

[文章编号] 1000-1182(2007)02-0180-04

变形链球菌表面蛋白多肽片段在转基因番茄中的表达

郑雨燕¹, 凌均桢², 麦穗²

(1.深圳市人民医院 口腔医学中心, 广东 深圳 518020; 2.中山大学光华口腔医院 牙体牙髓病科, 广东 广州 510055)

[摘要] 目的 在获得含编码变形链球菌表面蛋白唾液粘附区片段基因的转基因番茄原代种子的基础上, 应用分子生物学的方法检测外源基因在转基因植株中的表达。方法 用CTAB法提取子代番茄总DNA, PCR筛选含变形链球菌Pac基因唾液粘附区片段的转基因番茄子代植株; 用Trizol提取番茄总RNA, RT-PCR检测外源基因的转录情况; 提取番茄果实总蛋白, 用Bradford法测定番茄果实总蛋白含量; 通过Western blot检测外源蛋白的表达情况, 并用ELISA法对外源蛋白含量进行定量测定。结果 获得植物细胞染色体上整合有外源基因并发生表达的转基因番茄子代植株; Western blot和ELISA分析表明含编码变形链球菌表面蛋白唾液粘附区片段基因的转基因番茄子代植株能有效表达外源蛋白, 该蛋白含量占番茄可溶性总蛋白的1.2%。结论 含编码变形链球菌表面蛋白唾液粘附区片段基因的转基因番茄子代植株能有效表达外源蛋白。

[关键词] 变形链球菌表面蛋白唾液粘附区片段基因; 转基因番茄; 基因表达

[中图分类号] R781.1 **[文献标识码]** A

Expression of Saliva-binding Region of *Streptococcus mutans* PAc in Transgenic Tomatoes ZHENG Yu-yan¹, LING Jun-qi², MAI Sui². (1. Dental Center, Shenzhen People's Hospital, Shenzhen 518020, China; 2. Dept. of Endodontics, Guanghua College of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

[Abstract] Objective To analyze the expression of foreign gene in the filial generation of the transgenic plants on the base of the original transgenic tomatoes seeds carrying the gene encoding saliva-binding region(SBR) in PAc of *Streptococcus mutans*(*S. mutans*) gained. Methods The tomatoes total DNA was extracted by CTAB methods, and the filial generation transgenic tomatoes carrying the gene encoding SBR in PAc of *S. mutans* were selected by PCR. The tomatoes total RNA was extracted by trizol and the transcription of the foreign gene was analyzed by RT-PCR. Protein was extracted from fruit tissue and the content of the total protein was determined by Bradford's methods G250. The expression of foreign protein was analyzed by Western blot and the lever of the foreign protein was analyzed by ELISA. Results The fragment encoding SBR in *S. mutans* PAc gene integrated in the tomato genomic DNA and was expressed. The foreign protein lever was up to 1.2% of the total soluble protein in tomato fruit tissue. Conclusion The foreign protein gene in the filial generation of the transgenic plants could express the foreign protein.

[Key words] saliva-binding region of *Streptococcus mutans* PAc; transgenic tomatoes; gene expression

目前, 已有多种口服疫苗在转基因植物中表达成功, 并且在动物和人体实验中获得了满意的结果^[1-4]。本文旨在研究编码变形链球菌表面蛋白唾液粘附区片段基因在番茄中的表达, 并对其外源目的蛋白的含量进行测定。

1 材料和方法

1.1 番茄植株的培养种植

将本课题组^[5]研制的含编码变形链球菌表面蛋

白唾液粘附区片段基因的转基因番茄原代种子及对照中蔬五号番茄种子放置在完全浸湿的滤纸上, 待其发芽至芽长1 cm后移至土壤中。

1.2 转基因植株的筛选

1.2.1 植物总DNA的提取 取0.3~0.5 g新鲜番茄叶片, 在研钵中用液氮充分研磨成粉; 加入等体积约500 μ L预热的2-ME/CTAB提取缓冲液, 混匀, 65水浴保温45 min; 加入等体积的氯仿/异戊醇(24 1), 抽提混匀1 min, 12 000 r/min、4 离心10 min; 取上清, 加入等体积的异丙醇400 μ L, 混匀, 室温放置30 min后12 000 r/min、4 离心10 min; 去上清, 加入75%乙醇1 mL悬浮沉淀; 离心后弃洗液 用真

[收稿日期] 2006-07-20; [修回日期] 2006-10-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30240054)

