

# 人 $\beta$ 淀粉样蛋白基因植物表达载体的构建及转化

贺建华, 李文利, 魏立君, 夏秀英

(大连理工大学 环境与生命学院, 辽宁 大连 116024)

**摘要:**人 $\beta$ 淀粉样蛋白(Amyloid $\beta$  peptide,  $A\beta$ )是治疗阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD)的关键靶标之一。本试验利用重叠 PCR 技术获得 2 $A\beta$  串联基因片段, 并将其克隆到植物表达载体 pBIDST(含双 35S 启动子和 TEV 增强子)中。用根癌农杆菌 EHA105 介导转化烟草, 筛选获得了卡那霉素抗性植株。PCR 和 RT-PCR 检测结果证实 2 $A\beta$  基因已经整合进烟草基因组中并进行了转录。

**关键词:** $\beta$  淀粉样蛋白; 植物表达载体; 转基因烟草

中图分类号: Q782 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2009)增刊-0023-04

## Construction of Plant Expression Vector of Human $A\beta$ Gene and Its Transformation

HE Jian-hua, LI Wen-li, WEI Li-jun, XIA Xiu-ying

(School of Environmental and Biological Science and Technology,  
Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

**Abstract:** Human amyloid $\beta$  peptide ( $A\beta$ ) is one of the key targets in treatment of Alzheimer's disease. The two tandem fragment of  $A\beta$  obtaining by overlap PCR technique was cloned into plant expression vector pBIDST (containing double 35S promoter and TEV enhancer). The 2 $A\beta$  gene was introduced into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens* EHA105. Then the kanamycin resistant tobaccos were obtained. The results of PCR and RT-PCR indicated that the 2 $A\beta$  gene was integrated into the genome of tobacco and transcribed.

**Key words:** Amyloid  $\beta$  Peptide; Plant expression vector; Transgenic tobacco

阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease, AD), 又称老年痴呆症, 是一种以认知功能下降为特征的渐进性神经退行性疾病。目前全球拥有 2 000 多万名 AD 患者, 使 AD 成为最为普遍的神经退行性疾病<sup>[1]</sup>。近 20 年的病理研究表明,  $\beta$  淀粉样蛋白(Amyloid  $\beta$  peptide,  $A\beta$ )是 AD 发病机理中最重要的一个因素<sup>[2]</sup>。 $A\beta$  是由 39~43 个氨基酸残基组成的疏水肽, 分子量约为 4 24 kDa, 具有一个  $\beta$  片层的二级结构。过量  $A\beta$  的产生和聚集在大脑皮层上形成淀粉斑块, 是 AD 重要的病理学特征。而以  $A\beta$  为靶标的治疗药物的研究也已经成为目前 AD 研究的热点。Schenk<sup>[3]</sup>和 Bard 等<sup>[4]</sup>研究表明, 用  $A\beta$  直接免疫 AD 转基因鼠时能够诱发明显的抗体反应, 同时减少鼠脑内  $A\beta$  的沉积。虽然  $A\beta$  疫苗药物在临床试验中曾因部分病人出现严重的脑内炎症反应而被中止<sup>[5]</sup>, 但它仍是治愈 AD 药物最有价

值和前途的研究方向之一。

目前国内外研究 AD 主动免疫所用的免疫原大多采用直接化学合成  $A\beta$  全长或部分片段。人工合成  $A\beta$  需要昂贵的技术设备, 而且有报道称转基因模型鼠对合成的  $A\beta$  多肽的免疫反应较弱<sup>[6]</sup>。利用转基因植物生产药用蛋白成本低廉, 易于工业化生产, 而且可以保持它的免疫活性。迄今为止, 已有多 种药用蛋白在植物中表达成功, 其中包括乙肝表面抗原<sup>[7]</sup>、麻疹病毒红血球凝集素<sup>[8]</sup>、霍乱毒素(CTB)<sup>[9]</sup>等。Hyun-Soon Kim 等<sup>[10, 11]</sup>利用马铃薯表达了外源  $A\beta$  基因, 而国内还未进行  $A\beta$  基因植物表达体系的研究。本试验构建了  $A\beta$  串联基因的植物表达载体, 利用农杆菌介导的叶盘法将  $A\beta$  基因转入烟草中, 获得转基因植株, 为利用植物反应器生产  $A\beta$  提供技术支持, 并为进一步开发  $A\beta$  口服疫苗奠

