

网络出版时间:2017-11-06 13:53 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.12.016
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20171106.1353.032.html

CD20 片段抗体在红花悬浮细胞中的表达研究

王立勇^{a,b},刘秀明^a,张 玲^{a,b},姚 娜^a,王德仲^b,
历雯清^{a,b},蔡静波^{a,b},李海燕^a,姜 潮^a

(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,吉林 长春 130118)

【摘 要】【目的】研究用红花愈伤组织建立红花悬浮细胞培养体系的条件,并利用红花悬浮细胞通过农杆菌介导转化法表达 CD20 复合片段抗体。【方法】以红花子叶为外植体,研究不同种类激素组合对愈伤诱导率的影响,筛选优质愈伤组织进行悬浮培养,探索不同初始接种量、蔗糖质量分数、水解酪蛋白质量浓度对红花悬浮细胞生长的影响。将 CD20 复合片段抗体基因两端引入 *Xma* I / *Eco* R I 酶切位点,并将其与 pEASY-T1 和 pBasta 载体相连,构建 pEASY-T1-CD20 克隆载体和 pBasta-CD20 表达载体,再将构建的 pBasta-CD20 表达载体转入根瘤农杆菌,利用根瘤农杆菌介导红花悬浮细胞转化法表达 CD20 复合片段抗体。【结果】红花子叶愈伤诱导最佳条件为 MS+NAA 2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、温度(25±0.1)℃、光照 70 μmol/(m²·s)连续光照,继代培养条件为 MS+NAA 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、30 μmol/(m²·s)连续光照、温度(25±0.1)℃。悬浮细胞体系培养最佳条件为不加琼脂粉的 MS+NAA 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、接种量 2.5 g(50 mL 培养基)、蔗糖质量分数 2%、水解酪蛋白 800 mg/L。pBasta-CD20 表达载体构建成功,且目的蛋白在红花悬浮细胞中成功表达。【结论】成功构建了红花悬浮细胞培养体系,并用该体系成功表达了 CD20 复合片段抗体。

【关键词】 红花愈伤组织;悬浮细胞;农杆菌介导;表达载体;CD20 复合片段抗体

【中图分类号】 Q943.2

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2017)12-0112-09

Expression of CD20 antibody fragment in safflower suspension cells

WANG Liyong^{a,b},LIU Xiuming^a,ZHANG Ling^{a,b},YAO Na^a,WANG Dezhong^b,
LI Wenqing^{a,b},CAI Jingbo^{a,b},LI Haiyan^a,JIANG Chao^a

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

b College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】 This study aimed to investigate the culture conditions for suspension cell system established by safflower callus and the expression of CD20 complex fragment antibody by agrobacterium-mediated transformation in safflower suspension cells. 【Method】 The safflower cotyledon was used as explants for callus induction to research the effects of different hormone combinations on callus induction. High quality callus were selected to explore the effects of different initial inoculation amounts, sucrose concentrations and hydrolyzed casein concentrations on the establishment of safflower suspension cell. The *Xma* I / *Eco* R I restriction sites were introduced to both ends of the CD20 complex fragment antibody gene and it was connected with pEASY-T1 and pBasta carrier. The pEASY-T1-CD20 cloning vector and pBasta-CD20 expression vector were conducted and the pBasta-CD20 expression vector was transferred into

【收稿日期】 2016-10-24

【基金项目】 “十二五”国家高新技术研究与发展计划项目(2011AA100606);吉林省科技厅项目(20150623024TC-11);国家自然科学基金项目(31101172,31501366)

【作者简介】 王立勇(1990—),男,安徽六安人,在读硕士,主要从事植物反应器研究。E-mail:1109142886@qq.com

【通信作者】 姜 潮(1955—),男,加拿大籍,博士生导师,主要从事植物反应器研究。E-mail:chaojiang10@hotmail.com

agrobacterium to express CD20 complex antibody fragment in suspension cells by agrobacterium mediated transformation.【Result】The optimal conditions for safflower cotyledons callus induction were MS+NAA 2 mg/L+6-BA 0.5 mg/L,temperature (25±0.1) °C and continuous light at illumination 70 μmol/(m² · s). Subculturing conditions were MS+NAA 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L,continuous light at 30 μmol/(m² · s),and temperature (25±0.1) °C. The optimal conditions for suspension cell culturing were no agar MS+NAA 1 mg/L+6-BA 0.5 mg/L,inoculation 2.5 g per 50 mL medium,sucrose 20 g/L and casein hydrolyzate concentration 800 mg/L. The expression vector of pBasta-CD20 was constructed successfully and the target protein was expressed in safflower suspension cells.【Conclusion】The culture system of safflower suspension cells was successfully constructed and the CD20 complex fragment antibody was successfully expressed by this system.

Key words: safflower callus;suspension cells;agrobacterium-mediated transformation;expression vectors;CD20 complex antibody fragment

红花(*Carthamus tinctorius* L.),又名草红花、红蓝花、刺红花,是菊科(Asteraceae)红花属(*Carthamus* L. Herb.)的1年生草本植物,具特异香气,味微苦;以花片长、色鲜红、质柔软者为佳,主产河南、浙江、四川等地;具有活血通经、去瘀止痛等功效^[1-3]。目前,红花已经成为最重要的双子叶模式植物^[4],主要用来进行植物发育、生物学及分子遗传学研究等。红花种子在人工条件下很容易培养出幼苗,其茎、子叶、根等组织均可作为愈伤诱导材料,能够通过摇瓶法用愈伤组织建立悬浮细胞^[5]体系。而悬浮细胞是良好的试验材料,在研究植物遗传转化、体细胞胚胎发生、人工诱变、生物反应器等方面都有巨大的应用潜力,因此基于红花悬浮细胞培养进行细胞和分子生物学研究,已成为新的热点。

