

文章编号:1008-7826(2010)01-0096-05

## LBM2eHBc+融合基因植物表达载体构建及对番茄的转化研究

张国广<sup>1,2</sup>, 张辉煌<sup>1</sup>, 董美<sup>1</sup>, 陈亮<sup>1</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院, 细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;  
2. 漳州师范学院 生物科学与技术系, 福建 漳州 363000)

**摘要:** 禽流感病毒一直是家禽和家畜健康养殖的巨大威胁, 甚至威胁着人类的健康, 人们也一直在研究各种形式的疫苗来应对禽流感病毒的威胁。番茄作为生物反应器应用于动物疫苗生产具有独特的优点, 本研究优化了番茄子叶的再生体系, 同时构建了LBM2eHBc+融合基因的植物表达载体并对番茄进行了遗传转化。结果表明在玉米素(Zt)浓度为0.5 mg/L时番茄子叶外植体的芽再生率达到93.33%; 测序结果证明植物表达载体pBI121-LBM2eHBc+构建成功; 利用农杆菌介导的转化方法获得再生抗性苗34株, 经PCR检测, 阳性率为75.0%, 本研究结果为进一步开发禽流感口服疫苗奠定了基础。

**关键词:** 禽流感病毒; LTB; M2eHBc+; 转基因番茄

**中图分类号:** Q943.2 **文献标识码:** A

## Studies on Construction of Plant Expression Vector of Recombinant LBM2eHBc+ Gene and Tomato Transformation

ZHANG Guo-guang<sup>1,2</sup>, ZHANG Hui-huang<sup>1</sup>, DONG Mei<sup>1</sup>, CHEN Liang<sup>1</sup>

(1. The key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 2. Department of Biology Science and Technology, Zhangzhou Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China;)

**Abstract:** Avian influenza virus (AIV) infect almost all wild bird and domestic poultries and then decimate poultries, even the threat of AIV overhangs human. It also has been researching a variety of vaccines to combat the AIV threat. Tomato as a bioreactor used in animal vaccine production has a unique advantage. This study optimized the regeneration system of tomato cotyledon, while construct LBM2eHBc + gene plant expression vector, and then carried out the genetic transformation of tomato. The results show that the bud regeneration rates of tomato reach the highest 93.33% when MS medium supplemented 0.5 mg/L Zt+ 1 mg/L IAA; sequence results show that plant expression vector pBI121-LBM2eHBc + constructed successfully. A total of 34 putative transgenic tomato plants were obtained by using of *Agrobacterium*-mediated transformation method, and the positive rate was 75.0% by PCR detection. The results laid a foundation for the further development of oral AIV vaccines.

**Key words:** Avian influenza virus; LTB; M2eHBc+; Transgenic tomato

### 1 引言

禽流感(Avian Influenza, AI)是由正粘病毒科A型流感病毒引起的一种以侵害呼吸系统为主的高度接触性传染病, 广泛分布于世界各地, 每次爆发都给疫区养禽业带来毁灭性打击, 而且1997年还发现一些高致病性的亚型可以传染人<sup>[1]</sup>。目前接种疫苗是控制AIV流行的主要措施之一, 异源表达的高度保守的M2蛋白能为动物提供很好的免疫保护<sup>[2, 3]</sup>。M2蛋白N端24个氨基酸残基构成囊膜外区域(M2e), M2e

收稿日期: 2009-11-15

基金项目: 福建省科技厅重大项目子课题(2006NZ0003-2); 福建省教育厅A类科技项目(JA09168)

