

苦豆子内生真菌诱导子促进宿主生物碱合成关键酶基因表达的荧光定量PCR检测

孙牧笛¹, 张庆宸², 胡丽杰¹, 李文学¹, 闫思远¹, 吕苗苗³, 顾沛雯^{1*}

1. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021

2. 山东大学药学院, 山东 济南 250012

3. 宁夏农林科学院植保所, 宁夏 银川 750021

摘要: **目的** 建立荧光定量PCR (qRT-PCR) 检测苦豆子内生真菌诱导子促进宿主生物碱合成关键酶—赖氨酸脱羧酶 (LDC) 基因的表达式的方法。**方法** 根据苦豆子 LDC 和 Lectin 基因序列设计目的基因引物 QLDC-F/QLDC-R 和内参基因引物 Lectin-F/Lectin-R; 以 5 倍梯度稀释的 cDNA 作为标准样品, 建立目的基因 QLDC-F/QLDC-R 和内参基因 Lectin-F/Lectin-R 的标准曲线, 优化 qRT-PCR 反应体系与反应条件, 分析比较半定量 PCR 与 qRT-PCR 的灵敏度; 在苦豆子内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子不同诱导时间下, 高效液相色谱 (HPLC) 测定宿主氧化苦参碱 (oxymatrine, OMA) 的含量, qRT-PCR 检测 LDC 基因的表达量, 分析在内生真菌诱导下 LDC 基因与 OMA 合成积累的关系。**结果** 在 qRT-PCR 体系中 cDNA 质量浓度为 200 ng/μL, 退火温度为 61 °C 时检测结果最好; 构建的目的基因和内参基因标准曲线, 其循环阈值与模板浓度均呈良好的线性关系, 扩增效率都在 99% 以上, 灵敏度是半定量 PCR 的 25 倍; 在内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子诱导作用下, 宿主 LDC 基因的表达量在第 6 天达到峰值, 为对照的 25.58 倍; OMA 含量的增加滞后于 LDC 基因表达量的变化, 在诱导子处理第 9 天达到最高峰。**结论** 成功将 qRT-PCR 技术应用于苦豆子的功能基因研究。通过对各种条件的优化探索, 建立了准确和简单易行的检测苦豆子的功能基因表达的平台。

关键词: 荧光定量 PCR; 苦豆子; 内生真菌诱导子; 赖氨酸脱羧酶基因; 氧化苦参碱

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)19-4621-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.19.024

Real-time fluorescent quantitative PCR detection of key enzyme genes expression of alkaloid biosynthesis promoted by endophytic fungal elicitor in *Sophora alopecuroides*

SUN Mu-di¹, ZHANG Qing-chen², HU Li-jie¹, Li Wen-xue¹, YAN Si-yuan¹, LV Miao-miao³, GU Pei-wen¹

1. Agriculture College, Ningxia University, Yinchuan 750021, China

2. College of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China

3. Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Plant Protection, Yinchuan 750021, China

Abstract: **Objective** To establish a method of detecting the expression of Lysine decarboxylase (LDC) —a key enzyme for the synthesis of alkaloid in the host promoted by the endophytic fungal elicitor of *Sophora alopecuroides* by using real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR). **Methods** Target gene primers QLDC-F/QLDC-R and reference gene primers Lectin-F/Lectin-R were designed according to LDC and Lectin gene sequences of *S. alopecuroides*; Five-fold gradient dilution of cDNA was used as the standard sample for the construction of the standard curve of target gene and the reference gene. Reaction system and reaction conditions of qRT-PCR were optimized, and the sensitivity of semi-quantitative PCR and qRT-PCR were analyzed and compared. Under different eliciting time of endophytic fungal elicitors NDZKDF₁₃ of *S. alopecuroides*, the content of oxymatrine in the host was determined by HPLC, the expression of LDC gene was detected by qRT-PCR, and the relationship between LDC gene expression and the accumulation of OMA was analyzed. **Results** The results of qRT-PCR were better when the cDNA content in the system was 200 ng/μL and the annealing temperature was 61 °C. The standard curve of the target gene and the reference gene was constructed, in which the cycle threshold and template concentration showed a good linear relationship, the amplification efficiency was above 99%, and

收稿日期: 2018-02-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目: 苦豆子内生真菌促进宿主喹诺里西啶生物碱合成积累的机制研究 (31260452)

作者简介: 孙牧笛 (1991—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为生物防治与菌物资源利用。Tel: 15809580774 E-mail: 1169158591@qq.com

*通信作者 顾沛雯 (1969—), 女, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为生物防治与菌物资源利用。Tel: 13995192081 E-mail: gupeiwen2013@126.com

the sensitivity was 25 times that of semi-quantitative PCR. Under the induction effect of endophytic fungal elicitor NDZKDF₁₃, expression of host LDC gene reached the peak on the 6th day, which was 25.58 times that of the control. The increase of OMA content lagged the change of the LDC gene expression and reached the highest amount on the 9th day after the induction. **Conclusion** The qRT-PCR technique was successfully applied to the functional gene research of *S. alopecuroides*. Through the optimization of various conditions, a platform for accurate and simple detection of functional gene expression in *S. alopecuroides* was established.

