

ChIFN- γ 基因植物表达载体的构建与瞬时表达^{*}

吴拥军^{1,2}, 赵德刚^{1,2}, 宋 莉², 许文钊¹

(1. 贵州大学 生命科学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省农业生物工程重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 为了使鸡干扰素- γ (ChIFN- γ) 基因在油菜中获得高效表达, 优化了油菜偏爱的密码子, 在 ChIFN- γ 的 5' 端添加 Kozark 序列, 3' 端增加内质网滞留信号肽 SEKDEL. 应用同尾酶将人工合成的 ChIFN- γ , Napin 特异性启动子及信号肽与 NOS 终止子克隆到质粒 pSH 中构建成植物表达载体 pSH-NGN. 经生菜瞬时表达, ELISA 检测表明 ChIFN- γ 蛋白获得有效表达. 研究结果为进一步遗传转化油菜奠定了基础, 同时也对构建基因的正确表达提供了一种新的快速鉴定方法.

关键词: ChIFN- γ ; 同尾酶; 构建; 瞬时表达

中图分类号: Q 786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2008)06-0630-06

干扰素(Interferon, IFN)是一类具有广泛生物学活性的糖蛋白, 由英国科学家 Isaacs 和瑞士研究人员 Lindenmann 于 1957 年在研究流感病毒干扰现象时, 在鸡胚绒毛尿囊膜发现. 它具有较强的免疫调节、广谱抗病毒、抗寄生虫和抗肿瘤等多种重要的生理功用, 在疫病防治的研究中受到广泛关注^[1,2].

我国养鸡业历史悠久, 无论是鸡的品种资源、肉蛋制品和生产数量均名列世界第一. 但由于病毒变异快, 造成疫苗免疫失效, 且新的病毒病不断产生, 难以控制, 特别是全球高致病性禽流感疫情频发, 每年由病毒病造成的损失约上百亿元^[3]. 研究表明 IFN 可通过喉部黏膜吸收, 较少分子 IFN 就可产生很强的免疫应答. 由于干扰素不会出现耐药性, 对许多病原微生物具有有效的抑制和防御功能, 特别是 γ -干扰素具有广谱抗病毒活性和免疫保护作用, 而重组干扰素与天然干扰素又具有同样的抗病毒和免疫调节的活性, 因此在生产上有实际的应用意义^[4,5]. 但目前对 ChIFN- γ 表达方面研究较少, 且主要以原核细胞表达包涵体为主, 后处理工艺繁琐, 导致干扰素活性较低, 生产成本较高. 而利用转基因植物生产 ChIFN- γ 具有表达产物无需处理就具有生物活性, 植物籽实可长期贮存、

生产成本低、生产量大, 通过添加入饲料或直接作为口服疫苗喂养家禽, 从而达到预防治疗作用^[6-8].

利用 Genbank 数据库登录的 ChIFN- γ 序列, 依据油菜中使用频率最高的密码子优化 ChIFN- γ , 人工合成包含 Kozark 序列和内质网滞留信号肽 SEKDEL 的 ChIFN- γ 基因, 利用同尾酶连接法构建含有油菜种子特异性启动子 Napin, ChIFN- γ 及 NOS 终止子表达盒的 pSH-NGN 植物表达载体. 采用根癌农杆菌 EHA105 真空渗透法在生菜中瞬时表达, ELISA 检测表达的 ChIFN- γ 蛋白. 研究旨在通过同尾酶构建有效的植物表达载体, 瞬时表达验证 ChIFN- γ 蛋白能否正确表达, 为 pSH-NGN/EHA105 遗传转化油菜, 开发 ChIFN- γ 植物口服疫苗奠定基础.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 生菜购自贵阳市花溪农贸市场.

1.1.2 菌株及质粒 质粒 pSH, *E. coli* TG1, *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 均为本室

* 收稿日期: 2008-04-30

基金项目: 国家科技支撑计划项目资助(2007BAD59B06); 中国国际合作项目资助(2007DFA31260); 贵州省优秀青年科技基金项目资助(20030312).

