乳突果苗的组织培养及脂氧合酶的诱导

马长乐[1], 李 靖[1], 赵沛基[2*]

(1. 西南林学院, 昆明 650224; 2. 中国科学院 昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘 要: 脂氧合酶(LOX)是植物十八碳酸途径中一个很重要的酶,该酶作用的产物在植物生长发育过程以及在植物对环境胁迫反应中起着重要作用。首次建立了萝藦科植物乳突果苗的培养体系,并用仿真菌环境(几丁质)对乳突果组培苗进行刺激诱导,通过 LC-ESI-MS 检测脂氧合酶反应的产物。粗酶活性鉴定结果显示,经 150 mg/L 几丁质诱导 9 h 的乳突果组培苗产生了 9-LOX,该酶可催化亚油酸生成 9,10,11-三羟基-12-十八碳烯酸。推测在乳突果组培苗中,几丁质诱导的十八碳酸代谢途径沿着 9-LOX 方向进行。

关键词: 乳突果; 脂氧合酶; 十八碳酸途径; 几丁质

中图分类号: Q946 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-3142(2009)03-0386-04

Tissue culture of *Adelostemma gracillimum* seedlings and the inducement of lipoxygenase

MA Chang-Le[1], LI Jing[1], ZHAO Pei-Ji[2*]

(1. *Southwest Forestry College*, Kunming 650224, China; 2. *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences*, Kunming 650204, China)

Abstract: Lipoxygenases are important enzymes in plant octadecanoic acid pathway. Products of this enzyme have important functions in plant growth and development, as well as in response to environmental stress. Culture system of *Adelostemma gracillimum* was the first time to be constructed in Asclepiadaceae. Chitosan was used in the inducement experiment on *A. gracillimum* seedlings and the products of LOX were detected through LC-ESI-MS. The results showed that *A. gracillimum* seedlings induced by 150 mg/L chitosan for 9 h produced 9-LOX and the enzyme can catalyze linoleic acid to 9,10,11-trihydroxy-12-octadecenoic acid. It was speculated that octadecanoic acid pathway induced by chitosan differentiated to 9-LOX orientation.

Key words: *Adelostemma gracillimum*; lipoxygenase; octadecanoic acid pathway; chitosan

脂氧合酶(LOX,EC 1.13.11.12)是含有非血红素离子的双加氧酶,广泛分布于动植物。它是植物十八碳酸代谢途径的关键酶,该途径也称 LOX 途径。该酶作用的产物在植物的生长发育过程中以及在植物对环境胁迫反应中起着重要的作用(Grechkin,1998)。在植物中,亚油酸和亚麻酸是 LOX 最常见的底物,根据其对亚油酸加氧的位置特异性,将植物脂氧合酶分为两类:在亚油酸 C-9 位加氧的被称为 9-LOX,而氧原子加在 C-13 位的称为 13-LOX(Brash,1999)。

LOX 途径的产物有多样的生物学功能:在种子中,LOX 起防御作用,并促进种子的萌发(Santino 等,2005; Terp 等,2006);在发芽阶段它动员脂肪(Kolomets 等,2000);在生长阶段它促进块茎和结节的生长、果实的成熟(Sharma 等,2006);受伤时它起信号和防御作用(Lee 等,2004);病原菌攻击时它起抗微生物作用及促进敏感细胞死亡等(Kolomets 等,2000)。

收稿日期: 2008-01-08 **修回日期**: 2008-11-25

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金(08C0086)[Supported by Scientific Research Foundation of Education Department of Yunnan(08C0086)]

作者简介: 马长乐(1976-),男,新疆呼图壁县人,博士,副教授,主要从事植物分子生物学与生物地理学研究,(E-mail)machangle@sina.com。

* 通讯作者(Author for correspondence, E-mail: plenty@mail.kib.ac.cn)