Key words: real-time fluorescence quantitative PCR; *Sophora alopecuroides* L.; endophytic fungal elicitor; lysine decarboxylase gene expression; oxymatrine

内生真菌诱导子作为外源诱导子中一种特定的化学信号,在药用植物与微生物的相互作用中,可以快速、专一和选择性地诱导药用植物代谢过程中特定基因的表达,进而活化特定次生代谢途径,调控药用植物活性成分的生物合成^[1]。近年来,愈来愈多的研究证明内生真菌诱导子可作为研究药用植物次生代谢信号识别及其胞内信息传递的良好实验体系。陶金华等^[2]从茅苍术中筛选到1株有益内生真菌 *Fusarium* SP5,可显著促进 β -桉叶醇的生物合成,产量达到 66.59 $\mu\text{g/g}$,比对照提高了 257.6%。石岳香等^[3]用长春花内生真菌诱导子处理宿主悬浮细胞后,悬浮细胞生物碱代谢中的关键酶苯丙氨酸酶(PAL)和色氨酸脱羧酶(TDC)活性增强,总生物碱产量也得到提高。因此,利用内生真菌诱导子可促进药用植物细胞生物合成积累次生代谢物,也为研究药用植物次生代谢的调控提供了新手段。

苦豆子 *Sophora alopecuroides* L. 属豆科槐属,是宁夏干旱荒漠区重要的沙生药用植物资源和自然植被组成部分,生物碱是其重要的生物活性成分,其中氧化苦参碱(oxymatrine, OMA)和苦参碱(matrine, MA)在抗心律失常、抗肿瘤、保肝、抗炎、抗过敏等方面有重要的药理活性,在杀虫抗菌等方面也有着重要的作用^[4]。近年来,由于人们对苦豆子 OMA 和 MA 等原料药的需求量日益增加,野生苦豆子资源乱采滥挖日益猖獗,苦豆子野生自然资源面临着逐渐枯竭的危险。因此,无论是从药用植物种质资源的保存,还是从苦豆子植物资源的可持续利用来说,研究苦豆子中生物碱生物合成途径中的功能基因对于了解药用植物有效成分的产生和影响因素具有重要的现实意义。

OMA 和 MA 属于喹诺里西啶(quinolizidine alkaloids, QAs)类生物碱。有研究证实 QAs 的前体物质是赖氨酸(lysine, Lys),赖氨酸在赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC)的催化下生成戊二胺(尸胺),最终经过一系列生化反应转化为 MA

和 OMA^[5]。LDC 作为 QAs 生物合成第一步所需的关键酶,对其合成调控一直是国内外学者研究的热点。1984 年, Schoofs 等^[6]发现白羽扇豆 *Lupinus albus* L. 和黄羽扇豆 *Lupinus luteus* L. 叶片中生物碱的含量与 LDC 活性呈现正相关。2012 年, Bunsupa 等^[7]将羽扇豆的 LDC 基因转入烟草后发现尸胺含量明显提高,随之生物碱的含量也得以增加。2015 年, 杨毅等^[8]首次从宁夏苦豆子上克隆了 LDC 基因,并初步研究了干旱胁迫下苦豆子子叶中 LDC 基因表达量与 MA 和 OMA 含量的关系,但有关苦豆子内生真菌作为外源诱导子促进宿主生物碱合成积累的研究报道较少。

荧光时实定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, qRT-PCR) 技术是在常规 PCR 反应体系中加入荧光染料或荧光探针,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 反应进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法^[9]。目前国内外已成功将 qRT-PCR 技术应用于药用植物的功能基因研究。向蓓蓓等^[10]利用 qRT-PCR 检测了川西獐牙菜功能基因表达的差异。李清等^[11]对金钗石斛焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶基因进行克隆及表达分析,发现该基因的表达情况直接或间接影响石斛碱的生物合成。本实验在前期研究苦豆子内生真菌诱导子对宿主生物碱合成积累影响的基础上,采用 qRT-PCR 检测添加外源内生真菌诱导子后苦豆子组培苗中 LDC 基因表达情况,通过对各种条件的优化探索,建立检测苦豆子 LDC 基因表达的 qRT-PCR 反应体系,分析 LDC 基因与 OMA 合成积累之间的关系,以为苦豆子生物碱功能基因的研究提供新的技术支持,在分子水平上揭示其表达规律。

1 材料与仪器

1.1 材料

苦豆子豆荚采自宁夏白芨滩自然保护区,经宁夏大学农学院李小伟副教授鉴定为 *Sophora alopecuroides* L.。挑选饱满无病虫的健康种子,按高媛等^[12]提供的方法培养组培苗。苦豆子内生真菌

