

甘草毛状根培养系统的建立及化学成分分析

杜 旻¹, 向德军¹, 丁家宜¹, 刘 滢²

(1. 中国药科大学组织培养研究室, 江苏 南京 210038; 2. 上海中医药大学中药研究所, 上海 200032)

摘要: 利用发根农杆菌转化甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 外植体获得毛状根, 经 PCR 法检测, 表明已转化成功。应用均匀设计法与比较法, 建立了适合甘草毛状根的培养系统。化学成分分析结果表明, 甘草毛状根含半胱亚磺酸, 不含胱氨酸, 商品甘草却含胱氨酸而不含半胱亚磺酸; 甘草毛状根能合成多种黄酮成分, 其中甘草查尔酮 A 的含量高达干重的 0.18%。

关键词: 甘草; 毛状根; 培养; 化学成分

中图分类号: S567.7*1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0978(2001)01-0007-04

Culture system establishment and chemical constituents analysis of hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. DU Min¹, XIANG De-jun¹, DING Jia-Yi¹, LIU Di² (1. Laboratory of Plant Tissue Culture, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China; 2. Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2001, 10(1): 7-10

Abstract: Hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. were induced with *Agrobacterium rhizogenes* and identified by PCR. Using uniform design method and comparative method, the appropriate culture system of the hairy roots was established. The result of chemical analysis showed that the hairy roots was absent of cystine but contained cysteine sulfinic acid that crude drug of *G. uralensis* was deficient. Some kinds of flavonoid components were analyzed by HPLC; licochalcone A, one of the flavonoids, occupied 0.18% in the dry hairy roots.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.; hairy roots; culture; chemical constituents

甘草 (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) 为我国重要的传统药材, 号称“众药之王”, 有“十方九草”之说。甘草能补脾益气、清热解毒、祛痰止咳, 缓急止痛及调和诸药^[1]。由于野生资源过度采挖, 抚育更新不及时, 造成甘草质量与产量的下降, 给临床使用和中成药制造带来一定的困难。利用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 感染双子叶植物形成的毛状根具有生长迅速、生化性质和遗传性稳定以及易于进行基因操作等特点, 已发展成为继细胞培养后又一有用的培养系统^[2]。本文报道甘草毛状根培养条件的优化及其培养物的化学成分。

1 材料与方法

1.1 毛状根的转化及 PCR 检测

采用 Hu 和 Alfermann 等的方法^[3], 利用发根农杆菌 ATCC15834 (由上海中医药大学胡之璧院士惠赠)、R1000 (由武汉大学孙天恩教授惠赠) 转化甘草

无菌苗幼茎外植体诱导毛状根。根据 Silghtom 等^[4]的 Ri 质粒 T₁-DNA 序列分析结果, 设计 *rolC* 基因的引物: 5'-GATATATGCCAAATTTACTACTAG-3' 和 5'-GTTAACAAAGTAGGAAACAGG-3', (大连宝生物有限公司合成)。4 × dNTP, *Taq* DNA 聚合酶 (Promega 公司), GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Markers (MBI 公司)。植物基因组 DNA 与质粒 DNA 的提取及纯化按文献^[5]进行。在 0.5 mL 硅化离心管中加入 4 × dNTP 4 μL (含 dATP, dGTP, dCTP, dTTP 各 2 mmol/L), 引物各 2 μL (200 nmol/L), *Taq* DNA 聚合酶 1.5 Unit, MgCl₂ 缓冲液 5 μL (150 mg/L), 模板 DNA 2 μL (约 50 ng), 加无菌去离子水至终体积 50 μL, 混匀并离心。在 PCR 仪中 94℃ 变性 10 min, 然后开始 30 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 45s, 45℃ 退火

收稿日期: 2000-04-25

作者简介: 杜 旻 (1973-), 女, 江苏南京人, 硕士, 助理研究员, 主要从事中药生物技术研究。

30 s, 72℃反应 40 s。最后于 72℃延伸 10 min。扩增产物采用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳和 EtBr 染色进行分析^[6]。

