

长春花毛状根再生植株的获得及抗癌生物碱的产生

龚一富¹, 王何瑜¹, 卢鹏¹, 袁泉¹, 王桂林², 刘建军³

1. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211

2. 宁波市合一农业科技开发有限公司, 浙江 宁波 315000

3. 宁波市沁香园农业开发有限公司, 浙江 宁波 315800

摘要: **目的** 建立长春花转基因毛状根再生植株快速繁育体系, 获得生物碱量提高的长春花再生植株。**方法** 研究外源植物生长调节剂对长春花毛状根愈伤组织诱导、不定芽分化、不定根分化和再生植株移栽的影响, 采用 HPLC 法测定长春花再生植株生物碱量, 并采用定量 PCR 技术分析目的基因的表达情况。**结果** 转基因长春花毛状根愈伤组织诱导和不定芽诱导的最佳培养基均是 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L, 不定根分化的最适培养基是 1/2 MS+NAA 0.3 mg/L。采用炼苗的改进方法可使长春花再生植株的移栽成活率达 90%。HPLC 分析结果表明, 长春花再生植株中长春碱、长春新碱和阿吗碱量分别比对照提高 4.0、5.8、1.8 倍, 其中, 优良单株 OG30-3 的长春新碱和长春碱量比对照提高 7 倍和 10 倍。定量 PCR 分析结果表明, 转基因植株 *orca3* 基因和 *g10h* 基因的表达量比非转基因植株的高。**结论** 转基因长春花毛状根再生植株可促进抗癌生物碱的产生。

关键词: 长春花; 生物碱; 毛状根; 再生植株; HPLC

中图分类号: R282.12 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2012)04-0788-07

Obtainment of regeneration plantlet of *Catharanthus roseus* hairy roots and production of anticancer alkaloids

GONG Yi-fu¹, WANG He-yu¹, LU Peng¹, YUAN Quan¹, WANG Gui-lin², LIU Jian-jun³

1. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China

2. Ningbo Heyi Agriculture Science and Technology Development Co., Ltd., Ningbo 315000, China

3. Ningbo Qinxiangyuan Agriculture Development Co., Ltd., Ningbo 315800, China

Abstract: Objective To establish an efficient *in vitro* plant regeneration system in the transgenic *Catharanthus roseus* hairy roots and to obtain the high production of anticancer terpenoid indole alkaloids (TIAs) in *C. roseus* regeneration plantlets. **Methods** The effects of plant growth regulators on callus induction, adventitious shoot induction, and adventitious root induction were investigated. HPLC was used to determine the alkaloids in *C. roseus* and quantitative PCR (QPCR) to analyze the expression of target genes. **Results** The results showed that the best medium for callus and shoot induction was MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L and the best medium for root induction was 1/2 MS + NAA 0.3 mg/L. The improved transplant method could increase the survival rate of *C. roseus* plantlets to 90%. TIA profiling by HPLC revealed that the simultaneous introduction and overexpression of *orca3* and *g10h* in transgenic plant significantly enhanced vinblastine, vincristine, and ajmalicine accumulation. The concentrations of vinblastine, vincristine, and ajmalicine were 4.0-, 5.8-, and 1.8-fold respectively more than those in non-transformed plants. QPCR results showed that the expressions of *orca3* and *g10h* genes were greater than these of non-transformed root. **Conclusion** The regeneration plantlets from *C. roseus* transgenic hairy roots could significantly promote the antitumor alkaloid accumulation.

Key words: *Catharanthus roseus* L.; alkaloid; hairy roots; regenerated plants; HPLC

癌症已成为严重威胁人类健康且难以治愈的世界性重大疾病。据世界卫生组织统计, 全世界每年

新增癌症患者约有 1 000 万。其中, 因得不到有效治疗而死亡的人数达 600 万。这在很大程度上是由

收稿日期: 2011-09-06

基金项目: 中国博士后科学基金项目 (20060390733); 宁波市农业创新创业资金项目 (2010C91050); 宁波市农业科技攻关项目 (2010C10051, 2010C10057); 宁波大学学科项目 (XKL121, XKL11D2099)

作者简介: 龚一富 (1973—), 男, 重庆开县人, 宁波大学生物系主任, 副教授, 硕士生导师, 从事药用植物分子生物学、次生代谢调控和代谢工程方面的教学和科研工作, 在该领域发表学术论文 50 余篇, 其中 SCI 收录论文 27 篇。