菌株 NDZKDF₁₃ 为本实验室于 2013—2014 年从健康苦豆子植株中分离鉴定保存^[13]。

1.2 试剂和仪器

MS 培养基、植物总 RNA 提取试剂盒 E. Z. N. A.[®] Plant RNA Kit (Omega 公司); EASY Dilution (TaKaRa 公司); qRT-PCR 试剂盒 UltraSYBR Mixture (康为世纪公司); 反转录试剂盒 TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix、2×Eco Taq PCR SuperMix、DNA Marker-2K、GelStain 皆购自北京全式金生物有限公司; OMA 对照品 (批号 B21470, 质量分数大于 98%) 购自上海源叶生物技术有限公司。

SimpliNano 超微量分光光度计 (GE Healthcare 公司, 美国); Bio-Rad PCR 仪 (Bio-Rad 公司, 美国); qTOWER 2.0 Thermal Cycler PCR 仪 (Analytikjena 公司, 德国); Azure c200 紫外凝胶成像系统 (Azure Biosystems 公司, 美国); DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); Rigol L-3000 高效液相色谱仪 (Rigol 公司, 北京); Kromasil C₁₈ 反相色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), KQ2200DE 型数控超声波清洗器 (东莞科桥超声波设备有限公司); NDK200-2 氮吹仪 (杭州米欧仪器有限公司)。

2 方法

2.1 内生真菌诱导子的制备和添加

将苦豆子内生真菌菌株 NDZKDF₁₃ 接种到马铃薯葡萄糖液体培养基中, 25 °C、150 r/min 摇床中暗培养 7 d, 减压抽滤分离菌丝和菌液, 菌液减压浓缩。用蒽酮比色法测定制备菌液诱导子中多糖的含量^[12]。

以苦豆子组培苗为研究对象, 添加 20% 的内生真菌 NDZKDF₁₃ 菌株的菌液浓缩物作为内生真菌诱导子, 使培养基中诱导子的终质量浓度为 1.00 mg/L (多糖计), 25 °C, 每天连续光照 12 h, 光强为 1 000 lx, 添加当天每 3 d 取样 1 次, 共取样 6 次, 以不加诱导子组培苗为对照组。处理组和对照组分别收获 2 份样品于液氮速冻后, -80 °C 保存。其中 1 份用于 LDC 基因表达量测定, 另 1 份用于组培苗 OMA 含量测定。

2.2 引物设计

根据 GenBank 中苦豆子 LDC 基因编码区序列 SaLDC (登录号 KM24W71)^[14], 设计 qRT-PCR 的目的基因引物 QLDC-F: 3'-CTCAAACCTATC-ACGGAGCCA-5', QLDC-R: 3'-TGAAACCGCC-

ACCAATGTC-5', 扩增产物长度为 108 bp。根据豆科植物保守的 Lectin 基因序列 (GenBank 登录号 DQ011517.1)^[14-15] 设计内参基因引物 Lectin-F: 3'-ACTGCCCCGCATAAACTATAACG-5', Lectin-R: 3'-CTTGAGAATCCAACCCTGACC-5', 产物长度为 140 bp, 所有引物均由上海生工生物工程有限公司合成。

2.3 苦豆子总 RNA 提取和 cDNA 合成

取于 -80 °C 保存的苦豆子组培苗样品, 按植物总 RNA 提取试剂盒 (OMEGA) 说明书提取 RNA, 并进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳及超微量紫外分光光度测定样品浓度及纯度后, 按反转录试剂盒 (全式金) 说明书反转录合成 cDNA 第 1 链, 采用的反应体系为 20 μL, 加入样品总 RNA 1 000 ng, 使各样品 cDNA 浓度达到一致。

2.4 qRT-PCR 反应条件优化及反应体系

在 UltraSYBR Mixture 试剂盒说明书给出的反应体系的基础上进行优化。以 C_t 值 (每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数) 最小、荧光强度最高且熔解曲线显示扩增有单一特异的峰为标准, 优化最佳退火温度及最佳模板浓度。本实验将内生真菌诱导子处理组和无诱导子对照组共 12 份样品的 cDNA 原液各取 5 μL 混匀后, 用 EASY Dilution 对混合 cDNA 原液进行稀释, 使 cDNA 质量浓度分别为 200、100、50、25 ng/μL, 筛选出每对引物反应时最优的模板浓度; 在最优模板浓度下, 分别检测各引物在以 56.3、58.0、60.0、61.0、62.0、63.9 °C 为退火温度下的荧光信号及熔解曲线。

