

转天蚕素 AD(CAD) 基因于紫花苜蓿的研究

刘秀明^{1,2,3}, 朱海林^{1,3}, 杜淑环^{1,3}, 万 秋^{1,3}, 李海燕^{1,3}, 李校堃^{1,2}

(1 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118;

2 温州医学院, 浙江 温州 325035; 3 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘要:为了探索利用紫花苜蓿 *Medicago sativa* 作为生物反应器生产杂合抗菌肽天蚕素 AD(Cecropin AD, CAD) 的可行性, 通过 PCR 搭桥方法合成了 CAD 全长基因, 并插入对外源基因表达有一定促进作用的调控元件: Ω 序列、Kozak 序列及 KDEL 四肽序列, 然后将改造后的 CAD 基因克隆进载体 pCAMBIA1390R, 构建了 pCAMBIA1390R-CAD 植物表达载体. 将重组质粒转入根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, 并通过农杆菌介导方法将 CAD 基因转入紫花苜蓿. 在含潮霉素 (20 mg/L) 的筛选培养基上筛选转基因植株, 通过 PCR、Southern blotting 检测, CAD 基因已经转入紫花苜蓿中; 提取蛋白质进行抑菌活性研究, 结果表明转基因苜蓿蛋白提取物对沙门氏菌 *Salmonella* 及金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 具有一定抑菌活性.

关键词:紫花苜蓿; 抗菌肽; 天蚕素 AD; 转基因

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1001-411X(2012)04-0498-05

Expressions of Cecropin AD(CAD) in Transgenic Alfalfa

LIU Xiu-ming^{1,2,3}, ZHU Hai-lin^{1,3}, DU Shu-huan^{1,3}, WAN Qiu^{1,3}, LI Hai-yan^{1,3}, LI Xiao-kun^{1,2}

(1 Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2 Wenzhou Medicinal College, Wenzhou 325035, China; 3 College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: To explore the possibility of expressing the hybrid peptide CAD in the alfalfa, *Medicago sativa*, the cDNA sequence encoding CAD was obtained by recursive PCR(rPCR), and fused with elements such as Ω sequence, Kozak sequence and KDEL sequence to improve the expression level in the transgenic plants, and cloned into the plant transformation vector pCAMBIA1390R. This recombinant plasmid was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and CAD gene was transformed into alfalfa by *A. tumefaciens*-mediated method. The regenerated alfalfa plants were selected on medium 20 mg/L hygromycin. The results of PCR and Southern blotting showed that the CAD gene was successfully inserted into alfalfa genome. Proteins extracted from transgenic alfalfa showed a certain bacteriostatic activity to *Salmonella* and *Staphylococcus aureus*.

Key words: *Medicago sativa*; antibacterial peptide; cecropin AD; transgenic

抗生素的发现和应用挽救了许多被致病菌感染的人,然而,随着传统抗生素的广泛使用导致临床耐药株日益增多,从而使许多抗生素逐渐失去临床应用的价值. 因此,寻找新一代的抗菌药已成为现时一

收稿日期: 2011-12-27
作者简介: 刘秀明 (1981—) 女, 实验师, 博士研究生; 通信作者: 李海燕 (1971—) 女, 教授, E-mail: hyl99@163.com
基金项目: 吉林省科技厅科技发展计划项目 (20100147, 20090244); 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目 (70S018); 吉林农业大学校内启动基金 (201032); 温州市科技局科技计划项目 (S20100043)