作者简介: 吴拥军, 男, 河南人, 博士生, 副教授, 主要从事植物基因工程方面的研究.

通讯作者: 赵德刚, 男, 贵州人, 教授, 博士生导师, 院长, 主要从事植物基因工程方面研究, Email: degangzhao@yahoo.com.

保存。

1.1.3 主要试剂 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0, TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit Ver. 2.0, DNA Marker 为宝生物工程(大连)公司产品。植物基因组 DNA 提取试剂盒为北京三博远志生物技术有限公司产品;限制性核酸内切酶、连接酶为 Promega 公司产品。chick IFN- γ ELISA 检测试剂盒为上海轩昊科技发展有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 *ChIFN-γ* 基因改造与合成 采用 NCBI (Locus: U27465)所公布序列,根据油菜密码子使用频率对 *ChIFN-γ* 基因进行改造^[9]。在 *ChIFN-γ* 5'末端添加 *Kpn* I / *Sal* I 酶切位点,其起始密码子之前添加 *Kozark* 序列; *ChIFN-γ* 3'末端添加 *Xho* I 酶切位点,终止密码子之前添加内质网滞留信号肽 *SEKDEL*。改造后的基因由上海杰瑞生物工程公司进行合成,并克隆至 pBlue Script II SK (+)载体获得 pBSK-IFNG。

1.2.2 Napin PCR 扩增

(1) 基因组 DNA 的提取依照植物 DNA 提取试剂盒说明书进行。

(2) *Napin* PCR 引物设计与合成依据 NCBI (Locus: AF420598)序列,扩增片段长度 1 126 bp。

*Napin*F: 5'-GGGGTACCTACGTCGACTCTTCATCGGTGATTGAT-3', 包含 *Kpn* I 和 *Sal* I 位点; *Napin*R: 5'-GCCTCGAGTGTATGTTTTTAATCTTG-3', 包含 *Xho* I 位点。

1.2.3 *NOS* PCR 扩增 依据 NCBI (Locus: AY452736)序列,扩增片段长度 283 bp。

Pnos F: 5'-GGGGTACCCAAGTCGACGATCGTTCAAACATTTGGCAATAAAG-3', 包含 *Kpn* I 和 *Sal* I 位点; *Pnos* R: 5'-GCCTC-GAGCAGGCTAGCATCTAGTAACATAGATGACACCG-3', 包含 *Xho* I 和 *Nhe* I 位点。

1.2.4 *ChIFN-γ* PCR 检测引物依据合成的 *IFNG* 序列设计,扩增片段为 *ChIFN-γ*, 长度 508 bp。

*Pifng*F: 5'-GCATGACCTGCCAAACCTAC-3'; *Pifng*R: 5'-GCCATTAACAGTTACACCTC-3'。

1.2.5 表达载体的构建与鉴定 参照文献[10]进行。

1.2.6 瞬时表达浸染液的制备 接种 5%的 pSH-NGN/EHA105 至含有抗生素的 YEB 培养基(酵母抽提物 0.6%, 胰蛋白胨 0.5%, 蔗糖 0.5%, 硫酸镁 2 mmol/L, 卡那霉素 50 mg/L, 利福平 20 mg/L) 28 °C, 190 r/min, 48 h; 用稀释液(50 mmol/L 磷酸盐缓冲液, 20 μmol/L 乙酰丁香酮, 含抗生素的 YEB)以 100:1 体积比稀释上述培养菌液, 28 °C, 190 r/min, 18~24 h 至 OD₅₉₅=1.0 时, 添加 5.5%蔗糖和 200 μmol/L 乙酰丁香酮, 22 °C, 1 h; 最后添加 100 mg/L 2,4-D 和 0.005%吐温 20, 混匀制得浸染液。

