

文章编号: 1005-0906(2004)03-0022-04

口蹄疫病毒结构蛋白 P1 基因转化玉米的初步研究

余云舟,王 罡,金宁一,季 静,王 萍

(解放军军需大学植物基因工程研究中心,吉林 长春 130062)

摘 要: 实验在构建口蹄疫病毒 (Foot and Mouth Disease Virus, FMDV) 结构蛋白 P1 基因植物二元表达载体 (pBI131SP1、pBI21P1 和 pBI121AP1) 的基础上,以玉米自交系 8902、340、4112 的 II 型胚性愈伤组织为受体,用农杆菌介导法和基因枪轰击法转化玉米,获得 31 株抗性再生植株。GUS 染色证明外源目的基因在玉米细胞和组织中得到了表达。PCR 检测、Southern blotting 鉴定证实目的基因 P1 已整合到再生植株的基因组中,共获得了 13 株转基因玉米植株,首次进行了 FMDV 抗原基因转化玉米的研究。

关键词: 玉米;口蹄疫病毒;P1 基因;转基因;再生植株

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Transformation with P1 Gene from Foot and Mouth Disease Virus into Maize

YU Yun-zhou, WANG Gang, JIN Ning-yi, JI Jing, WANG Ping

(Research Center for Plant Genetic Engineering, Quartermaster University of PLA, Changchun 130062, China)

Abstract: FMDV-P1, neutralizing site determined, which induces protective antibody and immune response of animal, is subjective of gene engineering vaccine research. Plant binary expression vectors pBI131SP1, pBI21P1 and pBI121AP1 were constructed with P1 gene from FMDV. Type II calli were initiated from immature embryos of maize inbred line 8902, 340 and 4112, and were transformed with FMDV-P1 via *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404 and EHA105) and particle bombardment. 31 kanamycin-resistant transformants have been obtained in this experiment. GUS assay indicated that foreign gene had expressed in maize cell and calli. It was demonstrated that P1 gene had been inserted into maize genome after PCR and Southern blotting analysis of regenerated plants. 13 transgenic maize plants have been obtained. To our knowledge, this is the first report that FMDV-P1 gene was transformed into maize.

Key words: Maize; FMDV; P1 gene; Transformation; Regenerated plant

口蹄疫是由口蹄疫病毒引起的猪、牛偶蹄动物的一种急性、高度接触性病毒病。口蹄疫病毒 (FMDV) 的结构蛋白 P1 为口蹄疫病毒的抗原位点,其结构蛋白 P1 成熟后裂解为 VP1、VP2、VP3、VP4,其中 VP1 为主要抗原位点,能诱导机体产生抗 FMDV 中的抗体和抗病毒保护性免疫,是基因工程疫苗研究的对象。为了制备安全、有效的新型基因工程疫苗,人们积极探索 FMDV 转基因植物的研究,

1998 年 Carrillo 等^[1]、1999 年 Wigdorovitz 等^[2]和 2001 年 Carrillo 等^[3]将 FMDV-VP1 结构蛋白抗原基因的植物二元载体分别转化拟南芥、苜蓿和马铃薯,获得整合了 VP1 基因的转基因植物。并且 VP1 基因在转基因植物中的表达产物能够诱导动物产生特异性免疫应答。2002 年 Dus Santos 等^[4]把口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白 135 ~ 160 多肽 (VP1 135 ~ 160) 基因片段与 GUS 基因融合,转化苜蓿得到转基因植物,通过检测 GUS,证明该多肽在苜蓿中表达,能诱导动物的特异性免疫应答。这些研究结果表明,利用植物表达系统完全有可能生产有效安全的口蹄疫疫苗。本实验构建了含 P1 全长基因的植物表达载体,用于转化玉米、马铃薯等植物,以期获得食用性转基因植物疫苗,为利用植物生物反应器生产基因工程疫苗进行了探索性研究。

收稿日期: 2003-09-30

基金项目: “国家植物转基因中试及产业化基地”专项课题 (J99-B-001), 863 资助项目 (2001AA213071) 和吉林省科学技术厅资助项目 (20030552-4)

