

以提高乙肝病毒表面抗原表达量和免疫原性为目的的番茄果实特异表达载体的构建^{*}

祁 瑜, 贺竹梅, 郑诺燕, 徐 茵
(中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 为了提高乙肝病毒表面抗原基因在番茄果实中的表达量和免疫原性, 采用克隆的 E8 番茄果实特异表达启动子和乙肝病毒表面抗原 M 蛋白基因构建了植物表达载体 pBIES2 及只含有乙肝病毒表面抗原 S 蛋白的表达载体 pBIES, 并将它们分别导入根癌农杆菌 LBA4404 中。最后对该载体的优越性进行了讨论。

关键词: E8 启动子; 乙肝病毒表面抗原; 植物表达载体

中图分类号: Q782 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 06-0075-04

乙肝是由乙肝病毒 (HBV) 引起的传染病。HBV 入侵人体后引发急、慢性肝炎, 肝硬化及肝细胞癌变等。世界卫生组织 2002 年的报告指出: 全世界约有 3.5 亿 HBV 携带者, 因此有效防治乙肝是一个世界性的健康问题。

乙肝病毒衣壳蛋白的主蛋白 (HBsAg) 能诱发机体产生免疫反应, 可作为乙肝疫苗使用。目前商品化的乙肝疫苗蛋白主要通过微生物发酵获得, 但发酵生产工序烦琐, 成本高, 不易在发展中国家推广使用。基于植物表达系统的各种优点^[1], 人们尝试在各种植物中表达 HBsAg 并获得成功^[2-5], 提示了植物口服疫苗的可行性。

为了提高在可食性植物番茄中 HBsAg 的表达量, 且使表达的疫苗蛋白具有更高的免疫原性, 我们以植物双元表达载体 pBI121 为基础, 构建了以番茄果实成熟特异启动子 E8 的核心序列代替 35S 启动子且含有 HBsAg 基因及其前导序列 preS2 的重组质粒 pBIES2, 同时, 为了比较在番茄中表达的抗原的免疫原性, 构建了与 pBIES2 仅差 preS2 片段的载体 pBIES, 为以后抗乙肝病毒番茄疫苗的研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌种及质粒

大肠杆菌 *E. coli* Top10, 根癌农杆菌 *A. tumefaciens* LBA4404, 以及克隆载体 pBluescript II SK+/- (pSK)、植物表达载体 pBI 121 等质粒由本室保存; 克隆的 adr 亚型乙肝病毒 (pADR-1)

DNA 由中山大学彭志强博士提供。

1.2 植物材料

实验所用番茄品种为金丰 1 号 (*Lycopersicon esculentum* cv. Jinfeng 1), 种子购自广州市蔬菜研究所。

1.3 酶与试剂

DNA 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, T 载体 pMD18-T 和 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司; 抗生素氨苄青霉素 (Amp)、卡那霉素 (Kan)、和链霉素 (Str)、羧苄青霉素 (Car) 为 Sigma 公司产品; 其他化学试剂均为国产分析纯。

1.4 PCR 引物

根据甘人宝等^[6]发表的序列设计 3 条引物, P1 和 P3 扩增 preS2+S 基因片段, P2 和 P3 扩增 S 基因片段; 根据 Deikman 等^[7]发表的序列设计引物 P4 和 P5, 用于扩增 E8 启动子 1.1 kb 核心片段; 引物合成及序列分析由上海博亚生物技术有限公司完成。

P1: 5'-C ATG CAG TGG AAC TCC AC 3'

P2: 5'-CC ATG GAG AAC ACA ACA T 3'

P3: 5'-G GGT TCA AAT GTA TAC CC 3'

P4: 5'-AAG CTT CTA GAA ATT TCA CGA AAT 3'

P5: 5'-CTT CTT TTG CAC TGT GAA TGA T 3'

本文用 CTAB 法提取植物 DNA^[8], 用改良方法^[9]提取质粒; 所有 DNA 重组操作按《分子克隆》的方法进行^[10]; 用冻融法将外源 DNA 导入根癌农杆菌^[11]。

* 收稿日期: 2005-04-13

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (001212)

