

## 甘草悬浮细胞的玻璃化法超低温保存研究

余露, 杨英, 李硕, 付春华, 余龙江\*

(华中科技大学生命科学与技术学院, 资源生物学与生物技术研究所, 武汉 430074)

**摘要:** 以甘草悬浮细胞为材料, 进行了超低温保存技术的研究。高产黄酮的甘草悬浮细胞是一种极具价值但又难于保存的材料, 为解决甘草细胞超低温保存中存在的 key 问题, 即如何减少渗透压的突然改变对细胞造成损伤, 通过优化预培养时间、细胞年龄、预处理时间、脱水时间、洗涤液蔗糖浓度等影响因素, 建立了一套适合于甘草悬浮细胞的保存方法。采用改良的 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法检测, 此法存活率可达 82.9%。将保存后的细胞进行恢复培养, 其恢复生长率可达 80.4%。

**关键词:** 甘草; 悬浮细胞; 玻璃化; 超低温保存

**中图分类号:** Q943.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-470X(2007)05-0462-05

## Studies on the Cryopreservation of Suspension Culture Cell in *Glycyrrhiza inflata* Batal by Vitrification Approach

YU Lu, YANG Ying, LI Shuo, FU Chun-Hua, YU Long-Jiang\*

(Institute of Resource Biology and Biotechnology, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** A procedure had been developed for cryopreservation of *Glycyrrhiza inflata* Batal suspension cultures by vitrification. High flavonoid-yield *G. inflata* Batal suspension cultures are valuable materials but hard to be preserved. The key point of this research is how to reduce the damage of cell caused by the sharp change of pressure. So setting up a suitable method must depend on various important factors such as the duration of regrowth, the harvest time, the duration of dehydration, the sucrose concentration of washing solution, etc. Survival rate of *G. inflata* Batal suspension culture cell was 82.9% by TTC examination, and regeneration rate reached to 80.4%.

**Key words:** Liquorice (*Glycyrrhiza inflata* Batal); Suspension culture cell; Vitrification; Cryopreservation

甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Batal) 享有“中药之王”的美誉, 近年来, 人们大量的采挖导致甘草资源的极度匮乏<sup>[1]</sup>。采用植物细胞大规模培养等现代生物技术方法, 科学利用甘草资源日益显示出优越性, 可以不受季节、地点限制, 因而日益受到人们重视。但悬浮细胞的继代培养具有一定的变异性<sup>[2]</sup>, 每次传代都有可能导致甘草有效成分含量下降, 这使细胞大规模培养应用受到阻碍, 因此, 需要减少传代次数。将细胞系进行种质保存在一定程度上能够减少传代次数, 缓解细胞系的快速变异。

目前, 植物种质资源长期稳定保存的最好方法是液氮超低温保存法<sup>[3]</sup>。液氮环境下, 活细胞内的物质代谢和生长活动几乎完全停止, 而 20 世纪 80 年代才发展起来的玻璃化法是最简便易行的方

法之一<sup>[4,5]</sup>。该法在保存过程中整个系统快速降温使得植物材料中的液态水以玻璃化的形式存在, 玻璃态的物质结构与组分可长期不变, 因而可长期保存。与传统的方法相比, 玻璃化法不需要昂贵的程序降温仪, 操作简单且重复性好。1989 年 Langis 等<sup>[6]</sup>和 Uragami<sup>[7]</sup>相继证实了玻璃化法冻存植物材料的可行性。

已有一些研究者根据不同植物材料之间的遗传特性差异, 优化冷冻条件, 成功地保存了柑桔茎尖、欧柑愈伤组织细胞等一百多种材料<sup>[8-12]</sup>, 但目前尚未见到有关甘草种质保存的相关报道。我们以如何减少渗透压的突然改变对细胞造成损伤为研究重点, 优化预培养时间、细胞年龄、预处理时间、脱水时间、洗涤液蔗糖浓度等影响因素, 以期建立起甘草悬