作者简介: 余云舟 (1978-), 男, 硕士研究生, 从事植物分子生物学及植物基因工程研究。

王罡为本文通讯作者。Tel: 0431-6986561 6985087

E-mail: yuyunzhou@sina.com

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验取玉米自交系 8902、340、4112 的 10 ~ 15 d 的幼雌穗,表面用 75% 的酒精消毒 10 min,再用 0.1% 氯化汞浸泡消毒 10 min,无菌水洗 3 ~ 5 次后挑取幼胚接种在诱导培养基上,诱导出初始愈伤组织,诱导率达到 90% 以上;将愈伤组织块转入继代培养基中继代,每两周转一次,诱导出黄色、颗粒状 II 型胚性愈伤组织;胚性愈伤组织在分化培养基上分化出苗,分化率达到 70% 以上;然后将小苗移

入生根培养基上诱导出生根植株,待条件适宜时移栽。

1.2 质粒和菌株

携带有质粒 pBI121P1、pBI121AP1 和 pBI131SP1 的根癌农杆菌(EHA105 和 LBA4404)由本人构建(待发表)。质粒 pBI121P1、pBI121AP1 和 pBI131SP1 的 T-DNA 区见图 1 所示,其中植物表达载体 pBI131SP1 中的调控元件包括二个增强子,35S 启动子等序列,下游有多联终止密码子等与转录加工、翻译调控相关序列元件,pBI121AP1 为 Actin 1 禾本科特异启动子与 35S 启动子组成复合启动子。

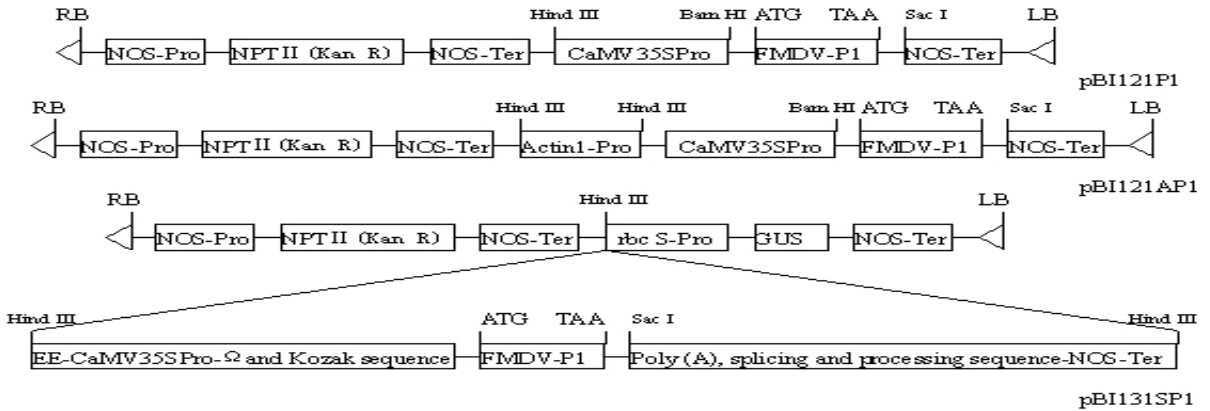


图 1 质粒 pBI121P1、pBI121AP1 和 pBI131SP1 的 T-DNA 区

1.3 农杆菌介导转化玉米愈伤组织及其抗性筛选和植株再生

参考本实验室建立的转化体系进行^[5],并略有改进与优化。农杆菌浸染后的愈伤组织,在共培养 3 d 后,转移到含有 300 mg/L 头孢霉素和 200 ~ 300 mg/L 卡那霉素的继代培养基进行脱菌筛选培养三代,然后将抗性愈伤组织转到含 50 ~ 100 mg/L 卡那霉素分化培养基上分化出苗,待条件适宜时移栽。

1.4 基因枪法转化玉米愈伤组织及其抗性筛选和植株再生

按照本实验室建立的转化体系进行^[6],并略有改进与优化。

1.5 GUS 报告基因检测

将农杆菌侵染后共培养 3 d 的愈伤组织和基因枪轰击后培养 1 d 的愈伤组织以及抗性愈伤组织,转移到 X-Guc 溶液中,37℃ 保温,过夜,在解剖镜下观察,观察愈伤组织是否有蓝色斑点形成。

