

文章编号:1009-0002(2002)04-0245-06

研究报告

## 乙肝病毒表面抗原基因在花生中的遗传转化及免疫原性检测

陈红岩, 张军, 高毅, 杜海莲, 马英, 郑文竹, 夏宁邵

(厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 厦门 361005)

**摘要:**首次用花生半胚作为外植体,与农杆菌 EHA105(含质粒 p1301HBs)共培养 5 d,再生培养基中通过加入潮霉素进行抗性筛选,得到抗潮霉素的芽,经芽的伸长、诱导生根获得转化植株。经 PCR、PCR-Southern 杂交、Southern 点杂交等分子检测,证实目的基因已整合到花生基因组中,ELISA 检测证实了在花生中表达的 HBsAg 具有较好的活性。经初步定量,花生小芽的蛋白初提液中可溶性蛋白含量 1.044 g/L, HBsAg 小蛋白的含量约占总可溶性蛋白的 0.032%,每克转化植株小芽鲜重含 HBsAg 小蛋白约  $2.4 \times 10^{-7}$  g。转基因花生植株初提重组蛋白经 HPLC 纯化、浓缩后,注射初免一次的小鼠,有明显的特异性抗体产生。口服饲喂已免疫但抗体下降至 0.025 (HBsAb ELISA D 值) Balb/c 小鼠,发现有较强的抗体回升,达 3.54,表明转基因花生疫苗可以加强口服免疫。

**关键词:**花生;转化;口服疫苗;乙肝表面抗原

中图分类号: Q785

文献标识码: A

### Transforming HBsAg into peanut and detection of its immunogenicity

CHEN Hong-yan, ZHANG Jun, GAO Yi, DU Hai-lian,

MA Ying, ZHENG Wen-zhu, XIA Ning-shao

(The Key Laboratory Ministry of Education for Cell Biology and  
Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Half-embryo was used as the acceptor of peanut transformation for the first time. Half-embryo co-culture with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105(including plasmid p1301 HBsAg) for five days. Through hygromycin selection, transformed peanuts were obtained. The presence and integration of foreign DNA in transgenic peanut was confirmed by hygromycin resistance, GUS detection, polymerase chain reaction(PCR), PCR-southern blot and genomic dot analysis. The immunoactivity of recombinant HBsAg(rHBsAg) was shown by ELISA. The amount of rHBsAg in transgenic bud of peanut is about  $2.4 \times 10^{-7}$  g/g. Immunogenicity of rHBsAg derived from transgenic peanut callus was confirmed by muscle injection of raw protein extraction and purified protein extraction from transformed callus, and oral feed of transformed calli to pre-vaccine Balb/c mice with commercial HBV vaccine. Special antibody to HBsAg were boosted in all cases. The feasible of peanut as oral vaccine is also proved, which proved a basic confidence for developing a practical transgenic peanut oral vaccine.

**Key words:** peanut; transform; oral vaccine; HBsAg

花生是世界上广泛种植的经济作物之一,是我国第二大食用植物油和蛋白质资源,又是军需民食的必需品。花生又称长生果,《本草纲目拾遗》中述及,花生有悦脾和胃,润肺化痰,滋养调气,清咽止咳的功效。花生含有 30%左右的蛋白质,营养价值很高,可与动物性食品鸡蛋、牛奶、瘦肉等媲美,且易于

吸收利用,是理想的生产蛋白疫苗的“反应器”。

植物基因工程在花生改良上的应用研究起步较晚,但近年来发展很快,相关的组织培养、选择和再生技术已建立起来。转基因研究国外主要集中在花生的抗病毒方面,其中包括花生条纹病毒(PSTV)、花生丛簇病毒(GRV)、花生丛矮病毒(PCV)和番茄斑萎病毒(TSWV)等<sup>[1]</sup>。品质改良方面,美国科学家正在分离生物合成脂肪酸的基因,试图通过改变基因的某些密码子来改变脂肪酸组织组成和含量,改进花生品质,延长保存时间。目前花生基因工程的大量工作

