

人胰岛素样生长因子-I 基因农杆菌工程菌株的构建

周 鹏^{1,2}, 王跃进¹, 贺普超¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 中国热带农业科学院 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

[摘 要] 采用固相亚磷酸三酯法人工化学合成了人胰岛素样生长因子-I (huIGF-I) 基因的4条寡核苷酸片段, 再通过片段1、2与3、4末端互补配对和Klenow酶促补平及酶切连接成为完整的huIGF-I DNA片段, 用EcoR I / Pst I 酶切后克隆于pGEM T-Easy Vector, 经测序证明所得DNA序列与设计的序列完全一致; 选用植物偏爱密码子校正了起始密码子ATG下游的6个密码子, 并在ATG处增加Kozak序列后, 插入pBI121的BamHI / Sac I 位点, 构建了以35S为启动子的植物表达载体; 以Hind III / EcoR I 切下“35S-Kozak-IGF-I-NOS(ter.)”插入pCAMBIA2300之Hind III / EcoR I 位点, 构建huIGF-I植物表达载体; 通过CaCl₂直接转化法将表达载体导入农杆菌EHA105(Rif.^r), 并以菌落原位杂交技术和DNA dot blot对重组农杆菌进行了筛选, 所获得的重组农杆菌菌株为培育huIGF-I药用植物奠定了基础。

[关键词] 胰岛素样生长因子-I; 化学合成; 植物表达载体; 重组农杆菌; 筛选

[中图分类号] Q781

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)03-019-05

利用基因工程技术把外源基因导入植物细胞是现代遗传育种的重要途径, 根癌农杆菌Ti质粒基因转化系统是目前研究最多、理论机理最清楚、技术方法最成熟的基因转化途径^[1]。人胰岛素样生长因子I (human Insulin-like Growth Factor I, huIGF-I) 是一种从血清中发现的具有促进多种细胞生长功能的活性多肽, 是由70个氨基酸残基组成的单链多肽, 含有3对二硫键, 其结构与胰岛素原相似^[2~4]。它通过自分泌、旁分泌、内分泌等方式发挥生物学功能^[5], 在神经损伤、糖尿病、生长迟滞、骨质疏松等疾病的治疗中已被证明是有效的。国外利用huIGF-I治疗糖尿病、肾衰、肌萎缩性侧索硬化症及生长激素受体缺乏症已进入I、II期临床试验。huIGF-I基因是单拷贝基因, 定位在12号染色体q22-24.1^[6], 由5个外显子和4个内含子构成, 其长度大于4 000 bp, 因此用一般的基因克隆技术难以获得该基因。本研究采用化学方法人工半合成了huIGF-I基因, 并且利用植物偏爱密码子校正了起始密码子ATG下游的6个编码子核苷酸, 在ATG处添加了有利于植物RNA聚合酶识别结合的Kozak保守序列, 构建成了huIGF-I植物表达载体, 采用CaCl₂直接转化法将huIGF-I植物表达载体导入农杆菌EHA105, 构建重组农杆菌菌株, 为

huIGF-I基因进一步转化葡萄等作物, 培育药用植物打下了良好的基础。国内外尚未见有关用huIGF-I基因转化植物培育获得药用植物方面的研究报道。现将本研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli* DH5 α 、EHA105、pBI121由热带作物生物技术国家重点实验室保存, pCAMBIA2300由中科院北京遗传所朱祯教授惠赠(CAMBIA公司产品, Australia), pGEM T-Easy Vector(T-载体)购自Promega公司。

1.1.2 酶及主要生化试剂 限制性内切酶EcoR I, Pst I, BamH I, Sac I及Klenow酶、Taq酶、T4-DNA连接酶、WizardTM DNA Clean-up System试剂盒均购自Promega公司, DIG-Labeling and Detection kit为宝灵曼公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 寡核苷酸片段的设计和合成 利用PC/GENE软件分析并参照文献^[7]的方法进行设计, 采用固相亚磷酸三酯法合成, 由上海生工生物工程

