

为解决川贝母药材严重匮乏的主要方式,其主要做法就是在海拔3 000 m以上地区集中繁育种子,然后在海拔3 500 m的川贝母适生群落中补播种子,增加川贝母种群密度,经过3~5年抚育生长收获药材。由于川贝母种子存在深度休眠,补播种子休眠的解除成为野生抚育成功须解决的关键技术环节之一。伊贝母 *F. pallidiflora* Schrenk、浙贝母 *F. thunbergii* Miq.^[1,2,11] 种子休眠研究表明其为胚形态后熟与发芽抑制物存在的混合休眠类型。

川贝母4种药材的基源植物中,只有川贝母 *F. cirrhosa* D. Don 有少量研究,陈士林^[1]、陈瑛^[2]等研究了卷叶贝母种子胚后熟的层积温度条件。笔者研究揭示出川贝母种皮无吸水障碍;通过对不同层积阶段种子胚的形态观察,揭示了川贝母种子从层积前的心形胚发育至层积后期鱼雷形胚的动态过程,这也表明川贝母存在胚形态后熟,且可以通过层积方法促进胚完成形态后熟。采用白菜种子发芽法进行生物鉴定,首次报道了川贝母种子存在发芽抑制物,且为存在于种子表皮及种子内部的水溶性抑制

物质;另外还揭示了经过层积处理的川贝母种子发芽适温。本实验首次揭示出了川贝母种子为混合休眠类型,研究结果为深入了解川贝母种子休眠机制、采用合适方法解除休眠奠定了基础。

参考文献:

- [1] 陈士林,肖诗鹰,魏建和,等. 川贝母野生抚育——中药材可持续利用模式研究[J]. 亚太传统医药,2006(2): 72-75.
- [2] 陈瑛,张军,李先恩. 卷叶贝母种子胚后熟的温度条件[J]. 中国中药杂志,1993,18(5): 270-272.
- [3] 陈瑛. 实用中药种子技术手册[M]. 北京:人民卫生出版社,1999.
- [4] 宋廷杰,肖杰易,李祥洲. 川贝母种子赤霉素处理试验研究[J]. 基层中药杂志,1994,8(1): 14-16.
- [5] 李铁华. 木荷种子休眠与萌发特性的研究[J]. 种子,2004,23(6): 15-17.
- [6] ISTA. 1996 国际种子检验规程[M]. 中国农业出版社,1999.
- [7] 唐安军,龙春林,刀志灵. 种子休眠机理研究概述[J]. 云南植物研究,2004,26(3): 241-251.
- [8] 李蓉,叶勇. 种子休眠与破眠机理研究进展[J]. 西北植物学报,2005,25(1): 2350-2355.
- [9] 蔺经,杨青松,李小刚,等. 砂梨种子休眠原因与解除休眠方法的研究[J]. 江西农业大学学报,2006,28(4): 525-528.
- [10] 杨万霞,猷香香,方升佐. 青钱柳种子的种皮构造及其对透水性的影响[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2005,29(5): 25-28.
- [11] 李志尧,潘映虹,李风. 贝母种子浸液抑制性测定[J]. 中国中药杂志,1989,14(5): 15-16.

人参体细胞胚胎发生过程中内源激素变化和基因表达研究

王义¹,赵文君²,孙春玉¹,杨晶¹,张美萍^{1*}

(1. 吉林农业大学生命科学学院,吉林 长春 130118; 2. 白山经济开发区管理委员会,吉林 白山 134300)

摘要:目的 探讨外源激素-内源激素-特异基因之间的关系,为阐明人参体细胞胚胎发生的分子机制奠定基础。方法 对人参不同发生途径,不同时期的培养物进行 AFLP 分析,对体细胞胚胎发生不同时期培养物的内源 IAA 和 ABA 以及皂苷的量进行了测定。结果 在早期胚时期 IAA 的量最高,在成熟胚时期 ABA 的量最高,而 ABA/IAA 的值在成熟胚时较高;不同发生途径,不同时期的培养物基因表达不同;体胚发生试管苗总皂苷的量比子叶胚时期高出4倍多。结论 IAA 的存在是维持人参体胚正常发育到早期胚的条件,ABA 与胚性启动,体胚发生、发育相关,尤其对胚胎发育后期有较大的影响;在不同生理状态或不同的培养条件下产生了不同的基因调控类型,不同的发育过程会有特异基因表达,导致了人参分化情况的不同;随着形态建成的逐步完成,也是次生代谢产物逐渐积累的过程。

关键词: 人参;内源激素;cDNA-AFLP

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2008)07-1084-06

Changes of endogenous hormone and gene expression during process of somatic embryogenesis in *Panax ginseng*

