

## 重组马铃薯 X 病毒注射番茄果实高效表达胸腺素 $\alpha 1$

牛颜冰<sup>1</sup>, 史正文<sup>1</sup>, 王德富<sup>1</sup>, 姚敏<sup>1</sup>, 乔木<sup>1</sup>, 郭平毅<sup>2</sup>

1 山西农业大学生命科学学院, 太谷 030801

2 山西农业大学农学院, 太谷 030801

**摘要:** 植物病毒载体表达外源蛋白表达水平高、表达速度快、宿主范围广。本研究用马铃薯 X 病毒(PVX)载体在番茄果实中表达胸腺素 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$ ), 是一种快速高效生产医用蛋白的新方法。将 pGEM-T-Easy-T $\alpha 1$  质粒酶切, 获得大约 100 bp 大小的 T $\alpha 1$  基因片段, 并将该片段与 PVX 载体(pGR-107)连接, 用 *Sal* I 和 *Cla* I 酶切鉴定, 筛选出阳性重组体。进一步将重组质粒转化根癌农杆菌 GV3101, 用农杆菌注射法(Agroinjection)侵染不同生长阶段的番茄果实, 用 ELISA 检测外源蛋白 T $\alpha 1$  的表达水平。结果表明已成功构建了 pGR107-T $\alpha 1$  表达载体, 在农杆菌的菌液密度(*OD*<sub>600</sub> 值)为 1.0、番茄植株开花后 2 周半到 3 周时侵染番茄果实, T $\alpha 1$  的表达量最大。

**关键词:** 番茄, 果实, 胸腺素 $\alpha 1$  基因, 马铃薯 X 病毒(PVX)表达载体

## High expression of thymosin alpha 1 by injecting recombinant PVX vector into the tomato fruit

Yanbing Niu<sup>1</sup>, Zhengwen Shi<sup>1</sup>, Defu Wang<sup>1</sup>, Min Yao<sup>1</sup>, Mu Qiao<sup>1</sup>, and Pingyi Guo<sup>2</sup>

1 College of Life Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

2 College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China

**Abstract:** For expression of foreign genes in plant, plant virus vector provides many advantages, such as high expression level, short expression period and wider plant hosts. In the present study, we report the expression of thymosin alpha 1 (T $\alpha 1$ ) in tomato fruits by potato virus X (PVX) vector. T $\alpha 1$  gene fragment from plasmid pGEM-T containing T $\alpha 1$  gene was cloned into plant virus vector pGR107 and the resulting pGR107-T $\alpha 1$  plasmid was confirmed by digestion with *Sal* I and *Cla* I. To express the T $\alpha 1$  protein, *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 transformed with pGR107-T $\alpha 1$  was directly injected into tomato fruits through the fruit stylar apex at different developmental stages. The ELISA results showed that T $\alpha 1$  protein was expressed successfully in fruits, and the highest expression level was obtained from 2.5–3 week-old tomato fruits inoculated by bacterium at 1.0 *OD*<sub>600</sub> density.

**Keywords:** tomato, fruit, thymosin alpha 1(T $\alpha 1$ ) gene, potato virus X vector

胸腺素 $\alpha 1$ (T $\alpha 1$ )能促进淋巴 T 细胞分化、成熟以及增强机体的免疫力, 常用于治疗乙肝、艾滋病和恶性肿瘤等<sup>[1-4]</sup>。临床上应用的 T $\alpha 1$  粉针剂主要由化学法合成, 生产效率低下、价格昂贵<sup>[5,6]</sup>。植物病毒

载体系统在植物中表达外源蛋白, 表达水平高、表达速度快。Obrien 等<sup>[7]</sup>将含有重组马铃薯病毒载体的农杆菌浸润烟草叶片, 在烟草中表达了儿童病毒性胃肠炎疫苗 VP6; Orzaez 等<sup>[8]</sup>将含有植物病毒表达

**Received:** July 24, 2008; **Accepted:** January 15, 2009

**Supported by:** Shanxi Province Key Technologies Research and Development Program (No. 2006031098), National Natural Science Foundation of China (No. 30571216).

