

文章编号: 1674-8085(2016)01-0057-05

重组人成纤维细胞生长因子 21 对胡萝卜遗传转化的研究

汪 洪¹, 蔡进章², *曾建军³

(1. 温州医科大学药学院, 浙江, 温州 325035; 2. 温州医科大学附属第二医院, 浙江, 温州 325000; 3. 井冈山大学生命科学学院, 江西, 吉安 343009)

摘 要: 人成纤维细胞生长因子 21 (*FGF21*) 是肝脏合成的一种可分泌多肽, 对糖脂代谢的调控具有重要作用。以胡萝卜(*Daucus carota* L.) 七寸人参品种为试验材料, 用含重组人成纤维细胞生长因子 21 (*rhFGF21*) 质粒 p1390 R II 的根癌农杆菌 LBA4404 对胡萝卜进行了遗传转化实验。PCR 扩增和 Western blot 结果表明外源基因 *FGF21* 已成功转入胡萝卜基因组中。此研究为今后用胡萝卜产业化表达生产 *FGF21* 提供参考。

关键词: *FGF21*; 胡萝卜; 农杆菌; 遗传转化

中图分类号: Q785

文献标识码: A

DOI:10.3969/j.issn.1674-8085.2016.01.012

GENETIC TRANSFORMATION OF RECOMBINANT HUMAN FIBROBLAST GROWTH FACTOR 21 (*hFGF21*) ON *DAUCUS CAROTA* L.

WANG Hong¹, CAI Jin-zhang², *ZENG Jian-jun³

(1. School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035 China;

2. The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035 China;

3. College of Life Sciences, Jinggangshan University, Ji'an, Jiangxi 343009, China)

Abstract: Human fibroblast growth factor 21 (*hFGF21*), found in the mouse embryo, is a new member of fibroblast growth factor family. It is synthesized in the liver as secreting protein. In this study, *Daucus carota* L. hypocotyl was used as experimental materials. Recombinant human fibroblast growth factor 21 (*rhFGF21*) was introduced into *D. carota* via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method. The regenerated hygmycin resistant plantlets were confirmed by PCR and Western blotting. The results provided an experimental basis for large-scale production of *FGF21*.

Key words: *hFGF21*; *Daucus carota* L.; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation

成纤维细胞生长因子 21 (Fibroblast growth factor 21, *FGF21*) 是在小鼠胚胎中发现的成纤维细胞生长因子家族的一个新成员, 是肝脏合成的一种可分泌多肽^[1]。在糖脂代谢调控方面, *FGF21* 可降低血糖和血脂, 且不会导致低血糖, 是治疗 II 型糖尿病的理想药物^[2-3]。

目前, 通过微生物发酵获得的大部分药用蛋白都存在生产成本高昂的问题。利用植物生物反应器表达动物来源的蛋白, 可大大降低外源活性蛋白的生产成本, 且具有许多微生物表达系统所没有的优点, 如植物属于真核生物, 能进行有效的蛋白翻译后加工; 转基因植物不含致病微生物或其它潜在的

收稿日期: 2015-10-07; 修改日期: 2015-12-17

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3100459)

作者简介: 汪 洪(1974-), 女, 四川眉山人, 副教授, 博士生, 主要从事生物反应器方向研究(E-mail: anghong@126.com);

蔡进章(1973-), 男, 浙江温州人, 副主任中药师, 主要从事药用植物资源方向的研究 (E-mail: wzcjz168@163.com);

*曾建军(1973-), 女, 江西井冈山人, 副教授, 博士, 主要从事植物生物技术等方面的研究(E-mail: jianjunzeng@139.com).

病原因而安全性好;植物属再生资源,生成规模不受限制,某些可食药物还可节约下游加工开支等。因此,利用植物基因工程使 *FGF21* 能够在植物中获得表达,对未来 *FGF21* 的产业化研究具有一定重要意义^[4]。

胡萝卜(*Daucus carota* L.)是世界上最重要的蔬菜作物之一,是一种遗传模式作物和农杆菌转化系统的转基因受体。胡萝卜的肉质根可作为外源可溶性蛋白高水平稳定表达的优良载体^[5]。目前,国内外尚未见以胡萝卜为生物反应器生产 *FGF21* 蛋白的研究报道。本研究以七寸人参胡萝卜为实验材料,将 *FGF21* 蛋白编码基因转入胡萝卜中,以胡萝卜为生物反应器生产 *FGF21* 蛋白,旨在为 *FGF21* 蛋白生产提供一个高效的系统。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