1.6 PCR 检测分析

取抗性再生植株和未转化植株叶片,鼎国试剂盒小量提取植物基因组 DNA。

根据 NPTII 基因序列和已知 FMDV-P1 基因序列,用 DNASTAR 软件分别设计四对引物用于转基

因植株中目的基因的 PCR 检测及 Southern 杂交分析。如下:

外源目的 P1 基因 PCR 扩增引物:上游 5-GC-TACGACCAGTACAAGGTA-3,下游 5-TGTGTCT-CACCACCGTAGTT-3,扩增特异带大小约为 900 bp,代号为 P1;

VP1 基因的引物:上游 5-ACCACCTCCACA-GGTGAGTCGGCT-3,下游 5-CCCAAAGCTGTTTC-ACAGGCGCCACA-3,扩增 640 bp 特异带,代号为 VP1;

P1 基因上游调控元件的引物:上游 5-AGCAAG-TGGATTGATGTGAT-3,下游 5-CGTTGCGGGTAGT-GAGGATG-3,扩增 500 bp 特异带,代号为 P;

NPTII 基因的引物:上游 5-GAACAAGATG-GATTGCACGC-3,下游 5-TTTCTCGGCAGGAG-CAAGG-3,扩增 380 bp 特异带,代号为 N。

PCR 扩增及 GUS 染色检测质粒 pBI131SP1T-DNA 区示意图(图 2)。

1.7 基因组 DNA Southern blotting 鉴定

SDS 法大量提取 1 g PCR 呈阳性的再生植株叶片和未转化再生植株叶片基因组 DNA。用 Hind III 酶切基因组 DNA 和阳性对照质粒 pBI131SP1,电泳

后采用电转仪 (BIO-RAD) 转移样品 DNA 到尼龙膜上。用 VP1 引物扩增质粒 DNA 的回收产物作探针,

用生物素地高辛法进行杂交,具体程序参照 DIG 试剂盒说明。

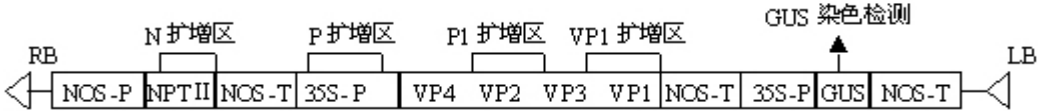


图 2 四对引物 PCR 扩增 GUS 染色检测质粒 pBI131SP1 区示意图

2 结果与分析

2.1 农杆菌转化玉米自交系 II 型胚性愈伤组织遗传转化体系的建立

为了研究农杆菌介导玉米转化的适宜条件,利用表达载体 pBI131SP1 中携带的 GUS 报告基因,对农杆菌的侵染浓度、菌株类型、侵染时间、AS(乙酰丁香酮)浓度及玉米基因型等条件进行了研究。每次每个处理取 50 块愈伤组织,3 次重复,对 GUS 瞬时表达进行组织化学检测,以每个愈伤为单位,统计产生蓝色斑的愈伤数,计算其所占百分率,求平均数后作图。对农杆菌转化玉米愈伤组织的不同条件进行比较,其最优转化条件为感染培养基菌液浓度 OD₆₀₀ 值为 0.4~0.5,侵染时间 10~15 min,AS 浓度为 100 μmol/L,建立了农杆菌介导优良玉米自交系 II 型胚性愈伤组织高效遗传转化体系(待发表)。利用这个转化体系进行 P1 基因三个表达载体的遗传转化。

