

such markers (SNPs) can be found in the mitochondrial nad 1 intron 2 sequences and used as a new molecular marker for the identification of *Dendrobium* species.

References:

- [1] Ma G X, Xu G J, Xu L S, et al. Survey and identification of commercial sample Shihu (*Dendrobium* Sw.) (■) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1995, 26: 370-372.
- [2] Ding X Y, Xu L S, Xu H, et al. Database establishment of the whole rDNA ITS region of *Dendrobium* species of "Fengdou" and authentication by analysis of their sequences [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2002, 37: 567-573.
- [3] Xu H, Li X B, Wang Z T, et al. rDNA ITS sequencing of *Herba Dendrobii* (Huangcao) [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 2001, 36: 777-783.
- [4] Teng Y F, Wu X J, Xu H, et al. A comparison of matK sequences between *Herba Dendrobii* (Shihu) and its adulterant species [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2002, 33: 280-283.
- [5] Zhang M, Huang H R, Liao S M, et al. Cluster analysis of *Dendrobium* by RAPD and design of specific primer for *Dendrobium candidum* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2001, 26: 442-447.
- [6] Mitton J B, Kreiser B R, Rehfeldt G E. Primers designed to amplify a mitochondrial nad 1 intron in ponderosa pine, *Pinus ponderosa*, limber pine, *P. flexilis*, and Scots pine, *P. sylvestris* [J]. *Theoret Appl Genet*, 2000, 101: 1269-1272.
- [7] Sperisen C, Büchler U, Gugerli F, et al. Tandem repeats in plant mitochondrial genomes: application to analysis of population differentiation in the conifer Norway spruce [J]. *Mol Ecol*, 2001, 10: 257-263.
- [8] Gugerli F, Senn J, Anzidei M, et al. Chloroplast microsatellites and mitochondrial nad 1 intron 2 sequences indicate congruent phylogenetic relationships among Swiss stone pine (*Pinus cembra*), Siberian stone pine (*Pinus sibirica*) and Siberian dwarf pine (*Pinus pumila*) [J]. *Mol Ecol*, 2001, 10: 1489-1497.
- [9] Chapdelaine Y, Bonen L. The wheat mitochondrial gene for subunit 1 of the NADH dehydrogenase complex: a trans-splicing model for this gene-in-pieces [J]. *Cell*, 1991, 65: 465-472.
- [10] Demesure B, Sodji N, Petit R J. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants [J]. *Mol Ecol*, 1995, 4: 129-131.

利用浸苗法将野生天麻总 DNA 导入马铃薯的研究

葛正龙¹, 周鹤峰², 邵敏¹

(1. 遵义医学院生物化学教研室, 贵州 遵义 563003; 2. 遵义医学院珠海校区生物工程系, 广东 珠海 519041)

摘要:目的 研究野生天麻总 DNA 对马铃薯的转化, 分析马铃薯转化植株中野生天麻的药用成分天麻素。方法 采用浸苗法将野生天麻总 DNA 导入马铃薯试管苗, 通过紫外扫描法、PCR 扩增筛选转化植株, 对转化植株进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 蛋白分析, 通过 TLC 法检测天麻素。结果 (1) 在 200 株转化的马铃薯中有 21 株的紫外扫描图谱与正常对照组有显著差异, 且在 220 nm 有明显吸收峰。(2) 5 株经 PCR 扩增出野生天麻抗真菌蛋白 (GAFP) 基因。(3) 转基因马铃薯与正常马铃薯的蛋白表达有明显差异, 并且在转基因马铃薯中有一条与 GAFP 相同的条带。而正常马铃薯中无此条带。(4) 通过薄层色谱法检测出 3 株转基因马铃薯表达野生天麻的有效药用成分天麻素。结论 采用浸苗法进行外源总 DNA 导入是可行的。

关键词: 野生天麻; 马铃薯; 浸苗法; 天麻素

中图分类号: R282.7

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)07-1062-04

A genetic transformation study of introducing wild *Gastrodia elata* DNA into *Solanum tuberosum* by soaking seedling method

GE Zheng-long¹, ZHOU He-feng², SHAO Min¹

(1. Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 2. Department of Bioengineering, Zhuhai Area, Zunyi Medical College, Zhuhai 519041, China)

