

# 变形链球菌葡聚糖结合蛋白 A 真核表达质粒 pcDNA3.1/GBD 在哺乳动物细胞中的表达

苏凌云<sup>1</sup>, 吴补领<sup>1</sup>, 李福洋<sup>2</sup>, 陆群<sup>1</sup>

(1. 第四军医大学口腔医院 牙体病科; 2. 第四军医大学基础部生化与分子生物学教研室, 陕西 西安 710032)

**[摘要]** 目的 观察变形链球菌葡聚糖结合蛋白 A (GbpA) 的葡聚糖结合区 (GBD) 真核表达质粒 pcDNA3.1/GBD 在哺乳动物细胞 COS-7 的表达情况。方法 通过基因重组技术构建真核表达质粒 pcDNA3.1/GBD, 通过脂质体转染法将其转染至 COS-7 细胞, 通过免疫组化 SABC 法检测其在 COS-7 细胞的表达。结果 pcDNA3.1/GBD 质粒转染的细胞质呈棕黄色染色, 胞核无着色, pcDNA3.1 空载体转染的细胞质及胞核无着色, 空白对照组也无着色。结论 质粒 pcDNA3.1/GBD 转染 COS-7 后能够在细胞内翻译、表达, 表达的蛋白质位于细胞质中, 可与抗 GbpA 抗体特异性结合, 具有抗原性, 可作为基因疫苗。

**[关键词]** 变形链球菌; 葡聚糖结合蛋白; 哺乳动物细胞; 基因表达

**[中图分类号]** R780.2 **[文献标识码]** A

**Expression of GBD Gene of Streptococcus Mutans Glucan Binding Protein A in Mammalian Cells** SU Ling-yun<sup>1</sup>, WU Bu-ling<sup>1</sup>, LI Fu-yang<sup>2</sup>, LU Qun<sup>1</sup>. (1. Dept. of Oral Medicine, College of Stomatology, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Dept. of Biochemistry, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the expression of recombinant plasmid pcDNA3.1/GBD of glucan binding protein of *Streptococcus mutans* in mammalian cells COS-7. **Methods** Eukaryotic plasmid carrying encoding gene of GBD of *Streptococcus mutans* gbpA was constructed and the plasmid was introduced into COS-7 cells by Lipofectamine reagent. The transient expressed protein in COS-7 cells was detected by immunochemistry technique. **Results** The positive expression was detected in plasma of the cells which were transfected with recombinant plasmid pcDNA3.1/GBD. The cells which were transfected with pcDNA3.1 were negative. **Conclusion** GBD can translate and express in COS-7 cells after transfected with recombinant plasmid pcDNA3.1/GBD. The expressed protein locates in the plasma and the protein is able to combine with anti-GbpA antibody. The expressed protein has the antigenicity and is a candidate gene vaccine.

**[Key words]** *Streptococcus mutans*; glucan-binding protein; mammalian cells; gene expression

龋病是在以口腔微生物为主的多因素共同作用下, 牙体硬组织出现的慢性进行性破坏, 而变形链球菌是主要的致龋微生物。葡聚糖结合蛋白 (glucan binding protein, Gbps) 是链球菌分泌的细胞外蛋白<sup>1</sup>, 参与介导细菌在牙面的粘附, 是重要的致龋因子。基因疫苗是 20 世纪 90 年代发展起来的新型疫苗, 利用现有成熟基因重组技术在宿主体内表达目的蛋白, 诱导持久的特异性细胞和体液免疫应答, 用变链菌的葡糖基转移酶 (gtfB) 构建基因疫苗, 可在哺乳动物细胞正确的表达和转录<sup>2</sup>, 用其免疫大鼠, 可诱导出血清中特异性 IgG 及唾液中特异性 IgA<sup>3</sup>。本研究拟构建变形链球菌葡聚糖结合蛋白的葡聚糖结合区 (glucan binding domain, GBD) 真核表达质粒 pcDNA3.1/GBD,

并在哺乳动物细胞表达, 为下一步基因疫苗的研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 载体与细胞株

PUC19/GBD 质粒 (第四军医大学分子生物学实验室构建)<sup>4</sup>, pcDNA3.1 载体 (第四军医大学分子生物学实验室保存), COS-7 细胞株 (田宇惠赠)。