收稿日期: 2007-02-13, 修回日期: 2007-04-30。

作者简介: 余露 (1984 -), 女, 硕士, 研究方向为中药生物技术。

\* 通讯作者 (E-mail: yulongjiang@mail.hust.edu.cn)。

浮细胞的超低温保存体系,为长期稳定保存高产甘草细胞提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

胀果甘草 (*Glycyrrhiza inflata* Batal) 悬浮细胞 (由本实验室诱导), 采用改良 MS 液体培养基悬浮培养, 其中 6-BA 0.5 mg/L、NAA 0.5 mg/L、2,4-D 0.5 mg/L, 蔗糖 30 g/L, pH 6.0, 培养温度 (25 ± 2) °C, 连续光照 16 h/d, 光照强度 2000 lx。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 细胞的保存

预培养: 取不同年龄的悬浮细胞 (分别培养 6、10、14、18、22、26 d) 为实验材料, 转至含有 60 g/L 蔗糖的改良 MS 液体培养基上, 预培养不同天数 (0、1、2、3、4、5、6 d), 分别比较细胞的年龄及不同预培养时间对超低温保存后悬浮细胞存活率的影响。

预处理: 将预培养后的悬浮细胞取出, 在 25% 玻璃化试剂 PVS2 中处理不同时间 (0、5、10、15、20 min)。PVS2 的成分参照 Sakai 等的配方<sup>[13]</sup>。

脱水处理: 将 25% PVS2 去除, 加入预冷至 0 °C 的 100% PVS2, 在 0 °C 下脱水不同时间 (0、5、10、15、20 min)。

冷冻: 将脱水后的悬浮细胞分装于 7 mL 冷冻管中, 装入新鲜 100% PVS2, 密度约为 40%, 然后将冷冻管迅速投入液氮中。

化冻: 悬浮细胞在液氮中保存 48 h 后, 取出冷冻管, 37 °C 水浴 60 s 内迅速化冻。

洗涤: 用含有不同蔗糖浓度 (0.4、0.8、1.2、1.6、2.0 mol/L) 无激素 MS 培养液洗涤冻后的悬浮细胞, 室温下洗涤 3 次, 每次 10 min。

#### 1.2.2 细胞存活率的检测

活力测定采用文献<sup>[14]</sup>中报道的改良 2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法。

标准曲线的绘制: 吸取 0.25 mL 0.4% TTC 溶液至 10 mL 容量瓶, 加少许低亚硫酸钠粉末, 摇匀后立即产生红色的三苯基甲唑 (TF)。再用丙酮定容至刻度, 摇匀。然后分别取此液 0.25、0.5、1、1.5、2 mL 置 10 mL 容量瓶中, 用丙酮定容至刻度, 即可得到含 TF 25、50、100、150、200 μg/L 的标准比色系列, 以空白做对照, 485 nm 测吸光度, 绘制标准曲线。以吸光度  $T$  与 TF 浓度  $C$  做回归处理, 得回归方程  $T = 0.0032C - 0.0037$ , 线性相关系数  $r^2 = 0.9998$ 。

脱氢酶活性的测定: 取一定量鲜重细胞, 加入 0.4% TTC 溶液, 37 °C 保温 1 h, 加入少量硫酸以停止反应。将细胞取出, 加丙酮一起磨碎, 以抽提出 TF, 加入离心管, 再倒少量的丙酮将剩余的 TF 全移入试管, 加丙酮定容至 5 mL, 离心。取上清液至 485 nm 分光光度计下比色, 查标线, 测得 TTC 还原量。

脱氢酶的活性 = 还原 TTC (μg) / [反应时间 (h) × 样品总量 (g)]

存活率的计算: 存活率 = 保存后脱氢酶活性 / 保存前脱氢酶活性 × 100%

## 2 结果与分析

### 2.1 甘草悬浮细胞的年龄对存活率的影响

植物细胞的抗冻能力与细胞的分裂和生长活动等各种生理状态有密切关系<sup>[15]</sup>, 我们取不同年龄的甘草悬浮细胞为材料, 考察了悬浮细胞的培养时间对甘草冻后存活率的影响。

