

霍乱毒素 B 亚基对胡萝卜的遗传转化^{*}

陈书霞^{1,2}, 方荣祥³, 刘 玲¹, 程智慧², 李 霞¹

(1 北京市蔬菜研究中心, 北京 100086; 2 西北农林科技大学, 陕西 杨陵 712100; 3 中国科学院 微生物研究所, 北京 100081)

[摘 要] 以胡萝卜无菌幼苗的下胚轴为外植体, 通过携带 CTB 基因的根癌农杆菌的介导进行转化, 在 Kan 50 mg/L 和 Carb 500 mg/L 的 M S3-1 固体培养基上诱导形成胚性愈伤组织, 转至 Kan 100 mg/L 和 Carb 100 mg/L 的 M S₀ 固体培养基上形成植株, 同时还进行了以经过预处理的下胚轴为外植体进行转化的试验, 发现低温处理 4 d 的下胚轴的抗性愈伤诱导率较高。经 PCR 检测、PCR-Southern 杂交检测以后, 表明 CTB 基因已整合进胡萝卜的基因组中。RT-PCR 检测初步证明了 CTB 基因的转录。

[关键词] 霍乱毒素 B 亚基(CTB 基因); 胡萝卜; 遗传转化

[中图分类号] S631.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)05-0043-04

霍乱弧菌是一种严重威胁人类健康的腹泻致病菌。霍乱肠毒素是由霍乱弧菌生产的霍乱致病因子, 其由 A、B 2 种亚基组成, A 为活性部分, B 亚基为抗原部分^[1]。CTB 具有良好的免疫原性, 可刺激机体产生保护性抗体, 对腹泻提供有效的保护^[2]。过去人类获得免疫预防主要是通过疫苗接种, 然而对霍乱弧菌而言, 粘膜免疫比肠外免疫更有效。因此, 近年来人们致力于研究利用转基因植物生产疫苗, 尤其希望利用转基因方法为人类提供廉价、安全的口服疫苗。至今已有多种疫苗在转基因植物中获得成功表达, 如乙型肝炎表面抗原^[3]、HIV 表面抗原、不耐热的肠毒素 B 亚单位^[4]、重组 CTB^[5]等, 但大都用模式植物如烟草或马铃薯等, 需经纯化或加热煮熟后食用。而胡萝卜可生食, 也可榨汁, 营养价值较高, 同时胡萝卜作为研究体细胞胚发生及组织培养方面

的经典材料, 其转化也有成功的报道, 因此胡萝卜是研究口服疫苗的理想材料。本研究利用胡萝卜作为植物材料表达霍乱毒素 B 亚基, 以期利用转基因植物生产口服腹泻疫苗的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

取亲本材料 AC93 和 AC101 胡萝卜种子, 人工搓去种子上的刺毛, 体积分数 70% 乙醇震荡 30 s, 10 g/L AgNO₃ 消毒 30 min, 用无菌水冲洗 5~6 次, 滤纸吸干, 接种至 1/2 M S 固体培养基上, 26 黑暗条件下培养 9~10 d 后, 切取下胚轴进行转化。

1.2 质粒和菌株

该质粒由中国科学院微生物研究所方荣祥所长提供。见图 1。

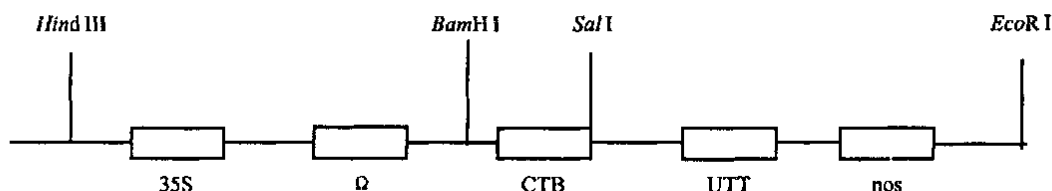


图 1 PBirc 38 质粒图谱

Fig 1 The diagram of PBirc 38

1.3 植物材料对卡那霉素敏感性的测定

将未经转化的 2 个亲本材料 AC93 及 AC101 的外植体分别培养在含 Kan 25, 40, 50, 70, 90, 110,

130 mg/L 和不含 Kan 的培养基上, 观察胡萝卜外植体对卡那霉素的敏感性, 以确定最合适的筛选压。

^{*} [收稿日期] 2002-10-09

[作者简介] 陈书霞(1971-), 女, 河南临颖人, 在读博士, 主要从事蔬菜生物技术研究。

[通讯作者] 李 霞(1970-), 女, 山东日照人, 博士, 助理研究员, 主要从事转基因疫苗研究。

1.4 无菌苗的预处理

参照上海植生所王凌健等^[6]的研究,对胡萝卜幼苗进行如下预处理: 26 11 d, 4 0 d; 26 7 d, 4 4 d; 26 7 d, 4 8 d; 26 7 d, 4 10 d。

