

· 药材与资源 ·

银杏细胞固定化培养及其影响因素考察

于荣敏¹, 高越², 吕华冲³, 张辉², 姚新生^{1,2*}

(1. 暨南大学药学院, 广东 广州 510632; 2. 沈阳药科大学, 辽宁 沈阳 110016; 3. 广东药学院, 广东 广州 510224)

摘要: 目的 利用银杏细胞固定化培养法生产银杏内酯。方法 以聚胺酯泡沫为固定化材料, 考察各种因素对固定化银杏细胞培养的影响。结果 用高密度、小孔径聚胺酯材料 P29, 将其切成 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 的小块, 每瓶加 0.72 g 载体, 加 65 mL 液体培养基 (MS+ 2,4-D 8.0 mg/L+ KT 0.04 mg/L+ NAA 0.4 mg/L), 接种鲜重 200 g/L, 可得到高达 71% 的固定化比例, 载体上细胞密度达到干重 22 mg/cm³。结论 以聚胺酯泡沫为固定化材料进行银杏细胞固定化培养具有方法简便、成本低廉、细胞固定化比例高等优点, 具有潜在的应用价值。

关键词: 银杏; 细胞培养; 固定化; 聚胺酯泡沫

中图分类号: R 282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)07-0803-06

Cell immobilization culture of *Ginkgo biloba* and determination of their affecting factorsYU Rong-min¹, GAO Yue², LU Hua-chong³, ZHANG Hui², YAO Xin-sheng^{1,2}

(1. College of Pharmacy, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 3. Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou 510224, China)

Abstract: **Object** To investigate the application of cell immobilization culture to producing ginkgolides in *Ginkgo biloba* L. **Methods** To immobilize the cells by polyaminoresin foam as support materials, and determine the effects of different factors. **Results** The results showed that 71% of immobilization ratio and 22 mg/cm³ of cell density were obtained using P29 of high density, small bore diameter with pieces of 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm, 0.72 g of support matrices per bottle in 65 mL of MS medium solution supplemented with 2,4-D 8.0 mg/L+ KT 0.04 mg/L+ NAA 0.4 mg/L and the inoculum quantity was 200 g/L. **Conclusion** It shows that present method has some advantages, such as simpleness, low cost, high immobilization ratio.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; cell culture; immobilization; polyaminoresin foam

植物培养细胞与微生物细胞比较, 具有生长速率慢、药用成分含量低等缺点。高密度发酵可以很好的解决前者的缺陷, 而固定化细胞培养则有利于活性成分的提高。虽然悬浮细胞能够生产次生代谢产物, 但与其生物量相比, 次生代谢物的产量却不高。科学研究发现, 密集而有一定程度分化的、生长缓慢的细胞培养物, 较分散而无结构的、生长迅速的细胞培养物累积更多的次生代谢物。其原因为: 前者细胞所处的理化环境与其在整体植物中所处的环境类似, 细胞因而能够发挥正常的代谢功能; 而对后者而言, 细胞在培养液中所处的环境既无极性, 也无理化梯度。故而设想把细胞固定在一定的支持物上, 使它们之间密切接触, 并形成一定的理化梯度, 即人为地

营造一个通过培养基循环供应的类似于在整体植物分化组织中的生长环境。如此, 既可以保障细胞的营养需要, 又可避免由于代谢产物的累积而对细胞代谢造成反馈抑制。基于上述理论, 目前, 细胞固定化技术已日臻完善, 且越来越多地引起了众多生物医药学家的关注。

生长的休止、环境压力及分化对触发次级代谢产物的形成至关重要。在固定化培养中, 上述 3 种因素相辅相成。就聚胺酯泡沫而言, 细胞进入小孔径的框架里, 最初仅为纯物理滞留^[1]。之后, 细胞分泌出蛋白、果胶、阿拉伯半乳糖和木糖-葡聚糖等糖类成分而形成延伸层, 牢固地附着于泡沫基质内, 在小空间内进行生长、分裂。由于聚集度较高, 形成生物

