

本氏烟草悬浮细胞 NBS-1 的创建及底盘特征分析

张方晴^{1,2,3}, 史佳欣^{1,2,3}, 于静^{2,3}, 赵玥^{2,3}, 范荣^{2,3}, 王晓伟^{2,3*}, 李志超^{2,3*}

1 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

2 国家合成生物学技术创新中心, 天津 300308

3 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

张方晴, 史佳欣, 于静, 赵玥, 范荣, 王晓伟, 李志超. 本氏烟草悬浮细胞 NBS-1 的创建及底盘特征分析[J]. 生物工程学报, 2024, 40(6): 1935-1949.

ZHANG Fangqing, SHI Jiaxin, YU Jing, ZHAO Yue, FAN Rong, WANG Xiaowei, LI Zhichao. Development and characterization of tobacco suspension cell chassis NBS-1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(6): 1935-1949.

摘要: 植物合成生物学在植物天然产物的发掘制造方面具有明显的理论优势, 但因缺乏高效的底盘系统及相关使能技术, 其对生物合成领域的贡献有限。最常用的植物底盘——烟草由于操作周期长、改造难度大、代谢及纯化背景复杂、烟碱毒性和农业生产难精准控制等问题, 而烟草悬浮细胞底盘体系可有效解决上述问题。本研究旨在开发出生长快速、生物量高、分散度好、转化效率高、烟碱含量极低并具备较高科研价值及工业化潜力的烟草悬浮细胞底盘。选取分子技术高适用性的本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*), 诱导获得的悬浮细胞 NBS-1 生长迅速、分散性好, 最高生物量可达到 476.39 g/L (鲜重), 各项参数均远超常用的烟草 BY-2 (*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow 2) 细胞系。常用的 pEAQ-HT 高效瞬时表达系统在 NBS-1 中的转化表达效率可达 81%, 远高于 BY-2。利用转录组数据对 BY-2 和 NBS-1 的代谢特征及偏好性进行分析, 发现 NBS-1 的黄酮类等化合物合成通路基因的表达显著高于 BY-2, 且 NBS-1 的生物碱合成通路基因的表达显著低于 BY-2, 并通过代谢物含量测定实验验证了该分析结果, 表明 NBS-1 极低烟碱含量的同时, 为该底盘对应产品的选择提供参考。综上, 本研究开发出的生长转化优异、黄酮类含量较高且烟碱含量极低的本氏烟草悬浮细胞底盘 NBS-1, 对于开发烟草悬浮细胞底盘有重要指导意义。

关键词: 植物底盘; 悬浮细胞; 本氏烟草; 生物量; 瞬时表达; 烟碱; 黄酮

资助项目: 国家重点研发计划(2020YFA0908000); 天津市合成生物技术创新能力提升行动项目(TSBICIP-CXRC-001); 中央本级重大增减支项目(2060302)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2020YFA0908000), the Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-CXRC-001), and the Key Project at Central Government Level of China (2060302).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Xiaowei, wangxiaow@tib.cas.cn; LI Zhichao, lizhch@tib.cas.cn

Received: 2023-10-24; Accepted: 2023-12-05; Published online: 2023-12-20

Development and characterization of tobacco suspension cell chassis NBS-1

ZHANG Fangqing^{1,2,3}, SHI Jiabin^{1,2,3}, YU Jing^{2,3}, ZHAO Yue^{2,3}, FAN Rong^{2,3},
WANG Xiaowei^{2,3*}, LI Zhichao^{2,3*}

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

2 National Technology Innovation Center of Synthetic Biology, Tianjin 300308, China

3 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: Plant synthetic biology has significant theoretical advantages in exploration and production of plant natural products. However, its contribution to the field of biosynthesis is currently limited due to the lack of efficient chassis systems and related enabling technologies. Synthetic biologists often avoid tobacco as a chassis system because of its long operation cycle, difficulties in genetic and metabolic modification, complex metabolism and purification background, nicotine toxicity, and challenges in accurately controlling for agricultural production. Nevertheless, the tobacco suspension cell chassis system offers a viable solution to these challenges. The objective of this research was to develop a tobacco suspension cell chassis with high scientific and industrial potential. This chassis should exhibit rapid growth, high biomass, excellent dispersion, high transformation efficiency, and minimal nicotine content. *Nicotiana benthamiana*, which has high applicability in molecular technology, was used to induce suspension cells. The induced suspension cells, named NBS-1, exhibited rapid growth, excellent dispersion, and high biomass, reaching a maximum biomass of 476.39 g/L (fresh weight), which was significantly higher than that of BY-2. The transformation efficiency of the widely utilized pEAQ-HT transient expression system in NBS-1 reached 81%, which was substantially elevated compared to BY-2. The metabolic characteristics and bias of BY-2 and NBS-1 were analyzed using transcriptome data. It was found that the gene expression of pathways related to biosynthesis of flavonoids and their derivatives in NBS-1 was significantly higher, while the pathways related to alkaloid biosynthesis were significantly lower compared to BY-2. These findings were further validated by the total content of flavonoid and alkaloid. In summary, our research demonstrates NBS-1 possesses minimal nicotine content and provides valuable guidance for selecting appropriate chassis for specific products. In conclusion, this study developed NBS-1, a tobacco suspension cell chassis with excellent growth and transformation, high flavonoid content and minimal nicotine content, which has important guiding significance for the development of tobacco suspension cell chassis.

Keywords: plant chassis; suspension cell; *Nicotiana benthamiana*; biomass; transient expression; nicotine; flavonoid

植物天然产物主要包括萜类、黄酮类、醌类和生物碱类等物质,具有广泛的生理活性和药理作用,在医疗、能源和工业领域有着广泛的应用。天然合成具有物种特异性和时空积累特异性等特点,导致植物天然产物在植物中含量低,提取分离困难。这些化合物一般结构复杂、化学合成难度大并易污染环境。基于合成生物学技术获得植物天然产物具有成本低、周期短、绿色可持续等优点。随着生物合成底盘细胞种类的不断开发,人们逐渐意识到选择合适的底盘类型往往比对底盘细胞的工程化改造更为重要。与微生物底盘相比,高等植物具有更加复杂精细的器官及细胞结构,在植物酶表达及活性、合成途径适配性、产物耐受性和安全性等方面具有独特的优势。烟草作为模式植物,基因组学、转录组学和代谢组学的信息资源丰富,并且具有成熟的瞬时转化和叶绿体转化等基因工程改造技术。改造的烟草植株可用于生产多类重组蛋白(如新冠疫苗^[1]、猪瘟 E2 疫苗、胶原蛋白、细胞生长因子)及天然产物(如青蒿素^[2]和虾青素^[3])等。

因植物具有操作周期长、难度大等特点,获得稳定的转化株系往往需要数月甚至更长的时间,这使得周期数天的瞬时表达体系成为植物转化中最受欢迎和经常使用的技术。瞬时系统中经常使用病毒功能元件甚至完整病毒,如常用的高效瞬时过表达系统 pEAQ-HT 就包含病毒来源的启动子、增强子和基因沉默抑制子等。但并非所有植物细胞都对病毒易感,病毒相关元件的有效性在植物种间差别很大。本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)因株型、生长周期及对植物病毒和农杆菌的易感性等特点,成为经典的实验室模式植物材料。目前,合成生物学中植物底盘相比微生物底盘发展缓慢,最常用的植物底盘——烟草也存在操作周期长、改

造难度大、代谢和纯化背景复杂、烟碱毒性以及农业放大难精准控制等问题,而烟草悬浮细胞底盘体系可有效解决上述问题^[4]。公开报道的烟草细胞系极少,最经典且常用的 BY-2 细胞系(*Nicotiana tabacum* L. cv Bright Yellow2)是由 Kato 等^[5]以普通烟草幼苗经诱导形成的愈伤组织为材料建立的悬浮细胞系,利用 BY-2 细胞可以合成吡啶生物碱^[6]和苋红素^[7]等产品。但由于普通烟草的病毒易感性差、长期异养悬浮驯化导致的光合自养及叶绿体功能损伤、分散度不高导致的多细胞聚集等原因, BY-2 并不太适合作为合成底盘进行实验改造和生产放大。所以利用本生烟草开发底盘特性优异的悬浮细胞系对植物合成生物学的发展具有重要意义。