1.5 共培养及转化

将胡萝卜下胚轴切成 0.5 cm 的段,浸没于 OD₆₀₀ 为 0.5~0.6 的菌液中,30 min 后取出,用无菌滤纸吸去多余的菌液,接种于含 0.2 mg/L 的 2,4-D 的 MS(MS-1) 固体培养基上,于 26℃ 黑暗条件下共培养 3 d,至外植体上长出明显的菌液。

1.6 抗性愈伤组织的诱导和植株再生

共培养后将外植体接种于附加 50 mg/L 的 Kan 及 500 mg/L Carb 的 MS-1 固体培养基上,2~3 周后转至附加 50 mg/L Kan 及 300 mg/L Carb 的 MS-1 固体培养基上,诱导抗性愈伤组织的形成,1 个月后,将抗性愈伤组织转至含 100 mg/L 的 Kan 及 100 mg/L 的 Carb 的 MS₀ 固体培养基上,2 周后可观察到黄白色胚状体的形成。

1.7 植株再生

等黄白色的胚状体长大一些后,用镊子将其轻轻拨下,使其散落在培养基上,等小植株长至 0.5~1.0 cm 时,将其接种至新的附加 100 mg/L Kan 及 100 mg/L Carb 的 MS₀ 培养基上,2 周内胚根明显伸长的可视为抗性株。

1.8 PCR 扩增

1.8.1 引物设计 据 CTB 序列设计 1 对特异引物 P1 和 P2。

P1: 5'ACACCTCAAAATATTA CTGATT3';

P2: 5'CCATTTGCCATACTAATTGCGG3'。

1.8.2 DNA 提取及 PCR 反应 DNA 提取用 CTAB 法。PCR 反应在 PERKIN ELMER Gene Amp PCR System 9600 上进行,反应条件: 94 3 min, 94 1 min, 54 1 min, 72 1 min, 30 个循环, 72 延伸 30 s。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8.3 PCR Southern-blot 鉴定 试验使用 Boehringer Mannheim 公司生产的 DIG-DNA 标记检测系统,用引物 P1 和 P2 从 PBirc 38 的质粒中扩增出 400 bp 的片段,经琼脂糖凝胶电泳纯化,采用随机引物标记法进行 DIG 标记后作为杂交探针。用该对引物从阳性株叶片总 DNA 中扩增出 400 bp 的片段,经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,采用毛细管法转移至尼龙膜上,按产品说明书进行杂交和免疫显色。

1.8.4 转基因植物的 RT-PCR 鉴定 取阳性株的幼嫩叶片 0.1 g,用异硫氰酸胍法提取叶片的总 RNA,采用 Promega 的 OligdT (15) 及逆转录酶 M-MLV 反转录出各 mRNA 的 cDNA 第一链,然后依此为模板,进行常规 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 植物材料对卡那霉素敏感性的测定

将未经转化的 AC93 和 AC101 的下胚轴分别培养在含不同质量浓度卡那霉素的 MS-1 培养基上,同时将正在分化胚的愈伤组织及由胚生成的小植株分别培养在含不同质量浓度的卡那霉素的 MS₀ 固体培养基上。结果表明,当卡那霉素质量浓度为 25 mg/L 时,下胚轴的端部有少量的愈伤分化,愈伤组织上有部分胚分化;当卡那霉素质量浓度为 50 mg/L 时,下胚轴基本无愈伤分化,而培养的愈伤组织还有少量的生长现象,分化的胚通过愈伤吸收营养,有生长现象,但呈生长不良状,小植株的胚根已不能伸长。

为了较严格地筛选抗性株,将下胚轴诱导愈伤组织卡那霉素质量浓度定为 50 mg/L,愈伤组织分化胚和抗性株生长的卡那霉素质量浓度定为 100 mg/L。

2.2 预处理对胡萝卜转化的影响

取不同预处理的胡萝卜下胚轴,在相同条件下进行转化试验,每个处理中下胚轴取相同块数,经过共培养、诱胚、继代等一系列培养后,随机抽取各处理的卡那抗性株进行检测。结果发现在所进行的转化试验中,幼苗经 4 处理 4 d,从其下胚轴所获得的抗性愈伤最多,各处理各接种约 400 块外植体,4 处理 4 d 的下胚轴的抗性愈伤组织的诱导频率为 80%,而其他各处理的抗性愈伤组织的诱导频率则低于此数值。