Abstract: **Objective** Using the soaking seedling method to introduce wild *Gastrodia elata* DNA into potato plantlets and analyze gastrodin of transformed *Solanum tuberosum*. **Methods** After the tuber grown up, the solution of gastrodin was extracted from the potatoes which were transformed by wild *G. elata* DNA. The transformed plants were scanned by ultraviolet. PCR was used to analyze GAFP gene by SDS-PAGE. TLC was used to analyze the gastrodin of transformed *S. tuberosum*. **Results** (1) The 21

收稿日期: 2004-11-16

基金项目: 贵州省省长基金和贵州省科技厅社发基金 (2001112)

作者简介: 葛正龙 (1962—), 男 (布衣族), 贵州修文人, 副教授, 硕士生导师, 1985 年毕业于遵义医学院临床医学专业, 1988—1991 年在北京医科大学生物化学与分子生物学系攻读研究生, 并获医学硕士学位, 1999—2000 年在英国 Darham 大学做访问学者, 研究方向为药用植物分子生物学。Tel: (0852) 8204473 Fax: (0852) 8204792 E-mail: zlongge@hotmail.com

transformed plants had obvious absorption peak at 220 nm in 200 transformed *S. tuberosum*. (2) The fragment of wild *G. elata* GAFP gene was found by PCR from 5 transformed plants. (3) The protein expressions in transgenic *S. tuberosum* were obviously different from the normal *S. tuberosum*; a band was detected in transgenic *S. tuberosum* and wild *G. elata*, but wasn't detected in normal *S. tuberosum*. (4) The expression of the gastrodin was detected by TLC from three transformed plants. **Conclusion** It is feasible to use the soaking seedling method to introduce exogenous DNA into plants.

Key words: wild *Gastrodia elata* Blume; *Solanum tuberosum* L.; soaking seedling method; gastrodin

天麻 *Gastrodia elata* Blume 属兰科, 是名贵传统中药, 有着非常广泛的药用价值, 近年来因为过度采伐以及病虫害等原因, 其资源已受到严重威胁, 因此对珍稀濒危的野生天麻进行可持续利用的研究已迫在眉睫。自从 20 世纪 70 年代周光宇教授提出 DNA 片段杂交假设以来, 应用“花粉管通道法”、“浸泡法”等方法将外源 DNA 导入植物已成为一种新的有效的遗传转化方法。作为外源基因导入技术之一的“浸苗法”已在烟草、大豆、蚕豆等作物中得到了实际应用, 并实现了遗传转化。朱生伟等人应用浸苗法成功地将外源 DNA 导入烟草, 导入后代在形态、品质和成分等方面已产生广泛的变异^[1]。本研究旨在探索通过转基因植物来生产野生天麻的有效药用成分的可行性, 试图通过转基因技术将野生天麻总 DNA 导入马铃薯, 培育出具有药用价值或保健作用的马铃薯新材料和新品系。

1 材料与方法

1.1 材料: 野生天麻, 购于遵义, 经贵阳中医学院李涛副教授鉴定。马铃薯(中薯 1 号), 由遵义农业科学研究所提供。

1.2 野生天麻总 DNA 的提取: 采用本实验室改进的 CTAB 法, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段完整性, 以 λ -DNA 作为相对分子质量参照, 电压 4 V/cm, 电泳 4 h^[2,3]。

1.3 野生天麻 DNA 对马铃薯试管苗的转化^[1]: 实验组: 选择生长一致的马铃薯壮苗(5~7 片真叶) 200 株, 在超净工作台上, 用无菌水将根部冲洗干净, 滤纸吸净水滴, 用提取的野生天麻 DNA 溶液(质量浓度 500 $\mu\text{g/mL}$) 浸泡 36 h^[1], 转到 MS 高糖培养基上, 温度 25 $^{\circ}\text{C}$, 暗培养 2 个半月。对照组: 采用 TE 液同样条件下处理。

1.4 筛选转化植株

1.4.1 粗筛(紫外扫描法): 分别取实验组和对照组试管薯, 称质量, 液氮研碎, 按 1:30 的质量体积比加入甲醇, 超声 1 h 后静置 24 h, 再超声 1 h, 静置 2 h, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 2 mL, 用紫外分

光光度计在 200~300 nm 下进行波长扫描^[4,5]。

1.4.2 细筛(PCR 扩增野生天麻抗真菌蛋白): 分别提取通过粗筛得到的转化株试管薯总 DNA, 进行野生天麻抗真菌蛋白(GAFP)的 PCR 扩增。GAFP 基因引物参照相关文献设计^[6], 引物序列如下: 上游 5'-AGGGATCGGTTGAATTCGGGC-3', 下游 5'-GCCAGACGCCGCCGCTGT-3'。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 、1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、6 min, 30 个循环。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳^[7]。