收稿日期: 2009-02-05

作者简介: 贺建华(1981-), 女, 河北保定人, 在读硕士, 主要从事植物转基因研究。

通讯作者: 夏秀英(1972-), 女, 黑龙江庆安人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事植物基因工程研究。

定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 含人类  $A\beta$  基因序列的质粒 pGEX-2T/ $A\beta$  由本实验室提供。pMD18-T simple vector 购自宝生物工程(大连)有限公司。载体 pBIDST 由笔者试验前期构建。大肠杆菌 Top10, 根癌农杆菌 EHA105 均由本实验室保存。

1.1.2 植物材料 烟草组培苗由本实验室培养保存。

1.1.3 试剂 限制性内切酶 *Xba* I、*Sac* I 和 *Hind* III Ex Taq 聚合酶, T4 DNA 连接酶, M-MLV 逆转录酶均购自宝生物工程(大连)有限公司; Trizol 购自 Invitrogen 公司; 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、 $\alpha$ -萘乙酸(NAA)和卡那霉素(Kan)均购自 Sigma 公司, 头孢噻肟钠(Cef)等其他试剂均为分析纯。

1.1.4 培养基 共培养培养基: MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA; 筛选培养基: MS+0.5 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+50 mg/L Kan+250 mg/L Cef; 生根培养基: MS+50 mg/L Kan+250 mg/L Cef。

### 1.2 方法

1.2.1 植物表达载体 pBIDST- $A\beta$  的构建 利用重叠 PCR 方法获得  $A\beta$  串联基因。根据人类  $A\beta$  基因序列, 分别设计了 2 对引物 F1、R1 和 F2、R2。其中引物 F1 中引入了 *Xba* I 酶切位点, 引物 R1 引入了 *Sac* I 酶切位点; 为了获得  $A\beta$  串联基因片段, 在 F2 的 5' 端加入了  $A\beta$  基因 3' 端的 14 个碱基, R2 的 5' 端加入了  $A\beta$  基因 5' 端的 14 个互补碱基。引物序列如下:

F1: 5'-GCTCTAGAATGGAATGAGAATTCGAC-3'

R1: 5'-CGAGCTCTACGCTAATGACAACACCG-3'

F2: 5'-GTTTGTCTATAGCGAATGAGAATTCG-3'

R2: 5'-CGGAATTCATGCAATCGCTAATGACAACAC-3'

引物由大连宝生物工程有限公司合成。

以质粒 pGEX-2T/ $A\beta$  为模板, 以 F2、R2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 37℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 5 个循环; 94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 25 个循环; 72℃延伸 10 min。获得不同数目  $A\beta$  基因串联的片段, 回收其中 2 个以上基因串联的产物, 并以其为模板, 以 F1、R1 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应条件: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 50℃延伸退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。回收目的片段, 与 pMD18-T 载体连接, 转化

大肠杆菌 Top10, 将获得的阳性克隆进行测序分析。

用 *Xba* I / *Sac* I 双酶切测序正确的克隆载体 pMD18-T/ $A\beta$  及植物表达载体 pBIDST, 将  $A\beta$  基因片段与载体大片段用 T4 DNA 连接酶 16℃连接过夜, 转化大肠杆菌 Top10, 用 PCR 和酶切方法筛选出阳性克隆, 将含目的基因的植物表达载体 pBIDST- $A\beta$  通过冻融法转化到根癌农杆菌 EHA105 中。

1.2.2 烟草的转化及筛选培养 采用农杆菌介导的叶盘法转化烟草<sup>[12]</sup>。取培养 20 d 左右的烟草无菌苗, 将叶片剪成 1 cm×1 cm 小块, 用 OD<sub>600</sub> 值达 0.5 的农杆菌菌液浸染 5 min, 取出叶片, 置于无菌滤纸上吸干菌液, 放在共培养培养基上, 28℃暗培养 2 d 后转至筛选培养基上, 待抗性芽长至 1~2 cm 时, 将其转入生根培养基中生根, 获得抗性植株。

