

# 农杆菌介导的角质细胞生长因子-1 转化油菜的研究

杜美丽<sup>1,2</sup>, 刘秀明<sup>1,2</sup>, 江 莺<sup>1,3</sup>, 李 巍<sup>1,2</sup>, 朱海林<sup>1,2</sup>, 李海燕<sup>1,2</sup>, 李校堃<sup>1</sup>

(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 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 3 吉林农业大学 中药材学院, 吉林 长春 130118)

**摘要:** 构建植物表达载体 pCAMBIA139035S-KGF1, 并将重组质粒转入到根瘤农杆菌 EHA105 中. 以甘蓝型油菜‘沪油 15’为受体材料, 用农杆菌介导法转入角质细胞生长因子(KGF)-1. 通过 PCR、Southern blot 杂交和 Western blot 检测, 表明 KGF-1 已经在油菜中成功表达, 相对分子质量为 19 000.

**关键词:** 油菜; 角质细胞生长因子; 转化

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2011)03-0073-04

## Genetic Transformation of Keratinocyte Growth Factor-1 to *Brassica napus* Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

DU Mei-li<sup>1,2</sup>, LIU Xiu-ming<sup>1,2</sup>, JIANG Ying<sup>1,3</sup>, LI Wei<sup>1,2</sup>, ZHU Hai-lin<sup>1,2</sup>, LI Hai-yan<sup>1,3</sup>, LI Xiao-kun<sup>1</sup>

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

3 College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract:** The plant expression vector pCAMBIA139035S-KGF1 was constructed, and transferred to the *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. The keratinocyte growth factor(KGF)-1 gene was transformed into the receptor material *Brassica napus* ‘Huyou15’ via *Agrobacterium tumefaciens*. The transgenic plants were detected by PCR, Southern and Western blot, which showed that KGF-1 gene ( $M_r = 19\ 000$ ) was expressed successfully in transgenic *Brassica napus*.

**Key words:** *Brassica napus*; keratinocyte growth factor; transformation

角质细胞生长因子(Keratinocyte growth factor, KGF)是成纤维细胞生长因子(Fibroblast growth factor, FGF)家族的一员, 1989年由Rubin等<sup>[1]</sup>首先从M426人胚胎肺成纤维细胞的生长培养液中分离出来, 由194个氨基酸组成, 相对分子质量约为19 000, 称为FGF-7. 具有很强的促上皮细胞分裂的功能, 在器官的损伤修复及减少放化疗损伤中起着重要作用.

天然的KGF来源有限, 目前主要利用微生物发

酵和动物细胞生产KGF-1, 由于设备昂贵、过程复杂等因素导致其纯品价格极其昂贵, 大大限制了其临床应用. 于是, 我们将目光移向植物生物反应器, 把传统农业与医学领域很好地结合起来, 旨在通过大规模田间种植, 而收获具有宝贵医疗价值的蛋白. 国内外也有在植物中成功表达人表皮生长因子的例子, 如: 智庆文等<sup>[2]</sup>在番茄中成功表达人表皮细胞生长因子, 表达量为3.78 ng/g; Bai等<sup>[3]</sup>也在烟草中成功表达人表皮细胞生长因子, 表达量占总可溶蛋白

收稿日期: 2010-12-13

作者简介: 杜美丽(1983—), 女, 硕士研究生; 通信作者: 李校堃(1964—), 男, 教授, 博士, E-mail: xiaokunli@163.net

基金项目: 国家863计划(2007AA100503); 吉林省科技发展计划重点项目(20070922); 高等学校科技创新工程重大项目培育资金项目(70S018)

的 0.3%, 并且通过体外活性检测试验证明其具有生物活性。

基于植物反应器本身的优势以及在油菜中表达药用蛋白的可行性, 本研究构建了含有 KGF-1 的植物融合表达载体, 通过农杆菌介导法转化白菜型油菜, 以期获得能表达角质细胞生长因子的转基因油菜。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 p1390R 质粒、大肠埃希菌 DH5 $\alpha$  菌株及农杆菌 EHA105 菌株由吉林农业大学生物反应器与药物开发工程研究中心实验室保存。