[收稿日期] 2000-08-28

[基金项目] 博士后科学基金资助项目(8784)

[作者简介] 周 鹏(1963-), 男, 安徽绩溪人, 教授, 博士后, 主要从事植物基因工程疫苗的研究。

技术服务公司完成。

1.2.2 IGF-I 基因的合成 采用文献[7]的半合成法。

1.2.3 IGF-I 基因克隆和序列测定 基因克隆采用常规克隆技术,序列测定由中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室完成(使用 PE 公司生产的 ABI 377 型测序仪)。

1.2.4 IGF-I 基因的改造及植物表达载体的构建 利用植物偏爱密码子校正 ATG 后 6 个氨基酸密码子,并在 ATG 处添加 Kozak 保守序列,采用 PCR 引物突变法进行,引物设计依据文献[8],引物由上海生工生物工程技术服务公司合成;huIGF-I 植物表达载体构建按常规方法。

1.2.5 IGF-I 基因植物表达载体转化农杆菌 EHA105 及菌落原位杂交 采用文献[9]报道的 CaCl₂ 直接转化法进行农杆菌转化,以文献[1]的方法进行菌落原位杂交和 DNA dot blot 分析。

F₁(59 bp) 5'GCGAATTCATGGGTCCAGAACTCTGTGTGGTGTGAAGTGGTTGATGCTCTGCAGTTT3'
EcoR I

F₂(77 bp) 5'GCTCTAGAGCTAGAACCCTAACCCAGTCGGTTTGTAAAGTAAAAACCACGATCACCACAA
Xba I
ACAACTGCAGAGCATC3'

F₃(77 bp) 5'GCTCTAGACGTGCTCCACAGACTGGTATCGTTGATGAATGTTGCTTTCGTTCTTGTGATCTG
Xba I
CGTCGTCTGGAAATG3'

F₄(59 bp) 5'GCCTGCAGTTAAGCAGATTTAGCCGGTTTCAGCGGAGCACAGTACATTTCCAGACGACG3'
Pst I

为方便构建更有效的植物表达载体,重新设计合成1对引物,在引物1的5'端引入 BamH I 位点和“A××ATGG”kozak 保守序列,它的存在将有利于翻译的起始^[11]。在引物2的5'端引入 Sac I 位点。

P1(28 bp) 5'ACGGATCCCCACCATGGGA CCA GAA ACT3'
BamH I Kozak

P2(23 bp) 5'GCGAGCTCTTAAGCAGATTTAGC3'
Sac I

2.2 huIGF-I 的半合成、克隆和序列测定

按等比例将合成的片段1、2和3、4分别混合,在 2400 型 PCR 仪上 75 °C 保温 5 min, 25 °C 温浴 1 h, 加 5 μmol/min Klenow 酶的作用补平 2 h; 再用 Xba I / EcoR I 酶切片段 1、2 合成的短片段, 用 Xba I / Pst I 酶切片段 3、4 合成的短片段, 酶切片断用 Wizard™ DNA Clean-up System kit 回收后, 在 T4-DNA 连接酶作用下将两个片断同时插入 pGEM-3zf Vector 的 EcoR I / Pst I 位点, 转化感受态大肠杆菌 *E. coli*

2 结果与分析

2.1 huIGF-I 基因的 4 条寡核苷酸片段的设计与合成

设计了 huIGF-I 基因的 4 条寡核苷酸片段, 长度分别为 59, 77, 77 和 59 bp, 在片段 1 的 5' 端设计了 EcoR I 位点, 并添加了 ATG 起始密码, 在片段 4 的 5' 端添加了 Pst I 位点和 TAA 终止密码。有研究报告^[10], 起始密码下游的几组密码子能改善翻译起始和 mRNA 的二级结构, 有利于提高基因的表达, 因此采用植物偏爱密码子设计片段 1 ATG 后连续 6 个密码子。此外, 在不改变氨基酸序列的前提下, 在片段 2、3 连接处设计了 Xba I 酶切位点。所有设计过程中都使用 PC/GENE 软件和文献[8]引物设计原则, 对 4 条片段和引物互补配对及同源性进行了分析, 以确保基因合成和改造的准确性。