2.5 qRT-PCR 目的基因与内参基因标准曲线的建立及灵敏度检测

由于目前没有商品化的苦豆子对照品, 将上述 12 种样品的混合 cDNA 原液作为对照品, 经过检测其起始质量浓度为 1 000 ng/μL, 按 5 倍梯度稀释成为 5⁰~5⁻⁷ 共 8 个梯度, 即 cDNA 的质量浓度依次为 1 000、200、40、8、1.6、0.32、0.064、0.012 8 ng/μL。采用以上实验优化的体系及条件对目的基因 (QLDC) 和内参基因 (Lectin) 进行 qRT-PCR 检测, 反应中每个梯度 3 个重复, 同时设阴性对照 (无模板对照), 根据起始模板浓度的对数和 C_t 值的线性关系, 构建各引物的标准曲线, 由仪器附带软件绘制曲线并计算扩增效率。同时对上述稀释样品用目的基因 QLDC-F/QLDC-R 进行半定量 PCR 和 qRT-PCR 扩增, 根据是否出现特异条带和扩增曲线

以及 C_t 值, 得出 2 种方法能够检出的最低限度, 并比较 2 种方法的灵敏度。

2.5.1 半定量 PCR 反应 半定量 PCR 在 Bio-Rad PCR 仪上进行, 反应采用 20 μ L 体系: cDNA 模板 1 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, MaxTaq 酶 12.5 μ L, RNase-free water 5.7 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 57 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 32 s, 35 个循环后于 72 $^{\circ}$ C 最后延伸 10 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测产物。

2.5.2 qRT-PCR 反应 采用 ULtraSYBR Mixture 试剂盒, 通过对反应体系的退火温度、最佳引物浓度进行不断摸索。优化后的 PCR 反应体系为 20 μ L: 2 $\times$ ULtraSYBR mix 10.0 μ L, 10 μ mol/ μ L 上下游引物各 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, RNase Free dH₂O 8.2 μ L。qRT-PCR 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 61 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 32 s, 40 个循环。

2.6 生物碱合成关键酶基因表达量的计算

分别以苦豆子空白处理组中各对应天数的样品作为对照, 采用优化后的体系进行 qRT-PCR, 每个样本重复 3 次, 并设阴性对照。扩增反应结束后进行 60~95 $^{\circ}$ C 扩增曲线与熔解曲线分析, 记录 C_t 值。按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算出基因的相对表达量^[16]。

2.7 苦豆子组培苗中 OMA 含量测定

2.7.1 苦豆子组培苗中生物碱的提取 称取 0.5 g 苦豆子组培苗, 加入 2 mL 无水乙醇于研钵中充分研磨, 常温水浴超声处理 30 min, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜浸提后, 于 25 $^{\circ}$ C、8 000 $\times$ g 离心 10 min, 取上清液于新离心管中, 氮吹后, 用流动相定容至 1.5 mL, 0.45 μ m 滤膜滤过后, 即为样品制备液, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

2.7.2 苦豆子组培苗中 OMA 含量的测定 精确称量 OMA 对照品 1.0 mg 用流动相溶解定容至 1 mL, 制成质量浓度 1 mg/mL 的对照品贮备液。流动相逐级对半稀释, 进样量 10 μ L。Kromasil C₁₈ 反相色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 0.037 mol/L 磷酸缓冲液 (H₃PO₄ 3.65 g/L) - 甲醇 (90:10); 检测波长 216 nm; 柱温 30 $^{\circ}$ C; 体积流量 1.0 mL/min。绘制标准曲线, 以峰面积 (Y) 对质量浓度 (X) 进行回归, 得 OMA 回归方程 $Y=794.9 X+11\ 713.2$, $R^2=0.999$ 。

精密量取“2.1”项所述待测样品 10 μ L 进样, 在相同色谱条件下检测, 根据标准曲线计算待测样品 OMA 含量。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 纯度分析

所提取的苦豆子组培苗总 RNA 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。如图 1 所示, 28S、18S、5S rRNA 的电泳条带完整且清晰, RNA 没有发生降解。经 SimpliNano 超微量分光光度计检测, 吸光光谱的曲线平滑, A_{260}/A_{280} 值在 1.9~2.1, A_{260}/A_{230} 值在 1.8~2.0, 说明无蛋白、酚类杂质, 纯度好, 满足后续实验的要求。

