

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410037474. X

[51] Int. Cl.

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

C12N 15/27 (2006.01)

C12N 15/65 (2006.01)

A01H 4/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 10 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 1281759C

[51] Int. Cl. (续)

C07K 14/52 (2006.01)

C07K 14/535 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

A01H 5/10 (2006.01)

[22] 申请日 2004.4.29

[21] 申请号 200410037474. X

[30] 优先权

[32] 2003. 6. 30 [33] US [31] 10/611,226

[71] 专利权人 香港中文大学

地址 香港新界

[72] 发明人 辛世文 冯明钊 林汉明

审查员 姜 涛

[74] 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司

代理人 王达佐 梁兴龙

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 10 页

[54] 发明名称

含有人粒细胞集落刺激因子的转基因植物和其制备方法

[57] 摘要

本发明提供了一种可用于转化植物的重组构建体，该构建体含有编码人重组细胞因子的 DNA 序列和可指导人重组细胞因子在植物中表达的启动子。本发明还提供了一种构建转基因植物的方法，该方法包括以下步骤：用本发明重组构建体转化植物细胞；从植物细胞再生出转基因植物以在转基因植物种子中产生人重组细胞因子，例如，人粒细胞集落刺激因子 (hG - CSF)。因而本发明的植物生产办法具有广阔的应用前景：可以用低廉得多的方式大规模生产某些供应紧缺的昂贵的生物医药产品，这对疾病治疗、诊断和预防具有很高的经济价值，并使不太富裕的发展中国家更容易获得此类药物。

1、一种用来转化植物的重组构建体，其含有编码人粒细胞集落刺激因子的 SEQ ID No.1 DNA 序列和能调控所述人粒细胞集落刺激因子在所述植物中表达的植物种子特异性启动子。

2、根据权利要求 1 所述的重组构建体，其中所述的植物种子特异性启动子是菜豆球蛋白启动子。

3、根据权利要求 1-2 中任一项所述的重组构建体，其还含有一个序列标签和一个酶切位点。

4、根据权利要求 3 所述的重组构建体，其中所述的序列标签和酶切位点包括 His 标签与 EK 位点。

5、根据权利要求 3 所述的重组构建体，其还含有菜豆球蛋白信号肽。

6、根据权利要求 1-2 中任一项所述的重组构建体，其还含有菜豆球蛋白信号肽。

7、根据权利要求 4 所述的重组构建体，其还含有菜豆球蛋白信号肽。

8、一种构建转基因植物的方法，该方法包括以下步骤：

a)用重组构建体转化植物细胞，其中所述重组构建体含有编码人粒细胞集落刺激因子的 SEQ ID No.1 DNA 序列和能调控所述人粒细胞集落刺激因子在所述植物中表达的植物种子特异性启动子；和

b)从该植物细胞再生出转基因植物以在所述植物的种子中生产人粒细胞集落刺激因子。

9、根据权利要求8所述的方法，其中所述的植物细胞用农杆菌系统进行转化。

10、根据权利要求9所述的方法，其中所述的农杆菌系统为根癌农杆菌-Ti质粒系统。

11、根据权利要求8-10中任一项所述的方法，其中所述的植物选自拟南芥和烟草。

12、根据权利要求11所述的方法，其中所述植物细胞的转化对于拟南芥通过真空渗透开花花蕾来进行或对于烟草通过叶盘外植体感染来进行。

13、根据权利要求12所述的方法，其中对于拟南芥，所述的转基因植物从种子中再生；或对于烟草，从叶盘愈伤组织中再生。

14、根据权利要求8所述的方法，该方法还包括用质粒载体 pBI121 克隆所述重组构建体的步骤。

15、重组构建体在制备转基因植物中的应用，其中所述重组构建体含有编码人粒细胞集落刺激因子的 SEQ ID No.1 DNA 序列和能调控所述人粒细胞集落刺激因子在所述植物中表达的植物种子特异性启动子。

16、根据权利要求15所述的应用，其中所述的转基因植物选自拟南芥和烟草。

含有人粒细胞集落刺激因子的转基因植物和其制备方法

发明领域

本发明涉及到外源基因在植物中的高度表达，特别地涉及包含人粒细胞集落刺激因子的重组构建和包含相同构建的转基因植物。

发明背景

人粒细胞集落刺激因子(hG-CSF)是集落刺激因子(CSFs)或造血生长因子家族中的一员。已经知道 hG-CSF 主要由初级骨髓基质细胞、巨噬细胞、纤维原细胞、内皮细胞在有不同种刺激，如感染和发炎时产生 (Metcalf, D 和 Nicola, N.A. 1985, Synthesis by Mouse Peritoneal Cells of G-CSF, the Differentiation Inducer for Myeloid Leukemia Cells: Stimulation by Endotoxin, M-CSF and Multi-CSF, *Leuk. Res.* 9, 35-50; Broudy, V. C., Kaushansky, K., Harlan, J.M 和 Adamson, J. W. 1987, Interleukin 1 Stimulates Human Endothelial Cells to Produce Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Granulocyte Colony-Stimulating Factor, *J. Immunol.* 139, 464-468; Kaushansky, K, Lin, N 和 Adamson, J.W. 1988, Interleukin 1 Stimulates Fibroblasts to Synthesize Granulocyte-Macrophage and Granulocyte Colony-Stimulating Factors. Mechanism for the Hematopoietic Response to Inflammation, *J. Clin. Invest.* 81, 92-97; Vellenga, E., Rambaldi, A., Ernst, T. J, Ostapovicz, D. and Griffin, J.D. 1988, Independent Regulation of M-CSF and G-CSF Gene Expression in Human Monocytes, *Blood* 71, 1529-1532)。如图 1 所示, hG-CSF 可以特异性地激活 CFU-GM(集落形成单位-粒细胞/单核细胞, colony forming units-granulocyte/monocyte)和 CFU-G(粒细胞, granulocyte)的增值与分化使之成为成熟嗜中性粒细胞。嗜中性粒细胞是白细胞或白血细胞的一种, 它通过吞噬和杀死入侵细菌及其它微生物来保护人体 (Palmlblad, J. 1984, The Role of Granulocytes in Inflammation, *Scand. J.*

Rheum. 13, 163-172)。

嗜中性粒细胞的半衰期很短,因此 hG-CSF 在保持人体内基本水平的嗜中性粒细胞和人体感染过程中调控骨髓中的全能性干细胞产生嗜中性粒细胞以大量增加体内嗜中性粒细胞的水平方面发挥关键的作用。另外 hG-CSF 还可使嗜中性粒细胞存活期延长(Williams, G.T., Smith, C.A., Spooner, E., Dexter, T.M 和 Taylor, D.R. 1990, Haemopoietic Colony Stimulating Factors Promote Cell Survival by Suppressing Apoptosis. *Nature* 343, 76-79.), 增强其功能性性能(Kitagawa, S., You, A., Souza, L.M, Saito, M., Miura, Y 和 Takaku, F. 1987, Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor Enhances Superoxide Release in Human Granulocytes Stimulated by the Chemotactic Peptide, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 1143-1146; Yuo, A., Kitagawa, S., Ohsaka, A., Ohta, M., Miyazono, K., Okabe, T., Urabe, A., Saito, M 和 Takaku, F. 1989, Recombinant Human Granulocyte Colony-Stimulating Factor as an Activator of Human Granulocytes : Potentiation of Responses Triggered by Receptor-Mediated Agonists and Stimulation of C3bi Receptor Expression and Adherence. *Blood* 74, 2144-2149; Yuo, A., Kitagawa, S., Ohsaka, A., Saito, M 和 Takaku, F. 1990, Stimulation and Priming of Human Neutrophils by Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor : Qualitative and Quantitative Differences, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 491-497), 并刺激嗜中性粒细胞活化而从骨髓进入血液和组织中(Hattori, K., Orita, T., Oheda, M., Tamura, M 和 Ono, M. 1996, Comparative Study of the Effects of Granulocyte Colony-Stimulating Factor and Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor on Generation and Mobilization of Neutrophils in Cyclophosphamide-Treated Neutropenic Mice, *In Vivo* 10, 319-327)。因此, 通过调节成熟与功能性嗜中性粒细胞的产生, hG-CSF 在保护我们身体免遭细菌、真菌和病毒感染方面起到了重要作用。用 hG-CSF 给药可以降低嗜中性白血球减少症的持续期, 降低各种感染的危险, 这对许多经过化疗和放射疗法的癌症病人而言具有非常大的好处。而且, hG-CSF 在治疗

嗜中性白血球减少症患者免受其它病症侵袭和活化造血干细胞方面发挥了重要的作用。因而，在世界的临床应用上，hG-CSF的需求量很高。

目前，在2000年，所有医药公司出售的rhG-CSF的总价值超过了20亿美元。如今，rhG-CSF是抗癌药物市场上卖得最多的和销售最好的药物之一。另外，hG-CSF疗法可以相应地缩减住院的时间(25.3天对29.8天)和抗生素治疗的持续时间(14.5天对18.6天)，因而降低了医院和病人的花费(Faulds, D., Lewis, N.J.W 和 Milne, R.J. 1992, Recombinant Granulocyte Colony-Stimulating Factor (rG-CSF): Pharmacoeconomic Considerations in Chemotherapy-Induced Neutropenia, *Pharmacoeconomics* 1, 231-249; Duncan, N., Hewetson, M., Atra, A., Dick, G 和 Pinkerton, R. 1997, An Economic Evaluation of the Use of Granulocyte Colony-Stimulating Factor after Bone Marrow Transplantation in Children, *Pharmacoeconomics* 11, 169-174)。由于以上重要的有利因素，因而hG-CSF的经济价值非常高，值得为临床应用而大规模生产此类药物蛋白。

