

李斯特菌载体结核疫苗候选株基因重组 构建及蛋白表达验证*

任晨艳, 刘思静, 蒲启康, 蒋明娟, 周梦莹, 汪川[△]

四川大学华西公共卫生学院 卫生检验与检疫系(成都 610041)

【摘要】 目的 基因重组构建以单增李斯特菌、绵羊李斯特菌为载体的新型结核疫苗候选株,并进行蛋白表达验证,为结核疫苗研究和结核防控提供新思路和新方法。**方法** 以体外基因连接、质粒转化等技术,将本实验室已有的分别编码结核抗原 Ag85C、ESAT-6 蛋白的两种基因盒,插入携带单增李斯特菌、绵羊李斯特菌同源序列的打靶质粒中。将打靶质粒电转化单增李斯特菌、绵羊李斯特菌,在 42 ℃ 和 30 ℃ 连续传代,利用同源重组杂交原理和基因打靶技术,将打靶质粒携带的两种编码结核抗原的抗原基因盒,分别整合至致病基因(*actA* 和 *plcB*)被敲除的单增李斯特菌、绵羊李斯特菌减毒株及未经减毒的绵羊李斯特菌基因组中。重组菌经蓝白斑、抗生素抗性 & PCR 筛选,再经 Western blot 检测其菌体蛋白及分泌蛋白的表达情况。**结果** 构建了携带抗原基因盒的重组菌株 5 株,其重组基因序列 PCR 验证结果均符合预期,且测序验证成功;重组菌不携带红霉素抗性基因,表型特征符合预期;其中,重组菌 *Li-Rv0129c*、*Li-ΔactAplcB-Rv0129c* 按预期表达了结核杆菌 Ag85C 抗原蛋白,*Li-ΔactAplcB-Rv3875* 按预期表达了结核杆菌 ESAT-6 抗原蛋白,*Lm* 重组菌未表达相应结核抗原蛋白。**结论** 成功构建并筛选得到 3 株以绵羊李斯特菌为载体的、携带结核杆菌 *Rv0129c*(编码 Ag85C)抗原基因盒或 *Rv3875*(编码 ESAT-6)抗原基因盒,且表达相应抗原蛋白的新型结核疫苗候选株。

【关键词】 李斯特菌 结核疫苗 活菌载体

Genetic Recombination and Protein Expression Detection of *Listeria*-based Tuberculosis Vaccine Candidates REN Chen-yan, LIU Si-jing, PU Qi-kang, JIANG Ming-juan, ZHOU Meng-ying, WANG Chuan[△]. Department of Public Health Laboratory Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

【Abstract】 Objective Genetic construction of tuberculosis vaccine candidates based on *Listeria* (*L.*) *monocytogenes*, *L. ivanovii*, and evaluation their protein expression, in order to provide a novel method for research on tuberculosis controlling. **Methods** Two kinds of gene cassettes carrying tuberculosis antigen encoding gene *Rv3875* or *Rv0129c* were inserted into targeting vector harboring *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* homologous sequences via genetic connection methods and plasmid transformation technology *in vitro*. Targeting plasmids were electroporated into *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, and the recombinant strains were experienced serial passage at 42 ℃ and 30 ℃. Subsequently, the tuberculosis antigen gene cassettes in targeting plasmids were integrated into *L. monocytogenes* and *L. ivanovii* attenuated strain (knocking out of virulence gene *actA* and *plcB*) and *L. ivanovii* wild type strain by homologous recombination and gene targeting technology. The recombinant strains were screened by blue-white spot and antibiotic resistance test; the intracellular and extracellular proteins of the recombinant strains were tested by Western blot. **Results** Five recombination strains carried antigen gene cassette were constructed, and the recombinant genome were confirmed by PCR and sequencing. No erythromycin resistance gene was found in 5 strains, which was coincident to expectation. Recombination strains *Li-Rv0129c*, *Li-ΔactAplcB-Rv0129c* and *Li-ΔactAplcB-Rv3875* expressed *Mycobacterium tuberculosis* antigenic protein, Ag85C or ESAT-6, as expected. But *L. monocytogenes* strains did not express proper antigenic protein. **Conclusion** Three novel *L. ivanovii*-based tuberculosis vaccine candidates, carrying *Mycobacterium tuberculosis* *Rv0129c* antigen gene cassette (coding for Ag85C) or *Rv3875* gene cassette (coding for ESAT-6), and expressing relevant antigenic proteins have been successfully selected.

