

# 马铃薯遗传转化系统的优化及 禽流感病毒(H5N1)基因的导入

杜海莲<sup>1,2</sup>, 张 军<sup>1</sup>, 肖 平<sup>1</sup>, 韩冬丽<sup>1</sup>, 陈红岩<sup>1</sup>  
高 毅<sup>1</sup>, 曾 定<sup>1</sup>, 陈启锋<sup>1</sup>, 夏宁邵<sup>1</sup>

(1. 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室, 福建 厦门 361005;

2. 福建农业大学遗传所, 福建 福州 351005)

**摘要:** 通过对以马铃薯(*Solanum tuberosum* L.) 块茎为受体的农杆菌转化系统进行优化, 筛选出使三个品种(鲁引 1 号、克新 3 号、优金)的受体均可得到高频分化的培养基: MS+ 2.0 mg/L BA+ 3.0 mg/L ZT+ 0.5 mg/L NAA+ 0.5 mg/L GA. 对几种农杆菌转化条件的比较研究发现, 菌体用 MS+ 0.5 mg/L GA 液体重悬并稀释 4 倍, 与受体于 28 ℃, 100 r/min 振荡浸染 20~30 min, 共培养时在分化培养基上加 30 μmol/L AS(乙酰丁香酮), 16 h 弱光照共培养 3 d, 可使马铃薯品种鲁引 1 号的转化效率较常规方法提高 5~7 倍. 将禽流感病毒(H5N1)基因与 35S 启动子及 nos 终止子构建表达载体 p130IH5N1, 直接法转入农杆菌 EHA 105, 用此菌株转化马铃薯得到再生植株. 基因组总 DNA 经 PCR 和 Southern 杂交证明目的基因已整合到马铃薯基因组中.

**关键词** 遗传转化; 禽流感病毒(H5N1)基因; 马铃薯

**中图分类号** Q 785

**文献标识码:** A

随着植物生物技术的发展, 利用转基因植物生产动物蛋白疫苗, 已成为一个重要的研究和开发领域. 植物反应器与微生物和动物反应器相比, 最大的优点是可以大规模、廉价、安全地生产动物蛋白疫苗<sup>[1,2]</sup>. 特别是用于免疫和治疗性疫苗的生产, 已随着研究的深入越来越显示出其独特的优势<sup>[3,4]</sup>. 其中马铃薯这一世界性的粮食和蔬菜作物, 被众多研究者认为是较理想的植物材料之一<sup>[2,4]</sup>. 美国康奈尔大学 Arntzen 等(1998)将一种最易引起腹泻的大肠杆菌(*Escherichiacoli*)毒素基因的一段插入到马铃薯基因组, 用转基因马铃薯块茎粗提物给 11 人食用 3 周后, 其中 10 人体内产生了大肠杆菌毒素的抗体<sup>[3]</sup>. 但目前马铃薯遗传转化系统还不完善, 特别是用于转基因疫苗的研究和生产, 普遍存在转化效率偏低、基因型依赖性较大、周期较长等问题<sup>[2-7]</sup>. 我国在马铃薯遗传转化方面的研究起步较晚, 且多数集中在抗病毒病和品质改良方

收稿日期: 1999-11-24

基金项目: 厦门凯立生物制品有限公司植物转基因课题资助项目

作者简介: 杜海莲(1969-)女, 博士

面。作者在前人研究的基础上,对马铃薯遗传转化系统进行进一步的优化,并将禽流感病毒(H5N1)基因导入马铃薯。该病毒基因是1997年5月香港爆发人禽共患流感时,从一位病亡儿童的气管组织中分离得到。这一源于禽的流感病毒株未经中间宿主直接传染给人类,引起流行病学家们的恐慌,担心该病毒会导致世界性流感的爆发<sup>[8]</sup>。本研究旨在为最终实现用马铃薯生产大量、廉价的动物蛋白疫苗提供一些基础的实验和理论指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)鲁引1号、克新3号、优金,三个品种的幼嫩块茎(直径约3~5 cm)由厦门市农科所提供,4℃黑暗保存备用。

### 1.2 菌株和质粒

大肠杆菌(*E. Coli*) DH5 $\alpha$ ;根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105(去Kan<sup>r</sup>标记)。质粒:pGEM-T-H5(含禽流感病毒H5N1基因),由香港大学微生物系吴文翰教授惠赠,抗性标记为Amp<sup>r</sup>;pBPF $\Omega$ 7(含CaMV35S启动子及nos终止子),抗性标记为Amp<sup>r</sup>;pCAMBI-A1301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(HYG)基因、报告基因 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因及质粒抗性标记Kan<sup>r</sup>。

