

几种营养物质对烟草细胞生长和 CoQ₁₀含量的影响

高向阳 叶国洪 穆虹 徐凤彩

(华南农业大学生物技术学院 广州 510642)

摘 要 研究了蔗糖、KH₂PO₄、NH₄⁺/NO₃⁻ 比对烟草细胞生长和 CoQ₁₀含量的影响。结果表明,当蔗糖浓度为 30g/L 时,CoQ₁₀总量最高,此时细胞产量、CoQ₁₀含量和总量分别为 19.8g/L、414.7μg/g(dwt)、8212μg/L。在上述蔗糖浓度下,当 KH₂PO₄ 起始浓度为 340mg/L、NH₄⁺/NO₃⁻ 为 1:2 时,细胞产量、CoQ₁₀含量和总量分别最高,高于此比例时有利于 CoQ₁₀形成,但不利于细胞生长。

关键词 CoQ₁₀ 烟草细胞 悬浮培养 细胞生长

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0078-04

辅酶 Q₁₀(Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀)是 2,3-二甲氧基-5-甲基-1,4-二苯醌的衍生物,其侧链含有 10 个类异戊二烯基。广泛存在于动物、植物、微生物体中^[1],是大多数动物、植物、微生物呼吸链的重要组成部分,起着传递电子(或氢)的作用。目前 CoQ₁₀ 正广泛用于治疗心脏疾病、细菌、病毒感染的疾病以及用于癌症病人的综合治疗,以改善机体的免疫功能^[2]。自 1974 年 Ikeda 等人^[3]从烟草组培细胞中分离到一种黄色针状物,并证明其为 CoQ₁₀,此后,他及其同事对悬浮培养细胞中 CoQ₁₀形成的化学及物理因子的影响作了进一步的研究,发现在不同培养条件烟草细胞中 CoQ₁₀的含量有较大差异^[4,5]。本实验以悬浮培养的烟草细胞为材料,研究几种营养物质对细胞生长和 CoQ₁₀含量的影响。

1 材料与方法

1.1 烟草愈伤组织的诱导、继代培养和悬浮培养

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种为红花大金元(HHDJY),由广东省经济作物研究所提供。取盆栽幼叶,酒精浸泡、升汞消毒、无菌水冲洗,切成(0.5×0.5)cm²的小块,接种于含 BA 1.5mg/L、NAA 1.0mg/L、蔗糖 3%和琼脂 0.7%的 MS 培养基(pH5.8、高压灭菌)上,诱导形成愈伤组织,经 3~5 次继代后,选择疏松的愈伤组织转入液体培养基培养,摇床转速为 100r/min,28℃黑暗培养 7~8d 后,吸取培养基上部烟草细胞过滤,以此作为悬浮培养

的种子细胞。

1.2 葡萄糖、无机磷及 NH₄⁺ 测定

葡萄糖、无机磷、NH₄⁺ 的测定分别采用 DNS 法、磷钼蓝法、苯酚-次氯酸法。

1.3 CoQ₁₀的提取与测定

CoQ₁₀的提取参考 Barr 等的方法^[6]并加以修改,将烟草细胞与丙酮 1:2(W/V)混合、研磨、过滤,用 0.5 倍体积石油醚(沸程 30~60℃)萃取,即为 CoQ₁₀石油醚油提液。CoQ₁₀的测定参考 Crane^[7]的方法,将 CoQ₁₀石油醚提取液于 60℃水浴蒸干,加入 10mL 无水乙醇溶解,在 275nm 波长下测定其氧化型吸光值(A₁),然后加入 0.1mL 0.7%的硼氢化钠水溶液充分还原并于 275nm 波长下测定还原型 CoQ₁₀的光吸值(A₂),以无水乙醇作对照。按下式计算 CoQ₁₀含量:

$$\text{CoQ}_{10}(\text{g/g dwt}) = (A_1 - A_2) \times n \times 10^6 / (142 \times s)$$

