

霍山石斛细胞悬浮培养及条件优化

李 蕤, 谭晓芳, 陈 群, 樊家荣

合肥学院 生物与环境工程系, 安徽 合肥 230022

摘要: 目的 利用细胞悬浮培养技术生产霍山石斛单细胞, 解决石斛药用植物资源短缺问题。方法 以霍山石斛叶片等外植体为实验材料, 通过不同的制备方法获得霍山石斛单细胞, 研究霍山石斛细胞培养的多种影响因素, 应用正交设计优化霍山石斛细胞悬浮培养的条件。结果 在蔗糖 35 g/L, NH_4NO_3 1.3 g/L, pH 5.6, 激素 IAA 0.4 mg/L, 6-BA 1.0 mg/L, 培养时间 14~18 d, 在此条件下培养的霍山石斛细胞数为 9.42×10^5 个/mL。结论 经过 4 次继代培养后石斛细胞多为圆状或椭圆状, 细胞碎片减少。应用优化的细胞悬浮培养条件, 能获得较大量的霍山石斛细胞。

关键词: 霍山石斛; 细胞悬浮培养; 正交试验; 培养条件; 单细胞

中图分类号: R282.23 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)02-0358-05

Cell suspension culture of *Dendrobium huoshanenes* and its optimal conditions

LI Rui, TAN Xiao-fang, CHEN Qun, FAN Jia-rong

Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei 230022, China

Abstract: **Objective** Single-cell of *Dendrobium huoshanenes* was cultured by using cell suspension culture for solving the problem of resource shortage of medicinal plant *D. huoshanenes*. **Methods** The single-cell of *D. huoshanenes* was obtained by different preparing ways, effects of various factors on cell growth were studied and the optimal growing conditions of cell suspension culture were investigated by orthogonal design. **Results** Through the orthogonal test, the results indicated that the optimum conditions for suspension culture of *D. huoshanenes* cell were as follow: is that the concentration of sucrose was 35 g/L, NH_4NO_3 was 1.3 g/L, pH value was 5.6, the hormone IAA was 0.4 mg/L, 6-BA was 1.0 mg/L, the best culture time was 14—18 d. Under optimal culture conditions, the concentration of single cells in this test was 9.42×10^5 cell/mL. **Conclusion** After four successive subculture, cellular morphology of *D. huoshanenes* shows circular shape or elliptic shape and the chip of cell is decreased. The higher concentration of *D. huoshanenes* cell could be obtained by using the optimal growing conditions of cell suspension culture.

Key words: *Dendrobium huoshanenes* C. Z. Tang et S. J Cheng; cell suspension culture; orthogonal test; culture conditions; single cell

近年来, 国内外对药用植物石斛进行了大量深层次的开发, 对石斛的需求量也越来越大, 而多年来石斛主要靠采收野生资源供药用和出口, 由于野生石斛繁殖很慢, 自然更新能力很差, 加之生态环境的制约, 人为过度采掘, 致使野生资源日渐枯竭。其中霍山石斛 *Dendrobium huoshanense* C. Z. Tang et S. J Che 等名贵品种已成为日益稀少的濒危植物, 被国家列为重点保护的药材品种。石斛多糖具有抗肿瘤、增强人体免疫等功效^[1]。利用石斛单细胞悬浮培养生产活性多糖是解决石斛资源短缺问题的有效途径之一^[2-3]。

利用石斛细胞悬浮培养生产次生代谢产物不仅避免了化学合成的缺点, 而且也克服了人工栽培中的不足。通过对石斛细胞进行悬浮培养, 可以改进

繁殖方法, 从而满足人们食用、药用及保健作用等的需求^[3-4]。对霍山石斛的繁殖培养研究以往多以诱导茎尖、茎段分生组织直接成苗的培养方式为其主要途径。近年来, 应用种子离体萌发诱导原球茎或原球茎悬浮培养方式培养霍山石斛^[5-6]已有报道。本实验应用霍山石斛为起始培养材料, 以其茎尖和茎段为外植体, 通过酶法和机械法获取单细胞, 并进行大量培养。该培养方法可明显缩短霍山石斛生长繁殖周期, 更宜于后期的有效成分提取等工业生产步骤, 对解决石斛资源短缺问题具有重大意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

