植物学通报 *Chinese Bulletin of Botany* 2007, **24** (5): 609–613, www.chinbullbotany.com

·实验简报·

口蹄疫抗原决定簇融合基因转化生菜及表达

邓小莉[1*], 常景玲[2]

[1] 平原大学应用生物系分子生物学实验室, 新乡 453003; [2] 河南科技学院生物工程系分子生物学重点实验室, 新乡 453003

摘要 以3-5天苗龄的散叶大速生生菜(*Lactuca sativa* var. *capatata*)无菌苗子叶为外植体, 通过根癌农杆菌介导, 将携带O型和A型口蹄疫抗原决定簇融合基因O_{21}-O_{14}-A_{21}-*HBcAg*导入生菜。研究结果表明, 含有20 mg·L^{-1}潮霉素(Hyg)的S_2培养基(MS+1.5 mg·L^{-1} 6-BA+0.2 mg·L^{-1} IAA+20 mg·L^{-1} Hyg +300 mg·L^{-1} Cb)为子叶外植体转化后诱导愈伤和芽再生的最适培养基, 经抗性筛选, 将抗性芽切下于S_3培养基(1/2MS+20 mg·L^{-1} Hyg)上诱导生根。通过PCR 和Southern杂交分析证明, 基因已经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。

关键词 根癌农杆菌, 口蹄疫抗原决定簇, 基因表达, 生菜

邓小莉, 常景玲 (2007). **口蹄疫抗原决定簇融合基因转化生菜及表达**. **植物学通报 24,** 609–613.

植物反应器与微生物和动物反应器相比, 最大的优点是可以大规模、廉价和安全地生产动物蛋白或疫苗(Hiatt et al., 1989; Mason et al., 1996), 特别是用于免疫和治疗性疫苗的生产已随着研究的深入越来越显示出其独特的优势(Arntzen, 1998; Tacket et al., 1998)。据不完全统计, 国外已经有几十种药用蛋白质或多肽在植物中得到成功表达, 其中包括人的细胞因子、表皮生长因子、促红细胞生成素、干扰素、生长激素、单克隆抗体和可作为疫苗用的抗原蛋白等(Mason et al., 1992; Higo et al., 1993; Matsumoto et al., 1993)。

散叶大速生生菜(*Lactuca sativa* var. *capatata*)为菊科莴苣属植物, 是一种由国外引进的生食蔬菜, 具有较高的营养价值。它生长周期短, 整株可以生食, 再生和转化率较高, 关于生菜的遗传转化已有成功的报道(Michelmore et al., 1987; Curtis et al., 1999; McCabe et al., 1999; 刘敬梅等, 2001; 左晓峰等, 2001)。

口蹄疫(foot-and-mouth disease, FMD)是一种由口蹄疫病毒(foot and mouth diseasevirus, FMDV)引起的主要感染偶蹄目动物, 传染性极强的人畜共患的急性传染病, 被国际兽疫局(OIE)列为A类传染病(Domingo et al., 1992)。该传染病传播途径广, 感染率和死亡率高, 往往带来巨大的经济损失。除动物死亡造成直接经济损失外, 动物在患病期间, 肉和奶产量减少且种用价值丧失。由于猪、牛和羊等主要的家畜均可感染此病, 因此可能形成大规模地流行(Knowles and Samuel, 2003)。

口蹄疫病毒通过直接和间接接触的方式传染。直接接触主要是通过消化道感染, 或经皮肤和黏膜等侵入在偶蹄目动物间传染。间接接触主要通过污染的草料或饮水而感染, 其次空气也是重要的传播媒介(Knowles and Samuel, 2003)。患病动物在消化道的皮状黏膜、口、舌、唇、蹄间隙和蹄冠缘、乳房及皮肤的其它无毛发处等部位发生水泡和溃烂。人和非偶蹄目动物也可感染此病, 但症状较轻。因此, 将口蹄疫抗原决定簇融合基因O_{21}-O_{14}-A_{21}-*HBcAg*导入可以生食的生菜中并使其表达, 培育出以植物作为生物反应器来大规模生

