

Ri 质粒转化的青蒿发根培养及青蒿素的生物合成

蔡国琴¹ 李国珍¹ 叶和春^{2(*)} 李国凤²

(北京师范大学生物系 北京 100088)¹

(中国科学院植物研究所 北京 100044)²

摘要 用发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 转化药用植物青蒿 (*Artemisia annua* L.) 并建立了发根体外培养系统。Southern 杂交、NPT I 酶的检测证明 Ri 质粒的 T-DNA 转移并整合到植物的核基因组上。在发根培养系统中, 检测了青蒿的重要次生代谢物—青蒿素的含量, 检测了不同理化因子对发根生长及青蒿素含量的影响。结果表明: 光照 (日光灯, 12h 光周期, 2000lx) 有利于次生产物青蒿素的积累。培养基的 pH 值为 5.4。蔗糖浓度为 3% 不仅促进发根的生长, 而且促进青蒿素的积累。低浓度萘乙酸 (NAA) 对发根生长具有促进作用, 但抑制青蒿素的合成。赤霉素 GA₃ 对发根的生长及次生产物的合成都具有促进作用, 其最适浓度为 4.8mg/L。

关键词 青蒿, Ri 质粒, 发根, 青蒿素

近年来应用 Ri 质粒转化植物, 尤其是药用植物的应用研究越来越广泛^[1,2]。中药青蒿性寒味苦, 为传统清热解暑药物。其有效成分青蒿素是一种无色针状结晶, 熔点 156~157℃, 分子式为 C₁₅H₂₂O₅, 是含过氧基团的倍半萜内酯^[3]。受热易分解。青蒿素对治疗疟疾, 尤其是脑型疟疾和抗氯喹恶性疟疾具有速效和低毒的特点^[4]。现在, 全世界每年还有 20 亿人口受到疟原虫的感染, 在热带地区, 尤其是东南亚和西非, 抗氯喹疟疾已成为公众健康的大敌, 并成为主要的死亡原因^[5]。青蒿素已成为世界卫生组织推荐的药品。青蒿素还具有免疫抑制和细胞免疫促进作用, 抗流感病毒作用^[4]。

目前, 药用青蒿素多直接从青蒿植物叶及花蕾中提取。提取环节多、费时费力、且各地青蒿品质差异较大。青蒿素虽已能人工合成, 但由于成本高、毒性大而未能投产。愈伤组织和细胞培养的方法都作了尝试, 但由于细胞处于未分化状态, 青蒿素的合成只有在组织分化发生后才能表现出来^[5]。Woerdenbag^[6]改用芽培养, 使青蒿素含量能够达到培养物干重的 0.08%, 但生长周期为 6 个星期。本文用青蒿的幼叶为材料, 建立了发根培养系统, 并在培养物中检测到青蒿素的存在。这一技术系统的建立, 有可能成为青蒿素工业化生产的新途径。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株及培养

国家自然科学基金资助项目。

* 通讯联系人。

本文于 1994 年 6 月 4 日收到。

发根农杆菌R1601具有 Ri 质粒 pRiA₄b, 并且其中 Hind III 片段 21 上整合 NPT I (Neomycin phosphotransferase I) 基因, 染色体背景与 C₅₈相同。同时该菌还具有超致病 (Supervirulence) 根癌农杆菌 pTiBo 542 的 Vir 区的粘性质粒 pTVK291^[7]。

R 1601在 YEB 培养基上暗培养, 温度为 27℃, 0~4℃保存。接种前置于 27℃、含 100μg/ml 卡拉霉素的选择培养基上活化两次即可用于转化。

1.2 无菌植株的获得

将青蒿种子用 5%次氯酸钠溶液消毒 10min, 用无菌水冲洗 5 次。将灭菌后的种子置于不含激素的 MS 培养基上, 在 2000lx、每天光照 12h、26℃下萌发成无菌苗。

