

建立稳定表达人 RANTES 基因的夏枯草细胞克隆

曾庆平* 冯丽玲 杨瑞仪 陈竹华

(广州中医药大学热带医学研究所生物技术研究室, 广州 510405)

摘 要 为了在中药细胞中表达人源有用基因,以增强其特异药理活性,将克隆自人外周血淋巴细胞(PBL)mRNA 的 RANTES 基因经 Ti 质粒衍生的中间表达载体 pROKII 导入携带 pAL4404 质粒的根癌农杆菌 LBA4404 菌株中,并采用叶盘共培养法转化离体培养夏枯草细胞,经 Southern 杂交确认 RANTES 基因在转化细胞基因组中的整合,用 RT-PCR 扩增、Western 印迹杂交和酶联免疫吸附测定(ELISA)分析转化细胞中 RANTES 基因的表达,以 PBL 的过氧化物酶活性作为重组 RANTES 对细胞趋化性诱导的检测指标。结果表明,RANTES 基因已在转基因夏枯草细胞中整合,并形成稳定表达 RANTES 基因的细胞克隆,为进一步培育具有特异药理活性的转基因夏枯草植株打下了基础。

关键词 RANTES,转基因夏枯草,基因表达,趋化活性

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0168-06

趋化因子是一类低分子量(8~10kD)诱导分泌型细胞因子,它们可通过结合细胞表面的趋化因子受体诱发致炎性免疫应答^[1],并通过受体与配基的相互作用发挥调节 T 细胞趋化作用和促进血管再生等重要功能^[2],在治疗自身免疫性疾病^[3]、抑制器官移植排斥反应^[4]和抗肿瘤^[5]等方面具有潜在药用价值。最近发现,趋化因子受体是人免疫缺陷病毒(Human immunodeficiency virus, HIV)感染人体细胞的辅助受体,其中 CCR5 是 M 嗜性毒株(R5 病毒)感染巨噬细胞的辅助受体;CXCR4 是 T 嗜性毒株(X4 病毒)感染 T 细胞的辅助受体^[6]。RANTES、SDF-1 等 β -趋化因子通过结合外周血细胞表面受体 CXCR4 或 CCR5 产生空间位阻与表达下调效应,可阻断 HIV 进入细胞的通路,并降低高危人群受 HIV 感染的危险^[7]。另一方面,高加索人种中的 CCR5 缺陷型(CCR5- Δ 32)对 HIV 感染具有抗性,表明趋化因子与受体的相互作用可以作为抗艾滋病的药物作用靶点^[8]。因此 β -趋化因子在艾滋病的防治上具有潜在药用价值^[9]。

传统清热中草药夏枯草含有两种抗 HIV 有效成分——夏枯草皂甙及硫酸多糖。体外评价实验证实,硫酸多糖能显著抑制 MT-4 细胞中 HIV 的逆转

录酶活性^[10]。为了尝试将特异性抗 HIV 基因引入中草药以提高其抗 HIV 感染的增效作用,我们在人 RANTES 基因克隆、测序和表达的基础上^[11-13],将 RANTES 基因通过根癌农杆菌中间表达载体 pROKII 与“解除武装”的 Ti 质粒 pAL4404 组成的二元载体(Binary vector)系统^[14]导入夏枯草培养细胞,形成稳定表达重组 RANTES 基因的传代愈伤组织,以便为今后利用转基因中草药防治艾滋病打下一定的基础。

1 材料与方法

1.1 重组中间表达载体的构建

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 (pAL4404)菌株和携带花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动子的 Ti 质粒衍生中间表达载体 pROKII^[15]由中国科学院微生物研究所提供。含有 RANTES 基因的 pT-RAN 由我室构建^[16]。将 pT-RAN 用 *Bam*H I、*Kpn* I (TaKaRa 公司)酶切,电泳回收 RANTES 基因片段,插入相同酶切的 pROK II 中,获得重组质粒 pR-RAN。以重组质粒转化 DH5 α 感受态细胞,挑取单菌落,提取质粒 DNA,用 *Eco*R I + *Hind* III 双酶切鉴定。

