

# 玉米特异启动子驱动下结核 Hsp65 与 Esat-6 融合基因表达载体的构建及鉴定

李君武,王珊珊,宋 东,刘 艳,黄清华

(暨南大学 医学院,微生物与免疫学教研室,广东 广州 510632)

**摘要:**利用转基因玉米研制新型结核口服疫苗。构建植物双元表达质粒 pCambia1300GHLE,并转化农杆菌 LBA4404。以本实验室构建的 pEGHLE 为模板经聚合酶链反应(PCR)扩增出 Hsp65-Esat6 基因,连接到含有玉米特异性启动子 globulin-1 的 pCR2.1 载体上;将 globulin-1-HLE 联合片断切下连到含有抗除草剂基因 bar 的 pCambia1300 载体中;电击法将重组质粒转化到农杆菌 LBA4404 中。成功构建了 pC1300GHLE 质粒,酶切鉴定得到 3.3 kb 和 8.6 kb 2 条带,测序分析表明克隆的 Hsp65 和 Esat6 序列与 NCBI 上公布序列一致;成功转化到农杆菌中,酶切从农杆菌中所提的质粒,条带大小与预期结果相符合。成功构建和转化了 pC1300GHLE 表达载体,为成功研制利用转基因植物生产抗结核口服疫苗奠定了基础。

**关键词:**结核分支杆菌;热休克蛋白 65;Esat-6;globulin-1

**中图分类号:**Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2009)03-0028-04

## Construction of Vector for Expression of Hsp65 and Esat-6 Genes Driven by a Maize Endosperm-specific Promoter

LI Jun-wu, WANG Shan-shan, SONG Dong, LIU Yan, HUANG Qing-hua

(Department of Microbiology and Immunology, Medical College  
of Jinan University, Guangzhou 510632, China)

**Abstract:** To construct the plant expression plasmid containing *Mycobacterium tuberculosis* Hsp65 and Esat-6 genes, and transform the recombined vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The fusion DNA fragment of Hsp65 and Esat-6 were amplified from pEGHLE by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into the vector pCRG. The combined fragment of promoter globulin-1 and the target gene HLE which get from double enzymes digestion of the recombined plasmid pCRGHLE was inserted into the plant expression vector pCambia1300 which contains the gene bar for herbicide resistance. The recombinant plasmid was analyzed by restriction enzyme digestion and the inserted target genes in the pC1300GHLE were verified by nucleotide sequencing. Then transformed pC1300GHLE vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by electroporation. The binary expression plasmid, which could express HSP65 and ESAT-6, was correctly constructed. The recombinant vector containing *Mycobacterium tuberculosis* Hsp65 and Esat-6 genes is constructed successfully and transformed into LBA4404, and lays a foundation for further study on its immunity effectiveness against MTB.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*; Hsp65; Esat-6; globulin-1

结核杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb) 是一种专性胞内寄生菌。机体抗结核杆菌的感染是以 T 细胞介导的细胞免疫为主。因此能否有效地激发机体的 T 细胞,尤其是 CD4<sup>+</sup> Th1 细胞的免疫反应,是

疫苗研制的关键所在。BCG 是世界上使用最广泛的疫苗,也是目前唯一在人体上使用的抗结核疫苗,但其保护效果不稳定(保护率为 0~80%)<sup>[1]</sup>。因此发展一种保护作用优于 BCG 的结核病新型防治疫

收稿日期:2009-02-28

基金项目:广东省科技计划重大专项(2006A20101006);广东省科技计划重点项目(2004B31201019)

作者简介:李君武(1949-),男,湖北武汉人,教授,博士,主要从事感染免疫及分子、细胞免疫方面研究。

通讯作者:王珊珊(1984-),女,安徽阜阳人,硕士,主要从事细胞分子免疫等研究。

苗就成了各国科研工作者们的重要任务之一。近年来,对结核研究最多的抗原主要有 *Hsp65*、*Esat6*、*Ag85B* 和 *MPT64* 等<sup>[2-4]</sup>。

