

## · 药材与资源 ·

## 青蒿鲨烯合酶基因打靶研究

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 通过代谢途径工程调整代谢流向, 试图增大转基因青蒿 *Artemisia annua* 植株中的青蒿素产量。方法 利用青蒿鲨烯合酶 (SS) 基因、绿色荧光蛋白 (GFP) 基因和胞嘧啶脱氨酶 (*CodA*) 基因构建基因打靶载体, 并通过冻融法将载体导入根瘤农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*。以叶盘法转化青蒿, 采用“分段选择法”筛选转基因再生植株。结果 对表达 GFP 基因后发出绿色荧光的转基因植株, 采用 PCR 及 PCR 产物杂交法, 在 1 株转基因植株中检测到外源 GFP 基因, 而未检测到内源 SS 基因。初步证据显示, 在转基因青蒿植株中, 突变型 SS 基因已取代野生型 SS 基因。结论 青蒿鲨烯合酶基因打靶已取得初步成功。

**关键词:** 青蒿; 鲨烯合酶; 基因打靶; 基因敲除

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)12-1857-05

Gene targeting of squalene synthase in *Artemisia annua*

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

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

**Abstract; Objective** To increase artemisinin yield in transgenic *Artemisia annua* plants by regulating metabolic affluxion through metabolic pathway engineering. **Methods** The gene targeting vector was constructed by squalene synthase (SS) gene of *A. annua*, green fluorescent protein (GFP) gene, and cytosine deaminase (*CodA*) gene, and the vector was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* by freeze-thawing procedure. *A. annua* was transformed through Leaf Disk method and regenerated transgenic plants were screened by the “Step-by-Step Selection”. **Results** Among the transgenic *A. annua* plants emitting green fluorescence after expression of GFP gene, the exogenous GFP gene rather than endogenous SS gene was detected in one transgenic plant by PCR as well as hybridization of PCR products. The preliminary data showed that the wild-type SS gene was replaced by mutated SS gene in the transgenic *A. annua* plant. **Conclusion** Gene targeting of squalene synthases of *A. annua* is successful.

**Key words:** *Artemisia annua* L.; squalene synthase (SS); gene targeting; gene knockout

青蒿素 (artemisinin) 是最有效的抗疟化学药物单体, 对氯喹等传统抗疟药表现抗性的疟原虫也有高效和速效杀灭效果<sup>[1]</sup>, 至今未见疟原虫产生抗性, 已成为全球抗疟药物的最大希望<sup>[2]</sup>。可是, 受品种、产地和气候条件等因素的限制, 现有青蒿素的产量远远不能满足市场需求, 而常规栽培育种方法在提高青蒿素产量中的作用又十分有限。因此, 采用基因工程手段培育高产青蒿素品种正在受到国内外学者的广泛关注<sup>[3,4]</sup>。

青蒿素是青蒿经类异戊二烯次生代谢途径形成的倍半萜衍生物, 天然合成量极低 (通常在 1% 以下)<sup>[5]</sup>。从类异戊二烯途径中碳源的流向来看, 甾类

作为主要代谢产物成为碳流的主导者, 而倍半萜类作为次生代谢产物只能分享部分碳流。因此, 为了将碳流从甾类途径“分流”至倍半萜类合成途径, 最佳办法是从生化角度抑制甾类合成酶的活性或采用基因敲除 (gene knockout) 手段阻断甾类合成酶基因的表达。本试验室尝试利用“基因打靶” (gene targeting) 技术, 通过对甾类合成关键酶——SS 基因的野生型与突变型的交换重组进行基因敲除, 最终获得稳定遗传的转基因高产青蒿素品系。

本实验采用携带 SS 基因、GFP 基因 (报告基因) 和 *CodA* 基因 (负选择标记基因) 构建的基因打靶载体的根瘤农杆菌对青蒿外植体进行共培养转

收稿日期: 2006-03-10

基金项目: 国家中医药管理局资助项目 (02-03ZP43); 广东省自然科学基金重点资助项目 (020799)

