

桑树组织培养物中 1-脱氧野尻霉素的产生规律初探

邢辉 李勇 张金芳 王洪利 冀宪领 段祖安

(山东农业大学林学院, 山东泰安 271018)

摘要 为探讨桑树合成 1-脱氧野尻霉素(1-DNJ)的代谢途径,采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)分析法,研究了桑树品种大 10 的组织培养物中 1-脱氧野尻霉素的产生规律。结果表明:桑树几种组织培养物中 1-DNJ 的质量分数在无菌苗叶片中为 0.309 604%,无菌苗中为 0.158 516%,再生芽中为 0.318 756%,再生苗中为 0.168 672%;桑树绿色愈伤组织、疏松愈伤组织、悬浮培养细胞、悬浮细胞诱导愈伤组织中不含 1-DNJ。推测 1-DNJ 产生于由愈伤组织分化为再生芽的阶段。

关键词 桑树; 1-脱氧野尻霉素; 组织培养物

中图分类号 S888.2 **文献标识码** A **文章编号** 0257-4799(2008)02-0322-05

Research on Production Regularity of 1-deoxynojirimycin in Mulberry Tissue Cultures

XING Hui LI Yong ZHANG Jin-Fang WANG Hong-Li* JI Xian-Ling DUAN Zu-An

(College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian Shandong 271018, China)

Abstract To investigate the metabolic pathway of 1-deoxynojirimycin (1-DNJ) in the mulberry, the production regularity of 1-DNJ in the tissue cultures of mulberry Da 10 variety was investigated using reversed phase high performance liquid chromatography method. The result showed that the content of the 1-DNJ was 0.309 604% in aseptic plant leaves, 0.158 516% in aseptic seedling, 0.318 756% in regeneration buds, and 0.168 672% in regeneration plant, respectively. There was no 1-DNJ in green callus, loose callus, suspension cells and induced callus from suspension cells, suggested that the 1-DNJ was produced in the phase of callus differentiation to regeneration buds.

Key words *Morus L.*; 1-deoxynojirimycin; Tissue cultures

1-脱氧野尻霉素(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ)及其衍生物具有高效广泛的药理作用,对糖尿病等有较显著的治疗效果^[1-4],是一种高效低毒的天然绿色药物。在含有 1-DNJ 的植物中,以桑树中的 1-DNJ 含量最高^[2,5-7]。目前有关体外培养桑树细胞和桑树组织再生培养过程中 1-DNJ 的产生规律还未见报道。本实验就桑树组织培养物中 1-DNJ 的产生规律进行了探讨,可为解明桑树中合成 1-DNJ 的代

谢途径和相关分化细胞的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂、仪器

无菌苗是将桑树品种大 10 的冬芽(采自山东农业大学蚕桑科研基地)接种在 MS 培养基上培养而获得。取桑树品种大 10 的无菌苗叶片,切成 0.5 cm 见方接种于 MS 培养基上,附加生长调节剂 1 mg/L 6-BA + 2 mg/L 2, 4-D + 1 mg/L NAA 诱导培养产生愈伤组织,经 4 次继代为黄色疏松状愈伤组织。悬浮细胞系选取驯化培养稳定的桑树品种大 10 的悬浮细胞系为实验材料。细胞诱导愈伤组织由上述悬浮细胞系经平板薄层静止培养,于附加

收稿日期:2007-05-23

作者简介:邢辉(1979-),男,山东,硕士研究生。

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

通讯作者:王洪利,副教授,硕士生导师。

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

生长调节剂 1.0 mg/L 6-BA + 0.1 mg/L NAA 的 MS 培养基上诱导培养。再生芽和再生苗由细胞诱导的愈伤组织于附加生长调节剂 1.2 mg/L 6-BA + 0.2 mg/L NAA 的 MS 培养基上分化培养生成。

