

cytometry (FCM) analysis and laser confocal microscopy (LCM), the change of cell cycle and cytoskeleton of CNE-2Z cells induced by the inhibitors of protein kinase C (PKC) were observed. Cells were respectively treated by staurospine (ST) and sphingosine (SS) at the concentration of 1×10^{-6} mol/L and 4×10^{-5} mol/L, and cocultured for 24 hours. Ladders of DNA electrophoresis and hypodiploid peaks were discovered in the two treated groups. Compared with the control groups, the cell cycle percentage of S in treated groups by SS was much increased, but the percentage of G1 was significantly decreased ($P < 0.05$), and the percentage of G2 in ST treated groups was much

increased, but both the percentage of S and G1 were much decreased ($P < 0.01$). The well distributed chromatin DNA was seen in untreated cells, but fragmentary DNA in treated cells. The granuliform microfilament regularly lined along and formed the intact cell morphology in untreated group cells. The microfilament clustered in disorder and formed clusters in induced cells. The results showed that the cell cycle and cytoskeleton may contribute to the CNE-2Z cells apoptosis induced by the inhibitors of protein kinase C.

Key words protein kinase C, inhibitor, nasopharyngeal carcinoma, apoptosis, cell cycle, cytoskeleton

外源基因在耻垢分枝杆菌中表达效率的研究*

程继忠 皇甫永穆 海 涛¹⁾

(同济医科大学实验医学研究中心, 武汉 430030)

摘要 将外源基因——日本血吸虫26K抗原(*Schistosoma japonicum* 26K antigen, Sj26GST) 基因克隆到大肠杆菌-分枝杆菌穿梭质粒 pBCG-2000 中, 构建四个不同的表达载体, 研究了它们在耻垢分枝杆菌中的表达效率。首先将含人结核杆菌热休克蛋白 70 (heat shock protein, hsp70) 启动子的质粒 pMT-70 用 Nco I 切, 进行两种不同的修饰, 得到不同的 SD 序列, 将 Sj26GST 基因克隆进去; 再将含 hsp70 启动子和 Sj26GST 的基因片段克隆到 pBCG-2000 中, 筛选出不同 SD 序列、不同方向和不同拷贝数的分枝杆菌表达载体四个。所表达的天然重组 Sj26GST 在 SDS-PAGE 上分子质量为 26 ku 处可见明显的表达蛋白带。通过薄层扫描分析, 发现表达质粒中, 双拷贝启动子-外源基因组合表达效率最高, 是单拷贝组合的1.6倍。而不同的克隆方向和不同的SD序列(两者相差3个碱基) 对表达效率的影响不明显。

关键词 表达效率, 分枝杆菌, 外源基因

分枝杆菌因生长缓慢等原因而影响了人们对它们的深入研究。近年发展起来的分枝杆菌分子遗传学手段和方法可将外源基因转入卡介苗 (Calmette-Guérin bacillus, BCG) 和其他分枝杆菌^[1], 为将 BCG 和其他分枝杆菌发展为多价疫苗载体打下基础。目前, 国外一些学者将数十种外源基因在分枝杆菌中表达, 制备基因工程分枝杆菌多价疫苗。我国近年来在这方

面的研究也取得了很大的进展, 皇甫永穆等^[2,3]先后构建出两代大肠杆菌-分枝杆菌穿梭载体, 并将 Sj26GST 基因在分枝杆菌中得到表达。本文研究了不同因素对外源基因在耻垢分枝杆菌中表达效率的影响。

* 血吸虫病重点研究总理基金资助项目 (94-Y-19)。

¹⁾ 同济医科大学职业医学研究所。

收稿日期: 1996-06-04, 修回日期: 1996-09-19

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) DH5 α 为本室收藏; 质粒 pBCG-2000、pUC19-GST 为本室构建^[3]; 耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis*) mc²155 由美国 Jacobs 博士赠送; 质粒 pMT-70 (含人结核杆菌热休克蛋白 70 的启动子序列) 由英国 Lowrie 提供. DNA 限制性内切酶、修饰酶及 DNA 和蛋白质分子质量标准, 均购于华美生物工程公司.

1.2 方法

1.2.1 *E. coli* 质粒 DNA 的制备、纯化、鉴

定、重组及转化: 质粒 DNA 提取参照 Birnboim 法, 用氯化锂和聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA; 其他方法参照文献 [4].

