

## 高产人参寡糖素培养细胞克隆系的诱变筛选

罗建平 郑光植 甘烦远

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

A

**摘要** 紫外辐射能显著地降低人参培养细胞单细胞克隆的挂板率。当紫外辐射悬浮细胞30 s后, 细胞克隆的挂板率是对照组的21.43%。细胞克隆平板培养60 d, 挑取克隆连续转移培养3次, 共获得克隆系122株。对所有克隆系进行变异分析并经10代连续继代培养, 从中筛选到一株稳定的高产寡糖素克隆系 PGUA-08, 而且它的过氧化物酶同工酶谱特征也保持稳定。克隆系 PGUA-08 的生长速率为  $0.537 \text{ g DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , 是亲本的1.46倍, 寡糖素含量为17.16% DW, 是亲本的1.81倍, 寡糖素产率为  $2.764 \text{ g/L}$ , 是亲本的2.62倍。

**关键词:** 人参, 单细胞克隆, 克隆系, 寡糖素, 紫外诱变, 过氧化物酶同工酶

寡糖素 (oligosaccharin) 作为一类新型植物调节分子, 在极低浓度时即可产生显著的生理效应 (Albersheim 和 Darvill 1985, Ryan 和 Farmer 1991)。它的发现和深入研究将有助于人们能更有效地控制植物的生长发育和提高植物抗病菌侵染的能力, 进而对农业产生巨大而深远的影响 (Albersheim 和 Darvill 1985)。近年来, 寡糖素研究主要集中在结构和功能方面 (McNeil 等 1984), 而高产寡糖素克隆系的筛选工作未见任何报告。

来自人参培养细胞的寡糖素对不同培养细胞的生长和次生物质的生产具有明显的诱导效应 (郑光植等 1989, 周立刚等 1990, 甘烦远等 1992), 并且能提高马铃薯的试管结薯数 (陈善娜等 1991)。作者等曾用栽培人参制备寡糖素, 其得率低于1%, 而用人参培养细胞制备寡糖素得率可

达8%。为利用植物组织和细胞培养技术大量制备高产有活性的人参寡糖素提供优良细胞株, 本实验通过对人参培养细胞紫外线辐射诱变并应用单细胞克隆技术进行了高产寡糖素克隆系的筛选。

### 材料与方 法

用于克隆系筛选的细胞材料是第60代人参 (*Panax ginseng* C. A. Mey) 愈伤组织无性系, 继代培养基为 MS 基本培养基, 附加  $2 \text{ mg/L}$  的 2, 4-D 和  $0.1 \text{ mg/L}$  的 KT, 细胞悬浮培养的培养基选用 MS 培养基附加  $0.25 \text{ mg/L}$  的 2, 4-D 和  $0.08 \text{ mg/L}$  的 KT。每  $250 \text{ ml}$  三角瓶中加入  $50 \text{ ml}$  培养液, 接种生长旺盛的愈伤组织  $100 \text{ mg DW}$ ,  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , 暗中于  $120 \text{ 转/min}$  旋转式摇床上振荡培养。

**细胞平板克隆** 悬浮培养12 d 的细胞悬浮培养物连续通过  $250 \mu\text{m}$  和  $154 \mu\text{m}$  尼龙网过滤, 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  $3.5 \times 10^4 \sim 4.0 \times 10^4 \text{ cells/ml}$ , 然后分成6组, 于培养皿中铺成薄层, 去盖, 在距紫外灯30 cm 处用紫外线 ( $253.7 \text{ nm}$ ) 分别照射0、30、60、90、120和150 s, 照射时不断摇晃培养皿使细胞被均匀照射。处理后的细胞暗中静止30 min, 和熔化的平板培养基迅速充分混匀, 立即铺在直径

1993-04-15收到, 1993-12-23修回。

国家自然科学基金资助项目。

3.5 cm 的培养皿中,用 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,内含 50% 的无细胞悬浮培养液,琼脂浓度为 5 g/L。每一克隆实验 5 次重复。

