

几种影响黄芩愈伤组织中黄芩苷含量的因素

王梦亮* 任振兴 刘滇生

山西大学现代化学研究所, 太原 030006

提要 研究碳源、生长调节物质、氮源、磷酸盐以及有机添加物对黄芩愈伤组织中黄芩苷含量和产量影响的结果表明, 在(25±1)℃暗培养条件下, 黄芩苷积累的最佳培养基为MS基本培养基, 其中氮源浓度为60 mmol·L⁻¹ (NH₄⁺:NO₃⁻为1:1), KH₂PO₄浓度为1.5 mmol·L⁻¹, 附加80 g·L⁻¹蔗糖、0.3 mg·L⁻¹ IAA、2 mg·L⁻¹ 6-BA和200 mg·L⁻¹ 蛋白胨。在上述培养基中, 黄芩愈伤组织培养40 d后的黄芩苷含量达到167.4 mg·g⁻¹, 产量达到4.8 g·L⁻¹, 分别是对照的5.54倍和18.2倍。

关键词 黄芩; 愈伤组织; 黄芩苷; HPLC

Effects of Several Factors on the Baicalin Content in *Scutellaria baicalensis* Georgi Callus

WANG Meng-Liang*, REN Zhen-Xing, LIU Dian-Sheng

Institute of Advanced Chemistry, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract Different carbon sources, nitrogen sources, plant growth regulators, KH₂PO₄ and organic additive substances were added to media. Their effects on baicalin yield of *Scutellaria baicalensis* Georgi callus were studied. The results showed the optimal media for the baicalin accumulation was: MS medium, 60 mmol·L⁻¹ (NH₄⁺:NO₃⁻=1:1), 1.5 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, 80 g·L⁻¹ sucrose, 0.3 mg·L⁻¹ IAA, 2 mg·L⁻¹ 6-BA and 200 mg·L⁻¹ peptone. After cultured for 40 d, the baicalin content and yield achieved finally 167.4 mg·g⁻¹ and 4.8 g·L⁻¹, respectively, which was 4.8 times and 18.2 times of the control.

Key words *Scutellaria baicalensis* Georgi; callus; baicalin; HPLC

目前, 对黄芩组织培养的研究主要集中在快繁技术和用毛状根培养系统提高其次生代谢产物的产量, 如用组织培养的方法直接从黄芩茎段诱导丛生芽, 并通过诱导生根形成了完整植株(丁如贤等1998)。将发根农杆菌ATCC 15834含有的Ri质粒中的T-DNA片段整合到黄芩细胞中, 诱导出毛状根, 而后培养黄芩的毛状根, 从而提高黄芩的黄酮苷类物质的产量(Nishikawa等1999)。采用黄芩组织培养技术快速繁殖, 为保护黄芩的野生资源, 发展人工资源和探讨育种新途径奠定了基础(高山林和陈柏君2004)。至于黄芩愈伤组织培养与其次生代谢物形成之间关系的研究, 报道尚少。

本文研究碳源、激素、氮源、磷酸盐以及有机添加物对黄芩愈伤组织中黄芩苷含量和产量的影响, 以期能为研究黄芩苷积累的规律和工业化生产黄芩苷提供参考。

材料与amp;方法

黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)愈伤组织

由我们实验室从黄芩试管苗幼茎诱导而来。诱导与继代培养基均为: MS培养基+0.2 mg·L⁻¹ IAA+2 mg·L⁻¹ 6-BA+3%蔗糖+0.8%琼脂, pH 5.8, 暗培养, (25±1)℃, 培养40 d。测定各种指标, 以诱导培养基为对照。

黄芩苷的对照样品由中国药品生物制品检定所提供, 甲醇为色谱纯(中国医药集团上海化学试剂公司生产), 水用重蒸馏水, 其余试剂均为A.R.级。仪器有: 高效液相色谱仪(Waters公司产品, 2487紫外检测器, Breeze色谱工作站)、SPX-250-GB光照培养箱(上海医疗器械厂生产)、JY98-3超声波细胞破碎机(宁波新芝科器研究所生产)。

黄芩愈伤组织的几个指标按以下公式计算: (1)鲜重增量=最终收获鲜重-接种量; (2)干重增量=最终收获鲜重-接种量; (3)黄芩苷产量=净增加干重×黄芩苷含量。

收稿 2006-05-16 修定 2006-07-14

资助 山西省攻关项目(051039-4)。

*E-mail: mlwang@sxu.edu.cn, Tel: 0351-7016101

黄芩苷含量测定用HPLC法(中国药典): ODS 色谱柱(4.6 mm×150 mm)由大连依利特科学仪器有限公司生产; 流动相为水:甲醇:磷酸=47:53:0.2; 检测波长为280 nm; 柱温为室温; 进样量为20 μL ; 流速为1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。按外标法以峰面积计算样品溶液中黄芩苷含量。

提取黄芩愈伤组织时, 称取0.3 g黄芩愈伤组织干粉, 加80 mL 50%乙醇超声破碎20 min, 定容至100 mL, 移取1 mL上清液置于10 mL容量瓶中, 用甲醇定容, 微孔滤膜过滤后进样。

