

乙肝病毒表面抗原基因转化番茄

马英^{1,2}, 林顺权³, 高毅¹, 张军¹, 吕柳新², 夏宁邵¹

(1. 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 福建农林大学亚热带果树研究所, 福建 福州 350002; 3. 华南农业大学园艺系, 广东 广州 510642)

摘要: 将乙肝病毒表面抗原(HBsAg)基因与CaMV 35S启动子及nos终止子构建植物表达载体p1301HBs, 直接法转入根癌农杆菌EHA 105(*Agrobacterium tumefaciens*), 以该菌株介导叶盘法转化番茄, 得到抗潮霉素的再生植株。抗性苗总DNA经PCR、Southern斑点杂交证实目的基因已整合到番茄基因组中, ELISA检测证明在番茄中正确表达了乙肝表面抗原蛋白。

关键词: 番茄; 乙肝表面抗原(HBsAg); 遗传转化

中图分类号: Q 785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-7817(2002)06-0223-05

Transformation of HBsAg (hepatitis B virus surface antigen) into tomato plants

MA Ying^{1,2}, LIN Shun-quan³, GAO Yi¹, ZHANG Jun¹, LU Lixun², XIANing-shao¹

(1. The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 2. Institute of Subtropical Fruits, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China; 3. Department of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China)

Abstract: Plant binary expression vector p1301HBs, which contained CaMV 35S promoter, HBsAg gene and Tnos, was directly introduced into *A. tumefaciens* EHA 105. With "leaf disk" method, tomato plants medicated by EHA 105 were transformed and hygromycin-resistant plantlets were obtained. The results of PCR and Southern dot blotting of tomato genomic DNA demonstrated that the target gene was integrated into the genome of tomato plants. The examination of ELISA suggested the HBsAg gene was expressed correctly in transgenic tomato plants.

Key words: tomato; HBsAg (hepatitis B virus surface antigen); transformation;

随着植物生物技术的发展,利用转基因植物生产基因工程疫苗已成为一个重要的研究和开发领域。与微生物发酵、动物细胞培养及转基因动物等系统生产疫苗相比,它具有许多优越性:(1)植物细胞培养简单,易成活,利于遗传转化操作;(2)植物种植简单,扩繁容易,种子易于贮存,有利于重组蛋白的生产和运输;(3)植物细胞是真核细胞,有与动物细胞相似的结构和功能,有利于重组蛋白的正确装配和表达;(4)植物口服疫苗可简化或避免下游加工程序;(5)植物病毒不感染人体,较为安全。

乙型肝炎是严重危害人类健康的传染病之一。乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)可刺激机体产生对乙肝病毒的保护性抗体,为现有商业疫苗的主要成分。目前,其基因已在烟草^[1,2]、马铃薯^[3,4]中表达,并具有免疫原性。但烟草不能口服,马铃薯亦不能生食,熟食又会破坏蛋白质疫苗。再者,用非生食植物表达的疫苗往往需要提纯加工后方可使用。因此,用番茄、香蕉等可生食果蔬生产口服乙肝疫苗更具意义。番茄营养丰富,富含Vc,在全世界种植广泛,是人们喜爱的可生食蔬菜,又堪称转基因研究的模式植物,因而是研制植物口服疫苗的理想载体。目前番茄的转基因研究多限于品质改良、抗性育种及保鲜等方面^[5],用于生产医药蛋白尤其是生产疫苗方面的研究极少。1995年,McGarvey^[6]在番茄中表达了狂犬病病毒糖蛋白(G-蛋白)基因;我国赵春晖等^[7]构建了含与不含前导序列的乙肝病毒表面抗原植物表达载体,并借助农杆菌介导将其导入番茄,得到转基因植株,其中不含前导序列的转基因植株中检测到了HBsAg的表达,但均未见有关免疫原性的报道。

