

培养基成分对组培桑苗叶片中 1-脱氧野尻霉素含量的影响

张金芳 殷浩 叶晶晶 王洪利 崔为正 段祖安 冀宪领

(山东农业大学林学院, 山东泰安 271018)

摘要 为探讨影响组培桑苗中 1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)合成的因素,采用反相高效液相色谱紫外检测法,调查了培养基成分对组培桑苗叶片中 1-DNJ 含量的影响。结果表明:采用 MS 培养基,适当提高果糖和无机盐浓度,降低磷酸盐浓度等,有利于桑苗叶片中 1-DNJ 的合成和积累;培养基中的 Fe^{2+} 浓度对桑苗叶片中 1-DNJ 的含量有显著影响,无 Fe^{2+} 时不能合成 1-DNJ, Fe^{2+} 浓度在 0.05~0.20 mmol/L 范围内,1-DNJ 的含量随着 Fe^{2+} 浓度增加有所降低;培养基中的烟酸、维生素 B_6 对于桑苗叶片中 1-DNJ 的合成具有抑制作用,而 Mg^{2+} 、肌醇、维生素 B_1 和甘氨酸等对 1-DNJ 合成的影响较为复杂,未见明显的规律性变化。

关键词 培养基成分;桑叶;组培苗;1-脱氧野尻霉素;反相高效液相色谱

中图分类号 S888.2 文献标识码 A 文章编号 0257-4799(2008)03-0400-05

Effect of Medium Compositions on 1-Deoxynojirimycin Content in Tissue Culture Mulberry Seedling

ZHANG Jin-Fang YIN Hao YE Jing-Jing WANG Hong-Li* CUI Wei-Zheng
DUAN Zu-An JI Xian-Ling

(College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an Shandong 271018, China)

Abstract To explore factors on the synthesis of 1-deoxynojirimycin in tissue culture mulberry seedling, we investigated the effect of medium compositions on the 1-deoxynojirimycin content in mulberry leaves using method of reversed-phase high performance liquid chromatography. The results showed that increment of the concentrations of fructose and inorganic salt, and decrement of phosphate concentration in MS were propitious to the synthesis and accumulation of the 1-DNJ in mulberry leaf. The Fe^{2+} concentration of medium had a significant influence on the 1-DNJ content. The 1-DNJ couldn't be synthesized if the medium is absent of Fe^{2+} . But the Fe^{2+} concentration increased from 0.05 to 0.20 mmol/L, the 1-DNJ content was reduced significantly. The existence of Nicotinic acid and VB_6 in the medium inhibited the synthesis of the 1-DNJ, while the Mg^{2+} , inositol, VB_1 and glycine had no significant effect.

Key words Medium compositions; Mulberry leaf; Tissue culture seedling; 1-Deoxynojirimycin; Reversed-phase high performance liquid chromatography

桑叶中含有的 1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ)是一种哌啶生物碱。自 1976 年 Yoshiaki 等^[1]首次从桑树根部和树干中分离到 1-DNJ

后,目前已从桑叶中分离出 6 种 1-DNJ,并确定其结构^[2]。研究发现 1-DNJ 是 α -糖苷酶的有效抑制剂,可用于治疗糖尿病、肥胖症、病毒感染等疾病^[3,4]。已发现多种植物和微生物具有合成和积累 1-DNJ 的特性,其中以桑叶中的含量最高^[5-7]。国内外对 1-DNJ 的提取检测方法及药理作用有较多研究^[8-11],近几年也有不少关于桑叶中 1-DNJ 含量的报道。施新琴等^[12],陈松等^[13],欧阳臻等^[14]分别对不同叶

