

密级

论文编号：

中国农业科学院 博士学位论文

口蹄疫病毒免疫原基因在番茄和拟南芥中的
表达及转基因番茄动物免疫试验

**Expression of the genes encoding the FMDV immunogens in tomato
plants and *Arabidopsis thaliana* and immunization test of the transgenic
tomato plants for guinea pigs against FMDV challenge**

博士研究生：潘 丽

指导教师：谢庆阁 研究员

张永光 研究员

申请学位类别：农学博士

专 业：预防兽医学

研 究 方 向：动物病毒分子生物学

培 养 单 位：兰州兽医研究所

提交日期 2005 年 6 月

Degree of Classification:

Number of Thesis:

**Chinese Academy of Agricultural Sciences
A Dissertation for the Dr.Degree**

Expression of the genes encoding the FMDV immunogens in tomato plants and *Arabidopsis thaliana* and immunization test of the transgenic tomato plants for guinea pigs against FMDV challenge

**Doctoral
Candidate : Pan Li**

**Supervisor : Prof. Xie Qingge
Prof. Zhang Yongguang**

Major : Preventive Veterinary Science

Speciality : Molecular Biology of Animal Virus

**Institute : Lanzhou Veterinary
Research Institute**

Submission in June 2005

评阅人和答辩委员会

论文评阅人：胡永浩 教授 甘肃农业大学
常正山 研究员 中国疾控中心寄生虫病
预防控制所
邱昌庆 研究员 兰州兽医研究所

答辩委员会主席：杨志强 研究员 兰州畜牧与兽药研究所
答辩委员会成员：胡永浩 教授 甘肃农业大学动物医学院
王雯慧 教授 甘肃农业大学动物医学院
魏彦明 教授 甘肃农业大学动物医学院
才学鹏 研究员 兰州兽医研究所
刘湘涛 研究员 兰州兽医研究所
刘在新 研究员 兰州兽医研究所

答辩时间：2005 年 6 月 28 日

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 2004 年 6 月 28 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

研究生签名：

时间： 2004 年 6 月 28 日

导师签名：

时间： 2004 年 6 月 28 日

英文缩略词

缩略词	英文名称	中文名称
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
AKP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酶
6-BA	6-Benzylaminopurine	6-苄基氨基嘌呤
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸酯
BHK	Baby hamster kidney cell line	仓鼠肾细胞系
Bp	Base pair	碱基对
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CaMV	Cauliflower mosaic virus	花椰菜花叶病毒
Carb	Carbenicillin	羧苄青霉素
Cef	Cefradium	头孢霉素
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromide	十六烷基三甲基溴化铵
CT-B	Cholera toxin B	霍乱肠毒素 B 亚单位
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦碳酸二乙脂
dNTP	Deoxynucleotide triphosphate	脱氧核糖核苷三磷酸
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	乙二胺四乙酸
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附试验
HBsAg	Hepatitis B virus surface antigen	乙型肝炎病毒表面抗原
HRP	Horseradish peroxidase	辣根过氧化物酶
IAA	Indoleacetic acid	吲哚乙酸
IBA	Indole-3-butyric acid	吲哚-3-丁酸
ID ₅₀	50% infective dose	半数感染量
IgG	Immunoglobulin G	免疫球蛋白 G
Kan	Kanamycin	卡那霉素
Kb	Kilobase	千碱基
KD	Kilodalton	千道尔顿
LB	Lyria broth	LB 培养基
β-ME	β-mercaptoethanol	β-巯基乙醇
MS	Murashige and Skoog medium	MS 培养基
MW	Molecular weight	分子量
NAA	Naphthalene acetic acid	萘乙酸
NBT	Nitroblue tetrazolium	氮蓝四唑
NPTII	Neomycin phosphotransferase	新霉素磷酸转移酶
nt	ribonucleotide	核苷酸

NVCP	Norwalk virus capsid protein	诺沃克病毒衣壳蛋白
OD	Optical density	光密度
OPD	O-phenylenediamine	邻苯二胺
ORF	Open-reading frame	开放阅读框架
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PMSF	Phenylmethy sulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PVP	Polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
Rif	Rifampicin	利福平
rpm	Rotation per minute	每分钟转数
RT	Reverse transcrippase	反转录
RVCP	Rabies virus capsid protein	狂犬病病毒衣壳蛋白
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
Str	Streptomycin	链霉素
TCID ₅₀	50% tissue culture infective dose	半数组织培养感染量
TE	Tris-EDTA buffer	Tris-EDTA 缓冲液
TEMED	N,N,N,N'-tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
TGEV	transmissible gastroenteritis virus	传染性肠胃炎病毒
TGS	transcription gene silencing	转录水平基因沉默
Ti plasmid	Tumor-inducing plasmid	肿瘤诱导质粒
Tris	Trishydroxymethylaminomethane	三羟甲基氨基甲烷
u	Unit	单位
Vir		农杆菌毒性区
ZT	Zeatin	玉米素

摘 要

口蹄疫是当今世界上危害最严重的家畜传染病之一。疫苗接种是预防口蹄疫的主要措施。近年来,随着植物基因工程的发展,用转基因植物表达抗原相对于传统疫苗而言是一种更安全、更经济的表达系统。本研究将口蹄疫病毒免疫原基因整合进番茄基因组并得以表达,用转基因番茄叶片蛋白提取液经肌肉途径免疫豚鼠,根据豚鼠抗体水平的消长动态和免疫豚鼠抗强毒攻击的保护率进行植物疫苗免疫原性的研究,为 FMD 转基因疫苗的开发奠定基础。

此外,由于植物种子生产外源基因工程蛋白质的品质相当稳定,可作为饲料添加剂或口服疫苗,为优化表达体系,本研究构建了 FMDV 结构蛋白 VP1 基因的种子特异性表达载体。具体结果如下:

1)构建了 O 型 FMDV China99 株结构蛋白 VP1 基因的组成型植物二元表达载体 pBin438/VP1 及结构蛋白 P1、非结构蛋白 2A、3C 以及部分 2B 基因的组成型植物二元表达载体 pBin438/P12X3C。VP1 基因及起始密码 ATG、内质网引导多肽 SEKDEL 共 660 个核苷酸,编码 220 个氨基酸;P12X3C 基因及起始密码 ATG、内质网引导多肽 SEKDEL 共 3 018 个核苷酸,编码 1 006 个氨基酸,与亲本毒株相应核苷酸序列比较,同源性分别为 100%和 99.6%。

2)建立了番茄高频转化系统。高频转化系统以 MS 为基本培养基,附加 ZT1.0mg/L 和 IAA0.1mg/L,选 8~10 日苗龄的子叶预培养 2d,在活化的根癌农杆菌菌液里侵染 3~5min,于暗处共培养 2d 后,直接在含卡那霉素再生培养基上筛选培养,形成抗性愈伤并分化出芽。转化率达 18%。

3)转基因番茄 PCR 检测表明:FMDV 免疫原基因 VP1 和 P12X3C 分别整合到番茄基因组中;RT-PCR 结果证实目的基因在转基因番茄的转录水平表达;ELISA 检测约 40%的 pBin438/VP1 卡那抗性植株呈阳性,约 25%的 pBin438/P12X3C 卡那抗性植株阳性;随机选取部分 ELISA 检测阳性植株进行 Western blotting 检测,重组蛋白能够与 FMDV 抗血清反应。表明 FMDV 免疫原基因 VP1 和 P12X3C 已分别转入番茄基因组并获得表达,且所表达的蛋白具有免疫反应性。

4)构建了 FMDV 结构蛋白 VP1 基因的种子特异性表达载体 p7S Bin438/VP1,浸花法转化拟南芥,分子检测表明,VP1 基因已整合进拟南芥基因组并在莢中获得表达,为今后将 FMDV 免疫基因转入大豆等油料植物种子提供了实验依据。

5)转基因番茄叶片蛋白提取液免疫豚鼠,第一次免疫后 10d ELISA 检测不到 FMD 特异性抗体,第二次免疫后 10d,豚鼠血清抗体水平显著提高并达到第一个高峰,第三次免疫后 21d,抗体水平达到第二个高峰,其中 pBin438/VP1 转基因番茄第三次免疫豚鼠后 21 天血清效价最高可达 1:64,攻毒后免疫豚鼠保护率达 80%,pBin438/P12X3C 转基因番茄第三次免疫后 21 天血清效价最高可达 1:128,攻毒后免疫豚鼠保护率达 100%。

关键词: 口蹄疫病毒, 转基因疫苗, 免疫原性, 豚鼠

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease (FMD) is the etiological agent of an important disease of livestock. Vaccination is the major method to prevent FMD. But the conventional inactivated vaccines have many defects, such as the possibility of virus dissemination, and the virulent recovery of vaccine virus. Therefore, it is necessary to develop a safe, efficient and economic FMD vaccine.

The use of transgenic plants as vectors for the expression of viral and bacterial antigens has been increasingly tested as alternative methodology for the production of experimental vaccines. Antigens produced in transgenic plants are capable of invoking protective mucosal immune responses against important pathogens as it has already been demonstrated. To explore the feasibility of FMD edible vaccine, in this study, the immunogen gene of VP1 and P12X3C were transferred into the nuclear chromosomal DNA of the tomato plants respectively. In order to evaluate immune response of guinea pigs against FMDV, the extracts of transgenic leaves were injected into guinea pigs. According to the sera antibody levels and the protection of the vaccinated guinea pigs against challenge with 100ID₅₀ FMDV, probed into the immunogenicity of the target protein expressed in transgenic plants.

Using plant seeds to produce target proteins could be used as food addition or oral vaccines. In this study, the structural protein VP1 gene was transformed into *Arabidopsis thaliana* and expression of VP1 in the genome of transgenic *Arabidopsis thaliana* was performed by molecular biology analysis. The main results presented in this thesis are as follows:

1)The plant constitutive-expression vector pBin438/VP1 with VP1 and pBin438/P12X3C with multi-genes of FMDV were constructed respectively, multi-genes P12X3C encode for the FMDV O/China/99 genomic regions P1(1A,1B,1C,1D), 2A, 3C and a part of 2B. The sequence of VP1 contain 660nt including complete VP1, a start codon and microsomal retentional signal sequence SEKDEL. The construction of multi-genes P12X3C also contain 3 018nt including full length of P1, 2A, 3C and a part of 2B, a start codon and microsomal retentional signal sequence SEKDEL. The percent identity of VP1 and P12X3C to the same gene from GenBank of FMDV O/China/99 were 100% and 99.6% respectively.

2)The optimal tomato transformation system that was mediated by *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 was established. On the base of the efficient regeneration system, factors that affected transformation such as the *Agrobacterium tumefaciens* concentration, infiltration time and transform style were optimized. Our protocol of plant transformation system was as follow: from eight to ten days post-germination, cotyledon was infiltrated 3~5min and co-cultivated for 48h with an overnight grown culture of *Agrobacterium Tumefaciens* on medium of Murashige and Skoog (MS) adding 1.0mg/L ZT and 0.1mg/L IAA. Cotyledons post-culturation with *Agrobacterium. Tumefaciens* carrying pBin438/VP1 and pBin438/P12X3C were directly placed onto the selective medium containing 50mg/L kanamycin and 500mg/L carbenicillin. After six weeks, kanamycin-resistant shoots were removed from calli, and transferred to the rooting medium. The frequency of success transformations reached to 18%.

3)After being selected by Kanamycin, a lot of resistant lines of transgenic tomato plants were obtained. The presence of the VP1 was detected in the pBin438/VP1 transformed plants by amplification of a PCR product of the expected size(650bp) that was regularly absent in the non-transformed plants. Additionally, the complete sequence of P12X3C was detected in the pBin438/P12X3C transformed plants. RT-PCR of pBin438/VP1 transformed plants and pBin438/P12X3C transformed plants indicated that most target cDNA could transcribe normally in the transformed tomato plants. After being detected by sandwich-ELISA assays, about 40% pBin438/VP1 transformed plants and 25% pBin438/P12X3C transformed plants were confirmed to express the recombinant protein. Based on sandwich-ELISA and Western Blotting, results showed recombinant protein could react with FMDV antisera. In conclusion, the results indicated that the constructed constitutive-expression plasmid was functionary; VP1 and P12X3C of FMDV were transformed into tomato plants and got expression affirmatively; structural protein VP1 and P1 of FMDV expressed by transgenic tomato plants have immunogenicity.

4)The plant seed-specific expression vector p7SBin438/VP1 was constructed and transformed into *Arabidopsis thaliana* via floral dip, a number of transgenic *Arabidopsis thaliana* were obtained. Molecular biology analysis revealed that VP1 had been inserted into the genome of transgenic *Arabidopsis thaliana* and structural protein VP1 was expressed in pods at high level. These results indicated that p7SBin438/VP1 should be a good expression vector and can be used in modification of oilseed crops.

5)Guinea pigs were intramuscular inoculation at days 0, 15, and 30 with leaves extracts from pBin438/VP1 and pBin438/ P12X3C transgenic tomato lines respectively. Anti-FMDV antibodies were elicited and reached a high level ten days after the second inoculation. Furthermore, guinea pigs immunized with transgenic leaves extracts developed a strong neutralizing antibody responses and antibodies increased further and reached a second peak twenty-one days after the third inoculation. In the challenge test, one group of guinea pigs immunized with pBin438/P12X3C were fully protected against FMD challenge. Another group of guinea pigs immunized with pBin438/VP1, four out of five(80%) animals were protected against FMD challenge. Indirect-ELISA antibody titers reached 1:64 and 1:128 twenty-one days after the third inoculation respectively. Immunity assay with guinea pigs showed that expression product of transgenic tomato had immunogenicity.

In conclusion, this study may provide the experimental bases of research for transgenic vaccine and encouraged further research work on the development of the edible vaccine against FMD derived from the transgenic plants.

Key words: FMDV, transgenic vaccine, immunogenicity, guinea pigs

目 录

第一章 序 言	1
1.1 研究背景	1
1.1.1 口蹄疫与口蹄疫病毒	1
1.1.2 口蹄疫疫苗的研究概况	1
1.2 转基因植物疫苗的原理和策略	2
1.2.1 植物基因转化载体系统的构建	2
1.2.2 转基因植物疫苗表达系统	3
1.3 转基因可饲（食）疫苗的免疫机理	4
1.4 转基因疫苗国内外研究现状	5
1.4.1 大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位（LT-B）在植物中的表达	5
1.4.2 乙肝表面抗原（HBsAg）在植物中的表达	6
1.4.3 诺沃克病毒衣壳蛋白（NVCP）在植物中的表达	6
1.4.4 猪传染性胃肠炎病毒 S 糖蛋白（TGEV-S）在植物中的表达	7
1.4.5 口蹄疫病毒（FMDV）结构蛋白 VP1 在植物中的表达	7
1.4.6 狂犬病病毒糖蛋白（G 蛋白）在植物中的表达	8
1.5 转基因疫苗存在的问题及未来研究的展望	8
1.5.1 外源基因在植物中表达量低	8
1.5.2 如何建立高频再生的遗传转化受体系统是制约研究者开发有应用前景的可饲疫苗 的“瓶颈”	10
1.5.3 转基因植物疫苗的免疫原性问题	11
1.5.4 转基因疫苗可能引起免疫耐受	11
1.6 本研究的目的及意义	11
第二章 口蹄疫病毒 O/China/99 株植物双元表达载体的构建	15
2.1 材料和方法	15
2.1.1 质粒和菌株	15
2.1.2 主要试剂	15
2.1.3 主要仪器	16
2.1.4 FMDV VP1 基因植物双元表达载体 pBin438/VP1 的构建	16
2.1.5 FMDV 多基因植物双元表达载体 pBin438/P12X3C 的构建	19
2.2 结果与分析	23
2.2.1 植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 的构建及序列分析	23
2.2.2 FMDV VP1 基因植物双元表达载体的构建	23
2.2.3 植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/P12X3C 的构建及序列分析	23
2.2.4 FMDV 多基因植物双元表达载体的构建	24

2.3 讨论	24
第三章 口蹄疫病毒免疫原基因在番茄中的转化	31
3.1 材料和方法	31
3.1.1 植物材料	31
3.1.2 转化载体	31
3.1.3 试剂的配制	31
3.1.4 种子的准备和消毒方法的确定	32
3.1.5 番茄的再生	32
3.1.6 不同植物激素浓度对番茄子叶再生的影响	32
3.1.7 Kan 梯度预实验	32
3.1.8 番茄子叶的遗传转化	33
3.2 结果与分析	33
3.2.1 种子消毒方法的确定	33
3.2.2 番茄的转化与再生系统	34
3.2.3 转基因番茄卡那霉素抗性植株的获得	37
3.3 讨论	38
3.3.1 植物细胞的全能性与高效再生转化系统的建立	38
3.3.2 培养基中不同激素比对愈伤组织诱导及不定芽分化的影响	38
3.3.3 转化细胞的选择	39
3.3.4 预培养对转化率的影响	39
第四章 口蹄疫病毒免疫原基因在番茄中的整合与表达	44
4.1 材料与方法	44
4.1.1 植物材料	44
4.1.2 主要试剂及仪器	44
4.1.3 PCR 法检测外源基因的整合	44
4.1.4 转基因番茄的 RT-PCR 检测	45
4.1.5 转基因番茄表达蛋白的双抗夹心 ELISA 检测	46
4.1.6 转基因番茄表达蛋白的 Western-blotting 检测	46
4.2 结果	47
4.2.1 转基因番茄的 PCR 检测	47
4.2.2 转基因番茄的 RT-PCR 检测	47
4.2.3 目的基因在番茄中表达蛋白的 ELISA 检测	47
4.2.4 目的基因表达蛋白的 Western-blotting 检测	47
4.3 讨论	48
4.3.1 外源基因在植物中的整合	48
4.3.2 外源基因在转基因植物中表达	48
4.3.3 外源基因在植物中表达存在的问题	49
4.3.4 未来研究的方向	50

第五章 口蹄疫病毒 VP1 基因在转基因拟南芥种子中的表达及活性检测	53
5.1 材料与方法	53
5.1.1 质粒和菌株	53
5.1.2 试剂及植物材料	54
5.1.3 引物的设计与合成	54
5.1.4 种子特异性表达 Mini-Ti 质粒 p7SBin438/VP1 的构建	54
5.1.5 FMDV 种子特异性双元表达载体的构建	54
5.1.6 浸花法(Floral dip)转化拟南芥	54
5.1.7 拟南芥 T0 代种子的抗性筛选	55
5.1.8 转基因拟南芥的 PCR 检测	55
5.1.9 转基因拟南芥 Western-blotting 检测	55
5.2 结果	55
5.2.1 种子特异性表达 Mini-Ti 质粒 p7SBin438/VP1 的构建	55
5.2.2 植物种子特异性双元表达载体的构建	57
5.2.3 拟南芥种子的收获和抗性筛选	58
5.2.4 转基因拟南芥的 PCR 检测	58
5.2.5 转基因拟南芥的 Western-blotting 分析	58
5.3 讨论	59
第六章 转基因番茄的动物免疫试验	61
6.1 材料和方法	61
6.1.1 植物材料和实验动物	61
6.1.2 主要试剂	61
6.1.3 疫苗的制备及免疫剂量	62
6.1.4 实验动物免疫	62
6.1.5 抗体的监测	62
6.1.6 攻毒试验	62
6.2 结果	63
6.2.1 豚鼠体内 FMDV 特异性抗体的动态变化	63
6.2.2 转基因疫苗免疫豚鼠的抗体滴度	63
6.2.3 攻毒试验	64
6.3 讨论	66
6.4 转基因疫苗的应用前景及未来研究的方向	67
第七章 结 论	69
参 考 文 献	70
附 录	80
致 谢	91
作 者 简 历	92

第一章 序 言

1.1 研究背景

1.1.1 口蹄疫与口蹄疫病毒

口蹄疫(foot-and-mouth disease,FMD)是偶蹄动物的一种急性、高度接触性传染病,主要感染猪、牛、羊,尽管该病致死率不高,但由于家畜感染后生产力下降以及引起的动物及畜产品贸易限制,由此造成严重的经济损失(Pereira et al,1981)。像其他许多传染病一样,口蹄疫的分布与一个国家或地区的发展水平有关,非洲、亚洲、南美洲的一些国家由于没有充足的财力及有效的控制措施,致使该病不断流行,北美洲和大洋洲无口蹄疫发生的报道,欧洲在 2001 年之前亦为无口蹄疫地区。近年来,东南亚地区连年暴发口蹄疫,2000 年,在已经很多年没有口蹄疫的日本、韩国和我国的台湾省也暴发了口蹄疫;在欧洲,有多年研究和防制口蹄疫历史的英国,继 1967 年口蹄疫大暴发后,于 2001 年 2 月再次暴发口蹄疫,直接经济损失 90 多亿英镑,给农业、旅游和乡村度假业以及其它相关行业的发展造成了严重影响,同时疫情还波及到法国、荷兰和爱尔兰,造成了巨大的经济损失(Samuel et al,2001;Aggarwal et al,2002),这几次流行大大刺激了欧洲乃至全世界加强对口蹄疫的基础研究和防制研究的力度。

口蹄疫病毒(foot-and-mouth disease virus,FMDV)属于小 RNA 病毒科口蹄疫病毒属,FMDV 基因组的中部是一大的开放阅读框,编码一多聚蛋白,开放阅读框由 L 基因、P1 结构蛋白基因、P2 和 P3 非结构蛋白基因以及起始密码子和终止密码子组成。多聚蛋白经过初级裂解形成 L-P1-2A、2BC、P3 三种前体蛋白,16 个氨基酸的多肽 2A 催化 P1-2A 从 2BC 连接处顺式切割(Pablo de Felipe et al,2003;Claire et al,1999),次级裂解由 3C 蛋白酶完成,P1-2A 被 3C 蛋白酶催化加工成 VP0、VP3 和 VP1,这三种蛋白相互联系并能够自我组装成二十面体的核衣壳,在病毒粒子最后形成阶段 VP0 经成熟裂解成 VP2、VP4,病毒 RNA 组装进入 75S 的空衣壳形成完整的病毒粒子,FMDV 粒子装配完毕(Abrams et al,1995;Belsham et al,1990;Lopez de Quinto et al,1997)。有报道(Rowlands et al,1975;Gregory et al,1996;Leticia et al,2001)称病毒衣壳由于包含 VP0、VP3 和 VP1,能够诱导与感染性 FMDV 粒子相同的免疫反应。

1.1.2 口蹄疫疫苗的研究概况

目前,口蹄疫防疫中普遍使用的是传统的灭活疫苗,生产这种疫苗要动用活病毒,疫苗的不完全灭活或从疫苗工厂逃逸的病毒有可能引起疫病的新爆发;而且动物免疫后,感染动物与免疫动物不能有效区分,其局限性日渐突出(Tulasiram et al,1998;Chan et al,2001)。新型疫苗是伴随着分子免疫学、分子生物学和现代生物工程技术等理论和技术的发展应运而生的,主要指基因工程技术生产的疫苗,包括亚单位疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗、基因缺失疫苗、多肽疫苗及抗独特型抗体疫苗等(Sobrinho et al,2001;Barnett et al,2002)。植物表达系统属真核细胞表达系统,不仅能进行正确的翻译后加工,可直接食用,易获得多价疫苗,而且廉价安全不需特殊的运输和储藏条

件, 因此被认为是一个比微生物或动物更理想的蛋白生产系统(Schuyler et al,2002; Lutwick et al,2000; Lauterslager et al,2002)。

自 1983 年首次报道植物的遗传转化以来, 该项技术已得到广泛应用, 并已在一些国家大面积种植多种转基因植物。这些植物包括抗虫、抗病、抗逆境的棉花、玉米、水稻、大豆、西红柿等。近年来转基因另外一方面进展是合成有医疗价值的多肽、蛋白质, 包括抗原、抗体、生物活性物质, 研制安全、热稳定、可口服并被广泛接受的疫苗是世界卫生组织提出的疫苗研制目标, 这些目标促使人们考虑在转基因植物中生产可食用的基因工程亚单位疫苗。目前, 这一领域的研究主要包括三个方面, 一是用植物来生产药用蛋白, 二是在植物中表达抗体, 三是用植物来生产疫苗, 其中转基因疫苗的研究倍受重视。1992 年 Mason 等人以专利的形式发表了乙肝表面抗原在转基因植物中表达的文章, 提出了转基因植物生产疫苗的新思路(Mason et al,1992), 1995 年该研究小组在 *Science* 上正式发表了关于植物性口服疫苗的实验结果(Haq et al,1995)。虽然植物性口服疫苗仅仅是转基因植物的一种手段, 但在免疫学上则是一次革命。目前, 这项研究多处于实验室研究阶段, 但也有少数进入了临床 I / II 期试用阶段, 具有良好的应用前景, 本文将对此作出阐述。

1.2 转基因植物疫苗的原理和策略

转基因植物疫苗(transgenic plant vaccine)的原理就是将病原微生物的主要抗原蛋白在植物组织或植物病毒中合成, 被人或动物摄取后能够使其得到一定的免疫保护, 是把植物基因工程技术与机体免疫机理相结合, 生产出能使机体获得特异抗病能力的疫苗(王关林等, 2002)。目前, 转基因疫苗中约 80%是由农杆菌介导的表达系统产生, 这种表达系统的成功构建是源于根癌农杆菌是一种寄主非常广泛的土壤细菌, 在自然状态下它能够通过伤口侵染大多数双子叶植物, 导致冠瘿瘤的发生(Kung et al,1996)。其侵染机理是基于农杆菌体内的 Ti 质粒和 vir 基因即毒性区两部分的共同参与, Ti 质粒中有一个 DNA 片断, 称为转移 DNA(Transfer DNA,T-DNA)。大多数双子叶植物组织受到创伤后, 诱导植物细胞分泌某些酚类物质, 如乙酰丁香酮(AS)或羟基乙酰丁香酮(OH-AS), 这些酚类物质即成为创伤信号分子或创伤诱导分子, vir 基因受到创伤信号刺激后, 转录活化其一系列基因 virA, B, C, D, E, F, G, H 等, 这些基因的表达产物最终形成膜通道以便于 T-DNA 复合物向植物细胞转移, T-DNA 复合物通过其左右边界各为 25bp 的重复序列以单拷贝或多拷贝的形式将 T-DNA 复合物插入到宿主基因组中, 将外源基因与 T-DNA 左右臂相连, 同样可以将外源基因整合进植物基因组并得以表达(图 1-1), 而且整合进植物基因组的外源 DNA 片断能够通过减数分裂以孟德尔方式传递给后代(Stachel et al,1985;May et al,1995)。

1.2.1 植物基因转化载体系统的构建

目前, 在植物基因转化中应用最多的 Ti 质粒载体系统有两种: 共整合载体系统(co-integrated vector)和双元载体系统(binary vector)。共整合载体是指 Ti 质粒上编码致瘤基因的序列被一段 pBR322 DNA 所取代, 带外源基因的 pBR322 衍生中间载体由大肠杆菌转入农杆菌后, 二者相同的 pBR322 序列发生同源重组, 外源基因就整合到 Ti 质粒上。双元载体系统是指在一个农杆菌株

系中含有两个彼此分离的质粒：Mini-Ti 质粒和 helper-Ti 质粒，前者含有 T-DNA 边界而 Vir 基因缺失，后者含有 Vir 区段而 T-DNA 缺失。Mini-Ti 质粒含有 T-DNA 和外源基因重组的多克隆载体质粒，它既能够在大肠杆菌中复制，又能在农杆菌中进行复制，并能够从大肠杆菌迁移到土壤农杆菌中，helper-Ti 质粒是含有 vir 基因的 Ti 衍生质粒。共整合载体的重组频率很低，而双元载体系统的两个质粒接合的频率较高，因此双元载体的遗传转化效率高于共整合载体。

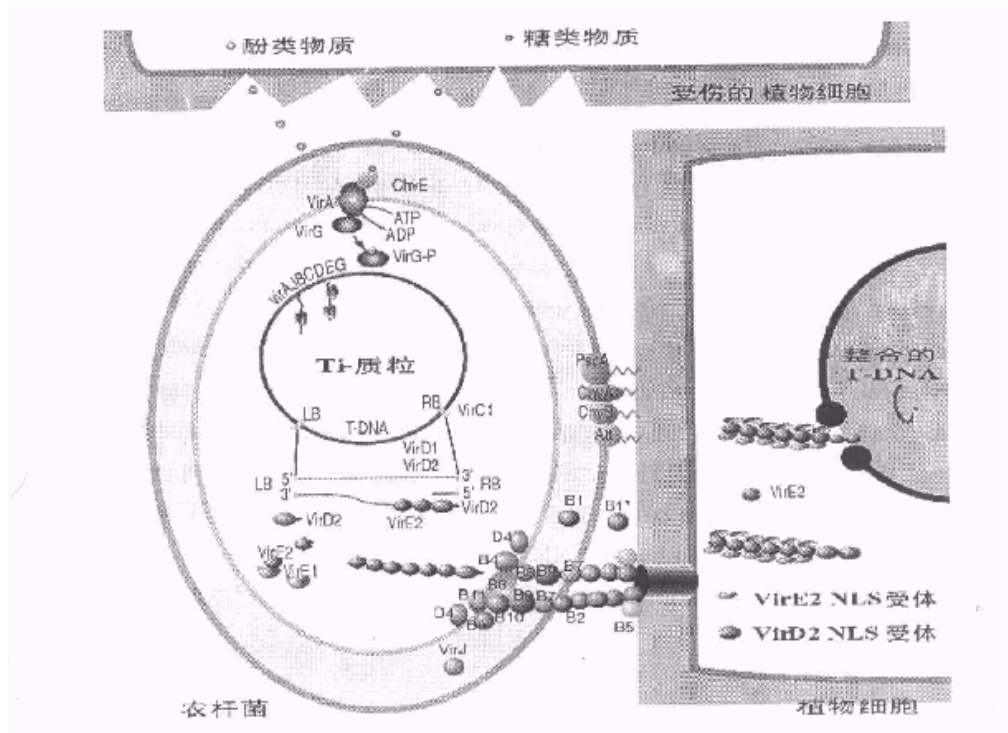


图 1-1 根癌农杆菌 Ti 质粒转移进植物染色体

Fig.1 transformation of Ti plasmid from *Agrobacterium tumefaciens* into plant chromosome

1.2.2 转基因植物疫苗表达系统

1.2.2.1 稳定的核表达系统

该表达体系是将外源基因构建到适当的表达载体中，在农杆菌介导下随机地插入植物核基因组中，可以遗传至后代。本方法具有以下优点：一是通过有性或无性繁殖的方法，可以很容易地获得大量的转基因植株，二是通过有性杂交的方法，可以获得生产多价复合疫苗的转基因植物，三是通过特异性表达启动子使抗原基因在器官或组织中特异性表达(Horsch et al,1985)。利用植物的核转化系统可以稳定、长期地生产重组抗原蛋白，有利于可食疫苗的商业生产(Maliga,2003; Staub et al,2000)。目前核表达系统主要采用花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 组成型表达启动子，这类启动子表达具持续性，RNA 和蛋白质表达量相对恒定，不表现时空特异性，也不受外界因素诱导，但该系统表达水平低，特异性的高效表达启动子还不能满足实际需要。另外，核转化生长周期长，根据转化植物的不同，一般在 3~9 个月后才能获得稳定的转化植物进行表达蛋白功能

与活性的检测(Schillberg et al,2005)。

1.2.2.2 暂态表达系统

该表达体系主要是利用植物病毒为载体将外源基因插入植物病毒基因组中,再用此重组病毒感染植物,外源基因随病毒在植物体内复制、装配而得以高效表达。在这里外源基因被克隆到植物病毒基因组中,并在强衣壳蛋白启动子的调控下转录表达重组蛋白,由于在病毒复制过程中,病毒衣壳蛋白高水平地表达复制,外源基因也随之得到高水平的表达(Gleba et al,2004)。另外一种方法是通过农杆菌介导的真空渗透法将重组载体转入植物细胞核中,用该方法几天内就可以得到毫克级的重组蛋白(Kapila et al,1997; Vaquero et al,1999)。

暂态表达系统表达量高,而且一般认为植物病毒不会传染动物,无交叉感染,相对于稳定表达系统,真空渗透法几天内就可快速得到结果,但缺点是不能稳定遗传。严格地说,该方法不属于转基因植物的范畴,因为病毒基因并不整合进植物基因组中,通常在核转化之前检验载体构建及外源蛋白表达情况时采用该方法(Schillberg et al,2005)。

1.2.2.3 叶绿体表达系统

尽管叶绿体作为遗传转化的受体有其独有的特点:叶绿体基因组分子量小,便于进行分子遗传操作;外源基因在叶绿体中定点整合,表达量高;遗传方式为母系遗传;有利于对环境的保护等(Staub et al,1995;Boynton et al,1988;Daniell et al,2001)。但该表达体系目前仍存在许多亟待解决的问题,首先叶绿体转化的植物大多为模式植物如烟草、衣藻,因此植物种类的拓展是目前叶绿体转化首要解决的问题之一,其次叶绿体转化中的同质化,即如何使外源基因完全整合到植物叶绿体每个 DNA 拷贝中,它的解决有助于提高叶绿体遗传转化的表达量。

1.3 转基因可饲(食)疫苗的免疫机理

动物及人体的呼吸道、消化道及生殖道黏膜与病原体接触后会引发机体的黏膜免疫反应,在黏膜的微环境中产生分泌型 IgA 抗体和特异的免疫淋巴细胞,从而构成机体防御病原体感染的第一道屏障。口服疫苗就是以胃肠道黏膜为接种免疫部位,从而使机体在胃肠道黏膜产生局部免疫应答进而获得全身性的免疫保护(Lauterslager et al,2002; Walmsley et al,2000)。

许多文献报道,转基因口服疫苗不仅诱导了机体系统免疫反应,而且还诱导了黏膜免疫反应(Tariq et al,1995 Modelska et al,1998)。诱导黏膜免疫是从 M 细胞识别抗原开始的(Yu et al,2000;Sheikh et al,2000)。黏膜免疫反应过程如下:

- 1) 抗原与 M 细胞表面尚未明确的部位结合;
- 2) 抗原被摄入 M 细胞的吞饮泡;
- 3) M 细胞将识别的抗原传递给巨噬细胞,巨噬细胞和其他抗原呈递细胞再将抗原展示给 Th 细胞;
- 4) 当 Th 细胞识别外源的蛋白质片段后, Th 细胞协助激活 B 细胞,活化的 B 细胞转移到肠

系淋巴结，并在那儿成熟分化为 IgA 浆细胞；

5) IgA 在浆细胞内产生，由 J 链连接成双聚体分泌出来。当 IgA 通过黏膜或浆膜上皮细胞向外分泌时，与上皮细胞产生的分泌片连接成完整的分泌型 IgA (sIgA)，释放到分泌液中，分布在黏膜或浆膜表面发挥免疫作用。当疾病因子出现时，记忆 Th 细胞一方面刺激胞毒 T 细胞攻击受感染细胞，另一方面迅速刺激记忆 B 细胞分泌中和抗体，消灭入侵的病原体。

口服疫苗最大的障碍是抗原蛋白在胃里被消化，植物细胞的细胞壁和细胞膜起到一个很好的生物胶囊作用(Biemelt S et al,2003)，以保护细胞内免疫原经过食道、胃时不被消化，当到达小肠组织时，细胞壁和细胞膜已慢慢开始降解，里面的免疫原释放出来被 M 细胞识别，然后转运给 APC 细胞，达到口服免疫的效果。

1.4 转基因疫苗国内外研究现状

1992 年，随着乙肝表面抗原在烟草中的成功表达，可食用植物疫苗的概念的提出，经过科学工作者十余年的努力，已有多种用于人类或动物疫苗的蛋白在植物中成功表达(表 1-1)。到目前为止，在转基因植物中表达用于疫苗研究的抗原主要有大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位 (LT-B)、霍乱弧菌毒素 B 亚单位 (CTB)、乙肝表面抗原 (HBsAg)、猪传染性胃肠炎病毒 S 糖蛋白 (TGEV-S)、诺沃克病毒衣壳蛋白 (NVCP)、狂犬病病毒糖蛋白 (RV-G 蛋白)、口蹄疫病毒 (FMDV) 结构蛋白 VP1 等，其中研究得最多的是 LT-B。

