

转亚洲 I 型口蹄疫病毒 VP1 基因烟草研究^{*}

王文秀^{1,2}, 顾节清¹, 陈德坤¹, 邓文¹,
潘丽², 王宝琴², 王永录², 张永光²

(1 西北农林科技大学 动物科技学院, 陕西 杨凌 712100; 2 中国农业科学院 兰州兽医研究所
家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 甘肃 兰州 730046)

[摘 要] 将亚洲 I 型口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因克隆到植物表达质粒 pBin438 中, 构建了植物表达载体 pBin-V P1, 通过根癌农杆菌叶盘转化法, 将亚洲 I 型口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 基因导入 NC89 烟草基因组中, 对经卡那霉素筛选获得的 20 株抗性植株, 进行 PCR 和 RT-PCR 检测。结果表明, 抗性烟草植株中已整合了 VP1 基因。

[关键词] 亚洲 I 型口蹄疫病毒; VP1 基因; 植物表达载体

[中图分类号] Q 87

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)01-0033-04

Tobacco transformation VP 1 gene of foot-and-mouth disease virus Asia I mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

WANG Wen-xiu¹, GU Jie-qing¹, CHEN De-kun¹, DENG Wen¹, PAN Li²,
WANG Bao-qin², WANG Yong-lu², ZHANG Yong-guang²

(1 College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology,
Lanzhou Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730046, China)

Abstract: The recombinant plant expression vector pBin-V P1 was constructed by inserting the target gene VP1 of foot-and-mouth disease virus of Asia I into pBin 438 vector, and transform the explants of tobacco leaves by agrobacterium mediated method. Twenty kanamycin resistant transformants were selected. PCR and RT-PCR detection showed that VP1 gene was integrated into the genome of tobacco.

Key words: foot-and-mouth disease virus; VP1 gene; plant expression vector

口蹄疫(Foot-and-Mouth disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth disease virus, FMDV)引起的偶蹄动物的一种急性、热性、高度接触性烈性传染病^[1],被世界动物卫生组织(OIE)列为A类疾病之首。目前,对该病的防控措施主要是疫苗接种,但传统疫苗的安全性并不十分理想,由疫苗引发的口蹄疫时有发生报道^[2]。因此,研制安全有效的新型口蹄疫疫苗成为目前亟待解决的首要问题。有研究表明,VP1基因是FMDV主要的抗原基因,含有T、B细胞抗原表位,能诱导机体产生中和抗体,是研制FMDV基因工程亚单位疫苗的靶基因^[3]。随

着转基因技术的日臻成熟,利用转基因植物制备口蹄疫疫苗的研究已取得了较大进展。Carrillo等^[4-5],Wigdorovitz等^[6]用O型FMDV VP1基因的植物双元载体分别转化拟南芥、苜蓿和马铃薯,获得了整合VP1基因的转基因植物,并且VP1基因在植物中得到表达,其表达产物能够诱导动物机体产生特异性免疫应答。国内此方面的研究还处于探索阶段,尚未见成功的报道。为此,本研究将亚洲I型FMDV VP1抗原基因重组到植物表达载体中,在根癌农杆菌GV3101的介导下,成功地将VP1基因整合到烟草基因组中,为进一步探索利用转VP1抗原

^{*} [收稿日期] 2005-12-26

[基金项目] 国家“863”项目(2003AA 24110)

[作者简介] 王文秀(1978-)女,新疆伊宁人,在读博士,主要从事分子病原学与免疫学研究。

[通讯作者] 张永光(1962-),男,甘肃临洮人,研究员,主要从事重大动物疫病病原学及免疫学研究。E-mail: zhangyg@public.lz.gs.cn

基因植物生产预防 FMD 的高效、低成本新型“口服疫苗”奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒与烟草 大肠杆菌 JM 109、DH5 α , 根癌农杆菌 GV 3101, 植物表达载体 pB in438 和烟草 NC89 无菌苗, 均由中国农业科学院兰州兽医研究所免疫实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Sal* I, *Taq* DNA 聚合酶及 T4-DNA L igase 购自 Promega 公司; RNA 提取试剂盒为 Q IAGEN 公司产品; 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、乙酰丁香酮(NAA)、卡那霉素(Kan)、链霉素(Str)、羧苄青霉素(Car)及利福平(Rif)均购自 Sigma 公司; MS 无机盐为分析纯。

