

• 药材与资源 •

共转 *orca3/g10h* 双基因长春花毛状根生物碱量及转录差异研究

陈艺璇, 朱帅旗, 龚一富*, 刘 林, 王小飞, 王何瑜

宁波大学海洋学院, 浙江 宁波 315211

摘 要: 目的 共转 *orca3/g10h* 双基因于长春花毛状根, 提高抗癌生物碱量。方法 通过构建 *pCambia1304⁺ + orca3 + g10h* 表达载体, 利用发根农杆菌介导获得双转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根。利用 RT-qPCR 研究共转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根萜类吲哚生物碱 (TIAs) 生物合成途径中相关基因的转录差异。采用 HPLC 研究共转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根 TIAs (包括长春碱、长春新碱和阿吗碱) 量。结果 转基因长春花毛状根中与 TIAs 生物合成相关基因 *asa*、*ggpps*、*g10h*、*str*、*tdc*、*cpr*、*sgd* 和 *dat* 转录水平均较非转基因长春花普通根高。HPLC 结果表明, 转基因长春花毛状根总 TIAs 量达到 58.23 mg/g, 是非转基因长春花普通根的 27.5 倍。长春碱和长春新碱的平均质量分数均较非转基因普通根高。其中, 长春碱平均质量分数最高, 为 51.30 mg/g, 是非转基因普通根的 197.3 倍。结论 共转 *orca3/g10h* 基因能够有效提高长春花毛状根中 TIAs 量。

关键词: 长春花; 毛状根; 生物碱; 转录差异; HPLC; 长春碱; 长春新碱; 阿吗碱

中图分类号: R282.12

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2016)18-3272-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.18.022

Study on content of terpenoid indole alkaloids and transcriptional differences for covalent *orca3/g10h* in double-gene transgenic hairy roots of *Catharanthus roseus*

CHEN Yi-xuan, ZHU Shuai-qi, GONG Yi-fu, LIU Lin, WANG Xiao-fei, WANG He-yu

School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China

Abstract: Objective In order to improve the content of terpenoid indole alkaloids (TIAs), *orca3/g10h* genes were introduced to the hairy roots in *Catharanthus roseus*. **Methods** Bivalent expression vector *Cambia1304⁺ + orca3 + g10h* was constructed and introduced into *Agrobacterium rhizogenes* strain and transformed into *C. roseus* to obtain transgenic hairy roots. RT-qPCR was used to study the transcriptional differences of relative genes referred to the biosynthesis pathway of TIAs. Then HPLC was used to study TIAs content in the transgenic hairy roots of *C. roseus*, including vinblastine, vincristine, and ajmalicine. **Results** The transcriptional level of genes that linked to biosynthesis of TIAs in the transgenic hairy roots of *C. roseus*, *asa*, *ggpps*, *g10h*, *str*, *tdc*, *cpr*, *sgd*, and *dat*, were all expressed higher than those of the nontransgenic roots. HPLC results showed that modified hairy root of *C. roseus* owned more total TIAs production, 58.23 mg/g, the number was larger than that of common roots in *C. roseus* as many as 27.5 times. On the other hand, the average content of vinblastine and vincristine was also more than the common roots in *C. roseus*. Among them, vinblastine content was the most. The number of production got 51.30 mg/g, which was as many as 197.3 times of the common root of *C. roseus*. **Conclusion** *Orca3/g10h* double-gene transgenic hairy root of *C. roseus* can increase TIAs content efficiently.

Key words: *Catharanthus roseus* L.; hairy roots; alkaloids; transcriptional differences; HPLC; vinblastine; vincristine; ajmalicine

长春花 *Catharanthus roseus* L. 属于夹竹桃科 (Apocynaceae) 草本植物, 含有丰富的抗癌萜类吲哚生物碱 (terpenoid indole alkaloids, TIAs) [1-2]。长春碱、长春新碱和阿吗碱均属于长春花中的 TIAs。研究表明, 长春碱对绒毛上皮细胞癌的治疗效果明显, 长春新碱对恶性淋巴瘤有作用, 阿吗

碱可作为高效的降压药 [3-4]。1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (DXP) 途径和莽草酸途径是长春花 TIAs 生物合成的上游途径。异胡豆萜 (strictosidine) 是合成长春碱、长春新碱及其他生物碱的共同前体, 而阿吗碱也是由异胡豆萜转变过来, 只是其合成部位在液泡 [5-6]。在长春花生物碱合成途径中异胡豆萜的合

收稿日期: 2016-02-23

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LY13C020004)

