

能,有效抑制肿瘤细胞的活性。哥纳香三醇衍生物抗肿瘤作用机制主要有以下几方面。

2.1 抑制细胞生物大分子的合成^[9]:采用^[3H]标记前体掺入试验,GHM-10 4~12 $\mu\text{g/mL}$ 作用 6 h,可抑制细胞的 DNA、RNA 及蛋白质的生物合成,其中对 DNA 的抑制作用最强,掺入曲线为递减型,说明其对 DNA 合成的抑制作用为不可逆抑制,对 RNA 的抑制作用次之,蛋白质最弱,对生物大分子合成的抑制作用呈现时间依赖性。

2.2 引起细胞 DNA 分子损伤^[10]:通过单细胞凝胶电泳法可观察到哥纳香衍生物作用于白血病 K562 细胞 4.5 h 后, DNA 分子受损,表现为电泳后在荧光显微镜下可见彗星状拖尾,碱洗脱法测定哥纳香衍生物对 DNA 单链长度的影响发现其能导致 DNA 单链断裂,呈明显的量效关系,哥纳香衍生物通过使 DNA 单链发生断裂,不可逆的抑制细胞的 DNA 的合成。

2.3 直接抑制 DNA 拓扑异构酶的活性^[11]:DNA 拓扑异构酶是一种重要的核酶,能修饰 DNA 的拓扑结构,引起 DNA 单链和双链的断裂或再连接,它在细胞增殖、DNA 复制以及基因表达等方面起着十分重要的作用,经过 GHM-10 作用的细胞 DNA 拓扑异构酶活性降低,无论在细胞内还是在细胞外都抑制了细胞 DNA 拓扑异构酶所介导的使 DNA 解旋的反应,干扰了 DNA 的正常功能,从而导致细胞死亡。

2.4 诱导肿瘤细胞凋亡^[12]:白血病细胞和肝癌细胞经哥纳香三醇衍生物处理后,Hoechst33342/PI 双荧光染色可观察到明显核固缩、凝集等细胞凋亡表现,单细胞凝胶电泳检测到明显彗星现象,流式细胞仪检测结果发现细胞凋亡,虽然凋亡率不高但能证实哥纳香衍生物能够诱导细胞凋亡。

3 展望

哥纳香衍生物作为抗癌药物的明日之星,在肿瘤疾病的治疗上有广阔的发展前景,今后的研究方向主要有:1)对哥纳香衍生物抑癌机制还需深入研究;2)目前合成的哥纳香衍

生物虽然对其结构进行了优化,但对肿瘤细胞的抑制率还比较低,仍需对其进行合理改造,为哥纳香抗肿瘤临床应用提供依据;3)从哥纳香属植物中获得的单体化合物目前仅限于抗癌作用的研究,以一物多筛的原则,开展哥纳香衍生物其他药用研究还有广阔的空间。

References:

