

件 陶,安胜军,邵铁梅,等. 微型人胰岛素基因载体的构建及其在花生中的表达[J]. 江苏农业科学,2019,47(4):42-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.04.009

微型人胰岛素基因载体的构建及其在花生中的表达

件 陶¹,安胜军²,邵铁梅¹,朱正歌³,焦 展¹,刘 培¹,李 雪¹

(1. 河北化工医药职业技术学院/河北省高校生物反应器与蛋白类药物应用技术研发中心,河北石家庄 050026;

2. 河北中医学院科研中心,河北石家庄 050091; 3. 河北师范大学生命科学学院,河北石家庄 050024)

摘要:制备和培养含微型人胰岛素基因的转基因花生植株,从而利用转基因花生表达微型人胰岛素。首先按照植物偏爱密码子设计合成了修饰 C 肽的微型人胰岛素基因(mini insulin,MI),其中胰岛素 B 链通过丙-丙-赖三肽和 A 链相连接,在表达载体 pBI121 上构建了由花椰菜花叶病毒 CAMV35S 启动子驱动表达微型人胰岛素的重组质粒 RIG。质粒 RIG 经农杆菌介导转化至花生胚和去胚子叶中,抗生素筛选得到转基因花生苗,之后利用 PCR 和 Western-blot 对转基因花生幼叶进行分子生物学鉴定。结果显示,试验优化了农杆菌介导的花生转基因技术,并且得到了转基因花生苗;分子生物学技术鉴定结果显示,微型人胰岛素基因成功转入花生叶片基因组中,且在花生叶片中表达,其中以花生胚为外植体长出的再生苗的阳性检测率为 2.27%。目前正在探索微型人胰岛素基因在花生油体中高效表达的方法,为转基因花生规模化生产微型人胰岛素提供理论基础。

关键词:分子医药农业;转基因花生;微型人胰岛素;载体构建;基因表达

中图分类号: Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)04-0042-05

胰岛素是在 1921 年由加拿大人班廷和贝斯特发现的一种由胰脏内的胰岛 β 细胞分泌的蛋白质类激素,由 A 链和 B 链 2 条多肽链通过二硫键连接而成。胰岛素参与调节糖代谢,控制血糖平衡,可用于治疗糖尿病。截至 2015 年,全球约有 4.15 亿人患有糖尿病,中国和印度的糖尿病患者总数最高,分别是 1.1 亿和 6 900 万人^[1]。其中,II 型糖尿病占糖尿病发病率的 90%^[2-3]。有研究证明,对 II 型糖尿病患者进行

短期胰岛素强化治疗,可使患者的血糖快速达标,并且还可改善患者的胰岛 β 细胞功能,使部分患者获得较长的缓解期^[4]。自 2012 年至 2015 年,每年有 150 万~500 万人死于糖尿病^[1],在 2014 年,由糖尿病导致的经济花费约为 6 120 亿美元。截至 2013 年,各种抗糖尿病药物有 9 类,其中,胰岛素和胰岛素类似物所占市场份额最高,治疗效果也最好^[5]。

现今人们使用的胰岛素大部分都是生物合成人胰岛素及其类似物^[6]。重组人胰岛素制备方法主要分为 5 类,包括酶促修饰法^[7],大肠杆菌发酵生产法(其一是 A 链 B 链合成法,其二是胰岛素原合成法)^[8-9],酵母发酵生产法(丹麦诺和诺德)^[10-11],哺乳动物细胞系生产法^[12],以及转基因植物生产法^[13-16]。分子医药农业(转基因植物生产法)是指通过基因工程的方法,将需要的重组蛋白基因插入到植物细胞(植物本身不表达这些重组蛋白),得到转基因植物,然后利用转基因植物来表达重组蛋白。分子医药农业表达系统包括生物总量表达系统、悬浮细胞和发根培养系统、叶绿体表达系统、种子和油体表达系统、果实/蔬菜表达系统以及体细胞胚表达系统等^[17]。其中,植物油体表达系统中将重组蛋白与油素蛋白

收稿日期:2017-10-17

基金项目:河北省高等学校科学技术研究重点项目(编号:ZD2014087);河北省高等学校科学技术研究重点项目(编号:ZH2012081)。

作者简介:件 陶(1985—),女,河北石家庄人,硕士,助教,主要从事植物生物反应器生产蛋白类药物研究。Tel:(0311)85110352; E-mail:wt12327@126.com。

通信作者:安胜军,博士,教授,主要从事植物生物反应器生产蛋白类药物研究,E-mail:sjsjan@126.com;朱正歌,博士,教授,主要从事植物生长发育及抗逆生理研究,E-mail:zhuzhengge@hebtu.edu.cn。

优化研究[J]. 安徽农业科学,2012,40(7):3867,3880.

