

BVDV 基因 E_0 在人参发根的转化及其分子检测

李 然,臧 埔,郜玉钢,马 琳,王亚星,李 学,李 萍,张连学
(吉林农业大学中药材学院,长春 130118)

摘要:将重组鹿源 BVDV 基因 E_0 植物表达载体(pBI121/ E_0),通过发根农杆菌 Ri 介导,用叶盘法转化得到人参发根,分别用 PCR、RT-PCR 检测其转化情况。结果表明:获得了转鹿源 BVDV 基因 E_0 人参发根,鹿源 BVDV 基因 E_0 已整合到人参发根基因组中并得到了转录,为研制转基因人参发根疫苗提供了科学依据和材料。

关键词:BVDV; E_0 基因; 人参发根; RT-PCR

中图分类号:Q789

文献标志码:A

论文编号:2010-3434

Transformation and Molecular Detection of BVDV Gene E_0 in Ginseng Hairy Roots

Li Ran, Zang Pu, Gao Yugang, Ma Lin, Wang Yaxing, Li Xue, Li Ping, Zhang Lianxue

(College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

Abstract: Ginseng hairy roots were induced by leaf disc method, and recombinant plant expression vector (pBI121/ E_0) of BVDV gene E_0 of deer was transformed into ginseng hairy roots by *Agrobacterium rhizogenes* with Ri-plasmid. E_0 in ginseng hairy roots was detected by PCR, RT-PCR methods. The results indicated that E_0 transgenic ginseng hairy roots were obtained. E_0 was transferred into Ginseng hairy roots, and expressed in ginseng hairy roots.

Key words: BVDV; E_0 ; ginseng hairy roots; RT-PCR

0 引言

牛病毒性腹泻病毒(BVDV)呈世界性分布, BVDV 易感动物较多,如鹿、牛、猪、羊等,且它们间可相互传染^[1-5]。该病毒引起的疾病全年均可发生,且动物感染 BVDV 阳性率逐年提高^[6,7]。BVDV 可导致动物的病毒性腹泻、粘膜病、繁殖力下降、持续性感染与免疫耐受、血小板减少和出血性综合症等多种临床症状, BVDV 还可导致非典型性猪瘟,给鹿业和奶牛业及养猪业造成极大的危害^[8]。但由于 BVDV 灭活苗免疫原性较差、保护力低, BVDV 活毒苗不安全原因,到目前为止国内还没有正式的国产 BVDV 疫苗可供使用^[9-10]。转基因植物疫苗具有低成本、安全、有效、使用方便等

优点,但由于栽培受环境等因素的影响,不适合工业化生产^[11-12]。本研究以可工业生产的人参发根作为生物反应器,不仅可以表达 BVDV 保护性抗原基因,还可产生人参皂甙等免疫佐剂增强物质^[13],从而为药用植物与疫苗联合应用开辟新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

菌株:发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)A₄ (pBI121/ E_0)菌株由本实验室构建和保存。2年生人参根、茎、叶取自吉林农业大学药植园。

主要试剂:ExTaq、dNTPs、MarkerDL2000、特异性引物、琼脂糖等均购自大连宝生物技术有限公司;YEB

基金项目:科技部项目“梅花鹿高效养殖加工关键技术的研究与应用”(2009GJB10031);国家科技支撑计划项目“平地栽参关键技术研究”(2007BAI38B01);中国博士后科学基金项目“鹿源牛病毒性腹泻病毒 E_0 基因在人参发根中表达及免疫原性研究”(20090461042)。

第一作者简介:李然,男,1985年出生,山东人,硕士研究生,研究方向:生药学。通信地址:130118 吉林省长春市新城大街2888号吉林农业大学中药材学院, Tel: 0431-84556226, E-mail: pullox@163.com。

通讯作者:郜玉钢,男,1969年出生,吉林人,副教授,博士,研究方向:生药学。通信地址:130118 吉林省长春市新城大街2888号吉林农业大学中药材学院, Tel: 0431-84556226, E-mail: gaoyugang_2006@163.com;张连学,男,1955年出生,吉林人,教授,博导,博士,研究方向:中药学。E-mail: zlxbooksea@163.com。