作者简介: 冯丽玲 (1975—), 女, 广州人, 学士, 助理研究员, 从事中药生物工程研究。

Tel: (020) 36585422 Fax: (020) 86373516 E-mail: fengliuling1@21cn.com

\* 通讯作者 曾庆平 E-mail: qpzeng@gzhtcm.edu.cn

化,并诱导形成愈伤组织及再生转基因植株。以荧光显微镜挑选发射绿色荧光的转基因植株叶片,通过 PCR 扩增及 PCR 扩增产物杂交,初步显示基因打靶已获得成功。

## 1 材料

1.1 青蒿叶片:采自四川酉阳种植青蒿所收种子发芽后离体生长的叶片。

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:卡那霉素 (Kan) 为 Sigma 公司产品,羧苄青霉素 (Carb) 为 Invitrogen 公司产品,利福平 (Rif) 为广东台山新宁制药厂产品。

1.4 扩增引物:分别设计带有末端酶切位点 *Hind* III (用下划线表示) 的 SS 基因扩增引物 SS-1-H: 5'-AAGCTTATGAGTAGTTTGAAGCAGTATTGAAACAC-3', SS-2-H: 5'-AAGCTTTTACAAAGTGAATTCTGCAGAGAGTAAGCA-3';不带末端酶切位点的 SS 基因扩增引物 SS-1: 5'-ATGAGTAGTTTGAAGCAGTATTGAAACA-C-3', SS-2: 5'-TTACAAAGTGAATTCTGCAGAGAGTAAGCA-3';分别带有末端酶切位点 *Xho* I 和 *Eco* RI 的 GFP 全基因扩增引物 GFP-1-X: 5'-GGCTCGAGACCGGTCGCCACC-3', GFP-2-E: 5'-GAATTCTAGAGTCGCGCCGC-3',不带末端酶切位点的 GFP 基因片段扩增引物 GFP-1: 5'-CAAGGGCGAGGAGCTGTTCA-3', GFP-2: 5'-GTGCTCAGGTAGTGTTGTC-3',均委托大连 Takara 公司合成。

1.5 试剂: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 扩增试剂盒购自 Takara 公司;dNTP、Bio-11-dUTP、DAB 浓缩显色液购自华美公司。

## 2 方法

### 2.1 载体构建

2.1.1 中间载体 pRSC 的构建:以青蒿 SS 基因<sup>[6]</sup>为模板,利用添加了酶切位点的 SS-1-H 和 SS-2-H 引物进行 PCR 扩增,扩增条件:94 ℃、30 s, 57 ℃、1 min, 72 ℃、5 min,共 30 个循环。将凝胶回收的 PCR 产物用 *Hind* III 酶切后,电泳回收酶切片段,插入用相同酶切并去磷酸化的 pRCodA 载体<sup>[7]</sup>中,

获得中间载体 pRSC。

2.1.2 中间载体 pGSN 的构建:将 pROK II 上的 CaMV 35S 启动子插入 pEGFP 的 *Pst* I 和 *Bam*HI 之间,再将 pROK II 上的 Nos 终止子插入 pEGFP 的 *Not* I 和 *Eco*RI 之间,获得中间载体 pGSN。

2.1.3 基因打靶载体 pRSCG 的构建:用 *Xho* I 酶切中间载体 pGSN,电泳回收 35S-GFP-Nos 片段,插入用相同酶切并去磷酸化的中间载体 pRSC 中,获得 pRSCG 基因打靶载体。

2.2 根癌农杆菌转化:用冻融法<sup>[8]</sup>将基因打靶载体 pRSCG 导入根癌农杆菌 LBA4404 (pAL4404) 中。

2.3 青蒿的转化和再生:选取 12~15 d 叶龄的青蒿叶片,剪成大小为 0.5 mm×0.5 mm 的叶块,置于附加 5 mg/L 6-BA 和 0.5 mg/L NAA 的 MS 培养基上,于 25 ℃ 暗培养 2 d。挑取 YEB 平板 (Kan 25 mg/L+Rif 50 mg/L) 上含 pRSCG 的根癌农杆菌单菌落,接种于 4 mL YEB (Kan 25 mg/L+Rif 50 mg/L) 培养液中,于 28 ℃、180 r/min 振荡培养过夜。取 400 μL 菌液转接入 20 mL 无抗生素的 YEB 培养液中培养,离心,弃上清,加入 20 mL MS 培养液悬浮菌体,转入无菌容器中。将预培养材料取出,倒入稀释菌液,轻轻摇晃 1 min,立即取出外植体置无菌滤纸上吸去多余菌液。将外植体转入附加 200 μmol/L 乙酰丁香酮 (AS) 的 MS 培养基中,于 25 ℃ 黑暗下共培养 2 d,转入附加 5 mg/L 6-BA、0.5 mg/L NAA 和 500 mg/L Carb 的 MS 培养基上进行脱菌培养。每隔 7 d 更换 1 次新鲜杀菌培养基,4~5 周后将 Carb 降至 125 mg/L。待丛生芽长出后,将 6-BA 和 NAA 分别改为 1 mg/L 和 0.2 mg/L,最后将新芽移置三角瓶中 (1/2 MS+NAA 0.5 mg/L+Carb 125 mg/L) 生根。

