

茶树咖啡碱合成酶基因 cDNA 在烟草中的表达

余有本^{1,2}, 江昌俊², 宛晓春², 黎星辉³

(1 西北农林科技大学 茶叶研究所, 陕西 杨凌 712100; 2 安徽农业大学 农业部茶叶生物化学和生物技术重点开放实验室, 安徽 合肥 230036; 3 南京农业大学 茶叶科学研究所, 江苏 南京 210095)

[摘要] 为了在烟草中合成咖啡碱,将咖啡碱合成酶(Tea caffeine synthase, TCS)基因 cDNA 全序列克隆到双元载体 pBII21 中,通过农杆菌叶盘转化法将 TCS 基因成功转入烟草,结果得到 72 株转基因烟草植株。对其中 3 株转基因植株进行 PCR 检测和 PCR-Southern 检测,证实 TCS 基因已整合到基因组中;RT-PCR 和 Northern 分析显示, TCS 在这些植株中均能正常转录。用从转基因植株中提取的粗酶液进行体外酶促反应,能催化 7-甲基黄嘌呤和可可碱向咖啡碱的转变,由此表明,转基因烟草植株中能产生具有正常生物学活性的 TCS,但从 3 株转基因烟草中均未检测到咖啡碱。

[关键词] 咖啡碱;咖啡碱合成酶;转基因烟草

[中图分类号] S571.1:Q786

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)11-0181-06

Expression of tea caffeine synthase cDNA in tobacco

YU You-ben^{1,2}, JIANG Chang-jun², WAN Xiao-chun², LI Xing-hui³

(1 Tea Research Institute, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Key Laboratory of Tea Chemistry and Biotechnology of Ministry of Agriculture, Anhui Agricultural University, Hefei, Anhui 230036, China;

3 Tea Science Research Institute, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: In order to synthesize caffeine, the full length of the tea caffeine synthase (TCS) cDNA was cloned into the binary vector pBII21. TCS cDNA was introduced into tobacco by employing the leaf disk method of Agrobacterium mediated transformation, and 72 transgenic tobacco plants were obtained, among which, three tobacco plants were tested by PCR and PCR-Southern blot, and the result confirmed that the TCS cDNA had been integrated into tobacco genome. RT-PCR and Northern blot indicated that the TCS gene could be transcribed normally. The results of *in vitro* enzymatic reaction indicated that the crude enzyme extracted from transgenic tobacco leaves could catalyze the methylation of 7-methylxanthine and theobromine. Therefore, transformed TCS gene could be translated and formed normal secondary structure in tobacco plant and the expressed protein had normal TCS biological activities. However, caffeine was not detected in three transgenic genetic tobacco plants.

Key words: caffeine; caffeine synthase; transgenic tobacco

咖啡碱是茶叶中的主要嘌呤碱,其含量约占茶叶干重的 2% ~ 5%,明显高于其在咖啡豆中的含量^[1-2]。咖啡碱既有兴奋神经、解除疲劳、止渴生津、

散热镇痛之作用^[3-4],又是医药、食品和化工的重要原料。目前,市场上的咖啡碱多为化学合成品,虽然价格较低,但由于在合成过程中使用了毒性极强的

†收稿日期] 2006-09-30

[基金项目] 农业部“948”引进项目(2001-236);江苏省自然科学基金项目(BK2004101)

[作者简介] 余有本(1974-),男,安徽金寨人,讲师,博士,主要从事茶树生理及生物技术研究。

[通讯作者] 江昌俊(1957-),男,安徽安庆人,教授,博士生导师,主要从事茶树生物技术育种及分子生物学研究。

氰化物和硫酸二甲酯,其毒副作用及对环境的污染不容忽视。从茶叶或咖啡豆中提取天然咖啡碱,不仅产量很低,而且生产成本很高。咖啡碱合成酶(Tea caffeine synthase, TCS)是茶树中咖啡碱生物合成途径中的关键酶,能催化最后两步甲基化反应。Kato 等^[5-7]从茶叶中分离纯化了 TCS,对其性质进行了比较全面的研究,并克隆了 TCS cDNA 全序列。