1.2.7 瞬时表达 生菜去除损伤叶片并用自来水漂洗 2~3 次,再用无菌水漂洗后风干。将生菜浸没于浸染液中后置于真空装置中, 0.045~0.050 MPa 真空抽气 25 min, 快速排气。取出浸染好的生菜于自来水中反复漂洗 3~4 次。滤干后叶片朝上, 根部朝下并整齐放置于铺有无菌吸水纸的塑料盆中, 20~22 °C光照培养, 每天光照时间 16 h, 共培养 3~4 d。

1.2.8 *ChIFN-γ* 粗蛋白的提取 称取 20 g 瞬时表达生菜叶片, 液氮研磨至细粉状, 按 1 g 加 1.5 mL 的比例加入蛋白提取缓冲液(0.2 mol/L NaCl, 1% SDS, 1% 2-ME, 0.05 mol/L PBS pH 7.5)冰浴 2 h, 间隔 20 min 研磨 1 次, 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液备用。

1.2.9 ELISA 定量检测 *ChIFN-γ* 蛋白 依照 chick IFN- γ ELISA 检测试剂盒说明书进行。

2 结果与分析

2.1 *ChIFN-γ* 基因序列 优化后合成的 *ChIFN-γ* 基因序列全长 596 bp, 包含植物 *Kozark* 序列 AACC, 63 bp *Napin* 信号肽, 492 bp *ChIFN-γ* 基因和内质网滞留信号肽 *SEKDEL* (见图 1)。

2.2 pSW-NGN 植物表达载体构建过程 以 pBSK(+)为亚克隆载体, 同尾酶连接法构建基因表达盒。利用 *Sal* I 与 *Xho* I 为同尾酶, 中间载体全部以 *Kpn* I / *Sal* I 双酶切, 连接 DNA 片段则均以 *Kpn* I / *Xho* I 双酶切, 依次按照 *NOS*→*IFNG*→*Napin* 顺序与载体连接, 并逐个消除同尾酶原有酶切位点。最后将 *IFNG* 以 *Napin* L 与 *Pnos* R 为引物 PCR 扩增全长 *IFNG* 基因, 从而使 *IFNG* 基因的 3'末端增加了 *Xho* I 位点, 经 *Kpn* I / *Xho* I 双酶切连接至质粒 pSH 的多克隆位点处, 获得植

物表达载体 pSH-NGN(图 2).