本研究选择本氏烟草开发悬浮细胞底盘系统,在分散度、生物量和转化效率等方面与 BY-2 进行比较分析,并通过转录组学等手段,在表达水平上系统性描述悬浮细胞的生理代谢特征,同时结合代谢物含量检测,重点分析本氏烟草悬浮细胞和 BY-2 在次级代谢产物合成方面的差异性,在阐明底盘基础代谢特征的同时,为底盘对应产品的选择提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

植物材料为本实验室保存的本氏烟草和烟草 BY-2 细胞。供试根癌农杆菌 EHA105 菌株和质粒 pEAQ-HT-GFP 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 培养基配制

本氏烟草萌发和植株生长培养基: MS 培养基(Murashige and Skoog, MS) 4.4 g/L,蔗糖 30 g/L; 本氏烟草愈伤组织诱导培养基: MS 4.4 g/L, 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D) 0.5 mg/L, 6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine,

6-BA) 1.0 mg/L, 蔗糖 30 g/L; 本氏烟草愈伤组织继代培养基: MS 4.4 g/L, 6-BA 0.5 mg/L, 萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA) 1.0 mg/L, 蔗糖 30 g/L; 本氏烟草细胞悬浮培养基: MS 4.4 g/L, 6-BA 0.5 mg/L, NAA 1.0 mg/L, 蔗糖 30 g/L; BY-2 细胞悬浮培养基: MS 4.4 g/L, 磷酸二氢钾 0.255 g/L, 肌醇 0.1 g/L, 盐酸硫胺素 1 mg/L, 2,4-D 0.4 mg/L, 蔗糖 30 g/L; LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L。植物培养基的 pH 值为 5.8, 细菌培养基的 pH 值为 7.5, 植物固体培养基加入 10 g/L 的琼脂, 细菌固体培养基加入 15 g/L 的琼脂。

1.2.2 本氏烟草愈伤组织诱导及继代培养

取本氏烟草种子置于 75%乙醇中消毒 1 min, 用 10%次氯酸钠消毒 10 min, 再用无菌水清洗 3 次, 均匀平铺到固体 MS 培养基上, 待萌发出两片真叶后种植到玻璃培养瓶中, 进行 16 h 光照和 8 h 黑暗的交替培养。随后将 1 月龄无菌苗的地上部分分割成小组织块作为外植体, 放置在愈伤组织诱导培养基上避光培养, 观察并记录愈伤组织的生长状况。待愈伤组织形成后, 切为小块, 转移到新鲜的本氏烟草继代培养基上。每 2 周继代 1 次, 直至愈伤组织颜色变得淡黄以及质地变得疏松。

1.2.3 烟草悬浮细胞系的建立

选取本氏烟草色泽淡黄、生长旺盛、质地疏松和增殖率高的新鲜愈伤组织用来获得悬浮细胞系 NBS-1。取 0.5 g 左右愈伤组织, 转移到装有本氏烟草细胞悬浮培养液的广口三角瓶中, 置于植物振荡培养箱中, 于 25 °C、130 r/min 避光培养。继代初期, 吸取混匀的细胞, 用无菌纱布过滤去除大的细胞团, 再加入新鲜细胞培养液进行继代培养。当悬浮培养体系中无大细胞团后, 每次吸取 5 mL 细胞转入装有 45 mL

新鲜培养液的 250 mL 广口三角瓶中, 每 7 d 进行继代培养(悬浮细胞与新鲜培养液按 1:10 的体积比), 悬浮驯化培养得到生长迅速的稳定细胞系 NBS-1 后于固体平板继代保存。取 0.5 g 固体平板保存的 NBS-1 或 BY-2 细胞置于装有 10 mL 培养液的 50 mL 广口三角瓶中, 培养 3 d 后, 以 1:10 的比例接种在装有 45 mL 培养液的 250 mL 广口三角瓶中, 每 7 d 继代 1 次, 继代 2 次后进行后续实验。

1.2.4 烟草悬浮细胞系的形态观察和生物量测定

使用 Olympus CX43 型光学显微镜观察 NBS-1 和 BY-2 悬浮细胞的生长状况和形态。把继代培养 3 d 和 8 d 的 NBS-1 和 BY-2 悬浮液分别稀释到 $OD_{700}=0.4$, 吸取同样体积的悬浮液制作临时装片观测细胞, 选取 3 个视野, 统计视野中细胞总数和细胞团的数量。利用细胞团数与细胞总数的比值来反映细胞分散度情况, 以每 100 个细胞中所含细胞团的数量表示, 比值越大, 表明分散度越高。并以细胞鲜重和干重反映细胞生物量, 根据细胞干重绘制 NBS-1 和 BY-2 的生长曲线, 每种处理的实验测定包含 3 个生物学重复。吸取 5 mL 培养 7 d 的 NBS-1 细胞, 接种到 45 mL 的新鲜培养基中, 于 25 °C、130 r/min 摇床避光振荡培养 14 d, 每隔 2 d 取样, 测定细胞鲜重和干重。吸取 2 mL 的 NBS-1 细胞, 置于滤纸上, 减压抽滤至恒重, 称量细胞鲜重; 随后于 60 °C 干燥至恒重, 称量细胞干重, 以每 mL 悬浮培养细胞液中所含的细胞重量表示。BY-2 细胞干重和鲜重的测定方法同上, 并在同样培养天数的情况下, 进行 NBS-1 和 BY-2 细胞干重的差异性分析。

1.2.5 烟草悬浮细胞瞬时转化及转化效率统计

采用农杆菌介导法转化烟草悬浮细胞, 利用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)

作为报告基因, 计算转化效率。方法参考植株叶背注射^[8], 区别在于将含有 pEAQ-HT-GFP 表达载体的 EHA105 农杆菌与 NBS-1 和 BY-2 细胞分别共培养, 5 d 后分别选择 3 个视野统计具有荧光细胞的数量占视野所有细胞总数的比例, 即烟草悬浮细胞的瞬时转化效率。

1.2.6 烟草悬浮细胞转录组测序

选取继代培养第 8 天的 NBS-1 和 BY-2 细胞进行转录组测序, 每种处理的实验测定包含 3 个生物学重复。使用 RNAPrep Pure Plant Plus 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]分别从样品中提取总 RNA, 通过 Nano-300 微量分光光度计评估 RNA 样品的浓度和纯度, 使用 1% (质量体积分数)琼脂糖凝胶和 Agilent Bioanalyzer 2100 system (Agilent Technologies 公司)检测 RNA 的完整性。将符合要求的 RNA 样品用干冰送至百迈客生物技术有限公司进行 cDNA 文库构建和 RNA 测序。文库构建采用 Illumina 的 VAHTS® Universal V8 RNA-seq 文库准备试剂盒(南京诺唯赞生物技术有限公司)进行制备。随后, 在 Illumina NovaSeq 6000 平台(Illumina 公司)上对 cDNA 文库进行双端测序。从得到的原始数据中删除包含接头、poy-N 和低质量的 reads, 获得 clean reads 用于下游分析, 同时计算 clean reads 的 Q30 和 GC 含量。然后使用 HISAT2 将 NBS-1 的数据与本氏烟草参考基因组 WebApollo LAB 3.6^[9]进行比对, 将 BY-2 的数据与普通烟草参考基因组 Ntab_TN90^[10]进行比对; 随后使用 StringTie^[11]对对比上的 reads 进行组装, 并以每千个碱基的转录每百万映射读取的片段数(fragments per kilobase million, FPKM)表示样品中基因的表达量^[12]。筛选 FPKM>1 的基因使用 BIASTX ($e<10^{-5}$)比对非冗余蛋白(non-redundant protein sequence database,