作者简介: 陈艺璇, 女, 主要从事植物次生代谢及分子机制研究。E-mail: 845753751@qq.com

*通信作者 龚一富, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要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。

Tel: (0574)87600889 E-mail: gongyifu@163.com

成由多步反应所形成。丙酮酸 (pyruvic acid) 和 3-磷酸甘油醛 (glyceraldehyde 3-phosphate, G3P) 通过 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸合成酶 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, DXS) 催化生成 1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸 (1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate, DXP)^[7]。法尼基焦磷酸 (farnesyl diphosphate, FPP) 和异戊烯基焦磷酸 (isopentenyl pyrophosphate, IPP) 在香叶基香叶基焦磷酸合成酶 (geranylgeranyl diphosphate synthase, GGPPS) 作用下缩合成香叶基香叶基焦磷酸 (geranylgeranyl diphosphate, GGPP)。细胞色素 P450 和依赖 NADPH 的细胞色素 P450 还原酶 (cytochrome P450-reductase, CPR) 组成的香叶醇 10-脱氢酶 (geraniol 10-hydroxylase, G10H) 能将香叶基焦磷酸羟基化形成 10-羟基香叶醇 (10-hydroxy-geraniol)^[8]。在莽草酸途径中, chorismate 通过邻氨基苯甲酸合成酶 (anthranilate synthase alpha subunit, AS α) 催化形成邻氨基苯甲酸^[9]。莽草酸途径中的色氨酸通过色氨酸脱羧酶 (tryptophan decarboxylase, TDC) 脱羧产生色胺 (tryptamine)。色胺和裂环马钱子苷 (secologanin) 通过异胡豆萆合成酶 (strictosidine synthase, STR) 作用形成异胡豆萆 (strictosidine)。去乙酰文多灵 (desacetoxyvindoline) 转变成脱乙酰文多灵 (deacetylvindoline) 是通过去乙酰文多灵-4-脱羧酶 (desacetoxyvindoline-4-hydroxylase, D4H) 的作用完成。而脱乙酰文多灵则是经脱乙酰文多灵-4-O-乙酰转移酶 (4-O-deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase, DAT) 催化形成文多灵。

长春花次生代谢产物 TIAs 在治疗癌症、过敏和抗高血压中有应用。但是天然药物的合成受植物生长和产量的控制, 无法满足人们的需求^[10]。其次, TIAs 化学结构复杂, 化学合成有较大困难且成本太高^[11]。目前, 利用体外刺激和生长调节因子提高长春花生物碱次生代谢产物的研究较多^[12-13]。如土壤条件、光照、外源钾、 β -环糊精和甲基茉莉酸等对长春花生物碱产量的影响^[14-17]。代谢工程和代谢调控技术能够为长春花 TIAs 量积累提供新的途径。近年来, 长春花生物碱合成途径中关键限速酶基因的不断发现也为代谢工程在长春花中的研究提供了保障^[18]。TIAs 的生物合成与裂环马钱子苷的合成有一定关系, g10h 基因的过量表达可以提高裂环马钱子苷量^[19]。长春花细胞中合成 TIAs 的能力也与 G10H 活性有关^[20]。因此, G10H 在 TIAs 的合成中

起到关键调控的作用。Gong 等^[21]成功将 g10h 基因导入长春花毛状根, 与非转基因长春花普通根相比, 转 g10h 基因长春花毛状根的 TIAs 量显著增加, 说明该基因是长春花生物碱合成关键基因之一。但研究表明 G10H 活性受到 TIAs 生物合成中代谢产物和终产物的抑制。诱导基因表达的转录调控因子能够降低抑制作用, 从而提高长春花中生物碱量。转录因子脂肪酸衍生物反映长春花 AP2 结构域蛋白 (ORCA3) 在吲哚前体的合成中有重要作用, 在 TIA 生物合成途径中, ORCA3 与多种酶合成基因的调节有关^[22]。研究发现单转 orca3 基因能够提高长春花中 dxs、asa、tdc、str 和 d4h 基因的表达, 但对 g10h、sgd 和 dat 没有影响, 并且没有提高生物碱量^[23]。本实验首次将 orca3 和 g10h 基因共转长春花毛状根, 通过 RT-qPCR 研究 TIAs 生物合成中相关基因转录差异, 利用 HPLC 研究共转 orca3/g10h 基因后长春花毛状根 TIAs 量的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