DH5α, 在涂布 X-gal/IPTG 的 Amp. 100 μg/mL 的 LB 平板上筛选白色菌落, 用 EcoR I / Pst I 酶切鉴定, 能切下约 210 bp 的 DNA 片段, 则为阳性克隆, 命名为 pGIGF-1. 1; 将测定的阳性克隆 DNA 序列与已发表的序列^[7]比较, 结果表明合成的 huIGF-I 基因正确率为 100%。

2.3 huIGF-I 基因的改造、植物表达载体的构建

以测序验证的质粒 DNA 为模板, 用引物 P1/P2 进行 PCR 扩增, 扩增程序为 95 °C, 5 min → 95 °C, 30 s → 35 °C, 30 s → 72 °C, 40 s, 共进行 30 个循环, 回收约 210 bp 的 DNA 片段(图 1), 在 T4-DNA 连接酶作用下插入 pGEM T-Easy 载体, 将筛选到的阳性克隆(命名为 pGIGF-1. 2)用 BamH I / Sac I 酶切回收后插入 pBI121 载体的 BamH I / Sac I 位点, 转化感受态 *E. coli* DH5α, 在含有 Kan. 50 μg/mL 的 LB 平板上筛选阳性克隆, 经 BamH I / Sac I 酶切鉴定, 能切下约 210 bp 的 DNA 片段, 则为阳性克

隆,命名为 pBIGF-I;以 *Hind* III/*Eco*R I 酶切 pBIGF-I,分离约1 400 bp 的 DNA 片段,插入 pCambia2300之 *Hind* III/*Eco*R I 位点,转化感受态 *E. coli* DH5 α ,在含有 Kan. 50 μ g/mL 的 LB 平板上筛选阳性克隆,经 *Bam*H I/*Sac* I、*Hind* III/*Eco*R I 酶切鉴定,能分别切下约210 bp 和1 400 bp 的 DNA 片段,则为阳性克隆,命名为 pCIGF-I,植物表达载体构建流程见图2。由于 huIGF-I DNA 片段过小,从 pCIGF-I 植物表达载体上切下进行电泳分析时条带不清晰,故本研究采用菌落原位杂交和 DNA dot blot 直接进行鉴定筛选。pCIGF-I 在进一步的使用中较 pBIGF-I 有如下优点:松弛、多拷贝型质粒,适于获得大量质粒和对农杆菌进行直接转化、基因枪转化植物等工作。

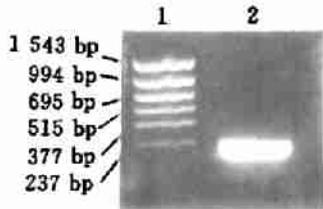


图1 huIGF-I PCR 扩增产物
1. PCR 标准分子质量(华美产品);2. PCR 扩增产物
Fig 1 Amplification of huIGF-I by PCR
1. PCR Marker;2. PCR Product of huIGF-I

2.4 huIGF-I 基因植物表达载体转化根癌农杆菌 EHA105和菌落原位杂交

采用 $CaCl_2$ 直接转化法将 pBIGF-I 和 pCIGF-I 分别转化感受态农杆菌 EHA105,涂布含 Kan. 50 μ g/mL 的 LB 平板,在 28 $^{\circ}C$ 下培养 2~3 d,可见单菌落的生长;利用菌落原位杂交技术对单菌落进行筛选,其中用 DIG-Labeling Kit 标记 huIGF-I 作为杂交探针,pCIGF-I /EHA105 的杂交结果见图3,与影印平板对照可见,转化阳性率是相当高的,为避免原位杂交的假阳性结果,随机挑取原位杂交的阳性单菌落培养,提取质粒 DNA,作 DNA dot blot 试验,结果见图4。从图4可见,在10个样品中除 A3、B4 和 C2为阴性外,其他都为阳性,阳性率为70%,说明本研究的菌落原位杂交是有假阳性的;一般而言,对平板上过多的菌落进行筛选,采用原位杂交法省时省力,但若平板上的菌落少于30个,采取 DNA dot blot 技术进行筛选鉴定则是明智的。将筛选到的阳性菌落命名为 pIGF-I /EHA105 和 pCIGF-I /EHA105,经活化培养后,配制成15%甘油的菌液冻存于-70 $^{\circ}C$ 冰箱,作为植物基因转化之备用菌株。

