

转哺乳动物 *cyp2e1* 基因烟草植株再生及其分析

李佩菡, 向太和, 谢军, 冯婷, 陆文怡

杭州师范大学生命与环境科学学院, 浙江 杭州 310036

李佩菡, 向太和, 谢军, 等. 转哺乳动物 *cyp2e1* 基因烟草植株再生及其分析. 生物工程学报, 2012, 28(10): 1195–1204.
Li PH, Xiang TH, Xie J, et al. Transgenic plant regeneration of tobacco (*Nicotiana tabacum*) harboring mammalian *cyp2e1* gene. Chin J Biotech, 2012, 28(10): 1195–1204.

摘 要: 哺乳动物肝细胞中 *cyp2e1* 基因所编码的蛋白 CYP2E1 在代谢异型有机物方面起着重要作用, 转 *cyp2e1* 基因植物可以代谢多种小分子有机污染物; 但 *cyp2e1* 基因在植物体内的表达调控和代谢机理尚不完全清楚。文中将含有 *cyp2e1* 基因的质粒 pSLD50-6 和对照 *gus* 基因的质粒 pKH200 转入根癌农杆菌 GV3101, 利用根癌农杆菌转基因技术将 *cyp2e1* 基因和对照 *gus* 基因成功转入烟草, 分别获得了转 *cyp2e1* 和 *gus* 基因再生植株。选取 PCR 鉴定的再生植株进行荧光定量 PCR (qRT-PCR) 分析, 结果表明: 在转录水平上, 转 *cyp2e1* 基因烟草中, 乙醇处理后 *cyp2e1* 基因的表达明显下降, 苯和甲苯处理后 *cyp2e1* 基因的表达量稍有下降; 而丙酮、甲醛处理和缺氧条件下 *cyp2e1* 基因的表达有不同程度的升高。此外, 苯处理后, 转 *cyp2e1* 基因烟草中 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5 酶的基因活性显著提高, 说明烟草中 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5 酶与 CYP2E1 酶的解毒过程有关, 可能起到哺乳动物体内的 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5 的功能, 参与 CYP2E1 酶催化过程的电子传递链。

关键词: 烟草, *cyp2e1* 基因, NADPH-P450 酶, 细胞色素 b5, 表达

Transgenic plant regeneration of tobacco (*Nicotiana tabacum*) harboring mammalian *cyp2e1* gene

Peihan Li, Taihe Xiang, Jun Xie, Ting Feng, and Wenyi Lu

College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, Zhejiang, China

Abstract: CYP2E1 enzyme encoded by *cyp2e1* gene plays an important role in metabolism of heterogeneous organics in

Received: January 16, 2012; **Accepted:** September 4, 2012

Supported by: Hangzhou Science and Technology Development Plan (No. 20091133B07).

Corresponding author: Taihe Xiang. Tel/Fax: +86-571-28865327; E-mail: xthcn@163.com

杭州市科技发展计划项目 (No. 20091133B07) 资助。

mammalian liver cells. The transgenic plant with *cyp2e1* can metabolize various low molecular weight organic pollutants. However, it is unclear the mechanism of expression control of *cyp2e1* in transgenic plant. In this study, plasmid pSLD50-6 with *cyp2e1* and pKH200 with *gus* as control were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 separately. Then, the *cyp2e1* or *gus* genes were transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum*) and the transgenic plants were regenerated via *Agrobacterium tumefaciens* method. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was used to analyze the *cyp2e1* gene expression. The expression of *cyp2e1* in transgenic tobacco with *cyp2e1* decreased obviously treated by ethyl alcohol and reduced slightly by benzene and toluene, while it enhanced by acetone, formaldehyde and oxygen deficit in different levels. In addition, the gene expression of NADPH-P450 oxidoreductase and cytochrome b5 enzyme in the transgenic tobacco with *cyp2e1* were increased significantly treated by benzene, which showed that NADPH-P450 oxidoreductase and cytochrome b5 enzyme in transgenic tobacco have relation with CYP2E1 detoxication process. It suggested that the NADPH-P450 oxidoreductase and cytochrome b5 enzyme in transgenic plant formed the requirement in mammalian and participated in the electron transport chain of CYP2E1 enzyme catalytic process.

