细胞均一性对葡萄细胞生长和花青素合成的影响

Effect of Homogeneity on Cell Growth and Anthocyanin Biosynthesis in Suspension Cultures of *Vitis vinifera*

曲均革[1,2],张 卫[1*],金美芳[1],虞星炬[1]

QU Jun-Ge[1,2], ZHANG Wei[1*], JIN Mei-Fang[1] and YU Xing-Ju[1]

1 中国科学院大连化学物理研究所,大连 116023

2 中国科学院研究生院,北京 100039

1 *Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian* 116023, *China*

2 *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100039, *China*

摘 要 通过色差筛选法建立了一个相对均一的葡萄细胞悬浮系 E,其细胞团较小,在长期继代培养过程中花青素合成能力的变异系数为 8.7%,重复摇瓶实验的变异系数为 5%。以 E 为实验材料进行的各组前体饲喂、诱导子添加、光照等联合作用实验,其生物量和花青素合成的变异系数均可控制在 12%以内,充分说明了培养体系的均一性对维持稳定生产的重要性;黑暗条件下添加 30μmol/L 苯丙氨酸(Phe)和 218μmol/L 茉莉酸甲酯(MeJA)可使单位细胞花青素含量达到对照组的 5.89 倍,花青素产量为对照组的 4.30 倍,且连续 5 次继代培养过程中生物量和花青素合成的变异系数均比对照组降低。

关键词 葡萄,细胞悬浮培养,花青素,均一性

中图分类号 Q813 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)05-0805-06

Abstract The instability of secondary metabolite production is a ubiquitous problem in plant cell culture. To understand the instability, the investigation of anthocyanin accumulation in suspension cultures of *Vitis vinifera*, as a model system, has been initiated in our laboratory. Suspension culture of a relatively homogeneous cell line E of *V. vinifera*, was established by long-term cell line selection by anthocyanin content differentiation. The aggregate size of E was smaller than that of other cell lines obtained by routine screening method. The variation coefficients of anthocyanin content in suspension cultures of E were 8.7% in long-term subcultures and 5% in repeated flasks, respectively. The effects of elicitor, precursor feeding and light irridiation on biomass and anthocyanin accumulation in suspension cultures of E had been investigated and the results showed that all the variation coefficients were lower than 12% and this indicated the importance of homogeneity on stable production in plant cell culture. With the combination treatment of 30μmol/L phenylalanine and 218μmol/L methyl jasmonate in the dark in suspension cultures of E, the anthocyanin content and production in suspension culture of E was 5.89-fold and 4.30-fold of the controls, respectively, and all the variation coefficients of biomass and anthocyanin accumulation were lower than those of the controls in 5 successive subcultures.

Key words *Vitis vinifera*, suspension cultures, anthocyanin, homogeneity

Received: April 28, 2006; Accepted: May 23, 2006.

This work was supported by the grant the National Natural Science Foundation of China (No. 20176058).

* Corresponding author. Tel: 86-411-84379069; E-mail: WeiZhang@dicp.ac.cn

国家自然科学基金资助项目(No. 20176058)。

植物细胞培养生产次生代谢物与从天然植株中直接提取或化学合成法相比具有不可比拟的优势[1-3]。但到目前为止,除了紫草宁、人参皂甙、紫杉醇等少数几个产品外,植物细胞培养实现商业化应用的例子非常少[4,5],其中很重要的一个原因是次生代谢物生产的不稳定性问题[6-8]。植物细胞培养过程中,次生代谢物的生产往往表现出不同程度的波动,这是该领域内一个普遍存在的现象和制约因素[9,10]。

花青素具有多种重要的生理功能,已被广泛用作葡萄酒、饮料中的添加剂并应用于保健品和医药领域中[3]。花青素是葡萄细胞中主要的次生代谢产物,因其为肉眼可见的色素,故使葡萄细胞具有易操作的选择性标记,保证了不同产量细胞株的筛选工作简单易行,同时花青素生物合成途径明确,分析检测手段成熟,且未实现工业化生产,是进行植物细胞培养生产次生代谢产物不稳定性研究的理想模式体系。

