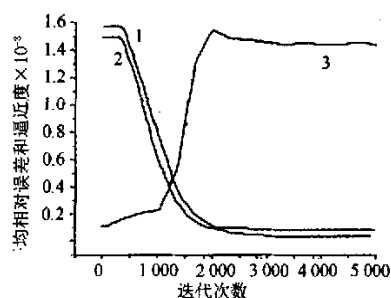


双曲正切等激励函数,并首创用反正切激励函数训练本模式,条件相同时,训练结果以反正切函数最好,收敛最快,精度最高(表2),可能是函数斜率较小,压缩坐标轴,从而摆脱误差函数的平坦区,避免大部分的局部极小值,使算法的收敛速度变快,但有时易发生振荡。

表2 激励函数的比较

Table 2 Comparison of excitation functions

激励函数	平均相对误差	时间(min)/迭代次数
反正切	0.001 835	0.85/5 000
Sigmoid	0.431 175	2.02/5 000
双曲正切	0.022 434	1.31/5 000
平方比(限幅输出)	0.031 689	1.56/5 000
正弦(限幅输出)	0.070 289	1.79/5 000



1-训练集样本平均误差 2-控制集样本平均误差 3-逼近度
1-mean relative error of training set 2-mean relative error of control set 3-approximation degree

图3 ANN逼近度优化

Fig. 3 ANN Optimization by approximation degree

有助于缓解中药色谱指纹图谱客观性和判别主观的矛盾。未来如能制定保证诸如采样的普遍、代表性,制备方法的科学、完善和系统的中药指纹图谱规范要求,结合谱效关系,信息采集、分析自动化等技术,必将极大促进中药现代化的进程。

References:

- [1] Scholkopf B, Smola A, Muller K R. Nonlinear component analysis as a kernel eigenvalue problem [J]. *Neur Comput*, 1998, 10 (5): 1299.
- [2] Zupan J, Gasteiger J. Neural networks: a new method for solving chemical problems or just a passing phase [J]. *Anal Chim Acta*, 1991, 248 (1): 1-30.
- [3] Jin P, Fan J B, Tan Y D. *Principle of Neural Network and Application of Neural Computer* (神经网络与神经计算机) [M]. Chengdu: Southwest Jiaotong University Press, 1991.
- [4] Liu P, Liang Y Z, Zhang L, et al. Artificial neural networks applied in the analysis of chemical data (I) [J]. *Chem J Chin Univ* (高等学校化学学报), 1996, 17 (6): 861-865.

4.5 训练方式:训练网络时先采用累计误差校正算法,即用全部样本都依次输入后计算总的平均误差,校正各连接权值,达到一定精度阈值后,再用标准误差校正算法处理,即每输入单一样本修改一次权值,可以保证网络计算速度与输出精度统一均衡。

4.6 针对神经网络的过拟合现象:由于中药指纹图谱中普遍存在预测样本数与特征数量比低于模式识别的分类要求,此外个别离散数据的存在,网络中不适当的误差精度要求和训练样本设计不合理,均易造成对训练样本的预测能力高于对未知样本的预测能力,则产生过拟合现象。本研究应用刘平等提出逼近度理论^[4]来减少过拟合现象发生,确定最优学习次数及对应的权、阈值参数(图3)。

5 结语

多种识别算法结合,较为有效地避免了单一算法的不足,将其应用于中药指纹图谱的模式识别中,

不同培养基对掌叶大黄毛状根克隆系质量的影响

杨世海¹, 刘晓峰², 果德安³, 郑俊华³

(1. 吉林农业大学中药材学院,吉林 长春 130118; 2. 吉林亚泰(集团)股份有限公司,吉林 长春 130031;
3. 北京大学药学院,北京 100083)

