

高产黄酮苷银杏悬浮培养细胞系选育和继代培养稳定性研究

刘佳佳^{1*} 郭 勇² 郑穗平² 张明浩¹

(中南大学化学化工学院 长沙 410083) (华南理工大学食品与生物工程学院 广州 510641)

关键词 黄酮苷、悬浮细胞系、继代培养、稳定性

中图分类号 Q942.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)01-0094-04

银杏叶中主要有效成分黄酮苷和萜内酯,具有多种药理作用,银杏叶提取物(EGB)及其加工品具有广阔的市场前景^[1,2]。为满足市场需要,Carrier等^[3]在90年代初就开始细胞培养生产黄酮苷和萜内酯的研究。细胞大规模培养生产黄酮苷的关键技术之一是选育性状稳定、生产能力强的细胞系。EGB的药理研究表明,它能使实验动物减少缺氧缺血造成的损害,抗脂质过氧化和清除氧自由基^[1,2],因此在缺氧胁迫条件下,合成黄酮苷能力强的细胞系,其对抗缺氧胁迫的能力越强。基于这一原理,从97年开始,我们开始进行本项研究,并已取得良好进展。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

诱导愈伤组织的外植体来自银杏优良品种桐子果(Ginkgo. biloba culti. Tongziguo)梅核1号(Ginkgo. biloba culti. Meihe)小佛手(Ginkgo. biloba culti. Xiaofushou)实生苗当年生根、茎、叶接种于含3%蔗糖、1%琼脂、3.0mg/L的2,4-D,0.5mg/L KT的MS培养基上,于恒温培养箱中25℃、黑暗条件下诱导,30d后转入继代培养基上进行继代培养。

1.2 培养基的考察

选择MS、B₅、SH、White 4种常用培养基,考察其对银杏愈伤组织生长和黄酮苷合成的影响,每种培养基添加3%的蔗糖、1%琼脂、3.0mg/L的2,4-D,0.4mg/L的KT,于25℃恒温培养箱中,每天24h光照培养,18d继代1次,从第5代开始连续测定3代愈伤组织的生长指数、状态、黄酮苷含量。

1.3 胁迫法选育高产黄酮苷悬浮培养细胞系

选育流程如下:已6次继代的愈伤组织转入加玻璃珠的MS液体培养基培养5d,捞出并转入MS固体培养基,每瓶植板20个左右的小细胞团,培养10d,然后加玻璃纸密封培养5d后挑出存活的细胞团转入新的MS固体培养基进行增

殖培养,继代3次后,转入MS液体培养基培养,继代4次后形成分散性良好的银杏悬浮培养细胞系。测黄酮苷含量与愈伤组织中的含量进行比较。

1.4 愈伤组织和细胞生长参数的测定

以干重为生长指标,结果为5个平行试样的平均值,增长指数=(收获细胞量-接种细胞量)/接种细胞量。

1.5 HPLC测黄酮苷含量

取2g左右的银杏干燥细胞,用50%的乙醇抽提2次,共1h,定容至100mL,取抽提液20mL,蒸发去掉其中的乙醇,加25%的HCl 2mL,水浴回流1h,冷却后用甲醇定容至100mL,以槲皮素为标样,用外标法计算样品中黄酮苷含量。测定条件参照文献[4], Waters高效液相色谱仪、U-Bondapak C₁₈柱、481紫外可见光检测器,灵敏度0.05AUF,流动相甲醇:水=6:4,流速0.7mL/min,检测波长370nm。3种水解苷元均以槲皮素为对照,黄酮苷含量=(槲皮素含量+山奈酚含量+异鼠李素)*2.5^[5]。

