

工具,有被小泡本身还具有酶活性;大鼠肝细胞的有被小泡中发现有NADH-单脱氢抗坏血酸还原酶和抗坏血酸氧化酶^[17];大豆细胞的有被小泡中存在过氧化物酶^[10]。但一般的细胞生物学书籍并没有把有被小泡写作动、植物细胞中正式的细胞器,我想最主要的原因是有被小泡大多存在于那些高度特化、合成代谢旺盛的细胞中,但是,有被小泡在动、植物很多细胞中都存在,研究和弄清它的作用将对广义发育原则^[18]提供更充分的依据。

摘 要

有被小泡是细胞膜的特化结构之一,因其膜外覆盖一层网络状的包涵蛋白而得名。至今认为有被小泡在动、植物细胞中均存在,参与胞内运输、膜循环等细胞内重要生理过程。有被小泡的包被结构本身可能包含了某种信号,通过分子间识别去完成一系列细胞功能,不过在植物中还没有直接的实验证据表明有被小泡的功能。

参 考 文 献

- [1] Gray, E. G., 1961, *J. Anat.*, 95: 345—356.
 [2] Wissig, S. L., 1962, *Anat. Rec.*, 142: 292.
 [3] Bonnett, H. T. and Newcomb, E. T.,

- 1966, *Protoplasma*, 62: 59—75.
 [4] Goud, B., Huot, C. and Louvard, D., 1985, *J. Cell Bio.*, 100: 521—527.
 [5] Alberts, B., Bray, D., et al (eds.) 1983, *Molecular Biology of the Cell*, pp. 307—311, Garland, N. Y. & London.
 [6] Brown, M. S. and, 1983, *Cell*, 32: 663—667.
 [7] Brown, M. S. and Goldstein, J. L., 黄仲平译 1985, 科学, 第三期: 20—30.
 [8] Bruni, C. and Portor, K. R., 1965, *Aner. J. Pathol.*, 46: 691.
 [9] Valk, P. van der and Fowke, L. C., 1981, *Can. J. Bot.*, 59: 1037—1313.
 [10] Griffing, L. R. and Fowke, L. C., 1985, *Protoplasma*, 128: 22—30.
 [11] Altstiel, L. and Branton, D., 1983, *Cell*, 32: 921—929.
 [12] Anderson, R. G. W., Vasil, E., et al, 1978, *Cell*, 15: 919—933.
 [13] Kartenbeck, J., Schmid, E., et al, 1981, *Exp. Cell Res.*, 133: 191—211.
 [14] Louvard, D., Morris, C., et al., 1983, *EMBO(Eur. Mol. Biol. Organ.) J.*, 2: 1655—1664.
 [15] Ungewickell, E., 1984, *Nature*, 311: 213.
 [16] Schmid, S. L., et al, 1984, *Nature*, 311: 228—231.
 [17] Sun, I. Ris., Morre, D. J., et al, 1984, *Biochim. Biophys. Acta.*, 797: 266—275.
 [18] Olson, M. V., 孙详燮译, 1983 《科学年鉴》, 威廉H. 诺尔斯主编, 154—158页, 科学出版社。
 [19] Pearse, B. & Bretscher, M. A., 1981, *Rev. Biochem.*, 50 85.

植物组织培养的次生代谢产物

Ⅲ.用改良培养基的方法生产紫草宁

山田 康之

紫草宁(Shikonin)系紫草(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb et Zuce)等部分紫草科植物根中所含的 α -萘醌系列的化合物(图1), 用作治疗外伤与痔疮的药物或高级染料。

田端等^[1,2]从紫草的幼苗诱发愈伤组织, 用琼脂

培养基生产紫草宁, 用细胞筛选的方法从亲本植物中获得优良细胞株。作者等引入这一优良细胞株, 首先用液体培养的方法来生产紫草宁获得成功, 继而使生产率获得极大的提高。本文叙述作者所开发的生产紫草宁的培养方法。

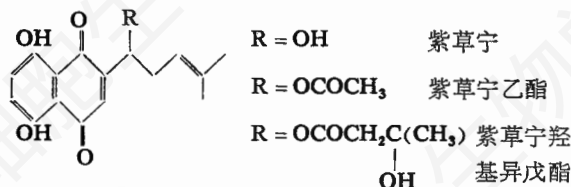


图1 紫草宁及其衍生物的化学结构

在紫草的根与紫草培养细胞中常见的紫草宁是紫草宁及其各种低级脂肪酸酯

一、培养方法概要

分阶段的使用两种性质完全不同培养基的“二段培养法”，可有效地生产紫草宁。第一阶段培养以增殖细胞为目的，将获得的种细胞在第二阶段进行以生产紫草宁为目的的培养。第一阶段作者等用新开发的MG-5培养基^[3]，这是一种改良的LS培养基^[4]，其组成成分见表1。在第一阶段中希望并不生产紫草宁的细胞能迅速增殖。如果用以生产紫草宁，其增殖率将显著降低。

第二阶段作者等用新开发的M-9培养基^[5,6]，作为生产紫草宁的培养基。这一培养基的成分见表1。M-9培养基系将White培养基^[7]予以大幅度的改良，其特点是以硝酸盐为唯一氮源，磷酸盐的浓度低，铜及硫酸盐的浓度高。以M-9培养基进行第二阶段培养，细胞倍增率较低，为3—4倍/14天，细胞中紫草宁的含量达15%，紫草宁的平均得率比white培养基高10倍。此外，M-9的主要营养成分浓度低，不能用以进行细胞的继代培养。二段培养法的概要见图2。

