

徐海, 鲍熹, 王义伟, 等. 转运真核表达盒的重组 T7 噬菌体构建[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(1): 117-121.  
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.01.018

## 转运真核表达盒的重组 T7 噬菌体构建

徐海, 鲍熹, 王义伟, 卢宇, 许梦薇, 侯继波  
(江苏省农业科学院/国家兽用生物制品工程技术研究中心, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了构建转运真核表达盒的重组 T7 噬菌体,并分别在体外、体内条件下检测其标签蛋白质 EGFP 的表达。以 T7 噬菌体基因组左侧 578 bp 处为插入位点,取上游 400 bp 和下游 200 bp 片段作为左右同源臂,并在其中插入表达 *EGFP* 基因的真核表达盒(EEB),构建同源重组质粒 pUC-L-EEB-R。将该质粒载体转化 T7 噬菌体宿主细菌 BL21,在噬菌体繁殖过程中完成同源重组,PCR 筛选重组 T7-EEB 噬菌体。提取该重组噬菌体基因组转染 Vero 细胞后体外检测 EGFP 蛋白质表达,纯化的噬菌体免疫小鼠后体内检测 EGFP 蛋白质表达。结果显示,通过同源重组方法成功构建了携带真核表达盒的重组 T7 噬菌体,PCR 检测和酶切鉴定均证明表达盒已正确插入。T7-EEB 基因组转染真核细胞可见明显的 EGFP 蛋白质表达,免疫小鼠后活体荧光检测到 EGFP 蛋白质信号,在小鼠肝脏、脾脏组织中 RT-PCR 检测到 *EGFP* 基因的 mRNA 转录。表明同源重组方法可以用于构建重组 T7 噬菌体,噬菌体能够转运真核表达盒并实现蛋白质表达。

**关键词:** 同源重组; DNA 疫苗; 真核表达; T7 噬菌体

中图分类号: Q939.48 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2015)01-0117-05

## Construction of recombinant bacteriophage T7 delivering eukaryotic expression box

XU Hai, BAO Xi, WANG Yi-wei, LU Yu, XU Meng-wei, HOU Ji-bo

(*Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/National Veterinary Biological Medicine Engineering Research Center, Nanjing 210014, China*)

**Abstract:** To construct a recombinant T7 phage delivering eukaryotic expression box and to detect the EGFP (enhanced green fluorescent protein) tag protein expression *in vivo* and *in vitro*, respectively, a 400-bp fragment (L) located at the upstream of 578 bp of T7 genome and a 200-bp fragment (R) located at the downstream were used as homologous arms. Eukaryotic expression box encoding EGFP protein (EEB) was inserted into left and right arm to construct homologous recombinant plasmid vector pUC-L-EEB-R. Plasmid vector was transformed into bacterium BL21 where homologous recombinant took place during the T7 phage propagation. EGFP protein expression was identified by phage genome transfection and phage particle immunization. PCR and restriction enzyme digestion analysis demonstrated that eukaryotic expression box was inserted into T7 phage genome correctly. Visible EGFP protein expression was detected both *in vivo* and *in vitro*. In mice liver and spleen, mRNA transcription of *EGFP* gene was detected by RT-PCR as well. These results indicate that homologous recombination is capable to construct recombinant T7 phage which could deliver eukaryotic expression box and achieve protein expression.

**Key words:** homologous recombination; DNA vaccine; eukaryotic expression; T7 phage

收稿日期: 2014-08-07

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目[ CX(11)4073 ]

作者简介: 徐海(1982-), 男, 江苏扬州人, 硕士研究生, 主要从事预防兽医学方面的研究。(Tel) 13645161013; (E-mail) hai\_x@126.com

通讯作者: 侯继波, (E-mail) houjibo@jaas.ac.cn

DNA 疫苗是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新型疫苗, 是指将含有编码靶抗原基因的质粒载体导入宿主, 通过宿主细胞表达抗原从而诱导机体产生免疫

反应。该免疫途径不仅能激发体液免疫反应,还能诱导高水平的细胞免疫,尤其是细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)反应,在疾病的防治中具有较大优势<sup>[1-2]</sup>。

