

[文章编号] 1000-2200(2008)02-0132-03

· 基础医学 ·

变形链球菌表面蛋白编码基因载体质粒 pMD-pac 构建

吴志刚¹, 刘建国², 洪献忠³

[摘要] 目的: 获取变形链球菌国内临床株表面蛋白 PAC 编码基因 pac 并构建载体质粒, 为构建植物表达基因载体做前期准备。方法: 以国内检出率最高的变形链球菌临床分离株(血清 c 型)的基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获取表面蛋白 PAC 编码基因 pac; 通过 T-A 克隆构建中间载体 pMD18-pac 质粒, 对其分析鉴定。结果: 目的基因成功的连接到中间载体上。结论: 获取的目的基因经测序和比对表明, 其与变形链球菌表面蛋白的相关编码基因在核苷酸序列和蛋白同源性上都很高, 可以作为抗原基因进一步研究。

[关键词] 变形链球菌; 质粒; 表面蛋白抗原; 基因疫苗

[中国图书资料分类法分类号] R 378.12; R 394.2 [文献标识码] A

Construction of recombinant plasmid carrying pac genes of *Streptococcus mutans* surface proteinWU Zhi-gang¹, LIU Jian-guo², HONG Xian-zhong³

(1. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Department of Oral Medicine, Affiliated Stomatological Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563003;

3. Department of Stomatology, Longsai Hospital of Zhenhai District, Ningbo Zhejiang 321000, China)

[Abstract] Objective: To obtain the pac gene encoding surface protein PAC of *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), which was isolated from clinical strain in China, and to construct the recombinant plasmids vector containing the pac gene, which will provide further study for edible plants vaccine against dental caries. Methods: According to the sequence of pac gene, a pair of pac gene specific primers was designed and synthesized; By using PCR the target DNA fragment was amplified from genome of serotype c of *S. mutans* which was highest frequency of clinical isolates in China. The recombinant intermediate vector pMD18-pac was constructed through T-A cloning and identified by sequencing. Results: The sequences of cloned pac gene was high homology with that of pac gene reported from references. Conclusions: The sequence of pac gene obtained in this study can be used to further study for preparation of DNA vaccine against dental caries.

[Key words] *Streptococcus mutans*; plasmids; surface protein antigen; genetic engineering vaccine

变形链球菌群 (*Mutans streptococci*, MS) 是人和动物的主要致龋菌, 从人类口腔中检出的 MS 主要是变形链球菌 (*Streptococcus mutans*, 简称变链菌, 血清型 c、e、f) 和远缘链球菌 (*Streptococcus sobrinus*, 血清型 d、g)^[1,2], 尤其是血清型 c 变链菌检出率最高, 可达 80%^[3]。表面蛋白 PAC 是变链菌表面主要的粘结构之一, 全分子表面蛋白或其多肽片段在体外都具有较好的免疫原性, 提示他们的相应编码的 pac 基因都可能作为候选抗原基因。但不同变形链球菌的粘结构不同, 与之反应的唾液成分(配体)不同, 粘结构与不同配体结合, 生物学意义可能也不同。本实验采用临床检出率最高的分离株(血清 c 型)^[4]的基因组 DNA 为模板, 根据报道的 pac 基因

序列设计合成引物体外扩增目的基因, 以进一步研究其与国外报道的基因之间的同源性, 并构建国内临床株表面蛋白编码 pac 基因的中间质粒载体。为下一步的转基因植物表达载体构建做前期准备, 进一步与其他变形链球菌菌株来源的表面蛋白编码基因^[5]进行对比研究。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器 TakaRa LA TaqDNA 聚合酶, DNA 分子量 Marker λ -Eco14 digest, Ligation Kit Ver.2 连接试剂盒, pMD18-T Vector、Control Insert (TakaRa 生物工程有限公司, 大连)。胶回收试剂盒(元泰, 成都), 基因组 DNA 抽提试剂盒(北京赛百盛), RNase A (Sigma 公司, 美国), 低熔点琼脂糖 (Sigma 公司, 美国), 余均为分析纯级化学试剂。PTC-100TM 型 PCR 仪 (MJ Research, Inc., 美国)。