### 1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶及 *EcoR*、*BamH* 内切酶 (大连宝生物工程有限公司), 100 bp DNA Ladder (上海生工生物技术有限公司), 柱式质粒提取试剂盒及柱式胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司), Lipofectamine PLUS<sup>TM</sup> 脂质体转染试剂 (GibcoBRL Life Technologies, GIBCO 公司), 抗 GbpA 抗体 (Banas 惠赠), HRP 标记羊抗兔二抗 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.), 二氨基苯胺 (DAB) (Dako 公司, 美国)。

[收稿日期 2003-03-10; 修回日期 2003-11-01]

[基金项目] 高等学校骨干教师资助计划资助项目 (2000 年)

[作者简介] 苏凌云 (1965-), 女, 陕西人, 副主任医师, 博士

[通讯作者] 吴补领, Tel: 029-3376073

### 1.3 实验方法

1.3.1 真核表达质粒 pcDNA3.1/GBD 的构建及鉴定<sup>5</sup> 取纯化的真核表达载体 pcDNA3.1 及 PUC19/GBD 质粒各 10  $\mu$ l, *Bam*H / *Eco*R 双酶切,将酶切产物分别进行琼脂糖凝胶电泳,采用华舜胶回收试剂盒分别回收 pcDNA3.1 及 GBD 酶切片段各 15  $\mu$ l,将 GBD 片段与 pcDNA3.1 载体连接,连接反应体系为: T4 DNA ligase 0.5  $\mu$ l, T4 DNA ligase buffer 2  $\mu$ l, pcDNA3.1 载体 4  $\mu$ l, PCR 酶切产物 13.5  $\mu$ l, 12 ~ 16  $^{\circ}$ C, 16 h. 将连接产物转化至 *E. coli* JM109 感受态细胞, 37  $^{\circ}$ C, 过夜, 进行 PCR 及酶切鉴定。

PCR 反应鉴定重组质粒: 从转化连接产物的培养基上随机挑取 4 个菌落, 分别接种于 LB 培养液(含氨苄西林 100 mg/L), 37  $^{\circ}$ C, 过夜。分别取菌液 500  $\mu$ l, 12 000 r/min, 离心 5 min, 弃上清, 加 STET 裂解液 0.1 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.0), 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), 5% Triton X-100, 混悬, 沸水中煮 3 min, 12 000 r/min, 离心 5 min, 取上清作为模板进行 PCR。

酶切鉴定重组质粒: 经 PCR 鉴定为阳性的菌液提取质粒, 然后 *Bam*H / *Eco*R 双酶切、琼脂糖凝胶电泳。

1.3.2 pcDNA3.1/GBD 质粒的大量提取及浓度与纯度测定 用华舜柱式质粒提取试剂盒进行 pcDNA3.1/GBD 质粒及 pcDNA3.1 载体的大量制备。用核酸/蛋白检测仪测定质粒 DNA 的  $A_{260}$ 、 $A_{280}$  值, 计算出其浓度及纯度。

1.3.3 COS-7 细胞的培养 COS-7 细胞复苏后用含 10% 胎牛血清的 DMEM 常规贴壁培养法培养。

1.3.4 脂质体介导的瞬时转染 COS-7 细胞 转染前 24 h 对 COS-7 细胞进行传代, 用胰酶消化 COS-7 细胞, 加 10% 的胎牛血清培养基, 传代于 24 孔板, 24 孔板底预先放入已处理的盖玻片, 转染当天细胞 80% 爬片。转染前 20 ~ 30 min 将 24 孔板的培养基换成无血清的 DMEM 培养基, 每孔 400  $\mu$ l。A 液: 1  $\mu$ g 质粒加无血清 DMEM 至 50  $\mu$ l/孔, B 液: 2  $\mu$ l 脂质体加 48  $\mu$ l DMEM 至 50  $\mu$ l/孔。5 min 后将 A、B 液混匀, 室温放置 20 min。每孔加 AB 混合液 100  $\mu$ l, 每孔终体积为 500  $\mu$ l, 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 培养 4 ~ 6 h 后将培养基换成 10% 的胎牛血清培养基继续培养 48 h。1  $\times$  PBS 洗 3 次, 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 1  $\times$  PBS 洗, 将爬片粘附到载玻片, -20  $^{\circ}$ C 保存。

1.3.5 插入基因 pcDNA3.1/GBD 表达产物的鉴定 用免疫组化 SABC 法检测 COS-7 细胞中 pcDNA3.1/GBD 的表达, 步骤如下: 0.01 mol/L PBS 漂洗, 5 min  $\times$  3 次; 0.75% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇, 37  $^{\circ}$ C, 30 min;