收稿日期: 2007-01-12; **接受日期**: 2007-04-05
基金项目: 福建省科技计划项目(No. JY-03-B-30-20)
* **通讯作者**。E-mail: xldeng207@126.com

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-184

产疫苗的转基因蔬菜具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

供试材料为美国大速生生菜(*Lactuca sativa* var. *capatata*), 种子购自新乡市科达种子公司。

1.1.2 质粒和菌株

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教授惠赠。质粒pCAMBIA1301-O_{21}-O_{14}-A_{21}的结构见图1。

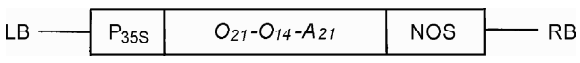


图1 融合基因 O_{21}-O_{14}-A_{21}-*HbcAg* 植物表达载体结构

Figure 1 Plant expression vector encoding the fused gene O_{21}-O_{14}-A_{21}-*HbcAg*

1.2 方法

1.2.1 无菌实生苗的培养

将生菜种子用75%的乙醇表面消毒30秒, 无菌水冲洗1次; 再用15%的次氯酸钠消毒15-20分钟; 无菌水冲洗4-6次, 每次1-2分钟; 将消毒过的种子摆放在铺有2-3层滤纸的灭菌培养瓶中, 25-28°C, 4×10^{-5} mol·m^{-2}·s^{-1}, 每天10小时光照条件培养。1-2天后种子萌发, 取3-5天苗龄的2片子叶作为实验材料进行遗传转化。

1.2.2 根癌农杆菌介导的叶盘法转化生菜和抗性植株的筛选

将-20°C冻存的含有重组质粒pCAMBIA1301-O_{21}-O_{14}-A_2-*HbcAg* $_1$的农杆菌EHA105在LB/ Km 的平板上划线, 28°C 过夜培养, 挑取单菌落于 LB 液体培养基, 28°C, 5×*g*振荡培养至菌液浓度为OD_{600}约1.0, 1 503×*g* 离心5分钟收集菌体, 用1/2 MS液体培养基洗涤2次, 重悬于1/2 MS液体培养基中使该菌体稀释至OD_{600}为0.5-0.8, 即为浸染液。

将生菜无菌苗子叶切去边缘和基部, 在叶片表面划痕后放入菌液中浸染20分钟, 灭菌滤纸吸干菌液, 接种于共培养培养基S_1中(MS+1.5 mg·L^{-1} 6-BA +0.2 mg·L^{-1} IAA+20 mmol·L^{-1} As), 28°C, 黑暗培养3天, 然后转移接种至诱芽筛选培养基 S_2 中 (MS+1.5 mg·L^{-1} 6-BA+0.2 mg·L^{-1} IAA+20 mg·L^{-1} Hyg +300 mg·L^{-1} Cb), 25°C, 光照强度 4×10^{-5} mol·m^{-2}·s^{-1}, 每天14小时光照长度进行诱芽培养, 每2周继代1次。诱芽筛选期间, 一些浸染外植体褐化死亡, 另一些浸染外植体边缘会长出抗性愈伤, 进一步长出嫩绿的小芽。待长出的芽为1-2 cm 时, 及时将芽拔下转入生根培养基 S_3 (1/2 MS)中诱导生根。将生根的植株先移入蛭石中炼苗6-10天后, 再移入土壤, 于室温自然光照下生长。从开始诱芽到长出芽苗和生根的时间大约为35-45天不等。

1.2.3 PCR 法检测转基因生菜

CTAB法提取抗性植株叶片DNA, 以P1和P2 为特异引物进行 PCR 扩增。引物设计: 根据融合基因内部序列设计1对特异引物P1和P2, 其序列如下: 上游引物P1: 5'-GGCGATTTGCAGGTGTTG-GC-3'; 下游引物P2: 5'-CGGGAATCTCAATGTT-AGAAGC-3'。

PCR 反应程序为: 94°C 变性5分钟、94°C 45秒、52°C 45 秒、72°C 1 分钟、35 个循环、72°C 5 分钟。预期的 PCR 产物长度为 800 bp 左右。PCR 扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 转基因植株的 Southern 杂交分析