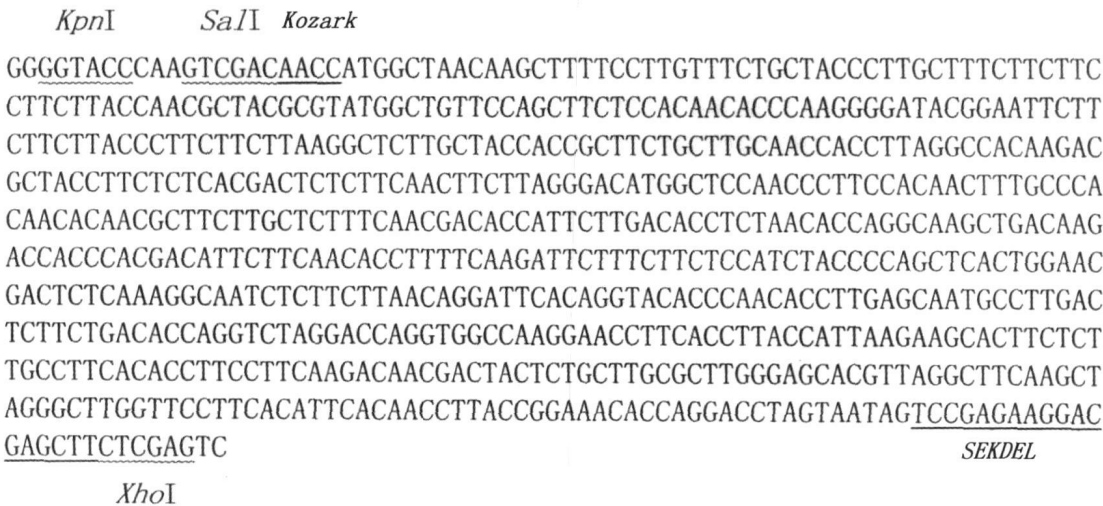


图 1 合成的 *ChIFN-γ* 基因序列
Fig. 1 The synthetic *ChIFN-γ* gene sequene

2.3 ChIFN-γ 重组子的鉴定 提取 pSH-NGN 质粒 DNA 转化根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞, 在含卡那霉素 50 mg/L 的固体培养基上挑取单菌落, YEB 液体培养, 提取重组质粒, 以 *Kpn* I / *Xho* I 双酶切 pSH-NGN 得到与预期片段大小一致的包含 *Napin* 启动子、*IFNG* 和 *NOS* 终止子的 1.9 kb DNA 片段和 14.6 kb 的 pSH 载体(图 3), 说明目的基因已正确克隆至植物表达载体中, 从而获得 pSH-NGN/EHA105 阳性克隆菌株.

2.4 PCR 检测 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取生菜叶片基因组 DNA, 以检测引物 PifngF 和 PifngR 扩增基因组 DNA, 结果显示(图 4): 扩增出与阳性对照大小一致的 508 bp DNA 片段, 空白及阴性对照生菜未扩增出片段, 说明 *ChIFN-γ* 基因存在于生菜细胞中.

2.5 ChIFN-γ 基因瞬时表达及 ELISA 定量检测 ChIFN-γ 蛋白 以 *ChIFN-γ* 标品梯度稀释后, ELISA 检测 *ChIFN-γ* 绘制得标准曲线. 生菜经真空渗透后共培养 72 h, 无菌水冲洗 1~2 次, 风干至叶片表面无水滴. 称取瞬时表达生菜片加提取液提取 *ChIFN-γ* 蛋白; 同时设立平行样品及空白对照. 从表 1 看出对照样品 *ChIFN-γ* 蛋白平均为 8 pg/g, 瞬时表达生菜 *ChIFN-γ* 蛋白为 654~706 pg/g. 由于试剂盒中使用的是 *ChIFN-γ* 多克隆抗

体, 植物中含有 *ChIFN-γ* 抗原决定簇结合的类似物, 因此对照样品检测出现假阳性, 这与 Edelbaum 等报道一致^[11]. 由于检测样品中 *ChIFN-γ* 含量远远高于对照, 说明 *ChIFN-γ* 在生菜中获得显著地表达. 另外, 实验中出现 *ChIFN-γ* 表达量存在一定的差异与生菜的新鲜度、叶片厚度等生理状况有直接的关系.

3 讨 论

利用同尾酶连接法构建多个基因时, 具有很多优点: ① 由于构建过程中产生的一系列中间载体, 特别适宜实验室批量构建载体; ② 所有构建基因序列 5' 端均为 *Kpn* I + *Sal* I, 3' 端均为 *Xho* I, 因此具有经济、使用方便、不易混淆的特点; ③ 由于使用的同尾酶, 经相应的限制性核酸内切酶切割并重新连接后, 原有的酶切位点消失, 因此, 不会增加新的酶切位点. 但此方法存在重组子筛选容易混淆的问题, 如: 由于构建过程会产生大小接近的中间载体. 因此, 这些载体在亚克隆时, 有时会出现一个克隆子中包含 2 个大小接近的载体, 而且电泳检测时不易分开. 为避免出现上述情况, 应逐一对克隆 DNA 片段分别设计各自的特异性引物, 以便通过 PCR 依次检测正确的重组子.

