

黄花蒿悬浮培养细胞系的建立及遗传转化

龙炎杏, 张学文, 罗莎, 肖楠, 赵燕*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 为建立稳定的黄花蒿悬浮细胞系, 以黄花蒿 428-A 植株的子叶、茎、腋芽和叶片为外植体, 以 MS 为基础培养基, 采用 3 因素(6-BA、NAA、2,4-D)4 水平的 $L_{16}(4^3)$ 正交试验, 优化黄花蒿愈伤组织诱导培养基, 分析不同质量浓度(0、5、10、15、20、25、30 mg/L)潮霉素对黄花蒿悬浮细胞生长的影响, 比较羧苄青霉素(0、100、150、200、250、300 mg/L)对农杆菌的抑制效果, 并运用农杆菌介导法对黄花蒿悬浮细胞进行 *GUS* 报告基因及色氨酸单加氧酶 *iaaM* 基因的遗传转化。结果表明: 黄花蒿叶片愈伤诱导率较高, 叶片愈伤组织较优培养基为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 出愈率可达 99.33%; 潮霉素最适筛选质量浓度为 30 mg/L, 羧苄青霉素最适抑菌质量浓度为 200 mg/L; 转基因抗性愈伤 *GUS* 组织化学染色及 PCR 鉴定结果表明, 外源基因 *iaaM* 已导入并整合至黄花蒿基因组中。

关 键 词: 黄花蒿; 6-苄基氨基腺嘌呤; 萘乙酸; 二氯苄氧乙酸; 悬浮细胞; 农杆菌介导; 遗传转化

中图分类号: Q949.783.5; Q943

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2018)06-0607-06

Establishment of *Artemisia annua* L. suspension cultured cell lines and its genetic transformation

LONG Yanxing, ZHANG Xuewen, LUO Sha, XIAO Nan, ZHAO Yan*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: To establish cultured cell lines of *Artemisia annua* L., we used its leaves and stems as explants, MS-based medium and performed three factors of 6-BA, NAA, 2,4-D mass concentration with each factor of 4 levels using $L_{16}(4^3)$ orthogonal table for orthogonal test. We also optimized different concentrations of hygromycin and carbenicillin on the growth of the suspension cells and the inhibition effect on *Agrobacterium tumefaciens* and applied *Agrobacterium*-mediated method to do genetic transformation of *GUS* reporter gene and tryptophan monooxygenase *iaaM* gene in the suspension cells. The results showed that the medium containing MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 30 mg/L hygromycin and 200 mg/L carbenicillin was optimal and the rate of callus formation is up to 99.33%. And, *GUS* histochemical staining and PCR analysis of transgenic callus showed that the exogenous gene had been introduced and integrated into the genome of *Artemisia annua* L., and the genetic transformation system of *Artemisia annua* L. suspension cells lines was successfully established.

Keywords: *Artemisia annua* L.; 6-BA; NAA; 2,4-D; cell suspension; *Agrobacterium*-mediated; genetic transformation

黄花蒿(*Artemisia annua* L.)为菊科蒿属一年生草本植物, 植株中含有的青蒿素是治疗各类疟疾药物的主要有效成分。研究表明, 青蒿素及其衍生物

在抗肿瘤^[1-3]、抗心血管疾病^[4]、抗病毒^[5-6]、免疫^[7-10]等方面有广泛的应用。

黄花蒿在中国分布较广, 但不同区域的气候条

件造成黄花蒿中青蒿素含量差异明显^[11]。利用基因工程技术获得高青蒿素含量的植株是目前选育优良黄花蒿新品系的有效途径。

植物细胞悬浮培养是植物细胞生长的微生物化,其细胞形状及细胞团个体均一,细胞代谢旺盛,分裂活跃,易于控制。目前,对黄花蒿悬浮细胞培养物的研究,大多是通过添加青蒿素合成的前体物或诱导剂以提高青蒿素含量^[12-16],鲜有关于黄花蒿悬浮细胞系遗传转化的报道。为摸索合适的黄花蒿遗传转化受体,丰富其转化方法,本研究,以黄花蒿植株叶片为外植体,通过诱导愈伤组织,建立了稳定的悬浮细胞系,并开展了相关基因的遗传转化,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