### 1.3 植物双元表达载体的构建

用限制性内切酶Xho I/Xba I双酶切载体pGEM-T-H5,回收H5N1目的片断(1 kb),同样酶切载体pBPF $\Omega$ 7,回收载体片断,T4 DNA连接酶连接,得到中间载体pBH5。Pst I单酶切pBH5和pCAMBIA1301分别回收片断和载体,T4 DNA连接酶连接,得到植物表达载体p1301H5N1。

### 1.4 双元质粒载体转化农杆菌

农杆菌感受态细胞的制备:-70℃以下保存的菌种4℃放置2~4 h后,取150  $\mu$ L加10~20 mL YEB培养基,28℃培养至OD<sub>600</sub>值为0.7~0.8,用4 mL的Eppendorf(Ep.)管分装,4000 r/min离心10 min,每管加1 mL TE重悬,4000 r/min离心10 min,弃上清液并将残留的TE吸尽,400  $\mu$ L YEB重悬,分装于1.5 mL Ep.管中,每管200  $\mu$ L供一次转化用,置液氮中或-70℃冰柜保存。

直接法转化农杆菌:将感受态农杆菌置冰浴中,每500  $\mu$ L加0.5~1.0  $\mu$ g质粒,依次冰浴5 min、置液氮中5 min、37℃下热激5 min后加1 mL YEB培养基,28℃振荡培养2~4 h,取200  $\mu$ L接种到含有250 mg/L Kan的YEB固体培养基,28℃培养2 d,挑单克隆用于转化。

### 1.5 马铃薯块茎诱导分化及诱导结薯

块茎表面消毒后削去表皮,切成2~3 mm厚、直径为0.9 cm的薄片接种到四种固体培养基,分别为M1:MS+1.0 mg/L BA+2.0 mg/L ZT+0.5 mg/L IAA+0.5 mg/L GA;M2:MS+2.0 mg/L BA+2.0 mg/L ZT+0.5 mg/L IAA+0.5 mg/L GA;M3:MS+3.0 mg/L BA+2.0 mg/L ZT+0.5 mg/L IAA+0.5 mg/L GA;M4:MS+2.0 mg/L BA+3.0 mg/L ZT+0.5 mg/L NAA+0.5 mg/L GA。在25~28℃、16 h光照下培养,15~20 d后长出绿色胚性愈伤组织,继续培养10~20 d分化出小丛芽,切取小丛芽在MS培养基上生根培养,试管苗长到2~3叶时剪下接种到M5(MS+0.5 mg/L BA)液体培养基,壮苗培养一周,转入M6(MS+

2. 0 mg/L BA + 3. 0 mg/L ZT + 10% 蔗糖) 液体培养基, 16 h 暗培养诱导结薯。

## 1.6 基础抗性的测定、农杆菌转化及转化体选择

配制含有潮霉素(Hygromycin, Hyg) 浓度分别为 0、10、20、30、40 mg/L 的块茎分化培养基 M4, 接种后每 5 天观察记录生长状况, 直到对照组分化出丛生芽为止。将含有表达载体的农杆菌接种到含有 250 mg/L Kan 的 YEB 培养基, 28 ℃ 培养至  $OD_{600}$  值为 0.8 ~ 1.0, 4 000 r/min 离心 10 min, 用 MS + 0.5 mg/L GA 液体培养基重悬菌体并稀释至原体积的 4 倍。将表面消毒后的马铃薯块茎切片置入上述菌液中 28 ℃、100 r/min 振荡 20 ~ 30 min 后, 用无菌滤纸吸干表面菌液, 转入共培养培养基 MS + 2.0 mg/L BA + 3.0 mg/L ZT + 0.5 mg/L NAA + 0.5 mg/L GA + 30  $\mu$ mol/L AS(乙酰丁香酮), 16 h 弱光照共培养 3 d, 转接到附加 20 mg/L Hyg + 300 mg/L Cef(Cefotaxime sodium) 的同样培养基上, 选择培养至对照启动分化变绿时(一般为 7 ~ 13 d), 在无 Hyg 抗性的培养基上培养至长出胚性愈伤组织, 之后转接到附加 30 mg/L Hyg 的相同培养基, 培养至长出转化体植株(中间转接 2 次)。该筛选方法称为间断抗性筛选法。另取 50 块受体材料共培养之后, 在 Hyg 基础抗性浓度压力下连续筛选。

