



乌拉尔甘草悬浮单细胞的筛选及培养

肖天剑, 李兴林, 蔡津, 高洁

(工业微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 乌拉尔甘草种子在消毒后培养无菌苗, 截取无菌苗子叶、上胚轴和下胚轴等作为外植体, 诱导和继代培养成松散型愈伤组织, 然后在振荡培养后过筛获得悬浮单细胞; 再对悬浮液进行多级稀释、培养制备小细胞团。结果表明, 在含 1.0 mg/L 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、1.0 mg/L α -萘乙酸(NAA)、1.0 mg/L 6-苄氨基嘌呤(6-BA)、0.3 mg/L 激动素(KT)的MS培养基中, 上胚轴能在3~5次继代培养后获得松散型愈伤组织, 过80目筛可以获得悬浮单细胞和小细胞团; 同样的培养基, 悬浮单细胞在琼脂表面、珍珠岩表面和看护培养中培养, 看护培养的细胞生长最快、小细胞团形态最佳。

关键词: 乌拉尔甘草; 愈伤组织; 单细胞筛选; 悬浮培养; 看护培养

中图分类号: Q813.1⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2009)06-0005-04

Screening and Culture of Suspended Single Cell of Liquorice

XIAO Tian-jian, LI Xing-lin, CAI Jin, GAO Jie

(Key Laboratory of Industrial Microbiology, Ministry of Education, College of Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The seeds of *Glycyrrhiza uralensis filch* were sterilized and cropped in medium to obtain the asepsis seedlings. After that the cotyledons, epicotyls and hypocotyls from the seedlings were applied to induce calli, which were subcultured into relaxed calli. Subsequently, the relaxed calli were performed by suspension culture and sifted through into suspension cells with many single cells and a little cell aggregation after shake culture. The results indicated that the calli from epicotyls were more easily subcultured into relaxed calli and suspension cells in MS medium with 1.0 mg/L 2,4-D, 1.0 mg/L NAA, 1.0 mg/L 6-BA, 0.3 mg/L KT for 3 to 5 times. The suspension cells were filtered through into single cells and cell aggregation by eighty screen mesh. The single cells were performed according to agar surface, perlite surface and nurse culture, respectively. The nursing culture was the best in cell growth speed and cell aggregation configuration.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis filch*; calli; single cell screening; suspension culture; nurse culture

甘草含有多种药理成分, 对其药理作用研究较为深入, 其中甘草甜素和甘草多糖在提高免疫力、抗病毒和抗菌等方面尤为突出^[1-3]。由于从天然产物中提取甘草次生代谢产物受环境等因素的影响, 已经难以满足工业化生产的需要, 因此采用细胞工程等大量培养甘草组织或细胞日益受到重视^[4], 如培养甘草毛状根等^[5-6]。但是由于材料、组织和细胞等之间的区别, 导致它们的次级代谢产物含量存在着较大的差

异, 所以筛选高产细胞系成为甘草细胞工程的重要环节, 而获得单细胞是筛选高产细胞系的前提。目前, 看护培养是植物单细胞筛选的重要方法。其中, 涉及到的看护因子有看护组织、看护细胞、看护培养基等; 培养对象有原生质体、悬浮单细胞等, 其中原生质体最多^[7-9]。但至今还没有关于甘草单细胞筛选的报道, 本文旨在甘草组织培养的基础上进一步探索悬浮单细胞筛选技术。

收稿日期: 2009-04-30; 修回日期: 2009-07-08

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划项目(08JCZDTC15300)

作者简介: 肖天剑(1983—), 男, 天津人, 硕士研究生; 通信作者: 李兴林, 副教授, lxlszf@tust.edu.cn.

1 材料与方法

1.1 材料

乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis filch*) 种子由北京时珍中草药研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 无菌苗的培养

将种子置于烧杯中,用 98%的浓硫酸浸没 1 h,倒掉浓硫酸,用无菌水迅速清洗 2~3 次并浸泡 12 h 后,用 75%的乙醇和 10%的次氯酸钠分别处理,无菌水清洗种子,最后将种子接种于 MS 培养基上,在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 无菌条件下进行培养。

1.2.2 愈伤组织诱导与继代培养

选择种子萌发 10 d 内的无菌苗,将其上胚轴或下胚轴切成长度为 5 mm、子叶切成 5 mm^2 的外植体,并接种在加各类激素组合的 MS 固体培养基内(见表 1)。每个激素组合、每种外植体接种 12 瓶,每瓶接种 20 个外植体,并将样品分别在光照和黑暗条件下进行培养。按激素组合、外植体类型分别统计愈伤组织率。

