

红花细胞培养条件的优化及其胞内产物生育酚的积累

王 镛¹ 邵 鸥² 岑沛霖³

¹ 浙江大学生物环境工程研究所 杭州 310029)

² 浙江工业大学生物与环境工程学院 杭州 310014)

³ 浙江大学化工学院 杭州 310027)

摘 要 红花(*Carthamus tinctorious*)的子叶能诱导出愈伤组织,并且该愈伤组织能合成生育酚。正相高效液相色谱测定的结果表明,其主要成分是 α -生育酚。在 MS 培养基基础上添加 0.1% 酪蛋白,并将生长调节剂浓度调整为 2,4-D 0.30mg/L,6-BA 1.80mg/L,可使 α -、 β -、 γ -生育酚含量分别达 4.1706、0.3120、0.1650 $\mu\text{g/g}$ 鲜重。其有效生育酚含量达 4.4091 $\mu\text{g/g}$ 鲜重,是对照组的 57 倍。

关键词 优化,生育酚,红花

分类号 Q813.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)04-0444-49

生育酚(Tocopherols)既是制药工业中的有用成分之一,也是食品工业中的抗氧化剂。它能保护不饱和脂肪酸使其不被氧化成脂褐色素(Lipofuscin)及其自由基,从而维护细胞的完整和功能,故有一定的抗衰老作用^[1]。生育酚有 α 、 β 、 γ 、 δ 4 种异构体,主要存在于植物油中。其中以 α 型的生理功效最高,而 β 、 γ 型的效价仅为 α 型的 50%, δ 型的功效约为 α 型的 1%^[1]。天然存在的生育酚是 *d* 构型,而化学合成的为 *dl* 构型,活性比前者低。因此,应用生物技术制备天然生育酚已引起关注^[2]。

通过红花细胞培养来生产高活性的生育酚已有报道。Furuya 等^[3]从红花花蕾的愈伤组织中分离到了生育酚,并且主要是 α 型。甘烦远等^[4]也作了报道,其主要操作程序和实验结果与 Furuya 等相一致。这些报道表明,通过细胞培养来大量生产高活性的生育酚是可行的。

本研究试图通过组合实验设计对红花细胞大量培养中愈伤组织的获得、生育酚含量及产量,和植物生长调节剂浓度及其配比之间的关系进行探讨,从而为优化培养条件,得到红花细胞次生代谢产物有效生育酚,尤其是 α -生育酚的高产率提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂

标准试剂 α -、 β -、 γ -、 δ -生育酚,为 Merck 公司生产,PN:15496。

混和标准工作液:准确吸取 4 种标准试剂储备液各 1mL 于 100mL 容量瓶中,用正己烷定容,其浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

培养基组成试剂及其它检测用试剂均为常规国产试剂。

1.2 仪器与设备

Beckman 生化仪器公司 HPLC System Gold (110B 泵、406 模拟接口转换器) 连接岛津 RF-450 型荧光分光仪(配 11 μ L 流动池)。

分离柱 :ULTRASPHERE-Si μ p 5 μ m 4.6mm \times 25cm(Beckman Part No. 235341)

顶柱 :ULTRASPHERE-Si μ p 5 μ m 4.6mm \times 4.5cm(Beckman Part No. 24401)

1.3 方法

1.3.1 生育酚含量的测定 : 各组样品经皂化后 , 以大体积石油醚(200mL 左右) 萃取毕后 , 均取 100mL 石油醚萃取层液进行水洗、过柱脱水、浓缩、定容、过滤等步骤处理 , 在流动相正己烷 : 异丙醇 = 99.7 : 0.3 (V/V) 流速 1.5mL/min 条件下 , 经硅胶柱分离 , 并在激发波长 298nm , 发射波长 328nm 下检测 , 经外标准定量 , 并按下式折算为百分含量 :

$$\alpha(\beta \text{ 或 } \gamma \text{ 或 } \delta) \text{ 生育酚含量} = \frac{c \times n \times V}{W \times 100} (\mu\text{g/g, 鲜重})$$