七寸人参胡萝卜种子购自杭州金科园艺种苗技术服务部。将胡萝卜种子搓去种毛,用自来水清洗数遍,再于室温下用来水浸泡种子过夜。选取籽粒饱满、大小均一的胡萝卜种子经 70%乙醇浸泡 30 s,无菌水冲洗 3 次,再用 0.1% 升汞浸泡 10 min,无菌水冲洗 4~5 次后接种于不含任何激素的 MS 固体培养基上,于 16 h/d、2500 lx 光照, (25 ± 1) °C 条件下培养成无菌苗作为供试材料。

1.1.2 菌株及质粒

根瘤农杆菌 LBA4404,植物表达载体质粒 p1390-R II (图 1),以上均由本实验保存。植物基因组提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司,Western blotting 试剂盒购于 Roche 公司。

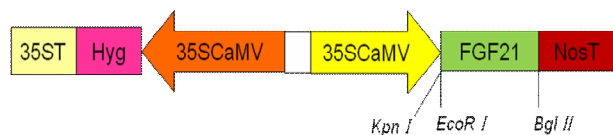


图 1 植物表达载体 p1390R II 结构示意图

Fig. 1 The illustration diagram of plant vector p1390R II expressing *FGF21*

1.1.3 培养基

无菌苗培养基: MS 基本培养基;愈伤组织诱导培养基: MS + 0.1 mg/L 2,4-D + 0.1 KT;体细胞胚诱导培养基: MS + 0.2% (WT) 酵母提取物。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌介导的转化条件优化

(1) 抑菌抗生素浓度的筛选:将预培养 2 d 的外植体浸入菌液(OD_{600}) = 0.6, 侵染 10 min 后倒掉菌液,并将外植体用无菌滤纸吸干残留菌液,接种到不含激素的 MS 共培养基上,于 25 °C 黑暗条件下共培养 2 d,转接到添加抑菌抗生素羧苄青霉素浓度为 0、100、200、300、400 mg/L 的愈伤组织诱导培养基中培养 1 周,之后转入含潮霉素 (Hyg) 筛选愈伤组织诱导培养基中,每 2 周继代 1 次,直至筛选出抗性愈伤组织,再将此抗性愈伤组织接种到含潮霉素的体细胞胚诱导培养基上诱导体细胞胚,培养条件 25 °C, 16 h/8 h (光/暗),光照强度 2500 lx。当体细胞胚分化成熟并长至 5~8 cm 高时经一周炼苗,即可进行移栽。

(2) 潮霉素筛选浓度的确定:待下胚轴在愈伤组织诱导 1 w 后转入到含筛选抗生素潮霉素浓度分别是 0、2、4、6、8 mg/L 的愈伤组织诱导培养基上,3 周后进行观察对比,筛选出合适的潮霉素抗性浓度。

1.2.2 转基因植物的检测

(1) 植物基因组 DNA 提取及 PCR 检测。植物总 DNA 的提取参考 CTAB 法进行。以未经转化的植物作阴性对照,以质粒 pCambia1390-R II DNA 为阳性对照进行 PCR 检测,引物设计为上游引物 P1: 5' - CACCCAATTCCAGATTCTTCTCC-3';下游引物 P2: 5' - TTAAGAAGCGTAAGATGGAG - 3'。PCR 扩增条件为循环参数:94 °C 预变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环,最后 72 °C 2 min。

