

# 奈瑟氏淋球菌表面蛋白 A 基因克隆及 在真核细胞中的表达研究

季明春 陈红菊

(扬州大学医学院微生物学和免疫学教研室 扬州 225001)

**摘 要** :为了研制奈瑟氏淋球菌外膜蛋白—奈瑟菌表面蛋白 A (*Neisseria* surface Protein A, NspA) 的核酸疫苗,根据淋球菌 *NspA* 的基因序列,设计一对寡核苷酸引物。以淋球菌 WHO-A 菌株基因组 DNA 为模板,通过 PCR 扩增获得具有完整开放读码框架(ORF)的 *NspA* 基因,并将其正向插入真核表达载体 pCMVscript,成功构建了表达 *NspA* 基因的真核细胞表达载体 pcNspA。用脂质体包裹 pcNspA 重组质粒转染 COS 细胞,以间接免疫荧光分析法分析 *NspA* 基因的表达,发现转染 pcNspA 的 COS 细胞能高表达 *NspA* 抗原。淋球菌免疫保护性抗原 *NspA* 基因的克隆与真核细胞表达,为进一步研究淋球菌 *NspA* 对雌激素处理的淋球菌感染实验小鼠的免疫保护作用奠定了基础。

**关键词** 奈瑟氏淋球菌,表面蛋白 A,克隆,表达

中图分类号:Q933 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2004)01-0104-03

奈瑟氏淋球菌在漫长的进化过程中已经形成一套逃避人体免疫系统作用的机制,从而严重地限制了淋病疫苗的研究<sup>[1]</sup>。通过对淋球菌 Por、Pil、Opa 和 LOS 等外膜抗原的研究,人们发现大多数淋球菌外膜抗原都具有非常大的抗原变异性。但是,为了研制有效的淋球菌疫苗,人们一直没有放弃寻找具有免疫保护性的淋球菌保守抗原。Plante 等首先克隆了淋球菌的奈瑟氏表面蛋白 A 基因,发现 NspA 抗原不但在细菌表面持续表达,而且高度保守,并具有较强免疫原性,是一个很好的淋球菌疫苗候选者。为了研制具有较强免疫保护能力的淋病疫苗,我们在克隆淋球菌 *NspA* 全长基因的基础上,构建淋球菌 *NspA* 真核细胞表达载体,为进一步研究淋球菌 *NspA* 基因疫苗在淋病预防中的作用奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒和细胞株

真核细胞表达质粒 pCMVscript 购自 Stratagene 公司。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  和 COS 细胞株为本室保存。COS 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中。

### 1.2 试剂

pCMVscript 克隆试剂盒购自 Stratagene 公司。*EcoR* I、*Kpn* I 等内切酶和 T4 连接酶购自 Roche 公司。*NspA* 单克隆抗体由加拿大 Laval 大学医学中心 Martin 教授惠赠。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗鼠 IgG 和聚乙烯亚胺(PEI, 25Kd) 购自 Sigma 公司。

### 1.3 PCR 扩增

参照已发表的淋球菌 *NspA* 基因序列,设计一对引物,用于扩增 *NspA* 基因序列。引物 1: 5'-GGCGGCGCCCGC-

CATGAAAAAGCACTTGCC-3', 引物 2: 5'-GGGCTCGAGT-CAGAATTTGACGCGCAGCCCG-3'。按文献方法进行 PCR 扩增<sup>[2]</sup>。反应结束后,取 PCR 产物作琼脂糖凝胶电泳,观察电泳条带的大小。

### 1.4 真核重组质粒的构建和酶切鉴定

按 pCMVscript 克隆试剂盒操作说明书要求,取 *EcoR* I、*Kpn* I 酶切后纯化的 PCR 产物和 pCMVscript 质粒 DNA,将两者按一定摩尔比混合、连接、转化和筛选阳性克隆。取阳性克隆的质粒,对其进行酶切鉴定分析。将获得的重组质粒命名为 pcNspA。