- [1] Alkofahi A, Ma W W, Mackenzie A T, et al. Goniatriol from *Goniothalamus giganteus* [J]. *Nat Prod*, 1989, 52(6): 1371-1373.
- [2] Mukai C, Hirai S, Hanaoka M. An optically active chromium (O)-complexed benzaldehyde derivative in organic synthesis. A highly stereo controlled total synthesis of (+)-goniofurone [J]. *Tetrahedron Lett*, 1993, 34(38): 6081-6084.
- [3] Chen R Y, Yu D Q, Ma L, et al. The chemical constituents of *Goniothalamus howii* Merr. [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(6): 453-456.
- [4] Sun S Y, Yu D Q. Studies on the synthesis and antitumor activities of howiinol A and its analogues [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(7): 502-511.
- [5] Chen H, Zhou L E, Zhang Y J, et al. Synthesis and antitumor activities of p-C1 howiinol A and its analogues [J]. *Chin Chem Lett*, 1999, 10(6): 449-452.
- [6] Chen H, Wang H, Jiang M C. Syntheses and anticancer activities *in vitro* of derivatives of goniatriol [J]. *Tianjin Pharm* (天津药学), 2002, 14(6): 31-34.
- [7] Chen H, Liu Z H, Wang H. Syntheses and antitumor activities of isogoniatriol [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2002, 18(6): 343-346.
- [8] He J H, Ye Y M, Xu C X. Studies on the anticancer effect of howiinol A, a new compound isolated from *Goniothalamus howii* [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(7): 493-497.
- [9] He J H, Ye Y M, Xu C X. Inhibitory effect of howiinol (GHM-10) on the synthesis of biological macromolecules in L1210 cells [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 33(12): 886-890.
- [10] Yu L R, Jin Q Y, Xie H, et al. The influence of isogoniatriol derivatives on tumor cell DNA [J]. *Tianjin Med J* (天津医药), 2005, 33(5): 266-267.
- [11] He J H, Xu C X. Effect of howiinol (GHM-10) on the structure of DNA molecules and activity of DNA topoisomerase I in L1210 cells [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(1): 5-8.
- [12] Hu W L, Jin Q Y, Chen L Y. The study of 5,7-O-isopropylidene-p-methyl-goniatriol-induced apoptosis in K562 cells [J]. *Acta Acad Med CPAPF* (武警医学院学报), 2002, 11(1): 1-3.

我国黄芩野生驯化研究进展

邵玺文, 韩梅, 杨利民*

(吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118)

黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 为唇形科黄芩属多年生草本植物, 根入药, 是我国常用大宗中药材之一, 始载于《神农本草经》, 其主要的活性成分有黄芩苷、黄芩素、汉黄芩苷、汉黄芩素等黄酮类化合物, 具有清热燥湿、解毒、止血安胎、抗菌、抗病毒、美白、防晒等作用, 主要分布在我国北方各

省^[1,2]。随着黄芩用量加大, 资源破坏严重, 野生资源锐减, 难以满足社会需求, 黄芩已被我国列为三级保护濒危植物, 栽培黄芩已成为我国黄芩药源的主要来源^[2]。虽然许多学者做了大量有价值的黄芩野生驯化研究工作, 但尚缺乏系统性的全面研究。本文概述了我国学者近年来研究黄芩野生驯化取

收稿日期: 2005-11-04

基金项目: 吉林省科技发展计划重点项目 (20050903)

作者简介: 邵玺文 (1966—), 男, 吉林前郭人, 在读博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事药用植物栽培及生理生态特性研究。

Tel: (0431) 4532849 E-mail: shaoxiwen888@yahoo.com.cn

* 通讯作者 杨利民

得的主要成果,希望通过总结提升野生黄芩驯化栽培技术,为提高栽培黄芩产量和品质提供一些参考依据。

1 黄芩驯化的植物学特性和生物学特性

黄芩株高 30~80 cm,主根粗壮、肉质,略呈圆锥形,表皮棕褐色,断面黄色;茎四棱形,基部木质化,多分枝。黄芩野生驯化栽培后容易形成一个复杂的异质群体,群体内变异类型丰富多样,茎色上存在从紫色到绿色的各种过渡类型^[3]。茎颜色不同的黄芩叶色深浅也不同,叶交互对生,具短柄;单叶,对生;叶片披针形,全缘,上面深绿色,下面淡绿色,有黑色腺点。总状花序顶生,花排列紧密,偏生于花序的一边。花唇形,蓝紫色。种子为小坚果近球形,果皮呈黑褐色。果实为四小坚果,蒴果小,近球形,黑褐色,包围于宿萼中。黄芩对温度的适应能力较强,成株地下部能耐-30℃低温,植株又能耐 35℃左右的高温。在高燥、向阳、排水良好、中性和微碱性的土壤或砂质土壤地块上生长良好,黄芩耐旱,但怕水涝,在低洼积水或雨水过多的地方生长不良,易造成烂根死亡^[1,3]。