CD20 是一种磷酸化蛋白质分子,分子质量为 33~36 ku,属于 4 次跨膜的蛋白质超家族,为 B 淋巴细胞表面特有的分化抗原。CD20 分子具有不易脱落、与抗体结合后不内化、在人体血清中无游离形式存在等特征^[6-8],因此作为治疗 B 细胞淋巴瘤的理想作用靶点而受到人们的关注。目前,关于 CD20 的抗体药物陆续被批准上市,但由于生产成本较高,价格越来越昂贵。

CD20 复合片段抗体蛋白的分子质量约为 53.3 ku。Ale 为信号分泌肽基因,且 scFv 为单链抗体基因,scFv 通过基因重组技术将抗体的轻链可变区与重链可变区通过一段 10~25 个氨基酸的柔性肽段连接在一起,这种抗体仍然具有对抗原表位的特异性识别能力;同时因其分子质量相对较小,因此可以更容易穿透肿瘤细胞^[9]。这种 CD20 复合片段抗体基因表达出的复合蛋白,不仅可以提高重组抗体在

血液中的半衰期,还保留了其激活下游信号通路的能力,在科研和临床应用中已经成为了一种有力工具^[10-11]。本研究利用 PUC57-Ale-scFv-CD20(Ale-scFv-CD20,文中简称为 CD20)为模板^[12],采用 PCR 技术获得抗 CD20 复合片段抗体基因,构建 pEASY-T1-CD20 克隆载体与表达载体 pBasta-CD20,并将 pBasta-CD20 载体转入感受态根瘤农杆菌 EHA105 中,通过农杆菌介导转化法将上述重组质粒转入红花愈伤组织,建立红花悬浮培养体系并初步检测出目的蛋白。

本试验研究了几种条件下红花悬浮细胞的生长特性,并用红花悬浮细胞表达 CD20 复合片段抗体,对其遗传转化体系^[13]进行验证,旨在摸索出维持红花悬浮细胞正常稳定生长与遗传转化的培养技术,并为红花悬浮细胞进一步的遗传操作提供良好的受体材料和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

红花(*Carthamus tinctorius* L.)种子,购自新疆塔城红花源有限公司。

以 MS(MS 粉 4.33 g/L、蔗糖 20 g/L、肌醇 0.1 g/L、有机试剂 3.4 mg/L、琼脂粉 8 g/L)、LB(酵母粉 5 g/L、蛋白胨 10 g/L、氯化钠 10 g/L)、YEP(酵母粉 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、氯化钠 5 g/L)为基础培养基。有机试剂配方:盐酸硫酸素 0.08 g/L,盐酸吡哆素 0.1 g/L,甘氨酸 0.4 g/L,烟酸 0.1 g/L。愈伤诱导培养基(M1)为:MS+2 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA;愈伤继代培养基(M2)为:MS+1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA;悬浮细胞液体培养基(M3)为:不加琼脂粉的 MS+1 mg/L NAA+0.5

mg/L 6-BA; 抑菌培养基(M4)为: M1+100 mg/L 头孢噻肟钠盐+100 mg/L 羧卞青霉素; 大肠杆菌液体培养基为: LB+100 mg/L 硫酸卡那霉素; 大肠杆菌固体培养基为: LB+15 g/L 琼脂粉+100 mg/L 硫酸卡那霉素; 农杆菌液体培养基为: YEP+100 mg/L 硫酸卡那霉素+50 mg/L 利福平; 农杆菌固体培养基为: YEP+15 g/L 琼脂粉+100 mg/L 硫酸卡那霉素+50 mg/L 利福平。

质粒 PUC57-Ale-scFv-Fc 由苏州金唯智公司构建, HRP-conjugated Goat Anti-Human Ig G (γ chain specific) 抗体购自美国 Southern Biotech 公司, Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate 购自美国 Thermo Scientific 公司, PVDF 膜购自美国 Biorad 公司, pBasta 表达载体、pEASY-T1 克隆载体、大肠杆菌 DH5 α 和根瘤农杆菌 EHA105 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提供与保存。CD20 复合片段抗体基因根据 PUC57-Ale-scFv-Fc 基因序列采用 Primer Premier 5.0 软件设计, 其引物序列为上游引物: 5'-AATAC CCGGGATGGCCACGCCCGCGTCCTC-3'; 下游引

物: 5'-AATAGAATTCTTATTTACCAGGTGA CAATGA-3'。

本试验所用的各种限制性内切酶、连接酶、质粒提取试剂盒、切胶回收试剂盒等, 均购自 TakaRa 公司; MS 粉、琼脂粉、蔗糖、肌醇、6-BA、NAA 等, 均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司。

1.2 红花愈伤组织的诱导与增殖

将红花种子接种在 MS 基础培养基中, 于 25 ℃ 培养箱暗培养 5~6 d, 即可培养出无菌苗。以无菌苗子叶为外植体, 以 MS 为基础培养基, 按表 1 方案分别添加对应的激素, 每组接种 20 片子叶, 于光照强度 70 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 、25 ℃ 条件下进行愈伤诱导, 重复 3 次, 统计诱导率。将诱导率最高与愈伤生长最好的一组定为愈伤诱导最佳方案, 并将此方案中的生长激素质量浓度减半作为继代培养基, 继代培养 4~5 代后, 挑选质地疏松、淡黄色、不透明的愈伤组织^[14]用于悬浮细胞培养。

