

## 外加紫杉醇对悬浮培养东北红豆杉细胞的诱导效应

马振毅 王艳东 元英进\*

(天津大学化工学院制药工程系,天津 300072)

**摘 要** 研究表明外加紫杉醇能够诱导悬浮培养的东北红豆杉(*Taxus cuspidata*)细胞总 DNA 发生梯带降解。利用 mRNA 差异显示技术比较了紫杉醇诱导凋亡与不诱导凋亡的东北红豆杉细胞基因表达的差异,得到了 8 个特异表达的 cDNA 克隆。经 Northern 杂交证实其中 3 个在不发生凋亡的细胞中表达,5 个在凋亡的细胞中表达。对这 8 个 cDNA 克隆单向序列测定后,与 GenBank/EMBL/DBJ 中同源序列进行了比较,结果表明:1 个 cDNA 片段与拟南芥中 ABA 应答蛋白基因的保守区有 86% 的同源性,2 个 cDNA 片段与番茄内切壳聚糖酶前体基因的保守区有 50% 的同源性,其他 5 个 cDNA 片段无明显的同源基因,可能是新基因。

**关键词** 红豆杉细胞,悬浮培养,凋亡,DDRT-PCR,同源性分析

中图分类号 Q503 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0204-04

利用红豆杉细胞悬浮培养技术生产紫杉醇是目前最有前途的生产途径之一,但红豆杉细胞中次生代谢产物产量少且不稳定,从而制约了紫杉醇的工业化生产<sup>[1]</sup>。对红豆杉细胞在悬浮培养过程中细胞的生理、生化等特性进行深入地研究,可以为调控紫杉醇的生产提供理论依据。前期的研究结果表明南方红豆杉细胞培养物中紫杉醇产量高,且有自发凋亡,而东北红豆杉细胞培养物中紫杉醇产量低,不发生凋亡<sup>[2]</sup>。为此,本文运用 mRNA 差异显示技术研究了紫杉醇诱导东北红豆杉细胞发生凋亡过程中基因的差异表达,这使得我们对于东北红豆杉细胞的凋亡过程可以有进一步的认识。

1992 年以来,DDRT-PCR(Differential display reverse transcription-polymerase chain reaction 差异显示)技术广泛应用于基因差异表达的研究<sup>[3,4]</sup>,尤其对于遗传背景相近的材料,少数有差异的 cDNA 就可能代表了细胞生理状态的改变,这对于差异 cDNA 片段的后续操作提供了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料和试剂

**1.1.1 细胞悬浮培养及凋亡的诱导** 东北红豆杉细胞悬浮培养依照文献[1],在细胞对数生长期加入

紫杉醇(由 DMSO 配制母液,培养体系中 DMSO 含量不超过总体积的 1.5%)至终浓度 10mg/L,每天取样直到取样的第 7 天,样品用于总 DNA 的提取和 TUNEL 检测,用于提取总 RNA 的细胞取样时间为加紫杉醇后的第 1 天,并设立平行组和对照组。

在所有锚定 mRNA 的 12 种引物 Oligo dT<sub>12</sub> MN 中(M 为 ACG 中的任何一种,N 为 ATGC 中的任何一种),随机选取 Oligo dT<sub>12</sub> CG 作为 cDNA 第一链合成和 PCR 反应的引物,引物由 Sangon(上海)公司合成。

**1.1.2 试剂**:限制酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、总 RNA 分离试剂盒和 T 载体均购自 Promega 公司;TUNEL 检测试剂盒、地高辛标记及检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司;质粒 DNA 提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自博大(北京)公司;其它试剂均为国产分析纯产品。

#### 1.2 方法

**1.2.1 总 DNA 的提取及检测** 细胞总 DNA 的提取参照文献[5],最后沉淀溶解于 30 $\mu$ L TE(10mmol/L Tris-Cl,1mmol/L EDTA pH8.0)中并加 RNase A 于 37 $^{\circ}$ C 处理 2h 以除去样品中的 RNA。纯化后的总 DNA 经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分离后,用 0.5  $\mu$ g/mL(W/V)溴化乙啶染色,并在紫外透射仪上观

察、照相。

**1.2.2 TUNEL 检测:** TUNEL 检测依据 Boehringer Mannheim 试剂盒操作手册进行。POD 耦联的 dUTP 经 DAB 显色后用苏木素衬染细胞核。在显微镜下观察并统计凋亡细胞的比率。

**1.2.3 总 RNA 及 mRNA 的分离:** 总 RNA 的提取按照 Promega 公司的操作手册进行。提取的总 RNA 用无 RNA 酶的 DNase I 处理一次,含 PolyA 的 mRNA 则通过 Oligo(dT)-纤维素柱层析获得<sup>[6]</sup>,随即使用或加无水乙醇覆盖样品存于 -20℃。