Keywords: tobacco (*Nicotiana tabacum*), *cyp2e1* gene, NADPH-P450 oxidoreductase, cytochrome b5, expression

细胞色素 P450 是一类与重金属结合的血红蛋白, 在代谢异型有机物方面起着重要作用; 其中, CYP2E1 作为 P450 酶家族中的成员之一, 主要分布在哺乳动物肝脏中, 具有非常重要的解毒功能^[1-3]。美国华盛顿大学 Doty 课题组先后将细胞色素 P450 2E1 基因 (*cyp2e1*) 转入到烟草 *Nicotiana tabacum*、颠茄 *Atropa belladonna* 和杨树 *Hybrid poplar* 中, 转基因烟草和杨树再生植株以及颠茄的毛状根能够高效分解苯、甲苯、三氯乙烯、三氯甲烷、四氯化碳和二氯乙烯等有机污染物^[4-8]。Zhang 等利用发根农杆菌转基因法, 将 *cyp2e1* 基因转入花卉植物矮牵牛 *Petunia hybrida*, 转基因矮牵牛提高了对苯、甲苯的吸收能力, 并提高了对甲醛的抗性^[9]。

在哺乳动物体内, 影响 CYP2E1 酶的因素有很多, 其中它的诱导剂有乙醇、异丙醇、丙酮、乙醚、苯、甲苯、甲醛、吡啶和异烟肼等; 此外, 缺氧等环境因素诱导 *cyp2e1* 基因的表达, 肥胖和患糖尿病时 CYP2E1 的活性增高^[10-14]。而且,

从代谢途径看, CYP2E1 酶对异型有机物的代谢过程中, 需要 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 (Cytochrome) b5 作为电子传递参与其中^[15-17]; 但 *cyp2e1* 基因在植物体内的表达调控和代谢机理尚不完全清楚^[4,6]。

本研究利用根癌农杆菌转基因技术将 *cyp2e1* 基因转入烟草, 分析了外源基因 *cyp2e1* 在转基因再生植物后代中的分离情况, 并分析了不同环境因子对转基因植株的表达影响以及转基因烟草中植物内源性 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5 的表达情况。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草品种为黄苗榆。含有哺乳动物兔肝细胞 *cyp2e1* 基因的质粒 pSLD50-6 和含 *gus* 基因的质粒 pKH200 由华盛顿大学 Doty 博士友情惠赠。*cyp2e1* 基因和 *gus* 基因均由 35S 启动子驱动, 质粒 pSLD50-6 和 pKH200 都含有 Kan (卡那霉素) 抗性基因^[6]。

1.2 根癌农杆菌介导的烟草遗传转化

烟草种子放入 1.5 mL 离心管中, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次后, 再用 0.1% 的升汞灭菌 5 min, 无菌水冲洗 3 次, 最后用无菌的滤纸吸干种子表面水分, 接种到 MS 固体培养基上。取萌发生长 30 d 后的无菌苗叶片作为转基因的受体。

通过冻融法将质粒 pSLD50-6 和 pKH200 分别转入根癌农杆菌 GV3101。参考王琳和向太和的方法^[18], 稍作改进, 对烟草无菌苗叶片进行侵染转化, 具体步骤是: 1) 含 *cyp2e1* 的质粒 pSLD50-6 和含 *gus* 基因的质粒 pKH200 的根癌农杆菌分别划线培养在 LB+Kan 50 mg/L+Rif (利福平) 40 mg/L 的培养基上, 28 °C 培养。挑取单菌落过夜培养于 LB+Kan 50 mg/L+Rif 40 mg/L 的液体培养基中, 28 °C、200~250 r/min 振荡培养。当农杆菌生长密度 OD_{600} 约为 0.5 时, 取 1 mL 菌液放入无菌的 1.5 mL 离心管中, 离心, 除上清, 用 MS 液体培养基悬浮菌体并稀释至 OD_{600} 约为 0.1, 用作侵染液。2) 将烟草无菌苗叶片切成约 1 cm² 的小块, 用无菌的手术刀划出伤口, 转入 MS+0.5 mg/L 6-BA 的培养基上预培养 2~3 d。3) 将预培养的烟草叶片放在已制备好的农杆菌侵染液中, 室温下 80~100 r/min 摇床振荡 8 min。4) 用无菌的滤纸把烟草叶片表面的农杆菌菌液吸干, 转入 MS+0.5 mg/L 6-BA 培养基上, 共培养 2~3 d。5) 共培养后的叶片放在 MS+0.5 mg/L 6-BA +500 mg/L Cef (头孢霉素) 的液体培养基中振荡培养 30 min, 80~100 r/min; 随后, 用无菌的滤纸吸干液体, 将叶片转入 MS+0.5 mg/L 6-BA +80 mg/L Kan+500 mg/L Cef 的筛选培养基上; 分化出的芽转移到不含任何植物激素的

MS(0)培养基上生根。6) 再生植株生长到 5 cm 以上后, 打开培养瓶盖炼苗 3 d, 移栽装有培养土 (培养土的成分是草木灰: 蛭石: 珍珠岩, V/V=6: 3: 1) 的盆钵中, 放入杭州师范大学人工气候室中生长。利用同样的方法获得对照烟草转 *gus* 基因的再生植株。