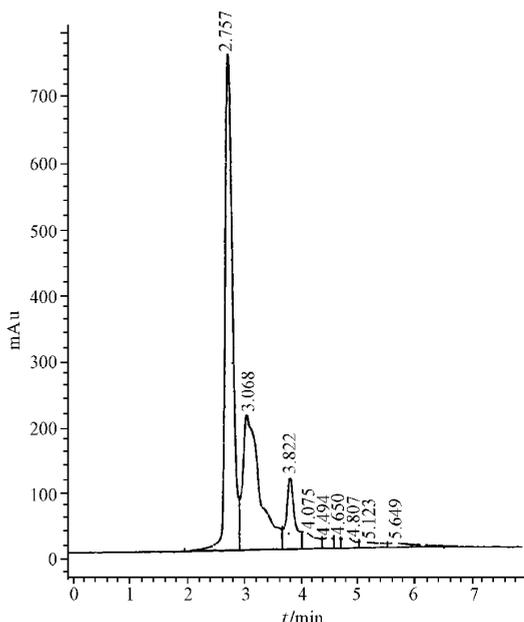


图1 银杏细胞提取液黄酮苷色谱图

Fig. 1 Chromatogram of flavone in cell extract

2.757 槲皮素 3.068 山奈酚 3.822 异鼠李素

收稿日期 2000-05-22,修回日期 2000-08-29。

基金项目 广东自然科学基金(990865)和中南工业大学基金资助项目。

* 通讯作者。Tel 86-731-8830465; Fax 86-731-8879616

2 结果与讨论

2.1 外植体来源对愈伤组织诱导和生长状态的影响

银杏 3 个品种实生苗的当年生根、茎、叶接种于附加 3mg/L 2,4-D 和 0.5mg/L KT 的 MS 培养基上,诱导愈伤组织后,分别在 MS 培养基上继代 5 次,愈伤组织的诱导效果和生长状态如表 1。外植体的来源影响愈伤组织的诱导和生长状态。叶片的愈伤组织诱导率低。愈伤组织结构较松软、黄白色、生长缓慢,从第 5 代开始生长势转弱,开始出现黑色坏死。根、茎的愈伤组织诱导率高,愈伤组织结构较致

密,生长速度快于叶片诱导的愈伤组织,生长势不因继代次数的增加而下降。幼茎诱导的愈伤组织黄绿色、根诱导的愈伤组织黄白色。

2.2 培养基对愈伤组织生长和黄酮苷含量的影响

由于叶片诱导的愈伤组织长势弱,因此只选择根茎诱导的愈伤组织分别接种在 MS、B₅、White、SH 培养基上,连续继代 5 次,每次周期 18d,结果如表 2,培养基的不同影响愈伤组织的生长和黄酮苷的合成,White 培养基不利于愈伤组织的生长,愈伤组织结块变硬,生长缓慢,但能促进黄酮苷的合成;MS 培养基利于形成分散性良好,结构松软的愈伤组织,

表 1 外植体种类对银杏愈伤组织诱导和生长状态的影响

Table 1 The comparison of callus induction and growth state with different explant of *Ginkgo biloba*

Cultivar	Explant	Callus induction/%	Growth and quality of calli
TZG	Leaf	50.0	White and yellow/soft/after 6 subcultures callus decline
	Stem	82.3	Green and yellow/harder/every subculture callus normal
	Root	79.7	White and yellow/harder/every subculture callus normal
Meihe	Leaf	45.2	White and yellow/soft/after 6 subcultures callus decline
	Stem	76.7	Green and yellow/harder/every subculture callus normal
	Root	75.4	White and yellow/harder/every subculture callus normal
XFSH	Leaf	57.4	White and yellow/soft/after 6 subcultures callus decline
	Stem	85.2	Green and yellow/harder/every subculture callus normal
	Root	82.3	White and yellow/harder/every subculture callus normal

TZG :Tongzigou , XFSH :Xiaofushou

表 2 培养基和外植体来源对愈伤组织生长和黄酮苷含量的影响

Table 2 Effects of media kind and explants on the growth and flavonol glycoside formation

Media	Cultivar	Explant	Growth index	GCV/(s/x)	FG content/%	CCV/(s/x)
MS	TZG	Stem	3.51	0.11	0.35	0.12
		Root	3.11	0.07	0.31	0.10
	Meihe	Stem	3.05	0.15	0.43	0.07
		Root	2.86	0.14	0.28	0.05
	XFSH	Stem	3.08	0.08	0.36	0.15
		Root	3.26	0.13	0.33	0.05
B ₅	TZG	Stem	3.36	0.08	0.48	0.06
		Root	2.86	0.14	0.31	0.11
	Meihe	Stem	2.83	0.12	0.37	0.07
		Root	3.06	0.07	0.30	0.05
	XFSH	Stem	3.16	0.14	0.50	0.12
		Root	3.01	0.13	0.37	0.14
SH	TZG	Stem	3.20	0.11	0.42	0.15
		Root	2.95	0.09	0.35	0.12
	Meihe	Stem	3.02	0.13	0.42	0.07
		Root	2.78	0.06	0.35	0.12
	XFSH	Stem	2.86	0.14	0.41	0.10
		Root	2.56	0.12	0.38	0.15
White	TZG	Stem	1.85	0.07	0.58	0.11
		Root	1.63	0.12	0.45	0.05
	Meihe	Stem	1.55	0.04	0.51	0.08
		Root	1.68	0.06	0.43	0.10
	XFSH	Stem	1.64	0.04	0.61	0.14
		Root	1.73	0.08	0.56	0.11