1.2 菌种 变形链球菌临床分离株和标准株(四川大学华西口腔医学院分子生物学实验室刘天佳教授惠赠), JM109 菌株(中科院成都生物所马欣荣博士惠赠)。

[收稿日期] 2007-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30160086)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第一附属医院 口腔科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 遵义医学院附属口腔医院, 贵州 遵义 563000; 3. 浙江省宁波市镇海区龙赛医院 口腔科, 浙江 宁波 321000

[作者简介] 吴志刚(1974-), 男, 硕士, 住院医师。

[通讯作者] 刘建国, 博士, 主任医师, 教授。

1.3 方法

1.3.1 引物的设计与合成 根据文献^[6]报道的 pac 基因序列在 National Bioscience Inc 研制的分子生物学软件 Oligo 6.0 上设计合成并评价 PCR 引物。引物由 TaKaRa 生命技术工程公司合成并经高效液相色谱法(HPLC)脱盐纯化定量。上游引物 5'-GCC CCA TAT GAA GGT CAA AAA AAC TTA CGG TTT TCG-3'; 下游引物 5'-GGC GGT ACC ATC TTT CTT AGC CTT TAA ACC AAG C-3'。

为便于目的基因与原核表达载体 pET32a(+) 的定向重组,在上游引物的 5'端加入 NdeI 限制性内切酶酶切位点,在酶切位点的 5'端有 4 个保护性碱基。下游引物的 5'端加入 KpnI 限制性内切酶酶切位点和 3 个保护碱基,并去除终止密码,以便下一步与霍乱毒素 B 亚单位(CTB)基因嵌合,表达融合蛋白。

1.3.2 变形链球菌基因组 DNA 提取及鉴定 取变形链球菌 c 型临床株将菌种接种 TPY 平皿,37 °C 微需氧培养 48 h,检查菌落生长情况,镜检无污染。挑单菌落接种 TPY 液体培养基,37 °C 微需氧培养 48 h,镜检无污染。DNA 抽提试剂盒提取各菌株 DNA。紫外分光光度计测定 DNA 在 260 nm 和 280 nm 处的吸光度值(OD)值。0.7% 琼脂糖凝胶电泳(80 V,2.5 h),20 °C 保存。

1.3.3 目的基因片段的体外扩增 PCR 反应体系:变形链球菌基因组 DNA 1 μl,10 × LA PCR buffer II 5 μl,MgCl₂ (25 mmol) 5 μl,dNTP mixture (各 2.5 mmol) 8 μl,上游引物(10 pmol/μl) 2 μl,下游引物(10 pmol/μl) 2 μl,LA Taq 0.5 μl,ddH₂O 6.5 μl 共 50 μl。循环参数:94 °C 5 min,(94 °C 1 min,55 °C 1 min,72 °C 4 min) × 35 个循环,72 °C 延伸 10 min。

1.3.4 回收与纯化扩增产物 PCR 产物以 0.7% 低熔点琼脂糖凝胶电泳验证是否获得 4.7 kbp 大小的目的基因。按照试剂盒操作说明方法用胶回收试剂盒回收 PCR 产物,-20 °C 保存。

1.3.5 连接反应 (1)取实验一已纯化的 pac 基因 PCR 扩增产物 1 μl,pMD18-T Vector 1 μl,Ligation Kit Ver.2 连接试剂盒中的 solution I 10 μl,ddH₂O 8 μl。(2)阳性对照 pMD18-T Vector 1 μl,Control Insert 1 μl,solution I 10 μl,ddH₂O 8 μl,将上述 2 管置于 forotoc 恒温金属浴 16 °C × 12 h。

