

## 基础研究 ·

# 基因重组鼠伤寒沙门氏菌防龋疫苗的研究 · 携带变形链球菌 *pac* 基因表达质粒的构建与初步鉴定

陈 罕 凌均荣 杨国平 涂家珍

**摘要** 目的:构建携带变形链球菌表面蛋白 *pac* 基因 A 区片段的原核高效表达系统。方法:对含变形链球菌表面蛋白 *pac* 基因的 pPC41 质粒进行 PCR 扩增,获得了 *pac* 基因 A 区片段;将扩增获得 *pac* 基因 A 区片段与表达质粒 pET17-b 定向克隆,重组质粒用 BamHI, EcoRV 双酶切后电泳鉴定。结果:获得携带 *pac* 基因 A 区片段的重组质粒。结论:利用基因工程技术获得的重组质粒为后继工作准备了实验基础。

**关键词** 变形链球菌 表面蛋白 减毒鼠伤寒沙门氏菌

## Recombinant *Salmonella typhimurium* Anticaries Vaccine · Construction and Confirmation of Expressing Plasmid Carrying A Region of *S. mutans pac* Gene

Chen Han, Ling Junqi, Yang Guoping, et al

College of Stomatology, Sun Yat-sun University of Medical Sciences

### Abstract

**Objective:** The objective of this study is to construct prokaryotic expressing plasmids carrying A region of *S. mutans pac* gene. **Methods:** The A region of *pac* gene was amplified by using PCR from plasmid pPC41 containing *S. mutans* surface protein *pac* gene. The new expression plasmid was constructed by using A region of *pac* gene and expressing plasmids pET17-b and directed cloning technique. The recombinant plasmid was identified by agarose gel electrophoresis after it was cut by using BamHI and EcoRV. **Results:** The expressing plasmid carrying *pac* gene A region was acquired. **Conclusion:** The recombinant plasmid provides useful experimental materials for further research work.

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

变形链球菌已被认为是人类龋病的主要致病病原菌<sup>1</sup>。变形链球菌菌体表面的表面蛋白 PAc 是变形链球菌非特异性地粘附于牙表面唾液获得膜的因子之一,已被认为是毒力因子<sup>2</sup>。同时表面蛋白 PAc 又可诱导机体产生保护性抗体抑制变形链球菌的致龋作用。直接口服表面蛋白 PAc 不能刺激机体产生足够的保护性抗体,需要使用免疫佐剂或免疫增强剂来提高保护效果。实验证实减毒鼠伤寒沙门氏菌被口服后,可在小肠粘膜的 Peyer's 结中定居,刺激机体产生分泌型 IgA (SIgA)<sup>3</sup>。在减毒鼠伤寒沙门氏菌中导入变形链球菌表面蛋白基因,并使之得到有效表达,再将该菌口服应用,可

望刺激机体产生足够的保护性抗体。本实验旨在构建携带变形链球菌表面蛋白 *pac* 基因 A 区片段的表达质粒,并进行初步鉴定。为进一步将质粒转化至减毒鼠伤寒沙门氏菌构建疫苗打下基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂与仪器

限制性内切酶, T<sub>4</sub> DNA 连接酶 (Life Technologies 公司, 美国); Taq 酶, dNTP (华美公司); 质粒回收纯化试剂盒, DNA 凝胶回收试剂盒 (Qiagen 公司)。PCR 反应在 PE9600 PCR 仪上进行。

#### 1.2 菌株与质粒

含 *pac* 基因的质粒 pPC41, 原核表达载体 pET-17b, *E. coli* DH5。

#### 1.3 引物设计

本课题为广东省自然科学基金资助项目(编号 970105)

作者单位: 510060 中山大学口腔医学院

根据 *pac* 基因的已知序列,应用引物设计软件 Primer3 辅助设计引物 A<sub>1</sub> A<sub>2</sub>。用引物 A<sub>1</sub> A<sub>2</sub> 选择性扩增 *pac* 基因 A 区,并在引物上分别加入 BamHI, EcoRV 限制性内切酶酶切位点。引物序列如下:

A<sub>1</sub> 5' gcgcggatccagcagcagatttagcagccgttc 3'

A<sub>2</sub> 5' gcgcgctatcgggaacttcccactctgtgtca 3'