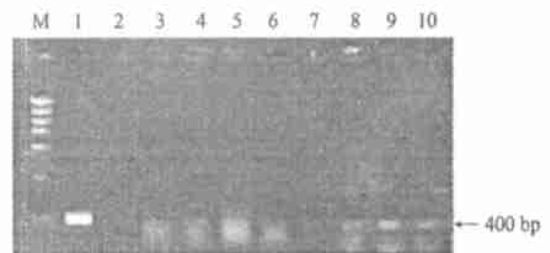


图 2 胡萝卜再生株的 PCR 检测

M. DNA 分子量标准; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~10 转化再生株

Fig 2 PCR detection of regenerated carrot plant

M. DNA step ladder; 1. Positive control;

2. Negative control; 3~10. Regeneration plant

2.3 转基因胡萝卜的鉴定

2.3.1 PCR 鉴定 取转化后正常生长的植株叶片提取基因组DNA, 以未经转化的胡萝卜植株的DNA 为对照, 用引物进行扩增, PCR 检测的结果如图2所示。

2.3.2 PCR-Southern 鉴定 使用DIG-DNA 标记检测系统对随机选取的阳性株进行 PCR-Southern 分析, 结果表明(图3), 从抗性株DNA 扩增的400 bp 的片段能与探针发生特异结合。证明再生植株的PCR 阳性结果可靠, 初步确定目的基因已整合到抗性再生植株的染色体中。

2.3.3 转基因植株的RT-PCR 分析 用提取的转基因胡萝卜的总RNA 进行 RT-PCR 扩增, 检测CTB 基因在转基因胡萝卜中的转录, 扩增结果如图

4所示。转基因胡萝卜的RNA 经过反转录后能扩增出目的条带, 而阴性对照则未扩出相应片段, 初步证明转基因胡萝卜中有CTB 基因的转录。

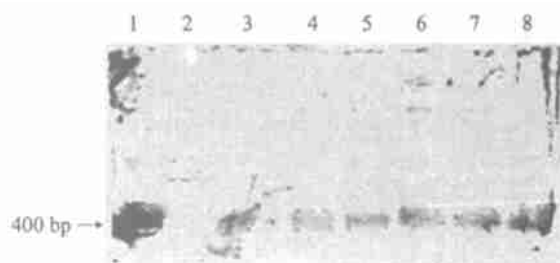


图3 转基因胡萝卜的 PCR-Southern

1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~8 阳性株

Fig 3 PCR-Southern blot of transgenic carrot plant

1. Positive control; 2. Negative control; 3- 8 Positive plant

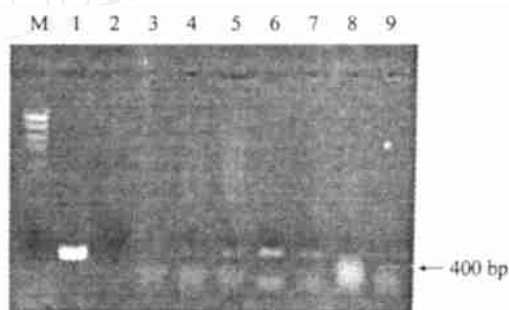
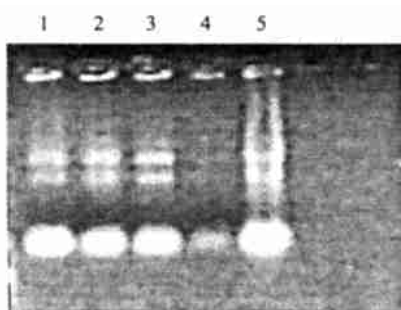


图4 转基因胡萝卜的RNA 提取及RT-PCR

左图: 1. 阴性对照; 2~5 阳性株; 右图: M. High DNA mass ladder 分子量标准;

1. 阳性对照; 2. 空白对照; 3. 阴性对照; 4~9 阳性株

Fig 4 RNA extraction and RT-PCR detection of transgenic carrot plant

Left plate: 1. Negative control; 2- 5 Positive plant; Right plate: M. High DNA mass ladder;

1. Positive control; 2. Blank control; 3. Negative control; 4- 9 Positive plant

3 讨论

植物遗传工程是建立在有效的载体、受体和有效的遗传转化方法基础之上的。本研究用胡萝卜作为受体系统, 一方面是它具有体细胞胚发生能力(大都认为体细胞胚属单细胞起源^[7]), 有效地减少了嵌合体的发生, 另一方面, 胡萝卜可生食, 这对研究口服疫苗具有重要意义。

