

含幽门螺杆菌 CagA、UreB 蛋白与霍乱肠毒素 B 亚单位(CTB)融合基因的植物表达载体的构建及遗传转化

程 畅¹ 陈 珍^{1,2} 朱 诚¹

(¹ 浙江大学生命科学学院 植物生理与生物化学国家重点实验室 杭州 310029)

(² 台州学院生命科学与医药化工学院 台州 317000)

摘 要 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染是慢性胃炎和消化性溃疡的主要病因,与胃癌和胃粘膜相关淋巴组织(MALT)淋巴瘤的发生也密切相关。目前所用的疫苗制造成本高、运输费用贵,然而利用转基因植物生产的植物疫苗成本低廉、服用方便是现有疫苗的良好替代品。将 Hp 相关蛋白与免疫佐剂 CTB 的融合基因(*ctb-linker-cagA* 和 *ctb-linker-ureB*)利用 PCR、酶切、连接等一系列方法从载体 p1300-WxCLCN 和 p1300-WxCLUN 中重组到载体 pCAMBIA2301 中(含 35S 启动子),重组载体分别命名为 p2301-35SCLCN 和 p2301-35SCLUN。通过冻融法将载体导入农杆菌 EHA105 菌株中,以农杆菌介导的方法,将重组载体 p2301-35SCLCN 和 p2301-35SCLUN 转化烟草黄苗榆和心叶烟,获得了具有卡那霉素抗性再生植株,经过酶切、PCR、GUS 染色和 PCR-Southern 鉴定结果表明,目的基因分别正确插入载体中并稳定整合到植株中,为利用植物反应器生产幽门螺杆菌疫苗奠定了坚实的基础。

关键词: 幽门螺杆菌; *cagA* 基因; *ureB* 基因; *ctb* 基因; 基因融合; 表达载体

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0029-05

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染已被公认为慢性胃炎、胃十二指肠溃疡的重要病因,与胃癌、胃黏膜相关性淋巴组织(MALT)淋巴瘤的发生密切相关,被世界卫生组织列为 I 类致癌原^[1]。无论在发达国家还是发展中国家, Hp 的感染率都较高。人体感染 HP 后体内尽管有强烈的局部和全身免疫反应,但并不能有效清除感染,相反能引起机体发生免疫病理反应。目前 Hp 的根治性治疗方案是联合应用质子泵、铋剂、抗生素的“三联”或“四联”疗法^[2]。但 Hp 感染范围广,治疗费用较高,药物治疗存在一定的不良反应,停药后易复发,而且随着抗生素的普遍应用,耐药菌株逐渐增多等因素,使以上治疗的临床应用受到较大限制。利用植物反应器来生产抗 Hp 疫苗不仅具有较高的科研价值,而且具有巨大的经济效益和社会效益。

Hp 疫苗的预防和治疗关键作用在于其激发机体的免疫保护。细胞毒素相关基因(cytotoxin-associated gene A, CagA)是 Hp 的主要毒力因子,与很多胃病的发生有着密切的关系^[3~5],有很强的免疫原性。Hp 尿素酶(UreB)作为幽门螺杆菌的定植因子和毒力因子,在 Hp 感染过程中其独特的作用,

为 Hp 在胃内存存所必需。尿素酶同样能引起较强的免疫原性。CTB 是霍乱毒素的非毒性部分,有很强的免疫原性,全长约 380bp,口服时 CTB 与 Ag 蛋白结合时能够增强鼠科动物特异性 Ag 体液免疫反应^[6],另外利用 *ctb* 作为免疫佐剂能够诱导所辅助的蛋白产生相应部位的特异 Ag 分泌 IgA^[7,8]增强免疫效力。

本实验构建了 CagA、UreB 与 CTB 的融合基因的植物表达载体,并且鉴定了外源融合基因的整合情况,为利用植物反应器生产疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 烟草: 黄苗榆(普通烟)和心叶烟,由浙江大学生命科学学院陈集双教授惠赠。

1.1.2 菌种: 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105,由中国水稻研究所农业部生物学重点实验室提供;改造后的 pCAMBIA1301 质粒,由中国农业大学张世宏博士提供。p1300-WxCLCN 及 p1300-WxCLUN 质粒载体由浙江大学医学院病原生物学研究所方平楚教授、姜

基金项目 浙江省自然科学基金重点资助项目(ZA0213) 浙江省科技厅资金资助项目(2003C32015)