项迫切的任务. 抗菌肽(Antibacterial peptide, ABP) 是广泛存在于生物体内具有抵抗外界微生物侵害的一类小分子多肽, 是生物天然免疫防御系统的重要组成部分. 与传统抗生素相比, 抗菌肽具有相对分子量小、水溶性好、热稳定、广谱抗菌、不易产生耐药性、对真核细胞毒性作用低、有一定抑制某些恶性肿瘤作用等特点, 显示出了良好的临床应用前景^[1]. 天蚕素 AD(Cecropin AD, CAD) 基因是人工合成的由 Cecropin A 的 N 端 1~11 肽段和 Cecropin D 的 C 端 12~37 肽段组成的杂合肽. 据测定, 化学合成的抗菌肽 AD, 其杀菌活性和抗菌谱都明显高于天然抗菌肽(杀菌活性是 Cecropin D 的 5~55 倍, 对枯草杆菌 *Bacillus subtilis* 的活性是 Cecropin A 的 6 倍)^[2-3]. 植物作为生物反应器生产药用蛋白有如下优点: 1) 植物细胞具有全能性; 2) 真核表达系统能正确表达和加工^[4]; 3) 生产成本低; 4) 存储、使用简单方便^[5]; 5) 使用安全. 紫花苜蓿 *Medicago sativa* 是世界上最重要的饲料作物之一, 具有抗逆性强, 适应范围广, 利用年限长, 再生性强的特点. 另外, 紫花苜蓿具有广泛的生态适应性和稳定的生产力, 每年可以收获多次, 而且由于本身能固氮, 需肥量少, 和其他植物相比投入少、生物量大, 所以适宜作生物反应器. 本研究利用根瘤农杆菌 LBA4404 将 CAD 基因导入紫花苜蓿, 成功得到了表达, 并且表达的蛋白具有一定的抑菌活性. 对利用紫花苜蓿作为植物反应器生产抗菌肽的研究有一定的意义.

1 材料与方法

1.1 菌种及质粒

根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌种 LBA4404(含 Ti 辅助质粒)、大肠埃希菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5 α 、质粒 pCAMBIA1390R 等由生物反应器与药物开发教育部工程研究中心提供.

1.2 酶及化学试剂

内切酶、DNA 相对分子质量标准 DL2000、*Taq*DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、PCR 回收试剂盒、胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购自 TaKaRa 公司; 植物 DNA 抽提试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司、RNA 抽提试剂盒购自捷瑞生物有限公司、通用型 RT-PCR 试剂盒购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司; 地高辛标记试剂盒购自 ROCHE(Cat. No. 11 745 832 910).

1.3 CAD 基因的合成

根据 GenBank 上登录的 Cecropin A 和 Cecropin D 序列设计 CAD 碱基序列, 按照植物偏好密码子将 CAD 碱基序列重新改造, 根据密码子的简并性消除在试验中用到的酶切位点, 并且引入对外源基因表达有促进作用的调控元件: Ω 序列、Kozak 序列及 KDEL 四肽序列. 应用 Primer Premier 5.0 软件, 设计合成正向引物: ADP1、ADP2、ADP3, 反向引物: ADP4、ADP5、ADP6(表 1), 并在基因两端引入 *Kpn* I 和 *Bgl* II 酶切位点及保护碱基. 采用基因重叠延伸拼接方法^[6](Gene splicing by overlap extension, SOE) 合成全长 CAD 基因(图 1).

表 1 设计并合成的引物序列
Tab.1 Primer sequences of designing

引物编号	引物序列(5'→3')	长度/bp
ADP1	GGGGTACCTTTATTTTTACAACAATTACCAACAACAACAAAC <i>Kpn</i> I	42
ADP2	ATTACCAACAACAACAAACAACAAACAACATTACAATTACTATTTACAATTACAGGATC	59
ADP3	CTATTTACAATTACAGGATCCGCAACCATGAAGTGGAAGCTTTTCAAGAAGATCGAG	57
ADP4	CAGCAGAAATAACAGCATCTCTAACTCTTTGTCCAACCTTCTCGATCTTCTTGAAAAGC	59
ADP5	CAAGAGCAGTAGCCTGAGCAACAGTAGCAACAGCTGGTCCAGCAGAAATAACAGCATC	58
ADP6	GAAGATCTTTACAACATCCTTGTCTTAGCAAGAGCAGTAGCCTG <i>Bgl</i> II	47

1.4 CAD 基因中间克隆载体的构建及测序

合成的 CAD 基因片段通过 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳在紫外灯下检测目的产物, 并用凝胶回收试剂盒纯化回收. 将回收产物分别用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bgl* II 酶切, 用 PCR 纯化回收试剂盒回收目的片段. 将目的基因片段与经相同酶切回收的 pUC19 大片段连接命名为 pUC19CAD. 反应产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 选择阳性克隆菌进行菌落 PCR

鉴定, 将鉴定正确的单菌落摇菌后保存菌种并测序, 测序工作由上海生工生物工程服务有限公司完成.

