

FMDV vp1 基因在烟草中表达及转基因烟草的免疫效果*

王宝琴^{1,2}, 张永光^{2**}, 王小龙¹, 王永录², 潘 丽², 王文秀², 董金杰², 吕建亮²

(1. 南京农业大学动物医学院, 江苏南京 210095; 2. 中国农业科学院兰州兽医研究所, 甘肃兰州 730046)

Protection of Mice Against Challenge with Foot-and-Mouth Disease Virus by

Immunization with vp1 Gene Expressed Transgenic *N. Benthamiana*

WANG Bao-qin^{1,2}, ZHANG Yong-guang^{2**}, WANG Xiao-long¹, WANG Yong-lu²,
PAN Li², WANG Wen-xiu², DONG Jin-jie², LU Jian-liang²

(1. College of Veterinary Medicine, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Lanzhou Veterinary Medicine, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China)

Abstract: A binary plasmid was constructed by triparental mating, which contained the vp1 gene of foot-and-mouth disease virus strain Akesu/58 serotype O. The *Nicotiana Benthamiana* (NC) leaves were transformed by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method with the binary expression plasmid. After selected by kanamycin, forty-nine resistant lines were obtained. Forty lines were positive through PCR with total DNA and twenty-one lines were positive through RT-PCR with total RNA from fresh leaves tissue. The leaf extracts of seven positive lines analyzed with ELISA and western-blot were respectively emulsified in Freund's adjuvant and the Balb/C mice were immunized intraperitoneally at days 0, 15, 30 and 45. After the last inoculation, the sera antibody were analyzed at 9 days and the mice were experimentally challenged intraperitoneally with 10⁴ suckling mouse 50% lethal doses (SM₅₀LD) of FMDV at 12 days. Protection was determined by the absence of viremia at 24h post-inoculation. Viremia was tested by intradermal inoculation of peripheral blood into suckling mice. These results showed that the constructed binary expression plasmid was functionary; vp1 gene was transformed into NC plants and expressed affirmatively; the structure protein VP1 expressed in two transgenic plants lines may possibly be used as a source of antigen, the inoculated Balb/C mice developed a specific antibody response; the protection against FMDV challenge in two groups was 100% and 63% respectively.

Key words: Foot-and-mouth disease virus; Expression; *Nicotiana benthamiana*; Immune; Antibody; Balb/C mice

摘要:通过三亲杂交法,构建克隆有阿克苏(Akesu/58)O型口蹄疫病毒 vp1 基因的双元表达载体 pBin FMDV VP1。采用农杆菌介导法转化 NC89 烟草叶盘,经卡那霉素筛选,共获得 49 株抗性植株。对抗性植株总 DNA 进行目的基因的 PCR 检测,有 40 株阳性植株。对阳性植株总 RNA 进行目的基因的 RT-PCR 检测,有 21 株阳性植株。将 7 株 ELISA 和 Western-blot 检测阳性植株叶片提取物分别与弗氏佐剂乳化,在 0、15、30 和 45d 腹腔接种 Balb/C 小白鼠,于第 4 次免疫后第 9d 进行血清抗体检测;第 12d 用 10⁴ SM₅₀LD 的同源强毒进行攻击;攻毒后 24h 采血,通过乳鼠病毒血症试验判定攻击 Balb/C 小白鼠的发病和保护情况。结果表明:双元表达载体 pBin FMDV VP1 构建正确;vp1 基因转入 NC89 烟草并获得表达;7 组中有 2 组 Balb/C 小白鼠血清抗体呈阳性,攻毒保护率分别为 100% 和 63%。证明 2 株转基因烟草表达的 VP1 蛋白具有较好的免疫原性,所免疫的 2 组 Balb/C 小白鼠对同源强毒攻击有一定的抵抗能力。

收稿日期:2004-09-16,修回日期:2004-11-22

* 基金项目:863 国家高技术研究发展计划生物工程项目(AA213071)

