

• 药材与资源 •

白藜芦醇合酶基因的克隆及丹参的转化

陈海敏^{1,2}, 徐妙云², 李刚强², 郝雯静¹, 魏昭荣², 艾铁民^{1*}, 刘德虎²

(1. 北京大学药学院, 北京 100083; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要:目的 为探索利用分子生物学技术培育新型药用植物的新途径, 将外源的白藜芦醇合酶 (RS) 基因导入到丹参中表达, 以改善或增加丹参的效用。方法 根据已公布的核苷酸序列, 利用引物悬挂延伸法, 经过 3 次扩增, 最终从葡萄基因组 DNA 中获得完整的 RS cDNA 基因序列; 以质粒 pBin438 为基础, 构建含有 RS 目的基因的组成型植物表达载体。在根瘤农杆菌介导下, 利用叶盘法转化丹参, 进而通过 PCR、PCR-Southern 杂交对不同的转基因植株进行筛选与检测。结果 总共得到了 45 棵卡那霉素抗性植株, 经 PCR 和 PCR-Southern 杂交检测, 确定葡萄 RS 基因已整合到部分转基因丹参苗的基因组中。结论 成功建立了白藜芦醇合酶基因转化丹参的体系, 并获得了转基因植株。

关键词:白藜芦醇合酶 (RS) 基因; 丹参; 根瘤农杆菌; 白藜芦醇; PCR-Southern 杂交

中图分类号:R282.2

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2007)08-1235-04

Clone of resveratrol synthase gene and transformation of *Salvia miltiorrhiza*CHEN Hai-min^{1,2}, XU Miao-yun², LI Gang-qiang², HAO Wen-jing¹,WEI Zhao-rong², AI Tie-min¹, LIU De-hu²

(1. School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Institute of Biotechnology,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Objective To explore a new method of producing novel medicinal plants by molecular biological technique. A resveratrol synthase (RS) gene was firstly expressed in *Salvia miltiorrhiza* for improvement and increase of the potential of *S. miltiorrhiza*. **Methods** Based on the published nucleotide sequences, the intact cDNA sequence of RS was obtained according to over-hang extension PCR protocol with grape genomic DNA as template through three times of amplifications. A plant component expression vector containing the RS gene was constructed, which was derived from plasmid pBin438. The RS gene was then introduced into *S. miltiorrhiza* with the leaf disc method mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The regenerated plants were assayed by PCR and PCR-Southern blotting analysis. **Results** The total 45 Kanamycin-resistant plants were obtained from this transformation. The results of PCR and PCR-Southern analysis confirmed that the RS gene had been integrated into the genome of some regenerated plants of *S. miltiorrhiza*. **Conclusion** An efficient transgenic system of *S. miltiorrhiza* by RS gene is established and some transgenic plants are obtained from this transformation.

Key words: resveratrol synthase (RS) gene; *Salvia miltiorrhiza* Bunge; *Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn; resveratrol (Res); PCR-Southern blotting

白藜芦醇 (resveratrol, Res) 是植物体在恶劣环境下或遭遇到病原体侵害时产生的天然二苯乙烯类多酚物质, 不仅可抵御霉菌的感染, 并对人体也具有多种作用, 如防治心血管疾病、抗肿瘤、抗病毒及免疫调节等功能^[1]。白藜芦醇由白藜芦醇合酶 (resveratrol synthase, RS) 催化 4-香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 合成, 两前体作为查耳酮合成酶底

物在植物中普遍存在^[2]。因此导入白藜芦醇合酶基因就足够在其他植物中合成需要的白藜芦醇^[3]。

目前已从葡萄和花生中克隆出 RS 基因, 并成功导入到一些植物中, 如烟草、小麦、马铃薯、水稻、西红柿和小白菜等。据报道不仅烟草、西红柿和马铃薯等对霉菌的抗病性得到增强^[4], 通过白藜芦醇在植物体内的产生与积累也培育出了药食兼用的蔬菜

