

利用转基因番茄表达人成纤维细胞生长因子 21(FGF21)

付宏岐^{1a,1b}, 李海燕^{1a,1c}, 庞实锋², 杨 晶^{1a}, 李洪志³, 薛 萍^{1a,1c},
刘秀明^{1a}, 李 莹⁴, 王艳芳^{1a,1b}, 李校堃^{1a}

(1 吉林农业大学 a 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, b 中药材学院, c 生命科学学院, 吉林 长春 130118;

2 广东医学院 生物教研室, 广东 湛江 523808; 3 牡丹江医学院, 黑龙江 牡丹江 157011; 4 吉林市农业科学院, 吉林 吉林 132101)

【摘 要】 【目的】在番茄中表达人成纤维细胞生长因子-21(Fibroblast growth factor-21, FGF21), 为利用植物反应器规模化生产 FGF21 奠定基础。【方法】以甘露糖-6-磷酸异构酶基因(*pmi*)作为转基因植物的选择标记, 将人源 *fgf21* 基因克隆至表达载体 pCambia1390R II (简称为 p1390R II) 上, 构建重组表达质粒 p1390R II MFGF21。采用冻融法将质粒 p1390R II MFGF21 转入根瘤农杆菌 EHA105, 叶盘法转化番茄 (*Lycopersicon esculentum*) “中蔬 6 号”, 采用 PCR 检测、Southern 杂交筛选转基因番茄阳性植株, 并对 FGF21 蛋白在转基因番茄叶片中的表达进行了 Western blot 分析。【结果】成功构建了带 *pmi* 安全选择标记基因的植物二元表达载体 p1390R II MFGF21, 在番茄中初步建立了以 *pmi* 为选择标记基因的遗传转化体系, 共获得了 26 株转基因番茄植株, 其中 5 株为阳性克隆, 转化率为 19.2%。采用 PCR 扩增和 Southern blot 分析进行检测, 结果表明, 重组 *fgf21* 基因已整合到转基因番茄基因组中。Western blot 分析检测结果显示, FGF21 蛋白在转基因番茄叶片中有一定水平的表达, 并具有良好的抗原性。【结论】获得了以 *pmi* 为选择标记成功表达 FGF21 蛋白的转基因番茄遗传体系。

【关键词】 农杆菌; 成纤维细胞生长因子-21; 甘露糖-6-磷酸异构酶; 生物反应器; 番茄; 遗传转化

【中图分类号】 Q786; S641.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2011)07-0163-08

Expression of fibroblast growth factor 21 in transgenic tomato plants

FU Hong-qi^{1a,1b}, LI Hai-yan^{1a,1c}, PANG Shi-feng², YANG Jing^{1a}, LI Hong-zhi³,
XUE Ping^{1a,1c}, LIU Xiu-ming^{1a}, LI Ying⁴, WANG Yan-fang^{1a,1b}, LI Xiao-kun^{1a}

(1 a Ministry of Education Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development,

b College of Traditional Chinese Medicine, c College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China;

2 Department of Biology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 523808, China; 3 Mudanjiang Medical University, Mudanjiang, Heilongjiang 157011, China; 4 Academy of Agricultural Sciences, Jilin, Jilin 132101, China)

Abstract: 【Objective】 The study investigated the expression of human fibroblast growth factor 21 (FGF21) in transgenic tomato plants. 【Method】 Phosphomannose isomerase gene (*pmi*) was used as a selection marker for transgenic plants; the plant expression vector p1390R II MFGF21 was obtained by cloning *fgf21* gene into the pCambia1390R II (p1390R II) vector. After p1390R II MFGF21 was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105, then *fgf21* gene was introduced into cultivated tomato (*Lycopersicon esculentum*) 6 via *Agrobacterium*-mediated leaf disc transformation. The positive transgenic

* [收稿日期] 2011-01-04

[基金项目] 国家高新技术研究与发展计划项目(“863”项目)生物反应器重大专项(2007AA100503); 吉林省科技发展重点计划项目(20070922); 教育部高等学校科技创新工程重大项目(70S018)

[作者简介] 付宏岐(1972—), 男, 陕西岐山人, 讲师, 博士, 主要从事药用植物生物转化和植物生物反应器研究。
E-mail: hqfu@163.com

[通信作者] 李校堃(1964—), 男, 吉林长春人, 教授, 博士生导师, 主要从事基因工程制药研究。
E-mail: xiaokunli@163.net

tomato plants were determined by PCR, Southern blotting, and Western blotting analysis. 【Result】 The plant binary expression vector p1390R Ⅱ MFGF21 that carries *pmi* selection marker was successfully constructed, and five positive tomato plants which correctly accumulated FGF21 protein were obtained from twenty-six transgenic plants, the transformation efficiency value being 19.2%. Subsequent PCR and Southern blotting analyses confirmed that *fgf21* gene was integrated into the genome of tomato plants. Western blotting analysis showed transgenic tomato plants had positive expression of FGF21 protein and good antigenicity. 【Conclusion】 Human *fgf21* was successfully expressed in transgenic tomato plants using *pmi* as a selectable marker.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*; FGF21; PMI; plant bioreactor; tomato; transformation