收稿日期:2008-03-15

资助项目:山东农业大学博士基金项目(编号 76047)。

作者简介:张金芳(1981-),女,山东,硕士研究生。

通讯作者:王洪利,副教授,硕士生导师。

Tel:0538-8242987, E-mail:hlwang@sdau.edu.cn

位、不同品种、不同季节桑叶中1-DNJ的含量变化规律进行了研究。然而,有关1-DNJ在桑树组织中的合成机制尚不明了。

本试验通过改变培养基中碳源、氮源、磷源等成分比例,利用反相高效液相色谱(RP-HPLC)紫外检测法研究了培养基组成对桑树组培苗叶片中1-DNJ含量的影响,旨在为以后通过组织培养或细胞培养生产1-DNJ及探讨1-DNJ在桑组织中的合成机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂、仪器

供试材料为桑品种盛东1号的组培苗。主要试剂:1-deoxynojirimycin-HCl(DNJ-HCl)为Sigma公司产品,9-Fluorenyl-methyl chloroformate(FMOC-Cl)为Fluka公司产品,乙腈、甲醇均为色谱纯,其它试剂皆为分析纯。高效液相色谱仪为美国Dionex(UVD170U),色谱柱为科瑞Venus-C18-5u。

1.2 桑苗组织培养方法

选择处于旺盛生长期且生长情况基本一致的桑树无菌苗,单芽接种于不同处理的培养基上。基本培养基为MS培养基,添加1.0 mg/L 6-BA、0.1 mg/L NAA、6.5 g/L 琼脂、30 g/L 蔗糖,pH值于灭菌前调到6.0。每个处理10瓶,每瓶4个单芽。培养条件为(25 ± 2) °C,光照强度1 000 ~ 1 500 lx,光照/黑暗为12 h/12 h,培养25 d。

1.3 桑组培苗叶片中1-DNJ含量的测定

取桑组培苗的叶片60 °C烘至恒重,研磨成细粉,过100目筛。称取干燥桑叶粉15 mg,于1.5 mL的离心管中,加入0.05 mol/L HCl 1 mL,漩涡振荡1 min,超声波处理40 min,12 000 r/min离心30 min,收集上清液,即得样品提取液。1-DNJ含量的测定方法参照施新琴等^[10]采用的RP-HPLC法测定。每种样品重复测定3次,平均值为其1-DNJ含量。试验数据采用SAS9.0数据分析软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 培养基中的糖类对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响

从表1看出,培养基中添加不同碳源对桑组培苗叶片中1-DNJ含量存在极显著影响。单加果糖的桑树组培苗叶片中,1-DNJ含量极显著地高于单加

蔗糖和蔗糖与果糖混合添加处理组,单加蔗糖时桑叶中1-DNJ的含量显著降低。因此,以果糖为碳源可能促进桑叶中1-DNJ的合成或积累。

由表2可见,培养基中果糖浓度过低抑制1-DNJ的合成,适当提高果糖浓度有利于1-DNJ的合成。在本试验设区范围内,当果糖质量浓度为40 g/L时,桑叶中1-DNJ的质量分数最高达0.133 4%。

表1 培养基中添加不同碳源对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响

Table 1 Effect of carbon sources in culture medium on 1-DNJ content in mulberry leaf

蔗糖质量浓度 / (g · L ⁻¹) Sucrose concentration	果糖质量浓度 / (g · L ⁻¹) Fructose concentration	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content
0	30	0.084 1 A
15	15	0.081 5 B
30	0	0.059 5 C

数据后面的大写字母为处理间多重比较结果,α = 0.01,表2-5同。

The capital letters within columns are the results after the multi-comparison at α = 0.01. The same in the table 2-5.

表2 培养基中的果糖浓度对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响

Table 2 Effect of fructose concentration in culture medium on 1-DNJ content in mulberry leaf

果糖质量浓度 / (g · L ⁻¹) Fructose concentration	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content
10	0.031 2 D
20	0.080 6 C
30	0.078 4 C
40	0.133 4 A
50	0.106 1 B

2.2 培养基中的氮源、无机盐对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响

在保持培养基中总氮量(60 mmol/L)不变的前提下,不同比例铵态氮和硝态氮对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响见表3。增加硝态氮的比例有利于桑叶中1-DNJ的积累,当培养基中只含有硝态氮时,桑叶中1-DNJ的质量分数最高为0.115 6%,极显著高于其它处理。由此可见,NO₃⁻的浓度是影响桑叶中1-DNJ合成的重要因素之一。

