

口蹄疫病毒 VP1 基因在番茄中的表达及转基因番茄对豚鼠诱导免疫保护

潘 丽,张永光*,王永录,王宝琴,谢庆阁*

(中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 农业部畜禽病毒学重点开放实验室 兰州 730046)

摘 要 构建克隆有 O 型口蹄疫病毒 China99 株 VP1 基因的植物双元表达载体 pBin438/VP1。通过农杆菌介导法转化番茄子叶,经卡那霉素抗性筛选,获得 60 株抗性植株。对抗性植株分别做 PCR、RT-PCR 检测目的基因的整合与转录,ELISA 筛选约 40% 的卡那抗性植株阳性,分别提取两株 ELISA 和 Western blot 检测阳性的转基因番茄叶片蛋白与弗氏佐剂乳化,于 0、15、30d 经肌肉途径免疫豚鼠,第三次免疫后 28d 用 100ID₅₀ 的同源强毒攻击,根据豚鼠抗体水平的消长动态和免疫豚鼠抗强毒攻击的保护率进行转基因植物疫苗免疫原性的评估。结果表明,双元表达载体 pBin438/VP1 构建正确,PCR、RT-PCR 结果证实口蹄疫病毒 VP1 基因已整合到番茄基因组并在转录水平表达,ELISA 和 Western blot 检测重组蛋白能够与 FMDV 阳性血清反应。转基因番茄第三次免疫豚鼠后 21d 血清效价最高可达 1:64,攻毒后两组免疫豚鼠保护率分别达 80% 和 40%,证明转基因番茄表达的 VP1 蛋白具有良好的免疫原性。

关键词:口蹄疫病毒;VP1 基因;转基因番茄;豚鼠;免疫原性

中图分类号 S852.65 文献标识码 A 文章编号 0001-6209(2006)05-0796-06

口蹄疫(Foot-and-Mouth Disease, FMD)是由口蹄疫病毒(Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV)引起的一种急性、热性、高度接触性传染病,主要感染偶蹄兽^[1],虽然该病的致死率不高,但引起动物生产性能下降,而且该病的暴发影响国际贸易,往往造成惨重的直接及间接经济损失。目前对口蹄疫的防制主要采取免疫与扑杀相结合政策^[2],而安全有效的疫苗是成功防制乃至最终消灭口蹄疫的先决条件。口蹄疫弱毒疫苗有较好的免疫力,免疫持续时间长,疫苗接种量少,但弱毒疫苗存在散毒和毒力返祖现象,国际上已有多起由于使用弱毒疫苗而引发口蹄疫的报道^[3],因此,许多国家已明文禁止使用弱毒疫苗。灭活疫苗虽克服了弱毒疫苗的一些缺点,但疫苗接种剂量较大,免疫持续期短,疫苗中未完全灭活的病毒可能引起疾病的新爆发,此外灭活疫苗诱导的抗病毒免疫机制的广谱性有限,其局限性日渐突出^[4],因此,世界各国的相关研究室都在致力于研制安全、有效的新型口蹄疫疫苗。

近年来,基因工程技术及免疫学的快速发展为口蹄疫新型疫苗的研制提供了条件,新型疫苗主要指基因工程技术生产的疫苗,包括亚单位疫苗、多肽疫苗、基因缺失疫苗、活载体疫苗、核酸疫苗及抗独

特型抗体疫苗^[5,6],但是上述新型疫苗由于其免疫效果和生产成本远不及传统疫苗,迄今没有成熟的产品投放市场。而植物表达系统不仅能进行正确的翻译后加工,可直接食用,易获得多价疫苗,而且廉价安全不需特殊的运输和储藏条件,因此被认为是一个比微生物或动物更理想的蛋白生产系统^[7,8]。近几年国内外利用转基因植物表达口蹄疫病毒 VP1 抗原蛋白的研究也有报道,阿根廷的一个研究小组利用植物表达系统生产的 VP1 蛋白免疫小鼠后,能够诱导小鼠产生特异性抗体,并使其得到有效的免疫保护^[9-11]。国内中国农业科学院生物技术研究所叶绿体遗传工程室与兰州兽医研究所合作将口蹄疫病毒 VP1 基因导入烟草和衣藻叶绿体中,并获得表达^[12]。尽管目前转基因疫苗在对小鼠的免疫试验中取得了可喜的进展,但成年小鼠对 FMDV 的易感性差,缺乏典型的临床症状,因而难以保证免疫小鼠攻毒保护试验的可靠性。本实验构建了 FMDV VP1 基因的植物表达载体,通过农杆菌介导法转化番茄,获得了表达 FMDV 结构蛋白 VP1 的转基因番茄,将转基因番茄经肌肉注射免疫豚鼠,根据豚鼠抗体水平的消长动态和免疫豚鼠抗强毒攻击的保护率检测口蹄疫转基因疫苗的免疫效果。为进一步利用植物

