

• 药材与资源 •

金属硫蛋白 2 基因在红花中表达的初步研究

官丽莉^{1,2}, 陈 昱^{1,2#}, 武云云², 滕孝花³, 杨 晶^{1,2}, 郭咏昕¹, 胡人阁², 李海燕¹, 李校堃², 姜 潮^{2*}

1. 吉林农业大学生命科学学院, 吉林 长春 130118

2. 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, 吉林 长春 130118

3. 通化市第一中学, 吉林 通化 134001

摘要: 目的 获得转金属硫蛋白 2 (metallothionein 2, MT2) 红花植株, 为 MT 药用蛋白的生产奠定基础。方法 采用 *Nco I/Hind III* 酶切 pEASY-oleosin-MT 获得 oleosin-MT 融合基因, 将其插入到植物油体高效表达载体 pOP 上, 构建重组质粒 pOP-oleosin-MT, 进行 PCR 和双酶切鉴定。采用冻融法将重组质粒 pOP-oleosin-MT 转入根瘤农杆菌 EHA105 中, 通过农杆菌介导法转化红花, 对转 MT 基因红花植株进行 PCR 检测及 Southern blotting 检测。结果 成功构建了 MT 基因的植物油体表达载体 pOP-oleosin-MT, 获得了 3 株 PCR 检测呈阳性的转 MT 基因红花植株。结论 建立了完善的花再生体系, 获得了转 MT 基因的红花植株。

关键词: 红花; 金属硫蛋白; 油体; Southern blotting 检测; 根瘤农杆菌; 重组质粒

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)12-2152-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.12.023

Study on expression of metallothionein 2 gene in safflower

GUAN Li-li^{1,2}, CHEN Yu^{1,2}, WU Yun-yun², TENG Xiao-hua³, YANG Jing^{1,2}, GUO Yong-xin¹, HU Ren-ge², LI Hai-yan¹, LI Xiao-kun², JIANG Chao²

1. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. Bioreactor and Drug Development Reseach Center, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

3. Tonghua No.1 Senior High School, Tonghua 134001, China

Abstract: Objective To obtain the transgenic safflower plants which expressed *Arabidopsis thaliana* metallothionein 2 (MT2) gene, and lay a foundation for development of MT products. **Methods** The oleosin-MT gene was obtained from pEASY-oleosin-MT by *Nco I/Hind III*, then was inserted into plant expression vector pOP. The recombinant plasmid named pOP-oleosin-MT was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. The oleosin-MT gene was introduced into safflowers via *Agrobacterium*-mediated method and positive transgenic plants were determined by PCR analysis. **Results** The recombinant plasmid pOP-oleosin-MT was successfully constructed. PCR and Southern blotting analysis confirmed that MT gene was integrated into the genome of safflower plant and three transgenic plants were obtained. **Conclusion** The safflower regeneration system is constructed successfully and MT gene is successfully transformed into safflower plant.

Key words: safflower; metallothionein; oil-body; Southern blotting; *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh; recombinant plasmid

金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 是一类低相对分子质量 (6~7 ku)、富含半胱氨酸, 可与大量金属离子 (如 Zn²⁺, Cd²⁺ 和 Cu²⁺) 相结合的独特蛋白质或者活性肽, 是机体内唯一一种在金属代谢中起重要调节作用的小分子蛋白^[1]。1957 年, 富含

Cd 的金属蛋白首次在马肾脏细胞中被发现^[2]。通过对金属硫蛋白进行提纯发现, 其含有大量的半胱氨酸残基和金属, 并因此将其命名为“metallothionein”^[3]。研究证实, 植物 MT 的高巯基含量使其在空气中极不稳定、分离困难, 目前仅在小麦 Ec 蛋白^[4]和拟南

收稿日期: 2015-12-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2011AA100606); 国家自然科学基金资助项目 (31201237); 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究项目重点项目 (吉教科合字[2016]179 号); 吉林农业大学大学生创新创业项目 (201610193046, 201410193045); 吉林省科技厅中青年领军人才及优秀创新团队项目 (20111815); 教育部博士点基金-青年教师基金项目 (20122223120002)

作者简介: 官丽莉 (1982—), 女, 吉林梅河口人, 在读博士, 主要从事药用植物与生物技术研究。E-mail: guanll2004@163.com

*通信作者 姜 潮 (1955—), 男, 加拿大国籍, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物生物反应器研究。E-mail: chaojiang10@hotmail.com

