

变形链球菌表面蛋白真核表达质粒 pcDNA3/pacA 和 pcDNA3/pacP 在哺乳动物细胞中的表达

郭丽宏 刘天佳 杨锦波

摘要 目的:研究变形链球菌表面蛋白真核表达质粒 pcDNA3/pacA 及 pcDNA3/pacP 在哺乳动物细胞中的转录及表达情况。方法:利用脂质体介导的转染技术,将真核表达质粒 pcDNA3/pacA 及 pcDNA3/pacP 分别转染 COS-7 细胞, $1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ G418 加压筛选获取稳定转染的 COS-7 细胞之后,采用 RT-PCR 法、LSAB 法、流式细胞术及 Western 印迹法,对真核表达质粒中插入基因 pac-A 和 pac-P 的转录及表达产物进行检测。结果:真核表达质粒 pcDNA3/pacA 及 pcDNA3/pacP 的插入基因在导入哺乳动物细胞后具有转录和翻译活性,表达的蛋白质产物可位于胞内、胞膜及胞外。结论:构建的真核表达质粒 pcDNA3/pacA 和 pcDNA3/pacP 能在哺乳动物细胞中表达插入基因所编码的蛋白质,为进一步的动物实验提供了实验依据。

关键词 变形链球菌 表面蛋白抗原 真核表达质粒 基因表达

Expression of Eukaryotic Expression Plasmid pcDNA3/pacA and pcDNA3/pacP in Mammalian Cells

Guo Lihong, Liu Tianjia, Yang Jinbo

College of Stomatology, West China University of Medical Sciences

Abstract

Objective: Prior to the use of pcDNA3/pacA and pcDNA3/pacP in vivo, the transcription and expression products of these two eukaryotic expression plasmids in mammalian cells were detected. **Methods:** The eukaryotic expression plasmids pcDNA3/pacA and pcDNA3/pacP were transfected into COS-7 cells respectively with liposome according to the manufacturer's protocol. In order to generate stable transfectants, after a 48h incubation period in regular Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, cells were treated with neomycin ($1\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ of G418) and maintained under continuous selective pressure. G418-resistant colonies, which became visible after 2 weeks, were isolated and screened for expression of the vector-encoded protein. The control transfections were performed with the pcDNA3 vector and without recombinant as well as vector plasmid DNA. The mRNA transcriptions of the two insertional genes were detected by RT-PCR assay and their expression products were analysed by labelled-avidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay, flow cytometry and Western blotting. The cells transfected by pcDNA3 were used as the negative control. **Results:** The two eukaryotic expression plasmids could be correctly transcribed and translated under the control of the CMV immediate early promoter in mammalian cells. The protein products could be detected in cell plasma, cell membrane and the culture supernatant. **Conclusion:** The two eukaryotic expression plasmids pcDNA3/pacA and pcDNA3/pacP can express protein products which were encoded by insertional gene pacA and pacP in mammalian cells.

Key words: *Streptococcus mutans* surface protein antigen gene expression eukaryotic expression plasmid

基因疫苗必须具备在体内、外表达的功能,本

实验将已构建的真核表达质粒 pcDNA3/pacA 及 pcDNA3/pacP 分别转染哺乳动物细胞株 COS-7,研究这两个质粒在 COS-7 细胞株中的转录及表达情况,为下一步的动物实验打下基础。

本课题为国家自然科学基金资助项目(编号 39770797)

作者单位:610041 华西医科大学口腔医学院

1 材料和方法

1.1 材料

真核表达质粒 pcDNA3/pacA 和 pcDNA3/pacP (已构建并经鉴定); COS-7 细胞株 (由卫生部成都生物制品研究所提供); DMEM 高糖型培养基 (Gibco BRL 公司); Qiagen Plasmid Mega Kit (Qiagen 公司); DOSPER 脂质体转染试剂盒、高纯 RNA 分离试剂盒及 Titan™ 一步法 RT-PCR 试剂盒 (BM 公司); SP™ 试剂盒 (Zymed 公司); 抗 PAC 兔血清 (美国 Alabama 大学 Russell 教授惠赠); 其余试剂购自 Gibco BRL, Sigma, Promega, Fluka, Pall-Gelman 公司。

1.2 重组质粒 DNA 及真核表达载体 pcDNA3 的大量制备

将携带有重组质粒 pcDNA3/pacA 及 pcDNA3/pacP 的两种转化子和含真核表达载体 pcDNA3 的大肠杆菌 JM103 分别增菌、培养至 500ml 后,用 Qiagen Plasmid Mega Kit 进行重组质粒 DNA 及真核表达载体大量制备。DNA 沉淀用 TE 溶解,用于转染 COS-7 细胞。测定 A_{260nm} 和 A_{280nm} 值,计算 A_{260nm}/A_{280nm} 比值。

