

人乳铁蛋白基因在番茄中的优化表达

曹慧颖 郭三堆*

(中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要: 采用农杆菌介导法, 将表达载体 pB II2ILF 中的人乳铁蛋白 (LF) 基因 (根据植物偏好密码子人工合成) 导入番茄, 经卡那霉素筛选, 获得了再生植株。经 PCR 和 Southern 鉴定, 证明部分番茄基因组中已经整合了 *lf* 基因。Western 检测表明, 基因在果实中得到了表达。

关键词: 乳铁蛋白; 转基因; 番茄; 生物反应器

中图分类号: S 641.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 06-1030-04

Expression of Human Lactoferrin Gene in Transgenic Tomato Plants

Cao Huiying and Guo Sandui*

(Biotechnology Research Institute, the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The plant expression vector pB II2ILF contained artificial synthesized human lactoferrin gene was constructed and introduced into tomato by *Agrobacterium* mediated. Twenty-three regenerated plants were obtained through kanamycin-resistant selection. It was demonstrated that *lf* gene had been integrated into tomato genome by PCR and Southern blot analysis. Western blot analysis showed that human lactoferrin had expressed in transgenic tomato fruits. It made the basic research for transgenic tomato as healthy food.

Key words: Lactoferrin; Transgenic; Tomato; Bioreactor

近年来, 植物基因工程发展迅速, 人们已经开发出抗乙型肝炎病毒的马铃薯^[1]、可以治疗肿瘤的水稻和小麦^[2]等多种转基因植物。通过有些植物生产的疫苗已经成功地用于临床试验^[3,4], 这说明植物表达系统具有广阔的研究与应用前景。乳铁蛋白 (Lactoferrin, LF) 是一种具有多种生物学功能的单体糖蛋白^[5], 具有抗菌、抗病毒、抗氧化、抗癌、免疫调节、转录调控、维持铁平衡等多种作用^[6~10]。目前乳铁蛋白已应用于食品添加剂、防腐剂、抗氧化剂、饲料添加剂、保健品、医药等领域, 但是天然乳铁蛋白主要从乳清中分离得到, 成本高, 来源有限。为满足需要, 降低成本, 人们尝试着采用基因工程的方法生产乳铁蛋白。Conneely 等用曲霉^[11]、Ward 等用酵母^[12]、Stowell 等用 BHK 细胞系^[13]、Salmon 等用草地夜蛾细胞^[14]、Krimpenfort 等用奶牛乳腺^[15]先后表达出人乳铁蛋白。作者通过基因工程的方法, 将人乳铁蛋白基因转入番茄, 为培育出可直接食用的具有保健特性的番茄新品种奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

番茄 ‘中蔬 6 号’ 种子购于中国农业科学院蔬菜花卉研究所; 质粒 pUC19LF (含有根据植物偏好密码子人工合成的 *lf* 基因)、质粒 pG4AB、植物表达载体 pB II21、大肠杆菌 DH5、根癌农杆菌 LBA4404 由本实验室保存; 标准人乳铁蛋白购于 Sigma 公司; LF 抗血清由中国科学院遗传与发育研究所实验动物中心制备; PCR DIG Labelling Mix 为 Roche 公司产品; 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 购自华美公司; PCR 引物由三博公司合成。

收稿日期: 2005 - 03 - 04; 修回日期: 2005 - 04 - 22

基金项目: 国家 ‘863’ 计划项目 (AA211050)

* 通讯作者 Author for correspondence

1.2 载体构建

用 *Pst* 和 *Xho* 将质粒 pUC19LF 中的 *lf* 基因克隆到质粒 pG4AB 中表达调控序列 因子和多聚腺苷 (polyA) 之间, 构建中间表达载体 pG4ALF。再将含调控序列的 *lf* 基因用 *Bam*H 和 *Sac* 克隆到 pB II21 中 *CaMV*35S 启动子和 *nos* 终止子之间, 构建植物双元表达载体 pB II21LF。pB II21LF 含有植物选择标记 *npt* 基因。其物理图谱见图 1。质粒 DNA 的提取及载体构建按文献 [16] 进行。最后, 采用 Hofgen 等的冻融法^[17]将表达载体导入农杆菌 LBA4404。