成纤维细胞生长因子-21 (Fibroblast growth factor-21, FGF21) 是 FGF 家族 23 个成员中的一个新成员, 其是一种可分泌蛋白^[1-2], 主要在肝脏中表达。FGF21 刺激脂肪细胞的葡萄糖吸收, 降低 *ob/ob* 和 *db/db* 小鼠血浆中葡萄糖和甘油三酯的浓度; 其在转基因小鼠中过量表达时可有效抵抗由饮食引起的肥胖。此外, FGF21 还能有效改善糖尿病恒河猴的脂蛋白表达谱^[3-4]。目前, *fgf21* 是 *fgfs* 家族中发现的惟一没有促有丝分裂活性的基因, 因此明显降低了 FGF21 临床应用的风险。此外, FGF21 具备治疗糖尿病必需的一些药物特性, 且不会导致糖尿病治疗中常见的副作用, 即低血糖和水肿^[5-6]。FGF21 的代谢调节功能与胰岛素类似, 并在很多方面优于胰岛素, 因此其有望成为代替胰岛素治疗糖尿病的新药。

目前, 利用大肠杆菌表达的 FGF21 蛋白在胞内易形成包涵体, 而且蛋白的生物活性不高^[3], 目标蛋白分离纯化成本高。若将 *fgf21* 基因转入植物中, 以植物为生物反应器来生产 FGF21 蛋白, 能使成本明显降低, 这在 FGF21 蛋白药物开发上具有重要的现实意义。植物生物反应器与其他生物反应器如动物反应器、蛋白的原核表达等相比有许多明显的优势, 如低成本、安全、操作简单、蛋白能正确折叠及得到真核相关修饰等, 已被广泛研究并应用在药物蛋白的生产上。目前, 已有成功利用番茄稳定表达系统生产目标蛋白的先例, 如张丽华等^[7]利用樱桃番茄成功遗传转化了胸腺肽基因。近些年来, 随着基因工程等生物技术的不断发展, 以转基因技术为代表的植物基因工程技术, 为农业的可持续发展提供了强有力的支持, 已有几十种药用蛋白或多肽在植物中成功表达^[8-11], 但是由于有效筛选转基因植物的选择标记基因(如抗生素抗性基因、除草剂抗性基因等)的使用, 引发了人们对转基因植物安全性的担忧。因此, 培育具有安全选择标记基因或无选择标

记基因的转基因植物, 成为提高转基因植物安全性的有效手段。目前, 甘露糖-6-磷酸异构酶 (Mannose-6-phosphate isomerase, PMI) 作为安全筛选标记在转基因植物中有了广泛的应用, 对转基因植物的发展起着重要作用。

番茄是世界上最重要的蔬菜作物之一, 常作为一种遗传模式作物, 用于改善其他双子叶植物特性的研究。目前, 国内外尚未见以番茄为生物反应器生产 FGF21 蛋白的研究报道。本研究构建了含 *pmi* 基因和 *fgf21* 基因的双 T-DNA 表达载体 pCAMBIA1390R Ⅱ MFGF21 (p1390R Ⅱ MFGF21), 将 *fgf21* 基因转入番茄中, 以番茄为生物反应器生产 FGF21 蛋白, 旨在为进一步提高番茄的利用价值及为利用其他植物生物反应器表达 FGF21 蛋白提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试番茄 (*Lycopersicon esculentum*) “中蔬 6 号”, 购于中国农业科学院蔬菜花卉研究所。先将种子用体积分数 70% 酒精浸泡 0.5~1 min, 然后用 50 g/L 次氯酸钠溶液表面消毒 10 min 左右, 再用无菌水冲洗 3 次, 将其播种在 1/2 MS 培养基上, 25~28 ℃、黑暗条件下培养 3 d 后, 光照培养 5~7 d。

1.1.2 菌株、质粒与试剂 质粒 pCAMBIA1390R Ⅱ (以下简称为 p1390R Ⅱ)、pUC19-FGF21、农杆菌 EHA105、大肠杆菌 DH5 α 均由吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心保存, p1390R Ⅱ 质粒构建基础是以 pCAMBIA1390 为蓝图, 在 pCAMBIA1390 上插入非特异性启动子 CaMV35S promoter。质粒 pM390 (克隆有 *pmi* 基因) 由东北师范大学遗传与细胞研究所王兴智教授惠赠。

限制性内切酶、Pyrobest DNA polymerase、T4

DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒、PCR 纯化回收试剂盒和 DNA 小量提取试剂盒等均购自 TaKaRa 公司,PCR 引物合成及测序由北京三博远志公司完成,植物基因组快速提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 购自 Roche 公司,Western Blotting Luminol Reagent sc-2048 Trial kit 购自美国 Santa Cruz 公司,6-BA、2,4-D、IAA 等激素均购自 Sigma 公司。

1.1.3 培养基配方及培养条件 以 MS 为基本培养基,调节 pH 值至 5.8。培养温度 25 ℃,光照强度 2 000~3 000 lx,每天光照 16 h,黑暗 8 h。

