

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)20-1855-04

人野生型 p53 肿瘤抑制基因在烟草中的遗传转化

康杰芳, 王喆之 (陕西师范大学药用植物资源与天然药物化学教育部重点实验室, 生命科学学院, 陕西 西安 710062)

Transformation of human wild-type p53 tumor suppressor gene in tobacco

KANG Jie-Fang, WANG Zhe-Zhi

Key Laboratory of Ministry of Education for Medicinal Plant Resource and Natural Pharmaceutical Chemistry, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China

【Abstract】 AIM: To construct the plant transformation vector containing human wild-type p53 tumor suppressor gene and establish human wild-type p53 transgenic tobacco plants. **METHODS:** The human wild-type p53 coding sequence was subcloned into vectors pUC19, pBI426 and pCAMBIA2301 to obtain plant expression vector pCAMBIA2301/p53. T-DNA regions of the pCAMBIA2301/p53 binary vector contained constitutive 2 × Cauliflower mosaic virus (2 × CaMV) 35S promoter, nopaline synthase terminator, and neomycin phosphotransferase II (*npt II*) gene, which allowed the selection of transformed plants against kanamycin. The tobacco (*Nicotiana tabacum L. Cultivar Xanthi*) plants were transformed by co-cultivating leaf discs method via *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 harboring the plant expression vector. The generated transgenic tobacco plants were selected by kanamycin, and identified by histochemical assay, PCR, Southern blot. **RESULTS:** Histochemical assay, PCR and Southern blot analyses demonstrated the stable integration of the human wild-type p53 gene into the tobacco genome. Transgenic tobacco plant with p53 gene was obtained successfully. **CONCLUSION:** Transgenic wild-type p53 tobacco plants have been established, which can serve as a base for further studies on detecting the biological activities of p53 gene and exploiting the new way of producing pharmaceutical proteins.

【Keywords】 human wild-type p53 gene; transgenic tobacco; *Agrobacterium tumefaciens*; gene transformation; anti-bacterial agents

【摘要】目的: 构建人野生型 p53 肿瘤抑制基因的植物表达载体, 并建立 p53 转基因烟草植株。方法: 将人野生型 p53 肿瘤抑制基因编码区克隆于 pUC19, pBI426 和 pCAMBIA2301

收稿日期 2007-04-05; 接受日期 2007-06-15

基金项目 陕西省科学技术研究发展计划项目(2005K16-G9)

通讯作者: 王喆之。Tel: (029) 85308317 Email: zzwang@snnu.edu.cn

作者简介: 康杰芳, 硕士, 讲师。Tel: (029) 85308352 Email: kangjiefang@snnu.edu.cn

载体, 构建含人野生型 p53 基因的植物表达载体 pCAMBIA2301/p53, p53 基因由 2 × CaMV 35S 启动子控制表达。利用叶盘共培养法经根瘤农杆菌 EHA105 介导转化烟草, 获得转基因烟草植株, 用组织化学法, PCR, Southern 杂交检测转基因烟草植株。结果: 经组织化学法, PCR, Southern 杂交检测表明人野生型 p53 基因已整合到转基因烟草植株的基因组中, 并获得了的转 p53 基因烟草植株。结论: 成功建立了含人野生型 p53 基因的转基因烟草植株, 为进一步检测 p53 基因的生物活性和开辟生产药用蛋白的新途径奠定了基础。

【关键词】 人野生型 p53 基因; 转基因烟草; 根瘤农杆菌; 基因转化; 抗菌药

【中图分类号】 Q943.2 **【文献标识码】** A

0 引言

人类癌症中最常见的基因改变是 p53 基因突变, 它是癌基因研究中重要的肿瘤抑制基因之一。野生型 p53 基因与细胞周期的生长调节、细胞转化的调节、DNA 复制以及诱导细胞程序性死亡有着密切关系^[1-2]。本研究利用转基因植物作为生物反应器的优点, 将人野生型 p53 肿瘤抑制基因构建于植物表达载体, 通过根瘤农杆菌介导的转化方法将其转入烟草, 获得表达人野生型 p53 基因的转基因植株, 为今后借助转基因烟草或其它转基因植物作为生物反应器生产人野生型 p53 蛋白奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒、菌株 人野生型 p53 肿瘤抑制基因由赵永同博士惠赠, 植物表达载体 pCAMBIA2301, 根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105, 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5α, pUC19 为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂 各种限制性酶、Tag 聚合酶、质粒快速提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒等购自 TaKaRa 公司和上海生工生物工程技术有限公司, 高效地高辛 DNA 标记检测试剂盒购自 Roche Molecular Biochemicals 公司, 头孢曲松钠购自上海先锋药业公司; 卡那霉素购自华美生物工程公司, 其他常规试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 培养基 LB 及 MS 培养基按参考文献方法

