

携带结核杆菌 Ag85B 基因的植物表达载体的构建及鉴定

李君武, 刘 艳, 黄清华, 叶秋萍

(暨南大学 医学院, 微生物与免疫教研室, 广东 广州 510632)

摘要: 构建包含结核杆菌 Ag85B 基因的植物表达载体, 并转化农杆菌 LBA4404。以 *pdNA3-Ag85B* 为模板, 通过常规 PCR 克隆出 Ag85B 基因, 定向克隆至含有玉米特异性启动子 *globulin-1* 的 *pCR2.1* 载体上, 然后将 *globulin-1-Ag85B* 的融合片段酶切下来, 并连接到经过加工修饰的含有抗除草剂基因 *bar* 的双元表达载体 *pCambia1300* 上, 将重组质粒转化至农杆菌 LBA4404 中。重组质粒双酶切可见 0.8 bp 和 10 kb 的两条特异性条带, 与预期大小相一致。重组质粒测序表明克隆的 Ag85B 基因序列与 Genbank 上相一致, 酶切从农杆菌中所抽提的质粒, 片段大小与预期相一致。成功构建与转化了携带结核 Ag85B 基因的植物双元表达载体, 为利用植物反应器生产口服结核疫苗奠定基础。

关键词: 结核分枝杆菌; Ag85B 基因; *globulin-1*

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)02-0001-04

Construction and Identification of the Expression Plasmid Containing Ag85B Gene of *Mycobacterium tuberculosis*

LI Jun-wu, LIU Yan, HUANG Qing-hua, YE Qiu-ping

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

Abstract: To construct the plant expression plasmid containing *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B genes, and transform the recombinant plasmid into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. We used *pdNA3-Ag85B* as template to amplify Ag85B gene by polymerase chain reaction (PCR), and cloned Ag85B gene into the vector *pCR2.1*. The fusion fragment of promoter *globulin-1* and the target gene Ag85B which get from double enzymes digestion of the recombinant plasmid *pCRGA85B* was inserted into the plasmid *pCambia1300* which contains the *bar* gene for herbicide resistance, transformed recombinant plasmid *pCAMGA85B* into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Restriction enzyme digestion demonstrated that the inserted gene fragments were 0.8 bp, DNA sequence analyzing revealed that the Ag85B gene sequences were totally consistent with the GenBank reported. We have successfully constructed expression plasmid containing Ag85B gene and transformed it into LBA4404, and lays a foundation for further study a better vaccine against MTB.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; Ag85B; *globulin-1*

结核病 (Tuberculosis, TB) 是成人中发病率和致死率最高的慢性传染性疾病之一, 由结核分枝杆菌引起, 2006 年以来全世界每年大约有 900 万新发病例, 每年约有 300 万人死于此病。卡介苗对于防治结核病发挥了巨大作用, 但其保护效果不稳定, 对人群的保护效果介于 0~80%^[1,2], 在应用过程中亦出现一些副作用。因而人们希望研制一种新型长效多价、安全、廉价的结核疫苗。

Ag85B 是结核分枝杆菌的主要的早期培养物滤液蛋白之一, 是目前确认的结核杆菌蛋白中能诱发保护性免疫的一类蛋白。Ag85B 能诱导较高水平的特异性抗体应答和特异性 Th1 型细胞免疫应答^[3,4], 有特异性 T 细胞识别位点, 可刺激记忆 T 细胞的产生, 可促进细胞因子分泌和提高 CTL 活性^[5]。此外, Ag85B 蛋白容易结合人纤维蛋白, 促进吞噬细胞吞噬结核杆菌, 有较强的防止结核杆菌

收稿日期: 2010-01-20

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引导项目 (2004B31201019)

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

再感染作用^[6]。研究表明,含 *Ag85B* 基因的疫苗可增强卡介苗的免疫效果^[7],亦或可以诱导更强的 CTL 活性^[8]。因而,*Ag85B* 可以作为结核疫苗的重要的候选抗原。

本研究成功构建了包含结核分枝杆菌 *Ag85B* 基因的植物表达载体 *pCAMG-Ag85B*,重组质粒中由于含有玉米种子特异性启动子 *globulin-1*,大大提高了目的基因在玉米中的表达。将该植物表达载体转入到可将外源基因导入植物愈伤组织的根癌农杆菌 LBA4404 中,为下一步利用植物反应器生产口服抗结核疫苗奠定了物质基础。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌株