## 1.7 转化体的鉴定

报告基因 GUS 的检测: 随机取转化体叶片用 X-g luc 染液 37 ℃ 温浴 12 h 后观察。PCR 检测: 取 100 mg 左右的转化体及非转化体叶片, 用 ROSE 快速一步法抽提植物总 DNA 进行 PCR 扩增<sup>[8]</sup>, 扩增条件: 94 ℃ 预变性 10 min 后加 Taq 酶开始循环(94 ℃ 45 s、57 ℃ 50 s、72 ℃ 45 s、40 个循环), 72 ℃ 7 min 补平。Southern 点杂交: 用 10 $\times$  DIG-dNTPmix 代替 dNTP, PCR 扩增制备 H5N1-DIG 探针, 纯化植物总 DNA 尽量去除蛋白质和 RNA, 在 0.2 mol/L NaOH 溶液中 94 ℃ 变性 5 min, 取 3  $\mu$ L 点于尼龙膜, 用 p1301H5N1 作为阳性对照, 非转化体总 DNA 为阴性对照。预杂交 4 h、杂交 12 h、洗膜后 AP-DIG 反应 4 h, 显色 5 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 马铃薯受体系统的优化

块茎诱导分化: 马铃薯幼嫩块茎切片在四种不同培养基上再生频率和速度之比较结果见表 1。

表 1 马铃薯块茎在不同培养基上的分化结果(鲁引 1 号)

Tab. 1 Regeneration results of potato discs on different medias(Luying No. 1)

培养基	接种数/块	平均发芽数/个·块 <sup>(-1)</sup>	分化频率/%	发芽起始时间/d
M1	50	4.5	45	40
M2	50	5.0	50	35
M3	50	4.3	65	30
M4	50	9.5	89	26

由表 1 可见, M4 培养基为最佳培养基, 接种两周后即可看到块茎切片表面长出许多绿色胚性愈伤组织, 20 d 左右便有丛生芽分化, 最多可达 13 个。且 3 个品种在该培养基上均可有较高的分化频率(见表 2)。

表2 3个不同品种的马铃薯块茎在M4培养基上的分化结果

Tab.2 Regeneration results of potato discs of three cultivars on media M4

品种名称	接种数/块	平均发芽数/个·块 <sup>-1</sup>	分化频率/%	发芽起始时间/d
鲁引1号	30	10.5	89	24
克新3号	30	9.0	79	27
优金	30	10.2	92	23

再生芽的扩增、壮苗、诱导结薯培养: 剪取丛生芽在MS固体培养基培养一周后, 将带有2~3片叶子的小苗转入M5培养基进行壮苗培养, 待长出腋芽后转入M6培养基诱导结薯, 约30天左右即可结出直径为2~3cm的试管薯(图1), 其中以鲁引1号结薯最多, 一般为7~10个, 最多可达15个。

## 2.2 马铃薯农杆菌转化条件的优化

在农杆菌转化中菌株类型、菌体浓度和状态、共培养条件、激素含量和种类等均对转化效率有很大的影响。本研究在文献报道常规方法的基础上, 设置几种不同的条件, 以常规方法为对照, 以农杆菌EHA105(p1301H5N1)转化马铃薯块茎切片, 比较其 $\beta$ -葡糖苷酸酶(GUS)的瞬时表达活性(见表3)。



图1 再生试管薯

Fig. 1 Regenerated tubers of potato

表3 不同转化条件下马铃薯块茎的GUS瞬时表达活性

Tab.3 GUS transient expression activity of potato tuber discs at different transformation conditions

稀释液	转化条件		共培养	GUS 瞬时表达活性*
	稀释倍数	浸菌条件		
MS	10	室温 10 min	暗培养	8.5
MS	10	28 100 r/min	暗培养	18.8
		振荡 25 min		
MS	4	同上	同上	25.1
MS	4	同上	弱光照 16 h	34.8
MS+ 0.5 GA	4	同上	同上+ AS 30 $\mu$ mol/L	56.0
MS+ 0.5 GA	4	0.06 MPa 压力下 10 min	同上	60.1