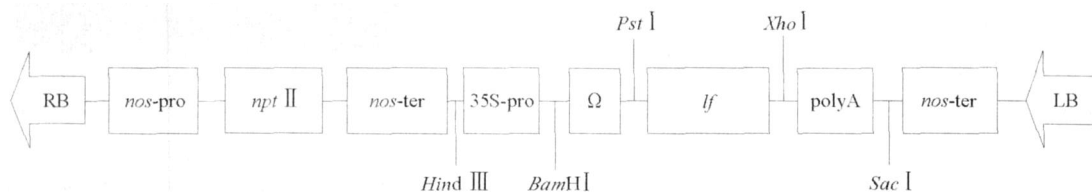


图 1 表达载体 pBII21LF 的结构示意图

Fig. 1 A schematic representation of expression vector pBII21LF

1.3 番茄转化与植株再生

取生长 7~10 d 的番茄无菌苗子叶, 用农杆菌侵染 3 min 后转到共培养基上: MS + 0.1 mg/L Zt (玉米素)。暗培养两天后转入诱导愈伤培养基: MS + 1 mg/L Zt + 50 mg/L Kan (卡那霉素) + 500 mg/L Cb (羧苄青霉素)。待愈伤组织分化后转入出芽培养基: MS + 0.1 mg/L Zt + 100 mg/L Kan + 500 mg/L Cb。芽长 1~2 cm 时移到生根培养基: MS + 100 mg/L Kan + 500 mg/L Cb。待根系发达后将小苗移到灭菌土中。

1.4 再生植株的 PCR 和 Southern 检测

提取总 DNA^[18]。PCR 上游引物: 5'-CTCC TCGTC CTGCT GTTCC3', 下游引物: 5'-GAGTG TCCGA AGGTC CTCCC3'。反应条件: 94 预变性 5 min; 94 变性 1 min, 53 退火 1 min, 72 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 延伸 10 min。

Southern 杂交^[16]: 20 μg DNA、1 μg 质粒 pB II21LF (作阳性对照), 用 *Hind* 在 37 分别消化 12 h 和 2 h, 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 电转移至尼龙膜进行杂交。杂交探针按照 PCR DIG Labelling Mix 使用说明制备。

1.5 再生植株的 Western 检测

取新鲜果实 0.5 g, 在液氮中充分研磨后加 0.5 mL PBS (每升含 NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄ 1.44 g, KH₂PO₄ 0.24 g, pH 7.4), 4 静置 1 h, 12 000 r/min 4 离心 20 min, 取上清液作为待测样品。

Western 检测^[19]: 样品经 SDS-PAGE (4% 的浓缩胶, 15% 的分离胶), 电转移至 PVDF 膜上进行杂交, 二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG, NBT/BCIP 显色。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建

构建的表达载体 pB II21LF 用限制性内切酶 *Hind* + *Sac* 消化, 得到了 10.3 kb 和 3.4 kb 两个片段 (图 2), 与理论大小 13.7 kb 相符。经过 Takara 公司测序, 证明载体构建正确 (测序图略)。

2.2 再生植株的获得及 PCR 和 Southern 检测

番茄子叶与农杆菌共培养后转到选择性培养基, 20 d 左右产生抗性愈伤组织。愈伤组织大约

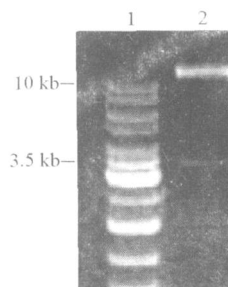


图 2 表达载体 pBII21LF 的酶切电泳图谱

1: DNA 分子质量标准; 2: pB II21LF/*Hind* + *Sac*。

Fig. 2 Detection of express vector pBII21LF by enzymatic digestion

1: DNA Ladder, 2: pB II21LF/*Hind* + *Sac*。

30 d分化出抗性芽。抗性芽生长 30 d左右转入生根培养基,一周后观察到有根生成。根系发达的再生植株移栽入土的成活率为 100%,最终得到再生植株 23株。

图 3为部分再生植株的 PCR检测结果。未转基因植株的总 DNA没有扩出条带,质粒 pUC19LF扩出 2.1 kb的条带,由此可以初步判断扩增出 2.1 kb条带的植株 (2~6、8)为转基因植株。

图 4为再生植株的 Southern检测结果,其中 4、5、6对应植株与阳性对照 pUC19LF一样出现了杂交信号,而作为阴性对照的未转化植株没有出现杂交信号,这说明 *lf*基因已经整合于番茄基因组中。因为在植物表达载体 pB II2ILF上,左右边界序列之间只有一个 *Hind* 酶切位点,所以转基因番茄总 DNA在完全酶切时, Southern杂交得到的阳性条带数应与外源基因的整合拷贝数相对应,那么 4、5、6号对应植株分别出现 2、3、2条杂交条带,说明外源基因的整合拷贝数可能为 2、3、2。

