

文章编号: 1007- 2985(2007) 03- 0095- 04

转乙肝病毒表面抗原基因烟草发根的获得

王逸群, 李 田, 李文明

(福建师范大学生命科学学院, 发育与神经生物学福建省高校重点实验室, 福建 福州 350108)

摘 要: 构建了乙肝病毒表面抗原基因(HBsAg)植物表达载体, 通过冻融法将 HBsAg 基因转入到发根农杆菌 LBA1314 中, 采用叶盘法将 HBsAg 基因导入到烟草中, 获得了转基因烟草发根. 对转基因烟草发根的 GUS 检测结果表明: 转 HBsAg 基因烟草发根可以染成蓝色, 而非转基因烟草的根没有染色反应. 这说明 gus 基因在转 HBsAg 基因烟草发根获得了表达.

关键词: 乙肝病毒表面抗原基因; 烟草; 发根; 转化

中图分类号: A785

文献标识码: A

利用转基因植物生产植物疫苗是当前基因工程研究的热点之一. 将病毒或病原体的抗原基因导入到植物中去, 并在植物中获得高效表达, 其表达产物抗原蛋白仍然具有免疫原性, 人(或动物)在摄取转基因食品过程中就可以完成疫苗的摄取, 激发人体(或动物体)产生特异性的免疫应答, 获得持久的抵抗某种疾病的能力. 乙型肝炎是严重危害人类健康的传染病之一, 乙型肝炎病毒表面抗原可以刺激人体产生抵抗乙肝病毒入侵的保护性抗体, 因此将乙肝病毒表面抗原基因导入植物中, 生产植物疫苗具有重要意义. 笔者构建了乙肝病毒表面抗原基因(HBsAg)植物表达载体, 采用农杆菌介导法将 HBsAg 基因导入到烟草中, 获得了烟草发根, 从而为植物乙肝疫苗的研究奠定基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 烟草云烟 85 由本室保存.

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌菌株 DH5 α 、发根农杆菌 LBA 1314、质粒 1301、pSPROK、PBsAg 由本室保存. 其中 pBsAg 中含有 681bp 的乙肝病毒表面抗原基因(HBsAg).

1.1.3 主要试剂 各种限制性内切酶、T4DNA 连接酶、碱性磷酸酶、Taq DNA 聚合酶等购自大连宝生物工程公司; x -gluc、IPTG、 x -gal、DNA 胶回收纯化试剂盒购自上海生工生物工程公司; 潮霉素 B 购自 Sigma 公司.

1.2 方 法

1.2.1 植物表达载体的构建 质粒 pCB1301 经 EcoR I/Hind III 双酶切后回收, 与 pSPROK 质粒用 EcoR I/Hind III 双酶切后回收的 P35S-Tnos 片段连接. 连接产物转化 E. coli DH5 α 感受态细胞, 在含有 x -gal 和 IPTG 的卡那霉素选择培养基上挑选白色菌落, 获得重组质粒 pCBROK. 质粒 PBsAg 经 Xba I/Kpn I 双酶切, 回收 HBsAg 片段, 与 pCBROK 经 Xba I/Kpn I 双酶切后回收大片段连接, 获得植物表达载体 pBRsAg.

* 收稿日期: 2006- 12- 25

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(B0410009); 福建省科技厅资助项目(2004N026); 福建省教育厅科学研究项目(JB03125)

作者简介: 王逸群(1964-), 男, 博士, 福建师范大学生命科学学院, 发育与神经生物学福建省高校重点实验室副教授, 主要从事植物分子生物学研究.