结核杆菌热休克蛋白 65 kDa 基因(Heat shock protein 65 kDa, *Hsp65*)属于 *Hsp70* 家族,有很强的免疫原性<sup>[5]</sup>,能诱导和增强机体的体液免疫和细胞免疫的发生,并可激活 T 细胞,分泌高水平的 IFN- $\gamma$  和杀伤感染的细胞,是人体感染结核杆菌以后免疫系统的主要靶抗原,是 T 细胞攻击的主要对象<sup>[6-8]</sup>;来源于结核分支杆菌的 *Esat6* 是相对分子质量为 6 kDa 的早期分泌性抗原靶(6 kDa Early secretory antigenic target),由结核分支杆菌 RD1 区 Y277 片段编码,全长 288 bp,编码 95 个氨基酸,是一种非常重要的 T 细胞免疫原。*Esat-6* 在机体产生保护性免疫应答中,通过活化巨噬细胞、树突状细胞、肥大细胞等释放炎症递质肿瘤坏死因子和组胺等;并参与诱导树突状细胞分化、成熟并促进干扰素介导的 *Esat-6* 特异性 Th1 细胞产生的过程。虽然 *Hsp65* 抗原和 *Esat6* 分别在感染免疫中的作用已经被研究证实有效<sup>[9,10]</sup>,但对 *Esat6* 协同 *Hsp65* 抗原在结核杆菌感染中的免疫应答特点和保护力尚不清楚<sup>[11]</sup>。我们将两者同时克隆到同一载体上,构建含结核杆菌 *Hsp65* 和 *Esat6* 的融合质粒,以期融合 *Hsp65* 和 *Esat6* 口服疫苗能比其中一种口服疫苗单独的免疫效果强。

## 1 材料和方法

### 1.1 质粒与菌株

质粒 pEGFPHsp65-*Esat6*、大肠杆菌 Top10 为本实验室保存;中间载体 pCR2.1-globulin1,植物表达载体 pCambia1300bar-nos 由广东省农业科学院提供。

### 1.2 主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶,  $T_4$  DNA 连接酶,限制性内切酶 *Bgl* II, *Bam*HI, *Xba* I, *Hind* III, DL-1 kb Ladder 购自大连宝生物公司;OMEGA PCR 产物清洁试剂盒,OMEGA 质粒提取试剂盒,OMEGA DNA 胶回收纯化试剂盒购自广州瑞扬生物科技有限公司;PCR 引物合成由上海生工生物工程公司完成;重组质粒上目的基因的序列测定由广州拓谱公司完成。

### 1.3 引物设计

根据发表的人结核分支杆菌 H37Rv 株 *Hsp65* 和 *Esat6* 基因的 CDS 序列设计融合基因 *Hsp65*-linker-*Esat6* 的 1 对引物,上游引物序列为: P1 5'-TT A-GATCT GCAATGCCAAGACAATTG-3',含 *Bgl* II 酶切位点和起始密码子 ATG;下游引物序列为 P2 5'-GC

TCTAGA CTATGCCAACATCCCAATG-3',含 *Xba* 酶切位点和终止密码子 CTA。

### 1.4 重组质粒 pCRGHsp65-*Esat6* 的构建

以质粒 pEGFPHsp65-*Esat6* 为模板,用引物 P1, P2 进行 PCR 扩增 *Hsp65*-linker-*Esat6*,反应体系为 50  $\mu$ L,其中上下游引物各 1  $\mu$ L, dNTP 4  $\mu$ L,模板 DNA 1  $\mu$ L, 10  $\times$  Ex Taq Buffer 5  $\mu$ L, Ex Taq 0.3  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 37.7  $\mu$ L,反应条件为 95 预变性 5 min, 95 30 s, 56 50 s, 72 90 s,共 40 个循环,72 再延伸 10 min。同时用 *Bgl* I 内切酶和 *Xba* I 内切酶对 PCR 纯化产物及质粒 pCRG 进行双酶切,酶切产物再进行回收纯化并按一定比例用  $T_4$  连接酶进行连接反应,16 连接过夜。连接产物转化低温  $CaCl_2$  制备的 *E. coli* 感受态细胞 Top10,涂布于含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素及 50  $\mu$ g/mL 四环素的 LB 平板中,次日挑出数个单菌落,分别接种于 3 mL 含卡那霉素和四环素的 LB 培养液中,37 下 150 r/min 振荡培养过夜,先取少量菌液煮沸作为模板进行菌落 PCR 检测是否有 HLE 的存在,将菌落 PCR 筛选呈阳性的菌落用质粒提取试剂盒抽提质粒 DNA。将提取的质粒 DNA 用 *Bam*HI 和 *Xba* I 双酶切鉴定,以 DL-1 kb marker 为分子量参照,将筛选出的阳性克隆产物的菌液进行测序鉴定。

