

青苹果竹芋的组培快繁技术

关丽霞, 韩德伟, 王振龙, 杨 智

(辽宁农业职业技术学院 营口 115009)

中图分类号: S 603.6 文献标识码: B 文章编号: 1001-0009(2007)06-0223-01

青苹果竹芋(*Calathea rotundifolia* CV. *Fasciata*)又称圆叶竹芋, 属于竹芋科肖竹芋属多年生常绿草本。青苹果竹芋是近年来从国外引进的室内高档观叶植物品种, 曾在 2005 年 1 月广州花博园举行的“中国首届盆栽花卉交易会”上, 以其叶片圆润, 质感好, 观赏价值高, 适宜于室内盆栽观赏等特点, 一举获得“金花奖”, 令人十分注目。

青苹果竹芋自然繁殖率低, 常规人工繁殖用分株法速度较慢且数量有限, 因而显得更加珍贵。通过组织培养为青苹果竹芋快速繁殖及大规模生产提供了一条有效的途径。有关青苹果竹芋的组织培养国内未见报道, 现将青苹果竹芋的组培快繁技术介绍如下。

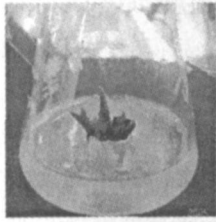
1 青苹果竹芋材料的选取与灭菌

6 月初从鲅鱼圈素质教育基地连栋温室内选取当年

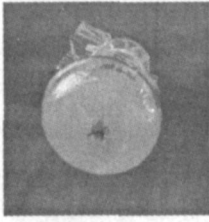
生、生长旺盛、无病虫害的盆栽青苹果竹芋。将盆栽青苹果竹芋的根茎处基质扒开, 露出根茎以上部分, 放在 30℃ 环境条件下, 控水 10d。利用锋利的剪刀剥去外部 2cm 以上的大叶片, 在低浓度洗衣粉水中泡 0.5h, 流水冲洗 2h, 再在无菌条件下, 用 70% 酒精浸泡 30s, 0.1% 升汞加 2 滴吐温-20 浸泡 12min, 最后用无菌水冲洗 5 次, 剥去顶芽外层叶片, 剪切成 0.5~1cm 大小作外植体备用。

2 青苹果竹芋的培养基及培养条件

培养基: 基本培养基为 MS, 添加蔗糖 30 g/L、琼脂 7 g/L, pH5.6~5.8。芽诱导培养基(1): 6-BA 2mg/L (单位下同)+NAA 0.5; 增殖培养基(2): 6-BA 1.0+NAA 0.1; 壮苗培养基(3): 6-BA 0.2+IBA 0.1; 生根培养基(4): 1/2MS+IBA 0.3+NAA 0.2。培养条件: 光照度 1 500~2 000Lx, 光照 14h/d, 培养温度 23℃~27℃。



青苹果竹芋的增殖苗



青苹果竹芋的根



青苹果竹芋的生根苗



青苹果竹芋移栽成活苗

3 青苹果竹芋的不定芽诱导、继代增殖、壮苗及生根

在超净工作台上, 将消毒好的外植体接种于培养基(1)中, 2 周后顶芽开始萌动。继续培养, 顶芽基部膨大, 逐渐分化出 2~3 个不定芽。待不定芽长至 1.5~2cm 高时, 切取其成单芽接种在增殖培养基(2)上。转接后小芽生长很快, 15d 左右形成芽丛。不定芽在继代培养基上增殖迅速, 30d 即可继代一次。增殖系数达 3~5 倍。培养基(2)中虽然可获得大量的不定芽, 但芽一般较矮小, 因此将不定芽分割成单芽后于壮苗培养基(3)

中进行壮苗。芽可伸长至 4~5cm, 成无根试管苗。将培养基(3)中的无根试管苗转接到生根培养基(4)中培养, 10d 后苗基部长出 2~3 条主根, 20d 左右主根上长出许多须根, 成为完整植株。

