

根癌农杆菌对云南红豆杉原生质体的转化*

□罗建平** 姜绍通 潘丽军

(合肥工业大学生物与食品工程学院 合肥 230009)

提 要: 本文介绍了根癌农杆菌T-DNA对云南红豆杉原生质体的转化, 分析了转化系的紫杉醇合成能力。实验以生长20 d 的云南红豆杉幼茎诱导的淡黄色愈伤组织为材料, 经酶解可分离出大量有活力的原生质体。在由B5无机盐、KM有机成分、3.0 mg/L 2,4-D、0.1 mg/L KT和0.45 mol/L果糖组成的培养基中培养1周后, 原生质体再生细胞持续分裂形成细胞团。根癌农杆菌对原生质体的转化能力与原生质体生长状态及菌株相关。虽然刚分离的或已再生细胞壁的原生质体不能被根癌农杆菌转化, 但由10个以上细胞组成的原生质体克隆和根癌农杆菌B6S3菌株共培养后可实现T-DNA转化, 高压纸电泳检测转化系具有冠瘿碱的合成, 转化率约为5%。HPLC证实转化系具有合成紫杉醇的能力, 但不同转化系中紫杉醇含量变异很大, 最高含量为0.076%, 是对照愈伤组织的6倍, 表明T-DNA的插入改变了培养细胞对紫杉醇的合成。获得的高产转化系细胞生长比对照低, 但继代培养中其生长和紫杉醇积累基本保持稳定。尽管转化系合成紫杉醇能力远未达到商业化生产的要求, 但研究通过T-DNA对原生质体的转化而实现插入诱变, 可以为分离高产紫杉醇优良细胞系提供单细胞筛选系统。

关键词: 云南红豆杉 原生质体 根癌农杆菌 转化 紫杉醇

紫杉醇 (Paclitaxel) 是一种新型的抗肿瘤药物, 近年研究还证明对类风湿关节炎、早脑痴呆和先天性多囊肾病等有疗效, 市场需求量很大^[1]。目前紫杉醇主要

是从红豆杉属植物中提取分离的, 资源十分有限。虽然化学法可以合成紫杉醇, 但因紫杉醇结构复杂, 工业化全合成无法实现, 半化学法合成需要的前体依然受到

野生资源少的限制^[2]。植物培养细胞可能是寻求紫杉醇药源的一条重要途径^[3]。迄今, 已由10多种红豆杉属植物进行过细胞培养, 在培养细胞生产紫杉醇研究方面取

收稿日期: 2002-11-28

* 合肥工业大学人才培养专项 (RC2001): 名贵珍稀野生药用植物细胞大量培养, 负责人: 罗建平。

** 联系人: 罗建平, 教授, 博士生导师, 从事药用植物生物技术研究, Tel: 0551-2900090, E-mail: jianpingluo@sohu.com。

[World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 49

得了很大进展^[1,2]。但培养细胞生长速率慢、紫杉醇积累水平低大大限制了培养细胞规模化生产紫杉醇的进程。解决这个问题的措施之一是利用培养细胞的变异筛选高产的优良细胞系。在红豆杉细胞培养中,除自然变异外,常用物理或化学方法处理细胞,增加变异频率,提高筛选效率^[4],尚未见用DNA分子直接插入诱变后分离高产细胞系的工作。已报道的筛选方法多是在组织或细胞团水平上进行,与原生质体筛选体系相比,不易获得单细胞起源的细胞系。本文将介绍根癌农杆菌T-DNA对云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)原生质体的遗传转化,并对原生质体转化系的紫杉醇合成能力进行初步分析,为高产紫杉醇优良细胞系的分离提供了单细胞起源的T-DNA分子插入诱变的筛选体系。

一、材料与方法

1. 植物材料 云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)幼茎愈伤组织按前文方法诱导^[5]。诱导出的愈伤组织在附加2.0 mg/L 2,4-D、0.5 mg/L KT和0.1% (w/v) 水解酪蛋白的B5培养基上、22±2℃、黑暗条件下继代培养,每5周转代1次。