霍山石斛幼苗由安徽华艺兰业兰科植物生产基地提供, 经合肥学院陈群教授鉴定为霍山石斛

收稿日期: 2010-04-14

基金项目: 安徽省高校自然科学基金研究项目(KJ2009B244Z)

作者简介: 李 蕤 (1959—), 女, 安徽省合肥人, 副教授, 研究方向为细胞工程。 E-mail: lirui@hfu.edu.cn

Dendrobium huoshanense C. Z. Tang et S. J. Che, 液体培养基为改良的 MS; 碳源: 蔗糖、葡萄糖; 氮源: NaNO_3 、 NH_4NO_3 、 NH_4Cl 、脲, 均由天津化学试剂厂生产; 植物生长调节剂: IAA、6-BA, 均由上海化学试剂有限公司生产。所有试剂均为分析级。

1.2 实验方法

1.2.1 外植体灭菌^[7] 取霍山石斛幼茎段冲洗干净, 70%酒精浸 1 min 后无菌水冲洗 5 次, 转入 0.1% HgCl_2 加 1 滴聚山梨酯 80 消毒 10 min 后, 无菌水冲洗 5 次, 用无菌纱布或无菌滤纸吸干水后待用。

1.2.2 霍山石斛单细胞的制备^[8] 取霍山石斛灭菌后的外植体, 采用组织匀浆机匀浆 (或酶解法或玻璃珠捣碎法), 滤过, 离心, 获得霍山石斛单细胞悬浮液。

1.2.3 培养基的选择 以 MS 为基本培养基, pH 5.0~6.0; 6-BA/IAA 的配比分别为 2.0:0.4、1.0:0.4、0.5:0.4、1.0:0.2 和 1.0:0.1 (mg/L); 添加物为香蕉泥。

1.2.4 接种与培养 用移液器移取 3 mL 霍山石斛单细胞悬浮液注入各个培养瓶内, 同时用超滤器向每瓶内各滴入不同质量浓度的 IAA 和 6-BA 组合, 将已接种的三角瓶置于 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 180 r/min 的恒温摇床中进行黑暗培养^[9]。

2 结果

2.1 不同提取方法对获取霍山石斛单细胞的影响

本实验获取霍山石斛单细胞主要用了 3 种方法: 机械匀浆组织破碎提取法、酶解法和玻璃珠捣碎法。3 种方法得到的细胞数分别为: 7.73×10^5 、 1.19×10^6 、 1.54×10^6 个/mL, 说明玻璃珠捣碎法效果最好, 本实验的操作均采用玻璃珠捣碎法。

2.2 碳源对霍山石斛细胞悬浮培养的影响

分别选用蔗糖和葡萄糖作为碳源对霍山石斛细胞进行悬浮培养, 实验结果表明, 蔗糖培养的石斛细胞数目为 1.13×10^6 个/mL, 葡萄糖培养的石斛细胞数目为 6.93×10^5 个/mL。蔗糖比葡萄糖更适宜石斛细胞的培养, 故用蔗糖作为碳源; 同时又用不同质量浓度蔗糖对霍山石斛细胞培养, 结果如图 1 所示。由图可知随着蔗糖质量浓度的增加, 细胞数随之增加, 当蔗糖质量浓度增至 30 g/L 时, 细胞数达到最大; 但如果蔗糖质量浓度继续增大, 细胞数呈递减趋势。

2.3 氮源对霍山石斛细胞悬浮培养的影响

实验选用了 4 种不同氮源对霍山石斛细胞进行悬浮培养, 结果见图 2。由图可知, 以 NH_4NO_3 为

氮源培养的石斛细胞数为 8.15×10^5 个/mL。故用 NH_4NO_3 作为氮源, 优势最为明显。

2.4 pH 对霍山石斛细胞培养的影响

培养基的 pH 值与细胞的生长繁殖关系密切, 在培养过程中过酸或过碱可导致细胞死亡, 这主要与蛋白质的变性和细胞膜的结构受损有关^[4]。植物细胞培养的 pH 一般控制在微酸性的范围内, 即 pH 为 5.0~6.0^[5]。本实验考察不同 pH 对霍山石斛细胞数目的影响, 结果如图 3 所示。由图可看出在 pH 为 5.6 时, 霍山石斛单细胞数最多, 为 9.58×10^5 个/mL。所以最适 pH 为 5.6。

