

土壤农杆菌转化的长春花冠瘿细胞培养

王宁宁 王淑芳 田俊英 李霞 朱亮基

(南开大学生物化学及分子生物学系, 天津 300071)

摘要 以土壤农杆菌 C_{58} 诱导的长春花冠瘿组织与从长春花茎、叶外植体诱导的愈伤组织进行比较, 发现冠瘿组织在生长、总吲哚生物碱含量及药用成份阿吗碱含量等方面都优于愈伤组织。测定了光照、温度、蔗糖浓度及外加 L-色氨酸前体等, 对长春花冠瘿细胞的生长、总生物碱及阿吗碱含量的影响, 为长春花冠瘿细胞培养生产吲哚生物碱的实际应用研究提供理论依据。

关键词 长春花, 冠瘿组织 (细胞), 愈伤组织, 吲哚生物碱, 阿吗碱

夹竹桃科植物长春花 (*Catharanthus roseus*) 的次级代谢产物吲哚生物碱中含有治疗心血管疾病、抗高血压和抗癌药物成份, 如蛇根碱、阿吗碱、长春新碱等。利用细胞工程技术生产长春花吲哚生物碱具有很好的应用前景, 但培养基中外源激素对培养细胞次级代谢的不利影响很难排除^[1]。国外很早就开始了这方面的研究工作, 并利用两段培养法^[2]排除激素的干扰, 取得了较大成功。但这种方法过程繁琐、成本很高, 限制了实际应用^[3]。本文比较了长春花冠瘿细胞与愈伤细胞在生长和吲哚生物碱含量等方面的差异, 讨论了一些培养因子的变化对长春花冠瘿细胞的生长和吲哚生物碱含量的影响, 以期有关工作提供一定的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

长春花 (*Catharanthus roseus*) 愈伤组织为本实验室诱导, 置于含 2.0mg/L 2, 4-Dl. 0mg/L 6-BA 的半固体 MS 培养基上 (蔗糖 30g/L) 培养, 每天照光 12 小时, 温度 25℃。

长春花冠瘿组织为以土壤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) C_{58} 直接感染长春花愈伤组织而得到。以不含任何外源激素的 MS 培养基 (蔗糖 30g/L) 为基本培养基, 半固体或液体悬浮培养。

1.2 冠瘿细胞培养条件

1.2.1 对照组: 每天照光 12 小时, 培养温度 25℃。

1.2.2 完全黑暗培养: 不照光。温度 25℃。

1.2.3 低温处理: 25℃ 条件下培养 15 天后, 转入 15℃ 低温培养, 12 天后温度升至 17℃, 第 18 天温度升至 19℃。光照条件不变。

本文于 1993 年 3 月 1 日收到。

1.2.4 培养基中分别加入 500mg/L、700mg/L、900mg/L 的外源 L-色氨酸，其它条件同对照组。

1.2.5 改变培养基中的蔗糖浓度 (g/L)：取 20、40 和 80 三种蔗糖浓度，其它培养条件不变。

1.3 分析方法

1.3.1 生长测定：以每瓶细胞的鲜重表示培养过程中的生长变化。

1.3.2 总吲哚生物碱的提取和含量测定：参照 Lee 等⁽⁴⁾的方法，并有如下改进：长春花愈伤组织或冠瘿组织（细胞）用 80% 甲醇匀浆，抽提过夜，减压蒸干甲醇，水相 pH 值调至 3.0，再以石油醚萃取，调水相 pH 值至 8.5，以二氯甲烷萃取，于 280nm 测 OD 值，减压蒸干二氯甲烷后可得长春花各类吲哚生物碱混合物即为总碱，称重。

1.3.3 长春花吲哚生物碱的薄层层析分析：按照 Morris 等⁽²⁾的方法。

1.3.4 阿吗碱含量的测定：紫外荧光扫描分析法。以双波长薄层层析扫描仪 CS-910（进口仪器），样品波长 365nm，发射波长 500nm 条件下扫描分析，外标法定量。

2 结果与讨论

2.1 冠瘿组织与愈伤组织的比较

实验所用长春花冠瘿组织在不含任何外源激素的 MS 基本培养基上培养；而将愈伤组织分别培养在 9 种不同激素配比的 MS 培养基上，从中选出愈伤组织生长最好的一种，确定为本实验所采用长春花愈伤组织的培养基，其外源激素比例如文中“培养条件”所述。实验结果（见图 1，2，3）表明：在这种培养条件下，长春花茎、叶愈伤组织的生长