1.1.3 培养基 MS: MS 基本成分+ 30 g/L 蔗糖, pH 5.8; 共培养培养基(TC): MS+ 100 mg/L 6-BA+ 100 mg/L NAA; 分化培养基(TB): MS+ 100 mg/L 6-BA+ 100 mg/L NAA+ 200 mg/L Kan+ 500 mg/L Car; 继代培养基(TM): MS+ 100 mg/L NAA+ 200 mg/L Kan+ 500 mg/L Car; MS 生根培养基: MS+ 100 mg/L NAA+ 30 g/L 蔗糖+ 200 mg/L Kan。

1.2 引物设计与合成

根据 VP1 基因序列和植物表达质粒 pB in438 上的多克隆酶切位点, 设计 1 对特异性引物, 上游引物设有 *Bam* H I 酶切位点和增强黏膜免疫的 Kozak 序列, 下游设有 *Sal* I 酶切位点和内质网识别序列。引物序列如下:

上游引物 P1: 5'-CGG GAT CCA ACA ATG GCC CGC CAA CAG ACT ACC ACC-3' ;

下游引物 P2: 5'-GCG TCG ACT AGC TCA TCT TTC TCA GAC AAG GTC TGT TTC TCA GG-3'。

引物由大连宝生物工程有限公司合成。

1.3 FMDV VP1 基因的克隆及鉴定

按照 Q IAGEN 公司的 RNA 提取试剂盒说明书从 FMDV 中提取 RNA, 以 P2 为引物对所提的 RNA 进行反转录合成 cDNA。以所获得的 cDNA 为模板, 以 P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系如下: cDNA 模板 10 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer (Mg²⁺ free) 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/mL) 3 μ L, dNTP (2.5 mmol/ μ L) 4 μ L, P₁ (50 pmol/L) 0.5 μ L, P₂ (50 pmol/L) 0.5 μ L, 灭菌去离子水 26.5

μ L。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 56 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。产物纯化回收后送大连宝生物有限公司测序。

1.4 FMDV VP1 基因重组植物表达载体 pB in-VP1 的构建

植物表达载体 pB in438 用 *Bam* H I 和 *Sal* I 双酶切后, 进行 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 回收大片段, 与经同样酶切处理的 VP1 基因用 T4-DNA L igase 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 构建表达载体 pB in438-VP1。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。挑取单菌落于 LB 液体培养基中培养过夜, 用碱裂解法提取质粒, 对所提取的质粒分别进行双酶切和 PCR, 并用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定重组克隆。将以阳性重组质粒为模板的 PCR 产物寄至大连宝生物工程有限公司测序。用三亲交配法^[7-8]将构建好的植物表达载体 pB in-VP1 转化到根癌农杆菌 GV 3101 中, 以备烟草转化使用。

1.5 烟草转化及转基因植株的培养

按照文献[9], 用叶盘法转化烟草品种 NC89。挑取根癌农杆菌单菌落接种于 5 mL YEB 培养基(含 25 mg/L 利福平、25 mg/L 链霉素、200 mg/L 卡那霉素)中, 于 28 $^{\circ}$ C、220 h/min 振荡培养 12 h。取农杆菌培养物 2 mL, 加入 20 mL 上述 YEB 培养基, 同样条件继续培养 12 h, 2 000 r/min 离心 5 min, 沉淀(菌体)用无菌 MS₀ 培养基悬浮, 并稀释至 OD₆₀₀ $\approx$ 200。将生长旺盛的烟草无菌苗叶缘切去, 将叶片切成 1 cm² 大小的小片, 然后用稀释好的农杆菌菌液侵染 10 min, 取出叶片用无菌滤纸吸干表面菌液, 背面朝上置于 TC 上, 于 25 $^{\circ}$ C 暗培养 2 d 后移至 TB 上, 光照培养 10 d 后移至 TM 继代培养, 待分化出的小芽长至 2~3 cm, 将其切下转接 TR 培养基。

