

[文章编号 1000-1182(2004)06-0503-04

牙龈卟啉单胞菌基因真核表达载体构建 及其在哺乳动物细胞中的表达

张凤秋¹, 杨连甲², 吴织芬¹, 秦鸿雁³

(1. 第四军医大学口腔医院 牙周科; 2. 病理科; 3. 第四军医大学 医学遗传学与发育生物学教研室, 陕西 西安 710032)

[摘要] 目的 构建分泌型牙龈卟啉单胞菌牙龈蛋白酶 K 基因的真核表达载体 VR1020/*KGPcd*, 并检测其在哺乳动物细胞中的表达及分泌情况。方法 应用基因重组方法, 构建真核表达载体 VR1020/*KGPcd*。然后用 Lipofectamine 2000 介导瞬时转染 COS7 细胞, 以反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 和间接免疫荧光检测重组质粒的基因转录和蛋白表达, 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测培养上清中蛋白分泌情况。结果 转染的 COS7 细胞中可检测到目的基因的转录和表达, 并且在培养的上清中检测到其表达的蛋白质。结论 成功构建了可分泌表达的真核表达载体 VR1020/*KGPcd*, 并在哺乳动物细胞中能够正确转录和翻译, 培养上清中可检测到正确表达的目的蛋白, 这为其作为基因疫苗免疫动物奠定了基础。

[关键词] 牙周炎; 牙龈卟啉单胞菌; 牙龈蛋白酶 K; 基因疫苗

[中图分类号] R 781.4 **[文献标识码]** A

Construction of Eukaryotic Expression Vector for *KGPcd* Gene from *Porphyromonas gingivalis* and Expression in Mammalian Cells ZHANG Feng-qiu¹, YANG Lian-jia², WU Zhi-fen¹, QIN Hong-yan³. (1. Dept. of Periodontitis, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China; 2. Dept. of Pathology, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China; 3. Dept. of Medical Genetics and Developmental Biology, The Fourth Military Medical University, Xi an 710032, China)

[Abstract] **Objective** This study aimed at constructing secretory eukaryotic expression vector of *KGPcd* gene encoding whole amino acid residues of mature *KGPcd* from *Porphyromonas gingivalis* and investigating the transcription and expression of recombinant plasmid VR1020/*KGPcd* in mammalian cells. **Methods** Eukaryotic expression plasmid VR1020/*KGPcd* was constructed by using molecular cloning methods. Then, the VR1020/*KGPcd* was transfected into mammalian cell COS7 with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instruction. The transcription of VR1020/*KGPcd* was assayed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression product of VR1020/*KGPcd* was analyzed by using indirect immunofluorescence. The protein secretion in cultural medium was detected by ELISA method. **Results** It proved that the VR1020/*KGPcd* could be transcribed and translated into transfected COS7 cells. The expressed targeted protein could be secreted into cultural supernatant and could be detected by ELISA. **Conclusion** The eukaryotic expression plasmid of VR1020/*KGPcd* was constructed successfully and its product can be expressed in mammalian cells. The results indicated that the recombinant plasmid has antigenicity and may be acted as candidate gene vaccine. This laid a basis for its use as gene vaccine candidates in the development of anti-periodontitis and paved the way for further study.

[Key words] periodontitis; *Porphyromonas gingivalis*; gingipain K; gene vaccine

目前疫苗的研究已由传统的灭活疫苗、减毒疫苗、亚单位疫苗发展为基因疫苗。基因疫苗不仅用于各种感染性疾病治疗, 还用于癌症及免疫性疾病的治疗, 基因疫苗被誉为第 3 次疫苗革命。构建的真核质粒能否作为基因疫苗, 最重要的是保证插入的外源基因在体外、体内能够正确转录、翻译和表达。本研究通过构建牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*) 的牙龈蛋白酶 K 催化结构域 (gingipain K

catalytic domain, *KGPcd*) 基因的真核表达质粒 VR1020/*KGPcd*, 并观察其在 COS7 细胞中的转录、翻译和表达情况, 为今后将 VR1020/*KGPcd* 作为基因疫苗免疫动物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株和试剂

pGEM-T/*KGPcd*¹, VR1020 (来自美国海军医学研究所 Stephen L. Hoffman, 由第四军医大学病原生物学实验室刘军转赠); rTaq DNA Polymerase、dNTP、Klenow、CIAP 及限制性内切酶、Rapid DNA Ligation Kit