1.3 脂质体介导的稳定转染 COS-7 细胞¹

转染前 24 h 对 COS-7 细胞进行传代,使 30 cm² 一次性培养瓶中细胞数达 1 × 10⁶。转染的当天细胞处于 50% 汇片。质粒 DNA 与脂质体 1:3 混匀,37℃ 振荡 45min,形成 DNA-脂质体混合物。将培养细胞用无血清、无双抗的 DMEM 液洗 2 遍,加入制备好的 DNA-脂质体混合物,37℃,5% CO₂ 培养 6 h 后,换用含 10% 胎牛血清、无双抗的 DMEM 继续培养 48h。胰酶消化吹散瞬时转染 48 h 的 COS-7 细胞,按 1:2 进行传代,随后用无双抗含 1 mg · ml⁻¹ G418 和 10% 胎牛血清的 DMEM 对转染的 COS-7 细胞进行加压筛选,以获得稳定转染的 COS-7 细胞,以 G418 加压的未经质粒转染的 COS-7 细胞为对照。COS-7 细胞每 4 d 换液 1 次,至第 14 天细胞 80% 汇片后,收集细胞培养液,储于 -70℃。胰酶消化吹散细胞,细胞悬液一部份在高压 (无双抗含 1 mg · ml⁻¹ G418 和 10% 胎牛血清的 DMEM) 下继续培养,另一部分冻存于液氮中。

1.4 重组质粒中外源基因转录产物的检测

用高纯 RNA 分离试剂盒提取细胞中总 RNA,其间用 DNase I (400U · ml⁻¹) 处理 15 min,以去除质粒转染 COS-7 细胞后胞内模板 DNA 的污染。引物采用的是目的基因 PCR 扩增时的两对引物。使用 Titan™ 一步法 RT-PCR 试剂盒对重组质粒中外源基因的转录产物进行检测,设立未经逆转录的对照组。

1.5 重组质粒中外源基因表达产物的检测^{2,3}

采用标记亲合素生物素酶联免疫检测法 (LSAB)、流式细胞术和 Western 印迹法对目的基因表达产物进行检测,以空载体 pcDNA3 稳定转染组为阴性对照,并设立空白对照。

1.6 统计分析方法

采用 SPSS 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 外源基因转录产物的检测

由重组质粒 pcDNA3/pacA、pcDNA3/pacP 稳定转染的 COS-7 细胞中提取的总 RNA,经 RT-PCR 扩增后在凝胶上可见分子大小约 1.3kb、1.2kb 左右的条带,分别与外源基因 pac-A 及 pac-P 的分子量一致,而未经逆转录的对照组未扩增出条带 (图 1)。

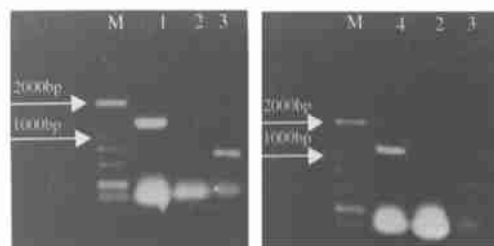


图 1 重组质粒 pcDNA3/pacA (图 A) 和 pcDNA3/pacP (图 B) 稳定转染 COS-7 细胞经 RT-PCR 检测外源基因的转录产物

M DNA 分子量 Marker DL2000; 1 pcDNA3/pacA 组; 2 未经逆转录的对照组; 3 试剂盒质量控制组; 4 pcDNA3/pacP 组

2.2 外源基因表达产物的检测

经 LSAB 法检测,pcDNA3/pacA 及 pcDNA3/pacP 稳定转染的 COS-7 细胞胞浆呈棕色 (图 2, 3), 在 pcDNA3 空载体稳定转染的 COS-7 细胞胞浆内未见明显棕色着色 (图 4)。流式细胞仪对稳定转染的 COS-7 细胞胞膜上表达产物检测的荧光强度测定结果见表 1。

表 1 表达产物荧光强度测定结果 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

组别	荧光强度
pcDNA3/pacA 组	4.5240 ± 0.8791
pcDNA3/pacP 组	2.2920 ± 0.4477
pcDNA3 组	0.8740 ± 0.3905

