

人小肠三叶因子在糙皮侧耳中的整合、表达及检测

徐晓晶 张 竞 李 曦 俞梅敏 茹炳根*

(北京大学生命科学学院蛋白质工程和植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

摘 要 :用原生质体法将含双 35S-AMV 启动子及人小肠三叶因子(hITF)cDNA 的表达载体导入糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)中,原生质体转化子在含有除草剂的培养基上初步筛选,获得抗性菌株。通过 PCR 分析证明 hITF cDNA 已整合到侧耳基因组中。以 hITF 为抗原免疫家兔制备了抗血清,纯化后的 IgG 以直接型酶联免疫吸附检测(ELISA)方法测定效价,并建立起 hITF 的竞争型酶联免疫吸附检测(ELISA)方法,给出了标准工作曲线,以应用于大规模表达菌株的筛选确立。检测表明,hITF 在侧耳新鲜菌丝体中分 3 个表达量段:1000~1250ng/g、1480~1700ng/g、最高达 2000~2250ng/g,约占总可溶性蛋白的 0.7%~1.5%。Western 印迹进一步分析证明 hITF 在侧耳中的表达。

关键词 :人小肠三叶因子(hITF) 糙皮侧耳,竞争型 ELISA

中图分类号 :Q943 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2004)05-0609-04

人小肠三叶因子(Human intestinal trefoilfactor, hITF)是一种特异分布于胃肠道粘膜表面的小分子量蛋白质。属于新发现的三叶因子蛋白家族,含有 7 个半胱氨酸残基。从 N 端起前 6 个半胱氨酸残基形成 3 对二硫键,交联方式为 1-5、2-4 和 3-6,由此使多肽链产生了特征性的三叶结构,并因此而得名。在因肠炎、胃及十二指肠溃疡等引起粘膜损伤的患者胃肠道内,hITF 的表达量显著升高,已有文献报道三叶肽能够保护胃肠道上皮,抵抗外部溃疡诱导因素诱导的损伤,它们能够促进上皮细胞的移动,从而参与损伤组织的修复过程^[1]。实验表明,正常情况下在小肠中表达的 ITF 经口服或皮下注射后对胃部损伤有明显的保护和治疗作用^[2,3]。将 hITF 基因在食药兼用的糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*,俗称平菇)中表达,有可能培育出对胃溃疡这种常见病有防治作用的保健型药物。因此本文以侧耳作为受体系统进行 hITF 基因的转化研究,获得了转基因再生菌株,并建立了竞争型 ELISA 方法快速灵敏地检测 hITF 基因在侧耳中的表达。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 :含有 hITF cDNA 的质粒 pCWTF 由本实验室构建,大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 为本实验室保存,测序载体 pMDT 购自 TaKaRa 公司。表达载体 pGPTVd35S 由本实验室构建^[4]。“中

蔬 10 号”糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)购于中国农业科学院。

1.1.2 主要试剂 :各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶等购自 Promega 公司,Hybond-N 膜购自 Amersham 公司。hITF 标准品为本实验室用酵母发酵方法生产纯化。hITF 多抗为本实验室自制。二抗为中山公司的辣根过氧化物羊抗兔 IgG 免疫球蛋白。溶壁酶购自广东微生物所,除草剂(膦丝菌素,PPT)由国家植物基因工程重点实验室林忠平教授惠赠。

1.1.3 培养基 :菌丝体培养基为 PDY 液体培养基:每升含 200g 马铃薯,20g 葡萄糖,2g 蛋白胨,2g 酵母膏,1.5g KH₂PO₄,0.5g MgSO₄·7H₂O,10mg VB₁。再生培养基为 CYM 完全培养基:每升含 10g 麦芽糖,20g 葡萄糖,2g 蛋白胨,2g 酵母膏,4.6g KH₂PO₄,0.5g MgSO₄·7H₂O。

1.2 方法

1.2.1 表达载体 pGPTVd35S-ITF 的构建 :构建方法详见文献[5]。

1.2.2 原生质体的制备及再生培养 :将活化后野生侧耳接种至装有 50mL PDY 液体培养基和 10 余粒玻璃珠的三角瓶中,25℃培养 5~7d,每天振摇 3 次以打散菌丝。无菌操作,以铺有两层纱布的玻璃漏斗过滤收集菌丝,先后用无菌水、0.6mol/L 甘露醇洗涤,吸水纸洗干水分后,将菌丝装入 50mL 离心管称

