

人参培养细胞的单细胞克隆

罗建平 郑光植 甘烦远

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

培养基组成成分能影响人参培养细胞单细胞克隆的植板率。MS培养基中2,4-D和KT需要一个适合的浓度比才能有效地促进细胞克隆的形成,其最佳浓度组合是2,4-D 1.5mg/L和KT 0.5mg/L。适合人参细胞克隆形成的 NH_4NO_3 浓度是400mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度是750mg/L。向培养基中补加适量的琥珀酸、精氨酸和维生素等都能明显提高植板率。通过优化培养基的组成成分,细胞克隆的植板率可增加到2.34倍。悬浮培养两周左右的细胞平板培养最有利克隆形成,当细胞植板密度低于 4×10^3 个细胞/ml时,几乎没有克隆形成。

关键词 人参; 单细胞克隆; 平板培养; 植板率

近年来,植物细胞初生壁来源的寡糖片段作为一种具有生理调节作用的活性分子,愈来愈引起人们的高度重视。作为寡糖素,它对植物的生长分化,形态建成具有明显的调控效应,并且能诱导植物蛋白酶抑制剂和抗毒素的形成。在植物抗病机制中起着重要作用^[1,2];作为功能食品,现已肯定它通过刺激人体的免疫应答,提高人体的免疫功能,从而达到增强体质和抗衰老的作用^[3]。

人参(*Panax ginseng*)培养细胞来源的寡糖素能有效地提高各种培养细胞的生长和促进培养细胞中次生物质的形成^[4-6]。药理和毒理实验的初步结果表明人参寡糖素能明显抑制癌细胞的生长和升高血液中白细胞的含量。同时对人体没有任何副作用。国际上虽然利用植物单细胞克隆技术筛选高产天然产物细胞系的工作取得了丰富的结果^[7],但关于高产植物寡糖素细胞系筛选以及有关人参培养细胞的单细胞克隆等工作均未见报道。由于植物细胞大量培养技术的迅速发展,生产有用天然产物的植物细胞工程已发展成为一门新兴的科研产业体系。本文通过人参

培养细胞单细胞克隆的研究,为有效地利用植物细胞工程的优点,大量制备高产有活性的人参寡糖素提供优良细胞系的筛选工作打下基础。

材料和方法

(一)愈伤组织培养和细胞悬浮培养

实验材料是第60代人参愈伤组织无性系。继代培养基为MS基本培养基,附加2,4-D 2mg/L和KT (6-咪唑氨基嘌呤) 0.1mg/L, $26 \pm 1^\circ\text{C}$,黑暗中培养。愈伤组织每30天转代一次。细胞悬浮培养的培养基为附加2,4-D 0.25mg/L和KT 0.08mg/L的MS培养基^[4],每250ml三角瓶中加入50ml培养液,接种愈伤组织,用接种铲轻压愈伤组织块并搅拌成为较分散的细胞,120r/min旋转式摇床上振荡培养。其它培养条件同上。培养基均在0.1MPa压力下灭菌。

(二)细胞平板培养

参考文献[8]的方法,细胞悬浮培养

本文于1992年10月21日收到。
国家自然科学基金资助项目。

物连续通过250 μm 和154 μm (或76 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%。双醋酸荧光素染色计算平均细胞活力为64.66%。含分散细胞的滤液调至一定细胞密度后,和熔化的平板培养基迅速充分混匀,立即铺在直径3.5cm的培养皿中,Parafilm膜密封,于 $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ 暗中培养。平板培养基同愈伤组织继代培养的培养基,琼脂浓度为3g/L。每次实验均为单因子对比实验。

