

携带乙肝大包膜蛋白 L 基因与结核 *Esa6* 融合基因植物表达载体的构建及鉴定

李君武, 宫君原, 刘 鑫, 叶秋萍, 黄清华

(暨南大学 医学院, 微生物与免疫教研室, 广东 广州 510632)

摘要: 构建包含编码结核杆菌 *Esa6* 基因和乙肝病毒大包膜蛋白 (L 蛋白) 基因的植物双元表达载体, 并转化根癌农杆菌 LBA4404。分别以质粒 pPIC9K-L 和结核杆菌基因组为模板进行 PCR 扩增, 获得 L 和 *Esa6* 基因, 然后运用部分重叠聚合酶链式反应扩增出 L-*Esa6* 融合基因片段, 连接到有玉米特异性启动子 *glb1* 的 pEGG 载体上, 将 G-L-*Esa6* 融合基因片段酶切下, 连接到含有抗除草剂基因 *bar* 的双元表达载体 pCAMBIA300 上, 电击法将重组质粒转化到农杆菌 LBA4404 中。构建了真核表达重组质粒 pCAMG-L-*Esa6*。测序分析表明, 克隆的 L 和 *Esa6* 序列与 NCBI 上公布序列一致。成功构建与转化了包含编码乙肝病毒大包膜蛋白 L 基因和结核杆菌 *Esa6* 基因的植物表达载体, 并将其转化入根癌农杆菌 LBA4404 中, 为成功研制利用转基因植物生产抗乙肝和结核联合口服疫苗奠定了基础。

关键词: 结核分枝杆菌; 乙肝病毒; 大包膜蛋白 L 基因; *Esa6* 基因; *glb1*

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)02-0001-06

Construction and Identification of the Expression Plasmid Containing Genes Encoding the Large Envelope Protein L of HBV and *Esa6* Gene of *Mycobacterium tuberculosis*

LI Jun-wu GONG Jun-yuan LIU Xin YE Qiu-ping HUANG Qing-hua

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

Abstract: To construction and identification of the expression plasmid containing genes encoding *Esa6* gene of *Mycobacterium tuberculosis* and the large envelope protein L of HBV, and transform the recombinant vector into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The L and *Esa6* gene were amplified from pPIC9K-L and *Mycobacterium tuberculosis* genome by PCR, then the fusion DNA fragment of L and *Esa6* were amplified by Splicing by Overlap Extension were cloned into the vector pEGG. The combine fragment of promoter *glb1* and the target gene L-*Esa6* which get from double enzymes digestion of the recombined plasmid pEG-G-L-*Esa6* was inserted into the plant expression vector pCAMBIA300 which contain the gene *bar* for herbicide resistance. Then transformed recombinant plasmid pCAMG-L-*Esa6* into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. We have successfully constructed eukaryotic expression recombinant plasmid pCAMG-L-*Esa6* and it is showed that the cloned sequence of L and *Esa6* is correct by sequencing. We have successfully constructed expression plasmid containing genes encoding L protein of HBV and *Esa6* gene and transformed into LBA4404 and lays a foundation for construction combined gene vaccine against HBV and MTB.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; HBV; L gene; *Esa6*; *glb1*

因乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus HBV) 感染而导致的肝病与因结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis* MTB) 感染引起的结核病, 是非常严重

的全球性传染性疾病。全球 60 亿人口中, 分别有三分之一人口感染过乙型肝炎病毒或结核分枝杆菌。目前应用的乙肝疫苗主要由中国仓鼠卵巢细胞

收稿日期: 2011-01-12

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); 国家重大科技专项 (2008ZX1002-009)

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。

(CHO 细胞)和啤酒酵母表达的乙肝病毒表面抗原 HBsAg(S 蛋白)颗粒组成。在预防接种的过程中发现仍有 10%~20% 人群接种乙肝疫苗表现为无反应或弱反应,甚至根本不产生抗体。卡介苗(BCG)作为预防结核病的疫苗,近 100 年来虽然广泛用于新生儿的预防接种,但保护率只有 50% 左右。移民、HIV 感染、传播性强的新型结核菌株与多重耐药菌株的出现,使传统的抗痨药物已无法发挥有效作用。鉴于乙肝与结核这两种疾病有可能在免疫后人群中流行而成为新的公共问题,研制保护作用分别优于市售啤酒酵母 HBsAg 疫苗与 BCG 的新型防治乙肝与结核疫苗成为各国科研工作者的紧迫任务之一。

