

· 专论 ·

开展“中药基因组计划”的研究

肖乐义¹, 薛歧庚¹, 董建军¹, 赵天增¹, 梁晓天², 于德泉²

(1. 河南省科学院, 河南 郑州 450002; 2. 中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要:“中药基因组计划”的根本点就在于从基因组学的高度,从分子水平上来发现、研究中药的基因,寻找有效成分基因,将功能基因克隆表达进行“工厂化生产”或转入植物(转基因植物)进行“田间种植”;寻找、发现克隆表达那些用于合成具有生物活性小分子有机物的酶基因,利用代谢工程在实验室合成这部分中药的有效成分。阐述开展中药基因组计划的主要内容和意义。

关键词: 中药现代化;基因组学;中药基因组计划

中图分类号: Q 789 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)01-0001-03

Studies on strategies to launch “Traditional Chinese Medicine Genome Project”

XIAO Le-yi¹, XUE Qi-geng¹, DONG Jian-jun¹, ZHAO Tian-zeng¹, LIANG Xiao-tian², YU De-quan²

(1. Henan Academy of Sciences, Zhengzhou Henan 450002, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Abstract The fundamental principle of the “Traditional Chinese Medicine (TCM) Genome Project” is to carry out genomic studies from the molecular level to discover effective functional genes in medicinal plants which may be cloned and expressed in factories or to transfer into plants for field cultivation. Another approach is to carry out research studies to obtain enzymic genes capable of synthesizing bioactive compounds to be replicated in laboratory metabolic engineering processes. The subject matter of “TCM Genome Project” and its significance for the modernization of TCM were expounded.

Key words modernization of TCM; genomics; Traditional Chinese Medicine Genome Project

中药是我们的国粹,是世界医药学的重要组成部分。中药现代化是历史和时代发展的必然,这不仅其本身发展的需要,也是世界医学及现代科技发展之必然。中药现代化就是利用现代科学技术,特别是现代生物技术来研究开发现有的中药,把几千年的传统中药提高到时代的先进水平。

“中药基因组计划”是中药现代化的重要组成部分,其根本点就在于从基因组学的高度,从分子水平上来发现、研究中药的基因,寻找有效成分的功能基因,开展中药基因制药及转基因;发现、克隆、表达那些次生代谢产物的酶基因,利用代谢工程在实验室生产中药的有效成分,改良和培育新的品种及保存中药的种质资源和基因资源。从整个基因组的水平来阐明重要的、常用的或珍稀濒危品种的植物性中药基因在染色体的位置、结构、基因及其产物的功能、基因与基因之间的相互关系,搞清功能基因和次生代谢的酶基因,进而“工厂化生产”或“田间种植”。

1 中药基因组计划的主要内容

1.1 染色体的分离与制备: 在研究一种植物中药基因时,首先要搞清该植物核基因组有几条染色体及染色体的形状,这是后续研究的基础。植物不但有单倍体而且还有多倍体,其染色体数目多少不等。植物中药种类多,其染色体数目可能差别较多。

1.2 核酸的分离提取

1.2.1 DNA的提取: 在显微镜下挑选分散好的染色体,用微细玻璃针在显微镜操作器下进行分离,将分离的单条染色体直接放入微量离心管中,用蛋白酶K法消化,提出DNA。

1.2.2 RNA的提取: 采用分离总RNA的异硫氰酸胍法。其步骤包括: 破碎细胞,灭活RNA酶,将RNA与DNA蛋白和多糖分开。

1.3 核基因组作图

1.3.1 遗传作图(genetic mapping): 需要搞清基因或DNA标志在染色体上的相对位置与遗传距

(20) 收稿日期: 2000-09-13

作者简介: 肖乐义(1955-),男,湖北省天门市人,硕士,首席专家,主要从事分子生物学研究。Tel (0371)5725915 E-mail xlyhightech@163.net

离。遗传距离通常以 DN A片段在染色体交换过程中分离的频率 cM 表示,用以反映遗传效应的基因组图。建立精细的遗传图的关键是获得足够的高度多态性标记。

1.3.2 物理图谱 (physical mapping): 又称限制性内切酶图谱。用限制性内切酶将基因组 DN A分段,并找出各片段的排列和连接关系。对于一个庞大的基因组来说,作物理图谱是结构分析的第一步。把庞大的基因组切割成较小片段,确定每个片段间的位置关系,再拼接综合为全序列。具体是以 DN A序列标记位点 (sequencing tagged site, STS)作路标,以 DN A实际长度即 bp kb Mb为图距的基因组图谱。物理图谱是进行 DN A序列分析和基因组结构分析的基础。

