

29 种鲜花提取液对羟自由基的清除作用*

许申鸿 杭 瑚

(青岛大学化学系, 青岛 266071)

Scavenging effects of fresh flower extracts of 29 plant species to $\cdot\text{OH}$ radical Xu Shenhong, Hang Hu (Department of Chemistry, Qingdao University, Qingdao 266071), *J. Plant Resour. & Environ.* 1999, 8(3): 59~60

The scavenging effects of the fresh flower extracts of 29 plant species on hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) are reported. The stronger anti- $\cdot\text{OH}$ activity of *Pelargonium hortorum* Bailey etc. has been found. It is worthy to be further researched.

关键词 羟自由基($\cdot\text{OH}$); 清除作用; 鲜花

Key words hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$); scavenging effect; fresh flower

在生命活动的氧化代谢过程中不断产生各种自由基^[1]。这些自由基与机体的许多功能障碍和疾病的发生密切相关。羟自由基($\cdot\text{OH}$)对机体具有强大的破坏力,还与衰老、肿瘤、辐射损伤及细胞吞噬等有关。所以研究物质对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用,具有重要意义。本文用化学发光法测定 29 种鲜花提取液对 $\cdot\text{OH}$ 的清除作用,从清除自由基的角度阐明了它们的药理作用。

1 材料与 方法

1.1 仪器、试剂和样品

OX-7 型化学发光分析仪(Tohoku Electronic Industrial Co. Ltd., Japan), pH-2 型数字酸度计(上海第二分析仪器厂)。抗坏血酸、 CuSO_4 、 H_2O_2 、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、硫脲(均为国产分析纯)、干酵母(河北马利食品有限公司)、特丁基对苯二酚(TBHQ, 法国罗地亚公司, 食品级)。供试样品为天竺葵等 29 种鲜花(见表 1)。将整朵摘下的鲜花花瓣及花粉分别置于研钵中磨碎,准确称取一定量(花瓣 0.850 0 g, 花粉 0.017 0 g)置于具塞试管中,加入 10 mL 溶剂浸提 4 h,以 3 000 r/min 离心 10 min,弃沉淀物,上清液定容至 10 mL,即为鲜花浸提液。整个操作均于室温下进行。

1.2 抗坏血酸- Cu^{2+} - H_2O_2 -酵母发光体系的测定方法

参照文献[2]的方法,向高 12 mm 直径 44 mm 的不锈钢样品池中依次加入 1.8 mmol/L 抗坏血酸 0.2 mL, 1.8 mmol/L CuSO_4 0.4 mL, 75 mg/mL 酵母 0.2 mL, 33.3 mmol/L H_2O_2 0.6 mL, 样品浸提液 0.6 mL (空白实验以等体积的样品提取溶剂代替),总体积为 2.0 mL。上述试剂加样时分别放于样品池的不同部位,彼此间不接触,测前快速混匀立即上机测定。快门 1 s,测定时间 200 s,温度 30℃。每个样品平行测 3 次,取峰值平均值进行定量。

$$\text{清除率} \% = \frac{(\text{空白峰值} - \text{本底}) - (\text{样品 50 s 处发光强度} - \text{本底})}{(\text{空白峰值} - \text{本底})} \times 100 \%$$

* 山东省自然科学基金资助课题(Y98DQ2050)