1.1.2 植物材料 油菜 *Brassica napus* 种子由上海交通大学赵凌侠老师提供。

1.1.3 培养基 MS<sub>0</sub> 培养基: MS 粉 4.3 g/L, 蔗糖 30 g/L, 琼脂粉 6.8 g/L; 预培养基: MS<sub>0</sub> + 2, 4 - D 1 mg/L; 共培养基: MS<sub>0</sub> + 6BA2.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 乙酰丁香酮 (AS) 200  $\mu$ mol/L; 分化培养基: MS<sub>0</sub> + 6BA2.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + 潮霉素 (Hyg) 6 mg/L + 羧苄 (Carb) 200 mg/L + 头孢 (Cef) 200 mg/L; 生根培养基: MS<sub>0</sub> + NAA 0.2 mg/L。

1.1.4 酶和试剂盒 各种限制性内切酶、Pyrobest DNA polymerase, T<sub>4</sub> DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒、DNA 小量提取试剂盒等均购自 TaKaRa 公司; PCR 引物合成及测序由北京三博远志完成; 植物基因组提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche 公司; 6BA、NAA、AS 等激素购自 Sigma 公司; Cef 购自华北制药股份有限公司; Hyg 购自 Boehringer Mannheim 公司。其他化学试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 植物表达载体 pCambia139035S-KGF1 的构建及转化 EHA105 以 pCambiaR II 为模板, PCR 扩增得到 KGF-1 基因。然后用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 分别酶切质粒 pCambia1390 和 KGF-1 基因的 PCR 回收产物, 经琼脂糖凝胶电泳回收前者大片段和后者的较小片段, 并用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接, 反应产物转化 DH5 $\alpha$  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保种 (命名为 pCambia139035S-KGF1, 其结构见图 1)。提取质粒并酶切鉴定, 测序 (由北京三博远志有限公司完成)。将测序正确的表达载体 pCambia139035S-KGF1 通过冻融法转化进农杆菌菌株 EHA105, 用 PCR 和酶切方法对转化菌落进行鉴定, 经检测, 所得阳性单菌落即为含目的基因的转化菌株, 用于下一步转化。

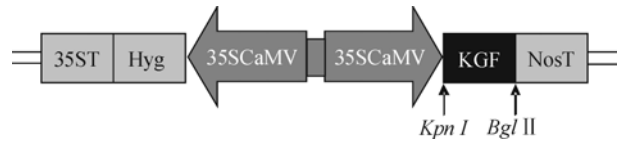


图 1 植物表达载体 pCambia139035S-KGF1 结构

Fig. 1 Illustration diagram of plant expression vector pCambia139035S-KGF1

1.2.2 油菜子叶的转化和再生 参照 Wang 等<sup>[4]</sup>的方法, 以 4~5 d 苗龄的甘蓝型油菜 ‘沪油 15’ 的下胚轴为外植体, 用光密度在 0.3~0.6 的农杆菌侵染预培养 2 d 的下胚轴 6 min, 在共培养基上培养 3 d, 然后转到分化培养基上培养, 每 2 周继代 1 次, 待不定芽长到 2 cm 左右, 将其剪下来转移到生根培养基上生根, 直到植株根系发达, 然后炼苗 2 周, 移栽到营养土中继续生长。

1.2.3 抗性植株的 PCR 检测 取转基因和非转基因植株新鲜叶片各 100 mg, 置液氮中研成粉末, 根据植物基因组提取试剂盒操作方法提取基因组 DNA, 取 1  $\mu$ L 总 DNA 为模板, 用 KGF-1 基因的上下游引物进行 PCR 扩增检测。

