

利用黄瓜做生物反应器表达人胰岛素的研究

孙学武^{1,2}, 袁定阳^{1,2}, 谭炎宁², 张磊³, 唐芬³, 孙志忠², 余东², 刘瑞芬², 段美娟^{1,2,3*} (1. 中南大学研究生院隆平分院, 湖南长沙 410125; 2. 湖南杂交水稻研究中心, 湖南长沙 410125; 3. 湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要 [目的] 研究利用黄瓜作为生物反应器时人胰岛素的表达情况。[方法] 通过农杆菌介导法将修饰过的人胰岛素基因 (*hINS*) 转入黄瓜, 构建表达人胰岛素的生物反应器, 再利用 PCR 和 RT-PCR 方法检测 *hINS* 的表达情况, 最后利用 NOD 小鼠饲喂试验检测表达蛋白的疗效。[结果] 研究成功构建了能够稳定表达人胰岛素的生物反应器, 目的蛋白表达量占其总可溶性蛋白含量的 0.042% ~ 0.190%; NOD 小鼠饲喂试验证实, 表达产物对 NOD 小鼠的糖尿病防治具有显著疗效。[结论] 该研究表明利用转基因植物作为生物反应器生产医用蛋白和药品具有理论可行性和巨大的利用价值。

关键词 黄瓜; 生物反应器; 人胰岛素; 基因工程

中图分类号 S642.2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)12-05201-03

Study on Expression of Human Insulin by Cucumber Bio-reactor

SUN Xue-wu et al (Graduate School of Central South University, Longping Branch, Changsha, Huan 410125)

Abstract [Objective] The paper was to study the expression of human insulin by using cucumber as bio-reactor. [Method] The modified human insulin gene (*hINS*) was transported into cucumber by *Agrobacterium* mediated method, and the bio-reactor which could express human insulin was constructed. The expression of *hINS* was detected by the PCR and RT-PCR methods, and the effect of the expressed protein was determined by NOD mice feeding experiments finally. [Result] The bio-reactor with stable expression of human insulin had been constructed successfully, and the expression protein content was 0.042% - 0.190% of the total soluble protein content; the NOD mice feeding experiments confirmed that, the expression product of cucumber bio-reactor had a significant effect for the prevention and treatment of diabetes. [Conclusion] The study showed using transgenic plants as bio-reactor to produce medical proteins and drugs had a great significance not only in theory but also in practice.

Key words Cucumber; Bio-reactor; Human insulin; Genetic engineering

目前我国已有超过 9 400 万的糖尿病 (Diabetes mellitus) 患者, 是世界上的糖尿病第一大国, 糖尿病防治形势十分严峻^[1]。糖尿病是一种常见的内分泌代谢疾病, 具有遗传易感性, 同时又易受环境因素的触发而发病。糖尿病的直接病因为胰岛素 (Insulin) 供应不足或靶细胞对胰岛素敏感性降低而引起的体内代谢失调, 表现为血糖升高和糖尿。胰岛素是目前治疗糖尿病历史最长且疗效最好的药物, 过半患者需长期服用^[2], 因此胰岛素市场需求极大。

临床应用的胰岛素最初主要从动物胰腺中提取, 需消耗大量动物胰脏, 且存在人畜共患病病原菌污染的风险^[3-4]。目前临床应用的胰岛素多为利用重组 DNA 技术等基因工程手段所制备的人胰岛素及其类似物, 主要采用大肠杆菌和酿酒酵母等工程菌发酵生产^[3,5-6]。利用这种手段生产人胰岛素也存在许多缺陷: ①工程菌发酵过程中需要复杂的生产设备; ②工程菌不能正确完成表达产物的翻译后加工; ③工程菌在生长与繁殖过程中易产生病原性菌以及内毒素污染。而利用转基因植物作为生物反应器生产人胰岛素, 可弥补原核与酵母表达系统的许多不足, 能够为人类提供大量安全、稳定、低成本的胰岛素产品。

基于植物表达系统生产人胰岛素的应用优势, 该研究通过基因工程手段将 *CaMV35S* 启动子驱动的人胰岛素基因 (*hINS*) 导入黄瓜, 并成功实现人胰岛素在转基因黄瓜中的稳定表达与合成。该研究为利用黄瓜生物反应器生产胰岛素