本研究将茶树咖啡碱合成酶基因 cDNA 通过农杆菌叶盘转化法导入烟草植株中,以表达具有正常生物学活性的酶蛋白,并能在烟草中合成咖啡碱,以期为利用生物反应器生产天然咖啡碱提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草植株由中国科学技术大学烟草研究中心胡淑贞老师提供,各种限制性内切酶购自 Promega 公司及大连宝生物工程有限公司(TakaRa),各种抗生素及乙酰丁香酮均购自 SIGMA 公司,核酸凝胶纯化试剂盒 SK1131 购自上海生物工程公司,DNA Marker 购自 MBI 公司,探针标记试剂盒购自 Roch 公司。PCR 引物合成及 DNA 序列测定由上海生物工程公司完成。大肠杆菌菌株 JM109 为农业部茶叶生物化学和生物技术重点开放实验室保存,克隆载体 pGEM 7zf(+) 购自华美生物工程公司,根癌农杆菌 LBA4404(pAL4404)、双元载体 pBI121 和大肠杆菌 HB101(pRK2013),均由中国科学院植物生理研究所陈晓亚研究员惠赠。

1.2 方法

1.2.1 目的片段的克隆、酶切分析和 DNA 序列分析 根据 GenBank 登录的 TCS cDNA 序列设计 1 对引物。上游引物 P₁ 的序列为:5' ctc gga tcc att agt gct ttt ctg gtt a 3';下游引物 P₂ 的序列为:5' ggg agc tct ttt ttt aaa att tca tgt 3'。为了将 RT-PCR 产物定向克隆到克隆载体 pGEM 7zf(+) 中,引物 P₁ 的 5' 端引入 BamH 酶切位点,引物 P₂ 的 5' 端引入 Sac 酶切位点。

按江昌俊等^[8]的方法提取茶叶总 RNA,进行逆转录 PCR(即 RT-PCR)反应。用 BamH 和 Sac 双酶切 RT-PCR 产物及克隆载体 pGEM 7zf(+),然后用核酸凝胶纯化试剂盒回收酶切后的 RT-PCR 产物,转化和筛选鉴定。将测序正确的阳性克隆质粒命名为 pGEM-TCS。

1.2.2 烟草表达载体 pBF-TCS 的构建 载体构建

过程中涉及的质粒提取、限制性内切酶酶切、连接、转化和鉴定等分子生物学操作均参照文献[9]的方法进行。

1.2.3 叶盘转化法转化烟草叶片 用三亲交配法^[10]将含目的基因的重组植物表达载体导入农杆菌 LBA4404 中,用叶盘法转化烟草。烟草转化后,在含有卡那霉素(Kan,100 mg/L)的再生培养基上筛选转基因植株。

1.2.4 抗性植株的 PCR 鉴定和 PCR-Southern 杂交鉴定 根据双元载体 pBI121 的序列设计 1 对引物。上游引物 P_{35S} 对应于 35S 启动子的序列,具体序列为:5' gat gac gca caa tcc cac tat cct tc 3';下游引物 P_{NOS} 对应于 NOS 终止子的序列,具体序列为:5' atc tca taa ata acg tca tgc att aca 3'。采用 CTAB 法^[11]从抗性植株中提取转基因烟草植株及对照植株的基因组,以其为模板,分别以 P₁ 和 P₂、P_{35S} 和 P_{NOS} 2 对引物组合进行 PCR 扩增,以未转化的烟草为阴性对照,以质粒 pBF-TCS 为阳性对照。PCR 扩增产物转移至硝酸纤维素膜,进行 PCR-Southern 杂交。探针的标记及 PCR-Southern 杂交参照 Roch 公司试剂盒说明书进行。

1.2.5 抗性植株的 RT-PCR 鉴定及 Northern 杂交鉴定 分别从转基因烟草植株、未转化烟草植株及茶树叶片中提取总 RNA,以 Oligo d(T)12-18 作为引物进行逆转录反应,合成 cDNA 第一链。再以 cDNA 第一链为模板,以引物 P₁ 和 P₂ 进行 PCR 扩增。转基因植株和对照的总 RNA,经 1% 甲醛-MOPS 琼脂糖凝胶电泳后转至硝酸纤维素膜,以 DIG 标记的探针进行杂交,Northern 杂交及检测按 Roche 公司的试剂盒说明书进行。

