

# 农杆菌介导的人白细胞介素-4 基因转化甘蓝的研究

金晓霞, 于海凤, 于丽杰

(哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 哈尔滨 黑龙江 150025)

**摘要:**以结球甘蓝‘92-1012-3-11’自交系种子转白细胞介素-4(IL-4)基因 T<sub>0</sub> 代材料为试材, 研究了通过农杆菌介导法将人 IL-4 基因导入甘蓝后代的遗传转化情况。结果表明:共得到抗草铵磷(PPT)抗性再生植株 396 株, 聚合酶链式反应(PCR)阳性植株 137 株, 其中带柄子叶转化率为 8.1%, 下胚轴分化率为 5.8%。通过对转基因阳性株 T<sub>0</sub> 代的 PPT 抗性筛选、PCR、PCR-Southern 杂交检测获得 IL-4 阳性甘蓝植株, 表明 IL-4 基因已转入甘蓝受体中。经 ELISA 和 Western 检测, 说明 IL-4 基因已整合到甘蓝基因组, 但表达量很低(0.23~2.81 ng/mL), 且各植株间的表达量差异极大。

**关键词:**甘蓝; 白细胞介素-4(IL-4); 遗传转化

**中图分类号:**S 635 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)15-0113-04

利用转基因植物生产药用蛋白及疫苗被称为植物医药基因工程。植物医药基因工程是指把重组的编码药用活性多肽和疫苗基因导入植物, 使转基因植物大量生产活性多肽和疫苗。目前已在转基因植物中表达成功的有麻疹<sup>[1]</sup>、乙型肝炎<sup>[2]</sup>、破伤风<sup>[3]</sup>等疫苗, 表皮生长因子<sup>[4]</sup>、人生长激素<sup>[5]</sup>、人胰岛素<sup>[6]</sup>、人血清白蛋白<sup>[7]</sup>等药用多肽。转基因植物作为生物反应器生产药用蛋白的研究成果丰硕, 展现出了诱人的魅力。

甘蓝(*Brassica oleracea* L.)属十字花科芸苔属 2 a 生植物, 地上近地面处结有叶球, 可供食用, 世界各地广泛种植, 是人们日常生活中不可或缺的一种蔬菜, 其作为基因转化受体具有自身的优势。白细胞介素(interleukin, IL)是介导白细胞间相互作用的一类细胞因

子, 白细胞介素家族至今得到公认的成员有 26 个。其中, IL-4 是 T 细胞产生的一种淋巴因子, 主要对免疫活性细胞起作用, 即对 B 细胞、T 细胞及 LAK(淋巴因子活化杀伤细胞)细胞等起作用, 而且可以抑制人体肿瘤细胞的生长, 具有预防和治疗肿瘤的作用<sup>[8-10]</sup>。将白细胞介素-4 基因转化到甘蓝再生植株, 使甘蓝作为一种生物反应器来生产 IL-4, 有利于降低相关药物的成本, 使之能够应用于更多的人群。

该试验在甘蓝高效再生体系及遗传转化体系建立的基础上, 通过农杆菌介导法将人 IL-4 基因导入甘蓝, 通过抗草铵磷(PPT)抗性、聚合酶链式反应(PCR)、PCR-Southern 杂交检测 IL-4 基因的整合情况, 并利用 ELISA 和 Western 技术, 检测 IL-4 基因是否表达出蛋白, 并为甘蓝作为生物反应器生产药用蛋白 IL-4 提供理论和实践依据, 同时也为转基因能否在遗传转化体内稳定遗传和表达提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试结球甘蓝品种为东北农业大学园艺学院惠赠

**第一作者简介:**金晓霞(1980-), 女, 博士, 讲师, 现主要从事植物分子生物学研究工作。E-mail: xiaoxia6195@126.com

**责任作者:**于丽杰(1961-), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 现主要从事植物基因工程研究工作。E-mail: yulijie1961@126.com

**基金项目:**黑龙江省自然科学基金资助项目(C0014)。

**收稿日期:**2013-04-12

**Abstract:** Taking *Medicago sativa* ‘Jin Queen’ as material, taking cotyledonary nodes of alfalfa as transformation receptors, the effects of transformation of alfalfa cotyledonary node of factors, the cotyledon sections physiological period, infection time, the co-culture time on transformation frequency via *Agrobacterium*-mediated transformation method were investigated. The object was to optimize transformation procedure, and lay a foundation for establishing the efficient alfalfa cotyledon node genetic transformation system. The results showed that infection with *Agrobacterium* ( $OD_{600} = 0.6$ ), the optimal receptor material was 9-day-old cotyledon node, infection time 20 min, co-culture time 3 d. The inhibitory concentration of cefotaxime was 500 mg/L.