2. 菌株 用于转化的根癌农杆菌是章鱼碱型菌株B6S3、胭脂碱型菌株C58和T37等3种野生型菌株。转化前,菌株于YEB液体培养基、28℃下培养过夜。

3. 原生质体分离和培养 取生

长旺盛的疏松淡黄色愈伤组织置于10 ml酶溶液中,在25±2℃、黑暗中消化10~12 h。酶溶液为含2.0% (w/v) 纤维素酶 Onozuka R10、1.0% (w/v) 果胶酶、0.1% (w/v) MES和0.45 mol/L甘露醇的CPW溶液^[6]。游离出的原生质体经74μm孔径的不锈钢筛过滤、70 g离心5 min和0.52 mol/L的蔗糖溶液纯化后,用原生质体培养基洗涤3次。原生质体活力按双醋酸酯染色法检测,原生质体产率(个/g愈伤组织)为5次单独分离获得的有活力原生质体数的平均值,每次分离的原生质体至少检查10个视野。原生质体用浅层液体培养基、黑暗、24±2℃下培养。培养基由B5培养基无机盐分、KM培养基有机成分组成,附加3.0 mg/L 2,4-D、0.1 mg/L KT和0.45 mol/L果糖, pH5.8。培养过程中每10 d用含20 g果糖的原生质体培养基降低渗透压1次。培养4周的原生质体克隆用于转化。植板率(%)以培养4周形成的细胞克隆数(≥10个细胞)占植板的原生质体总数的百分比表示,每个培养处理至少3次重复。

4. 转化 过夜培养的菌液和原生质体克隆悬浮在新鲜原生质体培养基中,附加100μmol乙酰丁香酮,共培养48 h后,原生质体克隆经过滤、洗涤后转到含500 mg/L头孢霉素的无激素固体B5培养基(蔗糖被果糖代替)中培养增值,每2周转移1次,至完全脱菌后转移到不含头孢霉素的B5培养基中继代培养。

表1 云南红豆杉原生质体愈伤组织生长对原生质体分离和培养的影响

生长时间 (d)	原生质体产率 (×10 ⁵ g callus)	植板率 (%)
10	3.11	0.02
20	7.83	0.66
30	1.93	0.02

5. 冠瘿碱合成酶活性的检测 转化的细胞克隆在附加1 mmol/L精氨酸的B5培养基上预培养1 d后,用80%乙醇提取冠瘿碱。按Otten的纸电泳—荧光显色法检测冠瘿碱^[7]。

6. 转化系紫杉醇含量测定及稳定性分析 转化系在无激素的B5培养基中继代培养,每5周转代1次,同时收获细胞干燥至恒重后,按前文的方法提取和HPLC分析紫杉醇。紫杉醇标准品购自Sigma公司。紫杉醇含量用干重细胞所含紫杉醇的百分比表示(%)。细胞生长以生长参数表示:

$$\text{生长参数} = \frac{\text{收获量} - \text{接种量}}{\text{接种量}}$$

二、结果和讨论

1. 原生质体分离与培养 根癌农杆菌T-DNA转化原生质体需要获得大量有活力的可持续细胞分裂的原生质体。将生长旺盛的云南红豆杉愈伤组织在含纤维素酶和果胶酶的酶溶液中保温10~12 h,可大量游离出原生质体(图1-A)。愈伤组织生长年龄对原生质体分离影响显著。由于生长20 d的愈伤组织正处于对数生长期^[5],细胞生长快、细胞壁较薄,有利于酶解去壁,所以分离原生质体

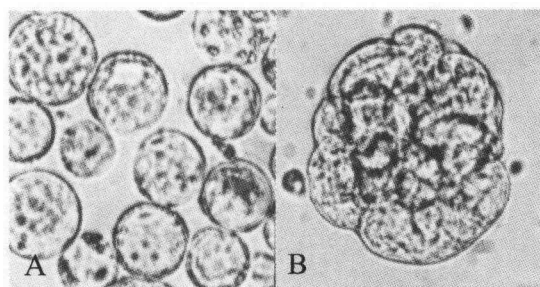


图1 云南红豆杉愈伤组织原生质体 (A)
和再生细胞克隆 (B)