表 1 愈伤组织诱导和细胞悬浮培养的激素组合

Tab.1 Hormone combination of calli inducement and suspension culture

| 组合编号 | 生长激素 | 剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) | 细胞分裂素 | 剂量/ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|------|-----------|--|---------|--|
| 1 | 2,4-D | 4.0 | 6-BA | 1.0 |
| 2 | 2,4-D | 1.0 | 6-BA | 1.0 |
| 3 | 2,4-D | 1.0 | KT | 0.7 |
| 4 | 2,4-D | 1.0 | KT | 0.3 |
| 5 | 2,4-D | 1.0 | 6-BA,KT | 1.0,0.3 |
| 6 | NAA | 1.0 | 6-BA | 1.0 |
| 7 | NAA | 1.0 | KT | 0.3 |
| 8 | NAA | 1.0 | 6-BA,KT | 1.0,0.3 |
| 9 | 2,4-D,NAA | 1.0,1.0 | 6-BA | 1.0 |
| 10 | 2,4-D,NAA | 1.0,1.0 | 6-BA,KT | 1.0,0.3 |
| 11 | — | | 6-BA,KT | 1.0,0.7 |

取淡黄色、未分化、生长快、出愈率高的愈伤组织进行继代培养。相同条件下对培养中的愈伤组织定

期取样,测定愈伤组织干重的变化曲线,以确定继代培养周期。

1.2.3 悬浮细胞的制备与继代培养

选取生长良好的松散型愈伤组织,夹碎后接种于含 10 号激素组合的 MS 液体培养基中,在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 、转速为 120 r/min 和黑暗的条件下振荡培养 10 d 后,培养物用 80 目的不锈钢筛过滤,获得分散程度较好的单细胞和小细胞团。

培养物静置 30 min 后倒去上清液并补加新鲜培养液继续培养,测定细胞密度,给出细胞生长曲线。取在快速生长后期悬浮细胞进行继代培养。如此 3~5 次即可获得密度高、分散性较好的细胞悬浮系。

1.2.4 悬浮单细胞的培养

将上述甘草细胞悬浮液用 80 目的不锈钢筛过滤,滤过液用血球计数板计数后将其稀释到细胞密度为 $2.0 \times 10^3\text{ mL}^{-1}$ 用于单细胞培养。使用 MS 基本培养基、10 号激素组合在 pH 5.8、黑暗条件下培养,支持物见下述。定期对形成的小细胞团计数。

琼脂表面培养:取稀释的甘草细胞悬浮液 1 mL 在 MS 固体培养基上涂匀, 25°C 、黑暗条件下培养,设 30 个平行样。

珍珠岩培养:取一定量的珍珠岩于培养皿中,上面加 1 层滤纸并加入适量 MS 液体培养基,灭菌后取稀释的甘草细胞悬浮液 1 mL 加在滤纸表面上涂匀, 25°C 、黑暗条件下培养,设 30 个平行样。

看护培养:将继代并处于快速增长期的愈伤组织接种到新鲜的 MS 固体培养基表面,并在其上铺 1 层灭菌滤纸,5 d 后取稀释的甘草细胞悬浮液 1 mL 在滤纸上涂匀, 25°C 、黑暗条件下培养,设 30 个平行样。

2 结果

2.1 外植体愈伤组织率比较

不同外植体的出愈率见表 2。由表 2 可知,在黑暗条件下,上胚轴在 11 种激素组合下出愈率的平均值为最高。其中,上胚轴在含 10 号激素组合培养基和黑暗条件下培养,出愈率最高。

表 2 不同外植体的出愈率

Tab.2 Calli ratio from different explants

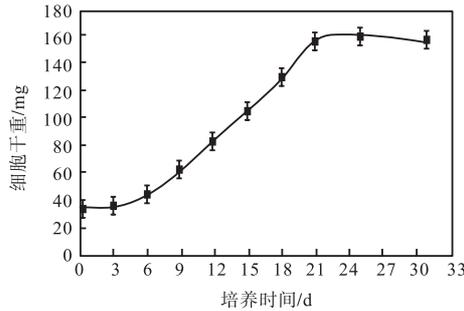
| 激素组合 | 子叶出愈率/% | | 上胚轴出愈率/% | | 下胚轴出愈率/% | |
|-----------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 光照 | 黑暗 | 光照 | 黑暗 | 光照 | 黑暗 |
| 所有激素组合平均值 | 34.2±12.4 ^{c,d,e} | 43.6±10.3 ^{b,c,d} | 57.5±6.3 ^{b,c} | 78.2±9.4 ^{a,b} | 56.2±12.4 ^{b,c,d} | 60.1±11.0 ^{a,b,c} |
| 10 号激素组合 | 47.5 | 63.3 | 69.4 | 93.2 | 63.9 | 72.2 |