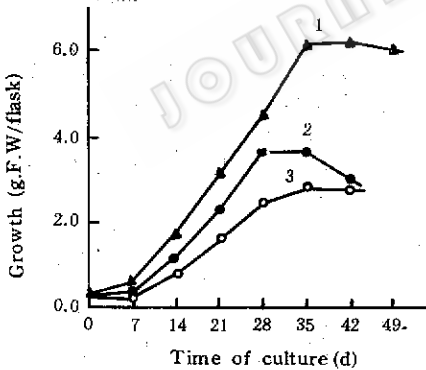


图 1 长春花冠瘿组织和愈伤组织生长的比较

Fig. 1 Comparison of growth between *C. roseus* crown gall tissue and callus
1. Crown gall tissue, 2. Leaf-callus
3. Stem-callus

周期虽比冠瘿组织稍有缩短，但这两种愈伤组织的生物学产量均远低于冠瘿组织（图 1）。茎、叶愈伤组织的总生物碱含量非常相近（图 2），表现出长春花细胞的生化全能

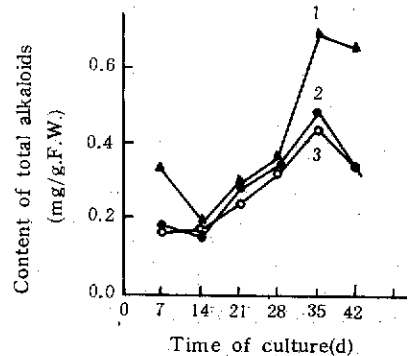


图 2 愈伤组织和冠瘿组织总吲哚生物碱含量的比较

Fig. 2 Comparison of total alkaloids content between *C. roseus* crown gall tissue and callus

The legend is as the same as in Fig. 1

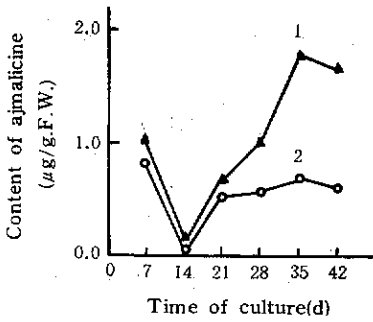


图3 长春花冠瘿组织和愈伤组织阿吗碱含量的比较

Fig. 3 Comparison of ajmalicine content between crown gall tissue and callus of *C. roseus*

1. Crown gall tissue, 2. Callus

条件下的愈伤组织相比,在细胞产量、总吲哚生物碱含量和药用成份阿吗碱含量等方面都有很强的优势。这方面的工作国内尚未见报道。

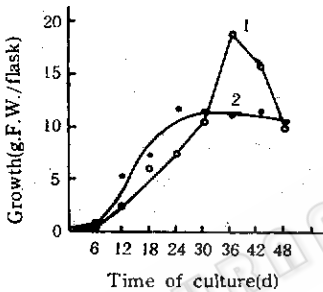


图4 光、暗变化对长春花冠瘿细胞生长的影响

Fig. 4 Effect of light on the growth of *C. roseus* crown gall cell

1. Cultured in continuous dark, 2. Cultured under illumination (the control)

2.2 培养条件对长春花冠瘿细胞的影响

2.2.1 光、暗变化的影响:与对照组相比,

完全黑暗培养的长春花冠瘿细胞虽然产量较高,但没有明显的生长平稳期(图4),生长达到顶峰后即迅速下降,细胞的总吲哚生物碱及阿吗碱含量均明显低于光照培养的细胞,只有在生长开始迅速下降(培养至42天)以后,才表现出生物碱的大量累积(图5,图6),这与植物细胞培养过程中,只有经过细胞快速分裂期以后才开始次级产物的大量形成这种特点是一致的。

性⁽⁵⁾。由于植物细胞在培养过程中,只有经过细胞快速分裂期以后,细胞生长速率降低,次级产物才开始大量形成、累积⁽⁶⁾,所以在进入生长平稳期之前,长春花的冠瘿组织和愈伤组织之间生物碱含量差异不大,但在进入生长和平稳期之后,冠瘿组织中总吲哚生物碱的累积量和其中阿吗碱的含量均远大于茎、叶愈伤组织(图2、图3),其中冠瘿组织中阿吗碱的最高含量是愈伤组织的2.6倍(图3)。