1.2 培养系统的建立

无菌条件下,将甘草毛状根生长旺盛的根尖部位切取成 1~1.5 cm 长的小段,无菌滤纸吸去培养基,每瓶接种量保持在 (30 ± 5) mg,分别接种于不同的培养基中。基本培养条件为 25℃ 黑暗悬浮培养,25 d 继代培养 1 次;重复 3 次,每次 10 瓶。以增长倍数和折干率作为衡量生长状况的指标。增长倍数 = (收获量 - 接种量)/接种量,折干率 = (干重/鲜重) × 100%。分别采用 1%~5% 的葡萄糖与蔗糖作为碳源。设计 6 个 pH 值,分别为 pH 5.0、5.4、5.8、6.2、6.6 和 7.0。设计 5 个不同转速,分别为 50、75、100、125 和 150 r/min。采用 MS、B₅ 和 White 3 种基本培养基进行初步筛选,在此基础上,利用均匀设计法^[7],对影响甘草毛状根生长的 6 种化合物: KNO₃、NH₄NO₃、CaCl₂·2H₂O、MgSO₄·7H₂O、NaH₂PO₄·H₂O、KH₂PO₄ 与蔗糖同时进行多因素多水平的筛选,微量元素及有机物采用 B₅ 水平。观察以上因素对甘草毛状根生长的影响。

1.3 氨基酸含量的测定

精密称定适量样品,加 6 mol/L HCl 3 mL,充氮气熔封,于 (100 ± 1) ℃ 水解 22 h,冷却后用 NaOH 中和,定容,稀释至上机浓度。用日立 835-50 型高速氨基酸自动分析仪测定氨基酸的含量,2.6mm × 150mm 标化分析柱,72 min 标化蛋白水解物分析程序,除氨柱 4.0mm × 50mm,柱温 (53 ± 1) ℃,茚三酮显色,双波长比色($\lambda_1 = 520$ nm, $\lambda_2 = 470$ nm)。

1.4 黄酮类化合物含量测定

300 mg 干燥粉末,加 30 mL 甲醇,80℃ 提取 4 h,浓缩,用甲醇定容至 10 mL。RP-HPLC 法定量分析,色谱柱 Lichrosorb RP-18(3mm × 150mm, 5 Micron),流动相为 V(水):V(冰醋酸) = 95:5 和甲醇,流速为 1.0 mL/min,检测波长为 310 nm 和 365 nm。

2 结果与讨论

2.1 甘草毛状根的转化和鉴定

发根农杆菌 ATCC15834 与 R1000 对甘草幼茎的转化率分别为 39.5% 与 21.6%。PCR 检测结果见

图 1。Ri 质粒的 T-DNA 在转化表达过程中,起着非常重要的作用,其中农杆菌型 Ri 质粒 T-DNA 的 T_L 区在转化过程中尤为重要。在没有 T_R 区存在时,单独的 T_L 区甚至部分 T_L 区基因仍然可以转化植物产生毛状根。有研究表明,在 T_L 区上至少存在四个位点(rolA、B、C 和 D)并决定 Ri 质粒对某些植物的致根性^[8]。Capone^[9] 进一步研究表明,当满足外源激素和 rolB 5' 端有一个 1.2 kb 的延长区的情况下,仍可转化产生毛状根。这些研究表明,T_L-DNA 可能是毛状根分化和控制毛状根形态的主要决定者,它给转化细胞提供一种对生长素的反应能力,而 T_R 区编码的生长素或添加的生长素作为一个信号启动转化细胞形成毛状根。在许多文献中,以从毛状根中检测到冠瘿碱作为转化的分子证据,但严格地讲,这并不是最直接的分子证据。现已证明,毛状根特性主要是由 Ri 质粒 T_L-DNA 上的 4 个基因 rolA、B、C 和 D 决定的,而冠瘿碱合成基因存在于 T_R-DNA 上,它们之间有很大的距离^[10],因此不能仅以冠瘿碱合成基因的存在与否而推断诱导毛状根基因是否存在。此外,冠瘿合成酶基因的表达不稳定,有报道指出,随着毛状根继代培养时间的延长,冠瘿碱合成会消失^[11]。据此原因,建议用与毛状根形态发生有关的基因进行检测,才是转化的可靠分子证据。



