

位置,两者相差10%以上的染色体是值得怀疑的,因为在人类染色体由于正常的多形性(译者注:即某些染色体个体之间的染色差异性)引起的大于10%的变化是很少见的。人染色体的预期位置是通过流式核型上其它人染色体峰和仓鼠标记染色体相比较计算出来的,因为仓鼠标记染色体与正常人的染色体的位置关系是已知的。一个来源于人的峰也可根据这个峰是否出现在用作杂交的仓鼠亲本细胞系的流式核型上来验证。

(3)通过人和仓鼠的基因组DNA分别与来自杂种细胞的染色体进行杂交,可验证分选的染色体是否来源于人。分选出来的染色体DNA结合于硝酸纤维素滤膜上,用 ^{32}P 标记的DNA探针与之杂交,或直接固定于载片上,用荧光标记的DNA探针与之杂交。

(4)将所得的DNA克隆作基因图可判断该克隆是否来自重组的DNA文库。但该方法耗时且只涉及有关染色体DNA顺序的很小一部分,因之对有些染色体的重排不敏感。

(5)在杂交细胞中,运用同功酶分析可以证明人染色体的存在。

(6)用分带法也可判断染色体峰是否同一。但用

硫酸镁法和多胺法分离的染色体很难分带,所以这种方法虽有效但不常用。

在实际应用时,常需要同时用几种方法才能准确地判断。例如对人仓鼠杂交系UV 20 HL15-33来说,同功酶分析表明存在9号染色体且无其它相似大小的染色体,而流式核型在预期的9号峰位置上却出现两个峰;用分带法证明这种杂交细胞系存在正常的和非正常的9号染色体;将50000个所分选出的染色体DNA与标记的人和仓鼠DNA进行分子杂交,又表明分选出的染色体大多数来源于仓鼠。所以9号染色体的双峰组成极为复杂,不适宜克隆。

三、分选

流式分选所需要的是,通过流式细胞计筛选能产生良好的流式核型的经染色的染色体样品。使用的仪器是一种特殊设计的高速的双激光流式分选计,其速度比一般流式分选计要快20倍。为了使克隆实验有足够的DNA,所选出的每种染色体至少要有 4×10^6 条。在高速分选计上成纤维细胞染色体只需要半天即可达到这一要求,而在一般分选计上需要9个工作日。(待续)

植物细胞的大量培养技术*

森 木 悌次郎

近年来,用植物细胞培养来生产有用次生代谢产物的研究十分活跃。但是,多数处于实验室规模的阶段,工业生产规模的只有两例,即最近作者等(三井石油化学)用 0.75 m^3 培养罐培养紫草(*Lithospermum erythrorhizon*)细胞和日东电工的用 2 m^3 培养罐培养高丽参细胞。此外,从目前几乎没有报道有关以次生代谢产物为目的的大量培养技术的详细研究内容来看,可以认为正式的大量培养技术尚未能确立。

本文系作者等将已进行的紫草细胞培养生产紫草宁为例,以迄今为止的大量培养技术开发中所讨论的几个基本项目为中心,予以叙述,以供今后建立大量培养技术的研究作为参考。

1. 培养基

大量培养是在液体培养基中将植物细胞进行悬浮培养。植物细胞来源于从固体培养基上从植物外植体

发生的愈伤组织细胞。这里必须注意的是用于固体培养的培养基大多不适于液体培养。紫草细胞的固体培养与液体培养可作为其中的一例。用已知培养基进行培养的情况见图1、图2^[1]。

可以看出,所有用于固体培养的培养基,均能生成次生代谢产物紫草宁,而在液体培养中能生成紫草宁的仅有White培养基。因为在固体培养和液体培养中细胞处于完全不同的环境,所以建立大量培养技术的第一步,须开发在液体培养中生产次生代谢产物效率最佳的培养基。

如作者等在紫草宁生产一文中(见细胞生物学杂志 Vol 9 No 1 p. 22-24)所说明,详细总结了White

* 本文译自山田康之编著 植物细胞培养マニュアル, 134-140页, 講談社サイエンスライフイック1984)

