

BCAT4、CYP79F1和ESM1过表达提高 西兰花细胞萝卜硫素含量

张佑齐 曹海艳 刘旦梅 张锦华 范三红 金竹萍* 裴雁曦*

(山西大学生命科学学院, 特色植物资源研究与利用山西省重点实验室, 太原 030006)

摘要 萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是目前防癌抗癌效果最好的植物天然产物之一。十字花科芸薹属植物西兰花是生产SFN的重要材料。然而普通西兰花中SFN产量仍无法满足巨大的市场需求。之前单一基因改造提高植物SFN含量的策略效果并不理想。该研究从西兰花中克隆了SFN合成相关的支链氨基酸转移酶4编码基因BCAT4、细胞色素P450氧化酶编码基因CYP79F1和环硫修饰酶编码基因ESM1。分别以单基因导入和三基因串联导入的方式, 通过农杆菌法转化西兰花愈伤组织, 对所获得的转化细胞系中SFN的含量进行比较, 以期获得SFN含量更高的细胞系, 为通过细胞系大量培养获取SFN奠定基础。实验结果表明, 目的基因BCAT4、CYP79F1、ESM1和B-C-E(BCAT4N-SCYP79F1N-SESM1)都成功整合于宿主细胞基因组。BCAT4和B-C-E基因过表达细胞系中SFN含量为139.7和171.4 $\mu\text{g/g}$, 分别是野生型细胞系SFN含量的1.79倍和2.19倍, 差异极显著(** $P<0.01$); B-C-E基因过表达细胞系SFN含量是BCAT4基因过表达细胞系的1.23倍, 差异显著(* $P<0.05$)。而CYP79F1和ESM1过表达细胞系未检测到高于对照的SFN含量。综上所述, 单基因BCAT4的过表达对SFN含量的影响大于CYP79F1与ESM1。多基因串联共表达对SFN含量的影响效果好于单个基因的过表达。

关键词 西兰花; 萝卜硫素; 支链氨基酸转移酶4; 细胞色素P450氧化酶; 环硫修饰酶1

Overexpression of BCAT4, CYP79F1 and ESM1 Promote Sulforaphane Yield in Broccoli Cells

ZHANG Youqi, CAO Haiyan, LIU Danmei, ZHANG Jinhua, FAN Sanhong, JIN Zhuping*, PEI Yanxi*

(School of Life Science, Shanxi University, Shanxi Key Laboratory of Research and Development Regional Plants, Taiyuan 030006, China)

Abstract SFN (sulforaphane) is one of the plant natural product with best anti-cancer effect at present. Broccoli, a Brassicaceae plant, is an important material for the production of SFN. However, the yield of SFN in broccoli is very low, and far from meeting market demand. Previous research strategies to improve SFN synthesis via single genetic modification in plants were not ideal. In this study, three important SFN synthesis related genes, branched-chain amino acid transferase 4 encoding gene *BCAT4*, cytochrome P450 oxidase encoding gene *CYP79F1* and epithiospecifier modifier 1 encoding gene *ESM1*, were cloned from broccoli. To get more SFN using cell suspension culture, single gene introduction and triple gene serial introduction into broccoli calli were conducted mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and the yield of SFN in the transformed cell line was compared with wild

收稿日期: 2019-09-23

接受日期: 2019-11-12

国家自然科学基金(批准号: 31672140)和山西省优秀人才培养项目(2018050211016)资助的课题

*通讯作者: Tel: 0351-7010599, E-mail: jinzhuping@sxu.edu.cn; peiyanxi@sxu.edu.cn

Received: September 23, 2019

Accepted: November 12, 2019

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31672140) and Shanxi Province Excellent Talents Science and Technology Innovation Project (Grant No.2018050211016)

*Corresponding authors. Tel: +86-351-7010599, E-mail: jinzhuping@sxu.edu.cn; peiyanxi@sxu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5155>

type cells. The results showed that the target genes *BCAT4*, *CYP79F1*, *ESM1* and *BCAT4N-SCYP79F1N-SESM1* (B-C-E) were successfully integrated with the genomic DNA of the host cell. The SFN content of *BCAT4* and B-C-E gene overexpressed cell lines was 139.7 and 171.4 $\mu\text{g/g}$, which were 1.79 and 2.19 times of SFN in wild-type cell, respectively. And the difference was extremely significant. The SFN content of B-C-E gene overexpressed cell lines was 1.23 times of *BCAT4* gene overexpressed cell lines. And the difference was significant. However, the overexpressed cell lines of *CYP79F1* and *ESM1* did not detect a higher SFN content than the control. In summary, the overexpression of single gene *BCAT4* has a greater effect on SFN content than *CYP79F1* and *ESM1*. The effect of multi-gene tandem co-expression on SFN content is better than that of single gene.

Keywords broccoli; sulforaphane; branched-chain amino acid transferase 4; cytochrome P450 oxidase; epithiospecifier modifier 1

萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是目前防癌抗癌效果最好的植物天然产物之一,可显著降低胃癌、食道癌、乳腺癌、肺癌、肝癌、前列腺癌等癌症的发生^[1-2]; SFN还具有抗氧化损伤的能力,在预防和治疗糖尿病、心脑血管疾病等方面也具有重要的药用价值^[3]。目前SFN的主要来源是植物提取^[4]。不同植物材料中SFN含量差异很大,十字花科的西兰花中SFN的含量远高于其他植物,是提取SFN的理想原料^[5]。但是其绝对含量仍然远远不能满足有效成分提取的需要,利用生物制药生产SFN需消耗大量原材料,生产成本非常高^[6]。通过基因工程和细胞系大量培养是有望提高SFN产量并降低生产成本的有效途径之一。