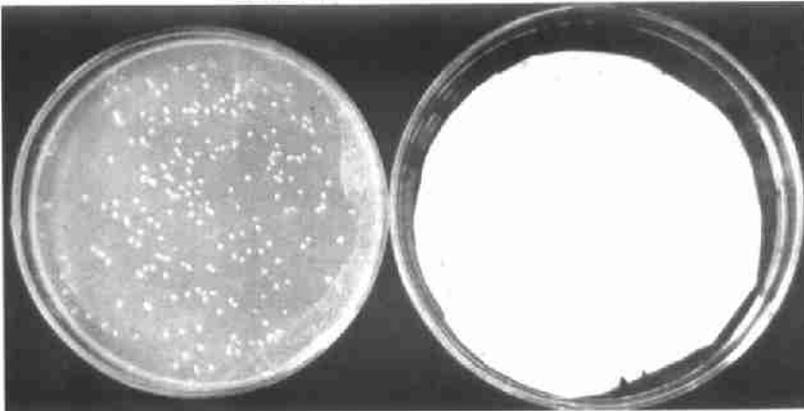


图3 菌落原位杂交
左,pCIGF-I 转化平板;右,杂交结果
(以 DiG-Labeling huIGF-I 为探针)
Fig. 3 Hybridization in Situ
Left:A transformation disk of pCIGF-I ;
Right;Hybridization result (DiG-labeling
huIGF-I used as a probe)

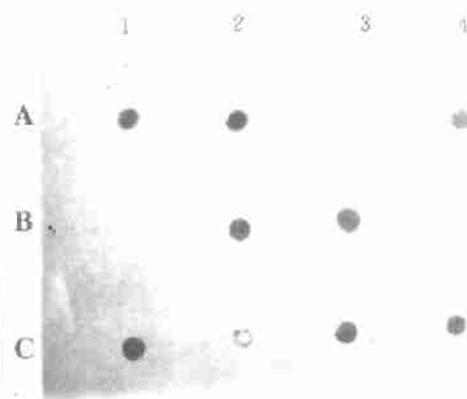


图4 DNA dot blot
A1~4、B2~4、C2~4为农杆菌重组质粒;
B1为空白载体(pCambia2300),-CK;
C1为 pCIGF-I 表达载体,+CK
Fig 4 DNA dot blot
A1-4、B2-4、C2-4 are agrobacterium
recombination plasmids;B1 is -CK;
pCambia2300;C1 is +CK,pCIGF-I

