

口蹄疫病毒 VP1 高效植物表达载体构建及鉴定

郝岗平¹, 边高鹏², 孙凌云¹, 张媛英¹

(1. 泰山医学院 生物化学教研室, 山东 泰安 271000; 2. 山西长治学院生化系, 山西 长治 046011)

摘要: 采用高保真 PCR 方法从 pGEM-VP1-T 质粒扩出 VP1 基因, 定向克隆到含 DHA 的融合中间载体 pUC18-DHA, 得到 pUC18-VP1-DHA, 经测序证实核酸序列正确后, 再亚克隆到转化范围广, 转化效率高, 且含有双增强子的高效植物二元表达载体 pGreen0029-GFP 上, 获得含 VP1 融合 DHA 基因的植物二元表达载体 pGreen0029-VP1-DHA, 采用电击法将含 VP1 的植物表达载体转入根癌农杆菌 G3101 中, 获得了含 VP1 基因的双元植物表达载体, 为下一步的广范围转基因植物表达研究奠定了基础。

关键词: 口蹄疫病毒 VP1 基因; 植物高效表达载体

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2007)01-0132-05

Construction and identification of VP1 plant high efficiency expression vector of foot-mouth disease virus

HAO Gang-Ping¹, BIAN Gao-Peng², SUN Ling-Yun¹,
ZHANG Yuan-Ying¹

(1. Department of Biochemistry, Taishan Medical College, Tai'an 271000, China; 2. Department of Biochemistry, Changzhi College, Changzhi 046011, China)

Abstract: Using high-fidelity PCR, VP1 was amplified from pGEM-VP1-T plasmid and then subcloned into the transition vector pUC18-DHA including the fusing DHA. Following confirmation the VP1 sequence, pUC18-VP1-DHA was obtained. After this vector was subcloned into the plant binary vector pGreen0029-GFP which is wide species and high transform efficiency, new plant binary vector, named pGreen0029-VP1-DHA, was produced. Analysis with restriction endonucleases confirmed successful transfer of pGreen0029-VP1-DHA into *Agrobacterium tumefaciens* G3101. The plant binary expression vector encoding VP1 have been constructed, which facilitates further investigation of VP1 protein expressions in wide transgenic plants.

Key words: VP1 gene of foot-mouth disease virus; high efficiency plant expression vector

利用转基因植物生产研制基因工程药物是当今植物基因工程研究的一大热点, 已有病毒蛋白、细菌毒素和抗体分子等多种基因在转基因植物中获得成功的报道(李昌等, 2003)。用转基因植物表达外源基因与细菌、酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞、转基因动物等表达系统相比, 具有独特的优势(王捷等, 1999)。自 Mason(1992)首次提出用植物生产可食性疫苗以

来, 运用此种方法生产的人用疫苗和功能蛋白已达 100 种以上。

口蹄疫(FMD)是由口蹄疫病毒(Foot and Mouth Disease Virus, FMDV)引起的一种急性、高度接触性传染病, 对牛、羊、猪等多种偶蹄动物危害甚大, 被国际兽疫局列为 A 类传染病之首(郭慧琛等, 2003)。目前, 除美国、日本、加拿大、澳大利亚、新西兰等少数国

收稿日期: 2005-04-11 修回日期: 2006-01-05

基金项目: 泰山医学院博士科研启动基金资助(2004) [Supported by Initial Foundation to PhD of Taishan Medical College (2004)]

作者简介: 郝岗平(1970-), 男, 山西临县人, 博士, 副教授, 从事药用植物分子生物学与基因工程研究, E-mail: haogangping@163.com。

家外,世界大部分国家和地区都不同程度地存在着 FMD 流行(Samuel 等,2001)。FMD 不仅造成巨大的经济损失,对旅游、贸易乃至政治、外交等也会有严重的不良影响,因此 FMD 的研究受到世界各国政府和学者的高度重视。