【Key words】 *Listeria* Tuberculosis vaccines Live vaccine vector

我国是全球 22 个结核病(tuberculosis, TB)高负担国家之一。卡介苗(bacillus calmette-guerin, BCG)是目前唯一的 TB 疫苗,但其保护效果极不稳

* 国家自然科学基金面上项目(No. 31570924)资助

[△] 通信作者, E-mail: wangchuan@scu.edu.cn

定,其保护力在 0%~80%不等^[1],约在接种 10~15 年后免疫效果开始逐渐减弱,新的 TB 疫苗亟待研发。以减毒李斯特菌为载体的重组疫苗,因能诱导强效细胞免疫应答而在近年来备受青睐,以其为载体构建的肿瘤治疗性疫苗在国外已进入临床试验^[2]。由于抗结核免疫以细胞免疫为主,故以减毒李斯特菌为载体的重组疫苗有望产生很好的抗结核免疫保护。

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, MTB) 的保护性抗原基因 *Rv0129c*、*Rv3875* 分别编码 Ag85C、ESAT-6 蛋白,它们是结核分枝杆菌早期分泌性蛋白,具有 T 细胞识别位点,可诱导机体产生以 T 细胞为主的细胞免疫,刺激特异性 T 细胞增殖并释放大量的干扰素- γ (IFN- γ) 及肿瘤坏死因子- α (TNF- α),二者均在抗 MTB 感染的免疫反应中发挥重要作用。

本研究以减毒单增李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*, LM)、绵羊李斯特菌 (*Listeria ivanovii*, LI) 两种菌株为活菌载体构建结核疫苗候选株。通过基因打靶重组技术,将 MTB 保护性抗原基因 (*Rv0129c*、*Rv3875*) 分别整合到敲除了 *actA*、*plcB* 基因的 LM 减毒株、LI 减毒株及 LI 野生株中,并验证其抗原蛋白表达情况。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒 pCW182,长度为 12 118 bp,含有 LM 同源序列 *mpl* 和 *orfBaldh*、*lacZ* 序列及抗氨苄西林 (ampicillin, Amp) 基因、抗红霉素 (erythromycin, Ery) 基因、双 *Not I* 酶切位点; pCW304,长度为 9 898 bp,与 *Li-lacZ* 有两段同源序列 (*orfXYZ* 和 *orfBaldh*),两段同源序列之间有一个 *Rv0129c* 编码序列基因盒,其插入方向为 *orfBaldh*→*orfXYZ* 方向,抗 Amp 基因,抗 Ery 基因,双 *Not I* 酶切位点; pCW305,长度为 9 552 bp,与 *Li-lacZ* 有两段同源序列 (*mpl* 和 *orfBaldh*),两段同源序列之间有一个 *Rv0129c* 编码序列基因盒,其插入方向为 *mpl*→*orfBaldh* 方向,抗 Amp 基因,抗 Ery 基因,双 *Not I* 酶切位点; pCW307,长度为 8 955 bp,与 *Li-lacZ* 有两段同源序列 (*mpl* 和 *orfBaldh*),两段同源序列之间有一个 *Rv3875* 编码序列基因盒,其插入方向为 *mpl*→*orfBaldh* 方向,抗 Amp 基因,抗 Ery 基因,双 *Not I* 酶切位点。以上质粒均为本课题组构建。

1.1.2 菌株 TOP10 感受态细胞,购自康为世纪生物科技有限公司; *Lm- Δ actAplcB-lacZ*, 含有 *lacZ* 基因,已敲除 *actA* 和 *plcB* 基因的单增李斯特菌; *Li-lacZ*, 含有 *lacZ* 基因的绵羊李斯特菌; *Li- Δ actAplcB-lacZ*, 含有 *lacZ* 基因,已敲除 *actA* 和 *plcB* 基因的绵羊李斯特菌。以上李斯特菌属菌株均为本课题组构建。