诱导率=(每组子叶诱导出的愈伤组织平均数量/20)×100%。

表 1 红花愈伤组织诱导与增殖的激素添加组合

Table Hormone addition scheme of callus induction and increasion

mg/L

组别 Group	6-BA	NAA	组别 Group	6-BA	2,4-D	组别 Group	2,4-D	KT
N1	0.5	0.5	D1	0.5	0.5	K1	1.0	0.1
N2	0.5	1.0	D2	0.5	1.0	K2	1.0	0.2
N3	0.5	1.5	D3	0.5	2.0	K3	1.0	0.3
N4	0.5	2.0	D4	0.5	3.0	K4	1.0	0.4
N5	0.5	2.5	D5	0.5	4.0	K5	1.0	0.5

1.3 红花悬浮细胞培养体系的初步建立

将 2 g 黄色、质地疏松、不透明的红花愈伤组织, 放入装有 50 mL MS 液体继代培养基(M3)的 100 mL 三角瓶中, 于(25±0.1) ℃、120 r/min 摇床上暗培养 12~14 d, 培养基经孔径 0.147 mm(100 目)不锈钢滤网过滤, 除去大的细胞团, 剩余部分置于新鲜培养基中继代培养, 继代时新、旧培养基加入体积比为 3:1, 12~14 d 继代 1 次, 3 次之后, 在显微镜下可观察到大量红花悬浮单细胞^[14], 表明初步建立了红花悬浮细胞培养体系。

1.4 红花悬浮细胞培养条件的优化

1.4.1 生物量的测定 将红花悬浮细胞培养液经 4 000 r/min 离心 25 min, 取沉淀细胞置于烘箱 60 ℃ 烘干至恒质量, 称得其干质量即为生物量。

1.4.2 初始接种量对悬浮细胞生长的影响 取 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 g 新鲜悬浮培养物, 分别接种到装有 50 mL 新鲜继代培养基(M3)的 100 mL 三

角瓶中, 每 4 d 测 1 次生物量, 直到细胞停止增殖, 3 次重复。绘制不同初始接种量处理的生物量增殖率随培养时间变化的曲线, 确定悬浮培养的最佳初始接种量。

1.4.3 蔗糖质量分数对悬浮细胞生长的影响 取上述最佳接种量, 将质量分数分别为 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4% 的蔗糖装入有 50 mL 新鲜继代培养基(M3)的 100 mL 三角瓶中, 每 4 d 测 1 次生物量, 直到细胞停止增殖, 3 次重复。观察悬浮细胞生长情况, 绘制不同蔗糖质量分数处理的生物量随培养时间变化的曲线, 确定悬浮培养的最佳蔗糖用量。

1.4.4 水解酪蛋白质量浓度对悬浮细胞生长的影响 取最佳初始接种量克数, 将质量浓度分别为 200, 400, 600, 800, 1 000 mg/L 的水解酪蛋白装入有 50 mL 新鲜继代培养基(M3)的 100 mL 三角瓶中, 每 4 d 测 1 次生物量, 直到细胞停止增殖培养, 3 次重复。观察悬浮细胞生长情况, 绘制不同水解酪

蛋白质量浓度处理的生物量随培养时间的变化曲线,确定悬浮培养的最佳水解酪蛋白质量浓度。

1.5 CD20 表达载体的构建

1.5.1 pEASY-T1-CD20 克隆载体的构建 取 CD20 复合片段抗体基因,以已加 *Xma* I 和 *Eco*R I 酶切位点的引物进行 PCR 扩增。扩增片段预期长度为 1 482 bp,PCR 程序依次为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,25 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保存。将扩增后的目的基因与克隆载体 pEASY-T1 于 25 ℃ 连接 15 min,转化大肠杆菌,并在含有硫酸卡那霉素的大肠杆菌固体培养基上均匀涂布后过夜培养。然后挑选单菌落在大肠杆菌液体培养基中摇菌培养,再进行菌液 PCR 与双酶切,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增产物,鉴定正确的送于苏州金唯智公司测序,测序正确即代表克隆载体构建成功,命名为 pEASY-T1-CD20。

1.5.2 pBasta-CD20 表达载体的构建 取含有克隆载体 pEASY-T1-CD20 的菌液与含 pBasta 表达载体质粒的菌液进行摇菌,提取质粒,分别用 *Xma* I 和 *Eco*R I 双酶切,获得目的基因与表达载体,将目的基因与表达载体加到含有连接酶的 buffer 中,4 ℃ 过夜连接。转化大肠杆菌感受态,挑取单菌落摇菌,提取质粒。进行菌液 PCR 与双酶切鉴定,PCR 程序依次为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,25 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min;4 ℃ 保存。将鉴定正确的 PCR 产物送于苏州金唯智公司测序,测序正确,即表明 pBasta-CD20 表达载体构建成功。将含有 pBasta-CD20 表达载体的大肠杆菌摇菌培养提取质粒,将质粒转入根瘤农杆菌 EHA105 感受态细胞,若 PCR 验证正确,其菌液即可用于侵染红花。

1.6 转基因红花悬浮细胞的获得

取根瘤农杆菌 EHA105 菌液置于 50 mL 含 100 mg/L 硫酸卡那霉素和 50 mg/L 利福平的 YEP 培养基中,28 ℃、200 r/min 恒温振荡培养过夜,当菌液 OD 值为 0.6~0.8 时收集菌液,待用。切下红花无菌苗的叶片投入到该菌液中,侵染 10 min,倒去菌液后,将外植体置于无菌滤纸上吸去多余菌液,再转入共培养基培养基(M1)中,于 25 ℃ 黑暗条件下共培养 72 h,然后转到抑菌培养基(M4)中抑菌培养 20 d,诱导分化出愈伤组织后接种到 M2+100 mg/L 头孢噻肟钠盐+100 mg/L 硫酸卡那霉素+2 mg/L 草胺磷的培养基中继代培养 4~5 代。获得