Nr)、基因本体(gene ontology, GO)、同源蛋白质簇(clusters of orthologous groups of proteins, COG)、蛋白质序列(swiss-prot protein sequence database, Swiss-Prot)、真核生物蛋白相邻类的聚簇(clusters of orthologous groups for eukaryotic complete genomes, KOG)、蛋白质结构域家族(the protein family database, Pfam)、直系同源蛋白分组比对(evolutionary genealogy of genes: non-supervised orthologous groups, EggNOG)和京都基因与基因百科全书(Kyoto encyclopaedia of genes and genomes, KEGG)数据库, 进行基因功能注释^[13]。参考文献[14]的研究方法, 计算通路的表达差异, 具体公式如下:

$$\Delta E_p = \sum_{a \in P} \log_2 x_a^i - \sum_{a' \in P} \log_2 y_{a'}^j$$

其中, x_a^i 是通路 P 在 NBS-1 中的基因 a 的表达, $y_{a'}^j$ 是通路 P 在 BY-2 中的基因 a' 的表达, ΔE_p 计算了通路 P 的所有基因在 2 个材料中的表达差别, 通过进行秩和检验, 得到该通路表达上升/下降的显著性。

1.2.7 总黄酮和总生物碱的提取和定量

选取继代培养第 8 天的 NBS-1 和 BY-2 细胞采用分光光度法测定 NBS-1 和 BY-2 中总黄酮和总生物碱的含量, 每种处理的实验测定包含 3 个生物学重复。参照生物碱检测试剂盒(北京华威锐科化工有限公司)说明书, 在紫外可见分光光度计 416 nm 处测定生物碱含量, 其测定原理是生物碱与溴甲酚绿指示剂反应, 生成绿色化合物, 在 416 nm 处有最大吸收峰。首先将 1 mg/mL 东莨菪碱标准溶液稀释至 0.20、0.16、0.12、0.080 和 0.040 mg/mL, 建立了总生物碱的标准曲线方程 $y=3.83x-0.0005$ ($R^2=0.994$), 其中 y 指吸光度值, x 指样品中总生物碱浓度(mg/mL)。取一定体积的悬浮培养细胞置于滤纸上, 减压抽滤至恒重, 称取 0.10 g, 超声破碎

提取 60 min, 12 000 r/min、25 °C离心 10 min, 取上清, 用提取液定容至 1 mL, 加入显色反应液进行吸光度测量。通过线性回归方程计算样品中生物碱的含量。

参照植物总黄酮含量检测试剂盒(北京华锐科化工有限公司)说明书, 使用紫外可见分光光度计在 510 nm 处测定总黄酮含量, 其测定原理是在碱性亚硝酸盐溶液中, 总黄酮与铝离子形成在 510 nm 处有特征吸收峰的红色络合物。首先将 10 mg/mL 芦丁标准溶液稀释至 1.25、0.63、0.31、0.16、0.080、0.040、0.020 和 0.010 mg/mL, 建立了总黄酮的标准曲线方程 $y=0.830 4x-0.006$ ($R^2=0.999$), 其中 y 指吸光度值, x 指样品中总黄酮浓度(mg/mL)。取一定体积的悬浮培养细胞置于滤纸上, 减压抽滤至恒重, 称取 0.10 g, 加入 1 mL 60% (体积分数)的乙醇, 涡旋, 并用超声提取法进行提取, 超声功率 300 W, 破碎 5 s, 间歇 8 s, 60 °C提取 30 min。12 000 r/min、25 °C离心 10 min, 取上清, 用提取液定容至 1 mL, 加入显色反应液进行吸光度测量。通过线性回归方程计算样品中总黄酮的含量。

1.2.8 数据统计和分析

实验数据来自于 3 次生物学重复的平均值。采用 Microsoft Excel 2010 和 OriginPro 2017 软件对实验数据进行处理, 使用 Students' t 检验研究差异的显著性, $P<0.05$ 是有统计学意义的差异, $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 NBS-1 烟草悬浮细胞的分散度好

为了开发兼具科研价值及工业化潜力的烟草悬浮细胞底盘, 选取来源于本氏烟草幼苗的外植体置于愈伤组织诱导培养基上, 2 周左右可以观察到边缘长出愈伤组织, 把愈伤组织切成小块, 放置在愈伤组织继代培养基上培养, 将经过 3 次继代培养后得到的颜色淡黄、质地疏松的愈伤组织用于液体培养(图 1A)。初代培养的细胞形态多样, 大小不一; 悬浮驯化培养 30 代以上, 得到生长迅速的稳定细胞系 NBS-1, 该细胞系外观为大小均一的细颗粒状, 培养基清澈透亮, 细胞色泽呈鲜艳的淡黄色(图 1B), 在摇床悬浮培养第 10 天时 NBS-1 呈半固体状

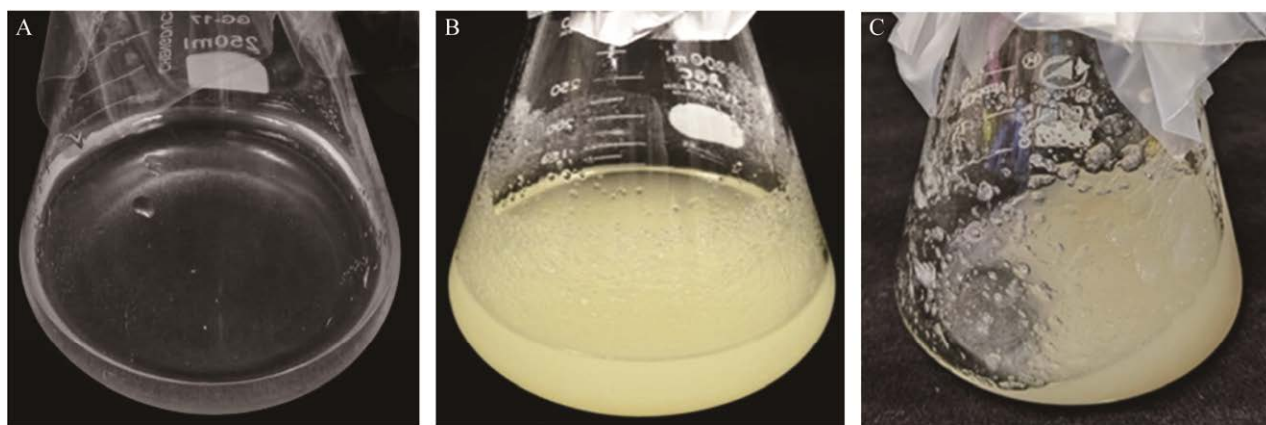


图 1 烟草悬浮细胞 A: 悬浮培养第 1 天的 NBS-1. B: 悬浮培养第 6 天的 NBS-1. C: 悬浮培养第 10 天的 NBS-1

Figure 1 Tobacco suspension cell. The NBS-1 were cultured for 1 day (A), 6 days (B), and 10 days (C).

态,无可见液体培养基,培养物无法摇动(图 1C)。在光学显微镜下可以观察到 NBS-1 和 BY-2 细胞在形态和分散度方面有显著差异, NBS-1 细胞呈球形或卵圆形,细胞核较小,在培养液中呈现单个细胞或少数几个细胞组成的寡细胞团状态。BY-2 细胞呈椭圆形或长圆形,细胞核清晰,在培养液中是多个细胞的聚集状态(图 2A)。根据细胞团数量和细胞总数的比值来评估悬浮细胞系的分散度,结果表明,在继代培养第 3 天和第 8 天时, NBS-1 的分散度均显著高于 BY-2,并且随着培养时间的增加, BY-2 的分散度显著降低,而 NBS-1 分散度的变化并未达到显著水平(图 2B)。综上表明相较于 BY-2, NBS-1 烟草悬浮细胞的分散度好。

2.2 NBS-1 的生物量高

为了进一步研究 NBS-1 的生长特性,测定了培养 2 周内 NBS-1 和 BY-2 细胞鲜重和干重

的变化,并绘制了生长曲线(图 3)。在培养过程中, NBS-1 和 BY-2 细胞生长量接近“S”形,细胞干重变化趋势明显。NBS-1 在 0-4 d 细胞增长不明显,此时为停滞期;在 4-10 d 进入对数期,细胞分裂迅速,细胞干物质的重量急剧增加;在 10 d 后增速减缓,进入平稳期,随后细胞干物质的重量缓慢下降,进入衰退期。BY-2 在 0-4 d 细胞增速较慢,随后进入对数生长期,在第 8 天开始就增速减慢,进入平稳期,继而细胞干物质的重量下降明显。BY-2 在生长第 10 天时达到最大生物量,细胞鲜重为 281.56 g/L,干重为 7.40 g/L; NBS-1 在培养 12 d 时生物量最大,鲜重是 476.39 g/L,干重是 17.18 g/L,分别是 BY-2 的 1.69 倍和 2.32 倍。研究结果显示,在培养周期内的第 6、8、10、12 和 14 天时, NBS-1 的细胞干重均显著高于 BY-2,表明相较于 BY-2, NBS-1 在生物量方面更具优势。