收稿日期:2010-11-26, **修回日期:**2010-12-31。

培养基、MS 培养基所需试剂等均购自北京鼎国生物技术有限公司；植物总 DNA 和 RNA 提取试剂盒购于天根公司。

1.2 方法

1.2.1 发根农杆菌 A4(pBI121/E₀) 菌株的培养 诱导发根前, A₄(pBI121/E₀) 菌株接种在 YEB 固体培养基上划线培养, 27℃ 活化 3 次, 挑取平板上的单菌落, 接种在 25 mL YEB 液体培养基中, 27℃、110 r/min 摇床上培养过夜, 备用。

1.2.2 人参发根的诱导与筛选 取生长健壮的 2 年生人参根、茎、叶, 用肥皂水洗净, 70% 酒精及 0.1% 氯化汞消毒, 无菌水冲洗 3 次, 将其分别切成 2~3 mm 的薄片, 置于无激素的 MS 固体培养基上预培养 1~2 天。利用无菌注射器将培养过夜的微量 A₄(pBI121/E₀) 菌液直接滴加在上述预培养的根片上, 在 25℃ 下暗培养诱导发根。将长至 1 cm 左右的小发根切下, 接于含有 500 mg/L 氨基青霉素的 MS 基本培养基上进行灭菌处理。每隔 5~7 天转移 1 次, 直至无细菌生长。无菌的发根培养在不含激素的 MS 和 1/2MS 固体培养基上, 每 4 周继代 1 次。

1.2.3 发根的分子检测 采用天根总 DNA 和 RNA 提取试剂盒提取人参发根 DNA 和 RNA。根据已报道 E₀ 基因序列保守区, 分别设计并合成特异性引物, 使用 PCR 和 RT-PCR 检测该基因在人参毛状根基因组中是否得到了整合和转录。

2 结果与分析

2.1 人参发根的诱导与筛选结果

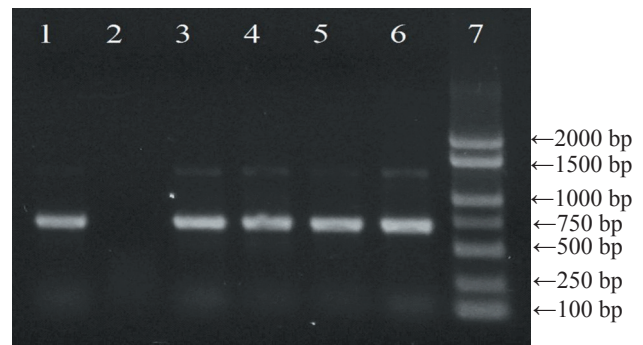
发根农杆菌 A₄(pBI121/E₀) 菌株成功诱导出人参发根, 该发根在固体和液体培养基上得到很好的继代(图 1)。



图 1 液体培养基上继代培养的人参发根

2.2 人参发根 DNA 的 PCR 检测

以人参发根 DNA 为模板进行 PCR 检测, 电泳结果显示(图 2), 人参发根 DNA 扩增出约 705 bp 条带,



1,3,4,5,6: 人参发根 DNA 的 PCR 结果; 2: 空白组; 7: DL2000

图 2 人参发根 E₀ 基因的 PCR 检测结果

证明 E₀ 基因已整合到人参发根基因组中。

2.3 人参发根总 RNA 提取及 RT-PCR 检测

使用天根植物总 RNA 提取试剂盒提取人参发根的总 RNA, 对提取的总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测(图 3), 证明提取到了质量较高的人参发根 RNA。以人参发根 RNA 为模板进行反转录得到 cDNA 并进行 RT-PCR, 电泳结果显示扩增出约 705 bp 条带(图 4)。证明 E₀ 基因已整合到人参发根基因组中并在人

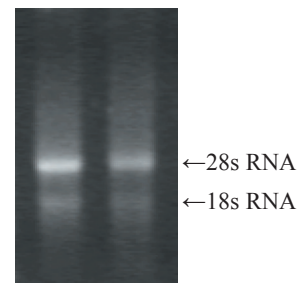
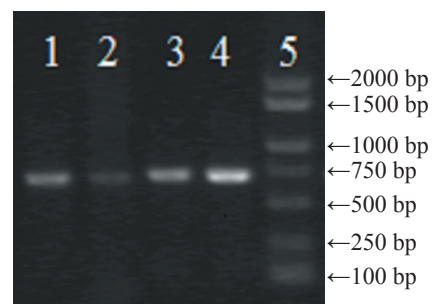