黄花蒿 428-A, 由湖南农业大学朱卫平先生惠赠。

供试根癌农杆菌 LAB4404 菌株和 Ti 质粒 pCAMBIA1301-35S::GUS、pWM101-GTpro::iaaM、pCAMBIA1301-GTpro::GUS,均由湖南农业大学生物科学技术学院细胞生物学研究室保存。

羧苄青霉素(Carb)和潮霉素(Hyg)购自罗氏公司;iaaM 基因的检测引物由华大基因合成;试验所用其他药品购自国药集团。

1.2 方法

1.2.1 黄花蒿悬浮细胞系的建立

以 MS 为基础培养基,添加 3%蔗糖和 0.7%琼脂,设置 3 因素(6-BA、NAA、2,4-D),每个因素 4 个水平:6-BA,0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L;NAA,0、0.1、0.3、0.5 mg/L;2,4-D,0、0.1、0.3、0.5 mg/L。采用 $L_{16}(4^3)$ 正交设计,运用 SPSS22.0 软件分析,从获得的 16 组植物生长调节物质组合中,筛选出适宜的诱导愈伤的培养基。

黄花蒿种子经 20% 84 消毒液消毒杀菌后平铺至 MS 固体培养基上,于(25±2)℃及 16 h 光照和 8 h 黑暗条件下培养,当种子萌发长至 5~6 片真叶时,取植株子叶、茎、腋芽、叶片作无菌苗的外植体。

另外,将黄花蒿种子播种于营养钵,当种子萌

发长至 5~6 片真叶时,取植株的子叶、茎、腋芽、叶片作实生苗的外植体。

分别切取无菌苗或经 20% 84 消毒液消毒的实生苗的子叶、茎、腋芽、叶片,接种于愈伤组织诱导培养基中,培养 1~3 周后,观察外植体脱分化情况,筛选适宜的诱导愈伤组织的外植体,第 25 天统计出愈数。

参照李弘剑等^[17]的方法,将适量深绿色或淡黄色颗粒状的黄花蒿愈伤组织置于含 100 mL MS、1.0 mg/L 6-BA 和 0.1 mg/L NAA 的液体培养基的三角瓶中,在(25±2)℃及 16 h 光照和 8 h 黑暗振荡(150 r/min)培养 15~20 d,取细胞悬浮液制作临时装片,于 Olympus BX51 型显微镜下观察黄花蒿悬浮细胞生长状况,选取直径小于 5 mm 的小细胞团及含有单细胞的悬浮液用于工程农杆菌转化。

将长势良好的黄花蒿悬浮细胞团分别接种于含 0、10、15、20、25、30 mg/L 潮霉素(Hyg)的 MS 培养基上,确定适宜的 Hyg 选择压力;用 0、100、150、200、250、300 mg/L 羧苄青霉素(Carb)MS 培养基进行选择培养,确定 Carb 的抑菌浓度。培养 4~6 周后,观察愈伤组织生长情况并统计存活率。

1.2.2 黄花蒿悬浮培养细胞系的遗传转化

将含有 GUS 报告基因与色氨酸单加氧酶 iaaM 基因(AF061780)的工程农杆菌单菌落分别接种于 5 mL YEB 液体培养基(按文献[18]配制,含利福平 50 mg/L,链霉素 50 mg/L,卡那霉素 50 mg/L)中过夜培养。取过夜培养菌液,按 1:50 的比例转接至 50 mL 含有相同浓度抗生素的 YEB 液体培养基中,继续培养至 $OD_{600\text{ nm}}$ 为 1.0。菌液离心,用 1/2 MS 液体培养基重悬菌体,将菌液分别与悬浮细胞团进行共培养转化。每皿 4 mL 的细胞悬浮液添加 200 μL 的菌悬液,对照组非转基因黄花蒿则添加相同体积的 1/2 液体培养基,避光共培养 3 d。

将共培养 3 d 的悬浮液用 MS 液体培养基清洗农杆菌,置于优化后的筛选培养基中进行培养。将转 GUS 报告基因的抗性愈伤组织进行化学染色,以同期非转基因的黄花蒿愈伤组织为对照,37℃避光处理 16 h,固定脱色后观察染色结果。