\* GUS 瞬时表达活性: 随机取5块转化体经X-glc 缓冲液 37 温浴 12 h 后, 在解剖镜下计数蓝斑并取其平均数。

从表3可见, 弱光照、减压、GA和AS的配合使用可大大提高马铃薯转化的瞬时表达活性, 因农杆菌介导的遗传转化是一个微生物与植物互作的过程, 对转化条件进行优化时二者要同时考虑方能得到理想的转化结果, 还要考虑到后期筛选的顺利进行。后期筛选时发现, 虽然

减压处理有利于瞬时表达,但由于菌体部分侵入组织内部,对后期的抑菌造成困难,虽然可以在用 500 mg/L Cef 液洗菌时,通过二次减压达到抑菌目的,但二次减压对植物的损伤导致再生频率下降。用 MS+ 0.5 mg/L GA 稀释菌体 4 倍,受体 28, 100 r/min 振荡 25 min 浸菌,共培养培养基加 30  $\mu$ mol/L AS, 弱光照共培养 3 d 可得到高且稳定的转化效果。

### 2.3 基础抗性测定和转化体的抗性筛选



图 2 马铃薯转化植株

Fig. 2 Plants of transformed potato

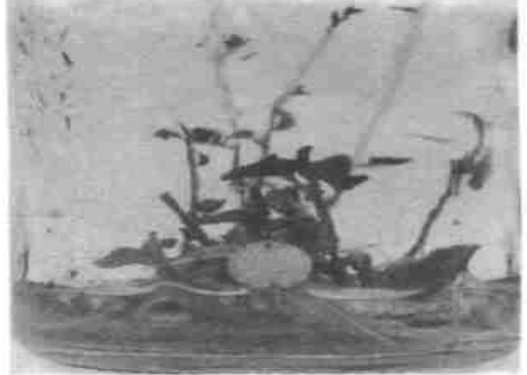


图 3 马铃薯转化植株试管薯

Fig. 3 Tubers of transformed potato

因同一植物的不同品种甚至同一品种的不同器官,对抗生素的耐受性差异较大,因此每个实验均要认真测定其相应抗生素的基础抗性。本实验测得鲁引 1 号马铃薯品种对潮霉素(Hyg)的基础抗性是 25 mg/L,在该抗生素浓度下受体分化受到抑制,2 周后褐化。对连续抗性筛选和间断抗性筛选方法的比较发现,用两种方法分别对各 50 块受体材料进行筛选,间断抗性筛选得到 Hyg 抗性植株 20 株,而连续抗性筛选只得到 Hyg 抗性植株 8 株。可见与连续抗性筛选相比,间断抗性筛选可使 Hyg 阳性率提高 1.5 倍左右,且分化时间缩短了 7~15 d。Hyg 抗性株及诱导试管薯见图 2, 3。

### 2.4 外源基因的整合与表达

马铃薯转化体叶片报告基因检测结果:为证明外源基因已在马铃薯中整合表达,对得到的 28 株 Hyg 抗性株叶片进行 GUS 活性检测,其中 24 株显蓝色阳性,乙醇脱色后仍保持蓝色(见图 4)。非转化株叶片乙醇脱色后几乎呈无色(见图 5)。说明外源基因 GUS 已在马铃薯中得到表达。基中有 4 株为 Hyg 假阳性。

转化体基因组 DNA 的 PCR 检测结果:为证明目的基因已整合到马铃薯基因组中,以 GUS 阳性株的总 DNA 为模板,用 H5N1 cDNA 5 端和 3 端两个引物进行 PCR 扩增,PCR 产物的电泳结果见图 6,扩增出的片断与目的基因大小(1kb)一致。说明 H5N1 确已整合到马铃薯基因组中。而未转化的植株未出现任何泳带。

转化体基因组 DNA 的 Southern 点杂交结果:为进一步确证目的基因的整合效果,以 DIG-dATP 标记 H5N1 作为探针,对转化株的总 DNA 进行点杂交。结果有 5 株为阳性,1 株呈弱阳性(见图 7)。进一步证实了目的基因已经整合到马铃薯基因组中。

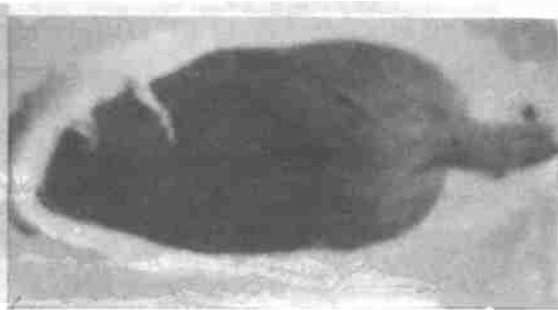
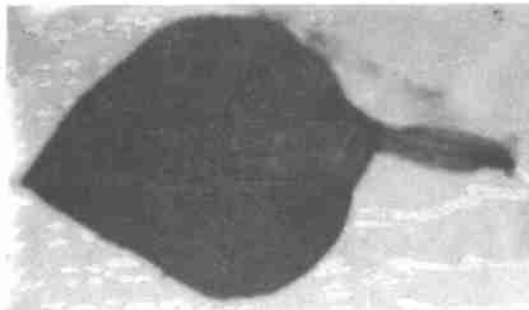


