

文章编号:1008-7826(2010)03-0097-04

人角质细胞生长因子-1 在水稻中的表达

张国广^{1,2}, 苏勇波¹, 沈明山¹, 陈亮^{1*}

(1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 漳州师范学院 生物系, 福建 漳州 363000)

摘要: 人角质细胞生长因子 (Keratinocyte growth factor, KGF) 在组织的损伤修复中起着重要的作用。植物细胞生物反应器是一种成本低、安全性好的蛋白生产系统。本研究将人 KGF-1 经农杆菌介导法转入水稻中, 共获得 38 株抗性再生植株。Southern 杂交和 RT-PCR 结果表明 KGF-1 基因整合入水稻基因组中且部分转化株中 KGF-1 基因得到转录。Western blotting 检测结果显示有两株转化水稻中能够表达 KGF-1。

关键词: 角质细胞生长因子; 水稻遗传转化; 基因表达

中图分类号: Q 78 文献标识码: A

Recombinant Keratinocyte Growth Factor-1 Expression in Rice

ZHANG Guo-guang^{1,2}, SU Yong-bo¹, SHEN Ming-shan¹, CHEN Liang¹

(1. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian, 361005, China; 2. Biology department, Zhangzhou Normal University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

Abstract: Keratinocyte growth factor (KGF) plays an important role in the tissue damage repair. Plant cell bioreactor is a low cost and safe protein production system. Human KGF-1 gene was transformed into rice by *Agrobacterium*-mediated method and a total of 38 putative transgenic rice plants were obtained. The results of southern blotting and RT-PCR assay showed that KGF-1 gene was integrated into the rice genome and KGF-1 gene was transcribed in part of the putative transformed rices. Western blotting results showed that KGF-1 was expressed in two transgenic rices.

Key words: keratinocyte growth factor-1; rice genetic transformation; gene expression

1 引言

角质细胞生长因子 (Keratinocyte growth factor, KGF) 是成纤维细胞生长因子 (fibroblast growth factors, FGFs) 超家族中的成员, 目前在人类组织中分离到两种角质细胞生长因子, KGF-1 (亦称成 FGF-7) 和 KGF-2 (亦称成 FGF-10), 两种蛋白因子间具有 57% 的同源性^[1]。研究表明两种细胞因子具有很多重要的生物学功能, 参与并调控多种组织和器官的形成和分化^[2,3], 同时在组织的损伤修复中发挥着重要的作用^[4,5], 因此 KGF 作为一种新型多肽类药物具有广阔的应用前景。目前 KGF 多是来源于异源细胞表达, 如原核细胞^[6-8], 酵母细胞^[9]等, 来源于植物细胞表达的较为少见。植物细胞作为生物反应器生产重组蛋白具有成本廉价、保存运输方便、免疫原性好、安全等诸多优点^[10]。本研究将人 KGF-1 基因导入水稻中, 获得了表达人 KGF-1 基因的转基因水稻。

2 材料与方法

2.1 材料

农杆菌菌株: 携带植物表达载体 pBI1301-KGF 的 EHA105 菌株^[11]保存于厦门大学细胞生物学实验室;

收稿日期: 2010-06-05

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (2010J01240)

作者简介: 张国广 (1973-), 男, 讲师。*通讯作者: 陈亮, 男, 教授。E-mail: chenlg@xmu.edu.cn

植物材料: 水稻品种中华 11(*Oryza sativa* L)幼胚由福建省农科院水稻研究所提供.试剂: 所用药品和抗生素等购自上海生工; 工具酶购自大连宝生物公司; 引物由上海英骏生物公司合成; KGF 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司.培养基的配制: 诱导培养基 MS+2, 4-D 2 mg/L; 继代培养基 MS+2, 4-D 2 mg/L; 共培养培养基 MS+2, 4-D 4 mg/L+AS(乙酰丁香酮); 筛选培养基 NB+2, 4-D 2 mg/L+Cb(头孢菌素) 500 mg/L+Hyg(潮霉素) 100 mg/L; 预分化培养基 NB+ABA 2 mg/L+6-BA 3 mg/L+NAA 1 mg/L + Cb 250 mg/L+Hyg 25 mg/L; 分化培养基 NB+6-BA 3 mg/L+NAA 1 mg/L+Cb 250 mg/L+Hyg 25 mg/L.