* 收稿日期: 2003-11-29

作者简介: 于荣敏(1955—), 男, 教授, 博士, 研究方向为中药生物技术和创新药物的研制开发。

膜而导致物质传递障碍^[2]。于是,形成了各种营养物质(包括 O₂)由外至内、各种代谢产物由内至外的浓度梯度。物质的不均一性必然引起细胞质状态的不均一——分化。细胞间的紧密联系、识别和反馈也导致分化。当细胞填充孔隙达到某种程度,四周的固形物给细胞某种反馈,细胞不再趋于分裂。这样将使得初级代谢物积累,并有利于生长方面的活动,包括大量转化为次级代谢物及向多元化发展。在细胞固定化的情况下,有许多流变学的优点,使得整个培养过程方便易控,外部的大环境可人为改变,细胞团内部有缓冲的不均一性,两者结合,可随时调控细胞的生命方向。

植物细胞固定化的大量兴起始于 20 世纪 80 年代,方法、材料和形式多种多样,一些方法的优点尚未完全明了,而另一些方法却已因缺陷太多而被淘汰。本研究使用聚胺酯泡沫作为银杏细胞固定化的支持物。聚胺酯泡沫具有如下特点:(1)固定化初期属于纯物理滞留型,之后逐步形成自然亲和型,结合后则属于紧密型,在空间形式上属于微包囊型。聚胺酯泡沫由商业成品获得,在固定化过程中其结构不再改变;(2)聚胺酯泡沫质量轻,单位质量的强度高,回弹性好,冲击强度高,可根据需要获得任意形状及大小,有较好的流变学特性。由于其伸展结构及性质多样性,是现今所知最好的生物及血液相容性材料之一,被广泛用于医疗器件制造等,范围从导管一直到全人工心脏^[3]。本实验在前期工作^[4-7]的基础上,进行了银杏细胞的固定化培养研究。

1 材料与方 法

1.1 材料:培养细胞选取本课题组诱导并不断继代选育得到的 WDa 细胞系。

固定化材料采用市售聚胺酯泡沫,将其制成一定边长的立方体,共采用 3 种型号的聚胺酯泡沫:P29(29.6 kg/m³),P24(23.9 kg/m³),P17(16.8 kg/m³)。灭菌前加入已分装培养液的瓶中。

1.2 方 法

1.2.1 培养方法:MS+NAA 1.0 mg/L+KT 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L+琼脂 7.5 g/L,每 24 天更换一次培养基,25℃ 培养。固定化培养时,采用 MS+NAA 1.0 mg/L+KT 0.1 mg/L+蔗糖 30 g/L,接种 10 d 龄 WDa 细胞系,摇床 80 r/min,25℃ 培养。

1.2.2 细胞数检测方法:(1)血球计数法:悬浮细胞数测定:将已移出泡沫的培养液加入玻璃珠打碎,振荡,迅速用滴管取出一部分,滴于血球计数板上,显微镜下观察计数;固定化细胞数测定:将泡沫移至

10 mL 0.9% NaCl 溶液中,振荡器振荡(120 r/min)30 s,将泡沫取出。重复以上操作两次。合并 3 次的 NaCl 液体,加入玻璃珠,振荡打碎,镜检计数。(2)干重法:将被固定的细胞及载体或悬浮细胞分别滤过,用蒸馏水洗 3 遍,置表皿中,于烘箱 80℃ 烘烤 24 h,称重。泡沫分装之前准确称质量,按一定质量分装。滤纸在滤过之前称质量,与滤过物同时烘干,同时称质量,以避免损失掉沾于滤纸上的细胞。

悬浮细胞量(g)=总质量-称量纸质量-滤纸质量

固定化细胞质量(g)=总质量-称量纸质量-滤纸质量-泡沫质量

总质量(g)=悬浮细胞质量+固定化细胞质量

固定化比例(%)=固定化细胞质量/悬浮细胞质量

1.2.3 载体材料预处理:载体材料取自于商业制品,是由两种不同单体经加聚反应制成的聚合物。由于少量残留的单体(尤其是异氰酸酯)可能对植物细胞产生毒性,故在使用前必须进行预处理。预处理现多采用有机溶剂(甲醇或乙醇)法^[8]清洗。方法^[9]为将市售的泡沫按所需裁成一定规格的标准立方体,经 95% 乙醇浸洗 3 遍,挤干,再浸泡于水中,于 121℃,30 min 高温高压处理之后挤干,再用约 100 mL 蒸馏水浸洗 3 遍,挤干,于烘箱 80℃ 烘干至恒重。称取一定量,分装至 250 mL 三角瓶中。

