

高产 SOD 大蒜悬浮细胞系的选育

李志勇¹, 罗焕亮², 郭 勇²

(1. 广州出入境检验检疫局, 广东广州 510623; 2. 华南理工大学食品与生物工程学院, 广东广州 510640)

摘 要: 筛选获得了高产 SOD 大蒜悬浮细胞系, 培养 18 d 后达到最大生物量及最大 SOD 总酶活分别为 22.12 g·DW/L 及 10.81×10^4 U/L, 最大单位细胞酶活为 679.67 U/g·FW, SOD 最大比活力可达 85.98 U/mg Pro, 具有较强的 SOD 合成能力。

关键词: 大蒜; 高产细胞系; 悬浮培养; SOD

中图分类号: Q945.51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)03-0252-04

Selection of high-yield SOD garlic suspension cell line

LI Zhi-yong¹, LUO Huan-liang², GUO Yong²

(1. Inspection and Quarantine Bureau of Guangzhou, Guangzhou 510623, China; 2. College of Food and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: High-yield SOD garlic suspension cell line was obtained after selection. The maximum biomass was 22.12 g·DW/L while the maximum total SOD activity was 10.81×10^4 U/L by selecting garlic cell line after 18 days' suspension culture. The maximum SOD unit activity and the maximum specific SOD activity of selected garlic cell line were 679.67 U/g·FW and 85.98 U/mg Protein respectively.

Key words: *Allium sativum* L; high-yield cell line; suspension culture; superoxide dismutase

大蒜是百合科葱属植物蒜(*Allium sativum* L.)的鳞茎,在我国南北广泛栽培。该植物不仅可作为蔬菜鲜食或加工,还可作为香辛调料,并且具有很高的药用价值。在植物界中,大蒜是含超氧化物歧化酶(SOD)量最高的植物之一,完全可作为 SOD 的天然植物来源^[1]。现已明确知道, SOD 在抗辐射损伤、抗炎症、预防衰老和治疗癌症肿瘤等方面具有积极作用。运用大蒜细胞大量培养生产代谢药物超氧化物歧化酶,应用前景广阔。本试验在以往研究的基础上,进行了高产 SOD 大蒜细胞系的筛选工作,以期为大蒜细胞悬浮培养生产 SOD 打下基础,

最终实现大蒜细胞大规模培养生产 SOD。

1 材料与方 法

1.1 材料及培养条件

采用筛选得到的继代稳定的大蒜愈伤组织^[2],以 40 g·FW/L 的接种量转入含 3%蔗糖的 MS+3.0 mg/L 2,4-D+1.2 mg/L 6-BA 液体培养基中。固体培养基为添加 0.8%琼脂的液体培养基。悬浮培养条件为:温度 25℃,全天光照,光强 1 200 lx,摇床转速 110 r/min。继代培养条件为温度 25℃,600 lx 12 h 循环光照。

收稿日期: 2001-03-26

作者简介: 李志勇(1972-),男,江西黎川人,博士,工程师,发酵工程专业,现在广州检验检疫局食品实验室工作。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29676017)

1.2 预选悬浮细胞系的获得

选择有代表性的黄色和绿色愈伤组织各 5 个夹碎为小细胞团,在液体培养基中加玻璃珠培养 18 d,然后将分散的小细胞团在 MS 固体培养基上进行连续继代培养,去杂后转入液体培养基悬浮培养,得到 10 个稳定性能较好的细胞系作为预选悬浮细胞系。

1.3 高产大蒜悬浮细胞系的筛选

将生长对数期的预选悬浮细胞系接种在 MS 液体培养基,悬浮培养 30 d。在培养 12 d 后每隔 3 d 取样测定其胞内 SOD 总酶活,取培养过程中的最大总酶活作为筛选依据。

1.4 细胞生长的测定

培养过程中,定期取下 2~3 瓶培养物。布氏漏

斗真空抽滤后得到的细胞用多倍体积的蒸馏水充分洗涤,抽干后称取细胞湿重,然后于 60 °C 烘箱中烘干至恒重,干燥器中冷却后称取细胞干重。生长指数为培养过程中的最大生物量(湿重)除以接种生物量(湿重)之比值。

1.5 大蒜细胞内 SOD 的测定

大蒜细胞 SOD 为较稳定的胞内酶,其类型以 Cu,Zn-SOD 为主^[2]。称取鲜重为 100 mg 的大蒜细胞,用预冷的抽提缓冲液(200 mM 磷酸二氢钠/磷酸氢二钠,pH7.8,4% [W/V] PVP,0.5% [V/V] Triton X-100)洗涤 3 次。加入上述抽提缓冲液,用 40 W 超声波处理 10 min,4 000 r/min 离心 10 min,得到的含酶上清液转入透析袋中,黑暗条件下,对 1 L 磷酸缓冲液(200 mM 磷酸二氢钠/磷酸氢二钠,