### 1.5 重组质粒 pCambia1300 GHLE 的构建

将已测序正确的菌落 37 过夜培养后提取质粒,用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切并回收纯化得到的 3.4 kb 的 globulin-*Hsp65*-*Esat6* 片断。同时提取含有 bar 和 nos 基因的 pCambia1300 质粒,用 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切,进行琼脂糖凝胶电泳分离和 DNA 凝胶回收纯化。回收的产物按一定比例用  $T_4$  连接酶进行连接反应,16 连接过夜。连接产物转化低温  $CaCl_2$  制备的 *E. coli* 感受态细胞 Top10,涂布于含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素及 50  $\mu$ g/mL 四环素的 LB 平板中。挑取单菌落于 LB 液体培养液中 37 过夜培养。提取质粒后进行单酶切鉴定,取比非重组质粒大的重组质粒再进行双酶切鉴定,最终得到 12 kb 的正确克隆的重组子。送广州拓谱生物有限公司完成测序。

### 1.6 转化农杆菌 LBA4404

首先制备农杆菌的电激感受态,方法参照卢圣栋《现代分子生物学实验技术》。取一管感受态细胞于冰上融化,加入 2  $\mu$ L 约 50 ng 的 pCambia1300GHLE 质粒混匀,将样品放入已于冰上预冷的 0.1 cm 宽的电极杯中,电压 1.8 kV,电容 25  $\mu$ FD,电阻 200  $\Omega$ ,电击 5 ms。加入 600  $\mu$ L YEB 培养基,轻轻

吹洗电极杯,将电击后的样品一并移入 1.5 mL EP 管中 28 220 r/min 培养 4 h 后铺于含有卡那霉素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 和链霉素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 YEB 平板上,28 培养 2~3 d。挑取单菌落于 YEB 液体培养液中 28 过夜

培养。提取质粒后进行双酶切鉴定,最终确定重组质粒 pCambia1300GHLE 转入到了 LBA4404 中。

1.7 构建流程图(图 1)

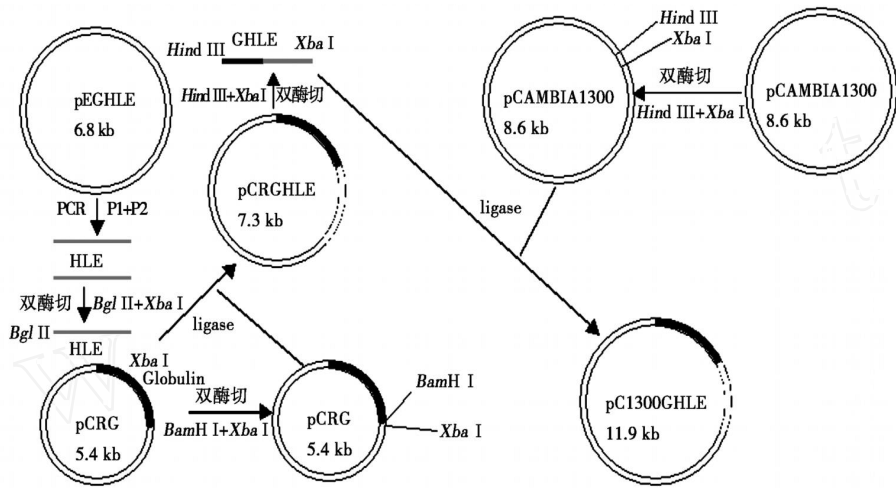
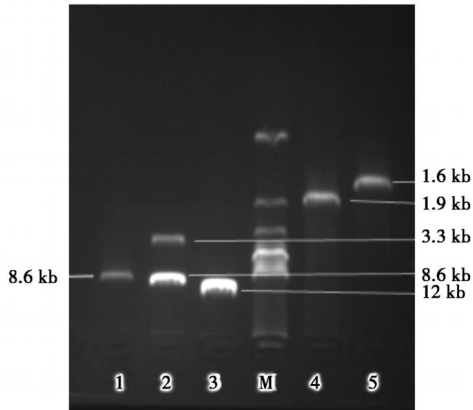