Tel: (0574)87600878 E-mail: gongyifu@163.com

于特效抗癌药物种类极少,且产量很低,价格昂贵,不能满足广大患者的需求所造成的。

长春花 *Catharanthus roseus* L. 是夹竹桃科一年生草本植物^[1],可产生 100 多种具有很高药用价值的萜类吲哚生物碱 (terpenoid indole alkaloids, TIAs)。其中,长春碱 (vinblastine) 和长春新碱 (vincristine) 是重要的抗肿瘤药用成分。此外,还有抗过敏药用成分利血平 (reserpine) 和降压药用成分阿玛碱 (ajmalicine) 等。因此,长春花被认为是一种具有很高开发应用价值的药用植物^[2]。然而,由于这些药物在长春花中的量微小,所以从天然植物中提取 TIAs 不能满足市场需求,导致长春花药用成分的供需矛盾严重,使其价格昂贵,而用化学合成和半合成因成本高而不具有商业价值。目前,我国市场上的长春生物碱纯品主要依靠进口,生物技术的发展为定向提高长春花中有效药用分量及实现长春生物碱的规模化生产提供了新的有效手段,从而引起国内外的广泛重视。

长春花作为 TIAs 生物合成研究的模式植物,其 TIAs 生物合成途径中多个重要限速酶基因以及转录调控因子已从长春花中成功克隆并进行了功能鉴定,使得用基因工程手段改良长春花以提高 TIAs 量成为可能^[3]。将 TIAs 生物合成途径上的关键酶基因 *g10h* 导入长春花毛状根,使 TIAs 量比对照提高了 3 倍^[4]。将全局性转录调控因子 *orca3*^[5-6] 和 TIAs 生物合成关键酶基因 *g10h* 共转化长春花毛状根,使 TIAs 量比对照提高了 27 倍,这是目前国内获得获得的 TIAs 及长春碱量最高的长春花毛状根^[7]。但是,毛状根在离体培养生产抗癌生物碱的过程中易出现老化现象,且用生物反应器繁育毛状根的生产成本高,因此,不能通过毛状根的大规模培养来生产生物碱。传统的长春生物碱生产是从天然长春花植株的叶片中提取的,因此获得生物碱高产量的长春花植株或种子将为实现生物碱商业化生产提供优良药源。采用组织培养的方法,从生物碱高产的转基因长春花毛状根再生出完整植株,将获得生物碱高产的长春花新品系,从而实现高产生物碱长春花转基因的规模化种植,无疑是使长春花生物技术走向产业化,解决 TIAs 药源匮乏的有效途径。

因此,本研究针对抗癌药用模式植物长春花在医药领域应用上的潜力,以可高产生物碱的转基因长春花毛状根为研究对象,通过研究外源植物生长调节剂对毛状根的愈伤组织诱导、不定芽分化、试

管苗生根和再生植株移栽的影响及条件优化,建立长春花转基因毛状根植株再生体系。通过对转基因植株生物碱量的测定以及优良株系的筛选,为转基因长春花优良品系的快速繁殖和规模化栽培提供理论和技术基础,同时也为利用转基因植物生产生物碱提供一条新的途径。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

长春花种子从荷兰 BD-Vereniging 公司购买。发根农杆菌菌株 C58C1 + pCAMBIA1304⁺ + *orca3* + *g10h* 由复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心保存。采用发根农杆菌菌株遗传转化长春花无菌苗,获得经 PCR 鉴定的长春花转基因毛状根,HPLC 检测结果表明共转 *orca3* 和 *g10h* 基因长春花毛状根生物碱量比非转基因长春花对照提高了 27 倍^[6],转基因长春花毛状根无性系 OG28 和 OG30 由复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心提供。

Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪, Waters 2996 PDA 紫外检测器,德国 Corbett 公司 Rotor Gene 2000 荧光定量 PCR 仪,Hybrid 梯度 PCR 仪。

长春碱、长春新碱和阿吗碱对照品均购自 Sigma 公司,质量分数为 99.9%。甲醇、乙腈为色谱纯,其余试剂为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 愈伤组织的诱导 取长春花毛状根系 OG28 和 OG30,用解剖刀分别切取外植体 1~2 cm,接种于长春花愈伤组织诱导培养基 (MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L, 3%蔗糖, 0.7%琼脂, pH 调至 5.8) 中,光照强度 1 600~12 000 lx, 16 h/d, 温度为 25 °C 条件下培养。20 d 后统计诱导率,并记录愈伤组织的颜色、质地及生长状况。