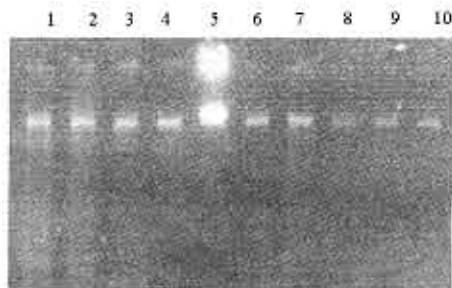
1.5 转基因马铃薯中 GAFP 基因表达的分析: 分别取实验组和对照组试管薯, 按王义琴等^[8]方法制成总的可溶性蛋白溶液。采用 5% 的浓缩胶, 15% 的分离胶, 用考马斯亮蓝 G250 染色^[9]。

1.6 转基因马铃薯中天麻素成分的分析: 分别取实验组和对照组试管薯, 称质量, 液氮研碎, 按 1:30 的比例加甲醇, 超声 1 h 后静置 24 h, 再超声 1 h, 静置 2 h, 1 000 r/min 离心 10 min, 取上清液进行浓缩处理^[4]。以 0.5% 羧甲基纤维素钠、硅胶 H 自制薄板, 110 $^{\circ}\text{C}$ 活化 30 min, 各取样品及天麻素对照品 4 μL 点样, 以氯仿-甲醇-冰醋酸(6:2:0.15)为展开剂, 展距为 15 cm, 10% 磷钼酸乙醇溶液为显色剂, 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 6 min, 观察并拍照^[4]。

2 结果与分析

2.1 DNA 片段的大小: 提取的野生天麻 DNA 样品在 0.3% 琼脂糖凝胶上电泳, 电压为 5 V/cm, 电泳 3 h, 以 λ -DNA 作为相对分子质量参照, 电泳结果显示: 通过改进的 CTAB 法所提取的野生天麻 DNA 样品为单一条带, 且片段大小为 50 kb 左右(图 1), 符合分子导入要求。

2.2 紫外扫描图谱分析: 对 200 株转化植株和 20 株正常的试管薯甲醇提取液进行紫外扫描, 扫描波长是 200~300 nm, 结果显示: 有 21 株转化马铃薯的紫外扫描图谱与正常马铃薯有显著差异, 并且转化马铃薯的甲醇提取液在 220 nm 处有明显吸收峰, 见图 2。



1~4,6~10-野生天麻 DNA 5-λ-DNA (48.5 kb)
1—4,6—10-wild *G. elata* DNA 5-λ-DNA (48.5 kb)

图 1 野生天麻 DNA 琼脂糖凝胶电泳图
Fig. 1 Agarose gel electrophoretogram of wild *G. elata* DNA

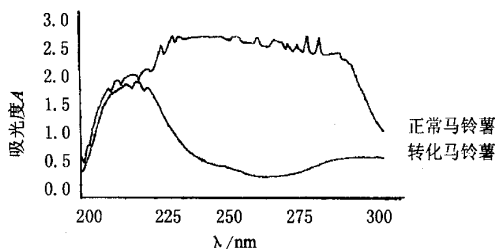
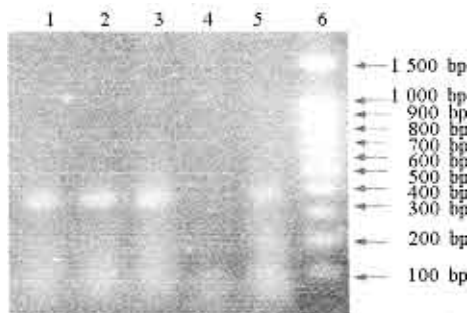


图 2 正常马铃薯和转化马铃薯紫外扫描图谱
Fig. 2 Ultraviolet scan of normal *S. tuberosum* and transgenic *S. tuberosum*

2.3 GAFF 基因的 PCR 分析:抗真菌蛋白是野生天麻皮层中的一种能强烈抑制真菌生长的蛋白,马铃薯中不存在此蛋白,因此分别以野生天麻总 DNA 和通过粗筛的转化植株总 DNA 为模板,通过 PCR 扩增来分析 GAFF 基因是否已转到马铃薯中,电泳结果发现在 3 株转基因马铃薯中扩增出与 GAFF 基因位于同一位置(380 bp)的条带,结果见图 3。



