

红花细胞克隆的平板培养

周 平 郑 光 植

(中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204)

摘 要

在红花 (*Cathamus tinctorius*) 细胞克隆的平板培养中很多因素都能影响其植板率, 如培养基的 pH 值, 无机盐中的 NH_4NO_3 、 ZnSO_4 、 MnSO_4 ; 有机酸中的柠檬酸、琥珀酸、苹果酸及延胡索酸, 谷氨酰胺和精氨酸, 葡萄糖, 椰乳和水解乳蛋白等。向培养基中加入 10mg/l 柠檬酸或 3mg/l 琥珀酸能显著提高植板率。适量的人参寡糖及黑节草寡糖应用对促进红花细胞克隆生长取得很好效果。常规的高压灭菌最不利于细胞生长, 在 15 磅/cm² 灭菌 5 分钟效果较好, 过滤灭菌效果最好。

关键词 红花; 细胞克隆; 平板培养; 植板率

PLATE CULTURE OF CELL CLONE FROM *CATHAMUS TINCTORIUS*

Zhou Ping and Zheng Guang-zhi

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

Abstract

Many factors could influence the plating efficiency of cell clone from *Cathamus tinctorius*. These factors include NH_4NO_3 , ZnSO_4 , MnSO_4 , citric acid, fumaric acid, malic acid, succinate acid, arginine, glutamine and glucose, coconut milk, lactalbumin hydrolysate and pH value in the medium. The plating efficiency could be intensively increased when supplemented with 10 mg/l citric acid or 3 mg/l succinate acid. A significant increase of plating efficiency can be obtained when the oligosaccharides of *Panax ginseng* and *Dendrobium candidum* were added to the medium. Different sterilization methods could obviously affect plating efficiency. The normal autoclaving was not favorable for the growth of cells. A better plating efficiency was obtained when the sterilization time was shortened to 5 min, at 15 lbs/cm². The best method for the growth of cells was filtering sterilization.

Key words *Cathamus tinctorius*; Cell clone; Plate culture; Plating efficiency

本文于 1988 年 9 月收到, 1988 年 12 月收到修改稿。

本文得到王世林同志的帮助并提供人参寡糖和黑节草寡糖。甘炳远同志赠送了红花茎愈伤组织。在此一并致谢。

用细胞克隆技术培养出的克隆系是同源细胞系,具有筛选效率高、筛选出的优良细胞系稳定性高、筛选量大、操作简便等优点^[3]。因而许多研究者把它作为探索遗传、变异、代谢、生长、分化以及生物合成等问题的重要工具。国际上用细胞克隆技术筛选高产次级代谢物细胞系的研究十分活跃,并已获得大量成果^[3,9,14-16]。而我国在这方面的研究尚未见报道。

材 料 和 方 法

将悬浮培养第二代的红花细胞悬浮培养物经 250 μm 孔径尼龙网过滤,或再经 76 μm 孔径尼龙网第二次过滤(凡不特别指明,均为一次过滤)。收集滤液,使得较分散的细胞。2次过滤所得的单细胞占 86.7%,2—3个细胞的细胞团占 10%,4—8个细胞的细胞团只占 3.4%。然后将滤液在 1000 转/分离心 5 分钟,用吸管吸去上清液,沉淀细胞在 35—40 $^{\circ}\text{C}$ 下与培养基混合。取 8ml 这样的混合液均匀铺在 5 个 3.5cm 直径的培养皿中。待培养基凝固后,用 parafilm 膜封好培养皿,于 26 $^{\circ}\text{C}$ 左右培养。植板率(PE 下同)是每毫升培养基中出现的可见克隆数与接种时活细胞数之比的百分数。每一实验处理为 5 个重复,P 值均小于 0.01,故这 5 个重复的植板率的平均值为该处理的植板率。每一实验又重复一次。

红花细胞平板培养的基本培养基是在 Kao 等(1977)^[7]的基础上修改而成,即去掉维生素 A、D₃、B₁₂,对氨基苯甲酸、玉米素及丙酮酸钠。补充琥珀酸和 KT,改变下列化合物的用量:蔗糖 25mg/l,延胡索酸 5mg/l,苹果酸 5mg/l。红花细胞的悬浮培养基与平板培养基类似,去掉了所有的有机酸。