配制^[3]. 浸染培养基 MS0 + AS(400 μmol/L) + pluronic F68 (0.5 mg/L), AS 和 pluronic F68 在浸染前加入. 共培养基 MS + BA(1 mg/L) + NAA(0.1 mg/L) + AS(400 μmol/L) + pluronic F68 (0.5 mg/L). 选择培养基 MS + BA(1 mg/L) + NAA(0.1 mg/L) + Kanamycin (100 mg/L) + 头孢曲松钠. 头孢曲松钠浓度依次为 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L, 500 mg/L, 600 mg/L. GUS 显色液按参考文献方法配制^[4].

1.1.4 植物材料 烟草(*Nicotiana tabacum* L. *Cultivar Xianthi*)为本实验室保存的无茵苗.

1.2 方法

1.2.1 人野生型 p53 肿瘤抑制基因植物表达载体的构建 人野生型 p53 肿瘤抑制基因两端酶切位点为 *Bam*H I 和 *Not* I. 经 *Bam*H I 和 *Not* I 双酶切后连接于载体 pUC19 中, 得到重组载体 pUC19/p53; 分别将 pUC19/p53 和 pBI426 的质粒用 *Bam*H I 和 *Sst* I 双酶切, 经 T4 DNA ligase 连接, 得到中间载体 pBI426/pUC19/p53. 用 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切, 回收目的片段, 连接到 pCAMBIA2301 载体中, 得到植物表达载体 pCAMBIA2301/p53. 提取质粒, 酶切鉴定, 测序证实. 通过冻融法^[4]转化到根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 中.

1.2.2 根瘤农杆菌的培养 挑取含 pCAMBIA2301/p53 质粒的根瘤农杆菌单菌落, 接种于 10 mL 附加 200 mg/L 利福霉素和 100 mg/L 卡那霉素的液体 LB 培养基中 (pH 7.0), 28℃, 180 r/min 恒温振荡培养过夜. 当培养至菌液 A_{600} 约为 0.6 时收集菌液, 5000 r/min 离心 5 min, 沉淀重悬于 2 倍体积的浸染培养液中以供转化用.

1.2.3 烟草的遗传转化 参照 Horsch 等^[5]方法, 采用叶盘共培养法进行烟草的遗传转化. 从烟草无茵苗上选取幼嫩叶片, 切成 0.5 cm × 0.5 cm 小片, 在农杆菌浸染液中浸泡 5 min, 用无菌滤纸吸干多余菌液, 将叶片表面向下置于共培养基上, 在 28℃ 暗培养条件下共培养 3~4 d. 同时设空根瘤农杆菌 EHA105 浸染对照及未浸染对照.

将上述共培养叶片转移至选择培养基上, 在每日光照 16 h, 光照强度 4000lx, 28℃ 条件下进行培养, 诱导抗性愈伤组织的形成. 当愈伤组织长出新生芽至 1 cm 时, 切下小芽转入新的选择培养基诱导分化. 每 18 d 左右更换一次选择培养基, 待根系形成, 幼芽长至 8~10 cm 后炼苗, 移入温室种植.

1.2.4 转基因烟草的 GUS 活性检测 取转基因烟草叶片少许, 放入平皿中, 加入 GUS 显色液, 使叶片

完全淹没在溶液中, 37℃ 保温 2 h 后观察.