**Corresponding author:** Pingyi Guo. Tel: +86-354-6287191-219; E-mail: niuniugood@yahoo.com.cn

山西省科技攻关项目(No. 2006031098), 国家自然科学基金(No. 30571216)资助。

载体的农杆菌通过花柱顶点注射一定生长阶段的番茄果实,在番茄果实中表达了重组的免疫球蛋白 A(IgA),但未提及表达量最高时的菌液密度和果龄;而周晓馥等<sup>[9]</sup>用马铃薯 X 病毒载体浸润烟草叶片诱导烟草 *rbcS* 基因沉默的研究表明,农杆菌菌液密度 ( $OD_{600}$  值)和受体植株的苗龄是影响瞬时表达效果的 2 个重要因素。基于农杆菌浸润法(Agroinfiltration)是通过侵染受体植株的叶片,使外源蛋白在整株植物中系统表达;农杆菌果实注射法(Agroinjection)是通过注射不同生长阶段的果实,使外源蛋白在果实中局部高效表达<sup>[10]</sup>。据此,本试验采用不同农杆菌菌液密度来直接侵染不同生长阶段的番茄果实,完善 Orzaez 等所创建的方法,进而建立外源蛋白在番茄果实中高效表达的农杆菌直接注射番茄果实的优化体系,开辟临床上应用的  $T\alpha 1$  粉针剂生产的新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 番茄材料

早丰,购自山西农业大学科技市场。

#### 1.1.2 菌种和质粒

质粒 pGR-107、根癌农杆菌菌株 GV3101 由英国 Sainsbury 实验室 Baulcomb 教授惠赠;含胸腺素  $\alpha 1$  基因片段的 pGEM-T-Easy 质粒由浙江大学生物技术研究所周雪平教授惠赠;大肠杆菌受体菌株 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

#### 1.1.3 抗体

胸腺素  $\alpha 1(T\alpha 1)$  兔抗血清由厦门大学生物技术学院惠赠;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自宝泰克生物技术有限公司。

#### 1.1.4 其他

限制性核酸内切酶 *Sal* I 和 *Cla* I, T4 DNA 连接酶, DNA marker DL2000 购自宝泰克生物技术有限公司;快速凝胶回收试剂盒购自 Promega, 其余试剂为进口或国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 马铃薯 X 病毒表达载体 pGR107- $T\alpha 1$ 的构建

将含胸腺素  $\alpha 1$  基因片段的 pGEM-T Easy 质粒,用 *Sal* I 和 *Cla* I 双酶切,凝胶电泳后回收目的片段;随后用 *Sal* I 和 *Cla* I 将 pGR-107 载体切成线性,建

立连接反应体系,10  $\mu$ L 反应体系中含 1  $\mu$ L 10 倍连接反应缓冲液,2  $\mu$ L pGR-107 线性载体,2  $\mu$ L 插入片段,1  $\mu$ L T4 DNA 连接酶,置于 16 $^{\circ}$ C 水浴锅过夜。构建重组载体,其构建示意图见图 1。

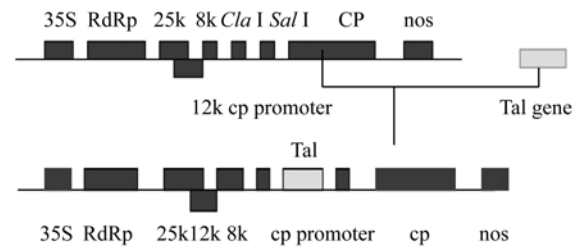


图 1 载体 pGR107- $T\alpha 1$  的构建示意图

Fig. 1 Plasmid construction of pGR107- $T\alpha 1$ .