1.2.6 转基因烟草植株的酶学鉴定 按 Suzuki 等^[12]的方法,从转基因烟草和未转化烟草鲜叶中提取咖啡碱合成酶粗酶液,以 7-甲基黄嘌呤和可可碱作为底物进行体外酶促反应,然后用 HPLC 检测反应产物。色谱柱为 SpherisorbC 185 u, 416 mm × L 250 mm,流动相体积分数为 12% 乙腈水溶液,流速 1 mL/min,检测波长为 272 nm,以加底物后立即终止反应的样品为对照。

1.2.7 转基因烟草植株中咖啡碱的测定 烟草叶片中咖啡碱的提取参照 Ashihara 等^[13]的方法进行。剪取转基因烟草叶片和未转化的烟草叶片,置于沸水浴中 15 min,然后在研钵中匀浆,匀浆液经 12 000 ×g 离心 10 min,取上清直接进行 HPLC 分析。

2 结果与分析

2.1 茶树咖啡碱合成酶基因 cDNA 全长的克隆

以茶树叶片总 RNA 为模板,以 P₁ 和 P₂ 为引物进行 RT-PCR,可得到长度约为 1 400 bp 的扩增产物。RT-PCR 产物定向克隆到克隆载体 pGEM 7zf (+) 中,得到重组质粒 pGEM-TCS。测序结果表明,克隆片段的碱基序列与 GenBank 登录的 TCS cDNA 序列基本一致,仅在第 319 位有一个碱基不同,由 A 变成 G,相应的氨基酸由天冬酰胺(N)变成天冬氨酸(D),这可能是由于不同品种间基因发生了变异。

2.2 烟草表达载体 pBI-TCS 的构建

烟草表达载体 pBI-TCS 的构建过程如图 1 所示。用 BamH I 和 Sac I 双酶切重组质粒 pGEM-TCS,回收纯化小片段,定向克隆到用同样酶双酶切的双元载体 pBI121 中,得重组质粒 pBI-TCS,经酶切鉴定和质粒 PCR 鉴定,均可获得长度约为 1 400 bp 的片段,说明该片段已插入到双元载体 pBI121 中,表达载体构建成功。在所构建的表达载体中,TCS 基因替代了载体中的 GUS 基因,正向插入到 35S 启动子下游,因而可以在其指导下进行正常的转录。

