

开展“中药基因组计划”的研究

To Carry on Studies of “Traditional Chinese Medicine Genome Project”

肖乐意 赵天增 薛歧庚 董建军

(河南省科学院生物技术开发中心 郑州 450000)

中药是我们的国粹,是世界医药学的重要组成部分。我国丰富的药用资源是中华民族几千年来用于防病治病、保障健康、繁衍昌盛的重要物质基础,蕴藏着巨大的开发利用潜力,前景非常广阔。

“中药基因组计划”的根本点就在于从基因组学的高度,从分子水平上来发现、研究中药的基因,寻找有效成分或活性成分的基因,将功能基因转入植物(转基因植物)进行“田间种植”;寻找、发现、克隆表达那些用于合成具有生物活性小分子有机物的酶基因,利用代谢工程在实验室合成这部分中药的有效成份。这样就可从根本上改变我国中医药研究和应用的困难局面,从源头上开创中医药研究与应用的新天地。“中药基因组计划”与以往的“零敲碎打”的基因研究的重要区别在于摒弃了一个基因一个基因地去研究的方式,而是从整个基因组的水平来阐明重要的、常用的或珍稀濒危品种的植物性中药基因在染色体中的位置、结构,搞清基因及其产物的功能、基因与基因之间的相互关系,分清功能基因和次生代谢的酶基因,进而实现“工厂化生产”或“田间种植”。

一、“中药基因组计划”的主要内容

1. 染色体的分离与制备 利用光学显微镜可

争,生物医药产业也不例外。谁拥有大批的专业人才队伍,谁就拥有竞争的主动权。目前我国从事生物医药技术研究开发的单位主要是高等医科院校和综合性大学生命科学院、医药科研机构,研究人员大约在1万以上。虽然一批优秀的青年科技人员脱颖而出、一些出国留学人员学成归来,使得我国的人才队伍初具规模,并形成一支有一定竞争力的研究队伍,近年的研究开发水平有了明显的提高;但也不得不看到,这支队伍很不稳定,从事基础研究的专业人才外流情况严重,相当一部分人才流向国外、流向外资企业或走上经营和管理岗位;而且当前特别缺少具有企业管理意识和科学家潜质的

观察到处于分裂过程中植物细胞中的染色体,并且可以通过染色体各自的形状以及经不同染色后形成的不同条带分布(banding pattern)对它们加以鉴别。用一定的化学或物理方法对植物标本进行预处理可以得到大量分裂中期的染色体,然后利用改良的染色体显微分离技术,分离获得染色体。在研究一种植物中药基因时,首先是要搞清该植物核基因组有几条染色体及染色体的形状,这是后续研究的基础。植物不但有单倍体而且还有多倍体,其染色体数目多少不等。植物中药种类多,其染色体数目可能差别较大。

2. 核酸的分离提取 (1) DNA的提取:在显微镜下挑选分散好的染色体,用微细玻璃针在显微镜操作器下进行分离,将分离的单条染色体直接放入微量离心管中,用蛋白酶k法消化,提出DNA。(2) RNA的提取:采用分离总RNA的异硫氰酸胍法,其步骤包括破碎细胞、灭活RNA酶、将RNA与DNA蛋白和多糖分开。

3. 核基因组作图 (1) 遗传作图(genetic mapping)。搞清基因或DNA标志在染色体上的相对位置与遗传距离。遗传距离通常以DNA片段在染色体交换过程中分离的频率cM表示,用以反映遗传效应的基因组图。建立精细的遗传图的关键是获得足够的高度多态性标记。(2) 物理图谱(Physical map-

两用人才。因此,振兴该产业的当务之急,是应打破旧的用人机制,制定相应的新政策和建立新机制,广纳人才,稳定人才,极大地发挥生物医药科技人才的作用。

参考文献

- [1] 蔡年生.我国新药研究开发的进展与分析.中国新药杂志.1999,8(6)
- [2] 周海钧.21世纪新药研究与开发的展望.中国新药杂志.2000,9(1)
- [3] 丁锡申.中国基因工程产业化发展历史、现状、存在问题与国外的差距和发展战略.生物工程进展.1999,19(1)