收稿日期: 2006-11-13

作者简介: 陈海敏 (1983—), 女, 浙江温岭人, 北京大学 2004 级硕士研究生, 主要研究方向为天然药物化学。

* 通讯作者 艾铁民 Tel: (010)82802685 刘德虎 Tel: (010)68919865

和水果^[5,6]。

丹参作为治疗心血管疾病的药物广泛应用于临床,机制主要是通过防止 H⁺-ATP 酶水解、清除氧自由基、扩张冠状动脉和抗血小板聚集等起到治疗作用^[7];而白藜芦醇的机制主要是通过与雌激素受体结合来调节血液中的胆固醇水平,抑制铜介导的低密度脂蛋白的氧化,从而达到预防心脏疾病的效果^[8]。本研究利用白藜芦醇的药理活性,通过克隆葡萄玫瑰香和巨峰中的白藜芦醇合酶基因,构建组成型植物表达载体,并将它导入到丹参基因组中,培育出高效表达白藜芦醇的丹参植株。不仅可以利用生物反应器来大量生产白藜芦醇,还有可能通过白藜芦醇和丹参在心血管防治方面的协同作用来增加丹参的疗效,增强丹参的抗病性,改善丹参的品质。

1 材料

1.1 菌种及质粒:DH5α 为本室保存;pBin438 质粒、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 和含辅助质粒 pRK2031 的大肠杆菌 (*Escherichia coli* (Migula) Castellani et Chalmers) 均由本室保存;pCFT-T 载体购自天为时代生物公司。

1.2 抗生素和植物激素:卡那霉素 (Kanamycin, Kan)、链霉素 (Streptomycin, Str)、头孢噻肟 (Cefotaxime, Cef) 购自上海生物工程公司,6-苄氨基嘌呤 (6-BA) 购自拜尔迪公司。

1.3 分子生物学试剂:Taq 酶,dNTP, X-Gal 和 IPTG 购自天为时代生物公司;T4 DNA Ligase, 限制性内切酶 Sal I、BamH I 购自 TaKaRa 公司;其他生化试剂均为国产分析纯试剂。

1.4 植物材料:丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge、葡萄玫瑰香 *Vitis vinifera* L. cv. Muscat Hamburg、葡萄巨峰 *V. vinifera* L. cv. Kyoho 由北京大学药学院艾铁民教授鉴定。

2 方法

2.1 引物悬挂延伸法扩增 RScDNA 及序列分析:CTAB 法提取新鲜的葡萄巨峰和玫瑰香果皮基因 DNA^[9]。根据美国生物技术信息中心 (NCBI) GenBank 上所公布的 RS 基因序列 (AF128861、AB046373、X76892、AAB19887、AF274281), 设计了两组简并引物,其中 R1 和 R2 分别与白藜芦醇合酶第 1 个外显子的上下游序列互补;R3 和 R4 分别与白藜芦醇合酶第 2 个外显子的上下游序列互补;此外,为使两个外显子的扩增产物在退火时能头尾相接,在 R2 和 R3 引物之间有 16 个核苷酸碱基

因是完全互补的。R1: 5'-G GGATCCAACAAT BamH I

GGCTTCAGT ^C _T GAGGAA ^T _A TTAG-3'; R2: 5'-A-

TCAT ^T _G GATTTGTCACATATGCGATTGAAC-

TTCTTCTC-3'; R3: 5'-AAGTTCAATCGCATA-

TGTGACAAATC ^A _C ATGATCAAGAAG-3'; R4:

5'-C GTCGACTTAATTTGT ^A _C ^{CG} _{TA} TAGGA-

Sal I ATGCTATG-3'。

引物悬挂延伸 PCR 扩增巨峰和玫瑰香葡萄的 RS cDNA^[10], 冻融法回收 RS cDNA, 然后与 pCFT-vector 连接, 转化 *E. coli* DH5α, 蓝白菌落筛选阳性克隆^[11], 碱法提取质粒, 通过酶切、PCR 鉴定重组子, 将正确克隆命名为 pTRSJ 和 pTRSM (pTRSJ 由葡萄巨峰克隆得到, pTRSM 由葡萄玫瑰香克隆得到), 重组子由上海生工生物工程技术公司完成序列分析。