**细胞克隆的挑选和继代培养** 克隆细胞平板培养 60 d,挑取直径为 1~2 mm 的细胞克隆于三角瓶中继续培养,每 30 d 转接一次,连续 3 次。每克隆系作为第一代,将其分为两半,一半用于继代培养,一半用于细胞生长和寡糖素含量测定。继代培养周期为 30 d,其它培养条件均同上。

**实验参数** 细胞存活率用荧光素双醋酸酯 (FDA) 染色法测定 (Widholm 1972),以观察到的活细胞数占总细胞数的百分比表示 (%)。细胞克隆的植板率以平板培养 30 d 出现的可见克隆数占植板细胞总数的百分比表示 (%)。细胞生长速率以每天每升增加的细胞干重表示 ( $\text{g DW L}^{-1} \text{d}^{-1}$ )。寡糖素的制备按 Hahn 等 (1981) 的方法,用蒽酮比色法测定含量,以占干重细胞的百分比表示 (% DW),同时计算寡糖素产率 ( $\text{g/L}$ ),即每 30 d 每升增加的干重细胞所得的寡糖素克数 ( $\text{g/L}$ )。除第一代克隆系结果分析外,其它试验处理至少 3 次重复。

**过氧化物酶同工酶的测定** 取生长 20 d 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  $3000 \times g$  离心 30 min。取上清液,每 ml 加蔗糖 0.4 g。用不连续聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法,分离胶浓度为 7%,浓缩胶浓度为 4%,胶厚 1 mm,以 Tris-甘氨酸溶液为电泳缓冲液, pH 8.3,每槽上样量均为 30  $\mu\text{l}$ ,稳压 10 V/cm,冰箱中电泳 6 h 左右。过氧化物酶同工酶采用联苯胺、维生素 C 和  $\text{H}_2\text{O}_2$  染色。

## 结 果

### 紫外辐射对人参培养细胞单细胞克隆形成的影响

紫外辐射能显著地降低人参培养细胞单细胞克隆的植板率,图 1 表明人参培养细胞对紫外辐射极其敏感。随着辐射时间的延长,细胞存活率呈负指数曲线下降 ( $r = -0.9789$ ),对应的细胞克隆形成能力也呈负指数曲线急剧下降 ( $r = -0.9894$ )。当紫外辐射 150 s 时,只有少数细胞存活,平板培养中几乎不见克隆形成。

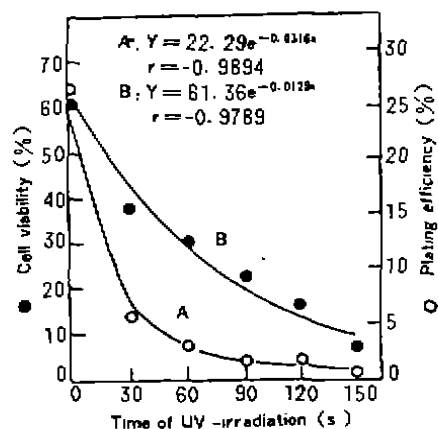


图 1 UV 辐射对人参培养细胞存活率和单细胞克隆的影响

Fig. 1 Effects of UV-irradiation on cell viability and plating efficiency of cultured cells from *P. ginseng*

### 细胞克隆系的变异分析及其筛选

不同时间紫外辐射处理的细胞进行平板培养,60 d 后挑选直径为 1~2 mm 的克隆转移培养,共 165 株 (图 2 A, B)。经 3 次转移培养后,获得克隆系 122 株 (图 2 C, D)。分析各克隆系的生长速率和寡糖素含量的变异情况表明,辐射时间不同,克隆系