[14]王北艳,向殿军,殷奎德. 提高梗稻成熟胚抗性愈伤再生频率的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2012,24(1):28-31.

[15]周 艳,黄亚萍,周 遥,等. 农杆菌介导的遗传转化籼稻 Kasalath 的条件优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2013,39(5):471-477.

[16]易自力,曹守云,王 力,等. 提高农杆菌转化水稻频率的研究[J]. 遗传学报,2001,28(4):352-358.

[17]段忠卫,李希臣,张 军,等. 无选择标记转高赖氨酸蛋白基因水稻植株的培育[J]. 东北农业大学学报,2013,44(7):46-51.

[18]冯梦诗,叶 俊,侯莉莉,等. 无选择标记基因的优质香稻新品系培育[J]. 华北农学报,2015,30(5):92-96.

[19]Mejima M,Kashima K,Kuroda M,et al. Determination of genomic location and structure of the transgenes in marker-free rice-based cholera vaccine by using whole genome resequencing approach[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture,2015,120(1):35-48.

[20]王春萍,谢树章,蒋晓英,等. 农杆菌介导的籼稻科恢 675 快速遗传转化体系的建立[J]. 西南农业学报,2012,25(1):1-5.

[21]李素娟,樊秀霞,王 华,等. 水稻不同品种组培再生和转基因频率研究[J]. 核农学报,2013,27(12):1817-1827.

[22]张燕红,赵志强,吴泽新,等. 根癌农杆菌介导的水稻遗传转化体系的研究[J]. 新疆农业科学,2014,51(8):1457-1462.

[23]周 蕾,陈 晨. 农杆菌介导水稻遗传转化方法的优化研究[J]. 农业与技术,2015,35(17):33-34,37.

融合表达,利用油相和水相不相溶易分开的特点,在后期蛋白纯化过程中可以简单快速地将重组蛋白和其他植物蛋白分开,极大地降低后期纯化成本^[18]。花生(*Arachis hypogaea*)是我国重要的油料作物^[19~22],含油量在 40%~60%,利用花生油体系统生产重组蛋白具有很好的前景,目前这方面的研究较少。本研究探索利用转基因花生表达重组蛋白微型人胰岛素,从而为花生生产重组蛋白提供理论和技术上的准备。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

植物材料:花生品种冀花 2 号、冀花 4 号、冀花 0607-5 由河北农林科学院粮油作物研究所花生研究室惠赠,花生品种大白沙、改良海花 1 号、四粒红、拔二罐购自玉安种业公司。

工程菌株及质粒载体:根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 由笔者所在实验室保存。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购自北京博迈德生物基因技术有限公司。

试剂:卡那霉素(kanamycin)和链霉素(streptomycin)购自 Roche 公司。培养基所用的无机盐购自天津市科密欧化学试剂有限公司。所用激素购自 Solarbio 公司。连接酶和限制性内切酶购自宝生物工程(大连)有限公司。2 \times EasyTaq[®] PCR SuperMix(+dye)购自北京全式金生物技术有限公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒小量提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。蛋白检测一抗购自美国 Santa Cruz 公

司,检测二抗购自美国 KPL 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 载体构建 根据相关文献报道,按照植物偏爱密码子设计合成了修饰 C 肽的微型人胰岛素基因(mini insulin, MI),其中胰岛素 B 链通过丙-丙-赖三肽和 A 链相连接(参考国际专利 WO2004/111244)。在表达载体 pBI121 上构建了由花椰菜花叶病毒 CAMV35S 启动子驱动表达微型人胰岛素的序列。其中水稻信号肽 Rice α Amy3SP 和微型人胰岛素融合基因由公司合成,在水稻信号肽和微型人胰岛素之间添加胰蛋白酶识别序列 Klip27。将融合基因所在质粒和 PBI121 质粒同样用 BamH I 双酶切后,酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳纯化回收,然后加入 DNA Ligation Kit LONG 进行连接反应,4 $^{\circ}$ C 连接过夜。第 2 天取连接产物转化 DH5 α 大肠杆菌感受态细胞中,然后均匀涂布在含卡那霉素的 LB 固体培养基上,通过抗生素筛选,挑取长出的单菌落进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定,鉴定正确的菌液送去北京中科希林测序部进行 DNA 测序。最终测序正确的重组质粒命名为 RIG。质粒 RIG 结构示意图如图 1 所示。

