

角质细胞生长因子 2 基因 (*KGF2*) 的克隆及其对油菜的遗传转化

潘国庆^{1,2}, 张爽³, 刘秀明¹, 李莹¹, 张耀方¹, 李洪志¹, 李海燕¹, 李校堃¹

1 吉林农业大学生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 长春 130118

2 吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118

3 中国人民解放军军事医学科学院军事兽医研究所, 长春 130062

摘要: 近年来, 植物表达人源蛋白的研究逐渐增多。本研究以人角质细胞生长因子 (*KGF2*) 基因 cDNA 为基础, 根据植物偏好密码子进行改造, 并利用 PCR 方法合成 *KGF2* 基因全长 cDNA。在此基础上构建了 *KGF2* 的植物油体系系统表达载体 p1390-YO-*KGF2*, 并采用农杆菌介导法对甘蓝型油菜无菌苗的子叶进行转化。通过 PCR、Southern 杂交和 Western blotting 检测, 证明外源基因 *KGF2* 已经转入油菜中并得到成功表达。

关键词: 油菜, 转基因植株, 植物生物反应器, 角质细胞生长因子

Cloning of Keratinocyte growth factor 2 gene (*KGF2*) and its transformation to *Brassica napus* L.

Guoqing Pan^{1,2}, Shuang Zhang³, Xiuming Liu¹, Ying Li¹, Yaofang Zhang¹, Hongzhi Li¹, Haiyan Li¹, and Xiaokun Li¹

1 Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3 Veterinary Institute, Academy of Military Medical Science, Changchun 130062, China

Abstract: Recently, more research about the plant bioreactor expressing genes encoding human proteins was reported. In the present study, the cDNA of the human gene keratinocyte growth factor 2 (*KGF2*) was replaced with plant preferred codons by PCR, and the modified full-length cDNA was cloned into the plant expression vector pCAMBIA-YO containing the oil-body promoter. The fusion construct pCAMBIA-YO-*KGF2* was transformed into *Brassica napus* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated cotyledon transformation method. The transgenic seedlings were identified by PCR, Southern and western blot analysis all showed that *KGF2* gene was successfully expressed in in transgenic *Brassica napus*.

Keywords: *Brassica napus* L, transgenic plants, plant bioreactor, keratinocyte growth factor

Received: December 13, 2009; **Accepted:** March 25, 2010

Supported by: Special Program of National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) for Research of Bioreactor in China (No. 2007AA100503), Science and Technology Development Projects of Jilin Province and Changchun City (Nos. 20070922, 06GG150), the Special Program for Investment Fund of Scientific Innovation Engineering, Institution of Higher Education (No. 70S018).

Corresponding author: Xiaokun Li. Tel: +86-431-84533327; E-mail: xiaokunli@163.net

国家高技术研究发展计划 (863 计划) 生物反应器重大专项 (No. 2007AA100503), 吉林省和长春市科技发展计划项目 (Nos. 20070922, 06GG150), 高等学校科技创新工程重大项目培育资金 (No. 70S018) 资助。

角质细胞生长因子 2 (Keratinocyte growth factor 2, KGF2) 是成纤维细胞生长因子家族中的一员, 称为 FGF10, 由 208 个氨基酸残基组成, N 端是 39 个疏水残基构成的信号肽序列^[1]。KGF2 有效促进上皮细胞的增殖、移行及分化^[2], 并对急慢性炎症、溃疡、烧伤等损伤的修复有极其重要的作用^[3], 特别是对放疗引起的静脉溃疡、溃疡性结肠炎等上皮组织损伤作用显著^[4-5]。KGF2 还参与调控四肢、肺支气管、牙齿腺体和脑垂体及皮肤等器官的形成和发育^[6-8]。未来临床上有望成为继表皮细胞生长因子、碱性成纤维细胞生长因子、血管内皮细胞生长因子和转化细胞生长因子后, 又一个在皮肤、黏膜各种创伤治疗上有重要前景的蛋白质因子。美国人类基因组公司 (Human Genome Sciences, HGS) 针对慢性溃疡和溃疡型肠炎及癌症化疗后口腔黏膜及胃肠黏膜损伤引起的炎症等的治疗已进入临床试验, 具有良好的稳定性和安全性^[9]。国内的上海新生源制药有限公司已经进入临床。