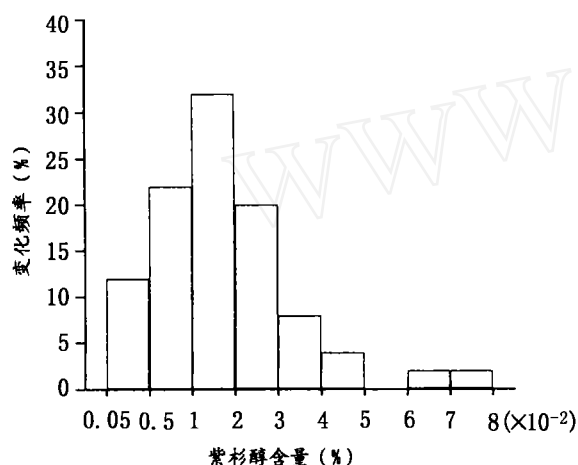


图2 云南红豆杉原生质体克隆转化系中
紫杉醇含量的变异分析

的效果好。用此时的愈伤组织进行酶解消化,原生质体产率分别是生长10 d(延滞期)和30 d(稳定期)愈伤组织的2.52倍和4.06倍,此时的原生质体在培养中植板率也是最高,是来自生长10 d(延滞期)和30 d(稳定期)愈伤组织的原生质体的33倍(表1)。当原生质体培养在液体培养基中,3~4 d可见原生质体由球形逐渐改变成椭圆形,表明细胞壁已经合成。培养1周后,原生质体再生细胞开始分裂,4周后形成细胞克隆(图1-B)。原生质体植板率和植板密度相关,有效植板率为2.5~3.0

$\times 10^5$ 个原生质体/ml培养基。虽然第一次细胞分裂频率较高,但大多数原生质体不能持续进行细胞分裂。4周后形成10个以上细胞组成的细胞克隆很少,植板率很低。

2. 原生质体克隆的转化 用新分离的原生质体和根癌农杆菌共培养,在随后的培养中原生质体全部死亡,用已再生细胞壁的原生质体进行转化,最后也都解体死亡。相似的情况在其它植物的原生质体转化中也见报道^[8]。原生质体的解体死亡可能与共培养后反复洗涤对它们造成的伤害以及培养基附加的抗生素对它们生长活力的抑制

相关。当原生质体长成小的细胞克隆后,再和根癌农杆菌共培养,经去菌培养可获得被转化的细胞克隆。不同的菌株对细胞克隆的感染能力不同,在所用的3株根癌农杆菌中,胭脂碱型菌株C58和T37对原生质体克隆不敏感,仅章鱼碱型菌株B6S3可转化细胞克隆,在转化液中加入100 μ mol/L乙酰丁香酮时,转化率约为5%。实验共获得114株转化克隆系。经电泳分析,在转化克隆系中检测出章鱼碱的存在,证明T-DNA已转移到细胞中并表达。

3. 转化克隆系中紫杉醇含量分析 转化的细胞克隆具有紫杉醇的合成能力,但不同的细胞克隆中紫杉醇含量的变异很大,变化幅度呈正态分布(图2)。在获得的转化克隆中,近1/3细胞克隆的紫杉醇含量和对照接近(0.012%),有8个转化克隆系的紫杉醇含量是对照1倍以上,最高的为0.076%,是对照的6倍,是最低克隆系的120多倍。和对照相比,高产转化系的细胞生长速率较低,但在继代培养中其细胞生长和紫杉醇积累基本保持稳定($P < 0.05$)(图3)。

结果表明,通过根癌农杆菌对原生质体形成的细胞克隆进行转化,T-DNA整合到细胞染色体上产生了基因的插入突变,其中某些突变可能与紫杉醇合成途径的分子基础直接相关,使分离高产紫杉醇的突变细胞系可行。

三、结 论

红豆杉属植物的遗传转化工作已有报道^[1,2],但所用的转化受体都不是原生质体,可能由于红豆杉原生质体难以培养。本文在成功诱导原生质体持续分裂形成细胞克隆的基础上,将原生质体克隆与根癌农杆菌共培养,实现了T-DNA的转化。研究结果为建立云南红豆杉由原生质体→细胞克隆→T-DNA转化→单细胞起源的高产紫杉醇细胞系筛选体系奠定了基础,并且T-DNA还为进一步研究不同细胞系紫杉醇合成能力差异的分子机理提供了分子标记。