1.4 目的片段获得

PCR 扩增:取 pPC41 质粒 5μl,10 ×PCR 缓冲液 5.0μl,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 2.0μl,25 mmol/L dNTP 0.2μl,Taq 酶 0.3μl,上下游引物各 1.0μl,ddH<sub>2</sub>O 35.5μl 进行 PCR 反应(94 1 min,55 1 min,72 1 min30 s,35 个循环后 72 延伸 10 min),取 10μl PCR 产物上样 1.5%琼脂糖凝胶电泳。

PCR 产物回收:将 PCR 产物上样 1.5%琼脂糖凝胶电泳后回收相应片段(Qiaquick Gel Extraction Kit)。

1.5 原核表达载体的构建

用 BamHI,EcoRV 双酶切 pET-17b 及 PCR 回收产物后,T<sub>4</sub> DNA 酶连接。连接产物转化 *E. coli* DH5 感受态细胞,取 200μl 涂布 LB-Amp 平板,37 过夜培养后取单菌落接种于 2 ml LB 培养液中,37 振荡过夜,小剂量制备质粒 DNA(Qiaquick Plamid Extraction Kit)。

1.6 表达载体的初步鉴定

将小量制备的质粒 DNA 经 BamHI, EcoRV 双酶切鉴定重组质粒,确认质粒构建正确。

2 结 果

2.1 PCR 产物

应用引物 A<sub>1</sub>,A<sub>2</sub>,扩增出变形链球菌表面蛋白 *pac* 基因 829 至 1778 位点的片段,覆盖 *pac* 基因的 A 区,长度 950bp(图 1)。

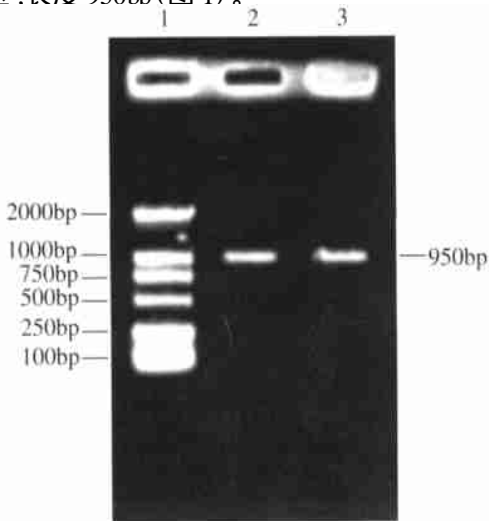


图1 PCR 扩增产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳结果 1:标准分子量标记 2:PCR 产物

2.2 重组表达载体的鉴定

重组质粒经 BamHI,EcoRV 双酶切,1.5%琼脂糖凝胶电泳,获得 3200 bp 和 950 bp 两个 DNA 片段(图 2)。初步证实重组表达载体构建正确。

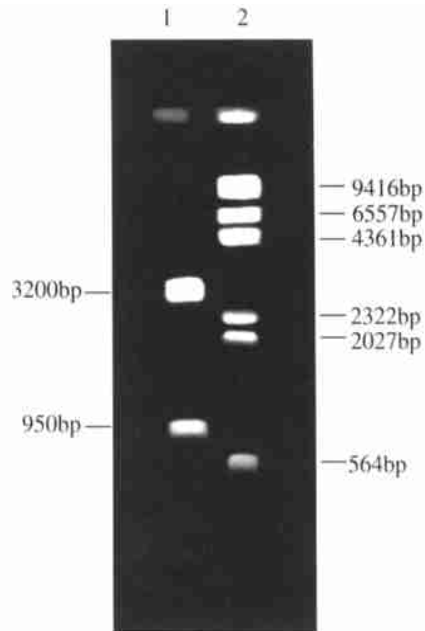


图2 重组质粒 BamHI,EcoRV 双酶切后 1.5%琼脂糖凝胶电泳结果 1:重组质粒 BamHI,EcoRV 双酶切后结果 2:标准分子量标记

3 讨 论

为使减毒鼠伤寒沙门氏菌中合成的外源性目的蛋白质达到引起机体特异性免疫反应的需要,必须极力提高外源基因的表达效率。如果表达水平仅仅停留在检测水平上,是不能达到进行疫苗试验要求的。就目前所知,能影响表达量的因素有:启动子的强度,DNA 转录起始序列,密码的选择,mRNA分子的二级结构,转录的终止,质粒的拷贝数以及质粒的稳定性和寄生细胞的生理特性等<sup>4</sup>。以上因素都会不同程度的影响到克隆基因的表达效率。构建的表达载体应有:1个强的原核启动子及其两侧的调控序列,应有 SD 序列,而 SD 序列与起始密码子 ATG 之间应有合适的距离,克隆基因与启动子之间应有正确的阅读框架,外源基因的下游应有合适的转录终止区。原核生物基因表达的控制主要是在转录水平,这种控制比对基因产物的直接控制要慢。这种控制有两种方式:1种是启动子控制,1种是终止子控制。因此对原核表达载体而言,强有力的启动子和终止子是保证重组载体系统中克隆片段高效表达的关键<sup>5</sup>。pET-17b 高效表达系统,利用 T<sub>7</sub> 启动子和 T<sub>7</sub> 终止子

