

# 鲑鱼降钙素基因向烟草遗传转化的初步研究\*

赵吉强<sup>1</sup>, 李霞<sup>2</sup>, 程智慧<sup>1</sup>, 陈杭<sup>2</sup>, 李元<sup>3</sup>, 陈松森<sup>3</sup>

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 国家蔬菜系统工程中心, 北京 100089;

3 中国医学科学院 生物技术研究所, 北京 100050)

[摘要] 报道了鲑鱼降钙素基因植物表达载体的构建及其向烟草的遗传转化。由鲑鱼降钙素的链霉菌表达载体 pM S680, 通过限制性内切酶 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切后将其克隆至中间载体 pART7, 获得中间表达载体 pART7-sCT, 从而给目的基因加上启动子和终止子, 将限制性内切酶 *Nor* I 酶切 pART7-sCT 得到的带有启动子和终止子的目的基因片段克隆至载体 pART27, 得到鲑鱼降钙素基因的植物表达载体 pART27-sCT。通过农杆菌介导的叶盘法将其转至烟草, 经 PCR 检测已得到转基因植株。

[关键词] 鲑鱼降钙素; 基因; 植物表达载体; 烟草; 遗传转化

[中图分类号] S965.232.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)01-0061-04

随着基因工程技术的发展, 利用转基因植物生产基因工程疫苗和药用重组蛋白是目前植物基因工程研究的一大热点。利用转基因植物生产药用重组蛋白, 除了能正确转录加工基因产物以外, 最大的优点是比细菌发酵和细胞培养生产方式更经济实惠, 在筛选到高效表达的植株后, 只需增加种植面积就可扩大产量, 因而易于形成产业化, 而且种子易于贮存, 有利于重组蛋白的生产和运输, 同时降低了药品的生产成本, 简化了用药途径, 更便于在贫困地区和第三世界推广<sup>[1]</sup>。据不完全统计, 迄今为止, 国外已经有几十种药用蛋白质或多肽在植物中得到成功表达, 其中包括人的细胞因子、表皮生长因子、促细胞生长素、干扰素、生长激素、单克隆抗体和可作为疫苗用的抗原蛋白等<sup>[2-4]</sup>。一些研究机构或公司已开始从这些药物蛋白的生产中获得巨大经济效益<sup>[5]</sup>。

降钙素(Calcitonin, CT)是由32个氨基酸组成的肽类激素, 其主要功能是在人体内调节钙磷代谢, 抑制破骨细胞的活性, 保护骨骼。所有动物都能产生降钙素, 在哺乳动物中由甲状腺产生, 在低等脊椎动物中由后鳃体产生, 其中由后鳃体产生的降钙素如鲑鱼降钙素(salmon calcitonin, sCT)在人体内的活性比哺乳动物降钙素活性高30~50倍<sup>[6]</sup>。随着我国人口的老齡化, 对降钙素的需求日益增加, 探讨用植物基因工程手段大规模生产降钙素的新途径具有重要的理论和实践价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli* DH5 $\alpha$ , *A. tumefaciens* C58, 质粒载体 pART7, pART27 由国家蔬菜系统工程中心种质改良实验室提供, 携带有鲑鱼降钙素基因的质粒 pM S680 由中国医学科学院李元教授惠赠。

1.1.2 转化材料 所用烟草 SR1 Wild type 无疫苗由国家蔬菜工程中心种质改良实验室提供。

1.1.3 试剂 所用的酶、常规化学试剂均购自 Promega 公司, 大连宝生物公司等。

1.1.4 引物 根据已发表的鲑鱼降钙素基因的核苷酸序列设计引物, PCR 引物由北京赛百盛公司合成。

上游引物 P<sub>1</sub>: 5' GCA TCG ATG TGC TCC AAC CTC AGC ACC 3';

下游引物 P<sub>2</sub>: 5' GCG GAT CCT ACT AGC CCG GCG TAC CAC TTC CCG 3'。

1.1.5 培养基 以MS培养基为基本培养基附加质量分数为0.8%琼脂, 3%蔗糖。

共培养基: MS + 0.5 mg/L 6-BA;