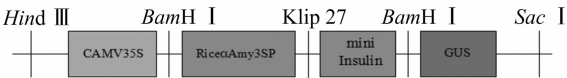


图1 重组质粒 RIG 结构示意图

对重组质粒 RIG 进行 PCR 鉴定所用引物见表 1。

表 1 检测重组质粒 RIG 所用引物

引物	引物序列 (5'→3')	引物长度 (bp)
RIF	CGCGGATCCATGCAGGTTCTCAATACCATGG	31
CX35S-GUSR	CAGACTGAATGCCACAGGC	20

1.2.2 根癌农杆菌介导的花生遗传体系的建立及优化

1.2.2.1 农杆菌侵染花生去胚子叶的诱导和分化 采用液

氮冻融法将 RIG 质粒转化至农杆菌 LBA4404 感受态细胞中。
1.2.2.2 去胚子叶的遗传转化 参考耿丽丽的方^[23]略有改动。选用花生品种冀花 2 号、冀花 4 号、冀花 0607-5、大白沙、改良海花 1 号。花生去壳后,将花生种子先置于 75% 乙醇中 1 min,然后放入 0.1% 氯化汞中 8 min,之后灭菌水洗 4 次,置于无菌滤纸上晾干;用无菌手术刀将花生 2 张子叶分开去胚后,将去胚子叶放在含噻苯隆的无菌蒸馏水中浸泡。弃含有噻苯隆的无菌蒸馏水,再用干净的无菌水洗 3 次。将已活化的根癌农杆菌 LBA4404 菌液离心,4 000 r/min,5 min。弃上清后用等体积的无菌水重悬菌体沉淀,然后将花生去胚子叶浸泡于重悬液中,过夜侵染。第 2 天用无菌水清洗花生去胚子叶 3 次后,再将去胚子叶正置放于共培养培养基上暗培养 2 d。2 d 后,将去胚子叶转到含 50 mg/L 卡那霉素的芽诱导培养基上,约 2 周后外植体上产生抗性芽;将抗性芽转移到含 30 mg/L 卡那霉素的伸长培养基上,约 2 周不定芽伸长;将伸长的诱导芽转到含 30 mg/L 卡那霉素的生根培养基上,2 周左右生根,有一些生根较迟缓;将生根的小苗进行炼苗,然后移栽到含营养土和蛭石(营养土和蛭石的体积比为 2:1)的花盆中,温室培养。

1.2.2.3 去胚子叶非转基因 花生去壳消毒后用无菌手术

刀将花生 2 张子叶分开并去掉胚,将去胚子叶正置放在芽诱导培养基上,2 周后诱导产生不定芽;将产生不定芽的花生外植体继代,转移到伸长培养基上,约 2 周左右,不定芽发生伸长;将伸长的不定芽转移到生根培养基上,2 周左右生根;将生根的小苗进行炼苗,然后移栽到含有营养土和蛭石(营养土和蛭石的体积比为 2:1)的花盆中,温室培养。

1.2.2.4 空白对照组处理 花生去壳消毒后,在无菌条件下用手术刀分开花生子叶并去掉胚,之后将去胚子叶正置于 MS 培养基上培养。

1.2.2.5 农杆菌侵染花生胚的诱导和分化 (1)花生胚转基因 RIG。选用花生品种冀花 2 号,花生种子去壳消毒后,用灭菌刀将花生胚切下后放在农杆菌(使用含 RIG 质粒的农杆菌菌液,摇菌培养至菌液吸光度 D=0.6)菌液中侵染 15~30 min,之后无菌水洗 4 次,共培养 4~6 d 后,转到含头孢的抑菌培养基上生长 1 周,1 周后分别转到含卡那霉素(50 mg/L)和头孢(300 mg/L)的培养基 A 和培养基 D 上进行光培养,转基因花生幼苗长到 2.5 cm 左右后转到生根培养基使其生根(头孢 300 mg/L,卡那霉素 30 mg/L)。生根后将花生苗炼苗后移栽至含有营养土和蛭石(体积比 2:1)的花盆中,温室培养。(2)花生胚非转基因。选用花生品种冀花 2 号,种子去

