

口蹄疫抗原决定簇融合基因转化生菜的研究

邓小莉^{1,2}, 常景玲³, 贺杰³, 何光存^{1*}

(1. 武汉大学生命科学学院, 植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉 430072; 2. 平原大学应用生物系分子生物学实验室, 河南新乡 453003; 3. 河南科技学院生物工程系分子生物学重点实验室, 河南新乡 453003)

摘要: 植物疫苗具有生产简单、成本较低、使用安全方便、易贮存等优点, 是目前植物基因工程的一个研究热点。本实验通过农杆菌介导的遗传转化, 以 O 型和 A 型口蹄疫抗原决定簇融合基因 $O_{21}-O_{14}-A_{21}-HBcAg$ 转化生菜。通过筛选, 获得潮霉素抗性愈伤组织, 经胚状体再生得到 56 棵抗性苗。对部分抗性植株进行 PCR 和 PCR-Southern 杂交检测, 证实目的基因已经成功整合到生菜基因组中。RT-PCR 检测初步表明, $O_{21}-O_{14}-A_{21}-HBcAg$ 基因可以在生菜中正常转录表达。

关键词: 口蹄疫; 抗原决定簇; 遗传转化; 生菜; 基因表达

中图分类号: Q78

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)05-0476-04

Transformation of Lettuce with FMDV Epitopes Fused Gene Mediated by Agrobacterium

DENG Xiao-Li^{1,2}, CHANG Jing-Ling³, HE Jie³, HE Guang-Cun^{1*}

(1. Key Laboratory of MOE for Plant Development Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;
2. Laboratory of Applied Molecular Biology, Pingyuan University, Xinxiang, Henan 453003, China;
3. Department of Bio-Engineering, Henan Science-Technical College, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Plant-derived vaccine is becoming one focus of plant gene engineering, which has advantages such as easy production, low cost, convenient and safe use. In this experiment, the fused gene $O_{21}-O_{14}-A_{21}$ containing both type O and A FMDV epitopes was introduced into lettuce mediated by agrobacterium. The hygromycin-resistant lettuce calli were obtained by screening on the medium containing antibiotic. Fifty six hygromycin-resistant lettuce seedlings were regenerated. The results of PCR and PCR-Southern blotting indicated that the fusion gene were successfully integrated into the genomes some of transformed lettuce plants. Expression of $O_{21}-O_{14}-A_{21}$ gene in transformed lettuce plants was proved by RT-PCR analyses.

Key words: Foot-and-mouth disease; Epitopes; Genetic transformation; Lettuce (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.); Gene expression

千百年来, 植物即是人类主要的食物来源, 也为人们提供了多种多样的药物。随着分子生物学的发展, 人们将激发机体免疫反应的病原体基因分离出来, 制备出专一性强、较灭活疫苗安全的重组疫苗^[1]。通常, 重组疫苗是在微生物和动物细胞内表达, 但存在分离纯化成本较高等问题。而利用转基因植物生产口服疫苗具有生产简单、成本较低、安全、使用方便、易贮存等优点^[2,3]。

口蹄疫 (foot-and-mouth disease, FMD) 是一种由口蹄疫病毒 (FMDV) 引起的主要感染偶蹄目动物的急性传染性极强的人畜共患的家畜传染病, 被国

际兽疫局 (OIE) 列为 A 类传染病^[4]。其特点是传播途径广, 感染率和死亡率高, 给人们带来了巨大的经济损失。

生菜 (*Lactuca sativa* var. *capitata* L.) 在中国种植广, 生长快, 生育期短, 以脆嫩的叶或叶球供食; 它营养价值很高, 可生食, 是生食菜中的上品, 其组织培养技术成熟, 是一种理想的研究转基因植物疫苗的载体植物。本研究选用易于生食的生菜作为受体系统进行口蹄疫抗原决定簇融合基因 $O_{21}-O_{14}-A_{21}-HBcAg$ 的转化研究, 获得了转基因再生植株, 并对 $O_{21}-O_{14}-A_{21}-HBcAg$ 基因在植株中的整合及表达