诱芽培养基: MS + 0.5 mg/L 6-BA + 75 mg/L Km + 300 mg/L Carb;

生根培养基: 1/2 MS + 75 mg/L Km。

\* [收稿日期] 2001-01-15

[基金项目] 北京市重点实验室资助项目(951890200)

[作者简介] 赵吉强(1974-), 男, 山东禹城人, 在读硕士, 主要从事蔬菜生物技术研究。

## 1.2 方法

1.2.1 DNA的制备和重组质粒的构建 质粒的提取、酶切和连接方法参照文献[7],质粒的纯化采用 Wizard<sup>plus</sup> DNA 纯化试剂盒进行。将 pMS680 利用限制性内切酶 *Hind* III, *Bam* H I 进行酶切获得目的基因片段 sCT, 同时将中间载体 pART7 用 *Hind* III, *Bam* H I 酶切, 把目的基因片段通过 T<sub>4</sub> DNA 连

接酶克隆至质粒 pART7, 获得中间表达载体 pART7-sCT; 然后将质粒 pART7-sCT 用 *Not* I 酶切, 从而获得带有 CaMV 35S 启动子和 Nos 终止子的目的基因片段, 将其克隆至 *Not* I 酶切的质粒载体 pART27, 获得植物表达载体 pART27-sCT (图 1)。采用基因脉冲导入仪导入农杆菌 C58。

