

禽流感病毒 H5HA 基因在马铃薯中的表达

谭 甜^{1,2}, 季 勤¹, 窦秉德¹, 王登瞻², 顾 科¹

(1 淮阴师范学院生物系, 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏 淮安 223300)
(2 南京师范大学生命科学学院, 生物多样性与生物技术江苏省重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 将编码禽流感病毒 H5N1 亚型 HA 基因(H5HA)的 cDNA 片段与 CaMV35S 启动子融合, 通过农杆菌介导法转化马铃薯. 分别用 PCR、RT-PCR 和 Western 斑点杂交方法对重组 H5HA 基因在马铃薯植株中的表达情况进行分析. 实验结果表明, 获得的 12 株转基因植株中, 11 株为阳性. Western 斑点杂交检测表明 H5HA 重组蛋白已在马铃薯体内表达. 这一结果将为利用马铃薯作为生物反应器生产禽流感口服疫苗提供理论依据.

[关键词] H5HA 基因, 血凝素, 转基因马铃薯

[中图分类号] Q939.44 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2009)03-0104-05

Expression of H5HA Avian Influenza Virus Gene in Potato Plant

Tan Tian^{1,2}, Ji Qin¹, Dou Bingde¹, Wang Dengzhan², Gu Ke¹

(1 Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural and Biotechnology Around Hongze Lake
Department of Biology, Huaiyin Normal University Huai'an 223300 China)

(2 Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, School of Life Sciences
Nanjing Normal University Nanjing 210097 China)

Abstract In this study, we explore the possibility of H5HA gene expression in potato plant. The H5HA-encoding cDNA fragment is fused to the sequence of CaMV35S promoter. One potato cultivar (cv. Desiree) is used for *Agrobacterium*-mediated transformation with pBIN19/35S-H5HA. Twelve transgenic rooting shoots are obtained and multiplied. The expression of H5HA gene in transgenic plants is analyzed by PCR, RT-PCR and Western dot-blotting. The results show that H5HA gene is successfully expressed in the eleven transformed potato plants, suggesting the possibility of using potato as a bioreactor for production of oral avian flu vaccine.

Key words H5HA gene, hemagglutinin, transgenic potato

近年来, 高致病性禽流感在我国及世界上许多国家爆发流行, 给养禽业造成了巨大的经济损失, 同时由于禽流感具有直接感染人的能力, 也给人类健康造成了巨大的威胁^[1,2].

禽流感是由禽流感病毒(Avian influenza Virus)引起的急性传染病, 病毒的毒力由多基因决定, 但一般认为血凝素(HA)基因起主导作用^[3,4]. 到目前为止, 已分离得到 15 个血凝素(H1~H15)亚型. 其中, H5、H7 亚型为高致病性流感病毒^[5,6]. 血凝素是构成流感病毒囊膜纤突的主要成分之一, 其功能是结合宿主唾液酸类的细胞受体, 帮助病毒吸附及穿透宿主胞膜, 从而逃脱宿主免疫系统的监视^[4,7]. 但血凝素也可刺激机体产生中和抗体来中和病毒的感染力, 而且可以刺激机体产生体液免疫反应, 对宿主抵抗禽流感起着决定性的保护作用^[8]. 由于血凝素具有的这一特性, 使得研制血凝素基因工程疫苗成为禽流感病毒疫苗的研究热点.

随着基因工程技术的发展, 利用转基因植物生产口服疫苗来抵制病毒对人类和饲养家禽的感染已有不少成功的例子. 如在 1998 年, 美国康奈尔大学的研究人员将一种最易引起腹泻的大肠杆菌毒素基因的

收稿日期: 2009-03-06

基金项目: 生物多样性与生物技术江苏省重点实验室开放基金, 淮阴师范学院教授基金(06HSJ025)、青蓝工程资助.

