

· 药材 ·

重组人细胞因子基因在转基因中药细胞中的瞬时表达

曾庆平,冯丽玲,杨瑞仪,符林春,郭兴伯*

(广州中医药大学热带医学研究所,广东 广州 510405)

摘要:目的 利用转基因中药表达人细胞因子基因,探讨培育基因修饰(GM)中药的可行性。方法 将体外扩增分别获得的人 α 干扰素基因与 RANTES基因酶切回收后插入中间载体,用 *Eco*RI 和 *Hind*III 双酶切鉴定重组子。由大肠杆菌分离重组质粒并导入根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*,通过加入卡那霉素(Km)和利福平(Rif)筛选含重组双元载体的转化子,用叶盘共培养法转化苦瓜和夏枯草外植体。结果 经 RT-PCR检测到人 α -干扰素基因与 RANTES基因在中药转化愈伤组织中的瞬时表达。结论 首次报道了重组人 α 干扰素基因与 RANTES基因在转基因苦瓜和夏枯草细胞中的表达,为探讨利用转基因中药抗病毒尤其是抗艾滋病开创了新途径。

关键词: α 干扰素基因; RANTES基因;转基因中药

中图分类号: R282.13 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)01-0063-04

Transient expression of recombinant human cytokine genes in transgenic Chinese materia medica cells

ZEN G Qing-ping, FENG Li-ling, YANG Rui-yi, FU Lin-chun, GUO Xing-bo

(Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

Abstract Object To explore the feasibility of breeding genetic modified (GM) medicine by expressing human cytokine in transgenic Chinese materia medica. **Methods** Human interferon α gene and RANTES gene available from the amplification *in vitro* were enzymatically excised, recovered, and inserted into intermediate vectors. The recombinants were identified by double enzyme digestion of *Eco*RI and *Hind*III. The plasmids were extracted from *Escherichia coli* and introduced into *A. tumefaciens*, and the transformants harboring binary vectors were screened by addition of antibiotics of kanamycin (Km) and rifampicin (Rif), and the explants of *M. charantia* and *P. vulgaris* were transformed by co-cultivation of leaf disks with *A. tumefaciens* strain. **Results** RT-PCR was applied to detect the transient expression of human interferon α gene and RANTES gene in transformed medicinal herbal calli. **Conclusion** The expression of recombinant human interferon α gene and RANTES gene in transgenic *M. charantia* and *P. vulgaris* cells was firstly reported, which opens an alternative road to antiviral, especially anti-AIDS virus, by using transgenic Chinese materia medica.

Key words interferon α gene; RANTES gene; transgenic Chinese materia medica

《本草纲目》记载苦瓜 *Momordica charantia* L. 可“除邪热,解劳乏,清心明目”,并能“泻六经之火”。杨显荣从苦瓜中分离出两种核糖体失活蛋白—— α -苦瓜素和 β -苦瓜素,并证实其能抑制艾滋病毒的复制^[1]。Chang等也从苦瓜中分离出对艾滋病毒感染细胞具有细胞毒性的 MAP-30^[2]。药化分析发现,夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 含有两种抗艾滋病毒有效成分——夏枯草皂苷及硫酸多糖。体外评价实验也证实,硫酸多糖能显著抑制 MT-4细胞中艾滋病毒的逆转录酶活性^[3]。

另一方面,干扰素具有广谱抗病毒活性和免疫强化功能,可使病毒繁殖量降低和细胞损伤减少。

1 mg 纯化的干扰素就有 2×10^8 个活力单位,大约 10 个干扰素分子就能使一个细胞产生抗病毒状态。因此,干扰素已作为艾滋病的辅助治疗药物^[4],并经美国 FDA 批准上市^[5]。最近发现,趋化因子受体可作为艾滋病毒侵入宿主细胞的通道,而趋化因子(如 RANTES, SDF-1 等)则可通过竞争结合与表达下调等机制限制艾滋病毒的感染^[6]。

为了提高中药的抗病毒活性及其作用的专一

* 收稿日期: 2002-03-05

基金项目: 国家自然科学基金 (39770902, 39870725); 广东省自然科学基金 (98064); 国家中医药管理局科研基金 (97Z082)