1.2.4 载体内含气体的影响:由于载体为网状泡沫,含有大量气体,如不经过处理就置于培养液中,水分不会自动浸满,加上载体本身很轻,故漂浮于液体中。为了观察气体的存在与细胞吸附的关系,以及载体的这种半气体充满半液体浸泡状态,经长期的摇床细胞培养其性质是否会改变,进行了脱气实验。采取 3 种方式脱气:(1)手动脱气(2)真空脱气(3)超声脱气。

1.2.5 影响细胞固定化的因素考察:植物细胞固定于聚胺酯泡沫上是一个复杂的过程,有纯物理滞留的作用,也有细胞自发的分泌黏性物质的生物吸附作用。整个过程或某一阶段到底哪个作用起主导,各种培养条件如何适合于各种固定化作用,至今没有形成一致的看法。本研究就此进行了深入的探讨,以寻求一种可达到高固定化比例、高密度的固定化细胞和低生长速率的条件。

(1)载体孔径:相同条件:细胞种子来源为 WDa,接种量为鲜重 40 g/L,85 mL/瓶。不同条件:a)将 P29 切成 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 的立方体,0.90 g/瓶;b)将 P24 切成 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 立方体,0.72 g/瓶;c)将 P17 切成 1.0 cm × 1.0

cm × 1.0 cm 立方体, 0.51 g/瓶。原则: 按体积计算, 使载体在液体培养基中的比例相同(约为 36%)。

(2) 载体大小: 相同条件: 细胞种子来源为 WDa, 接种量为鲜重 40 g/L, 65 mL/瓶, 载体均为 P29。不同条件: a) 2.0 cm × 2.0 cm × 2.0 cm, 约为 0.72 g/瓶; b) 1.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm, 约为 0.71 g/瓶; c) 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm, 约为 0.72 g/瓶; d) 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm, 约为 0.70 g/瓶。原则: 按体积计算, 使载体在液体培养基的比例相同(约为 36%)。

(3) 载体量: 相同条件: 细胞种子来源为 WDa, 接种量为鲜重 40 g/L, 65 mL/瓶。载体均为 P29, 1.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm。不同条件: a) 约为 0.91 g/瓶, 载体量为 46%; b) 约为 0.68 g/瓶, 载体量为 36%; c) 约为 0.51 g/瓶, 载体量为 26%。

(4) 培养液体积: 相同条件: 细胞种子来源为 WDa, 接种量为鲜重 40 g/L, 载体均为 P29, 按体积计算, 载体在液体培养基的比例相同(约为 36%)。不同条件: a) 载体 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm, 0.90 g/瓶, 培养液体积为 85 mL/瓶, 接种量为 3.5 g/瓶; b) 载体 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm, 0.72 g/瓶, 培养液体积为 65 mL/瓶, 接种量为 2.6 g/瓶; c) 载体 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm, 0.49 g/瓶, 培养液体积为 45 mL/瓶, 接种量为 1.8 g/瓶; d) 载体 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm, 0.27 g/瓶, 培养液体积为 25 mL/瓶, 接种量为 1.0 g/瓶。

(5) 溶氧: 相同条件: 细胞种子来源为 WDa, 接种量为鲜重 40 g/L, 培养液体积为 65 mL/瓶。载体为 P29, 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm, 约为 0.72 g/瓶。不同条件: a) 八层纱布盖; b) 八层纱布盖+一层塑料盖。

(6) 细胞接种量与载体最大承载量: 由于吸附过程初期属简单的物理过程, 故加大接种量必然会更有有效的利用这一过程, 且固定化导致细胞生长缓慢。为了获得高密度细胞发酵, 实验进行了接种量的考察。