DNA 疫苗有多种免疫途径:肌肉、皮内、皮下及静脉等注射,也可通过基因枪发送至细胞内<sup>[3]</sup>。不同 DNA 导入方式会引起辅助性 T 淋巴细胞(Th)向不同方向极化,产生免疫应答的机制与效果不同<sup>[4-5]</sup>。这种差异除了 DNA 疫苗本身抗原的特异性以外,其主要原因是 DNA 疫苗给药后,绝大多数的 DNA 在转运到靶细胞前被机体的酶类降解失活,裸露质粒 DNA 转运到胞内的效率低下,从而导致免疫效果不够理想<sup>[6-7]</sup>。因此,提高 DNA 疫苗转运至靶细胞的效率,是研制高效 DNA 疫苗的一个方向。目前,通过 PLGA、海藻酸钠、壳聚糖及其衍生物等可生物降解材料包裹 DNA 疫苗来提高效率<sup>[8-9]</sup>。

T7 噬菌体是感染肠杆菌的烈性噬菌体,其颗粒结构稳定能耐受极端的理化环境,在体液环境中保持结构完整从而有效保护衣壳内部的基因组不受损伤<sup>[10]</sup>。噬菌体颗粒的不对称性有利于募集 T 细胞,使其被免疫细胞识别、吞噬、降解;该过程能够有效地将噬菌体基因组直接转运到免疫细胞内部,是转运 DNA 疫苗的优良运输工具。通过同源重组方法将真核表达盒插入到 T7 噬菌体基因组非编码区,使其随噬菌体基因组复制而复制,构建出遗传稳定的重组噬菌体。利用重组 T7 噬菌体作为真核表达盒的转运工具,既能保护 DNA 不受酶类物质的降解破坏,又能诱发细胞吞噬从而直接将 DNA 送入免疫细胞内部提高抗原递呈的靶向性。本研究在 T7 噬菌体基因组左侧非编码区插入表达 EGFP 标签蛋白质的真核表达盒,建立构建转运真核表达盒重组噬菌体的方法,并验证 EGFP 蛋白质的表达情况,为 T7 噬菌体用于 DNA 疫苗的转运奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

菌株与质粒:T7 Select 415-1b Cloning Kit 购于 Merck 公司;pUC-19、pEGFP-N1 质粒由国家兽用生物制品工程技术研究中心实验室保存。

主要试剂:限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、反转录酶均为大连宝生物公司产品;脂质体 2000 为 Invitrogen 公司;其余试剂均为分析纯。

主要仪器:超高速离心机购自美国 Beck-man 公

司;BTX 电转化仪、PCR 仪购自大连宝生物公司;Geldoc-It Imaging System 购自美国 UVP 公司;荧光显微镜购自德国蔡司公司。

### 1.2 试验小鼠

6 周龄 ICR 小鼠购于南京医科大学试验动物中心,饲养于江苏省农业科学院实验动物中心。

### 1.3 插入位点的选择

利用 DNASTar 软件比较 T7 Select 415-1b 与 T7 野生型噬菌体基因组,选择缺失位点用于真核表达盒的插入。

### 1.4 同源重组质粒载体构建

以 T7 Select 415-1b 噬菌体基因组为模板,PCR 扩增插入位点左侧 400 bp (L)和右侧 150 bp (R)基因片段作为同源臂,并将其插入 pUC-19 质粒载体构建重组质粒 pUC-L-R。以真核表达载体 pEGFP-N1 为模板,PCR 扩增真核启动子(Pcmv)、EGFP、polyA 尾巴等元件并进行顺序拼接成完整真核表达盒(Eukaryotic expression box, EEB),将其插入重组质粒 pUC-L-R 构建同源重组质粒载体 pUC-L-EEB-R,酶切鉴定正确的克隆送样测序鉴定。

### 1.5 重组噬菌体构建与鉴定

将同源重组质粒 pUC-L-EEB-R 导入 T7 噬菌体宿主 *E. coli* BL21,挑取单菌落重组 BL21 细菌,过夜培养。T7 Select 415-1b 噬菌体稀释至  $10^3$  PFU/ml,分别取 10  $\mu$ l T7 噬菌体和 BL21 重组菌,加到 1 ml LB 培养液中,37  $^{\circ}$ C 培养 3 h。共培养液做 10 倍比稀释,双层琼脂夹心法测定滴度,挑取单克隆噬菌体斑,用 EGFP 上、下游引物做菌落 PCR 鉴定,筛选阳性噬菌体斑即为同源重组噬菌体,命名为 T7-EEB,提取重组噬菌体基因组酶切鉴定。