大肠杆菌 Top10、农杆菌 LBA4404、质粒 *pDNA3-Ag85B* (含有编码 MTB-*Ag85B* 蛋白的 CDS 的重组质粒);中间载体 *pCR2.1-globulin-1*,植物表达载体 *pCAMB A1300bar-nos*等均由本教研室保存。

1.2 主要试剂

Ex Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶,限制性内切酶 *Bam*H I *Xba*, *Hind*, 1 kb DNA Ladder marker, 150 bp DNA ladder marker 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。

1.3 引物的设计

根据 Genbank 公布的 MTB-*Ag85B* 序列 (GI 6469794),借助 Primer Premier 5.0 软件设计引物 P1 和 P2 扩增 MTB-*Ag85B* 基因,上游引物序列为: P1 5'-T T A T C G G G A T C C A T G G G A G G T T G G I C T T C-3',含 *Bam*H I 酶切位点和起始密码子 ATG;下游引物序列为: P2 5'-C G C G C T I C T A G A T C A A A T G T A T A C C C A A A G-3'含 *Xba* 酶切位点和终止密码子。

1.4 中间载体 *pCRG-Ag85B* 的构建

以质粒 *pDNA3-Ag85B* 作为模板,用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增,反应体系为 50 μ L,其中上下游引物各 1 μ L,模板 DNA 1 μ L, 10 \times *Ex-Taq* Buffer (含 Mg^{2+}) 5 μ L, dNTP 4 μ L, *Ex-Taq* 酶 0.25 μ L, ddH₂O 37.75 μ L。反应条件为 94 预变性 5 min, 94 45 s, 52 45 s, 72 1 min,共 30 个循环,72 再延伸 10 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离,PCR 回收试剂盒回收产物。用 *Bam*H I 和 *Xba* 分别对 PCR 产物与载体 *pCRG* 进行双酶切,酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,并经过 DNA 凝胶回收纯化试剂盒回收酶切产物,将两者酶切纯化的

产物按照 3:1 的摩尔比混合,用 T4DNA 连接酶连接过夜,连接产物转化低温 $CaCl_2$ 制备的 *E. coli* Top10 感受态中,然后涂布于含 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 平板。次日,随机挑取多个单菌落,分别接种于 3 mL 含氨苄青霉素的 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 下 130 r/min 振荡培养过夜。先取少量菌液煮沸作为模板进行菌液 PCR 检测是否有 *Ag85B* 的存在,再将菌液 PCR 筛选呈阳性的菌液用质粒小量提取试剂盒抽提质粒 DNA。将提取的质粒 DNA 进行双酶切鉴定,将筛选出的阳性克隆产物的菌液进行测序鉴定。测序采用 Sanger 双脱氧链终止法,对插入序列的两端进行测定,测序工作由上海生物工程有限公司完成。

1.5 重组载体 *pCAMG-Ag85B* 的构建

将测序正确的重组质粒 *pCRG-Ag85B* 用 *Hind* 和 *Xba* 双酶切,经过琼脂糖电泳分离 *globulin-1-Ag85B* 片段,同时用 *Hind* 和 *Xba* 双酶切植物表达载体 *pCAMB A1300*,用胶回收试剂盒纯化回收两酶切产物,并以片段与载体 3:1 的摩尔比混合,用 T4DNA 连接酶连接过夜。转化至低温 $CaCl_2$ 制备的 *E. coli* Top10 感受态中,然后涂布含 50 μ g/mL 卡那霉素的平板中。次日,随机挑取单菌落接种于 LB 培养液中,37 $^{\circ}$ C 下振荡培养过夜。首先进行菌液 PCR 鉴定,之后抽提质粒 DNA,进行双酶切鉴定,获得重组载体 *pCAMG-Ag85B*,测序工作由上海生物工程有限公司完成。

