

红花细胞培养中高产 α -生育酚克隆系的筛选

甘烦远 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘要 为了从红花 (*Carthamus tinctorius* L.) 培养细胞中筛选到具有高产 α -生育酚性能的细胞变异体, 利用细胞平板培养技术, 利用 HPLC 法测定培养细胞中 α -生育酚的含量, 对 200 多个由单细胞或小细胞团发育而来的细胞克隆进行了筛选。结果发现, 在细胞生长速率和 α -生育酚含量上, 这些克隆之间存在着显著的差异。在克隆的第一代分析过程中, 发现 α -生育酚含量由 0—138.9 $\mu\text{g}/\text{gDW}$ 变化; 细胞生产速率由 0.20—0.53 $\text{gDW}/\text{l.d}$ 变化。细胞生长速率与 α -生育酚含量之间无明显相关性。对一些 α -生育酚含量较高的克隆进行了稳定性观察, 经近 20 代继代培养观察后, 从中筛选到一个合成 α -生育酚较稳定的高产克隆系 (CT-289), 其 α -生育酚平均含量为 114.4 $\mu\text{g}/\text{gDW}$, 是原始株系 (15.83 $\mu\text{g}/\text{gDW}$) 的 7.2 倍; 其生长速率为 0.424 $\text{gDW}/\text{l.d}$, 与原始株系 (0.417 $\text{gDW}/\text{l.d}$) 相差不大。

关键词 红花; 细胞克隆; α -生育酚; 细胞平板培养; 生长速率

SCREENING OF HIGH-PRODUCING α -TOCOPHEROL CLONE LINES FROM *CARTHAMUS TINCTORIUS* CELL CULTURES

GAN Fan-Yuan, ZHENG Guang-Zhi

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

Abstract Plating culture technique was used for screening high-producing of α -tocopherol variants from the culture cells of *Carthamus tinctorius* L. The content of α -tocopherol in culture cells was measured by HPLC method. The cell variants were selected from more than 200 clones induced from single cell or small cell aggregates (2—8 cells), and found that these clones were significant difference in α -tocopherol synthesis and cell growth. α -tocopherol contents were varied from 0 to 138.9 $\mu\text{g}/\text{gDW}$ and cell growth rates were varied from 0.20 to 0.53 $\text{gDW}/\text{l.d}$ at the first generation of clones. There was not a significant correlation between α -tocopherol productivity and cell growth in these clones. The stability of some clones which high-producing α -tocopherol was tested. A more stable high-producing α -tocopherol clone line (CT-289) had been selected through out near 20 passages successive subculturing. Its mean content of α -tocopherol was 114.4 $\mu\text{g}/\text{gDW}$, and was 7.2-fold to the

1991年6月收稿, 同年7月定稿。

original strain ($15.83\mu\text{g}/\text{gDW}$). The growth rate of CT-289 was $0.424\text{ gDW}/\text{l.d}$, and was similar to the original strain ($0.417\text{ gDW}/\text{l.d}$).

Key words *Carthamus tinctorius*; Cell clone; α -Tocopherol; Cell plating culture; Growth rate

作者曾对红花 (*Carthamus tinctorius*) 的细胞培养进行了较详细的研究^[1-2]。但都发现培养细胞中 α -生育酚的含量甚低。虽然通过各种调控手段如改变培养条件、加人前体^[3]和诱导子植物性寡糖素^[2]等可以使 α -生育酚含量有所提高,但仍远远满足不了工业化大量生产的要求。因此,必需寻找更有效的方法来提 高 α -生育酚的含量。

植物培养细胞存在着极大的异质性及变异性。1981 年 Larkin 等^[4]把植物培养细胞存在的变异性定义为“体外克隆变异”(somaclonal variation)。因此利用培养细胞之间的变异来筛选具有高产次级代谢产物的细胞变异是可能的。目前,通过各种筛选方法已经在多种植物培养细胞中获得了高产次级代谢产物的细胞变异系^[5-7]。

为了观察红花培养细胞的体外克隆变异和利用细胞之间的变异性来筛选具有高产 α -生育酚的变异细胞系,作者利用细胞平板培养技术同时结合紫外线诱变等方法,对红花培养细胞进行了初步筛选。同时对筛选到的高产 α -生育酚克隆系进行了稳定性观察。