1.3.6 感受态细胞的制备及连接产物的转化 参照文献执行^[7]。

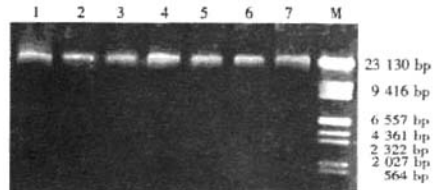
1.3.7 重组子的筛选和提取 参照质粒提取试剂盒说明书进行。

1.3.8 重组子的酶切鉴定 根据 pMD18-pac 载体和已知的 pac 序列选取 KpnI、NdeI、XhoI、SalI 做单酶切,KpnI、NdeI 双酶切。

1.3.9 测序 将已构建并酶切鉴定的质粒 pMD18-pac 送上海联合基因公司测序。

2 结果

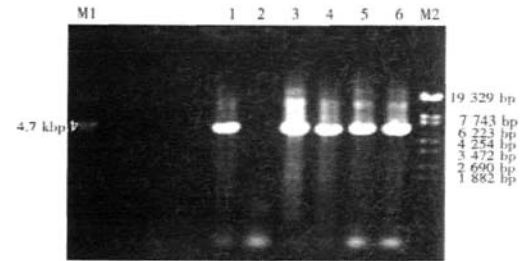
2.1 DNA 定量及鉴定 变形链球菌临床分离株和标准株全细菌基因组 DNA 抽提产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳均为单一条带,约 23 kbp,证实其完整,无降解,无 RNA 污染。OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值为 1.6 ~ 1.8 之间,说明抽提产物无蛋白质、酚污染(见图 1)。



M:λ-HindIII DNA Marker;1-7:C 型临床株

图 1 *S. mutans* 菌株 DNA 条带

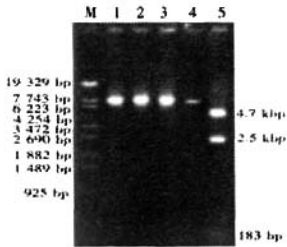
2.2 PCR 扩增产物电泳结果 以变形链球菌(血清 c 型)临床分离株基因组 DNA 为模板,扩增出约 4.7 kbp 的目的基因片段,分子量与预计的相同(见图 2)。



M1:制备的 4.7 kbp 对照;1,3-6:临床分离株;
2:空白对照;M2:λ-Eco14 Marker

图 2 *S. mutans* 临床分离株 pac 基因扩增产物

2.3 重组子的酶切鉴定 NdeI 单酶切切出大小约 150 bp、7 250 bp 左右两个片段;XhoI、SalI 单酶切切出一约 7 400 bp 大小的片段;KpnI 单酶切切出的片段在电泳图上只看到一条约 7 400 bp 的片段,但分析酶切图谱可知应该还有一大小 20 bp 的小片段考虑在此无法分辨;KpnI 和 NdeI 双酶切获得 4 700 bp、2 550 bp、150 bp 左右 3 个片段(见图 3)。通过以上酶切分析,pac 基因为反相插入到 pMD18-T Vector(随后酶切分析了其它 12 个重组子也是如此,原因尚不清楚)(见图 4),但因为是中间载体故并不影响下一步实验的进行。



M: A-Eco114 Marker; 1: Nde I; 2: Xho I; 3: Sal I; 4: Kpn I; 5: Nde I, Kpn I 双酶切

图3 pMD18-pac 酶切电泳图

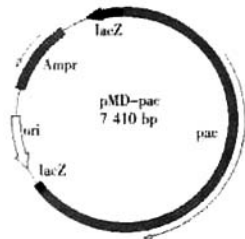


图4 pMD18-pac 质粒示意图

2.4 测序 以通用引物 M13 + 和 M13 - 双向测定, 正反向 walking8 个反应, 共计 10 个反应。将拼接组装后序列用生物软件与报道的 pac 基因序列进行对比, 表明本实验所获得的目的基因与已报道的 pac 基因核苷酸序列^[6] 同源性达 99%。