1.3 转基因烟草再生植株的鉴定分析

1.3.1 转基因烟草再生植株 PCR 分析

利用上海 Sangon 公司的植物基因组提取试剂盒提取烟草的基因组 DNA。根据 *cyp2e1* 基因 (GenBank Accession No. M15061) 和 *gus* 基因 (GenBank Accession No. AF354045) 序列, 分别设计扩增 *cyp2e1* 基因和 *gus* 基因的引物: *cyp2e1*-P1: 5'-TGAAGGGTGTGCAGCCGATGA CAA-3', *cyp2e1*-P2: 5'-CATCGGGAATCTTCTCC AGTTGG-3' 和 *gus*-P1: 5'-CTGCGACGCTCAC ACCGAT-3', *gus*-P2: 5'-TCACCGAAGTTCATG CCAGTCCAG-3', 引物由上海 Sangon 公司合成。PCR 扩增反应体积为 35 μ L, 其中包括 2 μ L 0.1 mmol/L 的 dNTPs (德国 Roche 公司), 2 μ L 10 pmol/L 的 PCR 引物, 2 U *Taq* DNA 聚合酶 (美国 Promega 公司) 和约 50 ng 基因组 DNA。用美国 ABI 公司 PE9700 型 DNA 扩增仪进行扩增反应。PCR 反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min, 随后于 4 °C 保存备用。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳 1.5 h (5 V/cm), 溴化乙锭 (EtBr) 染色, 用美国 Bio/Rad 凝胶成像系统观察并拍照记录。

1.3.2 转基因烟草再生植株 *cyp2e1* 基因的荧光定量 PCR 分析

用 RNA 提取试剂盒 (日本 TaKaRa 公司) 提

取转 *cyp2e1* 和 *gus* 基因植株和对照非转基因植株叶片 mRNA, 用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TaKaRa 公司) 进行 RT-PCR 扩增。根据烟草 *actin* 基因序列 (GenBank Accession No. GQ339768) 设计引物 *actin*-F: 5'-CACGCCA TTCTTCGTTTGG-3', *actin*-R: 5'-GGACAATT TCCCGTTCAGCAG-3', 预期扩增长度为 112 bp, 扩增结果作为内参。根据 *cyp2e1* 基因序列 (GenBank Accession No. M15061) 设计引物 *cyp2e1*-F: 5'-ATTCCCAAGTCCTTTGGCAGGA-3' 和 *cyp2e1*-R: 5'-TGTGGTTCAACAGCATCTCC C-3', 预期扩增长度为 124 bp。用 ROCHE LIGHTCYCLER 480 荧光定量 PCR 仪进行 *cyp2e1* 基因的定量扩增分析。荧光定量 PCR 条件是: 起始 95 °C 2 min; 随后 95 °C 30 s、59 °C 30 s、72 °C 20 s 进行 40 个循环; 结束后在 4 °C 保存。参考 Livak 和 Schmittgen 的方法计算 *cyp2e1* 基因相对表达量^[19], 即: 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_t}$, 其中 C_t 为样品管的荧光信号达到某一固定阈值的 PCR 反应循环数。

1.3.3 Southern blotting

同 1.3.1 中的方法大量提取转基因烟草植株基因组 DNA, 选用 *EcoR* I 核酸内切酶对基因组 DNA 进行酶切后转膜。从质粒 pSLD50-6 中扩增 *cyp2e1* 基因的片段, 扩增出的产物用上海 Sangon 公司 DNA 分离试剂盒进行纯化, 再用 Roche 公司高效地高辛 DNA 标记试剂盒 (DIG high prime) 制备探针, 利用地高辛发光检测试剂盒 (DIG luminescent detection kit) 进行杂交信号的检测, 操作按照试剂盒说明书进行。

1.3.4 Western blotting

利用 Roche 公司蛋白抽提试剂盒抽提总蛋

白质。取 50 μ L 按照上海博彩生物科技有限公司 BCA 蛋白定量分析试剂盒说明书操作, 进行蛋白定量。配制 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶。根据顺序加样, 每个样品上样量为 10 μ g 抽提蛋白, 装入电泳槽中, 打开电源, 恒压 100 V 开始电泳, 运行 20 min; 然后将电压调至 180 V, 运行 60 min, 取出胶进行转膜。

恒压 30 V 开始转膜, 运行 16 h, 转膜结束后将膜放在 5% 脱脂奶粉中封闭, 放入反应盒中备用。美国 BD Genetest 公司的 CYP2E1 酶鼠抗体用 5% 脱脂奶粉稀释 (1 : 1 000), 加入反应盒中, 室温缓摇 2 h。用 PBST 洗去未结合的一抗, 每次 10 min, 洗 4 次。二抗 (HRP) 用 5% 脱脂奶粉稀释 (1 : 1 000), 加入反应盒中, 室温缓摇 1 h。用 PBST 洗去未结合的二抗, 每次 10 min, 洗 4 次。在离心管中按照每 1 mL ECL-PLUS 显色液, 加入膜上 (有蛋白的一面), 反应 5 min, X-film 曝光显色。

1.3.5 *cyp2e1* 基因在转基因烟草再生植株后代中的分离分析

再生植株自花授粉所结种子播于钵钵中, 在人工气候室里种子萌发生长至 2 片真叶以上, 取小植株 (T1 代) 叶片同 1.3.1 的方法, 提取基因组 DNA 和进行 PCR 扩增。