基金项目 国家 863 计划(2001AA213071, 2003AA241110)

* 通讯作者。Tel 86-931-8342537; Fax 86-931-8340977; E-mail zhangyg@public.lz.gs.cn

作者简介 潘 丽(1974-),女,甘肃省天水市人,博士,主要从事动物病毒分子生物学与免疫学的研究。E-mail panlizhe@yahoo.com.cn

其他作者 方玉珍,王文秀,蒋守田,王 炜,孙 元,吕建亮,刘力宽

收稿日期 2005-10-26;接受日期 2006-01-13;修回日期 2006-03-29

反应器研制口蹄疫可饲疫苗奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株 :含 FMDV/China/99 株 VP1 基因的 pGEM/VP1 质粒由本实验室保存。根癌农杆菌 GV3101、辅助质粒 pRK2013 和植物组成型表达质粒 pBin438 由中国农业科学院作物所、中国科学院微生物所馈赠,大肠杆菌(*Escherichia coli*)JM109 和 DH5 α 由本实验室保存。

1.1.2 主要试剂及实验动物 :Taq 酶,La Taq 酶,dNTP 为 Promega 公司产品。RNA 酶(RNase),限制性内切酶 BamH I、Sal I,DL2000 Marker 购自大连宝生物公司。植物总 RNA 提取试剂盒 RNeasy Plant Mini Kit 及 RNase-Free DNase Set 为 QIAGEN 公司产品。口蹄疫病毒阳性牛血清、ELISA 诊断试剂盒由本所马军武副研究员提供,碱性磷酸酶(AKP)标记的兔抗牛 IgG 及 NBT/BCIP 为 Sigma 公司产品,PAGE 电泳试剂、NC 膜为 AMERSCO 产品。抗生素及植物激素购自拜尔迪生物技术有限公司。健康豚鼠(300~500g)由本所实验动物养殖场提供。

1.2 口蹄疫病毒 VP1 基因植物表达载体 pBin438/VP1 的构建

根据植物表达质粒 pBin438 的限制性酶切位点及已经测定的 VP1 基因的核苷酸序列,设计合成一对引物:VPR1:5'-TAGGATCCAACAATGACCACCTC CACAGGCGAGCCGGCTGAC-3',引入 Kozak 序列;VPR2:5'-TCCGTCGACTAGCTCATCTTTCTCAGACAAG AGCTGTTTCACAGGCCAC-3',引入内质网引导多肽 SEKDEL,另外上下游引物中分别引入酶切位点 BamH I 和 Sal I。以 pGEM/VP1 质粒为模板进行 PCR 扩增,扩增产物用 BamH I/Sal I 双酶切后,与经同样双酶切的表达载体 pBin438 大片段按文献[13]的方法连接、转化,碱法提质粒后用 PCR 法、双酶切法鉴定转化子,得到阳性重组质粒命名为 pBin438/VP1。采用三亲交配法^[14]将测序正确的 pBin438/VP1 导入根癌农杆菌 GV3101,PCR 法鉴定目的基因。

1.3 目的基因在番茄中的转化与抗性植株的筛选

番茄种子消毒后播种于 1/2MS 培养基上,在光照培养箱中培养 8~10d,取 2/3 子叶和带柄子叶置于含有重组质粒的根癌农杆菌菌液中侵染 3~5min,暗培养 2~3d 后转到选择培养基上,2 周左右更换新鲜选择培养基,当愈伤组织上的小苗生长到

