

• 药材与资源 •

人 RANTES 基因在转基因青蒿植株中表达的测定

冯丽玲, 曾庆平, 杨雪芹

(广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405)

摘要:目的 为了增强青蒿的特异药理活性, 探讨人 β -趋化因子 RANTES 基因在青蒿细胞中表达的可能性。方法 将克隆的 RANTES 基因经 Ti 质粒衍生的二元表达载体 pROKII 导入根癌农杆菌 LBA4404 菌株, 通过叶盘共培养法已获得一批表现卡那霉素抗性的转基因青蒿植株。结果 PCR 和 Southern 印迹杂交分析表明, RANTES 基因已导入并整合到青蒿基因组中; RT-PCR、Northern 印迹、Western 印迹杂交结果证实, RANTES 基因已在转基因青蒿植株中成功表达。结论 首次报道了 RANTES 基因在转基因青蒿植株中的表达, 为基因工程改造青蒿打下了良好的基础。

关键词: 青蒿; RANTES 基因; 转基因中药

中图分类号: R282.12

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)10-1167-05

Assay of human RANTES gene expressed in transgenic plants of *Artemisia annua*

FENG Li-ling, ZENG Qing-ping, YANG Xue-qin

(Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract: **Object** To enhance the specific pharmacological activity of *A. annua* and explore the possibility for expression of human β -chemokine RANTES gene in *A. annua* cells. **Methods** The cloned RANTES gene was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 strain by Ti plasmid-derived binary vector pROKII. A batch of transgenic *A. annua* plants with kanamycin resistance was regenerated by disk cocultivation procedure. **Results** The assay by polymerase chain reaction (PCR) and Southern blotting showed that RANTES gene had introduced and integrated into the genome of *A. annua*. The results of RT-PCR, Northern blotting, and Western blotting confirmed that RANTES gene had expressed successfully in transgenic *A. annua* plants. **Conclusion** The expression of RANTES gene in transgenic *A. annua* plants, which pave a direct path to modify *A. annua* by genetic engineering.

Key words: *Artemisia annua* L.; RANTES gene; transgenic Chinese materia medica

青蒿 *Artemisia annua* L. 用于治疗暑热外感、阴虚发热、湿热黄疸诸证, 其功用在历代本草中均有丰富记载。作为世界卫生组织极力推崇的抗疟药有效成分——青蒿素是我国科学工作者从青蒿中分离的化学单体。同时, 青蒿素还具有免疫调节功能^[1]; 青蒿素衍生物青蒿琥酯钠有抗肿瘤作用^[2]; 青蒿甲醇提取物 N1, N5, N10-三-*p*-香豆酰精脒及相关酰胺类化合物能抑制艾滋病病毒蛋白酶活性^[3]。鉴于青蒿资源的日益短缺及化学合成上的困难, 采用基因工程手段培育高产青蒿素品种正在受到国外学者的关注^[4,5]。为了探讨利用基因工程手段改造传统中药的可能性, 在人 RANTES 基因克隆的基础上^[6], 利用青蒿作为转基因模式系统, 采用叶盘共培养法

将 RANTES 基因通过根癌农杆菌二元载体系统导入青蒿细胞, 获得稳定表达重组人 RANTES 基因的转基因青蒿植株。

1 材料

1.1 青蒿种子: 青蒿 *Artemisia annua* L. 种子由广州华立健药业有限公司提供。

1.2 根癌农杆菌: 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 (pAL4404) 菌株和 Ti 质粒载体 pROKII 由中国科学院微生物研究所提供。含有人 RANTES 基因的表达载体 pR-RAN 由本室构建^[7]。

1.3 植物激素和抗生素: 6-苄氨基嘌呤 (BA), 新华活性材料研究所产品; α -萘乙酸 (NAA), 上海曹

收稿日期: 2004-01-03

基金项目: 国家自然科学基金新技术探索项目 (30271591); 广东省自然科学基金重点项目 (020799); 国家中医药管理局基础研究项目 (02-03ZP43); 健桥科研基金项目 (JQ0205)