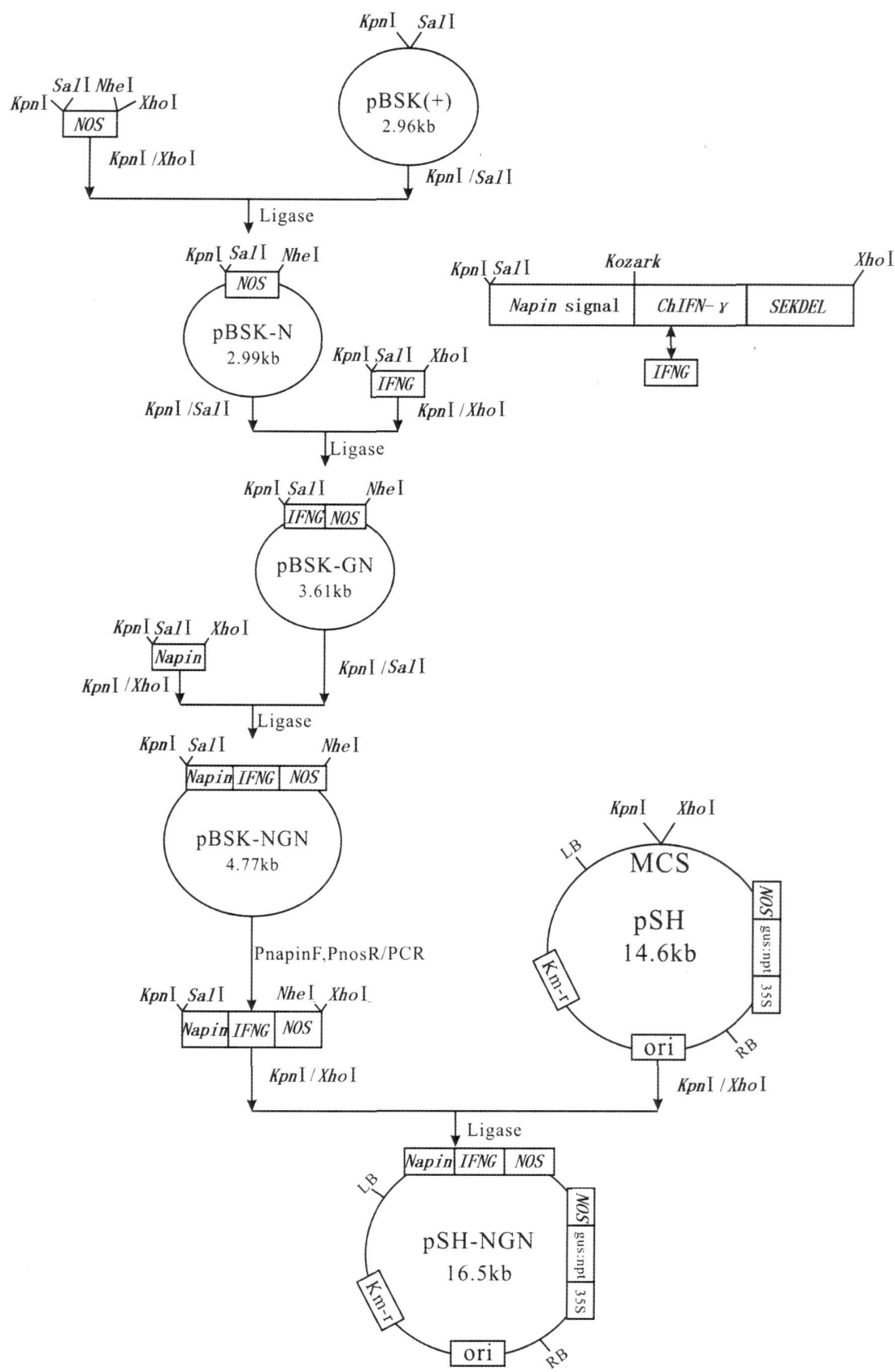
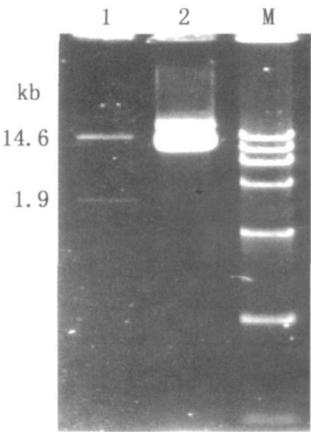