1.4 不同环境条件下转基因烟草 *cyp2e1* 基因的表达分析

在 20 mL 的挥发性有机物分析瓶 (Volatile organic analysis vial, 简称 VOA, 美国 Aglient 公司) 内盛放 5 mL MS 固体培养基, 培养基中分别含有 8 μ g/mL 乙醇、80 μ g/mL 丙酮、10 μ g/mL 苯、10 μ g/mL 甲苯、50 μ g/mL 甲醛。乙醇等分别在高温高压灭菌的培养基冷却到 50 °C 左右加

入。剪取带 2 片叶的转基因苗, 接入 VOA 瓶中, 培养 7 d 后, 取叶片提取 mRNA。同时, 培养在 MS 固体培养基上带 2 片叶的苗加入无菌水浸没过植株顶端进行缺氧处理 (水淹), 12 h 后, 提取叶片 mRNA。荧光定量 PCR 检测 *cyp2e1* 基因的表达, 荧光定量 PCR 方法同 1.3.2。

1.5 转基因烟草中 NADPH-P450 氧化还原酶基因和细胞色素 b5 基因的表达分析

根据烟草 NADPH-P450 氧化还原酶基因 (GenBank Accession No. AB004307) 和 cytochrome b5 基因 (GenBank Accession No. X71441) 序列, 设计荧光定量 PCR 扩增引物: NADPH-F: 5'-CCCAAATGCCACACATCA-3', NADPH-R: 5'-CCCAAGGAAAAGCCAAGCA-3' 和 b5-F: 5'-CTCCTCCCAATCAGCCTCATT-3', b5-R: 5'-GCCAAAAGCAACACCCAAAA-3', 预期分别扩增出 127 bp 和 124 bp 长度的片段。同 1.3.2 的方法, 以 *actin* 基因作为内参, 进行荧光定量 PCR 分析。

在超净工作台上切取称量相同质量 (1g) 的转 *cyp2e1* 基因无菌苗叶片、对照转 *gus* 基因和非转基因烟草植株的叶片, 放入含有 MS 培养基的 VOA 瓶中, 在 VOA 瓶中用微量加样器加入苯, 使培养基中苯终浓度达 1 $\mu\text{g/mL}$ 苯, 24 h 后提取经过苯处理和未经过处理的叶片 mRNA, 进行 NADPH-P450 氧化还原酶基因和细胞色素 b5 基因荧光定量 PCR 分析。

2 结果

2.1 转 *cyp2e1* 基因烟草植株再生

烟草无菌苗离体叶片在根癌农杆菌侵染

30 d 左右在筛选培养基上分化出单个芽或芽丛 (图 1A)。待再生芽长至 2 cm 以上切下转到 MS(0) 培养基上, 在 7 d 左右即能生根 (图 1B)。经过炼苗, 移栽到含有培养土的盆钵中 (图 1C), 能正常生长 (图 1D), 移栽 100 d 左右能开花结实 (图 1E)。

2.2 转基因烟草再生植株的 PCR 鉴定

利用 *cyp2e1* 基因引物 *cyp2e1*-P1 和 *cyp2e1*-P2 对获得再生植株进行 PCR 扩增。在获得的 59 株再生植株中, 其中 35 株扩增出预期大小 410 bp 的条带 (图 2), 初步确定 *cyp2e1* 基因成功转入烟草植株。

2.3 转 *cyp2e1* 基因烟草的荧光定量 PCR 分析

随机选取 PCR 检测阳性的 4 个株系 (TL01、TL03、TL15 和 TL26)、1 株转 *gus* 基因烟草植株、1 株野生型烟草进行目的基因 *cyp2e1* 实时荧光定量 PCR 分析, 结果显示转 *gus* 基因植株和野生型植株均没有检测到 *cyp2e1* 基因的表达, 而在转 *cyp2e1* 基因的 4 个株系中, 外源 *cyp2e1* 基因均有不同程度的表达 (图 3)。

2.4 Southern blotting 和 Western blotting 分析

Southern blotting 结果显示, 转 *cyp2e1* 烟草 4 个株系 TL01、TL03、TL15 和 TL26 分别杂交出 2 个或 2 个以上的条带、对照野生型烟草和转 *gus* 基因烟草植株无杂交条带, 说明外源基因以多拷贝的形式存在于转基因植株的基因组中 (图 4)。Western blotting 结果显示, 4 个株系 TL01、TL03、TL15 和 TL26 均杂交出预期大小 56.2 kDa 条带 (图 5), 表明转入的外源基因在烟草中实现了正常编码表达。

