

文章编号:1674-7054(2011)03-0204-05

牙龈卟啉菌菌毛基因在转基因番茄果实中的 特异表达及小鼠免疫实验

戴海燕¹,王 华²,文少敏¹,解 娜¹,邓芳成¹

(1. 海南医学院 口腔医学院,海南 海口 570102; 2. 海南医学院 海南省热带病重点实验室,海南 海口 571101)

摘 要: 将编码牙龈卟啉菌菌毛蛋白(Fimbrillin, FimA) (第266~337 Aa)与霍乱毒素B亚基(CTB)基因用农杆菌侵染法转入番茄植株,并利用番茄果实特异启动子E8使其在果实中实现特异表达,然后用特异表达的转基因番茄果实对实验小鼠进行口服免疫实验,研究转基因番茄果实的免疫原性。实验结果表明:获得的11株转化植株中,共有9株重组了CTB-FimA基因的植株在番茄果实中实现了特异表达;口服转基因番茄果实的免疫小鼠的血清中检测到抗FimA抗体;获得了以CTB为佐剂的在番茄果实中特异表达牙龈卟啉菌菌毛基因的植物口服疫苗候选植株。

关键词: 番茄; 牙周炎; FimA; CTB; E8启动子

中图分类号: Q 819

文献标志码: A

牙周炎是发生在牙齿支持组织的炎症,在世界范围内均有较高的患病率,在我国的患病率达到90%以上。牙周炎是导致成年人牙齿丧失的主要原因,且牙周炎的治疗仅在早期治疗效果较好,但牙周病治疗效果的不显著性以及治疗后的复发等问题一直困扰着临床口腔医生,为此,研究有效、可靠的疫苗来防治牙周炎已成了各国学者们追逐的热点。尽管多数学者认为牙周炎非单一细菌感染,但牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P. gingivalis*)是目前公认的慢性牙周炎的主要致病菌,牙龈卟啉单胞菌的存在与牙周炎治疗后复发或病情继续加重有关^[1]。菌毛是牙龈卟啉单胞菌主要毒力因子,菌毛蛋白(Fimbrillin, FimA)是其主要的亚单位,在其定植和侵入牙周组织过程中起着重要作用,因此,牙周炎疫苗的研究多以牙龈卟啉单胞菌菌毛作为抗原。

与常规疫苗相比较,转基因植物疫苗有其特有的优势,如无需冷藏、注射,可食用,廉价、安全和使用方便等,因此世界卫生组织提倡开展植物口服疫苗的研究^[2]。转基因植物疫苗作用方式为投递于胃肠道粘膜表面,进入粘膜淋巴组织。霍乱毒素B亚基(CTB)是转基因植物疫苗的良好佐剂,文献^[3]的研究结果表明,使用霍乱毒素B亚基为载体蛋白构建的重组CTB-FimA(第266~337 Aa)质粒转化马铃薯制备可食植物疫苗的方法是可行的。但因马铃薯不是鲜食蔬菜,高温煮熟会对目的蛋白有一定的破坏,进而可能影响其免疫原性;而番茄可以生吃,且以其作为转基因植物对象的研究也比较成熟。E8启动子是1987年Lincoln等人发现的番茄果实特异性启动子,在番茄果实自然成熟或由乙烯催熟的过程中,E8启动子控制下的基因转录水平会骤然提高^[4]。从转录起始位点至1 088 bp处约1.1 kb的片段为启动子的核心序列,这部分对于其控制下的基因的特异性转录已经足够^[5]。因此,本研究采用番茄果实特异启动子E8的核心序列来驱动外源基因,培育出在番茄果实中特异表达CTB-FimA的植物口服疫苗,为寻求一种有效防治牙周炎的植物疫苗奠定实验基础。

收稿日期: 2011-06-24

基金项目: 海南省自然科学基金资助项目(807096)

作者简介: 戴海燕(1974-),女,安徽宿州人,海南医学院口腔医学院副主任医师、副教授,硕士。

通信作者: 戴海燕, E-mail: daihy068@126.com

1 材料与方法

1.1 植物材料 采用金丰一号番茄培养无菌苗,取其子叶做为转化外植体。金丰一号番茄(*Lycopersicon esculentum* cv1 Jinfeng 1) 购自广州市蔬菜科学研究所。