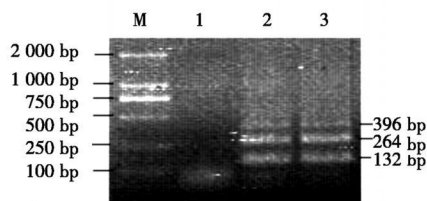
1.2.3 转基因植株的 PCR 检测 按照 CTAB 法提取抗性烟草和对照烟草的总 DNA, 利用引物 F1 和 R1 进行 PCR 鉴定。PCR 反应条件: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 50℃退火 30 s, 72℃延伸 1 min, 30 个循环; 72℃延伸 10 min。

1.2.4 转基因植株的 RT-PCR 检测 利用 Trizol 试剂提取 PCR 检测呈阳性的转基因烟草和对照烟草的总 RNA, 以 R1 为引物进行反转录, 合成 cDNA。取 2  $\mu$ L cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 引物及反应条件同 1.2.3。

## 2 结果与分析

### 2.1 2 $A\beta$ 串联基因的获得

以质粒 pGEX-2T/ $A\beta$  为模板, 以 F2 和 R2 为引物进行 PCR 扩增, 获得了 2 个  $A\beta$  (264 bp) 和 3 个  $A\beta$  (396 bp) 基因串联的目的片段(图 1)。



M. D2000 Marker; 1. 阴性对照; 2, 3. 质粒 pGEX-2T/ $A\beta$ 。

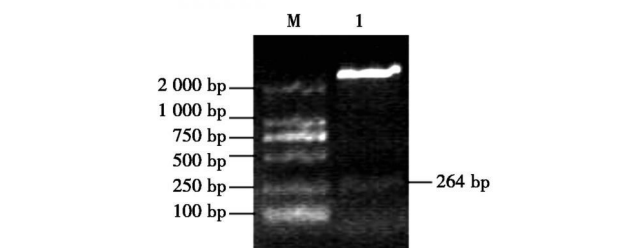
M. D2000 Marker; 1. Negative control; 2, 3. pGEX-2T/ $A\beta$ 。

图 1 F2 和 R2 为引物 PCR 电泳图

Fig. 1 Agrose gel electrophoresis of PCR with primers F2 and R2

对其进行切胶回收, 以 F1 和 R1 为引物进行 PCR 扩增, 在目的片段两端加入 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点。回收 264 bp 的目的条带, 与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 Top10。提取抗性菌落质粒, 利用 *Xba* I / *Sac* I 进行双酶切鉴定, 结果表明, 目的片段已连接到载体上(图 2)。测序结果也表明, 目的

基因与已知的人类  $A\beta$  基因序列完全一致, 基因两侧也引入了正确的酶切位点。

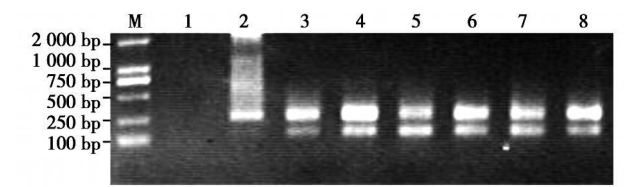


M. D2000 Marker; 1. 质粒  $Xba$  I/  $Sac$  I 双酶切。  
M. D2000 Marker; 1. pMD18-T/ $A\beta$  digested by  $Xba$  I/  $Sac$  I.