乳突果(*Adelostemma gracillimum*)为萝藦科鹅绒藤属植物，是一种重要的药用植物，主要分布于我国西南部，民间用其根作滋补强壮药，治疗小儿惊风症和风湿关节痛。先前，我们从乳突果愈伤组织中分离了两个三羟基十八碳烯酸，经 MS 和 NMR 光谱数据分别鉴定为 9,12,13-三羟基-10-十八碳烯酸和 9,10,11-三羟基-12-十八碳烯酸。它们具有相同的分子式和分子量(m/z 330)，但是在 LC-ESI-MS 实验中准分子离子峰 m/z 353$[M+Na]^+$ 的保留时间分别为 7 min 和 10 min，从结构推断它们均为 9-LOX 作用于亚油酸的产物(赵沛基等，2003)。该类化合物具有抗真菌活性，提示十八碳酸代谢途径和具有化学防御功能的次生代谢途径在该植物中可能存在关联，我们选择了乳突果作为实验材料进行脂氧合酶的初步研究。

1　实验材料

乳突果种子采自云南中甸。它一般生长在山脚下栅栏边，海拔约 3 000 m 的地方。其果实在 10 月左右成熟。采集乳突果果实 4 个，收集种子，4 ℃存放，用于种子萌发。

2　实验方法

2.1 乳突果种子萌发及其苗的组织培养

将乳突果种子用 75%的乙醇浸泡 30 s，再用 0.12%的 $HgCl_2$ 浸泡 10 min，然后用无菌水洗涤 3 次，用于接种。置培养箱中 2 个星期左右，待苗长至 4～5 cm，切取 1 cm 长的茎段，接种在另外的培养基上进行继代培养。

种子萌发的基本培养基为添加 GA_3 5.0 mg/L 的 MS 培养基，组培苗和悬浮培养的基本培养基为添加 BA 2.0 mg/L＋NAA 0.1 mg/L 的 MS 培养基，培养基的 pH 值均为 5.8。培养条件为每天光照 12 h，温度为(25±2) ℃。

GA_3 配制方法：将 GA_3 倒入烧杯中，加少量酒精充分搅拌使其溶解，再加水配成母液备用，在培养基灭菌后过滤加入(黄涛等，2003)。

2.2 苗的悬浮培养及几丁质诱导

选择生长较好的培养两周左右的无菌苗，剪成 1 cm 长的茎段，接种到悬浮培养液中，进行摇床培养。每 100 mL 三角瓶分装 20 mL 的培养液，每三角瓶的接种量约为 0.2 g(鲜重)，摇床转速 120 rpm，(25±2) ℃下于黑暗中培养。接种两周后的悬浮培养物用于几丁质诱导实验。

将几丁质(购自 Aldrich 公司)配成 10 mg/mL 的母液(用 HAc 和 NaOH 调 pH 至 5.8)。加入 300 μL 母液至培养液中，至终浓度为 150 mg/L。摇床转速 120 rpm，(25±2) ℃下于黑暗中培养。

2.3 脂氧合酶活性测定

取 5 g 经 150 mg/L 几丁质诱导 9 h 的乳突果组培苗，液氮条件下研磨成粉末，向其加入 10 mL 4 ℃预冷的 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH6.0)，4 ℃搅拌提取 30 min。10 000 g 冷冻离心 10 min，收集上清液，加入反应底物亚油酸至终浓度为 120 μmol/L，室温放置 30 min。反应产物用 3 倍体积的氯仿/甲醇混合物(2∶1，v/v)提取 3 次，提取液合并后，12 000 g 冷冻离心 10 min，收集有机相，用压缩氮气吹干，溶解于 1 mL 色谱纯甲醇中，用作 LC-ESI-MS 检测。样品经过反相 HPLC 系统(HPLC Waters 2695，C18 反相柱 3.5 μm，3.0×50 mm)，流动相 A 为甲醇、B 为含 1%甲酸的蒸馏水梯度洗脱，进样量为 10 μL，流速为 0.2 mL/min。用 Thermo Finnigan LCQ Advantage 质谱仪进行 ESI-MS(离子阱)分析，质谱仪参数设置分别为：Capillary Temp(270 ℃)，Sheath Gas Flow(15 psi)，Source Current(80 μA)，Capillary voltage(20V)。流动相前 20 min 为甲醇∶水(63∶37)，25～30 min 为甲醇。质谱检测的准分子离子峰为 m/z 353$[M+Na]^+$ (Göbel 等，2002；黄建昌等，2005)。

3　实验结果

3.1 种子萌发和苗的继代培养

MS 培养基中添加 5.0 mg/L 的 GA_3 有利于种子的萌发，图 1 为接种两周后的无菌苗，萌发率高达 100%。转接至含有 BA 的 MS 培养基上进行继代培养两周，出芽率较高，诱导出的新芽粗壮，生长速度也比较快(图 2)，可见 BA 对芽的发生产生了促进作用。