1.2.2 不定芽的分化 将长春花愈伤组织转接到不定芽分化培养基 (MS + 6-BA 2.0 mg/L + NAA 0.3 mg/L、3%蔗糖、0.7%琼脂、pH 调至 5.8)。光照强度 1 600~12 000 lx, 16 h/d, 温度为 25 °C 条件下培养。观察长春花愈伤组织上不定芽的分化情况。

1.2.3 不定根的诱导 切取 2~3 cm 的不定芽,接种到生根培养基 (1/2 MS + NAA 0.3 mg/L、2%蔗糖, 0.7%琼脂, pH 5.8) 上。光照强度 1 600~12 000 lx, 16 h/d, 温度为 25 °C 条件下培养,观察不定芽的生根情况。

1.2.4 炼苗移栽 由于传统的炼苗方法存在移栽成活率低、根部易腐烂等问题,本研究对炼苗方法进

行了改进。炼苗前, 将培养瓶瓶盖稍稍打开, 在光照培养箱中培养炼苗; 3~4 d 后, 将培养瓶瓶盖彻底打开, 并加入适量蒸馏水, 以恰能浸没根部为宜, 放在光照培养箱中培养; 在光照培养箱中放置 10 d, 用镊子将植株从培养瓶中取出, 用流水将根系上的培养基冲洗干净, 放入盛有蒸馏水的试管中, 置光照培养箱中继续炼苗。蒸馏水以浸没根为宜, 注意隔天换水, 一经发现根部长霉应及时用蒸馏水冲洗, 观察根部变化并做好记录, 统计成活率。

将炼苗成活的植株移栽到由泥土和珍珠岩混合的花盆中。将种有植株的花盆继续放于光照培养箱中培养, 并注意给植株适量浇水; 大约在光照培养箱中培养 1 周后, 给移栽的长春花适度的自然光

照, 第 1 天光照 1 h, 以后每天自然光照的时间适当延长; 约 10 d 后, 将移栽的长春花移出培养箱而放于自然环境下生长, 观察植株生长情况并统计成活率。

1.2.5 长春花再生植株的 PCR 检测 以 SDS 法小量提取长春花再生植株叶片基因组 DNA。根据 Furner 等^[8]所述的 *rolB*、*rolC* 基因的 DNA 序列, 分别设计并合成扩增诱发并维持毛状根形态的 *rolB* 和 *rolC* 基因的引物 *frolb*、*rrolb* 和 *frolc*、*rrolc*。根据目的基因和载体序列设计引物同时对 T-DNA 区的目的基因进行检测。用于转基因长春花毛状根的检测所使用的引物及其序列见表 1。

表 1 长春花再生植株 PCR 引物

Table 1 Primers for PCR analysis on *C. roseus* regenerated plants

目的基因	引物名称	引物序列 5'→3'	退火温度 / °C	扩增片段长度 / bp
<i>rolB</i>	<i>frolb</i>	5-GCTCTTGCAGTGCTAGATT-3	55	423
	<i>rrolb</i>	5-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3		
<i>rolC</i>	<i>frolc</i>	5-CTCCTGACATCAAACCTCGTC-3	55	622
	<i>rrolc</i>	5-TGCTTCGAGTTATGGGTACA-3		
<i>orca3</i>	<i>forca3</i>	5-ATGTCGGAAGAAATCATTTCCG TCTC-3	58	612
	<i>rorca3</i>	5-TT AATATCGTCT CTCTTCCTTCCTCC-3		
<i>g10h</i>	<i>fg10h</i>	5-ATGGATTACCTTACCATAATATTAAC-3	55	1 498
	<i>rg10h</i>	5-TTAAAGGGTGCTTGGTACAG-3		