图 4 转化体叶片 GUS 检测

Fig. 4 GUS analysis of transformed potato leaf

图 5 非转化体叶片 GUS 检测

Fig. 5 GUS analysis of untransformed leaf

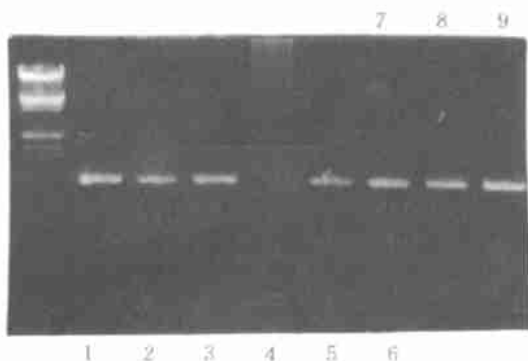


图 6 马铃薯基因组 DNA 的 PCR 结果

1. ADNA (Hind / EcoR), 2. pl30IH5N1,  
3、4、6~9. 转化株 DNA 的 PCR 产物, 5. 非  
转化株 DNA 的 PCR 产物

Fig. 6 PCR results of genomic DNA of potato

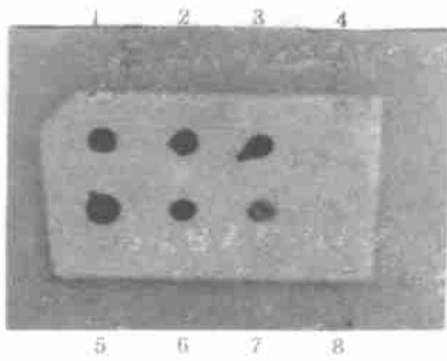


图 7 马铃薯基因组 DNA 的 Southern 斑点杂交结果

1: pl30IH5N1; 2、3、5~8: 转化株叶片总  
DNA; 4, 非转化株叶片总 DNA

Fig. 7 Southern blotting of total DNA of potato

### 3 讨论

1989 年, Hiatt 等在世界上首次报道植物能表达全长抗体<sup>[1]</sup>, 1996 年 Wilde 等在拟南芥中表达了全长的可分泌性抗体<sup>[10]</sup>, Arntzen 等则利用转基因马铃薯首次得到了人类可食疫苗的免疫反应结果<sup>[2,3,11]</sup>, 说明以马铃薯为材料进行动物蛋白疫苗的研究和生产的可行性. 有关用于防治养禽业的第一大病害——禽流感病的病毒基因在植物中的表达还未见任何报道. 相对于其它粮食和蔬菜作物而言, 马铃薯遗传转化系统是比较成熟的, 但距方便应用还有一定差距. 在转化系统中, 受体的快速分化再生是高效转化较关键的一步, 本实验利用马铃薯幼嫩块茎为受体, 分别对受体分化条件和农杆菌介导的转化条件进行优化, 得到较为理想的转化频率, 并将禽流感病毒(H5N1)基因首次成功地导入马铃薯基因组. 有关禽流感病毒(H5N1)基因在马铃薯中的表达水平、正确加工和定位、表达活性及动物免疫活性等的研究结果见另文. 在转化体的筛选过程中作者用间断抗性筛选得到较好的结果, 与连续抗性筛选相比, 该方法可

缩短筛选周期, 提高转化频率. 间断抗性筛选的优点在于既防止了连续抗性筛选造成的转化体营养断层, 又可避免后期抗性筛选产生假阳性严重的现象. 因为前期短时间加筛选剂, 可在一定程度上抑制非转化体生长, 并能保证转化体不被大量的死细胞所包围, 使二者处于相同的生长竞争状态, 此时撤去筛选剂给转化体以复苏的机会. 当胚性愈伤组织开始分化时, 加高于基础抗性浓度的筛选剂后, 非转化体愈伤组织很快白化、褐化、死亡, 转化体则正常分化出丛生芽. 间断抗性筛选的关键在于把握前期筛选的持续时间和浓度, 以及无抗性培养时间的长短. 对马铃薯块茎而言, 作者的 experience 是前期抗性筛选以对照受体变绿启动脱分化为止, 后期抗性筛选要从胚性愈伤组织分化开始. 该方法是否对其它类型的受体材料有效有待于进一步实验.