3.2 脂氧合酶粗酶活性的测定

用几丁质诱导后的组培苗进行酶活性的测定，实验结果如表 1 所示。对照反应中没有检测到三羟基十八碳烯酸产物(实验组 E，B，E＋B，E＋ET，B＋S1)；将底物溶解于无水乙醇中，进行酶反应(实验

图 1 乳突果种子的萌发

Fig. 1 Seed germination of *Adelostemma gracillimum*

图 2 乳突果组培苗

Fig. 2 Seedlings of *Adelostemma gracillimum*

组 E+S1),检测到了三羟基十八碳烯酸的存在。该实验重复 2 次,得到一致的实验结果。

从 LC-ESI-MS 检测图谱上我们可以看到,该物质的准分子离子峰为 m/z 353,保留时间为 9～10 min(图 3),可推断该化合物为 9,10,11-三羟基-12-十八碳烯酸,是 9-LOX 作用于亚油酸的产物。以上实验结果说明:经 150 mg/L 几丁质诱导 9h 的乳突果组培苗产生了 9-LOX,并且在粗酶提液中存在着有活性的酶蛋白。

表 1 酶活性测定数据

Table 1 Data of enzyme reaction

实验组 Experiment series	m/z 353
酶粗提液 E	—
缓冲液 B	—
酶粗提液 E+缓冲液 B	—
酶粗提液 E+无水乙醇 ET	—
缓冲液 B+S1 溶解于无水乙醇的底物	—
酶粗提液 E+溶解于无水乙醇的底物 S1	1.15E5