从图 1 可以看出, 培养了 4 d 的细胞活性比较低, 用 TTC 法测存活率仅为 59.3%。细胞继续培养, 在第 10 d 时达到一个最高值, 存活率为 79.8%。但是随着细胞年龄的增加, 细胞的存活率呈现一个不断下降的趋势, 原因可能是因为生长了 10 d 细胞处于指数生长期, 这个时期的细胞冻存后保持分裂能力的细胞密度比较大, 并且大部分细胞体积较小、细胞质浓度高、壁较薄、无液泡, 这类细胞比含有液泡、壁厚的细胞更耐冻。

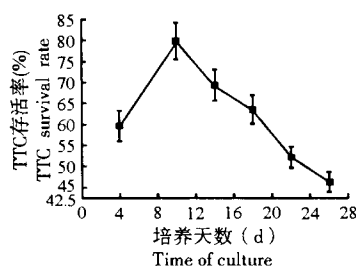


图 1 细胞的不同培养时间对甘草悬浮细胞玻璃化冻存后存活率的影响

Fig. 1 Effects of different time of culture on the survival rate of *Glycyrrhiza inflata* Bat. suspension culture cell cryopreserved by vitrification

### 2.2 预培养时间对甘草悬浮细胞存活率的影响

预培养的目的是提高分裂细胞的比例, 减少细胞内自由水含量, 增强细胞对低温的抗性。常用的预培养方法有高渗处理和低温锻炼等<sup>[16]</sup>。我们采用高渗处理, 即将悬浮培养的甘草细胞在含有

60 g/L蔗糖的改良 MS 培养基上悬浮培养数天,以减少细胞内的含水量,达到提高存活率的目的。

从图2可看出,没有经过预培养的悬浮细胞,细胞活性非常低,恢复生长的状态也很差,存活率仅为22.6%,而经过含有60 g/L蔗糖的改良 MS 培养基培养后,悬浮细胞的存活率有所上升,培养2 d时的效果最好,存活率为79.8%,随着预培养时间的增加,存活率有所降低,原因可能是因为渗透压过大,不利于悬浮细胞的生长,导致冻后细胞活性的下降。

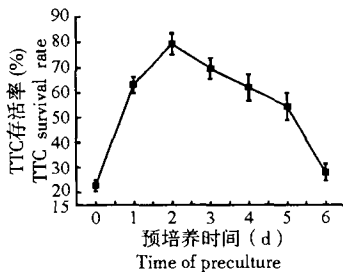


图2 不同预培养时间对甘草悬浮细胞玻璃化冻存后存活率的影响

Fig. 2 Effects of different time of preculture on the survival rate of *G. inflata* Bat. suspension culture cell cryopreserved by vitrification

### 2.3 预处理时间对悬浮细胞存活率的影响

为了进一步降低悬浮细胞含水量,在玻璃化脱水处理前还需要采用一个过渡性的预处理阶段。预处理的作用是增加保护性成分向细胞渗入,减缓细胞在脱水时的损伤,有利于提高冻后存活率<sup>[17]</sup>。我们采用25% PVS2对悬浮细胞在室温下进行预处理,比较不同预处理时间对悬浮细胞存活率的影响。

从图3可以看出,甘草悬浮细胞在10 min的预处理中获得较大的存活率,达79.8%。预处理时间少于10 min,由于过渡时间过短而未能完全达到缓冲的作用,材料不易存活;超过10 min,则由于溶液

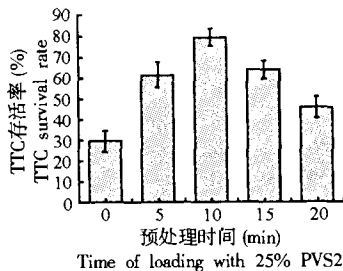


图3 25%玻璃化试剂对甘草悬浮细胞处理不同时间对其冻后存活率的影响

Fig. 3 Effects of different time of loading with 25% PVS2 on the survival rate of *G. inflata* Bat. suspension culture cell cryopreserved by vitrification

