

# 利用柱花草为受体表达口蹄疫病毒外壳蛋白 VP1 的研究

王冬梅, 沈文涛, 周 鹏

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101)

摘要: 将口蹄疫病毒外壳蛋白 VP1 基因克隆到植物表达载体 pBI121, 并转化到根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LBA4404 中, 采用叶盘转化法转化柱花草 (*Stylosanthes* spp.) 栽培品种热研二号柱花草 (*S. guianensis* cv. Reyan), 获得了转基因植株, 经 PCR、PCR-Southern blot 和 Southern blot 分析表明: VP1 基因已整合到转基因柱花草植株的核基因组中。经 RT-PCR、Northern blot 分析表明: VP1 基因已在转基因柱花草中获得转录。

关键词: 口蹄疫病毒; 柱花草; VP1 基因; 遗传转化

中图分类号: Q 943 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700 (2005) 06-0669-07

## Expression of VP1 of the Food-and-Mouth Disease Virus Outer Capsid Protein in Transgenic *Stylosanthes* spp.\*

WANG Dong-Mei, SHEN Wen-Tao, ZHOU Peng\*\*

(State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Institute of Tropical Biology Sciences,  
China Academy of Tropical Agricultural Science, Haikou 571101, China)

**Abstract:** Tender leaves of *Stylosanthes guianensis* cv. Reyan were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 carrying the gene VP1 coding food-and-mouth disease virus outer capsid protein. After 3 times kanamycin-resistant selection, the regenerated plantlets were analyzed further by PCR, PCR-Southern blot and Southern blot, the results confirmed that the VP1 gene were integrated in the genome. The results of RT-PCR and Northern blot of transgenic plants showed that VP1 gene was transcribed in transgenic plants.

**Key words:** FMDV; *Stylosanthes* spp.; VP1 gene; Genetic transformation

口蹄疫 (food-and-mouth disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (food-and-mouth disease virus, FMDV) 引起的一种偶蹄类动物共患的烈性传染病, 世界上每年都有流行的报道, 造成巨大的经济损失, 严重影响各国的对外贸易, 国际兽疫局 (OIE) 将其列为 A 类家畜传染病之首 (Yang 等, 1999; Gibbens 等, 2001; Knowls 等, 2001)。防控口蹄疫最行之有效的方法是易感动物接种预防。目前, 用于防控口蹄疫的疫苗是 FMDV 灭活苗及减毒苗, 其最大

基金项目: 中国热带农业科学院科学基金重点资助项目 (3003246), 海南省教育厅科技基金项目 (HjKj200507)

通讯作者: Author for correspondence. E-mail: zhpeng@hainan.net Tel: 0898-66890687

收稿日期: 2005-03-30, 2005-05-08 接受发表

作者简介: 王冬梅 (1980-) 女, 博士研究生, 研究方向: 植物基因工程研究。E-mail: aweeo@tom.com

缺点是有时病毒灭活不彻底, 残留的活病毒会引起新的疫情爆发或在使用的过程中毒性恢复造成更严重的疫情流行 (Beck and Strohmaier, 1987)。因此, 各国纷纷研制基因工程疫苗、合成肽疫苗、DNA 疫苗等, 但这些疫苗因受免疫效果, 价格昂贵或接种方式等的限制而未能很有效的达到预防口蹄疫的目的。随着生物学技术的发展和植物细胞培养及再生方法的完善, 人类在成功改变植物遗传性状的同时, 尝试着将转基因植物转变为人类所需昂贵药品的廉价“生产工厂”, 如利用植物细胞来表达细菌性或病毒性病原体的植物口服疫苗 (Walmsley and Amtzen, 2000), 我们也做了一些尝试性的工作 (沈文涛等, 2004; 张更林等, 2003)。这种疫苗不仅改变了传统的疫苗生产方式和接种手段, 而且大大降低了疫苗的生产成本, 给免疫预防领域带来了生机。FMDV VP1 蛋白是口蹄疫病毒的外壳蛋白和中和抗原, 含有 T、B 细胞表位。本研究使 VP1 基因在优良的热带牧草—热研二号柱花草中表达, 以期获得具有免疫原性的、可饲的口蹄疫植物疫苗, 将为防治口蹄疫提供一种方便、廉价、安全、有效的新型疫苗, 具有潜在的经济和社会价值。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