表 1 10 个预选悬浮细胞系的生长和状态特征

Table 1 Cell growth and tissue characters of 10 pre-select cell lines

细胞系 Cell line	生长指数 Growth index	状态特征 Tissue characters
1	4.58	浅黄色小颗粒,粒径<1 mm,颗粒间松散呈沙状。Yellowy granule,size of tissue<1 mm,loose.
2	2.12	绿色块状,质地较致密,粒径>2 mm,不易分散。Green nubby,compact,size of tissue>2 mm.
3	3.25	绿色颗粒,粒径>1 mm,颗粒易结团。Green granule,size of tissue>1 mm,combinative.
4	3.70	绿色小颗粒,粒径<1 mm,颗粒间较松散。Green granule,size of tissue<1 mm,loose.
5	5.35	黄色小颗粒,粒径<1 mm,颗粒间松散呈沙状。Yellow granule,size of tissue<1 mm,loose.
6	5.49	浅黄色小颗粒,粒径<1 mm,颗粒间松散呈沙状。Yellowy granule,size of tissue<1 mm,loose.
7	1.24	绿色块状,质地较致密,粒径>2 mm,不易分散。Green nubby,compact,size of tissue>2 mm.
8	4.98	浅黄色小颗粒,粒径<1 mm,颗粒间松散呈沙状。Yellowy granule,size of tissue<1 mm,loose.
9	2.05	淡绿色小颗粒,粒径<1 mm,颗粒间较松散。Virescent granule,size of tissue<1 mm,loose.
10	4.89	浅黄色小颗粒,粒径<1 mm,颗粒间松散呈沙状。Yellowy granule,size of tissue<1 mm,loose.

pH7.8)透析 24 h,期间更换缓冲液 4 次。取透析后酶液采用微量连苯三酚自氧化法^[3]测定其 SOD 酶活力。

1.6 酶液蛋白质含量的测定

采用 Bradford 的 CBBG-250 法^[4]。

2 结果与分析

2.1 预选悬浮细胞系的生长和形态特征

预选悬浮细胞系为 10 个稳定性能较好的细胞系,它们的生长和状态特征如表 1。

从上表可知,凡是从黄色或浅黄色愈伤组织得到的悬浮细胞系其生长指数均较高,而且颗粒的粒径均小于 1 mm,而从绿色或淡绿色愈伤组织获得的悬浮细胞系生长指数偏低,而且颗粒偏大,有些颗粒易结团,不易分散,难于适应大规模细胞悬浮

培养。因此,考虑到悬浮细胞系的生长速率及松散程度,应采用黄色或浅黄色大蒜悬浮细胞系以获得较大的生物量。

2.2 高产大蒜悬浮细胞系的筛选

为了进一步比较 10 个预选细胞系合成代谢产物 SOD 的能力,将生长对数期培养的悬浮细胞系接种在 MS 培养基悬浮培养。各个大蒜悬浮细胞系最大总酶活出现时间及合成 SOD 的能力见表 2。

从表中结果可知,不同大蒜悬浮细胞系合成 SOD 的能力各有差异,黄色或浅黄色大蒜悬浮细胞系合成 SOD 的能力比绿色或淡绿色大蒜悬浮细胞系高。而且,细胞系生长指数的大小与其合成 SOD 的能力呈正相关,表明大蒜细胞生长与 SOD 合成是相偶联的。另外,不同悬浮细胞系达到 SOD 最大总酶活的时间也有一定差异,从培养开始后 18~24 d

不等。

综合比较预选的 10 个大蒜细胞系,从细胞生长速度、细胞系状态和合成 SOD 能力等方面考虑,选择细胞系 6,其生长指数为 5.49 (219.6 g, FW/L),达到最大 SOD 总酶活为培养后 18 d,合成 SOD 最大能力为 10.81×10^4 U/L,作为高产 SOD 大蒜悬浮细胞系。

表 2 不同细胞系合成 SOD 能力比较
Table 2 Synthesis ability of SOD
among 10 garlic cell lines

细胞系 Cell line	最大总酶活出现时间(d) Appearance time of maximum SOD activity	SOD 合成能力 ($\times 10^4$ U/L) Synthesis ability of SOD
1	21	7.69
2	21	3.16
3	21	5.35
4	21	6.17
5	18	10.54
6	18	10.81
7	24	2.37
8	18	8.96
9	24	3.05
10	21	8.59