收稿日期: 2002-02-20

基金项目:福建省自然科学基金(C9910004)和厦门凯立生物制品有限公司资助

作者简介:陈红岩(1975-),女,硕士研究生

联系作者:夏宁邵 E-mail:nsxia@jingxian.xmu.edu.cn

仍多在美、英、澳等发达国家,国内仅有少数单位开展,用花生作为载体生产口服疫苗的研究鲜有报道。迄今所见关于在植物中表达乙肝疫苗的报道均集中在烟草、马铃薯、香蕉和蕃茄上<sup>[2,3,4]</sup>。烟草的毒性限制了其实际应用的价值,马铃薯块茎难以生食,而香蕉、蕃茄则受到本身蛋白含量的限制<sup>[5]</sup>。本课题选取花生作为受体植物,研究影响花生转化的各种因素,建立优化的转基因系统,并进行初步的小鼠实验,评价利用转基因花生生产疫苗的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

花生泉花一号、汕油(福建农业科学研究所)、鄂花四号、7868(中国农业科学院油料作物研究所)。

### 1.2 菌株和质粒

大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、JM101;农杆菌 EHA105 无抗性、LBA4404 为链霉素抗性 (*Sm<sup>r</sup>*) AGL1 无抗性。pBPFQ7 含 *camv35S* 启动子、 $\Omega$  因子及 *nos* 终止子,抗性标记为 *Amp<sup>r</sup>*; pCAMBIA1301 为植物双元质粒载体,含植物抗性筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因 (*hyg*)、报告基因  $\beta$ -葡萄糖苷酶基因 (*gus*) 及质粒抗性标记基因 (*kan<sup>r</sup>*)。

### 1.3 植物双元表达载体的构建

从 pGEM-T-HBsAg 上用 *XhoI/EcoRI* 切下 HBsAg(约 820 bp),同样酶切载体 pBPFQ7,回收载体片段  $T_4$  DNA 连接酶连接,得到中间载体 pBHBs。 *PstI* 酶切 pBHBs 和 pCAMBIA1301 分别回收片段和载体  $T_4$  DNA 连接酶连接,得到植物表达载体 p1301HBs。

### 1.4 培养基

基本培养基: MS、LB、YEB;  $P_{17}$  培养基: MS+5.0 mg/L Pro+10 mg/L BA+2 mg/L NAA;  $B_5N_0$  培养基: MS+5 mg/L BA;  $B_0N_{0.5}$  培养基: MS+0.5 mg/L NAA;  $B_1N_2$  培养基: MS+1 mg/L BA+2 mg/L NAA; YEB 培养基: 5 g/L 牛肉膏+1 g/L 酵母粉+5 g/L 蛋白胨+5 g/L 蔗糖+0.5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , pH7.2。

### 1.5 花生成熟半胚再生方法

1.5.1 外植体的制备 成熟带壳种子用含有洗洁精的自来水浸泡 1 min,流水冲洗 3 遍,再用 0.3%氯化汞溶液消毒 8 min,无菌水漂洗 5~6 次,每次间隔 7 min,取胚,横向切去胚根和顶芽只剩 1/2 胚(半胚)。

1.5.2 培养方法 半胚接种到  $P_{17}$  培养基上,在 28 $^{\circ}C$ 、3 000~4 000 lx 光强,16 h 光照条件下培养,每隔 10 d 更换新鲜培养基。当有绿色芽点形成后,接种到  $B_5N_0$  培养基上促进芽分化及伸长。待有 4~6 片叶时,切下转移到  $B_0N_{0.5}$  培养基上诱导生根。14 d 后根开始形成,21 d 后可将根系健壮的小植株移植于 120 $^{\circ}C$  高温灭菌的无菌土中,置于室温和室内光照条件下培养所 10 d 左右后,移栽至室外花盆中。

### 1.6 基础抗性的测定、转化及转化体筛选

1.6.1 花生半胚对抗生素的敏感性试验 分别配制含有潮霉素浓度梯度为 0、10、20、30、40 mg/L 及卡那霉素浓度梯度为 0、50、100、200、300 mg/L 的  $P_{17}$  分化培养基,每瓶接种 6~8 个外植体,15 d 后更换一次新鲜培养基。接种 10 d 后要注意观察生长状况,同时观察空白对照直至其分化出小芽为止。

