

物凝集素对刺吸式害虫杀虫性同 BT 的杀虫性相比效果不尽如意,一方面有必要深入研究清楚其作用机制,从而制订相应策略提高抗虫效果,比如从蛋白质结构、凝集素的结合位点相互作用等方面研究入手;另一方面应着手新的抗虫基因的克隆。

在植物中表达凝集素要求相对较高的水平才具有较好的抗虫效果,要求构建强的高效表达载体,采用合适的强启动子,针对害虫取食部位是韧皮部可采用特异性表达启动子。随着越来越多植物凝集素的鉴定和对它们结构功能及其基因的深入研究,凝集素在农业、医学等领域及生命科学研究中用途越来越广泛。凝集素参与植物体内组成防卫和诱导防卫的机制及其基因克隆和转化研究,仍将是一个活跃的研究领域。

#### References:

[1] Van Damme E J M, DeClercq N, Claessens F, *et al.* Molec-

- ular cloning and characterization of multiple of isoforms of the snow drop lectin [J]. *Planta Med*, 1999 (186): 35-43.
- [2] YAO J H, Sun X F, Tang K X, *et al.* Molecular cloning of lectin gene from *Pinellia ternata* [J]. *J Fudan Univ—Nat Sci* (复旦大学学报·自然科学版), 2001 (40): 461-464.
- [3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning* (2nd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] Gu H Y, Zai L J, Ming X T. *Plant Gene and Molecular Manipulation* (植物基因与分子操作) [M]. Beijing: Beijing University Press, 1995.
- [5] Xu M L, Yang J S, Ge K L. The mechanism integration of foreign DNA fragment into the genome of the explants [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1996, 32 (3): 234-240.
- [6] McKnight T D. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains [J]. *Plant Mol Biol*, 1987, 8: 439-445.
- [7] Baucombe D C, English J J. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, (7): 173-180.
- [8] Mao H Z, Tang X, Cao X L, *et al.* Study on insect resisted transgenic *Brassica oleracea* var. *capitata* and the progeny [J]. *Sci Sin (C)* [中国科学(C辑)], 1996, (26): 339-347.

## 对数期继代对南方红豆杉细胞培养动力学的影响

仇燕, 王丽, 刘子会, 王刚

(河北师范大学生命科学院, 河北石家庄 050016)

**摘要:** 目的 解决南方红豆杉细胞生长缓慢及代谢水平低下的问题。方法 对对数期(20 d)和静止期(30 d)的红豆杉细胞分别进行继代,在整个生长周期中测定了培养基中的碳源、氮源、磷酸盐的变化并分析了红豆杉细胞生长及紫杉醇的合成情况。结果 对数期继代细胞吸收碳源和硝态氮早于静止期继代的细胞,且前者的比生长速度是后者的 1.5 倍,紫杉醇含量提高了近 4 倍。结论 对数期继代有利于生物量的积累及紫杉醇的合成。

**关键词:** 对数期; 紫杉醇; 动力学

中图分类号: R 282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)09-0849-04

## Effect of subculture at logarithmic phase on kinetics of cell cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*

QIU Yan, WANG Li, LIU Zi-hui, WANG Gang\*

(College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

**Abstract:** **Object** To solve the problem of low growth rate and metabolism level in *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lem e et L vl.) Cheng et L. K. Fu. **Methods** Cells on logarithmic phase (20 d) and stationary phase (30 d) were subcultured individually. The uptake of carbohydrate, nitrogen and phosphate from the medium was examined, the growth rate of *Taxus* cell and the synthesis of taxol were analyzed too during the whole growth period. **Results** The *Taxus* cell subcultured at logarithmic phase uptook carbohydrate and nitrate earlier than that subcultured at stationary phase. The special growth rate of the former was 1.5 folds of that of the latter. The production rate of taxol was increased by nearly 4 times. **Condu-**

收稿日期: 2002-11-29

基金项目: 河北省自然科学基金(300162)