1.2 农杆菌菌种 用本课题组已成功构建的含番茄果实特异启动子 E8 基因和 CTB-FimA (第 266 ~ 337 Aa) 基因的载体重组质粒 pBIE8-CTB-FimA(第 266 ~ 337 Aa) ^[4] 转化根癌农杆菌。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 EHA105。

1.3 农杆菌介导的番茄遗传转化 农杆菌介导的番茄遗传转化方法参照文献 [4] 的方法。取生长期约 10 d 的无菌子叶,将无菌子叶在芽分化培养基 M1(MS + 6-BA $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 上预培养 2 d 后,用重组农杆菌侵染子叶,在铺有烟草悬浮细胞的 M1 上进行看护共培养 2 d 后,转入含有卡那霉素 (Kanamycin, Kan) $75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、羧苄青霉素 (Carbenicillin, Cb) $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 M1 选择培养基上,诱导芽再生,待芽长到 2 ~ 3 cm 时切下,将芽放在 M2: MS + IAA $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Kan $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + Cb $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 上进行诱导生根,然后将根系生长良好的转化植株移入温室中种植。

1.4 转基因植株的鉴定分析

1.4.1 PCR 检测 采用 CTAB 法提取转基因番茄植株总 DNA。PCR 引物为 P1: 5' - TC ATCGAT AGG AAT TTC ACG AAA TCG GCC CT - 3' 和 P2: 5' - AT GAG CTC TTA TTG TCC TTG GGT AAT AGC ACC - 3', 由上海生物工程技术服务有限公司合成。扩增条件是: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 进行 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min; 将 PCR 产物作琼脂糖电泳。

1.4.2 Southern blot 检测 分别提取 PCR、Southern blot 阳性番茄植株总 DNA 约 10 μg , 用 *Clai* 和 *SacI* 37 °C 酶切消化过夜。电泳后, 进行 Southern 印迹转移、杂交, 方法见文献 [7]。实验使用 Boehringer Mannheim 公司生产的 DIGDNA Labeling and Detection Kit, 以基因 CTB-FimA (第 266 ~ 337 Aa) 片段为模板进行探针标记。

1.4.3 RT-PCR 利用 RNA 抽提纯化试剂盒 (上海华舜生物工程有限公司), 分别提取 Southern blot 阳性转化植株果实和叶片的总 RNA, 用 RT-PCR 试剂盒 (Boehringer Mannheim 公司) 进行反转录, 再以反转录产物为模板, P3 (5' - ATG ATC AAG CTC AAG TTT G - 3') 和 P4 (5' - TTA TTG TCC TTG GGT AAT AGC ACC - 3') 为引物进行 PCR 扩增 (非转化植株果实和叶片作为对照)。

1.4.4 Western blot 检测 取约 200 mg 转基因番茄植株叶片和果实为实验材料。蛋白提取方法、SDS - PAGE 电泳分离蛋白质和 Western blot 杂交方法见文献 [4]。免疫反应所选用的 FimA 抗体和辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG, 由海南医学院提供。

1.5 动物免疫实验 将 18 只 90 d 的成年白仓小鼠 (Balb/c) 随机分为实验组、对照组和空白组, 每组 6 只。实验处理为分次在 0, 7, 14, 28 d 时, 对照组口服灌胃普通番茄 $10 \text{ g} \cdot \text{次}^{-1}$; 实验组口服灌胃转基因植株的番茄果实 $10 \text{ g} \cdot \text{次}^{-1}$; 空白组喂食普通鼠粮。处理 30 d 时经尾静脉采血, 离心取上清, -20 °C 保存。以间接 ELISA 方法检测血清中 IgG 的抗体水平。用纯化的 FimA 蛋白包被液 100 μL 包被 96 孔酶标板, 4 °C 过夜, 弃抗原液, $\varphi = 3\%$ 的胎牛血清封闭, 37 °C 孵育 40 min, 弃封闭液, 洗涤 3 次, 将待测血清加入酶标板, 每孔 100 μL , 经 37 °C 孵育 2 h 后, 加入辣根过氧化物酶标记。加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG, 经 37 °C 孵育 2 h 后, 加入柠檬酸磷酸盐底物反应液, 37 °C 显色 10 ~ 20 min, 当出现明显颜色变化时, 在酶标板中加 50 μL 终止液终止反应, 在酶标仪上波长为 450 nm 处测定各反应孔的 OD 值。数据采用 SPSS10.0 软件进行 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 牙龈卟啉菌菌毛基因转化番茄植株的获得 预培养 2 d 的番茄子叶用工程根癌农杆菌侵染后, 转接到芽分化培养基上, 看护共培养 3 d, 然后再转移到选择性芽分化培养基上, 经过约 15 d 的选择培养后, 大部分子叶黄化或褐化, 逐渐死亡。少数子叶伤口的基部能长出黄绿色的愈伤组织, 约 10 d 后分化出绿色芽点, 待芽长到 2 ~ 3 cm 时, 切下并转入生根培养基, 当根系发达后, 移入温室种植。实验共获得 11 株抗性转化再生番茄植株。将抗性植株移入温室大棚, 专人看护培养至果实成熟, 并做进一步检测和鉴定。