本实验将利用植物生物反应器的方法, 通过油菜油体表达系统, 将克隆的 *KGF2* 基因与油菜油体蛋白结合在种子中特异地表达 *KGF2* 蛋白, 为 *KGF2* 蛋白生产提供一个更为安全、廉价的生产体系, 也为以后将这种方法运用于产油量大、能够获得较大表达量的油料作物 (如红花) 提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

甘蓝型油菜、大肠杆菌 DH5 α 、根瘤农杆菌 (LBA4404)、质粒 p1390yo (pCAMBIA1390-Ycprmycoil) 为本实验室保存; 实验所用的各种限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶、凝胶回收试剂盒、DNA 小量提取试剂盒等均购自 TaKaRa 公司; PCR 引物合成及测序由北京三博远志完成; 植物基因组提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司; DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche 公司; 6-BA、2,4-D 等激素购自 Sigma 公司, Goat Anti-FGF10 和 Donkey Anti-Goat 抗体购自 Proteintech Grop.inc。

1.2 引物设计

根据 GenBank 上所登录的一段 *hKGF2* 基因序列 (Accession No. AF508782), 按照植物偏好的密码子将其碱基序列重新改造, 采用 Primer5.0 及 Oligo6.0 软件搭桥法设计 13 条引物, *kgpz1*-*kgpz7* 为正向引物, *kgpf1*-*Kgpf6* 为反向引物, 每条引物长度为 55~59 bp, 由大连宝生物技术有限公司合成。

1.3 *KGF2* 基因的扩增

将设计好的引物进行 PCR, 循环程序为: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 进行 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 再延 2 min。经过 7 轮 PCR 扩增, 最终获得 *KGF2* 全长基因。

1.4 *KGF2* 基因的农杆菌转化

将 *EcoR* I 和 *Bam*H I 酶切过的基因 (*KGF2*) 和用 *EcoR* I 和 *Bgl* II 酶切过的载体 (P1390-YO) 用 10 μ L 体系 16 $^{\circ}$ C 连接 2 h, 然后转化大肠杆菌, 最后提取质粒由北京三博远志进行测序鉴定。将测序正确的植物双元表达载体 p1390yo*KGF2* 通过冻融法转化入农杆菌菌株 LBA4404, 用 PCR 法和酶切法对转化菌落进行初步鉴定, 经鉴定所得到阳性单菌落即为含目的基因的转化菌株。

1.5 *KGF2* 在油菜中的转化

将种子用 70% 酒精和 10% 次氯酸钠分别处理 30 s 和 8 min 后放在种子培养基中, 切取 4~5 d 龄无菌苗子叶, 将叶片切口浸泡在农杆菌菌液中 8~10 min 后, 共培养 3 d, 经过抑菌培养, 分化培养和生根培养, 最后移栽进行分子水平检测。

1.6 PCR 鉴定和 Southern blotting 检测

用 CTAB 法提取转基因植株 DNA, 未经转化植株作阴性对照进行 PCR 检测。使用 *kgpz7* 和 *Kgpf6* 两条引物, 循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 进行 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 2 min。将转基因植株、对照亲本和质粒的 PCR 扩增产物电泳后转移到尼龙膜上, 42 $^{\circ}$ C 杂交炉中滚动 3 h 进行预杂交, 以质粒的扩增产物进行 P32 同位素标记制备探针, 与尼龙膜上的扩增产物杂交, 42 $^{\circ}$ C 滚动杂交过夜, 洗膜后在暗室中放射自显影 3~4 d。