根据文献[12-14]的方法,优化的培养基配方为:种子培养基为 1/2 MS;预培养基为:MS+1.0 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂;侵染液为:MS 液+200 μmol/L 乙酰丁香酮(AS);共培养基为:MS+100 μmol/L AS+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂;抑菌培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+10 mg/L AgNO₃+300 mg/L 特美汀+30 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂;愈伤诱导培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L IAA+10 mg/L AgNO₃+300 mg/L 特美汀+10 g/L 甘露糖+20 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂;分化培养基为:MS+1.0 mg/L 6-BA+0.02 mg/L IAA+10 mg/L AgNO₃+300 mg/L 特美汀+20 g/L 甘露糖+10 g/L 蔗糖+7 g/L 琼脂;生根培养基为:1/2 MS+1.0 mg/L IBA+300 mg/L 特美汀+蔗糖 20 g/L+琼脂 7 g/L。

1.2 重组质粒 p1390R II M 的构建

为了用 *pmi* 替换 p1390R II 中的潮霉素(hygromycin)抗性基因(*hpt* II),根据 GenBank (accession M15380)中 *pmi* 的序列设计 1 对特异性引物,引物序列为:

PMIP1,5'-GGC CTCGAGCATGCAAAAACT-CATTAAC-3';PMIP2,5'-GGCCTCGAGCTCT-TACAGCTTGTGTAAAC-3',为方便表达载体构建,在 PMIP1 和 PMIP2 的 5'端均引入核酸限制性内切酶 *Xho* I 识别位点(下划线处),引物扩增片段长度约为 1.2 kb。扩增体系:以质粒 pM390 作为模板,加入 10×buffer 5 μL,dNTP (2.5 mmol/L)4 μL,上游引物 PMIP1、下游引物 PMIP2 (10 μmol/L)各 1 μL,Pyrobest DNA polymerase (10 U/μL)0.25 μL,加 ddH₂O 至总体积为 50 μL。扩增条件:94 ℃变性 5 min;94 ℃ 35 s,58 ℃ 90 s,72 ℃ 35 s,28 个循环;72 ℃ 3 min。

将扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,在紫外灯下用凝胶回收试剂盒纯化回收 *pmi* 目的片段,用 *Xho* I 单酶切,得到约 1.2 kb 的 *pmi* 小片段;将 p1390R II 质粒用 *Xho* I 进行单酶切,用 PCR 纯化回收试剂盒回收目的载体大片段,将其与 *pmi* 小片段用 T4 DNA 连接酶连接,转化感受态大肠杆菌 DH5α,通过菌落 PCR 筛选阳性克隆菌,用 *Xho* I 单酶切鉴定 *pmi* 基因是否已连接重组到 p1390R II 中,将阳性克隆送北京三博远志公司测序,得到正向连接的中间表达载体,命名为 p1390R II M,其结构见图 1。

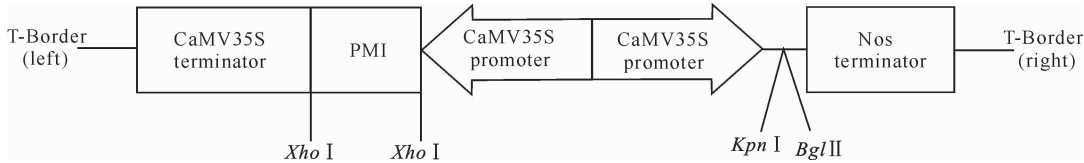


图 1 重组质粒 p1390R II M 的结构

Fig.1 A schematic map of recombinant plasmid p1390R II M

1.3 *fgf21* 基因的 PCR 扩增

为了便于目的蛋白的分离纯化,在 *fgf21* 上游引物 F21P1 5'端引入 *Kpn* I 酶切位点、保护碱基以及 6 个组氨酸(His)标签序列,F21P1 的序列为 5'-GGGGTACCATGCACCACCACCACCAC-3',下划线为 *Kpn* I 酶切位点;在 *fgf21* 下游引物 F21P2 5'端引入 *Bgl* II 酶切位点和保护碱基,F21P2 序列为 5'-GAAGATCTTTAAGAAGCG-TAAGATGGAGACCTTCCTTGAGAAG-3',下划

线为 *Bgl* II 酶切位点。扩增体系:以质粒 pUC19-FGF21 为模板,加入 10× buffer 5 μL,dNTP (2.5 mmol/L)4 μL,上游引物 F21P1、下游引物 F21P2 (10 μmol/L)各 1 μL,Pyrobest DNA polymerase (10 U/μL)0.25 μL,加 ddH₂O 至总体积为 50 μL。扩增条件:94 ℃变性 5 min;94 ℃ 35 s,60 ℃ 35 s,72 ℃ 35 s,28 个循环;72 ℃ 3 min。用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,用凝胶回收试剂盒纯化回收 *fgf21* 目的片段。

