

透明颤菌血红蛋白对黄芪甲苷生物合成的调控作用

王子艳, 胡之璧*, 王峥涛

(国家中医药管理局中药资源与质量标准重点实验室, 上海市复方中药重点实验室,
上海中医药大学中药研究所, 上海 201203)

摘要: 为了研究透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb) 对黄芪甲苷生物合成的调控作用, 本文运用农杆菌介导法, 将透明颤菌血红蛋白基因 (*Vitreoscilla* hemoglobin gene, *vgb*) 导入黄芪毛状根中, 经 PCR 特征性引物扩增得到 54 个转基因株系。Southern blot 分析, 证明 *vgb* 基因已经整合到转基因黄芪毛状根基因组中。RT-PCR 分析结果表明, *vgb* 基因在转录水平获得表达。转基因黄芪毛状根培养 15 天, 其生长量和增长倍数皆比非转基因黄芪毛状根高; 黄芪甲苷含量测定结果显示, 转基因黄芪毛状根黄芪甲苷含量是非转基因黄芪毛状根的 5~6 倍, 是山西产黄芪药材的 10~12 倍。研究结果表明, *vgb* 基因的表达促进了转基因毛状根的生长, 提高了黄芪甲苷含量。

关键词: 黄芪; 透明颤菌血红蛋白; 黄芪甲苷; 生物合成

中图分类号: Q591

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2011) 03-0355-06

Regulation of *Vitreoscilla* hemoglobin on biosynthesis of astragaloside IV

WANG Zi-yan, HU Zhi-bi*, WANG Zheng-tao

(The SATCM Key Laboratory for New Resources & Quality Evaluation of Chinese Medicines and Shanghai Key Laboratory of Complex Prescription, Institute of Traditional Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

Abstract: In the present study, the regulation of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) on astragaloside IV biosynthesis was investigated. An intermediate expression vector consisting of the CaMV35S promoter fused to the *vgb* and nopaline synthase terminator was transferred into *Astragalus membranaceus* via *Agrobacterium rhizogenes*. The transgenic hairy roots were confirmed by PCR amplification and Southern blot hybridization. The expression of *vgb* in transgenic hairy roots was confirmed by RT-PCR. After 15 days cultivation, the dry weight and growth rate of transgenic hairy roots were higher than that of the non-transgenic hairy root. ELSD-HPLC analysis showed that astragaloside IV content of transgenic hairy roots was 5 to 6 times of non-transgenic hairy root control and 10 to 12 times of Radix Astragali from Shanxi Province. These results suggested that the expression of *vgb* promoted the growth of transgenic hairy roots, and increased the content of astragaloside IV.

Key words: *Astragalus membranaceus*; *Vitreoscilla* hemoglobin; astragaloside IV; biosynthesis

黄芪是我国重要的常用中药材品种之一, 中国药典记载的品种为多年生豆科植物膜荚黄芪 (*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.) 和蒙古黄芪 (*Astragalus*

membranaceus (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao) 的干燥根^[1]。黄芪已有 2000 多年的应用历史, 始载于东汉《神农本草经》, 列为上品。中医认为, 黄芪性温味微甘, 能补一身之气, 兼有升阳、固表止汗、排脓生肌、利水消肿、安胎益血等作用。至今, 已从黄芪及其近属近缘植物根、茎、叶、毛状根等部位

收稿日期: 2010-09-30.

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划 (2006BAI09B01-8).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-21-51322108, E-mail: huzhibi@hotmail.com

分离到 150 余种三萜皂苷类化合物, 其中黄芪甲苷为主要成分。现代药理学表明, 黄芪甲苷具有心脏正性肌力、抗病毒性心肌炎、神经保护、抗皮肤表皮细胞衰老等作用。目前, 黄芪甲苷已作为病毒性心肌炎的治疗药物申请国家一类新药, 并已进入 III 期临床试验。

随着人们日益增长的保健观念的强化, 黄芪的需求量将会逐年增加。与此同时黄芪的野生资源逐年减少, 已成为我国二级野生资源保护品种; 而栽培品种品质下降且面临农药污染及重金属残留等问题的困扰, 给临床和成药加工、出口带来一定的困难。尤其当黄芪甲苷一旦成为一类新药, 势必对已紧缺的黄芪资源造成更大的压力。因此, 应用现代生物技术提高黄芪的产量, 改善其品质, 探索工业化生产的可行途径对黄芪的生产具有重要的意义。