作者简介: 张国广(1973-), 男, 河南遂平人, 讲师。通讯作者: 陈亮, 教授, 博导, E-mail: chenlg@xmu.edu.cn

是 M2 蛋白的中和抗体诱导表位, 基于 M2e 的单克隆抗体能有效抑制流感病毒在体外培养细胞和小鼠体内的复制<sup>[4, 5]</sup>, 但是 M2e 只有短短的 24 个氨基酸, 不能有效刺激机体产生免疫应答, 需要偶联一些大分子才能使免疫动物产生有效的免疫应答<sup>[6, 7]</sup>. 研究表明 M2e 与 Hepatitis B core antigen(HBcAg)大分子载体的融合能产生很好的动物免疫保护效果<sup>[6-8]</sup>. 粘膜是机体抵抗感染的主要屏障之一, 很多病原菌对机体的感染都是从粘膜系统开始, 如产肠毒素大肠杆菌, 禽流感病毒, 口蹄疫病毒等病原菌, 针对这些病原菌, 机体的粘膜免疫应答具有重要的意义. 产肠毒素大肠杆菌热不稳定蛋白 (Heat-labile enterotoxin, LT) 及其 B 亚单位 (LTB) 是已知的有效的粘膜免疫佐剂<sup>[9, 10]</sup>, 之前在原核系统中表达了 LTB 和 M2eHBc+ 的融合基因, 纯化蛋白 LBM2eHBc+ 能有效诱导动物的粘膜免疫应答<sup>[8]</sup>. 随着基因工程技术的发展, 植物细胞已成为基因重组生物制品的重要的反应器, 其具有成本廉价、保存运输方便、免疫原性好、安全等诸多优点<sup>[11]</sup>. 目前, 在植物中成功表达的疫苗包括: 乙肝表面抗原疫苗、霍乱弧菌疫苗<sup>[12]</sup>等. 番茄是药用蛋白植物反应器的理想选择之一, 其在遗传转化、基因工程等方面的研究都相对比较深入, 而且番茄可以生食, 做为口服疫苗生产载体, 能够克服因加热引起的外源药用蛋白变性问题. 鉴于其优点, 本研究构建了 LBM2eHBc+ 植物表达载体, 同时以“中蔬 5 号”番茄为转化对象, 通过农杆菌介导方法将重组基因 LBM2eHBc+ 转入番茄中, 获得了转基因番茄植株, 为进一步开发禽流感植物口服疫苗打下了基础.

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

中蔬 5 号番茄种子 (购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所); 玉米素 (Zt) 购自 sigma 公司; 大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 农杆菌 LBA4404, 载体 pBI121 等本实验室保存, 载体 pM-LBM2eHBc+ 本实验室构建<sup>[8]</sup>.

### 2.2 方法

#### 2.2.1 番茄再生系统的优化及卡那霉素筛选浓度的确定

在 MS 培养基附加 IAA 1 mg/L 基础上, 比较六种 (0, 0.2, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/L) 浓度的 Zt 对番茄子叶再生的影响. 在优化培养基的基础上附加不同浓度的卡那霉素, 确定合适的卡那霉素的筛选浓度.

#### 2.2.2 无菌苗培养和子叶外植体准备

中蔬 5 号番茄种子经次氯酸钠消毒 15 min (其中有效氯为 2%), 灭菌蒸馏水冲洗 3 次接种于 1/2 MS 培养基中 25°C 黑暗中发芽 4 d 后转入转入光照强度 1800 lx, 16 h 光/8 h 暗的光照培养室培养. 种子发芽后 7 d 左右, 将带有一小段叶柄的无菌苗子叶剪下接种于再生培养基中进行培养.

#### 2.2.3 LTB-M2eHBc+植物表达载体构建

根据构建的 pM-LBM2eHBc+ 载体中 LBM2eHBc+ 融合基因序列设计如下引物, 正向引物 P1: 5'-GCG-TCTAGAATGAATAAAGTAAAATG-3', 反向引物 P2: 5'-CTGGAGCTCATAGCTCATCTTTCTCAGAA-CATTGAGATTCCCAGATTG-3'. 为便于扩增片段连接入 pBI121 在引物中分别设计了 Xba I 和 Sac I 酶切位点, 同时为了提高外源基因在植物中的表达量, 在反向引物 P2 中设计有内质网滞留肽 (SEKDEL) 的编码序列. 以 pM-LBM2eHBc+ 为模板, 用引物 P1 与 P2 进行 PCR 扩增, 获得了 LBM2eHBc+ 片段, 克隆到 pBI121 的 Xba I 和 Sac I 位置之间, 构建植物表达载体 pBI121-LBM2eHBc+, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 筛选阳性克隆, 酶切鉴定, 测序确认后热激转化农杆菌 LBA4404.

#### 2.2.4 农杆菌介导的番茄转化、生根及移栽

将带有一小段叶柄的无菌苗子叶剪下接种于优化再生培养基中培养 2 d; 转化前一天, 取适量保存的菌液接种于含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中 28°C, 200 r/min 培养; 转化当天, 待农杆菌培养至 OD<sub>600</sub> ≈ 0.6 时, 取 15 mL 菌液离心收集农杆菌细胞, 然后用 15 mL 1/2 MS 液体培养基重悬; 经过预培养的叶片移入到上述重悬液中侵染 3-5 min, 然后灭菌滤纸吸干多余菌液, 将被侵染过的番茄子叶重新置回再生培

培养基上 28℃进行 3 d 共培养. 共培养后, 将外植体转入筛选培养基中, 每 2 w 转入新的筛选培养基中培养. 待再生芽长至 2 cm 左右时, 将芽切下, 放入生根培养基中生根; 待苗长出 4、5 条粗壮的根并有 4、5 cm 高时, 打开培养瓶盖, 温室中炼苗 4-5 d; 取出小苗, 清洗根部的琼脂, 移植到培养土(蛭石与土为 1:1)中, 温室(25℃、14 h/d 光照)中培养, 幼苗长大后移植到大盆中, 室外培养.