对材料的毒害而使成活率又有所下降。因此,10 min的过渡时间最合适。

### 2.4 玻璃化试剂脱水时间对悬浮细胞存活率的影响

100% PVS2处理的目的是脱去材料中过多的水分,使材料能够完全达到玻璃化,并使冷冻保护液渗入细胞,减轻在超低温保存过程中细胞所受到的伤害。脱水时间的长短起着至关重要的作用,实验发现,温度越低PVS2的毒性越小,当处理温度低于0℃时,液泡会形成晶体而对细胞造成损伤,因而最适宜在0℃用PVS2处理。

从图4中可以看出,甘草悬浮细胞在PVS2溶液中脱水处理10~15 min,具有较高的存活率,为79.8%~82.9%,脱水时间少于10 min,则材料的脱水程度不够,在降温过程中不能迅速达到玻璃化的状态,因而不易成活,脱水时间超过15 min,PVS2对材料的化学损伤增加,因而存活率也会有所下降。

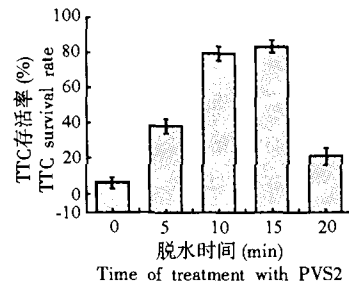


图4 玻璃化冷冻保护剂脱水不同时间对甘草悬浮细胞玻璃化冻存后存活率的影响

Fig. 4 Effects of different time of treatment with PVS2 on the survival rate of *G. inflata* Bat. suspension culture cell cryopreserved by vitrification

### 2.5 洗涤液蔗糖浓度对悬浮细胞存活率的影响

解冻后残留于细胞内外的冰冻保护剂仍对细胞有毒害作用,会影响细胞的恢复和生长<sup>[18]</sup>,因此,必须采用含有一定浓度蔗糖的改良 MS 培养液对细胞进行洗涤。这一过程不但可以除去高含量保护剂对细胞的毒性,而且也是一个以防渗透压的突变对细胞产生损伤的过渡过程。

从图5可以看出,蔗糖浓度以1.2 mol/L为最佳,过高或过低都不利于细胞的恢复。原因可能是因为蔗糖浓度过低,使得清洗液的渗透压过低,细胞由于膨胀而受到伤害,蔗糖浓度过高导致清洗液的渗透压过高,从而使得细胞脱水死亡。

### 2.6 保存后细胞的恢复培养

将经过玻璃化法保存的细胞接种于固体 MS 培养基上,观察其恢复生长的状态,与对照进行比较。

从图6可以看出,保存后恢复生长的细胞与对

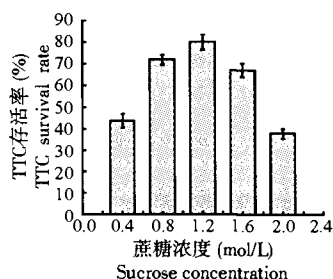


图5 蔗糖浓度对甘草悬浮细胞玻璃化冻存后存活率的影响

Fig. 5 Effects of sucrose concentration on the survival rate of *G. inflata* Bat. suspension culture cell cryopreserved by vitrification

