

嵌合体 SBR-CT^{A1} 植物表达质粒的构建

麦穗 凌均[✉]

【摘要】目的 构建含编码嵌合体 SBR-CT^{A1} 基因的植物表达质粒。方法 用 PCR 扩增的含编码嵌合体 SBR-CT^{A1} 基因的 P2 片段 (3 498 ~ 5 378 bp), 经 TA 克隆与 pGEM-easy 载体结合得到 pTSC 质粒, pTSC 质粒经 *Bam*H 和 *Kpn*I 双酶切后得到 P2 片段, P2 片段与 *Bam*H 和 *Kpn*I 双酶切后的植物高效表达质粒 pPOK 定向克隆, 构建 pROSC 表达质粒; 且将此质粒与 *bar* 基因 (抗除草剂基因) 连接, 构建重组质粒 pROSB, 并经酶切电泳及 DNA 序列测定鉴定。结果 含编码嵌合体 SBR-CT^{A1} 基因的 P2 片段整合到 pPOK 的适当部位, 插入相位正确, 未改变目的基因的阅读框架; 从 pBARGUS 分离出的 *bar* 基因整合到 pROSC, 构成重组质粒 pROSB。结论 本实验成功构建了携带编码嵌合体 SBR-CT^{A1} 基因的植物表达质粒 pROSC 和 pROSB。

【关键词】 龋病; SBR-CT^{A1}; 植物表达质粒; 可食用疫苗

Construction of Plant Expression Plasmid of Chimera SBR-CT^{A1}

MAI Sui, LING Junqi. (Department of Conservation and Endodontics, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510055, China)

【Abstract】 Objective The purpose of this study is to construct plant expression plasmid containing the gene encoding chimera SBR-CT^{A1}. **Methods** The target gene fragment P2, including the gene-encoded chimera SBR-CT^{A1} (3 498 ~ 5 378 bp), was obtained by standard PCR amplification. The PCR products were ligated with pGEM-easy vector through TA clone to form plasmid pTSC. The plasmid pTSC and plasmid pPOKII were digested by restricted endonuclease *Bam*HI and *Kpn*I, and the digested products were extracted and purified for recombination. Then the purified P2 and plasmid pPOKII were recombined by T4 DNA ligase to form recombinant plasmid pROSC; inserting *bar* gene into the plasmid and form pROSB plasmid. The recombined plasmids were isolated and identified by restricted endonuclease cutting and Sanger dideoxy DNA sequencing. **Results** P2 gene was linked to pPOKII plasmid and formed recombinant plasmid pROSC. The DNA sequence and orientation were corrected. And *bar* gene was inserted into pROSC and form recombinant plasmid pROSB. **Conclusion** Plant expression vector pROSC and pROSB containing the gene encoding chimera SBR-CT^{A1}, which may provide useful experiment foundation for further study on edible vaccine against caries have been successfully constructed.

【Key words】 caries; SBR-CT^{A1}; plant expression plasmid; edible vaccine

变形链球菌表面蛋白 PAc 是龋病的候选抗原之一, 其中的唾液黏附区 (saliva-binding region, SBR) 被认为是有效黏附区, 具有免疫原性和免疫反应性。霍乱毒素 B 亚单位 (cholera toxin B subunit, CTB) 能增强 SBR 的免疫原性并有定向诱导的作用。SBR-CT^{A1} 是通过基因重组的方法用相对分子质量为 4.2×10^4 的 SBR 替换 CT 中具有毒性的 A1 亚单位而得到的嵌合蛋白免疫原。可食用疫苗是随着转基因植物技术的发展, 将机体的免疫机理与植物 DNA 重组技术相结合, 利用转基因植物作为生物反应器, 将外源基因引

入植物内生产出的可食用医用疫苗。本研究将编码 SBR-CT^{A1} 的基因与植物高效表达质粒相连接, 以番茄作为生物反应器来表达 SBR-CT^{A1}, 为获得具有免疫防龋效果的可食用疫苗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 质粒与菌种

本实验所用的质粒与菌种见表 1。

1.2 试剂

Wizard PCR 纯化试剂盒 (Promega 公司, 美国), DNA 凝胶纯化试剂盒 (Qiagen 公司, 德国), 质粒纯化试剂盒 (Qiagen 公司, 德国), 限制性内切酶、T4 连接酶 (NEB 公司, 英国), PCR 超级反应液 (Promega 公司, 美国), 抗生素 (Sigma 公司, 美国), Gene Amp PCR System 2400 型 PCR 仪 (Perking Elmer 公司, 美国)。