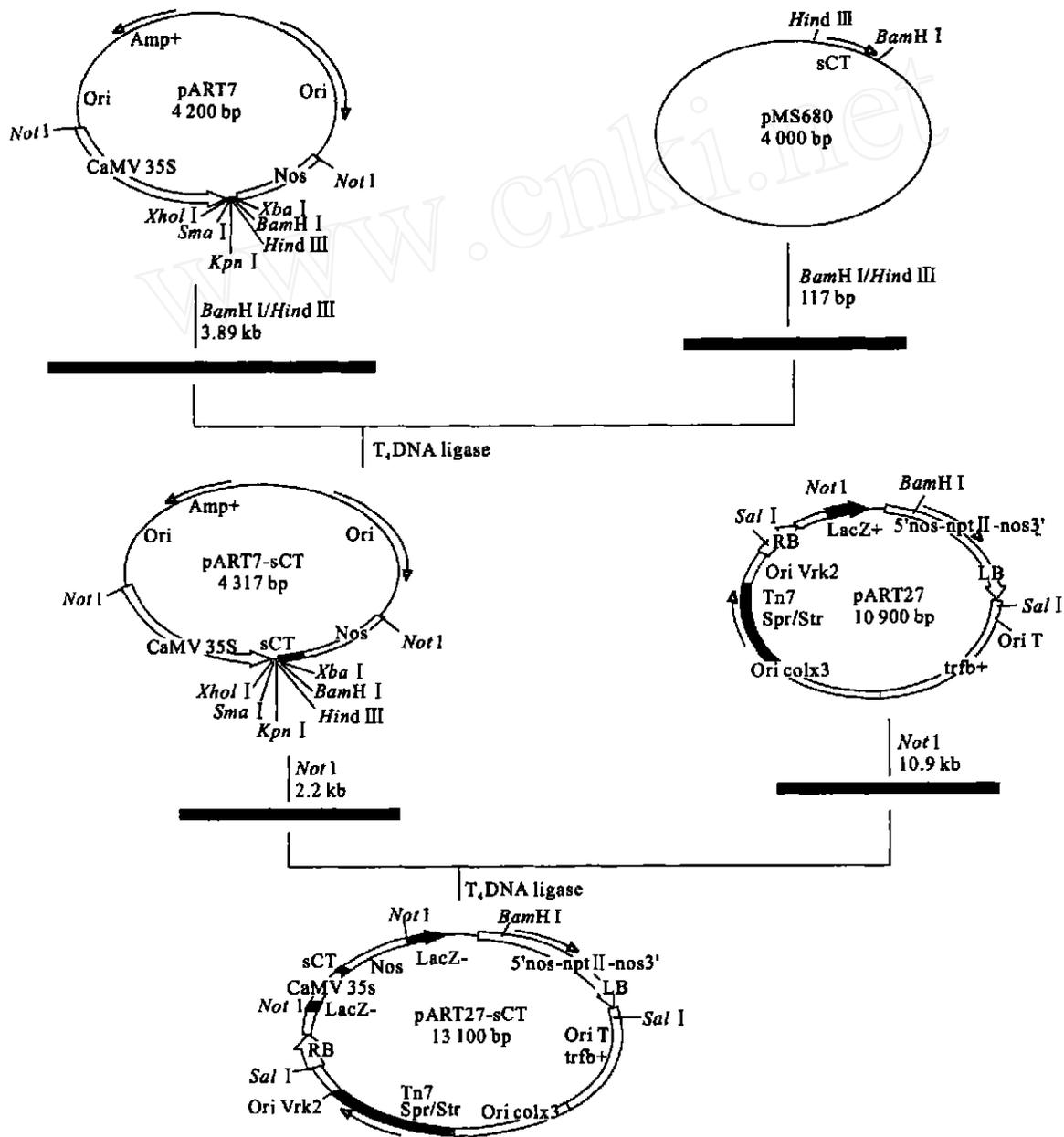


图1 植物表达载体 pART27-sCT 构建示意图

Fig 1 Construction of tobacco vector pART27-sCT

1.2.2 根癌农杆菌介导的叶盘法转化烟草 将含有重组质粒 pART27-sCT 的农杆菌 C58 在 YEB 培养基, 28 ℃, 210 r/min, 振荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.3~

0.5; 4 ℃, 6 000 r/min 离心 8 min, MS 液体 1:1 重悬, 烟草无菌苗叶片去掉主脉切成 0.5~1 cm<sup>2</sup> 小片, 菌液中浸染 30 min, 灭菌滤纸吸干菌液, 接种至

MS+0.5 mg/L 6-BA 的共培养培养基, 28 °C 培养 2 d 后, 接种至 MS+0.5 mg/L 6-BA+75 mg/L Km+300 mg/L Carb 的诱芽培养基, 置光下 25 °C 培养 10 d 左右, 芽长至 1~1.5 cm 时切下, 接种于 1/2 MS+75 mg/L Km 的生根培养基生根。生根后的再生苗移植到营养土的苗钵中, 温室栽培。随机取苗钵中的烟草再生植株进行叶片鉴定。

1.2.3 转基因植株的鉴定 (1) 植物总 DNA 的粗提液的微量制备。取 5~10 mg 叶片, 置 Eppendorf 管中, 加入 50~100 μL 0.5 mol/L NaOH, 用玻璃棒研碎, 5 000 r/min 离心 2 min, 取 5 μL 上清液转入另一新的 Eppendorf 管中, 加入 100 mmol/L Tris-HCl 溶液至 50~500 μL, 备用<sup>[8]</sup>。(2) PCR 鉴定。取 1 μL 植物 DNA 提取物, 加入 PCR 反应体系中, 直接进行 PCR 反应, 反应程序为: 96 °C, 10 min; 94 °C, 1 min; 40 °C, 80 s; 72 °C, 1 min (5 个循环); 94 °C, 1 min; 51 °C, 70 s; 72 °C, 1 min (30 个循环); 72 °C, 10 min。质量分数 2% 的琼脂糖凝胶检测扩增结果, 有 sCT 基因片段的为阳性植株。

## 2 结果与分析

### 2.1 sCT 基因植物表达载体的构建

2.1.1 重组质粒的酶切鉴定 将构建的中间载体 pART7-sCT 用 *Bam*H I 和 *Hind*III 双酶切, 质量分数 0.7% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果表明, pART7-sCT 经双酶切后可分为 2 个片段, 大小分别为 3.9 kb 和 117 bp, 与载体片段和目的基因片段大小相等 (图 2)。将植物表达载体 pART27-sCT 用 *Not*I 酶切后可分为 2.2 和 10.9 kb 2 个片段, 与目的片段和载体片段大小相符, 表明植物表达载体构建成功 (图 3)。

