

布范围内,产地生态环境条件不同,当归的遗传背景又存在不同程度的差异。这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。可以说,药材的道地性不仅仅是一个地理意义上的概念,同时具有广泛的生物学内涵,更具有丰富的遗传特质。而作为现代分子生物学的重要手段,RAPD分子标记技术对揭示道地药材与非道地药材之间的地理—生态—遗传的差异将是一种十分有效的手段。

参考文献:

- [1] 陈永久,王 文,杨跃雄,等. 冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)的随机扩增多态 DNA 及其遗传分化[J]. 遗传学报,1997,24(5): 410-413.
- [2] 肖小河,刘峰群,史成和,等. 中药分子鉴定学概念[J]. 中药材,2000,23(2): 107-109.
- [3] 肖小河. 国产姜黄属药用植物 RAPD 分析与分类鉴定[J]. 中草药,2000,31(3): 209-212.
- [4] Scott O R. Extraction of DNA from Plant Tissue[J]. Plant Mol Biol Manual, 1988, A6 1-6.
- [5] 奥斯伯 F,布伦特 R,金斯顿 R E,等(颜子颖,王海林译). 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社,1998.

pH对红豆杉愈伤组织生长 PAL活性和紫杉醇含量的影响

盛长忠,王淑芳,王 勇,王宁宁

(南开大学 生物化学与分子生物学系,天津 300071)

摘要:目的 研究不同 pH值对东北红豆杉和南方红豆杉愈伤组织生长和紫杉醇含量的影响。方法 采用不同 pH值的 B₅培养基培养两种红豆杉愈伤组织,测定生长率、PAL活性和紫杉醇含量。结果 不同红豆杉愈伤组织所需最适 pH值不同,而有利于愈伤组织生长的 pH值均不利于 PAL活性的提高和紫杉醇的积累。即:愈伤组织生长快时,PAL活性将下降,紫杉醇含量也减少。结论 pH值明显影响红豆杉愈伤组织的生长及次级代谢水平,从而影响了紫杉醇的合成与积累。

关键词: 红豆杉;愈伤组织;PAL;紫杉醇

中图分类号: R282.13 文献标识码: B 文章编号: 0253-2670(2001)10-0929-03

Effect of pH on callus growth, PAL activity and paclitaxel content of plants of *Taxus* L.

SHENG Chang-zhong, WANG Shu-fang, WANG Yong, WANG Ning-ning

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract **Object** To study the effect of pH on callus tissue growth and paclitaxel content of *Taxus cuspidata* Sieb. et Zucc. and *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu. **Methods** The callus tissues were cultured on B₅ medium with different pH values, and the growth rate, PAL activity and paclitaxel content were determined. **Results** Different callus tissues of taxus need different optimum pH values. The pH values, which could promote callus growth significantly, were all inhibitory to PAL activity and accumulation of paclitaxel. **Conclusion** pH had great influences on the growth of the callus and the level of secondary metabolism, thereby the synthesis and accumulation of paclitaxel were affected.

Key words *Taxus* L.; callus tissue; phenylalanine ammonia-lyase (PAL); paclitaxel

红豆杉植物中有多种紫杉烷类似物,其中 10 余种具有抗肿瘤活性,尤其是紫杉醇(Paclitaxel)活性最高。紫杉醇主要存在于植物树皮中,来源有限,因此药源十分紧张。近年来,对红豆杉细胞大规模培养这一有希望长期供应紫杉醇来源技术的研究引起国内外高度重视。与之有关的研究也有很多报道。pH 值是影响植物组织生理代谢的重要理化因素之一。Fett-Neto^[1]指出培养基 pH 值在 4.8~7.8 范围内东北红豆杉愈伤组织生长无明显差别,而在我们所

进行的红豆杉愈伤组织培养中发现,愈伤组织对 pH 值非常敏感。为此,本文以东北和南方红豆杉愈伤组织为材料,研究了 pH 值对其生长、PAL(苯丙氨酸转氨酶,为催化苯丙氨酸形成肉桂酸反应的酶,经一些实验证明在紫杉醇合成过程中,肉桂酸可能参与了紫杉醇前体物质 wintersein 的形成)活性及紫杉醇含量的影响,以期细胞大规模培养生产紫杉醇提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 愈伤组织的培养: 东北红豆杉和南方红豆杉愈伤组织由叶诱导而来, 采用 B₅ 培养基进行培养, 内含 1 mg/L KT 2 mg/L 2, 4-D 0.5 mg/L AG₃ 用 1 mol/L NaOH 调 pH

1.2 组织培养生长的指标:

接种鲜重 (克/瓶) = 接种后瓶重 - 接种前瓶重

收获鲜重 (克/瓶) = 收获前瓶重 - 收获后瓶重

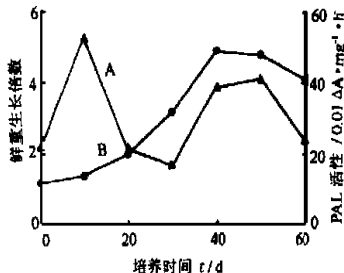
鲜重增长率 (鲜重增长倍数) = 收获鲜重 / 接种鲜重

1.3 紫杉醇提取与检测: 紫杉醇提取方法同文献^[2]。将样品用 1 mL 色谱纯甲醇溶解, 在 C₁₈ 反相硅胶柱进行恒速洗脱, 流动相为甲醇-水 (65: 35), 流速为 1 mL/min, 在 227 nm 下用紫外检测器检测。紫杉醇定量采用外标法。

