

植物组织培养的次生代谢产物

I. 色素(花青素 Anthocyanin)*

山本好和

诱导愈伤组织产生花青素

可采用通常的诱发愈伤组织的条件,来诱导产生花青素的愈伤组织。表1列举了诱导产生花青素愈伤组织的实例。基本培养基是 White, MS 或 LS 培养基,生长素用 2,4-D 或 NAA。添加激动素与天然抽出物(如酵母浸膏等)也很有效。培养温度为 20—30℃。光照可促进花青素的合成,特别是青色光或近紫外光的效果更为显著。

迄今报道产生花青素的愈伤组织,除表1所列11种植物以外,尚可列举出长春藤 (*Catharanthus noseus*), 玉米 (*Zea mays*), 爬山虎 (*Parthenocissus tricuspidata*), 柴胡 (*Bupleurum falcatum*), 蔷薇 (*Rosa sp., paul's Scarlet*), *Dimorphotheca auriculata* 等植物。

二、花青素高产细胞的筛选

在大多数情况下,诱发愈伤组织的各个细胞产生花青素的能力不同。因此,花青素高产细胞的筛选,细胞产生花青素稳定性的鉴定和保持都是重要的课题。

高等植物的培养细胞系多细胞系,通常以小团块状增殖。考虑到这类异质细胞的集合体中会保持某些细胞间的差别,所以这一细胞块中,会含有产生花青素能力高的小细胞团。用反复选择培养方法,将最终筛选出的花青素产量高的细胞进行培养,可期望产生稳定的细胞系。下面具体介绍这种小细胞块筛选法 (cell aggregate cloning) 的实验方法。

1. 细胞筛选方法 详细的方法见图1,此处采用洋葱平板培养法。

① 在清洁的工作台上,准备镊子、解剖刀、灭菌的空培养皿(一个)、加好培养基的方格培养皿(数个),以及事前已培养的原始愈伤组织的三角瓶或培养皿。用灭菌的镊子从三角瓶中选取愈伤组织移入空培养皿。供实验的愈伤组织数量越多越好,因受培养的空间与实验的人员等限制,作者所用愈伤组织的数量在

3—5克之间。

② 用灭菌的解剖刀,将愈伤组织切成直径3mm细胞小块。从筛选的效率来看,置入的细胞块越小越好,但如过小,移置后生长迟缓,有时又易坏死。因此愈伤组织移植块的大小须按植物的种类不同而进行调整。

③ 用灭菌的镊子取出培养皿中的小细胞块,置于加有培养基的36个方格培养皿上,从左上角按顺序逐个植入(见图2)。筛选用的培养基采用花青素产量高的培养基,也可仍用诱导培养基。培养皿的数目随细胞块数而增减。

④ 方格培养皿植入细胞小块后,用双层石蜡密封放入培养箱内。各种愈伤组织的培养条件必须加以选择,通常产生花青素的愈伤组织都在20°—30℃、2000—8000 Lux 光照下培养。最近也有在黑暗条件下培养的报道。培养时间以花青素含量达到最高时为准。培养时间过短则下一代的生长迟缓,应予注意。作者在铁海棠 (*Euphorbia millii*) 愈伤组织培养中所用时间为10天,遇节假日则增减一天。

⑤ 取用清洁工作台上的镊子、解剖刀、灭菌的空方格培养皿。将方格培养皿中各个方格上生长的每一细胞块,用灭菌的解剖刀切成二块,如果愈伤组织柔软则亦可用镊子进行。生长迟缓者如切开后的细胞块小于3mm时即不用切割。此外,如细胞块数多,可从中任意选择细胞块进行分切,通常在培养皿上二个细胞块中选择红色深的一块,移入空的方格培养皿的相应位置。不切的细胞块若是红色深的可移入空的培养皿内。

⑥ 用灭菌的解剖刀,愈伤组织柔软时用灭菌用的镊子,将直径约3mm大小的细胞块分散放置。

⑦ 用灭菌的镊子从培养皿内细胞块中,选择红色深的细胞块,逐个自左上角起按号码植入盛有新培养

* 本文摘译自山田康之编著(1984年)“植物细胞培养マニュアル”第45—55页)