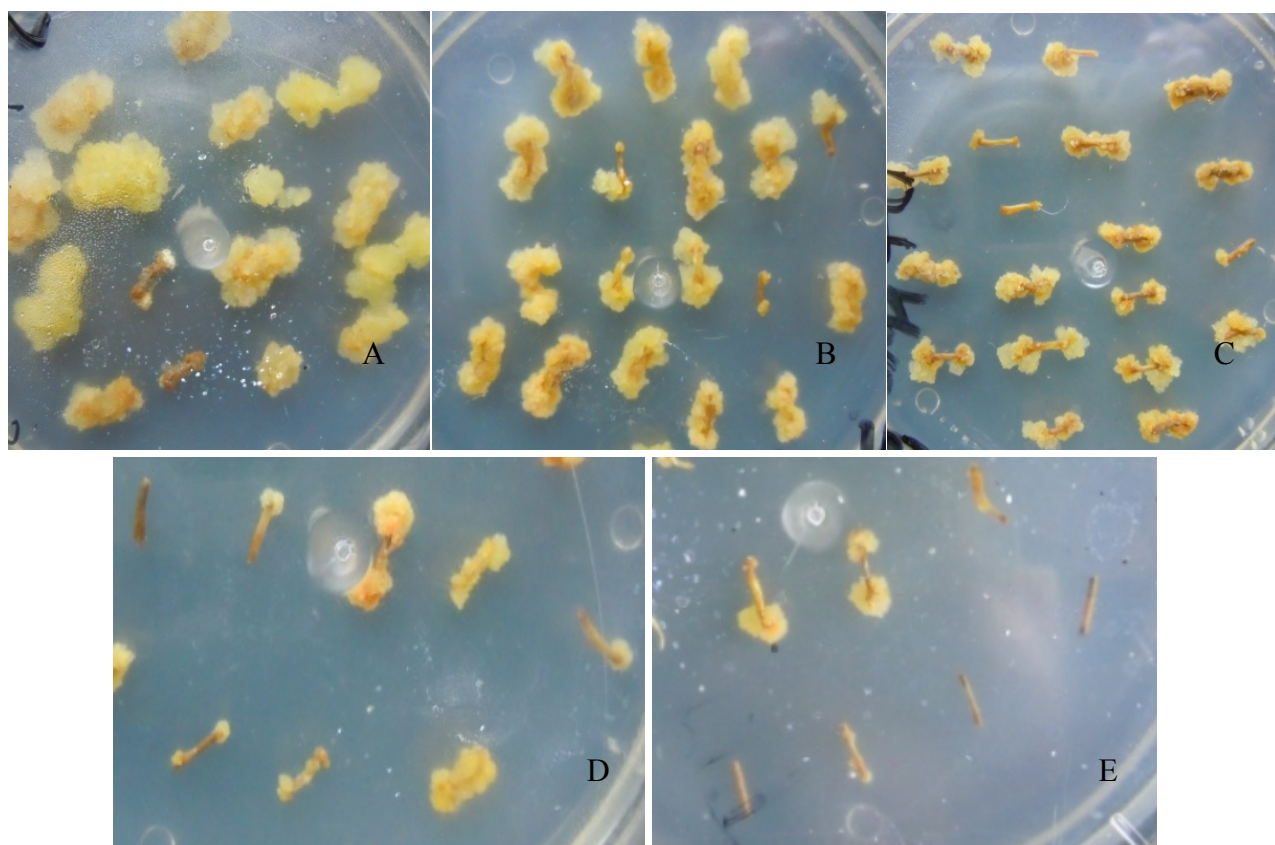
(2) 植物蛋白质的提取及 Western blotting 检测。准备 100 g 的转基因与非转基因胡萝卜直根,剪碎后液氮冷冻,于 4 倍冷冻缓冲液下碾磨匀浆,于 4 °C 下,1000 g 离心 15 min,上清液用于 western blotting 分析。将上清液用于 SDS-PAGE 电泳结束

后,将胶上的蛋白转移到硝酸纤维膜上,首先用封闭液封闭过夜,将一抗(羊抗 *FGF-21*)用 TBST (1:2000)稀释,将膜蛋白面朝下放于一抗液面上,室温下孵育 1~2 h 后,用 TBST 在室温下洗 2 次,每次 10 min,再用 TBS 洗 10 min;二抗(兔抗羊) 1:5000 稀释,方法同一抗;再将发光液 A 液和 B 液 1:1 混合,将蛋白面朝下于混合液充分接触,于暗室中进行曝光 30~60 s 左右。

2 结果与分析

2.1 潮霉素(Hyg)筛选浓度的确定

实验中成功转化的融合基因可使植物细胞对潮霉素产生抗性,确定转化植株对潮霉素的耐受能力可帮助筛选阳性转基因植株。本实验外植体在含有潮霉素的培养基上培养 3 w 后试验结果表明,在不添加 Hyg 的培养基上胡萝卜下胚轴愈伤组织诱导率最高,当 Hyg 浓度为 2 mg/L 和 4 mg/L 时,下胚轴外植体愈伤组织生长正常;当培养基中 Hyg 浓度为 6 mg/L 时,下胚轴愈伤组织生长情况受到明显抑制,甚至部分外植体处于濒死状态;当 Hyg 浓度上升到 8 mg/L 时,下胚轴明显变黑,愈伤组织停止生长,最终褐化死亡(图 2)。因此,将胡萝卜下胚轴 Hyg 筛选浓度确定为 6 mg/L。



A: 0.0 mg/L Hyg B: 2.0 mg/L Hyg C: 4.0 mg/L Hyg D: 6.0 mg/L Hyg E: 8.0 mg/L

图 2 不同 Hyg 浓度培养基上下胚轴的愈伤组织诱导

Fig.2 The induction of callus in the medium containing different Hyg concentrations