作者简介:王宝琴(1970-),女,青海贵德籍,讲师,博士研究生。

** 通讯作者:张永光(1962-),男,研究员。Corresponding author. Tel: (0931)8342537, E-mail: zhangyg@public.lz.gs.cn

关键词:口蹄疫病毒;表达;烟草;免疫;抗体;Balb/C 小白鼠

中图分类号:S852.65 文献标识码:A 文章编号:1003-5125(2005)02-0140-05

口蹄疫(Foot-and-mouth disease, FMD)是口蹄疫病毒(*Foot-and-mouth disease virus*, FMDV)引起的一种急性、高度接触性传染病,对牛、羊、猪等30多种动物危害较大,被国际兽疫局列为A类传染病之首^[1]。目前,防制口蹄疫的重要方法仍然是接种灭活疫苗。但由于口蹄疫病毒的血清型和变异株多,灭活苗的保护率不理想。同时灭活苗生产过程中存在着散毒、病毒灭活不完全等潜在危害^[2]。因此,研究高效、安全的新型疫苗势在必行。数种新型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、使用方便等优点,成为目前新型疫苗研究的新热点。

有关FMDV转基因植物方面的报道相对较少,Carrillo等将FMDV vp1基因或含有抗原表位的基因(VP1的135-160氨基酸残基)分别转入拟南芥^[3]、马铃薯^[4]、苜蓿^[5]进行稳态表达及以烟草花叶病毒(TMV)为载体进行烟草瞬时表达^[6]。该小组用所获得的转基因植物免疫实验动物并进行的攻毒试验,基本沿用了Fernandez和Zamorano等用乳鼠病毒血症试验判定攻毒保护情况的方法^[7,8]。国内这方面的研究刚刚起步,孙萌等将vp1基因通过基因枪法转化了烟草和衣藻的叶绿体并获得表达^[8]。李昌等也采用基因枪法将vp1基因转入马铃薯^[10],但尚未查到这两例成功研究相关的动物试验方面报道。本研究采用农杆菌介导法转化烟草进行vp1基因的稳态表达,将阳性烟草叶片提取物免疫Balb/C小白鼠,旨在探索表达的抗原蛋白是否具有免疫原性,为本课题中vp1基因转基因豆科牧草百脉根进行动物饲喂免疫试验提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

阿克苏(Akesu/58)O型口蹄疫病毒vp1基因和序列是笔者前期实验工作中获得。根癌农杆菌LBA4404、辅助质粒PRK2013和烟草种子由中国农科院生物技术所刘德虎研究员馈赠。表达质粒pBin438由中国科学院遗传所馈赠。酶、试剂盒及主要试剂购自宝生物(大连)公司。植物总RNA提取试剂盒购自QIAGEN公司。口蹄疫病毒豚鼠抗血清、ELISA诊断试剂盒由本所马军武副研究员提供。碱性磷酸酶标记的兔抗豚鼠IgG购自Sigma

公司。牛、羊口蹄疫病毒VP1结构蛋白抗体酶联免疫吸附试验诊断试剂盒购自UBI公司。60-80日龄和100-120日龄雄性Balb/C小白鼠(体重20±2g,清洁级),1-2日龄乳鼠及母鼠购自甘肃省肿瘤医院实验动物中心。

1.2 双元表达载体的构建

根据vp1基因序列和表达质粒pBin438上多克隆酶切位点,设计一对引物,上游引物VP1-A1:5'-ATGGA TCCAACAA TGACCACCTCACCGGGT GAGTCA-3,其中含有BamHI酶切位点和Kozak序列等元件;下游引物VP1-A2:5'-CA GGT CGAC-CAA GA GCTGTCTTTCA GGTGCCACAAT-3,其中含有SalI酶切位点。以该基因的克隆质粒为模板,用上述引物进行PCR扩增。扩增成分及浓度参照试剂盒说明书。扩增条件为:95℃预变性5min,按94℃1min,56℃1min,72℃1min共进行28个循环后,72℃延伸10min。按常规方法^[11]将目的片段与pBin438质粒连接、转化,并对重组质粒进行鉴定。采用三亲杂交法^[12]将上述鉴定阳性的重组克隆菌与PRK2013和LBA4404三者融合,在YEB培养基(含50mg/L卡那霉素和25mg/L链霉素)中,28℃培养筛选并检测目的基因。