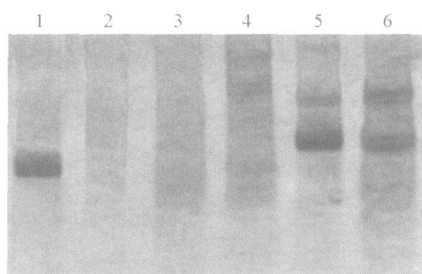


图 4 转基因植株的 Southern检测结果

1: 质粒 pB II2ILF; 2: 未转基因对照; 3~6: 再生植株。

Fig 4 Southern hybridization of total DNA isolated from transgenic tomato leaves

1: pB II2ILF; 2: DNA of non-transformed tomato leaves;
3 - 6: DNA of transformed tomato leaves

2.3 乳铁蛋白的表达检测

对 Southern检测呈阳性的植株果实提取总蛋白进行 Western检测,结果如图 5。未转基因植株果实没有出现特异条带,2、3、4对应转基因植株与标准乳铁蛋白出现大小相同的特异条带,说明 *lf*基因已经在转基因番茄果实中表达。

3 讨论

因为动物和植物密码子使用偏好不同,有些动物源基因在植物中不能表达或表达量很低。根据植物密码子使用偏好对人乳铁蛋白基因进行优化,可以使之在番茄中顺利表达。在构建植物表达载体时,于 *lf*基因 5'端增加了烟草花叶病毒 (TMV) 的 126 kD蛋白基因的因子,为核糖体提供了新的结合位点,可以增强 mRNA的起始翻译效率^[20]。植物细胞中 mRNA的稳定性与 3'端加入多聚腺苷 polyA的速度及长度有关。基因转录成 mRNA后,如果不能及时加入 polyA尾巴,将会很快被核酸外切酶所降解。mRNA在细胞内存在的半衰期越长,经翻译产生出的蛋白质量就越多^[21]。因此,为提高 *lf*基因 mRNA的稳定性,在设计其表达载体时,在转录终止子之前加入了 polyA序列。

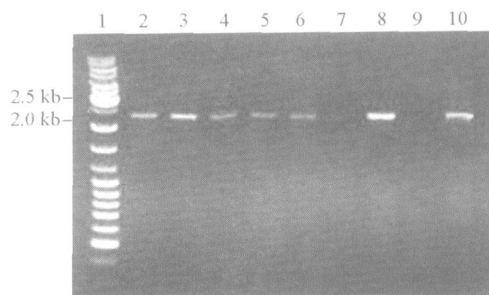


图 3 再生植株 PCR检测结果

1: DNA分子质量标准; 2~8: 再生植株; 9: 阴性对照;
10: pUC19LF阳性对照。

Fig 3 PCR analysis of *lf* gene in transformed tomato leaves

1: DNA ladder; 2 - 8: DNA of transformed tomato; 9: DNA of non-transformed tomato; 10: pUC19LF plasmid as positive control

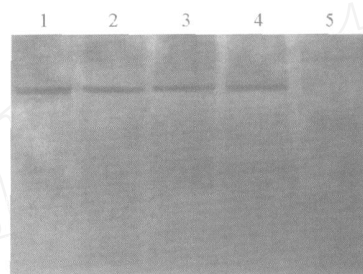


图 5 转基因植株 Western印迹分析

1: 标准乳铁蛋白; 2~4: 转基因植株果实; 5: 未转基因植株果实。

Fig 5 Western blot analysis of transgenic tomato fruits

1: LF standard protein; 2 - 4: Transgenic tomato fruits; 5: Non-transgenic tomato fruits

用番茄生产乳铁蛋白与细菌发酵、细胞培养及动物相比有自身的优越性。与细菌等低等生物相比，植物属高等生物，表达产物能够正确折叠、糖基化等，与天然产物非常相近，具有天然产物的理化特性和生物学功能。动物基因在原核表达系统中有时不能表达或产量很低，表达产物常不能正确折叠、糖基化等，没有生物活性。番茄生物反应器生产的乳铁蛋白贮存于果实，可以直接食用，从而减少了抽提过程中的损失和破坏，也简化了工艺，降低了成本。