摘要:目的 研究培养基优化和毛状根克隆系对掌叶大黄毛状根生物量和蒽醌产量的影响。方法 选取4个单克隆掌叶大黄毛状根和4种基本培养基,采用统计分析方法,研究影响大黄毛状根生物量积累和5种蒽醌类化合物的产量的因素。结果 不同克隆间大黄毛状根生物量积累存在显著差异,以单克隆毛状根DH7a最高;培养基种类对毛状根生物量的影响存在极显著差异,以WP培养基中毛状根生物量最高;大黄毛状根中的5种游离蒽醌中以大黄酚和大黄素甲醚为主;不同克隆间5种游离蒽醌总产量存在显著差异,以DH7a最高,并且DH7a与B5培养基的组合,5种蒽醌产量最高;克隆和培养基之间互作分析显示克隆DH5a、DH5d与WP培养基,克隆DH7a与B5培养基对于游离蒽醌产量来说是优势组合,而克隆DH5c在4种培养基上5种游离蒽醌产量差异不显著。结论 本研究为利用掌叶大黄毛状根培养系统大规模生产蒽醌类化合物提供依据。

关键词:掌叶大黄;毛状根;单克隆;培养基;蒽醌类化合物

中图分类号:R282.7

文献标识码:B

文章编号:0253-2670(2006)04-0595-04

Effect of various media on quality of hairy root clones of *Rheum palmatum*

YANG Shi-hai¹, LIU Xiao-feng², GUO De-an³, ZHENG Jun-hua³

(1. College of Chinese Medicinal Material, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2. Jilin YaTai Group Co. Ltd., Changchun 130031, China; 3. School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract: Objective To study the effect of optimized media and clones on growth and anthraquinone yield in hairy root cultures of *Rheum palmatum*. **Methods** The four monoclonal and four media were optimized statistically for studying the effect on the biomass accumulation and five anthraquinones yield in hairy root cultures of *R. palmatum*. **Results** Significant differences in biomass were shown among various clones and media, in which monoclonal DH7a was the highest and WP medium was the best. Chrysophanol and physcion were predominant among five free anthraquinones in hairy root cultures of *R. palmatum*. Notable differences of total five free anthraquinones yield were observed among different clones, in which DH7a was the highest. Reciprocity analysis showed that the highest yield of five free anthraquinones is in the combinations of DH7a with B5 medium. DH5a less and DH5a the least with WP medium, DH7a and B5 medium were predominant for the yield of above five free anthraquinones with exception of DH5c which has no significant difference in four media. **Conclusion** The study lays the foundation for mass production of anthraquinone by hairy root culture of *R. palmatum*.

Key words: *Rheum palmatum* L.; hairy root; monoclonal; media; anthraquinones

大黄是我国特产的传统中药。优质大黄只产于我国以青海为中心的甘肃、陕西、四川、西藏一带。大黄为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* L.、唐古特大黄 *R. tanguticum* Maxim. ex Balf. 和药用大黄 *R. officinale* Baill. 的干燥根及根茎^[1]。近年来,由于过度采挖和垦荒,某些正品大黄在许多地区已处于野外灭绝状态^[2]。通过生物技术手段生产蒽醌类化合物,开辟了大黄资源开发利用的新途径。

通过发根农杆菌感染植物,将其所含的 Ri 质粒上的一段 DNA (T-DNA) 转移并整合到植物基因组中,诱导出毛状根,并建立毛状根培养系统。与植物细胞悬浮培养系统相比,植物毛状根具有生长迅速,合成次生代谢产物能力强和遗传稳定等优点^[3]。毛状根的生长及次生代谢产物的产量主要是由毛状根的遗传特性和培养条件决定的。故筛选高产单克隆品系和优化培养条件在利用植物毛状根生产次生代谢产物过程中显得尤为重要。

本实验是在成功诱导掌叶大黄毛状根的基础上,研究培养基和毛状根克隆系对掌叶大黄毛状根生长及蒽醌类化合物合成的影响,为进一步筛选并建立适宜的掌叶大黄毛状根培养体系,用于生产蒽醌类化合物奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 单克隆掌叶大黄毛状根培养:4 种单克隆掌叶大黄毛状根,分别编号为 DH5a、DH5c、DH5d 和

DH7a,其中前 3 种由发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* LBA9402 诱导产生,后一种由发根农杆菌 *A. rhizogenes* R1601 诱导产生。每种毛状根切取 2 cm 长根尖(25 mg),分别接种于含 100 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中。所用培养基为无机盐均为 1/2 的无激素 WP、N6、MS、B5 4 种培养基。每种毛状根均设 3 组重复,置于转速为 100 r/min 的摇床上振荡培养,培养温度为 25 ℃。