收稿日期 2002-09-16, 修回日期 2002-12-23。

基金项目 国家自然科学基金资助(No. 39870725)。

* 通讯作者。 Tel 86-20-36585422-2422, Fax 86-20-86373516, E-mail zmibio@gzhtcm.edu.cn

1.2 重组表达质粒导入根癌农杆菌

用 pR-RAN 转化根癌农杆菌感受态细胞,在 50 μ g/mL 利福平(Rif)和 25 μ g/mL 卡那霉素(Kan)平板上筛选携带双元载体的根癌农杆菌转化子 LBA4404(pAL4404 : pR-RAN)^[17]。

1.3 夏枯草叶盘与根癌农杆菌共培养

将夏枯草(*Prunella vulgaris*)种子播种在 1/2 MS 培养基上发芽,取 8~10d 叶龄的无菌幼苗,将幼叶剪成 0.5cm × 1cm 大小,转入 MS 培养基(BA 0.1 μ g/mL + 2.4-D 1 μ g/mL)中,25 $^{\circ}$ C 光照条件下预培养 3d。挑取 YEB 平板(Kan 25 μ g/mL + Rif 50 μ g/mL)上的根癌农杆菌 LBA4404(pAL4404 : pR-RAN)单菌落,接种于 20 μ L YEB(Kan 25 μ g/mL + Rif 50 μ g/mL)液体培养基中,30 $^{\circ}$ C,180r/min 培养过夜。取 400 μ L 菌液转接至 20mL 无抗生素 YEB 液体培养中,继续培养 6h,待 $OD_{600} \approx 0.4$ 时用于转化。将菌液倒入无菌带盖离心管内,加盖并封口,4000r/min 离心 5min。弃上清,加入无菌 MS 液体培养基,重悬菌体。取出预培养材料,倒入稀释好的菌液,轻摇 1min,立即取出叶片,置无菌滤纸上吸去多余菌液。将叶片放回 MS 培养基(BA 0.1 μ g/mL + 2.4-D 1 μ g/mL)中,加盖并封口,于 28 $^{\circ}$ C 黑暗中培养 3~4d,再转入含 500mg/L 头孢菌素(Cef)的 MS 培养基(BA 0.1 μ g/mL + 2.4-D 1 μ g/mL)上经多次继代培养脱菌。

1.4 夏枯草 DNA 的提取与 Southern 杂交

按 E. Z. N. A. Plant DNA Kit(Omega 公司)说明书提取转化与未转化夏枯草细胞的总 DNA。在 PCR 反应体系中,按文献 [18] 所采用的模板、引物及扩增条件,另加 1.5 μ L Bio-11-dUTP 进行 PCR 以制备生物素标记探针,然后按常规进行 Southern 杂交。

1.5 夏枯草 RNA 的提取与 RT-PCR 扩增及重测序

切取 100mg 脱菌培养的愈伤组织,放入液氮冻干后,按柱式总 RNA 抽提试剂盒(上海华舜生物工程公司)说明书提取总 RNA。取总 RNA 加入 DNA 酶(TaKaRa 公司),37 $^{\circ}$ C 消化 20min,用等体积苯酚/氯仿抽提去蛋白,添加乙酸铵(最终浓度 2mol/L)再加入 2.5 倍量的冷乙醇沉淀,用 70% 乙醇洗涤,50 $^{\circ}$ C 烘干,加入 50 μ L TE 溶解。采用 Life Technologies 公司的 M-MLV 逆转录酶在 50 $^{\circ}$ C 下逆转录 30min,然后进行 PCR 扩增。按文献 [19] 所列引物并采用以下热循环条件对 cDNA 进行扩增:94 $^{\circ}$ C,30s;50 $^{\circ}$ C,30s;72 $^{\circ}$ C,1min,共 35 个循环。以 RANTES 基因上游引物作为测序引物,对 RT-PCR 产物直接进行测序。

1.6 夏枯草蛋白的提取与 Western 印迹

按文献 [20] 提取总蛋白。在 100mg 液氮冻干的转化及对照夏枯草愈伤组织中,加入 200 μ L 提取缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 6.0, 0.02% Na₃N, 0.001% PMSF),置冰浴中研成匀浆后,室温下 5000 r/min 离心 10min。取上清,加入 100 μ L 样品缓冲液(100mol/L Tris-HCl, pH8.0, 2% SDS, 10% 甘油, 5% 巯基乙醇, 0.1% 溴酚蓝),煮沸 10min,10 000 r/min 离心 10min,取 20 μ L 上清液与 20 μ L 样品缓冲液混合,95 $^{\circ}$ C 加热 5min,经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、洗膜、封闭后,依次加入 1:1000 的一抗(羊抗人 RANTES C19 抗体, Santa Cruz)和 1:1000 的酶标二抗(HRP 标记的马抗羊 IgG, Jackson Immno Res),最后用 DAB(华美公司)显色。