### 1.6 EGFP 表达与鉴定

1.6.1 体外表达鉴定 将处于对数生长期的 Vero 细胞经胰酶消化后用无抗生素含 10% 胎牛血清(FCS)的 MEM 培养液轻轻吹下,调整细胞密度到  $1 \text{ ml } 1.0 \times 10^6$  个,然后均匀分布于 6 孔细胞培养样板,用不含抗生素的培养基调整体积到 2 ml 每孔,于二氧化碳培养箱 37  $^{\circ}$ C 过夜培养。参照 Invitrogen 公司脂质体 2000 操作说明,将提取的重组 T7-EEB 噬菌体基因组、同源重组质粒载体 pUC-L-EEB-R 分别转染 Vero 细胞,培养 24 h 后荧光显微镜观察。

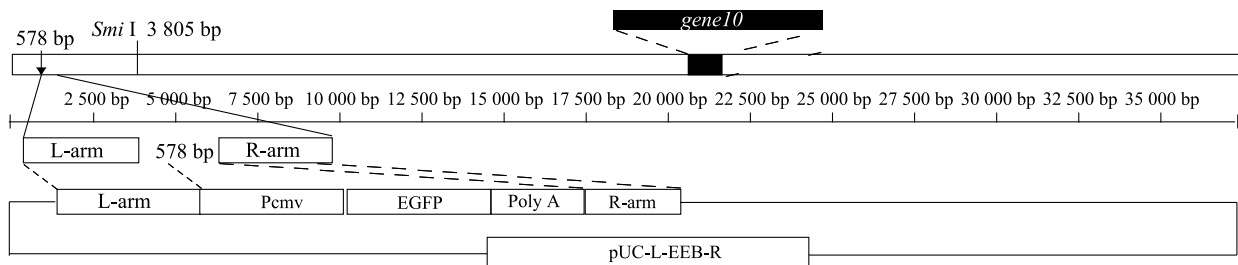
1.6.2 体内表达鉴定 15 只小鼠随机分为 3 组,每组 5 只,即 pUC-L-EEB-R 质粒免疫组、T7-EEB 重

组噬菌体免疫组和空白对照组。于 0 周免疫组小鼠左后腿肌肉注射盐酸布比卡因 50  $\mu\text{l}$  (0.5 mg/ml) 预处理,3 d 后同部位注射 pUC-L-EEB-R 质粒 DNA 100  $\mu\text{l}$  (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) 和 T7-EEB 重组噬菌体颗粒 100  $\mu\text{l}$  ( $1\times 10^{11}$  PFU/ml);14 d 后同等剂量加强免疫 1 次。分别于首免疫和二免后 7 d 经活体成像系统(南京大学生命科学学院协助)检测 EGFP 表达情况;并在二免后 14 d 处死小鼠,采集肝脏、脾脏提取总 RNA,RT-PCR 检测 EGFP 基因 mRNA 转录水平。

2 结果

2.1 插入位点及构建流程

对比 T7 Select 415 1b 噬菌体与野生型 T7 噬菌体基因组,发现 T7 Select 415 1b 基因组有 4 个缺失位点,其中在左侧 578 ~ 579 bp 有 2 168 bp 缺失,适合插入外源基因。选择 578 bp 处作为插入位点,以同源重组的方式将真核表达盒导入,操作流程见图 1。



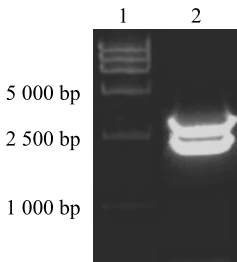
A: T7 Select 415 1b 基因组及插入位点; B: 同源重组质粒 pUC-L-EEB-R。