以长春花毛状根再生植株和未转化对照植株 DNA 为模板进行 *rolB*、*rolC* 基因和目的基因的 PCR 扩增检测, 以携带目的基因的相应工程菌株为阳性对照, 未转基因长春花对照根 DNA 为阴性对照。PCR 扩增反应采用 25 μL 反应体系: 2.5 μL 10×Ex-PCR 缓冲液, 0.5 μL dNTPs, 0.5 μL 上游引物, 0.5 μL 下游引物, 1 μL DNA, 0.5 μL Ex-Taqase, 19.5 μL dd H₂O。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min, 34 个扩增循环 (94 °C 变性 50 s, 55 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 100 s), 72 °C 继续延伸 8 min。反应完成后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.6 再生植株叶片生物碱的测定 用 HPLC 法对转基因长春花再生植株叶片进行长春碱、长春新碱和阿吗碱的测定^[7]。收集再生转基因长春花叶片, 用蒸馏水洗净叶片, 用滤纸吸干表面水分, 称取鲜质量, 60 °C, 48 h 烘干至恒质量, 称其干质量。将叶片放入研钵中, 加入少量石英砂, 研磨, 加入 95% 乙醇适量 (1:5), 50 °C 超声波提取 30 min, 冷却至室温, 对提取液 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取

上清, 12 000 r/min 再离心 10 min, 吸取上清, 备用。

精密称取长春碱、长春新碱和阿吗碱对照品 (Sigma 公司, 质量分数 99.9%) 10.0、5.0、10.0 mg, 用 1 mL 甲醇完全溶解, 分别得到 10 mg/mL 长春碱、5 mg/mL 长春新碱和 10 mg/mL 阿吗碱对照品溶液, 作为对照品贮备液, -20 °C 保存备用。

色谱条件: C₁₈ 反相硅胶柱 (Symmetry ShieldTM C₁₈, 250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-磷酸水溶液 (25:75), 检测波长 220 nm, 柱温 30 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 进样量 10 μL, 理论塔板数按长春碱、长春新碱和阿吗碱峰计算不低于 2 000。

分别精密吸取对照品溶液和供试样品溶液各 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录各组峰面积, 以各组峰面积为纵坐标 (Y), 长春碱、长春新碱和阿吗碱的量为横坐标 (X), 得到回归方程分别 $Y_1 = 586\ 912.3 X_1 - 1\ 287.4$, $r_1 = 0.999\ 93$; $Y_2 = 308\ 665.5 X_2 - 1526.5$, $r_2 = 0.999\ 94$; $Y_3 = 136\ 029.4 X_3 - 1\ 553.2$, $r_3 = 0.999\ 96$, 计算即得样品 TIAs 量。

1.2.7 再生植株基因表达分析 选取转基因长春花再生植株不同株系和非转基因植株叶片, 采用 Trizol 法提取 RNA 并反转录成 cDNA。采用实时荧光定量 PCR 方法分析转基因植株和非转基因植株 *g10h* 和 *orca3* 基因表达变化。根据长春花 *g10h* 和 *orca3* 基因序列分别设计特异性引物 *fcrg10h*、*rcrg10h*、*fcrorca3* 和 *rcrorca3* (表 2)。看家基因选

用 18S rRNA 基因。荧光定量 PCR 反应条件为: 热启动和变性 94 °C、15 min, 50 个循环 (94 °C 变性 15 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s 并检测荧光, 80 °C、20 s 并检测荧光)。对 PCR 产物进行溶解曲线分析, 样品中目的基因表达量以 18S rRNA 基因表达量进行校正, 并计算样品对非转化植株的相对表达量。

表 2 长春花植株荧光定量 PCR 检测所用的引物

Table 2 Primers for RT-QPCR analysis on *C. roseus* plantlets

目的基因	引物	引物序列 5'→3'	退火温度 / °C	扩增片段长度 / bp
18S rRNA	f18s	5-GTGACAATGGAAGTGGAAATGG-3	55	108
	r18s	5-AGACGGAGGATAGCGTGAGG-3		
<i>orca3</i>	forca3	5-ATGTCCGAAGAA ATCATTTCCTCCG TCTC-3	58	612
	rorca3	5-TT AATATCGTCT CTTCTTCCTTCCTCC-3		
<i>g10h</i>	fg10h	5-ATGGATTACCTTACCATAATATTAAC-3	55	207
	rg10h	5-TTAAAGGGTGCTTGGTACAG-3		

2 结果与分析

2.1 愈伤组织的诱导

将 OG28 和 OG30 的毛状根接种于诱导长春花愈伤组织的培养基 MS+6-BA 2.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L 中, 7 d 左右, 外植体均在伤口边缘出现白色小颗粒状突起 (图 1-A)。30 d 后从毛状根诱导出淡黄色、表面鲜亮、质地居中、不均匀的疏松愈伤组织块 (图 1-B), 长春花毛状根愈伤组织诱导率可达 96.7%。