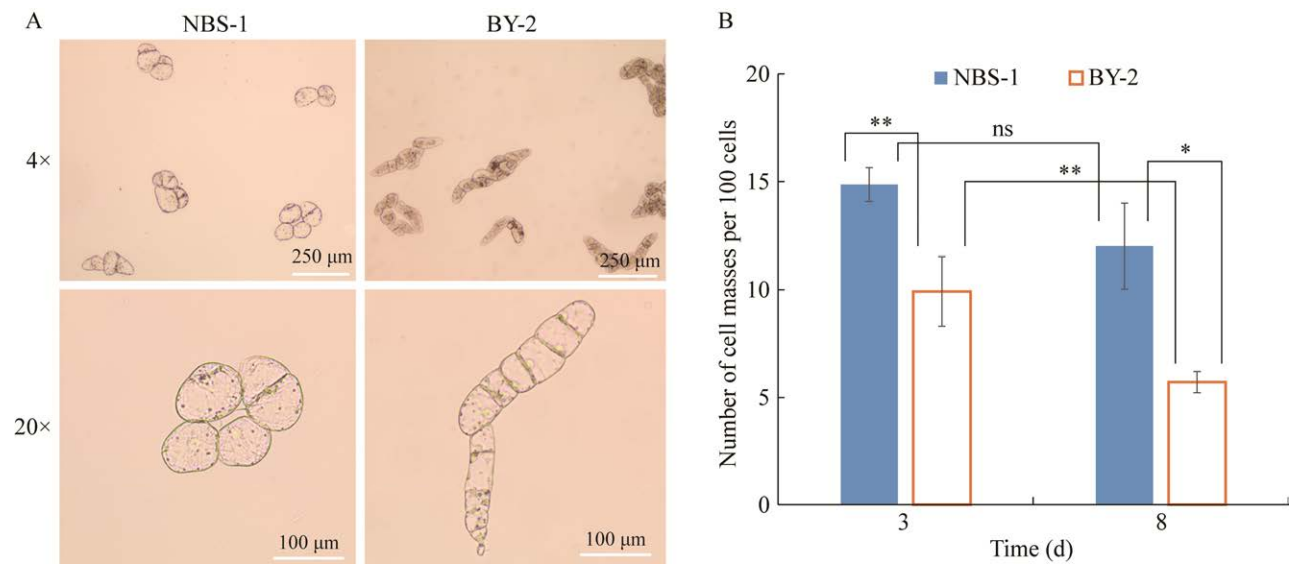


图 2 NBS-1 和 BY-2 细胞显微镜观察和分散度统计 A: 细胞形态观察. B: 细胞分散度统计

Figure 2 Microscopic observation and dispersion statistics of NBS-1 and BY-2 cells. A: Cell morphologic observation. B: Cell dispersion statistic. The significance of differences was analyzed by *t* test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$); ns represents no significant difference between the two groups at 0.05 level; Error lines represent $\bar{x} \pm s$ errors ($n=3$).

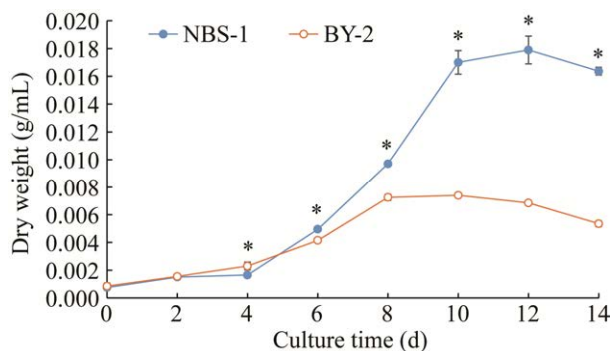


图3 烟草 NBS-1 和 BY-2 的生长曲线

Figure 3 Growth curves of NBS-1 and BY-2 suspension cell. The significance of differences was analyzed by *t* test (*: $P < 0.05$); Error bars represent $\bar{x} \pm s$ errors ($n=3$).

2.3 NBS-1 的瞬时转化效率高

作为合成天然产物的底盘,进行基因工程改造是十分必要的,测试了常用高效的瞬时表达载体 pEAQ-HT 在 NBS-1 和 BY-2 中的转化效率。NBS-1 细胞在与农杆菌共培养 3 d 后即可观察到有明显 GFP 绿色荧光的表达,GFP 在细胞质和细胞核积累,在共培养 5 d 时具有荧光的细

胞数量最多且荧光强度最强(图 4A)。在 BY-2 中,共培养第 3 天时未观察到明显的 GFP 荧光,仅有极少数的 BY-2 细胞在第 4 天出现荧光(图 4A),随着时间的增长,具有荧光的细胞数量并没有显著增加,荧光强度也没有明显变化。在共培养第 5 天时统计转化效率,NBS-1 为 81.00%,显著高于 BY-2 的 9.53% (图 4B)。

2.4 NBS-1 和 BY-2 转录组学比较分析

2.4.1 转录组测序和组装

为了在基因表达水平上系统性阐述 NBS-1 和 BY-2 的生理代谢特征,选取培养第 8 天的 NBS-1 和 BY-2 细胞进行转录组测序和分析。对原始数据质控后,NBS-1 细胞样品共获得 17.22 Gb clean data,每个样品的 clean data 在 5.38–6.00 Gb 之间, clean data 质量值大于或等于 30 的碱基(Q30)所占百分比在 90.85%以上,G+C 碱基含量介于 43.51%–43.61%之间,与参考基因组的比对效率在 92.14%–92.27%之间;BY-2 细胞样品共获得 18.26 Gb clean data,每个样品的 clean data 在 5.84–6.52 Gb 之间,Q30 百分比在 93.47%

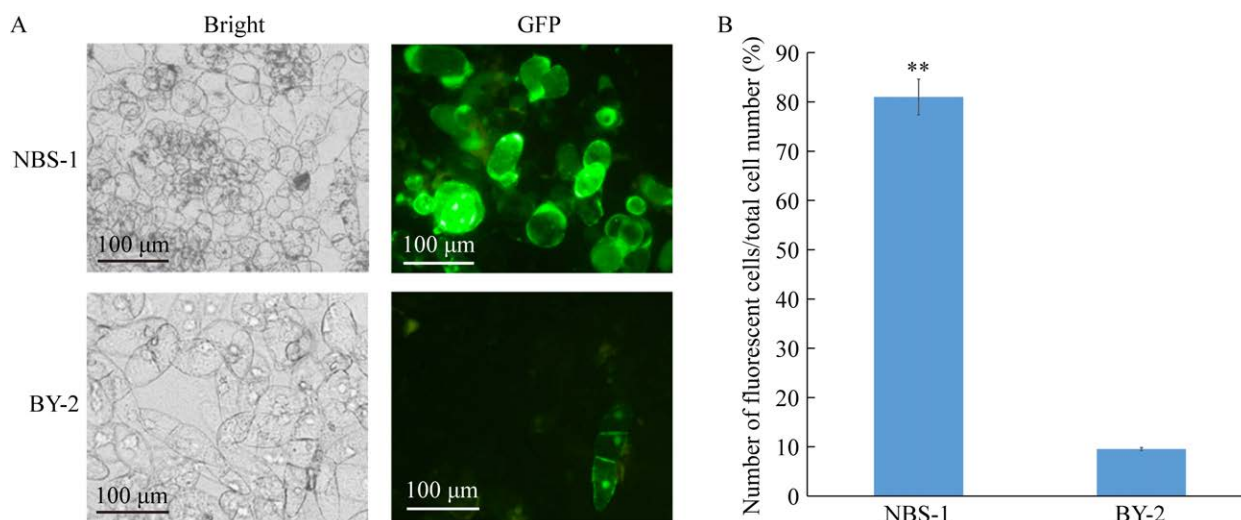


图4 烟草 NBS-1 和 BY-2 细胞的 GFP 转化 A: GFP 荧光观察. B: 瞬时转化效率统计

Figure 4 GFP transformation in NBS-1 and BY-2 cells. A: Fluorescence observation. B: Transient transformation efficiency. The significance of differences was analyzed by *t* test (**: $P < 0.01$); Error lines represent $\bar{x} \pm s$ errors ($n=3$).