选用这些抗原基因主要基于以下 3 点理由：有坚实的基础，特别是免疫原性和分子结构清楚；有标准的检测方法可用，因为外源基因在转基因植物中的整合是随机的，所以必须有灵敏、准确、可靠的检测技术进行转化植株的筛选，在免疫试验中，还要检测血清和黏膜抗体的反应水平，如果没有成功的检测方法，是无法进行此项研究的；有广阔的应用前景，这几种植物疫苗一旦研发成功，有广阔的世界市场，特别适用于第三世界发展中国家。

1.4.1 大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位 (LT-B) 在植物中的表达

1998 年, Mason 等用 LT-B 基因转化烟草和马铃薯, 外源基因在转基因植株中均能表达(Mason et al,1998), 并有较好的免疫原性。外源基因在烟草中的表达量可达 5 μ g/g 可溶性蛋白, 在马铃薯块茎中可达 30 μ g/g 可溶性蛋白。用烟草叶浸提物口服免疫小鼠, 其 IgA 和 IgG 抗体与用同剂量细菌性 LT-B 灌服的免疫小鼠完全一致, 用转基因马铃薯饲喂小鼠, 也都产生了黏膜 IgA 和血清 IgG。与灌服细菌性 LT-B 的小鼠相比, 饲喂转基因马铃薯的小鼠, 其血清 IgG 和黏膜 IgA 抗体水平平均较高, 当用 LT 进行攻击试验时, 饲喂试验组小鼠虽没有被完全保护, 但免疫保护效果优于灌服细菌性 LT-B 的对照组。Streatfield 等研究了 LT-B 基因在玉米种子中的表达, 外源基因在转基因玉米种子中的表达量占总可溶性蛋白的 10%, 用转基因玉米表达的 LT-B 和用纯 LT-B 饲喂小鼠可诱导同样的血清抗体 IgA(Streatfield et al,2002; Streatfield et al,2003)。

转基因疫苗在动物体内试验的成功, 推动了其进入人类临床试验阶段, 为进行人类试验提供了可靠的依据。美国于 1997 年进行了首例植物来源的可食用疫苗的人体临床试验(Tacket et al,1998), 在 I / II 期临床试验中, 志愿人群口服了植物组成性表达合成的 LT-B 免疫原的未经烹饪

的转基因马铃薯, 11 人服用了 50~100g 转基因马铃薯的供试者中有 10 人的 LT-B 抗体显著上升, 而作为对照组的三人服用了 50g 未转基因的马铃薯, 未见一人有任何的 LT-B 特异性抗体应达, 该实验说明植物可食性组织生产的重组 LT-B 可有效的保护免疫原免受胃液消化, 免疫原在不用佐剂的情况下同样能诱导体液和黏膜免疫反应。

1.4.2 乙肝表面抗原 (HBsAg) 在植物中的表达

1992 年, Arntzen 领导的研究小组报道了转基因植物生产乙肝疫苗的研究结果(Mason et al, 1992)。研究人员将 HBsAg 基因转入烟草获得转基因植株, 转基因烟草中 HBsAg 表达水平为总可溶蛋白质的 0.01%, 从转基因烟草的叶子中提取的 HBsAg 组成平均为 22nm 的颗粒, 其浮力密度和免疫原性与人和酵母来源的 HBsAg 相似, 表明在植物中成功地保持了蛋白质折叠的特性。以重组的 HBsAg 免疫小鼠, 其免疫反应与商品化的 HBsAg 疫苗相似, 产生了 IgM 和所有的 IgG 亚基, 并使 T 细胞增殖, 这表明转基因植物表达的抗原保留了激发 B 细胞和 T 细胞免疫反应的抗原决定簇。

Richter 等后来在马铃薯中表达了乙肝表面抗原, 将该抗原与口服免疫佐剂霍乱毒素 B 亚单位 (CTB) 共同免疫小鼠, 能引起小鼠免疫反应, 该试验表明在转基因植物中表达的非消化道型人类病原的抗原具有口服免疫原性(Richter et al, 2001)。用商品化乙肝疫苗对已经口服转基因马铃薯的小鼠进行二次免疫, 其抗体水平迅速升高, 这表明马铃薯中表达的乙肝表面抗原能刺激机体产生免疫记忆。

1999 年, Kapusta 在羽扇豆和莴苣的豆荚和叶片中表达了乙肝表面抗原, 并经美国 FDA 批准第一次组织了人类转基因植物疫苗乙肝表面抗原的临床实验(Kapusta, 1999; Anmich, 2001)。二次免疫两周后, 试验组 2/3 人体内 IgG 抗体水平有明显的增加, 二次免疫四周后 IgG 抗体水平开始下降, 到第十二周不再下降。在首免后二十周内, 服用转基因莴苣的志愿者没有表现出药物的副作用。

1.4.3 诺沃克病毒衣壳蛋白 (NVCP) 在植物中的表达

诺沃克病毒是病毒性胃肠炎的主要病原, Mason 等研究了 NVCP 在转基因烟草和马铃薯中的表达及口服免疫原性, 发现转基因烟草中表达的 NVCP 与杆状病毒表达的 NVCP 具有相似的物理学特性。转基因烟草的叶提取物中 rNVCP 也可以组装成直径 38nm 的病毒样颗粒, 在蔗糖密度梯度离心及 SDS/PAGE 中的物理特性与杆状病毒在昆虫细胞中表达的重组蛋白相似。rNVCP 在叶中的表达量最高可达总可溶性蛋白的 0.23%, 在马铃薯块茎中可达 0.37%, 烟草中的 NVCP 以病毒样颗粒存在, 转基因马铃薯块茎中的 NVCP 仅有一半以颗粒状存在。从叶片中提取的 rNVCP 灌服小鼠(在 1, 2, 11, 28 天灌服, 剂量 10~80 μ g)进行口服免疫试验, 或用土豆块茎直接饲喂小鼠(在相同的时间每次饲喂 4g 去皮土豆, 含 40~80 μ g NVCP 蛋白), 均可产生特异性血清 IgG 和分泌性 IgA 抗体, 但在摄入同样剂量抗原的条件下, 强饲纯化过的抗原的小鼠产生的抗体水平比饲喂未加工的转基因马铃薯抗体水平高, 这可能是由于未加工的转基因马铃薯消化慢, 纯度低, 而纯化过的疫苗含有的病毒样粒子多, 并且病毒样粒子在消化道内稳定, 容易被 M 细胞捕获并递

呈给位于 Peyer 氏结的淋巴细胞 (Mason et al,1996)。

Tacket 等报道转基因马铃薯表达的 NVCP 能装配成病毒样颗粒(Tacket et al,2000), 并用它作抗原进行试验, 以确定它能否诱导人体产生免疫应答。20 位成年自愿者食用了相当于小鼠 2 到 3 倍剂量的转基因马铃薯, 另 4 人口服野生型马铃薯, 试验结果显示 20 个食用了含有诺沃克病毒核衣壳蛋白转基因马铃薯的自愿者有 19 人产生了免疫反应, 95%的志愿者产生特异性 IgA 抗体, 20%的自愿者产生特异的血清抗体 IgG, 6%的志愿者粪便中检测到特异的 IgA 抗体。

目前为止仅有以上三种抗原进行了植物来源的口服疫苗的人体试验, 结果都证实, 植物细胞确实能够为免疫原顺利通过消化道提供保护, 免疫原在无需佐剂的情况下也会诱导机体产生系统和黏膜的免疫反应, 并且转基因的植物组织被食用后也没有不良的副反应(Gerber et al,2001; Biemelt et al,2003;Heribert et al 2003)。

1.4.4 猪传染性胃肠炎病毒 S 糖蛋白 (TGEV-S) 在植物中的表达

Gomez 等用 TGEV-S 蛋白 N 端 cDNA 或全长 cDNA 获得了转基因芥菜和马铃薯, 在叶浸提物中, 表达的外源蛋白占可溶性总蛋白的 0.03%~0.06%, 两种 cDNA 表达水平没有明显区别。用叶浸提物经肌肉注射免疫小鼠, 在 0, 15, 30 天各一次, 每次含总蛋白为 40mg, 结果表明免疫小鼠可产生特异性血清抗体, 并在蚀斑减少试验中表现了中和活性(Gomez et al,1998)。此后 Gomez 等人进一步将 TGEV 的纤突蛋白基因在马铃薯中表达, 并进行口服免疫小鼠试验, 证实马铃薯表达的纤突蛋白能刺激小鼠产生良好的免疫应答反应 (Gomez et al,2000)。Tuboly 等对 TGEV-S 蛋白基因进行了改造和选用强启动子, 获得三个转基因植株系, 转基因植物 S 基因表达产物用酶联免疫反应(ELISA)和 Western Blotting 检测表明其大小与预期结果一致, 并发现三个转基因植株系的基因表达量比 Gomez 等早期的报道高出 5~10 倍, 即转基因植物 S 蛋白表达量占总可溶性蛋白的 0.1%~0.2%, 且它们最终抗体滴度类似。用转基因叶片提取物经肌肉注射免疫小猪, 每周取血样, 用病毒中和试验和 ELISA 检测, 发现可产生 TGEV 特异性抗体, 中和抗体效价为 1:8, ELISA 效价达 1:320 以上(Tuboly et al,2000)。

Streatfield 等用玉米对 TGEV 的纤突蛋白进行高效表达, 表达产物与 TGEV 弱毒活苗在平行条件下饲喂免疫仔猪, 然后用 TGEV 标准致病毒株进行攻毒, 证实转基因疫苗对仔猪的免疫保护效果优于 TGEV 弱毒苗(Streatfield et al,2001)。

1.4.5 口蹄疫病毒 (FMDV) 结构蛋白 VP1 在植物中的表达

Carrillo 和 Wigdorovitz 用 FMDV VP1 蛋白基因转化拟南芥及烟草, 获得了转基因植株, 用含有重组 VP1 的叶片浸提物免疫小鼠, 可诱导产生特异性抗体, 这种抗体不仅能与 VP1 发生反应, 而且也能与完整的 FMDV 颗粒反应, 所有的免疫小鼠都抵抗了 FMD 强毒的攻击, 而未免疫或用空载体转化的植株免疫的小鼠全部感染发病(Carrillo et al,1998; Wigdorovitz et al,1999)。Wigdorovitz 等在此基础上, 将 FMDV VP1 结构蛋白基因转化苜蓿, 也获得转基因植株, 用转基因苜蓿的叶片浸提物腹腔注射小鼠, 或用新鲜叶片直接饲喂免疫, 均可诱导产生特异性免疫应答, 腹腔注射免疫的小鼠保护率达 77~80%, 饲喂免疫的小鼠保护率达 66~75%(Wigdorovitz et

al,1999;Carrillo et al,2001), 在筛选出的 4 株高表达的转基因苜蓿中, VP1 与 GUS 融合基因在苜蓿中的表达量占总可溶性蛋白的 0.05~0.1%, 免疫小鼠抗强毒攻击的保护率达 100%(Dus Santos et al,2002), 2005 年该研究小组又将 FMDV 衣壳蛋白 P1 与非结构蛋白 2A、3C 连接, 在转基因苜蓿得到表达, 免疫小鼠抗强毒攻击的保护率达 100%, 这一结果支持转基因牧草生产可饲化疫苗的观点(Dus Santos et al,2005)。

1.4.6 狂犬病病毒糖蛋白 (G 蛋白) 在植物中的表达

Modelska 等首次报道了植物病毒表达的疫苗经口服免疫后引起黏膜免疫应答, 在该实验中重组的苜蓿花叶病毒表达了狂犬病毒表面抗原, 一种免疫方式是把纯化的病毒颗粒灌注入消化道, 另一种方式是用病毒感染的菠菜叶饲喂小鼠, 灌注小鼠所用的抗原量是饲喂小鼠的 10 倍, 然而经饲喂小鼠的抗病毒 IgA 水平却是消化道灌注免疫小鼠的 2 倍。一个合理的解释是: 植物细胞的细胞壁和细胞膜起到一个很好的生物胶囊的作用, 以保护细胞内的免疫原经过食道、胃组织时不被消化液消化掉, 当到达小肠组织时, 细胞壁和细胞膜已慢慢开始降解, 里面的免疫原就释放出来被 M 细胞识别, 然后转运给 APC 细胞, 从而成功地达到口服免疫的效果。胃插管给药时含免疫原的植物材料细胞壁还未降解已到达小肠, 多数免疫原无法及时释放出来发挥效应就被排出体外。一系列的动物实验证明植物表达系统所生产的免疫原具有抗原性, 确证了口服转基因植物疫苗的可行性(Modelska et al,1998; Rose et al,1999)。

1.5 转基因疫苗存在的问题及未来研究的展望

1.5.1 外源基因在植物中表达量低

在稳定表达系统中, 外源基因所表达的重组蛋白, 大约只占植物中总可溶性蛋白的 0.01%~0.37%, 这个表达量作为疫苗生产系统来讲比较低, 如何提高转基因植物中目的蛋白的含量是今后研究的主要方向。转基因植物表达中, 限制重组蛋白表达量的因素归纳起来主要有三点: (1) 转化宿主和表达体系固有的特性; (2) 重组蛋白的稳定性; (3) 转基因表达的水平。主要包括启动子的活性和特异性, mRNA 的稳定性及翻译效率等(Sala et al,2003)。针对以上几点, 研究者进行了多方面的探索, 也取得了很大进展, 解决的策略主要包括: 选用强启动子和增强子、优化基因的密码子、利用表达产物的细胞定位以及在植物种子或特异组织中积累从而提高目的蛋白的表达量(Walmsley, 2000;Ma,2001;Koprowski et al,2001)。

1.5.1.1 使用植物偏爱密码子

对外源基因进行密码子的优化, 尽量使用植物偏爱密码子是克服转基因沉默、增强外源基因的翻译效率、提高表达量的策略之一。例如 Mason 对转基因进行了适当的修饰, 选用了植物表达的偏爱密码子, 结果大大提高了 LT-B 在植物中的表达水平(Mason et al,1998)。为了使外源基因适于在植物中表达, 必要时需重新合成外源基因, 苏云金芽孢杆菌(BT)的 cry 基因原来在植物中的

表达水平是很低的,其蛋白在总蛋白中的含量低于 0.001%,对此基因的序列分析表明其 AT 含量很高,在植物中表达时会遇到许多困难,因为富含 AT 的序列在植物中往往代表着多聚腺苷酸化 (polyA)位点、潜在的内含子、稀有密码子及 RNA 中的不稳定序列等,这样就造成了富含 AT 的基因编码的 RNA 在植物中不稳定,剪接不正确及翻译的效率低等问题。Perlak 等人重新合成了 cryIA(b)基因序列,将其 AT 含量由 63%降至 51%,使其蛋白的积累比未改造前提高了 100 倍(Perlak et al,1997)。

1.5.1.2 优化先导序列、提高翻译效率

提高翻译效率同样是调控外源基因表达的重要环节,5'端的翻译先导序列对翻译效率起着重要作用。在翻译起始时,先导序列与核糖体结合,形成适当的结构识别起始密码子。Kozak(Kozak, 1987)认为真核核糖体进行翻译的起始部位的共有序列是:GCCGCCA⁻³/GCCA¹UGG⁴。但在实际预测中,只需考虑-3 和+4 的位置即可判断起始密码子起始功能的强弱。只要-3 位出现嘌呤,那么若在其他位置上出现偏离共有序列的情况只会轻微影响起始效率,如果-3 位不出现嘌呤,那么+4 位上的 G 就成为有效地进行翻译所必不可少的条件,而且这时其他邻近核苷酸的贡献也相对显著。对植物来说近年来已经形成一个比较理想的翻译起始序列,即 AACAAUGGC,而动物细胞则是 CACCAUG。

1.5.1.3 利用表达产物的细胞定位

外源蛋白积累在一些细胞器中或分泌出细胞外,也可以有效地提高蛋白的积累量,因为这些区域蛋白酶含量很少,所以蛋白质积累在此比较稳定,而且蛋白质的区域化积累和富集也有利于对其进行提取。可供选择的区域有内质网、叶绿体及细胞内非原生质间隙处(Kuroda et al,2001;Daniell et al,2002;)。人们已经发现内质网(ER)对植物抗体的组装很重要,这很可能是因为一些促进蛋白折叠与分子间交联的酶类,如一些分子伴侣和蛋白质二硫键异构酶都集中在内质网腔中,当对所需要折叠与组装的轻链或重链蛋白加上一段信号肽使其导向内质网,植物可表达并组装出有活性的全长抗体,一旦两者任一个缺少导向内质网的信号肽,植物中就不能组装出有功能的全长抗体(Sandhu et al,1999)。如王新国等研究人员在转基因烟草中(王新国等,2000)将霍乱毒素 B 亚基(CTB)基因的 3' 端引入一段内质网引导多肽 SEKDEL,从而大大提高了重组蛋白的含量,但遗憾的是目前对内质网定位的研究仍较多停留在 KDEL 序列上。

1.5.1.4 利用植物种子或特异组织中积累提高目的蛋白的表达量

植物组成型启动子引导目的基因在植物的各组织中均有表达,这会消耗植物内源的物质和能量,可能会给植物的正常生长带来一些不利的影响。而组织特异性启动子也称为器官特异性启动子,在这些启动子调控下,基因的表达往往只发生在某些特定的器官或组织部位,目前已发现这类启动子中一般同时存在几种控制组织特异性表达的元件,其表达特异性由这些元件的种类、数目及相对位置等共同决定。利用组织特异性启动子调控基因表达,不仅可提高目的基因在这些部

位的表达量,将生物能耗降到最低,而且有利于表达产物的分离。一个典型的组织特异性启动子是马铃薯块茎启动子,通常只在块茎中表达,有时也在茎秆和根系中表达,但不会在叶片中表达。例如 Mason 用马铃薯块茎特异启动子驱动 NVCP 在转基因马铃薯块茎中表达,结果表达的 NVCP 的最高含量为可溶性蛋白量的 0.37%,明显高于外源基因在烟草叶片中的表达水平(Mason et al,1996)。

其他一些植物组织特异性启动子有:番茄果实成熟特异性表达的多聚半乳糖醛酸酶启动子、花粉特异表达启动子、大豆种子特异性启动子等。农作物的种子胚部分含有丰富的可溶性蛋白,重组蛋白表达量较高,并且能够长期保存,作为动物疫苗极适合饲喂免疫,并且种子蛋白比较容易分离纯化,这样便能够浓缩重组抗原蛋白,是非常理想的重组蛋白的生产载体,已有关于将外源基因在植物种子中表达生产重组蛋白的报道(Van Rooijen et al,1995;陈章良,1993)。Moloney 等人建立的油体蛋白分配系统也很成功,油体蛋白是在许多植物种子中特异表达的蛋白,它具有很强的亲脂性,可以与种子中储存脂类物质的油体结合(Moloney,2003)。利用这一特性,将油体蛋白的启动子和部分编码区与 GUS 融合表达,融合后的蛋白仍有 GUS 活力,对 GUS 酶活性的检测证明,至少 85%的融合蛋白分布在油体上,外源蛋白被油体蛋白锚定在油体上,其提取、纯化就变得很容易了,可以用简单的离心、洗涤的方法得到融合蛋白,再用蛋白酶将外源蛋白切出。这种方法已成功表达并提纯了抗凝血药物水蛭素,并已接近实用生产阶段(Ben et al,2004;Kuhnel 2003;Abell et al,2002)。

1.5.2 如何建立高频再生的遗传转化受体系统是制约研究者开发有应用前景的可饲疫苗的“瓶颈”

目前,受体系统中存在的问题是:再生频率低,基因型依赖性强,再生细胞部位与转化感受态细胞部位不一致,对农杆菌侵染不敏感,还有的植物对农杆菌侵染发生过敏反应导致感染部位的褐化死亡等,如何建立高频再生的基因转化受体系统是制约研究者开发有意义、有应用前景的可饲疫苗的“瓶颈”。此外,转基因植物种类的拓展对今后植物可食(饲)疫苗的商业化应用有着重要影响,目前,转基因疫苗的受体大多集中在烟草、马铃薯、拟南芥等少数植物上,烟草作为模式植物,遗传背景研究得较为清楚,基因表达系统已特征化,而且易于种植并大量供应,但烟草不能直接食用,且烟草中含有尼古丁等一些有害人体健康的生物碱,不能用于口服免疫。马铃薯是生产可食化疫苗的典型植物,易于转化,有块茎特异性表达启动子,但蛋白质含量低而且又不能生吃,烹饪又会使重组蛋白变性,造成疫苗失活,如果转基因疫苗表达在植物不能食用部位,要从中提纯疫苗则困难较多。因此提高转化效率,建立高效的基因转化系统仍然是有待解决的问题。近几年来用番茄、黄瓜、香蕉等植物生产人用疫苗已成为一个研究热点(Ma et al,2003),Ruf 报道了外源基因在番茄果实中的表达量占可溶性总蛋白的 20%,这为利用番茄表达系统高效生产口服疫苗、药剂、抗体提供了理想的技术平台(Ruf et al,2001)。对动物疫苗来说,其首选宿主就是作为饲料的谷类,如苜蓿、玉米和豆类等作物,种植广泛、产量高、种子中蛋白相当丰富,作为动物疫苗极适合饲喂免疫,如 TGEV 的 S 蛋白在转基因玉米种子中高水平表达。但缺点是转化效率不高,5~6 个月才能得到有限的种子。预计未来的转基因宿主将处在不断的筛选与优化之中,呈现多样化的局面,从而满足不同的需要。

1.5.3 转基因植物疫苗的免疫原性问题

尽管转基因疫苗安全性好、生产成本低,但是免疫原性较差,提高转基因疫苗的免疫原性是发展此类疫苗的当务之急,不解决这个问题,转基因疫苗将没有发展前途。有两个因素应该考虑:一是植物本身可能含有一些因素会影响或干扰重组蛋白的免疫原性,这需要进一步研究,并找出解决途径;二是重组蛋白在经历胃肠消化酶的作用后,重组蛋白可能发生降解和破坏,从而影响免疫原性,解决途径是将抗原基因与优良的黏膜免疫佐剂联合使用,黏膜免疫佐剂一般来源于细菌的毒素和免疫原,如霍乱毒素 B 亚单位(CT-B)和大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位(LT-B),它们往往与黏膜细胞表面的糖脂和受体特异结合,可较长时间停留在消化系统,进而激活机体的黏膜免疫系统(Yu et al,2001;Nemchinov et al,2000)。另外一个提高免疫原性的策略是将抗原蛋白组装成病毒样颗粒(virus-like particle,VLP)的有序结构,从而在穿过胃液低 pH 的环境后,这些颗粒仍能保持完整,增强免疫原的抗消化作用(Biemelt et al,2003;Warzecha et al,2003)。病毒样颗粒通常由两个或更多的蛋白质组成,不含有病毒核酸的空壳结构,这些衣壳表面有构象依赖表位,可通过和病毒感染一样的途径呈递给免疫系统,能有效地诱导产生中和抗体和其它保护性免疫反应。目前,已证实转基因烟草和马铃薯中表达的人乳头瘤病毒、诺沃克病毒、乙肝病毒的主要衣壳蛋白能够组装成病毒样颗粒,这为转基因疫苗的研究提出了一个新的思路(Streatfield et al 2003)。至今唯一成功的基因工程亚单位疫苗是乙肝表面抗原疫苗,其成功的原因是由于表面抗原可以形成病毒样颗粒,具有良好的免疫原性。

1.5.4 转基因疫苗可能引起免疫耐受

一个值得关注的问题是:是否本来应该增强免疫应答的疫苗不仅没起到增强作用反而抑制免疫应答,几次使用某些蛋白后,可导致机体对这些蛋白的免疫应答停止。食用转基因植物疫苗是否会诱导免疫耐受,尚待进一步研究。

总之,已有的研究表明转基因口服疫苗是安全可行的,具有其它疫苗不可替代的优点。尽管这项技术现在还面临着许多障碍,但它所显示出的诱人前景吸引着越来越多的免疫学家、分子生物学家和植物学家投身于这个领域,随着科学家们的共同努力和这项技术的不断完善,必将生产出各种有实用价值的转基因口服疫苗。

1.6 本研究的目的及意义

FMDV 自然条件下的感染途径主要经动物呼吸道和消化道的黏膜进入机体,极微少的病毒就可致病,通常 1 到 10 个感染性的病毒颗粒就能引起该病发生(Donaldson et al,1987;Seller et al,1971),因此对易感动物进行黏膜免疫保护是非常重要的。当今有关动物黏膜免疫疫苗的研究也已成为预防医学的前沿课题之一,研发 FMD 黏膜免疫疫苗具有重要的理论意义和应用价值。而且通过直接食用 FMD 转基因植物进行饲喂免疫是一种新思路,有着良好的应用前景。

到目前为止所进行的 FMD 转基因疫苗的动物免疫试验都是以 BalB/C 小鼠为动物模型,未见对免疫豚鼠或本动物报道,因此本研究的目的是将 FMDV 结构蛋白 VP1 基因及衣壳蛋白 P1、非

结构蛋白 2A、蛋白酶 3C (P12X3C) 基因与植物组成型启动子相连, 构建植物组成型表达载体, 通过农杆菌介导方法转化番茄, 使外源基因整合到转基因番茄的基因组中并得以表达, 将 ELISA 检测阳性的转基因番茄叶片的蛋白粗提物免疫豚鼠, 检测豚鼠体内抗 FMD 特异性抗体的消长动态及用 100ID₅₀ 的强毒攻击后免疫豚鼠抗强毒保护力, 为今后转基因疫苗的动物试验提供实验数据, 为生产价廉、安全、方便的可饲疫苗探索出一条可行的路子。另外将 FMDV VP1 基因与植物种子特异性启动子相连, 构建组织特异性表达载体, 通过农杆菌介导的浸花法 (floral dip) 转化拟南芥, 使外源基因整合到转基因拟南芥的基因组中, 并在特定的器官或组织部位得以表达。为下一步向豆科植物种子(如大豆)或谷类种子 (如玉米)中生产 FMDV 可饲疫苗建立技术平台, 为更好地预防口蹄疫做一些基础性的有价值的工作。

用植物生物反应器生产疫苗是当今研究的一个热点, 由于植物易于转化并能提供廉价的蛋白质源, 因此绿色疫苗的生产具有相当大的潜能。一些生物技术公司正在积极拓展这个领域的研究、申请专利以及进行绿色抗原的药理学试验, 随着转基因技术和基因改造技术的进步, 绿色疫苗将带来传统农业本质上的变革。从长远观点来看, 植物作为生产新型疫苗的反应器, 代表了新一代不用打针就可以进行免疫的疫苗, 而且其安全、经济的诱人前景在未来的疫苗和药物生产中可能占一定的地位。目前, 研究转基因植物基因工程疫苗最多的国家是美国, 几例进入临床研究阶段的转基因植物疫苗都是由美国大学及研究所研制, 我国对转基因植物基因工程疫苗也进行了一些相关研究, 如果我们能够成功开发利用这一生产体系, 研制成功一种不需操作活病毒粒子、更安全、更有效的绿色 FMD 疫苗, 使我们在未来绿色疫苗的领域中占有一席之地, 最终为疾病的预防与治疗奠定理论基石, 这不仅具有重大的理论意义, 而且对提升我国的国际声誉具有重要的政治经济意义。

表 1-1 在转基因植物中表达的具有代表性的亚单位疫苗
Table 1-1 Subunit vaccine candidates expressed by transgenic plants

病原/宿主	表达蛋白	转化受体	表达水平	疫苗的免疫原性和保护性	参考文献
链球菌	表面抗原	烟草	0.02%TSP/	小鼠口服免疫具有免疫原性	Curtiss 等,1990
细胞合胞体病毒/人	F 蛋白	番茄	0.01%FW	口服产生免疫原性	Belanger 等,2000
肠毒素性大肠杆菌/人类、牲畜	不耐热性肠毒素 B 亚单位	烟草	0.001%TSP/ 0.0002%FW	小鼠口服免疫具有免疫原性	Haq 等,1995
肠毒素性大肠杆菌/人类、牲畜	不耐热性肠毒素 B 亚单位	马铃薯块茎	0.2%TSP/ 0.001%FW	小鼠和人口服免疫具有免疫原性和保护性	Haq 等,1995;Mason 等,1998;Tacket 等,1998;Lauterslager 等,2001
肠毒素性大肠杆菌/人类、牲畜	CT-B	玉米种子	10%TSP/ 0.1%FW	小鼠口服免疫具有免疫原性和保护性	Streatfield 等,2001,2002,2003;
霍乱弧菌/人类	CT-B	马铃薯块茎	0.3%TSP/ 0.002%FW	小鼠和人口服免疫具有免疫原性和保护性	Arakawa 等,1997,1998
霍乱弧菌/人类	霍乱全毒素	烟草	4%TSP/ 0.5%FW	组装成完整的霍乱全毒素	Daniell 等,2001
霍乱弧菌/人类	CT-B	番茄	0.04%TSP/ 0.005%FW	小鼠和人口服免疫具有免疫原性和保护性	Jani 等,2002
人巨细胞病毒	糖蛋白 B	烟草种子	0.01%TSP/ 0.00007%FW		Tackaberry 等,1999
乙肝病毒/人类	膜表面抗原	烟草	0.007%TSP/ 0.0008%FW	小鼠腹腔免疫具有免疫原性	Mason 等,1992;Thanavala 等,1995
乙肝病毒/人类	膜表面抗原	马铃薯块茎	0.002%FW	小鼠口服免疫具有免疫原性	Richter 等,2000;Kong 等,2001
乙肝病毒/人类	膜表面抗原	羽扇豆	0.00002%FW	小鼠和人口服免疫具有免疫原性	Kapusta 等,1999
乙肝病毒/人类	膜表面抗原	莴苣	< 0.00002%FW	小鼠和人口服免疫具有免疫原性	Kapusta 等,1999
丙肝病毒/人类	VP1 与 CT-B 融合蛋白	烟草	0.07%TSP/ 0.005%FW	具有免疫原性	Nemchinov 等,2000;

诺沃克病毒/人类	衣壳蛋白	烟草	0.2%TSP/ 0.03%FW	能形成病毒样颗粒, 具有口服免疫原性	Mason 等,1996;
诺沃克病毒/人类	衣壳蛋白	马铃薯块茎	0.4%TSP/ 0.003%FW	能形成病毒样颗粒, 小鼠和人具有口服免疫原性	Mason 等,1996;Tacket 等,2000
人免疫缺陷病毒/人	gp41 蛋白	豌豆花叶	2%VPW/ 0.002%FW	小鼠皮下、口服免疫均具有免疫原性	McLain 等,1996;Durrani 等,1998;McInerney 等,1999;Porta 等,1994
人免疫缺陷病毒/人	gp41 蛋白	烟草	0.03%FW	小鼠皮下免疫具有免疫原性	Joelson 等,1997; Yusibov 等,1997
人免疫缺陷病毒/人	核衣壳蛋白 p24	烟草	0.4%TSP/ 0.05%FW		Zhang 等,2000; 2002;
狂犬病毒/人、家畜、野生动物	糖蛋白	番茄	1%TSP/ 0.1%FW		McGarvey 等,1995
狂犬病毒/人、家畜、野生动物	糖蛋白	烟草	10%VPW/ 0.0005%FW	小鼠腹腔免疫、口服免疫均具有免疫原性和保护性,人口服后也具有免疫原性	Yusibov 等,1997;Modelska 等,1998; Yusibov 等,2002
口蹄疫病毒/牲畜	结构蛋白 VP1	拟南芥		小鼠腹腔免疫具有免疫原性和保护性,	Carrillo 等,1998
口蹄疫病毒/牲畜	结构蛋白 VP1	苜蓿	0.004%TSP/ 0.0005%FW	小鼠腹腔免疫、口服免疫均具有免疫原性和保护性,	Dus Santos 等,2002;Wigdorovitz 等,1999;
口蹄疫病毒/牲畜	结构蛋白 VP1	马铃薯	0.01%TSP/ 0.001%FW	小鼠腹腔免疫具有免疫原性和保护性,	Carrillo 等,2001
口蹄疫病毒/牲畜	全衣壳蛋白 P1-3C	苜蓿		小鼠腹腔免疫具有免疫原性和保护性,	Dus Santos 等,2005
传染性胃肠炎病毒/猪	S 糖蛋白	拟南芥	0.06%TSP/ 0.008%FW	小鼠肌肉注射具有免疫原性	Gomez 等,1998
传染性胃肠炎病毒/猪	S 糖蛋白	马铃薯	0.07%TSP/ 0.0005%FW	小鼠腹腔免疫、口服免疫均具有免疫原性	Gomez 等,2000
传染性胃肠炎病毒/猪	S 糖蛋白	玉米种子	2%TSP/ 0.02%FW	猪口服免疫具有免疫原性	Streatfield 等,2001;Lamphear 等,2002
传染性胃肠炎病毒/猪	S 糖蛋白	烟草	0.2%TSP/ 0.03%FW	猪腹腔内免疫具有免疫原性	Gomez 等,2000

TSP: 总可溶性蛋白, FW: 鲜重, VPW: 病毒颗粒重

第二章 口蹄疫病毒 O/China/99 株植物双元表达载体的构建

由于植物表达系统具有真核生物蛋白合成途径、可直接食用以及廉价安全等特点,正逐渐引起人们的关注(Mason et al,1992;Haq et al,1995)。近几年国内外利用转基因植物表达 FMDV VP1 抗原蛋白的研究也有报道,阿根廷的一个研究小组将 FMDV 的 VP1 基因或 VP1 部分编码基因分别转入拟南芥、马铃薯和苜蓿,用转基因植物叶片注射或饲喂实验动物均获得了一定的攻毒保护(Carrillo et al,1998;2001; Wigdorovitz et al,1999; Dus Santos et al,2002)。虽然相对于完整病毒粒子而言,结构蛋白 VP1 的抗原性要弱,但已有的研究显示,VP1 上集中了较多的抗原位点,由 VP1 的 G-H 环(141-160 位残基)和 C 端 200-213 位残基组成的抗原位点 1 是病毒诱导抗体产生的主要成分,环上的氨基酸包含能刺激免疫反应的 T、B 细胞表位。此外,由于 FMDV 空衣壳包含较多的抗原位点,与完整病毒粒子具有相似的抗原性,能够诱导与感染性 FMDV 粒子相同的免疫反应,因此理论上空衣壳对于 FMD 新型疫苗的研制是一个很好的选择(Rowland et al,1975),另外,16 个氨基酸的多肽 2A 具有蛋白酶活性,3C 蛋白酶能够保证前体蛋白 P1-2A 正确裂解成 VP0、VP3 和 VP1,这些蛋白能够自我组装成二十面体的核衣壳。基于以上研究成果,本研究分别构建了包含有 FMDV O/China/99 株结构蛋白 VP1 基因的植物表达载体 pBin438/VP1 及衣壳蛋白 P1、非结构蛋白 2A、3C 以及部分 2B 基因的植物表达载体 pBin438/P12X3C,并对鉴定的阳性重组质粒进行序列分析,最后通过三亲交配法(王关林等,2002)将 pBin438/VP1、pBin438/P12X3C 质粒分别导入根癌农杆菌 GV3101,成功构建了两个分别包含 FMDV 结构蛋白 VP1 基因及全衣壳蛋白 P12X3C 基因的植物双元表达载体,为 FMD 可饲疫苗的研制奠定基础。

2.1 材料和方法

2.1.1 质粒和菌株

FMDV O/China/99 株结构蛋白 VP1 基因的质粒 pGEM/VP1 由本室保存, FMDV O/China/99 株衣壳蛋白 P1、非结构蛋白 2A 及部分 2B 基因的质粒 pGEM/P12X 及蛋白酶 3C 基因的质粒 pGEM/3C 由笔者在前期实验工作中获得。根癌农杆菌 GV3101、辅助质粒 pRK2013 和植物组成型表达质粒 pBin438 由中国农业科学院作物所、中国科学院微生物所馈赠, pUC18 DNA 载体购自大连宝生物工程有限公司产品, JM109 由本实验室保存。