作者简介: 冯丽玲 (1975—), 女, 广东广州人, 学士, 研究实习员, 主要从事中药生物工程研究。

Tel: (020) 36585422 E-mail: fengliling1@21cn.com

杨第二中学化工厂产品;头孢霉素 (Cef) 和卡那霉素 (Kan), Sigma 公司产品;利福平 (Rif), 广东台山新宁制药厂产品。

1.4 扩增引物:人 RANTES 基因的扩增引物,其中上游引物的序列为:5'-ATGAAGGTCTC-CGCGGCACGCCTC-3';下游引物的序列为:5'-CTAGCTCATCTCCAAAGAGTTGAT-3',由大连 Takara 公司合成。

1.5 酶及其他试剂:DNA 酶、RT-PCR 试剂盒 (mRNA Selective PCR Kit), Takara 公司;100 bp ladder、Taq 酶, Promega 公司;10×扩增缓冲液、dNTP、Bio-11-dUTP、DAB 浓缩显色液,华美公司;质粒 DNA 纯化试剂盒 (Concert Rapid Plasmid Miniprep System)、DNA 片段回收试剂盒 (Concert Rapid Gel Extraction System), Life Technologies 公司;植物 DNA 提取试剂盒 (E. Z. N. A. Plant DNA Kit)、植物 RNA 提取试剂盒 (E. Z. N. A. Plant RNA Kit), Omega 公司;RANTES 标准品, Intergen 公司;一抗 (羊抗人 RANTES C19 抗体), Santa Cruz 公司;酶标二抗 (HRP 标记的马抗羊 IgG), Jakson Immno Res 公司。

2 方法

2.1 青蒿种子发芽和无菌苗培养:青蒿种子先在 75% 乙醇中浸泡 30 s, 再在 5% NaClO 中浸泡 15 min, 无菌水洗涤 4 次后, 播种于 1/2 MS 培养基, 26 °C 暗培养 3 d, 出芽后在 25 °C, 光照 (10 000 lx) 培养, 光照时间为 16 h。

2.2 根瘤农杆菌转化:将 LBA4404 菌液涂在加有 50 μg/mL Rif 的 YEB 平板上, 28 °C 培养过夜。挑取单菌落, 接种于 5 mL YEB 培养液 (50 μg/mL Rif) 中, 28 °C、250 r/min 振荡过夜。用 pR-RAN 转化 LBA4404, 在加有 50 μg/mL Rif 和 25 μg/mL Kan 的 YEB 平板上筛选携带双元载体 (pAL4404::pR-RAN) 的转化子。

2.3 叶盘共培养:选取培养 8~10 d 的青蒿无菌幼苗, 将叶片剪成约 5 mm 长的小块, 转入 N6 培养基 (NAA 0.5 μg/mL) 中, 于 25 °C、光照条件下预培养 2 d。挑取 YEB 板 (Kan 25 μg/mL+Rif 50 μg/mL) 上含双元载体的农杆菌单菌落, 接种于 4 mL YEB (Kan 25 μg/mL+Rif 50 μg/mL) 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养过夜。取 400 μL 菌液转接入 20 mL 无抗生素 YEB 液体培养中, 继续培养 6 h。将菌液倒入无菌离心管内, 4 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 20 mL N6 液体培养基。将预培养

材料取出, 倒入稀释后的菌液, 轻轻摇晃 1 min, 取出外植体置于无菌滤纸上吸去菌液。将外植体放回 N6 培养基 (NAA 0.5 μg/mL) 中, 于 28 °C、黑暗中培养 2 d。将外植体转到 N6 培养基 (NAA 0.3 μg/mL) 中, 于 25 °C 光照培养 2 d, 转入含 25 μg/mL Kan 和 500 μg/mL Cef 的 MS 培养基 (BA 1 μg/mL+NAA 0.2 μg/mL) 中进行杀菌筛选培养。将转化绿芽转入上述筛选培养基, 每隔 1 周更换一次新鲜培养基。

