doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.18.006

结核分枝杆菌 Rv3586 结构域基因真核表达载体的构建及鉴定*

吴骏杰^{1,2} 王 辛^{3,4} 宋世杰^{1,2} 姚庆港^{1,2} 单炳乙^{1,2} 王 莹¹ 路延之¹^a 柏银兰¹
 (1第四军医大学基础部微生物学教研室 陕西 西安 710032;2第四军医大学学员旅 陕西 西安 710032;
 3第四军医大学第一附属医院 陕西 西安 710033;4 西安市第九医院 陕西 西安 710054)

摘要目的:构建结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis, Mtb)环二腺苷酸(cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)合成酶 Rv3586 结构域基因的真核表达载体,并在 COS-7 细胞中表达。方法:以 Mtb 基因组为模板 PCR 扩增 Rv3586 三个结构域基因,分 别克隆入 pEGFP-N3 真核表达质粒,用菌落 PCR、质粒酶切和测序方法对插入序列进行鉴定。通过脂质体将重组质粒转染 COS-7 细胞,间接免疫荧光法检测目的基因在 COS-7 细胞内的表达。结果:PCR 成功扩增出 Rv3586 三个结构域基因,菌落 PCR、质粒酶 切和质粒测序鉴定结果表明成功插入目的片段,包含 Rv3586 的三个结构域基因的真核表达载体构建成功。间接免疫荧光法结果 显示,Rv3586 三个结构域蛋白在 COS-7 细胞中表达成功。结论:成功构建 Rv3586 三个结构域基因的真核表达载体,并在 COS-7 细胞中表达成功,为后续 Mtb Rv3586 结构域的功能和应用研究奠定了基础。

关键词:结核分枝杆菌;Rv3586;结构域;真核表达

中图分类号:R378.911;Q78 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2017)18-3429-05

Construction and Identification of Eukaryotic Expression Vectors for Mycobacterium tuberculosis Rv3586 Domains*

WU Jun-jie^{1,2}, WANG Xin^{3,4}, SONG Shi-jie^{1,2}, YAO Qing-gang^{1,2}, SHAN Bing-yi^{1,2}, WANG Ying¹, LU Yan-zhi^{1△}, BAI Yin-lan^{1△}
(1 Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;
2 Student Brigade, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 3 First Affiliated Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710033, China; 4 Ninth Hospital of Xi'an, Xi'an, Shaanxi, 710054, China)

ABSTRACT Objective: To construct eukaryotic expression plasmids for three domains of Rv3586, a dinucleotide cyclase of cyclic diadenosine monophosphate (c-di-AMP) of *Mycobacterium tuberculosis*, and express in COS-7 cells. **Methods:** Three genes of Rv3586 domains were amplified by PCR and cloned into eukaryotic expression vector pEGFP-N3, which were identified by colony PCR, plasmid enzyme digestion and DNA sequencing. The recombinant plasmids were transfected into COS-7 cells by liposome. The expression of target genes in COS-7 cells was detected by indirect immunofluorescence. **Results:** Three genes of Rv3586 domains were amplified by PCR and cloned into eukaryotic expression plasmids respectively, which were confirmed by colony PCR, enzyme digestion and DNA sequencing. And the results of indirect immunofluorescence implied that target genes were expressed in COS-7 cells. **Conclusion:** The eukaryotic expression plasmids of Rv3586 domains were constructed and expressed in COS-7 cells successfully, which will be helpful for the further research on function and application of *M. tuberculosis* Rv3586.

Key words: Mycobacterium tuberculosis; Rv3586; Domain; Eukaryotic expression Chinese Library Classification(CLC): R378.911; Q78 Document code: A Article ID: 1673-6273(2017)18-3429-05

前言

结核病(tuberculosis,TB)是由结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis, Mtb)引起的慢性传染病。据WHO统计,2015 年TB新发感染者1040万,死亡人数约180万^[1]。卡介苗 (Bacillus Calmette Guerin, BCG)作为用于控制TB的惟一疫 苗,存在保护力不完善、不能用于免疫低下人群接种等缺点^[2]。 亚单位疫苗安全性好、免疫特异性强,还可联合多种抗原及佐剂的方式提高疫苗免疫效率^[3],是目前 TB 疫苗研究较多的领域。目前在研的亚单位疫苗以 *Mtb* 分泌蛋白和差异蛋白为主^[45],一些候选疫苗如 Ag85B-ESAT6 已进入临床试验阶段^[6]。 *Mtb* 基因组编码 4 000 多个基因,进一步筛选可提高机体免疫力的 *Mtb* 抗原,将有助于 TB 新型疫苗的研制。

