

黄芩愈伤组织中黄芩苷与过氧化物酶活性相关性分析

焦战战, 张东向, 赵静, 贾宾, 孟庆伟, 张超

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要:以黄芩愈伤组织为试材,研究了其生长过程中过氧化物酶活性变化规律及其与黄芩苷次生成之间的关系。结果表明:在黄芩愈伤组织生长周期(27 d)内,过氧化物酶的活性高低与黄芩苷的积累呈正相关性。在黄芩愈伤组织生长周期的前 15 d,愈伤组织处于生长期,过氧化物酶活性低水平表达,黄芩苷合成缓慢;15~21 d,愈伤组织处于稳定期,过氧化物酶的活性高水平表达,并到达最大值,期间黄芩苷迅速合成,也达到最大值;21~27 d,愈伤组织进入衰老期,而此时的过氧化物酶活性降低,黄芩苷合成几乎停止。采用 $L_9(3^4)$ 正交表优化培养基中 6-BA、碳源、氮源、pH 的配比,筛选过氧化物酶活性表达最优的培养条件为:6-BA 2 mg/L,碳源:20 g 蔗糖+10 g 葡萄糖,氮源(NH_4^+)30 mmol/L,pH 6.0。

关键词:黄芩;愈伤组织;黄芩苷;过氧化物酶活性;正交设计

中图分类号:S 503.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)13-0108-04

中药黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根,具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效^[1]。其主要成分黄芩苷(Baicalin)具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗变态反应、抗氧化、清除氧自由基、抗癌、抗肿瘤、抗凝、抗血栓形成和保护肝脏、心脑血管、神经元等作用^[2]。黄芩体内过氧化物酶能够催化黄芩有效成分黄芩苷与过氧化氢反应生成黄芩素^[3-4]。过氧化物酶还可以清除脂类氢过氧化物,减轻有机氢过氧化物对机体的损伤,防御活性氧等自由基对细胞膜的损伤,有一定的抗衰老作用^[5]。任振兴等^[6]研究表明,黄芩愈伤组织中多酚氧化酶活性与黄芩苷合成中有相关性。该试验研究了黄芩愈伤组织中黄芩苷与过氧化物酶活性相关性,通过对黄芩愈伤组织生长量、黄芩苷的含量、过氧化物酶活性的测定和分析,讨论三者之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试黄芩愈伤组织由齐齐哈尔大学生命科学与农林学院实验室筛选,来源于种植的黄芩根的诱导。继代培养基为:MS 培养基(附加 2.0 mg/L 的 6-BA 和

0.2 mg/L 的 2,4-D),蔗糖 3%,琼脂 0.8%,pH 5.8,暗培养,温度(25±1)℃,培养周期 27 d。

HP1500GS-B 型全智能人工气候植物箱,T6 新世纪型紫外可见分光光度计,GTR16-2 型高速台式冷冻离心机。

1.2 试验方法

1.2.1 黄芩愈伤组织的生长曲线和黄芩苷含量的变化曲线 将新鲜的黄芩愈伤组织接种于 MS 培养基上(接种量约为 1.0 g/瓶)置于培养箱中暗培养,从第 3 天起,每隔 3 d 取样,测定黄芩愈伤组织的生长量和黄芩苷的量。以生长时间为横坐标,分别以黄芩愈伤组织的生长量和黄芩苷的量为纵坐标,绘制变化曲线。

1.2.2 黄芩愈伤组织中过氧化物酶活性的变化规律 将新鲜的黄芩愈伤组织接种于 MS 培养基上(接种量约为 1.0 g/瓶)置于培养箱中暗培养,从第 3 天起,每隔 3 d 取样测定过氧化物酶活性。以生长时间为横坐标,以过氧化物酶活性为纵坐标,绘制变化曲线。

1.2.3 正交实验设计 为了更好的了解在黄芩愈伤组织生长周期中氧化物酶活性水平的表达,采用 $L_9(3^4)$ 正交表(表 1)^[7] 优化培养基中 6-BA、碳源、氮源、pH 值的配比,以筛选不同培养条件下培养黄芩愈伤组织中氧化

表 1 $L_9(3^4)$ 正交实验设计

Table 1 The design of $L_9(3^4)$ orthogonal experiment

水平	A 6-BA /mg · L ⁻¹	B 碳源(蔗糖+葡萄糖) /g · L ⁻¹	C NH_4^+ /mmol · L ⁻¹	D pH 值
1	1	25+5	30	5.6
2	2	20+10	40	5.8
3	3	15+15	50	6.0

