

物时,必须加入细胞分裂素解除抑制,才能打破休眠,促进萌发^[1]。

羌活种子中内源 Z、GA₃、IAA 和 ABA 的量在 20 d 时都增加,可能有利于启动羌活种胚的生长分化。从羌活种子内源 Z 的变化来看,Z 与种胚的生长速度有关,羌活种胚生长缓慢的时期是层积 70 和 150 d 时,这两个时期羌活种子中内源 Z 量相对较低。羌活种子内源 IAA 量在 20 d 时增加,之后下降,在 100 和 150 d 时检测不到,且未完成生理后熟的羌活种子 IAA 量比出芽种子中的高,可能羌活种子内源 IAA 与羌活种子休眠的解除有关。

羌活种子内源 GA₃量在 100 d 时较低,别的时期都比较高,尤其是在 20 d 时达到最高值,可能此时 GA₃量的增加提高了羌活种胚的生长潜力,有研究指出内源赤霉素可能通过这两条途径控制种子萌发:降低胚周围组织的机械阻碍作用和提高胚的生长潜力,种皮和胚乳的破裂导致烟草种子休眠解除与赤霉素相关^[2]。羌活种子内源 ABA 量在 20 d 时增加,之后下降,到 100 d 时就检测不到了,ABA 量在层积前期增加,可能促进胚的分化和发育,有研究指出 ABA 在植物种胚发育中的作用主要有两点:一是刺激胚胎的发生,一是防止成熟的胚过早萌发而影响物种的延续^[3]。而赤霉素可能对打破种子休眠没有直接的作用,如通过后熟和层积能提高 *Arabidopsis thaliana* 赤霉素缺陷突变体对赤霉素的敏感性来减轻种子的休眠;外源 GA₃处理 *A. thaliana* 的休眠种子不能很有效地打破休眠,GA₃只是当 ABA 的合成被抑制的时候才促进种子的萌发^[4]。羌活种子中内源 GA₃的量一直远高于 ABA 的量,而

且不同质量浓度的外源 GA₃浸泡完成形态后熟的羌活种子(胚率 80%) 24 h 对打破羌活种子的生理后熟效果也不明显(未发表),可能 GA₃对打破羌活种子的休眠也没有直接的作用。根据近些年来的研究,从生理学方面分析指出 ABA 和赤霉素在种子中的作用有“拔河”般的激素平衡关系,决定着种子所有的休眠和萌发能力。ABA 高敏感水平和赤霉素低敏感水平导致种子休眠程度增加,反之,ABA 低敏感水平赤霉素高敏感水平导致种子休眠程度降低^[5]。层积后期不能检测到 ABA,此时羌活种子并没有解除休眠,可能除了 ABA 之外还有其他内源抑制物质,有待进一步的研究证明。

致谢:实验得到中国林业科学院分析中心王文芝老师帮助。

References:

- [1] Han B W. *Plant Growth and Differentiation* (植物生长与分化) [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2003.
- [2] Philippe G, Denise B, Bruno S, et al. Control of seed dormancy in *Nicotiana plumbaginifolia*: post-imbibition abscisic acid synthesis imposes dormancy maintenance [J]. *Planta*, 2000, 210(2): 279-285.
- [3] Zhao Y H, Yang S L, Liu H Q, et al. Dynamics of endogenous hormone in American ginseng seed during morphological after-ripening period and their regulation to embryo development [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(2): 159-162.
- [4] Sonia A R, Denise B, Marie-Hélène W, et al. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 2004, 219(6): 479-488.
- [5] Brady S M, McCourt P. Hormone cross-talk in seed dormancy [J]. *J Plant Growth Regulat*, 2003, 22(1): 25-31.