做出了初步探索, 为口服含胰岛素食物防治糖尿病进行了理论尝试。

1 材料与方法

1.1 材料 植物材料: 黄瓜品种为津研四号, 市购。菌株和质粒: 转化所用根癌农杆菌菌株为 LBA4404, 由实验室保存。转化质粒为含有筛选标记 NPTII 的 pBI121-hINS (图 1), 实验室保存; 目的基因为人工合成的人胰岛素基因 (包含 A 肽、B 肽、连接肽与信号肽编码序列)。试剂: 2 × PCR mix、逆转录试剂盒购自全式金公司; 抗生素购自 Sigma 公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司; 人胰岛素酶联试剂盒购自上海慧颖生物科技有限公司; 其他常规试剂均为国产分析纯。



图 1 植物表达载体 pBI121-hINS T-DNA 区

1.2 农杆菌介导的遗传转化及再生植株的获得 利用热激法将质粒 pBI121-hINS 转入根癌农杆菌 LBA4404, 挑取阳性单克隆于 LB 液体培养基中培养 24 h^[7]; 取 1 ml 菌液到 100 ml LB 液体培养基中, 培养至 A_{600} 为 0.5 左右, 收集菌体后用 MS 液体培养基清洗、重悬, 以备后用。

取籽粒饱满的黄瓜种子, 消毒后接种于 1/2MS 培养基上发芽、生苗, 幼苗生长 2~3 d 后切下靠近生长点的半片子叶, 预培养 2 d 后用作外植体^[8-9]。用重悬后的菌液侵染黄瓜子叶 30 min, 吸干菌液置于共培养基暗培养 3 d 后, 转入筛选培养基中, 每 15 d 继代一次。待继代外植体长出抗性芽后, 将其转至伸长培养基继续生长; 当抗性芽长至 2~3 cm 时, 自

作者简介 孙学武 (1987 -), 男, 山东微山人, 硕士研究生, 研究方向: 植物基因工程, E-mail: sdsinger@163.com。* 通讯作者, E-mail: duanmeijuan@163.com。

收稿日期 2013-04-02

抗性芽基部切下转到生根培养基诱导生根^[10-11];根系长出后炼苗2~3 d,移栽到网室中。

1.3 再生植株的分子生物学检测 PCR检测:用CTAB法小量提取叶片总DNA^[12],再用PCR方法检测目的基因*hINS*。所用引物为*hINS*-F:5'-CGG GAT CCA TGT TCG TTA ACC-3'和*hINS*-R:5'-TAG CGA GCT CTT AGT TGC AGT AG-3'。PCR反应体系为:2×PCR mix 10 μl, ddH₂O 8.4 μl, 上下游引物各0.3 μl, DNA模板1 μl。PCR反应程序为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s, 53℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 45个循环;72℃后延伸7 min;10℃保存。PCR产物经2.5%琼脂糖凝胶电泳,检测有无目的条带,预期扩增片段大小为177 bp。

RT-PCR检测:对目的基因检测为阳性的植株再次进行mRNA检测,分别于幼苗期、初花期取黄瓜叶片,结果期取黄瓜叶片与果实进行检测,3次生物学重复。利用Trizol法提取黄瓜叶片与果实总RNA^[13],逆转录合成第1链cDNA后^[14],再按上述PCR检测方法检测目的基因有无表达。

1.4 黄瓜叶片与果实中人胰岛素含量检测 蛋白质提取:于幼苗期、初花期取黄瓜叶片,结果期取黄瓜叶片与果实进行检测,3次生物学重复。用预冷的含0.2%二硫苏糖醇(DTT)和20%三氯乙酸(TCA)的丙酮溶液匀浆;-20℃提取过夜后,8 000 r/min,4℃离心1 h;弃上清,沉淀用含有0.2% DTT的丙酮溶液清洗2次;沉淀冷冻干燥后用裂解液(含9 mol/L尿素,0.065 mol/L DTT,0.65 mol/L CHAPS)充分溶解^[15]。

