

人乳铁蛋白在转基因马铃薯块茎中的表达

宋东光*, 陈小英, 张辉松, 李筠, 张小凤, 王惠珍

(佛山科学技术学院园艺系, 广东 佛山 528231)

摘要:人乳铁蛋白(human lactoferrin, hLF)是人体非特异性免疫系统的重要成员之一,具有抗细菌、真菌和抗病毒活性及其他多种功能。报道将 *hLF* 基因的 cDNA 与马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)块茎专一性表达 *patatin* 基因启动子融合后通过农杆菌介导导入马铃薯,PCR 检测证实获得了多个转基因株系,RT-PCR 阳性结果说明 *hLF* mRNA 在马铃薯植株中得到了表达。同时,经过 ELISA 及 Western blot 检测证实,转基因马铃薯表达了 hLF 并具有人乳铁蛋白的活性。

关键词:乳铁蛋白;致转基因;马铃薯;块茎;表达

中图分类号:Q786

文献标识码:A

文章编号:1005-3395(2008)05-0430-05

Expression of Human Lactoferrin in Transgenic Potato Tubers

SONG Dong-guang*, CHEN Xiao-ying, ZHANG Hui-song,

LI Jun, ZHANG Xiao-feng, WANG Hui-zhen

(Dept. of Horticulture, Foshan University, Foshan 528231, China)

Abstract: Human lactoferrin (hLF) is a member of non-specific immune system, it plays many roles, such as resistances against bacteria, fungi and viruses, etc. In this paper, *hLF* cDNA directed by the tuber specific promoter of class I *patatin* gene of potato (*Solanum tuberosum* L.) were transferred into potato mediated by *Agrobacterium tumefaciens* transformation. *hLF* transgenic potato plants were confirmed by PCR detection, further RT-PCR showed that *hLF* RNAs were expressed in transgenic plants. hLF activities were detected by ELISA and Western blot analysis in *hLF* transgenic potato tubers.

Key words: Lactoferrin; Transgenic; Potato; Tuber; Expression

人乳铁蛋白(human lactoferrin, hLF)是由 703 个氨基酸组成的碱性单链糖蛋白,是转铁蛋白的一种,它是人体非特异性免疫系统中的重要成员之一,不仅乳腺可以分泌,其它腺体如泪腺、唾液腺、支气管粘膜、胃粘膜等也可以分泌,存在于腺体分泌性上皮细胞中,是胎儿防御系统的重要成分,具有明显的抗细菌、真菌和抗病毒等作用 and 增加人体对铁的吸收^[1-2]。

利用转基因植物表达人乳铁蛋白取得了一些重要的成果。人乳铁蛋白已在转基因马铃薯(*Solanum*

tuberosum)^[3]、番茄(*Lycopersicon esculentum*)^[4]、水稻(*Oryza sativa*)^[5]、胡萝卜(*Daucus carota*)^[6]、烟草(*Nicotiana tabacum*)^[7]等植物中表达,人乳铁蛋白在转基因植物中具有和人体内源蛋白一样的活性,如抗菌活性。马铃薯是世界第四大经济作物,以无性繁殖为主且易于进行遗传转化,利用块茎专一性高表达启动子大量表达外源基因开发其作为生物反应器具有广阔的应用前景。本研究利用马铃薯块茎专一性高表达 class I *patatin* 基因的启动子表达人乳铁蛋白,经 PCR(polymerase chain reaction, 聚

合酶链式反应)、RT-PCR(reverse transcription-PCR, 反转录 PCR)、ELISA (enzyme-links immunosorbent assay, 酶联免疫吸附分析)及 Western blot(蛋白质印迹)检测证实人乳铁蛋白在转基因马铃薯中得到了表达,为开发马铃薯作为生物反应器高水平表达人乳铁蛋白,提高马铃薯的营养价值奠定了坚实基础,为相关植物生物反应器的应用研究提供参考。

1 材料和方法

菌株 大肠杆菌 *E. coli* K12 菌株 XL1-Blue 为本实验室保存。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 购自 Electromax™, BRL 公司。