试剂:1-deoxynojirimycin-HCl (DNJ-HCl) 为 Sigma 公司产品,9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl) 为 Fluka 公司产品,乙腈色谱纯为天津市凯通化学试剂有限公司出品,其他试剂皆为分析纯,实验用水为自制双蒸水。

仪器:高效液相色谱仪(美国 Dionex),电热恒温干燥箱(上海一恒科技有限公司),电热恒温水浴锅(深圳天南海北有限公司),TG/L6G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),KQ-600 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司生产),旋涡混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂)等。

1.2 供试样品的预处理

参照文献[6]的方法,无菌桑苗叶片、植株(叶片、茎段和芽)、疏松愈伤组织、绿色愈伤组织、细胞诱导的愈伤组织、再生芽和再生苗均经 40 ℃ 电热恒温干燥箱干燥至恒重,研磨粉碎待测。悬浮培养细胞每 2 d 取 1 次样,以针筒过滤器过滤收集,将悬浮培养细

胞一个生长周期(14 d)收集的细胞试样经 40 ℃ 于电热恒温干燥箱干燥至恒重,混合研磨粉碎待测。

1.3 供试样品中 1-DNJ 含量的定量分析

参照文献[6,7]的方法,准确称取 15 mg 经 40 ℃ 干燥的样品,以 0.05 mol/L HCl 为溶剂提取样品中的 1-DNJ,并用 9-芴基氯甲酸甲酯(FMOC)为衍化剂,在 pH 8.5 的硼酸盐缓冲液中进行衍生化反应,生成具有紫外吸收的 DNJ-FMOC 络合物,再用反相高效液相色谱紫外检测法对其分离测定, DNJ-FMOC 的峰面积与 1-DNJ 浓度呈正相关关系。

2 结果与分析

1-DNJ 标样的衍生化反应混合物的 RP-HPLC 分析图谱如图 1 所示。图 1 有 3 个主色谱峰,但在进行衍生化反应时,若只加 FMOC-Cl 不加 Gly 和 1-DNJ,则仅出现色谱峰 3,只加 Gly 和 FMOC-Cl 进行衍生化反应,则只出现色谱峰 2 和 3,增加 1-DNJ 标样的加入量,则色谱峰 1 的峰面积线性增加。由此可以断定,色谱峰 1、2、3 分别为 DNJ-FMOC、Gly-FMOC、FMOC-Cl^[6],保留时间分别为第 5.490 ~ 5.495、15.870 ~ 15.920、20.000 min。

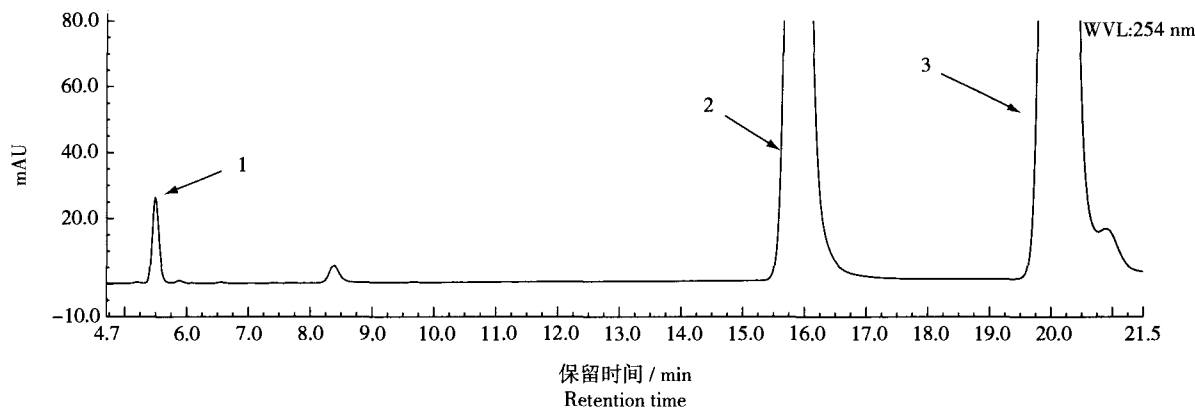


图1 1-DNJ 标准样品的反相高效液相色谱图

Fig. 1 RP-HPLC spectra of 1-DNJ standard

供试无菌桑苗叶片及无菌桑苗试样的反相高效液相色谱分离图谱如图 2、3 所示。图 2、3 中的色谱峰 A 和 B 与图 1 中的色谱峰 1 保留时间基本一致,加入 1-DNJ 内标后,可使图 2、3 中的色谱峰 A 和 B 的面积线性增加。因此可以确定,该色谱