将重组质粒转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 卡那霉素筛选出阳性白色菌落,提取 pGR107- $T\alpha 1$  重组质粒,用 *Sal* I 和 *Cla* I 双酶切鉴定。

#### 1.2.2 农杆菌转化

用冻融法将 pGR107- $T\alpha 1$  重组质粒转入农杆菌 GV3101,进而筛选出重组子。

#### 1.2.3 农杆菌注射番茄果实表达胸腺素 $\alpha 1(T\alpha 1)$ 体系的优化

1) 番茄果实: 选取不同生长阶段,发育良好的番茄果实作为试验对象。

2) 试验设计: 农杆菌菌液密度、番茄果龄是影响胸腺素  $\alpha 1$  在番茄果实中表达的 2 个关键因素。在试验中,番茄果实的侵染时间被分为 5 个阶段,即番茄植株开花后 1~2 周为第 1 阶段,2~2.5 周为第 2 阶段,2.5~3 周为第 3 阶段,3~3.5 周为第 4 阶段,3.5~4 周为第 5 阶段。农杆菌注射液的密度 ( $OD_{600}$ ) 共设置了 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 五个梯度。试验采用 2 因素、5 水平析因分析,共设 25 个处理,每个处理重复 4 次(表 1),同时设对照组。

表 1 试验设计

Table 1 Arrangement of the experiment

	$OD_{600}$	Time (week)
1	0.6	1~2
2	0.8	2~2.5
3	1.0	2.5~3
4	1.2	3~3.5
5	1.4	3.5~4

#### 1.2.4 农杆菌侵染番茄果实的方法

从含有筛选抗生素的 YEP 平板上选取单克隆,

28°C 过夜培养, 之后取 5 mL 培养液加入 50 mL 的诱导培养基[0.5%牛肉浸出粉、0.1%酵母浸出粉、0.5%蛋白胨、0.5% Suc、2 mmol/L 的  $MgSO_4$ 、20  $\mu mol/L$  的乙酰丁香酮、10 mmol/L 的 2-(N-吗啡啉)乙磺酸, pH 5.6]中过夜培养。第 2 天, 离心收集菌体沉淀, 之后加入 10 mmol/L 的  $MgCl_2$ 、10 mmol/L 的 MES、200  $\mu mol/L$  的乙酰丁香酮, 在室温下以 20 r/min 培养 2 h。当渗透液符合要求时, 用 0.5 mm  $\times$  16 mm 的注射器侵染处于不同生长阶段的番茄果实。将注射器针头通过花柱顶点扎入番茄果实约 3~4 mm, 同时渗透液被轻轻推入果实(图 2)。观察注射后的番茄果实, 在渗透区域会有微小的颜色变化。当渗透液通过花萼顶端的排水器溢出时, 表明整个果实已被渗透, 停止注射。



图 2 农杆菌通过花柱顶点注入番茄果实的方法  
Fig. 2 Injection of *Agrobacterium* cultures through the fruit stylar apex.

### 1.2.5 ELISA 检测

试剂: 包被液: 0.05 mol/L pH 9.6 的碳酸缓冲液; 洗涤液: pH 7.4 PBS-Tween-20(0.05%); 封闭液: 0.2% 酪蛋白溶液; 底物溶液: TMB 溶液(使用前用 pH 5.0 磷酸盐-柠檬酸缓冲液配制); 终止液: 2 mol/L  $H_2SO_4$ 。

待测样品的制备: 番茄果实的采收期分为绿熟期、转色期、坚熟期和完熟期。处于绿熟期的番茄, 果实已发育成熟, 这一时期采收的果实质地较硬, 耐贮存。本试验摘取绿熟期的番茄果实样本, 整个打碎, 之后称取 1.0 g 样品, 加 5 mL 包被液, 4°C 静置 4 h 以上, 5000 r/min 离心 15 min, 取上清液待测。

酶标板紫外处理: Boudet 等<sup>[11]</sup>发现聚苯乙烯酶标板经过紫外照射处理后, 能有效地增加酶标板对  $T\alpha 1$  的吸附作用, 提高检测灵敏度, 同时本底没有因处理而增加。基于此, 在使用前将 96 孔酶标板置于紫外灭菌灯下, 使酶标板上口边缘距灯管 10 cm,

室温照射 20 min, 以提高酶标板的吸附能力。

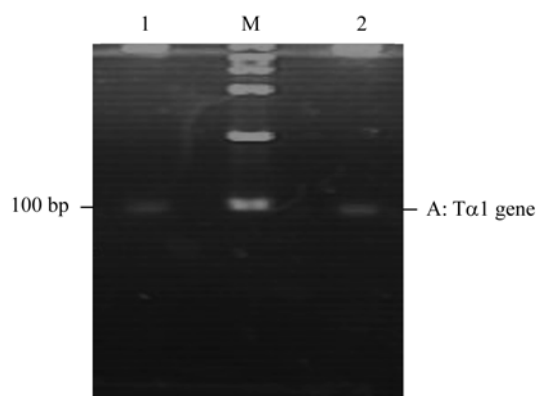


图 3 表达载体的酶切鉴定  
Fig. 3 Characterization of expression vectors by restriction enzyme. M: DNA marker DL2000; 1: pGR107- $T\alpha 1$ /*Sal* I and *Cla* I.

