

药用植物栝楼的组织培养及其表达蛋白的分析

郑树松² 苑华毅¹ 王莉江¹ 安成才^{1*} 陈章良¹

¹(北京大学生命科学学院, 蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室, 北京 100871)

²(云南省农业科学院油料作物研究所, 昆明 650205)

摘 要 对栝楼的快速繁殖、愈伤组织的诱导与再分化, 以及不同培养体系中天花粉蛋白的表达进行了初步研究。结果表明: 栝楼茎切段的腋芽和顶芽在 MS + 0.5、1.0mg/L 6-BA 培养基上可以快速繁殖; 组织培养苗的叶片切块在 MS + 4.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L IAA 的培养基上可形成愈伤组织, 该愈伤组织在 30d 后再分化为绿苗, 绿苗分化率为 0.25 苗/外植体; 绿苗转移至 MS + 0.1mg/L NAA 的培养基可 100% 生根; 生根苗移栽至土壤中 100% 成活; 移栽成活的栝楼在 30d 后长出小块根, 并检测到天花粉蛋白的表达。

关键词 栝楼, 组织培养, 天花粉蛋白

中图分类号 Q944.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)04-0420-04

栝楼(*Trichosanthes Kirilowii Maxim*), 亦称“瓜楼”、“药瓜”, 属葫芦科(*Cucurbitaceae*)栝楼属(*Trichosanthes*), 为多年生攀援植物。《本草纲目》记载栝楼根可入药, 有“通月水, 治胞衣不下”之功能。天花粉蛋白(Trichosanthin, TCS)是中药天花粉中的主要有效成分, 研究表明它对早期和中期妊娠引产有效率达 90% 以上, 并对葡萄胎、死胎及宫外孕有独特的疗效^[1,2]。本世纪 80 年代起又发现天花粉蛋白能够抑制肿瘤的生长、病毒的增殖, 并具有调节免疫功能的活性, 天花粉蛋白在培养细胞系中对乙型肝炎、柯萨奇 B2、麻疹、乙型肝炎及 HIV 病毒的复制均有一定的抑制作用^[3~5]。为了进一步研究天花粉蛋白的功能及表达调控, 我们对栝楼的组织培养进行了初步研究, 并对愈伤组织、组培苗和移植后的组培苗进行了蛋白质分析。

1 材料与方法

1.1 材料

2000 年 4 月于北大校园采摘栝楼果实, 剥去果皮, 用纱布裹住种子于水中搓洗, 除去表面的粘稠状物质, 用蒸馏水冲洗数遍, 晾干或直接作为供试材料。

1.2 方法

1.2.1 种子发芽: 将以上洗净的种子用 20% H₂O₂

浸泡 4h, 无菌水冲洗 3 次, 置于无菌的三角瓶中, 用无菌水浸泡过夜, 取出接种于 MS + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂(pH5.8)的培养基上, 一部分加无菌水浸没, 一部分不加水, 25℃持续光照培养, 诱导种苗长出。

1.2.2 栝楼快速繁殖: 将实生苗的茎在节间切断, 接种于 MS + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂(pH5.8), 添加不同激素组合的培养基上, 25℃持续光照培养, 诱导顶芽及腋芽长出。将以上长出的芽切下, 接种于 MS + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂(pH5.8), 添加不同浓度 NAA 培养基上, 25℃持续光照培养, 诱导生根。将长出 1.0~2.0cm 不定根的栝楼苗从培养基中取出, 用自来水洗去培养基, 移栽至蛭石和腐殖土(1:3)的混合基质中, 置于 25℃温室中, 前 5 天用玻璃板覆盖保湿, 每 2 天浇水 1 次。

1.2.3 愈伤组织诱导与再生: 将无菌苗叶片切成直径 0.5cm 大小的叶盘, 接种于 MS + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂或 0.2% fitage(pH5.8), 添加不同激素组合的培养基上, 25℃持续光照培养。