1~1.5cm 时,将其切下,转入生根培养基中诱导生根,待植株长至 5~6cm 高时,练苗后移栽于土壤。

1.4 转基因番茄的 PCR 检测

取 100mg 叶片于液氮中研磨成粉末,用 CTAB 法^[14]提取总 DNA,适当稀释后作模板,以 VPR1 和 VPR2 为引物,按前述方法进行 PCR 扩增,同时以未转基因的叶片作阴性对照。

1.5 转基因番茄的 RT-PCR 检测

按 RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒说明提取番茄总 RNA,按 RNase-Free DNase Set 试剂盒说明消化 DNA,以 VPR2 为引物进行反转录后,以 VPR1 和 VPR2 为引物按前述方法进行 PCR 扩增,同时以 RNA 为模板,以 VPR1 和 VPR2 为引物扩增,检测 RNA 中是否有 DNA 污染。

1.6 转基因番茄 ELISA 检测

取 100mg 转基因番茄叶片组织加入 400 μ L 样品抽提缓冲液(PBST,0.029% Na₃,pH7.4),研磨,10000r/min 离心 5min,取上清,用双抗夹心 ELISA 法检测目的蛋白的表达。

1.7 转基因番茄 Western blot 检测

取 100mg 叶片,液氮研磨,加 150 μ L 蛋白抽提缓冲液混匀,4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 20min,上清加入等体积的上样缓冲液,煮沸 5min,按常规方法电泳、转印、封闭、漂洗,FMD 阳性牛血清 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h,漂洗后以碱性磷酸酶(AKP)标记的兔抗牛 IgG 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h,漂洗后加入显色液 NBT/BCIP,至条带清晰后,终止显色反应。

1.8 转基因疫苗在豚鼠体内的免疫效力

1.8.1 疫苗的制备及免疫剂量^[10,11] :选取两株 ELISA 检测表达量高的转基因番茄,命名为 GBS-1 株系、GBS-3 株系。分别取这两株转基因番茄叶片 0.5g 于液氮中研磨,同时以非转基因番茄叶片作为阴性对照,1:4(W/V)加入 PBST(pH7.4)混匀,4 $^{\circ}$ C 12000r/min 离心 20min,上清与佐剂按 1:1 混匀乳化(首免用弗氏完全佐剂乳化,加强免疫用弗氏不完全佐剂乳化),首免每只豚鼠注射 0.4mL(相当于每只 50mg 叶鲜重),加强免疫时每只豚鼠注射 0.8mL(相当于每只 100mg 叶鲜重)。

1.8.2 实验动物免疫 :豚鼠随机分 4 组(5 只/组),A 组:转基因番茄 GBS-1 株系;B 组:转基因番茄 GBS-3 株系;C 组:空载体 pBin438 的转基因番茄;D 组:未转基因番茄。用乳化好的疫苗接种于豚鼠的股内侧,分别于 0d、15d、30d 各免疫一次。

1.8.3 FMDV 特异性抗体的监测 :间接 ELISA 法测

定血清抗体的 OD 值,于 96 孔酶标板上以 BEI 灭活的 O 型 FMDV 细胞毒为包被抗原(1:8 稀释),被检豚鼠血清为一抗,过氧化物酶标记的兔抗豚鼠 IgG (1:1 000)为二抗,于 λ_{492nm} 处测定每孔的 OD 值。

1.8.4 豚鼠抗强毒攻击的免疫保护力:于第三次免疫后 28d 攻毒。豚鼠后跖部皮内穿刺攻毒,每只豚鼠接种 $100ID_{50}/0.2mL$ 的 O 型 FMDV China99 株强毒,连续观察 7d。以病变出现的严重程度作为保护效果的判定:完全保护为不出现任何病变,部分保护为病变仅发生于攻毒接种的单只脚,不保护为两只及以上脚均出现病变。保护率(%)=完全保护的豚鼠数/每组豚鼠总数 $\times 100$ 。