目前植物分子生物学与生物技术的进展为应用外源基因转化植物来生产生物分子与异源蛋白，如脂类、碳水化合物、工业用酶和药物蛋白提供了必要的工具(Goddijn, O.J.M 和 Pen, J. 1995, Plants as Bioreactors, *Trends in Biotechnology* 13, 379-387)。转基因植物生产系统的潜在商业应用前景相当好，这得益于植物所具备的独特和优越的特性(Giddings, G., Allison, G., Brooks, D 和 Carter, A. 2000, Transgenic Plants as Factories for Biopharmaceuticals, *Nature Biotechnology* 18, 1151-1155)。植物生产系统和基于发酵的生产系统相比更加经济。因为植物仅仅需要水、土壤、阳光、一些肥料来有效的生长，因此转基因植物的生产成本低，而在基于发酵的生产系统中，则需要巨大的资本投资，如昂贵的发酵罐、设备和培养基(Goddijn, O.J.M 和 Pen, J. 1995, Plants as Bioreactors, *Trends in Biotechnology* 13, 379-387)。而且，对转基因植物而言，扩大生产规模的方法简单、快捷、便宜，而基于发酵的生产扩大规模的方法复杂、耗时、昂贵。依照 Kusnadi 等人的描述(Kusnadi, A. R., Nikolov, Z. L 和 Howard, J. A. 1997, Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations, *Biotechnology and Bioengineering* 56, 473-484)，

在植物中生产重组蛋白的成本估计比在大肠杆菌中发酵生产的成本要低10到50倍,植物生产系统可以以更加经济的方式为规模化生产某些供应紧缺的昂贵生物药物提供良好的应用前景,比如葡糖脑苷脂(Giddings, G., Allison, G., Brooks, D 和 Carter, A. 2000, Transgenic Plants as Factories for Biopharmaceuticals, *Nature Biotechnology* 18, 1151-1155)。然而,试图将植物制备成生物反应器的科学家们遇到了一个主要的障碍,那就是在转基因植物中外源蛋白的表达量低。

在本领域中,通过构建含有强种子特异性启动子,如菜豆球蛋白启动子的嵌合基因来增强目标蛋白编码序列的转录从而指导目标蛋白在植物种子中表达已被证明是解决此问题的有效方法。

高度表达种子特异性蛋白的启动子,如菜豆球蛋白启动子已被用来构建嵌合基因,并转化植物来生产目的蛋白。由于菜豆球蛋白是一种含量丰富的种子蛋白,因此该种子特异性菜豆球蛋白的启动子使人们对将其应用于转基因表达外源蛋白产生兴趣。Altenbach 等人(Altenbach, S. B., Pearson, K. W., Meeker, G., Staraci, L. C 和 Sun, S. S. M. 1989, Enhancement of the Methionine Content of Seed Proteins by the Expression of a Chimeric Gene Encoding a Methionine-rich Protein in Transgenic Plants, *Plant Molecular Biology* 13, 513-522)的研究表明,可应用菜豆球蛋白启动子作为调控元件在烟草中表达巴西坚果富含蛋氨酸的蛋白。有报道记录说作为菜豆球蛋白启动子强表达的结果,蛋氨酸含量在转基因烟草种子中增加了约30%。

菜豆球蛋白是一组多肽,包含法国扁豆(*Phaseolus vulgaris L.*)的主要种子储藏糖蛋白,在成熟种子中其占总蛋白的50%左右(Ma, Y 和 Bliss, F.A., 1978, Seed Proteins of Common bean, *Crop Sci.* 17, 431-437)。该蛋白由三个亚基组成,包括 α , β , γ 多肽,分子量分别51、48和45.5kD。Sun 等人(Sun, S. S. M., Mutschler, M. A., Bliss, F. A 和 Hall, T. C. 1978, Protein Synthesis and Accumulation in Bean Cotyledons during Growth, *Plant Physiology* 61, 918-923.)证实了在法国扁豆胚的发育过程中暂时性地积累菜豆球蛋白,由16S mRNA 种编码的3种多肽在7mm到17-19mm长的发育子叶中积累。由 Bustos 等人(Bustos, M. M., Gultinan, M. J.,

Jordano, J., Begum, D., Kalkan, F. A 和 Hall, T. C. 1989, Regulation of β -Glucuronidase Expression in Transgenic Tobacco Plants by an A/T-rich, cis-Acting Sequence Found Upstream of a French Bean β -Phaseolin Gene, *Plant Cell* 1, 839-853)对菜豆球蛋白基因做的更深入的研究表明在菜豆球蛋白基因的-295 到+20 区域存在多个顺式调控元件, 这些元件负责种子特异表达和基因表达的暂时控。

通过电穿孔方法, 用嵌合基因转化根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)。该农杆菌 GV3101/pMP90(Koncz, C 和 Schell, J. 1986, The Promoter of the T_L-DNA Gene 5 Controls the Tissue-specific Expression of Chimeric Genes Carried by a Novel Type of *Agrobacterium* Binary Vector, *Mol. Gen. Genet.* 204, 383-396)与农杆菌 LBA4404/pAL4404(Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J 和 Schilperoot, R.A. 1983, A Binary Plant Vector Strategy Based on Separation of *vir*- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid, *Nature* 303, 179-180)通过已知的真空渗透法(Bechtold, N., Ellis, J 和 Pelletier, G. 1993, In planta *Agrobacterium*-mediated Gene Transfer by Infiltration of Adult *Arabidopsis thaliana* Plants, *C. R. Acad. Sci. Paris, Life Sci.* 316, 1194-1199)和叶盘法(Fisher, D.K 和 Guiltinan, M.J. 1995, Rapid, Efficient Production of Homozygous Transgenic Tobacco Plants with *Agrobacterium tumefaciens*: A Seed-to-Seed Protocol, *Plant Mol. Bio.* 13, 278-289)转化宿主植物拟南芥和烟草。

发明内容

本发明的一个目的是提供可以转化植物的重组构建体, 此重组构建体含有编码重组人细胞因子的 DNA 序列及能指导重组人细胞因子在植物中表达的启动子。

在本发明中的一个实施方案中, 人细胞因子是人粒细胞集落刺激因子(hG-CSF)。

在本发明中优选使用种子特异性启动子, 在一个实施方案中, 种子特异性启动子来源于菜豆球蛋白。

在本发明优选的一个实施方案中，上述重组构建还可含有序列标签和酶切位点。

在本发明的另一个实施方案中，上述重组构建还可含有 His 标签和 EK 位点。

在本发明的又一实施方案中，上述重组构建还可以含有信号肽。在本发明中优选使用菜豆球蛋白信号肽。

本发明的另一个目的是提供转基因植物的构建方法，包括以下步骤：

- a) 用本发明的重组构建转化植物细胞；以及
- b) 从植物细胞中再生出转基因植物以在植物种子中生产人细胞因子。

在本发明方法中，可以用农杆菌系统来转化植物细胞。在本发明的一实施方案中，此农杆菌系统是土壤农杆菌 Ti 质粒系统。

在本发明的方法中，上述植物可以选自拟南芥和烟草。

在本发明的方法中，植物细胞转化对于拟南芥可以通过真空渗透开花花蕾或者对于烟草通过叶盘外植体感染来进行。

本发明的另一目的是提供含有重组人细胞因子的转基因植物。在本发明该方法的一个具体实施方案中，所应用的人细胞因子是人粒细胞集落因子。

本发明的另一目的是提供含有本发明所定义的目标基因的一种转基因植物。在本发明的转基因植物中，拟南芥和烟草是优选的。

本发明还提供了上文所定义的转基因植物的种子。

细胞因子 hG-CSF 以前并未在植物中表达过，本发明的工作在遗传工程蛋白的领域取得了突破，并且所产蛋白量较大且生物活性高。

因此，本发明提供了一种通过引入诸如菜豆球蛋白启动子之类的种子特异性启动子来构建嵌合基因从而提高翻译效率的解决方法。

本发明的植物生产方法具有广阔应用前景：可以用低廉得多的方式大规模生产某些供应紧缺的昂贵的生物医药产品，这对疾病治疗、诊断和预防具有很高的经济价值，并使不太富裕的发展中国家更容易获得此类药物。