1.7 夏枯草蛋白中 RANTES 的 ELISA 测定

用倍比稀释的 RANTES 标准品制作标准曲线,ELISA 测定按文献 [21] 进行。经包被、洗涤和封闭后,每孔加入 75 μ L 稀释(1:1000)的羊抗人 RANTES C19 抗体(Santa Cruz),37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,倾尽封闭液并洗涤。每孔加入 100 μ L 稀释(1:1000)的 HRP 标记马抗羊 IgG(Jackson Immno Res),37 $^{\circ}$ C 孵育 30min,倾尽封闭液并洗涤,然后显色。

1.8 PBL 分离与过氧化物酶活性测定^[22]

在 10 mL 全血中加入等体积 PBS,混匀后缓缓加至 10 mL 淋巴细胞分离液(华美公司)中,2000 r/min 离心 30min,取中、上层之间的细胞,用 PBS 洗 2 次,离心收集细胞,再用 PBS 重悬(2×10^6 /mL)。在 96 孔板中,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,然后加入 RANTES 标准品及植物蛋白提取液。将微孔板置于 4 $^{\circ}$ C 孵育 30min,加入 Triton X-100 至终浓度 0.8%,37 $^{\circ}$ C 孵育 45min,裂解细胞,离心,各取 50 μ L 上清,至微孔板中显色。

2 结 果

2.1 重组中间表达载体的构建与酶切鉴定

用 BamH I 和 Kpn I 消化 pT-RAN 和 pROK II,分别回收 pT-RAN 的 RANTES 基因小片段和 pROK II 载体大片段,然后将两个酶切片段用 T4 DNA 连接酶连接,获得重组中间表达载体 pR-RAN。经 Hind III 和 EcoR I 双酶切, pR-RAN 生成 9kb 和 1.5kb 两个片段, pROK II 用 Hind III - EcoR I 双酶切则产生 9kb 和 1.2kb 两个片段(图 1)。有 RANTES 基因的酶切片段与无 RANTES 基因的酶切片段相差约 300bp,刚好符合 RANTES 基因的实际大小,表明 RANTES

基因已成功插入 pR_{OK} II 中。

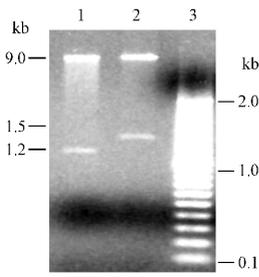


图 1 pR-RAN 的双酶切鉴定

Fig.1 Identification of pR-RAN by double digestion

1. pR_{OK} II(*Eco*R I + *Hind* III);
2. pR-RAN(*Eco*R I + *Hind* III);
3. 100bp ladder

2.2 RANTES 基因在夏枯草基因组中的整合

为了证实 RANTES 基因是否已整合在夏枯草基因组中,从转基因夏枯草细胞提取 DNA,并用 *Eco*R I 完全消化,经 Southern 杂交检测 RANTES 基因在夏枯草基因组中的存在,结果如图 2 所示。转化夏枯草 DNA 和 pR-RAN 均显示阳性杂交信号,而非转化夏枯草 DNA 则无杂交信号。由于 pR-RAN 上仅含有一个 *Eco*R I 切点,故其酶切产物是包含 pR_{OK} II 载体和 RANTES 基因的线性 DNA,大小约为 10.5k(3 泳道)。转化夏枯草 DNA 经 *Eco*R I 消化后的整合基因片段大小介于 RANTES 基因与线状 pR-RAN 之间(2 泳道)。杂交结果表明,RANTES 基因已经整合在夏枯草基因组中,但仅有一个拷贝。

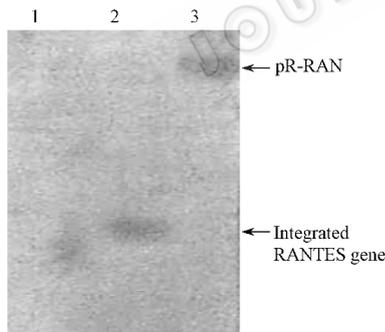


图 2 转化细胞 DNA 提取物的 Southern 杂交

Fig.2 Southern blotting of DNA extracts from transformed cells

1. *Eco*R I digestion of DNA from non-transformed cells ;
2. *Eco*R I digestion of DNA from transformed cells ;
3. *Eco*R I digestion of pR-RAN