材料和方法

实验材料 实验材料来源于由红花无菌苗胚轴诱导的已连续继代 10 代以上的愈伤组织,愈伤组织培养及细胞悬浮培养方法参见前文^[1]。

细胞平板培养 参考周平等^[8]的方法。培养于培养基 A 中的第三代的生长、分散好的悬浮培养细胞先过 $250\mu\text{m}$ 的尼龙网,然后再过 $154\mu\text{m}$ (或 $76\mu\text{m}$) 的尼龙网过滤。采取普通平板培养和液体浅层培养方法把含适当细胞密度的滤液与培养基 C 以 1:1 比例混合后铺于 3.5cm 直径的培养皿中 (约 1.6mm 厚),用 Parafilm 膜封好后于 $26\pm 1^\circ\text{C}$ 暗中培养。

紫外线照射 在超净工作台上安装一个距台面 20cm 的 30W (254nm) 紫外灯。将培养细胞吸于培养皿内,铺成薄层 (约 2mm 厚),照射时间分别为 3, 5, 7 和 9 分钟,照射时摇动培养皿使细胞接受均匀照射,收集受照射细胞,调制好细胞密度,然后与培养基 C 以 1:1 比例混合进行平板培养。

细胞克隆培养及其稳定性观察 将长出的可见克隆从培养皿中挑选出转移至新鲜的培养基 C 中继代培养,培养条件同前文^[9]。一段时间后将每克隆分成两半:一半用于继代培养,另一半用于细胞生长及 α -生育酚含量测定,测定的克隆至少重复 3 次,结果取其平均值。每次继代均测定克隆及原始株系的细胞生长及 α -生育酚的含量,并进行比较。

实验参数 细胞克隆的生长速率 ($\text{gDW}/\text{l.d}$)、 α -生育酚含量 ($\mu\text{g}/\text{gDW}$) 及其产率 ($\mu\text{g}/\text{flask}$) 的测定方法参见前文^[1]。细胞平板培养的细胞接种密度、细胞活力和植板率的测定及计算按周平等^[8]的方法进行。

结果与讨论

红花培养细胞的克隆变异

红花培养细胞的第三代悬浮培养物, 通过二次尼龙网过滤后, 所获得的细胞滤液中单细胞占 65% 左右, 2—8 个细胞的小细胞团占 25% 左右, 细胞平均活力为 54%, 细胞接种密度在 1330—5400 cell/ml 之间, 最后细胞植板率 (PE) 为 5%—9%。

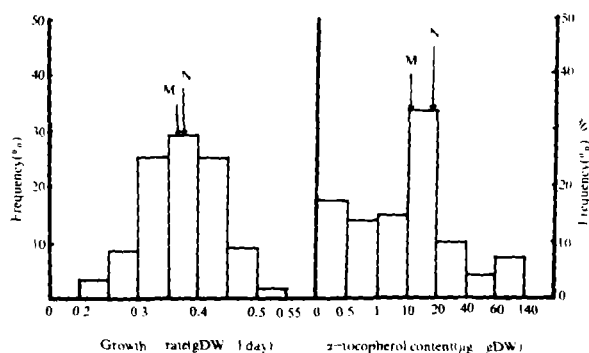


图 1. 各克隆在第一代继代中生长速率及 α -生育酚含量的分布

图中箭头 M 代表红花培养细胞原始株系的生长速率及 α -生育酚含量, 箭头 N 表示所有测试克隆的平均生长速率及平均 α -生育酚含量。

Fig.1 The distribution of the cell growth rate (A) and α -tocopherol content (B) in select clones at the 1st subculture

The arrow M indicated the values of growth rate and α -tocopherol content of the original strain and the arrow N indicated the average values of clones at the 1st subculture.

代克隆生长平均数 (0.371gDW/1.d) 的克隆占 50%, 可认为是高生长率克隆系。最高的生长率克隆系有两个, 生长速率分别达 0.51 及 0.53gDW/1.d, 但这两个克隆系的 α -生育酚含量都不高 (表 1)。在 218 个克隆中有 69 个克隆未检出 α -生育酚的含量, 占总数的 31.65%; 高于第一代克隆 α -生育酚平均含量 (18.0 μ g/gDW) 的克隆有 53 个, 占总数的 24.31%, 可认为是高产克隆系。其中有两个克隆系的 α -生育酚含量分别达到 136.0 和 138.9 μ g/gDW (表 1), 分别是原始株系 α -生育酚含量 (10.1 μ g/gDW) 的 13.3 和 13.8 倍。此两个克隆系的生长速率分别是 0.40 和 0.33gDW/1.d, 属于中等生长速率的克隆系。