壳消毒后,无菌条件下用灭菌刀将花生胚切下,分别置于培养基 A 和培养基 D 上进行光培养;之后转到生根培养基使其生根。生根后将花生苗炼苗后移栽至含有营养土和蛭石(营养

土和蛭石的体积比为 2 : 1)的花盆中,温室培养。
所用到的培养基见表 2。

表 2 花生去胚子叶和花生胚为外植体再生苗所用培养基

培养基类型	培养基组成成分
芽诱导培养基	MS + 20 mg/L 6 - BA,蔗糖(30 g/L),琼脂(8 g/L)
伸长培养基	MS + 5 mg/L 6 - BA,蔗糖(30 g/L),琼脂(8 g/L)
生根培养基	1/2MS + 0.5 mg/L NAA,蔗糖(30 g/L),琼脂(8 g/L)
培养基 A	MS + 4 mg/L 6 - BA + 0.5 mg/L NAA + 1 mg/L 2,4 - D,蔗糖(30 g/L),琼脂(8 g/L)
培养基 D	MS + 1 mg/L 6 - BA,蔗糖(30 g/L),琼脂(8 g/L)

1.2.3 花生转化苗的 PCR 鉴定 当花生转化苗长大后,剪取花生新鲜叶片,SDS 法提取叶片基因组后使用 2 × EasyTaq® PCR SuperMix(+ dye)进行 PCR 反应。检测 *mini insulin* 基因的引物见表 1,*mini insulin* 基因长度为 355 bp。

1.2.4 花生转化苗的 SDS - PAGE 和 Western - blot 检测 使用 Tris - HCl 法提取花生新鲜叶片的全蛋白,之后对提取的花生叶片全蛋白进行 SDS - PAGE 检测和 Western - blot 检测。共制备 2 块胶,所用分离胶浓度是 12%,浓缩胶浓度是 4%,一块胶进行 SDS - PAGE 电泳,电泳结束后使用考马斯亮蓝快速染液进行染色处理,另一块胶跑完电泳后,使用 PVDF 膜利用半干式转膜仪进行转膜,转膜结束后,TBST 洗膜,4 次/10 min,之后用 5% 奶粉溶液孵育 2 h 进行封闭处理。加入 1 : 1 000 封闭液稀释的鼠抗人 *insulin* 一抗,室温慢摇 30 min 后,4 ℃ 过夜。第 2 天取出杂交盒,室温慢摇 2 h,TBST 洗膜,5 次/10 min,加入 1 : 5 000 封闭液稀释的山羊抗鼠二抗,室温慢摇 2 h 后,TBST 洗膜,5 次/10 min。进入暗室进行曝光处理。

2 结果与分析

2.1 载体构建

2.1.1 重组质粒 RIG 的鉴定 使用引物 RIF 和 CX35S - GUSR(表 1)对构建好的质粒 RIG 进行 PCR 鉴定,结果见图 2 - A。2 条引物覆盖区域包括 *mini insulin* 的序列,目的基因长度为 355 bp。使用内切酶 *Hind* III 和 *Sac* I 对构建好的重组质粒 RIG 进行双酶切鉴定,结果如图 2 - B 所示。重组质粒 RIG 经双酶切后获得大片段约为 11 kb,小片段约为 3.3 kb,小片段是 35S 启动子驱动包括融合基因和 *GUS* 在内的总序列,酶切结果与预期相符,说明融合基因已克隆到载体 PBI121 上,之后的 DNA 测序结果进一步证实重组质粒 RIG 构建成功,可以进行下一步的花生转化试验。