1.3 发根的诱导

将青蒿无菌苗叶片切成约 5mm 长的小块, 在 MS 基本培养基上预培养 3d 后, 放入已活化的菌液中 10min 后取出, 吸干多余菌液, 移植到不含激素的 MS 培养基上培养 3d 后, 转入含羧苄青霉素 500μg/ml 的 MS 培养基进行杀菌培养。约 10d 出现发根, 将发根继续进行杀菌培养直至无菌。

1.4 发根体系的建立及青蒿素的检测

在 MS 固体培养基上杀菌完全后, 转至 L 固体培养基 (KNO₃、NH₄NO₃ 的浓度为 MS 的 1/5, 糖浓度为 2%, pH 值为 5.8, 其余成分与 MS 相同) 上继代培养。选取生长快、分枝多的发根进行液体培养, 摇床转速为 110r/min, 并测定发根的生长曲线及青蒿素的含量。

发根的生长用鲜重 (g) 和生长比 (收获时鲜重/接种量) 表示。发根中青蒿素的检测采用紫外分光光度法^[3]。培养物中青蒿素的含量以 mg/g (干重) 表示。青蒿素的总产量以 mg/L 表示 (包括外泌至培养液中的量)。液体和固体培养的周期分别为 27d 与 35d。

1.5 不同理化因子对发根生长及青蒿素含量的影响

试验中, 各种理化因子的处理除特别注明外, 均是在继代培养的第 1 天开始, 至少重复 2 次。

1.6 NPT I 酶活性检测

酶活检测参照 Roy 等的方法^[8]。

1.7 Southern 杂交分析

杂交分析参照 Rogers 等的方法^[9]。

2 结果与讨论

2.1 发根的诱导和发根培养体系的建立

2.1.1 发根的诱导: 预培养 3d 的青蒿幼叶在培养 3d 后, 在第 6 天就能在叶片伤口处诱导形成发根 (图版 1-A)。大约 10d 后发根呈丛生状。实验证明, R1601 是青蒿极为敏感的转化菌株。

2.1.2 发根培养体系的建立: 关于发根继代培养的培养基, 本实验室在 1991 年曾做过探索, 认为培养基中硝酸盐浓度过高对发根生长不利。因此将培养基中 KNO₃ 与 NH₄NO₃ 的含量降为 MS 培养基的 1/5。Woerdenbag 等^[3]认为培养基中含糖超过 2% 时, 青蒿素在芽培养中含量迅速降低。据此, 将蔗糖含量由 3% 降至 2%, pH 值为 5.8, 琼脂为 1%,

将此改良 MS 培养基简称 L 培养基。

2.2 发根的生长周期

图版 I-B 是发根在液体培养基中的生长情况。图 1 是相应的生长曲线图。发根在第 12 天到第 24 天为对数生长期, 24d 后发根开始出现老化现象, 颜色变褐。

L 培养基中, 发根产生的青蒿素约有 60% 的量释放到培养基中 (见表 1), 这对于用生物反应器进行大规模生产是非常有利的。

2.3 理化因子对发根的生长及青蒿素含量的影响

2.3.1 光因子的影响:

在光下生长的发根呈淡绿色。L 培养基上的转化根较柔软, 分枝多, 根毛多。MS 培养基上的发根较粗壮, 易断裂, 这可能也是 MS 培养基的发根易形成愈伤组织的原因之一。从表 1 也可看出液体培养基更适于发根的大量培养。

表 1 不同培养条件下发根生长及青蒿素含量的比较

Table 1 Comparison of the hairy root growth and content of artemisinin in the different culture conditions

Medium	Medium	Illumination (2000lx)	Growth-rate	Artemisinin content/mg · g ⁻¹
MS	Solid culture	12h/d	2.903	0.421
		Dark	2.667	0.000
L	Solid culture	12h/d	5.790	0.465
		Dark	3.766	0.000
	Liquid culture	12h/d	26.981	0.560 (In hairy roots) 1.021 (In medium)
		Dark	9.056	0.455 (In hairy roots) 0.457 (In medium)