质粒 含人乳铁蛋白 hLF cDNA 的质粒由中国科学院上海植物生理研究所洪孟民提供,马铃薯 class I *patatin* 基因 1.4 kb 5'侧翼区,即块茎专一性启动子,由上海复旦大学遗传所汪训明教授馈赠。本实验室构建了块茎专一性表达启动子与 hLF cDNA 融合的表达载体 pPLF8。分子克隆方法主要根据 Sambrook 等^[8]。

植物材料 马铃薯 (*Solanum tuberosum* L. 'Desiree')由本实验室继代保存。

农杆菌介导马铃薯转化 马铃薯植株茎段培养于 MS 培养基,每天光照 16 h,光强约 12.5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,温度 23 ~ 26℃。表达载体导入农杆菌采用的冻溶法及马铃薯转化按照宋东光等^[9]的方法。转化植株各个株系用塑料盆培养于温室大棚(每年 11 月至次年 3 月),块茎置于室内保存。

PCR、RT-PCR DNA、RNA 提取,PCR、RT-PCR 按照宋东光等的方法^[10]。PCR、RT-PCR 引物:扩增 hLF 中间 782 bp 片段引物为 LF-1F: 5'-ACAAGTCACCTGAAATTCC-3', LF-2: 5'-GTCTC-CAGCATTCTCAGC-3'; 扩增 hLF 及 3'端 *Nos-ter* 1.5 kb 片段引物为 LF-1F 及 M2: 5'-TAGTA-ACATAGATGACACCGC-3'(*Nos-ter*), 扩增启动子与 hLF 2.5 kb 片段为 PAT1-F: 5'-GGTGGTGA-GCTAAACAAT-3'和 M2。DNA 电泳分子量标准 $\lambda_{\text{Hind III} + \text{EcoR I}}$ 和 $\lambda_{\text{Hind III}}$ 购自上海生工生物工程公司。

ELISA 切取转基因马铃薯的块茎 0.5 g,用磷酸缓冲液 [PBS, pH 7.2, 添加 10 mmol/L EDTA, 0.1% Triton X-100, 10 mmol/L β -巯基乙醇, 1 mmol/L PMSF (phenylmethanesulfonyl fluoride, 苯甲基磺酰氟)]提取可溶性蛋白,ELISA 检测根据张英华等的

方法^[11]加以修改(预结合法),采取 500 ng 标准 hLF 包被过夜(4℃),洗板后用 3% BSA (bovine serum albumin, 牛血清白蛋白)25℃封闭 45 min,再加入待测样品或标准 hLF (用于制作标准曲线)与 hLF 一抗(用购自 Sigma 的 1 mg 标准 hLF 注射新西兰大白兔获得的多克隆抗血清)4℃预结合过夜的混合物,25℃温浴 2 h,洗板后用山羊抗兔血清碱性磷酸酶 (AP)标记二抗检测(25℃,1 h),用 AP 底物对硝基苯磷酸钠(PNPP)溶液染色 12 min。蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[12]。hLF 活性用 $\text{ng mg}^{-1}\text{ protein g}^{-1}\text{ FW}$ 表示,取两次重复的平均值。

Western blot 分析 SDS-PAGE 电泳按照 Sambrook 等的方法^[8],样品提取同 ELISA。电泳用垂直玻璃板(12 cm × 12 cm)厚度 1 mm,凝胶浓度为 10%,样品(50 μl)用 SDS 样品缓冲液处理,溴酚蓝进入分离胶后在 100 V 下电泳 6.5 h。后进行电转印(Bio-Rad 公司的 Transblot Mini 转印槽),湿转印方法参考 Bio-Rad 说明书,转印缓冲液采用 Tris-甘氨酸-甲醇溶液,恒流 90 mA,8℃下转印 16 h。转印到 N⁺ 尼龙膜(Amersham 公司)上的蛋白质条带先用丽春红 S 进行膜上染色记录条带,洗膜 [每种不同溶液 25℃温浴后均用 TBST (含 Tween20 的 Tris 缓冲液)洗 3 次]后用 3% BSA/TBS 封闭 1.5 h,洗膜,加一抗(1:1000)同 ELISA 温浴 2 h,洗膜,加山羊抗兔血清碱性磷酸酶(AP)标记二抗 (Abcam 公司,1:5000)温浴 1 h,洗膜后用 BCIP/NBT (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate pToluidine/Nitro-Blue Tetrazolium Chloride)显色 30 min,加 2 mmol/L EDTA 终止反应。

