

石斑鱼生长激素基因的合成及其在拟南芥中的表达^{*}

肖生科^{1, 2}, 王磊¹, 胡治球¹, 陈毓荃²

(1 中国农业科学院 生物技术研究所, 北京 100081;

2 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了使石斑鱼生长激素基因适合在植物中表达, 重新合成了石斑鱼生长激素基因, 对其密码子进行了优化, 把合成的基因构建于植物表达载体pBI 121 上并转化模式植物拟南芥, 获得了30个转基因抗性植株。对24株PCR 阳性苗进行Northern blotting 分析, 结果表明, 鱼类生长激素基因可以在转基因植物中表达, 其表达在不同的转基因植株中存在明显差异, 表达最强的植株与最弱的植株相比, 二者表达量差异达到43倍。

[关键词] 石斑鱼; 鱼生长激素; 转基因; 拟南芥

[中图分类号] Q 786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)09-0057-04

生长激素(GH)是由脑垂体前叶嗜酸性细胞分泌的一种单一肽链的蛋白质激素, 分子质量一般为22 ku。它是一种具有广泛生理功能的生长调节素, 能影响几乎所有的组织类型和细胞, 甚至包括免疫组织、脑组织及造血系统, 主要作用是刺激骨、软骨细胞的生长和分化, 调节蛋白质、糖及脂肪的代谢^[1]。

鱼类生长激素能够促进鱼体生长, 加速蛋白质合成和脂类降解, 促进鲑科鱼类和罗非鱼等多种鱼类的低渗调控和海水适应过程, 参与多种促合成代谢作用, 如在鱼、虾人工饲料中常常加入虾头粉以促进其生长, 虾头粉中含有脑垂体产生的生长激素。直接应用生长激素养殖鱼、虾的试验证明^[2], 体外添加生长激素也能促进鱼、虾的生长, 并能提高饵料的转化效率。鉴于GH 在鱼类养殖领域所具有的巨大应用前景, 鱼生长激素在水产养殖中的应用研究已经广泛展开。

目前, 鱼类生长激素基因工程研究主要集中在GH 基因的克隆及其在大肠杆菌和酵母中的高效表达方面, 通过外源生长激素在工程菌内的大量表达, 纯化之后可以得到大量的生长激素, 将表达的生长激素浸渍或加入饲料中喂食鱼虾。研究表明^[3, 4], 用基因工程方法生产的重组鱼生长激素具有生物学活

性, 能够通过口服经肠道被鱼体吸收, 具有很强的促生长作用。本研究把石斑鱼生长激素转入拟南芥, 尝试利用植物来生产鱼类生长激素的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 用于基因转化的拟南芥由本实验室保存。

1.1.2 菌株 大肠杆菌*E. coli* JM 109, 农杆菌菌株GV 3101 由本实验室保存。

1.1.3 石斑鱼生长激素基因及载体 石斑鱼生长激素基因原序列由中山大学林浩然院士提供(Gen-Bank 登录号AY038606), 序列与张为民等^[5]报道的一致; pBluescript II SK(-)及pBI 121 载体由本实验室保存。

1.1.4 试剂盒 质粒DNA 提取用Promega 公司的WizardTM M in prep sDNA Purification System, 回收DNA 用鼎国公司的DNA 片段快速纯化/回收试剂盒。

1.1.5 酶与化学试剂 各种限制性内切酶和修饰酶分别购自Promega 公司、New England Biolab 公司和Gibco 公司, EB 和A garose 购自Sigma 公司, 其他化学药品均为国产分析纯。

^{*} [收稿日期] 2004-03-18

[基金项目] 中国农业科学院科研项目

[作者简介] 肖生科(1973-), 男, 甘肃景泰人, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

[通讯作者] 陈毓荃(1943-), 男, 河北坝州人, 教授, 主要从事植物蛋白质研究。

1.1.6 引物合成与测序 引物合成由北京奥科公司完成,测序由上海博亚生物技术有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 石斑鱼生长激素基因的合成 共设计合成26个寡核苷酸片段(平均每段为50 nt),合成片段磷酸化,体系如下:基因片段3 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), T_4 PNK 1 μL , T_4 PNK Buffer (10 $\times$) 1 μL , 10 mmol/L ATP 1 μL , 灭菌水9.5 μL , 将此体系置于37 $^{\circ}\text{C}$ 合成反应40 min。