采用 CTAB 法提取转基因及非转基因黄花蒿愈

伤组织的 DNA ,利用 *iaaM* 基因特异引物(上游引物为 5'-CCTCCTGGTGGTGAACA-3', 下游引物为 5'-CCGCAGCAGACATAA TCG-3')进行 PCR 检测。PCR 程序为 :95 ℃ 预变性 5 min ;94 ℃ 变性 1 min , 58 ℃ 退火 1 min ,72 ℃ 延伸 45 s ,30 个循环 ;72 ℃ 延伸 7 min。预期扩增片段长度为 651 bp。

2 结果与分析

2.1 黄花蒿悬浮培养细胞系

2.1.1 黄花蒿愈伤组织的诱导结果

分别选取黄花蒿的子叶、茎、腋芽、叶片作为外植体诱导愈伤,在相同培养条件下,接种至第 8 天,叶片外植体开始出愈,其愈伤呈黄绿色,出愈率高,接种 11~18 d 后,腋芽、茎和子叶陆续开始出愈。观察出愈时间、愈伤质量和出愈率,发现叶片外植体为黄花蒿的最适外植体,其后依次为腋芽、茎和子叶。

将黄花蒿叶片切成 0.5 cm² 的组织块,接种至添加不同质量浓度 6-BA、NAA、2,4-D 的 MS 培养基上(表 1),约 1~3 周形成愈伤组织。通过正交试验筛选优化培养基,结果添加 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.5 mg/L 的培养基出愈率最高,达 99.33%,其他培养基的出愈率均超过 50%。诱导所得的愈伤组织,大体分为 3 种类型:I 型愈伤,分生能力强,生长速度快,结构致密,呈绿色或黄绿色,胚性细

胞含量高,是进行遗传转化的首选材料;II 型愈伤,质地疏松,呈浅黄色或淡绿色,虽然胚性细胞含量不及 I 型,但结构松脆、易分散,适合建立黄花蒿悬浮细胞系;III 型愈伤,水渍状、半透明、质地松软,由于没有胚性细胞,继代后极易褐化死亡。因此,建立黄花蒿悬浮细胞遗传转化体系以选取 I、II 型愈伤作为悬浮培养的受体材料较合适。

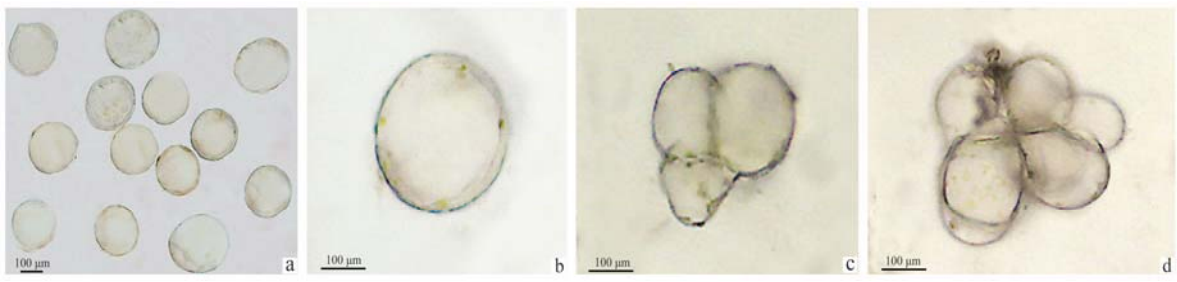
表 1 不同 MS 培养基下的黄花蒿叶片愈伤组织的出愈率
Table 1 The rate of plant growth material concentration in different

MS medium on the callus of leaves of <i>Artemisia annua</i> L.					
编号	培养基	接种数	出愈数	出愈率/%	
1	MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.1mg/L	300	159	53.00	
2	MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.3 mg/L	300	221	73.67	
3	MS+6-BA 2.0 mg/L+2,4-D 0.5 mg/L	300	230	76.67	
4	MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L	300	223	74.33	
5	MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L	300	246	82.00	
6	MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L	300	298	99.33	

表中数据为外植体培养 25 d、3 次重复的平均值。

2.1.2 黄花蒿悬浮细胞的显微观察结果

将质地疏松、淡黄或淡绿颗粒状的黄花蒿愈伤振荡培养 15~20 d 后,获得外观均一、稳定的黄花蒿细胞悬浮液。取少量的细胞悬浮液制作临时装片,观察黄花蒿细胞的生长情况。愈伤组织经悬浮培养后,获得大量的单细胞和小细胞团(图 1),细胞形态完整,分散均匀,增殖活跃,生长状况良好,符合遗传转化的要求。



a 黄花蒿悬浮培养单细胞群体;b 黄花蒿悬浮培养单细胞;c 细胞分裂;d 细胞分裂形成的细胞团。

图 1 黄花蒿悬浮细胞显微观察结果

Fig.1 The results of microscope observation of suspension cells of *Artemisia annua* L.