附图简述

图 1 图示了造血过程中造血生长因子的互相作用情况。

图 2 图示了本发明嵌合基因的构建步骤。

图 3 图示了 Southern 印迹的结果，结果表明依据本发明，hG-CSF 基因构建体整合到了拟南芥中。

图 4 图示了 Northern 印迹的结果，结果表明了依据本发明，hG-CSF 基因构建体在拟南芥中进行了 mRNA 水平的表达。

图 5 图示了 Western 印迹的结果，结果表明了依据本发明，hG-CSF 基因构建在拟南芥中进行了蛋白水平的表达。

图 6 图示了对拟南芥中生产的 rhG-CSF 进行功能分析的结果。

图 7 图示了 Southern 印迹的结果，结果表明依据本发明，hG-CSF 基因构建整合到了烟草基因组中。

图 8 图示了 Northern 印迹的结果，结果表明了依据本发明，hG-CSF 基因构建体在烟草中进行了 mRNA 水平的表达。

图 9 图示了 Western 印迹的结果，结果表明了依据本发明，hG-CSF 基因构建物体在烟草中进行了蛋白水平的表达。

图 10 图示了根据本发明对烟草中产生的 rhG-CSF 进行功能分析的结果。

图 11 图示了本发明的嵌合基因 pTZ/Phas/His/EK/hG-CSF 的构建步骤。

图 12 图示了本发明的嵌合基因 pBK/Phas/SP/His/EK/hG-CSF 的构建步骤。

图 13 图示了本发明的嵌合基因 pBK/Phas/SP/hG-CSF 的构建步骤。

图 14 图示了依据本发明将嵌合基因转化到农杆菌双元载体 pBI121 中的克隆。

图 15 图示了本发明的 hG-CSF 合成基因的核苷酸序列。

图 16 图示了构建 H，构建 SH，构建 S 的所用的 PCR 引物。

本发明的详细描述

如上所述，本发明的目的可以通过一特异性重组构建体得以完全实现，该重组构建体含有指导目标蛋白在转基因种子中表达的强种子特异

性启动子。

在本发明中，上述重组构建体含有强种子特异性启动子、种子特异性终止子和编码重组人细胞因子的 DNA 序列。

在本发明中，本领域的普通技术人员可以容易地选择已经公开的对某种植物具有特异性的终止子或启动子。在本发明中优选应用扁豆球蛋白启动子和终止子。

众所周知，必须扩增目标基因从而为构建足量嵌合基因提供充足的 DNA。本发明中，首先通过 PCR 方法以两个特异性引物扩增编码 hG-CSF 成熟肽(SEQ. ID No.1, 图 15)的核苷酸序列(525bp)，这样可以在目标基因的两边引入单酶切位点以用于亚克隆。

在本发明中，嵌合基因通常含有启动子、目标蛋白基因和终止子。优选地，该启动子应该在植物中高度表达，更优选地，该启动子是阶段和组织特异性的。在本发明中，优选地，用菜豆球蛋白作为种子特异性蛋白。

为了便于蛋白产品的后续亲和纯化，可以将不同种序列与目标蛋白融合，如 His 标签与 S 标签。为了从最终产物中除去这些纯化序列标记，通常在序列标签和目标蛋白之间引入特异性酶切位点，如肠激酶(EK)位点。本发明中，应用 His 标签与 EK 来作产物纯化之用。

如图 2 所示，应用人 G-CSF 编码基因和法国菜豆球蛋白启动子和终止子构建了三个嵌合基因。其中包括：具有 His 标签与 EK 位点的构建体 H；具有菜豆球蛋白信号肽和 His 标签与 EK 位点的构建体 SH；仅具有菜豆球蛋白信号肽的构建体 S。

可以用本领域通用的很多载体来构建发明的其他构建体。在本发明中，优选地使用转化植物常用的双元载体，如农杆菌双元载体。农杆菌双元载体通常由 T-DNA 的右臂(RB)、左臂(LB)，新霉素磷酸转移酶 II(NPT II)选择标记和 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)报告基因组成。RB 与 LB 用来将它们之间的 DNA 区域转入特定植物的基因组中，NPT II 用来筛选生长在含有卡那霉素培养基上的植物转化体，而 GUS 基因用于通过酶切鉴定来确认转化体。质粒中的嵌合基因通过限制性内切酶如 HindIII、BamHI 以及类似物来酶切，然后把嵌合基因克隆到与嵌合基因有相同单酶切位点的

农杆菌双元载体中而形成最终的构建体。在本发明中，优选地应用一种农杆菌双元载体 pBI121 来形成最终构建体。

在本发明中，将上述最终构建体转入到植物中。该植物优选地选自烟草和拟南芥。在应用拟南芥时，应用真空渗透法通过农杆菌系统转化开花花蕾细胞，其产生的种子能携带外源基因，从拟南芥种子中再生出转基因植物。在应用烟草时，应用叶盘转染法通过农杆菌系统转化叶盘外植物体，可以从携带外源基因的愈伤组织再生出转基因植物。

可以用 Southern 分析来鉴别植物基因组的整合情况，用 Northern 印迹来证实基因在 mRNA 水平的表达，然后，用 Western 杂交来证实基因在蛋白水平的表达。

目标蛋白，比如在拟南芥之类的转基因植物种子中产生的 hG-CSF 在体外的生物活性可以通过 MTT 测定法用细胞增值分析来测定，例如，因子依赖性的鼠类成髓细胞系 NFS-60。

本发明将通过下列实施例结合附图予以详细描述。

实施例 1 嵌合基因 pTZ/Phas/His/EK/hG-CSF(构建体 H)的构建

hG-CSF 的扩增

用图 16 所示的特异引物 5'GCSF-1 与 3'GCSF，通过 PCR 扩增 pB/KS/hG-CSF 中的编码 hG-CSF 成熟肽(图 15)的核苷酸序列(525bp)。该扩增在 hG-CSF 基因中引入了用于亚克隆的 1 个 5'NcoI 位点和 1 个 AccI 位点。制备 50 μ l 的 PCR 反应混合物，该混合物包含：40ng pB/KS/hG-CSF 的 DNA 模板链，1X Pfu 缓冲液(Stratgene, USA)，0.2mM dNTP，0.5 μ M 5'GCSF-1 引物，0.5 μ M 3'GCSF 引物，2.5 单位 Pfu DNA 聚合酶(2.5u/ μ l, Stratgene, USA)。PCR 条件设置如下：94 $^{\circ}$ C 5min；94 $^{\circ}$ C 30s，58 $^{\circ}$ C 30s，72 $^{\circ}$ C 30s，共 25 个循环；之后，72 $^{\circ}$ C 延伸 7min，1 循环。

嵌合基因 pTZ/Phas/His/EK/hG-CSF 的构建(构建体 H)

纯化 PCR 产物并且进行 A-加尾反应。将包含 300ng PCR 产物，1X Taq DNA 聚合酶反应缓冲液(Promega, USA)，2.5mM MgCl₂，0.2mM dATP 与 5 单位 TaqDNA 聚合酶(5u/ μ l, Promega, USA)的 10 μ l 反应混合物在

70°C 温浴 2 小时。首先将已经 A-加尾的 PCR 产物连接到 pGEM®-T 载体上, 然后用 NcoI 与 NotI 酶将 hG-CSF 基因从 pGEM®-T/hG-CSF 上切下, 并克隆到含有 6 组相邻的组氨酸标签和肠激酶(EK)位点的 pET/His/EK 载体上, 产生的质粒命名为 pET/His/EK/hG-CSF。之后, 用 AccI 酶切割整个基因盒, 并将其克隆到含有菜豆球蛋白启动子和终止子的 pTZ/Phas 载体上, 形成质粒 pTZ/Phas/His/EK/hG-CSF(图 11)。

实施例 2 pBK/Phas/SP/His/EK/hG-CSF(构建体 SH)的构建

pGEM®-T/hG-CSF 质粒的构建如上所述。然后, 用 NcoI 与 NotI 酶将目标基因从载体上切下来, 克隆到含有部分菜豆球蛋白信号肽序列、组氨酸标签和 EK 位点的 pET/SP/His/EK 载体中, 从而形成质粒 pET/SP/His/EK/hG-CSF。用 NdeI 与 AccI 酶切割整个基因盒并克隆至含有启动子, 扁豆球蛋白信号肽序列其它部分的 pBK/Phas/SP 载体中, 得到成的载体命名为 pBK/Phas/SP/His/EK/hG-CSF(图 12)。

实施例 3 嵌合基因 pBK/Phas/SP/hG-CSF(构建体 S)的构建

首先用图 16 所示的两个特异性引物 5'GCSF-2 和 3'GCSF, 通过 PCR 方法扩增 pB/KS/hG-CSF 载体中的编码 hG-CSF 成熟肽段的核苷酸序列 (525bp)。该扩增在目标基因中引入了用于亚克隆的 5'NdeI 位点和 3'AccI 位点。PCR 反应混合物溶液(除用 5'GCSF-2 引物代替 5'GCSF-1 引物外)与 PCR 条件与实施例 1 相同。PCR 产物经过纯化并且进行 A 加尾反应, 如同实施例 2。将 A-加尾后的 PCR 产物连接到 pGEM®-T 载体上。应用 NdeI 与 AccI 酶将目标基因从 pGEM®-T/hG-CSF-NoHis 载体上切下, 克隆到含有菜豆球蛋白启动子, 菜豆球蛋白信号肽序列和终止子的 pBK/Phas/SP 载体上。得到的质粒命名为 pBK/Phas/SP/hG-CSF(图 13)。

实施例 4 克隆嵌合基因到农杆菌双元载体中

在该实施例中, 使用由 T-DNA 的右臂(RB)、左臂(LB)、新霉素磷酸转移酶 II(NPTII)选择标记和 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)报告基因组成的农杆菌双元载体 pBI121。用 HindIII 酶切上所述制备的质粒

pTZ/Phas/His/EK/hG-CSF 、 pBK/Phas/SP/His/EK/hG-CSF 、 pBK/Phas/SP/hG-CSF 中的这三个嵌合基因并克隆至农杆菌双元载体 pBI121 中，从而形成三个最终构建。分别命名为 pBI/Phas/His/EK/hG-CSF (H) 、 pBI/Phas/SP/His/EK/hG-CSF (SH) 、 pBI/Phas/SP/hG-CSF (S)，准备用作植物转化(图 14)。