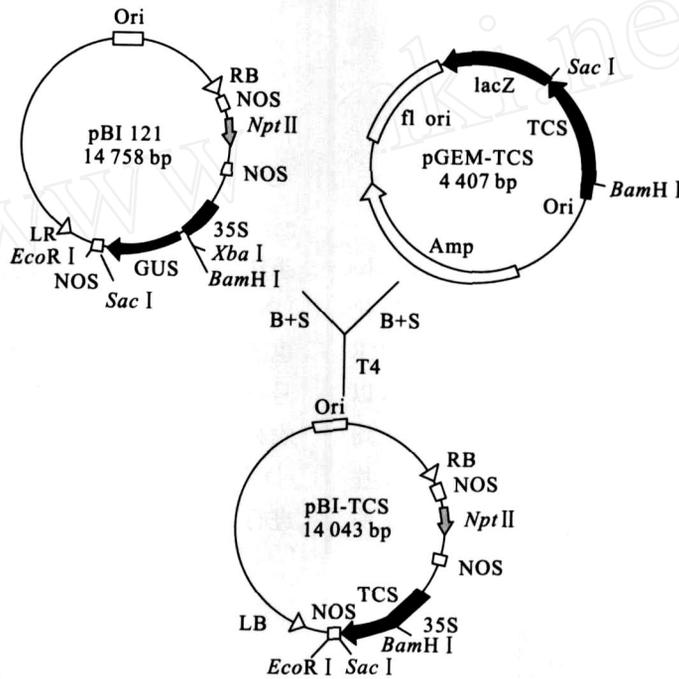


图 1 烟草表达载体 pBI-TCS 的构建流程图

Fig. 1 Construction of expression vector pBI-TCS

2.3 转基因烟草植株的鉴定

通过叶盘法转化烟草叶片,得到了 72 株转基因烟草植株(图 2)。



图 2 转 TCS 基因的烟草植株

Fig. 2 Transgenic tobacco plant expressing TCS gene

2.3.1 转基因烟草的 PCR 鉴定和 PCR-Southern 杂交鉴定 从获得的 72 株抗性转基因烟草植株中,随机挑选 3 株,提取基因组 DNA,进行 PCR 扩增,结果见图 3。从图 3 可以看出,以 2 对引物进行 PCR 扩增,3 株转基因烟草植株中均可以扩增出与阳性对照扩增片段长度相同的 DNA 片段,而以未转化烟草基因组 DNA 为模板均不能扩增出任何条带,这说明茶树中的咖啡碱合成酶基因已整合到烟草基因组 DNA 中。Southern blot 结果(图 4)显示,3 株转基因烟草植株均呈阳性信号,进一步说明 TCS 已整合到烟草基因组 DNA 中。

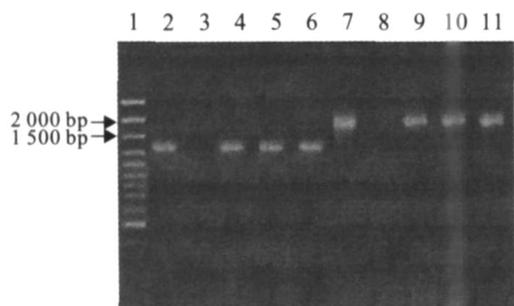


图 3 转 TCS 基因烟草植株的 PCR 鉴定结果

1. 标准分子量;2~6. 依次为质粒 pBF TCS、未转化烟草植株、株系 1、株系 2、株系 3 用引物 P₁ 和 P₂ 扩增的结果;7~11. 依次为质粒 pBF TCS、未转化烟草植株、株系 1、株系 2、株系 3 用引物 P_{35S} 和 P_{NOS} 扩增的结果

Fig. 3 Identification of tobacco plant by PCR

1. Marker;2. pBF TCS(P₁, P₂);3. Non-transgenic tobacco (P₁, P₂);4. Line-1 (P₁, P₂);5. Line-2(P₁, P₂);6. Line-3(P₁, P₂);7. pBF TCS (P_{35S}, P_{NOS});8. Non-transgenic tobacco (P_{35S}, P_{NOS});9. Line-1 (P_{35S}, P_{NOS});10. Line-2 (P_{35S}, P_{NOS});11. Line-3 (P_{35S}, P_{NOS})

2.3.2 转基因烟草植株的 RT-PCR 鉴定和 Northern blot 鉴定 从上述 3 株转基因烟草植株、未转化烟草植株及茶树叶片中提取总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 电泳结果如图 5 所示。从图 5 可以看出, 以 P₁ 和 P₂ 为引物进行扩增, 3 株转基因烟草植株中均可以扩增出与茶树中扩增片段长度相同的 DNA 片段, 而未转化烟草植株中未扩增出任何条带, 这说明

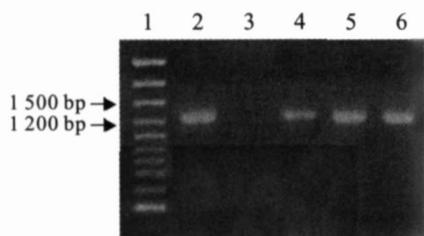


图 5 转 TCS 基因烟草植株的 RT-PCR 鉴定结果

1. 标准分子量;2. 质粒 pBF TCS;3. 未转化烟草植株;4. 株系 1;5. 株系 2;6. 株系 3

Fig. 5 Identification of transgenic tobacco plant by RT-PCR

1. Marker;2. pBF TCS;3. Non-transgenic tobacco;4. Line-1;5. Line-2;6. Line-3

2.3.3 转基因烟草植株的 TCS 酶活性 从转基因烟草植株叶片和未转化烟草植株叶片中提取 TCS, 以 7-甲基黄嘌呤和可可碱作为底物进行体外酶促反应, 反应产物经 HPLC 分析, 结果见图 7, 8。当以 7-甲基黄嘌呤为底物时, 从转基因烟草植株中提取的 TCS 可以催化生成可可碱和咖啡碱(图 7), 而对照

