

中图分类号: S532; Q578 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2009)06-0332-06

Patatin启动子驱动的人胰岛素原基因的植物表达载体的构建

马建忠*, 马雪青, 王永刚, 宋国伟, 周贤靖, 王倩

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃 兰州 730050)

摘要: 使用马铃薯的偏爱密码子设计合成人胰岛素原基因, 以植物表达载体 pCAMBIA1301 为基础, 构建由 patatin 启动子调控的人胰岛素原基因植物表达载体 p1301Ph, 并将导入根癌农杆菌 LBA4404 中, 经 PCR 鉴定证明, 此基因已整合到农杆菌 Ti 上。表达载体的建立为日后转基因工作奠定了基础。

关键词: patatin 启动子; 人胰岛素原基因; 植物表达载体

糖尿病是继心血管疾病、癌症之后致残率、致死率最高的第三大疾病。目前主要治疗方法多依赖于胰岛素的使用, 胰岛素主要通过化学提取和基因工程等方法合成。化学提取法主要从猪、牛等动物

胰腺中提取, 但产品纯度低, 与人胰岛素天然构象存在差异, 有免疫原性, 注射后易引发胰岛素过敏、注射部位肌肉萎缩及胰岛素抗性等副作用, 且收率低、成本高, 无法广泛应用于临床用药。此外世界各国科学家们先后构建了大肠杆菌及酵母表达系统, 高效地表达出具生物活性的重组人胰岛素^[1-4]。其构象虽接近于人胰岛素的天然构象, 但大都需要经过体外加工, 程序复杂, 成本较高, 活性亦不及天然人胰岛素。本研究用马铃薯偏好的密

收稿日期: 2009-10-21

基金项目: 甘肃省自然科学基金马铃薯块茎生产天然人胰岛素的研究资助(3ZS062-B25-023)。

作者简介: 马建忠(1963-), 男, 研究员, 博士, 研究方向为植物基因工程。

* 通讯作者: E-mail: majz@lut.cn

Detection of Potato Virus A by RT-PCR

Geng Hongwei¹, Bai Yanju¹, Fan Guoquan¹, Gao Yanling¹,
Zhang Wei¹, Shen Yu¹, Ma Ji¹, Guo Yifan²

(1. Virus-free Seedling Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

2. Crop Breeding Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: A pair of primers PVAF and PVAR were designed according to the segmental nucleotide sequence of conservative gene of potato virus A (PVA) in GenBank to amplify the gene from the healthy plants and the plants which were infected with PVA, potato virus Y (PVY), potato virus X (PVX) and potato virus S (PVS), respectively. Only one PVA specific 834 bp cDNA product was amplified from the plants which were infected with PVA, but not from the others. The detectable viral dsRNA amount of this RT-PCR was 1 pg. This RT-PCR has the good sensitivity and specialty. These results indicate that this RT-PCR could be used for rapid detection of the PVA disease.

Key Words: RT-PCR; detection; potato virus A

码子设计合成人胰岛素原基因, 在马铃薯块茎专一性启动子——Patatin 启动子的调控之下, 以马铃薯作为生物反应器表达人胰岛素原蛋白^[5]。以期建立高表达系统, 并为医药产业提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株为 DH5 α ; 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为 LBA4404, 抗性标记为利福平(Rif^r)和链霉素(Str^r); T-载体为 pMD-18, 抗性标记为氨苄青霉素(Amp^r); 植物表达载体为 pCambia1301, 抗性标记为卡那霉素(Kan^r); 含 Patatin 启动子的 pGPP 质粒由本实验室保存。

1.2 试验试剂

各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶、pMD18-T Vector、DNA 凝胶回收试剂盒购自 TaKaRa 公司; pGEM-T easy vector、Klenow Fragment I 购自 Promega 公司; 氨苄青霉素、卡那霉素、利福平为 Sigma 产品, 其他生化试剂为国产或进口分析纯。

1.3 Patatin 启动子的克隆

1.3.1 Patatin 启动子的 PCR 扩增

根据已发表和 GenBank 中 Patatin 基因的启动子序列(ACCESSION A08215)设计一对引物 PatP1 和 PatP2^[3], 并在 PatP1 中加入 EcoR I 酶切位点, 在 PatP2 中加入 Nco I 酶切位点, 用于特异性扩增 Patatin I 启动子序列。