已知透明颤菌属 (*Vitreoscilla* sp.) 能合成透明颤菌血红蛋白 (*Vitreoscilla* hemoglobin, VHb) 以适应在贫氧环境生活, 而该蛋白在大肠杆菌中的表达表明, VHb 在细胞处于限氧条件下大量合成, 促进细胞生长, 提高细胞培养密度和蛋白质合成能力。VHb 这一特性在耗氧量大、溶氧易成为限制性因素的基因工程高密度发酵和供氧受限制的植物细胞、毛状根培养过程中具有良好的应用前景。1997 年, 瑞典和瑞士科学家首次成功的将 *vgb* 基因转入植物中, 与对照相比, 转基因烟草种子萌发提前、转基因烟草植株平均干重增加、尼古丁含量提高了 34%^[2]。此后, VHb 又在多种植物中获得表达, 产生了改进植物生长特性^[3-5]、提高植物抗涝能力^[6, 7]、提高植物解毒能力^[8]等方面的生理效应。Wilhelmson 等^[9]将 *vgb* 基因转入黑莨菪 (*Hyoscyamus muticus*) 毛状根中, 毛状根平均干重较对照增加 18%, 莨菪碱含量较对照提高 22%。本文将 *vgb* 基因转入黄芪毛状根, 研究 VHb 对黄芪毛状根次生代谢水平和植物生长的影响, 以期通过基因工程技术提高黄芪有效成分含量。

材料与方法

菌株、质粒、基因及植物材料 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) LBA9402、含辅助载体 pRK2013 的大肠杆菌 DH5 α 、中间表达载体 pBI121 由本室保存。*vgb* (序列与 GenBank 发表的基因序列登录号 YP696633 一致) 由中国科学院上海生物工程研究中心杨胜利院士惠赠。膜荚黄芪无菌苗和非转基因黄芪毛状根由本室保种。

试剂和仪器 内切酶 *Xba* I、*Sac* I、*Hind* III 为 TaKaRa 产品; T4 DNA 连接酶为 Promega 产品; Taq 酶、引物合成及序列测序 (上海生物工程技术有限公司); 卡那霉素、利福平、头孢噻肟均为 Sigma 公司产品; 黄芪甲苷 (中国药品生物制品检验所); 乙腈 (Sigma, 色谱纯); 其他试剂为国产分析纯。

Hoefler HE 99X 型电泳系统 (Amersham Pharmacia Biotech); ImageMaster VDS 凝胶成像分析系统 (Amersham Pharmacia Biotech); 液相色谱仪 (美国惠普 HP1100), 蒸发光散射检测仪 (PL-ELS1000), HP 化学工作站。

植物表达载体 pBI121-*vgb* 的构建 设计一对特异性引物 P1 和 P2, 用于扩增 pBI121-*vgb* 载体构建所需要的 *vgb* 基因, 引物中引入 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点, P1: 5'-AATCTAGATGTTAGACCAGCAAACC-3' (*Xba* I); P2: 5'-AAGAGCTCATTCAACCGCTTGAGC-3' (*Sac* I)。以 *vgb* 基因为模板, 模板 1 μ L, 5 μ mol \cdot L⁻¹ 引物各 2 μ L, 10 \times 缓冲液 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol \cdot L⁻¹) 1.6 μ L, dNTPs (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L, Taq (5 U \cdot μ L⁻¹) 0.3 μ L, ddH₂O 10.6 μ L。PCR 循环条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后回收片段。用 *Xba* I 和 *Sac* I 分别酶切回收片段和质粒 pBI121, 双酶切得到的片段经 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜, 转化至感受态 *E. coli* DH5 α , 以卡那霉素为筛选标记, PCR 方法筛选携带中间载体 pBI121-*vgb* 的大肠杆菌。