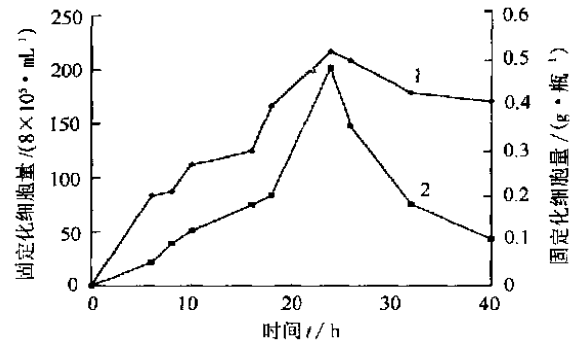
相同条件: 细胞种子来源为 WDa, 培养液体积为 65 mL/瓶。载体为 P29, 1.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm, 0.72 g/瓶。不同条件: 接种量分别为鲜重 2.6、5.2、13.0 g/瓶。

(7) 填充与游离的非可逆性: 接种 WDa 10 d 龄细胞, 接种量鲜重 2.6 g/瓶。载体采用 P29, 1.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm, 约为 0.72g/瓶, 培养液 65 mL/瓶。经过 13 d 培养将泡沫取出, 移入新的培养液中(该培养液中已有 3 块新的载体泡沫), 每瓶加入 4 块已长有细胞的泡沫, 80 r/min, 25 继

续摇床培养。定时取样, 观察细胞从原载体中转移到液体及新的载体中的情况。

2 结果

2.1 细胞数检测: 结果见图 1。干重法 RSD 值低, 操作也比较简单, 故本实验均采用干重法。



1-血球计数法(n=2, RSD=0.13%)

2-干重法(n=3, RSD=0.08%)

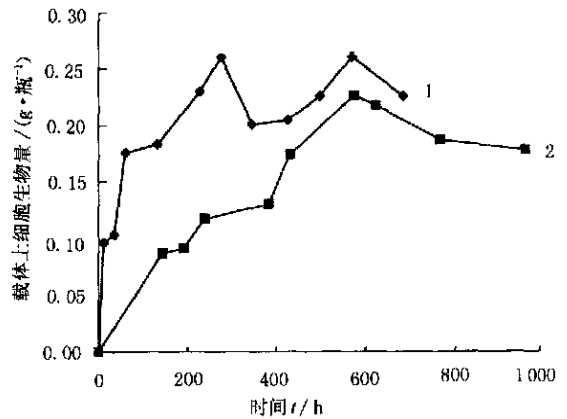
1-hemacytometry (n=2, RSD=0.13%)

2-dry weighting (n=3, RSD=0.08%)

图 1 细胞量检测方法比较

Fig. 1 Method comparison of cell number determining

2.2 载体材料预处理结果: 由图 2 可知, 实验材料预处理后, 可避免延迟期延长及生长速率降低。



1-经全部预处理过程 2-未经过 95% 乙醇预处理

1-by all pretreatment 2-by pretreatment besides 95% ethanol

图 2 载体材料预处理方法观察(n=3)

Fig. 2 Pretreatment of support matrices (n=3)

2.3 载体内含气体的影响: 实验结果显示: 不脱气, 则细胞依旧附着于载体上, 但远比脱气的吸附速度慢; 细胞的浸入仅扩张到有液体浸湿的边缘, 随着细胞的浸入, 载体表面的极性被改善, 更有利于亲水, 且载体的比重加大, 最终完全浸没于液体中。此外, 超声脱气无效。

2.4 影响细胞固定化的因素考察

2.4.1 载体孔径: 实验结果显示: (1) 游离细胞的量 P17 > P24 > P29; (2) 固定化细胞的量: P29 > P24 >

P17, P29 最高, 固定化比例在 40% 左右。P24, P17 到后期由于结构疏松, 强度低, 随着细胞的扩增及持续的机械碰撞, 导致部分破碎, 细胞随载体碎片一起游离于液体中, 导致固定化水平锐减, 游离的细胞量激增。游离细胞量的增长与固定化的细胞量的增长成反比关系; (3) 固定化比例越高越好, 故 P29 最优。但固定化影响生长速度, 最终倍增数仅为 2.7 (按 P29 计算)。由于生长消耗与代谢消耗的矛盾, 所以低生长是有利的。