#并列第一作者, 陈 昱 (1987—), 女, 吉林省吉林市人, 在读硕士, 主要从事植物生物反应器研究。E-mail: chenyu0506@126.com

芥 MT1、MT2 和 MT3^[5]中分离纯化获得, MT 基因的表达可增强植物在重金属胁迫过程中的抗逆作用, 对组织细胞损伤修复具有显著功效^[6-10]。同时研究发现, MT2 可与金属结合, 具有清除自由基、防辐射、加速皮肤炎症修复和延缓衰老等功效^[11-12]。

近些年来, 随着基因工程等生物技术的不断发展, 以转基因技术为代表的植物基因工程技术, 为农业的可持续发展提供了强有力的支持, 已有几十种药用蛋白或多肽在植物中成功表达^[13-14]。利用植物表达系统生产药用蛋白具有广泛的应用前景^[15], 加拿大 Sembiosys 公司利用红花油体系统表达人胰岛素, 已达到商业化生产水平, 国内也有利用植物表达系统生产水蛭素、降钙素等相关报道^[16]。本研究以药用植物红花作为植物反应器生产 MT, 构建红花植物表达载体, 获得了转基因红花植株, MT 与拟南芥油体融合后定位于红花油体中。利用金属硫蛋白特殊功效与油体易于纯化的特性, 提取的油体可直接用于化妆品原料的制备, 既节省了药物分离纯化的成本, 同时又增加了药物的治疗效果。以红花作为植物反应器生产 MT 蛋白, 旨在进一步提高红花的利用价值及为利用其他植物生物反应器表达重组蛋白提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 根瘤农杆菌菌株 EHA105、表达载体 pOP、pEASY-oleosin-MT、大肠杆菌菌株 DH5 α 均由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构建及保存。红花种子由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提供, 经吉林农业大学胡全德教授鉴定为红花 *Carthamus tinctorius* L. 选取个头饱满的种子。将种子用 70%乙醇浸泡 0.5~1.0 min, 然后用 0.1% HgCl₂ 进行表面消毒约 10 min, 再用无菌水冲洗 3~4 次, 将其播种在种子萌发培养基上 (MS 粉+30 g/L 蔗糖+100 mg/L 有机溶液+100 mg/L 肌醇+8 g/L 琼脂), 25~28 °C、黑暗条件下培养 3~4 d。

1.1.2 试剂 限制性内切酶、TaqDNA 聚合酶、Pfu DNA 聚合酶、DNA 分子量标准 Marker (DL-2000)、

DNA 小量提取试剂盒、Agarose Gel DNA Purification Kit 试剂盒、Mini BEST Plasmid Purification Kit Ver.2.0 试剂盒及 DNA Ligation Kit Ver.2 等均购自大连宝生物工程有限公司。细胞分裂素 (6-BA)、生长素 (NAA)、卡那霉素 (Kan)、链霉素 (Str) 和利福平 (Rif) 等购自美国 Sigma 公司。乙酰丁香酮 (AS) 购自日本 Wako 公司。头孢曲松钠 (Cef) 和羧苄西林钠 (Carb) 购自哈尔滨制药股份有限公司。草铵膦购自 Boehringer Mannheim 公司。其他常规试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 上的拟南芥 MT2 和拟南芥油体 (oleosin) 碱基序列, 利用 Primer Premier 5.0 引物设计软件, 分别设计 oleosin-MT 融合基因特异性检测引物, 本实验所用的引物以及测序都是由金唯智生物科技 (北京) 有限公司完成。引物序列如下: M1: 5'-ATGCCATGGCGGATACAGCTAGAGGAACCCATA-3'; M2: 5'-CCCAAGCTATTTCAGGTGCAGGTGCAAGGGTT-3'。

1.2.2 植物表达载体 pOP-oleosin-MT 构建 实验室保存的 pEASY-oleosin-MT 质粒经 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切, 1.0%琼脂糖凝胶电泳后, 割胶回收目的片段。利用连接酶将目的基因与酶切回收后的实验室改造后的 pOP 植物表达载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 利用蓝白斑筛选获得阳性菌落, 阳性克隆 PCR 鉴定和 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定后获得重组 pOP-oleosin-MT 质粒载体 (图 1)。利用冻融法将测序正确的 pOP-oleosin-MT 载体转化根瘤农杆菌 EHA105, 获得用于侵染用的工程菌种。