1.6.2 农杆菌法转化 菌液 ( $D_{600}$  值为 0.8~1.0) 4 000 r/min 离心 8 min,收集菌体后用 1/2 MS 液体培养基重悬 4 000 r/min 离心 8 min 收集菌体,再用  $P_{17}$  液体培养基稀释至最终  $D_{600}$  值为 0.2~0.3。将半胚放入农杆菌菌液中,静置 20 min,取出外植体在滤纸上吸去多余的菌液分别接种于  $P_{17}+0.2$  mol/L  $CaCl_2$  共培养基上,暗培养 5 d。

1.6.3 转化体的筛选 暗培养过后,转接到含 300 mg/L 头孢霉素和 300 mg/L 羧苄青霉素的分化培养基上进行 7 d 的恢复培养,然后再转接到含有 300 mg/L 头孢霉素、300 mg/L 羧苄青霉素和 20 mg/L 潮霉素的分化培养基上进行筛选,待有绿色芽点形成以后转到芽伸长培养基上。

### 1.7 转化体的鉴定

报告基因 *gus* 的检测:取转化体组织用 X-gluco 染液<sup>[6]</sup> 于 37 $^{\circ}C$  温浴 12 h 后,无水乙醇脱色,解剖镜下观察 *gus* 表达的蓝斑。

PCR 法检测外源基因的整合:用 ROSE 快速一步法抽提植物总 DNA 进行 PCR 扩增。扩增条件:94 $^{\circ}C$  预变性 10 min,加 *Taq* 酶后开始 40 个循环(94 $^{\circ}C$  变性 50 s,48 $^{\circ}C$  复性 45 s,72 $^{\circ}C$  延伸 50 s),72 $^{\circ}C$  延伸 7 min。

点杂交及 PCR-Southern 杂交:HBsAg-DIG 为探针与植物总 DNA 或 PCR 产物进行杂交。

### 1.7 植物重组蛋白的免疫原性检测

1.7.1 植物重组蛋白抗原活性检测及定量 植物蛋白粗提液通过 ELISA (乙肝表面抗原酶联检测试剂盒,厦门新创科技有限公司)进行抗原活性检测及初步的定量。

1.7.2 小鼠免疫 ①口服免疫:4~6 周龄的 Balb/c 小鼠 5 只,每只每天饲喂 5 g 抗性愈伤组织;用乙肝病毒免疫过抗体已经下降至 0.025 (HBsAb ELISA *D* 值)小鼠,每天饲喂 5 g 愈伤组织;②肌肉注射免疫:4~6 周龄的 Balb/c 小鼠 7 只,注射乙肝基因工程疫苗(卫生部长春生物制品研究所) 2  $\mu$ g/只;7 d 后 3 只用未纯化的转化体植株蛋白混合液,2 只用通过 HPLC 纯化、浓缩后的转化体植株蛋白混合液 400  $\mu$ l (约 1  $\mu$ g HBsAg)注射到四肢肌肉内;其余两只,一只注射非转化体植株蛋白提取液,另一只不作处理,作为实验对照组。每隔 7 d 从小鼠尾巴采集血液 3~4 滴,加入含 200  $\mu$ l 生理盐水的 1.5 ml EP 管中。37 $^{\circ}C$  孵浴 2 h,4 $^{\circ}C$  放置 2 h,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清。用 ELISA 检测血清中抗体的含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 花生再生系统的选择

从报道的比较成熟的花生组织培养技术(以花生成熟胚、幼嫩叶片、下胚轴、成熟子叶为外植体)中

挑选出小叶、胚轴为外植体,并进一步优化培养基,与我们首次采用的花生半胚相比较。以花生“泉花一号”、“汕油”、“鄂花四号”、“7868”四个栽培品种(系)的不同外植体半胚、小叶、胚轴等在其最优的分化培养基上诱导发芽。结果见表1。

表1 不同外植体及品种对芽诱导的影响

种(系)	半胚			小叶			胚轴		
	B/A	%	C	B/A	%	C	B/A	%	C
泉花一号	28/32	87.5	8.6	11/40	27.5	6.8	08/24	33.3	7.5
汕油	29/32	90.6	7.8	08/38	21.1	6.5	10/24	41.6	5.8
鄂花四号	30/32	93.5	9.7	10/40	25.0	5.6	17/35	53.1	8.7
7868	29/32	90.6	8.1	09/37	35.1	7.3	13/24	54.2	6.2