2 结果和分析

2.1 口蹄疫病毒 VP1 基因植物双元表达载体的构建

重组质粒 pBin438/VP1 用 *Bam*H I / *Sal* I 双酶切可切出一条约 650bp 的片段,以酶切正确的质粒为模板进行 PCR 扩增,扩增片段与预计大小相符。三亲交配后提取农杆菌质粒,PCR 可扩增到 VP1 基因,大小与预计片段相符,说明包含 VP1 基因的双元表达载体构建成功。测序结果表明:VP1 基因已正确克隆到表达载体上,与亲本毒株 O/China/99 株的相应编码序列完全一致,同源率为 100%,在构建的 pBin438/VP1 质粒中,VP1 基因、起始密码 ATG、内质网引导多肽 SEKDEL 等共 660 个核苷酸,编码 220 个氨基酸。

2.2 转基因番茄的获得与抗性植株的筛选

外植体在选择培养基上约 3~4 周后有少数绿色芽分化,在生根培养基上,大多数小苗出现粗而壮的根,有一小部分则无根发生,并逐渐发黄。未转化的对照组在选择培养基上被完全抑制,没有明显的愈伤组织和不定芽分化,4 周后,颜色逐渐变黄,最后死亡,而在无抗生素的培养基上分化、生根正常。

2.3 转基因番茄的 PCR 检测

提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,转化植株可扩增出 650bp 的 DNA 片段,大小与正常对照相同,非转化的对照植株没有扩增出任何条带(图略)。

2.4 转基因番茄的 RT-PCR 检测

以总 RNA 为模板进行 PCR,没有扩增出任何条带,排除了 DNA 污染的可能。以总 RNA 为模板进行 RT-PCR,结果 RT-PCR 扩增出的片段大小约为 650bp,与目的基因大小一致,说明 VP1 基因不仅已整合到转基因番茄基因组中,而且成功转录(图略)。

2.5 目的基因在番茄中表达蛋白的 ELISA 检测

转基因番茄蛋白提取液用双抗夹心 ELISA 检测,结果显示,约 40% 的转化植株 ELISA 检测阳性,其蛋白提取液原液的 OD 值比作为阴性对照的样品 10 高 2 倍或 2 倍以上(图 1)。

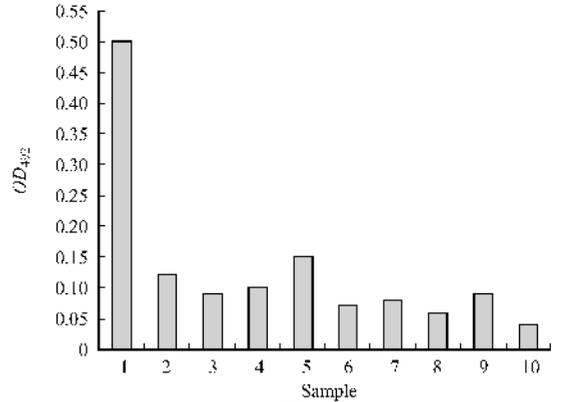


图 1 夹心 ELISA 检测转基因植物目的蛋白表达量

Fig. 1 Quantity of target protein in transformed plants tested with sandwich-ELISA. 1. FMDV antigen; 2~9. Transformed plants; 10. Non-transformed plants.

2.6 目的基因表达蛋白的 Western blot 检测

番茄叶片蛋白提取液进行 12% SDS-PAGE 和转膜杂交后,结果显示表达蛋白能被口蹄疫病毒阳性牛血清抗体识别,在约 24kDa 处出现特异性显色带,而未转化的对照植株无此杂交带(图 2)。说明 VP1 基因在转基因番茄中表达,且所表达的蛋白具有免疫反应活性。

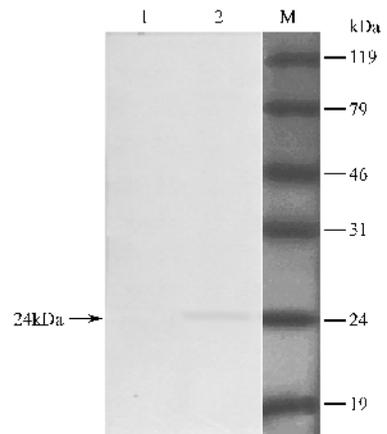


图 2 用 Western blot 检测目的蛋白

Fig. 2 Detection of target protein by Western blot. M. Molecular weight marker; 1. Protein of Non-transformed plant; 2. Protein of transformed plant.