PatP1: 5'-ACGAATTCAGTGTGAGTCTAGAAATCAT
PatP2: 5'-TGCCATGGCCAACTTAGCACATGTGAACT
设计好的引物提交上海生工合成。

以 pGPP 质粒 DNA 为模板, PatP1、PatP2 为引物, 扩增 Patatin 启动子。扩增条件为: 94℃预变性 60 s 后, 94℃ 30 s、58℃ 45 s、72℃ 55 s 共 30 个循环, 末次循环后置 72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离, 用凝胶回收试剂盒进行回收。

1.3.2 扩增产物的克隆及重组质粒的鉴定

取回收的扩增产物 5 μ l, 与 1 μ l pGEM-T 和 5 μ l ligation solution 混合, 16℃连接过夜。将连接反应液转化感受态 *E. Coli* DH5 α , 涂布于含有 100 mg·L⁻¹ Amp 的 X-Gal/IPTG/LB 平板培养基上,

倒置, 37℃培养 12~16 h, 选择分隔良好的白色菌落, 提取质粒, 酶切鉴定筛选重组质粒。该重组质粒定义为 pMD-P。

1.4 马铃薯偏好的人胰岛素原基因的合成

1.4.1 引物的合成

根据 GenBank 提供的人胰岛素原的氨基酸序列, 按照马铃薯的密码子偏爱性, 在人胰岛素原序列的前面加入 Nco I 酶切位点, 在人胰岛素原序列的后面加上终止密码子和 BstE II 的酶切位点, 分 6 段合成寡核苷酸。

正义链:

Z1: CCATGGGTTTTGTTAATCAA CATCTTTGTGGAT
CTCATCTTGTGAAGC(49)

Z2: GAGAAGCTGAAGATCTTCAAGTTGGACAAGTT
GAACTTGGAGGAGGACCTGGAGCTGG(58)

Z3: CTCTTCAAAGAGAGGAATTGTTGAACAATGT
TGACTTCTATTTGTTCTCTTTATC(57)

反义链:

F1: GATCTTCAGCTTCTTCTTAGTCTTAGGAGTAT
AAAAAATCCTCTTTCTCCACAAACAAGATA
AAGAGCTTCAACAAGATGAGATC(87)

F2: CCTCTCTTTGAAGAGATCCTTCAAGAGCAAG
AGTTGAAGAGATCCAGCTCCAGGTC(58)

F3: GGTCACCCTCATTAATTACAATAATTTCAAGT
TGATAAAGAGAACAAATAG(52)

1.4.2 PCR 扩增人胰岛素原基因

分别将 Z1 和 F1、Z2 和 F2、Z3 和 F3 用 Klenow Fragment I 于 37℃处理 1 h 后 60℃热激 15 min, 然后进行 PCR 扩增(图 1)。扩增条件为: 94℃预变性 45 s 后, 进入循环。循环程序为: 94℃热变性 45 s, 45℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 10 个循环; 94℃热

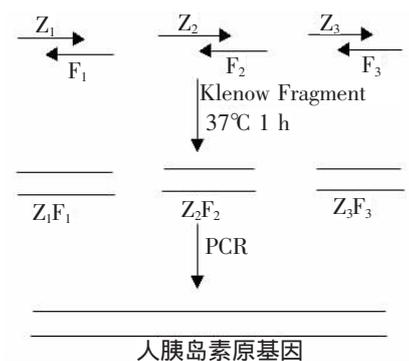


图 1 人胰岛素原基因合成示意图

变性 45 s, 50°C退火 30 s, 72°C延伸 30 s, 10 个循环; 94°C热变性 45 s, 55°C退火 30 s, 72°C延伸 30 s, 10个循环; 最后 72°C再延伸 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离, 切下目的 DNA 片段, 用凝胶回收试剂盒回收。

1.4.3 扩增产物的克隆及重组质粒的鉴定

取回收的扩增产物 5 μl, 与 1 μl pMD 18-T 和 5 μl ligation solution 混合, 16°C连接过夜。将连接反应液转化感受态 *E.Coli* DH5α, 涂布于含 100 mg·L⁻¹

Amp 的 X-Gal/IPTG/LB 平板培养基上, 倒置, 37°C 培养 12~16 h, 选择分隔良好的白色菌落, 提取质粒, 通过酶切鉴定筛选重组质粒并将酶切鉴定的重组克隆载体提交上海生工测序部进行基因序列的测定。将该重组质粒定义为 pMD-hINS。