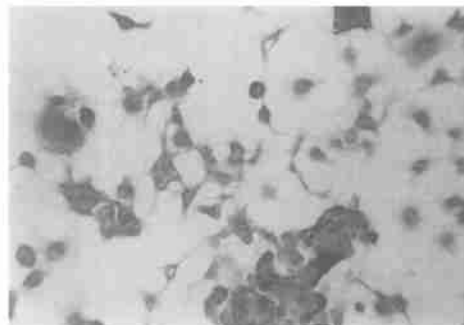


图 2 重组质粒 pcDNA3/pacA 稳定转染的 COS-7 细胞经 LSAB 法检测细胞内的表达产物 ×40

经方差分析,pcDNA3/pacA 组及 pcDNA3/pacP

组的荧光强度显著高于空载体组 ($P < 0.05$), pcDNA3/pacA组的荧光强度显著高于 pcDNA3/pacP组 ($P < 0.05$)。显示 pcDNA3/pacA 及 pcDNA3/pacP 稳定转染的 COS-7 细胞胞膜上具有目的基因的表达产物,并且 pcDNA3/pacA 组表达的胞膜表面蛋白质产物量多于 pcDNA3/pacP 组。经 SDS-PAGE 电泳,重组质粒和空载体组细胞培养液中的转染产物不能区别,经 Western 印迹后,重组质粒转染细胞表达产物可见分子量为 42700 ~ 66200D 的条带,而空载体转染产物中未见相应条带(图 5)。

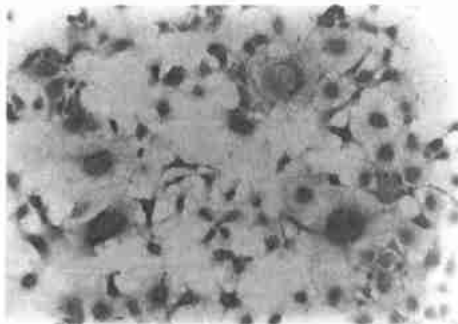


图3 重组质粒 pcDNA3/pacP 稳定转染的 COS-7 细胞经 LSAB 法检测细胞内的表达产物 ×40



图4 空载体 pcDNA3 稳定转染的 COS-7 细胞经 LSAB 法检测细胞内的表达产物 ×40



图5 重组质粒稳定转染的 COS-7 细胞培养液的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(A)和 Western 印迹分析(B)

M 中分子量蛋白质 Marker; 1 空载体 pcDNA3 稳定转染的 COS-7 细胞培养液; 2 重组质粒 pcDNA3/pacA 稳定转染的 COS-7 细胞培养液; 3 重组质粒 pcDNA3/pacP 稳定转染的 COS-7 细胞培养液

3 讨 论

3.1 COS-7 表达系统

本实验选取 COS-7 表达系统进行变形链球菌表面蛋白 PAc 分子中 T、B 细胞表位编码基因 pac-A 及 pac-P 在哺乳动物细胞中表达的研究,分别从转录和翻译水平检测这两段外源基因在 COS-7 细胞中的表达情况。COS-7 细胞株最常用于瞬时表达,但其产物量较低⁴,加上当每个 COS 细胞内积聚大于 10⁵ 个带 SV40 复制起点的重组质粒时,转染细胞将因无法耐受染色体外复制如此大量的 DNA,因而大多数细胞将在转染后第 3~4 d 内死亡。为了更有利于分析基因的功能及研究蛋白质表达产物的免疫活性,本实验通过 G418 加压筛选获取稳定转染的 COS-7 细胞。

3.2 外源基因在 COS-7 细胞中的表达

基因疫苗的免疫机理决定了重组质粒中插入的外源基因必须具备在哺乳动物细胞内表达的功能。外源基因在 COS-7 细胞中高效表达的可能机制^{5,6}: COS-7 细胞具有 SV40 大 T 抗原,其反式作用可将每一 COS 细胞中含 SV40 复制起点的质粒拷贝数扩增至 10⁵,从而导致转染 DNA 的高水平表达; pcDNA3 中具有 SV40 复制起点,是一种与 COS 表达系统匹配的真核穿梭表达载体; pcDNA3 中 CMV 启动子可起始高水平的转录,使外源基因具有较高水平的转录及翻译活性; pcDNA3 中 BGH Poly A 加尾信号具有稳定 mRNA 和调节翻译起始的功能; 当外源基因稳定整合于宿主细胞染色体基因组中,与能有效转录的真核 DNA 序列发生连锁,导致其有效表达。通过本实验证实了构建的两个真核表达质粒的目的基因的确可在哺乳动物细胞内进行转录和翻译,表达的蛋白质产物在胞浆中合成后可分泌至胞外间质中,或通过其跨膜区锚定在细胞膜表面,这与 PAc 蛋白在变形链球菌中的定位分布一致;此外表达的蛋白质产物可与抗 PAc 抗体特异性结合,具有与 PAc 蛋白一致的免疫反应性,表达产物的分子量为 42700 ~ 66200D,与根据目的基因编码的氨基酸组成推算的分子量范围一致。流式细胞术检测发现 pcDNA3/pacA 组的荧光强度显著高于 pcDNA3/pacP 组 ($P < 0.05$),显示 pcDNA3/pacA 组表达的胞膜表面蛋白质产物量多于 pcDNA3/pacP 组,这可能与两个外源基因编

