植 物 学 报 1994，36(3)：209—214
Acta Botanica Sinica

高产人参寡糖素培养细胞克隆系的筛选*

罗建平 郑光植 甘烦远
（中国科学院昆明植物研究所，昆明 650204）

摘 要

人参（*Panax ginseng* C. A. Mey.）培养细胞经细胞平板克隆，获得近300个克隆系。克隆系在细胞生长速率和寡糖素含量及产率上均存在显著差异，且寡糖素产率和细胞生长之间有明显的相关性。经11代连续继代培养观察及过氧化物酶同工酶谱特征分析，筛选到一株寡糖素产率高且稳定的克隆系PG-180，其平均生长速率是0.495 g干重/L·天，为原始株系的1.39倍，平均寡糖素含量为14.69%干重，是亲本的1.65倍，平均寡糖素产率是2.183 g/L，为原始株系的2.32倍。比较克隆系PG-180和原始株系细胞悬浮培养时间进程发现，由人参培养细胞生产寡糖素的最佳细胞收获期为3周左右。

关键词 人参；细胞克隆；克隆系；寡糖素；过氧化物酶同工酶

SCREENING OF CLONE LINES WITH HIGH YIELD OF OLIGOSACCHARINS FROM CULTURE CELLS OF *PANAX GINSENG*

Luo Jian-ping, Zheng Guang-zhi and Gan Fan-yuan
(*Kunming Institute of Botany, Academia Sinica*, Kunming 650204)

Abstract

Cell plating clone technique was employed to screen clone lines with high yield of oligosaccharins from culture cells of *Panax ginseng* C. A. Mey. Near 300 clone lines were obtained. The results from some clone lines analysed implied that these clone lines were significantly different in cell growth rate, oligosaccharins content and yield. Furthermore, there was a distinct correlation between oligosaccharins productivity and cell growth. A more stable high-yield oligosaccharin clone line PG-180 had been selected according to the character-

收稿日期：1993-04-14 接受日期：1993-08-15
* 国家自然科学基金资助课题。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cn

istics of growth rate, oligosaccharin yield and peroxidases isozyme patterns during successive subculturing of 11 generations of clone lines. The mean growth rate of clone line PG-180 was 0.495 g dry wt/L·d, and was 1.39 folds higher than to the original strain. Its mean content and yield of oligosaccharins were 14.69% dry wt and 2.183 g/L, which were 65% and 132% respectively higher than those of the original strain. In comparing the time course of cell suspension culture between clone line PG-180 and the original strain, the optimal period for high oligosaccharin production from *P. ginseng* culture cells was approximately three weeks.

Key words *Panax ginseng*: Cell clone; Clone lines; Oligosaccharins; Peroxidase isozyme

寡糖素(oligosaccharin)作为一类新型植物调节因子,在低浓度时即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任何报道。来自人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)培养细胞的寡糖素,能有效地刺激不同植物培养细胞的生长及其次级代谢物的合成[4]。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,通过细胞大量培养工业化生产人参寡糖素具有广阔前景。本研究将为工业化生产人参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2 mg/L 2,4-D和0.1 mg/L KT。细胞悬浮培养选用MS附加0.25 mg/L 2,4-D和0.08 mg/L KT。每250 ml三角瓶中加入50 ml培养液,在120 r/min旋转式摇床上振荡培养,26±1℃,暗培养。

(一)细胞平板培养

细胞悬浮培养物连续通过250 μm和154 μm(或67 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一定细胞密度后,与熔化的平板培养基迅速充分混匀,立即铺在直径3.5 cm的培养皿中,parafilm膜密封。培养条件如上所述。平板培养基同愈伤组织继代培养的培养基,内含50%的无细胞的悬浮培养液,琼脂浓度为5 g/L。植板率(PE, %)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。

(二)细胞克隆的挑选和继代培养

人参细胞平板培养30天后,挑取直径1—2 mm的细胞克隆于三角瓶中继续培养,每25天转接1次,连续3次。每克隆系作为第1代,一半用于继代培养,一半用于细胞生长和寡糖素含量测定。培养条件同上,继代培养周期为30天。