* 通讯作者。E-mail: qzhch@zju.edu.cn

作者简介 程 畅(1982-),女,东北辽宁人,硕士研究生,研究方向为植物分子及转基因研究。E-mail: chengchangchang@yahoo.com.cn

收稿日期 2006-03-15 接受日期 2006-05-30 修回日期 2006-06-30

云水硕士等克隆构建^[9]。pCAMBIA2301 质粒、含 CaMV 35S 启动子调控的报告基因 *gus* 和筛选标记基因 *npt II* (卡那霉素抗性基因), 由中国科学院上海植物生理生态所植物分子遗传国家重点实验室张景六研究员惠赠。重组质粒 p23-35SCLCN 和 p23-35SCLUN 由本实验室构建, 将构建好的质粒载体通过冻融法转化农杆菌, 用于植物的遗传转化。

1.1.3 试剂: *Taq* 酶购自北京鼎国生物技术有限公司, dNTP 和卡那霉素 (Kanamycin, Km) 购自上海 Sangon 公司, 琼脂糖 (Biowest agarose) 由上海 Yito 有限公司分装。明胶 Phytigel 和利福平 (Rifampicin, Rif) 为 Sigma 公司产品, 潮霉素 (hygromycin B, Hyg) 为 Roche 公司产品。蛋白胨 Tryptone、酵母提取物 Yeast extract 为 OXOID 公司产品。其它常用化学试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 PCR 引物设计

ctb 和 *cagA* 的检测引物根据 GenBank 公布的序列 (U25679, AB015416) 进行设计, *ureB* 的检测引物是根据载体 p1300-WxCLUN 测序的结果进行设计, 以上引物均由上海 Sangon 公司合成。引物序列分别为: *ctb1*: 5'-TCTTCAGCATATGCACATGGA-3'; *ctb2*: 5'-CAATCGCATGAGGCGTTT-3'; *ureB1*: 5'-GGCAAGACTTTGAGGGAAG-3'; *ureB2*: 5'-TAGTGGAAGCGGGCA GAATGTT-3'; *cagA1*: 5'-CTCGCAACTAAGGGAAGAAT ACG-3'; *cagA2*: 5'-CCTCAACATAAGGGAAGAAT ACG-3'; *Sma I* -*ctb5'*: 5'-GCGCCCGGGATGATTAATTTAA ATTTGG-3'; *Sac I* -*ureB3'*: 5'-GACGAGCTCCTAGAA AATGCTAAAGAGTTG-3'; *Sac I* -*cagA3'*: 5'-GACGAGC TCTCACTCTAAATGCTCTCGTTT-3'。

1.3 DNA 重组

质粒提取、酶切、连接、转化按文献^[10]进行。

1.4 烟草的转化及转基因植株的培养

碱法小量提取构建好的重组质粒 DNA, 用液氮冻融法转化根癌农杆菌 EHA105。挑取数个菌落提取质粒, PCR 及酶切鉴定, 将鉴定后正确的菌落用于转化烟草, 取室温生长的烟草叶片流水冲洗数小时, 0.1% 升汞灭菌 8min, 无菌水冲洗 3~5 次。在无菌的条件下, 用剪刀将叶片剪成约 0.5 × 0.5 cm² 大小的叶盘, 至于诱导培养基上光照与培养 2d; 取 OD₆₀₀ 约 0.6~0.8 的菌液与烟草叶盘在室温下悬浮培养 10~15min, 并不时晃动, 用无菌纸吸干多余的菌液, 置于共培养基上 26℃ 暗培养 3d 后置于含有抗生素的一次选择分化培养基上, 光照培养 3 周转入二次选择分化培养基 (两周更换一次), 约 3 周后可见分

化苗; 当不定芽长至 1~2cm 时, 将不定芽转移至不含激素的生根培养基中, 将根系发达的转化植株炼苗后移入土壤中温室下培养。

1.5 PCR 方法快速鉴定转化植株

用改良后的 CTAB 方法提取烟草叶片 DNA, 利用 *ureB*、*cagA* 和 *ctb* 这 3 对引物进行 PCR 检测。PCR 反应条件: 94℃ 5min; 94℃ 30s, 58℃ 30s, 72℃ 1min, 反应 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。

1.6 报告基因的检测

GUS 基因表达的检测参照 Jefferson (1987)^[11] 组织化学染色, X-Gluc 染色配方: X-Gluc 1mg/mL, 2% (V/V) 甲醇, K₄F₆(CN)₆ 0.5mmol/L, 0.1% (V/V) Triton X-100, pH7.0 磷酸缓冲液 0.1mol/L。将转化后形成的愈伤组织和再生苗的叶片用蒸馏水充分洗涤 5~6 次, 滤纸吸干, 浸泡在 X-Gluc 染色液中染色过夜。叶片用 70% 乙醇脱色。