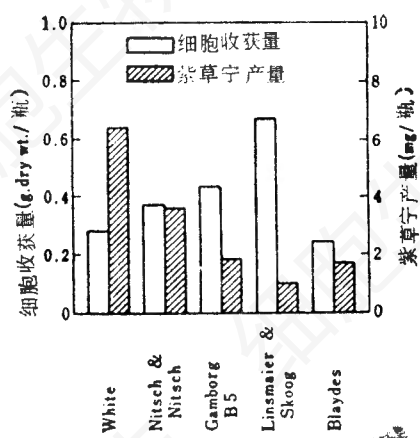


图1 紫草细胞按已知的培养基进行固体培养
(培养 28 天)

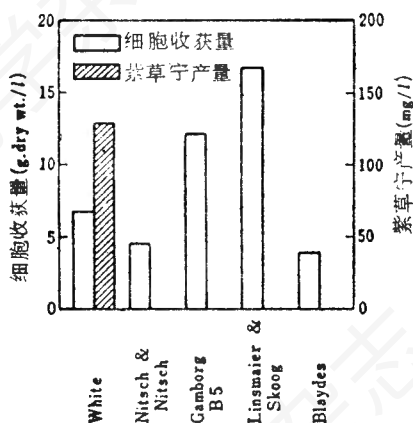


图2 紫草细胞按已知的培养基进行液体培养
(培养 14 天)

培养基成分的组成,开发了生产紫草宁最适的 M-9 培养基^[2]。用这一培养基培养 14 天时,紫草宁的获得率为 1500 mg/l。

但是,在 M-9 培养基中的细胞增殖率每二周为 3—4 倍,增殖率小是其缺点。此外,正如紫草宁生产一文中所述,这种培养基的最大缺陷是不能用于细胞继代培养。可是在开发 M-9 培养基中使我们了解细胞增殖和次生代谢产品的生产是两个不同的现象,可分别采用最适的培养基。液体培养中紫草细胞的增殖良好的系 LS 培养基,研讨了其成分的组成,开发了细胞增殖最适的 MG-5 培养基^[3]。MG-5 培养基的细胞增殖率每 9 天增加 6—7 倍。

2. 培养方式

虽然细胞的增殖和次生代谢产品的生产,一般采

用同一培养基的培养方式进行,但在紫草细胞的培养中,增殖用 MG-5 培养基,生产紫草宁用 M-9 培养基。用这两种培养基组合的培养方式,即首先用 MG-5 培养基进行紫草细胞的大量增殖,随后采取换用 M-9 培养基生产紫草宁为主体的培养方式,获得了最大的紫草宁的产率。实际上,研讨这一培养方式的结果,根据在 MG-5 培养基中细胞增殖培养 9 天,用 M-9 培养基紫草宁生产培养进行 14 天,紫草宁的产量最高,这一数值是仅用 M-9 培养基培养 23 天时的 3.5 倍。

这一培养方式称为二段培养。这一方式不限于用紫草细胞培养生产紫草宁,可以认为对以生产次生代谢产物为目的的细胞培养均会有效。

3. 种细胞量和种细胞密度

培养中所用种细胞量多,培养容器内细胞密度高,则次生代谢产品的产量多。种细胞量多到什么程度为好?紫草细胞用于培养的种细胞量和细胞收获量以及紫草宁含有率的关系见图 3。此时,培养基成分的浓度对种细胞量的比例发生变化。

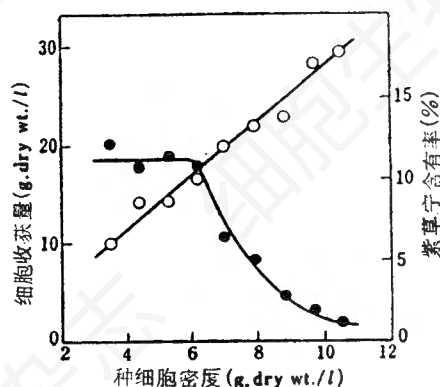


图3 种细胞密度和细胞收获量以及紫草宁的含有率(培养 14 天)

○ 细胞收获量 ● 紫草宁含有率

细胞收获量与种细胞量呈比例的增加,培养器内细胞密度相当高。但是,细胞的紫草宁含有率在种细胞量达 6 g DW/l 时为 11%,在此以上紫草宁的生产受到抑制,含有率急剧下降,这样,与细胞的增殖相比较,次生代谢产品的生产易受种细胞量的影响。除了随着种细胞密度增加,培养液的粘度上升,细胞供氧不足,培养基成分的浓度增加,细胞吸收养分异常等原因外,还有不了解之处。为此而进行探讨,据以考虑对策,从而开发出细胞密度的高效率培养方法是有可能性的,这是今后值得探讨的重要课题。

