

[文章编号] 1000-1182(2006)03-0265-04

# 牙龈卟啉单胞菌FimA蛋白和IL-15 真核共表达质粒的构建与鉴定

郭红梅<sup>1</sup>, 杨丕山<sup>1</sup>, 姜广水<sup>1</sup>, 王喜军<sup>2</sup>

(1.山东大学口腔医院 牙周科, 山东 济南 250012;

2.口腔生物医学工程教育部重点实验室, 四川大学, 四川 成都 610041)

[摘要] 目的 构建含编码牙龈卟啉单胞菌FimA蛋白和IL-15基因的真核共表达质粒, 并检测其在哺乳动物细胞中的表达。方法 应用基因重组技术, 构建真核表达载体pIRES-fimA和真核共表达载体pIRES-fimA:IL15, 通过酶切、PCR及DNA序列测定鉴定获得的质粒, 用Lipofectamine 2000介导转染CHO细胞, 用Western blot检测重组质粒在哺乳动物中的表达, 酶联免疫吸附试验检测培养上清中的蛋白表达。结果 PCR扩增获得的fimA和IL-15目的基因与预计相同, 定向插入真核表达质粒pIRES中, 插入位相正确, 未改变阅读框架。转染的CHO细胞能够检测到目的基因的表达, 在培养上清中也可以检测到蛋白质的表达。结论 本实验成功构建了牙龈卟啉单胞菌FimA蛋白和IL-15的真核共表达质粒pIRES-fimA:IL15, 为研制增强免疫应答的抗牙龈卟啉单胞菌DNA疫苗奠定了基础。

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌; 菌毛蛋白A; DNA疫苗; 转染

[中图分类号] Q782 [文献标识码] A

Construction of Eukaryotic Co-expression Plasmid Harboring Genes Encoding *Porphyromonas gingivalis* Fim A and Human IL-15 GUO Hong-mei<sup>1</sup>, YANG Pi-shan<sup>1</sup>, JIANG Guang-shui<sup>1</sup>, WANG Xi-jun<sup>2</sup>. (1. Dept. of Periodontology, Stomatology Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China; 2. Key. Laboratory of Oral Biomedical Engineering Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] Objective To construct a eukaryotic co-expression plasmid pIRES-fimA:IL15, which can be used as an immunoreaction-enhancing DNA vaccine against *Porphyromonas gingivalis* FimA, and investigate its expression in mammalian cells. Methods The eukaryotic co-expression plasmid pIRES-fimA:IL15 was constructed by molecular cloning methods and characterized by restricted endonuclease mapping, PCR and DNA sequencing. The plasmid was transfected into mammalian cell CHO using Lipofectamine 2000. Expression of fimA gene was detected by Western blot and the protein secretion in cultural medium was analyzed by ELISA. Results Endonuclease mapping showed that the target genes fimA and IL-15 obtained by PCR had the same molecular size as predicted. The DNA sequencing data also indicated that inserted fimA gene and IL-15 gene had correct DNA sequence and orientation. The recombinant plasmid could express FimA in mammalian cell CHO transfected. FimA and IL-15 could be secreted into cultural supernatant detected by ELISA. Conclusion A new eukaryotic co-expression plasmid pIRES-fimA:IL15 was constructed and it could be applied for further immunization in animal as an effective anti-*Porphyromonas gingivalis* vaccine.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis*; fimA; DNA vaccine; transfection

慢性牙周炎是导致牙齿功能丧失的主要原因之一, 而牙龈卟啉单胞菌 *Porphyromonas gingivalis*, *P.gingivalis* 是慢性牙周炎的主要致病菌, 其菌毛蛋白 (fimbriin, FimA) 被证明在致病过程中起重要作用。