1.2.4 组培栝楼的蛋白质分析: 取栝楼组培苗、移栽成活 1 个月的组培苗(盆栽苗)及野生栝楼的叶和根, 以及愈伤组织分别用于蛋白质分析。蛋白质提取、电泳及 Western blot 的方法参看文献[6]。Western 分析所用抗体是用大肠杆菌中表达的成熟天花

粉蛋白制备的兔血清。

2 结果与讨论

2.1 种子发芽

接种于 MS 培养基并加水浸没的 40 粒种子在 20d 后陆续萌发,2 个月后有 30 粒萌发,萌发率为 75%,而接种于 MS 培养基不加水浸没的 40 粒种子经过 2 个月后仅有 1 粒种子萌发,萌发率为 2.5%,可见栝楼种子萌发需充足的水分。萌发的种苗在 2 周内长成 5~8 片叶的植株,可用于以下试验。

2.2 栝楼苗快繁

茎段接种到不同激素的培养基上生长 1 个月,发现在所有添加植物激素的培养基上都有腋芽长出,而未加激素的 MS 培养基上仅有顶芽长成小苗,可见诱导腋芽生长加入植物激素是必需的。在不同的激素组合中,添加了 1.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA 和 2.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L NAA 的两种组合其苗基部长出直径为 1.5cm 大小的愈伤组织,而且小苗比较矮小,苗高仅为 2~3cm,有 2~3 个茎节;在单独添加 6-BA 的培养基中,所有腋芽均长出 6~8 茎节,并形成了直径只有 0.5cm 左右的愈伤组织(彩版 Plate I -Fig. 1A)。两种 6-BA 浓度组合比较,添加 0.5mg/L 6-BA 的组合多为 1 个腋芽长出 1 株小苗,长得较高(>5.0cm),节间长度大(>1.0cm),叶片宽大(最大叶片长>2.5cm),利于进一步的组培操作;添加 1.0mg/L 6-BA 的组合多数是 1 个腋芽长出 2~3 株小苗,但长得较矮(<4.0cm),节间长度小(>0.5cm),叶片窄(最大叶片长<1.5cm),用于生根可获得较多的生根苗。为此在本试验中,采用 MS + 0.5mg/L 6-BA 增殖,在生根前一代用 MS + 1.0mg/L 6-BA 继代,可获得较多的可用于生根的小苗。

在用于生根的几个激素组合中,所有添加 NAA 的组合在培养 7d 后开始诱导茎基部产生不定根,而未加激素的 MS 培养基中所有材料均不长根,可见诱导栝楼茎尖长根加入适量生长素是必需的。在添加 NAA 的几个组合中,所有激素浓度(0.1mg/L、0.2mg/L、0.5mg/L NAA)15d 后均能 100% 诱导栝楼茎尖产生不定根,但添加 0.1mg/L NAA 的组合,茎基部几乎不膨大就产生了不定根,而添加 0.2mg/L 和 0.5mg/L NAA 的组合,虽然长出不定根但茎基部膨大形成了直径大于 0.5cm 的愈伤组织,移栽时容易使不定根脱落,可见 0.1mg/L NAA 是比较合适的诱导栝楼茎尖生根的激素浓度。

在 MS + 0.1mg/L NAA 培养基上诱导生根的栝

楼苗,当不定根长至 1.0~2.0cm 时,取出洗净培养基,移栽至蛭石和腐殖土(1:3)的混合基质中,浇透水,然后用玻璃板覆盖保湿,至新叶展开,即可揭开玻璃板。每 2 天浇水 1 次,每月浇 1/2 MS 大量、微量元素一次。依此方法,先后移栽的 56 株栝楼组培苗全部成活,经 1 个月生长后,长出直径为 0.5cm 左右的小块根(彩版 Plate I -Fig. 1C)。