取 PCR 阳性株、非转化植株和质粒的 PCR 产物 10°C 进行胶浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离, 然后转至 Hybond-N$^+$ 膜上进行杂交。本实验采用 Bio-Rad 公司的Dig High Prime DNA Labeling and Dection Starter Kit1 试剂盒, 所有操作均按照试剂盒操作指南进行。

1.2.5 RT-PCR 检测

取阳性株的幼嫩叶片0.1 g, 用异硫氰酸胍法提取叶片总RNA。反转录采用TaKaRa公司的Oligo(dT)及逆转录

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-184

酶 AMV-RTase, 反转录出 mRNA 的 cDNA 第一链, 然后以此为模板, 进行 PCR 扩增反应。反应体系和反应条件与 1.2.3 节中的 PCR 扩增分析相同。

2 结果与分析

2.1 结果

2.1.1 抗性植株的获得及 PCR 鉴定

以无菌苗子叶为外植体, 其中, 对照子叶外植体在无潮霉素的S_2培养基中再生率可达90%, 经农杆菌侵染处理的外植体在含潮霉素的S_2培养基中出芽比对照稍迟, 且每块外植体上的芽数也少于对照。在 5-40 mg·L^{-1} 潮霉素浓度敏感性实验中, 芽的再生率随潮霉素浓度提高而降低, 达到30 mg·L^{-1}后芽再生困难。当潮霉素浓度为 20 mg·L^{-1} 时, 出芽多, 芽长势最好(邓小莉和李慧, 2006)。经抗性筛选和诱导生根, 共获得 66 株抗性植株。取幼嫩的抗性植株叶片提取 DNA 做PCR检测, 抗性植株扩增出长度约为 540 bp 清晰的预期条带(图2)。本实验中共检测到转基因阳性植株 28 株, 转化率为 50%, 初步说明目的基因已整合到生菜基因组中。

2.1.2 目的基因在生菜基因组中的整合

将 PCR 产物转膜, 进行 Southern 杂交, 转化植株与质粒为模板的PCR产物均与探针特异性结合, 显示一致的条带, 说明目的基因已经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。图 3 为 PCR 产物的 Southern 杂交结果。

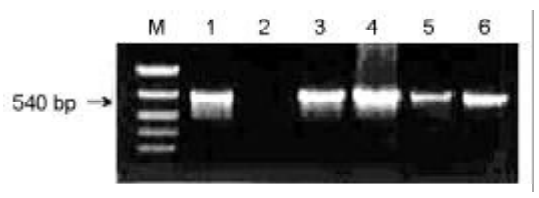


图 2 转基因生菜的 PCR 检测

M: DNA 分子量标准; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照; 3-6: 转基因植株

Figure 2 PCR analysis of transgenic lettuce plants

M: DNA ladder marker; 1: positive control; 2: negative control; 3-6: transgenic lettuce

2.1.3 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DNase I消化DNA, 再通过逆转录反应合成cDNA, 进行RT-PCR检测(图4)。结果显示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。

2.2 分析

选择编码强免疫原性的抗原决定簇基因是保证疫苗成功

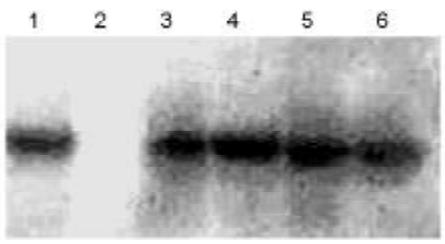


图 3 PCR 产物的 Southern 杂交

1: 质粒 pCAMBIA1301-O_{21}-O_{14}-A_{21} PCR 产物; 2: 阴性对照; 3-6: 转基因植株叶片 DNA 的 PCR 产物

Figure 3 Southern blotting analysis of transgenic lettuce plants

1: plasmid pCAMBIA1301-O_{21}-O_{14}-A_{21}; 2: negative control; 3-6: transgenic lettuce