- 1.2.2 导入发根农杆菌 按照文献[1]所介绍的方法,将质粒 pBRSAg 导入到发根农杆菌菌株 LBA1314 中。
- 1.2.3 烟草无菌苗的制备 用 0.1% 的硝酸银消毒 5 min 后,无菌水洗涤 5 次,再用 95% 的乙醇消毒 10 s,用无菌水洗涤 5 次,然后在 MS 固体培养基上萌发。
- 1.2.4 烟草转化 按照文献[2]所介绍的方法进行烟草转化。浸过农杆菌的小叶片先在不含抗菌素的 MS 培养基上 25 °C 暗培养 48 h,随后转至筛选培养基(MS 基本培养基补加 20 mg/L 潮霉素、300 mg/L 头孢噻肟钠)上。培养 3 周左右,有烟草发根生长出来。
- 1.2.5 GUS 组织化学染色 按文献[3]介绍的方法进行。将转基因烟草发根放入 *x*-gluc 溶液,37 °C 保温 8~24 h。

2 实验结果

2.1 植物表达载体的构建

植物双元表达载体 pCB1301 含有农杆菌 T-DNA 左右边界、植物报告基因 *gus* 和植物选择标记基因 *Hpt*。由于多克隆位点位于 *lacZ* 基因的编码区内,可以利用插入失活效应通过蓝白斑筛选重组子。PSPROK 中的 P35s-Tnos 片段插入 pCB1301 的相应位点,得到重组质粒 pCBROK。将 681bp 的 HBsAg 基因从 PBsAg 中切出,亚克隆到 pCBROK 的 *Xba* I 和 *Kpn* I 位点中,获得植物表达载体 pBRSAg。该载体适合于对双子叶植物进行遗传转化。由于载体中含有潮霉素磷酸转移酶 *hpt* 基因,它对潮霉素 B(hyg B) 具抗性,可以用潮霉素 B 对转基因植物进行筛选。使用 *gusA* 报告基因可以检测转化效率。植物表达载体 pBRSAg 的构建图谱见图 1。其酶切图谱见图 2。