注:不同字母之间的差异 $P=0.05$ 。

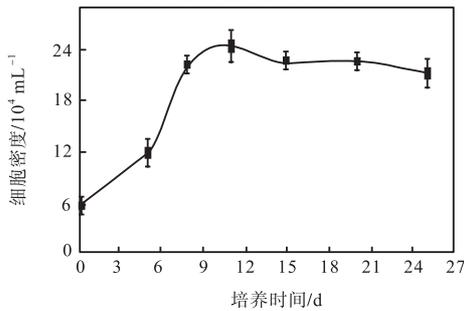
2.2 愈伤组织和悬浮细胞生长曲线

在 10 号激素组合的培养基中,图 1(a)为上胚轴形成的愈伤组织生长的干重变化. 由图 1(a)可知,该类愈伤组织在第 6~21 d 为快速增长阶段,取培养处于 2~3 周的愈伤组织进行继代培养.

在 10 号激素组合的 MS 液体培养基中,图 1(b)为细胞悬浮培养的密度变化. 由图 1(b)可知,悬浮细胞快速增长阶段出现在第 3~11 d,取培养处于 10 d 左右快速增长后期的细胞进行继代培养.



(a) 愈伤组织生长曲线



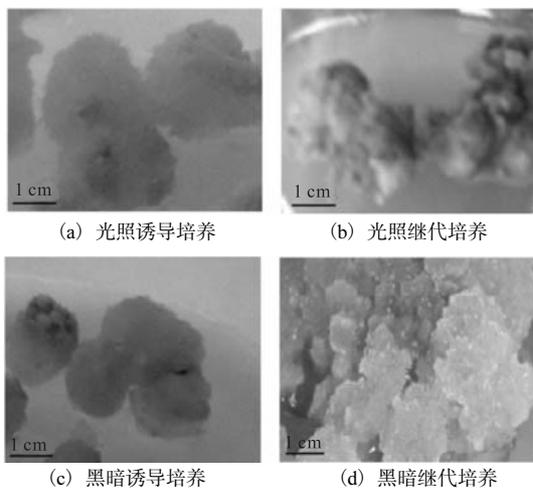
(b) 悬浮细胞生长曲线

图 1 甘草生长曲线

Fig.1 Licorice growth curves

2.3 松散型愈伤组织的获得

在 10 号激素组合的培养基中,上胚轴形成的愈伤组织无论在光照还是黑暗条件下,经过 5 次继代培养后均呈现淡黄色、松散状态,生长旺盛(见图 2).



(a) 光照诱导培养

(b) 光照继代培养

(c) 黑暗诱导培养

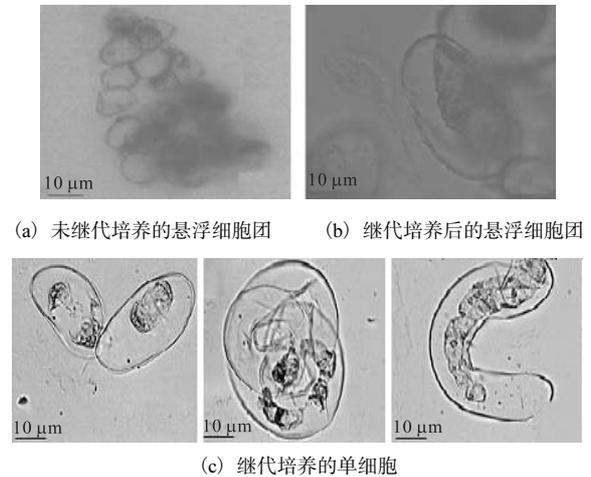
(d) 黑暗继代培养

图 2 上胚轴继代培养前后的愈伤组织

Fig.2 Calli from epicotyls during culture and subculture

2.4 单细胞和小细胞团的获得

继代培养和过筛前后的甘草悬浮细胞见图 3. 由图 3 可知,继代培养悬浮细胞过筛后细胞分散度最好,多数是单细胞,呈现球状和椭圆状(图 3(c));少量是小细胞团(图 3(b)),而多数小细胞团也仅含 2~5 个细胞.



(a) 未继代培养的悬浮细胞团

(b) 继代培养后的悬浮细胞团

(c) 继代培养的单细胞

图 3 细胞团和细胞形态

Fig.3 Shapes of cells and cell aggregation

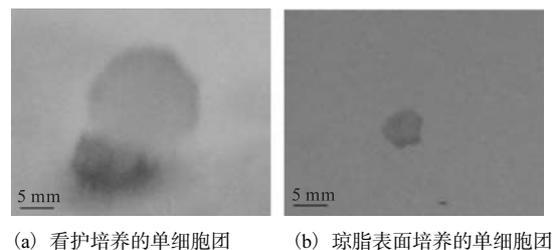
2.5 单细胞培养

悬浮单细胞在 40 d 内的 3 种培养结果见表 3. 由表 3 可知,到培养 25 d 时,看护培养的 3 个培养皿中能见到的小细胞团数达 19 个,而在琼脂和珍珠岩培养中小细胞团数为 0. 看护培养中悬浮单细胞形成的细胞团较快、较大,呈现球状突体(见图 4(a));而在琼脂表面形成的小细胞团生长较慢、较小,呈现扁平状(见图 4(b)).