2.1.2 主要试剂

Taq 酶, La Taq 酶, dNTP, 低熔点琼脂糖均为 Promega 公司产品。RNA 酶(RNase)、限制性内切酶 BamH I、Spe I、Sal I, DL2000 Marker、Agarose Gel DNA Extraction Kit 购自大连宝生物工程有限公司。100bp DNA Ladder Marker、Low Range II Marker 购自上海生工生物工程有限公司。氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、链霉素(Str)、利福平(Rif)为拜尔迪生物技术有限公司。

2.1.3 主要仪器

超净台、高速冷冻离心机、台式高速离心机、PCR 扩增仪(MJ research)、水平式电泳仪、凝胶成像系统、电子天平、恒温箱、恒温摇床、电热恒温水浴锅及微波炉。

2.1.4 FMDV VP1 基因植物双元表达载体的构建

pBin438/VP1 植物表达载体的构建策略见图 2-1。

2.1.4.1 表达引物的设计与合成

根据植物组成型表达质粒 pBin438 的限制性酶切位点及已经测定的 FMDV VP1 基因的核苷酸序列, 设计如下引物:

VPR1: 5' -TAGGATCCAACAATGACCACCTCCACAGGCGAGCCGGCTGAC-3'

引入 *Bam*H I 酶切位点、*Kozak* 序列;

VPR2: 5' TCCGTCGACTAGCTCATCTTTCTCAGACAAGAGCTGTTTCACAGGCGCCAC-3'

引入 *Sal*I 酶切位点及内质网引导多肽 SEKDEL。

2.1.4.2 PCR 扩增 VP1 基因

以质粒 pGEM/VP1 为模板, 以 VPR1 和 VPR2 为引物进行 PCR 扩增反应, 反应体系如下:

扩增体系	总体积 100 μ L
灭菌双蒸水	72.5 μ L
10 \times PCR buffer	10 μ L
MgCl ₂ (25mmol/L)	6 μ L
dNTP (2.5mmol/L)	8 μ L
VPR1 (50pmol/L)	1 μ L
VPR2 (50pmol/L)	1 μ L
模板	1 μ L

混匀, 于 95 $^{\circ}$ C 水浴变性 10min, 冷却后加入 *Taq* DNA 聚合酶(5u/ μ L)0.5 μ L, 放入 PCR 自动扩增仪进行扩增, 扩增程序为 55 $^{\circ}$ C 60s、72 $^{\circ}$ C 90s、94 $^{\circ}$ C 60s, 28 个循环后, 55 $^{\circ}$ C 60s、70 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 以标准 DNA Marker 作为分子质量参照物, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检查所扩增产物的分子大小。

2.1.4.3 PCR 产物的回收(用生工的 DNA gel extraction kit)

- 1) 用琼脂糖凝胶电泳将目的 DNA 片段与其它 DNA 尽可能分开, 然后用于净的手术刀切下含所要回收 DNA 的琼脂块, 放入 1.5mL 离心管;

- 2) 按每 100mg 琼脂糖凝胶加入 400 μ L Binding Buffer, 置于 50~60 $^{\circ}$ C 水浴 10min, 使胶彻底融化, 加热融胶时, 每 2min 振荡混匀一次;
- 3) 将 UNIQ-5 柱放入 2mL 收集管中, 将融化的胶溶液转移到 UNIQ-5 柱中, 室温放置两分钟, 8000rpm, 室温离心 1min;
- 4) 取下 UNIQ-5 柱, 倒掉收集管中的废液, 将 UNIQ-5 柱放入原收集管中, 加入 450 μ L Wash Solution, 8000rpm, 室温离心 1min;
- 5) 重复步骤 4;
- 6) 取下 UNIQ-5 柱, 倒掉收集管中的废液, 将柱放入原收集管中, 室温 12 000rpm, 1min;
- 7) 将柱放入一新的 1.5mL eppendorf 管中, 在柱子中央加入 30 μ L Solution Buffer, 室温或 37 $^{\circ}$ C 放置 2min。提高洗脱温度有利于提高 DNA 洗脱效率;
- 8) 12 000rpm, 1min, eppendorf 管中的液体即为回收的 DNA 片段, 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

2.1.4.4 纯化的 PCR 产物双酶切及切胶回收

回收的 PCR 产物用 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 酶切体系如下:

酶切体系	总体积 20 μ L
10 \times T buffer	3 μ L
纯化后的 PCR 产物	10 μ L
<i>Bam</i> H I	1 μ L
<i>Sal</i> I	1 μ L
灭菌双蒸水	5 μ L

混匀后, 稍离心, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中酶切 2h。酶切消化后, 以 1%的琼脂糖凝胶电泳检查消化结果, 将正确的酶切产物按照凝胶回收试剂盒说明进行回收, 具体操作见 2.1.4.3。

2.1.4.5 pBin438 质粒的扩繁、提取、酶切及纯化

将含有 pBin438 质粒的 JM109 单菌落用无菌牙签挑取接种到 5mL LB 液体培养基(含 100 mg/L Kan)中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养约 12 小时至对数生长期。用碱裂解法提取质粒, 操作步骤如下:

- 1) 取培养好的菌液 1.5mL, 5000rpm 离心 2min, 弃上清, 将离心管倒置使上清液全部流尽;
- 2) 用 100 μ L solution I 充分悬浮菌体细胞, 室温放置 5min;
- 3) 加入 200 μ L 新配制的 solution II, 盖紧瓶盖, 缓缓地颠倒离心管数次, 以充分混匀内容物, 冰浴 5~10min;
- 4) 加入 150 μ L 预冷的 solution III, 倒置温和振荡, 冰浴 5~10min, 此时应形成白色絮状沉淀;
- 5) 加等量的酚:氯仿, 振荡混匀, 用微量离心机于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000rpm 离心 2min, 将上清转移到另一离心管中;
- 6) 取上层水相, 加 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠(pH5.2)和 2 倍体积的预冷无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 1h, 4 $^{\circ}$ C 12 000rpm 离心 20min, 去上清, 沉淀用冰冷的 70%乙醇洗涤, 4 $^{\circ}$ C 12 000rpm

离心 5min, 去上清, 干燥;

7) 用 50 μ L 含无 DNA 酶的胰 RNA 酶(20 μ g/mL)的 TE 溶解沉淀, 贮存于-20 $^{\circ}$ C。

pBin438 质粒的酶切体系如下:

酶切体系	总体积 40 μ L
10 \times T buffer	6 μ L
pBin438	16 μ L
<i>Bam</i> H I	1.5 μ L
<i>Sal</i> I	1.5 μ L
灭菌双蒸水	15 μ L

混匀后, 稍离心, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中酶切 4h, 然后用 0.8%琼脂糖凝胶电泳。

酶切产物的切胶回收同 2.1.4.3。

2.1.4.6 pBin438 质粒和 VP1 基因酶切产物的连接和转化

2.1.4.6.1 连接体系如下:

连接体系	总体积 10 μ L
pBin438 酶切产物	1 μ L
VP1 基因酶切产物	3 μ L
2 \times Ligase buffer	5 μ L
T4 DNA Ligase(3u/ μ L)	1 μ L

混匀后稍离心, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜或者 16 $^{\circ}$ C 连接 2h。

2.1.4.6.2 感受态细胞制备(CaCl₂ 法, 以下步骤均在严格无菌条件下进行)

- 1) -70 $^{\circ}$ C 保存的大肠杆菌 JM109 接种到 LB 固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C 培养 16~20h;
- 2) 挑取新活化的菌落接种于 3mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 12h;
- 3) 取 500 μ L 菌液接种于 50mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 2.5h, 使 OD 值大约为 0.6;
- 4) 将培养液转入预冷的 50mL 离心管中冰上放置 10min, 在 4 $^{\circ}$ C 下 4 300rpm 离心 10min;
- 5) 弃上清, 加入 20mL 预冷的 0.1mol/L 的 CaCl₂ 溶液(滤菌器过滤除菌), 重悬沉淀, 冰浴 45min。4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 4 000rpm;
- 6) 弃上清, 倒置离心管控干残液, 用 2mL 预冷的 CaCl₂ 重悬沉淀, 每管 200 μ L 分装, -70 $^{\circ}$ C 或液氮中保存备用。

2.1.4.6.3 连接产物的转化(采用热激法进行连接产物的转化)

- 1) 取一管低温保存的感受态细胞, 冰上融化;
- 2) 加入 10 μ L 连接产物, 轻搅混匀, 冰浴 30min;
- 3) 42 $^{\circ}$ C 热击 90s, 迅速冰浴 3~5min;
- 4) 加入 800 μ L 液体 LB, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 1h, 使细胞复苏;
- 5) 4 000rpm 离心 2min, 弃部分上清, 剩余的重悬沉淀, 涂布于 LB 培养基(含 100mg/LKan),

正面向上放 30min, 待菌液完全被培养基吸收后倒置培养皿, 37℃培养 16~24h。

2.1.4.7 植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 的筛选与鉴定

2.1.4.7.1 碱法少量提取质粒

从转化平皿中挑选一单菌落, 接种于 5mL LB(Kan100mg/L)液体培养基, 37℃振荡培养 16~18 小时后, 碱裂解法提取质粒, 取 3μL 质粒经 0.8%琼脂糖凝胶电泳。

2.1.4.7.2 Mini-Ti 质粒的 PCR 鉴定

以可能重组的质粒为模板, 进行 PCR 鉴定, 空质粒 pBin438 为阴性对照, PCR 反应同 2.1.4.2。

2.1.4.7.3 Mini-Ti 质粒的酶切鉴定

以可能重组的质粒为模板进行 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切, 空质粒 pBin438 为阴性对照。方法同 2.1.4.4。阳性重组质粒命名为 pBin438/VP1。将筛选出的阳性质粒送大连宝生物工程有限公司进行自动化测序, 测序结果用 DNASTAR 软件分析。

2.1.4.8 三亲交配法将 Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 导入农杆菌 GV3101

2.1.4.8.1 三亲交配法

- 1) 接种受体农杆菌 GV3101 于 50mg/L 利福平、25mg/L 链霉素的 YEP 固体培养基上, 28℃培养至单菌落长出, 挑取一个单菌落接种在液体培养基中, 28℃振荡培养;
- 2) 接种含有“协助”质粒(pRK2013)的大肠杆菌在固体 LB 培养基上, 37℃培养至单菌落长出, 挑选一个单菌落接种在液体培养基中, 37℃振荡培养;
- 3) 挑选带有 Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 的大肠杆菌 JM109 单菌落在含有 Kan100mg/L 的液体培养基中 37℃振荡培养;
- 4) 三种菌生长到 OD 值为 0.5 左右时, 等体积混合, 28℃过夜培养;
- 5) 用接种环将菌液涂布在 YEB 固体培养基(100mg/L 卡那霉素、25mg/L 链霉素、50mg/L 利福平)28℃培养 2~3d, 直至长出单菌落;
- 6) 将长出的单菌落再次转接到含有 100mg/L 卡那霉素、25mg/L 链霉素、50mg/L 利福平的 YEP 培养基上, 28℃培养。将长出的菌落按常规的碱裂解法提取质粒。

2.1.4.8.2 双元表达载体的 PCR 鉴定

三亲交配后的转化子用碱裂解法提取质粒, 进行 PCR 鉴定。PCR 反应条件同 2.1.4.2。FMDV 结构蛋白 VP1 双元表达载体构建完成。

2.1.5 FMDV 多基因植物双元表达载体 pBin438/P12X3C 的构建

多基因植物表达载体 pBin438/P12X3C 的构建策略见图 2-2。

2.1.5.1 表达引物的设计与合成

根据植物表达质粒 pBin438 的限制性酶切位点及已经测定的 FMDVP12X、3C 片段的核苷酸序列, 设计如下引物:

P1 上游 (PR1): 5' -AGGGATCCAACAATGGTTCAGAAACGACTC-3' 引入 *Bam*H I 酶切位点、起始密码子 ATG 和 *Kozak* 序列等元件。

P1 下游 (PR2): 5'-GCACTAGTGATTGACATGTCCTCCTG-3', 引入 *Spe* I 酶切位点。

3C 上游 (3C1): 5'-CTACTAGTGGTGCTCCCCGACTGACTTGC-3' 引入 *Spe* I 酶切位点。

3C 下游 (3C2): 5'-ACGTCGACTAGCTCATCTTTCTCAGACTCGTGGTGTGGTTC-3' 引入 *Sal* I 酶切位点及内质网引导多肽 SEKDEL。引物由大连宝生物工程有限公司合成。

2.1.5.2 从质粒中扩增 P12X 基因及 3C 基因

以 PR1 和 PR2 为引物, 以 pGEM/ P12X 质粒为模板, 扩增 P1、2A 及部分 2B 基因。

扩增体系	总体积 100 μ L
灭菌双蒸水	78.5 μ L
10 \times PCR buffer	10 μ L
dNTP (2.5mmol/L)	8 μ L
PR1 (50pmol/L)	1 μ L
PR2 (50pmol/L)	1 μ L
模板	1 μ L

混匀, 于 95 $^{\circ}$ C 水浴变性 5min, 冷却后加入 *La Taq* DNA 聚合酶(5u/ μ L)0.5 μ L, 混匀, 放入 PCR 自动扩增仪进行扩增, 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 1min、56 $^{\circ}$ C 1.5min、72 $^{\circ}$ C 2min、, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

以 3C1 和 3C2 为引物, 以 pGEM/3C 质粒为模板, 扩增 3C 基因, 扩增体系如下:

扩增体系	总体积 100 μ L
灭菌双蒸水	78.5 μ L
10 \times PCR buffer	10 μ L
dNTP(2.5mmol/L)	8 μ L
3C1 (50pmol/L)	1 μ L
3C2 (50pmol/L)	1 μ L
模板	1 μ L

混匀, 于 95 $^{\circ}$ C 水浴变性 5min, 冷却后加入 *La Taq* DNA 聚合酶(5u/ μ L)0.5 μ L, 混匀, 放入 PCR 自动扩增仪进行扩增, 扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 1min、57 $^{\circ}$ C 1min、72 $^{\circ}$ C 1min、, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。以标准 DNA Marker 作为分子量参照物, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检查所扩增产物的分子大小。

2.1.5.3 中间载体 pUC18/P12X3C 的构建

2.1.5.3.1 目的基因与载体的酶切及连接

P12X 基因与 3C 基因按 2.1.4.3 方法纯化回收后,分别用 *Bam*H I /*Spe* I 和 *Spe* I /*Sal* I 双酶切,同时碱裂解法提取 pUC18 质粒后用 *Bam*H I /*Sal* I 双酶切,酶切体系如下:

酶切体系	总体积 20 μ L	酶切体系	总体积 20 μ L
10 \times K buffer	2 μ L	10 \times H buffer	2 μ L
P12X	10 μ L	3C	10 μ L
<i>Bam</i> H I	1 μ L	<i>Spe</i> I	1 μ L
<i>Spe</i> I	1 μ L	<i>Sal</i> I	1 μ L
灭菌双蒸水	6 μ L	灭菌双蒸水	6 μ L

酶切体系	总体积 20 μ L
10 \times T buffer	3 μ L
pUC18	10 μ L
<i>Bam</i> H I	1 μ L
<i>Sal</i> I	1 μ L
灭菌双蒸水	5 μ L

混匀后,于 37 $^{\circ}$ C 水浴中酶切 2h,65 $^{\circ}$ C 水浴 10min。然后用 1%琼脂糖凝胶电泳。酶切产物的割胶回收同 2.1.4.3。

将酶切后的载体 pUC18 与 P12X、3C 连接,连接体系如下:

连接体系	总体积 10 μ L
pUC18	1 μ L
P12X	1.5 μ L
3C	1.5 μ L
2 \times Ligase buffer	5 μ L
T4 DNA Ligase(3u/ μ L)	1 μ L

混匀后于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜,连接产物转化 JM109 感受态细胞(同 2.1.4.6.3),在筛选培养基(含 50mg/L 氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG)上培养,挑斑克隆后,经碱裂解法提质粒,将所提取的质粒取 5 μ L 进行琼脂糖凝胶电泳。

2.1.5.3.2 重组质粒 PCR 鉴定

以可能重组的质粒为模板,分别以 PR1/PR2、3C1/3C2、PR1/3C2 为引物扩增 P12X、3C、P12X3C,以判断目的片断的正确性。空质粒 pBin438 为阴性对照,PCR 反应条件同 2.1.5.2。

2.1.5.3.3 重组质粒酶切鉴定

以可能重组的质粒为模板进行 *Bam*H I /*Sal* I、*Bam*H I /*Spe* I 双酶切以判断目的片段的正确性。空质粒 pBin438 为阴性对照,方法同 2.1.5.3。

阳性重组质粒命名为 pUC18/P12X3C。将筛选出的阳性质粒送大连宝生物工程有限公司进行自动化测序，测序结果用 DNASTar 软件分析。

2.1.5.4 植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/P12X3C 的筛选与鉴定

pUC18/P12X3C 重组质粒经碱裂解法提质粒后，用 *Bam*H I /*Sal* I 双酶切，酶切体系如下：

酶切体系	总体积 40 μ L
10 \times T buffer	6 μ L
pUC18/P12X3C	16 μ L
<i>Bam</i> H I	1.5 μ L
<i>Sal</i> I	1.5 μ L
灭菌双蒸水	15 μ L

混匀后，稍离心，于 37 $^{\circ}$ C 水浴中酶切 2h 后，65 $^{\circ}$ C 水浴 10min。然后用 1%琼脂糖凝胶电泳，回收约 3.0kb 的 P12X3C 基因片段，酶切产物的切胶回收同 2.1.4.3。

植物表达载体 pBin438 的酶切、回收同 2.1.4.5。酶切后的载体与目的基因连接，连接体系如下：

连接体系	总体积 10 μ L
pBin438	1 μ L
P12X3C	3 μ L
2 \times Ligase buffer	5 μ L
T4 DNA Ligase(3u/ μ L)	1 μ L

混匀后于 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。连接产物的转化同 2.1.4.6。重组质粒的电泳、酶切、PCR 鉴定同 2.1.5.2、2.1.5.3，鉴定出的阳性重组质粒命名为 pBin438/P12X3C，将筛选出的阳性质粒送大连宝生物工程有限公司进行自动化测序，测序结果用 DNASTar 软件分析。

2.1.5.5 三亲交配法将 Mini-Ti 质粒 pBin438/P12X3C 导入农杆菌 GV3101

2.1.4.5.1 三亲交配法同 2.1.4.8。

2.1.4.5.2 转化子的 PCR 鉴定

三亲交配后的转化子用碱裂解法提取质粒，进行 PCR 鉴定。PCR 反应同 2.1.5.2。FMDV 多基因双元表达载体构建完成。

2.2 结果与分析

2.2.1 植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 的构建及序列分析

将目的片段 VP1 经 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切后与经同样处理的载体质粒 pBin438 连接、转化,对转化后经筛选得到的重组质粒 pBin438/VP1 用 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切可切出一条约 650bp 的片段,以酶切正确的质粒为模板进行 PCR 扩增,扩增片段与预计大小相符,说明结构蛋白 VP1 已正确插入到载体中,植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 已构建成功(图 2-3)。测序结果表明:FMDV VP1 基因与亲本毒株 O/China/99 株的相应编码序列完全一致,同源性的为 100%,在构建的 pBin438/VP1 质粒中,VP1 基因、起始密码 ATG、内质网引导多肽 SEKDEL 等共 660 个核苷酸,编码 220 个氨基酸。

2.2.2 FMDV VP1 基因植物双元表达载体的构建

三亲交配后的转化子经抗生素筛选,按照农杆菌质粒提取方法提取质粒 DNA,PCR 可扩增到 VP1 基因,大小与预计片段相符(图 2-4),说明植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 已转移到根癌农杆菌 GV3101,Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 与根癌农杆菌中的 helper-Ti 质粒共同构成植物双元表达载体。

2.2.3 植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/P12X3C 的构建及序列分析

2.2.3.1 P12X 基因与 3C 基因的扩增

以 pGEM/P12X 质粒 DNA 为模板,以 PR1 和 PR2 为引物通过 PCR 扩增得到约 2 350bp 大小的片段,与预期大小相符,以 pGEM/3C 质粒 DNA 为模板,以 3C1 和 3C2 为引物通过 PCR 扩增得到约 650bp 的片段,与预期大小相符,说明均扩增到了所需要的条带(图 2-5)。

2.2.3.2 中间质粒 pUC18/P12X3C 的构建

对重组质粒 pUC18/P12X3C 用 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切后,得到 3 000bp 和 2 700bp 的片段,经 *Bam*H I、*Spe* I 双酶切得到 2 300bp 和 3 400bp 的片段,以酶切正确的质粒为模板,以(PR1、3C2)、(PR1、PR2)和(3C1、3C2)为引物进行 PCR 扩增,分别能扩增出一条约 3 000bp、2 300bp、650bp 的片段,大小与预计的基因编码区片段相符,说明 P12X 基因与 3C 基因已成功连接并已克隆至特定的酶切位点(图 2-6)。

2.2.3.3 Mini-Ti 质粒 pBin438/P12X3C 的构建及序列分析

在含卡那霉素的 LB 平板上挑斑克隆后,经碱裂解法提质粒,将重组质粒 pBin438/P12X3C 用 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切检测插入片段的大小,结果可切出一条 3 000bp 的片段,经 *Bam*H I、

Spe I 双酶切后,可切出一条 2 350bp 的片段,以酶切正确的质粒为模板,以(PR1、3C2)、(PR1、PR2)和(3C1、3C2)为引物进行 PCR 扩增,分别能扩增出一条约 3 000bp、2 350bp、650bp 的片段,大小与预计的基因编码区片段相符,其结果证明构建正确,说明植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/P12X3C 已成功构建(图 2-7)。

测序结果表明:FMDV P12X3C 基因已正确克隆到植物表达质粒载体上,P12X3C 全长 3 018 个核苷酸,编码 1 006 个氨基酸,与亲本毒株 O/China/99 株的相应编码序列比较,P12X3C 基因与 Genbank 上下载的序列同源性的 99.6%。

2.2.4 FMDV 多基因植物双元表达载体的构建

按照农杆菌质粒提取方法提取质粒 DNA,以(PR1、3C2)为引物扩增 P12X3C 基因,标准 DNA Marker 作为分子量参照物,用 1%琼脂糖凝胶电泳可以清晰地看到约 3 000Kb 的 DNA 片段,大小与预计的基因编码区片段相符(图 2-8),说明植物双元表达载体构建成功。pBin438/P12X3C 是 Mini-Ti 质粒,与农杆菌中的 helper-Ti 质粒共同构成双元表达载体,将结果为阳性的农杆菌菌落扩繁保种,以备转化植物所用。

2.3 讨论

FMDV 结构蛋白 P1 上携带有刺激机体产生与完整病毒粒子相似的体液免疫和细胞免疫的 T、B 细胞表位,同时 2A 蛋白酶和 3C 蛋白酶对于 P1 多聚蛋白形成 VP1、VP3 和 VP0 也是必需的(Pablo de Felipe et al,2003;Claire et al,1999),与结构蛋白 VP1 相比,病毒全衣壳蛋白 P1 及非结构蛋白 2A、3C(P12X3C)对于新型疫苗而言是一个非常理想的选择,但由于结构蛋白 P1 基因、非结构蛋白 2A、3C 及部分 2B 基因共编码 1 006 个氨基酸,在选题时考虑较大片段的基因转入植物基因组,可能会对此后的植物遗传转化及表达产生影响,因此笔者在本试验中构建了两种植物表达载体,FMDV 结构蛋白 VP1 基因植物表达载体 pBin438/VP1 及全衣壳蛋白 P1 基因、非结构蛋白 2A、3C 及部分 2B 基因的植物表达载体 pBin438/P12X3C,对重组质粒测序表明,VP1 基因与亲本毒株 O/China/99 株的相应编码序列完全一致,同源性的 100%,在关键的抗原位点没有发生突变或缺失,P12X3C 基因与亲本毒株 O/China/99 株的相应编码序列同源性的 99.6%,在关键的抗原位点没有发生突变或缺失,同时笔者认为试验中选用高保真的聚合酶降低了 PCR 的差错率,提高了实验的准确性和成功率,这为以后的植物转化提供了重要实验依据。

实现外源基因在植物中的表达,必须将外源基因连接到特定的植物表达载体上,利用 Ti 质粒载体系统整合到植物染色体中,这是迄今为止最有效的获得遗传性稳定基因工程植物的方法(May et al,1995),该方法是通过农杆菌对植物的侵染作用,将外源基因整合到植物染色体 DNA 上。所谓“双元载体”或称“反式载体”系统是指由两个分别含 T-DNA 和 vir 基因的相容性 Ti 质粒构成的双质粒系统,其中,含 T-DNA 边界但缺乏 vir 基因的 Ti 质粒称为“微型 Ti(Mini-Ti)质粒”,这是一个广谱质粒或穿梭质粒,即可以在大肠杆菌中复制也可以在大肠杆菌中复制,质粒小,含有多克隆位点和选择标记基因 *NPTII* 基因,并具有左右两侧 25bp 边界序列。另一个含 vir 区段但缺乏 T-DNA 连同两侧边界序列的 Ti 质粒称为“辅助 Ti(helper-Ti)质粒”,质粒大约几十个

Kb, 其主要作用是提供反式 *vir* 功能, 激活处于反式位置上的 T-DNA 转移, 即通过合成直接介导 T-DNA 迁移的装置, 负责 T-DNA 中间产物的合成、迁移与整合(王关林等,2002)。中间载体 pBin438 中的 CaMV 35S 启动子是常用的植物表达启动子, 为组成型表达, 在植物的大部分组织中能很好地启动外源基因表达; 另外, 在启动子下游有一段增强子, 具有提高外源基因表达量的作用。pBin438 是常用的 Mini-Ti 质粒, 它含有 *NPTII*, 可在植物中表达新霉素磷酸转移酶, 使转化的植物细胞和组织能够在含卡那霉素的培养基上生长, 以此作为筛选因子, 筛选含有外源基因的植株。本试验构建的重组植物表达载体 pBin438/VP1 及 pBin438/P12X3C, 具有完整的植物表达调控元件, 其 T-DNA 区含有选择性报告基因 *NPTII*、双 CaMV35S 启动子、 Ω 增强子、UT 加尾序列及 NOS 终止子等重要元件, 将该重组表达载体转入根癌农杆菌 GV3101, 与 Ti 辅助质粒构成植物双元表达载体, 通过分子鉴定及测序, 证明已成功构建了 FMDV 结构蛋白 VP1 基因及全衣壳蛋白 P12X3C 基因的植物组成型表达载体, 为下一步将目的基因转入植物奠定了基础。

通过连接 *Kozak* 序列, 提高翻译效率。*Kozak*(Kozak,1987)认为真核核糖体进行翻译的起始部位的共有序列是: GCCGCCA⁻³/GCCA¹UGG⁴。对植物来说近年来已经形成一个比较理想的翻译起始序列, 即 AACAAUGGC, 而动物细胞则是 CACCAUG。本试验通过在起始密码子 ATG 之前添加 AACA, 达到优化先导序列、提高翻译效率。此外, 通过在 P12X3C 片段的 3' 端引入内质网引导多肽 SEKDEL, 使外源蛋白积累在细胞器中, 从而可以有效地提高蛋白的积累量。笔者在本试验中通过以上策略, 达到优化表达框架, 提高重组蛋白的表达量的目的。

由于农杆菌生长缓慢, 一般需 2 天左右才能长出菌落, 这时在分离的菌落中常混杂有一些未转化的细菌, 这对以后的植物转基因工作很不利, 因此在初步鉴定后往往需再经 1~2 次划平板才能最后得到纯的克隆, 方可用于植物转化。

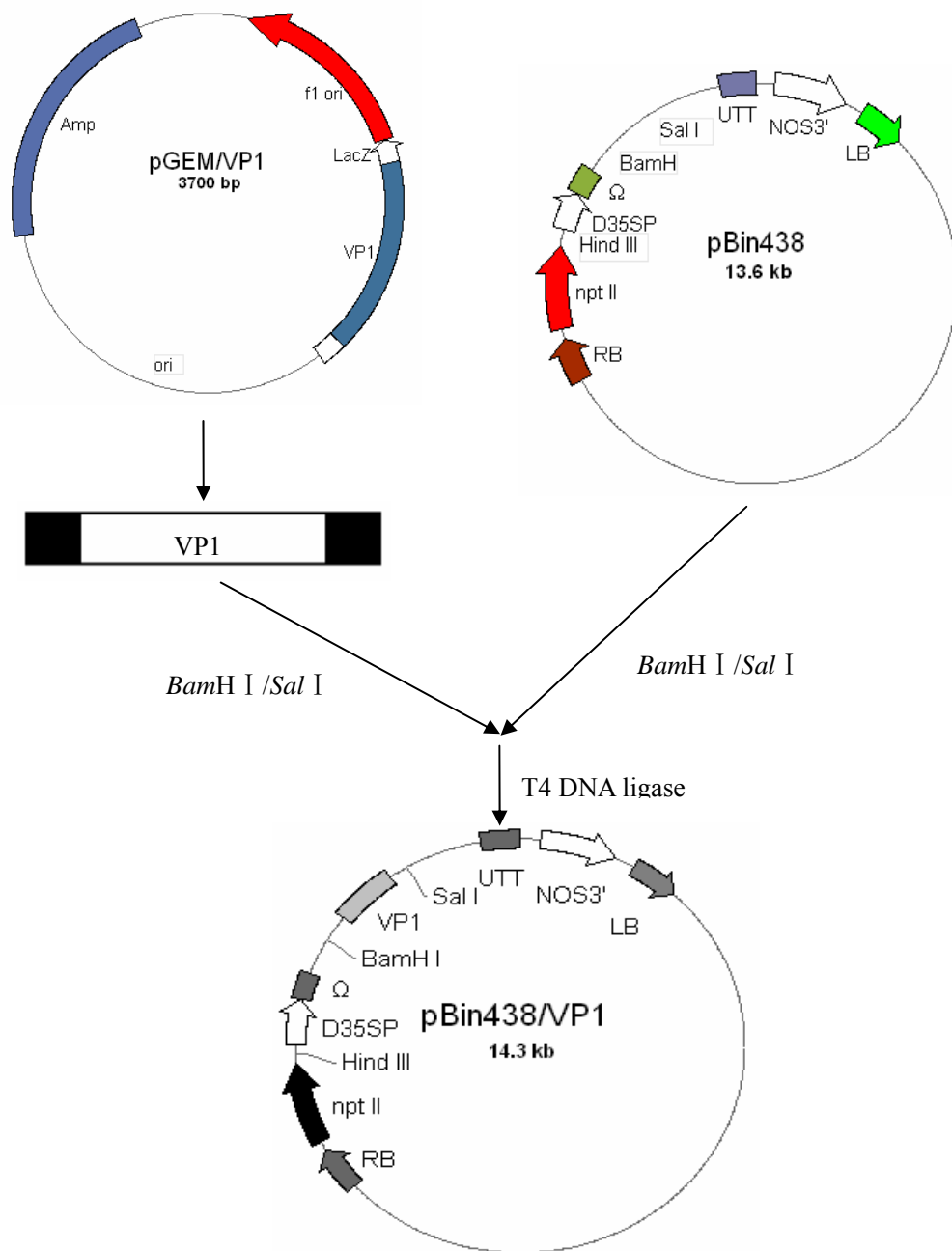


图 2-1 组成型表达载体 pBin438/VP1 构建策略

Fig 2-1 The construction of constitutive expression
vector pBin438/VP1

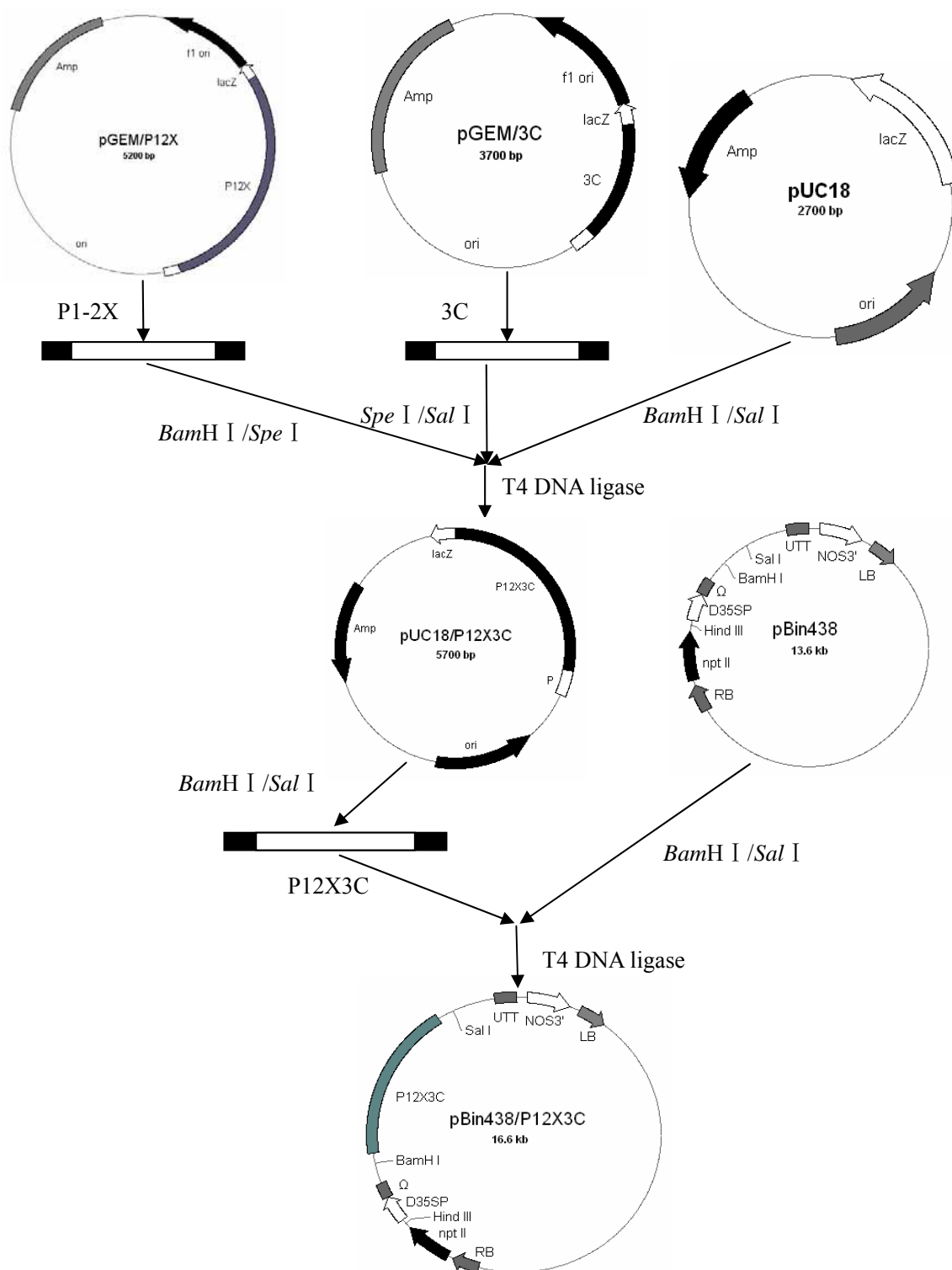


图 2-2 组成型表达载体 pBin438/P12X3C 构建策略

Fig 2-2 The construction of constitutive expression vector pBin438/P12X3C

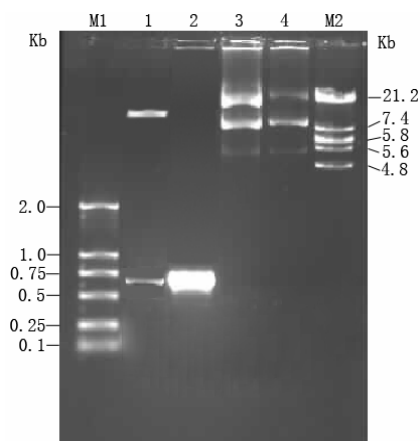


图 2-3 pBin438/VP1 的酶切及 PCR 鉴定

M1、M2:DNA marker; 1:重组质粒 pBin438/VP1 经 *Bam*H I /*Sal* I 双酶切;