**Key words:** cotyledonary nodes; *Agrobacterium*-mediated; transformation system

‘92-1012-3-11’自交系种子转 *IL-4* 基因  $T_0$  代材料。

供试质粒 P4IL4(图 1)为植物生物学黑龙江省高校重点实验室构建,并已被转入根癌农杆菌菌株 EHA105 (pEHA105,  $Rif^r$ )中,重命名为 E-P4-4。

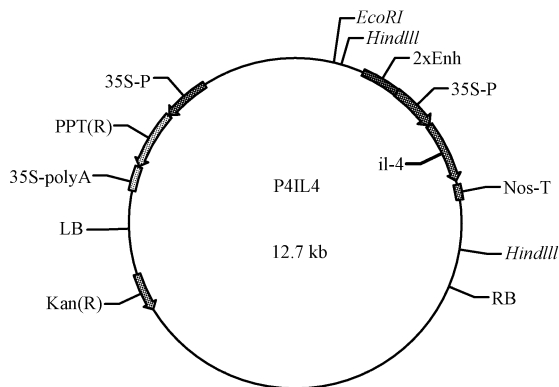


图 1 P4 RB-2×Enh-35SP-IL4-NosT-PPT(R)-LB

## 1.2 试验方法

该试验在植物生物学黑龙江省高校重点实验室内进行。

1.2.1 遗传转化试验 取‘92-1012-3-11’自交系甘蓝 6 日龄的无菌苗带 1~2 mm 子叶柄的子叶和 1 cm 左右长度的下胚轴做外植体,接种于分化培养基上,预培养 2 d,在 YEB+ $Kan_{50}$ + $Rif_{50}$  液体培养基中,培养根癌农杆菌 E-P4-4 18 h(OD 值 0.4)。将菌液稀释 10 倍后,分别侵染前述预培养 2 d 的外植体 3 min。将侵染过的外植体接回分化培养基,黑暗条件下共培养 2 d,无菌水冲洗共培养后的外植体 7 次,转移至含有 3.5 mg/L PPT 的筛选培养基上连续培养,再接种于继代培养基上继续培养 30 d 后将外植体转移至生根培养基。抗性芽生根并练苗后,移栽到塑料营养钵中。

1.2.2 抗性植株的 PCR 检测 以 *IL-4* 基因特异性引物( $P_1$ 、 $P_2$ )对 PPT 抗性植株进行 PCR 扩增,以 PPT 抗性植株总 DNA 为模板,以 P4IL4 质粒为阳性对照,以未转化植株的总 DNA 为阴性对照,以无菌水为空白对照。*IL-4* 基因引物序列:上游  $P_1$  引物:5'-CTGGATCCATG-CACAAGTGCAT-3',下游  $P_2$  引物:5'-TGGAGCTCT-CAGCTCGAACAACCTTTG-3'。PCR 反应体系 10  $\mu$ L,其中 10×PCR Buffer 1.0  $\mu$ L,dNTP 混合物 (2.5 mmol/L) 0.8  $\mu$ L,上、下游引物(浓度为 20  $\mu$ mol/L)各 0.1  $\mu$ L,*Taq* DNA 聚合酶(5 U/ $\mu$ L)0.08  $\mu$ L,DNA 模板 1  $\mu$ L,无菌双蒸水补至终体积 10.0  $\mu$ L。PCR 反应参数为:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,52.6℃退火 30 s,72℃延伸 1 min,35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析,照相。将扩增出 *IL-4* 基因特异条带并重复 2 次的 PCR 阳性植株确定为阳性株。

1.2.3 转基因植株的 PCR-Southern blotting 检测 按

Roche 公司生产的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒说明书进行。

1.2.4 Western 杂交检测 试验材料为 92-1012-3-11 自交系转基因 PCR 阳性再生甘蓝植株叶片,从 0.1 g 甘蓝叶片中提取可溶性蛋白,以 *IL-4* 标准品为阳性对照、未转化植株为阴性对照进行十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳。再采用电转移的方法将蛋白转移到聚解氟乙烯(PVDF)膜上,以免抗人白细胞介素-4 IgG 为第 1 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体为第 2 抗体,进行 Western 杂交检测。