1.4 PAL 活性测定: 参阅文献^[3]有改动。取愈伤组织 2 g, 加 4 mL 含 5 mmol/L 巯基乙醇的硼酸缓冲液、0.1 g PVP 于冰浴中研磨, 10 000 g 离心 15 min, 取上清液。酶液适当稀释。1 mL 酶液加 1 mL 0.02 mmol/L 苯丙氨酸 2 mL 蒸馏水。对照不加底物, 多加 1 mL 蒸馏水。30℃ 中保温 0.5 h 后置于冰浴。用紫外分光光度计在 290 nm 处进行吸收测定。以每小时在 290 nm 处吸收变化 0.01 所需酶量为一个单位 (相当于每毫升反应混合物形成 1 μg 肉桂酸)。蛋白浓度测定按 Bradford (1976) 方法进行。

3 结果与讨论

2.1 愈伤组织的生长进程及 PAL 酶活性的变化: 将愈伤组织接种于培养基上, 定期收获, 得到其生长曲线, 如图 1 所示。同许多报道一样, 东北红豆杉愈伤组织的生长较为缓慢, 接种后有较长的一段迟滞期, 鲜重倍增时间为 18 d, 40 d 时愈伤组织生长进入平稳期, 愈伤组织的生长率为 5.2。大约保持 10 d 左右, 细胞开始黑褐死亡, 重量下降。愈伤组织的生长周期为 40 d。



A-PAL活性 B-生长率

图 1 东北红豆杉愈伤组织生长曲线及 PAL 活性的变化

从图 1 中可以看出, 在东北红豆杉接种后的前一段时间, PAL 活性急剧上升, 10 d 时出现一个高

峰, 之后又降低, 约 30 d 时酶活性最低。酶活性在 40 d 时出现第二个高峰, 50 d 时又下降。已知植物感染病原体或受伤害后, PAL 活性升高, 促进了黄酮类和木质素等次生代谢物质的合成, 产生并积累小分子抗生物质用以增强自身的抵抗力。愈伤组织转接过程中, 细胞受伤害较严重, 刺激了 PAL 的活性, 加速了苯丙氨酸的代谢。大约 20 d 后, 愈伤组织适应了新的培养环境, 开始迅速生长, 进入对数期, 次级代谢活动降低, PAL 活性也维持在一个较低水平。愈伤组织到达生长高峰 (40 d) 时, PAL 活性又迅速回升, 次级代谢旺盛, 细胞生长受到抑制, 并开始变褐、衰老甚至死亡。

2.2 pH 值对东北红豆杉愈伤组织生长、紫杉醇含量及 PAL 酶活性的影响: 配制 B₅ 培养基, 分成 5 组, 用 NaOH 调节 pH 分别为 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 用于愈伤组织培养。每组至少有 5 瓶, 3 次重复, 40 d 时收获。记录愈伤组织生长率, 测定 PAL 活性, 提取紫杉醇并检测其含量, 结果见图 2, 3。

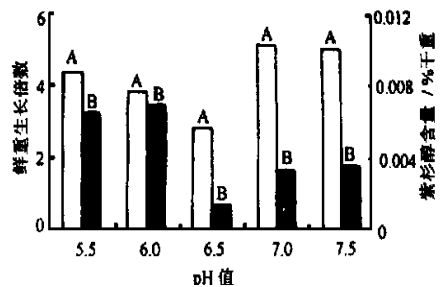


图 2 pH 值对东北红豆杉愈伤组织生长及紫杉醇含量的影响

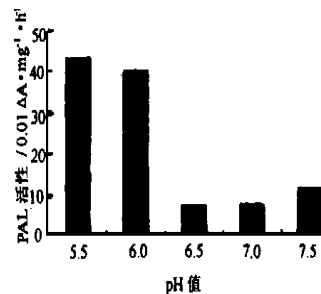


图 3 不同 pH 值对东北红豆杉愈伤组织 PAL 活性的影响

从图 2 中可以看出, 东北红豆杉愈伤组织生长状况受 pH 值影响显著。较高 pH 值对生长有利, pH 7.0 时愈伤组织生长状态最好, 组织块白色, 培养基红褐轻。在 pH 6.5 的培养基中, 愈伤组织颜色较暗, 生长较差, 生物产量仅为 pH 7.0 中愈伤组织生物产量的一半, 并且培养基中红褐严重。Fett-Ne-

to^[1]和 Wickremesinhe^[4]指出,培养基中 pH值在较大范围内对东北红豆杉和杂种红豆杉愈伤组织生长没有明显影响,即愈伤组织对 pH值有较强的耐受性。但本实验经过多次重复证明,我们诱导的东北红豆杉愈伤组织对 pH值非常敏感。