实施例 5 植物转化

将实施例 4 所准备的 3 个嵌合基因通过农杆菌转化系统转化到烟草和拟南芥中。在冰上融化农杆菌感受态细胞的等分试样(40 μ l)。然后将感受态细胞与 1 μ l 质粒 DNA(~500ng)轻轻混合，并置于冰上 1min。基因电穿孔转移仪(BioRad)设置为 25 μ F，2.5kV 与 600ohms，然后将细胞-DNA 混合液转移到一只预冷的电穿孔塑料管(Bio-Rad, U.S.A)中，无任何气泡地置于塑料管底部。然后对塑料管进行脉冲处理。脉冲后，在管中加入 1ml SOC 培养基(2%细菌培养用胰化蛋白胨，0.5%Bacto 酵母提取物，10mM NaCl，2.5mM KCl，10mM MgCl₂，10mM MgSO₄ 与 20mM 葡萄糖)。快速再悬浮细胞并转移至 5ml 聚丙烯圆底试管 (Falcon) 中，在 28 $^{\circ}$ C 震荡 2 小时。然后，将 5 μ l、50 μ l 和剩下的细胞涂布于加有 50mg/L 利福平、25mg/L 庆大霉素和 50mg/L 卡那霉素的 LB 培养皿中，28 $^{\circ}$ C 培养 2 天，选择筛选转化的农杆菌菌落。

在拟南芥中，利用土壤农杆菌-Ti 质粒系统，通过真空渗透法转化开花的花蕾细胞，产生出携带外源基因的种子，可以从种子再生出转基因植物。

在烟草中，通过农杆菌系统借助叶盘外植体转染法转化植物细胞。可从携带外源基因的愈伤组织中再生出转基因植株。

分析

Southern 印迹分析

通过 Southern 分析来检验基因组的整合情况。用 Doyle 等人的 CTAB 法(Doyle, J.D., Doyle, J.L.和 Bailey, L.H. 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue, Focus 12, 13-15.1990)从转基因烟草或拟南芥中提取基

基因组 DNA。用 HindIII 酶于 37°C 隔夜消化基因组 DNA(10 μ g)。通过在 0.8% 琼脂糖/TAE 凝胶上凝胶电泳分离酶切后的 DNA，并用 VacuGeneXL Vacuum Blotting System(Pharmacia Biotech, U.S.A)将其转移到一带正电荷的尼龙膜上(Boehringer Mannheim, Germany)。通过 PCR 扩增，利用地高辛 DNA 标记试剂盒(Boehringer Mannheim, Germany)制备针对目标蛋白成熟肽段序列的 DIG-标记的 DNA 有义探针。按照 DIG 核酸试剂检测试剂盒 (Boehringer Mannheim, Germany)所叙述的方法，尼龙膜与 DIG-标记的 DNA 有义探针进行杂交，并用抗地高辛抗体-AP(碱性磷酸酶, Alkaline phosphatase)进行检测。

如图 3 和图 7 所示，实施例 5 所制备的所有 3 个嵌合基因 H, SH 和 S 都有在拟南芥植物基因组和烟草基因组中检测到，序列长度大约为 3kb。

Northern 印迹分析

从拟南芥长出的长角果的中提取出总 RNA。在 1%的琼脂糖/甲醛胶中用凝胶电泳分离总长角果 RNA(10 μ g)，并用毛细管转移法将其过夜转移到带正电的尼龙膜上(Boehringer Mannheim, Germany)。通过 PCR 扩增，用地高辛标记试剂盒 (Boehringer Mannheim, Germany)制备出反义 DIG-标记 DNA 探针。按照 DIG 核酸试剂检测试剂盒 (Boehringer Mannheim, Germany)所叙述的方法，尼龙膜与 DIG-标记的 DNA 反义探针进行杂交，并用抗地高辛抗体-AP (碱性磷酸酶, Alkaline phosphatase)进行检测。

如图 4 和图 8 所示，由于在发育的种子中检测到了长 700bp 的外源基因的转录本，因此证实了上述 3 基因在 mRNA 水平上的表达。

Western 印迹分析

在印迹前，用 16.5% Tricine-SDS-PAGE 分离从成熟转基因种子中提取的种子总蛋白(100 μ g)。之后将尚未染色的 tricine-胶放在 Dunn 转移缓冲液(10mM NaHCO₃, 3mM Na₂CO₃ 和 0.02%SDS)中平衡 20 分钟。同时用 100%甲醇处理聚双氟乙烯 (PVDF)膜 1 分钟，之后在 Dunn 转移缓冲液中平衡 20 分钟。通过转渍器(Bio-Rad, USA)将 tricine-胶中的蛋白印迹到 PVDF 膜上。转移室中充满了 Dunn 转移缓冲液并将其放在冰上。在

44V 条件下进行电转化 1 小时。

电印迹后, 用 AURORA Western 印迹化学发光检测系统(ICN, USA) 对尼龙膜置进行免疫检测。首先将尼龙膜置于 Dunn 转移缓冲液中 15 分钟, 之后用 1X 磷酸盐缓冲液(PBS)(58mM Na₂HPO₄, 17mM NaH₂PO₄•2H₂O 和 68mM NaCl)冲洗两次。尼龙膜在阻断缓冲液(1X PBS, 0.2% Aurora TM 阻断剂和 0.1% Tween-20)中温浴 1 小时, 并且在含有 0.2μg/ml 抗-hG-CSF 多克隆抗体(R&D Systems Inc, USA)的阻断缓冲液中再温浴 1 小时。在阻断缓冲液中清洗 5 分钟(2 次)将未结合的一抗的除去, 之后在含有 1:5000 抗山羊 IgG 二抗 - 碱性磷酸酶轭合物的阻断液缓冲液中温浴尼龙膜 1 小时。通过在阻断缓冲液中清洗膜 5 分钟(3 次)再次除去未结合的二抗。然后在分析缓冲液中[20mM Tris-HCl(pH9.8), 1mM MgCl₂]清洗尼龙膜 2 分钟(2 次)。加入 1ml 化学荧光底物溶液后, 将尼龙膜曝光和显影。

如图 5 和图 9 所示, 利用抗-hG-CSF 多克隆抗体通过 Western 印迹证实了蛋白水平的表达。在成熟转基因种子中检测到了 hG-CSF, 都与预期的分子量一致, 来自构建体 S 的蛋白分子量为 20.5KD, 来自构建体 SH 的蛋白分子量为 21KD, 来自构建体 S 的蛋白分子量为 18.6KD。所述蛋白水平都达到了可提取的总种子蛋白的 0.2%, 或说每克种子 200μg hG-CSF。

功能分析

在转基因拟南芥种子中产生的 hG-CSF 的体外生物活性可以用因子依赖型的鼠类造血细胞系 NFS-60 通过细胞增值分析来测定。NFS-60 完全依赖白细胞介素 3(IL-3)或巨噬细胞集落刺激因子来生长和保持其在体外的活力。此类细胞在应答 hG-CSF 时也增值。因而, NFS-60 细胞可以用于功能分析。

快速地从液氮储存罐中取出装有 1ml NFS-60 细胞(ATCC, USA)的冷冻管并在 37°C 的水槽中温浴, 定期震荡使细胞融解。然后, 将冷冻管中的所有细胞都转移到一个 15ml 的离心管中。边匀速搅拌边逐滴加入大约 15ml 的 RPMI1640 完全培养基[16.2g/L RPMI1640 粉(Gibco, USA), 10mM HEPES, 1mM 丙酮酸钠, 1.5g/L 碳酸氢钠, 0.05mM β-巯基乙醇, 5ng/ml

人重组巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)(PeproTech, USA), 10%胎牛血清(FBS)和 1%PSN(50 μ g/ml 青霉素 G 钠盐, 50 μ g/ml 硫酸链霉素和 100 μ g/ml 硫酸新霉素)]以稀释冻存物(DMSO)和防止细胞渗透性的突然改变。接着将细胞混合物在 1000rpm, 20 $^{\circ}$ C 离心 10 分钟, 在 5ml 预热的 RPMI 1640 完全培养基中重新悬浮细胞颗粒。将 10 μ l 细胞与 10 μ l 锥虫蓝混合, 只有不具活性的细胞才染成蓝色。之后将混合物转移到血细胞计数器。在显微镜下计数与观察细胞, 可以检测到细胞的浓度与活力。在培养瓶中用新鲜 RPMI 1640 完全培养基培养适量的细胞, 细胞的起始密度为 2.5×10^4 细胞/ml, 此后细胞在 37 $^{\circ}$ C 具有 5% CO₂ 的培养箱中生长, 每隔 2-3 天传代, 使细胞最大密度不超过 5×10^5 细胞/ml。

MTT 分析

为了测定由转基因烟草或拟南芥产生的 hG-CSF 诱导的 NFS-60 细胞的增值, 进行快速比色测定(MTT 测定)(Mosmann, T. 1983, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63)。

用四唑盐 MTT (3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐)分析法来测定转基因种子中表达的 hG-CSF 诱导的 NFS-60 细胞增值。首先在培养瓶中培养 NFS-60 细胞直到细胞密度为 3×10^5 细胞/ml。接着把细胞转移到一个 50ml 的试管中, 1500rpm 离心 5 分钟。弃去上清, 将细胞再悬浮在适量体积的 RPMI 1640 培养基中[RPMI 1640 完全培养基, 不含 10% FBS 和 5ng/ml 人 M-CSF(PeproTech, USA)], 使细胞密度为 1×10^5 细胞/ml。向 96-井微孔板的每个井中加入 100 μ l 的细胞培养物(~10000 细胞), 在 5% CO₂ 的培养箱中 37 $^{\circ}$ C 饥饿培养 4-6 小时。然后将溶于 RPMI 1640 培养基(RPMI 1640 完全培养基, 不含 10% FBS 与 5ng/ml 人 M-CSF, 含有 20%热失活的 FBS)的种子总蛋白提取物(来自转基因种子)的 100 μ l 连续稀释溶液加到每个井中, 一式三份。同时, 将大肠杆菌 *E. coli* (PeproTech, USA)产生的纯 rhG-CSF 的 100 μ l 连续稀释液加入到井中, 一式三份作标准曲线。然后 37 $^{\circ}$ C 培养细胞 48 小时, 向每个井中加入 20 μ l MTT 溶液(5mg/ml MTT 的 HPBS 溶液, pH 7.4), 37 $^{\circ}$ C 培养 2 小时, 将培