CV :variation coefficient = s/x ,FG :flavonol glycoside

但黄酮苷的含量最低, B₅、SH 培养基上愈伤组织生长较快, 但结构较致密, 分散性不好, 但对黄酮苷的合成有利, 这种培养基对愈伤组织生长和黄酮苷合成的影响不因愈伤组织的来源而有显著差异。不同来源的愈伤组织其生长速度和黄酮苷含量有差异, 来源于根的愈伤组织中黄酮苷含量低于来源于茎的愈伤组织, 不同品种间愈伤组织的生长速度和黄酮苷含量有差异。愈伤组织在继代过程中其生长速度和黄酮苷含量不稳定, 变异系数为 0.04~0.15, 愈伤组织在生长特性、黄酮苷合成的差异及在继代过程中的不稳定性有利于选择出生长速度快, 黄酮苷含量高的悬浮细胞系。这是因为外植体细胞在诱导培养条件下脱分化形成具有分生能力的薄壁细胞, 在这个过程中容易产生突变细胞, 而且这些薄壁细胞在适应培养环境的过程中基因表达的不稳定, 也会发生

基因突变。通过定向增加选择压既能提高突变的发生率, 又能保存适应选择压的细胞系。

2.3 悬浮培养细胞系的生长特性和黄酮苷合成能力比较

由于幼根诱导的愈伤组织黄酮苷合成能力低于幼茎诱导的愈伤组织, 而在 B₅、White、SH 培养基上连续继代培养的愈伤组织结构致密, 分散性差, 不能用于选育悬浮细胞系, 因此选择在 MS 培养基上继代培养的幼茎诱导的愈伤组织, 按缺氧胁迫小细胞团法选育悬浮培养细胞系, 对选出的细胞系进行 7 代次的扩大和驯化培养, 淘汰生长慢的细胞系, 共选出 6 个细胞系, 其中桐子果 3 个、梅核 2 个、小佛手 1 个, 分别命名为 TZ-1、TZ-2、TZ-3、MH-1、MH-2、XFS-1。它们的生长特性、黄酮苷合成能力如表 3。

选择效益是指选出的悬浮细胞在生长特性和黄酮苷含

表 3 悬浮培养细胞系的生长特性和黄酮苷含量比较

Table 3 The comparison of growth and flavone glycoside content among suspension culture cell system

Content	TZ-1	TZ-2	TZ-3	MH-1	MH-2	XFS-1
Growth index	4.12	3.45	3.28	3.52	3.21	3.18
G. Selection efficiency(%)	17.4	-1.7	-6.6	15.4	5.2	3.2
FG conten(%)	1.25	0.96	1.14	1.21	0.98	1.32
Callus FG conten(%)	0.35	0.35	0.35	0.43	0.43	0.36
FG selection efficiency(%)	257.1	174.3	225.7	181.4	127.9	266.7

G. X Growth index, FG flavonol glycoside

量等方面比原来愈伤组织的提高程度, 定义选择效益(%) = $100 \times (\text{悬浮细胞系值} - \text{愈伤组织值}) / \text{愈伤组织值}$ 。从表 3 看出, 选出的悬浮培养细胞系细胞的生长速度比原来的愈伤组织提高幅度不大, 最好的细胞系 TZ-1 也比原来的愈伤组织提高 17.45%, 但黄酮苷的合成能力显著提高, TZ-1 中的黄酮苷含量在培养周期结束时比原来的愈伤组织提高了 257.1%, 达到细胞干重的 1.25%, 因此缺氧胁迫小细胞团法是一种有效的选育高产黄酮苷细胞系方法。

2.4 银杏细胞系 TZ-1 悬浮培养研究

在选出的银杏细胞系中, TZ-1 的黄酮苷生产能力最强, 在今后的研究中以此为实验材料, TZ-1 生长和黄酮苷积累的动态研究结果如图 1。细胞经过 6d 左右的缓慢生长, 随即生长明显加快, 生物量显著增加, 至 18d 时达到最高, 细胞干重为 16.7g/L, 比接种量增长了 3.77 倍, 随后进入生长静止期, 生物量略有下降。细胞中黄酮苷的含量在整个生长周期的变化趋势和细胞生长趋势相一致, 也分为 3 个时期, 在 18d 时达到最高, 为细胞干重的 1.23%。研究结果表明细胞生长和黄酮苷的合成相耦联。