1.5 植物双元表达载体 pCAMBIA1390RCAD 构建

将测序正确的 pUC19CAD 和 pCAMBIA1390R 分别用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bgl* II 进行酶切, 回收小片段 CAD 和大片段 pCAMBIA1390R, 连接并转化大肠埃希菌感受态 DH5 α , 通过菌落 PCR 筛选阳性克隆菌, 摇菌并保种, 命名为 pCAMBIA1390RCAD

(图 2). 提取质粒进行酶切鉴定,将鉴定正确的植物双元表达载体 pCAMBIA1390RCAD 用冻融法转入农杆菌 LBA4404 制备工程菌. 用 PCR 法对转化菌落进行鉴定,经鉴定所得阳性单菌落为含目的基因的工程菌株.

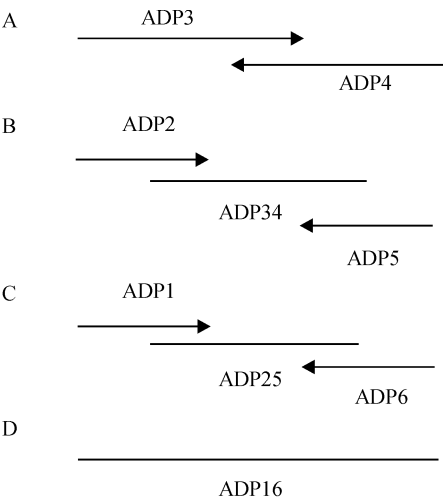


图 1 PCR 方法合成 CAD 基因全长策略图

Fig. 1 Strategy to synthesize CAD gene by overlapping extension method of PCR

1.6 紫花苜蓿的转化

将在种子培养基(MS 培养基 + 琼脂 7 g/L + 蔗糖 30 g/L)上培养 5~7 d 的紫花苜蓿无菌苗子叶剪成 0.3~0.5 cm 小段;用含 pCAMBIA1390RCAD 农杆菌 LBA4404 ($D_{600\text{ nm}} = 0.5 \sim 0.6$) 浸染 5~8 min, 吸去外植体表面残余菌液,置共培养基(TM-1 + 2,4-D 2 mg/L + 6-BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 琼脂 6 g/L + 蔗糖 30 g/L)上共培养 3 d(25 ℃ 黑暗条件);转入选择培养基(TM-1 + 2,4-D 2 mg/L + 6-BA 1 mg/L + NAA 0.1 mg/L + Tim 300 mg/L + Hyg 20 mg/L + 琼脂 6 g/L + 蔗糖 30 g/L)进行筛选,每 2 周继代 1 次诱导胚性愈伤组织;待组织有绿色的芽点出现,将其转移到分化培养基(MS 培养基 + Tim 300 mg/L + Hyg 20 mg/L + 琼脂 7 g/L + 蔗糖 10 g/L)上继续培养,每 2 周继代 1 次,待芽长至 3~5 cm 高时,将其从外植体上分离开,转移到生根培养基(MS 培养基 + Hyg 20 mg/L + 琼脂 7 g/L + 蔗糖 10 g/L)中继续伸长及生根. 培养温度 25~26 ℃,每天光照 16 h. 3~4 周后待根系发达后,打开瓶盖,炼苗 2~3 d,移栽到灭菌的土中继续培养.

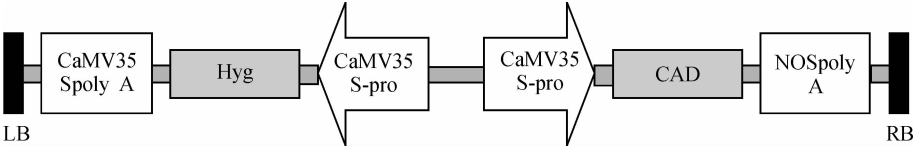


图 2 植物表达载体 pCAMBIA1390RCAD 结构示意图

Fig. 2 Structure of plant expression plasmid pCAMBIA1390RCAD

1.7 紫花苜蓿抗性植株的 PCR 检测

取潮霉素抗性苗和未转基因植株新鲜叶片各 100 mg,置于液氮中研磨成细粉,按照植物基因组 DNA 提取试剂盒操作方法提取总 DNA. 取 1 μ L 总 DNA 为模板,用 CAD 基因上游引物 ADP1 和下游引物 ADP6 为引物,以非转基因植株为阴性对照,以表达载体 pCAMBIA1390RCAD 为阳性对照,对基因进行 PCR 扩增检测. 反应体系为:2 $\times$ Power Taq PCR MasterMix 10 μ L,模板 DNA 1 μ L,上下游引物各 1 μ L(10 μ mol/ μ L),加 ddH₂O 至 20 μ L. 扩增反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,64 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 45 s,30 个循环;72 ℃ 后延伸 3 min. 通过 8 g $\cdot$ L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下分析扩增的 DNA 片段.