养板在 2000 rpm 离心 10 分钟,弃置所有上清液,在每井加入 100 μ l DMSO 以裂解细胞并溶解紫色结晶。每井的紫色强度用微板分光光度计在 OD₅₇₀ 测量。

如图 6 和图 10 所示,用鼠类造血细胞系 BFS-60 和 MTT[3-(4, 5-二甲基噻唑-2)-2, 5-二苯基四氮唑溴盐]法,以纯化的 hG-CSF 作为标准测定转基因拟南芥和烟草种子中表达的 hG-CSF 的生物学活性。粗蛋白提取物中的转基因 hG-CSF 的体外生物活性达到了 hG-CSF 标准值的 70%。

目前 hG-CSF 的表达水平(提取总蛋白的 0.2%)可以与在植物中表达的其它几种人蛋白水平相媲美,甚至更好。为临床应用,需要 hG-CSF 的剂量为 1-60ug/kg 体重/天,一名 50 千克体重的病人每天需要 50 到 300ug 人重组 hG-CSF,相当于 0.3 到 20g 本发明产生的转基因植物。

本发明的植物生产方法具有广阔应用前景:可以用低廉得多的方式大规模生产某些供应紧缺的昂贵的生物医药产品,这对疾病治疗、诊断和预防具有很高的经济价值,并使不太富裕的发展中国家更容易获得此类药物。