图2 质粒 pMD18-T/ $A\beta$  酶切鉴定  
Fig. 2 Restriction enzyme digestion identification of pMD18-T/ $A\beta$

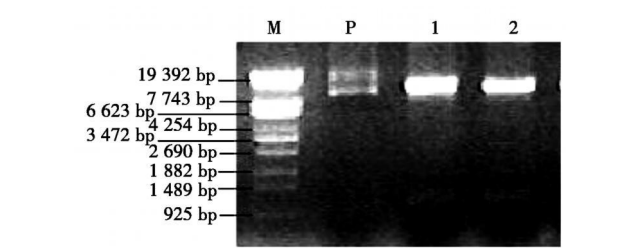
### 2.2 植物表达载体 pBIDST- $A\beta$ 的构建及鉴定

按 1. 2. 1 所述方法将  $2A\beta$  基因片段与载体 pBIDST 连接, 构建植物表达载体 pBIDST- $A\beta$ 。以 F1、R1 为引物进行 PCR 检测, 结果表明, 重组质粒 pBIDST- $A\beta$  能够扩增出 264 bp 大小的条带(图 3)。而且用  $Hind$  III/  $Sac$  I 双酶切抗性质粒, 也可获得含双 35S 启动子和  $2A\beta$  基因的大小约 1.1 kb 的条带(图 4), 证明目的基因已经插入载体 pBIDST 中, 植物表达载体 pBIDST- $A\beta$  构建成功(图 5)。



M. D2000 Marker; 1. 阴性对照;  
2. 阳性对照(质粒 pMD18-T/ $A\beta$ ); 3~8. pBIDST- $A\beta$ 。  
M. D2000 Marker; 1. Negative control; 2. Positive control (pMD18-T/ $A\beta$ ); 3~8. pBIDST- $A\beta$ 。

图3 重组质粒 pBIDST- $A\beta$  PCR 鉴定  
Fig. 3 PCR identification of recombinant pBIDST- $A\beta$



M.  $\lambda$ -EcoT14 Marker; P. 质粒 pBIDST- $A\beta$ ;  
1, 2. 质粒 pBIDST- $A\beta$  双酶切。  
M.  $\lambda$ -EcoT14 Marker; P. pBIDST- $A\beta$ ;  
1, 2. pBIDST- $A\beta$  digested by  $Hind$  III/  $Sac$  I。

图4 重组质粒 pBIDST- $A\beta$  双酶切鉴定  
Fig. 4 Restriction enzyme digestion identification of recombinant pBIDST- $A\beta$

### 2.3 烟草转化及抗性植株的 PCR 检测

用携带表达载体 pBIDST- $A\beta$  的根癌农杆菌 EHA105 转化烟草, 浸染的叶片在筛选培养基上培养

20 d 后可分化出大量抗性芽, 经过连续 3 代卡那霉素筛选, 最终获得了 20 株抗性植株。以 F1、R1 为引物对抗性植株进行 PCR 检测, 结果其中 18 株扩增出 264 bp 的目的条带, 而对照烟草没有扩增出任何条带, 初步证明  $2A\beta$  基因已经整合到烟草基因组中。检测结果如图 6 所示。

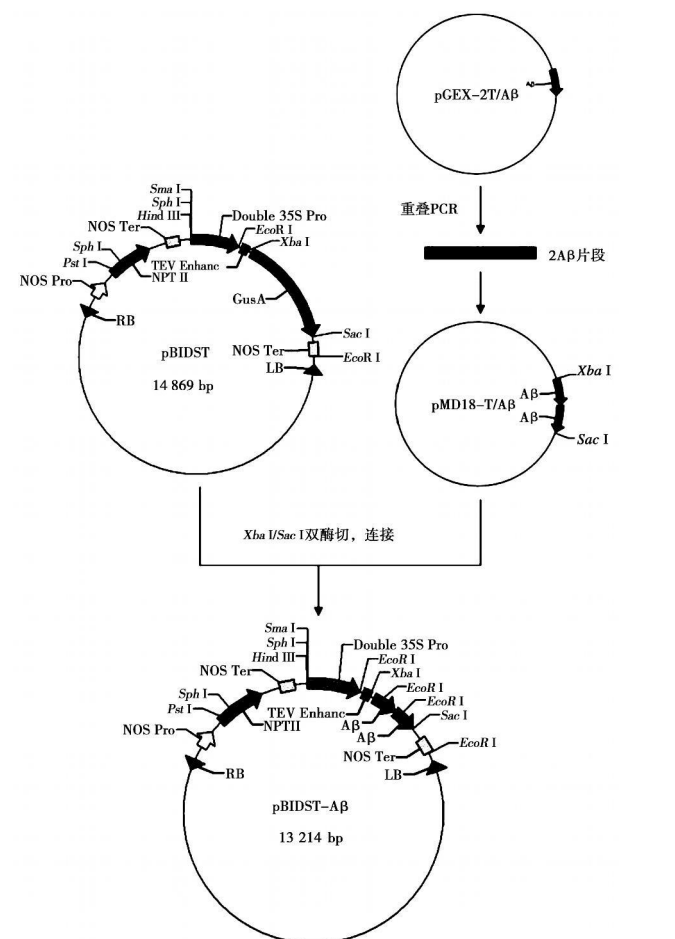
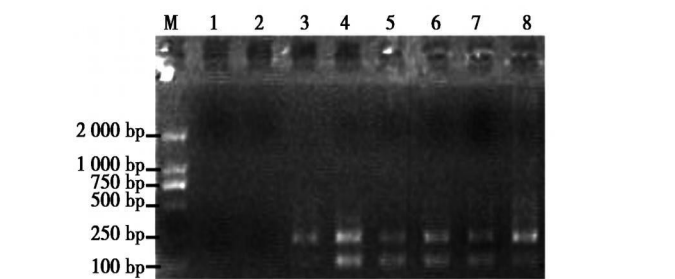