1.7 Western blotting 检测

取约 50 粒转基因油菜的种子加入 100 μ L

Tris-HCl 缓冲液研磨粉碎, 加入等体积蛋白样品缓冲液 (2×), 沸水浴处理 10 min。12 000 r/min 离心 10 min, 吸取中间清液进行 SDS-PAGE 检测。SDS-PAGE 电泳结束后, 将胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 首先用封闭液封闭过夜, 将一抗 (Goat Anti-FGF10) 用 TBST (1:2 000) 稀释, 将膜蛋白面朝下放于一抗液面上, 不要出现气泡, 室温下孵育 1~2 h 后, 用 TBST 在室温下洗 2 次, 每次 10 min, 再用 TBS 洗 10 min; 二抗 (Donkey Anti-Goat) 1:5 000 稀释, 方法同一抗; 再将发光液的 A 液和 B 液 1:1 混合, 将蛋白面朝下于混合液充分接触并避免气泡, 在暗室中进行曝光 30~60 s 左右为宜。

2 结果与分析

2.1 *KGF2* 基因扩增及转化农杆菌 4404

将设计好的引物进行 PCR 扩增, 得到 540 bp 左右的特异带 (图 1), 其结果与预期一致, 然后与载体 (图 2) 连接转化大肠杆菌后, 进行测序, 同时提取质粒进行酶切鉴定, 其结果与预期相符 (图 3), 最后转化普通农杆菌 LBA4404 用于下一步实验。

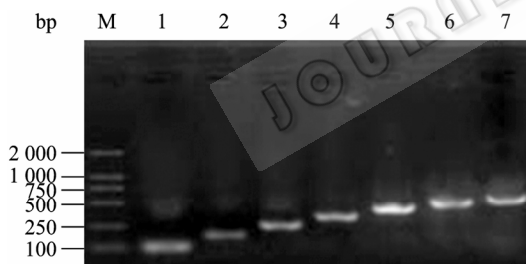


图 1 *KGF2* 基因合成琼脂糖电泳图

Fig. 1 Identification of the *KGF2* product by agarose gel electrophoresis. M: DL2000 marker; 1-7: Compound flow of *KGF2* gene.

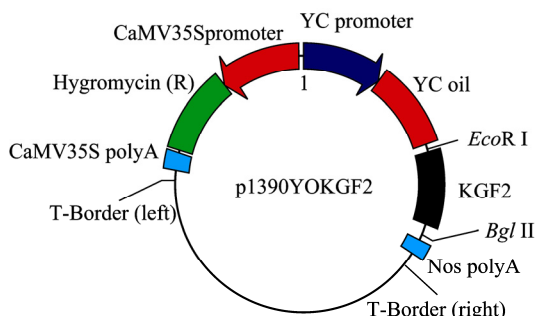


图 2 植物表达载体 P1390YOKGF2 质粒图谱

Fig. 2 Plasmid map of plant transformation vector 1390yoKGF2.

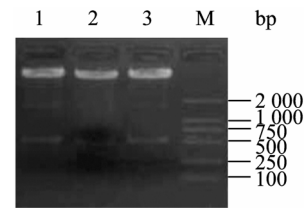


图 3 重组质粒 p1390-YO-KGF2 酶切鉴定

Fig. 3 Restriction digestion analysis of recombinant plasmid p1390yo KGF2. M: DL2000 marker; 1-3: p1390yo KGF2 digested with *EcoR* I / *Bgl* II.

2.2 油菜再生植株的获得与 PCR 检测

油菜的子叶外植体经过预培养可形成明显的愈伤组织, 约 30%~50% 愈伤组织上逐渐有芽点并形成小芽, 愈伤分化出的小芽在抑菌培养基中进行壮苗培养, 然后转入生根培养基中进行生根培养, 最终获得潮霉素抗性的再生植株 (图 4)。对转化得到的转基因油菜提取基因组, 进行 PCR 扩增, 得到了大小为 540 bp 左右的特异带 (图 5), 扩增结果初步表明目的基因已经整合到油菜基因组中。

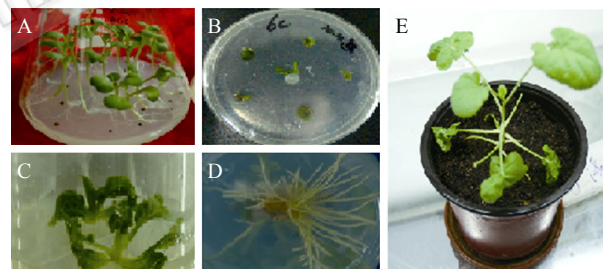


图 4 转基因再生植株流程图

Fig. 4 Obtaining of the transgenic plants. (A) 4 day *Brassica napus*. (B) Strong seedling cultured of *Brassica napus* 1 cm. (C, D) Shoot growing roots. (E) Transplanting of the young plants.