本研究成功构建了表达结核分枝杆菌 *EsaB* 基因与乙肝病毒包膜蛋白 L 融合基因抗原的植物表达载体 *pCAMG-L-EsaB*,并将其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的联合疫苗提供平台。重组质粒中含有玉米种子特异性启动子 *glb1ulin-1*,将大大提高目的基因在植物中的表达。

1 材料和方法

1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 *Top10*、农杆菌 LBA4404、结核分枝杆菌 H37Rv 株为本教研室保存; *pPIC9K-L* 由武汉大学生命科学院病毒所叶林柏教授馈赠; *pCRG* 中间载体 *PEGFP-C1*、植物表达载体 *pCAMB1300bar-nos* 由广东省农业科学院作物研究所提供。

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 *Kpn* I *Hind* III, 1 kb DNA Ladder Marker, 200 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

1.3.1 根据 GenBank 公布的 HBV-L 序列(GI 157091234),借助 Premier Premier 5.0 软件设计 1 对引物扩增 HBV-L 基因:上游引物(P1): 5'-AGGC-CAAGCTTGGCCGAGTGCCATCC-3',含 *Hind* III 酶切位点;下游引物(P2): 5'-TTAAGGGGTACCTTGGGTG-GCTGT-3',含 *Kpn* I 酶切位点。

1.3.2 根据 GenBank 公布的玉米种子特异表达启动子 *Glb1ulin-1* 序列(GI L22344 借助 Premier Premier 5.0 软件设计 1 对引物:上游引物(P3): 5'-AG-

GCCAAGCTTGGCCGAGTGCCATCC-3',含 *Hind* III 酶切位点;下游引物(P4): 5'-TTAAGGGGTACCTT-GGGTTGGCTGT-3',含 *Kpn* I 酶切位点。

1.3.3 根据 GenBank 公布的 MTB-*EsaB* 基因序列借助 Premier Premier 5.0 软件设计 1 对引物:下游引物(P5): 5'-CGGCTAGCATGACAGAGCAGCAGTG-GAA-3',含 *Nhe* I 酶切位点;下游引物(P6): 5'-TC-GAATGAATTCCTATGCGAACATCCCAGTGA-3',含 *Eco*R I 酶切位点。

1.3.4 根据 HBV-L 测序结果(与 GI 157091234 公布的序列一致)和人结核分支杆菌 H37Rv 株 *EsaB* 基因的编码序列借助 Premier Premier 5.0 软件设计联合抗原基因 L-*EsaB* 的 2 对(P1P2 和 P3P4)引物:正向引物(P5): P1 5'-ATTATT GGATCC ATGGGAGGTTG-GTCTTCC-3',含 *Kpn* I 酶切位点和起始密码子 ATG;反向引物(P6): P2 5'-CACTGCTGCTCTGTCATAATG-TATACCCAAAGAC-3',序列与 P3 反向互补。

1.4 中间载体 PEG-G 构建

以质粒 *pCR2.1-globulin-1* 作为模板,用引物 P3 和 P4 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 加 dH_2O 至 50 μ L 反应条件为 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min 94 $^{\circ}C$ 50 s 56 $^{\circ}C$ 50 s 72 $^{\circ}C$ 90 s 共 30 个循环,72 $^{\circ}C$ 再延伸 10 min PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳用 1 \times TAE 电泳缓冲液制备 1.0% 琼脂糖凝胶。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 *Kpn* I 和 *Hind* III 分别对 PCR 产物与载体 *PEGFP-C1* 进行双酶切,酶切后进行 10 g/L 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。转化至低温 *CaCl_2* 制备的 *E. coli* *Top10* 感受态中,然后涂布 50 μ g/mL 的 LB 固体培养基中。次日,随机挑取多个单菌落,分别接种于 3 mL 含卡那霉素的 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落 PCR 检测是否有 *Glb1ulin-1* 的存在,再将菌落 PCR 筛选呈阳性的菌落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有限公司完成。

1.5 L-*EsaB* 融合基因片段的获取

A. 以质粒 *pPIC9K-L* 为模板,用引物 P1 和 P2

进行 PCR 扩增出 HBV-L;

B: 以结核分枝杆菌 H37Rv 株的基因组为模板, 用引物 P5 和 P6 进行 PCR 扩增出 Esat6;