1.6 转化农杆菌 LBA4404

预先制备农杆菌 LBA4404 感受态,储存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。取 200 μ L 感受态细胞,冰上放置 30 min;将 1 μ g DNA 加入感受态细胞中,液氮中速冻 5 min 以上;37 $^{\circ}$ C 水浴快速解冻,小于 5 min;加入 800 μ L LB 培养基;28 $^{\circ}$ C 摇床低速培养 3 h;取 200 μ L 涂布于含 50 μ g/mL 卡那霉素的平板,28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 2~3 d。经菌落 PCR 验证,挑选阳性克隆子摇菌,提取质粒后进行双酶切鉴定,最终确定重组质粒 *pCAMG-Ag85B* 转入到了 LBA4404 中,-80 $^{\circ}$ C 保存菌株。

1.7 构建流程图(图 1)

2 结果与分析

2.1 *Ag85B* 基因扩增产物电泳分析

以质粒 *pDNA3-Ag85B* 作为模板,分别用引物 P1 和 P2 进行 PCR,产物进行琼脂糖凝胶电泳,产物片段大小与预期结果相符,大小约为 0.8 kb,如图 2 所示。

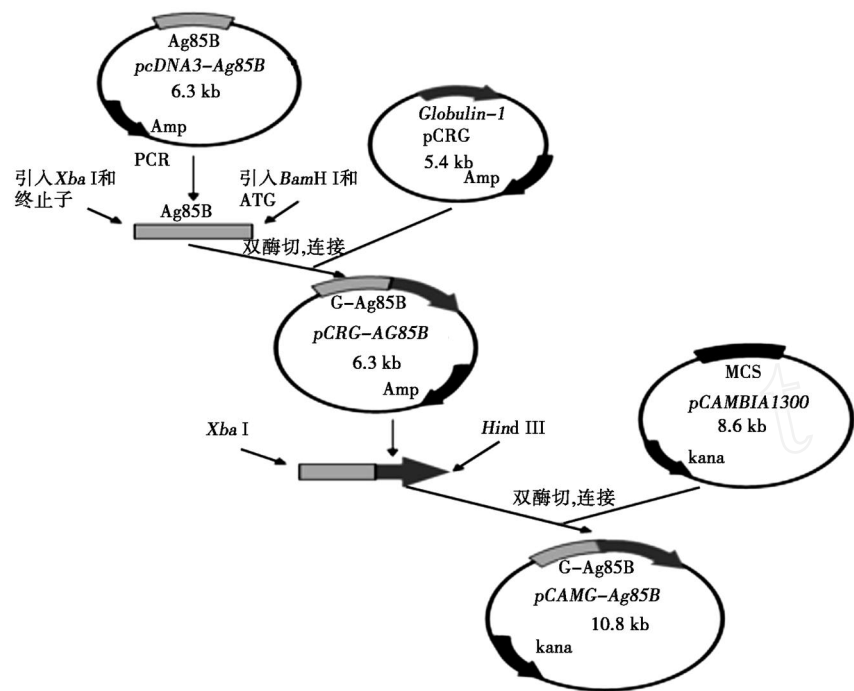


图 1 pCAM G-Ag85B 构建流程图

Fig 1 Construction of pCAM G-Ag85B

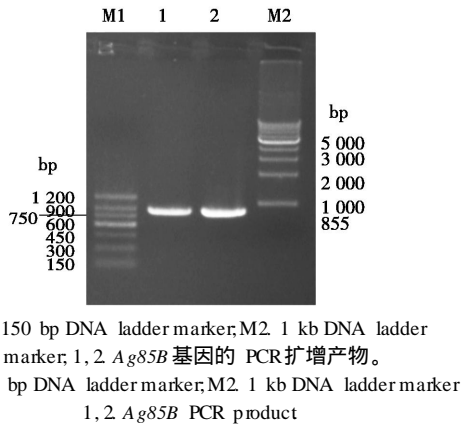


图 2 M TB -Ag85B 的 PCR产物

Fig 2 Electrophoretic file of PCR product of M TB -Ag85

2 2 双酶切鉴定

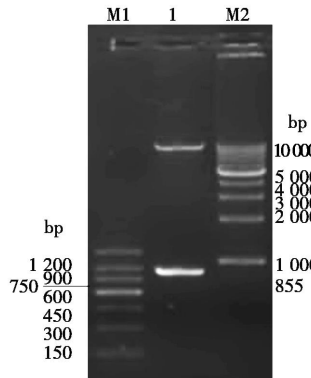
提取植物表达载体重组质粒 *pCAM G-Ag85B* ,用 *Bam*H 和 *Xba* 双酶切后 ,经 1%琼脂糖凝胶电泳分离 ,结果显示得到约 0.8 bp 特异性条带 ,与预期 *Ag85B* 片段大小相符 (图 3)。

