

·论 著·

## GM-CSF与BZLF1融合基因修饰的重组BCG的构建与表达

薛庆节, 杨媛媛, 胡文洁, 吕厚东, 李士根, 陈廷\*

济宁医学院病原生物学教研室, 医学免疫学山东省重点学科, 山东 济宁 272067

**摘要:**目的 将人粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子基因(GM-CSF)与EB病毒即刻早期基因(BZLF1)重组为融合基因GCBF,并转化入卡介苗(BCG)中进行表达。方法 用随机引物Oligo(dT)15进行RT-PCR,分别获得人GM-CSF和BZLF1编码序列的cDNA。将纯化GM-CSF和BZLF1 PCR扩增产物插入分泌表达载体pMV261,并转化入感受态细胞Escherichia coli DH5 $\alpha$ (E.coli DH5 $\alpha$ ),在LB培养基上进行卡那霉素抗性选择,测序正确的序列进行剪接式重叠延伸,将目的基因GM-CSF和BZLF1编码经多肽接头(Gly4Ser)3序列连接,构建融合基因GCBF,将GCBF克隆至pMV261,转化感受态细胞E.coli DH5 $\alpha$ ,在LB培养基平板上进行卡那霉素抗性选择,阳性克隆提取质粒后转化感受态BCG,western-blot检测GCBF在rBCG中的表达。结果 目的基因GM-CSF和BZLF1 RT-PCR产物大小分别为461 bp和788bp,与预期值一致。构建的重组质粒经双酶切、扩增及测序鉴定证实,融合基因GCBF(1209bp)正确插入载体,成功转化入BCG感受态细胞,且被正确表达。结论 融合基因GCBF修饰的rBCG构建及表达成功,为进一步探讨rBCG杀伤EB病毒阳性肿瘤的免疫活性研究奠定了实验基础。

**关键词:**融合基因GCBF;基因重组;重组卡介苗

中图分类号:R784 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2014)9-1035-05

## Construction and expression of recombinant BCG encoding GM-CSF and BZLF1 fusion gene

XUE Qing-jie, YANG Yuan-yuan, HU Wen-jie, LV Hou-dong, LI Shi-gen, CHEN Ting

Department of Pathogenic Biology of Shandong Provincial Key Discipline of Medical Immunology, Jining Medical College, Jining 272067, Shandong, P. R. China

Corresponding author: CHEN Ting, E-mail:chenting3465@163.com

**Abstract:** Objective To investigate the construction and expression of rBCG combining human granulocyte-macrophage colony stimulating factor(GM-CSF) and EB virus (EBV) encoding immediate early gene(BZLF1). **Methods** Oligo(dT)15 was used to obtain the cDNA sequence of GM-CSF and BZLF1, the purified GM-CSF and BZLF1 were amplified by PCR and inserted into plasmid pMV261, then transformed them into *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ (*E.coli* DH5 $\alpha$ ). In LB culture medium containing kanamycin, the positive colony was selected, the correct sequence of the GM-CSF and BZLF1 were connected by the polypeptide (Gly4Ser)3 series with the splicing overlap extension technology. The fusion gene GCBF was constructed and cloned into pMV261, transformed competent bacteria and selected on LB culture medium flat containing kanamycin. Plasmid pMVGCBF extracted from positive clones were transformed into competent BCG. Western-blot was employed for determination of expression of GCBF. **Results** The RT-PCR product sizes of objective gene GM-CSF and BZLF1 were 461bp and 788bp, consistent with expected values. The recombinant plasmid was confirmed by restriction double enzymes, amplification and sequencing, then the fusion gene (1209bp) was correctly inserted into the vector. pMVGCBF were correctly transformed into competent BCG. The expression of fusion protein GCBF was detected in rBCG. **Conclusion** rBCG encoding GCBF fusion gene was successfully constructed to have provided basis for further study of the function of rBCG.