引起红花细胞克隆变异的原因是多样的, 有些可能是细胞产生变异的表型, 而有些可能仅仅是其生理状态不同的表型。象这种经平板培养由单细胞或小细胞团发育而来的克隆存在着的在代谢产物含量上的变异在长春花^[10]、天仙子^[11]及唐松草^[12]等培养细胞中也观察到。证明了在植物细胞培养中存在的克隆变异是普遍性的。但对于确定其是否是真正的变异体, 只有在经长时间观察试验之后才能确定。

细胞克隆在培养皿中两周左右即可长出, 继续培养两周后即可从培养皿中挑出, 转移到新鲜的培养基 C 中继续培养, 待各克隆长成较大的愈伤组织团后, 进行了各克隆之间的细胞生长及 α -生育酚含量测定。共培养了 300 多个克隆, 对其中的 218 个克隆进行了测定, 对这些克隆在继代的第一代测定过程中的生长及 α -生育酚含量进行的几率统计分析见图 1。

结果表明: 各克隆在生长速率及 α -生育酚含量上均表现极大的变异。细胞生长速率从 0.20—0.53gDW/1.d 变化, 超过第一

利用紫外线照射诱发的效果

为了获得具有高产 α -生育酚性能的变异克隆或突变体, 利用紫外线对红花的平板培养细胞进行了照射试验。结果发现: 经照射后的红花平板培养细胞其活力稍有下降, 并且随照射时间增加细胞活力下降越多。照射后的细胞经平板培养后, 长出的克隆数很少 (每个培养皿只长出 0—20 个可见克隆)。说明经紫外线照射后, 大部分细胞已死亡。从长出的克隆中挑选出了近 30 个克隆进行培养并对其中的 11 个进行了分析, 其中只有 2 个克隆合成了 α -生育酚, 且含量极低, 其他的克隆均未检测出 α -生育酚的存在。用紫外线照射诱发的效果很不理想。

表 1. 选择的一些克隆系的生长速率及 α -生育酚含量之间的比较 (第一代)

Table 1. The comparison between some select clone lines on growth rate and α -tocopherol content at the 1st subculture

Clone lines	Growth rate (gDW / l.d)	α -Tocopherol content (μg / gDW)	α -Tocopherol yield (μg / flask)
Original strain	0.365	10.1	3.08
The mean value of isolated clones	0.371	18.0	6.70
CT-008	0.487	81.3	31.54
CT-033	0.395	136.0	51.68
CT-044	0.403	111.7	46.02
CT-049	0.242	92.6	25.56
CT-066	0.412	57.4	20.61
CT-086	0.382	116.5	35.53
CT-094	0.329	138.9	43.48
CT-095	0.278	121.4	30.71
CT-106	0.446	70.4	33.93
CT-162	0.392	86.0	30.62
CT-167	0.445	102.7	40.05
CT-170	0.385	76.1	28.08
CT-254	0.375	100.9	37.64
CT-289	0.431	111.7	46.24
CT-212	0.527	11.2	5.13
CT-251	0.505	—	—

红花高产 α -生育酚克隆系的稳定性观察

为了确定筛选到的高产 α -生育酚细胞克隆是否是真正的变异体, 其高产性能是否稳定, 对一些筛选到的高产的细胞克隆进行了连续继代的稳定性观察。经近 20 代的继代观察, 发现所有供试克隆在早期继代中 (1—4 代) 都表现出很大的变异性, 其合成产物能力极不稳定。经过长时间的继代培养, 有些克隆合成产物能力趋于稳定, 但有些克隆仍处于变异之中。目前, 有关真正由单细胞而来的克隆的报道极少^[13]。用单细胞克隆技术获得的克隆系大多也是杂有小细胞团而来的。因此这也可能是在随后的继代中变异仍然不断存在的原因之一。而且, 其变异的不稳定性不仅可能是由于存在于与亲本中不同基因型的继续分离, 而且也是由于在克隆过程中 (包括克隆分离与继代) 的遗传

表达上的变异而引起的。

通过观察, 发现一个高产 α-生育酚性能较稳定的克隆系, 命名为细胞克隆系 CT-289。该克隆系从第 4 代开始合成 α-生育酚能力即趋于稳定, 并且保持高产性能。从已测定的 18 代继代中, 其平均 α-生育酚含量为 114.41 μg / gDW (表 2), 为原始株系的 7.2 倍。但其生长速率与原始株系相差不大。

表 2. 克隆系 CT-289 与原始株系比较

Table 2. The comparison of clone line CT-289 and original strain

Clone lines	Growth rate (gDW / l.d)	α-tocopherol content (μg / gDW)	α-tocopherol yield (μg / flask)
Original strain	0.417	15.83	5.80
CT-289	0.424	114.41	42.63