2 结果和分析

2.1 hLFC 表达载体

将马铃薯块茎专一性表达基因 class I *patatin* 的启动子与 hLF cDNA 融合,插入在 pBIN19 双表达载体中,获得了 hLFC 表达载体 pPLF8(图 1)。

2.2 hLF 转基因马铃薯的获得

通常在筛选培养基上培养约 3 周可见部分绿色颗粒状抗性愈伤组织出现于茎段切口(图 2,部分标以箭头,图中部分抗性愈伤已切下培养),诱导率一般可达 20% 以上,取下继续培养于抗性筛选培养基,约 1 ~ 2 月后再生芽,获得的多个稳定的抗性再生植株的不同株系继代培养于不含抗生素的 MS 培养基上。

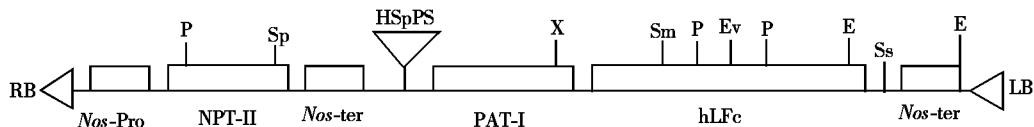


图 1 表达载体 pPAT1-hLFc 部分限制性内切酶图谱

Fig. 1 Partial restriction map of expression vector pPAT1-hLFc

E: *EcoR* I; Ev: *EcoR* V; P: *Pst* I; S: *Sal* I; Sp: *Sph* I; Ss: *Sst* I; X: *Xba* I; LB, RB: 左右边界区 Left or right border region; *Nos-Pro*, *Nos-ter*: 胭脂碱合成酶基因转录启动子和终止子 Transcription start and stop sequences; NPT II: 新霉素磷酸转移基因 Neomycin phosphate transferase gene; PAT-I: 马铃薯 Class 1 *patatin* 1.4 kb 启动子 Potato class 1 *patatin* 1.4 kb promoter; hLFc: 人乳铁蛋白 cDNA Human lactoferrin cDNA, 2.1 kb.

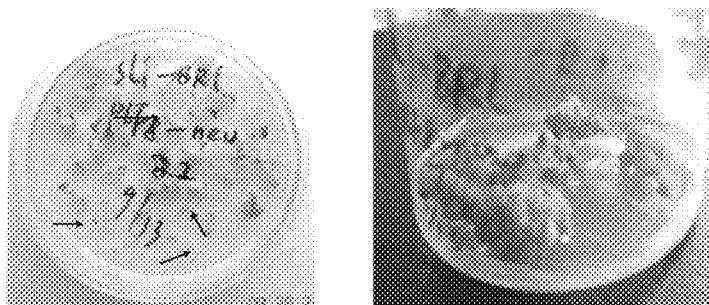


图 2 hLF 表达载体 pPLF8 转化马铃薯茎段诱导获得抗性愈伤(左)及其再生植株(右)

Fig. 2 Resistant calli (left) and regenerated plantlets (right) from hLF expression vector pPLF8 transformed potato

2.3 转基因马铃薯的 PCR 鉴定

利用一对 hLF cDNA 特异引物,即 hLFc 5'端引物 LF-1 与 3'端引物 LF-2 对马铃薯转化植株进行 PCR 扩增,产生了 782 bp 特异扩增条带,此外,LF-1 与 Nos-ter 3'端引物 M2 扩增产生特异 1.5 kb 条带(图 3),利用 PAT-I 启动子的 5'引物 PATI-F 与 hLFc 3'端引物 LF-2 亦从转基因植株中扩增产生了 2.5 kb 特异片段(图 4)。以上 PCR 结果证实获得了 hLFc 转基因马铃薯植株。