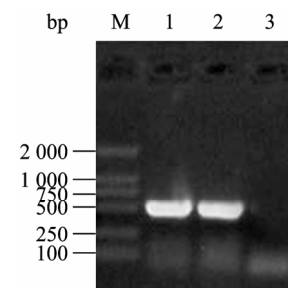


图 5 转基因植株的 PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of transformed plants with PCR. M: DL2000 marker; 1: positive plasmid control; 2: transgenic plant; 3: negative control (ddH₂O).

2.3 Southern 杂交和 Western blotting 检测

将油菜 PCR 扩增产物从凝胶中转移到尼龙膜上,以 PCR 方法制备的质粒扩增产物为探针进行杂交,结果 PCR 阳性转化植株(图 6 泳道 4)出现杂交带,泳道 2 未出现杂交带,野生型植株无杂交信号,进一步从分子水平上证明有 1 棵转基因植株中含有目的基因(图 6)。

在检测的 59 棵再生植株中经过 PCR 检测和 Southern 杂交鉴定有 1 棵植株中含有目的基因 *KGF2*, 转化率约为 1.7%。

提取阳性植株 T0 代种子的总蛋白, SDS 凝胶电泳转膜后,进行 Western blotting 检测。结果表明(图 7):来自转基因植株总可溶性蛋白质样都含有分子量约为 40 kDa 的目的蛋白,与预期结果一致。从而说明来自转基因植株中目的基因都获得蛋白质水平上的表达。*KGF2* 蛋白在油菜种子中有一定量的表达。

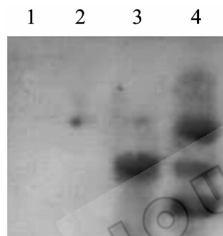


图 6 转化植株的 Southern blotting 分析

Fig. 6 Identification of the transplants by Southern blotting. 1: wild-type plant; 2, 4: transgenic plant; 3: plasmid.



图 7 转基因植株的 Western blotting 分析

Fig. 7 Identification of the transplants by Western blotting. 1: protein of wild-typ plants seed tissue; 2: protein of transformed plants seed tissue.

3 讨论

油菜是主要的油料作物之一,从 1985 年 Ooms 等^[10]获得第一株转基因油菜植株以来,利用油菜作为植物反应器受体对外源基因的遗传转化得到飞速

的发展,一系列抗病、抗虫、高产的转基因油菜相继诞生,而且已有部分商品化,但是外源基因在转基因油菜中的表达和纯化工艺复杂仍是科学家有待解决的重要难题。

实验中构建的植物表达载体 p1390YOKGF2 是以 pCAMBIA1390 为基本骨架,并加入了油菜油体启动子 (YC promoter) 和油体蛋白基因 (YC oil),载体 p1390YOKGF2 的 T-DNA 区域由 2 个转录单元组成:一个为编码潮霉素的选择标记基因,另一个为目的基因(编码 *KGF2*)。控制这两个转录单元的启动子一个为 CaMV35S promoter 启动子,另一个为油菜油体启动子 (YC promoter)。潮霉素基因的 3'端为 CaMV35S promoter 终止子,而 *KGF2* 基因的 3'端为胭脂碱合成酶(Nos) 终止子。所采用的启动子与终止子适合于植物表达体系,在转基因植物研究中应用广泛。20 世纪 70 年代,人们就认识到了密码子偏好性的重要性^[11],通过大量生物信息研究证实不同物种的基因在密码子使用上存在明显的偏好性^[12-14]。赵耀等^[15]通过对玉米 *waxy* 基因密码子偏好性分析证明 *waxy* 基因对一些密码子的使用存在明显的偏好性,通过密码子改构可以有效提高基因在宿主中的表达水平。