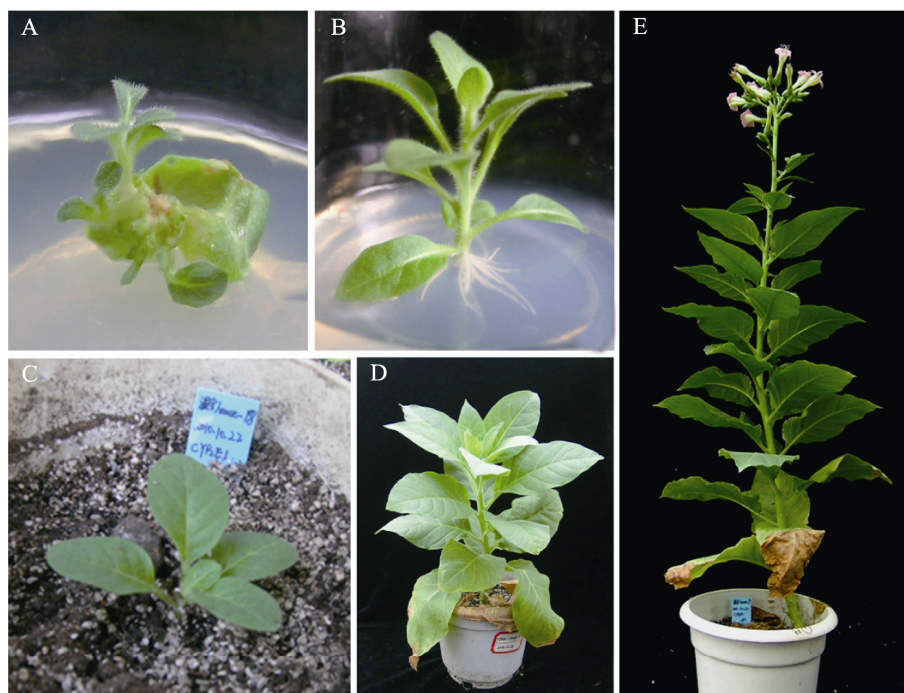


图 1 转 *cyp2e1* 基因烟草植株再生过程

Fig. 1 The transgenic plant with *cyp2e1* gene regeneration. (A) Buds differentiated from leaf. (B) Plantlet regeneration. (C) Plant transplanted in soil. (D) Plant growth normally in soil. (E) Plant flowering normally.

2.5 *cyp2e1* 基因在转基因后代中的分离情况分析

经过多重鉴定的 4 个转基因株系 TL01、TL03、TL15 和 TL26 均能正常开花, 其中 TL01、TL03 和 TL26 自花正常结实, 而 TL15 未能获得种子。经过 PCR 检测, *cyp2e1* 基因在 TL01、TL03 和 TL26 3 个株系后代中出现了分离, 其分离比分别是 51 : 9 (17 : 3)、48 : 12 (4 : 1) 和 34 : 26 (17 : 13), 均不符合 3 : 1 的比例, 这可能与转基因植株基因组中外源基因是多拷贝以及外源基因插入的位置效应有关。已有不少报道指出在转基因植物后代中转入的外源基因异常分离的情况经常出现^[20]。

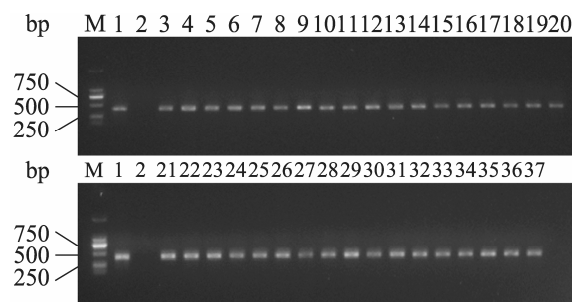


图 2 利用 *cyp2e1* 基因引物对烟草再生植株进行基因组 DNA PCR 扩增的结果

Fig. 2 PCR amplification of transgenic plant genomic DNA with primers from *cyp2e1* gene. M: DSTM 2000 DNA marker (Dongsheng Biotechnology Co.); 1: pSLD50-6 plasmid; 2: non-transgenic plant (wild-type); 3-37: transgenic plants with *cyp2e1* gene.

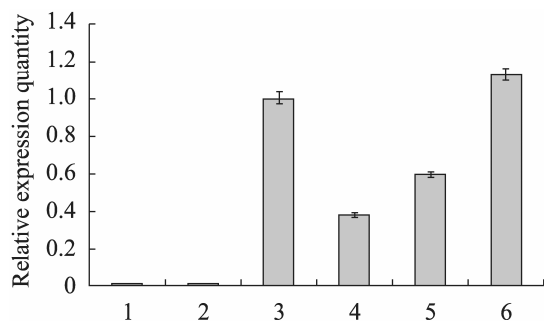


图3 转 *cyp2e1* 基因烟草再生植株荧光定量 PCR 分析
Fig. 3 Real-time quantitative PCR analysis of *cyp2e1* gene expression in transgenic plants. 1: non-transgenic plant (wild-type); 2: the transgenic plants with *gus* gene; 3–6: the *cyp2e1* transgenic plant individuals of TL01, TL03, TL15 and TL26.