峰是无菌桑苗叶片和无菌桑苗中的 1-DNJ 与 FMOC 形成的络合物 DNJ-FMOC,色谱峰 2 和 3 分别是络合物 Gly-FMOC、FMOC-Cl。经计算,无菌苗叶片中的 1-DNJ 质量分数为 0.309 604%,无菌苗中的 1-DNJ 质量分数为 0.158 516%。

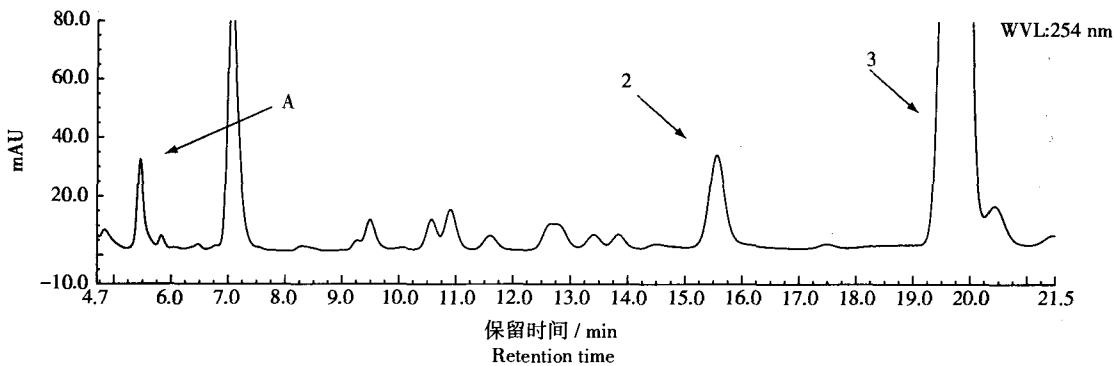


图 2 无菌桑苗叶片试样的反相高效液相色谱图
Fig.2 RP-HPLC spectra of aseptic mulberry leaves

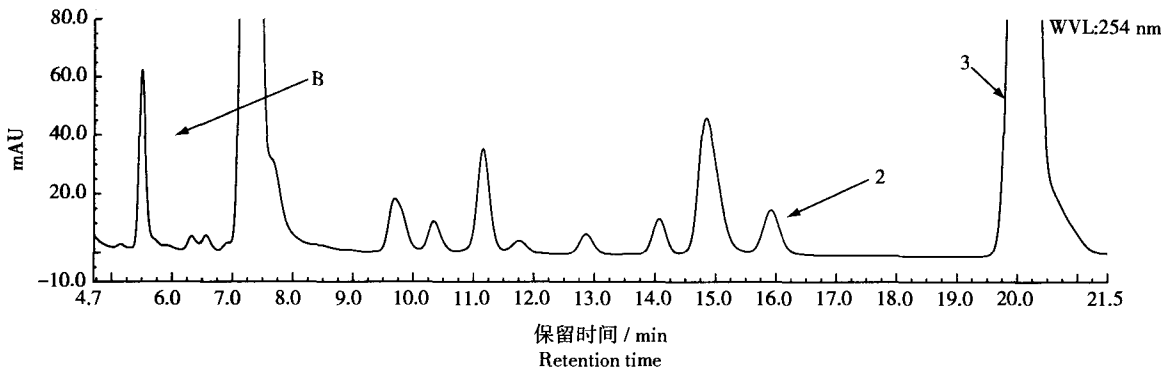


图 3 无菌桑苗试样的反相高效液相色谱图
Fig.3 RP-HPLC spectra of aseptic mulberry seedling

桑树悬浮细胞和 3 种愈伤组织的反相高效液相色谱数据见表 1:在 1-DNJ 标样中出现络合物 DNJ-FMOC、Gly-FMOC、FMOC-Cl 的 3 个主色谱峰;在桑树悬浮细胞和 3 种愈伤组织中只有络合物 Gly-FMOC 和 FMOC-Cl 的色谱峰在特定保留时间出现,而在络合物 DNJ-FMOC 色谱峰出现的特定保留时间没有色谱峰出现。因此可以确定桑树悬浮细胞和 3 种愈伤组织中不含 1-DNJ。

桑树再生芽和再生苗叶片及再生苗试样的反相高效液相色谱分离图谱如图 4-6 所示。色谱峰 C、D、E 与图 1 中的色谱峰 1 的特定保留时间基本一致,加入 1-DNJ 内标后,可使图 4-6 中色谱峰 C、D、E 的面积线性增加。因此可以确定,该色谱峰就是再生芽和再生苗叶片及再生苗中的 1-DNJ 与 FMOC 形成的络合物 DNJ-FMOC。经计算,再生芽和再生苗叶片及再生苗中的 1-DNJ 质量分数分别为 0.318 756%、0.168 672%、0.289 851%。

