

311: 227—131.

[28] 曾弥白等, 1986, 中国细胞生物学会第三次会议论文摘要汇编, 120页.

[29] Sack, J. M. W., 1983, From Egg to

Embryo. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press. 241 pp.

[30] Loewenstein, W. R., 1979, *Biochem. Biophys. Acta.* 560: 1—65.

## 植物组织培养的次生代谢产物 VII. 酶(过氧化物酶)\*

小林 节夫

来自辣根(*Armoracia rusticana*)的过氧化物酶是用作临床检查用药剂, 此外, 由于酶反应灵敏的原故亦作为酶免疫测定及单克隆抗体的筛选测定(Screening assay)的检出用药剂, 成为工业上各种用途的重要酶类之一。我们为考察用辣根植物细胞培养生产过氧化物酶的可能性, 由辣根诱发出愈伤组织。

### 1. 愈伤组织的诱导

外植体取自辣根根部的形成层部分。因为根部横切时, 外皮形成层部位过氧化物酶活性比中心部位的高2—3倍。另外, 因为从根部采取外植体, 微生物污染的可能性很大, 故最好不使用受伤的根部。而要在注意不要擦伤根的情况下, 用流水洗去附在外皮上的泥土, 除去外皮将根横切成1cm厚的圆片, 然后进行灭菌处理。灭菌的条件是在70%乙醇溶液中浸10秒钟, 再分别浸入0.2%洁而灭溶液5分钟, 0.8%次亚氯酸钠溶液20分钟, 最后用无菌水洗净, 由这一操作所得的根部再用木塞穿孔器沿形成层打孔, 除去两端后用解剖刀间隔2mm切成外植体。

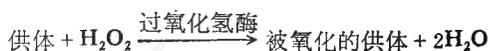
愈伤组织诱导培养基是LS培养基(含3%蔗糖、1%琼脂)。与其他MS、White、Gamborg培养基等相比较, LS培养基最适于诱发辣根的愈伤组织。植物激素是1-萘乙酸 $10^{-5}$ mol/L— $10^{-6}$ mol/L和6-苄基氨基嘌呤 $10^{-6}$ — $10^{-8}$ mol/L以及用激动素 $10^{-6}$ mol/L代替6-苄基氨基嘌呤, 在这两种情况下愈伤组织诱导率高, 诱发愈伤组织是在25℃、黑暗下静置四周。

作者此次实验在约900个外植体片中诱导出83个愈伤组织。

### 2. 酶的活性

#### A. 活性测定法

过氧化氢酶的反应一般用下述方式表示, 作为供体的基质已有很多报道<sup>[1]</sup>。



现在作者能以简便的测定方法, 用4-氨基安替比林(4-aminoantipyrin)和2,4-二氯苯酚作为基质。测定条件是将含有4mmol/L过氧化氢、1mol/L 4-氨基安替比林、2.5mol/L 2,4-二氯苯酚和50mmol/L磷酸缓冲液(pH6.7)的反应液加入酶溶液(全部反应液量为2ml), 在30℃下反应5分钟。反应结束时加入2ml乙醇, 然后测定505nm的吸光度。在上述反应条件下, 以1分钟分解1 $\mu$ mol的过氧化氢酶量作为酶单位(一个单位)。

#### B. 过氧化物酶的提取

将细胞破碎, 取其上清液来测定愈伤组织的过氧化氢酶活性。从正在生长的愈伤组织中在无菌条件下分离10—20mg(鲜重)的细胞块, 悬浮于1ml的0.01mol/L磷酸缓冲液(pH6.7)中。然后在水冷条件下用玻璃匀浆器(1000rpm, 1分钟)将细胞破碎, 离心分离(2500 $\times$ g, 4℃下10分钟)获上清液。离心结束后立即测定酶活性(因为存在蛋白酶)。再将离心分离后的沉淀物在800mmol/L氢氧化钾溶液中悬浮, 即可将与细胞壁结合的过氧化物酶在溶液中分离出来<sup>[2]</sup>。辣根愈伤组织在细胞壁上结合的过氧化物酶活性量大致与用磷酸缓冲液溶出的过氧化氢酶的量相等。

诱导的83个愈伤组织用上述方法提取过氧化物酶, 依据酶活性测定的结果, 在辣根的根部筛选出14个活性比较高的愈伤组织。

#### 3. 细胞小块选择法

一般在次生代谢产品的生产中, 愈伤组织中产物的含量比原来的植物减低, 这是大多数不能用愈伤组织进行生产的原因<sup>[3]</sup>。但是, 这里提及的辣根过氧化物酶, 在诱导愈伤组织过程中, 既然已在根部分离出

