

九连小檗悬浮培养细胞生理生化特性的研究

Ⅲ. 药根碱累积与细胞生长的关系*

侯嵩生 李新明 尚廷兰 吴玉兰 李洪林

(中国科学院武汉植物研究所, 武汉 430074)

提 要 本文叙述了九连小檗植物细胞悬浮培养过程中, 药根碱的累积和细胞生长与培养液中可溶性糖转化的关系。实验表明细胞培养过程中培养液的可溶性糖逐渐消耗, 细胞生物量和药根碱量都逐渐增加, 且细胞生长与药根碱累积的曲线几乎是平行的。然细胞生长速度较快, 其生长速率曲线的峰形较尖锐。药根碱累积速度较慢, 延续时间较长, 其累积速率曲线的峰形较平缓。根据糖的消耗与细胞生物量增长和药根碱累积的关系, 计算出蔗糖——细胞转化率为59%, 蔗糖——药根碱转化率为3.3%。

关键词 九连小檗; 药根碱累积; 细胞生长; 蔗糖转化率

引 言

植物细胞培养与次生物质代谢研究中, 细胞生长与次生物质累积之间的关系, 反映了初生代谢与次生代谢之间的关系, 牵涉到生物量与化学量之间的调控问题, 因而吸引了许多研究者的兴趣。Yeoman等^[6,12]从许多研究结果中发现, 次生产物的大量累积, 发生在细胞生长速率降低或培养物存在结构分化的情况下。而当细胞迅速生长时, 累积很少的次生产物, 因此细胞生长与产物累积存在矛盾的关系。Tabata^[8]根据大量实验资料, 把细胞生长与产物形成的关系归纳为三种主要类型, 并可通过各种因素的变化来调控细胞生长与次生产物的形成。Fujita等^[4]应用二步培养法使紫草宁的产量大幅度提高。因此, 研究细胞生长与次生产物累积的关系, 对于指导生产, 提高产量, 了解初生代谢与次生代谢的关系及代谢的调节均有重要的意义。我们应用九连小檗细胞培养技术进行药根碱生产的研究中, 已将部分结果作了报道^[1,2,3], 本文介绍细胞生长与药根碱累积和培养液中蔗糖转化的关系。

材 料 和 方 法

细胞培养 取经过35次继代培养的九连小檗 *Berberis julianae* Schneid 悬浮培养细胞为材料, 采用 MS 基本培养基, 补加2%蔗糖及1mg/l NAA和0.1mg/l 6-BA, 在

本文于1988年4月5日收到。

*承武汉市药品检验所杨仲元、李芳同志协助进行药根碱的HPLC分析, 特此致谢!

250ml 锥瓶中盛 100ml 液体培养基, 每瓶接种约 5g 细胞鲜重, 振荡速度 100-110rpm, 在温度为 20—22℃, 无光照条件下进行培养, 每隔 2 天取样进行各种指标测定, 具体方法如下:

细胞干重的测定 减压滤取 悬浮培养细胞, 用蒸馏水冲洗数次, 抽干后置于 60℃ 烘箱中烘干称重。

可溶性糖的测定 按蒽酮比色法^[11], 根据细胞培养不同时期培养液中含糖量情况, 进行适当稀释, 取 100ml 样液, 加 5ml 蒽酮试剂, 摇匀后煮沸 10 分钟, 取出后立即冷却, 用 7520 型分光光度计在 λ 620nm 处测定吸光值。以蔗糖作标准曲线。

药根碱的定量测定 称取适量干细胞, 在索氏抽提器中以甲醇抽提, 回流 8 小时, 将抽提液浓缩后定容至 5ml, 然后进行 HPLC 测定。采用国产组装液相色谱仪, 柱: Nucleosil 10C₁₈(12号), 柱温: 20℃, 流动相: 30% 乙腈 (含 0.02M H₃PO₄), 流速: 0.5ml/分 (100kg/cm²压力), 检测器: 346nm, 0.08AUFS。以已知药根碱作对照, 用外标法计算结果。

结果和讨论

实验结果见图 1、图 2 和表 1。图 1 表示九连小檗细胞悬浮培养过程中, 细胞生长与药根碱累积和培养液中可溶性糖之间转化的关系。当细胞接种于以蔗糖为碳源的新鲜培养液中进行培养时, 培养液中蔗糖含量迅速降低, 2 天后便不能检测出蔗糖的存在,

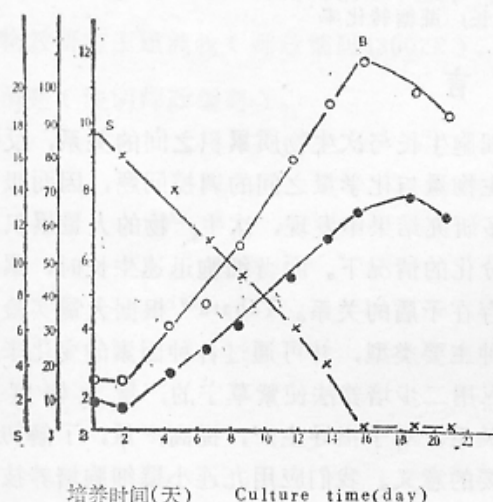


图 1 九连小檗细胞悬浮培养过程中药根碱的累积与细胞生长和可溶性糖消耗的关系

Fig. 1 Relationship between cell growth and jatropha alkaloid accumulation, as well as soluble sugars consumption during the suspension culture of *B. julianae* schneid cells