筛选草珊瑚黄酮高产细胞克隆系的研究

涂艺声,吴笑臣

(江西师范大学生命科学学院,江西 南昌 330022)

植物单细胞克隆的研究,国际上自 20 世纪 70 年代以后迅速发展。其原因是,一方面理论研究的需要,另一方面细胞工程的研究,特别是植物次级代谢工业化生产的兴起,推动了单细胞克隆研究的发展^[1,2]。笔者在江西省自然科学基金资助下,已研究

报道了草珊瑚 *Sarcandra glabra* (Thunb.) Nakai 愈伤组织启动诱导、悬浮细胞培养系统^[3~5]和建立了一套适合草珊瑚细胞克隆的平板培养技术^[6]。

光是植物生长发育的重要环境因素,它作为一种调节植物信号以调节植物的各生理过程因子,在

收稿日期:2005-04-01

基金项目:江西省自然科学基金项目(99460)

作者简介:涂艺声(1957—),女,教授,2002 年调入江西师范大学,研究方向植物生物技术。

研究欧芹悬浮培养细胞的类苯丙烷代谢和黄酮苷途径中^[7]报道,光诱导类苯丙烷代谢顺序相关 PLA 酶,肉桂酸-4-羟基化酶,P-香豆酸辅酶 A 连接酶(组 1)和类黄酮苷途径的乙酰辅酶 A 羧化酶,黄烷酮合成酶的活性。尤其是紫外光,通常刺激许多培养物形成某些次级代谢产物,高原植物因接受紫外光线多,类黄酮成分的质量分数相对高,这可能是因为黄酮类物质对植物自身起保护的功能。

为了探索细胞工程提高生产草珊瑚天然有效成分的技术方法,笔者采取相关的诱导方法,处理裸细胞并结合单细胞克隆培养,进行了系统的筛选研究检测工作,这为细胞大量培养生产草珊瑚有效成分提供了基础。

1 材料

采用人工诱导继代培养的第 38 代草珊瑚愈伤组织无性系,经液体悬浮振荡培养 2 代,收集培养物作细胞诱变及其平板培养筛选的材料。

2 方法

2.1 草珊瑚细胞克隆系培养:草珊瑚细胞克隆系培养基和培养方法见文献报道^[3,6]。

2.2 草珊瑚悬浮物的紫外光诱变:草珊瑚悬浮培养物的制备方法参见文献报道^[5],然后在 1 000 r/min 离心 5 min,用吸管吸去上清液,沉淀的细胞在无菌条件下定量转入灭菌皿中,以人工紫外光辐照裸露细胞,辐照度为 625 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 并进行不同辐照时间 5、4、3、2、1、0.5、0.25、0 min 处理和不同细胞密度(个/mL):2 700、3 600、4 500、5 400、6 300、7 200、8 100 处理实验,此后即进行细胞的平板培养。

2.3 草珊瑚悬浮培养福马酸、琥珀酸培养诱变及培养方法:在悬浮培养基中分别添加 60、40、20、10、5、0 mg/L 不同质量浓度的福马酸、琥珀酸后,进行诱变培养 15 d,以后正常悬浮培养二代,再进行细胞平板培养。悬浮培养方法见文献报道^[5]。

2.4 草珊瑚细胞平板培养基及培养方法:草珊瑚诱变细胞平板培养及培养方法见文献报道^[6]。

2.5 细胞克隆的挑选和继代培养:草珊瑚细胞平板培养 30 d,挑选直径 1~2 mm 的细胞克隆团块于三角瓶中继续培养,每 30 天转接 1 次,连续培养 4 次,其后各克隆系作为第 1 代,每克隆系一半用于继代培养,一半用于相对增长率、总黄酮量的检测。克隆系继代培养周期 30 d。

2.6 细胞相对增长率的测定计算、总黄酮的提取、测定法:采用相对增长率进行对比,以消除因接种量的差别产生的影响。实验时,称重接种培养物(接种前后分别称三角瓶及内含物的质量,得接种量),培养一个月后收获培养物并称重。计算公式:相对增长率 = [(收获质量 - 接种质量) / 接种量] $\times$ 100%。总

黄酮的提取、测定见文献报道^[3]。

3 结果

3.1 紫外光辐照诱变因子的效应:利用草珊瑚有效成分之一黄酮吸收紫外光的特性,人工辅加紫外光辐照为诱变压力,期望诱导细胞内表达有关酶的 DNA 发生变异,继之,经单细胞克隆筛选变异细胞株。由表 1 结果表明草珊瑚细胞紫外光辐射半致死时间为 2 min,当辐照时间为 5 min 时,细胞克隆植板率很低,并表现出细胞严重受伤害,细胞克隆很难发生,0.5 min 以下的辐照时间影响植板率变化甚小,植板率密度高,不利于细胞克隆筛选,由表 1 得知 3 min 的紫外光辐射较为适合,细胞植板率为 8.35%,能有效发生细胞克隆以及区别挑选(表 1 内诱变细胞的密度为 5 000 个/mL)。