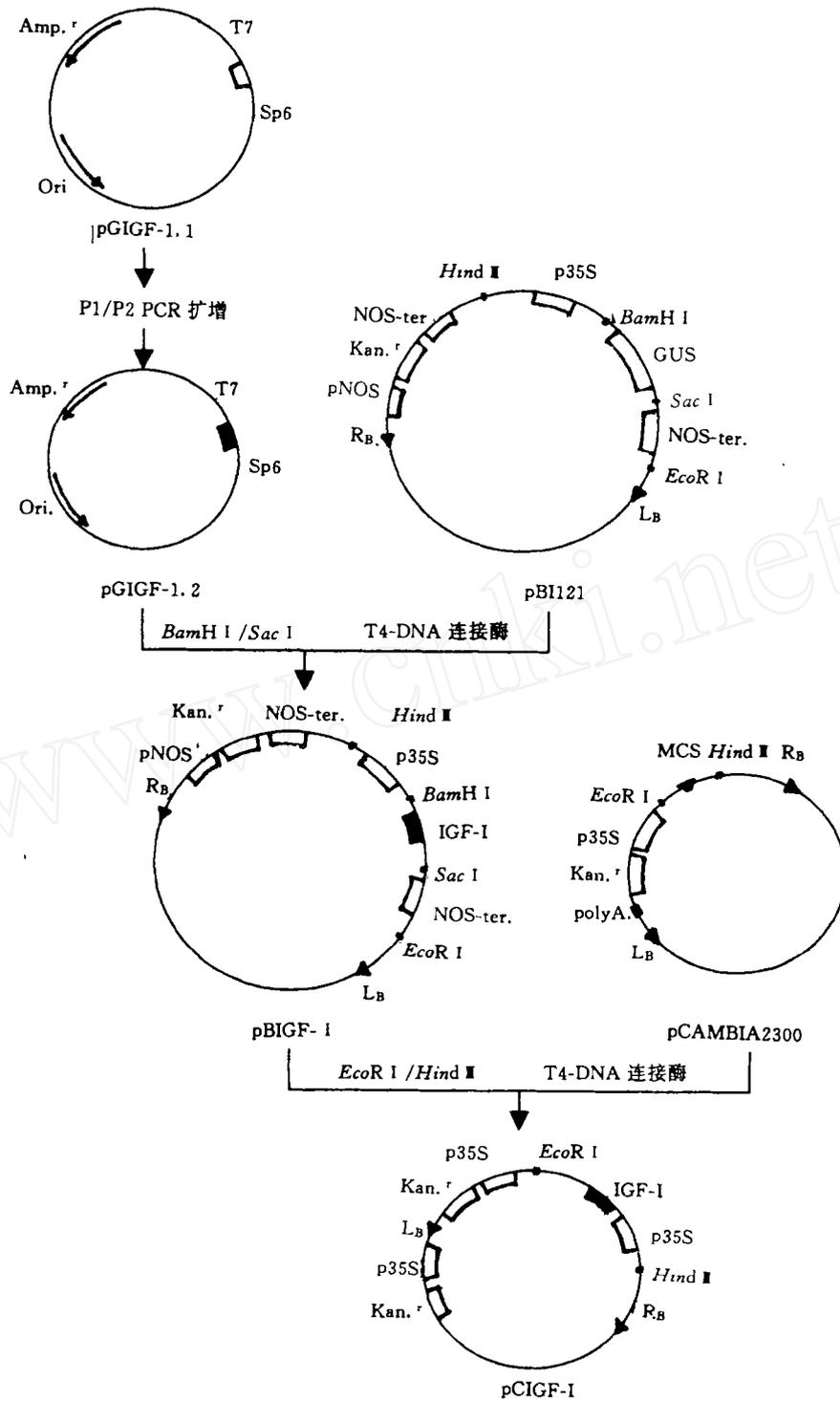


图2 huIGF-I 植物表达载体构建流程图

Fig. 2 The procedure of construction of plant expression vector of huIGF-I

3 讨 论

人胰岛素样生长因子-I (huIGF-I) 是一种具有促细胞分化和增殖活性, 又具有类似胰岛素代谢活性的多肽物质。近年来, 重组 huIGF-I 已作为一种生物制剂被用于糖尿病、Laron 综合症、骨质疏松症、神经炎等的试验性临床治疗。利用微生物表达系统(如大肠杆菌、酿酒酵母)已对 huIGF-I 进行了表达研究, 并得到了具有生物活性的 huIGF-I 基因工程产物, 但表达量不够高且成本昂贵, 若将其基因转化植物, 如果树作物, 成为药用植物, 人们通过口服途径获得药效, 这不失为一条经济、方便的路子; 有