4 练苗及移栽

选择苗高 4~5cm、根白、根长 1cm 以上的试管生根苗进行驯化移栽。试管苗移栽前先移在温室内放置 3~5d, 然后开瓶洗去根部培养基, 移栽至灭菌处理过的草炭、蛭石和珍珠岩(2:1:1)的混合基质中。移栽前期将其置于拱棚内, 将空气湿度保持在 80%~90% 间, 遮光率为 50%~60%, 环境温度控制在 22℃~26℃ 间。待小苗在基质中长出白色新根, 新叶展开, 即可移入花盆中。通过上述组培快繁程序一年内可繁殖大量青苹果竹芋苗。以上是青苹果竹芋几个关键时期的图片, 以供参考。

第一作者简介: 关丽霞(1978-), 女, 辽宁抚顺人, 本科, 助理实验师, 多年来一直从事花卉、树木的组织培养研究工作, E-mail: glx0126@163.com。

收稿日期: 2007-01-29

丙肝病毒 E2 基因植物表达载体的构建及对烟草的转化

李凤梅¹, 张 弢², 任大明³

(1. 青岛科技大学化工学院, 266042; 2. 莱阳农学院生命科学学院, 青岛 266109; 3. 复旦大学遗传学研究所遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘 要: 丙型肝炎病毒(HCV)是导致全世界 1.8 亿患者急慢性肝炎的主要原因, 目前还没有可利用的疫苗和有效的治疗措施。人的 HCV 包膜蛋白是 HCV 原型疫苗的吸引人的部分, 目前在遗传工程领域的发展允许利用植物作为工厂生产外源蛋白。在这一研究中, 构建了丙型肝炎病毒 E2 基因的植物表达载体, 通过农杆菌介导转化烟草。经 PCR 和 Southern blot 检测, 目的基因已整合到转基因植株的基因组中。为抗 HCV 植物疫苗的研究奠定的基础。

关键词: E2 基因; 转基因; 烟草

中图分类号: R 373.2; S 572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)06-0224-03

丙型肝炎病毒(HCV)能引起人类急、慢性肝炎、肝硬化及肝细胞癌, 目前尚无有效的治疗方法和疫苗^[1,2]。国内外学者研究了 HCV 各基因的结构与功能, 核心蛋白(C)和包膜蛋白 E2 与机体保护性免疫关系最为密切, 是研制 HCV 疫苗的优先考虑的靶抗原^[3]。在 HCV 基因组中, 包膜蛋白 E2 区基因变异最大。E2 蛋白不仅在 HCV 吸附宿主细胞过程中发挥重要作用, 而且还参与了信号转导过程。

随着生物技术的发展, 已经研究出多种疫苗来预防病毒病。其中转基因植物疫苗是近年来发展起来的一种新型疫苗。1992 年 Mason 首先提出了转基因植物疫苗的定义^[4], 即利用分子生物学技术把外源基因导入到植物细胞中, 在植物中能够大量表达外源基因的一种生物技术。该研究构建了 HCVe2 基因的植物表达载体, 农杆菌介导转化烟草, 通过分子检测表明 E2 基因已在烟草中表达, 为研制 HCV 植物疫苗奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

受体植物烟草(*Nicotianatabacum* L.)由上海复旦大学沈大棱实验室提供。

1.2 菌株、质粒及试剂

植物二元载体 pBI121、pCAMBIA 2300 由上海交通大学赵凌侠老师提供研究用, 含有 E2 基因的质粒 T-ele2 与根癌农杆菌(*Agrobacteriumtumefaciens*) EHA105 菌株、大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 菌株由本课题组提供, pGEM-T 载体购自 Promega 公司。

限制性内切酶购自博雅公司, Taq 酶和 DNA 连接酶购自 Promega 公司, DNA 凝胶回收试剂盒购自华舜生物工程公司, PCR 引物由上海生物工程公司合成。