### 1.5 序列测定和 BLAST 分析

提取含有正向插入 *NspA* 全长基因的质粒 pcNspA,采用 Pharmacia Biotech 公司的 ALFTM DNA Sequencer 系统,以引物 1 和引物 2 进行双向测序。测序结果送 GenBank 检索,并分析验证其阅读框架。

### 1.6 转染细胞和间接免疫荧光检测

参照文献[3],采用聚乙烯亚胺(PEI)为转染介质,用 pcNspA 表达载体转染 COS 细胞,以转染 pCMVscript 空载体的 COS 细胞作为阴性对照。细胞转染后 48 小时,用胰酶消化细胞制备细胞悬液,将细胞悬液滴在玻片上,自然干燥后固定、洗涤,分别加 *NspA* 单克隆抗体、FITC 标记二抗,在倒置荧光显微镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 PCR 扩增淋球菌 *NspA* 基因

以引物 1 和引物 2 特异性扩增淋球菌 WHO-A 参考细胞株 *NspA* 的全长基因,PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳显示为

基金项目 江苏省应用基础研究项目(BJ95122)

作者简介 季明春(1955-)男,江苏扬州人,副教授,硕士,现从事淋球菌外膜蛋白免疫保护作用的研究。Tel 86-514-7126062; Fax 86-514-7341733; E-mail: mcji@yzu.edu.cn

收稿日期 2003-04-08,修回日期:2003-09-08

单一条带片段,大小约 530bp,与理论设计扩增片段大小一致。

## 2.2 表达质粒的酶切鉴定和序列分析

提取重组质粒,分别用 *Xma* III 以及 *Eco* RI、*Bgl* I 进行酶切鉴定。正向插入 *NspA* 基因的质粒 pcNspA4 被 *Xma* III 酶切产生大小为 2888bp、2029bp、64bp 3 条带,反向插入 *NspA* 基因的质粒 pcNspA10、pcNspA13 被 *Xma* III 酶切产生大小为 2888bp、1588bp、505bp 的 3 条带。对重组质粒 pcNspA4 插入序列进行测序分析,插入序列全长为 525bp,并证明 pcNspA4 质粒的开放阅读框架是正确的。将淋球菌 WHO-A 菌株的 *NspA* 序列输入 GenBank,序列的接受号为 AY157539,蛋白序列号为 AAN77898.1。以 Blastp 方式(<http://www.ncbi.nlm.gov>)比较核苷酸数据库中的序列,发现它与奈瑟氏脑膜炎球菌 *NspA* 序列(U52066)有 97% 同源性,与已发表的奈瑟氏淋球菌 *NspA* 基因序列(U52069)完全一致。

## 2.3 *NspA* 真核细胞表达载体的体外表达

分别用转染 pcNspA 质粒和 pCMVscript 质粒的 COS 细胞悬液滴片,经固定、洗涤后,加 *NspA* 单克隆抗体、异硫氰酸荧光素标记的二抗,结果见图 1。转染重组 pcNspA 质粒的细胞胞浆中有特异性荧光染色,而转染空载体的对照细胞无荧光,证明淋球菌 *NspA* 蛋白在真核细胞中得到高效表达。

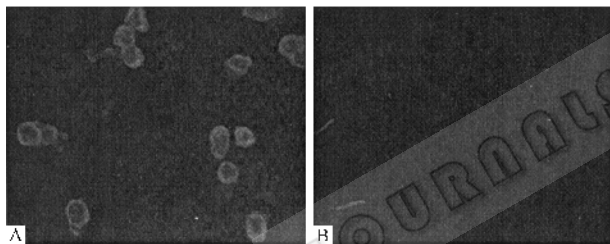


图 1 *NspA* 基因在真核细胞 COS 内高效表达

Fig.1 The *NspA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* was high expressed in COS cells transfected with pcNspA