98 届毕业生宋华参与大部分实验。

许申鸿:女,1959 年 4 月生,副教授,主要从事有机化学研究。

收稿日期:1998-11-09

2 结果与讨论

2.1 29种鲜花浸提液对·OH的清除作用

29种鲜花对·OH的清除率见表1。可以看出,多数鲜花具有抗氧化活性,其中天竺葵、春兰、仙客来、万寿菊等花瓣浸提液具有较强的清除·OH活性,值得进一步研究。

表1 29种鲜花浸提液对·OH的清除率

Tab 1 The scavenging rates of fresh flower extracts of 29 plant species

植物名称 Species	清除率(%) Scavenging rate		植物名称 Species	清除率(%) Scavenging rate	
	花瓣 Petal	花粉 Pollen		花瓣 Petal	花粉 Pollen
天竺葵 <i>Pelargonium hortorum</i> Bailey	88.39	53.98	仙客来 <i>Cyclamen persicum</i> Mill	76.12	
令箭荷花 <i>Nopalxochia ackermannii</i> (Haw.) F. M. Kunth	49.44	15.03	春兰 <i>Cymbidium goeringii</i> (Rchb. f.) Rchb. f.	78.31	
大花天竺葵 <i>Pelargonium domesticum</i> Bailey	86.50	51.34	铁海棠 <i>Euphorbia milii</i> Ch. des Moulins	63.24	
马蹄莲 <i>Zantedeschia aethiopica</i> (L.) Spreng	49.16		杜鹃花 <i>Rhododendron simsii</i> Planch.	29.30	
万寿菊 <i>Tagetes erecta</i> L.	73.77		蔷薇 <i>Rosa multiflora</i> Thunb. (white)	37.76	
蟹爪 <i>Zygocactus truncatus</i> K. Schum.	62.93		蔷薇 <i>Rosa multiflora</i> Thunb. (pink)	40.20	
君子兰 <i>Clivia miniata</i> Regel	26.98	13.78	蔷薇 <i>Rosa multiflora</i> Thunb. (red)	39.48	
山茶 <i>Camellia japonica</i> L.	26.35	37.45	虞美人 <i>Papaver rhoeas</i> L.	30.28	
裂叶牵牛 <i>Pharbitis nil</i> (L.) Choisy (violet)	25.32	36.22	蒲公英 <i>Taraxacum mongolicum</i> Hand. -Mazz.	54.62	
月季 <i>Rosa chinensis</i> Jacq. (yellow)	48.11		马兰 <i>Kalimeris indica</i> (L.) Sch. -Bip.	52.16	
月季 <i>Rosa chinensis</i> Jacq. (vermillion)	43.42		羊蹄 <i>Rumex japonicus</i> Houtt.	53.21	
月季 <i>Rosa chinensis</i> Jacq. (red)	40.21		北美独行菜 <i>Lepidium virginicum</i> L.	48.24	
月季 <i>Rosa chinensis</i> Jacq. (white)	44.32		藜(灰菜) <i>Chenopodium album</i> L.	50.06	
月季 <i>Rosa chinensis</i> Jacq. (pink)	56.64		景天 <i>Sedum erythrospermum</i> Hayata	35.66	
香水月季 <i>Rosa odorata</i> (Andr.) Sweet	41.60		紫穗槐 <i>Amorpha fruticosa</i> L.	31.18	
齿缘苦苣菜 <i>Ixeris dentata</i> (Thunb.) Nakai	55.67		朱顶兰 <i>Amaryllis vittata</i> Ait.		37.2
一串红 <i>Salvia splendens</i> Ker. -Gawl.	<0		紫罗兰 <i>Matthiola incana</i> (L.) R. Br.	31.60	
玻璃秋海棠 <i>Begonia evansiana</i> Andr	<0				

2.2 抗氧化效力评价

硫脲是一种有效的·OH清除剂,特丁基对苯二酚(TBHQ)是现今食品业广为应用的合成抗氧化剂。将天竺葵、仙客来、铁海棠和春兰的花瓣水提液的 IC_{50} (清除50%·OH所需样品用量)与这两种物质进行比较,结果(见表2)表明4种花卉都有较强的抗氧化效力。

我国花卉资源品种繁多,研究鲜花的抗氧化作用,对综合利用花卉资源,具有重要意义。

表2 4种鲜花花瓣水提液与硫脲和特丁基对苯二酚抗氧化效力的比较

Tab 2 Comparison of IC_{50} among the fresh petal extract of 4 species and thiourea and TBHQ

样品 Sample	含水量(%) Water content	IC_{50} (g/mL) ¹⁾
硫脲 Thiourea		7.6×10^{-6}
特丁基对苯二酚 TBHQ		6.9×10^{-5}
天竺葵 <i>Pelargonium hortorum</i>	92.00	1.8×10^{-6}
仙客来 <i>Cyclamen persicum</i>	91.54	1.4×10^{-5}
铁海棠 <i>Euphorbia milii</i>	82.12	2.5×10^{-5}
春兰 <i>Cymbidium goeringii</i>	87.88	1.2×10^{-5}

¹⁾折合干品量 convert into the amount of dry samples

参 考 文 献

- 1 莫 简主编. 医用自由基生物学导论. 北京:人民卫生出版社,1989. 21~25.
- 2 陈季武,胡天喜. 测定·OH产生与清除的化学发光体系. 生物化学与生物物理进展,1992,19(2):136.