转化菌 LBA9402-*vgb* 的获得 发根农杆菌 LBA9402 接种到含有 100 μ g \cdot mL⁻¹ 利福平的 YMB (1 g \cdot L⁻¹ 酵母浸膏、0.2 g \cdot L⁻¹ MgSO₄ \cdot 7H₂O、0.5 g \cdot L⁻¹ K₂HPO₄、0.1 g \cdot L⁻¹ NaCl、10 g \cdot L⁻¹ D-甘露醇, pH 7.0) 固体培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养至单菌落长出, 挑单菌落接种于加 100 μ g \cdot mL⁻¹ 利福平的 YMB 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C、250 r \cdot min⁻¹ 培养 40 h, 按 1% 的接种比例将农杆菌接种于 YMB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C、250 r \cdot min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5, 接种含有辅助载体 pRK2013 的大肠杆菌以及携带中间载体 pBI121-*vgb* 的大肠杆菌于含 50 μ g \cdot mL⁻¹ 卡那霉素固体 LB 培养基上, 37 $^{\circ}$ C、300 r \cdot min⁻¹ 培养过夜, 当单菌落长出后, 分别挑单菌接种于含 50 μ g \cdot mL⁻¹ 卡那霉素液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、300 r \cdot min⁻¹ 培养过夜, 按 1% 的接种比例将辅助菌和含中间载体的细菌接种于 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C、300 r \cdot min⁻¹ 培养至 OD₆₀₀ 为 0.5, 将 3 种菌等体积混匀后, 取 50 μ L 接种于直径 2 cm 的无菌滤纸上,

置于 YMB 固体培养基上, 25 °C 培养 1 天, 用适量无菌水冲洗滤纸片, 收集洗出的菌液, 均匀涂布于含有 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 YMB 固体培养基上, 25 °C 培养 4 天后出现单菌落, 挑单菌落进行 PCR 鉴定, 阳性菌落接种于含有 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 YMB 液体培养基, 28 °C、250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养过夜, 再对菌液提取质粒 DNA 进行 PCR 鉴定, 确定阳性菌 LBA9402-vgb。

转 vgb 基因发根农杆菌 LBA9402-vgb 侵染黄芪无菌苗诱导毛状根 接种发根农杆菌 LBA9402-vgb 在含有 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 YMB 固体培养基上, 28 °C 培养至单菌落长出。挑单菌落接种于加 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 利福平和 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 YMB 液体培养基, 28 °C、250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养约 40 h。按 1% 的接种比例将农杆菌接种于 YMB 液体培养基中, 28 °C、250 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养过夜。加适量乙酰丁香酮至终浓度 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 再培养 1 天。无菌条件下, 切取黄芪无菌苗的茎和叶片, 叶圆盘法对茎和子叶进行创伤, 用发根农杆菌 LBA9402-vgb 菌液侵染 5 min, 然后转移至 MSOH (去除 NH_4NO_3 的 MS 培养基, 添加 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 水解酪蛋白和 3% 蔗糖, pH 5.8) 固体培养基, 25 °C 黑暗条件下培养 2 天。无菌水洗涤外植体 4~5 次后, 转移至含 500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢噻肟的固体 MSOH 培养基, 25 °C 黑暗条件下培养诱导产生毛状根。

对转 vgb 基因黄芪毛状根 PCR 分析 CTAB 法^[10] 提取黄芪无菌苗、非转基因黄芪毛状根、转 vgb 基因黄芪毛状根总 DNA, 以 pBI121-vgb 质粒为阳性对照, 黄芪无菌苗和非转基因黄芪毛状根为阴性对照, 以总 DNA 为模板, P1 和 P2 为引物, 进行 PCR。取 5 μL PCR 反应产物, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