2.4.2 载体大小: 结果显示: (1) 固定化细胞的量随载体块体积的增大而增加, 即边长 $2.0 > 1.5 > 0.5$, 这是由于物理滞留的累积作用, 2.0 边长的固定化比例最高时达 81%; (2) 随着细胞量的继续积累, 使通气及营养物交换困难, 大块载体无法及时将有用物质运输至载体内, 也无法及时排除有毒代谢物。最终, 载体最大承载量出现了刚好相反的情形: $0.5 > 1.5 > 2.0$ 。Robins 等证明仅仅在泡沫块外围 1.5 mm 深度以外处, 才能有好的通 O_2 状态^[10]。此外, 载体体积越大, 载体上的细胞越早进入到衰减期, 即: (a) 2 ~ 140 h; (b) 1.5 ~ 360 h; (c) 1 ~ 280 h; (d) 0.5 ~ 430 h。所以, 低密度培养时采用大块泡沫, 而高密度培养时则宜采用小块泡沫; (3) 游离细胞量: $0.5 > 1.5 > 2.0$ 。由于小块载体最初的固定化比例低, 游离的细胞基数大, 其量一直高于大块载体, 且不受固定化细胞密度的影响。

2.4.3 载体量: 由结果可知: 载体量增加, 固定化细胞的量相应增加, 固定化比例也相应提高, 但总生物量基本一致。

2.4.4 培养液体积: 结果见图 3。采用 65 mL/瓶, 可使固定化比例达到最高值。这与银杏悬浮培养^[8]时细胞生长量达到最大的优化条件一致。由此推测发酵液体积可能与溶氧有关。

2.4.5 溶氧和细胞填冲泡沫所需时间, 结果如图 4。

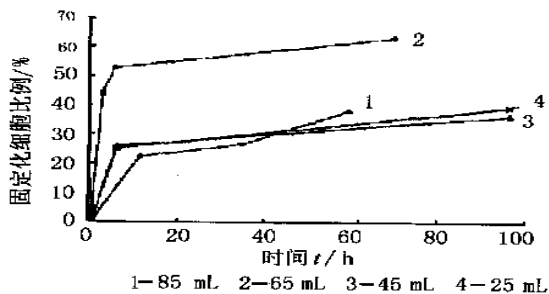
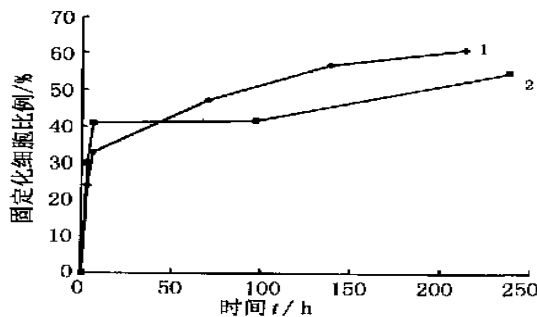


图 3 不同发酵液体积对固定化比例的影响 ($n=3$)
Fig. 3 Influence of various fermentation solution on immobilized ratio ($n=3$)

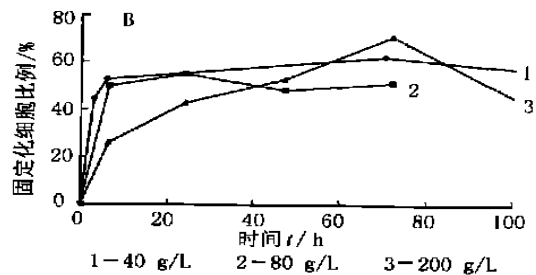
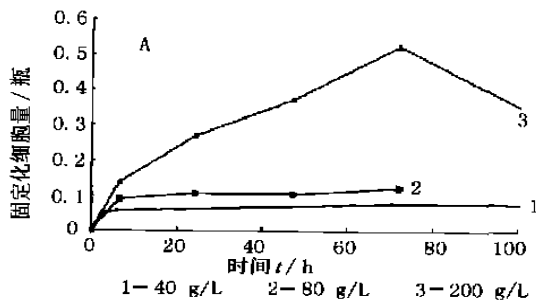