退火:分别取0.5 μL 经磷酸化处理的片段, T_4 PNK Buffer (5 $\times$) 6 μL , 加灭菌水至30 μL , 然后依次按90 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 5 min 处理,最后于-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

连接:取退火体系3 μL , T_4 ligase 1 μL , T_4 ligase Buffer (10 $\times$) 1 μL (约80 ng), 处理好pBluescript II SK(-)载体(*EcoR* V, *Sac* I 酶切后纯化)5 μL (约20 ng), 置于16 $^{\circ}\text{C}$ 培养20 h。电击法转化*E. coli* JM 109, 涂平板培养。挑单菌, 过夜培养后少量提取质粒, 酶切鉴定获得所需的阳性克隆后测序。

1.2.2 植物表达载体构建及农杆菌转化 (1)载体构建。将测序正确的克隆用*EcoR* V和*Sac* I 酶切, 纯化约为630 bp 的GH 基因片段; 植物表达载体pBI 121用*Sma* I 和*Sac* I 酶切, 回收约11 kb 的载体。连接时取3 μL GH 基因片段(约20 ng), pBI 121 载体5 μL (约40 ng), T_4 ligase 1 μL , T_4 ligase Buffer (10 $\times$) 1 μL , 置于16 $^{\circ}\text{C}$ 培养20 h。电击法转化*E. coli* JM 109, 挑出阳性克隆。

(2)农杆菌转化。取20 μL GV 3101 感受态细胞, 加入1 μL 测序正确的pBI GH 质粒, 电击转化后, 28 $^{\circ}\text{C}$ 250 r/min 恢复培养3 h。取200 μL 涂布到YEB 抗性平板上(Kan 50 mg/L, Ref 50 mg/L), 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养2~3 d。从转化的平板上挑取2个单菌落, 提取质粒, PCR 检测。

1.2.3 拟南芥转化 挑取1个检测正确的农杆菌单菌落接到YEB 液体培养基中过夜培养, 按体积比1:400 转接到200 mL 新鲜的YEB 液体培养基中生长至OD₆₀₀=1.8~2.0, 离心收集菌体, 用400 mL 1/2 MS 悬起, 加入体积分数0.05% Silwet L-77, 把拟南芥的花蕾浸入农杆菌渗透液中, 抽真空(0.85 Pa, 保持5 min)。转化完毕后, 花盆外套上塑料袋, 水平放置, 使其在低光强度下生长24~48 h 后, 即可正常培养。

1.2.4 转基因阳性苗筛选 称25~30 mg 种子放入1.5 mL 离心管, 加1 mL 体积分数75%的乙醇

(含体积分数0.05% Tween 20), 于摇床上摇10 min (300 r/min), 离心, 去上清液; 加1 mL 体积分数95%的乙醇洗1次, 离心, 去上清液; 重复洗1次; 在超净台中向洗过的种子加0.3 mL 体积分数100%乙醇, 移到无菌滤纸上, 吹干。将吹干的种子撒到1/2 MS 平板(Kan^{50 mg/L})上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放2 d 后, 于22 $^{\circ}\text{C}$, 16 h 光照培养。将阳性植株(T₁ 代)移栽到盆中培养, 收集种子进行T₂ 代筛选。同样的方法筛选T₃ 和T₄ 代转基因苗, 直到获得纯系的种子。

1.2.5 基因组DNA 的提取及PCR 检测 (1)基因组DNA 的提取。拟南芥基因组DNA 的提取方法参照十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法。在液氮中研磨0.1~0.2 g 拟南芥叶片, 转移至1.5 mL 离心管中, 加入0.7 mL CTAB (100 mmol/L Tris, 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 2% CTAB, 体积分数0.1% 巯基乙醇), 60 $^{\circ}\text{C}$ 静置30 min, 加0.7 mL 体积比为1:1 的酚:氯仿, 颠倒几次, 10 000 r/min 离心5 min; 转移上清液至一新的离心管, 加等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 混匀, 10 000 r/min 离心5 min, 转移上清液至一新的离心管, 加等体积的异丙醇, 颠倒混匀, 10 000 r/min 离心10 min, 除去上清液, 用体积分数70%乙醇洗1次, 抽干, 溶于50 μL 的无菌水中。