2:重组质粒 pBin438/VP1 扩增产物; 3:质粒 pBin438; 4:重组质粒 pBin438/VP1

Fig 2-3 Agarose electrophoresis analysis of the pBin438/VP1 by enzyme digestion and PCR

M1:DL2000 Marker; M2:Low Range II Marker; 1:Recombinant plasmid pBin438/VP1

digested with *Bam*H I /*Sal* I ; 2:PCR products with recombinant plasmid;

3:Plasmid pBin438; 4:Recombinant Plasmid pBin438/VP1

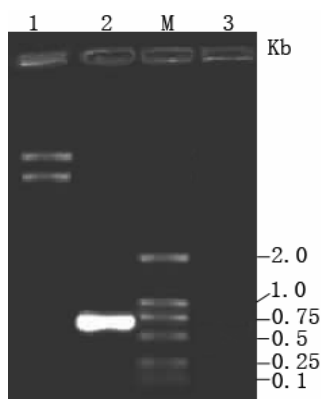


图 2-4 VP1 基因双元表达载体的 PCR 鉴定

M:DNA marker;1:根癌农杆菌双元表达质粒; 2:双元表达质粒 VP1 的 PCR 扩增;

3: 阴性对照的 PCR 扩增

Fig 2-4 Identification of FMDV VP1 binary expression vector by PCR

M: DL2000 Marker; 1:*Agrobacterium Tumefaciens* plasmid;

2:PCR products with binary expression plasmid; 3:Negative control

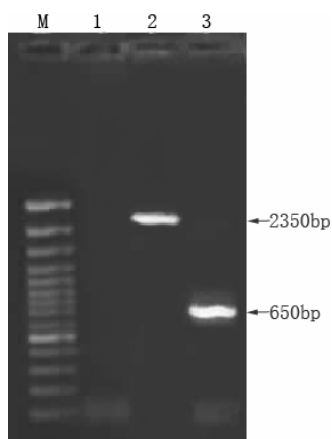


图 2-5 P12X 与 3C 基因的 PCR 产物

M:DNA marker;1:阴性对照的 PCR 扩增;

2:P12X 基因的扩增产物; 3:3C 基因的扩增产物

Fig 2-5 PCR products of P12X and 3C gene

M:100bp Ladder Plus Marker; 1:Negative control;

2:PCR products of P12X; 3:PCR product of 3C

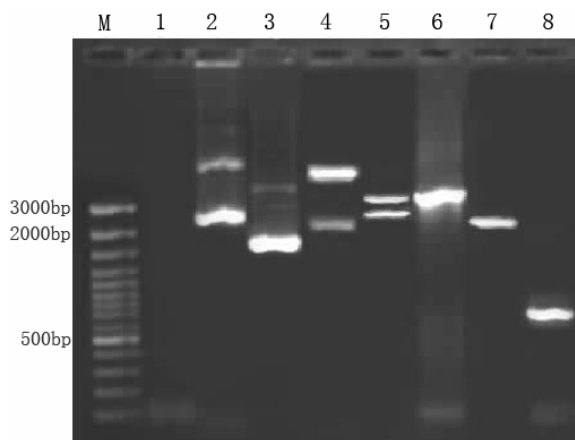


图 2-6 pUC18/P12X3C 的 PCR 及酶切鉴定

M:DNA marker;1:阴性对照的 PCR 扩增;2:重组质粒 pUC18/P12X3C;3:空质粒 pUC18;

4:pUC18/P12X3C 经 *Bam*H I 和 *Spe* I 双酶切;5:pUC18/P12X3C 经 *Bam*H I 和 *Sal* I 双酶切;6,7,8:P12X3C、P12X、3C 基因的扩增产物

Fig 2-6 Identification of pUC18/P12X3C plasmid by PCR and enzyme digestion

M:100bp Ladder Plus Marker; 1:Negative control; 2:Plasmid pUC18/P12X3C;

3:Plasmid pUC18; 4:pUC18/P12X3C digested with *Bam*H I /*Spe* I ;5:pUC18/P12X3C digested with *Bam*H I /*Sal* I ;

6,7,8:PCR products of P12X3C(3.0Kb),P12X(2.35Kb)and 3C(0.65Kb)

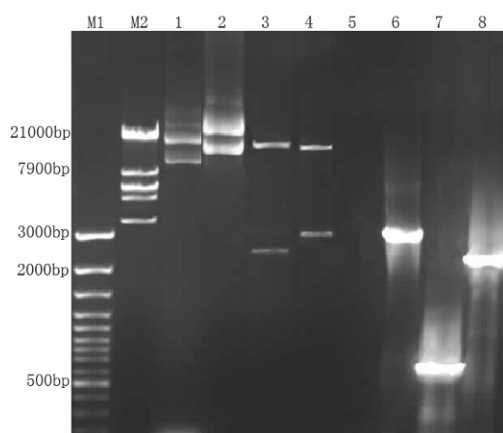


图 2-7 pBin438/P12X3C 的 PCR 及酶切鉴定

M1.M2:DNA marker; 1:质粒 pBin438; 2:重组质粒 pBin438/P12X3C;
3:pBin438/P12X3C 经 *Bam*H I /*Spe* I 双酶切;4:pBin438/P12X3C 经 *Bam*H I /*Sal* I 双酶切;
5:阴性对照 PCR 扩增; 6.7.8:P12X3C、.P12X、3C 基因的扩增产物

Fig 2-7 Identification of pBin438/P12X3C by PCR and enzyme digestion

M1:100bp Ladder Plus Marker;M2:Low Range II Marker; 1:Plasmid pBin438;
2:Recombinant plasmid pBin438/P12X3C;3:pBin438/P12X3C digested with *Bam*H I /*Spe* I ;
4:pBin438/P12X3C digested with *Bam*H I /*Sal* I ; 5:Negative control;
6,7,8:PCR products of P12X3C(3.0Kb),3C(0.65Kb)and P12X(2.35Kb)

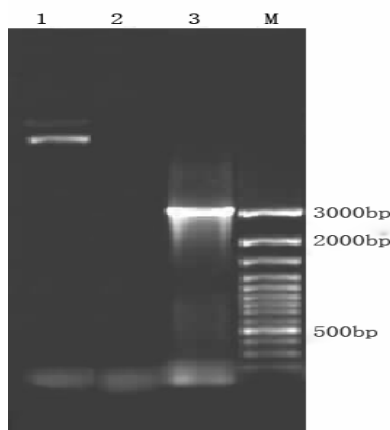


图 2-8 : 多基因植物双元表达载体的 PCR 鉴定

M:DNA marker;1:根癌农杆菌双元表达质粒;2:阴性对照的 PCR 扩增;
3:双元表达质粒 P12X3C 基因的 PCR 扩增

Fig 2-8: Identification of multi-gene binary expression vector by PCR

M:100bp Ladder Plus Marker; 1:*Agrobacterium Tumefaciens* plasmid;
2:Negative control; 3:PCR products of P12X3C(3.0Kb)

第三章 口蹄疫病毒免疫原基因在番茄中的转化

自 1983 年首次获得转基因植物至今,植物基因工程的研究取得了飞速发展,建立在 DNA 重组技术和植物细胞、组织培养技术基础上的植物基因工程,可将各种特殊设计或改造的外源基因转移到植物染色体内,在分子水平上定向重组遗传物质,从而改良植物性状,培育优质高产的农作物新品种。而以转基因植物作为生物反应器来生产医药重组蛋白,如药物、抗体、可食性疫苗等,也成为国际上植物基因工程一个新的发展趋势。当人们能够有效地将免疫基因转到可食用的植物中并表达在果实内,那么预防接种的过程将变得方便和经济,这对于传染病多发的不发达国家和地区的疾病预防无疑将是一个福音。因此,以转基因植物生产口服疫苗的研究正在成为一个热点,虽然存在一些已知和未知因素,但是,这方面的探索具有很大的潜力,一旦取得突破,将大大降低疫苗生产的成本。

植物基因转化依赖于一种良好的转化系统,该系统应能有效地将外源基因导入植物受体细胞并得到表达。根癌农杆菌介导的转化是最常用的基因转化系统,是目前研究最多,机理较清楚,技术和方法较成熟且广泛应用的转化途径。农杆菌转化受很多因素影响,但成功的转化依赖于农杆菌与植物细胞间的相互作用。本章从番茄的再生系统出发,确定了外植体类型,筛选了最佳再生培养基,确定了预培养的培养基、培养时间、浸菌时间及共培养时间等转化条件,建立了番茄高频转化系统。

3.1 材料和方法

3.1.1 植物材料

黄珍珠番茄、中蔬五号、中蔬六号番茄购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所。

3.1.2 转化载体

植物双元表达载体 pBin438/VP1 及 pBin438/P12X3C。具体构建方法详见第二章。

3.1.3 试剂的配制

3.1.3.1 培养基

细菌培养基为 YEP 培养基,植物组织培养的 MS 基础培养基见附录。

3.1.3.2 激素

- (1) 吲哚乙酸(IAA)(0.05mg/mL): 取 0.25mg IAA, 少量 NaOH 溶解, 灭菌双蒸水定容至 5ml。
- (2) 6-苄基嘌呤(6-BA)(0.5mg/mL): 取 2.5mg BA, 少量 NaOH 溶解, 灭菌双蒸水定容至 5ml。

(3) 萘乙酸(NAA)(1mg/mL): 取 5mg NAA, 少量 NaOH 溶解, 灭菌双蒸水定容至 5ml。

(4) 玉米素(ZT)(1mg/mL): 取 5mg ZT, 少量 NaOH 溶解, 灭菌双蒸水定容至 5ml。

3.1.3.3 抗生素

卡那霉素 (Kan)、链霉素 (Str) 用灭菌双蒸水配为浓度为 100mg/mL 的溶液, 过滤除菌, 羧苄青霉素 (Carb)、头孢霉素 (Cef) 用灭菌双蒸水配为浓度为 200mg/mL 的贮存液, 过滤除菌。

3.1.4 种子的准备和消毒方法的确定

挑选番茄种子, 剔除瘪瘦种子及杂质, 取 200~300 粒种子放入 100mL 灭菌三角瓶内。先用 75% 的酒精清洗种子。再用 30ml 稀释的次氯酸钠或 0.1% 的升汞灭菌, 期间不断摇动三角瓶, 使灭菌均匀。无菌蒸馏水冲洗 4~5 遍, 每次浸泡 10min 以上, 将灭菌后的种子移入 MS 培养基上, 光强为 1000~1500Lux, 光周期为 16h/8h, 温度为 26 ± 2℃, 进行无菌苗的培养。

3.1.5 番茄的再生

取上述萌发 8~10d 番茄幼苗, 无菌条件下取下列不同外植体进行再生能力比较实验:

- 1) 带柄完整子叶, 从子叶柄与下胚轴交界处切取子叶。
- 2) 不带柄完整子叶, 从子叶片与子叶柄交界处切下。
- 3) 下胚轴切段, 不带顶芽。
- 4) 2/3 子叶, 沿子叶基部将子叶切下, 从子叶柄端切去 1/3 左右弃之不用, 取剩余的 2/3 部分子叶。

子叶和叶盘下表面朝下, 伤口处插入培养基, 放置在含有 6-BA 和 IAA 的 MS 培养基上, 筛选再生培养基。

3.1.6 不同植物激素浓度对番茄子叶再生的影响

为了优化番茄的再生体系, 本实验对 6-BA、ZT 和 IAA 不同配比摸索番茄子叶再生的最优转化系统。培养条件为: 温度 24±2℃, 光照强度 2 000Lux, 光照时间为 16h/d。

3.1.7 Kan 梯度预实验

将番茄子叶叶盘各 20 片接种在含 Kan 0, 20, 30, 50, 75mg/L 的 MS 培养基上, 根据出愈、分化和死亡情况确定转化后筛选转化植株的最佳浓度。

3.1.8 番茄子叶的遗传转化

3.1.8.1 含表达载体的农杆菌菌液的活化

- 1) 挑取含双元表达载体的农杆菌单菌落，接种于 5mL 附加有 Kan 100mg/L, Rif 50mg/L, Str 50mg/L 的 YEP 液体培养基中，28℃，220rpm 摇床振荡培养约 2d;
- 2) 菌液浓度达到 OD₆₀₀ 为 0.8 时，取培养活化的农杆菌按 1%的比例转接至 10mL 含 Kan 100mg/L, Rif 50mg/L, Str 50mg/L 的 YEP 液体培养基中，28℃，220rpm 摇床振荡培养至 OD₆₀₀ 为 0.4~0.6;
- 3) 将菌液移至灭菌的离心管中，3 500rpm 离心 5min;
- 4) 弃去上清，用 MS 液体培养基重悬菌体细胞，再将重悬后的菌液稀释至 OD 值约 0.2~0.3，即为转化用的侵染液;

3.1.8.2 外植体的预培养、侵染及共培养

- 1) 预培养：切取 8~10d 苗龄的子叶外植体，置于筛选的再生培养基上，预培养 0~4d。
- 2) 将预培养的外植体投入预先准备好的农杆菌菌液中，室温下不时摇动，使外植体与农杆菌充分接触，侵染 3~15 min。
- 3) 侵染结束后，取出外植体，用滤纸吸干多余的菌液，转入表面铺有一层滤纸的再生培养基上，于暗处共培养 2~3d。

3.1.8.3 筛选培养及植株再生

- 1) 经共培养的外植体，转至添加抗生素 (Carb 500mg/L, Kan 30mg/L) 的再生培养基上，在 25℃/23℃，16h 光照/10h 黑暗的光周期下培养，2 周左右更换新鲜选择培养基，并逐渐提高卡那霉素的浓度(至 50mg/L)。
- 2) 当外植体从愈伤组织上长出芽，芽高 1~1.5cm 时，把再生的抗性芽切下 (不带基部的愈伤组织)，转接到含有 Carb500mg/L, Kan50mg/L 的生根培养基上诱导生根。当植株长出健壮的根系，苗高 5~6cm 时，开瓶一周炼苗后移栽于土壤。

3.2 结果与分析

3.2.1 种子消毒方法的确定

番茄种子外壳比较粗糙，容易残留消毒液，毒性过低灭菌不充分，过高容易造成残留，影响发芽率。因此对消毒液的种类、浓度及消毒时间有一定的要求，通过对消毒剂不同浓度和时间的搭配(表 3-1)，比较不同组合的灭菌效果，确定番茄种子最佳消毒方法。

表 3-1 不同消毒剂对番茄种子的消毒对照
Table 3-1 Comparison of sterilization for tomato seeds with different disinfectant

消毒液	浓度	消毒时间（min）	抑菌效果	萌发率(%)
次氯酸钠	10%	10	+	0（污染）
		15	+	33
		20	++	67
	12%	10	+	34
		15	++	55
		20	+++	96
	15%	10	+	43
		15	++	70
		20	+++	50
	20%	6	++	30
		10	+++	14
		15	+++	10
升汞	0.1%	5	++	25
		10	++	31
		15	+++	18

抑菌效果：+抑菌效果差；++抑菌效果较好；+++抑菌效果好

通过消毒对照试验，0.1%升汞虽然消毒效果比较好，但对种子的伤害比较大，残留很严重，不容易洗干净，在培养基上发芽率很低，而且升汞对人的毒性很大，考虑到今后要对大量的种子进行消毒，所以不选用它作为消毒剂。12%的次氯酸钠消毒 20 分钟消毒效果很好，残留不多，对种子的伤害较小，发芽率在 95%以上，15%的次氯酸钠消毒效果也不错，但种子萌发需要的时间较长，20%的次氯酸钠消毒时间超过 10 分钟，种子接在培养基中逐渐变黑，发芽率在 15%以下，因此，12%的次氯酸钠振荡消毒 20 分钟是最佳消毒方法。另外，中蔬五号和中蔬六号番茄种子在次氯酸钠浓度低、时间短的情况下，消毒不彻底，种子污染严重，而加大次氯酸钠浓度和适当延长消毒时间又造成种子不萌发，故在以后的试验中淘汰。

3.2.2 番茄的转化与再生系统

3.2.2.1 不同外植体的再生能力比较

理论上讲，植物具有全能性，即任何细胞均具有再生为完整植株的潜力，但在组织培养过程中并不是所有细胞都能再生出植株。不同组织由于分化程度和生理状态等不同，其脱分化的能力不同，再生的难易程度是不一样的。分化程度低、幼嫩组织容易再生，反之则再生难。用 8~10 天苗龄的番茄子叶、带柄子叶、下胚轴和 2/3 子叶四种不同外植体进行再生试验，结果表明(表 3-2)其再生能力有明显差异，以 2/3 子叶芽再生频率最高，为 86%，其次为带柄子叶，在以后试

验中确定以 2/3 子叶及带柄子叶为外植体进一步优化再生培养基。

表 3-2 番茄不同外植体在不同分化培养基上的再生能力比较

Table 3-2 Comparison on shoot regeneration capacity of different types of explants in tomato

外植体类型	外植体总数 (个)	分化芽		芽数/外植体数
		外植体数 (个)	百分数 (%)	
带柄子叶	50	36	72%	2.8
不带柄子叶	50	11	22%	0.8
下胚轴	50	10	20%	1.2
2/3 子叶	50	43	86%	3.6

基本培养基为 MS，附加激素 6-BA1.0+IAA0.2(单位为 mg/L，下同)，30 天时统计结果。

3.2.2.2 6-BA、ZT 和 IAA 配比对子叶再生的影响

表 3-3 番茄子叶在不同激素配比培养基上的再生比较

Table 3-3 Comparison of callus induction and shoot regeneration from tomato cotyledons on different medium with hormone matching

培养基类型	外植体总数 (个)	分化芽		芽数/外植体数
		外植体数 (个)	百分数 (%)	
B1	50	17	34%	1.8
B2	50	22	44%	2.6
B3	50	14	28%	2.4
B4	50	10	20%	2.1
B5	50	11	22%	1.9
B6	50	17	34%	2.2
B7	50	15	30%	1.7
Z1	50	46	92%	4.8
Z2	50	43	86%	4.0
Z3	50	43	86%	3.8
Z4	50	41	82%	3.9
Z5	50	44	88%	3.6
Z6	50	36	78%	2.8
Z7	50	42	84%	2.9
Z8	50	37	74%	1.3
Z9	50	31	62%	0.8

B1:BA1.0+IAA0.1 B2:BA1.0+IAA0.2 B3:BA1.0+IAA0.5 B4:BA1.0+IAA1.0

B5:BA2.0+IAA0.2 B6:BA2.0+IAA0.5 B7:BA2.0+IAA1.0 Z1:ZT1.0+IAA0.1

Z2:ZT1.0+IAA0.2 Z3:ZT1.0+IAA0.5 Z4:ZT1.0+IAA1.0 Z5:ZT2.0+IAA0.2
Z6:ZT2.0+IAA0.5 Z7:ZT2.0+IAA1.0 Z8:ZT1.0 Z9:ZT2.0

在不同浓度的 BA、ZT 和 IAA 配比的培养基上子叶的再生如表 3-3 所示。BA 从 1.0~2.0mg/L 且 IAA 从 0.2~1.0mg/L 时，都能诱导再生出芽，频率为 20%~44%。当用 ZT 代替 6-BA 进一步做子叶再生时，再生频率和每个外植体的分化芽数都有所增加，在 ZT 从 1.0~2.0mg/L 且 IAA 从 0.1~1.0mg/L 之间，芽的再生频率为 62~92%，平均每个外植体的芽数为 2.9~4.8 个，表明 ZT 比 BA 更有效。无 IAA 时，子叶保持绿色，形成愈伤和芽的分化率较低，而且芽生长很慢。以 ZT 1.0mg/L 和 IAA0.1mg/L 配比的培养基是最佳的再生培养基，再生频率高达 92%，每个外植体的芽数达 4.8 个。

3.2.2.3 外植体对卡那霉素的敏感性试验结果

卡那霉素筛选浓度的确定对转基因植物的获得非常重要，它可以检测出植物本身的卡那抗性，并确定农杆菌转化后的卡那筛选浓度。但是，选择压直接影响对转化子的筛选和转化效率，选择压低时，逃逸多，假转化子增加；选择压高时，真转化子由于未能承受高选择压而同样被抑制，转化效率降低。卡那霉素(Kan)是双子叶植物常用的选择剂，在番茄子叶耐 Kan 试验中（表 3-4），将番茄子叶叶盘分别接种在含有 Kan 0，20，30，50，75mg/L 的 MS 培养基上，培养 30 天后，在无抗生素培养基上的叶盘长出大量愈伤组织并分化出芽，而在有抗生素培养基上的叶盘很少诱导出愈伤组织，子叶逐渐黄化，Kan 浓度越高，黄化越快，无任何愈伤和芽产生，当 Kan 浓度为 30mg/L 时，分化几乎被抑制，叶盘黄化。当 Kan50mg/L 及 Kan75mg/L 时，外植体一周以后逐渐褐化、软腐、死亡。表明 Kan30mg/L 就能完全抑制子叶的再生，因此，本研究将 Kan 浓度 30mg/L 定为转化体选择压力。

番茄植株在不加抗生素的生根培养基上生长良好，根系发达；当在培养基中加入 Kan 浓度大于(包括)50mg/L 时，幼苗生长完全受到抑制，没有生根，反而黄化枯死。因此，本研究确定诱导转化植株生根的 Kan 浓度为 50mg/L。

表 3-4 卡那霉素浓度对番茄子叶再生的影响
Table 3-4 Effect of Kan concentration on callus induction and shoot regeneration of tomato cotyledons

Kan 浓度(mg/L)	外植体总数（个）	形成愈伤的外植体数（个）	形成芽的外植体数(个)
0	20	19	16
20	20	4	2
30	20	0	0
50	20	0	0
75	20	0	0

3.2.2.4 预培养时间对番茄子叶转化及再生的影响

农杆菌对植物带来的损伤很大,如果切下外植体的同时进行侵染,大量外植体会直接死去,经过预培养阶段使植物对创伤有所适应对提高农杆菌介导的转化率十分重要(表 3-5)。这是因为:(1)预培养促进细胞分裂。处于分裂状态的细胞更容易接受并整合外源基因;(2)减少杂菌污染;(3)调整外植体的生理状态,使它们更适应体外培养条件;(4)有利于侵染接种的外植体能与培养基平整接触。但预培养时间过长,则会增加假外植体的数量,因为芽的分化一旦启动,Kan 难以抑制。

本实验中用未预培养的子叶直接侵染时,伤口褐化严重,没有抗性愈伤形成,预培养 1~4 天,褐化减少。预培养时间较短或较长均不利于转化及再生,时间短,外植体仍然褐化多,时间长,则伤口有愈合和封闭的趋势,使侵染能力下降。本试验中 4 天预培养,抗性愈伤及再生都减少,2 天预培养时,抗性愈伤和抗性芽形成最高,分别为 30%和 20%。因此,预培养 2 天比较合理,在预培养基上垫两张滤纸效果会更好。

表 3-5 预培养时间对番茄子叶转化及再生的影响

Table 3-5 Effects of pre-culture time on transformation and regeneration of tomato cotyledons

预培养时间 (d)	外植体总数 (个)	形成抗性愈伤		形成抗性芽(个)	
		外植体数(个)	百分数(%)	外植体数(个)	百分数(%)
0	30	2	6.7	2	6.7
1	30	4	13.4	3	10
2	30	9	30	6	20
3	30	6	20	2	6.7
4	30	5	16.7	1	3.3

3.2.3 转基因番茄卡那霉素抗性植株的获得

通过上述对影响转化及再生的诸因素分析,确立了番茄子叶的遗传转化体系,将子叶在分化培养基 M1(MS+ZT1.0mg/L+IAA0.1mg/L)上预培养 2d,浸菌 3~5 分钟,于分化培养基上共培养 2d,再在含抗生素的筛选培养基 M2(MS+ZT1.0mg/L+IAA0.1mg/L+Carb500mg/L+Kan30mg/L)上直接筛选,三周后开始形成抗性愈伤,抗性愈伤在继代过程中,大多数失去分化能力,变得松散,呈黄褐色,少数愈伤仍为绿色而且紧密,逐渐分化出芽,而对照则完全黄化(图 3-1)。在继代过程中,逐渐提高卡那霉素的浓度(至 50mg/L),当芽伸长到 1.5~2.0cm 时,转入含抗生素的生根培养基 M3(MS+NAA0.1mg/L+Carb500mg/L+Kan50mg/L)上诱导生根,一般 10~15d 后可见抗性芽生根(图 3-2),待抗性芽长出粗壮且富有弹性的根系后,炼苗后移栽入土,转基因番茄在花盆内生长良好(图 3-3)。

3.3 讨论

3.3.1 植物细胞的全能性与高效再生转化系统的建立

一般而言,植物的任何体细胞都具有再生成完整植株的能力,即具有“全能性(totipotency)”。但实际上并不是所有的细胞都能再生出完整植株。有些细胞由于培养技术不成熟而不能在离体条件下表现出其全能性,而有些细胞则会由于深度分化而难以逆转。细胞全能性只是一种可能,要实现这种可能必须满足两个条件:一是将具有较强全能性的细胞或组织离体培养,使其处于独立发育的状态,从完整植株的抑制性中解脱出来;二是赋予细胞一定的刺激,如在培养基中给予营养物质、激素等调控物质。

成功的基因转化首先依赖于良好的植物再生系统的建立,外植体只有具备较强的全能性,并对选择性抗生素敏感,才能选作基因转化的受体系统。由于植物基因转化的频率较低,一般情况下只有 0.1%,而进行基因转化的操作,如农杆菌侵染、抗生素使用等,还会使转化植株的再生频率有不同程度降低,只有具备较强的再生能力和较高的转化率,被转化的外植体才有机会分化出芽,再生成株。因此,在现有研究经验的基础上,我们对番茄的转化条件作了进一步优化。农杆菌吸附在细胞表面是 T-DNA 转移及整合的前提,在子叶与农杆菌共培养前,所用的农杆菌应该用无激素的 MS 液体培养基稀释到 OD 值为 0.2~0.3、侵染时间控制在 3~5min 为好。菌液浓度过高或侵染时间过长都会使植物外植体组织褐化,并且农杆菌污染严重,在以后的筛选中难以控制。本实验发现,当农杆菌浓度过低或侵染时间过短时,外源基因进入子叶外植体细胞的几率很小,不能承受卡那霉素抗性的筛选,子叶外植体会较早出现枯黄、萎缩等卡那霉素毒性作用现象,最后死亡。只有在条件适宜的情况下,子叶才会存活较长时间,被诱导出抗性愈伤,最后分化出转化植株。对转化条件的优化结果使得番茄子叶外植体的抗性芽生成率高达 18%,高于目前国内外所报道的 10%。

3.3.2 培养基中不同激素比对愈伤组织诱导及不定芽分化的影响

不同的激素种类及其配比是细胞脱分化及再分化的关键,特别是细胞分裂素与生长素的比例。番茄子叶最初用 NAA 时,再生频率比较低,换用 IAA 后再生频率大大提高,这可能是在诱导分化前期,需要较高生长素,进一步分化,需要较低的生长素。IAA 容易被降解和破坏,浓度逐渐降低,适应了分化的要求,而 NAA 比 IAA 稳定,高浓度 NAA 抑制了分化。

本实验在植物分化培养基中,添加玉米素 1mg/L 能够促使叶片高效再生芽,并使叶片保持鲜绿色,而未添加玉米素的分化培养基不定芽发生较晚,叶片较黄。玉米素为细胞分裂素的一种,其主要功能是促进细胞分裂,改变顶端优势,促进芽的分化,因此添加玉米素的培养基可使芽的分化率达到 10%。在植物组织培养中,细胞分裂素与生长素的比例是激素使用的关键,根据培养目的进行调节,原则是细胞分裂素浓度明显高于生长素则促进细胞脱分化诱导愈伤组织,反之促进细胞分化。

本试验中 BA 的作用不及 ZT 强,特别是愈伤组织的诱导分化。由于转化后的再生主要是从抗性愈伤组织上分化产生抗性芽,但愈伤组织在多次继代培养中会失去分化能力,这就要求用分

化作用强的分裂素,使愈伤组织在失去分化能力前再生。ZT 不仅能提高子叶的再生频率,也能增加分化的芽数(表 4),对于转化后的再生筛选很有利,本试验表明,MS+ZT1.0mg/L+IAA0.1mg/L 的再生培养基对于番茄子叶的再生及转化后的筛选是有效的。

3.3.3 转化细胞的选择

虽然选择标记基因对转基因植物并不是必要的,但在遗传转化技术中它是必需的。在经过共培养的组织中,转化细胞与非转化细胞相比只占少数,两者之间存在竞争,必须施加选择压,以促进那些转化并表达选择标记基因的细胞分裂、分化和再生,抑制非转化细胞,才能选择出转化细胞,进而分化成转基因植株。但在离体条件下,由于选择剂作用的准确方式不十分清楚,结果使选择经常处于非最适条件下,导致了转化频率较低,出现假转化体等。选择压强度和施加时间是影响转化的重要因素,强度不足,难以筛选出转化体,强度过大,由于基因表达量的限制,转化体也难以存活,选择压施加早,由于基因还未表达而杀死细胞,未能起到筛选作用,施加晚,选择效果降低。从文献资料来看,番茄外植体用卡那霉素 50mg/L 的选择压比较普遍,但笔者在本试验中发现,共培养后的子叶在 50mg/L 的筛选培养基中一周内几乎全部褐化死亡,而在卡那霉素 30mg/L 时,外植体分化几乎被抑制,叶盘黄化,没在明显的愈伤组织和不定芽分化,四周后,颜色逐渐变黄,最后死亡,在筛选后期随着转化细胞的分化,逐渐提高卡那的筛选浓度至 50mg/L,愈伤组织在分化培养基上可分化出芽,再生芽在生根培养基上生根并长成幼苗,而未转化的芽由于不能耐受 Kan 选择压力而逐渐白化死亡。在诱导生根时将部分植株 Kan 浓度提高为 100mg/L,分化芽均有一少部分未能长根,并慢慢枯黄、死亡,这些分化芽可能是假阳性芽。而正常的转基因植株在附加 100mg/L 卡那霉素的生根培养基上也可顺利生根,这样通过生根培养基提高抗性筛选浓度的再次筛选可进一步降低假阳性的出现。

3.3.4 预培养对转化率的影响

农杆菌侵染外植体后,往往引起伤口褐化,这是由于细菌分泌了有毒物质和植物对细菌侵染引起的过敏反应,严重褐化就意味着细胞的死亡,这对于转基因过程十分不利。虽然农杆菌侵染引起的褐化是不可避免的,但通过预培养能使外植体对农杆菌侵染产生抵抗能力,从而有效减少外植体的褐化。另外在预培养时加入激素后显著提高了转化及再生频率,这可能是由于外植体伤口处于活跃的细胞分裂和脱分化状态,合成细胞壁为农杆菌提供了附着点,有利于 T-DNA 插入和整合到染色体上。较短的预培养,不能有效改变外植体的褐化程度,较长的预培养,减少转化频率,并有增加假转化体的可能性,尽管番茄子叶伤口在较长的一段时间内(10d)都有感受性,但在 48h 内转化能力最强,到 96h,由于一种脂肪酸类物质沉淀到伤口上,对侵染造成了物理障碍,使转化频率下降,本试验表明,以 2d 预培养为宜。

实际操作中还发现子叶柄伤口变黑或外植体褐化与操作有关,子叶经菌液浸泡后用滤纸吸干多余菌液时动作应迅速,因为风干时间过长易导致切口萎缩,农杆菌将无法进一步侵染,并且被侵染组织容易失水死亡,转化率下降;另外要在浸过液体 MS 湿润的滤纸上切取子叶及子叶柄,切下的外植体需浸在液体 MS 中,以防切口风干;操作时尽量使用锋利刀片,刀片太钝则切口粗

糙，愈伤和芽再生都很困难，转化率会降低。

分析番茄转化及再生的影响因素表明，在 MS+ZT1.0mg/L+IAA0.1mg/L 的培养基上预培养 2d，浸菌 3~5min，黑暗处共培养 2d，再在选择培养基上直接用 Kan30mg/L 筛选，并逐渐提高卡那筛选浓度至 50mg/L，转化率达 18%。应用这一体系，将构建好的 FMDV 免疫原基因的植物表达载体通过根癌农杆菌介导的方法转化番茄，获得含有 FMDV 结构蛋白 VP1 基因及衣壳蛋白 P1、非结构蛋白 3C (P12X3C) 基因的转基因番茄，为 FMD 转基因植物疫苗的研制奠定了基础。



图 3-1 番茄抗性愈伤、抗性芽的筛选

A:选择培养基上的抗性愈伤;B:未转化的子叶在无抗生素的 MS 培养基上;C: 未转化的子叶在选择培养基上;D,E:转化后的子叶分化的愈伤及再生芽

Fig 3-1 Selection of tomato resistant calli and resistant shoots

A:Resistant calli formation from transformed cotyledons on selective medium contained Kanamycin;

B:Non-transformed cotyledons on MS medium; C:Non-transformed cotyledons on selective medium contained Kanamycin; D,E:Calli formation and shoots regeneration from transformed cotyledons of tomato

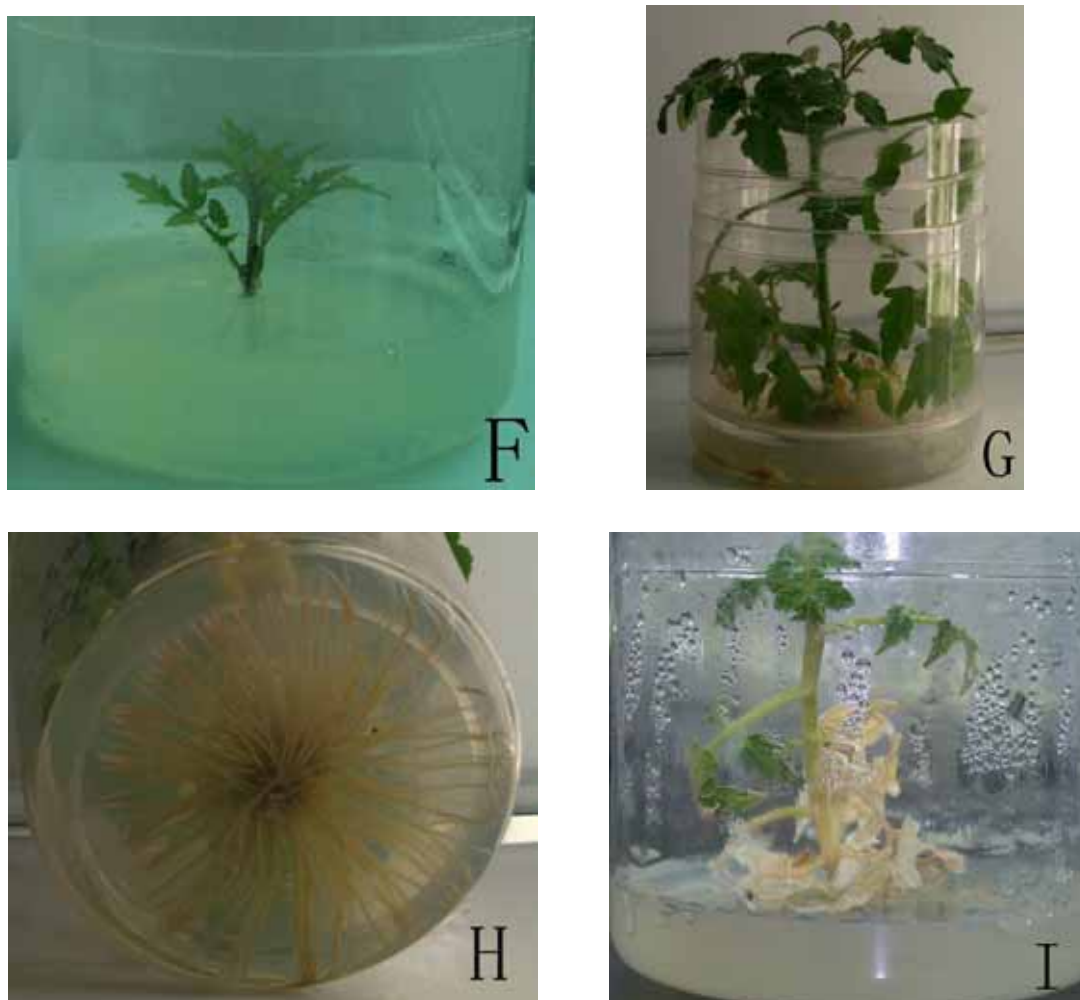


图 3-2 番茄转化苗的再生

F,G: 在含抗生素的生根培养基上的转基因番茄; H:转基因番茄的根; I:未转基因的番茄在含抗生素的生根培养基上

Fig 3-2 Selection of regeneration of tomato plants

F:Transformant of tomato plant on root regeneration medium containing Kanamycin;