[作者简介] 郑雨燕(1975-), 女, 重庆人, 主治医师, 硕士

空机干燥,加40 μL TE液溶解,加入RNaseA至终浓度为10 mg/mL,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.2 PCR扩增分析 提取15株番茄总DNA,进行PCR扩增分析。引物1:5'-GGATCCCAAATTTG-GAGGATTATGAAAGTC-3',引物2:5'-GGTACCT-CAACCAGCCAGCTTTATCACC-3'。反应条件:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性1.5 min,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火1.5 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸2.5 min,30个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 继续延伸10 min。

1.3 外源目的基因转录的检测

1.3.1 植物总RNA的提取 取0.1 g番茄幼叶,在研钵中用液氮充分研磨成粉;将粉末转入经1 mL Trizol预冷的匀浆器中,匀浆10 min;将匀浆后的溶液移至Eppendorf管中,加入200 μL 氯仿,剧烈振荡30 s,室温放置3 min;12 000 r/min,25 $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min后分为3层;取最上层上清加入等体积约500 μL 异丙醇,混匀,室温放置10 min;12 000 r/min,25 $^{\circ}\text{C}$ 离心10 min;弃上清,用75%乙醇洗RNA沉淀3次;弃上清,真空干燥;溶解于35 μL 经DEPC处理过的DDH₂O中,-70 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.2 RT-PCR分析 提取9株经DNA检测为阳性的转基因番茄植株中总RNA,进行RT-PCR分析。在0.5 mL Eppendorf管中冰上加入总RNA提取液8 μL ,Oligo(dT)₁₈ Primer 1 μL ,DEPC水3 μL ,70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴;在冰上按顺序加入以下成分:5 \times RT buffer 4 μL ,RNase OUT (RNA酶抑制剂)1 μL ,10 mmol/L dNTP 2 μL ,混匀后短暂离心,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育5 min;冰上加入逆转录酶1 μL ,42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育60 min;72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min灭活逆转录酶,终止反应;以RT-PCR产物5 μL 为模板,余条件同1.2.2 PCR扩增反应,进行PCR。

1.4 外源目的基因表达蛋白的检测

1.4.1 植物蛋白的提取及Bradford法测定总蛋白含量 取番茄果肉0.5 g,液氮下研磨成粉;加入0.5 mL 2 \times 蛋白提取缓冲液,充分混匀;置沸水中,100 $^{\circ}\text{C}$,5 min;取出,室温离心10 000 r/min,5 min;取上清,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存;配制成0.5 mg/mL的BSA标准贮液,并按照0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4、12.5、25、50 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度系列稀释,以0管调空白,消毒三蒸水为缓冲液,考马斯亮兰G250为染色液,用分光光度计读取波长为595 nm时的OD值,结果绘制标准曲线;取待测样品20 μL ,加H₂O至300 μL ,再加入染色液3 mL,测波长为595 nm时的OD值。在标准曲线上找出其对应的蛋白浓度。

1.4.2 Western blot 取转基因番茄蛋白提取液、非转基因番茄蛋白提取液20 μL ,100 $^{\circ}\text{C}$ 变性后加等体积的上样缓冲液,经12%的SDS-PAGE分离蛋白质;转移到PVDF膜上 将膜置于封闭缓冲液(1 \times TBS液

含0.1%Tween-20和5%脱脂奶粉)中孵育1 h;室温下将膜浸泡在清洗缓冲液(含0.1%Tween-20的1 \times TBS液)中轻轻摇动,洗涤4次,每次5 min;加入1 2 000的兔抗Pac抗体,室温下置于摇床上轻摇1 h;洗膜4次;将辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体(1 2 000)和辣根过氧化物酶标记的抗生物素抗体(1 1 000)加入膜上,室温孵育1 h;将膜与10 mL底物反应液(LumiGLO 0.5 mL,过氧化氢 0.5 mL,DDH₂O 9 mL)置于暗盒孵育30 s后闭光显色。

1.4.3 ELISA检测目的蛋白浓度 分别取Pac标准蛋白浓度梯度液、转基因番茄蛋白提取液、非转基因番茄蛋白提取液和抗原包被液包被酶标板,每孔100 μL ,各3孔,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜;次日弃液,每孔加入150 μL 抗原包被液(Na_2CO_3 0.32 g, NaHCO_3 0.586 g, NaN_3 0.04 g, DH_2O 定容至200 mL,调pH至9.5),室温放3 min;每孔加入100 μL 封闭液(BSA 0.1 g,抗原包被液10 mL,调pH值至9.5),置37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒温育2 h;洗板;每孔加入100 μL 抗Pac抗体(一抗),稀释度为1 2 000,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒温育2 h;洗板;每孔加入100 μL 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体(二抗),稀释度为1 1 000,37 $^{\circ}\text{C}$ 湿盒温育1 h;洗板;每孔加入100 μL 底物反应液,37 $^{\circ}\text{C}$ 暗反应,15 min;每孔加入50 μL 2 mol/L H_2SO_4 终止反应;酶标仪上记录波长490 nm处的样本OD值,3个平行样本的平均OD值为该样本的平均吸光度值。