C: 以步骤 A 和 B 扩增所得的 DNA 片段为模板, 用引物 P5 和 P6 进行部分重叠聚合酶链式反应扩增 L-Esat6;

其中, 步骤 A 和 B 的反应体系均为 50 μ L 其中上下游引物各 1 μ L dNTP 4 μ L 模板 DNA 1 μ L 10 \times Ex-Taq Buffer (含 Mg^{2+}) 5 μ L NTP 4 μ L Ex-Taq 酶 0.25 μ L 加 ddH₂O 至 50 μ L 将上述液体混匀, 稍离心, 使液体沉至管底。步骤 A 的反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 94 $^{\circ}$ C 45 s 55 $^{\circ}$ C 45 s 72 $^{\circ}$ C 1 min 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min 步骤 B 的反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 94 $^{\circ}$ C 30 s 54 $^{\circ}$ C 30 s 72 $^{\circ}$ C 30 s 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min 步骤 C 的反应体系 P5 和 P6 各 1 μ L dNTP 4 μ L HBV-L 1 μ L Esat6 1 μ L 10 \times Ex-Taq Buffer (含 Mg^{2+}) 5 μ L NTP 4 μ L Ex-Taq 酶 0.25 μ L 加 ddH₂O 至 50 μ L 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min 94 $^{\circ}$ C 30 s 54 $^{\circ}$ C 30 s 72 $^{\circ}$ C 3 min 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min PCR

扩增产物琼脂糖凝胶电泳用 1 \times TAE 电泳缓冲液制备 1.0% 琼脂糖凝胶。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。

1.6 重组载体 pEG-G-L-Esat6 的构建

用 Kpn I Hind III 对中间载体 PEG-G 进行双酶切, 酶切后进行 10 g/L 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, 将酶切纯化的产物与 L-Esat6 融合基因片段按照 3:1 的摩尔比混合, 用 T4DNA 连接酶连接过夜。转化至低温 CaCl₂ 制备的 E. coli Top10 感受态中, 然后涂布 50 μ g/mL 的 LB 固体培养基中。次日, 随机挑取多个单菌落, 分别接种于 3 mL 含卡那霉素的 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落 PCR 检测是否有 G-L-Esat6 的存在, 再将菌落 PCR 筛选呈阳性的菌落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, 测序工作由上海工程生物有限公司完成。