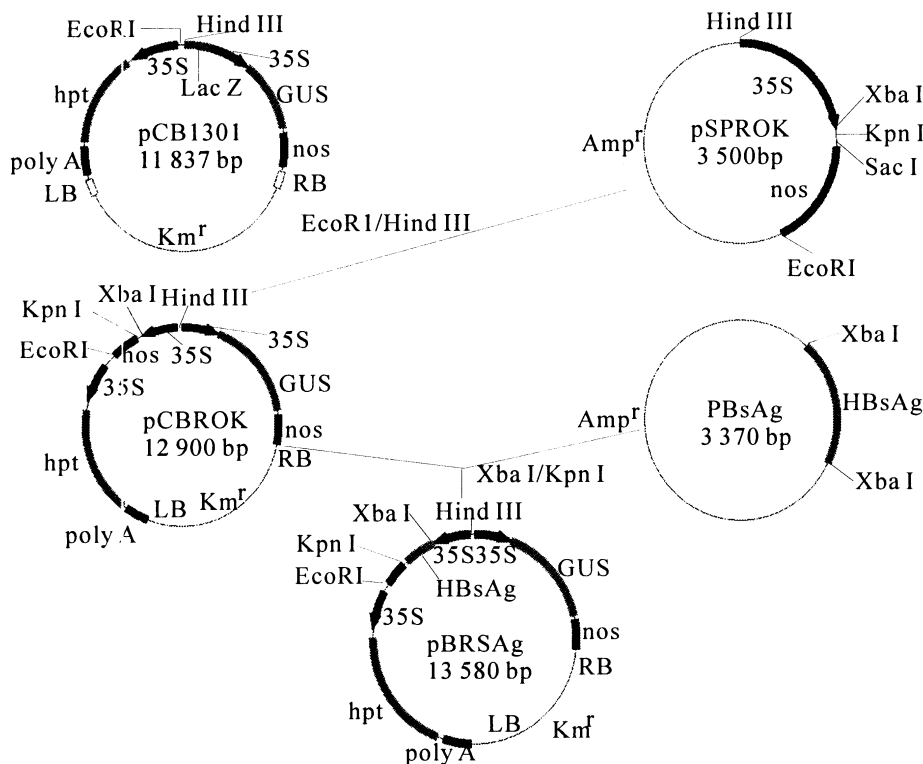


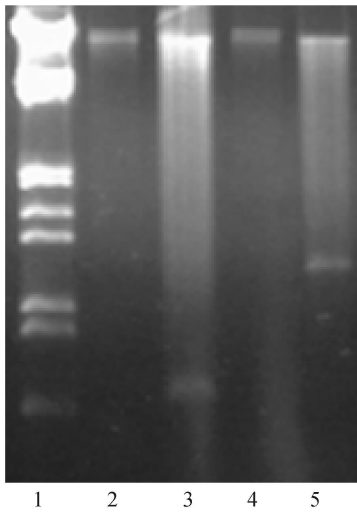
图 1 植物表达载体 pBRSAg 的构建图谱

2.2 转基因烟草发根的获得

本试验选用苗龄 2 周左右的无菌烟草苗,用携带 pBRSAg 质粒的发根农杆菌菌株 LBA1314 对烟草进行转化,获得烟草发根(见图 3)。

2.3 *gus* 标记基因在转基因烟草发根中的表达

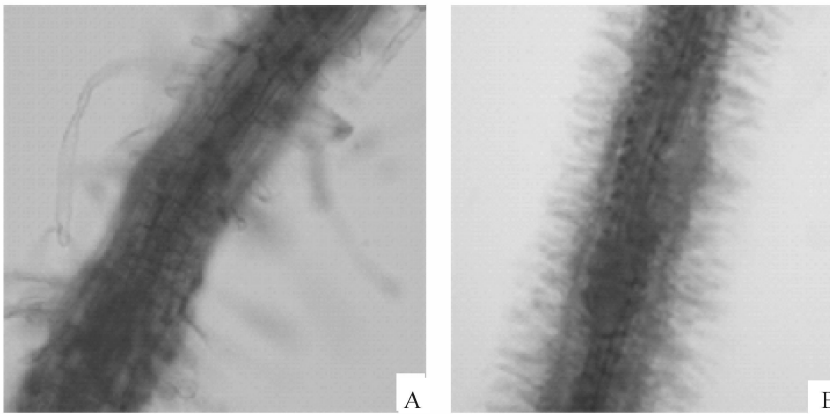
由于植物表达载体 pBRSAg 中含有报告基因 *gus*,因此在基因表达检测时可以进行 GUS 组织化学染色,结果见图 4。



1—分子量标记 Marker(λ DNA/HindIII+ EcoRI); 2—质粒 pBRSAg;
3—pBRSAg/XbaI+ KpnI; 4—质粒 pCBROK; 5—pCBROK/ HindIII+ EcoRI
图 2 植物表达载体 pBRSAg 的限制性内切酶分析



图 3 转 HBsAg 基因的烟草发根



A—转 HBsAg 基因烟草发根的 GUS 染色; B—非转基因烟草对照
图 4 转基因烟草发根的 GUS 染色

从图 4 看出, 转 HBsAg 基因烟草发根可以染成蓝色, 而非转基因烟草的根没有染色反应, 说明 gus 基因在转 HBsAg 基因烟草发根获得了表达, 也说明 HBsAg 基因已经导入到烟草发根中。

3 讨论

3.1 Ri 质粒在植物生物技术研究中的应用

由于 Ri 质粒诱导植物形成发根, 其生长速度快, 生长条件可以人为控制, 而且遗传上稳定, 因而发根成为某些植物生物技术研究的理想实验系统^[4]. 1988 年张荫麟等利用 Ri 质粒转化赛莨苳 (*Scopolia camilioides*), 获得了发根, 且发根培养物中东莨苳碱和莨苳碱含量均高于野生植株. 1990 年张荫麟获得了甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 发根, 在发根中检测到了高于正常根培养物的黄酮化合物^[5]. 1994 年, 秦明波等获得了青蒿 (*Artemisia annua*) 发根^[6-7]. 2000 年赵寿经等利用发根农杆菌 A4 菌株转化吉参 1 号, 获得了人参发根^[8]. 笔者将乙肝表面抗原基因导入烟草, 获得烟草发根, 为乙肝表面抗原基因转化其它种类作物, 如番茄、胡萝卜等并获得发根奠定实验基础。

