

## 003 植物培养细胞 次级代谢产物高产细胞系的筛选

甘烦远 郑光植

(中国科学院昆明植物研究所)

**摘要** 对植物培养细胞中高产次级代谢产物细胞系筛选的方法与研究作了概述;包括高产变异系和突变体的产生和筛选等。同时对高产细胞系的稳定性及保存方法和当前研究的进展进行了讨论。

**关键词** 筛选方法 细胞系 次级代谢产物

### 一 前言

利用植物细胞培养生产有用的次级代谢产物并实现工业化应用的关键之一是需有高产且稳产的细胞系。因此,必须对培养细胞进行广泛的筛选,利用细胞的异质及变异性筛选出所需的细胞系。

对于一个具有高产性能的细胞系的从头筛选,除了整个过程中的培养条件因素外,还应满足下列条件:(1)有足够的变异源细胞群;(2)通过单细胞克隆技术使制备单细胞克隆成为可能;(3)具有灵敏的、简单的分析产物的方法;(4)能进行细胞系稳定性试验。要全部满足这些条件是很困难的,需要不断开辟其他筛选方法,使筛选工作简单、快速地进行。

到目前为止,已在很多植物培养细胞中通过不同的筛选方法获得了很多具有高产次级代谢产物特性的细胞系<sup>[1]</sup>。

### 二 具有高产性能的变异细胞系的筛选

#### 1 用于高产细胞系选择的原始材料

植物组织培养在工业上能脱颖而出的机会在于它生产只能由高等植物产生或转化的、价格高的、或有独到用途又有相当大市场的商品化合物。因此,原始材料的选择是很重要的。

一般认为,若应用次级产物高的外植体诱导出的培养物,其次生产物的含量也高<sup>[2]</sup>。但这并不总是一致的。Sasse等发现来自骆驼蓬根、茎和叶的愈伤组织之间产生的 $\beta$ -吡啶生物碱和5-羟色胺没有明显差异。而且从低含量的物种寻找某种成分以建立高产系也是有可能的。由于对次级产物合成和积累的遗传学基础很不清楚,因此最好从不同的遗传来源的材料建立细胞培养物,然后从中选择出高产细胞系。

#### 2 用于选择高产系的培养系统

常用的培养方法包括愈伤组织培养、细胞悬浮培养及单细胞培养(平板培养和原生质体培养)。对每一筛选目标选择合适的培养方法是很重要的,这样可以使群体之间的变异性充分表现出来。

##### (1) 愈伤组织培养

愈伤组织培养是最容易、最简单的培养方法,也是其他两种培养方法的基础。但由于愈伤组织细胞以团块存在,个体变异的细胞不易表现出来,因而它对于精确的选择来说亦是最受限制的方法。

##### (2) 细胞悬浮培养

与愈伤组织相比,悬浮培养物分散好,因而个体变异的细胞易表现出来。悬浮培养常常与细胞平板培养等方法结合起来进行高产细胞系的筛选。

### (3) 单细胞培养

单细胞培养方法对筛选高产变异系是最精确的方法。因为这种方法可以培养从单细胞起源的培养物,所选择到的目标是同质的。这样不仅可以减少筛选时间,而且也利于选择系的稳定。

利用单细胞培养方法的两个关键是:(a)怎样获得足够的单细胞。目前多采用如物理的、化学的及酶学的方法<sup>[3]</sup>。(b)怎样使单细胞顺利生长并能顺利继代下去。利用平板培养、条件培养、看护培养、饲喂层培养、微滴培养及液体浅层培养<sup>[4]</sup>等方法可以很好地使细胞生长,在降低细胞密度的情况下提高细胞植板率。一般培养单细胞的方法,亦适合于原生质体培养。

利用单细胞培养方法进行高产变异系的筛选目前应用得最广泛,同时结果亦最丰富,研究也极为活跃。

#### 3 用于筛选高产系的分析系统

由于植物培养细胞中细胞生长速率与其产物积累并不存在一种绝对的线性关系<sup>[5]</sup>说明了对高产细胞系的筛选的分析似乎不能按照主动的筛选方法进行,而只有依靠直接的或间接的筛选愈伤组织、悬浮培养物或单细胞克隆来增加产物的积累。直接的筛选方法包括通过分离的克隆或愈伤组织就能直接地继代培养的所有技术。而当筛选的克隆只有在进行细胞提取液的分析之后才能评价和只有一部分的克隆能继代培养时,就应采用间接的分析方法。