2.7 转基因疫苗在豚鼠体内的免疫效力

2.7.1 豚鼠体内 FMDV 特异性抗体的动态变化:每组随机采血 3 只,将豚鼠血清 1:4 稀释,间接 ELISA

测定结果的 OD 值如下表 1,并将抗体水平的动态变化用曲线图表示(图 3)。

表 1 间接 ELISA 检测豚鼠血清 FMDV 特异性抗体($\bar{X} \pm SD$)

Table 1 Detection of anti-FMDV specific antibodies in the sera from the immunized guinea pigs by indirect ELISA

	Group A	Group B	Group C	Group D
Before vaccination	0.1842 ± 0.001	0.1510 ± 0.024	0.1415 ± 0.023	0.1605 ± 0.045
Ten days after the first vaccination	0.2214 ± 0.002	0.1625 ± 0.032	0.0960 ± 0.043	0.1130 ± 0.027
Ten days after the second vaccination	0.7170 ± 0.114	0.4428 ± 0.067	0.2060 ± 0.088	0.2360 ± 0.074
Ten days after the third vaccination	0.3820 ± 0.067	0.4857 ± 0.136	0.1765 ± 0.036	0.1584 ± 0.048
Twenty-one days after the third inoculation	0.5110 ± 0.245	0.6582 ± 0.283	0.1834 ± 0.084	0.2030 ± 0.001
Twenty-eight days after the third inoculation	0.4263 ± 0.138	0.4950 ± 0.143	0.2146 ± 0.037	0.1945 ± 0.025

本试验用 FMDV VP1 基因的转基因番茄叶片蛋白提取液免疫豚鼠,每 15 天 1 次,共 3 次,同时设空载体及非转基因番茄叶片为阴性对照组。在 0d,首免后 10d,二免后 10d,三免后 10d,21d,28d 各采血一次,用间接 ELISA 检测所取血清的特异性抗体。结果表明,转基因番茄对豚鼠首免后 10d 间接 ELISA 检测不到抗体;二免后 10d,A 组、B 组豚鼠抗 FMD 特异性抗体水平较首免后 10d 有明显提高;三免后 10d,B 组特异性抗体没有明显变化,A 组抗体水平较二免后有所下降,三免后 21d,A 组豚鼠的抗体水平虽然逐渐攀升,但与二免后的抗体水平相比其峰值较低,B 组抗体水平较二免后有进一步提高(图 3)。

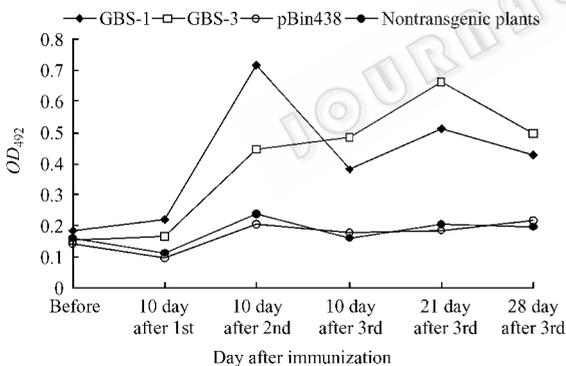


图 3 豚鼠免疫后抗体水平折线图

Fig.3 Curve of antibody levels of guinea pigs after immunization.

2.7.2 免疫豚鼠的抗体滴度:分别将 A 组和 B 组的 3 只豚鼠二免、三免后的血清从 1:4 开始以 2 倍系列稀释,间接 ELISA 方法测定抗体滴度,同时将抗体滴度用 log10 倒数的对数表示(图 4)。结果显示 B 组豚鼠三免后 21d 的抗体效价明显高于二免后 10d 的抗体效价,血清效价最高达到 1:64,说明转基因番茄中表达的抗原蛋白具有良好的免疫原性。

2.7.3 豚鼠抗强毒攻击的免疫保护力:转基因番茄免疫组的抗病能力远远大于非转基因番茄免疫组,尤其是 B 组,保护率达 4/5(表 2),而空载体 pBin438 和非转基因番茄免疫组豚鼠全部发病。