G:Transgenic tomato plant; H:The root of transgenic tomato plant;

I:Non-transformed tomato plant on root regeneration medium containing Kanamycin



图 3-3 移栽后的转基因番茄

A:转基因番茄盛开的花朵; B:转基因番茄的果实; C:转基因番茄的成熟果实

Fig 3-3 Transgenic tomato plants transplanted in soil

A: Flowers of transgenic tomato plants; B: Fruits of transgenic tomato plants;

C: Some transgenic tomato plants

第四章 口蹄疫病毒免疫原基因在番茄中的整合与表达

基因转化后必须确定外源基因是否整合到植物染色体上,整合的基因是否正常表达。已有许多方法用于转基因植物的鉴定,通常的分子生物学方法是提取植物基因组 DNA 进行 PCR 扩增或 Southern 杂交分析,确定转基因植株。进行基因表达的分子检测常用的主要有两种途径,一是转录水平上 mRNA 的表达,即 RT-PCR 或 Northern 杂交分析;二是翻译水平上特异性蛋白质的表达,即 Western Blotting 杂交或 ELISA 检测外源基因表达蛋白的抗原性。本章主要从上述方面对外源基因进行检测。转基因植株的获得及初步的分子生物学检测,为进一步研制开发安全、有效的 FMD 转基因植物疫苗奠定了基础,为利用植物作为未来疫苗来源的候选材料提供了依据。

4.1 材料与方法

4.1.1 植物材料

转基因番茄植株及非转基因番茄植株(见第三章)。

4.1.2 主要试剂及仪器

工具酶为 Promega 公司产品。植物总 RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant Mini Kit 及 RNase-Free DNase Set 为 QIAGEN 公司产品。牛抗 FMDV 多克隆抗体、FMDV 标准抗原由本所马军武副研究员提供,碱性磷酸酶(AP)标记的兔抗牛 IgG 为 Sigma 公司产品,PAGE 电泳试剂、NC 膜及 NBT/BCIP 均为 AMERSCO 和 Sigma 产品。CTAB 购自北京 Sigma 公司。蛋白凝胶电泳 Bio-Rad mini-III Electrophoresis System 及电转移槽为 Bio-Rad 公司产品。

4.1.3 PCR 法检测外源基因的整合

4.1.3.1 植株总基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法,提取卡那霉素选择压力下筛选的番茄转化植株(pBin438/VP1 转基因番茄和 pBin438/P12X3C 转基因番茄)及未转基因的番茄植株总 DNA,具体操作步骤如下:

- 1) 50~100mg 幼嫩叶片在液氮中迅速研磨成粉末;
- 2) 将粉末迅速转入一加有 500 μ L、60 $^{\circ}$ C 预热的 DNA 提取缓冲液(2%CTAB, 1.4mol/L NaCl, 50mol/L Tris-HCl, pH8.0, 20mol/L EDTA)的离心管中;
- 3) 加入 50 μ L 1%偏重亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 25 μ L β -巯基乙醇(至终浓度为 1%);
- 4) 65 $^{\circ}$ C 温浴 30min;
- 5) 冷却至室温,加入 50 μ L 20%PVP(至终浓度为 1%)轻轻混匀;
- 6) 加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混匀;
- 7) 室温,12 000rpm 离心 10min;

- 8) 取上清液转入一新的 10mL 离心管, 加入等体积的异丙醇和 1/10 体积的 3mol/L NaAc (pH5.2), 颠倒离心管混匀, 室温下沉淀 10min;
- 9) 用 70%乙醇洗两次, 室温干燥;
- 10) 将沉淀物溶于 20 μ L TE 溶液(1mol/L Tris-HCl pH8.0, 0.1mol/L EDTA)中, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

4.1.3.2 PCR 法扩增目的基因和选择性报告基因

以抗性植株总 DNA 为模板、未转化植物 DNA 为阴性对照、对应质粒为阳性对照, 以 VPR1/VPR2 为引物扩增 VP1 基因, PR1/3C、3C1/3C2 为引物分别扩增 P12X3C、3C 基因, 扩增体系及条件同 2.1.5.2。随机选取部分转基因植株用引物 *NPTII* 4(GATGGATTGCACGCAGGTTC) 和 *NPTII* 5(AAATCTCGTGATGGCAGGTTGG)进行选择性报告基因 *NPTII* 的扩增, 扩增结束后取 5 μ L 反应液用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析。

4.1.4 转基因番茄的 RT-PCR 检测

PCR 分析中表现为阳性的转基因番茄植株按植物总 RNA 提取试剂盒法提取总 RNA, 按 RNase-Free DNase Set 试剂盒说明消化 DNA, 具体操作步骤如下:

4.1.4.1 植物总 RNA 的提取

器皿和容器的处理: 所有待用的烧杯、研钵、试剂、离心管、量筒、试剂瓶等都用 0.1%DEPC 水溶液浸泡 12h, 然后将离心机、枪头等塑料器皿以及烧杯等玻璃器皿(以及能用高压灭菌的试剂、溶液)高压灭菌 20min, 玻璃和陶瓷制品 180 $^{\circ}$ C 干燥 3h;

- 1) 剪取番茄植株叶片 100mg, 放在液氮中磨成粉末。之后将粉末转入无 RNA 酶的、液氮预冷的离心管中(植物材料不能溶解);
- 2) 加入 450 μ L 裂解缓冲液 RLT (RLT 用前必须加入 β -ME), 剧烈振荡或 56 $^{\circ}$ C 水浴 1~3min;
- 3) 将裂解液转移到 2mL 的收集管中, 最大转速离心 2min, 将上清转移到一个新的离心管中, 弃沉淀;
- 4) 立即加入 0.5 倍体积 (225 μ L) 的无水乙醇, 充分混匀;
- 5) 取上述样品 (约 650 μ L) 加到 RNeasy Mini 柱中, 10 000rpm 离心 15s, 弃滤液;
- 6) 加 350 μ L RW1 buffer 于 RNeasy Mini 柱中, 10 000rpm 离心 15sec, 弃滤液后, 取 10 μ L DNase 和 70 μ L RPD buffer 混匀, 将混和液加在 Mini 柱中, 室温静置 15min, 加 350 μ L RW1 buffer 于 RNeasy Mini 柱中, 10 000rpm 离心 15s, 弃滤液;
- 7) 将 RNeasy Mini 柱转移到一干净的 2mL 的收集管中, 加 500 μ L RPE buffer 于柱中, 10 000rpm 离心 15s, 弃滤液;
- 8) 再加入 500 μ L RPE buffer 于柱中, 10 000rpm 离心 2min, 使膜干燥;
- 9) 将 RNeasy Mini 柱移至另一新的 1.5ml 的收集管中, 管中事先加入 1.5 μ L RNasin, 吸取 30 μ L 无 RNase 水于柱膜中, 室温静置 30s, 10 000rpm 离心 1min 洗脱, 收集离心液-70 $^{\circ}$ C 保存。

4.1.4.2 RT-PCR 法扩增目的基因

分别以 VPR2 及 PR2 为反转录引物, 以提取的 pBin438/VP1 转基因番茄和 pBin438/P12X3C 转基因番茄植株的基因组 RNA 进行反转录, 体系如下:

反转录体系	18 μ L	反转录体系	18 μ L
5 \times AMV buffer	4 μ L	5 \times AMV buffer	4 μ L
dNTP (2.5mmol/L)	1.5 μ L	dNTP (2.5mmol/L)	1.5 μ L
VPR2 (50 pmol/L)	1 μ L	3C2 (50 pmol/L)	1 μ L
模板	11.5 μ L	模板	11.5 μ L

充分混匀后在 70 $^{\circ}$ C 水浴中变性 5min, 然后加入 AMV 反转录酶(10u/ μ L)2 μ L, 在 42 $^{\circ}$ C 水浴中作用 1h, 沸水浴 10min 灭活 AMV 酶, -20 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

以反转录产物为模板, 分别以 VPR1/VPR2 扩增 VP1 基因, 3C1/3C2 为引物按前述方法扩增 3C 基因, 同时以 RNA 为模板, 直接进行 PCR 扩增, 检测 RNA 中有无 DNA 污染。扩增结束后取 5 μ L 反应液用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析。

4.1.5 转基因番茄表达蛋白的双抗夹心 ELISA 检测

取 100mg 转基因番茄叶片加入 400 μ L 样品抽提缓冲液 (PBST, 0.029%NaN₃, pH7.4), 研磨, 10 000rpm 离心 20min, 取上清, 同时以标准 FMDV 抗原和非转基因植株叶片提取物分别作为阳性和阴性对照, 用双抗夹心 ELISA 法检测目的蛋白的表达。96 孔酶标板用口蹄疫兔阳性血清包被, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜。马血清封闭后, 加入 FMDV 标准抗原、RT-PCR 检测阳性植株、非转基因植株叶片提取物, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h 后, 洗涤, 加入口蹄疫豚鼠阳性抗血清(1:1600), 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 洗涤后加入 HRP-兔抗豚鼠 IgG(1:2000), 37 $^{\circ}$ C 作用 1h, 加入底物 OPD-H₂O₂ 于 37 $^{\circ}$ C 作用于 15min, 用终止液结束反应, 于 λ 492nm 处测光吸收。

4.1.6 转基因番茄表达蛋白的 Western-blotting 检测

植物叶片总蛋白的提取: 称取番茄叶片 100mg, 液氮中研磨, 再加入 150 μ L 蛋白提取缓冲液 (50mmol/L Tris-Cl pH7.5, 10mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 0.5%Triton X-100, 14mmol/L 巯基乙醇, 1mmol/L PMSF)混匀, 4 $^{\circ}$ C, 12 000rpm 离心 20min, 上清液中加入等体积 2 倍的上样缓冲液(20%甘油, 0.05%溴酚蓝, 125mmol/L Tris-CL pH6.8, 4%SDS, 10%巯基乙醇), 煮沸 5min, SDS-PAGE 凝胶的灌制及电泳参照分子克隆 P906。每一泳道上样 25 μ L。

按照 Towbin(1979)方法将蛋白从聚丙烯酰胺凝胶电转移至硝酸纤维素膜(NC)上, 常温 25V 电转移 3h。将已转移过的 NC 膜放入 PBST 缓冲液中漂洗一下, 转入膜封闭缓冲液 [PBS+3%BSA(W/V)]中, 在摇床上室温孵育 2h 或 4 $^{\circ}$ C 过夜。将封闭缓冲液倒掉, 用 PBST 洗 2~3 次, 每次 5~10min., 用抗体封闭液 [PBS+1%BSA(W/V)]稀释牛抗 FMDV 的多克隆抗体(1:2 000), 室温孵育 1h 后, 用 PBST [PBS+0.05%Tween-20]漂洗三次, 每次 5~10min。加入抗体封闭液稀释的

碱性磷酸酶（AP）标记的兔抗牛 IgG 抗体(1:15 000)，室温孵育 1h 后，用 PBST 漂洗 3 次，每次 5~10min。闭光条件下，加入 BCIP/NBT 显色液，至条带清晰后，将膜放入蒸馏水中漂洗，终止显色反应，用水冲洗，观察结果。

4.2 结果

4.2.1 转基因番茄的 PCR 检测

以抗性植株叶片总 DNA 为模板，质粒 pBin438/VP1、pBin438/P12X3C 为阳性对照，非转化植株为阴性对照，并设置 H₂O 为模板的空白对照，用 PCR 方法检测外源基因，结果从 60 株 pBin438/VP1 转基因抗性植株中，有 51 株出现与质粒所扩增的目的片段大小一致的条带(图 4-1)，阳性率大于 80%，而非转基因番茄的对照没有扩增出任何特异性条带。进一步对 pBin438/P12X3C 转基因抗性植株进行 PCR 扩增，有 26 株能够扩增出目的基因（图 4-2），阳性率大于 60%，而非转基因植株没有扩增出任何特异性条带。初步证实筛选出的抗性植株中有目的基因的整合。

随机选取 30 株转基因植株用 *NPTII* 4 和 *NPTII* 5 为引物扩增选择标记基因 *NPTII*，结果有 26 株扩增到了 *NPTII* 基因，这 26 株中有 21 株即可以扩增到 *NPTII* 基因也可以扩增到外源基因，*NPTII* 和外源基因共转化的植株占所获得的抗性植株的 70%。由此初步证明植物组成型表达质粒 pBin438/VP1 和 pBin438/P12X3C 的 T-DNA 已从农杆菌中转入番茄基因组中。

4.2.2 转基因番茄的 RT-PCR 检测

对 PCR 检测阳性的植株提取总 RNA，以总 RNA 为模板进行 RT-PCR，从 pBin438/VP1 转基因植株中扩增出的片段大小约为 650bp，与目的基因大小一致（图 4-3），pBin438/P12X3C 转基因植株中可扩增出 650bp 的 3C 基因，说明 FMDV 免疫基因不仅已整合到转基因番茄基因组中，而且成功转录（图 4-4）。以总 RNA 为模板进行 PCR，没有扩增出任何条带，排除了 DNA 污染的可能。

4.2.3 目的基因在番茄中表达蛋白的 ELISA 检测

提取 pBin438/VP1 转基因番茄植株总蛋白，用双抗夹心 ELISA 检测，结果显示，约 40% 的 PCR 阳性植株 ELISA 检测也呈阳性，25% 的 pBin438/P12X3C 转基因番茄 PCR 阳性植株 ELISA 检测同样呈阳性，对其中的 15 株植株的蛋白提取液原液 OD 值进行比较分析，结果显示，样品 B、C、D、E、F、G、H、I、J 的 OD 值比作为阴性对照的样品 K 高 2 倍或 2 倍以上，说明这几株转基因番茄均表达出目的蛋白（图 4-5）。

4.2.4 目的基因表达蛋白的 Western-blotting 检测

将 ELISA 筛选出的阳性植株叶片蛋白提取液经电泳和转膜杂交后，结果显示：表达蛋白能被口蹄疫病毒阳性牛血清抗体识别，转 VP1 基因的植株在约 24KD 处可见较微弱的特异性免疫反应

条带，与标准 VP1 蛋白大小相符，而未转化的对照植株无此杂交带（图 4-6）。说明 VP1 基因在转基因番茄中已表达，且所表达的蛋白具有免疫反应活性。

随机选取 pBin438/P12X3C 转基因番茄 ELISA 检测阳性的 4 株植株，提取叶片蛋白进行 Western Blotting 检测，结果显示有 1 株转基因植株在约 24KD 和 31KD 有特异性免疫条带(图 4-7)。由此说明在番茄中表达的外源蛋白具有一定的免疫学功能。在植物叶片总蛋白中，有些蛋白也可与抗 FMDV 血清产生交叉免疫反应，所以在 Western Blotting 分析中，除特异性蛋白分子之外，还观察到了由非特异抗原抗体结合反应而产生的非特异蛋白分子条带。

4.3 讨论

4.3.1 外源基因在植物中的整合

T-DNA 转移包括 T-DNA 在农杆菌中被加工、剪切、复制，最后穿过细胞膜转移到植物细胞并整合进植物基因组的过程。T-DNA 的合成是从右边界至左边界，故若右边界缺失，T 链的合成便无法开始，说明右边界在 T-DNA 转入植物细胞中的重要性。在本试验中随机选取 30 株 pBin438/VP1、pBin438/P12X3C 的转基因植株只有 21 株即可以扩增到 *NPTII* 基因也可以扩增到目的基因，*NPTII* 和外源基因共转化的植株占所获得的抗性植株的 70%，不是所有抗 Kan 植株都能扩增出目的基因的现象表明 pBin438/VP1 和 pBin438/P12X3C 的 T-DNA 在由右边界起始转入植物的过程中，由于 *NPTII* 基因在构建上靠近 T-DNA 右边界而优先进入到植物细胞中，VP1 基因距右边界较远可能未能复制合成或插入到番茄基因组中。推测如果把目的基因构建在 T-DNA 区的右边界，选择标记基因位于其下游，将可能有效的提高筛选到含目的基因的转基因植株的效率。

4.3.2 外源基因在转基因植物中表达

将构建的双元表达载体 pBin438/VP1 及 pBin438/P12X3C 通过农杆菌介导法转化番茄，获得 pBin438/VP1 转基因植株 60 余株，pBin438/P12X3C 转基因植株 40 余株，PCR 检测阳性率较高。双抗夹心 ELISA 和 Western Blotting 方法对目的蛋白的表达情况进行检测，结果表明：目的蛋白在转基因番茄中正确表达，且具有反应原性；对 P12X3C 的 Western 杂交发现在约 24KD 处出现了一条特异性免疫条带，样品 3 除在约 24KD 处有一条特异性条带外，在约 31KD 处也有一条带，未转基因植株在相应的位置上没有条带（图 4-7），推测可能是转基因植物中表达的多聚蛋白 P1 在 3C 蛋白酶的裂解作用下，以结构蛋白 VP1、VP0、VP3 单体的形式存在，但是转基因植物中表达的病毒衣壳蛋白能否组装成病毒样颗粒（VLP）还需进一步的验证。ELISA 检测结果不理想，转基因植株抗原表达量远低于稀释后的口蹄疫病毒抗原量，阳性率低，推测原因可能是因为外源基因在不同转基因植株个体之间表达差异，虽然基因的表达水平取决于启动子的强度，但它同样也受到启动子两翼序列的影响。经由农杆菌介导法导入的外源 DNA，对寄主植株染色体的整合作用是随机发生的。如果转基因是整合在转录活跃的常染色质中，就有可能获得高水平的表达；相反，如果转基因是插入在重复序列或异染色质区，或是插入在两者的附近，那么其表达活性就会明显下降。另外笔者认为 ELISA 检测阳性率低、重复性不好也可能与植物组成型表达载体导致

植株不同生长时期、不同生长条件、不同取材部位目的蛋白表达量存在差异有关,或者跟我们的纯化技术有关,从植物中提取的粗蛋白可能会掩盖部分的表达蛋白或者使部分蛋白发生了降解,以上结果、结论仅仅是初步的尝试,对表达体系的优化及表达的多聚蛋白能否组装、加工成空衣壳尚需进一步摸索。

国外转基因疫苗的研究发现,尽管 ELISA 检测不理想,但无论饲喂免疫还是注射免疫动物后,都能诱导动物体内产生特异性抗体,并得到一定的免疫保护。另外, Arakawa 和 Tacket 也发现即使在转基因植物中表达的大肠杆菌不耐热肠毒素 B 亚单位(LT-B)蛋白的水平为可溶性蛋白的 0.1%,也可以刺激小鼠产生特异性的保护性抗体 (Arakawa et al,1998;Tacket et al,1998),这一点在我们后续的动物免疫实验中也得到了验证。

4.3.3 外源基因在植物中表达存在的问题

外源基因整合到植物基因组后并不一定能有效表达出外源蛋白,有尚未知道的原因使外源基因不能表达即基因沉默(Brennan et al,1999),本试验中经 PCR 检测阳性的转基因植株未能全部获得正常转录和翻译,RT-PCR 结果表明,DNA 检测阳性但 RNA 检测阴性的植株可能发生了基因沉默,另外部分植株 DNA、RNA 检测阳性但 ELISA 及 Western Blottin 检测表达量很低甚至不表达,我们认为可能有几个原因:1)由于受体植物番茄本身含量低,表达产物相对来说也较低,这是转基因植物疫苗普遍存在的问题,如何提高抗原蛋白在植物中的表达量是今后研究植物表达抗原的主要任务之一;2)表达的多聚蛋白 P1 及蛋白酶 3C 分子量很大,在植物体内可能影响表达量;3)可能是由于导入的外源基因插入到植物基因组中不太活跃的区域引起基因沉默。这种外源基因在转基因植物中表达受抑制的现象,在植物基因工程中已极为常见,成为植物遗传工程走向商业化的潜在障碍,受到了较为广泛的关注。

目前认为,重复序列是基因沉默的普遍诱因,甲基化是基因沉默的直接原因。引起基因沉默的遗传学机制主要有 4 种(Cramer et al,1999;Tuboly et al,2000;Marshall et al,2001):

- 1) 位置效应(position effect): 外源基因在植物基因组中的整合位点是随机的,其表达必然会受到不同插入位点的遗传背景的影响,因此,同一实验中得到不同转化植株,外源基因的表达水平有很大差异,此为“位置效应”。当外源基因整合到甲基化程度高、转录活性低的异染色体上时,一般不能表达或表达水平低;若整合到甲基化程度低、转录活性高的常染色体上,其表达也要受两侧基因序列中 GC 碱基对含量的影响。在高 GC 碱基对序列组成区域,外源基因的插入可能会在此位置产生一个易于识别的甲基化位点,从而激活甲基化酶,使外源基因甲基化从而导致其转录活性降低。因此,“基因沉默”现象发生的频率极高。
- 2) 重组效应(recombination effect): 外源基因相对于受体植物基因组来讲是“外来侵入者”,对于外源基因的“侵入”,植物肯定会作出排斥反应来保护自己。现已明确植物基因组存在的重组和修复系统很容易识别外源基因,使其发生不同程度的重排,从而导致 DNA 的易位、缺失、重复等一系列的结构变化(Rollinson et al,1999)。研究表明,基因的重排对基因的表达调控有重要作用,外源基因的结构异常导致其失活,出现“基因沉默现象”。
- 3) 转录水平的基因沉默(transcriptional gene silence, TGS): TGS 是 DNA 水平上基因调控的

结果,指外源基因无法顺利转录成相应的 RNA 而导致沉默。外源基因如果以多拷贝形式整合到同一位点上,形成正向或反向重复,则不能表达。这可能是由于重复序列间自发配对,甲基化酶特异识别这种配对结构而使其甲基化,从而抑制表达。另外,外源基因及其启动子的甲基化、同源基因间的反式失活会导致转录水平的基因沉默。

- 4) 转录后的基因沉默(post-transcriptional gene silence, PTGS): PTGS 较 TGS 更为普遍,是指外源基因能够转录成 mRNA,但正常的 mRNA 不能积累,即 mRNA 一经合成就被降解,或被相应的反义 RNA 蛋白封闭,从而失去功能。这可能是由于同源或重复的基因表达了过量的 mRNA 的结果。过量的 RNA 也可能和同源 DNA 相互作用导致重新甲基化,使基因失活(Yu et al,2000)。与转录水平的基因沉默不同,转录后水平的基因沉默具有逆转性,即受抑基因可以通过减数分裂来恢复表达活性,表现为减数分裂的不可遗传性。

针对上述基因沉默的机制,可从以下方面加以改进,尽可能地克服基因沉默现象,促进目的基因的高效表达(Langridge et al,1989;Strohmaier et al,1982;Walmsley et al,2000):

- 1) 外源基因的选择:对外源基因进行密码子的优化,尽量选用植物偏爱密码子,是克服转基因沉默的策略之一;
- 2) 启动子的选择:构建载体时,尽量使用中等强度的启动子,并避免使用具有同源序列的启动子;
- 3) 利用具有组织和发育特性作用的增强子,以诱导正确的去甲基化作用,从而启动基因转录;
- 4) 利用特异性重组系统,以实现外源基因单拷贝、位点特异的整合,避免多拷贝基因所造成的顺式或反式失活,又避免位置效应所造成的转基因沉默;
- 5) 选择单拷贝的转化体:通过 Southern 印迹杂交,在分子水平筛选单拷贝的转化体,并对其稳定性进行鉴定,以避免多拷贝引起的转基因沉默。

4.3.4 未来研究的方向

虽然植物的核转化系统可以稳定、长期地生产重组抗原蛋白,并且方法简单,有利于可饲(食)用疫苗的商业化生产,但如何提高表达量是今后转基因疫苗研究的主要方向,其中优化基因表达的策略之一是利用植物种子或特异组织中积累从而提高目的蛋白的表达量,如马铃薯块茎特异启动子驱动诺沃克病毒衣壳蛋白基因的表达,结果在转基因马铃薯微块茎中,表达蛋白占总可溶性蛋白的 0.37%,明显高于外源基因在烟草叶片中的表达水平。其他一些植物组织特异性启动子有:番茄果实成熟特异性表达的多聚半乳糖醛酸酶基因启动子、花粉特异表达基因启动子、大豆种子特异性启动子等。最近 Ruf 等(Ruf et al,2001)成功建立了番茄果实的质体表达系统,可使外源基因在番茄果实中超量表达(重组蛋白占总可溶性蛋白的 20%),为高等植物果实中高效表达疫苗蛋白建立了技术平台。因此,优化并改进基因表达框架,选用强启动子和增强子,使其可调控或可定位表达以增强外源基因的翻译效率是今后转基因疫苗研究的关键。同时,进一步加强对各表达系统分子生物学基础研究是必要的。检测方法的改进也是目前包括转基因疫苗在内的新型疫苗面临的主要问题。

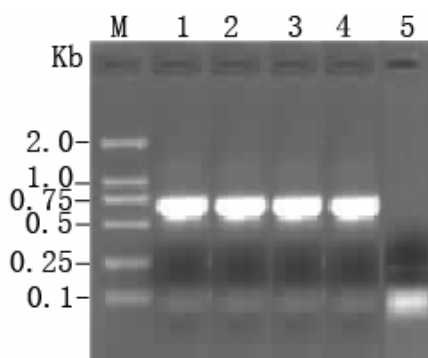


图 4-1 pBin438/VP1 转基因植株的 PCR 分析

M:DNA marker;1-4:转基因植株; 5: 未转基因植株
Fig 4-1 Detection of the VP1 in transgenic plants using PCR

M: DL2000 Marker;

1-4:PCR products of transformed plants;

5:PCR products of Non-transformed plants

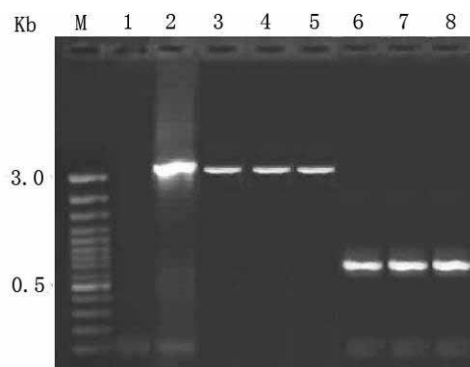


图 4-2 pBin438/P12X3C 转基因植株的 PCR 分析

M:DNA marker;1: 未转基因植株; 2-5:从转基因植株扩增 P12X3C; 6-8: 从转基因植株扩增 3C

Fig 4-2 Detection of the P12X3C in transgenic plants using PCR

M:100bp Ladder Plus Marker;1:negative control;

2-5:P12X3C products from transformed plants;

6-8:3C products from transformed plants

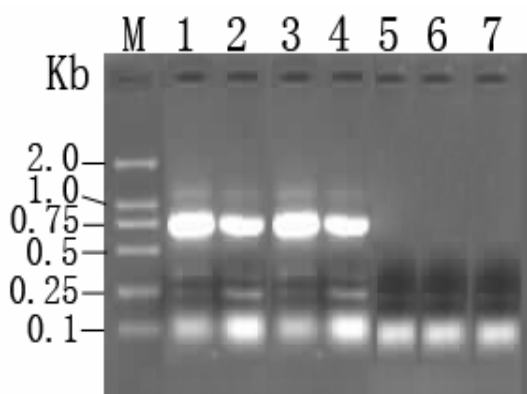


图 4-3 pBin438/VP1 转基因植株 VP1 基因 RT-PCR 分析

M; DNA Marker;1-4:转基因植株 RT-PCR; 5-6:转基因植株 RNA 直接 PCR;7:未转基因植株 RT-PCR

Fig 4:Detection of transcription of the VP1 in transgenic plants using RT-PCR

M:DL2000 Marker;

1-4:PCR products of transformed plants after RT reaction;

5-6:PCR products of transformed plants without RT reaction as control for DNA contamination;

7:PCR products of Non-transformed plants after RT reaction

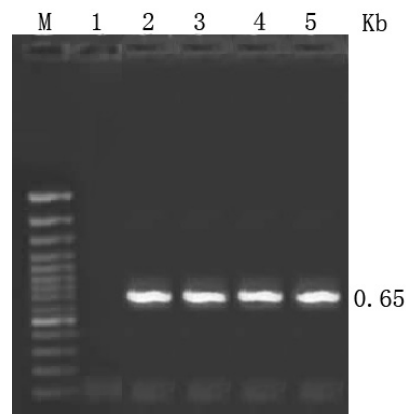


图 4-4 pBin438/P12X3C 转基因植株 3C 基因 RT-PCR 分析

M;DNA Marker;1:转基因植株 RNA 直接 PCR;2-5:转基因植株 RT-PCR

Fig 4-4 Detection of transcription of the 3C in transgenic plants using RT-PCR

M:100bp ladder Plus Marker;

1:PCR products of transformed plants without RT reaction as control for DNA contamination;

2-5:PCR products of transformed plants after RT reaction

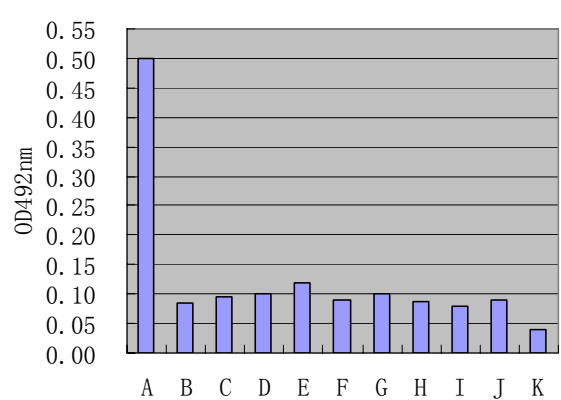


图 4-5 夹心 ELISA 检测转基因植物蛋白表达

A:标准抗原; B-E: pBin438/VP1 转基因植株;
F-J:pBin438/P12X3C 转基因植株; K:未转基因

Fig 4-5 Quantity of target protein in transformed plants tested with sandwich-ELISA

A:FMDV antigen;
B-F:pBin438/P12X3C transformed plants;
H-J:pBin438/VP1 transformed plants;
K:Non-transformed plants

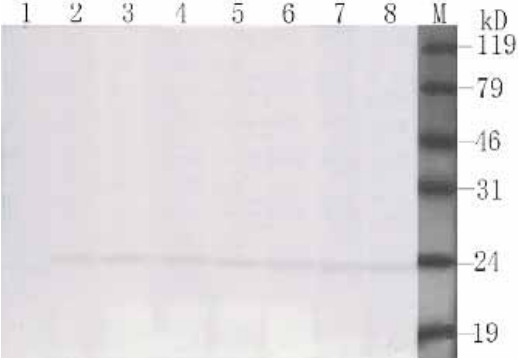


图 4-6 结构蛋白 VP1 的 Western-blotting 检测

M:蛋白分子质量标准;
1:未转基因植株; 2-8:转基因植株

Fig 4-6 Western-blotting analysis of target protein

M. Protein Molecular Weight Marker;
1:Proteins of Non-transformed plants;
2-8:Proteins of transformed plants

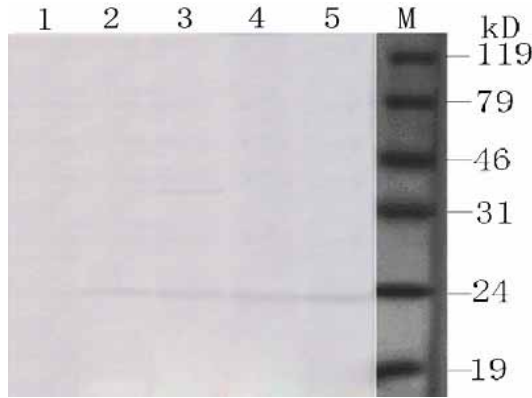


图 4-7 结构蛋白 P12X3C 的 Western-blotting 检测

M:蛋白分子质量标准;
1:未转基因植株; 2-5:转基因植株

Fig 4-7 Western-blotting analysis of target protein

M:Protein Molecular Weight Marker;
1:Proteins of Non-transformed plants;
2-5:Proteins of transformed plants

第五章 口蹄疫病毒 VP1 基因在转基因拟南芥种子中的表达及活性检测

一个世纪以来,许多国家为了预防和控制口蹄疫的发生和流行,对 FMD 疫苗的研究一直没有间断过。从弱毒疫苗到灭活疫苗,从实验动物疫苗到组织、细胞培养疫苗,通过传统方法生产的疫苗虽然在一定程度上控制了 FMD 的流行,但由于其具有热不稳定性、成本高以及生产和使用中的安全隐患等缺点限制了疫苗的推广。现在,随着 DNA 重组技术和 FMDV 分子生物学的飞速发展,基因工程亚单位疫苗、合成肽疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗的研究相继出现,上述几种新型 FMD 疫苗中,植物反应器生产的可饲化疫苗不仅克服了灭活疫苗存在的弊端,而且具有生产成本低、贮存和运输不需要特殊的冷链系统以及使用方便等优点,成为目前新型疫苗研究的热点(Schuyler et al,2002; Lutwick et al,2000; Lauterslager et al,2002),但欲要有新的突破,首先应该考虑如何提高表达量,优化基因表达的策略之一是利用植物种子或特异组织中积累从而提高目的蛋白的表达量。

目前在核表达系统中,主要采用花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 组成型表达启动子,它具有多种顺式作用元件,这类启动子表达具持续性, RNA 和蛋白质表达量相对恒定,不表现时空特异性,也不受外界因素诱导,在组成型启动子的调控下,不同组织器官和发育阶段的基因表达没有明显差异,但表达水平低,而且由于植物组成型启动子引导目的基因在植物的各组织中均有表达,这会消耗植物内源的物质和能量,可能会给植物的正常生长带来一些不利的影响。组织特异性启动子也称为器官特异性启动子,在这些启动子调控下,基因的表达往往只发生在某些特定的器官或组织部位,目前已发现这类启动子中一般同时存在几种控制组织特异性表达的元件,其表达特异性由这些元件的种类、数目及相对位置等共同决定。利用组织特异性启动子调控基因表达,不仅可提高目的基因在这些部位的表达量,将生物能耗降到最低,而且有利于表达产物的分离 (Van Rooijen,1995)。笔者在本试验用种子特异性启动子 7S 替换了植物组成型表达载体 pBin438 中的花椰菜花叶病毒 35S 组成型启动子,构建了 FMDV 结构蛋白 VP1 的种子特异性表达载体 p7S Bin438/VP1,在根癌农杆菌菌种 GV3101 的介导下,通过浸花法转化拟南芥 (Clough et al,1998;Ye et al,1999),转基因拟南芥通过 Kan 抗性筛选后,进一步进行了基因组 PCR 鉴定和 Western Blotting 杂交的鉴定,分子检测表明,FMDV 结构蛋白 VP1 编码基因已整合进拟南芥基因组并获得表达。本试验利用模式植物拟南芥探索了该载体在植物转化上的应用潜能,为进一步将 FMDV 免疫基因向豆科植物中的转化提供依据。

