

• 药材与资源 •

大肠杆菌 *CodA* 基因表达赋予转基因青蒿负选择表型

冯丽玲, 杨瑞仪, 杨雪芹, 曾庆平

(广州中医药大学热带医学研究所, 广东 广州 510405)

摘要:目的 为了验证 *CodA* 基因是否适宜作为有效的青蒿基因打靶负选择标记。方法 用 PCR 法扩增大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因 *CodA*, 经克隆和测序后插入植物基因表达载体 pROK II, 并导入根癌农杆菌 LBA4404 (pAL4404) 中。以共培养法转化青蒿叶盘, 在添加 25 $\mu\text{g/mL}$ 卡那霉素(Kan)的 N6 培养基上选择青蒿转化愈伤组织并再生绿芽。将 Kan 抗性转基因青蒿芽转植到含有 500 $\mu\text{g/mL}$ 5-氟胞嘧啶(5-FC)和 25 $\mu\text{g/mL}$ Kan 的 MS 培养基上继续培养 2 周。结果 转基因青蒿芽全部死亡, 而未转化青蒿芽仍正常生长, 表明导入 *CodA* 基因的青蒿细胞已赋予其预期的负选择表型。经 RT-PCR 检测, 转基因青蒿芽显示 *CodA* 阳性扩增带, 而未转化青蒿芽无此特异扩增带。这一结果显示, *CodA* 基因已在青蒿细胞中转录生成相应的 mRNA, 从而进一步印证了表型检测结果。结论 *CodA* 基因可作为有效的青蒿基因打靶负选择标记。

关键词: 青蒿; 基因打靶; 负选择

中图分类号: R282.12

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)04-0578-05

Expression of *CodA* gene from *Escherichia coli* conferring a negative selection phenotype on transgenic *Artemisia annua*

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

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

Abstract: **Objective** To explore the feasibility of utilizing the cytosine deaminase A (*CodA*) gene as an effective negative selectable marker in *Artemisia annua* for gene targeting. **Methods** The PCR procedure was employed to amplify *CodA* gene from *Escherichia coli*. After being cloned and sequenced, the gene was inserted into a plant expression vector, pROK II, and then introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (pAL4404). The leaf disks of *A. annua* were transformed by the co-cultivation protocol, after which the transformed calli were selected and green shoots of *A. annua* were regenerated on N6 medium supplemented with 25 $\mu\text{g/mL}$ Kanamycin (Kan). Then the Kan-resistant transgenic shoots were transplanted onto the MS medium containing 500 $\mu\text{g/mL}$ 5-fluorocytosine (5-FC) plus 25 $\mu\text{g/mL}$ Kan and continuously cultured for up to two weeks. **Results** The transgenic shoots have totally died while untransformed shoots still kept normal growth, indicating that *A. annua* cells introduced into the *CodA* gene had conferred an expected negative selection phenotype. When detected by RT-PCR, the transgenic shoots displayed a *CodA*-positive amplified band, but untransformed shoots gave no such *CodA*-specific amplified pattern. This result suggested that *CodA* gene had transcribed into corresponding mRNA in *A. annua* cells with furtherly verifying the result of phenotypic assay. **Conclusion** The *CodA* gene can be utilized as an effective negative selectable marker in *A. annua* for gene targeting.

Key words: *Artemisia annua* L.; gene targeting; negative selection

正负双向选择标记的应用已成为植物基因打靶 选择标记多达 10 余种, 主要是抗生素抗性基因, 如中富集同源重组体的新策略^[1]。迄今报道的植物正 赋予卡那霉素(Kan)抗性的新霉素磷酸转移酶

收稿日期: 2004-06-27

基金项目: 国家自然科学基金新技术探索项目(30271591)、国家中医药管理局基础研究项目(02-03ZP43)、广东省自然科学基金重点项目(020799)、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, 助理研究员, 主要从事中药生物工程研究。

Tel: (020)36585422 Fax: (020)86373516 E-mail: fenglilingl@21cn.com

(NPT II)基因和赋予潮霉素抗性的潮霉素磷酸转移酶(HPT)基因等,但负选择标记仅有大肠杆菌胞嘧啶脱氨酶基因(cytosine deaminase A, *CodA*)^[2]和双翅目昆虫毒蛋白基因(diphtheria toxin A, DT-A)^[3]等。细菌 *CodA* 基因编码的胞嘧啶脱氨酶可催化无毒的5-氟胞嘧啶(5-FC)转变成有毒的5-氟尿嘧啶(5-FU)。在动植物细胞中表达细菌 *CodA* 基因可使其在添加5-FC的培养基上迅速死亡,从而赋予“自杀”(负选择)表型。