2.2 质粒载体构建和农杆菌培养: 用 Sal I 和 BamH I 酶切含目的基因的质粒 pTRSJ、pTRSM 和植物表达载体 pBin438, T4 DNA 连接酶连接目的基因片段和载体片段, 得到重组植物表达载体, 命名为 pBRSJ 和 pBRSM。三亲融合法^[9]将重组植物表达载体克隆菌与含协助质粒 pRK2013 的 *E. coli* 和含 Ti 质粒的根癌农杆菌 LBA4404 3 者融合, 在含 50 mg/L Kan 和 50 mg/L Str 的 YEB 培养基 28 ℃ 培养, 以得到融合有目的基因质粒的农杆菌。

2.3 叶盘法转化丹参: 挑取融合好的农杆菌单菌落于 50 mL Kan/Str 液体 YEB 中, 28 ℃, 200 r/min 摇菌过夜至 A₆₀₀ 为 1.0 左右, 4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 MS₀ 液体培养基洗涤一次, 离心收集沉淀后再加 25 mL MS₀ 重悬, 倒至小瓶中即为侵染液。剪取一定大小的外植体 (0.5 cm×0.5 cm 左右的幼嫩丹参叶片), 放至侵染液中浸泡 5~10 min, 用滤纸吸干, 转到覆盖一层滤纸的共培养基 (MS₀+2.0 mg/L 6-BA) 中暗培养 4 d。将共培养后的外植体转到选择培养基 (MS₀+1.0 mg/L 6-BA+20 mg/L Kan+400 mg/L Cef) 中进行光照培养, 每 2 周继代一次。1~2 个月, 待再生芽长到 2 cm 左右时, 将芽切下转到生根培养基中 (1/3 MS₀+15 mg/L Kan+400 mg/L Cef) 中生根。当再生苗生出健壮的根并长至 5~6 cm 高时, 将其移入蛭石中炼

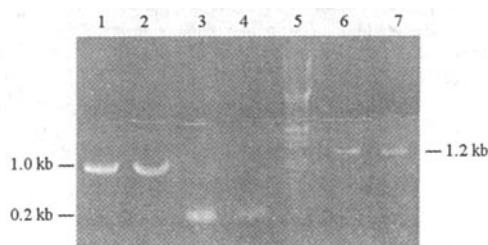
苗,定时用 1/2 MS₀营养液浇灌,待生长良好后,再移入田间。

2.4 转基因丹参的检测:CTAB 法小量提取抗性丹参植株和未转基因植株的基因组 DNA,对 RS 基因进行 PCR 扩增鉴定。引物为 R1 和 R4,PCR 反应程序:94 ℃、5 min,94 ℃、45 s,58 ℃、45 s,72 ℃、60 s,30 个循环;72 ℃、10 min。

PCR-Southern 进一步确定基因整合情况,将 PCR 产物经 0.8% 琼脂糖电泳后,经变性、中和、转膜,并按照 Roche 公司的 DIG Nucleic Acid Detection Kit 试剂盒进行探针制备、预杂交、杂交、洗膜。

3 结果与讨论

3.1 目的基因的扩增与测序:引物悬挂延伸 PCR 扩增法扩增得到巨峰和玫瑰香葡萄的 RS cDNA (图 1)。将扩增得到的两个基因序列与 NCBI 上的 RS 基因序列比对,核苷酸同源性最高达 98.1%,最低 93.6%,拟推导的氨基酸同源性最高达 98.5%,最低 93.0%,而本研究中的两个 RS 基因之间的核苷酸序列同源性为 93.3%,氨基酸序列同源性为 93.3%。



泳道 1,2-巨峰和玫瑰香 RS 基因第一外显子的扩增条带
泳道 3,4-巨峰和玫瑰香 RS 基因的第二外显子的扩增条带
泳道 5-λDNA/EcoR I + Hind III 相对分子质量标准
泳道 6,7-巨峰和玫瑰香 RS cDNA

Lanes 1 and 2-PCR amplification of exon 1 of RS gene lanes 3 and 4-PCR amplification of exon 2 of RS gene lane 5-λ DNA/EcoR I + Hind III relative molecular markers lanes 6 and 7-amplification of RS cDNA

