

长春花叶片三种生物碱含量及合成基因表达的初步研究

田跃胜¹, 陆平², 王名雪¹, 唐克轩¹, 赵静雅¹

(上海交通大学 农业与生物学院, 上海 200240; 2. 华南理工大学 生物科学与工程学院, 广州 510006)

摘要: 为探明长春花叶片中生物碱的动态变化和生物碱合成途径中的关键酶基因的表达量, 利用高效液相色谱技术(HPLC)测定了 5 对真叶期、开花前期、出现花蕾期、出现开花期、成熟期 1 和成熟期 2 等 6 个生长阶段的长春花幼嫩、中等成熟、成熟三种叶片的生物碱(文多灵、长春质碱、长春碱)的含量。幼嫩叶片中文多灵、长春质碱和成熟叶片中长春碱的含量最高。长春花叶片的最佳采集期是花蕾期到开花期。利用荧光定量 PCR 技术检测了长春花叶片中生物碱合成途径中 10 个相关基因的相对表达量, *GGPP*, *G10H*, *SLS*, *STR*, *D4H* 及 *DAT* 这 6 个基因对生物碱含量贡献较大, *ASA* 及 *TDC* 基因对生物碱的增加的作用不明显。

关键词: 长春花; 萜类吲哚生物碱; 荧光定量 PCR; 高压液相色谱

中图分类号: Q 949.776.5; Q 946.88

文献标识码: A

Preliminary Studies on Dynamic Change of Three Alkaloids and Expression of The Associated Biosynthetic Genes In *Catharathus Roseus* Leaves

TIAN Yue-sheng¹, LU Ping², WANG Ming-xue¹, TANG Ke-xuan¹, ZHAO Jing-ya¹

(1. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China;

2. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 51006, China)

Abstract: In order to clarify the dynamic change of three alkaloids (TIAs including vindoline, catharanthine and vinblastine) and the expression of the associated biosynthetic genes in the *Catharathus Roseus* leaves (young, medium and old) at different growing stages, high performance liquid chromatography was applied to determine the contents of TIAs at the leaf period, pre-flowering period, bud stage, flowering period, fully-mature period 1 and fully-mature period 2 in five pairs of leaves from *Catharathus Roseus*. In addition, the expression of the associated biosynthetic genes was analyzed by molecular biological technique (real time PCR, FQ-PCT). The results showed that highest contents of vindoline and catharanthine were presented in young leaves while the content of vinblastine was highest in old leaves. The best time for collecting the leaves of *Catharathus Roseus* was between the stage of alabastrum and flowering since the maximum contents of TIAs could be extracted in this period. The data from the

收稿日期: 2011-02-21

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2007AA10Z189).

作者简介: 田跃胜和陆平为本文共同第一作者, 田跃胜(1982), 男, 硕士研究生, 研究方向: 植物生物技术,

E-mail: tianyuesheng006@163.com;

陆平(1987), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物生物技术, E-mail: luping2763618@126.com;

赵静雅(1974)为本文通讯作者, 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向: 植物生物技术, E-mail: zhaojy@sjtu.edu.cn

FQ-PCR determination indicated that the expression of TIAs contents in *C. Roseus* leaves was more affected by the six genes including *GGPP*, *GOH*, *SLS*, *STR*, *DAH* and *DAT* while two genes (*ASA*, *TDC*) showed less influence on the production TIAs.

Key words: *Catharanthus Roseus* L. G. don; Terpenoid indole alkaloids (TIAs); fluorescent real time quantitative PCR (FQ-PCR); high performance liquid chromatography (HPLC)

文多灵 (Vindoline)、长春质碱 (Catharanthine)、长春碱 (Vinblastine) 三种生物碱产于药用植物长春花 (*Catharanthus roseus* L. G. Don), 具有抗肿瘤作用。但这些萜类吲哚生物碱 (Terpenoid indole alkaloids, TIAs) 在天然长春花植株中含量较低并且具有组织和生长阶段的特异性, 不能满足市场需求, 使其价格较为昂贵^[1]。利用代谢工程在长春花中过量表达 TIAs 生物合成途径中的关键酶基因, 为提高植物生物碱含量和改变生物碱组成成份开辟了新的途径^[2]。然而长春花 TIAs 的生物合成途径十分复杂, 包含了多个关键酶和转录因子。目前已有 30 多个催化酶和转录因子基因被克隆^[3]。因此探明长春花叶片中生物碱的动态变化规律和生物碱合成途径中的关键酶和转录因子的表达量是十分必要的。