1.8 转基因紫花苜蓿的 Southern blotting 分析

取 PCR 检测为阳性的紫花苜蓿植株叶片 4 g,用

CTAB 法^[7]提取苜蓿基因组 DNA. 每个苜蓿植株样品取 40~50 μ g 基因组 DNA,用限制性内切酶 *Kpn* I 酶切过夜. 将酶切好的基因组样品用 8 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳,使片段按照分子大小分开,用碱变性法处理凝胶后,再利用毛细转移法将酶切后的 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜上. 根据 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒制备探针(TTTATTTTTTACAACAATTACCAACAACAACAAAC; TTACAACCTCATCCTTGTTCTTAGCAAGAGCAGTAGCCTG),42 ℃ 进行杂交过夜,显色,分析杂交信号.

1.9 CAD 转基因植株体外抗菌活性鉴定

将沙门氏菌 *Salmonella* 及金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 单克隆培养过夜,摇至 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0.4~0.6 后,取 100 μ L 均匀涂布于无抗生素的固体 LB 平板上,涂布均匀无液体后,在板上放入裁剪好的圆型滤纸,在其上加入 20 μ L 蛋白样品. 待加入的液体被吸收之后,将平板正置于 37℃ 培养箱中,过夜.

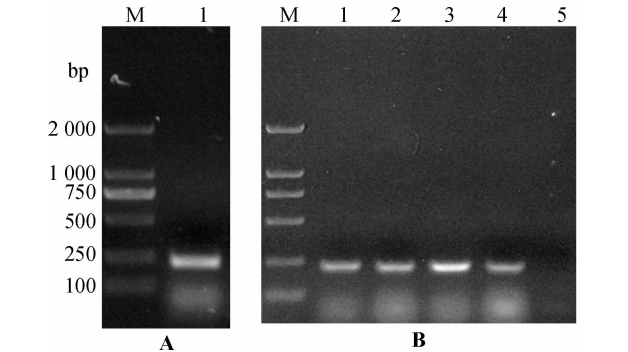
2 结果与分析

2.1 CAD 基因的克隆及测定

利用 PCR 搭桥法合成 CAD 全长基因,得到长度为 229 bp 的基因片段(图 3A),与预期一致.将目的基因片段与测序载体 pUC19 连接并转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,选择阳性克隆菌进行菌落 PCR 鉴定(图 3B),PCR 鉴定为阳性的菌落测序结果与预期一致.

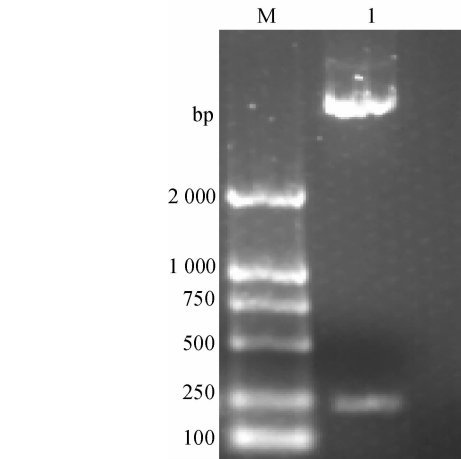
2.2 植物双元表达载体 pCAMBIA1390RCAD 的构建

将 CAD 基因定向插入 pCAMBIA1390R 载体中,得到重组质粒 pCAMBIA1390RCAD,经过限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Bgl* II 酶切得到了 229 bp 的目的片段和载体大片段(图 4).结果与预期一致,表明 CAD 基因已经整合进了重组质粒中.



A:CAD 全长基因克隆结果电泳图;B:以 pUC19CAD 阳性菌落为模板的 PCR 电泳图;M: DL2000 DNA marker;1~4:样品;5:阴性对照.

图 3 CAD 全长基因及其克隆菌的 PCR 鉴定
Fig. 3 PCR amplification of CAD gene and identification of colony



M:DL2000 DNA marker;1:*Kpn* I 和 *Bgl* II 酶切的重组质粒 pCAMBIA1390RCAD.