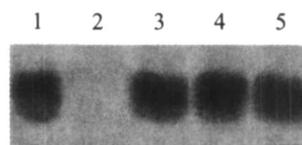


图 4 转 TCS 基因烟草植株的 PCR-Southern 杂交检测

1. 质粒 pBF TCS;2. 未转化烟草植株;3. 株系 1;4. 株系 2;5. 株系 3

Fig. 4 PCR-Southern blot of transgenic tobacco plants

1. pBF TCS;2. Non-transgenic tobacco;3. Line-1;4. Line-2;5. Line-3

茶树中的咖啡碱合成酶基因已整合到烟草基因组 DNA 中, 并能正常转录。Northern blot 结果(图 6) 也表明, 3 株转基因烟草和茶树均产生阳性杂交信号, 而未转化烟草植株呈阴性, 这进一步说明, 通过农杆菌叶盘转化法已将茶树咖啡碱合成酶基因 cDNA 导入到烟草中, 并能在 35S 启动子的指导下进行正常转录。

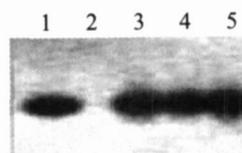


图 6 转 TCS 基因烟草植株的 Northern blot 检测

1. 质粒 pBF TCS;2. 未转化烟草植株;3. 株系 1;4. 株系 2;5. 株系 3

Fig. 6 Identification of transgenic tobacco by Northern blotting

1. pBF TCS;2. Non-transgenic tobacco;3. Line-1;4. Line-2;5. Line-3

未生成。当以可可碱为底物时, 从转基因烟草中提取的 TCS 也可催化生成咖啡碱(图 8)。由此说明, 未转化烟草自身不含有内源的 TCS, 导入的 TCS cDNA 可以翻译成相应的蛋白质, 并且具有正常的生物学活性。

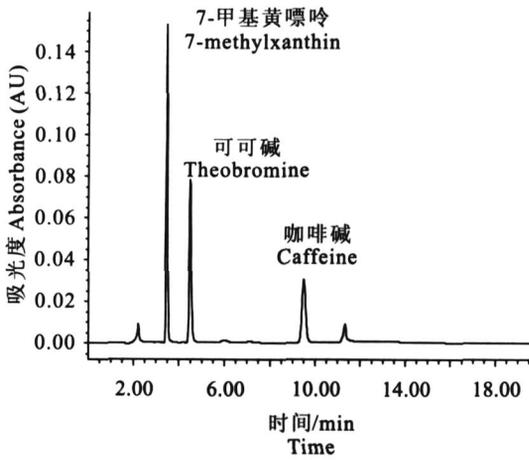


图 7 以 7-甲基黄嘌呤为底物酶促反应产物的 HPLC 检测

Fig. 7 Analysis of in vitro enzymatic reaction by HPLC (7-Methylxanthine as substrate)

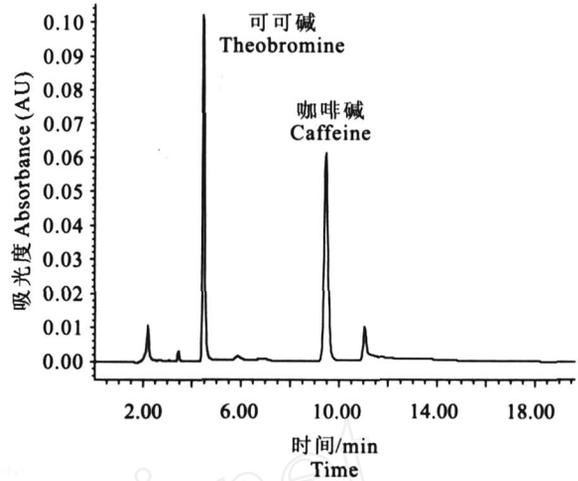


图 8 以可可碱为底物酶促反应产物的 HPLC 检测

Fig. 8 Analysis of in vitro enzymatic reaction by HPLC (theobromine as substrate)