5.1 材料与方法

5.1.1 质粒和菌株

含 FMDV/China/99 分离株 VP1 基因的植物表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 的构建见第二章。根癌农杆菌 GV3101、辅助质粒 pRK2013 由中国农业科学院作物所馈赠,含种子特异性启动子 7S

的质粒 pUC19/7S 由中国科学院微生物所馈赠。

5.1.2 试剂及植物材料

工具酶为 Promega 公司产品。限制性内切酶 *Bam*H I、*Sal* I、*Hind*III, DL2000 Marker 购自大连宝生物有限公司。100bp DNA Ladder Marker 购自上海生工生物工程有限公司。口蹄疫病毒阳性牛血清由本所马军武副研究员提供, CTAB、碱性磷酸酶 (AP) 标记的兔抗牛 IgG 为 Sigma 公司产品, PAGE 电泳试剂、NC 膜及 NBT/BCIP 均为 AMERSCO 和 Sigma 产品。植物材料野生型拟南芥 *Columbia* 生态型由中国科学院寒区旱区环境与工程研究所植物基因工程实验室安黎哲研究员馈赠。

5.1.3 引物的设计与合成

根据已构建的植物组成型表达 Mini-Ti 质粒 pBin438/VP1 的限制性酶切位点及种子特异性启动子的核苷酸序列, 设计一对扩增种子特异性启动子 7S 的引物: 7S5 (上游)、7S3 (下游), 上游引物中引入一个 *Hind*III 的酶切位点, 下游引物中引入一个 *Bam*H I 的酶切位点。引物由大连宝生物工程大连有限公司。

5.1.4 种子特异性表达 Mini-Ti 质粒 p7SBin438/VP1 的构建

种子特异性表达载体 p7SBin438/VP1 的构建策略见图 5-1。

提取质粒 pUC18/7S, 以 7S5 和 7S3 为引物, 扩增种子特异性启动子 7S 片段, 扩增产物经 *Hind*III、*Bam*H I 双酶切后与经同样双酶切回收的 pBin438/VP1 载体大片段连接, 转化感受态菌株 JM109。对转化子进行酶切和 PCR 鉴定, 阳性克隆命名为 p7SBin438/VP1。将筛选出的阳性质粒送宝大连宝生物工程有限公司进行自动化测序, 测序结果用 DNASTAR 软件分析。酶切、连接、转化等操作参见第二章。

5.1.5 FMDV 种子特异性双元表达载体的构建

采用三亲交配法将测序正确的 Mini-Ti 质粒 p7SBin438/VP1、辅助质粒 pRK2013 和根癌农杆菌 GV3101 融合, 在 YEB 培养基(Kan100mg/L, Str25mg/L, Rif50mg/L)上, 28℃培养筛选并检测目的基因。具体操作详见 2.1.4.8。

5.1.6 浸花法(Floral dip)转化拟南芥

在直径 10cm 的小花盆中装上营养土, 然后用改良 Hoagland 培养液将营养土浇透, 将拟南芥种子播入小花盆, 播种前种子加少量水置于 4℃纯化 2~3d, 播好的种子放入 20±2℃、连续光照的气候室培养, 待拟南芥开始抽苔之后, 切掉主苔, 待侧枝伸出 2~10cm 时, 顶端有较多未开放的花苞时进行转化, 选择最佳转化时机非常重要。

在真空渗入前 2d, 挑取含 p7SBin438/VP1 的 GV3101 农杆菌单菌落于 5mL 的 YEB 培养基

(Kan100mg/L, Str25mg/L, Rif50mg/L)中, 28℃、250rpm 培养约 2d 后, 以 1:100 比例转接到 500ml YEB 培养基中, 摇培至 OD₆₀₀ 约 0.8 左右, 5 000rpm 离心 15min, 将离心所得菌体重悬于渗透介质(1/2MS 盐, 1 倍的 B5 维生素, 蔗糖 50g/L, MES 0.5g/L, 0.044μM 6-BA, 200μl/L Silwet L-77, 用 KOH 调 pH5.7)中, 将菌液倒入小烧杯, 稀释至 OD₆₀₀ 约 0.8 左右, 将待转化的拟南芥连同花盆倒浸于渗透介质中, 浸泡 3~5min 后, 将处理好的拟南芥用高且干净的保鲜膜包起, 保持湿度, 黑暗中放置, 第二天去掉保鲜膜, 放在温室中, 并给拟南芥充足水分, 营养, 继续培养至种莢开始变黄, 大约 4 周后, 给拟南芥套上信封并放倒, 放置一星期左右, 将植株上半部分剪下, 放在信封里, 待种子彻底干燥后, 收种子保存在装有硅胶的 EP 管里, 待筛选。

5.1.7 转基因拟南芥 T0 代种子的抗性筛选

将种子在灭菌水里浸泡 30min, 倒掉无菌水, 加入 70%乙醇放置 30s, 倒掉乙醇, 无菌水洗两次, 加入 10%次氯酸钠振荡消毒 10min 后, 用无菌水洗 5~6 次, 将种子重悬于少量无菌水中, 4℃春化 2d 后, 用 1mL 移液器吸取水溶液中的种子, 均匀播种于 MS 培养基上 (Kan50mg/L), 转入 20±2℃、连续光照的气候室培养。

5.1.8 转基因拟南芥的 PCR 检测

取卡那抗性筛选的转基因拟南芥叶片 50mg 于液氮中研磨成粉末, 用 CTAB 法提取总 DNA, 适当稀释后作模板, 以 VPR1 和 VPR2 为引物, 按 2.1.4.2 方法进行 PCR 扩增, 同时以未转基因的叶片作阴性对照。植物基因组 DNA 的提取方法及 PCR 扩增方法详见第三章和第二章。

5.1.9 转基因拟南芥 Western-blotting 检测

分别提取 50mg PCR 阳性转基因拟南芥叶片和莢的总蛋白, 液氮研磨, 加 150μL 蛋白抽提缓冲液 (50mmol/L Tris-CL, pH7.5, 10mmol/L EDTA, 100mmol/L NaCl, 0.5% Triton X-100, 14mmol/L 巯基乙醇, 1mmol/L PMSF), 混匀, 4℃, 12 000 rpm 离心 20min, 加入等体积的上样缓冲液, 煮沸 5min, 12%SDS-PAGE 电泳后, 电转移至 NC 膜上, 封闭、漂洗, 用口蹄疫阳性牛血清 (1:12 000 稀释) 37℃孵育 2h, 漂洗后以碱性磷酸酶 (AP) 标记的兔抗牛 IgG (1:15 000 稀释) 37℃孵育 1h, 膜漂洗后, 闭光条件下加入显色液 NBT/BCIP, 至条带清晰后, 将膜放入蒸馏水中漂洗, 终止显色反应。

5.2 结果

5.2.1 种子特异性表达 Mini-Ti 质粒 p7S Bin438/VP1 的构建

种子特异性表达载体的构建流程策略 5-1。

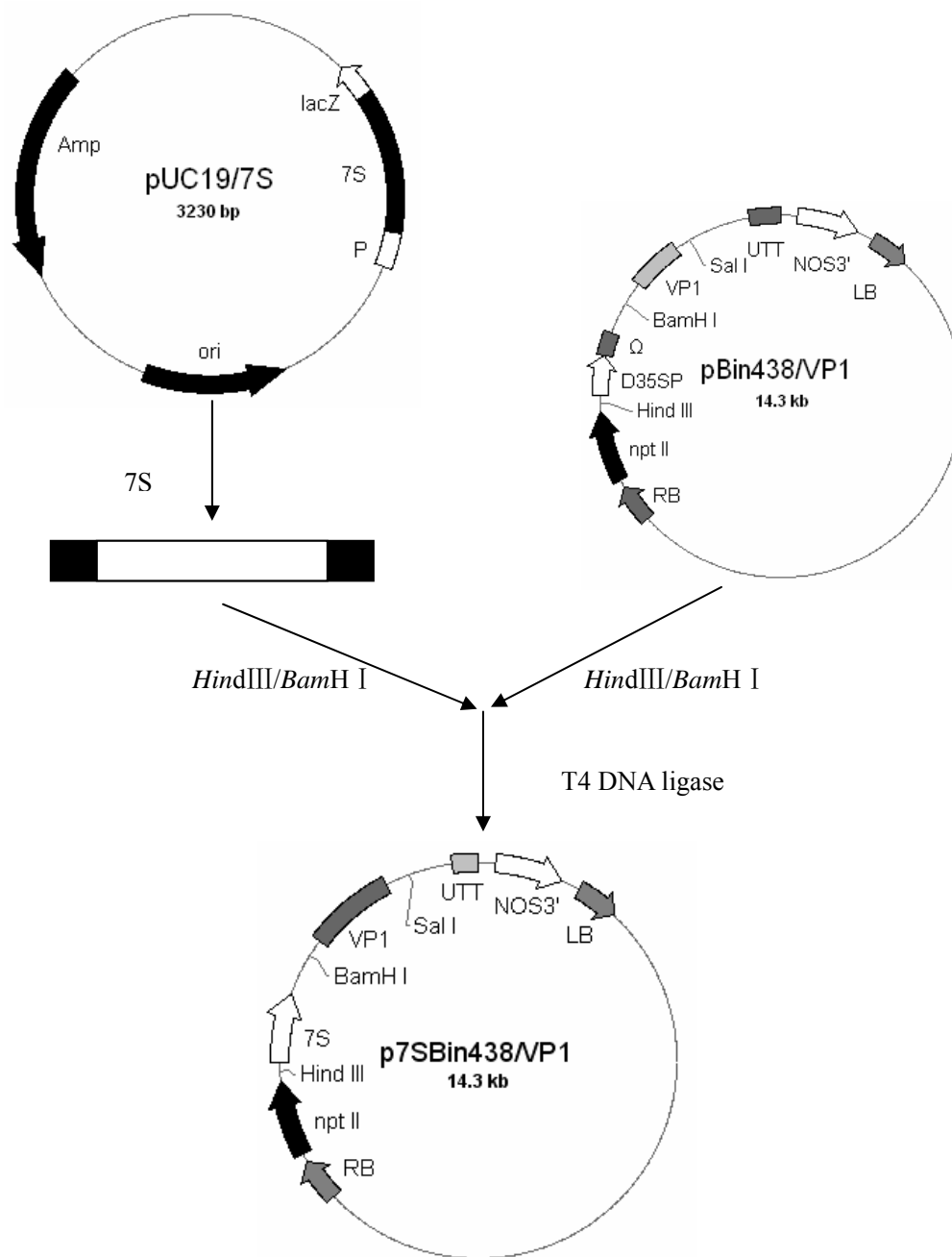


图 5-1 种子特异性表达载体 p7SBin438/VP1 构建策略

Fig 5-1 The construction of plant seed-specific
expression vector p7SBin438/VP1

在含卡那霉素的 LB 平板上挑斑克隆后,经碱裂解法提质粒,将 Mini-Ti 质粒 p7SBin438/VP1 用 *Bam*H I、*Sal* I 双酶切检测插入片段的大小,结果可切出一条 650bp 的片段,经 *Hind*III、*Bam*H I 双酶切后,可切出一条 530bp 的片段,以酶切正确的质粒为模板,以(VPR1/VPR2)和(7S5/7S3)为引物进行 PCR 扩增,分别能扩增出一条约 650bp、530bp 的片段,大小与预计的片段相符,说明包含 VP1 基因的种子特异性表达 Mini-Ti 质粒 p7SBin438/VP1 已构建成功(图 5-2)。测序结果表明:FMDV VP1 基因已正确克隆到植物表达质粒载体上,与亲本毒株 O/China/99 株的相应编码序列完全一致,同源率为 100%。

5.2.2 植物种子特异性双元表达载体的构建

按照农杆菌质粒提取方法提取质粒 DNA,以(VPR1/VPR2)和(7S5/7S3)为引物进行 PCR 扩增,分别能扩增出一条约 650bp、530bp 的片段,大小与预计的片段相符(图 5-3),说明种子特异性表达载体 p7SBin438/VP1 已转移进农杆菌 GV3101,将结果为阳性的农杆菌菌落扩繁保种,以备转化植物所用,FMDV VP1 基因的种子特异性双元表达载体 p7SBin438/VP1 构建成功。

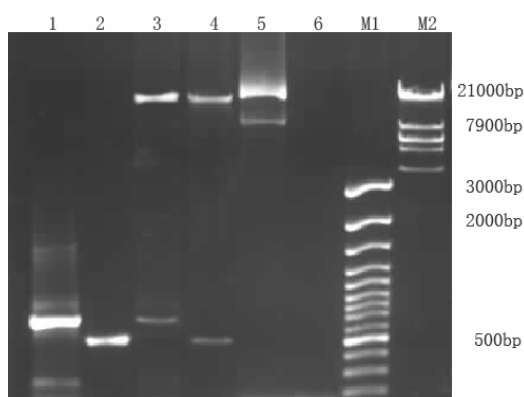


图 5-2 质粒 p7SBin438/VP1 的酶切及 PCR 鉴定

M1.M2:DNA marker; 1:VP1 扩增产物; 2:7S 扩增产物;

3:*Bam*H I /*Sal* I 双酶切; 4:*Hind*III/*Bam*H I 双酶切;

5:质粒 p7SBin438/VP1; 6:阴性对照

Fig 5-2 Identification of p7SBin438/VP1 by enzyme digestion and PCR

M1:100bp DNA Ladder Plus;M2:Low Range II Marker;

1:PCR products of VP1; 2:PCR products of 7S;

3:p7SBin438/VP1 digested with *Bam*HI/*Sal*I;

4:p7SBin438/VP1 digested with *Hind*III/*Bam*HI;

5:Recombinant Plasmid p7SBin438; 6:Negative control

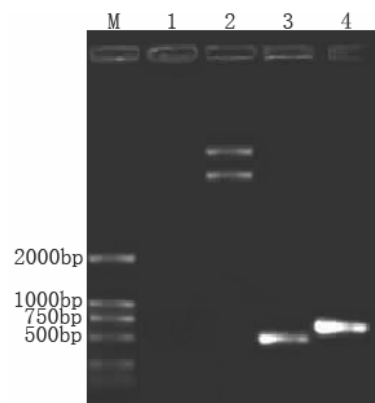


图 5-3 双元表达载体的 PCR 鉴定

M:DNA marker;1:阴性对照;2:农杆菌质粒;

3:7S PCR 扩增;4:VP1 PCR 扩增

Fig 5-3 Identification of *Agrobacterium*

Tumefaciens binary plasmid by PCR

M:DL 2000 Marker;1:Negative control;

2:*Agrobacterium Tumefaciens* plasmid;

3:PCR products of 7S(0.65Kb);

4:PCR products of VP1(0.53Kb)

5.2.3 拟南芥 T0 代种子的收获和抗性筛选

待拟南芥植株生长成熟后,收获其种荚中的种子,按前述的方法进行消毒后,播种于含卡那霉素 50mg/L 的 1/2MS 培养基上筛选抗性转化幼苗,大多数幼苗在抗性筛选两周后开始发黄变白,然后逐渐死亡,抗 Kan 的转化幼苗则逐渐长大,生根迅速,而非转化植株则不能生根并开始枯黄(图 5-4),对照生长良好(5-5)。待抗 Kan 幼苗长出 4~8 片莲座叶后移栽到 Hoagland 营养液浸透的营养土里继续培养(图 5-6,图 5-7)。

5.2.4 转基因拟南芥的 PCR 检测

提取抗 Kan 的拟南芥幼苗叶片基因组 DNA,用引物 VPR1/VPR2 进行转基因拟南芥目的基因的检测,图 5-8 为 PCR 检测结果,在获得的 16 株卡那霉素抗性转基因植株中,有 10 株可扩增出 VP1 基因,阳性率为 62%。由此初步证明种子特异性质粒 p7SBin438/VP1 的 T-DNA 已从农杆菌中转入拟南芥基因组中。

5.2.5 转基因拟南芥的 Western-blotting 分析

分别提取转基因拟南芥和未转基因拟南芥的叶片和荚的总蛋白进行 Western Blotting 检测,结果如图 5-9 所示,有两株转基因拟南芥的荚样品在相应的位置上出现了一条浅带,而对应的叶片蛋白提取液和未转基因拟南芥的荚在相应位置上没有出现特异性免疫条带,说明种子特异性启动子 7S 引导 VP1 基因在转基因拟南芥的荚中得到了高效表达。

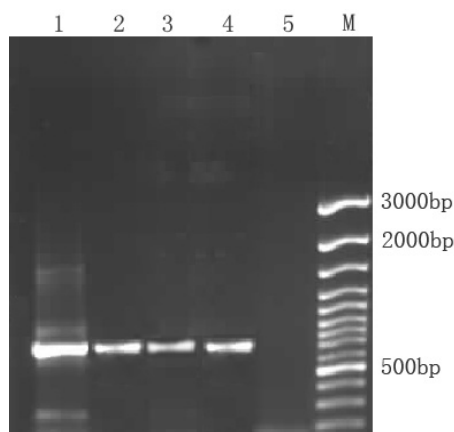


图 5-8 转基因拟南芥的 PCR 鉴定

M: DNA Marker;1-4:转基因植株;5:未转基因植株

Fig 5-8 Identification of transgenic *Arabidopsis thaliana* by PCR.

M:100bp Ladder Plus Marker;

1-4:Transformed plants;

5:Non-transformed plants

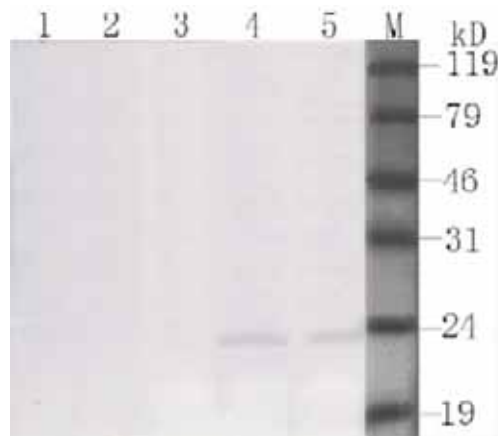


图 5-9 Western-blotting 检测

M:蛋白分子质量标准;1:未转基因植株;

2-3:转基因植株叶片;4-5:转基因植株结的荚

Fig 5-9 Western-blotting analysis of target proteins

M.:Protein Molecular Weight Marker;

1:Non-transgenic plants;2-3:Leaves of transgenic

plants;4-5:Pods of transformed plants

5.3 讨论

自 1985 年 Horsch 等人首创农杆菌叶盘法转化成功后, 应用于基因转化的外植物体种类迅速增加, 作为一种重要的模式植物, 拟南芥同时也是一种优良的转化材料(Elke et al,1992; Huang et al,1992; Shahla et al,1987;陈璋, 1994)。拟南芥植株个体小, 种子量大, 生长周期短, 基因组小且已全部测定, 便于研究(孟金陵, 1995;樊妙姬, 1992)。拟南芥的浸花法(Floral-dip)主要是刚露白的花作为农杆菌浸染的感受态细胞, 通过表面活性剂 Silwet L-77 和蔗糖的高渗作用使农杆菌浸染植物组织(Clough et al,1998; Kenneth et al,1987), 该法不需要外植体离体再生系统即可获得转化体种子, 避免了烦琐的组织培养过程, 而是直接以整株植株为对象, 为组织培养困难的植物开辟了一条新的转化途径。在本实验中, 我们用这种方法转化拟南芥得到了转化株, 分子检测证明: FMDV 结构蛋白 VP1 在拟南芥的荚中得到了表达。

外源基因表达量不足往往是导致转基因疫苗效果不理想的主要原因, 现在用于提高外源蛋白在转基因植物中的表达量的方法主要有三种: 优化外源基因的启动子, 修饰转译序列以及使用信号肽。在植物基因工程中大都使用组成型启动子, 对许多双子叶植株的转化, 通常使用花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子或胭脂氨酸合成酶 nos 启动子, 在单子叶植物转化中最常用水稻肌动蛋白 Act 启动子、玉米泛素 Ubi 启动子和 35S 启动子。这类启动子均为高效组成型表达启动子, 在其控制下, 外源基因在转基因植物中的表达可维持一个恒定的水平。然而用于生产疫苗抗原的植物往往要求其在特定时期, 特异组织或器官中表达目的蛋白, 因此有必要使用组织特异型表达启动子或诱导型启动子。目前 Richter 等使用组织特异型表达启动子 Patatin 启动子在马铃薯块茎组织中成功地表达了乙肝表面抗原和诺沃克病毒衣壳蛋白(Richter et al,2000)。其他一些植物组织特异性启动子有: 番茄果实成熟特异性表达的多聚半乳糖醛酸酶启动子、花粉特异表达启动子、大豆种子特异性启动子等。农作物的种子胚部分含有丰富的可溶性蛋白, 重组蛋白表达量较高, 并且能够长期保存, 并且种子蛋白比较容易分离纯化, 有利于浓缩重组抗原蛋白, 是非常理想的重组蛋白的生产载体, 已有关于将外源基因在植物种子中表达生产重组蛋白的报道(Mason et al,1996; 陈章良,1993)。因此本试验用种子特异性启动子 7S 替换了花椰菜花叶病毒 35S 组成型启动子, 构建了包含 FMDV VP1 基因的种子特异性表达载体 p7S Bin438/VP1, 利用模式植物拟南芥研究了该载体在植物转化上的应用, 获得了在荚中高效表达结构蛋白 VP1 的转基因拟南芥植株, 表明 VP1 基因在 7S 启动子的引导下能在转基因植物的荚和种子中高效表达, 为进一步将 FMDV 免疫基因向豆科植物中的转化奠定了良好基础。



图 5-5 未转基因拟南芥种子在无卡那霉素培养基上

Fig.5-5 Non-transgenic plant seeds on MS without Kanamycin



图 5-6 转基因拟南芥 T0 代种子在卡那霉素培养基上

Fig 5-6 Transgenic plant seeds on MS containing Kanamycin



图 5-7 移栽到土壤的转基因拟南芥

Fig 5-7 Transgenic *Arabidopsis thaliana* transplanted in soil



图 5-8 转基因拟南芥生长正常

Fig 5-8 Transgenic *Arabidopsis thaliana* is growing normally

第六章 转基因番茄的动物免疫试验

尽管目前在可饲(食)用转基因疫苗的开发过程中还有许多不肯定因素和技术困难,但是这项研究的前景仍然是光明的。Mason 等用表达 Norwalk 病毒核衣壳蛋白的转基因马铃薯喂饲小鼠或将初步提纯的植物来源的抗原导入鼠胃后,均可在实验动物中检测到特异性 IgG 和 IgA,这一结果与用从昆虫细胞表达系统中提取的 VLP 的动物实验结果相似,表明以上两种来源的病毒颗粒有相同的抗原性(Mason et al,1996)。Arakawa 等在马铃薯中表达了霍乱毒素 B 亚单位(CT-B),用这种转基因马铃薯喂饲小鼠产生的免疫血清,可以中和霍乱肠毒素对 Vero 细胞的致病作用,动物实验结果显示,喂饲含 CT-B 马铃薯的小鼠,在用霍乱肠毒素攻击后,60%的小鼠小肠积液减少(Arakawa et al,1998)。1994 年, Mason 等将 HBsAg 基因转进番茄中,生产出世界上首例植物来源的可食用乙肝疫苗(Mason et al,1994),经过研究人员十余年的努力,已经有多种用于人类或动物疫苗的蛋白在植物中成功表达,转基因疫苗免疫动物后也产生了理想的免疫应答和攻毒保护效果。近几年国内外利用转基因植物表达口蹄疫病毒 VP1 抗原蛋白的研究也有报道,阿根廷的一个研究小组利用植物表达系统生产的 VP1 蛋白免疫小鼠后,能够诱导小鼠产生特异性抗体,并使其得到有效的免疫保护(Carrillo et al,1998;Wigdoroviz et al,1999;Dus Santos et al,2005),中国农业科学院生物技术研究所叶绿体遗传工程室与兰州兽医研究所合作将口蹄疫病毒 VP1 基因导入烟草和衣藻叶绿体中,并获得表达(Sun et al,2003)。虽然转基因疫苗在对小鼠的免疫试验中取得了可喜的进展,但目前还未看到口蹄疫转基因疫苗对豚鼠或本动物的免疫效果的报道,本试验将第四章筛选出的阳性转基因番茄免疫豚鼠,通过间接 ELISA 法检测豚鼠特异性中和抗体的动态变化,以及豚鼠抗强毒攻击的保护力,初步探索了口蹄疫转基因疫苗对实验动物的免疫效果,为进一步研究口蹄疫可饲疫苗提供有力的实验依据和支持。

6.1 材料和方法

6.1.1 植物材料和实验动物

pBin438/VP1 转基因番茄株系 GBS-1、GBS-3, pBin438/P12X3C 转基因番茄株系 GBL-1、GBL-2, 转空载体的番茄植株及非转基因番茄植株作为阴性对照。

健康豚鼠(300~500g)由本所实验动物养殖场提供。

6.1.2 主要试剂

弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂为 Sigma 公司产品。包被抗原、辣根过氧化物酶(HRP)标记的兔抗豚鼠 IgG、OPD、双氧水等试剂为 ELISA 诊断试剂盒所配备。

6.1.3 疫苗的制备及免疫剂量

- 1) 取 0.5g 转基因或非转基因番茄叶片于液氮中研磨，以 1:4(W/V)加入 PBST(pH7.4)混匀；
- 2) 12 000rpm, 4℃ 离心 20min, 取上清液与佐剂按 1:1 混匀乳化(首免用弗氏完全佐剂乳化，加强免疫用弗氏不完全佐剂乳化)；
- 3) 首免每只豚鼠注射 0.4ml(相当于每只 50mg 叶鲜重)，加强免疫时每只豚鼠注射 0.8ml(相当于每只 100mg 叶鲜重)。

上述疫苗制备参考 Carrillo、Dus Santos 等(Carrillo et al,2001;Dus Santos et al,2005)方法。

6.1.4 实验动物免疫

将豚鼠随机分为六组(5 只/组)，将乳化好的疫苗接种于豚鼠的股内侧，分别于 0d、15d、30d 各免疫一次,各组注射试剂及剂量见表 6-1。

表 6-1 实验动物分组
Table 6-1 Grouping of guinea pigs

组别	注射试剂	第一次免疫剂量(FW)	加强免疫剂量(FW)
A	GBS-1 株	0.4ml(50mgFW)	0.8ml(100mgFW)
B	GBS-3 株	0.4ml(50mgFW)	0.8ml(100mgFW)
C	GBL-1 株	0.4ml(50mgFW)	0.8ml(100mgFW)
D	GBL-2 株	0.4ml(50mgFW)	0.8ml(100mgFW)
E	pBin438	0.4ml(50mgFW)	0.8ml(100mgFW)
F	未转基因番茄对照	0.4ml(50mgFW)	0.8ml(100mgFW)

注：FW：叶鲜重，A、B 组为 pBin438/ VP1 转基因番茄，C、D 组为 pBin438/ P12X3C 转基因番茄，E 组为转空载体 pBin438 的番茄，F 组为未转基因番茄。

6.1.5 抗体的监测

6.1.5.1 采血：在免疫前、首免后的第 10d，二免后的第 10d，三免后的第 10d、21d、28d 对免疫豚鼠心脏采血。

6.1.5.2 FMDV 特异性抗体的检测

以间接 ELISA 法测定血清抗体的 OD 值。于 96 孔酶标板上以 BEI 灭活的 O 型 FMDV 细胞毒为包被抗原(1:8 稀释)，被检豚鼠血清为一抗，过氧化物酶标记的兔抗豚鼠 IgG(1:1 000)为二抗，于 λ 492nm 处测定每孔的 OD 值。

6.1.6 攻毒试验

于第三次免疫后第 28 天攻毒。豚鼠后跖部皮内穿刺攻毒，每只豚鼠接种 100ID₅₀/0.2mL 的 O

型 FMDV China99 株强毒, 连续观察 7d。以病变出现的严重程度作为保护效果的判定: 完全保护为不出现任何病变; 部分保护为病变仅发生于攻毒接种的单只脚; 不保护为两只及以上脚均出现病变。保护率(%)=完全保护的豚鼠数/每组豚鼠总数 \times 100。

6.2 结果

6.2.1 豚鼠体内 FMDV 特异性抗体的动态变化

每组随机采血 3 只, 将豚鼠血清 1:4 稀释, 间接 ELISA 测定结果的 OD 值如下表 6-2, 并将抗体水平的动态变化用曲线图表示(图 6-1)。

表 6-2 间接 ELISA 检测豚鼠血清 FMDV 特异性抗体 ($\bar{X} \pm SD$)
Table 6-2 Detection of anti-FMDV specific antibodies in the sera from the immunized guinea pigs by indirect ELISA

组别	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组
免疫前	0.1842 \pm 0.001	0.1510 \pm 0.024	0.1253 \pm 0.006	0.1725 \pm 0.016	0.1415 \pm 0.023	0.1605 \pm 0.045
首免后十天	0.2214 \pm 0.002	0.1625 \pm 0.032	0.1800 \pm 0.028	0.1548 \pm 0.035	0.0960 \pm 0.043	0.1130 \pm 0.027
二免后十天	0.7170 \pm 0.114	0.4428 \pm 0.067	0.2136 \pm 0.004	0.7256 \pm 0.262	0.2060 \pm 0.088	0.2360 \pm 0.074
三免后十天	0.3820 \pm 0.067	0.4857 \pm 0.136	0.3844 \pm 0.145	0.4284 \pm 0.083	0.1765 \pm 0.036	0.1584 \pm 0.048
三免后二十一天	0.5110 \pm 0.245	0.6582 \pm 0.283	0.4423 \pm 0.038	0.9260 \pm 0.254	0.1834 \pm 0.084	0.2030 \pm 0.001
三免后二十八天	0.4263 \pm 0.138	0.4950 \pm 0.143	0.3382 \pm 0.068	0.6240 \pm 0.264	0.2146 \pm 0.037	0.1945 \pm 0.025

本试验用转基因番茄叶片蛋白提取液免疫健康豚鼠, 每 15 天 1 次, 共 3 次, 同时设空载体及非转基因番茄叶片为阴性对照组。在 0d, 首免后 10d, 二免后 10d, 三免后 10d、21d、28d 各采血一次, 用间接 ELISA 检测所取血清的特异性抗体效价。结果表明, 转基因番茄叶片提取液对豚鼠首免后 10 天未能用间接 ELISA 方法检测出特异性抗体; 二免后 10 天, 除 C 组外, A 组、B 组、D 组豚鼠抗 FMD 特异性抗体水平明显提高; 三免后 10 天, B 组特异性抗体没有明显变化, C 组抗体缓慢上长, A 组、D 组抗体水平有所下降, 三免后 21 天, A 组豚鼠的抗体水平虽然逐渐攀升, 但与二免后的抗体水平相比其峰值较低, B 组、C 组、D 组豚鼠抗体水平较二免后有进一步提高, 尤其是 D 组豚鼠的抗体水平提高显著。

6.2.2 转基因疫苗免疫豚鼠的抗体滴度

将二免、三免后的豚鼠血清从 1:4 开始以 2 倍系列稀释, 用间接 ELISA 方法测定其抗体滴度(表 6-3), 同时将抗体滴度用 \log_{10} 倒数的对数表示(图 6-2)。

表 6-3 间接 ELISA 检测豚鼠血清 FMDV 特异性抗体
Table 6-3 Anti-FMDV antibodies of guinea pigs tested with indirect ELISA

组别	二免后 10d	三免后 10d	三免后 21d
A 组	1:16	1:8	1:16
	1:8	<1:8	1:8
	1:8	<1:8	<1:8
B 组	1:8	1:32	1:64
	<1:8	1:16	1:32
	<1:8	<1:8	1:32
C 组	<1:4	1:32	1:64
	<1:4	<1:8	1:16
	<1:4	<1:8	<1:8
D 组	1:32	1:16	1:128
	1:16	1:16	1:64
	1:8	<1:8	1:32

从表 6-3 和图 6-2 中可看出, 三免后血清效价明显升高, pBin438/P12X3C 转基因番茄免疫豚鼠的血清效价比 pBin438/VP1 转基因番茄免疫豚鼠的效价高, 除 A 组豚鼠外, B 组、C 组、D 组豚鼠三免后 21d 的抗体效价明显高于二免后的抗体效价, 最高可达到 1:128。说明转基因番茄中表达的抗原蛋白具有良好的免疫原性。

6.2.3 攻毒试验

表 6-4 免疫豚鼠保护率检测
Table 6-4 Protection against FMDV challenge in guinea pigs

	豚鼠编号	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组
保护效果	1 号	完全保护	完全保护	完全保护	完全保护	不保护	不保护
	2 号	完全保护	完全保护	完全保护	完全保护	不保护	不保护
	3 号	部分保护	完全保护	完全保护	完全保护	不保护	不保护
	4 号	部分保护	完全保护	部分保护	完全保护	不保护	不保护
	5 号	部分保护	部分保护	部分保护	完全保护	不保护	不保护
保护率		2/5	4/5	3/5	5/5	0/5	0/5

表 6-4 表明, 转基因番茄免疫组的抗病毒能力远远大于非转基因番茄免疫组, 尤其 D 组, 保护率达 5/5, 而空载体 pBin438 和非转基因番茄免疫组豚鼠全部发病。

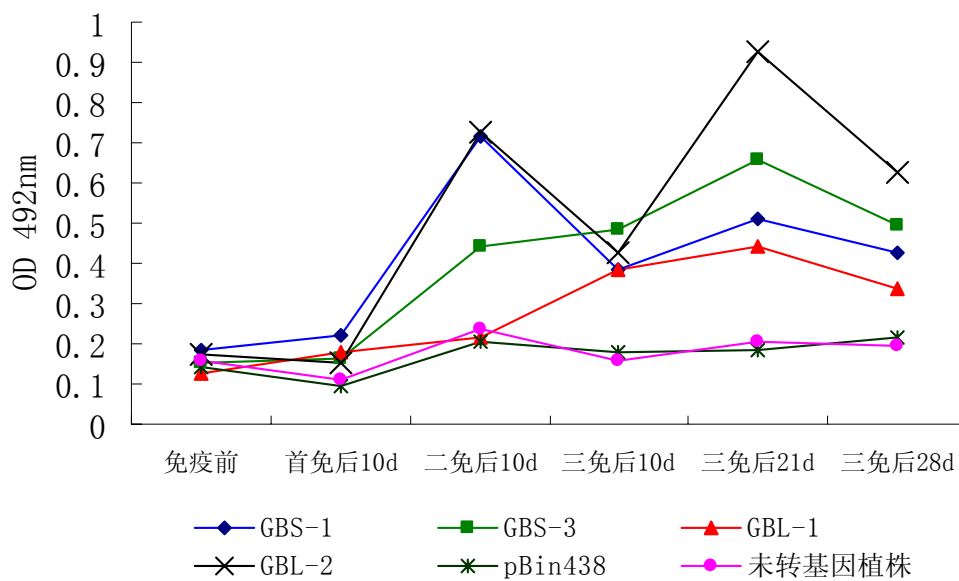


图 6-1 豚鼠抗体水平动态变化折线图

Fig 6-1 Curve of antibodies alternation in guinea pigs

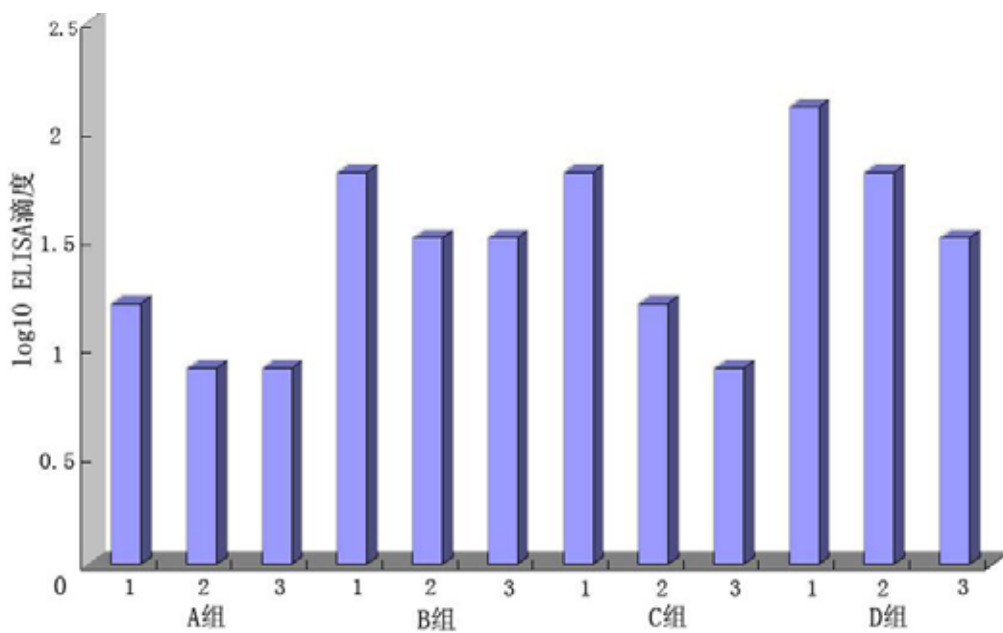


图 6-2 第三次免疫豚鼠后 21d 的 ELISA 抗体滴度

Fig 6-2 Detection of antibody titers in guinea pigs twenty-one days after the third inoculation using ELISA