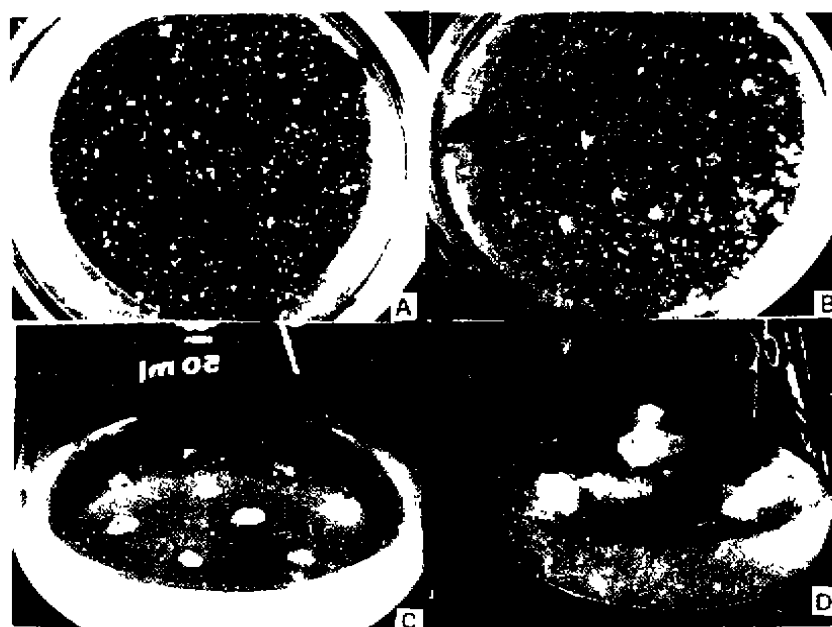


图2 人参单细胞克隆的平板培养和细胞克隆形成愈伤组织的过程

Fig. 2 Plating culture and callus formation of single cell clone

A and B: plating culture; C and D: formation of calli.

表1 不同紫外辐射处理后筛选的一些寡糖素产率较高的克隆系

Table 1 Some high yielding oligosaccharin clone lines selected from cultured cells irradiated with UV for different time

| Clone line | Growth<br>(g DW L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | Oligosaccharin<br>content (% DW) | Oligosaccharin<br>yield (g/L) |
|------------|---------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Parent     | 0.358                                             | 9.02                             | 0.968                         |
| PGUA-08    | 0.480                                             | 19.48                            | 2.806                         |
| PGUA-15    | 0.486                                             | 13.68                            | 1.994                         |
| PGUA-26    | 0.489                                             | 14.18                            | 2.080                         |
| PGUA-40    | 0.409                                             | 10.43                            | 1.279                         |
| PGUB-07    | 0.454                                             | 14.59                            | 1.987                         |
| PGUB-12    | 0.332                                             | 10.41                            | 1.006                         |
| PGUC-08    | 0.490                                             | 14.14                            | 2.077                         |
| PGUC-13    | 0.371                                             | 11.01                            | 1.222                         |
| PGUD-06    | 0.290                                             | 13.43                            | 1.169                         |
| PGUE-04    | 0.226                                             | 10.41                            | 0.706                         |

PGUA, PGUB, PGUC, PGUD AND PGUE show clone lines selected from cells irradiated with UV for 30, 60, 90, 120, 150 s, respectively.