#### (1) 直接的分析筛选方法

在直接的分析方法中最简单,最快速的方法是目视法(Visual Method)<sup>[6]</sup>。目视法大多数用在获得高产色素细胞系的筛选上,如花青素、蒽醌,类胡萝卜素、叶绿素和 Betalains 等。由于色素上的变异通常在愈伤组织和悬浮培养细胞中就表现了出来,因而易于用目视法筛选。

用目视法进行色素高产系的筛选,典型的例子是 Yamamoto 等<sup>[7]</sup>对铁海棠

(*Euphorbia millii*) 的培养细胞中具有高产和稳产花青素细胞系的筛选。他们建立了一种颇为简单有效并能长时间维持的筛选方法,即首先对铁海棠进行愈伤组织诱导,然后把愈伤组织分成许多小区块并都培养于相同的培养基上,各区块长大的愈伤组织中其中的一半进行分析,另一半继代培养。选择最红的区块并继续分离和分析,这样筛选了近三十代,在第二十三代之后细胞块的色素含量的平均值保持稳定,并比原细胞株含量高 7 倍。这也证明了一个稳定的细胞系的最后成功是要经过长时间反复筛选的。Yamakawa 等<sup>[8]</sup>利用此法通过不断重复选择葡萄愈伤组织,得到了含花青素 1~1.8% 的高产系,而从喂饲层中获得的单克隆色素含量高达 3.4%。遗憾的是,上述两例的单细胞克隆或原生质体培养都没有获得理想的变异系。这种现象在紫草和胡萝卜的单细胞克隆培养中亦发现。Dougall 等<sup>[9]</sup>对分离出的胡萝卜高产花青素细胞系再克隆时,发现子代细胞系产花青素各不相同,随继代增加,高产系含量有下降趋势。并且从低产的克隆中再克隆之后可获得高产的克隆系。因此,认为用目视法选择的细胞系有时并不是真正的变异体,而仅仅是生理上不同状态的细胞。因培养基成分常亦是影响产物积累的因素之一<sup>[1]</sup>,因此,对分析选择细胞系的极大的不稳定性时常不能由遗传上的不稳定性来解释,而是我们对鉴定真正的变异体及生理状态不同的细胞克隆缺乏足够的认识。

虽然这样,我们也不能放弃用目视法对变异系的筛选。无疑这个方法亦已取得极大成功。

Kinnersley 和 Dougall 等<sup>[9]</sup>已从胡萝卜细胞中分离出更稳定的细胞系。他们利用细胞团筛选方法对其悬浮细胞进行了 6 个月的筛选(12 代),其中小块细胞团( $< 63\mu\text{m}$ )的花青素含量比未筛选的高 3 倍,而大于  $63\mu\text{m}$  的细胞团的花青素含量却比未选择的低。解释这样的现象是由于小细胞团中内源激素

的降低有利于花青素的合成。除此之外,利用目视法还筛选出了高产蒽醌衍生物的药鼠李细胞系<sup>[10]</sup>和高产小檗碱的黄连细胞系。

小檗碱是一类广谱的抗菌药,已知从日本黄连等好几种植物的培养物中获得了小檗碱。Yamada 和 Sato 等利用细胞团块进行反复克隆,选出了一个生长快、生物碱含量高的细胞系,细胞在 3 周内增殖 5~6 倍,最高小檗碱含量达 13% 干重且相当稳定<sup>[11]</sup>。

Bariaud-Fontanel 等<sup>[12]</sup>通过反复克隆法从唐松草的细胞中获得了含 0.76g/L 小檗碱的高产并稳产细胞系,有 70% 的小檗碱分泌到胞外去。

Koblitz 等<sup>[13]</sup>在培养小果博落回 (*Macleaya microcarpa*) 细胞时发现细胞的生物碱含量与黄色色素的形成成正比,以此为标记,从中筛选出了含量为 0.4% 的前鸦片碱 (Protopine) 和别隐品碱 (Allocryptine) 的高产系。