目前,防治口蹄疫的主要方法仍然是接种灭活疫苗,但由于 FMDV 血清型和变异株众多,灭活疫苗的保护率并不理想;同时灭活疫苗生产过程中存在着散毒、病毒灭活不完全等潜在危险(Mason 等,2001),因此研究高效、安全的新型疫苗受到国内外学者的广泛关注。口蹄疫病毒的结构蛋白 P1 为口蹄疫病毒的抗原位点,其结构蛋白 P1 成熟后裂解为 VP1、VP2、VP3、VP4,其中 VP1 为主要抗原位点,能诱导机体产生抗 FMDV 中的抗体和抗病毒保护性免疫,是基因工程疫苗研究的对象。为了制备安全、有效的新型基因工程疫苗,人们积极探索 FMDV 转基因植物的研究,1998~2001 年 Carrillo 等(1998)、Wigdorovitz 等(1999)将 FMDV-VP1 结构蛋白基因的植物二元载体分别转化拟南芥、苜蓿和马铃薯,获得整合了 VP1 基因的转基因植物,并且在转基因植物中得到表达。将其表达产物提取物免疫动物能够诱导动物产生特异性免疫应答。另外,Dussantos 等(2002)把口蹄疫病毒 VP1 结构蛋白 135~160 多肽(VP1135-160)基因片段插入到 gus 基因的前面构成融合基因,转化苜蓿得到转基因植物,通过检测 gus,证明该多肽在苜蓿中表达,并也能诱导动物的特异性免疫应答。这些研究结果表明用植物表达系统完全有可能生产有效安全的口蹄疫疫苗。但这些研究都存在表达检测复杂,表达量低等问题。随着植物转基因的研究进展和对口蹄疫及其病毒基因组研究的深入,我们拟采用转化范围广且转化效率高的 pGreen0029 载体,构建含 DHA 凝集素的 VP1 基因融合表达载体,利于表达检测,提高表达效率,用于转化玉米、牧草等植物,为进一步研究可饲用的 FMD 疫苗奠定基础,现将研究结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 质粒和菌株

含亚洲 I 型口蹄疫病毒 VP1 基因(700 bp)片段的 pGEM-VP1-T 质粒,由中国科学院遗传与发育研究所王义琴博士惠赠。pGreen0029-GFP 和 pUC18-DHA 质粒和 GV3101 根癌农杆菌由北京农业生物技

术研究中心黄丛林研究员惠赠。E. coli DH5 α 为本室保存。

1.2 试剂和主要仪器

限制性内切酶 NcoI、StuI 和 PstI 购自 Takara 公司。质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司。DNA 凝胶纯化试剂盒、Tag 酶、dNTP 均购自大连宝生物工程公司。

高速冷冻离心机(Allegra™ 64R centrifuge,美国 BECKMAN 公司),PTC100PCR 仪(美国 MJ 公司生产),凝胶自动成像系统(法国 VILBERLOURMAT 公司)。冷冻干燥仪(ALPHA 1-4,德国 Martin Christ 公司),电泳系统(北京六一仪器公司)。Gene pulser II 电击转化仪(BIO-RAD 公司)

1.4 方法

(1)质粒 DNA 提取:参照《分子克隆实验指南》(萨姆布鲁克等,1993)中的方法进行。

(2)VP1 基因的 PCR 扩增与纯化:根据已经测定的 FMDVP1 片段的核苷酸序列及质粒 pUC18-DHA 的限制性酶切位点,设计 1 对引物,其序列为:PR1:5' ACGCCATGG TCGAGCCCAAACCACCTCTGC; PR2: 5' CGAGGCCTCAGTCGAAGTTCAGAAGCTGTTTT。两引物的 5' 端分别引入 NcoI 和 StuI 酶切位点(下划线部分)。取 pGEM-VP1-T 质粒约 40 ng 为模板,在 50 μ L 反应体系中 PCR。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 下预变性 4 min,94 $^{\circ}$ C 下变性 50 s,60 $^{\circ}$ C 下退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 下延伸 1 min,共 30 个循环,最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 7 min。PCR 产物全部上样电泳。PCR 产物用 Omega 公司的胶回收试剂盒回收。

(3)质粒 DNA 酶切、片段回收、连接和转化:质粒 DNA 酶切与连接按厂家说明书进行,DNA 片断回收采用 Omega 公司的胶回收试剂盒。取 5 μ L 连接产物,转化 E. coli DH5 α 感受态细胞,涂布于含 60 μ g/mL 安苄青霉素或 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养 16~18 h。