2.3 愈伤组织诱导与再生

所有诱导栝楼愈伤组织的激素组合在培养 7d 时叶盘边缘开始膨大,并逐渐脱分化长出黄绿色的愈伤组织。其中添加 4.0mg/L KT + 0.5mg/L 2,4-D 和 4.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L 2,4-D 两个激素组合诱导愈伤组织的速度最快,愈伤组织的生长量也最大,分别用各自产生的愈伤组织做继代培养,培养 20d,愈伤组织的增殖倍数分别为 53.0 和 16.3(愈伤组织的增殖量/愈伤组织的接种量),但这两种激素组合诱导产生的愈伤组织经多种方法摸索未能诱导其分化成苗,可见 2,4-D 诱导栝楼叶片产生愈伤组织的能力最强,但不利于再生。在上述两种激素组合中,4.0mg/L KT + 0.5mg/L 2,4-D 组合在培养 20d 后愈伤组织还是鲜黄色(彩版 Plate I -Fig. 1B),而 4.0mg/L 6-BA + 0.5mg/L 2,4-D 组合从 10d 起就逐渐发褐,30d 后就成了黄褐色。为此 4.0mg/L KT + 0.5mg/L 2,4-D 是一较好的诱导及继代栝楼愈伤组织的激素组合。

在 MS + 3% 蔗糖 + 0.7% 琼脂(pH5.8),添加 2.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L NAA 或 4.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L NAA、6.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L NAA、2.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L IAA、4.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L IAA、6.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L IAA、2.0mg/L KT + 0.2mg/L IAA、4.0mg/L KT + 0.2mg/L IAA、6.0mg/L KT + 0.2mg/L IAA 的培养基上栝楼叶盘缓慢长出了黄绿色的愈伤组织,其中 4.0mg/L 6-BA + 0.2mg/L IAA 和 4.0mg/L KT + 0.2mg/L IAA 两个激素组合诱导产生的愈伤组织在培养 25d 后逐渐长出小绿点,30d 后分化出小芽点,并迅速长大成为无根苗(彩版 Plate I -Fig. 1D)。两个组合的分化率分别为 25.0% 与 14.3%(14 苗/56 片叶盘、8 苗/56 片叶盘)。可见 0.2mg/L NAA 与激动素配合可诱导栝楼叶片脱分化长出愈伤组织,但不利于诱导愈伤组织再分化,而 0.2mg/L IAA 与适当的激动素(4.0mg/L 6-BA、4.0mg/L KT)配合可诱导栝楼叶盘愈伤组织发生并诱导其分化成苗。在以上培养基中诱导产生的小苗,采用与快繁相同的生根和移栽方法即可获得盆栽的栝楼苗。

2.4 蛋白质分析

我们分别从组培、盆栽、野生栝楼的叶和根,以及栝楼愈伤组织中提取了总蛋白,并进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(彩版 Plate I -Fig. 2A)及 Western blot 分析(彩版 Plate I -Fig. 2B)。结果表明,不同来源的根蛋白带型差异较大。我们认为,盆栽根与野生根蛋白带型差异可能是由宿根与新生块根的不同引起的,而组培根蛋白含量低的原因有待研究。Western 结果显示,在盆栽和野生栝楼的根中都检测到了与正对照天花粉蛋白条带相对应的特异性条带,说明天花粉蛋白在盆栽栝楼和野生栝楼的根中有相似的表达,而组培根中未观察到任何明显的杂交条带,说明天花粉蛋白的表达可能需要一定的外界诱导条件。叶的蛋白电泳条带差异不明显,Western 结果也观察不到明显的杂交条带,说明天花粉蛋白在栝楼叶中不表达或表达极其微量。栝楼愈伤组织与完整植株叶和根的蛋白带型有明显差异,而且 Western 分析显示,愈伤组织中检测到 5 条较明显的杂交条带,这可能是在愈伤组织中表达的天花粉蛋白及其同源蛋白与多抗产生反应的结果,这也说明在无菌条件下,愈伤组织中天花粉蛋白的表达与组培及野生栝楼苗有所不同。