1.3 目的基因在烟草中的转化与抗性植株的筛选

活化阳性单菌落并转化烟草叶盘^[13]。在25±1℃,16h光照/8h黑暗,光照强度2000 lux进行培养。在含200 mg/L卡那霉素的分化、继代、生根培养基中生长和生根良好的小苗练苗后移栽。

1.4 转基因烟草的检测

1.4.1 目的基因的PCR和转录水平检测:以SDS法^[12]提取烟草总DNA,经适当稀释后作模板,用引物VP1-A1和VP1-A2,将退火温度升高到60℃,其它按1.2中条件进行扩增。按植物总RNA提取试剂盒法提取烟草总RNA,用引物VP1-A2合成cDNA。反转录反应成份和条件参考试剂盒说明书。以上述cDNA为模板,按1.2中条件进行PCR扩增。

1.4.2 目的基因的ELISA和Western-blot检测:取0.1g上述阳性植株新鲜叶片,在400μL抽提缓冲液(50 mmol/L Tri-CL, 0.029% NaN₃)中研磨。10000r/min离心5 min,将本所口蹄疫ELISA诊断试剂盒中液相阻断法改为双抗夹心法检测。

取ELISA检测阳性植株叶片0.1g,于液氮中

充分研磨成细粉,垂悬于 SDS-PAGE 样品提取缓冲液 (50mmol/L Tris, pH7.5, 1mmol/L PMSF, 8 mol/L 尿素, 1% SDS, 2mmol/L DTT, 2% 巯基乙醇) 中,煮沸 10min, 12% SDS-PAGE 进行电泳后,转移至硝酸纤维素膜上,膜经封闭液 (PBS + 0.05% Tween-20 + 3% BSA) 封闭、漂洗,用口蹄疫病毒豚鼠抗血清 (1:1000 倍稀释), 37℃, 孵育 2h。漂洗后以碱性磷酸酶标记的兔抗豚鼠 IgG (1:15000 倍稀释), 37℃, 孵育 1h。膜漂洗后,在避光条件下加入显色液 NBT/BCIP, 至条带清晰,将膜放入蒸馏水中漂洗,观察并拍照。

1.5 动物试验

1.5.1 免疫方法及血清抗体检测: 取 7 株 Western-blot 检测阳性和 1 株未转基因的新鲜烟草叶片,分别提取总可溶性蛋白^[6]。于第 0、15、30、45d 腹腔接种 60~80 日龄 Balb/C 小白鼠,每株叶片提取物接种 8~10 只,首免以 200μL 叶片提取物与等体积弗氏完全佐剂充分乳化,其余 3 次以 400μL 叶片提取物与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化。于第 4 次免疫后第 9 天,每组随机取 8 只 Balb/C 小白鼠断尾采血,按 UBI 公司试剂盒说明书进行抗体检测和结果判定。

1.5.2 病毒的乳鼠半数致死量和病毒血症试验: 阿克苏 (Akesu/58) 毒株系牛舌皮毒,适应乳鼠后的鼠毒经鉴定为 O 型。病毒经乳鼠传代复壮、收集冻存,测定病毒的乳鼠半数致死量 (SM₅₀LD)。

参考文献^[3-8]中方法,在预试验的基础上改进并建立了本研究的病毒血症判定试验。即用 10⁴ SM₅₀LD 的同源强毒通过腹腔接种攻击 100-120 日龄雄性 Balb/C 小白鼠 4 只,每只 200μL; 对照组腹腔接种相同剂量稀释液 (灭菌乳白液)。接种后 24h,试验组和对照组 Balb/C 小白鼠断尾采血,快速将血液用灭菌乳白液以 1:10 稀释。每份稀释血样颈部皮下接种 4 只 2-4 日龄乳鼠,每只 200μL。连续观察 7d,记录发病、死亡情况。

1.5.3 攻毒保护试验: 选用 1.5.1 中第 4 和 5 组抗体检测阳性、第 2 组抗体阴性和对照组共 4 组 Balb/C 小白鼠,在第 4 次免疫后第 12d,按 1.5.2 中试验组方法和剂量进行攻毒和病毒血症试验。