1-纱布盖 2-纱布盖+塑料盖
1-gauze cover 2-gauze cover + plastic cover
图 4 溶氧对固定化比例的影响 ($n=3$)

Fig. 4 Influence of dissolved oxygen on immobilized ratio ($n=3$)

由于塑料加盖, 使通气性能下降, 但并未影响固定化的比例。所以, 溶氧并不是影响固定化的重要因素。由图 4 还可以看出, 银杏细胞固定化明显存在一个快速吸附期, 由于此期属物理吸附过程, 较生物吸附有更大的可控制潜力, 故进一步对细胞填冲泡沫所需时间进行了考察。结果显示, 在各种情况下, 6 h 以内均能完成第一阶段的吸附过程。

2.4.6 细胞接种量与载体最大承载量: 结果见图 5。



A-对细胞量的影响 B-对固定化比例的影响
A-effect on cells B-effect on immobilized ratio
图 5 细胞接种量对固定化的影响 ($n=2$)

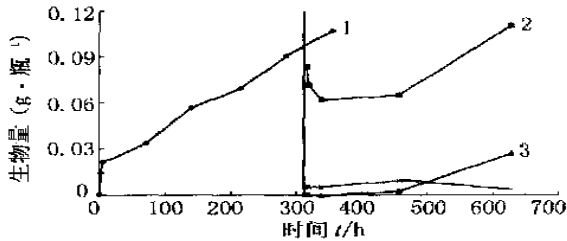
Fig. 5 Effect of cell inoculum on immobilization ($n=2$)

(1) 当细胞接种量鲜重低于 80 g/L 时, 仍然是 6 h 内完成最初的快速吸附期。在此接种量以内, 随接种量的增加, 固定于载体内的细胞的量呈正比例增加, 而固定于载体内的细胞占总细胞量的比例不变; (2)

当细胞接种量鲜重为 200 g/L 时, 其吸附过程在 70 h 达到最高点。固定化比例也在 70 h 时达到最大值, 且高于低接种量的最终固定化比例。(3) 最高的固定化细胞密度为鲜重 0.52 g/瓶, 高于本实验中已获得的任何最终固定化细胞密度。

2.4.7 填充与游离的非可逆性: 结果见图 6, 7(0~312 h 内每瓶固定化细胞的量为折算值, 即每瓶 7 块载体折算为相当于 4 块载体的量)。

细胞从载体上脱落的比例极低, 新、旧载体间细胞的转移率更低, 故不适宜用已固定的细胞作种子, 用悬浮细胞系或固体培养的细胞作种子较佳。

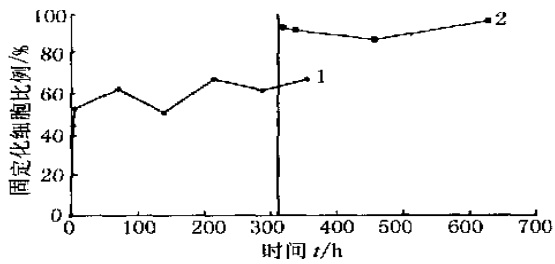


1-载体上生物量 2-旧载体上生物量
3-新载体上生物量 4-悬浮细胞生物量

1-biomass on supports 2-biomass on old supports 3-biomass on new supports 4-biomass of suspended cells

图 6 载体上细胞的重新分配 (n=3)

Fig. 6 Redistribution of cells on supports (n=3)



1-最初栽培状态 2-移入旧介质附加新鲜介质
1-first cultivating phase 2-old medium was removed and fresh medium added

图 7 固定化比例的变化

Fig. 7 Difference of immobilized ratio

3 讨论

植物细胞固定于聚胺酯泡沫中可分为 3 个阶段: 第 1 阶段(0~12 h): 为快速吸附期, 在 12 h 之内基本完成, 属纯物理滞留; 第 2 阶段(35~60 h): 为较快吸附期, 历时 25 h 左右, 此间游离细胞略有生长, 在载体上细胞量却以更快的速度增加, 最终, 使得固定化比例达到整个培养过程的最高值。此过程可能是细胞本身分泌黏性物质, 自发的吸附于载体上, 分泌黏性物质需要一定的时间。第 3 阶段(130 h 后): 为细胞生长阶段, 此时细胞进入对数生长期,