栝楼是中药天花粉的源植物。近年来,由于人们发现天花粉的有效成分天花粉蛋白具有广谱抗真菌、抗病毒的作用,而且有抗 HIV 的活性,所以使其受到了广泛的关注。我们建立了栝楼的快繁,愈伤

的诱导以及苗的再生系统。Western 结果表明,盆栽苗叶片及根部天花粉蛋白的表达与野生栝楼相似。这为研究在栝楼中天花粉蛋白抗病作用及其表达调控的机理奠定了基础。另外,天花粉蛋白在愈伤组织中可获得一定表达,这为利用生物反应器生产天花粉蛋白提供了可能。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Tsao S W, Yan K T, Yeung H W. Selective killing of choriocarcinoma cells *in vitro* by trichosanthin: a plant protein purified from tubers of the Chinese medicinal herb *Trichosanthes Kirilowii*. *Toxicol*, 1986, **24**: 831 ~ 840.
- [2] WANG Y(汪猷). *Trichosanthin*(《天花粉蛋白》), Beijing: Science Press(科学出版社), 1990.
- [3] Leung K N, Yeung H W, Leung S O *et al*. The immunomodulatory and antitumour activities of trichosanthin—an abortifacient protein isolated from Tian-Hua-Fer(*Trichosanthes Kirilowii* M.). *Asian Pacific J. Allergy Immunol*, 1986 **4**: 111 ~ 120.
- [4] McGrath M S, Hwang K M, Caldwell S E *et al*. GLQ223: an inhibitor of human immunodeficiency virus replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989 **86**: 2844 ~ 2848.
- [5] Byers V S, Levin A S, Waites L A *et al*. A phase I/II study of trichosanthin treatment of HIV disease. *AIDS*, 1990 **4**: 1189 ~ 1196.
- [6] BAO Y M(鲍一鸣), CHU R Y(储瑞银), HAN J H(韩晋华) *et al*. Cloning and sequencing of trichosanthin gene and its expression in *Escherichia coli* and the tobacco plant. *Science in China(B)*(《中国科学》B 辑), 1992 **9**: 944 ~ 950.
- [7] Richky N S, Wong N K, Mak W T, Choi Patrick T W. Law. Increased accumulation of trichosanthin in *Trichosanthes kirilowii* induced by microorganisms. *Journal of Experimental Botany*, 1995 **46**: 355 ~ 358.

The Tissue Culture of Medicinal Plant *Trichosanthes Kirilowii* and its Protein Analysis

ZHENG Shu-Song² YUAN Hua-Yi¹ WANG Li-Jiang¹ AN Chen-Cai^{1*} CHEN Zhang-Liang¹

¹(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering, College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

²(The Oil Crops Research Institute of Yunnan Academy of Agriculture Science, Kunming 650205, China)

Abstract We reported preliminary results of rapid propagation, callus induction and regeneration of *Trichosanthes Kirilowii* and its protein analysis. Pre-existing meristems regenerate shoots very rapidly when grown on MS medium containing 0.5 or 1.0 mg/L 6-BA; calli could be induced from leaf sections when put on MS medium containing 4.0 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L IAA; shoots regenerated successfully 30 days after calli induction and the differentiation ratio was one shoot out of every four leaf sections; and all shoots gave rise to roots after removing onto MS medium containing 0.1 mg/L NAA and 100% survived when transplanted into soil. Very excitingly, these plants produced small tubers in one month, where satisfactory expression of TCS protein was detected by Western blot analysis.

Key words *Trichosanthes Kirilowii* Maxim, Tissue culture, Trichosanthin(TCS)

Received: January 8, 2001

This work was supported by grant from the National Natural Sciences Foundation of China(39980003).

* Corresponding author. Tel: 86-10-62752405, 86-10-62751841; E-mail: zhcaian@pku.edu.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>