1.5 植物表达载体的构建

1.5.1 植物表达载体 p1301Ph 的构建策略

图 2 为 Patatin 启动子驱动的人胰岛素基因植物表达载体的构建策略。

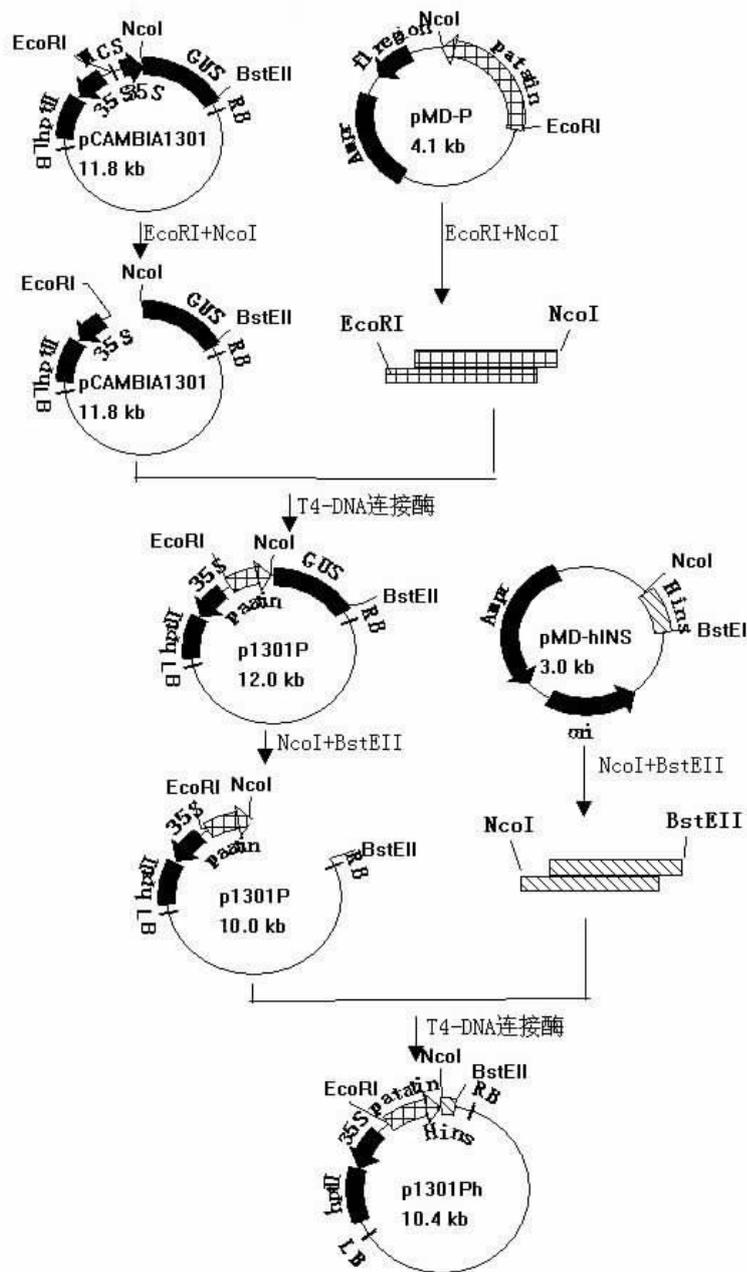


图 2 植物表达载体的构建策略

1.5.2 含Patatin 启动子植物表达载体 p1301P的构建

用限制性核酸内切酶 *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切重组质粒 pMD-P 和质粒 pCAMBIA1301, 分别回收 Patatin 启动子小片段和 pCAMBIA1301 载体大片段, 将回收的两种酶切产物用 T_4 DNA 连接酶连接, 将连接反应物转化感受态细胞, 转化细胞经 Kan 筛选后, 抽提质粒经 *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切鉴定, 重组质粒命名为 p1301P。

1.5.3 含人胰岛素原基因植物表达载体 p1301Ph 的构建

将重组质粒 pMD-hINS 和质粒 p1301P 用 *Nco* I 和 *BstE* II 进行双酶切, 将得到的人胰岛素原基因片段和 p1301P 载体大片段用 T_4 DNA 连接酶连接, 将连接反应物转化感受态细胞, 转化细胞经 Kan 筛选后, 用菌落 PCR 技术初步挑选重组子, 抽提质粒后, 进一步用 *Nco* I 和 *BstE* II 双酶切鉴定, 重组载体命名为 p1301Ph。