A. COS cells transferred with pcNspA ;

B. COS cells transferred with pCMVscript.

## 3 讨论

在自然界,淋球菌的唯一宿主是人,淋球菌在漫长的进化过程中已经形成了一套逃避人体免疫系统作用的机制,加上缺少很好的动物实验模型,给制备淋球菌疫苗进行淋病预防造成相当大的障碍。但近年来,从 Por、Pil、Opa 和 LOS 等淋球菌外膜蛋白抗原的一系列研究中,人们认识到理想的淋球菌疫苗抗原应该具有下列 5 个基本特征(1)在细菌繁殖过程中能持续表达(2)在细菌菌株之间保持一定的稳定性;(3)含有一个或更多保守的抗原表位来作为抗体的靶位点,诱导具有调理作用的抗体(4)能在泌尿生殖道粘膜表面诱导产生有效的免疫保护作用(5)不能被还原修饰蛋白(Rmp)污染。因为 Rmp 会诱导大量阻断性抗体,增强人体对淋球菌感染的敏感性<sup>[4]</sup>。淋球菌 Porin 与菌毛、Opa、LOS 等外膜抗原相比,是相对保守的抗原,但淋球菌菌株之间的

PorB 约有 95% 的同源性,而 PorA 和 PorB 之间的同源性仅有 63%。

1997 年,Martin 等<sup>[5]</sup>首次报道奈瑟氏属脑膜炎球菌的外膜上存在一种低分子量蛋白,并命名为奈瑟氏菌表面蛋白 A (*Neisseria surface Protein A*, *NspA*)。*NspA* 存在于所有脑膜炎球菌的膜表面,其抗原性在菌株间高度保守,用重组 *NspA* 免疫小鼠能诱导保护免疫,*NspA* 单抗能保护小鼠免于致死量脑膜炎球菌的攻击,并且发现淋球菌的基因组内也存在 *NspA* 基因<sup>[6-10]</sup>。Plante 等<sup>[11]</sup>在上述研究的基础上克隆淋球菌 *NspA* 基因,发现淋球菌 *NspA* 氨基酸序列和脑膜炎球菌 *NspA* 的同源性为 93%,淋球菌菌株之间的同源性高达 98%。用放射性标记 *NspA* 单抗检测 *NspA* 在细胞膜表面的暴露情况,证实淋球菌 *NspA* 位于完整的细菌表面。Plante 所制备的 7 株淋球菌 *NspA* 单抗中有 4 株单抗能识别所有用于测试的 51 株淋球菌。

*NspA* 抗原高度保守,在菌体表面持续表达,并具有较强免疫原性,所以是一个很好的淋球菌疫苗候选者。为制备具有较强免疫保护力的淋球菌 *NspA* 基因疫苗,我们利用基因重组技术克隆淋球菌参考菌株 WHO-A 的 *NspA* 的全长基因。和 GenBank 核苷酸数据库中已经发表的 *NspA* 基因序列相比较,发现它与奈瑟氏脑膜炎球菌 *NspA* 序列有 97% 同源性,与已发表的奈瑟氏淋球菌 *NspA* 基因序列(U52069)的核苷酸序列完全一致,进一步证实奈瑟氏淋球菌 *NspA* 具有高度保守性,其抗原保守性远远超过现在所发现的其他淋球菌外膜蛋白。

在克隆淋球菌 *NspA* 全长基因的基础上,我们成功地构建了淋球菌 *NspA* 真核细胞表达质粒——pcNspA。将 pcNspA 真核细胞表达质粒经脂质体包裹后转染 COS 细胞,能在真核细胞中高水平地表达淋球菌 *NspA*。淋球菌 *NspA* 全长基因的克隆和真核细胞表达质粒的构建,为我们进一步研究 *NspA* 对雌激素处理的淋球菌感染实验小鼠的免疫保护作用奠定了基础。

