

发根农杆菌 Ri T-DNA 对墨旱莲的遗传转化

张汉明¹, 许铁峰¹, 董贤¹, 李博华²

(1. 第二军医大学药学院 生药学教研室, 上海 200433; 2. 第二军医大学肿瘤国际合作研究所, 上海 200433)

摘要:目的 建立墨旱莲 *Eclipta prostrata* 的毛状根离体培养系统。方法 分别用发根农杆菌 A4, R1601, ATCC15834 3 种菌株感染墨旱莲的子叶外植体, 获得毛状根, 并筛选了优质株系; 测定了毛状根的生长曲线; 利用高压纸电泳法对毛状根进行 T-DNA 转化的检测。结果 首次利用发根农杆菌 A4, R1601, ATCC15834 3 种菌株成功地从墨旱莲中诱导出毛状根; 经高压纸电泳检测, 墨旱莲毛状根中含有甘露碱, 表明 Ri 质粒的 T-DNA 已整合进毛状根中。结论 墨旱莲毛状根离体培养的建立为进一步进行药用活性成分的工业化生产奠定了基础。

关键词: 发根农杆菌; 毛状根; 墨旱莲

中图分类号: R282.12

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2001)10-0924-03

Genetic transformation of *Eclipta prostrata* by Ri T-DNA

ZHANG Han-ming¹, XU Tie-feng¹, DING Ru-xian¹, LI Bo-hua²

(1. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China;

2. International Joint Cancer Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Object** To establish the culture system of hairy root of *Eclipta prostrata* (L.) L. **Methods** Hairy root of *E. prostrata* was obtained from infected cotyledon explants after infection with *Agrobacterium rhizogenes* strains A4, R1601 and ATCC15834, elite strains were screened and growth curves determined. The transformation of Ri T-DNA was examined through high voltage paper electrophoresis.

Results The hairy root was originally obtained from *E. prostrata*. The result of high voltage paper electrophoresis confirmed the transformation of T-DNA from Ri plasmid to the hairy root. **Conclusion** The acquisition of hairy root of *E. prostrata* provided further a foundation for the industrial production of active drug component.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes*; hairy roots; *Eclipta prostrata* (L.) L.

自从发根农杆菌 Ri 质粒被人们发现和认识以来, 它在许多领域都显示出极其广泛的应用前景, 首先利用发根农杆菌转化药用植物产生的毛状根建立离体培养系统, 实现次生代谢物质的工业化生产以解决中药资源的短缺问题越来越受到人们的重视。相对于常规细胞培养, 毛状根培养系统具有生长快速、不需外源植物激素、合成次生代谢物质能力强而且稳定及向培养液释放部分代谢产物等优点^[1]。另外, Ri 质粒还是植物基因工程理想的载体, 以 Ri 质粒为载体可将抗虫、抗病基因或其它我们感兴趣的基因转移到植物基因组并得到表达, 从而达到改良植物性状、提高品质的目的。

墨旱莲即菊科鳢肠属植物鳢肠 *Eclipta prostrata* (L.) L., 为常用中药, 以全草入药, 是二至丸、参鹿补膏、凉血安神片等中成药的原料之一^[2]。该植物

始载于《唐本草》, 具滋肝补血、凉血止血之功效, 是 1995 年版药典品种。墨旱莲主要化学成分有黄酮、三萜皂苷、噻吩类化合物、香豆草醚类化合物等, 药理研究表明具有止血、保肝、免疫调节和抗炎、抗诱变、抗蛇毒作用及对心血管系统的作用, 在中医临床上为凉血、止血要药, 用于牙齿松动、须发早白、吐血、衄血、尿血、便血、血痢、外伤出血等病症的治疗^[3]。

我们利用发根农杆菌 Ri 质粒首次成功地从墨旱莲 *E. prostrata* 中诱导出毛状根, 筛选出了各自的生长快速的优质株系, 建立了毛状根离体培养系统, 为利用毛状根进行次生代谢物质的生产打下了基础。

1 材料和方法

1.1 发根农杆菌的活化: 将 3 种发根农杆菌菌株

A4, R1601, ATCC15834 于- 20 ℃保存在灭菌甘油中, 临用前于 YEB 固体培养基、25 ℃活化 3 次, 然后转至 YEB 培养液(R1601 的培养液中加入 200 mg/L 卡那霉素) 于黑暗、25 ℃、100 r/min 振荡培养, 12 h 后用于感染外植体^[4]。

1.2 实验材料: 墨旱莲种子采自南京紫金山, 用清水洗净后, 在 75%乙醇中浸泡 1 min, 用清水冲净乙醇, 再用 0.1% HgCl₂ 消毒 10 min, 无菌水冲洗 5 次, 置于 MS 培养基上, 5 d 后萌发。取生长 3 d 左右的无菌苗的子叶作为外植体。