WANG Yi¹, ZHAO Wen-jun², SUN Chun-yu¹, YANG-Jing¹, ZHANG Mei-ping¹

(1. College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Management Committee

收稿日期:2007-10-15

基金项目:吉林省科技厅基金资助项目(250113)

作者简介:王义(1964—),男,吉林省德惠县人,博士,副教授,硕士生导师,吉林农业大学生命科学院副院长,主要从事药用植物细胞工程、药用植物种质资源创新和开发领域的研究,主持和参加国家中医药管理局、省科技厅和省教育厅等课题12项,核心期刊上发表论文30余篇,出版著作1部。Tel:(0431)84533182 13504315977 E-mail:wanglaoshi2007@tom.com

*通讯作者 张美萍 Tel:(0431)84531630 13394489398 E-mail:wzhaoyun@tom.com

of Bai mountain Economic Development Region, Baishan 134300, China)

Abstract: Objective To study the relationship during exogenous hormone-endogenous hormone-idiogene, and establish the foundation to illuminate the molecule mechanism during process of somatic embryogenesis in *Panax ginseng*. **Methods** AFLP Analysis on the period of different culture in development pathway of *P. ginseng* was carried out simultaneously, the endogenous IAA, ABA, and the saponin content in the period of different cultures during process of somatic embryogenesis in *P. ginseng* were determined. **Results** It indicated the content of IAA was the highest in early embryo period and ABA was the highest in the mature embryo period. The ratio of ABA/IAA was higher at the stage of mature embryo than that of others. The gene expression was different in the different period cultures during process of somatic embryogenesis in *P. ginseng*. The total saponin content of test-tube plantlet is four fold higher than that in the period of cotylen embryo. **Conclusion** The condition that maintains normal development of somatic embryogenesis in *P. ginseng* is the presence of IAA. ABA correlates with the embryo priming, somatic embryogenesis and development. Especially, it influences the later period of somatic embryogenesis. It produces the different types of gene regulation in different physiology condition or different culture conditions. There is idiogene expression in the different development processes, which induces the different cell differentiation. With gradually completion of morphogenesis, it is the accumulative process of secondary metabolite.

Key words: *Panax ginseng* Meyer; endogenous hormone; cDNA-AFLP

体细胞胚胎发生技术不仅成为植物快繁的重要手段,而且也已成为研究植物胚胎发生机制和遗传转化的重要系统,其在药用植物上的应用也很受重视。对于植物组织培养过程中内源激素的研究,国外从 20 世纪 60 年代起可见一些报道,随着内源激素检测手段的不断改进,近年来已有国内外科学工作者在一些植物上作过研究,这将对植物组织培养过程中,有效指导合理添加外源激素,阐明植物组织培养中脱分化、分化及再生长的生理机制起重要作用。

cDNA-AFLP 技术是近年发展起来的比较成熟的用于差异基因筛选和分析 RNA 指纹图谱的技术,能同时处理多个不同来源样品间基因表达的差异。生物体表现出的各种特性,主要是由于基因的差异表达引起的。由于基因差异表达的变化是调控细胞生命活动过程的核心机制,通过比较同一类细胞在不同生理条件下或不同生长发育阶段的基因表达差异,可为分析生命活动过程提供重要信息。

本实验以一年生人参茎叶为外植体,通过调节外源激素,诱导离体细胞胚胎发生。首次测定了胚胎各个不同发育时期内源激素的变化,进行 AFLP 分析,且对皂苷的量进行了测定,以探讨在离体细胞胚胎发生过程中的外源激素-内源激素-特异基因之间的关系,为进一步在分子水平上研究体细胞胚胎发生机制奠定基础,也为人工种子研究提供理论依据,具有十分重要的理论和实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料:选用人参芽胞为外植体,诱导愈伤组织的培养基为 MS+2,4-D 4.0 mg/L+BA 0.2 mg/L;在 MS+2,4-D 1.0 mg/L+KT 0.2 mg/L 培养基上继代培养,获得胚性愈伤组织;在去掉 2,4-D 的培养基上诱导胚状体发生和发育,转入无任何激素的 MS 培养基上使胚状体快速生长,之后在 1/2MS 培养基上进一步生长获得再生植株。蔗糖质量浓度为 30 g/L,琼脂 6.5 g/L,灭菌前 pH 值调至 5.8,高温高压灭菌 15~20 min。培养温度(23±2)℃,每日光照 16 h。

1.2 cDNA-AFLP

1.2.1 RNA 的提取:分别取不同发生途径不同时期的培养物(愈伤组织、胚性愈伤组织、早期胚、成熟胚、不定芽、再生植株)0.1 g,液氮研磨,按 50~100 mg 加入 1 mL Trizol,转入离心管,室温放置 5 min,使其充分裂解,12 000 r/min 离心 5 min,按每 1 mL Trizol 加 200 μL 氯仿的比例,向混合液中加入氯仿,振荡混匀,4℃离心 15 min,加入异丙醇混匀,12 000 r/min 离心 10 min,用 75%乙醇洗涤 2 次,8 000 r/min 离心 5 min,室温晾干或真空干燥,复溶于 50 μL ddH₂O 处理水中。