[收稿日期 2003-10-31; 修回日期 2004-09-20]

[作者简介] 张凤秋 (1971-), 女, 山东人, 主治医师, 博士

[通讯作者] 杨连甲, Tel: 029-83376244

(Takara 公司, 日本); LipofectAMINE 2000、Trizol Reagent、SuperScript™ Kit (Gibco 公司, 美国); DNA/Hind Marker (购于华美生物有限公司); DSL2000 Marker (购于鼎国技术有限公司); 羊抗兔 FITC-IgG (北京中山生物有限公司); 羊抗小鼠 HRP-IgG、ABTS (Sigma 公司, 美国); 抗 *KGPcd* 兔多克隆抗体 (作者制备); 质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒 (上海华舜生物有限公司); 大肠杆菌 *E. coli* XL-10、COS7 细胞株 (第四军医大学医学遗传学与发育生物学实验室); COS7 细胞采用 DMEM (Gibco 公司, 美国) 常规培养; 大肠杆菌采用 LB 卡那抗性液体和固体培养基常规培养。

1.2 真核表达质粒 VR1020/*KGPcd* 的构建及鉴定

用质粒小提试剂盒提取质粒 pGEM-T/*KGPcd* 及 VR1020, 然后各取 15 μ l, VR1020 用 *Bam*H 酶切, pGEM-T/*KGPcd* 用 *Nde* 酶切, 均用 Klenow 酶将酶切片段补平, 用 CIAP 将切平的载体 VR1020 去磷酸化, 胶回收试剂盒回收目的片段和载体、Rapid DNA Ligation Kit 连接, 将连接产物转化至 *E. coli* XL-10 感受态细胞中, 挑选菌落、提取质粒进行酶切鉴定, 并鉴定插入片段的方向。正确的表达质粒命名为 VR1020/*KGPcd*。

1.3 重组质粒 VR1020/*KGPcd* 转染细胞

用质粒小提试剂盒抽提与纯化重组质粒 VR1020/*KGPcd* 和质粒 VR1020, 用 UV265 型紫外分光光度计测 A_{260} 、 A_{280} , 并计算其浓度与纯度。采用 LipofectAMINE 2000 介导的瞬时转染贴壁细胞的方法转染细胞: 转染前 24 h 将 COS7 细胞传代于 6 孔板, 转染前 30 min 改用无血清培养基, 加入一定量质粒与 Lipofectamine2000 混合, 室温放置 30 min 后逐滴加入细胞培养板, 在细胞培养箱中培养 5 h, 换成 10% 胎牛血清 DMEM 培养液继续培养 24 h。将重组质粒 VR1020/*KGPcd*、空质粒 VR1020 分别转染 COS7 细胞。

1.4 转染细胞中 *KGPcd* 基因转录水平检测

按 Trizol Reagen 说明书提取基因转染后培养细胞中总 RNA, 用 SuperScript™ Kit 从提取的 RNA 反转录合成 cDNA 第一链, 以下述一对引物进行反转录聚合酶链反应 (reverse transcription PCR, RT-PCR) 检测 *KGPcd* 基因的转录水平。

上游: 5'-CAT ATG GAT GIT TAT ACA GAT-3

下游: 5'-TCA ACG GGA AGC TTC TGC C-3

PCR 反应条件: 94 变性 5 min; 94 30 s, 55 1 min、72 1 min 30 s, 35 个循环后, 72 延伸 7 min。将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.5 转染后 *KGPcd* 基因翻译水平的检测

1.5.1 间接免疫荧光检测 制备细胞爬片, 4% 多聚

甲醛固定, 以免疫荧光化学染色检测重组质粒 VR1020/*KGPcd* 转染后 COS7 细胞中的表达产物。设空质粒 VR1020 转染的 COS7 细胞为阴性对照。一抗为抗 *KGPcd* 兔抗血清; 二抗为羊抗兔 FITC-IgG。

1.5.2 培养上清的酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测 转染后 24 h 细胞培养液的上清用 1:8 丙酮沉淀蛋白, 然后进行 ELISA 分析。抗 *KGPcd* 兔抗血清包被缓冲液稀释后包被 96 孔板, 1% 牛血清白蛋白封闭, 加待测培养上清, 37 温育 2 h, 加抗 *KGPcd* 小鼠抗体, 37 温育 2 h, 加羊抗小鼠 HRP-IgG, ABTS 显色, 酶标仪 Microplate Reader (Bio-Rad) 读取 $A_{410\text{nm}}$ 值。ELISA 结果判定: $A_{410\text{nm}}$ 值不得低于 0.1, 与阴性对照 $A_{410\text{nm}}$ 值比值大于 2.1。