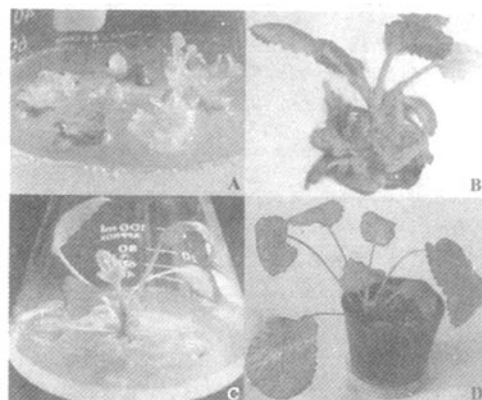
图 1 RS 基因的两外显子扩增产物及退火延伸结果

Fig. 1 PCR Amplification of two exons of RS gene and RS cDNA and results of annealing extension

3.2 植物表达载体的构建和三亲融合结果:pBRSJ 和 pBRSM 质粒经 Sal I 和 BamH I 双酶切所得片段的大小与预期结果相符,表明 RS 基因已成功构建到 pBin438 植物表达载体中。三亲融合后的农杆菌能在含适量 Kan 和 Str 的 YEB 培养基上生长,菌落 PCR 得到 1.2 kb 的条带,说明 pBRSJ 和

pBRSM 质粒已通过协助质粒 pRK2013 转移到根癌农杆菌 LBA4404 中。

3.3 转基因植株的获得:丹参叶片外植体在选择培养基上培养 2 周左右产生颗粒状愈伤组织和丛生芽,继续培养,从愈伤组织中产生更多的丛生芽,待芽生长 20 d 将其移至含有抗生素的生根培养基中,转入温室生长的转基因植株生长良好 (图 2-A~D)。



A-愈伤组织形成 B-幼芽形成 C-完整植株形成 D-移至花盆中的转基因丹参植株

A-formation of calli B-regeneration of shoots C-regeneration of intact plantlet D-transgenic plantlet of *S. miltiorrhiza*

图 2 转 RS 基因丹参的培育过程

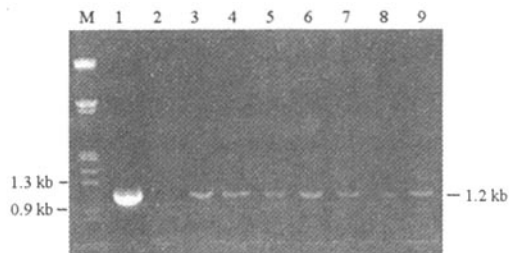
Fig. 2 Regeneration of RS transgenic *S. miltiorrhiza*

从 pBRSJ 载体转化后的丹参外植体中,总共得到 40 棵卡那霉素抗性植株;而经 pBRSM 载体转化的丹参外植体,由于幼芽玻璃化严重,最后只得到 5 棵卡那霉素抗性植株。

在丹参转化过程中,部分幼芽会出现比较严重的玻璃化幼苗现象,主要表现为叶和嫩梢呈水晶透明或半透明,失绿。通过增加培养基中的琼脂粉量 (达 0.75%)、降低 6-BA 量 (由 2.0 mg/L 降至 1.0 mg/L)、增加透气性或转移到生根培养基后,部分已发生玻璃化的植株还可以转为正常苗。

3.4 转基因丹参的检测:对部分丹参的抗性植株进行 PCR 检测均扩增出 1.2 kb 的目的条带,而未转基因植株未扩出任何带 (图 3)。初步表明目的基因已经转入到丹参基因组中。

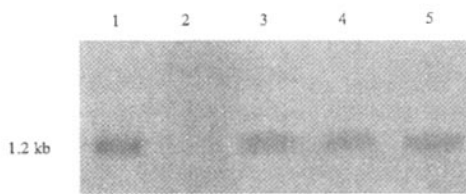
PCR 扩增虽然非常灵敏,但有时会出现假阳性扩增,因此对外源基因是否整合的最后确定需要对扩增产物进行 Southern 杂交。对 PCR 阳性株再进行 PCR-Southern 杂交检测,发现 PCR 阳性植株都产生了杂交信号,阴性植株并无信号 (图 4),说明白藜芦醇合酶基因已经整合到丹参基因组中。