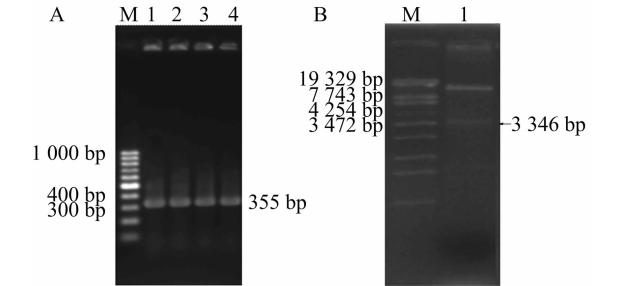


图 2 重组质粒 RIG 的鉴定

2.2 根癌农杆菌介导的花生遗传体系的建立及优化

2.2.1 去胚子叶的遗传转化

2.2.1.1 转基因去胚子叶 将花生消毒去胚后,用无菌刀片将 2 张子叶分开,经农杆菌侵染后正置于芽诱导培养基上培养,约 2 周后发现部分去胚子叶长出簇状芽,继续生长观察,发现簇状芽在伸长过程中会有部分发褐枯萎,有的去胚子叶的簇状芽会停止伸长,有的去胚子叶一部分芽枯萎,剩余芽伸长长成完整植株。去胚子叶转基因花生苗移栽后,发现其比非转基因花生苗要矮小(图 3 - A、图 3 - B)。

2.2.1.2 非转基因去胚子叶 将花生消毒去胚后,用无菌刀片将 2 张子叶分开,正置于芽诱导培养基上培养,约 2 周后发现部分去胚子叶长出簇状芽和小叶,继续生长后,簇状芽和小叶部分有变褐枯萎现象,需要进一步探索原因(图 3 - C)。

2.2.1.3 空白对照 将花生去胚后,用无菌刀片将 2 张子叶分开,正置于 MS 培养基上进行光培养,经过 2 个月生长后,1/2 去胚子叶一直未诱导出芽(图 3 - D、图 3 - F)。图 3 - D、图 3 - E 中所用外植体品种分别是改良海花 1 号、大白沙;图 3 - F 中是冀花 2 号、冀花 4 号、冀花 0607 - 5。

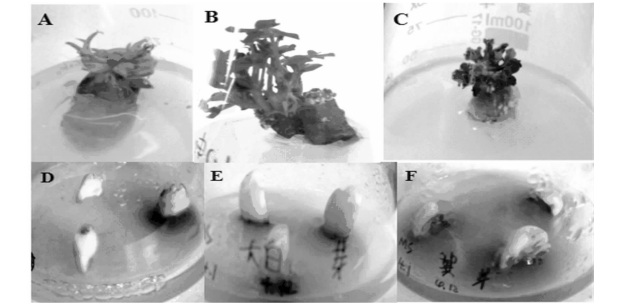


图 3 去胚子叶为外植体诱导的转化苗

2.2.2 花生胚的遗传转化

2.2.2.1 转基因花生胚 将花生胚消毒并进行农杆菌侵染后置于培养基 A 和培养基 D 上生长,待小苗长至约 2.5 cm 高时转至生根培养基进行生根,观察其生长的整个过程,最终花生胚全部可以长成完整植株。

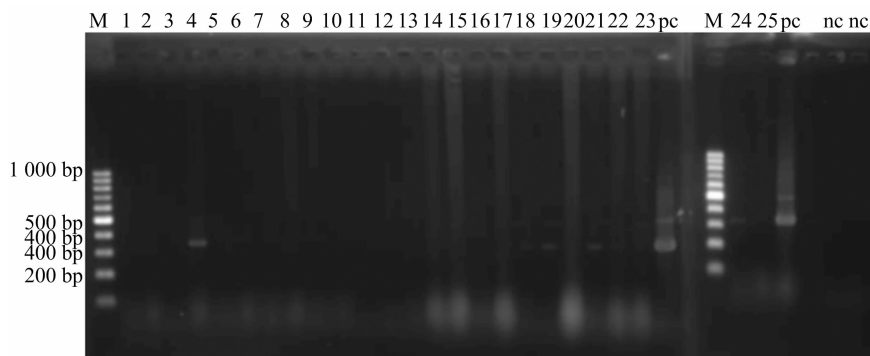
2.2.2.2 非转基因花生胚 将花生胚消毒后直接置于培养基 A 和培养基 D 上生长,待小苗长至约 2.5 cm 高时转至生根培养基进行生根,观察其生长的整个过程,最终花生胚全部可以长成完整植株。