制备对照样品溶液时, 精确称取黄芩苷对照样品5 mg, 用甲醇配成0.12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液, 作为对照品溶液。

制备标准曲线时, 取0.12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照样品溶液, 用甲醇稀释成60、38.4、30.7、18.4、11.0和2.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 各取20 μL , 注入色谱仪, 记录色谱图。以对照样品溶液的浓度 C 为横坐标, 相应的峰面积 S 为纵坐标得回归方程: $S=78776C-47513$, $r=0.9994$, 线性范围: 2.6~120 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

结果与讨论

1 不同碳源对黄芩愈伤组织中黄芩苷积累的影响

从表1可以看出, 蔗糖是黄芩苷积累的最佳碳源。

表1 不同碳源对愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响

Table 1 Effects of different carbon sources on callus growth and the accumulation of baicalin

| 碳源 | 干重增量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (培养液) | 黄芩苷含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW) | 黄芩苷产量/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (培养液) |
|-----|---|--|--|
| 甘露醇 | 0 | 0 | 0 |
| 麦芽糖 | 3.13 | 0 | 0 |
| 葡萄糖 | 3.95 | 16.1 | 63.6 |
| 蔗糖 | 8.73 | 30.2 | 263.6 |

各种碳源的浓度均为3%。

2 不同浓度蔗糖对黄芩愈伤组织中黄芩苷积累的影响

从图1可以看出, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖培养的黄芩无黄芩苷形成; 30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的蔗糖中才开始形成, 然后, 黄芩苷的含量和产量都随着蔗糖浓度的增加而迅速增大, 80 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的黄芩苷达到最大值;

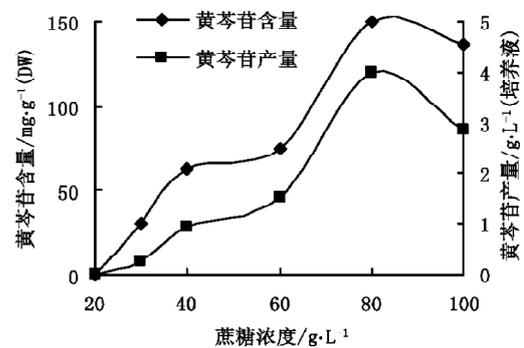


图1 不同浓度蔗糖对黄芩苷含量和产量的影响
Fig. 1 Effects of different concentrations of sucrose on the content and yield of baicalin

100 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 蔗糖的黄芩苷形成受抑制, 这可能是培养基中渗透压增高所致。

3 生长调节物质对黄芩愈伤组织中黄芩苷积累的影响

图2和图3显示, IAA浓度固定为0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 黄芩苷的含量和产量都以2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA为最大; 6-BA浓度高于2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 黄芩苷的含量和产量都受抑制(图2)。6-BA浓度固定为2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 黄芩苷的含量和产量均以0.3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IAA的为最大, 但IAA浓度进一步增加, 黄芩苷的积累量即减小。

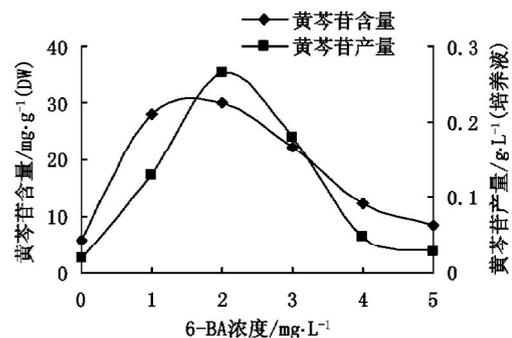


图2 不同浓度6-BA对黄芩苷含量和产量的影响
Fig. 2 Effects of different concentrations of 6-BA on the content and yield of baicalin

4 氮源对黄芩愈伤组织中黄芩苷积累的影响

植物细胞培养中, 通常采用一定量的硝酸盐和铵盐作为混合无机氮源, 单独以铵盐或者硝酸盐为氮源, 都对细胞的生长和次级代谢物的形成不利(郭勇等2004)。黄芩愈伤组织生长对 NH_4^+ 和 NO_3^- 的需求是有差别的, 铵盐和硝酸盐分别用

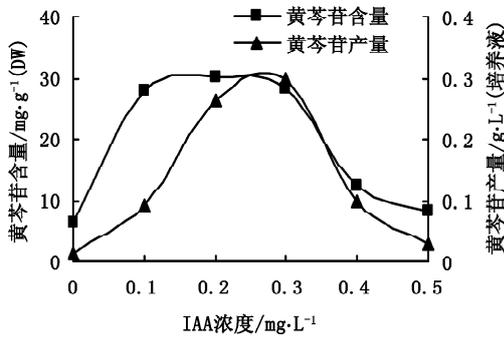


图3 不同浓度IAA对黄芩苷含量和产量的影响
Fig. 3 Effects of different concentrations of IAA on the content and yield of baicalin

