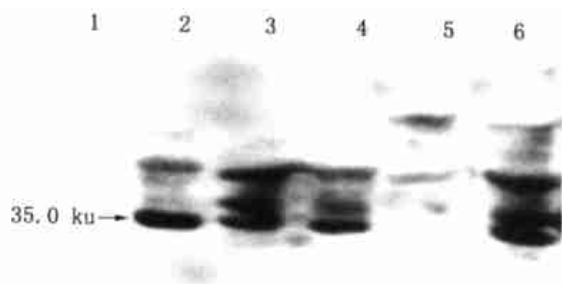


图4 鼠伤寒沙门氏菌 SL3261(pET-17b/A) 株 Western 杂交结果

Fig. 4 Western blot of *S. typhimurium* SL3261(pET-17b/A)

Lane 1: Marker; Lane 2~4, 6: *S. typhimurium* SL3261 (pET-17b/A); Lane 5: *S. typhimurium* SL3261

服疫苗已成为研究的热点。用作重组疫苗的载体主要包括:①各种病毒载体,如牛痘病毒、腺病毒、逆转录病毒等以及各种无害的细菌,如乳链球菌、双歧杆菌等。②各种减毒致病菌,如减毒沙门氏菌等。减毒的鼠伤寒沙门氏菌,能有效地携带异源抗原经口侵入宿主粘膜免疫系统,激发宿主产生抗该异源抗原局部的和全身性的免疫应答,特别是产生特异性的 SIgA^[5]。由于减毒鼠伤寒沙门氏菌是一个粘膜免疫的有效载体,而被应用于细菌、病毒、寄生虫等疫苗的研制,已有的研究包括龋病疫苗、疟疾疫苗、淋病疫苗、乙肝疫苗和爱滋病疫苗等^[6]。

用减毒的鼠伤寒沙门氏菌作为载体构建的活菌苗,在小鼠、牛、猪等动物甚至人体内的实验证明是安全有效的。目前已进行广泛实验研究的减毒株有: gal E 突变株、aro 和 pur 突变株、cya 和 crp 缺陷株、质粒消除株、链霉素依赖实验突变株等。其中 aro 突变株的研究进行得较为彻底,应用广泛。由 Stocker 等构建的 *S. typhimurium* SL3261 是 aro 突变株,作为载体已进行了多种外源基因的表达和免疫学研究。已进行的研究包括利用 *S. typhimurium* SL3261 进行淋球菌疫苗、疟原虫疫苗等的研究工作,证明是一种有效的,可靠的减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗载体^[7,8]。

结合本实验的要求,选用了 pET-17b 质粒构建质粒载体表达系统,进行变形链球菌表面蛋白 PAc 的 A 区片段在 *S. typhimurium* SL3261 中表达研究。通过实验已成功的将重组表达质粒 pET-17b/A 转化入 *S. typhimurium* SL3261 中。外源性抗原基因在减毒鼠伤寒沙门氏菌中必须能够高效、稳定地表达,并且要求表达的产物应具有相应的免疫活性,才能达到构建疫苗的目的。变形链球菌表面

蛋白 PAc 的 A 区片段在减毒鼠伤寒沙门氏菌中表达后是否具有免疫学和生物学活性及活性高低是决定其是否具有实用价值的关键。本实验对表达质粒 pET-17b/A 在 *S. typhimurium* SL 3261 中的表达产物,用 Dr. Russell 提供的抗 PAc 标准抗血清进行了 Western Blot 检测,结果显示表达质粒 pET-17b/A 在 *S. typhimurium* SL3261 中表达的变形链球菌表面蛋白 PAc 的 A 区片段能与抗 PAc 抗血清反应,具有抗原性,为进一步研究变形链球菌基因载体疫苗的粘膜免疫打下了基础。

参考文献:

- [1] Loesche W J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay[J]. *Microbiol Rev*, 1986, 50(2): 353 ~ 380.
- [2] Hamada S, Slade H. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans* [J]. *Microbiol Rev*, 1980, 44(3): 331.
- [3] Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, *et al* . Molecular characterization of a surface protein antigen gene from

serotype c *Streptococcus mutans* . Implicated in dental caries[J]. *Mol Microbiol*, 1989, 3(2): 673.

- [4] Walker R I. New strategies for using mucosal vaccination to achieve more effective immunization[J]. *Vaccine*, 1994, 12(2): 387.
- [5] Chatfield S. The development of oral vaccines based on live attenuated *Salmonella* strains[J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1993, 7(1): 1.
- [6] 黄建生, 李全贞, 王昌才, 等. 恶性疟原虫抗原基因在鼠伤寒沙门氏菌中的表达及免疫原性的初步鉴定[J]. *寄生虫与原学昆虫学报*, 1995, 2(3): 129.
- [7] 吴 卫, 林元凯, 谢匡成. 淋球菌重组与减毒鼠伤寒沙门氏菌活疫苗口服免疫的初步研究[J]. *上海免疫学杂志*, 1998, 18(2): 71.
- [8] Galan J E, Nakayama K, Curtiss R. Cloning and characterization of the *asd* gene of salmonella typhimurium; use in stable maintenance of recombinant plasmids in salmonella vaccine strains[J]. *Gene*, 1990, 94(1): 29.
- [9] 卢圣栋. 现代分子生物学技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1993, 258~260.

(编辑 刘清海)

· 简 讯 ·

博士后黄孝伦探索基因治疗肝移植排斥反应 新途径获可喜成绩

免疫排斥反应是器官移植的主要障碍之一,预防和逆转急性排斥反应是提高移植成功率,提高受者及移植长期存活率的关键所在。中山医科大学临床医学博士后黄孝伦在合作导师黄洁夫教授指导下采用反义核酸基因重组的技术,以同种异体大鼠原位肝移植为模型,研究预防和逆转肝移植急性排斥反应取得可喜成绩。

黄博士首先采用构建反义核酸真核质粒表达载体的方法,借助不断发展和优化的载体转染方法,将其导入细胞,源源不断地转录出反义 mRNA,在构建重组真核质粒时引入适当的基因表达调控元件,使其在特定的靶细胞中高效、靶向、可控制地转录反义 RNA,达到阻断靶基因表达的目的。他们成功地构建了 3 个不同类型的 mIL-2R 反义核酸真核表达质粒,为进一步比较它们抑制 mIL-2R 基因表达的差异,及其对 T 淋巴细胞活化效率的影响奠定理论基础。研究者既采用体外检测又采用体内转染 IL-2R α 、 β 质粒的方法,并以同种异体大鼠肝移植为模型,观察 IL-2R α 、 β 质粒抗急性排斥反应的作用及其在体内的生物学活性。分别经胸腺、阴茎背静脉注射 IL-2R α 、 β 质粒,拟比较不同的给药途径是否有差异。研究表明,成功构建的 IL-2R α 、 β 反义核酸的真核质粒表达载体在体外、内的活细胞转染中获得高效的转化,稳定的表达,并特异的封闭目的基因的表达,抑制 T 细胞的活化,有效控制了同种异体大鼠肝移植的急性排斥反应,延长了大鼠的存活时间,尤以经胸腺注射的途径优于外周途径。该研究结果提示重组 IL-2R α 、 β 反义核酸有一定的临床应用前景。

(冯世容)