收稿日期: 2001-12-24

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C9910004)。

作者简介: 马英(1969-),女,硕士。研究方向: 果树生物技术。

本研究以番茄为受体, 将乙肝病毒表面抗原基因导入番茄, 以期为深入研究外源基因表达产物的免疫活性以及利用番茄生产乙肝或其他植物口服疫苗提供实验基础和理论指导

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌 DH5 α JM 101, 根癌农杆菌 EHA 105 (无抗性), 中间载体 pBPFQ7 (Amp^r) (含 CaMV 35S 启动子、 Ω 增强子及 nos 终止子) 及 pCAMB IA 1301 植物二元质粒, 含有植物抗性筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因 (Hyg)、报告基因 β 葡糖苷酸酶基因 (Gus) 及质粒抗性标记基因 (Kan^r), 均为本实验室保存。乙肝表面抗原 (HBsAg) 小蛋白基因 (HBsAg-s) 由本实验室克隆得到

1.1.2 酶和生化试剂 主要工具酶和生化试剂购自 Promega、Sigma 及上海 Sangon 公司。潮霉素 (hygromycin) 购自 Calbiochem-novabiochem 公司, X-g luc (GUS 染液) 购自 Am res 公司。乙肝表面抗原 (HBsAg) 酶联检测试剂盒由北京万泰生物药业有限公司提供

1.1.3 番茄种子 “羞女” 品种购自厦门农友种苗有限公司

1.1.4 培养基 有 1/2MS+ 0.8% Agar+ 3% Suc (M₁)、MS+ ZT₁+ IAA₁+ 0.8% Agar+ 3% Suc (M₂)、M₂+ Cef₅₀₀+ Hyg₁₀ (M₃)、M₂+ Cef₅₀₀+ Hyg₂₀ (M₄) 及 MS+ IAA₂+ 0.8% Agar+ 3% Suc+ Cb₂₀₀+ Hyg₂₀ (M₅)。

1.2 方 法

1.2.1 植物二元表达载体的构建和农杆菌转化 从 pGEM-T-HBs 上用 Xho I/EcoR I 切下 HBsAg 小蛋白基因片段 (约 480 bp), 同样酶切载体 pBPFQ7, 回收载体片段 (约 4.3 kb), T₄DNA 连接酶连接基因和载体片段, 得到中间载体 pBHBs。然后用 Pst I 酶切该中间载体, 回收含有“P35S+ HBsAg-s+ Tnos” 的片段, 同时用相同酶切载体 pCAMB IA 1301, 回收载体片段, 用 T₄DNA 连接酶连接得到植物表达载体 p1301HBs, 经鉴定后以直接法转入农杆菌 EHA 105。

1.2.2 叶盘法转化番茄及转基因番茄苗的再生 番茄种子经体积分数为 75% 的乙醇消毒 30 s, 以体积分数为 20% 的次氯酸钠消毒 20 min, 无菌水漂洗 5 次后在 M₁ 培养基上播种。发芽。取播种后 7-12 d 的番茄幼苗子叶及下胚轴, 在 M₂ 培养基上预培养 2-3 d 后按 Horsch et al^[8] 的叶盘法进行转化。在含卡那霉素 (50 mg · L⁻¹) 的 YEB 培养基上扩繁带目的基因的农杆菌 EHA 105, 浸染番茄无菌苗子叶 20 min, 将外植体置于 M₂ 培养基上, 28℃ 暗培养 3 d 后, 转移到 M₃ 上培养, 1 周后再转到 M₄ 培养基上筛选。其后每隔 15 d 在 M₄ 上继代 1 次, 并逐渐减少头孢霉素 (Cef) 的用量。25℃、16 h 光周期培养。一般 2 周后可长出愈伤组织, 3-4 周后长出小芽, 待小芽长至约 1 cm 时移入 M₅ 培养基上生根, 根系发达后移栽到土壤栽培。

1.2.3 转基因番茄植株的鉴定

报告基因 GUS 的检测: 分别取转化体和非转化体组织, 用 X-g luc 染液 37℃ 温浴 12 h 后, 以无水乙醇脱色, 解剖镜下观察 GUS 表达的蓝斑。