**1.2.4 cDNA 第一链的合成及 cDNA 片段的扩增:** 反转录及 PCR 在同一个反应管中进行,引物由 Oligo dT<sub>12</sub>CC 其中 dCTP 用四甲基诺丹明标记)和 10 个核苷酸的随机引物组成。随机引物为: 5' TCGGTCATAG 3' 5' GAGCTAGATC 3' 5' GTCAGAGAGC 3' 或 5' CAAGCGAGGT 3', 反应条件为: 42℃, 1h; 95℃, 2min; 94℃, 30s; 55℃, 30s; 72℃, 2min, 30 cycles; 72℃, 5min。

**1.2.5 cDNA 扩增片段的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析及差异条带的再扩增及克隆:** PCR 产物在 6% 聚丙烯酰胺-尿素测序凝胶中分离后,经 230nm 紫外光激发四甲基诺丹明发光以显示 DNA 条带,切取有差异的 cDNA 片段进行再扩增,条件为: 95℃, 2min; 94℃, 30s; 60℃, 30s; 72℃, 2min, 30 cycles; 72℃, 7min。琼脂糖凝胶电泳检测再扩增成功后,回收 DNA 条带,把它克隆到 T 载体 pGEM-5Z(+)EcoRV 位点中,转化 *E. coli* JM109,经 IPTG + X-gal 筛选,用双脱氧末端终止法测序。

**1.2.6 RNA 斑点杂交及 Northern 杂交<sup>[6]</sup>:** 用 Boe-

hringer Mannheim 公司的体外转录试剂盒,以 UTP-DIG 掺入来标记负链 RNA 探针。RNA 杂交检测依据 Boehringer Mannheim 公司的 DIG 检测试剂盒进行。

**1.2.7 差异片段序列的查新:** 测定的 cDNA 序列提交 GenBank 库查新,并申请序列登录号。

## 2 结果和讨论

### 2.1 紫杉醇诱导东北红豆杉细胞凋亡

悬浮培养过程中的东北红豆杉细胞本身不发生凋亡,但外加紫杉醇可以诱导细胞发生凋亡,如图 1。紫杉醇诱导的细胞中存在 TUNEL 阳性,随机选取 20 个不同视野下的阳性细胞和总细胞数,统计阳性比率(表 1)。细胞总 DNA 也发生特异降解,在 DNA 琼脂糖凝胶电泳中形成 180bp 及其整数倍的 DNA 梯带,随着诱导时间的延长,DNA 进一步降解,成弥散状(图 2)。DNA 梯带和 TUNEL 阳性被认为是主要的凋亡检测指标,是由于在凋亡过程中细胞体内激活了特异的核酸内切酶,并作用于染色质的核小体之间,引起 DNA 的特异降解,形成 180bp 及其整数倍的 DNA 梯带<sup>[7]</sup>。

### 2.2 差示 PCR 扩增、差示带的回收、再次扩增与克隆

针对紫杉醇诱导的东北红豆杉凋亡细胞与不诱导凋亡的东北红豆杉细胞体系进行了基因表达的差异研究。如图 3 所示,差示 PCR 产物在 6% 聚丙烯酰胺-尿素测序凝胶中分离后,选取 300bp 以上的差异带从胶上切下,采用同差示 PCR 相同的一对引物进行再次扩增,经琼脂糖凝胶电泳证实再扩增成功

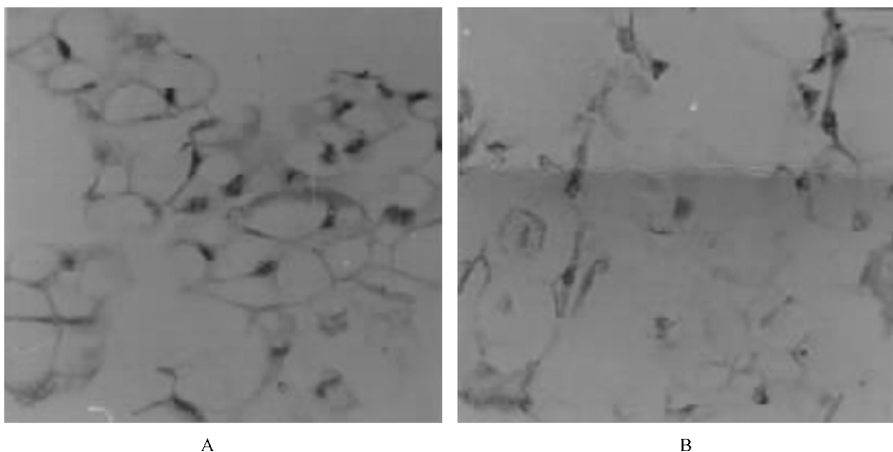


图 1 外加紫杉醇诱导的东北红豆杉细胞 TUNEL 检测

Fig.1 TUNEL assay in *T. cuspidata* cells induced by additional taxol

A. Control (TUNEL negative reaction with the blue nuclei); B. TUNEL positive reaction in taxol-treated cells with brown nuclei

