

# 甘草毛状根中内源植物生长调节物质的分析

丁家宜 向德军<sup>1</sup>

(植物组织培养研究室)

**摘 要** 用酶联免疫检测方法对通过 Ri 质粒遗传转化药用植物甘草后所获得的毛状根中之内源生长调节物质进行分析,结果在不添加任何植物生长调节物质的 1/2 MS 培养基上生长迅速的甘草毛状根中 IAA、ZR<sub>s</sub>、iPAs 的含量大大富在于同样培养条件下生长缓慢的甘草实生苗根中的含量,说明内源生长素、细胞分裂素类物质的高含量是甘草毛状根生长迅速的原因。

**关键词** 甘草毛状根;植物生长调节物质;吲哚乙酸;玉米素核苷类;异戊烯基腺苷类

随着植物基因工程研究的深入和迅速应用,必将对未来农业、林业、医药、环保等许多领域产生巨大影响。Ri(root inducing)质粒是除 Ti 质粒以外的另种植物基因工程的质粒载体,它存在于发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)中,也是一个双链共价闭合的环状 DNA 分子,大小在 180~250kb 之间,其上也有一段 T-DNA。Ri 质粒最突出的特点是具有诱导毛状根的特性,它转化植物后获得器官化的“毛状根系统”,具有生长迅速、次生代谢产物产量稳定及培养时不需外加生长调节物质等优点,所以近年来 Ri 质粒转化植物特别是药用植物获得了广泛的应用<sup>[1-4]</sup>。

按照 T-DNA 在转化植物中合成冠瘿碱的种类,可将 Ri 质粒分为农杆碱(Agropine)型、甘露碱(Mannopine)型和黄瓜碱(Cucumopine)型三类<sup>[5]</sup>。农杆碱 Ri 质粒是最常用的一种,其 T-DNA 被分隔为 TL-DNA 和 TR-DNA 两段,四个与根的形态建成有关的位点 rolA、B、C、D 均位于 TL 片段上,TR-DNA 含有合成生长素基因 1 与基因 2;甘露碱型 Ri 质粒仅有一段 T-DNA,没有与生长素合成酶基因同源的序列。所有 Ri 质粒都没有细胞分裂素合成酶的基因。

已知六大类植物生长调节物质在植物组

织培养、生物技术中起调节生长、分化作用的主要是生长素和细胞分裂素两大类物质。尽管 Ri 质粒的 T-DNA 上只含有生长素合成基因,但毛状根的培养不仅无需添加外源生长素,且不必添加外源细胞分裂素,却生长迅速。故本实验试图通过精确测定其内源生长调节物质的含量而找出一定的规律性。

植物生长调节物质的检测方法甚多<sup>[6,7]</sup>,本实验采用固相抗原型酶联免疫测定法(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, ELISA)<sup>[8]</sup>,所有免疫药盒均由南京农业大学提供。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

酶联免疫检测仪(DG3022 型,南京国营华东电子管厂)。

IAA ELISA 试剂:①洗涤缓冲液(WB): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  406 mg;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  6.23 g;  $\text{NaCl}$  17.54 g;用蒸馏水溶解,定容至 200 ml,临用前加 Tween-20 至 0.05%,4℃保存备用。②稀释缓冲液(DB): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  81.2 mg;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.246 g;  $\text{NaCl}$  3.51 g 加蒸馏水,加入明胶 0.6 g,加热完全溶解,冷至室温后定容至 400 ml,4℃备

用。③ 包被缓冲液(CB):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.3392 g,  $\text{NaHCO}_3$  0.5712 g, 用蒸馏水溶解, 定容至 200 ml, 于 4℃ 保存备用。④ 基质缓冲液(MB):  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  3.68 g; 柠檬酸 1.02 g, 用蒸馏水溶解, 定容至 200 ml, 于 4℃ 保存备用。⑤ IAA ELISA 药盒: 包括 IAA 包被液, IAA-Me 标准液、兔抗 IAA 抗体、阻断液、酶标二抗、正常兔血清(NRS)、邻苯二胺(OPD)、丁羟甲苯(BHT)、亚硝基甲基脒。