2.5 培养时间对霍山石斛细胞悬浮培养的影响

霍山石斛细胞在营养充足的情况下, 开始快速

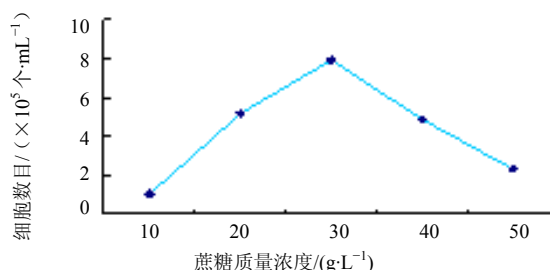


图 1 蔗糖浓度对石斛细胞悬浮培养的影响

Fig. 1 Effect of concentration of sucrose on cell suspension culture of *D. huoshanenes*

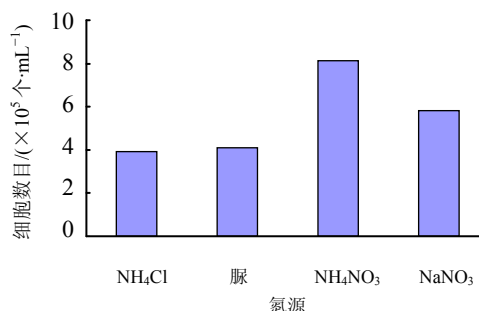


图 2 氮源对石斛细胞悬浮培养的影响

Fig. 2 Effect of nitrogen-source on cell suspension culture of *D. huoshanenes*

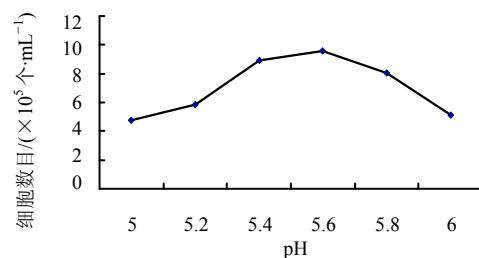


图 3 pH 值对石斛单细胞培养的影响

Fig. 3 Effect of pH value on single-cell culture of *D. huoshanenes*

地有丝分裂, 细胞的数目随着时间的变化而变化。通过培养、观察、计数, 得到其数目变化的结果见图 4。由图可知, 在前 12 d, 石斛细胞进行迅速的有丝分裂; 到第 14 天有丝分裂开始缓慢, 并趋于稳定达到最大值 1.673×10^6 个/mL; 18 d 以后逐渐呈下降趋势。因此最佳培养时间为 14~18 d。

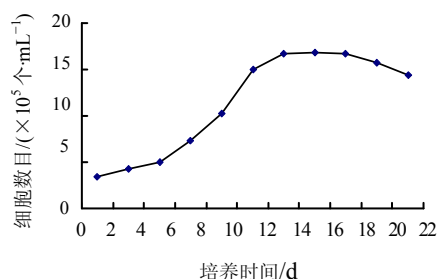


图 4 培养时间对石斛细胞培养的影响

Fig. 4 Effect of culture time on cell culture of *D. huoshanenes*

2.6 不同激素对比对霍山石斛细胞悬浮培养的影响

在植物细胞培养的过程中激素的种类及其比例都对植物细胞的生长、繁殖、分化、发育和新陈代谢起重要调节控制作用。取 6-BA/IAA 分别为 2.0 : 0.4、1.0 : 0.4、0.5 : 0.4、1.0 : 0.2 和 1.0 : 0.1 不同配比 (mg/L), 进行培养, 结果如图 5 所示。从图中可以看出, 当 6-BA-IAA 为 1.0 : 0.4 时, 获得了最好的效果, 培养所得细胞数最多, 为 9.73×10^5 个/mL。