(三)细胞克隆植板率的计算

植板率(PE,%)以平板培养30天出现的可见克隆数占植板细胞总数的百分比表示。

结 果

(一)培养基pH值对植板率的影响

培养基pH值的改变能影响细胞膜的渗透性,进一步可以影响细胞对内源代谢物质流失的控制,从而影响细胞克隆的形成和生长。如图1所示细胞克隆生长最适宜的pH值为5.8。

(二)培养基组成成分对细胞克隆生长的影响

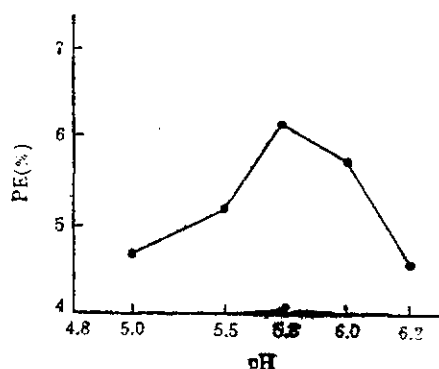


图1 pH值对植板率的影响

Fig.1 Effects of pH value on PE

1. 激素:激素间的相互作用对细胞克隆植板率影响较大。本文试验了不同浓度的2,4-D和KT组合对人参细胞克隆的影响。由表1的结果说明,各种组合都能获得较好的植板率。当培养基附加2,4-D 1.5mg/L和KT 0.5mg/L时,植板率最高。还可以看出2,4-D/KT浓度比值约为3/1时,细胞克隆生长较好。

表1 2,4-D和KT不同浓度组合对植板率的影响

Table 1 The influences of the combinations of different 2,4-D concentrations and K T concentrations on the PE

KT(mg/L)	0.1	0.3	0.5	0.8	1.0
2,4-D(mg/L)					
1.0	10.49	13.39	9.16	8.58	7.94
1.5	10.26	11.01	16.00	12.99	10.66
2.0	8.86	10.97	15.01	14.69	10.06
2.5	10.80	11.65	12.52	13.36	10.61

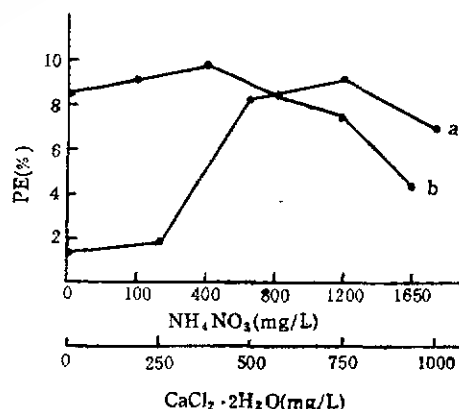


图2 硝酸铵和氯化钙对细胞克隆生长的影响

Fig.2 Effects of NH_4NO_3 and $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ concentrations on PE

a. $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$; b. NH_4NO_3

2. 无机盐:培养基中正常的 NH_4NO_3 浓度对人参单细胞克隆生长表现强抑制作用,去除 NH_4NO_3 时,植板率可提高一倍。通过比较 NH_4NO_3 不同浓度对细胞生长的影响(图2)表明培养

基中加入适量的 NH_4NO_3 比完全去除 NH_4NO_3 能进一步地促进细胞生长, 最佳浓度是 400mg/L 。培养基中 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 浓度的大小对细胞克隆生长影响也很大(图 2), 当其浓度达到 750mg/L 时植板率最高, 再增加它的浓度植板率开始下降。而低于此浓度只能得到较低的植板率。

3. 有机酸和氨基酸: 培养基中附加三羧酸循环(TCA)中的有机酸能促进人参细胞克隆的生长, 从图 3 中可以看出琥珀酸对细胞生长的影响比柠檬酸大, 当琥珀酸浓度增加到 6mg/L 时, 植板率可提高一倍, 再增加其浓度反而抑制细胞生长。另外, 附加一定的谷氨酰胺和精氨酸也有利细胞克隆的生长(图 4)。

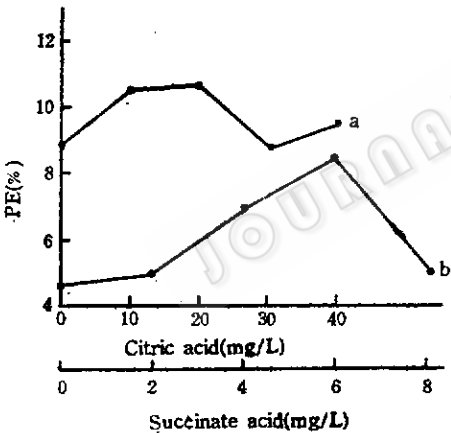


图 3 有机酸对植板率的影响
Fig.3 Effects of organic acid on PE
a. citric acid; b. succinate acid

4. 维生素: 分别选肌醇和维生素 B1 试验它们对人参细胞克隆生长的影响(图 5)。当肌醇浓度为 150mg/L 时对细胞克隆生长最有效。在一定浓度范围内, 随维生素 B1 含量的增加植板率逐渐提高, 当浓度为 10mg/L 时植板率达最大值, 超过此值, 细胞克隆的生长受到抑制。