目前与西兰花同属于十字花科的模式植物拟南芥中, SFN合成途径已基本明确。其合成主要分成3个阶段: 甲硫氨酸侧链延长、SFN核心结构合成和侧链的二次修饰。合成途径涉及非常复杂的基因网络,如支链氨基酸转移酶基因4(branched-chain amino acid transferase 4, *BCAT4*)、环硫修饰蛋白基因1(epithiospecifier modifier 1, *ESM1*)、上皮硫特异蛋白基因(epithiospecifier protien, *ESP*)、细胞色素氧化酶基因(cytochrome P450 oxidase, *CYP79F1*)、硒甲基转移酶基因(selenocysteine methyltransferase, *SMT*)、甲基硫代烷基苹果酸合酶基因1(methylthioalkylmalate synthase 1, *MAMI*)、黑芥子酶基因(myrosinase, *MY*)等^[7]。由于SFN的巨大市场需求,针对植物中SFN合成相关基因改造以提高其含量的研究备受关注。WU等^[8]将黑芥子酶基因 *Myrosinase* 转入西兰花中过表达, SFN含量比野生型增加了约0.92倍; YUAN等^[9]在拟南芥中过表达上皮硫特异蛋白基因 *ESP* 获得SFN含量比野生型显著减少的植株; HUANG等^[10]发现富硒环境中西兰花的SFN合成受

到抑制,将 *SMT* 在西兰花中过表达,在富硒环境中转基因植株的SFN含量比野生型增加了约0.52倍。这些单一基因改造提高植物SFN含量的策略虽不同程度上提高了植物SFN生成,但效果并不理想。据此推测, SFN合成途径中存在多个关键基因的互作,同时对多个基因进行遗传改造,可能是获得SFN含量更高植物材料的有效途径。本研究选定西兰花中3个候选酶编码基因 *BCAT4*、*CYP79F1* 和 *ESM1* 作为研究对象: *BCAT4* 是西兰花中甲硫氨酸合成SFN侧链的限速酶^[11]; *CYP79F1* 主要参与SFN核心结构合成中的 *N*-羟基化反应,该反应是合成SFN的重要反应之一^[12-13]; *ESM1* 可促进底物萝卜硫腈转化成SFN^[14-15]。为进一步提高西兰花中SFN含量,本文将以上3种SFN合成的关键基因 *BCAT4*、*CYP79F1* 和 *ESM1* 在西兰花愈伤组织中单独过表达和串联共表达,检测获得的转化细胞系SFN含量,以期获得SFN含量更高的细胞系,为利用细胞系大量培养生产SFN奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

西兰花品种“绿剑三号”种子购自天津耕耘种业有限公司; 西兰花离体细胞的诱导与培养,参照张品南等^[16]的方法,使用MS培养基,并添加植物激素2 mg/L的2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)和1 mg/L的6-苄氨基嘌呤(*N*-phenylmethyl-9H-purin-6-amine, 6-BA); 菌株LBA4404为本实验室保存; XF-350(含pCambia2302骨架)为中国科学院遗传与发育生物学研究所曹晓凤研究员惠赠; 常规试剂均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 多基因串联载体构建试剂盒 Hieff Clone Plus Multi One Step Cloning Kit 购自上海翊圣生物科技有限公

表1 引物列表
Table 1 The primers of genes

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
<i>BCAT4</i> -F	GAT TAT GCC GGA TCC ATG GCT CCT TCT GCG CTA TC
<i>BCAT4</i> -R	GTG GCT AGC GAA TTC TCA AAG TTT CAA CCC TGG TTT G
<i>CYP79F1</i> -F	GAT TAT GCC GGA TCC ATG ACA ATG TTG ATG AGC CTT AC
<i>CYP79F1</i> -R	GTG GCT AGC GAA TTC TCA AGG GCA GAA TTT TGG ATA AA
<i>ESM1</i> -F	GAT TAT GCC GGA TCC ATG GTA GGA AAG TGT GAT TTG G
<i>ESM1</i> -R	GTG GCT AGC GAA TTC TCA TCC AAT TAA ATC AAG AAG CC
<i>BCAT4N</i> -F	TAC GAT GTG CCT GAT TAT GCC
<i>BCAT4N</i> -R	ATC TAG CCG ATG GAC CCC GAT CTA GTA ACA TAG ATG A
<i>SCYP79FIN</i> -F	GTC CAT CGG CTA GAT CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AG
<i>SCYP79FIN</i> -R	GTC AAT GGA GTC AGC CCC GAT CTA GTA ACA TAG ATG A
<i>SESM1</i> -F	GCT GAC TCC ATT GAC CAT GGA GTC AAA GAT TCA AAT AG
<i>SESM1</i> -R	GTG GTG GTG GCT AGC GAA TT
<i>BoActin</i> -F	TCT CGA TGG AGG AGC TGG TT
<i>BoActin</i> -R	GAT CCT TAC CGA GAG AGG TT
CX0338	GCA AGA CCC TTC CTC TAT ATA AGG A
CX0454	TAT AAT TGC GGG ACT CTA ATC A

司;限制性内切酶购自NEB(北京)有限公司。

1.2 植物过表达载体的构建

1.2.1 *BCAT4*、*CYP79F1*及*ESM1*基因克隆 通过Trizol法提取野生型西兰花七日龄幼苗子叶总RNA, 反转录制备cDNA; 根据基因*BCAT4*(GenBank No.XM013728260.1)、*CYP79F1*(GenBank No.MG012890.1)、*ESM1*(GenBank No.XM013728577.1)的*CDS*(coding sequence)序列设计特异性引物(表1)进行PCR扩增。

1.2.2 载体的构建 单基因载体的构建: 使用限制性内切酶*Bam*H I和*Eco*R I对载体XF-350进行消化, 并按照载体构建试剂盒Ligation-Free Cloning System说明书进行操作。

三基因串联载体的构建: 分别使用已构建成功的重组质粒XF350-*BCAT4*、XF350-*CYP79F1*、XF350-*ESM1*作模板, PCR扩增表达框为*BCAT4N*(*BCAT4*+His tag+Nos 3'UTR)、*SCYP79FIN*(CaMV 35S+HA tag+*CYP79F1*+His tag+Nos 3'UTR)、*SESM1*(CaMV 35S+HA tag+*ESM1*)(表1), 使用限制性内切酶*Bam*H I和*Eco*R I对载体XF-350进行消化, 按照载体构建试剂盒Hieff Clone Plus Multi One Step Cloning Kit的说明书进行操作。