与动物相比，植物转基因效率高。目前，动物转基因常用胚胎显微注射，其转化率低，规模有限，成本高，周期长，且许多动物疾病可以传染人类，使得动物产品存在安全性问题。而植物转基因常用农杆菌介导法，操作简便，转化效率高，可大批量处理，周期也比动物的短，成本低。所以。番茄生物反应器生产的乳铁蛋白具有更高的安全性。

参考文献：

- 1 Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki A B. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *The FASEB Journal*, 1999, 13: 1796 ~ 1799
- 2 Støger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D, Perrin Y, Christou P, Fischer R. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biol*, 2000, 42 (4): 583 ~ 590
- 3 Castanon S, Mam M S, Martin-A Alonso J M, Boga J A, Casais R, Humara J M, Ordas R J, Parra F. Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J. Virol*, 1999, 73: 4452 ~ 4455
- 4 Tuboly T, Yu W, Bailey A, Degrandis S, Du S, Erickson L, Nagy E. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants. *Vaccine*, 2000, 18: 2023 ~ 2028
- 5 Chasteen N D. Transferrin: a perspective. *Adv. Inorg. Biochem.*, 1983, 5: 201 ~ 233
- 6 Waarts B L, Aneke O J, Smit J M, Kimata K, Bitman R, Meijer D K, Wilschut J. Antiviral activity of human lactoferrin: inhibition of alphavirus interaction with heparan sulfate. *Virology*, 2005, 333 (2): 284 ~ 292
- 7 Iyer S, Lonnerdal B. Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 1993, 47 (4): 232 ~ 241
- 8 Nichols B L, McKee K S, Henry J F, Putman M. Human lactoferrin stimulates thymidine incorporation into DNA of rat crypt cells. *Pediatr. Res.*, 1987, 21 (6): 563 ~ 567
- 9 Hangoc G, Falkenburg J H, Broxmeyer H E. Influence of T-lymphocytes and lactoferrin on the survival-promoting effects of L-1 and L-6 on human bone marrow granulocyte-macrophage and erythroid progenitor cells. *Exp. Hematol.*, 1991, 19 (7): 697 ~ 703
- 10 Penco S, Pastorino S, Bianchi-Scarra G, Garre C. Lactoferrin downmodulates the activity of the granulocyte macrophage colony-stimulating factor promoter in interleukin-1 beta-stimulated cells. *J. Biol. Chem.*, 1995, 270 (20): 12263 ~ 12268
- 11 Conneely O M, Heason D R, O'Malley B W. Expression of processed recombinant and lactoferrin polypeptide fragments from a fusion product in *Aspergillus*. *U. S. Patent*, 1996, 5: 571 ~ 697
- 12 Ward P P, Piddington C S, Cunningham G A, Zhou X, Wyatt R D, Conneely O M. A system for production of commercial quantities of human lactoferrin: a broad spectrum natural antibiotic. *Biotechnology*, 1995, 13 (5): 498 ~ 503
- 13 Stowell K M, Rado T A, Funk W D, Tweedie J W. Expression of cloned human lactoferrin in baby-hamster kidney cells. *Biochem. J.*, 1991, 276: 349 ~ 355
- 14 Salmon V, Legrand D, Georges B, Skomianny M C, Coddeville B, Spik G. Characterization of human lactoferrin produced in the baculovirus expression system. *Protein Expression and Purification*, 1997, 9 (2): 203 ~ 210
- 15 Krimpenfort P. The production of human lactoferrin in the milk of transgenic animals. *Cancer Detect Prev.*, 1993, 17 (2): 301 ~ 305
- 16 Sambrook J, Russell D W. 分子克隆实验指南 (第三版). 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002. 45 ~ 68, 487 ~ 512
Sambrook J, Russell D W. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd ed). Translated by Huang P T. Beijing: Science Press, 2002. 45 ~ 68, 487 ~ 512 (in Chinese)
- 17 Hofgen R, Wilmnitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16: 9877
- 18 Wang H, Qi M, Cutler A J. A simple method of preparing plant samples for PCR. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21 (17): 4153 ~ 4154
- 19 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1998. 366 ~ 373
Ausubel F M, Brent R, Kingston R E. *Short protocols in molecular biology*. Translated by Yan Z Y, Wang H L. Beijing: Science Press, 1998. 366 ~ 373 (in Chinese)
- 20 Gallie D R, Walbot V. Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 4631 ~ 4638
- 21 Ingelbrecht I L, Heman L M, Dekeyser R A, Van Montagu M C, Depicker A G. Different 3' end regions strongly influence the level of gene expression in plant cells. *Plant Cell*, 1989, 1 (7): 671 ~ 680