2.3.4 转基因烟草中咖啡碱的测定 经 HPLC 分析(图 9),转基因烟草和未转化烟草中均未检测到咖啡碱,也没有可可碱和 7-甲基黄嘌呤。这说明虽然转基因烟草植株中能表达产生咖啡碱合成酶,且

具有正常的生物学活性,但并不能合成咖啡碱,这可能是因为烟草体内缺少合成咖啡碱的前体物质,如 7-甲基黄嘌呤和可可碱等。

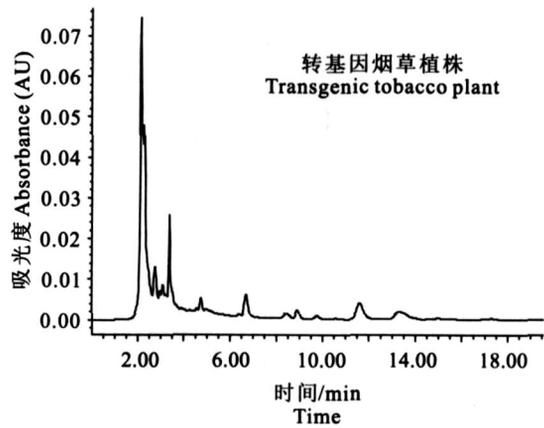
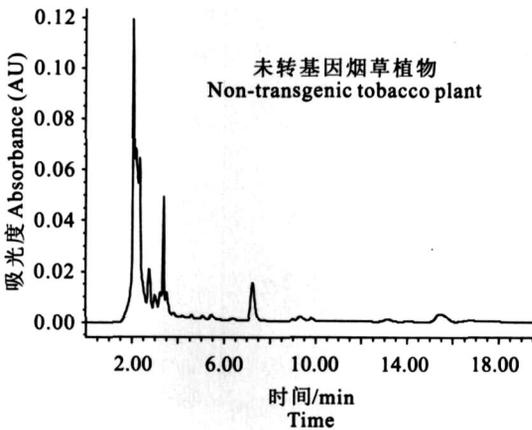


图 9 转 TCS 基因烟草和未转化烟草植株中咖啡碱的 HPLC 检测

Fig. 9 Analysis of caffeine in transgenic and non-transgenic tobacco plant by HPLC

3 讨 论

植物是一种多样化、低成本和可再生的生物资源。植物通过自身光合作用积累的各类生物大分子,如碳水化合物、纤维素、蛋白质和脂肪酸等,不仅为人类和动物提供了赖以生存所需要的各种食物,同时还提供了大量非食用性的化工产品。而生物技术,特别是其在基因工程研究领域内的快速发展使人类进一步拓宽了植物的应用范围。利用转基因植物作为生物反应器生产药用蛋白的研究逐渐受到各

国的重视,国外一些发达国家,特别是美国采用植物生物反应器这种“分子农业”的方法,已经成功地生产出多种高新生物技术产品,其中包括特殊的饱和或不饱和脂肪酸、改性淀粉、环糊精或糖醇、次生代谢产物、工农业用酶以及一些高经济附加值的药用蛋白多肽。

咖啡碱是一种紧俏的生物碱类医药原料,也是重要的食品和化工原料,在国内外市场上经常有价无货。本研究通过农杆菌叶盘转化法,将 TCS cDNA 首次成功导入烟草植株中,旨在以烟草为生物

反应器,大量合成纯天然的咖啡碱,满足市场上的需求。试验结果证明,茶叶中的咖啡碱合成酶基因能在转基因烟草植株中表达,并具有正常的生物学活性,能催化 7-甲基黄嘌呤和可可碱向咖啡碱的转变。但在转基因烟草植株中不能检测到咖啡碱,其主要原因可能是,一方面,在烟草体内本身不含有合成咖啡碱所必需的前体物质,如可可碱和 7-甲基黄嘌呤等;另一方面,植物体内次生代谢产物的生物合成途径非常复杂,需要有很多酶的参与才能完成,本研究虽然将咖啡碱合成酶转入到烟草植株中,但由于烟草中不含有咖啡碱生物合成途径中的其他酶类,因而不能合成咖啡碱的前体物质,如 7-甲基黄嘌呤和可可碱等。如果将咖啡碱合成酶基因及参与咖啡碱生物合成的其他酶类一同导入到烟草植株中,或者将这些酶导入到大肠杆菌及酵母中,能否生产咖啡碱,有待进一步深入研究。