收稿日期: 2006-03-17, 修回日期: 2006-06-12。

基金项目: 福建省科技计划项目 (JY-03-B-30-20)。

作者简介: 邓小莉 (1962-), 女, 广东龙川人, 硕士, 副教授, 从事植物基因工程方面研究, 现工作单位为平原大学应用生物系 (E-mail: xldeng207@126.com)。

* 通讯作者 (E-mail: gche@whu.edu.cn)。

情况进行了检测。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 美国大速生生菜(*Lactuca sativa* var. *capitata*L.), 种子由新乡市科达种子公司生产(新文牌种子)。

农杆菌株: 农杆菌 EHA105(含质粒 pCAMBIA1301-*O*₂₁-*O*₁₄-*A*₂₁)由厦门大学生命科学学院陈亮惠赠。

质粒 pCAMBIA1301-*O*₂₁-*O*₁₄-*A*₂₁的结构见图1。

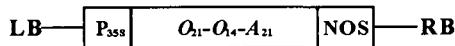


图1 融合基因 *O*₂₁-*O*₁₄-*A*₂₁-*HBcAg* 植物表达载体结构

Fig. 1 Plant expression vector of fused gene *O*₂₁-*O*₁₄-*A*₂₁-*HBcAg*

试剂: 所用试剂、引物、酶等购自上海生工公司、大连宝生物及 Bio-Rad 公司、北京天为时代科技有限公司、Boehringer Mannheim 公司等。

植物组织培养基: 本实验所用的各种培养基见表1。

表1 生菜组织培养的培养基组成

Table 1 Composition of media for lettuce tissue culture

| 培养基 Media | 成分 Components |
|---------------------------------|---|
| 诱导愈伤(继代)培养基 Callus induction | SM ₁ = MS + 6-BA 1.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L |
| 共培养基 Co-culture | SM ₂ = MS + 6-BA 1.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L + AS 40 mmol/L |
| 筛选培养基 Screening | SM ₃ = MS + 6-BA 1.5 mg/L + IAA 0.2 mg/L + Hyg 20 mg/L + Carbenicillin 300 mg/L |
| 分化培养基 Regeneration | SM ₄ = MS + Hyg 10 mg/L + Carbenicillin 100 mg/L |
| 生根壮苗培养基 Rooting | SM ₅ = 1/2 MS |

1.2 方法

1.2.1 转化受体的培养

将生菜种子用 75% 的酒精表面消毒 30 s, 无菌水冲洗 1 次; 再用 15% 的次氯酸钠消毒 20 min; 无菌水冲洗 4~6 次, 每次 1~2 min; 将消毒过的种子摆放在铺有 2~3 层滤纸的灭菌培养瓶中进行萌发。取萌发 3~5 d 的无菌苗子叶和下胚轴, 子叶切去两端和边缘成 0.3 cm²; 下胚轴切段 3~5 mm, 接种到 SM₁ 中诱导愈伤组织, 愈伤组织长出后转移到新的 SM₁ 中继代培养, 约 10~12 d 继代一次。培养条件为: 温度 15~20℃, 光强 2 000 lx, 光照 16 h/d。

1.2.2 根癌农杆菌浸染液的制备

从平板上挑取农杆菌单菌落接入含 20 mL LB 液

体培养基(含 Kan 50 μL/mL)的三角瓶中, 于 28℃, 200 r/min 振荡培养至 OD₆₀₀ 约 1.0; 4 000 r/min 离心 5 min 收集菌体, 用 1/2 MS 液体培养基洗涤 2 次, 重悬于 1/2 MS 液体培养基, OD₆₀₀ 0.5~0.8, 即为浸染液。

1.2.3 转化、筛选和植株的再生及不同转化条件的优化

将鲜亮、生长旺盛的愈伤组织块用镊子夹成小块, 放入上述制备的浸染液中浸泡 5~10 min, 轻轻摇晃三角瓶, 使材料充分接触到菌液, 之后取出材料, 用无菌滤纸吸去多余的菌液; 将材料转移到 SM₂ 中, 在 28℃ 黑暗条件下共培养 2~3 d; 转入 SM₃, 进行筛选培养, 14 d 后转入新的 SM₃ 中继代一次; 待长出抗性愈伤组织后转入 SM₄ 中进行分化培养, 抗性愈伤组织在分化培养基 SM₄ 中再生出抗性芽, 当芽长到 1~2 cm 时移入 SM₅ 中进行生根培养。