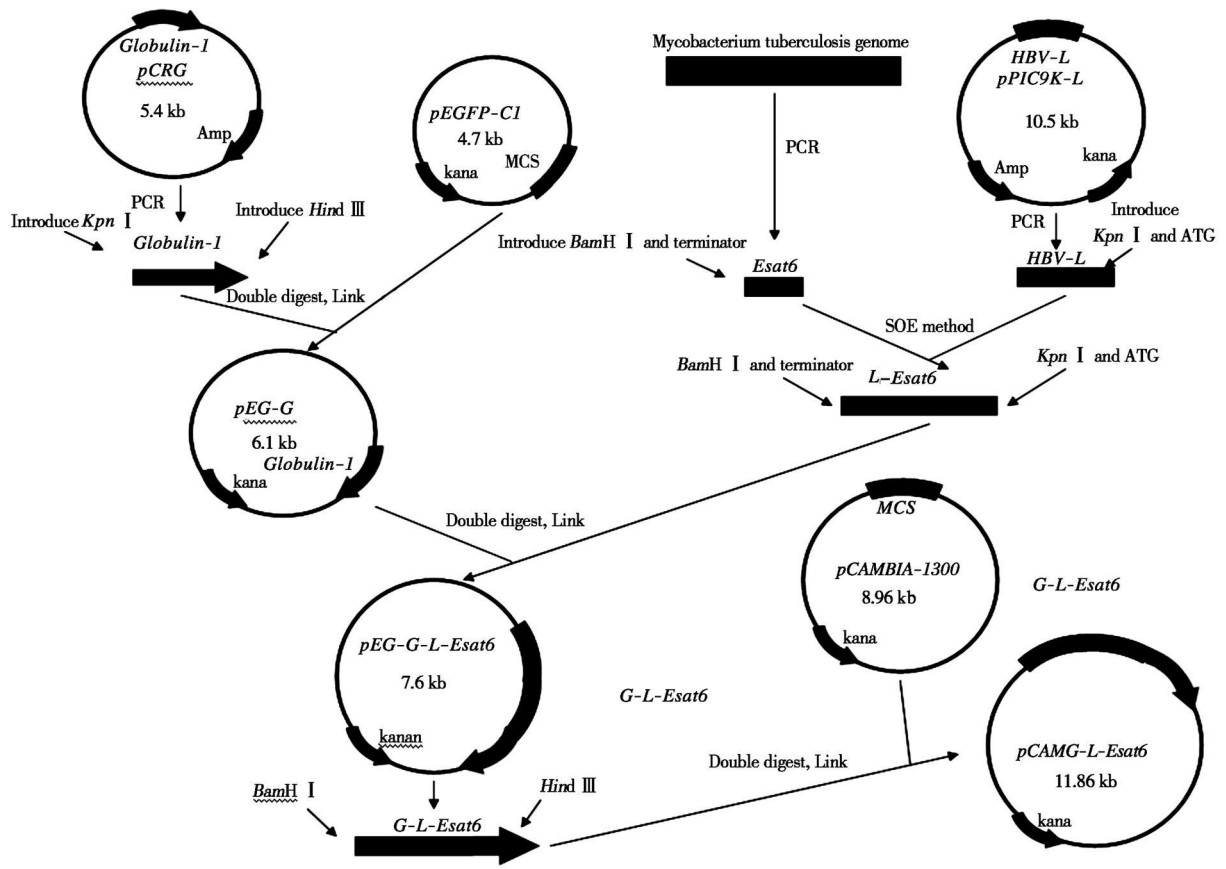


图 1 pCAM G-L-Esat6 构建流程图
Fig 1 Construction of pCAM G-L-Esat6

1.7 重组载体 pCAMG-L-Esat6 的构建

将测序正确的重组质粒 pEG-G-L-Esat6 用 Hind III 和 BamH I 双酶切, 经过琼脂糖电泳分离 G-L-Es-

at6 片段, 同时用 Hind III 和 BamH I 双酶切植物表达载体 pCAMBIA300, 用胶回收试剂盒纯化回收两酶切产物, 并以载体与片段 1:3 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* Tq10感受态中,然后涂布 $50 \mu\text{g/mL}$ 的 LB固体培养基中。次日,随机挑取单菌落接种于 LB培养液中, 37°C 下振荡培养过夜。首先进行菌液 PCR 鉴定,抽提质粒 DNA 进行双酶切鉴定,获得重组载体 pCAMG-L-Esa6,测序工作由上海生物工程有限公司完成。

1.8 转化农杆菌 LBA4404

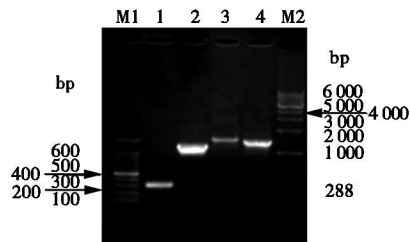
预先制备农杆菌 LBA4404 感受态,储存于 -80°C 冰箱备用。取 $200 \mu\text{L}$ 感受态细胞,冰上放置 30 min 将 $1 \mu\text{g}$ DNA加入感受态细胞中,液氮中速冻 5 min 以上; 37°C 水浴快速解冻,小于 5 min 加入 $800 \mu\text{L}$ LB培养基; 28°C 摇床低速培养 3 h 取 $200 \mu\text{L}$ 涂布于含 $50 \mu\text{g/mL}$ 卡那霉素的平板, 28°C 摇床培养 $2 \sim 3 \text{ d}$ 经菌落 PCR 验证,挑阳性克隆子摇菌,提取质粒后进行双酶切鉴定,最终确定重组质粒 pCAMG-L-Esa6 转入到了 LBA4404 中, -80°C 保存菌株。

1.9 植物表达载体的构建流程图(图 1)

2 结果与分析

2.1 Gbbulin1、L-Esa6 基因扩增产物电泳分析

分别以质粒 PCR-G、pT9K-L 结核分枝杆菌 H37Rv株基因组为模板进行 PCR 及 SOE 法扩增 L-Esa6 基因,产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳,产物片段大小如图 2 所示,分别为约 1.4 kb 1.2 kb 0.288 kb 1.5 kb 的特异性片断,与预期启动子 Gbbulin1 基因、L 基因、Esa6 基因和 L-Esa6 基因大小相符。



M1 DNA MarkerDL1500 (bp); 1. Esa6 基因 PCR 产物; 2 L 基因 PCR 产物; 3 L-Esa6 基因 PCR 产物; 4. Gbbulin1 基因 PCR 产物; M2 DNA MarkerDL10000 (bp).