2.2 玉米抗性愈伤组织的筛选和植株再生



图 3 转基因植株生根培养

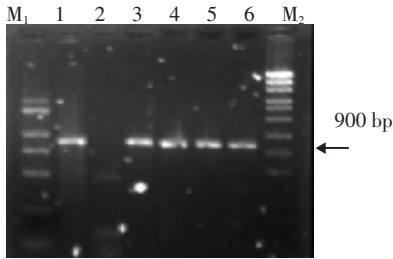
图 4 转基因植株移栽成活

不同浓度的卡那霉素对玉米愈伤组织的生长有不同的抑制作用。为了确定有效的选择剂浓度,本实验设卡那霉素的浓度分别为 0、50、100、200、400 和 1 000 mg/L,对愈伤组织进行了选择性筛选试验,结果愈伤组织相应的褐死率分别为 0、10%、20%、50%、70%和 100%。另外,卡那霉素在浓度高时对玉米愈伤组织的分化具有明显的抑制作用,因此本实验以略高于半致死的卡那霉素的浓度作为选择标准,即 200~300 mg/L,而在分化培养基中则用 50~

100 mg/L 浓度进行选择筛选。本实验获得了植物表达载体 pBI131SP1 转化的抗性再生植株共 25 株,其中农杆菌转化获得了 20 株抗性再生植株,而基因枪转化获得了 5 株抗性再生植株(图 3、图 4)。转化材料及抗性愈伤组织进行 GUS 染色呈蓝色,表明外源目的基因能够在玉米细胞和组织中表达。

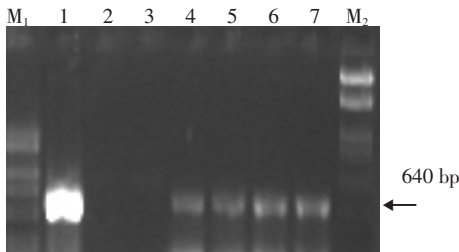
2.3 抗性再生植株的 PCR 检测

用引物 P1、VP1、P 和 N 分别对 pBI131SP1 转化的再生植株进行 PCR 检测,结果部分为阳性,扩增出 900 bp 的特异带(图 5)、640 bp 的特异带(图 6)、500 bp 的特异带(图 7)和 380 bp 的特异带(图 8),而对照没有此特异带,初步证明 P1 基因已整合到再生植株基因组中。对 25 株再生植株的 4 对引物扩增结果表明,农杆菌转化有 8 株均呈阳性,而基因枪转化仅有 2 株。四对引物均扩增出特异带的转基因玉米植株,表明整个二元载体 RB 和 LB 之间序列均整合到基因组中,构成一个完整的表达盒。另外,也获得了 pBI121P1 和 pBI121AP1 转化再生植株各 3 株,用 P1、VP1 和 N 引物 PCR 检测有 3 株呈阳性。



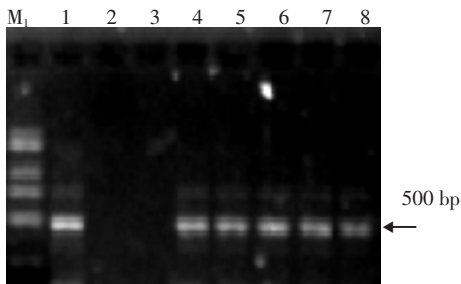
1 为质粒 DNA, 2 为未转化植株, 3~6 为转基因植株
M₁ 为 DGL2000, M₂ 为 T12/Hind III

图 5 P1 引物对 P1 基因 PCR 检测



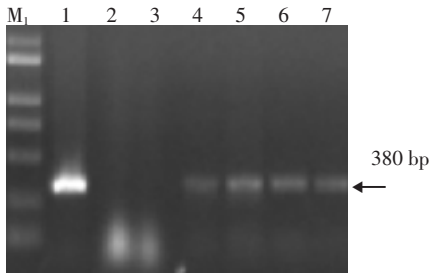
1 为质粒 DNA, 2 为水, 3 为未转化植株, 4~7 为转基因植株
M₁ 为 DGL2000, M₂ 为 T12/Hind III