的愈伤组织一部分放在 M3 培养基中进行液体摇瓶培养,其余部分继续培养,继代 3 次后获得转基因红花悬浮细胞。

1.7 转基因红花悬浮细胞的检测

1.7.1 PCR 检测 取悬浮细胞过滤物 0.5 g,进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 90 s,30 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 扩增产物,鉴定正确的初步认定为转基因悬浮细胞。

1.7.2 Western-blot 检测 取 0.5 g 经孔径 0.147 mm 镍网过滤的转基因悬浮细胞,放入 1.5 mL 离心管中,液氮速冻后充分研磨,加入 100 μ L 50 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)进行溶解,冰浴 30 min,加入适量 5 $\times$ loading buffer,沸水浴 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液,使用 12% SDS-PAGE 分离胶进行分离。根据分子质量大小对凝胶进行分割,在恒流 300 mA 条件下转 PVDF 膜 60 min,用 TBST 清洗 2 次,每次 1 min。加入 20 mL 封闭液(质量分数 5% 脱脂奶粉,TBST)于孵育盒中,37 ℃ 封闭 1 h,用 TBST 清洗 2 次,每次 1 min。使用封闭液 2 000 倍稀释 HRP-conjugated Goat Anti-Human Ig G (γ chain specific)抗体,37 ℃ 孵育 1.5 h,用 TBST 清洗 4 次,每次 5 min。配制 Super Signal[®] West Pico Chemiluminescent Substrate 显色液,孵育 1 min 后于暗室进行曝光,保存图片。

2 结果与分析

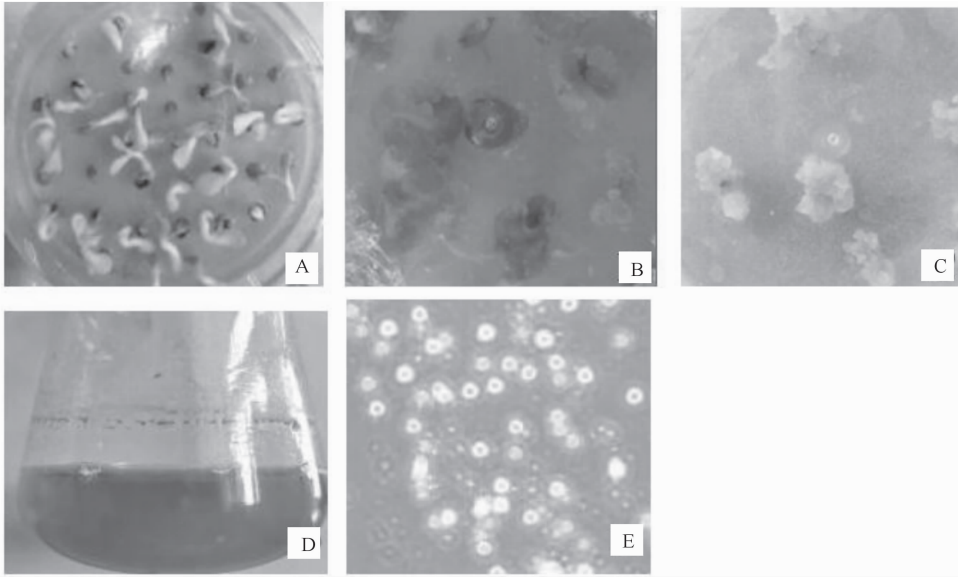
2.1 红花悬浮细胞系的建立及显微观察

松散、淡黄色、不透明的愈伤组织是适宜进行植物细胞悬浮培养的材料,通过轻微的机械振荡,即可获得单细胞或由几个细胞组成的悬浮细胞系。图 1 为红花无菌苗、愈伤诱导、成熟愈伤、悬浮细胞与悬浮细胞显微形态转化流程图。从图 1 可见,红花愈伤形态及悬浮细胞显微形态符合悬浮细胞特点,说明红花悬浮细胞体系建立成功。

2.2 红花悬浮细胞系培养条件的优化

2.2.1 激素 不同激素种类及其质量浓度对红花愈伤诱导影响较大,在低质量浓度激素作用下,悬浮细胞分裂较慢,细胞活力较低,愈伤诱导效率低;过高质量浓度激素对悬浮细胞的生长则有抑制作用^[15],愈伤诱导效率低。如图 2 所示,当诱导激素为 2 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA(N4 组)、继代激素为 1 mg/L NAA+0.5 mg/L 6-BA 时,愈伤诱导

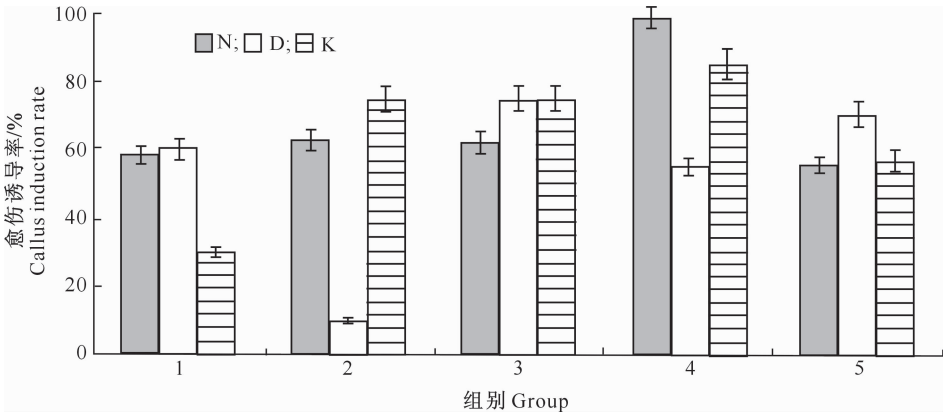
效率最高,即诱导率最高,且继代愈伤大多呈疏松、淡黄色愈伤。



A. 无菌幼苗;B. 初代诱导的愈伤组织;C. 继代后成熟的愈伤组织;D. 悬浮细胞;E. 悬浮细胞显微镜图(40×)
A. Sterile seedlings;B. The early generation of callus induction;C. The mature transgenerational of callus;
D. The suspension cells;E. The micrographs of suspension cells(40×)