1.6 Patatin 启动子驱动的人胰岛素原基因表达载体转化农杆菌

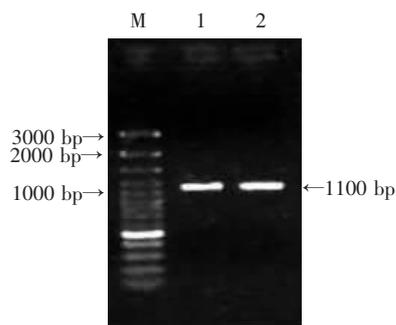
SDS 碱裂解法小量提取表达载体质粒 DNA, 通过直接导入法转化农杆菌 LBA4404。转化产物涂布于含有 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan、 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Str、 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Rif 的 YEP 固体培养基上, 于 28°C 培养 2 d, 选择白色菌落, 对其进行 PCR 鉴定。

2 结果与分析

2.1 Patatin 启动子的克隆

2.1.1 PCR 特异性扩增 Patatin 启动子

以 pGPP 质粒 DNA 为模板, PatP1、PatP2 为引物, 利用 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 期望获得 1.1 kb 大小的 DNA 片段。扩增产物电泳检测表明, 扩增产物与预期片段的大小一致(图 3)。



M-100-3000bp Ladder-K ;1,2-PCR 扩增产物。

图 3 Patatin 基因的 PCR 扩增产物

2.1.2 Patatin 启动子与 T-载体的连接及重组子的鉴定

将纯化的 Patatin 启动子与 pGEM-T 载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞通过蓝白斑和滞后质粒筛选, 进行 *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切鉴定(图 4), 获得约 1.1 kb 大小的 DNA 片段。说明我们成功的将 PCR 纯化产物克隆到 T-载体上。

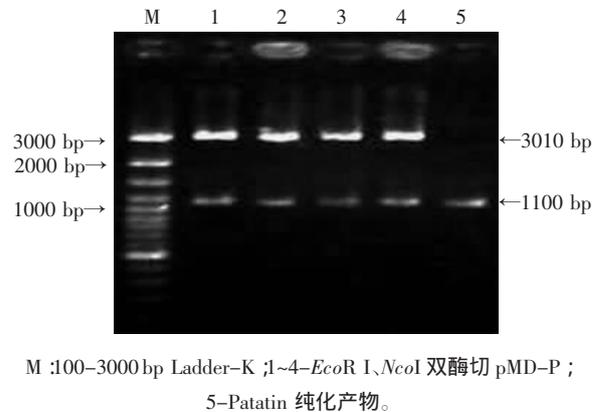
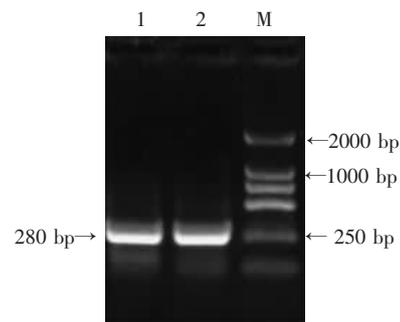


图 4 重组质粒 pMD-P 双酶切鉴定

2.2 马铃薯偏好的人胰岛素原基因的合成

2.2.1 PCR 扩增人胰岛素原基因

经 Klenow Fragment I 处理和 PCR 扩增, 期望获得 280 bp 大小的 DNA 片段, 扩增产物电泳检测表明, 扩增产物与预期片段的大小一致(图 5)。



1,2-PCR 扩增产物 ;M-DNA Marker DL 2000。

图 5 人胰岛素原基因的 PCR 扩增

2.2.2 重组子的酶切鉴定及测序分析

将纯化的人胰岛素原基因与 T-载体连接, 转化 DH5 α 感受态细胞通过蓝白斑和滞后质粒筛选, 进行 *Nco* I 和 *BstE* II 酶切鉴定(图 6), 获得约 280 bp 大小的 DNA 片段。经测序分析表明, 目的基因的序列与设计的完全一致。说明我们成功的将人胰岛素原基因克隆到 T-载体上。