以上, G+C 碱基含量介于 44.48%–44.78% 之间, 与参考基因组的比对效率在 94.17%–95.06% 之间(表 1)。在 NBS-1 中, 组装后得到 41 710 条基因, 其中表达量 FPKM 值大于 1 的有 26 583 条(63.73%), 大于 10 的有 8 156 条(19.55%)。BY-2 转录组数据得到 61 105 条基因, 其中表达量 FPKM 值大于 1 的有 32 311 条(52.88%), 大于 10 的有 10 416 条(17.05%)。

2.4.2 NBS-1 和 BY-2 的细胞组成功能组差异显著

GO 功能注释是对基因和蛋白功能进行限定和描述, 从而来全面描述生物体中基因和基因产物的属性^[15]。GO 注释结果表明, NBS-1 共有 20 839 个基因被注释到 40 条功能组, 其中执行细胞组成(cellular component)的有 3 条(图 5A), 执行生物学过程(biological process)的有 23 条(图 5B), 执行分子功能(molecular function)的有 14 条(图 5C); BY-2 共有 23 433 个基因被注释到 55 条功能组, 其中执行细胞组成(cellular component)的有 19 条(图 5A), 执行生物学过程(biological process)的为 21 条(图 5B), 执行分子功能(molecular function)的有 15 条(图 5C)。NBS-1 和 BY-2 在细胞组成部分的注释差异最大, 主要体现在功能组的数量和类别的不同:

在 NBS-1 中仅有细胞结构体(cellular anatomical entity)、细胞内(intracellular)和蛋白复合物(protein-containing complex) 3 条功能组; 不同于 BY-2 中的 19 条功能组, 包括细胞(cell)、细胞组分(cell part)、细胞器(organelle)、细胞膜(membrane)、细胞膜组分(membrane part)和细胞器组分(organelle part)等, 功能组属性与数量的不同表明 NBS-1 和 BY-2 在细胞组分层面的差异显著, 这些差异应当与 2 种细胞的种间差异相关, 还可能与 BY-2 细胞数十年继代培养而 NBS-1 仅仅经过 1 年的继代培养有关。

2.4.3 NBS-1 的黄酮类合成通路基因高表达而生物碱合成通路基因低表达

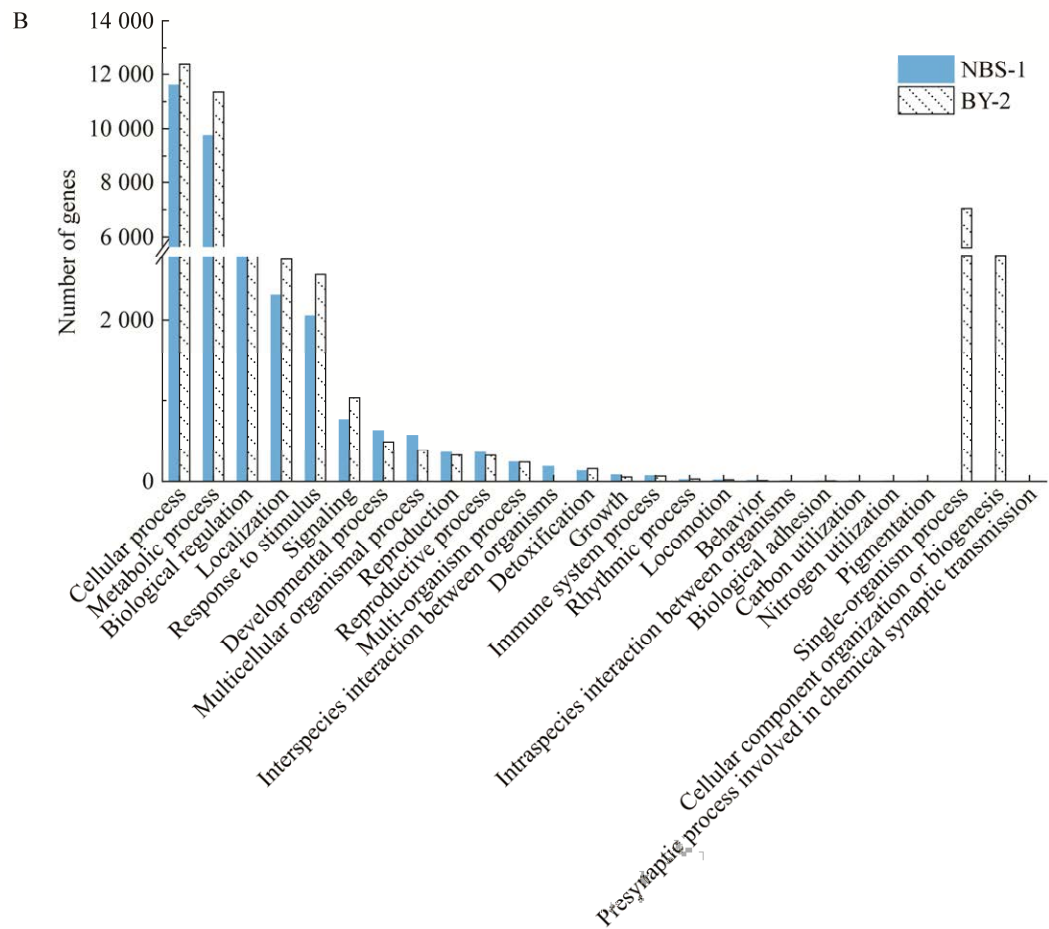
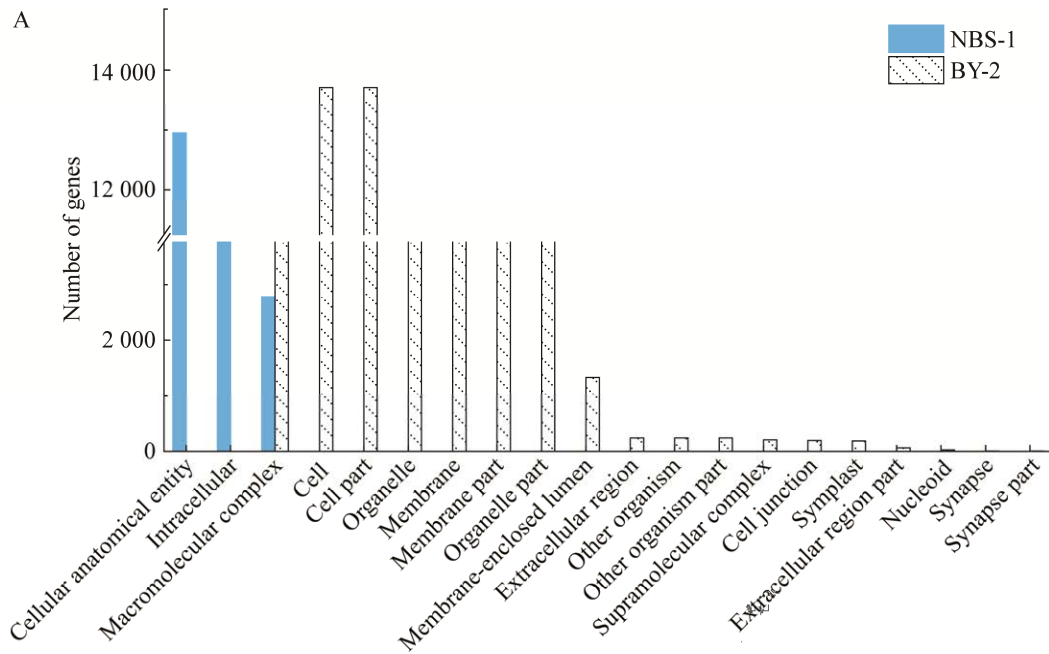
以 NBS-1 和 BY-2 细胞的转录组数据比对 KEGG 数据库, 尝试描述 NBS-1 和 BY-2 的代谢特征及偏好性。NBS-1 和 BY-2 分别注释到 9 209 个和 10 215 个基因, 分布在 135 条 KEGG 通路中, 其中 104 条通路与新陈代谢(metabolism)相关。为了更好地利用烟草细胞底盘合成天然产物, 聚焦了 2 种细胞底盘的次生代谢过程, 次生代谢物生物合成通路有 23 条, 相比于 BY-2, NBS-1 中表达显著上调的前 6 条合成通路中有 4 条与黄酮类化合物生物合成相关, 分别为黄酮及黄酮醇(flavone and flavonol biosynthesis)、二苯