长春花种子购自 BD-Vereniging 公司 (荷兰)。pCambia1304 载体由 Cambia 公司提供, 长春花毛状根无性系则由复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心馈赠。对照品长春碱、长春新碱和阿吗碱均购自 Sigma 公司 (质量分数为 99.9%)。胶回收 (小量) 试剂盒, pGEM-T easy vector (Promega 公司, 美国), 限制性内切酶 (Biolab 公司), T₄ DNA 连接酶 (Takara 公司, 中国), 质粒提取 (小量) 试剂盒, Ex-Taq DNA 聚合酶 (Takara 公司, 中国)。

1.2 方法

1.2.1 植物表达载体 pCambia1304⁺-orca3-g10h 表达载体的构建 以长春花 cDNA 为模板, 利用带 BglII 和 BstEII 酶切位点的引物 fg10h: 5'-GGAGATCTATGGATTACCTTACCATAATATTA-AC-3', rg10h: 5'-TCGGTGACCTTAAA GGGTGCT TGGTACAG-3' 克隆 g10h 基因。带 XbaI 和 SacI 酶切位点的引物 forca3: 5'-GCTCTAGAATGTCCGA-AGAAATCATTTCCGTCTC-3', rorca3: 5'-GGGAG-CTCTTAATATCGTCTCTTCTTCCTTCCTCC-3' 扩增 orca3 基因序列 (划线部分为酶切位点)。将 2 基因扩增片段分别与 pGEM T-easy 载体连接, 获得 pGEM T-g10h 和 pGEM T-orca3 克隆载体。以 EcoRI 和 HindIII 分别对 pCambia1304 和 pBI121 进行双酶切。并对 pCambia1304 酶切后大片段和 pBI121 酶切后小片

段进行连接, 构建新的表达载体 pCAMBIA1304⁺。利用 *Xba*I/*Sac*I 对重组载体 pCAMBIA1304⁺ 和 pGEMT-orca3 进行双酶切并利用 T₄ DNA 连接酶连接, 以达到 orca3 基因替换 pCAMBIA1304⁺ 中 gus 基因的目的。以 pCAMBIA1304⁺-orca3 为基础, 利用 BglII/*Bst*EII 对表达载体 pCAMBIA1304⁺-orca3 和 pGEMT-g10h 载体进行双酶切, 连接形成 pCAMBIA1304⁺-orca3-g10h 重组载体 (g10h 基因替换 pCAMBIA1304⁺ 载体上的 gfp+gus 融合基因)。

1.2.2 发根农杆菌 C58C1 介导 pCAMBIA1304⁺+orca3+g10h 转化长春花及阳性克隆检测 利用冻融法转化发根农杆菌 C58C1 感受态细胞, 将活化菌液涂布于含抗生素的 YEB 固体培养基上 (50 mg/L Kan 和 40 mg/L Rif), 28 °C 培养 1~2 d 至菌落大小适中, 挑菌落于相同抗性液体培养基中, 28 °C 恒温培养至一定质量浓度, 对转化的 C58C1 进行目的基因和 pRiA4 质粒中的 rolB 和 rolC 基因、潮霉素抗性基因 hpt 基因 PCR 检测, 验证 pCAMBIA1304⁺+orca3+g10h 重组载体是否导入发根农杆菌 (rolB、rolC、hpt、g10h、orca3 基因 PCR 验证引物见表 1)。挑选含重组载体阳性克隆的 C58C1 发根农杆菌于

同抗生素 LB 培养基, 28 °C, 200 r/min 过夜培养。离心 10 min, 弃上清, 用含乙酰丁香酮终浓度为 100 μmol/L 的 1/2 MS 液体培养基重悬, 稀释至原体积的 5~20 倍, 相同培养条件培养至 A₆₀₀ 值为 0.5 左右。将长春花无菌苗叶片和外植体剪成适当大小于预培养基中 25 °C 暗培养 2 d。将导入重组载体的 C58C1 发根农杆菌菌液与长春花叶片及茎段外植体充分接触, 灭菌吸水纸吸干表面菌体, 在共培养基 (1/2 MS+AS 100 μmol/L) 上黑暗培养 2 d。随后, 将其转移至脱菌培养基 (1/2 MS+250 mg/L Cef) 中 25 °C 光照培养 (16 h/8 h) 至外植体边缘长出毛状根。剪毛状根于上述培养基中暗培养 2 周。取毛状根于 1/2 MS+250 mg/L Cef 培养基中进行脱菌处理 (5 次继代培养)。最后将毛状根转入 1/2 MS 培养基中暗培养 20 d 作为后续分子鉴定、基因表达和定量测定的实验材料。分别提取毛状根 DNA, 检测各组 DNA 中 rolB、rolC、hpt 基因及目的基因 orca3、g10h, 以此确定是否导入成功。本实验以 1/2 MS 培养基浸泡的未转基因叶片和茎段外植体为阴性对照, 以 C58C1+pCAMBIA1304⁺+orca3+g10h 工程菌为阳性对照。