图 1 同源重组示意图

Fig. 1 A schematic diagram of homologous recombination

2.2 同源重组质粒鉴定

构建的同源重组质粒载体 pUC-L-EEB-R 分别用左侧同源臂 5'端 XhoI 和右侧同源臂 3'端 BamHI 双酶切鉴定,观察到长度约 2 200 bp 的预期条带,测序结果进一步证实所构建的载体与设计一致。表明该同源重组质粒载体 pUC-L-EEB-R 构建成功(图 2)。



1: DL15000 DNA marker; 2: pUC-L-EEB-R 质粒 XhoI/BamHI 酶切。

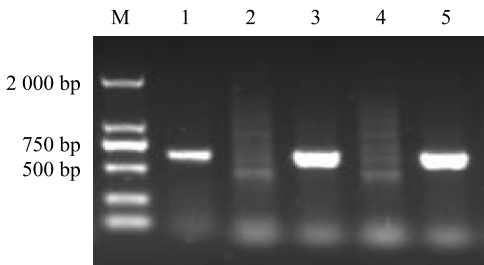
图 2 同源重组质粒载体酶切鉴定

Fig. 2 Identification of homologous recombinant vector by enzyme digestion

2.3 重组噬菌体筛选与鉴定

挑取待鉴定噬菌斑,用针对 EGFP 基因的上下游引物做菌落 PCR,5 个噬菌斑扩增出 3 个 720 bp 目的

条带,初步筛选到插入真核表达盒的重组噬菌体 T7-EEB(图 3)。扩繁 T7-EEB 重组噬菌体并提取基因组,以位于 T7 Select 415 1b 噬菌体基因组左侧 3 805 位的 SmiI 位点进行酶切鉴定。T7 Select 415 1b 基因组酶切获得 3 800 bp 目的条带,而 T7-EEB 基因组酶切获得 5 000 bp 目的条带,条带大小符合预期(图 4)。通过菌落 PCR 初步筛选到阳性重组噬菌体,酶切鉴定确定该重组噬菌体成功插入真核表达盒。



M: DL2000 DNA ladder marker; 1 ~ 5: 单克隆噬菌斑。

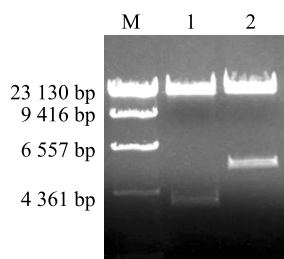
图 3 重组噬菌体 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant phage by PCR

2.4 T7-EEB 噬菌体基因组体外表达

构建的真核表达盒能够在真核细胞中表达 EGFP

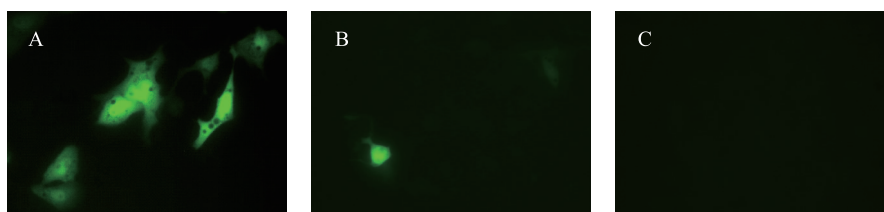
标签蛋白质(图 5)。同源重组质粒 pUC-L-EEB-R (图 5A) 转染效率较高, 视野内可见多个细胞表达; T7-EEB 基因组 (图 5B) 分子量较大, 转染效率较低, 仅单个细胞可见蛋白质表达; 细胞空白对照 (图 5C) 未见显色, 没有蛋白质表达。



M:  $\lambda$ -Hind III digest DNA ladder marker; 1: T7 Select 415 1b 基因组 *Smi* I 单酶切; 2: T7-EEB 基因组 *Smi* I 单酶切。

图 4 噬菌体基因组酶切鉴定

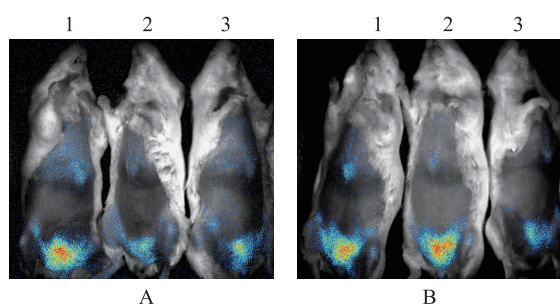
Fig. 4 Identification of phage genome by enzyme digestion