在口腔环境中防御病原入侵的免疫球蛋白主要是分泌型IgA (secretary IgA, sIgA), 可抑制细菌对上皮的粘附, 是黏膜抵抗病原入侵的重要机制之一。IL-15可特异地作用于抗原致敏的B1细胞向产生IgA细胞转型分化的早期阶段, 并且可促进产生IgA细胞的增殖<sup>[1]</sup>。本实验的目的就在于构建并鉴定FimA和IL-15的真核共表达质粒, 作为增强sIgA应答的抗牙龈卟啉单胞菌FimA的DNA疫苗, 为其进行免疫动物的实验研究奠定基础。

[收稿日期] 2005-10-18; [修回日期] 2005-12-07

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30371323); 山东省自然科学基金资助项目 (21350005200337)

[作者简介] 郭红梅 (1978-), 女, 山东人, 博士研究生

[通讯作者] 杨丕山, Tel: 0531-88382368

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、细菌菌株与细胞来源

质粒pcDNA3- fimA由日本大阪大学Hamada惠赠, 质粒pORF- hIL15(Invivogen公司, 美国), 真核表达质粒pRES- BD Biosciences Clontech公司, 美国); 大肠杆菌DH5(山东大学分子生物学实验室提供), 中国仓鼠卵巢癌细胞株(CHO细胞株)(山东大学解剖学实验室提供)。

### 1.2 主要试剂

PCR扩增体系、各种限制性内切酶及T<sub>4</sub>DNA连接酶、质粒纯化回收试剂盒及DNA相对分子质量Marker(大连宝生物公司); DNA纯化回收试剂盒(Qiagen公司, 德国); Lipofectamine 2000(Invitrogen公司, 美国); F12培养基(Gibco公司, 美国); 牛血清白蛋白、TMB、G418、蛋白质相对分子质量Marker(上海生工生物有限公司); 引物由上海生工生物有限公司合成; IL-15 ELISA检测试剂盒(上海森雄公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG(北京中杉生物有限公司); 抗FimA兔多克隆抗体(自制); 细胞裂解液(碧云天生物技术公司); FimA蛋白为日本大阪大学Kawabata惠赠。

### 1.3 fimA基因与IL-15基因片段的PCR扩增

以质粒pcDNA3- fimA为模板行PCR扩增fimA基因。引物: 上游5'-ATCTCGAGTGTGGGACTT-GCTGCT-3', 下游5'-GGCACGCGTCGATATAGACA-AACTATG-3', 分别引入限制性内切酶Xho和Mlu酶切位点。反应条件为94℃预变性5 min, 94℃1 min, 58℃1 min, 72℃2 min, 72℃终延伸7 min。以质粒pORF- hIL15为模板行PCR扩增IL-15基因, 引物: 上游5'-TATCTAGAAAGGAGGGCCACCA-T-GCG-3', 下游5'-TAGCGGCCGCTCAATTGCAATC-AAGAAG-3', 分别引入限制性内切酶Xba和Not酶切位点。反应条件为94℃预变性5 min, 94℃1 min, 58℃1 min, 72℃1 min, 72℃终延伸7 min。PCR产物行琼脂糖凝胶电泳鉴定。

### 1.4 真核表达质粒pRES- fimA及pRES- fimA:IL15的构建

fimA基因PCR扩增产物经纯化回收后与质粒pRES均以Xho和Mlu双酶切, 酶切产物经纯化回收后以T<sub>4</sub>DNA连接酶连接, 连接产物转化感受态E.coli DH5, 挑选菌落、纯化回收质粒并进行PCR和酶切鉴定, 正确的真核表达质粒命名为pRES- fimA。

IL-15基因PCR扩增产物经纯化回收后与质粒pRES- fimA均以Xba和Not双酶切, 酶切产物经

纯化回收后以T<sub>4</sub>DNA连接酶连接, 连接产物转化感受态E.coli DH5, 挑选菌落、纯化回收质粒并进行PCR和酶切鉴定, 上海博亚公司DNA序列鉴定, 正确的真核共表达质粒命名为pRES- fimA:IL15。