2 黄芩驯化生长发育规律

黄芩为多年生草本植物,新种子发芽率较高,但顶土能力弱。在春夏季播种均可以,若雨水充足生长良好并于当季开花。苏淑欣等^[4]研究认为,在 20℃时足墒播种黄芩发芽势高、苗齐苗壮,低于 15℃播种会造成出苗不齐、不全。叶片平均功能期一年生黄芩为 44 d,多年生黄芩为 52 d,一年生黄芩叶片寿命最短的 20 d,位于基部,叶片寿命最长的 57 d,位于上部,叶片平均寿命为 49 d,多年生黄芩叶片平均寿命 55 d;第 1~15 叶片为光合面积形成期,第 15 叶片后为光合面积保持期,更有利于果实和根系的生长;当年生黄芩出苗后 62 d 左右现蕾;黄芩 8 月前以地上生长为主,9 月后以地下生长为主。根据栽培黄芩生长发育规律,及时采取有效措施促进黄芩地上和地下部协调生长,提高黄芩产量和品质。

3 黄芩驯化无性繁殖技术

栽培黄芩以种子繁殖为主,因种子顶土能力弱,在干旱地区或干旱季节播种,常因土壤干旱造成出苗困难。如果采用黄芩扦插、黄芩茎段直接诱导丛生芽、黄芩试管苗的节诱导愈伤组织等生物技术手段集约化育苗,在雨季移栽,能提高移栽成活率,保证黄芩苗齐苗壮生长迅速,为黄芩高产优质奠定基础。

3.1 黄芩不同部位扦插繁殖:用黄芩茎梢的幼嫩部分作插条,很容易成活,若条件合适,其成活率可达 95%以上,且生根快,插条生长迅速,40 d 左右即可出圃移栽。黄芩最适宜的扦插期一般最低气温应达 18℃左右,平均气温在 25℃左右,植株处于营养生长期扦插最好,插条生根快,容易成活。研究不同扦插材料试验表明,采用茎尖部分作插穗较茎中部、茎基部插穗早生根 1~3 d。这 3 部分的成活率分别为 93.7%、51.7%和 41.7%,平均产量达 25.7 kg/hm²,最高单产达 28.5 kg/hm²。

3.2 黄芩茎段直接诱导丛生芽:丁如贤等^[5]用无菌的黄芩种子接种于 MS 培养基上 4 d 左右,种子萌发,逐渐长成幼苗,待苗茎长有 6~7 个节段时,剪取其带节茎段,去掉两侧

叶片,作为外植体,进行诱导培养,培养基为附加 1 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基,成功得到丛生苗。该方法繁殖黄芩幼苗具有快速、省时、取材方便、不受季节限制、诱导再生率高、丛生苗数量多等优点。

3.3 黄芩试管苗的节诱导愈伤组织:高山林等^[6]研究表明,黄芩试管苗的节、节间都很容易诱导出愈伤组织,诱导率均达 100%,而叶片的愈伤组织诱导率低,多效唑(PP₃₃₃)对黄芩试管苗的生长有着显著的矮壮作用。因此,黄芩试管苗的节是诱导愈伤组织的理想外植体,在培养基中适当添加 PP₃₃₃能显著改善试管苗的素质,PP₃₃₃与激素的配合使用,能有效地调控黄芩愈伤组织的分化、试管苗的生长与根,并能显著提高移栽成活率。

3.4 栽培黄芩无性繁殖的田间表现及有效成分:黄芩插穗生长半个月后即可移栽。先在畦面刨穴、浇水,然后立即移栽,插穗不萎蔫,根与土壤结合紧密,成活率高。对插穗根系发育观察结果认为,有性繁殖的黄芩只有一条主根,扦插繁殖的黄芩则有 3~4 条主根。第 7、8 天长出新根,第 10 天每株新根系增加到 6、7 条,第 20 天每株新根系增加到 20 余条,以后逐渐减少,生长到 200 d 时苗高 60 cm,根长 50~70 cm,有 3~4 条主根,根的直径可达 1 cm。扦插繁殖黄芩苷质量分数高达 13.4%,同期有性繁殖的黄芩苷达 12.9%。