变化用曲线图表示(图 3)。

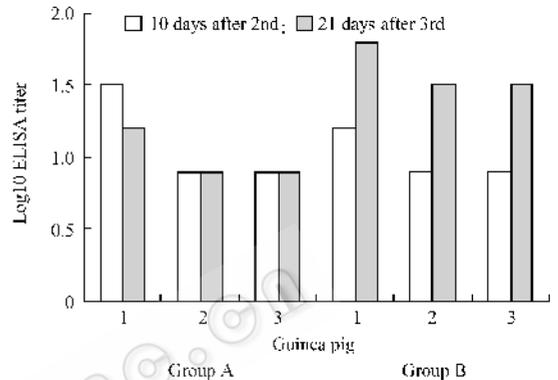


图 4 豚鼠二免、三免后的血清抗体检测

Fig.4 Assay of sera antibodies of guinea pigs after the second and third inoculation.

表 2 豚鼠免疫保护试验

Table 2 Protection of guinea pigs against FMDV challenge.

Serial number of guinea pigs	Group A	Group B	Group C	Group D
1	Total	Total	None	None
2	Total	Total	None	None
3	Partial	Total	None	None
4	Partial	Total	None	None
5	Partial	Partial	None	None
Rate of protection(%)	4(2/5)	8(4/5)	0(0/5)	0(0/5)

Total: Total protection was defined as complete absence of lesions; Partial: Partial protection was scored as lesions restricted on one rear foot; None: None was lesions on all of rear feet. Rate of protection(%) = number of guinea pigs no lesions on both rear feet/total number of guinea pigs.

3 讨论

在已确定的 O 型口蹄疫病毒 5 个抗原位点中,有 3 个位于 VP1 上,特别是抗原位点 1,由 VP1 的 G-H 环 141~160 位残基和 C 端 200~213 位残基组成,环上的氨基酸包含能刺激免疫反应的 T、B 细胞表位,VP1 的这两个区域在决定病毒的抗原性和免疫原性方面起主要作用^[15],故本试验选择将 VP1 基因转入植物表达载体,构建了 FMDV VP1 基因的双元表达载体 pBin438/VP1。通过农杆菌介导法,共获得 60 余株转基因植株,双抗夹心 ELISA 和 Western blot 检测表明,目的蛋白在转基因番茄中能正确表

达,且表达蛋白具有免疫原性,但 ELISA 检测结果不理想,转基因植株抗原表达量远低于稀释后的口蹄疫病毒抗原量,为进一步确证结果的可靠性,随机选取 8 株 ELISA 检测阳性植株的蛋白提取液倍比稀释后发现,其 OD 值随倍比稀释度的增加而逐渐降低,这一变化特点与口蹄疫病毒抗原 OD 值变化相似,而未转化的对照植株其蛋白提取液的 OD 值随倍比稀释度的增加无规律变化,进一步证明转基因番茄中有目的蛋白产生,对照植株无特异性蛋白产生。笔者认为 ELISA 检测阳性率低、重复性不好未必就是转化植株表达量低或不表达,可能与植物组成型表达载体导致植株不同生长期、不同生长条件、不同取材部位目的蛋白表达量存在差异有关,或者跟我们的纯化技术有关,从植物中提取的粗蛋白可能会掩盖部分的表达蛋白或者使部分蛋白发生了降解,也可能与现有的检测手段不够灵敏有关,尚需进一步探索。