1.2.4 抗性植株的 Southern blot 检测 用碱裂解法提取 PCR 检测呈阳性的油菜基因组 DNA, 通过冷冻干燥法, 对样品进行浓缩。每个植株样品取 40~50  $\mu$ g 基因组 DNA, 选用 *Eco*R I 酶切过夜。将酶切好的基因组样品用 80 g/L 琼脂糖凝胶电泳使各片段按照分子大小依次分开, 用碱变性方法处理凝胶, 利用毛细转移法将酶切片段由凝胶转移到固相硝酸纤维素膜上。探针标记, 杂交等按照地高辛标记试剂盒操作方法操作。

1.2.5 抗性植株的 RT-PCR 检测 选取 PCR 和 Southern 杂交检测均为阳性的植株进行 RT-PCR 分析, 按照 TaKaRa 公司的说明书提取油菜叶片总 RNA, 反转录用 Promega 公司试剂盒, 取 1  $\mu$ L 反转录产物作为模板。

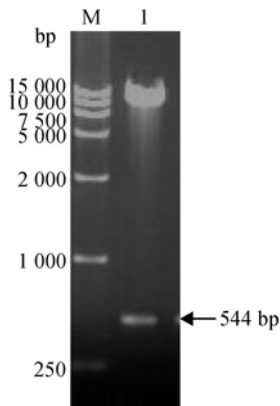
1.2.6 外源蛋白的 Western blot 检测 提取 RT-PCR 检测为阳性的植株叶片总蛋白, SDS-PAGE 电泳分析蛋白位置, 电转移到硝酸纤维素膜上, 用丽春红染色确定转膜效果。依次加入 KGF-1 单克隆抗体和羊抗鼠 IgG, 在联苯胺 (DAB) 溶液中显色。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物表达载体的构建

KGF-1 基因定向插入到表达载体 p1390, 所获得的质粒经过 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定 (图 2), 得到 544 bp 的目的基因小片段和载体大片段, 说明目的片段已经正确地插入到了 p1390 的 *Kpn* I/*Bgl* II 位

点,通过测序结果显示,目的基因成功重组到了表达载体 p1390 中.



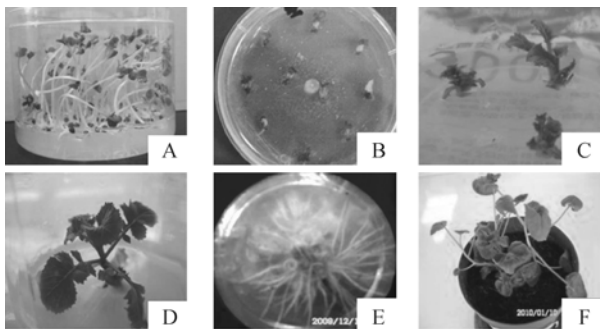
M: DNA marker DL15000; 1: *Kpn* I/*Bgl* II 酶切的 p139035S-KGF1 质粒.

图 2 重组质粒 p139035S-KGF1 的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction digestion analysis of recombinant plasmid p139035S-KGF1

### 2.2 油菜下胚轴的转化及再生

用农杆菌 EHA105 介导 KGF-1 转化油菜下胚轴,将外植体在含有潮霉素的抗性选择分化培养基上进行再生芽的诱导和筛选,经过 2 个月的筛选后,大部分再生芽褐化死亡,少数小苗能正常生长,然后将其转入生根培养基中,待根系发达后,开盖炼苗 2 周,然后移栽到花盆中,置人工气候室继续培养.如图 3 所示:



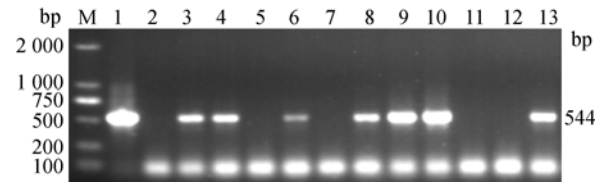
A: 5 d 苗龄的油菜; B: 已经分化的下胚轴; C、D: 选择培养基上生长的抗性小苗; E: 生根培养基上的抗性苗; F: 移栽后的再生苗.