1.3 西兰花离体细胞转化和筛选

以冻融法将重组质粒转化到根癌农杆菌LBA4404; 参考Bhalla等的方法^[17], 通过农杆菌法转化西兰花离体细胞, 转化细胞在含300 mg/L氨苄青霉素(ampicillin, Amp)与50 mg/L卡那霉素(kanamy-

cin, Kan)的MS培养基上继代培养3~4次(15天/次), 获得Kan抗性的转化细胞系。

1.4 阳性细胞鉴定

1.4.1 抗性细胞PCR鉴定 分别提取转化细胞和野生型细胞的基因组DNA, 利用载体引物(CX0338/CX0454)对单基因转化细胞进行PCR扩增鉴定, 利用目的基因特异引物(*BCAT4*-F/*BCAT4*-R、*CYP79F1*-F/*CYP79F1*-R和*ESM1*-F/*ESM1*-R)对多基因转化细胞进行PCR扩增鉴定。

1.4.2 抗性细胞的RT-PCR检测 分别提取PCR阳性细胞与野生型细胞的总RNA, 反转录成cDNA第一链, 用目的基因引物(*BCAT4*-F/*BCAT4*-R、*CYP79F1*-F/*CYP79F1*-R和*ESM1*-F/*ESM1*-R)进行RT-PCR检测。

1.5 萝卜硫素的提取及含量测定

具体参照文献ZHANG等^[18]所用的方法提取西兰花离体细胞的萝卜硫素并使用高效液相色谱检测萝卜硫素含量。

1.6 统计学分析

通过SPSS 17.0软件进行数据处理与单因素ANOVA分析, 实际数据均为3次重复的 $\bar{x}\pm s$ 表示, Duncan's测验分析显著性, **P*<0.05表示具有显著性差异, ***P*<0.01表示具有极显著性差异。

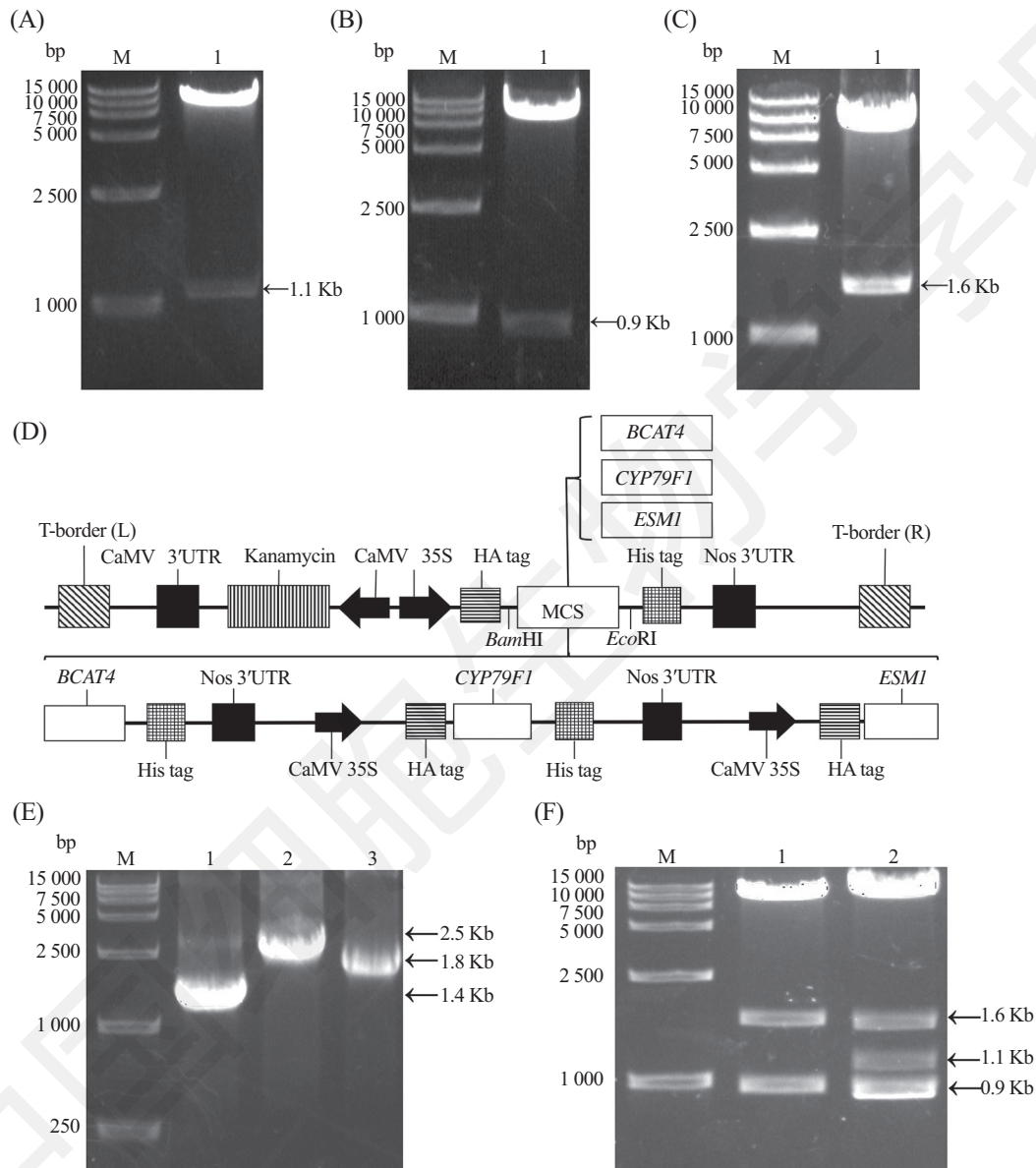
2 结果

2.1 过表达载体的构建

为提高西兰花细胞中SFN合成相关基因的

表达量, 我们构建了SFN合成相关基因 *CYP79F1*、*ESM1* 和 *BCAT4* 的单基因过表达载体和 *BCAT4N-SCYP79F1N-SESM1* (B-C-E) 三基因串联共表达载体。同源重组的方式构建质粒 (图 1D), 转化大肠杆菌 DH5 α , 菌液 PCR 鉴定阳性菌株, 单基因重组质粒