1.2.2 cDNA 的合成:cDNA 的合成按 Takara 的 cDNAsynthesis kit(M—MLV version)操作说明进行。

1.2.3 cDNA-AFLP 分析:用约 100 ng cDNA 进行 AFLP 分析。cDNA-AFLP 参照 Bachem^[1]方法进行。合成的双链 cDNA 经 *EcoR* I / *Mse* I 双酶切并加接头进行预扩增,将预扩产物稀释 1 000 倍作为

模板,以E/M引物组合进行选择扩增。扩增产物在5%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,银染显色,E/M引物分别为:M1:5' GTTCACTACAGTGCCCAA 3'; M2:5' GTTCACTACAGTGCCAC 3'; M3:5' GTTCACTACAGTGCCCAT 3'; M4: 5' GTTCACTACAGTGCCAG 3'; E2:5' GATACCTTAGGAAATCAT 3'; E3:5' GATACCTTAGGAAATCAC 3'; E4: 5' GATACCTTAGGAAATCAG 3'。引物组合方式为:(E4/M1,E4/M2);(E4/M3,E4/M4);(E3/M1,E3/M2);(E3/M3,E3/M4);(E2/M3,E2/M4)。

1.3 内源激素的ELISA测定:内源IAA和ABA的测定均采用酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)。激素测定试剂盒购自中国农业大学化控中心,按照ELISA说明书,用酶联免疫检测仪进行测定。

1.4 HPLC测定

1.4.1 仪器与试剂:高效液相色谱仪(Agilent—1200,UVD检测器,美国);人参皂苷Rb₁、Rc、Re、Rh₁、Rd(中国药品生物制品检定所),乙腈,色谱纯。

1.4.2 色谱条件:ODS-C₁₈分析柱(250 mm×4.0 mm,5 μm),流动相为乙腈(A)—水(B),梯度洗脱:0~35 min,A19%;35~55 min,A19%~28%;55~80 min,A28%;80~105 min,A28%~40%;105~110 min,A40%;110~113 min,A40%~19%;113~120 min,A19%,体积流量:1.0 mL/min,柱温:室温,检测波长:203 nm,进样量10 μL。在此条件下,样品中人参皂苷Rb₁、Rc、Re、Rh₁、Rd达到良好基线分离(图1~3)。

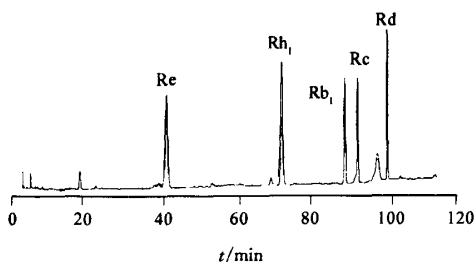


图1 人参皂Rb₁、Rc、Re、Rh₁、Rd对照品HPLC谱

Fig. 1 HPLC Chromatogram of ginsenosides Rb₁,

Rc, Re, Rh₁, and Rd reference substances

1.4.3 对照品溶液及供试品溶液的制备:精密称取人参皂苷对照品,分别加甲醇制成溶液,即得。

将样品烘干后研磨成细粉,恒重后取3份,每份1 g。参照《中国药典》2005版方法进行提取。总皂苷用甲醇定容,供HPLC定量分析(样品由吉林农业

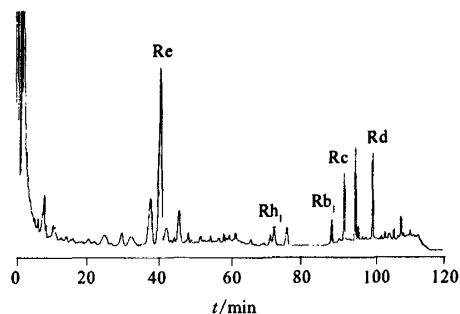


图2 人参体细胞胚胎发生试管苗HPLC谱

Fig. 2 HPLC Chromatogram of somatic embryogenesis of *P. ginseng* regeneration plantlet

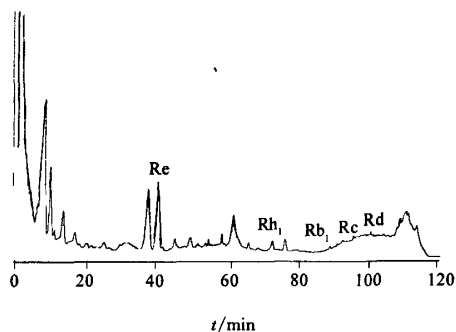


图3 人参体细胞胚胎发生子叶胚HPLC谱

Fig. 3 HPLC Chromatogram of somatic embryogenesis of *P. ginseng* cotyledon embryo