1: Transformed *G. uralensis* by R1000; 2: Transformed *G. uralensis* by ATCC15834; 3: Untransformed *G. uralensis*; 4: ATCC15834; 5: R1000; 6: Markers

图 1 甘草毛状根 PCR 产物的电泳图谱

Fig. 1 Electrophotogram of PCR products from *Glycyrrhiza uralensis* hairy roots

2.2 培养基的选择

从图 2 可知,适合甘草毛状根生长的碳源为蔗糖,葡萄糖不适合。蔗糖与葡萄糖作为碳源被广泛用于细胞培养中,这是因为二者均能维持较高的增

长倍数,如在人参的组织培养中,应用蔗糖、葡萄糖对生长量的影响不大^[12]。但在毛状根培养中却有不同报道,如 Taya^[13]等发现, *Armorcia rusticana* P. 的毛状根在蔗糖培养基上增长倍数高,而在葡萄糖培养基上增长倍数低;Uozumi^[14]等也指出在蔗糖培养基上胡萝卜 (*Daucus catota* L.) 的毛状根增长倍数高,在葡萄糖培养基上增长倍数低,这与本实验的结果类似。甘草毛状根生长的最适 pH 为 6.2 左右(灭菌前)(图 3),最佳转速为 100 r/min(图 4)。利用均匀设计法筛选 6 种大量元素及蔗糖浓度的结果为:

KNO₃ 50 mg/L, NH₄NO₃ 0 mg/L, CaCl₂·2H₂O 100 mg/L, NaH₂PO₄·H₂O 0 mg/L, KH₂PO₄ 0~225 mg/L, 蔗糖 32.5 g/L, MgSO₄·7H₂O 640 mg/L, 此时的增长倍数为 55.19,明显高于基本培养基 B₅(34.71)与 MS(29.19)。综合上述实验结果,甘草毛状根的最佳培养条件是:50 mg/L KNO₃, 100 mg/L CaCl₂·2H₂O, 0~225 mg/L KH₂PO₄, 640 mg/L MgSO₄·7H₂O, 微量元素及有机物采用 B₅水平, 32.5 g/L 蔗糖, 转速 100 r/min, pH 6.2。

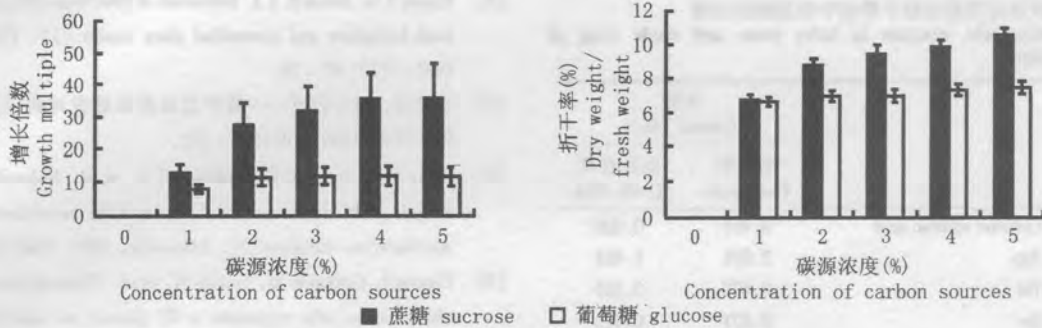


图 2 不同碳源及碳源浓度对甘草毛状根生长的影响

Fig. 2 Effects of different carbon sources and its concentration on the growth of hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis*

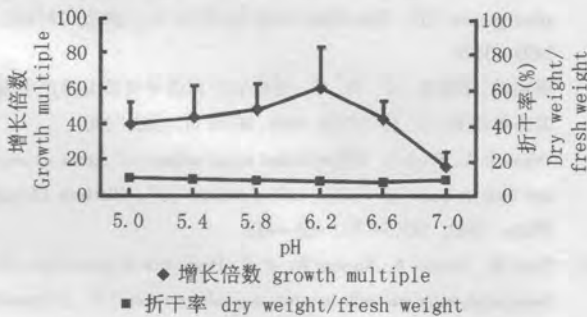


图 3 不同 pH 值对甘草毛状根生长的影响
Fig. 3 Effect of different pH on the growth of hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis*