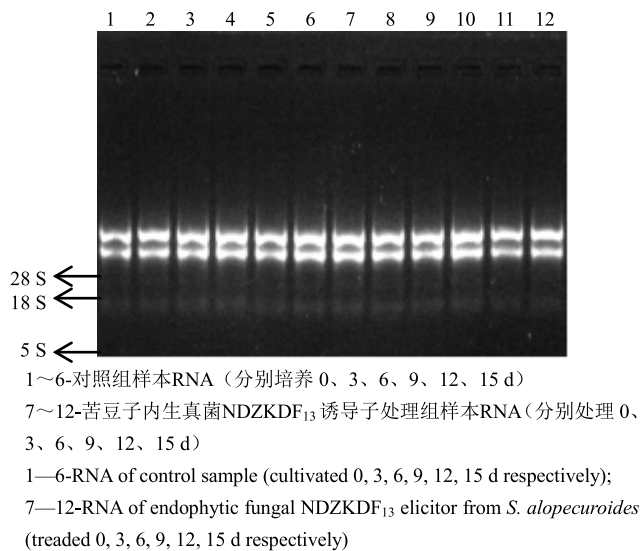


图 1 苦豆子组培苗总 RNA 提取电泳图

Fig. 1 Total RNA extraction of tissue culture seedling from *S. alopecuroides*

3.2 qRT-PCR 反应条件的优化

3.2.1 扩增曲线和熔解曲线 qRT-PCR 进行反应条件优化, 结果表明, cDNA 浓度为 200 ng/ μ L, 退火温度为 61 $^{\circ}$ C 时检测结果最好。扩增曲线显示扩增 C_t 值在 15~30 (图 2-A), 且熔解曲线呈现特异的单峰曲线 (图 2-B), 而在其他温度和模板浓度下, 扩增曲线呈锯齿状, 扩增特异性较差。

3.2.2 目的基因和内参基因标准曲线的建立 在优化体系扩增结束后, 系统自动绘制出标准曲线, 得出标准浓度对数 (X) 与 C_t 值 (Y) 之间的线性关系: 目的基因 QLDC: $Y=-3.325\ 1 X+31.321\ 5$, $R^2=0.993\ 1$, 内参基因 Lectin: $Y=-3.345\ 8 X+27.195\ 4$, $R^2=0.996\ 0$ 。目的基因 QLDC 和内参基因 Lectin 的扩增效率分别是 99.87% 和 99.01%, 两者差值小于 0.1, 目前认为当标准曲线 R^2 近似于 1, 目的基因与内参基因扩增效率相近, 且越接近 100%, 结果可信度越高, 故本实验中内参基因和目

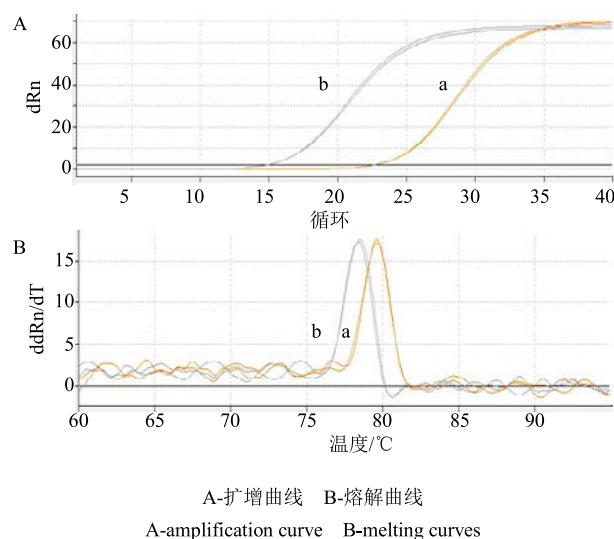
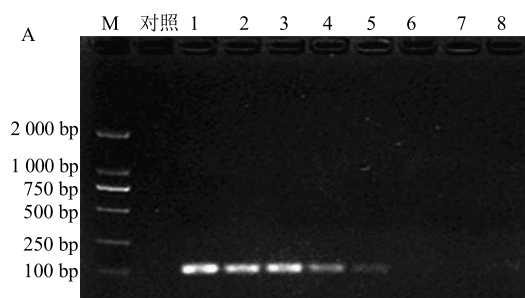


图 2 QLDC (a)、Lectin (b) 基因 qRT-PCR 反应扩增曲线和熔解曲线

Fig. 2 Melting curves and amplification curves of QLDC (a) and Lectin (b) genes by real-time fluorescence quantitative PCR amplification



M-Marker 1~8-cDNA 浓度稀释梯度为 $5^0 \sim 5^{-7}$ (即 cDNA 质量浓度为 1 000、200、40、8、1.6、0.32、0.064、0.012 8 ng/ μ L)
M-Marker 1—8-cDNA concentration gradient $5^0 \sim 5^{-7}$ (cDNA concentration of 1 000, 200, 40, 8, 1.6, 0.32, 0.064, 0.012 8 ng/ μ L)

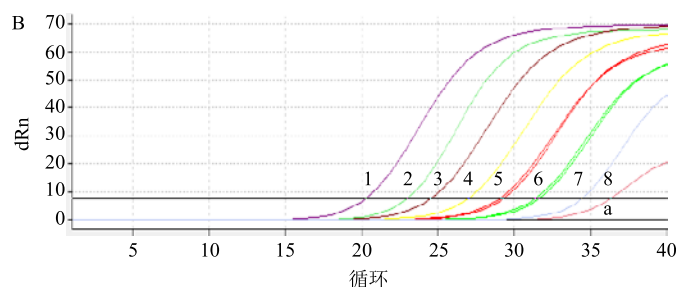


图 3 半定量 PCR (A) 和 qRT-PCR (B) 灵敏度检测

Fig. 3 Sensitivity test of semi-quantitative PCR (A) and real-time fluorescence quantitative PCR (B)