### 2.2.5 PCR 检测转基因植株

选取移栽出的卡那霉素抗性株, 以 CTAB 法小量提取的嫩叶的 DNA 为模板, 通过 PCR 方法鉴定外源基因在抗性株的整合情况, 重新合成能够扩增 LBM2eHBC+融合基因部分片段的特异引物 M2-F (5'-ATGAGTCTTCTAACCGAGG-3') 和 M2-R (5'-CTAACATTGAGAT TCCCGAG-3'), 引物对扩增片段长度为 675 bp 左右.

## 3 结果与分析

### 3.1 Zt 对番茄子叶再生的影响

在番茄子叶的再生过程中, 许多再生芽无生长点、生长点坏死或为叶状结构, 这些芽失去了分化成植株的能力, 为畸形芽. 在 Zt 浓度为 0.5 mg/L 时, 番茄子叶出芽率达到 93.33% (表 1), 而且正常芽率也达到最高的 36.37%. 而在高浓度的 Zt 作用下, 子叶褐化和坏死的比例提高, 可见 Zt 在诱导细胞的分裂和器官的分化中起重要作用, 但其浓度要求适当.

表 1 Zt 对番茄子叶外植体再生频率的影响

Zt 浓度(mg/L)	总出芽率(%)	正常芽率(%)
0	0	0
0.2	69.23	15.40
0.5	93.33	36.37
1.0	77.78	30.60
1.5	38.46	11.50
2.0	66.67	28.20

注: 总子叶数(50)用 Zt 诱导中蔬 5 号番茄分化, 30 天生长状况统计结果

### 3.2 Kan 筛选压的确定

选择压力要求是: 抗生素的浓度既能有效地抑制非转化细胞的生长, 使之慢慢死亡又不影响转化细胞的正常生长分化. 实验结果表明(表 2), 在 30 d 的培养过程中, 随着 Kan 浓度的提高, 外植体逐渐变黄, 愈伤分化率明显弱小. 在 10 mg/L 的选择压下, 叶片情况与对照组相比生长状况良好, 但分化率下降明显; 20 mg/L 的浓度下, 叶片单个外植体部分褐化死亡, 但仍能分化出再生芽; 当 Kan 浓度加到 50 mg/L 时, 70%叶片完全死亡, 并且无再生芽分化. 选择压为 70 mg/L 条件下, 叶片完全褐化死亡. 因此确定所选的中蔬 5 号子叶诱导分化 Kan 的选择压力为 50 mg/L.

表 2 不同选择压对番茄再生苗分化的影响

Kan 浓度(mg/L)	出芽率(%)	子叶生长情况
0	92.51	生长良好, 有大量再生芽出现
10	30.77	子叶较对照组短小, 出现部分再生芽
20	13.33	子叶短小, 部分再生芽出现
50	0	70%叶片褐化, 无再生芽
75	0	大部分子叶褐化死亡

注: 总子叶数(50)用 ZT 诱导中蔬 5 号番茄分化, 30 天生长状况统计结果

### 3.3 植物表达载体 pBI121-LBM2eHBc+的构建及转化农杆菌细胞

利用设计的引物对 P1 和 P2, 以 pM-LBM2eHBc+载体为模板, 通过 PCR 扩增出两端分别带有酶切位点 *Xba*I 和 *Sac*I 的融合基因 LBM2eHBc+片段(约 1 kb), 用 *Xba*I 和 *Sac*I 分别双酶切该片段和 pBI121 空载体, 回收相应酶切产物, 连接转化 DH5 $\alpha$  后, 先后通过 PCR 鉴定和酶切鉴定(图 1), 测序正确的命名为 pBI121-LBM2eHBc+. 提取 pBI121-LBM2eHBc+质粒转化农杆菌 LBA4404, 通过菌落 PCR 鉴定获得阳性转化子, 即获得含 LBM2eHBc+融合基因的农杆菌工程菌株。