1.2.2 分枝杆菌培养、转化及 SDS-PAGE 参照文献 [3, 5].

1.2.3 SDS-PAGE 蛋白密度扫描: 蛋白质 SDS-PAGE 结果用图象分析系统和岛津薄层扫描仪在波长为 560 nm 处扫描分析.

2 结 果

2.1 四种穿梭表达质粒的构建

大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG-Sj26 I ~ IV 的构建如图 1 所示. 首先用 Nco I

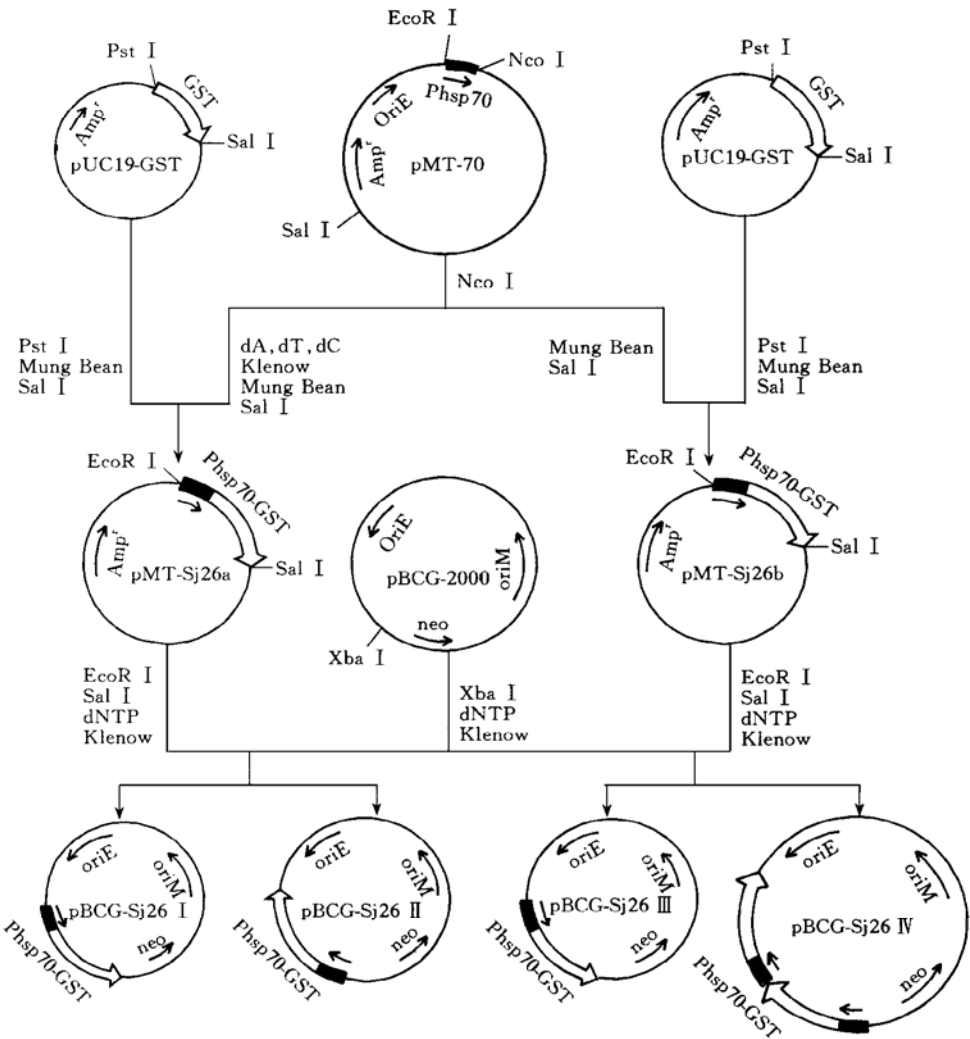


图 1 四种大肠杆菌-分枝杆菌穿梭表达质粒的构建

切含有人结核杆菌 hsp70 启动子的质粒 pMT-70, 末端分别用 Mung Bean 核酸酶和 Klenow DNA 聚合酶、dCTP、dATP、dTTP 修饰, 再用 Sal I 切后回收 2.8 kb 含人结核杆菌 hsp70 启动子的基因片段; 经 Pst I 切后的质粒 pUC19-GST, 末端用 Mung Bean 核酸酶修饰, 再用 Sal I 切, 得到编码 Sj26GST 的 DNA 片段; 然后将所分离的两个片段连接重组, 得到重组质粒 pMT-Sj26a、pMT-Sj26b. 该质粒中 Sj26GST 的编码基因完全取代分枝杆菌 hsp70 的编码基因, 两者 SD 序列不同. 然后, 用 Xba I 切 *E. coli*-分枝杆菌穿梭质粒 pBCG-2000, 得到一大片段; 用 EcoR I 和 Sal I 双酶切质粒 pMT-Sj26a、pMT-Sj26b, 回收含 hsp70 启动子及 Sj26GST 的 800 bp DNA 片段; 将两片段末端用 Klenow DNA 聚合酶和 dNTP 单核苷酸修饰, 然后进行连接, 最终筛选出四种 *E. coli*-分枝杆菌穿梭表达质粒 pBCG-Sj26 I ~ IV. 