2.2 不定芽的分化

将长春花愈伤组织转接到生芽培养基中, 培养约 30 d 后, 愈伤组织表面出现多个浅绿色小体 (图 1-C), 其诱导率为 78.6%。继续培养 20 d 后, 浅绿

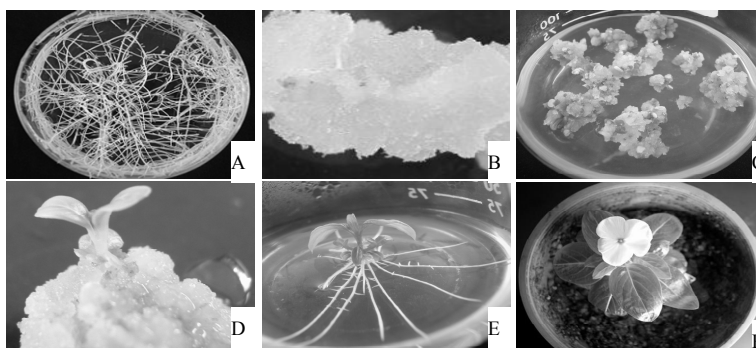
色小体渐渐长大出现绿色芽点, 最终形成不定芽的分化。再经过 20 d 的培养, 浅绿色芽点可生长分化成约 2 cm 左右的不定芽 (图 1-D)。

2.3 不定根的诱导

切下诱导的不定芽, 转接到生根诱导培养基 (1/2 MS+NAA 0.3 mg/L) 中, 培养 15 d, 不定芽基部开始分化出根毛及其分支 (图 1-E), 根多而粗壮, 多分支, 具有典型毛状根的特性。长春花不定根的诱导率可达 100%。

2.4 炼苗和移栽

用镊子将再生植株从培养瓶中取出, 用流水将根系上的培养基冲洗干净, 再放入盛有蒸馏水的试



A-长春花转基因毛状根 B-转基因长春花毛状根愈伤组织的诱导 C-从长春花毛状根愈伤组织块上长出的浅绿色生长点 D-芽点分化成约 2 cm 高的芽体 E-转基因长春花毛状根不定芽的生根及完整植株再生 F-转基因长春花再生植株的移栽
A-transgenic hairy roots of *C. roseus* B-induction of callus from transgenic hairy roots of *C. roseus* C-green apical points induced from callus of transgenic hairy roots D-2 cm buds differentiated from bud points E-plant regeneration and adventitious roots induced from transgenic hairy roots of *C. roseus* F-transplantation of rengeration plantlets of transgenic *C. roseus*

图 1 长春花毛状根植株再生及其移栽

Fig. 1 Plant regeneration from transgenic hairy roots of *C. roseus* and plantlets transplantation

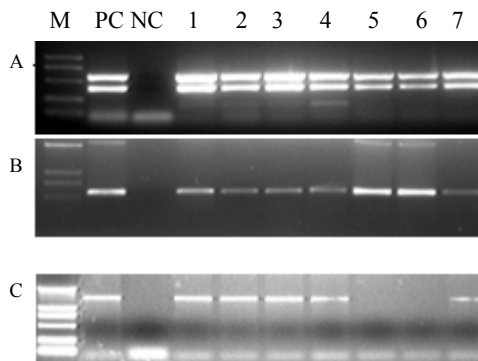
管中，置于光照培养箱中继续培养。再生植株放于蒸馏水中炼苗，可防止培养基中的营养物质导致细菌或真菌繁殖生长而使试管苗污染死亡的发生，而对长春花的生长无大的影响，因此，改进的炼苗方法可大大提高再生植株的移栽成活率(83.33%)(图 1-F)。分析移栽过程中长春花再生植株的死因，原因主要有两个。其一，如果是已经被感染的根系，当植株被直接移栽到花盆中后，虽然经过清洗，但它的根系上或多或少还带有细菌或真菌，当生长着的细菌或真菌遇到土壤时，便有了一定的营养以及环境让其生长繁殖，最终导致植株的根系出现问题，不能充分吸收营养，而使植株死亡。其二，即使是完全健康的根系，但由于清洗不能彻底除去吸附在根系上的培养基，而所移栽的土壤并未经过消毒，里面肯定含有大量的细菌和真菌，一旦细菌和真菌接触到了植物根系上的培养基，培养基中的营养物质就导致了细菌和真菌的大量繁殖与生长。