1.4 植物双元表达载体的构建

将重组质粒 p1390R Ⅱ M 和 *fgf21* 基因片段分别用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 进行双酶切,用 PCR 纯化回收试剂盒分别回收目的片段,连接、转化感受态大肠杆菌 DH5 α ,采用菌落 PCR 筛选阳性质粒,命名为

p1390R Ⅱ MFGF21,其结构见图 2。用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 对 p1390R Ⅱ MFGF21 进行双酶切鉴定,并送北京三博远志公司测序。采用冻融法将测序正确的植物双元表达载体 p1390R Ⅱ MFGF21 转化到农杆菌 EHA105 中。

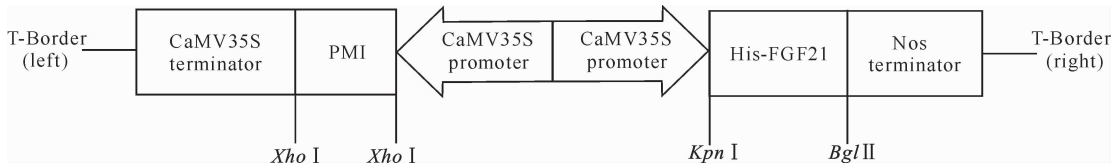


图 2 植物表达载体 p1390R Ⅱ MFGF21 的结构

Fig. 2 A schematic map of plant expression vector p1390R Ⅱ MFGF21

1.5 转基因番茄的遗传转化

采用叶盘法^[14]对番茄进行遗传转化。将培养好的番茄无菌苗子叶切去叶尖和基端,剪成 0.5 cm² 的小块,正面朝上放于铺有无菌滤纸的预培养基上,25 ℃ 下暗培养 1~2 d 后,将预培养的外植体用侵染液侵染 5~8 min,吸去菌液,在共培养基中培养 3 d,在抑菌培养基上培养 5~7 d,然后转到愈伤诱导培养基上培养,诱导形成愈伤后转到分化培养基中,当分化出的再生芽长至 2 cm 时将其从外植体上切下,置入生根培养基中诱导生根,4~5 周后将根系发达的再生的 T₀ 代小植株直接移入装有泥炭土和蛭石的营养钵中,遮荫保湿炼苗 5~7 d 后,将其在温室自然光照条件下生长,同时采用植物基因组快速提取试剂盒的操作方法提取真叶总 DNA,以非转基因植株为阴性对照,p1390R Ⅱ MFGF21 质粒为阳性对照,利用 *fgf21* 基因的上下游引物 F21P1、F21P2 进行 PCR 检测。

1.6 转基因番茄的 Southern blot 分析

用溴化十六烷基三甲铵(CTAB)法^[15-16]提取 PCR 检测呈阳性的转 *fgf21* 基因番茄植株总 DNA,用限制性内切酶 *Bgl* II 完全酶切 40 μ g 的总 DNA,经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离后,用碱变性方法^[16-17]处理凝胶,利用毛细管法将酶切片段由凝胶转移到固相硝酸纤维素膜上,用地高辛标记的 *fgf21* 基因片段作为探针,按照地高辛发光检测试剂盒说明书进行 Southern 杂交。

1.7 转基因番茄的 Western blot 分析

取转基因番茄与非转基因番茄(对照)幼苗叶片各 100 mg,于液氮中迅速研磨,加入 300 mL 粗蛋白提取缓冲液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液,pH 7.2、1 mmol/L 苯甲基磺酰氟)^[13,17],4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液。将提取的总可溶性蛋白冻干

浓缩后,进行 SDS-PAGE 电泳,电转印至聚偏二氟乙烯膜,依次加入 FGF21 的单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体,用 Western blot 发光试剂盒检测免疫反应条带。

2 结果与分析

2.1 含 *pmi* 安全选择标记基因植物中间表达载体的构建

以 PMIP1 和 PMIP2 为引物、质粒 pM390 作为模板进行 PCR 反应,扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,结果(图 3)显示,在约 1 200 bp 处出现了 1 条特异条带,与报道的 *pmi* 基因长度一致。

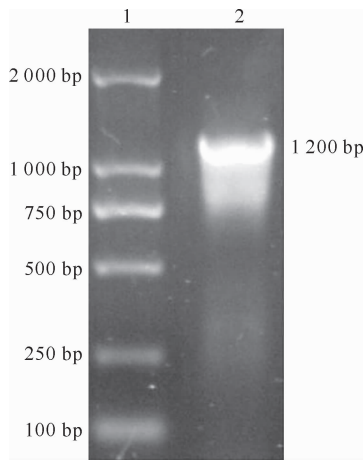


图 3 *pmi* 基因的检测

1. DL2000 DNA Marker;2. *pmi* 全长基因

Fig. 3 PCR amplification of *pmi* gene

1. DL2000 DNA Marker;2. Full length of *pmi* gene

将 *Xho* I 酶切回收的 *pmi* 基因定向插入到植物双元表达载体 p1390R Ⅱ 中,获得了重组质粒 p1390R Ⅱ M,将其用 *Xho* I 酶切,得到了约 1 200 bp 的 *pmi* 基因小片段和载体大片段(图 4),说明目的

