

Ri 质粒转化植物生产天然活性成分的研究进展(Ⅱ)[△]

北京医科大学生物化学及分子生物学系(100083) 常振战* 果德安** 郑俊华**

摘 要 综述了影响发根生长和次生代谢产物合成的因素,用生物反应器培养植物发根的方法,提高发根次生代谢物含量的措施,以及发根培养物的次生代谢产物。

关键词 Ri 质粒 转化 发根(hairy root) 次生代谢物

1 影响发根生长和次生代谢物合成的因素

1.1 光因子的影响:光能使一些在原植物叶中大量表达的产物在绿色发根中得到表达,或是光激活了合成途径中的某些酶,从而促进了次生代谢物的合成。有些植物的发根暴露在光下一段时间之后便开始变绿,生长速度和终产量都比暗培养高。Maldonado-Mendoza^[1]用光照诱使无刺曼陀罗发根变绿,并用于生产莨菪烷生物碱。有些植物只有在光培养下才合成次生代谢物,如青蒿 *Artemisia annua* L. 发根中青蒿素的合成便依赖于光^[2]。而 Hook 观察到在缺光的条件下培养高山火绒草 *Leontopodium alpinum* Cass. 发根能够增加发根挥发油的得率。

1.2 培养基种类、组成的影响:基本培养基的种类和组成、碳源等因素对发根及次生代谢物的产物均有影响。Vanhala 等^[3]用不同致病性的农杆菌感染钝天仙子 *Hyoscyamus muticus* 的实验,在 LBo 培养基上得到的发根比 B₅ 培养基上的多。研究表明,Nitch、SH 培养基对龙胆 *Gentiana manshurica* Kitag 发根生长优于 MS 培养基,而 White、HE 不利于龙胆发根生长。20 g/L~30 g/L 蔗糖作碳源时龙胆发根生长最好,高于 60 g/L 时不利于发根生长;可溶性淀粉与蔗糖效果类似,而葡萄糖对龙胆发根生长不利。Shimomura 等^[4]发现紫草发根在 MS 固体培养基上培养

时,不能产生任何色素,然而在用专门的培养根的固体或液体培养基上培养时,却产生大量的色素并释放到培养基中。Uozumi 等^[5]研究表明,在补料分批培养(feed-batch culture)中,果糖作碳源可以大量提高反应器中胡萝卜发根的密度。Kino-Oka 等观察到,在果糖和硝酸盐作唯一碳源和氮源的 MS 改良培养基上培养西洋茜草 *Rubia tinctorum* L. 发根能极大增强发根的生长和色素形成。浓度为 60 mmol/L 的氮及用蔗糖作碳源对人参发根培养物的生长和花色素苷的产生具有显著的影响^[6]。Taya 等发现,磷是甜菜发根中色素积累的关键营养元素。磷浓度较低时,发根中色素的含量较高。在不含磷的培养基上批量培养 18 d,生成的色素总量是正常 MS 培养基上产生色素的 4.8 倍。

1.3 pH 值的影响:培养基起始 pH 值对在发根生长和代谢均有影响,原因在于 pH 值对发根生长和代谢中起关键作用的酶的活性有影响。

1.4 激素的影响:生长素和细胞分裂素常用来调控发根的生长和次生产物合成,但它们对不同植物发根的作用不同。实验证明:1.0 mg/dm³ NAA 与 0.5 mg/dm³ BAP 配合使用引起辣根发根向细胞团的巨大变化;单独加入 NAA,在从细胞团再生发根的过程中,发根形成和生长都增强。Saitou 等发现 NAA

* Address: Chang Zhenzhan, College of Pharmacy, Beijing University of Medical Sciences, Beijing

** 北京医科大学药学院

[△](1) 刊于《中草药》杂志 1998 年第 10 期

和 5,6-Cl₂-IAA 等生长素(IAA 例外)在光下抑制辣根发根产生不定芽;BA、Kin、i6Ade、i6Ado 等细胞分裂素在暗处诱导发根芽的形成,在光下增加发根上芽形成的数量。Arroo 等^[7]用同位素^[35S]掺入实验证明:在培养万寿菊 *Tagetes patula* 发根时加入 IAA,发根产生了大量侧根,噻吩的合成受到抑制;不加 IAA 时,发根分枝与噻吩积累之间却未表现出明显的相关性。

