

短葶飞蓬毛状根的诱导及黄酮类成分测定

刘成洪¹, 段艳冰¹, 张磊¹, 张汉明¹, 张卫东², 陈万生^{2,3*}

(1. 第二军医大学药学院, 上海 200433; 2. 现代中药研究中心, 上海 200433;

3. 第二军医大学附属长征医院 药学部, 上海 200003)

摘要:目的 通过诱导培养短葶飞蓬毛状根产生有用次生代谢产物。方法 利用发根农杆菌 C58C1 感染短葶飞蓬无菌苗叶盘诱导毛状根, 小量提取脱农杆菌完全的毛状根 DNA 用于 *rol* 基因的 PCR 检测, 经 PCR 检测阳性的毛状根采用 4 种不同液体培养基振荡扩大培养, 对于获得的毛状根系测定其中总黄酮和灯盏花素的量。结果 发根农杆菌感染 10 min 共培养 2 d 可取得较好的转化效果, 继代培养约两个月后可脱菌完全, 获得的毛状根 PCR 检测阳性率为 52.9%, 4 种液体培养基中 B₅ 培养基更适合于毛状根的生长, 毛状根中总黄酮量要明显高于正常根中的量, 但灯盏乙素的量明显低于正常根中的量。结论 通过短葶飞蓬毛状根大量培养可获取灯盏黄酮类药用成分。

关键词:短葶飞蓬; 毛状根; 黄酮; 灯盏乙素

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)11-1730-04

Induction of hairy roots and determination of flavonoids in *Erigeron breviscapus*

LIU Cheng-hong¹, DUAN Yan-bing¹, ZHANG Lei¹, ZHANG Han-ming¹,

ZHANG Wei-dong², CHEN Wan-sheng^{2,3}

(1. College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Morden Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200433, China; 3. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital,

Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

Key words: *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz.; hairy root; flavone; scutellarin

短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand.-Mazz. 系菊科药用植物, 其干燥全草为中药灯盏花。灯盏花原为我国传统民间药, 现已收入《中国药典》2005 年版一部。近年来, 灯盏花提取物已被开发用于多种疾病的临床治疗^[1~3], 尤其在治疗心脑血管疾病方面疗效显著。但在其开发过程中由于过度采集造成了其野生资源的匮乏^[4]。目前我国云南地区已开展了短葶飞蓬人工种植方面的研究, 但在人工引种栽培过程中存在繁殖慢、成活率低以及品质不稳定等问题^[5]。本研究利用已建立的短葶飞蓬快速繁殖体系^[6], 对短葶飞蓬进行毛状根诱导培养并测定其黄酮及灯盏乙素的量, 旨在为开发利用灯盏花黄酮类药用成分提供新的资源与途径。

1 材料与方法

1.1 植物材料: 利用短葶飞蓬无菌苗^[6], 取生长健壮的小植株的叶片(去主脉)分割成叶盘(大小约 5 mm × 5 mm), 放在不含任何激素的 MS 培养基(MS₀)上, 防止外植体脱水。

1.2 菌株: 发根农杆菌 *Agrobacterium rhizogenes* C58C1 菌株由复旦大学遗传工程国家重点实验室提供, 从平板上挑取该农杆菌单菌落, 接种到含 30 mg/L 利福平的 LB 液体培养基中 28 ℃ 振荡(180 r/min)培养过夜, 供感染用。

1.3 毛状根的诱导与继代培养: 在超净台上(以下均在无菌条件下操作)将上述叶盘放入 50 mL 活化好的上述菌液中, 封口后置于 28 ℃ 摇床上 70 r/min 振荡 10 min; 将外植体用灭菌吸水纸稍稍吸干后接种到 MS₀ 培养基上, 于暗处(25 ± 2) ℃ 共培养约 1~2 d 后, 用无菌水冲洗几次后接种到选择培养基 MS + 300 mg/L 头孢噻肟钠(Cefotaxime, Cef)上。诱导出的毛状根约 2 cm 长时切下转移到新鲜培养基上, 每两周继代一次, 继代过程中逐步降低 Cef 筛选压。剪取脱菌完全的毛状根尖约 2 cm 接种到 B₅、1/2B₅、MS、1/2MS 液体培养基上, 置于摇床上 70 r/min 振荡, (25 ± 2) ℃ 暗培养, 第 7、14、21、28、35、42 天记录每瓶毛状根的鲜质量以第一次记录的毛