M1 DNA MarkerDL1500 (bp); 1. Esa6 PCR product 2 L PCR product 3 L-Esa6 PCR product 4 Gbbulin1 PCR product M2 DNA MarkerDL10000 (bp).

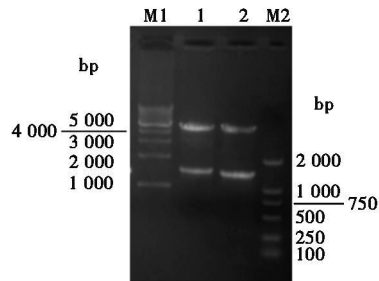
图 2 Esa6 基因、L 基因、L-Esa6 基因、启动子 Gbbulin1 基因的 PCR 产物结果

Fig 2 PCR products of Esa6 gene L gene L-Esa6 gene promoter Gbbulin1 gene

2.2 pEG-G-L-Esa6 双酶切鉴定

提取植物表达载体 pEG-G-L-Esa6 用 Hind III

和 BamH I双酶切,双酶切后与标准分子量 DNA 在 1%琼脂糖凝胶电泳。结果显示,得到约 1.5 kb 特异性条带,与预期 L-Esa6 片断大小相符(图 3)。



M1. DNA Marker DL10000 (bp); 1 2 pEG-G-L-Esa6 采用 BamHI 和 KpnI 双酶切; M2 DNA MarkerDL2000 (bp).

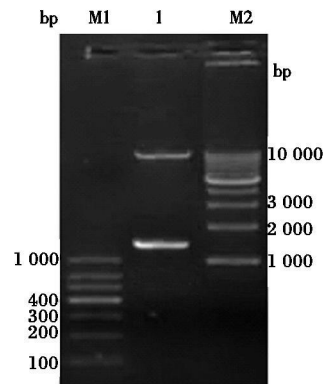
M1. DNA Marker DL10000 (bp); 1 2 pEG-G-L-Esa6 /BamHI , KpnI ; M2 DNA MarkerDL2000 (bp).

图 3 pEG-G-L-Esa6 重组质粒双酶切鉴定

Fig 3 Identification of pEG-G-L-Esa6 by restriction enzyme analysis

2.3 序列分析鉴定

对 pCRG-L-Esa6 和 pCAMG-L-Esa6 两个重组质粒的启动子 gbbulin1 后的 DNA 序列进行序列分析鉴定,结果与乙肝病毒的 HBV-L 基因 CDS 序列 (NCBI 登陆号: 157091234)和结核分支杆菌的 Esa6 基因 CDS 序列均完全相同 (NCBI 登陆号: AF420491)。



M1 DNA MarkerDL1200 (bp); 1. pCAMG-L-Esa6 采用 BamHI 和 KpnI 双酶切; M2 DNA MarkerDL10000 (bp).

M1 DNA MarkerDL1200 (bp); 1. pCAMG-L-Esa6 /BamHI , KpnI ; M2 DNA MarkerDL10000 (bp).

图 4 农杆菌中提取的 pCAMG-L-Esa6 重组质粒双酶切鉴定

Fig 4 Identification of pCAMG-L-Esa6 by restriction enzyme analysis

2.4 含有表达载体的农杆菌双酶切检测

在农杆菌 LBA4404 中提取 pCAMG-L-Esa6 重组质粒,用 BamHI 和 KpnI 双酶切后与标准分子量 DNA 在 1%琼脂糖凝胶电泳。结果显示,得到约 10.36 kb 与 1.5 kb 的特异性条带,与预期 L-Esa6 片段和质粒 pCAMG 大小相符(图 4)。

3 讨论

近年来,在预防多种传染病的同时,伴随着一系列问题的产生,如儿童预防接种次数增加、疫苗管理难度加大、预防接种工作成本增高等^[1 2]。因此开发并推广应用可以预防多病的联合疫苗势在必行。