1.2.5 转基因烟草的 PCR 检测 参照 CTAB 方法, 分别提取转化植株和未转化植株叶片基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 根据 wt-p53 基因设计上下游引物, P1: 5'-CCAAGCAATGGATGATTTGATG-3', P2: 5'-GAGTTTTTATGGCGGGAGGTA-3' (引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成), 扩增条件为: 95℃ 变性 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min. PCR 反应产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.6 转基因烟草的 Southern blot 检测 提取 PCR 检测阳性植株的叶片基因组 DNA, 用 *Hind* III 酶切, 地高辛随机引物标记探针并进行 Southern 杂交检测, 方法按照 Roche 试剂盒说明进行.

2 结果

2.1 pCAMBIA2301/p53 植物表达载体的构建 含有 2 × CaMV35S 启动子、增强子、终止子、报告基因 *gus*, 卡那霉素抗性基因 *npt* II, 左右两侧 25 bp 边界序列 (图 1) 通过冻融法转化到农杆菌 EHA105 中.

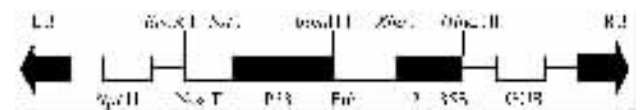


图 1 植物表达载体 pCAMBIA2301/p53T-DNA 结构模式图

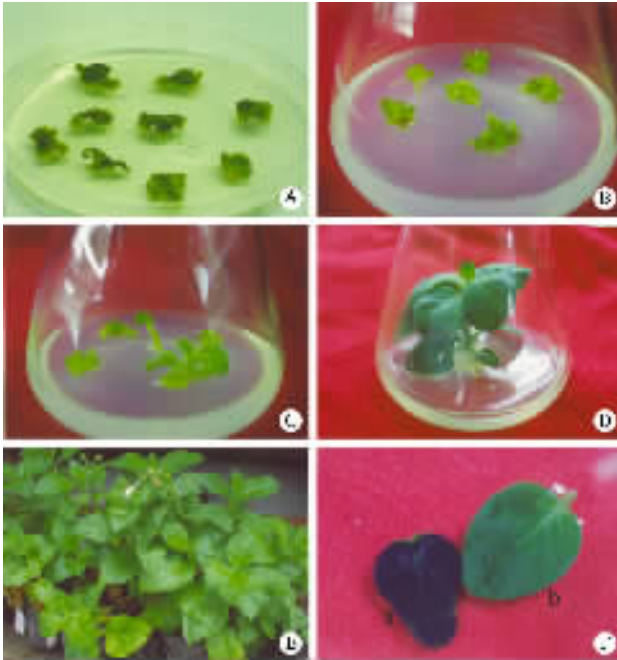
2.2 烟草叶片的转化及转化植株再生体系的建立

2.2.1 转基因烟草植株的再生 浸染过含人野生型 p53 基因的农杆菌菌液的烟草叶片在附加 200 mg/L 头孢曲松钠、100 mg/L 卡那霉素的选择培养基上培养 14 d 左右, 叶片边缘处膨大, 长出抗性愈伤组织, 将其切下转入新的选择培养基中, 抗性芽继续生长, 一部分黄化死亡, 另一部分生长为正常的绿色芽, 当不定芽长至 3~5 cm 时转入新的选择培养基, 部分小苗可长大并产生不定根, 发育为完整的再生植株 (图 2), 即 Km 抗性表型的再生植株.

2.2.2 抗生素头孢曲松钠在转基因烟草中的作用 当头孢曲松钠的浓度为 200 mg/L 时, 抑菌率、愈伤组织诱导率和不定芽平均增殖率都达到最高, 之后随着浓度的增加愈伤组织诱导率和不定芽平均增殖率有所下降.

2.3 转基因烟草植株的检测 ① 具有 GUS 酶活性 (图 2F), GUS 基因已经整合进入烟草基因组, 并且能够稳定表达, 与 GUS 基因相连的目的基因人野生型 p53 基因也转化到烟草基因组中; ② 盆栽的 12 株抗

性再生植株经 PCR 扩增反应均能扩增出 1039 bp 的预期 DNA 片段 (图 4); ③ 对 PCR 检测阳性的转化植株随机选取 8 株, 提取总基因组 DNA 显示 Southern Blot 阳性率为 87.5% (获得 7 株转基因植株), 表明外源人野生型 p53 基因已经整合到烟草基因组中 (图 5)。