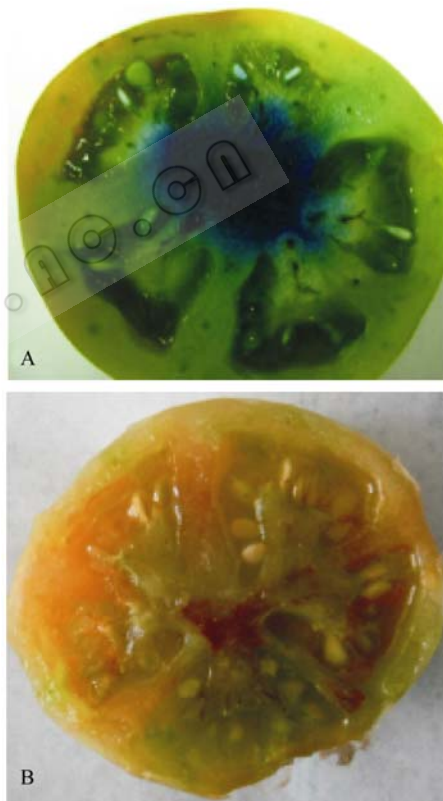


图 4 农杆菌菌液在番茄果实中的分布  
Fig. 4 Extent of agroinfiltration of tomato fruits. Fruit slices from tomato agroinjected with methylene blue-stained bacteria (A) and with an unstained culture (B).

ELISA 法测定程序: 取特定抗原(标准  $T\alpha 1$  及待测样品)溶液 100  $\mu L$ , 加入酶标板反应孔中, 每个样品重复 3 次, 置于 4°C 冰箱包被过夜。用 100  $\mu L$  的洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 min, 沥干。加入 100  $\mu L$  封闭液, 37°C 封闭 1 h, 洗涤 3 次。每孔加入一定稀释倍数的兔抗  $T\alpha 1$  IgG 抗体 100  $\mu L$ , 37°C 保温 1 h, 洗

涤 3 次。加入稀释 1000 倍的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 37°C 作用 1 h, 洗涤 5 次, 每次 5 min。加入 TMB 显色液 100  $\mu$ L, 37°C 避光显色 10 min。加入 50  $\mu$ L 终止液终止反应。在酶标仪 (SUNRISE) 上测定各孔的光密度值, 测定波长为 450 nm。以未侵染的正常番茄果实作为阴性对照组, 检测方法同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 重组马铃薯 X 病毒表达载体 pGR107-T $\alpha$ 1 的酶切鉴定

提取已构建成功的 pGR107-T $\alpha$ 1 重组质粒, 用 *Sal*I 和 *Cla*I 双酶切鉴定, 酶切产生大约 100 bp 的目的片段及 pGR107 载体片段(图 3)。

### 2.2 番茄果实中菌液的分布

用亚甲基兰把农杆菌侵染液染成蓝色, 注射番茄果实, 观察番茄果实的横切面, 发现在果实中心的薄片上, 胎座上, 果皮上都有蓝色的亚甲基兰着色, 但种子和子房室没有着色。而且, 染色的农杆菌优先聚集在番茄果实的胎座上, 其次才是番茄果实中心的薄片和果皮(图 4)。