通过双酶切进行鉴定, 结果见图 1A~图 1C (*BCAT4* 序列中含 *EcoR* I 酶切位点, 会释放 947 bp 的片段)。测序结果与参考序列比对表明构建成功。以 3 个单基因的过表达质粒为模板, 分别扩增得到 *BACT4N*、*SCYP79F1N*、*SESM1* 表达框部分, 并包含来自质粒



A~C: 重组质粒XF350-*ESM1*、XF350-*BCAT4*、XF350-*CYP79F1*的*Bam*H I和*Eco*R I双酶切鉴定; D: 重组质粒XF350-*BCAT4*、XF350-*CYP79F1*、XF350-*ESM1*、XF350-*BCAT4N-SCYP79F1N-SESM1* T-DNA区域示意图; E: *BCAT4N*(*BCAT4*+His tag+Nos 3'UTR) PCR扩增条带(泳道1)、*SCYP79F1N*(CaMV 35S+HA tag+*CYP79F1*+His tag+Nos 3'UTR) PCR扩增条带(泳道2)、*SESM1*(CaMV 35S+HA tag+*ESM1*) PCR扩增条带(泳道3); F: 限制性内切酶*Bam*H I和*Eco*R I对重组质粒XF350-*BCAT4N-SCYP79F1N*(泳道1)、XF350-*BCAT4N-SCYP79F1N-SESM1*(泳道2)双酶切鉴定。M: DNA分子量标记。

A~C: digestion of recombinant vector XF350-*ESM1*, XF350-*BCAT4*, XF350-*CYP79F1* with *Bam*H I and *Eco*R I; D: diagram of T-DNA region in XF350-*BCAT4*, XF350-*CYP79F1*, XF350-*ESM1*, XF350-*BCAT4N-SCYP79F1N-SESM1* recombinant vector; E: amplification of *BCAT4N* (*BCAT4*+His tag+Nos 3'UTR) (lane 1), amplification of *SCYP79F1N* (CaMV 35S+HA tag+*CYP79F1*+His tag+Nos 3'UTR) (lane 2), amplification of *SESM1* (CaMV 35S+HA tag+*ESM1*) (lane 3); F: digestion of recombinant vector XF350-*BCAT4N-SCYP79F1N*, XF350-*BCAT4N-SCYP79F1N-SESM1* with *Bam*H I and *Eco*R I. M: DNA marker.

图1 重组质粒的构建及双酶切鉴定

Fig.1 Construction and double restriction enzyme identification of recombinant vector

粒XF-350的CaMV 35S、Nos 3'UTR、His tag和HA tag, 大小分别为1 442 bp、2 587 bp和1 820 bp(图1E), 同源重组构建3基因串联载体, 转化大肠杆菌DH5 α 后, 菌液PCR鉴定阳性菌株, 重组质粒使用双酶切进行鉴定(图1F), 电泳结果表明, 释放条带大小正确。测序结果与参考序列比对无误, 质粒构建成功。

2.2 转基因细胞DNA分子水平检测

为了验证目的基因是否与宿主细胞的基因组DNA成功整合, 我们提取了抗性细胞的基因组DNA并进行目标条带的PCR扩增。结果显示, 使用载体引物(CX0338/CX0454), 转*ESM1*、*BCAT4*和*CYP79F1*细胞系可扩增出相应大小的目标条带(图2A~图2C); 转B-C-E细胞使用目的基因引物可同时扩增出三条目标条带(图2D); 野生型与阴性对照均未扩增出条带; 初步证明重组质粒T-DNA与宿主细胞的基因组整合。

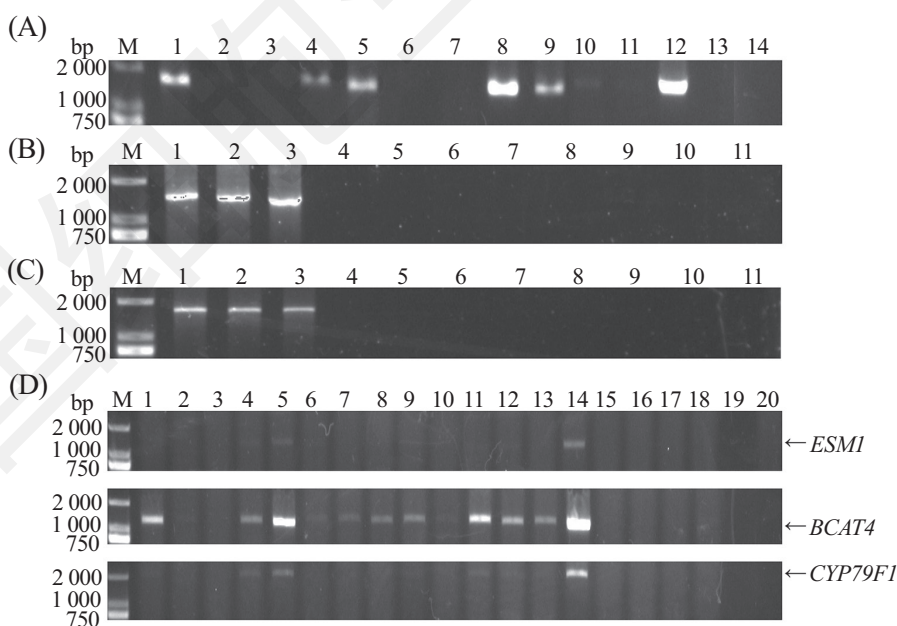
2.3 转基因细胞转录水平检测

为验证目的基因是否能够在宿主细胞内进行转录表达, 分别提取2.2鉴定阳性细胞与野生型细胞的总RNA, 并反转录cDNA第一链作为模板, RT-PCR

检测目的基因在宿主细胞内的表达情况。结果显示, *ESM1*基因在ESM1-1、ESM1-8和ESM1-12 3个细胞系中有明显过量表达(图3A), *BCAT4*基因在BCAT4-1、BCAT4-2中有明显过量表达(图3B), 转*CYP79F1*的各细胞系中, *CYP79F1*-1、*CYP79F1*-2和*CYP79F1*-3目的基因正常表达(图3C), 转B-C-E细胞系三个目的基因都有超出野生型的表达(图3D)。各转化阳性细胞系见图4。

