

doi: 10.3969/j.issn.1672-8513.2011.06.005

人角质细胞生长因子-1转化番茄的研究

邹金美¹ 张辉煌² 张国广^{1,2} 陈亮²

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

摘要: 人角质细胞生长因子在组织的损伤修复中起着重要的作用. 以番茄子叶为外植体, 通过根癌农杆菌介导法, 将人 KGF-1 导入番茄中, 共获得 12 株独立的抗性转化植株. PCR 和 DNA 斑点杂交结果表明: KGF-1 基因整合入番茄基因组中, 为获得植物源表达的 KGF-1 蛋白打下了基础.

关键词: 角质细胞生长因子-1; 番茄; 遗传转化

中图分类号: S 641.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-8513(2011)06-0454-04

Study on Tomato Transformation with Human Keratinocyte Growth Factor -1

ZOU Jin-mei¹, ZHANG Hui-huang², ZHANG Guo-guang^{1,2}, CHEN Liang²

(1. Biology Department, Zhangzhou Normal University, Zhangzhou 363000, China;

2. School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Keratinocyte growth factor plays an important role in the tissue damage repair. Using sterile tomato cotyledons as explants, the human KGF-1 gene had been introduced into the tomato genome by *Agrobacterium*-mediated transformation method. As a result, a total of 12 independent putative transgenic tomato plantlets were obtained. The results of PCR and DNA dot-blot hybridization showed that KGF-1 gene was integrated into the tomato genome. This work has laid a foundation for further studies on the development of KGF-1 proteins expressed in tomatoes.

Key words: keratinocyte growth factor -1; tomato; genetic 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 Factors, FGFs)超家族中的成员,目前在人的组织中已发现 KGF-1(亦称成 FGF-7)和 KGF-2(亦称成 FGF-10) 2 种,二者间具有 57% 的同源性^[1]. KGF 在体内具有促进上皮细胞的增殖与分化^[2],参与精囊腺和卵泡的发育^[3],同时对保持胃肠系统粘膜的完整性和促进皮肤损伤修复有很重要的作用^[4],因此 KGF 作为一种新型多肽类药物具有广阔的应用前景,肿瘤患者在放、化疗前使用 KGF,能减少体重下降,存活率可显著提高^[5]. KGF 多来源于原核、酵母等工程细胞表达^[6-8]. 番茄细胞是药用蛋白反应器的理想选择之一,本研究以“中蔬 5 号”番茄为转化对象,通过农杆菌介导方法将 KGF-1 转入番茄中,获得了转基因番茄植株,为利用番茄生产可口服 KGF 打下了基础.

1 材料与方法

1.1 材料

番茄种子“中蔬 5 号”购自中国农科院蔬菜花卉研究所; 玉米素(Zeatin, Zt) 购自 Sigma 公司; pBI121,

收稿日期: 2011-08-01.

基金项目: 福建省自然科学基金(2010J01240).

作者简介: 邹金美(1973-),女,硕士,讲师. 主要研究方向: 植物学.

通讯作者: 陈亮(1963-),男,教授,硕士生导师. 主要研究方向: 细胞分子生物学.

DH5 α , LBA4404, pBI1301-KGF-1^[9]保存于厦门大学细胞生物学实验室。

1.2 方法

1.2.1 pBI121-KGF-1植物表达载体构建

根据 pBI1301-KGF-1 质粒中 KGF-1 基因序列合成一对引物, 为便于扩增片段连接入 pBI121, 在引物中分别设计了 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点, 引物序列如下:

正向引物 KGF-F: 5'-CGCTCTAGAATGGCTTGCAATGACATGAC-3'.

反向引物 KGF-R: 5'-GGCGAGCTCTTAAGTTATTGCCATAGGAAG-3'.

以 pBI1301-KGF-1 为模板, 用引物 KGF-F 与 KGF-R 进行 PCR 扩增, 扩增程序为: 94℃ 5 min; 94℃ 45 s; 55℃ 45 s; 72℃ 50 s; 33 个循环; 72℃ 7 min 4℃ 结束扩增, 获得的 KGF-1 片段插入到 pBI121 的 *Xba* I 和 *Sac* I 位点之间, 构建植物表达载体 pBI121-KGF-1, 转化 DH5 α , 筛选阳性克隆测序确认后转化 LBA4404.