式中:*n* 为稀释倍数,*s* 为细胞干重,142 为 CoQ₁₀的 1%无水乙醇溶液在 275nm 波长下氧化型与还原型吸光值之差。

1.4 细胞干、鲜重的测定

按常规法测定。

2 结果与分析

2.1 蔗糖浓度对烟草细胞生长和 CoQ₁₀含量的影响

2.1.1 不同蔗糖浓度下烟草细胞生长动力学:采用 10、20、30、40、50g/L 蔗糖浓度,进行烟草细胞悬

浮培养,每2天分别测定不同蔗糖浓度下细胞的鲜重,并对培养天数作图(图1),同时计算细胞对数生长期比生长速率(d^{-1})、细胞倍增时间(h)如表1。

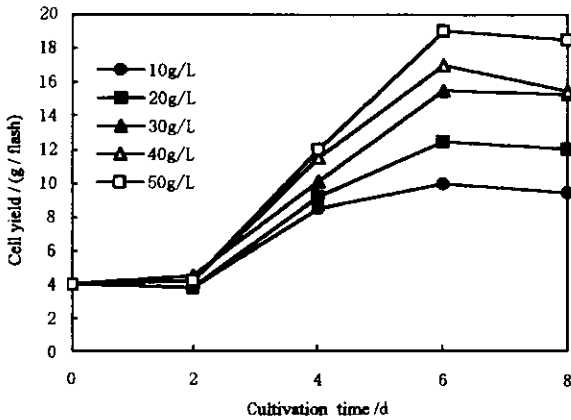


图1 不同蔗糖浓度下的烟草细胞生长曲线

Fig. 1 Growth curve of tobacco suspension cells in different sucrose concentration

表1 不同蔗糖浓度下烟草细胞对数生长期比生长速率、倍增时间

Table 1 Effect of different sucrose concentration on growth rate and time in tobacco cells by suspension culture

Sucrose conc./ (g/L)	Growth rate/ d^{-1}	t/h
10	0.24	69
20	0.23	72
30	0.34	49
40	0.34	49
50	0.39	43

在不同蔗糖浓度下细胞生长均在4d后进入对数生长期(图1),从表1可见,随着蔗糖浓度升高,比生长速率增加,细胞倍增时间缩短;同时随蔗糖浓度的增加,细胞培养过程动力学曲线的“S”形越趋明显(图1)。

2.1.2 蔗糖起始浓度对细胞生物量和 CoQ₁₀含量、总量的影响:分别测定了在5种不同蔗糖浓度下,烟草细胞干重、CoQ₁₀含量、总量,结果如表2所示。

从表2中看出,随着蔗糖浓度升高,所获得的细胞生物量逐步加大,说明在低糖浓度时,糖是细胞生长的限制性基质。但 CoQ₁₀含量的变化与细胞生长情况相反,随着蔗糖浓度的升高 CoQ₁₀含量逐渐降低。比较不同蔗糖浓度对 CoQ₁₀总量的影响表明,蔗糖浓度为30g/L时 CoQ₁₀总量最高。综合比较不同蔗糖浓度对细胞生长、CoQ₁₀含量、CoQ₁₀总量的

影响,以蔗糖浓度为30g/L时 CoQ₁₀总量为最高,因而以蔗糖浓度为30g/L来悬浮培养烟草细胞生产 CoQ₁₀较为合适。

表2 不同蔗糖起始浓度对烟草细胞干重、CoQ₁₀含量、总量的影响

Table 2 Effect of initial sucrose concentration on cell dry weight CoQ₁₀ content and total of CoQ₁₀ in tobacco cell by suspension culture

Initial conc./ (g/L)	Cell dry weight/ (g/L)	CoQ ₁₀ content/ ($\mu g/g$, dwt)	Total of CoQ ₁₀ / ($\mu g/L$)
10	13.20 e	507.0 a	6632 e
20	15.80 d	445.6 b	7092 d
30	19.80 c	414.7 c	8212 a
40	22.04 b	331.1 d	7298 c
50	22.52 a	308.0 e	7552 b

* a, b, c, d, e indicate significant difference at 5% level by SSR.