5. 培养基组成成分的优化: 根据以

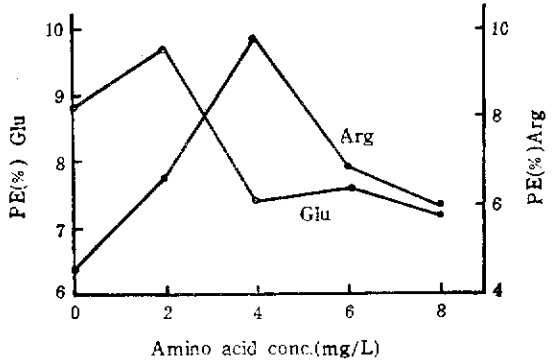


图 4 氨基酸对植板率的影响
Fig.4 The influences of amino acid on PE
a. Arg; b. Glu

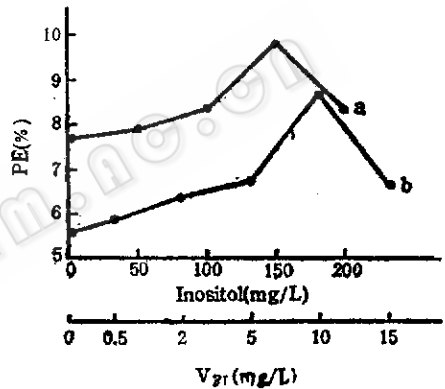


图 5 维生素对植板率的影响
Fig.5 Effects of vitamins on PE
a. Inositol; b. V_{B_1}

上各单因子试验的结果, 修改原平板培养基的组成(表 2)。优化的培养基和原培养基进行人参单细胞克隆培养, 对照结果表明采用修改的培养基, 其平板克隆的植板率(11.14%)是原培养基(4.76%)的 2.34 倍。以后的实验除注明外均系优化的 MS 培养基(m-MS)。

(三)细胞生长年龄对植板率的影响

植板细胞的生长年龄和单细胞克隆的形成密切相关, 因此选择最佳生长年龄的细胞进行细胞克隆是必要的, 一般生长旺盛的细胞克隆时植板率较高。实验结果(图 6)表明生长早期的细胞其植板率最低, 生长后期的细胞其植板率也较低, 而

表 2 培养基组成成分的优化
Table 2 Optimization of the compositions of medium

Compositions		MS (mg/L)	m-MS (mg/L)
Mineral salts	NH ₄ NO ₃	1850.0	400.0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	440.0	750.0
Vitamins	Inositol	100.0	150.0
	VB ₁	0.5	10.0
Hormones	2,4-D	2.0	1.5
	KT	0.1	0.5
Additives	Glu	—	2.0
	Arg	—	4.0
	Succinate acid	—	8.0
PE(%)		4.76	11.14

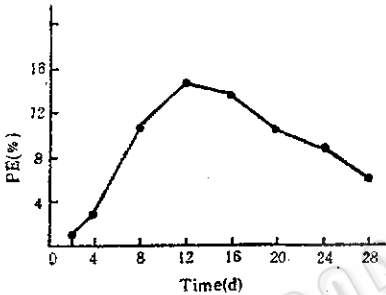


图 6 细胞生长年龄对植板率的影响

Fig.6 Effects of cell growth age on PE
培养两周左右的细胞其植板率最高。

(四)细胞植板密度对单细胞克隆生长的影响

细胞能生长形成克隆，植板细胞必须达到最低有效密度。从表 3 中可以看出两种培养基(MS和m-MS)的植板率都随细胞密度的增加而增加。当细胞密度为 4×10^3 个细胞/ml时，未修改的培养基其植板率仅有0.82%，采用优化的培养基其植板率仍能保持5.54%，两者相差 7 倍，表明了 m-MS 对人参细胞的克隆更有效。当细胞密度再降低时两者均几乎不见克隆形成。

讨 论

植物单细胞克隆是筛选细胞突变体的一个极其有效且应用普遍的方法。利用细

表 3 细胞植板密度对细胞克隆生长(PE,%)的影响
Table 3 Effects of cell plating density on the cell clone growth(PE,%)

Cell density ($\times 10^3$ cells/ml)	2	4	6	8	10
MS	0.00	0.82	8.30	10.54	11.59
m-MS	0.63	5.54	11.20	12.06	15.34