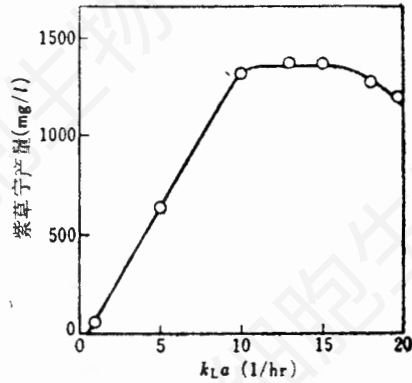


图4 k_{La} 与紫草宁产量
(培养14天)

4. 氧气的供给

培养的细胞吸收溶解在液体培养基中的氧气,因此要获得细胞的增殖和次生代谢产品的生产,培养基的氧气溶解能力和氧气的浓度成为重要因素。氧气溶解能力以氧气移动容量系数(k_{La})求出,氧气浓度以溶存氧气浓度(DO)测定出来。

烟草细胞培养中,有报道说 k_{La} 在 10 h^{-1} 以上时增殖率必定最大, 10 h^{-1} 以下与 k_{La} 成比例降低^[4]。次生代谢产品的生产也受 k_{La} 的影响。作者等进行紫草细胞培养生产紫草宁, k_{La} 于 $10\text{--}15\text{ h}^{-1}$ 时紫草宁生产最大(图4),DO对紫草培养细胞的影响表示于图5,DO在6 ppm以上时,细胞收获量最高,而紫草宁生产量则以DO在 $5\text{--}8.5\text{ ppm}$ 时最高,比细胞增殖更易受DO的影响。

因为 k_{La} 和DO随通入气体的氧气浓度、通气量、搅拌情况而变化,通过对这些条件的调节,而获得最适的 k_{La} 值和DO值。其中特别应加以注意的是搅拌。与微生物相比较,大而柔嫩的植物细胞由于易受搅拌的剪断力破坏,必须考虑采用对细胞的应力小而搅拌有效的方法。特别是在机械搅拌情况下,在考虑搅拌速度的同时,应考虑搅拌叶翼的形状和按装的位置。有关搅拌叶翼形状的研究也有一些^[5,6],结论是这一课题必须按具体情况来进行研讨。

5. 培养装置

在植物细胞大量培养的培养罐中,通气搅拌罐和空气提升型培养罐有很大区别。采用这些培养罐已有一些研究,但是结果是多种多样的,究以哪种型式为优,尚难以判定。

例如从田中进行 *Cudrania tricuspidata* Bureau

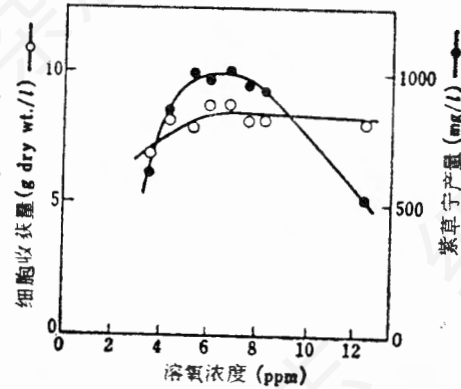


图5 溶存氧气浓度和细胞收获量以及紫草宁的产量
(培养14天)

的高浓度培养结果,通气搅拌罐比空气提升型培养罐为佳^[7]。而Wagner等用鸡眼藤属植物(*Moriuda citrifolia*)细胞培养生产蒽酮(anthraquinene),在采用的多种培养罐中,以通气管式空气提升型培养罐为最好。

在原理上是使保持培养液保持所定的 k_{La} 值与DO值,尽可能使细胞不受应力,维持悬浮状态。但是,要达到这一状况,必需研究所培养植物种类和培养细胞的大小、坚固程度等种种不同的具体情况。

培养的经济性也是决定培养罐的重要因素。一般空气提升型培养罐与通气搅拌罐相比较,构造简单不易发生杂菌污染。 100 m^3 以上的大型化培养是有可能的,并具有电费便宜的优点。但是,培养液的 k_{La} 、DO以及细胞的悬浮状态要全部保持最适值是困难的。培养液起泡沫以及难以防止细胞附着在培养罐气液界面的器壁是其缺点。