A: 烟草的抗性愈伤组织; B, C: 分化的抗性芽; D: 转基因烟草的再生植株; E: 移栽后开花的转基因烟草; F: 转基因烟草的 GUS 检测 (a 为已转化烟草, b 为未转化烟草)。

图 2 转基因烟草植株的再生和 GUS 检测

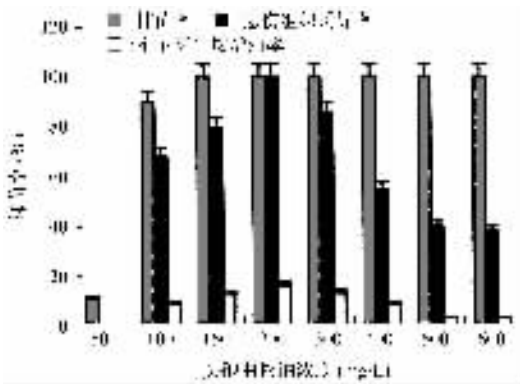
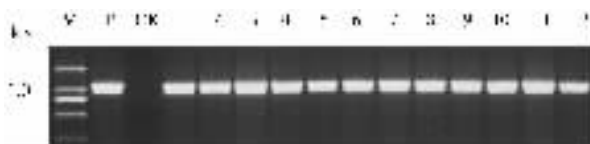
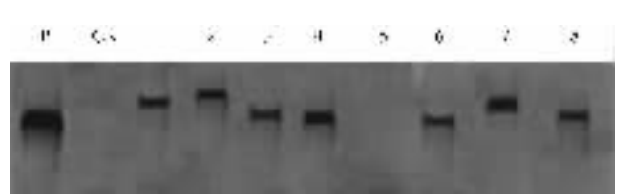


图 3 头孢曲松钠对农杆菌的抑制效果和对转基因烟草愈伤组织及不定芽形成的影响



M: DNA marker; P: 阳性对照 (pCAMBIA2301/p53 质粒 DNA); CK: 阴性对照 (非转化烟草总 DNA); 1~12: 转基因烟草植株。

图 4 转基因烟草的 PCR 检测



P: 阳性对照 (pCAMBIA2301/p53 质粒 DNA); CK: 阴性对照 (非转化烟草总 DNA); 1~8: 转基因烟草植株 (5 为未转化成功的烟草植株)。

图 5 部分转基因烟草总 DNA Southern Blot 检测

3 讨论

人类 p53 基因的缺失或失活与 50% 以上肿瘤的发生、发展相关, 基因突变是 p53 基因正常功能丧失的最主要方式, 大量体外培养细胞和动物模型都证实了外源的 wt-p53 导入后, 肿瘤细胞增殖减慢, 细胞发生凋亡, 瘤体体积缩小, 对放、化疗药物的敏感性增高^[6-7]。因此获得大量、廉价、安全且具有正常功能的 wt-p53 基因便成为 p53 抑癌基因治疗的首要任务。利用转基因植物作为生物反应器生产重组药用蛋白具有常规的微生物发酵、动物细胞和转基因动物等生产系统不可比拟的潜在优越性, 目前已有胰岛素、免疫球蛋白、干扰素、人表皮生长因子、尿激酶、葡萄糖脑苷脂酶、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、人生长激素脑啡肽等多种药用蛋白在转基因植物中表达并生产^[8]。本实验构建了人野生型 p53 肿瘤抑制基因的植物表达载体 pCAMBIA2301/p53, 该载体具有完整的植物表达调控元件, 如组成型启动子 2 × CaMV35S, 连接外源基因的多克隆酶切位点, 卡那霉素抗性基因 *npt II* 标记基因 *gus* 及左右边界序列, 可与农杆菌中的 Ti 辅助质粒构成植物双元表达载体, 适用于根瘤农杆菌介导的植物转化, 并获得了大量抗性植株。经组织化学法, PCR, Southern 杂交检测, 表明人野生型 p53 基因已整合到转基因烟草植株的基因组中, 获得了含人野生型 p53 基因的烟草转化植株, 为进一步检测 p53 基因的生物活性奠定了基础。