**Key words:** Recombinant gene GCBF; Gene recombination; rBCG

EB病毒(Epstein-barr virus, EBV)主要感染口咽部上皮细胞与B淋巴细胞,与多种恶性肿瘤(如鼻咽癌)的发生和发展密切相关。研究发现<sup>[1]</sup>,EB病毒基因几乎存在于所有EB病毒阳性的肿瘤细胞中,显示EB病毒可以作为治疗EB病毒阳性肿瘤的关键靶点之一。BZLF1是EB病毒复制周期的关键基因,可诱

导潜伏期病毒进入裂解期。EB病毒大量增殖后可导致肿瘤细胞裂解死亡,故而激活BZLF1表达具有启动EBV相关肿瘤细胞裂解死亡效应<sup>[2]</sup>。GM-CSF是一种具有增强机体免疫力生物活性的细胞因子。卡介苗(BCG)为人类防治结核病的减毒活疫苗,也是安全有效的免疫增强剂,常用于肿瘤免疫治疗。为了增强

**基金项目:**山东省高等学校科技计划项目(No.J12LK56);山东省自然科学基金(No.ZR2012HM037);教育部留学回国人员科研启动基金(No.20101174);山东省高等学校青年骨干教师国内访问学者项目(2012年度)

**作者简介:**薛庆节(1973~),男,硕士,副教授,研究方向:微生物与肿瘤分子生物学。

**\*通讯作者:**陈廷, E-mail:chenting3465@163.com

BCG抗肿瘤免疫活性及实现靶向性免疫治疗EB病毒阳性恶性肿瘤研究目标,本实验在前期研究的基础上,拟将GM-CSF与BZLF1基因进行融合,构建GCBF融合基因,并插入结核分枝杆菌分泌性表达载体pMV261,电转化导入BCG构建rBCG,为后期进一步探讨融合基因修饰的rBCG对EB病毒阳性恶性肿瘤细胞的影响作用提供实验基础。

## 1 实验材料与方法

1.1 主要试剂 T4 DNA Ligase、Easy Taq DNA 聚合酶、AMV 逆转录酶、内切酶EcoR I、Sal I、BamH I、DNA DL2000 marker均为天根生化(北京)公司产品;其余试剂均为Promega进口分装。

1.2 质粒与菌株 pMV261为Stover CK博士构建,结核分枝杆菌分泌表达质粒,购自Biovector Science Lab, Inc., E. coli DH5 $\alpha$ 为本实验室保藏;BCG(丹麦株)购自上海生物制品研究所。

1.3 扩增引物设计 根据GeneBank中报道人GM-CSF及EB病毒的BZLF1基因序列,利用Premier5.0软件设计扩增引物。引物F1、下游重叠引物F2的设计方法见本实验室已发表文献<sup>[3]</sup>。BZLF1上游重叠引物F3:

5'-GGTGGCGGTGGAAGCGGCGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGCAGCGACCCAACTCGACTTCTG-3', 下游引物F4: 5'-GCCGAATTCTTAGAAATTTAAGAGATCCTCGTG-3'。设计GM-CSF下游引物F5: 5'-GCCGAATTCTCACTCCTGGACTGGCTC-3'; BZLF1上游引物F6: 5'-GCGGATCCATG-GACCCAACTCGAC-3'。

分别扩增BZLF1和GM-CSF序列基因,用来构建BZLF1及GM-CSF重组结核分枝杆菌分泌性表达载体pMV261,斜体部分为酶切位点。扩增目的片段GM-CSF长为461bp, BZLF1长为788 bp。