图 2 pSH-NGN 植物表达载体构建示意图

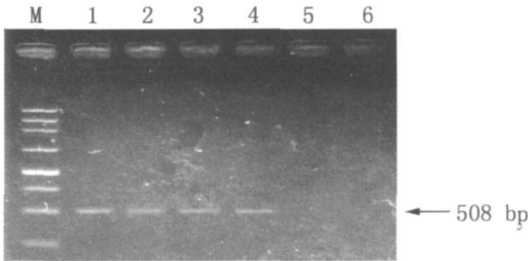
Fig. 2 The expression vector pSH-NGN used for *Agrobacterium*-mediated transformation of lettuce plants



1: 重组质粒 pNGN/*Kpn*I + *Xho*I ;
2: 重组质粒 pNGN; 3: DL15000 marker

图 3 重组质粒 pSH-NGN 酶切图

Fig. 3 Restricted enzyme digestion recombinant plasmid with *Kpn*I and *Xho*I . Lanes 1: a band of about 1.9 kb corresponding to *NGN* gene is present. lane 2: pSH plasmid. lane M: DL15000 marker



1: 阳性对照; 2~4: 瞬时表达生菜;
5: 空白对照; 6: 阴性对照

图 4 PCR 检测生菜中瞬时表达 ChIFN-γ

Fig. 4 PCR amplification of ChIFN-γ from transient expression in lettuce leaves. M: DL15000 marker. Lane 1: Positive control; Lane 2-4: The sample of transient expression lettuce (a band of about 508 bp corresponding to *IFNG* gene is present). Lane 5: control group. Lane 6: Negative control

表 1 ELISA 检测瞬时表达 ChIFN-γ 蛋白($\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab. 1 Transient expression levels of ChIFN-γ by ELISA($\text{pg} \cdot \text{g}^{-1}$)

指 标	样 品					对照	空白
	1	2	3	4	5		
质量比	680	711	590	653	715	11	0
	660	690	610	661	705	6	0
	674	705	602	648	698	7	0
平均	671	702	601	654	706	8	0

以市售生菜为材料进行目的基因的瞬时表达研究, 整个过程 1 周内即可完成. 具有材料来源广、几乎不受季节影响、方法简便易行、时间短、表达效率高优点^[12-13], 对研究构建目的基因高效表达, 特别是研究真核基因表达蛋白活性功能方面有很强的实用性. 植物稳定遗传表达外源基因存在表达量较低的问题, 研究中发现, ChIFN-γ 蛋白在生菜中瞬时表达量比同一表达载体在烟草中稳定表达高 6~7 倍, 由于本研究中 *ChIFN-γ* 基因是依据油菜密码子设计, 因此 ChIFN-γ 蛋白的表达水平应该还能提高.

启动子是影响基因表达极其重要的因素. 启动子的类型对外源基因的表达至关重要, 目前植物中

使用最广泛的花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子为组成型启动子, 这类启动子在细胞周期 S 特异表达, 表达活性强, 具有持续性, RNA 和蛋白质表达量相对恒定, 不表现时空特异性, 也不受外界因素诱导. *Napin* 启动子与 CaMV35S 启动子相比, 可以使外源目的基因在植株特定部位特异表达, 谭小力等报道 *Napin* 启动子控制基因只在和种子有关的部位和种子衍生的部位表达^[14]. 本研究中, 种子特异性启动子 *Napin* 能有效启动 *ChIFN-γ* 基因表达, 表明经修饰改造过的 *ChIFN-γ* 表达框构建正确, 同时说明种子特异性启动子出现了“渗漏”现象. *Napin* 启动子包含一些在进化上保守性很高的序列, 如 AT-rich 序列, TACACAT 保守序

列、RY 重复序列、G-box 等, 这些顺式作用元件可能对种子特异性表达起重要的调控作用. *Napin* 启动子为何能在生菜中启动基因表达, 与 *Napin* 序列自身、*ChIFN- γ* 基因有关还是 *Napin* 信号肽存在所致, 还有待进一步研究.