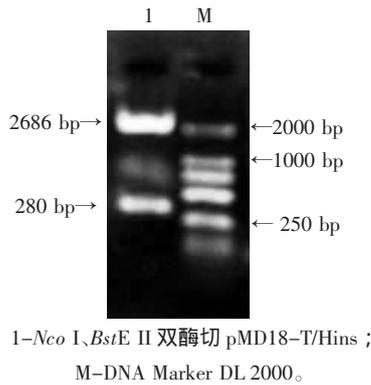


图6 pMD-hINS 的酶切鉴定

的 35S 启动子和 GUS 基因替换为 patatin 启动子和人胰岛素原基因。

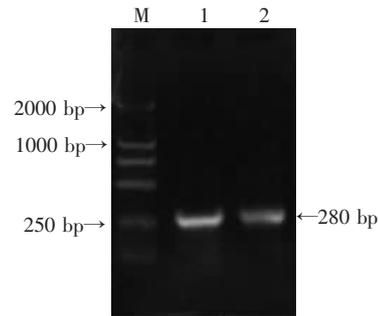


图8 p1301Ph 的 PCR 鉴定

2.3 植物表达载体构建

2.3.1 重组质粒 p1301P 的鉴定

挑取在卡那霉素平板生长的单菌落摇菌, 小量质粒抽提试剂盒抽提质粒, 将重组质粒 p1301P 经 EcoR I 和 Nco I 双酶切, 被消化为 2 个片段, 1 个为酶切片段, 另 1 个为载体骨架, 大小分别为 1.1 kb 和 10 kb, 与预期一致(图 7)。表明 Patatin 基因已经成功替换 35S 启动子。

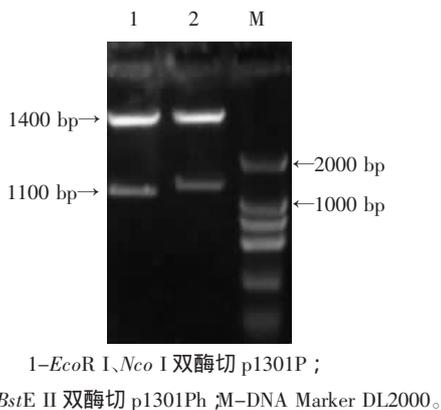


图7 p1301P 及 p1301Ph 的酶切鉴定

2.4 patatin 启动子驱动的人胰岛素原基因表达载体转化农杆菌

通过直接导入法将 pCambia1301Ph 表达载体导入农杆菌 LBA4404 中, 共获得 10 个白色菌斑。挑取 5 个菌斑提取质粒, 以 PatP1 和 F3 为引物进行扩增得到大小约 1.4 kb 的基因片段, 与预期一致。说明已成功获得了携带 Patatin 启动子和人胰岛素原基因的根癌农杆菌菌株(图 9)。

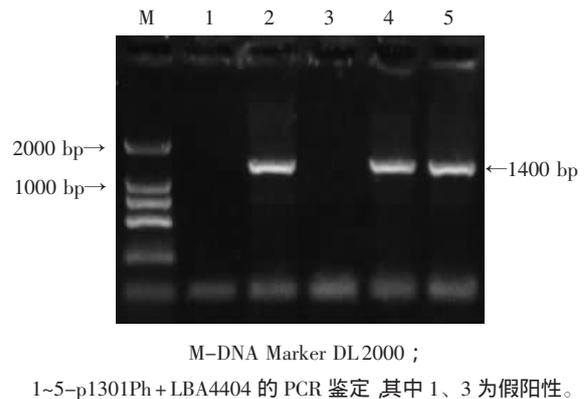


图9 植物表达载体 p1301Ph 导入农杆菌的 PCR 鉴定

2.3.2 表达载体 p1301Ph 的鉴定

以表达载体 p1301Ph 为模板, Z1 和 F3 为引物进行 PCR 扩增, 获得 280 bp 的基因片段(图 8), 与预期一致; 表达载体 p1301Ph 经 EcoR I 和 BstE II 双酶切后, 被消化为 2 个片段, 1 个为酶切片段, 另 1 个为载体骨架, 大小分别为 1.4 kb 和约 8 kb (图 7), 与预期一致, 表明 Patatin 基因和人胰岛素原基因已经成功替换 35S 和 GUS 基因。