总蛋白浓度测定:按照碧云天Bradford蛋白浓度测定试剂盒中所述方法,测定样品总蛋白浓度。

人胰岛素含量检测:采用上海慧颖生物科技有限公司人胰岛素ELISA试剂盒,测定样品中人胰岛素含量。每样品3次技术重复,计算样品总蛋白中人胰岛素所占比例。

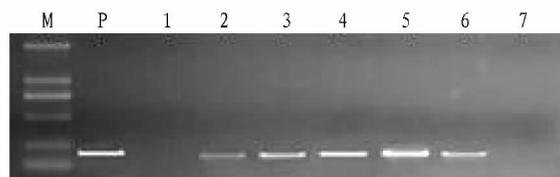
1.5 非肥胖型糖尿病(NOD)小鼠饲喂试验 NOD小鼠饲喂试验^[16-17]在湖南农业大学进行。将NOD小鼠随机分成2组,每组20只,一组饲喂含表达人胰岛素蛋白黄瓜叶片和果实的饲料,另一组饲喂含非转基因对照黄瓜叶片和果实的饲料。每周人胰岛素饲喂当量不超过5 mg,连续饲喂20周,每周检测并记录实验组和对照组NOD小鼠的糖尿病发病率。

2 结果与分析

2.1 转*hINS*基因黄瓜的获得及其分子生物学检测 采用根瘤农杆菌介导的叶盘法进行黄瓜的遗传转化,经过抗性芽诱导、抗性芽的卡那霉素筛选及诱导生根等过程,获得再生植株124株。

对获得的再生植株进行PCR检测,阳性质粒对照及部分再生植株均能扩增出177 bp的目的条带,阴性对照及非转基因对照无特异扩增条带(图2)。经3次重复PCR检测,有28株再生植株能检测出目的条带,PCR检测阳性率为22.6%。结果表明,筛选所选用的卡那霉素浓度适当,筛选压力较好,适合作为黄瓜抗性芽的筛选。

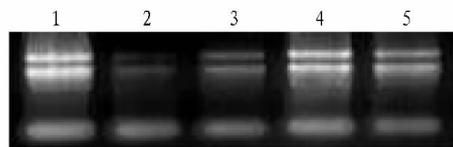
对PCR检测的阳性植株提取RNA后(图3)进行RT-



注:M. DL2000 Marker; P. 阳性对照(pBI121-hINS);1~6. 再生植株;7. 非转基因对照。

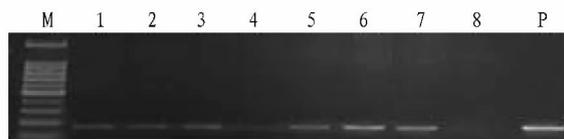
图2 转*hINS*基因再生植株的PCR鉴定

PCR检测,筛选*hINS*基因能够稳定表达的植株,发现28株PCR检测阳性植株中,有23株在3个发育时期均表现RT-PCR检测阳性(图4),说明*hINS*基因可在这23株黄瓜中稳定表达,可作为候选生物反应器。



注:1~4. 再生植株;5. 非转基因对照。

图3 RNA提取质量检测



注:M. 100 bp DNA Ladder;1~7. 再生植株;8. 非转基因对照;P. 阳性对照(pBI121-hINS)。

图4 转*hINS*基因植株RT-PCR检测

2.2 人胰岛素蛋白表达量分析 对*hINS*基因能够稳定表达的23株黄瓜进行人胰岛素ELISA检测,发现23株均能检测出人胰岛素蛋白的表达。结合总蛋白浓度测定结果,计算人胰岛素在总蛋白中的相对含量,结果显示,人胰岛素在总蛋白中的相对含量较低,比值为0.042%~0.190%;不同检测部位中人胰岛素含量有显著差异,整体表现为结果期果实中人胰岛素含量比叶片高20%~60%。在23个黄瓜单株中,第14号单株叶片与果实中人胰岛素相对表达量均为最高,其中叶片中为0.077%,果实中为0.190%。因此确定第14号单株及其后代可作为生物反应器,用于人胰岛素的生产。

2.3 NOD小鼠饲喂试验 对NOD小鼠连续饲喂20周后,实验组有15只存活,对照组有6只存活;实验组NOD小鼠糖尿病发病率为25%,对照组发病率为70%。这表明,长期饲喂含人胰岛素的黄瓜叶片与果实的饲料,可显著降低NOD小鼠的糖尿病发病率,也证明用转*hINS*基因黄瓜做生物反应器生产人胰岛素,具有理论可行性。