0.01 mol/L PBS 漂洗, 5 min  $\times$  3 次; 0.3% Triton X-100, 37  $^{\circ}$ C, 30 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗, 5 min  $\times$  3 次; 10% 的正常山羊血清封闭, 37  $^{\circ}$ C, 30 min; 倾去血清, 加兔抗 GbpA 抗体 (1:200), 4  $^{\circ}$ C, 过夜; 37  $^{\circ}$ C, 复温 1 h, 0.01 mol/L PBS 漂洗, 5 min  $\times$  3 次; 加 1:100 的生物素标记的二抗, 37  $^{\circ}$ C, 30 min, 0.01 mol/L PBS 漂洗, 5 min  $\times$  3 次; 加 1:100 的辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素, 37  $^{\circ}$ C, 30 min; 0.01 mol/L PBS 漂洗, 5 min  $\times$  3 次, DAB 显色 (A 液、B 液、C 液各滴加一滴, 加水 1 ml); 11 镜下观察, 细胞出现棕黄色染色时, 双蒸水终止反应; 12 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。

本实验设立两个对照组, pcDNA3.1 空质粒转染 COS-7 细胞作为阴性对照, pcDNA3.1/GBD 质粒转染 COS-7 细胞, PBS 代替一抗, 作为空白对照。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pcDNA3.1/GBD 的 PCR 及酶切鉴定

通过 PCR 及 *Bam*H / *Eco*R 双酶切鉴定, PCR 产物电泳可见 1 200 bp 处有一阳性条带 (图 1), 酶切后可见两条带 (5.6 kb, 1.2 kb), 见图 2。



图 1 pcDNA3.1-GBD 的 PCR 鉴定电泳  
1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 为 PCR 产物, 8 为 DNA Marker

Fig 1 Electrophoresis analysis of PCR product of pcDNA3.1/GBD

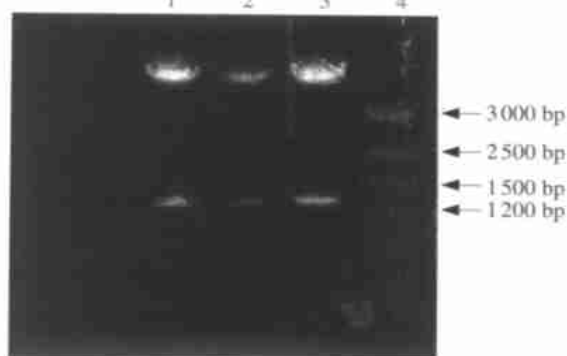


图 2 pcDNA3.1/GBD 酶切电泳

1, 2, 3 为酶切产物, 4 为 DNA Marker

Fig 2 Electrophoresis analysis of enzymatic result

## 2.2 pcDNA3.1/GBD 质粒在哺乳动物细胞中的免疫组化表达

经 SABC 法对瞬时转染的 COS-7 细胞检测,发现 pcDNA3.1/GBD 质粒转染的细胞质呈棕黄色染色,胞核无着色,pcDNA3.1 空载体转染的细胞质及胞核无着色,空白对照组也无着色。这说明重组质粒 pcDNA3.1/GBD 转染 COS-7 后能够在细胞内翻译、表达,表达的蛋白质位于细胞质中,可与抗 GbpA 抗体特异性结合,具有抗原性,可作为基因疫苗(图 3)。

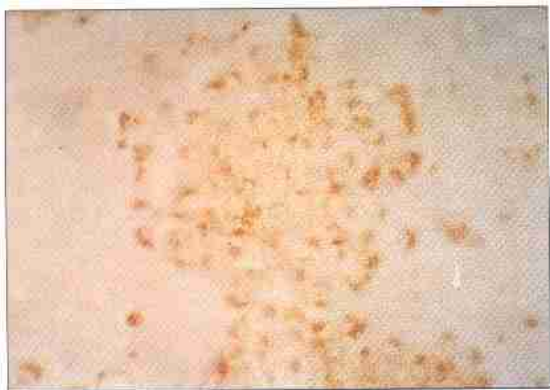


图 3 pcDNA3.1/GBD 瞬时转染 COS-7 细胞免疫组化结果  
Fig 3 Immunohistochemical result of COS-7 after transiently transfected by pcDNA3.1/GBD