我们实验室以生产花青素的葡萄细胞为模式体系,对花青素合成的不稳定性研究已经开展了一些工作[11,12]。在以前的研究中,我们通过 A、B、C、D 四个相同来源细胞株的花青素合成能力的大范围变化以及相应的重复摇瓶实验,证明了培养体系的不均一性是造成植物细胞培养不稳定性的一个直接原因[11]。在花青素代谢调控相关实验中,我们发现了苯丙氨酸、茉莉酸甲酯和光照对葡萄细胞花青素合成有明显的促进作用[12]。本文基于对这些问题的认识,从提高葡萄细胞培养体系的均一性出发,采用色差筛选法筛选得到了一个相对均一的细胞系 E,并考察了前体、诱导子和光照等联合作用对其生物量和花青素合成的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞株来源及继代培养条件

本实验中所用的葡萄细胞株由加拿大 Francois Cormier 的实验室提供[11],已在本实验室培养 4 年。继代培养基为 B5 培养基[13] 添加 30g/L 蔗糖,250mg/L水解酪蛋白,0.1mg/L NAA 和 0.2mg/L KT (pH 5.7~5.8),115℃灭菌 15min。该悬浮细胞系每周继代 1 次,继代时用 250mL 三角瓶盛 50mL 继代培养基,将培养 1 周的种子细胞经 50μm 筛网过滤后,称取 5.0 g 湿细胞接种,然后置于 100r/min 摇床上,(25±1)℃黑暗培养。

1.2 相对均一细胞系的获得

常规的细胞株筛选过程更多的是注重细胞的生长状态,一般选取生长旺盛、组织疏松的细胞团进行继代培养。在长期的葡萄细胞培养过程中,我们建立了色差筛选法来进行不同花青素合成能力细胞株的筛选工作。色差筛选首先在固体培养的愈伤组织水平进行,图 1 是用色差筛选法进行不同产量葡萄细胞株筛选的示意图。本实验室的葡萄细胞培养是从四年前的唯一一瓶固体愈伤组织发展起来的,从该瓶愈伤组织出发,在培养了一个周期后更换新鲜培养基进行继代培养的同时,通过肉眼辨别挑取不同颜色的细胞团分别进行培养。初期分选出的细胞间颜色差异并不大,但每次继代时逐步富积,这样经过一个长期的富积过程后,各体系的颜色差异逐渐明显,并且各细胞群落的花青素合成能力相对较为集中。即富积筛选的时间越长,培养体系的均一性越强。在筛选到了相对均一且颜色具有显著差异的固体愈伤组织后,将其转移到液体培养基中悬浮培养,建立不同花青素合成能力的液体悬浮系。液体悬浮培养时,再按上述方法进一步筛选富积。

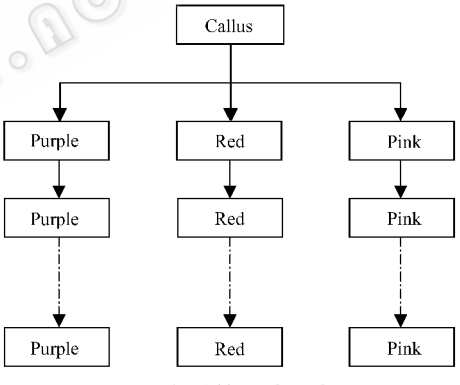

图 1 色差筛选法示意图

Fig.1 Sketch map of cell lines selection by anthocyanin content differentiation

1.3 重复摇瓶实验

重复摇瓶实验是指用相同的培养基接种相同的种子细胞,在相同的条件下培养相同的时间,考察各摇瓶中花青素合成能力的差异[11]。为了通过重复摇瓶实验比较不同的筛选方法得到的细胞系的均一性程度,我们将通过色差筛选法得到的 E 悬浮系和常规筛选法得到的 A 悬浮系的种子细胞分别经 50μm 筛网过滤,精确称取过滤后的湿细胞 1.60g 接种至盛装 20mL 上述继代培养基的 100mL 三角瓶中,各接种 12 只重复摇瓶,于 100r/min 摇床上(25±1)℃黑暗培养,培养至第 7 天取样分析。

1.4 前体、诱导子和光照对 E 悬浮系细胞生长和花青素合成的影响

以悬浮系 E 为实验材料,用 100mL 三角瓶盛

20mL继代培养基,按7d一个继代周期、1.60g接种量的继代条件,于(25±1)℃、100r/min摇床上振荡培养。分别考察以下3组条件:对照组:黑暗培养,接种后第7天收获细胞;实验组(1):黑暗培养,接种后第4天向培养物中加入30μmol/L Phe和218μmol/L MeJA,第7天取样分析;实验组(2):3000~4000 lx光照下培养,其它同实验组(1)。