2.4 转基因细胞的萝卜硫素含量检测

为比较各转基因细胞系与野生型细胞系的SFN含量, 通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)对每个转基因细胞系的SFN含量进行检测。图5结果显示, 转B-C-E细胞SFN含量为 $171.4 \pm 8.8 \mu\text{g/g}$, 是野生型的2.19倍($P < 0.01$); 转*BCAT4*细胞系中, BCAT4-1的SFN含量为 $117.6 \pm 3.4 \mu\text{g/g}$, 是野生型的1.50倍($P < 0.01$), BCAT4-2的SFN含量为 $139.7 \pm 6.2 \mu\text{g/g}$, 是野生型的1.79倍($P < 0.01$); 转*CYP79F1*细胞系中*CYP79F1*-1、*CYP79F1*-2和*CYP79F1*-3的SFN含量分别为 61.3 ± 4.8 、 64.7 ± 8.3 和 $75.8 \pm 5.1 \mu\text{g/g}$, 转*ESM1*细胞系中ESM1-1、ESM1-8和ESM1-12的SFN含量分别为 72.7 ± 1.7 、 77.23 ± 1.5 和 $67.47 \pm 4.4 \mu\text{g/g}$, 且均

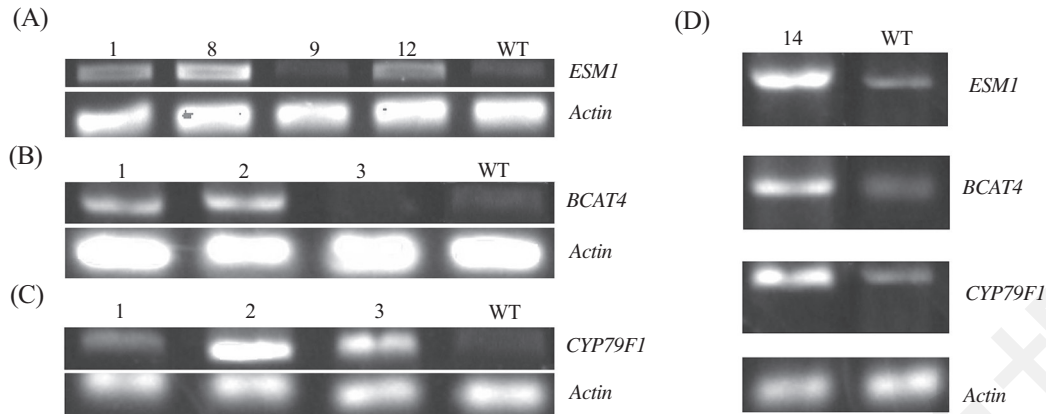


A: 转*ESM1*抗性细胞(1~12)、野生型对照(13)、ddH₂O为阴性对照(14); B: 转*BCAT4*抗性细胞(1~9)、野生型对照(10)、阴性对照(ddH₂O)(11); C: 转*CYP79F1*抗性细胞(1~9)、野生型对照(10)、阴性对照(ddH₂O)(11); D: 转B-C-E抗性细胞(1~18)、野生型对照(19)、阴性对照(ddH₂O)(20)。M: DNA分子量标记。

A: the resistant cells of *ESM1* transformation (1-12), WT cells (13), 14: negative control (ddH₂O) (14); B: the resistant cells of *BCAT4* transformation (1-9), WT cells (10), negative control (ddH₂O) (11); C: the resistant cells of *CYP79F1* transformation (1-9), WT cells (10), negative control (ddH₂O) (11); D: the resistant cells of B-C-E transformation (1-18), WT cells (19), negative control (ddH₂O) (20). M: DNA marker.

图2 抗性西兰花细胞PCR鉴定

Fig.2 PCR identification of the resistant broccoli cells

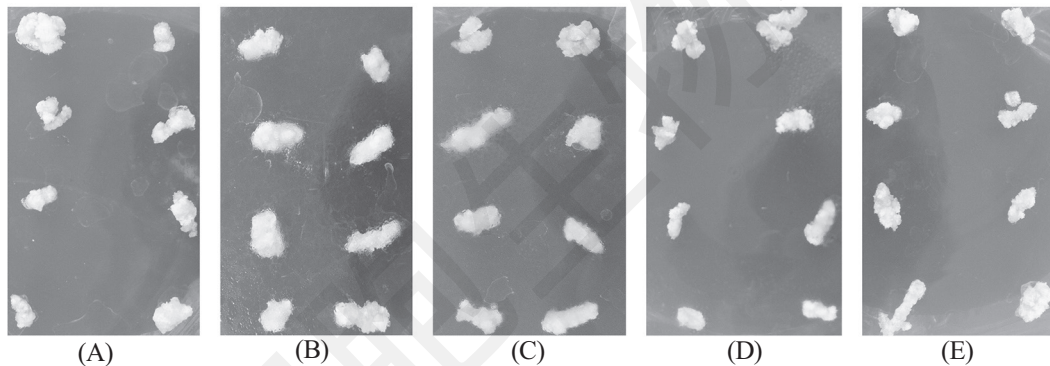


A: *ESM1*转化抗性细胞(1、8、9、12), 野生型细胞(WT); B: *BCAT4*转化抗性细胞(1~3), 野生型细胞(WT); C: *CYP79F1*转化抗性细胞(1~3), 野生型细胞(WT); D: B-C-E转化抗性细胞(14), 野生型细胞(WT)。

A: the resistant cells of *ESM1* transformation (1, 8, 9, 12), wild type cells (WT); B: the resistant cells of *BCAT4* transformation (1-3), wild type cells (WT); C: the resistant cells of *CYP79F1* transformation (1-3), wild type cells (WT); D: the resistant cells of B-C-E transformation (14), wild type cells (WT).