2.3 花生转化苗的 PCR 鉴定

SDS 法提取花生叶片基因组 DNA,利用上下游引物 RIF

和 CX35S-GUSR 对基因组进行 PCR 检测,目的基因长度是 355 bp。从图 4 中可知,一共获得了 6 株转基因阳性植株,分别是 4 号、13 号、18 号、19 号、21 号、24 号,其中 4 号、13 号、

18 号、19 号、21 号是由农杆菌侵染花生胚诱导出的转基因花生苗,24 号是由农杆菌侵染花生去胚子叶诱导出的转基因花生苗。

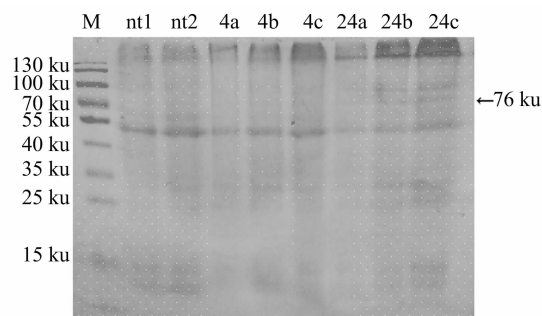


M—100 bp- II DNA ladder; 1~25—转基因花生苗; pc—阳性对照; nc—阴性对照

图4 花生基因组中 *mini insulin* 基因的 PCR 检测

2.4 花生转化苗的 SDS-PAGE 和 Western-blot 检测

2.4.1 SDS-PAGE 检测 融合蛋白(水稻信号肽+微型人胰岛素+GUS)大小约为 76 ku(图 5)。非转基因花生植株样品上样量分别是 10 μ L(nt1)和 20 μ L(nt2),二者在目标区域未出现条带。4 号转基因植株上样量为 5 (4a)、10 (4b)、20 μ L(4c);24 号转基因植株上样量为 5 (24a)、10 (24b)、20 μ L(24c)。4 号和 24 号转基因苗在 76 ku 处有条带,非转基因苗此处无条带,为了确定人胰岛素是否在转基因花生中表达,还需对转基因花生植株进行 Western-blot 鉴定。



M—molecular weight marker; nt1, nt2—非转基因花生苗; 4a~4c—4号转基因花生苗; 24a~24c—24号转基因花生苗

图5 转 *mini insulin* 基因花生叶片蛋白的 SDS-PAGE 检测

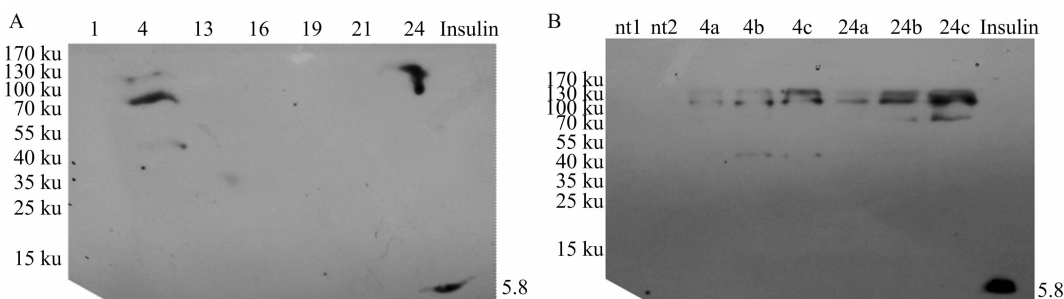
2.4.2 Western-blot 检测 图 6-A 中,所有转基因花生叶片总蛋白上样量都是 30 μ L,其中转基因植株 4 号和 24 号出现明显条带,大小正确,4 号是用农杆菌侵染花生胚得到的转

基因植株,24 号是用农杆菌侵染花生去胚子叶得到的转基因植株,两者都出现了条带。正对照胰岛素标准品出现的条带约在 5.8 ku 处。图 6-B 中,非转基因花生植株样品上样量分别是 10 (nt1)、20 μ L (nt2)。4 号转基因花生植株样品上样量分别是 5 (4a)、10 (4b)、20 μ L (4c);24 号转基因花生植株样品上样量分别是 5 (24a)、10 (24b)、20 μ L (24c);胰岛素标准品上样量是 5 μ L。非转基因样品未出现条带,胰岛素标准品出现的条带在 5.8 ku 左右,24 号样品在目标区间出现条带,4 号样品则不明显,可能是由于胰岛素分子发生聚合作用导致单体胰岛素浓度降低。4 号和 24 号样品在 130 ku 以上区域均出现条带,推测可能是有蛋白质聚合现象^[24]。