2.1.3 不同蔗糖浓度下培养基中主要基质的消耗:
a 蔗糖的消耗:对上述5种蔗糖浓度培养基中葡萄糖的变化进行测定,结果(图3)表明,蔗糖起始浓度为10g/L、20g/L的培养2d后,培养基中葡萄糖含量达最高;培养8d后,已检测不出葡萄糖含量,说明此时蔗糖已基本被细胞分解利用了。而蔗糖浓度为30g/L、40g/L、50g/L的悬浮培养液中葡萄糖含量在第4天最高,8d后仍有少量葡萄糖,说明30g/L的蔗糖起始浓度已基本保证烟草细胞整个培养周期的需要。

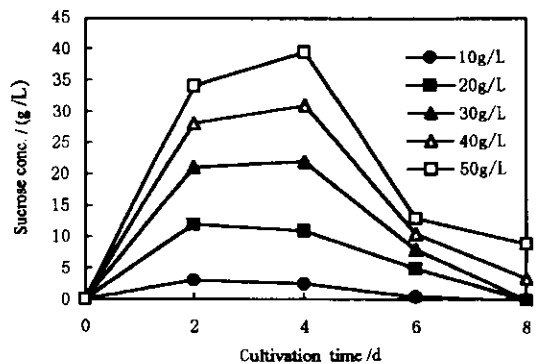


图2 不同蔗糖起始浓度下培养基中葡萄糖随培养时间的变化

Fig. 2 The content of glucose changed with time in different initial sucrose concentration in the medium

b 不同蔗糖起始浓度下烟草细胞对磷的吸收和利用:对上述蔗糖浓度下烟草细胞培养过程中培养基

中磷的变化情况进行测定,结果表明,尽管起始蔗糖浓度不同,但在烟草细胞培养 4d 后,培养基中均测不出磷的含量。提高起始蔗糖浓度有利于细胞对磷的吸收。与烟草细胞生长曲线(图 1)比较发现磷酸根的消耗在细胞进入对数生长期前培养基中磷已被吸收,说明磷的吸收与细胞生长并非同步进行。

c 不同蔗糖起始浓度下烟草细胞对 NH_4^+ 的吸收和利用:对在上述不同蔗糖起始浓度下 NH_4^+ 的吸收和消耗进行测定(结果中未列出),当烟草细胞悬浮培养 2d 后,培养基中已测不出 NH_4^+ ,说明 NH_4^+ 的吸收比磷更快。

2.2 不同磷起始浓度对烟草细胞生长和 CoQ_{10} 含量的影响

2.2.1 不同磷浓度下烟草细胞生长动力学:采用 42.5、85、170、340、510 mg/L 的 KH_2PO_4 为起始磷浓度,每 2 天分别测定烟草细胞生长情况,得到烟草细胞生长动力学曲线(图 3)对数生长期的比生长速率(d^{-1})及细胞倍增时间(表 3)。由图 3 可见,在 5 种不同起始磷浓度下,细胞生长都经历了迟滞期(0~4d)后才进入对数生长期,说明起始磷浓度的高低,并不影响细胞培养周期,但随起始磷浓度的增加,细胞生长曲线的“S”形越趋明显。当磷浓度为 340mg/L 和 510mg/L 时,烟草细胞生长曲线部分重叠,说明当起始磷浓度为 310mg/L 时,已能充分满足细胞生长,但起始磷浓度为 510mg/L 时并未对细胞生长产生抑制。从表 3 中可见,随着起始磷浓度的增加,细胞对数生长期的比生长速率增加,而细胞倍增时间下降。说明培养基中起始磷浓度在 510mg/L 以内,随着起始磷浓度的增加,有利于细胞生长,在其进入对数生长期后,细胞比生长速率升高,倍增时间缩短。