植物总 DNA 提取采用 CTAB 法^[9]。

PCR 检测: PCR 引物由上海基康公司合成。上游引物 SSP: 5'-ATGGA GAACA TCA CA TCA -3', 下游引物 α R: 5'-GGA TCCTTTT GCGGAA GCCCA -3'。

扩增条件: 94℃ 预变性 10 min, 随后按一定条件 (94℃ 变性 50 s, 48℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 50 s) 循环 40 次后, 72℃ 延伸 7 min。

Southern 斑点杂交: 用 10 × D IG-dNTP mix 代替 dNTP, PCR 扩增制备 HBs-DIG 探针。经纯化的植物的总 DNA 在 0.1 mol · L⁻¹ 的 NaOH 溶液中 94℃ 变性 5 min。取 6 μ L 该溶液点于尼龙膜, 以 p1301HBs 为阳性对照, 非转化体总 DNA 为阴性对照。预杂交 4 h, 杂交 12 h, AP-DIG 包被 2 h, 洗膜后显色。

ELISA: 按文献^[9]的方法提取植物蛋白。以双抗体夹心法检测植物蛋白提取液中的 HBsAg。

2 结果与分析

2.1 表达载体 p1301HBs 的鉴定

用 Pst I 酶切 p1301HBs 后得到约 2400 bp 的片段 说明 HBsAg 基因已经正确插入植物表达载体中(图 1).

2.2 转基因植株报告基因(GUS)的检测结果

浸染过农杆菌 EHA 105 的番茄子叶及下胚轴, 在含 20 mg · L⁻¹ 的潮霉素培养基上筛选约 7 周后得到抗性苗(图 2), 移栽后部分植株已经成活(图 3).

对得到的抗性植株的叶片进行 GUS 活性检测, 经乙醇脱色后, 阳性组织仍为蓝色, 非转化株叶片呈无色(图 4、5), 说明外源 GUS 基因已在番茄中表达

2.3 目的基因的 PCR 检测及 Southern 点杂交

以 3 μL 植物总 DNA 为模板, SSP、αR 为扩增引物, 质粒 p1301HBs 为阳性对照, 非转化植株为阴性对照 从 14 个株系 GUS 阳性抗性苗中, 随机检测了 7 株 结果表明, 转化株扩增出的片段与质粒扩增出的目的片段(约 480 bp) 大小一致, 而阴性对照株未扩增出相应的条带, 初步证实目的基因已整合到植物基因组中(图 6).



1. DNA marker: DL-15000; 2. p1301HBs
图 1 p1301HBs 酶切鉴定 (Pst I)
 Fig 1 Restriction endonuclease analysis of p1301HBs(Pst I)



图 2 转化植株
 Fig 2 Transgenic plant



图 3 移栽成活的转化株
 Fig 3 Transplanted transformant

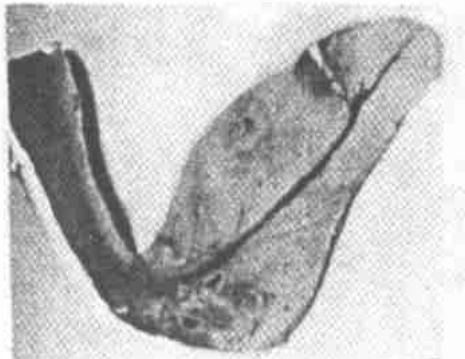


图 4 转化体叶片 GUS 检测
 Fig 4 Gus analysis of transformed leaf

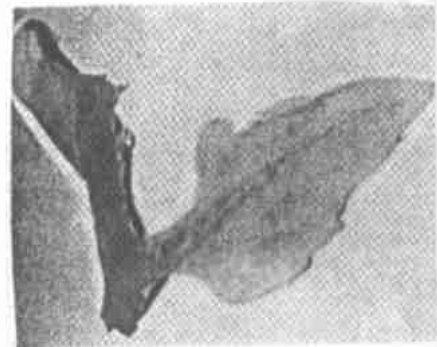
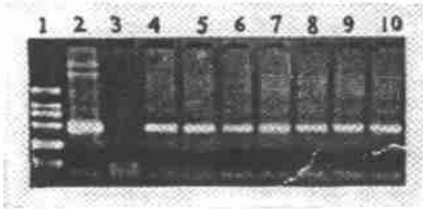


