

58-62

1409(10)

生物工程学报 11(1):58-62,1995
Chinese Journal of Biotechnology

人参培养细胞单细胞克隆的条件培养

罗建平 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

A

S567.5/0.3

摘要 来自细胞悬浮培养物的条件培养基能显著地促进人参培养细胞的单细胞在较低细胞植板密度培养时的克隆形成。每毫升含 3×10^2 个细胞时,条件培养的植板率是普通平板培养的 4 倍。细胞悬浮培养 12—16 天时所制备的条件培养基活性最大,在一定浓度范围内随条件培养基浓度增加,细胞克隆植板率随之增加。条件培养基具有一定的生理作用专一性。看护培养和条件培养的比较,表明前者在细胞密度较低时能更有效地促进细胞克隆的形成和生长。条件培养基在 4℃ 条件下贮存两周仍保持活性稳定,并且能耐受高温处理。当受到强酸或强碱处理其活性失去,但在弱酸或弱碱条件下稳定。

关键词 人参, 单细胞克隆, 条件培养, 条件培养基, 植板率

利用植物单细胞克隆技术筛选细胞突变体,其困难之一就是要在低细胞植板密度克隆时获得较高的植板率。为了进一步提高人参培养细胞单细胞低密度克隆时的植板率,以便能有效地筛选出高产人参寡糖素培养细胞克隆系,本文在优化人参单细胞克隆平板培养基的基础上^[1],对人参单细胞克隆的条件培养进行了研究。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人参愈伤组织继代培养基为优化的 MS 培养基^[1],愈伤组织培养每 30 天转代 1 次。人参、三七和西洋参细胞悬浮培养的培养基同上,其中含 2,4-D 0.25mg/L,KT(细胞激动素)0.08mg/L,滇紫草细胞悬浮培养的培养基同文献[2]。每 250ml 三角瓶中加入 50ml 培养液,接种新鲜愈伤组织,于 120r/min 旋转式摇床上振荡培养。所有培养物均于 $26 \pm 1^\circ\text{C}$,暗中培养,培养基均在 0.1MPa 压力下灭菌 15 分钟。

1.2 单细胞克隆

单细胞克隆方法同前文^[1]。

1.3 条件培养

无菌条件下,细胞悬浮培养物经过滤或离心得无细胞的培养液,即条件培养基(CM)。除注明外,CM 均是来自人参细胞悬浮培养液以 50% 比例和平板培养基(5g/L 琼脂)充分混匀后进行单细胞克隆试验。

1.4 看护培养

国家自然科学基金资助项目。
本文于 1993 年 9 月 3 日收到。

根据文献[5]的方法, 直径 9cm 的培养皿中铺 20ml 平板培养基, 内植入一直径 1.5cm 的滤纸圆筒, 按上法进行单细胞克隆试验, 同时接种一小块人参愈伤组织于滤纸圆筒中作看护培养, 培养两周后, 取看护愈伤组织小块继续培养。

1.5 单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, 每次试验至少 5 次重复, 结果为 5 次重复的平均值。

2 结 果

2.1 条件培养基对细胞克隆植板率的影响

对比普通平板培养和条件培养, 结果 (表 1) 表明随细胞密度的下降, 两种培养方法的植板率都下降, 但两者之间的差异越来越明显, 细胞低密度培养时, 条件培养明显有利于细胞克隆的生长。每毫升有 6.5×10^3 个细胞时条件培养的植板率是普通平板培养的 2.5 倍, 而当每毫升细胞下降到 3.0×10^3 个时, 条件培养的促进作用更加明显, 两者植板率相差 4 倍; 当细胞密度再降低时, 普通平板培养已无克隆形成。

表 1 条件培养和普通平板培养对植板率影响的比较

Table 1 The effect comparison between conditioning culture and normal plating culture on PE

Cell density ($\times 10^3$ /ml)	0.8	1.5	3.0	5.0	6.5
Normal plating culture	0.00	0.00	3.09	8.37	11.58
Conditioning culture	0.15	5.36	12.71	23.60	29.47

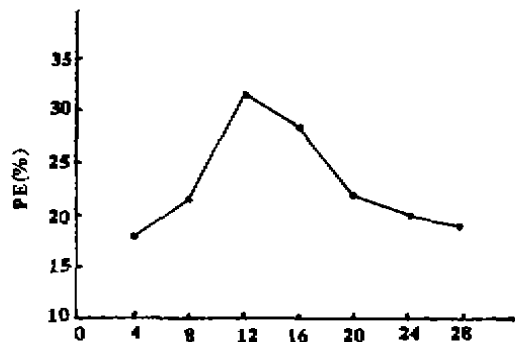


图 1 来自不同培养时间时, 条件培养基 (CM) 对细胞克隆的影响

Fig. 1 Effects of CM from different cell culture period on cell clone

2.2 制备条件培养基的时间对细胞克隆的影响

图 1 表明条件培养基的刺激效果和它来源的细胞悬浮培养时间密切相关。当细胞悬浮培养 12—16 天时所制备的条件培养基最有效, 细胞生长后期制备的条件培养液效果较差, 来自细胞生长早期的条件培养液效果最差。