本课题为国家自然科学基金 (编号 30240054) 及广东省自然科学基金 (编号 001364) 资助项目

作者单位: 510055 中山大学光华口腔医学院附属口腔医院牙体牙髓科

表1 菌株和质粒
Tab 1 Strain and plasmid

| 质粒和菌种 | 表型或基因型 | 来源 |
|-------------|------------------|---------------|
| pROK | Km ^r | 中山大学生命科学学院 |
| pUAB030 | Amp ^r | 中山大学光华口腔医学院 |
| pGEM-T easy | Amp ^r | 美国 Promega 公司 |
| pBARGUS | Km ^r | 中山大学生命科学学院 |
| 大肠杆菌 JM109 | | 中山大学光华口腔医学院 |
| 大肠杆菌 DH5 | | 中山大学光华口腔医学院 |

Km^r:卡那霉素抗性 Amp^r:氨苄青霉素抗性

1.3 引物的设计与合成

引物由 TaKaRa 大连宝生物生命技术公司合成, P1: 5' GGATCCAATGAAATACCTGCTGCCGA 3', P2: 5' GGTACCATAATACGCACTAAGGATGTG 3'。在上下游引物的 5 端分别加入 *Bam*H 和 *Kpn* 限制性内切酶的酶切位点,经分析无回文序列,无发卡结构,无连续 6 个或 6 个以上的碱基相同。

1.4 目的基因的获得

以质粒 pUAB030 为模板,采用以上设计的引物进行 PCR 扩增。扩增条件:95 预变性 10 min,94 变性 30 s,54 退火 30 s,72 延伸 1 min 30 s,以上条件反应循环 30 次,72 继续延伸 12 min,4 保存,电泳鉴定,回收纯化。将扩增片段与 pGEM-T easy 质粒系统进行 TA 连接,得到含所需酶切位点目的基因的 pTSC 质粒,用蓝白斑实验及 Amp^r 筛选阳性克隆株,分别用 *Bam*H 和 *Kpn* 单酶切、*Bam*H 和 *Kpn* 双酶切、PCR 电泳鉴定。

1.5 重组质粒 pROSC 及 pROSB 的构建

用 *Bam*H 和 *Kpn* 限制性内切酶分别双酶切植物表达载体 pROK 和 pTSC,分别回收 11 kb 的载体片段和 1.9 kb 的目的基因片段,经 T4DNA 连接酶 4 过夜连接,氯化钙法转化感受态大肠杆菌 DH5,铺于 Km^r LB 平板。随机挑取转化菌落振荡培养,少量抽提重组质粒 pROSC,分别用 *Bam*H 和 *Kpn* 单酶切、*Bam*H 和 *Kpn* 双酶切、PCR 电泳鉴定。

用 *Hind* 酶切 pROSC 并去磷酸化,电泳回收 12.9 kb 载体片段,将其与用 *Hind* 酶切质粒 pBARGUS 得到的 2.1 kb 的 *bar* 基因片段经 T4DNA 连接酶 4 过夜连接并转化,抽提重组质粒 pROSB,用 *Hind* 酶切电泳鉴定。

1.6 目的基因序列测定和比较

测序部分由 TaKaRa 大连宝生物生命技术公司完成。用荧光染色标记 Sanger 双脱氧链终止法,以目的基因上下游引物对 pROSC 质粒中的插入片段进行测序,5 端测 641 个碱基对,3 端测 600 个碱基对。

2 结果

2.1 PCR 扩增目的片段及产物纯化

在设定的各项参数下扩增目的片段,电泳检测见单一 DNA 亮带,未见非特异性扩增的杂带及拖尾现

象,约 1.9 kb 片段。紫外分光法测定 DNA 的质量浓度约 200 mg/L, A_{260nm} 与 A_{280nm} 比值为 2.0,符合克隆条件(图 1)。

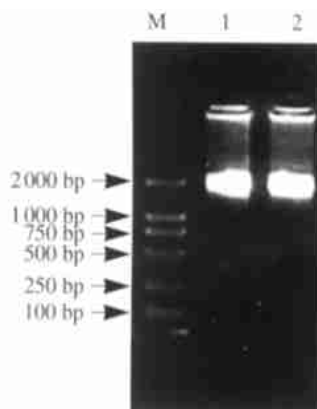


图1 质粒 pUAB030 PCR 扩增产物

M DL2 000 Marker (bp); 1, 2 PCR 扩增产物(1.9 kb)