表 1 长春花毛状根 PCR 检测引物

Table 1 Primers for PCR analysis on hairy roots of *C. roseus*

目的基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/°C
rolB	frolb	GCTCTTGCACTGCTAGATT	55
	rrolb	GAAGGTGCAAGCTACCTCTC	
rolC	frolc	CTCCTGACATCAAACCTCGTC	55
	rrolc	TGCTTCGAGTTATGGGTACA	
hpt	fhpt	CGATTTGTGTACGCCCCGACAGTC	55
	rhpt	CGATGTAGGAGGGCGTGGATATG	
orca3	forca3	ATGTCCGAAGAAATCATTTCCG TCTC	58
	rorca3	TTAATATCGTCTCTTCTTCCTTCCTCC	
g10h	fg10h	GAGCTGATTCCGTTTCGGTGCTG	55
	rg10h	AAGGGTGCTTGGTACAGCACGC	

1.2.3 转基因长春花毛状根 TIAs 生物合成相关基因转录差异 利用 Trizol 法分别提取各组毛状根总 RNA, 利用反转录试剂盒 (Takara 公司, 中国) 将 RNA 反转录成 cDNA。以非转基因毛状根 cDNA 为模板, 扩增 orca3、10 个 TIAs 生物合成相关基因及 18S rRNA 基因 (作为内参基因) (表 2), 目的条带回收后测定浓度, 并进行梯度稀释。对每组标准稀释液进行 RT-qPCR 检测, 得到各组 C_t 值, 分别将 12 组浓度和 C_t 值建立标准曲线。SYBR Premix Ex TaqTM II (Takara 公司, 中国) 为荧光染料。PCR

反应体系: 2×SYBR Green Master Mix 10 μL, F-primer 0.2 μL, R-primer 0.2 μL, ddH₂O 4.6 μL, 模板 5 μL, 共计 20 μL。反应程序: 94 °C 预变性 15 min, 50 轮扩增循环 (94 °C、15 s, 55/58 °C、30 s, 72 °C、30 s, 80 °C、20 s), 72 °C 延伸 10 min, 分别设 3 组重复。将各组 C_t 值带入各标准工作曲线, 获得各基因初始浓度。各组基因初始浓度与其内参基因初始浓度比值为校正浓度。该校正浓度与非转基因毛状根相应基因校正浓度的比值即为相对转录水平。

表 2 长春花毛状 RT-qPCR 检测所用的引物
Table 2 Primers used in RT-qPCR analysis on hairy roots of *C. roseus*

目的基因	引物名称	引物序列 (5'→3')	退火温度/℃
18 S rRNA	f18s	GTGACAATGGAAGTGAATGG	55
	r18s	AGACGGAGGATAGCGTGAGG	
orca3	fcorca3	ATGTCCGAAGAAATCATTTCCGTCTC	58
	rcorca3	TTAATATCGTCTCTTCTTCCTTCCTCC	
g10h	ferg10h	GAGCTGATTCCGTTCCGGTGCTG	55
	rcrg10h	AAGGGTGCTTGGTACAGCACGC	
dxs	fcrdxs	GCAGATGGACCCACTCATTGTGG	55
	rcrdxs	CCTTTTCCAATCTCAAGCGGTGTTC	
ggpps	fcrggpp	AATTGTGGGTGGTGCTAATGATGAAC	55
	rcrggpp	GGAGCAGCCTTTTCAGGATCAAACCTC	
asa	fcras	CAAGCTGGTGCAGGTATAGTAGCCG	55
	rcras	GCGATGTGGCAAGGAGACGACTTC	
cpr	fcrepr	GAGAAAGTTGCTGAACAGGGTGGTAAG	55
	rcrepr	CCTCCACGGTTTCAGATAGATTATCACAG	
str	fcrstr	GGAAGTCTCTCCCATAGCTCTGTGG	55
	rcrstr	GCAGCAGACACTCAAAATCTCCTCC	
tdc	fcrtdc	ACGGATTTCGGCATCTCACCTC	55
	rcrtdc	GGATTTCGTAGTGAGTGCCCTTAGTAAC	
sgd	fcrsgd	CAACAAGCCCATCGTTCATCGTC	55
	rcrsgd	CACTCAAGAAGCCTCCATACTCGTC	
d4h	fcrd4h	CATGTTGGACTAAATAAGCGTCGGC	55
	rcrd4h	AGAACTAGTCGGGCGATGCTCGG	
dat	fcrdat	TCAAACCTCTTCTCCAACCCCTC	55
	rcrdat	AAGCAGCCCAATCCTTCATAAACG	