通讯联系人: 季 勤, 博士, 教授, 研究方向: 分子生物学. E-mail: jqin@hytc.edu.cn

片段插入到马铃薯基因组中, 用转基因马铃薯块茎粗提物给 11 位供试者食用 3 周后, 其中 10 位体内产生了大肠杆菌毒素的抗体^[9]。

马铃薯是世界性的粮食和蔬菜兼用作物, 目前被众多学者认为是用于生产口服基因工程疫苗较理想的植物材料之一^[10]。

为此, 本文以马铃薯为材料, 通过农杆菌介导的方法将禽流感病毒 H5N1 亚型的血凝素基因 H5HA 转入马铃薯植株中, 并对重组基因在马铃薯体内的表达进行研究, 以期利用马铃薯作为生物反应器生产口服疫苗提供理论依据。

1 材料

1.1 植物材料

马铃薯品种 Desiree 组培苗由南京农业大学生命科学学院杨清教授提供。

1.2 菌株与质粒

大肠杆菌 DH5、农杆菌 EHA105、Pcambia1301、pBN19 质粒以及禽流感病毒 H5HA 基因由江苏省环洪泽湖生态农业重点实验室保存。

2 方法

2.1 植物表达载体的构建

植物表达载体 pBN19/35S-H5HA 的构建是从 pBN19/H5HA 质粒开始, 该质粒带有 H5HA 基因的编码序列 (H5HA *Sal*I-*Bam*HI 片段) 和胭脂碱合成酶 (Nos) 基因的终止子 (Nos *Sac*II-*Eco*RI 片段)。

依据 Pcambia1301 质粒中的 CaMV 35S 启动子序列, 利用 primer 5.0 软件设计一对特异性引物 35S1 (5'-TGGAGTCA**AAGCTT**CATGGAGTCAAAGA-3') 和 35S2 (5'-ATAATAG**ATCGAC**AGTCCCCCGTGTCT-3'), 在 35S1 引物中引入 *Hind*III 位点 (黑体划线部分), 在 35S2 中引入 *Sal*I 酶切位点 (黑体划线部分)。以 Pcambia1301 质粒中的 35S 启动子序列为模板, 利用 *Taq* 聚合酶进行 35S 启动子片段的 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 29 个循环, 72℃ 10 min。用 *Sal*I 和 *Hind*III 核酸内切酶分别消化 pBN19/H5HA 质粒 DNA 和 35S 启动子的 PCR 扩增产物, 分别回收质粒 DNA 和 35S 启动子条带, 将 35S 启动子片段插入到 pBN19 质粒载体的 *Hind*III 和 *Sal*I 位点之间, 得到植物表达载体 pBN19/35S-H5HA (图 1)。

得到的重组植物表达载体经酶切鉴定后进行核苷酸序列分析 (南京金思特生物公司)。测序结果表明重组基因的序列结构、读码结构及插入序列方向均正确。

2.2 外植体的准备

用生长 4 周左右的马铃薯无菌苗, 切取长 0.8 cm 左右不带腋芽的茎段, 接种于培养基 (MS+0.1 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L BA^[11]) 上预培养 2~3 d。培养条件: 28℃, 光照时间 16 h/d, 光照强度 2000 lx。

2.3 农杆菌菌液的制备

在新鲜平板上挑取带有 pBN19/35S-H5HA 质粒的农杆菌 EHA105 单菌落, 接种于含 100 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素的 30 mL LB 培养基中, 在 28℃, 210 r/min 黑暗振荡培养至农杆菌 A_{600} 值为 0.6~0.8。将菌液转移至离心管中, 在 5000 r/min 下离心 10 min, 收集菌体, 然后用 MS 液体培养基重新悬浮菌体, 使菌液的 A_{600} 值稀释为 0.3~0.4。

2.4 农杆菌介导的马铃薯遗传转化及植株再生

取预培养 2~3 d 的马铃薯茎段, 在制备好的农杆菌菌液中浸染 10 min, 倒掉菌液后, 将茎段转移到无菌滤纸上吸去多余的菌液, 然后将茎段转至共培养培养基 (MS+0.1 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L BA+50.0 mol/L AS^[11]) 上共培养 2~3 d。待茎段周围开始出现白晕时, 转至愈伤培养基 (MS+0.1 mg/L 2,4-D+1.0 mg/L BA+250.0 mg/L cefo^[11]) 上继续培养。当愈伤长至一定大小时, 将其转移至分化培养基 (MS+1.0 mg/L GA+1.0 mg/L ZT+250.0 mg/L cefo+50.0 mg/L Kan^[11]) 上, 待芽长至 1.0~1.5 cm 高时, 将芽转移置于生根培养基 (MS+250.0 mg/L cefo+50.0 mg/L Kan^[11]) 上诱导生根。