由表3可知,以 H_2PO_4^- 作为磷源,当培养基中磷酸盐浓度为0.5 mmol/L时,桑组培苗叶片中1-DNJ的质量分数最高为0.1185%;当磷酸盐浓度高于1.25 mmol/L时,桑叶中1-DNJ的含量显著降低。说明磷酸盐浓度过高对1-DNJ的合成具有抑制作用。

改变MS培养基中大量元素(硝酸铵、硝酸钾、

硫酸镁和磷酸二氢钾)的质量浓度,探讨培养基无机盐浓度对桑叶中1-DNJ含量的影响,结果见表3。培养基无机盐浓度对桑叶中1-DNJ的合成和积累有极显著影响。当无机盐质量浓度为8.180 g/L时,桑组培苗叶片中1-DNJ的含量最高,当无机盐质量浓度为10.225 g/L时,桑组培苗叶片中1-DNJ的含量最低。

表3 培养基中氮源、无机盐对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响

Table 3 Effects of nitrogen sources and inorganic salt in culture medium on 1-DNJ content in mulberry leaf

氮源 $n(\text{NH}_4^+) : n(\text{NO}_3^-)$ Nitrogen sources	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content	磷酸盐浓度 / (mmol · L ⁻¹) Phosphate salt concentration	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content	无机盐 质量浓度 / (g · L ⁻¹) Inorganic salt concentration	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content
1:1	0.071 2 E	0.10	0.059 1 C	2.045	0.122 4 D
2:0	0.080 2 D	0.50	0.118 5 A	4.090	0.132 9 C
0:2	0.115 6 A	1.00	0.095 7 B	6.135	0.163 7 B
2:1	0.091 2 C	1.25	0.060 9 C	8.180	0.176 6 A
1:2	0.101 6 B	1.50	0.060 7 C	10.225	0.084 6 E

2.3 培养基中 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 的浓度对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响

培养基中常用的3种金属离子 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 浓度对桑叶中1-DNJ的含量均有极显著影响(表4):当培养基中不含 Fe^{2+} 时,桑叶中几乎检测不到1-DNJ,当 Fe^{2+} 的浓度为0.05 mmol/L时桑叶

中1-DNJ的含量最高,浓度超过0.05 mmol/L时桑叶中1-DNJ的含量有所降低;当 Ca^{2+} 的浓度为1.5 mmol/L时,桑叶中1-DNJ的质量分数最多为0.1149%;当不添加 Mg^{2+} 时,桑叶中1-DNJ的质量分数最高为0.0774%,但 Mg^{2+} 的浓度对1-DNJ合成的影响无明显的规律性。

表4 培养基中 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 的浓度对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响

Table 4 Effects of Fe^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} concentration in culture medium on 1-DNJ content in mulberry leaf

Fe^{2+} 浓度 / (mmol · L ⁻¹) Fe^{2+} concentration	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content	Ca^{2+} 浓度 / (mmol · L ⁻¹) Ca^{2+} concentration	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content	Mg^{2+} 浓度 / (mmol · L ⁻¹) Mg^{2+} concentration	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content
0.00	0.000 0 E	0.0	0.050 3 E	0.0	0.077 4 A
0.05	0.090 3 A	1.5	0.114 9 A	1.0	0.055 8 D
0.10	0.082 1 B	3.0	0.079 9 B	1.5	0.060 6 C
0.15	0.078 1 C	4.5	0.076 3 C	2.0	0.074 9 B
0.20	0.068 9 D	6.0	0.073 4 D	2.5	0.053 3 E

2.4 培养基中的有机成分对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响

由表5可见,培养基中的维生素和甘氨酸的含量对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响作用不同,

其中烟酸和维生素 B_6 的含量对桑叶中1-DNJ的合成和积累有抑制作用;培养基中的肌醇、维生素 B_1 和甘氨酸对桑叶中1-DNJ含量的影响较为复杂,存在互作效应。