1 材料与方法

1.1 长春花叶片材料的获得

实验于 2010 年 5 月在上海交通大学闵行校区温室内进行。将长有 2~3 对功能叶的长春花幼苗移至花盆 (直径 13 cm)。实验用土壤为黑土, pH 值为 7.5~8.0。在长春花生长的 6 个时期 (见表 1) 即 5 对真叶期、开花前期、出现花蕾期、出现开花期、成熟期 1 和成熟期 2 采集长春花幼嫩、中等成熟、成熟三种叶片 (图 1)。各样品一部分于 50 °C 烘箱中烘至恒重, 磨成粉末和剩余部分置于 -70 °C 下密封保存备用。

表 1 长春花生长阶段的划分

Tab. 1 Division of *Catharanthus* growth stages

编号	生长阶段	植株特征
1	5 对真叶期	七月份
2	开花前期	七月份
3	出现花蕾期	八月份
4	出现开花期	八月份
5	成熟期 1	九月份 刚出现种荚时
6	成熟期 2	九月份 部分叶片开始呈黄白色

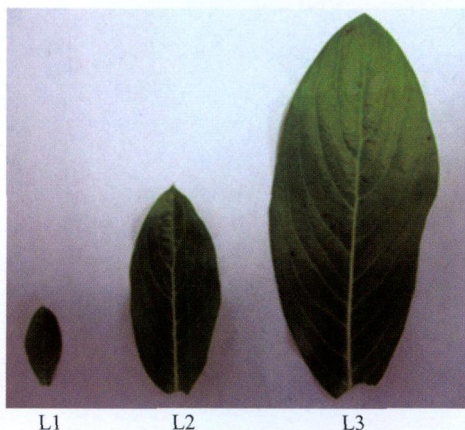


图 1 三种形态的长春花叶片

Fig. 1 Three forms of *Catharanthus* leaves

1.2 生物碱的测定

1.2.1 样品处理

称取 0.1 g 干粉于 2 mL Eppendorf 管中, 加入 1 mL 甲醇, 浸泡 3 h, 然后用超声波 40 W 处理 30 min, 5,000 r/min 离心 10 min, 取上清用 0.4 μm 的滤膜过滤。

1.2.2 HPLC 分析条件

仪器: Waters Alliance 2695 高效液相色谱仪; 色谱柱: DiKana Diamonsil C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)

流动相为: A: 乙腈, B: 甲醇, C: 0.7% 二乙胺 (用磷酸调整 pH=7.2, 抽滤, 超声波除去气泡)。流动相比例为 A: B: C=7: 9: 6, 流速为 1 mL/min, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL, 保留时间分别为 10.1、14.1 和 17.6 min。文多灵、长春碱、长春质碱标准品购自 sigma 公司。

1.3 定量 PCR 分析

提取生物碱含量差异较大的长春花叶片的总 RNA (见图 2), 用 Real time PCR 试剂盒 (Takara 公司) 按照说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA。选取长春花生物碱合成途径中的 10 个关键酶基因进行引物设计 (见表 2)。并配制荧光定量 PCR 反应体系。循环参数为: 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40 个循环。采用 Ct 比较法^[4], 计

算方法如下: $C_{ti} = C_t, X_i - C_t, R_i$ (样品中目的基因与内参基因的 Ct 差); $C_t, CK = C_t, CK - C_t, R_{CK}$ (对照中目的基因与内参基因的 Ct 差); $C_{ti} = C_{ti} - C_t, CK$ (样品与对照的标准化 Ct 差); $Expression\ ratio = 2^{-C_{ti}}$