### 1.5 重组质粒pRES- fimA及pRES- fimA:IL15转染细胞

以F12培养基常规培养CHO细胞, 采用脂质体(Lipofectamine 2000)转染的方法将重组质粒pRES- fimA及pRES- fimA:IL15导入CHO细胞。以pRES作为空载体对照, 并以未进行基因转染的CHO细胞作为空白对照。转染细胞以800 mg/L的G418选择培养2周, 获得转染的阳性克隆。

### 1.6 重组质粒pRES- fimA及pRES- fimA:IL15的表达分析

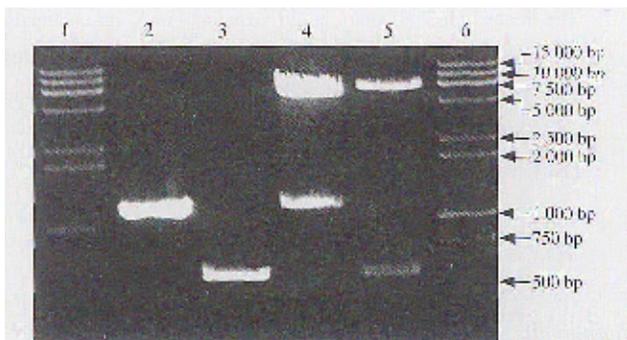
1.6.1 SDS-PAGE和Western blot分析 细胞裂解液裂解细胞, 收集裂解液SDS-PAGE电泳, 以Western blot对表达的FimA蛋白进行免疫学分析, 所用一抗为抗FimA兔抗血清(1:400), 二抗为辣根过氧化物酶标记羊抗兔IgG(1:1000), DAB显色。

1.6.2 培养上清的酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 收集转染后的无血清培养上清, 包被96孔板, 3%牛血清白蛋白封闭, 加抗FimA兔抗血清(1:20)和HRP标记的羊抗兔IgG(1:5000), TMB显色, 酶标仪读取OD<sub>450 nm</sub>值。IL-15以IL-15 ELISA检测试剂盒检测, 酶标仪读取OD<sub>492 nm</sub>值。

## 2 结果

### 2.1 fimA和IL-15基因的PCR产物

将片段的PCR扩增产物行琼脂糖凝胶电泳, 与DNA相对分子质量Marker比较, 得到目的大小片段, fimA基因片段为1225 bp, IL-15为489 bp(图1)。



1, 6: DNA相对分子质量Marker; 2: fimA PCR扩增产物; 3: IL-15 PCR扩增产物; 4: Xho和Mlu双酶切鉴定pRES- fimA; 5: Xba和Not双酶切鉴定pRES- fimA:IL15

图1 fimA与IL-15基因PCR产物及pRES- fimA和pRES- fimA:IL15酶切鉴定琼脂糖凝胶电泳结果

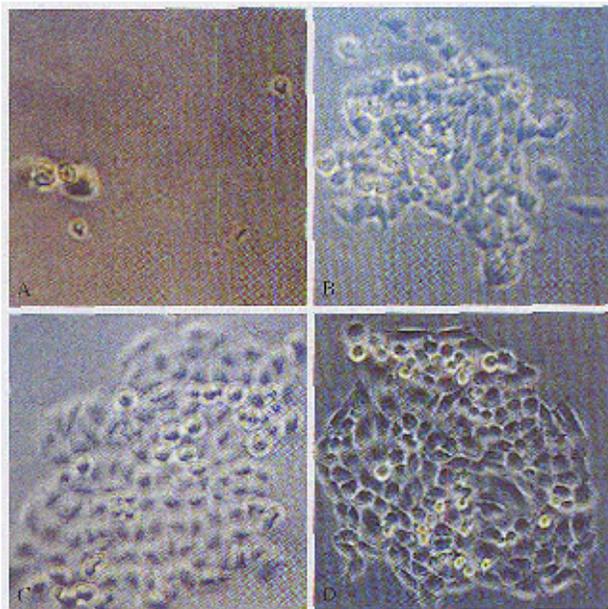
Fig 1 Results of agarose gel electrophoresis of PCR products of fimA and IL-15 and restriction analysis of pRES- fimA and pRES- fimA:IL15