2.2 转基因番茄植株的分子鉴定

2.2.1 PCR 筛选 利用引物 P1 和 P2,对获得的抗性转化再生苗进行 PCR 检测,有 11 株转化植株 PCR 扩增出预期约 1.7 kb 的电泳带(E8 1 100 bp + CTB-FimA 600 bp)。初步证明 CTB-FimA(第 266 ~ 337 Aa)融合基因已导入番茄植株,检测结果见图 1。

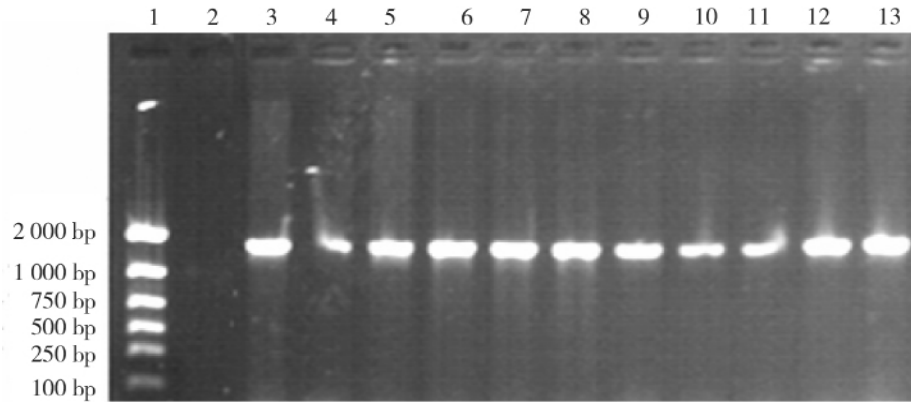


图 1 番茄转化植株的 PCR 检测结果

1. Marker; 2. 非转基因植株; 3 ~ 13. 转基因植株

2.2.2 Southern blot 杂交 对 PCR 检测为阳性的 11 株转化番茄植株进行 Southern blot 杂交,以 CTB-FimA (第 266 ~ 337 Aa) 基因片段作为标记探针,对番茄总 DNA 以 *Cla*I 和 *Sac*I 进行酶切消化,印迹杂交。杂交结果显示,有 9 株转化番茄的泳道出现了杂交信号,阴性对照的未转化番茄植株未出现杂交信号。根据阳性对照 重组质粒 pBIE8-CTB-FimA(第 266 ~ 337 Aa) 片段的大小进行推算,转化植株的杂交目的带大小约 1.7 kb [E8 1 100 bp + CTB-FimA (第 266 ~ 337 Aa) 600 bp],这进一步证实启动子、目的基因、终止子均已整合到番茄的基因组中(见图 2)。

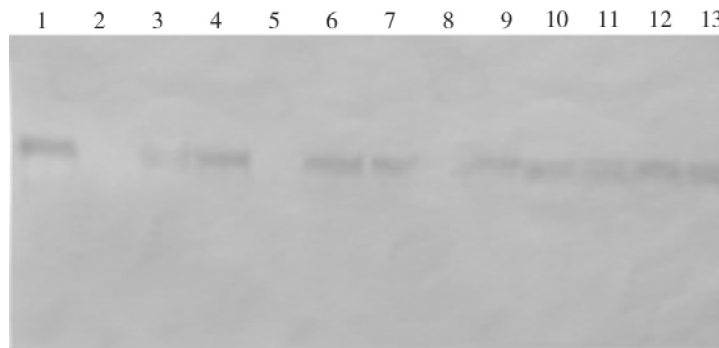


图 2 番茄转化植株的 Southern blot 检测结果

1: 阳性对照 pBIE8-CTB-FimA(第 266 ~ 337 Aa); 2: 非转基因植株; 3 ~ 13: 转基因植株

2.2.3 RT-PCR 分析 利用 CTB-FimA (第 266 ~ 337 Aa) 片段引物 P3 和 P4,对 Southern blot 阳性的植株进行 RT-PCR 分析。RT-PCR 分析结果初步表明,有 9 株转基因植株在果实特异启动子 E8 控制下,CTB-FimA(第 266 ~ 337 Aa) 融合基因在转录水平上仅在果实中获得表达(见图 3)。