近年研究发现,细菌可分泌一种小核苷酸第二信使分子 --

第四军医大学本科生导师基金项目(2016011)

△ 通讯作者:路延之(1987-),硕士研究生,助教,研究方向:结核分枝杆菌的感染与免疫,E-mail: luyanzhi@fmmu.edu.cn;

^{*}基金项目:国家自然科学基金面上项目(81371774,81671638);第四军医大学科技发展基金课题(2016XD047);

作者简介:吴骏杰(1995-),本科生,研究方向:结核分枝杆菌疫苗候选抗原的筛选,电话:15709238008, E-mail: wjj9587@163.com

柏银兰(1975-),博士研究生,副教授,研究方向:结核分枝杆菌的感染与免疫,E-mail: yinlanbai@fmmu.edu.cn (收稿日期:2016-12-28 接受日期:2017-01-26)

环二腺苷酸 (cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)^[7]。 c-di-AMP 不仅参与调节细菌的生长¹⁸、细胞壁的代谢平衡¹⁹、生 物膜的形成¹⁰⁰以及耐药性改变¹¹⁰等生理过程,还可以分泌到菌 体外,直接作用于宿主免疫细胞,激活宿主的固有免疫四,因而 引起研究者强烈的兴趣。c-di-AMP 由细菌二腺苷酸环化酶 (dinucleotide cyclase, DAC) 催化 2 分子的 ATP 或 ADP 而成 [13]。研究者前期证实, Rv3586 是 Mtb 的 DAC 酶, 与磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE)共同调节 Mtb c-di-AMP 的水平,参与 调节细菌细胞大小及细菌毒力^[14]。进一步研究发现,Rv3586重 组蛋白^[13]和 BCG 过表达菌株均可诱导小鼠强烈的免疫应答 (未发表结果)。Rv3586蛋白包含三个结构域,从N端到C端 分别为:具有合成 c-di-AMP 活性的 Dac(dinucleotides cyclase) 结构域、连接结构域和能够结合 DNA 的 HhH(Helix-hairpin-Helix)结构域[13,16],但各结构域的功能及与机体的相互作用 机制仍不清楚。本研究构建了 Rv3586 三个结构域的真核表达 载体,为后续 Rv3586 功能研究及疫苗机制研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料

GXL PrimeStar 酶、*Hin*d III 限制性内切酶、T4 DNA Ligase、去磷酸化酶等分子生物学试剂购于 Takara 公司。Hoechst 购于碧云天生物技术有限公司。胎牛血清 FBS 购自 Hyclone 公 司, PRMI-1640 购于 Gibco 公司。 ViaFect 转染试剂购于 Promega 公司。抗小鼠 Cy3 荧光二抗为 Bioscience 公司产品。 小鼠抗 Rv3586 多抗血清为第四军医大学微生物学教研室制备 ^[15], COS-7 细胞为第四军医大学微生物学教研室保存。

1.2 方法

1.2.1 **目的基因的 PCR 扩增** 按照公布的 *Mtb* H37Rv Rv3586 基因序列,分别设计 N 端(N)、中段(M)、C 端(C)三段 结构域的基因扩增引物,如表 1 所示。以 H37Rv 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,反应体系为:5 × GXL PCR buffer 20 µL,dNTP 8 µL,质粒模板 2 µL,上、下游引物各 2 µL,ddH₂O 65 µL。反应条件为:95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s,30 个循环;72 ℃ 5 min。Rv3586 三段结构域基因分别命名 为 Rv3586N、Rv3586M、Rv3586C。

1.2.2 真核表达载体的构建 对 Rv3586 结构域基因的 PCR 扩增产物分别进行 *Hind* III 单酶切,同时 pEGFP-N3 真核表达

表	1 PCR	打	⁺增及	鉴定	引	物

Table 1 PCR Primers for amplification and identification					
Primers	Sequences				
N-F	5'-gcgaagcttcgatgcacgctgtgactcgtc-3'				
N-R	5'-tttaagettgtacgtgacgttccccgcg-3'				
M-F	5'-gcgaagettcgatgttgaccgactcggcaacc-3'				
M-R	5'-gcgaagettgcgaateetgcgetteegtg-3'				
C-F	5'-tttgcgaagcttcgatgacgctgagcccgcgtggc-3'				
C-R	5'-gcgaagcttgttgatcgctgatggtcg-3'				
GFP-R	5'-cggaagettttacttgtacagetcgtc-3'				