2 3 序列分析鉴定

对 *pCRG-Ag85B* 和 *pCAM G-Ag85B* 两个重组质粒的启动子 *globulin-1*后的 DNA 序列进行序列分析鉴定 ,结果与结核分支杆菌 *Ag85B* 基因 CDS 序列完全相同 (NCBI 登陆号 : 6469794)。

2 4 含有表达载体的农杆菌检测

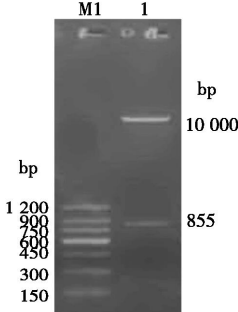
在农杆菌 LBA4404 中提取重组质粒 *pCAM G-Ag85B* ,用 *Bam*H 和 *Xba* 双酶切后 ,进行 1%琼脂糖凝胶电泳。结果显示 ,得到约 0.85 bp 特异性条带 ,与预期 *Ag85B* 基因片段大小相符 (图 4)。



M1. 150 bp DNA ladder marker;M2. 1 kb DNA ladder marker;
1. *pCAM G-Ag85B* 经 *Bam*H 和 *Xba* 双酶切。
M1. 150 bp DNA ladder marker;M2. 1 kb DNA ladder marker;
1. *pCAM G-Ag85B* /*Bam*H + *Xba* .

图 3 重组质粒 pCAM G-Ag85B 双酶切鉴定

Fig 3 Restriction map of recombinant plasmid pCAM G-Ag85B



M1. 150 bp DNA ladder marker;
1. *pCAM G-Ag85B* 经 *Bam*H 和 *Xba* 双酶切;
M1. 150 bp DNA ladder marker;
1. *pCAM G-Ag85B* /*Bam*H + *Xba* .

图 4 农杆菌中提取的重组质粒 pCAM G-Ag85B 的双酶切鉴定

Fig 4 Restriction map of recombinant plasmid

pCAM G-Ag85B extracted from *Agrobacterium tumefaciens*

3 讨论

转基因植物疫苗是当今疫苗研制的热点之一,转基因疫苗利用植物作为反应器具具有其独特的优势^[9,10]。国内外利用转基因植物表达疫苗功能蛋白的蔬菜、水果和农作物有马铃薯、西红柿、胡萝卜、香蕉、番木瓜、玉米、水稻等^[11-13],目前为止已取得一定成果^[14,15]。本实验室进行了利用转基因玉米表达目的抗原的系列研究^[16,17],主要是通过构建植物双元表达载体,转化根癌农杆菌 LBA4404,利用农杆菌介导法导入玉米愈伤组织,培养并筛选转基因玉米植株,大量表达优势抗原,并与机体免疫系统因子相互作用,提高结核口服疫苗的免疫原性,增强机体抗结核感染的保护能力。

本试验采用的玉米胚乳特异性表达启动子 *globulin-1* 属于组成型启动子,可以调控外源基因在玉米中定时、定位、定量表达。Mei等^[18]研究显示, *globulin-1* 启动子可调控抗真菌基因 *chitinase 18* 特异性表达于玉米种子的胚胎中。同时, Hood等^[19]也证实 *globulin-1* 启动子能驱动真菌的虫漆酶基因在玉米种子中高水平表达。本研究所选用的植物双元表达载体 *pCAMB A1300*,是经过加工修饰的,以抗除草剂基因 *bar* 取代了原来的潮霉素 *Hygromycin* 基因。试验中,首先将 *Ag85B* 基因克隆至含有 *globulin-1* 的中间载体 *pCR2.1* 上,从而在获得 *globulin-1-Ag85B* 的融合片段后,进一步将其克隆至植物表达载体 *pCAMB A1300* 中,以期通过农杆菌介导,转入玉米基因组后可以利用玉米特异性启动子 *globulin-1* 的优势调控 *Ag85B* 抗原的大量表达,并可以利用 *pCAMB A1300* 上的 *bar* 基因来筛选重组玉米植株。