序列表

<110> 香港中文大学

<120> 含有人粒细胞集落刺激因子的转基因植物和其制备方法

<130> 4

<150> US10/611,226

<151> 2003-06-30

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 525

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

acccccctgg gccctgccag ctccctgccc cagagcttcc tgctcaagtg cttagagcaa      60
gtgaggaaga tccagggcga tggcgcagcg ctccaggaga agctgtgtgc cacctacaag      120
ctgtgccacc ccgaggagct ggtgctgctc ggacactctc tgggcatccc ctgggctccc      180
ctgagcagct gccccagcca ggccctgcag ctggcaggct gcttgagcca actccatagc      240
ggccttttcc tctaccaggg gctcctgcag gccctggaag ggatctcccc cgagttgggt      300
cccaccttgg acacactgca gctggacgtc gccgactttg ccaccacat ctggcagcag      360
atggaagaac tgggaatggc ccctgccctg cagcccacce agggtgcat gccggccttc      420
gcctctgctt tccagegccc ggcaggaggg gtccctagttg cctcccatct gcagagcttc      480
ctggaggtgt cgtaccgcgt tctacgccac cttgcccagc cctga                          525

```

<210> 2

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gcagccatgg ccaccccct gggcct

27

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

cgccatatgc caccccctg ggcct

26

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gaagtatact caggctggg caaggtggc

29

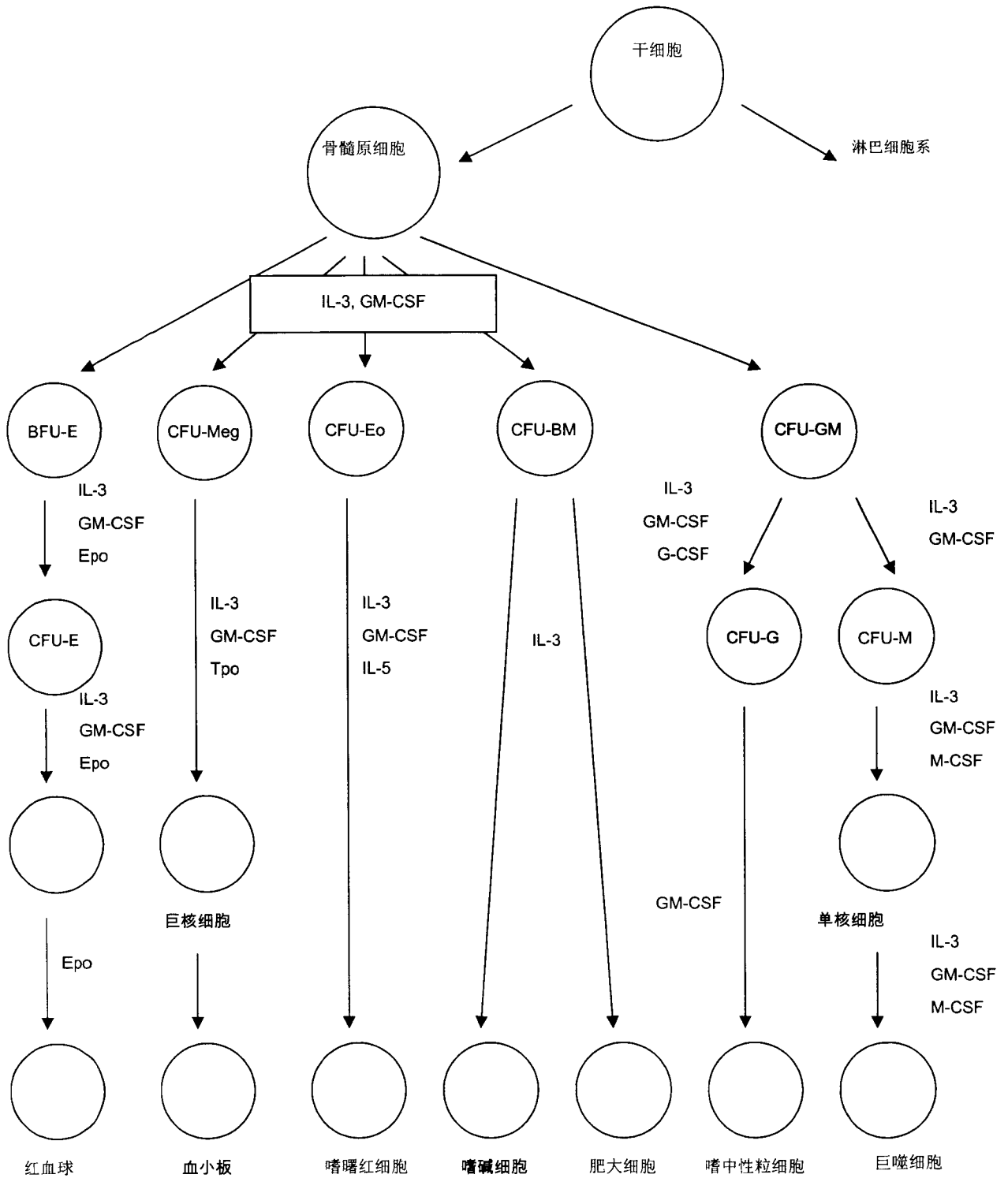


图 1

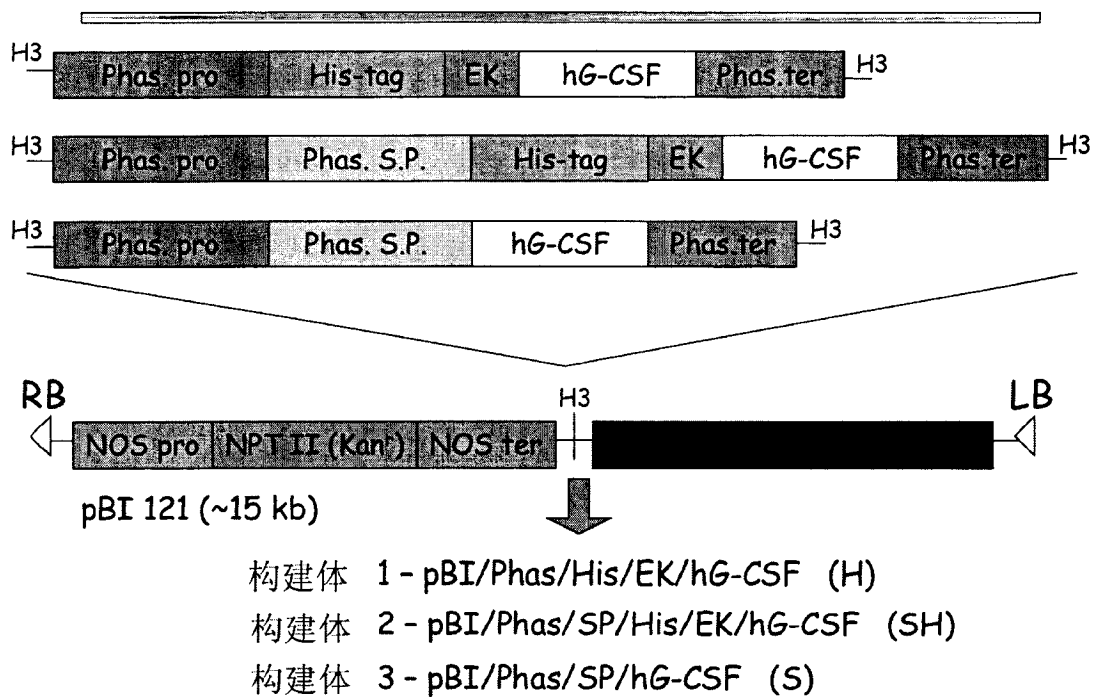


图 2

Southern 印迹

拟南芥

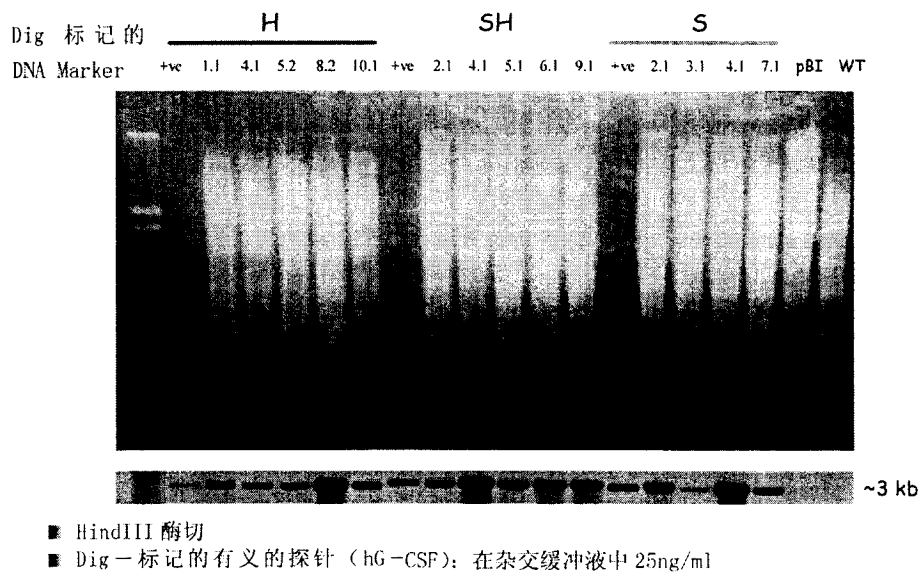
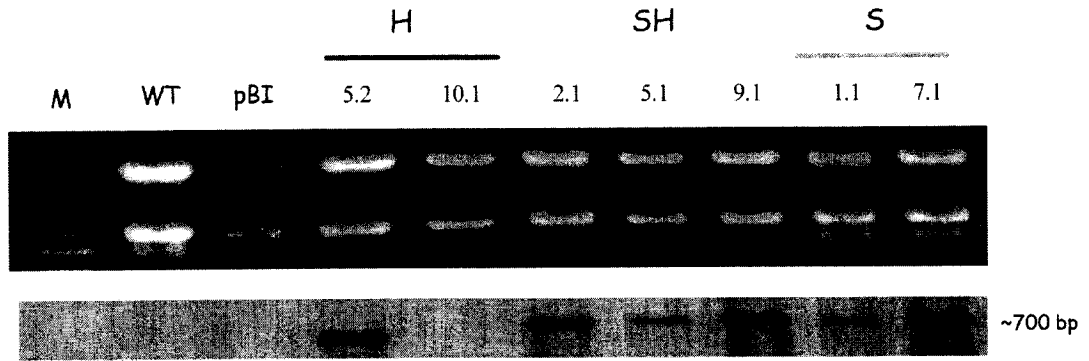


图 3

Northern 印迹

拟南芥

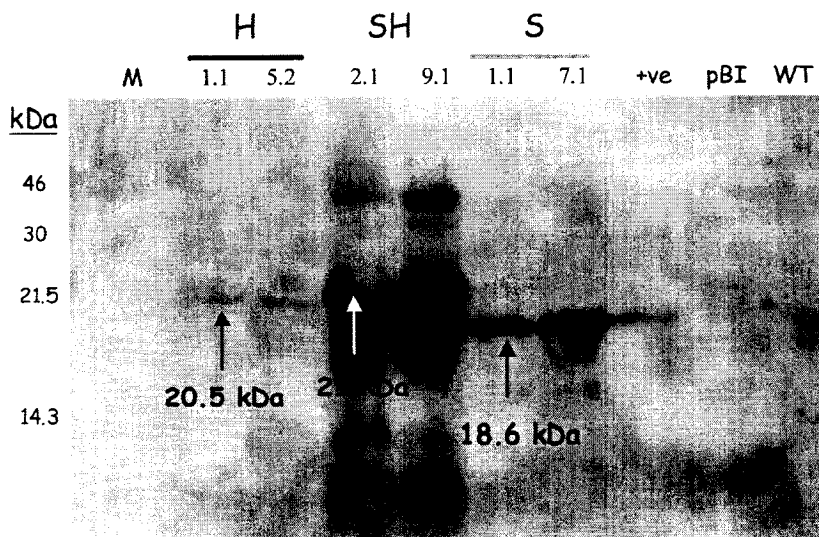


- DID-标记的反义探针 (hG-CSF) :在杂交缓冲液中 25ng/ml

图 4

Western 印迹

拟南芥



- 种子总蛋白: 100 u g/泳道
- +ve 对照—商用 rhG-CSF(E coli):20ng
- 抗-hG-CSF 多克隆抗体 (1: 500)

图 5

功能分析

拟南芥

转基因拟南芥产生 rhG-CSF 的生物活性

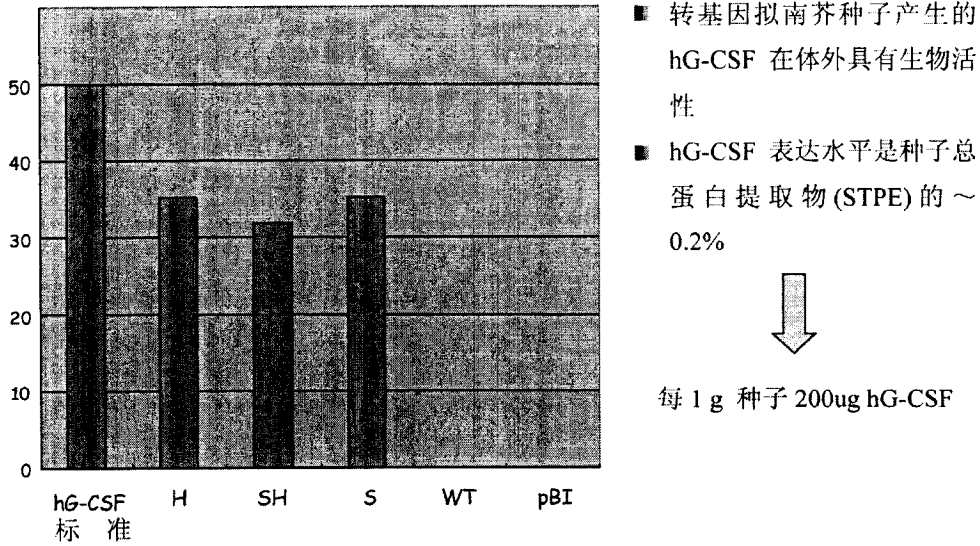
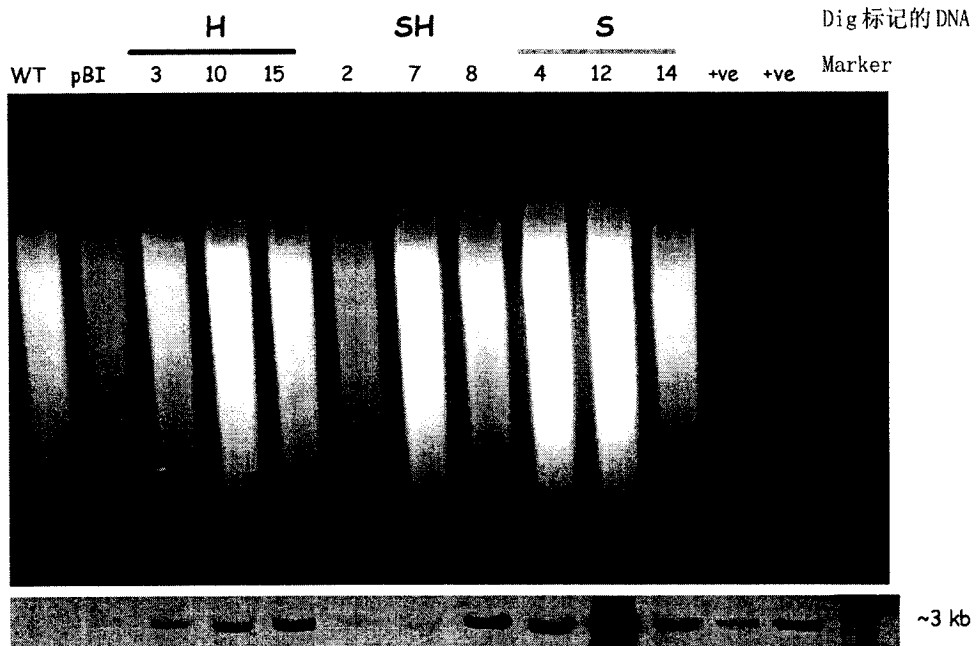


图 6

Southern 印迹

烟草

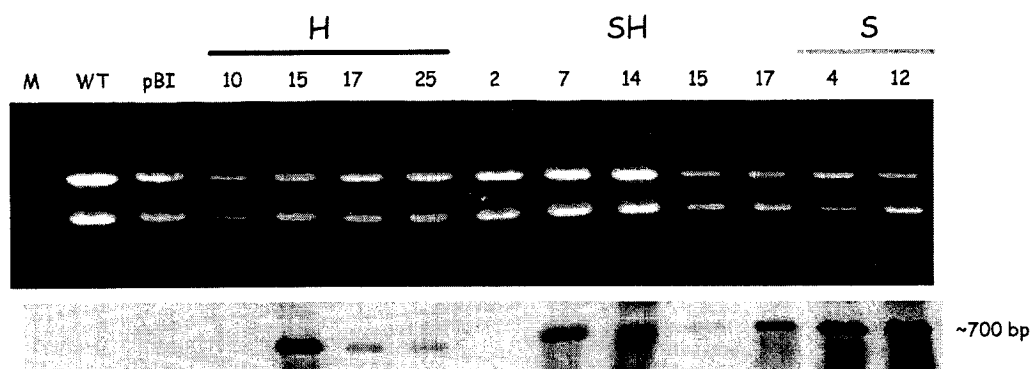


■ Dig-标记 DNA 有义探针 (hG-CSF): 在杂交缓冲液中 25ng/ml

图 7

Northern 印迹

烟草

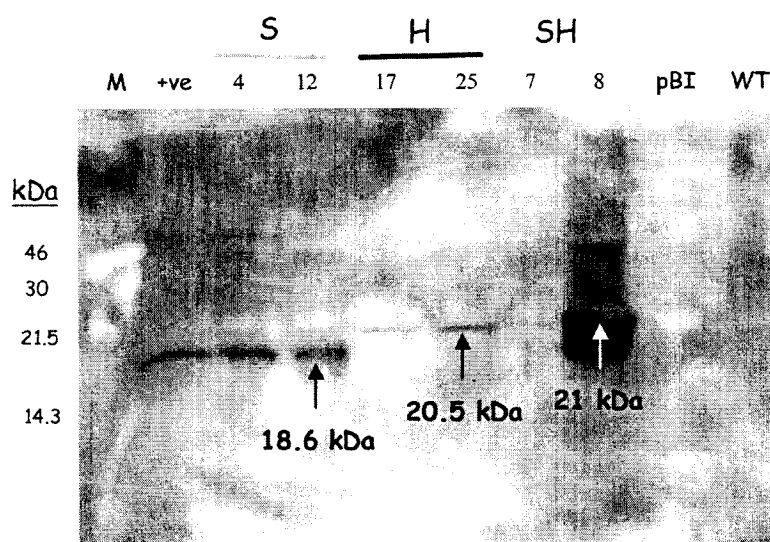


- DID-标记的反义探针 (hG-CSF) :在杂交缓冲液中 25ng/ml

图 8

Western 印迹

烟草