作者简介: 仇燕(1977-),女,河北石家庄人,河北师范大学博士研究生,植物学专业,研究方向为植物抗逆生理学。

E-mail: qiu-yan-yan77@sohu.com

\* 通讯作者

**sion** Subculturing at logarithmic phase will benefit the biomass accumulation and the taxol synthesis.

**Key words:** logarithmic phase; taxol; kinetics

紫杉醇(taxol)是从红豆杉属植物中分离出来的一种二萜生物碱,具有显著的抗癌活性。红豆杉植物细胞培养法是解决药源紧缺的一种理想方法<sup>[1]</sup>。虽然近年来这方面的报道很多,但该方法还未工业化生产,其主要原因是细胞生长缓慢,紫杉醇含量较低。次生代谢的启动是遗传因素和外界环境共同作用的结果并与培养时的操作条件(细胞接种密度、颗粒度),尤其是细胞在转代前所处的生长周期时相等因素也有密切关系<sup>[2]</sup>。目前很多研究以细胞增殖量最大的时期即静止期作为细胞增殖培养的继代时期<sup>[3]</sup>,这样造成细胞继代后延迟期过长的现象,从而影响到细胞的增殖速率,最终影响细胞产量。为此本实验比较了对数期与静止期继代南方红豆杉 *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lem e et L vl.) Cheng et L. K. Fu Z<sub>3</sub> 细胞的生长和紫杉醇积累,培养基中碳源、氮源、无机磷的消耗规律,为获得最佳的继代时期提供参考。

## 1 材料和方法

1.1 细胞株和培养基:实验采用的细胞株为本实验室经过 2 年继代培养的南方红豆杉 Z<sub>3</sub> 细胞株。继代培养基为 B<sub>3</sub> 培养基并附加 NAA 1.0 mg/L, 6-BA 1.0 mg/L, Vc 100 mg/L 及 Gln(谷氨酰胺) 292.8 mg/L, 琼脂 0.4% (均为分析纯), pH5.6。红豆杉细胞于 25℃ 进行暗培养, 150 mL 三角瓶中培养基装置 40 mL, 接种量 3.0 g/瓶湿细胞, 继代周期为 30 d。

1.2 继代时期的选取:选取细胞生长对数期和静止期两个时期,以选取的时间(d)作为继代周期,继代 3 次后测定比干重增长率。

比干重增长率 = (收获干重 - 接种干重) / 接种干重 × 培养天数

### 1.3 分析

1.3.1 细胞量:湿细胞 50℃ 烘干至恒重称得细胞干重 细胞干重增长率 = (收获干重 - 接种干重) / 接种干重, 并用于测定紫杉醇含量。取出三角瓶中的培养基进行抽滤, 至抽干, 滤液用于残糖、硝酸根、铵根、磷酸根含量的测定。

1.3.2 主要培养基成分:残糖采用蒽酮比色法<sup>[4]</sup>; 磷酸根、硝酸根采用美国 DIOXAN (DX-120) 公司生产离子色谱仪, 分离柱为 AS14, 流动相为 NaCO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>, 流速 1 mL/min; 进样量 20 μL, 进样前用 0.2 μm 的滤膜滤过; 铵根采用微量凯式定氮法。

1.3.3 紫杉醇 紫杉醇的分析采用配有日本岛津公司

生产的 SPD-10AVP 紫外检测仪的 SCL-10AVP 型高效液相色谱仪; 分析柱 C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 10 μm); 流动相:乙腈-水, 梯度洗脱, 进样 10 μL, 227 nm 检测。紫杉醇标样从 Sigma 公司购得。

## 2 结果和讨论

2.1 细胞生长:红豆杉细胞生长大周期呈 S 型, 如图 1 所示。该周期可划分为:延迟期(0~15 d 左右), 对数生长期(16~25 d), 静止期(25~30 d), 静止期后, 愈伤组织很快衰老变黑死亡。常见的在细胞进入静止期进行继代的培养方法, 往往不能最大限度地发挥细胞本身的增殖能力, 在大量的实际培养中造成了延迟期过长的现象, 这也是红豆杉细胞培养增殖缓慢的原因之一。因此以静止期(第 30 天)时继代为对照选取红豆杉细胞生长旺盛的对数期(第 20 天)继代, 以充分发挥对数期细胞生长旺盛的优势。