基因 *pmi* 已经正确插入到了 p1390R II 的 *Xho* I 位点;测序结果也证实 *pmi* 基因已成功正向连接到植物载体 p1390R II 中。

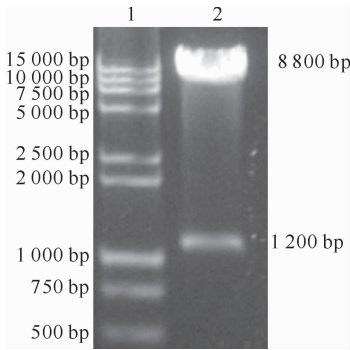


图 4 重组质粒 p1390R II M 的 *Xho* I 单酶切鉴定
1. DL15000、DL2000 DNA Marker;
2. *Xho* I 单酶切的 p1390R II M 重组质粒

Fig. 4 Restriction digestion analysis of recombinant plasmid p1390R II M by *Xho* I
1. DL15000, DL2000 DNA Marker; 2. p1390R II M digested by *Xho* I

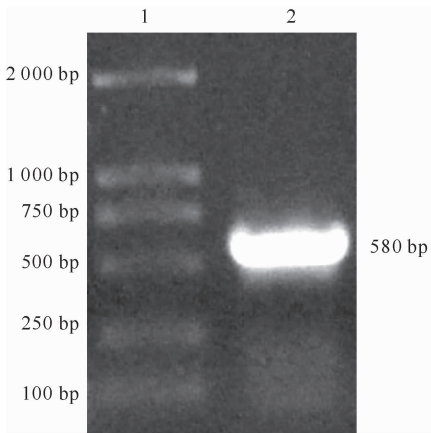


图 5 重组质粒 p1390R II MFGF21 的 PCR 鉴定
1. DL2000 DNA Marker; 2. *fgf21* 基因

Fig. 5 PCR amplification of *fgf21* gene
1. DL2000 DNA Marker;
2. Full length of *fgf21* gene

2.4 转 *fgf21* 基因番茄的 PCR 检测

经农杆菌转化和甘露糖选择共获得了 26 株转 *fgf21* 基因番茄植株。转 *fgf21* 基因番茄的 PCR 检测结果(图 8)显示,26 株转 *fgf21* 基因植株中,有 5 株可扩增出 580 bp 的目的条带,转化率 19.2% 左右,表明 *fgf21* 基因已整合到番茄基因组中。

2.2 含 *fgf21* 基因植物二元表达载体的构建

将 *fgf21* 基因定向插入到植物中间表达载体 p1390R II M,获得重组质粒 p1390R II MFGF21,经 PCR 鉴定(图 5)以及 *Kpn* I 和 *Bgl* II 双酶切鉴定(图 6),均得到了 580 bp 的目的基因小片段,说明目的基因 *fgf21* 已经正确插入到 p1390R II M 的 *Kpn* I /*Bgl* II 位点。测序结果证实,目的基因 *fgf21* 成功地重组到植物中间表达载体 p1390R II M 中。

2.3 转 *fgf21* 基因番茄的再生

采用农杆菌 EHA105 介导叶盘法使 *fgf21* 基因向番茄遗传转化,获得了转 *fgf21* 基因番茄。将转 *fgf21* 基因番茄外植体在愈伤诱导培养基和分化培养基上进行再生芽诱导和筛选,1 个月后观察发现,只有少数芽苗能正常生长,将长势正常的芽苗切下,在生根培养基中培养 4~5 周,待有须根长出后进行炼苗和移栽,最后转到温室中,其生长情况如图 7 所示。

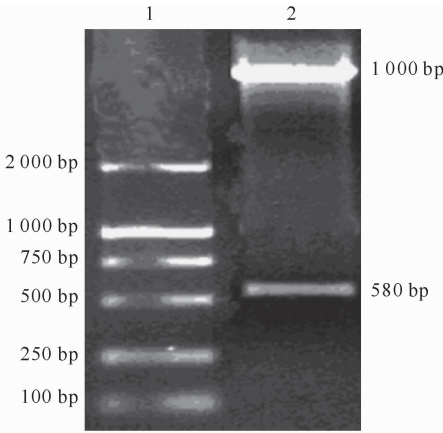


图 6 重组质粒 p1390R II MFGF21 的 *Kpn* I /*Bgl* II 双酶切鉴定
1. DL2000 DNA Marker;
2. *Kpn* I /*Bgl* II 双酶切的 p1390R II MFGF21 重组质粒

Fig. 6 Restriction digestion analysis of recombinant plasmid p1390R II MFGF21 by *Kpn* I /*Bgl* II
1. DL2000 DNA Marker;
2. p1390R II MFGF21 digested by *Kpn* I /*Bgl* II

2.5 转 *fgf21* 基因番茄的 Southern blot 分析

提取 5 株 PCR 检测为阳性的番茄植株总 DNA,用 *Bgl* II 完全酶切,以地高辛标记的 *fgf21* 基因片段为探针进行 Southern 杂交,在受检的 5 株转基因植株中,2 株有杂交信号,其中 1 株有 1 个基因拷贝,另 1 株有 2 个基因拷贝,而非转基因植株没有杂交信号(图 9)。表明外源基因 *fgf21* 已稳定整