图 3 转基因植株的再生流程

Fig. 3 Flow chart of the transgenic plants

### 2.3 抗性植株的 PCR 检测

取经过潮霉素筛选 2 个月的 11 株再生植株,提取基因组 DNA 进行 PCR 检测,结果显示有 7 株转化植株为阳性,无特异性条带的为未转化植株.初步证明外源基因 KGF-1 已经转入油菜植株的基因组中,检测结果如图 4 所示:



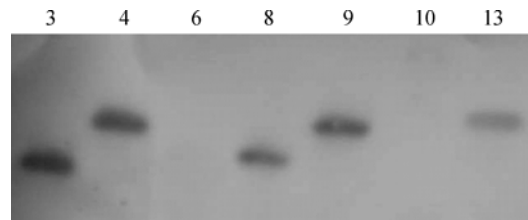
M: DNA marker DL2000; 1: 阳性质粒对照; 2: 非转基因植株对照; 3~13: 抗性植株.

图 4 抗性植株的 PCR 鉴定图

Fig. 4 PCR identification of resistant plants

### 2.4 抗性植株的 Southern blot 检测

对 7 株阳性转化植株进一步进行 Southern blot 分析.以 p35S-KGF-1 为模板 PCR 标记探针,酶切消化油菜叶片总 DNA,印记杂交.共 5 株转化植株出现了杂交信号,并且都是单拷贝,而未转化的植株没有出现杂交信号,结果如图 5 所示:



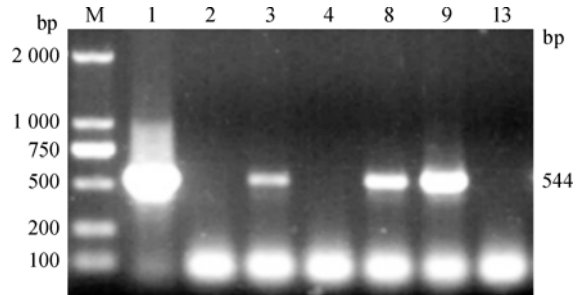
3、4、6、8、9、10、13 号油菜均用 *Eco*R I 酶切.

图 5 抗性植株的 Southern blot 杂交分析

Fig. 5 Southern blot analysis of resistant plants

### 2.5 抗性植株的 RT-PCR 检测

对 5 株阳性植株进行 RT-PCR 分析,初步表明有 3 株转基因植株中的 KGF-1 基因在 CaMV35S 启动子的控制下发生了转录,结果如图 6 所示:



M: DNA marker DL2000; 1: 阳性质粒对照; 2: 非转基因植株对照; 3、4、8、9、13: 分别对应相应的抗性植株.

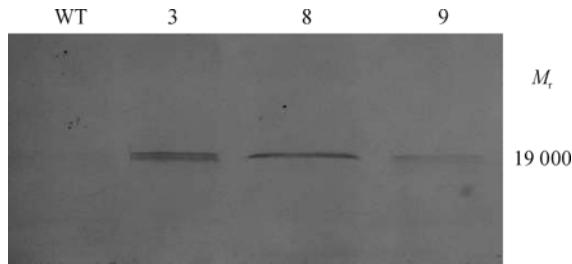
图 6 抗性植株的 RT-PCR 鉴定图

Fig. 6 PCR identification of resistant plants

### 2.6 抗性植株的 Western blot 检测

为了进一步确定转基因植株表达的外源蛋白为 KGF-1,提取 3 株油菜叶片的粗体蛋白进行 Western blot 分析.如图 6 所示,植株在 19 000 附近出现了清晰的杂交信号,而未转基因油菜叶片蛋白处没有杂交信号出现. Western blot 结果显示,外源基因 KGF-1