上式中 c 为进样时样液浓度 ($\mu\text{g/mL}$) ; n 为进样时样液体积 , 均为 2mL ; W 为样品重量 (g) ; V 为萃取用石油醚层的总体积 (mL) 。

1.3.2 对照的设立 : 红花 (*Carthamus tinctorius*) 种子取自浙江大学植物园。播种萌发至幼苗 4~5 cm 高时 , 剪取子叶。流水冲洗 , 0.2% 的升汞浸泡 10 min , 无菌水洗涤 5 遍。接种至 MS 培养基 (添加 1.0mg/L 6-BA 和 1.0mg/L 2,4-D) 中。培养 1 周 , 即出现愈伤组织。第 25~30 天继代一次 , 取继代 8 次以上的愈伤组织作为试验材料。

从愈伤组织外周剥离重约 0.2g 刚增殖出来的、黄白色、湿润、有光泽、易剥落的幼嫩愈伤块 , 接种到上述培养基中。每瓶中有 5 个接种块 , 放在光照 10h/d 的人工气候培养箱 (LRH-250-GS 型) 中培养。培养 25d^[3,4] , 测愈伤组织鲜重 (5 个接种块之和) 及其胞内生育酚的含量 , 作为对照 1。在培养基中加入 0.1% 的酪蛋白^[3,4] , 作为对照 2 , 培养及测试均同对照 1。

1.3.3 激素浓度的组合实验设计^[5] : 为探讨激素不同浓度配比与愈伤组织增殖以及生育酚产量之间的关系 , 按照组合实验设计安排试验。

a) 确定因子变化范围 : 本实验确定 6-BA 和 2,4-D 的浓度为考察因子 z_1, z_2 。其中第 i 个因子的上、下界分别为 z_{2i}, z_{1i} ($i=1, 2$) , 规定各因子的零水平和变化区间如下 :

$$z_{0i} = (z_{1i} + z_{2i}) / 2 ; \Delta = (z_{2i} - z_{0i}) / \gamma ;$$

进行 5 个零水平重复试验 , 有 $\gamma^2 = 1.606$ $\gamma = 1.267$

因植物细胞培养所用的 6-BA 和 2,4-D 的浓度一般均在 0.1~2.0mg/L 范围内 , 故令该范围经验值为 z_{1i} 与 z_{2i} , 则 $z_{0i} = (0.1 + 2.0) / 2 = 1.05$

$$\text{所以 : } \Delta = (2.00 - 1.05) / 1.267 = 0.75$$

b) 因子的线性变换 : 按 $x_i = (z_i - z_{0i}) / \Delta$ 进行因子的线性变换 , 得原变量 z 和编码变量 x 之间的关系 , 列于表 1。

c) 组合实验设计 : 组合实验设计见表 2。共 9 个激素配方 , 13 个试验组 , 其中 10~13 组是零水平重复试验。接种、培养和测定方法等与对照相同。

表 1 编码变量与原变量的关系

Table 1 Relationship between coded variables and pro-variables

Coded variables x_1, x_2	Pro-variables	
	6-BA conc. (mg/L)	2 4-D conc. (mg/L)
1.267	2.00	2.00
1	1.80	1.80
0	1.05	1.05
-1	0.30	0.30
-1.267	0.10	0.10

表 2 组合试验设计

Table 2 The combinatorial experiment design

No.	x_1	x_2	6-BA conc. (mg/L)	2 4-D conc. (mg/L)
1	1	1	1.80	1.80
2	1	-1	1.80	0.30
3	-1	1	0.30	1.80
4	-1	-1	0.30	0.30
5	1.267	0	2.00	1.05
6	-1.267	0	0.10	1.05
7	0	1.267	1.05	2.00
8	0	-1.267	1.05	0.10
9	0	0	1.05	1.05
10	0	0	1.05	1.05
11	0	0	1.05	1.05
12	0	0	1.05	1.05
13	0	0	1.05	1.05