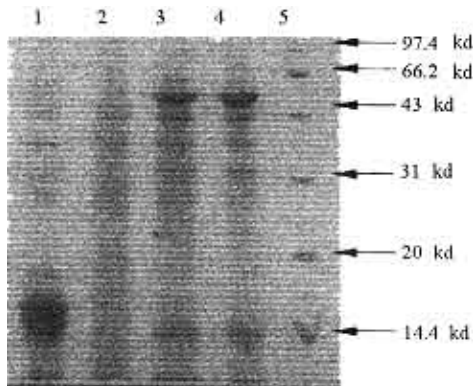
1~3-转基因马铃薯 4-正常马铃薯 5-野生天麻 6-标记
1—3-transgenic *S. tuberosum* 4-normal *S. tuberosum*
5-wild *G. elata* 6-Marker

图 3 PCR 扩增结果

Fig. 3 Results of PCR amplification

2.4 转基因马铃薯中 GAFF 基因表达分析:GAFF 是一种相对分子质量为 14 kd 的蛋白质,通过 PCR 扩增的方法从粗筛的 21 株马铃薯中细筛得到 3 株

含有 GAFF 基因,此 3 株经过 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况,结果显示:经过转基因的马铃薯植株中含有 GAFF(14 kd 处),而正常马铃薯中无此带,且转基因马铃薯与正常马铃薯的蛋白表达有明显差异,见图 4^[9]。

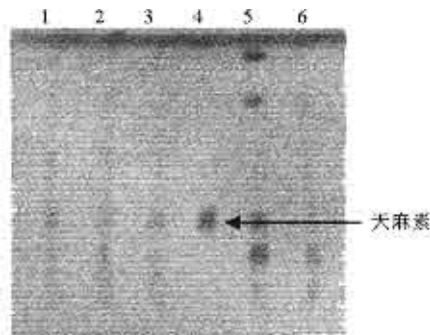


1-野生天麻 2-正常马铃薯 3,4-转基因马铃薯 5-标记
1-wild *G. elata* 2-normal *S. tuberosum*
3,4-transgenic *S. tuberosum* 5-Marker

图 4 SDS—PAGE 电泳图谱

Fig. 4 Electrophoretogram of SDS—PAGE

2.5 药用成分分析:天麻素(gastrodin)是野生天麻的有效药用成分,通过薄层色谱(TLC)法分析转基因马铃薯、正常马铃薯、野生天麻 3 者中天麻素,结果可见:转基因马铃薯中可检测到天麻素,见图 5。



1~3-转基因马铃薯 4-天麻素对照品
5-野生天麻 6-正常马铃薯
1—3-transgenic *S. tuberosum* 4-gastrodin reference substance
5-wild *G. elata* 6-normal *S. tuberosum*

图 5 薄层色谱图谱

Fig. 5 TLC chromatogram

3 讨论

本实验从转化的马铃薯中检测到 3 株含有 GAFF 基因,其转化效率为 1.5%,比用农杆菌介导的转化法效率要低,可能原因是:野生天麻的总 DNA 导入马铃薯后其基因与受体马铃薯细胞整合与转化完全是随机的,缺乏控制机制,因而实现的目的性较差,以致转化效率低。尽管采用此法转化效率

不高,但仍表明:采用浸苗法将野生天麻总DNA导入马铃薯中的方法是可行的。

GAFP其相对分子质量为14 kd,它能强烈抑制腐生性真菌生长,从而阻止密环菌侵染顶生球茎,使其得以正常生长。马铃薯中不存在此蛋白,通过SDS—PAGE发现在转化的植株中有GAFP,说明GAFP基因已整合到马铃薯基因组中,并且通过基因表达调控而翻译GAFP^[1]。

野生天麻的有效成分为天麻素即对羟基苯-β-D-葡萄糖吡喃糖苷,它是一种小分子有机物质,其甲醇液在220 nm有最大吸收峰。本实验通过紫外扫描法从200株转化的马铃薯中检测到21株的扫描图谱与正常对照组有明显差异,说明天麻的基因在马铃薯中已经表达并且导致马铃薯发生变异。变异的发生可能通过受、供体基因同源重组这一整合途径或通过供体DNA片断插入到受体基因组中^[10]。