6.3 讨论

国外对 FMD 转基因疫苗的研究做了许多有益的探索, 1999 年, Wigdorovitz 等将口蹄疫病毒 VP1 基因与烟草花叶病毒构建的重组表达载体转化烟草叶片, 用含有重组 VP1 的叶片蛋白粗提物免疫小鼠, 可诱导产生 FMD 特异性抗体, 这种抗体不仅能与 VP1 发生反应, 而且也能与完整的口蹄疫病毒颗粒反应, 所有的免疫小鼠都抵抗了口蹄疫病毒强毒株的攻击, 而未免疫或用空载体转化的植株免疫的小鼠全部感染发病(Wigdorovitz et al, 1999); 该研究小组还将口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白基因转化苜蓿, 也获得转基因植株, 用转基因苜蓿的叶片浸提物腹腔注射小鼠, 或用新鲜叶片直接饲喂免疫, 均可诱导产生特异性免疫应答, 腹腔注射免疫的小鼠保护率达 77~80%, 饲喂免疫的小鼠保护率达 66~75%(Wigdorovitz et al, 1999; Carrillo et al, 2001), 在 4 株高表达的植株中, VP1 与 GUS 融合基因在苜蓿中的表达量占总可溶性蛋白的 0.05~0.1%, 免疫小鼠抗强毒攻击的保护率达 100%(Dus Santos et al, 2002); 2005 年又将 FMDV 全衣壳蛋白基因 P1 与非结构蛋白 2A、3C 连接, 在转基因苜蓿得到表达, 免疫小鼠抗强毒攻击的保护率达 100%, 遗憾的是没有病毒空衣壳的电镜结果(Dus Santos et al, 2005)。

由于 FMDV 结构蛋白 P1 上携带有刺激机体产生与完整病毒粒子相似的体液免疫和细胞免疫的 T、B 细胞表位, 同时 2A 蛋白酶和 3C 蛋白酶对于 P1 多聚蛋白形成 VP1、VP3 和 VP0 也是必需的(Pablo de Felipe et al, 2003; Claire et al, 1999), 与结构蛋白 VP1 相比, 病毒全衣壳蛋白对于新型疫苗而言是一个非常理想的选择, 但由于结构蛋白 P1、非结构蛋白 2A、3C 及部分 2B 蛋白共编码 1 006 个氨基酸, 在选题时考虑较大片段的基因转入植物基因组, 可能会对此后的植物遗传转化及表达产生影响。因此本研究构建了两种植物表达载体, FMDV 结构蛋白 VP1 植物表达载体 pBin438/VP1 及全衣壳蛋白的表达载体 pBin438/P12X3C, 转化番茄后, 对转基因植株基因检测和蛋白检测证实, VP1 基因和 P12X3C 基因能够整合进植物基因组并表达, 同时动物免疫试验的结果也说明, 转基因番茄中表达的 VP1 抗原蛋白和全衣壳蛋白具有良好的免疫原性, 而且, 后者免疫豚鼠的抗体效价比前者的高, 抗强毒攻击的免疫保护效果前者为 40%~80%, 后者为 60%~100%。这为今后的研究工作奠定了良好的基础, 为下一步利用植物生物反应器生产廉价可饲(食)用疫苗提供了一个技术平台。

转基因疫苗免疫豚鼠的抗体水平检测结果显示, 第一次免疫后 10 天的血清用 ELISA 检测不到抗体, 可能与试验中选用的佐剂有关, 本试验中首免用弗氏完全佐剂乳化, 加强免疫用弗氏不完全佐剂, 佐剂的使用使抗原蛋白缓慢释放, 机体免疫系统产生的抗体水平不会迅速提高, 因此, 抗体效价低, ELISA 检测结果为阴性。而第二次免疫后 10 天, A 组、D 组豚鼠血清抗体水平显著提高并达到第一个高峰, B 组抗体缓慢上升, C 组仍然检测不到抗体。第三次免疫后 10 天, A 组、D 组抗体水平较二免有所下降, B 组、C 组抗体增高缓慢, 推测原因可能是抗原蛋白被机体产生的高水平抗体中和导致抗体滴度下降或增高缓慢; 三免后 21 天, D 组抗体水平达到第二个高峰, B 组、C 组逐渐攀升并达到一个高峰, 而 A 组抗体虽然缓慢上升, 但最终没能达到二免后的第一个高峰, 造成这一结果的原因可能与抗原蛋白被机体产生的抗体中和后, 抗原免疫剂量减少有关, 这一结果与核酸疫苗免疫豚鼠后的抗体变化结果相似(郭慧琛, 2004)。另外, 从免疫豚鼠血清抗体动态变化的折线图也说明一点, 本试验的动物免疫程序不理想, 免疫程序尚待优化,

二免与三免的间隔时间太短, 建议今后继续动物免疫试验时, 第二次免疫后 28 天进行第三次免疫。

本试验中 pBin438/VP1 转基因番茄与 pBin438/P12X3C 转基因番茄都能诱导豚鼠产生 FMDV 特异性抗体, 而且随着免疫次数的增加, 免疫豚鼠的血清效价逐渐升高, 这与 Streatfield(2001) 等报道的相似, 肌肉注射时, 免疫效力随免疫次数、免疫剂量的增加而加强。本试验中虽然结构蛋白 VP1 与 P12X3C 全衣壳蛋白的转基因番茄都能诱导豚鼠产生 FMDV 特异性抗体, 但效价不一样, 前者第三次免疫后 21 天血清效价最高可达 1:64, 而后者第三次免疫后 21 天血清效价最高可达 1:128。本试验的 ELISA 效价总体较低, 这可能与免疫剂量低有关, 因为本实验的最高免疫剂量为 0.1g 番茄叶片, 而 Mason (1998), Lauterslager(2001), Haq(1995)等报道的免疫剂量均为 5g, Gomez(1998)甚至每次用 40mg 可溶性总蛋白进行免疫, 因此, 为了优化 FMD 转基因疫苗的免疫效果, 需要从免疫剂量、免疫方式、免疫程序等多方面考虑以有效地诱导免疫保护。

目前, 转基因疫苗动物免疫实验的研究较多地集中在体液免疫方面, 用 ELISA 或微量中和试验检测血清中和抗体, 而对细胞免疫方面报道很少, 但是, FMD 除体液免疫外, 细胞免疫在抗病毒感染中也起着重要的作用。本试验中, 部分免疫豚鼠用 ELISA 没有检测到中和抗体, 或抗体效价很低, 但能够完全或部分抵抗强毒攻击, 推测可能是细胞免疫发挥了作用。对于细胞免疫的机制还有待今后深入研究。

6.4 转基因疫苗的应用前景及未来研究的方向

尽管 FMD VP1 抗原蛋白在细菌、酵母、杆状病毒等表达系统中都得到成功表达, 但纯化抗原蛋白的成本十分昂贵, 这就限制了基因重组亚单位疫苗的推广应用, 而 FMD VP1 抗原蛋白在转基因拟南芥、苜蓿中成功表达, 用转基因疫苗免疫 BalB/C 小鼠结果表明: 在转基因植物中表达的抗原蛋白可以刺激机体的系统免疫和黏膜免疫从而产生一定水平的保护性抗体, 这为植物生物反应器大规模廉价生产 FMD 可饲用疫苗提供了一条可行的途径(Carrillo et al.1998;Wigdorovita et al.1999)。Arakawa(1998)和 Tacket(1998)认为, 即使在转基因马铃薯中表达的大肠杆菌热敏肠毒素 B 亚单位(LT-B)蛋白的水平为总可溶性蛋白的 0.1%, 也可以刺激小鼠产生特异性的保护性抗体(Arakawa et al,1998; Tacket et al,1998), 如果我们能够进一步提高 FMDV 抗原蛋白在转基因植物中的表达水平, 通过对转基因植物的基因表达、产物的免疫原性和临床评价的进一步研究, 有可能制成免疫效果更好的可饲(食)用疫苗, 这一部分工作将在今后继续进行。本研究结果为 FMD 转基因疫苗的研究提供了实验数据, 为研制廉价、使用方便、安全有效新型疫苗奠定了实验基础。

FMDV 自然条件下的感染途径主要经动物呼吸道和消化道的黏膜进入机体(Donaldson et al,1987;Seller et al,1971), 因此对易感动物进行黏膜免疫保护是非常重要的。霍乱毒素 B 亚基(CT-B)的五聚体结构能够与肠道上皮细胞膜 GM1 受体结合, 以引发机体强大的黏膜免疫反应, 因此 CT-B 可作为优良的黏膜免疫佐剂与其它抗原蛋白联合使用(Langridge et al,1989; McKenzie et al,1984)。将 FMDV 抗原基因与 CT-B 基因同时构建到植物表达载体中, 在转基因牧草中表达并定期喂饲动物, 将为植物反应器表达动物黏膜免疫疫苗提供一条新的思路和研究方向(Hohngren et al,1993; Lycke et al,1986; Hondred et al,1999;Sun et al,2003)。

目前, 如何提高抗原蛋白的表达量是转基因疫苗面临大规模产业化的一个关键因素, 因此, 只有使植物系统表达外源蛋白的水平进一步提高, 才能应用这种廉价的植物表达系统生产出可饲(食)用疫苗。采用组织特异性启动子、以植物偏爱密码子合成抗原基因核苷酸序列等方式(Chong et al,1997; Czerkinsky et al,1989), 可以有效提高外源蛋白的表达水平, 同时表达出能够组装成病毒空衣壳的病毒样颗粒(VLP)也是今后研究的方向。

第七章 结 论

1. 成功构建了 O 型 FMDV China/99 株结构蛋白 VP1 基因的植物组成型双元表达载体 pBin438/VP1 及结构蛋白 P1、非结构蛋白 2A、3C 以及部分 2B 基因的植物组成型双元表达载体 pBin438/P12X3C，并证实组成型的启动子 35S 能够引导目的基因在转基因番茄中表达。
2. 成功构建了 O 型 FMDV 结构蛋白 VP1 基因的种子特异性双元表达载体 p7SBin438/VP1，分子检测证实种子特异性启动子 7S 能够引导 VP1 基因在拟南芥的荚中表达。
3. 对农杆菌转化系统进行了条件优化实验，使得番茄子叶的平均转化效率高达 18%，高于目前国内外文献所报道的转化率 10%。
4. 将双元表达载体 pBin438/VP1 及 pBin438/P12X3C 转化番茄，通过卡那霉素抗性筛选、PCR、RT-PCR 检测证实 VP1 基因及 P12X3C 基因能够整合到番茄基因组中，并且整合的外源基因得到正确转录。
5. ELISA 检测和 Western Blotting 检测证实不仅 VP1 基因能在番茄中表达，而且 P12X3C 基因也能够在番茄中表达，且表达蛋白能与 FMDV 特异的抗血清发生微弱反应，证实利用植物生物反应器表达抗原蛋白是可行的。
6. 动物免疫试验的结果肯定了转基因番茄中表达的 VP1 抗原蛋白和 P12X3C 全衣壳蛋白具有良好的免疫原性，pBin438/P12X3C 转基因番茄对豚鼠的免疫效果优于 pBin438/VP1 转基因番茄，另外本试验中动物免疫程序尚待优化。

所建立的质粒构建方法、农杆菌转化法、拟南芥基因转化方法、转基因植株鉴定及动物免疫试验为今后工作提供了可供参考的实验方法和经验，所构建的质粒和获得的转基因植株种子可作为开展进一步研究工作的实验材料，为实验室的后续工作打下了坚实的基础。

参 考 文 献

1. 殷震, 刘景华主编. 动物病毒学. 第二版. 北京: 科学出版社, 1997.
2. 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程. 第二版. 北京: 科学出版社, 2002.
3. 王新国, 张国华, 方荣祥等. 转基因烟草表达霍乱毒素 B 亚基单位的研究. 生物技术通讯, 2000, 11 (2): 98-102
4. 陈章良. 植物基因工程研究. 北京: 北京大学出版社, 1993
5. 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南(金冬雁, 黎孟枫, 侯云德等译). 第二版. 北京: 科学出版社, 1998.
6. 刘玉乐. 人乙型肝炎病毒表面抗原基因在转基因烟草中的表达. 中国科学 (B 辑), 1993, 23: 252-254
7. 李宝健. 植物生物技术原理和方法. 湖南: 湖南科学技术出版社, 1990
8. 马清钧, 周建光, 于秀琴等. 霍乱弧菌无毒肠毒素基因在大肠杆菌的表达. 中国科学 (B 辑), 1988, 5: 516-521
9. 马清钧, 周建光, 于秀琴等. 大肠杆菌生产霍乱肠毒素 B 亚单位. 中国科学 (B 辑), 1990, 7: 726-730
10. 孟金陵. 拟南芥及其分子生物学的研究. 遗传, 1995, 17: 41-45
11. 樊妙姬. 拟南芥的分子遗传学研究概况. 遗传, 1992, 14: 40-42
12. 陈璋. 拟南芥: 植物分子生物学的模式物种. 植物学通报, 1994, 11: 35-39
13. 刘在新. 口蹄疫病毒基因组及其编码蛋白一级结构研究: [刘在新博士论文]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2002
14. 张显升. 口蹄疫病毒 China/99 基因组全序列及结构与功能分析: [张显升博士论文]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2002
15. 郭慧琛. 0 型口蹄疫病毒多基因 DNA 疫苗的研制: [郭慧琛博士论文]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2004
16. Abell B M, Hahn M, Holbrook L A, Maloney M M. Membrane topology and sequence requirements for oil body targeting of oleosin. *The Plant Journ*, 2004, 37: 461-470
17. Abell B M, High S, Maloney M M. Membrane Protein Topology of Oleosin is constrained by its long hydrophobic domain. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(10): 8602-8610
18. Abrams C C, King A M Q, Belsham G J. Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J Gen Virol*, 1995, 76: 3089-3098
19. Aggarwal N, Zhang Z, Cox S, et al. Experimental studies with foot-and-mouth disease virus, strain O, responsible for the 2001 epidemic in the United Kingdom. *Vaccine*, 2002, 20: 2508-2515
20. Andino R, Rieckhof G E, Achacoso P L. Poliovirus RNA synthesis utilizes an RNP complex formed around the 5'-end of viral RNA. *EMBO J*, 1993, 12: 3587~3598
21. Anmich M. Edible genetically modified microorganisms and plants for improved health. *Curr Opin Biotechnol*. 2001, 12: 510-515

22. Arakawa T, Chong D K X, Merritt J L, et al. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res*, 1997, 6: 403-413
23. Arakawa T, Chong D K X, Langridge W H R. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 292-297
24. Bae J L, Lee J G, Kang T J, et al. Induction of antigen-specific systemic and mucosal immune responses by feeding animals transgenic plants expressing the antigen. *Vaccine*, 2003, 21: 4052-4058
25. Belanger H, Fleysh N, Cox S, et al. Human respiratory syncytial virus vaccine antigen produced in plants. *FASEB J*, 2000, 14: 2323-2328
26. Belsham G L, Brangwyn J K, Ryan M D, et al. Intracellular expression and processing of foot-and-mouth disease virus capsid precursors using vaccinia virus vectors influence of the L Protease. *Virology*, 1990, 176: 524-530
27. Beck E, Strohmaier K. Subtyping of European foot and mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J Virol*, 1987, 61: 1621-1629.
28. Barnett P V, Carabin H A review of emergence foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine*, 2002, 20: 1504-1514
29. Berinstein A, Tami C, Taboga, et al. Protective immunity against foot-and-mouth disease virus induced by a recombinant vaccinia virus. *Vaccine*, 2000, 18: 2231-2238.
30. Biemelt S, Sonnewald U, Galmbacher P, et al. Production of human papillomavirus type 16 virus-like particles in transgenic plants. *J Virology*, 2003, 77: 9211-9220
31. Boynton J E, Gillham N W, Harris E H, et al. Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 1988, 240: 1534-1538
32. Bremman F, Jones T, Grilleland L, et al. Pseudomonas aeruginosa outer-membrane protein F epitopes highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiol* 1999, 145: 211-220
33. Brigitte D, Renate S, Lothar W. Efficient Transformation of *Arabidopsis Thaliana* using direct gene transfer to protoplasts. *Mol Gen Genet*, 1989, 217: 6-12
34. Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros J C, et al. Protective immune response to foot and mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J Virol*, 1998, 72: 1688-1690
35. Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, et al. Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Viral Immunol*, 2001, 14: 49-57
36. Chan E W C, Wong H T, Cheng S C S, et al. An immunoglobulin G based chimeric protein induced foot-and-mouth disease specific immune response in swine. *Vaccine*, 2000, 19: 538-546
37. Chikwamba R K, Paul Scott M, Mejia L B, et al. Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels. *PNAS*, 2003, 100: 11127-11132
38. Chong D K X, Roberts W, Arakawa T, et al. Expression of the human milk protein, β -casein in transgenic potato plants. *Transgenic Res*, 1997, 6: 289-96

39. Claire H, Susan E, Cooke, et al. Self-processing 2A-polypeptides—a system for co-ordinate expression of multiple proteins in transgenic plants. *The Plant Journal*, 1999, 17(4): 453-459
40. Cramer C L, Boothe J G, Oishi K K. Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1999, 240: 95-118
41. Curtiss R I, Cardineau C A. World Patent Application, 1990, 2465-02484
42. Czerkinsky, C, Russell, M W; Lycke, N, et al. Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect. Immun*, 1989, 57: 1072-7
43. Daniell H, Khan M S, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmental friendly era in biotechnology. *TRENDS Plants Sci*, 2002; 7: 84-91
44. Daniell H, Seung-Bum Lee, Panchal T, et al. Expression of the native cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts. *J Mol Biol*, 2001, 311: 1001-1009
45. Dirk V, Marc V, Montagu, M, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated Transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc. Natl. Sci. USA*, 1988, 85: 5536-5540
46. Donaldson A I, Gibson C F, Oliver R, et al. Infection of cattle by airborne foot-and-mouth disease virus: minimal doses with O2 and SAT2 strains. *Res Vet Sci*, 1987, 43: 339~346
47. Doughty W J, Gleeson L J, Prasatsuwan K, et al. Serological comparison of type AsiaI foot and mouth disease virus isolates from Thailand. *Rev Sci Tech*, 1995, 14(3): 539-546.
48. Durrani Z, McInerney T L, McLain L, et al. Intranasal immunization with a plant virus expressing a peptide from HIV-1 gp41 stimulates better mucosal and systemic HIV-1-specific IgA and IgG than oral immunization. *J Immunol Methods*, 1998, 220: 93-103
49. 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. *Vaccine*, 2002, 20: 1141-1147
50. Dus Santos M J, Carrillo C, Ardila F, et al. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. *Vaccine*, 2005, 23: 1838-1843
51. Ehsani P, Khabiri A, Domansky N N. Polypeptides of hepatitis B surface antigen produced in transgenic potato. *Gene*, 1997, 190: 107-111
52. Elke K, Christoph G, Jeff S, et al. Improved method for the transformation of *Arabidopsis thaliana* with chimeric dihydrofolate reductase constructs which confer methotrexate resistance. *Plant Cell Reports*, 1992, 17: 118-121
53. Gerber S, Lane C, Brown D M, et al. Human papillomavirus virus-like particles are efficient oral immunogens when coadministered with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin mutant R192G or CpG DNA. *J Virol*, 2001, 75: 4752-4760
54. Gao Y, Ma Y, Li M et al. Oral immunization of animals with transgenic cherry tomatillo

- expressing HBsAg. *World J Gastroenterol*,2003,9:996-1002
55. Gleba Y,Marillonnet S,Klimyuk V.Engineering viral expression vectors for plants:the 'full virus'and the 'deconstructed virus'strategies.*Curr Opin Plant Biol*,2004,7:182-188
56. Gomez N,Carrillo C,Salinas J,et al.Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants.*Virology*,1998,249:352-358
57. Gomez N,Wigdorovitz A,Castanon S,et al.Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus.*Arch Virol*,2000,145:1725-1732
58. Gregory A, Mayr, Jarasvech Chinsangaram, et al. Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3Cprotease coding of foot and mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology*,1999,26(3):496-508
59. Haq T A,Mason H S,Clements J D,et al.Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants.*Science*,1995,268:714-715
60. Hohngren, J, Lycke N , Czerkinsky, C. Cholera toxin and cholera B subunit as oral mucosal adjuvant and antigen vector systems. *Vaccine*,1993,55:330-339
61. Horsch R B,Fry J E,Hoffmann N L,et al.A simple and general method for transferring genes into plants.*Science*,1985,227:1229-1231
62. Hondred D, Walker J M, Mathews D E, et al. Use of ubiquitin fusions to augment protein expression in transgenic plants. *Plant Physiology*,1999,119:713-23
63. Huang Z, Elkin G, Maloney B J,et al. Virus-like particle expression and assembly in plants:hepatitis B and Norwalk virus.*Vaccine*;2005,23:1851-1858
64. Huang H,Ma H.An improved procedure for Transforming Arabidopsis Thaliana root explants.*Plant Molecular Biology Reporter*,1992,10(4):372-383
65. Jani D,Singh Meena L,Mohammad R,et al.Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants.*Transgenic Res*,2002,11:447-454
66. Joelson T,Akerblom L,Oxelfelt P,et al.Presentation of a foreign peptide on the surface of tomato bushy stunt virus.*J Gen Virol*,1997,78:1213-1217
67. Kapila J,Derycke R,Vanmontagu M.An Agrobacterium-mediated transient gene expression system for intact leaves.*Plant Sci*,1997,122:101-108
68. Kapusta J A,Modelska M,Figlerowica T,et al.A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus.*FASTB J*.1999,13:1796-1799
69. Kenneth A,Feldmann M,David M.Agrobacterium-mediatedtransformation of germinating seeds of Arabidopsis Thaliana:A non-tissue cultureannroach.*Mol Gen Genet*,1987,1208:1-9
70. Khamdelwal A, Sita G L, Shaila M S. Oral innunization of cattle with hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in transgenic peanut iduced specific immune responses. *Vaccine*,2003,21:3282-3289
71. Kitching R P,A recent history of foot-and -mouth disease virus.*J Comp Pathol*,1998,118:89~108
72. Kong Q,Richter L,Yang Y F,Arntzen C J,Mason H S.Oral immunization with hepatitis B

- surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:11539-11544
73. Kozak M. 1989. The scanning model for translation: An update. *J. Cell Biol*, 108:229
74. Koprowski H, Yusibov V. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine*, 2001, 19:2735-2741
75. Kruoda H, Maliga P. Sequence downstream of the translation initiation codon are important determinants of translation efficiency in chloroplasts. *Plant Physiol*, 2001, 125:430-436
76. Kung, Shain D, Wu R. *Transgenic plants*. Academic Press, 1996
77. Kühnel B, Alcantara J, Boothe J, Moloney M M, et al. Precise and efficient cleavage of recombinant fusion proteins using mammalian aspartic proteases. *Protein Engineering*, 2003, 16(10):777-783
78. Langridge W H R, Fitzgerald K L, Koncz, C, et al. Dual promoter of *Agrobacterium tumefaciens* mannopine synthase gene is regulated by plant growth hormones. *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 1989, 86:3219-23
79. Lauterslager T G, Hilgers L A. Efficacy of oral administration and oral intake of edible vaccines. *Immunol Lett*, 2002, 84:185-190
80. Lauterslager T G M, Florack D E A, Van der Wal T J, et al. Oral immunization of native and primed animals with transgenic potato tubers expression LT-B. *Vaccine*, 2001, 19:2749-2755
81. Legocki A B, Mieddziska K, Czaplinska M, et al. Immunoprotective properties of transgenic plants expressing E2 glycoprotein from CSFV and cysteine protease from *Fasciola hepatica*. *Vaccine*, 2005, 23:1844-1846
82. Lopez de Quinto S, Martinez-Salas E. Conserved structural motifs located in distal loops of aphthovirus internal initiation of translation. *J Virol* 1997, 71:4174~4175
83. Leticia C B, Mildred F C, Graham J, et al. Induction of a protective response in swine vaccinated with DNA encoding foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the 3D RNA polymerase. *Journal of General virology*, 2001, 82:1713-1724
84. Lutwick L I, Abramson J M. Pediatric immunization for the future. Lyme disease vaccine and beyond. *Pediatr Clin North Am*, 2000, 47:465-479
85. Lycke N, Holmgren J. Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune response to orally presented antigens. *Immunology*, 1986, 59:301-8
86. Ma J K C. Gene, greens, and vaccines. *Nature Biotechnol*. 2001, 18:1141-1142
87. Ma J K C, Drake P M W, Chargelegue D, et al. Antibody processing and engineering in plants, and new strategies for vaccine production. *Vaccine*, 2005, 23:1814-1818
88. Ma Y, Lin S Q, Li M, et al. Expression of ORF2 partial gene of hepatitis E virus in tomatoes and immunoactivity of expression products. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(10):2211-2215
89. Marshall H, Boothe J G, Oishi K Y, et al. Edible vaccine for hepatitis B. *Trends Immunol*. 2001, 22(2): 71
90. Mason H S, Lam D M K, Arntzen C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89:11745-11749

91. Mason H S, Ball J M, Shi J J, et al. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 5335-5340
92. Mason P W, Piccone M E, McKenna T S C, et al. Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology*, 1997, 227: 96-102
93. Mason H S, Haq T A, Clements JD. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine*, 1998, 16(13): 1336-1343
94. Maliga P. Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends Biotechnol*, 2003, 21: 20-28
95. Maloney B J, Takeda N, Suzuki Y, et al. Challenges in creating a vaccine to prevent hepatitis E. *Vaccine*, 2005, 23: 1870-1874
96. May G D, Rowan A, Mason H S, et al. Generation of Transgenic Banana Plants via *Agrobacterium*-Mediated Transformation. *Biotechnology*, 1995, 13: 486-492
97. Meyer K, Petersen A, Niepmann M, et al. Interaction of eukaryotic initiation factor eIF-4B with a picornavirus internal translation initiation site. *J Virol*, 1995, 69: 2819~2824
98. McCormick A A, Osadjan M D, Kmsnyansld S F, et al. Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumor-derived single-chain Fv epitopes in tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 703-708
99. McGarvey P B, Hammond J, Dienelt M M, et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Biotechnology*, 1995, 13: 1484-1487
100. McInerney T L, Brennan F R, Jones T D, et al. Analysis of the ability of five adjuvants to enhance immune responses to a chimeric plant virus displaying an HIV-1 peptide. *Vaccine*, 1999, 17: 1359-1368
101. McKenzie S J, Halsey J F. Cholera toxin B subunit as a carrier protein to stimulate a mucosal immune response. *J. Immunol*, 1984, 133: 1818-24
102. McLain L, Durrani Z, Wisniewski L A, et al. Stimulation of neutralizing antibodies to human immunodeficiency virus type 1 in three strains of mice immunized with a 22 amino acid peptide of gp41 expressed on the surface of a plant virus. *Vaccine*, 1996, 14: 799-810
103. Modelska A, Dietzschol B, Sleysh N, et al. Immunization against rabies with plant derived antigen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(5): 2481-2485
104. Moffat A S. Toting up the early harvest of transgenic plants. *Science*, 1998, 282(5397): 2176-8
105. Nemchinov L G, Liang T J, Rifaat M M, et al. Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus. *Arch Virol*, 2000, 145: 2557-2573
106. Niepmann M, Petersen A, Meyer K, et al. Functional involvement of polypyrimidine tract-binding protein in translation initiation complexes with the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus. *J Virol*, 1997, 71: 8330~8339
107. Owen M R L, Pen J. Transgenic Plants: A Production System for Industrial and Pharmaceutical

- Proteins. John Wiley & Sons, Inc, 1996, 213, 65-67, 261-272, 106-111, 164, 169-187
108. Pablo de Felipe, Lorraine E, Hughes, et al. Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem*, 2003, 278(16): 11441-11448.
109. Pereira H G. Foot-and-mouth disease, in: Gibbs E. P. J. (Ed), *Virus disease of foot animals*. Academic Press Inc, London, 1981, 333~363.
110. Perlak W J. Waste Sources for Polyhydroxyalkanoate Production, in the Proceedings of the 1996 International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates. NRC Press, 56-65
111. Polkunghorne I, Hamerli D, Cowan P, et al. Plant-based immunocontraceptive control of wildlife-“potentials, limitations, and possums”. *Vaccine*, 2005, 23: 1847-1850
112. Porta C, Spall V E, Loveland J, et al. Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology*, 1994, 202: 949-955
113. Pujol M, Ramirez N I, Ayala M, et al. An integral approach towards a practical application for a plant-made monoclonal antibody in vaccine purification. *Vaccine*, 2005, 23: 1833-1837
114. Richter L J, Thanavala Y, Arntzen C J, Mason H S. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1167-1171
115. Rollinson E A. Molecular vaccines: delivering on the promise. *Curr Opin Mol Ther*. 1999, 1(1): 8
116. Rose R, Lane C, Wilson S, et al. Oral vaccination of mice with human papillomavirus virus-like particles induces systemic virus-neutralizing antibodies. *Vaccine*, 1999, 17: 2129-2135
117. Rowlands D J, Sangar D V, Brown F. A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 1975, 26: 227-238.
118. Ruf S, Hemann M, Berger I J, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 870-875
119. Ryan M D, Belsham G J, King A M Q. Specificity of enzyme-substrate interactions in foot-and-mouth disease virus polyprotein processing. *Virology*, 1989, 173: 35-45
120. Sala F, Manuela Rigano M, Barbbante A, et al. Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 2003, 21: 803-808
121. Samuel A R, Knowles N J. Foot-and-mouth disease type O virus exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages topotypes. *J Gen Virol*, 2001, 82: 609-621.
122. Sandhu J S, Osadjan M D, Krasnyanski S F, et al. Enhanced expression of the human respiratory syncytial virus-F gene in apple protoplasts. *Plant Cell Rep*, 1999, 18: 394-397
123. Schuyler S, Korban, Sergei F, et al. Foods as production and delivery vehicles for human vaccines. *Am Coll Nutr*, 2002, 21: 212-217
124. Schillerg S, Twyman R M, Fischer R. Opportunities for recombinant antigen and antibody expression in transgenic plants-technology assessment. *Vaccine*, 2005, 23: 1746-1769
125. Sellers R F. Quantitative aspects of the spread of foot-and-mouth disease. *Vet Bull*, 1971, 41: 431~439
126. Shahla N, Sheikholeslam, Donald P. Acetosyringone promotes high efficiency transformation of

- Arabidopsis Thaliana explants by Agrobacterium tumefaciens. Plant Molecular Biology, 1987, 8: 291-298
127. Sheikh N A, Shamisi M, Morrow W J. Delivery systems for molecular vaccination. Curr Opin Mol Ther, 2000, 2(1): 37-54
128. Smith M L, Keegan M E, Mason H S, et al. Factors important in the extraction, stability and in vitro assembly of the hepatitis B surface antigen derived from recombinant plant systems. Biotechnol Prog, 2002, 18: 538-550
129. Smith M L, Mason H S, Shuler M L. Hepatitis B surface antigen(HBsAg) expression in plant cell culture: Kinetics of antigen accumulation in batch culture and its intracellular form. Biotechnol Bioeng, 2002, 80: 812-822
130. Sobrino F, Saiz M, Miguel A, et al. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. Vet Res, 2001, 32: 1-30
131. Sojikul P, Buehner N, Mason H S. A plant signal peptide-hepatitis B surface antigen fusion protein with enhanced stability and immunogenicity expressed in plant cells. PNAS, 2003, 100: 2209-2214
132. Stachel S, Mcsensen E, Montagu M, et al. Identification of the signal molecules-produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in Agrobacterium tumefaciens. Nature, 1985, 318: 624-629
133. Staub J M, Garcia B, Graves J, et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. Nat Biotechnol, 2000, 18: 333-338
134. Staub J M, Maliga P. Expression of a chimeric uidA gene indicates that polycistronic messenger-RNAs are efficiently translated in tobacco plastids. Plant J, 1995, 7: 845-848
135. Steven J, Clough, Andrew F. Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal, 1998, 16: 735-743
136. Streatfield S J, Jilka J M, Hood E E, et al. Plant-based vaccines: unique advantages. Vaccine, 2001, 19: 2742-2748
137. Streatfield S J, Mayor J M, Barker D K, et al. Development of an edible subunit vaccine in corn against enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. In Vitro Cell Dev Biol Plant, 2002, 38: 11-17
138. Streatfield S J, Lane J R, Brooks C A, et al. Corn as production system for human and animal vaccines. Vaccine, 2003, 21: 812-815
139. Streatfield S J, Howard J A. Plant-based vaccines. International Journal for Parasitology, 2003, 33: 479-493
140. Strohmaier K, Franze R, Adman K H. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunization protein. J Gen Virol, 1982, 59: 295-306
141. Sun M, Qian K X, Su N, et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. Biotechnology Letters, 2003, 25(13): 1087-92
142. Tackaberry E S, Dudani A K, Prior F, et al. Development of biopharmaceuticals in plant

- expression systems:cloning,expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B(UL55) in seeds of transgenic tobacco.Vaccine,1999 , 17:3020-3029
143. Tacket C O,Mason H S,Losonsky J D,et al.Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato.Nat Med,1998,4:607-609
144. Tacket C O,Mason H S,Losonsky J D,et al.Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potato.J Infect Dis,2000, 182:302-305
145. Tacket C O.Plant-derived vaccines against diarrheal disease. Vaccine,2005, 23:1866-1869
146. Tacket C O, Pasetti M F, Edelman R.et al. Immunogenicity of recombinant LT-B delivered orally to humans in transgenic corn. Vaccine,2004,22:4385-4389
147. Tariq A, Haq, Hugh S. Mason, et al. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. SCIENCE,1995,268(5):715-716
148. Thanavala V,Yang Y F,Lyons P,et al.Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen.Proc Natl Acad Sci USA,1995,92:3358-3361
149. Tuboly T,Yu W,Bailey A,et al.Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plant. Vaccine,2000,18:2023-2028
150. Tulasiram P,Suryanaryana V.Antigenic structure of foot and mouth disease virus type A22(Indian isolates).Indian J Exp Biol,1998,36(1):70-75
151. Twyman T M,Stoger E,Schillberg S,et al.Molecular farming in plant:host systems and expression technology.Trends Biotechnol,2003,21:570-578
152. Usha R,Rohll J B,Spall V E,et al.Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle.Virology,1993,197:366-374
153. Vaquero C,Sack M,Chandler J,et al.Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves.Proc Natl Sci USA,1999,96:11128-11133
154. Van R ,Moloney, G J H. Plant seed oil-bodies as carries for foreign proteins. Bio Technology,1995,13:72-77
155. Viswanathan S,Ratish G,Reddy G R et al.Comparative studies on immunoreactivity of truncated recombinant protein of foot-and-mouth disease virus produced in E.coli and insect cells.Indian J Exp Biol,1999,37(6):536-540
156. Warzecha H,Mason H S,Lane C,et al.Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato.Vaccine,2003,21:8702-8711
157. Wigdorovitz A, Filgueira DM, Robertson N, et al. 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 expressing the FMDV structural protein VP1. Virology,1999,264:85-91
158. Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, et al. 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. Virology,1999,236:347-353