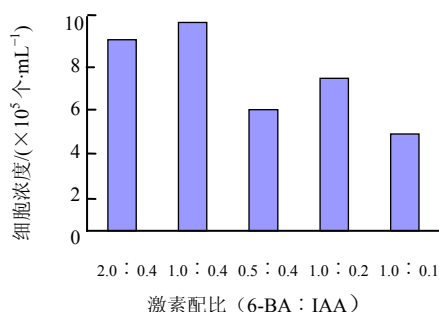


图 5 激素对比对霍山石斛细胞悬浮培养的影响

Fig. 5 Effect of growth hormone ratio on cell suspension culture of *D. huoshanenes*

2.7 培养温度对石斛细胞悬浮培养的影响

培养温度与细胞的生长繁殖关系密切。不同培养温度下获得的石斛细胞数目结果如图 6 所示。

在其他条件均相同的情况下, 当培养温度调控在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 时, 石斛细胞数目为 1.019×10^6

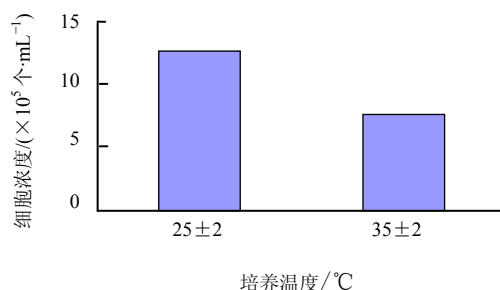


图 6 培养温度对石斛细胞培养的影响

Fig. 6 Effect of culture temperature on cell suspension culture of *D. huoshanenes*

当培养温度调控在 $(35 \pm 2)^\circ\text{C}$ 时, 培养的石斛细胞数目为 6.15×10^5 个/mL。故培养的最适温度是 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$ 。

2.8 正交试验的设计与结果

根据以上单因素优化的结果, 选取影响霍山石斛细胞培养的 4 个主要因素, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验, 考察 pH 值 (A)、碳源 (B)、氮源 (C) 和激素配比 (D), 结果见表 1。

表 1 正交试验因素水平表

Table 1 Levels and factors of orthogonal test

水平	因素			
	A	B/(g·L $^{-1}$)	C/(g·L $^{-1}$)	D/(6-BA : IAA)
1	5.4	25	1.30	2.0
2	5.6	30	1.65	2.5
3	5.8	35	2.00	3.0

个/mL。按正交试验设计, 配制不同的培养基, 接种后在温度 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 转速 120 r/min 条件下培养, 结果见表 2。对霍山石斛细胞培养条件进行 $L_9(3^4)$ 试验, 结果表明: 4 个因素对石斛细胞的生长影响顺序依次是 $B > D > A > C$, 即碳源 > 激素配比 > pH > 氮源。蔗糖 35 g/L, NH_4NO_3 为 1.3 g/L, pH 为 5.6, 激素配比 6-BA/IAA 为 1.0 : 0.4 组合的培养细胞数最多, 为 9.42×10^5 个/mL。

2.9 石斛细胞传代培养

本实验在原代悬浮培养霍山石斛细胞 14 d 后, 对石斛细胞进行了第 1 次传代培养, 即将原代细胞从培养箱中取出, 静置 10 min, 然后在超净工作台上取 5 mL 原代培养上清液注入到含有香蕉泥的完全培养基中, 继续培养。随后每隔 10 d 传代 1 次, 共传代 4 次, 以此来建立细胞系。传代后的细胞长势较原代不同, 最大特点就是细胞较圆, 可见细胞

表2 正交分析试验结果及极差分析

Table 2 Results and range analysis of orthogonal test

实验序号	A	B	C	D	细胞数量/ ($\times 10^5$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	1	1	1	1	5.24
2	1	2	2	2	8.05
3	1	3	3	3	7.98
4	2	1	2	3	6.15
5	2	2	3	1	7.53
6	2	3	1	2	9.42
7	3	1	3	2	6.08
8	3	2	1	3	7.29
9	3	3	2	1	5.96
平均值					
K ₁	7.090	5.823	7.317	6.243	
K ₂	7.700	7.623	6.720	7.850	
K ₃	6.443	7.787	7.197	7.140	
R	1.257	1.964	0.597	1.607	

