

高产人参寡糖素培养细胞变异克隆系的筛选*

罗建平 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 用 2 mmol/L 的 MNNG 处理经过滤的人参悬浮培养细胞 1 小时后, 细胞存活率下降显著, 细胞克隆植板率只是对照组的 10.12%。经细胞平板克隆共获得克隆系 151 株, 其中很多克隆系在转移培养中生长缓慢, 甚至不生长而死亡。经分析可供测定的克隆系生长和寡糖素含量的差异, 对 11 株寡糖素含量较高克隆系经连续 10 代继代培养观察, 选出一株稳定高产人参寡糖素优良克隆系 PGMB-37, 其平均生长速率是 $0.558\text{gDWL}^{-1}\text{d}^{-1}$, 为亲本的 1.5 倍, 平均寡糖素含量是 14.67%DW, 平均寡糖素产率是 2.456g/L, 分别比亲本高 70% 和 156%, 并且它的过氧化物酶同工酶谱特征与亲本之间也呈稳定性差异。

关键词 人参, 寡糖素, 变异克隆系, 过氧化物酶同工酶

SCREENING OF VARIANT CLONE LINE WITH HIGH YIELDING OLIGOSACCHARIN FROM SUSPENSION CULTURE CELL OF PANAX GINSENG

LUO Jian-Ping, ZHENG Guang-Zhi

(Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204)

Abstract The suspension cells of *Panax ginseng* which had been filtrated, were treated with mutagenic compound, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine at 2 mmol/L, for 1 hour. Cell viability was remarkably decreased and the formation of cell clone was only 10.12% of control. Cells treated were plated on a nutrient agar medium. More than 150 clone lines were obtained after plating culture of 60 days, of which many clone lines grew slow or stopped growing and died during transplantation culture. On the light of the stability of 11 clone lines with high yield of oligosaccharin obtained on their differences in cell growth and oligosaccharin content among all clone lines picked out petri dishes, a stable clone line PGMB-37 with high yield of oligosaccharin had been selected through 10 generations of successive subculture. The mean growth rate of clone line PGMB-37 was $0.558\text{gDWL}^{-1}\text{d}^{-1}$, and was about 1.5-fold to its parent, and its mean oligosaccharin content and yield were 14.67%DW and 2.456 g/L, which were near 70% and 156% higher than those of its parent, respectively. The patterns of isoperoxidases of clone line PGMB-37 were different from those of its parent, and these differences were also stable during successive subculture.

Key words *Panax ginseng*, Oligosaccharin, Variant clone line, Peroxidase isozyme

寡糖素 (oligosaccharin) 作为一类新型植物调节因子, 在低浓度时可产生显著的生理效应^[1,2]。近年来, 寡糖素研究主要集中在结构和生理功能方面^[3], 而高产寡糖素克隆系的筛选工作未见文献报道。

来自人参 (*Panax ginseng* C. A Mey) 培养细胞的寡糖素能有效诱导不同细胞培养物的生长和次生物质的合成^[4], 并且能提高马铃薯试管结薯率^[5]。初步药理试验表明人参寡糖素具有显著的抗肿瘤活性, 对放、化疗引起的白细胞和血小板数量下降具有明显的回升作用。作者曾从栽培人参中制备寡糖素, 得率低于千分之一, 而从人参培养细胞中制备的寡糖素可达 8%。因此, 通过生物工程技术进行工业化生产人参寡糖素具有广阔前景。本文通过化学诱变剂处理人参悬浮培养细胞增加细胞间差异, 并用细胞平板技术进行高产人参寡糖素变异克隆系的筛选, 以期细胞大规模培养生产寡糖素提供优良细胞株系。

材料和方法

实验材料是第 60 代人参愈伤组织无性系, 继代培养基为 MS 附加 1.5 mg/L 的 2,4-D (2,4-二氯苯氧乙酸) 和 0.5 mg/L 的 KT (激动素)。26±1℃, 暗中培养。继代周期为 30 天。

细胞悬浮培养 人参细胞悬浮培养的培养基选用 MS 附加 0.25 mg/L 的 2,4-D 和 0.08 mg/L 的 KT。每 250 mL 三角瓶中加入 50 mL 培养液, 接种愈伤组织, 26±1℃、暗中于 120 rpm 旋转式床床上振荡培养。