致谢:本试验是在安徽农业大学农业部茶叶生物化学和生物技术重点开放实验室完成的,试验过程中夏涛教授、方世辉教授、张正竹副教授、胡颖惠老师、李叶云老师等给予了大量帮助,在此一并致以谢意。

[参考文献]

- [1] Ashihara H, Gillies F M, Crozier A. Metabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of tea (*Camellia sinensis* L.) [J]. *Plant Cell Physiology*, 1997, 38:413-419.
- [2] Suzuki T, Ashihara H, Waller G R. Purine and purine alkaloid metabolism in *Camellia* and *Coffea* plants[J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 2575-2584.
- [3] 阮宇成. 茶叶咖啡碱与人体健康[J]. *茶叶通讯*, 1997, 1:3-4.
- [4] 黎小萍,陈华玲. 浅谈茶与健康[J]. *蚕桑茶叶通讯*, 2002, 1:20-22.
- [5] Kato M, Kanehara T, Shimizu H, et al. Caffeine biosynthesis in young leaves of *Camellia sinensis*: *in vitro* studies on N-methyltransferase activity involved in the conversion of xanthosine to caffeine[J]. *Plant Physiology*, 1996, 98:629-636.
- [6] Kato M, Mizuno K, Fujimura T, et al. Purification and characterization of caffeine synthase from tea leaves[J]. *Plant Physiology*, 1999, 120:579-586.
- [7] Kato M, Mizuno K, Crozier A, et al. Caffeine synthase gene from tea leaves[J]. *Nature*, 2000, 406(6799):956-957.
- [8] 江昌俊,王朝霞,李叶云. 茶树中提纯总 RNA 的研究[J]. *茶叶科学*, 2000, 20(1):27-29.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [10] 王关林,方宏筠. *植物基因工程技术原理与技术*[M]. 北京:科学出版社, 1998.
- [11] 李德葆,周雪平,许建平,等. *基因工程操作技术*[M]. 上海:上海科学出版社, 1996:54-56.
- [12] Suzuki T, Takahashi E. Further investigation of the biosynthesis of caffeine in tea plants (*Camellia sinensis* L.)-Methylation of transfer ribonucleic acid by tea leaf extracts[J]. *Journal of Biochemistry*, 1976, 160(2):181-184.
- [13] Ashihara H, Monteiro A M, Gillies F M, et al. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee [J]. *Plant Physiology*, 1996, 111(3):747-753.

欢迎订阅 2008 年度《西北农业学报》

《西北农业学报》是教育部主管、西北农林科技大学和甘肃、宁夏、青海、新疆农(林)业科学院和新疆、青海畜牧(兽医)科学院及新疆农垦科学院联合主办的综合性农林牧业学术期刊。本刊立足大西北,面向国内外,主要刊登农学、林学、植(森)保、土壤肥料、节水灌溉、旱地农业、园艺、食品加工、贮藏、保鲜、畜牧兽医、农业机械、农田水利等学科在基础理论研究和应用技术理论研究方面具有创见的学术论文,领先水平的科研成果,研究简报等。主要读者对象为农林牧业科研人员、农业院校师生及农业科技管理人员等。

《西北农业学报》1992年创刊,现为全国综合性农业科学类中文核心期刊,中国科技核心期刊和中国科学引文数据库核心期刊。已被国内外 20 多家数据库和文摘期刊固定收录或转载。

《西北农业学报》为双月刊,逢单月 16 日出版,大 16 开本。国内外公开发行,邮发代号 52-111;国外发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱),代号 Q4380。每期每册定价 15.00 元,全年 6 期 90.00 元。全国各地邮局均可订阅,亦可直接向编辑部订阅。

编辑部地址:陕西杨凌西北农林科技大学西林校区大铁 10 号信箱

邮政编码:712100 联系电话:029-87082760 87082010

网址: <http://xbnx.chinajournal.net.cn>

E-mail: xbnx@chinajournal.net.cn