3.2 植物疫苗的一些科学研究

植物疫苗是将抗原基因转入植物中并且得到表达, 人(或动物)在摄取转基因植物过程中就可以完成疫苗的摄取, 激发人体(或动物体)产生特异性的免疫应答, 获得持久的抵抗某种疾病的能力. 在这领域科

技工作者也做了大量工作,近年来,在植物中表达用于疫苗研究的病原基因主要有大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位基因、霍乱弧菌毒素 B 亚单位基因、口蹄疫病毒 VP1 蛋白基因、狂犬病病毒 C 蛋白基因、结核杆菌分泌蛋白 MPT64 基因和轮状病毒结构蛋白 vp4、vp7 基因等^[9-11]。

参考文献:

- [1] HOFEN R, WILLMITZER L. Storage of Competent Cells for Agrobacterium Transformation [J]. Nucl. Acids. Res., 1988, 16: 9877.
- [2] HORSCH R B. Leaf Disc Transformation [A]. GELVIN S B, SCHILPEROOT R A, VERMA D P S. Plant Molecular Biology Manual [C]. Dordrecht: Kluwer, 1988.
- [3] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M V. GUS Fusion: β -Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher Plants [J]. EMBO J., 1987, 6(13): 3 901- 3 907.
- [4] 刘本叶,叶和春,李国凤. Ri 质粒在植物科学应用的新进展 [J]. 植物学通报, 1998, 15(4): 1- 7.
- [5] 叶和春. 应用植物生物技术生产次生代谢产物的研究现状与展望 [C]. 第三届全国植物科学专题学术研讨会论文集, 1996.
- [6] 秦明波,李国珍,云月,等. 发根农杆菌诱导青蒿发根产生及其离体培养 [J]. 植物学报, 1994, 36(增刊): 165- 170.
- [7] 王红,叶和春,李国凤,等. 真菌诱导子对青蒿发根细胞生长和青蒿素积累的影响 [J]. 植物学报, 2000, 42(9): 905- 909.
- [8] 赵寿经,杨振堂,李昌禹,等. 人参高产发根无性系的筛选及其高效液体培养 [J]. 中国农业科学, 2000, 33(5): 103- 105.
- [9] 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.
- [10] 余祖华,王红宁. 用植物生物反应器研制基因工程疫苗的进展 [J]. 生物技术, 2004, 14(4): 78- 80.
- [11] 姜鹏,秦松,曾呈奎. 乙肝病毒表面抗原(HBsAg)基因在海带中的表达 [J]. 科学通报, 2002, 47(14): 1 095- 1 097.

Transformation of HBsAg Gene into Tobacco and Production of Transgenic Tobacco Hairy Roots

WANG Yi-qun, LI Tian, LI Weir-ming

(The Key Lab of Developmental and Neural Biology in Fujian Provincial Universities, College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fujian 350108, China)

Abstract: A plant expression carrier containing HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) gene was constructed in a plasmid, the plasmid was mobilized into a rhizogenes Strain LBA 1314 by freeze thaw method, the HBsAg gene was planted into tobacco by leaf disc via *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 as a vehicle and the tobacco hairy roots were received. Histochemical staining of GUS activity was made in the transgenic tobacco hairy roots: The roots with HBsAg genes can be dyed into blue, while those without have no reflection of color. So the conclusion can acquire that the gene has its expression in the roots.

Key words: hepatitis B virus surface antigen gene; tobacco; hairy roots; transformation

(责任编辑 易必武)