## 3 讨论

所构建的真核质粒能否作为基因疫苗,首先是插入的外源基因在哺乳动物细胞内能否表达。本实验构建的 pcDNA3.1(+)/GBD 通过脂质体法转染至 COS-7 细胞内,免疫组化结果显示,在 COS-7 细胞质中呈强阳性染色,胞核无染色,说明构建的重组质粒可在哺乳动物细胞中表达,并且具有抗原性,初步确定其可作为后选基因疫苗。

随着分子生物学技术的发展,基因转染的方法不断增多,可归类为生物方式介导和理化方式介导两大类。其中生物方式介导的方法主要指病毒介导的方法。病毒介导的方法是将载有目的基因片段的病毒载体经包装细胞(package cell)后,形成具有一次感染能力而无复制能力的病毒,从而感染靶细胞并把目的基因转入细胞。此举虽然可获得极高的转染效率,但尚不能排除产生野生型病毒的可能,而且由于涉及包装细胞的培养和病毒效价的测定,在简便程度上还不理想<sup>6-8</sup>。物理的基因转染方法,例如微粒注射技术、电穿孔、高压脉冲、基因枪等,均需特殊设备,费用昂贵。基因转染的化学方法不存在野生型病毒污染问题,而且简便易行,常见的有磷酸钙沉淀法、DEAE-葡聚糖转染法、聚季铵盐(polybrene)、原生质体融合、脂质体介导的转染。化学介导转染的共性是在一

定条件下,一定比例的化学试剂和 DNA 形成复合物,粘附在靶细胞上并促进细胞对该复合物的内吞,从而达到基因转染的目的。脂质体介导的转染是化学法中转染效率高、应用广泛的方法,重复性好,操作简单。笔者的体会是采用脂质体 lipofectamine 及柱式质粒提取试剂盒,所提取质粒纯度高,转染效率高,重复性好。

COS-7 瞬时表达系统是所有真核表达系统中最常用的。COS 细胞株是复制起点缺陷的猴病毒 40(SV 40)基因组转化猴肾成纤维细胞所得到的细胞系,对带有复制起点的表达载体十分便利。COS 细胞以组成型表达的形式持续合成野生型 SV 40 T 抗原,并且含有启动带 SV 40 复制起点的质粒进行复制所必需的所有细胞内因子<sup>8</sup>。在转染实验过程中,每个 COS 细胞将聚集大于  $10^5$  个带 SV 40 复制起点的重组表达质粒,获得高效表达的外源 DNA<sup>9</sup>。但由于转染质粒的复制无限进行,细胞可能无法耐受在染色体外复制如此大量的 DNA 而最终死亡,所以这一系统只能作为瞬时表达。质粒 pcDNA3.1(+)具有 SV40 复制起点,是一种与 COS-7 细胞匹配的真核表达质粒。另外,pcDNA3.1(+)的 CMV 可启动高水平的转录<sup>9</sup>,使外源基因具有较高水平的转录。

## [参考文献]

- 1] Smith DJ, Akita H, King W, et al. Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* J. Infect Immun, 1994, 62(6): 2545-2552.
- 2] 杨锦波,刘天佳,谭红. 重组质粒 pcDNA3-gtfB 在哺乳动物细胞中的表达 J. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(5): 370-373.
- 3] 杨锦波,刘天佳,谭红. 变形链球菌防龋基因疫苗 pcDNA3-gtfB 免疫途径筛选的实验研究 J. 华西口腔医学杂志, 2002, 20(5): 374-376.
- 4] 苏凌云,吴补领,李福洋,等. 变形链球菌葡聚糖结合蛋白 A 的 GBD 的分子克隆及在大肠杆菌的表达 J. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2002, 12(4): 197-200.
- 5] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术 M. 北京:高等教育出版社, 1993: 342-399.
- 6] Fegner PL. Lipofection: A highly efficient, lipid-mediate DNA-transfection procedure J. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(21): 7413-7417.
- 7] Lee SS. Intravesical gene therapy: *In vivo* gene transfer using recombinant vaccinia virus vector J. Cancer Res, 1994, 54(13): 3325-3330.
- 8] Mellon P, Parker V, Guzman Y, et al. Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system J. Cell, 1981, 27(2): 279-288.
- 9] Sabbioni S, Negrini M, Rimessi P, et al. ABK virus episomal vector for constitutive high expression of exogenous cDNA in human cell J. Arch Viro, 1995, 140(2): 335-339.