转基因植物技术的成功应用已使全世界的农业发生了革命性的进步,在各种类型的新型疫苗中,利用转基因植物生产疫苗成为当今研究的一个热点。转基因植物作为疫苗生产的生物反应器,为人类提供了一个安全和廉价的生产体系^[3],本研究特点之一一是成功构建了包含结核分枝杆菌 *Esat6* 基因和乙肝病毒 L 蛋白融合基因的植物表达载体 pCAMG-L-*Esat6*。*Esat6* 是结核分枝杆菌的主要的早期培养物滤液蛋白之一,由结核分枝杆菌 RD1 区 Y 277 片段编码,全长 288 bp 编码 95 个氨基酸,其理论分子量为 9 904 Da^[4 5]。*Esat6* 是结核杆菌在反复传代制备 BCG 过程中丢失的抗原,可能是导致 BCG 免疫效果不稳定的原因之一^[6 7]。*Esat6* 可以显著活化巨噬细胞,提高巨噬细胞对胞内结核杆菌的生长抑制作用和杀伤能力;还能促进 IFN- γ 的释放,促进抗体产生和增强巨噬细胞吞噬消化 MTB 的能力;同时在保护性细胞免疫中发挥着作用,并介导长期持久的免疫记忆^[5 8-13]。*Esat6* 有多个 T 细胞、B 细胞表位,有较强的免疫原性和免疫反应性,主要介导 Th1 型为主的细胞免疫反应^[14 15]。所以 *Esat6* 成为现今人们制备结核疫苗的重要抗原。

HBV 基因组含有四个分别称为 S、C、P 和 X 区的 ORF,其中 S 基因区含 3 个 ATG 起始密码子。S 基因区分为 PreS1、PreS2 和 S 三个区段,编码 3 种外膜蛋白,其中 S 蛋白由 S 区翻译, M 蛋白由 PreS2 和 S 区翻译,而 L 蛋白是由 PreS1、PreS2、S 区翻译^[16]。L 蛋白与 S 相比,多了 PreS1 和 PreS2 其中 PreS1 的 21~47 aa 为肝细胞受体结合位点,而且 preS1 肽段含有许多免疫原性比 S 蛋白更强的 T 细胞和 B 细胞表位^[17-19]。preS2 (120~145 aa) 序列中也含有多个抗原表位和病毒中和位点。在疫苗制剂中加入 preS1 和 preS2 的抗原表位后,能诱导更高效的免疫应答,产生中和乙肝病毒抗体,保护机体免受病毒攻击;并可打破免疫耐受,清除乙肝病毒;同时人群对传统的乙肝疫苗的不反应和低反应频率大大降低^[20 21]。因此 *Esat6* 和 L 蛋白成为现今人们制备结核和乙肝联合疫苗的优势抗原之一。

本研究的另一特点是将玉米胚乳特异性表达的启动子 *gbulin1* 与所选的结核与乙肝优势抗原一

起构建到植物二元表达载体 pCAMBIA300 中,以期在农杆菌介导后转入玉米基因组可以诱导表达大量优势抗原。Mei 等^[22] 的研究报告表明, *gbulin1* 启动子可调控抗真菌基因 *chitinase18* 特异性表达于玉米种子的胚胎中。在载体构建的过程中,表达载体 pCAMBIA300 被改造,插入了加 *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 L-*Esat6* 上存有多个酶切位点,针对这种情况,在设计试验方案的过程中巧妙地利用了同尾酶 BamH I 和 KpnI^[23]。试验中,首先将 L-*Esat6* 基因克隆至含有 *gbulin1* 的中间载体 PEGG 上,从而在获得 *gbulin1*-L-*Esat6* 的融合片段后,进一步将其克隆至植物表达载 pCAMBIA300 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 *gbulin1* 的优势调控 L 和 *Esat6* 抗原的大量表达,并利用 pCAMBIA300 上的 *bar* 基因来筛选重组植株。

下一步将含有目的抗原基因重组质粒通过农杆菌转入愈伤组织或通过基因枪技术打入玉米幼胚中,以期获得表达 L-*Esat6* 融合基因的抗原植株。在检测目的蛋白在玉米中表达无误后,拟进一步将上述抗结核与乙肝联合口服疫苗免疫小鼠,观察其对小鼠的体液免疫与细胞免疫的影响及其免疫保护效果,为今后临床实验奠定坚实的基础。

参考文献:

[1] 王 敏,扈丽萍. 联合疫苗的发展与期望[J]. 中国自然医学杂志, 2007, 9(5): 455-456

[2] 杨卉娟,廖国阳,李卫东. 联合疫苗发展概况[J]. 国际生物制品学杂志, 2006, 2(29): 66-70

[3] 程丽琴,周继勇. 转基因植物疫苗免疫原基因表达研究概述[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(6): 889