**ELISA 试剂** ① 洗涤缓冲液(WB):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5.8 g;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.5 g 与 NaCl 17.53 g, 用蒸馏水溶解, 定容至 200 ml, 调 pH 至 7.4, 临用前加 Tween-20 至 0.05%, 4℃ 保存备用。② 稀释缓冲液(DB): 明胶 0.8 g, 加入 200 ml 热水中, 待完全溶解后冷却至室温, 加  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  101.5 mg;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1558.25 mg 与 NaCl 4.385 g; 然后加蒸馏水定容至 500 ml, pH 7.4, 使用前加 Tween-20 至 0.05%, 4℃ 保存备用。③ 包被缓冲液(CB):  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.3392 g;  $\text{NaHCO}_3$  0.5712 g, 用蒸馏水溶解, 定容至 200 ml, 调 pH 9.5, 4℃ 保存备用。④ 基质缓冲液(MB):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  1.84 g; 柠檬酸 0.51 g; 用蒸馏水定容至 100 ml, 调 pH 5.0, 于 4℃ 保存备用。⑤ ELISA 药盒: 包括 ZRs (& iPAs) 包被液、ZRs (& iPAs) 标准液、兔抗 ZRs (iPAs) 抗体、阻断液、酶标二抗、正常兔血清(NRS)、邻苯二胺(OPD)、丁羟甲苯(BHT)、亚硝基甲基脒。

## 1.2 方法

**1.2.1 甘草毛状根的培养** 用活化的发根农杆菌 R1000 和 R1000(pTVK85) 感染甘草外植体获得毛状根(转化和鉴定另文发表)。将甘草毛状根 90104 株系与从甘草实生苗上直接切下的甘草普通根, 分别于超净工作台上准确称量, 然后置于 50 ml/150 ml 三角瓶 1/2 MS 液体培养中, 25℃, 110 r/min 条件下悬浮培养。

**1.2.2 IAA 的提取与纯化** 取 1 g 毛状根

样品置研钵中, 分次加入 80% 甲醇(含 BHT 10 mg/L) 共 3 ml, 在冰浴中研磨, 在 5000 r/min 条件下离心 15 min, 取其上清液 400  $\mu\text{l}$ ,  $\text{N}_2$  吹干除甲醇, 用 pH 9.2 的  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  200  $\mu\text{l}$  溶解, 使样品液 pH 达 8.0 左右; 用乙酸乙酯 200  $\mu\text{l}$  萃取 3 次后, 水相用 0.1 mol/L HCl 调 pH 为 2.5, 再用乙酸乙酯 200  $\mu\text{l}$  抽提 3 次; 酯相用  $\text{N}_2$  吹干除乙酸乙酯后, 用甲醇 300  $\mu\text{l}$  溶解, 甲酯化; 用  $\text{N}_2$  吹干, 用 DB 300  $\mu\text{l}$  溶解, 即为 ELISA 测试样品。

### 样液的甲酯化:

**重氮甲烷的制备** 在通风橱中取三支带盖试管 A、B、C, 于 A 中加入 40% (W/V) KOH 2 ml 和乙醚 5 ml, 并置于冰浴, 然后加入亚硝基甲基脒 500 mg, 磁力搅拌 10 min, 待上层乙醚相呈黄色后, 将含重氮甲烷的乙醚液转移到试管 B 中, 并在 B 管中加数粒 KOH 颗粒吸水 20 min, 去除水分后的重氮甲烷乙醚液倒入 C 管, 即可使用, 加盖于 -20℃ 下保存。

**植物样品的甲酯化** 取上述甲醇溶的样品 300  $\mu\text{l}$  放入冰浴预冷, 再加过量的重氮甲烷乙醚液(100~200  $\mu\text{l}$ ), 直至样品呈黄色, 反应 10 min 后, 以半滴 0.2 mol/L 乙酸乙酯液破坏过量的重氮甲烷(黄色消失), 用  $\text{N}_2$  吹干样液, 加 DB 300  $\mu\text{l}$  液溶解后即可进行免疫检测。

**1.2.3 IAA ELISA 标准溶液的配制** 取 6 支试管, 每管加入 DB 150  $\mu\text{l}$ , 第 1 号管中加入 3200 pmol/50  $\mu\text{l}$  标准液 50  $\mu\text{l}$ , 充分涡旋后, 取 50  $\mu\text{l}$  至 2 号管中; 同样涡旋后, 取 50  $\mu\text{l}$  到第 3 号管中; 依次稀释到第 6 号管, 这样稀释后的标准液浓度依次为 800, 200, 50, 12.5, 3.13, 0.78 pmol/50  $\mu\text{l}$ 。