2 结果

2.1 筛选转基因番茄子代植株

提取15株番茄总DNA,进行PCR扩增分析,其中9个样本电泳后见特异性的1.76 kb扩增条带,其余样本未见特异条带。阳性对照为含目的基因的质粒pPC41,亦可见1.76 kb扩增条带(图1)。

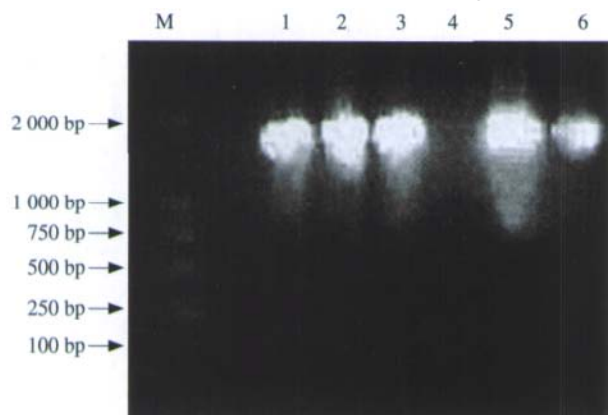
2.2 转基因番茄植株转录情况的检测

提取9株经DNA检测为阳性的转基因番茄植株中的总RNA,进行RT-PCR分析,其中有6个样本扩增出1.76 kb条带,其余3个样本未扩增出1.76 kb条带(图2)。

2.3 转基因番茄植株外源蛋白表达的检测

2.3.1 用Bradford法检测植物总蛋白含量 对牛血清蛋白(bovine serum albumin,BSA)标准溶液浓度梯度测波长为595 nm时的OD值,用SPSS 10.0软件分析得回归方程为: $Y=4.860X+0.036$,回归系数为4.860,对其进行t检验,P值为0.000($P<0.01$)。说明两个变量之间有相关性,OD值随蛋白浓度增加而增加。经RT-PCR检测为阳性的转基因番茄植株的总蛋白提取样本测得OD 值为0.248 根据回归方程

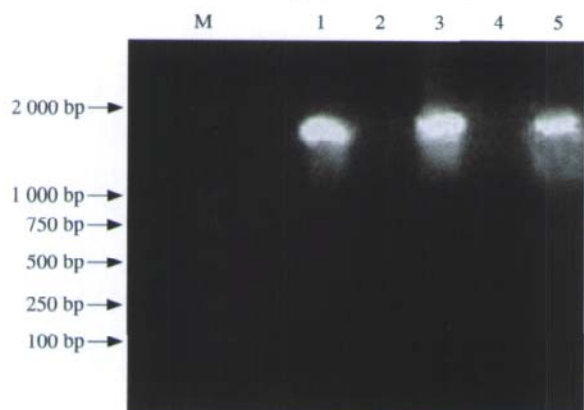
得样本稀释15倍后的浓度为44 $\mu\text{g/mL}$ ，因此计算出转基因番茄植株的总蛋白浓度为660 $\mu\text{g/mL}$ 。



M: DL2000 Marker; 1: 阳性对照, 以质粒pPC41为模板的扩增产物; 2、3、5、6: 整合外源基因子代植株的扩增产物 (1.76 kb); 4: 未整合外源基因子代植株的扩增产物

图1 转基因植株外源基因的PCR分析

Fig 1 PCR analysis of the foreign gene in the transgenic tomatoes



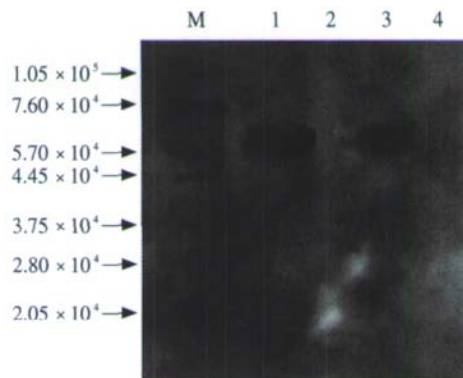
M: DL2000 Marker; 1、3、5: 转基因植株的RT-PCR产物 (1.76 kb); 2、4: 未转基因植株的RT-PCR产物