\* 本文摘译自山田康之编著“植物细胞培养マニュアル”(1984)講談社サイエンティフィック, 第84—88页。

比较高含量的愈伤组织,因此作者等用细胞小团块选择法进一步筛选生产能力高的愈伤组织。将14个过氧化物酶生产能力高的愈伤组织移入新鲜培养基(与诱导愈伤组织相同的培养基条件),静置培养三周后,肉眼观察选择6个生长良好的愈伤组织(第一代愈伤组织)。各个愈伤组织在无菌条件下分切成 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ 的小细胞块移入培养基(培养皿培养)。再经三周培养后肉眼观察选择生长良好的细胞团30个(合计180个),用一部分测定酶活性,显示高活性的细胞团再行分切培养(第二代愈伤组织)。

以下选择连续进行约一年的结果,6个愈伤组织中有二个愈伤组织[LS·N 5K 6 ( $1\text{-NAA}10^{-5}\text{ mol/L}$  及  $\text{KT}10^{-6}\text{ mol/L}$  诱导的愈伤组织)及 LS·N 5B 6 ( $1\text{-NAA}10^{-5}\text{ mol/L}$  及  $6\text{-BA}10^{-6}\text{ mol/L}$  诱导的愈伤组织)]分离获得过氧化物酶生产能力比第一代愈伤组织高约4倍,比辣根根部高约7倍的愈伤组织( $700\text{ u/g}$  愈伤组织鲜重)。

#### 4. 液体振荡培养

如上所述,从辣根根部诱导愈伤组织,进而经细胞小团块选择法分离出过氧化物酶生产能力高的愈伤组织。但是,考虑植物细胞培养的实际生产时,不能不探讨发酵培养。所以作者等着手用三角瓶(300 ml 容积)进行液体振荡培养。愈伤组织使用 LS·N 5 K 6 培养基。作为前培养,将25 ml 的 LS 培养基(含有3%蔗糖、 $1\text{-NAA}10^{-5}\text{ mol/L}$ 、 $\text{KT}10^{-6}\text{ mol/L}$ )加入100 ml 容积的三角瓶,移入0.5克在琼脂培养基中生长的愈伤组织(鲜重),在 $25^\circ\text{C}$ 、黑暗下振荡培养二周。以后,培养的愈伤组织用滤膜(120目、尼龙制筛网)分离,无菌水洗净后,取1.5克移入已加75 ml 培养基的300 ml 三角瓶中,进行振荡培养(正式培养)。液体培养之所以间隔二周移植,是由于 LS·N 5 K 6 的愈伤组织对数增殖为二周,取增殖能力高的细胞用于正式培养。LS·N 5 K 6 愈伤组织在上述培养条件下,经14天培养后可获得细胞15克(鲜重、含水量90%)。此时的过氧化物酶生产量为 $180\text{ u/ml}$  培养液,培养

期间的过氧化物酶的产生能力大致规定约为 $700\text{ u/g}$  鲜重。此外,在愈伤组织之外在培养基中也存在过氧化物酶,其活性量占培养液总过氧化物酶的10%。Huystee 等报道花生细胞培养中存在分泌到培养基内的过氧化物酶<sup>[4]</sup>,然而辣根同样的从细胞分泌过氧化物酶,而且在培养期间还没有证据说明细胞出现不良的活性。

另外,为了解提高过氧化物酶产量的因素,探讨了其他培养基(MS、White、Gamborg 培养基等),植物激素浓度和其他的植物激素(IAA、2, 4-D、6-BA 等)的效果,但均未能明显提高产量。

植物细胞培养用于生产有用物质方面,有关次生代谢产物的研究有许多报道,但有关酶的生产研究目前尚不多。工业上所用的主要酶类大部分来自于微生物,虽然植物细胞也有酶存在,但从生产考虑不大可能与之竞争。可是也有重要的酶类来源于植物,本文介绍过氧化氢酶便是其中之一。今后用植物细胞培养来生产酶的事例,可能还会有极大的增加,但应充分研究如何增加与次生代谢产物有关酶类在快速阶段中酶的产生能力,植物细胞培养也是生产酶的重要领域之一。

今后,应对分离具有更高的过氧化物酶产生能力的愈伤组织,探讨进行发酵培养以及探讨工业规模生产过氧化物酶的可能性等问题进行考虑。(周荣仁译,周郑校)。

#### 参 考 文 献

- [1] T. Gaspar, C. penel, T. Thorpe and H. Greppin (eds.), peroxidase 1970-1980, Université de Genève Centre de Botanique, Genève 1982.
- [2] V. C. Kossatz and R. B. Van Huystee, Can. 1976, *J. Bot.*, 54, 2089.
- [3] 田端守,平岗昇,1975,组织培养,1,120.
- [4] B. A. Maldonado and R. B. Van Huystee, Can. 1980, *J. Bot.*, 58, 2280.

更正:本刊1987年第4期第184页材料和方法倒数第2行醋酸铅应为醋酸铀。