1.6 转基因烟草的检测

1.6.1 PCR 检测 按照文献[10]SDS 法并稍作改进。提取转基因烟草的基因组 DNA 作为模板, 以 P1、P2 引物进行 PCR 扩增。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后, 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。同时, 以未进行转化的烟草植株按同样方法进行试验, 以其 PCR 产物作为对照。将阳性植株的 PCR 产物送大连宝生物工程有限公司测序, 以确定其中是否整合有完整的 VP1 基因。

1.6.2 RT-PCR 检测 用 Q IAGEN 公司的植物 RNeasy Mini Kit RNA 提取试剂盒, 直接提取烟草总 RNA, 以 P2 为引物, 对所提取的 RNA 进行反转

录合成 cDNA。再以其为模板, P1, P2 为引物进行 PCR 扩增, 扩增方法同 1.2.2, 扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 FMDV VP1 基因的获得

利用 RT-PCR 方法获得的扩增产物, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 在大约 670 bp 处有明亮条带(图 1), 与预期结果相符。扩增产物测序结果表明, 获得了完整的 VP1 基因, 并在基因两侧含有正确的酶切位点和修饰序列。

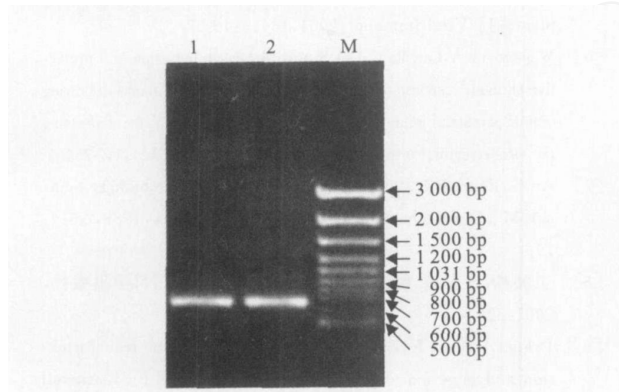


图 1 FMDV VP1 基因 RT-PCR 产物的电泳结果

1~2 VP1 基因扩增产物; M: DNA 分子量标准

Fig 1 A gel electrophoresis of RT-PCR VP1 gene

1-2 RT-PCR products of VP1 gene; M: 100 bp DNA ladder marker

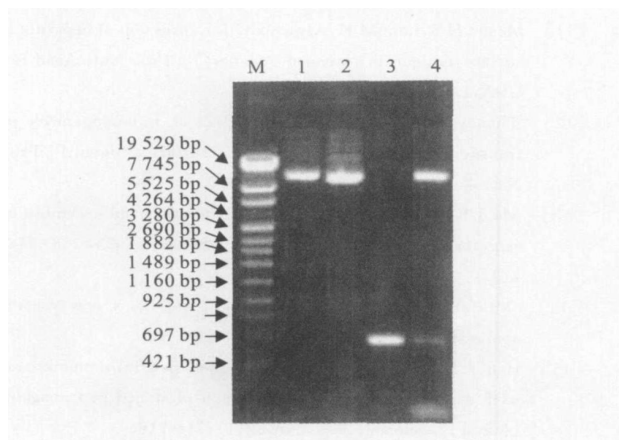


图 2 重组植物表达载体 pB in-VP1 的 PCR 及酶切鉴定

M: DNA 分子量标准; 1 重组植物表达载体 pB in-VP1; 2 植物表达载体 pB in 438; 3 pB in-VP1 PCR 扩增产物; 4 pB in-VP1 双酶切产物

Fig 2 Identification of recombinant

plasmid by PCR and restriction digestion

M: DNA M marker; 1 Recombinant plasmid pB in-VP1; 2 Plasmid pB in 438; 3 PCR identification of pB in-VP1; 4 Restriction identification of pB in-VP1