表1 诱导产生花青素的愈伤组织的事例

植物材料	诱导部位	培养基	培养条件	报告者
胡萝卜 <i>Daucus Carota</i>	根	white 培养基, IAA(1 mg/l) 酵母抽出汁(1 g/l)	27°C 5500 lx(12小时)	Sugano 等(1967)
苹果 <i>Malus pumila</i>	胚轴	MS 培养基 NAA(2 mg/l) 激动素(0.05 mg/l) 水解酪蛋白(1 g/l)	27°C 2500 lx	Ibrahim 等(1971)
菊芋 <i>Helianthus tuberosus</i>	块茎 茎		18°C(12小时) 黑暗下	
亚麻 <i>Linum usitatissimum</i>	胚轴	同上 激动素(2 mg/l)		
蔷薇 <i>Rosa multiflora</i>	胚轴			
<i>Haplopappus gracilis</i>	茎	white 培养基 2,4-D(0.005 mg/l)	20°C 4000 lx	Reinert 等 (1963)
矮牵牛 <i>Petunia hybrida</i>	叶	MS 培养基 NAA(0.001 mg/l)	26°C 2000 lx(18小时)	Coligin 等 (1981)
杨属杂交种 <i>populus. hybrid</i>	芽	LS 培养基 2,4-D(0.5 mg/l)	28°C 5000~6000 lx	Matsumoto 等 (1970)
葡萄属杂交种 <i>Vitis, hybrid</i>	藤蔓	MS 培养基 2,4-D(0.05 mg/l) 激动素(0.2 mg/l) 酵母抽出汁(3 g/l)	30°C 黑暗下	Yamakawa 等 (1983)
铁海棠 <i>Euphorbia millii</i>	叶	MS 培养基 2,4-D(0.1 mg/l) 麦芽抽出汁(2 g/l)	25°C 2000 lx	Yamamoto 等 (1980)
马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	块茎	white 培养基 2,4-D(6 mg/l) 水解酪蛋白(2 g/l)	25—27°C 2000 lx	Gamborg (1965)

基的方格培养皿内。进行继代培养时植入的细胞小块的数量最好不要有很大的变动。作者所取的细胞块数在40—60之间。收取的细胞块数可按第③项选择来增减。

⑧ 按④项处理后,将培养皿置培养箱内。收拾工作台上全部器具,结束实验。

此后,按上述步骤反复进行至培养的系统稳定为止。作者等反复进行24次以上,这一系统即稳定下来。

⑨ 按需测定花青素含量的细胞块数来准备5ml的样品瓶。用电子天平称量样品瓶。在工作台上将培养皿中的细胞块移入样品瓶,测定细胞块鲜重。细胞块数多时,随机挑选细胞块测定其含量。例如作者按随意数表选取30个样品,

⑩ 在装有细胞块的样品瓶中,用移液管加入4ml含2%盐酸的酸性甲醇,放置1小时以上。按浸出液的量、样品容器及所用细胞块重量来决定花青素的含量。放置时间长短应预先进行试验。作者等即用上述方法进行常规操作。

⑪ 将浸出液置入分光光度计测量杯内,测定370nm吸光度,计算出花青素含量。测定所用的波长是花青素的最大吸收波长。

2. 细胞筛选数据的管理与整理 关于数据的管理与整理,在数据少时(例如继代选择到5—6代)人力可以完成,数据多时利用计算机则可节省时间和人力。本文所介绍使用计算机处理与储存的系统(图2、3)及内储程序,市场并无出售(仅有一部分有可能利用),

色素(花青素)