表5 培养基中的维生素和氨基酸组分对桑组培苗叶片中1-DNJ含量的影响

Table 5 Effect of vitamin and amino acids in culture medium on 1-DNJ content in mulberry leaf

处理编号 Treatment No.	肌醇 (100 mg · L ⁻¹) Inosital	烟酸 (0.5 mg · L ⁻¹) Aicotinic acid	VB ₆ (0.5 mg · L ⁻¹) Pyridoxine	VB ₁ (0.1 mg · L ⁻¹) Thiamine	甘氨酸 (2 mg · L ⁻¹) Glycine	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content
1	+	+	+	+	+	0.107 8 D
2	+	+	+	+	-	0.082 4 GF
3	+	+	+	-	+	0.110 0 D
4	+	+	-	+	+	0.130 1B
5	+	-	+	+	+	0.160 4 A
6	-	+	+	+	+	0.088 8 F
7	+	-	-	-	-	0.082 1 GF
8	-	+	-	-	-	0.108 7 D
9	-	-	+	-	-	0.080 7 G
10	-	-	-	+	-	0.119 0 C
11	-	-	-	-	+	0.098 5 E
12	-	-	-	-	-	0.110 9 D

“+”表示加入原培养基组分,“-”表示不加入。

“+” means adding component to original media;“-” means not adding component to original media.

3 讨论

不同植物培养过程中所需的碳源种类和浓度不同,糖类在培养基中除了作为碳源和能源外,还具有维持渗透压的作用。分析本试验结果发现,只添加果糖有利于桑组培苗叶片中1-DNJ的合成,适当提高果糖质量浓度有利于桑叶中1-DNJ的合成,说明桑叶中的1-DNJ合成与渗透压有一定关系。高渗透压可能对培养基中其它营养物质的吸收有抑制作用,从而影响了细胞内某些代谢水平的正常进行。

培养基中硝态氮和铵态氮对桑组培苗叶片中1-DNJ的合成有一定作用。以NO₃⁻作为唯一氮源时,桑叶中1-DNJ的含量最高;以铵态氮作为唯一碳源时,桑叶中1-DNJ含量较低;二者以一定比例混合时,硝态氮含量多时有利于桑叶中1-DNJ的合成。表明在培养基中适当提高NO₃⁻的比例有利于桑叶中1-DNJ的合成和积累。以铵态氮为唯一氮源,对大多数高等植物的生长有毒害作用^[15],硝态氮影响桑叶中1-DNJ的合成和积累的机制还有待于研究。

金属离子通过调控与次生代谢物合成有关的酶活性来影响代谢物的合成。本试验表明Fe²⁺对组培苗桑叶中1-DNJ的合成有显著影响,当培养基中

不添加Fe²⁺时,样品中几乎检测不到1-DNJ,这可能是因为Fe²⁺对细胞代谢的调节机制影响了合成生物碱的某种关键酶的活性,至于具体影响哪些与桑叶中1-DNJ合成有关的酶还需要进一步探讨。Mg²⁺是一些酶的辅助因子,因此加入适量的Mg²⁺应有利于次生代谢物的合成;但本试验结果表明,不添加Mg²⁺反而使桑叶中1-DNJ的含量增加。这一结果与郭肖红等^[16]、郭志刚等^[17]研究Mg²⁺对丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)、红豆杉(*Taxus chinensis*)的次生代谢物合成的影响结果相似,其作用机制有待于进一步研究。

植物体在自然条件下,维生素和氨基酸是依靠自身的代谢加以调节的,而培养离体组织,虽然能合成必需的维生素,但量太少,所以培养基中应含有一种或几种维生素和氨基酸。本研究表明:烟酸、维生素B₆具有抑制桑叶中1-DNJ合成的作用,肌醇和甘氨酸的作用较为复杂。一般认为维生素B₁是一种必需的成分^[18],但本试验未能看出明显效果。不同有机物质量浓度对桑叶中1-DNJ的合成可能也有一定的影响,尚待进一步研究。