2.3 平板培养基中条件培养基的浓度对细胞克隆的影响

表 2 表明在一定浓度范围内, 随条件培养基浓度的增加, 人参单细胞克隆的植板率逐渐增加, 条件培养基占 50% 时, 植板率最高可达 31.84%, 再增加它的浓度, 植板率不再增加。

表 2 条件培养基浓度对细胞克隆的影响

Table 2 Effects of the CM concentrations on *P. ginseng* cell cloning

CM (%)	0	10	25	50	75
PE (%)	10.61	15.81	23.15	31.84	28.42

2.4 条件培养基的生理作用专一性

用分别来自人参、西洋参、三七和滇

紫草细胞悬浮培养系的条件培养基进行人参单细胞克隆的条件培养, 结果见表3。与人参同属的三七和西洋参的条件培养基对细胞克隆生长刺激效果和人参的条件培养基相似, 而紫草的条件培养基的刺激效果较弱, 表明条件培养基具有一定的生理专一性。

2.5 条件培养和看护培养的比较

比较条件培养、看护培养以及条件培养基和看护细胞组合的培养, 结果表明看护培养的效果比较好(表4)。在不同细胞密度下条件培养和看护培养, 当细胞密度较高时两者几乎无差异, 但当细胞密度降低时, 两者刺激细胞生长的差异愈来愈大, 每毫升含 0.5×10^3 个细胞时, 看护培养的植板率仍有 2.83%, 而条件培养的植板率只有 0.08%, 从表4中还可看出看护培养和条件培养的组合效果并不比单独的看护培养更好。

2.6 条件培养基的稳定性

2.6.1 pH: 用 HCl 或 NaOH 溶液将条件培养基的 pH 值分别调至 1, 3, 7, 9, 11 时处理 2 小时, 再调回到 pH 5.8, 然后做条件培养, 结果见图 2。强酸处理时, 条件培养基的活性急剧下降, 植板率从 26.73% 减至 7.80%, 强碱处理时植板率下降幅度也较大。弱酸和弱碱处理时对条件培养基活性的影响不是太大。

2.6.2 温度: 取同样来源的条件培养基各 20ml, 按表 6 的温度分别处理 1 小时, 其中常规高温灭菌 15 分钟, 压力为 0.1MPa。结果表明随温度的升高, 条件培养基的活性仅有下降, 常规高温高压灭菌处理对其活性的破坏性较大。

2.6.3 长期贮存: 条件培养基是来自培养时间相同的细胞悬浮培养系。在 4℃ 条件下分别贮存 0, 3, 6, 9, 12, 15 天后同时做条件培养, 比较不同处理对细胞克隆生长的影响。从图 3 中可以看出各处理对条件培养基的活性影响不大, 细胞克隆的植板率保持一恒定的水平 ($P > 0.05$)。

表 3 不同来源的条件培养基对人参细胞克隆生长的影响

Table 3 Effects of CM from different plant cell suspension cultures on the growth of *panax ginseng* cell clones

CM	<i>Panax ginseng</i>	<i>P. notoginseng</i>	<i>P. quinque folium</i>	<i>Dendrobium caudatum</i>
PE (%)	38.13	32.71	35.56	24.12

表 4 条件培养和看护培养的比较 (一)

Table 4 Comparison between conditioning culture and nursing culture (一)

Methods	N-C	C-C	N+C
PE (%)	29.14	24.43	30.00

表 4 条件培养和看护培养的比较 (二)

Table 4 Comparison between conditioning culture and nursing culture (二)

Cell density ($\times 10^3$ /ml)	0.5	1.0	2.0	3.5	5.0
PE (%) of C-C	0.08	3.11	10.74	16.37	27.61
PE (%) of N-C	2.83	11.61	14.61	25.70	28.32

N-C: Nursing culture; C-C: Conditioning culture; N+C: Combination culture of N-C and C-C.