### 3.4 转基因番茄植株再生及移栽

将苗龄 7 d 左右的番茄无菌苗子叶切下, 置入优化的再生培养基(MS 培养基附加 0.5 mg/L Zt+ 1.0 mg/L IAA) 预培养 2 d 后, 农杆菌浸染 5 min 后, 灭菌滤纸擦干, 然后再移入再生培养基中共培养 3 d, 转入选择培养基上进行培养. 经过 1-2 w 培养, 大多数子叶颜色变暗, 叶片萎蔫并逐渐变白; 有些子叶基部也能形成少量白色疏松的愈伤组织, 但最终会在继代培养中死去; 只有少数子叶的基部能逐渐长出少量致密的愈伤组织并慢慢转为绿色, 大约 3-4 w 后便能分化形成小芽点. 小芽点逐渐分化出幼叶, 形成小芽, 但也有小芽点仅能分化出 1-2 片叶, 无正常的生长点, 不能正常生长. 一个愈伤组织上一般只能形成一个小芽, 个别也可以分化出 3-4 个芽. 获得的抗性芽长高至 2 cm 左右时, 将芽切下转移至生根培养基(1/2 MS 培养基附加 1.0 mg/L IAA) 中, 90% 以上的芽可以在 10 d 左右形成明显的根, 少数则不能生根. 转化再生芽在生根培养基中长出 4、5 cm 时, 既可以炼苗移栽. 农杆菌 LBA4404-pBI121-LBM2eHBc+ 侵染番茄中蔬 5 号 30 d 后, 抗性芽分化率为 6.19%, 其中正常芽率为 3.81%. 按照上述转化方案操作共获得转基因抗性再生苗 34 株.

### 3.5 转基因植株 PCR 鉴定

取长势旺盛 8 株抗性再生苗、1 株对照组(转入 pBI121 空载体)再生苗及 1 株未转化植株的叶片, 提取其总 DNA, 以 M2-F/M2-R 作为引物进行 PCR 鉴定. 结果表明对照组及未转化的植株 DNA 为阴性, 转基因番茄 6 株扩增出 675 bp 左右的目的带, 阳性苗比率达到了 75.0%. 上述结果表明, LBM2eHBc+ 基因已整合入转化番茄基因组中.

## 4 讨论

外植体再生是植物器官或组织从分化状态脱分化再重新分化的过程, 植物激素在这一过程中起十分重要的作用, 尤其是细胞分裂素和生长素的比例是调节这

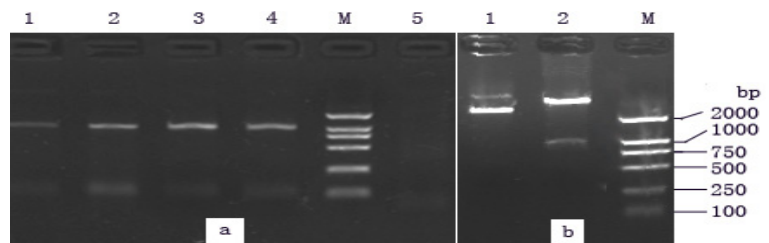


图 1 重组植物表达质粒 pBI121-LBM2eHBc+ PCR(a)和酶切鉴定(b) a 1-3: pBI121-LBM2eHBc+菌落 PCR 鉴定结果, 4: 阳性对照 5: 空白对照; b 1: 抽提的 PCR 阳性克隆的质粒, 2: *Xba*I 和 *Sac*I 双酶切结果, M: 均为 DL 2000 DNA marker