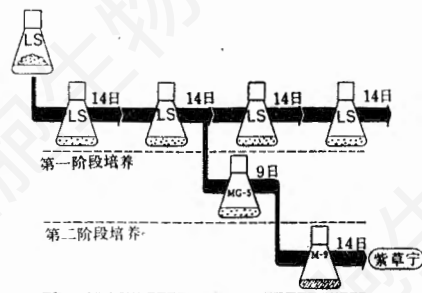


图2 用于生产紫草宁的培养方式

□表示生产紫草宁

二、实 例

A. 愈伤组织的诱导 有关诱发紫草宁愈伤组织方法的详细情况请参照田端等的报道^[1]。本文仅介绍

表1 MG-5培养基与M-9培养基的组成

成 分	MG-5 培养基 (mg/l)	M-9 培养基 (mg/l)
NH_4NO_3	500	—
KNO_3	1900	80
NaNO_3	2480	—
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	—	694
KH_2PO_4	170	—
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	—	19
KCl	—	65
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	150	—
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	120	750
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	203	—
Na_2SO_4	—	1480
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	27.8	—
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	37.3	—
$\text{NaFeEDTA} \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$	—	1.8
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	22.3	—
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	8.6	3
H_3BO_3	1.9	4.5
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.25	—
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.025	0.3
蔗 糖	30(g/l)	30(g/l)
肌 醇	100	—
盐酸硫胺素	0.4	—
3-IAA	—	1.75

其梗概。将紫草成熟种子置于含有 10^{-6} mol/L 2,4-D和 10^{-6} mol/L 激动素的LS琼脂培养基(琼脂1%)上，一直在黑暗、25℃下培养。种子萌发后于幼根部形成愈伤组织，再将此愈伤组织移植于含有 10^{-6} mol/L IAA和 10^{-5} mol/L 激动素的LS琼脂培养基中，便可产生出紫草宁。作者等引入的便是在这一阶段由田端等所筛选出的紫草宁高产细胞株。

B. 继代培养 将获得的1.5克鲜重愈伤组织，移入装有80 ml含有 10^{-6} mol/L IAA和 10^{-5} mol/L 激动素的LS液体培养基的300 ml三角瓶中，在100 r/m转速下振荡培养，使细胞增殖。瓶塞用市售通气良好的不锈钢瓶盖。培养初期由于琼脂培养细胞产生紫草宁易变质，细胞外观极不均匀，但经过14天培养的细胞移入新鲜培养基后，生长迅速的白色细胞大量增殖，以后每隔14天移入新鲜培养基，经2—3代培养后，即可获得均匀的细胞团。这样均匀的细胞经14天

培养约增加13倍。细胞移植时,用不锈钢制孔径40 μ m的筛网,收集细胞,按80ml培养基加1.5克鲜重的比例进行接种。

C. 第一阶段的培养(细胞增殖的培养) 接种在LS培养基内继代培养14天后,用B节中所述的方法收集细胞,将1.5克鲜重细胞接种在80ml MG-5培养基中,进行振荡培养,在细胞增加6—7倍后,自第10—11天起对数增殖期结束,增殖速度开始降低。生产紫草宁的种细胞的生长阶段对第二阶段在M-9培养基中的培养有很大影响。用对数增殖期的细胞作为种细胞,紫草宁的得率最高。因此从细胞收获量和紫草宁生产考虑,在移植后九天结束第一阶段最为合适。此外,MG-5培养基不含植物激素,所以不能用以维持细胞株的继代。

D. 第二阶段的培养(生产紫草宁的培养) 以B节所述方法收集第一阶段所获得的细胞,将2.4克鲜重细胞移入盛有80ml M-9培养基的300ml三角瓶中,在100rpm转速下振荡培养。紫草宁的生成能为肉眼所确定,从培养第二天起,一部分细胞即呈红色,至第七天全部细胞团完全呈鲜红色。经14天培养的培养细胞中紫草宁含量达15%,1立升培养基中紫草

宁的收获量约为15克。(周荣仁译自山田康之编著植物细胞培养マニュアル(1984年)p55—59)。

(周郑校)

参 考 文 献

- [1] M. Tabata, H. Mizukami, N. Hiraoka and M. Konoshima, 1974. *Phytochemistry*, 13, 927.
- [2] H. Mizukami, M. Konoshima and M. Tabata, 1978 *Phytochemistry*, 17, 95.
- [3] Y. Fujita, M. Tabata, A. Nishi and Y. Yamada, Proc. 5th Int. Congr. Plant Tissue and Cell Culture, P. 399, JAPTC (1982).
- [4] E. F. Linsmaier and F. Skoog, 1965 *Physiol. Plant.*, 18, 100.
- [5] Y. Fujita, Y. Hara and T. Ogino, and C. Suga, 1981 *Plant Cell Reports*, 1, 59
- [6] Y. Fujita, Y. Hara, C. Suga and T. Morimoto, 1981 *Plant Cell Reports*, 1, 61.
- [7] P. R. White, 1954 *The Cultivation of Animal and Plant Cells*, The Ronald Press CO.

(上接第47页)

套一硬塑料管或金属管(图1),将安瓿瓶腰部放在已按比例注入的双蒸水或缓冲液的棕色试剂瓶口中央位置,两手各握一根套管,同时用轻微之力一掰。安瓿瓶即破裂(图2),将断开的安瓿瓶滑入棕色试剂瓶中,

并即时密封瓶口,置冰箱或阴凉处保存待用。

这种方法除安全可靠外,可免去用小砂轮或钻石刀划痕;还可预先按比例注入双蒸水或缓冲液于棕色试剂瓶,最大限度地缩短钨酸与空气的接触时间。在破裂时晶体钨酸并不会触及套管而影响其质量。