159. Walmsley A M, Arntzen C J. Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11(2): 126-129
160. Xie Q G, McCahan D, Crowther J R, *et al.* Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J Gen Virol*. 1987, 68: 1637-1647
161. Ye G N, Deborah S, Pang S Z, *et al.* Arabidopsis ovule is the target for Agrobacterium in planta vacuum infiltration transformation. *The Plant Journal*, 1999, 19: 249-267
162. Yu J, Langridge W H R. Novel Approaches to Oral Vaccines: Delivery of Antigens by Edible Plants. *Curr Infect Dis Rep*, 2000, 2(1): 73-77
163. Yu J, Langridge W H R. A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nat Biotechnol*. 2001, 19: 548-552
164. Yusibov V, Modelska A, Steplewski K, *et al.* Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 5784-5788
165. Yusibov V, Hooper D C, Spitsin S V, *et al.* Expression in plants and immunogenicity of plant virus-based experimental rabies vaccine. *Vaccine*, 2002, 20: 3155-3164
166. Zhang G G, Leung C, Murdin L, *et al.* In planta expression of HIV-1 p24 protein using an RNA plant virus-based expression vector. *Mol Biotechnol*. 2000, 14: 99-107
167. Zhang G G, Rodrigues L, Rovinski B, *et al.* Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol Biotechnol*, 2002, 20: 131-136

附 录

MS 培养基母液的配制 (用时倍比稀释)

100×大量元素母液	g/L
NH_4NO_3	82.5
MgSO_4	18.5
KNO_3	95g
KH_2PO_4	8.5g
1000×微量元素母液	g/L
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6
H_3BO_3	6.2
KI	0.83
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25
$\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
200×EDTA-Fe 元素母液	g/L
Na_2EDTA	7.46
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.56
100×钙元素母液	g/L
CaCl_2	33.2
100×维生素母液	g/L
盐酸硫胺素	0.04
盐酸吡哆辛	0.05
肌醇	10g
烟酸	0.05

倍比稀释后, 加入 3%蔗糖, 固体培养基加琼脂粉 0.7%, PH5.8。

CTAB 抽提液


CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)	2%(w/v)
Tris.Cl,pH 8.0	100mmol/L
NaCl	1.4mol/L

于室温保存(可在几年内保持稳定)

拟南芥改良 Hoagland 培养液配方 (用时倍比稀释)

10×大量元素母液	g/2L
NH_4NO_3	1.06
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.82
KNO_3	6.8
KH_2PO_4	1.2
$\text{CaNO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	17.84
100×微量元素母液	g/L
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	11.15
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22
H_3BO_3	38
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.125
CuSO_4	1
100×EDTA-Fe 元素母液	g/L
Na_2EDTA	3.73g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.78g

目的基因VP1序列比较

China/99/VP1	1	-----ATGACCACCTCCACAGGTGAGTCGGCTGACCCCGTACTGCCACTGTTGA	50
		M T T S T G E S A D P V T A T V E	
pBin438/VP1	1	<u>GGATCCAACAAT</u> GACCACCTCCACAGGCGAGTCGGCTGACCCCGTACTGCCACTGTTGA	60
		<i>Bam</i> HI <i>Kozak</i> M  T T S T G E S A D P V T A T V E	
China/99/VP1	51	GAACTACGGTGGTGAGACACAGGTCCAGAGACGCCAACACACGGATGTCTCGTTCATATT	110
		N Y G G E T Q V Q R R Q H T D V S F I L	
pBin438/VP1	61	GAACTACGGTGGTGAGACACAGGTCCAGAGACGCCAACACACGGATGTCTCGTTCATATT	120
		N Y G G E T Q V Q R R Q H T D V S F I L	
China/99/VP1	111	AGACAGATTTGTGAAAGTAACACCAAAAGACCAAATTAATGTGTTGGACCTGATGCAAAC	170
		D R F V K V T P K D Q I N V L D L M Q T	
pBin438/VP1	121	AGACAGATTTGTGAAAGTAACACCAAAAGACCAAATTAATGTGTTGGACCTGATGCAAAC	180
		D R F V K V T P K D Q I N V L D L M Q T	
China/99/VP1	171	CCCTGCACACACTTTGGTAGGCGCGCTCCTCCGTACTGCCACCTACTACTTCGCAGATCT	230
		P A H T L V G A L L R T A T Y Y F A D L	
pBin438/VP1	181	CCCTGCACACACTTTGGTAGGCGCGCTCCTCCGTACTGCCACCTACTACTTCGCAGATCT	240
		P A H T L V G A L L R T A T Y Y F A D L	
China/99/VP1	231	AGAAGTGGCAGTGAAACACGAGGGGAACCTTACCTGGGTCCGAATGGGGCGCCGAGAC	290
		E V A V K H E G N L T W V P N G A P E T	
pBin438/VP1	241	AGAAGTGGCAGTGAAACACGAGGGGAACCTTACCTGGGTCCGAATGGGGCGCCGAGAC	300
		E V A V K H E G N L T W V P N G A P E T	
China/99/VP1	291	AGCGTTGGACAACACCACCAATCCAACGGCTTACCACAAGGCACCGCTCACCCGGCTTGC	350
		A L D N T T N P T A Y H K A P L T R L A	
pBin438/VP1	301	AGCGTTGGACAACACCACCAATCCAACGGCTTACCACAAGGCACCGCTCACCCGGCTTGC	360
		A L D N T T N P T A Y H K A P L T R L A	
China/99/VP1	351	ACTGCCTTACACGGCACCACACCGTGTCTTGGCTACTGTTTACAACGGGAAGTCAAGTA	410
		L P Y T A P H R V L A T V Y N G N C K Y	
pBin438/VP1	361	ACTGCCTTACACGGCACCACACCGTGTCTTGGCTACTGTTTACAACGGGAAGTCAAGTA	420
		L P Y T A P H R V L A T V Y N G N C K Y	

China/99/VP1 411 TGGCGAGAGCCCCGTGACCAATGTGAGAGGTGACCTGCAAGTGTGGCCCAGAAGGCGGC 470
 G E S P V T N V R G D L Q V L A Q K A A

pBin438/VP1 421 TGGCGAGAGCCCCGTGACCAATGTGAGAGGTGACCTGCAAGTGTGGCCCAGAAGGCGGC 480
 G E S P V T N V R G D L Q V L A Q K A A

China/99/VP1 471 AAGAACGCTGCCTACCTCCTTCAATTACGGTGCCATCAAAGCCACTCGGGTGACTGAACT 530
 R T L P T S F N Y G A I K A T R V T E L

pBin438/VP1 481 AAGAACGCTGCCTACCTCCTTCAATTACGGTGCCATCAAAGCCACTCGGGTGACTGAACT 540
 R T L P T S F N Y G A I K A T R V T E L

China/99/VP1 531 GCTTTACCGCATGAAGAGGGCCGAAACATACTGCCCCGGCCTCTTTTGGCTATTCACCC 590
 L Y R M K R A E T Y C P R P L L A I H P

pBin438/VP1 541 GCTTTACCGCATGAAGAGGGCCGAAACATACTGCCCCGGCCTCTTTTGGCTATTCACCC 600
 L Y R M K R A E T Y C P R P L L A I H P

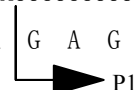
China/99/VP1 591 GAGCGAAGCTAGACACAAACAAAAGATTGTGGCGCCTGTGAAACAGCTTTTG----- 642
 S E A R H K Q K I V A P V K Q L L

pBin438/VP1 601 GAGCGAAGCTAGACACAAACAAAAGATTGTGGCGCCTGTGAAACAGCTCTTGTCAGAGAA 660
 S E A R H K Q K I V A P V K Q L L S E K

China/99/VP1 642 ----- 642

pBin438/VP1 661 AGATGAGCTAGTCGAC 676
 D E L *Sal* I



目的基因P12X3C序列比较

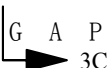
China/99/P12X3C	1	-----ATGGGCGCCGGGCAATCCAGCCCCGGCGACTGG	32
		M G A G Q S S P A T G	
pBin438/P12X3C	1	<u>GGATCCAACAATGGTTCAGAAACGACTCAGAGGCGCCGGGCAATCCAGCCCCGGCGACTGG</u>	60
		<i>Bam</i> HI Kozak M V Q K R L R G A G Q S S P A T G	
			
China/99/P12X3C	33	GTCACAGAACCAGTCAGGCAACACTGGAAGCATTATCAACAATTACTACATGCAGCAGTA	92
		S Q N Q S G N T G S I I N N Y Y M Q Q Y	
pBin438/P12X3C	61	GTCACAGAACCAGTCAGGCAACACTGGAAGCATTATCAACAATTACTACATGCAGCAGTA	120
		S Q N Q S G N T G S I I N N Y Y M Q Q Y	
China/99/P12X3C	93	CCAGAACTCCATGGACACGCAACTTGGTGACAACGCTATTAGCGGAGGCTCCAACGAGGG	152
		Q N S M D T Q L G D N A I S G G S N E G	
pBin438/P12X3C	121	CCAGAACTCCATGGACACGCAACTTGGTGACAACGCTATTAGCGGAGGCTCCAACGAGGG	180
		Q N S M D T Q L G D N A I S G G S N E G	
China/99/P12X3C	153	GTCCACGGACACCACCTCCACCCACACAACCAACACTCAGAACAATGACTGGTTTTCAAA	212
		S T D T T S T H T T N T Q N N D W F S K	
pBin438/P12X3C	181	GTCCACGGACACCACCTCCACCCACACAACCAACACTCAGAACAATGACTGGTTTTCAAA	240
		S T D T T S T H T T N T Q N N D W F S K	
China/99/P12X3C	213	GCTGGCCAGTTCGCTTTTAGCGGTCTTTTCGGCGCTCTTCTCGCCGACAAGAAAACCGA	272
		L A S S A F S G L F G A L L A D K K T E	
pBin438/P12X3C	241	GCTGGCCAGTTCGCTTTTAGCGGTCTTTTCGGCGCTCTTCTCGCCGACAAGAAAACCGA	300
		L A S S A F S G L F G A L L A D K K T E	
China/99/P12X3C	273	GGAGACCACTCTTCTCGAGGACCGCATCCTCACTACCCGCAACGGACACACGACCTCGAC	332
		E T T L L E D R I L T T R N G H T T S T	
pBin438/P12X3C	301	GGAGACCACTCTTCTCGAGGACCGCATCCTCACTACCCGCAACGGACACACGACCTCGAC	360
		E T T L L E D R I L T T R N G H T T S T	
China/99/P12X3C	333	AACCCAGTCGAGCGTTGGAGTCACTTACGGGTACGCAACAGCTGAGGACTTTGTGAGCGG	392
		T Q S S V G V T Y G Y A T A E D F V S G	
pBin438/P12X3C	361	AACCCAGTCGAGCGTTGGAGTCACTTACGGGTACGCAACAGCTGAGGACTTTGTGAGCGG	420
		T Q S S V G V T Y G Y A T A E D F V S G	

China/99/P12X3C	393	ACCAAACACATCTGGGCTTGAGACCAGGGTTGTGCAGGCAGAGCGGTTCTTCAAAACCCA	452
		P N T S G L E T R V V Q A E R F F K T H	
pBin438/P12X3C	421	ACCAAACACATCTGGGCTTGAGACCAGGGTTGTGCAGGCAGAGCGGTTCTTCAAAACCCA	480
		P N T S G L E T R V V Q A E R F F K T H	
China/99/P12X3C	453	CTGTTCGACTGGGTCAACAGTGACCCGTTTCGGACGGTACTACCTGCTGGAACCTCCCAAC	512
		L F D W V T S D P F G R X Y L L E L P T	
pBin438/P12X3C	481	CTGTTCGACTGGGTCAACAGTGACCCGTTTCGGACGGTACTACCTGCTGGAACCTCCCAAC	540
		L F D W V T S D P F G R C Y L L E L P T	
China/99/P12X3C	513	TGACCACAAAGGTGTCTACGGCAGCCTGACTGACTCTTATGCTTACATGAGAAACGGTTG	572
		D H K G V Y G S L T D S Y A Y M R N G W	
pBin438/P12X3C	541	TGACCACAAAGGTGTCTACGGCAGCCTGACTGACTCTTATGCTCACATGAGAAACGGTTG	600
		D H K G V Y G S L T D S Y A H M R N G W	
China/99/P12X3C	573	GGATGTTGAGGTCACTGCAGTGGGAAATCAGTTCAACGGAGGATGTCTGTTGGTGGCCAT	632
		D V E V T A V G N Q F N G G C L L V A M	
pBin438/P12X3C	601	GGATGTTGAGGTCACTGCAGTGGGAAATCAGTTCAACGGAGGATGTCTGTTGGTGGCCAT	660
		D V E V T A V G N Q F N G G C L L V A M	
China/99/P12X3C	633	GGTGCCAGAACTTTGCTCTATTGACAAGAGAGAGCTGTACCAGCTCACGCTCTTTCCCCA	692
		V P E L C S I D K R E L Y Q L T L F P H	
pBin438/P12X3C	661	GGTGCCAGAACTTTGCTCTATTGACAAGAGAGAGCTGTACCAGCTCACGCTCTTTCCCCA	720
		V P E L C S I D K R E L Y Q L T L F P H	
China/99/P12X3C	693	CCAGTTCATCAACCCCGGACGAACATGACGGCGCACATCACTGTGCCCTTTGTTGGTGT	752
		Q F I N P R T N M T A H I T V P F V G V	
pBin438/P12X3C	721	CCAGTTCATCAACCCCGGACGAACATGACGGCGCACATCACTGTGCCCTTTGTTGGTGT	780
		Q F I N P R T N M T A H I T V P F V G V	
China/99/P12X3C	753	CAACCGCTACGACCAGTACAAGGTACACAAACCTTGGACCCTCGTGGTTATGGTTGTGGC	812
		N R Y D Q Y K V H K P W T L V V M V V A	
pBin438/P12X3C	781	CAACCGCTACGACCAGTACAAGGTACACAAACCTTGGACCCTCGTGGTTATGGTTGTGGC	840
		N R Y D Q Y K V H K P W T L V V M V V A	
China/99/P12X3C	813	CCCGTGACTGTCAACACCGAAGGTGCCCCACAGATCAAGGTCTATGCCAACATCGCCCC	872
		P L T V N T E G A P Q I K V Y A N I A P	
pBin438/P12X3C	841	CCCGTGACTGTCAACACCGAAGGTGCCCCACAGATCAAGGTCTATGCCAACATCGCCCC	900
		P L T V N T E G A P Q I K V Y A N I A P	

China/99/P12X3C	873	TACCAACGTGCACGTTGCGGGTGAGTTCCCTTCTAAGGAAGGGATCTTCCCCGTGGCATG	932
		T N V H V A G E F P S K E G I F P V A C	
pBin438/P12X3C	901	TACCAACGTGCACGTTGCGGGTGAGTTCCCTTCTAAGGAAGGGATCTTCCCCGTGGCATG	960
		T N V H V A G E F P S K E G I F P V A C	
China/99/P12X3C	933	TAGCGACGGTTACGGTGGTCTGGTGACCACTGACCCAAAGACGGCTGACCCCGCCTACGG	992
		S D G Y G G L V T T D P K T A D P A Y G	
pBin438/P12X3C	961	TAGCGACGGTTACGGTGGTCTGGTGACCACTGACCCAAAGACGGCTGACCCCGCCTACGG	1020
		S D G Y G G L V T T D P K T A D P A Y G	
China/99/P12X3C	993	GAAAGTGTTCAATCCACCTCGCAACATGTTGCCGGGGCGGTTACCAACTTCCTTGATGT	1052
		K V F N P P R N M L P G R F T N F L D V	
pBin438/P12X3C	1021	GAAAGTGTTCAATCCACCTCGCAACATGTTGCCGGGGCGGTTACCAACTTCCTTGATGT	1080
		K V F N P P R N M L P G R F T N F L D V	
China/99/P12X3C	1053	GGCTGAGGCGTGCCCTACGTTTCTGCACTTTGAGGGTGACGTGCCGTACGTGACCACAAA	1112
		A E A C P T F L H F E G D V P Y V T T K	
pBin438/P12X3C	1081	GGCTGAGGCGTGCCCTACGTTTCTGCACTTTGAGGGTGACGTGCCGTACGTGACCACAAA	1140
		A E A C P T F L H F E G D V P Y V T T K	
China/99/P12X3C	1113	GACGGACTCAGACAGGGTGCTCGCCAGTTTGACTTGTCTCTGGCAGCAAAGCACATGTC	1172
		T D S D R V L A Q F D L S L A A K H M S	
pBin438/P12X3C	1141	GGCGGACTCAGACAGGGTGCTCGCCAGTTTGACTTGTCTCTGGCAGCAAAGCACATGTC	1200
		A D S D R V L A Q F D L S L A A K H M S	
China/99/P12X3C	1173	AAACACCTTCCTGGCAGGTCTCGCCAGTACTACACACAGTACAGCGGCACCATCAACCT	1232
		N T F L A G L A Q Y Y T Q Y S G T I N L	
pBin438/P12X3C	1201	AAACACCTTCCTGGCAGGTCTCGCCAGTACTACACACAGTACAGCGGCACCATCAACCT	1260
		N T F L A G L A Q Y Y T Q Y S G T I N L	
China/99/P12X3C	1233	GCACTTCATGTTACAGGACCCACTGACGCGAAAGCGCGTTACATGATTGCATACGCCCC	1292
		H F M F T G P T D A K A R Y M I A Y A P	
pBin438/P12X3C	1261	GCACTTCATGTTACAGGACCCACTGACGCGAAAGCGCGTTACATGATTGCATACGCCCC	1320
		H F M F T G P T D A K A R Y M I A Y A P	
China/99/P12X3C	1293	CCCTGGCATGGAGCCGCCAAAACACCTGAGGCGGCCGCTCACTGCATTCATGCGGAGTG	1352
		P G M E P P K T P E A A A H C I H A E W	
pBin438/P12X3C	1321	CCCTGGCATGGAGCCGCCAAAACACCTGAGGCGGCCGCTCACTGCATTCATGCGGAGTG	1380
		P G M E P P K T P E A A A H C I H A E W	

China/99/P12X3C	1353	GGACACAGGGTTGAATTCAAAATTCACATTTTCAATCCCTTACCTTTCGGCGGCTGATTA	1412
		D T G L N S K F T F S I P Y L S A A D Y	
pBin438/P12X3C	1381	GGACACAGGGTTGAATTCAAAATTCACATTTTCAATCCCTTACCTTTCGGCGGCTGATTA	1440
		D T G L N S K F T F S I P Y L S A A D Y	
China/99/P12X3C	1413	CGCGTACACCGCTCTGACGCTGCGGAGACCACAAATGTACAGGGATGGGTCTGCCTGTT	1472
		A Y T A S D A A E T T N V Q G W V C L F	
pBin438/P12X3C	1441	CGCGTACACCGCTCTGACGCTGCGGAGACCACAAATGTACAGGGATGGGTCTGCCTGTT	1500
		A Y T A S D A A E T T N V Q G W V C L F	
China/99/P12X3C	1473	TCAAATTACACACGGAAGGCTGACGGCGACGCACTGGTCGTTCTAGCTAGCGCCGGTAA	1532
		Q I T H G K A D G D A L V V L A S A G K	
pBin438/P12X3C	1501	TCAAATTACACACGGAAGGCTGACGGCGACGCACTGGTCGTTCTAGCTAGCGCCGGTAA	1560
		Q I T H G K A D G D A L V V L A S A G K	
China/99/P12X3C	1533	GGACTTTGAGCTGCGTCTGCCAGTTGACGCTCGCACGCAGACCACCTCCACAGGTGAGTC	1592
		D F E L R L P V D A R T Q T T S T G E S	
pBin438/P12X3C	1561	GGACTTTGAGCTGCGTCTGCCAGTTGACGCTCGCACGCAGACCACCTCCACAGGTGAGCC	1620
		D F E L R L P V D A R T Q T T S T G E P	
China/99/P12X3C	1593	GGCTGACCCCGTGA CTG CCACTGTTGAGAACTACGGTGGTGAGACACAGGTCCAGAGACG	1652
		A D P V T A T V E N Y G G E T Q V Q R R	
pBin438/P12X3C	1621	GGCTGACCCCGTGA CTG CCACTGTTGAGAACTACGGTGGTGAGACACAGGTCCAGAGACG	1680
		A D P V T A T V E N Y G G E T Q V Q R R	
China/99/P12X3C	1653	CCAACACACGGATGTCTCGTTCATATTAGACAGATTTGTGAAAGTAACACCAAAAGACCA	1712
		Q H T D V S F I L D R F V K V T P K D Q	
pBin438/P12X3C	1681	CCAACACACGGATGTCTCGTTCATATTAGACAGATTTGTGAAAGTAACACCAAAAGACCA	1740
		Q H T D V S F I L D R F V K V T P K D Q	
China/99/P12X3C	1713	AATTAATGTGTTGGACCTGATGCAAACCCCTGCACACACTTTGGTAGGCGCGCTCCTCCG	1772
		I N V L D L M Q T P A H T L V G A L L R	
pBin438/P12X3C	1741	AATTAATGTGTTGGACCTGATGCAAACCCCTGCACACACTTTGGTAGGCGCGCTCCTCCG	1800
		I N V L D L M Q T P A H T L V G A L L R	
China/99/P12X3C	1773	TACTGCCACCTACTACTTCGAGATCTAGAAGTGGCAGTGAACACAGGGGAACCTTAC	1832
		T A T Y Y F A D L E V A V K H E G N L T	
pBin438/P12X3C	1801	TACTGCCACCTACTACTTCGAGATCTAGAAGTGGCAGTGAACACAGGGGAACCTTAC	1860
		T A T Y Y F A D L E V A V K H E G N L T	

China/99/P12X3C	1833	CTGGGTCCCGAATGGGGGCCCCGAGACAGCGTTGGACAACACCACCAATCCAACGGCTTA	1892
		W V P N G A P E T A L D N T T N P T A Y	
pBin438/P12X3C	1861	CTGGGTCCCGAATGGGGGCCCCGAGACAGCGTTGGACAACACCACCAATCCAACGGCTTA	1920
		W V P N G A P E T A L D N T T N P T A Y	
China/99/P12X3C	1893	CCACAAGGCACCGCTACCCGGCTTGCACTGCCTTACACGGCACCACACCGTGTCTTGGC	1952
		H K A P L T R L A L P Y T A P H R V L A	
pBin438/P12X3C	1921	CCACAAGGCACCGCTACCCGGCTTGCACTGCCTTACACGGCACCACACCGTGTCTTGGC	1980
		H K A P L T R L A L P Y T A P H R V L A	
China/99/P12X3C	1953	TACTGTTTACAACGGGAAGTGAAGTATGGCGAGAGCCCCGTGACCAATGTGAGAGGTGA	2012
		T V Y N G N C K Y G E S P V T N V R G D	
pBin438/P12X3C	1981	TACTGTTTACAACGGGAAGTGAAGTATGGCGAGAGCCCCGTGACCAATGTGAGAGGTGA	2040
		T V Y N G N C K Y G E S P V T N V R G D	
China/99/P12X3C	2013	CCTGCAAGTGTTGGCCAGAAAGGCGCAAGAACGCTGCCTACCTCCTTCAATTACGGTGC	2072
		L Q V L A Q K A A R T L P T S F N Y G A	
pBin438/P12X3C	2041	CCTGCAAGTGTTGGCCAGAAAGGCGCAAGAACGCTGCCTACCTCCTTCAATTACGGTGC	2100
		L Q V L A Q K A A R T L P T S F N Y G A	
China/99/P12X3C	2073	CATCAAAGCCACTCGGGTGACTGAACTGCTTTACCGCATGAAGAGGGCCGAAACATACTG	2132
		I K A T R V T E L L Y R M K R A E T Y C	
pBin438/P12X3C	2101	CATCAAAGCCACTCGGGTGACTGAACTGCTTTACCGCATGAAGAGGGCCGAAACATACTG	2160
		I K A T R V T E L L Y R M K R A E T Y C	
China/99/P12X3C	2133	CCCCGGCCTCTTTTGCTATTACCCGAGCGAAGCTAGACACAAACAAAAGATTGTGGC	2192
		P R P L L A I H P S E A R H K Q K I V A	
pBin438/P12X3C	2161	CCCCGGCCTCTTTTGCTATTACCCGAGCGAAGCTAGACACAAACAAAAGATTGTGGC	2220
		P R P L L A I H P S E A R H K Q K I V A	
China/99/P12X3C	2193	GCCTGTGAAACAGCTTTTGAAGTGTGACCTGCTCAAGTTGGCAGGAGACGTCGAGTCCAA	2252
		P V K Q L L N F D L L K L A G D V E S N	
pBin438/P12X3C	2221	GCCTGTGAAACAGCTTTTGAAGTGTGACCTGCTCAAGTTGGCAGGAGACGTCGAGTCCAA	2280
		P V K Q L L N F D L L K L A G D V E S N	
			
China/99/P12X3C	2253	CCCTGGGCCTTTCTTCTCTGACGTCAGGTCAAATTTTCCAAGTTGGTTGAAACCAT	2312
		P G P F F F S D V R S N F S K L V E T I	
pBin438/P12X3C	2281	CCCTGGGCCTTTCTTCTCTGACGTCAGGTCAAATTTTCCAAGTTGGTTGAGACCAT	2340
		P G P F F F S D V R S N F S K L V E T I	
			

China/99/P12X3C	2313	CAACCAGATGCAGGAGGACATGTCAA---CAAGTGGTGCYCCCCGACTGACTTGCAAAA	2369
		N Q M Q E D M S T S G X P P T D L Q K	
pBin438/P12X3C	2341	CAACCAGATGCAGGAGGACATGTCAATCACTAGTGGTGTCCCCGACTGACTTGCAAAA	2400
		N Q M Q E D M S I <i>Spe</i> I 	
China/99/P12X3C	2370	GATGGTCATGGGTAACACCAAGCCTGTTGAGCTCATCCTCGACGGAAGACGGTGGCCAT	2429
		M V M G N T K P V E L I L D G K T V A I	
pBin438/P12X3C	2401	GATGGTCATGGGTAACACCAAGCCTGTTGAGCTCATCCTCGACGGAAGACGGTGGCCAT	2460
		M V M G N T K P V E L I L D G K T V A I	
China/99/P12X3C	2430	CTGCTGCGCCACCGGAGTGTTTGGTACTGCCTACCTTGTTCTCTCGTCATCTTTTCGCAGA	2489
		C C A T G V F G T A Y L V P R H L F A E	
pBin438/P12X3C	2461	CTGCTGCGCCACCGGAGTGTTTGGTACTGCCTACCTTGTTCTCTCGTCATCTTTTCGCAGA	2520
		C C A T G V F G T A Y L V P R H L F A E	
China/99/P12X3C	2490	GAAGTATGACAAGATCATGTTGGACGGCAGAGCCATGACAGACAGTGACTACAGAGTGTT	2549
		K Y D K I M L D G R A M T D S D Y R V F	
pBin438/P12X3C	2521	GAAGTATGACAAGATCATGTTGGACGGCAGAGCCATGACAGACAGTGACTACAGAGTGTT	2580
		K Y D K I M L D G R A M T D S D Y R V F	
China/99/P12X3C	2550	TGAGTTTGAGATTAAAGTGAAAGGACAGGACATGCTCTCAGACGCCGCGCTCATGGTGCT	2609
		E F E I K V K G Q D M L S D A A L M V L	
pBin438/P12X3C	2581	TGAGTTTGAGATTAAAGTGAAAGGACAGGACATGCTCTCAGACGCCGCGCTCATGGTGCT	2640
		E F E I K V K G Q D M L S D A A L M V L	
China/99/P12X3C	2610	TCACCGTGGGAATCGCGTGC GGGACATCACGAAGCACTTCCGTGATGTGGCAAGAATGAA	2669
		H R G N R V R D I T K H F R D V A R M K	
pBin438/P12X3C	2641	TCACCGTGGGAATCGCGTGC GGGACATCACGAAGCACTTCCGTGATGTGGCAAGAATGAA	2700
		H R G N R V R D I T K H F R D V A R M K	
China/99/P12X3C	2670	GAAAGGCACCCCCGTCGTCGGCGTGATCAACAACGCTGATGTTGGGAGACTGATCTTCTC	2729
		K G T P V V G V I N N A D V G R L I F S	
pBin438/P12X3C	2701	GAAAGGCACCCCCGTCGTCGGCGTGATCAACAACGCTGATGTTGGGAGACTGATCTTCTC	2760
		K G T P V V G V I N N A D V G R L I F S	
China/99/P12X3C	2730	TGGTGAGGCCCTTACCTACAAGGACATTGTAGTGTGCATGGACGGAGACACCATGCCCGG	2789
		G E A L T Y K D I V V C M D G D T M P G	
pBin438/P12X3C	2761	TGGTGAGGCCCTTACCTACAAGGACATTGTAGTGTGCATGGACGGAGACACCATGCCCGG	2820
		G E A L T Y K D I V V C M D G D T M P G	

China/99/P12X3C	2790	TCTCTTCGCCTACAAAGCCGCCACCAAGGCGGGTTACTGTGGAGGAGCCGTTCTTGCAAA	2849
		L F A Y K A A T K A G Y C G G A V L A K	
pBin438/P12X3C	2821	TCTCTTCGCCTACAAAGCCGCCACCAAGGCGGGTTACTGTGGAGGAGCCGTTCTTGCAAA	2880
		L F A Y K A A T K A G Y C G G A V L A K	
China/99/P12X3C	2850	GGACGGAGCCGAGACTTTCATCGTCGGCACTCACTCCGCAGGCGGCAACGGAGTTGGATA	2909
		D G A E T F I V G T H S A G G N G V G Y	
pBin438/P12X3C	2881	GGACGGAGCCGAGACTTTCATCGTCGGCACTCACTCCGCAGGCGGCAACGGAGTTGGATA	2940
		D G A E T F I V G T H S A G G N G V G Y	
China/99/P12X3C	2910	CTGCTCATGCGTTTCCAGGTCTATGCTGCTTAAATGAAGGCACACATCGATCCCGAACC	2969
		C S C V S R S M L L K M K A H I D P E P	
pBin438/P12X3C	2941	CTGCTCATGCGTTTCCAGGTCTATGCTGCTTAAATGAAGGCACACATCGATCCCGAACC	3000
		C S C V S R S M L L K M K A H I D P E P	
China/99/P12X3C	2970	ACACCACGAG-----	2979
		H H E	
pBin438/P12X3C	3001	ACACCACGAGTCTGAGAAAGATGAGCTAGTCGAC	3034
		H H E S E K D E L <i>Sal</i> I	

致 谢

时光飞逝，三年前那个清爽的秋日去农科院报到的情景仿佛就在昨天，而今天我已在这里为自己的论文做最后的陈述了，提笔之际，首先衷心感谢我的两位导师—谢庆阁研究员和张永光研究员的悉心指导和启发。谢先生严谨的学风、孜孜不倦的研学态度及执著的学术追求为学生今后的工作和学习树立了榜样，感谢张永光研究员在这三年里给予我学习和生活上的关心和支持，张老师不仅指导我设计试验路线，而且帮助我分析和解决问题，没有他的支持，我不可能在这个全新的领域里开展课题的研究工作，两位导师在学术上敏锐的洞察力、雷厉风行的工作作风和对科学的执着追求是我永远开拓进取的榜样。

感谢兰州兽医研究所所长才学鹏研究员、科管处处长殷宏研究员、病毒室主任刘湘涛研究员及副主任刘在新研究员及其它领导给予的支持和鼓励！

感谢中国科学院寒区旱区环境与工程研究所植物基因工程实验室安黎哲研究员、陈书燕博士在番茄及拟南芥转化方面提供的指导和帮助！

感谢中国农业科学院作物所韩天富研究员、吴存祥副研究员、徐琳硕士及中国科学院微生物所蔡文启研究员、欧阳青博士提供的质粒！

感谢中国农业科学院生物所刘德虎研究员、李刚强老师、徐妙云博士在载体构建和植物转化方面提供的指导和热心帮助！

感谢兰州兽医研究所马军武副研究员及其课题组祁淑云、周广清、林密等同事在 ELISA 检测中给予的巨大帮助和支持！感谢兰州兽医研究所王永录研究员、常慧芸副研究员、方玉珍老师、蒋守田老师、张维德老师、梁仲副研究员的热心帮助！

感谢南京农大王宝琴博士及本课题组王文秀、王炜、孙元、董金杰、吕建亮、刘庆军等师弟师妹们在试验方面给予的帮助，共同承担课题的日子里配合默契，相处愉快并结下深厚的友谊！

感谢远在美国的李丽博士、渠春菁博士、方卫国博士，他们虽然远在异国他乡继续深造，但仍在关心着我试验的进展，并给了我许多宝贵的经验和建议，冲涌我内心的感动无以言表！

感谢兰州兽医研究所郭慧琛博士、刘艳红博士、刘力宽博士、孙士琪博士、包慧芳博士、郭建宏博士、卢曾军博士、杨彬博士、冯霞博士、袁改玲博士、骆学农博士的热心帮助！

感谢中国农业科学院研究生院的老师及兰州兽医研究所科研管理处老师的帮助和支持！

最后感谢我的爱人及父母家人多年来对我的关爱和支持，他们给予我生活上的关怀与照顾和学业上的鼓舞与支持始终是我前行路上无穷的动力源泉！

三年的学习和工作短暂而又漫长，其中经历了太多的困难，无数次的失败，正是经过这三年的磨难，使我学到了分子生物学方面许多新的东西，也积累了很多宝贵的经验。难忘怀一路跋涉的朋友们，共同品味成功与喜悦、分担挫折苦辛的日子里有她（他）们相伴、相助，求索的路上脚步变得坚实而轻快。感谢一路走来的朋友，感谢这段学习历程，让他成为我记忆里深刻的一页。

收笔之际，再次感谢所有曾给予我关心和帮助的人！

本研究由国家高技术研究发展计划（863）项目资助（No：2001AA213071）

本论文在兰州兽医研究所农业部畜禽病毒学重点实验室完成。

作者简历

潘丽，女，1974年9月8日生，甘肃省天水市人，助理研究员。1997年毕业于西南农业大学微生物专业，同年被分到兰州兽医研究所工作，1998年到甘肃农业大学参加在职人员申请硕士学位学习，2001年毕业并获得硕士学位，2002年考取中国农业科学院兰州兽医研究所预防兽医学专业博士研究生。主要从事动物病毒分子生物学方面的研究，参加农业部高新技术产业化重点项目—口蹄疫重大疫情监测与毒种库的构建，参加973子课题“口蹄疫病毒遗传衍化关系的研究”，对口蹄疫流行毒株进行了VP1和3A基因的克隆、测序和序列分析，为口蹄疫流行的疫源分析、疫苗种毒的筛选以及病毒的遗传变异提供了分子生物学的研究数据。参加十五攻关“口蹄疫O、A双价苗的研制”。参加863子课题“口蹄疫新型疫苗的研究”，主要进行口蹄疫植物反应器亚单位疫苗的研制。

在读期间发表的论文：

1 潘丽，张永光，王永录等．口蹄疫病毒O/China/99株多基因植物组成型表达载体的构建及序列分析．中国人兽共患病杂志，已接受

2 潘丽，张永光，王永录等．口蹄疫病毒O/China/99株结构蛋白VP1植物种子特异性表达载体的构建及农杆菌导入．中国兽医科技，已接受