2 结果与讨论

2.1 培养条件对生育酚含量的影响

不同培养条件下红花愈伤组织中生育酚含量测定结果见表 3。

表 3 不同培养条件下愈伤组织鲜重、生育酚的含量及其产量*

Table 3 Callus fresh weight and its tocopherols content and yield under different culture conditions*

No.	6-BA conc.	2 4-D conc.	Fresh weight	α	β	γ	δ	E	(α -) yield
1	1.80	1.80	7.80	0.4441	/	/	/	0.4441	3.4640
2	1.80	0.30	7.15	4.1706	0.3120	0.1650	/	4.4091	29.8198
3	0.30	1.80	4.13	0.1407	/	/	/	0.1407	0.5811
4	0.30	0.30	8.80	0.1688	/	/	/	0.1688	1.4854
5	2.00	1.05	7.29	0.1193	/	/	/	0.1193	0.8697
6	0.10	1.05	7.69	0.2175	/	/	/	0.2175	1.6726
7	1.05	2.00	6.82	1.4758	/	/	/	1.4758	10.0650
8	1.05	0.10	7.27	0.8445	0.1453	/	/	0.9172	6.1395
9	1.05	1.05	7.41	0.2442	/	/	/	0.2442	1.8095
10	1.05	1.05	6.51	1.5182	0.2084	/	/	1.6224	9.8835
11	1.05	1.05	5.64	0.1543	/	/	/	0.1543	0.8703
12	1.05	1.05	6.54	0.3388	/	/	/	0.3388	2.2158
13	1.05	1.05	7.28	0.2570	/	/	/	0.2570	1.8710
CK1	1.00	1.00	4.00	0.0774	/	/	/	0.0774	0.3096
CK2	1.00	1.00	6.68	0.3087	/	/	/	0.3087	2.0621

* Concentration unit : mg/L ;fresh wight unit :g ; $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ " represent the content of 4 tocopherol isomers respectively ($\mu\text{g/gFW}$) ; " E " Stands for effective tocopherols content ($\mu\text{g/gFW}$) ; $E = \alpha + 0.5\beta + 0.5\gamma + 0.01\delta$; yield : product of callus fresh weight multiplying α -tocopherol content ; "/ " : Stands for no product has been inspected ; Each group has been added 0.1% casein in MS medium , except CK1.

表 3 中 CK2 与 CK1 相比 ,有效生育酚含量增加 3 倍 ,可见添加 0.1% 酪蛋白对生育

酚的合成具有显著的促进作用,这与有关报道^[3,4]是一致的。最佳的激素组合是第 2 组,即添加 0.30mg/L 2-A-D 和 1.80mg/L 6-BA,收获的 α -生育酚含量达 4.1706 $\mu\text{g/g}$ 鲜重, β -生育酚含量达 0.3120 $\mu\text{g/g}$ 鲜重, γ -生育酚含量为 0.1650 $\mu\text{g/g}$ 鲜重,有效生育酚含量达 4.4091 $\mu\text{g/g}$ 鲜重,远远超过其它各组及对照组。更加适合于生育酚的积累。“生产培养基^[6]”的研究是细胞培养生产代谢产物领域中的热点之一。我们的研究表明,合理地优化培养基,的确能大大提高产物得率。经优化后的培养基,所收获的红花细胞中有效生育酚含量是对照培养基的 57 倍。采取组合试验的设计方案,所取的几个实验点都具有代表性。既减少了实验的工作量,也减小了盲目性。

2.2 组合试验分析

2.2.1 以 α -生育酚含量 y_1 为因变量,6-BA 浓度编码变量 x_1 、2-A-D 浓度编码变量 x_2 为自变量,可得经验回归方程:

$$\hat{y}_1 = 0.3278 + 0.5788x_1 - 0.4098x_2 + 0.7393x_2^2 - 0.9246x_1x_2 \quad (1)$$