1.1.3 PCR 引物 rLM-insert-f/r(f: 5'-CAGTGTGATGGATATCTGCAG-3', r: 5'-CGACTTATCATTTTCCTAATCTATTC-3'), 扩增含 *Rv0129c* 或 *Rv3875* 片段的抗原基因盒 (LM 与 LI 通用), *Rv0129c* 基因盒长约 1 400 bp, *Rv3875* 基因盒长约 800 bp; rLM-insert-f&-S-rLM-in-*ldh*-r (f: 5'-CAGTGTGATGGATATCTGCAG-3', r: 5'-ACTGGCGTTAACTTTATGAAAG-3'), 以 pCW182 为骨架的打靶质粒中基因盒插入方向筛选, *Rv0129c* 基因盒长约 1 600 bp, *Rv3875* 基因盒长约 1 000 bp; rLi-insert-f&-S-rLi-in-*orfBaldh*-r (f: 5'-CAGTGTGATGGATATCTGCAG-3', r: 5'-AATTAACGCACGTGAGGAAGC-3'), 以 pCW304 为骨架的打靶质粒中基因盒插入方向筛选, *Rv0129c* 基因盒长约 1 600 bp; Ery-f/r-i (f: 5'-GTTCGACGATTCACAAAAAATAGGC-3', r: 5'-ACTAGTCCCCGGGCGCAATTG-3'), 扩增抗 Ery 基因,长约 1 200 bp; *LmactA*-f/r (f: 5'-GCTATAAATGAAGAGGCTTCAGG-3', r: 5'-CTCTTAAATCAGCTAGGCGATC-3'), 扩增 LM 中毒力基因 *actA*,长约 950 bp; *LiactA*-f/r (f: 5'-GAAGCTAAAAGTGCAAATGTCCC-3', r: 5'-ATTTCTTTAATACTGCGTTTGGGG-3'), 扩增 LI 中毒力基因 *actA*,长约 600 bp; *LiorfBaldh*-f/r (f: 5'-GATTAAAGATTGTGATTTAAAG-3', r: 5'-ACAAAAACGGAATCAGTTAG-3'), 扩增 LI 中特异性基因 *orfBaldh*,长约 1 000 bp; *LmorfBaldh*-f/r-i-1 (f: 5'-CTTCGATGACAACA GCTGTACC-3', r: 5'-AATCCTAAAGCATGCGC CTTCG-3'), 扩增 LM 中特异性基因 *orfBaldh*,长约 1 000 bp。

引物委托上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.4 主要仪器 PCR 仪 (BIO-RAD); 电泳仪 (BIO-RAD); 隔水式电热恒温培养箱 (上海跃进医疗器械厂); PAGE 垂直电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司); DYCZ-40D 型转移电泳槽 (北京市六一仪器厂); ChemiDoc XRS 凝胶成像系统 (BIO-RAD)。

1.1.5 试剂和培养基 质粒提取试剂盒 Plasmid Mini Kit I (200)、胶回收试剂盒 E. Z. N. A.™ Gel Extraction Kit(200)(OMEGA bio-tek); 去磷酸化试剂盒、 T_4 DNA Ligase(TaKaRa Biotechnology); HA-单克隆抗体、三氯乙酸(TCA)(Sigma-Aldrich); SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)(碧云天生物技术有限公司); β -巯基乙醇、质量分数为 0.1% 的溴酚蓝(Amersco); HRP 化学发光底物显色反应液(Thermo Fisher Scientific); PVDF 膜(Millipore 中国有限公司); LB 肉汤培养基(LB Broth)、LB 琼脂(LB Agar)、脑心浸液琼脂(BHI Agar)、脑心浸液培养基(BHI Broth)(北京陆桥技术有限责任公司)。

1.2 方法

1.2.1 打靶质粒构建 提取质粒 pCW182、pCW304, 分别经 *Not* I 进行酶切, 获得骨架载体; 提取质粒 pCW305、pCW307, 分别经 *Not* I 进行酶切, 获得靶抗原基因盒。pCW182 骨架载体和抗原基因盒(*Rv0219c*、*Rv3875*)、pCW304 骨架载体和抗原基因盒(*Rv0129c*) 在 T_4 连接酶作用下连接, 热击转化大肠杆菌 TOP10 感受态细胞, 筛选抗 Amp 的转化菌, 并用 rLM-insert-f/r 引物对 PCR 扩增, 筛选阳性打靶质粒。