2 结果与分析

2.1 双元表达载体的构建

以克隆有阿克苏 (Akesu/58) O 型口蹄疫病毒 VP1 基因的质粒为模板,用引物 VP1-A1 和 VP1-A2 进行 PCR 扩增,得一条 0.65kb 的条带,与 vp1

基因基本相符。经 *Bam*H 和 *Sal* 双酶切目的片段与 pBin438 质粒连接得到约 14.3kb 的质粒。该重组质粒用 *Bam*H 和 *Sal* 双酶切,得到 0.65kb 和 13.6kb 的两条带;以该重组质粒为模板进行 PCR 扩增得到一条 0.65kb 的条带,与预期结果相符 (图 1)。再将该基因克隆到测序载体中测序,与 vp1 原序列比对,含有相应的酶切位点和 Kozak 序列等元件,全序列除一个核苷酸不同外,其余均一致。证明已成功地构建了含 vp1 全基因的双元表达载体 pBin438 FMDV VP1。

2.2 转基因烟草的获得与抗性植株的筛选

在含 200 mg/L 卡那霉素的分化、继代和生根培养基上分别经诱导愈伤、诱导芽及芽伸长、生根培养和筛选,获得了 49 株卡那霉素抗性植株。未转化的对照组外植体在含 200 mg/L 卡那霉素的分化、继代和生根培养基中黄化枯死;而在无卡那霉素的分化、继代和生根培养基中分化、生长良好,这说明卡那霉素对早期抗性植株的筛选起到了重要作用。

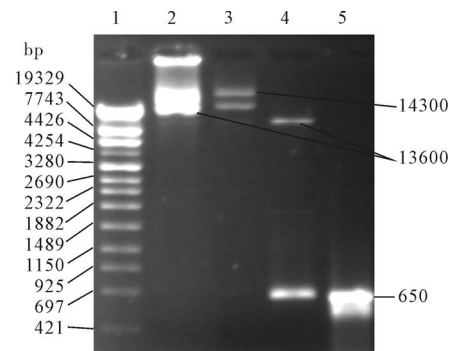


图 1 重组质粒酶切和 PCR 鉴定图

Fig. 1 Restriction enzyme analysis and PCR products of pBin438FMDV VP1

1, Marker; 2, Plasmid pBin438; 3, Recombinant plasmid; 4, Restriction enzyme analysis with *Bam*H and *Sal* of recombinant plasmid; 5, PCR products of VP1 gene from recombinant plasmid.

2.3 目的基因的 PCR 和转录水平检测

以烟草总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,有 40 株均得到一条约 0.65kb 的条带,未转化的对照植株无此条带。该方法简单快捷,但存在一定的假阳性。以烟草总 RNA 为模板,进行 RT-PCR,有 21 株均得到一条约 0.65kb 的条带,而未转化对照植株无此条带。

2.4 目的基因在烟草中的表达

双抗夹心 ELISA 法仅检测到 7 株阳性植株。因采样的时间或者植物生长的不同时期,同植株 3 次检测结果重复性不好 (数据略)。提取 7 株阳性植株总可溶性蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳和转膜杂交后,7 份样品均在大约 23.5kDa 处出现杂交带,而未

转化对照植株无此杂交带(图 2)。说明 *vp1* 基因在烟草中获得正确表达。

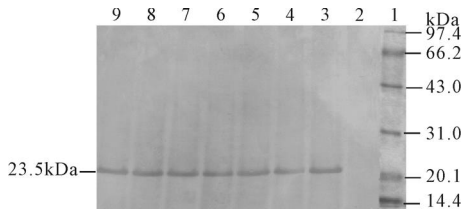


图 2 目的蛋白 western-blot 检测

Fig. 2 Western-blot assay of protein

1, Marker; 2, Protein of Non-transgenic *NC* plants lines; 3 ~ 9, Protein of transgenic *NC* plants lines.