自1993年Perera等^[4]首次将*CodA*基因用作植物负选择标记以来,至今已成功地应用于拟南芥^[5,6]、烟草^[7,8]、大麦^[9]和日本黄连^[10]。最近据Tarada等^[11]报道,水稻愈伤组织对5-FU表现较强的耐受性,因此*CodA*基因不宜作为转基因水稻中可靠的负选择标记。为了验证*CodA*基因是否适宜作为青蒿的负选择标记,本实验从大肠杆菌中扩增了*CodA*基因,并将其与花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子融合后插入T-DNA末端内侧,然后通过根癌农杆菌双元载体介导的共培养转化系统导入青蒿细胞。经过选择培养,已成功地获得Kan抗性和5-FU敏感的转基因青蒿芽,并在分子水平上进行了验证,为进一步在青蒿中实施基因打靶奠定了基础。

1 材料

1.1 植物种子:青蒿种子采自四川酉阳地区大田栽培青蒿,由广州华立健药业有限公司提供。

1.2 菌种及质粒:大肠杆菌JM109菌种由本室保存;pTarget载体购自Promega公司;根癌农杆菌LBA4404(pAL4404)菌株及Ti质粒载体pROK II由中国科学院微生物研究所提供。

1.3 抗生素和植物激素:头孢霉素(Cef)、卡那霉素(Kan)、5-氟胞嘧啶(5-FC)为Sigma公司产品,利福平(Rif)为广东台山新宁制药厂产品,6-苄氨基嘌呤(BA)为新华活性材料研究所产品, α -萘乙酸(NAA)为上海曹杨第二中学化工厂产品。

1.4 扩增引物:按文献^[12]设计大肠杆菌*CodA*基因扩增引物,并委托大连Takara公司合成。末端无酶切位点的上游引物*CodA*1的序列为:5'-AT-GTCGAATAACGCTTTA-3';下游引物*CodA*2的序列为:5'-TCAACGTTTGTAAATCGAT-3'。末端有BamHI酶切位点的上游引物*CodA*-B的序列为:5'-GGATCCATGTGTCGAATAACGCTTTA;末端有KpnI酶切位点的下游引物*CodA*-K的序列为:5'-GGTACCTCAACGTTTGTAAATCGAT。

1.5 试剂盒:质粒提取试剂盒、植物DNA提取试剂盒、植物RNA提取试剂盒购自Omega公司;质粒DNA纯化试剂盒、DNA片段回收试剂盒购自Life Technologies公司;PCR扩增试剂盒、RT-PCR扩增试剂盒购自Takara公司。

2 方法

2.1 *CodA*基因扩增、pT-*CodA*构建和*CodA*基因测序:以大肠杆菌JM109菌液制备的DNA为模板,利用*CodA*1和*CodA*2扩增引物进行PCR扩增,扩增条件为:94℃、1 min,55℃、1 min,72℃、3 min,共30个循环。将凝胶回收的PCR产物与pTarget载体连接,转化JM109感受态细胞,涂板,蓝白斑筛选重组质粒pT-*CodA*,用T7启动子引物测序。

2.2 pROK II-*CodA*构建及酶切鉴定:以pT-*CodA*重组质粒为模板,利用*CodA*-B和*CodA*-K扩增引物进行PCR扩增,扩增条件为:94℃、1 min,55℃、1 min,72℃、3 min,共30个循环。将BamHI和KpnI酶切PCR产物后所得片段插入相同酶切的pROK II载体中,获得中间表达载体pROK II-*CodA*。以pROK II-*CodA*转化JM109感受态细胞,挑取单菌落,用BamHI和KpnI进行双酶切鉴定。