2.3 RANTES 基因在夏枯草细胞中的表达——RNA 水平的检测

为了分析整合在夏枯草基因组中的 RANTES 基因能否正常表达,用转化愈伤组织的 RNA 进行 RT-PCR,观察细胞中是否存在由 RANTES 基因转录产生的 mRNA(图 3)。转化愈伤组织总 RNA 经 DNA 酶消化后无 PCR 扩增产物(泳道 1)表明 DNA 酶已将基因组中整合的 RANTES 基因完全消化。相反,转

化愈伤组织总 RNA 的 DNA 酶消化产物经 RT-PCR 后均有扩增产物生成(泳道 2、3),而且转化愈伤组织中 RANTES 基因表达产物的大小与 pT-RAN 质粒中的 RANTES 基因(泳道 4)相同(约 300bp),显示转基因夏枯草细胞中已合成 RANTES mRNA。

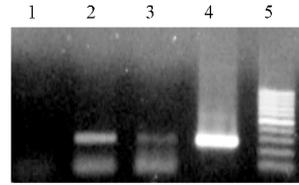


图 3 转化细胞 RNA 提取物的 RT-PCR 扩增

Fig.3 RT-PCR amplification of RNA extracts from transformed cells

1. PCR amplification of DNase-digested total RNA from transformed calli ;
2. RT-PCR amplification of DNase-digested and deproteinized total RNA from transformed calli ;
3. RT-PCR amplification of DNase-digested and undeproteinized total RNA from transformed calli ;
4. PCR amplification of pT-RAN ;
5. 100bp ladder

将上述 RT-PCR 扩增产物直接进行测序,以确认基因序列的正确性,结果如图 4 所示。由图可见,测序结果与 RANTES 基因序列(GenBank AF266753)^[23]完全吻合,表明转化愈伤组织的 RT-PCR 扩增产物确实来自 RANTES 基因表达产生的 mRNA。

```

ATGAAAGGTCCTCCGCGCCACCGCTGGCTGTGCATCCTCTTGTACTGCCCTCTGCGCTCTGCACTTGCCT
CCCCATATTCCTCGGACACACACCCCTGCTGCTTTGGCTACACTGCCGCCCACTGCCCGTGGCCACA
TCAAGGAGTATTTCTACACCACTGGCAAGTGTCTCCAACCCAGCAGTCGTCTTGTCAACCCGAAAGAACC
GCCAAGTGTGTGCCAACCCAGAGAAGAAATGGGTTCCGGAGTACATCAACTCTTTGGAGATGAGCTAG

```

图 4 转化细胞 RT-PCR 扩增产物序列分析

Fig.4 Sequence analysis of RT-PCR amplicons from transformed cells

Shadowed letters represent primer sequences ; Short lines represent identical bases

Top : Standard RANTES gene sequence ; Bottom : Sequence of RT-PCR amplicons

2.4 RANTES 基因在夏枯草细胞中的表达——蛋白质水平的检测

以转化愈伤组织为材料提取总蛋白进行 Western 印迹杂交,以检测其中是否已有 RANTES 的合成(图 5)。由印迹图谱可以看出,阳性区带的位置(6~8 泳道)与 RANTES 标准品(1 泳道)相当,表明 RANTES 基因已在夏枯草细胞中成功实现异源表达。此外,在 pH8.0 条件下提取的转化愈伤组织总蛋白无阳性信号(泳道 5),而在 pH6.0 条件下提

取的转化愈伤组织总蛋白的印迹则呈阳性(6~8泳道)表明植物总蛋白的提取方法对印迹结果有显著影响。

2.5 RANTES 的 ELISA 测定

以 ELISA 法制作 RANTES 标准曲线,用于待测样品中 RANTES 的半定量测定(表 1)。结果表明,转化愈伤组织(阳性样品)与非转化愈伤组织(阴性对照)总蛋白的 A_{450} 值分别为 0.922 和 0.315,由 RANTES 标准曲线查得样品中 RANTES 含量为 1.5ng/mL 左右。