* 通讯作者。Tel :86-10-62751842 ; E-mail :rulab@pku.edu.cn

作者简介 徐晓晶(1975-)女,甘肃武威人,博士研究生,从事蛋白质化学和蛋白质工程研究。E-mail :vicky_xj@yahoo.com.cn

收稿日期 2004-01-16,修回日期 2004-04-20

重,每克新鲜菌丝加入溶壁酶溶液 1mL,充分摇匀后置于 34℃ 水浴中酶解 2~4h,每 15min 摇一次,镜检观察原生质体释放情况,待有大量原生质体释放后加入等量 0.6mol/L 甘露醇稀释终止反应,用装有脱脂棉的注射器除去菌丝残片,4000r/min 离心 10min,弃上清,再用 0.6mol/L 甘露醇洗涤 2 次,即得纯化的原生质体。取原生质体悬液 10 μ L、50 μ L、100 μ L 分别以双层法培养于 CYM 再生培养基上,25℃ 培养至有绒毛星状菌落出现^[6]。

1.2.3 转基因菌株除草剂抗性筛选 挑取再生培养基培养的菌落,分别接种于含 0.1 μ g/mL 和 0.2 μ g/mL 除草剂的 CYM 培养基上,25℃ 继续培养 15d,筛选具有除草剂抗性的转化菌株。

1.2.4 转基因菌株的 PCR 检测 用 SDS 法^[7]提取转化菌株和野生菌株液体培养菌丝体总 DNA 用作模板。PCR 反应条件:94℃ 7min;94℃ 1min,60℃ 1min,72℃ 1min,30 个循环后,72℃ 10min。预期的 PCR 产物长度为 200bp 左右。

1.2.5 侧耳蛋白的提取 取新鲜的侧耳菌丝体,加液氮研成粉末,再加入提取缓冲液[50mmol/L Tris·HCl(pH7.5),50mmol/L NaCl,400mmol/L 蔗糖,5mmol/L EDTA,1mmol/L DTT]研成匀浆,每 0.5g 菌丝体加入 0.5mL 蛋白提取缓冲液,煮沸 3min,10000r/min 离心 10min(4℃)后,取上清液备用。

1.2.6 直接型和竞争型 ELISA 法:步骤参照文献[8],一抗为 hITF 蛋白免疫家兔得到的抗血清。

1.2.7 Western 印迹分析:15% SDS-PAGE 分离菌丝体总蛋白后,按照文献[9]提供的程序进行 Western 印迹分析。

2 结果

2.1 表达载体 pGPTVd35S-ITF 的构建

pGPTVd35S-ITF^[5]携带两个串联的 CaMV35S 启动子、增强目的基因 mRNA 转译效率的 AMV 5'端非转译序列、200bp 外源基因(hITF cDNA)、Nos 终止子以及用于筛选的标记基因 *bar*(除草剂抗性基因)。构建好的载体通过电击法导入侧耳中。

2.2 转基因侧耳的获得和分子检测

2.2.1 转基因侧耳除草剂抗性筛选 通过电击法将目的基因转入侧耳原生质体中,经过再生培养基培养。再生的原生质体转化子经 0.1 μ g/mL 除草剂初步筛选,再以含 0.2 μ g/mL 除草剂培养基复筛,共获得 120 株抗性菌株(图 1),具有较强的除草剂抗性也初步说明可能有外源基因的整合。