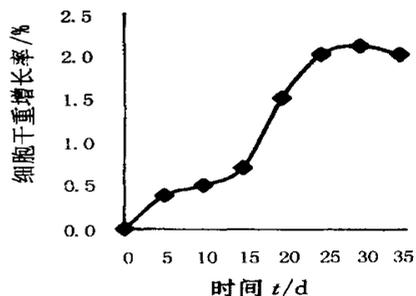


图 1 红豆杉细胞生长曲线

Fig. 1 Growth curve of *Taxus* cells

2.2 细胞生长和紫杉醇积累:图 2-A, B 分别显示了以 20, 30 d 为一周期继代细胞生长和紫杉醇积累的状况。图 2-A 可以看出以 20 d 继代的细胞较 30 d 继代的生长快, 且基本呈直线生长, 细胞最大比增长率为每天 0.071%, 30 d 继代的细胞延迟期较长达 15 d, 25 d 后细胞量增长停滞, 细胞的最大比增长率为每天 0.047%, 前者是后者的 1.5 倍。对数期(第 20 天)细胞分裂旺盛, 细胞活力较高, 及时将细胞继代到新鲜培养基中可补充细胞生长所需养分, 所以缩短了细胞生长的延迟期并且保持较高的比生长速度。图 2-B 表明以 20 d 继代的细胞在生长初期紫杉醇含量迅速提高, 第 5 天时最高达 0.175 mg/g, 而后下降; 而以 30 d 继代在细胞生长前期紫杉醇含量较低, 15 d 后开始积累, 25 d 时达最高 0.047 mg/g, 随后下降。据分析, 紫杉醇的这种积累方式与细胞生长的关系属于部分相关型<sup>[5]</sup>。这可能是由于随着细胞的生长, 细胞分化程度提高, 生产次生代谢物的能力得到加强的

缘故。王红强等<sup>[6]</sup>的研究结果表明在静止期向细胞中饲喂蔗糖,使合成紫杉醇的时期(静止期)延长了 10 d,所得紫杉醇的量是未加蔗糖的近 2 倍。在本实验中以 20 d 继代的细胞紫杉醇的含量是 30 d 继代的近 4 倍,这可能是因为在原培养基养分已有部分消耗的情况下将细胞继代至新鲜培养基使细胞所需营养物质得到补充,从而延长了紫杉醇合成活跃时期(前一周期的静止期)的缘故。

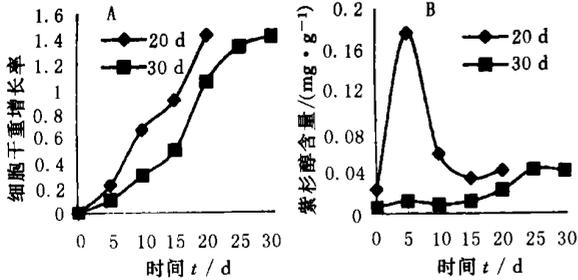


图 2 不同时间继代对细胞生长(A)及紫杉醇含量(B)的影响  
Fig. 2 Effect of different subculture time on cell growth (A) and taxol content (B)

2.3 主要培养基成分的吸收:在培养过程中营养物质的消耗主要用于细胞自身的增殖及产物的合成,培养基中最主要的营养物质是碳源和氮源,磷酸盐也是培养细胞所必需的。南方红豆杉细胞培养过程中培养基中糖、硝酸根、铵根和磷酸根离子的吸收状况,如图 3。

2.3.1 碳源的吸收:在植物细胞培养过程中碳源为蔗糖,其作用是提供细胞代谢过程中需要的能量及细胞组分与代谢物的碳骨架。结合图 2-A 和图 3-A 可以看出糖的消耗与细胞量的积累密切相关。这是由于红豆杉细胞在碳源丰富的条件下会在细胞内形成淀粉颗粒,作为能源储备,而以细胞干重来表征生