2.4 转基因植株的分子检测

2.4.1 PCR:按植物 DNA 提取试剂盒说明书操作, 分别提取转基因和未转基因青蒿叶片的 DNA, 在 50 μL 反应体系中用上、下游引物进行 PCR 扩增, PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳。

2.4.2 Southern 杂交:将青蒿 DNA 用 *EcoRI* 进行单酶切和 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 将凝胶放在 20×SSC 浸润的尼龙膜上, 采用高盐转移法转膜, 然后将膜在紫外交联仪中照射 4 min。以人 β-趋化因子 RANTES 基因为探针, 按生物素标记及显色试剂盒说明书进行标记和显色。

2.4.3 青蒿 RNA 提取与 RT-PCR:按植物 RNA 提取试剂盒说明书分别提取转基因和未转基因青蒿叶片的总 RNA, 加入 DNA 酶, 37 °C 消化 20 min, 用等体积苯酚-氯仿抽提去蛋白, 添加醋酸铵 (终浓度 2 mol/L), 再加入 2.5 倍量冷乙醇沉淀, 用 70% 乙醇洗涤, 50 °C 烘干, 加入 50 μL TE 溶解。按以下条件进行 RT-PCR 扩增:50 °C、30 min→85 °C、1 min;45 °C、1 min;72 °C、1 min;共 30 个循环。

2.4.4 Northern 杂交:将青蒿 RNA 在 1% 甲醛变性凝胶电泳中进行分离, 按 Southern 杂交法进行转膜和杂交显色, 但不经过变性和中和处理。

2.4.5 青蒿蛋白提取与 Western 杂交:按文献^[9]方法提取青蒿总蛋白。取 20 μL 总蛋白与 20 μL 载样缓冲液混合, 95 °C 加热 5 min, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、洗膜、封闭后, 依次加入 1:1 000 一抗 (羊抗人 RANTES C19 抗体) 和 1:1 000 酶标二抗 (HRP 标记的马抗羊 IgG), 用 DAB 显色。

3 结果

3.1 青蒿的转化和筛选:经共培养转化的青蒿叶盘在加有抗生素的选择培养上生长 4~6 d 后, 叶盘周边长出颗粒状愈伤组织, 并不断膨大 (图 1-a), 14~21 d 开始出现绿芽分化 (图 1-b), 继续培养, 并淘汰白化苗及畸型苗, 可获得形态正常的 Kan 抗性绿苗 (图 1-c)。

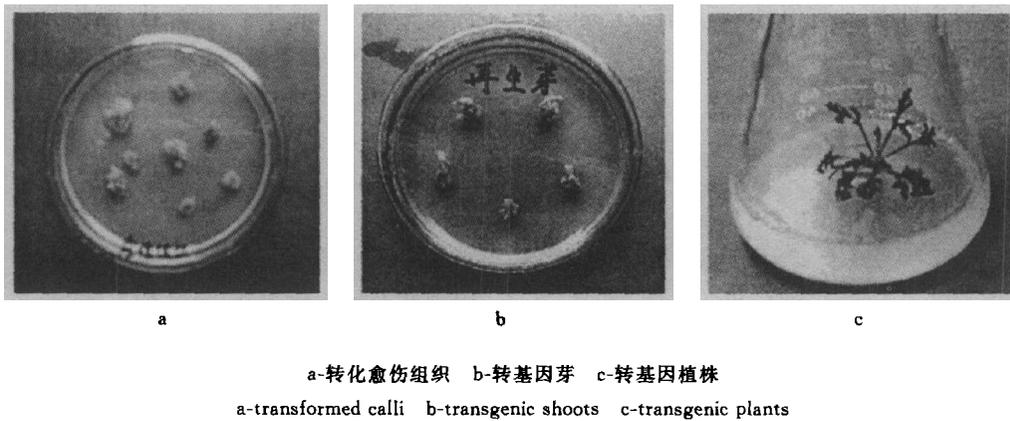
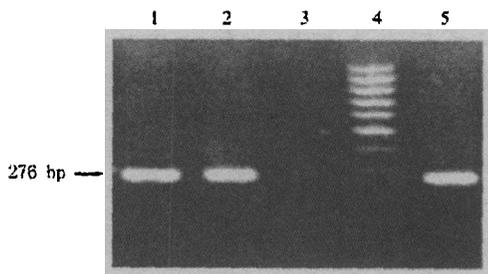