9~15 天时差异极显著 ($P < 0.01$), 其中第 9 天时, 组培苗中 OMA 质量分数达到最高, 为 2.990 mg/g 鲜质量, 是对照组的 1.95 倍, 此后随着培养时间的延长, 诱导组组培苗中 OMA 含量虽有下降, 但在相应培养时间仍比对照组高, 第 12、15 天分别是对照的 1.56 倍和 1.41 倍。

3.4 苦豆子内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子对宿主 LDC 基因表达的影响

由图 5 可知, 苦豆子内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子不仅提高了苦豆子组培苗中 OMA 的含量, 还促进了宿主 LDC 基因的表达。在内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子不同的诱导时间下, 宿主 LDC 基因的表达均高于对照组, 且 LDC 表达量随诱导

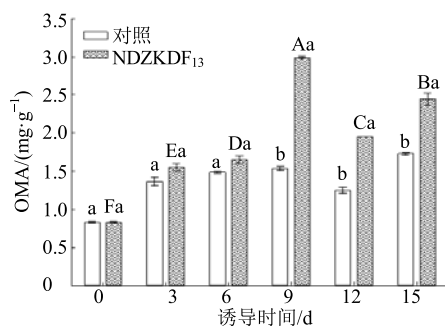
的基因可以用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对定量实验^[17]。

3.2.3 灵敏度检测结果 由图 3 可知, qRT-PCR 灵敏度高于半定量 PCR 灵敏度。qRT-PCR 在稀释度为 $5^0 \sim 5^{-7}$ 下对 QLDC 基因均有明显的阳性扩增曲线, 一般认为当 C_t 值大于 35 时, qRT-PCR 检测结果无效^[18]。在 cDNA 质量浓度为 0.064 ng/ μ L (即稀释 5^{-6}) 时, 其 C_t 值为 34.34, 是 qRT-PCR 检测灵敏度的下限。半定量 PCR 检测中 QLDC 基因在 cDNA 浓度为 1.6 ng/ μ L (即稀释度 5^{-4}) 时, 能隐约看到扩增条带, 为半定量 PCR 的下限, 说明 qRT-PCR 比半定量 PCR 灵敏度高 25 倍。

3.3 苦豆子内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子对宿主 OMA 积累的影响

由图 4 可知, 内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子在不同的诱导时间下对苦豆子组培苗中 OMA 含量的影响不同。诱导组间差异极显著, 与对照组相比, NDZKDF₁₃ 诱导下组培苗中 OMA 的含量明显提高, 在诱导 3~9 d 时, 诱导组与对照组无显著差异, 第

时间的增加呈现先增加后减少的趋势, 除诱导第 0 天与第 15 天差异不显著以外, 其他诱导时间下宿主 LDC 基因表达量均呈极显著差异 ($P < 0.01$)。在诱导子处理后第 3~6 天时, 宿主 LDC 基因的表达量迅速增加, 在第 6 天达到最高, 为对照组的 25.58 倍, 诱导作用最强, 之后宿主 LDC 表达量逐渐降低, 诱导第 15 天时, LDC 基因的表达量与对照组基本持平。而在相同诱导条件下, 宿主 OMA 含量的增加滞后于 LDC 基因表达量的变化(图 5), 在诱导子处理第 6~9 天后宿主 OMA 含量大量积累增加, 并在诱导第 9 天时达到最高峰, 这与图 5 苦豆子内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子对宿主 OMA 积累结果相一致。

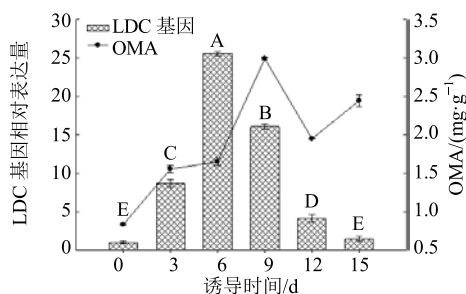


大写字母代表各苦豆子内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子在不同诱导时间的差异水平, 不同的大写字母代表 $P < 0.01$; 小写字母代表 NDZKDF₁₃ 诱导组与对照组处理对应天数下的差异水平, 不同的小写字母代表 $P < 0.01$

The capital letters represent the difference levels of endophytic fungal NDZKDF₁₃ elicitors at different induction times, with the different letter mean significantly different ($P < 0.01$); The lowercase letters mean difference level between NDZKDF₁₃ induction group and control group, with the difference letter mean significantly different ($P < 0.01$)

图4 苦豆子内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子在不同诱导时间下对宿主组培苗 OMA 含量的影响