1.2.3 含 oleosin-MT 基因的农杆菌转化红花 红花种子经过表面灭菌处理后, 在种子萌发培养基中, 25 °C暗培养 3 d, 选用含有 pOP-hEGF-hEGF 的农杆菌工程菌侵染红花子叶, 在芽诱导培养基上培养 2 周, 转移到芽分化培养基上继续培养 4 周。长出阳性苗后将其转移到伸长生根培养基内培养。实验所用培养基如下:

(1) 芽诱导培养基: MS 粉+30 g/L 蔗糖+1.5

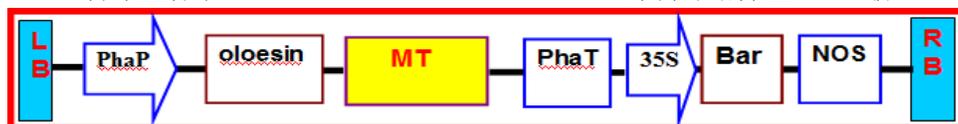


图 1 表达载体 pOP-oleosin-MT 结构示意图

Fig. 1 Schematic of pOP-oleosin-MT expression vector

mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+100 mg/L 有机溶液+100 mg/L 肌醇+8 g/L 琼脂。

(2)芽分化培养基: MS 粉+30 g/L 蔗糖+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+100 mg/L Cef+200 mg/L Carb+100 mg/L 有机溶液+100 mg/L 肌醇+8 g/L 琼脂。

(3) 伸长生根培养基: MS 粉+30 g/L 蔗糖+1.5 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+3.8 mg/L KNO₃+100 mg/L Cef+200 mg/L Carb+100 mg/L 有机溶液+100 mg/L 肌醇+8 g/L 琼脂。

1.2.4 PCR 再生植株检测 取转化苗的新鲜叶片 100 mg, 用新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA, 以未转基因的新鲜叶片作为阴性对照, pOP-oleosin-MT 载体质粒作为阳性对照。Y1 和 M2 分别为上下游引物扩增得到 oleosin-MT 融合基因片段。20 μL PCR 反应体系如下: 2×Power Taq PCR Master Mix 10 μL, M1 和 M2 各 1 μL, 红花基因组 1 mL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应的程序同前。PCR 扩增产物经 10 g/L 核酸琼脂糖凝胶电泳后, 在 DNRBio Imaging Systems (购自以色列 DNR 成像系统有限公司) 紫外灯下进行分析。

1.2.5 RT-PCR 再生植株检测 称取 50~100 mg T1 代红花种子, 用钳子去除种皮, 采用 Trizol 试剂盒提取 RNA 后反转录成 cDNA, 以未转基因的新鲜叶片作为阴性对照, pOP-oleosin-MT 载体质粒作为阳性对照。M1 和 M2 分别为上下游引物扩增得到 oleosin-MT 融合基因片段。20 μL PCR 反应体系如下: 2×Power Taq PCR Master Mix 10 μL, M1 和 M2 各 1 μL, 红花 cDNA 1 μL, ddH₂O 7 μL。PCR 反应的程序同前。PCR 扩增产物经 10 g/L 核酸琼脂糖凝胶电泳后, 在 DNRBio Imaging Systems 紫外灯下进行分析。

1.2.6 转基因红花的 Southern blotting 分析 取 PCR 检测呈阳性的转基因红花叶片, 用 CTAB 法取其总 DNA, 用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Hind* III 双酶切总 DNA, 经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用碱变性方法处理凝胶^[17], 利用毛细管法将酶切片段由凝胶转移到固相硝酸纤维素膜上, 用地高辛标记的 MT 基因片段作为探针, 按照地高辛检测试剂盒说明书进行 Southern blotting 分析。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体 pOP-oleosin-MT 构建