用 PDS-1000/He 型基因枪将外源基因质粒 pZFX₂ 导入小麦细胞的研究*

曾黎琼 程在全 段玉云 寸守铤

徐增富

(云南省农业科学院生物技术研究所, 昆明 650223)

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

Study on introduction of foreign NPT II gene into cells of wheat Zeng Liqiong, Cheng Zaiquan, Dun Yuyun, Cun Shouxian (Biotechnology Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223), Xu Zengfu (Biotechnological Center, Sunyatsen University, Guangzhou 510275), *J. Plant Resour. & Environ.* 1999, 8(3): 61~63

Foreign NPT II gene was introduced into calli and mature embryos of wheat strains 922-267, 942-114 and 953-1575 by using PDS-1000/He particle delivery system. Plasmid pZFX₂ contains the NPT II (neomycin phosphotransferase) and glycolate oxidase gene which can increase the wheat plant resistance to insects. After selection culture based on MS medium containing 100 µg/mL Kanamycin, resistant calli were selected. Green plants were regenerated from part of resistant calli. Through this test, we found that the optimum pressure of bombarding calli was 1 100 psi. Using this pressure, more resistant calli were obtained. Mature embryos were bombarded at pressure of 1 300 psi. It is worth to notice that the green plants derived from transformed mature embryos were easier than those from transformed calli.

关键词 基因枪; 小麦; 成熟胚; 胚性愈伤组织; 基因转化

Key words particle bombardment; wheat; mature embryos; calli; gene transformation

小麦是世界上分布广、种植面积大的粮食作物,选育高产、优质、抗病等优良性状的小麦新品种具有重要的意义。近年来,随着植物遗传转化技术的不断完善,小麦的遗传转化也取得较大突破,先后采用基因枪法、花粉介导法、PEG法和激光穿刺法等,将NPT II、Bar、GUS等基因导入小麦细胞中^[1],为小麦的生物技术育种奠定了基础。基因枪法是籍高速运动的金属微粒将附着于其表面的核酸分子引入受体细胞中的一种遗传物质导入技术。它本质上是一种物理过程,不受受体基因型的限制,而且能缩短获得转基因植株的周期,因此,被广泛应用于植物(尤其是禾本科植物)的遗传转化。小麦是举世公认的最难转化的重要农作物,利用基因枪转化技术进行小麦遗传转化的,取得了很大进展。用基因枪法将GUS和Bar基因导入小麦胚性愈伤组织和幼胚盾片组织中,获得了小麦转基因再生植株。1997年国内傅荣昭等用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦,并获得了转基因再生植株^[2]。本研究用PDS-1000/He型基因枪将质粒pZFX₂导入小麦胚性愈伤组织和成熟胚中,经卡那霉素筛选,获得了抗性愈伤组织和再生绿苗。

1 材料与方 法

1.1 植物材料及质粒的构建和提取

小麦材料为922-267、942-114和953-1575三个品系。质粒pZFX₂含有抗蚜虫的乙醇酸氧化酶基因(GOS)和抗卡那霉素的基因(NPT II),pZFX₂的制备采用碱法提取,PEG法纯化,得到的pZFX₂溶解在TE(pH 8.0)中,浓度调为1 µg/µL, -20℃保存。