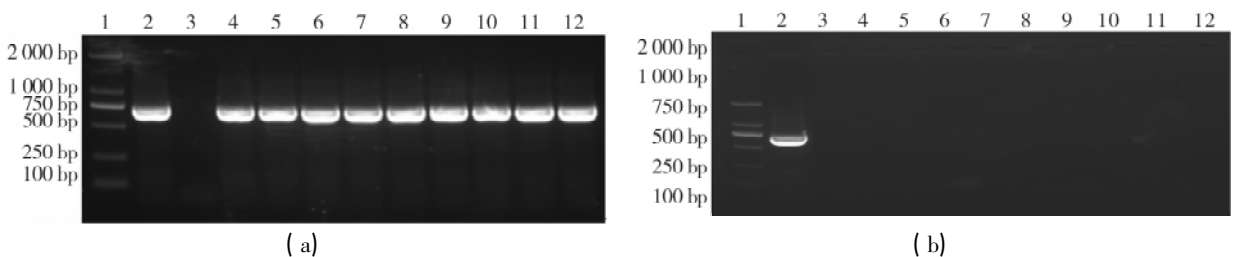


图 3 转基因植株的果实 (a) 和叶片 (b) 的 RT-PCR 检测结果

1. Marker; 2. 阳性对照; 3. 分别为非转基因植株的果实 (a) 和叶片 (b); 4 ~ 12. 分别为转基因植株的果实 (a) 和叶片 (b)

2.2.4 Western blot 分析 提取 RT-PCR 检测呈阳性的 9 株转基因植株的叶片和果实总蛋白,并利用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,蛋白分离后进行 Western blot,结果表明,在 9 株的果实中都出现蛋白杂交带,而在叶片中未出现蛋白杂交带,这说明 CTB-FimA (第 266 ~ 337 Aa) 融合蛋白在转基因番茄果实中存在特异表达(见图 4)。

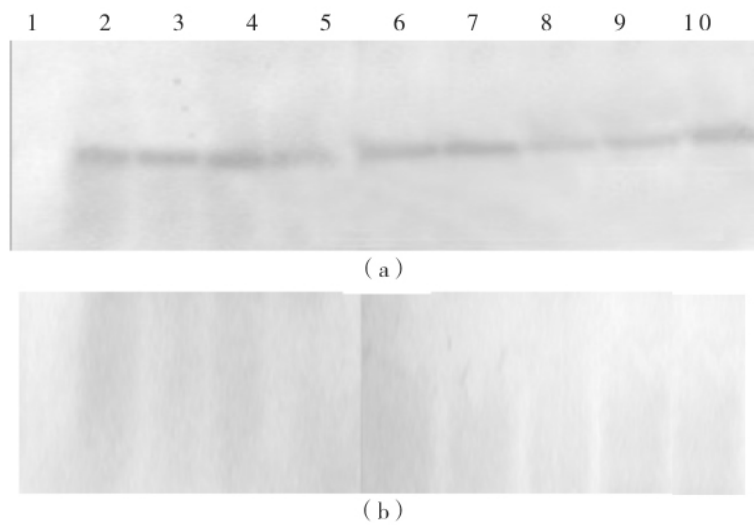


图 4 转基因植株的果实(a) 和叶片(b) 的 Western blot 检测结果

1. 分别为非转基因植株的果实(a) 和叶片(b) ;2 ~ 10. 分别为转基因植株的果实(a) 和叶片(b)

2.3 小鼠免疫效果分析 小鼠口服上述转基因番茄果实后,经 ELISA 检测,实验组小鼠血清中 IgG 含量明显高于对照组和空白组,差异极显著 ($P < 0.01$) (见表 1)。