图3 转基因西兰花细胞的RT-PCR检测

Fig.3 RT-PCR test on the transgenic broccoli cells



A: B-C-E三基因串联转化细胞系; B: *BCAT4*转化细胞系1; C: *BCAT4*转化细胞系2; D: *CYP79F1*转化细胞系; E: *ESM1*转化细胞系。

A: B-C-E transgenic cells; B: *BCAT4* transgenic cells-1; C: *BCAT4* transgenic cells-2; D: *CYP79F1* transgenic cells; E: *ESM1* transgenic cells.

图4 转基因西兰花细胞系

Fig.4 Transgenic broccoli cells

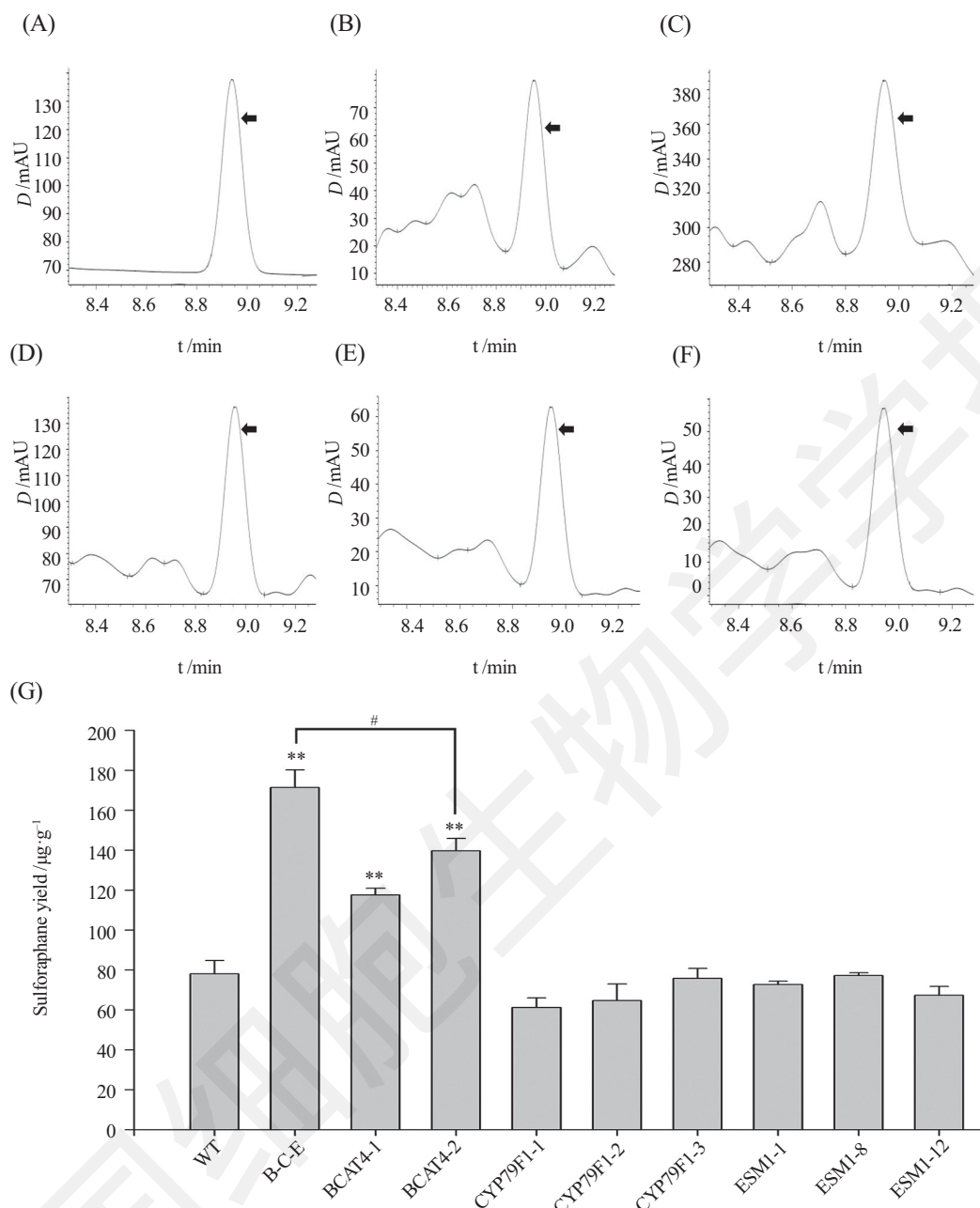
没有检测到高于对照的SFN含量。

3 讨论

萝卜硫素作为一种公认的抗癌植物次生代谢产物, 受到广泛关注。植物的基因型和生长环境都是影响SFN内源含量的主要因素^[19-20]。探讨植物生长环境因素对SFN含量影响也是一个重要的领域。二者相结合可能是解决萝卜硫素含量问题的更加有效的综合途径。2010年XUE等^[21]研究了光质对西兰花愈伤组织中SFN含量的影响, 发现红光和蓝光下SFN含量是白光条件下的1.08倍; 2017年AZADEH等^[22]研究了NaCl和水杨酸对西兰花芽中SFN合成的影响, 发现用160 mmol/L的NaCl与100 μ mol/L水杨

酸处理西兰花幼芽可提高SFN的含量。还有一些关于提高植物SFN前体物质萝卜硫苷(glucoraphanin, GRA)含量的报道, 如2007年HANSEN等^[23]将GRA合成相关的黄素单加氧酶基因*FMO-GSOX1*在拟南芥中过表达后, 植株GRA含量比野生型增加了5倍; 2015年CAO等^[24]将西兰花中GRA合成相关基因*CYP83A1*转入拟南芥中过表达, 但HPLC未检测到GRA含量的显著变化; 由于SFN不是GRA唯一的代谢产物, 故GRA的含量变化是否可成为SFN含量变化的衡量标准仍有待探讨^[15]。