2.2 抑菌剂羧苄青霉素 (Carb) 浓度的选择

从表 1 中可以看出,不添加 Carb 的 1 组,抑菌率为 0,农杆菌过度生长,使外植体全部死亡。2~5 组随着添加的 Carb 浓度升高,农杆菌被逐渐抑制,

外植体的死亡率逐渐降低。但第 6 组出现外植体死亡率升高,而愈伤组织诱导率也降低,Carb 选择浓度定为 400 mg/L。

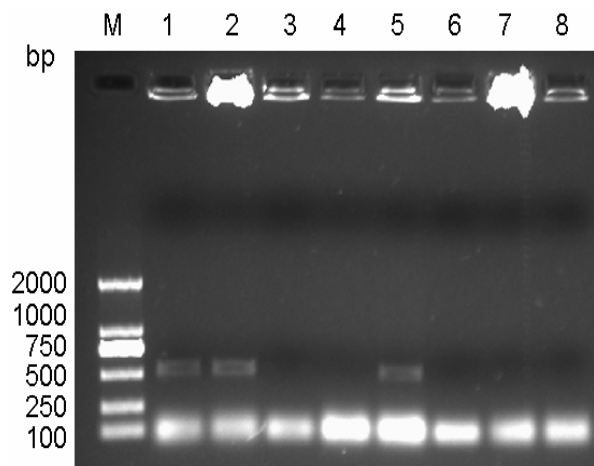
表 1 Carb 对农杆菌抑菌效果及愈伤组织诱导的影响

Table 1 Effect of different concentration of Carb on the anti-*Agrobacterium* and the induction of callus

组别	Carb (mg/L)	外植体死亡率 (%)	愈伤组织诱导率 (%)	抑菌率 (%)
1	0.0	100 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
2	100.0	84.02 ± 0.22	15.29 ± 0.08	10.38 ± 0.09
3	200.0	74.77 ± 0.24	12.22 ± 0.05	22.70 ± 0.15
4	300.0	20.16 ± 0.20	11.35 ± 0.10	64.32 ± 0.23
5	400.0	9.37 ± 0.06	9.71 ± 0.21	81.92 ± 0.26
6	500.0	14.83 ± 0.12	4.51 ± 0.12	89.62 ± 0.41

2.3 胡萝卜的 PCR 鉴定

经潮霉素初筛共获得 21 株抗性植株,剪取抗性植株的叶片和非转基因植物的叶片提取 DNA,PCR 扩增检测到目的条带 589 bp 处有 2 个条带(图 2),结果表明有 2 株可能为阳性植株,其转化频率为 9.52%,PCR 鉴定结果初步表明 *rhFGF21* 可能已转入胡萝卜基因组中。



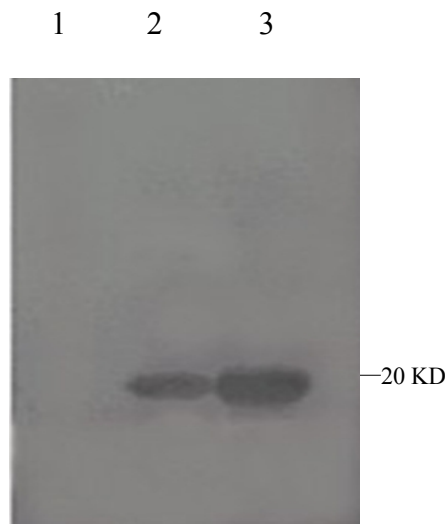
M. DNA marker; 1.阳性质粒 p1390R II FGF21; 2-7.转基因植株; 8. 非转基因植株

图 3 转基因胡萝卜植株的 PCR 检测

Fig. 3 Identification of transgenic plants by PCR amplification

2.4 胡萝卜的 Western blot 检测

由于 PCR 扩增可能会出现假阳性,因此,为了进一步证实外源基因 *rhFGF21* 已经转入到胡萝卜的基因组中,本实验对 PCR 鉴定为阳性的植株肉质根再提取总蛋白进行 Western blot 检测外源基因表达产物,检测结果显示在 20 KDa 处有 1 条明显的目的条带(图 3),而非转基因胡萝卜肉质根中没有特异性的条带出现,该结果表明 FGF21 蛋白已在转基因胡萝卜中得到了表达,并显示出良好的抗原性。