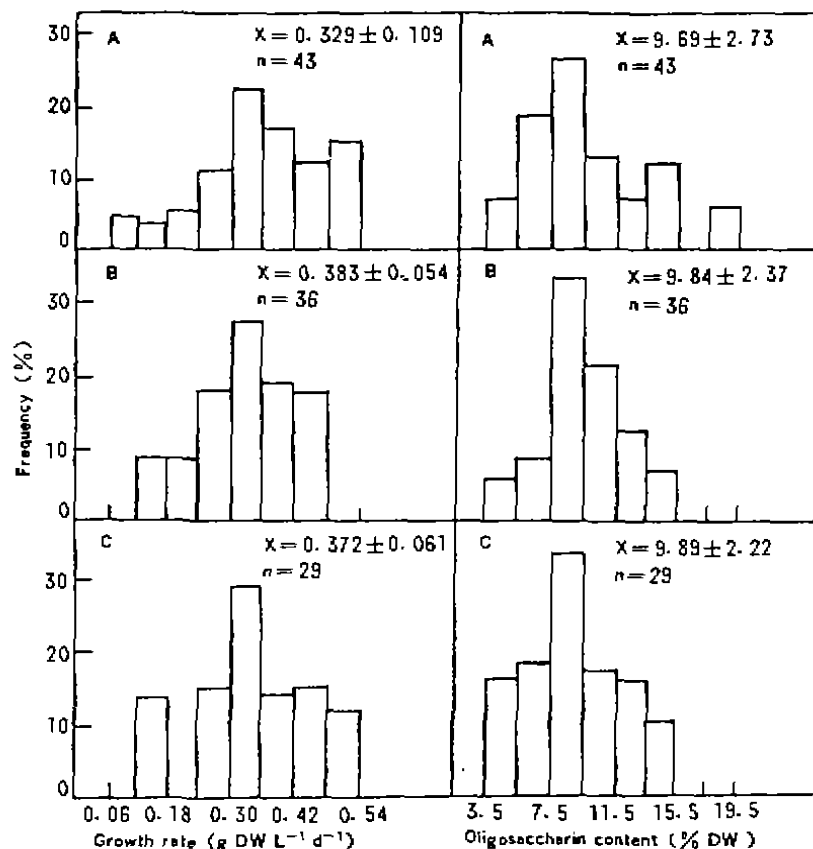


图3 不同UV辐射处理后各克隆系生长速率和寡糖素含量的分布

Fig. 3 Distribution of growth rate and oligosaccharin content of selected cell lines obtained by single cell cloning after irradiating with UV for different time

A, B and C denote cell lines selected from cultured cells irradiated with UV for 30, 60 and 90 s.

生长速率和寡糖素含量的变异幅度不同(图3和表1)。比较各处理组生长速率和寡糖素含量的变异系数发现,辐射30s时,克隆系生长速率和寡糖素含量变化幅度很大,随辐射时间延长,克隆系生长速率和寡糖素含量的变异幅度呈缩小趋势。辐射120s和150s时,仅分别得到10个和4个克隆系,它们的生长速率都比亲本低(表1),生长速率变异系数分别是7.75%和4.93%,寡糖素含量变异系数分别是20.01%和8.31%。从辐射30s处理组中

可选出一株含量高达19.48%DW的克隆系PGUA-08,其生长速率、寡糖素含量和产率分别是亲本的1.34倍、2.16倍和2.90倍。

#### 高产寡糖素克隆系的稳定性

克隆系在连续继代培养早期表现显著的不稳定性,而且各处理组的变化情况不同,图4为6株寡糖素产率较高克隆系的10代继代培养的情况。细胞生长速率观察结果表明,辐射30s处理的克隆系PGUA-08和PGUA-26在第二代下降高达20%~

30%, 随后继代培养中出现回升, 至第4~5代维持稳定, 克隆系 PGUA-08 的生长速率最高可达  $0.546 \text{ g DW L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ 。辐射60s的克隆系 PGUB-07 第二代略有下降, 于第三代始保持稳定。而辐射90s的克隆系 PGUC-08 极不稳定, 直至第6代才趋于稳定。辐射120s的克隆系 PGUD-06 在继代培养中生长速率呈上升趋势, 到第三代稳定。辐射150s处理的克隆系 PGUE-04 变化不大。寡糖素含量测定表明, 各处理组的克隆系在前几代培养中下降幅度较大, 随着继代培养代数的增加, 仅略回升至稳定水平。克隆系寡糖素含量增加和生长速率的增加不表现相关性, 从图4中可以看出, 尽管克隆系 PGUA-08 在连续继代培养中生长速率增加很多, 但寡糖素含量并不随细胞生长速率的增加而增加。克隆系 PGUA-08 无论是生长速率还是寡糖素含量均为最高, 因而寡糖素产率也是最高。其

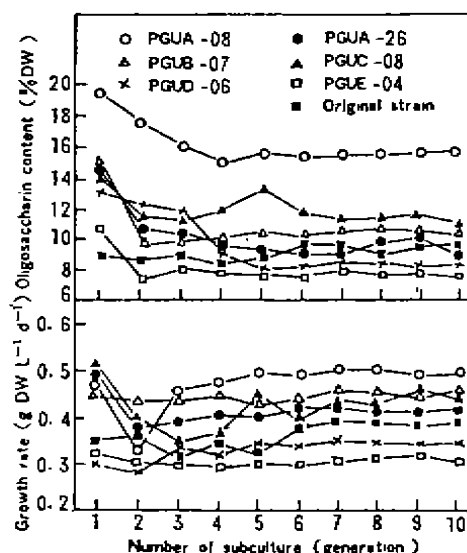


图4 一些寡糖素产率较高克隆系在连续继代培养中的稳定性

Fig. 4 Stability of some clone lines with high yield of oligosaccharin during successive subculture