图 1 红花幼苗到悬浮细胞的培养流程

Fig. 1 Culturing processes of safflower from seedling to suspension cell



各组激素方案与表 1 同

The scheme of hormones is the same as Table 1

图 2 不同激素对红花愈伤诱导率的影响

Fig. 2 Effects of different hormones on induction rate of safflower callus

2.2.2 初始接种量 悬浮细胞生长启动需要一个最低的细胞起始密度,即临界值,当接种量小于临界值时,细胞容易自溶^[16],细胞分裂困难,生长较慢;当接种量大于临界值时,细胞增殖才比较明显,且随着细胞密度的增加,营养物质消耗速度加快,因此接种量成为影响细胞生长的重要因素^[17]。如图 3 所示,当接种量较少时,细胞适应期较长,红花悬浮细胞相对增殖速度较慢;随着接种量的增加,细胞生物

量增殖率不断提高,在接种量为 50 mL 培养基中 2.5 g 时,细胞生物量增殖率可达最大值 261.6%。由此得出红花最适接种量为 50 mL 培养基中 2.5 g。
2.2.3 蔗糖质量分数 蔗糖不仅是悬浮细胞生长的碳源主要来源,更是渗透压调节剂^[18],因此适量的蔗糖对悬浮细胞生长十分重要。如图 4 所示,当蔗糖质量分数为 0.5%时,红花悬浮细胞开始生长

较快,至 12 d 时生长速度减慢,可能是因为此时碳源不足;随着蔗糖质量分数增高,细胞生长迅速,在蔗糖质量分数为 2% 时达到最大;当蔗糖质量分数

为 4% 时细胞生长速度减慢,且 2% 与 3% 差异不大,因此培养基中添加质量分数 2% 的蔗糖最适合红花悬浮细胞生长。

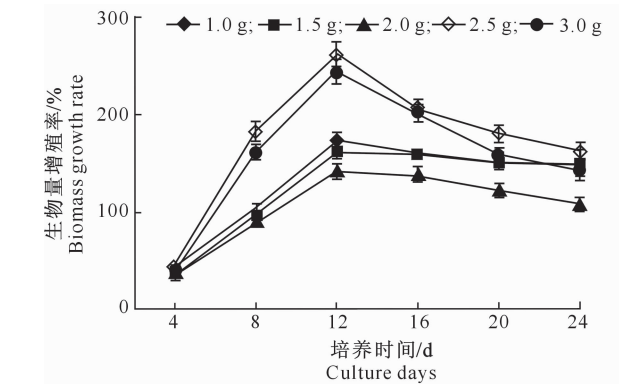


图 3 初始接种量对红花悬浮细胞生长的影响
Fig. 3 Effects of inoculation amount on growth of safflower suspension cultivars

2.2.4 水解酪蛋白质量浓度 水解酪蛋白对红花悬浮细胞生长有促进作用,一般其质量浓度在100~1 200 mg/L^[19]。如图 5 所示,当水解酪蛋白质量浓度为 200 mg/L 时,悬浮细胞开始缓慢生长,随着水解酪蛋白质量浓度增大,细胞生长较为迅速,当水解酪蛋白质量浓度为 800 mg/L 时,细胞生长最快。可见水解酪蛋白对红花悬浮细胞生长起一定促进作用,且其质量浓度以 800 mg/L 为宜。

2.3 红花 CD20 表达载体的构建

图 6-A 与图 6-B 分别为 pEASY-T1-CD20 克隆载体构建的 PCR 与双酶切验证结果,其琼脂糖凝胶电泳均有目的片段,送于苏州金唯智公司测序,结果正确,即表示克隆载体构建成功。

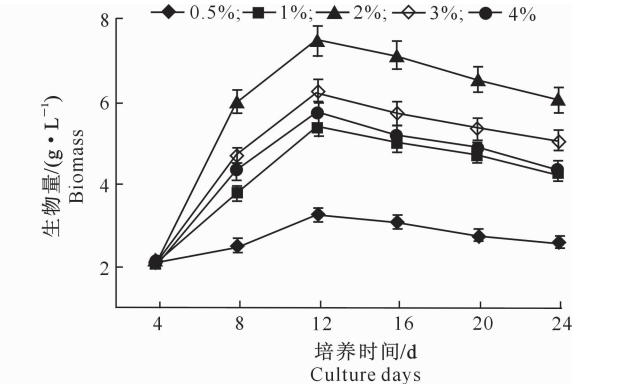


图 4 蔗糖质量分数对红花悬浮细胞生长的影响
Fig. 4 Effects of sucrose mass fraction on growth of safflower suspension cultivars