以 rLM-insert-f & S-rLM-in-*ldh*-r 引物对做 PCR, 对以 pCW182 为骨架的阳性打靶质粒 pCW182-*Rv0129c* (编号为 pCW701)、pCW182-*Rv3875* (编号为 pCW702) 的抗原基因盒插入方向进行筛选; 以 rLi-insert-f & S-rLi-in-*orfBaldh*-r 引物对做 PCR, 对以 pCW304 为骨架的阳性打靶质粒 pCW304-*Rv0129c* (编号为 pCW310) 的抗原基因盒插入方向进行筛选。

1.2.2 打靶质粒电转化李斯特菌 pCW310 电转化 *Li-lacZ*; pCW305 及 pCW307 分别电转化 *Li- Δ actAplcB-lacZ*; pCW701 及 pCW702 电转化 *Lm- Δ actAplcB-lacZ*。电转参数: 电压 1 500 V, 持续时间 5 ms, 电转杯内径: 1 mm。电转液全部涂布于含 Ery(3 μ g/mL)、X-gal 及 IPTG 的 BHI 平板(以下简称 BE₃-X-I 平板), 经 30 °C 培养 48~72 h, 筛选单个蓝色菌落, 并提取质粒及用 rLM-insert-f/r 引物对进行 PCR, 以验证重组质粒是否已导入载体菌。

1.2.3 同源重组 携带打靶质粒的菌株接种 BE₃-X-I 平板 42 °C 传代培养 2~3 代(每代培养时间为 48 h), 分别挑取各平板上蓝色单菌落转种 BHI 肉汤, 摇床 30 °C、200 r/min 传代培养 6 代(每代培养

时间为 24 h), 待传到肉汤第 3 代开始, 每代取适量肉汤进行 10⁶ 倍稀释后分别取 100 μ L 涂布 BE₃-X-I 平板和不含 Ery, 含 X-gal、IPTG 的 BHI 平板(以下简称 BHI-X-I 平板), 30 °C 培养。平板筛选无 Ery 抗性的白色菌落(同源重组菌)用相应引物对扩增抗 Ery 基因、靶抗原盒、*orfBaldh* 片段以及 *actA* 基因进行验证。

1.2.4 靶抗原蛋白验证 按本课题组发表的李斯特菌胞内和分泌型蛋白提取条件^[3]提取各重组菌菌体和分泌型蛋白。所有样品(阳性质控组: *Lm*-OVA; 实验组: *Li*-*Rv0129c*、*Li- Δ actAplcB-*Rv0129c*、*Li- Δ actAplcB-*Rv3875*、*Lm- Δ actAplcB-*Rv0129c*、*Lm- Δ actAplcB-*Rv3875*) 经 SDS-PAGE 电泳, 以抗 HA-小鼠 IgG 单克隆抗体为一抗, 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L) 做二抗, 对转印且封闭后的 PVDF 膜进行孵育, 孵育结束后, 用 HRP 化学发光底物显色, 分析。****

2 结果

2.1 构建打靶质粒

打靶质粒中的抗原基因盒用 PCR 扩增, 其产物电泳条带见图 1。pCW702 PCR 产物在约 800 bp 处出现一条带, pCW701、pCW310 PCR 产物在约 1 400 bp 处出现一条带。

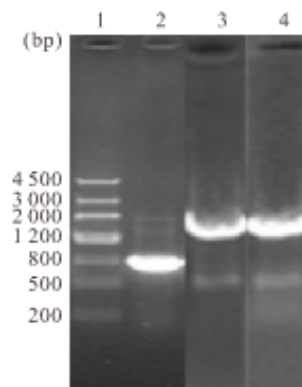


图 1 打靶质粒中抗原基因盒的 PCR 扩增结果

Fig 1 PCR amplification of gene cassette carried by targeting plasmids

1: Makrer III; 2: pCW702; 3: pCW701; 4: pCW310

阳性重组打靶质粒基因盒插入方向的 PCR 筛选结果见图 2, pCW701 在约 1 600 bp 处出现一条带, pCW702 在约 1 000 bp 处出现一条带, pCW310 在约 1 600 bp 处出现一条带, 与预期相符。再对质粒进行基因测序, 结果显示, 基因盒插入片段方向为 *mpl/orfXYZ*→*orfBaldh*, 与预期相符, 测序序列