比较不同浸染液浓度和不同浸染时间条件下所得转化率(依据 GUS 基因表达检测, 带蓝斑愈伤块数/总转化愈伤块数)的不同来优化转化系统。

1.2.4 生菜总 DNA 的提取

取抗性植株和未转化植株的叶片, 用 CTAB 法^[5] 提取植株基因组 DNA。

1.2.5 转化生菜总 RNA 的提取

转化生菜植株总 RNA 的提取参照 TaKaRa 公司试剂盒说明进行。

1.2.6 转化植株的检测

GUS 基因检测^[5]: 把共培养后的愈伤组织或者抗性植株的叶片, 放入 X-Gluc 底物缓冲液^[5] 中, 37℃ 温浴过夜, 75% 的乙醇脱色 1 次; 无水乙醇脱色 2~3 次, 每次 20 min, 解剖镜下观察, 阳性反应为材料出现蓝色斑点。

PCR 扩增检测: 根据融合基因内部序列设计引物, 扩增长度约 800 bp 的目的片段。

5' 端引物: 5'-GGCGATTTCAGGTGTTGCC-3'; 3' 端引物: 5'-CGGGAATCTCAATGTTAGAA GC-3'。

PCR 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s; 52℃ 45 s; 72℃ 1 min; 35 个循环; 72℃ 5 min。

PCR 产物的 Southern 杂交: 将 PCR 产物进行转膜^[5]。杂交方法依照 Bio-Rad 公司的 Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit1 试剂盒说明操作。

RT-PCR 检测: 用 DNase I 处理 1.2.5 获得的 RNA 样品, 进行逆转录合成 cDNA 并进行 PCR 扩增。逆转录合成 cDNA 样品的扩增引物、反应体系、反应条件与 1.2.5 中的 PCR 扩增检测相同。

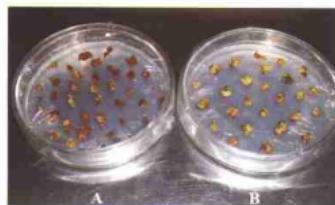
2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导和继代培养

在SM₁培养基上培养14到20 d后,生菜外植体表面出现了小颗粒状的愈伤组织,继代培养,4周后,愈伤组织生长速度加快,向四周无定形扩大,浅黄色、半透明、松散颗粒状。试验表明,当6-BA浓度为1.5 mg/L;IAA浓度为0.2 mg/L时,愈伤组织诱导率最高,生长状态最好。所以将6-BA浓度1.5 mg/L和IAA浓度0.2 mg/L作为生菜诱导愈伤的最佳激素条件。

2.2 抗性愈伤的筛选及其再生

与农杆菌共培养后的愈伤组织在筛选培养基上12 d后逐渐变褐,20 d后,多数愈伤褐化变黑(图2: A)。然后,一部分愈伤组织褐化死亡,另一部分愈伤组织则长出淡黄色、半透明、鲜亮,生长较好的抗性愈伤组织(图2: B)。这些抗性愈伤经体细胞胚途径再生抗性芽,进而长成抗性苗(图3),然后在生根培养基上生根培养。



A. 褐化的愈伤组织块; B. 转化的愈伤组织块再生出愈伤组织
A. Induced browning callus; B. New callus regenerated from transfectants

图2 经筛选长出的生菜抗性愈伤组织

Fig. 2 Lettuce callus on the medium containing hygromycin



图3 经筛选培养基中长出后再生的生菜植株
Fig. 3 Regenerated lettuce plants

2.3 不同转化条件下的GUS染色检测结果

通过比较转化过程中不同的农杆菌浸染液浓度和不同浸染时间等条件,对转化愈伤组织进行GUS

基因表达检测,以确定不同转化条件对转化效率的影响。结果见表2。

从表2可以看出,不同菌液浓度和浸染时间对生菜转化率没有明显的影响,这是因为不同浓度浸染液的菌体数目已远大于受体组织饱和浸染所需的菌体数目,且愈伤组织表面粗糙、松散,有利于菌体附着受体材料以致于转化对浸染时间不敏感。但仍能看出在菌液浓度为OD₆₀₀ 0.5~0.8,浸染时间为5~10 min时,转化率较高。