Fig. 4 Effect of different induction time of NDZKDF₁₃ elicitor on OMA content of tissue culture seedling from *S. alopecuroides*



大写字母表示在 0.01 水平下苦豆子内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子在不同诱导时间的差异水平, 不同的大写字母代表 $P < 0.01$

The capital letters meant the difference levels of endophytic fungal NDZKDF₁₃ elicitors at different induction times, with the different letter mean significantly different ($P < 0.01$)

图5 苦豆子内生真菌诱导子 NDZKDF₁₃ 在不同诱导时间下对宿主 LDC 基因表达的影响

Fig. 5 Effect of different induction time of NDZKDF₁₃ elicitor on LDC gene expression of tissue culture seedling from *S. alopecuroides*

4 讨论

半定量 PCR 可作为研究基因转录水平的手段之一, 能够粗略地估计基因表达的相对变化, 可用于检测基因表达及其变化状况大致趋势。它存在一些自身缺点, 如难以保证引物扩增效率一致, 对于

基因表达较低的样本, 电泳易看不到目的条带, 易误判为基因缺失, 并不能准确测定不同样品间基因表达相差的倍数, 若要精确地分析基因表达的差异还需利用 qRT-PCR 等技术^[19]。

qRT-PCR 主要是利用高质量的 RNA 反转录成 cDNA 后, 通过检测 cDNA 的丰度来确定基因的表达量, 可分为绝对定量和相对定量 2 种方法。对于相对定量来说, 需要选择合适的稳定内参基因进行校正和标准化来减少样品之间和样品内部的差异。在其分析过程中, RNA 的质量和产量、反转录效率的差异以及引物的扩增效率等因素都会对分析结果的准确性产生影响^[20]。本实验采用相对定量的方法, 设计目的与内参基因, 经过反应体系优化、标准曲线的建立、目标基因灵敏度检测后, 建立检测苦豆子 LDC 基因表达的 qRT-PCR 反应体系。该方法标准曲线循环阈值与模板浓度呈良好的线性关系, 目的基因与内参基因扩增效率相近且都在 99% 以上。与半定量 PCR 相比, qRT-PCR 的灵敏度提高了 25 倍, 说明该方法可用于苦豆子 LDC 基因表达的快速检测。

目前, 内生真菌诱导子广泛应用于药用植物细胞中, 被认为是提高次生代谢产物产量最有效的途径之一。有研究表明^[21], 宿主体内的个别内生真菌之所以能产生与宿主相同或相似的活性成分, 是由于两者的长期共生关系导致宿主可能将其遗传物质或信息传递给其内生真菌, 使之有与宿主相同或相似的代谢途径。徐茂军等^[22-23]证明了一氧化氮 (NO) 是介导桔青霉诱导子促进红豆杉悬浮细胞中紫杉醇合成和苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活化信号转导途径中必需的信号分子。在粉葛细胞中 NO 分别依赖水杨酸 (JA) 和茉莉酸 (SA) 信号转导途径诱发 NahG 转基因粉葛细胞和野生型细胞中葛根素的合成积累。杨致荣等^[24]报道长春花受到外界刺激后诱导萜类吲哚生物碱前体代谢途径中 TDC、STR 和 D4H 基因高表达, 最终促进次生代谢产物生物碱的合成。本课题组前期从苦豆子中分离出 8 株内生真菌, 分别制备灭活菌丝和菌液浓缩物 2 类诱导子, 发现菌液浓缩物的诱导效果要强于灭活菌丝。其中菌株 NDZKDF₁₃ 的菌液浓缩物对宿主生长以及生物碱的合成作用效果明显, 愈伤组织生物碱是空白对照的 23.8 倍, 且其诱导了生物碱合成关键酶 PAL 活性的升高^[25]。本实验在前期研究的基础上, 研究以内生真菌 NDZKDF₁₃ 菌液浓缩物为诱导子时对宿

主 LDC 基因表达量的影响,发现内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子在不同的诱导时间下,不仅提高了宿主 OMA 的含量,还促进了苦豆子 LDC 基因的表达。基因表达量在第 6 天达到峰值,为对照组的 25.58 倍,即此时内生真菌诱导子的诱导作用最佳。利用 HPLC 测定 OMA 含量,发现 OMA 含量的增加滞后于 LDC 基因表达量的变化,在诱导子处理 6~9 d 后大量积累增加,并在 9 d 达到最高峰,是对照的 1.95 倍。说明在苦豆子组培苗中添加内生真菌 NDZKDF₁₃ 诱导子在诱导前期促进了苦豆子 LDC 基因的表达量,随后提高宿主中 OMA 的含量。