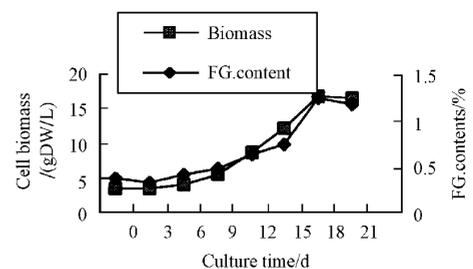


图 2 TZ-1 悬浮培养细胞生长和黄酮苷合成结果

Fig. 2 Kinetics of the cell growth and FG contents in TZ-1 cell suspension culture

2.5 银杏悬浮培养细胞系 TZ-1 在继代培养中稳定性研究

在悬浮培养过程中, 很多植物细胞由于形态分化受到抑制和染色体发生变异, 使目的产物含量降低甚至消失, 如红豆杉中的紫杉醇, 随着继代次数的增加, 紫杉醇的含量迅速降低^[6], 因而建立具有高而稳定的目的产物的细胞系是实现细胞大规模培养生产次生代谢物的关键之一。我们对细胞系 TZ-1 进行了连续 6 代的继代培养, 结果如表 4。在继代

表 4 细胞系 TZ-1 在继代培养过程中的稳定性

Table 4 The property stability of TZ-1 cell during subcultures

Subcultures	1	2	3	4	5	6	X	CV
Growth index	3.97	4.11	3.76	4.28	4.01	3.82	3.99	0.048
FG contents/%	1.32	1.14	1.18	1.28	1.21	1.35	1.25	0.065

培养过程中,细胞的生长指数和黄酮苷含量没有随继代次数的增加而明显下降,其变异系数分别为 0.048 和 0.065,性状表现稳定。在反应器中性状稳定性研究还需进行深入研究。

采用缺氧胁迫法从愈伤组织中选育高产黄酮苷细胞系取得明显效果,选出的细胞系黄酮苷的生产能力比原来的愈伤组织有了显著提高,且性状在继代过程中表现稳定,为今后实现银杏细胞大规模培养生产黄酮苷打下了良好基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] ZHANG K W(张可炜),XU Y T(徐誉泰),CHENG J Y(陈建英). Advance in pharmacologic research of Ginkgo Biloba. Chinese Traditional and herbal Drugs(中草药),1998,29(addition):11~13

[2] Defeudis F V. *Ginkgo biloba* extract(Egb 761) pharmacological activities and clinical applications. Paris :Elsevier, 1991 9

[3] Carrier D J, Cosentino G, Neufeld R *et al*. Nutritional and hormonal requirements of *Ginkgo biloba* embryo-derived callus and suspension cell culture. *Plant Cell Report* 1990 8 635~638

[4] XIE D N(谢大年),GUO Z G(郭兆贵). Analysis and determination of the flavonoids from Ginkgo Biloba Extract by High performance liquid. *Chinese Journal of Chromatography*(色谱), 1994,12(5) 384~385

[5] Hasler A, Sticher O, Meier B *et al*. Identification and Determination of the flavonoids from Ginkgo biloba by higher-performance liquid. *J Chroma*. 1992 605 41~48

[6] WANG H Q(王红强). Producing taxoids with cell suspension culture of *Taxus chensis*, Ph D thesis of East China university of science and technology, 1998, pp. 89~90

Research on the Selecting Suspension Cell Line of Higher Productivity of Flavonol Glycoside by Hypoxia Stress as Well as the Stability in Subcultures

LIU Jia-Jia^{1*} GUO Yong² ZHENG Sui-Ping² ZHANG Ming-Hao¹

¹ College of Chemistry and Chemical Engineering, Central-south University of Technology, Changsha 410082, China

² College of Food Engineering and Biotechnology, South-China University of Technology, Guangzhou 510641, China

Abstract Investigate the influence of culture media to growth and flavonol glycoside synthesis of calli introduced from seedling of *Ginkgo biloba*. 6 cell lines were selected from calli by hypoxia stress. Among these cell lines the best one TZ-1 which growth index was 4.12 and the flavonol glycoside content was 1.25% in dried cell which was enhanced 257.1% compared with callus. The stability in subcultures was investigated: The average content of flavonol glycoside was 1.25% in dried cells and the growth index was 3.99 during 6 subcultures. Which variation coefficient was separately 0.065 and 0.048. The results show that hypoxia stress is a efficient method to select suspension cell line of higher productivity of flavonol glycoside.

Key words flavonol glycoside, suspension cell lines of *Ginkgo biloba* L, stability

Received: May 22, 2000

This work was supported by Grant from Nature Science Fund of Guangdong Province(990865) and Research Fund of Central-south University of technology.

* Corresponding author. Tel 86-731-8830465; Fax 86-731-8879616

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>