**样品测试** 依吴颂如等<sup>[9]</sup>方法进行 IAA 样品 ELISA。加样时在微量滴定板内第 1~6 号管中的 IAA 标准品溶液 50  $\mu\text{l}$ , 第 7~8 列 A、B 孔中加入 DB 50  $\mu\text{l}$ , 在其余孔中每两孔平行加入样品液; 然后在第 8 列 A、B 孔中加入 NRS 50  $\mu\text{l}$ , 其余各加入抗体 50  $\mu\text{l}$ 。终止反

应后,在 490 nm 波长下,酶免仪上读数,以第 8 列 A、B 孔为空白调零,测定其余各孔的 OD 值。

#### 1.2.4 植物材料中 ZRs(& iPAs)的提取与纯化

提取 准确称取植物材料约 1000 mg,分别加入预冷的 80% 甲醇(含 BHT 10 mg/L)共 3 ml,在弱光冰浴下匀浆,将匀浆倒入离心管中,4℃ 放置 2 d,1000 g 离心 30 min,倒出上清液,残渣加 80% 甲醇 1 ml,于 4℃ 放置 1 d,然后于 4℃,10000 g 离心 30 min,合并上清液,上清液经 PT-C<sub>18</sub> 色谱预处理柱初纯化。

植物样液中 ZRs(& iPAs)的纯化 准确吸取初纯化液 600 μl,在减压条件下除去甲醇,用 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 9.2) 400 μl 溶解(用 1 mol/L HCl 调 pH 至 8.0),然后用等体积的饱和正丁醇(每次 100 ml 中含 85 ml 正丁醇和

15 ml 去离子水,混匀)提取三次,合并提取液在碱性条件下除去正丁醇,用 DB 600 μl 溶解,即可直接用于测定。

1.2.5 ZRs(& iPAs)的 ELISA 依吴颂如等的方法<sup>[9]</sup>对样品中的 ZRs 和 iPAs 进行 ELISA。

#### 1.2.6 甘草毛状根中 IAA 含量的测定

IAA 标准曲线的绘制 以第 7 列 A、B 孔的 OD 值为最大(B<sub>0</sub>),1 至 6 列 A、B 孔的 OD 值为 B,以  $\ln \frac{B/B_0}{1-B/B_0}$  为纵坐标,以标准 IAA 浓度的常用对数(log[IAA])为横坐标绘制标准曲线。

样品中 IAA 含量的计算 样品孔 OD 值(B)通过  $\ln \frac{B/B_0}{1-B/B_0}$  换算,可以从标准曲线上查出样品 IAA 浓度的对数值,取反对数即得每孔 IAA 的含量。

$$\text{试样 IAA 含量} = \frac{\text{样品孔 IAA 含量}(\text{pmol}/\mu\text{l}) \times \text{提取液体积}(\mu\text{l}) \times (300/400) \times 1/50}{(\text{pmol}/\text{g FW}) \quad \text{试样鲜重}(\text{g} \cdot \text{FW})}$$

## 2 结果与讨论

### 2.1 甘草毛状根与普通根培养的生长速度比较

甘草毛状根和从甘草实生苗切下的普通根在相同条件下培养 43 d,结果毛状根生长迅速,而普通根生长极缓慢,且大多数易发黄变黑。

Tab 1. Culturing comparison of hairy-roots with roots of *Glycyrrhiza uralensis*

	Hairy-roots 90104		Roots	
Inoculating wt,mg	78	90	193	194
Output wt,mg	1420	1245	227	217
Increasing multiple	18.2	13.8	1.18	1.12
Average increasing multiple	16.0		1.15	

### 2.2 IAA ELISA 的标准曲线

2.3 ZRs、iPAs 的标准曲线之斜率 通过作标准曲线,分别求得  $k_{\text{ZR}} = -0.8315$ ,  $k_{\text{iPA}} = -1.150$ 。

### 2.4 不同材料中内源 IAA、ZRs、iPAs 含量

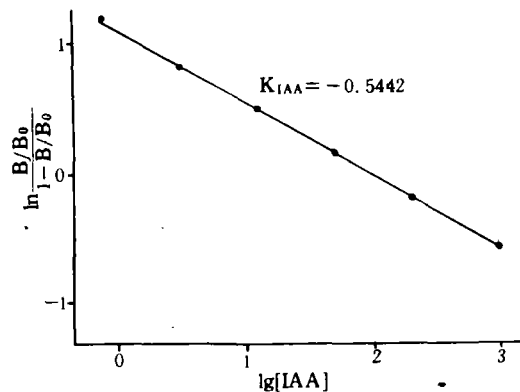


Fig 1. Standard curve of IAA with ELISA

Tab 2. Endo-hormones in hairy-roots and seedlings of *G. uralensis*

Endo-hormones	Hairy-roots 90103	Seedlings
IAA, pmol/g · FW	2622.9	761.54
ZRs, pmol/g · FW	63029.4	1080.28
iPAs, pmol/g · FW	7405.9	3619.0