笔者通过薄层色谱法在3株转化的植株中检测到天麻素,而天麻素不属于蛋白质,说明天麻的基因在马铃薯中已经表达并且通过一系列复杂的体内代谢产生了天麻的有效药用成分天麻素。但转基因马铃薯中含天麻素很少(样品浓缩200倍),如何提高转基因马铃薯中野生天麻的有效药用成分——天麻素的量有待于进一步研究。

References:

- [1] Zhu S W, Xu Z, Zhu X C, et al. A preliminary study on using the seedling soaking method to induce the genetic characters in flue-cured tobacco [J]. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), 1999, 30(2): 190-194.
- [2] Huang J, Ge X, Sun M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA [J]. *Biotechniques*, 2000, 28(3): 432-434.
- [3] Li X B, Feng B, Zhang Z H, et al. Isolation of total DNA from plant Chinese medicinal materials [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(7): 652-654.
- [4] Ding L, Huang Y. Detecting gastrodin by TLC—UV in *Gastrodia elata* patch [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1996, 18(1): 48-49.
- [5] Zhou J, Jia E, Liu T F. The methods of gastrodin's determination in *Gastrodia elata* [J]. *Prac J Med Pharm* (实用医药杂志), 2002, 19(9): 713-714.
- [6] Hu Z, Huang Q, Liu X, et al. Primary structure and cDNA cloning of the antifungal protein GAFP-1 from *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1999, 21(2): 131-138.
- [7] Wang X C, Willson A D, Guy D. Molecular cloning of GAFP-1 an antifungal protein from *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41(10): 1041-1045.
- [8] Wang Y Q, Li W B, Lan H M, et al. N-terminal sequence and cDNA cloning of *Gastrodia* antifungal protein (GAFP) from *Gastrodia* (*G. elata* Bl. f. *elata*) [J]. *High Technol Lett* (高技术通讯), 2000, 10(1): 10-14.
- [9] Ding G H, Chi C Y, Xu Q J, et al. Electrophoretic analysis of proteins in D₁ generation after exogenous DNA introduced of tobacco [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 2003, 39(2): 153-155.
- [10] Potrykus I, Paszkowski J, Saul M W, et al. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer [J]. *Mol Gen Genet*, 1985, 199(2): 169-177.

雷公藤属3种植物不同群体和个体中雷公藤甲素的研究

黄文华¹, 郭宝林^{1*}, 斯金平², 阮秀春², 余竞光¹, 孙 兰¹

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094;

2. 浙江省丽水市林业科学研究所, 浙江 丽水 323000)

摘要:目的 测定雷公藤属3种植物(雷公藤、昆明山海棠和黑蔓)不同群体和个体中雷公藤甲素(triptolide),为评价雷公藤药材质量和寻找雷公藤的优质种质奠定基础。方法 建立雷公藤甲素HPLC测定方法,并测定了全国主要分布区25个群体91个个体的木质部和韧皮部中的雷公藤甲素。结果 黑蔓的雷公藤甲素质量分数很低;雷公藤和昆明山海棠种间的雷公藤甲素差异不明显,个体质量分数木质部为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 5.83 \times 10^{-5}$;韧皮部为 $2.3 \times 10^{-6} \sim 1.030 \times 10^{-4}$ 。结论 雷公藤和昆明山海棠不同个体雷公藤甲素质量分数最高值与最低值相差约50倍,不同居群雷公藤甲素质量分数最高值与最低值相差10多倍,不同来源的药材质量差异极大,严重影响用药的安全性;雷公藤甲素质量分数高的居群位于浙江西南部和中部、湖南新宁、贵州雷山和安徽黄山;湖南新宁、贵州雷山和浙江江山居群中有雷公藤甲素质量分数极高的个体,值得进一步研究,以寻找质量分数高的优良单株。

关键词:雷公藤属;雷公藤;昆明山海棠;黑蔓;雷公藤甲素;高效液相色谱法

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)07-1065-04

收稿日期:2004-11-23

基金项目:浙江省林业重大科研项目“木本药材高效栽培技术及有效成分提取工艺的研究”资助项目(2002 A 01)

作者简介:黄文华(1969—),女,新疆石河子市人,助理研究员,硕士,中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所工作,从事天然药物和药用植物资源的科研工作。 Tel:(010)62899728 Fax:(010)62899717 E-mail:hwhzh69@sohu.com

* 通讯作者 郭宝林 Tel:(010)62899732 E-mail:guobaolin010@yahoo.com.cn