2.3 高产 SOD 悬浮细胞系细胞生长和合成 SOD 的特性

为了进一步弄清高产 SOD 悬浮细胞系的特性,我们采用 40 g, FW/L 接种量,接种到悬浮培养基中,定期观察高产悬浮细胞系的特性,结果如图 1 所示。

从图 A 可见,在培养初期,大蒜细胞生长缓慢,总 SOD 酶活变化不大。随着培养的进行,大蒜细胞新陈代谢过程加快,胞内合成 SOD 的能力随之加强。当细胞对数生长期结束时,SOD 的合成还会持续一段时间才会趋于稳定。随后,细胞进入平衡期和衰老期,细胞活力下降,也削弱了合成 SOD 的能力,导致培养后期 SOD 总酶活呈下降趋势。大蒜细胞生长和 SOD 积累呈现密切的偶联关系,在培养 18 d 时细胞生物量和 SOD 总酶活都达到最大值,分别为 22.12 g, DW/L 及 10.81×10^4 U/L。因此,为了获得最大 SOD 总酶活,选取 18 d 龄的细胞进行收获是适宜的。

图 B 显示了大蒜细胞培养生产 SOD 的单位细胞酶活和 SOD 比活力变化过程。由图可见,我们筛选得到的大蒜悬浮培养细胞具有较强的合成 SOD

的能力,其单位细胞酶活力变化趋势是先升后降,在悬浮培养 12 d 可达最高为 679.67 U/g, FW, 约为蒜瓣 (152 U/g, FW)^[2] 的 4.5 倍。SOD 最大比活力在悬浮培养后 15 d 可达最高为 85.98 U/mg Pro, 表明此时大蒜细胞内 SOD 含量较高。

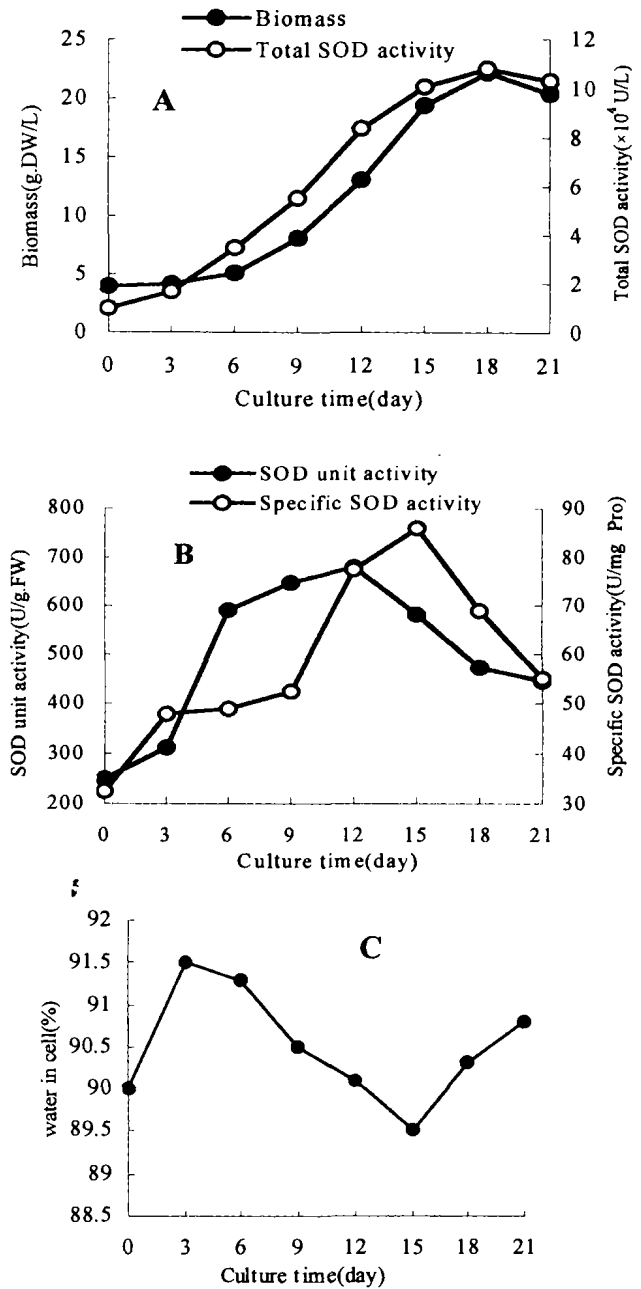


图 1 高产悬浮细胞系细胞生长和合成 SOD 特性
Fig. 1 Character of cell growth and SOD production
of high-yield SOD garlic suspension cell line
A-生物量和 SOD 总酶活; B-单位细胞酶活和
SOD 比活力; C-细胞含水量。