其中: $x_1 = \frac{c_{6-BA} - 1.05}{0.75}$ $x_2 = \frac{c_{2-A-D} - 1.05}{0.75}$

其方差分析结果见表 4。

表 4 方程(1)回归系数方差分析结果

Table 4 Variance analysis of regression coefficient for equation(1)

Variance origin	Sun of squares	Degree of freedom	Sum of mean squares	F_{ratio}	$F_{0.05}$	$F_{0.1}$
Primary effect x_1	2.424082	1	2.424082	3.76	5.32	3.46
Primary effect x_2	1.210753	1	1.210753	1.88	5.32	3.46
Interaction effect x_1x_2	3.419541	1	3.419541	5.30	5.32	3.46
Quadratic effect x_2^2	2.819143	1	2.819143	4.37	5.32	3.46
Regression	9.873519	4	2.468380	3.83	3.84	2.81
Residual error	5.158532	8	0.644816			
Total	15.032051					

回归方程及其系数的 F 比乘以安全因子^[5]以后,均大于 $F_{0.05}$,误差平方和 $S_{误差} = 1.223286$,失拟平方和 $S_{失拟} = 5.145999$, $F_{失拟} = 2.10$,小于 $F_{0.05}(3, 6) = 4.76$ 。因此,方程(1)在 95% 的置信区间内显著。在 $x_1 = 1.267$, $x_2 = -1.267$ 时,该方程有最大值 $y_{max} = 4.2527$ 。

回归方程(1)的三维图和等高线图分别示于图 1 与图 2。

同样可得,愈伤组织鲜重 y_2 和 6-BA 浓度编码变量 x_1 、2-A-D 浓度编码变量 x_2 的回归方程:

$$\hat{y}_2 = 7.15 + 1.33x_1x_2 \quad (2)$$

α -生育酚产量 y_3 与 6-BA 浓度编码变量 x_1 、2-A-D 浓度编码变量 x_2 的回归方程:

$$\hat{y}_3 = 3.6883 + 4.1883x_1 + 4.2870x_2^2 - 6.3629x_1x_2 \quad (3)$$

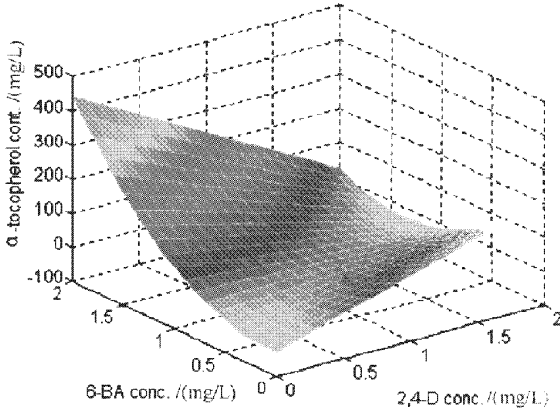


图1 回归方程 $\hat{y}_1 = 0.3278 + 0.5788x_1 - 0.4098x_2 + 0.7393x_2^2 - 0.9246x_1x_2$ 的三维图*

Fig. 1 Three-dimension graph of regression equation of $\hat{y}_1 = 0.3278 + 0.5788x_1 - 0.4098x_2 + 0.7393x_2^2 - 0.9246x_1x_2$ *

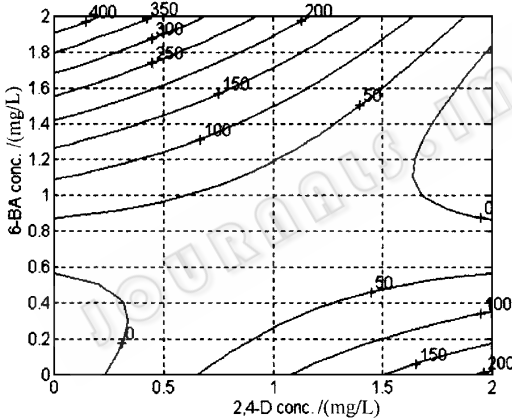


图2 回归方程 $\hat{y}_1 = 0.3278 + 0.5788x_1 - 0.4098x_2 + 0.7393x_2^2 - 0.9246x_1x_2$ 的高等线图*

Fig. 2 Contour graph of regression equation of $\hat{y}_1 = 0.3278 + 0.5788x_1 - 0.4098x_2 + 0.7393x_2^2 - 0.9246x_1x_2$ *

* The values of tocopherol content and contour lines have been multiplied 100.