2.1.3 选择压力对黄花蒿转化的影响

为筛选合适的 Hyg 选择压力,将黄花蒿悬浮细胞置于添加不同质量浓度(0、10、15、20、25、30 mg/L) Hyg 的培养基上培养。结果表明:黄花蒿悬浮细胞在不含 Hyg 的对照培养基上生长良好,随着 Hyg

的浓度升高,黄花蒿细胞团褐化死亡的数量增多且褐化死亡的时间缩短;当 Hyg 质量浓度为 10、15、20 mg/L,黄花蒿悬浮细胞有一定的耐受能力;当 Hyg 质量浓度增至 25、30 mg/L 时,黄花蒿细胞团全部褐化死亡。为降低后续遗传转化获得抗性愈伤

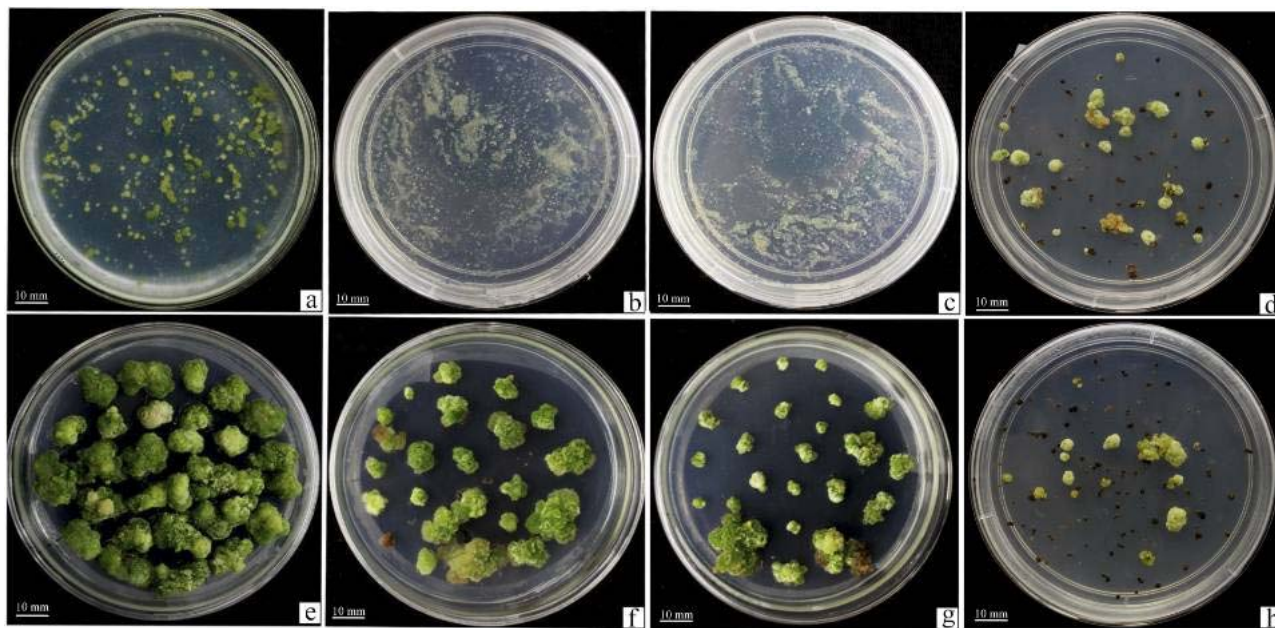
的假阳性率, 确定 30 mg/L 为转基因黄花蒿的 Hyg 筛选浓度。

将黄花蒿悬浮细胞经工程菌侵染后, 在不添加 Carb 的 MS 培养基上进行培养, 过夜后, 发现悬浮细胞团周围农杆菌迅速生长。当添加 100 mg/L 的 Carb 时, 平板中成片生长的农杆菌明显减少, 但仍有较多的农杆菌单菌落分布; 当 Carb 的质量浓度升至 150 mg/L 时, 平板中只有零星分布的单菌落, 抑菌效果明显; 当 Carb 质量浓度为 250、300 mg/L 时, Carb 对农杆菌的抑制效果显著, 但是新细胞团的数量逐渐减少; 而当 Carb 质量浓度为 200 mg/L 时, 既不影响细胞团的生长增殖, 又有良好的抑制农杆菌效果。因而确定 200 mg/L 为农杆菌抑菌浓度。