第一作者简介:焦战战(1986-),男,硕士研究生,研究方向为植物代谢与生理。E-mail:jiaozz999@126.com。

责任作者:张东向(1963-),男,硕士,教授,硕士生导师,现主要从事植物生理及植物细胞工程等研究工作。E-mail:zhang-dx1019@163.com。

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C201013);黑龙江省教育厅科研资助项目(12521609)。

收稿日期:2013-03-19

物酶活性水平的表达的最优培养条件。

1.3 项目测定

1.3.1 黄芩苷含量测定 采用紫外分光光度法进行测定,称取1 g的愈伤组织,记录其鲜重,用恒温箱烘干,记录其干重。将烘干的愈伤组织在干燥的研钵中研磨,倒入试管中,并在试管中加入10 mL 60%乙醇,放入60℃水浴锅中,萃取6.5~7 h。将萃取液用过滤膜过滤备用。打开紫外分光光度计,设置波长为278 nm,取60%乙醇1 mL加蒸馏水稀释与待检样相同倍数后作对照,依据标准曲线方程^[8](图1)计算黄芩苷浓度C。根据 $Y(\text{mg/g DW}) = (C \times \text{稀释倍数} \times \text{提取介质体积}) / \text{培养物干重}^{[8]}$,计算1 g干培养物(g DW)中黄芩苷的含量。

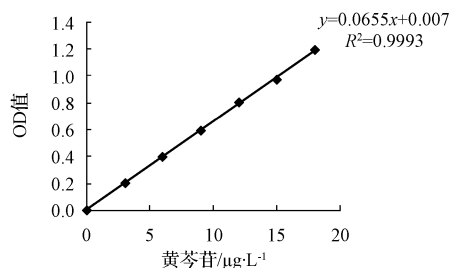


图1 紫外分光光度法测定黄芩苷标准曲线

Fig. 1 The standard curve of baicalin by UV spectrophotometer

1.3.2 过氧化物酶活性测定 酶液提取:称取新鲜的材料0.5 g,加入酶提取液^[9]1 mL(内含1 μL β-巯基乙醇,1 μL 0.06 mol/L 维生素C溶液,2 μL 0.5 mol/L 蔗糖溶液,1 mL pH为8.0的Tris-HCl),迅速研磨成匀浆,后倒入4℃温度下的1.5 mL离心管中,作好标记,待全部样本研磨完毕后,置4℃ 12 000 r/min条件下离心15 min,各取上清液,再置4℃ 12 000 r/min条件下离心10 min,各取上清液置冰箱中保存备用。采用紫外分光光度法测定,将4 mL反应混合液(磷酸缓冲液2 mL、酶液1 mL、0.05 mol/L愈创木酚1 mL)和1 mL 2% H₂O₂加入试管中立即摇匀并迅速倒入比色皿中,于470 nm波长记录吸光度值,以后每隔30 s记录1次,记录4 min,OD₄₇₀变化0.01为1个活力单位,表示酶活性大小,即公式^[10]为 POD活性=V₁ΔOD/(V₂WΔt)。式中:ΔOD为反应初速度阶段的吸光度差,比色波长470 nm;Δt为ΔOD对应的时间(min);ΔOD/Δt为直线部分的斜率,在此阶段吸光度与反应时间成正比;V₁为提取酶液总体积(mL);V₂为测定时取用的提取酶液体积(mL);W为植物样品鲜重(g)。

2 结果与分析

2.1 黄芩愈伤组织的生长曲线和黄芩苷含量的变化曲线

从图2可以看出,黄芩愈伤组织的生长曲线呈典型的“S”形,0~6 d为潜伏期,6~15 d为快速合成期,15 d后黄芩愈伤组织生长变缓,干质量重量不再增加,最大

值达到7.1142 g/瓶。而从图3可以看出,黄芩苷在前15 d合成的比较缓慢,但从培养18 d后开始快速合成,18~21 d为黄芩苷的快速合成期,到21 d时,黄芩苷的积累量达到最大值,为22.674 mg/g DW,之后黄芩苷的量变化不大。由此可以看出,黄芩愈伤组织的生长和黄芩苷合成积累是不同步的,为先生长后合成。在愈伤组织生长的前15 d,细胞内主要是进行初级代谢,很少有次级代谢产物合成。但随着培养基成分的逐渐消耗,初级代谢逐渐减弱,次级代谢逐渐得到增强,黄芩苷逐渐合成积累。