CT-289 的稳定性观察图见

图 2。

红花细胞克隆的生长与 α-生育酚含量之间的关系

对所有筛选出的克隆的生长及 α-生育酚含量之间的关系进行了直线回归和相关系数的分析。结果发现: 细胞克隆的生长及 α-生育酚含量之间无明显相关性。即生长速率高的克隆, 其 α-生育酚的含量不一定高; 相反, α-生育酚含量高的克隆, 其生长速率也不一定低。这种现象与很多研究报道认为细胞生长与代谢产物含量之间呈负相关的结论不同^[12]。在这种情况下, 对于筛选同时具有高生长率和高 α-生育酚含量的变异克隆系是可能的。细胞克隆生长和 α-生育酚含量之间的直线回归方程如下:

$$y = 0.37 - 0.004x$$

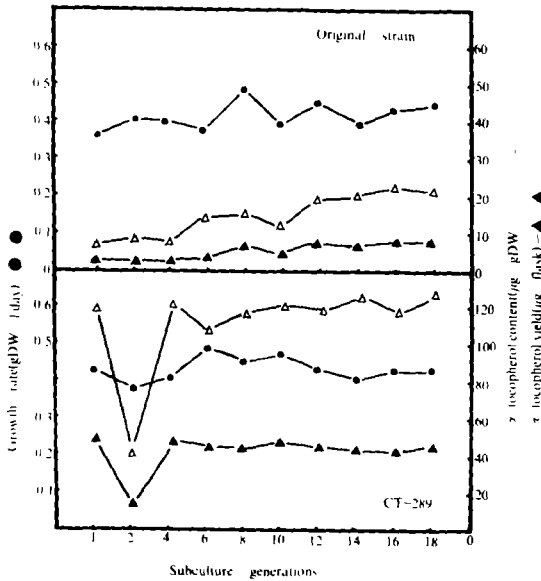


图 2. 克隆系 CT-289 与原始株系在继代培养过程中的变化情况
Fig. 2 Changes in cell growth and α-tocopherol production during successive subculturing of CT-289 and original strain

致谢 本所生理室仪器组周力强、易永生等协助部分工作。

参考文献

- (1) 甘熲远, 郑光植. 红花愈伤组织诱导、生长及其 α -生育酚的产生. 云南植物研究 1991; 13 (2): 189-195
- (2) 甘熲远, 郑光植, 王世林. 植醇与寡糖对红花悬浮培养细胞的生长及 α -生育酚积累的效应. 植物生理学报 1990; 16 (4): 361-366
- (3) Furuya T, Yoshikawa T, Kimura T. et al. Production of tocopherols by cell culture of Safflower. *Phytochemistry* 1987; 26 (10): 2741-2747
- (4) Larkin P J, Scowcroft W R. Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures. *Theor Appl Genet* 1981; 60: 197-214
- (5) 甘熲远, 郑光植. 植物培养细胞次级代谢产物高产细胞系的筛选. 国外医药. 植物药分册 1990; 5 (1): 10-14
- (6) Dix P H. Cell line selection. In: Yeoman M M. ed. *Plant Cell Culture Technology*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986: 143-201
- (7) Berlin J, Sasse F. Selection and screening techniques for plant cell cultures. *Adv in Biochem Eng / Biotechnol* 1985; 31: 99-131
- (8) 周平, 郑光植. 红花细胞克隆的平板培养. 植物学报 1989; 31 (7): 505-511
- (9) 周平, 郑光植. 红花单细胞克隆的建立. 植物学报 1989; 31 (9): 661-667
- (10) Petiard V, Baubault C, Bariaud A. et al. Studies on variability of plant tissue cultures for alkaloid production in *Catharanthus roseus* and *Papaver somniferum* callus cultures. In: Neumann K H, Barz W, Reinhard E. eds. *Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures*. Berlin: Springer-Verlag, 1985: 133-142
- (11) Oksman-Caldentey K M, Strauss A. Somaclonal variation of scopolamine content in protoplast-derived cell culture clones of *Hyoscyamus muticus*. *Planta Medica* 1986; (1): 6-12
- (12) Bariaud-Fontanel A, Tabata M. Somaclonal variation in the berberine-producing capability of a culture strain of *Thalictrum minus*. *Plant Cell Reports* 1988; 7: 206-209
- (13) Ellis B E. Characterization of clonal cultures of *Anchusa officinalis* derived from single cells of known productivity. *J Plant Physiol* 1985; 119: 149-158