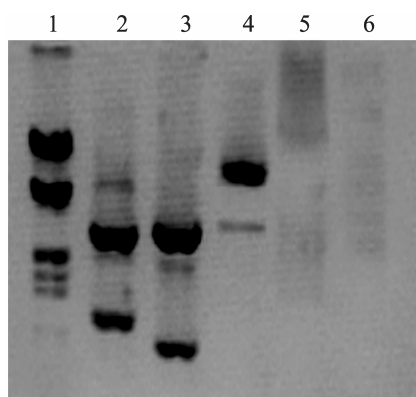


图4 Southern blotting 分析转 *cyp2e1* 烟草植株
Fig. 4 Southern blotting analysis of *cyp2e1* transgenic plants. 1–4: the *cyp2e1* transgenic plant individuals of TL01, TL03, TL15 and TL26; 5: non-transgenic plant (wild-type); 6: the *gus* transgenic plants.

2.6 不同环境因子条件下 *cyp2e1* 基因的表达

选取 *cyp2e1* 基因表达量较高和较低的株系 TL01 和 TL03 放在分别含苯、甲苯、乙醇和丙酮的培养基中培养 7 d、浸没水中 12 h 进行缺氧处理后,再对其进行荧光定量 PCR 分析。两个株系的结果相一致,与对照相比,乙醇处理后 *cyp2e1* 基因的表达明显下降,苯和甲苯处理后 *cyp2e1* 基因的表达量稍有下降;而丙酮、甲醛处

理和缺氧条件下 *cyp2e1* 基因的表达有不同程度的升高 (图 6)。

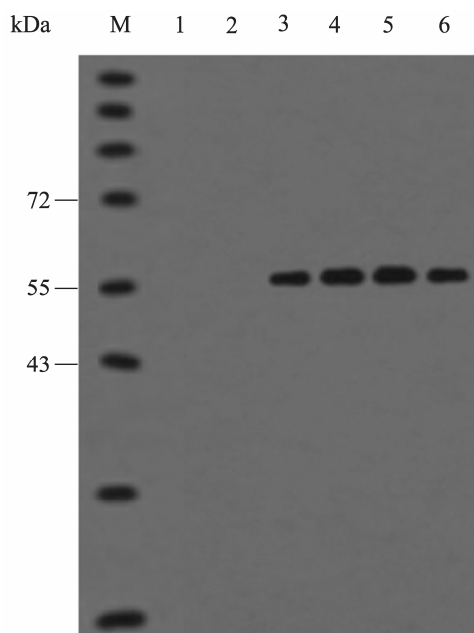


图5 Western blotting 分析转 *cyp2e1* 烟草植株
Fig. 5 Western blotting analysis of *cyp2e1* transgenic plants. M: protein marker (MBI Co.); 1: non-transgenic plant (wild-type); 2: the *gus* transgenic plants; 3–6: the *cyp2e1* transgenic plant individuals of TL01, TL03, TL15 and TL26.

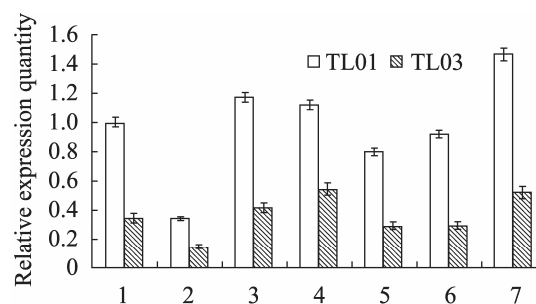


图6 不同环境因子条件下转基因植株 *cyp2e1* 基因的表达分析

Fig. 6 Expression of *cyp2e1* gene of transgenic plant treated with different factors. 1: non-treatment; 2: treated with ethyl alcohol; 3: treated with acetone; 4: treated with formaldehyde; 5: treated with benzene; 6: treated with toluene; 7: treated with oxygen deficit.

2.7 转 *cyp2e1* 基因烟草 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5 的表达分析

荧光定量 PCR 分析结果显示,烟草内源性 NADPH-P450 氧化还原酶基因和细胞色素 b5 基因在野生型烟草、转 *gus* 烟草和转 *cyp2e1* 烟草中

表达量没有明显差异。经过苯处理后,转 *cyp2e1* 烟草中 NADPH-P450 氧化还原酶基因的表达显著升高,与野生型和转 *gus* 烟草相比提高达 4 倍以上;细胞色素 b5 基因表达量比野生型和转 *gus* 烟草升高 2 倍以上 (图 7)。