合到番茄基因组中。

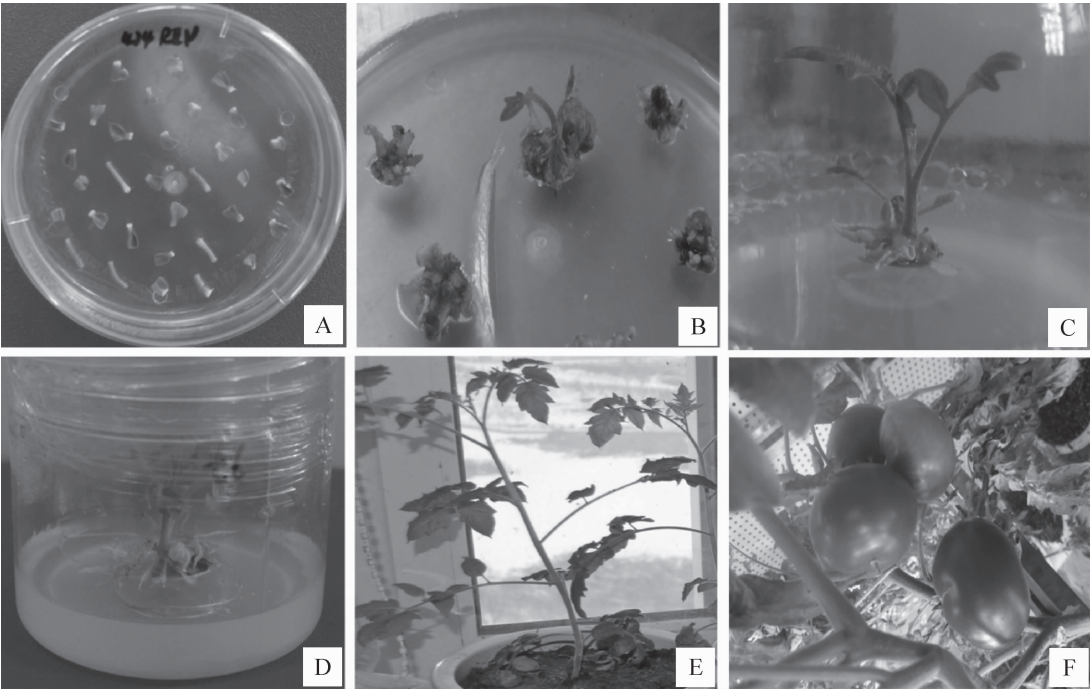


图 7 转 *fgf21* 基因番茄植株的再生

A. 共培养基中的外植体;B. 愈伤诱导培养基中分化的芽苗; C、D. 诱导再生的芽根;
E. 移栽成活的再生植株;F. 转化植株的果实

Fig. 7 Regeneration of transgenic tomato plants

A. Transformed cotyledonary explants;B. Callus and shoot initiation on the differential medium;
C,D. Root formation in transgenic tomato;E. Transgenic tomato in greenhouse;F. Fruits of transgenic tomato