1.3 外植体的转化: 将上述外植体于 MS 培养基上预培养 24 h 分别浸入处于对数生长期的发根农杆菌 A4, R1601, ATCC15834 菌液中, 在黑暗条件下 120 r/min 振摇 10 min, 取出, 用无菌滤纸吸干多余的菌液, 置于 MS 培养基上共培养 24 h 后移至含 300 mg/L 头孢噻肟钠的 MS 固体培养基上培养, 25 ℃, 光照 12 h/d, 光强度 2 000 lx, 并以未经感染的子叶作对照。

1.4 毛状根的除菌: 将感染后长出的毛状根剪下移到新的含 300 mg/L 头孢噻肟钠的 MS 固体培养基上培养, 每 5 天转接 1 次, 转接 3 次以后, 将培养瓶放入 39.5 ℃的恒温箱中除菌, 48 h 后取出移到不含抗生素的 MS 培养基上。

1.5 毛状根优质株系的筛选: 将 MS 培养基上的毛状根逐一分开, 挑取 2 cm 左右者移入 1/2 MS 培养液中, 35 mL 培养液/50 mL 三角锥瓶, 每瓶一根, 20 d 后观察生长情况, 挑选生长迅速的进行继代培养。

1.6 毛状根生长曲线的测定: 取毛状根的优质株系在 1/2 MS 培养液中进行测定, 35 mL 培养液/50 mL 三角锥瓶, 共 30 瓶, 每 4 天测 1 次鲜质量与干质量, 每次测 3 瓶, 以平均质量 as 指标绘制生长曲线。鲜质量系用布氏漏斗抽滤至无水滴下时测得, 干质量系 60 ℃烘 12 h 后测得。

1.7 甘露碱的检测: 取墨旱莲毛状根 100 mg, 按 Morgan 等^[5]的方法进行高压纸电泳分析, 以试管苗的正常根为阴性对照, 甘露碱标准品(1 mg/mL) 为阳性对照。

2 结 果

2.1 毛状根的获得: 经发根农杆菌感染, 墨旱莲子叶 10 d 后有根长出, 大多数具有典型的毛状根特征: 具大量根毛, 分支多, 向上、贴瓶壁向上或沿培养基水平生长, 失去向地性。与一般毛状根不同的是墨旱莲毛状根为绿色(图 1-A)。对照组子叶出根率低且向下长入培养基中。20 d 后统计出根率, 结果见

表 1, 可见 R1601 菌株诱导率较其它两种菌株高。

表 1 3 种发根农杆菌对墨旱莲子叶外植体感染的诱导率

发根农杆菌	外植体数	生根的外植体数	诱导率(%)
A4	30	5	16.7
R1601	30	7	23.3
ATCC15834	30	4	13.3
对照	30	2	7.0

2.2 毛状根快速生长的优质株系的筛选: 在 1/2 MS 培养液中培养 20 d 后, 观察各瓶中毛状根生长状况, 选出分枝多、生长快速的毛状根的优质株系: ER6 株, 来源于 1601 菌株。

2.3 毛状根生长速率测定: 结果见表 2, 表明墨旱莲毛状根的质量随时间的延长而快速增加, 18 d 时达到最大质量, 增长 52.5 倍, 以后逐步下降。

表 2 墨旱莲毛状根生长速率测定

培养时间(d)	鲜重(g)	干重(g)	增长倍数
0	0.41±0.012	0.036±0.003 7	-
3	0.56±0.02	0.046±0.006 5	1.28
6	1.02±0.07	0.086±0.013	2.39
9	1.84±0.09	0.172±0.024	4.78
12	4.38±0.17	0.388±0.022	10.56
15	11.35±0.48	1.039±0.050	28.89
18	22.51±0.74	1.892±0.046	52.50
21	21.50±0.80	1.868±0.074	51.94
24	21.50±0.49	1.861±0.042	51.67

2.4 毛状根中甘露碱的检测: 高压纸电泳检测结果表明墨旱莲毛状根中含有甘露碱, 说明毛状根中确已含有农杆菌 Ri 质粒转入的 T-DNA。对照正常根的高压纸电泳图谱无甘露碱斑点。

3 讨 论

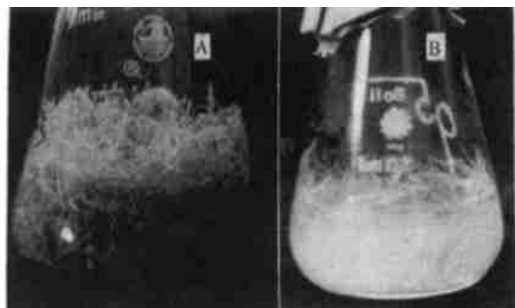
发根农杆菌感染植物的方法通常有 3 种^[1]: 即外植体共培养接种法、原生质体共培养转化法和活体接种法。其中外植体共培养接种法应用最广, 如常振战转化掌叶大黄^[6]、费厚满转化绞股蓝^[7]、刘伟华转化黄瓜^[8] 都采用此法。本实验以子叶为外植体, 采用外植体共培养接种法首次成功地在墨旱莲上诱导出了毛状根, 诱导率较高, 毛状根生长良好。