4 栽培措施对黄芩产量及黄芩苷量的影响

黄芩野生驯化栽培后,如何采取有效的栽培措施来提高黄芩产量和品质是必须面对和解决的问题,学者们做了许多有益的研究工作。

4.1 栽培方式对黄芩产量及黄芩苷量的影响:陈万翔等^[7]研究认为,平畦宽行宽幅条插剪花枝、窄行条播蹲苗控上与对照窄行条插相比,增产极显著,起垄宽幅条插的产量比对照减产,达到显著水平。黄芩苷量以窄行条播蹲苗控上、平畦宽行宽幅条插剪花枝的最高,但均未达到显著水平。秋天育苗春栽法比春育密植法、地膜春插法高产,产量差异达显著水平,秋育春栽法黄芩苷量也高于其他栽培方法。陈万翔等^[8]研究盖草种类和厚度对黄芩产量及黄芩苷量的影响表明,地面覆盖整稻草 1 cm、碎稻草 3 cm、整稻草 3 cm、整玉米秸 1 cm、碎稻草 1 cm 比裸地对照增产达极显著水平,覆盖整玉米秸 3 cm,比裸地对照增产达显著水平;黄芩苷量以覆盖碎稻草 3 和 1 cm、玉米秸 3 cm 的最高,但与对照相比均未达到显著水平。综合黄芩产量和黄芩苷量看,覆盖 1 cm 左右碎稻草最好。研究栽培措施对黄芩的影响,应统筹考虑土壤质地、肥水条件、气候因素等环境因子的作用,使栽培措施的效果最大化。

4.2 施肥对栽培黄芩产量及黄芩苷量的影响:单一施用和复合施用氮、磷、钾化肥在提高黄芩根部产量的同时,不会导致黄芩根部主要有效成分黄芩苷量的下降,而且多数情况下,还会提高黄芩苷的量,尤其是施用磷肥效果最为显著。氮、钾化肥单独施用,黄芩根部黄芩苷量均有不同程度增加,氮、钾配合施用黄芩苷量却有明显降低。苏薇薇^[9]运用灰色系统理论中的关联度分析方法,研究黄芩内积累的氮、磷、

钾养分与总黄酮之间的关系表明,黄芩中总黄酮的量高低与其内积累的氮、磷、钾养分有关联,其关联序为氮>钾>磷,这一结果证实氮、磷、钾养分与中药质量有密切联系。何福林等^[10]研究鸡粪、猪粪、人粪和骡马粪4种有机肥料对黄芩总黄酮和黄芩苷量的影响,认为有机肥料种类及其施用量的不同,对黄芩总黄酮没有显著影响,但对黄芩苷有影响,4种有机肥料间存在极显著差异,其中以施用骡马粪的黄芩苷量最高。研究施肥对黄芩产量和品质的影响应因地制宜,测土施肥和配方施肥技术能更好解决施肥种类和施肥数量的问题。

5 驯化黄芩与野生黄芩的质量比较

由于栽培黄芩种子来源的差异、栽培措施的不同、栽培环境条件的影响,必将影响黄芩的生长、产量和品质。黄芩驯化栽培后有效成分、药效作用、组织结构发生哪些变化,产量和质量的积累变化过程及栽培黄芩的毒性怎样,这些问题是黄芩驯化栽培后必须解决的问题。