图 3 人参发根总 RNA 的电泳检测



1,2,3,4: 人参发根 DNA 的 RT-PCR 结果; 5: DL2000

图 4 人参发根中 E₀ 基因的 RT-PCR 检测

参发根基因组中得到了转录。

3 结论与讨论

本研究成功构建了重组鹿源 BVDV 分离株 E₀ 基因植物表达载体(pBI121/E₀), 通过发根农杆菌 Ri 介导, 用叶盘法获得了转鹿源 BVDV 基因 E₀ 人参发根, 鹿源 BVDV 基因 E₀ 已整合到人参发根基因组中并得

到了转录。

牛病毒性泻病毒(BVDV)是严重危害鹿、牛、猪等养殖业的病原之一。BVDV 灭活苗虽然安全性好,但是由于灭活苗免疫原性较差,它对保护胎儿的有效性方面很多学者存在置疑,Zimmer G.M.等^[14]报道间隔3周免疫两次灭活苗对牛群只提供了60%的保护力。BVDV 活毒疫苗虽然可以刺激机体产生较高滴度的抗体,对胎儿也具有一定的保护力,但是从活毒疫苗问世至今,它的安全性问题一直是人们关注的焦点。早在1965年就有接种活毒疫苗后引起粘膜病的报道。活毒疫苗的安全性主要存在两方面的问题,一是会感染胎儿引起或多或少的临床症状,二是还会引起免疫抑制作用^[15]。活毒疫苗还可能存在NCP型BVDV污染的问题,接种了这种污染的疫苗极容易引起发病和免疫失败^[16-18]。王新平报道应用BVDV弱毒苗后该病仍有流行的可能。可见在BVDV疫苗的研制方面还需要开展很多工作,基因工程疫苗研制已成为研究热点。

1993年Reddy等^[19]提出可以通过增加 E_2 基因的数量和用细胞介素做为佐剂等方法来提高疫苗的有效性。1996年Bolin和Ridpath、1997年Bruschke等先后报道了BVDV E_2 基因疫苗的研制。Christianne J.M.等^[20]1999年报道了多价的 E_2 基因疫苗可以部分抵抗4个同源株的攻击,但保护率不高。Isabelle Nobiron等^[21]报道了编码仅含有 E_2 糖蛋白的DNA疫苗抵抗同源病毒的攻击,使得50%左右的实验动物未发生病毒血症。郜玉钢将梅花鹿源BVDV CCSYD株 E_0 基因分别用原核表达质粒pET28a和真核表达质粒PVAX 1中进行了表达,研制的梅花鹿源CCSYD株 E_0 基因苗免疫家兔产生了体液免疫和细胞免疫应答,其免疫源性比灭活苗效果好^[22-25]。何海娟^[26]将VEDEVAC-Like株BVDV E_0 、 E_1 和 E_2 基因在原核表达载体pGEX-6P-1进行了表达。吴立君^[27]将VEDEVAC株BVDV E_0 基因在杆状病毒表达系统和毕赤酵母表达系统中进行了表达。吴明福^[28]将C₂₄V株BVDV E_2 基因在真核表达载体上pcDNA3.1(+)进行了表达。徐兴然^[29]使长春184株BVDV E_2 基因在原核表达载体pET28a中进行了表达。基因 E_0 和 E_2 均为其保护性抗原基因,但 E_2 基因保守性低,是BVDV逃逸的主要原因,而 E_0 基因保守性高,更适合做基因工程疫苗。

研究表明人参皂苷对新城疫、禽流感、狂犬病、口蹄疫等病毒疫苗有免疫增强的作用^[30-32]。发根农杆菌A₄菌株诱导人参产生发根诱导率为31.6%,且诱导的发根系R9923人参发根总皂苷含量达15.2 mg/g,其中人参皂苷Rb₁的含量为68.3%(10.38 mg/g),超过栽培6

年生人参根中Rb₁含量(6.45 mg/g),比3年生栽培人参中Rb₁含量高1.3倍。人参发根还可进行工厂化培养。用构建成的LBA4404(pBI rolC)工程菌转化人参子叶,可获得发根的表达^[33-38]。可见,人参是转基因植物的理想材料。人们将人胰岛素、乙肝病毒表面抗原、人干扰素在人参愈伤组织中进行了表达^[39-42]。综上,在研制BVDV各种疫苗方面,国内外均做了大量有价值的工作,但多集中在亚单位疫苗和核酸疫苗方面,而BVDV转基因植物疫苗的研究尚未见报道。本研究建立了人参发根的表达系统,为利用人参发根生产转基因植物疫苗打下坚实基础,为珍贵药用植物与疫苗联合应用开辟新思路。本研究选用的鹿源BVDV保护性抗原基因 E_0 具有较高的保守性,对不同BVDV毒株均有预防作用,对鹿更有免疫针对性。