2.2 黄花蒿悬浮培养细胞系的遗传转化及筛选

2.2.1 黄花蒿悬浮细胞的遗传转化及抗性愈伤的筛选结果

将黄花蒿细胞悬浮液分别与工程农杆菌 LAB4404-pCambia1301-35S::GUS、LAB4404-pCambia1301-GTpro::GUS、LAB4404-pWM101-GTpro::iaaM 共培养后, 转入筛选培养基, 约 6 周, 筛选平板上可见直径大于 1 mm 的同期非转基因黄花蒿对照组愈伤(图 2-a)和直径小于 1 mm 的转基因黄花蒿绿色小愈伤组织(图 2-b、图 2-c), 而未转化成功的细胞团因不能耐受 Hyg 的选择, 大多逐渐褐化死亡(图 2-d、图 2-h); 继代后, 抗性愈伤膨大增殖(图 2-e、图 2-f、图 2-g)。



a、e 转到固体培养基的非转基因黄花蒿悬浮细胞; b、c 黄花蒿抗性愈伤筛选获得的小愈伤; d、h 未转化成功的小细胞团; f、g 黄花蒿抗性愈伤。

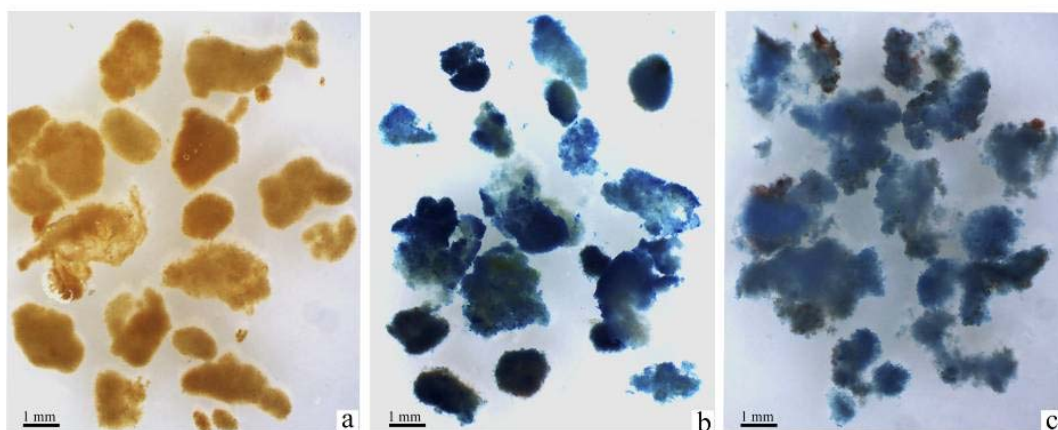
图 2 黄花蒿悬浮细胞转固体培养基筛选培养结果

Fig. 2 The results of selection and culture of suspension cells of *Artemisia annua* L. in solid medium

2.2.2 转基因愈伤 GUS 基因表达检测结果

将经抗性筛选继代增殖后的转 35::GUS 及 GTpro::GUS 的黄花蒿愈伤组织进行 GUS 组织化学染色(图 3)后, 成功检测到了 GUS 报告基因的表达