柱花草品种 (*Stylosanthes* spp.): 热研二号柱花草 (*S. guianensis* cv. Reyan), 由中国热带农业科学院热带牧草研究中心提供。培养无菌苗, 取刚长出两片真叶用作转化的外植体。

### 1.2 质粒

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LBA4404, O 型口蹄疫外壳蛋白 VP1 基因由本课题组克隆及进行改造得到, 构建植物表达载体 pBI121 VP1 (周鹏等, 2004) (图 1)。

### 1.3 重组农杆菌介导的柱花草遗传转化

转化方法参照王关林和方宏筠 (1998)。取刚长出两片真叶的无菌苗的真叶, 在芽的分化培养基  $M_1$ : MS + 6 - BA 4.0 mg L + NAA 1.0 mg L 上暗预培养 2 d, 用经乙酰丁香酮预处理的重组农杆菌抽真空浸入法侵染, 在加有脯氨酸的  $M_1$  上看护暗培养 2 d, 转入含有 Kanamycin (卡那霉素, Kan) 75 mg L, Carbenicillin (羧苄青霉素, Cb) 400 mg L 的  $M_1$  选择培养基上, 诱导芽再生。再生芽转接到  $M_2$ : MS + 6 - BA 0.1 mg L + NAA 0.01 mg L + Kan 75 mg L + Cb 400 mg L 上继代培养和进一步筛选。经 3 次继代和筛选后, 待芽长到 2~3 cm 时切下, 在  $M_3$ : MS + 6 - BA 0.05 mg L + Kan 25 mg L + Cb 400 mg L 上诱导生根。将根系生长良好的转化植株移入温室中种植。

### 1.4 转基因植株的鉴定分析

1.4.1 PCR 及 PCR-Southern blot 检测 采用 CTAB 法提取转化植株的总基因组 DNA。VP1 基因的引物由上海生物工程服务有限公司合成。

5' 端引物 P1: 5' TCGAGCTCTCTTTACAAG 3'

3' 端引物 P2: 5' GTACTAGTATGGCTACCTCC 3'

扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 41℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 进行 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min; 将 PCR 产物作琼脂糖电泳。然后将电泳胶进行 Southern 印迹转移、杂交, 方法参照王关林和方宏筠 (1998)。实验使用 Boehringer Mannheim 公司生产的 DIG DNA Labeling and Detection Kit, 以 VP1 基因片段 (约 693 bp) 为模板进行探针标记。

1.4.2 Southern blot 检测 提取 PCR-Southern blot 阳性柱花草植株总 DNA 约 25  $\mu$ g, 用 *Sca*I 和 *Eco*R Ⅲ 酶切过夜。电泳后, 进行 Southern 印迹转移、杂交。

1.4.3 RT-PCR 检测 利用 RNA 提取纯化试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司) 提取 Southern blot 阳性转

基因植株总 RNA，用 RT-PCR 试剂盒（Boehringer Mannheim 公司）进行反转录，再以反转录产物为模板，P1 和 P2 为引物进行 PCR 扩增。

1.4.4 Northern blot 检测 用异硫氰酸胍法提取 RT-PCR 阳性转基因植株总 RNA。变性电泳、进行 Northern 印迹转移、杂交。

1.4.5 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝 R-250 染色检测 采用改良丙酮沉降法提取柱花草转化植株的总蛋白，进行 10% SDS-PAGE 电泳，电泳后的胶进行考马斯亮蓝 R-250 染色分析。

1.4.6 转基因柱花草 T<sub>1</sub> 代的遗传分析 选取转基因单株自交后代正常发育种子 T<sub>1</sub>（100 粒），将种子表面消毒后播种到含 150 mg L Kan 的 MS 筛选培养基上，以未转化柱花草植株的种子作为对照。2 周后分析抗性绿苗和播种数的比例，以确定其遗传分离比。选择长势良好的绿苗进行 PCR 分析（同 1.4.1），检测目的基因 VP1 与 Kan 抗性筛选基因 *Npt* 是否在后代中协同分离。