Southern blot 分析 CTAB 法提取黄芪无菌苗、非转基因黄芪毛状根及转基因黄芪毛状根总 DNA 各 10 μg , 用 *Hind* III 和 *Sac* I 双酶切总 DNA, 酶切完全后, 酶切产物用酚-氯仿 (1:1) 抽提两次, 取上清液, 用氯仿-异戊醇 (24:1) 抽提 1 次, 加 1/10 体积 NaOAc (3 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 5.2), 两体积无水乙醇在 20 °C 醇沉 2 h, 12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 弃上清液, 沉淀用 70% 乙醇洗涤两次, 室温晾干, 加 30 μL ddH₂O 溶解, 琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果, 核酸蛋白分析仪分析浓度。制 1% 琼脂糖凝胶, 酶切产物加 6×Loading buffer 上样, 以 vgb PCR 产物和 pBI121-vgb *Hind* III 和 *Sac* I 双酶切产物为阳性对照, 进行电泳。转模、杂交及检测参照 ECL direct nucleic acid labelling and

detection system (Amersham-Pharmacia Biotech) 试剂盒说明进行。

RT-PCR 鉴定 总 RNA 提取方法参照异硫氰酸胍法^[11]。cDNA 第一条链的合成: 向 RNase-free 的 20 μL PCR 反应管中分别加入 3.0 μg 非转基因和转基因黄芪毛状根的总 RNA, RNasin (RNA 酶抑制剂 40 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , Oligo (dT)₁₈ (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4.0 μL , 加 RNase-free 水至总体积 13.5 μL ; 68 °C 水浴 5 min, 降温至 30 °C, 保温 5 min, 最后降温至 0 °C, 保温 5 min; 再加入 5×反转录反应缓冲液 4.0 μL , dNTPs (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2.0 μL , M-MLV 反转录酶 0.5 μL , 混匀, 离心 5 s, 37 °C 水浴 1 h, 然后立即冰浴。PCR 反应合成 ds cDNA: 以反转录反应的产物为模板, 建立 20 μL PCR 反应体系, 引物 P1、P2 各 2 μL , 10×缓冲液 2 μL , MgCl_2 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 1.6 μL , dNTPs (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL , Taq (5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.3 μL , cDNA 第一链混合液 1 μL , ddH₂O 10.6 μL ; PCR 循环条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应结束后, 取 4 μL PCR 反应产物, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

转 vgb 基因黄芪毛状根生长量测定 取白嫩的黄芪毛状根接入 100 mL 液体 MSOH 培养液中, 接种量为 1±0.05 $\text{g}\cdot(100\text{ mL})^{-1}$ 。然后将其置于 100 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速的摇床, 25 °C 黑暗振荡培养。每个株系接种 3 瓶。第 15 天收获, 测定鲜重、干重。比较生长量 (按干重计算)。鲜重 (FW): 用滤纸吸干黄芪毛状根表面的培养基后称得的重量。干重 (DW): 培养所得黄芪毛状根经冷冻干燥后称得的重量。增长倍数 = (收获鲜重量 - 接种量) / 接种量。

转 vgb 基因黄芪毛状根黄芪甲苷含量测定 分别将转 vgb 基因黄芪毛状根、非转基因黄芪毛状根、山西产膜荚黄芪 3 种干燥样品粉碎, 过 80 目筛, 每组称取 3 份, 每份 0.300 g, 加 80% 的甲醇溶液 10 mL, 浸泡过夜, 80 °C 超声提取 3 次, 每次 30 min。蒸干甲醇提取液, 残渣加水 10 mL 溶解, 以 10 mL 水饱和正丁醇萃取 3 次, 合并正丁醇液, 用 0.15% (w/v) NaOH 溶液洗涤, 收集正丁醇液。蒸干正丁醇, 残渣用甲醇溶解定容至 2 mL, 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得样品溶液, 进适当体积的样品液, 测定峰面积, 外标法计算黄芪甲苷含量。液相条件如下: Inertsil ODS-3 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 乙腈-水 (35:65) 流动相; 流速: 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温 30 °C; ELSD 参数分别为, 蒸发温度: 80 °C, 雾化温度: 60 °C, 出口温度: 50 °C; 载气流速: 1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

TLC 定性分析 样品溶液的制备方法与转基因黄芪毛状根含量测定相同, 以黄芪甲苷为对照品, 在硅胶板 60F₂₅₄ (Merck) 点样, 展开剂为氯仿-乙酸乙酯-甲醇-水 (20 : 40 : 22 : 10), 10 °C 以下放置后的下层溶液; 展开方式为展开箱用展开剂预平衡 15 min, 上行展开; 展距: 14 cm; 显色条件为喷以硫酸乙醇溶液 (1 : 10), 105 °C 加热数分钟, 至斑点显色清晰, 置日光灯和紫外灯 (366 nm) 下检视^[12]。