1.2 掌叶大黄毛状根和非转化根生物量的测定:培养 40 d 后,收获 4 种掌叶大黄毛状根培养物。先用镊子取出根,挤净根中所含培养基,用分析天平称鲜重。用蒸馏水漂洗 1 min,80 ℃烘干,称干重。

1.3 蒽醌类化合物的 HPLC 检测^[4]

1.3.1 总蒽醌类化合物的提取:将称好干重的毛状根,用研钵研成粉末,分别装入 5 mL 试管中,每个试管中加入 2 mL 丙酮-甲醇(1:1)混合液,超声振荡 5 min 后置于 4 ℃冰箱中过夜。吸取每管上清液,通过滤膜滤过 1.5 Eppendorf 管中,挥干溶剂后准确加入 2 mL 甲醇,用于液相色谱测试。

1.3.2 对照品溶液配制:分别称取芦荟大黄素 2.5 mg、大黄酸 4.9 mg、大黄素 2.4 mg、大黄酚 4.1 mg、大黄素甲醚 2.9 mg,共同溶于丙酮-甲醇(1:1)的溶液中,用量瓶定容至 25 mL 作为标准储备液,取 1 mL 该储备液定容于 25 mL 量瓶作为测试对照品溶液。

1.3.3 HPLC 色谱条件: TSP P100 高效液相色谱仪, TSP UV100 紫外检测器, Phenomenex ODS-3 色谱柱, 流动相为甲醇-1% 高氯酸 (85:15), 体积流量: 1 mL/min, 检测波长为 254 nm。

1.3.4 测定与分析: 在上述色谱条件下, 用 HPLC 测定各样品的峰面积, 根据回归方程计算芦荟大黄素、大黄酸、大黄素、大黄酚、大黄素甲醚的量。

1.4 统计分析: 用 SPSS 8.0 软件进行数据处理和统计分析。

2 结果

2.1 单克隆大黄毛状根生物量分析: 在培养过程中观察发现, 4 种单克隆大黄毛状根在 4 种培养基里的生长表现和生物量积累明显不同。在 WP 培养基里多数毛状根生长较快, 根粗并呈白色。而在 B5 培养基里毛状根生长较慢, 根细并为暗黄色。4 种单克隆大黄毛状根在 4 种培养基里培养 40 d 后的生物量见表 1。

表 1 不同培养基单克隆大黄毛状根生物量鲜重(干重)

Table 1 Biomass accumulation of hairy root monoclones of *R. palmatum* on various media in fresh weight (Dry weight)

克隆毛	不同培养基的生物量/g·瓶 ⁻¹			
状根	MS	B5	N6	WP
DH5a	5.083 0 (0.146 6)	2.717 4 (0.081 1)	2.522 2 (0.054 8)	5.813 4 (0.159 3)
DH5c	3.836 0 (0.098 4)	1.252 2 (0.028 7)	1.160 4 (0.026 4)	6.192 7 (0.143 0)
DH5d	4.210 7 (0.116 4)	1.568 9 (0.059 2)	4.023 1 (0.084 6)	5.595 1 (0.156 0)
DH7a	4.994 2 (0.117 1)	3.554 6 (0.076 0)	4.613 4 (0.089 9)	7.465 6 (0.230 2)

对不同单克隆大黄毛状根在 4 种培养基里生物量积累进行方差分析(表 2), 发现不同单克隆大黄毛状根生物量积累存在显著差异, 不同培养基对大黄毛状根生物量存在极显著差异, 对其进一步分析结果表明, 不同单克隆大黄毛状根生物量存在显著差异, 以克隆 DH7a 最高, 显著高于 DH5c, 但与 DH5a、DH5d 差异不显著。培养基之间对大黄毛状根生物量的积累影响非常大, WP 培养基大黄毛状根生物量积累最高, 极显著地高于 MS、N6 和 B5 培养基。因此, 可以认为 WP 培养基最有利于大黄毛状根的生长。