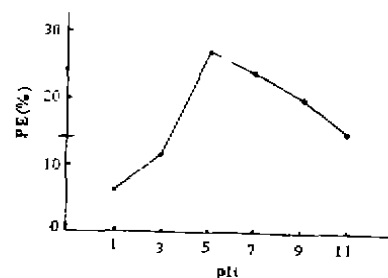


图 2 pH 值对条件培养基 (CM) 活性的影响

Fig. 2 Effects of pH value on the activity of CM

表 5 温度对条件培养基活性的影响

Table 5 Effect of temperatures on the activity of conditioned medium

T (°C)	25	50	80	100	Autoclaving
PE (%)	39.95	38.64	32.68	31.41	21.67

3 讨 论

条件培养基是悬浮培养细胞旺盛生长一段时间的无细胞培养液, 内含有丰富的生长细胞分泌的代谢物质, 其中某些成分对细胞的生长和分裂有显著的促进作用, 被称为条件因子 (Conditioning Factors, CFs)^[3,12,13]。条件因子可能是一类分子量在 500—1500 道尔顿之间的寡糖类物质, 长期贮存, 高温处理, 弱酸和弱碱处理及蛋白水解酶处理, 其活性仍相当稳定^[3,6,9,10,11,14], 它们能明显地提高单细胞克隆的植板率。本文中条件因子的稳定性有一定的波动可能是条件因子未纯化的结果^[9]。一些作者^[4,11]认为看护细胞除能提供植板细胞条件因子外, 还提供另一类不稳定的看护因子 (Nursing Factors, NFs), 这种因子对细胞克隆的生长分裂具有很强的诱导作用, 但在条件培养液制备过程中已丢失。Schroder 等 (1989)^[9]报道条件培养时细胞植板密度不能低于每毫升含 1.0×10^3 个细胞, 看护培养可以在细胞植板密度较低甚至低到每毫升含 7 个细胞时诱导克隆形成。条件培养基的活性和分离它的细胞悬浮培养时间相关^[11]。细胞生长后期其效果较差, 可能是生长后期的细胞趋于停止生长, 分泌一些抑制细胞生长的因子所造成的。细胞生长早期的培养液中不含或只含有很少的条件因子, 因而对细胞克隆的生长也无明显的刺激作用。

关于条件因子生理作用的专一性目前没有一致的看法^[11,14]。由于不同植物培养细胞具有生理生化等诸方面的差异, 这些差异能够表现于条件培养液中, 从而造成植板细胞和非同样来源的条件培养基有个相互适应的过程, 可能减弱了条件培养液的刺激作用, 如果差异存在于条件培养液中起刺激作用的条件因子组成或结构上, 则只有很弱甚至没有刺激效果。

参 考 文 献

- (1) 罗建平、郑光植、甘炳远. 生物工程学报, 1993, 9 (4) : 337—341.
- (2) 周立刚、郑光植、王世林. 云南植物研究, 1991, 13 (2) : 237—240.
- (3) Bellincampi D, Morpurgo G. Plant Sci, 1987, 51 (1) : 83—91.
- (4) Bellincampi D, Morpurgo G. Plant Sci, 1987, 65 (1) : 125—130.
- (5) Bergmann L. J Genet Physiol, 1960, 43 : 841—851.
- (6) Birnberg P R, Somers D A, Brenner M L. J Plant Physiol, 1988, 132 : 316—321.
- (7) Hahne B. Plant Cell Rep, 1990, 8 : 590—593.
- (8) Schaffler E, Koop H U. J Plant Physiol, 1990, 137 : 95—106.
- (9) Schroder R, Gartner F, Steinbrenner B *et al.* J Plant Physiol, 1989, 135 : 422—427.

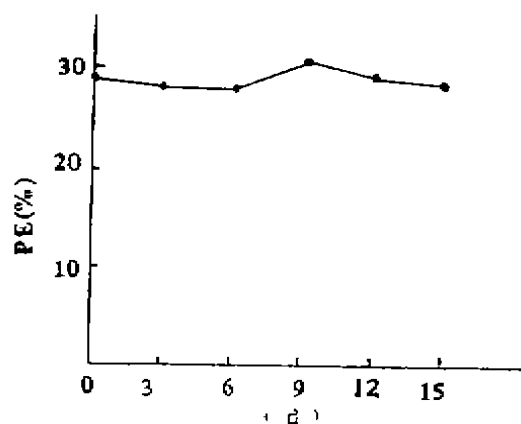


图 3 长期贮存对条件培养基 (CM) 活性的影响

Fig. 3 Effects of long-storage on the activity of CM

- [10] Somers D A, Birnberg P R, Petersen W L *et al.* *Plant Sci.* 1987, **53**: 249—256.
[11] Steinbrenner B, Schroder R, Knoop B *et al.* *J Plant Physiol.* 1989, **134**: 582—585.
[12] Stuart R, Streen H E. *J Exp Bot.* 1969, **20**: 556—571.
[13] Stuart R, Streen H E. *J Exp Bot.* 1971, **22**: 96—106.
[14] Teasdale R D, Richards D K. *Plant Cell Tissue & Organ Culture.* 1991, **26**: 53—59.

Conditioning Culture of Single Cell Clone from Culture Cells of *Panax ginseng*

Luo Jianping Zheng Guangzhi

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

Abstract Conditioned medium (CM) stemming from cell suspension culture could remarkably promote the formation of single cell clone from culture cells of *Panax ginseng* below a critical cell plating density. The plating efficiency of conditioning culture was 4 times as much as that of the normal plating culture if CM was added to the plating medium when cell plating density was 3×10^3 /ml. The activity of CM would be the highest if it originated from cells cultured for 12—16 days. The plating efficiency was improved when the amount of CM in plating medium was increased within the ranges of proper concentrations. CM possessed species-specificity to some extent. The comparative study between nursing culture and conditioning culture indicated that the former could more effectively stimulate the formation and growth of single cell clone at a lower cell plating density compared with the latter. CM stored for two weeks at 4 C remained its stimulating activity. Moreover, it was resistant to high temperature, weak acid or alkaline pH, but it was unstable when treated with strong acid and alkaline pH.

Key words *Panax ginseng*, single cell clone, conditioning culture, conditioned medium (CM), plating efficiency (PE)