每一试验均为单因子对比实验。如调培养基组分仅改变组分或组分含量。

实 验 结 果

(一) 培养基不同灭菌处理对植板率的影响

将培养基分别用过滤灭菌,常规高压灭菌及 15 磅/cm² 下灭菌 5 分钟处理,发现过滤灭菌对红花细胞生长最为有利,常规高压灭菌后的培养基几乎使红花细胞不能生长成可见克隆;15 磅/cm² 5 分钟灭菌处理虽不如过滤灭菌对细胞生长有利,但比常规高压灭菌更适宜一些(表 1)。因而在做以下的实验处理时,采用了 15 磅/cm² 下灭菌 5 分钟的方法灭菌。这一方法的灭菌效果几乎与常规高压灭菌效果一样,很少有污染出现。

表 1 不同灭菌处理方法对植板率的影响

Table 1 The influence of sterilized methods on plating efficiency

灭菌方法 sterilized methods	植板率 PE(%)
过滤灭菌 Filter	18.0
高压灭菌,15 磅/cm ² , 5 分钟 Autoclave, 15 lbs/cm ² , 5mins	1.7
高压灭菌, 15 磅/cm ² , 15分钟 Autoclave, 15 lbs/cm ² , 15mins	0.0

(二) 培养基 pH 值对植板率的影响

培养基的 pH 值对细胞克隆生长的影响很大(图 1)。当 pH 低到 4.9 时, 未见克隆形成, 当 pH 高于 5.5 以上时, 植板率很快下降。培养基对红花细胞生长的最适 pH 为 5.5。

(三) 无机盐对植板率的影响

改变培养基中微量元素 MnSO_4 、 ZnSO_4 以及大量元素 NH_4NO_3 的浓度, 发现三者在不同的浓度下相应的植板率不同。当培养基中 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 的浓度为 20mg/l 时, 其植板率达到最高值, 高于或低于这一浓度, 植板率均下降(图 2)。 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对克隆生长的最适浓度为 1.0mg/l (图 2)。 NH_4NO_3 的加入抑制克隆生长, 不加 NH_4NO_3 植板率最高, 为 18.3%。随着 NH_4NO_3 浓度的增加, 植板率下降(图 2)。

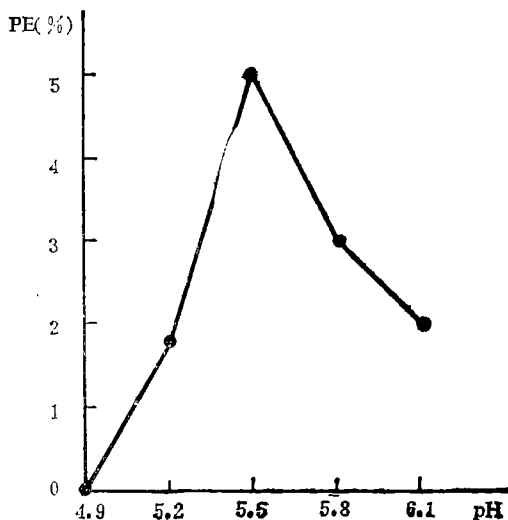


图 1 pH 值对植板率的影响

Fig.1 The influence of pH on PE

(四) 葡萄糖对克隆生长的影响

红花细胞经过二次过滤处理后, 在只含蔗糖做碳源的 B 培养基中也能生长, 但加入一定量葡萄糖后, 植板率提高(图 3)。葡萄糖对克隆生长的最适用量为 10g/l 。

(五) 两种氨基酸对克隆生长的影响

谷氨酰胺和精氨酸对红花细胞克隆生长是有影响的(图 4)。当谷氨酰胺和精氨酸浓度为 0.5mol/l 时, 植板率比不加这两种氨基酸的对照有所增加, 但两者浓度大于 0.5mol/l 时, 则表现出对红花细胞生长的抑制作用。

(六) 有机酸对克隆生长的影响

从图 5 中可以看出, 柠檬酸和琥珀酸对红花细胞克隆生长的影响较大。当培养基中不加这两种有机酸时, 几乎未见克隆形成, 当培养基中加入 10mg/l 柠檬酸或 3mg/l 琥珀酸时, 植板率达到相应处理的最高值。但当琥珀酸浓度大于 5mg/l 时, 便不利于克隆生长, 植板率下降到几乎为 0。