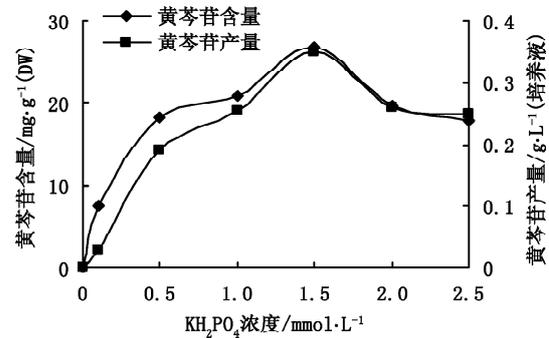


图4 不同浓度KH₂PO₄对黄芩苷含量和产量的影响
Fig. 4 Effects of different concentrations of KH₂PO₄ on the content and yield of baicalin

(NH₄)₂SO₄ 和 KNO₃ 来配制。表2的结果表明, NH₄⁺:NO₃⁻ 为1:1的生物量和黄芩苷含量均最高。另外, NH₄⁺:NO₃⁻ 为1:1的培养基中改变总氮浓度的结果表明, 总氮浓度为60 mmol·L⁻¹的黄芩苷含量最高(37.64 mg·g⁻¹); 总氮浓度达120 mmol·L⁻¹时, 黄芩愈伤组织生长受抑, 黄芩苷含量也显著降低(5.76 mg·g⁻¹)。据此认为, 适宜的氮源浓度为60 mmol·L⁻¹, 其中, NH₄⁺:NO₃⁻ 为1:1。

表2 NH₄⁺ 和 NO₃⁻ 浓度比例对愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响

Table 2 Effects of different nitrogen sources on callus growth and the accumulation of baicalin

| NH ₄ ⁺ :NO ₃ ⁻ | 干重增量/ g·L ⁻¹ (培养液) | 黄芩苷含量/ mg·g ⁻¹ (DW) | 黄芩苷产量/ g·L ⁻¹ (培养液) |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1:0 | 0 | 0 | 0 |
| 0:1 | 4.73 | 5.91 | 28.0 |
| 1:1 | 10.47 | 34.90 | 365.2 |
| 1:2 | 9.34 | 11.90 | 110.9 |
| 2:1 | 8.65 | 4.82 | 41.7 |

总氮浓度为50 mmol·L⁻¹。

5 磷酸盐对黄芩愈伤组织中黄芩苷积累的影响

从图4可以看出, 当KH₂PO₄的浓度在1.5 mmol·L⁻¹时, 黄芩苷的含量和产量均达到最大值; 随着KH₂PO₄浓度的进一步增加, 黄芩苷的积累即受到抑制。因此认为, 对于黄芩苷积累而言, KH₂PO₄的最佳浓度为1.5 mmol·L⁻¹。

6 有机物对黄芩愈伤组织中黄芩苷积累的影响

从表3可以看出, 3种有机物均不能提高黄

表3 有机物对黄芩愈伤组织生长和黄芩苷积累的影响
Table 3 Effects of different organic compounds on callus growth and the accumulation of baicalin

| 有机物 | 干重增量/ g·L ⁻¹ (培养液) | 黄芩苷含量/ mg·g ⁻¹ (DW) | 黄芩苷产量/ g·L ⁻¹ (培养液) |
|-----|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 对照 | 8.73 | 30.2 | 263.6 |
| 牛肉膏 | 11.30 | 24.9 | 281.4 |
| 蛋白胨 | 12.10 | 27.4 | 331.5 |
| 酵母粉 | 6.33 | 9.0 | 56.0 |

芩苷含量, 但牛肉膏和蛋白胨都显著增加黄芩愈伤组织的生物量, 所以黄芩苷的产量均提高, 以蛋白胨的效果更好些。因此认为, 可用蛋白胨作有机添加剂。

根据上述实验结果, 我们认为, 生产黄芩苷的最佳培养基为: MS基本培养基, 其中氮源浓度为60 mmol·L⁻¹ (NH₄⁺:NO₃⁻ 为1:1), KH₂PO₄浓度为1.5 mmol·L⁻¹, 蔗糖为80 g·L⁻¹, IAA为0.3 mg·L⁻¹, 6-BA为2 mg·L⁻¹, 蛋白胨为200 mg·L⁻¹, 温度为(25±1) °C, 暗培养。

参考文献

- 丁如贤, 张汉明, 付翔(1998). 黄芩茎段直接诱导丛生芽. 中草药, 29 (3): 194~195
- 高山林, 陈柏君(2004). 黄芩组织培养快速繁殖技术的优化. 中草药, (3): 312~315
- 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯(2004). 植物细胞培养技术与应用. 北京: 化学工业出版社, 139~140
- 中国药典(一部)(2005). 北京: 化学工业出版社, 211~212
- Nishikawa K, Furukawa H, Fujioka T, Fujii H, Mihashi K, Shimomura K, Ishimaru K (1999). Flavone production in transformed root cultures of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Phytochemistry, 52: 885~890