收稿日期: 2006-01-10

作者简介: 刘成洪(1975—), 男, 湖北人, 生药学专业博士研究生, 主要从事药用植物基因工程研究。

* 通讯作者 陈万生 Tel: (021)63610109-73712 E-mail: chenws@vnet.citiz.net

状根鲜质量为基数计算各毛状根系增长倍数,绘制不同培养基中毛状根系的生长速率曲线。

1.4 毛状根的 PCR 检测:超净台上剪取约 50 mg 的新鲜毛状根,编号后采用 SDS 小量法抽提总 DNA。根据文献报道^[7]设计 *rolb*、*rolc* 基因 PCR 检测引物。*rolb* 基因引物: Frolb: 5'-GCTCTT-GCAGTGCTAGATTT-3', Rrolb: 5'-GAAGGT-GCAAGCTACCTCTC-3'; *rolc* 基因引物: Frolc: 5'-CTCCTGACATCAAACCTCGTC-3', Rrolc: 5'-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3'。在 0.2 mL 薄壁管中加入模板 DNA 约 40 ng, *Taq* DNA 聚合酶 2 个单位,PCR 反应总体积为 50 μ L。PCR 扩增参数如下:起始 94 $^{\circ}$ C 热变性 3 min 后,接着进行 30 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 45 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸反应 90 s,循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色进行分析。

1.5 毛状根中灯盏总黄酮和灯盏乙素测定

1.5.1 对照品溶液制备:精密称取在 120 $^{\circ}$ C 减压干燥至恒重的芦丁对照品 48.0 mg,置 25 mL 量瓶中,加甲醇 20 mL,置水浴上微热使溶解,放冷,加甲醇至刻度,摇匀,精密量取 10.0 mL 置 100 mL 量瓶中,加水至刻度,摇匀,即得黄酮对照品溶液。

精密称取 60 $^{\circ}$ C 减压干燥 4 h 的 6.5 mg 灯盏乙素对照品,用甲醇(HPLC 级)溶于 50 mL 量瓶中,超声使溶解完全后,冷却,定容,即得灯盏乙素对照品溶液。

1.5.2 供试品溶液制备:随机取短葶飞蓬种子发芽植株 5 株,切取根部用自来水洗净根上附着培养基,吸水纸吸干,分别编号,50 $^{\circ}$ C 干燥过夜至恒重,研磨成粉,过 40 目筛,精密称取 100 mg 干粉加入 20 mL 甲醇,超声提取 30 min,5 000 r/min 离心 5 min,收集上清,沉淀加入 20 mL 甲醇继续同上超声提取 30 min,同前离心后合并上清液,全部转移至 50 mL 量瓶中,用甲醇适量洗涤容器,定容至 50 mL,该样品溶液用于总黄酮测定;样品溶液经 0.45 μ m 有机相膜滤过后,用于 HPLC 检测灯盏乙素。重复测定 1 次。

取通过液体振荡扩大培养获得的生长迅速的 3 个毛状根系(编号分别为 C58C1-7、C58C1-10 和 C58C1-11),同上述正常根处理,每个根系重复测定 1 次。

1.5.3 实验条件选择:利用 UV 法测定短葶飞蓬总黄酮,参照文献方法^[8]。检测波长为 510 nm,使用 UV-2100 双光束紫外分光光度计(北京瑞利分析仪

器公司)。

利用 HPLC 测定灯盏乙素,参照文献方法^[9,10]。HPLC 色谱条件:色谱柱为 Diamonsil C₁₈ 柱(5 μ m, 200 mm $\times$ 4.5 mm,美国迪马公司),流动相为甲醇-0.1%磷酸(40:60),检测波长为 335 nm,体积流量为 1 mL/min,灵敏度为 AUFS=1.0,柱温为室温。使用高效液相色谱仪(Waters515 泵, Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector),SR2000 色谱工作站(上海三锐科技有限公司)。