表 1 紫杉醇诱导东北红豆杉细胞 TUNEL 阳性比率

Table 1 TUNEL positive ratio in *T. cuspidata* cells induced by additional taxol

Inductive time/d	Positive reactions in treated groups/%	Positive reactions in control groups/%	
		DMSO	H <sub>2</sub> O
2	25	0	0
5	23	0	3
9	34	2	2

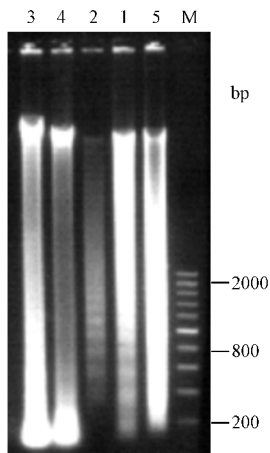


图 2 外加紫杉醇诱导东北红豆杉细胞总 DNA 的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose gel electrophoresis of DNA fragments of *T. cuspidata* cells induced by additional taxol (10mg/L)

后,回收再扩增片段,共得到 8 条 cDNA 片段,分别命名为 TIGT1-TIGT8 (Taxol-induced gene in *T. cuspidata*, TIGT),其对应的克隆分别为 TC01-TC08,并测定其序列,序列已被 GenBank 接收,接收号见表 2。

表 2 紫杉醇诱导东北红豆杉细胞差异表达的基因

Table 2 Differential genes expression in *Taxus cuspidata* cells induced by additional taxol

Putative function	Clone name	Insert /bp	GenBank accession No.
ABA-responsive protein <sup>[8]</sup>	TC01	TIGT1 (490)	BF704552
Unknown	TC02	TIGT2 (449)	BF704553
Endochitinase precursor <sup>[9]</sup>	TC03	TIGT3 (307)	BF704554
Unknown	TC04	TIGT4 (364)	BF704555
Unknown	TC05	TIGT5 (338)	BF704556
Unknown	TC06	TIGT6 (340)	BF704557
Unknown	TC07	TIGT7 (312)	BF704558
Endochitinase precursor <sup>[10]</sup>	TC08	TIGT8 (379)	BF704559

### 2.3 Northern 杂交验证

并不是所有从胶上回收的差异带都代表基因的差异表达,还需 Northern 杂交来验证差异基因片段是否来源于诱导转录的 RNA。分别以不同克隆的质粒 DNA 为模板,用 SP6 或 T7 RNA 转录酶体外转

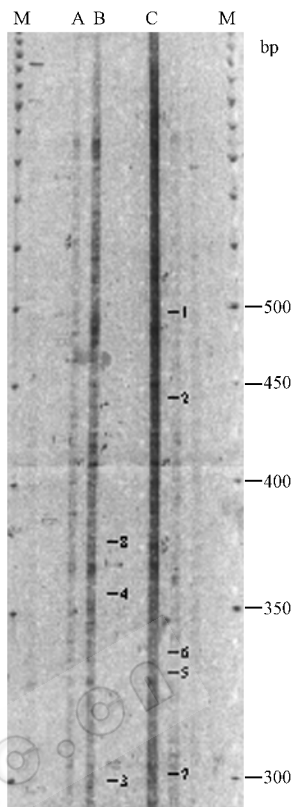


图 3 cDNA 片段在聚丙烯酰胺凝胶上的分离

Fig.3 Isolation of cDNA fragments on the sequencing PAGE A, B. Control groups ; C. Induced group TIGT 1 ~ 8 showing the different expressed cDNA fragments ; M. 50bp DNA markers

录出 UTP-DIG 标记的负链 RNA 为探针分别对各自来源的总 RNA 进行斑点杂交(图 4)和 Northern 杂交分析(图 5)。结果表明有 8 个基因片段在此过程中表达。所获得的差异序列中, TIGT1 与 ABA 应答蛋白基因保守区的同源性最高,达 86%,已知 ABA 应答蛋白与高渗透压胁迫相关<sup>[8]</sup>,但其确切的生理意义尚不清楚; TIGT3 和 8 与已知的内切壳聚糖酶前体基因的保守区有部分同源(约 50%),内切壳聚糖