码不同结构的蛋白质有关。pac-A 基因片段中含有 PAC A 区的编码基因, A 区蛋白质的二级结构为 α -helix, 呈疏水性, 因此推测 pac-A 表达的产物可能具有更多的跨膜结构。鉴于哺乳动物细胞与原核细胞具有不同的信号肽识别体系, 因此在构建基因疫苗时, 本实验未引入编码 PAC 信号肽的基因序列, 结果表明虽然目的基因上游无编码信号肽的序列, 其表达产物仍具有分泌作用, 证实了哺乳动物细胞对表达产物具有翻译后加工、修饰的功能。

参考文献

- 1 Ausubel F, Brent R, Kingston RE, et al. Short Protocols in Molecular Biology. 3rd ed. John Wiley & Sons, Inc, 1995
- 2 苏红, 谷代平, 胡海霞, 等. LSAB 法与 ABC 法免疫组化

染色敏感性的对比研究. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(2): 296 ~ 299

- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 888 ~ 897
- 4 陈谦, 汪家政, 范明. 人脑源性神经营养因子 cDNA 在 COS7 细胞中的表达及活性研究. 生物化学与生物物理学报, 1997, 29(4): 419 ~ 423
- 5 Harvey TJ, Macnaughton TB, Gwans EJ. The development and characterisation of a SV40 T-antigen positive cell line of human hepatic origin. J Virol Methods, 1997, 65(1): 67 ~ 74
- 6 Zhang C, Sriratana A, Minamikawa T, et al. Photosensitisation properties of mitochondrially localised green-fluorescent protein. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 242(3): 390 ~ 395

(2000-07-14 收稿, 2000-11-01 修回)

(本文编辑 刘怡)

牙脱位 132 小时再植一例报告

宋玉荣 徐金国

外伤致牙脱位较常见。脱位牙离体时间的长短, 对脱位牙再植术能否成功非常重要。笔者于 1992 年曾收治 1 例牙脱位 132 h (5.5 d), 予再植后获得成功, 报告如下。

患者朱某某, 女, 29 岁。于 1992 年 7 月 2 日 21 时, 不慎致左上前牙外伤脱落, 当时未做任何处理。7 月 8 日来我科就诊。检查: $\overline{1}$ 缺失, 牙槽窝无渗血, 有陈旧性血块, 牙周及牙龈收缩良好, 无红肿, 未查见牙槽突骨折。 $\overline{1}$ 离体牙牙体完整, 干燥并已变色, 牙周膜已完全干结坏死, 牙体表面不清洁。诊断: $\overline{1}$ 外伤脱位。

治疗: 大量生理盐水冲洗清洁牙体, 去除坏死牙周膜, 用含庆大霉素的生理盐水浸泡 5 min。纱布包裹, 于舌侧窝处开髓, 根管常规去髓充填。常规消毒受植区, 局麻, 刮除牙槽窝内血块, 生理盐水及庆大霉素液冲洗, 吸干, 搔刮牙槽窝致新鲜出血。将 $\overline{1}$ 置牙槽窝完全复位, 用手指按压收紧牙槽窝。将 $\overline{1}$ 与邻牙酸蚀后光固化树脂粘结固位。调骀, 降低咬合。术后予口服沙霉素、甲硝唑、消炎痛、维生素 C 5 d, 洗必泰漱口。嘱前牙禁咬食物 1 月。

1 月后复查, $\overline{1}$ 无痛, 叩诊略不适, 不松动, 牙龈无红肿

及脓瘘。X 线片见根周约 0.5 mm 的牙周膜腔影, 根尖区阴影约 1 mm \times 1.5 mm (图 1)。术后 3 年摄片见牙周膜腔影已消失, 根尖区阴影约 1.5 mm \times 2 mm。术后 7 年患牙从无红肿疼痛, 咀嚼功能良好, 外观良好。检查: $\overline{1}$ 不松动, 垂直叩诊(-), 侧向叩诊(-)。叩击声较邻牙清脆实沉。牙龈外形正常, 无红肿及退缩, 龈沟约 2 ~ 3 mm, 牙冠与邻牙粘结牢固。摄片见根周区无牙周膜腔影, 骨小梁清晰, 根尖区阴影约 2 mm \times 2.5 mm。



图 1 $\overline{1}$ 再植术后

左: 术后 1 月, 中: 术后 3 月, 右: 术后 7 年

(2000-03-10 收稿)

(本文编辑 邹玲莹)