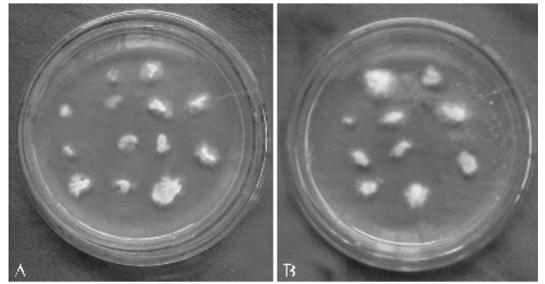


图 1 转基因侧耳的除草剂抗性筛选

Fig.1 Screen of transgenic *P. ostreatus* by PPT resistant assay

A. Transformants growth on 0.1 μ g/mL PPT; B. Transformants growth on 0.2 μ g/mL PPT.

2.2.2 转基因侧耳的 PCR 检测 取新鲜的液体培养菌丝体提取总 DNA,做 PCR 检测,以 pCWITF 质粒为阳性对照,双蒸水为阴性对照。120 株只有 30 株得到阳性结果,扩增出含有目的基因的 200bp 条带。说明目的基因已整合到这些转基因侧耳的染色体组中(图 2)。



图 2 转基因侧耳的 PCR 检测

Fig.2 Identification of transgenic *P. ostreatus* by ITF gene with PCR assay

1.100bp DNA Marker; 2~4.Positive transgenic *P. ostreatus*; 5.Negative control; 6.Positive control.

2.3 酶联免疫吸附检测(ELISA)

2.3.1 直接型 ELISA 测 hITF 一抗的效价:以本实验室制备的重组 hITF 为抗原免疫家兔,得到兔抗人 ITF IgG。此抗血清经过蛋白质 A 琼脂糖(1.4cm × 2.8cm)进一步纯化,得到兔抗 hITF 多克隆抗体。

以一定浓度 hITF 进行固相包被和依次递减稀释倍数梯度的兔抗 hITF($1 \times 10^1 \sim 5 \times 10^6$)随后加至孔中,以 BSA 阴性血清孔为对照,二抗结合酶为辣

表 1 hITF 一抗效价的测定

Table 1 ELISA of the titer of antiserum against hITF		
Dilution rate	Antiserum(A_{450})	BSA(A_{450})
1 × 10	0.297	0.054
0.5 × 10 ²	0.265	0.057
1 × 10 ²	0.263	0.057
0.5 × 10 ³	0.262	0.061
1 × 10 ³	0.255	0.054
0.5 × 10 ⁴	0.232	0.053
1 × 10 ⁴	0.129	0.056
0.5 × 10 ⁵	0.120	0.059

根过氧化物酶,显色后在 450nm 波长下读数,测波长为 450nm 时各孔光吸收,每个样品做 3 个平行重复取平均值 ($P < 0.05$) (表 1)。计算阳性血清与阴性 BSA 对照 A_{450} 值之比,当比值 ≥ 2.1 时为阳性,比值 < 2.1 而 > 1.5 时为可疑,比值 < 1.5 时为阴性。从表 1 结果计算来看,自制兔抗人 ITF 多抗(一抗)的效价为 $5 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 。

2.3.2 竞争型 ELISA 进行 hITF 标准曲线的测定:以一定数量 hITF 进行固相包被,不同浓度梯度的 hITF 标准品 (40 ~ 2500ng/L) 随后加至孔中,再加入一定浓度的兔抗人 ITF 多克隆抗体(一抗设立 3 个稀释浓度:1:2000,1:5000 和 1:10000)。设立包被液为阴性对照,每份标准品和样品做 4 个复孔。二抗结合酶为辣根过氧化物酶(二抗设立 4 个稀释浓度:1:1000,1:5000 和 1:10000,1:100000),显色后在 450nm 波长下读数,每个样品做 3 个平行重复取平均值。得到标准曲线。当一抗稀释度为 1:2000 时由于浓度过高,增加了非特异性吸附而造成阴性对照较高的背景,系统误差也较大 ($P < 0.05$);一抗稀释度为 1:10000 时,由于浓度偏低,不足以饱和参与竞争的抗原,而使标准曲线的斜率趋缓,造成读数误差。因此,选择一抗稀释度以 1:5000 为宜 ($P < 0.01$)。当二抗稀释度为 1:1000 时由于浓度过高,显色时间很快,造成较高的背景;二抗稀释度为 1:100000 时,浓度又过低,不足以饱和一抗,而使标准曲线的斜率变缓,造成读数误差。因此,选择二抗稀释度为 1:5000 或 1:10000 为宜。