农杆菌介导的基因转化中常用的抑菌抗生素由于其种类较多, 抑菌效果也有差异。这些抗生素不仅对农杆菌有杀伤或抑制作用, 而且对植物细胞组织同样有一定的生物效应^[9]。本实验选用的抑菌抗生素头孢曲松钠为第三代头孢类抗生素, 是目前半衰期最长的头孢菌素之一, 属于 β-内酰胺类抗生素, 是分子结构中含有头孢烯结构的合成半合成抗生素, 它与青霉素类结构的不同在于母核 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 取代了 6-氨基青霉烷酸 (6-APA), 这种差异使头孢类抗生素可以耐青霉素酶, 其作用机理与青霉素类相似, 为繁殖期强效杀菌剂, 可与蛋白结合抑制转

肽酶交联反应,从而阻碍细胞壁粘肽的合成,使细菌的细胞壁缺损,菌体高渗膨胀裂解,进而诱导粘肽水解酶激活而溶菌。本实验中头孢曲松钠在适宜的浓度下,抑制农杆菌生长的同时能提高烟草愈伤组织诱导率和丛生芽诱导率,有类似激素的活性。

【参考文献】

- [1] 高丰,宋今丹. p53 家族新成员研究进展[J]. 国外医学遗传学分册, 2000, 23(2): 66-71.
- [2] Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, et al. Human surviving is negatively regulated by wild type p53 and participates in p53 dependent apoptotic pathway[J]. Oncogene, 2002, 21(17): 2613-2622.
- [3] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理和方法[M]. 北京:科学出版社, 2002: 350-355.
- [4] Jefferson RA. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion

system[J]. Plant Mol Biol Rep, 1987, 5(4): 387-405.

- [5] Horsh RB, Fry JL, Hoffman NC, et al. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. Science, 1985, 217: 1229-1231.
- [6] Fujiwara T, Grimm EA, Mukhopadhyay T, et al. A retroviral wild-type p53 expression vector penetrates human lung cancer spheroids and inhibits growth by inducing apoptosis[J]. Cancer Res, 1993, 53: 4129-4133.
- [7] Toschi E, Rota R, Antonini A, et al. Wild-Type p53 gene transfer inhibits invasion and reduces matrix metalloproteinase-2 levels in p53-mutated human melanoma cells[J]. J Invest Dermatol, 2000, 114: 1188-1194.
- [8] 程霞英,杨宗岐. 转基因植物生产药用蛋白研究进展[J]. 生物技术, 2005, 15(2): 86-88.
- [9] Okkel FT, Pederson MG. The toxicity to plant tissue and to Agrobacterium tumefaciens of some antibiotics[J]. Acta Hort, 1998, 225: 199-207.

编辑 黄良田

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)20-1858-01

经腹胸膜外修补右肝后叶破裂 3 例

张海森¹, 张绍舜², 张志华³ (¹ 万安县人民医院外科, 江西万安 343800, ² 长沙市第一医院普外科, 湖南长沙 410005, ³ 浙江上虞市中医院外科, 浙江上虞 312300)

【关键词】肝破裂 缝合术 失血性休克

【中图分类号】R605 【文献标识码】B

1 临床资料 本组共 3 例, 均为男性, 年龄 20~25(平均 22) 岁。例 1 为右下胸部枪弹伤, 出血半小时后入院。头昏, 出冷汗, 胸腹胀, 心慌, 面色苍白, 唇发绀, 睑结膜苍白, 肢冷。右第 7 肋间锁骨中线外 3 cm 处 0.7 cm × 0.7 cm 圆形创口和背部第 8 肋间棘突右侧 4.5 cm 处 1 cm × 2 cm 创口, 各流血少许, 无溢气, 心率 116 次/min, 心音弱快。腹肌紧张, 轻压痛, 移动性浊音存在。抗休克处理。行右肋缘下斜切口, 见腹腔积血约 3500 mL, 右肝叶多发性破裂, 仅置管引流, 30 h 引流量 1200 mL。脉转快, 血压下降, 于静脉麻醉并局麻下切断右第 7 肋软骨弓, 胸膜外分离 7~8 肋间肌, 似“活瓣”牵起暴露右肝叶, 见大量血块堆积, 积血约 3000 mL, 后叶上段膈面 3 条星形裂伤, 各 6 cm × 1 cm × 2 cm, 肝中叶右缘全裂 3 cm, 沿脏面纵形伤至后缘, 约 13 cm × 2 cm × 5 cm, 有活动性出血。以明胶海绵填塞压迫止血, 将游离网膜填入脏面裂伤内, 以铬制肠线分别间断缝扎, 将网膜填塞包盖后缘裂伤内。术后吸氧、抗炎、间断少量输血, 1 mo 后出院, 随访 10 a 健康。例 2 为 3 m 高处坠落, 右臀部着地, 持续性腹痛 2 h 入院。无昏迷及呕吐, 面容痛苦苍白, 唇绀, 四肢冷, 心率 110 次/min。腹膨隆, 肌紧张, 全腹压痛, 反跳痛, 右侧显著, 有移动性浊音, 右下腹穿抽出不凝固血液。B 超显示: 肝破裂、血腹。抗休克处理。于硬膜外麻醉下, 右腹直肌切口进腹, 手术未果, 随依例 1 方法扩大切口, 见