图 1 叶盘法转化的转基因青蒿植株

Fig. 1 Transgenic *A. annua* plant transformed by leaf disk method

3.2 转基因青蒿的分子检测

3.2.1 转基因青蒿的转化证据——PCR: 从 Kan 抗性青蒿植株提取总 DNA, 以含有人 RANTES 基因的 pR-RAN 质粒为阳性对照, 未转化青蒿总 DNA 为阴性对照, 用上、下游引物进行 RANTES 基因扩增 (图 2)。结果显示, 转化的 Kan 抗性植株总 DNA 可扩增出 276 bp 的目的基因片段, 而未转化植株总 DNA 则无相应扩增片段。



1,2-转基因青蒿植株的 PCR 产物 3-未转化青蒿植株的 PCR 产物 4-100 bp 梯度相对分子质量标准 5-pR-RAN 质粒的 PCR 产物
1,2-PCR transgenic *A. annua* 3-PCR nontransformed *A. annua* 4-100 bp ladder 5-PCR pR-RAN

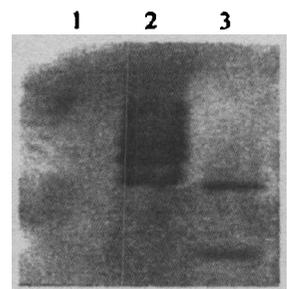
图 2 转基因青蒿植株的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of transgenic *A. annua* plant by PCR

3.2.2 转基因青蒿的整合证据——Southern 印迹: 为了获得 RANTES 基因在青蒿染色体上整合的证据, 以 PCR 阳性的转基因青蒿及未转化青蒿的总 DNA 为材料, 用 *EcoRI* 消化后, 以生物素标记的 RANTES 基因探针进行 Southern 印迹杂交, 结果如图 3 所示。转基因植株 (2 和 3) 显示出 2~3 条特征性杂交带, 表明 RANTES 基因已整合到转基因青蒿植株的基因组中, 并以多拷贝形式存在, 而未转化植株则无任何杂交带。

3.2.3 转基因青蒿的表达证据——RT-PCR:

以 Kan 抗性转基因青蒿植株及未转化植株的总 RNA 为材料进行 RT-PCR, 结果如图 4 所示。转基因叶片总 RNA 经 RT-PCR 后, 均可见 276 bp 的 RANTES mRNA 扩增带 (4~6 泳道)。其中, 未经 DNA 酶消化及去蛋白处理的 RT-PCR 产物最多 (6 泳道), 经 DNA 酶消化而且不去蛋白的 RT-PCR 产物最少 (5 泳道), 用 DNA 酶消化并去蛋白的 RT-PCR 产物则介于二者之间 (4 泳道), 表明 DNA 酶可消化逆转录产生的 cDNA 而使 RT-PCR 产物减少, 其中不去蛋白 (不除去 DNA 酶) 比去蛋白 (除去 DNA 酶) 的效果更为显著。另外, 预先用 DNA 酶消化的转基因叶片 (无 DNA) 总 RNA, 在 PCR 后未检测到任何扩增产物 (3 泳道)。