表 1 桑树悬浮细胞和愈伤组织反相高效液相色谱比较
Table 1 Comparison of RP-HPLC spectra between mulberry suspension cell and callus

样品 Sample	色谱峰 Chromatogram peak	保留时间 / min Retention time	1-DNJ 质量分数 / % 1-DNJ content
1-DNJ 标样 Standard sample	DNJ-FMOC	5.491	0.302 154
	Gly-FMOC	15.872	
	FMOC-Cl	20.000	
桑树悬浮细胞 Mulberry suspension cell	DNJ-FMOC	-	0.000 000
	Gly-FMOC	15.801	
	FMOC-Cl	19.784	
桑树疏松愈伤组织 Mulberry loose callus	DNJ-FMOC	-	0.000 000
	Gly-FMOC	15.908	
	FMOC-Cl	20.045	
桑树绿色愈伤组织 Mulberry green callus	DNJ-FMOC	-	0.000 000
	Gly-FMOC	15.897	
	FMOC-Cl	18.024	
桑树悬浮细胞诱导 愈伤组织 Induced callu from mul- berry suspension cells	DNJ-FMOC	-	0.000 000
	Gly-FMOC	15.827	
	FMOC-Cl	20.101	

表中“-”表示在特定保留时间无色谱峰。
“-” in the table indicates that there is no peak at the retention time.