胞平板克隆技术筛选细胞突变体至少要满足两个条件，一是细胞植板密度要低，使形成的细胞克隆彼此分开，保证挑选转代的克隆来源于单个细胞或一个细胞植板单位(Cell plating unit)；二是要有一定的植板率，使细胞之间的差异能充分地表现出来，提高筛选的效率。通常情况下，细胞低密度培养时只有极低的植板率，绝大多数细胞停止生长不分裂，甚至有时无克隆形成。普通的平板培养即使细胞密度较高也只有很低的植板率^[9]。普遍认为细胞克隆时，首先要适应培养环境，细胞一方面从培养基中吸取营养成分，另一方面也向培养基中流失自身内源代谢物质。细胞要维持生长和诱导分裂，其内源代谢物质必需达到一定的阈值^[10]。细胞高密度培养时这种阈值较易达到，而低密度培养时较难达到，因此植物单细胞克隆时细胞植板密度必需达到最低有效密度，否则细胞不生长和分裂。在人参单细胞克隆中，采用未优化的培养基，当细胞密度低于 4×10^3 个细胞/ml时几乎无克隆形成。

培养基的组成成分及其含量对细胞克隆的生长有显著的影响，不同激素配成一定的浓度比，适量的NH₄⁺盐存在等对培养细胞克隆的生长是必需的^[11-13]。培养基中附加一定量的还原态氮源也能促进细胞生长，精氨酸可以由精氨酸脱羧酶催化形成腐胺对细胞克隆的形成和生长起作用^[14]。Ca²⁺对细胞生长和分裂作用可能是和不同浓度的Ca²⁺对微管聚合的调节有关^[12]。

参 考 文 献

- [1] Albersheim, P. et al., *Scientific Amer.*, 253:44—50, 1985.
[2] Ryan, C. A., *Plant Mol. Biol.*, 19:123—133, 1992.
[3] 马延和、周培璠: 食品与发酵工业, 1:80—82, 1992.
[4] 郑光植等: 云南植物研究, 11(1):97—102, 1989.
[5] 甘炳远等: 植物学报, 34(3):208—213, 1992.
[6] 周立刚等: 天然产物研究与开发, 4(2):16—19, 1989.
[7] Dougall, DK., In "Cell culture and somatic cell genetics of plants" (Constabel, F. et al. eds.), Academic Press, Inc., pp. 117—124, 1987.
[8] 周平、郑光植: 植物学报, 31(7):505—511, 1989.
[9] Bergmann, L.: *J. Gen. Physiol.*, 43:841—851, 1960.
[10] Street, H. E., In "Plant tissue and cell culture" (Street, H. E. ed), Black well Scientific Publication Oxford, pp. 207—222, 1977.
[11] 郑光植等: 植物生理学报, 8(1):53—58, 1982.
[12] Bellini, C. et al., *Plant Cell Tissue and Organ Culture.*, 23:27—37, 1990.
[13] Oka, S. et al., *J. Plant Physiol.*, 119:455—460, 1985.
[14] Minocha, R. et al., *Plant Cell Rep.*, 10:126—130, 1991.

Single Cell Clone from Culture Cells of *Panax ginseng*

Luo Jianping Zhen Guangzhi Gan Fanyuan

(Kunming Institute of Botany, Academia Sinica, Kunming 650204)

The plating efficiency of single cell clone from culture cells of *Panax ginseng* could be influenced by the nutritional compositions of plating medium. In order to promote the growth of single cells, it was essential to establish a appropriate ratio between 2,4-D concentration and KT concentration. The best combination of these two hormones was 1.5mg/L and 0.5mg/L, respectively. Considering the formation of cell clones, the suitable NH_4NO_3 concentration and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ concentration should be 400mg/L and 750mg/L, respectively. The plating efficiency could also be effectively increased when the plating medium was suitably supplemented with succinate acid, arginine, inositol and so on. Optimization of the nutritional compositions of medium resulted in plating efficiency close to 2.34 times against controlled. The cells suspended for 12 days was the most favourable for the formation of cell clones. Different plating efficiency was obtained with different cell plating density. There was a low plating efficiency when the cells plating density was no more than 4×10^3 cells/ml.

Key words *Panax ginseng*; single cell clone; plating culture; plating efficiency(PE)