## 2 结果与分析

### 2.1 载体的构建

为了方便克隆，在设计 PCR 引物时引进能够连接到植物表达载体上的克隆位点 *Spe* 和 *Sac*，经 PCR、pGEM-T 载体克隆，得到了 pTVP1 克隆，基因测序结果表明 VP1 获得了正确的设计改造。利用 *Sac* 和 *Xba* 切除含高效启动子 CaMV35S 的 pBI121 上的 *GUS* 基因，同时用 *Spe*（与 *Xba* 是同裂酶）和 *Sac* 酶消化 pTVP1 克隆载体获得 VP1 基因片段。在 T4-DNA 连接酶的作用下，将线性化质粒和酶切后的 VP1 基因片段连接成新的重组质粒 pBIVP1。这样 VP1 基因 5 端是 CaMV35S 启动子，3 端是 NOS 终止子，卡那霉素抗性作为转化植株的筛选标记，具体构建见图 1。

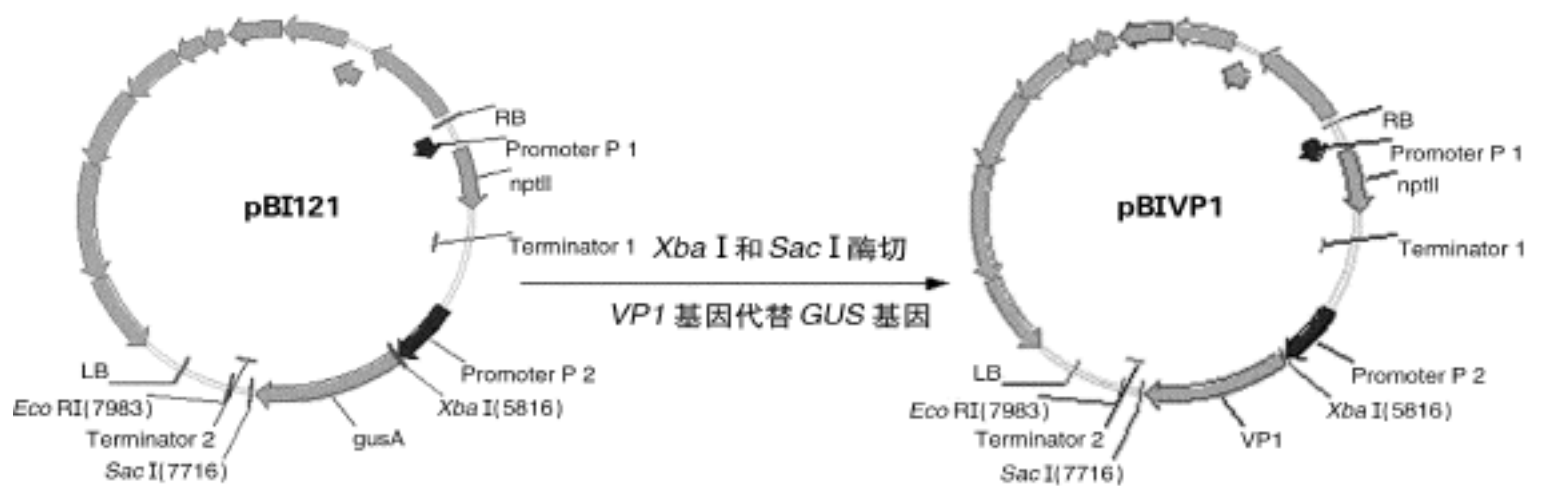


图 1 表达载体 pBIVP1 的构建示意图

Fig. 1 The construction of pBIVP1 recombinant

### 2.2 转化与植株再生

经预培养 2 d 的柱花草真叶用工程根癌农杆菌侵染后，转接到芽分化培养基上，看护共培养 2 d，然后再转移到选择性芽分化培养基上，经过约 7 d 的选择培养后，大部分外植体黄化或褐化，逐渐死亡。少数真叶伤口的基部能长出黄绿色的愈伤组织，约 7 d 后分化出绿色芽点。将有芽点的外植体转接到继代培养基上进行继代及抗性筛选。3 次继代和筛选后，待芽长到 2~3 cm 时，切下转入生根培养基，当根系发育良好后，移入温室。本研究共获得 34 株抗性转化再生柱花草植株。

### 2.3 柱花草转化株的 PCR 和 PCR-Southern blot 检测

对获得的抗性转化再生苗用 P1、P2 一对引物进行 PCR 扩增和 PCR-Southern blot 检测, 有 27 株转化株植株 PCR 扩增出预期的 693 bp 左右的电泳带, 且 PCR-Southern blot 也呈阳性, 而未转化的柱花草植株则无特异性扩增带, 初步证明 VP1 基因已导入柱花草植株, 部分检测结果如图 2 (a, b)。