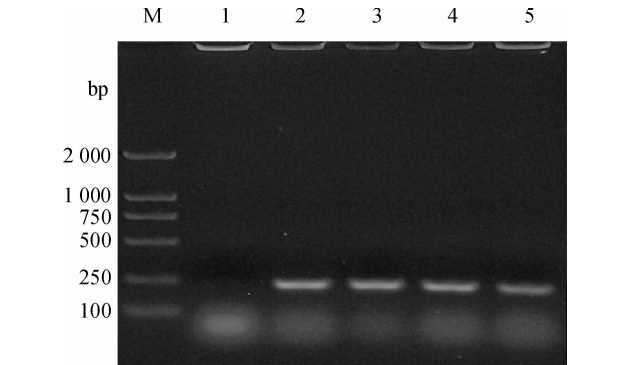
图 4 重组质粒 pCAMBIA1390RCAD 的酶切鉴定
Fig. 4 Restriction digestion analysis of recombinant plasmid pCAMBIA1390RCAD

2.3 农杆菌的转化

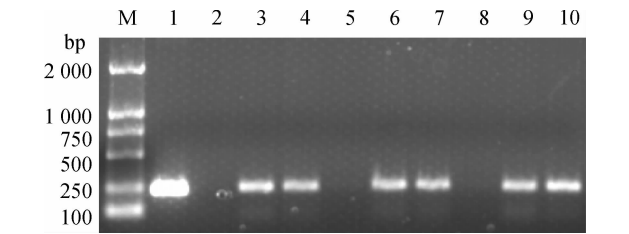
利用冻融法将重组质粒 pCAMBIA1390RCAD 转入农杆菌 LBA4404,用菌落 PCR 法对阳性菌落进行 PCR 鉴定,PCR 扩增得到大小为 229bp 左右的 CAD 基因(图 5),说明挑取的农杆菌可以用于下一步紫花苜蓿的转化.

2.4 紫花苜蓿阳性植株的 PCR 鉴定

挑选潮霉素抗性植株,提取基因组 DNA,非转基因植株作为阴性对照,重组质粒 pCAMBIA1390RCAD 为阳性对照,以 ADP1 和 ADP6 为上、下游引物进行 PCR 扩增,结果显示有目的条带出现(图 6),表明 CAD 已整合进苜蓿基因组.



M:DL2000 DNA marker;1:阴性对照;2~5:PCR 鉴定 LBA4404 的菌落.
图 5 农杆菌阳性克隆
Fig. 5 Screen of positive transformants of *Agrobacterium tumefaciens*



M:DL2000 DNA marker;1:阳性质粒 pCAMBIA1390RCAD;2:非转基因植株;3~10:转基因植株.

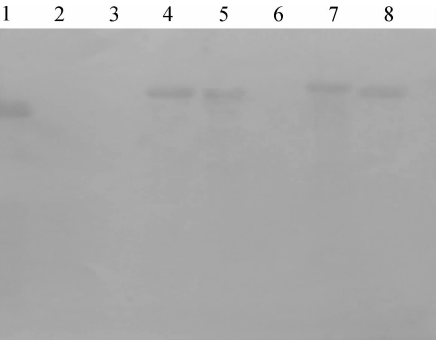
图 6 转基因苜蓿植株的 PCR 检测
Fig. 6 Identification of transgenic plants by PCR amplification

2.5 转基因植株的 Southern blotting 分析

对 PCR 检测为阳性的转基因植株进行 Southern blotting 分析(图 7).结果显示有 4 株出现杂交信号,而非转基因植株没有出现杂交信号.由此可以说明,目的基因 CAD 已经成功地整合进苜蓿基因组中.

2.6 转基因植株的体外抗菌活性鉴定

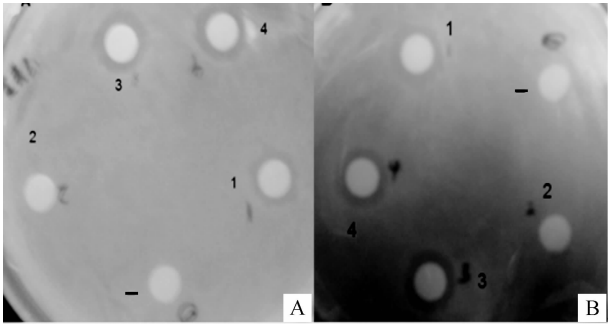
对从转基因苜蓿叶片中提取的总蛋白的抑菌活性进行了分析,选取 2 种不同的指示菌,即沙门氏菌和金黄色葡萄球菌.结果显示,转基因苜蓿对测试菌有抑菌圈出现,而野生型苜蓿没有抑菌圈(图 8).