提取不同 pH值下生长的东北红豆杉愈伤组织中的紫杉醇并测定其含量,结果如图 2所示。pH6.0下培养基中生长的愈伤组织紫杉醇含量最高,达 0.006 8%, pH6.5中愈伤组织的紫杉醇含量最少,仅为 0.001 4%,二者相差近 4倍之多。从图中看到,除 pH6.5中的愈伤组织外,愈伤组织生长越好,紫杉醇含量越低,生长状态较差的,紫杉醇含量却增高了。如 pH7.0时愈伤组织生长率为 5.20,生物产量明显高于 pH6.0(生长率为 3.80),但其紫杉醇含量(0.033%)仅为后者(0.068%)的一半,这表明细胞的生长速率与紫杉醇含量呈负相关。这与 Fett-Neto^[5]的报道基本一致。pH6.5既不适合东北红豆杉愈伤组织的生长,也不利于产生紫杉醇。

通过对不同 pH值培养基中生长的东北红豆杉愈伤组织紫杉醇含量和 PAL活性的比较(图 2, 3)可以看出,二者存在着一定相关性。比如:愈伤组织在 pH5.5, 6.0时 PAL活性高,其紫杉醇含量也很高。可见, PAL活性的大小在一定程度上反映了紫杉醇含量高低。

2.3 pH值对南方红豆杉愈伤组织生长和紫杉醇含量及 PAL活性的影响:在不同 pH的 B培养基上培养南方红豆杉愈伤组织, 30 d收获,测鲜重和紫杉醇含量(图 4)并且测定了 PAL活性(图 5)。

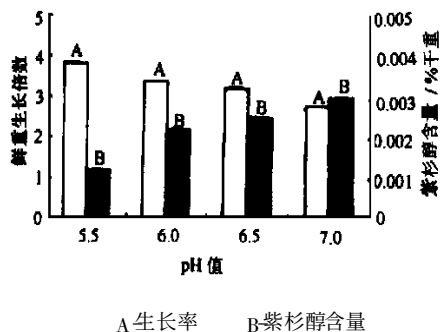


图 4 不同 pH对南方红豆杉愈伤组织生长及紫杉醇含量的影响

南方红豆杉愈伤组织的生长受 pH影响明显, pH5.5对于愈伤组织生长最为有利,达接种量的 3.84倍,但紫杉醇的含量较低,仅占干重的 0.001 2%。随着 pH的提高,愈伤组织的生长越来越差。pH7.0时仅为接种量的 2.80倍,而紫杉醇的含量却显著提高,占干重的 0.003 0%,是 pH5.5的 2倍多。同时

也说明南方红豆杉愈伤组织的生长与紫杉醇的合成呈负相关。

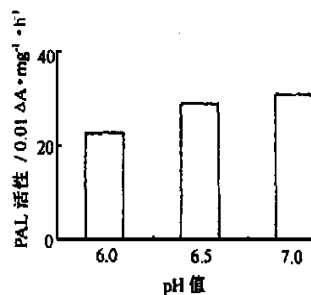


图 5 不同 pH对南方红豆杉愈伤组织 PAL活性的影响

从图 5中可以看出, pH对 PAL活性有影响。对照图 4,我们发现随着 pH值的升高,生物产量下降而 PAL活性升高,紫杉醇含量也随之提高。三者之间存在着一定的相关性。

本文初步研究了培养基 pH值对东北红豆杉和南方红豆杉愈伤组织生长、紫杉醇含量与 PAL活性的影响,结果表明:

1) pH值的高低对红豆杉愈伤组织生长及紫杉醇含量影响很大,这一结果与 Fett-Neto的报道结果不一样。

2) 有利于愈伤组织生长的 pH值不适于次生代谢产物的形成,因而减少了紫杉醇的积累。用组织培养的方法生产紫杉醇应综合考虑愈伤组织生长和次生代谢产物形成两方面的因素。

3) PAL活性的大小与紫杉醇含量密切相关,即 PAL活性高,紫杉醇含量往往也高。原因可能是:在 PAL的作用下由苯丙氨酸脱氨基而形成的肉桂酸参与了 wintersein 酸的形成, wintersein 酸是紫杉醇合成的前体^[6]。

参考文献:

- [1] Fett-Neto A G, Melanson S J, Sakata K, *et al.* Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification [J]. *Bio/Technology*, 1993, 11: 731-734.
- [2] Fett-Neto A G, Dicosmo F. Distribution and amounts of taxol in different parts of *Taxus cuspidata* [J]. *Plant Media*, 1992, 58: 461-466.
- [3] 上海植物生理学会. 植物生理学实验手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985.
- [4] Wickremesinhe E R M, Artea R N. Habituated callus cultures of *Taxus media* cv. *Hicksii* as a source of taxol [J]. *Plant Physio*, 1991, 96S: 96-100.
- [5] Fett-Neto A G, Zhang W Y, Dicosmo F, *et al.* Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata* [J]. *Biotechnol Bioengineer*, 1994, 44: 205-210.
- [6] 王伟, 钟英长. 紫杉醇生物合成的研究 [J]. *植物学通报*, 1999, 16(2): 138-149.