表2 长春花定量 PCR 检测所用的引物

Tab. 2 Primers used in Real time PCR analysis of *C. Roseus*

引物名称	序列(5'→3')	长度/bp	退火温度/℃
rps9 f	GCGTTGGATGCTGAGTTGAAG	257	55
rps9 r	GCGGCTCAAGGAAGTCTCTAC		
str rtp f	GCCTTACCTTCGATTCAAACG	287	55
str rtp r	GTGGCTAGTTGTGTGGCATAAC		
dat rtp f	CTTCTTCTCATCACGTACCAACTC	172	55
dat rtp r	ATACCAAACCTCAACGGCCTTAG		
dx r rtp f	CAAGCCTCAGTTAGTTTCTGTCAGAA	228	55
dx r rtp r	ATTGGCCAAGGCAATGTCTTTCCAG		
g10lr rtp f	GCTCACAAATCAATCAAATTCTCCGT	216	55
g10lr rtp r	CAACCGCTTCTCCGCTCTGGCTATTT		
tde rtp f	GCTCGAGGATGACGTGGCGGCGG	263	55
tde rtp r	ACTCAGACTCAGTGAGTCAACTCGTT		
prx f rtp f	GCGATTATCAGTGCTGCTGGTGGGA	237	55
prx f rtp r	GTGGAAGTTTGCTATTGTGCTGCC		
sls rtp f	CTTCACTCTTGAGAACTAAAGTCAA	266	55
sls rtp r	AGTCAATTGTGAGATCCATGAGTT		
cpr rtp f	TGGTTGTAGAGGAAATGATAGAGG	244	55
cpr rtp r	ATTCTCAGCCATGCAGCAAAGTCAT		
d4lr rtp f	CATGTTGGACTAAATAAGCGTCGGC	236	55
d4lr rtp r	AGAAGTACTCGGGCGATGCTCGG		
ggpp rtp f	AATTGTGGGTGGTGCTAATGATGAAC	251	55
ggpp rtp r	GGAGCAGCCTTTT CAGGATCAAACCTC		
asa rtp f	CAAGCTGGTGAGGATAGTAGCCG	272	55
asa rtp r	GCGATGTGGCAAGGAGACGACTTC		

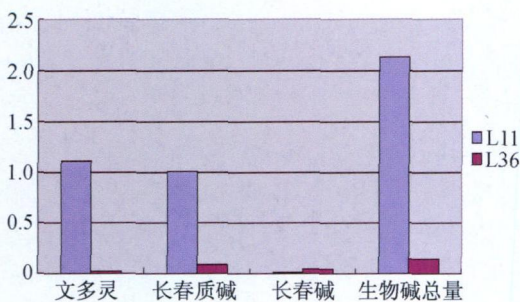


图2 L11、L36 叶片中生物碱含量的比较

注: L11 长春花叶片的生物碱总量为 L36 的生物碱含量的 21 倍, 文多灵为 50 倍, 长春质碱约为 14 倍, L36 叶片中的长春碱含量约为 L11 的 3 倍

Fig. 2 The content of total alkaloids of *Catharanthus* leaves L11, L36 in different times

Note: Compared to the contents in L36 leaves from *Catharanthus Roseus*, L11 leaves contain 21 fold of total TIAS, 50 fold of vindoline, 14 fold of catharanthine. But, L36 leaves contains 3 fold of vinblastine

2 结果

2.1 不同时期长春花三种叶片形态中生物碱含量的比较

长春花吲哚生物碱文多灵、长春碱、长春质碱具有组织器官和生长发育的特异性(见图3)。不同时期长春花三种叶片形态中文多灵含量的差异较大, 其中最高含量为 1.18 mg/g, 最低含量为 0.02 mg/g, 相差大约 60 倍左右。长春质碱的含量为 0.109~1.16 mg/g, 大约相差 10 倍。长春碱在长春花叶片中的含量比较低, 最高含量只有万分之四。长春碱的最高含量为最低含量的四倍, 为 0.01~0.04 mg/g。

2.2 同一形态长春花叶片在不同时期生物碱含量的比较

在三种生长状态的长春花叶片中, 幼嫩叶片的

文多灵、长春质碱、长春碱的含量分别在开花期 (1.18 mg/g)、成熟期 2 (1.16 mg/g)、开花时期 (0.023 mg/g) 最高; 中等成熟叶片的文多灵、长春质碱、长春碱的含量分别在 5 对真叶生长期 (0.91 mg/g), 开花期 (0.99 mg/g)、成熟期 2 (0.028 mg/g) 最高。成熟叶片的文多灵、长春碱的含量分别在开花期 (0.32 mg/g), 成熟期 2 (0.038 mg/g) 最高, 而长春质碱在五对真叶生长期, 开花期, 花蕾期的含量差异不大, 大约为 0.34 mg/g (见图 4)。以长春花叶片的生物量最大为依据, 从花蕾期到开花期为最佳的采收期, 此时长春花植株生物碱含量最大。

2.3 生物碱合成途径中关键酶基因的相对表达量分析

环烯醚萜苷途径中的 *GGPP*、*G10H*、*SLS* 三个基因的表达可促进裂环马钱子苷的合成, *STR* 基因的表达量增加可使生物碱长春质碱的含量提高, *D4H* 和 *DAT* 基因的表达可促进文多灵的生成。文多灵和长春质碱在 *PRX* 基因编码的蛋白的催化下可促进长春碱的合成。莽草酸途径中的 *ASA* 和 *TDC* 基因对叶片中生物碱的增加没有明显的促进作用 (见图 5)。