诱变剂处理及细胞平板克隆 培养 12 天的细胞悬浮培养物连续通过 250 μm 和 154 μm 尼龙网过滤, 对数期时单细胞得率为 87.50%, 2—3 个细胞组成的细胞团占 9.78%, 4—8 个细胞组成的细胞团占 2.72%。含分散细胞的滤液调至细胞密度为 8.0 × 10³—1.0 × 10⁴ 个细胞/mL, 然后分成 4 组, 除对照组外, 分别用最终浓度为 1 mmol/L, 2 mmol/L 和 3 mmol/L 的 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 处理 1 小时, 反复洗涤去 MNNG, 按前文^[6]进行细胞克隆, 平板培养基内含 50% 无细胞的悬浮培养液, 琼脂浓度为 5g/L。

细胞克隆的挑选和继代培养 人参细胞平板培养 60 天后, 挑取直径为 1—2mm 的细胞克隆于三角瓶中继续培养, 一段时间后, 每克隆系一半用于继代培养, 一半用于细胞生长和寡糖素含量测定, 并比较各克隆系的生长速率和寡糖素含量。克隆系继代培养周期为 30 天, 其它培养条件同上。

实验参数 细胞克隆植板率以平板培养 30 天的可见克隆数占植板细胞总数的百分比表示 (%)。双醋酸荧光素染色法测定细胞存活率^[7], 以观察到的活细胞数占观察的总细胞数的百分比表示 (%)。收获的培养细胞冰冻干燥至恒重, 称重后计算细胞生长速率和制备寡糖素。生长速率以每升每天增加的细胞干重表示 (单位: 克干重/升·天, gDWL⁻¹d⁻¹)。寡糖素的制备按文献^[8]方法, 用苯酚-浓硫酸比色法测定寡糖素含量, 以占干重样品的百分比表示 (%DW), 并计算寡糖素产率, 以每升 30 天增加的干重细胞所制备的寡糖素克数表示 (g/L)。所有结果均 3 次重复。

过氧化物酶同工酶的测定 取生长 20 天的克隆系愈伤组织 0.1 g, 边研磨边加入 0.5 mL 的 Tris-柠檬酸缓冲液, pH 8.2, 匀浆于 3 × 10³ × g 下离心 30 分钟, 取上清液, 每 mL 加蔗糖 0.4 g。电泳时, 分离胶浓度为 7%, 浓缩胶浓度为 4%, 胶厚 1 mm, Tris-甘氨酸溶液为电极缓冲液, pH 8.3, 每槽上样量均为 50 μL, 稳压 10 V/cm, 冰箱中电泳 6 小时左右, 用联苯胺、维生素 C 和 H₂O₂ 染色。

结果

MNNG 对人参培养细胞活力及细胞克隆形成的影响

和对照组相比较, 3 种 MNNG 浓度处理都显著降低人参培养细胞的存活率, 细胞存活率分别是对

对照组的 72.64%、35.39% 和 19.81% (图 1)。随细胞存活率的下降, 细胞克隆的植板率也急剧下降, 3 种浓度处理组的单细胞克隆植板率分别只有对照组的 17.38%, 10.12% 和 3.77%。

优良变异克隆系的选择

3 种 MNNG 浓度处理人参悬浮细胞滤液 1 小时后, 经细胞平板培养 60 天后, 共挑选直径 1—2 mm 的克隆系 151 株继续培养, 在连续转接培养中所有处理组的克隆系中有许多生长缓慢, 不少克隆系停止生长直至死亡, 最后获得的克隆系很少, 不足以进行克隆系变异的统计分析。经 3 次转接后可供测定的克隆系共为 46 株, 通过分析各个克隆系生长速率和寡糖素含量的差异情况, 选出 11 株寡糖素产率较高的克隆系 (表 1)。在克隆系第 2—5 代的继代培养中 (图 2), 1 mmol/L 的 MNNG 处理组高产克隆系生长速率随培养代数的增加而增加, 然后稳定; 寡糖素含量在第 2 代下降后也回升至一稳定水平。2 mmol/L 的 MNNG 处理组高产克隆系生长速率变化不一致, PGMB-15 的生长速率基本稳定, 但 PGMB-37 的生长速率在继代培养中增加显著, 至第 4 代达最大值, 超过所有供试克隆系的生长速率。寡糖素含量的变化和细胞生长速率变化一致, 表现相关性。3 mmol/L 的

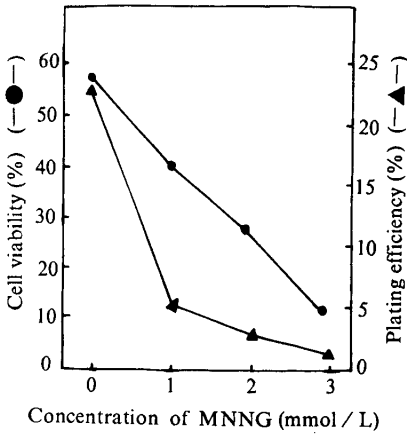


图 1 MNNG 对人参培养细胞的细胞存活率和细胞克隆形成的影响

Fig.1 Effects of MNNG on cell viability and cell clone formation of culture cells from *Panax ginseng*

