

禽流感病毒表面抗原 HA 基因 转化小麦的初步研究

常向博^{1,2} 廖玉才^{2,3} 李和平^{1,2}

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070;

2. 华中农业大学麦类作物分子生物技术实验室, 武汉 430070;

3. 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为了建立利用小麦生产禽流感口服疫苗的方法, 选择禽流感病毒 H5N1 亚型表面抗原 HA 基因, 与谷类作物启动子构建小麦表达载体, 经基因枪法转入我国小麦栽培品种郑 9023 幼胚, 在含 5 mg/L 草铵膦愈伤诱导培养基和分化培养基及含 4 mg/L 草铵膦生根培养基上筛选后, PCR 鉴定获得转 HA 基因植株, Southern 杂交分析转基因 T₁ 代植株证实, 外源 HA 基因确已整合到小麦基因组中。

关键词 禽流感病毒; 基因枪转化; 小麦; 植物生物反应器

中图分类号 S 512.150.353 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)03-0266-04

禽流感(avian influenza, AI)是 A 型流感病毒引起的一种禽类传染病, 突发率和死亡率高, 不仅给世界养禽业带来巨大经济损失, 而且禽流感亚型病毒可突破种间障碍, 感染人并导致患者死亡, 严重威胁人类生命安全^[1-2]。因此, 研究和高效、安全、价格低廉的禽流感疫苗生产技术具有重要意义。血凝素蛋白(HA)是禽流感病毒表面的一种膜蛋白和最主要的表面抗原, 是病毒基因合成产物中相对分子质量最大的糖蛋白, 既能诱导机体产生特异抗体, 也在病毒吸附及释放出芽过程中起关键作用^[1-3]。

疫苗免疫是目前采用的禽流感疫情防治主要手段, 包括灭活全病毒疫苗、重组活载体疫苗、核酸疫苗^[3]等。随着生物药业(molecular farming, 或 molecular pharming)技术的发展及应用^[4-6], 用生产成本低、安全性高、便于储藏和运输等优点的植物作为生物反应器生产疫苗已成为当今分子生物技术研究热点, 一些具有重要价值的疫苗或抗体已在烟草、马铃薯、番茄、香蕉、玉米、苜蓿、拟南芥、百脉根等植物中表达^[5-10]。

本研究利用遗传转化技术, 将禽流感病毒表面抗原 HA 基因转化小麦, 经筛选鉴定获得了整合 HA 基因的转基因小麦株系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

含 H5N1 亚型禽流感病毒湖北菌株(A/chicken/Hubei/327/2004)表面抗原血凝素(HA)基因, 由华中农业大学动物科技学院金梅林教授惠赠, 经 PCR 从拟南芥表达载体中扩增 HA 基因后^[9], 与玉米 Ubiquitin 启动子连接, 构建小麦表达载体 pBAR-LYA。T₄ DNA 连接酶、各种限制性内切酶购自大连宝生物公司, 高保真 DNA 聚合酶购自东洋纺生物科技有限公司, DNA 回收试剂盒购自杭州维特洁公司, 引物由上海生工合成。其他常用试剂、培养基为国产分析纯试剂。供试小麦品种郑 9023、大肠杆菌 DH5 α 由笔者所在的实验室提供。愈伤诱导培养基、分化培养基及生根培养基参照文献^[11], 愈伤诱导及分化培养基的草铵膦(*L*-phosphinothricin, PPT)质量浓度为 5 mg/L, 生根培养基的草铵膦质量浓度为 4 mg/L。

1.2 基因枪转化及转基因植株再生

1)取材及愈伤诱导。取小麦开花后 13~15 d 的麦穗, 剥出幼嫩颖果, 经 70%乙醇消毒 30 s, 无菌水冲洗 2~3 次, 然后用 0.1% HgCl₂ 消毒 5~

收稿日期: 2010-11-30

基金项目: “863”国家高技术研究发展专项(2007AA100505)和教育部博士点基金项目(20070504010)