1.2 微粒子子弹的制备

* 云南省应用基础研究基金资助课题

曾黎琼:女,1968年8月生,助理研究员,双学士,主要从事水稻、小麦等禾本科作物的基因转化研究。

收稿日期:1999-02-04

1.2.1 金粉的处理 取 60 mg 金粉于离心管中,加入 1 mL 无水乙醇,充分振荡 3 min,在 10 000 r/min 情况下,离心 1 min,吸去上清液,再加入 1 mL 无菌水,充分振荡后,10 000 r/min 离心 1 min,重复上述操作步骤 3 次,最后,将金粉悬浮于 600 μ L 无菌水中,置 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 DNA 的处理 取 50 μ L 金粉悬浮液,加入 5 μ L 质粒 pZFX₂液,指弹 5 次,滴加 50 μ L 2.5 mol/L CaCl₂液,指弹 5 次,再加入 20 μ L 0.1 mol/L 的亚精胺,振荡 3 min 后,在室温下放置 10 min,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,加入 230 μ L 无水乙醇,振荡后,在 10 000 r/min 情况下,离心 20 s,弃上清液,沉淀悬浮于 60 μ L 无水乙醇中,供 5~10 枪用。

1.3 用基因枪将质粒 pZFX₂导入小麦胚性愈伤组织

小麦种子用 75% 酒精灭菌 5 min,再用 0.1% HgCl₂灭菌 20 min,无菌水冲洗 3 次,置于 MS+2,4-D 2~3 mg/L+KT 0.5~1 mg/L 的培养基中诱导愈伤组织,1 多月后,选择生长良好的愈伤组织切成直径为 0.5~2 mm 的小块,置于铺有滤纸的 MS+2,4-D 1 mg/L+KT 1 mg/L 的继代培养基中过渡培养 4~5 d 后,用 PDS-1000/He 型基因枪将质粒 pZFX₂导入小麦胚性愈伤组织中^[1],共培养 4~7 d,将愈伤组织转入 MS+2,4-D 1 mg/L+KT 1 mg/L+Kan 100 mg/L 的继代培养基中筛选培养,1~2 个月后,转到 MS+6-BA 2~3 mg/L+NAA 0.5~1 mg/L+LH 400 mg/L 的培养基中分化培养。

1.4 用基因枪将质粒 pZFX₂导入小麦成熟胚

小麦种子用 75% 酒精灭菌 5 min,再用 0.1% HgCl₂灭菌 7 min,无菌水冲洗 3 次,加入少量无菌水放置大约 48 h,重复上述灭菌过程,切割胚后,平铺于小培养皿中心,用 PDS-1000/He 型基因枪将质粒 pZFX₂导入切割胚中,枪击后,置于 MS+2,4-D 2 mg/L+KT 1 mg/L+Kan 80~100 mg/L 的培养基中诱导愈伤组织,1~2 个月后,转到 MS+6-BA 2~3 mg/L+NAA 0.5~1 mg/L+LH 400 mg/L 的培养基中分化培养。

2 结果与分析

2.1 影响基因枪法进行小麦基因转化的理化因素

不同轰击力度、阻挡网与靶细胞的距离、样品室的真空度、轰击次数、DNA 的纯度与浓度、DNA 沉淀剂的浓度等因素,都对转化频率有一定影响。采用 1 100、1 300、1 550 psi 三种轰击力度,分别以不同的阻挡网与靶细胞的距离对不同材料进行轰击,均获得抗 Kan 的愈伤组织及部分绿苗(见表 1)。结果表明,分别采用 1 100 和 1 300 psi 的轰击力度对愈伤组织和成熟胚进行轰击效果较好,分化情况较理想。在轰击愈伤组织前,将愈伤组织切碎,平铺在垫有滤纸的培养皿中央,减少细胞团的相互遮盖,增加轰击的有效面积,这样可提高转化频率。在轰击成熟胚时,采用轰击两次的办法,提高转化频率(见表 2)。质粒 pZFX₂的浓度控制在 0.75 μ g/枪左右,浓度过高,微粒子弹严重结块,浓度过低,则受体获得质粒 DNA 的机率降低,从而影响转化率。

表 1 不同轰击力度轰击小麦胚性愈伤组织的转化效果

Tab 1 The transformation of embryogenic calli of wheat bombarded at various pressures