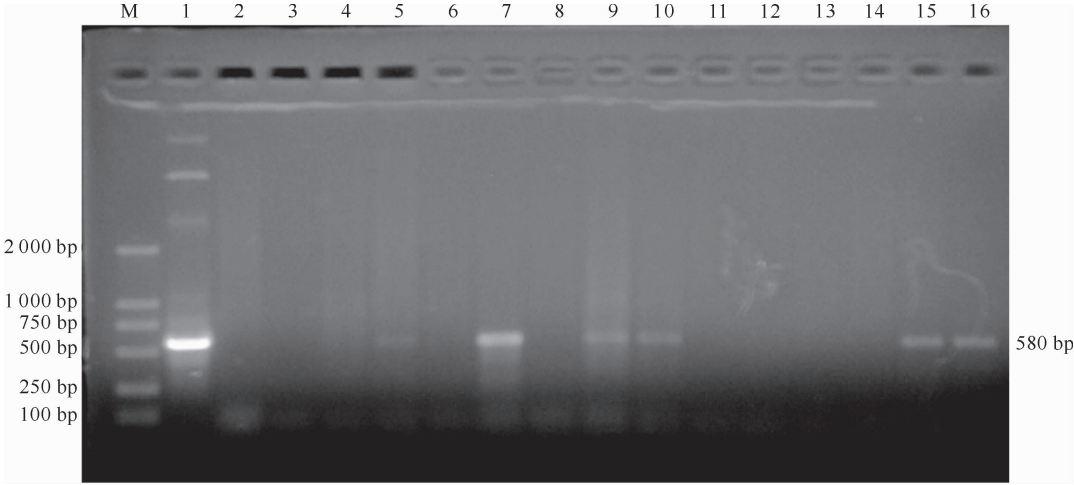


图 8 转 *fgf21* 基因番茄植株的 PCR 检测

M. DL2000 DNA Marker;1. 阳性质粒 p1390R Ⅱ MFGF21;2. 非转基因番茄植株;3~16. 部分转基因番茄植株

Fig. 8 PCR detection of the *fgf21* gene in transgenic tomato plants

M. DL 2000 Marker;1. Positive plasmid control p1390R Ⅱ MFGF21;2. Wild-type plant;3—16. Transgenic plants

2. 6 转基因番茄表达 FGF21 蛋白的检测

将蛋白提取液浓缩后用 FGF21 的单克隆抗体进行 Western blot 检测,结果(图 10)显示,在 22 ku

处有 1 条目的条带,而对照组中未见特异性条带,说明 FGF21 蛋白在转基因番茄中得到了表达并具有良好的抗原性。

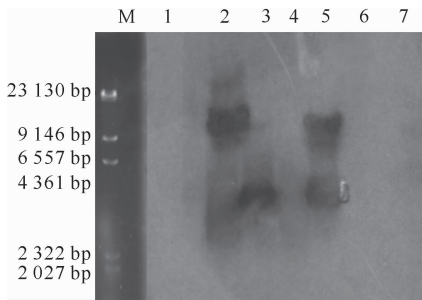


图 9 转 *fgf21* 基因番茄植株的 Southern blot 分析
M. λ Hind III Marker;1. 非转基因番茄植株;

2. 阳性质粒 p1390R II MFGF21;3~7. 转基因番茄植株

Fig. 9 Southern blot analysis of the *fgf21* gene
in transgenic tomato plants

M. λ Hind III Marker;1. Wild type plant;2. Positive plasmid
control p1390R II MFGF21;3-7. Transgenic plants

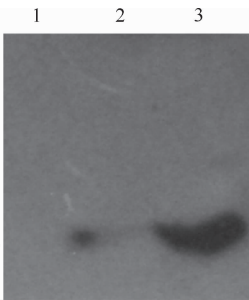


图 10 转基因番茄植株表达 FGF21 蛋白的 Western blot 分析
1. 非转基因番茄叶片;2. 转基因番茄叶片;

3. 大肠杆菌重组的 FGF21 蛋白标准品

Fig. 10 Western blot analysis of transformed plants
FGF21 proteins

1. Wild type tomato leaves;2. Transformed
tomato leaves;3. *E. coli* recombinant FGF21

3 结论与讨论

本研究初步建立了以 *pmi* 为选择标记基因的番茄遗传转化体系,成功获得了表达 FGF21 蛋白的转基因番茄植株,并收获了 T₀ 代番茄种子,PCR 扩增和 Southern 杂交检测结果证实,重组 *fgf21* 基因以单拷贝和多拷贝 2 种方式插入番茄基因组中;Western blot 分析结果显示,FGF21 蛋白在转基因番茄叶片中具有一定水平的表达,并具有良好的抗原性。

目前,*pmi* 作为标记选择基因,甘露糖作为筛选剂时对玉米、小麦的转化率可以高达 20%,研究者认为这主要是由于在甘露糖培养基中,濒死的非转化细胞产生的有毒代谢产物累积较低且全部坏死愈伤组织较少所致,而坏死的愈伤组织往往会抑制转化细胞的组织再生^[18-19]。本研究采用甘露糖做筛选剂,转基因番茄的阳性植株转化率为 19.2%,且很少观察到愈伤组织坏死的情况。本研究中,“中蔬 6 号”在 20 g/L 甘露糖、10 g/L 蔗糖的选择培养基上可以长出非转基因再生苗,但是经过 1 个月筛选后观察发现,非转基因再生芽苗生长缓慢,叶片出现扭曲纤细,并且逐渐枯萎死亡,只有少数芽苗能正常生长,但当培养基中甘露糖相对含量降低或将其去除之后,原来形态异常的再生苗可再生长出形态恢复正常的新芽。甘露糖筛选可以抑制非转化植株的生长,这可能是由于甘露糖在细胞内的累积作用及一些与光合作用、乙醛酸循环相关基因的转录被抑制所致^[20]。

对以甘露糖为选择剂的转化过程,培养基中甘

露糖的含量应逐渐增加,蔗糖的含量逐渐降低,这种逐步增大选择压力的过程有利于获得较高的转化效率。对于不同的基因型,甘露糖选择压力增加的速度不同^[21]。本研究中,转 *fgf21* 基因番茄的愈伤诱导培养基中含 10 g/L 甘露糖和 20 g/L 蔗糖,分化培养基中含 20 g/L 甘露糖和 10 g/L 蔗糖,培养基中甘露糖的含量先低后高,蔗糖的含量先高后低,也获得了较高的转化效率。

与直接从动物组织中提取或利用微生物发酵法生产 FGF21 蛋白相比,本研究采用 *pmi* 作为转基因植物的选择标记基因,利用番茄植物反应器生产 FGF21 具有安全高效、成本低特点,有助于大规模生产,降低了 FGF21 市场价格。

然而,利用转基因番茄大规模生产 FGF21 还有很长的一个过程,有许多问题还需要解决,如本研究获得的转 *fgf21* 基因番茄中外源基因整合位置情况、基因的表达水平、转基因番茄后代中外源基因的表达稳定性以及蛋白的生物学活性等。但是,随着人们在植物基因工程领域取得的长足进展,利用植物反应器生产基因工程药物蛋白的研究,必将为各种廉价药物蛋白的生产和应用开拓更广阔的前景。为此本研究下一步的工作目标是获得带安全筛选标记的转基因番茄植株纯系,并且建立果实特异表达药物蛋白的番茄植物反应器,为利用番茄生物反应器生产治疗性重组蛋白奠定基础。

[参考文献]

[1] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, et al. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1492(1): 203-206.