1.2.4 长春花毛状根 TIAs 提取 选择经 PCR 鉴定为转基因成功长春花毛状根, 将其切成 5 cm 根段于 1/2 MS 液体培养基 25 ℃暗培养 30 d。将毛状根表面擦净, 称鲜质量, 60 ℃烘 2 d, 记录干质量。研磨后加入 95%乙醇 (1 : 5), 50 ℃超声破碎 30 min, 冷却至室温。12 000 r/min, 10 min 离心吸上清 (重复离心), 2 次上清为长春花毛状根 TIAs 提取物。

1.2.5 转基因长春花毛状根 TIAs 量的测定 精确称取 10.0 mg 长春碱、5.0 mg 长春新碱和 10.0 mg 阿吗碱对照品, 分别充分溶解于 1 mL 甲醇中。3 组对照品各进行梯度稀释。将各对照品及对照品稀释液进 HPLC 检测。建立长春碱、长春新碱和阿吗碱标准曲线。各组 TIAs 提取物分别进行 HPLC 检测, 根据积峰面积和标准曲线得到各组提取物 TIAs 量。本实验色谱条件^[23]: C₁₈ 反相硅胶柱 (Symmetry ShieldTM C₁₈, 250 mm×4.6 mm, 5 μm, Waters 公

司), 乙腈-磷酸缓冲液 (25 : 75) 为流动相, 220 nm 监测波长, 体积流量 1.0 mL/min。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体 pCAMBIA1304⁺-orca3-g10h 的构建

用含 BglII/BstEII 和 XbaI/SacI 酶切位点的引物分别扩增长春花 g10h、orca3 基因。并利用相同的限制性内切酶分别对 pGEM T-g10h 和 pGEM T-orca3 进行双酶切。回收小片段 (g10h 基因片段为 1 499 bp, orca3 基因片段为 628 bp, 图 1), 并与重组载体 pCAMBIA1304⁺连接进行植物双元表达载体的构建。

2.2 发根农杆菌介导 pCAMBIA1304⁺+orca3+g10h 转化长春花 PCR 检测

通过发根农杆菌 C58C1 介导将 pCAMBIA1304⁺+orca3+g10h 表达载体导入长春

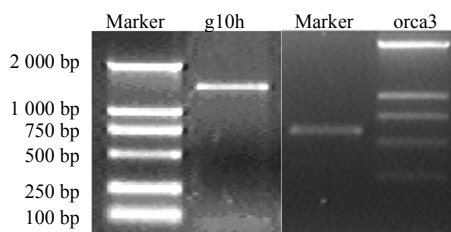


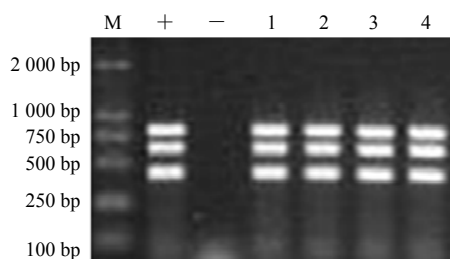
图 1 长春花 g10h 和 orca3 基因编码区克隆

Fig. 1 Gene coding region cloning of g10h and orca3 gene from *C. roseus*

花外植体。转化成功的长春花毛状根含有 Ri 质粒 T-DNA 上的 rolB 和 rolC 基因和 pCambia1304⁺上 hpt 基因。因此,通过设计 rolB、rolC、hpt 基因以及目的基因 orca3、g10h 引物对各组长春花毛状根进行 PCR 检测,获得成功导入重组载体的长春花毛状根进行下一步实验。PCR 检测结果如图 2 和图 3 所示(rolB 基因为 423 bp、rolC 基因为 622 bp、hpt 基因为 812 bp)。

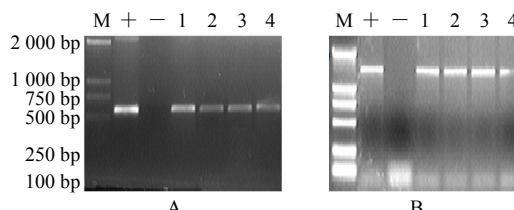
2.3 共转 orca3/g10h 长春花毛状根 TIAs 生物合成相关基因转录差异