表2 不同菌液浓度和浸染时间对生菜转化效率的影响

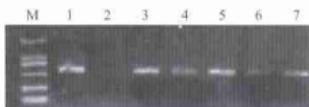
Table 2 Effects of bacterium concentration and infection time on transformation efficiency (100%)

| 感染时间(min) | 菌液浓度(OD ₆₀₀) | | | | | 细菌浓度 |
|-----------|--------------------------|------|------|------|------|------|
| | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.8 | 1.5 | |
| 1 | 17.4 | 17.6 | 18.5 | 19.0 | 18.1 | |
| 5 | 17.7 | 18.8 | 19.4 | 20.1 | 18.0 | |
| 10 | 17.5 | 18.7 | 19.3 | 19.5 | 18.4 | |
| 20 | 17.4 | 18.5 | 18.9 | 18.4 | 18.1 | |

转化愈伤组织在共培养后,通过GUS基因组织化学染色检测,转化组织块部分表面呈现蓝色斑点,在检测的196块愈伤组织中,38块呈阳性,阳性率为19.4%。取抗性植株叶片做GUS基因组织化学染色检测,出现蓝色区域者为转化植株,在检测的24株抗性植株中,16株呈阳性,阳性率为66.7%。

2.4 转化植株的PCR检测

从转化植株中分别提取基因组总DNA作为模板,以融合基因内部序列设计引物进行PCR扩增,能扩增出长度约为800 bp的清晰条带,与阳性对照(质粒pCambia1301-O₂₁-O₁₄-A₂₁-HBeAg)的条带一致,而未转化植株没有检测到扩增产物带(图4)。



M. Marker; 1. 阳性对照(质粒pCambia1301-O₂₁-O₁₄-A₂₁-HBeAg); 2. 未转化植株; 3~7. 抗性植株
M. Marker; 1. Plasmid DNA as positive control; 2. Untransformed plant; 3~7. Transgenic lettuce plants

图4 生菜转化植株的PCR扩增分析

Fig. 4 PCR analysis of transgenic lettuce plants

将PCR产物转膜,进行Southern杂交,转化植株和以质粒为模板的PCR产物均能与探针特异性结合,显示一致的条带,说明目的基因已整合到转化植株的基因组中,同时也证实了PCR检测阳性结果的正确性。杂交结果见图5。

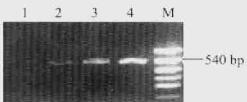


1. 质粒 pCAMBIA1301- O_{21} - O_{14} - A_{21} - $HBcAg$; 2. 阴性对照; 3~7. 转化植株叶片的 PCR 产物
1. Positive control (Plasmid DNA pCAMBIA1301- O_{21} - O_{14} - A_{21} - $HBcAg$); 2. Negative control; 3~7. Transgenic lettuce

图 5 PCR 产物的 Southern 杂交
Fig. 5 Result of PCR-Southern blotting

2.5 转基因植株的 RT-PCR 检测

为了进一步证明 O_{21} - O_{14} - A_{21} - $HBcAg$ 基因在转基因植株中的转录表达情况, 取 3 株阳性植株提取基因组总 RNA, 用 DNaseI 消化 DNA, 再通过逆转录反应合成 cDNA, 做 RT-PCR 检测(图 6)。结果 3 株都能够扩增出 540 bp 左右的条带, 与 Southern 杂交结果一致, 初步表明目的基因在转录水平上进行了表达。



1. 未转化植株; 2~4. 转化植株; M. PCR marker
1. Non-transgenic lettuce; 2~4. Transgenic lettuce; M. PCR marker