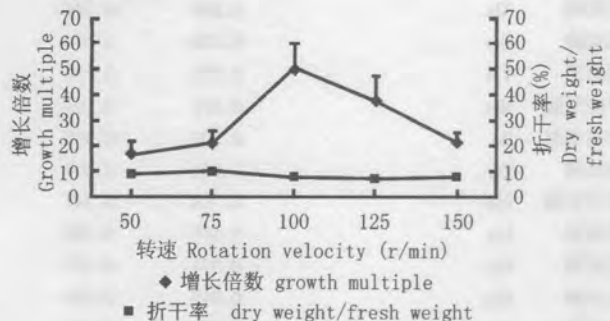


图 4 不同转速对甘草毛状根生长的影响
Fig. 4 Effect of different rotation velocity on the growth of hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis*

2.3 甘草毛状根与商品甘草中氨基酸含量的比较

由表 1 可知,最佳培养条件下产生的甘草毛状根中含有商品甘草中没有的半胱亚磺酸,商品甘草中含有胱氨酸而在甘草毛状根中没有检测到。甘草毛状根中除个别氨基酸(鸟氨酸)的含量略低于商品甘草外,其余氨基酸的含量均高于商品甘草。就氨基酸含量而言,甘草毛状根的品质优于商品甘草。

2.4 甘草毛状根与商品甘草中黄酮含量的比较

最佳培养条件下产生的甘草毛状根和商品甘草中均含有甘草甙、异甘草甙、甘草素、异甘草素和甘

草查尔酮 A 等 5 类黄酮类物质。但是,在商品甘草中,甘草甙的含量较高,而甘草查尔酮 A 的含量较低;在甘草毛状根中,甘草查尔酮 A 的含量却相对较高,可达干重的 0.18% 以上(表 2)。这可能是因为在离体培养条件下,催化甘草查尔酮 A 形成的甲基转移酶活性增强的缘故。这也从一个侧面说明:离体培养与天然培养相比,由于酶性发生变化,致使次生代谢途径发生改变,朝着有利于合成目的化合物的方向进行,有助于含量的提高。Ayabe^[15]等在皮刺甘草 (*G. echinata*) 悬浮培养细胞中添加酵母提取物,

能使 4,4'-二羟基-2-甲氧基查尔酮(echinatin)的含量提高数倍,同时甲基转移酶的活性也明显增强;他们将细胞固定化后,也得到了相似的结果。目前对甘草黄酮的研究正越来越受到重视,迄今为止已从该属植物中分离出 61 个黄酮类化合物,其中甙元 46 个(另有一个以甙的形式分离到的甙元——芹菜素),分属 10 种类型^[16]。研究还发现,最佳培养条件下产生的甘草毛状根与商品甘草有着相同的清除自由基、抗氧化和保肝等药理活性^[17],是值得进一步研究和开发利用的人工新资源。

表 1 甘草毛状根与商品甘草干燥根中氨基酸的含量
Table 1 Amino acid contents in hairy roots and crude drug of *Glycyrrhiza uralensis*

氨基酸种类 Amino acid		含量 Content (%)	
		毛状根 Hairy roots	商品甘草 Crude drug
半胱亚磺酸	Cysteine sulfinic acid	0.191	0.000
天冬氨酸	Asp	3.891	1.431
苏氨酸	Thr	0.629	0.353
丝氨酸	Ser	0.871	0.412
谷氨酸	Glut	1.724	0.692
脯氨酸	Pro	1.625	1.167
甘氨酸	Gly	0.606	0.301
丙氨酸	Ala	0.859	0.344
胱氨酸	Cys	0.000	0.073
缬氨酸	Val	0.955	0.438
甲硫氨酸	Met	0.291	0.108
异亮氨酸	Ile	0.707	0.335
酪氨酸	Tyr	1.064	0.489
苯丙氨酸	Phe	0.708	0.347
赖氨酸	Lys	1.111	0.449
组氨酸	His	0.374	0.273
鸟氨酸	Orn	0.015	0.019
精氨酸	Arg	0.753	0.606
氨基丁酸	GABA	0.101	0.030
色氨酸	Trp	0.309	0.169