—●—●— 药根碱含量 contents of jatropha alkaloid mg/l
—○—○— 细胞干重 cell dry weight g/l
—×—×— 可溶性糖含量 contents of soluble sugars g/l

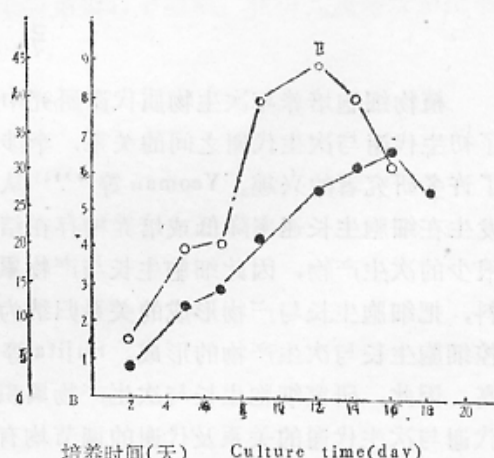


图 2 九连小檗细胞悬浮培养过程中细胞生长和药根碱累积速度的动态

fig. 2 Time course of cell growth rate and jatropha alkaloid accumulation rate during the suspension culture of *B. julianae* Schneid cells

—●—●— 药根碱含量 contents of jatropha alkaloid mg/l/day
—○—○— 细胞干重 cell dry weight g/l/day

虽然此时细胞生长还处在延迟期, 细胞并未迅速生长。根据 Ueda^[10], Maretek^[7]等的研究认为, 这是由于在位于细胞壁上的酸性转化酶的作用下, 蔗糖迅速水解为葡萄糖和果糖, 并以此形式逐渐进入细胞内而被氧化或用于合成高分子物质, 故培养液中的可溶性糖主要是由蔗糖水解后产生的葡萄糖和果糖。随着培养液中可溶性糖的消耗, 细胞生

表 1 九连小檗细胞悬浮培养中细胞生长和药根碱累积的实验结果

Table 1 Experimental results for cell growth and jatrorrhizine accumulation during the suspension culture of *Berberis julianae* Schneid cells

蔗 糖 浓 度	最高生物量 及到达的 时 间	细胞生长最高 速率及到达的 时 间	最高药根碱量 及到达的时间	药根碱累积 的最高速率 及到达的时间	蔗糖——细胞 转化率	蔗糖—— 药根碱 转化率
Sucrose con- centr- ation	Maximum Biomass yield and arrival time	Maximum rate of cell growth and arrival time	Maximum yield of jatrorrhizine and arrival time	Maximum rate of jatrorrhizine accumulation and arrival time	Sucrose—— cell conversion	Sucrose—— jatrorrhizine conversion
%	g/l	g/l/day	mg/l	mg/l/day	%	%
2	11.8g/l 第16天	0.87g/l/day 第12天	660mg/l 第19天	31.96mg/l/day 第16天	59	3.3

物量和药根碱量也逐渐增加。细胞生物量达到最高产量的时间在第 16 天, 药根碱累积达到最高产量时间为第 19 天, 较前者延迟 3 天。从图 1 所示细胞生长与药根碱累积的曲线几乎是平行的, 这与 Tabata 所概括的细胞生长与产物形成的关系中的第一种类型, 与烟草细胞培养中细胞生长和烟碱形成的曲线相类似^[8]。从可溶性糖的消耗与细胞干重和药根碱累积的关系中可以计算出, 消耗 1 克蔗糖, 便可转化为 0.59 克细胞 (干重), 蔗糖——细胞转化率为 59%, 消耗 1 克蔗糖, 可以得到药根碱 33mg, 蔗糖——药根碱的转化率为 3.3%。这个数字表示了这个细胞株和培养体系的物质转化效率, 可作为生产中经济核算的重要参数。通常, 蔗糖转化率的高低与植物种类、细胞株系及培养条件等因素有关。Fowler^[6]认为, 植物细胞培养中蔗糖转化率一般在 50%, 也有达到 70% 的记录。我们采用的九连小檗细胞和培养体系, 蔗糖转化率为 59%, 说明这个体系的转化效率还是比较高的。