## 参考文献:

- [ 1 ] Hiatt A, Cafferkey R, Bowdish B. Production of antibodies in transgenic plants[J]. Nature, 1989, 342: 76 - 78.
- [ 2 ] Mason H S, Ball J M, Shi j-j. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice[J]. Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, 93: 5 335- 5 340.
- [ 3 ] Arntzen C J. Immunity for Breakfast [J]. Science , 1998, 280(8): 831.
- [ 4 ] Tacket C O, Mason H C, Lososky G, et al. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato[J]. Nature Medicine, 1998, ( 14) 5: 607.
- [ 5 ] Dale P J, Hampson K K. An assessment of morphogenic and transformation efficiency in a range of varieties of potato (*Solanum tuberosum L.*) [J]. Euphytica, 1995, 85: 101- 108.
- [ 6 ] 于静娟, 敖光明. 水稻 10KD 富硫醇溶蛋白基因在马铃薯中的表达[J]. 植物学报, 1997, 39(4): 329- 334.
- [ 7 ] 赵倩, 敖光明, 刘淑兰, 等. 牛生长激素基因在马铃薯中的表达[J]. 植物学报, 1995, 37(11): 840- 847.
- [ 8 ] David L Suarez. Comparisons of highly virulent H5N1 influenza A viruses isolated from humans and chickens from Hong Kong [J]. Journal of virology, 1998, 72(8): 6 678- 6 688.
- [ 9 ] Steiner J J, Poklemba C J, Fjellstrom R G. A rapid one-tuber genomic DNA extraction process for PCR and PAPD analyses [J]. Nucleic Acids Research, 1995, 23( 13): 2 569- 2 570.
- [ 10 ] Wilde D E, Neven M, Wilde C, et al. Intact antigen binding MAK33 antibody and fab. fragment accumulate in intercellular space of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Sci. 1996, 114( 2): 133- 141.
- [ 11 ] Haq T A, Mason H S, Clements J D, et al. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants [J]. Science 1995, 268( 5211): 714- 716.

# Optimizing for Genetic Transformation System of Potato (*Solanum tuberosum* L.) and Introducing of Avian Influenza Virus(H5N1) Gene into It

DU Hai-lian<sup>1,2</sup>, ZHANG Jun<sup>1</sup>, XIAO Ping<sup>1</sup>, HANG Dong-li<sup>1</sup>, CHEN Hong-yan<sup>1</sup>  
GAO Yi<sup>1</sup>, ZHEN Ding<sup>1</sup>, CHEN Qi-feng<sup>2</sup>, XIA Ning-shao<sup>1</sup>

(1. ministry of education Key Lab. of Tumor Cell Engineering

of Xiamen Univ., Xiamen 361005, China;

2. Genetic institution of Fujian Agriculture Univ., FuZhou 350002, China)

**Abstract:** To optimize the genetic transformation conditions of potato(*Solanum tuberosum* L.), several conditions of *Agrobacterium* mediated gene transfer were determined. The medium(MS + 2.0 mg/L BA+ 3.0 mg/L ZT+ 0.5mg/L NAA+ 0.5mg/L GA) is high efficient for discs regenerating of three cultivars(Luying No. 1, Kexing No. 3 and Youjing). *Agrobacterium* resuspended and diluted by solution MS+ 0.5 mg/L GA, invaded potato discs swirling at 100 r/min 28 for 20~30 minutes. Following cocultivation, the explants were transferred to the medium as same as the above medium but with the addition of 30  $\mu$ mol/L AS and under 16 hr weak light for 3 days. Compared with routine method, the transformation efficiency increased by 5~7 times. The expression vector p1301H5N1, which contained CaMV35S promoter and gene H5N1 and Tnos, was directly transferred into *Agrobacterium* strain EHA105. After incubating the discs of tuber, 28 individuals of regenerated resistant plants were obtained. The results of PCR and Southern blotting of potato genomic DNA demonstrated that the target gene was integrated into the genome of potato.

**Key words:** Genetic transformation; H5N1; Potato(*Solanum tuberosum* L.)