

人参发状根与栽培人参有效成分的比较研究

盖玉红¹, 王文慧¹, 王沥浩¹, 魏 健²

(1. 吉林农业大学, 吉林 长春 130118; 2. 长春师范学院 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘 要:为了研究人参发状根这种有别于人参的特殊器官与人参之间的关联, 采用考马斯亮蓝法测定了人参各部位的蛋白含量, 同时采用标准曲线法测定了人参发状根与其它不同部位的皂苷含量、游离氨基酸含量、可溶性糖含量、过氧化物酶含量和丙二醛含量等各项生理生化指标, 并与栽培人参根的各部位进行比较。结果表明:人参发状根中的皂苷含量高于栽培人参中的皂苷含量, 且以人参芦头和人参须根的皂苷含量最高; 固体培养的人参发状根和液体培养的人参发状根的皂苷含量相比, 尤以液体培养的人参发状根的皂苷含量最高, 可达 3.05%, 发状根的丙二醛 MDA 与栽种人参芦头和人参须根中的 MDA 均偏低。

关键词:人参发状根; 固体培养; 液体培养; 人参皂苷

中图分类号:S 567.5⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)07-0166-04

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为五加科(Araliaceae)多年生草本植物, 生长周期长, 并且对生长土壤及环境的要求极高, 所以也是人参资源稀少的原因。人参主要分布在亚洲东部区域的中国、朝鲜、日本、俄罗斯东部靠近中国的部分地区。在中国历史上, 中国人参(野山参)分布于太行山脉上党一带, 长白山脉及其迎山区和大、小兴安岭一带的林区。目前我国人参主要分布在吉林省的长白山脉、通化地区、延边朝鲜族自治州, 辽宁省丹东及本溪地区和黑龙江省的大小兴安岭一带^[1]。

人参是中国千百年来流传下来的中药瑰宝, 作为我国传统的名贵药材有着悠久的药用历史, 被我国第一部药学著作《神农本草经》所收录, 将其列为上品, 因其大补元气, 固脱生津以及安神等功效, 被称为闻名遐迩的“东北三宝”之首, 素有“百草之王”的美誉^[2]。现通过含有 Ri 质粒的发根农杆菌诱导出人参发状根, 研究人参发状根与人参之间的关联, 检测人参发状根的皂苷含量和各项生理生化指标, 并与栽培人参根的各部位进行比较, 以期大规模生产有活性的人参发状根总皂苷提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试人参为 2~3 a 生生长健壮的“二马牙人参”, 购

于集安人参市场。农杆菌菌种为发根农杆菌 A4 菌株, 由中国农业科学院特产研究所李昌禹老师惠赠。抗生素与化学试剂药品: Cef 和 Cb 购自华北制药股份有限公司; 酵母提取物(Yeast extract)、蛋白胨(Peptone)购自 OXOID 公司; MS(Murashige and Skoog)粉及植物凝胶(Phyta gel)购自 Sigma 公司; 分析纯化学试剂购自北京化工。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体的准备 将完整的人参用水洗净泥沙, 洗净后取主根部位用小毛刷仔细清洗, 用 70% 酒精清洗, 无菌水清洗 3~5 次, 再用 1% 升汞灭菌 10~12 min, 无菌水清洗 3~5 次。将灭菌后的主根切成 1~1.5 cm 厚的圆片, 置于无激素的 MS 基本培养基上黑暗培养 1~3 d, 备用。

1.2.2 Ri 质粒遗传转化获得发状根 取过夜培养的 A4 发根农杆菌 500 μ L 加入 50 mL 新鲜的 YEB 液体培养基中置于 180 r/min 摇床上 27℃ 黑暗震荡培养 2~4 h 后达到 OD₆₀₀=0.5~1.0 时取出, 用灭过菌的手术刀轻蘸取菌液, 将携带菌液的手术刀在预培养后的人参根片上倾斜划 3 刀, 将侵染后的人参根片放入新鲜的 MS 基本培养基上 24℃ 暗培养。侵染 5~6 周后, 在部分被侵染的人参根片上生长出发根, 这种发根即为经过发根农杆菌转化成功的含有 Ri 质粒的副产物, 也被称为发状根。经过抑菌培养, 抑制发根农杆菌生长, 得到无激素自养并快速增殖的发状根。

1.2.3 人参发状根与人参根各部位总皂苷提取 取人参发状根组织(固体培养基和液体培养基培养的发状根)放在 60℃ 烘箱中烘干至恒重, 然后称取烘干后的干燥组织 0.5 g 干燥样品, 加入 50 mL 甲醇溶液浸泡 24 h, 在频率 22 Hz 的超声波中提取 10 min, 连续提取 6 次,