(责任编辑 肖庆山)

ping), 又称限制性内切酶图谱。用限制性内切酶将基因组 DNA 分段, 并找出各片段的排列、连续关系。对于一个庞大的基因组, 作物理图谱是结构分析的第一步。把庞大的基因组切割成较小片段, 然后确定每个片段间的位置关系, 最后再拼接综合为全序列。具体是以 DNA 序列标记位点 (Sequencing tagged Site, STS) 作路标, 以 DNA 实际长度即 bp、kb、Mb 为图距的基因组图谱。物理图谱是进行 DNA 序列分析和基因组结构分析的基础。(3) 序列图谱 (Sequence mapping), 即测定全部染色体 DNA 的核苷酸序列。(4) 转录图谱 (transcription mapping), 又称 cDNA 计划。首先建立 cDNA 文库, 再从中随机挑选进行 DNA 克隆测序, 主要目标是找出足够多的表达序列标志 (expressed sequence tags, EST)。(5) 染色体定位 (chromosome mapping), 即采用细胞生物学和病理学的基因定位方法, 搞清各基因在染色体的位置。

4. 建立基因文库 用基因工程方法, 把核基因组分割成同等大小片段, 然后插入载体中, 经转化后全部保存于宿主菌中, 即建立了基因文库 (gene Library)。

(1) 基因组文库 (genomic library) 是含有某种生物体全部基因的随机片段的重组 DNA 克隆群体。完整的基因组文库的构建使任何 DNA 片段的筛选和获得成为可能, 是发现中药功能基因的工作基础。建构基因组文库时, 先将植物中药染色体 DNA 提纯, 通过机械剪切或酶切使之成为一定大小的片段, 将其与适当的载体 (pUC19 或 λ 噬菌体) 连接, 转化或转染细菌, 得到基因重组库。这个文库中将含有基因组全部基因片段, 它像一个贮存有基因组全部序列的信息库, 是发现基因、基因序列测定的基础工作。

(2) cDNA 文库是以 mRNA 为模板, 在逆转录酶的作用下形成的互补 DNA (complementary DNA, cDNA) 库。与基因组文库一样, cDNA 文库也是指一群含重组 DNA 的细菌或噬菌体克隆。其区别之处在于在体外重组 DNA 时, 选用的供体不是源于生物体的基因组, 而是将细胞的 mRNA 逆转录成 cDNA 后再与载体重组, 转化到宿主细菌里或包装成噬菌体颗粒, 得到一系列克隆群体。每个克隆只含有一种 mRNA 的信息, 足够数目克隆体的总和则包含细胞的全部 mRNA 的信息, 这样的克隆群体叫 cDNA 文库。cDNA 便于克隆和大量扩增, 不像基因组 DNA 因含有内含子而很难表达, 可以从 cDNA 库中筛选到所需的目基因或功能基因, 并直接用于该基因的表达。因而, 在基因工程研究中, 真核细胞的 cDNA 库往往比基因库更重要。

cDNA 文库可分为表达型和非表达型两种。表达型 cDNA 文库采用表达型载体, 插入的 cDNA 片

段可表达产生融合蛋白, 具有生物活性。这些 cDNA 库适用于哪些蛋白质的氨基酸序列目前尚不清楚; 但不能采用核苷酸探针筛选的目的基因。非表达型 cDNA 库适用于那些采用核苷酸探针进行杂交筛选的探针。