(七) 复合添加物对克隆生长的影响

当向培养基中加入 $20-40\text{mg/l}$ 椰乳时, 对克隆生长有促进作用, 但当浓度大于 40mg/l 时则抑制克隆生长(图 6)。

向培养基中加入水解乳蛋白时, 植板率有较明显的提高。水解乳蛋白对红花克隆生长的最适浓度为 60mg/l 。

(八) 两种寡糖对红花细胞生长的影响

不同浓度的人参寡聚糖和黑节草寡聚糖都显著提高了红花细胞克隆的植板率(图 7)。

通过以上对最初采用的培养基^[6]的 pH 值、大量及微量元素、碳及氮源、氨基及有机

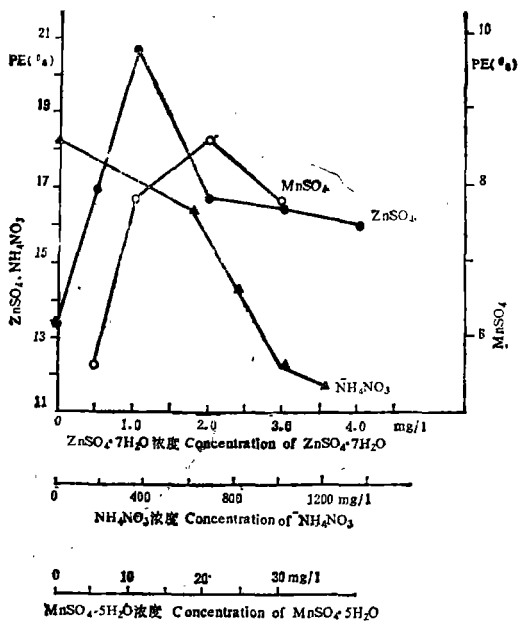


图2 $MnSO_4$ 、 $ZnSO_4$ 和 NH_4NO_3 浓度对植板率的影响

Fig. 2 The influence of $MnSO_4$, $ZnSO_4$ and NH_4NO_3 concentration on PE

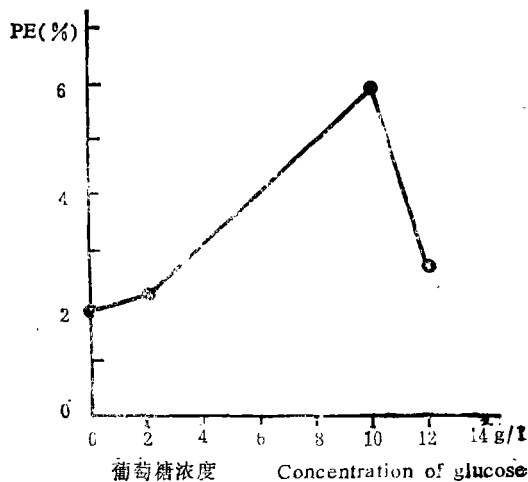


图3 葡萄糖对植板率的影响
Fig. 3 The influence of glucose on PE

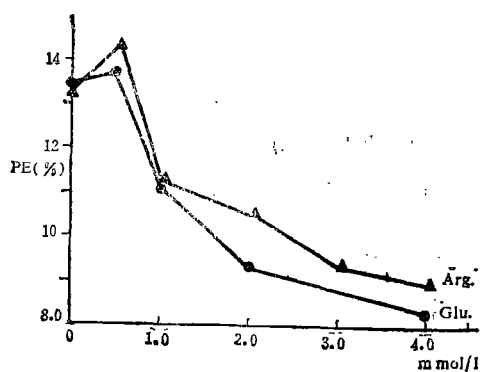


图4 氨基酸对植板率的影响

Glu. 谷氨酰胺 Arg. 精氨酸
Fig. 4 The influence of amino acid on PE
Glu. glutamine Arg. arginine

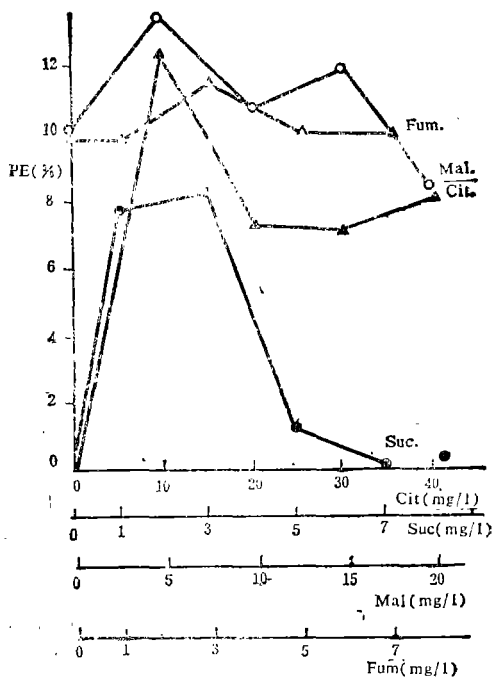


图5 有机酸对植板率的影响

Cit. 柠檬酸 Suc. 琥珀酸 Fum. 延虎索酸
Mal. 苹果酸
Fig. 5 The influence of organic acid on PE
Cit. Citric acid Suc. Succinate acid Fum. Fumalic acid Mal. Malic acid