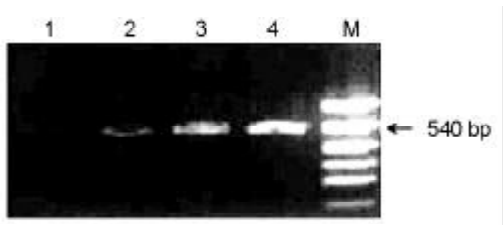


图 4 转基因生菜总 RNA 的 RT-PCR 检测

1: 未转化植株; 2-4: 转化植株; M: DNA 分子量标准

Figure 4 RT-PCR analysis of transgenic lettuce plants

1: non-transgenic lettuce; 2-4: transgenic lettuce; M: DNA ladder marker

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-184

的前提。同时, 利用转基因植物生产口服疫苗具有其独特的优势——植物细胞壁的耐胃肠降解性。这是由于植物细胞外面包裹着由纤维素和糖类组成的厚厚的不易被蛋白酶消化的细胞壁, 可以保护疫苗抗原免受或至少部分免受胃肠道内环境的降解, 从而使利用转基因植物来生产口服疫苗成为可能, 特别是可生食水果和蔬菜更能满足口服疫苗的要求和标准(Tacket and Mason, 1999)。转基因植物生产口服疫苗生产成本低、使用方便、安全, 特别是大范围给药时优点更明显。生菜可以生食, 为廉价生产可食疫苗提供了一条新途径。通过将口蹄疫抗原决定簇融合基因转化生菜, 经PCR 检测、Southern杂交和RT-PCR检测可知, 口蹄疫抗原决定簇融合基因已经在生菜基因组中得到整合并初步验证在转录水平上可以表达。通过阳性株的无性繁殖可以扩大阳性植株的数量。

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入生菜基因组, 进而表达出功能性蛋白质。本研究选用易于生食的生菜作为受体系统, 通过叶盘侵染转化法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并表达。研究已经取得了第一步的结果, 今后的研究重点将转入融合基因表达的调控和目标蛋白质的功能分析。

参考文献

邓小莉, 李慧 (2006). **生菜遗传转化体系的建立及口蹄疫抗原决定簇融合基因的导入**. **平原大学学报 23**, 120-123.

刘敬梅, 陈大明, 陈杭 (2001). **甜蛋白基因** *MBLII* **对莴苣的遗传转化**. **园艺学报 28**, 246-250.

左晓峰, 张晓钰, 单龙, 肖传英, 何笃修, 茹炳根 (2001). **人小肠三叶因子基因在生菜中的整合与表达**. **植物学报 43**, 1047-1051.

Arntzen CJ (1998). Immunity for breakfast. *Science* **280**, 831-831.

Curtis IS, Power JB, de Laat AMM, Caboche M, Dabey MR (1999). Expression of a chimeric nitrate reductase gene in transgenic lettuce reduces nitrate in leaves. *Plant Cell Rep* **18**, 889-896.

Domingo E, Escamis C, Martinez MA (1992). Foot-and-mouth disease virus populations are quasispecies. *Curr Top Microbiol Immunol* **176**, 33-47.

Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish B (1989). Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* **342**, 76-78.

Higo KL, Saito Y, Higo H (1993). Expression of a chemically synthesized gene for human epidermal growth factor under the control of califlower mosaie virus 35S promoter in transgenic tobacco. *Biosic Biotechnol Biochem* **57**, 1477-1481.

Knowles NJ, Samuel AR (2003). Molecular epidemiology of foot and-mouth disease virus. *Virus* **91**, 65-80.

Matsumoto S, Ishi A, Ikura K (1993). Expression of human erythropoietin in cultured tobcco cells. *Biosci Biotechnol Biochem* **57**, 1249-1252.

Mason HS, Ball JM, Shi JJ (1992). Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 11745-11749.

Mason HS, Ball JM, Shi JJ (1996). Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immuno genicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5335-5340.

McCabe MS, Schepers F, van der Arend A, Mohapatra U, de Laat AMM, Power JB, Davey MR (1999). Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a pet E promoter-bar gene compared with a CaMV35S-bar gene. *Theor Appl Genet* **99**, 587-592.

Michelmore RW, Marsh E, Seely S, Landry B (1987). Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* **6**, 439-442.