1.2.5 转 *IL-4* 甘蓝的 ELISA 检测 用 *IL-4* 的特异抗体对 PCR 检测中阳性样品进行免疫检测。0.5 g 甘蓝叶片于 20℃预冷的研钵中,进行蛋白粗提液的制备,该研究的 DAC-法是以(样品的 OD/阴性对照 OD)>2 为阳性反应,检测基因表达量。将 *IL-4* 标准品按 100 ng/孔×(1/5)<sup>n</sup>,n=1~6 的标准稀释 6 个浓度梯度,作为阳性对照,制作标准曲线;以水为空白;以非转化甘蓝蛋白为阴性对照。所有样品的 OD<sub>450</sub> 值均为 2 次重复测定结果的平均数。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增结果

以 CTAB 法提取 PPT 抗性植株的 DNA 为模板进行 *IL-4* 的 PCR 扩增,得到 PCR 阳性植株。由图 2 可知,在 Marker DL 2 000 500~250 bp 之间大约 400 bp 位置,阳性质粒和部分 DNA 样品均可见清晰的阳性条带,而阴性对照(未转化植株)和空白对照(水)无特异条带,证明操作过程没有污染。该试验中所使用的 PCR 反应体系稳定性高,重复性好。

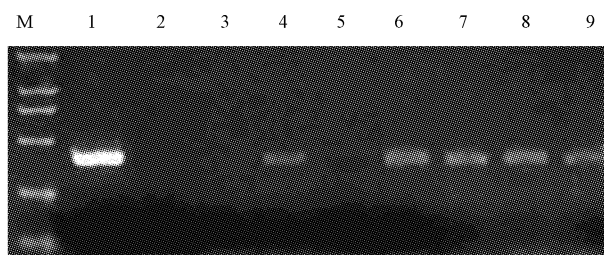


图 2 转基因植株 PCR 结果

Fig. 2 PCR results of transgenic plants

注:M:DL 2 000;1:阳性对照(质粒);2:阴性对照(未转基因植株);3:空白对照(水);4~9:转基因植株,5 为 PCR 阴性,其余为阳性。

该试验共做‘92-1012-3-11’自交系总外植体数 2 024 个,其中带柄子叶 864 个,下胚轴 1 160 个,共得到 PPT 抗性再生植株 396 株,其中带柄子叶的再生植株 160 株,下胚轴的再生植株 309 株,PCR 阳性植株共 137 株,其中带柄子叶的再生植株为 70 株,下胚轴的再生植

株为 67 株,带柄子叶转化率为 8.1%,下胚轴分化率为 5.8%。*IL-4* PCR 阳性转基因植株经春化处理已经开花并得到后代。

## 2.2 PCR-Southern 结果

随机选取 *IL-4* PCR 阳性植株的 DNA 为模板进行 *IL-4* 基因的 PCR 扩增及 PCR-Southern 检测。从图 3 可以看出,*IL-4* PCR 结果为阳性的转基因植株和阳性对照(质粒)均有特异性杂交条带,阴性对照(未转化植株)和空白对照(水)均无杂交条带,并且无非特异性杂交条带出现,证明 PCR 结果是可靠的,初步断定 *IL-4* PCR 阳性植株为转基因植株。

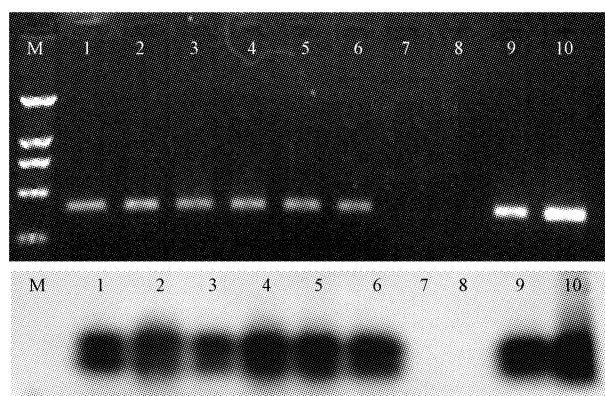


图 3 PCR-Southern blot 检测结果

Fig. 3 Results of PCR-southern blot

注:M:DL 2 000;1~6:转基因阳性植株;7:阴性对照(未转基因植株);8:空白对照(水);9:未转化植株与 *IL-4* 基因的混合物(10 000:1);10:阳性对照 1。

## 2.3 Western 杂交结果

随机选取 PCR 阳性植株叶片,以丙酮沉淀法提取叶片蛋白,采用硝酸银染色法对凝胶进行染色,进行 Western 杂交,从图 4 可以看出,阳性对照(标准样品)具有杂交信号,阴性对照(未转基因甘蓝叶片蛋白)无杂交信号,在选取的 6 个样品中,只有 4 个样品显示出微弱的杂交信号,2 个样品呈阴性反应,说明 *IL-4* 基因整合到甘蓝基因组中,并能够得到表达。部分样品没有杂交信号,可能是因为蛋白含量过少而无法检测到杂交信号,也可能是该转基因植株为嵌合体或者目的基因没有整合到甘蓝基因组中或者发生了转基因沉默。