1.3 E2 基因片段的获得及植物表达载体的构建

以 T-ele2 质粒为模板, 采用 PCR 方法扩增 E2 基因, 克隆到 pGEM-T 载体上, 经酶切和 PCR 鉴定重组质粒 pGEM-T-e2, 然后送到上海生物工程公司测序。

将载体 pBI121 中含 GUS 基因的植物表达盒插入到植物二元表达载体 pCAMBIA 2300 的多克隆位点中, 即 EcoRI、Hind III 酶切位点之间得到中间载体 pCAMBIA2300-G。用 BamHI、SacI 双酶切 pGEM-T-e2, 获得的 E2 基因片段与经过同样酶消化具有相同的粘性末端 pCAMBIA2300G 载体连接, 得到 p35S-e2 植物表达载体。

1.4 E2 基因植物表达载体对烟草的转化及转基因烟草的检测

对烟草(*Nicotianatabacum* L.)的转化采用叶盘法^[5]。从烟草无菌苗上选取幼嫩叶片, 切成 0.5cm×0.5cm 小片, 在含有质粒 p35S-e2 的农杆菌菌液中浸泡 5min 左右, 用无菌滤纸吸去多余菌液, 置于 MS 基本培养基上, 附加 IAA 1mg/L、Zn 1mg/L、卡那霉素 50mg/L、羧苄青霉素 500mg/L 的选择培养基上进行筛选培养, 获得抗性植株。

抗性植株进行 PCR 扩增检测(PCR 反应程序为 94℃预变性 10min; 94℃变性 30 s, 58℃复性 45 s, 72℃延伸 45 s, 35 个循环; 72℃后延伸 10min)、以地高辛标记的 E2 基因片段为探针进行 Southern 分析, 检测外源基因是否整合到烟草基因组中。

2 结果与分析

2.1 E2 基因植物表达载体的构建及其分子鉴定

第一作者简介: 李凤梅(1973-), 女, 博士, 讲师, 从事分子生物学研究, E-mail: lifengmei37@163.com。

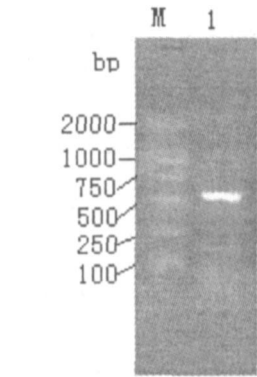
收稿日期: 2007-02-27

HCV E2 基因经过序列特异性引物的 PCR 扩增, PCR 产物克隆至 pGEM-T 载体上, 得到阳性重组质粒 pGEM-T-e2。提取阳性克隆的质粒经 BamHI、SacI 双酶切鉴定与目的基因的大小一致, 图 1 所示。经测序, 插入片段的序列与目的基因的序列一致。

用 EcoRI 和 Hind II 双酶切载体 pBI121 和 pCAM-BIA2300, 胶回收前者的小片段和后者的片段, 用连接酶连接两片段, 获得重组质粒 pCAMBIA2300-G, 提取阳

性克隆的质粒并用 EcoRI 和 HindII 双酶切鉴定, 重组质粒含有 pBI121 载体上的含 GUS 基因的表达盒, 图 2 所示。

用 BamHI、SacI 双酶切质粒 pGEM-T-e2 和 pCAM-BIA2300-G, 胶回收前者的 E2 基因片段和后者的片段, 用连接酶连接两片段, 获得重组质粒 p35S-e2。提取阳性克隆质粒, 经 BamHI、SacI 双酶切鉴定重组质粒构建正确, 图 3 所示。