Fig 1 Product of plasmid pUAB030 amplified by PCR

2.2 pTSC 质粒的鉴定

利用蓝白斑实验及 Amp^r 筛选阳性克隆株,抽提质粒酶切电泳鉴定 pTSC(图 2)。

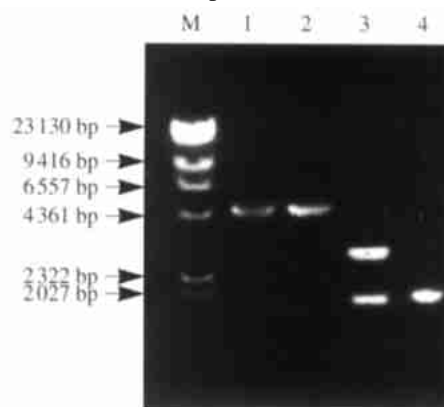


图2 质粒 pTSC 鉴定电泳图

M *Hind* Marker (bp); 1 pTSC 质粒 *Bam*H 单酶切产物(4.9 kb); 2 pTSC 质粒 *Kpn* 单酶切产物(4.9 kb); 3 pTSC 质粒 *Bam*H 和 *Kpn* 双酶切产物(3.0 kb, 1.9 kb); 4 pTSC 质粒 PCR 扩增产物(1.9 kb)

Fig 2 Identification of plasmid pTSC by electrophoresis

2.3 pROSC 和 pROSB 质粒的鉴定

利用 Km^r 筛选阳性克隆株,抽提质粒酶切电泳鉴定 pROSC 及 pROSB(图 3)。

2.4 重组质粒中插入基因序列测定及比较

序列测定结果表明目的基因插入位相正确,未改变其阅读框架。进行 BLAST 同源序列比较结果显示:5 端序列与 *pac* 基因、*sr* 基因、*spaP* 基因序列比较同源性达 98%~99%;3 端序列与 *Vibrio cholerae* 基因序列比较同源性达 98%~99%。

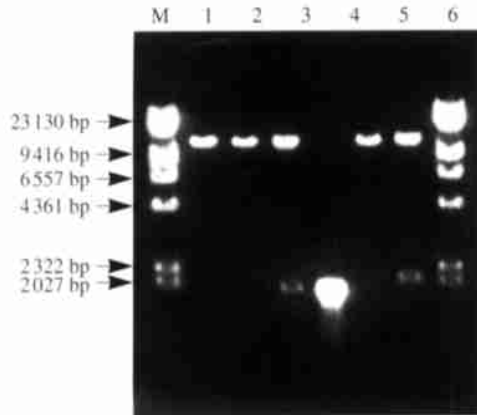


图3 质粒 pROSC, pROSB 鉴定电泳图

M *Hind* Marker (bp); 1 pROSC 质粒 *Kpn* 单酶切产物 (12.9 kb); 2 pROSC 质粒 *Bam*H 单酶切产物 (12.9 kb); 3 pROSC 质粒 *Bam*H 和 *Kpn* 双酶切产物 (11.0 kb, 1.9 kb); 4 pROSC 质粒 PCR 扩增产物 (1.9 kb); 5 pROSC 质粒 *Hind* 单酶切产物 (12.9 kb); 6 pROSB 质粒 *Hind* 单酶切产物 (12.9 kb, 2.1 kb)

Fig 3 Identification of plasmid pROSC and pROSB by electrophoresis

3 讨论

3.1 嵌合体 SBR-CT^{Al} 在龋病免疫预防中的作用

龋病疫苗的主要候选抗原之一是变形链球菌中的黏附毒力因子表面蛋白 PAc。变形链球菌表面蛋白 PAc 作为黏附毒力因子, 不仅参与变形链球菌早期与唾液获得性膜的非特异黏附过程, 同时还参与了变形链球菌与牙菌斑早期定居菌血链球菌、口链球菌、轻链球菌、粘性放线菌的相互黏附过程¹。其中的 SBR, 即富丙氨酸区被认为是有效黏附区, 具有免疫原性和免疫反应性, 用变形链球菌表面蛋白 SBR 口服免疫小鼠², 可诱导机体产生抗 PAc 特异性抗体和 T 细胞增殖反应。