2 结果

2.1 真核表达质粒 VR1020/*KGPcd* 的构建及鉴定

用 *Nde* 切出 pGEM-T/*KGPcd* 中目的基因片段, 插入真核表达载体 VR1020 中, 构建重组表达质粒 VR1020/*KGPcd*, 经 *Kpn*、*Pst* 酶切后, 电泳结果如图 1, # 号克隆是正向插入者, 为正确质粒。



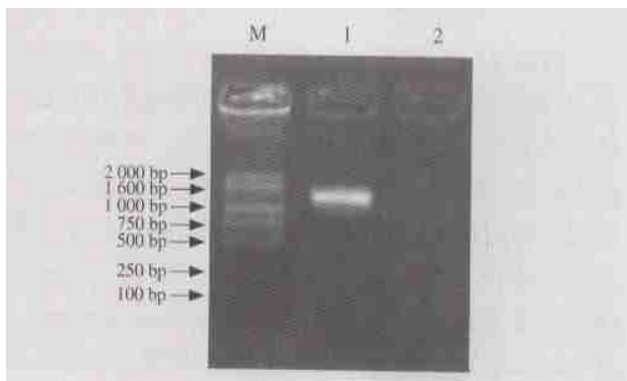
1: *Kpn* 酶切; 2: *Pst* 酶切; M: DNA/*Hind* marker

图 1 VR1020/*KGPcd* 酶切鉴定

Fig 1 Restriction analysis of recombinant plasmid VR1020/*KGPcd*

2.2 重组质粒 VR1020/*KGPcd* 转录水平的检测

RT-PCR 检测可见重组子 VR1020/*KGPcd* 转染细胞可扩增约 1.5 kbp cDNA 片段, 空质粒 VR1020 转染组细胞则不能扩增 (图 2)。表明 VR1020/*KGPcd* 质粒转染 COS7 细胞后, 有 *KGPcd* 基因转录水平表达。



M: DSL2000 marker; 1: VR1020 转染组; 2: VR1020/*KGPcd* 转染组

图 2 转染细胞 RT-PCR 产物电泳

Fig 2 Result of agarose gel electrophoresis of RT-PCR product

2.3 重组质粒 VR1020/ *KGPcd* 蛋白表达水平的检测

2.3.1 间接免疫荧光检测 采用脂质体法,将质粒瞬时转染 COS7 细胞,取转染细胞进行间接免疫荧光化学染色,结果发现 VR1020/ *KGPcd* 转染的 COS7 细胞的胞浆、胞膜中呈现绿色荧光(图 3);空载体 VR1020 转染组无荧光(图 4)。说明重组质粒 VR1020/ *KGPcd* 转染 COS7 细胞后目的基因能够在细胞内正确转录、翻译、表达,并可与抗 *KGPcd* 蛋白的抗体特异性结合。

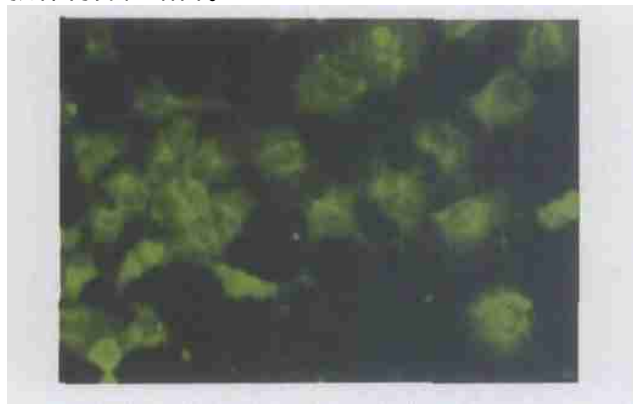


图 3 VR1020/ *KGPcd* 转染 COS7 细胞 FITC ×20

Fig 3 COS7 cells transfected by VR1020/ *KGPcd* FITC ×20



图 4 VR1020 转染 COS7 细胞 FITC ×20

Fig 4 COS7 cells transfected by VR1020 FITC ×20

2.3.2 培养上清的 ELISA 检测 VR1020/ *KGPcd* 转染组 $A_{410\text{nm}}$ 为 0.428 ± 0.004 , VR1020 转染组 $A_{410\text{nm}}$ 为 0.152 ± 0.001 , 阴性对照 0.131 ± 0.003 。结果表明 VR1020/ *KGPcd* 转染细胞的培养上清液中有 *KGPcd* 蛋白抗原的分泌。