表 2 大黄毛状根生物量鲜重方差分析

Table 2 Variance analysis of biomass accumulation of hairy roots of *R. palmatum*

变异来源	DF	SS	MS	F
克隆	3	8.592 8	2.864	4.935*
培养基	3	36.970 3	12.323	21.22**
误差	9	5.226 0	0.581	
总变异	15	50.789 1		

2.2 单克隆大黄毛状根中蒽醌类化合物产量分析: 4 种单克隆大黄毛状根在 4 种培养基里培养 40 d 后收获, 提取总蒽醌类化合物, 用 HPLC 测定 5 种蒽醌产量, 结果见表 3。对其进行方差分析, 结果见表 4。

表 3 单克隆大黄毛状根中 5 种游离蒽醌类化合物产量

Table 3 Yield of five free anthraquinones in hairy root monoclones of *R. palmatum*

毛状根	产量/(μg·瓶 ⁻¹)					
	培养基	芦荟大黄素	大黄酸	大黄素	大黄酚	大黄素甲醚
DH5a	MS	2.25	6.60	11.75	5.88	7.97
	B5	0.24	0.76	5.71	11.97	19.12
	N6	0.99	3.98	6.95	7.45	6.20
	WP	4.04	16.06	22.32	22.14	17.58
DH5c	MS	0.59	1.77	6.50	11.81	17.13
	B5	0.18	0.18	2.48	1.13	2.30
	N6	0.74	1.51	5.39	5.13	6.16
	WP	1.78	3.07	9.18	11.30	15.10
DH5d	MS	1.53	1.02	0.89	2.06	1.54
	B5	0.73	2.36	14.38	7.34	16.78
	N6	0.22	0.29	2.93	13.21	11.61
	WP	1.96	3.92	7.46	6.53	7.24
DH7a	MS	2.01	6.37	7.34	3.27	2.89
	B5	0.71	0	10.72	42.22	36.89
	N6	2.76	0	7.55	22.51	18.79
	WP	0.99	0.48	5.02	6.85	5.58

表 4 大黄蒽醌类化合物产量方差分析

Table 4 Variance analysis of anthraquinone yield of *R. palmatum*

变异来源	DF	SS	MS	F
蒽醌种类	4	1 479.25	369.81	11.774**
克隆	3	302.30	100.77	32.08*
培养基	3	192.54	64.18	2.043
蒽醌种类×克隆	12	319.27	26.61	0.847
蒽醌种类×培养基	12	423.04	35.25	1.122
克隆×培养基	9	1 137.14	126.35	4.023**
误差	36	1 130.75	31.41	
总变异	79	4 984.29		

* 表示在 5% 水平上差异极显著; ** 表示在 1% 水平上差异极显著

* significant difference at level of 5%; ** significant difference at level of 1%

可见大黄毛状根的蒽醌种类、不同单克隆以及培养基与克隆之间互作对蒽醌产量存在极显著差异, 而培养基之间却无明显的差异, 说明对大黄蒽醌类化合物而言, 培养基的影响不大。进一步分析结果表明, 大黄根中的 5 种游离蒽醌产量以大黄素甲醚为最高, 极显著地高于大黄素、大黄酸和芦荟大黄素; 以芦荟大黄素最低, 仅是大黄素甲醚的 1/10, 与 5 种蒽醌差异不显著。

不同克隆之间 5 种游离蒽醌总量也存在显著差

异, DH7a 和 DH5a 显著地高于 DH5c 和 DH5d。

由于克隆与培养基之间存在互作, 对其进一步分析结果表明, 4 种单克隆大黄毛状根在不同培养基上蒽醌产量差异显著。以 DH7a 在 B5 培养基上蒽醌产量最高, DH5a 在 WP 培养基上次之, 以 DH5d 在 B5 培养基上产量最低。