5. 基因序列测定 植物中药基因组基因序列的测定是“中药基因组计划”的核心与基石。20 世纪 80 年代以来, 随着计算机软硬件技术、仪器制造和分子生物学研究的迅速发展, 使得 DNA 自动测序技术取得了突破性进展。DNA 自动测序技术, 由于它在操作上简单 (自动化)、安全 (非同位素)、精确 (计算机控制)、快速等特点而得到了广泛的应用。此外, 这些仪器在各种应用软件的辅助下还可以进行 DNA 片段大小分析和定量分析、基因突变分析 (SSCP)、DNA 指纹图谱分析、基因连锁图谱分析以及表达水平的分析方面, 具有广阔的应用前景。

6. 中药基因组生物信息学研究 生物信息学 (Bioinformatics) 是随着人类基因组计划的实施而发展起来的用数理和信息学方法研究蛋白质和核酸序列的结构和功能的一门生物学与计算机信息学交叉的学科。其主要内容包括: 收集管理基因组和蛋白质组的数据; 分析、解释基因组和蛋白质组的内涵。其研究的对象是生物信息数据, 其中包括蛋白质和核酸序列; 其方法是数据库、矩阵和信息编码; 其手段是计算机和网络。“中药基因组计划”必将产生大量的基因组学和蛋白质组的生物学信息的数据。建立中药数据库, 进行中药基因、蛋白质及多肽类等生物活性物质的信息化管理与分析, 具有极其重要的实用价值。中药生物信息学有以下主要内容。(1) 中药生物信息的收集、存储、组织、检索和管理。(2) 基因组序列的提取与分析, 用于电脑基因克隆, 以发现和鉴定新基因; 用于编码区的识别; 用于非编码区的信息结构分析; 用于生物进化的遗传信息研究。(3) 蛋白质结构与功能分析, 用于蛋白质及多肽类活性物质的分类、检索, 蛋白质三维结构的分析等。

7. 功能基因和次生代谢酶基因的鉴定 这是中药基因组学研究的核心和精华所在。功能基因和次生代谢酶基因决定了中药有效成份的结构与功能, 确定它们对研制现代中药具有关键性意义。

由于这方面的信息和资料非常有限, 本项目研究主要通过建立基因文库, 特别是 cDNA 文库来寻找、发现功能基因。通过基因标签法 (gene tagging) 和同源重组中的基因敲除法 (gene knockout) 来确定有效成份的功能基因。

8. 基因的克隆与表达 (工厂化生产) 掌握植物中药的基因, 就可能在实验室研制和生产中药的基因药物。

9. 中药转基因植物 (田间种植) 植物遗传转

化是将外源基因导入植物细胞,经组织培养将细胞培养成植株,并且让导入的基因在植物体内能够稳定地表达和遗传,这样的植物称为转基因植物^[9,10]。建立在植物组织和细胞培养基础上的各种转基因技术不断革新,绝大多数植物转化已获成功。本项目拟采用农杆菌质粒构建的双元载体系统,它的宿主菌既可是大肠杆菌,又可是农杆菌,操作简单方便。该法是以载体为媒介的基因转化(vector mediated gene transfer)。除此之外,还可采用DNA直接转化(naked DNA transfer),将裸基因通过电击法、基因枪法、花粉管通道法进行转基因操作。将中药基因导入易种植、可食用的植物(如红萝卜、甘蔗等)内,可直接食用或从中大量提取高纯度的中药有效成分。

10. 通过代谢工程^[12,13]合成小分子有效成分
克隆表达植物中药次生代谢酶基因^[14,15],按其次生代谢^[6]途径合成具有预防和治疗作用的小分子有机化合物。

11. 生物芯片在“中药基因组计划”中的应用
基因芯片是研究、分析基因的一种强有力的分子生物技术。中药基因芯片作为“中药基因组计划”的又一重点,将从根本上改变长期以来人们对中药的研究手段和认识层次。中药基因芯片将是高通量、高效率地从分子水平上研究中药的最新技术手段。中药基因芯片包括分类、鉴定芯片和药物筛选芯片两种重要类型。前者可以用于对中药材料及制成品的定性、定量分析,在药物鉴定、质量保证方面具有极为重要的应用价值,还可用于寻找、发现中药新基因;后者用于中药的药效筛选以及药理分析,还可用于证实、发现中药新品种。