除以上几种因素可影响桑组培苗叶片中1-DNJ含量外,还有其它如诱导子、培养条件和合成的前体

物质等因素。有关生物合成的调控是目前研究的热点领域之一,但关于桑叶中 1-DNJ 的生物合成途径目前还知之甚少,查明其合成机制和调控机制,对阐明 1-DNJ 的生物学功能以及大规模生物生产 1-DNJ 具有重要意义。

参考文献 (References)

- [1] Yoshiaki A, Hivomu M. The structure of moranoline a piperidine, alkaloid from *Morus species* [J]. Nippon Nogei Kagaku Kaishi, 1976, 50(11): 571-572
- [2] Asano N, Tomioka E, Kizu H, et al. Sugars with nitrogen in the ring isolated from the leaves of *Morus bombycis* [J]. Carbohydr Res, 1994, 253: 235-245
- [3] Hughes A B, Rudge A J. Deoxynojirim: Synthesis and biological activity [J]. Nat Prod Rep, 1994, 11(2): 135-162
- [4] Kim H S, Hong Y S. α -Glucosidase inhibitors from *Commelina communis* [J]. Planta Medica, 1999, 65: 437-439
- [5] Asano N, Kato A, Miyauchi M, et al. Nitrogen-containing furanose and pyranose analogues from *hyacinthus orientalis* [J]. Nat Prod, 1998, 62: 625-628
- [6] Asano N, Nishida N, Miyauchi M, et al. Polyhydroxylated pyrrolidine and piperidine alkaloids from *adenophora triphylla* var. japonica (campanulaceae) [J]. Phytochemistry, 2000, 53: 379-382
- [7] Asano N, Tomioka E. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities [J]. Carbohydr Res, 1994, 259: 243-255
- [8] 雷晓燕,黄海华. 1-脱氧野尻霉素及其衍生物的药理学与合成研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2000, 17(6): 456-460
- [9] Kim J W, Kim S U, Lee H S, et al. Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2003, 1002: 93-99
- [10] 施新琴,崔为正,裘立群,等. 反相高效液相色谱-紫外检测法测定 1-脱氧野尻霉素的含量[J]. 蚕业科学, 2006, 32(1): 146-149
- [11] 罗存敏,施新琴,徐升胜,等. 桑叶提取物对小鼠血糖的影响及有效成分测定[J]. 蚕业科学, 2005, 31(4): 418-421
- [12] 施新琴. 家蚕和桑叶中 1-脱氧野尻霉素含量变化的研究[D]. [硕士学位论文],泰安: 山东农业大学, 2006
- [13] 陈松,刘宏程,储一宁,等. 12 个桑树品种中的 1-脱氧野尻霉素含量测定与分析[J]. 蚕业科学, 2007, 33(4): 637-641
- [14] 欧阳臻,陈钧. 不同季节桑叶中 1-脱氧野尻霉素(DNJ)含量的测定[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 211-214
- [15] Coyal S S. 铵态氮对萝卜生长的抑制作用 I. NH_4^+ 对萝卜生长毒害的特征和 NO_3^- 对 NH_4^+ 的缓解作用[J]. 农业科技译丛, 1983, (4): 85-89
- [16] 郭肖红,高文远,陈海霞,等. 金属离子对丹参酮 II_A 和原儿茶醛生物合成的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12): 885-888
- [17] 郭志刚,冯莹,刘瑞芝. 无机元素对紫杉醇和紫杉烷类化合物生物合成的调节作用[J]. 天然产物研究与开发, 2000, 12(5): 23-27
- [18] Jiang L, Zhang W C, Ke Y. Effects of five organic elements on cell growth and formation of flavonol glycosides of ginkgo callus [J]. J Agric Biotechnol, 1999, 7(4): 373-376

更名启事

原“广东省翁源县信达茧丝有限公司”已于 2008 年 3 月正式更名为“广东信达茧丝绸股份有限公司”。董事长罗展勇携全体员工热诚欢迎海内外同仁洽谈合作,共创蚕业美好未来!