小麦品系 Wheat strain	轰击力度 Rupture pressure (psi)	轰击愈伤组织块数 No. of bombarded calli	获得抗性愈伤组织 Resistant calli		分化出绿点绿苗的块数 No. of regenerated green spots and plants
			块数 No.	百分率 %	
922-267	1 100	630	132	20.95	5
	1 300	359	49	13.65	2
	1 550	169	7	4.14	2
953-1575	1 100	508	130	25.59	5
	1 300	582	34	5.84	1
	1 550	225	9	4.00	0

2.2 胚性愈伤组织和成熟胚两种受体的比较

用胚性愈伤组织作为基因枪转化的受体, DNA 的导入和转化体的筛选都比较容易进行, 故比较容易获得抗性愈伤组织。但是, 要获得大量均一旦再生能力强的胚性愈伤组织并非易事, 从小麦种子诱导胚性愈伤组织需要 1~2 个月或更长的时间。基因枪轰击后, 愈伤组织须经卡那霉素的筛选培养, 再进行分化培养, 周期很长, 对分化极为不利, 造成大多数抗性愈伤组织不分化, 而只有少数抗性愈伤组织分化出绿点或绿苗。

成熟胚具有良好的再生能力, 轰击成熟胚后, 诱导抗性愈伤组织, 再进行分化培养, 周期明显缩短, 因此比较容易获得转基因植株。当然, 以成熟胚作为转基因的受体, 由于细胞分散程度不如愈伤组织等原因, 可能比较容易产生假转化体, 因此, 对转化体进行严格筛选是必不可少的。轰击成熟胚后, 在诱导愈伤组织的培养基中加入卡那霉素对其进行筛选, 从而获得抗性的愈伤组织。

3 讨 论

小麦的组织培养尤其是分化培养比较困难, 当加入卡那霉素等选择压力后, 由于卡那霉素对愈伤组织的伤害作用, 使之几乎不分化, 但是, 转基因的目的是要获得转化的再生植株, 所以, 本实验在后期的抗性愈伤组织分化培养过程中弃除了选择压力, 以利于抗性愈伤组织的分化。当然, 再生植株还有待于进行分子生物学检测, 证实是否是阳性转化体。

基因枪是继农杆菌介导转化法之后又一应用最广泛的遗传转化技术。由于禾本科作物对农杆菌感染不敏感, 因此, 基因枪转化法为禾本科作物的转化提供了可行的手段^[3,4]。在基因枪轰击小麦时, 作者发现只有击中了具有潜在再生能力的胚性细胞、生长点细胞和分生组织细胞, 才能获得转基因植株。小麦的离体培养存在一定难度, 尤其是经过转基因处理后, 对小麦细胞产生一定的创伤, 导致愈伤组织更难分化。在小麦的基因转化实验中, 采取有效措施, 缩短实验周期, 选择分化能力强的材料作为受体, 提高转化率, 具有重要意义。从实验结果可见, 以小麦成熟胚作为受体, 不受基因型的限制, 而且成熟胚具有良好的分化能力, 是进行小麦基因转化的适宜材料。当然, 用基因枪法进行小麦基因转化, 还有待于不断提高转化效率, 使这一方法更好地发挥作用。本实验为进一步获得基因工程抗虫小麦材料奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- 2 傅荣昭, 曹光诚, 马江生. 用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦的研究初报. 遗传学报, 1997, 24(4): 358~361.
- 3 Wan Y, Widholm J M, Lemaux P G. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 1995, 196: 7~14.
- 4 Perl A. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat cell by optimization of culture conditions and DNA microprojectile delivery procedures. *MGG*, 1992, 235: 279~284.

(责任编辑: 许定发)

表 2 基因枪轰击小麦成熟胚的转化效果(两枪/皿)
Tab 2 The transformation of mature embryos after bombardment

小麦品系 Wheat strain	轰击力度 Rupture pressure (psi)	受体块数 No. of bombarded mature embryos	再生苗数 No. of regenerated green plants	转化率% ¹⁾ Transformation frequency
952-1575	1 300	193	2	1.04
942-114	1 300	98	2	2.04

¹⁾ 转化率 = (再生苗数/受体块数) × 100%
Transformation frequency = (No. of regenerated green plants/No. of bombarded mature embryos) × 100%