与预期序列同源率达到 97% 以上。

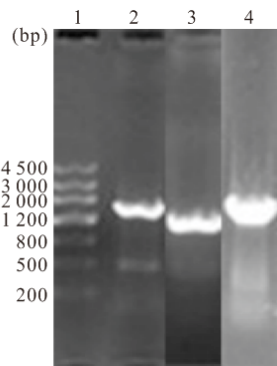


图 2 重组打靶质粒基因盒插入方向的 PCR 筛选结果
Fig 2 PCR selection of inserted deration of gene cassette carried by recombinant targeting plasmids
1: Makrer III; 2: pCW701; 3: pCW702; 4: pCW310

2.2 重组菌筛选

对重组菌携带的抗原基因盒、抗 Ery 基因、*orfBaldh* 片段及 *actA* 基因片段的 PCR 验证结果见图 3。

抗原基因盒扩增结果：*Lm-ΔactAplcB-Rv0129c*、*Li-ΔactAplcB-Rv0129c* 及 *Li-Rv0129c* 在约 1 400 bp 处出现一条带，*Lm-ΔactAplcB-Rv3875*、*Li-ΔactAplcB-Rv3875* 在约 800 bp 处出现一条带(泳道 2~6)；Ery 抗性基因扩增结果：所有菌株均未在 1 200 bp 处出现特异性条带(泳道 7~11)；重组菌中特异性片段 *orfBaldh* 扩增结果：所有菌株均在约 1 000 bp 处出现一条带(泳道 12~16)；毒力基因 *actA* 扩增结果：*Lm-ΔactAplcB-Rv0129c*、*Lm-ΔactAplcB-Rv3875*、*Li-ΔactAplcB-*

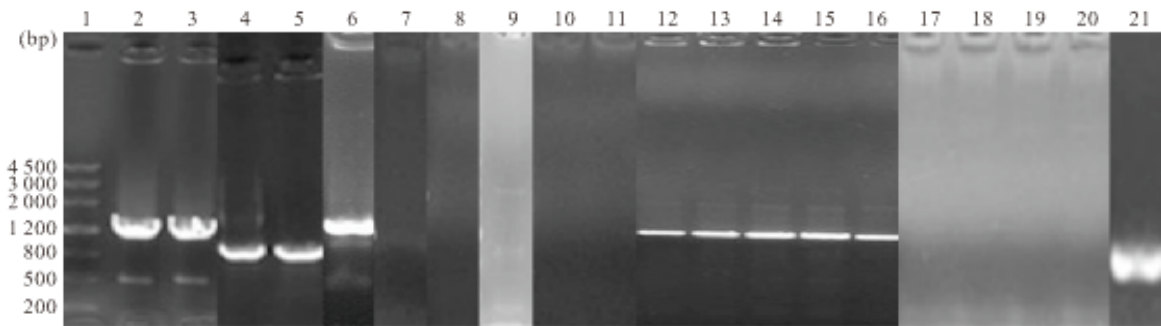


图 3 重组菌 PCR 筛选结果
Fig 3 PCR confirmation of recombinant strains
1: Makrer III; 2-6: PCR amplification about gene cassette of *Lm-ΔactAplcB-Rv0129c*, *Li-ΔactAplcB-Rv0129c*, *Lm-ΔactAplcB-Rv3875*, *Li-ΔactAplcB-Rv3875*, *Li-Rv0129c*; 7-11: PCR amplification about erythromycin resistance cassette of *Lm-ΔactAplcB-Rv0129c*, *Li-ΔactAplcB-Rv0129c*, *Lm-ΔactAplcB-Rv3875*, *Li-ΔactAplcB-Rv3875*, *Li-Rv0129c*; 12-16: PCR amplification about specific gene *orfBaldh* of *Lm-ΔactAplcB-Rv0129c*, *Li-ΔactAplcB-Rv0129c*, *Lm-ΔactAplcB-Rv3875*, *Li-ΔactAplcB-Rv3875*, *Li-Rv0129c*; 17-21: PCR amplification about virulent genes *actA* of *Lm-ΔactAplcB-Rv0129c*, *Li-ΔactAplcB-Rv0129c*, *Lm-ΔactAplcB-Rv3875*, *Li-ΔactAplcB-Rv3875*, *Li-Rv0129c*