图2 转基因植株的RT-PCR分析

Fig 2 RT-PCR analysis of the transgenic tomatoes

2.3.2 Western blot 经SDS-PAGE电泳分离后, 电转移到PVDF膜上进行Western blot, 经RT-PCR检测为阳性的转基因番茄蛋白提取样本在PVDF膜上出现了1条明显杂交带, 非转基因番茄蛋白样本未见特异条带。由转基因番茄表达的免疫蛋白的相对分子质量约为 6.0×10^4 (图3)。

2.3.3 转基因番茄植株中外源蛋白的含量 对PAC标准蛋白浓度梯度测波长为492 nm时的OD值, 用SPSS 10.0软件分析得回归方程为: $Y=0.01271X+0.0592$, 绘制PAC标准蛋白曲线 (图4)。回归系数为0.01271, 对其进行t检验, P值为0.000 ($P<0.01$)。说明两个变量之间有相关性, OD值随蛋白浓度增加而增加。转基因番茄蛋白提取样本所得OD值为0.1585, 对应外源蛋白浓度为7.9 $\mu\text{g/mL}$ 。根据2.3.1所得转基因番茄总蛋白浓度660 $\mu\text{g/mL}$ 计算, 外源蛋白所占比例为1.2%。



M: Biotinylated Protein Marker; 1、2: 转基因番茄表达外源蛋白; 3、4: 非转基因番茄

图3 转基因番茄表达的免疫蛋白的Western blot结果

Fig 3 Western blot result of foreign protein expressing by transgenic tomatoes

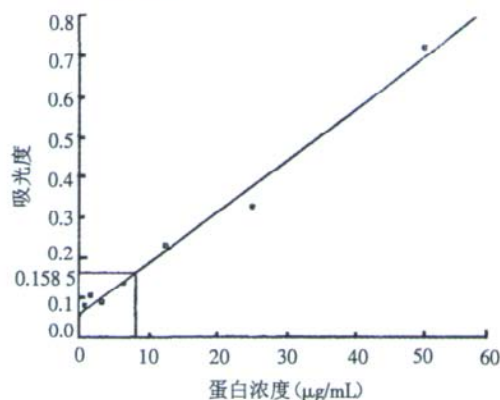


图4 PAC蛋白标准曲线

Fig 4 Standard contour of PAC

3 讨论

3.1 含编码变形链球菌表面蛋白唾液粘附区基因的转基因番茄的遗传特性

本课题组^[9]已研究获得含编码变形链球菌表面蛋白唾液粘附区基因的转基因番茄原代种子。本实验将其播种成苗后进行分子检测, 分析外源基因在后代中的遗传, 发现15株番茄中有9株经PCR反应后电泳出现1.76 kb的特异条带。出现子代与亲代的遗传分离是由转基因植物的遗传特性决定的。大量的研究结果表明, 转化的外源基因能够整合到植物细胞基因组, 整合后的外源基因遵循该细胞遗传物质的复制和表达规律。大多数转基因植株中外源基因能稳定遗传, 并显示孟德尔单基因分离规律。虽然大多数情况下外源基因在整合过程中可能经受各种变化, 在减数分裂中能保持下来, 但也会出现转化的外源基因丢失的问题。有学者报道, 不稳定率可能达到10%。这种外源基因表型丢失的原因还不清楚, 对于控制外源DNA在染色体内的稳定性的分子机制也尚未了解^[9]。本实验中番茄子代的含外源基因植株比例为60%, 可能与外源基因遗传的不稳定

性有关,同时样本数量较少也可能影响统计结果。

3.2 外源基因在番茄植株中的转录

外源基因在转入植株后,能否实现以特殊需求为目的的不同基因的的稳定表达是植物基因工程实现生产价值的关键。本实验将经PCR检测为阳性的9株转基因番茄植株进行了转录水平的检测,发现其中6株RT-PCR反应后电泳见1.76 kb的特异条带,另外3株的反应产物电泳后未见特异条带,说明含有目的基因的部分转基因番茄子代植株发生异源性表达。外源基因能否在植物细胞中表达并不在于其编码序列是否与植物基因一致,而在于该基因的5'端启动子序列能否被植物的表达调控系统所识别。本研究所采用的启动子能为外源基因的高效和正确表达提供必要条件。研究中同时发现部分植株出现在转录水平的不表达,可能的解释是转化基因发生了基因沉默(gene silencing)。导致基因沉默的原因^[7]可能是位置效应(position effect)和同源依赖的或重复序列诱导的基因沉默。对此,学者们探讨了不少解决方案:如形成独立的结构域,减少插入位点附近染色质的影响,避免位置效应^[8];对外源基因及启动子进行改造,改造的结果应保证设计的序列与植物基因组间只有很短的同源序列,从而避免异位配对的发生等。