2.2.2 从方程与实验所得结果都可以看出,无论是对愈伤组织鲜重还是对 α -生育酚含量及产量的增加,6-BA 和 2,4-D 的交互作用的影响是主要的。从实验结果还可以初步判断,一般而言,在 6-BA 浓度 $\leq 2.0 \mu\text{g/L}$ 的前提下,6-BA 浓度与 2,4-D 浓度的比值大于 5,有利于 α -生育酚含量的提高。

2.3 绿色愈伤组织的获得
生育酚在叶绿体内均可合成,但在绿色组织中的含量高于黄色组织^[3]。我们的实验中,新鲜接种的愈伤组织在光照/黑暗的培养条件下,逐渐增殖长大,颜色由黄白色变为黄绿色,少量呈绿色,这应与叶绿体的成熟有关。当培养达 20d 以上时逐渐变褐。据 Furuya 报道,采用黑暗培养方法和进行光照均未能获得绿色愈伤组织^[3]。这一不同实验结果产生的原因,还有待于进行细胞结构的观察来进一步研究确定。

在实验中,我们还明显观察到,接种块的初始状态

即颜色、质地等的不同,也直接影响收获时胞内生育酚的含量。尽管我们尽量注意选择外部形态一致的初始接种块,但仍难免避免其差异。因此研究外部形态与内部生理状态或分化状态之间的相关性,建立合理的数学模型来指导规模化细胞培养的商业化生产,是十分迫切与重要的。我们已对愈伤组织形态表现与其内部细胞分化状态之间的关系作了一些研究,以求克服植物细胞培养中重复性差的弊病。研究结果将另文发表。

致谢 对浙江省轻工业研究所任一平在生育酚测试上给予的支持表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] 郑 集, 陈钧辉. 普通生物化学(第三版)北京:高等教育出版社,1998 p.220.
- [2] 国家自然科学基金委员会. 自然科学学科发展战略调研报告·植物科学.北京:科学出版社,1993 p.59.
- [3] Tsutomu Furuya *et al.* *Phytochemistry*,1987 **26**(10) 2741~2747.
- [4] 甘烦远,郑光植.植物学报,1991 **33**(7) 516~522.
- [5] 朱中南,戴迎春.化工数据处理与实验设计,北京:轻工业出版社,1989 pp.274~290.
- [6] S. H. Mantell, H. Smith. *Plant Biotechnology*. London: Cambridge University Press. 1983 p.17.

Optimization of Culture Conditions for Safflower Cell and Accumulation of Cellicolous Product Tocopherols

Wang Pu¹ Shao Ou² Cen Peilin³

¹(Bio-environment Engineering Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310029)

²Institute of Bio-environment Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014)

³Institute of Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027)

Abstract The culture of calli, which was induced from cotyledon of *Carthamus tinctorius*. L was able to synthesis tocopherols. The results determined by NP-HPLC showed that the main component was α -tocopherol. When adding 0.1% casein into MS medium, and 2,4-D concentration was adjusted to 0.30mg/L and 6-BA to 1.80mg/L, α -, β - and γ -forms of tocopherol reached 4.1706, 0.3120 and 0.1650 $\mu\text{g/g}$ fresh calli respectively. The effective tocopherols content was 4.4091 $\mu\text{g/g}$ fresh calli, which was 57 times as much as controls.

Key words Optimization, tocopherols, safflower