Rv0129c 及 *Li-ΔactAplcB-Rv3875* 均未出现特异性条带，*Li-Rv0129c* 在约 600 bp 处出现一条带(泳道 17~21)。基因测序结果显示，重组菌与预期序列同源率达到 97% 以上。

2.3 靶抗原蛋白 Western blot 检测结果

提取重组菌分泌型和菌体蛋白进行 Western blot 检测，结果如图 4 所示，阳性质控对照 *Lm-OVA* 分泌型蛋白在相对分子质量约 35×10^3 处出现一条带(泳道 2)；重组菌 *Lm-ΔactAplcB-Rv0129c*、*Lm-ΔactAplcB-Rv3875* 均未在预期处 (43×10^3 、 19×10^3) 出现特异性条带(泳道 3~6)，重组菌 *Li-Rv0129c* 菌体蛋白及其分泌型蛋白在预期相对分子质量为 43×10^3 处出现特异性条带(泳道 7、8)；重组菌 *Li-ΔactAplcB-Rv0129c* 菌体蛋白及其分泌型蛋白在预期相对分子质量为 43×10^3 处出现

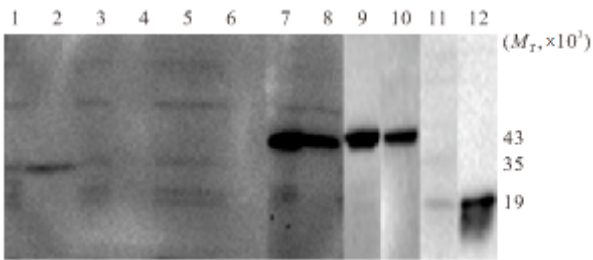


图 4 重组菌蛋白 Western blot 检测结果
Fig 4 Western blot detection of protein of recombinant strains
1: *Lm-OVA* thalli protein; 2: *Lm-OVA* secreted protein; 3: *Lm-ΔactAplcB-Rv0129c* thalli protein; 4: *Lm-ΔactAplcB-Rv0129c* secreted protein; 5: *Lm-ΔactAplcB-Rv3875* thalli protein; 6: *Lm-ΔactAplcB-Rv3875* secreted protein; 7: *Li-Rv0129c* thalli protein; 8: *Li-Rv0129c* secreted protein; 9: *Li-ΔactAplcB-Rv0129c* thalli protein; 10: *Li-ΔactAplcB-Rv0129c* secreted protein; 11: *Li-ΔactAplcB-Rv3875* thalli protein; 12: *Li-ΔactAplcB-Rv3875* secreted protein

特异性条带(泳道 9、10); 重组菌 *Li-ΔactAplcB-Rv3875* 菌体蛋白及其分泌型蛋白在预期相对分子质量为 19×10^3 处出现特异性条带(泳道 11、12)。

3 讨论

作为活菌疫苗载体, LM 具备以下优点^[4]: ① LM 减毒株作为疫苗载体相关的基因操作技术纯熟; ②操作较容易, 多个基因产物可通过质粒或染色体系统表达; ③对 LM 的遗传学和免疫学特性已有较为明确的认识; ④LM 的感染机制可导致抗原直接感染抗原提呈细胞(antigen presenting cells, APCs), 并在细胞内生长, 从而运送抗原到细胞质中。这些特性使得 LM 不仅可以运送抗原蛋白, 而且可以运送与编码抗原有关的 DNA 和 RNA^[5]。LM 还具有 T 细胞活化佐剂特性, 可通过激活 CD4⁺T、CD8⁺T 细胞而有效诱发完全细胞免疫。与其他常用于疫苗构建的革兰阴性菌相比, 不会过早地激活机体的免疫系统^[6]。目前, 重组 LM 作为疫苗载体已应用于表达流感病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、人类乳头瘤病毒 HPV-16 E7、人类免疫缺陷综合征病毒(HIV)抗原等^[7-9], 均能引发针对特异性抗原的细胞免疫, 并表现出较好的安全性。LI 具有跟 LM 极其相似的胞内增殖和胞间传播的繁殖特性、相似的基因组成, 同时, LI 具有低毒安全的优点^[10], 以 LI 为载体的疫苗虽尚未见报道, 但从生物学特征和基因特点上, 可以推论 LI 也可能是一种良好的疫苗载体, 且与 LM 相比安全性更高。