5.1 驯化栽培黄芩与野生黄芩有效成分比较:栽培黄芩根(3~4年)木质部未出现木栓化细胞,中央稍有裂隙,未见空心;野生黄芩根木质部内侧出现了数层栓化细胞排成的圆环,且中央枯朽空心,即造成了黄芩苷的损失又减轻了根的质量,认为从药材质量和产量两个方面来看,栽培黄芩均应高于野生黄芩。丁少纯等^[11]研究表明,野生黄芩驯化栽培后,由于生长环境和年限不同于野生黄芩,栽培黄芩根在性状上产生了差异,在组织结构和化学成分上二者基本一致,在水溶性和醇溶性浸出物上,栽培黄芩均高于野生黄芩,有效成分量1年生栽培黄芩低于野生黄芩,2年生栽培黄芩高于野生黄芩,栽培黄芩与野生黄芩内在质量基本相同,可代替野生黄芩药用,并以2年生栽培黄芩为佳。冯卫生等^[12]利用薄层扫描法对2~3年生栽培黄芩和野生黄芩进行了主要成分的定性、定量分析表明,2~3年生栽培黄芩与野生黄芩含有相同化学成分,栽培黄芩中黄芩苷量略低于野生品,但栽培黄芩有些苷元量高于野生品,从整体上看栽培黄芩与野生黄芩黄酮类成分量差别不大,2年生栽培黄芩更接近野生品。栽培与野生黄芩在外观性状及组织结构方面略有差异,二者黄芩苷量无明显差异。宋平顺等^[13]研究认为,栽培黄芩与野生黄芩化学成分相近,栽培黄芩与野生黄芩中黄芩苷分别在7.5%~16.2%和9.4%~19.2%,根部组织结构野生品与栽培品基本相同,颜色和外观性状不同地区有差别。

5.2 驯化栽培黄芩的产量与质量的动态变化:李滨等^[14]研究表明,栽培2年生黄芩根的折干率在考察期内升高,至秋季出现最高峰,该时期采收药材产量为最高。综合药材产量和质量两方面因素,栽培黄芩的最佳采收期应为秋季果期至果后期。崔玉菊等^[15]研究认为,黄芩生长到一年时,黄芩苷的量即达到最高值,再延长生长期黄芩苷量也不再增加。生长期为一年半的黄芩产量增长最快,产量相对高。黄芩苷的量在生长期达一年后即达到相对平衡,不再随黄芩的生长期延长而增高,黄芩的产量尽管随着生长期的延长有所提高,但生长期超过一年半后,其提高速度显著变慢,综合考虑经济效益和药用成分,黄芩生长期达到一年半时是其最佳收获

期。方阵等^[16]研究认为黄芩的地上干质量与黄芩苷的量之间呈线性相关。

5.3 栽培黄芩与野生黄芩毒性比较:解黎雯等^[17]研究表明,野生黄芩驯化栽培在毒性方面与野生黄芩比较无显著差异,临床和中药生产上栽培黄芩可以替代野生黄芩应用是安全可靠的。

6 栽培黄芩采收加工

野生黄芩驯化栽培后的采收年限和采收时间与黄芩产量、有效成分量密切相关。有学者研究认为栽培黄芩2年采收质量佳^[11,12,14,15];王秀敏等^[18]综合研究黄芩苷量和黄芩产量认为河北怀柔栽培黄芩最佳采收期为栽培后的第3年9月;又有认为栽培黄芩生长到2~3年均可采收,春秋均可,但以春季的色泽为佳。由于各地栽培黄芩的环境条件不同,黄芩的采收时期不能统一标准,应根据当地水、肥、气候等具体情况确定,优质和效益是唯一标准。秋季采收应在地上茎叶枯萎后进行,春季采收应在土壤解冻后,幼芽萌动前进行,药材以根条粗长、质地坚实、色泽黄、除净外皮者为上品。

7 结语

常规中药材栽培侧重于肥料、插期、密度、浇水、生殖规律、生长发育等子系统的孤立研究,许多研究仅证明了某种养分因素对药用植物有效成分有影响,对其形成的生理机制和养分机制仍未完全了解。因此,只有注重系统的整体性和综合性,采用先进的研究设计方法,优化栽培措施组合,建立高效能的栽培体系,实现栽培技术量化、指标化和可控化,才能实现栽培措施在黄芩野生驯化过程中1+1>2的功效。