青蒿素的形成依赖于光。表 1 中在液体暗培养下的发根虽然也能形成青蒿素, 但这一试验材料是来源于光培养下的发根。若在暗培养条件下连续两个培养周期, 无论是 MS 培养基还是 L 培养基, 都不能产生青蒿素。光可使一些在原植物叶中大量表达的产物, 在绿色的发根中得到表达^[10]。或者是光激活了合成途径中的某个或某些酶, 从而促进了次生产物合成^[11]。比较 MS 培养基和 L 培养基上生长的发根, 可看出青蒿素的含量和生长比并不成正相关。

2.3.2 蔗糖对发根的生长及青蒿素合成的影响:

蔗糖浓度对发根的生长、青蒿素的含量及产量的影响见图 2。从图 2 可看出, 在一定范围内, 糖浓度的增加, 刺激发根的生长^[11]。但当糖浓度达到 8% 时, 根的形态已发生变化, 分枝减少, 根变粗, 极易断裂, 颜色由淡黄色变成浅褐色。生长速度也开始下降。3% 的蔗糖是发根培养最合适的浓度。

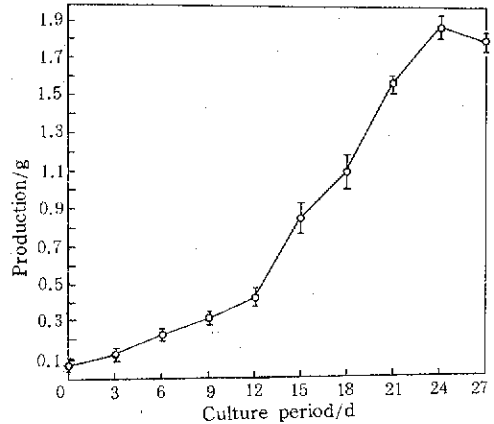


图 1 青蒿发根在 L 液体培养基中的生长动态

Fig. 1 Time-course of hairy root growth of *artemisia annua* in L liquid medium

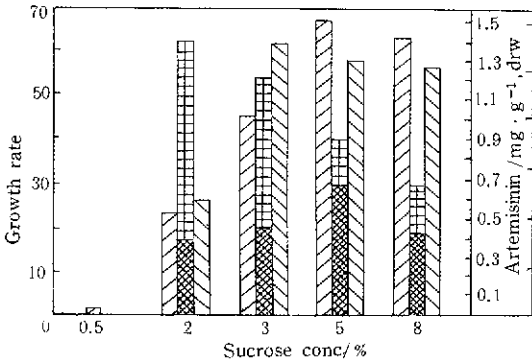


图 2 蔗糖浓度对发根的生长、青蒿素含量的影响

Fig. 2 Effects of different concentration of sucrose on hairy root growth, artemisinin content and its production in hairy root cultures

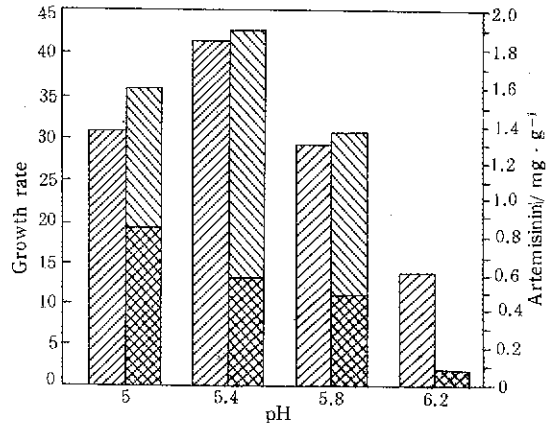








图 3 pH 值对发根生长及青蒿素含量的影响

Fig. 3 Effects of pH value on the hairy root growth and artemisinin content

 Growth rate,
  Artemisinin in medium
 Artemisinin production
 Artemisinin in hairy roots
 Growth rate, fresh weight/inoculum size