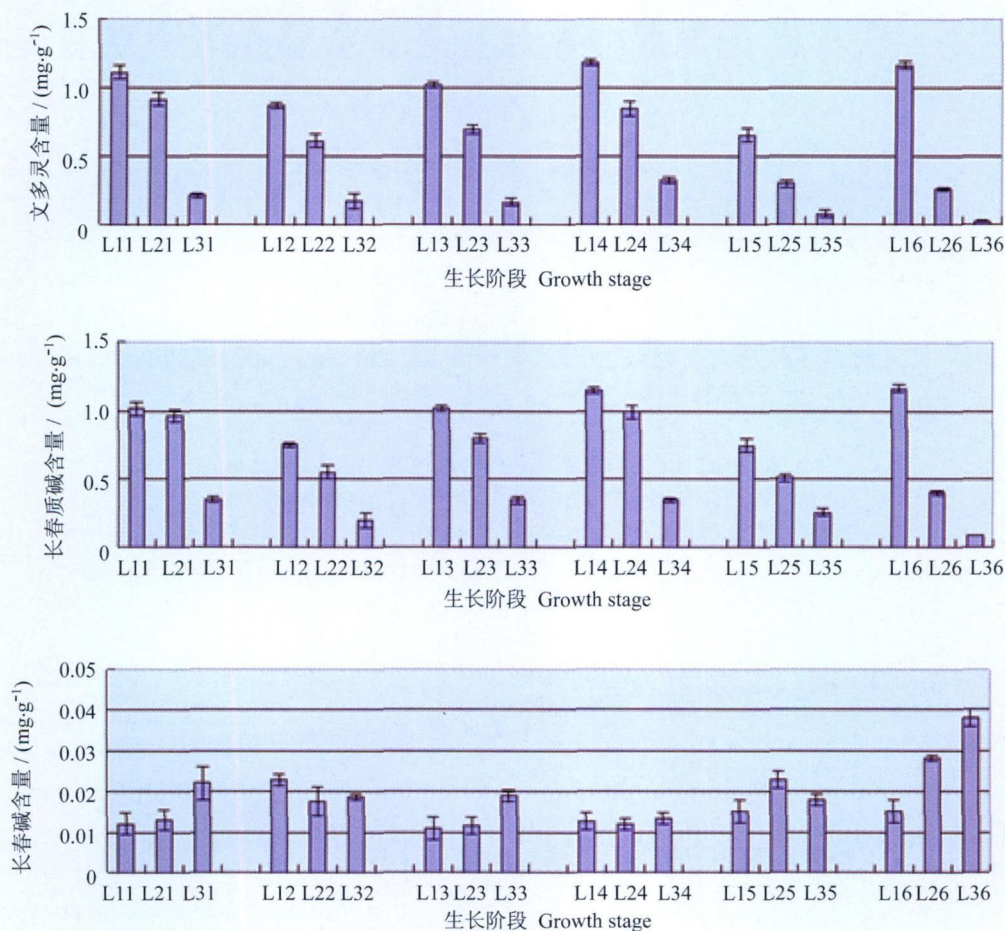


图 3 不同时期长春花三种叶片形态中生物碱的含量

注: L1(F6), L2(F6), L3(F6) 分别表示六个生长阶段 L1、L2、L3 状态叶片

Fig. 3 The content of TIAs in three forms of *Catharanthus* leaves

Note: The leaves of L1, L2, L3 in six growth stages are shown as L1(F6), L2(F6), L3(F6)

3 讨论

在长春花中, 长春花生物碱的含量及其微少, 并受到植株发育阶段和环境的影响^[5]。目前, 全世界

长春碱的年产量仅约 12 kg, 市场价格为大约 100 万美元/kg; 而长春新碱的年产量约 1 kg, 市场价格大约 350 万美元/kg^[6]。确定长春花生物碱含量分布的时空性, 具有重要的经济价值和社会效益。