物量必然将这种细胞内淀粉作为生物量来处理<sup>[7]</sup>。图 3-A 表明以 20 d 继代的细胞对糖的吸收与细胞量的增长基本呈直线关系。30 d 继代的细胞在第 5 天后开始对糖进行吸收,进入 25 d 后糖的消耗逐渐变慢,表明此时糖只是维持细胞正常生理代谢及次生代谢产物的生物合成。20 d 继代的细胞对糖的吸收相对要早一些,一方面可能是由于大量的碳源流向前期合成紫杉醇;另一方面,处于对数期的细胞分裂能力要比静止期的高,需要大量的碳源以供生长。

2.3.2 磷酸盐的吸收:磷在细胞中是核酸与磷脂的组成成分,同时磷也用于合成高能磷酸化合物,对细胞的能量代谢进行调节。磷在培养过程中的消耗如图 3-B 所示,由于磷被大量用于合成结构性组分,故(0~5 d)消耗迅速,20 d 继代的尤为突出,细胞对磷的吸收较快,这可能是因为这些细胞的生长和合成能力较对照强的缘故,第 20 天时磷几乎全部被吸收。结合图 3-A, B 可以看出细胞对磷的吸收与糖的吸收存在一定的相关性。

2.3.3 氮源的吸收:氮源在培养基中的作用是合成蛋白质与核酸等细胞物质,蛋白质是细胞膜等结构组分的重要成分,同时也为次生代谢物紫杉醇侧链合成提供底物。图 3-C, D 表明两个处理细胞培养基中硝酸根离子和铵根的浓度随培养时间的延长而逐渐下降。红豆杉细胞在生长阶段优先利用氨态氮,而硝态氮则主要用于紫杉醇的生物合成<sup>[8]</sup>。20 d 继代的细胞吸收硝态氮要早于 30 d 继代的细胞,可能是用于早期合成紫杉醇的缘故。铵态氮的吸收要快于硝态氮第 5 天时铵态氮吸收近 50%,两个处理无显著差异,20 d 时铵态氮几乎全被吸收而硝态氮尚有剩余。

### 3 结论

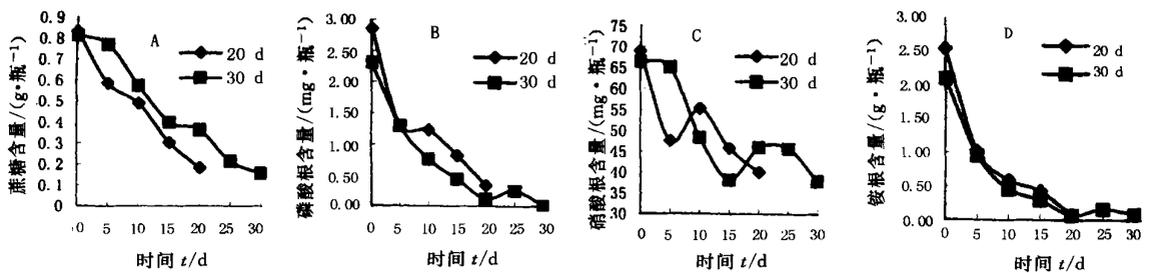


图 3 南方红豆杉细胞培养中主要培养基成分蔗糖(A)、磷酸根(B)、硝酸根(C)及铵根(D)离子消耗曲线  
Fig. 3 Depletion curve of main ingredients in medium containing sucrose (A), phosphate (B), nitrate (C) and ammonia anions (D) in *T. chinensis* var. *mairei* cell culture

由实验结果可知对数期继代细胞生长速度明显提高且紫杉醇合成较对照提高了近 4 倍,可能是由于对数期细胞分裂能力及生活力高于静止期细胞致

使对数期细胞较早吸收碳源、硝态氮以用于合成紫杉醇。而两个处理的细胞对磷酸根和铵根的吸收无明显差异,表明在细胞培养中铵根、磷酸根对细胞的

生长及代谢没有显著影响。细胞增殖及其次生代谢物的合成需大量的能量及营养成分,所以在培养基成分已有部分消耗的情况下于对数期及时将细胞继代到新鲜培养基能补充细胞所需营养,为细胞的迅速增殖及紫杉醇合成提供有利条件。

References:

[1] Fett-Neto A G, Zhang W Y, Dicosmo F. Kinetics of taxol production, growth and nutrient uptake in cell suspensions of *Taxus cuspidata* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44 (2): 205-210.