2.5 长春花再生植株的 PCR 检测

再生的长春花完整植株由于是从转基因长春花毛状根分化而来的，因此，长春花再生植株应该具有毛状根所特有的基因和目的基因。由于 Ri 质粒的 T-DNA 上带有 *rolB*、*rolC* 基因，且再生的完整植株不定根具有毛状根的特征，因此本实验检测了长春花毛状根再生植株中 *rolB* 和 *rolC* 基因的整合情况。以 SDS 法小量提取的长春花再生植株叶片基因组 DNA 为模板，利用 *rolB* 和 *rolC* 基因的 PCR 特异引物，能分别扩增出 423 bp 和 622 bp 的特异 DNA 片段。而以非转化长春花普通根总 DNA 为模板时，没有扩增出任何片段(图 2)。用目的基因 *orca3* 和 *g10h* 基因的 PCR 引物扩增长春花毛状根再生植株 DNA，能分别扩增出与预期结果一致的 612 bp 和 1 498 bp 的特异目的片段。这表明转基因长春花毛状根再生植株基因组中整合有毛状根形成的 *rolB*、*rolC* 基因、T-DNA 区的 *orca3* 和 *g10h* 基因。

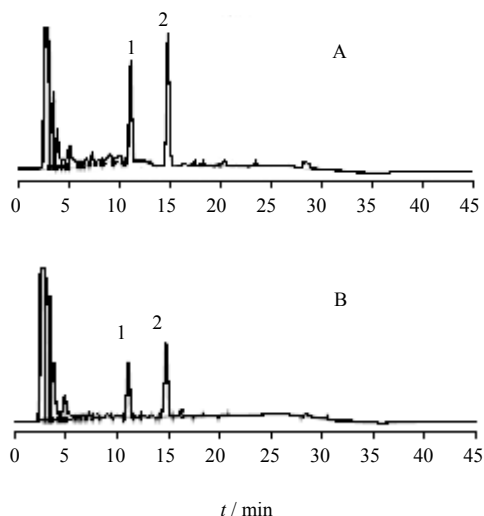
2.6 再生植株叶片中生物碱的测定

从再生的长春花毛状根再生植株中随机挑选长势良好的长春花株系，剪取叶片经干燥后称质量，用乙醇提取并用 HPLC 法测定其生物碱量，用各转基因样品生物碱量与非转基因对照样品生物碱量的比值表示生物碱相对量(图 3, 4)。结果表明，转基因再生植株中长春新碱、长春碱、阿吗碱和总生物碱平均量分别为 1.09、4.11、0.007、5.21 mg/g，分别是非转基因长春花植株叶片生物碱量的 4.0、



M-Marker PC-相应工程菌阳性对照 NC-非转基因长春花 1~7 分别代表不同的转基因再生植株株系
M-Marker PC-positive control, the correspondant engineered bacteria were used as templates NC-negative control, native *C. roseus* which was not genetically transformed 1~7 represent independent transgenic *C. roseus* regeneration plantlet lines

图 2 长春花转基因毛状根再生植株中 *rolB*、*rolC* (A)、*orca3* (B)、*g10h* (C) 基因的 PCR 检测
Fig. 2 PCR detection of *rolB*, *rolC* (A), *orca3* (B), and *g10h* (C) genes in regeneration plantlets from transgenic hairy roots of *C. roseus*



1、2 分别代表长春新碱和长春碱
1 and 2 represent the vincristine and vinblastine samples

图 3 混合对照品 (A) 和长春花样品 (B) HPLC 色谱图
Fig. 3 HPLC chromatograms of mixed reference substances (A) and *C. roseus* sample (B)

5.8、1.8、5.3 倍(非转基因长春花植株叶片生物碱量分别为 0.274、0.710、0.004、0.988 mg/g)。其中，转基因长春花株系 OG30-3 总长春新碱、长春碱量最高，分别为 2.054、7.797 mg/g，分别比对照(0.274、0.710 mg/g)提高 7 倍和 10 倍。

本研究表明，共转化转录调控因子 *orca3* 和关

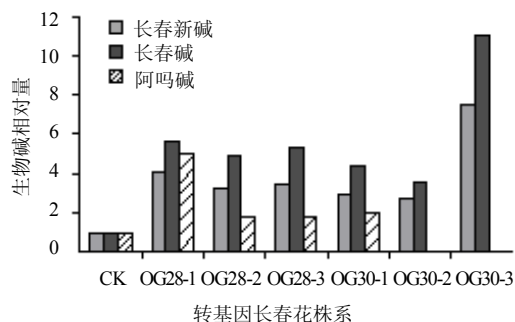


图 4 转基因长春花毛状根再生植株生物碱测定

Fig. 4 Determination of alkaloids in regeneration plantlets from transgenic hairy roots of *C. roseus*