作者简介: 祁瑜 (1978 年生), 男, 硕士, 通讯联系人, 贺竹梅; E-mail: lsshezm@mail.sysu.edu.cn

2 结 果

2.1 preS2+S 基因的克隆及中间克隆载体 pSKS2 的构建

用 PCR 的方法从 pADR-1 中调出约 850 bp 的 preS2+S 片段，将纯化的 PCR 产物克隆到 T 载体 pMD18-T 上，得到 pTS2。BamH I 和 Pst I 双酶切鉴定；同时将 pTS2 转化大肠杆菌 Top10，在 Amp⁺ 的 LB 平板筛选得到转化子，提取质粒，测序结果显示克隆的 preS2+S 片段与乙肝病毒 pADR-1 亚型只有一个碱基的区别。用 BamH I 和 Pst I 双酶切 pTS2，低熔点琼脂糖凝胶电泳回收 preS2+S 片段，产物与同样用 BamH I 和 Pst I 双酶切的 pSK 连接。连接物转化大肠杆菌 Top10，从 Amp⁺ 的 LB 平板上挑单菌落培养，提取质粒 DNA 进行 BamH I 和 Pst I 双酶切与 PCR 鉴定，分别切出与扩增出约 850 bp 的片段，证实 preS2+S 片段克隆到 pSK 上，得到 pSK2。

2.2 E8 启动子的克隆及其中间载体 pBIE8 的构建

以番茄金丰 1 号基因组 DNA 为模板扩增出 1.1 kb 的 E8 启动子核心片段，纯化的 PCR 产物与 T 载体 pMD18 T 连接得到 pTE8。Hind II 和 Sac I 双酶切得到大小正确的片段；序列分析结果与 GenBank 上发布的序列（X13437）完全一致。用 Hind III 和 Sac I 分别对 pTE8 和 pBI121 进行双酶切，将两组酶切产物混合进行连接反应，连接产物转化大肠杆菌 Top10。重组子质粒用 Hind III 和 Sac I 双酶切及 PCR 鉴定均得到 1.1 kb 片段，证明 E8 片段已经克隆到 pBI121 载体中，中间载体 pBIE8 用 1.1 kb E8 启动子核心部分取代了 pBI121 上的 35S 启动子和 GUS 检测基因。

2.3 植物双元表达载体 pBIES2 的构建与鉴定

KpnI 和 SacI 双酶切 pSKS2 和 pBIE8，然后连接、转化和筛选。用 1.1 kb E8 片段的上游引物（P4）和 preS2+S 片段的下游引物（P3）进行 PCR，在 24 个转化子中有 2 个菌落的质粒 DNA 扩增出约 1.9 kb 片段，大小相当于 1.1 kb E8 片段与 preS2+S 片段长度之和；再用 Hind III 和 SacI 对这 2 个重组子的质粒 DNA 进行双酶切鉴定，切下的片段大小与 PCR 产物大小一致，表明它们为连接正确的重组子（图 2a），命名为 pBIES2。整个构建过程如图 1 所示。

2.4 植物双元表达载体 pBIES 的构建与鉴定

用 PCR 的方法以 P2 和 P3 为引物，从 pADR-1 中扩增获取约 690 bp 的 S 片段，按 2.1 的方法将 S 基因插入 pSK 载体中得到 pSKS；经过 PCR 和双酶

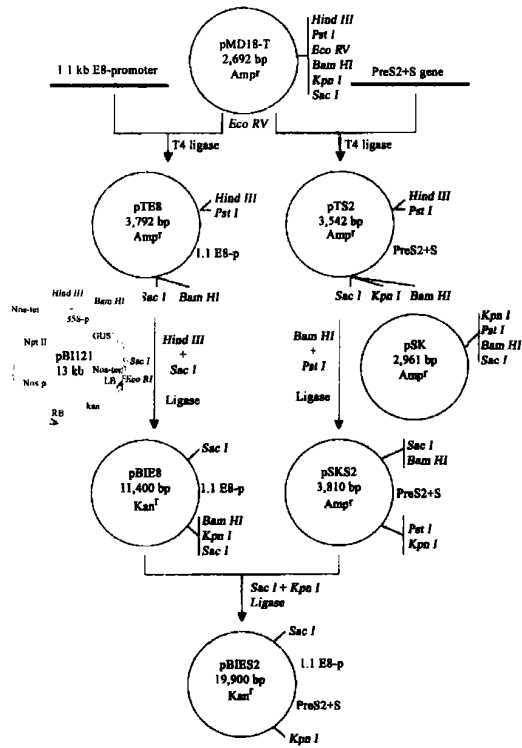


图 1 植物表达载体 pBIES2 的构建

Fig 1 Schematic representation of the construction procedure of plant expression vector pBIES2