注:A为外植体数,B为能再生产生多于3个的外植体数,C为每个外植体再生的芽数

从表中可以看出半胚品种间差异小,小叶和胚轴品种间差异大。选择理想的转化受体的原则应易于再生,有很高的再生频率,并且具有良好的稳定性和重复性,所以我们选择花生成熟半胚作为遗传转化的受体。

## 2.2 花生筛选剂的选择及浓度的确立

本实验所采用的植物表达载体中含有潮霉素磷酸转移酶基因(*NPT II*)和抗卡那霉素基因,既能分解潮霉素,又能分解卡那霉素。绝大多数植物对潮霉素比对卡那霉素敏感。理论上两者都可以作为转化体的筛选剂,但卡那霉素不仅会严重抑制未转化组织的生长,也会影响转化组织的生长,并且产生白化苗的现象很多。

对潮霉素和卡那霉素两种抗生素的敏感性实验表明,花生对卡那霉素的基础抗性很高,当卡那霉素达到300 mg/L的浓度时仍然不能有效地杀死组织细胞。花生对卡那霉素如此高的耐受性会导致假阳性出现频率增加。潮霉素在20 mg/L浓度下就可以完全抑制芽的分化,所以本实验选择潮霉素为筛选剂,20 mg/L为筛选剂的基础压力(表2)。

表2 卡那霉素、潮霉素不同浓度下对花生半胚芽分化诱导的影响

抗生素	浓度(mg/L)	外植体数	活的外植体数
卡那霉素	0	32	32
	100	32	28
	200	32	5
	300	32	0
潮霉素	0	32	32
	10	32	7
	20	32	0
	30	32	0

## 2.3 农杆菌介导的花生遗传转化的条件优化

农杆菌的基因转化过程是细菌和植物互作的过

程。成功的转化不仅需要细菌处于最佳的生长、感染状态,植物细胞处于易于接受外来DNA的感受态也是同样不可忽视的。植物细胞感受态除需要创伤反应外还与植物激素和 $Ca^{2+}$ 浓度有关。植物激素是信号传递的第一信使,其功能的发挥还有赖于 $Ca^{2+}$ 的参与<sup>[7]</sup>。所以我们试图比较在菌液和共培养基中加入一定浓度的 $CaCl_2$ 和不同共培养时间对转化效率的影响(表3)。

表3  $CaCl_2$ 和共培养时间对转化效率的影响

$CaCl_2$ 浓度(mol/L)	共培养时间(d)	<i>gus</i> 瞬时表达活性
0	2	±
0.1	2	+
0.2	2	++
0.3	2	+
0.2	3	++
0.2	4	++
0.2	5	+++
0.2	6	+++

随机取4块转化体经X-gluc缓冲液37℃温浴12 h后,在解剖镜下观察。+:表示目测*gus*表达的蓝斑数、蓝斑颜色

结果表明适当浓度 $CaCl_2$ 可以有效提高转化效率。同时我们发现,花生本身的代谢产物有抑制农杆菌生长的作用,在保证外植体四周有适量但不能过量菌体的情况下适当地延长共培养的时间,最长的可达到一周。随着共培养时间的延长转化效率也有所增长,但考虑到以后的筛选等问题,我们选择了0.2 mol/L  $CaCl_2$ ,共培养时间5 d为转化条件。

## 2.4 外源基因整合的检测

2.4.1 转基因植株获得 花生“鄂花四号”成熟胚120颗,切去两片子叶、胚根和胚芽后,得到的半胚与农杆菌EHA105(含质粒p1301HBsAg)在加入0.2 mol/L  $CaCl_2$ 的 $P_{17}$ 培养基上暗培养5 d,后接种到含300 mg/L头孢霉素和300 mg/L羧苄青霉素的 $P_{17}$ 培养基上进行7 d的恢复培养,每瓶接种10颗。然后再转接到含300 mg/L头孢霉素、300 mg/L羧苄青霉素和20 mg/L的潮霉素的 $P_{17}$ 培养基上进行筛选。每隔7 d更换新鲜培养基,转接时丢弃掉变褐死亡的外植体,14 d转接时仅剩5个部分褐化但还有少许绿色芽点的外植体,再经过14 d后仅有2块外植体,约有6个小芽。接种到300 mg/L羧苄青霉素和20 mg/L潮霉素 $B_5N_0$ 培养基上进行芽伸长。10 d后仅有3个芽生长正常,最后在含20 mg/L的潮霉素的 $B_0N_{0.5}$ 培养基上诱导生根。