在揭示栽培因子对药材产量和品质的影响规律,为优化栽培技术奠定基础,进而实施模式化栽培同时,应通过对各生态因子及其综合作用进行研究,明确影响药材产量和质量的限制因子和主导因子及其作用特征和规律,揭示生态主导因子影响药材质量的作用机制。综合考虑栽培措施和生态因子对黄芩产量和品质的影响,确定黄芩最适宜的生长区,为黄芩GAP基地建设和优质药材规模化生产奠定基础,是今后研究的重要方向。

References:

- [1] Chen J, Yang S L, Cheng H Z, et al. Primary study on the geographic variation of the feature of *Scutellaria baicalensis* growth [J]. *J Chin Med Mater* (中草药), 2002, 25(11): 777-778.
- [2] Xiao L H, Wang H Y, Li F M, et al. Comparative study on HPLC-FPS of *Radix Scutellariae* of various sources [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2004, 21(1): 28-31.
- [3] Xu Z X, Wei J H. Study on reproductive biological features and comparison of group splitting type of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28(10): 623-626.
- [4] Su S X, Li S, Shang W Y, et al. Study on growth regularity of *Scutellaria baicalensis* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(11): 1018-1021.
- [5] Ding R X, Zhang H M, Fu X. Rosette bud induction from stem segments of baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1998, 29(3): 194-195.
- [6] Gao S L, Chen B J. Optinization on cloning rapid-propagation technology by tissue culture in *Scutellaria baicalensis* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 312-315.
- [7] Chen W X, Li S, He F L, et al. Effects of different cultural

- methods on *Scutellaria baicalensis* georgi yield and baicalin content [J]. *J Chengde Voca Tech Coll Natio* (承德民族职业技术学院学报), 2003, 2: 79-80.
- [8] Chen W L, Li S, He F L, et al. Effects of kind and thickness of covering grass on field on *Scutellaria baicalensis* Genorgi and baicalin content [J]. *J Chengde Voca Tech Coll Natio* (承德民族职业技术学院学报), 2003, 4: 92-94.
- [9] Su W W. Grey system analysis on content of nitrogen phosphorous and potassium and active components on *Scutellaria baicalensis* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1996, 19(9): 464-465.
- [10] He F L, Chen W X, Jiang S X, et al. Effects of organic fertilizer on total flavone and baicalin [J]. *J Chengde Voca Tech Coll Natio* (承德民族职业技术学院学报), 2002, 4: 58-60.
- [11] Ding S C, Jiang F K. Comparative study on wild and cultivated *Scutellaria baicalensis* [J]. *Shandong J Tradit Chin Med* (山东中医杂志), 1998, 17(11): 510-511.
- [12] Feng W S, Ji C R, Du T X, et al. The comparative analysis on composition of cultivated and wild *Scutellaria baicalensis* in henna [J]. *Chin Arch Henan Tradit Chin Med* (河南中医药学刊), 1994, 9(4): 5-8.
- [13] Song P S, Zhu J R, Ding Y H, et al. Quality assessment of cultivated *Scutellaria baicalensis* in Gansu [J]. *J Gansu Coll Tradit Chin Med* (甘肃中医学院学报), 2003, 20(4): 44-46.
- [14] Li B, Du X W, Sun H F, et al. Dynamic study on culture quality of *Scutellaria baicalensis* [J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 1999, 1: 45.
- [15] Cui Y J, Ban F Z, Zhang H P, et al. Effects of whole growth phase of *Scutellaria baicalensis* on baicalin content and *Scutellaria baicalensis* Georgi yield [J]. *Shandong Pharmacol Ind* (山东医药工业), 1996, 15(3): 53.
- [16] Fang Z, Yang J B, Wang K C, et al. Growth characteristics and accumulation of effective ingredient of *Scutellaria baicalensis* [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2002, 25(2): 84-85.
- [17] Xie L W, Guan X, Lv Q L, et al. Comparative study on the toxicity of cultivated and wild *Scutellaria baicalensis* [J]. *Info Chin Pharmacol* (中国药理学学会通讯), 2001, 18(4): 33-34.
- [18] Wang X M, Deng Y J, Zhong H J, et al. Study on best harvest time of cultivation *Scutellaria baicalensis* of Hebei Huairou [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2005, 28(1): 5-7.