大学参茸测试中心测定)。

1.4.4 线性关系考察:分别精密吸取各对照品储备液适量,配制成含人参皂苷Rb₁、Rc、Rd、Re、Rh₁为0.2、0.2、0.2、0.4、0.2 mg/mL的质量浓度,依次注入高效液相色谱仪,各进样10 μL,按上述色谱条件测定峰面积。以峰面积(Y)为纵坐标,进样量(X)为横坐标,绘制标准曲线。回归方程、相关系数和线性范围见表1。

表1 5种人参皂苷成分的标准曲线

Table 1 Calibration curve of five kinds of *P. ginseng* saponins

化合物	回归方程	r	线性范围/μg
人参皂苷 Rb ₁	$Y=429.9669X+36.274$	0.9972	0.8~6.4
人参皂苷 Rc	$Y=402.3562X+69.3415$	0.9951	0.4~3.2
人参皂苷 Re	$Y=357.5862X+94.1378$	0.9972	0.4~3.2
人参皂苷 Rd	$Y=439.3637X+53.6667$	0.9926	0.4~3.2
人参皂苷 Rh ₁	$Y=752.3118X+80.311$	0.9982	0.4~3.2

2 结果与分析

2.1 人参体细胞胚胎发生:外植体在附加4 mg/L 2,4-D和0.2 mg/L BA的MS培养基上,21 d后诱导出愈伤组织,转移到含有2,4-D 1.0 mg/L和KT 0.2 mg/L的培养基中培养,30 d大部分愈伤组织转变成胚性愈伤组织,在含有KT的培养基上胚状

体发育成熟,发育出心形胚和子叶形胚,转入无任何激素的 MS 培养基上进一步成熟,长至 2 cm 以上后,在生根培养基上诱导生根,可得到再生植株。从实验结果可以看出,外植体在脱分化并产生胚性细胞时需要外源激素来启动,一旦胚性愈伤组织和原胚形成后,内源生长激素的量提高,原来的外源激素反而起抑制胚性细胞发育的作用,可以看到在胚分化时不需要外源激素存在,外源激素只能使细胞停留于脱分化状态。

2.2 内源激素:由外植体诱导的愈伤组织可分为胚性愈伤组织(EC)和非胚性愈伤组织(NEC),在很大程度上 EC 的形成和维持受内源激素调控。内源激素作为执行细胞通讯的化学信息在代谢、生长、形态建成等植物生理活动的各个方面均起着十分重要的作用。它对胚状体的作用机制主要是诱导基因的差别表达。

2.2.1 ABA、IAA 量的变化:内源激素参与植物发育的许多过程,比如衰老对环境胁迫的反应、气孔关闭、生长抑制等,胁迫能够诱导植物内源激素量的升高。在体细胞胚胎发生过程中,内源 ABA 和 IAA 与胚性能力的启动或表达有关,并在调节体胚发育方面扮演着特定角色。

体细胞胚发生过程中,ABA 和 IAA 的量变化见图 4,胚性愈伤组织的内源 ABA 的量比较稳定,但随着体胚的发育,内源 ABA 上升趋势明显,体胚发育的早期,内源 ABA 的鲜质量较低,只有 186.585 ng/g,当体细胞胚胎发育到成熟期时,ABA 达到最高值 1 180.09 ng/g,说明体细胞胚胎发育后期 ABA 较发育前期上升快,由此可见,ABA 对胚胎发育后期有较大的影响。而在胚性愈伤组织阶段,内源 IAA 的量变化不明显,一直处于较高水平。但在整个体胚的发育过程中,其内源 IAA 的量变化显著。早期胚时,内源 IAA 形成了一个明显的高峰,其鲜质量达到了最大值 23.18 ng/g,然而发育到成熟胚时,其量却降低至 4.16 ng/g,由此可见,高质量浓度 IAA 的存在是维持人参体胚正常发育到早期胚的条件。

2.2.2 内源激素的平衡:各激素在体胚发生中的作用具有相对专一性,但体胚发生不仅需要内源激素量达到一定水平,更重要的是不同激素间相互作用及相互平衡。

由图 5 可知,体胚发育中 ABA/IAA 的变化比较明显,在胚性愈伤组织阶段,ABA/IAA 达到最高,随着体胚的不断发育,ABA/IAA 开始降低,到早期胚时达到最低,说明早期胚时的 ABA 量比较