图 2 表示九连小檗细胞悬浮培养过程中细胞生长和药根碱累积速率的动态, 可以看出细胞生长速度较快, 在第 12 天便出现细胞生长速率的高峰, 随之便迅速减慢和停止, 故细胞生长速率曲线的峰形较尖锐。药根碱的累积速度较慢, 延续时间较长, 在第 16 天才出现药根碱累积速率的高峰, 故其累积速率曲线的峰形较平缓。在第 12 天后, 细胞生长速度已经减慢或停止, 培养液中糖的浓度已很低。在第 16 天后, 培养液中已不能检测出可溶性糖的存在, 但药根碱的累积却仍在继续进行, 直至第 19 天才达到药根碱的最高产量, 表明细胞生长与药根碱累积有不一致的地方。可能在细胞生长减慢或停止时, 用于建造细胞的物质和能量消耗减少, 或是由于后期营养不足, 导致代谢

方向的改变,有利于次生物质的形成。

细胞生长与次生物质形成的关系,反映了初生代谢与次生代谢之间复杂的关系,它们相互联系,又相互制约。Yeoman等^(11,12)认为苯丙氨酸是处在初生与次生代谢交叉路口的化合物,它可用于合成蛋白质,也可参与一系列多酚化合物的形成。当细胞迅速生长时,标记的苯丙氨酸主要渗入到蛋白质中;当细胞停止生长和开始分化时,标记苯丙氨酸主要渗入到多酚化合物中。由此说明细胞生长和次生物质形成存在着对前体的竞争,并与细胞的生长状态紧密相关。当细胞生长减慢或停止时,可能通向次生代谢的“阀门”更加敞开,由初生代谢转向以次生代谢占优势,这种转变,可能是培养过程中基因依次表达的变化,或是培养条件的变化引起基因表达的变化。由此设想可能通过控制各种因素的变化来实现由初生代谢向次生代谢的转变与调节。如在一定的时期加入适当的前体或采用生长阻滞剂、蛋白质合成抑制剂,或改变营养条件和激素的种类、浓度与组合等各种方法,限制或减慢细胞生长和分裂,以诱导次生物质的积累,达到增加次生物质产量的目的。前述 Fujita 应用二步培养法提高紫草素的产量,便是很好的例证。当然,这个问题是复杂的,它与植物的种类、产物的特性、细胞株系、培养条件等各种因素有关。但对它的深入研究和了解,无疑将对次生物质代谢的调控和稳产高产都有重要的意义。

参 考 文 献

- 1 侯嵩生,李新明,吴玉兰等.植物学报,1988; 30(1): 62—65
- 2 侯嵩生,李新明,尚延兰等.武汉植物学研究,1988; 6(2): 129—132
- 3 侯嵩生,李新明,尚延兰等.武汉植物学研究,1988; 6(4): 391—394
- 4 Fujita Y, Tabata M, Nishi A, Yamada Y. In Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, Maruzen, Tokyo, 1982; 399—400
- 5 Fowler M M, J. Chew Tech Biotechnol, 1982; 32: 338—346
- 6 Lindsey K, Yeoman M M. J EXP Botany, 1983; 34(145): 1055—1065
- 7 Mareteki A, Thom M, Nickell L G. In Tissue Culture and Plant Science (Ed. Street H E) Academic Press, London, 1974; 329—361
- 8 Tabata M, Yamamoto H, Hiraoka N, Marumoto Y, Konoshima M. Phytochemistry, 1971; 10(4): 723—729
- 9 Tabata M. In Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application (Ed. Barz W, Reinhard E, Zenk M H) 1977; 3—66 Berlin Heidelberg and New York: Springer-Verlag
- 10 Ueda Y, Ishiyama M, Fukui M, Nishi A. Phytochemistry, 1974; 13(2): 383—387
- 11 Van Handel E. Analytical Biochemistry, 1968; 22: 280—283
- 12 Yeoman M. British Society for Cell Biology Symposium 4 (Ed. Yeoman M M, Truman D E S) Cambridge University Press, 1982

STUDIES ON PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTER IN SUSPENSION CULTURE OF BERBERIS JULIANAE SCHNEID

III. Relationship between jatrorrhizine accumulation and cell Growth

Hou Songsheng, Li Xipmin, Shang Tinglan,
Wu Yulan, Li Honglin

(Wuhan Institute of Botany, Academia Sinica, Wuhan 430074)

Abstract The relationship between cell growth and jatrorrhizine accumulation during the suspension culture of *Berberis julianae* Schneid cells was reported. In the *B. julianae* cell suspension culture the cell growth (dry weight per liter) increased gradually and reached a maximum in 16th day. The alkaloid content of the cells increased nearly in parallel with cell growth curve, and reached a maximum in 19th day, and then tended to decrease. The cell growth rate (g/l/day) and alkaloid formation rate (mg/l/day) in suspension culture of *B. julianae* cells are little difference. The rate of cell growth is quicker than that of alkaloid formation. The peak pattern of cell growth rate is sharper, it reached to peak on 12th day. The rate of alkaloid formation increased slowly and reached to peak on 16th day, it's peak form is showed much gently. When the cell growth decreased or ceased, the alkaloid formation is still proceeding. So that the time to peak of alkaloid formation rate is delayed 4 days. Based on the sugar consumption and cell growth the percentage of sucrose conversion was calculated by 59%.

Key words *Berberis julianae* Schneid, Jatrorrhizine accumulation, cell growth, Sucrose conversion