### 2.3 建立 PVX 重组载体表达 T $\alpha$ 1 的优化体系

#### 2.3.1 试验结果

结果表明: 第 1 阶段, 即番茄植株开花后 1~2 周被侵染的番茄果实, 大部分在没有成熟时就脱落了。其原因可能是处于开花期后 1~2 周的番茄果实果龄较小, 经受不住农杆菌给植物组织带来的伤害, 所以容易脱落。番茄果实注射的第 5 阶段, 即番茄植株开花后 3.5~4 周, 其成熟果实中 T $\alpha$ 1 的 ELISA 检测值与阴性对照组几乎相同, 表明外源蛋白并没有在番茄果实中表达。其原因可能是番茄植株开花后 3.5~4 周是番茄果实成熟的后期, 这时果实基本停止膨大, 仅着重于果实内部物质的转化<sup>[12]</sup>。因此, 在这一阶段外源蛋白很难在番茄果实中表达。

试验中农杆菌侵染液的密度( $OD_{600}$ )共设置了 0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 五个梯度。当农杆菌侵染液密度为 0.6 时, 绝大部分番茄果实中几乎检测不到 T $\alpha$ 1, 表明当农杆菌密度  $OD_{600}$  值为 0.6 时, 瞬时表达效果不佳。当农杆菌密度  $OD_{600}$  为 1.4 时, 番茄果实中农杆菌侵染过的区域变黄、变脆, 最后坏死。其原因可能是农杆菌的密度过大时, 对植物组织毒

害作用较大, 不利于外源蛋白的表达。

#### 2.3.2 数据分析

试验结束时, 剔除脱落、坏死等不良番茄果实后, 共获得 36 个侵染成功的番茄果实样本。针对 36 个样本, 进行 2 因素(菌液密度、番茄果龄)、3 水平(菌液密度分别为 0.8、1.0、1.2; 番茄果龄分别为 2~2.5 周、2.5~3 周、3~3.5 周)的析因分析, 采用 SPSS12.0 统计软件进行数据处理, 以  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

析因分析结果显示: 注射时间因素间差异、菌液密度因素间差异、交互作用差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。农杆菌注射番茄果实表达 T $\alpha$ 1 的优化体系为: 农杆菌的密度( $OD$  值)为 1.0、番茄植株开花后 2.5~3 周时侵染番茄果实, 胸腺素 $\alpha$ 1 的表达量最大(表 2、3)。

表 2 胸腺素 T $\alpha$ 1 表达量

Table 2 Expression concentration of T $\alpha$ 1

Treatment	$OD_{600}$	Week	T $\alpha$ 1 (ng/g)
1	0.8	2~2.5	6.800
2	0.8	2.5~3	6.972
3	0.8	3~3.5	7.150
4	1.0	2~2.5	7.875
5	1.0	2.5~3	9.361
6	1.0	3~3.5	7.425
7	1.2	2~2.5	8.025
8	1.2	2.5~3	8.176
9	1.2	3~3.5	7.091

表 3 影响 T $\alpha$ 1 表达量的析因分析

Table 3 Factorial analysis of two-factor effect on T $\alpha$ 1 expression

Source	Type III sum of squares	df	Mean square	F
$OD_{600}$	9.540	2	4.770	11.24 *
Week	5.526	2	2.763	6.51 *
$OD^*W$	5.696	4	1.424	3.35 *
Error	11.458	27	0.424	
Total	2140.594	36		

\* $P < 0.05$

## 3 讨论

研究者已分别在大肠杆菌、酵母和转基因螺旋藻中表达了 T $\alpha$ 1。与细菌、酵母表达系统相比, 植物生物反应器具有种植简单, 不需要昂贵的发酵设

备, 且外源蛋白能在植物细胞中进行翻译后加工等优点; 与转基因植物稳定表达外源蛋白相比, 植物病毒表达载体系统介导的植物生物反应器, 由于病毒的增殖速度快, 外源蛋白不仅表达量大, 而且表达速度快。