第一作者简介:盖玉红(1980-), 女, 博士, 实验师, 研究方向为植物遗传转化。

责任作者:魏健(1980-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为药用植物组织培养。E-mail: 148050459@qq.com

基金项目:吉林省教育厅科研资助项目(吉教科合字[2012]第 59 号; 吉教科合字[2011]第 191 号)。

收稿日期:2012-12-17

80℃水浴蒸干,先用乙酸乙酯脱脂3~4次,再用正丁醇萃取3~4次,合并所有正丁醇溶液,蒸干后用50 mL甲醇定容,此时提取出的总皂苷全部溶解在甲醇溶液中,进行含量测定^[3]。

1.3 项目测定

1.3.1 考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白质含量 牛血清白蛋白配成含蛋白质 100 μg/mL 的标准蛋白溶液。以蛋白质浓度为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。称取人参根的不同部位以及培养 28 d 的人参发状根鲜样各 0.5 g,置于 5 mL 蒸馏水或缓冲液中研磨提取吸取样品 1.0 mL 放入具塞试管中,加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,充分混匀,放置 2 min 后,在 595 nm 下比色,记录吸光值,并通过标准曲线查得蛋白质含量。

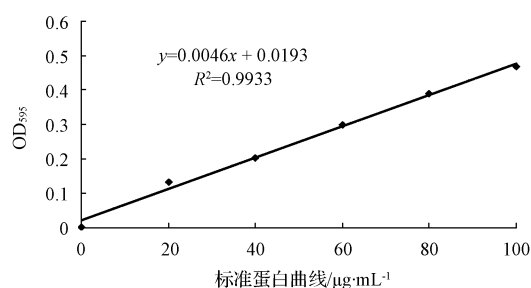


图1 蛋白含量标准曲线

Fig. 1 The standard curve of protein level

1.3.2 游离氨基酸含量测定 取人参不同部位组织 0.5 g 加 5 mL 10% 醋酸研磨,离心取上清液 0.5 mL,用 pH 5.4 醋酸盐缓冲液,定容至 25 mL,然后取制备好的样品提取液 10 mL,加入 20 mL 试管中,在水浴锅中沸水煮沸 15 min,目的是沉淀样品中的蛋白质氧化抗坏血酸,冷却备用。

1.3.3 可溶性糖含量测定 吸取 0.5 mL 样品液于试管中,加入 1.5 mL 蒸馏水,按照制作标准曲线的方法,按顺序分别加入苯酚、浓硫酸溶液,显色并测定光密度。分别作出 3 个平行样。由标准线性方程求出可溶性糖的含量,计算样品中可溶性糖的含量。可溶性糖含量 (%) = $(C \times V_T \times \text{稀释倍数}) / (V_1 \times W \times 10^6) \times 100\%$,式中: C:标准方程求得糖量(μg), V_T :提取液体积(mL), V_1 :吸取样品液体积(mL), W:组织重量(g)。

1.3.4 过氧化物酶(POD)活性测定 取 1.0 g 人参根部不同部位组织和人参发状根分别剪碎,置入预冷的玻璃匀浆杯中,再加入预冷的 20 mM KH_2PO_4 5 mL 进行冰浴研磨提取。再将匀浆液低温离心 8 000 r/min 15 min,上清液为酶粗提液,定容到 50 mL 测定。过氧化物酶活性($\text{U} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) = $(\Delta A_{470} \times V_T) / (W \times V_s \times 0.01 \times t)$,式中: ΔA_{470} :反应时间内吸光度的变化, W:植物鲜重(g), V_T :提取酶液总体积(mL), V_s :测定时取用酶液体积(mL), t:反应时间(min)。

1.3.5 丙二醛含量测定 称取人参根部各部位和人参

发状根各 1 g,分别剪碎,加入 2 mL 10% TCA 和少量石英砂,在研钵中研磨至匀浆再加 8 mL TCA 进一步研磨,匀浆液在 4 000 r/min 离心 10 min,上清液为样品提取液。MDA 浓度($\mu\text{mol/L}$) = $6.45 \times (\text{OD}_{532} - \text{OD}_{600}) - 0.56 \times \text{OD}_{450}$, MDA 含量($\mu\text{mol/g} \cdot \text{FW}$) = MDA 浓度($\mu\text{mol/L}$) × 提取液体积(L) / 植物组织鲜重(g)。