1.2.2 子叶外植体准备

用含有效氯 2% 左右的次氯酸钠处理番茄种子 15 min, 灭菌水冲洗 3 次后接种于 1/2 MS 培养基中, 种子萌发后置于光照强度 1800 lx, 16 h 光、8 h 暗的培养室培养. 待子叶完全平展后剪下带有一小段叶柄的子叶作为转化的外植体.

1.2.3 番茄再生系统的优化

在 MS 培养基附加 IAA 1 mg/L 基础上, 比较不同质量浓度的 6-BA 和 Zt 对番茄子叶再生的影响. 在 1/2 MS 培养基的基础上, 比较添加不同质量浓度 IAA 对不定芽生根情况的影响.

1.2.4 农杆菌介导的番茄转化、生根及移栽

将剪下的子叶接种于优化再生培养基中预培养 2 d; 将工程农杆菌培养至 OD₆₀₀ 约为 0.6 h, 取 15 mL 菌液离心收集细胞, 然后用同体积的 1/2 MS 液体培养基重悬农杆菌细胞; 经过预培养的子叶移入重悬细胞中浸泡 3~5 min, 然后弃农杆菌并用灭菌滤纸吸干多余菌液; 在优化培养基上放 2 层无菌滤纸, 将被侵染过的子叶置于无菌滤纸上进行 3 d 共培养; 共培养结束后将外植体转入筛选培养基中, 每 2 w 转入新的筛选培养基中培养; 抗性芽再生后长至 1.5 cm 左右时, 将芽切下, 置入生根培养基中生根; 待苗长出多条粗壮的根并有 4~5 cm 高时, 即可炼苗移栽.

1.2.5 PCR 和基因组 DNA 点杂交检测转基因植株

以 CTAB 法小量提取的抗性植株的 DNA 为模板, 通过 PCR 方法鉴定外源基因在抗性株的整合情况, 合成能够扩增载体 35S 启动子的引物 35S-1: 5'-ATGTGATATCTCCACTGA-3' 和 35S-2: 5'-ACGTACTG-CAATAAATA-3', 引物对扩增片段长度为 760 bp 左右. 点杂交中 DNA 探针采用 PCR 扩增的 KGF-1 基因, 采用地高辛标记 DNA 探针, 方法参照 Bio-Rad 公司 Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒操作, 基因组 DNA 点杂交实验步骤参照文献 [10].

2 结果与分析

2.1 番茄再生体系的优化

6-BA 对番茄子叶不定芽再生诱导效果不如 Zt, 6-BA 诱导很容易在子叶的切割部位形成蓬大、疏松的愈伤, 不定芽直接诱导率较 Zt 低很多, 且芽常较瘦小, 生长状况一般. Zt 对番茄子叶不定芽的再生有很高的诱导率, 在质量浓度为 0.5 mg/L 时, 子叶切口部位多形成致密型绿色小愈伤, 不定芽分化率最高, 分化的不定芽健康、壮实, 也发现 Zt 诱导出的再生芽很多无生长点或只有叶状结构, 这些芽是不具有分化成植株能力的畸形芽. Zt 质量浓度过大时, 番茄子叶较快地出现膨大, 长出疏松的愈伤组织, 甚至是白色泡沫状愈伤, 芽分化能力反而降低, 且会导致大量畸形芽的出现. 高度为 1.5 cm 左右的不定芽, 插入到 1/2 MS 附加不同浓度 IAA 的培养基中, 20 d 后统计生根数发现 IAA 对番茄再生芽生根的诱导效果比较理想, 在 IAA 质量浓度达到 1.0 mg/L 时, 平均根数达到最多(见表 1).

表1 6-BA、Zt 对子叶外植体再生和 IAA 对芽生根的影响

6-BA		Zt		IAA		
质量浓度/(mg·L ⁻¹)	正常出芽率/%	质量浓度/(mg·L ⁻¹)	总出芽率/%	正常出芽率/%	质量浓度/(mg·L ⁻¹)	平均根数
0	0	0	0	0	0	0
0.5	7.5	0.2	69.23	15.40	0.1	5.67
1.5	15	0.5	93.33	36.37	0.2	8.00
2.0	10	1.0	77.78	30.60	0.5	13.60
2.5	7.5	1.5	68.46	11.50	1.0	15.00
3.0	2.5	2.0	66.67	28.20	2.0	9.00