3 讨论

研究表明, 不同毛状根无性系具有不同的生长速率及次生代谢产物量, 这是由于毛状根起源于单细胞, 这些细胞在大小、结构、遗传、生理生化特征上各不相同, 其代谢状态和合成次生代谢物的能力也不同, 因此不同毛状根克隆系之间存在很大差异^[5~8]。本实验诱导产生的 4 个单克隆毛状根株系中, 其生物量积累和 5 种游离蒽醌总量存在显著差异, 以克隆 DH7a 生长速率快, 且蒽醌化合物含量高, 因此, 要提高蒽醌化合物含量, 必须对毛状根细胞系进一步筛选, 以获得生长速度快和蒽醌化合物含量高的细胞系。

各种培养基由于所含组分及其比例不同, 对毛状根生长及次生代谢产物的形成有不同的影响^[9,10]。不同培养基的无机元素浓度差异很大, 一般分为高盐、高硝酸钾、中盐和低盐 4 种类型, 对植物细胞生长和次生代谢产物的形成必然会有较大的差异。培养基中硝态氮和铵态氮之间的比例也会影响毛状根生长和次生代谢产物的合成^[11]。本实验中, WP 培养基最有利于掌叶大黄毛状根生物量积累, 显著优于 MS、N6 和 B5 培养基。对培养基优化的研究有待进一步深入, 应采用统计分析方法对培养基

中各种成分进行多因素多水平的筛选。

References:

- [1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2000.
- [2] Ye B L. Plant resources of *Rheum* in Qinghai Province [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 1996, 19 (6): 280-281.
- [3] Liu B Y, Ye H C, Li G F. The latest progress of the application of Ri plasmid in plant science [J]. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 1998, 15 (4): 1-7.
- [4] Yang S H, Liu X F, Guo D A. Effect of rare-earth elements La^{3+} on growth of hairy roots and normal roots of *Rheum palmatum* and their yield of anthraquinone [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (10): 1171-1174.
- [5] Mano Y, Nabeshima S, Matsui C, et al. Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica* [J]. *Agric Biol Chem*, 1986, 50: 2715-2722.
- [6] Chen M, Wang H Y, Liao Z H, et al. Review of studies on medicinal plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2000, 12 (3): 98-102.
- [7] Li B H, Zhang H M, Ding R X, et al. Establishment of hairy root culture of autotetraploid indigoblue woad (*Isatis indigotica*) and different extrinsic factors affecting the growth [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (2): 132-134.
- [8] Zhao S J, Li C Y, Qian Y C, et al. Induction of hairy roots of *Panax ginseng* and studies on suitable culture condition of ginseng hairy roots [J]. *Chin J Biotech* (生物工程学报), 2004, 20 (2): 215-220.
- [9] Lui H L, Zhang Y Z, Tao W Y. Effects of nutrition and environmental factors on growth and alkaloid production of *Catharanthus roseus* hairy-roots [J]. *Pharm Biotechnol* (药物生物技术), 2003, 10 (3): 155-158.
- [10] Wang C Z, Ding J Y. Effects of different media* and phytohormones on the growth and ginsenoside content of *Panax quinquefolium* L. hairy root [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境学报), 2001, 10 (4): 1-4.
- [11] Bensaddek L, Gillet F, Saucedo J E, et al. The effect of nitrate and ammonium concentrations on growth and alkaloid accumulation of *Atropa belladonna* hairy roots [J]. *J Biotechnol*, 2001, 85 (1): 35-40.

半夏药材中蛋白质 IEF 电泳图谱的研究

黄必胜, 陈科力*, 曹 艳

(湖北中医学院, 湖北 武汉 430061)

摘要:目的 通过对半夏及其近缘植物的蛋白质电泳图谱比较, 研究半夏药材的电泳鉴别方法。方法 应用等电聚焦(isoelectrofocusing, IEF)技术, 对不同产地半夏及其近缘植物块茎进行比较。结果 半夏具有稳定的 IEF 电泳图谱, 显示具有 8 条特征蛋白质带, 并测定了其等电点(PI)值, 半夏与其几种近缘植物的 IEF 谱有明显的区别。结论 半夏 IEF 电泳图谱可作为半夏药材的鉴别依据, 半夏特征蛋白质的 PI 值为半夏的鉴定和蛋白质分离纯化提供了参数。

关键词:半夏; 掌叶半夏; 水半夏; 蛋白质电泳; 等电聚焦

中图分类号: R282.7

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)04-0598-03