A: pUC-L-EEB-R; B: T7-EEB 基因组; C: 空白对照。

图 5 EGFP 真核表达

Fig. 5 Eukaryotic expression of EGFP



A: 首次免疫后 7 d; B: 二次免疫后 7 d。1: T7-EEB 免疫组; 2: pUC-L-EEB-R 免疫组; 3: 空白对照组。

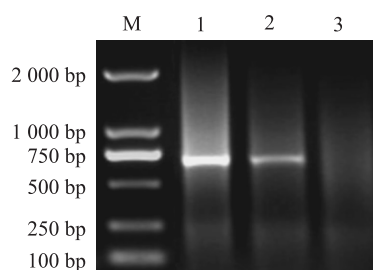
图 6 免疫小鼠活体荧光检测

Fig. 6 Fluorescence images of immunized mice

## 2.5 T7-EEB 介导体内表达

首次免疫后 7 d 经活体成像系统检测 EGFP 蛋白质表达情况, T7-EEB 免疫小鼠能够检测到 EGFP 蛋白质发射信号, 而 pUC-L-EEB-R 免疫后未能检测到信号 (图 6A); 在二次免疫后 7 d, T7-EEB 和 pUC-L-EEB-R 免疫小鼠均能检测到信号 (图 6B), 空白对照均未检测到信号 (图 6A 和图 6B)。说明 T7-EEB 免疫后 EGFP 蛋白质的表达比 pUC-L-EEB-R 免疫后更加迅速。

二次免疫后取小鼠肝脏、脾脏提取总 RNA, RT-PCR 检测编码 EGFP 蛋白质的 mRNA 转录水平。结果 (图 7) 显示, 电泳条带可见 T7-EEB 免疫组 mRNA 转录水平高于 pUC-L-EEB-R 免疫组, 空白对照未能扩增出目的条带。



M: DL2000 DNA ladder marker; 1: T7-EEB 免疫组; 2: pUC-L-EEB-R 免疫组; 3: 空白对照组。

图 7 mRNA 转录 RT-PCR 检测

Fig. 7 Detection of mRNA transcription by RT-PCR

## 3 讨论

T7 噬菌体载体 Novagen 公司独家产品, 是一种烈性噬菌体, 在胞浆内组装子代粒子, 成熟的噬菌体

通过细胞裂解而释放。该 T7 噬菌体载体对比野生型 T7 噬菌体其基因组左侧 578 bp 处有约 2 000 bp 缺失, 理论上可用于插入外源基因而不影响 T7 噬菌体生物学性状。本研究将携带真核表达盒的质粒导入



T7 噬菌体宿主细菌 BL21,在噬菌体繁殖时完整基因组与质粒的同源重组,进而筛选出插入真核表达盒的重组噬菌体。T7 噬菌体繁殖迅速,每个宿主细胞释放约 200 个子代噬菌体粒子,本构建方法没有引入有效的筛选标记,如何提高筛选几率决定该方法的可操作性。本研究中以极低的感染复数感染宿主细胞,增加 T7 噬菌体在宿主细菌中的循环次数进而提高同源重组几率。重组 T7 噬菌体由于复制负担增加,在平皿上表现出较小的噬斑形态,挑选形态较小的噬斑进行菌落 PCR 鉴定能够提高筛选阳性率。本研究从 5 个单噬斑中筛选到 3 个疑似阳性克隆,证明同源重组方法构建重组噬菌体具有可行性。

利用完整噬菌体粒子作为真核表达盒的转载体是一个比较新的途径。在这个过程中,克隆到噬菌体基因组中的真核表达盒携带保护性抗原基因,以完整的噬菌体粒子免疫动物,在噬菌体被免疫细胞吞噬、裂解后释放出的真核表达盒利用宿主细胞表达元件启动保护性抗原的表达。Clark 等<sup>[11-13]</sup>用包含乙肝表面抗原表达盒的完整的  $\lambda$  噬菌体颗粒免疫动物发现其免疫保护效果是裸露的核酸疫苗的 10 倍左右。噬菌体转运真核表达盒与传统质粒 DNA 疫苗传递系统相比在对核酸酶的稳定性方面有明显优势;而且噬菌体颗粒被免疫细胞吞噬,抗原递呈效率更高。本研究中,基因组的体外瞬时转染证明噬菌体携带的真核表达盒可以实现蛋白质的表达,由于 T7-EEB 基因组分子量远大于 pUC-LEEB-R,其转染效率较低所表达的 EGFP 蛋白量也相对较少。相反,T7-EEB 免疫组相比 pUC-L-EEB-R 免疫组,其 EGFP 表达更为迅速、表达量更高,间接说明噬菌体颗粒转运真核表达盒作为 DNA 疫苗免疫的新途径效率更高效果更好。