2.2 植物表达载体 pBI121-KGF-1 的构建及转化农杆菌细胞

利用设计的 KGF-F 和 KGF-R 引物对,通过 PCR 扩增得到目的大小片段(约 600 kb).目的片段通过 *Xba*I/*Sac*I 双酶切后插入到 pBI121 中得到植物表达载体.转化大肠杆菌后,将通过 PCR 鉴定(图 1a)及限制性内切酶酶切鉴定(图 1b)获得的阳性克隆测序确认后命名为 pBI121-KGF-1.提取 pBI121-KGF-1 质粒转化农杆菌,通过 PCR 鉴定获得阳性转化子,即获得携带有 KGF-1 基因的工程农杆菌.

2.3 转基因番茄植株再生及移栽

将切下的子叶置入 MS 附加 0.5 mg/L Zt + 1.0 mg/L IAA 培养基中预培养 2 d,农杆菌浸染 5 min 后共培养 3 d 转入筛选培养基中(MS + 0.5 mg/L Zt + 1.0 mg/L IAA + 300 mg/L 头孢霉素 + 50 mg/L 卡那霉素)进行筛选培养,筛选过程中及时清除掉受农杆菌污染严重的子叶.经过 1~2 w 培养,大多数子叶颜色变为褐色,萎蔫死亡;有些子叶切口部位会形成少量白色疏松的愈伤组织,在继代筛选培养中死去,只有少数子叶的切口部位能逐渐长出致密的绿色愈伤组织并保持不褪色,约 3~4 w 后能分化形成小芽点并逐渐分化出小芽(图 2a),但也有小芽点仅能分化出 1~2 片叶,无正常的生长点.抗性芽长高至 1.5 cm 左右时,将芽切下转移至生根培养基中(1/2 MS + 1.0 mg/L IAA + 200 mg/L 头孢霉素)生根(图 2b),少数不能生根的抗性芽则放弃.通过转化操作共获得抗性再生苗 12 株,抗性芽分化率为 4.25%.

2.4 转基因植株 PCR 和 DNA 斑点杂交鉴定

取 12 株抗性再生苗和 1 株未转化植株的叶片,提取其总 DNA,以 35S-1/35S-2 作为引物进行 PCR 鉴定.结果表明未转化的植株 DNA 为阴性,中蔬 5 号抗性番茄植株中能扩增出 760 bp 左右的目的带(图 3 箭头所指),12 株抗性株中 8 株 PCR 检测为阳性,初步表明 KGF-1 基因已整合入部分番茄植株的基因组中.取 PCR 阳性植株的总 DNA,以未转化植株为阴性对照,以

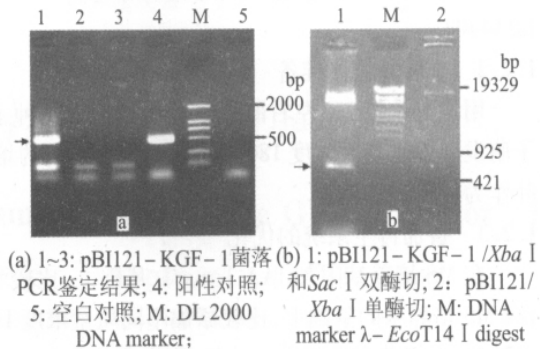
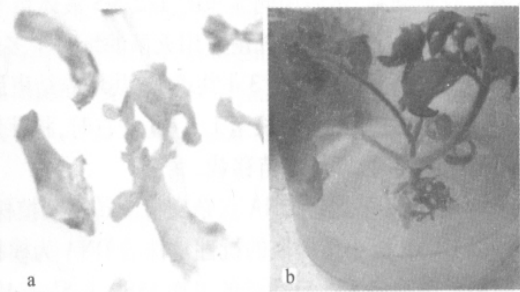


图1 重组植物表达质粒pBI121-KGF-1 PCR (a)和酶切鉴定(b)