葡萄细胞生长和花青素代谢动力学实验表明其在接种第7天可达到指数生长后期[12],生物量和花青素合成均达到最大值,故本文实验均在第7天取样分析。以上3组条件均考察连续5代培养的细胞生长和花青素生产情况,每代测3个平行。

1.5 生物量测定

将培养的整瓶细胞真空抽滤,用重蒸水冲洗除去培养基中残留的蔗糖,抽滤后称量鲜重(Fresh Cell Weight,FCW)(g/L)。留取大约0.15g鲜细胞用于提取花青素,其它于80℃烘箱中过夜烘干至恒重,即得细胞干重(Dry Cell Weight,DCW)(g/L)。

1.6 花青素测定

1.6.1 花青素提取 将称取的约0.15g鲜细胞按其准确质量加入20倍体积(3mL左右)的50%冰醋酸,振荡混匀后室温下黑暗浸取1h[11]。浸取液经0.22μm注射式滤器过滤,用分光光度计测定花青素含量。

1.6.2 分光光度计法测定花青素含量 取1mL花青素提取液加入3mL McIlvaine's buffer(14.7g/L $Na_2HPO_4\cdot 2H_2O$和16.7g/L无水柠檬酸,pH3.0)混合,535nm测*OD*值(50%冰醋酸:McIlvaine's buffer=1:3为空白对照)。花青素含量以色度值(Color Value,CV)表示,色度值可按公式(1)计算[11]:

$$CV = 0.1 \times \text{吸光度} \times \text{稀释倍数}(CV/g\text{-}FCW) \quad (1)$$

此处的稀释倍数为80。

1.6.3 花青素产量的计算 生物量乘以单位细胞重的花青素含量得花青素产量(CV/L)。

2 结果和分析

2.1 相对均一细胞系的获得

变异系数(variation coefficient,VC)是标准偏差和平均值的比值,是反映变量均一程度的一个统计指标,可以消除因变量水平高低和计量单位不同对均一性的影响。变异系数越小,说明均一性越强[11]。这里我们用变异系数来表征葡萄细胞悬浮培养体系的均一性程度。

采用色差筛选法经过多代的富积筛选后,我们

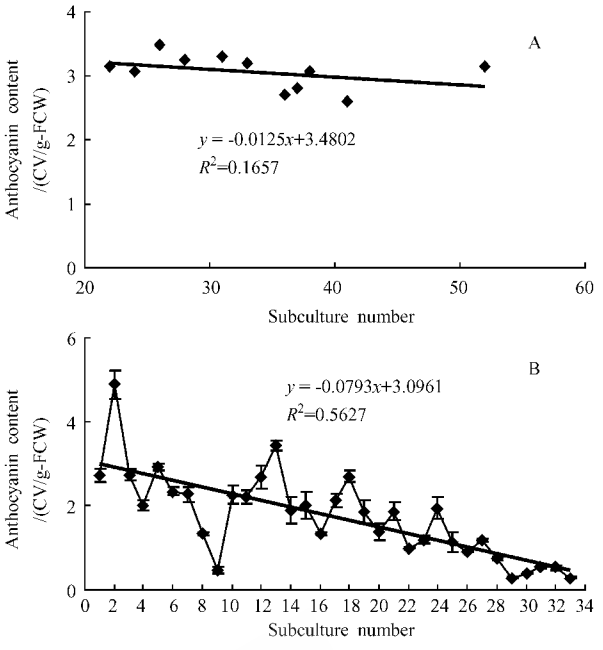

图2 不同筛选法得到的悬浮系继代培养花青素合成能力比较

Fig.2 Comparison of anthocyanin biosynthesis abilities in long-term subcultures between suspension cultures obtained from different cell line screening methods

(A) Suspension culture of E obtained by cell line selection of anthocyanin content differentiation; (B) Suspension culture of A obtained by cell line selection of normal method[11].