随着植物基因工程技术的发展, 番茄(肉质果实的模式植物)有望成为生产口服疫苗和免疫蛋白的“植物工厂”。植物病毒表达外源蛋白, 具有转化途径简单、可快速得到外源蛋白等优点。但是, 采用农杆菌浸润法侵染受体植物的叶片, 使外源蛋白在整株植物中系统表达, 其不足之处是外源蛋白不能在特定的植物组织中大量表达。如何将植物病毒表达外源蛋白的技术很好地应用到番茄果实? 农杆菌果实注射技术解决了这一难题。本实验将植物病毒表达外源蛋白和农杆菌果实注射两项技术相结合, 成功地在番茄果实中表达了外源的胸腺素 $\alpha 1$ 。针对农杆菌菌液密度、番茄果龄是影响胸腺素 $\alpha 1$ 在番茄果实中表达的 2 个关键因素, 本实验采用不同的农杆菌菌液密度来侵染不同生长阶段的番茄果实, 筛选出最佳菌液密度和最佳侵染时间, 进而建立起外源蛋白在番茄果实中高效表达的农杆菌直接注射番茄果实的优化体系, 即农杆菌菌液的密度(OD)值为 1.0、番茄植株开花后 2.5~3 周时注射番茄果实, T $\alpha 1$ 的表达量最大。

## REFERENCES

- [1] Bodey B, Bodey JB, Siegel SE. Review of thymic hormones in cancer diagnosis and treatment. *Int J Immunopharmacol*, 2000, **22**: 261–273.
- [2] Huang W, Li ZY, Jin LJ, *et al.* Construction and expression of recombinant human thymosin $\alpha 1$  fusion gene in *Pichia pastoris*. *Hereditas*, 2002, **24**(6): 679–783.  
黄雯, 李兆育, 金礼吉, 等. 人胸腺素 $\alpha 1$  基因在毕赤酵母中的融合表达. *遗传*, 2002, **24**(6): 679–783.
- [3] Lau GK, Nanji A, Hou J. Thymosin $\alpha 1$  and farnesyl transferase inhibitor combination therapy activates T-cell response in patients with chronic hepatitis B virus infection in immune-tolerant phase. *J Viral Hepatitis*, 2002, **9**(4): 280–287.
- [4] Baumann CA, Badamchian M, Croidstein AL. Thymosin alpha 1 antagonizes dexamethasone and CD3-induced apoptosis of CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> thymocytes through the activation of cAMP and protein kinase C dependent second messenger path ways. *Mech Ageing Dev*, 1997, **94**(1-3): 85–101.
- [5] Shi JH, Zhang YQ, Zhao YT, *et al.* Cloning, expression of Thymosin alpha 1 gene in *E. coli* and its purification and characterization. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2001, **17**(3): 344–349.  
石继红, 张英起, 赵永同, 等. 胸腺素 $\alpha 1$  基因的克隆表达及生物活性. *中国生物化学与分子生物学报*, 2001, **17**(3): 344–349.
- [6] Miao H, Guo BY. Study on the fermentation of fusion expression of pGEX-T $\alpha 1$ . *Pharm Biotechnol*, 2003, **10**(2): 68–71.  
苗红, 郭葆玉. 融合表达 pGEX-T $\alpha 1$  的发酵研究. *药物生物技术*, 2003, **10**(2): 68–71.
- [7] O'Brien GJ, Bryant CJ, Voogd C, *et al.* Rotavirus VP6 expressed by PVX vectors in *Nicotiana benthamiana* coats PVX rods and also assembles into virus like particles. *Virology*, 2000, **270**: 444–453.
- [8] Orzaez D, Mirabel S, Wiel WH, *et al.* Agroinjection of tomato fruits-A tool for rapid functional analysis of transgenes directly in fruit. *Plant Physiol*, 2006, **140**: 3–11.
- [9] Zhou XF. The establishment of virus vector induced post transcriptional gene silencing system and the functional analysis of rbcS gene in tobacco, *Nicotiana benthamiana*. Ph. D Dissertation, Northeast Normal University, 2003.  
周晓馥. 病毒载体诱导转录后基因沉默系统的建立及烟草-rbcS 基因功能的研究, 博士论文. 东北师范大学, 2003.
- [10] Hoffmann T, Kalinowski G, Schwab W. RNAi-induced silencing of gene expression in strawberry fruit by agroinfiltration: A rapid assay for gene function analysis. *Plant J*, 2006, **48**: 818–826.
- [11] Boudet F, Theze J, Zouali M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *Immunol Methods*, 1991, **142**(1): 73–82.
- [12] Han SD. *Vegetable Planting*. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 137–138.  
韩世栋. *蔬菜栽培*. 北京: 中国农业出版社, 2001: 137–138.