2.2 方法

2.2.1 水稻幼胚的愈伤组织诱导

取中华 11 幼胚, 70%酒精灭菌 1 min, 10%的次氯酸钠表面消毒 45 min; 无菌水清洗 3~5 遍, 用解剖针剥出幼胚盾片, 接种于诱导培养基中.在 25~26℃, 暗培养的条件下, 幼胚一般 4 d 后会会长出芽, 用镊子将芽从基部掐出, 将剩余的颗粒状的愈伤接种至新的诱导培养基中, 2 周后, 会长出直径约 0.5~1.0 cm、淡黄色、半松散状颗粒愈伤, 可用作下一步的遗传转化.

2.2.2 根癌农杆菌介导的水稻转化

用接种环从保存的农杆菌菌种中取样并划卡那霉素抗性平板, 28℃培养 2-3 d 后, 挑取活化的农杆菌单菌落接种于 50 ml 含卡那霉素的 LB 培养基中, 培养至对数生长期, 离心收集农杆菌并重悬于适量的共培养液体培养基中, 将 1.2.1 制备的愈伤组织立即浸入以农杆菌悬浮液, 于摇床中缓慢摇动 15 min 后, 将愈伤组织块从菌液中取出, 置于无菌滤纸上吸干, 而后移入共培养培养基中. 共培养 2-3 d 后, 再把愈伤组织块移到筛选培养基上, 2 周继代一次, 继代 2 次.

2.2.3 预分化、分化及抗性植株再生

挑选直径 1-2 mm 生长良好、结构致密的抗性愈伤组织转移入预分化培养基中, 25℃, 12 h 光照培养, 预分化时间一般为 2 周.将预分化后的抗性愈伤组织转移至分化培养基上进行分化培养, 6-8 周后再生出小苗, 再生小苗在 1/2 MS 培养基上培养两周后, 移栽到土里.

2.2.4 转基因植株的 PCR 检测

PCR 鉴定正向引物 5'-GGCGGATCCTCTAGAATGGCTTGCAATGACATGACTCCA-3'; 反向引物 5'-GAATTCTTAAGTTATTGCCATAGGAAG-3'.扩增 KGF 全长约 500 bp 大小的片段.PCR 反应程序为: 94℃ 4 min; 94℃ 45 s, 50℃ 45 s, 72℃ 50 s, 35 个循环; 72℃, 8 min.PCR 结束后 1%凝胶电泳检测目的条带.

2.2.5 点杂交和 RT-PCR 检测

点杂交中 DNA 探针采用 KGF 基因, 标记采用地高辛标记, 方法参照 Bio-Rad 公司 Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒操作, 实验步骤参照文献[12].抗性再生植株总 RNA 的提取和 RNA 的反转录采用大连宝生物试剂盒, 按照试剂盒步骤操作, 以反转录获得的 cDNA 为模板, 2.2.4 所述引物和条件进行检测.

2.2.6 GUS 及 Western blotting 检测

再生植株的叶片, 放入 X-Gluc 液中, 37℃下放置过夜, 无水乙醇脱色, 呈蓝色的为 GUS 阳性[10].转基因水稻蛋白提取采用丙酮沉淀法, 蛋白浓度的测定采用上海生工试剂盒(SK3041), 取 20-50 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE, 电泳结束后将蛋白电转移至尼龙膜, 以兔抗 KGF 蛋白抗体为第一抗体, 以辣根过氧化物酶(HRP)偶联的羊抗兔 IgG 为第二抗体, 进行 Western blotting 分析, 采用 ECL 方法曝光、显影, 操作步骤参考文献[12].



图 1 水稻抗性植株

3 结果

3.1 转 KGF 抗性植株的获得

转移到筛选培养基中的愈伤经过 2 周的筛选培养后, 愈伤褐化, 继代一次再经过约 2 周, 部分褐化的组织上长出淡乳白色, 略透明, 生长相对旺盛的抗性愈伤. 抗性愈伤在筛选培养基中长大至直径为 5 mm 时移至预分化培养基中, 一般 1 周后可以看到愈伤上有绿点产生, 预分化培养基培养 2 周后转移至分化培养基中, 在分化培养基中 2 周后, 每个愈伤一般能长出 1~4 棵小苗 (图 1), 转化实验共获得 38 株抗性植株.

3.2 抗性再生植株的 PCR 检测

以抗性再生水稻总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 未转化植株 DNA 为阴性对照模板, 部分抗性株 KA3、KA4、KA5、KA6、KA8 检测出现 500 bp 左右的目的带, 与阳性对照 (质粒) 大小一致, 阴性对照没有出现相应的带 (图 2). 38 株抗性再生植株中 20 株 PCR 检测为阳性.