表 3 不同起始磷浓度下细胞对数生长期的比生长速率和倍增时间

Table 3 Effect of different initial P concentration on growth rate and time in tobacco cells by suspension culture

P conc./ (g/L)	Growth rate/(d^{-1})	t/h
42.5	0.24	69.3
85.0	0.28	59.4
170.0	0.35	47.5
340.0	0.36	46.2
510.0	0.37	45.0

2.2.2 磷起始浓度对细胞生物量和 CoQ_{10} 含量、总量的影响:上述磷起始浓度对细胞生物量和 CoQ_{10}

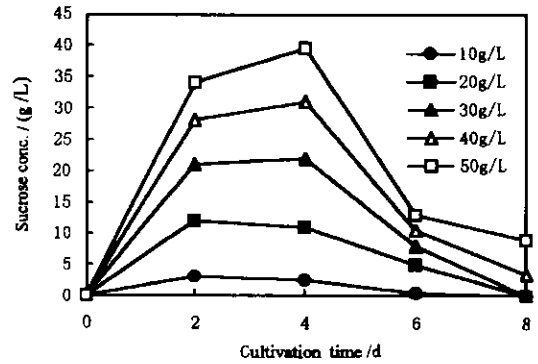


图 3 不同磷起始浓度下烟草细胞生长曲线
Fig. 3 Growth curve of tobacco suspension cells in different initial P concentration

含量、总量的影响如表 4。

表 4 不同起始磷浓度下烟草细胞干重、 CoQ_{10} 含量和总量
Table 4 Effect of initial P concentration on cell dry weight CoQ_{10} content and total of CoQ_{10} in tobacco cell by suspension culture

Initial conc./ (g/L)	Cell dry weight/ (g/L)	CoQ_{10} content/ ($\mu\text{g/g}$, dwt)	Total of CoQ_{10} / ($\mu\text{g/L}$)
42.5	13.52 d	369.7 d	5459 d
85.0	16.16 c	394.3 c	6372 c
170.0	19.72 b	414.1 b	8164 c
340.0	21.04 a	514.5 a	10824 a
510.0	21.12 a	506.4 a	10692 a

* a, b, c, d, e indicate significant difference at 5% level by SSR.

从表 4 可见,随着起始磷浓度增加,细胞干重逐渐加大, CoQ_{10} 含量、总量亦上升。当起始磷浓度为 340mg/L 时, CoQ_{10} 含量、总量达最高。虽然当起始磷浓度为 510mg/L 时细胞对数生长期比生长速率最大、细胞倍增时间短(表 3),但细胞干重、 CoQ_{10} 含量、总量与磷起始浓度为 340mg/L 时比较差异不显著。

2.2.3 不同起始磷浓度下培养基主要基质的变化:

a 蔗糖的消耗:当蔗糖浓度为 30mg/L 时,采用上述不同磷起始浓度培养基培养,在细胞培养周期的最初 4d,细胞生长缓慢,处于停滞期,此间蔗糖被迅速分解,葡萄糖含量急剧升高,到第 6 天时葡萄糖含量迅速降低,第 8 天后,培养基中仍可测到葡萄糖的残留,在细胞生长停滞期内,随着起始磷浓度的升高,培养基中葡萄糖含量增加,说明起始磷浓度的提高加快了蔗糖的分解速度。在细胞进入对数生长期

后随着磷起始浓度的增加,葡萄糖浓度下降速度加快。而且培养 8d 后,起始磷浓度越高,培养基中残留葡萄糖越少,所获得的细胞生物量越大,说明磷可加快蔗糖的分解,使葡萄糖的利用更充分。b 磷的消耗:不同磷起始浓度下,在细胞培养初期,培养基中磷含量迅速下降,起始磷浓度为 42.5mg/L 和 85mg/L 时,培养 2d 后,培养基中未检出磷,即使起始磷含量达到 510mg/L 时,培养 8d 后,培养基中亦测不到残留磷量。说明细胞对磷的吸收优先于对葡萄糖的吸收。