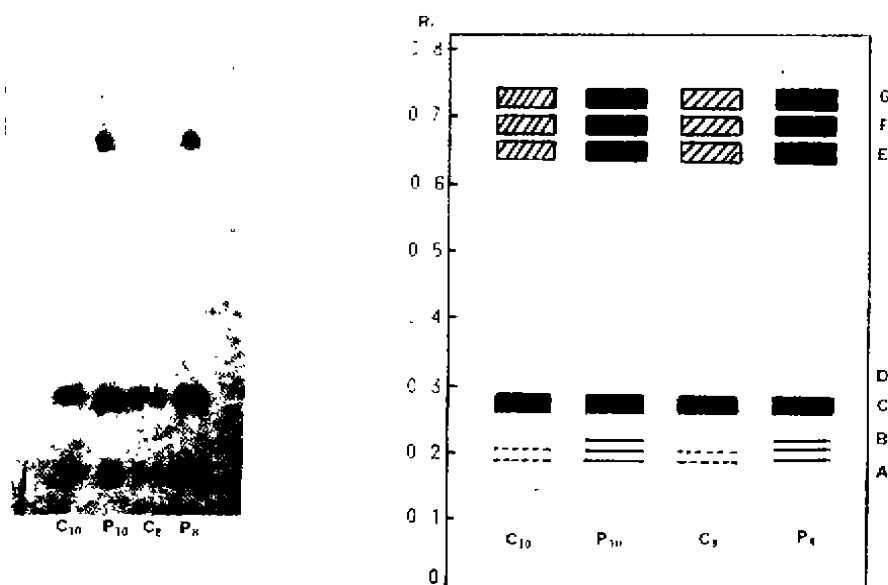


图5 克隆系 PGUA-08 和亲本之间过氧化物酶同工酶谱的比较

Fig. 5 Comparison of peroxidase isozyme patterns between clone line PUGA-08 and parent

P<sub>8</sub> and P<sub>10</sub> are from the 8th and 10th subcultures of parent; C<sub>8</sub> and C<sub>10</sub> are from the 8th and 10th subcultures of clone line PGUA-08.

表2 克隆系 PGUA-08和原始株系的比较( $\bar{X} \pm SD$ )Table 2 Comparison of clone line PGUA-08 and the original strain ( $\bar{X} \pm SD$ )

| Clone line          | Growth rate<br>(g DW L <sup>-1</sup> d <sup>-1</sup> ) | Oligosaccharin<br>content (% DW) | Oligosaccharin<br>yield (g/L) |
|---------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| The original strain | 0.369 $\pm$ 0.011                                      | 9.53 $\pm$ 0.47                  | 1.055 $\pm$ 0.023             |
| PGUA-08             | 0.537 $\pm$ 0.012                                      | 17.16 $\pm$ 0.25                 | 2.764 $\pm$ 0.106             |

生长速率、寡糖素含量和产率分别是亲本的1.46倍、1.81倍和2.62倍(表2)。

#### 优良克隆系过氧化物酶同工酶谱的稳定性

图5表明,克隆系 PGUA-08愈伤组织的过氧化物酶同工酶谱特征和亲本之间呈现明显的差异。在克隆系 PGUA-08的过氧化物酶同工酶谱中,亲本的三条慢带只有不明显的两条带,谱带 C( $R_f$ : 0.222)不见,三条快带也和亲本有明显的区别。通过比较克隆系第8代和第10代愈伤组织中过氧化物酶同工酶谱的特征,表明克隆系 PGUA-08和亲本之间的过氧化物酶同工酶谱的差异变化不大。

## 讨 论

无论是从细胞存活率还是从单细胞克隆植板率及克隆系生长情况上看,都表明人参培养细胞对紫外辐射极敏感。根据不同剂量紫外辐射处理中所分析的克隆系变化程度及其在继代培养中稳定性情况,可以推测人参培养细胞是由异质细胞组成的群体,其中有些细胞对紫外辐射敏感性高,有些细胞对紫外辐射敏感性低,表现出不同的细胞对紫外辐射处理具有不同的反应。随紫外辐射剂量的增加,有些类型的细胞被杀死或其生长受到强烈的抑制,使得经过平板培养后得到的克隆系类型减少,造成克隆系间变异幅度的缩小和变化幅度值的下降(Eriksson 1967)。