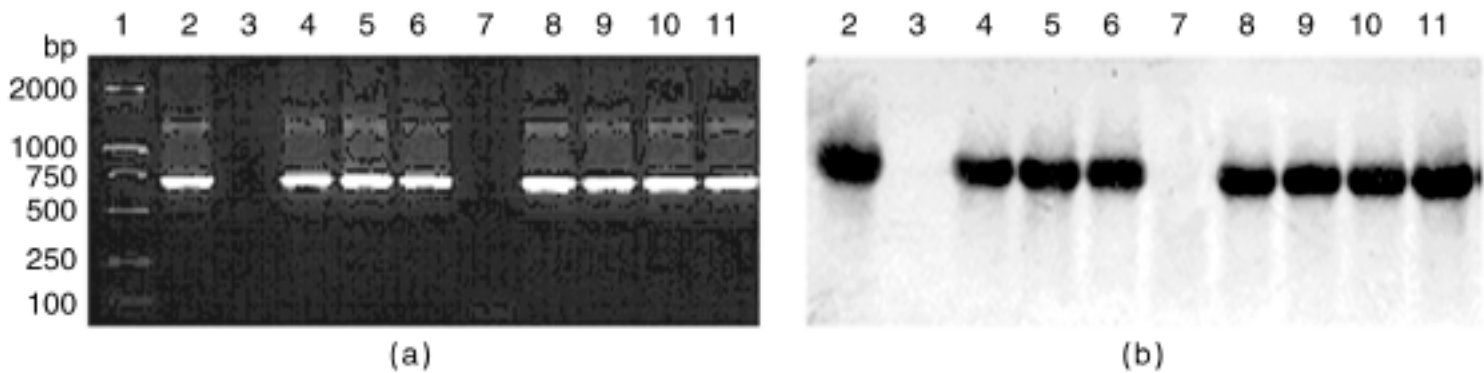


图 2 柱花草转化植株的 PCR (a) 和 PCR-Southern blot (b) 检测结果

Fig. 2 PCR (a) and PCR-Southern blot (b) analysis of transgenic *Stylosanthes* spp.

Lane 1: DL2000 Marker; Lane 2: pBIVP1; Lane 3: non-transformed *Stylosanthes* spp.; Lane 4-11: transformed *Stylosanthes* spp.

### 2.4 柱花草转化株的 Southern blot 检测

对 PCR 和 PCR-Southern blot 检测为阳性的转化柱花草植株进一步进行 Southern blot 分析。以回收的地高辛标记的 VP1 基因作为探针, 对柱花草总 DNA 以 *Sca* 和 *EcoR* 酶切消化, 印迹杂交。共有 21 株转化柱花草的泳道出现杂交信号, 而作为阴性对照的非转化植株未出现杂交信号。根据阳性对照片段的大小推算, 转化植株的杂交目的带大小约 1.8 kb (CaMV35S ~ 850 bp + VP1 ~ 693 bp + NOS Ter ~ 250 bp), 这证明启动子 CaMV35S, VP1 基因, 终止子 NOS Ter 已经整合到转基因柱花草植株核基因组中, 部分结果如图 3。