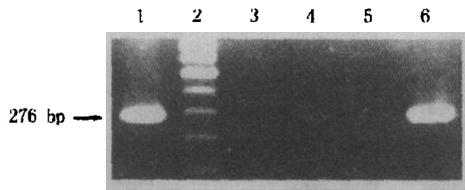
1-未转化青蒿植株 2,3-转基因青蒿植株
1-nontransformed *A. annua* plant 2,3-transgenic *A. annua* plants
图 3 转基因青蒿植株的 Southern 印迹杂交鉴定

Fig. 3 Identification of transgenic *A. annua* plant by Southern blotting

3.2.4 转基因青蒿的表达证据——Northern 印迹杂交: 对 Kan 抗性的转基因青蒿和未转化青蒿总 RNA 进行 Northern 印迹杂交, 结果见图 5。转基因青蒿总 RNA 对应位置有明显杂交信号, 而未转化青蒿总 RNA 对应位置无杂交信号。

3.2.5 转基因青蒿的表达证据——Western 印迹杂交: 对 Kan 抗性的转基因青蒿和未转化青蒿总蛋白进行 Western 印迹杂交, 结果见图 6。转基因青蒿

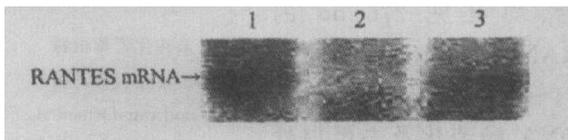
总蛋白对应位置有明显杂交信号,而未转化青蒿总蛋白对应位置无杂交信号。



1-pR-RAN 质粒的 PCR 产物 2-100 bp 梯度相对分子质量标准 3-转基因植株总 RNA 经 DNA 酶消化后的 PCR 产物 4-转基因植株总 RNA 经 DNA 酶消化并去蛋白后的 RT-PCR 产物 5-转基因植株总 RNA 经 DNA 酶消化而未去蛋白的 RT-PCR 产物 6-转基因植株总 RNA 的 RT-PCR 产物
1-PCR product of pR-RAN 2-100 bp ladder 3-PCR product of transgenic plant RNA digested by DNase 4-RT-PCR product of transgenic plant RNA digested by DNase with protein-extraction 5-RT-PCR product of transgenic plant RNA digested by DNase without protein extraction 6-RT-PCR product of transgenic plant RNA

图 4 转基因青蒿植株的 RT-PCR 鉴定

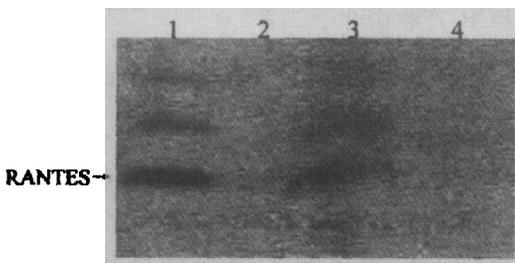
Fig. 4 Identification of transgenic *A. annua* plant by RT-PCR



1,3-转基因青蒿植株 2-未转化青蒿植株
1,3-transgenic *A. annua* plant
2-nontransformed *A. annua* plant

图 5 转基因青蒿的 Northern 杂交鉴定

Fig. 5 Identification of transgenic *A. annua* plant by Northern blotting



1,3-转基因青蒿植株 2,4-未转基因青蒿植株
1,3-transgenic *A. annua* plant
2,4-nontransformed *A. annua* plant

图 6 转基因青蒿的 Western 印迹杂交鉴定

Fig. 6 Identification of transgenic *A. annua* plant by Western blotting

4 讨论

20 世纪 80 年代以来,由根癌农杆菌 Ti 质粒衍生的双元载体、共整合载体、分隔末端载体、载体卡

盒等相继构建成功,共培养法、脂质体法、电穿孔法、基因枪法等基因转移技术已分别用于培育转基因粮食、经济和蔬菜作物。同时,用抗原蛋白基因、细胞因子基因及其他有用基因对药用植物进行遗传修饰 (genetic modification, GM),可望育成能口服的转基因疫苗及对中药原有药理活性产生增效作用的转基因中药。迄今为止,国外已有几十种药用蛋白及药用多肽在植物中表达成功,如干扰素、表皮生长因子和抗体等,可开发为治疗药物或诊断试剂。