本实验成功地转化了油菜外植体并获得了转基因植株,以 *KGF2* 为目的基因转化油菜的研究进行了初步的尝试,首次将角质细胞生长因子 2 (*KGF2*) 基因转入到油菜中并获得转基因植株,其转化率在 1.7%。通过 Southern blotting 和 Western blotting 检测,证明外源基因 *KGF2* 在油菜中有一定水平的表达。以上结果为建立以油菜为生物反应器生产药用蛋白提供了参考。

REFERENCES

- [1] Emoto H, Tagashira S, Mattei MG, *et al.* Structure and expression of human fibroblast growth factor 10. *J Biol Chem*, 1997, **272**(37): 23191-23194.
- [2] Igarashi M, Finch PW, Aaronson SA. Characterization of recombinant human fibroblast growth factor (FGF)-10 reveals functional similarities with keratinocyte growth factor (FGF-7). *J Biol Chem*, 1998, **273**(21):

- 13230–13235.
- [3] Jimenez PA, Rampy MA. Keratinocyte growth factor-2 accelerates wound healing in incisional wounds. *J Surg Res*, 1999, **81**(2): 238–242.
- [4] Smith PD, Polo M, Soler PM, *et al.* Efficacy of growth factors in the accelerated closure of interstices in explanted meshed human skin grafts. *J Burn Care Rehabil*, 2000, **21**(1): 5–9.
- [5] Freytes CO, Ratanatharathorn V, Taylor C, *et al.* Phase I/II randomized trial evaluating the safety and clinical effects of repifermin administered to reduce mucositis in patients undergoing autologous hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Cancer Res*, 2004, **10**(24): 8318–8324.
- [6] Jiang ZY, Fu XB. FGF10: a multifunctional signal factor regulating embryonic organ development. *China Biotechnol*, 2003, **23**(3): 25–29.
姜笃银, 付小兵. FGF10: 胚胎器官发育中重要的多功能信号分子. *中国生物工程杂志*, 2003, **23**(3): 25–29.
- [7] Shinkai M, Shinkai T, Pirker MA, *et al.* Effect of nitric oxide on fibroblast growth factor-10 and bone morphogenetic protein 4 expressions in the branching morphogenesis of fetal rat lung explants. *J Pediatr Surg*, 2005, **40**(6): L379–L385.
- [8] Mailleux AA, Kelly R, Veltmaat JM, *et al.* Fgf10 expression identifies parabronchial smooth muscle cell progenitors and is required for their entry into the smooth muscle cell lineage. *Development*, 2005, **132**(9): 2157–2166.
- [9] Sandborn WJ, Sands BE, Wolf DC, *et al.* Repifermin (keratinocyte growth factor-2) for the treatment of active ulcerative colitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Aliment Pharmacol Ther*, 2003, **17**(11): 1355–1364.
- [10] Ooms G, Bains A, Burrell M, *et al.* Genetic manipulation in cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*) using *Agrobacterium*. *Theor Appl Genet*, 1985, **71**: 325–329.
- [11] Gustafsson C, Govindarajan S, Minshull J. Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol*, 2004, **22**(7): 346–353.
- [12] Ikemura T. Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes. *J Mol Biol*, 1981, **146**(1): 1–21.
- [13] Kanaya S, Yamada Y, Kinouchi M, *et al.* Codon usage and tRNA genes in eukaryotes: correlation of codon usage diversity with translation efficiency and with CG-dinucleotide usage as assessed by multivariate analysis. *J Mol Evol*, 2001, **53**(4/5): 290–298.
- [14] Murray EE, Lotzer J, Eberle M. Codon usage in plant genes. *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**(2): 477–498.
- [15] Zhao Y, Liu HH, Gu Y, *et al.* Analysis of characteristic of codon usage in waxy gene of *Zea mays*. *J Maize Sci*, 2008, **16**(2): 16–21.
赵耀, 刘汉海, 顾勇, 等. 玉米 waxy 基因密码子偏好性分析. *玉米科学*, 2008, **16**(2): 16–21.