## 2.4 ELISA 检测结果

经检测结果表明,14 个样品中有 8 个表现为阳性(表 1)。根据标准蛋白配制的 *IL-4* 梯度稀释液以及 ELISA 检测出波长为 450 nm 的  $OD_{450}$  值,以每孔中 *IL-4* 含量的对数为  $X$ , $OD$  值为  $Y$ ,经线性回归求出回归方程  $Y=0.489+0.392X$ ,将待测样品的  $OD_{450}$  值代入相关式,即可求出反应孔中的 *IL-4* 的浓度( $ng/mL$ )(表 2)。

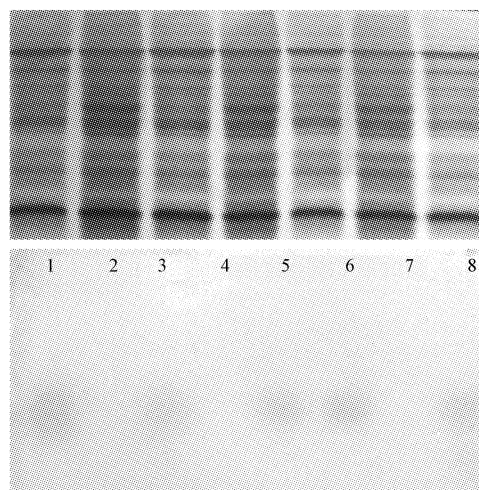


图 4 Western-blotting 检测结果

Fig. 4 Results of Western-blotting

注:1:阳性对照(标准样品);2:阴性对照(未转基因植株);3~8:转基因植株 PCR 阳性样品。

表 1 样品测定

Table 1 Determination of samples

标准品浓度 / $ng \cdot mL^{-1}$	标准品 $OD$ 值	粗提液 $OD$ 值	粗提液 $OD$ 值	样品编号 <sup>b</sup>
1 000	1.638	0.360 *	0.271 *	11,21
200.0	1.565	0.634 *	0.316 *	28,31
40.00	1.053	0.329 *	0.665 *	35,45
8.000	0.651	0.283 *	0.188	65,78
1.600	0.577	0.137	0.235 *	87,89
0.320	0.395	0.186	0.181	92-2,95-2
0.000 <sup>c</sup>	0.142	0.125	0.126	117,125
0.000 <sup>c</sup>	0.126	0.116 <sup>a</sup>	0.117 <sup>a</sup>	阴性对照 1,2

注:a:为阴性对照。b:样品编号中的 2 组数字分别代表前后 2 组粗提液的编号。c:标准品最后 2 个为空白对照。\*:检测呈现阳性的样品。

表 2 阳性样品 *IL-4* 表达量

Table 2 The expression of *IL-4* in positive samples

样品编号	11	21	28	31	35	45	65	89
样品 $OD_{450}$ 值	0.360	0.271	0.634	0.316	0.329	0.665	0.283	0.235
<i>IL-4</i> 表达量/ $ng \cdot mL^{-1}$	0.47	0.28	2.34	0.36	0.39	2.81	0.30	0.23

通过 ELISA 检测,14 个经过 PCR 和 PCR-Southern 检测显现出阳性样品只有 8 个在 ELISA 检测中呈现阳性,说明有部分阳性植株虽然转入了 *IL-4* 基因,但是没有表达。由表 2 可知,8 个阳性样品的  $OD$  值在 665~235 之间,通过计算得出样品中 *IL-4* 的表达量大约在 0.23~2.81  $ng/mL$ 。

## 3 讨论

该试验通过农杆菌介导法成功的将人的 *IL-4* 基因导入甘蓝植株,并获得转基因植株后代,但是基因的转化率较低,带柄子叶转化率为 8.1%,下胚轴分化率为 5.8%。这可能是由于喷洒 PPT 后引起植株叶片生理代谢过程的改变,某些次生代谢物增多,从而影响 PCR 扩



增的效果。也可能是基因的导入诱发纯合致死,造成转基因后代阳性率偏低<sup>[11]</sup>;或者是由于外源基因影响配子的存活能力<sup>[12]</sup>,导致配子体存活率下降。此外,一些人为因素也会对试验结果造成一定的误差<sup>[13]</sup>。