苦豆子生物碱合成途径的调控机制较为复杂,目前虽然利用内生真菌诱导子促进药用植物次生代谢物生物合成的研究已取得了一些进展,但是关于内生真菌诱导子作用机制,诱导子如何实现信号传导,如何促进代谢途径中关键酶活性的提高以及是否存在其他合成途径尚不清楚,还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Li P, Mou Y, Shan T, *et al.* Effects of polysaccharide elicitors from endophytic *Fusarium oxysporium* Dzf17 on growth and diosgenin production in cell suspension culture of *Dioscorea zingiberensis* [J]. *Molecules*, 2011, 16(11): 9003-9016.
- [2] 陶金华,汪冬庚,濮雪莲,等. H₂O₂ 介导内生真菌诱导子促进茅苍术细胞 HMGR 的活化和 β -桉叶醇的生物合成 [J]. *中草药*, 2013, 44(19): 2740-2744.
- [3] 石岳香,周敏,杨华,等. 内生真菌和诱导子对长春花悬浮细胞及生物碱合成的影响 [J]. *现代生物医学进展*, 2009, 9(5): 886-889.
- [4] 胡会平,刘建慧,孙鑫,等. 苦参碱及衍生物的生物活性和合成研究进展 [J]. *鲁东大学学报: 自然科学版*, 2015, 31(4): 339-345.
- [5] Hartmann T, Schoofs G, Wink M. A chloroplast-localized lysine decarboxylase of *Lupinus polyphyllus*: The first enzyme in the biosynthetic pathway of quinolizidine alkaloids [J]. *Febs Lett*, 1980, 115(1): 35-38.
- [6] Schoofs G, Teichmann S, Hartmann T, *et al.* Lysine decarboxylase in plants and its integration in quinolizidine alkaloid biosynthesis [J]. *Phytochemistry*, 1983, 22(1): 65-69.
- [7] Bunsupa S, Katayama K, Ikeura E, *et al.* Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in leguminosae [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(3): 1202-1216.
- [8] 杨毅,田蕾,刘萍,等. 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因表达与苦参碱和氧化苦参碱含量的关系 [J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(10): 846-849.
- [9] 崔颖,王秀娟,高山,等. 实时荧光定量 PCR 技术在植物中的应用 [J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(13): 3073-3077.
- [10] 向蓓蓓,李晓雪,王勇,等. 川西獐牙菜牻牛儿苗基焦磷酸合成酶基因的克隆及表达分析 [J]. *中草药*, 2017, 48(5): 962-970.
- [11] 李清,李标,郭顺星. 金钗石斛焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶基因的克隆及表达分析 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2018, 37(2): 2223-2229.
- [12] 高媛,孙牧笛,徐全智,等. 苦豆子内生真菌对宿主培养物生长及喹诺里西啶类生物碱合成的影响 [J]. *干旱地区农业研究*, 2017, 35(3): 212-218.
- [13] 周星辰. 苦豆子内生真菌遗传多样性及其产喹诺里西啶生物碱菌株的筛选 [D]. 银川: 宁夏大学, 2014.
- [14] 杨毅. 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因克隆及表达分析 [D]. 银川: 宁夏大学, 2015.
- [15] 张海波. 适合转基因大豆 GTS 40-3-2 复合 PCR 检测标准分子研制及番茄内标准基因国际协同验证 [D]. 上海: 上海交通大学, 2008.
- [16] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [17] 唐永凯,贾永义. 荧光定量 PCR 数据处理方法的探讨 [J]. *生物技术*, 2008, 18(3): 89-91.
- [18] 于春梅,刁有祥,唐熠,等. 坦布苏病毒荧光定量 RT-PCR 方法的建立 [J]. *中国农业科学*, 2012, 45(21): 4492-4500.
- [19] Gutierrez L, Mauriat M, Pelloux J, *et al.* Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR [J]. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1734-1735.
- [20] 周晓慧,刘军,庄勇. 喀西茄内参基因实时荧光定量 PCR 表达稳定性评价 [J]. *园艺学报*, 2014, 41(8): 1731-1738.
- [21] 曾松荣,徐成东,王海坤,等. 药用植物内生真菌及其具宿主相同活性成分的机制初探 [J]. *中草药*, 2000, 31(4): 68-70.
- [22] 徐茂军,董菊芳,朱睦元. NO 参与真菌诱导子对红豆杉悬浮细胞中 PAL 活化和紫杉醇生物合成的促进作用 [J]. *科学通报*, 2004, 49(7): 667-672.
- [23] 徐茂军,董菊芳,朱睦元. NO 通过水杨酸(SA)或者茉莉酸(JA)信号途径介导真菌诱导子对粉葛悬浮细胞中葛根素生物合成的促进作用 [J]. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2006, 36(1): 66-75.
- [24] 杨致荣,陈钊,李润植. 茉莉素介导的长春花生物碱次生代谢转录调控机制 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2014, 30(6): 533-542.
- [25] 高媛. 苦豆子悬浮细胞培养及其内生真菌对宿主喹诺里西啶生物碱合成积累的影响 [D]. 银川: 宁夏大学, 2016.