表 1 RANTES 的定量测定

Table 1 Quantitative assay of RANTES

Dilution	Standard RANTES (100 ng/mL)	Transformed calli (Positive sample)	Non-transformed calli (Negative control)
1:1	1.938	0.922	0.315
1:2	1.780	1.016	0.346
1:4	1.607	0.925	0.321
1:8	1.422	0.966	0.320
1:16	1.261	0.990	0.357
1:32	1.132	0.999	0.429
1:64	0.893	1.053	0.369
1:128	0.819	1.015	0.377

2.6 RANTES 的细胞趋化活性诱导

将 PBL 与夏枯草总蛋白提取液共育,然后测定其过氧化物酶活性(A_{450} 值),由此判断转化细胞所合成的 RANTES 对细胞趋化作用的诱导,结果如表 2 所示。

表 2 PBL 的过氧化物酶活性测定

Table 2 Peroxidase activity assay of PBL

	$A_{450}(\bar{x} \pm S)$
Blank control(PBS)	0.196 ± 0.028
Standard(positive)control(500 ng/mL RANTES)	1.145 ± 0.163
Sample(negative)control	0.168 ± 0.057
Sample 1	2.436 ± 0.039
Sample 2	2.359 ± 0.025
Sample 3	2.334 ± 0.020

以上数据表明,转基因夏枯草总蛋白提取液可使 PBL 的过氧化物酶活性增高,表明其中所含 RANTES 已诱导中性粒细胞产生趋化作用。这是因为趋化因子诱导中性粒细胞趋化时,趋化细胞表达的过氧化物酶或 β -葡萄糖醛酸增加,其表达量与趋化因子的浓度成正比,检测这些物质可间接了解趋

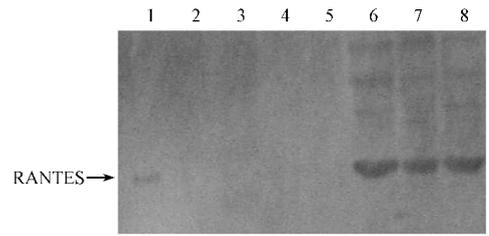


图 5 转化细胞总蛋白的 Western 印迹

Fig.5 Western blotting of total proteins from transformed cells
1. RANTES standards; 2. Total protein extracts from untransformed cells;
3~5. Total protein extracts from transformed cells(pH8.0);
6~8. Total protein extracts from transformed cells(pH6.0)

化因子的含量^[22]。

3 讨论

通过培育遗传修饰(Genetic modification, GM)中药,可将病原体抗原基因、肿瘤抗原基因及其它有用基因引入中药细胞,育成能口服的转基因疫苗及对中药原有药理活性产生增效作用的转基因中药^[25]。目前,利用转基因植物已生产出多种疫苗、抗体和细胞因子等生物工程药物^[24]。我们开展的转入 RANTES 基因夏枯草永久性细胞克隆的研究,为提高夏枯草的药用价值提供了可能。迄今为止尚未报道人 RANTES 基因在植物细胞中的表达。

本研究通过根癌农杆菌共感染系统将 RANTES 基因导入夏枯草细胞,并在 DNA、RNA 和蛋白质水平上进行了鉴定。Southern 杂交结果表明,RANTES 基因已成功地整合在夏枯草基因组中,整合拷贝数为 1。在转基因植物中,既有插入单拷贝者^[26-27],也有插入多拷贝者^[28-29]。不过,大多数转基因失活都涉及多拷贝基因整合,而且多拷贝的转化易发生 DNA 的甲基化修饰^[30]。因此,从这个意义上来说,单拷贝整合优于多拷贝整合。

从 RT-PCR 产物的测序结果来看, RANTES 基因全序列(包括信号肽序列)已被忠实地转录出来。从 Western 杂交图谱可以看出, 重组 RANTES 与标准品大小相当, 而且具有与标准品类似的趋化诱导活性, 可能表明重组 RANTES 前体中的信号肽已被成功切除或信号肽的存在不影响趋化活性的诱导, 但这一推论还有待重组蛋白 N 末端测序结果的支持。虽然某种植物蛋白前体能在另一种植物中正常加工^[31], 但人 RANTES 前体能否在植物中转变为成熟蛋白, 则未见报道。

