

参 考 文 献

- [1] 陈季楚、傅婉华, 1980, 实验生物学报 13: 281—286
- [2] Kasamo, K. and T. Yamaki., 1976. *Plant and Cell Physiol.*, 17: 149—164.
- [3] Nigam, V. N., R. Morais and S. Kareasaki., 1971. *Biochim. Biophys. Acta*, 249: 34—40.
- [4] Ames, B. N., 1966. *Methods enzymol.*, 8: 115—118.
- [5] Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall., 1951. *J. Biol. Chem.*, 193: 265—275.
- [6] Lucy, J. A. and Glauert, A. M., 1954. *J. Mol. Biol.*, 8: 727—748.
- [7] Kasamo, K. 1979. *Plant and Cell Physiol.*, 20: 281—292.
- [8] Kasamo, K. and T. Shimomura., 1978. *Plant Physiol.*, 62: 731—734.

人 参 细 胞 悬 浮 培 养 的 研 究

I. 悬 浮 培 养 细 胞 的 生 长

丁葆祖 柏淑华 吴 逸 杨静仪

(山西生物研究所)

人参细胞的悬浮培养,是在其他植物悬浮培养的基础上发展起来的。首先用于悬浮培养并获得成功的植物是烟草和万寿菊(Muir, 1953)。此后有胡萝卜、白云杉,金鱼草等。Nickell(1956)第一次证明了植物细胞可以象微生物一样进行培养,并不断生长。后来,他又用微生物发酵技术研究了悬浮培养细胞生长的动力学,生化组成和特殊的代谢产物的产生^[3]。Rose等(1972)研究了甘薯培养细胞代谢活力的变化动态,氮和蔗糖的利用速度以及细胞中氮和碳水化合物的累积^[9]。Street等从1966年开始连续数年对假挪威槭悬浮培养细胞进行了多方面的研究^[7,8,6,5]。但是有关人参细胞悬浮培养的系统资料却很少。我国进行人参细胞悬浮培养研究的有Chang(张唯勤)等(1979)(台湾省)^[4]、丁家宜等(1981)^[1]和丁葆祖等(1981)^[2]。我们的前一个报告,观察了悬浮培养细胞的形态结构和繁殖。本文报道悬浮培养细胞的生长和代谢活动的初步结果。

材 料 和 方 法

材料来源与培养条件同前文^[2]。人参根、茎诱导的愈伤组织细胞,经二年继代培养,愈伤组织淡黄色。采

用MS培养基,附加2,4-D 0.5毫克/升。每批培养30—35天。每五天取样一次。

方法:

(1) 培养细胞生长量的计算,以细胞鲜重的增长倍数表示。即接种时细胞鲜重与生长若干天后细胞鲜重之比。

(2) 糖的测定,蔗糖水解后生成葡萄糖,用弗林试剂进行定量测定。用公式

$$\frac{(\text{空白毫升数} - \text{样液耗糖数}) \times \text{稀释倍数} \times 0.1}{\text{取样毫升数}}$$

计算,即可得到培养基内的含糖量。

$$\text{蔗糖利用率} = 1 - \frac{\text{样品液蔗糖含量}}{\text{原液蔗糖含量}}$$

(3) 二氧化碳的测定,利用FQW-CO₂红外线气体分析仪,定期测量整瓶培养细胞生长过程中CO₂释放量。测定时,气体流量0.3升/分,打开记录仪约20分钟后,当指针达到基本恒定时,记取其数值,每个样品重复4—6次。计算公式:

$$\text{CO}_2 \text{ PPM/小时} \cdot \text{克鲜重} = \frac{\text{CO}_2 \text{ PPM数} \times \text{流量} \times 60 \text{分钟}}{\text{细胞鲜重(克)}}$$

结 果 与 讨 论

一、悬 浮 培 养 细 胞 的 生 长 动 态

在人参细胞悬浮培养过程中,随着培养时间的进展,细胞数量在不断改变。这种改变有一定的规律性。正如Wilson等^[10]1971年描述

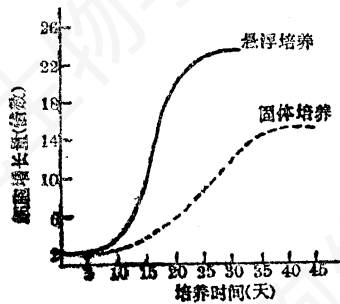


图1 人参培养细胞的生长曲线

的那样。在一个生长周期内，细胞数量的改变基本上是一条S形曲线。人参细胞也不例外。在我们的实验条件下，人参悬浮培养细胞生长的各个时期大体为：延迟期3—5天，对数生长期7—10天，直线期约7天，减慢期5—7天，生长25—30天之后，进入静止期(图1)。延迟期细胞很少分裂。对数生长期和直线生长期，细胞数目迅速增加，单位时间细胞的增长速度达到最高峰。减慢期，细胞生长速度逐渐减慢。进入静止期，细胞停止生长。因此，在静止期

到来之前，必须进行继代培养，或者将其收获。影响培养细胞生长曲线的因素是多方面的，如植物种类、取材部位、培养细胞品系、继代培养频率、接种密度、培养基组成及培养方式等。就人参而言，来源于茎愈伤组织的培养细胞与来源于根愈伤组织的培养细胞比较，前者延迟期较短，后者延迟期略长；悬浮培养细胞与固体培养细胞比较，生长曲线虽然都是S形，但固体培养细胞的各个时期均延长。在一个生长周期内，固体培养比悬浮培养时间延长10天左右。悬浮培养细胞的生长周期短，细胞增长速度快(参看图1)。实践证明，悬浮培养是提高细胞生长量的有效方式。

二、悬浮培养细胞在生长周期中代谢活力的变化

(1) 蔗糖的利用 蔗糖的利用可以反映细胞的产量。以根、茎培养细胞为材料，比较了两者细胞生长量与蔗糖利用的关系(见表1)。

表1 人参悬浮培养细胞对蔗糖的利用

取材部位	培养时间(天)	5	10	15	20	25	30
根的培 养细胞	鲜重增长量(倍数)	1.50	1.80	3.43	6.88	7.00	9.69
	蔗糖的利用率(%)	10.00	14.67	23.30	33.34	55.33	66.67
茎的培 养细胞	鲜重增长量(倍数)	1.55	2.08	3.92	8.10	12.07	13.00
	蔗糖的利用率(%)	12.00	22.00	32.00	60.00	62.67	70.00

表1表明，随着培养时间的延长，细胞数量不断增加，培养基内蔗糖的含量越来越少。蔗糖的利用率与细胞的增长量成正相关。特别是当培养细胞进入对数生长期和直线生长期(10—20天)时，蔗糖的利用迅速增加，培养基糖的含量迅速下降。无论来源于茎还是根的培养细胞，其细胞生长量与蔗糖的利用情况是一致的。茎细胞生长快，蔗糖利用快。根细胞生长较慢，蔗糖利用速度相应也慢。

(2) 培养液中pH的变化 随着培养时间的加长、细胞数量的增加，培养液pH值略有下降，即由pH 5.6降至pH 5.4。pH的这种

改变对人参悬浮细胞的生长无明显影响。

(3) 悬浮培养细胞的生长量与CO₂释放量的关系 我们利用CO₂气体分析仪，测量了在生长过程中人参细胞CO₂的释放量。(见表2)。随着培养时间的延长，人参细胞鲜重不断增加。每克细胞每小时CO₂释放量，最初低，10天左右高，以后又逐渐下降。这种现象可能与培养细胞的生长特点及培养空间的限制有关。接种后，当细胞处于延迟期的时候，代谢活动比较缓慢，CO₂释放量较少。培养十天左右，细胞处于对数生长转向直线生长阶段，代谢活动非常旺盛，呼吸作用很强，但这时细胞数量的

表 2 悬浮培养、固体培养 CO₂ 释放量的比较

培养方式	培养时间(天)	5	10	15	20	35
悬浮培养	细胞增长量(倍数)	2.08	2.36	5.40	16.65	17.13
	CO ₂ PPM/小时·克鲜重	2.97	9.58	1.13	0.96	0.46
固体培养	细胞增长量(倍数)	1.53	1.92	3.59	8.58	11.80
	CO ₂ PPM/小时·克鲜重	4.50	10.20	9.44	1.54	1.37

增加并不明显。如以单位克鲜重,单位时间 CO₂ 释放量计算,显然 CO₂ PPM 数较高。以后,随着细胞数量的迅速增加,平均每克细胞每小时 CO₂ 释放量逐渐减少。悬浮培养与固体培养的结果趋势是一致的。

从蔗糖的利用和 CO₂ 的释放量与人参悬浮培养细胞的生长曲线对照分析,可以看出,在一个生长周期内,前两者下降,后者上升。到某一点时,后者的上升速度减慢,甚至停止。显然,要进一步提高人参细胞的生长量,需要及时补充养料和新鲜空气。因此,就有进一步进行半连续培养和连续培养研究的必要。

参 考 文 献

[1] 丁家宜等 1981, 南京药学院学报(2):61—66

[2] 丁葆祖等 1981, 细胞生物学杂志, 第3卷第3期 27—30.

[3] 中国科学院上海植物生理所细胞室编译, 1978, 植物组织和细胞培养, 上海科学技术出版社, 73—88.

[4] Chang W. C., et al., 1979, *Natinal Science Council Monthly R. O. C.* 7: 147—154.

[5] Bayliss, M. W. et al., 1974. *J. Exp. Bot.* 25: 772—781.

[6] Cox, B. J. et al., 1973. *J. Exp. Bot.* 24: 159—174.

[7] Henshaw, G. G. et al., 1966, *J. Exp. Bot.* 17: 362—377.

[8] Short K. C. et al., 1969. *J. Exp. Bot.* 20: 572—790.

[9] Rose, D. et al., 1972, *Can. J. Bot.* 50: 1301—1308.

[10] Wilson, S. B. et al., 1971. *J. Exp. Bot.* 22: 177—179.

用改良的姐妹染色单体分化染色法对白鲢肾细胞增殖动力学和化学药品诱发姐妹染色单体交换频率的初步研究*

李 康 李渝成 周 璇

(武汉大学生物系)

自 Latt^[1]首先使用 Hoechst 33258 对 5-溴脱氧尿苷(BrdU)掺入的人淋巴细胞姐妹染色单体分化染色(SCD)以来,一些 SCD 永久制片法已陆续有报道^{[2]—[4]}。我们采用一种改良的 SCD 法,即硫堇-UV-Giemsa 法,对离体短期培养在白鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)肾细胞增殖动力学和丝裂霉素 C(MMC)、敌枯双(N,N-甲撑-双:2-氨基-1,3,4-噻二唑)在白

鲢肾细胞所诱发的姐妹染色单体交换(SCE)频率进行了初步研究。

材 料 与 方 法

白鲢取自武汉市水产科学研究所,为一斤左右(一冬龄)的鱼。

* 本工作是在余先觉教授指导下进行的。