通过对目的蛋白在总可溶蛋白中的含量分析,可以看出 *IL-4* 基因在宿主植物—甘蓝中表达目的蛋白(*IL-4*)的量很低,大约只占总可溶蛋白的 0.35%~4.20%。分析其可能有以下几方面原因:一是该试验所用的质粒在构建时采用的是 CaMV-35S 组成型启动子,外源基因在受体植物中非特异性的持续、高效表达造成浪费,而往往在需要目的基因大量表达的特定时间和组织部位则因表达量过低而得不到与其效果。二是该试验转化的外源基因是人源的白介素,并没有根据植物密码子偏爱性进行密码子改造,致使外源基因表达的 mRNA 不稳定,影响表达效率。三是由于该试验采用的是农杆菌介导的遗传转化,外源基因是随机插入到宿主植物的基因组中,受位置效应的影响,外源基因的表达效率低下,甚至于基因沉默。四是外源基因在植物组织细胞中表达时,其表达产物受细胞中大量蛋白酶的作用而降解,造成外源蛋白积累量的减少。

#### 参考文献

- [1] Marquet-Blouin E, Bouche E B, Steinmet A, et al. Neutralizing immunogenicity of transgenic carrot (*Daucus carota* L.)-derived measles virus hemagglutinin[J]. Plant Mol Biol, 2003, 51(4): 459-469.
- [2] Kumar G B, Ganapathi T R, Srinivas, et al. Secretion of hepatitis B surface antigen in transformed tobacco cell suspension cultures[J]. Biotechnol Lett, 2005, 27(13): 927-932.
- [3] Tregoning J S, Nixon P, Kuroda H, et al. Expression of tetanus toxin fragment C in tobacco chloroplasts[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(4): 1174-1179.
- [4] Askari M D, Tsao M S, Schuller H M, et al. The tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone stimulates proliferation of immortalized human pancreatic duct epithelia through beta-adrenergic transactivation of EGF receptors[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2005, 131(10): 639-648.
- [5] Staub J M, Garcia B, Graves J, et al. High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts [J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(3): 333-338.
- [6] 龚剑, 刘春林, 郭纯, 等. 人胰岛素链基因表达载体的构建与大豆遗传转化[J]. 江苏农业科学, 2005(2): 27-31.
- [7] Bulat K L, Etokebe G E, Knezevic J, et al. Interferon-gamma receptor-1 gene promoter polymorphisms (G - 611A; T - 56C) and susceptibility to tuberculosis[J]. Scand J Immunol, 2006, 63(2): 142-150.
- [8] Conlon K, Osborne J, Morimoto C, et al. Comparison of lymphokine secretion and mRNA expression in the CD45RA<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> subsets of human peripheral blood CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes[J]. Eur J Immunol, 1995, 25: 644-648.
- [9] Grimm E A, Mazumder A, Zhang H Z, et al. Lymphokine activated killer cell phenomenon: lysis of natural killer [J]. J Exp Med, 1982, 155: 1823-1841.
- [10] Henney C S, Gall O K. Interleukin-2 augments natural killer cell activity [J]. Nature, 1981, 291: 335-338.
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 654.
- [12] 华志华, 黄大年. 转基因植物中外源基因的遗传学行为[J]. 植物学报, 1999, 41(1): 1-5.
- [13] 贾庆利. 外源基因在拟南芥转基因植株中的遗传研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2004: 24-26.

## Study on *Agrobacterium*-mediated Inter leukin-4 Gene Transferred into Cabbage

JIN Xiao-xia, YU Hai-feng, YU Li-jie

(College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

**Abstract:** Taking the cabbage inbred lines seeds of transgenic *IL-4* T<sub>0</sub> materials named '92-1012-3-11' as experimental material, the experiment researched the genetic transformation of *IL-4* gene into cabbage, which was mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that 396 strains of PPT resistant regenerated plants, 137 strains of PCR positive plants, wherein the cotyledons with petiole conversion rate of 8.1%, hypocotyls differentiation rate was 5.8%. *IL-4* positive cabbage plant in the positive transgenic line T<sub>0</sub> generation were detected by PPT resistance, PCR, PCR-Southern hybridization, and was showed that the *IL-4* gene had been transferred into cabbage receptor. *IL-4* gene had been integrated into the genome of cabbage which were detected by ELISA and Western detection, but it expressed very low (0.23~2.81 ng/mL), and there were difference greatly between the expression of each plant.

**Key words:** *Brassica oleracea* L.; *IL-4*; genetic transformation