2.4 转基因马铃薯表达 hLF 的 RT-PCR 分析

用引物对 LF-1 与 LF-2 从提取的转化植株总 RNA 中进行反转录 PCR 亦获得了 782 bp 的特异

扩增条带(图 5),说明 hLF cDNA 在转基因马铃薯中得到了表达。其中,个别株系没有得到特异 RT-PCR 扩增产物,可能与其转录水平有关。实验同时利用 RNA 进行了 PCR,没有获得特异扩增条带,说明 RNA 没有被 DNA 污染(结果未示),用 DNaseI 处理总 RNA 后进行 RT-PCR,亦获得了特异扩增条带(结果未示)。此外,RT-PCR 结果亦出现了一条非特异性条带(前端为引物带),可能是总 RNA 反转录物模板较多所致。

2.5 转基因植株 hLF 表达的 ELISA 分析

提取盆栽马铃薯块茎粗提液与一抗预结合后进行 ELISA 检测,对照 hLF 标准曲线,检测到转基

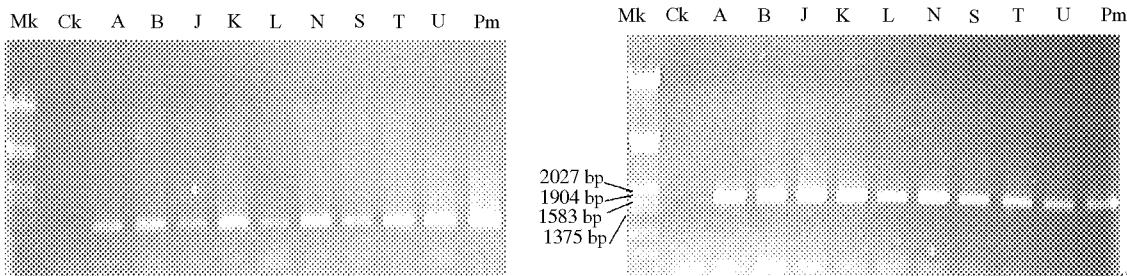


图 3 pPLF8 转化植株的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR of pPLF8 transformed plants

左(left): 引物对为 LF1-LF2. Primer pairs are LF1-LF2; 右(right): 引物对为 LF1-M2. Primer pairs are LF1-M2.

Mk: λ *Hind* III+*EcoR* I marker; Ck: 对照 Control; Pm: pPLF8; A, B, J, K, L, N, S, T, U: 不同转化株系 Different transformed plants.

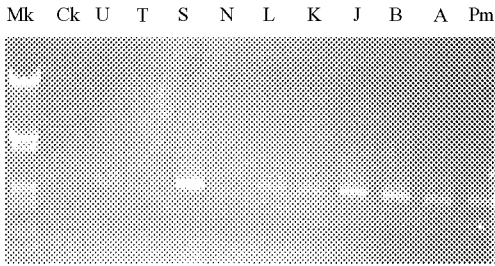


图 4 pLF8 转化植株 PCR 鉴定

Fig. 4 PCR of pPLF8 transformed plants

引物对为 PAT1F-LF2. Primer pairs are PAT1F-LF2.

Mk: λ *Hind* III+*Eco*R I marker; Ck: 对照 Control;

Pm: pPLF8; A, B, J, K, L, N, S, T, U: 不同转化株系 Different transformed plants.

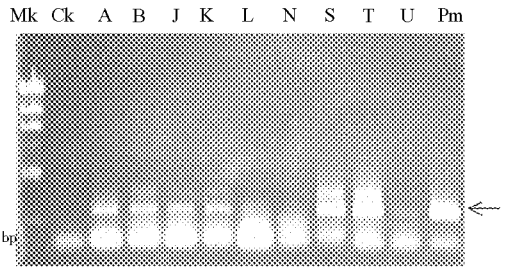


图 5 hLF 转基因植株 RT-PCR

Fig. 5 RT-PCR of hLF transformed plants

引物对为 PAT1F-LF2. Primer pairs are PAT1F-LF2.

Mk: λ *Hind* III marker; Ck: 对照 Control;

Pm: pPLF8; A, B, J, K, L, N, S, T, U: 不同转化株系 Different transformed plants.