(4)阳性克隆的筛选与鉴定:从上述抗性平板挑取单菌落,接种在含 60 μ g/mL 安苄青霉素或 50 μ g/mL 卡那霉素的 3 mL LB 液体培养基中,培养 6~8 h。取 2 μ L 菌液为模板,按 1.3.2 节中的反应条件进行 PCR 扩增。将 PCR 扩增阳性的菌液测序。

(5)电击法转化农杆菌:用 BIO-RAD Gene pulser II 电击转化仪转化根癌农杆菌 G3101 受体细胞。

(6)转化农杆菌的酶切鉴定:小量提取农杆菌中的质粒酶切鉴定。

2 结果

2.1 VP1 基因的扩增

用所设计的引物从 pGEM-VP1-T 质粒扩增到特异性条带,大小约 700 bp,与预期大小相符(图 1)。

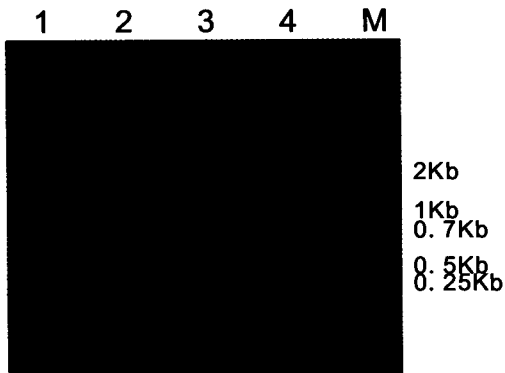


图 1 VP1 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of amplification by PCR for VP1 gene
1-4: Result of PCR; M: DNA Marker.

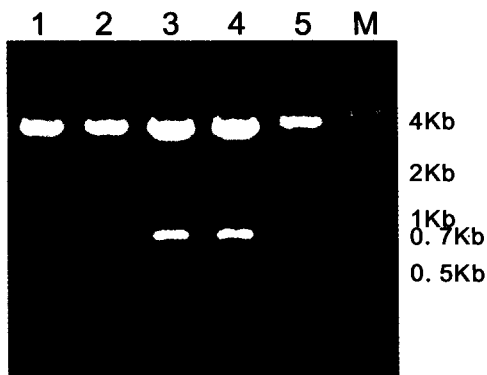


图 2 重组质粒 pUC18-VP1-DHA
Nco I 和 Stu I 双酶切结果

Fig. 2 Identification of plasmid pUC18-
VP1-DHA by Nco I + Stu I

1-5: pUC18-VP1-DHA/Nco I + Stu I; M: DNA Marker.

2.2 pUC18-VP1-DHA 中间载体的构建和鉴定

Omega 公司的胶回收试剂盒回收上述 PCR 产物,用 NcoI 和 StuI 双酶切位点。同时用相同的酶双酶切 pUC18-DHA,经琼脂糖凝胶电泳,回收大片段,与上述双酶切回收的 PCR 产物连接,连接物转化大肠杆菌,经含抗生素 Amp 平板筛选,提取质粒,NcoI 和 StuI 双酶切鉴定(图 2)。测序证实 VP1 基因与 pUC18-DHA 大片断连接成功,且核苷酸序列正确。

2.3 pGreen0029-VP1-DHA 载体构建和鉴定

将上述构建好的 pUC18-VP1-DHA 中间载体和 pGreen0029-GFP 载体同时进行 NcoI + PstI 双酶切,

电泳,回收 pUC18-VP1-DHA 的小片段,回收 pGreen0029-GFP 大片段,再将两回收产物连接,连接物转化大肠杆菌,经含抗生素 Kan 平板筛选,得到 9 个转化菌落,提取质粒,NcoI + PstI 双酶切鉴定(图 3)。整个载体的构建路线见图 4。