作者简介: 曾庆平 (1961-),男,湖南常德人,博士,副研究员,主要从事中药生物工程研究

性,我们在克隆人 α -干扰素基因和 RANTES 基因的基础上^[7-9],将 α -干扰素基因和 RANTES 基因通过根癌农杆菌共培养转化系统分别导入苦瓜及夏枯草培养细胞,实现了重组人细胞因子基因在转基因中药细胞中的瞬时表达,为进一步获得稳定表达人细胞因子基因的转基因中药植株并将其作为生物反应器生产人重组蛋白创造了条件。

1 材料和方法

1.1 中间表达载体的构建:将 RANTES 基因及 α -干扰素基因用 *Bam* H^I, *Kpn* I (Taraka 公司) 酶切,电泳回收,插入相同酶切的 pROKII 载体中, T4 DNA 连接酶 (Promega 公司) 连接,分别获得重组质粒 pR-RAN 和 pR-I FN 将重组质粒转化 DH5 α 感受态细胞,挑取单菌落,提取质粒 DNA,以 *Eco* R^I + *Hind* III 进行双酶切,并在扩增后测序。

1.2 根癌农杆菌的转化:将根癌农杆菌 LBA4404 (pAL4404) 涂于含有 Rif 50 μ g/mL 的 YEB 平板上,挑取单菌落接种于 5 mL YEB 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 250 r/min 振荡培养过夜。按常规方法制备感受态细胞,用重组质粒直接转化农杆菌^[10]。采用 Rif 50 μ g/mL 和 Km 25 μ g/mL 对转化子进行双抗性 (Km^r + Rif^r) 筛选及双酶切 (*Bam* H^I + *Kpn* I 及 *Eco* R^I + *Hind* III) 鉴定。

1.3 夏枯草外植体的共培养转化:选取 8~10 d 叶龄的夏枯草无菌幼苗,将叶片剪成 0.5 cm $\times$ 1 cm 大小,叶柄则剪成 1 cm 长度,转入 MS 培养基 (BA 0.1 μ g/mL + 2,4-D 1 μ g/mL) 中,于 25 $^{\circ}$ C 光照条件下预培养 3 d。挑取 YEB 平板 (Km 25 μ g/mL + Rif 50 μ g/mL) 上的根癌农杆菌 LBA4404 (pAL4404::pR-RAN) 单菌落,接种于 20 μ L YEB (Km 25 μ g/mL + Rif 50 μ g/mL) 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 180 r/min 培养过夜,取 400 μ L 菌液转接 20 μ L 无抗生素的 YEB 液体培养中,继续培养 6 h,待吸光度 $A_{600} \approx 0.4$ 时即可用于转化。将菌液倒入无菌带盖离心管内,加盖并封口,4 000 r/min 离心 5 min 弃去上清液,加入无菌 MS 液体培养基,重悬菌体。取出预培养材料,倒入稀释好的菌液,轻摇 1 min,立即取出叶片,置无菌滤纸上吸去多余菌液,将叶片放回 MS 培养基 (BA 0.1 μ g/mL + 2,4-D 1 μ g/mL) 中,加盖并封口,于 28 $^{\circ}$ C 黑暗中培养 3~4 d,再转入含 BA 0.1 μ g/mL + 2,4-D 1 μ g/mL 和 500 mg/L 头孢霉素 (Cef) 的 MS 培养基上进行脱菌培养。

1.4 苦瓜外植体的共培养转化:切取苦瓜无菌苗的

子叶和叶片,置于 2 mg/L NAA 和 0.1 mg/L BA 的 MS 培养基上预培养 4 d。将预培养后的外植体放入稀释 2 倍的根癌农杆菌 LBA4404 (pAL4404::pR-I FN) 菌液中 30 s,用无菌滤纸吸干残留菌液,放回预培养用的培养基中,在 26 $^{\circ}$ C 遮光条件下共培养 1 d。将共培养后的外植体用无激素 MS 培养液洗 2 次,每次 30 min,滤纸吸干残液后,转入含 2 mg/L NAA, 0.1 mg/L BA 和 500 mg/L Cef 的 MS 培养基上。

1.5 RT-PCR 检测:切取 100 mg 脱菌培养的愈伤组织,放入液氮冻干后,于研钵中加入 1 mL RL 液研磨,按柱式总 RNA 抽提试剂盒 (上海华舜生物工程公司) 说明书提取总 RNA, -70 $^{\circ}$ C 保存备用。取总 RNA 加入 DNA 酶 (Taraka 公司), 37 $^{\circ}$ C 消化 20 min,用等体积苯酚-氯仿抽提去蛋白,添加醋酸铵 (最终浓度 2 mol/L),再加入 2.5 倍量的冷乙醇沉淀,用 70% 乙醇洗涤, 50 $^{\circ}$ C 烘干,加入 50 μ L TE 溶解。采用 Life Technologies 公司的 M-M LV 逆转录酶在 50 $^{\circ}$ C 下逆转录 30 min,然后进行 PCR。夏枯草 cDNA 的扩增条件是: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min,共 35 个循环。苦瓜 cDNA 的扩增条件是: 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min,共 35 个循环。