紫草细胞能产生萘醌色素紫草素。Tabata 等<sup>[14]</sup>在从紫草实生苗建立的 45 个培养系中,通过不断重复筛选至 22 代时,得到了一个含 50~1200mg/g 鲜重的培养细胞系。他们利用原生质体克隆,发现在 48 个系中有 15 个系产生的紫草素比亲本高,最高含量比亲本高 2 倍。Fujita 等<sup>[15]</sup>已利用所获得的细胞系进行大量商品化生产紫草素。

当产物具荧光特征时,用目视法筛选就不需培养物本身颜色来体现。Sasse 等<sup>[16]</sup>用 UV- 灯筛选骆驼蓬的愈伤组织,通过不断的荧光斑点法筛选,获得了哈尔满生物碱比亲本高 10 倍的细胞系。具荧光的细胞也可用荧光显微镜来分析。Deus 和 Zenk 等<sup>[17]</sup>利用此法从长春花细胞中分离具有高荧光浓度的克隆,荧光主要是由蛇根碱产生的,已建立了一个含量为 400mg/L 蛇根碱的细胞系,并认为此方法比 RIA 法更有效,因为几乎所有的细胞系都不受什么限制地得到筛选。

最近,Ellis 等<sup>[18]</sup>用显微分光光度法根据

细胞内某成分的吸收波长,从建立的很多 *Anchusa officinalis* 的单细胞克隆中分析了他们合成酚类的 ability。发现各克隆系产生的迷迭香酸能力不一致,并发现细胞系中迷迭香酸浓度与诱导条件无关,因而认为是变异细胞系。

## (2) 间接的分析筛选方法

与直接分析法相反,间接分析法必须分析细胞提取液来揭示一个细胞系的合成能力。用作检查的克隆不得分成培养继代部分和化学分析部分。由于要从大量的细胞系中进行筛选,因此,必须建立一种快速分析克隆的简单技术,并且要求在少量的组织样品中能够进行。化学分析法是非常麻烦和费力的工作,只有抱着坚定的信心和忍耐的精神才会成功。

一种粗糙的但快速的间接分析法是“细胞压榨法”“Cell squash method”<sup>[19]</sup>。Ogino 等把少量烟草愈伤组织样品放于滤纸上并用两块玻璃板压榨,细胞汁液被滤纸吸收,然后用 Dragendorff 试剂喷雾,从颜色反应中可以半定量地估计样品中尼古丁的含量,用此法测定了 1000 个克隆,在进行两次再克隆后,分离到了 5 个高产系,产量达 2.5% 干重,这些细胞系极为稳定并能保持 1 年以上。但此技术只适用于积累较多产物的细胞,对含量微的细胞就不适用了。

到目前为止,放射免疫分析法 (RIA 法) 可认为是最敏感和最精确的方法,它可以从无数微量细胞样品中迅速地定量测定特殊的成分。Zenk 等<sup>[20]</sup>首次建立和使用半自动 RIA 技术,对长春花细胞产生有用生物碱和高产系进行了精细的研究,从分批培养中的单细胞和小细胞团获得的 160 个克隆中的蛇根碱含量从 0~1.4% 不等;阿吗碱含量从 0~0.8% 不等。他们成功分离的高产克隆在液体生产培养基中生物碱总量达 1.3% 干重,比原植物高 1.5 倍。此法仅需 0.1ml 的粗提液 (单细胞水平) 即可,每天能处理 200 个样品,并且其特异性极高。

除此之外,利用 RIA 法还成功地测定毛地黄细胞中强心甙含量<sup>[20]</sup>;金鸡纳树组织中合成奎宁的能力<sup>[21]</sup>和忍冬科某些培养物转化马钱子甙为次生马钱子甙的能力<sup>[22]</sup>。由于建立一种 RIA 法需要至少 1 年时间,因此目前该技术还未得到充分应用。

利用酶标免疫法 (ELIA) 亦取得同 RIA 法一样灵敏的结果。Kanaoka 等已经建立了测定甘草苦质酸 (glycyrrhetic acid) 的 ELIA 法<sup>[23]</sup>。Robins 等<sup>[24]</sup>利用此法测定了 Quassia amara、Q. indica 和苦木植株及培养物中苦木素分布情况,并指出此法能检测低至每 0.1ml 样品仅有 5pg 的物质。