表 1 紫外光辐射草珊瑚细胞不同时间处理的克隆植板率效应

Table 1 Plant efficiency corresponding to various ultraviolet time periods

辐射时间/min	克隆植板率/%	与对照相差%
5	4.32	79.38
4	5.88	71.93
3	8.35	60.14
2	10.43	50.21
1	15.51	25.97
0.5	17.96	14.27
0.25	20.68	1.29
0	20.95	

不同裸细胞密度受紫外光辐射后与其细胞克隆的发生和生长存在密切关系,由表 2 可以看到细胞密度在 4 500 个/mL 细胞以下的处理,细胞植板率较低,而超过 8 000 个/mL 细胞时,克隆植板率迅速提高,这是因为细胞密度大,细胞间互相遮盖,而紫外光透过力差,结果是有的细胞未受到紫外光的作用生长势强所致。因此,认为本实验适宜紫外光辐照(辐照度 625 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$)的细胞密度为 4 500~7 200 个/mL,辐照时间采用 3 min。

表 2 紫外光辐照不同细胞密度的细胞克隆植板率变化

Table 2 Plant efficiency corresponding to irradiated cellular density

诱变细胞密度/(个 $\cdot\text{mL}^{-1}$)	克隆植板率/%
2 700	0.82
3 600	5.34
4 500	8.71
5 400	10.89
6 300	11.03
7 200	11.22
8 100	17.53

3.2 福马酸、琥珀酸诱导草珊瑚细胞的胁迫实验:

福马酸、琥珀酸均为草珊瑚有效成分^[3],本实验期望通过添加外源福马酸或琥珀酸质量浓度胁迫压力,诱导、筛选有效成分(福马酸或琥珀酸)的高产细胞突变株,在悬浮培养中分别单独添加 60、40、20、10、5、0 mg/mL 不同质量浓度的福马酸或琥珀酸预处理诱变培养,测定其悬浮培养物的相对增长率,结果是几乎都比对照的相对增长率降低 1~2.5 倍,有些处理的细胞全褐死,不能生长,尤其采用它们的悬浮培养物进行细胞平板培养,多次重复表现植板率几乎为零,这可能因为有效成分福马酸、琥珀酸皆属草珊瑚的初级代谢物,当外源添加后,直接扰乱其初级代谢生理过程,进而对生活细胞的有关酶起了抑制或伤害,致使其生长不良乃至死亡,故此预示福马酸和琥珀酸外源添加作诱导压力是不能引发代谢正效应的。

3.3 细胞克隆系的培养和变异株的筛选:草珊瑚细胞经紫外光辐照诱变处理后,立即进行平板细胞分离培养,约 15 d 开始有克隆形成的迹象(肉眼可见平板上凸起的“星”点),30 d 后挑选增殖块(2 mm 大小)的克隆小团块转代到三角瓶新鲜培养基上培养,初选到 215 个诱变细胞克隆株;连续培养 4 次后开始选优去劣,最后选留 36 个细胞克隆系,表 3 列出部分克隆系的分析结果。

表 3 细胞克隆第 9 代生长和总黄酮的比较
Table 3 Contrast of cell clone and flavones in 9th generation

克隆系	相对增长率/%	与亲本相比/倍	总黄酮/%	提高亲本的百分率/%
亲本愈伤组织	357.28		4.28	
SG002	396.62	1.11	4.62	7.94
SG018	445.73	1.25	4.29	
SG035	442.55	1.24	4.37	2.1
SG056	871.51	2.44	4.94	15.42
SG059	620.03	1.74	5.09	18.92
SG078	332.54		3.95	
SG082	592.57	1.66	5.03	17.52
SG091	424.76	1.19	4.43	3.5
SG112	850.17	2.40	4.62	7.94
SG130	718.42	2.01	4.95	15.65
SG132	364.73		3.52	
SG145	463.88	1.30	4.53	5.84
SG147	435.56	1.22	4.81	12.38
SG162	319.96		2.89	
SG183	351.72		4.16	
SG192	548.18	1.53	4.58	7.01
SG203	317.33		3.03	
SG208	863.46	2.42	4.84	13.08
SG211	346.83		4.23	