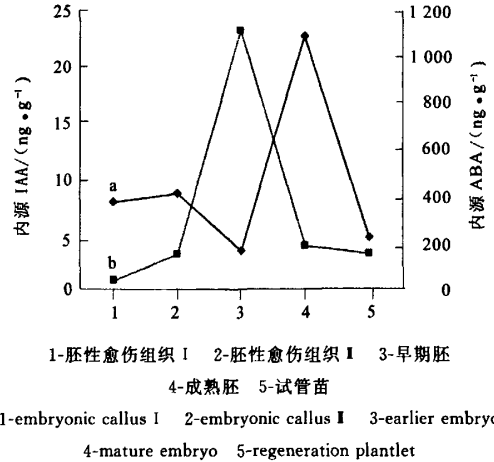


图 4 体细胞胚发生过程中 ABA(a)、IAA(b)量的变化
Fig. 4 Changes of endogenous ABA (a) and IAA (b) contents during somatic embryogenesis

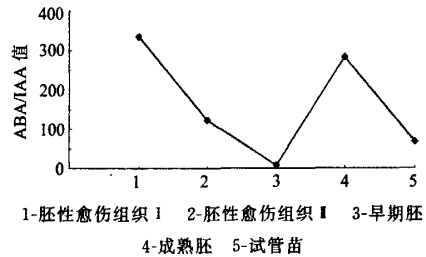


图 5 体细胞胚发生过程中内源 ABA/IAA 的变化
Fig. 5 Changes of endogenous ABA/IAA during somatic embryogenesis

低,IAA 量比较高;到成熟胚时期又开始上升,说明这时的 ABA 量升高,IAA 量降低;而到试管苗时期,ABA/IAA 有所回落,此时的 ABA 量降低,IAA 量又开始升高。

2.3 人参培养物发生过程中基因的表达:由图 6 可知, A_1 、 B_3 、 C_1 和 E_1 在 6 个发育时期里都有出现,说明, A_1 、 B_3 、 C_1 和 E_1 片段的表达是人参形态建成各个时期共同存在的,应该是管家基因; B_1 、 E_2 在胚性愈伤组织时期出现,可能和脱分化时的表达有关,是胚性愈伤组织发生的标志, A_2 在胚性愈伤组织和早期胚时期出现,且在早期胚时期表达量相对较高,然而到成熟胚时期又消失,推测该基因可能和胚状体早期分化有关; A_4 只在早期胚时期出现,说明此基因为早期胚时期的特异表达基因; B_2 、 B_5 和 C_2 在成熟胚时期进行特异表达,而其余谱带随着不同发育时期发生变化,反映了这些时期不同的生理状态的需要。 A_3 、 B_4 和 D_1 在早期和成熟胚时期都出现,该

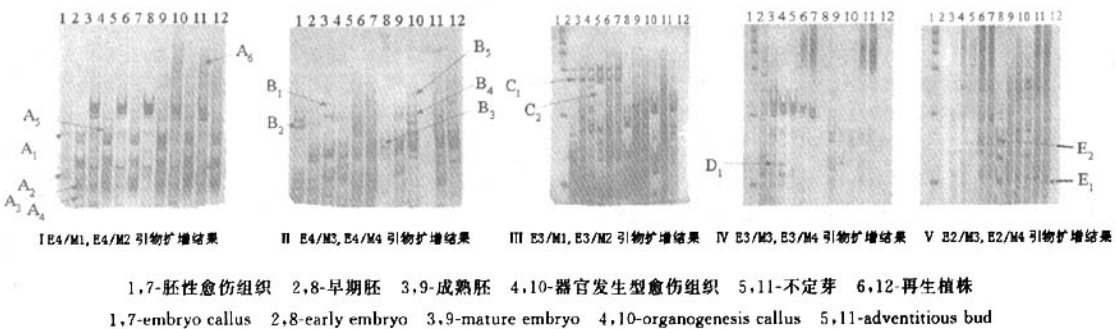


图 6 不同时期 cDNA-AFLP 分析

Fig. 6 cDNA-AFLP Analysis during different periods

基因可能与胚状体分化相关;A₅ 只在器官发生型愈伤组织中出现,推测可能是分化相关基因。A₆ 在成熟胚和不定芽丛里出现,这两个时期都将发育形成再生植株,该基因可能是向再生植株发生的标志。

由 II E4/M3、E4/M4 引物扩增结果可看出,另外一组引物没扩增出第 4 带,说明此对引物的选择性碱基在人参基因组中分布较少,不宜使用。

2.4 样品测定结果:由表 2 可以看出子叶胚中的皂苷量依次为:Re>Rh₁>Rb₁>Rd>Rc,而试管苗中的皂苷量依次为:Re>Rc=Rd>Rb₁>Rh₁,无论在哪一个时期人参皂苷 Re 的量均为最高。另外,试管苗时期 Re 量比子叶胚时期高 3.48 倍,Rd 比子叶胚时期高出 34.23 倍,Rc 高出 44.44 倍,Rb₁ 高出 14.5 倍,Rh₁ 高出 2.31 倍;总皂苷量比子叶胚时期高出 4 倍多。

表 2 样品测定结果(n=3)

Table 2 Determination of sample (n=3)

样 品	人 参 皂 苷 / %				
	Rb ₁	Rc	Re	Rh ₁	Rd
子叶胚	0.004	0.002 7	0.29	0.013	0.003 5
体细胞胚试管苗	0.058	0.12	1.01	0.03	0.12

3 讨论

3.1 内源激素的作用:激素对胚状体的作用机制主要是诱导基因的差别表达。多种植物的研究表明,器官分化主要决定于外植体内源细胞分裂素和生长素的平衡^[2~4]。植物体细胞转化为胚性细胞的一个重要前提是有相应的激素来诱导其细胞分化^[6]。已有的研究表明内源激素对基因活动起着调控作用,从而影响一系列代谢过程,最终影响到植物细胞胚性潜力的诱导、维持和表达。

在体细胞胚胎发生过程中,高水平的内源 ABA 与胚性能力的启动或表达有关,并在调节体胚发育

方面扮演着特定角色。程玉兰^[6]发现胡萝卜体细胞胚胎发育后期,随着胚的发育,内源 ABA 上升得更明显。本实验中可见体胚后期 ABA 较前期上升快。本实验的研究结果与程玉兰的实验结果相同。可见,ABA 与胚性启动,体胚发生、发育相关,尤其对胚胎发育后期有较大的影响。

邢登辉^[7]研究皇冠草体胚发生过程发现,内源 IAA 在球形胚时期形成了一个明显的高峰。本实验发现,人参体胚发育过程中,IAA 量先是在胚性愈伤组织时期较高,随后到早期胚时最大,而到了成熟胚时期 IAA 量又开始降低。当 IAA 达到峰值时,是胚性细胞数量的最高期,当 IAA 下降时,开始进入芽的分化。表明 IAA 的存在是维持人参体胚正常发育到早期胚的条件。IAA 的量急剧上升这说明胚状体的萌发和迅速生长需要高水平的内源生长素。

3.2 基因的差异表达:高等生物大约有 30 万个不同的基因,但在生物体内任意细胞中只有 10% 的基因得以表达,而这些基因的表达是按时间和空间顺序有序地进行着,这种表达的方式即为基因的差异表达。其包括新出现的基因的表达与表达量有差异的基因表达。

不定芽的发生是植物再生过程的重要过程,是植物再生能力的重要衡量标准。但植物愈伤组织形成、不定芽发生过程受哪些基因的调控,这些基因与诱导条件存在有怎样的关联,目前尚不能有明确的理论支持^[8]。

本实验通过 cDNA-AFLP 技术对人参形态发生过程的 mRNA 表达进行了初步的研究。发现人参体细胞胚胎发生过程中,基因表达有所不同,特异条带主要出现在早期胚、成熟胚和器官发生型愈伤组织时期,且主要集中在 200~600 bp。在不同发育时期基因表达不同,这种差异的形成可能是由于不同

培养条件对人参培养物的影响,导致了人参分化情况的不同。通过基因特异性表达分析,可以推测,不同的发育过程会有特异基因表达。由此,可以通过调节形态发生相关基因的表达实现提高植物再生能力的目的,为解决生产实际问题提供理论依据。但是,调控基因表达的因素以及调控的方式还有待于进一步的研究。

3.3 HPLC 结果可以看出,体细胞胚胎发生试管苗各种单体皂苷的量均较子叶胚时期高几倍至几十倍。表明随着形态建成的逐步完成,也是次生代谢产物逐渐积累的过程。本实验体系下子叶胚和试管苗有望成为种苗,实现工厂化生产。

参考文献

[1] Bachem C W, Hoeven R S, Bruijn S M. Visualization of dif-

ferential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. *Plant J*, 1996, 9: 745-753.

- [2] 马晖玲,张崇浩,肖尊安,等. 植物内源激素对原生质体培养的影响[J]. 北京师范大学学报,1997, 33(3): 414-417.
- [3] 陶静,詹亚光,由香玲,等. 白桦组培再生系统的研究(1)——组培过程中内源激素的变化[J]. 东北林业大学学报,1998, 26(6): 6-9.
- [4] 唐玉林,陈婉方,周 雯. 烟草叶分化根和芽过程中内源激素水平的变化[J]. 南京农业大学学报,1996, 19(2): 12-16.
- [5] 向景葵,黄 哲. 黄姜体细胞胚发生过程中内源激素含量变化的研究[J]. 岳阳职业技术学院学报,2006, 21(1): 62-64.
- [6] 程玉兰,刁丰秋. 蔗糖调控培养对胡萝卜体细胞内源 ABA 水平的效应[J]. 植物学报, 1999, 7: 761-765.
- [7] 邢登辉. 皇冠草体细胞胚胎发生及其体细胞胚发生过程中内源激素的变化[J]. 生物工程学报,1999, 15(1): 98-103.
- [8] 黄 科,余小林. 芥蓝不定芽发生过程的基因表达差异分析[J]. 细胞生物学杂志,2007, 29: 153-157.

黄芪药材的 HPLC-UV 指纹图谱研究

白焱晶,王智颖,杜新刚,吕晓洁,赵玉英,张庆英*

(北京大学医学部药学院 天然药物学系,天然药物及仿生药物国家重点实验室,北京 100083)

摘 要:目的 建立黄芪药材的 HPLC-UV 指纹图谱。方法 采用 HPLC-UV 方法。色谱柱为 YMC-Pack ODS-A (250 mm×4.60 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%磷酸水线性梯度洗脱(0→60 min, 20:80→40:60);体积流量:1 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:室温。结果 建立了黄芪药材的 HPLC-UV 指纹图谱,指定出 16 个共有指纹峰,标定了其中 7 个指纹峰的结构:3 号峰为毛蕊异黄酮苷,5 号峰为芒柄花苷,8 号峰为 9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-吡喃葡萄糖苷,10 号峰为毛蕊异黄酮,14 号峰为芒柄花素,15 号峰为(6aR,11aR)-3-羟基-9,10-二甲氧基紫檀烷,16 号峰为(3R)-8,2'-二羟基-7,4'-二甲氧基异黄酮。结论 本法简便、准确、重现性好,可作为黄芪药材质量检测的方法。

关键词:黄芪;指纹图谱;HPLC-UV

中图分类号:R282.7

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)07-1089-04

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) Hsiao 或膜荚黄芪 *A. membranaceus* (Fisch.) Bunge 的干燥根,具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌之功效^[1]。目前我国市场上黄芪用量大,但市售黄芪药材质量良莠不齐,严重影响其临床疗效。为了更加科学准确地控制黄芪药材的质量,在建立一个或几个有效成分的量测定的基础上,探讨并建立黄芪药材的多成分综合评价体系是非常必要的,而化学成分指纹图谱是评价中药或天然药物质量的最有效的手段之一。近年来虽然也有一些文献对黄芪的 HPLC 指纹图谱进行了研究^[2-5],但是这些指

纹图谱普遍存在没有对共有峰进行指认,或者即使进行了指认但指认的峰数目过少(仅指认了 1 个或 2 个色谱峰的结构)。因此,笔者对黄芪药材的 HPLC 指纹图谱进一步进行了研究,对黄芪药材中的主要成分进行了分离、结构鉴定,并对指纹图谱中主要色谱峰进行了指认,为综合评价药材质量提供了更多的信息。本实验测定了 13 个不同地区黄芪药材的 HPLC-UV 指纹图谱,指定出 16 个共有指纹峰,标定了其中 7 个指纹峰的结构,以其中 3 号峰(毛蕊异黄酮苷)作为参照色谱峰。研究结果为黄芪药材的质量评价进一步提供了科学参考依据。

1 仪器与试药

收稿日期:2007-10-10

基金项目:国家自然科学基金项目(30371735);教育部长江学者和创新团队项目(985-2-063-112)

作者简介:白焱晶(1975—),男,讲师,主要从事天然药物化学的教学与研究工作。E-mail: yjbai@bjmu.edu.cn

* 通讯作者 张庆英 Tel: (010)82801725 E-mail: qyzhang@bjmu.edu.cn

人参体细胞胚胎发生过程中内源激素变化和基因表达研究

作者：[王义](#), [赵文君](#), [孙春玉](#), [杨晶](#), [张美萍](#), [WANG Yi](#), [ZHAO Wen-jun](#), [SUN Chun-yu](#),
[YANG Jing](#), [ZHANG Mei-ping](#)
作者单位：[王义](#), [孙春玉](#), [杨晶](#), [张美萍](#), [WANG Yi](#), [SUN Chun-yu](#), [YANG Jing](#), [ZHANG Mei-ping](#)(吉林农业大学
生命科学学院, 吉林, 长春, 130118), [赵文君](#), [ZHAO Wen-jun](#)(白山经济开发区管理委员会
, 吉林, 白山, 134300)
刊名：[中草药](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名：[CHINESE TRADITIONAL AND HERBAL DRUGS](#)
年, 卷(期): 2008, 39(7)
被引用次数: 2次

参考文献(8条)

1. [Bachem C W](#); [Hoeven R S](#); [Bruijin S M](#) [Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development](#) [外文期刊] 1996(5)
2. [马晖玲](#); [张崇浩](#); [肖尊安](#) [植物内源激素对原生质体培养的影响](#) 1997(03)
3. [陶静](#); [詹亚光](#); [由香玲](#) [白桦组培再生系统的研究\(I \)—组培过程中内源激素的变化](#) 1998(06)
4. [唐玉林](#); [陈婉方](#); [周燮](#) [烟草叶块分化根和芽过程中内源激素水平的变化](#) 1996(02)
5. [向景葵](#); [黄哲](#) [黄姜体细胞胚发生过程中内源激素含量变化的研究](#) [期刊论文]-[岳阳职业技术学院学报](#) 2006(01)
6. [程玉兰](#); [刁丰秋](#) [蔗糖调控培养对胡萝卜体细胞内源ABA水平的效应](#) [期刊论文]-[植物学报](#) 1999(7)
7. [邢登辉](#) [皇冠茎体细胞胚胎发生及其体细胞胚发生过程中内源激素的变化](#) 1999(01)
8. [黄科](#); [余小林](#) [芥蓝不定芽发生过程的基因表达差异分析](#) [期刊论文]-[细胞生物学杂志](#) 2007(1)

本文读者也读过(10条)

1. [王义](#), [赵文君](#), [孙春玉](#), [杨晶](#), [蒋世翠](#), [张美萍](#), [WANG Yi](#), [ZHAO Wen-jun](#), [SUN Chun-yu](#), [YANG Jin](#), [Jiang Shi-cui](#), [ZHANG Mei-ping](#) 2, 4-D、BA对人参体细胞胚胎发生过程的影响研究 [期刊论文]-[中国生物工程杂志](#) 2008, 28(10)
2. [王义](#), [赵文君](#), [杨忠](#), [孙春玉](#), [张美萍](#), [WANG Yi](#), [ZHAO Wen-jun](#), [YANG Zhong](#), [SUN Chun-yu](#), [ZHANG Mei-ping](#) [人参体细胞胚胎发生及植株再生研究](#) [期刊论文]-[药物生物技术](#) 2008, 15(4)
3. [师海荣](#), [Shi Hairong](#) [陆地棉愈伤组织诱导及体细胞胚发生的生化机制研究](#) [期刊论文]-[中国农学通报](#) 2007, 23(2)
4. [王义](#), [杨晶](#), [张颖](#), [蒋世翠](#), [朱延钧](#), [张美萍](#), [WANG Yi](#), [YANG Jing](#), [ZHANG Ying](#), [JIANG Shi-cui](#), [ZHU Yan-jun](#), [ZHANG Mei-ping](#) [人参原生质体的分离培养](#) [期刊论文]-[吉林农业大学学报](#) 2009, 31(3)
5. [吉艳慧](#), [艾军](#), [王英平](#), [王振兴](#), [JI Yan-hui](#), [AI Jun](#), [WANG Ying-ping](#), [WANG Zhen-xing](#) [人参花芽分化的形态学研究](#) [期刊论文]-[特产研究](#) 2009, 31(4)
6. [陈侃](#) [芸芥体细胞胚胎诱导及胚胎发生相关蛋白质的研究](#) [学位论文] 2009
7. [王克臣](#) [亚麻离体再生及早期体细胞胚胎发生机理的研究](#) [学位论文] 2008
8. [王义](#), [赵文君](#), [孙春玉](#), [张美萍](#), [WANG Yi](#), [ZHAO Wen-jun](#), [SUN Chun-yu](#), [ZHANG Mei-ping](#) [人参体细胞胚胎发生过程中的生理变化](#) [期刊论文]-[东北师大学报\(自然科学版\)](#) 2008, 40(2)
9. [张美萍](#), [王义](#), [魏汉莲](#), [张镡](#), [李向高](#) [西洋参脱分化基质优化及影响因素](#) [期刊论文]-[吉林农业大学学报](#) 2003, 25(4)
10. [张美萍](#), [王义](#), [孙春玉](#), [李向高](#) [辐照西洋参培养物皂苷次生代谢调控的研究](#) [期刊论文]-[核农学报](#) 2003, 17(3)

引证文献(2条)

1. [顾地周](#), [冯颖](#), [顾美影](#), [王艳萍](#), [姜云天](#) [基于均匀设计优化人参体细胞胚胎发生及植株再生体系](#) [期刊论文]-[中草药](#)

2010(6)

2. [冯辉](#), [杨硕](#), [王超楠](#), [付颖](#) [青梗菜优异DH系的创制与利用](#) [期刊论文] - [中国农业科学](#) 2009(9)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zcy200807044.aspx