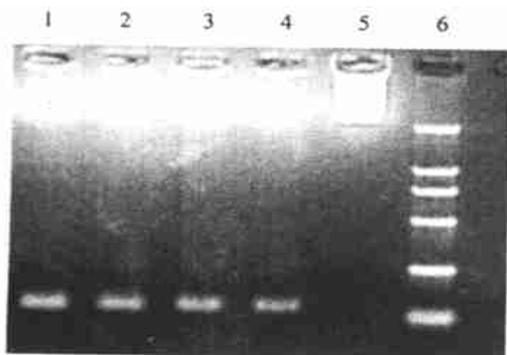


图 2 质粒 pART7-sCT 酶切图谱  
1~4 质粒 pART7-sCT/*Bam*H I + *Hind*III;  
5 质粒 pART7-sCT; 6 DL-2000 分子量标准  
Fig 2 Clony screening of pART7-sCT  
1~4 pART7-sCT/*Bam*H I + *Hind*III;  
5 pART7-sCT plasmid; 6 DL-2000 marker

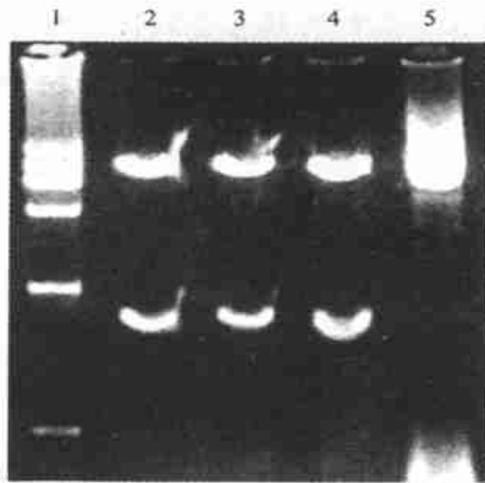


图 3 质粒 pART27-sCT 酶切图谱  
1 DL-15000 分子量标准; 2~4 质粒 pART27-sCT/*Not*I; 5 质粒 pART27-sCT

Fig 3 Clony screening of pART27-sCT  
1 DL-15000 marker; 2~4 pART27-sCT/*Not*I; 5 pART27-sCT

2.1.2 序列测定 纯化的重组质粒 pART27-sCT 由上海生物工程公司代为测序。测序结果表明, 重组质粒 pART27-sCT 中含有 sCT 基因序列, 且在起始密码子和终止密码子之间的序列无移码和错码。

### 2.2 转基因植株的鉴定

将 75 mg/L 卡那霉素培养基初筛的转基因烟草植株用碱抽提的方法快速制备 DNA, 并且用 PCR 扩增目的基因片段, 电泳检测, 有 sCT 基因片段的为转基因植株 (图 4)。检测结果表明, 烟草转化率达 20%。

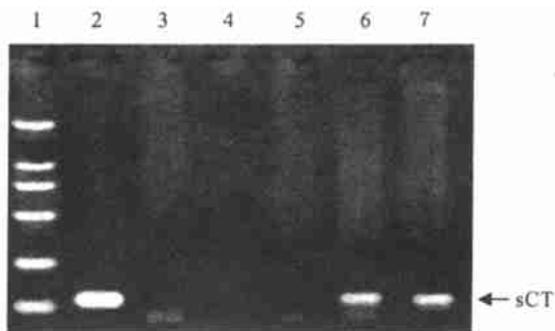


图 4 PCR 鉴定转基因烟草植株  
1 DL-2000 分子量标准; 2 sCT 基因为阳性对照;  
3 未转化株为阴性对照; 4~5 未转化株;  
6~7 转基因植株

Fig 4 PCR analysis of transgenic tobacco plants  
1 DL-2000 marker; 2 sCT gene as a positive control; 3 Non-transgenic tobacco as a negative control; 4~5 Failed transgenic tobacco; 6~7 Transgenic tobacco