因马铃薯块茎中 hLF 的表达,检测的 7 个株系中有 5 个株系的 hLF 活性较高(最高活性株系 S 达到 $81 \text{ ng mg}^{-1} \text{ protein g}^{-1} \text{ FW}$), 另外的两个活性很低(与未转化对照相当,小于 $5 \text{ ng mg}^{-1} \text{ protein g}^{-1} \text{ FW}$) (图 6),说明这两个株系中 hLF 的表达可能受到影响。未转化植株没有检测到 hLF 活性。

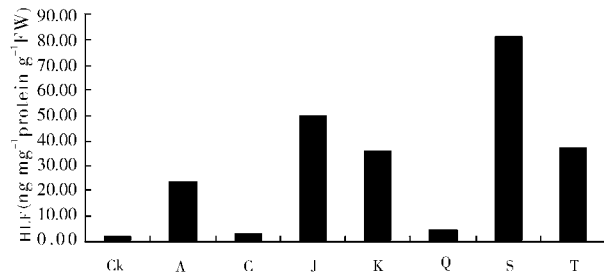


图 6 hLF 转基因植株的 ELISA 检测

Fig. 6 ELISA of hLF transgenic plants

Ck: 对照 Control.

2.6 转基因马铃薯表达 hLF 的 Western 印迹分析

为了进一步确定 hLF 的表达,实验选用 ELISA 检测活性最高的两个株系进行了 Western 检测,两个株系均可以看到明显的特异印迹条带(图 7, 转基

因株系 S 和 T 最前端的条带), 阳性 hLF 条带可能因为缓冲系统离子的影响而略拖后(样品蛋白质较多表现出泳动较快,右边上方箭头),也可能由于植物蛋白质糖基化系统与人体不同导致人乳铁蛋白在转基因马铃薯中糖基化程度偏低而泳动稍快。转基因阴性对照没有该条带。可能由于使用的是多抗,出现了较多的非特异性条带(图中后端两条带,各株系均有此带,其他非特异性带没有附上)。

3 讨论

本文报道人乳铁蛋白(hLF)由农杆菌介导转化马铃薯并获得转基因植株,PCR 检测证实 hLF cDNA 的插入,RT-PCR 检测说明 hLF mRNA 得到了表达,ELISA 和 Western blot 检测了转基因马铃薯块茎中 hLF 的活性。在转基因马铃薯块茎进行的 ELISA 检测结果中,不同株系的表达量是不一样的,可能与各个株系的外源基因插入位点不同而导致其表达受到影响有关。不同测定时间的重复亦有差异,我们曾进行不同时间包被提取液,发现过夜后样品活性大大降低,说明蛋白酶等可能引起可溶性蛋白的降解,而检测不同贮藏过程的部分薯块亦发现,块茎中 hLF 的活性受贮存时间的影响并不大(结果未示)。本实验采用预结合法进行 ELISA 能够很大程度降低非特异性蛋白质与一抗的结合,这从 Western 印迹结果出现的非特异性条带亦可以看出(图 7)。另外,ELISA 检测活性不高的株系(图 6 中的 C,Q),其 mRNA 的 RT-PCR 亦未能检测到特异条带,说明基因的表达可能在转录水平受到了影响,但仍需要进一步的证实。用 Western 印迹检测证实 ELISA 检测中活性较高的两个株系能够检测到 hLF 表达,但由于使用了 hLF 多抗而产

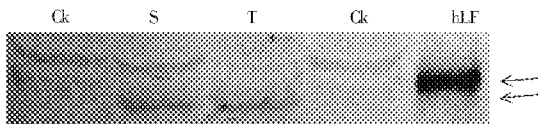


图 7 hLF 转基因马铃薯块茎蛋白质提取物的 Western 印迹检测

Fig. 7 Western blot analysis from tuber extractions of hLF transgenic plants

Ck: 对照 Control; S, T: hLF 转基因植株 hLF transgenic plants;

hLF: 人乳铁蛋白 Human lactoferrin.

左侧箭头为从负极到正极的泳动方向。Left arrow is the direction of electrophoresis.