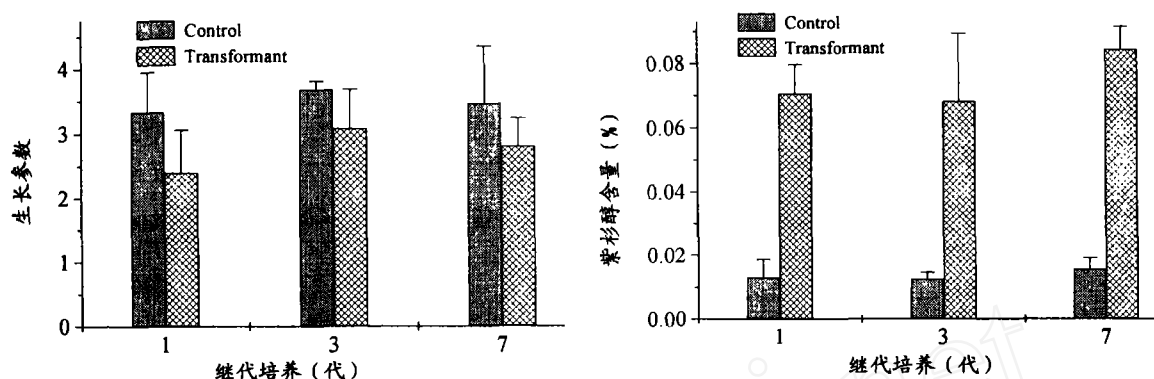


图3 高产紫杉醇转化系继代培养中生长与紫杉醇含量的分析

参考文献

- 1 孙彬贤, 章国英, 刘涤等. 红豆杉细胞培养与紫杉醇生产. 植物生理学通讯, 1999, 35: 135~140.
- 2 邱有德, 韩一凡. 红豆杉器官、组织、细胞培养和基因工程的研究进展. 天然产物研究与开发, 1998, 10: 90~98.
- 3 Fett-Neto AG, DiCosmo F, Reynolds WF, et al. Cell culture of *Taxus* as a source of the neoplastic drug taxol and related taxanes. Biotechnology, 1992, 10: 1572~1575.
- 4 Michio K, Shigeoka T, Tahara M, et al. Efficient selection of cells with high taxol content from heterogeneous *Taxus* cell suspension by magnetic or fluorescent antibodies. Seibutsu -Kogaku Kaishi, 1998, 76: 3~7.
- 5 罗建平, 牛炳韬, 贾敬芬等. 云南红豆杉培养细胞系的建立. 生物工程学报, 1997, 13: 326~330.
- 6 Frearson EM, Power JB, Cocking EC. The isolation, culture and regeneration of petunia leaf protoplasts. Developmental Biology, 1973, 33: 130~137.
- 7 Otten LABM, Schilperoord RA. A rapid microscale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities. Biochem Biophys Acta, 1978,

527: 497~500.

- 8 Puonti-Kacrcelas J. Transformation of pea (*Pisum sativum* L.) by *Agrobacterium*

tumefaciens. Plant Cell Reports, 1989, 8:321~324.

(责任编辑: 刘维杰 柳 莎)

“优秀中医临床人才研修项目”实施方案出台

继“全国名老中医药专家学术经验继承工作”之后, 国家中医药管理局“优秀中医临床人才研修项目”实施方案近日出台, 这是培养优秀中医临床人才, 带动整个中医临床队伍建设的又一重要举措。“十五”期间, 国家中医药管理局将在全国选拔200名具有扎实专业基础、较高临床水平和有培养前途的优秀中青年中医临床人才进行重点培养, 着力提高其中医临床水平, 使他们尽快成长为医德高尚、理论深厚、医术精湛以及享有较高知名度的新一代中医临床优秀人才。

该实施方案对于“优秀中医临床人才研修项目”的培养目标、培养对象、培养要求、研修时间、研修内容、方式与途径、管理与考核及经费管理等方面均作了详尽的规定, 并要求各省、自治区、直辖市中医药行政管理部门切实加强管理, 确保“优秀中医临床人才研修项目”顺利实施。

1 秒内测出体温的红外热像仪

“慧眼 HW-05 人体温度红外热图像仪”已在华中科技大学研制成功。

该仪器集先进的光电子技术、热成像技术和图像处理技术于一体, 具有测温灵敏度高、热图像直观、探测范围广、不干扰被测目标、使用安全轻便等特点。使用时, 只要被测人面向摄像镜头, 在离镜头 5 米以内停留小于 1 秒的瞬间, 仪器就会立即显示人体热图像和最高体表温度, 若遇到可疑发烧病人, 仪器会立即报警。该系统的温度分辨率可达到 0.06℃, 测温精度可达 $\pm 0.2^\circ\text{C}$, 操作人员在监控室通过测检镜头即可获得准确数据。