表 1 转录组信息统计

Table 1 Transcriptome information statistics

Sample name	Clean reads	Clean bases	GC content (%)	≥Q30 (%)	Total reads	Mapped reads
NBS-1	19 355 905	5 780 246 432	43.61	91.14	38 711 810	35 677 554 (92.16%)
NBS-2	20 956 187	6 259 257 410	43.56	90.85	41 912 374	38 672 783 (92.27%)
NBS-3	21 599 507	6 451 858 442	43.51	91.23	43 199 014	39 802 051 (92.14%)
BY-2-1	21 246 203	6 333 568 486	44.78	94.34	42 492 406	40 100 733 (94.37%)
BY-2-2	23 436 036	7 011 502 112	44.48	94.15	46 872 072	44 558 555 (95.06%)
BY-2-3	20 975 134	6 266 812 644	44.58	93.47	41 950 268	39 505 230 (94.17%)

Samples: Sample name; Total reads: Total number of reads; Clean reads: Counts of clean PE (pair-end) reads; Clean bases: Total base number of clean data; GC content: Percentage of G (guanine) and C (cytosine) in clean data; ≥Q30: Percentage of bases with Q-score no less than Q30; Mapped reads: Percentage of G (guanine) and C (cytosine) in clean data.



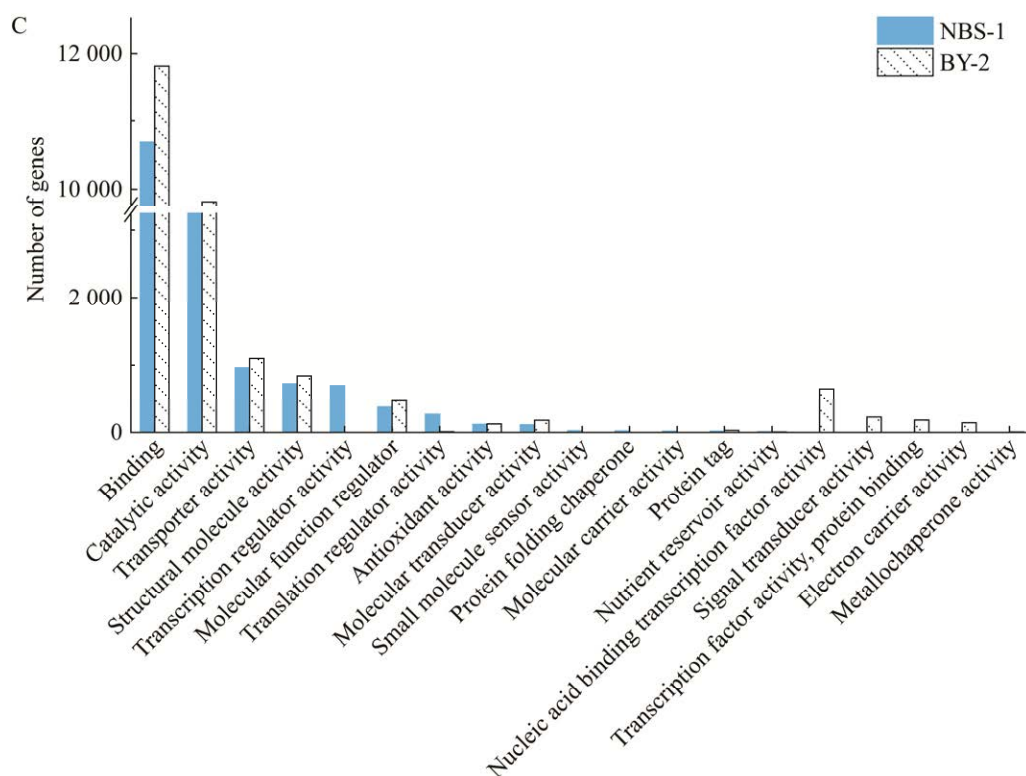


图 5 烟草 NBS-1 和 BY-2 细胞的 GO 功能注释分析 A: 细胞组成. B: 生物学过程. C: 分子功能
Figure 5 GO function annotation analysis of NBS-1 and BY-2 cells. A: Cellular component. B: Biological process. C: Molecular function.

乙烯类(stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis)、类黄酮(flavonoid biosynthesis)和苯丙烷类(phenylpropanoid biosynthesis)生物合成途径。通过进一步分析总黄酮合成通路的表达,发现 NBS-1 中总黄酮合成通路的表达同样显著高于 BY-2 (图 6), 暗示 NBS-1 中黄酮类化合物的生物合成途径更为活跃。

烟碱是烟草的特征化合物,也是烟草中含量最高的生物碱,一般占总生物碱含量的 90% 以上^[16]。总生物碱的合成包括异喹啉生物碱的生物合成(isoquinoline alkaloid biosynthesis)、托品烷、哌啶和吡啶生物碱的生物合成(tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis)与吲哚生物碱生物合成(indole alkaloid biosynthesis),它们在 NBS-1 中的表达均显著低于 BY-2, 总生

物碱合成通路的表达同样显著低于 BY-2 (图 6), 暗示 NBS-1 中生物碱及烟碱类化合物的合成代谢过程显著弱于 BY-2。

2.5 NBS-1 的黄酮类化合物含量高而生物碱含量极低

转录组分析发现,在黄酮类化合物的合成通路中, NBS-1 的基因表达量显著高于 BY-2,但在生物碱合成通路中, NBS-1 的基因表达量显著低于 BY-2。为了验证这一结果,对 NBS-1 和 BY-2 中代谢物总黄酮和总生物碱的含量进行了定量。BY-2 细胞中的总黄酮含量低于试剂盒的检测线,未检测到黄酮类物质; NBS-1 细胞中总黄酮的含量为 0.11 mg/g (鲜重),与表达分析结果相一致(图 7A),暗示 NBS-1 更有利于作为黄酮类化合物合成的底盘。