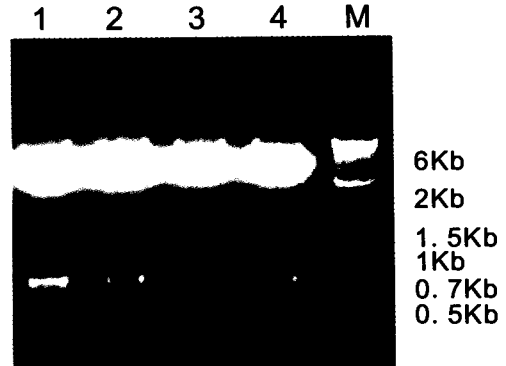


图 3 重组质粒 pGreen0029-VP1-DHA
Nco I + Pst I 双酶切鉴定

Fig. 3 Identification of plasmid pGreen0029-
VP1-DHA by NcoI + PstI

1-4: pGreen0029-VP1-DHA/NcoI + PstI; M: DNA Marker.

2.4 植物表达载体导入根癌农杆菌

将构建的表达载体 pGreen0029-VP1-DHA 用电转移法转化根癌农杆菌菌株系 GV3101,2 d 后长出菌落,由于根癌农杆菌的质粒拷贝数很低,因此先采用碱法提取质粒,再转化大肠杆菌,扩增后用碱法提取质粒,酶切鉴定。NcoI + PstI 双酶切鉴定与 pGreen0029-VP1-DHA 用相同的双酶切鉴定得到相同的结果,可以切出大约 700 bp 的片段。PCR 扩增转化的农杆菌,可扩出 VP1 基因片段,表明 pGreen0029-VP1-DHA 质粒已经导入到农杆菌菌株系 GV3101。

3 讨论

表达载体是指按特殊要求设计的,能使克隆在其中特定位点的外源基因的编码序列,在原核或真核细胞中正常转录并翻译成相应蛋白质的克隆载体。

构建高效表达载体时,应选择有意义的目的基因并对其进行序列修饰,本研究以目前急需研制新型疫苗的 FMD 为研究对象,以引起这类传染病的病原体 FMDV 的主要抗原基因为靶基因,通过设计一系列中间载体,消除多余及不必要的酶切位点。

同时,构建载体时,还应采用正确的构建策略。除考虑编码基因即目的基因阅读框与启动子方向一

致外,还要根据目的基因所在原载体的多克隆位点,选用最快捷的途径,构建到最终表达载体上。另外,在构建过程中,还应考虑最终载体的大小。FMDV 只含有 1 个开放阅读框,编码病毒前体蛋白,经过裂解形成 4 种结构蛋白,其中,VP1 是诱导中和抗体的主

要成分。业已证实的 O 型口蹄疫病毒 5 个抗原位点中,有 3 个位于 VP1 上,包含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的作用,是各种亚单位疫苗研制的首选基因(刘铀等,2004)。