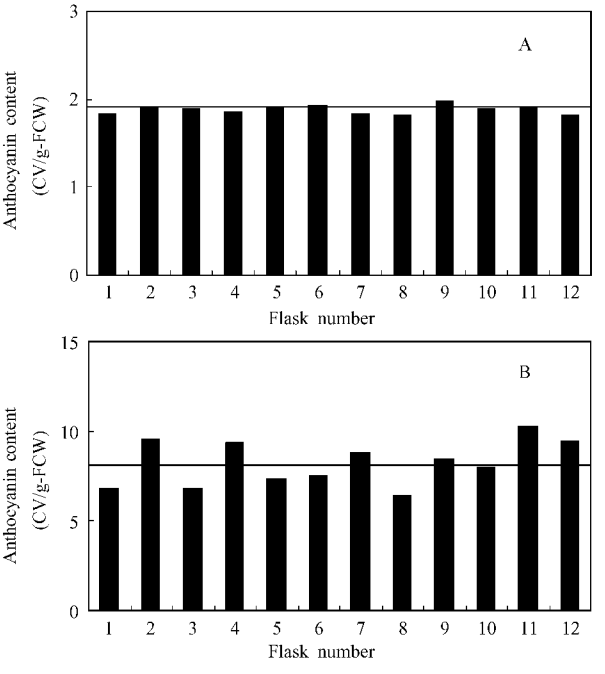

图3 不同筛选法得到的悬浮系重复摇瓶花青素合成能力比较

Fig.3 Comparison of anthocyanin biosynthesis abilities in repeated flasks between suspension cultures obtained from different cell line screening methods

(A) Suspension culture of E obtained by cell line selection of anthocyanin content differentiation; (B) Suspension culture of A obtained by cell line selection of normal method.

得到了肉眼观察呈粉红色的悬浮系 E。如图 2 所示,在随机抽取的若干次培养中,E 悬浮系花青素合成能力的波动不大,花青素平均含量为(3.06 ± 0.27)CV/g – FCW,变异系数为 8.7%;而常规筛选得到的 A 悬浮系花青素平均含量为(1.75 ± 1.02)CV/g – FCW,变异系数高达 58%[11]。E 悬浮系在长期继代培养过程中能维持花青素合成能力较小的变异系数,说明了色差筛选法进行的细胞株筛选提高了培养体系的均一性程度。

同时,在重复摇瓶培养实验中,E 悬浮系花青素合成能力的变异系数为 5%,而常规筛选得到的 A 悬浮系的变异系数为 16%(图 3),进一步说明了 E 悬浮系相对均一性。显微观察可以发现,同常规法筛选得到的 A 悬浮系相比,E 悬浮系的细胞团较小(见图 4)。

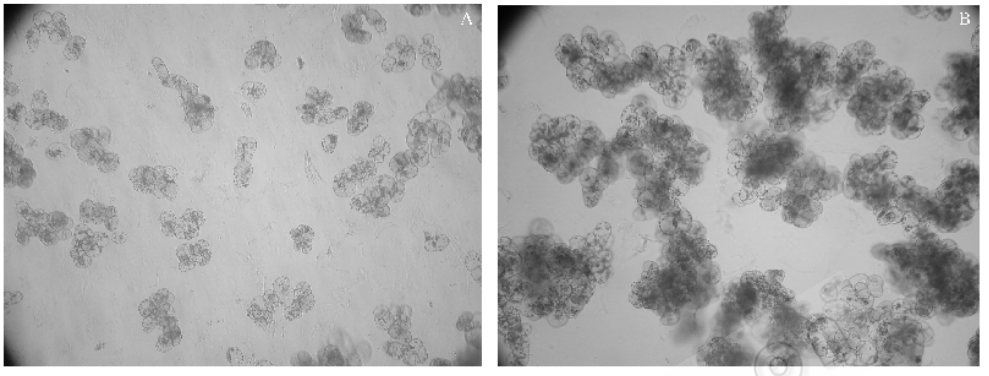

图 4 不同筛选法得到的悬浮系的显微观察

Fig.4 Suspension cultures obtained from different cell line screening methods observed by microscope

(A) Suspension culture of E obtained by cell line selection of anthocyanin content differentiation; (B) Suspension culture of A obtained by cell line selection of normal method.

2.2 前体、诱导子和光照对 E 悬浮系细胞生长和花青素合成的影响

在以前的研究中,我们发现苯丙氨酸和茉莉酸甲酯联合作用对葡萄细胞花青素合成有明显的促进作用,且它们与 3000 ~ 4000 lx 光照同时使用时获得了较高的花青素产量[12]。本文以用色差筛选法得到的相对较均一的悬浮系 E 为实验材料,考察以上两组诱导条件对其继代培养的影响时发现,两组诱导条件均能促进花青素的表达,但对生物量的增长有一定的抑制作用(见图 5)。黑暗条件下添加 30μmol/L Phe 和 218μmol/L MeJA 可使单位细胞花青素含量达到对照组的 5.89 倍,花青素产量为对照组的 4.30 倍;光照条件下添加 Phe 和 MeJA 可使单位细胞花青素含量达到对照组的 6.24 倍,但因光照进一步抑制了细胞生长,故花青素产量为对照组的 4.11 倍,比黑暗条件下前体和诱导子的联合作用略有降低(表 1)。黑暗条件下添加 30μmol/L Phe 和 218μmol/L MeJA 不仅可以大幅度提高葡萄细胞花青素产量,且其生物量和花青素合成的变异系数均比对照组降低,说明该条件进一步提高了培养体系的均一性;相对而言,光照条件下变异系数变大,说明光照是增加培养体系不均一性的一个因素。同时,以上 3 组实验在连续 5 次继代培养过程中生物量和花青素合成的波动范围较小,变异系数均控制在 12%以内,充分说明了筛选均一细胞系对维持稳定生产的重要性。