2.3.3 竞争法进行转基因菌株 hITF 蛋白表达的定量分析及含量的测定:对 30 株 PCR 检测为阳性的转基因侧耳菌株的蛋白提取上清液和一定浓度梯度的 hITF (40 ~ 2500 μ g/L) 同时进行上述步骤的检测,选取一抗稀释度为 1:5000,二抗稀释度为 1:5000。将包被液及野生菌丝体蛋白提取上清液设立为阴性对照,每份标准品和样品做 4 个复孔。未知样品中 hITF 的含量由线性回归方程得到,用 Excel 计算方差。结果显示 30 株 PCR 检测阳性的转基因侧耳菌株中目的蛋白 hITF 为表达阳性的有 17 株(表 2),其中 hITF 有显著表达的转基因侧耳的有 13 株(按每克新鲜菌丝体所含 hITF 量计)表达量分为 3 段:表达量为 1000 ~ 1250ng/g 的有 4 株 ($n = 4$);表达量为 1480 ~ 1700ng/g 的有 3 株 ($n = 3$);表达量高达 2000 ~ 2250ng/g 的有 6 株 ($n = 6$)。用紫外吸收法测定侧耳中总可溶性蛋白含量,计算得出表达率为 0.7% ~ 1.5%。

表 2 转基因侧耳的 ELISA 检测结果

Table 2 Competitive ELISA assay results of Transgenic <i>P. ostreatus</i>				
Stage	n	Expression status	A_{450} reading	hITF(ng/g)
Wild control	1	-	0.099 \pm 0	223.68
I	1	-	0.1380 \pm 0	-486.8 \pm 0
II	3	-	0.1124 \pm 0.0018	-250.11 \pm 21.08
III	8	-	0.09505 \pm 0.0056	374 \pm 65.78
IV	4	+	0.0858 \pm 0.0022	959.1 \pm 84.91
V	4	+	0.07950 \pm 0.0017	1141 \pm 20.05
VI	3	+	0.0700 \pm 0.0025	1486 \pm 253.73
VII	6	+	0.05842 \pm 0.0020	2176 \pm 125.42

2.4 Western 印迹分析

提取 17 株转基因侧耳表达阳性的菌株,经过 Western 印迹分析,显示在 hITF 二聚体约 13.1kD 位置有显色条带(图 3),从而进一步确证了 hITF 基因在侧耳中的表达。



图 3 转基因侧耳的 Western 检测结果

Fig. 3 Identification ITF expression in transgenic *P. ostreatus* with Western assay

1. Negative control, expression supernatant of wild *P. ostreatus*; 2. Positive, expression supernatant of transgenic *P. ostreatus*; 4. Standard hITF protein.

3 讨论

糙皮侧耳俗称平菇,侧耳是 *Pleurotus ostreatus* 大型食用真菌的一种,其味鲜美,营养丰富,食药兼用,生产方式灵活^[10-13]。因此可以做为一种良好的生物反应器以生产一些高成本的口服药用蛋白。

本研究所采用的双 35S 启动子表达载体原本为植物表达载体,如今在真菌中也可以启动外源基因的表达。外源蛋白比一般的转基因植物外源蛋白表达量高 7 至 8 倍。用原生质体法介导真菌转化再生过程中不易产生嵌合现象,比农杆菌侵染的转基因植物稳定,由于表达载体没有自主复制序列,其表达属于整合型表达,但以何种机制进行整合,仍需要做进一步的研究。造成不同表达量的原因,可能与外源基因的整合状态有关。

另外,除草剂筛选标记 *bar* 也原本用于植物的抗性筛选,已成功运用在转基因水稻中。1995 年英国已批准抗除草剂大豆作为食品,结论指出抗除草剂大豆可安全作为食品及饲料^[14]。由于真菌具有强的抗生素抗性,因此选择除草剂抗性基因 *bar* 作

为筛选标记是一个很好的选择。

本文所要表达的外源蛋白 hITF 蛋白不具有酶活性,通过生物活性检测表达量是相当复杂的,即使在真菌中 0.7% ~ 1.5% 的表达量仍不易运用常规的大肠杆菌和酵母表达系统检测外源蛋白表达的方法(如 SDS-PAGE)进行比较大规模的筛选,因此本实验建立了一个系统,定量,重复性好,数据具有统计意义的竞争型 ELISA 法一次性测定 30 株 PCR 检测阳性菌株中 hITF 的表达,一方面具有高通量,特异性强,杂蛋白质干扰性小的优点,另一方面,还可以直接鉴定转化株的免疫学活性,并通过总可溶性蛋白的检测,同时计算出表达率。大大提高了工作效率。因此,对于外源蛋白表达量较低的生物反应器,运用竞争型 ELISA 法是一个快速、灵敏、高效筛选转化植(菌)株和检测外源蛋白表达量的方法。