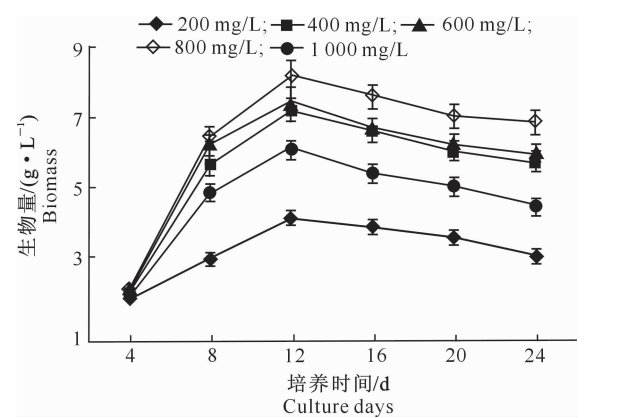
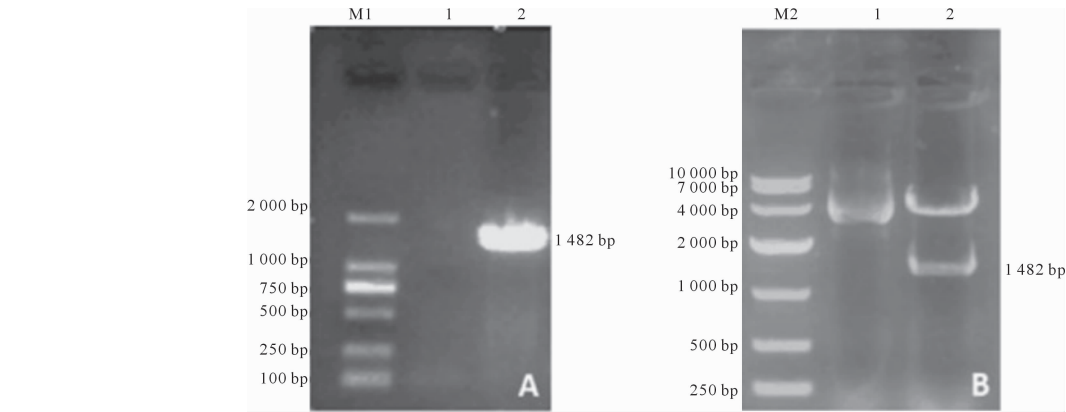
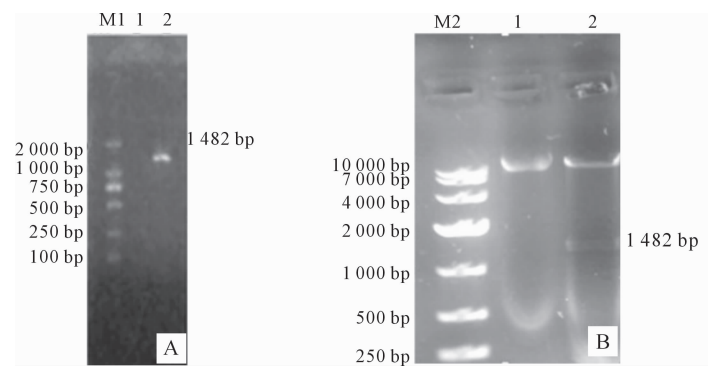


图 5 水解酪蛋白质量浓度对红花悬浮细胞生长的影响
Fig. 5 Effects of hydrolyzed casein mass fraction on growth of safflower suspension cultivars



M1. 2 000 bp DNA Marker; M2. 10 000 bp DNA Marker; 1. 阴性对照; 2. 样品
M1. 2 000 bp DNA Marker; M2. 10 000 bp DNA Marker; 1. Negative control; 2. Sample
图 6 pEASY-T1-CD20 克隆载体构建的 PCR(A)和双酶切(B)鉴定结果
Fig. 6 PCR(A) and double digestion(B) results of pEASY-T1-CD20 cloning vector

图 7-A 与图 7-B 分别为 pBasta-CD20 表达载体构建的 PCR 与双酶切验证结果,其琼脂糖凝胶电泳均有目的片段,送于苏州金唯智公司测序,结果正确,即表示表达载体构建成功。

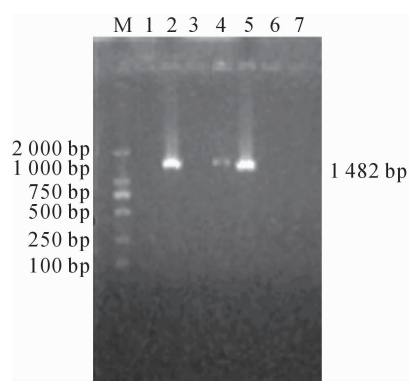


M1. 2 000 bp DNA Marker; M2. 10 000 bp DNA Marker; 1. 阴性对照; 2. 样品
M1. 2 000 bp DNA Marker; M2. 10 000 bp DNA Marker;
1. Negative control; 2. Sample

图 7 pBasta-CD20 表达载体构建的 PCR(A) 和双酶切(B) 验证结果
Fig. 7 PCR(A) and double digestion(B) results of pBasta-CD20 expression vector

2. 4 红花的转化与检测

用根瘤农杆菌 EHA105 菌液侵染红花子叶,然后通过共培养、抑菌培养、草胺磷筛选及继代培养筛选出愈伤组织,建立悬浮细胞,继代 3 次,进行 PCR 与 Western-blot 检测,结果如图 9 和图 10 所示。由



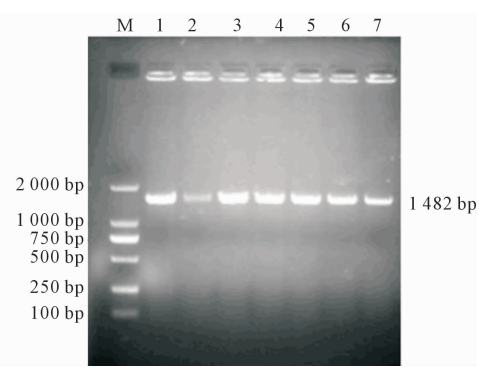
M. 2 000 bp DNA Marker; 1-7. 样品 Sample

图 9 转基因红花悬浮细胞的 PCR 验证结果
Fig. 9 PCR results of transgenic safflower suspension cells