紫外辐射可以使 DNA 分子上邻接的

碱基形成二聚体,使 DNA 双链呈不正常的构型,通过倾向差错 SOS 修复系统使 DNA 继续复制,同时产生突变(Brash 和 Haseltine 1982)。紫外辐射也能诱发细胞染色体畸变,Eriksson (1967)曾用紫外辐射 *Haplopappus gracilis* 悬浮单细胞,最后获得一株花色苷高产克隆系,检查到其染色体发生了显著的畸变。

本文通过对克隆系进行变异分析,并对寡糖素产率较高的克隆系连续10代继代培养,最后筛选到一株寡糖素产率很高的变异克隆系,它的寡糖素产率和过氧化物酶同工酶谱特征均保持稳定。

## 参 考 文 献

- 甘炳远,徐 纯,郑光植。人参寡糖素 M 对红花培养细胞生长与  $\alpha$ -生育酚形成的影响。植物生理学报 1992, 18: 353
- 郑光植,王世林,何静波。三七、人参和西洋参细胞悬浮培养的比较研究。云南植物研究 1989, 11: 97
- 周立刚,郑光植,王世林。寡糖素对滇紫草愈伤组织色素合成的影响。天然产物研究与开发 1990, 2: 22
- 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的影响。云南植物研究 1991, 13: 321
- Albersheim P, Darvill AG. Oligosaccharins. Sci Amer 1985, 253: 44
- Brash DE, Haseltine WA. UV induced mutation hotspots at DNA damage Hotspots. Nature 1982, 298: 189
- Eriksson T. Effects of ultraviolet and X-ray radia-

- tion on *in vitro* cultivated cells of *Haploappus gracilis*. *Physiol Plant* 1967, 20: 507
- Hahn MG, Darvill AG, Albersheim P. Host-pathogen interactions X X. The endogenous elicitor, a fragment of a plant cell wall polysaccharide that elicits phytoalexin accumulation in soybeans. *Plant Physiol* 1981, 68: 1161
- McNeil M, Darvill AG, Fry SC *et al.* Structure and function of the primary cell walls of plants. *Ann Rev Biochem* 1984, 53: 625
- Ryan CA, Farmer FF. Oligosaccharide signals in plants: A current assessment. *Annu Rev Plant Physiol* 1991, 42: 651
- Widholm JM. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stam Technol* 1972, 47: 189

## Selection of Variants with High Yield of Oligosaccharin from *Panax ginseng* Cultured Cells

LUO Jian-Ping, ZHENG Guang-Zhi and GAN Fan-Yuan

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

Cultured cells of *Panax ginseng* were found to be highly sensitive to UV-irradiation, which could markedly decrease the plating efficiency of single cell cloning of *P. ginseng* cultured cells. After cultured cells were treated with UV-irradiation for 30 s, the plating efficiency was 21.4% of the control (Fig. 1). Cell growth rate and oligosaccharin content of all 122 clone lines obtained from 165 clone lines through 3 times transplantation culture, chosen after 60 d of plating culture, were measured (Table 1, Fig. 2 and 3). Basing on the stability of clone lines obtained through 10 generations successive subculture, a stable

clone line PGUA-08 with high yield of oligosaccharin had been selected (Fig. 4). Moreover, the isozyme patterns of peroxidases of clone line PGUA-08 maintained almost unchanged during successive subculture (Fig. 5). The growth rate of clone line PGUA-08 was  $0.537 \text{ g DW}^{-1} \text{ L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , and was 46% higher than that of its parent, and its oligosaccharin content and yield were 17.16% DW and 2.764 g/L, respectively, 1.81 and 2.62 times that of its parent, respectively (Table 2).

**Key words:** *Panax ginseng*, single cell clone, clone lines, oligosaccharins, UV-irradiation, peroxidase isozyme