MNNG 处理组高产克隆系生长速率和寡糖素含量在第二代下降后一直保持稳定。根据以上分析, 如果 PGMB-37 在长期连续继代培养中, 仍保持生长速率和寡糖素含量的优良特性, 就可选出所需的目的克隆系。

表 1 MNNG 处理后选择的一些寡糖素含量较高的克隆系

Table 1 Some clone lines with higher yielding oligosaccharin selected from cells treated with different MNNG concentrations by cell cloning

克隆系 Clone line	生长速率 Growth rate (gDWL ⁻¹ d ⁻¹)	寡糖素含量 Oligosaccharin content (%DW)	寡糖素产率 Oligosaccharin yield (g/L)
Parent	0.357	9.02	0.967
PGMA-07	0.429	11.03	1.420
PGMA-08	0.485	10.91	1.423
PGMA-16	0.471	13.40	1.893
PGMA-22	0.451	11.73	1.587
PGMB-03	0.452	11.09	1.503
PGMB-15	0.440	10.63	1.403
PGMB-35	0.434	11.49	1.496
PGMB-37	0.462	13.49	1.868
PGMC-09	0.422	12.12	1.265
PGMC-13	0.446	11.81	1.578
PGMC-23	0.422	10.36	1.312

.PGMA、PGMB 和 PGMC 分别为 1 mmol/L、2 mmol/L 和 3 mmol/L 的 MNNG 处理组的克隆系。

PGMA, PGMB and PGMC show clone lines selected from cells treated with 1 mmol/L, 2 mmol/L and 3 mmol/L MNNG, respectively.

优良变异克隆系的稳定性

PGMB-37 继代培养稳定性观察表明 (表 2), 在连续继代培养中克隆系生长速率和寡糖素含量及产率均保持稳定。平均生长速率为 0.558 gDW / L · D 水平左右, 是亲本的 1.5 倍, 寡糖素含量稳定在 14.67%DW 左右, 平均寡糖素含量比亲本高 70%, 平均寡糖素产率为 2.456 g / L, 是亲本的 2.59 倍。

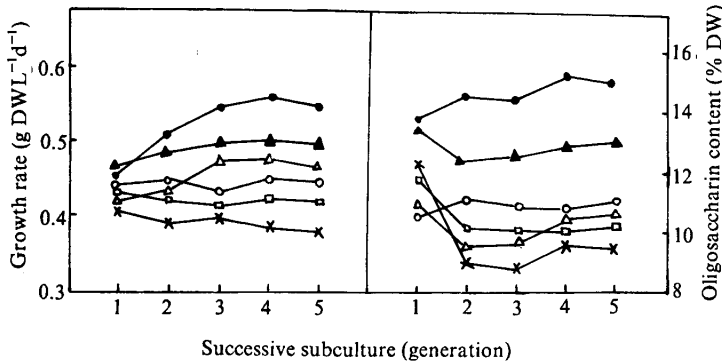


图 2 不同浓度 MNNG 处理对克隆系继代培养中生长速率和寡糖素含量的影响

Fig.2 The influence of MNNG of different concentrations on the growth rate and oligosaccharin content of clone lines during successive subculture

PGMA-07 —△—△—; PGMA-16 —▲—▲—; PGMB-15 —○—○—
 PGMB-37 —●—●—; PGMC-09 —×—×—; PGMC-13 —□—□—

表 2 克隆系 PGMB-37 和亲本的比较

Table 2 Comparison of clone line PGMB-37 and parent

继代培养 Subculture	生长速率 Growth rate (gDW L ⁻¹ d ⁻¹)	寡糖素含量 Oligosaccharin content (%DW)	寡糖素产率 Oligosaccharin yield (g / L)
P ₆	0.359	9.47	1.020
C ₆	0.551	14.61	2.415
P ₈	0.378	7.48	0.848
C ₈	0.579	14.92	2.592
P ₁₀	0.371	9.07	1.007
C ₁₀	0.554	14.72	2.446

P₆、P₈ 和 P₁₀ 分别是亲本愈伤组织第 6、8 和 10 代继代培养。

C₆、C₈ 和 C₁₀ 分别是克隆系 PGMB-37 愈伤组织第 6、8 和 10 代继代培养。

P₆、P₈ and P₁₀ show the 6th, 8th and 10th subculture of parent callus.