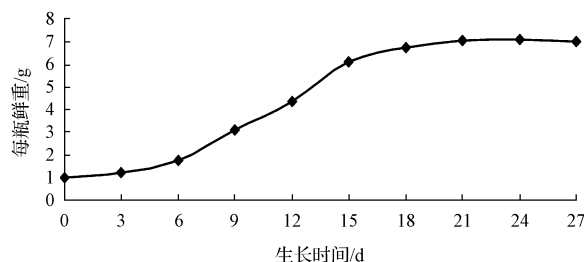


图2 黄芩愈伤组织生长曲线

Fig. 2 Growth curve of callus in *Scutellaria baicalensis*

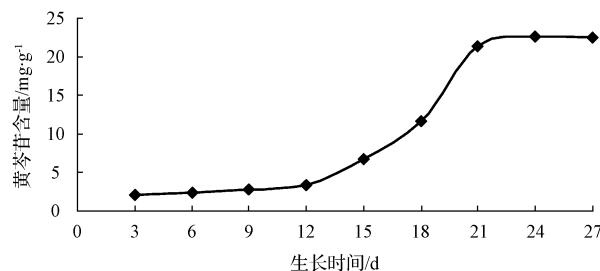


图3 黄芩苷合成曲线

Fig. 3 Synthesis curve of baicalin

2.2 黄芩愈伤组织中过氧化物酶活性的变化规律

将新鲜的黄芩愈伤组织接种于MS培养基上(接种量约为1.0 g/瓶)置于培养箱中暗培养,从第3天起,每隔3 d取样测定过氧化物酶活性。由图4可知,在黄芩愈伤组织生长周期的前15 d,过氧化物酶的活性低水平表达,酶活性在0.001964~0.002708 U·mg⁻¹·min⁻¹的范围;18~24 d,有高水平表达,21 d左右过氧化物酶活性达到最高值0.010406 U·mg⁻¹·min⁻¹,21 d后过氧化物

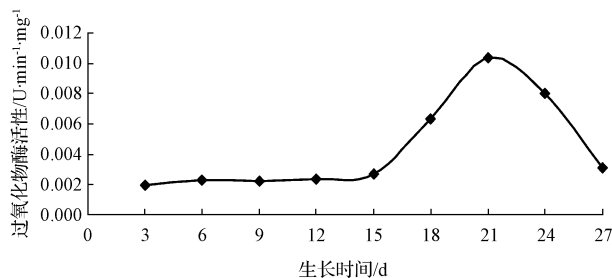


图4 过氧化物酶活性变化曲线

Fig. 4 Changes curve of POD activity

酶的活性逐渐降低。

结合图2和图3可以看出,过氧化物酶活性变化规律与黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累量的关系为:在黄芩愈伤组织生长周期的前15 d,细胞内主要进行初级代谢,表现为细胞生物量的增加,但是次生代谢产物黄芩苷合成缓慢,此时由于缺少过氧化物酶作用的底物,其活性低水平表达;15~21 d,随着培养基中营养成分的逐渐消耗,初级代谢逐渐减弱,次级代谢逐渐增强,表现为细胞生物量增长缓慢,次级代谢产物开始合成,而此时的过氧化物酶的活性逐渐提高,细胞内的次级代谢物在酶得作用下快速合成,24~27 d,细胞内次级代谢逐渐减弱,细胞进入衰亡期,而此时的过氧化物酶活性降低,黄芩苷的合成几乎停止。由此推出,在黄芩愈伤组织生长周期(27 d)内,过氧化物酶的活性高低与黄芩苷的积累呈正相关性。同时,过氧化物酶活性与细胞的衰老呈正相关,过氧化物酶的活性越强,细胞衰老的速度也就越快,即过氧化物酶活性也是细胞生长周期长短的一个制约因素。可以看出过氧化物酶是影响黄芩愈伤组织成长和黄芩苷积累的一个重要因素,因此过氧化物酶的活性对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累有着重要意义。