参考文献:

[1] SCHIJNSV E, WEINING K C, NUIJTEN P, et al. Immunoadjuvant activities of *E. coli* and plasmid expressed recombinant chicken IFN- α /beta, IFN- γ and IL-1 beta in 1-day-and 3-week-old chickens[J]. *Vaccine*, 2000, 18: 2 147-2 154.

[2] DIGBY M R, LOWENTHAL J W. Cloning and expression of the chicken interferon- γ gene[J]. *Interferon Cytokine Res*, 1995, 15: 939-945.

[3] 夏春, 吴丹, 阮小飞. 禽类基因工程重组干扰素研究进展[J]. *动物医学进展*, 2003, 4: 39-41.

[4] LAMBRECHT B, GONZE M, MORALES D, et al. Comparison of biological activities of natural and recombinant chicken interferon- γ [J]. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1999, 70: 257-267.

[5] SONG K D, LILLEHOJ H S, CHOI K D, et al. Expression and functional characterization of recombinant chicken interferon- γ [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1997, 58: 321-333.

[6] 茅海燕, 方平楚. 利用转基因植物作为疫苗生产系统

的研究进展[J]. *浙江大学学报: 医学版*, 2003, 32(1): 77-80.

[7] 傅玲琳, 帅江冰, JhaRajeevKumar, 等. 转基因植物疫苗研究进展[J]. *中国兽药杂志*, 2005, 39(5): 22-26.

[8] 王琼瑜. 译. 食用 IFN-A 薄脆饼卷土重来[J]. *生物技术通报*, 1993(4): 14.

[9] WADA K, WADA Y, ISHIBASHI, et al. Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data[J]. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20: 2 111-2 118.

[10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1996.

[11] EDELBAUM O, ILAN N, GRAFI G, et al. Purification and characterization of two antivirally active proteins from tobacco by monoclonal antibodies to human beta interferon[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1990, 87: 588-592.

[12] REINER H, MONIQUE B, ROBERTE B, et al. Transient gene expression in sunflower (*Helianthus annuus* L.) following microprojectile bombardment [J]. *Plant Science*, 1995, 105: 95-109.

[13] VALENTINE N, GALINA E, HYUNG-il L, et al. Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce[J]. *Plant Science*, 2005, 169: 433-438.

[14] 冷虹, 李加纳, 陆合, 等. Δ^6 脂肪酸脱饱和酶基因种子特异表达载体的构建[J]. *农业生物技术科学*, 2006, 22(4): 66-70.

Construction of plant expression vector consisting of *ChIFN- γ* gene and its transient expression

WU Yong-jun^{1, 2}, ZHAO De-gang^{1, 2}, SONG Li², XU Wen-zhao¹
(1. College of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China;
2. Guizhou Key Laboratory of Agro-Bioengineering, Guiyang 550025, China)

Abstract: The coding sequence of the chicken interferon gamma (*ChIFN- γ*) gene was optimized by modification of codon usage to that of *Brassica napobrassica* plant genes. The synthetic *ChIFN- γ* gene, along with an endoplasmic reticulum retention signal (*SEKDEL*), was placed under control of the *Napin* promoter and *napin* signal peptide in the plasmid with isocaudarner technique, pSH-NGN which transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. The transient expression system utilizes lettuce (*Lactuca sativa* L.) vacuum-infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens*. The *ChIFN- γ* transient expression level in lettuce was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results provide a basis for the next stage of stable genetic transformation of brassica napobrassica plants as an oral vaccine, simultaneously also provide a new method for efficient and rapid identification gene expression.

Key words: chicken interferon gamma; isocaudarner; construction; transient expression