噬菌体进入体内会很快被循环系统清除,但是在脾脏可以检测到存活的噬菌体,其存活周期可以达到 14~21 d<sup>[14]</sup>。在噬菌体治疗过程中,兔子口服噬菌体后血浆中能检测到活性噬菌体,并且能够检测到针对噬菌体衣壳蛋白质的特异性体液免疫反应<sup>[15]</sup>。本研究中所用 T7 噬菌体衣壳蛋白质 p10B 还可以用于外源多肽的表面展示,可在其表面展示抗原表位激发体液免疫反应,而基因组中嵌合的真核表达盒可以表达蛋白质激发细胞免疫反应,可以进一步升级该系统达到体液、细胞免疫的双重激发。因此,基于该理念开发噬菌

体疫苗并且可以通过口服途径进行免疫,将会是一种具有良好前景的疫苗研发策略。

## 参考文献:

- [1] MA L. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future [J]. *Immunol Rev*, 2011, 239(1):62-84.
- [2] MICHELE A K, DAVID B W. DNA vaccines: ready for prime time [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008(9):776-788.
- [3] PASETTI M F, BARRY E M, LOSONSKY G, et al. Attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi and *Shigella flexneri* 2a strains mucosally deliver DNA vaccines encoding measles virus hemagglutinin, inducing specific immune responses and protection in cotton rats [J]. *J Virol*, 2003, 77(9):5209-5217.
- [4] PACHUK C J, MCCALLUS D E, WEINER D B, et al. DNA vaccines-challenges in delivery [J]. *Curr Opin Mol Therapy*, 2000, 2(2):188.
- [5] DUBENSKY T W, LIU M A, ULMER J B. Delivery systems for gene based vaccines[J]. *Mol Med*, 2000, 6(9):723.
- [6] ERTL H C, XIANG Z. Novel vaccine approaches [J]. *J Immunol*, 1996, 156(10):3579-3582.
- [7] FYNAN E F, WEBSTER R Q, FULLER D H, et al. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral mucosal, and gene-gun inoculations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(24):478-482.
- [8] HAO T, MCKEEVER U, HEDEY M L. Biological potency of microsphere encapsulated plasmid DNA [J]. *J Controlled Release*, 2000, 69:249.
- [9] GUPTA R K, CHANG A C, SIBER G R. Biodegradable polymer microspheres as vaccine adjuvants and delivery systems [J]. *Deve BiolStand*, 1998, 92:63.
- [10] 徐海,王义伟,鲍熹,等.表面展示 GnRH 重组 T7 噬菌体构建及其免疫效果[J]. *江苏农业学报*, 2014, 30(4):809-813.
- [11] CLARK J R, MARCH J B. Bacteriophage-mediated nucleic acid immunization [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2004, 40(1):21-26.
- [12] CLARK J R, MARCH J B. Bacterial viruses as human vaccines? [J]. *Expert Rev Vaccines*, 2004, 3(4):463-476.
- [13] CLARK J R, BARTLEY K, JEPSON C D, et al. Comparison of a bacteriophage-delivered DNA vaccine and a commercially available recombinant protein vaccine against hepatitis B [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2011, 61(2):197-204.
- [14] KELLER R, ENGLE F B. Fate of bacteriophage particles introduced into mice by various routes [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1958, 1:577-580.
- [15] REYNAUD A, CLOASTRE L, BERNARD J, et al. Characteristics and diffusion in the rabbit of a phage for *Escherichia coli* 0103. Attempts to use this phage for therapy [J]. *Vet Microbiol*, 1992, 30(2-3):203-212.

(责任编辑:袁伟)