

# 银杏愈伤组织单细胞克隆的研究

秦卫东, 高明侠, 苗敬芝, 吕兆启  
(徐州工程学院食品工程系, 江苏 徐州 221008)

**摘 要:** 利用银杏单细胞克隆系研究银杏单细胞生长稳定性与细胞均一性之间的关系。结果显示: 培养基过滤杀菌是促进细胞生长的好方法, 当悬浮培养愈伤组织 3 代和向培养基中加入 0.5g/L 的酪蛋白水解物, 能显著增加植板率, 单细胞克隆的植板率为 27.04%。克隆系 GB-11 平均生长率为 0.55g fw/g fw·d。

**关键词:** 银杏; 愈伤组织; 单细胞克隆; 植板率; 生长速率

## Studies on Single-cell Cloning of Ginkgo Callus

QIN Wei-dong, GAO Ming-xia, MIAO Jing-zhi, LÜ Zhao-qi  
(Department of Food Engineering, Xuzhou Institute of Technology, Xuzhou 221008, China)

**Abstract:** The relationship between stability of ginkgo single-cells and cells uniformity was studied by cells-cloning series of ginkgo. The results indicated: sterilization of medium by filtration was the good method to promote cells growth. When suspended culture of the 3rd generation callus, adding 0.5g/L hydrates of casein in medium might increase planting efficiency. The planting efficiency of single-cells cloned was 27.04%. The average growth rates of GB-11 cloning lines reached 0.55g fw/g fw·d.

**Key words:** ginkgo; callus; single-cells clone; plating efficiency; growth rates

中图分类号: Q813.2

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2005)12-0068-03

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为我国珍贵的药用植物,内含黄酮和萜内酯两大类活性物质,具有扩张血管、抑制血栓形成、降血压和胆固醇的效果<sup>[1]</sup>。近几年,我国银杏叶产业发展迅速,并已开始叶用银杏资源的评价和育种工作<sup>[2,3]</sup>。但大面积栽培银杏占用大量的耕地,同时采用银杏叶加工受季节的限制,且叶中药用成分含量较低。采用植物细胞培养技术工业化生产植物天然产物是一条可取的途径<sup>[4]</sup>,国内外许多学者用银杏细胞培养研制次生代谢产物并取得了可喜的效果<sup>[5~8]</sup>。然而,目前银杏细胞系的筛选几乎都停留在愈伤组织的水平上,远远不能满足银杏细胞大规模培养的需要。为此,利用细胞克隆技术可以获得大量的细胞克隆,再通过克隆筛选,可以得到优良的细胞系。本试验拟通过单细胞克隆技术筛选出高产银杏黄酮细胞系,并探讨细胞培养物中产生黄酮与细胞均一性的关系,为银杏细胞培养制备黄酮提供理想的材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采用江苏省邳州市出产银杏成熟果实的子叶诱导的

愈伤组织。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 愈伤组织诱导及继代

按照先前描述的方法<sup>[9]</sup>进行。取当年银杏新果消毒后,取胚芽接种到 MS 培养基上,培养条件为 25℃ 光照。以诱导产生的愈伤组织每隔 30 d 继代一次,继代 6~7 代。

#### 1.2.2 细胞悬浮培养

以连续继代 6~7 代的银杏愈伤组织,无菌水洗涤,研磨粉碎、过滤、稀释,取细胞悬浮液接种在悬浮培养基中,在 25℃、摇床转速为 120 r/min 下振荡培养。

#### 1.2.3 细胞克隆平板培养

参照戴均贵<sup>[10]</sup>的方法,取其对数生长期(10~18d)的细胞悬浮培养物,用 76 μm 的不锈钢细胞筛过滤,1000 r/min 离心,稀释、计数,定量取细胞悬浮液加入定量的 35℃ 琼脂培养基混匀,倒入直径 6 cm 培养皿中,封口,暗培养(25±1)℃。所用培养基为 MS+0.5mg/L BA+0.5mg/L NAA+0.2mg/L 2,4-D,并分别加入 0.1g/L 活性炭和 0.5g/L 水解酪蛋白。每隔 3d 观察 1 次。培养 30d 计算结果,统计植板率(PE%):

收稿日期: 2004-12-31

作者简介: 秦卫东(1961-),男,副教授,学士,研究方向为食品生物技术。

### 1.2.4 细胞克隆生长率的测定

随机选择培养成大块愈伤组织的若干细胞克隆,接种在含 0.1g/L 活性炭、0.5g/L 水解酪蛋白、3% 椰子汁的 MS 培养基。培养条件 25℃、暗培养,培养 30 d 后统计各细胞克隆生长率。

$$\text{克隆率}(\%) = \frac{\text{克隆数}(\text{ml})}{\text{活细胞数}(\text{ml})} \times 100$$

## 2 结果与分析

### 2.1 培养基不同灭菌方式对植板率的影响

将培养基分别用过滤灭菌和高压灭菌等方法处理后,接种培养。结果见表 1。

表 1 不同灭菌方式对植板率的影响  
Table 1 Effects of different sterilizing methods on plating efficiency

灭菌方式	植板率(%)
过滤灭菌	18.08
高压灭菌(15 磅/cm <sup>2</sup> 、5min)	1.70
高压灭菌(15 磅/cm <sup>2</sup> 、15min)	0