将 oleosin-MT 和 pOP 质粒分别用 *Nco* I 及 *Hind* III 进行双酶切, 然后用 PCR 纯化回收试剂盒分别回

收目的片段和大载体, 进行连接, 转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α, 37 °C 过夜培养。采用菌液体 PCR 筛选阳性质粒, 命名为 pOP-oleosin-MT。然后对 pOP-oleosin-MT 进行菌落 PCR 鉴定(图 2)和酶切鉴定(图 3), 验证正确后送上海生物工程有限公司测序。采用冻融法将测序正确的植物双元表达载体 pOP-oleosin-MT 转化到农杆菌 EHA105 感受态中, 农杆菌菌液进行 PCR 鉴定, 图 4 表明融合基因已成功插入到 pOP 载体中, 成功构建了植物表达载体。

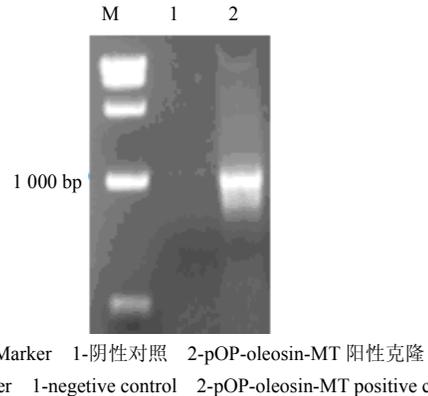


图 2 重组质粒 pOP-oleosin-MT PCR 鉴定
Fig. 2 PCR identification of recombinated plasmid pOP-oleosin-MT

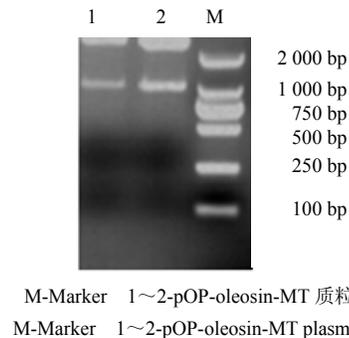


图 3 重组质粒 pOP-oleosin-MT 的酶切鉴定
Fig. 3 Restrigation analysis on pOP-oleosin-MT

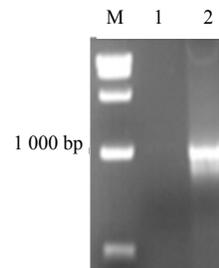


图 4 pOP-oleosin-MT 菌液的 PCR 鉴定
Fig. 4 PCR amplification of plasmids pOP-oleosin-MT

2.2 转基因红花的 PCR 鉴定

选取筛选后得到的 27 株红花阳性组育苗叶片，提取基因组，进行 PCR 检测，部分 PCR 检测结果如图 5 所示，植株 3~8 均扩增获得了大小约为 1 000 bp 的 oleosin-MT 片段，仅初步说明目的基因已经整合到红花基因组中，但还需要进一步验证。但由于红花苗生根困难，将获得的红花组育苗嫁接，仅有一株红花阳性苗嫁接成活，收到 16 粒红花 T0 代种子。由于收到的种子有限，仅播种了 6 粒种子，但是由于种子的成熟饱满程度不同，仅有 3 株 T1 代阳性植株成活，如图 6 所示。对 T1 代 3 株红花阳性植株（分别标记为 A、B、C）又进行了检测，为了确保 PCR 检测的准确性，设计了不同的引物进行检测，结果如图 7 所示。由图 7 可知，A、B、C 3 株植株都有可能为阳性苗。在表观上鉴定转基因红花与野生型红花的区别，转基因红花叶片的大小明显大于野生型叶片，说明 oleosin-MT 对红花表型可能有影响，见图 8。