2.3 不同 NH₄⁺/NO₃⁻ 比例对烟草细胞生长和 CoQ₁₀形成的影响

在保持总氮浓度为 60mmol/L 不变情况下,改变 NH₄⁺/NO₃⁻ 比例,研究其对烟草细胞生长及

CoQ₁₀形成的影响,当提高培养基中 NH₄⁺/NO₃⁻ 比例(NH₄⁺/NO₃⁻ = 1 : 1 或 2 : 1),培养 8d 所获得的细胞生物量比对照有所降低,差异显著。但降低 NH₄⁺/NO₃⁻ 比例(NH₄⁺/NO₃⁻ = 1 : 3)或仅以硝态氮为氮源悬浮培养烟草细胞,所得生物量与对照相比,差异不显著,说明此烟草细胞能以硝态氮作为唯一氮源。提高 NH₄⁺/NO₃⁻ 比例虽不利于细胞的生长,但却有利于 CoQ₁₀形成。当提高 NH₄⁺/NO₃⁻ 比例为 2 : 1 时,CoQ₁₀的含量即由对照(NH₄⁺/NO₃⁻ = 1 : 2)的 458.0(μg/g, dwt)升高到 566.0(μg/g, dwt)。从 CoQ₁₀总量上看,在其它条件相同的情况下,NH₄⁺/NO₃⁻ 为 1 : 2 时,CoQ₁₀产量最高,达到 10820μg/L,说明 MS 培养基中的 NH₄⁺/NO₃⁻ 为 1 : 2 适合培养烟草细胞产生 CoQ₁₀。

参 考 文 献

- [1] Ikeda M, Kagei K. *Phytochemistry*, 1979, **18** :1577~1578
- [2] Karl F, Basic Chemical Research on Coenzyme Q₁₀ and Integrated Clinical Research on the Rapy Todisease. Coenzyme Ed G Lenaz Chichaste. New York. 1985
- [3] Ikeda T, Matsumoto T, Kato K *et al.* *Agric Biol Chem*, 1974, **38**(11) :2297~2298
- [4] Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M *et al.* *Agric Biol chem*, 1976, **40**(9) :1765~1770
- [5] Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. *Agric Biol Chem*, 1977, **41**(7) :1197~1201
- [6] Barr R, Frederick L. The Isolation and Characterization of Coenzyme Q and Related Compounds, New York, p :42~44, 1985
- [7] Crane F L, Lester R L, Widmer C *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 1959, **32** :73~79

Effects of A Few Nutritional Factors on Content of Coenzyme Q₁₀ by Tobacco Plant Cells in Suspension Culture

GAO Xiang-yang YE Guo-hong MU Hong XU Feng-cai
(College of Biotechnology, South China Agr. Univ., Guangzhou 510642)

Abstract With suspension cultured cells of tobacco (*Nicotiana glauca* L.), effects of inorganic phosphate, nitrogen sources and carbon source on cell growth and CoQ₁₀ content were investigated. It showed that, when treated with 30g/L of sucrose, the total amount of CoQ₁₀ was highest (8212g/L); and the cell biomass and CoQ₁₀ content were 19.8μg/L, 414.7μg/g (dwt) respectively. When treated 340mg/L of KH₂PO₄, the cell biomass, the content and total amount of CoQ₁₀ were 21.04g/L, 514.5μg/g (dwt) and 10824 μg/L respectively. When treated with the ratio of NH₄⁺/NO₃⁻ was 1 : 2, the cell biomass, the content and total amount of CoQ₁₀ were 21.04g/L, 514.3μg/g (dwt) and 10820μg/L respectively. The high ration of NH₄⁺/NO₃⁻ was suitable for the formation of CoQ₁₀, but not for the cell growth.

Key words CoQ₁₀, tobacco cell, suspension culture, cell growth