3 讨论

龋病是严重危害人类健康的口腔疾病, 人群中的发病率约 40%, 老年和青少年中的发病率高达 90% 以上。为找到一个安全有效的防龋疫苗近年国内外学者进行较深入的研究^[8-10]。但对于表面蛋白等抗原分子结构的基础研究上, 还存在一些问题: (1) 表面蛋白等抗原分子的二级结构和三级结构仍不确定。相同性质的黏附决定簇在一级结构中可能相距甚远, 但在天然分子立体结构中, 经反复折叠使这些氨基酸聚在一起, 构成一个或多个黏附功能区^[6,9,10]。基因工程技术制备的用于黏附相关研究的基因工程多肽的结构与全细胞表面蛋白天然全分子立体结构间有一定差异, 而且这些多肽的结构也不甚清楚。不同变形链球菌菌株的表面蛋白编码基因具有遗传多肽性^[1,11], 其分子结构的功能多肽片段可能有所不同, 所提供的结合位点可能也有差异。(3) 不同变形链球菌的黏结素不同, 与之反应的唾液成分(配体)不同, PAc 主要与富脯蛋白、黏蛋白和溶菌酶结合。本实验采用国内检出率最高的表面链球菌分离株(血清 c 型)的表面蛋白编码基因作

为研究对象, 设计特定引物直接从变形链球菌染色体 DNA 中成功的扩增出约 4.7 kbp 的目的基因, 并利用 T-A 克隆法将目的基因成功的连接到中间载体上, 经限制性内切酶单酶切、双酶切初步判断获得了所要的目的基因。经测序和比对表明目的基因与变形链球菌表面蛋白的相关编码基因在核苷酸和蛋白同源性上都很高, 可以作为抗原基因来构建防龋疫苗。其所包含的功能黏附多肽片段及所提供的抗原结合位点等方面可能与其他报道基因^[5] 有所差异, 在诱导的免疫应答反应上是否也有所区别, 尚需进一步研究。

【参考文献】

- [1] Li Y, Caufield PW, Emanuelsson IR, et al. Differentiation of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* via genotypic and phenotypic profiles from three different populations [J]. *Oral Microbiol Immunol*, 2001, 16(1): 16-23.
- [2] De Soet JJ, van Loveren C, Lammens AJ, et al. Different cariogenicity between Fresh isolates of *S. sobrinus* and *S. mutans* [J]. *Caries Res*, 1991, 25(2): 116-122.
- [3] Kozai K, Nakayama R, Tedjosasongko U, et al. Intrafamilial distribution of *mutans Streptococci* in Japanese families and possibility of father-to-child transmission [J]. *Microbiol Immunol*, 1999, 43(2): 99-106.
- [4] 黄晓晶, 刘天佳, 陈舟. 变形链球菌(血清型 C) 临床分离株 AP-PCR 基因分型 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2001, 36(4): 281-284.
- [5] 刘建国, 刘天佳, 周学东, 等. 变形链球菌表面蛋白真核表达载体 pcDNA3-Pac 的构建 III, 变形链球菌表面蛋白 Pac 编码基因 pac 的体外扩增 [J]. *贵州医药*, 2003, 27(8): 679-681.
- [6] Kelly CG, Todryk S, Kendal HL, et al. Adhesion and B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen L/II [J]. *Infect Immun*, 1995, 63(9): 3 649-3 658.
- [7] J. 萨姆布鲁克 D. W. 拉塞尔著. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 87-94.
- [8] 贾荣, 樊明文, 边专, 等. 融合防龋 DNA 疫苗 pGLUA-P 的构建及其细胞表达研究 [J]. *中华口腔医学杂志*, 2002, 17(6): 456-459.
- [9] Tsuha Y, Hanada N, Asano T, et al. Role of peptide antigen for induction of inhibitory antibodies to *Streptococcus mutans* in human oral cavity [J]. *Clin Exp Immunol*, 2004, 137(2): 393-401.
- [10] Smith DJ, King WF, Barnes LA, et al. Immunogenicity and protective immunity induced by synthetic peptides associated with putative immunodominant regions of *Streptococcus mutans* glucan-binding protein B [J]. *Infect Immun*, 2003, 71(3): 1 179-1 184.
- [11] 庄 娟, 刘天佳, 刘建国, 等. 变形链球菌表面蛋白 V 区, P 区及 C 末端遗传多态性与龋病发生关系的研究 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2005, 36(1): 5-8.