结果

1 植物表达载体 pBI121-vgb 的构建

以 *vgb* 基因为模板, 用引物 P1 和 P2 进行 PCR 扩增, 得到 454 bp 的片段, PCR 产物和 pBI121 分别进行 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切。将双酶切并回收纯化的 pBI121 载体与 454 bp 目的片段酶连, 得到植物表达载体 pBI121-*vgb*。植物表达载体的构建示意图见图 1。用 P1 和 P2 引物进行序列测序表明与 *vgb* 基因序列相同, 表明植物表达载体 pBI121-*vgb* 与预期结果一致。

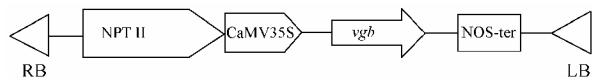


Figure 1 Structure of plant expression vector pBI121-*vgb*: *vgb* gene coding for VHb

2 转 vgb 基因黄芪毛状根鉴定

以转基因黄芪毛状根基因组 DNA 为模板进行 PCR 检测, 得到 450 bp 片段, 与阳性对照 pBI121-*vgb* 扩增出的片段大小一致, 而阴性对照非转基因黄芪毛状根未扩增出对应条带, 证实 *vgb* 基因已经转入黄芪毛状根。部分转基因黄芪毛状根的 PCR 结果如图 2 所示。结果 83 个毛状根株系中有 54 个株系扩增出目的条带, 阳性率达 65%。

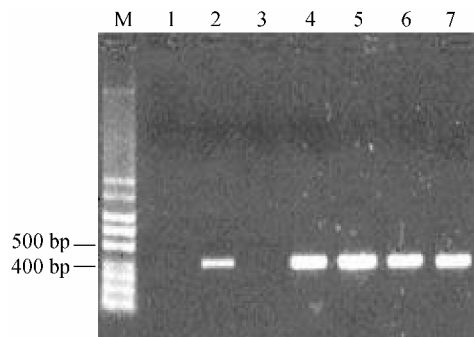


Figure 2 PCR analysis of *vgb*-transgenic hairy roots of *A. membranaceus*. M: 100 bp DNA Ladder; Lane 1: ddH₂O; Lane 2: pBI121-*vgb*; Lane 3: Non-transgenic hairy root; Lane 4 to Lane 7: *vgb*-transgenic hairy roots

为了检测 *vgb* 基因在转基因黄芪毛状根基因组中的整合情况, 对转基因黄芪毛状根基因组 DNA 进行 *Hind* III 和 *Sac* I 双酶切, 以 *vgb* 基因标记探针, 进行 Southern 印迹杂交, Southern 杂交结果如图 3 所示, 转基因黄芪毛状根和阳性质粒中都具有 1.3 kb 的目的条带即包含 CaMV35S 启动子 (834 bp) 和 *vgb* (450 bp) 两个片段, 而非转基因黄芪毛状根无对应条带, 证实 *vgb* 基因整合进了转基因毛状根基因组中。

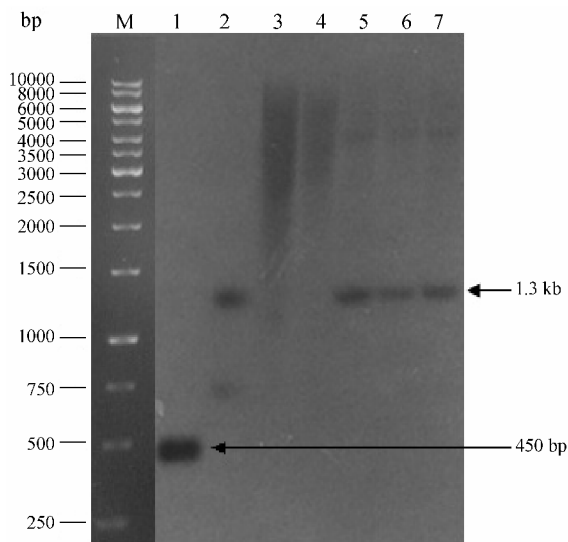


Figure 3 Southern blot analysis of *vgb*-transgenic hairy roots. M: 10 kb DNA Ladder; Lane 1: PCR production of pBI121-*vgb*; Lane 2: Restriction production of pBI121-*vgb*; Lane 3: Restriction production of the sterile plant of *A. membranaceus*; Lane 4: Restriction production of non-transgenic hairy root; Lane 5 to Lane 7: Restriction production of *vgb*-transgenic hairy roots