2 5 转基因植株的检测

2 5 1 PCR 检测

分别以转基因和对照马铃薯叶片为材料, 用 CTAB 法^[12]提取基因组 DNA, 根据禽流感病毒 H5HA 基因两端的序列设计一对特异性引物:

H5HA 1(GCTCCTCGGAAACCCCTATGTGTGAC)和 H5HA 2(CCTGCCATCCTCCCTCTATAAAACCT), 分别以提取的基因组 DNA 为模板, 利用 Taq 聚合酶进行 PCR 扩增. PCR 反应条件为: 94 预变性 3 min, 94 变性 1 min, 59 退火 30 s, 72 延伸 1 min, 29 个循环, 72 10 min 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶检测.

2 5 2 RT-PCR 检测

根据 PCR 检测结果, 将转基因阳性植株和非转基因植株分别用 EZ Spin Column Total RNA Isolation Kit 试剂盒 (美国 BBI 公司) 进行总 RNA 的提取, 然后以其作为模板, 用 AMV One Step RT-PCR 试剂盒 (美国 BBI 公司) 进行 RT-PCR 反应. 操作按 BBI 公司产品说明书进行.

2 5 3 Western 斑点杂交分析

对禽流感病毒 H5HA 重组蛋白质在转基因马铃薯中表达的分析采用 Western 斑点杂交方法^[13].

2 5 3 1 植物蛋白样品的制备

根据 RT-PCR 检测的结果, 用 SDS 提取法^[14]提取马铃薯转基因植株和非转基因植株的蛋白质.

2 5 3 2 蛋白质的斑点杂交

取 10 L 蛋白质样品液, 直接上样至 NC 膜上 (美国 Millipore 公司), 以非转基因植株的蛋白质样品液作为对照, 待样液干燥后, 将 NC 膜置于 50 mL 封闭液 [50 mL PBST 缓冲液 (PBS+ 0.05% Tween20) + 0.5 g 脱脂奶粉] 中室温下过夜封闭. 次日, 用 10 mL PBST 缓冲液洗膜 4 次, 每次 10 min. 随后加入 1 500 的 PBS (0.8% NaCl + 0.02% KCl + 0.144% Na₂HPO₄ + 0.024% KH₂PO₄, pH 7.4) 缓冲液稀释的一抗 Anti-h5n1 hemagglutinin of A Influenza Virus Monoclonal Antibody (美国 GenScript Corporation 公司), 室温震荡 2 h. PBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 5 min. 加入 1 200 的 PBST 缓冲液稀释的二抗阳抗小鼠 IgG-HRP (南京 Key GEN 公司), 室温下震荡 2 h. PBST 缓冲液清洗 3 次, 每次 5 min. 最后加入显色液 (10 mL 0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.6 + 0.01 mL 30% H₂O₂ + 6 mg 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸) 显色 2~3 min. 待颜色出现后, 加入蒸馏水终止显色反应.

3 结果与讨论

3 1 植物表达载体构建

在构建 H5HA 基因植物表达载体时, 分别在 H5HA 基因的 5'和 3'融合了 35S 启动子和胭脂碱合成酶 (Nos) 基因的终止子. 重组基因插入 pBIN19 双元植物表达载体中 (见图 1), 得到质粒 pBIN19/35S-H5HA.

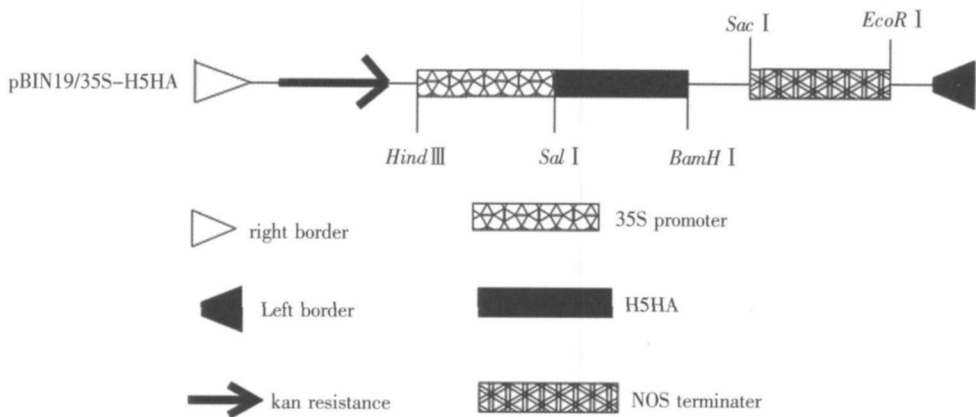


图 1 pBIN19/35S-H5HA 植物表达载体示意图

Fig.1 Schematic representation of pBIN19/35S-H5HA plasmid used for expression in plant