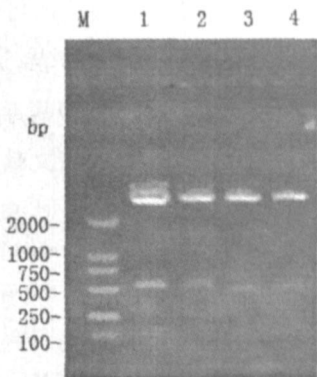
M: DL2000 Marker; 1: PCR 扩增的 E2 基因片段

图 1 E2 基因的扩增结果



M: DL2000 Marker; 1-2: EcoRI、HindII 双酶切 pCAMBIA2300-G

图 2 表达载体 pCAMBIA2300-G 的酶切鉴定

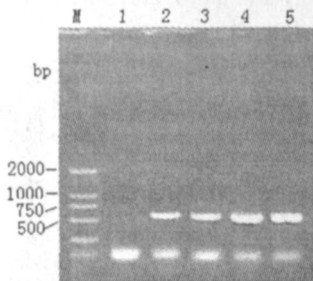


M: DL2000 Marker; 1-4: BamHI、SacI 双酶切 p35S-e2 质粒

图 3 重组质粒 p35S-e2 的酶切鉴定结果

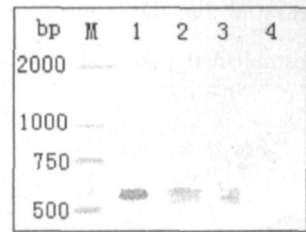
2.2 转基因烟草的检测

提取转基因及野生型烟草基因组总 DNA 进行 PCR 检测, 结果表明, 第 2~4 泳道出现目的基因谱带(如图 4)。这初步说明 E2 基因已经整合到烟草基因组 DNA 中。转基因烟草基因组 DNA 与野生型 DNA BamH I 酶切后的 Southern 杂交结果(如图 5)所示, 第 2、3 泳道均出现杂交信号。Southern 分子杂交结果表明 E2 基因已经整合到烟草基因组 DNA 中。



M: DL 2000 Marker;
1: 水为模板的负对照;
2: 未转基因植株;
3: 阳性对照;
4-5: 转基因植株

图 4 转 p35S-e2 烟草再生植株的 PCR 鉴定



M: DL2000 Marker;
1: 阳性对照;
2-3: Southern blot 阳性株;
4: 未转基因植株

图 5 转 E2 基因烟草植株的 Southern blot 杂交

3 讨论

烟草作为转基因的模式植物, 具有成熟的遗传转化再生系统和完整的真核细胞表达系统等特点。利用转基因烟草生产基因工程疫苗等活性多肽有很多研究报道。Curtiss 等^[9]人在 1990 年首次报道了在烟草中表达链球菌(Streptococcus)抗原蛋白 SpaA, 1997 年转基因植物疫苗的第一次临床试验证明了转植物疫苗在抵抗传染性疾病方面的巨大潜能。1992 年 Amtzena^[7]研究小组于烟草中表达了乙型肝炎表面抗原(HBsAg), 用叶片提取液免疫小鼠时, 表现出较强的免疫原性。2006 年郭小玲等^[8]报道了禽流感病毒 H5N1 的 HA 基因转化烟草, 获得了表达 HA 基因的表达植株, 具有免疫原性, 另外还有利用其他植物的生产疫苗的报道 1998 年 Amtzen 研究小组^[9]将一种易引起婴幼儿腹泻的大肠杆菌毒素基因的一段插入马铃薯基因组, 食用这种马铃薯的人产生了抗体。Mason 等^[10]把编码 LT-B 的基因转化马铃薯, LT-B 在马铃薯的叶片和块茎中得到表达。McGarvey 等^[11]在西红柿中表达狂犬病毒表面抗原。Lamphear 等^[12]在玉米种子中表达出传染性胃肠炎病毒刺突蛋白(TGEV-s)和 E. coli 不耐热肠毒素 B 亚单位(LiB)作为预防肠毒性大肠杆菌(ETEC)及 TGEV 的疫