3 讨论与结论

3.1 表达载体中信号肽的作用

在植物表达载体 RIG 中,添加了水稻信号肽序列。根据 1975 年 Blobel 和 Sabatini 等提出的信号肽假说,分泌性蛋白 N 端序列作为信号肽,指导分泌性蛋白到内质网膜上合成,在蛋白合成结束之前信号肽被切除。现已确认,指导分泌蛋白在糙面内质网合成的决定因素是蛋白质 N 端的信号肽,信号识别颗粒以及位于内质网膜上的信号识别颗粒受体。Chen 等进行的功能性分析证明,水稻淀粉酶信号肽序列可使水稻淀粉酶在叶绿体、淀粉体、细胞壁、叶子细胞外小室和悬浮细胞中表达^[25],试验中,选用了水稻淀粉酶的信号肽序列来引导微型人胰岛素在植物中表达,一方面确保微型人胰岛素可



A: 1、4、13、18、19、21、24—转基因花生苗, Insulin—胰岛素标准品; B: nt1、nt2—非转基因花生苗, 4a、4b、4c—4号转基因花生苗, 24a、24b、24c—24号转基因花生苗, Insulin—胰岛素标准品

图6 转 *mini insulin* 基因花生植株的 western blot 检测

以准确进入内质网进行合成和修饰,另一方面,观察其在叶片中的表达情况,以利于以后进行在植物悬浮细胞中表达。

3.2 植物器官再生体系的建立

本研究中分别采用了花生去胚子叶和花生胚作为外植体,通过培养和筛选从而直接从植物器官再生出了转基因花生苗,而未经过愈伤组织再生生成转基因苗。这样做的优势是:培养周期短,无需经过愈伤组织诱导和分化阶段,大大缩短了培养周期;在诱导愈伤组织过程中,可能会引起体细胞无性系变异,而由植物器官直接再生可以较好地避免这一点,从而提高遗传稳定性。但器官直接再生体系得到的转基因苗是嵌合体植株,需要加大筛选和检测力度^[26]。

3.2.1 农杆菌侵染去胚子叶的诱导和分化 参考耿丽丽的花生去胚子叶转基因方法^[23],选用 5 种花生品种进行试验,其中包括冀花 2 号花生种子 15 粒、冀花 4 号花生种子 5 粒、冀花 0607-5 花生种子 5 粒、大白沙花生种子 15 粒、改良海花 1 号花生种子 6 粒,最终获得 2 株转基因苗,这 2 株转基因苗来源是冀花 2 号花生种子和大白沙花生种子。冀花 2 号花生种子中有 3 个去胚子叶发芽,最终只有 1 个去胚子叶长出转基因花生苗,另 2 个去胚子叶长出的芽最终枯萎无法继续生长,大白沙花生种子中只有 1 个去胚子叶发芽并最终长成转基因花生苗,改良海花 1 号花生种子中有 1 个去胚子叶有发芽趋势,但最终枯萎未长成,其余的或是没有诱导出芽或是芽较小无法继续伸长。所以冀花 2 号花生种子和大白沙花生种子较适合用去胚子叶转基因法进行转化。2 株转基因苗中有 1 株(24 号,来源于冀花 2 号花生)的基因组 PCR 检测阳性,之后全蛋白提取物经由 Western-blot 检测后出现目的条带,有 1 株(25 号,来源于大白沙花生)的 PCR 检测和 Western-blot 检测皆未出现目的条带,可能是嵌合体的原因。利用此方法长出的簇状芽和簇状叶会出现发褐枯萎现象,影响了转基因苗的生长,目前原因不明,需要进一步探索。转基因 RIG 组总共用了 46 粒花生,共 92 个外植体,其中有 2 个外植体成苗,2 株苗里有 1 株 PCR 检测和 Western-blot 都呈阳性。

3.2.2 农杆菌侵染花生胚的诱导和分化 用此方法共得到 44 株转基因花生苗,其中,共有 5 株转基因花生苗的叶片基因组经过 PCR 检测显示阳性,只有 1 株苗(30 号)的全蛋白提取物经 Western-blot 检测出现目的条带,阳性检测率为 2.27%,有关外源基因能否稳定遗传,正在进一步研究中。