Ellis 等<sup>[25]</sup>报道了两种吸引人的分析方法。他认为 GC-MS 结合方法可以达到与 RIA 法同样灵敏水平的结果,而且不限制在利用 RIA 法中只能检查一种单一的高度专性的化学品的问题。另一方法是“电细胞分类法”“Electronic cell-sorting”或者一种相方法“流动血球计数法”“Flow cytometry”。这种方法可从细胞群中迅速筛选高产细胞。培养物的细胞能通过分类器 (sorter) 并使细胞所含某成分的荧光在所设计的波长下加强。由于此方法仅需小的唯一的细胞单位作为筛选目标,因此认为原生质体是最适合的供试材料。1983 年 Brown<sup>[26]</sup>利用 Flow cytometry 法分析长春花原生质体的蛇根碱,他认为可以通过每秒分类 1000 个细胞的高速率来筛选高含量蛇根碱的亚细胞群体。Melamed<sup>[27]</sup>对此方法的技术和应用作了详细描述。

由于电细胞分类法对细胞无任何副作用,并能直接从选择的细胞中建立,因此,正越来越受到人们的重视。

用过的其他方法包括 Tam 等<sup>[28]</sup>利用 TLC 鉴别罂粟中可待因的高产细胞系。Matsumoto<sup>[29]</sup>和 Macek 等<sup>[30]</sup>利用 HPLC 分别测定了烟草和澳洲茄中泛醌-10 和茄解定的高产细胞系及 Nishi 等利用生物试法从黄槿中筛选出高产小檗碱 (267 $\mu$ g/g 鲜重) 细胞系<sup>[31]</sup>。

利用抗性筛选有时也会获得高产细胞系。如很多植物细胞能利用庚二酸 (Pimelic acid) 和丙氨酸合成生物素。但高浓度的庚二酸对细胞有很大毒性。Watanabe 等<sup>[32]</sup>利用抗性筛选法,在悬浮培养中加入不同浓度的庚二酸,经过不断筛选,产生了能抗庚二酸毒性的细胞系。在薰衣草 (Lavandula vera) 细胞中获得了含量为 0.9  $\mu$ g/g 鲜重的高产生物素细胞系并比亲本的高 15 倍,比叶中的高 10 倍。Deus-Neumann 和 Zenk<sup>[33]</sup>利用长春花细胞对 5-甲基色氨酸的抗性筛选也得到了产量为 565mg/L 蛇根碱和阿吗碱的高产系。

对选择出的高产系的内部生化机理的变化了解甚少,但可以肯定高产系中生物合成过程中的一个或几个酶的活性加强了。如在高产桂皮烯醛基腐胺并抗 PFP 的烟草细胞系 TX-4 中,其中的 PAL-trans-cinnamate-4-hydroxylase-4-香豆酸 COA 连接酶、鸟氨酸脱羧酶和精氨酸脱羧酶的活性比低产系高 3~10 倍<sup>[34]</sup>。其他的研究中也发现了酶活性的增加。因此,对变异系中产物生物合成过程中酶活性的进一步研究就为能分离过量生产有产物的变异系提供基础。

### 三 具有高产性能的突变体的产生和选择

突变是 DNA 一级结构的永久性可遗传的变异而导致基因型的改变。它与普通的变异是有区别的。

原理上,利用单倍体细胞作为诱导突变体的材料是最合适的。但通常的培养细胞多为双倍体或多倍体,因此,要获得高产性能特别是指定产物的突变体就比较困难。迄今为止,对所获得的很多表型变异体还不能肯定是不是突变体,就有必要对这类问题加强基础研究。