(三)细胞生长速率的测定

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(g dry wt/L·d)。细胞

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cn

$$生长速率(g\ dry\ wt/L \cdot d) = \frac{(最终收获干重 - 接种干重)}{(培养天数 \times 培养基体积)}$$

(四)寡糖素的制备

寡糖素的制备按文献[5]的方法。寡糖素含量用蒽酮比色法测定，以占干重样品的百分比(% dry wt)表示，结果取 3 次重复的平均值。同时计算寡糖素产率(g/L)。

$$寡糖素产率(g/L) = \frac{(最终收获干重 - 接种干重) \times 寡糖素含量}{培养基体积}$$

(五)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 4000 r/min 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-甘氨酸溶液为电泳缓冲液，pH 8.3，每槽上样量均为 30 μg，稳压 10 V/cm，冰箱中电泳 6 小时左右。用联苯胺、维生素 C 和 H_2O_2 染色。

实　验　结　果

(一)人参细胞克隆的变异分析及筛选

培养 12 天的人参细胞悬浮培养物，连续通过两次尼龙网过滤，收集单细胞和小细胞团(2—8 个细胞)，其细胞活力为 64.66%，平板培养时细胞植板密度在 3000—4000 个细胞/ml 之间，平板培养 30 天后植板率为 12%—18%。共培养第 1 代细胞克隆系 292 个，从中随机挑选 46 个克隆进行分析。表 1 列出了一些克隆系的分析结果。

由表 1 可以看出，各克隆系间的差异非常显著。统计分析表明，生长速率变化在 0.215—0.555 g 干重/L·天之间，超过亲本的占 73.91%。寡糖素含量和产率的变化范围分别是 3.87%—16.53%干重和 0.326—2.649 g/L，超过亲本的占 56.52%。从中筛选出 5 个高产克隆系：PG-053、PG-177、PG-180、PG-235、PG-276。其中 PG-053 生长速率最高，是亲本的 1.58 倍，寡糖素含量及产率分别是亲本的 1.74 倍和 2.75 倍。PG-235 寡糖素含量最高，为亲本的 1.81 倍，生长速率和寡糖素产率分别是亲本的 1.29 倍和 2.32 倍。PG-177 寡糖素产率最低，却比亲本高 1 倍左右，其生长速率和寡糖素含量分别是亲本的 1.30 倍和 1.52 倍。

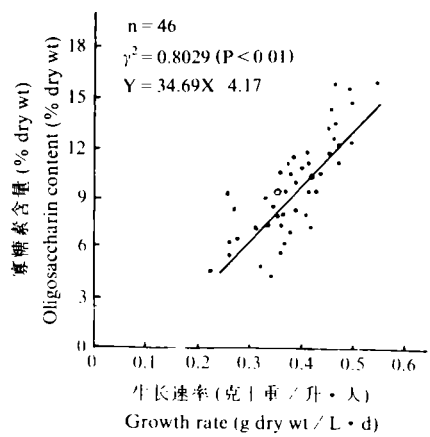

图 1　细胞克隆系寡糖素含量和生长速率的相关
○ 原始株系　● 细胞克隆系
Fig. 1　Correlation between oligosaccharin content and growth rate of clone lines
○ The original strain　● Clone line