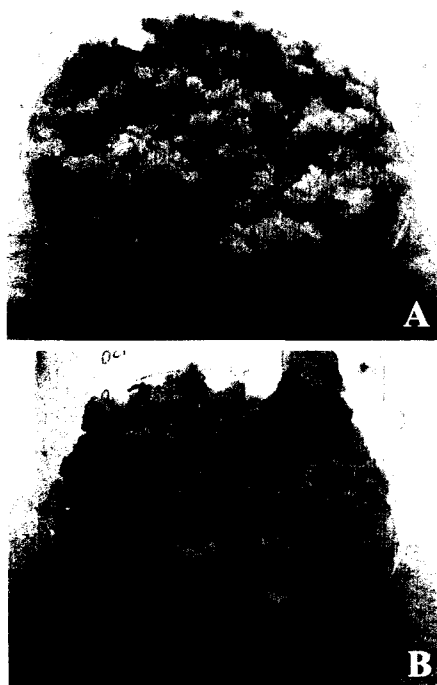


图6 保存前正常生长细胞(A)与保存后恢复生长细胞(B)对照图

Fig. 6 Comparison between normal growing cells(A) prior to cryopreservation and regrowing cells(B) post cryopreservation

照相比在状态上并无明显差异,但存活率要略低于正常生长的细胞,这可能是因为玻璃化保存过程对细胞造成了损伤。

### 3 讨论

细胞的超低温技术保存实际上涉及3个过程:一是细胞的预冻;二是细胞在 $-196^{\circ}\text{C}$ 的环境中长期保存;三是细胞的化冻与再培养。正如前文中提到的,在 $-196^{\circ}\text{C}$ 环境下,活细胞内的物质代谢和生长活动几乎完全停止,所以,活细胞是安全的。如果细胞在保存后有所死伤,那么一定是发生在预处理和

冷冻、化冻的过程中,与保存在液氮里的时间长短没有相关性<sup>[5]</sup>。

玻璃化法进行超低温保存,对实验材料有很高的要求。在预实验中,也尝试用固体培养基上的愈伤组织进行超低温保存,遇到了重复性差的问题,可能是因为生长在固体培养基上的愈伤组织,接触培养基的部分生长充分,而远离培养基的部分生长比较缓慢,使得细胞的生长不均匀。悬浮培养则能解决这个问题,使处于悬浮培养体系的细胞状态均一,是用于玻璃化低温保存材料的好方法。

本文从预培养时间、细胞年龄、预处理时间、脱水时间、洗涤剂中蔗糖的浓度等5个方面对超低温保存甘草悬浮细胞的效果进行了探讨。结果显示,选取10 d龄的甘草悬浮细胞在含有60 g/L蔗糖的MS液体培养基上预培养2 d,室温下25% PVS2预处理10 min,0℃条件下100% PVS2脱水15 min,投入液氮保存,48 h后再37℃水浴迅速化冻,用含有1.2 mol/L蔗糖的MS培养基洗涤3次,每次10 min,采用红氯四氮唑(TTC)法检测,存活率可达82.9%。并且,融化后有活力的细胞并不一定能恢复生长<sup>[14]</sup>,因此,我们在此实验结果的基础上对保存后的细胞进行了恢复培养,其恢复生长率(保存前后细胞干重比)也达到80.4%,进一步验证了用玻璃化法保存甘草细胞是可行的。

### 参考文献:

- [1] 崔国盈,赵桂林,杨启元,祖力皮亚,孙小平,冯立涛,孟林. 新疆甘草资源的分布及其开发利用[J]. 草食家畜,1999,6(2): 40-42.
- [2] Khurshheed A, Malik. A convenient method for maintaining *Chlorella* for long time periods as slow growing liquid cultures[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1996, 27: 151-155.
- [3] Gwo J C, Chiu J Y, Chou C C, Cheng H Y. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) [J]. *Cryobiology*, 2005, 50: 338-343.
- [4] 张继,姚健,丁兰,郭守军,杨永利. 甘草的利用研究进展[J]. 草原与草坪, 2000, 9(2): 12-17.
- [5] 李广武,郑从义,唐兵主编. 低温生物学[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1998. 33, 319-324.
- [6] Langis R, Schnabel B, Earle E D, Steponkus P L. Cryopreservation of *Brassica campestris* L. cell suspensions by vitrification[J]. *Cryoletters*, 1989, 10: 421-428.
- [7] Uragami A, Sakai A, Naqai M, Takahashi T. Survival of cultured cells and somatic embryos of *Asparagus officinalis* cryopreserved by vitrification[J]. *Plant Cell Reports*, 1989, 8: 418-421.
- [8] 王子成,邓秀新. 玻璃化超低温保存柑桔茎尖及植株再生[J]. 园艺学报, 2001, 28(4): 301-306.
- [9] 王子成,邓秀新. 柑桔原生质体的超低温保存[J]. 河南大学