2 结果与分析

2.1 不同培养基中人参发状根中培养周期的确定

从图 2 可看出,随培养时间的增长,固体培养的发状根和液体培养的发状根的生物量均有不同程度的增加,而在液体培养基中发状根的生物积累量增长的非常快,而且培养的时间越长,其生物积累量越多,在 28 d 的时候液体培养发状根生物积累量已经增长到了 11.31 g, 35 d 时生物积累量增长到 11.81 g,基本接近平台期,不再过多繁殖;发状根的皂苷含量变化稍有不同,在前期一直与时间呈正相关,固体和液体培养的发状根皂苷含量在 28 d 都达到了皂苷的最大含量,分别为 2.21% 和 3.01%;但是当时间延长至 35 d 时液体培养的发状根皂苷含量略有下降,而固体培养的发状根皂苷含量下降的比较多,说明发状根在培养 28 d 时达到平台期,培养 35 d 时发状根的皂苷含量逐渐降低,可能由于发状根增长到一定积累量时,由于发状根内部积累成团装,封闭无法吸收氧气而逐渐从内部老化,影响了皂苷的含量。因此,根据人参发状根的生物积累量与皂苷含量综合比较,最终确定人参发状根的液体培养周期为 28 d,固体培养发状根也为 28 d。

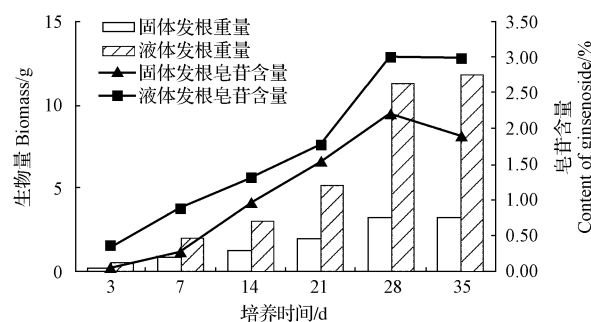


图2 发状根生物量和皂苷含量随时间变化情况

Fig. 2 Condition of the biomass and content of ginsenoside in hairy roots by time

2.2 人参发状根与参不同部位的皂苷含量比较

由图 3 可以看出,3 a 生的栽培人参根部芦头和须根的皂苷含量较高,分别达到 2.79% 和 2.74%,而人参主根的皂苷含量比芦头和须根要略低一点,但是也能达到 1.93%。但是诱导生成的发状根皂苷含量与 3 a 生的栽培人参相比基本一致,且液体培养 28 d 的发状根的皂苷含量相对较高,达到 3.05%,可能是由于液体培养的养料充足,液体形式的糖和营养物质容易吸收,有助于次生代谢物的积累。

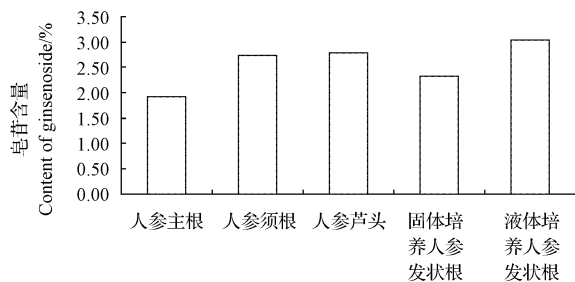


图3 人参发状根和人参根不同部位皂苷的含量

Fig. 3 The content of ginsenoside in different positions of ginseng and ginseng hairy roots

2.3 人参发状根生理生化指标的变化

2.3.1 可溶性总蛋白含量 植物体内的可溶性蛋白质大多是参与各种代谢的酶类,其含量的变化可以了解植物总的代谢过程。生物体内的新陈代谢是在液体环境中进行的,所以可溶性蛋白质的含量标志着更旺盛的生命活动^[4]。由图4可以看出,人参的主根部分含可溶性蛋白质含量最高,达到2.173 mg/g FW,相比其它部位,主根含水量最高,其水溶性物质含量也较高,说明主根的细胞内合成并积累了大量蛋白质;人参的须根和芦头的可溶性蛋白含量几乎一样,但含量却只有主根一半左右,分别为0.807 mg/g FW和0.872 mg/g FW,而液体培养的发状根的蛋白质含量却和主根蛋白质含量相似,为1.665 mg/g FW,推测其可能是由于液体培养时其培养基所含营养物质较多,尤其糖类物质提供了发状根生长所需的营养,且含量充足;固体培养发状根蛋白质含量较液体培养发状根蛋白质含量低,为1.043 mg/g FW,可能发状根更容易吸收液体培养基养分。