决定设计的培养槽与附属设备配置和管道按排后,大量培养装置即告完成。作者等以紫草细胞培养进行紫草宁的生产设备的流程图见图6。

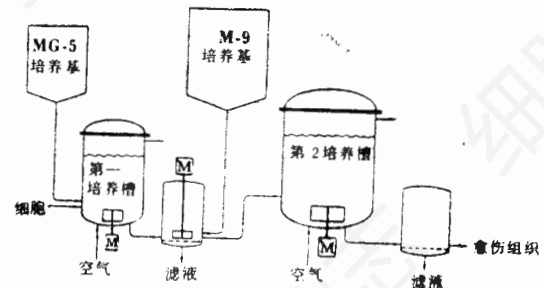


图6 紫草细胞培养生产紫草宁的流程

这一设备由细胞增殖用的第一培养罐,紫草宁生产用第二培养罐,置换培养基的细胞过滤器和含有生成紫草宁细胞的过滤器所组成。

(周荣仁 译,周 郑 校)

参 考 文 献

- [1] Y. Fujita, Y. Hara, T. Ogino and C. Suga, 1981, *Plant Cell Reports*, 1; 59.
- [2] Y. Fujita, Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto, 1981, *Plant Cell Reports*, 1; 61.
- [3] Y. Fujita, M. Tabata, A. Nishi and Y. Yamada, 1982, *Proc. 5th Int. Congr.*

Plant Tissue and Cell Culture, p. 339.

- [4] 加藤陽, 1982, *发酵工学*, 60: 105.
- [5] A. Jones and I. A. Veloky 1981, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 84.
- [6] 佐藤文彦, 渡边克美, 山田康之, 白井直规, 田中渥大, 福井三郎, 1983, 日本农芸化学会大会要旨集, P 543.
- [7] 田中秀夫, 1980, 第7回植物组织培养シンポジウム讲演要旨集, P 48.
- [8] F. Wagner and H. Vagelmann, 1977, *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application*, p 245. Springer-Verlag.

人胃癌细胞在丁酸钠的诱导下膜分子运动与膜相关骨架的关系

牛敏英 赵孟莲 方家梅 梁云燕 石永进 王代树

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物学室)

丁酸是一种短链脂肪酸,对培养的哺乳类细胞的形态、生长速度和某些基因的表达有影响。丁酸钠在 0.5—3 mmol/L 时对培养的肿瘤细胞会产生可逆性的生长抑制作用^[1],也可以引起或促进新蛋白质的生物合成^[2],抑制细胞内 DNA 合成^[3],诱导纤维粘连蛋白的产生^[4]。丁酸钠对细胞的一些生物学效应已经进行了广泛的研究。本文用荧光淬灭后的光复现(Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP)方法研究细胞膜的运动,用免疫荧光方法测定细胞表面纤维粘连蛋白(Fibronectin, FN)及染色反应研究细胞骨架微丝,以探讨丁酸钠对人胃癌细胞(MGc 80-3)的质膜与细胞骨架之间的相关性。

材 料 和 方 法

一、细胞及细胞培养

人胃低分化粘液腺癌细胞系(MGc 80-3, 山东师

范大学建株),培养于含 15%小牛血清的 Eagle 培养液中。接种细胞于小培养瓶内,每瓶 4.5 万/1.5 毫升。24 小时后分三组处理:第一组换含有 2 mmol/L 丁酸钠(BDH)的培养液持续处理,第二组以含 2 mmol/L 丁酸钠的培养液处理 48 小时,再换为正常培养液继续培养,第三组为空白对照组。以上三组均隔日换液,自加药之日起每天从三组中各取三瓶进行细胞计数,以绘出细胞生长曲线。

二、丁酸钠对细胞微丝及纤维粘连蛋白的影响

1. 微丝骨架的显示

在盖玻片上生长的 MGc 80-3 细胞在含有 2 mmol/L 丁酸钠培养液中培养,24 小时及 48 小时分别取出,按 Pana 方法^[5]用考马斯蓝 R 250(Coomassie Blue R 250)染色并略加改良^[6]。

2. 纤维粘连蛋白的显示

在进行显示微丝实验的同时,取出另一部分细胞分别用 3.5% 福尔马林固定 30 分钟,用 PBS 液洗涤后,加纤维粘连蛋白抗血清与细胞保温(37℃)45 分,经 PBS 液洗,稍干后再与二级荧光抗体避光保温(37℃)45 分,最后用 PBS 液充分洗去细胞上游离的荧光物质,9:1 甘油/PBS 封片,荧光显微镜下观察。