1.4 BZLF1和GM-CSF的获得及鉴定 分别取保存的EBV阳性肿瘤细胞与人骨髓细胞,采用TaKaRa公司(大连)RT-PCR试剂盒用随机引物进行扩增。扩增体系为:AMV酶20 U(0.8 $\mu$ L),随机引物Oligo(dT) 15:0.5  $\mu$ g(1.5 $\mu$ L),模板RNA 1  $\mu$ g(5 $\mu$ L),MgCl<sub>2</sub> 5 mmol/L(5  $\mu$ L),10 $\times$ 逆转录缓冲液3  $\mu$ L,加无RNase水至20  $\mu$ L。条件:42  $^{\circ}$ C反应1 h,99  $^{\circ}$ C 5 min,冷却至4  $^{\circ}$ C,反转录后用引物F1(上游引物)和引物F5(下游引物)对GM-CSF扩增,用F6(上游引物)和F4(下游引物)对BZLF1扩增。反应条件:94  $^{\circ}$ C预变性5 min;94  $^{\circ}$ C变性50 s,55  $^{\circ}$ C退火60 s,72 $^{\circ}$ C延伸1.5 min共循环40次,最后72  $^{\circ}$ C延伸10 min。然后电泳检测,紫外分析系统进行观察分析结果。产物用试剂盒(U-NIQ-5PCR, Ta-

KaRa产品)纯化。步骤:1%琼脂糖凝胶电泳分离,紫外灯下取目的片段;按胶重与胶胶缓冲液混合(胶切成小块),60 $^{\circ}$ C下水浴融化,将纯化柱置于收集管上,然后将融化的回收胶置于柱中,12 000r/min(半径10cm)离心50s,弃去收集管中液体,将纯化柱再13 000r/min(半径10cm)离心1min;将柱置于新的收集管上,向柱中加入60 $\mu$ L EB缓冲液,静置1min;13 000r/min(半径10cm)离心1 min洗脱DNA片段,将离心管中纯化的DNA片段-20 $^{\circ}$ C保存。

纯化的BZLF1及GM-CSF送上海生工测序,测序引物为F1和F5(GM-CSF测序)、F6和F4(BZLF1测序),结果与GeneBank中报导的GM-CSF序列及EB病毒全基因序列进行比较分析。

1.5 基因融合与鉴定 将测序正确的BZLF1序列,以引物F3和F4进行扩增,GM-CSF序列,以引物F1和F2进行扩增,获得有部分互补序列的BZLF1和GM-CSF DNA片段。分别对BZLF1和GM-CSF片段进行电泳,回收琼脂糖凝胶(按回收试剂盒说明书操作)作模板,用T4 DNA连接酶连接后,用引物F1、F4进行PCR,获得GCBF融合基因。条件:94  $^{\circ}$ C预变性2 min;94  $^{\circ}$ C变性30 s,60  $^{\circ}$ C退火30 s,72  $^{\circ}$ C延伸1.5 min共40个循环,最后72  $^{\circ}$ C 10 min。产物用凝胶电泳检测,Tanon 1600R凝胶成像系统观察分析结果。

1.6 GCBF与质粒pMV261的连接 纯化后的基因GCBF和质粒pMV261用EcoR I和Sal I酶切后,进行连接:依次加入PCR产物0.1~0.3pmol和pMV261 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O调至5 $\mu$ L,再加入连接缓冲液(Ligation Solution I) 5 $\mu$ L,16 $^{\circ}$ C反应过夜。

1.7 转化E.coli DH5 $\alpha$  将IPTG 50  $\mu$ L涂于制备的细菌基础培养基(LB)固体平板上,室温放置2 h。从超低温冰箱中取出感受态E. coli DH5 $\alpha$ 细胞,冰浴融化。将E. coli DH5 $\alpha$ 混匀,取30~40 $\mu$ L与重组质粒轻轻混合,冰浴20~30 min,42  $^{\circ}$ C热击90 s,立即冰浴3 min;加1mL液体LB培养基(不含抗生素),37  $^{\circ}$ C培养2 h;12 000 r/min(半径10cm)离心3 min,细菌沉淀用LB液体培养基进行回溶;取适量用LB培养基稀释后涂布于LB(含IPTG)平板上,37  $^{\circ}$ C培养9~20 h;取单菌落,做PCR扩增鉴定;取重组正确的细菌,提取质粒,双酶切鉴定后进行测序。测序结果与GeneBank中报导的序列对比。