研究报道^[12], 苦瓜中有类似 huIGF 的物质(称植物类胰岛素), 用苦瓜匀浆液给动物静脉注射和灌胃, 获得了相同的降血糖药用效果, 通常人们多食苦瓜得到类似的降血糖效果也证明了这一点; 本研究构建 huIGF-I 植物表达载体, 为转化植物培育 huIGF-I 药用植物的研究和应用打下基础。在众多的植物基因转化技术中, 农杆菌 Ti 质粒转化系统与其他基因转化体系如 DNA 直接导入、基因枪轰击转化等相比, 具有许多突出的优点^[1], 因此构建 huIGF-I 重组农杆菌菌株, 为通过植物基因工程技术培育 huIGF-I 药用植物奠定了物质基础。

[参考文献]

- [1] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京, 科学出版社, 1998. 515—518, 538—539.
- [2] Forsberg G, Palm G, Ekebacke A, et al. Separation and characterization of modified variants of recombinant human insulin-like growth factor I derived from a fusion protein secreted from *Escherichia coli*[J]. *Biochem J*, 1990, 271: 357—361.
- [3] Petrides P F, Hintz R L, Bohlen P, et al. An improved method for the purification of human insulin-like growth factor I and II[J]. *Endocrinology*, 1986, 118(1): 2034—2040.
- [4] Johansson A G, Lindh E, Ljunghall S. IGFs; function and clinical importance. 4 Growth hormones, insulin-like growth factor I, and bone; a clinical review[J]. *J Int Med*, 1993, 234: 553.
- [5] Cohick W S, Clemmons D R. The insulin-like growth factors[J]. *Annu Rev Physiol*, 1993, 55: 131.
- [6] 刘宝英, 王会信. 胰岛素样生长因子I 的结构与功能研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25(4): 311—315.
- [7] 刘宝英, 赵 明, 王会信, 等. 人胰岛素样生长因子I 基因的人工半合成和克隆[J]. *北京军事医学科学院院刊*, 1997, 21(1): 20—23.
- [8] 周 鹏. 引物间同源性和裂口对 PCR 扩增的影响[J]. *生命科学研究*, 2000, 4(1): 35—40.
- [9] 崔 武, 刘 炜, 吴光耀. 高效、快速地将外源 DNA 导入根癌农杆菌[J]. *生物工程学报*, 1995, 11(4): 350—355.
- [10] Elizabeth E M, Jeff L, Mary E. Codon usage in plant genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(2): 477—492.
- [11] Cavener D R, Stuart. Eukaryotic start and stop translation sites[J]. *Nucleic Acids Res*, 1991, 19: 3185—3192.
- [12] 权建新, 蒿兴厚, 张振强, 等. 苦瓜果实中植物胰岛素降血糖研究[J]. *陕西医学杂志*, 1991, 20(11): 691—693.

The construction of recombinational agrobacterium of huIGF-I

ZHOU Peng, WANG Yue-jing, HE Pu-chao

(Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Four oligonucleotides were synthesized according to human insulin-like growth factor I DNA sequence by means of the solid-phase phosphotriester method. Two pairs of oligos 1 and 2, 3 and 4 had respectively been annealed by their 15 base-complementarity, and then polymerized into two intact double-stranded gene, which was then inserted into pGEM T-Easy vector site of *EcoR* I / *Pst* I, DNA sequencing show that the sequence of synthesized gene of human IGF-I was the same as that of the designed one. After sequencing, the partial codons of plant were choosed for correcting 6 codons behind ATG, and Kozak was added, all for reconstructing IGF-I, which would be inserted into *BamH* I / *Sac* I site of pBI121, then pBI121 was digested with *Hind* III / *EcoR* I and the fragment of 35S-Kozak-IGF-I-Nos(ter). was inserted into *Hind* III / *EcoR* I site of pCMBIA2300, a new plant expression vector was formed, transferred into EHA105, finally, a kind of recombinational agrobacterium strain was reconstructed, these results had been identified in this study.

Key words: human insulin-like growth factor-I (huIGF-I); chemical synthesis; plant expression vector; recombinational agrobacterium; identification