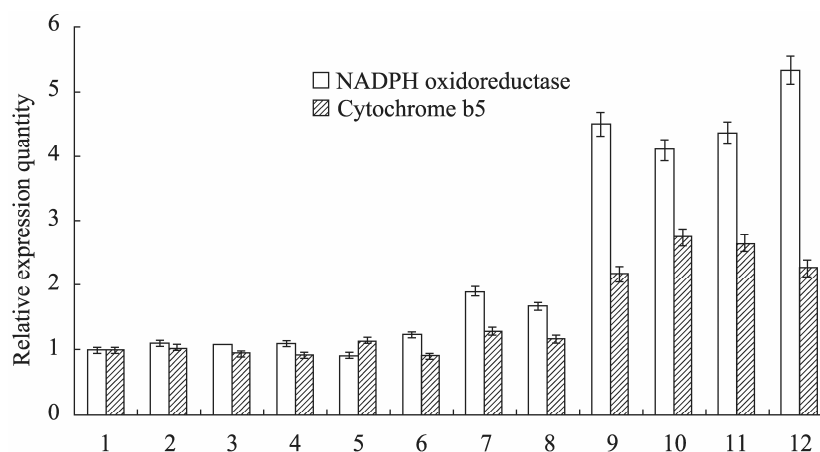


图 7 转 *cyp2e1* 基因烟草中 NADPH-P450 氧化还原酶基因和细胞色素 b5 基因表达情况

Fig. 7 Expression of NADPH-P450 oxidoreductase gene and cytochrome b5 gene in *cyp2e1* transgenic plant. 1: non-transgenic plant (wild-type); 2: the *gus* transgenic plant; 3: the transgenic plant TL01; 4: the transgenic plant TL03; 5: the transgenic plant TL15; 6: the transgenic plant TL26; 7: non-transgenic plants (wild-type) treated with benzene; 8: the *gus* transgenic plants treated with benzene; 9: the transgenic plant TL01 treated with benzene; 10: the transgenic plant TL03 treated with benzene; 11: the transgenic plant TL15 treated with benzene; 12: the transgenic plant TL26 treated with benzene.

3 讨论

CYP2E1 作为 P450 酶家族中的成员之一,存在于哺乳动物肝细胞中,对许多小分子有机化合物有分解能力^[1-3]。*cyp2e1* 基因在转基因植物体内表现出与动物体内相似的解毒功能,转 *cyp2e1* 基因烟草、颠茄、杨树和矮牵牛等提高了对苯、甲苯、氯仿 (三氯甲烷)、四氯化碳、三氯乙烯、二溴化乙烯、氯乙烯、溴二氯甲烷等有机小分子污染物的吸收分解能力^[4-8];并提高了对

甲醛的抗性^[9],在植物环境修复中具有应用前景。此外,细胞色素 P450 基因家族的其他系列基因,如 *cyp1a1*、*cyp2b6* 和 *cyp2c19* 转入水稻后,提高了水稻对除草剂异丙甲草胺、莠去津的耐受能力,并且可以降低环境中的除草剂浓度^[21]。

在哺乳动物包括人类中, P450 基因的表达有多种调控方式,分为转录水平、加工和 mRNA 稳定以及翻译和酶稳定等调控类型。其中, *cyp2e1* 的表达受乙醇、异丙醇、丙酮、乙醚、苯、甲苯、甲醛、吡啶和异烟肼等小分子有机物的诱

导; 并受缺氧、禁食、多尿症、肥胖和糖尿病等生理状态的诱导^[10-14]。

本研究获得的转 *cyp2e1* 基因烟草, 荧光定量 PCR 分析显示, 在 mRNA 转录水平上, 乙醇处理后 *cyp2e1* 基因的表达明显下降; 苯和甲苯处理后 *cyp2e1* 基因的表达量稍有下降; 而丙酮、甲醛处理和缺氧条件下 *cyp2e1* 基因的表达有不同程度的升高。其中, 丙酮、甲醛和缺氧环境对 *cyp2e1* 基因表达的影响与哺乳动物相似, 而乙醇、苯和甲苯对 *cyp2e1* 表达的影响与哺乳动物不同, 即: 在植物体内, 外界因子对 *cyp2e1* 的调控与哺乳动物体内不完全相同, 这可能与植物和哺乳动物体内存在不同的调控系统有关。由于乙醇、丙酮是植物体内糖和脂肪代谢的中间产物, 缺氧是植物胁迫环境的种类之一, 苯、甲苯和甲醛是常见的环境污染物, 因此, 本研究结果可为调控和提高 *cyp2e1* 基因在转基因植物中的表达提供参考。

另外, 在哺乳动物中, CYP2E1 酶的催化过程需要电子传递链中 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5 的互作^[15-17]。在转 *cyp2e1* 基因植物中, 并没有同时转入哺乳动物体内的 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5 基因, 但在植物体内 CYP2E1 酶同样具有分解小分子污染物的功能, 这一直是个很不明确的问题^[4,6]。本研究结果显示, 苯处理后, 转 *cyp2e1* 基因烟草 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5 酶的基因活性显著提高, 这说明烟草中内源性的 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5 酶与 CYP2E1 酶的解毒过程有关, 可能起到哺乳动物体内的 NADPH-P450 氧化还原酶和细胞色素 b5