2.2 FMDV VP1 基因植物重组表达载体 pB in-VP1 的 PCR 及酶切鉴定

由图 2 可知, 构建的重组载体条带较空的植物表达载体条带滞后, 且以重组载体为模板的 PCR 产物长度和酶切后的小片段长度一致, 约为 670 bp, 与 VP1 基因大小相符。测序结果表明, VP1 基因正确插入到 pB in 438 中。由此可知, 重组植物表达载体 pB in-VP1 构建成功。

2.3 转 FMDV VP1 基因烟草的 PCR 扩增

由图 3 可知, 所有转化植株均能扩增出一条约 670 bp 的条带, 而从非转化植株中不能扩增出此目标条带(图 3)。测序结果表明, 转化的烟草植株中整合有 VP1 基因。

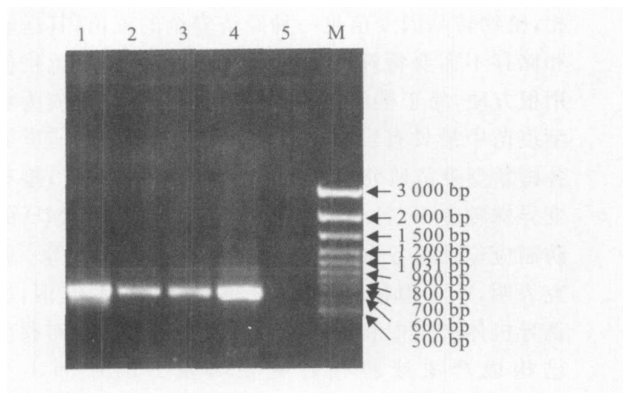


图 3 转 FMDV VP1 基因烟草的 PCR 检测结果

1~3 不同植株转基因烟草; 4 阳性对照(pB in 438-VP1 质粒 PCR 产物); 5 阴性对照(未转化烟草 NC89); M: DNA 分子量标准

Fig 3 PCR analysis of transgenic tobacco plants

1-3 Different transgenic tobacco plants;

4 Positive control; 5 Negative control; M: DNA M marker

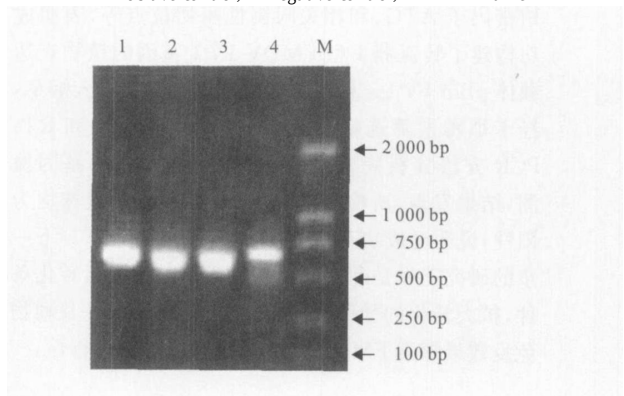


图 4 转 FMDV VP1 基因烟草的 RT-PCR 检测结果

1~3 不同植株转基因烟草; 4 阳性对照(pB in 438-VP1 质粒 PCR 产物); M: DL 2000 分子量标准

Fig 4 RT-PCR analysis of transgenic tobacco plants

1-3 Different transgenic tobacco plants;

4 Positive control; M: DL 2000 M marker

2.4 转 FMDV VP1 基因烟草的 RT-PCR 检测

由图 4 可知,经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳发现,在 670 bp 的位置有很亮的条带,与目的片段长度一致,说明烟草植株中已经整合有 VP1 基因,且已经转录。