Tacket CO, Mason HC, Losonsky G (1998). Immunogenicity in human so far ecombinant bacterial antigen deliver edina transgenic potato. *Nat Med* **5**, 607-607.

Tacket CO, Mason HS (1999). A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect* **1**, 777-783.

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-184

Transformation and Expression of FMD Antigenic-determinant Fused Gene in *Lactuca sativa* var. *capatata*

Xiaoli Deng [1*], Jingling Chang [2]

[1]*Laboratory of Molecular Biology, PingYuan University, Xinxiang 453003, China*

[2]*Key Laboratory of Applied Molecular Biology, Department of Biology Engineering, Henan Science-Technical College, Xinxiang 453003, China*

Abstract The FMD antigenic-determinant fused gene (O_{21}-O_{14} -A_{21}-*HbcAg*) was introduced into lettuce (*Lactuca sativa* var. *capatata*) by co-culturing excised cotyledon explants with *Agrobacterium tumefaciens*. The best transformation efficiency was obtained on co-culture with the selective medium S_2 (MS + 1.5 mg·L^{-1} 6-BA + 0.2 mg·L^{-1} IAA + 500 mg·L^{-1} Cb) containing 20 mg·L^{-1} hygromycin. Roots were induced on S_3 (1/2 MS + 20 mg·L^{-1} Hyg). Integration of FMD antigenic-determinant fused gene O_{21}-O_{14} -A_{21}-*HBcAg* into the genome of lettuce plants was confirmed by PCR and Southern blotting analysis. Expression of the fused gene at the transcriptional level was shown by RT-PCR.

Key words *Agrobacterium tumefaciens*, FMDV antigenic determinant, gene expression, *Lactuca sativa* var. *capatata*

Deng XL, Chang JL (2007). Transformation and expression of FMD antigenic-determinant fused gene in *Lactuca sativa* var. *capatata*. *Chin Bull Bot* **24**, 609–613.

* Author for correspondence. E-mail: xldeng207@126.com

(**责任编辑**: **孙冬花**)

《遗传学报》和《遗传》杂志

《遗传学报》、《遗传》杂志是中国遗传学会和中国科学院遗传与发育生物学研究所主办、科学出版社出版的核心期刊, 已被美国化学文摘(CA)**、生物学数据库**(BIOSIS)**、生物学文摘**(BA)**、医学索引**(Medical Index)**、俄罗斯文摘杂志**(AJ)**以及** NCBI、CABI **等** 20 **多种国内外重要检索系统与数据库收录。刊登内容包括遗传学、发育生物学、基因组学、细胞生物学以及分子进化。读者对象为基础医学、农林牧渔、生命科学领域的科研与教学人员、研究生、大学生、中学生物学教师等。**

2005 **年**, **《遗传学报》获得第三届国家期刊奖提名奖**, 2006 - 2007 **年**, **连续获得中国科协精品科技期刊工程项目**(B **类**)**资助。自** 2007 **年起**, **《遗传学报》的外文刊名变更为** *Journal of Genetics and Genomics*。

《遗传学报》 (ISSN 1673-8527, CN11-5450/R)**为月刊**, **全年** 12 **期**, **国内邮发代号** 2-819, **国外发行代号**: M63。2008 **年定价** 50 **元**, **全年** 600 **元。期刊中文网址**: **遗传学报**.cn

《遗传》 (ISSN 0253-9772, CN11-1913/R)**为月刊**, **全年** 12 **期。国内邮发代号** 2-810, **国外发行代号**: M62。2008 **年定价** 40 **元**, **全年** 480 **元。期刊中文网址**: **遗传**.cn

欢迎订阅，欢迎网上注册投稿，欢迎发布广告。

联系地址: 北京市安定门外大屯路中国科学院遗传与发育生物学研究所编辑室
主 编: **薛勇彪**; **编辑室主任**: **李绍武** **E-mail:**ycxb@genetics.ac.cn; yczz@genetics.ac.cn
邮政编码: 100101; **电话 / 传真:** 010-64889354; 64807669
http:// www.Chinagene.cn; http://jgenetgenomics.org; **中国遗传网**.cn

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t26-184