[2] Schlattmann J E, Moreno P R H, Selles M, et al. Two-stage batch process for the production of A jamaicine by *Catharanthus roseus*: The link between growth and production stage [J]. *Biotech Bioeng*, 1995, 47: 53-59.

[3] Wang H Q, Zhong J J, Chen X F, et al. Kinetic study on

suspension cultures of *Taxus chinensis* for production of anti-cancer drug taxol [J]. *J East China Univ Sci Technol* (华东理工大学学报), 1997, 23 (6): 679-683.

[4] Zhang Z L. *Experiment Guide of Plant Physiology* (植物生理学实验指导) [M]. Beijing: High Education Publishing House, 1990.

[5] Wang D I C, Conney C L. *Fermentation and Enzyme Technology* [M]. New York: John Wiley & Sons Inc, 1979.

[6] Wang C G, Wu J Y, Mei X G. Enhanced taxol production and release in *Taxus chinensis* cell suspension cultures with selected organic solvents and sucrose feeding [J]. *Biotechnol Prog*, 2001, 17 (1): 89-94.

[7] Hu P, Yuan Y J, Miao Z Q. Effects of fed-batch carbohydrate, nitrogen, phosphorus on growth of *Taxus chinensis* var. *mairiei* cell during suspension culture [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (1): 28-31.

[8] Mei X G, Huang W, Wang C G. Production of taxol by two-phase culture *Taxus* cell suspension [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2000, 10 (1): 10-12.

## 青蒿素的组织化学定位及其含量相关性研究

朱卫平<sup>1</sup>, 盛孝邦<sup>2</sup>

(1. 湖南农业大学理学院, 湖南 长沙 410128; 2. 湖南农业大学农学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 目的 确定青蒿素储存部位并为高青蒿素含量黄花蒿植株筛选提供选择指标。方法 应用组织化学方法确定青蒿素的储存结构, 应用统计学方法确定储存结构腺毛状分泌腺密度与青蒿素含量的相关性。结果 青蒿素储存于腺毛状分泌腺(BGT)和T-型网状分泌腺(NTFT)中, 在叶中腺毛状分泌腺的密度与青蒿素含量正相关。结论 腺毛状分泌腺密度可作为高青蒿素含量黄花蒿育种筛选指标。

关键词: 黄花蒿; 青蒿素; 腺毛状分泌腺; 组织化学

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)09-0852-03

### Correlation between histochemical location and content of artemisinin

ZHU Wei-ping<sup>1</sup>, SHENG Xiao-bang<sup>2</sup>

(1. College of Science; 2. Agronomy College, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract: Object** To determine the histochemical location deposited artemisinin and to provide selection character for screening of *Artemisia annua* L. which contains rich content of artemisinin. **Methods**

Artemisinin was located by the histochemical method and then statistical method was used to ascertain the correlation between the content of artemisinin and the density of biseriate glandular trichemes (BGT).

**Results** Artemisinin is located in both BGT and nonglandular T-shaped filamentous trichomes (NTFT) in *A. annua* leaves. The content of artemisinin had a positive correlation with the density of BGT in *A. annua* leaves. **Conclusion** High density of BGT in foliar tissue might be considered as one of the selection characters for the screening of *A. annua* with rich content of artemisinin.

**Key words:** *artemisia annua* L.; artemisinin; biseriate glandular trichome (BGT); histochemistry

青蒿素(artemisinin)是我国科技工作者从黄花蒿中分离并鉴定的有效抗疟单体成分,为世界卫生组织推荐的抗疟药品<sup>[1,2]</sup>。目前,青蒿素类药物主要

依靠我国从天然黄花蒿中提取。野生黄花蒿已远远不能满足生产的需要,许多地方开始栽培。培育高青蒿素含量的优质黄花蒿新品种,能够成倍提高生产

收稿日期: 2002-11-26

基金项目: 湖南省科技厅资助项目(00NKY2013, 01JZY2024)

作者简介: 朱卫平(1962-),男,湖南双峰人,讲师,博士,研究方向为药用植物的种质资源的研究与利用和遗传育种。

Tel: (0731)4635161 E-mail: wpzhu511@Yahoo.com.cn