图 6 转基因生菜的 RT-PCR 检测
Fig. 6 RT-PCR analysis of transgenic lettuce plants

3 讨论

组织培养中发现生菜子叶比其下胚轴容易诱导愈伤组织, 子叶的愈伤组织诱导率为 90%, 且出愈快, 整齐一致; 而下胚轴的诱导率为 87%; 且前者在培养中污染率明显比后者低, 可能是前者组织生长快、内生菌少的缘故。

试验表明, 在愈伤组织再生过程中, 把激素 6-BA 和 IAA 降低到一定水平, 有利于体细胞胚的形成, 与愈伤组织直接再生相比, 经此途径其再生率高。生菜组织培养再生能力较强, 为其遗传转化及转化组织再生出植株奠定了良好的基础。

共培养过程中农杆菌的状态和浓度对转化效率的影响很大。如果转化时用的菌液浓度过高, 菌体本身易相互聚结, 而影响其在外植体上的附着; 浓度过低时, 附着的菌体过少, 也会影响基因的转化效率。随着 OD₆₀₀ 值增大, 共培养后, 抑制农杆菌的难度也随

之增大, 当 OD₆₀₀ 值超过 0.8 时, 农杆菌就很难被抑制住。因此, 本实验采用 OD₆₀₀ 值 0.6 既可达到比较理想的效果, 且在共培养时, 在共培养基上铺上一层无菌滤纸, 将材料放在上面共培养, 与不用滤纸相比, 筛选中农杆菌不易长出, 材料抑菌容易得多。

潮霉素和羧苄青霉素对筛选获得的抗性愈伤组织分化成苗均有不同程度的影响, 抗性愈伤组织分化成苗率有较明显的下降。筛选中将潮霉素和羧苄青霉素分别撤掉后, 愈伤组织分化成苗率有明显的提高, 说明潮霉素和羧苄青霉素对分化成苗有抑制作用。在大豆、花生、桑树、胡萝卜等的遗传转化中也发现有类似现象^[6~8]。

本研究选用易于生食的生菜作为受体系统进行口蹄疫抗原决定簇融合基因 O_{21} - O_{14} - A_{21} - $HBcAg$ 的转化研究, 获得了转基因再生植株, 并对转基因再生植株进行了分子生物学的分析。我们的实验表明, O_{21} - O_{14} - A_{21} 融合基因可以在生菜中整合和表达。以转基因生菜来生产口服疫苗, 其关键是目标基因稳定整合进生菜基因组, 进而表达出功能性蛋白质。我们的研究已经取得了第一步的结果, 今后将重点研究转基因生菜中融合基因表达的调控和目标蛋白质的功能分析。

参考文献:

1. Wang L, Zhuang H. Hepatitis E: an overview and recent advances in vaccine research [J]. *World J Gastroenterol*, 2004, **10**(15): 2157~2162.
2. Mason H S, Warzecha H, Mor T, Arntzen C J. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine [J]. *Trends Mol Med*, 2002, **8**(7): 324~329.
3. Streatfield S J, Jilka J M, Hood E E, Turner D D, Bailey M R, Mayor J M, Woodard S L, Beiffuss K K, Hom M E, Delaney D E, Tizard I R, Howard J A. Plant based vaccine: unique advantage [J]. *Vaccine*, 2001, **19**(17~19): 2742~2748.
4. Domingo E, Escamis C, Martinez M A, Martinez-Salas E, Maten M G. Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1992, **176**: 33~47.
5. 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002. 744, 831~832, 850~854.
6. 周思军, 李希臣, 刘昭军, 刘丽艳, 杨庆凯. 大豆农杆菌介导转化系统的优化研究 [J]. 东北农业大学学报, 2001, **32**(4): 313~319.
7. 庄振宏, 朱锦懋, 陈由强. 花生再生和转化体系的初步研究 [J]. 福建师范大学学报, 2001, **17**(4): 88~92.
8. 钟名其, 楼程富, 陈建中. 桑树遗传转化中抗生素的浓度优化研究 [J]. 汕头大学学报, 2001, **16**(2): 1~6.