据介绍, 4月20日~25日, 首批 5 台仪器开始在深圳机场、厦门机场、华中科技大学及同济医学院附属同济医院等人流密集的地方试用, 每天测量达数万人, 效果良好。现已生产供应

(文 摘)

Progress of Study on Extraction of Alkaloids by Supercritical Fluid

Zhang Tao and Cai Jianguo

(Institute of Chinese Herbal Medicine Engineering, East China University of Science and Engineering, Shanghai 200237)

This article summarizes the progress of the study on the application of the technology of supercritical fluid extraction to the isolation of alkaloids, and analyzes the factors that may affect the result of the isolation. It also indicates that besides the general factors, such as temperature, pressure, solvent and the time of extraction, extraction result can be improved by adding alkalis while the extraction capacity of supercritical fluid can be enhanced due to the use of cosolvents.

Key Words: supercritical fluid extraction, alkaloids, affecting factors

Toxic Theories of Chinese Herbal Medicines and Their Study Progress

Liu Shumin, Luo Mingmei and Li Yujie

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040)

As for the deep study and correct understanding of the toxicity of Chinese herbal medicines, should be well handled the contradiction that not only the curative effectiveness of poisonous medicines should be brought into full play, but also their toxic reaction and side-effects should be reduced to the minimum so as to establish a set of complete world criteria for the assessment of the safety of Chinese medicines, and this is an important task for the acceleration of the modernization and internationalization of Chinese medicines. This article generally reviews the history and methods of the study on poisonous Chinese medicines and proposes that people should get out of the misunderstanding of poisonous Chinese medicines on the basis of summing up the valuable experience of our predecessors, and carry out the study on the toxicology of Chinese herbal medicines by making use of the knowledge of modern pharmacology and toxicology and advanced experimental means.

Key Words: toxicity of Chinese herbal medicine, source of theory, experimental research

Transformation of Protoplast-derived Colonies by *Agrobacterium tumefaciens* in *Taxus yunnanensis*

Luo Jianping, Jiang Shaotong and Pan Lijun

(Department of Biotechnology and Food Technology, Hefei University of Technology, Hefei 230009)

In order to isolate cell lines with high paclitaxel productivity via molecular mutagenesis, the transformation of *Taxus yunnanensis* protoplasts by *Agrobacterium tumefaciens* was studied. Protoplasts were obtained from friable, light yellow callus of *T. yunnanensis* in enzyme solution. Callus in the exponential growth phase of 15–20 days after subculture produced the highest yield of viable protoplasts. When cultured in liquid medium composed of B5 salts, KM vitamin and organic components and 0.45 mol/L fructose and supplemented with 3.0 mg/L 2,4-D and 0.1 mg/L KT, protoplasts underwent sustained divisions and formed cell colonies. Although *A. tumefaciens* failed to transform freshly isolated protoplasts and protoplasts with regenerated cell walls, transformants were obtained by co-cultivating protoplast-derived minicolonies consisting of 10 or more cells with the strain B6S3. The transformants were confirmed by opine analysis. The transformation frequency was about 5%. HPLC analysis showed that there was a significant difference in paclitaxel content among all transformants. The highest paclitaxel content in transformants was found to be 0.076%, which was 6 times as high as in control callus. The transformant with high paclitaxel accumulation showed a lower cell growth as compared to its control. During subculture the transformant remained unchanged with respect to cell growth and paclitaxel accumulation. Although the paclitaxel accumulation in the transformants was not high enough to produce paclitaxel for commercial purposes, the method described in the present study would provide an opportunity to isolate cell lines with high paclitaxel productivity from mutagenized single cell culture via T-DNA insertion.

Key Words: *taxus yunnanensis*; protoplasts; *agrobacterium tumefaciens*, transformation; paclitaxel

Isolation and Purification of Polysaccharides in *Zizyphus Jujuba* MILL and Determination of their Molecular weight

Yang Yun Meng Jiang and Miao Mingsan

(Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008)

Li Zhenguo (Henan Institute for Drug Control, Zhengzhou 450008)