国外对 FMD 转基因疫苗的研究做了许多探索, Wigdorovitz 等利用植物表达系统生产的 VP1 蛋白粗提物免疫小鼠,腹腔注射或用新鲜叶片直接饲喂免疫,均可诱导产生特异性免疫应答,前者保护率达 77%~80%,后者保护率达 66%~75%^[9~11]。虽然转基因疫苗在对小鼠的免疫试验中取得了较好的结果,但由于成年小鼠对 FMDV 的易感性差,缺乏典型的临床症状,因而难以保证免疫小鼠攻毒保护试验的可靠性,因此笔者选择了对 FMD 易感的豚鼠进行动物免疫试验,用间接 ELISA 跟踪免疫豚鼠体内抗 FMDV 的特异性抗体的动态变化,通过免疫豚鼠抗强毒攻击的保护率检测口蹄疫转基因疫苗的免疫效果。转基因疫苗免疫豚鼠的抗体水平检测结果显示,第一次免疫后 10d ELISA 检测不到抗体,可能与试验中选用的佐剂有关,本试验中首免用弗氏完全佐剂乳化,加强免疫用弗氏不完全佐剂,佐剂的使用使抗原蛋白缓慢释放,机体免疫系统产生的抗体水平不会迅速提高,因此,抗体效价低。第二次免疫后 10d, A 组豚鼠抗体水平显著提高并达到第一个高峰, B 组抗体缓慢上升,第三次免疫后 10d, A 组抗体水平较二免有所下降, B 组抗体增高缓慢,推测原因可能是抗原蛋白与机体产生的抗体中和导致抗体滴度下降;三免后 21d, B 组逐渐攀升并达到一个高峰,而 A 组抗体虽然缓慢上升,但最终没能达到二免后的第一个高峰,造成这一结果的原因可能与抗原蛋白被机体产生的抗体中和后,抗原免疫剂量减少有关,这一结果与核酸疫苗免疫豚鼠后的抗体变化结

果相似^[16]。另外,从免疫豚鼠血清抗体动态变化的折线图中也说明一点,本试验的动物免疫程序不理想,免疫程序尚待优化,二免与三免的间隔时间太短,建议今后继续动物免疫试验时,第二次免疫后 28 天进行第三次免疫。从国外转基因疫苗的研究结果来看,尽管 ELISA 检测不理想,但无论饲喂免疫还是注射免疫动物后,都能诱导动物体内产生特异性抗体,并得到一定的免疫保护,这一点在我们的动物免疫实验中也得到了验证。

转基因植物表达的抗原蛋白能自我组装成病毒样颗粒,且表达产物与高等动物细胞表达产物具有一致的免疫原性和生物学活性^[17,18]。理论上病毒空衣壳包含较多的抗原位点,与完整病毒粒子具有相似的抗原性,对新型疫苗而言是一个非常理想的选择,本试验只选择了编码口蹄疫病毒全衣壳蛋白的部分基因,也未对目的基因的密码子进行优化,在今后的研究中可尝试通过优化基因的密码子、表达病毒全衣壳蛋白的策略提高目的蛋白的表达量。

致谢 在番茄转化及 ELISA 检测过程中得到中国科学院寒区旱区环境与工程研究所植物基因工程实验室安黎哲研究员、陈书燕博士和兰州兽医研究所马军武副研究员、祁淑云硕士的帮助,在此表示衷心感谢!

参 考 文 献

- [1] Snowdon WA. The susceptibility of some Australian fauna to infection with foot-and-mouth disease virus. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 1968, **46**: 667-687.
- [2] Aggarwal N, Zhang Z, Cox S, et al. Experimental studies with foot-and-mouth disease virus, strain O, responsible for the 2001 epidemic in the United Kingdom. *Vaccine* 2002, **20**: 2508-2515.
- [3] Beck E, Strohmaier K. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J Virol*, 1987, **61**: 1621-1629.
- [4] Chan EWC, Wong HT, Cheng SCS, et al. An immunoglobulin G based chimeric protein induced foot-and-mouth disease specific immune response in swine. *Vaccine* 2000, **19**: 538-546.
- [5] Sobrino F, Saiz M, Miguel A, et al. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res* 2001, **32**: 1-30.
- [6] Barnett PV, Carabin H. A review of emergence foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* 2002, **20**: 1504-1514.
- [7] Korban SS, Krasnyanski SF, Buetow DE. Foods as production and delivery vehicles for human vaccines. *Am Coll Nutr* 2002, **21**: 212-217.
- [8] Lauterslager TG, Hilgers LA. Efficacy of oral administration and oral intake of edible vaccines. *Immunol Lett* 2002, **84**: 185-190.
- [9] Wigdorovitz A, Carrillo C, Dus Santos MJ, et al. Induction of a protective antibody to foot and mouth disease virus in mice following oral or parenteral immunization with alfalfa transgenic plants expressing the viral structural protein VP1. *Virology*, 1999, **255**: 347-353.