1.7 PCR-Southern 杂交

按照 ECL Southern 杂交试剂盒的说明进行探针的制备及各步杂交, 将杂交好的膜包裹与保鲜膜中, 轻抚去气泡。暗室中将膜的正面置于一张 X 光片上, 压片 2h, 严防曝光, 暗中取出胶片于显影液中洗片 2min 左右; 在清水中漂洗 1min, 再于定影液中定影, 至胶片通明条带清晰可见为止。

2 结果

2.1 融合基因载体的构建

将含有目的基因的载体 p1300-WxCLUN 用 *Kpn*I 和 *Hind*III 进行双酶切, 同时将原始质粒载体 p2301 用相同的酶进行酶切后连接, 再将来自 p1301-35SCC1N (图 1) 质粒载体的 35S 启动子插入重组质粒 p2301 中的目的基因之前, 得到含有融合基因

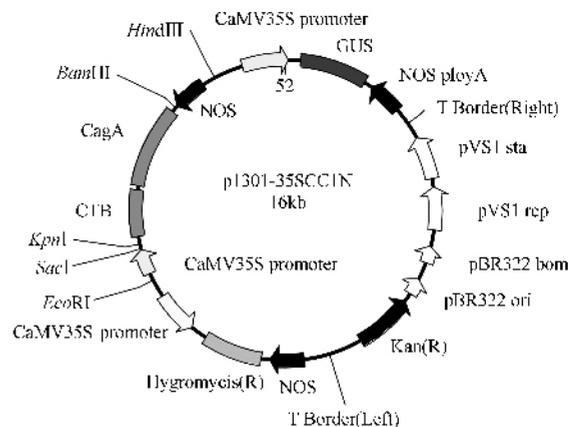


图 1 改造后的质粒载体 p1301-35SCC1N

ctb-ureB 及 35S 启动子的植物表达载体 p23-35SCLUN (图 2-A)。将植物表达载体 p23-35SCLUN 和 p1300-WxCLCN 同时用 *Kpn* I 及 *Pst* I 进行双酶切后连接,得到含有融合基因 *ctb-cagA* 的植物表达载体 p23-35SCLCN (图 2-B)。

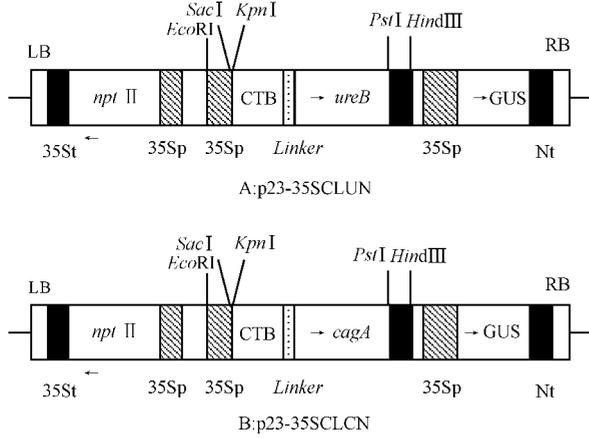


图 2 重组植物表达载体 p23-35SCLUN (A) 和 p23-35SCLCN (B) T-DNA 区域图谱

Fig. 2 Structures of the T-DNA region of the recombinant plant expression vectors p23-35SCLUN and p23-35SCLCN. LB: the left border; RB: the right border, defines the beginning and the end of the DNA transferring region into the plant; 35Sp: cauliflower mosaic virus 35S promoter; Npt: nopaline synthase gene promoter; Nt: nopaline synthase gene polyadenylation and transcription terminator site; GUS: β -glucuronidase coding region of the bacterial; *gusA*: *uidA* gene; *nptII* gene: encodes neomycin phosphotransferase.