对照品芦丁与灯盏乙素(野黄芩苷,96.4%)均购自中国药品生物制品检定所,甲醇为 HPLC 级,水为双蒸水。

1.5.4 标准曲线的制备:精密量取芦丁对照品溶液 0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL,分别置 10 mL 量瓶中,各加水至 3 mL,加 5%亚硝酸钠溶液 0.5 mL,使混匀,放置 6 min,加 10%硝酸铝溶液 0.5 mL,摇匀,放置 6 min,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 5 mL,再加水至刻度,摇匀,放置 15 min,照紫外-可见分光光度法(《中国药典》附录 V A),在 510 nm 的波长处测定吸光度,以吸光度为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。在 0.009 6~0.048 0 mg/mL 与吸光度线性关系良好, $Y=15.75 X-0.022 6$, $r=0.999 4$ 。

用移液管分别精密量取灯盏乙素对照品溶液 0.1、0.4、0.8、1.6、3.2 mL 至 10 mL 量瓶中,定容,摇匀,制成质量浓度为 1.3、5.2、10.4、20.8、41.6 μ g/mL 对照品溶液,分别进样测定。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。进样量在 1.3~41.6 mg/mL 与峰面积线性关系良好, $Y=189 665.39 X-173 471.88$, $r=0.999 8$ 。

2 结果与分析

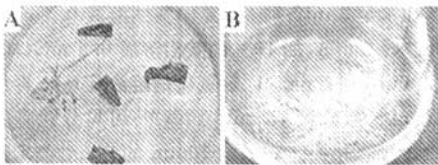
2.1 感染时间与共培养时间对转化外植体生长的影响:在利用叶盘法诱导短葶飞蓬毛状根的过程中,观察到农杆菌感染时间对转化效率影响较大,感染时间过长很容易造成叶盘褐化死亡,感染时间不宜超过 10 min,说明本实验所用供试材料对转化使用的农杆菌比较敏感。

共培养时间过长也会对转化产生不利影响。随着共培养时间的延长,由于农杆菌过度繁殖,褐化死亡的外植体数量迅速上升。通常观察到共培养 2 d 外植体周围就有水渍状菌液长出,为生长起来的农杆菌,此时宜用无菌水将外植体冲洗两次吸干水分后转移到选择培养基上培养。共培养到第 3 天,农杆菌已大量繁殖,外植体周围可见白色液体状菌液,此时即使用较高质量浓度 Cef (500 mg/L) 冲洗外植

体后,在选择培养中也不易控制农杆菌生长。

2.2 短葶飞蓬毛状根的诱导与继代培养:在发根农杆菌介导的初步转化中,叶盘经农杆菌侵染约 20 d 后,观察到叶盘边缘处长出毛状根(图 1A),利用发根农杆菌侵染叶盘获得了大量的毛状根,在浸染的 214 个叶盘中,有 89 个叶盘诱导出了毛状根。

毛状根经剪取根尖继代培养 7~8 次(约 2 个月)后均已脱菌完全,转到液体培养基上进行了扩大培养。在 4 种不同的培养基上,毛状根在 B₅ 液体培养基中生长速度最快(图 1B),总体上是 B₅ > 1/2MS > MS > 1/2B₅(图 2)。毛状根整个生长周期约为 45 d,其中在第 6 周生长速度达到最快,在第 7 周生长进入停滞期,毛状根开始变硬,部分根尖开始褐化,培养基变得浑浊黏稠。



A-叶盘边缘诱导毛状根
B-B₅ 液体培养基上培养的毛状根系
A-hairy root induced from cut end of leaf disc
B-hairy root line cultured in B₅ liquid medium

图 1 毛状根诱导与液体培养

Fig. 1 Induction and liquid culture of hairy roots

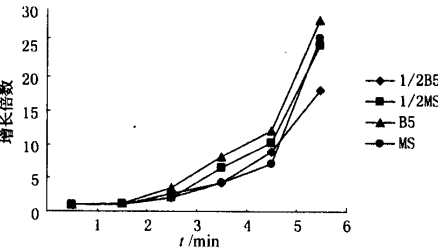
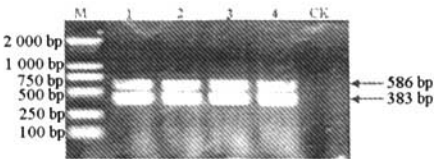