3 讨论

基因疫苗²是通过把含有编码保护性抗原基因的真核表达载体直接导入宿主细胞,诱导宿主免疫系统对目的基因所表达的蛋白质产生免疫应答,达到预防和治疗疾病的目的。基因疫苗是应用构建的 DNA 质粒直接在体内进行蛋白表达,只需对编码抗原的 DNA 质粒进行操作,省略了目的基因在体外表达,也

不需要体外纯化抗原,具有生产简便、成本低廉、稳定性好等特点,而且表达的蛋白与天然构象更接近,抗原性强。

目前已证实牙周炎是一种细菌感染性疾病,其中 *P. gingivalis* 是公认的牙周病原菌,其细胞表面具有多种抗原性物质,如膜蛋白、囊泡、菌毛蛋白等,可诱导机体的保护性免疫应答。Rajapakse 等³用纯化的 *P. gingivalis* 牙龈蛋白酶作抗原,诱导的抗体可抑制 *P. gingivalis* 的定植、生长,并减轻由 *P. gingivalis* 引起的牙槽骨吸收。本实验利用基因工程重组技术,使 *KGPcd* 基因在大肠杆菌中获得了高效、稳定表达,并用 Ni 柱亲和层析纯化系统纯化该蛋白后用于免疫 BALB/c 小鼠,结果表明免疫鼠血清中可检测到抗 *KGPcd* 蛋白的抗体,纯化的 *KGPcd* 蛋白免疫 SD 大鼠,可减轻由 *P. gingivalis* 引起的牙槽骨破坏。这表明 *KGPcd* 是 *P. gingivalis* 的有效免疫原。这为构建 *KGPcd* 基因疫苗用于基因免疫提供了依据。

本实验应用分子生物学实验技术,成功构建了 *P. gingivalis* 牙龈蛋白酶 K 成熟肽蛋白酶结构域基因的重组质粒 VR1020/ *KGPcd*。为了确定重组质粒 VR1020/ *KGPcd* 所携带的目的基因能否在体内表达,必须将质粒转移到哺乳动物细胞内,即需要进行体外细胞转染。因此重组质粒必须首先能在体外培养的细胞中表达目的蛋白,然后构建的重组质粒才能作为基因候选疫苗用于后续的动物实验研究。

将外源基因通过某种途径转移入哺乳动物细胞以促进表达的过程,称为转染。脂质体包裹法是转染细胞的重要方法之一,脂质体是转染细胞的重要载体, Lipofectamine 2000 是一种阳离子脂质体,可与带负电荷的 DNA 结合,形成脂与核酸的复合体,附着于细胞膜,通过疏水和静电相互作用,使 DNA 进入细胞。脂质体转染法操作简单,转染效率在 10% ~ 20%⁴。

本实验所用分泌型真核表达载体 VR1020⁵⁻⁷ 是以 pUC18 为骨架构建的用于基因疫苗的载体,是专为人体应用设计的载体,其抗性选择基因为 *kanR* 而不是 *ampR*。此载体具有 CMV 的立即早期增强子/启动子复合体,在启动子与编码序列之间插入了 CMV IE 基因的第二个内含子 Intron A, CMV 启动子具有极强的转录活性,能使目的基因在哺乳动物细胞内高效、持续表达,多克隆位点的下游含有牛生长激素转录终止序列及 poly(A) 信号,来自人组织纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, TPA) 的信号肽序列位于多克隆位点的 5 端,在阅读框架内进行与外源基因融合可提高表达水平,并可使表达的蛋白分泌到细胞外,有助于增强表达的外源蛋白的抗原性。

VR1020 载体具有 SV40 复制起点,是一种与 COS7 表达系统匹配的真核表达载体。

COS7 细胞瞬时表达系统是所有真核表达系统中最为常用的。该细胞株源自复制子缺失的猴病毒 40 (SV40) 转化的非洲绿猴肾细胞。COS7 细胞大量表达对在 SV40 复制起始点引发 DNA 复制所必需的 SV40 大 T 抗原,在转染实验过程中,每个 COS7 细胞将积聚大于 10^5 个带 SV40 复制起点的重组表达质粒并高效表达外源 DNA 序列⁸。