图 2 农杆菌 LBA4404-pBI121-LBM2eHBc+转化中蔬 5 号番茄 a、抗性芽再生; b、抗性芽伸长; c、抗性芽生根

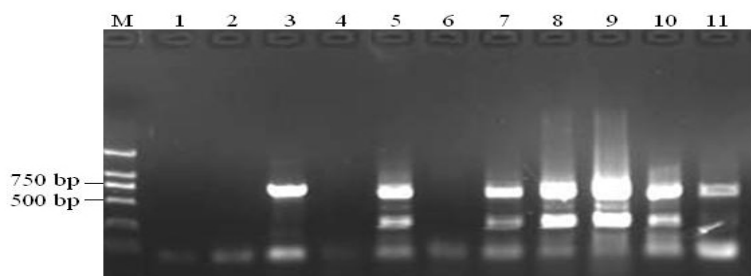


图 3 LBM2eHBc+转基因番茄 PCR 检测

1: 未转基因番茄; 2: 阴性对照(转空载体番茄); 3: 质粒阳性对照; 4-11: 转基因番茄; M: DNA marker DL 2000

一过程的重要因素。以往的研究表明番茄的子叶外植体可以在不同的激素组合下再生成芽。之前的研究也大多采用 Zt 或者 Zt 与 IAA 组合,但他们采用的 Zt 浓度大多高于 1 mg/L,如 Frary 等<sup>[13]</sup>采用 2 mg/L Zt, Tabaeizadeh 等<sup>[14]</sup>采用 2 mg/L Zt + 0.2 mg/L IAA, 吴昌银等<sup>[15]</sup>利用 1 mg/L Zt + 1 mg/L IAA, 我们在研究发现整个再生过程中高浓度 Zt 并不能有效促进再生不定芽的形成,反而导致大量畸形芽的出现,0.5 mg/L Zt + 1.0 mg/L IAA 获得了较为理想的结果。

基因工程为利用植物生产疫苗提供了多种策略。在这些策略中,生产植物口服疫苗(oral vaccine)或可食用疫苗(edible vaccine)是转基因植物疫苗的研究重点之一。用转基因植物生产疫苗是一个廉价的生产系统,不需昂贵的设备,在获得高效表达的转基因植株后,通过增加种植面积,就能获得大量的疫苗,前景诱人。食用植物疫苗使用方便,易于推广应用,特别是对第三世界国家来说更具有重要意义,近年来用模式植物番茄生产疫苗的研究较多,该作物具有易于栽培、产量高,果实可以生食等优点,对于生产口服植物疫苗生食可以克服加工过程中对表达抗原的破坏。本研究的禽流感病毒 M2e 多肽抗原基因前融合有粘膜佐剂 LTB,同时为了提高外源基因在番茄中的表达量,参照 Arakawa 等<sup>[12]</sup>方法在融合基因的 C 末端融合了内质网滞留信号肽序列(SEKDEL),转化番茄后,通过食用转化番茄获得的转基因果实,能够诱导机体的粘膜免疫应答,进而为免疫对象提供一定程度的免疫保护,本研究为发展禽流感植物口服疫苗提供了一定的实验依据。

## 参考文献:

- [1] Subbarao K, Klimov A, Katz J, et al. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness [J]. *Science*, 1998, 279: 393-396.
- [2] Slepushkin V A, Kata J M, Black R A, et al. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein [J]. *Vaccine*, 1995, 13(15): 1399-1402.
- [3] Frace M A, Klimov A I, Rowe T, et al. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus [J]. *Vaccine*, 1999, 17: 2237-2244.
- [4] Zebedee S L, Lamb R A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions [J]. *Journal of Virology*, 1988, 62: 2762-2772.
- [5] Treanor J J, Tierney L, Zebedee S L, et al. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice [J]. *Journal of Virology*, 1990, 64: 1375-1377.
- [6] Neiryck S, Deroo T, Saelens X, et al. A universal influenza a vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein [J]. *Nature Medicine*, 1999, 5(10): 1157-1163.
- [7] De Filette M, Min Jou W, Birkett A, et al. Universal influenza A vaccine: Optimization of M2-based constructs[J]. *Virology*, 337, 149-161.
- [8] Zhang Guo-guang, Li Dong-xiao, Zhang Hui-huang, et al. Enhancement of mucosal immune response against the M2eHBc+ antigen in mice with the fusion expression products of LTB and M2eHBc+ through mucosal immunization route[J]. *Veterinary research communication*, 2009, 33(7): 735-747.
- [9] De Haan L, Verweij W R, Holtrop M, et al. Nasal or intramuscular immunization of mice with influenza subunit antigen and the B subunit of *Escherichia coli* heat-labile toxin induces IgA- or IgG-mediated protective mucosal immunity[J]. *Vaccine*, 2001, 19: 2898-2907.
- [10] Yamanaka H, Ishibashi D, Yamaguchi N, et al. Enhanced mucosal immunogenicity of prion protein following fusion with B subunit of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin[J]. *Vaccine*, 2006, 24: 2815-2823.
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Arakawa T, Chong D K, Langridge W H. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine[J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 292-297.
- [13] Frary A, Earle E D. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 16: 235-40.
- [14] Tabaeizadeh Z, Agharbaoui Z, HARRAK H, et al. Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2 [J]. *Plant Cell Rep*, 1999, 19: 197-202.
- [15] 吴昌银, 叶志彪, 李汉霞, 等. 雪花莲外源凝集素基因转化番茄[J]. *植物学报*, 2000, 42(7): 719-23.

[责任编辑: 喻玉萍]