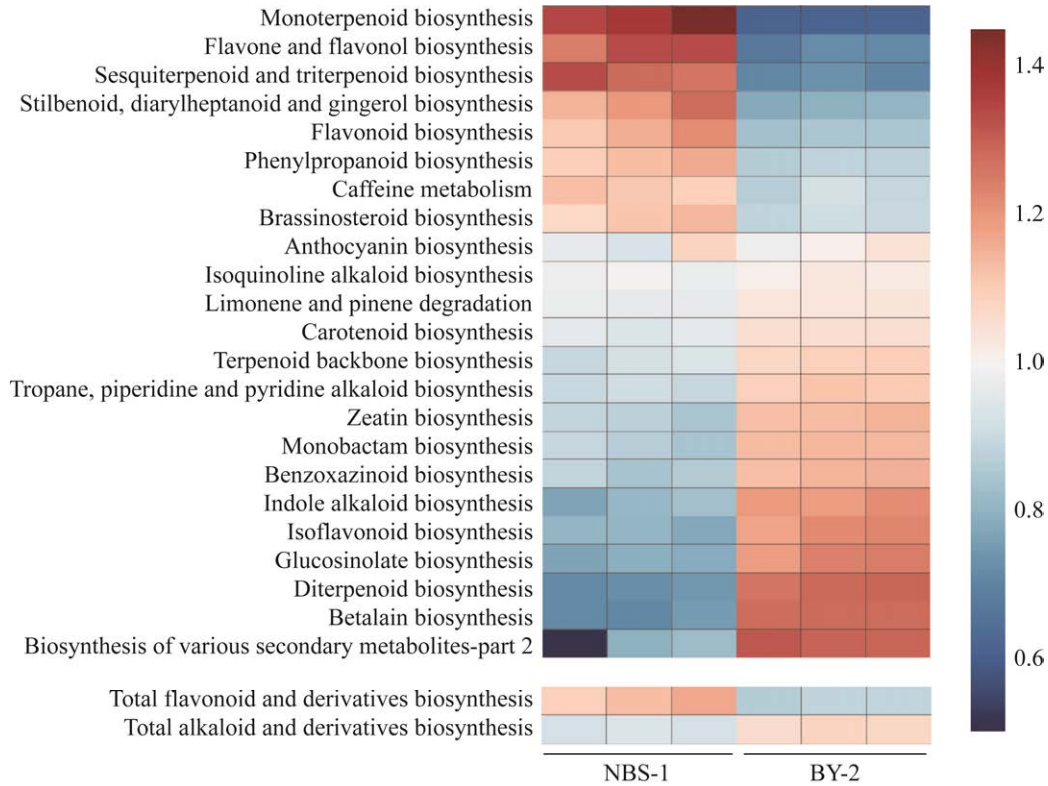


图 6 NBS-1 和 BY-2 细胞 KEGG 通路表达热图

Figure 6 KEGG pathway expression heat map of NBS-1 and BY-2 cells. The right ordinate represents the KEGG orthology (KO) number of the KEGG metabolic pathway.

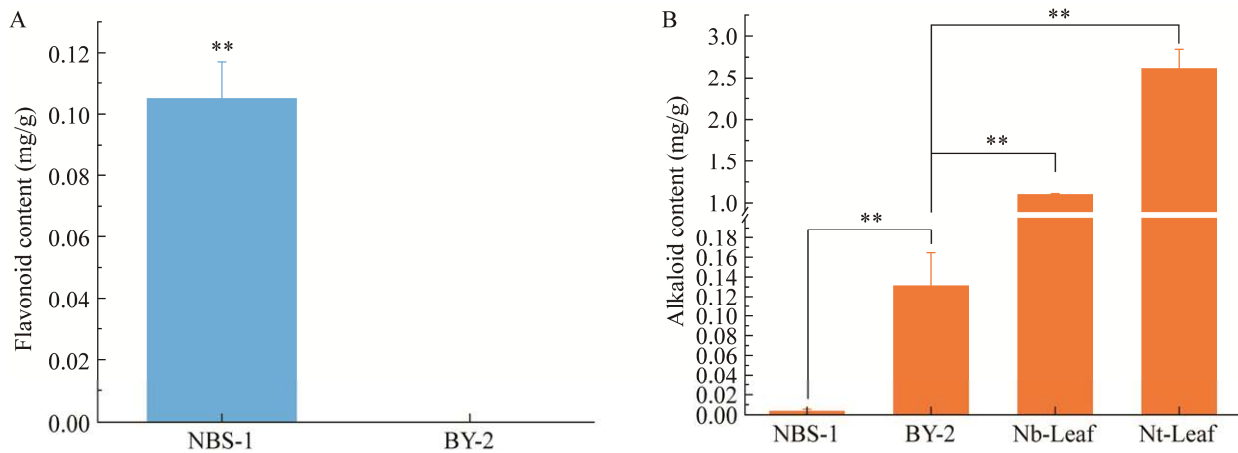


图 7 烟草总黄酮和总生物碱含量测定 A: NBS-1 和 BY-2 细胞总黄酮含量. B: NBS-1、BY-2、本氏烟草叶片(Nb-Leaf)和普通烟草叶片(Nt-Leaf)的总生物碱含量

Figure 7 Total alkaloids and total flavonoids were determined in tobacco. A: Total flavonoids in NBS-1 and BY-2 cells. B: Total alkaloids in NBS-1, BY-2, Nb-Leaf, and Nt-Leaf. The significance of differences was analyzed by *t* test (**: $P < 0.01$); Error lines represent $\bar{x} \pm s$ errors ($n=3$).

为了更好地掌握不同烟草底盘中烟碱的含量,检测了 NBS-1 细胞、BY-2 细胞、普通烟草叶片和本氏烟草叶片中总生物碱含量(图 7B)。在本研究中,普通烟草叶片中总生物碱的含量最高,为 2.61 mg/g (鲜重);本氏烟草叶片次之,为 1.10 mg/g (鲜重);BY-2 细胞总生物碱含量显著低于烟草叶片,为 0.13 mg/g (鲜重);NBS-1 中总生物碱的量仅为 0.003 4 mg/g (鲜重),是 BY-2 细胞的 2.62%,显著低于 BY-2 细胞。综上,NBS-1 是烟碱含量极低的烟草底盘细胞。

3 讨论与结论

在利用合成生物学手段生产天然产物的过程中,相比于对底盘细胞的系统性代谢改造,针对目标产物选择合适的底盘细胞更为关键。针对植物天然产物的生物合成,相比低等微生物细胞底盘,植物细胞底盘具有多重优点^[17-18]:具有更为精细复杂的区室化和细胞器结构,有助于多步复杂合成反应的发生和协调;相似的细胞大环境和后修饰系统使得植物酶(细胞色素 P450 酶等)表现更好;合成途径反应产物的耐受性更好等^[19]。烟草植株底盘存在种植过程繁琐、生命周期长、代谢途径复杂和难以实现工业化等问题,导致植物合成生物发展缓慢,而烟草悬浮细胞底盘体系可有效解决上述问题。易培养、分散度好、生物量高一直都是工业底盘开发的重要标准和研究方向^[20-21]。

本研究旨在开发高生物量及分散度、易于遗传代谢改造和工业化生产的烟草悬浮细胞底盘。首先,本研究建立了分散性好和生物量高的本氏烟草悬浮培养体系,更适合工业化放大生产。在植物细胞放大生产中,良好的细胞分散性和均一性可以减少细胞集聚体形成和细胞黏附的发生,从而与养分物质充分混合,利于

植物细胞的实验操作和高密度培养。激素配比是诱导愈伤组织和建立悬浮细胞系的关键因素之一,通过选择合适配比的激素诱导本氏烟草,并经过长时间的驯化获得分散性好、均一性好和生长迅速的悬浮细胞系 NBS-1,其生物量高于文献报道^[22]。光照对悬浮细胞的培养、生长状态及代谢发育具有显著影响,通常来讲避光培养有助于植物细胞的脱分化进程,有利于建立分散度高的悬浮细胞系,故通常避光诱导构建烟草的悬浮细胞系^[5,22]。脱分化程度高的植物悬浮细胞系通常不具备叶片特有的完整且高效的光合自养能力,单以细胞增殖和放大增产为目的,异养比自养的培养方式显得更加高效,且避光异养方式摆脱了培养过程中对光的依赖,使反应器的开发及放大过程变得更加简单,更有利于快速和高密度细胞培养,实现高效的工业化放大生产。此外,有些观点认为光照会诱导一些植物生长调节因子的降解,对细胞生长增殖不利^[23]。针对本研究开发的 NBS-1,与避光培养相比,光照使得烟草悬浮细胞的生长速率更慢,生物量更低。但同时也有研究表明,一些种类的植物悬浮细胞在适当光照下比完全避光条件下生长增殖更快,比如拟南芥悬浮细胞的培养条件通常为全日照或者光暗交替^[24]。这也许与植物本身的光周期习性有关,长日照植物拟南芥的生长发育等过程及相关调节因子可能需要更多的光照调节参与,使得无光条件显著抑制拟南芥细胞的培养,很难通过避光诱导使细胞进一步脱分化。但短日照植物烟草在这方面受到的影响可能较小,作为底盘使用时的培养条件也通常是避光^[21-22]。此外,光照时间长短、光质和光强对植物悬浮细胞的生长及次生代谢过程的影响有待进一步研究。并且代谢产物的合成量一般与细胞的生长周期是同步的,与 BY-2 细胞相比,本氏烟草细胞悬浮培养