下一步我们将含有目的抗原基因重组质粒通过农杆菌转入玉米愈伤组织,以期获得表达 *Ag85B* 抗原的植株。在检测玉米中表达目的抗原蛋白正确无误后,进一步把纯化蛋白免疫小鼠,观察抗原性蛋白对小鼠的免疫系统的影响及评价其抵抗结核杆菌攻击的免疫保护能力。

参考文献:

- [1] Colditz G A, Brewer T F, Berkey C S, *et al* Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis Meta-analysis of the published literature [J]. JAMA, 1994, 271 (9): 698 - 702
- [2] Fine P E Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity [J]. Lancet, 1995, 346 (8986): 1339 - 1345.
- [3] Kariyone A, Tamura T, Kano H, *et al* Immunogenicity of

- Peptide-25 of *Ag85B* in Th1 development: role of IFN- γ [J]. Int Immunol, 2003, 15 (10): 1183 - 1194.
- [4] Dietrich J A C, Rappuoli R. Mucosal administration of *Ag85B-ESAT-6* protects against infection with *Mycobacterium tuberculosis* and boosts prior bacillus Calmette-Guérin immunity [J]. J Immunol, 2006, 1 (177): 6353 - 6360.
 - [5] Elvang T C J, Billeskov R. CD4 and CD8 T cell responses to the *M. tuberculosis Ag85B-TB10.4* promoted by advantaged subunit, adenovector or heterologous prime boost vaccination [J]. PLoS ONE, 2009, 4 (4), e5139: 1 - 13.
 - [6] Sinha R K, Vema I, Khuller G K, *et al*. Immunobiological properties of a 30 kDa secretory protein of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra [J]. Vaccine, 1997, 15 (6/7): 689 - 699.
 - [7] Skinner M A B B, Wedlock D N. A DNA prime *Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis [J]. Infect Immun, 2003, 71 (9): 4901 - 4907.
 - [8] 张万江, 邓喜玲, 吴芳. 结核杆菌 *Ag85B* 基因疫苗的免疫保护效果研究 [J]. 生命科学研究, 2006, 10 (2): 128 - 133.
 - [9] Tregoning J S, Nixon P, Kuroda H, *et al* Expression of tetanus toxin Fragment C in tobacco chloroplast [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31 (4): 1174 - 1179.
 - [10] Tacket C O, Mason H S, Loson G, *et al* Human immune response to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes [J]. Infect Dis, 2000, 182 (1): 302 - 305.
 - [11] Lou X M, Yao Q H, Zhang Z, *et al* Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants [J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14 (4): 464 - 469.
 - [12] Kumar G B, Ganapathi T R, Revathi C J, *et al* Expression of hepatitis B surface in transgenic banana plants [J]. Planta, 2005, 222 (3): 484 - 493.
 - [13] Nicholson L, Gonzalez-Melendi P, Dolleweerd C, *et al* A recombinant multimeric immunoglobulin expressed in rice shows assembly-dependent subcellular localization in endosperm cells [J]. Plant Biotech J, 2005, 3 (1): 115 - 127.
 - [14] Han M, Su T, Zu Y G, *et al* Research advances on transgenic plant vaccines [J]. Yi Chuan Xue Bao, 2006, 33 (4): 285 - 293.
 - [15] 及晓宇, 于丽杰. 植物生物反应器生产口服疫苗的研究进展 [J]. 现代农业科技, 2009, 8: 210 - 211.
 - [16] 李君武, 王珊珊, 宋东, 等. 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 [J]. 华北农学报, 2009, 24 (3): 28 - 31.
 - [17] 李君武, 黄清华, 王珊. 玉米特异启动子驱动下结核 hsp65 基因植物表达载体构建及鉴定 [J]. 玉米科学, 2009, 4: 550 - 554.
 - [18] Mei C, Wassom J J, Widholm J M. Expression specificity of the globulin-1 promoter driven transgene (chitinase) in maize seed tissues [J]. Maydica, 2004, 49 (4): 255 - 265.
 - [19] Hood E E B M, Beifuss K, Magallanes-Lundback M, *et al* Criteria for high-level expression of a fungal laccase gene in transgenic maize [J]. Plant Biotechnol J, 2003, 1 (2): 129 - 140.