2.3 pROK II-*CodA*导入根癌农杆菌及青蒿培养细胞^[13]:用pROK II-*CodA*直接转化根癌农杆菌LBA4404(pAL4404)感受态细胞,以50 μ g/mL Rif和25 μ g/mL Kan选择转化。选取8~10 d叶龄的青蒿无菌幼苗,将叶片剪成5 mm长小块,转入N6培养基(0.5 μ g/mL NAA)中,于25℃光照下预培养2 d。将预培养材料用稀释的农杆菌菌液浸泡1 min,吸去多余菌液后放回N6培养基(0.5 μ g/mL NAA)中,28℃黑暗中培养2 d,再转到N6培养基(0.3 μ g/mL NAA)中,25℃光照下培养2 d,最后转入含25 μ g/mL Kan和500 μ g/mL Cef的MS培养基(1 μ g/mL BA+0.2 μ g/mL NAA)中继续培养。

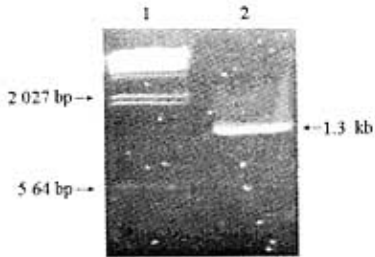
2.4 转基因青蒿的筛选培养:在含1 μ g/mL BA+0.2 μ g/mL NAA及25 μ g/mL Kan+500 μ g/mL Cef的正选择培养基上筛选Kan抗性转基因青蒿芽,转入含1 μ g/mL BA+0.2 μ g/mL NAA及500 μ g/mL 5-FC、25 μ g/mL Kan和500 μ g/mL Cef的正负双向选择培养基上继续培养,同时用未转化的正常青蒿芽作为对照。

2.5 转基因青蒿RNA提取与RT-PCR扩增:将转基因青蒿芽和未转化的正常青蒿芽放入液氮冻干后,按RNA纯化试剂盒说明书提取总RNA。将

RNA 用 DNA 酶消化,经抽提和沉淀后进行 RT-PCR 扩增,扩增条件为:50 ℃、30 min→85 ℃、1 min,45 ℃、1 min,72 ℃、1 min,共 30 个循环。

3 结果与讨论

3.1 目的基因的扩增、克隆和测序:大肠杆菌 JM109 菌株 DNA 经 *CodA* 基因特异 PCR 扩增和凝胶电泳,可检测到长度约为 1.3 kb 的特异扩增区带(图 1)。该扩增带的大小与大肠杆菌 *CodA* 基因的实际长度(1 284 bp)相符^[12],表明其为 *CodA* 基因的阳性扩增产物。



1-λ DNA/*Hind* III 相对分子质量标准 2-PCR 产物
1-λ DNA/*Hind* III markers 2-PCR amplicon

图 1 大肠杆菌 *CodA* 基因 PCR 扩增产物

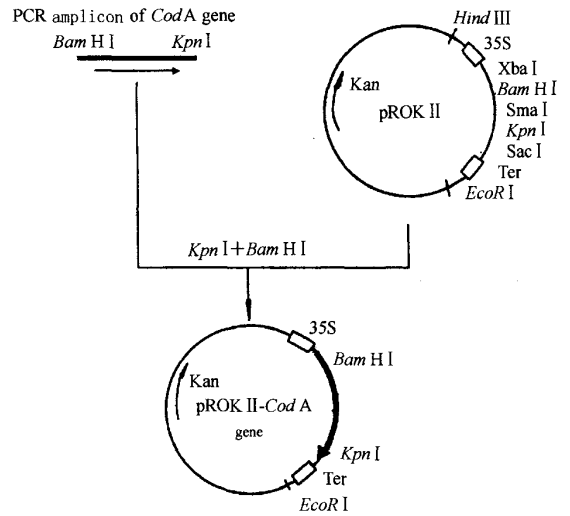
Fig. 1 PCR amplicon of *CodA* gene from *E. coli*

将扩增产物克隆后进行序列分析,结果与已发表的大肠杆菌 *CodA* 基因序列(GenBank 登记号 S56903)相同,进一步证实该扩增序列为 *CodA* 基因。本研究测得的 *CodA* 基因序列已被 GenBank 收录(GenBank 登记号 AY552602)。

3.2 中间表达载体的构建与鉴定:将携带 *Bam*H I 和 *Kpn* I 酶切位点的 *CodA* 基因 PCR 扩增产物与 pROK II 同时用 *Kpn* I 和 *Bam*H I 消化,然后经 T4 DNA 连接酶连接而获得重组质粒 pROK II-*CodA* (图 2)。