壁,如图7所示。

根据显微摄影图片可以看出,霍山石斛细胞在培养前后形态发生了很大变化。培养前的霍山石斛细胞悬浮液较分散均匀,单细胞较少,且多为游离状,可明显观察到细胞碎片,霍山石斛细胞多呈大小不一,不规则的多边菱形。培养后的霍山石斛细胞有的紧挨在一起,形成细胞团,经过4次继代培养后霍山石斛细胞多为圆状或椭圆状,细胞数目明显增多。

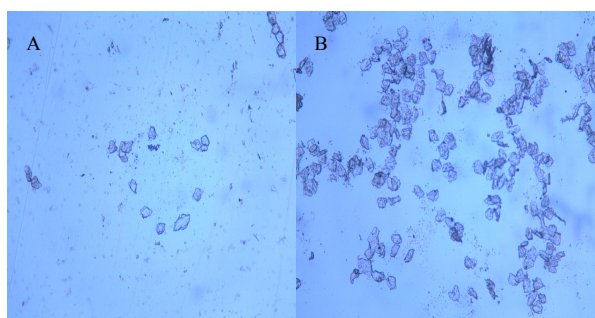


图7 霍山石斛细胞培养前(A)及培养后(B)的细胞形态

Fig. 7 Cellular morphology of *D. huoshanensis* before (A) and after (B) cell culture

3 结论与讨论

3.1 单细胞的制备

植物细胞可以从外植体中直接分离获得,从外植体中直接分离植物细胞的方法通常有机械法、玻璃珠捣碎法和酶解法。用机械捣碎法分离的细胞,

由于受到机械作用,细胞结构会受到一定的伤害,获得的细胞数量少^[9]。在实验中,对不同转速和不同匀浆时间进行了研究。最后获取霍山石斛单细胞的最佳条件是1 000 r/min匀浆2 min。玻璃珠捣碎法可直接在超净工作台内操作,操作简单,组织培养的小幼苗非常稚嫩,只需玻璃棒和玻璃珠搅拌,将细胞打开即可。酶解法则是以质量浓度为0.2 g/mL的酶液酶解幼苗2 h,温度保持在37℃。通过酶解法获取的单细胞数目多于机械组织匀浆捣碎法,但少于玻璃珠捣碎法。所以本实验主要采用玻璃珠捣碎法制备单细胞。

3.2 激素配比

植物激素是植物细胞培养中不可缺少的成分,其种类及比例都对植物细胞的生长、繁殖、分化、发育和新陈代谢起调节控制作用。适时适量地加入适宜种类和浓度的植物激素,是诱导植物细胞生理和形态变化的重要因素。在悬浮培养霍山石斛细胞时,加入适当比例的植物生长调节剂是很关键的。经过实验得出当6-BA/IAA为1.0:0.4时是石斛细胞悬浮培养的最适激素配比,即6-BA为1.0 mg/L和IAA为0.4 mg/L。

3.3 添加物

添加香蕉泥对霍山石斛悬浮培养细胞影响显著,香蕉提取物除了提供植物细胞生长发育所需的养分外,还对维持培养基的pH值在5.0~5.5有缓冲作用^[10]。因此控制添加物的质量分数就显得很重要,如果过高,就会使培养基的渗透压过高,抑制了植株对水分和养分的吸收,进而抑制细胞正常的生长发育。实验结果显示,石斛细胞培养的最适香蕉泥质量分数是15%。