3 讨 论

植物悬浮细胞具有良好的分散性、均一性、生长迅速等特点,已被广泛应用于细胞学、生理学、生物化学及分子生物学等研究领域。同时,悬浮细胞为

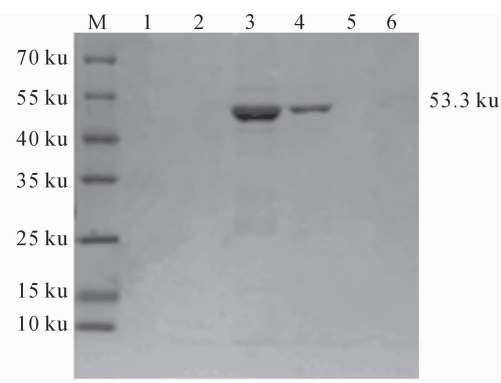
图 8 为 pBasta-CD20 表达载体转化 EHA105 根瘤农杆菌的 PCR 验证结果,其琼脂糖凝胶电泳有目的片段,说明转化成功。



M. 2 000 bp DNA Marker; 1-7. 样品 Sample
图 8 pBasta-CD20 表达载体转化 EHA105 根瘤农杆菌的 PCR 验证结果

Fig. 8 PCR results of pBasta-CD20 expression vector transformed with EHA105 agrobacterium tumefaciens

图 9 和图 10 可以看出,目的基因条带大小为 1 482 bp,CD20 复合片段抗体蛋白分子质量为 53. 3 ku, PCR 与 Western-blot 检测结果表明,目的基因和目的蛋白条带与预期大小一致,因此可判定转基因悬浮细胞系构建成功。



M. 70 ku 蛋白 Marker; 1-6. 样品
M. 70 ku protein Marker; 1-6. Sample

图 10 转基因红花悬浮细胞的 Western-blot 检测结果
Fig. 10 Transgenic safflower suspension cells by Western-blot test results

从细胞水平上进行植物遗传操作提供了理想的材料,如快速筛选突变体、分离原生质体、杂交细胞、转基因、调控次生代谢产物等^[20-23]。本试验为充分利用红花悬浮培养体系表达 CD20 复合片段抗体,优化了红花悬浮培养体系,通过研究影响红花悬浮细

胞培养的几个重要因素,建立了较好的红花悬浮细胞系,获得了 CD20 红花悬浮细胞转基因细胞系,验证了利用红花悬浮细胞表达药用蛋白的可行性。此结果对将红花悬浮细胞用作植物反应器生产 CD20 抗体蛋白奠定了良好的基础。

目前,国内研究者大多利用大肠杆菌系统表达蛋白,但这会出现复性困难且易产生包涵体,而利用动物细胞表达又易被自身病原体污染^[24]。虽然利用植物植株表达无上述问题,但生长周期太长,不适合大量生产,因此生长周期短且可控性强的植物悬浮细胞成为生产药用蛋白的理想材料之一。目前已有在小鼠体内利用基因重组抗原研制人 CD20 单克隆抗体的报道^[25],但未见利用红花悬浮细胞表达 CD20 抗体的研究文献。本研究构建了 pBasta-CD20 植物表达载体,并建立了红花悬浮细胞培养体系,利用红花悬浮细胞表达出了 CD20 复合片段抗体,这为大规模生产 CD20 抗体蛋白提供了可能。

[参考文献]

- [1] 易善勇,官丽莉,杨 晶,等. 红花药理作用及其开发与应用研究进展 [J]. 北方园艺, 2015(5):191-195.
Yi S Y, Guan L L, Yang J, et al. Advances in pharmacological effects of safflower and its development and application [J]. Northern Horticulture, 2015(5):191-195.
- [2] 张 华. 红花的药物功效及现代制剂的研究发展与前景 [J]. 中国中医药咨讯, 2012, 4(3):87.
Zhang H. The research of development and prospect about safflower's drug efficacy and modern formulations [J]. Traditional Chinese Medicine Journal, 2012, 4(3):87.
- [3] 赵 钢,王安虎. 红花的资源及药用价值 [J]. 中国野生植物资源, 2004, 23(3):24-25.
Zhao G, Wang A H. Resources and medicinal value of safflower [J]. Chinese Wild Plant Resources, 2004, 23(3):24-25.
- [4] Koornneef M, Meinke D. The development of *Arabidopsis* as a model plant [J]. Plant Journal for Cell Molecular Biology, 2010, 61(6):909-921.
- [5] Neumann K H, Imani J, Kumar A. Cell suspension cultures [J]. Principles & Practice, 2009, 66(2):718-723.
- [6] Weisser N E, Hall J C. Applications of single-chain variable fragment antibodies in therapeutics and diagnostics [J]. Biotechnology Advances, 2009, 27(4):502-520.
- [7] Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene [J]. Blood, 2002, 99(3):754-758.
- [8] Feugier P. A review of rituximab, the first anti-CD20 monoclonal antibody used in the treatment of B non-Hodgkin's lymphomas [J]. Future Oncology, 2016, 11(9):1327-1342.
- [9] Powers D B, Amersdorfer P, Poul M, et al. Expression of single-chain Fv-Fc fusions in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Immunological Methods, 2001, 251(12):123-135.
- [10] Sugimoto T, Tomita A, Hiraga J, et al. MS4A1 (CD20) gene expression is down-regulated by recruiting the histone deacetylase protein complex to the promoter in the CD20-negative B-lymphoma cells after treatment with rituximab [J]. Blood, 2009, 114(22):527.
- [11] Polyak M J. Molecular analysis of the CD20 oligomeric complex and its response to B cell antigen receptor activation [J]. Annals of Internal Medicine, 2015, 163(8):321-338.
- [12] 王德仲. 抗 CD20 片段抗体在拟南芥种子中的表达及其所引起的内质网应激响应 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
Wang D Z. Expression of anti-CD20 fragment antibodies in *Arabidopsis* seeds and the endoplasmic reticulum stress response [D]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [13] Shilpa K S, Kumar V D, Sujatha M. Agrobacterium-mediated genetic transformation of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2010, 103(3):387-401.
- [14] 陈书安, 王晓东, 袁晓凡, 等. 藏红花细胞悬浮培养体系的建立及优化 [J]. 生物技术通报, 2010(7):157-160.
Chen S A, Wang X D, Yuan X F, et al. Establishment of cell suspension culture system and optimization [J]. Biotechnology Bulletin, 2010(7):157-160.
- [15] Zhang D X, Shuang X U, Shi S L, et al. Effects of different hormones on the suspension cell growth and development of *Bupleurum falcatum* [J]. Medicinal Plant, 2012(12):268-293.
- [16] 颜日明, 张志斌, 朱 筠, 等. 高产绿原酸杜仲细胞悬浮培养体系优化研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2):301-304.
Yan R M, Zhang Z B, Zhu D, et al. Optimization of cell suspension culture system and *Eucommia ulmoides* Oliv [J]. Chinese Traditional Drug, 2010, 41(2):301-304.
- [17] 姜新超, 刘 春, 明 军, 等. 岷江百合悬浮细胞系的建立及植株再生 [J]. 园艺学报, 2011, 38(2):327-334.
Jiang X C, Liu C, Ming J, et al. Establishment of suspension cell line and plant regeneration of liliun [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011, 38(2):327-334.
- [18] Pieraccini S, Conti S, Chaurasia S, et al. Modelling the effect of osmolytes on peptide mechanical unfolding [J]. Chemical Physics Letters, 2013, 578(1):138-143.
- [19] 李忠光, 龚 明. 水解酪蛋白对烟草愈伤组织和悬浮培养细胞生长的促进作用 [J]. 云南师范大学学报(自然科学版), 2006, 26(4):60-61.
Li Z G, Gong M. Effects of hydrolyzed casein on the growth and tobacco callus and suspension culture [J]. Journal of Yunnan Normal University (Natural Sciences Edition), 2006, 26(4):60-61.
- [20] 孙敬三. 植物细胞工程实验技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1995:200-225.
Sun J S. Plant cell engineering experiment technology [M]. Beijing: Science Press, 1995:200-225.