(2)转基因植株的PCR 检测。上游引物为35S 启动子引物(5'-TCTGCCGACAGTGGTCCCAA-3'), 下游引物为GH 引物(5'-TTAGAGGGTACAGTTAGCTTC-3'); 反应体系: 转基因植株DNA 1 μL (20~50 ng), 10 $\times$ buffer 2 μL ; MgCl₂ (2.5 mmol/L) 2 μL , Taq 酶 0.2 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL , 引物各加1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$); 加无菌水至20 μL 。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸5 min。

1.2.6 Northern blotting 用PCR 检测阳性的拟南芥提取总RNA。按Promega 公司的RNA gents Total RNA Isolation System kit 进行, 提取总RNA 约50 μg , TBE 胶电泳检测其是否有降解, 然后用于Northern blotting, 方法参照植物分子生物学及生物技术的实用方法^[6]。

2 结果与分析

2.1 石斑鱼生长激素的改造

将合成的寡核苷酸磷酸化后退火, 直接克隆到pBluescript II SK(-)载体上, 提取质粒后酶切出约660 bp 的条带(图1), 挑选酶切正确的克隆进行

测序, 结果表明, 合成的GH片段与原石斑鱼生长激素基因的蛋白序列完全一致。将GH连接到植物表达载体pBI121上, 获得pBIGH质粒, 酶切及测序结果表明, GH已正确插入到pBI121载体上(图2)。为了使来源于石斑鱼的生长激素在植物体内得到有效表达, 在不改变氨基酸的情况下, 根据Frederick等^[7]报道的原则对GH基因进行了改造, 把在植物中使用频率很低的密码子改变为植物优化密码子, 使之适应在植物中高效翻译的要求, GC比例由原

来的55.5%下降到45.7%, 符合大多数植物外显子46%~49%的比例; 考虑到真核生物起始密码子附近的序列会影响翻译起始的效率, 因此, 合成基因时使其序列符合Kozak序列(AACAATGG, 其中+4位的G和-3位的A对翻译的准确起始非常重要); 采用植物最常用的终止序列CTAAA, 同时注意防止一些不稳定序列, 如ATTTA和Poly(A)加尾信号序列及其他可能的不稳定序列的出现。

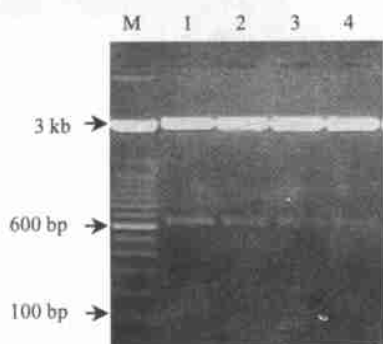


图1 合成的GH基因的酶切分析

M. 100 bp DNA 分子质量标准; 1~4. 阳性克隆的酶切分析

Fig. 1 Digestion analysis of GH gene

M. 100 bp DNA ladder; 1~4. Digestion analysis of positive clone

2.2 转基因植株的获得及分析检测

采用真空渗透法转化3株拟南芥, 收获种子, 经卡那霉素筛选, 共获得30个抗卡那霉素的转基因植株, 转化率约为1%。对获得的转基因植株进行PCR检测, 上游用35S引物, 距插入基因的多克隆位点

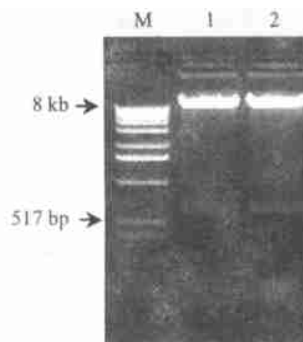


图2 植物表达载体pBIGH的酶切分析

M. 1 kb DNA 分子质量标准; 1, 2. 阳性克隆的酶切分析

Fig. 2 Digestion analysis of plant expression vector pBIGH

M. 1 kb DNA ladder; 1, 2. Digestion analysis of positive clone

200 bp; 下游用GH基因末端引物对转基因植株进行PCR检测, 可扩增出约830 bp的DNA片段, PCR检测结果表明, 其中有24株为阳性苗, 阳性率为80% (图3)。