从 Western 印迹的技术层面来说, 由于 pH 值对于蛋白质的溶解度有较大影响, 故提取缓冲液的 pH 应偏离蛋白质的等电点。蛋白质在细胞内多以离子键形式结合, 选用 pH3~6 的提取液有利于离子键的解体^[32]。夏枯草蛋白的 pH 介于 7~8 之间, 用 pH6.0 的缓冲液可使其偏离等电点, 并减弱蛋白质的结合作用, 这样可以大大提高蛋白质的溶解度, 从而改善提取效果, 有助于 Western 杂交鉴定。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Baggolini M, Beatrice D, Moser B. Human chemokines :an update. *Annual Review Immunology*, 1997, **15** :675 - 705
- [2] Horuk R. Chemokines beyond inflammation. *Nature*, 1998, **393** :524 - 525
- [3] Barnes D A, Tse J, Kauthoid M *et al.* Polyclonal antibody directed against human RANTES ameliorates disease in the Lewis rat adjuvant-induced arthritis model. *Journal of Clinical Investigation*, 1998, **101** :2910 - 2919
- [4] Belperio J A, Burdick M D, Keane M P *et al.* The role of the CC chemokine, RANTES, in acute lung allograft rejection. *Journal of Immunology*, 2000, **165** :461 - 472
- [5] Wang J M, Deng X, Gong W *et al.* Chemokines and their role in tumor growth and metastasis. *Journal Immunological Methods*, 1998, **220** :1 - 17
- [6] Doms R W, Peipert S C. Unwelcomed guests with master keys :how HIV uses chemokine receptors for cellular entry. *Virology*, 1997, **235** :179 - 190
- [7] Michael N L, Moore J P. HIV - 1 entry inhibitors : evading the issue. *Nature Medicine*, 1999, **5** :740 - 742
- [8] Premack B A, Schall T J. Chemokine receptors :gateways to inflammation and infection. *Nature Medicine*, 1996, **2** :1174 - 1178
- [9] SUN H X(孙晗笑), FENG L X(冯丽霞), LI Y X(利奕成) *et al.* The role of vMIP α homologous to hMIP-1 α on human chemokine receptors. *Science Bulletin(科学通报)*, 2001, **46** :471 - 477
- [10] Chang R S. Inhibition of growth of human immunodeficiency virus *in vitro* by crude extracts of Chinese medicinal herbs. *Antiviral Research*, 1988, **9** :163 - 176
- [11] ZENG Q R(曾庆平), YANG R Y(杨瑞仪), FENG L I(冯丽玲) *et al.* Cloning and sequencing of human RANTES gene. *Journal for China AIDS/STD prevention and control(中国性病艾滋病防治)*, 2000, **14** :245 - 247
- [12] ZENG Q R(曾庆平), YANG R Y(杨瑞仪), FENG L I(冯丽玲) *et al.* Cloning, sequencing and *in vitro* expression of human RANTES genes. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2001, **17** :349 - 351
- [13] ZENG Q R(曾庆平), YANG R Y(杨瑞仪), FENG L I(冯丽玲) *et al.* Polymorphism analysis and *in vitro* expression of RANTES genes. *Chinese Journal of Sexually Transmitted Infection(中华性传播感染杂志英文版)*, 2001, **1** :15 - 19
- [14] LI B X(李宝健), ZENG Q R(曾庆平). *Plant biotechnology : principles and methods*. Changsha :Hunan Science and Technique Publishing House, 1990 pp.131
- [15] SONG J X(宋俊岐), QIU B S(邱井生), WANG R(王荣) *et al.* The manipulation and modification of fruit ripening by expression of ACC deaminase gene in tomato. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 1998, **14** :33 - 38
- [16] ZENG Q R(曾庆平), YANG R Y(杨瑞仪), FENG L I(冯丽玲) *et al.* Cloning of human IFN- α gene and construction of plant gene expression vector. *Chinese Science Abstracts(中国学术期刊文摘)*, 2000, **6** :1152 - 1154
- [17] WANG G I(王关林), FANG H Y(方宏筠). *Plant genetic engineering : principles and techniques*. Beijing : Science Press, 1998, pp.543 - 544
- [18] YANG R Y(杨瑞仪), FENG L I(冯丽玲), ZENG Q R(曾庆平). Activity analysis on fused expression product of recombinant human β - Chemokine RANTES gene. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology(中国生物化学与分子生物学报)*, 2002, **18** :704 - 707
- [19] ZENG Q R(曾庆平), FENG L I(冯丽玲), YANG R Y(杨瑞仪) *et al.* Transient expression of recombinant human cytokine genes in transgenic materia medica cells. *Chinese Traditional and Herbal drugs(中草药)*, 2003, **34** :63 - 66
- [20] WANG G I(王关林), FANG H Y(方宏筠). *Plant genetic engineering : principles and techniques*. Beijing : Science Press, 1998, 634
- [21] LI Y X(李永明), ZHAO Y Q(赵玉琪) *et al.* Practical manual of molecular biology methods. Beijing : Science Press, 1999 pp.360 - 363
- [22] SUN W M(孙卫民), WANG H X(王惠琴). *Research methodology of cytokines*. Beijing : People's Health Publishing House, 1999, p.141
- [23] ZENG Q R(曾庆平), YANG R Y(杨瑞仪), FENG L I(冯丽玲) *et al.* Homo sapiens beta-chemokine RANTES precursor, mRNA, complete cds, GenBank AF266753, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [24] Giddings G Allison G, Brook D *et al.* Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nature Biotechnology*. 2000, **18** :1151 - 1157
- [25] LIU D(刘涤), HU Z R(胡之璧). Application prospects of biotechnology on production of traditional medicine. *Progress in Biotechnology*