切鉴定后，分别用 BamH I 单酶切 pTE8 和 pSKS；两组酶切产物按 2.2 的方法连接、转化 Top10 和筛选。由于单酶切连接会产生两种连接产物，因此用 Pst I 对重组子的质粒 DNA 进行酶切鉴定，其中 1 号重组子的质粒 DNA 得到 1.1 kb 的目的片段，说明 S 基因按正确的方向连入，而 2 号和 3 号重组子的质粒 DNA 切出 1.8 kb 的片段，为 S 基因反向连接的结果。用 Hind III 和 Sac I 分别对 pTES 和 pBI121 进行双酶切，然后按 2.2 的方法连接、转化 Top10 和筛选，获得 10 个单菌落。按 2.3 的方法进行 PCR 和双酶切鉴定，其中 7、8、9 号重组子的质粒 DNA 得到约 1.8 kb 的 PCR 产物与相同大小的酶切产物，长度与 1.1 kb E8 片段与 S 片段长度之和（1.8 kb）一致，表明它们为连接正确的重组子，命名为 pBIES。

2.5 植物表达载体导入农杆菌

将构建的表达载体 pBIES2 和 pBIES 用冻融法转化根癌农杆菌 LBA4404，在含 Car 和 Kan 的 YEB 平板上得到单菌落。提质粒，按 2.3 的方法作 PCR 和双酶切鉴定，均分别得到 1.9 kb 和 1.8 kb 的扩增产物及酶切产物（图 2），证明 pBIES2 和 pBIES 被成功转入农杆菌。

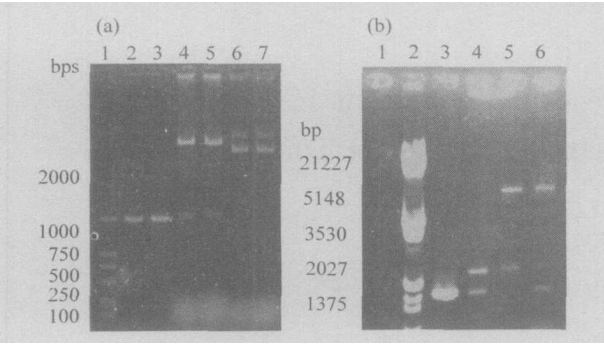


图 2 pBIES2 的酶切和 PCR 鉴定图谱 (a) 及 pBIES 的酶切鉴定图谱 (b)

Fig 2 The identification of pBIES2 by PCR and digestion with *Hind* III and *Sac* I

(a) 1. DNA 相对分子质量标准; 2 和 3. 以 pBIES2 为模板的 (E8+S2+S) PCR 扩增产物; 4 和 5. *Hind* III+*Sac* I 酶切 pBIES2 的结果; 6 和 7. 质粒 pBIES2;
(b) 1. PCR 负对照; 2. λ DNA/*Eco* RI & *Hind* III; 3. 以 pTES 为模板的 (E8+S) PCR 产物; 4. pTES/*Hind* III+*Sac* I; 5. pBI121/*Hind* III+*Sac* I; 6. pBIES/*Hind* III+*Sac* I

3 讨 论

本实验所构建的植物表达载体 pBIES2 以调节型启动子 E8 的核心片段代替了 pBI121 中的 35S 启动子。E8 是番茄果实特异启动子, 在番茄果实自然成熟或由乙烯催熟的过程中, E8 启动子控制下的基因的转录水平会骤然提高^[7]。全长的 E8 启动子为 2.2 kb, 其中从转录起始位点到-1088 处约 1.1 kb 的片段为启动子的核心序列, 这部分对于其控制下的基因的特异性转录已经足够^[12]。本实验采用的就是这部分序列。

乙肝病毒衣壳由 S 蛋白、M 蛋白和 L 蛋白构成。3 种蛋白由同一个开放阅读框编码, 该开放阅读框为 preS1 区、preS2 区和 S 区, 其中 S 区编码 S 蛋白, S 区和 preS2 区共同编码 M 蛋白, 3 个区一起共同编码 L 蛋白。研究证实 S 蛋白具有较好的免疫保护作用, 但在 HBsAg 作为疫苗使用的过程中也发现约 10% 的成年接种者对抗原不产生应答。而许多实验结果表明 preS2 的免疫原性高于 S 蛋白, 能促进机体产生抗-HBs^[13], 在疫苗中引入该区段可克服对 HBsAg 的无免疫应答现象, 而且产生的抗-PreS2 抗体具有中和 HBV 的作用^[14]。M 蛋白已在马铃薯中成功表达。有人认为完整的 L 蛋白比 M 蛋白有更高的免疫原性, 但赵春晖等人曾将 L 蛋白的编码基因转入番茄, 但在转基因番茄中没有检测到 L 蛋白的表达^[9]。因此本实验选择构建含 M 蛋白编码基因, 即 preS2+S 基因的植物表达载体 pBIES2, 同时构建仅含 S 基因的植物表达载体

pBIES, 以期在以后的研究中比较两者在转基因番茄中表达的差异和两种转基因番茄的免疫效果。相关转基因番茄的研究工作正在进行。

参考文献:

[1] MA J K, BARROS E, BOCK R et al. Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants[J]. EMBO Reports, 2005, 6(7): 593-599.
[2] MASON H S, LAM D M K, ARNTZEN C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 11745-11749.
[3] KAPUSTA J, MODELSKA A, FIGLEROWICZ M et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus[J]. FASEB J, 1999, 13: 1796-1799.
[4] THANAVAIA Y, MAHONEY M, PAL S et al. Immunogenicity in humans of an edible vaccine for hepatitis B[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(9): 3378-3382.
[5] 赵春晖, 王荣, 赵长生, 等. 含与不含前导序列的乙肝病毒表面抗原在转基因番茄中表达的研究[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(2): 190-193.
[6] 甘人宝, 储美瑾, 沈绿萍, 等. 克隆的 adr 亚型乙型肝炎病毒(pADR-1) DNA 的全顺序[J]. 中国科学: B 辑, 1986, 1: 55-65.
[7] DEIKMAN J, KLINE R, FISCHER R L. Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*)[J]. Plant Physiology, 1992, 100: 2013-2017.
[8] 邹喻萍, 葛颂, 王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 16.
[9] 贺竹梅, 刘秋云. 一种提取质粒 DNA 的改良方法[J]. 生物技术, 1996, 6(1): 37-38.
[10] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. 北京: 科学出版社, 1992: 1-50.
[11] RAINER H, LOTHAR W. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16(20): 9877.
[12] COUPE S A, DEIKMAN J. Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 5' flanking regions of two fruit-ripening genes[J]. Plant J, 1997, 11(6): 1207-1218.
[13] GEISLER M, TOKUSHIGE K, CHANTE C C, et al. Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural proteins in mice after DNA-based immunization[J]. Gastroenterology, 1997, 112(4): 1307-1320.
[14] POLS, NAIPAS B, DRISS F, et al. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B[J]. J Hepatol, 2001, 34(6): 917-921.

Construction of Two Plant Expression Vectors for Enhancing
Expression and Immunogenicity of HBsAg in Tomato

QI Yu, HE Zhu mei, ZHENG Nuo yan, XU Yin

(School of Life Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Expression amount and immunogenicity of plant produced vaccine are two main problems in the development of plant based vaccine. For the purpose of enhancing expression in tomato fruits and immunogenicity of HBsAg, we constructed plant expression vector pBIES2, which contains HBsAg M protein gene and under the control of E8 tomato fruit specific promoter. Another expression vector pBIES, containing HBsAg S protein gene and under the control of E8 promoter, was constructed as well. Both the vectors were introduced into *A. tumefaciens* LBA4404. A brief discussion for the advantages of pBIES2 was processed at the end of the article.

Key words: E8 promoter; HBsAg; plant expression vector

(上接第 74 页)

The Expression of Tomato 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate
Synthase in *Escherichia coli*

LI Jian feng¹, ZHOU Hui¹, XU Zeng fu¹, LI Ning², QU Liang hu²

(School of Life Sciences //Key Laboratory of Gene Engineering of the Ministry of Education,
Sun Yat sen Universty, Guangzhou 510275, China;

2. Department of Biology, The Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Hongkong SAR, China)

Abstract: Ethylene is a simplest phytohormone regulating many aspects of the developmental process in higher plants. ACC synthase is the committed enzyme to regulate the rate limiting step in ethylene biosynthetic pathway. This work clones the cDNA of tomato ACC synthase (*LeACS2*) by RT-PCR and overproduced it in *Escherichia coli* BL21 starTM (DE3) pLysS cells as C terminal fusion with GST tag. The resultant 83 kDa fusion protein was found to have good solubility. The LeACS2 enzyme was purified by GST affinity purification and MonoQ chromatography. Consequent enzymatic activity assay confirmed its intact catalytic function.

Key words: ACC synthase; LeACS2; GST fusion; good solubility; purification; activity assay