由表 3 可以看到,各克隆系间的差异非常明显,

它们的相对增长率变化在 317.33%~871.51%,19 个细胞株增长率中有 14 个超过原始株,超过原始株的细胞株系占 71.43%,总黄酮质量分数变化范围在 2.89%~5.09%,19 个细胞株中总黄酮有 14 个超过原始株,超过原始株的细胞株系占 61.9%,从中选出 4 个双高(即增长率高、总黄酮质量分数高)细胞系 SG-112,SG-056,SG-130,SG-208,它们的相对增长率是原始株系的 2 倍以上,总黄酮质量分数比母株提高 8%~15%。

3.4 高产草珊瑚黄酮的克隆系稳定性分析鉴定:为筛选优良克隆系,对建立的克隆系进行了连续继代培养观察,发现早期继代培养中的克隆系无论是细胞增殖,还是总黄酮的质量分数都表现变化很大,随着继代培养代数的增加,各克隆系的两种指标变化均趋向稳定。通过测定第 9、10、11、12、13 多代细胞克隆系的相对增长率和总黄酮质量分数,对高产系 SG-056,SG-112,SG-130,SG-208 的相对增长率和黄酮量的继代变化作图分析,由图 1 明显发现,SG130 从第 9 至第 13 代保持较稳定的水平,并且两种指标都优于原始株系。认为 SG130 属高产黄酮的优良细胞株,它的相对增长率平均是原始株系的 2 倍,总黄酮质量分数比原始株系提高 15.72%,而 SG-056,SG-112,SG-208 第 9 代时相对增长率和总黄酮质量分数皆高,随着继代增加,它们的两个指标仍有较大变化,尚不稳定,说明细胞克隆是来源杂小细胞团,因此,当继代增加,不同质的细胞增殖和代谢继续随着来源的不同而表现不同,反映在培养结果上的差异凸显。

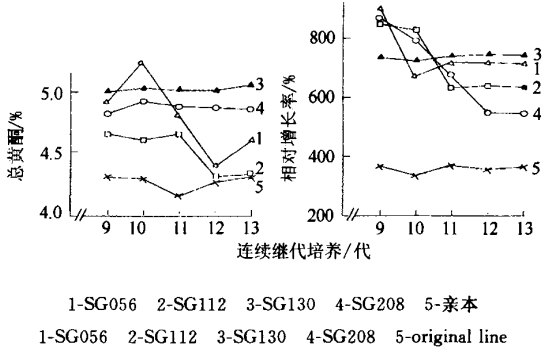


图 1 细胞克隆系在连续继代培养中的稳定性
Fig. 1 Stability of clone lines during successive subculturing

3 讨论

植物单细胞克隆是筛选细胞突变体的一个极其有效的方法。利用紫外光辐照草珊瑚裸细胞诱变突变株,结合细胞平板克隆培养分离选择,能有效地培

养高产草珊瑚黄酮的细胞株。但是通过细胞克隆培养的许多克隆系中,有些属于细胞突变产生的表型,有些可能仅是细胞间生理状态差异的表型,在草珊瑚细胞克隆系连续继代培养的早期,大部分处于生长和黄酮质量分数不稳定的状态,经过10代左右的连续继代培养并鉴定分析,才能确定真实的高产变异细胞株,这和大多数利用细胞克隆技术筛选高产系的报道是一致的。作为高产草珊瑚黄酮的细胞系必须同时满足两个条件:其一是在一定时间内,细胞相对增殖率高;其二是细胞代谢次生产物的有效成分黄酮质量分数高,只有这样,两者的积才表现高产。实验中SG-130符合这两个条件。因此,认为SG130确属高产草珊瑚黄酮细胞株系,对于其细胞大量培养工艺研究有待进一步深入探索。

References:

- [1] Sata F, Yanmda Y. High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells [J]. *Phytochemistry*, 1984, 23(2): 281-285.
- [2] Tabata M, Hiaoka N. Variation of alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures [J]. *Physiol Plant*, 1976, 38: 19-23.
- [3] Tu Y S, Jiang H R, Wang B Q. Cultures of callus and cell suspension of *Sarcandra glabra* for the production of medicinal component [J]. *Nat Prod Res Deve* (天然产物研究与开发), 1995, 7(1): 35-41.
- [4] Tu Y S, Jiang H R, Wang B Q, et al. Study on different colour lights temperatures and pH values on callus growth and secondary metabolite accumulation of *Sarcandra glabra* [J]. *Jiangxi Sci* (江西科学), 1994, 12(2): 85-89.
- [5] Tu Y S, Jiang H R, Wang B Q. studies on the supension cell cultures of *Sarcandra glabra* [J]. *Jiangxi Sci* (江西科学), 1994, 12(3): 162-165.
- [6] Tu Y S, Jiang H R. Plant culture of sigle cell clone from *Sarcandra glabra* [J]. *Jiangxi Sci* (江西科学), 1996, 14(2): 97-101.
- [7] Barz W. *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application* [M]. Berlin: Springer-Verlag, 1977.

RP-HPLC 法测定黄柏中黄柏内酯

马学敏^{1,2}, 王力生¹, 赵 巍¹, 郭亚健¹, 郭树仁²

(1. 北京中医药大学, 北京 100102; 2. 北京大学, 北京 100083)

黄柏为常用中药,系芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 及黄柏树 *P. amurense* Rupr. 除去栓皮的干燥树皮,前者习惯称“川黄柏”,后者习惯称“关黄柏”。黄柏性味苦寒,具有清热燥湿、泻火解毒、退虚热等功效。主要含有生物碱,如小檗碱、药根碱、木兰花碱等。另含黄酮醇、白鲜交酯、黄柏内酯等。其中,黄柏内酯具有降血糖^[1]、驱虫、抗溃疡^[2]的作用,可作为黄柏及其制剂的指标性成分之一。

一直以来,《中国药典》及各种文献中大多单独以小檗碱作为黄柏药材及制剂定性定量的指标性成分,然而,小檗碱存在于黄连、三颗针、功劳木多种植物中,其专属性较差,黄柏内酯作为黄柏药材及其制剂的指标性成分更加具有科学性。

本实验建立了黄柏药材中黄柏内酯的测定方法,该方法操作简便、准确,重现性好,为改善黄柏中的指标性成分的专属问题提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器:RE-52A 薄膜旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂),Brucker AM-500 型核磁共振仪,APEX II FT-ICR 型质谱仪,SHZ-3 型水循环真空泵(河南巩义市英峪电子仪器厂),KQ-100 型超

声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),惠普 HP1050 高效液相色谱仪。

1.2 试剂:柱色谱硅胶和薄层色谱硅胶(青岛海洋化工厂);水为重蒸水,乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯;显色剂为对二甲基氨基苯甲醛;关黄柏 1 于 2003 年采自吉林,经本校生药系阎玉凝教授鉴定为黄柏树 *Phellodendron amurense* Rupr. 干燥树皮;关黄柏 2、川黄柏、山黄柏来自中药学院生药系标本馆;黄柏内酯对照品为自制,质量分数>98%。

2 方法与结果

2.1 黄柏内酯的提取分离与结构鉴定:将关黄柏 1 依次用石油醚、醋酸乙酯提取。将醋酸乙酯提取物进行硅胶柱色谱分离,以氯仿-醋酸乙酯(50:1~8:1)进行梯度洗脱,将氯仿-醋酸乙酯(10:1)部分进行反复柱色谱分离,得到白色针状结晶(CHCl_3 -MeOH)。经结构鉴定为黄柏内酯(obaculactone)^[3]。

2.2 色谱条件:Diamondsil-C₁₈ 分析柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),流动相:乙腈-水-磷酸(50:50:0.2),体积流量:1.0 mL/min,柱温:室温,检测波长 210 nm。在此条件下,样品中黄柏内酯与相邻成分达到良好基线分离,见图 1。