2.4.2 转基因植株报告基因(*gus*)检测结果 对得到的3株抗性芽及小叶进行*gus*活性检测(图1~4),经乙醇脱色后,阳性植株的小芽及叶片仍为蓝色,非



转化植株的叶片几乎呈无色,说明外源 *gus* 基因已在花生中表达。

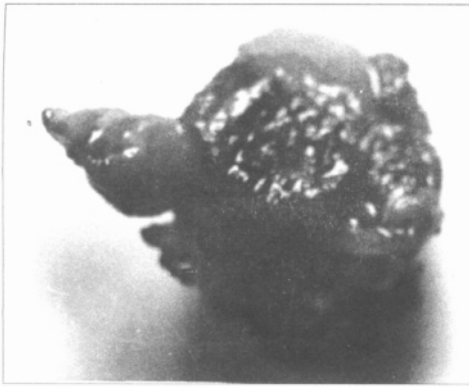


图1 抗性芽 GUS 检测

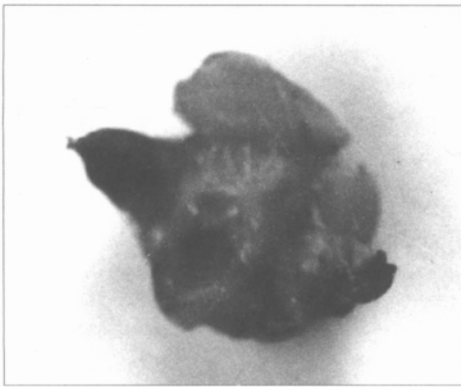


图2 非转化芽 GUS 检测

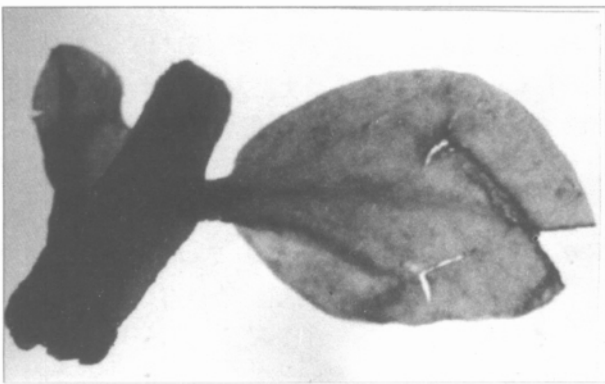


图3 转化体叶片 GUS 检测

#### 2.4.3 目的基因的 PCR 检测及 PCR 产物转膜杂交

2  $\mu$ l 植物总 DNA(Plant DNA Isolation Kit)为模板, SPIF5'-ATTAATAGTCAACAATATGT-3 和 SPIR 3'-ATTAAGCACCCTATACATT-5' 为扩增引物。结果扩增出的片段与预期的基因大小 (540 bp) 一致

(图5),而未转化的植株 DNA 没有扩增出相同大小的条带。以 DIG-dATP 标记 HBsAg DNA 作为探针,用 PCR 扩增出来的产物进行转膜杂交,以 p1301HBs 作为阳性对照。结果表明,由转化植株 PCR 扩增的产物有明显的杂交信号,非转化植株则无杂交信号,从而进一步证实了目的基因已经整合到植物基因组中(图6)。