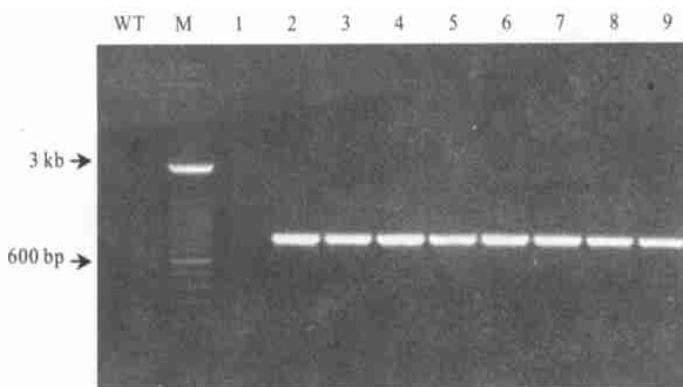


图3 部分转基因植株的PCR检测

M. 100 bp DNA 分子质量标准; WT. 未转基因的野生型拟南芥; 1~9 转GH基因拟南芥的不同植株

Fig. 3 PCR detection of partial transgenic plant

M. 100 bp DNA Ladder; WT. Non-transgenic wildtype *Arabidopsis*; 1-9 Different transgenic plants

为了进一步分析外源基因GH在转基因植株中的表达情况, 提取总RNA进行Northern blotting分析。由图4可以看出, 在不同转基因植株中GH的表达情况存在明显差异, 其中5和7号植株表达最强,

2, 4, 6号植株次之, 3号植株最弱。经扫描分析表达最强的7号植株与最弱的3号植株相比, 二者表达量差异达到43倍(图5)。

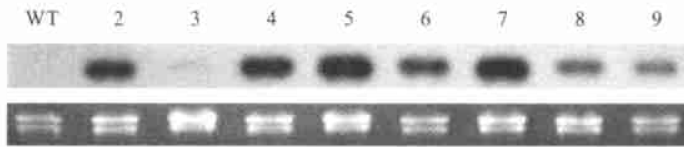


图4 转基因植株的 Northern blotting 检测

WT. 未转基因的野生型拟南芥; 2~9. 不同转 GH 基因的拟南芥植株

Fig. 4 Northern blotting detection of transgenic plants

WT. Non-transgenic wildtype *Arabidopsis*;

2—9. Different transgenic plants

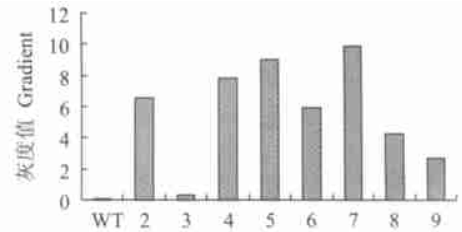


图5 Northern blotting 灰度扫描分析

WT. 未转基因的野生型拟南芥;

2~9. 不同转 GH 基因的拟南芥植株

Fig. 5 Northern blotting gradient analysis

WT. Non-transgenic wildtype *Arabidopsis*;

2—9. Different transgenic plants

3 讨 论

由于位置效应、拷贝数的不同及基因沉默等原因, 外源基因在不同转基因植株之间的表达量存在明显差异, 而且外源基因在不同植株之间的表达稳定性也不相同^[8], 因此, 需要对获得较多的转基因植株分别进行分析, 才能最终筛选出理想的株系。在不同转基因植株之间, 引起石斑鱼生长激素表达量差异明显及其表达稳定性的原因, 还有待于进一步的研究分析。

利用微生物基因工程技术大量合成或表达鱼生长激素作为鱼饲料添加剂, 是目前利用生长激素的主要途径。在细菌中表达的鱼生长激素往往以包涵体的形式存在, 需要纯化和复性^[3], 程序复杂, 成本高; 利用酵母作为表达体系具有更多的优越性, 如有利于蛋白糖基化, 保持外源蛋白的结构、可溶性及生物活性等。尽管利用基因工程菌表达鱼类 GH 均已

获得成功, 其表达水平也有很大提高^[9], 但由于需要经过发酵生产, 其生产成本仍然比较高。而植物生物反应器具有植物培养条件简单, 植物种植不需要特殊技术和生产设备, 可进行大规模廉价生产等许多潜在的优势, 因而是最经济有效的生产系统; 此外植物在生产过程中不会对环境产生任何污染, 并且还有绿化、美化环境的作用。