图 5 非转化体叶片 GUS 检测
 Fig 5 Gus analysis of untransformed leaf

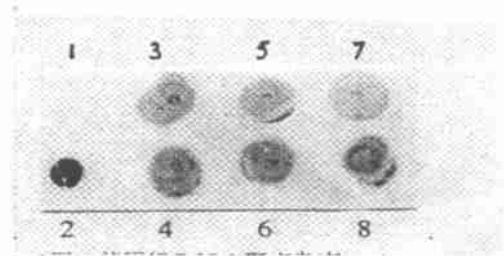
以DIG-DATP 标记的HBsAg DNA 作为探针,对转化植株的总DNA 进行杂交,同样设阴、阳性对照。随机取出的 6 株抗性苗的转化植株均有杂交斑点,非转化株未见杂交斑点(图 7),进一步证实目的基因已经整合到番茄基因组中。



1. Marker: DL-2000, 2 p1301HBs, 3 非转化株DNA; 4- 10 转化株DNA.

图 6 基因组总DNA PCR

Fig. 6 PCR products of genomic DNA



1. 未转化株系总DNA; 2 p1301HBs; 3- 8 转化株系总DNA.

图 7 基因组DNA 斑点杂交

Fig. 7 Dot blotting of totalDNA of tomato

2.4 转化株中目的基因表达活性的检测

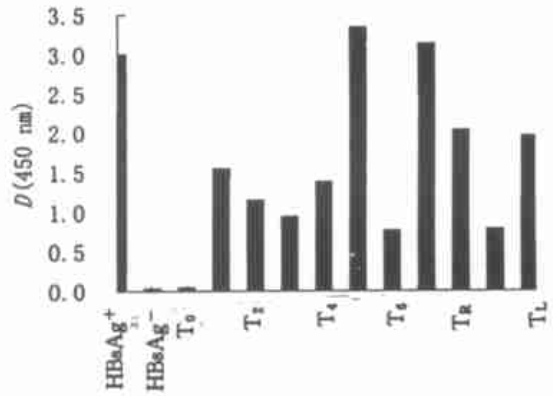
2.4.1 转化株系HBsAg 表达的ELISA 的检测 以GUS 检测为阳性的 7 株番茄的蛋白粗提液($0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$),与HBsAg 的抗体反应,在酶联免疫检测仪上测 $D(450 \text{ nm})$ 值。另外随机取 3 株转化株,与其混合后分别测其根、茎、叶的总蛋白,进行ELISA 分析,结果见图 8。从图 8 可见:被检测的 7 株GUS 阳性苗中,HBsAg 均有明显表达;各株系间HBsAg 的表达量存在较大差异,这与GUS 基因的表现是一致的。说明外源基因随机插入使外源基因表达量出现差异,故应选择高表达量的株系进行扩繁。

2.4.2 表达量的测定 将各株系蛋白粗提液稀释成 2N 倍($N = 1, 2, 3, 4, 5, 6$),HBsAg 抗原的标准蛋白质量浓度为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。当样品的 $D(450 \text{ nm})$ 值和标准样相同或接近时,粗提液中蛋白含量为 $2N \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。再根据取样量、样品的可溶性蛋白含量,计算出HBsAg 的相对含量(表 1)。

根据ELISA 检测结果:1 g 新鲜植物组织中HBsAg 的平均含量约为 78.75 ng ;不同转化株系含量不同,变化幅度为 $40\text{--}160 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。不同组织器官HBsAg 含量也不同,根中较高,叶中次之,茎中最少。

3 讨论

番茄作为口服疫苗的突出优点是可以鲜食,无需受热加工,但番茄本身积累蛋白质的能力较差,外源蛋白的表达量更低。本实验中,转基因植株目的蛋白平均表达量仅为 $78.75 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,检测到的最大表达量也仅为 $160 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。但人们可以通过改进表达策略,如采用强启动子、增强子及调控序列来提高表达量。Mason et al^[11]研究表明:HBsAg 基因不经修饰而直接插入植物表达载体(PB II21)时,转基因烟草中每克总可溶蛋白含有 6 ng HBsAg;将表达载体的CaMV 35S 启动子与烟草刻蚀病毒 5' 末端重复序列(TEV leader)相连,作为HBsAg 基因的启动子,HBsAg 的表达量在转基因烟草中增加到 66 ng ,其含量提高了 11 倍。