长春花中生物碱的分析方法有薄层扫描法^[7]、

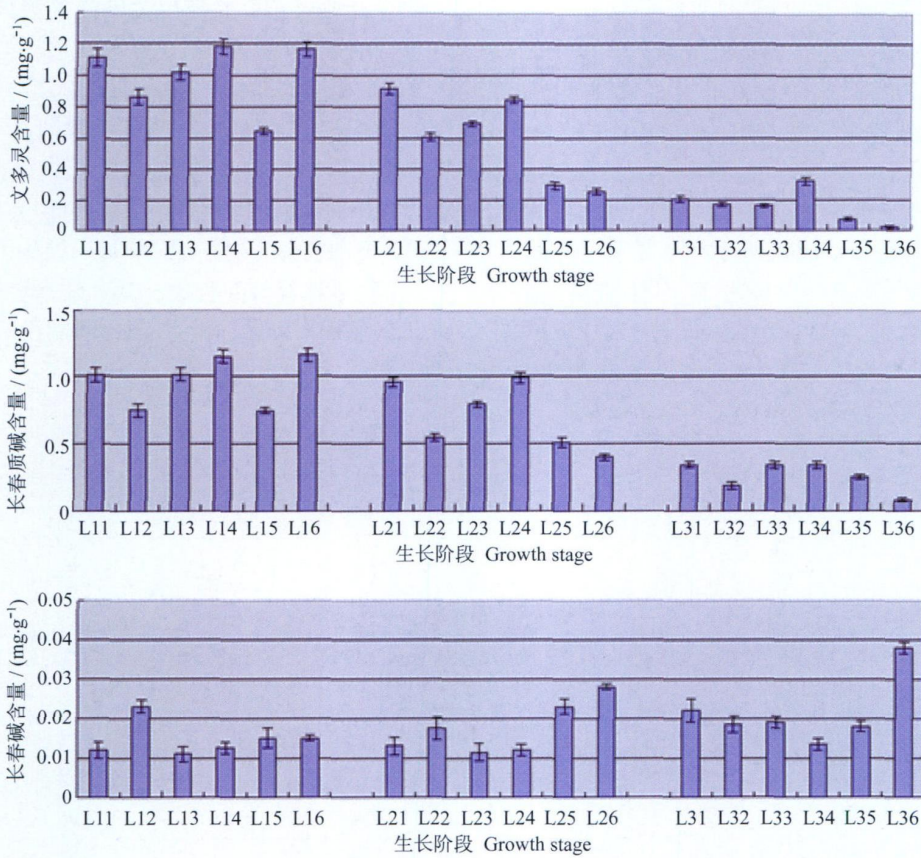


图 4 同一形态长春花叶片在不同时期生物碱含量的比较

注: L1(↑6), L2(↑6), L3(↑6) 分别表示六个生长阶段 L1、L2、L3 状态叶片

Fig. 4 The content of TIAs of Catharanthus leaves in different times

Note: The leaves of L1, L2, L3 in six growth stages are shown as L1(↑6), L2(↑6), L3(↑6)

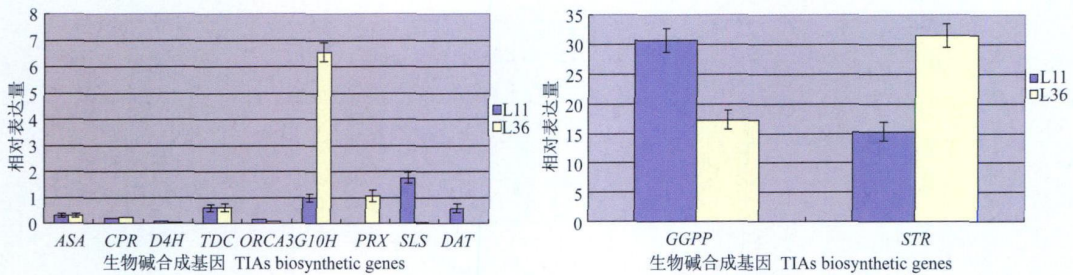


图 5 L11、L36 叶片中生物碱合成基因的相对表达量

Fig. 5 Quantification of the transcripts of TIAs biosynthetic gene in L11、L36

放射免疫法^[8]和高效液相色谱法等。高效液相色谱技术(HPLC)由于具有分离能力高,适用范围广,以及条件优化灵活性等优点成为长春花生物碱分析的主要方法。本实验采用 HPLC 分析了不同生长发育阶段长春花叶片的生物碱含量,幼嫩叶片中文多灵和长春质碱的含量比较高,成熟叶片中长春碱的含量比较高,这可能与长春花叶片的自我保护有关。通过对同一时期不同生长阶段的长春花叶片中文多