2.5 血清抗体

由图 3 可知,第 4 和第 5 组 Balb/C 小白鼠血清抗体 OD_{450} 值高于临界值呈阳性;第 1、2、3、6、7 组和对照组的 Balb/C 小白鼠血清抗体 OD_{450} 值均低于临界值呈阴性,说明 7 株转基因烟草中 2 株表达的蛋白能够刺激 Balb/C 小白鼠产生特异性抗体。

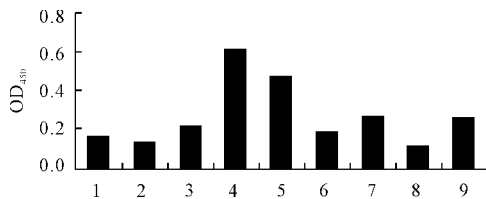


图 3 血清抗体检测

Fig. 3 Assay of sera antibody of Balb/C mice

1-7, Sera antibody of 7 Balb/C mice groups inoculated with 7 transgenic *NC* plants lines; 8, Sera antibody of the control Balb/C mice group inoculated with non-transgenic *NC* plants lines; 9, The threshold value of sera antibody to VP1 protein.

2.6 病毒的乳鼠半数致死量和病毒血症试验

测定结果经 Reed-Muench 法计算,阿克苏(Akesu/58)株 FMDV $SM_{50}LD$ 为 10^{-8} 。

在攻毒和接种后 24h 采血进行乳鼠病毒血症判定试验,攻毒组乳鼠发病死亡率为 100%,即用 $10^4 SM_{50}LD$ 病毒量攻击后 100% 的 Balb/C 小白鼠有病毒血症;稀释液(灭菌乳白液)接种的对照组乳鼠全部健活。该方法可以作为本试验转基因烟草免疫 Balb/C 小白鼠攻毒保护试验的判定标准。

2.7 攻毒保护率

用 $10^4 SM_{50}LD$ 病毒量攻击后 24h 采血进行的乳鼠病毒血症判定试验表明,第 4、5、2 组和照组 Balb/C 小白鼠保护率分别为 100%、63%、0% 和 0%,说明第 4 和第 5 组 Balb/C 小白鼠在一定程度上能够抵抗口蹄疫同源病毒强毒的攻击。

3 讨论

研究表明,口蹄疫病毒结构蛋白 VP1 功能区内

包含病毒的主要抗原位点,能诱导动物产生中和抗体^[14]。O 型口蹄疫病毒 5 个抗原位点中,有 3 个位于 VP1 上,包含了病毒的宿主细胞受体位点 RGD,在病毒的侵入和免疫保护中发挥着重要作用^[15]。因此,本试验选用阿克苏(Akesu/58) O 型口蹄疫病毒结构基因 VP1 作为目的基因进行遗传转化。

农杆菌介导转化法决定了目的基因插入细胞染色体是随机的,各转化子中目的基因表达水平也各异,筛选出高表达量转基因植株是关键环节。尽管农杆菌介导转化法有很多优点,但转化植株表达量低,难以检测及定量是目前诸多该类研究共同存在的问题,也是本试验的不足之处。转基因植株需经过抗生素抗性筛选、目的基因的基因水平(PCR, Southern-blot)、转录水平(RT-PCR, Northern-blot)和翻译水平(ELISA, Western-blot)等多项检测后,才能确定阳性植株。检测花费很长时间,方法也因植物品种、目的基因功能及目的蛋白性质不同而各异,植物外源蛋白的检测灵敏度差异也很大。Dus Santos 等针对目的基因表达量低、难以检测筛选等问题,将 FMDV 抗原决定簇(VP1 第 135-160 位氨基酸残基)与葡萄糖醛酸苷酶(glucuronidase, Gus A)基因融合表达,通过 Gus 基因表达的酶活性来筛选目的基因高表达植株^[5]。报告基因 Gus 在植物中易表达,检测方法简单快捷,很多植物中不存在该基因背景,可以减少繁琐而复杂的检测工作。但融合表达的蛋白易使抗原决定簇被遮蔽而影响免疫原性,这比低表达量更致命。