利用 RT-qPCR 研究共转 orca3/g10h 长春花毛状根中与 TIAs 生物合成相关基因 g10h、asa、dxs、ggpps、str、tdc、cpr、sgd、dat、d4h 和转录调控因子 orca3 基因的转录差异。结果表明(图 4),共转 orca3/g10h 基因长春花毛状根中与长春花初级代谢有关的基因 asa 和 ggpps 基因的转录水平较非转基因高,但相差不大。而与长春花次级代谢相关基因 g10h、str、



M-Marker “+”-阳性对照(C58C1+pCambia1304⁺+orca3+g10h 工程菌) “-”-阴性对照(非转基因长春花普通根) 1~4 为转基因系 OG28、OG29、OG30、OG32

M-Marker “+”-represents positive control (correspondant engineered bacteria included vector C58C1 + pCambia1304⁺ + orca3 + g10h) “-”-represents negative control which was not genetically transformed in *C. roseus*, 1—4 represent different transgenic hairy root lines of *C. roseus*, OG28, OG29, OG30, OG32

图 2 检测 C58C1+pCambia1304⁺+orca3+g10h 转化长春花毛状根 rolB、rolC 和 hpt 基因Fig. 2 Detection of rolB, rolC, and hpt genes in hairy roots of *C. roseus* induced by C58C1 + pCambia1304⁺ + orca3 + g10h

A-orca3 基因 PCR 检测 B-g10h 基因 PCR 检测 M-Marker

“+”-阳性对照(C58C1+pCambia1304⁺+orca3+g10h 工程菌) “-”-阴性对照(非转基因长春花普通根) 1~4-转基因系 OG28、OG29、OG30、OG32

A-detection of PCR for orca3 gene B-detection of PCR for g10h gene. M-Marker “+” represents positive control (correspondant engineered bacteria included vector C58C1+pCambia1304⁺+orca3+g10h) “-”-represents negative control which was not genetically transformed in *C. roseus* 1—4 represent different transgenic hairy root lines of *C. roseus*, OG28, OG29, OG30, OG32

图 3 长春花转基因毛状根中目的基因 orca3 (A)、g10h (B) PCR 检测

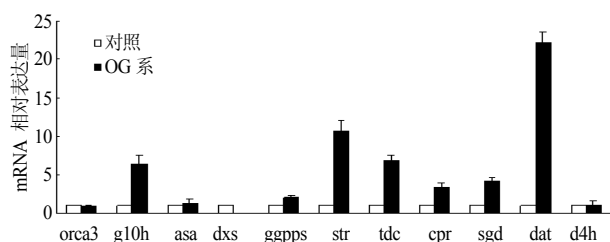
Fig. 3 PCR detection of transgenic hairy root lines of *C. roseus* for presence of transgenic genes orca3 (A) and g10h (B)

图 4 共转 orca3/g10h 基因长春花毛状根 TIAs 生物合成相关基因转录差异

Fig. 4 Transcriptional differences of genes related to TIAs biosynthesis for covalent orca3/g10h double-gene transgenic hairy root lines (OG lines) and non-transformed roots of *C. roseus*

tdc、cpr、sgd 和 dat 的转录差异研究中发现,转基因长春花毛状根中这些基因的转录水平较非转基因有较大的提高。其中,转基因毛状根 dat 的转录水平较对照组差异最大,是对照组转录水平的 22 倍。

2.4 HPLC 检测共转 orca3/g10h 基因长春花毛状根 TIAs 量

根据长春碱、长春新碱和阿吗碱对照品稀释液质量浓度(X)与其峰面积(Y),建立各组对照品的线性回归方程: $Y_{\text{长春碱}} = 586\,912.3 X - 1\,287.4$, $r = 0.999\,93$; $Y_{\text{长春新碱}} = 308\,665.5 X - 1\,526.5$, $r = 0.999\,94$; $Y_{\text{阿吗碱}} = 136\,029.4 X - 1\,553.2$, $r = 0.999\,96$ 。将各组待测提取液经 HPLC 检测,据峰面积与线性回归方程得出转基因毛状根与非转基因普通根长春碱、长