MTB 在早期即可释放分泌型蛋白, 这些蛋白主要存在于培养基中或感染细胞的吞噬小体中, 而在菌体自身内存在较少^[11]。Ag85C(*Rv0129c* 编码)是 MTB 主要的分泌蛋白——Ag85 的主要组成部分之一, 具有特异性的 T 细胞识别位点, 故而可以刺激效应 T 细胞、记忆 T 细胞产生^[12], 并引起 IL-2、GM-CSF 及 IFN- γ 等细胞因子水平的上升^[13]。ESAT-6(*Rv3875* 编码)在 MTB 感染早期即可被机体的免疫系统识别, 并诱导机体的特异性 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞增殖及 IFN- γ 释放, 在抗 MTB 感染的免疫反应中发挥重要作用^[14]。

本次研究得到的 *Lm-ΔactAplcB-Rv0129c*、*Lm-ΔactAplcB-Rv3875* 均经检测证实携带了外源 MTB 抗原基因, 但遗憾的是未检测到特异性蛋白的分泌表达; 而携带同样抗原基因盒的 *Li-Rv0129c*、*Li-ΔactAplcB-Rv0129c* 和 *Li-ΔactAplcB-Rv3875* 则表

达了特异性蛋白, 我们初步猜测是由于 LM、LI 基因组间的差异引起的, 同时, 也不排除 LM 减毒株在减毒过程中使基因组丢失了一些与蛋白翻译、表达相关的片段, 需要进一步研究。

本研究所选择的同源重组位点位于李斯特菌重要毒力基因簇——李斯特菌毒力岛 1 (*Listeria pathogenicity island 1*, *Li PI-1*)。Li PI-1 位于基因组管家基因 *prs* 和 *orfBAldh* 之间, 包含了致病性李斯特菌的重要致病基因(*prfA*、*plcA*、*hly*、*mpl*、*actA* 和 *plcB*)^[15]。编码李斯特菌溶血素的毒力基因 *hly* 位于 Li PI-1 的中央, *hly* 与其下游的卵磷脂酶操纵子朝同一方向转录翻译。卵磷脂酶操纵子中包含毒力基因 *mpl*、*actA* 和 *plcB*, 它们既可以被 *mpl* 启动子调控而转录为一条 5.7 knt 的长 mRNA 片段, 又可以被翻译为更短的转录产物: *actA-plcB-orfXYZ* 转录片段和 *mpl* 转录片段^[16]。卵磷脂酶操纵子下游为毒力岛外的 *orfB*、*orfA* 和 *orfBAldh* 基因, 这 3 个基因以相反的方向转录翻译^[17]。

本课题组构建的质粒 pCW304 与 pCW310 的差异就在于二者所携带的抗原基因盒 *Rv0129c* 的插入方向不同, 在 pCW304 中抗原基因盒的插入方向为 *orfBAldh*→*orfXYZ*, 而其在 pCW310 中的转录方向为 *orfXYZ*→*orfBAldh*, 故而是由其同源重组所得到的重组菌中, 抗原基因盒的插入方向也是相反的, 导致了相反的基因转录方向。在 Western blot 分析中, 并未检测到由 pCW304 同源重组得到的重组菌(由本课题组其他成员构建, 本文中未提及构建过程及结果)分泌的特异性蛋白, 而由 pCW310 同源重组得到的重组菌 *Li-Rv0129c* 检测到了特异性蛋白的分泌。由此可推测, 外源基因盒的转录方向对其蛋白的翻译表达具有影响。

Li PI-1 毒力岛中基因的表达受到一个重要的正向调控因子(positive regulating factor A, PrfA)的影响。PrfA 被认为属于细菌转录因子 Crp/Fnr 家族, 通过与毒力基因启动子上特定的序列识别, 形成“靶基因启动子-PrfA-RNA 聚合酶”复合物来上调靶基因表达^[18]。靶基因启动子上的与 PrfA 识别结合的序列称为“PrfA 盒”, 是位于转录起点-41 bp 处长 14 bp 的回文序列。经过序列分析发现, *mpl* 同源序列的末端含有一个“PrfA 盒”, 而 *orfBAldh* 的末端并不具有。因此, 该“PrfA 盒”可能对抗原基因的表达具有正向调控作用。由此便可解释, 同样的载体菌, 通过 pCW304 同源重组得到的重组菌无法检测到特异性蛋白的分泌, 而由

pCW310 同源重组得到的重组菌就可以检测到相应蛋白的表达分泌。

本研究成功构建了 3 株以 LI 为活菌载体分泌表达 MTB 保护性抗原的结核疫苗候选株 *Li-Rv0129c*、*Li-ΔactAplcB-Rv0129c* 和 *Li-ΔactAplcB-Rv3875*, 后续研究将会对以上 3 株结核疫苗候选株的安全性、免疫效果进行评价, 并对免疫方案进行优化, 以进一步验证其保护效力。