Note: bases underlined were sites recognized by restriction enzymes *Hind* III. 载体 Hind III 单酶切后用去磷酸化酶处理,基因与载体片段分 别连接后转化 E. coli DH5α,卡那霉素抗性平板筛选重组转化 子。挑取单克隆,用各基因上、下游引物分别和下游的反向引物 GFP-R 配对进行 PCR 鉴定,判断目的基因是否插入以及插入 方向是否正确。从鉴定正确的菌株中提取质粒,采用 Hind III 单 酶切鉴定。质粒送上海生工生物技术有限公司测序(图1)。





1.2.3 **真核表达载体的转染** 生长状态良好的 COS-7 细胞 2×10⁵ 个 / mL 接种孔底含有薄圆盖玻片的 24 孔板, RP-MI-1640 完全培养基(含 10 % FBS)^[17]培养 24 h。配置转染混合 液:0.5 μg 重组质粒分别和 50 μL 的 RPMI-1640 不完全培养 (不含 FBS)预混, 加入 1.5 μL 预温的 ViaFect 转染试剂, 室温 孵育 10 min。转染前, 孔板内更换为 250 μL 新鲜的 RPMI-1640 完全培养基, 小心加入转染混合液 51.5 μL。37 ℃、5 % CO₂ 培 养 6 h, 再加入 200 μL RPMI-1640 完全培养基, 继续培养 48 h。 以空白质粒 pEGFP-N3 转染的 COS-7 细胞作为阴性对照。

1.2.4 目的基因表达的间接免疫荧光检测 待 COS-7 细胞在 孔板内载玻片上生长至约 95 %-100 %时,取出载玻片,用预温 的 PBS 洗涤后,4 %多聚甲醛固定 20 min。PBS 漂洗 3 遍, 300 μL 0.2 % TritonX-100 作用 10 min。PBS 洗 3 遍,3 % BSA 100 μL 室温封闭 30 min。PBS 洗 3 遍,滴加 200 μL 小鼠抗 Rv3586 多抗血清,4 ℃避光过夜。PBS 漂洗后加入 50 μL Cy3 荧光标 记的山羊抗小鼠二抗,37 ℃避光孵育 1 h。PBS 漂洗后加 200 μL Hoechst 室温避光孵育 5 min。PBS 漂洗后 95 %甘油封片。 荧光显微镜下分别在波长 350 nm、395 nm、550 nm 的激发光 下观察。

2 结果

2.1 Rv3586 结构域基因的 PCR 扩增

以 *Mtb* H37Rv 的基因组为模板, 扩增 Rv3586 结构域基因, PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分析显示, 成功扩增出大小分别为 420 bp (图 2a)、441 bp (图 2b)、216 bp (图 2c)的 Rv3586N、Rv3586M、Rv3586C 目的基因片段。

2.2 Rv3586 结构域基因真核表达载体的 PCR 鉴定

分别采用 Rv3586 结构域基因上游与 GFP 下游引物对转



图 2 Rv3586 结构域的 PCR 扩增 Fig. 2 PCR amplification of Rv3586 domains (a) Rv3586N domain; (b) Rv3586M domain; (c) Rv3586C domain



图 3 Rv3586 结构域真核表达质粒的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR identification of eukaryotic expression plasmids for Rv3586 domains

(a) Rv3586N domain; (b) Rv3586M domain; (c) Rv3586C domain; Lane 1, forward insertion; Lane 2, reverse insertion.



图 4 Rv3586 结构域真核表达质粒的酶切鉴定

Fig.4 Identification of eukaryotic expression plasmids by enzyme digestion

(a) Rv3586N domain; (b) Rv3586M domain; (c) Rv3586C domain; Lane 1, plasmid + Hind III; Lane 2, plasmid





化子进行 PCR 鉴定,1%琼脂糖凝胶电泳显示,分别成功扩增 出 Rv3586N、Rv3586M、Rv3586C 与部分 GFP(5'端 800 bp)融 合基因片段,大小分别为1220 bp(图 3a)、1241 bp(图 3b)、1 016 bp(图 3c),表明重组质粒的插入序列大小和方向均正确。 2.3 Rv3586 结构域基因真核表达载体的酶切鉴定

包含 Rv3586 结构域真核表达质粒的转化子扩大培养并提 取质粒, Hind III 单酶切分别可切出 420 bp(图 4a)、441 bp(图 4b)、216 bp(图 4c)片段,表明 Rv3586 三个结构域的真核表达 质粒构建成功。测序结果显示插入序列与目的 DNA 序列完全 一致,将序列鉴定正确的质粒分别命名为 PW-135、PW-136、 PW-137。