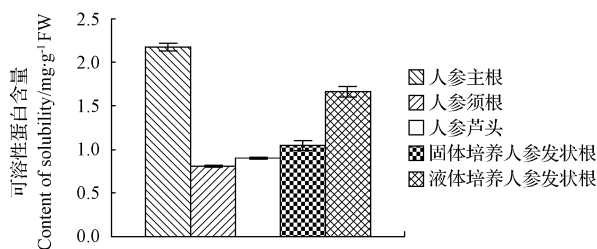


图4 人参发状根和人参各部位可溶性蛋白质的含量

Fig. 4 The content of soluble protein in different positions of ginseng and ginseng hairy roots

2.3.2 游离氨基酸含量 植物吸收、同化的氮素主要以氨基酸和酰胺的形式进行运输,所以测定植物体内游离氨基酸含量对研究之物在不同条件下及不同生长使其氮代谢变化、植物对氮素的吸收、运输、同化及营养状况等有重要意义。由图5可知,液体培养的人参发状根中的游离氨基态氮含量最高,每100 g样品中游离氨基酸含量达到31.036 mg,其次是人参主根和固体培养的人参发状根,分别为25.099和18.794 mg,在人参须根跟含

量较低,为16.415 mg,而在人参芦头中含量最低,为12.457 mg,由此说明,在离体培养过程中,培养基供给了丰富的营养物质,比3 a生的人参主根游离氨基酸含量都高。同时也说明,液体培养基中的人参发状根生长活性较强,固体培养的人参发状根与之相比生理活性较弱。

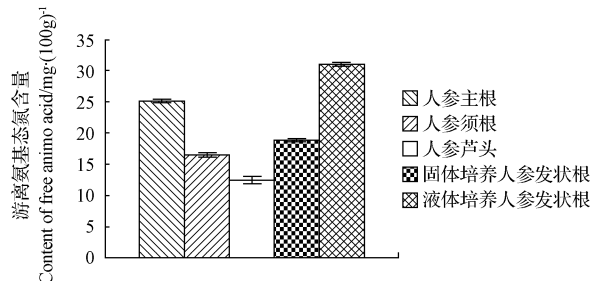


图5 人参发状根与参不同部位游离氨基态氮含量

Fig. 5 Content of free amino acid in different positions of ginseng and ginseng hairy roots

2.3.3 可溶性糖含量 可溶性糖是植物生长发育和基因表达的重要调节因子。植物体内可溶性糖的变化既能在生理水平上表征外界环境的干扰程度,又能作为构建物质提供能量和底物,也可从物质分配的角度表征各生活史型间的转变。由图6可以看出,液体培养人参发状根可溶性糖含量最高,达到5.58%,固体培养的人参发状根与人参主根可溶性糖含量基本一致,人参须根可溶性糖含量比较低,达到3.86%,人参芦头可溶性糖含量最低,为2.71%。

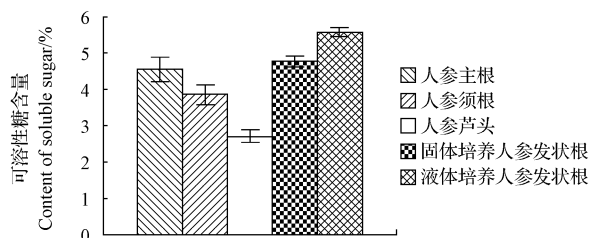


图6 人参发状根和人参各部位可溶性糖含量变化

Fig. 6 The change of soluble sugar in different positions of ginseng and ginseng hairy roots

2.3.4 过氧化物酶(POD)活性 POD活性在植物生长发育过程中的不同阶段会不断发生变化,通过对POD活性的测定可以探究植物处在某一阶段的新陈代谢状况。由图7可以看出,液体培养发状根的POD活性最高,达到60.590 U/g FW,固体培养的发状根POD含量也较高,离体培养的发状根普遍比人参根的各部位POD活力都高,可能是由于发状根为无菌培养,发状根生长环境良好,无逆境影响,呼吸作用较强,使细胞抗过氧化物破坏能加强;而土壤栽培的3 a生人参可能由于外界生长环境有细菌的共生,土壤环境的影响而使人参内的POD活性较低,另外,须根的POD活性较高,可能是须

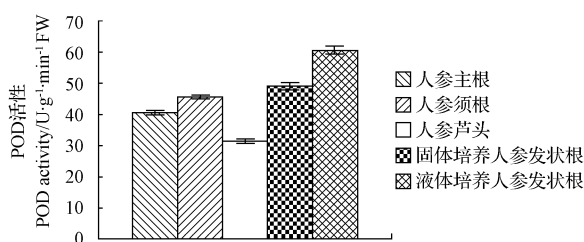


图7 人参发状根和人参不同部位 POD 酶活性变化

Fig. 7 The change of POD activity in different positions of ginseng and ginseng hairy roots