常向博, 硕士研究生, 研究方向: 植物基因工程。E-mail: haitun_031@163.com

通讯作者: 李和平, 教授, 研究方向: 麦类作物分子生物学。E-mail: hepingli@mail.hzau.edu.cn

8 min, 无菌水冲洗 3~5 次。剥取幼胚, 将幼胚转至 MSI 诱导培养基上。在 25 ℃ 黑暗条件下培养 5~7 d, 用于基因枪转化。

2) 基因枪转化及转基因植株筛选。以 Bio-Rad 基因枪按文献[11]方法转化幼胚和恢复培养后, 将愈伤转至含 5 mg/L PPT 的筛选培养基中, 25 ℃ 光照条件下筛选 2 轮, 抗性愈伤分化出绿芽, 将绿芽转至含 4 mg/L PPT 的生根筛选培养基中培养, 选择根系健壮的绿苗置于 4 ℃ 春化 2 周后移栽至土钵中, 于 16 h 光照、20 ℃ 条件下生长。

1.3 转基因植株 PCR 鉴定

用 CTAB 法提取小麦叶片基因组 DNA^[11], 以 HA-P1 (AACCTTGGATCCATGGAGAAAAT-AGTGCTT) 和 HA- P3 (AGGAGGGCTTTC-CCAGGTAT) 为引物, 进行 PCR 扩增, 可产生 487 bp 的 HA 基因特异 DNA 片段。扩增条件为: 95 ℃ 预变性 4 min, 94 ℃ 变性 40 s, 58 ℃ 复性 40 s, 72 ℃ 延伸 40 s, 34 个循环, 72 ℃ 延伸 8 min。PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳检测。

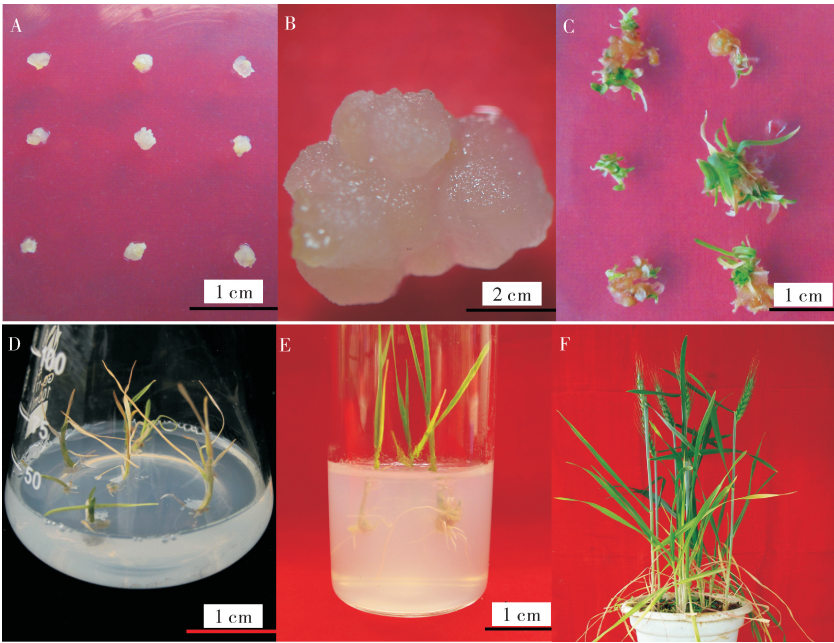
1.4 转基因植株 Southern 鉴定

对 PCR 鉴定为阳性的转基因植株和未转化对照植株, 取约 15~20 μg 基因组 DNA 经 Hind III 酶切、电泳, 以 α-P³²dCTP 标记的 Ubiquitin 启动子基因为探针进行 Southern 杂交^[11]。