泳道 M-DNA/*Bam*H I + *Hind* III 相对分子质量标准
泳道 1-阳性质粒扩增产物 泳道 2-未转基因植株扩增产物
泳道 3~9-转基因植株扩增产物
Lane M-λ DNA/*Bam*H I + *Hind* III relative molecular markers
lane 1-amplified product of positive plasmid lane 2-amplified product of non-transgenic plant lanes 3—9-amplified product of transgenic plant

图3 卡那霉素抗性植物 PCR 检测结果

Fig. 3 PCR Analysis of Kan-resistant plants



泳道 1-阳性质粒扩增产物 泳道 2-未转基因植株
泳道 3~5-部分卡那霉素抗性植株
Lane 1-amplified product of positive plasmid lane 2-amplified product of non-transgenic plant lanes 3—5-amplified product of some Kan-resistant plants

图4 卡那霉素抗性植株 PCR-Southern 杂交检测

Fig. 4 PCR-Southern blotting detection of some Kan-resistant plants

4 讨论

目前为止,转白藜芦醇合酶基因植物的研究多是为了提高经济作物(如小麦)的抗菌性,或者为了开发新的保健食品、蔬菜。白藜芦醇在心血管等方面的防治作用显示了其在转基因药物具有极大的发展前景。本研究通过克隆葡萄的白藜芦醇合酶基因,构建了植物表达载体;通过根癌农杆菌介导的叶盘法转化得到了抗性丹参植株,部分抗性植株经 PCR 和 PCR-Southern 检测确定了白藜芦醇合酶基因在丹参中的表达。含有白藜芦醇合酶基因的转基因丹

参有望加强丹参在心血管等方面的治疗作用,并增强丹参自身的抗病性,本研究探索了用生物技术方法构建新药用植物的方法。

以转基因方式导入新的外源 RS 基因后,下一步将确定转基因丹参植株中白藜芦醇的表达情况。此外,含有白藜芦醇的转基因丹参能否加强丹参在心血管等方面的治疗作用以及能否增强丹参自身的抗病性也是进一步研究的课题。

致谢:本研究工作主要在中国农业科学院生物技术所完成,并得到了刘德虎研究员的悉心指导。

References:

- [1] Achille G, Francesca S, Fulvio M, *et al.* Expression of the stilbene synthase (StSy) gene from grapevine in transgenic white poplar results in high accumulation of the antioxidant resveratrol glucosides [J]. *Transgenic Res*, 2004, 3: 203-204.
- [2] Schröder G, Brown J W, Joachism S, *et al.* Molecular analysis of resveratrol synthase cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase [J]. *Euro J Biochem*, 1988, 172: 161-169.
- [3] Yun J Z, Ricelle A, Mel C, *et al.* Expression of the grapevine stilbene synthase gene *VST1* in papaya provides increased resistance against diseases caused by *Phytophthora palmivora* [J]. *Planta Med*, 2004, 220: 241-250.
- [4] Thomzik J E, Stenzel K, Stocker R. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans* [J]. *Physiol Molecu Plant Pathol*, 1997, 51: 265-278.
- [5] Tan L, Kang Y F, Ma B G, *et al.* Resveratrol production of tomato transformed with a *Vitis Stilbene synthase* gene [J]. *Life Sci Res* (生命科学杂志), 2003, 7(3): 262-266.
- [6] Hu X P, Shang W J, Cai W Q, *et al.* Transgenic plants of *Brassica campestris* with resveratrol synthase gene [J]. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2006, 14(2): 231-234.
- [7] Guan X, Wu L J, Jie L W. The general review of *Salvia miltiorrhiza* Bge [J]. *J Pract Tradit Chin Med* (实用中医药杂志), 2005, 21(7): 445-446.
- [8] Roberto F, Maria P F, Lucie F, *et al.* Biological effects of resveratrol [J]. *Life Sci*, 2000, 66(8): 663-673.
- [9] Wang G L, Fang H Y. *The Principle and Technique of Plant Genetic Engineering* (植物基因工程原理和技术) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
- [10] Liu L, Wei Y H, Jing X G, *et al.* cDNA Cloning of resveratrol synthase by over-hang extension PCR [J]. *Acta Bot Boreali-Occi Sin* (西北植物学报), 2005, 25(3): 436-440.
- [11] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆实验室指南) [M]. Newyork: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.