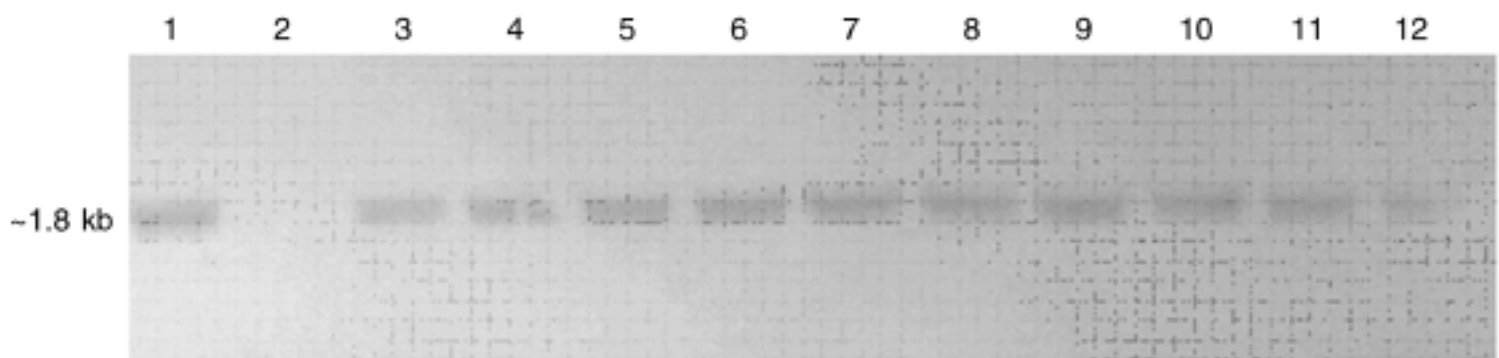


图 3 柱花草转化植株 Southern blot 检测结果

Fig. 3 Southern blot analysis of transformed *Stylosanthes* spp.

Lane 1: pBI121 VP1 *Sca* + *EcoR*; Lane 2: non-transformed *Stylosanthes* spp. DNA *Sca* + *EcoR*; Lane 3-12: transformed *Stylosanthes* spp. DNA *Sca* + *EcoR*

### 2.5 RT-PCR 检测

对 Southern blot 阳性的植株进行 RT-PCR 分析, 初步表明有 11 株转基因植株中 VP1 基因在转录水平上获得表达, 部分结果如图 4。从图 4 可以看出有部分转基因植株在转录水平上发生了转基因沉默。

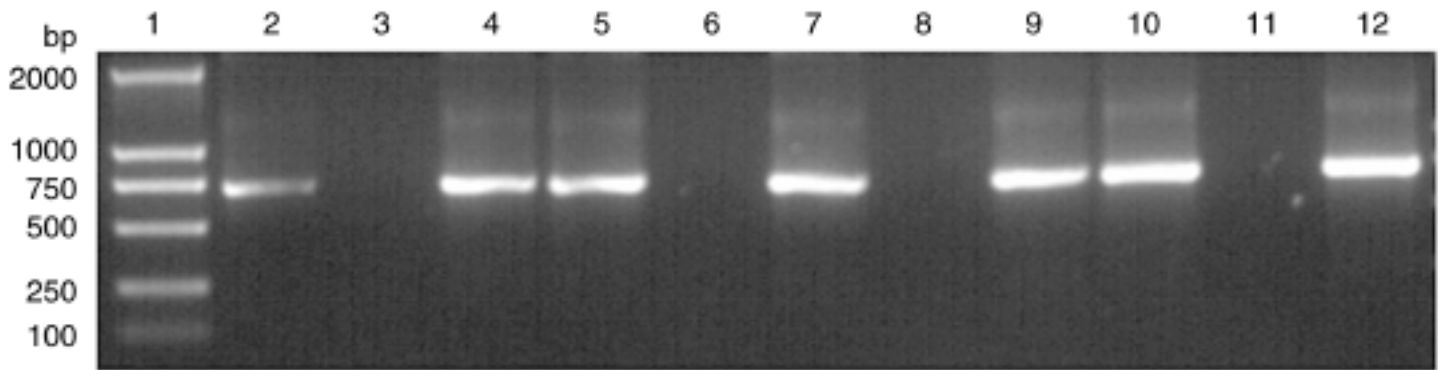


图4 转基因植株 RT-PCR 检测结果

Fig. 4 RT-PCR analysis of transgenic *Stylosanthes* spp .

Lane 1: DL2000 Marker; Lane 2-10: transgenic *Stylosanthes* spp .; Lane 11: non-transgenic *Stylosanthes* spp .; Lane 12: pBIVP1

## 2.6 Northern blot 检测

对 RT-PCR 阳性的植株进行 Northern blot 分析，表明 RT-PCR 为阳性的 11 株转基因植株中 VP1 基因在转录水平上有 10 株获得表达，结果如图 5。