1.非转基因植株; 2.转基因植株; 3.大肠杆菌 LBA4404 来源的 rhFGF21

蛋白

图 4 转基因胡萝卜植株的 western blotting 检测

Fig. 4 Western blotting for transgenic plants

3 讨论

影响植物转化的因素较多,我们前期的实验研究已经探索出以胡萝卜子叶和下胚轴为外植体再生植株的条件体系,并培养得到了胡萝卜最高的出愈率可以达到 100%的愈伤诱导体系^[6],以及从愈伤组织中诱导出高频率体细胞胚的条件体系^[7]。张娅^[8]等发现以胡萝卜下胚轴为转化外植体过程中,萌发 7~10 d 后的无菌苗下胚轴植物细胞处于活跃分化的状态,易于转化。本研究试验采用 5 d 苗龄的下胚轴作为转化受体,其再生周期短、再生率高、对农杆菌很敏感等特点,可以提高转化率^[9]。在筛选转化子的过程中,添加抑菌抗生素可防止农杆菌大规模生长而影响转化效率,不同基因型的植物选用不同的抗生素^[10]。羧苄青霉素有明显的抑菌效果,可提高转化效率,但浓度过高也会显著抑制植物的生长^[11]。

本研究发现,在抑菌培养基中添加 400 mg/L 羧苄青霉素作为抑菌剂,抑菌效果较好,但培养时间过长对再生植株生长有副作用,因此,在农杆菌得到较好抑制后,要逐步降低羧苄青霉素的浓度,以保证转化子的正常生长。潮霉素在植物遗传转化过程中起筛选子的作用,探索潮霉素筛选的临界

值,对降低再生苗的假阳性率非常重要^[12]。本研究经过浓度梯度筛选试验,最终确定潮霉素 6 mg/L 为该试验筛选的临界浓度。

利用植物表达外源医用蛋白或多肽是近年来研究的一个热点,尤其是当这些蛋白或多肽来源有限,成本高昂时,人们试图寻找一条用植物来低廉、高效的表达生产途径,用植物成功表达外源医用蛋白或多肽的研究^[13-14]预示着这条途径的可行性。本实验中,外源蛋白 rhFGF21 按照预期设想成功地在胡萝卜中表达,这预示着利用胡萝卜表达外源蛋白 FGF21 的可行性,为今后的产业化生产奠定了基础。

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] Kharitononkov A, Shiyanova TL, Koester A, et al. *FGF-21* as a novel metabolic regulator[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(6): 1627-1635.
- [3] Kharitononkov A, Wroblewski VJ, Koester A, et al. The metabolic state of diabetic monkeys is regulated by fibroblast growth factor-21[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(2): 774-781.
- [4] 李营,庞实锋,薛萍,等. 农杆菌介导的成纤维细胞生长因子-21 基因对甘蓝型油菜的转化[J]. *西北农林科技大学学报:自然科学版*, 2010, 38(8): 124-130.
- [5] Luchakivskaya Y, Kishchenko O, Gerasymenko I, et al. High-level expression of human interferon alfa-2b in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants[J]. *Plant Cell Rep*, 2011, 30:407-415.
- [6] 汪洪,夏鸿亮,李校堃,等. 胡萝卜愈伤组织诱导培养的研究[J]. *北方园艺*, 2012(6):103-105.
- [7] 汪洪,蔡进章,夏鸿亮,等. 影响胡萝卜体细胞胚诱导与发育因素的研究[J]. *药物生物技术*, 2014, 21(4): 297-301.
- [8] 张娅,曾君祉,周志勇,等. 胡萝卜组织培养和高效遗传转化体系的建立[J]. *植物学通报*, 2005, 22(增刊): 37-42.
- [9] 朱晓艳,于丽杰. 转基因胡萝卜的研究进展[J]. *北方园艺*, 2012(2): 188-190.
- [10] 曾建军,孙敏,肖璇,等. 四种抗生素对菘蓝外植体生长的影响[J]. *西南师范大学学报*, 2003, 28(6): 987-990.
- [11] 唐亚萍,原慧,覃建兵. 不同抗生素对雪莲愈伤组织生长的影响[J]. *西北植物学报*, 2012, 32(3): 611-615.
- [12] 杜金霞,庞实锋,徐岩,等. 油菜子叶及下胚轴对潮霉素敏感性研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(6): 2384-2385.
- [13] Banilas G, Daras G, Rigas S, et al. Oleosin di- or tri-meric fusions with GFP undergo correct targeting and provide advantages for recombinant protein production[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2011, 49(2): 216-222.
- [14] Yi-Hui Audrey Teh, Tony A, Kavanagh. High-level expression of Camelid nanobodies in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Transgenic Res*, 2010, 19(4):575-586.