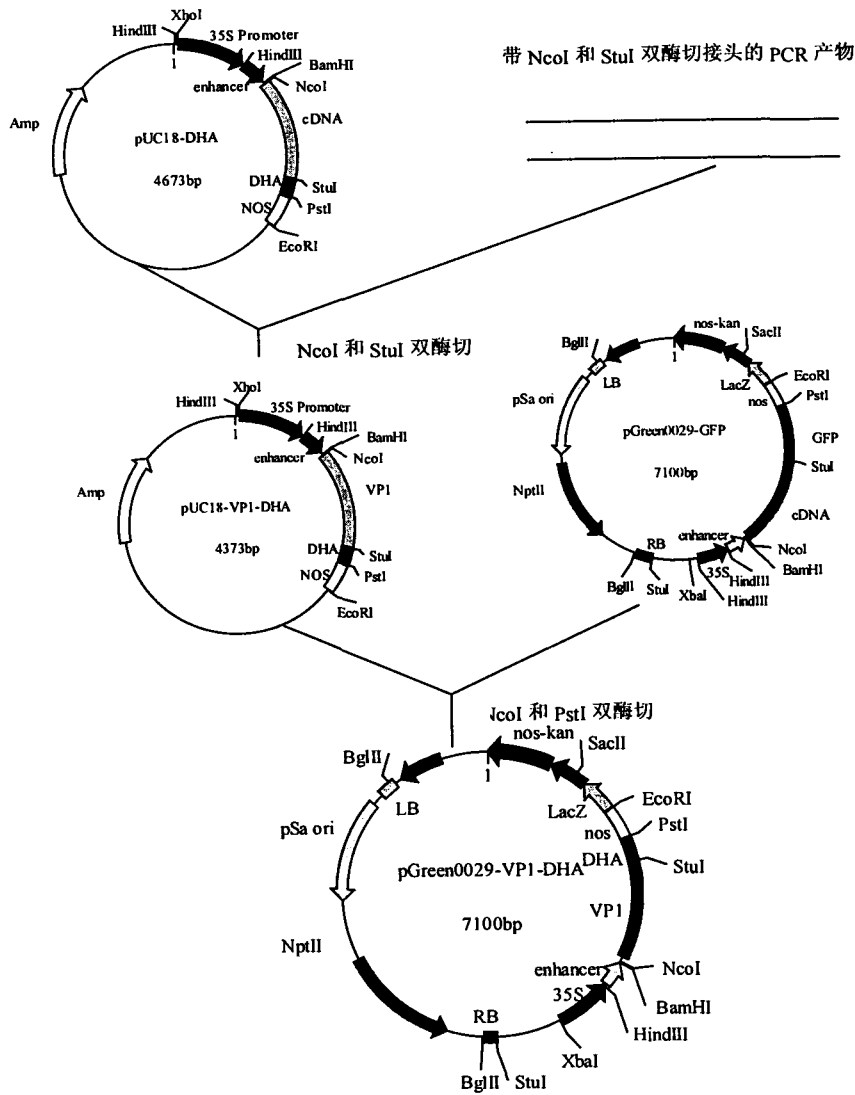


图 4 pGreen0029-VP1-DHA 表达载体质粒的构建技术路线
 Fig. 4 Construction of recombinant plasmid pGreen0029-VP1-DHA

中间载体 pUC18-DHA 含有常用的组成型启动子 35S 和一个增强子,且该中间载体的目的基因不含终止子,目的序列后面直接连接 DHA(植物凝集素基因),目的是为了通过 West blotting 检测 DHA,说明目的基因是否表达。由于没有合适的酶切位点,不可以直接将 VP1 基因从 pGEM-VP1-T 载体直接切下连接到此中间载体上,因此,采用高保真 PCR 方法调出 VP1 基因,并在 PCR 产物上加上 NcoI 和 StuI 酶切

接头,以便定向克隆到中间载体上。

实现外源基因在植物中的表达,必须将外源基因连接到特定的植物表达载体上,通过根癌农杆菌对植物的侵染作用,将外源基因整合到植物染色体 DNA 上(彭志强等,2002)。pUC18-DHA 中间载体的 35S 启动子是组成型启动子,在植物大部分组织中能很好地启动外源基因的表达,pGreen0029-GFP 载体中含有双增强子,可以大大提高外源基因表达量。根癌农

杆菌仅将左右边界序列 RB 和 LB 之间的 DNA 序列整合到植物染色体中。pGreen0029 载体在 pSoup 质粒的协助下,在农杆菌 GV3101 内的复制速度快,转化植物的范围广,多克隆位点多,操作方便(Hellens 等,2000)。因此,整个含 VP1 基因的表达调控元件(启动子、增强子、外源基因和 DHA)通过酶切连接,构建在植物双元载体 pGreen0029 的左右边界序列之间,由于构建的 VP1 表达为独立的表达单元,因此不需要鉴别其方向,左右边界序列之间还包含一个 NPTII 基因,也是一个独立的表达单元,其表达产物能够磷酸化卡那霉素及其衍生物,作为筛选转基因植株的抗性基因。

本研究所构建的 pGreen0029-VP1-DHA 植物表达载体,可用于烟草、马铃薯、玉米、番茄等植物的转化,从而为用植物作为生物反应器生产口服疫苗提供依据。

参考文献:

- 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 DW. 黄培堂,等(译). 2002. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社:27-29
- Carrillo C, Wigdorovitz A, Olieros JC, et al. 1998. Protective immune response to foot-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants[J]. *J Virol*, **72**(2):1 688-1 690
- Dus Santos MJ, Wigdorovitz A, Trono K, et al. 2002. A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus(FMDV) peptide-based vaccine in transgenic plants[J]. *Vaccin*, **20**:1 141-1 147
- Guo HC(郭慧琛), Liu ZX(刘在新), Sun SQ(孙世珞), et al. 2003. The latest progress of genetics vaccines against foot-mouth disease (口蹄疫基因疫苗研究进展)[J]. *Progress in Veterinary Medicine*(动物医学进展), **24**(4):1-5
- Hellens RP, Edwards EA, Leyland NR, et al. 2000. pGreen; a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation[J]. *Plant Mol Biol*, **42**(6):819-832
- Li C(李昌), Jin NY(金宁一), Wang G(王罡), et al. 2003. On constructing expressing vectors for genetics engineering vaccine(植物基因工程疫苗高效表达载体的构建)[J]. *J Jilin Agric Univ*(吉林农业大学学报), **25**(3):253-256
- Liu Y(刘铀), Bi YZ(毕英佐), Ma JY(马静云), et al. 2004. Construction of VP1 plant expression vector of foot-mouth disease virus(口蹄疫病毒 VP1 植物表达载体的构建)[J]. *J Zhanjiang Ocean Univ*(湛江海洋大学学报), **24**(4):59-62
- Mason HS. 1992. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, **89**,11 745-11 749
- Mason PW, Grubman MJ. 2001. Controlling foot and mouth disease with vaccine[J]. *Australian Veterinary Journal*, **79**(5):342-343
- Peng ZQ(彭志强), Yu SY(俞守义), Yu DQ(余迪求), et al. 2002. Construction of plant expression vector containing the gene encoding cholera toxin B subunit(编码霍乱毒素 B 亚单位基因植物表达载体的构建)[J]. *J First Military Medical Univ*(第一军医大学学报), **22**(8):736-738
- Samuel AR, Knowles NJ. 2001. Foot and mouth disease sevirus; Cause of the recent crisis for the UK livestock industry[J]. *Trends in genetics*, **17**(8):421-424.
- Wang J(王捷), Guo Y(郭勇). 1999. Vaccine production in transgenic plant(疫苗生产的新途径——转基因植物)[J]. *Guhaia*(广西植物), **19**(3):260-262
- Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, et al. 1999. Induction of a protective antibody response to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structure protein VP1[J]. *Virology*, **255**(2):347-353

(上接第 139 页 Continue from page 139)

泳拖尾现象消失。

参考文献:

- 王关林,方宏筠. 2002. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社:742-744,755
- 郭锡勇,曹宇浩. 1999. 黔产绞股蓝中多糖的含量测定[J]. 贵阳中医学院学报, **21**(3):59-60
- Cheng FS, Broun SK, Weeden NF. 1997. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species[J]. *Hortscience*, **32**(5):921-922
- Collins GG, Symon SRH. 1992. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure[J]. *Plant Mol Rep*, **10**:233-235
- Ding XD(丁晓东), Lu LX(吕柳新). 2000. Study on genomic DNA extraction from recalcitrant litchi(从顽拗植物荔枝中提取基因组 DNA 技术的研究)[J]. *Chin J Appl Environ Biol*(应用与环境生物学报), **6**(2):142-145
- Fang G, Hammar S, Grumet R. 1992. A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA[J]. *Biotechniques*, **13**(1):52-56
- Haymes KM. 1996. Mini-prep method suitable for a plant breeding program[J]. *Plant Mol Biol Rep*, **14**(3):280-284
- Kim C S, Lee C H, Shin J S, et al. 1997. A simple and rapid method for isolation of high quality genomic DNA from fruit tree and conifers using PVP[J]. *Nucleic Acid Res*, **25**,1 085-1 086
- Luro F, Laigret F. 1995. Preparation of high molecular weight genomic DNA from nucleoli of woody plants[J]. *Biotechniques*, **19**:388-392
- Oard J H, Dronavall S. 1992. Rapid isolation of rice and maize DNA for analysis by random-primer PCR[J]. *Plant Mol Biol Rep*, **10**:236-241
- Wang Z(王珍), Fang XJ(方宜钧). 2003. Plant DNA isolation(植物 DNA 分离)[J]. *Mol Plant Breeding*(分子植物育种), **1**(2):281-288