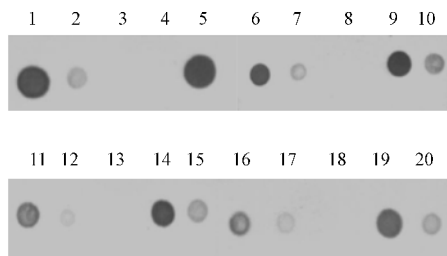


图 4 TIGT1-8 的 RNA 斑点杂交

Fig.4 Analysis of TIGT1-8 by RNA dot-blot Total RNA samples were hybridized by DIG-labeled antisense probes. 2, 7, 10, 12, 15, 17, 20 are positive controls and 3, 4, 8, 13, 18 are negative controls. 1, 5, 6, 9, 11, 14, 16, 19 standing for

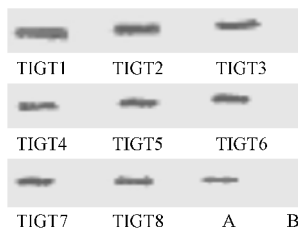


图5 TIGT1-8 的 Northern 杂交

Fig.5 Analysis of TIGT9-22 by RNA gel blot

Total RNA samples were separated in agarose gel, transferred onto the nylon membranes and hybridized by DIG-labeled antisense probes.

A. Positive control, B. Negative control, TIGT1-8. Positive reaction

酶能够降解真菌等病原菌的细胞壁而达到抗病的目的<sup>[9,10]</sup>,其他基因片段在 GenBank/EMBL/DDBJ 中均无明显的同源序列,可能是功能未知的基因。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] YUAN Y (元英进), HU G W (胡国武), WANG C Q (王传贵) *et al.*. Effect of La, Ce on *Taxus cuspidata* cell growth, biosynthesis and release of taxol. *Journal of Rear Earths* (稀土学报), 1998, **16**(4): 300 ~ 306
- [ 2 ] YUAN Y (元英进), MA Z Y (马振毅), GE Z Q (葛志强) *et al.*. Apoptosis and taxol production in suspension cultures of *Taxus spp* cells. *Journal of Chemical Industry and Engineering* (化工学报), 2000 **51**( Suppl ) 43 ~ 46
- [ 3 ] Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257**: 967 ~ 970
- [ 4 ] Liang P, Pardee A B. Differential display. A general protocol. *Mol Biotechnol*, 1998, **10**(3): 261 ~ 267
- [ 5 ] Dellaporta S L, Wood J and Hicks J B. A plant DNA mini-preparation: Version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, **1**(4): 19 ~ 22
- [ 6 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 7 ] Ryerson R E, Heat M C. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or abiotic treatments. *Plant Cell*, 1996, **8**: 392 ~ 402
- [ 8 ] Uma S, Prasad T G, Kumar U M. Genetic variability in recovery growth and synthesis of stress protein on response to polyethylene glycol and salt stress in finger millet. *Annals of Botany*, 1995, **76**(1): 43 ~ 49
- [ 9 ] Dalisay R F, Ku J A. Persistence of reduced penetration by colletotrichum lagenarium into cucumber leaves with induced systemic resistance and its relation to enhanced peroxidase and chitinase activities. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1995, **47**(5): 329 ~ 338
- [ 10 ] Sun L W, Adams B, Gurnon G R *et al.* Characterization of two chitinase genes and one chitosanase gene encoded by chlorella virus PB-CV-1. *Virology*, 1999, **263**(2): 376 ~ 387

## Induced-effects by Additional Taxol in Suspension Cultures of *Taxus cuspidata* Cells

MA Zhen-Yi WANG Yan-Dong YUAN Ying-Jin\*

( Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China )

**Abstract** Apoptosis was induced by taxol treatment in suspension cultures of *Taxus cuspidata* cells. Differential display technique was used to investigate the induced-gene expression between the taxol-induced *T. cuspidata* cells and normal control. Eight different expressed cDNA fragments were cloned and sequenced. These differential expressed fragments were further confirmed by Northern blotting hybridization with their original total RNAs. The result showed that three of the cDNA fragments were from control RNA and five of those were from taxol-induced *T. cuspidata* cells. The homology of the sequences revealed that one of the clones had 86% homology with ABA-responsive protein gene sequence in *Arabidopsis thaliana*, two of the clones had 50% homology with endochitinase precursor in tomato and the other 5 clones, which might be new gene fragments, had no significant homology with the known gene sequences in GenBank/EMBL/DDBJ.

**Key words** *Taxus cuspidata*, cell suspension cultures, apoptosis, DDRT-PCR, homology analysis

Received 08-10-2001

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China ( No. 29976032 ).

\* Corresponding author. Tel 86-22-27401149, Fax 86-22-27403888, E-mail: yjyuan@public.tpt.tj.cn

中国微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn