

Ri 质粒转化植物用于 生产天然活性成分的研究进展(I)

北京医科大学药学院(100083) 常振战* 果德安 郑俊华

摘 要 Ri 质粒转化植物产生的发根生长迅速,能合成与原植物相同或相似的次生代谢物,在生产植物天然活性成分方面具有广阔的应用前景。作者对 Ri 质粒的分类及转化植物的机制,发根农杆菌感染植物的方法及发根的产生与鉴定,发根培养物的特点等方面作了较详细的综述。

关键词 Ri 质粒 转化 发根(hairy root) 次生代谢物

70 年代末 80 年代初兴起的植物基因工程技术与农杆菌的研究密切相关。农杆菌质粒介导的基因转移系统主要是通过致病农杆菌(包括根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 和发根农杆菌 *A. rhizogenes*) 进行植物基因组的直接操作,即转化。发根农杆菌是一种革兰氏阴性菌,通过把含 Ri 质粒(root-inducing plasmid)中的转移 DNA(Transferred DNA, T-DNA)转移并整合到植物基因组中,从而引起植物在形态和代谢上的变化。在形态方面,Ri 质粒诱导快速生长的、非向地性、高度分支的发根的形成;在代谢方面,Ri 质粒转化根能合成与原植物相同或相似的次生代谢物且具有遗传稳定性。这些次生代谢物作为药物或药物赋形剂具有较高的经济价值。美国、日本、德国、韩国、加拿大等国竞相开展这方面的研究。人参皂苷、黄连素已通过发根培养法得以工业化生产。

1 Ri 质粒转化植物诱导发根

1.1 Ri 质粒的分类及转化植物的机制:在自然状态下,发根农杆菌可作为毛根病的病原菌在某些植物伤口处诱生发根。这一事实最初由在苹果树毛根病研究中得以证实^[1]。发根农杆菌宿主范围因菌株不同而异。一般

局限于双子叶植物,也有一些裸子植物诱导出了发根。Tempe 用发根农杆菌 15834 菌株从玉米幼苗上诱导出了发根,实现了发根农杆菌感染单子叶植物零的突破^[2]。目前已经诱导出发根的植物多数集中在茄科、菊科、十字花科、旋花科、伞形科、豆科、石竹科、蓼科植物,主要是草本植物,而木本植物较少有成功报道。

发根农杆菌能从植物伤口处诱导出发根,原因在于含有 Ri 质粒——发根诱导质粒。Ri 质粒是发根农杆菌染色体外的一个大质粒,带有冠瘿碱(opine)合成酶基因,该基因在真核的植物细胞中表达能产生特异氨基酸衍生物即冠瘿碱。根据合成冠瘿碱的差异,Ri 质粒大体可划分为:Agropine-type(农杆菌碱型)、Mannopine-type(甘露碱型)、Cucumopine-type(黄瓜碱型)和 Mikimopine-type。不同类型 Ri 质粒的致根特性也有差异,含农杆菌碱型 Ri 质粒的农杆菌通常比含其它 3 种类型的农杆菌的宿主范围大得多。Ri 质粒通过 T-DNA 和 Vir 区(致病区)来转化植物。Vir 区位于 Ri 质粒复制起点与 T-DNA 区之间。Vir 区基因并不发生转移,但它对 T-DNA 的转移十分重要。Vir 区的 7 个

* Address: Chang Zhenzhan, College of Pharmacy, Beijing University of Medical Sciences, Beijing
常振战 男,1965 年生。1994 年~1997 年在北京医科大学攻读博士学位,留本校生化及分子生物学系任讲师,从事药用植物组织培养、遗传转化、分子克隆及次生代谢物生物合成途径研究。发表“天山大黄发根培养物中蒽醌化合物的产生”,“掌叶大黄毛状根培养及培养物中蒽醌类成分分析”等论文。

操纵子 Vir A~G, 除 Vir A 外, 均处于沉默状态^[3], 植物伤口产生的低分子酚类化合物(乙酰丁香酮、羟基乙酰丁香酮等)能以 Vir A 的表达产物为媒介激活其它 Vir 基因联合群, 从而使 T-DNA 转移并完成对植物的转化。这些酚类化合物可以用来提高发根农杆菌感染某些植物的转化率^[4], 从裸子植物花旗松中分离的松柏素(coniferin)也可提高某些裸子植物的转化率^[5]。

发根农杆菌转化植物时, 把自身 Ri 质粒的 T-DNA 上的基因转移并整合入植物基因组, 这些基因表达后即产生发根。也可以对 Ri 质粒进行遗传操作, 构建载体, 把外源基因通过中间载体或二元载体导入发根农杆菌, 然后感染植物外植体, 外源基因及 Ri 质粒 T-DNA 部分基因便在诱导出的发根或再生植株中得到表达。目前, 通过插入抗生素抗性基因或报告基因高效筛选转化细胞系的载体也已开发出来。发根农杆菌已成为把外源基因插入植物基因组的强有力的工具。同时, 质粒 DNA 的随机插入有可能诱导宿主植物基因组发生突变, 已有报道, 质粒 DNA 的插入改变了母体植物对特殊生物合成途径的控制^[6]。

在转化细胞中, T-DNA 的插入长度与发根农杆菌的类型有关。Ri 质粒农杆菌型 TL-DNA 或黄瓜碱型 T-DNA 插入长度相当稳定^[7], 而农杆菌型 TR-DNA 或甘露碱型-DNA 插入长度则很不稳定^[7,8]。例外的是, TL-DNA 在转化烟草中总比在其它转化植物中短^[7,9]。另一方面, 转化细胞基因组中插入 T-DNA 的数目也与发根农杆菌类型有关, 许多菌株的转化细胞基因组中有多个 DNA 插入。它们在大多数情况下相互独立, 也有连在一起的情况出现^[9]。多个 DNA 插入一个转化细胞基因组中的原因可能有: 两个或多个发根农杆菌侵染并整合进同一个植物细胞; 或是单个发根农杆菌的两个或多个 T-DNA 整合进一个植物细胞。后者是插入 T-DNA 数目变化的主要原因^[10]。

Ri 质粒转化细胞再生的植株具有叶皱

缩、叶缘卷曲、节间缩短、顶端优势较弱等特征^[8,11]。但某些发根的再生植株表型完全正常^[8,12]。对发根再生植株有性后代 T-DNA 插入的遗传分析表明: 分离类型只与母体植物的 1 个克隆组成一致。虽然此类分析工作尚少^[8,13], 但结果一致证明: 1 条发根起源于 1 个细胞。发根这一特性可用于筛选 高产发根细胞系。

1.2 发根农杆菌感染植物的方法: 一般认为, 农杆菌的转化过程类似于细菌接合作用, 农杆菌的单链 DNA 与特殊的膜蛋白结合后被传入机械损伤的植物细胞中^[14]。发根农杆菌感染植物使用最多的是叶圆片法(leaf disc), 最初由 Horsch 等转化植物时使用^[15]。原生质体-农杆菌共培养法、整株感染法则使用较少。

1.3 Ri 质粒转化根的产生与鉴定: 植物在感染发根农杆菌后, 病症发生及其形态与植物基因组、生理状态、感染方式、接种后外植体的环境条件均有直接关系。发根农杆菌宿主范围以外的植物自然不能被转化。Hemstad 用发根农杆菌感染葡萄时只出现冠瘿瘤而不出现发根。曾用发根农杆菌感染葫芦巴子叶, 产生了大量的瘤状物, 有的子叶在瘤表面形成很短的根状突起却不能继续伸长为典型发根。完整植株能合成抗菌物质, 一般不易转化。镰田博等认为, 感染整株旺盛发育的药用植物一般不会产生发根; 实验表明, 干燥条件下一般不出现发根, 在高湿度条件下出现典型发根。有的植物即使有 T-DNA 插入, 也有可能不表现出病症(产生发根)^[16]。

Ri 质粒 T-DNA 带有合成生长激素的基因和冠瘿碱合成酶基因, 转化的植物细胞可以产生冠瘿碱并能在不含植物生长激素的培养基上生长。可以根据冠瘿碱的有无和激素自主生长特性筛选转化根, 使转化细胞带有合适的选择标记, 如新霉素磷酸转移酶(NPT-Ⅱ)基因、氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因等抗生素抗性基因可以有效选择转化细胞, β -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因、荧光素酶

基因等报告基因的应用,能直接检测外源基因的表达,对于鉴别转化子十分重要。经过上述方法的筛选、鉴别,在抗性克隆及其再生植株中,仍会存在一定比例的假阳性,需进一步作点杂交、Southern blotting 杂交分析,才能最终确定外源基因是否整合到受体细胞染色体组中。

2 发根培养物的特点

2.1 生长迅速:发根本质上是一种恶性增殖的激素自主型的器官,生长速度很快,可用于大量培养。Flores 等培养的天仙子发根在 1 个培养周期鲜重增加 2 500 倍。液体培养金荞麦发根,在 25 d 中,发根增殖 1 861 倍,而作对照的细胞培养物只增殖 26.7 倍^[17]。

2.2 合成能力高且稳定:Hamill 等实验表明,在研究过的大多数植物中,次生代谢物的积累与植物生长都大致呈正相关。另一方面,发根是细胞分化而来的根组织,具有遗传稳定性,不仅染色体数目和亲本一致,而且合成能力、合成模型及生长速度也很稳定。

2.3 生物转化功能:发根培养物可用于生物转化^[18,19],川口基一郎用人参发根转化洋地黄毒苷产生了强心苷。Muranaka^[20]用含 parAt-GUS 融合基因的烟草发根、颠茄发根、拟南芥发根分别转化 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖苷酸,均产生了 4-甲基伞形酮。

2.4 向培养基中释放代谢物:有些植物^[20,21]的发根把一部分次生代谢物释放到培养基中。黄花烟草 *Nicotiana rustica* 发根培养物在 16 d 生长期,质量提高 35 倍,向培养基中分泌的尼古丁高达 10 mg/mL。Parr 等用烟草属其它植物也得到了相似的结果。发根的这一特性有利于分离提取次生

代谢物。

2.5 繁殖能力强:发根具有高度的繁殖潜能,可以制成人工种子长期保存^[22]。Uozumi 等研究表明,带有顶端分生组织或分支的辣根 *Armoracia rusticana* 发根切段能再生出整个植株。他们用海藻酸钠凝胶包裹发根切段制成了人工种子。Repunte 等用辣根发根起源的细胞团制成的人工种子,25 ℃ 贮藏 60 d 后仍保持再生根的能力。

参考文献

- 1 何玉科. 西北植物学报,1990;10(1):61
- 2 Tanaka N, et al. Ann Phytopathol Soci Jpn, 1994; 60 (1):45
- 3 Jouanin L. Plasmid, 1984; 12:91
- 4 Sheikoleslam S R, et al. Plant Mol Biol, 1987; 8:291
- 5 Morris J W, et al. PNAS, 1990; 89:3614
- 6 Pezzuto J M, et al. Biotechnology and Pharmacy. New York London: Chapman and Hall, 1993:290
- 7 Birot A M, et al. Plant Physiol Biochem, 1987; 25:323
- 8 David C, et al. Plant Cell Rep, 1988; 7:88
- 9 Jouanin L, et al. Mol Gen Genet, 1987; 206:387
- 10 Depicker A, et al. Mol Gen Genet, 1985; 201:477
- 11 Taylor B H, et al. Mol Gen Genet, 1985; 201:554
- 12 Petil A, et al. Mol Gen Genet, 1986; 202:288
- 13 Mcknight T D, et al. Plant Mol Biol, 1987; 8:439
- 14 Stachel S E, et al. Nature, 1986; 322:706
- 15 Horsch R B, et al. Science, 1985; 227:1229
- 16 Kamada, H. et al. Plant Cell Rep, 1986; 5:239
- 17 张荫麟,等. 中草药, 1990; 21(12):23
- 18 Muranaka T, et al. App Microbiol Biotechnol, 1994; 40 (6):841
- 19 Flores H E, et al. Plant Phys Biochem, 1994; (4):511
- 20 Muranaka T, et al. Biosci Biotech Biochem, 1993; 57 (8):1398
- 21 Hu Z B, et al. Phytochemistry, 1993; 32(3):699
- 22 Uozumi N, et al. J Ferment Bioeng, 1992; 74(1):21

(1998-04-13 收稿)

欢迎订阅 1999 年《中国现代应用药学》杂志

本刊是由中国药学会主办、综合性药学科技期刊,国内外公开发行,双月刊。

主要栏目有:药理、中药与天然药、药剂、药物化学、生物化学、药物分析与检验、医院药学、不良反应、药事管理、论坛和综述等。

本刊为双月刊,每期定价 8.00 元,全年 48 元。国内邮发代号 32—67,本刊地址:杭州市莫干山路文北巷 27 号,邮编:310012。如有漏订可直接与本刊联系。