本研究虽然成功构建了重组鹿源BVDV分离株 E_0 基因植物表达载体(pBI121/ E_0),通过发根农杆菌Ri介导,用叶盘法获得了转鹿源BVDV基因 E_0 人参发根,使鹿源BVDV基因 E_0 整合到人参发根基因组中并得到了转录,但其能否获得高效表达和是否具有强免疫原性及其机理尚需进一步的研究。通过比较发现,所培养的转BVDV E_0 基因人参发根的根系比普通人参发根的根系发达,可能与转入BVDV E_0 基因有关,但其机理目前尚不清楚,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 王新平,刘红,宣华,等.绵羊感染牛病毒性腹泻病毒的调查研究[J].兽医大学学报,1993,13(3):219-221.
- [2] 王新平,宣华,朱维正,等.鹿感染牛病毒性腹泻—粘膜病病毒的调查[J].中国畜禽传染病,1995(4):41-42.
- [3] Doyle L G, Heuschele W P. bovine viral diarrhea virus infection in Captive exotic ruminants[J]. T Am Vet Med Assoc,1983,183: 1257-1259.
- [4] 杜锐,王新平,宣华,等.从幼鹿顽固性腹泻病料中检出牛病毒性腹泻—粘膜病病毒[J].经济动物学报,1998,2(1):41-43.
- [5] 杜锐,杜威,王树志.粘膜病毒感染幼鹿的病原流行病学调查[J].吉林农业大学学报,2000,22(3):89-91.
- [6] 刘亚刚,殷中琼,刘世贵.牦牛病毒性腹泻/粘膜病的防制研究[J].中国预防兽医学报,2003,25(6):487-490.
- [7] 舒展,卢旺银,陈轶霞.牦牛病毒性腹泻—粘膜病的诊断和防制[J].中国兽医科技,2001,31(4):35-36.
- [8] 王新平,宣华,朱维正,等.鹿感染牛病毒性腹泻—粘膜病病毒的调查[J].中国畜禽传染病,1995,4:45-46.
- [9] 群吉.猪瘟弱毒疫苗对牦牛病毒性腹泻预防效果[J].青海畜牧兽医杂志,2003,33(2):49-51.
- [10] 郜玉钢.鹿源BVDV分离鉴定、 E_0 基因的克隆与表达及免疫原性研究[D].吉林:吉林农业大学,2005.
- [11] 曾作财,张晓东,王金洛,等.转基因植物作为生物反应器在畜禽疫