2.4 荧光观察与照相:将转基因再生芽放在载玻片上,用盖玻片压片,同时将未转基因再生芽作为对照,在 Leica MPS 60 荧光显微镜下,观察转基因再生芽的荧光发射现象,并采用 Leica DM RA2 自动成像系统拍照。

### 2.5 PCR

2.5.1 DNA 提取:将转化的青蒿叶片放入液氮中充分研磨,按试剂盒所述方法提取总 DNA。

2.5.2 GFP 基因扩增:反应体积为 50 μL,其中 10×buffer 3 μL,dNTP (2 mmol/L) 3 μL,GFP-1 引物 (35 pmol/L) 1 μL,GFP-2 引物 (34 pmol/L) 1 μL,模板 DNA (200 ng/μL) 3 μL,*Taq* DNA 聚合酶 (3 U/μL) 1 μL,加无菌水定容至 50 μL。样品

经 95 °C 变性 3 min 后,按下列程序进行扩增:94 °C 变性 30 s,57 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 2 min,30 个循环后,72 °C 延伸 10 min。

2.5.3 SS 基因扩增:SS-1 (30 pmol/L) 1 μL,SS-2 (30 pmol) 1 μL,其他成分及条件同上,延伸时间改为 5 min。

2.6 PCR 产物杂交:PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后,将凝胶放在 20×SSC 湿润的尼龙膜上,采用高盐转移法转膜后,将膜在紫外交联仪中照

射 10 min。以 bio-11-dUTP 扩增标记的 GFP DNA 序列为探针,杂交,洗膜,按显色试剂盒说明书进行显色。

3 结果

3.1 基因打靶载体的构建:将中间载体 pGSN 和 pRSC 合并,即由 pGSN 切出的 35S-GFP-Nos 片段组装到 pRSC 中,构建了含有 CaMV35S 启动子控制的 GFP 基因、*CodA* 基因及分离成两段的 SS 基因的植物基因打靶载体 pRSCG (图 1)。

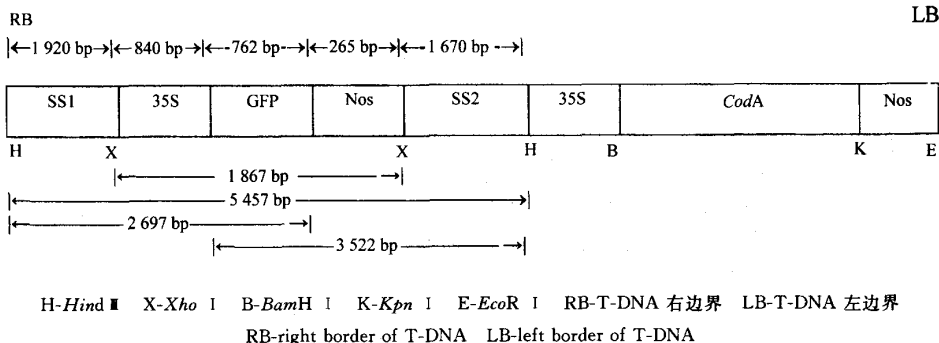


图 1 SS 基因打靶载体 pRSCG 的限制图谱

Fig. 1 Restriction map of SS gene targeting vector pRSCG

3.2 基因打靶载体的酶切鉴定:将 pRSCG 用 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切,分别获得 1 867 bp 的 35S-GFP-Nos 片段和 5 457 bp 的 SS1-35S-GFP-Nos-SS2 片段,其大小与图 1 所示预期值相符,表明打靶载体中基因排列顺序正确 (图 2)。