- 种子总蛋白: 100 μ g/泳道
- +ve 对照——商用 rhG-CSF(E coli):20ng
- 抗-hG-CSF 多克隆抗体 (1: 500)

图 9

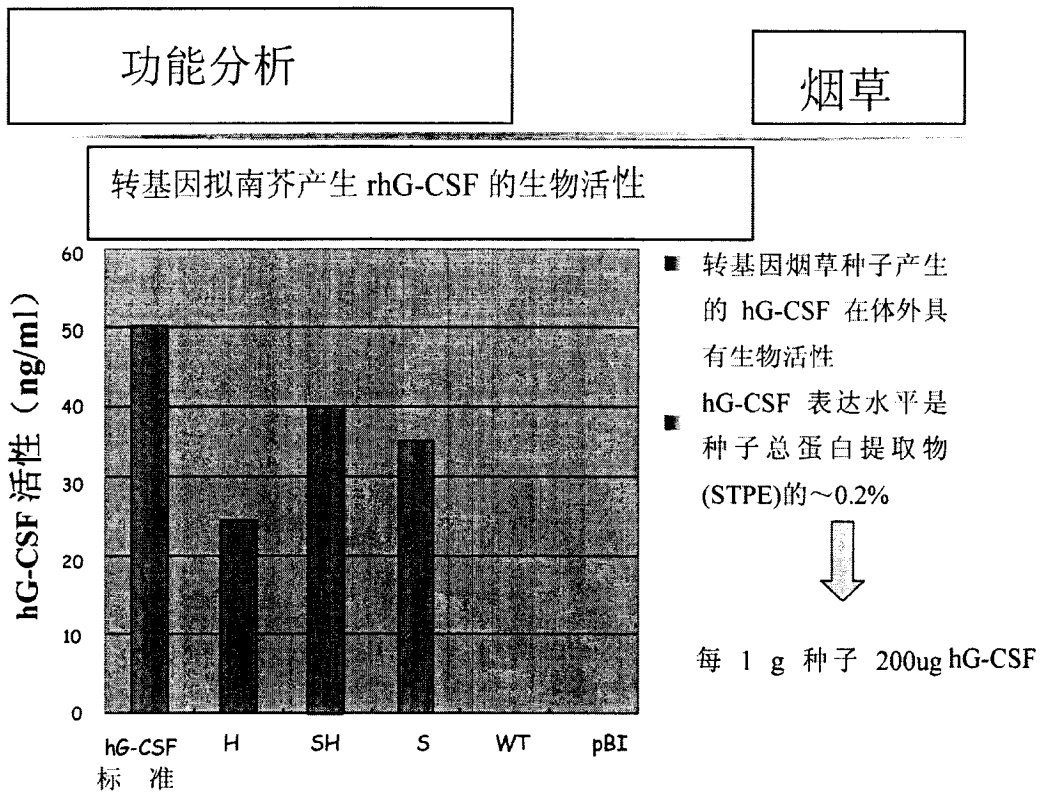


图 10

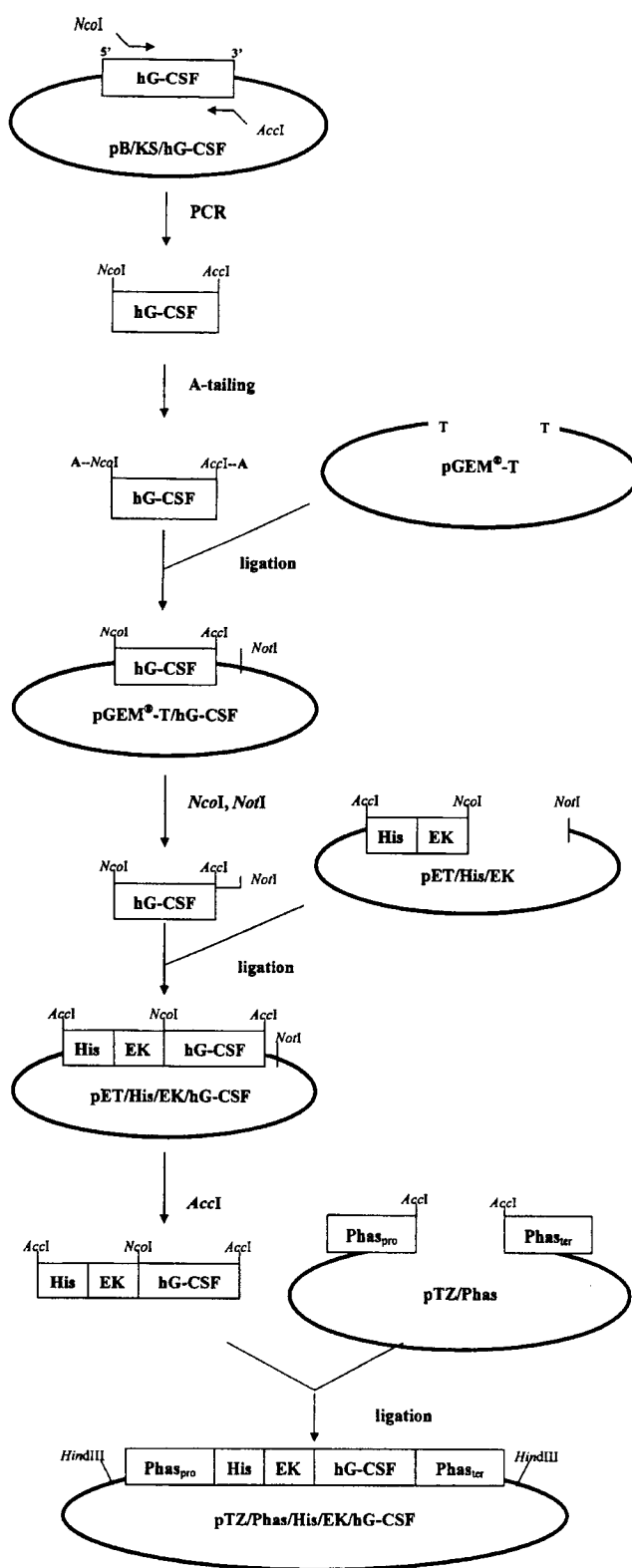


图 11

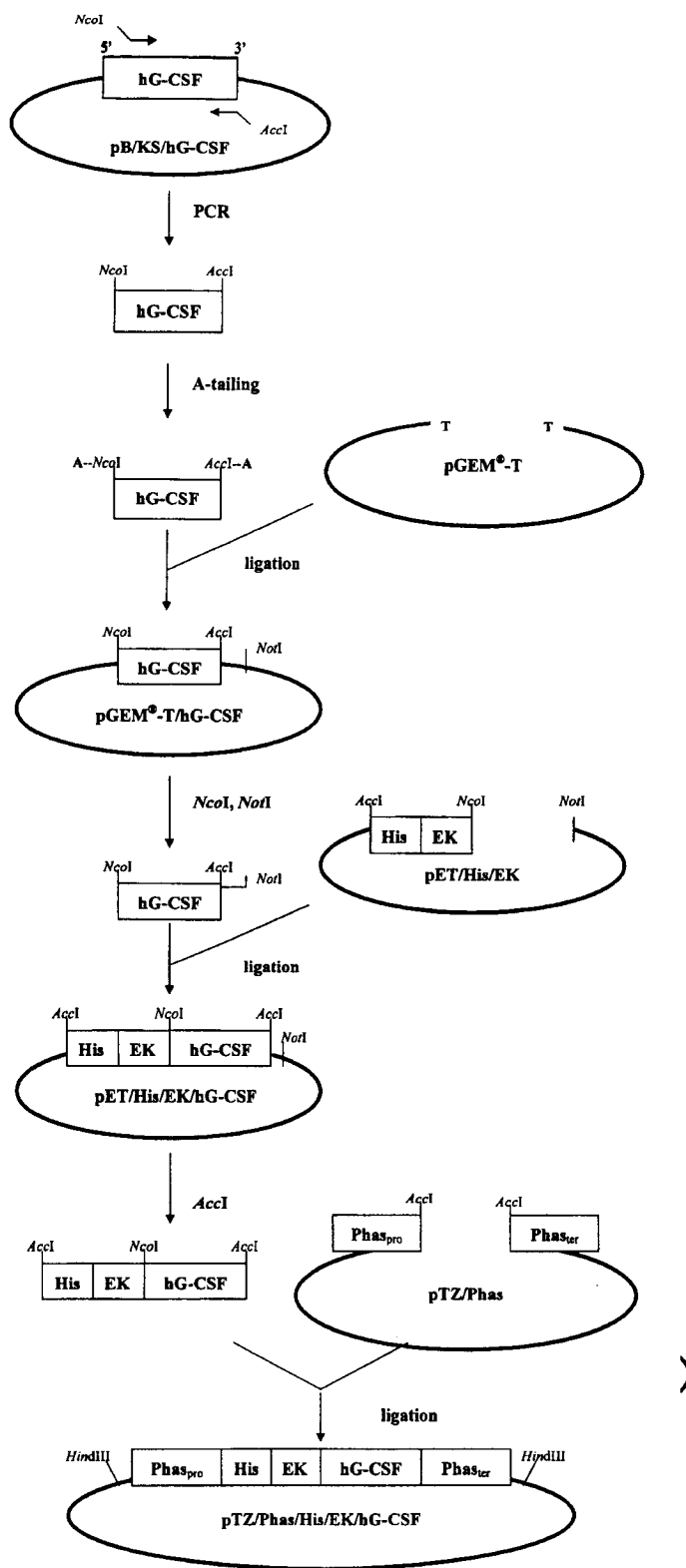


图 12

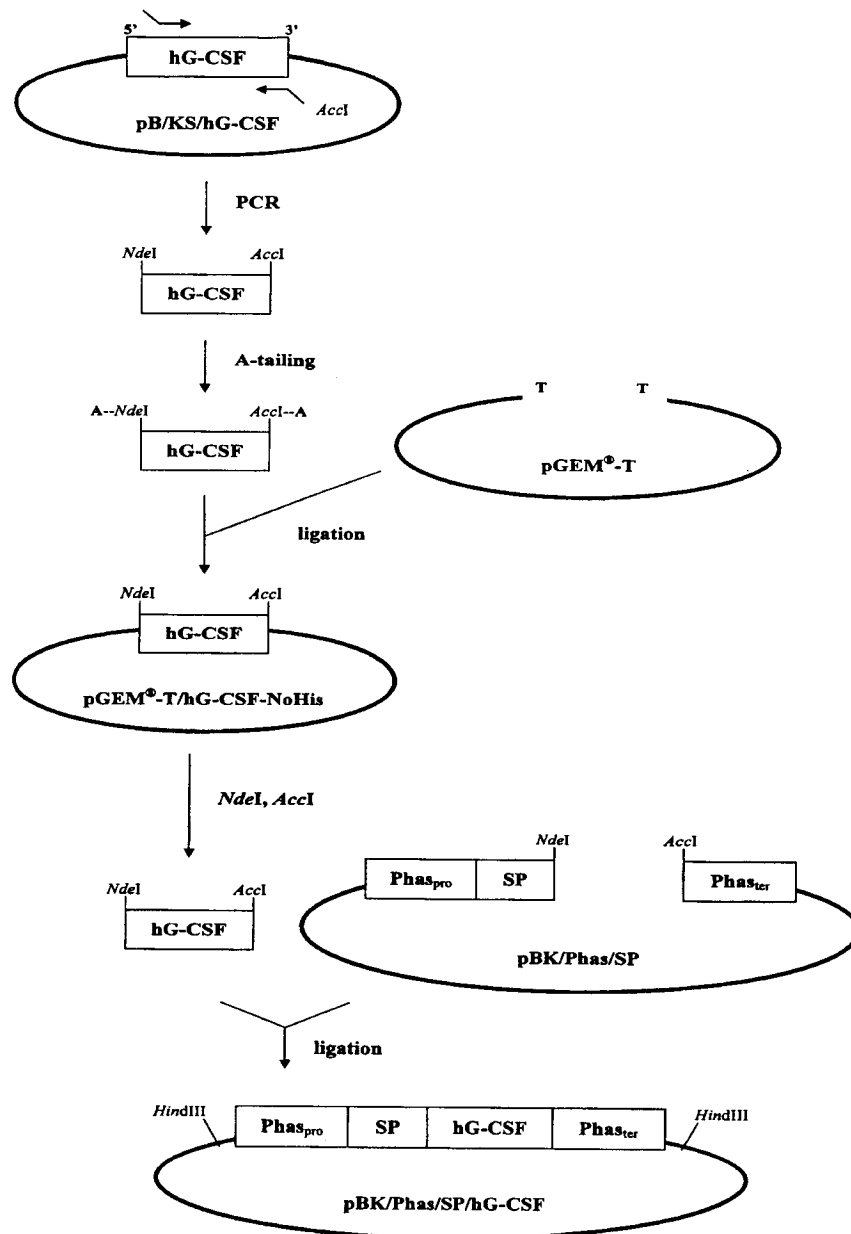


图 13

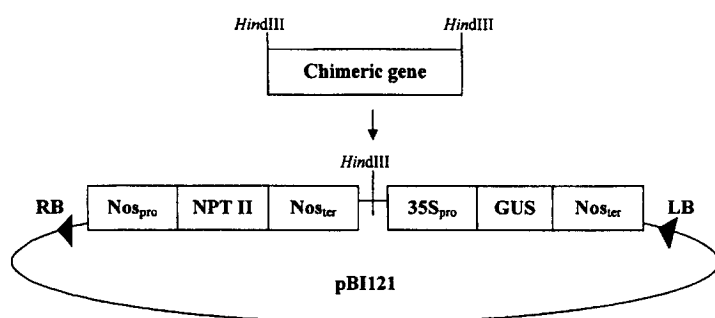


图 14

ACCCCCCTGG GCCCTGCCAG CTCCCTGCCC CAGAGCTTCC TGCTCAAGTG CTTAGAGCAA GTGAGGAAGA
 TCCAGGGCGA TGGCGCAGCG CTCCAGGAGA AGCTGTGTGC CACCTACAAG CTGTGCCACC CCGAGGAGCT
 GGTGCTGCTC GGACACTCTC TGGGCATCCC CTGGGCTCCC CTGAGCAGCT GCCCAGCCA GGCCCTGCAG
 CTGGCAGGCT GCTTGAGCCA ACTCCATAGC GGCCTTTTCC TCTACCAGGG GCTCCTGCAG GCCCTGGAAG
 GGATCTCCCC CGAGTTGGGT CCCACCTTGG ACACACTGCA GCTGGACGTC GCCGACTTTG CCACCACCAT
 CTGGCAGCAG ATGGAAGAAC TGGGAATGGC CCCTGCCCTG CAGCCCACCC AGGGTGCCAT GCCGGCCTTC
 GCCTCTGCTT TCCAGCGCCG GGCAGGAGGG GTCCTAGTTG CCTCCCATCT GCAGAGCTTC CTGGAGGTGT
 CGTACCGCGT TCTACGCCAC CTTGCCCAGC CCTGA

图 15

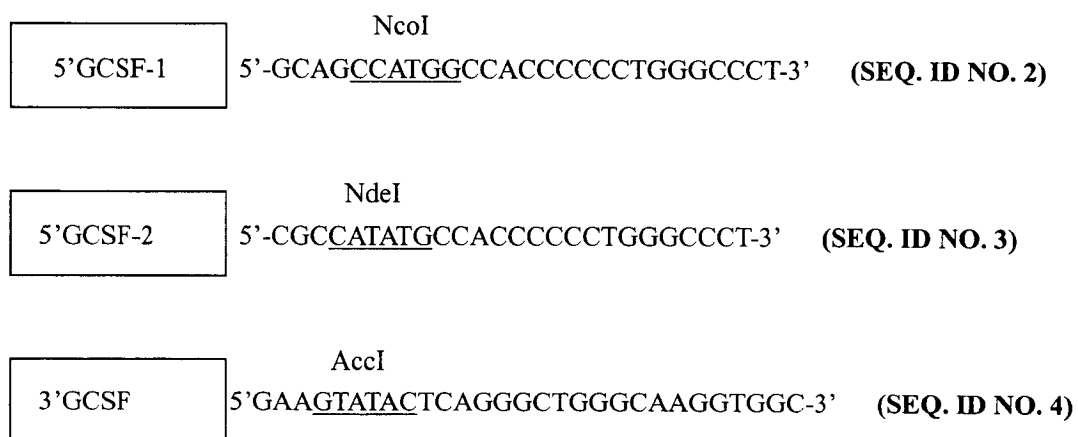


图 16