2.2 转化植株再生芽的获得、伸长、生根及成熟

用根癌农杆菌浸润法对烟草外植体进行转化。对转化芽做伸长及生根培养,并将根系发达的植株转至土壤于自然条件下培育至成熟(图 3)。

2.3 转化植株的鉴定

2.3.1 GUS 报告基因的检测: 分别取普通烟非转化植株的叶片和 6 株转基因植株的叶片,剪成小片,用 GUS 染色液浸泡过夜,用乙醇脱色后观察,在 6 株转基因烟草叶片中均检测到了 GUS 基因的表达(图 4),而对照叶片无蓝色斑点。

转化后得到的抗性芽,在生根培养过程中,有些芽基部形成较多的愈伤组织而阻止了芽的正常生根,对这些抗性愈伤组织进行 GUS 染色,观察到了大量蓝色斑点(图 4)。

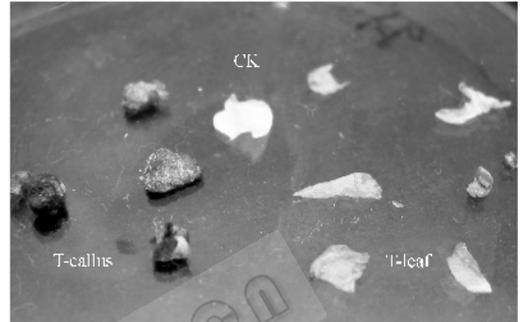


图 4 GUS 基因在转基因烟草叶片和愈伤组织中的表达

Fig. 4 GUS expressions in tobacco leaves and calli after transformation. CK: Non-transgenic tobacco leaf; T-leaf: Transgenic tobacco leaf; T-callus: Transgenic tobacco callus tissue.

2.3.2 转基因植株的 PCR 检测: 以烟草叶片基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,p23-35SCLCN 转化后得到的 15 株植株中有 12 株都检测到了基因 *cagA* (652bp) 和 *ctb* 基因片段,大小与理论相符,PCR 阳性率为 80%。其中有一株植株检测到了 *ctb* 基因片段 (322bp) 而未检测到 *cagA* 基因片段。

对 p23-35SCLUN 转化后得到的 22 株烟草进行外源基因片段的 PCR 扩增,其中 19 株同时检测到了 *ureB* 基因 (762bp) 和 *ctb* 基因片段,而有 1 株未能

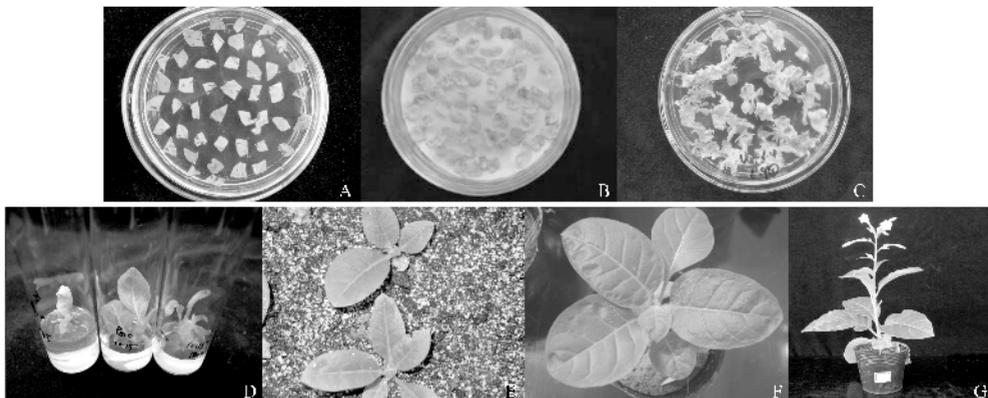


图 3 烟草遗传转化全过程图

Fig. 3 Different stages in tobacco genetic transformation process. A: Pre-culture of tobacco leaves on inducing medium; B: Transformed explants cultured on co-cultivation medium; C: Resistant shoots of tobacco regenerated from leaves of tobacco; D: Transgenic seedlings growing on rooting medium; E: Transgenic seedlings growing on vermiculite; F: Transgenic tobacco in greenhouse; G: Transgenic tobacco in flower.

检测到这两个基因片段,PCR 阳性率为 86.4%。此外还发现 1 号植株只检测到了 *ctb* 基因片段,而 7 号植株只检测到了 *ureB* 基因片段。

2.3.3 转基因植株的 PCR-Southern 杂交鉴定:PCR 扩增得到目的基因 *ctb* 322bp 的片段,纯化回收后定量,稀释至 10ng/ μ L,严格按照试剂盒操作标记探针和 Marker。选取 3 株 PCR 阳性植株,以基因组 DNA 为模板,用 50 μ L 体系进行 PCR 扩增,然后将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。电泳时将 PCR 扩增后所得的反应液直接以 50 μ L 上样。电泳后将 DNA 转移至尼龙膜上,与探针杂交(图 5)。

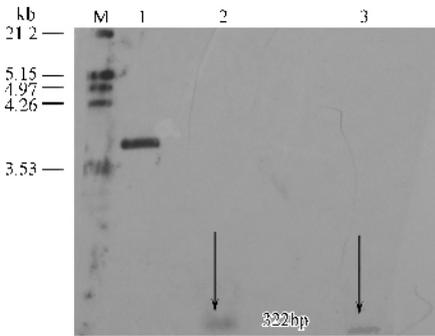


图 5 转 p23-35SCLCN 烟草植株 PCR-Southern 杂交检测

Fig.5 PCR-Southern analysis of transgenic tobaccos.