1.8 质粒的提取和纯化 按质粒提取试剂盒说明书进行操作。

1.9 BCG感受态的制备 卡介苗(BCG)在M7H9液体培养基中振荡培养(37 $^{\circ}$ C,转速250rpm);用分光光度计测细菌OD600值,当其达0.6时,将菌液加入离心

管,冰上预冷2h;然后4℃下12 000rpm离心10min,弃上清;将高压灭菌的10%甘油4℃预冷3h,用原体积1/10甘油重悬BCG;重复五次;即得到感受态BCG。

1.10 重组卡介苗的构建 取 $5 \times 10^6$ BCG感受态细胞,用电转仪将pMVGCBF质粒转化卡介苗,参数及操作方法见文献<sup>[3]</sup>。

1.11 Western-blot检测融合基因表达 从重组BCG中提取融合蛋白质GCBF,经SDS-PAGE电泳后转膜,分别以GM-CSF抗体、BZLF1抗体进行杂交,进行融合蛋白的分析。以空载体pMV261转化BCG为对照。融合蛋白的提取,SDS-PAGE,Western-blot操作方法及详细步骤参见文献<sup>[4]</sup>。

## 2 结果

2.1 目的基因GM-CSF和BZLF1测序结果 将PCR扩增产物进行纯化后,采用通用引物进行测序,经与NCBI报告序列进行对比,扩增产物的测序结果与NCBI报告序列完全一致。测序结果如下:GM-CSF(正向引物)测序结果:

GACGATTTATGCTGCTCTTGCGCACTGTGGCCTGCA  
GCATCTCTGCACCCGCCCGCTCGCCCAGCCCCAG-  
CACGCAGCCCTG.....TTTCAAAGAGAACCT-  
GAAGGACTTTCTGCTTGTACCCCTTTGACTGCT-  
GGGAGCCA。

BZLF1(正向引物)结果:

CTAGAGAGCGATATCTTAGAAATTTAAGAGAT  
CCTCGTGTAACATCTGGTGTCGGGGGATAATG-  
GAGTCAACATCCAGGCTT.....  
GGAGCTTGCGATGGCCCTCCCAGGTCTGATAGACT  
CTGGTAGCTTTGGTCAAAAGCTTGTACAAAAGGCAC  
CTGGTATGGGTCAGGTGTAAATTTTA-  
CATCTTCAGAAGTCGAG。

2.2 RT-PCR产物鉴定 GM-CSF基因与BZLF1基因的RT-PCR产物分别进行1%琼脂糖凝胶电泳,其大小与理论值一致,分别为461 bp(图1)和788bp(图2)。

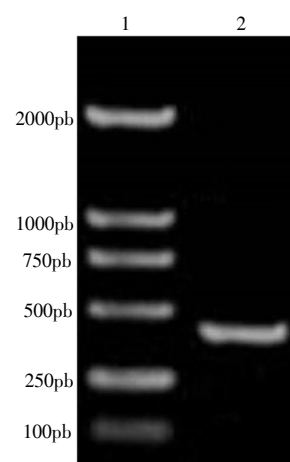
2.3 融合基因GCBF鉴定 融合基因GCBF的PCR产物进行电泳,凝胶成像系统对融合基因GCBF进行分析。全长为1 209bp(图3),与理论值(461+788-45bp)一致。测序分析表明融合基因构建成功。