## 2.2 真核共表达质粒pIRES-fimA:IL15的构建

pIRES-fimA用Xho和Mlu酶切, pIRES-fimA:IL15用Xba和Not酶切, 酶切产物经琼脂糖凝胶电泳, 与相对分子质量Marker比较, 得到目的大小片段(图1)。经上海博亚公司序列测定, pIRES-fimA:IL15真核表达质粒中插入的fimA与IL-15基因片段读码框正确。

## 2.3 G418选择培养转染细胞获得阳性克隆

以800 mg/L的G418选择培养转染细胞2周后, 于倒置显微镜下观察, 可见转染了重组质粒pIRES-fimA、pIRES-fimA:IL15以及质粒pIRES的CHO细胞出现阳性克隆, 而未进行基因转染的CHO细胞则全部死亡(图2)。



A: 未进行基因转染细胞; B: 转染质粒pIRES的细胞; C: 转染重组质粒pIRES-fimA的细胞; D: 转染重组质粒pIRES-fimA:IL15的细胞

图2 G418选择培养2周后CHO细胞的状况 倒置显微镜 ×20

Fig 2 CHO cells after 2 weeks in G418 cultural medium inverted microscope ×20

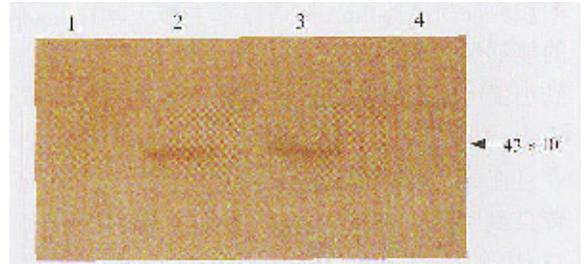
## 2.4 Western blot检测FimA蛋白在转染CHO细胞中的表达

Western blot分析表明, 转染了质粒pIRES-fimA和pIRES-fimA:IL15的CHO细胞裂解液中检测到了FimA蛋白的表达, 而转染pIRES组和未转染组则没有FimA蛋白的表达(图3)。

## 2.5 ELISA分析转染CHO细胞培养上清中的FimA蛋白和IL-15

培养上清中FimA蛋白的检测: 转染质粒pIRES组 $OD_{450\text{nm}}$ 为 $0.146 \pm 0.003$ , 转染重组质粒pIRES-fimA组 $OD_{450\text{nm}}$ 为 $0.626 \pm 0.004$ , 转染重组质粒pIRES-fimA:IL15组 $OD_{450}$ 为 $0.607 \pm 0.003$  未转染组 $OD_{450}$ 为

$0.140 \pm 0.002$ 。转染pIRES-fimA及pIRES-fimA:IL15组, 与转染pIRES及未转染组,  $OD_{450\text{nm}}$ 比值大于2.1, 说明转染pIRES-fimA及pIRES-fimA:IL15的细胞培养上清中有FimA蛋白的表达。



1: 转染pIRES的CHO细胞裂解液; 2: 转染pIRES-fimA的CHO细胞裂解液; 3: 转染pIRES-fimA:IL15的CHO细胞裂解液; 4: 未转染的CHO细胞裂解液

图3 Western blot检测FimA蛋白在转染CHO细胞中的表达

Fig 3 Expression of FimA protein in CHO cells

培养上清中IL-15的检测: 转染质粒pIRES组 $OD_{492\text{nm}}$ 为 $0.131 \pm 0.002$ , 转染重组质粒pIRES-fimA:IL15组 $OD_{492\text{nm}}$ 为 $0.461 \pm 0.003$ , 未转染组 $OD_{492\text{nm}}$ 为 $0.161 \pm 0.002$ 。转染pIRES-fimA:IL15组与转染pIRES及未转染组,  $OD_{492\text{nm}}$ 比值大于2.1, 说明转染pIRES-fimA:IL15的细胞培养上清中有IL-15的表达。