2.4 Rv3586 结构域基因在真核细胞 COS-7 中的表达鉴定

将质粒转染入 COS-7 真核细胞,进行免疫荧光检测。如图 5 所示,转染 PW-135、PW-136 和 PW-137 的 COS-7 中,细胞核 位置的 Hoechst 染料在 350 nm 的激发光下发射出 460 nm 波 长的蓝光。在 395 nm 的激发光下,GFP 蛋白发出 509 nm 波长 的绿色荧光。在 550 nm 的激发光下,结合到 Rv3586 结构域上 的 Cy3 标记二抗发出波长为 561 nm 的红色荧光。绿色荧光和 红色荧光融合后的黄色荧光为 Rv3586 结构域和 GFP 共定位。 结果表明 Rv3586 三个结构域基因片段均可在 COS-7 细胞中 表达。

3 讨论

c-di-AMP 为 2008 年发现的细菌信号分子,其在细菌中的 调控及作用研究仍处于初级阶段。Bai YL 等^[13] 首次报告 Rv3586 是 *Mtb* 细胞内第二信使 c-di-AMP 的合成酶,其可催化 两分子 ATP 或 ADP 产生 3',5' - 磷酸二酯键,合成 c-di-AMP。 生物信息学分析显示,Rv3586 蛋白包含三个结构域,N 端结构

域包含第 1-140 位氨基酸,属于 DisA 蛋白质家族,是 c-di-AMP 合成酶的主要活性位点。将 Rv3586 的 N+M 和 M+C 结构域分 别进行原核表达并验证其功能,研究结果表明,其生物学活性 区域位于 N 端,其中 RHR 基序是其主要的活性位点,突变后 蛋白不能结合 c-di-AMP。不同细菌的 Dac 蛋白均具有和 Rv3586 相似的结构域^[18:20]。M 段结构域包含第 141-287 位氨基 酸,包含三个α 螺旋,形成了两端结构域的 linker 连接结构域。 C 端结构域肽段属于 HhH 家族成员,可特异性结合 DNA^[16],但 各结构域的相互作用仍需进一步研究确定。

本室曹田宇等用 Rv3586 重组蛋白¹⁵¹及 N+M 结构域(未发 表结果)免疫小鼠,结果均可诱导显著的体液免疫和细胞免疫 应答。本实验中,我们采用 Rv3586 蛋白免疫小鼠的多克隆血清 孵育转染重组质粒的 COS-7 细胞,免疫荧光结果显示 Rv3586 多克隆抗体可识别三个结构域蛋白,表明三个结构域均包含抗 原表位,并刺激机体产生免疫应答,但其各自免疫应答的强度, 以及是否具有免疫保护力,仍需进一步的实验证实。

c-di-AMP可直接结合细胞内 STING(stimulator of interferon genes)分子,通过 STING 通路激活巨噬细胞 I 型干扰素反 应^[1221]。c-di-AMP 合成酶的 Dac 结构域具有催化活性,在真核 细胞中表达 Dac 结构域可能以细胞中的 ATP 为底物产生 c-di-AMP,并对宿主细胞的生理过程产生影响^[12]。我们用脂质 体将 Rv3586 三个结构域基因真核细胞表达质粒转染入 COS-7 细胞中,发现目的蛋白表达载体和空质粒载体的转染效率相 似,且转染后细胞形态和生长没有显著的变化,表明目的基因 在真核细胞中的表达对细胞的生理过程影响不显著。

综上,本研究首次成功构建了 Rv3586 三个结构域基因的 真核表达载体,并在真核细胞 COS-7 细胞成功表达目的基因, 可为阐述细菌 c-di-AMP 与宿主细胞的相互作用研究奠定基 础,并为进一步阐明 Mtb Rv3586 结构域的功能及其用于 Mtb 的致病机制和疫苗研究提供了实验基础。

参考文献(References)

- Marco Schitoa DH, Alimuddin Zumlab. Tuberculosis eradication versus control [J]. International Journal of Infectious Diseases, 2016, [Epub ahead of print]
- [2] Russell DG, Barry CE, Flynn JL. Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us[J]. Science, 2010, 328(5980): 852-856
- [3] 李洱花, 梁张, 宝福凯, 等. 结核新疫苗研究进展 [J]. 中国病原生物 学杂志, 2015, 10(1): 69-74
 Li Er-hua, Liang Zhang, Bao Fu-kai, et al. Advances in the study of new tuberculosis vaccines [J]. Journal of Pathogen Biology, 2015, 10 (1): 69-74
- [4] Betts G, Poyntz H, Stylianou E, et al. Optimising immunogenicity with viral vectors: Mixing MAV and HAdv-5 expressing the mycobacterial antigen Ag85A in a single injection [J]. PLoS One, 2012, 7 (12): e50447
- [5] 柏银兰,薛莹,王丽梅,等. 结核分枝杆菌 ESAT6-MPT64 融合蛋白的构建及应用性初步研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2009,23 (4): 325-328