表 3 40 d 内 3 种培养方式形成的小细胞团数

Tab.3 Cell aggregation numbers from three culture methods in 40 days

| 培养时间/d | 琼脂表面培养 | 珍珠岩表面培养 | 看护培养 |
|--------|--------|---------|------|
| 15 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 0 | 0 | 2 |
| 25 | 0 | 0 | 19 |
| 30 | 6 | 0 | 22 |
| 40 | 6 | 0 | 22 |



(a) 看护培养的单细胞团

(b) 琼脂表面培养的单细胞团

图 4 单细胞培养形成的小细胞团

Fig.4 Cell aggregation from single cell by different culture methods

3 讨 论

在愈伤的单细胞培养过程中,珍珠岩在不同时间内均未得到单细胞愈伤,这可能是在培养过程中液体蒸发,使单细胞或小细胞团不能得到充分营养导致细胞死亡,最终不能得到愈伤. 利用琼脂固体培养基表面直接培养,单细胞愈伤的形成率为 20%. 而利用看护培养单细胞愈伤的形成率为 73.3%,这主要是由于看护的组织细胞自身可以分泌一些有利于细胞生长的物质^[10],这不仅可以促进单细胞的生长,也可促进愈伤组织的形成^[7,10-14]. 但通过看护培养获得小细胞团的周期长达 3 周以上,还有待于进一步优化看护组织、培养基和培养条件等.

参考文献:

- [1] Lee C H, Park S W, Kim Y S, et al. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice[J]. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 2007, 30(10) : 1898–1904.
- [2] Akanatsu H, Komura J, Asada Y, et al. Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin: Effect of neutrophil functions including reactive oxygen species generation[J]. *Planta Medica*, 1991, 57(2) : 119–121.
- [3] Hirabayashi K, Iwata S, Matsumoto H, et al. Antiviral activities of glycyrrhizin and its modified compounds against human immunodeficiency virus type I (HIV-1) and herpes simplex virus type I (HSV-1) *in vitro* [J]. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1991, 39(1) : 112–115.
- [4] 于林清, 何茂泰, 王照兰, 等. 甘草组织培养快速繁殖技术研究[J]. *中国草地*, 1999(1) : 12–14.
- [5] Mareshige K, Hiroshi K, Naomi T, et al. *In vitro* propagation from axillary buds of *Glycyrrhiza glabra* L. [J]. *Plant Tissue Culture Letter*, 1995, 12(2) : 145–149.
- [6] 芮和恺, 吴美芬, 顾慧芬, 等. 光果甘草等五种甘草组织培养研究[J]. *中药材*, 1991, 14(4) : 12–13.
- [7] Komai F, Morohashi H, Horita M. Application of nurse culture for plant regeneration from protoplasts of *Lilium japonicum* thumb [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2006, 42(3) : 252–255.
- [8] Bakos F, Darko E, Ponya Z S, et al. Regeneration of fertile wheat (*Triticum aestivum*) plants from isolated zygotes using wheat microspore culture as nurse cells [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 74(3) : 243–247.
- [9] Tamaro S, Simoniello P, Filosa S, et al. Block of mitochondrial apoptotic pathways in lizard ovarian follicle cells as an adaptation to their nurse function [J]. *Cell and Tissue Research*, 2007, 327(3) : 625–635.
- [10] Horita M, Morohashi H, Komai F. Regeneration of flowering plants from difficile lily protoplasts by means of a nurse culture [J]. *Planta*, 2002, 215(5) : 880–884.
- [11] HAO Yu-jin, DENG Xiu-xin. Single-cell-derived sibling lines are established as an experimental system to assess chromosome number variations in embryogenic callus cultures of sweet orange [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2003, 73(3) : 275–280.
- [12] XIAO Wang, HUANG Xue-lin, HUANG Xia, et al. Plant regeneration from protoplasts of *Musa acuminata* cv. Mas (AA) via somatic embryogenesis [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2007, 90(2) : 191–200.
- [13] Lardet L, Martin F, Dessailly F, et al. Effect of exogenous calcium on post-thaw growth recovery and subsequent plant regeneration of cryopreserved embryogenic calli of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.) [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(5) : 559–569.
- [14] Assani A, Chabane D, Foroughi-Wehr B, et al. An improved protocol for microcallus production and whole plant regeneration from recalcitrant banana protoplasts (*Musa* spp.) [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2006, 85(3) : 257–264.