生了较多非特异性条带,丽春红 S 染色的蛋白质条带中并不能看到 hLF 的特异条带(结果未示),但转印检测后看到的清晰特异条带说明 hLF 仍有较高表达。

本研究利用块茎专一性高表达 class I *patatin* 启动子在转基因马铃薯块茎中表达 hLF, hLF 活性达到 $81 \text{ ng mg}^{-1} \text{ protein g}^{-1} \text{ FW}$ (图 6 中的株系 S), 由于提取过程导致 hLF 的部分降解, 实际的活性可能还要高些。已有研究表明, hLF 的稳定性较好, 耐酸和热, 因而转基因产品可以考虑添加于婴儿食品中^[2,13]。同时, 转 hLF 基因水稻植株表现了抗细菌、真菌和抗病毒的活性^[14-15], 这对于植物抗病和抗病毒具有重要意义。此外, 在植物收获器官中增加铁的含量也可能用于治疗缺铁而引起的疾病^[16]。可见, 利用转基因马铃薯高水平表达 hLF 将展现其广阔的应用前景。开发转基因马铃薯作为高表达块茎生物反应器生产 hLF, 期望进行马铃薯块茎营养品质遗传改良。

参考文献

- [1] Lönnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: Molecular structure and biological function [J]. *Annu Rev Nut*, 1995, 15: 93-110.
- [2] Lönnerdal B. Recombinant human milk proteins [J]. *Nestle Nut Workshop Ser Pediatr Program*, 2006, 58: 207-215.
- [3] Chong D K, Langridge W H. Expression of full-length bioactive antimicrobial human lactoferrin in potato plants [J]. *Trans Res*, 2000, 9: 71-78.
- [4] Cao H Y (曹慧颖), Guo S D (郭三堆). Expression of human lactoferrin gene in transgenic tomato plants [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 2005, 32: 1030-1033. (in Chinese)
- [5] Humphrey B D, Huang N, Klasing K C. Rice expressing lactoferrin and lysozyme has antibiotic-like properties when fed to chicks [J]. *J Nut*, 2002, 132: 1214-1218.
- [6] Zheng H Y (郑回勇), Zheng J G (郑金贵), Huang B F (黄碧芳). A preliminary study on genetic transformation of carrot with human lactoferrin gene [J]. *J Fujian Agri Univ* (Nat Sci) (福建农林大学学报: 自然科学版), 2002, 31: 215-217. (in Chinese)
- [7] Zhang D B (张大兵), Zhang J L (张景六), Wang Z Y (王宗阳), et al. Expression of cloned human lactoferrin cDNA in transgenic tobacco confers resistance to bacterial and viral diseases [J]. *Acta Phytophysiol Sin* (植物生理学报), 1999, 3: 234-243. (in Chinese)
- [8] Sambrook J, Russell D W. Translated by Huang P T (黄培堂), Wang J X (王嘉玺), Zhu H C (朱厚础), et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Beijing: Science Press, 2001: 1949. (in Chinese)
- [9] Song D G (宋东光), Zhou J (周健), Huang D Q (黄大庆), et al. 1.4 kb 5' flanking region of class I *patatin* directs tuber-specific *GUS* expression in potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. *Acta Biol Exp Sin* (实验生物学报), 2001, 34: 5-10. (in Chinese)
- [10] Song D G (宋东光), Zhang Y H (张英慧), Yang Q N (杨泉女), et al. RT-PCR analysis of human calcitonin gene-related peptide gene expression in transgenic potato [J]. *China Biotechn* (中国生物工程杂志), 2003, 23: 96-99. (in Chinese)
- [11] Zhang Y H (张英华), Chi Y J (迟玉杰), Dong P (董平). The determination of concentration for lactoferrin by enzyme-linked immunosorbent assays [J]. *China Dairy Ind* (中国乳品工业), 1999, 27(6): 19-31. (in Chinese)
- [12] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [13] Nandi S, Suzuki Y A, Huang J, et al. Expression of human lactoferrin in transgenic rice grains for the application in infant formula [J]. *Plant Sci*, 2002, 163: 713-722.
- [14] Suzuki Y A, Kelleher S L, Yalda D. Expression, characterization, and biologic activity of recombinant human lactoferrin in rice [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2003, 36: 190-199.
- [15] Takase K, Hagiwara K, Onodera H. Constitutive expression of human lactoferrin and its N-lobe in rice plants to confer disease resistance [J]. *Biochem Cell Biol*, 2005, 83: 239-249.
- [16] Bethell D R, Huang J. Recombinant human lactoferrin treatment for global health issues: iron deficiency and acute diarrhea [J]. *Biomaterials*, 2004, 17: 337-342.