2 结果和讨论



1-pROK II (*Eco* RI + *Hind* III) 2-pR-I FN (*Eco* RI + *Hind* III) 3-100 bp 梯度相对分子质量标准

图 1 pR-I FN 的双酶切鉴定

Fig. 1 Identification of pR-I FN by double digestion

2.1 重组质粒的鉴定: α -干扰素基因内部含有两个 *Eco* R^I 切点,用 *Hind* III 和 *Eco* R^I 双酶切时, pR-I FN 可产生 5 个片段,依次为 *Hind* III-*Hind* III (约 600 bp), *Hind* III-*Eco* R^I (121 bp), *Eco* R^I-*Eco* R^I (141 bp), *Eco* R^I-*Eco* R^I (约 900 bp), *Eco* R^I-*Hind* III (约 9 kb) (图 1-2);而 pROK II 只产生两个片段,分别约 1.2 kb *Hind* III-*Eco* R^I 片段和约 9 kb *Hind* III-*Eco* R^I 片段 (图 1-1)。

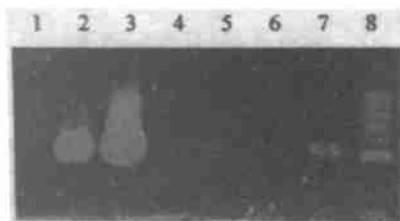
pR-RAN 的 *Hind* III-*Eco* R^I 双酶切产物为 9 kb *Hind* III-*Eco* R^I 片段和 1.5 kb *Hind* III-*Eco* R^I 片段 (图 2-2); pROK II 经 *Hind* III-*Eco* R^I 双酶切可产生约 1.2

kb *Hind*III-*Eco*RI 片段和约 9 kb *Hind*III-*Eco*RI 片段 (图 2-1)

以上结果表明, α -干扰素基因和 RAN TES 基因已分别插入 pRO KII 载体中, 而且由此获得的中间表达载体的酶切图谱正确

2.2 α -干扰素基因在苦瓜细胞中的表达分析: 将 pRI FN 导入根癌农杆菌构成二元载体系统, 在其中微型 Ti 质粒 pAL4404 的 *Vir* 基因协助下^[11], pRI FN 中携带 α -干扰素基因的 T-DNA 片段可整合在苦瓜细胞染色体上, α -干扰素基因则在 CaMV 启动子作用下转录产生 α -干扰素 mRNA, 通过 RT-PCR 即可对其进行检测 (图 3)

从图 3 可以看出, 未转化愈伤组织 (图 3-1) 无 α -干扰素基因存在, 而转化愈伤组织 (图 3-2, 3) 则可检测到 α -干扰素基因的扩增产物, 提示该扩增产物可



1 未转化愈伤组织 PCR 产物 2 转化叶片愈伤组织 PCR 产物
3 转化子叶愈伤组织 PCR 产物 4 转化子叶愈伤组织总 RNA 经 DNA 酶消化后的 PCR 产物 5 转化子叶愈伤组织总 RNA 经 DNA 酶消化后的 PCR 产物 6 转化叶片愈伤组织总 RNA 经 DNA 酶消化后的 RT-PCR 产物 7 转化子叶愈伤组织总 RNA 经 DNA 酶消化后的 RT-PCR 产物 8-100 bp 梯度相对分子质量标准

1-PCR amplicon of untransformed leaf-derived calli (ULDC)
2-PCR amplicon of transformed leaf-derived calli (TLDC)
3-PCR amplicon of transformed cotyledon-derived calli (TCDC)
4-PCR amplicon of TLDC, from total RNA digested by DNase
5-PCR amplicon of TCDC, from total RNA digested by DNase
6-RT-PCR amplicon of TLDC, from total RNA digested by DNase
7-RT-PCR amplicon of TCDC, from total RNA digested by DNase
8-100 bp ladder