- [10] Carrillo C , Wigdorovitz A , Trono K , *et al.* Induction of a virus-specific antibody response to foot and mouth disease virus using the structural protein VP1 expressed in transgenic potato plants. *Viral Immunol* 2001 ,**14** :49 – 57.
- [11] Dus Santos MJ , Wigdorovitz A , Trono K , *et al.* A novel methodology to develop a foot and mouth disease virus(FMDV) prptide-based vaccine in transgenic plants. *Vaccine* 2002 ,**20** :1141 – 1147.
- [12] Sun M , Qian KX , Su N , *et al.* Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnology Letters* 2003 ,**25** (13) :1087 – 1092.
- [13] Sambrook J , Fritsch EF , Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁 , 黎孟枫 , 等译. 第三版. 北京 : 科学出版社 , 1999.
- [14] 王关林 , 方宏筠. 植物基因工程. 第二版. 北京 : 科学出版社 , 2002.
- [15] Xie QG , McCahan D , Crowther JR , *et al.* Neutralization of foot-and-mouth disease virus can be mediated through any of at least three separate antigenic sites. *J Gen Virol* ,1987 ,**68** :1637 – 1647.
- [16] Guo HC , Liu ZX , Sun SQ , *et al.* Immune response in guinea pigs vaccinated with DNA vaccine of foot-and-mouth disease virus O/China 99. *Vaccine* ,2005 ,**23** 3236 – 3242.
- [17] Mason HS , Ball JM , Shi JJ , *et al.* Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1996 ,**93** 5335 – 5340.
- [18] Warzecha H , Mason HS , Lane C , *et al.* Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *J Virol* , 2003 ,**77** 8702 – 8711.

Protective immune response of guinea pigs against challenge with foot and mouth disease virus by immunization with foliar extracts from transgenic tomato plants expressing the FMDV structural protein VP1

PAN Li , ZHANG Yong-guang* , WANG Yong-lu , WANG Bao-qin , XIE Qing-ge*

(Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture , State Key Laboratory of Veterinary Etiological Biology , Lanzhou Veterinary Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Lanzhou 730046 , China)

Abstract : The plant constitutive expression vector pBin438/VP1 for VP1 gene of foot-and-mouth disease virus strain O/China/99 was constructed. Mediated with *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 harboring pBin438/VP1 , VP1 gene was transferred into cotyledons of tomato. After selected by Kanamycin , sixty resistant lines were obtained. The integration and transcription of the VP1 gene in transformed plants was detected by PCR and RT-PCR. After being detected by sandwich-ELISA assays , about 40% transformed plants confirmed to express the recombinant protein. The leave extracts of two positive lines were respectively emulsified in Freund ' s adjuvant and guinea pigs were intramuscular inoculation at days 0 , 15 and 30d. According to the sera antibody levels and the protection of the vaccinated guinea pigs against challenge with 100ID₅₀ FMDV , probed into the immunogenicity of the target protein expressed in transgenic plants. Experimental results showed that the plant expression vector was successfully constructed. PCR and RT-PCR analyses confirmed VP1 gene was transformed into tomato plants and got expression at the transcription levels. The expressed VP1 protein of FMDV , which was identified by ELISA and Western blot , can be specifically recognized by polyclonal antibodies against FMDV. Indirect-ELISA antibody titers reached 1 : 64 twenty-one days after the third inoculation. In the challenge test , the protection against FMDV challenge in two groups was 80% and 40% respectively. The immunization test in guinea pigs indicated that the expression product of transgenic tomato plants had immunogenicity and could effectively induce the specific antibodies against FMDV.

Keywords : Foot-and-mouth disease virus ; VP1 gene ; Transgenic tomato ; Immunogenicity ; Guinea pigs

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA213071 , 2003AA241110)

* Corresponding author. Tel 86-931-8342537 ; Fax 86-931-8340977 ; E-mail zhangy@public.lz.gs.cn

Other authors : FANG Yu-zhen , WANG Wen-xiu , JIANG Shou-tian , WANG Wei , SUN Yuan , LV Jian-liang , LIU Li-kuan

Received : 26 October 2005 / Accepted : 13 January 2006 / Revised : 29 March 2006