本实验将构建的重组质粒 VR1020/ KGPcd 经 Lipofectamine 2000 介导瞬时转染贴壁细胞的方法转染 COS7 细胞,然后通过 RT-PCR 和间接免疫荧光染色方法,证实重组质粒 VR1020/ KGPcd 在哺乳动物细胞中能够正确转录、翻译并表达,而且 VR1020/ KGPcd 转染细胞的培养上清中也可检测到 KGPcd 蛋白的分泌。由此表明重组质粒 VR1020/ KGPcd 能在体外培养的哺乳动物细胞中正确翻译表达目的蛋白,并能将目的蛋白分泌到细胞外,而且表达的目的蛋白可与抗 KGPcd 蛋白的抗体特异性结合,具有抗原性,因此 VR1020/ KGPcd 可考虑作为基因候选疫苗用于后续的动物实验研究。

[参考文献]

- 1] 张凤秋,杨连甲,吴织芬,等. 牙龈卟啉菌牙龈蛋白酶 K 催化结构域的克隆及其在大肠杆菌中的表达 J. 口腔医学研究, 2003, 19(4): 244-246.
- 2] 罗超权主编. 基因诊断与基因治疗进展 M. 郑州:河南医科大学出版社, 2000: 273-275.
- 3] Rajapakse PS, O'Brien-Simpson NM, Slakeski N, et al. Immunization with the RgpA-Kgp proteinase-adhesion complexes of *Porphyromonas gingivalis* protects against periodontal bone loss in the rat periodontitis model J. Infect Immun, 2002, 70(5): 2480-2486.
- 4] 杜宝恒主编. 基因治疗的原理和实践 M. 天津:天津科学技术出版社, 2000: 69-97.
- 5] Cheryl AL, Ravi D, Nirbhay K. Immunization of mice with DNA-based Pfs25 elicits potent malaria transmission-blocking antibodies J. Infect Immun, 1999, 67(4): 1688-1693.
- 6] Luke CJ, Carner K, Liang X, et al. OspA-based DNA vaccine protects mice against infection with *Borrelia burgdorferi* J. J Infect Dis, 1997, 75(1): 91-97.
- 7] Hartikka J, Sawdey M, Cornefert-Jensen F, et al. An improved plasmid DNA expression vector for direct injection in skeletal muscle J. Human Gene Therap, 1996, 7(6): 1205-1217.
- 8] 金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南 M. 第 2 版,北京:科学出版社, 1998: 765-780.

(本文编辑 汤亚玲)

药品“碧兰麻”商品名将更名为“必兰”

根据国家食品药品监督管理局有关药品名称管理的有关规定,法国碧兰公司生产的口腔局部麻醉剂“碧兰麻”,商品名将更名为“必兰”,新货将于 2004 年底上市。

以“必兰”为新商品名的 Primacaine Adrenaline(原“碧兰麻”),药品通用名称为阿替卡因肾上腺素注射液,化学成份仍为盐酸阿替卡因和肾上腺素(1:100000),规格 1.7 ml/支,50 支/盒。目前该药品已经获得国家食品药品监督管理局颁发的新“进口药品注册证”,注册证号:H20040327。此外,为了适合运输需要,“必兰”的外包装还改成了与国际同步的新型包装,新包装“必兰”预计年内在国内上市。阿替卡因作为新一代的酰胺类口腔局部麻醉药,一方面具有与利多卡因等酰胺类药物类似的特点,同时还具有很高的组织穿透力,起效时间短,麻醉效能高,持续时间相对长,毒性小,即相同条件注射时,“必兰”用量最小,效果最理想,安全性最高。

自 1999 年在中国上市以来,“必兰”以其优越的疗效受到广大口腔医生的信赖与广泛应用。

说明:

1 在选购产品时,请认准法国碧兰公司包装标识以及相关产品信息。

2 法国碧兰公司为法国艾龙集团(原法国赛特力-碧兰集团)的子公司。法国赛特力-碧兰集团是 70 年代成立的生产口腔设备和材料的高科技企业,经过 30 多年的发展,整个集团已经成为口腔临床材料和设备的顶尖供应商。为了今后更好的运营和发展,2003 年 3 月,整个企业更名为—艾龙集团(ACTEON GROUP)。

欢迎垂询法国碧兰公司北京办事处:010-64657011/12/13/14

网址:www.cn.acteongroup.com