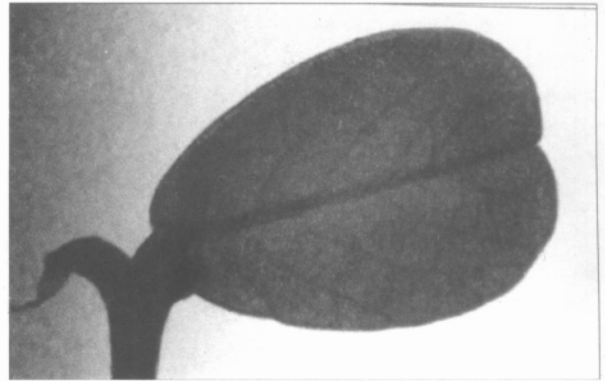


图4 非转化体叶片 GUS 检测

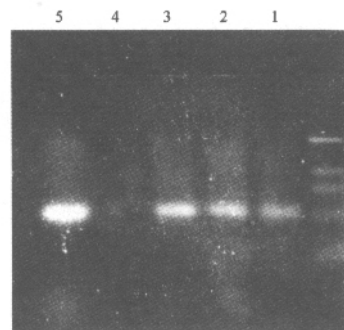


图5 花生基因组总 DNA 的 PCR 产物  
1、2、3. 转化植株 4. 非转化植株 5. 质粒 p1301HBs

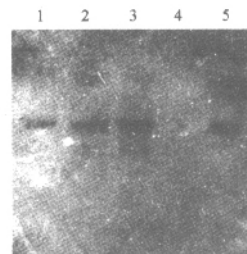


图6 花生基因组 PCR-Southern 杂交  
1、2、3. 转化植株 4. 非转化植株 5. 质粒 p1301HBs

2.4.4 基因组 DNA 点杂交检测 以 DIG-dATP 标记 HBsAg DNA 作为探针,对转化植株的总 DNA 进行点杂交,同时以非转化植株作为阴性对照, p1301HBs 作为阳性对照对。结果 3 份被检测的转化

植株都为阳性(图7),非转化植株未见杂交斑点,证明目的基因已经整合到花生基因组中。

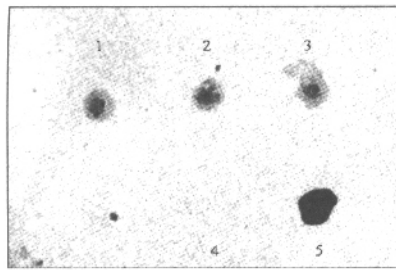


图7 花生基因组DNA斑点杂交  
1、2、3. 转化植株 4. 非转化植株 5.质粒 p1301HBs

### 2.5 转化植株中目的基因表达活性的检测及定量

取转化植株及非转化植株小芽 0.2 g,用 CTAB 法提取蛋白,得到 1.5 ml 蛋白粗提液,取 50 μl 样品用乙肝表面抗原 ELISA 试剂盒检测 HBsAg 活性,结果见表 4。

表 4 转化株系 HBsAg 表达量测定结果

测定项	D 均值	HBsAg 活性 含量 (ng/ml)	可溶性蛋白 含量 (g/L)	活性 HBsAg	
				占可溶性 蛋白含量(%)	每克鲜重 活性 HBsAg 量 ( $\times 10^{-7}$ g/g)
P <sub>1</sub> <sup>+</sup>	1.07	20	1.02	0.020	1.27
P <sub>2</sub> <sup>+</sup>	1.426	40	1.21	0.032	2.40
P <sub>3</sub> <sup>+</sup>	0.845	16	0.89	0.018	1.21
P <sup>-</sup>	0.06	-	1.04	-	-
HBsAg <sup>+</sup>	2.429	-	-	-	-
HBsAg <sup>0</sup>	0.242	-	-	-	-
HBsAg <sup>-</sup>	0.019	-	-	-	-

HBsAg<sup>+</sup> 为阳性对照血清,HBsAg<sup>0</sup> 为标准阳性血清,HBsAg<sup>-</sup> 为阴性血清;  
P<sub>1</sub><sup>+</sup>、P<sub>2</sub><sup>+</sup>、P<sub>3</sub><sup>+</sup> 为转化植株 P<sup>-</sup> 为非转化植株