为了检测 *vgb* 基因在转基因黄芪毛状根中的转录表达, 以整合了 *vgb* 基因的黄芪毛状根总 RNA 为模板经反转录后进行 RT-PCR, 转基因黄芪毛状根均扩增出一条 450 bp 特征条带, 而非转基因黄芪毛状根没有扩增出对应条带, 表明转基因黄芪毛状根中 *vgb* 转基因已成功转录 mRNA, 并得到表达 (图 4)。

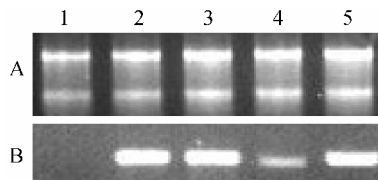


Figure 4 RT-PCR analysis of *vgb*-transgenic hairy roots. A: Total RNA; B: Production of RT-PCR; Lane 1: Non-transgenic hairy root; Lane 2 to Lane 5: *vgb*-transgenic hairy roots

3 转 vgb 基因黄芪毛状根生长量测定

非转基因黄芪毛状根及转基因黄芪毛状根接种

到 MSOH 液体培养基中, 第 15 天收取材料, 称鲜重, 冷冻干燥, 称干重, 计算增长倍数。转 *vgb* 基因黄芪毛状根平均干重比非转基因黄芪毛状根增加了 13%~25%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 转基因黄芪毛状根的增长倍数也比非转基因要高, 差异不具有统计学意义 (图 5)。

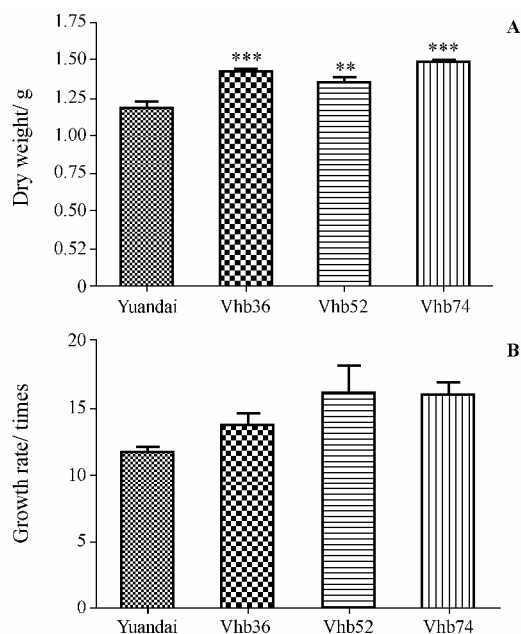


Figure 5 Dry weight and growth rate of hairy roots. Yuandai: Non-transgenic hairy root; Vhb36, Vhb52, Vhb74: Different lines of *vgb*-transgenic hairy roots; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs yuandai

4 转 *vgb* 黄芪毛状根黄芪甲苷含量测定和 TLC 检测

经 ELSD-HPLC 法测定黄芪甲苷含量, 转 *vgb* 基因黄芪毛状根中黄芪甲苷含量为非转基因黄芪毛状根含量的 5~6 倍, 为山西产黄芪药材含量的 10~12 倍 (图 6)。

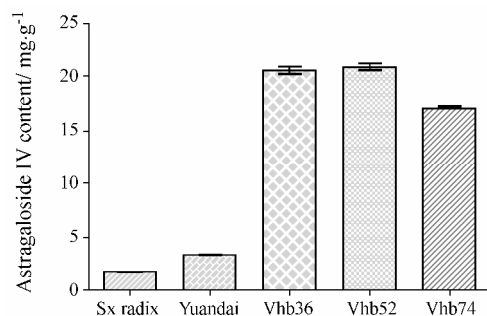


Figure 6 Results of astragaloside IV content. Sx radix: Radix Astragali from Shanxi Province; Yuandai: Non-transgenic hairy root; Vhb36, Vhb52, Vhb74: Different lines of *vgb*-transgenic hairy roots