参 考 文 献

- [1] FATTORINI L. Strategies for the development of new tuberculosis vaccines. *Minerva Med*, 2007, 98(2): 109-119.
- [2] 段斐斐, 殷月兰, 康美琴, 等. 单核细胞增生性李斯特菌作为肿瘤疫苗运送载体的研究进展. *中国人兽共患病学报*, 2014, 30(7): 743-746.
- [3] 徐宗凯, 林青青, 周梦莹, 等. 三种李斯特菌菌体蛋白提取方法的比较. *生命科学研究*, 2015, 19(1): 29-33.
- [4] 周 云, 潘 蕾, 郝春秋, 等. 单增李斯特菌作为疫苗载体的研究进展. *中国免疫学杂志*, 2011, 27(12): 1132-1134.
- [5] LOEFFLER DIM, SCHOEN CU, GOEBEL W, *et al*. Comparison of different live vaccine strategies *in vivo* for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*, 2006, 74(7): 3946-3957.
- [6] VASSAUX G, NITCHEU J, JEZZARD S, *et al*. Bacterial gene therapy strategies. *J Pathol*, 2006, 208(2): 290-298.
- [7] BRUHN KW, CRAFT N, MILLER JF. *Listeria* as a vaccine vector. *Microb Infect*, 2007, 9(10): 1226-1235.
- [8] GUNN GR, ZUBAIR A, PETERS C, *et al*. Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J Immun*, 2001, 167(11): 6471-6479.
- [9] LIEBERMAN J, FRANKEL FR. Engineered *Listeria monocytogenes* as an AIDS vaccine. *Vaccine*, 2002, 20(15): 2007-2010.
- [10] FREHEL C, LETY MA, AUTRET N, *et al*. Capacity of ivanolsin O to replace listeriolysin O in phagosomal escape and *in vivo* survival of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology*, 2003, 149(3): 611-620.
- [11] 满昌军, 董香玉, 王 啸, 等. 结核分枝杆菌分泌性抗原 Ag85 与 ESAT-6 在肾结核感染诊断中的应用分析. *中华医院感染学杂志*, 2014, 24(18): 4660-4662.
- [12] HALDAR S, BOSE M, CHAKRABARTI P, *et al*. Improved laboratory diagnosis of tuberculosis—the Indian experience. *Tuberculosis*, 2011, 91(5): 414-426.
- [13] 袁 伟, 董 娜, 张丽芳, 等. 小鼠对结核分枝杆菌 Ag85B-Esat6-HspX 融合基因的免疫反应. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(6): 47-51.
- [14] 范 琴, 鲍 朗. 结核疫苗优势抗原 ESAT6/CFP10 的分子生物学基础及应用研究进展. *生物医学工程学杂志*, 2012, 29(2): 392-396.
- [15] VÁZQUEZ-BOLAND JA, DOMÍNGUEZ-BERNAL G, GONZÁLEZ-ZORN B, *et al*. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. *Micro Infect*, 2001, 3(7): 571-584.
- [16] VEGA Y, RAUCH M, BANFIELD MJ, *et al*. New *Listeria monocytogenes* prfA * mutants, transcriptional properties of PrfA * proteins and structure-function of the virulence regulator PrfA. *Mol Microbiol*, 2004, 52(6): 1553-1565.
- [17] SCHMID MW, NG EYW, LAMPIDIS R, *et al*. Evolutionary history of the genus *Listeria* and its virulence genes. *Syst Appl Microbiol*, 2005, 28(1): 1-18.
- [18] DE LAS HERAS A, CAIN RJ, BIELECKA MK, *et al*. Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Curr Opin Microbiol*, 2011, 14(2): 118-127.

(2015-11-12 收稿, 2016-02-22 修回)

编辑 余 琳