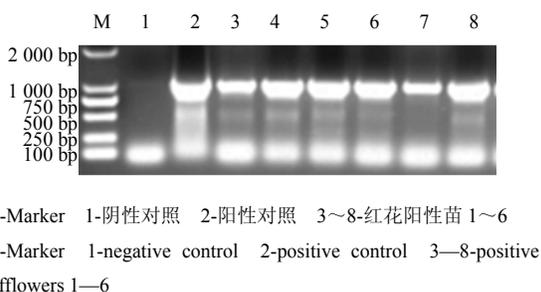


图 5 抗性植株的 PCR 检测

Fig. 5 PCR analysis on kan-resistant plants

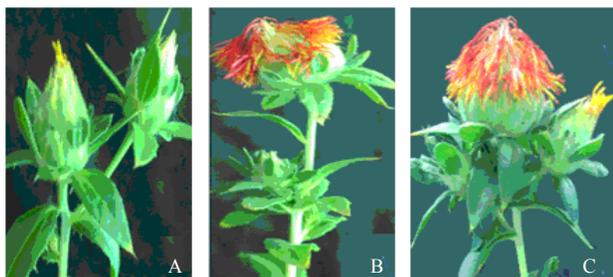


图 6 转基因红花 T1 代植株

Fig. 6 Transgenic safflower T1

2.3 Southern blotting 检测

取 3 株 PCR 检测为阳性的红花植株总 DNA，用限制内切酶酶切，以地高辛标记的 hEGF 基因片段为探针进行 Southern blotting，结果在受检的 3 株转基因植株中，3 株均有杂交信号，其中 2 株为双拷贝，另一株为单拷贝，而非转基因植株没有杂交信号(图 9)。表明外源 MT 基因已稳定整合到红花基因组中。

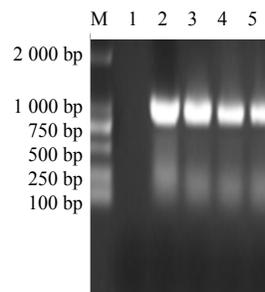


图 7 转基因红花 T1 代的 PCR 检测

Fig. 7 PCR amplification of transgenic safflower T1

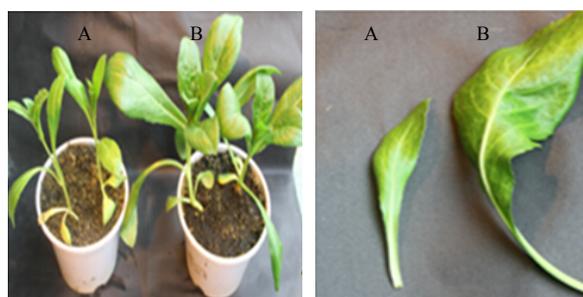


图 8 野生型 (A) 与转基因 (B) 红花表观对比

Fig. 8 Apparent contrast of wild type (A) and MT transgenic (B) of safflower

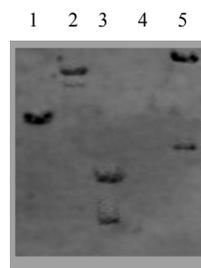
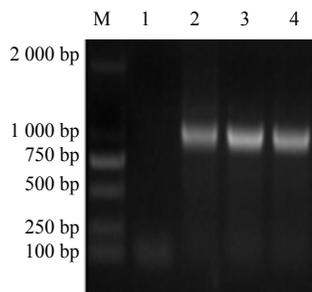


图 9 转 pOP-oleosin-MT 基因红花植株的 Southern blotting 分析

Fig. 9 Southern blotting analysis on transgenic pOP-oleosin-MT safflower

2.4 RT-PCR 检测

选取转基因红花 T1 代种子用 Trizol 试剂盒提取 RNA 后反转录成 cDNA，以特异性引物进行 PCR 检测，扩增结果如图 10 所示。经 RT-PCR 鉴定，均扩增出目的基因的特异性条带，且 oleosin-MT 株系的表达量较高。表明 oleosin-MT 基因已整合到红花基因组中并在转录水平上表达。



M-Marker 1-阴性对照 2-阳性对照 3~4-红花阳性苗
M-Marker 1-negative control 2-positive control 3~4-positive safflower

图 10 转基因红花 T1 RT-PCR 检测

Fig. 10 RT-PCR amplification of transgenic safflower T1

3 讨论

植物 MTs 的研究已取得很大的发展,但是关于植物 MTs 分离提取的报道相对较少^[18]。从拟南芥中提取 MT,并将 MT 基因转入到红花中的研究更是尚未见报道。本研究通过构建 oleosin-MT 融合基因植物表达载体,可以提高目的基因的表达水平;选用红花作为转基因材料,主要基于红花自身的诸多药效作用,同时也不会对环境产生污染。本研究构建红花植物表达载体并转化红花,在基因水平及转录水平上验证了 MT 基因的表达,获得了 3 株转 oleosin-MT 基因的红花植株,并对 oleosin-MT 目的基因在红花基因组中的整合情况进行了研究,为利用红花作为植物生物反应器生产药用重组蛋白奠定了一定的基础。