3.3 抗性再生植株的 GUS 检测

部分再生植株的叶片和根经组织化学染色后, 可观察到明显的蓝色, 说明 GUS 基因在转基因植株中稳定表达 (图 3). 检测的 38 株再生植株中, 有 17 株 GUS 检测为阳性.

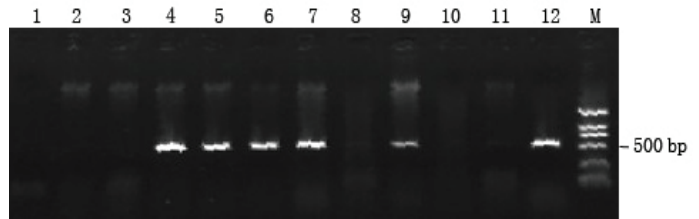
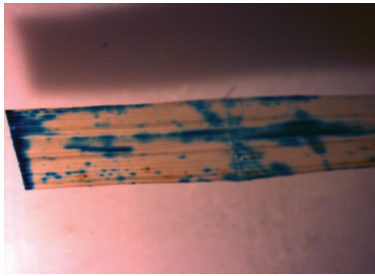
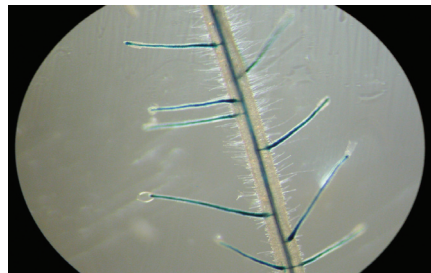


图 2 抗性植株的 PCR 检测结果

1、未转化的再生植株; 2~10、抗性再生植株 (编号 KA1~KA9); 11、空白对照; 12、阳性对照; M、DL2 000 DNA marker



A



B

图 3 GUS 基因在水稻再生植株中稳定表达

A、GUS 基因在水稻再生植株叶片中稳定表达; B、GUS 基因在水稻再生植株根中稳定表达

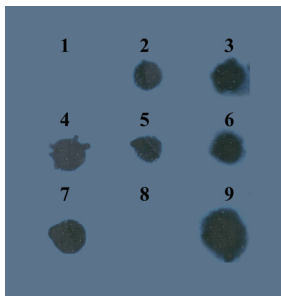


图 4 部分水稻再生植株的斑点杂交检测结果

1~7 转化再生植株编号 KA1、KA3、KA4、KA5、KA6、KA8、KA11; 8 未转化的再生植株; 9 阳性对照 (质粒 pMD18T-KGF)

3.4 斑点杂交检测

取部分转基因植株的叶片提取总 DNA, 进行斑点杂交. 结果显示部分再生植株的 DNA 与地高辛标记的探针结合, 在底片的显影中呈现黑色斑点 (图 4), 进一步证实了 KGF 基因已经整合入部分水稻基因组中.

3.5 RT-PCR 检测

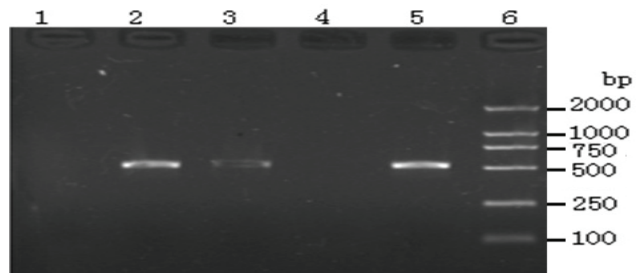


图 5 部分水稻再生植株的 RT-PCR 检测结果

1、阴性对照; 2~5、转化再生植株编号 KA3、KA4、KA5、KA6; 6、DL2 000 DNA maker

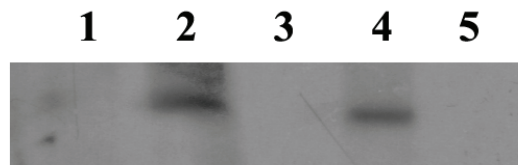


图 6 水稻再生植株的 western blotting 检测结果

1-4、分别为抗性植株 KA3、KA4、KA5 和 KA6; 5、未转化植株

提取部分抗性再生植株的总 RNA, 经反转录反应合成 cDNA, cDNA 作为反应模板, 部分转化植株扩增出长度约为 500 bp 的清晰条带, 而阴性对照(未转化植株 cDNA)没有相应的扩增条带(图 5), 说明目的基因已在部分转化植株中正常转录。