控制表达区域内的外源基因。T<sub>7</sub> 启动子是强启动子,能有效地提高外源基因的表达量。因为上游的强 T<sub>7</sub> 启动子控制转录,必须由强终止子抑制,才能不至于干扰和载体本身稳定性相关基因的表达。因此利用 pET-17b 表达系统在理论上是能够获得高效表达的变形链球菌表面蛋白 A 区片段。将载体和外源性片段用两种不同的限制性内切酶酶切后,均产生相应的非互补粘性末端,使外源性片段只可能有一个方向连接于载体,达到定向克隆的目的。在以后进行重组表达载体鉴定时,不需要对重组子插入片段进行插入方向鉴定。本实验在 PCR 引物设计时,在引物上分别带有 BamHI, EcoRV 的酶切位点,保证了在双酶切后,能将 PCR 扩增的产物定向插入表达载体 pET-17b 中,保证阅读框正确,使以后翻译产生的蛋白质具有可靠的生物活

性。构建的重组质粒经 EcoRV, BamHI 双酶切,电泳后初步确认了构建的正确。

参考文献

- 1 Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbiol Rev, 1986, 50(2) :353 ~ 380
- 2 Hajishengallis G, Michalek SM. Current status of a mucosal vaccine against dental caries. Oral Microbiol Immunol, 1999, 14(1) :1 ~ 20
- 3 Mestecky J. The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune response in external secretions. J. Clin. Immunol, 1987, 7(1) :265 ~ 276
- 4 吴乃虎. 基因工程原理. 北京:高等教育出版社, 1989: 135 ~ 140
- 5 卢圣栋. 现代分子生物学技术. 北京:高等教育出版社, 1993: 283 ~ 286

(2000-02-22 收稿, 2001-04-23 修回)

(本文编辑 王 晴)

2001 年中华口腔医学会国家级继续医学教育部分项目

项目名称	主办单位	项目 负责人	负责人 联系电话	举办期限 起止日期	地点	学分	人数
颞下颌关节病基础与临床进展	中华口腔医学会颞下颌关节病学组	马绪臣	62179977 - 2323	2001/06/23 ~ 27, 5天	厦门	10	40 ~ 60
牙周病学的新理论和新技术培训班	中华口腔医学会牙周病学专业委员会	曹采方	62179977 - 2212、 2522	2001/07/09 ~ 13, 5天	青岛	10	40 ~ 60
颌骨严重发育不足牵引成骨治疗	上海第二医科大学附属第九人民医院	唐友盛	63138341 - 5144	2001/07/15 ~ 18, 4天	上海	8	30
口腔修复技术的新进展	中华口腔医学会修复工艺学专业委员会	吴景轮	029 - 3376278	2001/09/11 ~ 15, 5天	太原	10	80
口内颌骨牵引技术学习班	中华口腔医学会	王 兴	62179977	2001/09/14 ~ 19, 6天	北京	12	40
固定矫正器治疗中出现釉脱矿、牙周、支抗丢失等问题的解决方法	中华口腔医学会正畸专业委员会	傅民魁	62179977 - 2383	2001/10/09 ~ 11, 3天	上海	6	200
儿童牙髓尖周病新理论新技术学习班	中华口腔医学会儿童口腔医学专委会	杨富生	029 - 3376087	2001/10/09 ~ 14, 5天	西安	10	20
老年口腔医学讲座	中华口腔医学会老年口腔医学专业委员会	栾文民	65132266 - 3402	2001/10/09 ~ 14, 5天	西安	10	150
儿童牙科治疗新技术学习班	同济大学口腔医学院	石四箴	021 - 64179279	2001/11/01 ~ 05, 5天	上海	10	70
颞下颌关节外科进展	中华口腔颌面外科专业委员会	邱蔚六	63138341 - 5395	2001/11/20 ~ 24, 5天	上海	10	30