在黄芪药材、非转基因黄芪毛状根、转 *vgb* 基因黄芪毛状根样品制备前取样量相同而 TLC 上样量不一样的情况下, 在温度 17.5 °C、湿度 50% 的条件下, 进行 TLC 展开, 硫酸乙醇溶液 (1:10) 显色后, 在与对照品色谱相应的位置上, 日光下显棕褐色斑点; 紫外光灯 (366 nm) 下显橙黄色荧光斑点 (图 7)。

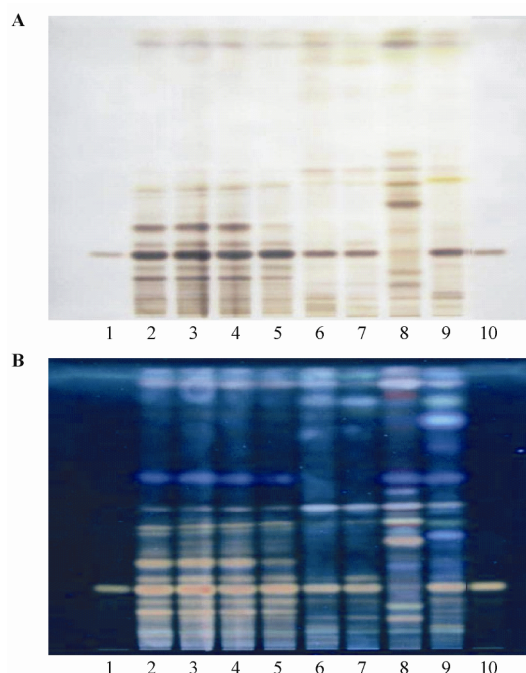


Figure 7 TLC identification of the astragalosides of hairy roots. A: Plate of merck, visual; B: Plate of merck, UV 366 nm; 1, 10: Astragaloside IV; 2-5: *vgb*-transgenic hairy roots (1 μ L); 6: Radix Astragali (Shanxi Province) (4 μ L); 7: Radix Astragali (Chongming, Shanghai) (4 μ L); 8: Sterile plant of *A. membranaceus* (5 μ L); 9: Non-transgenic hairy root (2 μ L)

讨论

转 *vgb* 基因黄芪毛状根平均干重比非转基因黄芪毛状根增加了 13%~25%, 差异具有统计学意义, 而增长倍数表现为增加但无统计学意义, 这可能与测定毛状根鲜重操作过程中存在误差大有关。植物细胞中增加氧或提高氧的利用率可以改善植物对缺氧的抵抗能力。透明颤菌在限氧条件下大量合成 VHB 并提高氧的利用率使细菌能够在限氧条件下很好的生存。毛状根培养过程中缺氧是主要制约因素之一, 同期培养后, 转 *vgb* 基因黄芪毛状根白嫩、粗壮、长势很好, 而非转基因黄芪毛状根同期相比, 根颜色偏黄, 较纤细。同样的结果在矮牵牛^[7]中得到验证, 转 *vgb* 矮牵牛在水培条件下比非转基因对照生长更好, VHB 使植株在缺氧条件下提高氧的转运效率。

TLC 结果 (图 7) 显示转 *vgb* 基因黄芪毛状根黄

芪皂苷成分较非转基因黄芪毛状根及黄芪药材斑点多,且转 *vgb* 基因黄芪毛状根 TLC 图谱更相似。作者认为多出的斑点为黄芪皂苷类成分,在转基因黄芪毛状根中得到了大量积累,而在非转基因黄芪毛状根和黄芪药材中因积累量低而不清晰或看不到。同时,不同株系转 *vgb* 基因黄芪毛状根表现了相同的作用结果,均提高了黄芪皂苷类成分的含量,因此转 *vgb* 基因黄芪毛状根 TLC 图谱更相似。