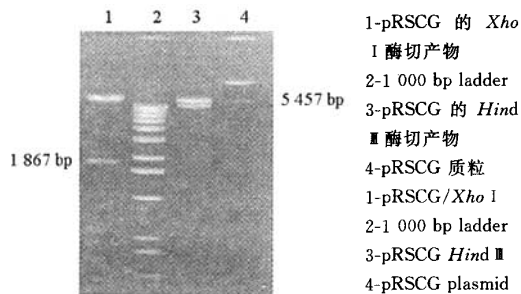


图 2 pRSCG 的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pRSCG by restriction enzyme digestion

3.3 基因打靶载体的扩增鉴定:用 GFP-1-X、SS-2 引物和 GFP-2-E、SS-1 引物扩增 pRSCG,分别获得 2 697 bp 的 GFP-Nos-SS2 片段和 3 522 bp 的 SS1-35S-GFP 片段,其大小与图 1 所示预期值相符,表明打靶载体中 SS 基因插入方向正确 (图 3)。

3.4 转化菌中基因打靶载体的检测:将 pRSCG 重组质粒通过冻融法导入农杆菌后,从农杆菌中提取

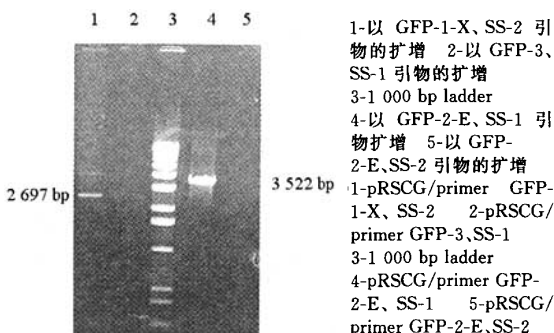


图 3 pRSCG 的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of pRSCG by PCR

质粒,以 GFP-1 和 GFP-2 为引物进行 PCR 检测,结果显示农杆菌 LBA4404 和大肠杆菌 DH5α 中均携带 pRSCG,并能扩增出 600 bp 的 GFP 基因片段 (图 4),说明重组的 pRSCG 质粒已成功导入农杆菌 LBA4404 中。

3.5 转化细胞培养与植株再生:在未加抗生素的培养基上,对转化的青蒿外植体进行愈伤组织培养和植株再生。在长芽培养基上,转化的外植体培养 2 周时长出愈伤组织,其上再生出幼芽;3 周时幼芽长成茂盛的小叶丛;4 周时小叶扩展成大叶。5 周后转接到长根培养基上出现根系,继续生长至 6 周后获得完整植株。结果如图 5 所示。

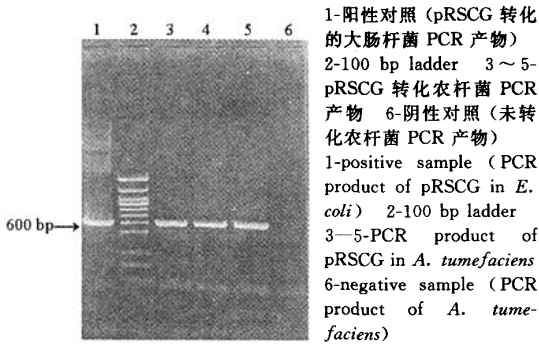
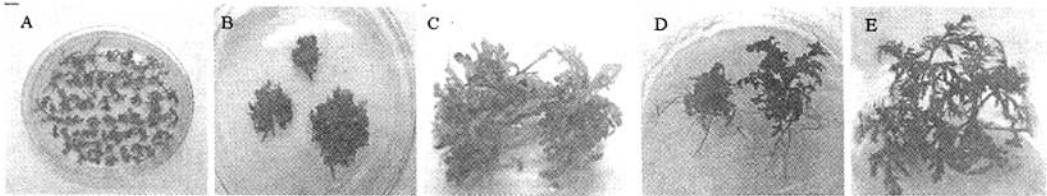


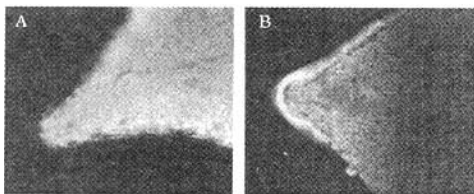
图 4 大肠杆菌及农杆菌中 GFP 基因的 PCR 鉴定  
Fig. 4 PCR Identification of GFP gene in *E. coli* and *A. tumefaciens*



