

牛分枝杆菌 ag85b 基因的瞬时表达

宫强, 刘思国 (1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南洛阳 471003; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 黑龙江哈尔滨 150001)

摘要 [目的] 为牛结核病 DNA 疫苗的研制提供参考。[方法] 利用 PCR 技术扩增出牛分枝杆菌 ag85b 基因片段, 克隆到真核载体 pcDNA3.1(+) 上, 构建重组质粒 pcAg85B, 将重组质粒转染 SP2/0 细胞, 间接免疫荧光试验检测该基因的表达情况。[结果] 结果表明: 在转染了重组质粒 pcAg85B 的 SP2/0 细胞中出现绿色荧光, 说明 ag85b 基因在 SP2/0 细胞中成功进行了瞬时表达。[结论] 为研究牛分枝杆菌 ag85b DNA 疫苗奠定了基础。

关键词 牛分枝杆菌; ag85b 基因; 克隆; 表达

中图分类号 S858.23 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)21-08908-02

Transient Expression of *Mycobacterium bovis* ag85b Gene

GONG Qiang et al (Food and Bioengineering College, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

Abstract [Objective] The research aimed to provide references for the DNA vaccine development of bovine tuberculosis. [Method] The ag85b gene fragment amplified by PCR from *Mycobacterium bovis* was cloned into the eukaryotic expression vector pcDNA3.1(+), the recombinant plasmid pcAg85B was obtained. Then the recombinant plasmid was transfected into SP2/0 cells in vitro. Indirect immunofluorescence was used to detect the expression of target protein in SP2/0 cells transfected by pcAg85B. [Result] Indirect immunofluorescence which used to detect the expression of target protein showed SP2/0 cells transfected by pcAg85B appeared fluorescence. So the target protein had been successfully expressed. [Conclusion] This study laid a foundation for ag85b gene DNA vaccine of *Mycobacterium bovis*.

Key words *Mycobacterium bovis*; ag85b gene; clone; expression

牛结核病是一种严重危害人畜健康的传染病, 然而目前仍无一种疫苗可用于该病的预防^[1]。传统的卡介苗(BCG)由于会干扰牛结核病的检疫, 并不适用于预防该病^[2]。因此, 研制针对牛结核病的新型疫苗对于该病的预防 and 开发人结核病新型疫苗无疑具有重要的意义。该研究构建了牛分枝杆菌分泌蛋白基因 ag85b 的真核表达质粒 pcAg85B, 对其在 SP2/0 细胞中的表达进行了研究, 为牛结核病 DNA 疫苗的研制奠定了一定的基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株与细胞。牛分枝杆菌 Vallee 菌株购自中国兽药药品监察所; 大肠杆菌感受态细胞 TG1 和小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0 细胞) 由哈尔滨兽医研究所兽医生物技术国家重点实验室细菌室(以下简称细菌室)保存。

1.1.2 载体。质粒 pET32a⁺ 和 pcDNA3.1(+) 由细菌室保存。

1.1.3 试剂。Taq DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶 Kpn I、EcoR、T₄ DNA 连接酶及 DL2000 Marker 购自大连宝生物工程有限公司, 脂质体 2000 为 Invitrogen 公司产品, 羊抗兔 IgG HRP 和 IgG FITC 为北京中杉金桥公司产品。

1.2 方 法

1.2.1 重组质粒构建。设计合成牛分枝杆菌 ag85b 基因引物, 以牛分枝杆菌 Vallee 全基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 ag85b 基因, 引物序列如下, PU: 5'-GTGGGGAATTCG-TAGCCGCGCCTAACGAAC-3'; PL: 5'-GCGCGGTACCATGACAGACGTGAGCCGAAAG-3'。PCR 产物回收后以 EcoR / BamH 双酶切, 连接到真核载体 pcDNA3.1(+) 的相应位点, 转化大肠杆菌感受态细胞 TG1, 抽提质粒酶切鉴定, 阳性重组质粒命名为 pcAg85B, 进行序列测定。