农杆菌诱导获得的毛状根中共生有大量农杆菌, 必须除去农杆菌以使毛状根大量、快速生长。本文采用抗生素除菌和温度法相结合, 除菌效果较好, 即将共生有农杆菌的毛状根在含 300 mg/L 头孢噻肟钠的 MS 培养基上经过 3 次继代培养, 农杆菌的生长受到了抑制, 而毛状根的生长状态较为良好, 这时将培养瓶放入 39.5 ℃的恒温箱中除菌 48 h, 这种方法简单有效, 对毛状根的生长影响不大。

由于一条毛状根起源于一个细胞, 所以我们把获得的毛状根逐一分开, 进行单克隆培养, 这样的培

养物性能稳定,有利于提供稳定的次生代谢产物。

由墨旱莲获得的毛状根为绿色,该毛状根在 12 h/d 光照,光照强度 2 000 lx 条件下较黑暗中生长迅速,光照下第 18 天时重量增加 52 倍,而黑暗条件下仅增重 34 倍,并且颜色也不相同,光照下生长的呈黑绿色(图 1-A),在黑暗条件下生长的为淡绿色(图 2-B)。据报道,毛花洋地黄及鬼针草属、万寿菊属的植物诱导出的毛状根在光下培养变成绿色毛状根,其次生代谢产物的合成能力显著增加^[9,10],其机制尚不清楚。墨旱莲的次生代谢产物合成能力如何



A-光照条件下 B-黑暗条件下

图 1 墨旱莲毛状根

也需要进一步的研究。

致谢:墨旱莲种子经我室郑汉臣教授鉴定,谨此致谢。

参考文献:

- [1] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].北京:科学出版社,1998.
- [2] 汤海峰,赵越平,蒋永培.中药墨旱莲的研究概况[J].西北药杂志,1999,14(1):32-34.
- [3] 中国药典[S].2000年版.一部.
- [4] 孙敬三.植物细胞工程实验技术[M].北京:科学出版社,1995.
- [5] Morgan A J, Cox P N, Turner D A, *et al.* Transformation of tomato using an Ri plasmid vector [J]. Plant Science, 1987, 49(1):37-49.
- [6] 常振战,果得安,沈昕,等.掌叶大黄毛状根培养及培养物中蒽醌类成分分析[J].药学报,1998,33(11):869-872.
- [7] 费厚满,梅康凤,沈昕,等.发根农杆菌对绞股蓝的转化及毛状根中皂甙的产生[J].植物学报,1993,35(8):629-631.
- [8] 刘伟华,姜静,石锐,等.发根土壤杆菌 Ri 质粒对黄瓜进行遗传转化的研究[J].植物研究,1997,17(4):436-440.
- [9] 王毅,张美萍,关贺群,等.发根农杆菌感染龙胆再生植株的研究[J].吉林农业大学学报,1994,16(2):43-45.
- [10] Yoshimatsu K, Satake M, Shimomura K, *et al.* Determination of cardenolides in hairy root cultures of *Digitalis lanata* by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Nat Prod, 1990, 53(6):1498-1506.

当归药材道地性的 RAPD 分析

高文远¹,秦恩强²,肖小河^{2*},余惠受²,高光跃¹,陈四保¹,赵扬景¹,杨世林¹

(1. 中国医学科学院药用植物研究所,北京 100094; 2. 中国人民解放军 302 医院,北京 100039)

摘要:目的 从 DNA 分子水平上探讨当归药材道地性的生物学基础。方法 对来自不同产地的 18 个当归样品,提取其基因组 DNA,并进行 RAPD 分析。对筛选出的 10 个引物的 RAPD 结果进行聚类分析,得出 18 个当归样品的聚合树状图。结果 显示地理分布距离越小,当归的遗传差异越小;反之,越大。但生态环境特别是小生境对当归遗传差异的作用亦不可忽视。结论 为我们从分子生物学角度研究当归药材道地性提供了新的启示。

关键词: 当归;道地性;RAPD

中图分类号:R 282.7 文献标识码:B 文章编号:0253-2670(2001)10-0926-04

Analysis on Genuineness of *Angelica sinensis* by RAPD

GAO Wen-yuan¹, QIN En-qiang², XIAO Xiao-he², YU Hui-ming², GAO Guang-yao¹, CHEN Si-bao¹, ZHAO Yang-jing¹, YANG Shi-lin¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100094, China; 2. Hospital 302 of PLA, Beijing 100039, China)

Abstract: **Object** To investigate the genuineness of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels from the level of molecular biology. **Methods** The genomic DNAs of 18 samples of *A. sinensis* collected from different localities were isolated and analysed by RAPD. Based on the cluster analysis of their RAPD strips, the molecular phylogenetic tree of 18 *A. sinensis* samples was described. **Results** The results indicated that the smaller the geographic distance between two *A. sinensis* samples, the smaller their genetic difference; while the genetic difference became greater as their geographic distance increases. However it should not

收稿日期:2001-05-09

基金项目:国家自然科学基金重点项目(编号 39730500)

* 联系人:Tel: (010) 66933324; E-mail: xiaohx@hotmail.com