图 6 VP1 引物对 VP1 基因 PCR 检测



M 为 DGL2000,1 为质粒 DNA,2 为水,3 为未转化植株
4~8 为转基因植株

图 7 P 引物对 P1 基因上游调控元件 PCR 检测

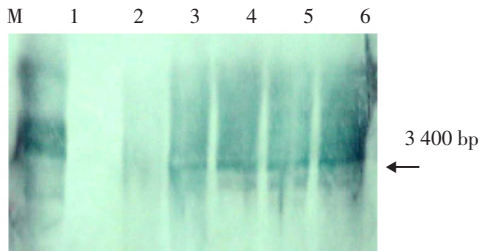


M 为 DGL2000,1 为质粒 DNA,2 为水,3 为未转化植株
4~7 为转基因植株

图 8 N 引物对 NPT II 基因 PCR 检测

2.4 转基因玉米植株基因组 DNA 的 Southern blotting 鉴定

对四对引物 PCR 检测均为阳性的转基因再生植株基因组 DNA 进行 Southern blotting 鉴定时,取 pBI131SP1 转化的再生植株,其中农杆菌转化取 2 株,基因枪转化取 1 株。Southern blotting 鉴定(用 Hind III 酶切基因组 DNA,理论上应该产生 3.4 kb 的特异带)结果见图 9,表明 PCR 呈阳性转基因植株在特定位置出现了较强的杂交信号,证明了 P1 基因确已整合到玉米植株基因组中,获得了转基因再生植株。



1 为水,2 为未转化植株,3~5 为 PCR 阳性转化植株
6 为质粒 pBI131SP1,M 为 Marker

图 9 基因组 DNA Southern 杂交

3 讨 论

口蹄疫病毒结构蛋白 P1 为口蹄疫病毒的抗原位点,成熟后裂解为 VP1、VP2、VP3 和 VP4,接近于

自然感染过程,可诱导类似于全病毒的抗病毒免疫反应。研究表明,VP1 转基因植物能够诱导动物产生特异性免疫应答,但作为主要抗原位点 VP1 基因,易突变,保护性免疫力不强,易引起免疫耐受等问题。金宁一研究员等领导的课题组进行了 P1 基因重组痘苗病毒和核酸疫苗的研究工作,已证实 P1 基因作为抗原基因的有效性,故本实验选用 P1 为目的基因转化植物,以期获得含 P1 全长基因的 FMDV 植物基因工程疫苗。

本实验采用玉米作为反应器,考虑到外源蛋白在植物体内表达量低、纯化不易等问题,而可以直接让偶蹄动物饲用玉米,甚至可用作青贮饲料,来提高少量抗原蛋白的生物学活性,可以起到更好的免疫保护作用。虽然以 II 型胚性愈伤组织为受体进行的转化 GUS 染色率高达 40%以上,也获得了转基因植株,但植株再生频率及阳性转化率较低,可能与所用受体为长期继代愈伤组织,其感受状态及其分化能力下降有关,如实验中发现抗性愈伤不易分化出苗。在 P1 基因转化玉米和马铃薯^[7]基础上,下一步本课题组正试图利用这些载体继续摸索转化条件,扩大转化受体范围,以求建立良好的转化体系,并从表达水平及免疫试验上探索该植物疫苗的可行性,为利用植物生物反应器生产 FMDV 基因工程疫苗进行了探索性基础研究。

参考文献:

[1] Carrillo C, Wigdorovitz A, Olieros J C, et al. Protective immune response to foot-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants[J]. J. Virol., 1998, 72(2): 1688-1690.

[2] Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos M J, et al. Induction of a protective antibody response to food and month 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.

[3] Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, et al. Induction of a virus-specific antibody response to food and month disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants[J]. Viral Immunol, 2001, 14(1): 49-57.

[4] Dus Santos M J, Wigdorovitz A, Trono K, et al. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus(FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants[J]. Vaccine, 2002, 20: 1141-1147.

[5] 张艳贞,王 罡,胡汉桥,等. 农杆菌介导将杀虫蛋白基因导入优良玉米自交系的研究[J]. 遗传, 2002, 24(1): 35-39.

[6] 杜 娟,余云舟,张领兵,等. 玉米自交系 II 型胚性愈伤组织诱导及遗传转化初报[J]. 吉林农业大学学报, 2000, 22(4): 41-44.

[7] 李 昌,金宁一,王 罡,等. 基因枪法转化马铃薯及转基因植株的获得[J]. 作物杂志, 2003, (1): 12-14.