## 3 讨论

根癌农杆菌能将自身的 Ti 质粒两边界序列之

间的片段(称为转移DNA 片段,即 T-DNA 片段)整合进植物基因组并进行表达。据此人们构建了许多植物基因表达载体,即在两边界序列之间插入外源基因与调控序列,这是植物基因表达载体的基本结构。选择标记基因常用新霉素磷酸转移酶(NPT-II)基因,它与胭脂碱合成酶(Nos)的启动子相连,目的基因常用花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 的启动子,该启动子在大多数植物细胞内都能启动外源基因的表达。使用这一表达载体调控疫苗基因在植物内表达已获成功,如狂犬病毒糖蛋白基因。本研究采用这一方法构建了鲑鱼降钙素基因的表达载体 pART27-sCT,转入烟草,PCR 检测表明 sCT 基因已整合至烟草基因组中。至于其蛋白的表达量,还有

待于进一步研究,若表达量过低,将考虑选择合适的启动子、增强子等调控元件以提高其蛋白的表达量。烟草是转基因研究的模式植物,作为外源基因表达的受体已有很多报道,如 HBsAg 基因<sup>[9]</sup>,LTB<sup>[10]</sup>基因和 spaA 基因等都得到了成功表达。试验证明,烟草作为外源基因表达系统所表达的重组蛋白能够正确装配,并具有特定的生物活性,但烟草含有尼古丁等一些有害人体健康的生物碱,这增加了重组蛋白纯化的难度。本研究选择烟草也只是作为模式植物来研究,同时以生菜、胡萝卜为转基因试材的研究也已得到转基因植株,关于鲑鱼降钙素基因向蔬菜的遗传转化研究正在进行之中。

#### [参考文献]

- [1] 张晓东,李东梅,徐文英,等.用基因枪将除草剂Basta 抗性基因与小麦HMW 谷蛋白亚基基因导入小麦获得转基因植株[J].华北农学报,1997,12(1):133-136
- [2] Higo K L, Saito Y, Higo H. Expression of a chemically synthesized gene for human epidemic growth factor under the control of califlower mosaic virus 35S promoter in transgenic tobacco[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1993, 57(9): 1477-1481.
- [3] Matsumoto S, Ishi A, Ikura K, et al Expression of human erythropoietin in cultured tobacco cells[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 1993, 57: 1249-1252
- [4] Mason H S, Ball J M, Shi J J, et al Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 11745-11749
- [5] Goddijn O J M, Pen J. Plants as bioreactors[J]. Trends in Biotechnology, 1995, 13: 379-387
- [6] 洪斌,李元,李嗣英,等.鲑鱼降钙素在链霉菌中的分泌表达[J].遗传学报,1998,25(4):287-293
- [7] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual[M]. 2nd New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学技术出版社,1998:598
- [9] McGarvey P B, Hammond J, Dienelt M M, et al Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes[J]. Biotechnology, 1995, 13: 1484-1487
- [10] Mason H S, Haq T A, Clements T A, et al Edible vaccine protects mice against Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LTB gene[J]. Vaccine, 1998, 16: 1336-1343

## A study on the transformation of salmon calcitonin gene into tobacco

ZHAO Ji-qiang<sup>1</sup>, LI Xia<sup>2</sup>, CHENG Zhi-hui<sup>1</sup>, CHEN Hang<sup>2</sup>, LI Yuan<sup>3</sup>, CHEN Song-sen<sup>3</sup>

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Vegetable System Engineer Center, Beijing 100089, China;

3 Institute of Biotechnology the Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract:** This paper reported the construction of the recombinant expression plasmids of salmon calcitonin gene for the first time. A gene coding for salmon calcitonin (sCT) was obtained from its streptomycetes vector pMS680 by digestion of restriction enzyme *Bam*H I and *Hind*III. The gene coding was cloned into vector pART27 to generate plant expression vector pART27-sCT. The infection of *Agrobacterium tumefaciens* was used to transform tobacco plant, PCR of transformed tobacco DNA demonstrated the integration of sCT expression vector into the transgenic tobacco genome.

**Key words:** salmon calcitonin; gene; plant expression vector; tobacco; gene transform