A-愈伤组织及再生幼芽 (2 周) B-再生小叶 (3 周) C-再生大叶 (4 周) D-生根幼苗 (5 周) E-完整植株 (6 周)  
A-callus and regenerated buds (2 weeks) B-regenerated young leaves (3 weeks) C-regenerated leaves (4 weeks)  
D-regenerated shoots (5 weeks) E-whole plants (6 weeks)

图 5 转基因青蒿植株再生

Fig. 5 Regeneration of transgenic *A. annua* plants



A-未转化再生叶片 B-转基因再生叶片  
A-a non-transformedly regenerated leaf bud of *A. annua*  
B-a transgenic regenerated leaf bud of *A. annua*

图 6 转基因青蒿的荧光检测

Fig. 6 Fluorescence assay of transgenic *A. annua*

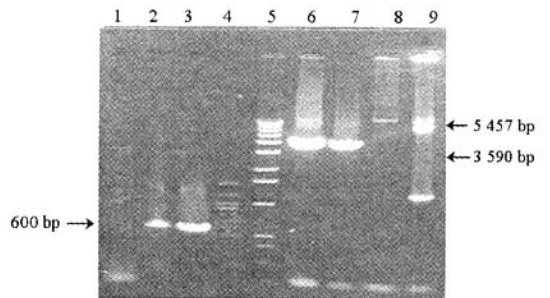
3.8 PCR 扩增产物杂交:为进一步印证 PCR 检测结果,用 GFP 基因和 SS 基因特异探针对 PCR 产物进行杂交,结果仅预期大小的扩增片段有杂交带(图 7)。

4 讨论

基因打靶技术的核心是基因敲除,即突变型基因通过同源序列重组替换野生型基因。按基因敲除的机制不同,可分为定点诱变与随机诱变,前者可用于生物性状改良(代谢途径工程),后者可用于基因功能发现(功能基因组学)。自 1997 年 Kempin 首次报道植物基因打靶成功以来<sup>[9]</sup>,迄今仅在拟南芥<sup>[10]</sup>

3.6 转化细胞的荧光镜检:将转基因再生叶片置于荧光显微镜下观察,可见叶身发出较强的绿色荧光,而未转化再生叶片则无绿色荧光(图 6),表明 GFP 基因已在转基因细胞中表达而发出绿色荧光。

3.7 PCR 扩增:采用相应的扩增引物对转基因植株进行 PCR 扩增,可分别得到预期的 600 bp 的 GFP 基因片段(图 6-2,3)及 5 457 bp 的 SS1-35S-GFP-Nos-SS2 基因片段(图 6-8),而未见青蒿植株原有的 SS 基因片段。相反,从对照植株中则可扩增出 3 590 bp 的 SS 基因片段(图 6-6,7)。这一结果初步表明,青蒿 SS 基因已由 SS1-35S-GFP-Nos-SS2 基因片段取代,即已获得“基因敲除”成功的初步证据。



1-未转化植株以 GFP-1-X、GFP-1-E 引物的扩增 2-转基因植株以 GFP-1-X、GFP-1-E 引物的扩增 3-pRSCG 质粒以 GFP-1-X、GFP-1-E 引物的扩增 4-100 bp ladder 5-1 kb ladder 6~7-未转化植株以 SS-1、SS-2 引物的扩增 8-转基因植株以 SS-1、SS-2 引物的扩增 9-pRSCG 质粒以 SS-1、SS-2 引物的扩增  
1-amplification of non-transformed *A. annua* plant by GFP-1-X, and GFP-1-E Primers 2-amplification of transgenic *A. annua* plant by GFP-1-X and GFP-1-E Primers 3-amplification of pRSCG plasmid by GFP-1-X and GFP-1-E Primers 4-100 bp ladder 5-1 kb ladder 6~7-amplification of non-transformed *A. annua* plant by SS-1 and SS-2 Primers 8-amplification of transgenic *A. annua* plant by SS-1 and SS-2 Primers 9-amplification of pRSCG plasmid by SS-1 and SS-2 Primers

图 6 转基因青蒿植株的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR Identification of transgenic *A. annua* plants



1-pRSCG 质粒以 GFP-1-X、GFP-1-E 引物的扩增 2-转基因植株以 GFP-1-X、GFP-1-E 引物的扩增 3-未转化植株以 GFP-1-X、GFP-1-E 引物的扩增 4-未转化植株以 SS-1、SS-2 引物的扩增 5-pRSCG 质粒以 SS-1、SS-2 引物的扩增 6-转基因植株以 SS-1、SS-2 引物的扩增