## 3 讨论

*P.gingivalis*是慢性牙周炎的主要致病菌, 而其菌毛蛋白FimA则是*P.gingivalis*引起牙周病变的主要毒力因子之一。FimA可介导*P.gingivalis*粘附于上皮细胞、内皮细胞、唾液成分, 也与该菌侵入到牙周组织的上皮细胞及结缔组织内有关, 而且可刺激致炎性细胞因子(IL-1、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ )的产生, 导致骨质吸收和其他炎症反应。同时FimA可以介导树突状细胞摄取*P.gingivalis*, 并促进树突状细胞的成熟, 分泌炎症细胞因子IL-1、IL-6、IL-8、IL-12以及TNF- $\alpha$ 。有实验表明<sup>[2-4]</sup>, 多菌毛*P.gingivalis*野生型菌株可引起定菌大鼠牙槽骨吸收, 而无菌毛的突变菌株则不会造成牙槽骨的破坏。也有实验发现<sup>[5]</sup>, 用FimA免疫大鼠可减轻由*P.gingivalis*引起的牙槽骨破坏, 将抗FimA的单克隆抗体用于口腔被动免疫<sup>[2]</sup>, 可以抑制该菌在口腔的定植。所以将FimA作为防治牙周炎疫苗抗原具有确定的可行性和必要性。

DNA疫苗是指将编码外源蛋白的核酸表达载体直接转化到机体内, 以产生针对外源蛋白的特异性免疫应答。DNA质粒进入宿主细胞并能停留数月, 这又为机体的免疫系统接受长期的抗原刺激创造机会, 从而使体内特异的免疫记忆细胞能长期存在, 以此维持特异性免疫力。故而DNA疫苗在免疫范

围(诱发体液免疫和细胞免疫)、免疫持久性等方面与以往的各种疫苗比较有着很大的优越性。

国外已有报道将牙龈卟啉单胞菌FimA蛋白的DNA疫苗用于防治牙周病的实验<sup>[7-9]</sup>。本实验所使用的质粒pcDNA3-fimA就是日本大阪大学Hamada构建的能够编码FimA蛋白的真核表达质粒<sup>[7]</sup>, 将其注射到小鼠唾液腺组织中, 结果唾液中的FimA特异抗体slgA、IgG及血清中的特异抗体IgG含量大幅度升高, 并且在第1次注射后至少维持了138 d。同时还将其转染到哺乳动物细胞中, 表达了相对分子质量为43 x10<sup>3</sup>的FimA蛋白, 验证了这个DNA疫苗所携带的fimA基因的完整性和功能性。

在口腔环境中防御病原入侵的免疫球蛋白主要是分泌型IgA, 它可以抑制细菌对上皮的粘附。由于slgA本身结构的特点, 在口腔环境中抗蛋白水解酶的能力较强, 所以作用效果好。因此通过诱导以slgA反应为主的P.gingivalis黏膜免疫应答是防治成人牙周病的理想选择。而IL-15<sup>[1]</sup>可以特异的作用于被抗原致敏的B1细胞向产生IgA细胞的转型分化, 可促进产生IgA细胞的增殖, IL-15还是一种具有维持T细胞增殖活性的糖蛋白。同时, IL-15在NK细胞分化增殖过程中也起重要的作用。动物实验表明, IL-15注射到体内有抗肿瘤作用且无不良反应<sup>[1]</sup>。因此, 选择IL-15作为增强免疫反应, 尤其是增强IgA应答的免疫调节因子是理想的。