致谢 感谢本实验室方敏同学所提供的 hITF 标准品及在实验过程中的大力协助。

参 考 文 献

- [1] Mashimo H, Wu D C, Pdolsky D K, *et al.* Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor. *Science*, 1996, **274** :262 - 265.
- [2] Babyatsky M W, Debeaumont M, Thim L, *et al.* Oral trefoil peptides protect against ethanol and indomethacin induced gastric injury in rats. *Gastroenterology*, 1996, **110** :489 - 497.
- [3] Chinery R, Playford R J. Combined intestinal trefoil factor and epi-

- dermal growth factor is prophylactic against in domethacin induced gastric damage in the rat. *Clin Sci (Colch)*, 1995, **88** :401 - 403.
- [4] 张晓钰,李伟,张竞,等.金属硫蛋白突变体的植物高效表达载体及其在烟草中的表达.中国生物化学与分子生物学报,1999, **15** :888 - 892.
- [5] 左晓峰,张晓钰,单龙,等.人小肠三叶因子(hITF)基因在生菜中的整合与表达.植物学报,2001, **43** (10):1047 - 1051.
- [6] Zhang J, Nie S W, Shan L, *et al.* Transformation of metallothionein gene into mushroom protoplasts by application of electroporation. *Acta Botanica Sinica*, 2002, **44** (12):1445 - 1449.
- [7] 施苏华,章群,陈月琴,等.一种简易的植物核酸提取方法.中山大学学报(自然科学版),1996, **35** :103 - 105.
- [8] 张龙翔,张庭芳,李令媛,主编.生化实验方法和技术.第二版.北京:高等教育出版社,1997,360 - 370.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] 姜自彬,魏学彦.糙皮侧耳真菌的研究进展.中草药,1999, **30** (1):72 - 75.
- [11] 刘晓峰,李玉,孙晓波,等.侧耳属真菌化学成分及药用活性研究进展.吉林农业大学学报,1998, **20** (3):92 - 98.
- [12] 张丽萍,苗春艳,许丽艳,等.金顶侧耳多糖 PC 4 的结构确定与抗肿瘤活性的研究.菌物系统,1995, **14** (1):69 - 74.
- [13] Yoshika Y, Tetsuro I. Studies on Antitumour activity of some fractions from Basidiomycetes. I. An antitumour acidic polysaccharide fraction of *P. ostreatus* (Fr.) Quel. *Cham Pharm Bull*, 1972, **20** (6):1175 - 1180.
- [14] 贾士荣.转基因植物食品中标记基因的安全性评价.中国农业科学,1997, **30** (2):1 - 15.

Expression of Human Intestinal Trefoil Factor (hITF) in Transgenic *Pleurotus ostreatus* and Its ELISA Assay

XU Xiao-Jing ZHANG Jing LI Xi YU Mei-Min RU Bing-Gen*

(The National Laboratory for Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract :The vector pGPTVd35S-ITF containing human intestinal trefoil factor(hITF) cDNA under control of the double CaMV-35S promoter and a Nos terminator was constructed and transformants were selected on a PDY medium containing phosphinothricin(PPT) (1.0 μ g/mL). Integration of the hITF cDNA into the genome of *Pleurotus ostreatus* was confirmed by PCR analysis. Then competition enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) was developed for detection and quantitative analysis of human intestinal trefoil factor, and the standard curves were supplied. Results show the highest hITF protein content in mycelia was 2000 ~ 2250ng/g, about 1.5% of the total soluble protein.

Key words :Human intestinal trefoil factor(hITF), *Pleurotus ostreatus*, Competitive ELISA

* Corresponding author. Tel 86-10-62751842; E-mail: rulab@pku.edu.cn

Received date 01-16-2004