(a) 抗性芽再生 (b) 生根的抗性苗
图2 农杆菌LBA4404-pBI121-KGF-1转化中蔬5号番茄

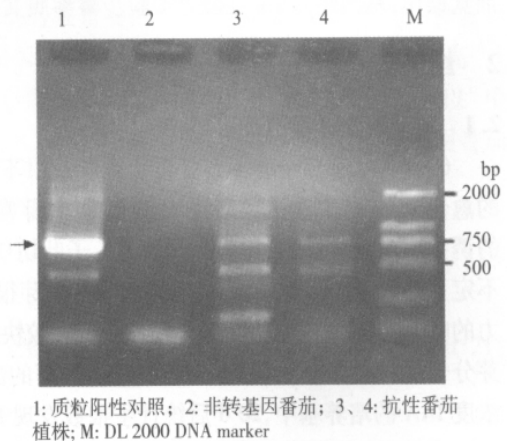


图3 部分转KGF-1基因番茄PCR检测 (35S-1/35S-2引物)

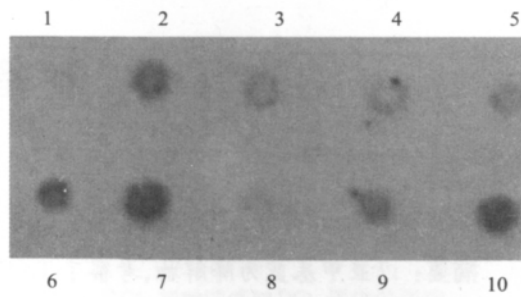
pBI121-KGF-1 质粒为阳性对照, 进行斑点杂交。结果显示有 7 株的 DNA 与地高辛标记的探针结合, 在底片的显影中呈现清晰的黑色斑点(图 4), 进一步证实了 KGF 基因已经整合入至少 7 株番茄的基因组中。

3 讨论

植物细胞作为生物反应器生产重组蛋白具有成本低廉、保存运输方便、免疫原性好、安全等诸多优点^[10], 目前利用植物生产药用蛋白或疫苗是植物转基因研究的侧重点之一, 番茄作为一种模式植物, 其遗传转化等方面的研究比较多, 且易栽培、产量高, 尤其是具有果实可以生食的优点对于生产口服药用蛋白尤其有利, 近年来用番茄生产疫苗的研究^[11-12]较多。鉴于 KGF 因子在组织损伤修复的良好作用, 不少研究尝试了将 KGF 在异源细胞中表达, 之前我们尝试了将 KGF-1 转入水稻中并获得了可表达的植株^[13], 但上述细胞表达出的蛋白都需要进一步的提纯工作, 考虑到番茄果实可以生食的特点, 本研究将 KGF-1 转入番茄中, 为下一步筛选出对消化系统溃疡的患者有辅助治疗作用的口服 KGF 药物番茄打下了基础。

参考文献:

- [1] IGARASHI M, FINCH P W, AARONSON S A. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor(FGF) - 10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor(FGF - 7) [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273(21): 13 230 - 13 235.
- [2] CARDOSO W V, 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] ALARID E T, RUBIN J S, YOUNG P, et al. Keratinocyte growth factor functions in epithelial induction during seminal vesicle development [J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91(3): 1 074 - 1 078.
- [4] FARRELL C L, BREADY J V, REX K L, et al. Keratinocyte growth factor protects mice from chemotherapy and radiation - induced gastrointestinal injury and mortality [J]. Cancer Research, 1998, 58(5): 933 - 939.
- [5] FINCH P W, RUBIN J S. 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.
- [6] 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 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 461 - 464.
- [7] 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.
- [8] 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: 自然科学版, 2002, 32(3): 59 - 61.
- [9] 苏勇波, 邵寒娟, 沈明山, 等. 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: 自然科学版, 2006, 42(2): 25 - 28.
- [10] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] JANI D, MEENA L S, RIZWAN - UL - HAQ Q M, et al. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants [J]. Transgenic Research, 2002, 11(5): 447 - 454.
- [12] WALMSLEY A M, ALVAREZ M L, JIN Y, et al. Expression of the B subunit of *Escherichia coli* heat - labile enterotoxin as a fusion protein in transgenic tomato [J]. Plant Cell Reports, 2003, 21(10): 1 020 - 1 026.
- [13] 张国广, 苏勇波, 沈明山, 等. 人角质细胞生长因子 - 1 在水稻中的表达 [J]. 漳州师范学院学报: 自然科学版, 2010, 23(3): 97 - 100.



1: 未转化的再生植株; 2~9: PCR检测阳性植株; 10: 阳性对照(质粒pBI121-KGF-1)

图4 PCR阳性植株的斑点杂交检测结果

(责任编辑 王琳)