1.3.3 序列图谱 (sequence mapping): 测定全部染色体 DN A的核苷酸序列。

1.3.4 转录图谱 (transcription mapping): 又称 cDNA 计划。首先建立 cDNA 文库,再从中随机挑选克隆进行 DN A克隆测序,主要目标是找出足够的表达序列标志 (expressed sequence tags, EST)。

1.3.5 染色体定位 (chromosome mapping): 采用细胞生物学和病理学的基因定位方法,搞清各基因在染色体的位置。

1.4 建立基因文库: 用基因工程方法,把核基因组分割成同等大小片段,然后插入载体中,经转化后全部保存于宿主菌中就是基因文库 (gene library)。

1.4.1 基因组文库 (genomic library): 是含有某种生物体全部基因的随机片段的重组 DN A克隆群体。完整的基因组文库的构建使任何 DN A片段的筛选和获得成为可能,是发现中药功能基因的工作基础。构建基因组文库时,先将植物中药染色体 DN A提纯,通过机械剪切或酶切使之成为一定大小的片段,将其与适当的载体连接、转化或转染细菌,得到基因重组库。这个文库中将含有基因组全部基因片段,它像一个贮存有基因组全部序列的信息库,是发现基因、基因序列测定的基础工作。

1.4.2 cDNA 文库: 是以 mRN A为模板,在逆转录酶的作用下形成的互补 DN A (complementary DN A, cDNA)库。与基因组文库一样,cDNA 文库也是指一群含重组 DN A的细菌或噬菌体克隆。其区别之处在于在体外重组 DN A时,选用的供体不是源于生物体的基因组,而是由细胞的 mRN A将其逆转录成 cDNA 后再与载体重组,转化到宿主细菌里

或包装成噬菌体颗粒,得到一系列克隆群体。每个克隆只含有一种 mRN A的信息,足够数目克隆的总和则包含细胞的全部 mRN A的信息,这样的克隆群体叫 cDNA 文库。cDNA 便于克隆和大量扩增,不像基因组 DN A含有内含子很难表达,可以从 cDNA 库中筛选到所需的目基因或功能基因,并直接用于该基因的表达。因而,在基因工程研究中,真核细胞的 cDNA 库往往比基因库更重要。

1.5 基因序列测定: 植物中药基因组基因序列的测定是“中药基因组计划”的核心与基石。80年代以来,随着计算机软硬件技术、仪器制造和分子生物学研究的迅速发展,使得 DN A自动测序技术取得了突破性进展。DN A自动测序技术,以及它在操作上简单 (自动化)、安全 (非同位素)、精确 (计算机控制)、快速等特点而得到了广泛的应用。此外,这些仪器在各种应用软件的辅助下还可以进行 DN A片段大小分析和定量分析,应用于基因突变分析、SSCP、DN A指纹图谱分析、基因连锁图谱分析以及表达水平的分析方面具有广阔的应用前景。

1.6 中药基因组生物信息学研究: 生物信息学 (Bioinformatics)是随着人类基因组计划的实施而发展起来的用数理和信息学方法研究蛋白质和核酸序列的结构和功能的一门生物学与计算机信息交叉的学科。其主要内容有两个:一是收集管理基因组和蛋白质组的数据,另一个是分析、解释基因组和蛋白质组的内涵。其研究的对象是生物信息数据包括蛋白质和核酸序列,方法是数据库、矩库和信息编码,手段是计算机和网络。“中药基因组计划”必将产生大量的基因组学和蛋白质组的生物学信息的数据,建立中药数据库,进行中药基因、蛋白质及多肽类等生物活性物质的信息化管理与分析,具有极其重要的实用价值。

中药生物信息学的主要内容有: (1)中药生物信息的收集、存储、组织、检索和管理。(2)基因组序列的提取与分析,用于电脑基因克隆,以发现和鉴定新基因;识别编码区;非编码区信息结构分析;生物进化的遗传信息研究。(3)蛋白质结构与功能分析: 用于蛋白质及多肽类活性物质的分类、检索、蛋白质三维结构的分析等。