在基因选择方面, *BCAT4*是支链氨基酸转移酶编码基因家族中参与SFN合成的关键基因, 西兰花中的SFN侧链是由甲硫氨酸参与合成的, 而*BCAT4*



HPLC系统检测萝卜硫素所得峰图(A~F)。A: 标品(20 µg/mL); B: WT细胞系提取物; C: B-C-E转基因细胞系提取物; D: BCAT4-2转基因细胞系提取物; E: CYP79F1-2转基因细胞系提取物; F: ESM1-1转基因细胞系提取物; G: 各转基因细胞系萝卜硫素含量(根据萝卜硫素标准曲线计算), [#]*P*<0.05; ^{**}*P*<0.01, 与WT相比。黑色箭头所指处代表萝卜硫素对应峰。

A-F: peak map of authentic sulforaphane (20 µg/mL) (A), the extracts from WT cells (B), B-C-E transgenic cells (C), BCAT4-2 transgenic cells (D), CYP79F1-2 transgenic cells (E), ESM1-1 transgenic cells (F) was identified using Agilent 1200 HPLC system; G: The sulforaphane yield was determined according to standard curve of authentic sulforaphane. [#]*P*<0.05; ^{**}*P*<0.01 compared with WT. The black arrows represent the peak corresponding to sulforaphane.

图5 转基因西兰花细胞萝卜硫素含量检测

Fig.5 Detection of sulforaphane yield in transgenic broccoli cells

在西兰花中表现出合成SFN侧链的高催化效率, 是这一合成途径中的限速酶; 拟南芥*BCAT4*的敲除突变体中, 观察到SFN的大幅减少^[11]; *CYP79F1*是细胞色素P450氧化酶编码基因家族中参与SFN合成的重要基因, *CYP79F1*主要参与SFN核心结构合成中

的*N*-羟基化反应, 其可催化二高甲硫氨酸(dihomo-Met)生成5-甲基硫基戊醛肟, 是合成SFN的重要反应之一。 *CYP79F1*在拟南芥的子叶、莲座叶和茎中强烈表达, 转座子标记的*CYP79F1*敲除突变体完全缺乏SFN^[12-13]; GRA代谢过程形成的优势产物是萝卜

硫脲(sulforaphane nitrile, 没有抗癌活性), 西兰花的ESP蛋白可以指导萝卜硫脲的形成, 使得GRA代谢产物中SFN所占比例降低, 环硫修饰蛋白基因*ESM1*的表达可以抑制萝卜硫脲的形成过程并促进SFN的形成^[14-15]。SFN合成途径涉及十分复杂的基因网络, 在之前的相关报道中, 人们研究更多的是单一过表达某个基因是否具有提高SFN的能力, 一直没有取得料想的效果。将多个基因串联共表达对于提高SFN含量应该是一个值得尝试的途径。目前多基因串联共表达在提高植物次生代谢产物含量的研究多有报道, 例如RAVANELLO等^[25]将类胡萝卜素(carotenoid)合成相关基因*crtB*、*crtI*和*crtY*在油菜中共表达, 类胡萝卜素含量比野生型增加了20倍; RA-CLARU等^[26]将拟南芥中维生素E(vitamin E)合成相关基因*pds1*、*hpt1*和*vte1*在油菜中共表达, 转基因植株的vitamin E含量比野生型增加了2倍, 等等。

目前很多植物次生代谢产物的生产都选择细胞系大量培养作为生物反应器, 例如韩国Samyang Genex公司已利用植物细胞大量培养实现了紫杉醇的商业化生产^[27]; 一些重要的药用植物如人参、西洋参、黄连、长春花等植物细胞培养都十分成功^[28]。因此使用西兰花细胞大量培养作为生物反应器对实现SFN大量生产应具有很大潜力。

为进一步提高SFN含量, 我们构建*BCAT4*、*ESM1*、*CYP79F1*以及B-C-E(三基因串联组合)四种过表达载体, 通过遗传转化与抗性筛选得到转基因西兰花细胞系, 过表达*BCAT4*细胞系中SFN含量为139.7 $\mu\text{g/g}$, 是野生型细胞系的1.79倍, 证明基因*BCAT4*的导入能够显著提高西兰花细胞的SFN含量, 且在SFN合成途径中发挥重要作用; 基因*ESM1*与*CYP79F1*单一过表达的细胞系却并没有检测到高于对照的SFN含量, 这可能是由于遗传转化后目的基因在基因组中整合的位置效应造成的, 也可能是由于它们在SFN合成途径中存在互作调控造成的, 导致单一过表达其中的某个基因并不能显著提高SFN的含量。过表达B-C-E细胞系中SFN含量为171.4 $\mu\text{g/g}$, 是野生型细胞系的2.19倍, 是*BCAT4*基因过表达细胞系的1.23倍, 其SFN含量的显著提高能够证明多基因串联共表达对SFN含量的影响效果好于单个基因的过表达。相比于单独过表达一个基因而言, 这种将多个基因在植物体内共表达的方法对提高植物SFN含量具有更大潜力。

参考文献 (References)