将 pROK II-*CodA* 与 pROK II 用 *Bam*H I 和 *Kpn* I 进行双酶切,结果 pROK II-*CodA* 可产生大小 2 个片段,其中小片段的长度为 1.3 kb,pROK II 只产生 1 个片段(图 3)。这一结果显示,*CodA* 基因已被成功克隆到中间表达载体中。

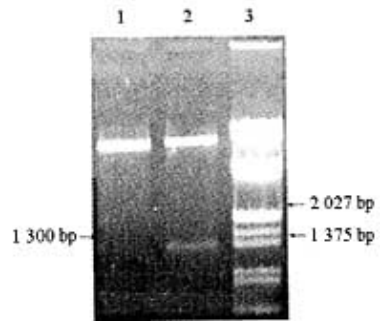
3.3 青蒿的转化与选择培养:经共培养转化的青蒿叶盘在加有 Kan 的正选择培养基上生长 4~6 d 后,叶盘周边长出颗粒状愈伤组织,并不断膨大,14~21 d 开始出现绿芽分化,继续培养并淘汰白化芽及畸形芽后,可获得生长及形态正常的 Kan 抗性转基因青蒿芽(图 4a),转化率为 15%。将转基因青蒿芽与未转化青蒿芽转植在含有 500 μg/mL 5-FC 的负选择培养基上培养 1 周后,未转化青蒿芽生长正常,无



35S-花椰菜花叶病毒启动子 Ter-胭脂碱合成酶基因终止子
35S-CaMV promoter Ter-NOS poly A signal site

图 2 中间表达载体的构建

Fig. 2 Construction of intermediate vector



1-pROK II (*Bam*H I + *Kpn* I) 双酶切产物
2-pROK II-*CodA* (*Bam*H I + *Kpn* I) 双酶切产物
3-λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III 相对分子质量标准
1-pROK II (*Bam*H I + *Kpn* I)
2-pROK II-*CodA* (*Bam*H I + *Kpn* I)
3-λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III markers

图 3 pROK II-*CodA* 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pROK II-*CodA* by enzyme cleavage

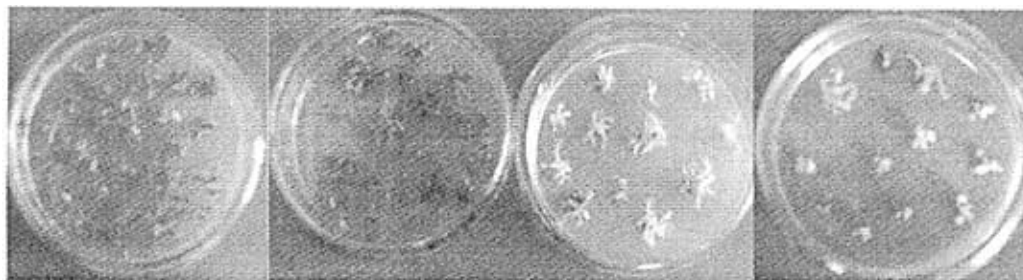
白化现象(图 4b),而转基因青蒿芽则出现发白和变枯等现象(图 4c),2 周后全部死亡(图 4d)。

以上结果表明,外源 *NPT* II 基因和 *CodA* 基因都已在转基因青蒿芽中表达,使其对 Kan 具有抗性,而对 5-FC 表现敏感;相反,未转化青蒿芽中因无 *CodA* 基因而不受 5-FC 的影响。Perera 等^[4]发现,由于重复基因诱导的基因沉默,某些含有多拷贝 *CodA* 基因的转基因拟南芥仅有低水平的 *CodA* 基因表达,故对 5-FC 不甚敏感。本研究尚未对 *CodA* 基因整合的拷贝数进行分析。

3.4 转基因青蒿芽的 RT-PCR 检测:以 DNA 酶消化的转基因绿芽 RNA 为材料进行 RT-PCR 扩增,同时设置对照,检测 *CodA* 基因是否已在青蒿细胞中表达,结果如图 5 所示。

无 DNA 的转基因青蒿芽总 RNA 经 RT-PCR 扩增后,可见约 1.3 kb 的扩增产物(3 泳道),这与 *CodA* 基因的大小一致(2 泳道)。无 DNA 的转基因