趋化因子是一类低相对分子质量 (8 000~10 000) 诱导分泌细胞因子,可结合细胞表面的趋化因子受体而诱发炎症性免疫应答,由此调节 T 细胞趋化动员并促进血管再生,在自身免疫性疾病、器官移植排斥反应、肿瘤发生和发展中具有重要作用。最近还发现,人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染人体细胞的主要受体为 CD4,辅助受体则是趋化因子受体。RANTES、SDF-1 等趋化因子是趋化因子受体的天然配基,它们可结合趋化因子受体而产生空间位阻效应,同时还能下调趋化因子受体在细胞表面的表达,从而阻断 HIV 侵入细胞,降低受 HIV 感染的危险^[9]。另一方面,高加索人种中的趋化因子受体缺陷型 (CCR5-Δ32) 对 HIV 感染具有抗性,表明趋化因子受体与趋化因子的相互作用是艾滋病药物作用的潜在靶点之一^[10]。

本研究将人 RANTES 基因通过根癌农杆菌共培养转化系统导入青蒿培养细胞,已再生转基因青蒿植株,实现了外源基因在青蒿染色体上的整合及在完整植株中的表达。通过对转基因青蒿植株中 RANTES 基因的 PCR 扩增,已获得外源基因在转化细胞中存在的证据。Southern 印迹杂交证实导入转化细胞的外源基因已在染色体上整合,其拷贝数为 2~3 个。笔者曾利用该双元载体系统转化夏枯草细胞,结果在转基因愈伤组织中检测到整合的 RANTES 基因,但拷贝数仅为 1 个^[11]。RT-PCR 和 Northern 印迹杂交结果显示,RANTES 基因在 35 S 启动子指导下已成功转录出 RANTES mRNA。从 RT-PCR 产物的测序结果来看,包括信号肽序列在内的 RANTES 基因全序列已被忠实转录 (未发表结果)。采用 Western 印迹杂交直接检测到转基因青蒿中 RANTES 的存在,表明 RANTES mRNA 可顺利完成转录后加工并能正确翻译。

青蒿是广泛分布于我国境内的药用野生植物资源,其有效成分青蒿素是强效和高效抗疟药组份,但

青蒿中青蒿素含量过低极大地制约了其规模化生产与临床应用。因此,利用基因工程对青蒿基因组进行敲入(knockin)和敲除(knockout)成为青蒿遗传改良的两大方向,其目标是提高青蒿素含量和促进青蒿的综合利用,前提条件是成熟而可靠的载体系统、转化方法和再生技术的建立。为此,国内叶和春研究小组建立了青蒿宿主-载体及其转化系统^[12]。本研究为进一步开展这方面的研究奠定了基础。

References:

[1] Shen M. The immunosuppression of artemisinin [J]. *Sci Sin (B)* (中国科学 B 辑), 1983, 10: 928-934.
 [2] Yang X P. The antitumor effect of artemisinin succinate [J]. *Cancer (癌症)*, 1997, 16: 186-187.
 [3] Gong S X. Inhibition of tri-*p*-coumaric arginamide and related amide compounds on HIV-1 proteinase [J]. *Foreign Med Sci—Chin Med* (国外医学·中医中药分册), 2002, 24: 302-303.
 [4] Vergauwe A, Cammaert R, Vanderberghe D. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Artemisia annua* L. and regeneration of transgenic plants [J]. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 929-933.