(二)人参细胞克隆的生长和寡糖素含量的相关性

从表 1 可以看出，生长较快的克隆系寡糖素含量也趋高，相应的寡糖素产率也高。通过分析各克隆系的生长速率和寡糖素含量的直线回归及其相关系数(图 1)，表明细胞克

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cn

隆的生长速率和寡糖素含量之间有较明显的正相关性($r^2=0.8029$)。这样就可以根据细胞生长速率的高低来筛选寡糖素高产克隆系。

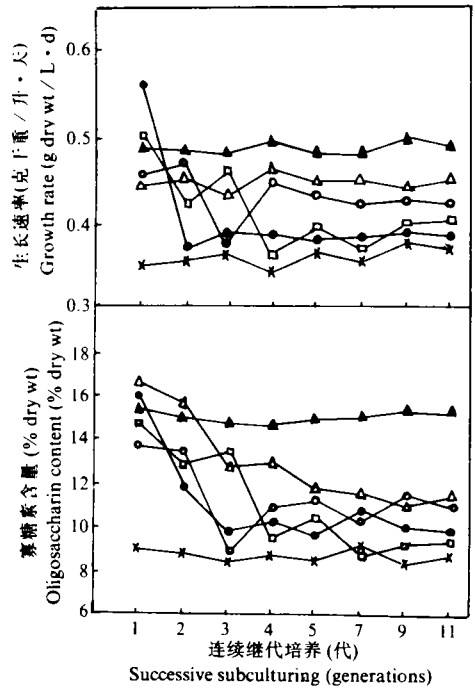

图2 细胞克隆系在连续继代培养中的稳定性
Fig. 2 Stability of clone lines during successive subculturing
PG-053 —●—●—; PG-177 —○—○—; PG-180 —▲—▲—;
PG-253 —△—△—; PG-276 —□—□—; Parent —×—×—

(三)高产寡糖素克隆系的稳定性分析

为筛选优良克隆系,对一些克隆系进行连续继代培养的观察发现,在早期继代培养中,克隆系无论是细胞生长速率还是寡糖素含量都表现很大程度的变异,随着继代培养代数的增加,克隆系的两种指标均逐渐趋于稳定。图2是上述5个高产克隆系继代培养的情况。从图中可以看出PG-053第1代各方面指标均优良,但在连续继代培养中,生长速率和寡糖素含量下降很快,而PG-180从一开始就比较稳定,在11代连续继代培养中,其生长速率、寡糖素含量和产率始终保持较恒定水平。PG-180平均生长速率是亲本的1.39倍,平均寡糖素含量和产率分别是亲本的1.65倍和2.32倍(表2)。

对PG-180愈伤组织过氧化物酶同工酶谱的稳定性分析表明,PG-180的过氧化物酶同工酶谱和亲本相比具有明显差异,缺少谱带D、F(Rf:0.279;0.696),3条慢带不明显,而且两条快带(Rf:0.664;0.728)和亲本也有明显区别。所有这些差异在克隆系连续继代培养中稳定存在(图3)。

表1 选择第1代细胞克隆系其生长速率、寡糖素含量和寡糖素产率的比较
Table 1 The comparisons among some clone lines selected on growth rate, oligosaccharin content and yield at the first subculture generation

克隆系 Clone lines	生长速率 Growth rate (g dry wt/L·d)	寡糖素含量 Oligosaccharin content (% dry wt)	寡糖素产率 Oligosaccharin yield (g/L)
Parent	0.352	9.13	0.963
The mean value of isolated clones	0.390	9.37	1.253
PG-016	0.396	10.41	1.238
PG-053	0.555	15.92	2.649
PG-058	0.335	7.11	0.714
PG-075	0.365	6.29	1.190
PG-090	0.381	6.98	0.749
PG-128	0.348	4.60	0.480

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cn

续表

克隆系 Clone lines	生长速率 Growth rate (g dry wt/L·d)	寡糖素含量 Oligosaccharin content (% dry wt)	寡糖素产率 Oligosaccharin yield (g/L)
PG-138	0.313	3.87	0.364
PG-147	0.480	11.57	1.665
PG-163	0.465	9.26	1.443
PG-177	0.459	13.88	1.912
PG-180	0.486	15.61	2.322
PG-192	0.215	5.06	0.326
PG-214	0.358	10.82	1.161
PG-235	0.457	16.53	2.237
PG-251	0.367	6.51	0.717
PG-270	0.329	8.85	0.873
PG-276	0.498	14.30	2.135
PG-290	0.450	12.33	1.667