### 2.6 植物重组蛋白的免疫原性检测

2.6.1 肌肉注射免疫 4~6 周龄的 Balb/c 小鼠 7 只,注射乙肝基因工程疫苗 2 μg/只,7 d 后,用经 SE-HPLC 分离、纯化过的蛋白注射其中 2 只(400 μl/只,约 1 μg HBsAg),另 3 只注射没有纯化过的粗提蛋白(400 μl/只,约 1 μg HBsAg);剩余 2 只,1 只注射非转化植株的蛋白粗提液,另 1 只未加处理,作为对照组。从注射乙肝基因工程疫苗开始,每隔 7 d 采集小鼠血液,用 ELISA 检测其血清中抗体的含量,抗体变化如图 8。可见对照组 1,2 小鼠抗体上升趋势很缓慢,于第 7 周时,抗体升至 1.14 和 0.972;纯化 1 组、2 组小鼠抗体上升趋势最为明显,于一月左右开始上升,在第 7 周抗体水平已达到 3.585 3.369;未纯化 1 组、2 组小鼠抗体上升趋势也比较明显,于第 7 周达到了 3.079 2.84。结果显示,无论是纯化后的还是没有纯化的植物蛋白都具有同商用基因工程疫苗类似的免疫原性,注射小鼠后,能够诱导机体产生抗 HBsAg 抗体。但是未纯化的蛋白注射小鼠后,

有 1 只 在第 12 d 死亡。可能是由于植物粗提蛋白中存在一些未知的杂蛋白或过敏源所致。

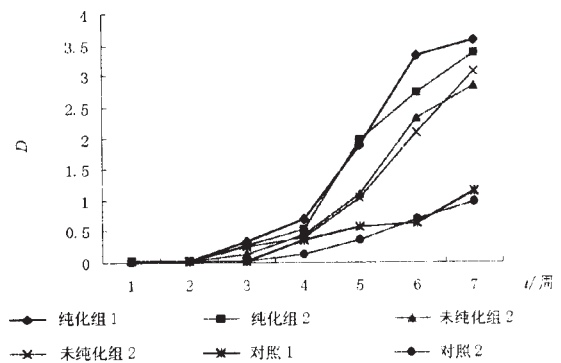


图 8 肌肉注射小鼠后血清抗体的变化  
对照:乙肝基因工程疫苗初免一次;纯化组 1,2:乙肝基因工程疫苗初免,纯化的植物蛋白;未纯化组 1,2:乙肝基因工程疫苗初免,未纯化的植物初提液加强

2.6.2 口服免疫 注射免疫结果证实了植物来源的重组蛋白有很好的免疫原性,但考虑到植物疫苗的一个特有的优点就是可以直接食用,所以进一步采用直接饲喂途径。取 7 只 4~6 周龄的 Balb/c 小鼠,其中 2 只作为对照组,1 只每天只饲喂鼠食(对照组 1),另一只增加饲喂 5 g 非转化植株的愈伤组织(对照组 2),其余 5 只小鼠每天除正常饲喂鼠食外,每只增加饲喂 5 g 转化植株愈伤组织。还有 1 只是在以前注射乙肝病毒,抗体已由 2000 年 12 月时的 3.98 (HBsAb ELISA D 值)下降到 0.025,作为加强组,每天也添加饲喂转化植物愈伤组织。从饲喂小鼠开始,每隔 7 d,采集小鼠血液,经 ELISA 检测其血清中抗体的含量。经过近 2 个月的饲喂,其中有 2 只分别 在第 8 d、13 d 死亡。实验结果见图 9。可以看出,对照组曲线为近似的平滑水平直线;3 只饲喂植物愈伤组织的小鼠(口服免疫组)在近 2 个月抗体水平也几乎为 0;加强组小鼠经 2 个月饲喂,于 1 个月左右抗体开始回升,由 1.12 至第 7 周检测时抗体已上升到 3.54。

实验结果表明,用于免疫加强的小鼠经过近 2 个月的饲喂,抗体有明显的回升,说明转基因植物表达的外源 HBsAg 具有诱导机体产生特异性抗体的生物学功能。口服初免的小鼠抗体与对照组小鼠一样没有明显的抗体产生,可能由于表达的外源蛋白占植物总蛋白的比例偏低,小鼠每天的食量有限,经胃肠道消化时,蛋白被消化液酶解成很小的肽段或游离的氨基酸,失去了原有的免疫原性,经吸收后,

具有免疫原性的 HBsAg 达不到直接诱导产生抗体反应 (初次免疫应答) 的浓度 ; 加强免疫的小鼠则只需极少抗原刺激就可以激活初次免疫后机体中存在的记忆细胞 , 快速产生再次免疫应答 (或称免疫记忆)。