- 学报,2002,32(3):38-40.
- [10] 陈勇. 铁皮石斛原生质体的玻璃化超低温保存[J]. 温州师范学院学报,2000,21(3):40-42.
- [11] 周小梅,王国英,敖光明,赵云云. 玉米组培材料的玻璃化法超低温保存及冻后植株再生[J]. 农业生物技术学报,2001,9(4):355-358.
- [12] 陈勇,陈娴婷,王君晖. 欧柑愈伤组织的玻璃化法超低温保存[J]. 浙江大学学报(理学版),2004,31(2):197-201.
- [13] Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tananka) by vitrification[J]. *Plant Cell Reports*, 1990, 146:489-496.
- [14] 沈业寿,卫青,张峻岭. 美味侧耳子实体组织的细胞活力[J]. 中国食用菌,1995,14(6):33-35.
- [15] 陈品良. 植物组织培养的超低温保存[J]. 武汉植物学研究, 1989,7(4):390-398.
- [16] 苗琦,谷运红,王卫东,秦广雍. 植物组织培养物的超低温保存[J]. 植物生理学通讯,2005,41(3):350-354.
- [17] 王君晖,郑泳,严庆丰,颜秋生,张雪琴,黄纯农. 水稻胚性悬浮细胞的玻璃化法超低温保存和可育植株再生[J]. 科学通报,1996,41(22):2081-2084.
- [18] 陈书安,王晓东,赵兵,王玉春. 水母雪莲愈伤组织超低温保存条件的初探[J]. 过程工程学报,2002,2(6):539-543.

## 欢迎订阅《长江流域资源与环境》杂志

《长江流域资源与环境》杂志由中国科学院资源环境科学与技术局和中国科学院武汉文献情报中心联合主办,科学出版社出版,是目前全国唯一一份专门研究长江流域各种资源的开发利用保护与生态环境建设的综合性学术刊物。本刊是全国中文核心期刊要目总览、中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、中国科学引文数据库(CSCD)、中文社会科学引文索引(CSSCI)、中国人文社会科学核心期刊要览等检索系统的来源刊物,同时收录本刊的还包括美国“化学文摘(CA)”、俄罗斯“文摘杂志(PЖ)”、美国剑桥科学文摘(CSA)、日本科学技术文献数据库(JICST)以及其他十多种国内外检索刊物。

本刊立足长江流域,面向国内外,围绕流域资源与生态环境重大问题,报道最新的科学研究成果及工作经验,介绍国内外江河流域开发整治和环境保护的最新成就。主要栏目有:资源环境与社会经济可持续发展;自然资源;农业发展;生态环境;自然灾害;学术讨论·决策建议;动态信息等。对广大从事农业、林业、气象、能源、水利、土地管理、旅游、经济、人口、生物、地理等学科部门的科技人员、决策与管理人员、高等院校师生都很有参考价值。

本刊为双月刊,大16开本,每期160页,全年定价180元(含邮费);国内外公开发行。国内统一刊号:CN 42-1320/X,国内邮发代号:38-311,国外发行:42-1320Q。如有漏订者,可直接汇款到编辑部补订。银行汇款:户名:中国科学院武汉文献情报中心;账号:42001237053050001480;开户银行:建行科学院支行;《长江流域资源与环境》杂志网站:<http://yangtzebasin.whlib.ac.cn>;编辑部地址:武汉市武昌小洪山西区25号;邮政编码:430071;电话:(027)87198181,传真:(027)87198181;电子信箱:[bjb@mail.whlib.ac.cn](mailto:bjb@mail.whlib.ac.cn)