图 1 pC1300 GHLE 构建流程图  
Fig.1 Construction of pC1300 GHLE

2 结果与分析

2.1 Hsp65- Esat6 基因 PCR 扩增产物电泳分析

琼脂糖凝胶电泳结果显示,PCR 产物为 1.9 kb 的特异性片段,与预期 Hsp65- Esat6 基因大小相符。如图 2 所示。



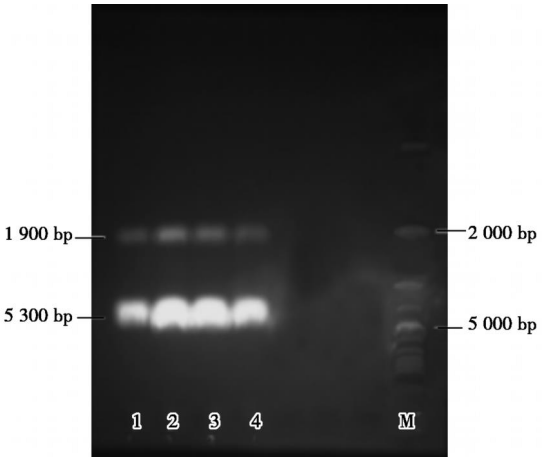
1. pC1300 单酶切;2. pC1300GHLE 经 Hind 和 Xba 双酶切;3. pC1300GHLE 质粒;4. PCRHLE;5. PCRHSP65;M. 1 kb Ladder marker。  
1. pC1300 single digest;2. pC1300GHLE digested by Hind and Xba ;3. Plasmid pC1300GHLE;4. PCRHLE;5. PCRASP65;M. 1 kb Ladder marker.

图 2 Hsp65- Esat6 基因 PCR 扩增产物  
电泳分析及 pC1300 GHLE 的双酶鉴定

Fig.2 Electrophoretic file of PCR product of Hsp65- Esat6  
and restriction map of recombinant plasmid pC1300 GHLE

2.2 重组质粒 pCRGHLE 限制性内切酶消化鉴定

质粒 pCRGHLE 经 BamH 和 Xba 双酶切后,电泳可见大小约为 1.9 kb 和 5.3 kb 的两条带,大小相符(图 3)。



1~4. pCRGHLE 经 Hind 和 Xba 双酶切;M. 1 kb Ladder marker。  
1 - 4. pCRGHLE digested by Hind and Xba ;M. 1 kb Ladder marker.

图 3 pCRGHLE 的双酶切鉴定

Fig.3 Restriction map of recombinant plasmid pCRGHLE

2.3 重组质粒 pC1300 GHLE 限制性内切酶消化鉴定

质粒 pC1300GHLE 经 Hind 和 Xba 双酶切后,与非重组子 pC1300 单酶切结果进行电泳对比分析,得到 3.3 kb 和 8.6 kb 两条特异性条带,大小相符。如图 2 所示。

2.4 序列分析鉴定

对质粒 pCRGHLE 的启动子 globulin 后的 DNA 序列进行序列分析鉴定,结果与结核分支杆菌 H37Rv 株的 Hsp65 的基因序列一致 (NCBI 登陆号: M15467)。对质粒 pC1300GHLE 的终止子 nos 前的 DNA 序列进行序列分析鉴定,结果与 Esat6 的基因序列一致 (NCBI 登陆号: AF420491)。

### 3 讨论

转基因植物疫苗是当今疫苗研制的热点之一。至今利用转基因植物表达的疫苗和功能蛋白已达 100 种以上,烟草、马铃薯、大豆、香蕉、莴苣、羽扇豆等作为生物反应器生产的口服疫苗可口服接种,免除了打针带来的经济负担和疼痛<sup>[12]</sup>,得到了人们的广泛关注,国内外对此进行了大量的研究工作,并取得了一定的成果<sup>[13]</sup>。玉米等禾谷类作物种子中蛋白质含量高,储存时间较长而不降解,干种子方便储藏和运输,是特别合适的疫苗载体<sup>[14]</sup>。