1: 阳性质粒 pCambia1390RCAD; 2: 非转基因植株; 3~8: 转基因植株.

图 7 转基因苜蓿植株 Southern blotting 分析

Fig. 7 Identification of the transgenic plants by Southern hybridization



A: 金黄色葡萄球菌; B: 沙门氏菌; 1~4: 样品; -: 阴性对照

图 8 琼脂糖扩散法测抑菌活性

Fig. 8 Results of agarose diffusion assay

3 讨论

近年来,很多研究证实植物表达系统具有表达活性外源蛋白的能力,无论是在产品质量、成本 and 安全性等各方面都显现出巨大优势^[8]. 但是,作为一种新型的表达系统,如何提高蛋白表达量,减少错误蛋白的修饰以及降低下游分离纯化成本等问题是所有研究者共同面对的问题.

起始位点上游的调节序列,也对转录的效率有很大的影响,如 Ω 序列等. 有研究显示在烟草和水稻中,以 CaMV35S 为启动子,插入 Ω 序列和内含子序列,使 GUS 基因的活性提高 20~70 倍^[9]. 所以本试验在合成基因时在起始位点上游引入了 Ω 序列和 Kozak 序列.

为了提高外源蛋白的表达量,本试验在抗菌肽的 C 端引入了 KDEL 序列. 研究表明,蛋白质 C 端的 KDEL 序列能将蛋白质定位在内质网膜上,通过改变蛋白质的细胞定位和分泌途径,能明显地提高外源蛋白在宿主体内的表达水平^[10-11].

本研究利用植物生物反应器表达系统表达 CAD 基因,经 PCR 检测、Southern blot 检测和抑菌活性检测,结果表明:根瘤农杆菌能够成功介导 CAD 基因,整合到阳性紫花苜蓿转化株的基因组中,抑菌活性结果表明,转基因苜蓿具有一定的抑菌活性. 本试验将 CAD 基因导入紫花苜蓿中,可为今后利用生物反应器表达系统在植物中生产药用蛋白的工程化提供参考.

参考文献:

[1] 赵东红,戴祝英,周开亚. 昆虫抗菌肽的功能、作用机理与分子生物学研究最新进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(5): 14-18.

[2] 郑青,鲍时翔,姚汝华,等. 抗菌肽 AD 基因的合成[J]. 生物化学和生物物理进展, 1998, 25(1): 178-180.

[3] 郑青,黄自然,姚汝华,等. 人工合成 cecropin AD 基因在酵母中的表达[J]. 蚕业科学, 1999, 25(3): 75-180.

[4] DANIELL H, STREATFIELD S J, WYCOFF K. Medical molecular farming: production of antibodies biopharmaceuticals and edible vaccines in plants[J]. Trends Plant Sci, 2001, 6(5): 219-226.

[5] KORBAN S S, KRASNYANSKI S F, BUETOW D E. Foods as production and delivery vehicles for human vaccines[J]. J Am Coll Nutr, 2002, 21(3): 212-217.

[6] 张素芳,贾云,蔡梅红,等. Magainin 和 cecA2mil 抗菌肽基因的密码子优化及在毕赤酵母中的高效表达[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(7): 93-97.

[7] 顾红雅,瞿礼嘉. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998: 464-466.

[8] STREATFIELD S J. Approaches to achieve high-level heterologous protein production in plants[J]. Plant Biotech J, 2007, 5(1): 2-15.

[9] MITSUHASHI I, UGAKI M, HIROCHIKA H, et al. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign gene in dicotyledonous and monocotyledonous plant [J]. Plant Cell Physiol, 1996, 37(1): 49-59.

[10] MUNROE W D, PELHAM H A. C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins [J]. Cell, 1987, 48: 899-907.

[11] ANDRES D A, RHODES J D, MEISEL R L, et al. Characterization of the carboxyl-terminal sequences responsible for protein retention in the endoplasmic reticulum [J]. J Biol Chem, 1991, 266(22): 14277-14282.