- [1] LIU C M, PENG C Y, Liao Y W, et al. Sulforaphane targets cancer stemness and tumor initiating properties in oral squamous cell carcinomas via miR-200c induction [J]. JFMA, 2017, 116(1): 41-8.
- [2] KALLIFATIDIS G, RAUSCH V, BAUMANN B, et al. Sulforaphane targets pancreatic tumour-initiating cells by NF-kappaB-induced antiapoptotic signalling [J]. Gut, 2009, 58(7): 949-63.
- [3] GUERRERO-BELTRÁN C, CALDERÓN-OLIVER M, PEDRAZA-CHAVERRI J, et al. Protective effect of sulforaphane against oxidative stress: recent advances [J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(5): 503-8.
- [4] BERTELLI D, PLESSI M, BRAGHIROLI D, et al. Separation by solid phase extraction and quantification by reverse phase HPLC of sulforaphane in broccoli [J]. Food Chem, 1998, 63(3): 417-21.
- [5] WILKINSON A P, RHODES M, FENWICK R G. Myrosinase activity of cruciferous vegetables [J]. J Sci Food Agr, 1984, 35(5): 543-52.
- [6] HU C Z, LI S, MA S Y, et al. Response surface optimizes the compound extraction process of sulforaphane from broccoli [J]. J Sci Tech Food Indus, 2016, 37(4): 271-7.
- [7] SONDERBY I, GEU-FLORES F, HALKIER B A. Biosynthesis of glucosinolates-gene discovery and beyond [J]. Trends Plant Sci, 2010, 15(5): 283-90.
- [8] WU Q Y, LIN J C, HUANG K, et al. Characterization and expression analysis of myrosinase for sulforaphane synthesis in broccoli [J]. Int J Agric Biol, 2013, 15(1): 83-9.
- [9] 袁高峰, 汪俏梅. 青花菜上皮硫特异蛋白基因的功能. 浙江大学学报(农业与生命科学版)(YUAN G F, WANG Q M. Function of epithiospecifier protein gene from broccoli [J]. J Zhejiang Univ: Agric & Life Sci, 2012, 38(5): 529-34.
- [10] HUANG K, LIN C J, WU Q Y, et al. Changes in sulforaphane and selenocysteine methyltransferase transcript levels in broccoli treated with sodium selenite [J]. Plant Mol Biol Rep, 2016, 34(4): 807-14.
- [11] SCHUSTER J, KNILL T, REICHELT M, et al. BRANCHED-CHAIN AMINOTRANSFERASE4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006, 18(10): 2664-79.
- [12] REINTANZ B, LEHNEN M, REICHELT M, et al. Bus, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates [J]. Plant Cell, 2001, 13(2): 351-67.
- [13] HANSEN C H, OLSEN C E, HALKIER B A. Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates [J]. J Biol Chem, 2001, 276(14): 11078-85.
- [14] ZHANG Z Y, OBER J A, KLIEBENSTEIN D J. The gene controlling the quantitative trait locus EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2006, 18(6): 1524-36.
- [15] MATUSHESKI N V, SWARUP R, MITHEN R, et al. Epithiospecifier protein from broccoli (*Brassica oleracea* L. ssp. *italica*) inhibits formation of the anticancer agent sulforaphane [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(6): 2069-76.
- [16] 张品南, 马绍英, 杨海荣, 等. 西兰花种子及其愈伤组织中萝

- 萝卜硫素含量比较. 天然产物研究与开发(ZHANG P N, MA S Y, YANG H R, et al. Comparison of sulforaphen content in seeds and callus induced from different organs of broccoli species [J]. Nat Prod Res Dev), 2013, 25(6): 796-8.
- [17] BHALLA P L, SINGH M B. Agrobacterium-mediated transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* [J]. Nat Protoc, 2008, 3(2): 181-89.
- [18] 张锦华, 郭楠, 杨妍, 等. 西兰花副产物中萝卜硫素提取、纯化及鉴定. 食品科学(ZHANG J H, GUO N, YANG Y, et al. Studies on extraction, purification and identification of sulforaphane from broccoli by-products [J]. Food Sci), 2019, 8: 248-55.
- [19] BONES A M, ROSSITER J T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates [J]. Phytochem, 2006, 67(11): 1053-67.
- [20] PEREZ-BALIBREA S, MORENO D A, GARCIA-VIGUERA C. Genotypic effects on the phytochemical quality of seeds and sprouts from commercial broccoli cultivars [J]. Food Chem, 2011, 125 (2): 348-54.
- [21] 薛冲, 李胜, 马绍英, 等. 不同光质对西兰花愈伤组织及萝卜硫素含量的影响. 甘肃农业大学学报(XUE C, LI S, MA S Y, et al. Effects of different light qualities on the callus and its sulforaphane content from broccoli [J]. J Gansu Agric Univ), 2010, 45(4): 95-9.
- [22] ESFANDIARI A, SAEI A, MATICH A, et al. Preferentially enhancing anti-cancer isothiocyanates over glucosinolates in broccoli sprouts: How NaCl and salicylic acid affect their formation [J]. Plant Physiol Biochem, 2017, 115: 343-53.
- [23] HANSEN B G, KLIEBENSTEIN D J, HALKIER B A. Identification of a flavin-monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in Arabidopsis [J]. Plant J, 2007, 50(5): 902-10.
- [24] 曹阳理慧, 李勇, 李晶. CYP83A1基因的克隆及功能验证. 生物技术通报(CAOYANG L H, LI Y, LI J. Cloning and function analysis of CYP83A1 gene from *Brassica oleracea* var.italica [J]. Biotech Bulletin), 2015, 31(2): 103-10.
- [25] RAVANELLO M P, KE D Y, ALVAREZ J, et al. Coordinate expression of multiple bacterial carotenoid genes in canola leading to altered carotenoid production [J]. Metab Eng, 2003, 5(4): 255-63.
- [26] RACLARU M, GRUBER J, KUMAR R, et al. Increase of the tocochromanol content in transgenic *Brassica napus* seeds by overexpression of key enzymes involved in prenylquinone biosynthesis [J]. Mol Breeding, 2006, 18(2): 93-107.
- [27] MALIK S, CUSIDÓ R M, MIRJALILI M H, et al. Production of the anticancer drug taxol in *Taxus baccata* suspension cultures: A review [J]. Process Biochem, 2011, 46(1): 23-34.
- [28] 甘烦远, 郑光植. 提高植物培养细胞中次级代谢产物含量的途径. 植物学报(GAN F Y, ZHENG G Z. The pathways of promoting secondary metabolite contents in plant cell cultures [J]. Chinese Bulletin of Botany), 1991, 8(4): 14-20.