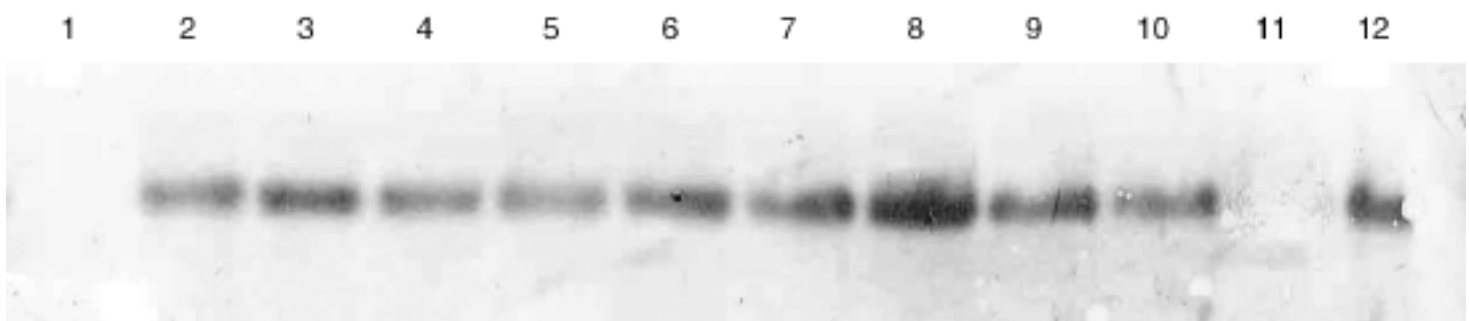


图5 转基因植株 Northern blot 检测结果

Fig. 5 Transcript analysis of transgenic *Stylosanthes* spp .

Lane 1: non-transgenic *Stylosanthes* spp .; Lane 2-12: transgenic *Stylosanthes* spp .

## 2.7 SDS-PAGE 电泳和考染检测

对 Northern blot 阳性植株采用改良丙酮沉降法提取柱花草植株的总蛋白（谷瑞升等，1999）。然后进行 SDS-PAGE 电泳和考马斯亮蓝 R-250 染色分析，从考染的图片上可以看出有约 25.4 kD 的目的蛋白条带出现，初步表明口蹄疫外壳蛋白 VP1 在 9 株转基因柱花草中得到了表达，由于表达量较低或上样量不够，只有很淡的目的带出现，部分结果如图 6。

## 2.8 转基因柱花草植株 T<sub>1</sub> 代遗传分析

选取转基因单株自交后代发育正常种子 T<sub>1</sub>（转 pBIVP1 和非转化植株种子各 100 粒），在含 150 mg L Kan 的筛选培养基 MS 上培养，2 周后，通过对种子的萌发数，绿苗数和白苗数的统计，最终获得的转基因柱花草植株自交子代 Kan 抗性分离情况见表 1。统计分析结果表明，转基因柱花草植株自交子代出现 Kan 抗性分离，各自分离比例，经卡方（ $\chi^2$ ）适合性分析表明，呈 3:1 分离，符合孟德尔分离规律。且 *Npt* 基因片段也插入转基因柱花草植株基因组中，并能传递给后代。选择部分长势良好的 T<sub>1</sub> 代绿苗进行 PCR 分析（如图 7），PCR 结果皆为阳性，表明目的基因 VP1 皆整合在这些抗性子代绿苗中，Kan 抗性基因和 VP1 紧密连锁。