上述结果表明:我们得到的长春花冠瘿组织,在相同培养条件下,与处于最佳生长

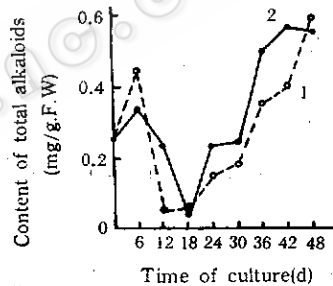


图5 光、暗变化对长春花冠瘿细胞总吲哚生物碱含量的影响

Fig. 5 Effect of light on the total indole alkaloids content of *C. roseus* crown gall cell

The legend is the same as in Fig. 4

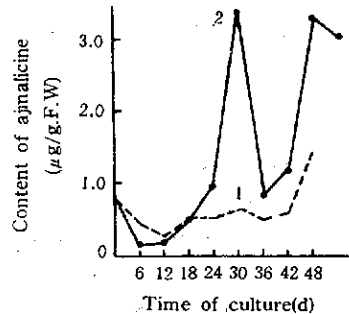


图6 光、暗变化对长春花冠瘿细胞阿吗碱含量的影响

Fig. 6 Effect of light on the ajmalicine content of *C. roseus* crown gall cell

The legend is the same as in Fig. 4

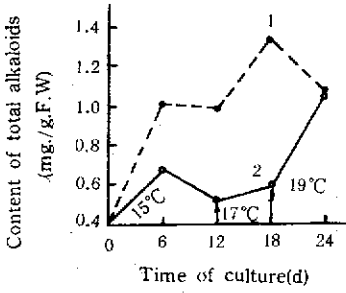


图7 温度变化对长春花冠瘿细胞总吲哚生物碱含量的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the total indole alkaloids content of *C. roseus* crown gall cell cultures

1. The control 2. Cultured in low temperature

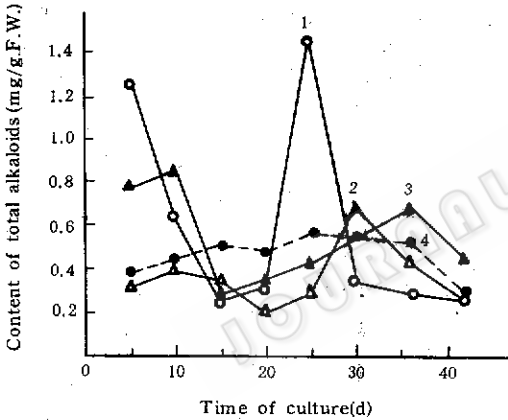


图9 外加L-色氨酸对长春花冠瘿细胞总吲哚生物碱含量的影响

Fig. 9 Effect of exogenous *L*-Trp on the total indole alkaloids content of *C. roseus* crown gall cell cultures

Content of *L*-trp, 1. 900mg/L, 2. 700mg/L, 3. 500mg/L, 4. 0.0mg/L

2.2.2 温度变化的影响：一些植物细胞在低温培养条件下，次级代谢产物含量会有明显增加^[1]，但本实验所采用的长春花冠瘿细胞在常温（25℃）培养15天以后，转入15℃低温培养，12天后转入17℃条件下培养，其生物碱含量均明显低于对照组，而且检测不到阿吗碱含量，只有当培养温度升到19℃以后，冠瘿细胞中总吲哚生物碱的含量才有明

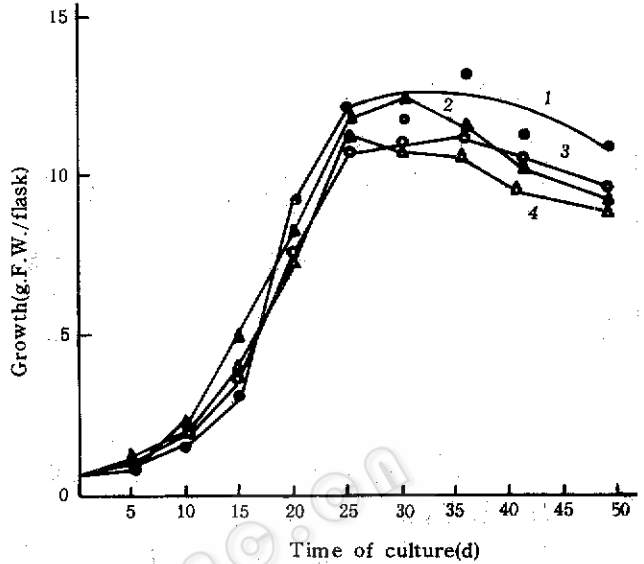


图8 外源L-色氨酸对长春花冠瘿细胞生长的影响

Fig. 8 Effect of exogenous *L*-Trp on the growth of *C. roseus* crown gall cell cultures