1.7 功能基因和次生代谢酶基因的鉴定: 这是中药基因组学研究的核心和精华所在。功能基因和次生代谢酶基因决定了中药有效成分的结构与功能,是中药现代化关键环节,因而尽快地找到功能基因、或功能基因族及相关基因及次生代谢酶基因意义相当

重要

1.8 基因的克隆与表达(工厂化生产):掌握了植物中药的基因,就可能在实验室研制和生产中药的基因药物,这是一个非常了不起的飞跃。

1.9 中药转基因(田间种植):植物遗传转化是将外源基因导入植物细胞,经组织培养将细胞培养成植株,并且导入的基因在植物体内能够稳定的表达和遗传,这样的植物称为转基因植物^[1~3]。建立在植物组织和细胞培养基础上的各种转基因技术不断革新,绝大多数植物转化已获成功。本项目拟采用农杆菌质粒构建的双元载体为媒介的基因转化(vector mediated gene transfer)除此之外,还将采用DNA直接转化(naked DNA transfer),将裸基因通过电击法、基因枪法、花粉管通道法进行转基因操作。将中药基因转进好种植、可食用的植物(红萝卜、甘蔗)内,可直接食用或从中大量提取高纯度的中药有效成分。

1.10 通过代谢工程^[4,5]合成小分子有效成分:克隆表达植物中药次生代谢酶基因^[6,7],按其次生代谢^[8]途径合成预防和治疗作用的小分子有机化合物。

1.11 生物芯片的应用:基因芯片是研究分析基因的一种强有力的分子生物学技术。中药基因芯片作为“中药基因组计划”的又一重点,将从根本上改变长期以来人们对中药的研究手段和认识层次。中药基因芯片将是高通量、高效率的从分子水平上研究中药的最新技术手段。中药基因芯片包括分类、鉴定芯片和药物筛选芯片两种重要类型,前者可以用于对中药材料及制成品的定性、定量分析,在药物鉴定、质量保证方面具有极为重要的应用价值,还可用于寻找、发现中药新基因;后者用于中药的药效筛选以及药理分析,还可用于证实、发现中药新品种。

2 开展“中药基因组计划”的意义

“中药基因组计划”是将分子生物学、生物信息学等现代生物技术与其他现代科学技术相结合研究开发中药。美国相继提出的“人类基因组计划”

(HGP)、“植物基因组计划”(PGP)、“微生物基因组计划”(MGP)都取得了突破性进展。特别是人类基因组计划测序工作即将完成,该计划的完成将彻底揭开生命的奥秘,对“人”的概念将有彻底的了解,生命观、健康观将有本质的改变,对生命科学的发展将起到重大推进作用。中医药是世界医学的重要组成部分,现在提出和实施“中药基因组计划”,这是落实我国中药现代化研究与开发政策的重大战略措施。“中药基因组计划”是中药研究和应用的转折点,是中药现代化的新的里程碑,将为中药走向世界开辟崭新的道路,是中药研究的又一次革命;“中药基因组计划”的实施,将开辟一个新的研究领域,建立一门新的学科,培养一大批高层次中药研究人才,为中药现代化奠定新的理论基础、应用基础、人才基础,加速中药现代化进程;“中药基因组计划”的实施和应用,将会形成若干重大的自主知识产权,具有显著的社会效益和巨大的经济效益,并对当今技术创新、产业升级和经济结构调整都将产生重大影响,把握这次历史性机遇,加快“中药基因组计划”研究乃是当务之急。

参考文献:

- [1] 姜国勇,金德敏,翁曼丽,等. 天花粉蛋白基因转化番茄的研究[J]. 植物学报, 1999, 41(3): 334-336.
- [2] Moffat A S. Toting up the early harvest of transgenic plants[J]. Science, 1998, 282: 2176-2128.
- [3] Moffat A S. Engineering plants to cope with metals[J]. Science, 1999, 285: 369-370.
- [4] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.
- [5] Raltz R H, Hosted T J. Molecular genetic methods for improving secondary-metabolite production in actinomycetes[J]. Trends Biotechnol, 1996, 14(4): 245-250.
- [6] Wildung M R, Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis[J]. J Biochem, 1996, 271: 9201-9204.
- [7] 孙雷心. 美国 Cytoclonal公司试生产重组红豆杉醇[J]. 生物技术通报, 1997, (1): 32-34.
- [8] 余叔文,汤章成. 植物生理与分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 1999.