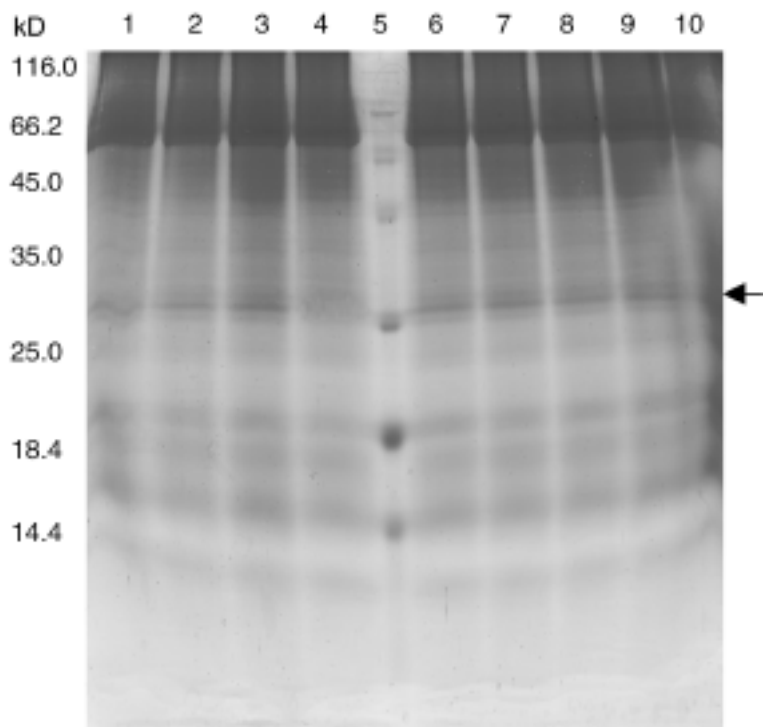


图6 SDS-PAGE 电泳和考染检测结果

Fig. 6 Expression analysis of transgenic *Stylosanthes* spp. by SDS-PAGE. Lane 1, 2, 9, 10: non-transgenic *Stylosanthes* spp.; Lane 5: protein molecular weight Marker; Lane 3, 4, 6, 7, 8: transgenic *Stylosanthes* spp.

表1 转基因柱花草植株自交子代 Kan 抗性的遗传分析  
(自由度  $DF=1$ )

Table 1 Heredity analysis of Kan-resist of T<sub>1</sub> of transgenic *Stylosanthes* spp.

编号	播种数	萌发数	绿苗数	白苗数	$\chi^2(3, 1)$	P (1)
1	100	85	74	11	0.053	< P <sub>0.05</sub>
CK	100	19	0	0	-	-

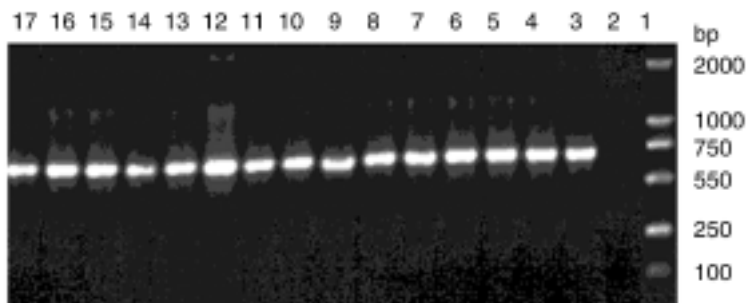


图7 部分转基因柱花草植株抗性自交 T<sub>1</sub> 代 PCR 检测结果

Fig. 7 PCR analysis of T<sub>1</sub> filial generation of transgenic *Stylosanthes* spp. Lane 1: DL2000 Marker; Lane 2: non-transgenic *Stylosanthes* spp.; Lane 3-17: transgenic *Stylosanthes* spp.

### 3 讨论

植物可饲疫苗是通过诱导黏膜免疫反应来达到预防疾病为目的的一种新型疫苗，与目前主要采用黏膜外接种的疫苗相比，其具有以下优点：1) 能有效的诱导黏膜免疫反应，更好的抵制病原物入侵 (Yu and Langridge, 2000; Haq 等, 1995)。目前，应用的疫苗主要采用肌肉注射等肠外途径接种。肠外接种途径对发展系统免疫是有效的，但其产生的免疫力不能扩展到黏膜表面，而病原菌又主要通过黏膜途径进入人和动物体内。黏膜表面的保护性抗体主要是就地合成，而不是来自系统的抗体池。因此，通过黏膜接种的绿色植物疫苗比通过注射产生的黏膜免疫反应效果更佳。2) 具有优良的表达系统。与微生物发酵、动物细胞和转基因动物等生产系统相比，生产绿色植物疫苗的植物表达系统具有成本低，培养条件、遗传操作简单，只需增加耕种面积就能扩大其产量，且储存和运输方便；生产的蛋白能正确的加工、折叠，有较好的免疫效果；安全性高，避免了污染动物病毒的问题；可通过植物杂交的方法实现基因重组，较方便的生产一种高效多价疫苗。3) 使用方便。只需口服或饲喂就可以达到接种的目的，便于推广使用。本研究初步确定获得了表达口蹄疫病毒外壳蛋白 VP1 的转基因植株，为这种在全世界范围内流行，采用传统疫苗存在潜在传播口蹄疫病毒危险性的可怕病毒的防治提供了另一条更好的途径，具有一定的应用前景。