 Growth rate,
  Artemisinin in medium
 Artemisinin in hairy roots

2.3.3 培养基 pH 值对发根生长和次生代谢的影响: 从图 3 中可明显看出, pH 值倾向酸性时, 有利于发根生长和次生代谢产物的合成。接近 70% 的青蒿素被释放到培养基中。当 pH 值大于 6.0 时, 生长受到抑制, 并且只在培养基中检测到青蒿素的存在, 发根中未能检测出。

2.3.4 激素对发根生长及青蒿素形成的影响: 萘乙酸 (NAA) 是最常用来调控发根生长及次生产物形成的一种激素。实验证明, NAA 对青蒿发根的生长和次生产物的积累是不利的 (表 2)。虽然 NAA 在低浓度下对生长有一些促进作用, 但却严重阻碍次生代谢物的合成。从根的形态看, 低浓度 NAA 诱导的发根几乎没有分枝, 根很短。当浓度大于 0.1mg/L 时, 根的颜色变成浅褐色, 并诱导发根分化而形成愈伤组织。值得一提的是, NAA 对不同种植物转化根的作用并不相同^(10,11)。赤霉素 GA₃ 对青蒿发根的生长及青蒿素的形成均有促进作用。它使发根培养的倍增期由原来的 3d 减为 1d。发根在形态上细而柔软, 不易折断, 分枝多, 淡黄色。

表 2 NAA 对发根生长及青蒿素含量的影响

Table 2 Effects of NAA on the hairy root growth and content of artemisinin

NAA/mg · L ⁻¹	Growth-rate	Artemisinin/mg · g ⁻¹
0.025	34.457	0.080
0.050	33.500	0.166
0.100	29.400	0.128
0.250	15.813	0.000
0.500	13.059	0.000
0.750	8.706	0.000
0.000	27.101	1.480

图 4 为 GA₃ 浓度为 7.8mg/L 发根的生长曲线。在 100ml 的 L 培养基中, GA₃ 浓度

为 7.8mg/L 时, 生长比可达到 126。在 GA_3 浓度为 9.6mg/L 时, 生长比达到最大值 154, 个别瓶中发根的生长比甚至超过 250。Ohkawa 在 1989 年曾对毛曼陀罗 (*Datura innoxia*) 的发根用 GA_3 处理, 发现 GA_3 能促进发根的生长, 认为可能是 T-DNA 的一些基因产生与赤霉素相互作用的因子^[12]。在研究 rol C 单个基因在转基因烟草中的表达时, 发现内源 GA_3 含量比野生植株增加了五六倍。认为 rol C 的表达使赤霉素合成的调节过程中, GA_{19} 的氧化酶活性降低^[13]。看来, T-DNA 确实有影响赤霉素代谢的因子。

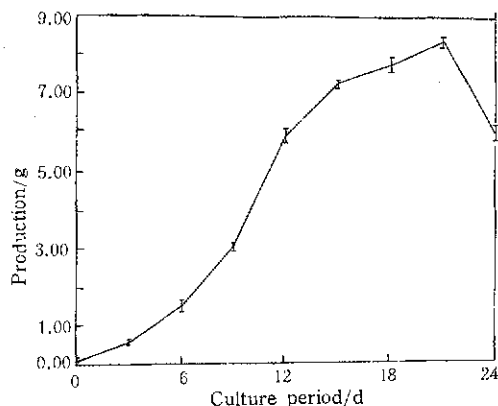


图 4 发根在 GA_3 浓度 7.8mg/L 时的生长动态

Fig. 4 Time-course of hairy root growth of *artemisia annua* with GA_3 (7.8mg/L)
Production (g) is fresh weight