3 结论与讨论

该研究采用根瘤农杆菌介导的叶盘转化法,将人工修饰过的人胰岛素原基因*hINS*转入黄瓜,并实现了目的基因的稳定遗传与表达。人胰岛素ELISA检测结果显示,人胰岛素表达相对较低,仅占总可溶性蛋白的0.042%~0.190%。

NOD 小鼠饲喂试验证明,口服含人胰岛素食品、药品具有治疗糖尿病的理论可行性。

该研究所用的人胰岛素基因,为选用植物偏好密码子人工合成,在其编码区 5'端添加了内质网信号肽 KDEL 编码序列,以编码 β 转角的六氨基酸编码序列替换了 C 肽编码序列。虽然人胰岛素最高表达量比前人研究已有所提高^[18],但最高表达量尚不及总可溶性蛋白的 0.2%。如何解决大部分外源基因在植物体内表达不高的问题,依然是目前所面临的最主要任务之一。

注射给药目前是胰岛素最常用的给药方式^[19],但长期注射易造成局部皮下脂肪萎缩或纤维化增生、皮肤局部过敏疼痛、低血糖等副作用。口服给药则可避免注射给药带来的副作用,一直被认为是最方便、最易被患者接受的给药方式。目前口服胰岛素成为糖尿病治疗的热点之一,已有试验表明:口服胰岛素制品可预防并延迟 I 型糖尿病的发生,对 II 型糖尿病也有一定的疗效^[20-23]。该研究中对 NOD 小鼠饲喂含人胰岛素的食物,显著降低了 NOD 小鼠的糖尿病发病率。据此可将表达人胰岛素的黄瓜做成口服食品,用于防治一些胰岛素依赖的糖尿病。

参考文献

- [1] 陆菊明. 糖尿病研究现状及展望[J]. 解放军医学杂志,2010(7):777-780.
- [2] 姚立群,张敏,林朝芹,等. 糖尿病连续性护理的研究进展[J]. 中华护理杂志,2012(6):568-570.
- [3] 曹月青,周玲,韩柱,等. 人胰岛素基因在体内外表达的研究[J]. 遗传,2002(4):407-409.
- [4] 张友尚. 胰岛素生产的回顾与展望[J]. 食品与药品,2008(1):1-3.
- [5] 郝贺龙,黄志伟,张兴群,等. 人胰岛素 B27K-DT1I 前体在毕赤酵母中发酵条件的优化[J]. 药物生物技术,2011(6):509-513.
- [6] 史莹飞,敬科举,凌雪萍,等. 人胰岛素原密码子的优化及其在毕赤酵

- 母中的表达[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2012(1):101-106.
- [7] 王关林,方宏鸽. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [8] 薛丹丹,张凤生,王保菊,等. 黄瓜再生体系的建立[J]. 北方园艺,2010(7):119-121.
- [9] 冯嘉明,邹志荣,秦盛华,等. 黄瓜子叶节高频再生体系建立及再生植株倍性观察[J]. 西北植物学报,2008(5):956-962.
- [10] 王辉,顾兴芳,张圣平,等. 疏氨酸对农杆菌介导的黄瓜子叶节遗传转化的影响[J]. 华北农学报,2012(S1):51-56.
- [11] 刘文萍,卢淑雯,刘建新,等. 农杆菌介导的 BnCS 基因对黄瓜遗传转化研究[J]. 北方园艺,2009(1):20-22.
- [12] 宋晓飞,李晓丽,冯志红,等. 黄瓜基因组 DNA 提取及 AFLP 体系优化研究[J]. 安徽农业科学,2009(29):14035-14037.
- [13] 姜群峰,王彪,李为观,等. 一种适于黄瓜不同组织总 RNA 提取的方法[J]. 江苏农业科学,2007(6):108-110.
- [14] 丁国华,许春梅,于虹,等. 黄瓜 RGA 基因的半定量 RT-PCR 表达分析[J]. 西北植物学报,2010(4):659-664.
- [15] 陈晶瑜,郭宝峰,何付丽,等. 适合双向电泳的植物全蛋白提取方法比较[J]. 中国农学通报,2010(23):97-100.
- [16] GREWAL I S, FLAVELL R A. New insights into insulin dependent diabetes mellitus from studies with transgenic mouse models[J]. Lab Invest, 1997,76(1):3-10.
- [17] YAMAMURA K, MIYAZAKI T, UNO M, et al. Transgenic Mouse as a Tool for the Study of Autoimmune Disease: Insulin-dependent Diabetes Mellitus[J]. Int J Immunopharmacol, 1992,14(3):451-455.
- [18] ARAKAWA T, YU J, CHONG D K X, et al. A Plant-based Cholera Toxin B Subunit-insulin Fusion Protein Protects Against the Development of Autoimmune Diabetes[J]. Nat Biotechnol, 1998,16(10):934-938.
- [19] 安红莲,许春华. 胰岛素不同的给药途径与护理[J]. 实用护理杂志,2002(9):48.
- [20] 石海涛,张志荣,龚涛,等. 胰岛素口服缓释给药系统的制备[J]. 华西药理学杂志,2005(2):101-104.
- [21] 薛伟明,刘袖洞,雄鹰,等. 胰岛素口服给药[J]. 科学通报,2002(14):1044-1049.
- [22] 孙爽,吕邵廷,王锐,等. 胰岛素非注射给药及与中药联合应用新进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011(13):266-269.
- [23] 李松,张华,王学清,等. 一种胰岛素口服纳米骨架给药系统的体内外初步研究[J]. 中国药理学杂志,2011(19):1496-1500.