本实验在无菌操作条件下,对霍山石斛细胞悬浮培养的条件进行了单因素研究,得出了最佳碳源为蔗糖,且最适质量浓度为30 g/L;最佳的氮源为NH₄NO₃,最适pH为5.6,培养基中需要添加香蕉泥,在28℃,120 r/min的转速下摇床培养,最佳培养时间为14~20 d,其中最适的激素配比6-BA-IAA为1.0:0.4。优化出最佳单因素后又对石斛细胞培养进行了正交试验,得出了最适合石斛细胞悬浮培养的条件。当蔗糖质量浓度为35 g/L, NH₄NO₃质量浓度为1.3 g/L, pH为5.6,激素配比6-BA/IAA为1.0:0.4时,培养所得的霍山石斛细胞浓度可达 9.42×10^5 个/mL。结果表明:应用细胞悬浮培养技术,培养霍山石斛细胞将具有较好应用前景。

参考文献

- [1] 白音, 包英华, 金家兴, 等. 我国药用石斛资源调查研究 [J]. 中草药, 2006, 37(9): 附4-附6.
- [2] 贾书华, 王娣, 高橡, 等. 继代周期对霍山石斛试管苗生长及培养基成分的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(8): 1239-1242.
- [3] 张泉锋, 毛碧增. 铁皮石斛培养的产业化研究 [J]. 中草药, 2004, 35(4): 438-440.
- [4] 薛淮, 刘敏, 张纯花. 中国药用植物组织培养研究进展 [J]. 植物杂志, 2002(1): 6-7.
- [5] 吴明纲, 康春风, 鲁润龙. 霍山石斛带节间的茎段在 IBA/NAA 诱导下的组织培养 [J]. 中国科学技术大学学报, 2001, 35(5): 624-628.
- [6] 魏明, 姜绍通, 罗建平. 精胺对霍山石斛类原球茎悬浮培养细胞生长和多糖合成的影响 [J]. 生物工程学报, 2007, 23(2): 327-331.
- [7] 李胜, 李唯. 植物组织培养原理与技术 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [8] 郭勇, 崔堂兵, 谢秀祯. 植物细胞培养技术与应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [9] 常任, 刘涤, 胡之璧. 植物细胞和器官大规模培养研究的进展 [J]. 生物技术通讯, 2001(1): 31-36.
- [10] 李小军, 刘石泉, 潘维陵, 等. 香蕉提取物对霍山石斛试管苗壮苗的影响 [J]. 江苏大学学报: 自然科学版, 2004, 25(6): 469-472.

《药物评价研究》征稿与征订启事

《药物评价研究》(原《中文科技资料目录·中草药》)杂志是由中国药学会和天津药物研究院共同主办的国家级药学科技学术性期刊, 双月刊, 国内外公开发行。桑国卫院士为名誉主编, 刘昌孝院士任编委会主任委员, 汤立达研究员为主编。

办刊宗旨: 报道药物评价工作实践, 推动药物评价方法研究, 开展药物评价标准或技术探讨, 促进药物评价与研究水平的提高, 为广大药物研究人员提供交流平台。

内容与栏目: 针对药物及其制剂的评价规范以及药理学评价、安全性评价、药效学评价、药物代谢动力学评价、临床评价、上市药物评价等评价研究的内容, 设置论坛、综述、方法学研究、试验研究(论著)、审评规范、国外信息、专题7个栏目。

读者对象: 药品管理、新药研发、药物临床应用、药学教育等相关的高等院校、科研院所、CRO组织、生产企业、药品管理与审评机构的研究人员、管理人员、临床医生和研究生等。

本刊的创办填补了药物评价领域期刊的空白, 将为我国广大药物研究人员提供一个交流的平台, 通过交流药物评价工作的实践经验, 发展和完善评价的方法学, 探讨评价相关的国际标准或指南, 提高我国的总体评价研究水平。

欢迎广大作者积极投稿, 广大读者踊跃订阅! 本刊自办发行, 订阅请直接与编辑部联系! 本刊热忱与中外制药企业合作, 宣传推广、刊登广告(包括处方药品广告)。

本刊已正式开通网上在线投稿、审稿、查询系统, 欢迎广大读者、作者、编委使用!

《药物评价研究》编辑部

地址: 天津市南开区鞍山西道308号(300193)

电话/传真: 022-23006822

E-mail: der@tiprpress.com

帐号: 441140100100081504

网址: www.中草药杂志社.中国

www.tiprpress.com

开户银行: 兴业银行天津南开支行

户名: 天津中草药杂志社