## 参 考 文 献

- [1] 季明春.淋球菌外膜蛋白疫苗的研究进展.国外医学免疫学分册,2003,26(3):158-160.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 430-450.
- [3] Boussif O, Lezoualc H, Antonietta M, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(16):7297-7301.
- [4] 季明春.淋病奈瑟菌孔蛋白疫苗研究.国外医学微生物分册,2003,26(2):18-20.
- [5] Martin D, Cadieux N, Hamel J, et al. Highly conserved *Neisseria meningitidis* surface protein confers protection against experimental infection. J Exp Med, 1997, 185(7):1173-1184.
- [6] Cadieux N, Plante M, Rioux C R, et al. Bactericidal and cross -

protective activities of a monoclonal antibody directed against *Neisseria meningitidis* NspA outer membrane protein. *Infect Immun* , 1999 , **67** ( 9 ) : 4955 – 4959 .

[ 7 ] Moe G R , Tan S , Granoff D M . Differences in surface expression of NspA among *Neisseria meningitidis* group B strains. *Infect Immun* , 1999 , **67** ( 11 ) : 5664 – 5675 .

[ 8 ] Moe G R , Zuno-Mitchell P , Lee S S , *et al* . Functional activity of anti-neisserial surface protein a monoclonal antibodies against strains of *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Infect Immun* , 2001 **69** ( 6 ) : 3762 – 3771 .

[ 9 ] Moe G R , Zuno-Mitchell P , Hammond S N , *et al* . Sequential immunization with vesicles prepared from heterologous *Neisseria meningitidis* strains elicits broadly protective serum antibodies to group B strains. *Infect Immun* 2002 **70** ( 11 ) : 6021 – 6031 .

[ 10 ] Martin D , Brodeur B R , Hamel J , *et al* . Candidate *Neisseria meningitidis* NspA vaccine. *J Biotechnol* , 2000 **83** : 27 – 31 .

[ 11 ] Plante M , Cadieux N , Rioux CR , *et al* . Antigenic and molecular conservation of the gonococcal NspA protein. *Infect Immun* , 1999 , **67** ( 6 ) : 2855 – 2861 .

**Cloning the *NspA* Gene of *Neisseria gonorrhoeae* and its Expression in Eukaryotic Cells**

JI Ming-Chun\* CHEN Hong-Ju

( Department of Microbiology and Immunology , Medical College of Yangzhou University , Yangzhou 225001 , China )

**Abstract** :To develop a DNA vaccine against *Neisseria* surface protein A ( NspA ) of *Neisseria gonorrhoeae* , according to the sequence of gene *Neisseria* surface protein A of *Neisseria gonorrhoeae* WHO-A strain , a pair of oligonucleotide primers was designed. The gene *NspA* of *Neisseria gonorrhoeae* was amplified by using polymerase chain reaction ( PCR ) , and inserted into the *EcoRI* and *KpnI* sites of pCMVscript plasmid to construct recombinant plasmid. The recombinant plasmid pcNspA was transferred into COS cell line with polyethylenimine ( PEI ). The expression of the NspA gene in COS cells was analyzed by using indirect fluorescence immunoassay ( IFA ). The gene *NspA* of *Neisseria gonorrhoeae* was successfully amplified by using PCR. A recombinant eukaryotic expression plasmid of *NspA* was constructed. The recombinant plasmid could highly express *NspA* gene of *Neisseria gonorrhoeae* in COS cells transfected with liposome-pcNspA. The *NspA* gene was expressed in eukaryotic cells in vivo. The results of this investigation have provided a basis for the further research on the development of *NspA* DNA vaccine of gonorrhoeae.

**Key words** :*Neisseria gonorrhoeae* , *Neisseria* surface protein A ( NspA ) , Cloning , Expression

Foundation item : Jiangsu Province Application Basic Investigation Item( BJ95122 )

\* Corresponding author. Tel 86-514-7126062 ; Fax 86-514-7341733 ; E-mail : mcji@yzu.edu.cn

Received date : 04-08-2003