CTB 是霍乱毒素的连接亚单位, 能与有核细胞表面神经节苷脂 G_{M1} 受体特异性结合, 可协助多肽分子进入细胞, 是一种理想的制备抗病疫苗的载体。同时 CTB 还具有较强的免疫原作用, 能够刺激机体产生针对 CT 的抗体。由于 G_{M1} 受体广泛存在于有核细胞的表面, 将 CTB 与其他抗原合并免疫, 可以激发机体产生针对其他抗原的较高效价的抗体。CTB 的这一特性, 有助于解决许多口服疫苗在胃肠道内易被分解和抗原成分在 Peyer's 结的 M 细胞中定位吸收的问题, 因而, CTB 作为免疫佐剂得到了较为广泛的应用。研究表明, 口服变形链球菌表面蛋白唾液黏附区和霍乱毒素 B 亚单位的嵌合蛋白 (SBR-CTB) 可以刺激机体产生特异性抗表面蛋白 IgA, 降低龋病的发生³。

通过基因重组用变形链球菌 PAc 中相对分子质

量为 4.2×10^4 的 SBR 取代 CT 中具有毒性的 CTA1 亚单位, 保留具有连接功能的 CTA2 亚单位, 构成嵌合质粒 pSBR-CT^{Al}, 转染 *E. coli*, 表达产物嵌合蛋白 SBR-CT^{Al} 经酶联免疫吸附检测, 既有结合 G_{M1} 神经节苷脂的能力, 又保留 SBR 的抗原性, 经口腔免疫小鼠, 诱导出高滴度的抗 Ag / 的 SIgA 和血清 IgG, 且持续 3~6 月, 降低龋病的发生, 与用 SBR 混合非结合的 CTB 免疫效果比较, 其免疫效果明显增强⁴。

3.2 关于可食用疫苗

可食用疫苗是 90 年代以来新兴的研究领域, 有易形成产业化规模、价廉、安全及使用方便等特点。1990 年, Curtiss 等⁵ 利用转基因烟草表达了变形链球菌 SpaP 蛋白, 发现口服 SpaP 蛋白后, 唾液中检测到抗 SpaP 蛋白的 SIgA, 但此后没有进一步相关报道。此后, 利用转基因烟草或马铃薯生产疫苗来预防腹泻及病毒性疾病的研究开展起来^{6,7}。Ma 研究小组^{8,9} 于 1995 年和 1998 年运用转基因烟草生产 SIgA, 进行局部免疫防龋的研究工作。由于烟草含有生物碱不能直接对人体使用, 马铃薯必须熟食而降低抗原的免疫性, 研究者们致力于寻找可直接食用的植物作为生物反应器, 希望疫苗成分包含在可食用的植物果实或叶片中, 在食用这些植物性食物的同时完成一次预防性接种, 于是香蕉等可食用植物发展为替代物来生产疫苗。

本课题研究小组选用番茄作为生物反应器, 因为番茄含有丰富的营养成分, 可以直接食用或制成果酱食用, 且研究发现番茄可以提高机体的免疫力, 预防膀胱癌和前列腺癌的发生¹⁰。目前, 已将含变形链球菌表面蛋白唾液黏附区植物表达质粒的农杆菌载体成功转化入番茄植株, 并培养出果实。

3.3 植物表达载体的构建

外源基因在植物内高效表达的关键在于高效表达的载体, 高效表达的载体必须具有强启动子、转录终止信号、供外源基因插入的多克隆位点。pROK 是转基因植物技术中较好的表达载体, 其中含有一个 CaMV35s 启动子、终止子和多酶切位点的片段。CaMV35s 启动子来自花椰菜花叶病毒 (cauliflower mosaic virus, CaMV), 由于启动 CaMV 基因组的一小段重复序列的转录产物的沉降系数是 35 s, 故称为 35 s 启动子。35 s 启动子是很强的组成型启动子, 能使外源基因在植物细胞中表达, 并且表达量很高。本实验将双酶切后的 P2 片段与 pROK 载体相连, 构建能高效表达目的基因的植物表达载体。