图5 植物表达载体 pBIDST- $A\beta$  构建示意图  
Fig. 5 The schematic diagram of plant expression vector pBIDST- $A\beta$  construction



M. D2000 Marker; 1. 阴性对照( $H_2O$ ); 2. 阴性对照(未转化植株);  
3. 质粒 pMD18-T/ $A\beta$ ; 4~8. 转基因植株。  
M. D2000 Marker; 1. Negative control( $H_2O$ ); 2. Negative control (non-transformed tobacco); 3. pMD18-T/ $A\beta$ ; 4~8. Transformed plants

图6 转基因烟草 PCR 检测  
Fig. 6 PCR identification of transgenic tobacco

### 2.4 转基因烟草的 RT-PCR 检测

提取转基因烟草和对照烟草总 RNA, 以 F1、R1

为引物进行 RT-PCR。转基因烟草扩增出了与目的片段大小一致的条带(图 7),对照烟草未扩增出相应条带,证明  $2A\beta$  基因不仅整合到烟草基因组中,并进行了转录。

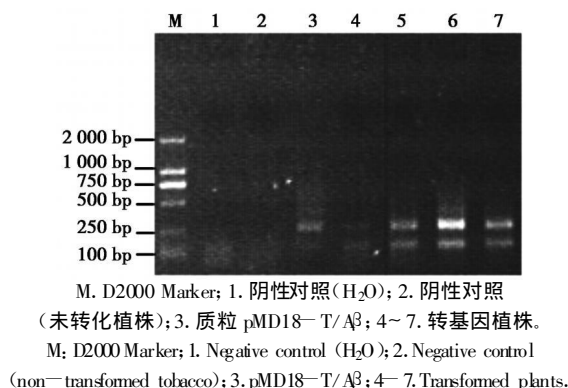


图 7 转基因烟草 RT-PCR 检测

Fig. 7 RT-PCR identification of transgenic tobacco

### 3 讨论

利用植物作为反应器生产药用蛋白,具有生产成本低、简单、高效、安全等诸多优点,是植物基因工程的一个新兴研究领域。而外源蛋白在受体植物中的表达量低是制约其真正产业化的一个重要因素。目前,常采用改造启动子、添加增强子、改造目的基因、消除位置效应等方法提高外源基因在植物中的表达量<sup>[13]</sup>。花椰菜病毒的 35S 启动子是一种重要的强启动子,将 35S 启动子的一些元件重复串联,可以大大提高报告基因表达量<sup>[14]</sup>。本实验室前期构建了载体 pBIDST,该载体经 pBI121 改造而成,使用双 35S 启动子代替 35S 驱动目的基因表达,并在启动子后引入了具有增强翻译功能的 TEV5' 非编码区。本试验前期工作证明,该载体能够显著提高 *gus* 基因表达量。因此,本试验将  $A\beta$  基因构建在载体 pBIDST 上,以期提高  $A\beta$  基因的表达。