根的表面积大,呼吸作用比主根和芦头都强。

2.3.5 丙二醛含量测定 MDA 数量的多少能够代表膜脂过氧化程度,也可以反映植物组织的抗氧化能力的强弱。由图 8 可知,人参根的各部位以及人参发状根的丙二醛(MDA)含量普遍较低,可能是由于没有逆境的影响,没有引起细胞膜脂过氧化。其中须根和芦头的 MDA 含量基本一致,固体培养的发状根 MDA 含量最低,可能是由于固体培养基提供的养分固定,发状根生长稳定。

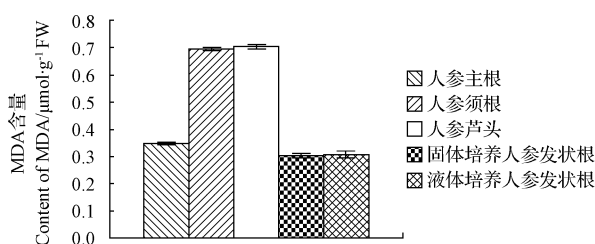


图8 人参发状根和人参根各部位的 MDA 含量

Fig. 8 The content of MDA in different positions of ginseng and ginseng hairy roots

3 讨论

随着植物细胞工程与基因工程技术的不断发展,发状根培养已经广泛的被应用到生产次生代谢产物、作物品种改良和特种植物栽培以及植物生物反应器等领域^[5]。由于发状根具有生长迅速、易于培养,且稳定、不易变异等特点,而且许多试验表明发状根的次生代谢产物含量往往比植物自身合成的含量还要高几倍甚至几十倍^[6],因此,应用发状根培养技术实现大规模培养,达到工业化生产次生代谢产物的目的。

为了研究人参发状根这种有别于人参的特殊器官与人参之间的关联,该试验检测了人参发状根的各项生理生化指标,并与栽种人参根的各部位进行比较,结果表明,液体培养的发状根在游离氨基酸含量和可溶性糖含量均比栽种人参主根含量要多,说明液体培养的发状根营养供给充足,体内新陈代谢旺盛;另外发状根的丙二醛(MDA)比栽种人参芦头和人参须根要小,说明人参发状根较少受到外界环境的胁迫,没有自由基的毒害作用。

参考文献

- [1] 闫兆光. 人参生产技术现状与发展对策[J]. 中国现代中药, 2005, 7(11): 31-32.
- [2] 李向高. 人参研究(续)[J]. 人参研究, 1989(1): 10-13.
- [3] 唐伟卓, 赵余庆, 贾力. 人参和人参皂苷新近研究证明的生物活性和临床用途[J]. 人参研究, 2010, 22(2): 32-38.
- [4] 李红艳. 人参蛋白活性研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2010.
- [5] Guillon S, Tre'mouillaux-Guiller J, Pati P, et al. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects Commem-tary[J]. Curr Opin Plant Biol, 2006, 9(3): 341-346.
- [6] 张萌麟. 发状根农杆菌的质粒转化和赛蕤若的发状根培养[J]. 植物学报, 1988, 30(4): 368-372.

Study on Comparison of Physiological and Biochemical Composition Between Hair Root of Ginseng and Cultivated Ginseng

GAI Yu-hong¹, WANG Wen-hui¹, WANG Li-hao¹, WEI Jian²

(1. Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. College of Life and Sciences, Jilin Changchun Teachers University, Changchun, Jilin 130118)

Abstract: To study the association between ginseng and specific organ hairy root of ginseng which is different from ginseng, the protein contents in every part of ginseng were determined by coomassie brilliant blue method, and the saponin content, free amino acid content, soluble sugar content, peroxidase and malondialdehyde content in ginseng root and other hairy parts were determined using the standard curve method; the saponin content in hairy root of ginseng and other physiological and biochemical indexes were determined and compared with every part in cultivated ginseng. The results showed that the saponin content in hairy roots of ginseng was higher than in liquid culture, and the saponin contents in rhizoma and fibrous roots were the highest. It indicated that in liquid and solid culture, the saponin content in hairy root was as same as or more higher than in root, especially the saponin content in liquid culture reached the highest, up to 3.05%, and the MDA content in hairy root of ginseng was lower than in rhizome and fibrous roots.

Key words: hairy roots of ginseng; solid culture; liquid culture; ginsenoside