三、“中药基因组计划”的意义

中药现代化就是依靠现代先进科学技术的方法和手段,遵循严格的规范标准,研制出优质、高效、安全、稳定、质量可控、服用方便并具有现代剂型的新型中药——现代中药。这种新型中药从总体上来说,应符合国际医药主流市场对产品的标准要求,可在国际上广泛流通。

运用现代科学技术理论和手段,研究和开发现代中药,促进我国传统中药产业水平的提高,是我国研究和开发中药的重要政策。虽然我国在这方面已作出了几十年的努力,但是,在与以分子生物学为代表的现代生物技术相结合方面,有关工作还相差甚远。中药的资源保护、质量保证、药效学与药理学研究等都没有从根本上有所突破,这些都严重地束缚着中药现代化的进程。“中药基因组计划”就是在此背景下提出的。

“中药基因组计划”的目的是将分子生物学、生

物信息学等现代生物技术与其他现代科学技术相结合研究和开发中药。中医药是世界医学的重要组成部分,现在到了提出和实施“中药基因组计划”的时候了。这是落实我国中药现代化研究与开发政策的重大战略措施。

“中药基因组计划”应成为中药研究和应用的转折点,应是中药现代化的新的里程碑,它将为中药走向世界开辟崭新的道路,是中药研究的又一次革命。“中药基因组计划”的实施,将开辟一个新的研究领域,建立一门新的学科,培养一大批高层次中药研究人才,为中药现代化奠定新的理论基础、应用基础、人才基础,加速中药现代化进程。“中药基因组计划”的实施和应用,将会形成若干重大的自主知识产权,具有显著的社会效益和巨大的经济效益,并对当今技术创新、产业升级和经济结构调整都将产生重大影响。把握这次历史性机遇,加快“中药基因组计划”的研究乃是当务之急。

参考文献

- [1] 孙汉董. 植物资源、植物化学与新药开发. 国外医药. 植物药分册, 1999, 14(6): 231
- [2] 阚毓铭. 中药有效成分研究与复方新药开发. 南京中医药大学学报, 1999, 15(2): 65
- [3] 刘卫华, 王志萍. 论中药资源开发途径. 时珍国医国药, 1999; 10(1): 75
- [4] 黄璐琦, 杨滨, 网敏等. 当前我国药用植物资源开发利用研究中几个问题的探讨. 中国中药杂志, 1999; 24(2): 70
- [5] 刘振武, 李满飞. 中药产业的可持续发展与 GAP. 中草药, 1999, 30(11): 附 1
- [6] 吴旻. 人类基因组计划的进展及其影响. 科技导报, 1999(1)
- [7] <http://sinost.chinainfo.gov.cn/kjck/k4.htm>
- [8] 余叔文, 汤章成主编. 植物生理与分子生物学. 北京: 科学出版社, 1999: 390
- [9] 姜国勇, 金德敏, 翁曼丽等. 天花粉蛋白基因转化番茄的研究. 植物学报, 1999, 41(3): 334
- [10] Anne Simon Moffat. Toting up the early harvest of transgenic plants. Science, 1998; 282: 2176
- [11] Anne Simon Moffat. Engineering plants to cope with metals. Science, 1998; 280: 2129
- [12] 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 26
- [13] Baltz R H, Hosted T J. Molecular genetic methods for improving secondary metabolite production in actinomyces. Trends Biotechnol, 1996; 14(4): 245
- [14] Wildung M R, Croteau R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. J Bio Chem, 1996, 271: 9201 ~ 9204
- [15] 孙雷心. 美国 Cytoconal 公司试生产重组红豆杉醇生物技术通报, 1997(1): 32

(责任编辑 肖庆山)