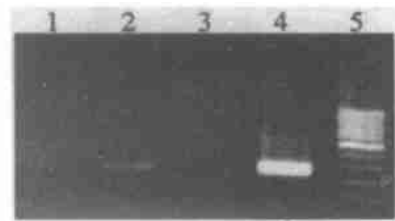
图 3 转基因苦瓜愈伤组织的 RT-PCR 鉴定

Fig. 3 Assay of transgenic *M. charantia* calli by RT-PCR



1-pRO KII (*Eco*RI + *Hind*III) 2-pR-RAN (*Eco*RI + *Hind*III) 3-100 bp 梯度相对分子质量标准
1-pRO KII (*Eco*RI + *Hind*III) 2-pR-RAN (*Eco*RI + *Hind*III) 3-100 bp ladder

图 2 pR-RAN 的双酶切鉴定
Fig. 2 Identification of pR-RAN by double digestion



1 转化叶片愈伤组织总 RNA 经 DNA 酶消化后的 PCR 产物 2 转化叶片愈伤组织总 RNA 经 DNA 酶消化并去蛋白后的 RT-PCR 产物 3 转化叶片愈伤组织总 RNA 经 DNA 酶消化而未去蛋白的 RT-PCR 产物 4-pT-RAN 质粒的 PCR 产物 5-100 bp 梯度相对分子质量标准

1-PCR amplicon of transformed leaf-derived calli (TLDC), from total RNA digested by DNase 2-RT-PCR amplicon of TLDC, from total RNA digested by DNase and deprivation of protein 3-RT-PCR amplicon of TLDC, from total RNA digested by DNase but not deprivation of protein 4-PCR amplicon of plasmid pT-RAN 5-100 bp ladder

图 4 转基因夏枯草愈伤组织的 RT-PCR 鉴定

Fig. 4 Assay of transgenic *P. vulgaris* calli by RT-PCR

能来自转化的植物细胞或根癌农杆菌本身。为了消除 α -干扰素基因对 RT-PCR 检测 α -干扰素 mRNA 的干扰, 我们用 DNA 酶完全消化转化愈伤组织总 RNA 提取物, 以彻底除去 α -干扰素基因拷贝, 结果在 PCR 扩增后未检测到 α -干扰素基因的扩增产物 (图 3-4, 5), 表明 α -干扰素基因相关的 DNA 已不复存在。以此无 DNA 的转化愈伤组织总 RNA 为模板, 再进行 RT-PCR 扩增, 结果检测到 α -干扰素基因表达产生的 mRNA (图 3-6, 7)。

2.3 RAN TES 基因在夏枯草细胞中的表达分析: 二元载体系统中 RAN TES 基因所在的 T-DNA 可以整合在夏枯草细胞中的染色体上, 并在 CaMV 启动子作用下表达。采用经 DNA 酶消化的转化愈伤组织的 RT-PCR, 已检测到 RAN TES 基因的表达产物 (图 4-2, 3), 其大小与 pT-RAN 质粒中的 RAN TES 基因 (图 4-4) 相同。此外, 去蛋白的 RT-PCR 产物的检测信号 (图 4-2) 明显强于未去蛋白的 RT-PCR 产物 (图 4-3), 提示 DNA 酶可能通过消化 RAN TES 基因的逆转录产生的 cDNA 而降低模板的数量, 从而使扩增产物显著减少。

RT-PCR 检测结果表明, α -干扰素基因与 RAN TES 基因已分别进入苦瓜细胞核及夏枯草细胞核, 并在其中合成出相应的 α -干扰素 mRNA 和 RAN TES mRNA。至于二者是否已整合在细胞核内染色体上, 则需待它们再生完整植株后再通过 Southern 印迹杂交加以证实。

在中药新药研制过程中,除了积极寻找中药有效成分外,也应重视生物技术在改造传统中药中的重要作用。陈炬在烟草中成功表达人 α -干扰素基因^[12]。随后,Edelbaum又分别在烟草和水稻中表达了人 β -干扰素基因^[13]。然而,这些植物本身无药用价值,其用途有限,迄今为止尚未报道人 α -干扰素基因和 RANTES 基因在中药细胞中的成功转化与表达。为此,我们开展的转人 α -干扰素基因苦瓜及转人 RANTES 基因夏枯草的研究工作,首次报道了人细胞因子基因在转基因中药细胞中的瞬时表达,这将有助于最终培育基因修饰 (genetic modification, GM) 中药,由此可将病原体或肿瘤抗原基因、抗病毒基因及其他有用基因引入中药细胞,以育成可以口服的转基因疫苗以及对中药原有药理活性产生增效作用的转基因中药。