2.3 正交实验结果

由表2可知,最优的培养条件为:6-BA 2 mg/L,碳源:20 g 蔗糖+10 g 葡萄糖,氮源(NH_4^+) 30 mmol/L, pH 6.0。图4表明,在不同培养条件下,过氧化物酶活性的变化趋势基本一样,在18~24 d的期间活性最大。

表2 $L_9(3^4)$ 正交实验结果

序号	因素A	因素B	因素C	因素D	POD活性/ $\text{U} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
1	1	1	1	1	0.4294±0.0076
2	1	2	2	2	0.4408±0.0083
3	1	3	3	3	0.4125±0.0069
4	2	1	2	3	0.4793±0.0117
5	2	2	3	1	0.3755±0.0072
6	2	3	1	2	0.4709±0.0095
7	3	1	3	2	0.3768±0.0087
8	3	2	1	3	0.5383±0.0173
9	3	3	2	1	0.3974±0.0081
K1	0.4276	0.4285	0.4795	0.4008	
K2	0.4419	0.4515	0.4392	0.4295	
K3	0.4375	0.4269	0.3883	0.4767	
R	0.0143	0.0246	0.0912	0.0759	

3 结论与讨论

植物体中含有大量过氧化物酶,它是一种活性较高的酶。其与呼吸作用、光合作用及生长素的氧化等都有关系。在植物生长发育过程中过氧化物酶活性不断发生变化。一般老化组织中活性较高,幼嫩组织中活性较弱,这是因为过氧化物酶能使组织中所含的某些碳水化合物转变成木质素,增加木质化程度。黄芩苷是细胞次生代谢的产物,它本身可以表征次生代谢的旺盛程度。在该试验

中,在黄芩愈伤组织生长周期前15 d,次生代谢缓慢,由于缺少底物,过氧化物酶活性低水平表达。在黄芩愈伤组织生长周期15 d时,黄芩苷开始合成,而此时过氧化物酶的活性并没有大幅度提高,而是在18 d时,过氧化物酶的活性有明显提高。到了21 d时过氧化物酶达到最高。

通过图2~4可以看出,过氧化物酶活性变化规律与黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累量的关系为:在黄芩愈伤组织生长周期的前15 d,细胞内主要进行初级代谢,表现为细胞生物量的增加,但是次生代谢产物黄芩苷合成缓慢,此时由于缺少过氧化物酶作用的底物,其活性低水平表达;15~21 d,随着培养基中营养成分的逐渐消耗,初级代谢逐渐减弱,次级代谢逐渐增强,表现为细胞生物量增长缓慢,次级代谢产物开始合成,而此时的过氧化物酶的活性逐渐提高,细胞内的次级代谢物在酶得作用下快速合成,24~27 d,细胞内次级代谢逐渐减弱,细胞进入衰亡期,而此时的过氧化物酶活性有所降低,而黄芩苷的合成几乎停止,黄芩苷达到一定量时抑制过氧化物酶活性。

当底物达到一定量的时候,过氧化物酶的活性表达水平提高。过氧化物酶活性是在黄芩愈伤组织生长周期后期表达,黄芩苷达合成最大值时,也抑制黄芩苷的合成,表现酶与底物的关系,少促进多抑制,也表现过氧化物酶活性促进黄芩愈伤组织的衰老到死亡。同时,过氧化物酶活性与细胞的衰老呈正相关,过氧化物酶的活性越强,细胞衰老的速度也就越快,即过氧化物酶活性也是细胞生长周期长短的一个制约因素。可以看出过氧化物酶是影响黄芩愈伤组织成长和黄芩苷积累的一个重要因素,因此过氧化物酶的活性对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累有着重要意义。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典一部[M]. 北京:化学工业出版社,2005.
- [2] 许文杰,丁启龙. 黄芩素的药理学研究进展[J]. 江苏药学与临床研究,2006,14(2):35-39.
- [3] 森元聪. 黄芩培养细胞的类黄酮代谢的研究[J]. 国外医学中医中药杂志,1999,21(5):56-57.
- [4] Morimoto S, Tateishi N, Matsuda T, et al. Novel hydrogen peroxidase metabolism in suspension cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1998, 273:12606-12611.
- [5] 方允中,李文杰. 自由基与酶-基础理论及其在生物学和医学中的应用(第一版)[M]. 北京:科学出版社,1994:138-139.
- [6] 任振兴,耿韶华,王梦亮,等. 黄芩愈伤组织中多酚氧化酶活性与黄芩苷合成的关系研究[J]. 中草药,2009,40(11):1796-1799.
- [7] 王海波,沙明,邸学. 均匀设计法与正交设计法在复方工艺中应用比较[J]. 辽宁中医杂志,2005,32(1):71-72.
- [8] 韩会玲,宋小妹,张选军. 黄芩苷提取工艺的改进[J]. 陕西中医学院学报,1997,20(4):35-36.
- [9] 李康,张东向,张磊,等. 均匀设计法优化黄芩愈伤组织培养基[J]. 生物技术,2006,16(6):62-64.
- [10] 王伟玲,王展,王晶英. 植物过氧化物酶活性测定方法优化[J]. 实验室研究与探索,2010,29(4):21-23.