本研究具有以下特点: 选用优势抗原的科学性, *Hsp65* 可以为抗结核杆菌感染提供稳定和可靠的基础免疫保护力;而 *Esat-6* 又是结核杆菌在反复传代制备 BCG 过程中缺失的抗原,可能是导致 BCG 免疫效果不稳定的原因之一;故而将选择这两种抗原进行共同免疫以期获得更强的免疫效果。将玉米胚乳特异性表达的启动子 *globulin-1* 基因与所选的两个优势抗原一起构建到植物二元表达载体 pCAMBIA1300 中,以期通过农杆菌的诱导,转入玉米基因组中诱导外源基因的大量表达。在载体构建的过程中,由于插入的 *globulin-1* 基因已消除了原始质粒 pCR2.1 的大多数酶切位点,表达载体 pCAMBIA1300 也已被改造插入了 *nos* 基因和 *bar* 基因,其 MCS 的大部分位点亦被消除,而且目的基因 *hsp65-Esat6* 上存有多个酶切位点,针对这种情况,我们在设计实验方案的过程中巧妙地利用了同尾酶 *Bam*H I 和 *Bgl* II。 *Hsp65* 和 *Esat6* 之间的 Linker 编码一段疏水性多肽,其具有良好的柔顺性和折叠性,有利于翻译成融合蛋白时两蛋白之间的空间折叠,使融合蛋白保持与两个天然蛋白空间构象的一致性,从而形成正确的构型而提高它们的免疫原性。本试验所选用的植物表达载体 pCAMBIA1300 是经过基因加工修饰的,以乙酰转移酶基因 *bar* 取代了大约 1 kb 的潮霉素 *Hygromycin* 基因,用于筛选重组玉米植株的选择标记基因。下一步可将目的抗原基因通过根癌农杆菌的介导作用导入到玉米染色体基因组中,培养筛选玉米愈伤组织,获得转基因植株。

### 参考文献:

- [1] Mustaeaa S. Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis [J]. *Molecular Immunology*, 2002, 39: 113 - 119.
- [2] Lowrie D B, Tascon R E, Bonatovl D, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination [J]. *Nature*, 1999, 400: 269 - 271.
- [3] 师长宏, 范雄林, 柏银兰, 等. 结核分枝杆菌 Ag85B-ESAT6 融合蛋白在小鼠体内诱导的免疫应答及其保护力 [J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25 (18): 1633 - 1636.
- [4] 师长宏, 安家泽, 唐小凤, 等. 结核分枝杆菌 MPT64-ESAT6 融合蛋白在小鼠内诱导的免疫应答及其保护力 [J]. *第四军医大学学报*, 2006, 27 (9): 769 - 771.
- [5] Paton D J, Valarcher J F, Bergmann I, et al. Selection of foot and mouth disease vaccine strains—a review [J]. *Rev Sci Tech*, 2005, 24.
- [6] Kaufmann S H E. Heat shock proteins and the immune response [J]. *Immunol Today*, 1990, 11 (1): 129 - 136.
- [7] Johansen P, Raynaud C, Yang M, et al. Anti-mycobacterial immunity induced by a single injection of *M. leprae* HSP65-encoding plasmid DNA in biodegradable microparticles [J]. *Immunol Lett*, 2003, 90 (2 - 3): 81 - 85.
- [8] Trajkovic V, Natarajan K, Sharma P. Immunomodulatory action of mycobacterial secretory proteins [J]. *Microbes Infect* 2004, 6 (5): 513 - 519.
- [9] Lowrie D B, Tascon R E, Colston M J, et al. Towards a DNA vaccine against tuberculosis [J]. *Vaccine*, 1994, 12: 1537 - 1540.
- [10] Ravn P, Demissie A, Egale T, et al. Human T cell response to the ESAT-6 antigen from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *J Infect Dis*, 1999, 179: 637 - 645.
- [11] Hongxun S, Vladimir M P, Corey M, et al. Regional, but not systemic recruitment, expansion of dendritic cells by a pluronic-formulated Flt3-ligand plasmid with vaccine adjuvant activity [J]. *Vaccine*, 2003, 21 (26): 3019 - 3020.
- [12] 李林, 佳飞. 转基因植物口服疫苗的免疫机制研究进展 [J]. *国外医学免疫学分册*, 2004, 27 (6): 354 - 357.
- [13] 郝浩永, 尉亚辉. 转基因番茄表达口服乙肝疫苗 [J]. *食品科学*, 2007, 28 (6): 201 - 204.
- [14] 陈珍, 陈文莉. 转基因植物口服疫苗研究的新进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22 (6): 831 - 833.