References

[1] Liu W B. *Prevention and Treatment of AIDS by Chinese Medicine and Western Medicine* (艾滋病中西医结合防治学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1993.
[2] Chang R S. Inhibition of growth of human immunodeficiency virus *in vitro* by crude extracts of Chinese medicinal herbs [J]. *Antiviral Res*, 1988, 9: 163-176.
[3] Zeng Q P. *Human AIDS* (人类艾滋病) [M]. Beijing:

People's Medical Publishing House, 2001.
[4] Zhang S M. Application of interferon in treatment of AIDS-related syndrome [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 1998, 7(4): 284-287.
[5] Yin H, Fan C R. Biological products and bio- technological drugs approved by Food and Drug Administration of USA [J]. *Chin New Drugs J* (中国新药杂志), 1998, 7(5): 409-411.
[6] Michael N L, Moore J P. HIV-1 entry inhibitors: evading the issue [J]. *Nat Med*, 1999, 5: 740-742.
[7] Zeng Q P, Feng L L, Yang R Y, *et al.* Cloning of human interferon and construction of plant gene expression vector [J]. *Chin Sci Abstr* (中国学术期刊文摘), 2002, 6(9): 1152-1154.
[8] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, *et al.* Cloning and sequencing of human RANTES gene [J]. *J China AIDS/STD Prev Control* (中国性病艾滋病防治), 2000, 14(6): 245-247.
[9] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, *et al.* Cloning and expression *in vitro* of human RANTES gene [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2001, 17(3): 349-351.
[10] Wang G L, Fang H Y. *Principles and Techniques of Plant Genetic Engineering* (植物基因工程原理与技术) [M]. Beijing: Science Press, 1998.
[11] Li B J, Zeng Q P. *Principles and Methods of Plant Biotechnology* (植物生物技术原理和方法) [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Publishing House, 1990.
[12] Chen J. Expression of human interferon α cDNA in transgenic tobacco plants [J]. *Sci Sin (B)* (中国科学·B辑), 1990, 3: 253.
[13] Edelbaum A. Expression of active human interferon beta in transgenic plants [J]. *Interferon Res*, 1992, 12: 449.

rRNA 基因间隔区碱基测序对当归进行鉴定的研究

姬可平*,李应东*,张西玲**,李啸红*

(甘肃中医学院 生物学教研室,甘肃 兰州 730000)

摘要:目的 通过 rRNA 基因内转录间隔区的碱基序列测定,对当归进行分子水平鉴定。方法 常规提取当归种籽 DNA,利用合成的特异性引物对其 rRNA 基因内转录间隔区进行套式 PCR 扩增,将扩增产物进行碱基序列测定。结果 琼脂糖凝胶电泳证实当归种籽中 rRNA 基因内转录间隔区 PCR 扩增产物存在;经测序后得到了当归种籽 rRNA 基因内转录间隔区的碱基序列。结论 rRNA 基因内转录间隔区的碱基序列测定可做为分子水平鉴定植物性中药材的又一有效途径。

关键词: 当归;套式 PCR; DNA 测序; rRNA 基因;分子鉴定

中图分类号: R282.710.3 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)01-0066-04

Identification by measuring internal transcribed spacer regions of rRNA gene in *Radix Angelicae Sinensis*

Ji Ke-ping, Li Ying-dong, ZHANG Xi-ling, LI Xiao-hong

(Department of Biology, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

Abstract Object To set up an identified standard on the level of molecule through measuring the internal transcribed spacer regions of the rRNA gene in *Radix Angelicae Sinensis*. **Methods** To extract

* 收稿日期: 2002-04-24

基金项目: 甘肃省自然科学基金资助项目 (ZS011-A25-058-Y)

作者简介: 姬可平 (1956-), 男, 甘肃中医学院基础课部副主任、生物学教研室副教授,《中国优生与遗传杂志》编委、副主编, 1982 年毕业于西北师范学院生物系, 获理学学士学位, 研究方向主要为分子生物学理论与技术在中草药质量控制、鉴定方面的应用及中草药对优生和遗传方面的影响。主持省级科研课题 1 项, 厅局级课题 1 项, 参加省级课题 3 项, 厅局级课题 4 项, 获厅局级科研三等奖 1 项。Tel (0931) 8666534

* 本院中心实验室 ** 本院中药鉴定教研室