[5] Chen D H, Meng Y L, Ye H C, *et al.* Culture of transgenic *Artemisia annua* hairy root with cotton cadinenin synthase gene [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1998, 40: 711-714.
 [6] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, *et al.* Cloning and sequencing of human RANTES gene [J]. *Chin J Sex Trans Dis AIDS* (中国性病艾滋病防治), 2000, 14: 245-247.
 [7] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, *et al.* Cloning sequencing and *in vitro* expression of human RANTES genes [J]. *Chin J Biotech* (生物工程学报), 2001, 17: 349-351.
 [8] Zeng Q P, Feng L L, Yang R Y, *et al.* Transient expression of recombinant human cytokine genes in transgenic *Artemisia annua* cells [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(1): 63-66.
 [9] Michael N L, Moore J P. HIV-1 entry inhibitors: evading the issue [J]. *Nature Med*, 1999, 5: 740-742.
 [10] Premack B A, Schall T J. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection [J]. *Nature Med*, 1996, 2: 1174-1178.
 [11] Zeng Q P, Yang R Y, Feng L L, *et al.* Establishment of stably expressed human RANTES gene in *Prunella vulgaris* cell clone [J]. *Chin J Biotech* (生物工程学报), 2003, 19: 168-173.
 [12] Chen D H, Ye H C, Li G F, *et al.* Expression of green fluorescent protein gene in transgenic shoots of *Artemisia annua* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41: 490-493.

稀土元素镧对掌叶大黄毛状根和非转化根生长及蒽醌产量的影响

杨世海¹, 刘晓峰², 果德安³

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118; 2. 吉林亚泰(集团)股份有限公司, 吉林 长春 130031; 3. 北京大学药学院, 北京 100083)

摘要:目的 研究不同浓度的稀土元素镧(La³⁺)对3种大黄根生物量和蒽醌次生代谢产物产量的影响。方法 采用统计学分析方法,研究稀土元素 La³⁺对两种掌叶大黄单克隆毛状根 DH5c、DH7a 和液体培养非转化根 NOR 生物量和蒽醌化合物合成的影响。结果 La³⁺浓度对大黄根生物量积累有显著影响,培养基中 La³⁺为 10 mg/L 时,对大黄根生长表现出明显的抑制作用;La³⁺浓度对3种大黄的蒽醌产量有极显著影响,当培养基中 La³⁺ 1.0 mg/L 时,蒽醌产量最高;经稀土离子处理的3种大黄根中芦荟大黄素和大黄素显著高于大黄素、大黄酚和大黄素甲醚。结论 培养基中添加适宜浓度的稀土离子 La³⁺对掌叶大黄单克隆毛状根的生物量积累和蒽醌类化合物的合成具有明显的促进作用。

关键词:掌叶大黄; 毛状根; 稀土元素; 蒽醌类化合物

中图分类号:R282.6 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2004)10-1171-04

Effect of rare-earth elements La³⁺ on growth of hairy roots and normal roots of *Rheum palmatum* and their yield of anthraquinone

YANG Shi-hai¹, LIU Xiao-feng², GUO De-an³

(1. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin YaTai Group Co., Ltd., Changchun 130031, China; 3. School of Pharmacy, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: **Object** To study the effect of rare-earth elements La³⁺ on growth of hairy roots and normal roots of *Rheum palmatum* L and their yield of anthraquinones. **Methods** The biomass and an-

收稿日期: 2004-01-16

作者简介: 杨世海(1962-),男,吉林人,副教授,博士后。1983年7月毕业于吉林农业大学中药材学院,1995年9月—1998年11月在北京医科大学药学院(现北京大学药学院)攻读博士学位,2000年12月—2002年12月在日本国立农业生物资源研究所做日本科学技术振兴事业团博士后(STA Fellow)研究,主要从事中药资源和中药生物工程研究。
 Tel: 0431-4533086 Fax: 0431-4512151 E-mail: jlyangs@yahoo.com.cn