开始在载体上以略低于游离细胞的生长速度生长, 固定化比例保持不变或略有下降。

单个载体上的细胞量并未随载体总量的增加而明显减少, 有时载体量多, 单个载体的细胞量也多。参考 Rhodes 等的研究, 当载体量很少时, 增加载体将明显分担固定化的压力, 导致单位载体上的细胞量明显减少, 固定化比例明显增加, 但距最高值很远; 而当载体量很大时, 在增加其用量时, 固定化比例缓慢增加, 单位载体上的量不再有大的变化。所以, 实验中所选载体的量较适宜, 即在此接种量时, 载体量已达饱和。

元英进等^[1]在固定化长春花细胞时, 将泡沫块与不锈钢丝连接起来, 以达到泡沫与培养液的相对运动, 获得了很高的固定化比例及高细胞生长量。这是因为相对运动造成的载体纯物理滞留, 还是由于物质高效率交换的缘故呢? 笔者未加探讨。且其伴随的高细胞生长现象, 也是固定化中所不常见的。

用 0.5 cm 边长的立方体作载体时, 由于物质交换良好, 载体上细胞生长速度快, 而游离的细胞量也很高, 所以最终总细胞量最大, 且最终固定化比例不低于 1.5 cm 边长的载体; 此外, 由于边长 1.0 cm 的载体数据取自密度因素考察实验中, 因其摇瓶体积为 85 mL/瓶, 所以数值偏低, 由此可见, 发酵液体积对固定化过程影响也很大; 此外, 2.0 cm × 2.0 cm × 2.0 cm 及 1.5 cm × 1.5 cm × 1.5 cm 的固定化细胞在 200 h 以后不再增加的同时, 游离细胞的生长也随之停止。本研究根据增代时间计算公式^[2]计算 p29, 载体大小为 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 时, 固定化细胞的增代时间约为 10 d。

由图 7 可以看出, 将载体移至新的培养液中, 因为此时固定化的细胞占绝大多数, 而悬浮的细胞极少, 正是一个排除游离细胞干扰, 观察固定化细胞特性的好时机。将载体移至新培养液以后, 细胞从载体上脱落, 虽然很缓慢, 但却说明细胞与载体的结合确实存在着小比例的非牢固结合。另外, 细胞被移入新的培养基后, 也存在一个延迟期, 之后进入生长期, 载体上细胞的生长趋势与移入前载体上细胞的生长趋势很相似。可见, 固定化细胞的生长与游离细胞的生长是独立的, 各自在不同的环境中完成其生长过程。

References:

[1] Endress R. *Plant Cell Biotechnology* [M]. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1994.
[2] Rhodes M J C, Smith J I, Robins R J. Factors affecting the immobilization of plant cells on reticulated polyurethane foam particles [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1987, 26: 28-35.
[3] Yu H B, Zhang B H, Song M D, et al. Surface morphology and antithrombogenicity of modified polydimethylsiloxane/

polyurethane blends [J]. *J Biomed Eng* (生物医学工程杂志), 1995, 12(3): 191-196.

[4] Yu R M, Zhao H L, Zheng Y G, *et al.* Studies on the callus cultures of *Ginkgo biloba* and its metabolites-ginkgolides [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1999, 15(1): 51-58.

[5] Yu R M, Ma W X, Zhang H, *et al.* Studies on the polysaccharides in the cell cultures and the leaves of *Ginkgo biloba* [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 1999, 20(5): 217-220.

[6] Song L Y, Ma W X, Yu R M, *et al.* Studies on the biological activities of polysaccharides from the cell cultures and the leaves of *Ginkgo biloba* [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志) 1999, 20(6): 278-280.

[7] Yu R M, Zhao H L, Zhang H, *et al.* Studies on the cell suspension culture of *Ginkgo biloba* [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报) 1999, 15(2): 207-210.