真核表达质粒pIRES含有核糖体内部进入位点(internal ribosome entry site, IRES)的特异序列, 它可以连接两段基因, 使其转录在一条mRNA上, 但翻译成两个独立的蛋白质, 两蛋白的空间构象及功能互不干扰<sup>[9]</sup>。这样, 插入的目的基因在体内表达后, 抗原FimA蛋白可以诱导免疫应答, IL-15则可以使被抗原致敏的B1细胞向产生IgA的细胞转型分化及增殖, 增强slgA应答。

本实验构建的真核共表达质粒pIRES-fimA:IL15经Lipofectamine 2000介导转染CHO细胞后经Western blot和ELISA分析, 能够在哺乳动物细胞中表达FimA蛋白, 在转染细胞的培养上清中也可以检测到FimA

蛋白和IL-15的表达, 同时表达的FimA蛋白能够与特异性抗体结合, 具有抗原性。因此, 本实验成功构建了FimA与IL-15的真核共表达质粒。该重组质粒作为抗牙龈卟啉单胞菌FimA的DNA疫苗, 具有表达产物FimA和IL-15的生物活性, IL-15可以用来增强局部免疫应答强度, 缩短免疫应答潜伏期, 从而为进一步动物实验研究打下基础。

[参考文献]

- [1] Hiroi T, Yanagita M, Ohta N, et al. IL-15 and IL-15 receptor selectively regulate differentiation of common mucosal immune system-independent B-1 cells for IgA responses[J]. J Immunol, 2000, 165(8): 4329-4337.
- [2] Isogai H, Isogai E, Yoshimura F, et al. Specific inhibition of adherence of an oral strain of Bacteroides gingivalis 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae[J]. Arch Oral Biol, 1988, 33(7): 479-485.
- [3] Khlgatian M, Nassar H, Chou HH, et al. Fimbria-dependent activation of cell adhesion molecule expression in Porphyromonas gingivalis-infected endothelial cells[J]. Infect Immun, 2002, 70(1): 257-267.
- [4] De Felipe P, Izquierdo M. Tricistronic and tetracistronic retroviral vectors for gene transfer[J]. Human Gene Therapy, 2000, 11(13): 1921-1931.
- [5] Malek R, Fisher JG, Caleca A, et al. Inactivation of the Porphyromonas gingivalis fimA gene blocks periodontal damage in gnotobiotic rats[J]. J Bacteriol, 1994, 176(4): 1052-1059.
- [6] Deslauriers M, Haque S, Flood PM. Identification of murine protective epitopes on the Porphyromonas gingivalis fimbriin molecule[J]. Infect Immun, 1996, 64(2): 434-440.
- [7] Kawabata S, Terao Y, Fujiwara T, et al. Targeted salivary gland immunization with plasmid DNA elicits specific salivary immunoglobulin A and G antibodies and serum immunoglobulin G antibodies in mice[J]. Infect Immun, 1999, 67(11): 5863-5868.
- [8] Sharma A, Honma K, Evans RT, et al. Oral immunization with recombinant Streptococcus gordonii expressing Porphyromonas gingivalis FimA domains[J]. Infect Immun, 2001, 69(5): 2928-2934.
- [9] Jotwani R, Outler CW. Fimbriated Porphyromonas gingivalis is more efficient than fimbria-deficient P.gingivalis in entering human dendritic cells in vitro and induces an inflammatory Th1 effector response[J]. Infect Immun, 2004, 72(3): 1725-1732.

( 本文编辑 汤亚玲)

2006年深圳世界口腔医学大会通知

2006年9月22—25日深圳世界口腔医学大会正在积极筹备中。组委会决定接受投稿, 请于2006年7月31日前将论文的中文摘要(400字以内)寄至: 北京中关村南大街22号中华口腔医学会 朱春华收, 邮编: 100081, E-mail: fdcisa@vip.sina.com.

中华口腔医学会  
世界口腔医学大会组织委员会