3 讨论

Hp 通常是胃粘膜组织的局部感染,其抗感染能力取决于粘膜免疫力,血清抗体仅有诊断价值,这决定了 Hp 疫苗必须是口服的。虽然单独服用保护性抗原也具有一定的免疫原性和免疫效应,但实验已证明辅以佐剂能增强免疫效果^[12,13]。CTB 一向被认为是有效和可靠的免疫佐剂。CTB 简单地与抗原混合进行免疫时,所产生的抗体效价远不及与抗原化学偶联后进行免疫时所产生的效价高^[14],但是化学交联存在着反应条件剧烈、交联效率低等缺点,所以通过基因融合技术使疫苗抗原与 CTB 融合,可方便操作又起到良好的免疫佐剂作用。

本文目的在于构建能在植物中高效表达 *ctb-cagA* 和 *ctb-ureB* 融合基因的植物表达载体。因此采用了酶切位点丰富、拷贝数高、连接效率高的 pCambia 系列载体,为了进一步提高目的基因的表达,插入的外源基因由 CaMV35S 启动子控制,CaMV35S 启动子含有一个双增强子序列,许多报道表明双增强子能增强启动子活性。为了提高融合基因的保真性,载体重组过程中选用酶切的方式避免 PCR 扩增中出现的碱基突变现象。

文中 Hp 相关蛋白基因都是连接在 *ctb* 和 *linker* 基因之后,利用 *ctb* 基因的目的在于其能够提高目的蛋白表达后的免疫活性,从而提高口服疫苗的口服效果。*CagA*、*UreB* 基因比 *ctb* 基因长很多,考虑到表达量及其空间构象的问题,因此在 *ctb* 和 *CagA*、*UreB* 基因之间加入了一段柔性的连接肽序列(图 2),这有利于两个基因所编码的蛋白质各自保持原有的构象,不影响融合蛋白活性的发挥。

通过根癌农杆菌介导的遗传转化方法获得转化植株,在转化植株的 PCR 检测结果中我们发现有几株材料出现了融合基因部分整合的现象,可见农杆菌在介导外源基因转化时可能会发生片段缺失或转移现象。Fladung^[15]认为如果外源基因整合在一个有高度转座活性的区域可能会导致外源基因的丢失。GUS 瞬时染色(图 4)和 PCR-Southern(图 5)的结果进一步证明了外源基因已整合入烟草植株的基因组中。PCR-Southern 中目的基因杂交条带位置稍有不同,这可能是由于插入片段的位置不同引起的。这些结果充分说明,3 种载体携带的两种融合基因大部分能很完整的整合进入转基因植株的基因组中,阳性率较高。

综上所述,本研究构建了高效的植物表达载体,为利用植物反应器来生产疫苗奠定了基础,植物疫苗的关键是外源基因能够在植物体内正常表达和表达量的问题。由于基因沉默现象的存在,即使外源基因整合到了植物染色体上,外源基因也不一定能够表达。所以转基因烟草中是否有融合蛋白的表达以及表达出来的蛋白是否有免疫原性,有待进一步试验来证明。后续的试验正在进行中,相信不久后植物疫苗将会发挥其巨大的潜力。

参 考 文 献

- [1] Hardin FJ, Wright RA. *Helicobacter pylori*: review and update. *Hospital physician*, 2002, 23: 31.
- [2] Anagnostopoulos GK, Kostopoulos P, Margantis G, et al. Omeprazole plus azithromycin and either amoxicillin or tinidazole for eradication of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol*, 2003, 36(4): 325-328.
- [3] The Eurogast Study Group. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. *Lancet*, 1993, 34: 1359-1362.
- [4] Sipponen P. Gastric cancer-a long-term consequence of *Helicobacter pylori* infection. *Scand J Gastroenterol*, 1994, 29: 24-27.
- [5] Van Doorn LJ, Figueiredo C, Sanna R, et al. Clinical relevance of the *cagA*, *vacA*, and *iceA* status of *Helicobacter pylori*.