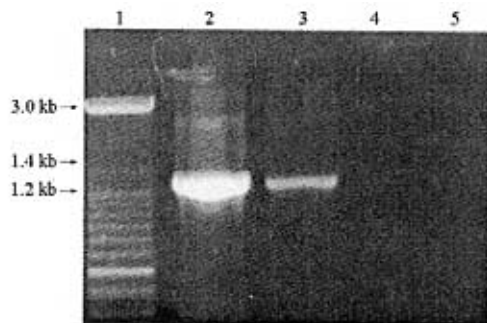
青蒿芽总 RNA 经 PCR 扩增后,未检测到相应的扩增产物(4 泳道),表明青蒿基因组中的 *CodA* 基因已被 DNA 酶消化。未转化青蒿芽总 RNA 中因无可扩增 *CodA* 基因模板而无扩增产物(5 泳道)。这一结果表明,*CodA* 基因在青蒿细胞中已转录生成相应的 mRNA,而对照细胞无扩增信号,表明其中无 *CodA* 对应的基因拷贝及转录产物。



a-未加 5-FC 的转基因青蒿芽 b-加 5-FC 的未转化青蒿芽 c-加 5-FC 的转基因青蒿芽(1 周) d-加 5-FC 的转基因青蒿芽(2 周)
a-transgenic shoots of *A. annua* not by 5-FC b-untransgenic shoots of *A. annua* by 5-FC c-transgenic shoots of *A. annua* by 5-FC (one week) d-transgenic shoots of *A. annua* by 5-FC (two weeks)

图 4 转基因青蒿芽的筛选

Fig. 4 Screening of transgenic shoots of *A. annua*



1-100 bp 梯度分子量标准 2-pROK II -*CodA* 质粒的 PCR 产物
3-转基因芽总 RNA 经 DNA 酶消化并去蛋白后的 RT-PCR 产物
4-转基因芽总 RNA 经 DNA 酶消化并去蛋白后的 PCR 产物
5-未转基因芽总 RNA 经 DNA 酶消化并去蛋白后的 RT-PCR 产物
1-100 bp ladder 2-PCR amplicon of pROK II -*CodA* 3-RT-PCR amplicon of total RNA from transgenic shoots digested by DNase with protein extraction 4-PCR amplicon of total RNA from transgenic shoots digested by DNase with protein extraction 5-RT-PCR amplicon of total RNA from untransgenic shoots digested by DNase with protein extraction

图 5 转基因青蒿芽的 RT-PCR 鉴定

Fig. 5 Identification of transgenic shoots of *A. annua* by RT-PCR

在植物中无论通过何种方式引入外源 DNA,其整合方式均以“非同源末端连接”(non-homologous end joining, NHEJ)即随机整合为主,而同源重组(homologous recombination, HR)即定点整合则异

常罕见^[14]。因此,通常植物基因打靶的效率非常低,一般在 $10^{-3} \sim 10^{-5}$ ^[15],而且成功的报道很少,目前仅见 3 例^[11,16,17]。为了富集植物基因打靶中的同源重组体,常用的策略是利用正负双向选择标记区分同源重组与非同源重组,其中正选择标记位于同源序列以内,用于筛选全部整合体,包括定点整合与随机整合;负选择标记位于同源序列以外,用于淘汰随机整合体。以大肠杆菌 *CodA* 基因作为负选择标记的筛选技术已在少数几种植物中建立^[3~10],本研究首次应用 *CodA* 基因作为负选择标记进行转基因青蒿芽的快速筛选,将为下一步实施青蒿基因工程改造打下良好的基础。

References:

- [1] Hanin M, Paszkowski J. Plant genome modification by homologous recombination [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 157-162.
- [2] Kobayashi T, Hisajima S, Stougaard J, et al. A conditional negative selection for *Arabidopsis* expressing a bacterial cytosine deaminase gene [J]. *Jpn J Genet*, 1995, 70: 409-422.
- [3] Terada R, Urawa H, Inagaki Y, et al. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1030-1034.
- [4] Perera R J, Linard C G, Signer E R. Cytosine deaminase as a negative marker for *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 23: 793-799.
- [5] Gallego M E, Sirand-Pugnet P, White C I. Positive-negative selection and T-DNA stability in *Arabidopsis* transformation [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 39: 83-93.
- [6] Wang X H, Viret J F, Eldridge A, et al. Positive-negative selection for homologous recombination in *Arabidopsis* [J].