2.4 Western-blot检测融合基因表达 经Western-blot检测rBCG表达产物可与GM-CSF抗体、BZLF1抗体结合呈现反应条带(图4)。

## 3 讨论

卡介苗(BCG)自1921年开始在全球广泛用于预防人类结核病,此后有研究报道<sup>[5-9]</sup>,BCG亦可以激发

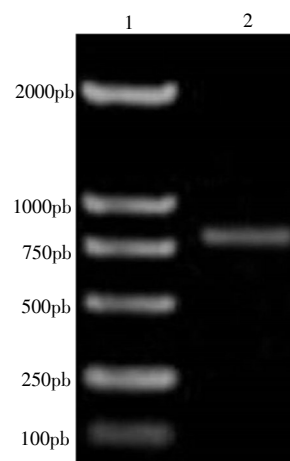
机体的免疫功能发挥抗肿瘤作用,在膀胱癌、黑色素



1.DNA DL2000 marker 2.GM-CSF PCR产物

图1 GM-CSF PCR产物电泳图谱

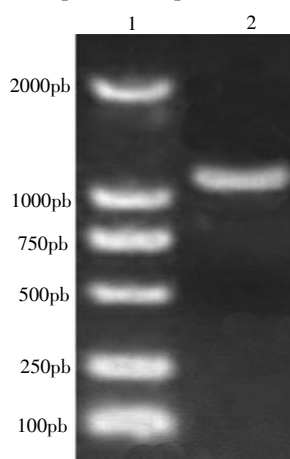
Fig.1 Electrophoresis map of GM-CSF PCR product



1.DNA DL2000 marker 2.BZLF1 PCR产物

图2 BZLF1 PCR产物电泳图谱

Fig.2 Electrophoresis map of BZLF1 PCR product

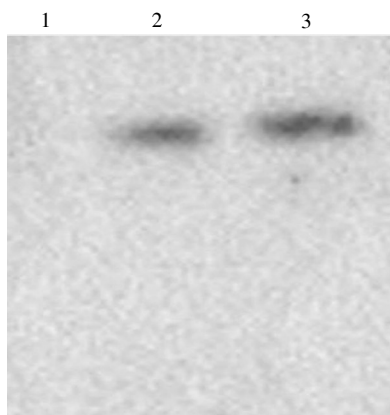


1.DNA DL2000 marker 2.GCBF PCR产物

图3 融合基因GCBF PCR产物电泳图谱

Fig.3 Electrophoresis map of fusion gene PCR product





1.空载体 pMV261 转化 BCG 杂交结果; pMV261 hybridization with BCG

2. rBCG 表达产物与 BZLF1 抗体杂交结果; rBCG product hybridization with BZLF1 antibody

3. rBCG 表达产物与 GM-CSF 抗体杂交结果; rBCG product hybridization with GM-CSF antibody

**图4 rBCG表达产物分析(Western-blot法)**

**Fig. 4 rBCG expression product (by Western-blot)**

瘤、淋巴瘤、肾癌的免疫治疗中取得了一定的效果,卡介苗已经成为肿瘤免疫治疗的研究热点之一。随着分子生物学技术的发展,以目的基因对疫苗进行修饰从而增强疫苗的抗肿瘤免疫活性已成为可能。大量实验表明,应用双基因联合修饰疫苗的抗肿瘤免疫治疗效果优于单基因,但选择合理目的基因是获得理想效果的关键因素<sup>[10]</sup>。

EB病毒感染宿主细胞包括潜伏期和裂解期,在EB病毒阳性肿瘤细胞中,病毒一般处于潜伏期,其潜伏存在及其DNA与宿主细胞整合是导致肿瘤发生的重要原因,人工诱导病毒由潜伏期进入裂解期,导致肿瘤细胞裂解死亡,有望成为治疗EB病毒相关肿瘤的新手段与新方法。EB病毒的即刻早期基因BZLF1编码蛋白为转录激活因子,BZLF1的表达可诱导EB病毒从潜伏期进入病毒复制周期<sup>[11]</sup>。有研究表明,将BZLF1重组腺病毒后,感染EBV阳性肿瘤细胞,可以诱导肿瘤细胞中处于潜伏期的EB病毒进入裂解期,并开启病毒复制机制,EBV增殖导致EB病毒阳性肿瘤细胞裂解死亡,达到特异性杀伤肿瘤细胞的作用<sup>[12-13]</sup>。