表 1 小鼠口服转基因番茄果实后血清中 IgG 的含量

组 别	样本数目/只	血清 IgG/OD 值
实验组	6	0.185
对照组	6	0.011
空白组	6	0.012

3 讨 论

牙周炎是严重威胁人类口腔健康的感染性疾病,与许多疾病相关,如: 心血管疾病、中风、冠状动脉粥样疾病和糖尿病等。牙龈卟啉单胞菌是慢性牙周炎证据充分的致病菌,其表面成分菌毛是重要的致病因子之一。菌毛作为候选抗原被广泛地研究,不仅因为其位于细胞表面,更重要的是菌毛可介导牙龈卟啉单胞菌粘附于宿主组织表面或对其他微生物具有粘附作用。CTB 常被用作疫苗的佐剂,有实验结果表明,用 CTB 为佐剂联合菌毛蛋白经鼻腔免疫 BALB/c 鼠,免疫鼠的血清特异性 IgG 和唾液中的 IgA 均得到增加,且可以抑制牙龈卟啉单胞菌引起的牙槽骨的破坏,而单独用菌毛免疫 BALB/c 鼠产生抗体的量则远远不够^[8]。

本研究采用番茄果实特异启动子 E8 的核心序列来驱动外源基因,获得了番茄果实特异表达 CTB-FimA (第 266 ~ 337 Aa) 融合基因的转基因植株。为进一步了解所获得的转基因番茄是否有免疫原性,笔者又将转基因番茄果实给小鼠灌胃,经 4 周免疫后,检测小鼠血清中 IgG 的含量,结果发现小鼠体内产生了特异性抗体,与喂食普通番茄组和鼠粮组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。这说明转基因番茄果实至少有一部分可通过动物消化道不被降解,成为抗原刺激机体的粘膜免疫系统产生抗体。这个结果可以初步断定,小鼠口服了表达 CTB-FimA (第 266 ~ 337 Aa) 的转基因番茄果实后,具有一定的免疫原性,但在小鼠身上产生的抗体是否具有保护性,还有待于进一步研究。同时,转入的 CTB-FimA 基因表达的稳定性也需要在 F2、F3 代转基因植株中进行测定。

参考文献:

- [1] 孟焕新. 牙周病学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 55.
- [2] MOFFAT A S. Exploring transgenic plants as a new vaccine source [J]. 1995, 268(5211): 658 – 660.
- [3] SHIN E A, LEE J Y, KIM T G, et al. Synthesis and assembly of an adjuvanted *Porphyromonas gingivalis* fimbrial antigen fusion protein in plants [J]. Protein Expr Purif, 2006, 47(1): 99 – 109.
- [4] DEIKMAN J, KLINE R, FISCHER R L. Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Plant Physiology, 1992, 100: 2013 – 2017.
- [5] COUPE S A, DEIKMAN J. Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 5′ flanking regions of two fruit-ripening genes [J]. Plant J, 1997, 11(6): 1207 – 1218.
- [6] 戴海燕, 王华, 文少敏, 等. 牙龈卟啉菌菌毛 FimA 基因高效植物表达载体的构建 [J]. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2010, 11(11): 630 – 633.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [8] TAKAHASHI Y, KUMADA H, HAMADA N, et al. Induction of immune responses and prevention of alveolar bone loss by intranasal administration of mice with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae and recombinant cholera toxin B subunit [J]. Oral Microbiol Immunol, 2007, 22(6): 374 – 380.

Expression of *Porphyromonas Gingivalis* Fimbrillin Gene in the Fruit of Transgenic Tomato and Its Immunization Assay

DAI Hai-yan¹, WANG Hua², WEN Shao-min¹, Xie Na¹, DENG Fang-cheng¹

(1. School of Stomatology, Haian Medical College, Haikou 570102, China;

(2. Hainan Provincial Key Laboratory of Tropical Medicine, Haian Medical College, Haikou 570102, China)

Abstract: In this report, *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato with plasmid pBIE8-CTB-FimA (266 – 337) containing FimA and CTB gene with E8 promoter were performed, and the immunity of the transgenic tomato fruit as an edible vaccine by oral immunization of mice were determined. The results indicated that the transgenic plants were confirmed by Southern blot and RT-PCR; the fusion proteins from leaf and fruit tissue of transgenic plants were detected by Western blot; specific anti-FimA antibodies in the serum of mouse were detected, all of which suggested that candidate edible plant vaccine was obtained successfully.

Key words: tomato; periodontitis; FimA; CTB; E8 promoter