图 C 为大蒜细胞悬浮培养过程中细胞含水量的变化曲线,大蒜细胞含水量在培养过程中显示出

先升后降然后又再升高的趋势。总的来看,培养过程中细胞含水量保持在 90%左右。

3 讨 论

植物在繁殖过程中雌雄配子之间的随机组合,形成了众多的基因型,这为进行高产细胞系的选育提供了巨大的物质基础^[5]。同一种类不同个体、不同部位的外植体诱导的愈伤组织其生长特性和目的物含量也显著不同^[6],因此有可能通过自然选择法选出生长速率快,目的产物含量高的细胞系。如 Srinivasan 等从 *Taxus baccata* 中选出的细胞系倍增时间为 4~5 d,培养周期结束时紫杉醇的产量为 8.2 mg/L,而普通细胞系的产量为 1.5 mg/L^[7]。杜金华等^[8]用小细胞团法筛选产花青素的玫瑰茄细胞系,结果获得花青素含量达到 2.33%的稳定细胞系,比筛选前提高了 14.5 倍。

我们以前也筛选得到了产 SOD 的大蒜悬浮细胞系^[2],悬浮培养 15~18 d,细胞生物量最大约为 12.08 g DW/L, SOD 总酶活为 3.78×10^4 U/L,单位细胞酶活为 312.9 U/g FW,胞内 SOD 的比活力为 33.7 U/mg Pro。同以前筛选的大蒜细胞悬浮细胞系相比,我们重新筛选获得的高产 SOD 大蒜悬浮细胞系的最高生物量及 SOD 总酶活均有较大幅度的提高,同比分别提高了 83.11%和 185.97%,这为

利用大蒜细胞大规模培养生产 SOD 打下了较好的基础。

参考文献:

- [1] 李志勇,郭 勇,罗焕亮. 大蒜愈伤组织诱导条件初报[J]. 广西植物, 1999, 19(3): 251-254.
- [2] 张 毅. 大蒜细胞培养及其超氧化物歧化酶 SOD 积累的研究[D]. 广州: 华南理工大学, 1993.
- [3] 谢卫华,姚菊芳,袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J]. 医药工业, 1998, 19(5): 217-219.
- [4] Bardford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principles of protein dye-binding [J]. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-254.
- [5] 刘佳佳,郭 勇. 红豆杉细胞培养生产紫杉醇研究进展[J]. 经济林研究, 1999, 21: 41-45.
- [6] Gibson D M, Ketchum R E, Vance N C, et al. Initiation and growth of cell lines of *Taxus Brevifolia* (Pacific New)[J]. *Plant Cell Rep.* 1993, 12: 479-482.
- [7] Srinivasan V. Taxol production in bioreactors: Kinetics of biomass accumulation, nutrient uptake, and taxol production by cell suspension of *taxus baccata* [J]. *Biotechnol. and Bioeng.* 1995, 47: 666-667.
- [8] 杜金华,郭 勇. 高产花色苷玫瑰茄细胞的筛选[J]. 生物工程学报, 1997, 4: 437-439.

(上接第 241 页 Continue from page 241)

Explanation of Plates

Plate I An anatomical structure in the floral nectar of Xin-Li No. 7

E-Epidermis; F-Filament; N-Nectar; NT-Nectar tissue; P-Parenchyma; S-Starch grains; Sl-Style; St-Stoma; V-Vascular bundle.

1. Scanning of a blooming flower, showing the place of the mature nectar, $\times 52$; 2. Longitudinal section of nectar at emergence budding stage, $\times 528$; 3. Longitudinal section of nectar at swell budding stage, $\times 528$; 4. Longitudinal section of nectar at corolla appearance stage, showing surface-bulges of nectar, $\times 528$; 5. Longitudinal section of nectar at initial blooming stage, showing more dense cytoplasm, $\times 528$; 6. Longitudinal section of nectar at full blooming stage, $\times 528$; 7. Longitudinal section of nectar at senescence stage of flower, showing the central big vacuole in nectar-cells, $\times 528$; 8. Longitudinal section of nectar at full blooming stage, showing starch grains decreasing in nectar-cells, $\times 528$; 9. Longitudinal section of nectar at initial blooming stage, showing many starch grains in nectar-cells, $\times 528$; 10. Longitudinal section of nectar at senescence stage of flower, showing no starch grains in nectar-cells, $\times 528$.