- [2] Mohammadi M, Olsen S K, Ibrahimi O A. Structural basis for-fibroblast growth factor receptor activation [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2005, 16(2): 107-137.
- [3] Kharitonov A, Shiyanova T L, Koester A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator [J]. J Clin Invest, 2005, 115(6): 1627-1635.
- [4] Kharitonov A, Wroblewski V J, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21 [J]. Endocrinology, 2007, 148(2): 774-781.
- [5] Coskun T, Bina H A, Schneider M A, J et al. FGF21 corrects obesity in mice [J]. Endocrinology, 2008, 149(12): 6018-6027.
- [6] Xu J, Lloyd D J, Hale C, et al. FGF21 reverses hepatic steatosis, increases energy expenditure and improves insulin sensitivity in diet-induced obese mice [J]. Diabetes, 2009, 58(1): 250-259.
- [7] 张丽华, 程智慧, 陈 杭, 等. 胸腺肽基因对樱桃番茄的遗传转化 [J]. 西北植物学报, 2004, 24(9): 1669-1673.
Zhang L H, Cheng Z H, Chen H, et al. Transformation of thymosin gene to cherry tomato [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2004, 24(9): 1669-1673. (in Chinese)
- [8] 杜小春, 何正权, 陈 磊, 等. 植物生物反应器表达药用蛋白研究新进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(9): 135-143.
Du X C, He Z Q, Chen L, et al. Recent progress on plant bioreactor expressing pharmaceutical proteins [J]. China Biotechnology, 2008, 28(9): 135-143. (in Chinese)
- [9] 何乃彦, 于源华, 张 晓, 等. HBsAg/截短型 HCV 核心蛋白融合基因对番茄的遗传转化 [J]. 现代预防医, 2008, 35(20): 4022-4025.
He N Y, Yu Y H, Zhang X, et al. Transformation of tomato by HBsAg/Truncated HCV core protein fusion gene [J]. Modern Preventive Medicine, 2008, 35(20): 4022-4025. (in Chinese)
- [10] Huang T K, McDonald K A. Bioreactor engineering for recombinant protein production in plant cell suspension cultures [J]. Biochemical Engineering Journal, 2009, 45(3): 168-184.
- [11] Sergio R M, Ruth E S G, Leticia M F, et al. Expression of an immunogenic F1-V fusion protein in lettuce as a plant-based vaccine against plague [J]. Planta, 2010, 232(2): 409-416.
- [12] Park S H, Morris J L, Park J E, et al. Efficient and genotype-independent *Agrobacterium*-mediated tomato transformation [J]. J Plant Physiol, 2003, 160(10): 1253-1257.
- [13] Alvarez M L, Pinyerd H L, Crisantes J D, et al. Plant-made subunit vaccine against pneumonic and bubonic plague is orally immunogenic in mice [J]. Vaccine, 2006, 24(14): 2477-2490.
- [14] 彭世清, 陈守才. 甘露糖阳性选择系统的建立及在番茄转化中的应用 [J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 141-144.
Peng S Q, Chen S C. A novel selection system for tomato transformation by mannose [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2005, 13(2): 141-144. (in Chinese)
- [15] Murray H, Thompson W. Rapid isolation of high molecular weight DNA [J]. 1980, Nucl Acids Res, 8(19): 4321-4325.
- [16] 顾红雅, 瞿礼嘉. 植物分子生物学实验手册 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1998: 464-466.
Gu H Y, Zhai L J. Plant molecular biology manual [M]. Beijing: Higher Education Press, 1998: 464-466. (in Chinese)
- [17] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理和方法 [M]. 北京: 科学技术出版社, 1998: 446-464.
Wang G L, Fang H J. Principle and methods of plant biotechnology [M]. Beijing: Science and Technology Press, 1998: 446-464. (in Chinese)
- [18] Wright M, Dawson J, Dunder E, et al. Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene *pmi* as the selectable marker [J]. 2001, Plant Cell Reports, 20(5): 429-436.
- [19] Lucca P, Ye X D, Potrykus I. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent [J]. Mol Breed, 2001, 7(1): 43-49.
- [20] Jang J C, Sheen J. Sugar sensing in higher plants [J]. Plant Cell, 1994, 11(6): 1665-1679.
- [21] 王仁厚. 利用转基因番茄表达人类酸性成纤维细胞生长因子 (aFGF) [D]. 吉林长春: 东北师范大学, 2003.
Wang R H. The expression of human acid Fibroblast Growth Factor (aFGF) intragenic tomato [D]. Changchun, Jilin: Northeast Normal University, 2003. (in Chinese)