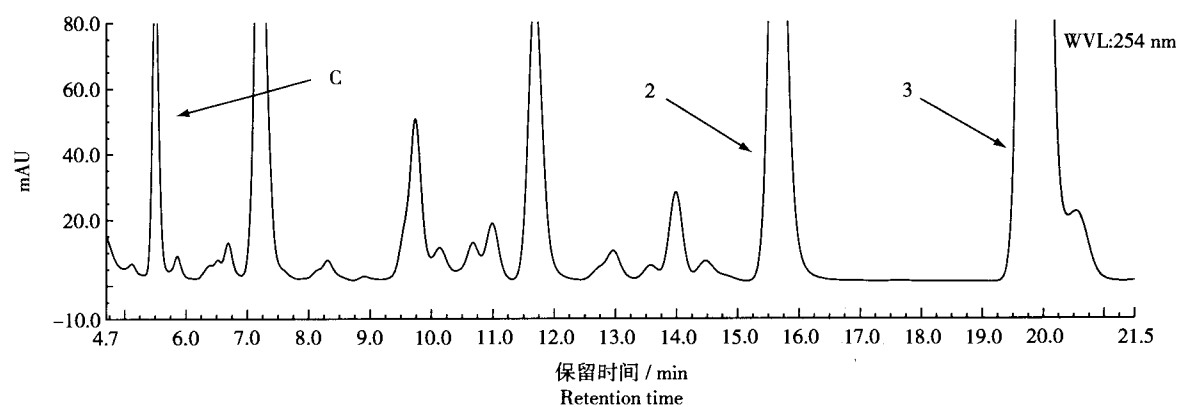


图4 桑树再生芽试样的反相高效液相色谱图

Fig. 4 RP-HPLC spectra of mulberry regeneration buds

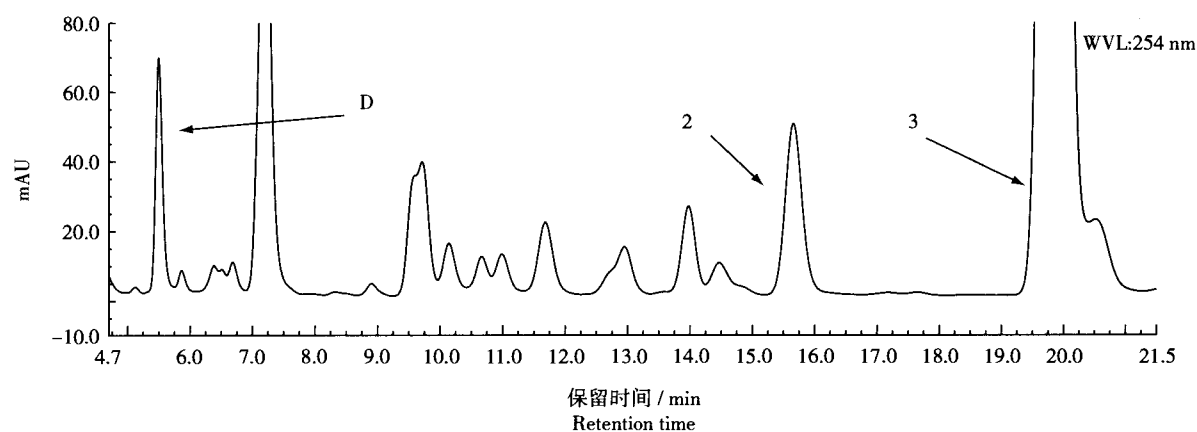


图5 桑树再生苗叶片试样的反相高效液相色谱图

Fig. 5 RP-HPLC spectra of mulberry regeneration seedling leaves

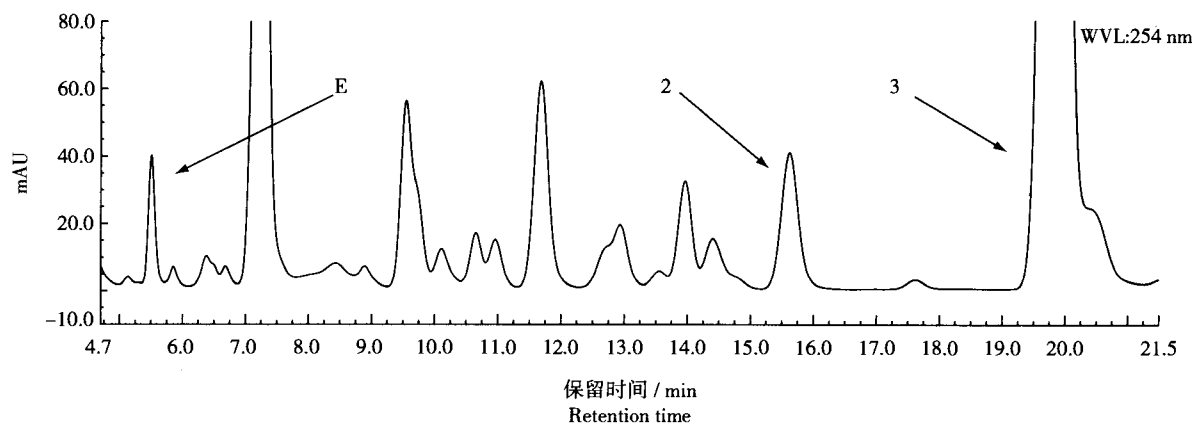


图6 桑树再生苗试样的反相高效液相色谱图

Fig. 6 RP-HPLC spectra of regeneration seedling

3 讨论

本实验探讨了桑树无菌苗叶片、无菌苗、疏松愈伤组织、绿色愈伤组织、悬浮细胞,以及细胞诱导的愈伤组织、再生芽、再生苗叶片和再生苗的再生培养过程中1-DNJ的产生规律,结果在无菌苗叶片、无菌苗、再生芽、再生苗叶片和再生苗中检测到1-DNJ。这一结果显示,1-DNJ产生于由桑树愈伤组织分化为再生芽这一培养阶段中,推测是由处于愈伤组织分化为再生芽这一阶段内的某一类分化细胞所产生的。然而,由桑树愈伤组织分化为再生芽的这一发育阶段中,其不同的发育时期较难界定,同时对不同发育时期的取材不易操作。因此,在后续的研究中将利用切片技术针对由愈伤组织分化为再生芽这一发育阶段的不同发育时期进行取材测定,以确定桑树产生1-DNJ的具体发育时期,进而确定具体的分化细胞。

参考文献 (References)

- [1] Ezure Y, Maruo S, Miyazaki K, *et al.* Moran line (1-deoxynojirimycin) fermentation and its improvement[J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49(4): 1119-1125
- [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] Asano N, Nishida M, Kizu H, *et al.* Homono jirimycin isomers and glycosides from *aglaonema treubii*[J]. *Nat Prod*, 1997, 60: 98-101