单链抗体技术及其在药用植物研究中的应用

马丽玲¹, 晁志^{2*}, 田中宏幸³

(1. 广州医学院护理学院 药检学科组, 广东 广州 510182; 2. 南方医科大学中医药学院,

广东 广州 510515; 3. 九州大学大学院药学院, 日本 福岡 812-8582)

抗原刺激动物免疫系统产生抗体, 抗体识别抗原的部位在其重链和轻链的可变区(variable region)。如果将抗体的可变区(V_H和V_L)通过弹性多肽接头(peptide linker)稳定地连接在一起, 即为单链抗体(single chain fragments variable, scFv)。scFv 大小仅为完整抗体的 1/6, 但其完全保持了抗体的抗原特异性及抗原的结合能力, 同时由于为单链, 在大肠杆菌或植物体内等容易表达, 无须组装即能保持活性。在植物研究领域, 其可用于植物病理诊断、植物生物活性成分的检测、定量分析与分离精制; 而将单链抗体基因转入植物细胞, 更可使转基因植物获得诸如增强对病毒、除草剂等抗性, 体内生理活性物质增加, 次生代谢产物量提高等新的特性。特别是通过转入单链抗体基因, 提高药用植物中具生物活性的次生代谢产物量的技术, 可望发展成为一种新的分子育种方法, 可以在不需要明了目标成分的生物合成途径的情况下, 提高其产量。

1 单链抗体的构建^[1]

基因工程单链抗体技术的基本原理是: 首先从杂交瘤细胞^[2]、外周血淋巴细胞^[3]中提纯 mRNA, 再经逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)分别扩增抗体的重链可变区和轻链可变区编码基因, 人工合成一条寡核苷酸序列(即多肽接头), 将V_L的C端与V_H的N端或V_H的C端与V_L的N端相连接, 构建成单链抗体基因, 在一定的表达系统中得以表达。

人工合成的寡核苷酸多肽接头序列, 在单链抗体的构建

中十分重要, 接头必须能使重、轻链可变区自由折叠, 使抗原结合位点处于适当的构型, 并不引起分子动力学改变, 目前使用最多的接头序列是 Huston 根据 X 射线衍射分析抗体可变区结构的 15 肽序列(Gly₁Ser₃), 许多研究者应用此序列构建单链抗体基因并表达出活性产物。

单链抗体的 C 末端可以引入半胱氨酸尾、酪蛋白激酶底物尾、E 尾等结构, 有助于标记和偶联其他分子; 也可以引入钙调蛋白尾、c-myc 尾、葡萄球菌 A 蛋白尾、脂类标签、组氨酸尾等, 使表达产物易于检测和纯化。

常用的单链抗体表达系统有细菌(最常用为大肠杆菌 *Escherichia coli*)、酵母、动物细胞(昆虫细胞、COS 细胞、CHO 细胞等, 最常用为乳腺细胞)、植物细胞、噬菌体等。其中使用噬菌体的表达技术称为噬菌体展示(phage display), 是近年来常用的一种手段。

2 单链抗体技术在植物研究中的应用

单链抗体技术在肿瘤的诊断和生物治疗方面显示良好的应用前景^[4], 备受瞩目以外, 随着近年来抗体工程学的进步, 在植物学研究领域, scFv 及其应用也日益受到重视。

2.1 植物病理诊断: Harper 等^[5]从合成的噬菌体抗体库中筛选出了针对马铃薯卷叶黄症病毒(potato leafroll luteovirus, PLRV)特异的单链抗体; 然后将编码此 scFv 的 DNA 重组至 pDAP2 质粒中, 转化大肠杆菌, 用异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导其产生抗 PLRV 单链抗体——碱

收稿日期: 2006-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30500652)

作者简介: 马丽玲, 女, 江西高安人, 讲师, 主要从事生物化学及检验研究。

* 通讯作者 晁志 Tel: (020)61648256 E-mail: chaozhi@fimmu.com