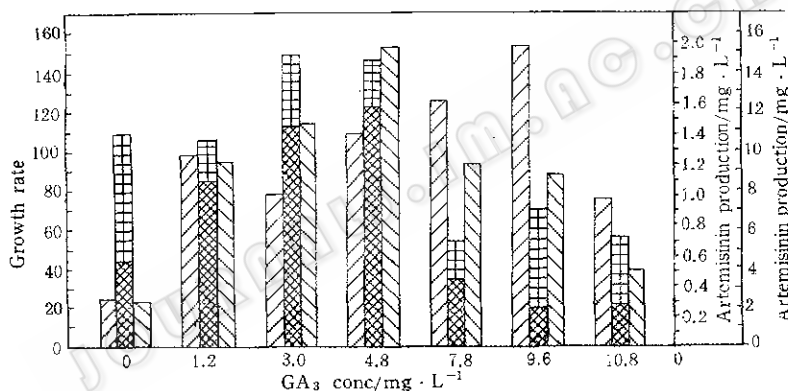


图 5 不同浓度的 GA_3 对发根生长、青蒿素含量及产量的影响

Fig. 5 Effects of different concentration GA_3 on hairy root growth, artemisinin content and its production



赤霉素是植物生长调节剂, 它能诱导植物开花, 而青蒿素在天然植物中是在花前至盛花期达到最大量^[14]。在发根培养中加入赤霉素不仅刺激生长, 而且促进青蒿素的合成。从图 5 中可看出, 赤霉素浓度为 3~4.8mg/L 时, 青蒿素的含量达到最高值 (约 1.9mg/g)。从产量上考虑, 则 4.8mg/L 浓度的赤霉素是最合适的浓度。

2.4 NPT I 酶活性

NPT I 酶活性的检测表明: 青蒿发根及由发根而来的愈伤组织均为阳性结果。说明 Ri 质粒上 NPT I 酶基因转移到了植物细胞的核基因组上 (图版 I-C)。

2.5 Southern 杂交

利用含农杆菌 Ri 质粒 pRiA 4b 的 pFW302 作探针, 与植物 DNA 的杂交图谱表明, 未

转化的青蒿叶片为阴性, 而转化的发根 (无论是固体培养还是液体培养) 及来源于发根的愈伤组织均有杂交带出现 (图版 I-D), 说明 T-DNA 转移并整合到植物的核基因组上。

参 考 文 献

- [1] Chilton M-D, Tepfer D A, Petit A *et al*, *Nature*, 1982, **295**: 432~434.
- [2] Hamill J D, Parr A J, Rhodes M J C *et al*. *Bio/technol*, 1987, **5**: 800~804.
- [3] 沈旋坤, 严克东, 罗泽渊, *药物分析杂志*, 1983, **3** (1): 24.
- [4] 钱瑞生, 李柱良, 余建良等, *中医杂志*, 1981, **6**: 63~66.
- [5] 贺锡纯, 曾美怡, 李国凤等, *植物学报*, 1983, **25** (1): 87~90.
- [6] Woerdenbag H J, Luers J F J, Uden W V *et al*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culturc*, 1993, **32**: 247~257.
- [7] 秦明波, 李国珍, 叶和春等, *植物学报*, 1994, **36** (增刊): 165~170.
- [8] Roy P Sahasrabudhe N. *Plant Mol Biol*, 1990, **14**: 873~876.
- [9] Rogers S O, Bendich A J, *Plant Mol Biol*, 1985, **5**: 69~76.
- [10] Sauerwein M, Yamazaki T, Shimomura K. *Plant Cell Rep*, 1990, **9**: 579~589.
- [11] Sauerwein M, Wink M, Shimomura K. *J Plant Physiol*, 1992, **140**: 147~152.
- [12] Ohkawa H, kamada H, Sudo H *et al*. *J Plant Physiol*, 1989, **134**: 633~636.
- [13] Nilsson O, Moritz T, Impault N *et al*. *Plant Physiol*, 1993, **102**: 363~371.
- [14] Singh A, Vishwakarma R A, Husain A. *Planta Med*, 1988, **54**: 475~476.