Bai Yin-lan, Xue Ying, Wang Li-mei, et al. Construction of secreted protein ESAT6 and MPT64 of *Mycobacterium tuberculosis* to evaluate its applicability in serological diagnosis [J]. Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy, 2009, 23(4): 325-328

- [6] Dissel JT, Arend SM, Prins C, et al. Ag85b-EAST-6 adjuvanted with IC31 promotes strong and long-lived *Mycobacterium tuberculosis* specific T cell responses in naive human volunteers [J]. Vaccine, 2010, 28(20): 3571-3581
- [7] Gomelsky M. Camp, c-di-GMP, c-di-AMP and now cGMP: Bacteria use them all![J]. Mol Microbiol, 2011, 79(3): 562-565
- [8] Ye M, Zhang JJ, Fang X, et al. Dhhp, a cyclic di-AMP phosphodiesterase of *Borrelia burgdorferi*, is essential for cell growth and virulence[J]. Infect Immun, 2014, 82(5): 1840-1849
- [9] Luo Y, Helmann JD. Analysis of the role of *Bacillus subtilis* sigma(m) in *Beta-lactam* resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis[J]. Mol Microbiol, 2012, 83(3): 623-639
- [10] Gundlach J, Rath H, Herzberg C, et al. Second messenger signaling in Bacillus subtilis: Accumulation of cyclic di-AMP inhibits biofilm formation[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 804
- [11] Dengler V, McCallum N, Kiefer P, et al. Mutation in the c-di-AMP

cyclase DacA affects fitness and resistance of methicillin resistant Staphylococcus aureus[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73512

- [12] Dey B, Dey RJ, Cheung LS, et al. A bacterial cyclic dinucleotide activates the cytosolic surveillance pathway and mediates innate resistance to tuberculosis[J]. Nat Med, 2015, 21(4): 401-406
- [13] Bai Y, Yang J, Zhou X, et al. Mycobacterium tuberculosis Rv3586 (DacA) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-AMP[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35206
- [14] Yang J, Bai Y, Zhang Y, et al. Deletion of the cyclic di-AMP phosphodiesterase gene (CnpB) in *Mycobacterium tuberculosis* leads to reduced virulence in a mouse model of infection[J]. Mol Microbiol, 2014, 93(1): 65-79
- [15] 曹田宇,吉思雨,褚阳光,等.结核分枝杆菌 c-di-AMP 合成酶的表达和纯化以及小鼠多抗血清的制备[J].中国病原生物学杂志, 2015,10(8):681-688

Cao Tian-yu, Ji Si-yu, Chu Yang-guang, et al. Expression and purification of *Mycobacterium tuberculosis* c-di-AMP synthesis to prepare polyclonal antibodies in mice [J]. Journal of Pathogen Biology, 2015, 10(8): 681-688

- [16] Witte G, Hartung S, Buttner K, et al. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates [J]. Mol Cell, 2008, 30(2): 167-178
- [17] Zhang H, Peng P, Miao S, et al. Recombinant Mycobacterium smegmatis expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against Mycobacterium tuberculosis challenge in mice [J]. Scandinavian Journal of Immunology, 2010, 72(4): 349-357
- [18] Muller M, Deimling T, Hopfner KP, et al. Structural analysis of the diadenylate cyclase reaction of DNA-integrity scanning protein a (DisA) and its inhibition by 3'-dATP [J]. Biochem J, 2015, 469(3): 367-374
- [19] Pham TH, Liang ZX, Marcellin E, et al. Replenishing the cyclic-di-AMP pool: Regulation of diadenylate cyclase activity in bacteria[J]. Curr Genet, 2016, 62(4): 731-738
- [20] Rosenberg J, Dickmanns A, Neumann P, et al. Structural and biochemical analysis of the essential diadenylate cyclase CdaA from *Listeria monocytogenes*[J]. J Biol Chem, 2015, 290(10): 6596-6606
- [21] Andrade WA, Firon A, Schmidt T, et al. Group B Streptococcus degrades cyclic-di-AMP to modulate sting-dependent type I interferon production[J]. Cell Host Microbe, 2016, 20(1): 49-59