除了上述影响因素外,Yu 等研究了颠茄发根对氧气的需求。Kato 等观察了不同磁场强度对胡萝卜和颠茄发根生长速度的影响。Jung 等^[8]研究了无机盐成分对长春花 *Catharanthus roseus* 发根生长与长春花碱积累的影响,发现硝酸盐对发根生长和 catharanthine 生成均有利;铵和磷酸盐则产生相反的作用;硼酸盐和钼酸盐对发根生长和 catharanthine 生成均有抑制作用;碘化钾硫酸盐和铁盐没有太大的影响。

2 发根培养技术

2.1 生物反应器(bioreactor)培养发根:发根可以用一般的组织培养方式在固体或液体培养基上培养。商业价值昂贵的化合物还可以用生物反应器批量培养。

发根是生长迅速、高度分支的器官,培养容器中发根的密度往往很高,因此保持低的流体压力和高的容量氧气转移系数十分必要,开发这种特性的生物反应器很有意义^[9]。Ko 等^[10]用气升式(air-lift type)反应器培养胡萝卜发根,发根快速生长,25 d 后发根终产量比起始质量高 11 倍。Nuutila 等^[11]比较了 3 种类型的生物反应器,在喷气式(air-sparged)反应器中,长春花发根生长和吲哚生物碱合成均最好,在搅拌反应器和基质环流(medium circulation)反应器中,发根则不能生长。Uozumi 等^[5]的研究表明:用单糖作碳源能极大提高反应器中胡萝卜发根的密度,同时可以避免用蔗糖作碳源时果糖和葡萄糖在培养基中的大量积累。从以上研究报道可以看出,通气性能良好的气升式或喷气

式反应器是培养发根的理想装置。单糖作碳源适合于批量培养发根的反应器的具体情况,可以避免反应器中糖的积累。

2.2 提高次生代谢物含量的措施

2.2.1 二步培养法(two-stage culture process):发根起初在可获得最大生长速率的生长培养基上培养,然后转移到可诱导产生目的次生代谢物的生产培养基上培养。这种培养基通常是改良的 MS 或 B₅ 培养基,其中蔗糖和磷酸盐水平已做了调整。Jung 等^[12]通过优化无机盐建立的两阶段培养法使长春花发根培养中 catharanthine 的得率高达 60.5 mg/L,比原先的 SH 培养基一步培养法的得率高 5.4 倍。

2.2.2 引发子(elicitor)的应用:绝大部分报道的引发技术应用了从酵母或真菌^[13,14]中提取的蛋白或多糖物质。青霉菌 *Penicillium* spp.、大丽花轮枝孢 *Verticillium dahlia* 和串珠镰孢 *Fusarium moniliforme*^[15]、黑曲霉 *Aspergillus niger*^[16,17]、瓜果腐霉 *Pythium aphanidermatum*^[18] 的细胞壁粗提物,以及一些特殊的化合物,如杆菌肽、粘菌素以及多粘菌素 B 都可作引发子运用。

2.2.3 前体(precursor)追加法:通过饲喂目的次生代谢物的前体对发根代谢途径进行调节,进而提高次生代谢物的合成^[19]。

实际研究中,根据具体植物发根培养物的特点和影响因素,优化组合运用这些培养技术,必将取得良好的效果。

3 发根培养物的次生代谢产物

随着发根培养技术的逐步完善,许多有开发价值的次生代谢物已从不同植物的发根培养物中提取出来,有的化合物已通过发根培养法得以工业化生产或中试生产。其中药用价值较高的是有生物活性的喹啉生物碱、吲哚生物碱、托品烷生物碱、喹啉烷生物碱等,此外,噻吩、多炔、蒽醌、糖苷等次生代谢物也是重要的药用化合物。

3.1 生物碱类次生代谢物:以提高组织培养系统中次生代谢物产量为目的,利用发根培

养技术进行了广泛的研究。Hamill 研究小组^[20]发现, *Cinchona ledgeriana* 发根培养物产生的甲氧基喹啉、奎宁和奎尼定的含量是他们早期工作中得到的最高产的深绿色冠瘿瘤细胞中生物碱含量的 2 倍~3 倍。Parr 等^[21]转化长春花得到的发根培养物在 28 d 的生长期, 发根质量增加了 20 倍, 并合成了高产量的吲哚生物碱, 包括阿吗碱、catharanthine、长春花朵宁。Christen 等^[22]报道: 白花曼陀罗 *Datura candida* 的发根培养物在 1 个月的生长期细胞质量增加 20 倍, 生物碱含量达到细胞干重的 0.68%。Wink 等^[23]用鹰爪豆 *Spartium junceum* 的发根培养物产生了在正常情况下由茎和叶组织合成的喹啉烷类生物碱, 含量与完整植株茎组织中相当甚至更高, 每克鲜重发根含数微克喹啉烷生物碱。