的功能, 参与 CYP2E1 酶催化过程的电子传递链。

REFERENCES

- [1] Lee SST, Buters JTM, Pineau T, et al. Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. *J Biol Chem*, 1996, 271(20): 12063–12067.
- [2] Lieber CS. Cytochrome P-4502E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev*, 1997, 77(2): 517–544.
- [3] Gonzalez FJ. The 2006 Bernard B. Brodie Award Lecture. CYP2E1. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(1): 1–8.
- [4] Doty SL, Shang QT, Wilson AM, et al. Enhanced metabolism of halogenated hydrocarbons in transgenic plants containing mammalian cytochrome P450 2E1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6287–6291.
- [5] Banerjee S, Shang TQ, Wilson AM, et al. Expression of functional mammalian P450 2E1 in hairy root cultures. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 77(40): 462–466.
- [6] Doty SL, James CA, Moore AL, et al. Enhanced phytoremediation of volatile environmental pollutants with transgenic trees. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(43): 16816–16821.
- [7] James CA, Xin G, Doty SL, et al. Degradation of low molecular weight volatile organic compounds by plants genetically modified with mammalian cytochrome P450 2E1. *Environ Sci Technol*, 2008, 42(1): 289–293.
- [8] Kang JW, Wilkerson HW, Farin FM, et al. Mammalian cytochrome CYP2E1 triggered differential gene regulation in response to trichloroethylene (TCE) in a transgenic poplar. *Funct Integr Genomics*, 2010, 10(3): 417–424.
- [9] Zhang DX, Xiang TH, Li PH, et al. Transgenic plants of *Petunia hybrida* harboring the CYP2E1 gene efficiently remove benzene and toluene pollutants and improve resistance to formaldehyde. *Genet Mol Biol*, 2011, 34(4): 634–639.
- [10] Yang CS, Yoo JS, Ishizaki H, et al. Cytochrome

- P450IIE1: roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metab Rev*, 1990, 22(2/3): 147–159.
- [11] Ding X, Peng HM, Pernecky SJ, et al. Induction of P-450 cytochromes 2E2, 1A1, and 1A2 by imidazole in neonatal rabbits. *Drug Metab Dispos*, 1992, 20(6): 792–796.
- [12] Hu Y, Ingelman-Sundberg M, Lindros KO. Induction mechanisms of cytochrome P450 2E1 in liver: interplay between ethanol treatment and starvation. *Biochem Pharmacol*, 1995, 50(2): 155–161.
- [13] Carpenter SP, Lasker JM, Raucy JL. Expression, induction, and catalytic activity of the ethanol-inducible cytochrome P450 (CYP2E1) in human fetal liver and hepatocytes. *Mol Pharmacol*, 1996, 49(2): 260–268.
- [14] Peng HM, Coon MJ. Regulation of rabbit cytochrome P450 2E1 expression in HepG2 cells by insulin and thyroid hormone. *Mol Pharmacol*, 1998, 54(4): 740–747.
- [15] Yamazaki H, Nakano M, Gillam EM, et al. Requirements for cytochrome b5 in the oxidation of 7-ethoxycoumarin, chlorzoxazone, aniline, and N-nitrosodimethylamine by recombinant cytochrome P450 2E1 and by human liver microsomes. *Biochem Pharmacol*, 1996, 52(2): 301–309.
- [16] Shiota N, Nagasawa A, Sakaki T, et al. Herbicide-resistant tobacco plants expressing the fused enzyme between rat cytochrome P4501A1 (CYP1A1) and yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *Plant Physiol*, 1994, 106(1): 17–23.
- [17] Shiota N, Kodama S, Inui H, et al. Expression of human cytochromes P450 1A1 and P450 1A2 as fused enzymes with yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase in transgenic tobacco plants. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(10): 2025–2033.
- [18] Wang L, Xiang TH. Cloning of flavonoid-3', 5'-hydroxylase gene (F3', 5'H) of *Petunia hybrida* and construction of a novel vector expression F3', 5'H driven by flower-specific promoter. *J Trop Subtrop Bot*, 2009, 17(4): 358–364.
王琳, 向太和. 矮牵牛 F3', 5'H 全长 cDNA 的克隆及花特异启动子介导表达载体的构建. *热带亚热带植物学报*, 2009, 17(4): 358–364.
- [19] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 2001, 25(4): 402–408.
- [20] Dong LY, Zhang J, Wang PW, et al. The inheritance of foreign genes in the progenies of transgenic plants and research progress. *Mol Plant Breed (Online)*, 2011, 9(18): 1127–1133.
董灵艳, 张君, 王丕武, 等. 外源基因在转基因植物后代中的遗传规律及研究进展. *分子植物育种 (网络版)*, 2011, 9(18): 1127–1133.
- [21] Kawahigashi H, Hirose S, Ohkawa H, et al. Phytoremediation of the herbicides atrazine and metolachlor by transgenic rice plants expressing human CYP1A1, CYP2B6, and CYP2C19. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(8): 2985–2991.