参考文献:

- [1] Tucker M E. IDF Atlas; about 415 million adults worldwide have diabetes[R]. International Diabetes Federation, 2015.
- [2] Melmed S, Polonsky K S, Larsen P R, et al. Williams textbook of endocrinology[M]. Philadelphia: Elsevier Medicine, 2007: 1371-1435.
- [3] Shi Y, Hu F B. The global implications of diabetes and cancer[J]. Lancet, 2014, 383(9933): 1947-1948.
- [4] 蒋丽华, 胡玲. 胰岛素强化治疗对新诊断 2 型糖尿病患者 β 细胞功能及病情缓解的影响[J]. 中国全科医学, 2010, 13(36): 4055-4057, 4065.
- [5] 阿丽塔, 刘晓婷. 全球抗糖尿病药物研发现状及市场分析[J]. 中国药房, 2013, 24(29): 2689-2691.

- [6] Aggarwal S R. What's fueling the biotech engine—2011 to 2012[J]. Nature Biotechnology, 2012, 30(12): 1191-1197.
- [7] 姜宁, 吕晔, 陈执中. 重组人胰岛素类似物的研究应用进展[J]. 食品与药品, 2012, 14(11): 445-447.
- [8] 冯佑民, 张友尚. 重组人胰岛素研究的回顾和展望[J]. 生物工程进展, 1996, 16(4): 26-32.
- [9] 张冉. 利用油菜油体系系统表达重组人胰岛素原的研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2010.
- [10] 张友尚. 胰岛素生产的回顾与展望[J]. 食品与药品, 2008, 10(1): 1-3.
- [11] Thim L, Hansen M T, Norris K, et al. Secretion and processing of insulin precursors in yeast[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(18): 6766-6770.
- [12] Yanagita M, Hoshino H, Nakayama K, et al. Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to mature insulin reflects the expression of furin in nonendocrine cell-lines[J]. Endocrinology, 1993, 133(2): 639-644.
- [13] Nykiforuk C L, Boothe J G, Murray E W, et al. Transgenic expression and recovery of biologically active recombinant human insulin from *Arabidopsis thaliana* seeds[J]. Plant Biotechnology Journal, 2006, 4(1): 77-85.
- [14] Markley N, Nykiforuk C, Boothe J, et al. Producing proteins using transgenic oilbody-oleosin technology[J]. Biopharm International, 2006, 19(6): 34-47.
- [15] Siloto R M, Findlay K, Lopez-Villalobos A, et al. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis*[J]. Plant Cell, 2006, 18(8): 1961-1974.
- [16] 张昱, 张小平, 赵凌侠. 利用烟草表达重组人胰岛素原的初步研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2010, 28(1): 14-18, 52.
- [17] 张丹凤, 余自青, 吴锁伟, 等. 植物生物反应器在分子医药农业中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(1): 86-94.
- [18] 曲勐, 李校堃, 于雅琴. 利用油体表达系统生产外源重组蛋白[J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(8): 111-115.
- [19] 周曙东, 孟恒宽. 中国花生主产区种植面积变化的影响因素[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(13): 250-253.
- [20] 颜丙国, 侯学会, 梁守真, 等. 花生叶鲜生物量的高光谱估算模型[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 59-62.
- [21] 梁克红, 朱大洲, 孙君茂, 等. 品种与产地因素对花生营养品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(17): 73-76.
- [22] 赵会芳, 张习金, 张永康, 等. 索氏抽提法测定花生脂肪含量的方法改进[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 154-156, 163.
- [23] 耿丽丽. 转 Bt *cry8Ea1*、*cry8Ha1* 基因花生的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011: 54-75.
- [24] Zhang Y S, Xu Y G, Li W, et al. Preparation of animal insulin through calcium phosphate gel adsorption[C]// Modern trends in protein and enzyme research. Beijing, 1993: 241-243.
- [25] Chen M H, Huang L F, Li H M, et al. Signal peptide-dependent targeting of a rice α -amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells[J]. Plant Physiology, 2004, 135(3): 1367-1377.
- [26] 蒋滢. 基于大豆种子油体系系统表达重组白介素 IL-21 的研究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学, 2014: 32-33.