人GM-CSF是机体免疫中起重要作用的细胞因子,对树突状细胞调节作用最强,可促进DC细胞分化、成熟和活化<sup>[14]</sup>,上调CD86的表达进而激发对肿瘤的免疫应答,对DC在体内分布有重要调节作用,此外亦可通过活化巨噬细胞、淋巴细胞等多种免疫细胞发挥抗肿瘤效应。有文献报道<sup>[15-16]</sup>,在动物实验中,GM-CSF的表达可引起荷瘤小鼠肿瘤生长抑制,小鼠脾细胞CTL杀伤力明显升高,瘤体周围CD8<sup>+</sup>T细胞浸

润,表明GM-SCF可有效地激活机体抗肿瘤免疫。

基于相关报道<sup>[17]</sup>和本研究前期基础<sup>[3]</sup>,课题组选用GM-CSF和BZLF1作为目的基因,经融合修饰BCG,可望修饰后的rBCG用于免疫治疗EBV阳性恶性肿瘤,在其抗肿瘤作用机制中,融合基因能够发挥协同杀伤效应,即同时发挥BZLF1诱导潜伏期病毒进入裂解期和GM-CSF免疫增强的作用。本文研究成功构建了BZLF1和GM-CSF融合基因GCBF,并正确插入结核分枝杆菌的专用分泌性表达载体pMV261(Stover CK博士构建),该载体可使GM-CSF和BZLF1蛋白正确折叠和有效表达。本文实验结果也显示,rBCG可同时表达GM-CSF和BZLF1蛋白,并且在本研究设计中,以15个主要由甘氨酸组成的柔性疏水性肽作为GM-CSF和BZLF1基因连接子,充分发挥甘氨酸具有可及构象广泛性、体积小、利于堆积、不易产生碰撞等优点<sup>[18-19]</sup>,这样可能使BCG分泌表达的GM-CSF和BZLF1蛋白在细胞外折叠为天然的三维结构,虽是同时表达,但只与各自的抗体相互作用,不影响行使其各自的功能。本文报道为进一步开展融合基因的协同抗肿瘤作用及rBCG治疗EBV阳性肿瘤的免疫效果的研究奠定了实验基础。

#### 参考文献

- [1] Hoshikawa Y, Satoh Y, Murakami M, et al. Evidence of lytic infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-positive gastric carcinoma [J]. J Med Virol, 2002, 66(3): 351-359.
- [2] Liang CL, Chen JL, Hsu YP, et al. Epstein-Barr virus BZLF1 gene is activated by transforming growth factor-beta through cooperativity of Smads and c-Jun/c-fos proteins [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 23345-23357.
- [3] 薛庆节, 陈廷, 朱伟. EB病毒融合基因重组BCG穿梭质粒的构建与鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2009, 4(12): 887-889.
- [4] 薛庆节, 王颖, 赵强, 等. EB病毒融合基因Z2A重组BCG的免疫学特性研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(11): 969-971.
- [5] Zbar B, Bernstein ID, Rapp HJ. Suppression of tumor growth at the site of infection with living bacillus Calmette-Guérin [J]. J Natl Cancer Inst, 1971, 46(4): 831-839.
- [6] Lundholm C, Norlen BJ, Ekman P, et al. A randomized prospective study comparing long-term intravesical instillations of mitomycin C and bacillus Calmette-Guérin in patients with superficial bladder carcinoma [J]. J Urol, 1996, 156(2): 372-376.
- [7] Ratliff TL, Gillen D, Catalona WJ. Requirement of a thymus dependent immune response for BCG mediated antitumor activity [J]. J Urol, 1987, 137(1): 155-158.
- [8] Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B. Effect of bacillus Calmette-Guérin infection on transplanted tumours in the mouse [J]. Nature, 1959, 184(Suppl 5): 291-292.
- [9] 蒋翡翎, 单保恩, 张淑芳, 等. 卡介苗提取物对小鼠脾细胞免疫调节作用的体外实验研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2007, 14(11): 827-829.