表 2 平板培养基 C
Table 2 Plate medium C

a) 矿质盐

Mineral salts (mg/l)

KNO ₃	1900.0	Na ₂ -EDTA	37.30	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1.00
CaCl ₂ · 2H ₂ O	600.0	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.80	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
MgSO ₄ · 7H ₂ O	300.0	Ki	0.75	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
KH ₂ PO ₄	170.0	H ₃ BO ₃	3.00	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
KCl	300.0	MnSO ₄ · 5H ₂ O	20.00		

b) 维生素

Vitamins (mg/l)

肌醇		泛酸钙		核黄素	
inositol	100.0	D-Calcium		riboflavin	0.1
		pantothenate	0.5		
烟酰胺		生物素		抗坏血酸	
nicotinamide	1.0	biotin	0.005	ascorbic acid	1.0
吡哆醇		氯化胆碱		叶酸	
pyridoxine HCl	1.0	choline		folic acid	0.2
		chloride	0.5		
盐酸硫胺盐					
thiamine HCl	10.0				

c) 有机酸

Organic acid (mg/l)

柠檬酸		琥珀酸	
citric acid	10.0	succinate acid	3.0

d) 糖

Sugar (g/l)

蔗糖		人参寡糖	
sucrose	25.0	oligosaccharide of <i>P. anax notoginseng</i>	0.002
葡萄糖		黑节草寡糖	
glucose	10.0	oligosaccharide of <i>D. endrobium candidum</i>	0.003

e) 激素

Hormones (mg/l)

2,4-D	2.0	NAA	0.5	KT	0.3
水解乳蛋白					
lactalbumin hydrolysate (mg/l)		60.0		agar (g/l)	3.0
pH	5.5				

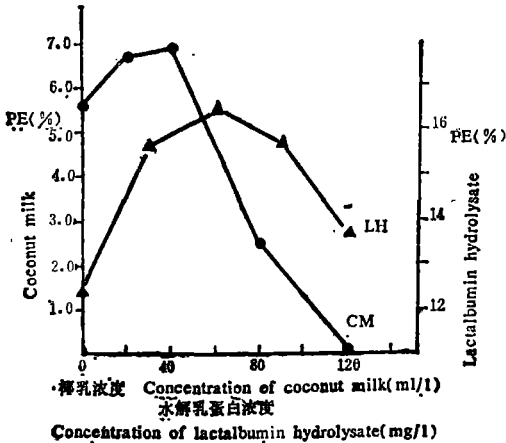


图 6 添加物对植板率的影响

CM. 椰乳 LH. 水解乳蛋白

Fig. 6 The influence of additives on PE

CM. Coconut milk LH. Lactalbumin hydrolysate

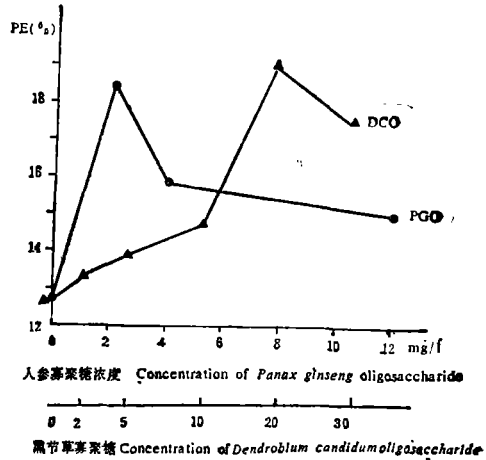


图 7 寡糖浓度对植板率的影响

DCO. 黑节草寡聚糖 PGO 人参寡聚糖

Fig. 7 The influence of oligosaccharides concentration on PE

DCO. *Dendrobium candidum* oligosaccharides PGO. *Panax ginseng* oligosaccharide

酸、复合添加剂等进行了调整,形成了适合红花细胞克隆生长的培养基 C (表 2)。在培养基 C 上红花细胞克隆的植板率为 30% 左右。

讨 论

我们曾做过离析酶处理和密度梯度离心实验,结果与尼龙网过滤法所得的分散细胞无甚差别,因而选用尼龙网过滤法。本文所报道的植板率均为培养 4 周时的植板率,因此时各处理间的差别较之后期明显。若延长培养时间,植板率还会提高。