- [26] LIU C Y(刘传银), TIAN Y C(田颖川), SHEN C Q(沈传光) *et al.* Cloning of ACC synthase cDNA and its inhibition of fruit ripening by its antisense RNA in transgenic tomato plants. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1998, **14** :139 - 146
- [27] YAN Y C(闫艳春), QIAO C L(乔传令), ZHANG Y(张媛). Cloning and expression of the detoxifying gene in Cyanobacteria. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16** :42 - 45
- [28] LU R F(鲁瑞芳), LI W M(李为民), WANG H Y(王海云) *et al.* The primary role of central region of HC - Pro of potato Y potyvirus in synergism of plant viruses. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17** :264 - 268
- [29] ZHAO C Y(赵存友), YUAN Z Q(袁正强), QIN H M(秦红敏) *et al.* Studies on transgenic tobacco plants expressing two kinds of insect resistant genes. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2001, **17** :273 - 277
- [30] WANG J X(王竟雪), SUN Y(孙毅). Progress of plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Biotechnology Bulletin*(生物技术通报), 1999, **1** :7 - 13
- [31] ZHOU Y(周岩), TIAN Y C(田颖川), WU H(吴标) *et al.* Inhibition effect of transgenic tobacco plants expressing snowdrop lectin on the population development of *Myzus persicae*. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1998, **14** :13 - 19
- [32] WANG G L(王关林), FANG H Y(方宏筠). Plant genetic engineering : principles and techniques. Beijing : Science Press , 1998 , pp.453

Establishment of Stably Expressed Human RANTES Gene in *Prunella vulgaris* Cell Clone

ZENG Qing-Ping* FENG Li-Ling YANG Rui-Yi CHEN Zhu-Hua

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

Abstract To express interesting human genes in herbal cells for boosting their specific pharmacological activities , RANTES gene cloned from human peripheral blood lymphocyte(PBL) mRNA was introduced into *A. tumefaciens* strain LBA4404 harboring pAL4404 plasmid via tumor-inducing(Ti) plasmid-derived intermediate expression vector pROKII. *In vitro* cultured *P. vulgaris* cells were transformed by leaf-disk cocultivation procedure. Integration of RANTES gene in the genome of transformed cells was confirmed by Southern blotting , and expression of RANTES gene in transformed cells was analyzed by RT-PCR amplification , Western blotting and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The peroxidase activity of PBL was utilized as a detection index of cellular chemotropism induction by recombinant RANTES. The results have shown the RANTES gene was integrated in transgenic *P. vulgaris* cells , and RANTES gene-stably expressed cell clones were available , which could pave the way to obtain transgenic *P. vulgaris* plants demonstrating specific pharmacological activities.

Key words RANTES , transgenic *P. vulgaris* plants , gene expression , chemotropic activity

Received : 09-16-2002

This work was supported by Grant from National Science Foundation of China(No.39870725).

* Corresponding author. Tel : 86-20-36585422-2422 ; Fax : 86-20-86373516 ; E-mail : tmibio@gzhtcm.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>