外植体的生理状态是影响转化效果的重要因素。本试验中将无菌苗做低温处理, 发现4 处理4 d 的无菌苗下胚轴所获得的抗性株PCR 阳性率较高, 此结论需做更多的试验进行验证。胡萝卜是通过

体细胞胚发生再生植株, 试验发现, 在分化及脱分化阶段需用不同的卡那选择压来筛选抗性株。在愈伤组织的诱导阶段, 将卡那霉素质量浓度定为50 mg/L; 在诱胚阶段, 将卡那霉素质量浓度定为100 mg/L; 在再生植株的胚根伸长阶段, 为了较严格地筛选抗性株, 把卡那霉素质量浓度定为100 mg/L。

本研究中, 通过 PCR-Southern 初步确定了CTB 基因已整合进基因组中, 也通过 RT-PCR 初步确定了CTB 的转录, 还需通过做 Southern 杂交准确确定外源基因整合的拷贝数及通过 Northern 杂交确定外源基因的转录量。

[参考文献]

[1] 熊凌霄, 马清钧, 张艳红. 工程菌产霍乱毒素B 亚单位的纯化[J]. 生物化学杂志, 1990, 6(1): 27- 31.

[2] 王新国. 用转基因植物生产霍乱毒素B 亚单位[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 1999. 3- 4.

- [3] Nason H S, Lam D M K, Arentzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89: 11754- 11759
- [4] 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: 714- 715
- [5] Arakawa T, Chong D K X, Langridge W H R. Efficacy of a food plant-derived oral cholera toxin B subunit vaccine[J]. Nature Biotechnology, 1998, 16: 292- 297.
- [6] 王凌健, 倪迪安, 陈永宁, 等. 利用转基因胡萝卜表达肺结核疫苗[J]. 植物学报, 2001, 43(2): 132- 137.
- [7] 周俊彦. 植物体细胞在组织培养中产生的胚状体 I. 植物体细胞的胚状体发生[J]. 植物生理学报, 1981, 7(4): 389- 396

Genetic transformation of CT-B on carrot

CHEN Shu-xia^{1,2}, FANG Rong-xiang³, LIU Ling¹, CHENG Zhi-hui², LI Xia^{1*}

(1 Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100086, China;

2 Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The hypocotyl of carrot were infected with *Agrobacterium tumefaciens* containing CTB gene, the explants were transferred to MS-3 selection media which contained Kan 50 mg/L and carb 500 mg/L to induce embryogenic callus. Then the callus were transferred to MS media to form plantlet, and it was found that the transgenic rate of hypocotyls which were treated of low temperature were higher in all treatments. PCR, PCR-Southern detection of carrot DNA confirmed that the CTB gene had been introduced into the plant genome. RT-PCR detection showed primarily the transcription of CTB.

Key words: cholera B subunit (CTB gene); carrot; genetic transformation

欢迎订阅 2004 年《南京农业大学学报》

《南京农业大学学报》是综合性、多科性农业科学学术期刊。主要刊登动、植物遗传育种, 生理生化, 生物技术; 作物栽培、病虫害防治; 园艺; 食品科学; 动物医学与动物科学; 资源与环境科学; 农业应用化学; 农业经济管理与贸易; 土地管理及农业工程等专业学术论文、研究报告、实验技术、文献综述和科研简报。读者对象主要为国内外农业院校、综合性大学和师范大学生物系的师生, 以及农业科学研究人员和专业技术人员。

《南京农业大学学报》为中国自然科学核心期刊, 论文被国内外多种重要数据库和文摘期刊收录, 同时发行光盘版。近年来, 学报被评为“教育部优秀自然科学学报”, 并两次荣获“江苏省十佳科技期刊”称号; 2001 年入选中国期刊方阵; 2001 年被中国科学技术信息研究所评为“百种中国杰出学术期刊”; 2002 年荣获“第二届国家期刊奖百种重点期刊”称号。学报自 1998 年起影响因子和总被引频次均居全国农业高校学报之首。2001 年影响因子达到 0.338。

《南京农业大学学报》为季刊, 标准 16 开本, 定价 8.00 元/册。公开发行, 全国各地邮局收订, 邮发代号 28-53。错过订阅时间的可向本刊编辑部直接办理邮购。欢迎订阅。

编辑部地址: 南京卫岗 1 号 《南京农业大学学报》编辑部

邮编: 210095 联系电话: (025) 4395214 E-mail: nauxb@njau.edu.cn