春新碱以及阿吗碱量。并对转基因长春花毛状根和非转基因长春花普通根 TIAs 平均量和 TIAs 量进行分析。结果表明(图 5 和 6), 相较于非转基因普通根 TIAs 量, 共转 *orca3/g10h* 基因的长春花毛状根 TIAs 量显著提高。其中, 长春碱量变化最明显, 转基因长春花毛状根中长春碱量为 51.30 mg/g, 是非转基因普通根的 197.3 倍。其次是长春新碱的平均量, 转基因毛状根为 6.93 mg/g, 是非转基因普通根的 3.8 倍。而转基因长春花毛状根和非转普通根中阿吗碱量少且变化不大。总 TIAs 量为 58.23 mg/g, 是非转基因普通根的 27.5 倍。在所有转基因长春花毛状根无性系中, OG28 总 TIAs 量最高, 为 60.33 mg/g。

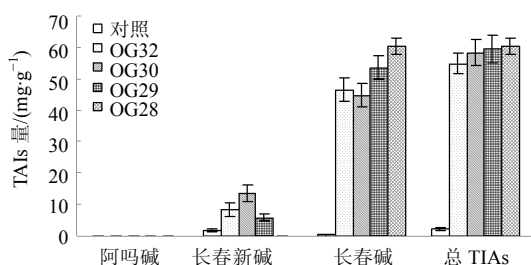


图 5 共转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根 TIAs 的量
Fig. 5 Content of TIAs in covalent *orca3/g10h* transgenic hairy roots (OG lines) of *C. roseus*

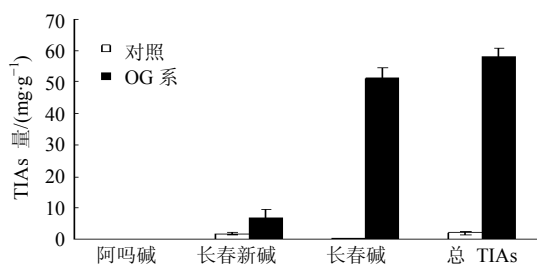


图 6 共转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根 TIAs 平均量
Fig. 6 Average content of TIAs in covalent *orca3/g10h* double-gene transgenic hairy roots of *C. roseus*

3 讨论

长春花中因含较高药用价值的生物碱而受到人们的青睐。但长春花生物碱量并不能满足人们的需求, 使得价格相对较高。代谢工程为长春花 TIAs 的生物合成提供了新思路。本研究首次成功将 *orca3/g10h* 基因导入长春花毛状根。通过 RT-qPCR 研究了转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根中 TIAs 生物合成途径中相关基因的转录差异。研究表明, 通过转基因长春花毛状根中相关基因 *asa*、*ggpps*、*g10h*、*str*、*tdc*、*cpr*、*sgd* 和 *dat* 的转录水平均较非

转基因长春花普通根高。Gong 等^[21]研究表明单转 *g10h* 基因长春花毛状根 TIAs 生物合成途径中 *ggpps*、*g10h*、*str*、*tdc*、*sgd* 和 *dat* 的转录水平明显较非转基因长春花普通根高。Van 等^[24]通过单转 *orca3* 基因发现长春花生物碱合成中 *dxs*、*asa*、*tdc*、*str* 和 *d4h* 基因的转录水平提高, 对 *g10h*、*sgd* 和 *dat* 的转录无影响。双转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根 TIAs 生物合成中 *g10h*、*str*、*tdc*、*cpr*、*sgd* 和 *dat* 基因均比单转 *orca3* 和单转 *g10h* 的转录水平高。

利用 HPLC 研究双转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根中 TIAs 量。研究表明共转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根 TIAs 量较非转长春花普通根显著增加。并比龚一富^[23]的单转 *g10h* 和单转 *orca3* 基因的长春花毛状根中 TIAs 量要高。双转 *orca3/g10h* 基因长春花毛状根的 TIAs 量与基因转录差异有一定联系。ORCA3 是长春花中重要的转录调控因子, 在代谢过程中, 不管是代谢产物或是代谢终产物均会对 TIAs 生物合成产生反馈抑制作用。只有通过转录调控因子才能够使反应朝着 TIAs 积累的方向移动。而 *g10h* 基因是 TIAs 中重要的限速酶基因。根据 van der Fits 等^[24]的研究发现 *orca3* 并不会提高 *g10h* 的转录水平, 因此 TIAs 的量也没有提高。本研究通过双转 *orca3/g10h* 基因于长春花毛状根中, 实现了 TIAs 生物合成途径中相关基因的显著表达, TIAs 量也有较明显的提高。这可能有 2 个原因引起的。一方面 *orca3* 基因打破了 TIAs 生物合成中的反馈抑制, 对通路进行了全局调控; 另一方面, 更能够体现 *g10h* 基因是长春花生物碱合成途径中的关键限制酶, 通过转入 *g10h* 基因, 整条长春花生物碱合成途径由此打通, 从而使 TIAs 的量不断升高。本研究结果表明共转 *orca3/g10h* 基因能够有效提高长春花毛状根中 TIAs 量。