3.6 Western blotting 检测

取四株 KA3、KA4、KA5、KA6 转基因水稻中的总蛋白 SDS-PAGE 电泳后转膜, 用 KGF 抗体进行 western blotting 分析, 显影后观察到其中两株转基因水稻(KA4 和 KA6)中出现大小约为 19 Ku 的杂交信号(图 6), 与预期表达蛋白 KGF-1 的大小相同, 未转化植株并没有相应杂交信号出现, western blotting 结果表明 KGF-1 基因在 KA4 和 KA6 两株水稻中得以有效表达。

4 讨论

利用转基因植物生产药用蛋白具有其独特的优势, 因其具有真核表达系统多肽翻译后的糖基化、磷酸化等正确的修饰和加工能力, 且生产成本低, 在获得高效表达的转基因植株后, 通过增加种植面积, 就能获得大量的药用蛋白。目前利用植物表达系统表达的有抗体^[13]、疫苗^[14]和药用蛋白^[15]等, 部分已经推出商业化产品。以往的研究中多数是将 KGF 基因在原核细胞和酵母细胞中^[6-9]表达, 本研究将人 KGF-1 基因通过农杆菌介导法转化水稻, 获得 38 株抗性植株, 通过 western blotting 获得了 2 株能够表达 KGF-1 蛋白的转基因水稻, 本研究为进一步深入 KGF 的功能研究以及基因工程重组药物开发奠定了基础。

参考文献:

- [1] Igarashi M, Finch PW, Aaronson SA. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor(FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor(FGF-7) [J]. *J Biol Chem*, 1998, 95: 537-543.
- [2] Cardoso WV, Itoh A, Nogawa H, et al. FGF-1 and FGF-7 induce distinct patterns of growth and differentiation in embryonic lung epithelium [J]. *Developmental Dynamics*, 1997, 208(3): 398-405.
- [3] Ohuchi H, Hori Y, Yamasaki M, et al. FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2IIIb in mouse multi-organ development[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 277 (3): 643-649.
- [4] Finch PW and Rubin JS. Keratinocyte growth factor/fibroblast growth factor 7, a homeostatic factor with therapeutic potential for epithelial protection and repair[J]. *Advances in Cancer Research*, 2004, 91: 69-136.
- [5] Farrell CL, Bready JV, Rex KL, et al. Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation-induced gastrointestinal injury and mortality[J]. *Cancer Research*, 1998, 58(5): 933-939.
- [6] 马雁冰, 李 擎, 谢天宏, 等. 重组人角质细胞生长因子-2 基因克隆、表达、纯化与活性分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, 17(6): 761-765.
- [7] 吴斌文, 段招军, 李武平, 等. 人角质化细胞生长因子-2 基因的克隆、表达及产物的纯化、鉴定. *生物工程学报*, 2004, 20(3): 461-464.
- [8] 王园园, 王金凤, 蔡 欣, 等. 重组人 KGF-2 的制备及生物学活性研究[J]. *军事医学科学院院刊*, 2008, 32(1): 34-38.
- [9] 于成德, 杨生玉, 沈永红, 等. 重组人角质细胞生长因子(KGF-2)在毕赤酵母中的克隆与表达[J]. *河南大学学报: 自科版*, 2002, 32(3): 59-61.
- [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理和技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [11] 苏勇波, 邵寒娟, 沈明山, 王鸣刚, 陈 亮. 人角质细胞生长因子的植物表达载体构建[J]. *兰州大学学报: 自科版*, 2006, 42(2): 25-28.
- [12] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. *Short protocols in molecular biology*[M], Translated by MA Xue-jun, SHU Yue-long, et al. 4th ed. Beijing: Science Press, 2005 (in Chinese).
- [13] Ma JK, Hiatt A, Hein M, Vine ND, et al. Generation and assembly of secretory antibodies in plants [J]. *Science*, 1995, 268(5211): 658-660.
- [14] Arakawa T, Chong DK, Langridge WH. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine[J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 292-297.
- [15] Hood EE, Witcher DR, Maddock S, et al. Commercial Production of avidin from transgenic maize: characterization of transformant, production, processing, extraction and purification[J]. *Molecular Breeding*, 1997, 3(4): 291-306.

[责任编辑: 喻玉萍]