其中 pBCG-Sj26 I、II 和 pBCG-Sj26 III、IV 之间的区别在于目的基因起始密码 ATG 与 hsp70 启动子内的 SD 序列长短不一样, 质粒 I、II 较 III、IV SD 序列长三个碱基. 质粒 I 与 III、质粒 II 与 IV 之间 hsp70-Sj26 的插入方向相反, 其中质粒 IV 为反向双拷贝.

2.2 四种穿梭表达质粒的酶切图谱分析

酶切图谱见图 2. pBCG-Sj26 II 和 pBCG-Sj26 IV 的比较可见后者较前者分子质量大, EcoR I 和 Sca I (Sj26GST 基因中含有一个位点) 切后的两个片段的电泳图证实了 pBCG-Sj26 IV 是 hsp70-Sj26GST 双拷贝.

2.3 日本血吸虫 26 ku 抗原在耻垢分枝杆菌中表达效率的比较及其含量测定

四种穿梭表达质粒在分枝杆菌中表达 Sj26GST 的情况见图 3. 含质粒 pBCG-Sj26 I ~ IV 的耻垢分枝杆菌, 收菌前, 于 45℃ 水浴 30 min, 进行诱导. 经过 SDS-PAGE, 在分子质量 26 ku 处可见明显的表达蛋白带, 与天然 Sj26GST 分子质量相同. 含 pBCG-Sj26 IV 的分枝杆菌表达目的蛋白的含量明显较其他三种高. 用岛津薄层扫描仪在波长 560 nm 处对聚

丙烯酰胺凝胶上的蛋白带进行的图象分析表

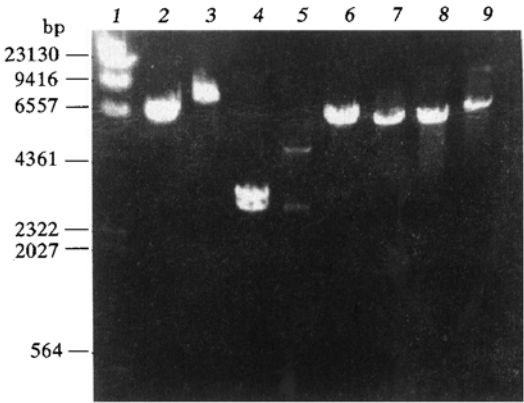


图 2 穿梭表达质粒的酶切图谱

1: 分子质量标准 (λDNA/Hind III); 2: pBCG-Sj26 II/Xba I; 3: pBCG-Sj26 IV/Xba I; 4: pBCG-Sj26II/EcoRI; 5: pBCG-Sj26 IV/EcoRI; 6: pBCG-Sj26 II/(BamHI + Kpn I); 7: pBCG-Sj26 IV/(BamHI + Kpn I); 8: pBCG-Sj26II/ScaI; 9: pBCG-Sj26 IV/ScaI.