[21] 肖 望. ‘过山香’香蕉胚性悬浮细胞原生质体分离的方法研究 [J]. 现代生物医学进展, 2009, 19(6): 1079-1081.
Xiao W. Research on protoplast isolation of embryogenic cell suspensions of *Musa silk* cv. Guoshanxiang (ABB) [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009, 19(6): 1079-1081.

[22] 余 露, 杨 英, 李 硕, 等. 甘草悬浮细胞的玻璃化法超低温保存研究 [J]. 植物科学学报, 2007, 25(5): 462-466.
Yu L, Yang Y, Li S, et al. The research of cryopreservation of tobacco suspension cells by vitrification [J]. Plant Science Journal, 2007, 25(5): 462-466.

[23] 吕建军, 胡高升, 李经奎, 等. 前体饲喂和真菌诱导子对肉苁蓉悬浮培养细胞次生代谢产物的影响 [J]. 中药材, 2009, 32(2): 171-173.
Lü J J, Hu G S, Li J K, et al. Effects of precursor feeding and fungal elicitor on secondary metabolites of cell suspension cultures of *cistanche* [J]. Chinese Herbal Medicines, 2009, 32(2): 171-173.

[24] Larrick J W, Thomas D W. Producing proteins in transgenic plants and animals [J]. Curr Opin Biotechnol, 2001, 12: 411-418.

[25] 李爱玲, 孙瑛勋, 洪海燕, 等. 利用基因重组抗原研制人 CD20 单克隆抗体及其功能的研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2002, 22(4): 385-388.
Li A L, Sun Y X, Hong H Y, et al. Development of human monoclonal antibody against human CD20 by gene recombinant antigen and its function [J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2002, 22(4): 385-388.

.....

(上接第 111 页)

[34] 王惠哲, 庞金安, 李淑菊, 等. 弱光处理对春季温室不同品种黄瓜生长发育的影响 [J]. 河南农业大学学报, 2006, 40(2): 156-160.
Wang H Z, Pang J A, Li S J, et al. Effects of weak light treatments on growth and development of different varieties of *Cucumis sativus* L. in spring greenhouse [J]. Journal of Henan Agriculture University, 2006, 40(2): 156-160.

[35] 贾士芳, 李从锋, 董树亭, 等. 弱光胁迫影响夏玉米光合效率的生理机制初探 [J]. 植物生态学报, 2010, 34(12): 1439-1447.
Jia S F, Li C F, Dong S T, et al. Physiological mechanism of shading stress on photosynthetic efficiency in summer maize (*Zea mays*) [J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2010, 34(12): 1439-1447.

[36] Jishi T, Matsuda R, Fujiwara K. A kinetic model for estimating net photosynthetic rates of cos lettuce leaves under pulsed light [J]. Photosynthesis Research, 2015, 124(1): 107-116.

[37] Ernesto O G, Daniel A L, Rumen I T, et al. Chlorophyll fluorescence emission of tomato plants as a response to pulsed light based LEDs [J]. Plant Growth Regulation, 2013, 69(2): 117-123.

[38] Jishi T, Fujiwara K, Nishino K, et al. Pulsed light at lower duty ratios with lower frequencies is less advantageous than continuous light for CO₂ uptake in cos lettuce [J]. Journal of Light & Visual Environment, 2012, 36(3): 88-93.

[39] 沈韞曦, 郭双生, 艾为党, 等. 密闭系统中光强和光照时间对小麦的交互作用 [J]. 航天医学与医学工程, 2014, 27(4): 280-285.
Shen Y Z, Guo S S, Ai W D, et al. Effects of light intensity and illumination time on wheat growth in a closed system [J]. Space Medicine & Medical Engineering, 2014, 27(4): 280-285.