总之 , 把经过粗提、纯化的植物蛋白注射小鼠或直接用转化的植物愈伤组织饲喂小鼠的实验 , 均初步证实了转基因花生中重组 HBsAg 蛋白具有同商用基因工程疫苗类似的免疫原性 , 即能够诱导小鼠产生抗 HBsAg 抗体。

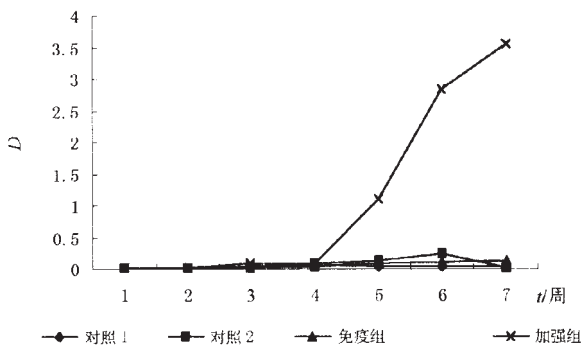


图9 饲喂小鼠后血清抗体变化

对照 1,2 : 没有饲喂转基因愈伤组织和饲喂非转化植株愈伤组织的小鼠 ; 免疫组 : 饲喂转基因愈伤组织的小鼠 ; 加强组 : 抗体下降后饲喂的小鼠

### 3 讨论

以花生的子叶、未成熟子叶、幼芽、下胚轴、幼嫩叶片等各种组织、器官为外植体的再生研究尽管均获成功 , 但所需周期长 , 容易产生体细胞变异 , 而且品种间再生效率变化大<sup>[8]</sup>。我们首次挑选再生频率高 , 再生周期短的半胚作为转化的受体材料进行实验 , 在 P<sub>17</sub> 培养基上芽的诱导率达 90 % 以上 , 每个外植体可再生 8 个以上植株 , 并且发现在泉花一号、汕

油、鄂花四号、7868 四个不同品种间差异很小 , 是很理想的再生系统。在转化系统优化方面 , 挑选出超毒力农杆菌菌株 EHA105 , 通过在菌液和共培养基中加入 0.2 mol/L CaCl<sub>2</sub> , 延长共培养时间等方法有效地提高了转化效率。潮霉素筛选得到的抗性植株经 PCR、PCR-Southern、Southern 点杂交等分子检测 , 证实目的基因已整合到花生基因组中。

在过去的研究中 , 我们曾将 HBsAg 基因转入番茄和胡萝卜中 , 经 ELISA 活性定量 , 表达出的 HBsAg 重组蛋白含量分别为 6×10<sup>-8</sup> g/g 鲜重和 3.2×10<sup>-8</sup> g/g 鲜重。为进一步提高转基因植株中 HBsAg 蛋白的含量 , 我们又建立优化了花生转化体系 , 成功地利用花生半胚为受体 , 获得了转 HBsAg 基因的转基因花生植株 , 经 ELISA 活性定量 , 表达出的 HBsAg 重组蛋白含量达 2.4×10<sup>-7</sup>g/g 鲜重 , 较番茄和胡萝卜提高了 5~8 倍。花生转化体口服饲喂已免疫但抗体已明显下降的 Balb/c 小鼠 , 可见有较明显的抗体回升。表明转基因花生表达 HBsAg 具有良好的免疫原性。由于花生更高的表达产量和总蛋白含量 , 以及更好的食用性 , 因此具有成为口服疫苗的更大潜力。

### 参考文献

- [1] 王传堂,李广存,毕玉平.花生基因工程研究进展[J].花生科技,1999,1:1
- [2] Richter LJ, Yasmin Thanavala, Arntzen CJ. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18:1167
- [3] Kapusta H. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus[J]. FASEB, 1999,13:1796
- [4] 刘德虎. 利用转基因植物生产药用蛋白[J]. 生物技术通报, 1999, 4:1
- [5] Amanda M. Current Opinion in Biotechnology, 2000, 11:126
- [6] Jefferson Ra *et al.* Mechanism and applications of DNA mediated gene transfer in mammalian cells [J]. Plant Mol Biol Rep, 1987,5:387
- [7] 王景雪,张毅等.农杆菌介导的植物基因转化进展[J].生物技术通报,1999,1:7
- [8] 周桂元,梁炫强,李一聪等.国内外花生遗传转化研究的现状[J].作物杂志,1999,1:1