- [6] Pierre P, Denis O, Bazin H, *et al.* Modulation of oral tolerance to ovalbumin by cholera toxin and its B subunit. *Eur J Immunol*, 1992, **22**: 3179.
- [7] Stok W, van der Heijden PJ, Bianchi AT. Conversion of orally induced suppression of the mucosal immune response to ovalbumin into stimulation by conjugating ovalbumin by cholera toxin or its B subunit. *Vaccine*, 1994, **12**: 521.
- [8] Wu HY, Russell MW. Induction of mucosal immunity by intranasal application of a streptococcal surface protein antigen with the cholera toxin B subunit. *Infect Immun*, 1993, **61**: 314.
- [9] 姜云水, 方平楚, 付亚萍, 等. 幽门螺杆菌 CagA 蛋白与 CTB 融合基因的克隆及其植物表达载体的构建. 科技通报, 2004 **20**: 189 - 193.
- [10] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996.
- [11] Jefferson RA. Assaying chimeric gene in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, **4**: 387 - 405.
- [12] Monath TP, Kleanthous H, Lee CK, *et al.* Development of recombinant *Helicobacter pylori* urease as an oral vaccine: Current status (abstract). *Gut*, 1993, **37**(Suppl 1): A52.
- [13] Ghiara P, Rossi M, Marcheletti M, *et al.* Therapeutic intragastric vaccination against *Helicobacter pylori* in mice eradicates another wise chronic infection and confers protection against reinfection. *Infect Immun*, 1997, **65**(12): 4996 - 5002.
- [14] Pyeung-Hyeun Kim, Lars Eckmann, Wha Jung Lee, *et al.* Cholera toxin and cholera toxin B subunit induce IgA switching through the action of TGF- β 1. *The Journal of Immunology*, 1998, **160**: 1198 - 1203.
- [15] Fladung M. Gene stability in transgenic aspen (*Populus*). I. Flanking DNA sequences and T-DNA structure. *Mol Gen Genet*, 1999, **260**: 574 - 581.

Construction of plant expression vectors with fusion gene of *Helicobacter pylori* cagA , ureB and ctb and its genetic transformation in tobacco

CHENG Chang¹, CHEN Zhen^{1,2}, ZHU Cheng^{1*}

(¹ State Key Laboratory of Plant Physiology & Biochemistry, College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(² College of Life Sciences and Pharmaceutical and Chemical Engineering, Taizhou University, Taizhou 317000, China)

Abstract: *Helicobacter pylori* (Hp) is the principal cause of most chronic active gastric and peptic ulcer disease, and also is closely related with gastric cancer and MALT lymphoma. Current vaccines are expensive to produce and deliver, however, transgenic plants expressing recombinant vaccine immunogens offer an attractive and potential inexpensive alternative to vaccination and injection. In this study, plant expression vectors which harbor Hp related proteins CagA and UreB were constructed. Fusion gene *ctb-linker-cagA* and *ctb-linker-ureB* were cut from vectors p1300-WxCLCN and p1300-WxCLLUN, and then constructed into vector pCAMBIA2301 which was under the control of the CaMV 35S promoter by series molecular methods. Those reconstructed vectors were named p2301-35SCLCN and p2301-35SCLLUN and were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105. Tobacco was transformed by co-cultivating leaf discs with *Agrobacterium* strains harboring fusion genes. The regenerated Kanamycin-resistant transforms were selected, elongated, rooted and transferred for flowering in greenhouse. Recombinant plant expression vectors were confirmed by digestion and PCR and transgenic plants were analyzed by PCR, GUS histochemical assays, PCR-Southern blot. The results show that more than 80% transgenic plants are confirmed to be positive ones and these results also indicate that *ctb-linker-cagA* and *ctb-linker-ureB* are integrated into the genomic DNA of the tobacco which laid a solid foundation for the research of establishing transgenic plants as bioreactors to carry microbe antigen and Hp transgenic plant vaccines.

Keywords: *Helicobacter pylori*; Cytotoxin associated gene; Urease B subunit; Cholera toxin B subunit gene; Fusion gene; Expression vector

Foundation item: Nature Science Foundation of Zhejiang Province (ZA0213); Science and Technology Department Foundation of Zhejiang Province (2003C32015)

* Corresponding author. E-mail: zpzhch@zju.edu.cn

Received: 15 March 2006 / Accepted: 30 May 2006 / Revised: 30 June 2006

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>