积血 1500 mL, 右肝后叶上段膈面及段间裂处呈“Y”形放射状多处裂伤, 约 10 cm × 2 cm × 5 cm。填塞覆盖明胶海绵并以铬制羊肠线间断缝扎, 再以游离网膜填压覆盖, 右肝周间隙置管引流, 输血 1200 mL, 术后恢复顺利, 22 d 后出院, 随访 5 a 健康。例 3 为右胸腹部摔撞伤, 昏迷约 10 min, 腹痛剧烈, 3 h 后入院。面容痛苦, 面色苍白, 上腹部横斜擦伤约 20 cm × 6 cm, 肌紧张, 右第 5~6 肋间压痛, 有移动性浊音, 肠鸣消失, 右下腹穿抽出不凝固血液。硬膜外麻醉下右腹直肌切口进腹, 手术未果, 随按例 1 方法进行。见腹腔积血约 2000 mL, 右肝叶缘 2 cm × 1.5 cm 裂伤, 右后叶上下段间横行 8 cm × 7 cm × 4 cm 破裂, 外侧碎裂, 星形活动性涌血, 肝门后腹膜血肿 5 cm × 5 cm × 2 cm, 右肝曲结肠壁血肿 2 cm × 2 cm, 置明胶海绵填塞压迫止血, 间断缝扎肝缘裂伤, 另游离 12 cm × 8 cm 网膜 2 块, 包裹明胶海绵数块制成如“鸡蛋卷”状填塞后叶裂伤内, 铬制羊肠线间断缝扎数针止血, 少量网膜填塞碎裂伤内。以 3 条各 120 cm 的铬合碘带按先后次序填压并作“标记”引出体外固定, 置管引流, 术后抗感染, 纠正低蛋白血症及重度贫血, 及时处理肝肾功能不全、右胸腔积液(外伤性) 和切口裂开等并发症, 55 d 治愈出院。随访 5 a 健康。

2 讨论 本文 3 例均为外伤所致, 且均为右肝后叶多发性破裂^[1]。因初诊医院不能做气管插管麻醉, 不能行胸腹联合切口, 故经腹胸膜外径路, 切断右肋软骨弓, 分离右侧第 7~8 肋间肌成为“活瓣式”掀起, 直视下处理右肝后叶多发性破裂。实践证明此法在基层医疗单位麻醉和技术条件受限时, 施行右肝后叶破裂修补是经济、安全和实用的。不同类型肝破裂的处理方法迥异, 但其原则是清创、修补、引流、抗休克的同时, 积极手术止血^[2]。对于大部分肝破裂, 缝合是有效的方法, 游离网膜是填塞或保护创面的最佳材料, 实践证明大网膜粘附和再生能力强, 可促进创伤愈合。

【参考文献】

- [1] 张绍舜. 肝外伤 32 例分析[J]. 湖南医学, 1993, 10: 35-36.
- [2] 吴孟超. 肝脏外科学[M]. 上海: 上海科技出版社, 1982: 350-360.

编辑 王雪萍

收稿日期 2007-07-18; 接受日期 2007-09-03

作者简介 张海森, 学士, 主治医师. Tel: (0796) 5708385 Email: war-myyzhs@tom.com