[4] Behr M A, Wilson M A, Gill W P et al. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray[J]. Science 1999, 284: 1520-1523

[5] 刘建利,师长宏,靳亚平,等. 结核分枝杆菌 Ag85 与 ESAT6 融合蛋白的表达、纯化及抗原活性的初步研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2009, 25(5): 449-452

[6] Khera A, Singh R, Shakila H et al. Elicitation of efficient protective immune responses by using DNA vaccines against tuberculosis[J]. Vaccine 2005, 23(48-49): 5655-5665

[7] Brodin P, Rosenkrands I, Andersen P et al. ESAT-6 proteins: protective antigens and virulence factors[J]. Trends in Microbiology 2004, 12(11): 500-508

[8] Kishkar Arvind G, Vema et al. Potential role for ESAT6

- in dissemination of *M. tuberculosis* via human lung epithelial cells [J]. *Molecular Microbiology* 2010 75 (1): 92—106
- [9] 祝秉东, 王洪海. 结核疫苗研究的历史与现状 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007 3(5): 378—382
- [10] Steven C Derrick, Sheldon L. et al. The ESAT6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* induces apoptosis of macrophages by activating caspase expression [J]. *Cellular Microbiology* 2007 9(6): 1547—1555
- [11] Chee Mun Fang, Zainul F. Zainuddin. Cloning, expression and purification of recombinant protein from a single synthetic multivalent construct of *Mycobacterium tuberculosis* [J]. *Protein Expression and Purification* 2006 47: 341—347
- [12] Shi Changhong, Zhang Hai, Wang Limei, et al. Therapeutic efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding heat shock protein 65 of *Mycobacterium tuberculosis* and the human interleukin 2 fusion gene [J]. *Tuberculosis* 2009 89: 54—61
- [13] Pollock JM, Andersen P. The potential of the ESAT 6 antigen secreted by virulent mycobacteria for specific diagnosis of tuberculosis [J]. *Infect Dis* 1997 175: 1251—1254
- [14] Brian J Rogerson, Yu-Jin Jung, et al. Expression levels of *Mycobacterium tuberculosis* antigen-encoding genes versus production levels of antigen-specific T cells during stationary level lung infection in mice [J]. *Immunology* 2006 118(5): 195—201
- [15] Lindsay J Hall, Simon C Jarea, Derek Pickard, et al. Characterisation of a live *Salmonella* vaccine stably expressing the *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B ESAT6 fusion protein [J]. *Vaccine* 2009 27 (49): 6894—6904
- [16] Young M D, Schneider D L, Zuckerman A J, et al. Adult hepatitis B vaccination using a novel triple antigen recombinant vaccine [J]. *Hepatology* 2001 34: 372—376
- [17] Chi SW, Kim D H, Lee S H, et al. Pre-structured motifs in the natively unstructured preS1 surface antigen of hepatitis B virus [J]. *Protein Science* 2007 16(10): 2108—2117
- [18] Park J H, Cho E W, Lee Y J, et al. Determination of the protective effects of neutralizing anti-hepatitis B virus (HBV) immunoglobulins by epitope mapping with recombinant HBV surface-antigen proteins [J]. *Microbiol Immunol* 2000 44(8): 703—710
- [19] Maeng C Y, Ryu C J, Gpion R, et al. Fine mapping of virus-neutralizing epitopes on hepatitis B virus PreS1 [J]. *Virology* 2000 270(1): 9—16
- [20] Park J H, Lee M K, Kim H S, et al. Targeted destruction of the polymerized human serum albumin binding site within the preS2 region of the HBV surface antigen while retaining full immunogenicity for this epitope [J]. *Viral Hepat* 2003 10(1): 70—79
- [21] 郭晓兰, 邓健康, 朱道银, 等. HBV preS S-rhGM-CSF 融合基因表达质粒的构建和表达 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004 5(20): 548—551
- [22] Mei C, Wasson J W, John J M. Expression specificity of the globulin-1 promoter driven transgene (chitinase) in maize seed tissues [J]. *Maydica* 2004 49(4): 255—265
- [23] 李君武, 王珊珊, 宋东, 等. 玉米特异启动子驱动下结核 Hsp65 与 Esat6 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