Content of exogenous *L*-Trp: 1. 0.0mg/L, 2. 500mg/L, 3. 700mg/L, 4. 900mg/L

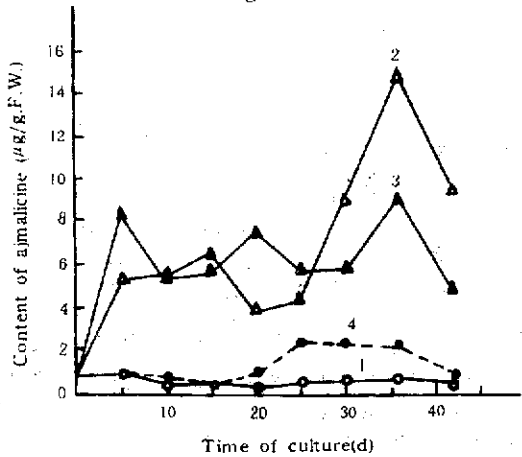


图10 外加L-色氨酸对长春花冠瘿细胞阿吗碱含量的影响

Fig. 10 Effect of exogenous *L*-Trp on the ajmalicine content of *C. roseus* crown gall cell cultures

Content of *L*-Trp: The legend is the same as in Fig. 9

显增加(图7)。说明降低培养温度对长春花冠瘿细胞次级代谢产物的形成和积累有抑制作用。

2.2.3 外加不同浓度 L-色氨酸的影响: L-色氨酸是长春花吲哚生物碱合成的前体,对于不同的长春花细胞品系,其生物化学合成特点不同,色氨酸敏感细胞系的生长会受到培养过程中外源色氨酸的强烈抑制,而非敏感细胞系则不受影响⁽⁷⁾。人们进行了大量工作以期从非敏感细胞系中筛选出 L-色氨酸刺激次级产物累积的长春花细胞品系。外加 500、700、900mg/L 的 L-色氨酸对本实验采用的长春花冠瘿细胞的生长没有显著影响(图8),说明我们得到的是一非色氨酸敏感细胞系。其中外加 900mg/L L-色氨酸可显著增加长春花冠瘿细胞总生物碱的含量,总碱高峰提前出现,最高含量为对照组的 3 倍。但外加 900mg/L L-色氨酸对阿吗碱的含量却有抑制作用;而外加 500mg/L、700mg/L L-色氨酸虽然对长春花冠瘿细胞总生物碱的含量影响不大,却能显著提高细胞中阿吗碱的

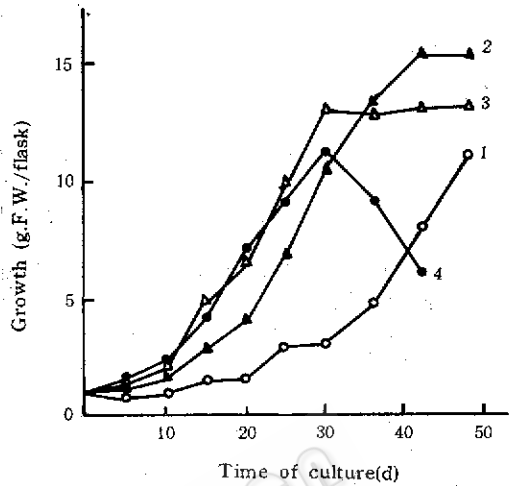


图 11 蔗糖浓度变化对长春花冠瘿细胞生长的影响

Fig. 11 Effect of change of sucrose concentration on the growth of *C. roseus* crown gall cell cultures
Level of sucrose; 1. 80g/L, 2. 600g/L, 3. 40g/L, 4. 20g/L

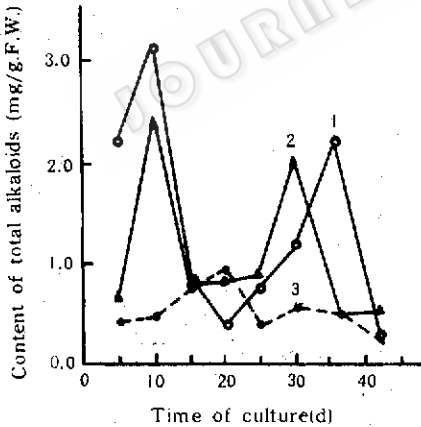


图 12 蔗糖浓度变化对长春花冠瘿细胞总吲哚生物碱含量的影响

Fig. 12 Effect of sucrose level on the total indole alkaloids content of *C. roseus* crown gall cell cultures
Level of sucrose, 1. 80g/L, 2. 40g/L, 3. 20g/L