- [4] 杨海霞,朱祥瑞. 1-脱氧野尻霉素的研究进展[J]. *中国蚕业*, 2002, 23(4): 60-62
- [5] Tsuruka T, Fukuyasu H, Ishii M, *et al.* Inhibition of mouse tumor metastasis with nojirimycin-related compounds[J]. *J Antibiot*, 1996, 49(2): 155-161
- [6] 施新琴,崔为正,裴立群,等. 用反相高效液相色谱-紫外检测法测定1-脱氧脱氧野尻霉素的含量[J]. *蚕业科学*, 2006, 32(1): 146-149
- [7] 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

欢迎订阅 2008 年《蚕业科学》

《蚕业科学》是由中国蚕学会、中国农业科学院蚕业研究所共同主办的蚕丝学专业学术期刊。本刊主要刊载蚕丝学科在应用基础理论和应用技术研究方面的学术论文、专题研究报告、研究简报、国内外研究进展综述、学术动态、研究简讯等,栏目丰富,内容新颖。本刊的主要读者群为从事蚕丝业的科研人员、大专院校师生、生产部门的技术人员和管理人员。

本刊是美国《化学文摘》(CA)、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国学术期刊综合评价数据库统计刊源、中国期刊全文数据库、北京图书馆《中文核心期刊要目总览》、万方数据—数字化期刊群、中文科技期刊数据库等中外重要检索刊物及数据库的入选期刊,并被评为中国科协优秀期刊、江苏省优秀期刊,2002年、2004年获全国优秀农业期刊一等奖,2007年获江苏省科技类期刊封面设计和编校质量奖。

本刊为季刊,季末月25日出版,大16开本,全铜版纸彩色印刷,128页/期。定价:10元/期,40元/年。全国各地邮局均可订阅,亦可直接向编辑部订阅。邮发代号28-23。

本刊承接蚕丝业的各类广告业务,欢迎洽谈。

编辑部地址:江苏省镇江市四摆渡中国农业科学院蚕业研究所

邮编:212018 电话:0511-85616835

传真:0511-85622507

E-mail:CYKE@chinajournal.net.cn