利用转基因植物表达鱼生长激素的研究还未见报道, 本研究重新合成石斑鱼生长激素基因, 并将其成功转化到模式植物拟南芥中, Northern blotting 分析表明, 石斑鱼生长激素基因在拟南芥中得到明显表达, 但它是否具有天然 GH 的生物活性, 对鱼类的生长是否具有促进作用还有待于进一步的研究。一旦利用转基因植物获得具有生物活性的石斑鱼生长激素的高效表达, 就可直接作为饲料使用, 不需要对 GH 进行分离纯化, 可大大降低生产成本。

【参考文献】

- [1] 孙 逊, 朱尚权. 生长激素的结构与功能[J]. 国外医学生理、病理科学与临床分册, 1999, 19(1): 6- 9
- [2] 白俊杰, 简 清, 马 进, 等. 鲑鱼生长激素 cDNA 在大肠杆菌中的表达及表达产物对罗非鱼促生长作用[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(4): 343- 346
- [3] M D, Lean E, Donaldson E M, Dye H M, et al. Growth acceleration of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) following oral administration of recombinant bovine somatotropin[J]. A quaculture, 1990, 91: 197- 203
- [4] 李英华, 白俊杰, 李新辉, 等. 鲤鱼生长激素在毕赤酵母中的表达[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2001, 17(4): 488- 491
- [5] 张为民, 张 勇, 李 欣, 等. 斜带石斑鱼生长激素 cDNA 克隆及其在大肠杆菌中的融合表达[J]. 水产学报, 2003, 27(5): 391- 397
- [6] 格利克 B R, 汤普森 J E. 植物分子生物学及生物技术的实用方法[M]. 李汝刚, 张春义, 译. 重庆: 重庆出版社, 1999. 58- 65
- [7] Frederick J P, Roy L F, Duff A D, et al. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 3324- 3328
- [8] Shavindra Bajaj, Jayaprakash Targolli, Lirfei Liu, et al. Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants[J]. Molecular Breeding, 1999, 5: 493- 503
- [9] 王 伟, 孙永华, 汪亚平. 草鱼生长激素在毕赤酵母中的高效分泌表达[J]. 遗传学报, 2003, 30(4): 301- 306

(下转第65页)

globe conjunctiva) were not observed, which could be used for limbal stem cells transplants; At the same time, the whole corneal limbal epithelium lamella were excised and the center corneal epitheliums were erased with a swab soaked in physiological saline, there were 2 rabbits corneal surface presented corneal epithelium phenotype, and the other 3 presented conjunctiva epithelium phenotype. The results are unsure for experimental use; The rabbit's corneas that were removed with upper-half of corneal limbal epithelium lamella and erased the center corneal epitheliums were transparent with intact corneal epithelium; In the approach, the corneal and limbal epitheliums were burned with a cotton swab socked in 1 mol/L NaOH, there were 4 rabbits' corneal stroma happened perforation or ulcer and symblepharon, and the other one presented corneal epithelium phenotype. This is an applicable method to create the pathological model of corneal limbal stem cell total deficiency.

Key words: cornea; corneal limbal stem cell total deficiency; pathological model; rabbits

(上接第60页)

Synthesis of *Epinephelus coioides* growth hormone gene and its expression in *Arabidopsis thaliana*

XIAO Sheng-ke^{1,2}, WANG Lei¹, HU Zhi-qiu¹, CHEN Yu-quan²

(1 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2 College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to enhance the expression of *Epinephelus coioides* growth hormone gene in *Arabidopsis thaliana*, the gene was fully modified by optimizing the codons according to the preferential codon usage in plants. The synthesized DNA fragment was cloned into plant expression vector pBI121 and transformed into *Arabidopsis thaliana* by floral dipping. The transgenic plants obtained were analyzed by PCR and subsequently by Northern blotting, and the results showed that the modified gene was expressed in all the transgenic plants checked with different expression levels. The biggest difference in gene expression level between two of the individual transgenic plants reached as much as 43 folds.

Key words: *Epinephelus coioides*; fish growth hormone; transgenic; *Arabidopsis thaliana*