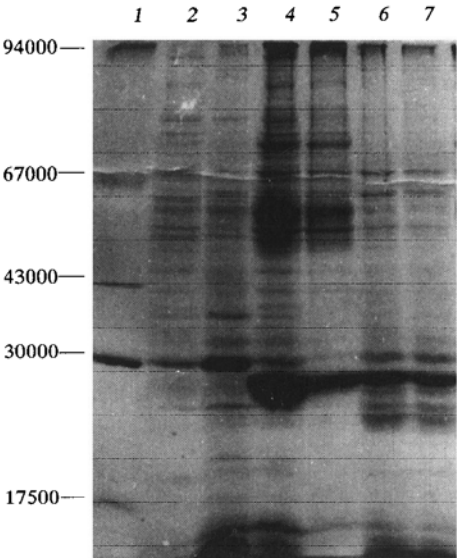


图 3 Sj26GST 在分枝杆菌中的表达

1: 分子质量标准; 2: *M. smegmatis* mc² 155 总蛋白; 3: 含 pBCG-200 的 *M. smegmatis* mc² 155 总蛋白; 4: 含 pBCG-Sj26 IV 的 *M. smegmatis* mc² 155 总蛋白; 5: 含 pBCG-Sj26 III 的 *M. smegmatis* mc² 155 总蛋白; 6: 含 pBCG-Sj26 II 的 *M. smegmatis* mc² 155 总蛋白; 7: 含 pBCG-Sj26 I 的 *M. smegmatis* mc² 155 总蛋白.

明, 含质粒 pBCG-Sj26 IV 的分枝杆菌表达 Sj26GST 的量最高, 占菌体总蛋白的 28%, 另外三种质粒的表达量占菌体总蛋白的 14% ~ 18%, 结果见图 4.

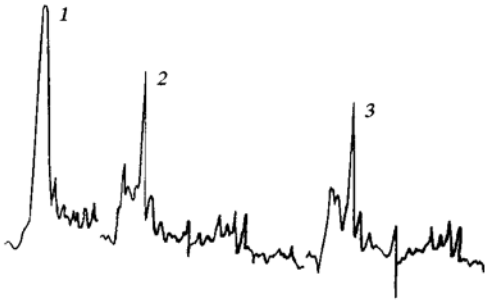


图 4 蛋白质密度扫描分析

1: 含 pBCG-Sj26 IV 的 *M. smegmatis* mc² 155; 2: 含 pBCG-Sj26 I 的 *M. smegmatis* mc² 155; 3: 含 pBCG-Sj26 II 的 *M. smegmatis* mc² 155.

3 讨 论

基因工程技术的应用促进疫苗研究的发展, 目前已得到多种 BCG 疫苗, 实验证明有较好的保护力^[6]. 由于 BCG 生长缓慢, 需 15~18 h 增殖一代, 培养时间长, 不易操作, 因而我们用 *M. smegmatis* 这种生长相对较快、电转化效率较高的突变株, 作为研究对象; 而且, 它同 BCG 一样, 也是一种非致病菌和强的细胞免疫佐剂, 故将来也可被发展成为一种疫苗载体.

外源基因在分枝杆菌中的有效表达是基因工程分枝杆菌多价疫苗发挥作用的基础. Stover 等^[7]发现破伤风毒素 C (Tox C) 在 BCG 中的表达量低, 不能激发机体产生免疫保护反应, 可见提高外源基因在分枝杆菌的表达效率是发展重组分枝杆菌疫苗的制约因素之一. 而外源基因在原核生物中的高效表达是由高效可控的启动子、适当的 SD 序列等因素共同决定的. 选择 hsp70 启动子作为调控元件是因为它属于细菌中高效启动子, 且在被巨噬细胞吞噬后能诱导 hsp70 的高水平表达. 正如在

E. coli 中的 tac 启动子可用 IPTG 来控制外源基因的表达一样, 分枝杆菌的 hsp70 启动子也可通过加热或过氧化物诱导表达^[8]. 这将增加载体在分枝杆菌中的稳定性, 减少外源蛋白表达对宿主细胞生长产生的影响以及减少宿主细胞蛋白酶对所表达蛋白的降解作用. 除了高效转录之外, 指导蛋白质高效翻译的 SD 序列也很重要. SD 序列位于起始密码 AUG 上游 3~9 个核苷酸处, 与 16 S rRNA 3' 端的序列互补, SD 序列的组成、与 AUG 间的距离及其周围的序列对蛋白质的翻译起重要作用^[9]. 为了探讨 SD 序列、外源基因的克隆方向和拷贝数对表达的影响, 我们构建了四个不同的分枝杆菌表达载体, 并对其在分枝杆菌中的表达作了比较.