C₆、C₈ and C₁₀ show the 6th, 8th and 10th subculture of clone lines PGMB-37 callus.

同工酶酶谱的比较表明, PGMB-37 愈伤组织的过氧化物酶同工酶谱特征和亲本之间在连续继代培养中具稳定性差异。PGMB-37 过氧化物酶同工酶谱带只有 5 条, 比亲本少两条, 谱带 A (Rf: 0.198) 不见, 谱带 B、C (Rf: 0.210; 0.222) 染色较浅, 谱带 F (Rf: 0.696) 消失 (图 3)。

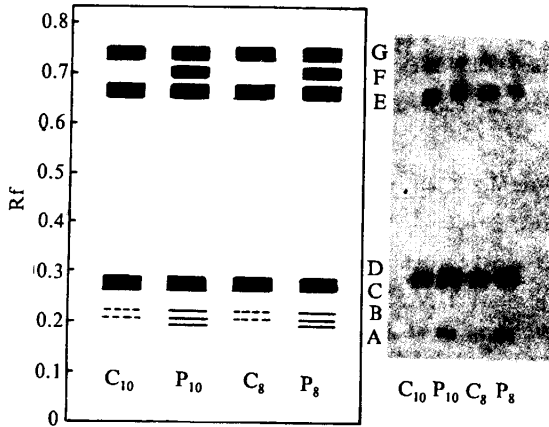


图3 克隆系 PGMB-37 和亲本之间过氧化物酶同工酶谱的比较

P_8 和 P_{10} 分别表示亲本第 8 和 10 代愈伤组织过氧化物酶同工酶谱。

C_8 和 C_{10} 分别表示克隆系 PGMB-37 第 8 和 10 代愈伤组织过氧化物酶同工酶谱。

Fig.3 Comparison of peroxidase isozyme patterns between clone lines PGMB-37 and parent

P_8 and P_{10} show the 8th and 10th subculture of parent.

C_8 and C_{10} show the 6th and 10th subculture of clone line PGMB-37.

讨 论

MNNG 是一种强作用的烷基化诱变剂, 对人参培养细胞的生长有很强的抑制作用。对克隆系生长速率和寡糖素产率稳定性分析结果表明, 用 MNNG 诱变处理后获得的变异克隆系在连续继代培养中具有较好的稳定性, 和 Nishi 等人^[9]的结果一致。这种原因可能是 MNNG 处理悬浮细胞时, 即使有小细胞团存在, 但其内部细胞和外周细胞受 MNNG 作用的浓度和时间存在差别, 外周细胞相对地受 MNNG 作用的浓度高且时间长, 使外周细胞生长受抑制甚至死亡, 细胞平板克隆后单个细胞或真正同源的小细胞团来源的克隆系增加, 而这些克隆系在继代培养中具较高的稳定性^[10]。

由于寡糖素是来自培养细胞壁的水解产物, 而细胞壁又是细胞干重的主要贡献者, 当细胞生长速度较快时, 每个生长周期总细胞干重增加较多, 细胞壁干重增加也较多, 因此寡糖素产率较高, 使克隆系的寡糖素产率和细胞生长速率之间具明显的相关性。

参 考 文 献

- [1] Albersheim P, Darvill A G. Oligosaccharins. *Sci Amer*, 1985, 253: 44—50.
- [2] Ryan C A, Farmer E E. Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. *Annu Rev Plant Physiol Mol Bio*, 1991, 42: 651—674.
- [3] McNeil M, Darvill A G, Fry S C. et al. Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annu Rev Biochem*, 1984, 53: 625—663.
- [4] 郑光植编著. 植物组织培养及其次级代谢. 昆明: 云南大学出版社, 1993.
- [5] 陈善娜, 李琼红, 王丽华等. 香豆素和寡糖素对马铃薯试管结薯率的影响. *云南植物研究*, 1991, 13(3): 321—326.
- [6] 罗建平, 郑光植, 甘烦远. 人参培养细胞的单细胞克隆. *生物工程学报*, 1993, 9(4): 337—341.

- [7] Widholm J M. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cell. *Stain Technol*, 1972, 47: 189—194.
- [8] Hahn M G, Darvill A G, Albersheim P. Host-Pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol*, 1981; 68: 1161—1169.
- [9] Nishi A, Yoshida A, Mori M. et al. Isolation of variant carrot cell lines with altered pigmentation. *Phytochemistry*, 1974, 13: 1653—1656.
- [10] Dougall D K. Cell cloning and the selection of high yielding strains. In: Constabel F, Vasil I K. eds. Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. IV. New York: Academic Press Inc., 1987: 117—124.