转入 *vgb* 基因,黄芪毛状根生长加速,次生代谢产物累积加快,作者认为 VHb 能够加速黄芪甲苷的生物合成。这同在烟草中表达 VHb 蛋白结果相似,增加了某些代谢产物并提高了生长量。Bailey 等^[2]构建的表达载体经由根瘤农杆菌转入烟草中,实验表明,转基因烟草由于 VHb 蛋白表达平均干重比对照提高了 80%~100%;发芽时间从野生型的 6~8 天提前为 3~4 天;开花时间也提前了 3~5 天。同时转基因烟草比对照要多合成 30%~40% 的叶绿素 II;次生代谢产物尼古丁产量要多 34%。

中国药典规定黄芪药材中黄芪甲苷含量不得少于 0.04%^[1],受诸多因素影响,黄芪药材中黄芪甲苷含量为 0.05%~0.23%^[13]。本研究中测得山西产黄芪药材黄芪甲苷含量为 1.77 mg·g⁻¹,非转基因黄芪毛状根黄芪甲苷含量为 3.33 mg·g⁻¹,而转 *vgb* 基因黄芪毛状根黄芪甲苷含量高达 21.00 mg·g⁻¹。本研究提高了黄芪甲苷含量及黄芪毛状根产量,为大规模生产黄芪甲苷提供了一条可行途径,也为提高中药材皂苷类成分提供了一条新思路。

致谢:感谢杜旻和吴晓俊老师对本研究的悉心指导和支持。

References

- [1] China Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2010 ed. Part I. Beijing: China Medical Science Press, 2010: 283-284.
- [2] Holmberg N, Lilius G, Bailey JE, et al. Transgenic tobacco expressing *Vitreoscilla* hemoglobin exhibits growth and altered metabolite production [J]. Nat Biotechnol, 1997, 15: 244-247.
- [3] Cao MX, Huang JQ, Wei ZM, et al. Engineering higher yield and herbicide resistance in rice by *Agrobacterium*-mediated multiple gene transformation [J]. Crop Sci, 2004, 44, 2206-2213.
- [4] Li X, Peng RH, Fan HQ, et al. *Vitreoscilla* hemoglobin overexpression increases submergence tolerance in cabbage [J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 710-715.
- [5] Häggman H, Frey AD, Ryyänen L, et al. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin in hybrid aspen (*Populus tremula* × *tremuloides*) [J]. Plant Biotechnol J, 2003, 1: 287-300.
- [6] Wang ZN, Xiao Y, Chen WS, et al. Functional expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) in *Arabidopsis* relieves submergence, nitrosative, photo-oxidative stress and enhances antioxidants metabolism [J]. Plant Sci, 2009, 176: 66-77.
- [7] Mao ZC, Hu YL, Zhong J, et al. Improvement of the hydroponic growth and waterlogging tolerance of petunias by the introduction of *vhb* gene [J]. Acta Bot Sin (植物学报), 2003, 45: 205-210.
- [8] Frey AD, Farrés J, Bollinger CJ, et al. Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins for alleviation of nitrosative stress in *Escherichia coli* [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68: 4835-4840.
- [9] Wilhelmson A, Kallio PT, Oksman-Caldentey KM, et al. Expression of *Vitreoscilla* hemoglobin enhances growth of *Hyoscyamus muticus* hairy root cultures [J]. Planta Med, 2005, 71: 48-53.
- [10] Csaikl UM, Bastian H, Brettschneider R, et al. Comparative analysis of different DNA extraction protocols: a fast, universal maxi-preparation of high quality plant DNA for genetic evaluation and phylogenetic studies [J]. Plant Mol Biol Rep, 1998, 16: 69-86.
- [11] Yue QX, Zhu DQ, Zhao W, et al. Molecular mechanism of ajmalicine over-production in *Catharanthus Roseus* cell line C_{20hi} [J]. Pharm Biotechnol (药物生物技术), 2008, 15: 157-160.
- [12] Chinese Pharmacopoeia Commission. TLC Atlas of Chinese Crude Drugs in Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典中药薄层色谱彩图集) [S]. Shenzhen: Guangzhou Science and Technology Press, 1993: 66.
- [13] Sun WJ, Xie SC. Natural Medicine Quantitative Analysis (天然药物成分定量分析) [M]. Beijing: Chinese Medicine Science and Technology Press, 2003: 48.