参考文献

- [1] O'Connor S E, Maresh J J. Chemistry and biology of monoterpene indole alkaloid biosynthesis [J]. *Natl Prod Rep*, 2006, 23(42): 532-547.
- [2] 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玛碱积累的影响 [J]. *中草药*, 2011, 42(1): 167-170.
- [3] 卢 懿, 候世祥, 陈 彤. 长春花抗癌成分长春新碱研究的进展 [J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(11): 1006-1009.
- [4] 龚一富, 王何瑜, 卢 鹏, 等. 长春花毛状根再生植株的获得及抗癌生物碱的产生 [J]. *中草药*, 2012, 43(4): 788-794.
- [5] De Carolis E, De Luca V. Purification, characterization,

- and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate-dependent deoxygenate involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus* [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(8): 5504-5551.
- [6] Blom T J M, Sierra M I, Van Vliet T B, *et al.* Uptake and accumulation of ajmalicine into isolated vacuoles of cultures cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don and its conversion into serpentine [J]. *Planta*, 1991, 183(3): 170-177.
- [7] Sprenger G A, Schörken U, Wiegert T, *et al.* Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94(24): 12857-12862.
- [8] Meijer A H, De Wall A, Verpoorte R, *et al.* Purification of the cytochrome P-450 enzyme geraniol-10-hydroxylase from cell cultures of *Catharanthus roseus* [J]. *J Chromatogr*, 1993, 653(2): 237-249.
- [9] Poulsen C, Bongaerts R J, Verpoorte R. Purification and characterization of anthranilate synthase from *Catharanthus roseus* [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 212(2): 431-440.
- [10] Meijer A H, Verpoorte R, Hoge J H C. Regulation of enzymes and genes involved in terpenoid indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus* [J]. *J Plant Res*, 1993, 3: 145-164.
- [11] 卢衍, 常凯, 郑月, 等. 长春花萜类吲哚生物碱的分子生物学与代谢工程研究 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(16): 8793-8796.
- [12] Hedhili S, Courdavault V, Giglioli G H N, *et al.* Regulation of The terpene moiety biosynthesis of *Catharanthus roseus* terpene indole alkaloids [J]. *Phytochem Rev*, 2007, 6(2/3): 341-351.
- [13] 章津, 赵淑娟, 胡之璧. 长春花吲哚萜类生物碱代谢途径研究进展 [J]. *药物生物技术*, 2012, 19(3): 278-282.
- [14] 何际婵, 董志超, 王建荣, 等. 土壤条件对长春花生物碱含量的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(11): 2412-2413.
- [15] 郭晓瑞, 陈琪, 段喜华. 外源钾水平对长春花生长和生物碱积累的影响 [J]. *植物研究*, 2013, 33(6): 718-722.
- [16] 佟璐, 张宝友, 唐中华, 等. 弱光胁迫对大田长春花生物量分配及次生代谢的影响 [J]. *植物研究*, 2011, 31(2): 227-230.
- [17] Zhou P, Yang J, Zhu J, *et al.* Effect of β -cyclodextrin and methyl jasmonate on the production of vindoline, catharanthine, and ajmalicine in *Catharanthus roseus* cambial meristematic cell cultures [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(17): 7035-7045.
- [18] 赵恒伟, 葛锋, 孙颖, 等. 植物萜类物质生物合成的相关转录因子及其应用前景 [J]. *中草药*, 2012, 43(12): 2512-2519.
- [19] Whitmer S, Canel C, Hallard D, *et al.* Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus* [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(2): 853-857.
- [20] Collu G, Garcia A A, van der Heijden R, *et al.* Activity of the cytochrome P450 enzyme geraniol 10-hydroxylase and alkaloid production in plant cell cultures [J]. *Plant Sci*, 2002, 162(1): 165-172.
- [21] 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 Jiao Tong Univ*, 2005, 10(S1): 8-13.
- [22] Peebles C A M, Hughes E H, Shanks J V, *et al.* Transcriptional response of the terpenoid indole alkaloid pathway to the overexpression of ORCA3 along with jasmonic acid elicitation of *Catharanthus roseus* hairy roots over time [J]. *Metab Eng*, 2009, 11(2): 76-86.
- [23] 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.
- [24] van der Fits L, Memelink J. ORCA3, a jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism [J]. *Science*, 2000, 289: 295-297.