4 讨论

近年来,国际上关于从植物中研究脂氧合酶已经很多。许多植物的 LOX 基因序列已经知道,这

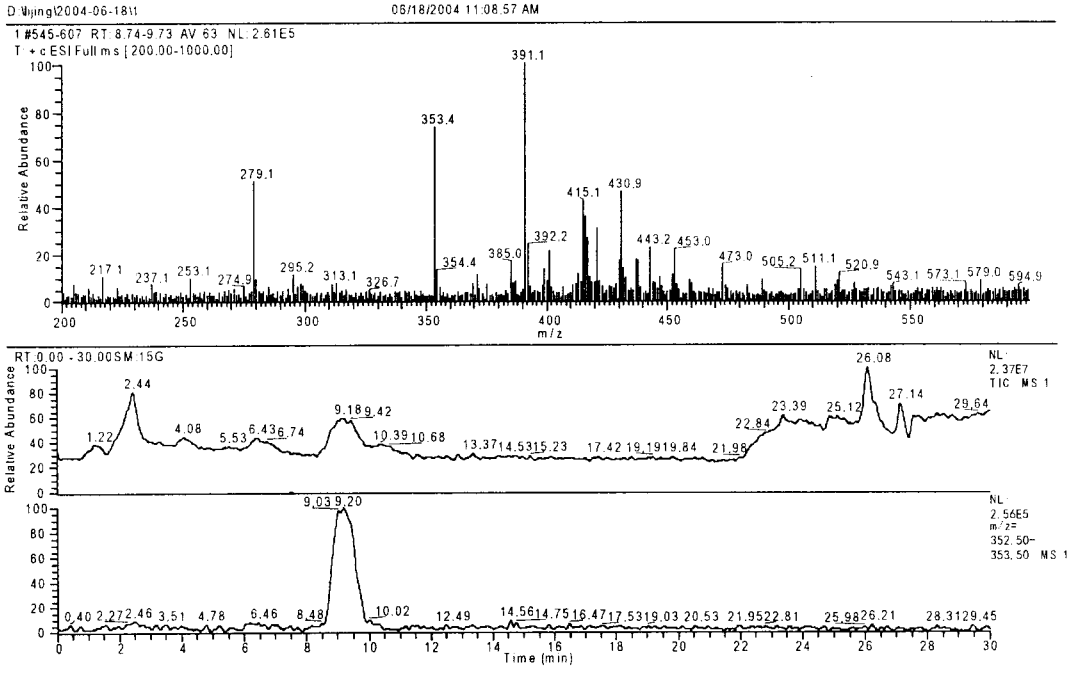

图 3 粗酶活性 LC-ESI-MS 检测图

Fig. 3 LC-ESI-MS detection of rude enzymes

为研究它们之间的系统进化关系，阐明基因序列、结构以及位置特异性和活性之间的关系提供了可能。在过去的几十年中，有关 LOX 途径的生化研究也取得了很大进展(Grechkin，1998)。13-LOX 途径的次生代谢产物通过信号分子作用或直接起化学防御的作用，如在受伤反应中茉莉酮酸酯和 OPDA 作为信号分子起作用(Creelman & Mullet，1997)；有的产物对次生代谢起调节作用(李靖等，2004)，此途径的研究报道也很多，尤其是 JA 途径，已经研究的比较清楚。而有关 9-LOX 途径的研究报道较少。

本文首次建立了乳突果苗的培养体系，并用仿真菌环境(几丁质)对乳突果组培苗进行刺激诱导，并作初步的酶活鉴定，检测到了反应产物—9，10，11-三羟基-12-十八碳烯酸的存在，根据结构可知它为 9-LOX 作用于亚油酸的产物。可见在乳突果组培苗中，几丁质诱导的十八碳酸代谢途径可能沿着 9-LOX 方向进行。本实验结果为探索"诱导—9-LOX 途径—化学防御"之间的关系及脂氧合酶基因的分离奠定基础。至于该酶作用的产物是如何作进一步转化，以及该途径的产物是如何起到化学防御作用的，还需要进一步的实验来证明。

参考文献：

赵沛基，甘烦远，沈月毛. 2003. 乳突果组织培养及愈伤组织中的多羟基脂肪酸[C]//中国植物学会. 中国植物学会七十周年年会论文摘要汇编. 北京：高等教育出版社，441－442

Brash AR. 1999. Lipoxygenases：occurrence，functions，catalysis，and acquisition of substrate[J]. *J Biol Chem*，**274**：23 679－23 682

Creelman RA，Mullet JE. 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*，**48**：355－381

Göbel C，Feussner I，Hamberg M. 2002. Oxylipin profiling in pathogen-infected potato leaves[J]. *Biochimica Biophysica Acta*，**1 584**：55－64

Grechkin A. 1998. Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway[J]. *Prog Lipid Res*，**37**(5)：317－352

Huang JC(黄建昌)，Xiao Y(肖艳)，Zhou HG(周厚高). 2005. Impact of simulated acid rain on peroxidation of membranes lipids in leaves of papaya seedlings (模拟酸雨对番木瓜不同成熟度叶片膜脂过氧化作用的影响)[J]. *Guihaia*(广西植物)，**25**(6)：562－565

Huang T(黄涛)，Dong GF(董高峰)，Zhang LY(张兰英)，*et al*. 2003. Factors affecting *in vitro* shoot regeneration from leaf explants of *Citrus grandis* cv. Shatian-Yu(影响沙田柚叶片离体培养的因素研究)[J]. *Guihaia*(广西植物)，**23**(6)：561－564

Kolomets MV，Chen H，Gladon RJ，*et al*. 2000. A leaf lipoxygenase of potato induced specifically by pathogen infection[J]. *Plant Physiol*，**124**：1 121－1 130

Lee A，Cho K，Jang S，*et al*. 2004. Inverse correlation between jasmonic acid and salicylic acid during early wound response in rice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*，**318**(3)：734－738

Li J(李靖)，Zhao PJ(赵沛基)，Lu CH(鲁春华)，*et al*. 2004. Studies on lipoxygenase and polyhydroxy fatty acid in SA-elicited *Maytenus hookeri* suspension cells(水杨酸诱导美登木悬浮细胞产生脂氧合酶及多羟基脂肪酸的研究)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究)，**26**(5)：543－548

Santino A，Iannacone R，Hughes R，*et al*. 2005. Cloning and characterisation of an almond 9-lipoxygenase expressed early during seed development[J]. *Plant Sci*，**168**(3)：699－706

Sharma R，Krishna H，Patel V，*et al*. 2006. Fruit calcium content and lipoxygenase activity in relation to albinism disorder in strawberry[J]. *Sci Hort*，**107**：150－154

Terp N，Göbel C，Brandt A，*et al*. 2006. Lipoxygenases during *Brassica napus* seed germination[J]. *Phytochemistry*，**67**(18)：2 030－2 040

* * * \