为了增强  $A\beta$  的抗原性,本试验使用了重叠 PCR 技术以期获得多个  $A\beta$  基因串联的片段。根据重叠 PCR 技术原理设计引物,扩增获得多个  $A\beta$  基因相连的条带。这种方法不需要限制内切酶消化和连接酶处理,因此可以更快的获得所需的基因片段。但由于本试验中串联的基因是同一个,利用序列互补的引物 F2 和 R2 进行扩增,这大大降低了 PCR 反应的特异性,给 PCR 扩增带来了困难。经过多次试验,最终扩增出了 2 个和 3 个  $A\beta$  基因串联的条带。为加入合适的酶切位点而进行第二次扩增时,我们只得到了  $2A\beta$  串联的片段。所以本实验最终选择了  $2A\beta$  基因片段进行载体构建及转化研究。

选择烟草作为受体植物,是因为它具有转化简

单、生长周期短、生物产量高等优点。本试验已经获得转基因烟草,通过 PCR 和 RT-PCR 检测证明  $A\beta$  基因已经整合到烟草基因组中并进行了转录,其蛋白表达情况正在进一步试验中。但烟草只能作为“反应器”大量生产  $A\beta$ ,而不能直接食用达到免疫的效果。随着植物转基因技术的发展,多种口味鲜美的水果和蔬菜成为了受体植物,如草莓、番木瓜、西红柿和胡萝卜等。在以后的试验中我们将考虑选择可以直接生食的植物作为受体,为开发  $A\beta$  口服疫苗奠定基础。

### 参考文献:

- [1] Michel Goedert. A century of Alzheimer's disease [J]. Science, 2006, 314: 777-781.
- [2] Mark A. Finkbein. The role of amyloid  $\beta$  peptide 42 in Alzheimer's disease [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2007, 116: 266-286.
- [3] Schenk D, Barbour R, Dunn W, et al. Immunization with amyloid- $\beta$  attenuates Alzheimer's disease-like pathology in the PDAPP mouse [J]. Nature, 1999, 400: 173-177.
- [4] Bard F, Cannon C, Barbour R, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid beta peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease [J]. NatMed, 2000, 6: 916-920.
- [5] Schenk E. Nerve inflammation halts trial for Alzheimer's drug [J]. Nature, 2002, 415: 462.
- [6] Alon M, Ruth M, Victor Z, et al. Immune hyporesponsiveness to amyloid  $\beta$  peptide in amyloid precursor protein transgenic mice: implications for the pathogenesis and treatment of Alzheimer's disease [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98 (18): 10273-10278.
- [7] Mason HS, Lam DMK, Amtzen CJ, et al. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 11745-11749.
- [8] D. E. Webster, M. C. Thomas Z Huang, et al. The development of a plant-based vaccine for measles [J]. Vaccine, 2005, 23: 1859-1865.
- [9] Henry Daniel L. Expression of the nNative cholera toxin B subunit gene and assembly as functional oligomers in transgenic tobacco chloroplasts [J]. J Mol Biol, 2001, 311: 1001-1009.
- [10] Kim H S, Euy M J W. Expression of human amyloid- $\beta$  peptide in transgenic potato [J]. Plant Sci, 2003, 165: 1445-1451.
- [11] Jung Won Youm, Hee Kim, Jee Hye Lo Han, et al. Transgenic potato expressing  $A\beta$  reduce  $A\beta$  burden in Alzheimer's disease mouse model [J]. FEBS Letters, 2005, 579: 6737-6744.
- [12] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第 2 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002, 795-798.
- [13] 秦宏伟. 转基因植物生物反应器中存在的问题及解决途径 [J]. 生命的化学, 2007, 27(2): 156-158.
- [14] 郝林, 曹军. CaMV35S 双启动子显著提高转基因在拟南芥中表达水平的研究 [J]. 植物生理学报, 2000, 36(6): 517-519.