目前,应用各种化学的和物理的诱变处理,已在不少培养细胞中获得所需性状的突变体,有些突变体表现出了良好的生产能

力。Nishi 等用化学诱变剂 N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍处理胡萝卜的细胞获得了很多变异克隆,他们在合成 $\beta$ -胡萝卜素和番茄红素上各不相同,这些克隆的胡萝卜素含量比原来的细胞系高3倍,比原植物根增加4倍<sup>[35]</sup>。Furuya 等<sup>[36]</sup>用亚硝基胍和 r-射线处理人参愈伤组织,得到了一个含粗皂甙 25.5%的突变体(对照为 21.1%)。郑光植等<sup>[37]</sup>利用  $4\text{KRh}^{-1}$  的  $^{60}\text{Co}$ -r 射线照射三分三愈伤组织,诱导出的一个愈伤组织突变系其东莨菪碱含量为 0.177mg/g 干重,比亲本高 30% 且很稳定。Watanabe 等利用  $^{60}\text{Co}$ -r 射线( $10\text{KRh}^{-1}$ )照射薰衣草细胞也获得了含量为 0.425 $\mu\text{g/g}$  鲜重生物素的细胞系,并比亲本高 7 倍<sup>[32]</sup>。利用  $^{137}\text{Cs}$ -x 射线照射长春花细胞也获得一个含量达 2% 干重蛇根碱的突变系(对照为 0.12% 干重)<sup>[38]</sup>。因此,随着对产物合成途径的调控水平及酶水平知识的积累,利用诱变剂诱导高产目的化合物的突变体是很有潜力的。

#### 四 高产细胞系的稳定性及保存

细胞高产量生产次级产物的稳定性可分为二种类型。一类是能够多年稳产、高产的。如海巴戟的悬浮培养系保存了十二年以上仍保持蒽醌生产能力不变<sup>[39]</sup>。这类细胞通常是一开始就具有高产量,不必经克隆技术进行再筛选就能稳定多年。另一类如长春花等细胞其高产性是不稳定的,这些大多是经反复克隆而获得的高产细胞系。造成高产系不稳定的原因还不很清楚,很可能是因为在培养过程中植物细胞染色体的数目或组型发生改变<sup>[40]</sup>,部分原因可能是在继代过程中培养成分的微小变化造成产物的不稳定<sup>[1]</sup>。

高产细胞系的不稳定性是阻碍向工业化生产的一个极大的问题,因此必须寻找解决的方法。目前解决的方法主要有以下三种:

(1)、从高产系中再不断克隆形成新的高产细胞系;

(2)、高产系出现不可逆的退化时,干脆重新开始筛选;

(3)、尽量减少继代次数,因此可用矿物油包埋法、低温保存法( $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ )和冰冻保存法( $-196^{\circ}\text{C}$ )。除此之外,在继代时应严格遵守一种已定的方案,任何偏离都会使产生的代谢物在质和量上发生显著变化。

冰冻保存法在保存植物细胞的研究中已经得到越来越广泛的使用,所保存的植物细胞已经证明有能力恢复其生物合成产物的能力<sup>[41,42]</sup>。

#### 参考文献

- [1] Dix PH; Plant Cell Culture Technology (Yeoman, M. M. ed.), Blackwell Scientific Publications 1986,143-201
- [2] Kurz W G W; CRC Critical Reviews in Biotechnol 1985,2: 105
- [3] Kubek, D. J. 等; Can J Bot 1978, 56: 2521-2527
- [4] Jocelyne Tremouillaux-Guiller 等; Plant Cell Reports 1987,6: 375-378
- [5] Miyasaka H 等; Phytochem. 1987, 26: 1421~1424
- [6] Berlin J 等; Adv in Biochem Eng/ Biotechnol 1985, vol 31: 59-88
- [7] Yamamoto Y 等; Theor Appl Genet 1982,61: 113
- [8] Yamakawa T 等; Plant Tissue Culture 1982, Proc. 5th. Int. Cong Plant tissue and Cell Culture (Fujiwara, A. ed.), Tokyo 1982,27
- [9] Kinnersley A M 等; Planta 1980, 149: 200
- [10] Van der Berg A J J 等; J. Nat. Prod. 1987,50: 940-943
- [11] Sato F 等; Phytochem. 1984,23: 282-28
- [12] Bariaud-Fontanel A 等; Plant Cell Rep. 1988,7: 206
- [13] Koblitz H 等; Experientia 1975,31: 768
- [14] Mizukami H 等; Phytochem 1978,17: 95
- [15] Curtin M E; Biotechnology 1983,10: 649
- [16] Sasse F 等; Plant Physiol 1982,69: 400

(下接第 48 页)