2.3.3 植物表达载体 p1301PH 的测序鉴定

将鉴定的阳性克隆 p1301Ph 交上海生工测序, 测序结果与预期一样, 成功的将 pCambia1301 上

3 讨论

为了提高外源基因的转录表达水平, 降低转录后基因沉默现象的出现, 并减少外源基因表达的不利因素, 在基因合成和植物表达载体的构建过程中, 本研究采取了如下一系列的措施: 用马铃薯块茎特异蛋白启动子 Patatin 启动子来替换 35 S 启动子, 使人胰岛素原基因能够专一性的在块茎发生和形成过程中高水平表达; 按照马铃薯的偏好密码子, 设计合成人胰岛素原基因, 从而解决了天然人

胰岛素原基因中某些密码子在马铃薯中出现频率极低的问题, 然后再将其克隆进构建好的植物表达载体中, 从而有可能提高目的基因在马铃薯中的表达水平^[6]。

本研究选用植物表达载体进行目的基因的构建, 为利用植物作为生物反应器打下基础。与传统的表达系统如细菌系统、酵母系统和哺乳动物细胞系统相比, 植物表达系统有以下的优点^[7,8]。植物的组织、细胞、原生质体均能在离体条件下诱导再生成一个完整的植株, 且培养、种植条件简单易成活, 可降低成本; 植物细胞具有完整的真核细胞表达系统, 能对外源蛋白进行翻译后加工, 如糖基化、酰胺化、磷酸化、精确地切割、折叠和装配, 使表达产物具有与高等动物细胞一致的生物活性, 保持了自然状态下的免疫原性; 转基因植物生产的疫苗不会感染人体, 因而更具有安全性; 转基因植物细胞是可以启动粘膜免疫的有效途径, 其机制可能是植物细胞壁给抗原提供了一种生物微囊, 后者可保护抗原不被消化道酶所降解, 并有缓释作用; 植物表达系统生产的疫苗可以直接储存在植物种子和果实中, 易于长距离运输和普及推广。

本研究构建的植物双元表达载体 p1301Ph 是以植物表达载体 pCAMBIA1301 为基本骨架, 用马铃薯块茎特异蛋白启动子 Patatin 启动子来替换 GUS 基因前的 35 S 启动子, 并将按马铃薯的偏好密码子设计合成的人胰岛素原基因, 来替换 GUS 基因, 使人胰岛素原基因在 Patatin 启动子的调控

之下, 专一性的在块茎的发生和形成中高水平表达。并将此载体通过冻融法转化进根瘤农杆菌 LBA4404 中, 成功获得了携带 Patatin 和人胰岛素原基因的根瘤农杆菌菌株, 为日后转基因植物工作打下了一定的基础。下一步的工作将是利用筛选到的阳性转化菌株侵染马铃薯的愈伤组织, 以研究用马铃薯作生物反应器表达人胰岛素原。

[参 考 文 献]

- [1] Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, et al. Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequence [J]. *Science*, 1977, 196: 1313-1319.
- [2] Cousens L S, Shuster J R, Callegos C, et al. High level expression of proinsulin in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Gene*, 1987, 61: 265-275.
- [3] Kjeldsen T, Peterson A F, Hach M. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Appl Bio Chem*, 1999, 29: 79-86.
- [4] Wang Y, Liang Z H, Zhang Y S, et al. Human insulin from a precursor over expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, 73(1): 74-79.
- [5] Paiva E, Lister R M, Park W D. Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles [J]. *Plant Physical*. 1983, 71: 161-168.
- [6] 王彪, 武天龙. 提高外源基因在植物体内表达的策略[J]. *热带亚热带植物学报*, 2005, 13(1): 80-84.
- [7] Langridge W H. Edible vaccines [J]. *Sci Am*, 2000, 283(3): 66-71.
- [8] Haq T A, Mason H S, Clements J D, et al. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants [J]. *Science*, 1995, 268(5211): 714-716.

Construction of Human Proinsulin Gene Plant Expression Vector Controlled by Patatin Promoter

Ma Janzhong, Ma Xueqing, Wang Yonggang, Song Guowei, Zhou Xianjing, Wang Qian

(College of Life Science and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou, Gansu 730050, China)

Abstract: Human proinsulin gene was designed and synthesized with the potato partial codon. Plant expression vector p1301Ph was derived from pCAMBIA1301, with human proinsulin gene being controlled by patatin promoter. Then the recombination plasmid was introduced into *Agrobacterium* LBA4404. It was proven that the vector was integrated into LBA4404. This study provides a foundation for the transgenic of plants.

Key Words: patatin promoter ; human proinsulin ; plant expression vector