3.3 外源蛋白的表达检测

自从1990年研究出首例转基因植物以来,各种来源的外源蛋白在诸如烟草、马铃薯、番茄、大豆和谷类等植物中表达成功。由于植物表达系统和提取方法不同,各种蛋白质表达量很难相互比较。外源蛋白表达累积量差别很大,一般来说,外源蛋白质表达水平达可溶性总蛋白1%以上被认为是可喜的结果^[9]。除蛋白质在植物反应器中的积累水平外,外源蛋白的表达量还与转基因产物的处理和加工、蛋白质的回收等因素有关。本课题获得的含编码变形链球菌表面蛋白唾液粘附区基因的转基因番茄其外源蛋白的表达量占果实可溶性总蛋白的1.2%。首先,胚质的来源影响到最终外源蛋白的表达。番茄作为一种植物反应器,其转化效率较高,蛋白质累积水平相对稳定。其次,外源蛋白同植物组织蛋白一同提取,由此来确定外源蛋白的表达水平。针对不同的转基因植物和外源蛋白的特性,采取不同的提取方法。在提取过程中控制离子强度和pH值,低温进行以防止蛋白变性及降解,加入适量的除污剂或蛋白酶抑制剂等都是外源蛋白表达测定的影响因

素。本实验在提取蛋白质的过程中,严格控制实验条件,pH值稳定,在液氮低温下破碎植物细胞,提取缓冲液中加入去污剂等措施,都有利于提高蛋白质的提取效率,从而有利于外源蛋白表达的测定。目前,如何提高转基因植物的蛋白表达量是研究关注的焦点,而优化启动子、使用信号肽、修饰转译序列等都是可行的途径。本研究在获得含变形链球菌表面蛋白唾液粘附区片段基因的转基因番茄原代植株种子的基础上,通过分子检测,筛选出9株含外源基因的子代植株;并检测其转录水平及翻译水平的表达情况,RT-PCR反应显示其中6株番茄转录,Western blot见相对分子质量 6.0×10^4 处有特异条带出现,通过ELISA反应测得外源蛋白约占总蛋白含量的1.2%,为进一步动物实验以研究转基因番茄的免疫原性提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] Tacket CO, Mason HS. A review of oral vaccination with transgenic vegetables[J]. Microbes Infect, 1999, 1(10): 777-783.
- [2] Arakawa T, Chong DK, Langridge WH. Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine[J]. Nature Biotech, 1998, 16(3): 292-297.
- [3] Smith G, Walmsley A, Polkinghorne I. Plant-derived immunocontraceptive vaccines[J]. Reprod Fertil Dev, 1997, 9(1): 85-89.
- [4] Mason HS, Amtzen CJ. Transgenic plants as vaccine production systems[J]. Trends Biotechnol, 1995, 13(9): 388-392.
- [5] 蒋少云, 凌均荣. 转基因番茄防龋疫苗的基础研究. . 变形链球菌pac基因唾液粘附区植物表达质粒的构建[J]. 口腔医学纵横, 2000, 16(2): 94-97.
(JIANG Shao-yun, LING Jun-qi. Study of transgenic tomato vaccine against caries. . Construction of plant expressional vector of salivary-binding region of surface protein antigen gene of Streptococcus mutans[J]. J Comprehensive Stomatol, 2000, 16(2): 94-97.)
- [6] Matzke MA, Aatzke AJM. How and why do plants inactivate homologous(trans) gene[J]. Plant Physiol, 1995, 107(2): 679-685.
- [7] Meyer P, Saedler H. Homology-dependent gene silencing in plant[J]. Plant Mol Biol, 1996, 47(1): 23-48.
- [8] Spiker S, Thompson WF. Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants[J]. Plant Physiol, 1996, 110(1): 15-21.
- [9] 彭志强, 贺竹梅. 转基因植物表达重组蛋白的研究进展[J]. 生命科学研究, 2000, 4(2): 75-82.
(PENG Zhi-qiang, HE Zhu-mei. Study of the expression of foreign proteins in transgenic plants[J]. Life Sci Res, 2000, 4(2): 75-82.)

(本文编辑 汤亚玲)