Hairy Root Culture of *Artemisia annua* L. by Ri Plasmid Transformation and Biosynthesis of Artemisinin

Cai Guoqin Li Guozhen

(*Biology Department, Beijing Normal University, Beijing 1000088*)

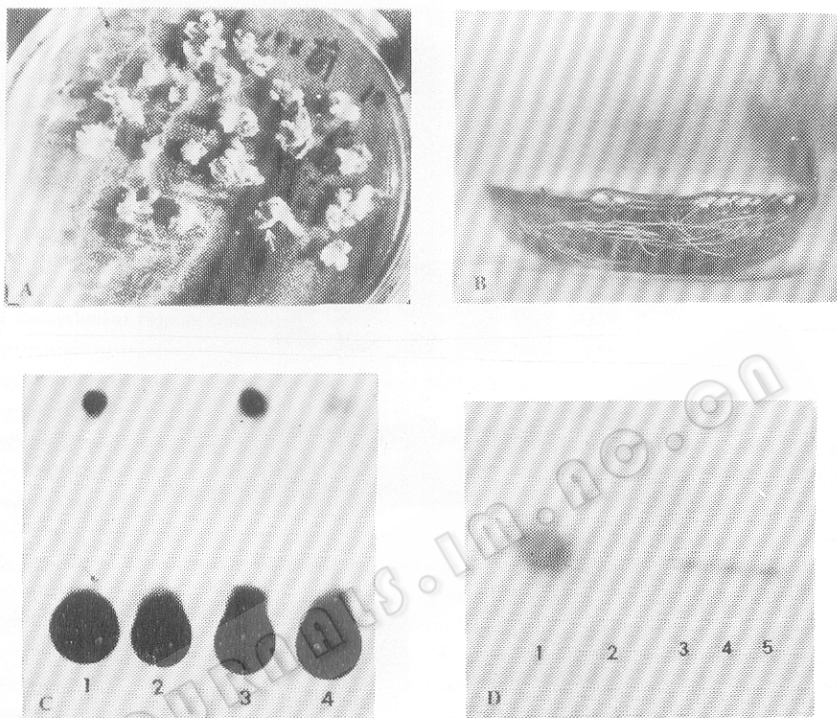
Ye Hechun Li Guofeng

(*Institute of Botany, Academia Sinica, Beijing 100044*)

Abstract Hairy root culture system of medical plant *Artemisia annua* L. was established by infection with *Agrobacterium rhizogenes* R 1601. The transgenic state of transformed roots was confirmed by Southern blot hybridization with TL-DNA of pFw302. The expression of NPT I gene was confirmed by enzymic assay. The important secondary metabolites—artemisinin was obtained in the hairy root cultures. The effects of various physical and chemical factors on the growth of the hairy roots and production of artemisinin were studied. Artemisinin could be detected in hairy root cultures in the light. The optimum pH value of medium was 5.4. Fast growth of the hairy roots and maximal production of artemisinin was observed in the presence of 3% sucrose. Low concentration of NAA (0.025mg/L) enhanced the growth of the roots, but inhibited the production of artemisinin. The growth and artemisinin production in hairy root cultures were greatly promoted by addition of GA₃ to the medium. Its optimum concentration was 4.8mg/L.

Key words *Artemisia annua* L., Ri plasmid, hairy root, artemisinin

by Ri plasmid transformation and biosynthesis
of artemisinin



A. Induction of hairy roots by leaf disk method

B. Hairy roots in liquid medium (24d)

C. Detection of NPT I activity

1. A positive control

2. Untransformed leaves

3. Hairy roots

4. Callus derived from hairy roots

D. Southern analysis

1. Contains Hind III digested pFW302 DNA

2. Untransformed leaves

3. Hairy roots in solid medium

4. Hairy roots in liquid medium

5. Callus derived from hairy roots