平板培养由于其方法简便,一次能处理大量细胞,又便于镜检细胞生长分裂情况,因而成为细胞克隆研究中应用普遍的方法。但普通平板培养的植板率不高^[4,8],因此必须对培养基作大量调整。如铵态氮对红花细胞生长有较强抑制作用,只有加入谷氨酰胺或精氨酸形式的还原态氮源时才有促进生长作用。这与 Nesius 等 (1972)^[8] 及 Ohira 等 (1973)^[10] 的结果相似,但与 Caboche (1980)^[2] 的结果相反。向培养基中加入适宜浓度的硫酸锌、葡萄糖、氨基酸、有机酸及复合添加剂对红花细胞克隆生长是十分重要的,特别是其中的柠檬酸和琥珀酸。学者们认为植物培养细胞能通过胞膜将其有机物流失到培养基中,导致细胞不能继续正常分裂生长^[6,7,11-13]。向培养基中补充某些有机物,就会减少细胞中这些物质的流失,本研究中有有机物的影响十分明显。

在植物组织培养中应用寡糖是近年来的事^[15]。细胞克隆培养中应用寡糖还未见报道。本文选用的两种寡糖对红花细胞克隆生长和提高植板率都很显著。但由于所用的寡糖是几种寡糖的混合体,故要确切了解是哪一种或哪几种寡糖在起作用、起多大作用还需进一步研究。

培养基的灭菌方法对植板率的影响相当大, 常规高压灭菌非常不利于细胞生长。过滤灭菌不仅繁琐、污染率高而且不适于固体平板培养。通过实验, 高压 (15 磅) 灭菌 5 分钟为简便、污染少的适用方法。

参 考 文 献

- [1] Bergmann, L., 1960: Growth and division of single cells of higher plants *in vitro*. *J. Gen. Physiol.*, 43: 841—51.
- [2] Caboche, M., 1980: Nutritional requirements of protoplast-derived, haploid tobacco cells grown at low cell densities in liquid medium. *Planta*, 149: 7—18.
- [3] Fujita, Y., S. Takashi and Y. Yamada, 1985: Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplast culture of *Lithospermum erythrorhizon* cells. *Agric. Biol. Chem.*, 49(6): 1755—59.
- [4] Gibbs, J. and D. K. Dougall, 1965: The growth of single cells from *Nicotiana tobacum* callus tissue in nutrient medium containing agar. *Exp. cell Res.*, 40: 85—95.
- [5] Funk, C., K. Guegler and P. Brodelius, 1987: Increased secondary product formation in plant cell suspension cultures after treatment with a yeast carbohydrate preparation (elicitor). *Phytochemistry*, 26(2): 401—05.
- [6] Ham, R. G., 1973: Dilution plating and nutritional considerations. A. Animal cells. In: *Tissue Culture Methods and Applications*, pp. 254—261, Acad. Press, New York.
- [7] Kao, K. N., 1977: Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean *Nicotiana glauca*. *Molec. Gen. Genet.*, 150: 225—30.
- [8] Nesius, K. K., L. E. Uchytel and Y. S. Fletcher, 1972: Minimal organic medium for suspension culture of Paul's scarlet rose. *Planta*, 106: 173—176.
- [9] Nishi, A., A. Yoshida, M. Mori and N. Sugano, 1974: Isolation of variant carrot cell lines with altered pigmentation. *Phytochemistry*, 13: 1653—56.
- [10] Ohira, K., K. Ojima and A. Fujiwara, 1973: Studies on the nutrition of rice cell culture I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant and cell Physiol.*, 14: 1113—21.
- [11] Sanford, K. K., W. R. Earle and G. D. Likely, 1948: The growth *in vitro* of single isolated tissue cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 9: 229—46.
- [12] Sergeant, P. A. and J. King, 1974: Investigations of growth-promoting factors in conditioned soybean root cells and in the liquid medium in which they grow: ammonium, glutamine, and amino acids. *Can. J. Bot.*, 52: 1747—55.
- [13] Stuart, R. and H. E. Street, 1971: Studies on the growth in culture of plant cells. X. Further studies on the conditioning of culture media by suspensions of *Acer pseudoplatanus* L. cell. *J. Exp. Bot.*, 22: 96—106.
- [14] Sata, F. and Y. Yamada, 1984: High berberine-producing cultures of *Coptis japonica* cells. *phytochemistry* 23(2): 281—85.
- [15] Tabata, M. and N. Hiraoka, 1976: Variation of alkaloid production in *Nicotiana rustica* callus cultures. *Physiol. Plant.*, 36: 19—23.
- [16] Yamada, Y. and K. Watanabe, 1980: Selection of high vitamin B₆ producing strains in cultured green cells. *Agric. Biol. Chem.*, 44(11): 2683—2687.