3 2 马铃薯转基因植株的获得

用农杆菌介导的方法将质粒 pBIN19/35S-H5HA 转入 Desiree 马铃薯植株中, 经 NPT II 抗性筛选后, 获

得 12 个转基因株系. 每个株系扩繁 25 株, 以非转基因的植株作为对照, 同时置于培养箱中培养, 转基因植株在生长期其表型与对照没有明显差异.

3 3 转基因植株的 PCR 检测

取 Kan 抗性再生植株, 提取其基因组 DNA, 以质粒 pBIN 19/35S-H5HA 作阳性对照, 以未转化植株为阴性对照, 用特异性引物进行 PCR 扩增, 结果见图 2 从图 2 可以看出, 12 株转基因植株中有 11 株 (株系 2 ~ 12) 的基因组中扩增到一条与阳性对照同样大小 (857 bp) 的片段, 而阴性对照植株未扩增出相应的片段, 初步证明禽流感病毒 H5HA 基因已经整合到转基因马铃薯基因组 DNA 中.

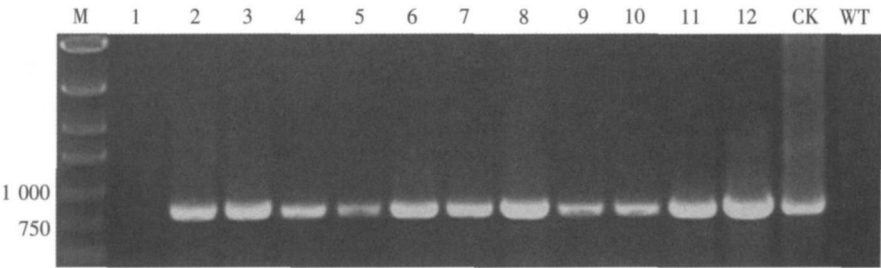


图 2 转基因马铃薯中 H5HA 基因的 PCR 分析

Fig.2 PCR analysis of H5HA gene in transgenic potatoes

M: DNA Marker 1~12: 转基因马铃薯株系

CK: 阳性对照 (pBIN19/35S-H5HA 质粒) WT: 非转基因马铃薯植株

3 4 转基因植株的 RT-PCR 检测

取转基因株系 2~ 6 和 8~ 12 的植株 (株系 7 因污染死亡), 提取其总 RNA, 以未转化植株为阴性对照, 用特异引物进行 RT-PCR 检测, 检测结果见图 3 由图 3 可以看出, 所有被检测的 10 个转基因株系经 RT-PCR 扩增, 均得到 1 条与预期长度一样大小 (857 bp) 的扩增条带, 而对照植株未扩增出相应条带. 这一结果表明, 禽流感血凝素基因 H5HA 在马铃薯体内已得到转录.

3 5 转基因植株的 Western 斑点杂交

从 10 个转基因株系和对照植株中提取总蛋白, 对重组蛋白在马铃薯植株中的表达水平用 Anti - h5n1 hemagglutinin of A Influenza Virus Monoclonal Antibody 抗体进行 Western 斑点杂交分析. 重组蛋白相对表达水平的估计是通过 NC 膜上蛋白显色斑点颜色深浅比较得出的, 分析结果如图 4 所示. 从图中可以看出, 除对照以外 10 个转基因株系均检测到 H5HA 重组蛋白的表达. 株系 2 杂交斑点显示的颜色最深, 株系 6 和 8 最浅, 由此可知, H5HA 蛋白在转基因株系 2 中的表达水平高于其他株系, 约为株系 6 和 8 的 3 倍. 这主要是由于目的基因在马铃薯基因组 DNA 中随机插入所导致的. 本研究成功地利用转基因马铃薯表达了禽流感血凝素蛋白, 为利用马铃薯作为生物反应器生产禽流感口服疫苗提供了理论依据. 但能否在此基础上进一步提高禽流感重组基因的表达水平还有待于研究和探讨.