图 2 毛状根系 C58C1-7 不同液体培养基培养生长曲线
Fig. 2 Growth curve of hairy root lines C58C1-7 in different liquid media

2.3 毛状根 *rol* 基因的 PCR 扩增: *Rollb* 与 *rolc* 基因是发根农杆菌 Ri 质粒上 TL-DNA(T-DNA 左臂)上对转化细胞产生毛状根过程起重要作用的两个基因。利用这两个基因各自对应的一对引物,通过 PCR 一次扩增出了这两个基因的对应片段,大小分别为 383 bp 与 586 bp 的两条条带(见图 3),与文献报道的大小一致^[7],而从短葶飞蓬非转化正常根中未扩增出相应片段。这表明含 *rol* 基因的 Ri T-DNA 部分已经整合到短葶飞蓬基因组中。PCR 检测了 51

个来自不同转化事件的毛状根,阳性转化毛状根数为 27 个,阳性转化率为 52.9%。



1~4-不同的毛状根系 M-DL 2000 分子量标准
CK-正常根
1-4-different lines of hairy root M-DL 2 000 Marker
CK-normal root

图 3 毛状根 *rol* 基因 PCR 检测电泳图
Fig. 3 Electrophoretogram of *rol* genes PCR identification of hairy roots

2.4 发根系中灯盏总黄酮和灯盏乙素测定:对于转化获得的毛状根经液体振荡扩大培养获得了生长迅速的发根系,经 PCR 检测后测定了发根系中灯盏总黄酮和灯盏乙素的量(表 1)。

表 1 短葶飞蓬不同发根系总黄酮和灯盏乙素
Table 1 Total flavones and scutellarin in different hairy root lines of *E. breviscapus*

材料	总黄酮/%	灯盏乙素/%
C58C1-7	5.46	0.013
C58C1-10	3.98	0.013
C58C1-11	3.40	0.010
正常根(n=5)	3.05	0.091

3 讨论

在发根农杆菌介导的遗传转化研究中,叶盘法已成为经典转化方法,本实验选用叶盘作为外植体诱导毛状根。在毛状根诱导中,观察到未转化叶盘在 MS₀ 培养基上仍可以从叶盘边缘生出幼根,这可能与植物本身的内源激素水平较高有关,可以直接诱发其生根。由于转化培养中不存在筛选压,而叶盘即使未经农杆菌侵染,仍可以在叶盘边缘长出根,在转化初期并不能鉴别排除,被剪下来继代培养,它们的存在可能使得阳性率偏低。因此对于转化获得的毛状根需要经过多次剪取根尖继代培养,从生长形态上筛选非转化毛状根。

黄酮类化合物为灯盏花中的主要药用成分,在原植物根中量相对地上部分较低^[11],本研究测得灯盏花种子发芽植株正常根总黄酮量约为 3%,与上述报道的野生短葶飞蓬根部总黄酮量相近。有报道在金丝桃属植物中通过植物组织培养可能是生产黄酮类物质的另一个有效途径^[12],本实验通过转基因从短葶飞蓬叶盘诱导毛状根后,通过器官培养也检

测到黄酮合成并且量略有提高。已知灯盏乙素是灯盏花中的有效成分之一^[13],它是一个由黄酮苷元和糖基配体组成的黄酮类化合物,在次生代谢中以终产物的形式存在。在毛状根培养物中检测到大量黄酮存在而灯盏乙素的量很低,这可能与毛状根中合成灯盏乙素下游相关的代谢调控酶有关,笔者将在已建立的短葶飞蓬毛状根转化体系的基础上进一步开展灯盏乙素生物合成关键酶的研究。

References:

- [1] Cheng S F, Zhang Y N, Zhang X P, et al. Recent Research of *Breviscapin* in clinical applications [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2000, 11(2): 177-178.
- [2] Wei N. Advances of breviscapin in clinical applications and its side-effects [J]. *Chin Pharm* (中国药师), 2001, 4(2): 144-146.
- [3] Ma Q, Li Y L, Hang Y P. Clinical applications of breviscapin [J]. *Her Med* (医药导报), 2003 (22) (Supplement): 79.
- [4] Yu H Y, Chen Z L. Study on artificial culture of *Erigeron breviscapus* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 2002, 24 (3): 115-120.
- [5] Yang S C, Yang Z X, Zhang Q Q, et al. Preliminary studies on growing of *Erigeron breviscapus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(3): 318-321.
- [6] Liu C H, Zhang M K, Deng H, et al. Establishment of rapid propagation system of *Erigeron breviscapus* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(4): 597-599.
- [7] Aleksandra K, Izabela S, Krzysztof B, et al. Establishment of hairy root cultures of *Ammi majus* [J]. *Plant Sci*, 2001, 160: 259-264.
- [8] Wu Z C, Liang W Y, Ding Y S. Study on ultrasonic extraction of total flavones of *Erigeron breviscapus* [J]. *Yunnan J Tradit Chin Med Mater* (云南中医中药杂志), 2004, 25(3): 35-36.
- [9] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
- [10] Zhang H, Zhang Z F. Ecological and biological analysis of scutellarin in *Erigeron multiradiatus* [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2004, 26(1): 60-62.
- [11] Feng D X, Chen B, Dang C L, et al. Study on variation of total flavonoids in *Erigeron breviscapu* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(4): 362-365.
- [12] Zeng H Y, Zhou P H, Pei G. Total flavonoid contents in cultural materials of *Hypericum sampsonii* [J]. *J Plant Resour Environ* (植物资源与环境学报), 2002, 11(1): 59-60.
- [13] Cui J M, Wu S. The advance on the research of breviscapine [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15 (3): 255-258.

茯苓灭活原生质体融合育种研究

梁清乐, 王秋颖*, 曾念开, 王怀凯

(中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

原生质体融合是一项重要的生物工程技术,近30年来发展迅速,该技术比基因工程法和原生质体转化法简便易行,可以克服传统育种法中细胞壁和交配系统对育种的障碍,实现种间、属间以至远缘的杂交。由于原生质体融合是整套基因组连同细胞在内的其他组分一起融入另一细胞,就为遗传物质的充足和有效表达提供了更多的机会,且并不需要预先了解有关基因组或单个基因太多的具体细节,就能改变物种的生物学特性,获得新品种,甚至可以通过将几个优良品种的融合而将多种优良性状组合到单个菌株中,所以,这是一个有可能在较短时期内取得明显成效的育种方法^[1],并被广泛应用于微生物遗传育种工作中^[2]。灭活原生质体融合是对原生质体融合技术的重大发展。自1977年以来,人们开始了用灭活原生质体进行微生物融合育种的尝试^[3]。

茯苓 *Poria cocos* (Fr.) Wolf 是传统名贵中药,近年来,茯苓菌种退化严重,给生产带来巨大的损失。笔者在对茯苓原生体制备与再生条件进行探索

的基础上^[4],通过原生质体融合技术,得到了茯苓融合重组子,并对融合子进行了初步的鉴定。

1 材料和方法

1.1 出发菌株: Z_{10-2} 为中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所真菌室保藏; Z_{10-3} 来自福建三明真菌研究所。

1.2 培养基

1.2.1 斜面培养基: 麦麸 5% (水煮 0.5 h, 滤过, 取滤汁), 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.3%, 硫酸镁 0.15%, VB 0.001%, 琼脂 1.5%, pH 值 6.5。

1.2.2 发酵培养基: 麦麸 5% (水煮 0.5 h, 滤过, 取滤汁), 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.3%, 硫酸镁 0.15%, VB 0.001%, 琼脂 1.5%, pH 值 6.5。

1.2.3 再生培养基: 马铃薯 10% (水煮 0.5 h, 滤过, 取滤汁), 酵母粉 0.3%, 蛋白胨 0.5%, 葡萄糖 2%, 磷酸二氢钾 0.2%, 硫酸镁 0.1%, 硫酸铵 0.1%, VB 0.001%, 琼脂条 1.5% (煮溶)。

1.2.4 高渗再生培养基: 再生培养基中加入 0.5