过表达 miR398 对烟草抗旱性的影响

颜秦峰, 李科友, 石振楠, 王琳, 武永军

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以烟草为试材, 构建了拟南芥 *MIR398* 过表达载体, 对烟草进行了转基因试验, 研究了转基因烟草 T₁ 代与野生型烟草在干旱条件下超氧阴离子、丙二醛、游离脯氨酸含量的差异。结果表明: 该试验成功将拟南芥 *MIR398* 基因转入烟草中, 与野生型相比, 转基因烟草在干旱胁迫下丙二醛与超氧阴离子含量都有所升高, 脯氨酸含量则相对降低。该试验结果说明了 miR398 在植物抗旱过程中的作用。

关键词: miR398; 转基因; 烟草; 抗旱性

中图分类号: S 572 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)13-0111-06

干旱胁迫会导致植物体发育不良, 叶片变黄, 生长受到抑制, 严重时影响作物产量^[1-2]。干旱胁迫会激发

植物体内的许多生理生化反应和代谢变化使植物适应环境变化, 并帮助其度过逆境。近年来的研究发现, miRNA 作为一种重要的调控因子也能够参与到植物体响应外界胁迫的过程中^[3-5]。Sunkar 等^[6]在干旱、盐害、冷害、脱落酸胁迫下构建拟南芥幼苗的小 RNA 文库, 较早克隆出了 miR398 等 26 个与逆境胁迫应答相关的 miRNAs。Jones-Rhoades 等^[7]采用了比较基因组学的方法成功预测出了拟南芥和水稻基因组中十分保守的 miR398 家族, 其家族包括 3 个成员: miR398a、miR398b 和 miR398c。其中 miR398b 与 miR398c 的成熟序列完全

第一作者简介: 颜秦峰(1989-), 男, 硕士, 现主要从事植物抗逆分子生物学等研究工作。E-mail: namelessfit@hotmail.com

责任作者: 武永军(1974-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事植物抗逆分子生物学等研究工作。E-mail: wuyongjun@nwsuaf.edu.cn

基金项目: 高校基本科研业务费专项资助项目; 国家自然科学基金资助项目(30600384); 西北农林科技大学大学生创新性实验计划资助项目。

收稿日期: 2013-03-19

Analysis of the Correlation Between Baicalin and Peroxidase Activity in the Callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi

JIAO Zhan-zhan, ZHANG Dong-xiang, ZHAO Jing, JIA Bin, MENG Qing-wei, ZHANG Chao

(College of Life Science and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: Taking the callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi as material, the relationship between the variation of peroxidase activity and baicalin secondary synthesis in the growth process of the callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi were studied. The results showed that during the growth cycle (27 days) of the callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi, the activity of the level of peroxidase and the accumulation of baicalin was positively correlated. During the former 15 days of the growth cycle of the callus of *Scutellaria baicalensis* Georgi, the skullcap callus was in its growth phase. The activity of the peroxidase express at a low level. The synthesis of baicalin was slow. During 15 to 21 days, the callus was in its stable phase. The activity of peroxidase express at high levels and reached its maximum, at the same time baicalin rapidly synthetised and reached its maximum. During 21 to 27 days, the callus was in its aging period, while the activity of peroxidase reduced. The synthesis of baicalin almost stopped. L₉ (3⁴) orthogonal table was used to optimize the ratio of medium 6-BA, carbon sources, nitrogen sources, the pH. The optimal culture conditions were 6-BA 2 mg/L, carbon source: 20 g sucrose+10 g glucose, nitrogen source (NH₄⁺) 30 mmol/L, pH 6.0.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; callus; baicalin; peroxidase activity; orthogonal design