1.2.2 重组质粒的转染。将处于对数生长期的 SP2/0 细胞

于转染前 1 d 接种于 24 孔细胞培养板中, 在 5% CO₂、37℃ 下孵育至细胞融合度约 80%, 取 2 μl 脂质体 2000 和 0.8 μg 重组质粒 pcAg85B 在 200 μl 细胞培养液中充分混匀, 室温作用 20 min, 加入 800 μl 新鲜的完全培养液, 混匀后加入细胞培养板中, 37℃、5% CO₂ 培养 72 h。设转染空载体 pcDNA3.1(+) 的细胞为阴性对照。

1.2.3 Ag85B 兔抗血清的制备。将 ag85b 基因连接原核表达载体 pET32a⁺ 构建重组质粒 pET32a⁺-ag85b, 转化入大肠杆菌感受态细胞, 诱导表达并纯化重组蛋白, 用纯化的蛋白与矿物油混合制成疫苗免疫兔子, 采用背部多点注射, 共免疫 3 次, 每次间隔 2 周, 间接 ELISA 方法检测抗体效价后 20 保存备用。

1.2.4 重组质粒的表达。转染了重组质粒 pcAg85B 的 SP2/0 细胞培养 72 h 后, 用 70% 的乙醇室温固定 30 min, 加入 1:40 稀释的兔抗 Ag85B 血清, 37℃ 湿盒内作用 1 h, 加入 1:100 稀释的含 1% 伊文斯兰的 FITC 标记的山羊抗兔 IgG, 湿盒内 37℃ 作用 1 h, 洗涤后滴加碱性甘油, 倒置显微镜下观察结果^[3]。

2 结果与分析

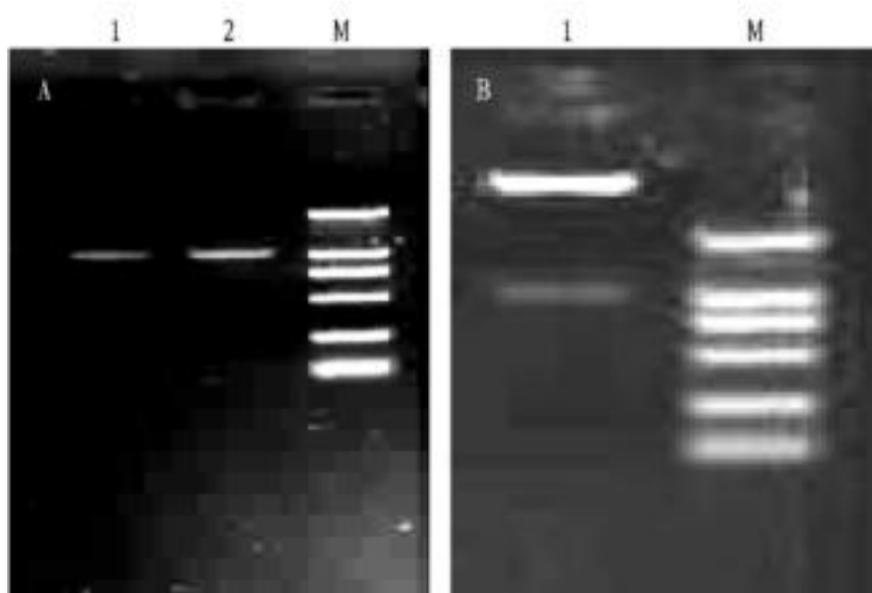
2.1 重组质粒 pcAg85B 的构建 将 PCR 扩增的牛分枝杆菌 ag85b 基因(图 1A) 克隆到真核载体 pcDNA3.1(+) 上构建重组质粒, 命名为 pcAg85B, 并进行双酶切鉴定, 结果如图 1B 所示。