2 结果与分析

2.1 基因枪转化及植株再生

取开花后 13~15 d 的麦穗, 剥出小麦幼胚, 盾片向上接种于愈伤诱导培养基中培养 5~7 d, 诱导形成愈伤组织(图 1-A), 用于基因枪转化; 转化的愈伤恢复培养 2~3 周后开始分化出胚性愈伤组织(图 1-B); 胚性愈伤在筛选培养基中培养 2~3 周, 少数愈伤组织可分化形成绿芽(图 1-C), 将绿芽转入生根筛选培养基培养 3~4 周(图 1-D), 存活下来的绿苗转至生根培养基上培养, 直至长出新根系(图 1-E); 筛选获得的幼苗春化后移栽到土钵中, 于温室生长至开花结实(图 1-F)。



A. 离体幼胚诱导培养 5~7 d 后形成愈伤 Callus on induction after 7 days; B. 恢复培养后的愈伤 The state of transformants after 10 days; C. 分化筛选 2~3 周后分化出绿色小芽 Plant regeneration from callus on PPT selection media; D. 筛选 3~4 周后的幼苗 Re-generated resistant plants on PPT selection media; E. 抗性苗生根 Root regeneration of transformed wheat; F. 在温室生长并正常结实的转基因植株 Transgenic plants.

图 1 转基因小麦的筛选及生长

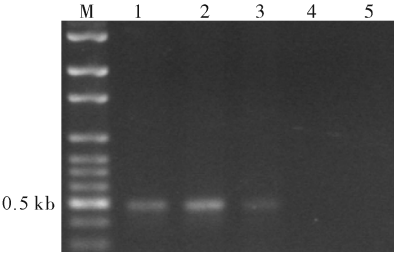
Fig. 1 Wheat transformation and growth of transgenic plants

2.2 转基因小麦 PCR 鉴定

根据在生根培养基中幼苗的生长状态, 选择根

系发育良好的 T₀ 代健壮幼苗, 取叶片提取基因组 DNA, 同时提取未转化对照植株叶片 DNA, 以禽流

感表面抗原 *HA* 基因特异引物 HA-P1 和 HA-P3 进行 PCR 扩增。结果表明,在筛选出来的植株中,有 3 株产生 487 bp 的特异 DNA 片段,而未转化的野生型植株及其他对照均没有 PCR 产物(图 2),表明这些转基因植株的基因组中含有目的基因。



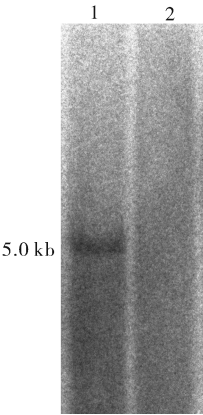
M, 100 bp DNA 分子质量标记; 泳道 1~3. 阳性植株; 泳道 4. 水对照; 泳道 5. 阴性对照。M. 100 bp DNA ladder marker; Lanes 1-3. Positives; Lane 4. Water; Lane 5. Negative control.

图 2 T_0 代转基因植株的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of transgenic T_0 plants

2.3 转基因植株 Southern 鉴定

为了进一步验证转基因小麦基因组中确实含有转入的 *HA* 基因,将上述 PCR 鉴定筛选获得的阳性转基因植株自交产生 T_1 代,种植后取 T_1 代植株叶片提取基因组 DNA,经 *Hind* III 酶切后进行 Southern 杂交,以 Ubiquitin 启动子为杂交探针,结果如图 3 所示,在转基因株系中检测到杂交信号带,而未转化的野生型植株则没有信号,这个结果证明,本研究中的禽流感病毒表面抗原 *HA* 基因,确实已经整合到小麦的基因组中,也可遗传到下一个世代,而且在该转基因株系的基因组中仅具有 1 个拷贝。



泳道 1. 转基因植株;泳道 2. 未转基因植株。Lane 1. Transgenic plant; Lane 2. Non-transgenic plant.