- 苗生产中的应用[J].生物技术通报,2010(5):27-32.
- [12] 李轶女,胡英考,沈桂芳.转基因植物基因工程疫苗[J].生物技术通报,2002(2):11-15.
- [13] 褚秀玲,苏建青,韦旭斌.人参皂苷免疫调节和抗病毒作用研究进展[J].中兽医医药杂志,2008(5):20-23.
- [14] Zimmer G M. Failure of foetal protection after vaccination against an experimental infection with bovine virus diarrhoea virus[J]. *Veterinary Microbiology*,2002,89:255-265.
- [15] Van Oirschot J T. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhoea [J]. *Veterinary Microbiology*,1999,64:169-183.
- [16] Gratzek J B, Segre D, Berman D T. Detection and isolation of a virus contaminating a stock of virus diarrhoea virus[J]. *Am. J. Vet. Res.*,1964,25:37-379.
- [17] Nuttall P A, Luther P D, Stott E J. Viral contamination of bovine foetal serum and cell cultures[J]. *Nature*,1977,266:835-837.
- [18] Tamoglia T W. Laboratory evaluation of bovine respiratory disease vaccines for safety[J]. *JAVMA*,1968,152:847-850.
- [19] Reddy D N. Immunopotential of bovine respiratory disease virus vaccines by interleukin-1 b and interleukin-2[J]. *Vet. Immunol. Immunopath.* 1993,37:25-38.
- [20] Christianne J M. An experimental multivalent bovine virus diarrhoea virus E2 subunit vaccine and two experimental conventionally inactivated vaccines induce partial fetal protection in sheep[J]. *Vaccine*,1999,17:1983-1991.
- [21] Isabelle Nobiron. DNA vaccination against bovine viral diarrhoea virus induces humoral and cellular responses in cattle with evidence for protection against viral challenge[J]. *Vaccine*,2003,21:2082-2092.
- [22] 郜玉钢.鹿源BVDV分离鉴定、E0基因的克隆与表达及免疫原性研究[D].吉林:吉林农业大学,2005.
- [23] 郜玉钢,杜锐,王全凯,等.牛病毒性腹泻病毒梅花鹿分离株E0基因的克隆与表达[J].中国兽医学报,2005,25(4):353-355.
- [24] 王楠,杜锐,郜玉钢,等.鹿源牛病毒性腹泻病毒核酸疫苗免疫实验研究[J].吉林农业大学学报,2006,28(2):201-203.
- [25] 王铁,郜玉钢,王楠,等.梅花鹿源牛病毒性腹泻病毒分离株油剂灭活苗的制备和免疫效果观察[J].经济动物学报,2006,10(3):142-144.
- [26] 何海娟.BVDV囊膜蛋白E0、E1和E2基因的克隆及原核表达[D].哈尔滨:东北农业大学,2005.
- [27] 吴立君.BVDV E0基因的真核表达与E2基因真核表达载体的构建[D].哈尔滨:东北农业大学,2006.
- [28] 吴明福.牛病毒性腹泻病毒全基因克隆及核酸疫苗初步研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2007.
- [29] 徐兴然,涂长春,余兴龙,等.牛病毒性腹泻病毒Changchun184株E2基因的克隆及在大肠杆菌中的高效表达[J].中国预防兽医学报,2005,27(2):98-101.
- [30] 孔祥峰,胡元亮,李祥瑞,等.9种中药成分对新城疫IV系疫苗免疫雏鸡血清中血凝抑制抗体水平的影响[J].畜牧兽医学报,2004,35(4):468-472.
- [31] 呼显生,姜成,刘芳,等.人参皂甙Rb1对禽流感疫苗的免疫佐剂作用[J].黑龙江畜牧兽医,2006(1):80-82.
- [32] 史秀山,人参皂甙Rb1提高狂犬病疫苗免疫效果的研究[J].中国热带医学,2005,5(1)22-24.
- [33] 赵寿经,杨振堂,李昌禹,等.发根农杆菌诱导人参产生发根及离体发根中人参皂甙含量的测定[J].吉林农大学学报,2001,23(2):57-63.
- [34] 赵寿经,杨振堂,李昌禹,等.发根农杆菌介导的人参遗传转化及人参皂甙工厂化生产[J].云南大学学报:自然科学版,1999,21(3):142.
- [35] 赵寿经,杨振堂,李昌禹,等.人参高产发根无性系的筛选及其高效液体培养[J].中国农业科学,2000,33(5):103-105.
- [36] 赵寿经,蒋磊,李军华,等.高产人参发根系的建立及发根中皂甙Rb1的分离纯化[J].吉林大学学报:工学版,2006,36(4):622-627.
- [37] 李昌禹,赵寿经,臧埔,等.人参发根R9923系皂甙生产研究[J].特产研究,2004(3):11-15.
- [38] 赵寿经,李昌禹,骆晓佩,等.诱导人参发根的roIC基因植物表达载体构建及其在人参中的表达[J].中国生物工程杂志,2004,24(9):58-62.
- [39] 汪春义,戚凤春,陈桂玲,等.表达人胰岛素的人参愈伤组织细胞系的建立[J].中国生物制品学杂志,2007,20(11):818-820.
- [40] 刘丹,盛军,刘晓宇,等.表达乙肝病毒表面抗原人参细胞系统的建立[J].中国生物制品学杂志,2005,18(6):454-456.
- [41] 任琦,盛军,任志霞.人干扰素基因植物表达载体的构建及其在人参愈伤组织细胞中的表达[J].中国免疫学杂志,2006,22(9):852-855.
- [42] 刘丹,于海鹏,盛军,等.乙肝病毒表面抗原基因在人参细胞中的表达[J].植物生理与分子生物学学报,2005,31(5):551-554.