2.2 间接免疫荧光分析 转染了重组质粒 pcAg85B 的 SP2/0 细胞在倒置显微镜下可见到均匀的绿色荧光, 表明该重组质粒在 SP2/0 细胞中获得了表达, 所表达的蛋白可与兔抗 Ag85B 多抗发生特异性结合, 而 pcDNA3.1(+) 转染的 SP2/0 细胞中无荧光出现, 此结果表明牛分枝杆菌 ag85b DNA 能进入真核细胞并表达目的蛋白(图 2)。

3 结论与讨论

Ag85B 蛋白又称为 MPB59, 是牛分枝杆菌 Ag85 复合物中的一种主要成分, 最早在结核杆菌和卡介苗(BCG) 的培养滤液中发现。牛分枝杆菌在侵入机体后可分泌大量的 Ag85B

蛋白,诱导细胞免疫,产生IFN γ ,其诱导的细胞免疫应答在抵抗牛分枝杆菌再次感染中具有重要作用^[4]。该试验构建了真核表达质粒pcAg85B,并转入SP2/0细胞中进行了表达,结果表明ag85b基因能成功在真核表达系统中表达相应蛋白,从而为研究牛分枝杆菌ag85b DNA疫苗奠定基础。



注:A与B中M为DL2000 Marker,A中1与2为ag85b扩增产物,B中1为pcAg85B Kpn/EcoR消化的鉴别。

Note:Min both Chart A and Chart Bis DL2000 Marker;1 and 2 in Chart A are the amplified products of ag85b gene;1 in Chart Bis the identification of pcAg85B by Kpn/EcoR digestion.

图1 ag85b基因的PCR扩增(A)与酶切鉴定(B)

Fig.1 PCR amplification and enzyme digestion identification of ag85b gene

(上接第8869页)

预报 x_1 的因子是 $\{x_7^2, x_8 \times x_9\}$,预报 x_2 的因子是 $\{x_{10}, x_{11}, x_7^2, x_4 \times x_8, x_7 \times x_{10}, x_5 \times x_{11}\}$,预报 x_3 的因子是 $\{x_4 \times x_8, x_4 \times x_{11}\}$,于是用 $x_{10}, x_{11}, x_4 \times x_{11}, x_7^2, x_4 \times x_8, x_8 \times x_9, x_7 \times x_{10}, x_5 \times x_{11}$ 作为预报因子, x_1, x_2, x_3 为预报对象作典型相关分析。

由计算结果得知:典型相关系数分别是0.903 139, 0.577 233, 0.526 990;典型相关系数平方分别是0.815 660, 0.333 198, 0.277 718。第1典型相关系数0.903 139远大于2组变量间单个相关系数。标准化第1典型相关系数为0.871 687。由似然比检验表明,第1对典型相关是高度显著的(概率0.000 7 < 0.01)。其中标准化第1对典型变量是:

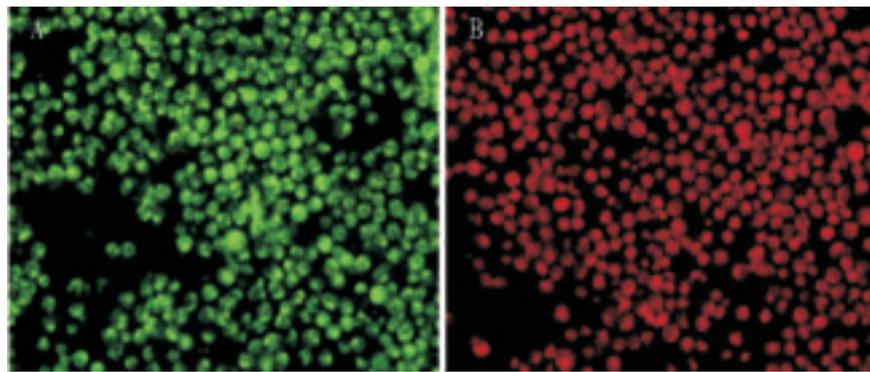
$$v_1 = -0.2197x_1 - 0.9602x_2 + 0.0330x_3$$

$$w_1 = -0.4708x_{10} - 1.1518x_{11} - 0.9377z_4 + 0.4785z_{11} + 0.8464z_{25} + 0.4825z_{26} + 0.4241z_{29} + 0.2258z_{30}$$