图 3 T_1 代转基因小麦 Southern 杂交

Fig. 3 Southern blot of transgenic T_1 plants

3 讨 论

植物作为生物反应器具有经济、安全、可靠等优点。小麦既为人类食用,也可用作禽类饲料,小麦籽粒容易储藏运输,利用麦类作物表达的动物疫苗,可随种子蛋白在室温保存而不丧失活性,疫苗生产成本低,特别适合于边远地区应用。如能筛选获得高效表达禽流感病毒抗原的小麦株系,收获的籽粒可以直接用作禽类饲料,饲喂动物后诱导动物机体产生特异抗体,从而增强动物的抗禽流感能力,降低感病机率,保障养禽业的发展。

本研究将禽流感主要表面抗原 *HA* 基因成功转入小麦基因组中,并在转基因 T_1 代中检测到转基因的存在,为进一步筛选高效表达禽流感疫苗的小麦材料奠定了基础。

参 考 文 献

[1] PEITIS J S,DE-JONG M D,GUAN Y. Avian influenza virus (H5N1):a threat to human health[J]. Clin Microbiol Rev, 2007,20:243-267.

[2] 曹梅,田夫林,庄文忠. 禽流感病毒血凝素分子生物学研究进展[J]. 动物医学进展,2004,25(2):35-37.

[3] 刘颖,唐秀英,吴凤鸣. 禽流感疫苗的研究进展[J]. 广东农业科学,2009(1):86-93.

[4] FISCHER R,LIAO Y C,HOFFMANN K,et al. Molecular farming of recombinant antibodies in plants[J]. Biol Chem, 1999,380(7/8):825-839.

[5] FISCHER R,STOEGER E,SCHILLBERG S,et al. Plant-based production of biopharmaceuticals[J]. Curr Opin Biotechnol, 2004 (7):152-158.

[6] STREATFIELD S J,LANE J R,BROOKS C A,et al. Corn as production system for human and animal[J]. Vaccine, 2003, 21:812-815.

[7] 郭小玲,崔红. H5N1 型禽流感病毒 *HA* 基因在烟草中的表达[J]. 厦门大学学报,2006, 45(1):126-128.

[8] 宋长征,MASON H S. 禽流感病毒血凝素疫苗在转基因马铃薯中的表达[J]. 生物技术,2001,11(5):3-4.

[9] 张鹏,廖玉才,李和平,等. 禽流感病毒 *HA* 基因在拟南芥中的表达[J]. 华中农业大学学报,2009,28(4):386-389.

[10] 张占路,唐益雄,薛文通,等. 百脉根表达 H5N1 亚型禽流感血凝素的研究[J]. 中国农业科学,2008,41(1):303-307.

[11] LI H P,ZHANG J B,SHI R P,et al. Engineering *Fusarium* head blight resistance in wheat by expression of a fusion protein containing a *Fusarium*-specific antibody and an antifungal peptide[J]. Molecular Plant-Microbe Interaction, 2008, 21: 1242-1248.

Transformation of wheat with a hemagglutinin gene from H5N1 subtype of avian influenza

CHANG Xiang-bo^{1,2} LIAO Yu-cai^{2,3} LI He-ping^{1,2}

1. *College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

2. *Molecular Biotechnology Laboratory of Triticeae Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;*

3. *College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract To develop a method for the production of avian influenza proteins in wheat as an oral vaccine, a gene encoding hemagglutinin (HA) of avian influenza H5N1 was constructed in a wheat expression vector with promoter of cereal crops. The constructed vector DNA was bombarded into immature embryos of an elite wheat cultivar Zheng 9023. Calluses induced on media supplemented with 5 mg/L phosphinothricin (PPT) were screened and transferred to media containing 4 mg/L PPT for rooting and regeneration. The PPT-resistant green plantlets derived from the rooting media were identified by PCR, and the transgenic wheat plants carrying the *HA* gene were obtained. Southern blot analysis of T₁ transgenic plants demonstrated that the *HA* gene was indeed integrated into the wheat genome with a single copy integration pattern. These results provide materials for further investigating expression of avian influenza *HA* gene and accumulation of its protein in wheat seeds.

Key words avian influenza; bombardment; wheat; plant bioreactor

(责任编辑: 杨锦莲)