已经成功地在转基因油菜中得到表达。



WT: 野生型油菜; 3、8、9: 分别对应3、8和9号抗性植株

图7 抗性植株的Western blot 鉴定图

Fig.7 Western blot analysis of resistant plants

### 3 讨论与结论

油菜作为四大转基因作物之一,目前已有40多种基因转入油菜<sup>[5]</sup>.但对转基因油菜研究主要集中在改良其生物性状及提高抗病虫害方面<sup>[6-9]</sup>,而利用其表达外源蛋白的研究甚少.本研究报道了以油菜作为生物反应器生产角质细胞生长因子,为KGF-1的产业化研究奠定了基础.

外源蛋白在转基因植物中的表达量一直是作物生物技术领域备受关注的话题,长期以来由于其核转化表达量低而成为大面积种植的瓶颈.如利用转基因莴苣表达的重组乙型肝炎表面抗原(Hepatitis2B surface antigen)每克鲜质量仅为1~5 ng,在人体试验中仅诱导产生了较低水平的血清抗体,从而大大限制了其临床应用<sup>[10]</sup>.利用马铃薯表达的诺沃克病毒衣壳蛋白(Norwalk virus capsid protein)由于其表达量仅占总可溶蛋白的0.37%,不能进行大规模生产<sup>[11]</sup>.本试验中,虽然外源蛋白按照预期的设想成功在油菜中表达,但通过SDS-PAGE试验结果分析来看,KGF-1蛋白占总可溶蛋白的比例很少,还达不到商业化水平,如何提高外源蛋白的表达量是下一步研究的重点.

目前,KGF-1基因虽然在微生物中得到了较高的表达,但由于外源蛋白存在于包涵体中,其纯化的成本较高,大大限制了其应用<sup>[12]</sup>.本研究成功在植物中表达了KGF-1基因,且表达产物具有较好的免疫原性,但其活性还有待进一步研究.

#### 参考文献:

- [1] RUBIN J S, OSADA H, FINCH P W, et al. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86(3):802-806.
- [2] 智庆文,张凤英,柴敏,等.人表皮生长因子在转基因番茄中成功表达[J].中国药理学通报,2007,23(5):692-695.
- [3] BAI Jie-ying, ZENG Lin, HU Yuan-lei, et al. Expression and characteristic of synthetic human epidermal growth factor (hEGF) in transgenic tobacco plants[J]. Biotechnol Lett, 2007, 29:2007-2012.
- [4] WANG Y, HE B, ZENG Y L. Improving high frequency plant regeneration of the explant of cotyledon with petiole rapeseed (*Brassica napus*) [J]. Chin J Oil Crop Sci, 2004, 26(4):86-90.
- [5] 刘晓,景寅.转基因油菜研究进展[J].现代农业科技, 2010, 28(4):80-81.
- [6] 邱敦莲, KATAVIE V, FRIESE W, et al. 利用拟南芥的FAE1基因和酵母的SLC1-1基因通过生物技术提高油菜芥酸含量的尝试[J].国外作物育种, 2001, 20(4):37-44.
- [7] 郎春秀,胡张华.油菜农杆菌转基因体系的建立及转PEP反义基因油菜的获得[J].浙江农业学报, 1999, 11(2):55-58.
- [8] DALEY M. Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants[J]. Plant Cell Repots, 1998(17):489-496.
- [9] 孙万仓.转基因研究进展[J].西北农业学报, 2000, 9(3):117-121.
- [10] KAPUSTA J, MODELSKA A, FIGLEROWICZ M, et al. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus [J]. FASEB J, 1999, 13:1796-1799.
- [11] TACKET C O, MASON H S, LOSONSKY G, et al. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes[J]. J Infect Dis, 2000, 182:302-305.
- [12] 韩兵,陈伟,付小兵.人成纤维细胞生长因子7的基因克隆和蛋白鉴定[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(14):2629-2632.

【责任编辑 李晓卉】