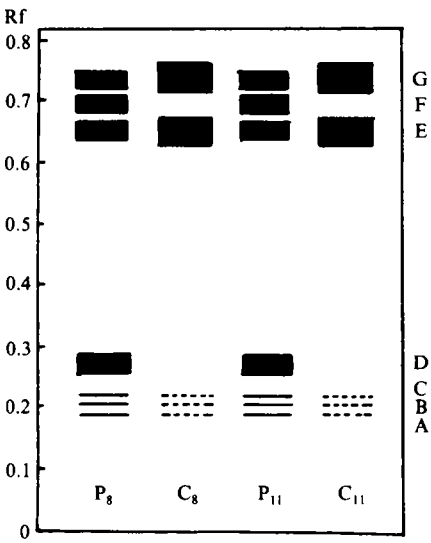

Fig. 3

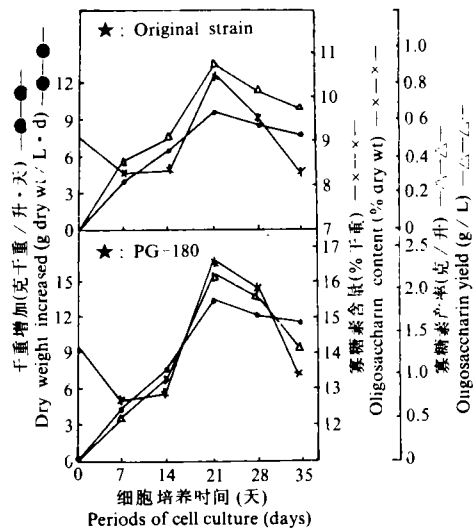

Fig. 4

图 3　克隆系 PG-180 和亲本之间过氧化物酶同工酶谱的比较
P_8和 P_{11}分别表示亲本第 8 代和第 11 代的过氧化物酶同工酶谱；C_8和 C_{11}分别表示 PG-180 第 8 代和第 11 代的过氧化物酶同工酶谱
图 4　克隆系 PG-180 和原始株系细胞悬浮培养时间进程的比较
Fig. 3　Comparison of peroxidase isozyme patterns between clone line PG-180 and parent
P_8 and P_{11} show the eighth and eleventh subculturing of parent; C_8 and C_{11} show the eighth and eleventh subculturing of PG-180
Fig. 4　The comparison between clone line PG-180 and the original strain on the time course of cell suspension culture

(四)优良克隆系细胞悬浮培养的时间进程

为进一步考察高产克隆系细胞生长动态和寡糖素产率的关系，以第 8 代 PG-180 和亲本为材料，比较它们的细胞悬浮培养时间进程，结果见图 4。PG-180 和亲本细胞悬浮培养的时间进程基本相似，生长早期，细胞干重增加缓慢，寡糖素含量略有下降，当细胞悬浮

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cn

培养3周，细胞干重增加到最大值13.824 g/L，相应的寡糖素含量和产率也最高，分别为16.60%干重和2.295 g/L，到生长后期，总的细胞干重呈下降趋势，寡糖素含量随之下降，使得寡糖素产率也明显降低。

表2 克隆系PG-180和亲本的比较

Table 2 The comparison of clone line PG-180 and parent

克隆系 Clone lines	生长速率 Growth rate (g dry wt/L·d)	寡糖素含量 Oligosaccharin content(% dry wt)	寡糖素产率 Oligosaccharin yield(g/L)
Parent	0.354	8.89	0.942
PG-180	0.495	14.69	2.183

讨 论

人参培养细胞克隆间存在很大程度的变异。通过细胞克隆能同时获得许多克隆系，有些属于细胞突变产生的表型，有些可能仅是细胞间生理状态差异的表型，因此，只有经过长期继代培养观察和分析，才能确定真正属于突变产生的克隆系。人参细胞克隆系在连续继代培养的早期，大部分处于生长和寡糖素产率很不稳定的状态，经过几代继代培养才逐渐趋于稳定。这和大多数利用细胞克隆技术筛选高产系的报道一致[6]。目前，除非以原生质体为克隆材料，用细胞克隆技术获得的克隆系不少是由杂有小细胞团而来的，因而在继代培养中继续存在不同质的细胞分离和对培养条件反应的差异。

参 考 文 献

1 Albersheim P. Darvill A G. Oligosaccharins. *Sci Amer*. 1985. **253**: 58—64

2 Ryan C A. Farmer E E. Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. *Ann Rev Plant Physiol Mol Biol*. 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. *Ann Rev Biochem*. 1984. **53**: 625—663

4 Zheng G Z. Plant Cell Culture and Its Secondary Metabolism. Vol. I. Kunming: Yunnan University Press. 1992.

5 Hahn M G. Darvill A G. Albersheim P. Host-pathogen interactions XIX. The endogenous elicitor, a fragment of plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol*. 1981. **68**: 1161—1169

6 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. 1987. 117—124

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cn