HBsAg⁺: 乙肝表面抗原阳性血清; HBsAg⁻: 乙肝表面抗原阴性血清; T₀: 非转化体株系; T₁- T₇: 转化体株系; T_R: 3 株转化株的根; T_S: 3 株转化株的茎; T_L: 3 株转化株的叶。

图 8 转化株系 HBsAg 表达的 ELISA 检测结果

Fig. 8 Results of ELISA of transformants

已有的研究表明, 转基因植物口服疫苗是可行且安全的 它使用方便, 费用低廉, 有许多其它疫苗不可替代的优点 尽管这项技术在短期内还难以产生巨大的商业价值, 但目前人们在植物基因工程领域所取得的进展表明, 采用转基因植物生产基因工程疫苗必将为各种廉价疫苗的生产和运输开拓更广阔的前景

表 1 HBsAg 在转基因番茄中表达量估算¹⁾

Table 1 Amount of HBsAg expressed in transformants

	D (450 nm)	ρ (HBsAg) ng · mL ⁻¹	ρ (可溶性蛋白) mg · mL ⁻¹	活性 HBsAg 占可 溶性蛋白含量/%	w (HBsAg) ng · g ⁻¹
T ₁	1.535	6	0.570	1.05×10^{-3}	60
T ₄	1.370	4- 6	0.456	1.10×10^{-3}	40- 60
T ₅	3.329	16	0.622	2.57×10^{-3}	160
T ₆	0.756	4	0.232	1.72×10^{-3}	40
T ₇	3.117	12	0.545	2.20×10^{-3}	120
根	2.019	8- 10	0.418	2.15×10^{-3}	80- 100
茎	0.772	4	0.248	1.61×10^{-3}	40
叶	1.945	6- 8	0.484	1.45×10^{-3}	60- 80
T ₀	0.037	-	-	-	-
HBsAg ⁺	2.988	+	-	-	-
HBsAg ⁻	0.024	-	-	-	-
HBsAg ^u	0.138	1	-	-	-

¹⁾T₁, T₄, T₅, T₆, T₇: 转化植株; T₀: 非转化株; HBsAg⁺: 阳性对照血清; HBsAg⁻: 阴性血清;
HBsAg^u: 标准阳性血清(1 ng · mL⁻¹).

参考文献:

- [1] MASON H S, LAM D M K, ARNTZEN C J. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. **Proc Natl Acad Sci**, 1992, 89: 11745- 11749
- [2] THANAVALA Y, YANG Y F, LYONS P, et al Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen [J]. **Proc Natl Acad Sci**, 1995, 92: 3358- 3361
- [3] RICHTER L J, THANAVALA Y, ARNTZEN C J, et al Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization[J]. **Nat Biotechnol**, 2001, 18: 1167- 1171
- [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
- [5] 高蓝, 傅建熙, 王建华 转基因番茄研究进展[J]. **西北农业大学学报**, 2000, 28(3): 90- 95
- [6] MCGARVEY P B, HANNOND J, DIENELT M M, et al Expression of hepatitis virus glycoprotein in transgenic tomatoes[J]. **Biotechnology**, 1995, 13: 1484- 1487
- [7] 赵春晖, 王荣, 赵长生, 等 含与不含前导序列的乙肝病毒表面抗原在转基因番茄中表达的研究[J]. **农业生物技术学报**, 2000, 8(2): 190- 193
- [8] HORSCH R B, FRY J E, HOFFMANN N L, et al A simple and general method for transferring genes into plants[J]. **Science**, 1985, 217: 1229- 1231
- [9] 王关林, 方宏筠 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998 600- 602, 633

(责任编辑: 叶济蓉)