键酶基因 *g10h* 可使转基因长春花再生植株抗癌生物碱量显著提高, 可能是因为 *orca3* 的全局调控和 *g10h* 基因打破类萜途径合成瓶颈的双重作用的结果, 使代谢流不断地向生物碱合成方向流动, 从而显著促进了生物碱的积累。

2.7 再生植株目的基因表达

采用荧光定量 PCR 技术对长春花转化植株和非转化植株目的基因表达进行检测, 结果表明 (图 5), 转基因株系 OG28 和 OG30 再生植株中 *orca3* 和 *g10h* 基因表达量显著高于非转基因植株。说明关键酶基因超量表达将促进长春花生物碱的合成和积累。

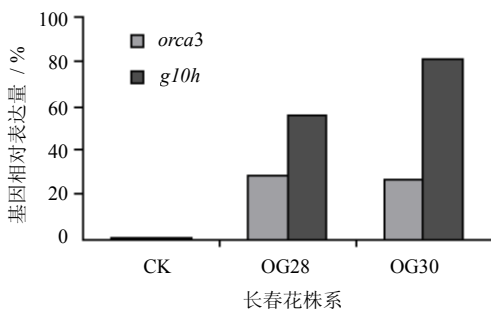


图 5 长春花转基因植株和非转基因植株基因表达情况

Fig. 5 Expression of target genes in transgenic and non-transgenic *C. roseus* plantlets

3 讨论

用野生型的发根农杆菌转化植物获得毛状根可以提高次生代谢产物的量, 迄今为止, 用发根农杆菌诱导形成的植株毛状根至少涉及到 31 科 100 余种双子叶植物。长春花中因含有重要的抗癌生物碱已引起人们极大的兴趣, 目前, 用野生型发根农杆菌感染长春花已获得了生物碱量提高的长春花毛状根, 但生物碱量提高的幅度不大, 不具有工厂化生产价值^[9]。通过基因工程手段将关键酶基因或转录

调控因子转入长春花毛状根中将提高长春花毛状根生物碱的量^[4,7,10]。本研究所使用的植物材料正是共转化转录调控因子 *orca3* 和关键酶基因 *g10h* 的生物碱高产的长春花毛状根无性系。虽然长春花毛状根容易获得, 但毛状根在培养过程中容易出现退化现象, 生长速度变慢, 甚至有些毛状根出现愈伤化, 因此, 不能采用生物反应器大规模培养长春花毛状根。对生物碱高产的长春花毛状根进行组织培养研究以获得长春花完整植株具有重要的意义。长春花外植体容易诱导愈伤组织的产生, 但离体培养分化出不定芽十分困难, 目前还未见长春花通过组织培养获得不定芽或再生完整植株的报道。本研究首次报道了由转基因毛状根再生完整植株, 再生植株具有矮化、不定根数目多等特点, 与菘蓝、曼陀罗、新疆雪莲等植物中得到的结果相似^[11-13]。

通过测定长春花移栽植株中生物碱量, 结果表明, 转基因长春花叶片的长春新碱量比普通非转化长春花提高了 3 倍, 长春碱的量提高了 4 倍之多。目前长春花转基因毛状根再生完整植株的研究尚未见到报道, 而本实验不仅避免了毛状根在离体培养生产抗癌生物碱的过程中易出现老化现象和用生物反应器繁育毛状根的生产成本高的缺点, 并使生物碱的量在再生体系的植株的叶片中得到了极大幅度的提高。本实验研究表明, 长春花转基因毛状根再生的完整植株可以用于大规模生产和提取长春花生物碱并降低其生产成本。

参考文献

- [1] 向蓓蓓, 朱晔荣, 王文娟, 等. 盐胁迫对长春花愈伤组织生长及阿吗碱积累的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 167-170.
- [2] 高贤, 单淇, 辛宁, 等. 长春花化学成分和药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(4): 274-277.
- [3] El-Sayed M, Verpoorte R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation [J]. *Phytochem Rev*, 2007, 6: 277-305.
- [4] Gong Y F, Liao Z H, Pi Y, et al. Engineering terpenoid indole alkaloids biosynthetic pathway in *Catharanthus roseus* hairy root cultures by overexpressing the geraniol 10-hydroxylase gene [J]. *J Shanghai Jiaotong Univ*, 2005, E-10(S1): 8-13.
- [5] van der Fits L, Memelink J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism [J]. *Science*, 2000, 289: 295-297.
- [6] Memelink J, Gantet P. Transcription factors involved in

- terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *Phytochem Rev*, 2007, 6: 353-362.
- [7] 龚一富. 长春花萜类吲哚生物碱代谢工程 [D]. 上海: 上海交通大学, 2005.
- [8] Furner I J, Huffman G A, Amasino R M, *et al.* An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana* [J]. *Nature*, 1986, 319: 422-427.
- [9] 周立刚, 王君健, 杨崇仁. 植物毛状根的培养及其化学进展 [J]. 1997, 10(3): 87-95.
- [10] Peebles C A M, Sander G W, Hughes E H, *et al.* The expression of 1-deoxy-D-xylulosesynthase and geraniol-10-hydroxylase or anthranilate synthase increase sterpenoid indole alkaloid accumulation in *Catharanthus roseus* hairy roots [J]. *Metab Eng*, 2011, 13: 234-240.
- [11] 汪洪, 王晓慧, 王艳红, 等. 四倍体菘蓝毛状根的诱导及其植株再生 [J]. 作物杂志, 2008, 5: 31-35.
- [12] 张继栋, 杨雪清, 乔爱民, 等. 木本曼陀罗毛状根植株再生体系的建立 [J]. 热带亚热带植物学报, 2008, 16(5): 480-485.
- [13] 付春祥, 金治平, 杨睿, 等. 新疆雪莲毛状根的诱导及其植株再生体系的建立 [J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 366-371.

欢迎订阅《中草药》杂志1996—2009年增刊

为了扩大学术交流, 提高新药研究水平, 经国家新闻出版主管部门批准, 我部从1996年起, 每年出版增刊一册。

- 1996年增刊:** 特邀了国内知名专家就中药新药研究的方向、法规及如何与国际接轨等热点问题撰文阐述。
- 1997年增刊:** 包括紫杉醇的化学成分、提取工艺及组织培养等方面的科研论文, 并特邀国内从事紫杉醇研究的知名专家撰写综述文章, 充分反映了紫杉醇研究方面的新成果、新进展和新动态。
- 1998年增刊:** 以当今国际研究的热点银杏叶为专论重点, 包括银杏叶的化学成分、提取工艺、质量控制、药理作用及临床应用等方面, 充分反映了国内银杏叶开发研究方面的新成果、新进展和新动态。
- 1999年增刊:** 为“庆祝《中草药》杂志创刊30周年”会议论文集, 特邀中国工程院院士、国家药品监督管理局药品评审中心及知名专家就中药新药研究热点问题撰写了综述文章。
- 2000年增刊:** 以“中药新理论、新剂型、新工艺和新技术”为主要内容。
- 2001年增刊:** 特邀了中国工程院院士、专家就加快中药现代化的进程, 我国入世后中药产业的发展新对策及西部药用植物资源的保护、开发和利用等撰写综述文章。
- 2002年增刊:** 以“中药现代化”和“中药指纹图谱”为主要内容。
- 2003—2008年增刊:** 包括中药创新药物开发的思路和方法、中药现代化研究、中药知识产权保护、中药专利的申请及中药走向国际等热点内容。
- 2009年增刊:** 为庆祝“《中草药》杂志创刊40周年”和“《中草药》英文版(*Chinese Herbal Medicines*, CHM)创刊”, 以中药创新药物开发的思路和方法、活性天然产物的发现及其作用机制研究、中药代谢组学研究、生药学研究、中药的安全性评价和不良反应监控、中药新药审评法规的最新进展、中药知识产权保护和专利的申请、民族药研究为主要内容; 学术水平高, 内容丰富, 信息量大。

以上各卷增刊选题广泛、内容新颖、学术水平高、科学性强, 欢迎广大读者订阅。以上增刊为我部自办发行, 邮局订阅《中草药》不含增刊, 但能提供订阅凭证者, 购买增刊7折优惠, 款到寄刊。

地址: 天津市南开区鞍山西道308号

邮编: 300193

网址: www.tiprpress.com; www.中草药杂志社.中国

电话: (022)27474913 23006821

传真: (022)23006821

E-mail: zcy@tiprpress.com

《中草药》杂志编辑部