成年小白鼠对 FMDV 的易感性比乳鼠差,缺乏典型的临床症状,所以通过乳鼠试验来判定成年 Balb/C 小白鼠攻毒后有无病毒血症,从而判断免疫后的成年 Balb/C 小白鼠对强毒攻击后的保护反应^[3-6]。在病毒血症预试验中对攻毒病毒的滴度、乳鼠日龄、乳鼠接种途径和部位、剂量、攻毒后采血时间等的筛选和确定时,发现上述因素均可导致病毒血症试验结果出现差异,因而难以保证免疫小白鼠攻毒保护试验的真实性。因此,在进行 FMDV 病毒血症等方面的试验时,建立与该试验实验条件相一致的参考数据是非常重要且必不可少的。本研究通过病毒血症预试验和病毒血症实验,对文献中方法作了以下改动:(1)对 5-6 日龄乳鼠腿部肌肉注射 50 μ L 稀释血样时易洒漏^[4-8],而且仍有部分乳鼠健活。故选择 2-4 日龄乳鼠颈背部皮下注射 200 μ L 稀释血样,与本试验 $SM_{50}LD$ 测定中乳鼠日龄、注射部位和剂量一致;(2)攻毒后 36h^[4-8]和 48h^[3]对 Balb/C 小白鼠血液进行乳鼠病毒血症试验,提前为攻毒

后 24h 采血进行病毒血症试验。

本试验结果表明,农杆菌介导的 FMDV VP1 转基因烟草表达的抗原蛋白具有一定免疫原性,免疫成年 Balb/C 小白鼠后能产生抗 VP1 抗原蛋白的特异抗体,能够抵抗同源 FMD 病毒的攻击。这一初步试验结果对本课题中转基因豆科牧草可饲化免疫原(或疫苗)的研究具有一定的试验基础和参考意义。但表达量仍然是急待解决的问题,尽管可以通过选择特异性启动子、植物偏好密码子、内质网识别序列(SKEDDEL)等途径改善,但这些措施也与外源基因、转化受体品种等有很大差异,即外源基因的插入、转录和有效翻译都具有不可控性。

参考文献

- [1] 刘在新,谢庆阁. 口蹄疫防治技术的研究和发展[J]. 中国兽医科技,2001,31(5):18-21.
- [2] Mason P W, Grubman M J. Controlling foot-and-mouth disease with vaccine [J]. Austr Veter, 2001, 79(5): 342-343.
- [3] 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(2): 1688-1690.
- [4] Carrillo C, Wigdorovitz A, Trono K, *et al.* Induction of a virus-specific antibody response to foot-and-mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants [J]. Viral Immunol, 2001, 14: 49-57.
- [5] Dus Santos M J, Wigdorovitz A, Trono K, *et al.* A novel methodology to develop a foot-and-mouth disease virus (FMDV) peptide-base vaccine in transgenic plants [J]. Vaccine, 2002, 20: 1141-1147.
- [6] Wigdorovitz A, Perez D M F, Robertson N, *et al.* Protective 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 [J]. Virol, 1999, 264: 85-91.
- [7] Fernandez F M, Borca M V, Sadir A M, *et al.* Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: Susceptibility and immune response of adult mice [J]. Veter Microbiol, 1986, 12: 15-24.
- [8] Zamorano P, Igdorovitz A, Perez D M, *et al.* A 10-Amino-acid linear sequence of foot-and-mouth disease virus containing B-and T-cell epitopes induces protein in mice [J]. Virology, 1995, 212: 614-621.
- [9] 孙 萌. 口蹄疫病毒 VP1 抗原基因在模式植物叶绿体中的重组和表达[D]. 杭州: 浙江大学, 2003, 06.
- [10] 李 昌, 金宁一, 王 昱, 等. 基因枪法转化马铃薯及转基因植株的获得[J]. 作物杂志, 2003, 1: 12-14.
- [11] 萨姆希鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社(第 2 版), 1993, 16-40.
- [12] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社(第 2 版), 2002, 329-330; 742-744.
- [13] Zhang J Y, YE L, LIL, *et al.* Obtainment of transgenic tobacco harboring phbA, phbB and phbC genes by twice transformation[J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(1): 59-62.
- [14] Strohmaier K, Franze R, Adman K H. Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunization protein[J]. J Gen Virol, 1982, 59: 295-360.
- [15] 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]. J Gen Virol, 1987, 68: 163-167.