(上接第 5195 页)

- [8] CHEN Q, WU K H, ZHANG Y N, et al. Physiological and molecular responses of broad bean (*Vicia faba* L.) to aluminum stress[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2012,34(6):2251-2263.
- [9] WU K H, XIAO S Q, CHEN Q, et al. Changes in the Activity and Transcription of Antioxidant Enzymes in Response to Al Stress in Black Soybeans[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013,31:141-150.
- [10] UCHIDA A, JAGENDORF A T, HIBINO T, et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice[J]. Plant Science, 2002,163:515-523.
- [11] SASAKI T, YAMAMOTO Y, EZAKI B, et al. A wheat gene encoding all aluminum activated malate transporter[J]. Plant J, 2004,37(5):645-653.
- [12] ROY A K, SHARMA A. A time-course study on effects of aluminum on mitotic cell division in *Aluminum sativum*[J]. Mutation Research, 1989, 227:221-226.
- [13] ACHKOR H, DIAZ M, FERNÁNDEZ M R, et al. Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2003,132(4):2248-2255.
- [14] LI R, MOORE M, BONHAM-SMITH P C, et al. Overexpression of formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* resulted in plants tolerant to high concentrations of formate[J]. Journal of Plant Physiol, 2002,159:1069-

- 1076.
- [15] NADALI I, PAKNEJAD E, MORADI F, et al. Effects of Methanol on Sugar Beet (*Beta vulgaris*) [J]. Aust J Crop Sci, 2010,4(6):398-401.
- [16] PAKNEJAD F, MIRAKHORI M, JAMI AL-AHMADI M, et al. Physiological response of soybean to foliar application of methanol under different moistures[J]. Am J Agric Bio Sci, 2009,4(4):311-318.
- [17] MIRAKHORI M, PAKNEJAD F, VAZAN S. Effect of drought stress and methanol on yield and yield components of soybean Max [J]. Am J Biochem Biotechnol, 2009,5(4):162-169.
- [18] MAKHDUM M L, MALIK M N A, AHMAD F, et al. Physiological response of cotton to methanol foliar application[J]. Res Sci, 2002,13:37-43.
- [19] 胡可, 韩科厅, 戴思兰. 环境因子调控植物花青素苷合成及呈色的机理[J]. 植物学报, 2010,45(3):307-317.
- [20] LI Y, LU X D, SHEN S D, et al. Study on Involvement of the GTPase RAB1b in Embryonic Development of *Arabidopsis thaliana* [J]. Agricultural Science & Technology, 2011,12(12):1795-1798,1953.
- [21] 胡京蕊, 沈金宝, 李晶岚, 等. 拟南芥耐盐相关基因 AtSTK 原核表达载体的构建及表达[J]. 华北农学报, 2013(2):38-41.
- [22] 方雪飞. 脂肪酸不饱和度的增加对转基因拟南芥植株生理及抗盐抗低温的影响[D]. 泰安:山东农业大学, 2009.