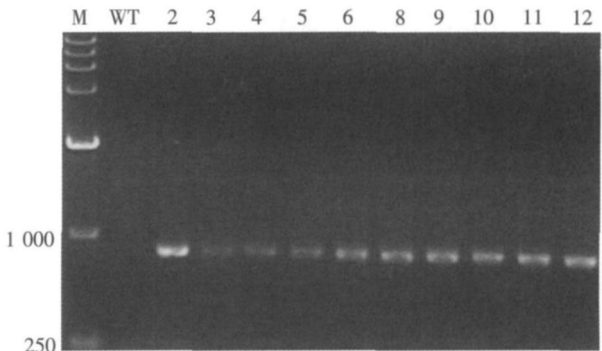


图 3 转基因马铃薯中 H5HA 基因转录的 RT-PCR 分析

Fig.3 RT-PCR analysis of H5HA expression in transgenic potatoes

M: DNA Marker WT: 非转基因马铃薯植株

2~6, 8~12: 转基因马铃薯株系

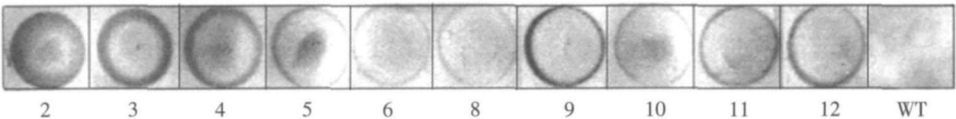


图 4 转基因马铃薯中 H5HA 基因表达的 Western 斑点杂交分析

Fig.4 Western dot dot-blotting analysis of H5HA expression in transgenic potatoes

WT: 非转基因马铃薯植株 2~6, 8~12: 转基因马铃薯株系

[参考文献]

- [1] Lin Y P. Recent examples of human infection by animal and avian influenza viruses in HongKong[J]. International Congress Series, 2001, 1219: 179-185.
- [2] 于康震, 崔尚金, 付朝阳, 等. 禽流感与养禽业发展和人类健康 [J]. 中国预防兽医学报, 2000, 22(4): 312-315.
- [3] 贾红玲, 苏艳, 吴润. 禽流感病毒血凝素保守氨基酸对其受体结合位点的影响 [J]. 中国预防兽医学报, 2008, 30(7): 500-504.
- [4] Garcia M, Crawford JM, Latimer JW, et al. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico [J]. Gen virol, 1996, 77: 1493-1503.
- [5] Weis W, Brown JH, Cusack S, et al. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor: sialic acid [J]. Nature, 1988, 333: 426-431.
- [6] Wood G W, McCauley JW, Bashiruddin JB, et al. Deduced amino acid sequences at haemagglutinin site of avian influenza A viruses of H5 and H7 subtypes [J]. Arch Viro, 1993, 130: 209-217.
- [7] 曹梅, 田夫林, 庄文忠. 禽流感病毒血凝素分子生物学研究进展 [J]. 动物医学研究进展, 2004, 25(2): 35-37, 61.
- [8] Webster RG, Rott R. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of haemagglutinin [J]. Cell, 1987, 50(5): 665-666.
- [9] Amtzen C J. Immunity for Breakfast [J]. Science, 1998, 280(8): 831.
- [10] 杜海莲, 张军, 肖平, 等. 马铃薯遗传转化系统的优化及禽流感病毒 (H5N1) 基因的导入 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2000, 39(5): 607-607.
- [11] 顾科, 季勤, 谭甜, 等. 两种遗传标记筛选物在马铃薯 Desiree 遗传转化应用中的研究 [J]. 淮阴师范学院学报: 自然科学版, 2008, 7(1): 54-58.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔著 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002: 238.
- [13] 季勤. SBD 在重组蛋白质中位移对其酶活性及与淀粉粒结合性能的影响 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2005, 28(1): 88-92.
- [14] 彭学贤. 植物分子生物学技术应用手册 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 292-293.

[责任编辑: 孙德泉]