表达载体中应含有筛选标记基因以便在转化过

程中筛选出转化细胞。本实验所选用的载体 pROK 的左右边界之间有新霉素磷酸转移酶基因 (Npt⁻) ,它编码的产物对卡那霉素具有抗性,其作用原理是通过酶促磷酸化使氨基葡萄糖类抗生素失活,从而解除毒性。Npt⁻ 对茄科植物的转化选择特别有效,包括番茄、烟草、马铃薯等,已成功地转化了许多植物。经基因和蛋白安全性分析后认为,Npt⁻ 可用于培育番茄新品种。

本研究在构建载体时将 *bar* 基因串连到含有目的基因的质粒上,且位于左右边界序列之间,在进行植物转化时能和目的基因一起插入植物基因组中,作为一种筛选标记,为提高后期转基因植株的分离筛选效率提供可靠基础,在转基因后代发生分离时,可通过喷洒除草剂筛选掉非转基因和假杂种进行纯合系的选择,同时获得抗除草剂的性能,为后期的培育种植提供有利条件。

至此,本实验构建了能高效表达 SBR-CT^{Al} 的植物表达载体 pROSC 与 pROSB,为可食用防龋疫苗的研究奠定了基础,为免疫防龋开辟了新思路。

参考文献

- 1 Brady LJ, Piacentini DA, Crowley DJ, et al. Identification of monoclonal antibody binding domains within antigen PI of *Streptococcus mutans* and cross-reactivity with related surface antigens of real streptococci. *Infect Immun*, 1991, 59(12):4425-4435
- 2 Hajishengallis G, Russell MW, Michalek SM. Comparison of an adherence domain and a structural region of *Streptococcus mutans* antigen / in protective immunity against dental caries in rats after intranasal immunization. *Infect Immun*, 1998, 66(4):1740-1743
- 3 Toida N, Hajishengallis G, Wu HY, et al. Oral immunization with the saliva-binding region of *Streptococcus mutans* Ag / genetically coupled to the cholera toxin B subunit elicits T-helper-cell responses in gut-associated lymphoid tissues. *Infect Immun*, 1997, 65(3):909-915
- 4 Hajishengallis G, Hollingshead SK, Koga T, et al. Mucosal immunization with a bacterial protein antigen genetically coupled to cholera toxin A2/B subunit. *J Immunol*, 1995, 154(9):4322-4332
- 5 Curtiss R, Cardineau GA. Oral immunization by transgenic plants. World Intellectual Property Organization, 1990, PCT/us89/03799
- 6 Wigdorovitz A, Carrille C, Dus Santos MJ, et al. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, 1999, 252(2):347-353
- 7 Tuboly T, Yu W, Bailey A, et al. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*, 2000, 18(19):2023-2028
- 8 Ma JK, Hiatt A, Hein M, et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plants (see comments). *Science*, 1995, 268(5211):716-719
- 9 Ma JK, Hikmat BY, Wycoff K, et al. Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Nat Med*, 1998, 4(5):601-607
- 10 Okajima E, Tsutsumi M, Ozono S, et al. Inhibitory effect of tomato juice on rat urinary bladder carcinogenesis after N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine initiation. *Jpn J Cancer Res*, 1998, 89(1):22-26

(2002-02-06 收稿,2003-01-07 修回)

(本文编辑 王 晴)

《中国口腔医学年鉴》第十卷出版发行

《中国口腔医学年鉴》第十卷于2003年7月出版发行。该书由周学东教授主编,全国近20所高等院校70余名口腔医学专家、教授组成的编辑委员会编纂,四川科学技术出版社出版。

该书是我国一部口腔医学综合性资料密集型的工具书。1984年创刊,每两年出版一卷,迄今已出版10卷。它集全国生物、医药类期刊之精华,并精选、综合与口腔医学有关资料,较全面地反映近几年我国口腔医学各学科在临床、科学研究的发展状况及学术水平、最新研究动态等;反映我国口腔医学教育的发展和口腔医学领域的重大事件等。第十卷设回顾、论坛、文选、述评、口腔医学题录索引、教育、人物、口腔医学组织机构、记事、特载9个栏目。该书适宜从事口腔医学医疗、教学、科研人员及口腔医学学生等阅读。

全书70万字,16开本,精装,每册定价68.00元(邮寄需加邮挂费6.00元)。需购书者请汇款至:四川成都人民南路三段14号(邮编610041),四川大学华西口腔医学院《中国口腔医学年鉴》编辑部收,并在汇款单附言栏内写明所购书名(卷)、数量。联系电话:028-85502414。

《中国口腔医学年鉴》编辑部