1-amplification of pRSCG plasmid by GFP-1-X and GFP-1-E Primers 2-amplification of transgenic *A. annua* plant by GFP-1-X and GFP-1-E Primers 3-amplification of non-transformed *A. annua* plant by GFP-1-X and GFP-1-E Primers 4-amplification of non-transformed *A. annua* plant by SS-1 and SS-2 Primers 5-amplification of pRSCG plasmid by SS-1 and SS-2 Primers 6-amplification of transgenic *A. annua* plant by SS-1 and SS-2 Primers

图7 PCR 扩增产物的杂交检测

Fig. 7 Hybridization of PCR amplicons

和水稻<sup>[11]</sup>中取得了实质性成果。植物基因打靶研究进展缓慢的主要原因是外源基因插入植物基因组的方式通常以随机整合为主,定点整合异常罕见<sup>[12]</sup>,因而导致植物中基因打靶效率极低( $10^{-3} \sim 10^{-5}$ )<sup>[13]</sup>。随着正-负标记筛选技术的建立,基因打靶效率已经得到普遍提高。然而,由于选择标记基因表达水平低、多拷贝标记基因沉默<sup>[14]</sup>或植物细胞耐受性<sup>[15]</sup>等原因,常常导致一些基因打靶已获成功的转化细胞死亡。在植物基因打靶效率很低的情况下,采用正-负双向选择难以得到成活的转化细胞,因而无从进行选择。为此,在青蒿基因打靶实验中尝试“分段选择法”,即第1步不加任何抗生素,以保证转化细胞成活,并以报告基因(GFP)取代正选择标记(如抗生素抗性标记)基因,以尽快淘汰非转化细胞;第2步经过 PCR 扩增并结合分子杂交区分突变基因与野生基因;第3步才利用负选择区分含有定点替换与随机插入的转化细胞,从而确认基因打靶成功。采用这种方法,笔者检查了大约 200 棵转基因植株,从中发现了1株可能带有打靶基因的转基因青

蒿植株,基因打靶效率已达到 0.02。由此可见,分段选择法有利于获得基因打靶植物,对于在其他植物中开展基因打靶研究也可能具有一定的启发意义。下一步工作是鉴定基因打靶的表型效果,即 SS 基因的缺失对青蒿素含量及植株生长发育的影响。

#### References:

- [1] Abdin M Z, Israr M, Rehman R U, et al. Artemisinin, a novel antimalarial drug: Biochemical and molecular approaches for enhanced production [J]. *Planta Med*, 2003, 69 (4): 289-300.
- [2] van der Meersch H. Review of the use of artemisinin and its derivatives in the treatment of malaria [J]. *J Pharm Belg*, 2005, 60(1): 23-29.
- [3] 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.
- [4] Chen D H, Meng Y L, Ye H C, et al. Culture of transgenic *Artemisia annua* hairy root with cotton cadinene synthase gene [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1998, 40 (8): 711-714.
- [5] Picaud S, Brodelius M, Brodelius P E. Expression, purification and characterization of recombinant (*E*)-beta-farnesene synthase from *Artemisia annua* [J]. *Phytochemistry*, 2005, 66(9): 961-967.
- [6] Feng L L, Zeng Q P. Cloning and sequencing of squalene synthase gene and cDNA in *Artemisia annua* L. [J]. *J Guangzhou Tradit Chin Med* (广州中医药大学学报), 2004, 21(5): 387-390.
- [7] Feng L L, Yang R Y, Yang X Q, et al. Expression of *CodA* gene from *Escherichia coli* conferring a negative selection phenotype on transgenic *Artemisia annua* L. [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(4): 578-582.
- [8] Yu Y Z, Du J, Wang W, et al. Studies on the freeze-thaw method of transforming recombinant plasmid DNA into *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *J Jilin Agric Univ* (吉林农业大学学报), 2003, 25(3): 257-259.
- [9] Kempin S A, Lijegren S J, Block L M, et al. Targeted disruption in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1997, 389: 802-803.
- [10] Hanin M, Volrath S, Bogucki A, et al. Gene targeting in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2001, 28: 671-677.
- [11] Terada R, Urawa H, Inagaki Y, et al. Efficient gene targeting by homologous recombination in rice [J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20: 1030-1034.
- [12] Britt A B, May G D. Re-engineering plant gene targeting [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 90-95.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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, 22(9): 653-659.