FMDV VP1 蛋白中 141 ~ 160 aa 和 21 ~ 40 aa 分别是最主要的 T 细胞表位和 B 细胞表位，决定病毒的血清型，并可以诱导中和抗体，因此成为 FMDV 绿色植物疫苗的首选抗原。VP1 基因已经转化到拟南芥、烟草、苜蓿、马铃薯等植物中，并具有较好的免疫效果

(Carrillo 等, 1998; Wigdorovitz 等, 1999; Wigdorovitz 等, 1999; Carrillo 等, 2001)。柱花草是一种优良的热带牧草, 以它为受体生产口蹄疫可饲疫苗有着无可比拟的优越性。虽然通过 RT-PCR, Northern blot 及 SDS-PAGE 电泳、考染检测分析发现有部分转基因植株目的基因在转录及翻译水平上出现了转基因沉默, 但绝大部分转基因植株都转录并翻译出 FMDV VP1 蛋白, 而且转基因植株当代及 T<sub>1</sub> 代生长发育都跟非转基因植株一样, 没有发现任何变异植株, 初步证明在柱花草中表达 FMDV VP1 蛋白存在可行性。本研究在进行下一部检测的同时, 在转化体系、提高表达量、免疫效果、转基因安全筛选标记等方面进行探索, 力求找到更有效、安全的柱花草植株疫苗生产系统。

### 〔参 考 文 献〕

- Beck E, Strohmaier K, 1987. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination [J]. *J Virol*, 61 (5): 1621—1629
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros JC, et al, 1998. Proective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants [J]. *J Vriol*, 72: 1688—1690
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, et al, 2001. Induction of a virus-specific antibody response to foot-and-mouth disease virus the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants [J]. *Viral Immunol*, 14: 49—57
- Gibbens JC, Sharp CE, Wilesmith JM, et al, 2001. Descriptive epidemiology of the 2001 foot-and-mouth disease epidemic in Great Britain: the first months [J]. *Vet Rec*, 149: 729—743
- Gu RS (谷瑞升), Liu QL (刘群录), Chen XM (陈雪梅), et al, 1999. Comparison and optimization of the methods on protein extraction and SDS-PAGE in woody plants [J]. *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 16 (2): 171—177
- Haq TA, Mason HS, Clements JD, et al, 1995. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced transgenic plants [J]. *Science*, 268: 714—716
- Knowls NJ, Samuel AR, Davied PR, et al, 2001. Outbreak of foot-and-mouth disease virus serotype O in the UK caused by a pandemic strain [J]. *Vet Rec*, 148: 258—259
- Sheng WT (沈文涛), Zhou P (周鹏), Guo AP (郭安平), et al, 2004. Specific expression of rotavirus outer capsid protein VP7 in transgenic tomato fruits [J]. *Acta Bot Yunnan (云南植物研究)*, 26 (2): 207—212
- Walmsley AM, Amtzen CJ, 2000. Plants for delivery of edible vaccines [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 11 (2): 126—129
- Wigdorovitz A, Filgueora DM, Robertson N, et al, 1999. Protection of mice against challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by immunization with foliar extracts from plants infected with recombinant tobacco mosaic virus espressing the FMDV structural protein VP1 [J]. *Virology*, 264: 85—91
- Wigdorovitz A, Carrilo C, Dus Santos MJ, et al, 1999. Induction of a protective antibody 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*, 236: 347—353
- Yang PC, Chu RM, Chung WB, et al, 1999. Epide miological characteristics and financial costs of the 1997 foot-and-mouth disease epidemic in Taiwan [J]. *Vet Rec*, 145: 731—734
- Yu J, Langridge WH, 2000. Novel approaches to oral vaccines: delivery of antigens by edible plants [J]. *Curr Infect Dis Rep*, 2: 73—77
- Zhang GL (张更林), Zhou P (周鹏), Guo AP (郭安平), et al, 2003. An initial study of transgenic *Carica papaya* used as a kind of vaccine for anti-*Tuberculosis* [J]. *Acta Bot Yunnan (云南植物研究)*, 25 (2): 223—229
- Zhou P (周鹏), Shen WT (沈文涛), Li XY (黎小瑛), 2004. Multi-mutation of FMDV-VP1 gene by overlap extension of PCR with high-fidelity thermostable DNA polymerase [J]. *Life Science Research (生命科学研究)*, 8 (1): 29—31