3 讨论

口蹄疫病毒属于小 RNA 病毒科,口蹄疫病毒属,有 7 个血清型,各型之间无交叉保护反应。亚洲 I 型 FMDV 主要流行于亚洲地区,对我国已构成严重威胁。自从 1992 年 Mason 等^[11]提出利用转基因植物生产动物疫苗的新思路以来,已经有诸多的研究进一步证明了利用转基因植物作为“工厂”生产疫苗^[12-14]或亚单位疫苗^[15-16]的可行性。与传统的疫苗相,植物转基因疫苗是一种经济安全的疫苗,其运输和储存不需要特殊的冷链系统,且通过口服免疫使用很方便,易于推广普及。转基因植物疫苗已成为新型疫苗中最具有发展前景的一种疫苗,是目前世界各国新型疫苗研究的热点之一。FMDV 的血清型和变异株较多,且各型间无交叉保护,因此对 FMD 的防制应包括对各血清型疫苗的开发。Kupper 等^[3]研究表明,VP1 基因是 FMDV 主要的免疫原基因,能诱导机体产生中和抗体。鉴于此,本研究选用对我国已构成严重威胁且研究相对较少的亚洲 I 型 FMDV,用其结构蛋白 VP1 基因转化模式植物——烟草,开展了转基因植物疫苗的初步研究。

本研究对构建的重组植物表达载体 pBin-VP1 进行了酶切、PCR 扩增及核苷酸序列测定,结果显示序列中含有完整的 Kozak 有效翻译起始基序,起始密码子 ATG、和相关限制性酶切位点等,表明成功构建了转亚洲 I 型 FMDV VP1 基因的植物表达载体 pBin-VP1。利用农杆菌介导法将其导入烟草,经卡那霉素筛选获得抗性植株,通过 PCR 和 RT-PCR 方法分别从复制和转录水平进行目的基因检测,结果发现,所检测的 20 株转基因烟草植株均为阳性,说明已成功获得了转 VP1 基因的烟草。下一步的研究工作是利用所构建的载体继续探索转化条件,扩大转化的受体范围,进一步从表达水平及动物免疫效果探索 FMDV 转基因植物疫苗的可行性。

[参考文献]

[1] Kitching R P. Foot-and-mouth disease: current world situation[J]. Vaccine

cine, 1999, 17: 1772-1774

- [2] Brown F. Review of accidents caused by incomplete inactivation of viruses[J]. Dev Biol Stand, 1993, 81: 103-107.
- [3] Kupper H, Keller W, Kurz C H, et al. Cloning of cDNA of major antigen of foot-and-mouth disease virus and expression in *E. coli*[J]. Nature, 1981, 289: 555-559.
- [4] Carrillo C, Wigdorovitz A, Olieros J C, et al. Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants[J]. J Virol, 1998, 72 (2): 1688-1690.
- [5] Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, et al. Induction of a virus-specific antibody response to foot-and-mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants[J]. Viral Immunol, 2001, 14(1): 49-57.
- [6] Wigdorovitz A, Carrillo C, Dos Santos M J, et al. Induction of a protective antibody response to foot-and-mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1[J]. Virology, 1999, 255 (2): 347-353.
- [7] An G, Ebert P R, Mitra A, et al. Plant molecular biology manual[M]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1988, A 6: 1-19.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 325.
- [9] Draper J, Scott R, Annitage P, et al. Plant genetic transformation and gene expression: a laboratory manual[J]. Blackwell Scientific Publications, 1988, 126: 1-24.
- [10] Yeager R, Maiti IB, Nielsen M T, et al. Tissue partitioning of cadmium in transgenic tobacco seedlings and field grown plants expressing the mouse metallothionein I gene[J]. Transgenic Res, 1992, 1: 261-267.
- [11] Mason H S, Lam M K, Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 11745-11749.
- [12] Thanavala Y, Yang Y F, Lyons P, et al. Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92: 3358-3361.
- [13] Ma J K, Hiatt A, Hein M, et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plants[J]. Science, 1995, 268: 716-719.
- [14] Moffat A S. Exploring transgenic plants as a new vaccine source[J]. Science, 1995, 268(5211): 658-660.
- [15] Haq T A, Mason H S, Clements J D, et al. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants[J]. Science, 1995, 268(5211): 714-716.
- [16] Mason H S, Ball J M, Shi J J, et al. Expression of norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice[J]. Proceedings of National Academy of Science USA, 1996, 93: 5335-5340.