将分枝杆菌 pBCG-Sj26 I ~ IV 分别电转化到耻垢分枝杆菌 mc² 155 中, 得到表达 Sj26GST 的分枝杆菌疫苗. 所表达的天然重组 Sj26GST 分子质量为 26 ku. 含质粒 IV 的耻垢分枝杆菌表达效率最高, Petros 用 N2 逆转录病毒双拷贝载体 (double copy, DC) 表达腺苷脱氨酶, 发现其转录和表达效率明显强于单拷贝载体^[10]. 本实验说明: 外源基因在耻垢分枝杆菌中的表达与其拷贝数有关, 而与克隆的方向无明显关系. 人结核杆菌 hsp70 启动子与目的基因之间的 SD 序列的 3 个碱基改变, 对表达的影响不大. 本文研究了 SD 序列、外源基因的克隆方向和拷贝数对表达的影响, 为外源基因在分枝杆菌中的表达提供了依据. 而启动子、转录终止序列和菌属间“密码偏爱”对分枝杆菌表达的影响尚待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 Matsuo K, Yaamaguchi R, Yamazaki A *et al.* Cloning and expression of mycobacterium bovin BCG gene for extracellular α antigen. *J Bacteriol*, 1988, **170**: 3847~ 3854
- 2 Huangfu Y M, Zhang D J, Cheng J Z *et al.* Construction of shuttle expression plasmid and stable expression of foreign gene in *Mycobacteria* and *E. coli*. *Journal of Tongji Medical University*, 1995, **15** (3): 138~ 142
- 3 程继忠, 皇甫永穆, 梁驹卿等. 日本血吸虫 26 ku 抗原基

因在分枝杆菌和大肠杆菌中的高效表达. 同济医科大学学报, 1996, 25 (3): 173~ 179

4 Sambrook J, Fritsch E F, Mantiatis T. Molecular cloning, a laboratory mannual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1987. 97~ 118

5 Horwitz M A, Lee B W E, Dillon B J *et al.* Protection immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 1530~ 1534

6 Stover C K, Bansak G P, Hanson M S *et al.* Protection immunity elicited by recombinant Bacille Calmatte-Guerin (BCG) expressing outer surface protein A (Osp A) lipoprotein: a candidate lyme disease vaccine. J Exp Med, 1993, 178: 197~ 209

7 Stover C K, de la Cruz V F, Fuerst T R *et al.* New use of BCG for recombinant vaccines. Nature, 1991, 351: 456~ 460

8 Aldovini A, Young R A. Humoral and cell-mediated immune responses to live recombinant BCG-HIV vaccines. Nature, 1991, 351 (6): 479~ 482

9 Shine J, Dalgarno L. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* and 16 S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. Proc Natl Acad Sci USA, 1974, 71 (4): 1342~ 1346

10 Hantzopoulos P A, Sullenger B A, Ungers G *et al.* Improved gene expression upon transfer of the adenosine deaminase minigene outside the transcriptional unit of a retroviral vector. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86: 3519~ 3523

Investigation of Expression Efficiency of Foreign Gene in *Mycobacteria smegmatis*.
CHENG Jizhong, HUANGFU Yongmu, HAI Tao¹⁾ (*Department of Medical Molecular Biology Research Center of Experimental Medicine Tongji Medical University, Wuhan 430030, China;* ¹⁾ *Institute of Occupational Medicine,*

Tongji Medical University, Wuhan 430030, China).
Abstract Four different experssion vectors were constructed by cloning foreign gene which encode *Schistosoma japonicum* 26K antigen (Sj26GST) into *Escherichia coli-Mycobacteria* shuttle plasmid pBCG-2000 and their expression efficiency were investigated in *Mycobacterium smegmatis*. The plasmid which contains promoter of human *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 70 (hsp70) was digested with Nco I and modified with two different ways to lead to two kinds of SD squences, and then ligated with Sj26GST encoding gene. The DNA fragment contained hsp70 promoter and Sj26GST gene was cloned into pBCG-2000, and finally four recombinant mycobacterial expression vectors that are different in SD sequence, orientation and copy number were selected. The expressed native recombinant Sj26GST (rSj26GST) could be observed on SDS-PAGE about at the molecular weight of 26 ku obviously. Analysis with protein density scanning indicated that the expression efficiency that containing double-copy promoter-foreign gene vector was the highest and the expressed protein was about 1.6 folds than that of others. The cloning direction and SD sequence had no significant effect on expression efficiency.
Key words expression efficiency, mycobacteria, foreign gene

敬告读者

我刊电子邮箱现已开通, 地址如下:
prog @ sun5. ibp. ac. cn
欢迎广大读者和作者通过电子邮件与我们联系或向我刊投稿.