的平稳期的时间持续时间更长，这也暗示 NBS-1 在代谢物合成产量方面的优势。

作为合成天然产物的底盘，还需要具备良好的基因工程改造潜力，本研究发现广泛使用的瞬时高效表达系统 pEAQ-HT，在 NBS-1 中的转化效率远高于 BY-2，这很有可能是由于本氏烟草和普通烟草对细菌和病毒的易感性的差异造成。之后，利用组学分析结合实验测定发现 NBS-1 的高黄酮类和低生物碱的代谢特性。生物碱是烟草中的主要次生代谢物，主要包括烟碱(nicotine)、降烟碱(nornicotine)、新烟草碱(anatabine)等^[16,25]。以尼古丁为代表的烟碱被认为是植物界最著名的几种天然毒性物质之一，降低烟碱合成、纯化出无毒性物质的产品是烟草底盘开发必须要解决的问题。BY-2 被认为是低烟碱含量的烟草细胞系^[26]，而本研究诱导的 NBS-1 的烟碱含量比 BY-2 还要低很多，说明烟碱含量方面优势明显。以黄酮类为代表的代谢偏好性分析结果，也有助于指导 NBS-1 对应产品的选择与合成。

REFERENCES

- [1] TUSÉ D, NANDI S, McDONALD KA, BUYEL JF. The emergency response capacity of plant-based biopharmaceutical manufacturing-what it is and what it could be[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 594019.
- [2] FUENTES P, ZHOU F, ERBAN A, KARCHER D, KOPKA J, BOCK R. A new synthetic biology approach allows transfer of an entire metabolic pathway from a medicinal plant to a biomass crop[J]. *eLife*, 2016, 5: 13664.
- [3] ALLEN QM, FEBRES VJ, RATHINASABAPATHI B, CHAPARRO JX. Engineering a plant-derived astaxanthin synthetic pathway into *Nicotiana benthamiana*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 12: 831785.
- [4] DORAN PM. Foreign protein production in plant tissue cultures[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2000, 11(2): 199-204.
- [5] KATO K, MATSUMOTO T, KOIWAI A, MIZUSAKI S, NISHIDA K, TAMAKI E. Liquid suspension culture of tobacco cells[J]. *Fermentation Technology Today*, 1972: 689-695.
- [6] HAN J, LIU HT, WANG SC, WANG CR, MIAO GP. A class I TGA transcription factor from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. modulates the biosynthesis of secondary metabolites in both native and heterologous hosts[J]. *Plant Science*, 2020, 290: 110293.
- [7] IMAMURA T, ISOZUMI N, HIGASHIMURA Y, MIYAZATO A, MIZUKOSHI H, OHKI S, MORI M. Isolation of amaranthin synthetase from *Chenopodium quinoa* and construction of an amaranthin production system using suspension-cultured tobacco BY-2 cells[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(5): 969-981.
- [8] HUANG AC, JIANG T, LIU YX, BAI YC, REED J, QU BY, GOOSSENS A, NÜTZMANN HW, BAI Y, OSBOURN A. A specialized metabolic network selectively modulates *Arabidopsis* root microbiota[J]. *Science*, 2019, 364(6440): eaau6389.
- [9] RANAWAKA B, AN JY, LORENC MT, JUNG H, SULLI M, APREA G, RODEN S, LLACA V, HAYASHI S, ASADYAR L, LeBLANC Z, AHMED Z, NAIM F, de CAMPOS SB, COOPER T, de FELIPPES FF, DONG PF, ZHONG SL, GARCIA-CARPINTERO V, ORZAEZ D, et al. A multi-omic *Nicotiana benthamiana* resource for fundamental research and biotechnology[J]. *Nature Plants*, 2023, 9(9): 1558-1571.
- [10] SIERRA N, BATTEY JND, OUADI S, BAKAHER N, BOVET L, WILLIG A, GOEPFERT S, PEITSCH MC, IVANOV NV. The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3833.
- [11] PERTEA M, PERTEA GM, ANTONESCU CM, CHANG TC, MENDELL JT, SALZBERG SL. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads[J]. *Nature Biotechnology*, 2015, 33(3): 290-295.
- [12] TRAPNELL C, WILLIAMS BA, PERTEA G, MORTAZAVI A, KWAN G, van BAREN MJ, SALZBERG SL, WOLD BJ, PACHTER L. Transcript assembly and quantification by RNA-seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(5): 511-515.
- [13] ALTSCHUL SF, MADDEN TL, SCHÄFFER AA, ZHANG JH, ZHANG Z, MILLER W, LIPMAN DJ.

- Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [14] HU J, LOCASALE JW, BIELAS JH, O'SULLIVAN J, SHEAHAN K, CANTLEY LC, VANDER HEIDEN MG, VITKUP D. Heterogeneity of tumor-induced gene expression changes in the human metabolic network[J]. *Nature Biotechnology*, 2013, 31(6): 522-529.
- [15] ASHBURNER M, BALL CA, BLAKE JA, BOTSTEIN D, BUTLER H, CHERRY JM, DAVIS AP, DOLINSKI K, DWIGHT SS, EPPIG JT, HARRIS MA, HILL DP, ISSEL-TARVER L, KASARSKIS A, LEWIS S, MATESE JC, RICHARDSON JE, RINGWALD M, RUBIN GM, SHERLOCK G. Gene ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25-29.
- [16] SISSON VA, SEVERSON RF. Alkaloid composition of the *Nicotiana* species[J]. *Contributions to Tobacco & Nicotine Research*, 1990, 14(6): 327-339.
- [17] MONTAÑO LÓPEZ J, DURAN L, AVALOS JL. Physiological limitations and opportunities in microbial metabolic engineering[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(1): 35-48.
- [18] LIN JJ, YIN X, ZENG YR, HONG XY, ZHANG SC, CUI BM, ZHU QL, LIANG ZS, XUE ZY, YANG DF. Progress and prospect: biosynthesis of plant natural products based on plant chassis[J]. *Biotechnol Advances*, 2023, 69: 108266.
- [19] 谷荣辉, 洪利亚, 龙春林. 植物细胞培养生产次生代谢物的途径[J]. *植物生理学报*, 2013, 49(9): 869-881. GU RH, HONG LY, LONG CL. The ways of producing secondary metabolites *via* plant cell culture[J]. *Plant Physiology Journal*. 2013, 49(9): 869-881 (in Chinese).
- [20] LIU X, ZHANG P, ZHAO Q, HUANG AC. Making small molecules in plants: a chassis for synthetic biology-based production of plant natural products[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(2): 417-443.
- [21] LI Q, JIA E, YAN Y, MA R, DONG J, MA P. Using the strategy of inducing and genetically transforming plant suspension cells to produce high value-added bioactive substances[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2022, 70(3): 699-710.
- [22] 孔琼, 袁盛勇, 肖亚楠, 杨文超, 陈俊梅, 蒋双番, 史艳春, 杨升. 烟草悬浮细胞系的构建[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(1): 29-31. KONG Q, YUAN SY, XIAO YN, YANG WC, CHEN JM, JIANG SF, SHI YC, YANG S. Construction of tobacco suspension cell line[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2018, 46(1): 29-31 (in Chinese).
- [23] 杨斌, 郭海燕. 植物组织培养的影响因素[J]. *科技信息*, 2006(9S): 191-191. YANG B, GUO HY. Influencing factors of plant tissue culture[J]. *Science Information*, 2006(9S): 191-191 (in Chinese).
- [24] 李建安, 胡芳名. 拟南芥悬浮细胞生长特性及其继代培养条件[J]. *经济林研究*, 2006, 24(1): 26-29. LI JA, HU FM. Subculture conditions and growth characteristics of *Arabidopsis* suspension culture[J]. *Economic Forest Research*, 2006, 24(1): 26-29 (in Chinese).
- [25] 王威威, 席飞虎, 杨少峰, 江丽芳, 王峰吉. 烟草烟碱合成代谢调控研究进展[J]. *亚热带农业研究*, 2016, 12(1): 62-67. WANG WW, XI FH, YANG SF, JIANG LF, WANG FJ. Progress on nicotine metabolism regulation in tobacco[J]. *Subtropical Agriculture Research*, 2016, 12(1): 62-67 (in Chinese).
- [26] NAGATA T, NEMOTO Y, HASEZAWA S. Tobacco BY-2 cell line as the "HeLa" cell in the cell biology of higher plants[J]. *International Review of Cytology*, 1992, 132: 1-30.

(本文责编 陈宏宇)