灵、长春碱、长春质碱含量的数据统计发现,花蕾期到开花期植株的三种生物碱含量最高,即为最佳采集期。

长春花 TIA s 生物合成上游有两条途径: 吲哚途径和类萜途径。由吲哚途径来的色氨酸经色氨酸脱羧酶脱羧生成衍生物色胺; 由类萜途径来的香叶基焦磷酸经香叶醇-10-脱氢酶脱氢生成 10-羟基香

(下转第 15 页)

- [10] Philippe B, Pierre G, Jean FC, *et al.* Distribution and genetic analysis of TTV and TTMV major phylogenetic groups in french blood donors [J]. **J Med Virol**, 2006, 78: 298-304.
- [11] Eva M, Jowita S, Bjørn G. Real time PCR methods for independent quantitation of TTV and TTMV [J]. **J Virol Meth**, 2002, 104: 59-67.
- [12] Helena C F, Ma'rcio C, Christian N. Mixed infections of adults and children with multiple TTV-like mini virus isolates [J]. **J Med Virol**, 2002, 68: 291-298.
- [13] Moen E M, Sleboda J, Grinde B. Serum concentrations of TT virus and TT virus like mini virus in patients developing AIDS [J]. **Aids**, 2002, 16(12): 1679-1682.
- [14] Matsubara H, Michitaka K, Horiike N, *et al.* Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother to neonatal transmission [J]. **Hepatology Res**, 2001, 21: 280-287.
- [15] Philippe B. Human circoviruses [J]. **Vet Microbiol**, 2004, 98: 95-101.

(上接第10页)

叶醇,再经多步反应合成裂环马钱子苷。然后,裂环马钱子苷与吲哚途径来的色胺在异胡豆苷合成酶催化下耦合成 TIA_s 的共同前体 3 α (S)-异胡豆苷^[9]。异胡豆苷经过不同的途径最后生成文多灵、长春质碱、蛇根碱、长春碱、长春新碱等其它生物碱。包含了多个关键酶和转录因子。目前已有 30 多个催化酶和转录因子基因被克隆。利用悬浮细胞培养和转基因毛状根技术确定了长春花生物碱合成途径中的 10 个关键酶基因(ASA、CPR、DAH、TDC、GGPP、STR、GIOH、PRX、SLS、DAT)。本实验利用定量 PCR 技术初步确定了 DAT、GIOH、SLS、STR、DAH、GGPP 长春花叶片生物碱合成途径中的关键酶基因,由于生物碱合成途径的复杂性,这些关键酶基因对生物碱含量的贡献需用转基因技术手段进一步确定。

参考文献:

- [1] Vand H R, Jacobs D I, Snocijer W, *et al.* The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology [J]. **Current Medicinal Chemistry**, 2004, 11(5): 607.
- [2] Oksman Caldentey K M, Inze D. Plant cell factories in the post-genomic era new ways to produce designer secondary metabolism [J]. **Trends in Plant Science**, 2004, 9(9): 433-440.
- [3] Liu D H, Jin H B, Chen Y H, *et al.* Terpenoid Indole Alkaloids Biosynthesis and Metabolic Engineering in *Catharanthus roseus*. **Journal of Integrative Biology**, 2007, 49(7): 961-974.
- [4] Joshua S Yuan, Ann Reed, Feng Chen, *et al.* Statistical analysis of real time PCR data [J]. **BMC Bioinformatics**, 2006, 7: 1471-2105.
- [5] 袁芳,王莹,潘琪芳,等.根癌农杆菌介导的 g10h 基因遗传转化长春花初步研究 [J]. **上海交通大学学报(农业科学版)**, 2009, 28(6): 606-610.
- [6] Loyola Vargas, V M, Galaz Avalos, *et al.* *Catharanthus* biosynthetic enzymes: the road ahead [J]. **Phytochem Rev**, 2007, 6: 307-339.
- [7] Tam M N, Nikolova Damyanora B, Pyuskyuler B. Quantitative thin layer chromatography of indole alkaloids II: Catharanthine and vindoline [J]. **Journal of Chromatography A**, 1995, 18: 849-858.
- [8] Arens H, Stockigt J, Weiler EW, *et al.* Radioimmunoassays for the determination of the indoalkaloids ajmalicine and erpentine in plants [J]. **Planta Medica**, 1978, 3: 34-37.
- [9] De Carolis E, De Luca V. Purification, characterization and kinetic analysis of a 2-oxoglutarate dependent deoxygenase involved in vindoline biosynthesis from *Catharanthus roseus* [J]. **Journal of Biological Chemistry**, 1993, 268: 5504-5551.