- Gene, 2001, 272: 249-255.
- [7] Risseuw E, Franke-van Dijk M E, Hooykass P J. Gene targeting and instability of *Agrobacterium* T-DNA loci in the plant genome [J]. *Plant J*, 1997, 11: 717-728.
- [8] Serino G, Maliga P. A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastid [J]. *Plant J* 1997, 12: 697-701.
- [9] Thykjaer T, Finnemann J, Schauser L, et al. Gene targeting approaches using positive-negative selection and large flanking region [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 35: 523-530.
- [10] Koprek T, McElroy D, Louwerse J, et al. Negative selection system for transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.): comparison of bacterial *CodA*-and cytochrome 450 gene-mediated selection [J]. *Plant J*, 1999, 19: 719-726.
- [11] Terada R, Asao H, Iida S. A large scale *Agrobacterium*-mediated transformation procedure with a strong positive-negative selection for gene targeting in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2004.
- [12] Austin E A, Huber B E. A first step in the development of gene therapy for colorectal carcinoma: cloning, sequencing and expression of *Escherichia coli* cytosine deaminase [J]. *Mol Pharmacol*, 1993, 43: 380-387.
- [13] Feng L L, Zeng Q P. Detection of human RANTES gene expression in transgenic *Artemisia annua* L. plants [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 10: 701-703.
- [14] Britt A B, May G D. Re-engineering plant gene targeting [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 90-95.
- [15] Vergunst A C, Hooykaas P J J. Recombination in the plant genome and its application in biotechnology [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1999, 18: 1-31.
- [16] Kempin S A, Lijegren S J, Block L M, et al. Targeted disruption in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1997, 389: 802-803.
- [17] Hanin M, Volrath S, Bogucki A, et al. Gene targeting in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2001, 28: 671-677.

荒漠肉苁蓉茎腐病的初步研究

程齐来¹, 陈君^{1*}, 于晶¹, 刘杏忠², 孙炳达², 程惠珍¹

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094; 2. 中国科学院微生物研究所
真菌地衣系统学重点实验室, 北京 100080)

摘要:目的 分离和鉴定肉苁蓉茎腐病病原菌, 研究其生物学特性, 并室内筛选对该病原菌有效的杀菌剂。方法 组织分离法和菌丝尖端纯化法得到主要病原菌, 通过测量不同营养条件下菌落生长直径研究其生物学特性, 平皿菌丝生长抑制法进行杀菌剂的生物测定。结果 接骨木镰刀菌 *Fusarium sambucinum* 是肉苁蓉茎腐病的主要病原菌, 为首次记录; 适合其生长的培养基为 PSA 培养基, 对碳和氮的吸收主要以蔗糖和蛋白胨为主, 适宜生长温度为 10~30℃, 适宜生长 pH 为 6~8; 多菌灵、菌线威、绿享二号在室内可以有效地抑制病原菌。结论 该病原菌的分离鉴定可以为该病害原的防治提供理论依据。

关键词: 肉苁蓉; 茎腐病; 接骨木镰刀菌; 杀菌剂

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)04-0582-05

Stem rot of *Cistanche deserticola*

CHENG Qi-lai¹, CHEN Jun¹, YU Jing¹, LIU Xing-zhong², SUN Bing-da², CHENG Hui-zhen¹

(1. Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. Key Laboratory of Systematic Mycology and Lichenology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Objective To isolate and identify pathogen of *Cistanche deserticola* stem rot, study its biological characteristics, and select the effective fungicides against the pathogenic bacteria. **Methods** The main pathogen can be gained by tissue isolation and mycelium cusp purification, the biological characteristics can be studied by measuring the growth diameter under different nutrient conditions and seeded the hyphae disk at the centre of agar plate containing chemicals to do fungicide bioassay. **Results** *Fusarium sambucinum* was the main pathogenic bacteria on *C. deserticola* stem rot which was first recorded; its suitable medium was PSA culture medium; among the carbon and nitrogen sources supplied, saccharose and peptone were most available; the temperature range of its growth was 10—30℃ and it grew best between 6—8 pH value. Duojunling (carbendazim), Junxianwei (1.5% methane dithiocyanate), Lüxiang No. 2 (80%