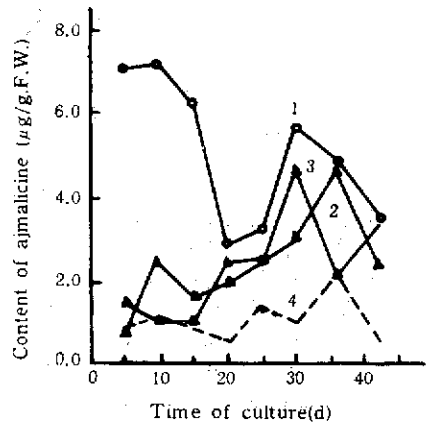


图 13 不同蔗糖浓度对长春花冠瘿细胞阿吗碱含量的影响

Fig. 13 Effect of sucrose level on the ajmalicine content of *C. roseus* crown gall cell cultures
Level of sucrose, 1. 80g/L, 2. 60g/L, 3. 40g/L, 4. 20g/L

含量(图9、图10),其中外加 700mg/L L-色氨酸处理的冠瘿细胞,其阿吗碱的最高含量是对照组的 7-8 倍。

2.2.4 蔗糖浓度变化的影响: 提高培养基中的蔗糖浓度作为一种渗透调节, 可以增加植物细胞的次级产物产量^[1]。实验结果表明: 随着培养基中蔗糖浓度的增加, 长春花冠瘿细胞的生长周期延长(图 11)。蔗糖浓度为 40g/L、80g/L 条件下培养的细胞, 总吲哚生物碱和阿吗碱的含量均远大于 20g/L 蔗糖条件下培养的细胞, 而且由转移效应引起的生物碱含量高峰依次增加, 以 80g/L 蔗糖的作用效果最为显著(图 12、图 13)。这与国外有关长春花愈伤细胞培养的结果是一致的^[6], 但冠瘿细胞可耐受的蔗糖浓度更高、作用效果更明显。以上研究结果表明: 通过土壤农杆菌转化所得到的这一长春花冠瘿细胞系, 由于完全排除了外源激素对细胞次级代谢的不利影响。与愈伤细胞相比, 在提高生物学和经济学产量方面都占有很大优势, 对提高药用成份含量进行正向调节, 是进行长春花冠瘿细胞培养生产吲哚生物碱工程的理想材料。

致谢: 本专业冯秀清、曹云峰两位同学在培养条件对长春花冠瘿细胞的生长和次级代谢的影响等方面做了大量基础工作, 在此谨表谢意。

参 考 文 献

- (1) Mantell S H and Smith H. In: Plant Biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press, 1983, pp. 75—110.
- (2) Morris P *et al.* In: Dixon RA (ed) Plant Cell Culture—a practical approach. 1985, pp. 127—167.
- (3) Drapeau D *et al.* Biotechnology and Bioengineering, 1987, 30: 946—953.
- (4) Lee, SL *et al.* Phytochemistry, 1981, 20: 1841—1843.
- (5) Zenk M H. In: Thorpe TA (ed) Frontiers of Plant Tissue Culture, Calgary: University of Calgary Press, 1978, pp. 1—13.
- (6) Luckner M *et al.* In: Secondary Metabolism and Cell Differentiation, Berlin; Heidelberg and New York; Springer, 1977.
- (7) Stafford A and Smith-L. In: Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. 1986, pp. 250—256.
- (8) Merillon J M *et al.* Planta Medica, 1984, 497—501.

Study on Cell Suspension Culture of *Catharanthus roseus* Crown Gall Cell Induced by *Agrobacterium C*₅₈

Wang Ningning Wang Shufang Tian Junying Li Xia Zhu Liangji

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract In comparison with calli from *C. roseus* leaf or stem, *C. roseus* crown gall cell cultured on MS basic medium was superior in growth, total indole alkaloids and ajmalicine contents. Several cultural factors can affect production of alkaloids by *C. roseus* crown gall cell cultures. When illuminating-cultured or cultured in the control temperature (25°C), the contents of total alkaloids and ajmalicine were higher than those cultured in continuous dark or lower temperature. Treating with exogenous *L*-Trp or increasing sucrose level of medium can greatly improve the total alkaloids and ajmalicine contents of *C. roseus* crown gall cell cultures. The most affective concentration of exogenous *L*-Trp for production of total alkaloids and ajmalicine were 900mg/L and 700mg/L, respectively. The most effective concentration of sucrose was 80g/L. These results imply that *C. roseus* crown gall cell be used in replacing calli cells to producing useful indole alkaloids.

Key words *Catharanthus roseus* crown gall cell, callus, total alkaloids, ajmalicine