3.2 其它次生代谢物: 多炔类和萜吩类等次生代谢物, 可以用作真菌、细菌和线虫的抗生素, 已能在发根组织中诱导出来。Flores 等^[24]发现万寿菊属 *Tagetes* 和鬼针属 *Bidens* 的发根培养物产生了在完整植物根中合成的相同类型的多炔类和萜吩类。甜叶菊 *Sterea rebaudiana* 的发根培养物能合成甜菊苷的前体化合物 steriobioside, 从而可以生产甜菊苷^[25]。人参发根培养物比未转化的根培养物生长快 2 倍~3 倍, 经过 3 周培养, 干重即可增高 2.4 倍^[26]。大批量培养人参发根进而生产人参皂苷可以获得很高的利润。除了培养发根生产天然次生代谢物外, 用 Ri 质粒作为载体通过发根农杆菌向植物基因组插入外源基因可以生产外源基因产品。Stougaard^[27]等将嵌合大豆血红蛋白基因通过 Ri 质粒中间载体法导入牛角花植物中, 外源基因在牛角花中得到了表达。此外, Ri 质粒 T-DNA 随

机插入植物基因组可能引起宿主基因组发生突变, 从而导致新化合物的产生, 这对于发现新的药用化合物很有意义。

综上所述, Ri 质粒转化系统为利用植物组织培养生产次生代谢物带来了新的契机。Ri 质粒转化系统在植物组织培养上的应用将会在通过生物技术手段工业化生产植物次生代谢物方面发挥出越来越大的作用。

参考文献

- 1 Maldonado-Mendoza I E T, et al. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1995;40(3):197
- 2 蔡国琴, 等. 生物工程学报, 1995;11(4):315
- 3 Vanhala L, et al. Plant Cell Rep, 1995;14(4):236
- 4 Shimomura K, et al. Plant Cell Rep, 1991;10(6/7):282
- 5 Uozumi N, et al. J Ferment Bioeng, 1991;72(6):457
- 6 Ko K M, et al. J Plant Biology, 1994;37(1):85
- 7 Arroo R R J, et al. Physiol Phanta, 1995;93(2):233
- 8 Jung K H, et al. J Ferment Bioeng, 1994;77(1):57
- 9 Kim Y H, et al. Biotech Tech, 1993;7(17):859
- 10 Ko K M, et al. Korean J Bot, 1992;35(4):365
- 11 Nuutila A M, et al. Biotech Tech, 1994;8(1):61
- 12 Jung K H, et al. J Ferment Bioeng, 1994;77(1):57
- 13 Sim S J, et al. J Ferment Bioeng, 1994;78(3):229
- 14 Kim C H, et al. Agri Chem Biotech, 1994;37(4):237
- 15 O'keefe B, et al. Biotechnology and Pharmacy. New York London: Chapman and Hall, 1993:290
- 16 Buitelaar R M, et al. Enzyme Microb Technol, 1992;14(1):2
- 17 Buitelaar R M, et al. Enzyme Microb Technol, 1993;15(8):670
- 18 Mckinley T, et al. Plant Physiol Biochem, 1993;31(6):835
- 19 Arroo R R J, et al. Phytochemistry, 1995;38(5):1193
- 20 Hamill J D, et al. Planta Med, 1989;55:354
- 21 Parr A J, et al. Plant Cell Rep, 1988;7:309
- 22 Christen P, et al. Plant Cell Rep, 1989;8:309
- 23 Wink M, et al. Z Naturforsch, 1987;42C:69
- 24 Flores H E, et al. Trends Biotech, 1987;5:64
- 25 Yamazaki T, et al. Plant Physiol, 1989;89:10
- 26 Yoshikawa T, et al. Plant Cell Rep, 1987;6:449
- 27 Stougaard J J, et al. Mol Genet, 1987;207:251

(1998-04-13 收稿)