活性, 且转化率较高。以悬浮细胞作为黄花蒿遗传转化的受体, 利用悬浮细胞分裂活跃、增殖迅速、易于控制等特点, 可获得大量的转基因材料, 有效提高转化效率。



a 非转基因黄花蒿细胞团 GUS 染色；b 转 35S::GUS 黄花蒿细胞团；c 转 GTpro::GUS 的黄花蒿细胞团。

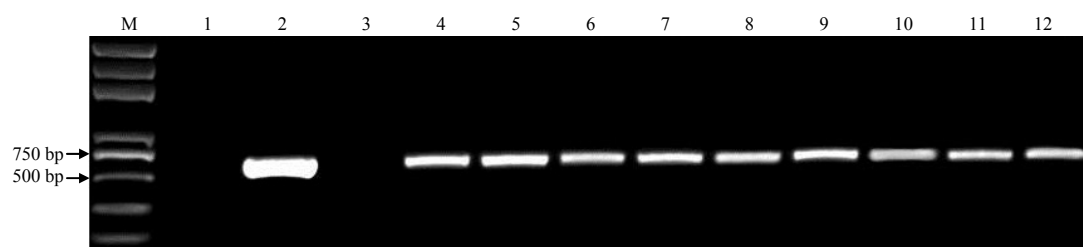
图 3 转 GUS 报告基因的黄花蒿愈伤组织化学染色结果

Fig.3 The results of GUS histochemical staining of callus of *Artemisia annua* L. transformed with GUS reporter gene

2.2.3 转基因愈伤 PCR 检测结果

对转 pWM101-GTpro::iaaM 的黄花蒿愈伤组织进行 PCR 检测，结果如图 4 所示，4~12 泳道均

扩增出与目的基因大小一致的条带，说明外源基因 *iaaM* 已成功整合至黄花蒿基因组中。



M Marker DL5 000；1 阴性对照，水；2 阳性对照，质粒(pWM101-GTpro::iaaM)；3 空白对照，非转基因黄花蒿愈伤组织 DNA；4~12 转基因黄花蒿愈伤组织 DNA。

图 4 转 GTpro::iaaM 的抗性愈伤 PCR 检测结果

Fig.4 The PCR detection results of resistant callus transformed with GTpro::iaaM

3 结论与讨论

穆胜玉等^[19]和贾秀山等^[20]以黄花蒿不同组织器官为外植体诱导愈伤，一致认为花序愈伤诱导率较高，子叶、胚轴、叶片、花枝和茎段次之。郭新荣等^[21]对黄花蒿花序、叶和叶柄愈伤组织的培养体系进行研究，发现 3 种外植体的出愈率均可达到 100%。本试验中，采用黄花蒿 428-A 的子叶、茎、腋芽和叶片诱导愈伤，其叶片诱导率可达 99.33%，与李飞等^[22]和张丽珍等^[23]的研究结果相近。

愈伤组织的外观形态和生理状态均影响悬浮细胞系的建成质量和转化效率。本试验中，以黄花蒿叶片作为外植体诱导愈伤，在 3 种类型的愈伤中，I 型愈伤是良好的遗传转化受体材料，II 型愈伤虽疏松易散，但在悬浮培养过程中，较 I 型愈伤更能

快速获得大量均一、稳定的黄花蒿单细胞及细胞团，因此，II 型愈伤也可作为悬浮细胞遗传转化的良好受体材料。有研究^[24]表明，经过一定时间与条件的诱导和筛选，I 型愈伤与 II 型愈伤可相互转换。研究 II 型愈伤向 I 型愈伤转变是悬浮细胞培养体系再生的关键。

以叶盘等外植体作为黄花蒿遗传转化受体的研究已有相关报道。本研究团队前期也开展了相关的工作，但愈伤组织分化的抗性苗均产生了嵌合体，使转基因后代难于筛选、鉴定，因此，探索并建立一条新型、高效的黄花蒿遗传转化途径对于提高黄花蒿的转化效率，选育高青蒿素含量的黄花蒿新品系具有重大意义。建立黄花蒿悬浮细胞系，短期内可获得大量大小均一的单细胞及细胞团作为遗传转化受体，避免转基因后代嵌合体的产生，保

证转基因植株及后代遗传背景的纯合稳定,是一种比较理想的转化受体。随着黄花蒿悬浮细胞遗传转化体系的日臻完善,这种新颖、高效的转化技术将为高青蒿素含量的黄花蒿品系的选育提供有效途径。

参考文献:

- [1] VATSVEEN T K, MYHRE M R, STEEN C B, et al. Artesunate shows potent anti-tumor activity in B-cell lymphoma[J]. Journal of Hematology & Oncology, 2018, 11: 23.
- [2] KONSTAT-KORZENNY E, ASCENCIO-ARAGN J A, NIEZEN-LUGO S, et al. Artemisinin and its synthetic derivatives as a possible therapy for cancer[J]. Medical Sciences, 2018, 6(1): 19.
- [3] BADSHAH S L, ULLAH A, AHMAD N, et al. Increasing the strength and production of artemisinin and its derivatives[J]. Molecules, 2018, 23(1): 100.
- [4] KRUSCHE B, AREND J, EFFERTH T. Synergistic inhibition of angiogenesis by artesunate and captopril in vitro and in vivo[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013: 454783.
- [5] EFFERTH T. Beyond malaria the inhibition of viruses by artemisinin-type compounds[J]. Biotechnology Advances, 2018, 36(6): 1730-1737.
- [6] EFFERTH T, ROMERO M R, WOLF D G, et al. The antiviral activities of artemisinin and artesunate[J]. Clinical Infectious Diseases, 2008, 47(6): 804-811.
- [7] AN J, MINIE M, SASAKI T, et al. Anti-malarial drugs as immune modulators: new mechanisms for old drugs[J]. Annual Review of Medicine, 2017, 68: 317-330.
- [8] ISLAMUDDIN M, CHOUHAN G, FAROOQUE A, et al. Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis[J]. Plos Negl Trop Dis, 2015, 9(1): e3321.
- [9] BAO L D, REN X H, MA R L, et al. Efficacy of *Artemisia annua* polysaccharides as an adjuvant to hepatitis C vaccination[J]. Genetics & Molecular Research, 2015, 14(2): 4957-4965.
- [10] HUANG X, XIE Z, LIU F, et al. Dihydroartemisinin inhibits activation of the Toll-like receptor 4 signaling pathway and production of type I interferon in spleen cells from lupus-prone MRL/lpr mice[J]. International Immunopharmacology, 2014, 22(1): 266-272.
- [11] 张小波, 郭兰萍, 黄璐琦. 我国黄花蒿中青蒿素含量的气候适宜性等级划分[J]. 药学学报, 2011, 46(4): 472-478.
- [12] BALDI A, DIXIT V K. Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(11): 4609-4614.
- [13] ZHU J, YANG J, ZENG Z, et al. Inducing effect of dihydroartemisinic acid in the biosynthesis of artemisinins with cultured cells of *Artemisia annua* by enhancing the expression of genes[J]. Scientific World Journal, 2014: 293190.
- [14] CARETTO S, QUARTA A, DURANTE M, et al. Methyl jasmonate and miconazole differently affect artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua* suspension cultures[J]. Plant Biol(Stuttg), 2011, 13(1): 51-58.
- [15] DURANTE M, CARETTO S, QUARTA A, et al. β -Cyclodextrins enhance artemisinin production in *Artemisia annua* suspension cell cultures[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 90(6): 1905-1913.
- [16] RIZZELLO F, DE PAOLIS A, DURANTE M, et al. Enhanced production of bioactive isoprenoid compounds from cell suspension cultures of *Artemisia annua* L. using β -cyclodextrins[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(10): 19092-19105.
- [17] 李弘剑, 张毅, 郭勇. 生物量对黄花蒿悬浮培养细胞生长的影响[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 1997, 18(5): 89-92.
- [18] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 1595.
- [19] 穆胜玉, 白志川, 宋孝霞. 青蒿组织培养体系建立的研究[J]. 重庆科技学院学报(自然科学版), 2006, 8(4): 21-24.
- [20] 贾秀山, 廖宇静, 于飞飞, 等. 黄花蒿组织培养研究[J]. 生物技术通讯, 2008, 19(2): 259-262.
- [21] 郭新荣, 李晋, 马琳, 等. 青蒿愈伤组织的诱导及化学成分变化规律研究[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(4): 219-224.
- [22] 李飞, 马焕新, 李忠爱, 等. 青蒿组织培养再生体系的建立[J]. 北方园艺, 2016(8): 93-96.
- [23] 张丽珍, 徐淑庆, 杨冬业, 等. 青蒿组织培养及其快速繁殖研究[J]. 生物学通报, 2010, 45(3): 48-50.
- [24] 方琪, 张雪平, 张伟, 等. NAA、2, 4-D 对崇明水仙 (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) 愈伤组织的诱导及再生的不同影响[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2013, 31(3): 9-15.

责任编辑: 毛友纯

英文编辑: 柳 正