苗。Khandelwal 等^[13]报道用转 RPV H 蛋白基因花生 (*Arachis hypogea* L.) 叶片饲喂牛可诱导产生 H 一特异性抗体。最近有报道将小反刍兽瘟病毒 (*Pestedes petitis ruminants virus*, PPRV) 的抗原蛋白血凝素—神经氨酸苷酶 (HN) 基因转入鸽豆 (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) 内表达, 并测得植物源 HN 蛋白具有较好的神经氨酸苷酶活性^[14]。

研究通过农杆菌介导的方法将 E2 基因转入烟草, 探索 E2 基因在烟草中表达的可能性, 最终目的是获得丙型肝炎病毒的口服植物疫苗, 通过食用转基因植物的果实使人们获得对丙型肝炎病毒的免疫力。

参考文献

[1] Leyssen P, De Clercq E, Neyts J. Perspectives for the treatment of infections with Flaviviridae[J]. Clin Microbiol Rev 2000 13(1): 67-82.

[2] Charlene c. Infectious diseases. Hard won advances spark excitement about hepatitis C[J]. Science 2001, 294(5542): 506-507.

[3] Ezelle HJ, Markovic D, Barber GN. Generation of hepatitis c virus like particles by use of a recombinant vesicular stomatitis virus vector[J]. Virology 2002, 76(23): 12325-12334.

[4] 郝林, 徐昕, 王尊生. 重组蛋白在植物体中的表达及其应用[J]. 植物学通报 2004 21(1): 101-112.

[5] HORSCH R B. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. Science 1985 227: 4 691-693.

[6] Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, et al. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato[J]. Nat Med 1998 4: 607-609.

[7] Mason H S, Lara D M, Arntzen C J. Expression of hepatitis B antigen in transgenic plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(24): 11745-11749.

[8] 郭小玲, 崔红, 王语等. H5N1 型禽流感病毒 HA 基因在烟草中的表达[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006 45(增刊): 126-128.

[9] Tacket C O, Mason H C, Losonsky G, et al. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato[J]. Nature Medicine 1998, 5(4): 607-609.

[10] Mason H S, Haq T A, Clements J D, et al. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT); potatoes expressing a synthetic LTB gene[J]. Vaccine 1998, 16(13): 1336-1343.

[11] McGarvey PB, Hammond J, Dienelt M M, et al. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes[J]. Biotechnology (NY), 1995 13: 1484-1487.

[12] Lamphear BJ, Streafield S J, Jilka J M, et al. Delivery of subunit vaccines in maize seed[J]. J Control Release 2002, 85(1-3): 169-180.

[13] Khandeswal A, Sita G L, Shaila M S. Oral immunization of cattle with hemagglutinin protein of rinderpest virus expressed in transgenic peanut induces specific immune responses[J]. Vaccine 2003, 21(23): 3282-3289.

[14] Prasad V, Satyavathi V V, Sanjaya, et al. Expression of biologically active Hemagglutinin-neuraminidase protein of Pestides petitis ruminants virus in transgenic pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) [J]. Plant Science 2004 166(1): 199-205.

Construction of Plant Expression Vector Containing the E2 gene of HCV and its Genetic Transformation of Tobacco

LI Feng-mei¹, ZHANG Tao², REN Da-ming³

(1. College of Chemical Engineering Qingdao University of Science and Technology Qingdao 266042; 2. Department of life science Laiyang Agricultural College Laiyang 266109; 3. State key laboratory, Institute of Genetics Fudan University Shanghai 200433)

Abstract: Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of acute and chronic hepatitis with over 180 million cases worldwide. Unfortunately, neither a vaccine nor any effective therapy is available. Envelope protein E2 of human HCV is an attractive component of a prototype HCV vaccine. Recent developments in genetic engineering allow the employment of plants as factories for foreign protein production. In this research, the E2 gene of HCV was constructed into plant expression vector, and transformed into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. It was demonstrated that the fragment of E2 gene had been integrated into the genome of tobacco by PCR and Southern blotting. We established a basis for study of plant-based vaccines against HCV.

Key words: E2 gene; Transgene; Tobacco