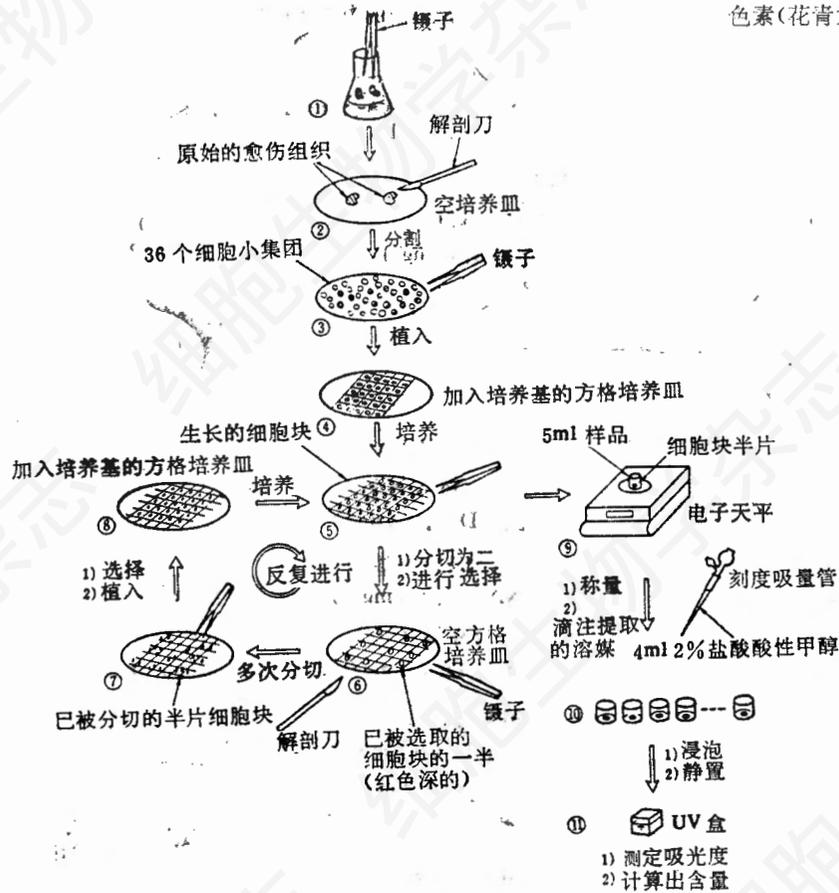


图 1 细胞团块筛选法

继代 No. _____

培养开始日期 _____

细胞块数 _____ 个

亲本号		鲜 (重) (mg)	吸光度	含 量	子 代 号
培养皿	方格 No.				
A	0.1	50	0.250	5.0	A 01 A 02 A 03 A 04 A 05
	0.2	40	0.300	7.50	
	0.3				
	}				
	36				
B	01				
	02				
	03				
	}				
	36				

均由山田康之领导的研究组所创制,山田等用 Sharp 生产的 MZ-80 微型机与 DEC 生产的 PDP 11/34 小型

机组合完成这一系统,只有微型机与小型机组合才能组成充分的系统,其程序并不复杂。象图 3 所示的流

01	02	03	04	05	06
07	08	09	10	11	12
13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24
25	26	27	28	29	30
31	32	33	34	35	36

方格培养皿的号码设计
图2 细胞筛选数据表格

程量, 化费不多的人力就可能完成。

① 各次继代实验结束时, 按照图2的数据用纸上的要求, 将数据输入计算机(输入程序)。山田等输入从第7代到第28代共1588个细胞块的数据(细胞块编号、鲜重、吸光度、母本编号)。

② 将已输入细胞块的花青素含量的分布制成直方图(分级分布程序)。图3b显示输出的一个例子。此图示山田等对铁海棠(*Euphorbia millii*)培养细胞中花青素高产量细胞的筛选过程中, 从16代到28代的各代细胞块的花青素含量的分级分布。图中的级差间隔为0.5, 但可用计算机选择任意所需的级差。

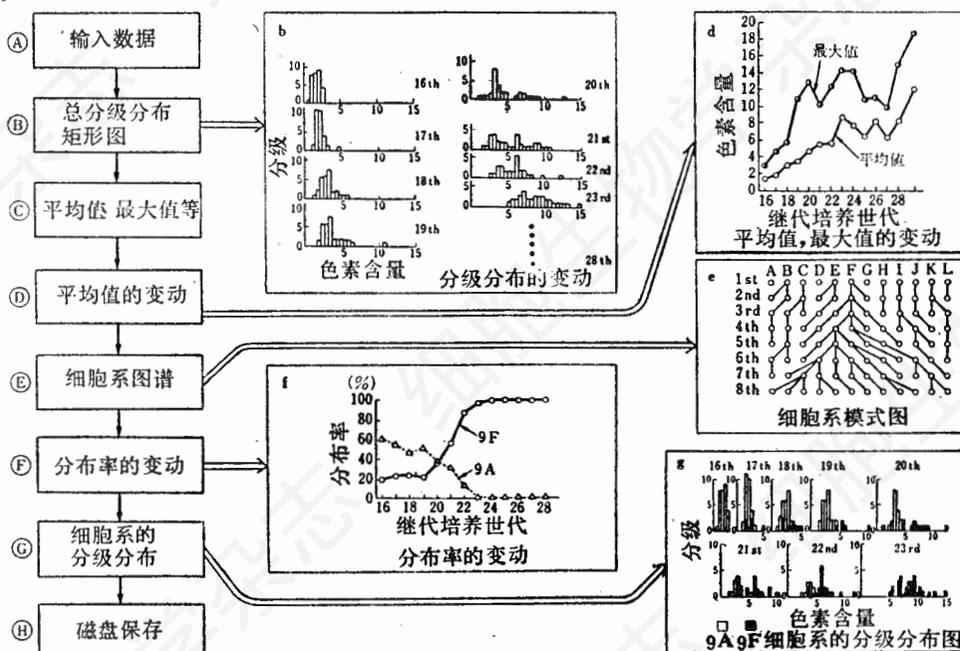


图3 用计算机筛选数据的管理与整理

[图e系引用 Agric. Biol. Chem., 47, 1025(1983)]

③ 统计值的继代变迁图表化(图表程序)。图3d示一个输出的例子。图中可以看出筛选高产量花青素的铁海棠培养细胞, 从16代到28代的平均值(\bar{C})和最大值(C^{max})的动态变化。 \bar{C} 从16代到22代逐步增加, 23代以后波动上升, 比原来愈伤组织的含量高7倍。

④ 制成细胞谱系图(谱系程序)。这一输出的模式图见图3e。

⑤ 在各代细胞块的群体中, 使某一特定细胞系分布率的变化图表化(图表程序)。这一输出的例子见图3f。分布率用以下公式计算:

$$\text{分布率} = \frac{\text{属于特定细胞系的细胞块数}}{\text{各代细胞块群体的细胞块总数}} \times 100$$

这里所谓的细胞系是指作为祖先的某一特定细胞块的后代细胞块群体。

⑥ 制成各代细胞块群体中属于某一特定细胞系细胞块的花青素含量分级分布直方图(分级分布程序)。输出的例子见图3g。这一图表说明来自特定细胞块(9F和9A)高产细胞系的16代到23代的细胞块群体的分布。从图3f及g可以看出自23代以后全部细胞块都仅从一个细胞块(9F)所传。

⑦ 将数据储入磁盘(disk)中保存(文字程序)。

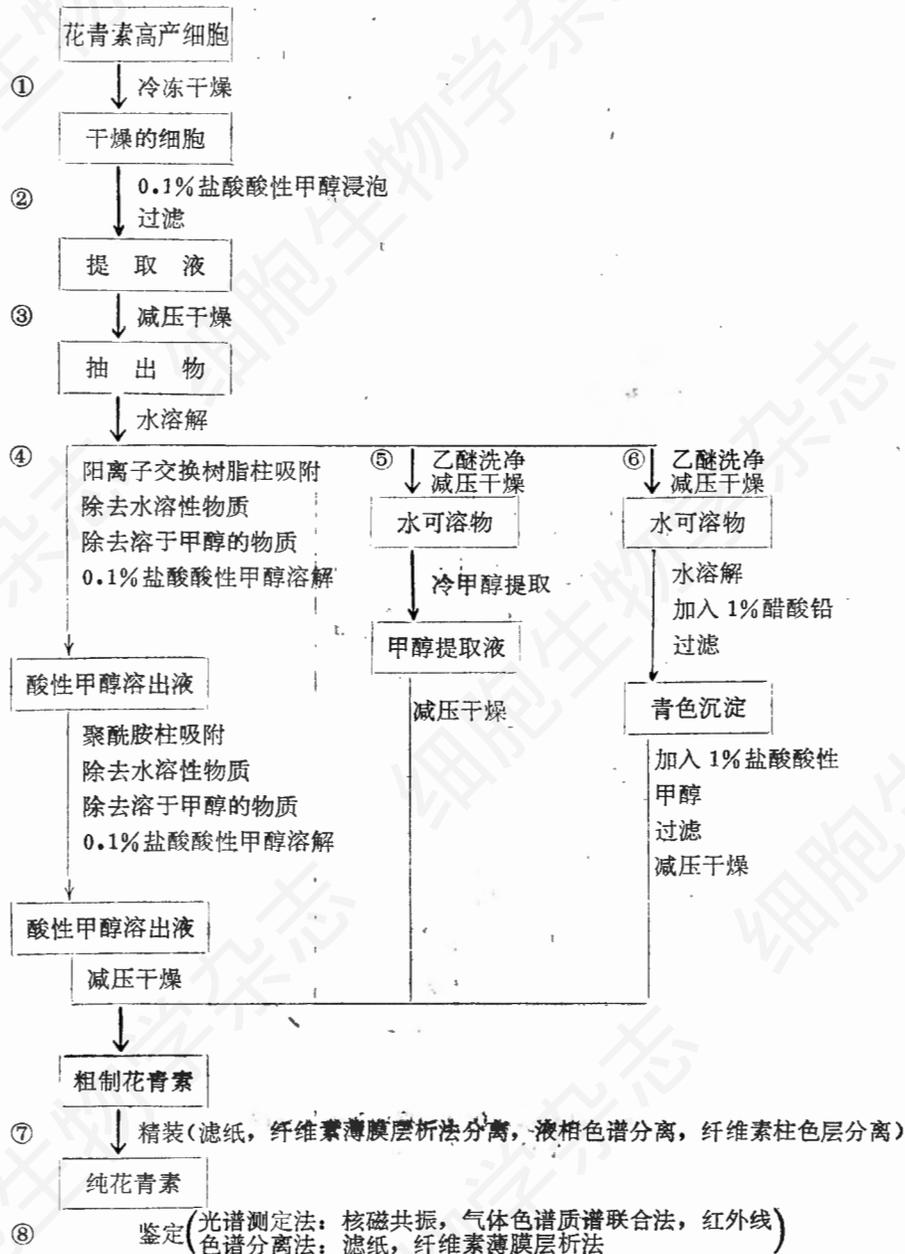


图 4 花青素的提取分离的流程

三、花青素高产细胞的培养 通常植物细胞培养的方法用以培养产生花青素的细胞, 效果很好。只是高产的细胞由于长期的筛选易极为娇嫩, 从固体培养基到液体培养基, 以及从振荡培养到搅拌培养, 在培养条件变更时易有不适应的倾向。在这种情况下, 提高培养细胞的浓度常可获得令人满意的结果。

四、花青素的提取、分离与鉴定 过去已有许多综述, 详细情况可参阅文献。这里简单介绍有代表性

的例子如图 4 所示。

① 收集花青素高产细胞进行冷冻干燥。培养的植物细胞含水量高, 通常在 90% 以上, 在提取花青素前进行冷冻干燥除去水分, 会使提取处理简便而迅速。因为花青素对热、光不稳定, 必须进行冷冻干燥。样品经一定时间的冷冻干燥后达到一定重量, 山田等将铁海棠的培养细胞冷冻干燥 16 小时, 约除去 93% 的水分。

② 加入 0.1% 或 1% 盐酸酸性甲醇进行浸泡, 置冰库过夜提取出花青素, 如要求所得结果正确, 应按此方法反复提取 2—3 次。

③ 将获得的提取液减压浓缩。用真空泵在 5 mmHg 以下减压的回复式蒸发器中在 15°C 以下进行浓缩, 将浓缩物中含有多量脂肪、盐份等杂质, 用图 4 所示方法可将其纯化。

④ 提取物用少量水溶解并用阳离子交换树脂 (Dawex) 吸附。经水、甲醇洗去杂质后, 用 0.1% 盐酸酸性甲醇洗出花青素。洗出液减压干燥后, 再用少量水溶解。聚酰胺柱吸附, 用水、甲醇洗脱杂质。最后用 0.1% 盐酸酸性甲醇将花青素洗出, 再次将洗出液减压干燥, 获得花青素粗制品。

⑤ 提取物用少量水溶解, 随后加入乙醚反复洗净到乙醚层不着色, 除去脂肪物质。取出水层减压干燥后加入冷甲醇, 从干固体中提取花青素。除去不溶于甲醇中的盐类残余物, 减压除去甲醇, 获得粗花青素。

⑥ 提取物用少量水溶解, 加入乙醚反复洗净到

乙醚层不着色。于水层中每次加入一滴 1% 醋酸铅水溶液, 直到不发生青色沉淀为止, 然后过滤沉淀物。沉淀物加入 0.1% 盐酸酸性甲醇, 过滤除去所产生的白色沉淀 (氯化铅), 将过滤液减压干燥, 获得粗花青素。

④、⑤、⑥ 工序可单独应用, 配合使用时则可提高制品的精度。

⑦ 将粗制品用滤纸、纤维素薄膜层析分离、纤维素色层分离 (Cellulose Chromatograph)、液相色谱分离、再结晶等方法, 单独或配合使用, 从而获得精制品。

⑧ 将提纯花青素用滤纸、纤维素薄膜层析法、核磁共振、气体色谱质谱联合法、显微分光镜、红外线、液相色谱等进行鉴定。由于花青素不稳定, 用分光光度计鉴定花青素常发生困难。为此, 通常多采用色层分离法鉴定。但是最近正在使用 FT-核磁共振、气体色谱质谱联合法来鉴定花青素。

(周荣仁译, 编辑部校)

大蒜根尖细胞微管的免疫荧光观察

张金忠 朱 激

(北京大学生物系)

1963 年, 先后在动物和高等植物细胞中发现微管结构。已经知道微管不仅具有支持功能, 而且在运动、运输和分泌等一系列细胞活动中发挥重要作用。在高等植物细胞中, 微管明显地参与形态建成^[1,2]。周质微管 (Cortical microtubules) 可能与细胞壁中纤维素微纤丝的排列与定向有关。早前期带 (Preprophase Bands) 预示胞质分裂时细胞板的位置。成膜体微管参与细胞板的形成等等。

70 年代中期, 免疫荧光技术在以动物组培细胞为材料的微管研究中获得很大成功^[3,4]。使用该方法研究微管不受其它细胞骨架成分的干扰, 在荧光显微镜下能对完整细胞内的微管

系统进行三维的观察。然而, 到目前为止, 还没有一个从高等植物中提取微管蛋白的成熟方法。1977 年, Franke 等人在用猪脑微管蛋白抗体研究高等植物胚乳微管时, 证明动植物微管蛋白有免疫交叉反应^[5]。近几年, Wick 等人^[6-8]成功地将这一技术用于具壁的高等植物细胞的微管研究上。植物细胞有相当厚的、坚固的细胞壁和大的液泡, 用免疫荧光技术研究微管更有它的优越性。

目前, 国内有关植物微管方面的研究工作还很少^[9], 用免疫荧光技术研究植物微管则未见报道。我们用组装-去组装超速离心方法提取猪脑微管蛋白, 制备兔抗微管蛋白血清,