与微生物反应器相比,利用红花植物反应器生产 oleosin-MT 具有安全高效、成本低的特点,而且有助于大规模生产,降低 MT 市场价格^[19]。然而,利用转基因红花大规模生产 MT 将是一个很漫长的过程,有许多问题有待解决,如本研究获得的转 MT 基因红花中外源基因整合位置情况、基因的表达水平、转基因红花后代中外源基因的表达稳定性以及表达的 MT 蛋白的生物学活性等。本研究通过在药用植物红花中表达 MT 为进一步研究 MT 蛋白的结构和功能提供了实验基础,下一步实验将会用抗氧化活性试实方法继续研究该蛋白的具体功能。

本研究通过构建红花植物表达载体并转化红花,在基因水平及转录水平上验证了 MT 基因的表达,同时比较了野生型红花与转 MT 基因红花外观的差异,为进一步研究 MT 蛋白生物学功能奠定基础,进一步提高红花的利用价值及为利用其他植物生物反应器表达重组蛋白提供理论依据。

参考文献

- [1] 李晓伟, 鲁曼. 金属硫蛋白对铅中毒儿童临床干预观察研究 [J]. 中国儿童保健杂志, 2008, 16(4): 391-393.
- [2] Margoshes M, Vallee B. A cadmium protein of from kidney cortex [J]. *J Am Chem Soc*, 1957, 79: 4813-4814.
- [3] Dziegiel P, Jelen M, Muszcynska B, et al. Role of metallothionein expression in non small cell lung carcinomas [J]. *Rocz Akad Med Bialymst*, 2004, 49(Suppl 1): 43-45.
- [4] Kameo S, Nakai K, Kurokawa N, et al. Metal components analysis of metallothionein 2 III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP/MS [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 381(8): 1514-1519.
- [5] Binz P A, Kagi J H R. *Metallothionein: Molecular Evolution and Classification, in Metallothionein-IV* [M]. Klaassen CD: Basel Birkhäuser, 1999.
- [6] Lane B G, Kajioka R, Kennedy T D, et al. The wheat Ec protein is a zinc-containing metallothionein [J]. *Biochem Cell Biol*, 1987, 65: 1001-1005.
- [7] Margoshes M, Vallee B L. A cadmium protein from equine kidney cortex [J]. *J Am Chem Soc*, 1957, 79: 4813-4818.
- [8] An Z G, Li C J, Thoma R, et al. Expression of BjMT2, a metallothionein 2 from Brassica juncea, increases copper and cadmium tolerance in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana*, but inhibits root elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings [J]. *Exp Bot*, 2006, 57(14): 3575-3582.
- [9] Liu J M, Gang Y, An Z G, et al. BjMT2, a metallothionein type-2 from *Brassica juncea*, may effectively remove excess lead from erythrocytes and kidneys of rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2007, 23: 168-173.
- [10] 唐中华, 郭晓瑞, 张洋洋, 等. 拟南芥 MT2 过量表达提高抗旱性 [J]. 植物研究, 2005(25): 415-418.
- [11] 郑军恒, 李海洋, 茹刚, 等. 金属硫蛋白清除自由基功能的研究 [J]. 北京大学学报: 自然科学版, 1999, 35(4): 573-576.
- [12] 张保林, 卢景芬, 王文清, 等. 金属硫蛋白抗自由基损伤研究 [J]. 生物物理学报, 1992, 8(3): 539-544.
- [13] 官丽莉, 崔琪, 韩怡来, 等. 红花 bZIP20 转录因子基因的克隆、表达分析及植物表达载体构建 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1369-1374.
- [14] 王艳芳, 张玲, 张娜, 等. 红花单功能反馈抑制敏感型 CtAK1 基因克隆、序列分析及表达载体构建 [J]. 中草药, 2015, 46(24): 3740-3745.
- [15] 杨晶, 李天航, 李校堃, 等. 植物生物反应器的研究进展 [J]. 生物工程学报, 2009, 25(5): 650-654.
- [16] 付宏岐. 利用转基因烟草和红花表达成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2010.
- [17] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69-76.
- [18] 张博润, 蔡向荣, 怀文辉, 等. 金属硫蛋白的研究进展及应用前景 [J]. 微生物学通报, 1999, 26(5): 355-357.