其中, $z_4 = x_7 \times x_7, z_{11} = x_4 \times x_8, z_{25} = x_7 \times x_{10}, z_{26} = x_8 \times x_9, z_{29} = x_4 \times x_{11}, z_{30} = x_5 \times x_{11}$ 。

2.2 主成分法 从 $x_1, x_2, \dots, x_m; x_1^2, x_2^2, \dots, x_m^2; x_1x_2, x_1x_3, \dots, x_{m-1}x_m, \dots$ 中选出少数主成分,用这些主成分与 Y_1, Y_2, \dots, Y_k 作典型相关。

这里仍用上面的实例进行分析,从 $x_4, x_5, \dots, x_{11}, x_4^2, x_5^2, \dots, x_{11}^2, x_4 \times x_5, \dots, x_{10} \times x_{11}$ 中选出前6个主成分 $pin_1, pin_2, \dots, pin_6$ 与 x_1, x_2, x_3 作典型相关。



注:A为pcAg85B转染SP2/0细胞,B为pcDNA3.1(+)转染细胞。

Note:A, SP2/0 cells transfected by pcAg85B;B,SP2/0 cells transfected by pcDNA3.1(+) .

图2 ag85b基因转染SP2/0细胞的免疫荧光结果

Fig.2 The immunofluorescence results of ag85b gene transfected into SP2/0 cells

参考文献

- [1] BUDDLE B M, SKINNER M A, WEDLOCK D N, et al. New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife[J]. Vet Immunol Immunopathol, 2002, 87:177 - 185.
- [2] BRANDT L, CUNHA J F, OLSENA W, et al. Failure of the Mycobacterium bovis BCG Vaccine: Some species of environmental Mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis[J]. Infect Immun, 2002, 70:672 - 678.
- [3] JU W, HU J Y, YU Y L. Expression of HSP65 from Mycobacterium tuberculosis in eukaryotic cell system[J]. J Immunol, 2005, 21:216 - 217.
- [4] KAMATH A T, FENG C G, MACDONALD M, et al. Differential protective efficacy of DNA vaccine expressing secreted proteins of Mycobacterium tuberculosis[J]. Infect Immun, 1999, 67:1702 - 1707.

通过分析SAS程序输出结果得知:典型相关系数分别是0.777 074, 0.445 758, 0.378 861;典型相关系数平方分别是0.603 844, 0.198 700, 0.143 535。第1典型相关系数0.777 074远大于2组变量间单个相关系数。标准化第1典型相关系数为0.713 059。由似然比检验表明,第1对典型相关是显著的(概率0.040 3 < 0.05)。其中标准化第1对典型变量是:

$$v_1 = 0.2693x_1 + 0.9035x_2 + 0.0724x_3$$

$$w_1 = -0.4727pin_1 - 0.2090pin_2 - 0.4950pin_3 + 0.6231pin_4 - 0.0623pin_5 - 0.7297pin_6$$

3 结语

综上2种方法可以明显发现,对于直接作典型相关得到结论是不相关的2组数据,通过对预报因子的多项式进行逐步选择或从中选取部分主成分,将其与预报对象做典型相关分析,得到的结果都是高度相关的。因此用这2种方法能够很好地解决直接做典型相关的数据之间不相关的问题。此方法不仅可以应用到选择降雨量的预报因子,或是对农业生产有巨大影响的因子的选择,还可以利用到更多方面。

参考文献

- [1] 吴洪宝,吴蕾.气候变率诊断和预测方法[M].北京:气象出版社,2005:156 - 160.
- [2] 施能.气象科研与预报中的多元分析方法[M].北京:气象出版社,2002:128 - 141.
- [3] 黄嘉佑.气象统计与预报方法[M].北京:气象出版社,2000:168 - 186.
- [4] 吴诚鸥,秦伟良.近代实用多元统计分析[M].北京:气象出版社,2007:208 - 231.