比较 由表 2 的结果可以看出,甘草毛状根中的 IAA、ZRs 和 iPAs 含量均大大高于甘草实生苗根中的含量。表 1 说明甘草毛状根的

生长速度远超过甘草普通根的生长速度。这表明在植物体或其器官中生长素(IAA)、细胞分裂素类(ZRs, iPAs)的含量与其生长速度成正比例关系。可以认定内源植物生长调节物质的含量高是甘草毛状根生长迅速的原因。

### 3 讨 论

3.1 ELISA 检测结果显示甘草毛状根中既含有较高的生长素量,同时细胞分裂素含量又大大高于实生苗的根。前者含量高恰恰是甘草外植体导入并转化了 Ri 质粒上基因的佐证之一,因为 Ri 质粒具有生长素合成基因,所以毛状根的培养无需添加外源 IAA;细胞分裂素含量高是由于 Ri 质粒的作用产生了大量的毛状根,众所周知,根尖具有合成细胞分裂素的能力。因此细胞分裂素的含量显著提高。上述结果从内源生长激素的角度很好地解释了毛状根较实生苗根生长迅速的原因。

3.2 在植物生物技术中,植物生长调节物质起着十分重要的作用,但真正通过植物内源

生长调节物质的分析,并从该角度来解释和证实它们与植物生物技术中细胞或组织的生长、分化关系的研究却不多<sup>[10]</sup>,这是一个有生理学意义的研究方向,值得深入研究。

### 参 考 文 献

- 1 Hamill JD, Parr AJ, Rhodes MJC, et al. New routes to plant secondary products. *Bio Tech*, 1987; 5: 800
- 2 KO KS, Noguchi H, Ebizuka Y, et al. Oligoside production by hairy root cultures transformed by Ri plasmids. *Chem Pharm Bull*, 1989; 37 (1): 245
- 3 Jung G and Tepfer D. Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *A. rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa*, *belladonna* and *calystegia sepium* roots grown *in vitro*. *Plant Science*, 1987; 50: 145
- 4 张荫麟. 发根农杆菌的 Ri-质粒转化和赛莨菪的发根培养. *植物学报*, 1988; 30 (4): 368
- 5 张毅, 沈文辉. 植物基因工程的新载体—农杆菌 Ri 质粒. *生物工程学报*, 1989; 5 (3): 173
- 6 丁静, 沈镇德, 方亦雄等. 植物内源激素的提取分离和生物鉴定. *植物生理学通讯*, 1979; (2): 227
- 7 马庆虎, 谭志一, 焦述平. 简评植物激素的几种测定方法. *植物生理学通讯*, 1987; (1): 7
- 8 张能刚, 周 雯, 吴颂如. 吲哚乙酸间接酶联免疫法的建立. *南京农业大学学报*, 1990; 13 (1): 116
- 9 吴颂如, 陈婉芬, 周 雯. 酶联免疫法(ELISA)测定内源植物激素. *植物生理学通讯*, 1988; (5): 53
- 10 向德军, 丁家宜, 徐德然等. 人参组织培养中生长素自养型愈伤组织的获得和 IAA 含量测定初报. *中国药科大学学报*, 1988; 19 (3): 171

## Analysis of Endo-Plant Hormones in Hairy-Roots of *Glycyrrhiza uralensis*

Ding Jiayi and Xiang Dejun

Laboratory of Plant Tissue Culture

This paper reports the experiment results about the levels of endo-plant hormones in hairy-roots obtained from transgenic *Glycyrrhiza uralensis* by Ri plasmid with ELISA; the contents of IAA, ZRs, iPAs of hairy-roots of fast growth *G. uralensis* in 1/2 MS medium without adding plant-growth-regulators are higher than those of slow growth roots of seedling from seeds of *G. uralensis* in the same culture condition. It is shown that high contents of endo-auxins and cytokinins cause the fast growing of hairy-roots of *G. uralensis*.

**Key words** Hairy roots of *G. uralensis*; Plant growth regulators; IAA; ZRs(Zeatin riboside); iPAs(isopentenyladenosines)