表 1 E 悬浮系连续 5 代培养生物量和花青素合成情况

Table 1 Biomass and anthocyanin accumulation in 5 successive subcultures in suspension culture of E

		DCW	CV/g-DCW	CV/L
Dark	Mean	11.27	23.57	264.56
	STDEV	0.36	2.21	18.82
	VC	3.18%	9.37%	7.11%
Dark + Phe + MeJA	Mean	8.21	138.83	1138.68
	STDEV	0.22	5.67	26.11
	VC	2.65%	4.08%	2.29%
Light + Phe + MeJA	Mean	7.42	147.06	1087.33
	STDEV	0.25	17.39	98.97
	VC	3.42%	11.83%	9.10%

3 讨论

植物细胞培养生产次生代谢物的不稳定性是制约其商业化应用的瓶颈之一。目前对其产生机制的认识还十分有限,对不稳定机制的解释基本上处于假说阶段,缺乏直接和确切的实验数据加以证明。目前比较有影响力的假说包括外植体材料的遗传不均一性,遗传和后生遗传不稳定性,环境压力,难形成组织分化状态,缺少信号分子的参与等[8, 14-18]。

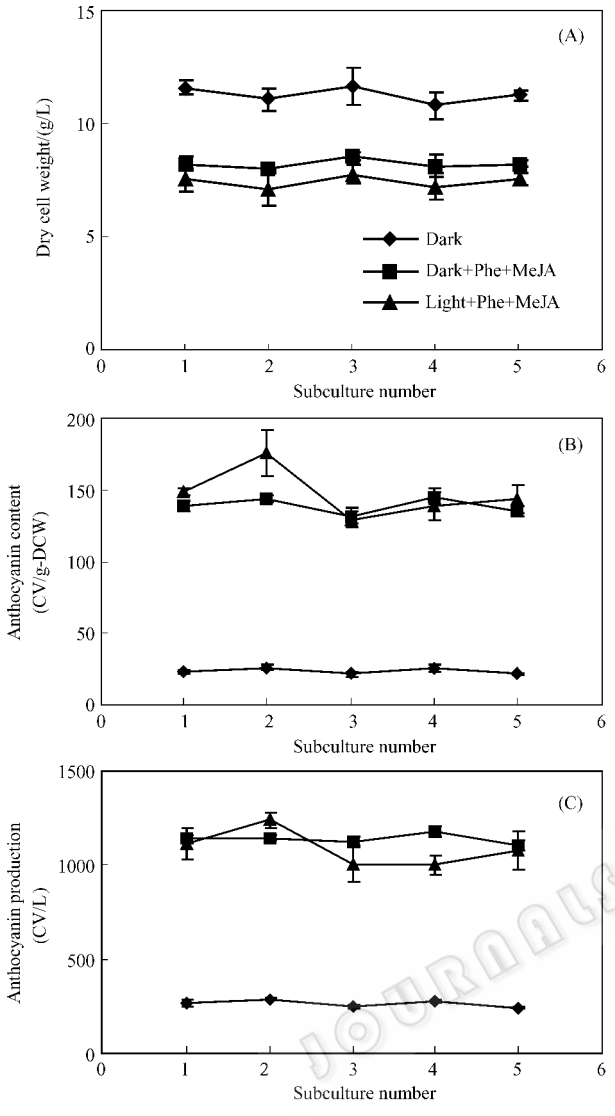

图 5　前体、诱导子和光照对 E 悬浮系细胞生长和花青素合成的影响

Fig.5　Effects of precursor, elicitor and light irradiation on cell growth and anthocyanin biosynthesis in suspension culture of E

(A) Cultured in darkness; (B) Cultured in darkness and treated with 30μmol/L phenylalanine and 218μmol/L methyl jasmonate; (C) Cultured under 3000 ~ 4000 lx light irradiation and treated with 30μmol/L phenylalanine and 218μmol/L methyl jasmonate.