表 2 甘草毛状根中黄酮类物质的含量
Table 2 Flavonoid contents in hairy roots of *Glycyrrhiza uralensis*

样品 Samples	黄酮含量 Flavonoid content (%) ¹⁾				
	A	B	C	D	合计 Total
毛状根 Hairy roots	0.016 3	0.001 7	0.192 0	0.184 7	0.393 7
愈伤组织 Callus	0.017 3	0.012 7	1.001 3	0.000 0	1.031 3
商品甘草 Crude drug	0.434 5	0.174 5	0.148 1	0.048 5	0.805 6

¹⁾A: 甘草甙 liquiritin; B: 异甘草甙 isoliquiritin; C: 甘草素 + 异甘草素 liquiritigenin + isoliquiritigenin; D: 甘草查尔酮 A licochalcone A

参考文献

九五年版(一部)[M]. 北京:人民卫生出版社,1995. 71.

[2] Toivonen L. Utilization of hairy root cultures for production of secondary metabolites [J]. Biotechnol Prog, 1993, 9(1): 12-20.

[3] Hu Z B, Alfermann A W. Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* [J]. Phytochemistry, 1993, 32(3): 699-703.

[4] Slightom J L, Purand-Tardif M, Jouanin L, et al. Nucleotide sequence analysis of T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine-type plasmid: Identification of open reading frames [J]. J Biol Chem, 1986, 261(1):108-121.

[5] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1996. 16-34, 627-693.

[6] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues [J]. Plant Mol Biol, 1985, 5(2): 67-76.

[7] 方开泰. 均匀设计——数学方法在实验设计的应用[J]. 应用数学学报, 1985, 3(4): 367-372.

[8] White F F, Taylor B H, Huffman G A, et al. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* [J]. J Bacteriol, 1985, 164(1): 33-44.

[9] Capone I, Cardarelli M, Trovato M, et al. Upstream non-coding region which confers polar expression to Ri plasmid root inducing gene *rolB* [J]. Mol Gen Genet, 1989, 216(2-3): 239-244.

[10] White F F, Ghidossi G, Gordon M P, et al. Tumor induction by *Agrobacterium rhizogenes* involves the transfer of plasmid DNA to the plant genome [J]. Proc Natl Acad Sci U. S. A., 1982, 79(10): 3193-3197.

[11] 秦明波, 李国珍, 云月, 等. 发根农杆菌诱导青蒿发根产生及其离体培养[J]. 植物学报, 1994, 36(增刊): 165-170.

[12] Odnevall A, Bjork L. Differentiated tissue cultures of *Panax ginseng* and their response to various carbon sources [J]. Biochem Physiol Pflanz, 1989, 185(5-6): 403-413.

[13] Taya M, Yoyama A, Nomura R, et al. Production of peroxidase with horseradish hairy root cells in a two step culture system [J]. J Ferment Bioeng, 1989, 67(1): 31-34.

[14] Uozumi N, Makino S, Kobayashi T. 20-Hydroxyecdysone production in *Ajuga* hairy root controlling intracellular phosphate content based on kinetic model [J]. J Ferment Bioeng, 1995, 80: 362-368.

[15] Ayabe S, Udagawa A, Lida K, et al. Studies on plant tissue cultures. Part 47. Regulation of retrochalcone biosynthesis: activity changes of O-methyltransferases in the yeast extract-induced *Glycyrrhiza echinata* cells [J]. Plant Cell Rep, 1987, 6(1): 16-19.

[16] 刘勒, 刘永隆. 甘草属植物中黄酮类成分的研究概况[J]. 中国药学杂志, 1989, 24(12): 705-709.

[17] 杜旻, 刘峻, 丁家宜, 等. 甘草毛状根体内抗氧化能力的测定[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(4): 1-4.

(责任编辑: 惠红)

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典一九