[8] Iboraa J L, Guardiola J, Montaner S, *et al.* Enhanced accumulation of anthocyanins in vitis vinifera cells immobilized in PUF [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(5): 416-419.

[9] Li X M, Hou S S, Chen S Y, *et al.* Study on immobilized suspension cells of *Berberis julianae* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1993, 35(Suppl): 101-105.

[10] Morris P, Scragg A H, Stafford A, *et al.* *Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.

[11] Yuan Y J, Hu Z D. Study on alkaloid production of immobilized *Catharanthus roseus* cells in polyurethane foams [J]. *Chem React Eng Technol* (化学反应工程与工艺), 1994, 10(2), 195-199.

[12] Departments of Microbiology, Wuhan University and Fudan University. *Microbiology* (微生物学) [M]. Beijing: Beijing Higher Education Press, 1987.

石斛属 4 种植物的 AFLP 分析

虞泓^{1,2*}, 和锐¹, 倪念春¹, 张时刚^{1*}

(1. 云南英茂生物技术实验室, 云南昆明 650106; 2. 云南大学生命科学学院生态遗传学实验室, 云南昆明 650091)

摘要: 目的 研究石斛属植物 DNA 指纹图谱, 初步探讨 AFLP 分子标记技术在石斛地道性鉴别上的应用。方法 采用扩增片段长度多态性(AFLP)技术对石斛属内石斛组 4 个种和一个外类群种进行基因组 DNA 多态性分析。结果 从 64 对引物组合中选出 5 对引物组合构建了 5 个种的 DNA 指纹图谱。通过聚类分析, 石斛属 4 种植物聚成一个大类, 彼此关系得到了很好的分辨, 并获得 bootstrap 校验的有力支持。结论 AFLP 技术可用于药用石斛 DNA 指纹图谱研究。

关键词: 石斛属; AFLP; DNA 指纹图谱

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2004)07-0808-03

Fingerprinting analysis of plants of *Dendrobium* Sw. by AFLP

YU Hong^{1,2}, HE Rui¹, NI Nian-chun¹, ZHANG Shi-gang¹

(1. Inmol Laboratory of Biotechnology of Yunnan, Kunming 650106, China 2. Laboratory of Ecological Genetics, College of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: **Object** Studies on DNA fingerprinting of four species of *Dendrobium* Sw. and the application of amplified fragment length polymorphism (AFLP) to the identification of natural herbal. **Methods** The polymorphisms of four species from *Dendrobium* Sw. and one outgroup species were detected by AFLP technique. **Results** The DNA fingerprinting of five species were generated by fine primer combinations screened from 64 primer combinations. Four species of *Dendrobium* Sw. were clustered into one big group, whose relationships were distinguished very well. The results were strongly supported by bootstrap test. **Conclusion** AFLP technique has provided us with the method of study on the DNA fingerprinting of medicinal species of *Dendrobium* Sw.

Key words: *Dendrobium* Sw.; amplified fragment length polymorphism (AFLP); DNA fingerprinting

扩增片段长度多态性(AFLP)是在随机扩增多态性(RAPD)和限制性片段长度多态性(RFLP)技

* 收稿日期: 2003-10-12

作者简介: 虞泓, 博士生导师, 云南大学生物系教授, 云南英茂生物技术实验室主任, 主持云南大学生命科学学院生态遗传学实验室工作。从事生态遗传学和居群生物学科研与教学。1996 年评为云南省学术和技术带头后备人才; 1997 年主持完成的《横断山区百合科四个属的细胞遗传与进化研究》获“云南省自然科学二等奖”; 1998 年主持完成的《云南百合科遗传多样性与进化研究》获首届“云南省青年科技奖”; 2000 年获云南省五四青年奖章; 2002 年云南省人民政府授予“云南省中青年学术技术带头人”称号; 2003 年获“云南省科技论文一等奖”。发表论文 40 篇(SCI 论文 6 篇)。

* 通讯作者 Tel: (0871) 8327767 Fax: (0871) 8327761 E-mail: fisher@poblock.km.yn.cn