植物细胞悬浮培养物是以细胞团的形式存在的，不同培养体系细胞团大小不一，从几个到几十个、甚至上百个不等。细胞团的存在使其不同部位的细胞处于不同的微环境中，团外部和内部的细胞在溶氧、营养物质的传递等方面都存在着较大差异，故细胞团尺寸的大小直接影响了其组成细胞的生长和代谢行为。细胞团越小，其组成细胞所处的微环境的差异越小，决定了培养体系的生长和代谢能力的波动程度越小。我们通过色差筛选法得到的 E 悬浮系，其细胞团较小，长期培养过程中花青素合成能力的变异系数仅为 8.7%，对其进行前体饲喂和诱导子联合作用后，不仅可使花青素产量达到对照组的 4.3 倍，而且连续 5 次继代培养生物量和花青素合成的变异系数均控制在 5% 以内，远远低于常规筛选法获得的 A、B、C、D 悬浮系（变异系数 54% ~ 84%）[11]。由此可见，培养体系的均一性是植物细胞稳定生产的基础，而均匀的小细胞团是保证培养体系均一性的有利因素。

培养体系的均一性是影响植物细胞培养过程中次生代谢物稳定生产的一个重要因素。针对特定的培养物，可通过有效的细胞株筛选获得相对均一的培养体系。同时基于对其培养特性的系统考察，可以优化出提高次生代谢物产量以及保持次生代谢物稳定生产的最适培养条件。这对保证次生代谢物的持续稳定高产具有重要意义，是实现植物细胞培养工业化生产的基础。

REFERENCES（参考文献）

[1] Rao S, Ravishankar GA. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 2002, **20**: 101 – 153

[2] Sajc L, Grubisic D, Vunjak-Novakovic G. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, **4**: 89 – 99

[3] Zhang W, Furusaki S. Production of anthocyanin by plant cell cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 1999, **4**: 231 – 252

[4] Roberts SC, Shuler ML. Large-scale plant cell culture. *Current Opinions in Biotechnology*, 1997, **8**: 154 – 159

[5] Verpoorte R, van der Heijden R, ten Hoopen HJG *et al*. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 1999, **21**: 467 – 479

[6] Callebaut A, Terahara N, de Haan M *et al*. Stability of anthocyanin composition in *Ajuga reptans* callus and cell suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1997, **50**: 195 – 201

[7] Deus-Neumann B, Zenk MH. Instability of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* cell suspension cultures. *Planta Medica*, 1984, **50**: 427 – 431

[8] Kim BJ, Gibson DM, Shuler ML. Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures. *Biotechnology Progress*, 2004, **20**: 1666 – 1673

[9] Vogelien DL, Hrazdina G, Reevers S *et al*. Phenotypic differences in anthocyanin accumulation among clonally related cultured cells of carrot. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1990, **22**: 213 – 222

[10] Ketchum REB, Gibson DM, Croteau RB *et al*. The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, **62**(1): 97 – 105

[11] Qu JG, Zhang W, Yu XJ *et al*. Instability of anthocyanin accumulation in *Vitis vinifera* L. var Gamay Fréaux suspension cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2005, **10**: 155 – 161

[12] Qu JG(曲均革), Yu XJ(虞星炬), Zhang W(张卫) *et al*. Significant improved anthocyanin biosynthesis in suspension cultures of *Vitis vinifera* by Process Intensification. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2006, **2**(22): 209 – 305

[13] Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, 1968, **50**: 151 – 156

[14] Hall RD, Yeoman MM. Temporal and spatial heterogeneity in the accumulation of anthocyanin in cell cultures of *Catharanthus roseus* (L.) G Don. *Journal of Experimental Botany*, 1986, **37**: 48 – 60

[15] Hall RD, Yeoman MM. Intercellular and interculture heterogeneity in secondary metabolite accumulation in cultures of *Catharanthus roseus* following cell line selection. *Journal of Experimental Botany*, 1987, **38**(193): 1391 – 1398

[16] Hara Y, Yamagata H, Morimoto T *et al*. Flow cytometric analysis of cellular berberine contents in high- and low-producing cell lines of *Coptis japonica* obtained by repeated selection. *Planta Medica*, 1989, **55**: 151 – 154

[17] Naill MC, Roberts SC. Preparation of single cells from aggregated *Taxus* suspension cultures for population analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, **86**(7): 817 – 826

[18] Dornenburg H, Knorr D. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microbial Technology*, 1995, **17**: 674 – 684