从表 1 可知,过滤灭菌对银杏细胞生长有利,而 15 磅/cm<sup>2</sup>、15min 灭菌处理后,银杏细胞不能长成可见克隆,15 磅/cm<sup>2</sup>、5min 灭菌处理的银杏细胞的克隆数很低,仅为 1.70%。

### 2.2 添加物对细胞克隆的植板率影响

当培养基中分别添加 0.1g/L 活性炭和 0.5g/L 水解酪蛋白时,结果见表 2。

表 2 不同添加物对植板率的影响  
Table 2 Effects of different additives on plating efficiency

添加物	处理方式	克隆数(个)	植板率(%)
0.1g/L	封口	$5.1 \times 10^3$	14.55
活性炭	未封口	$4.6 \times 10^3$	13.04
0.5g/L	封口	$8.6 \times 10^3$	24.62
水解酪蛋白	未封口	$8.2 \times 10^3$	23.48

从表 2 可以看出,添加物为水解酪蛋白时,能够促进银杏细胞的克隆植板率,其值远高于添加活性炭的结果,达到 24.62%。与未封口培养比较,封口后培养的植板率较高。

### 2.3 不同细胞代数对克隆植板率的影响

在细胞悬浮培养中,每隔 10d 继代 1 次。对不同代数的细胞进行平板培养,统计植板率,结果如表 3 所示。

表 3 的数据表明:用第 1 代至第 3 代细胞培养时,植板率呈上升趋势。但至第 4 代细胞后,植板率出现下降。这可以说明随着继代代数的增加,细胞活力逐渐下降。

表 3 不同悬浮培养细胞代数对植板率的影响

Table 3 Effects of different times of suspended culture of on plating efficiency

细胞代数	植板率(%)
1	21.52
2	22.64
3	27.04
4	19.49
5	9.13

### 2.4 银杏细胞克隆生长速率测定结果

从银杏细胞在平板上培养 30d 左右出现的大小不一的克隆中选择细胞克隆若干个,培养于含 0.1g/L 活性炭、0.5g/L 水解酪蛋白及 0.3% 椰子汁的 MS 培养基中,25℃ 培养 30 d 后,各细胞克隆疏松、均匀、外观为乳白色的不同细胞克隆之间生长速率存在一定的差异。在同样的培养基上培养半年,细胞克隆仍然保持生长快、性状稳定的特性(表 4)。

表 4 银杏不同的细胞克隆的生长速率  
Table 4 The growing rates of different cells-cloning lines of ginkgo

细胞克隆	初始接种量(g)	培养 30d 重(g)	生长速率(g fw/g fw·d)
GB-1	0.21	1.32	0.21
GB-2	0.06	0.13	0.07
GB-3	0.08	0.92	0.38
GB-4	0.05	0.62	0.41
GB-5	0.10	0.92	0.31
GB-6	0.09	0.88	0.33
GB-7	0.09	0.75	0.28
GB-8	0.20	0.90	0.15
GB-9	0.25	1.10	0.17
GB-10	0.16	1.08	0.23
GB-11	0.08	1.33	0.55
GB-12	0.26	1.08	0.13

从表 4 中可以看出,不同的细胞克隆生产速率之间存在着较大的差异,最高者达 0.55g fw/g fw·d,而最低者仅为 0.07g fw/g fw·d,两者相差 7.8 倍。由此可见,经过细胞克隆的筛选,可以获得一批生长速度快且稳定的银杏细胞系,可直接用于细胞悬浮培养。

## 3 讨论

### 3.1 单细胞克隆中提高植板率的途径

单细胞克隆技术是获得优质、高产和稳定细胞系的有效方法,采用不同的方法处理细胞可以达到提高细胞的植板率的目的。对银杏细胞培养基采用不同的灭菌方法进行比较,过滤灭菌比高压灭菌培养基的效果好。两者的植板率相差 10 倍左右。这说明了经高压灭菌后,培养基中的有效成分受到了很大的破坏,导致银杏无法生长。在本实验中,比较了在培养基中添加活性炭和水

解酪蛋白的方法对植板率的影响。结果表明, 添加水解酪蛋白的效果好于活性炭。其主要原因是酪蛋白水解后产生大量的 L- 氨基酸, 便于细胞吸收和利用, 从而提高了银杏细胞的植板率。这一结果与戴均贵等人<sup>[10]</sup>向培养基中添加 L- 谷氨酰胺的效果相同。周平等<sup>[11]</sup>证实了培养基中添加适量的硫酸锌、葡萄糖、氨基酸、有机酸及复合添加剂后, 对红花细胞克隆生长有促进作用, 特别是加入 10mg/L 柠檬酸或 3mg/L 琥珀酸时, 植板率的效果最高。有些学者认为, 植物细胞培养是通过胞膜将其有机物流失到培养基中, 导致细胞不能正常生长<sup>[12~14]</sup>。

### 3.2 影响银杏细胞克隆生长速率的因素探讨

银杏细胞培养克隆间存在着很大程度的差异。通过细胞克隆能同时获得许多克隆系, 有些属于细胞突变产生的, 有些可能是细胞之间生理状态差异产生的。因此, 只有通过长期继代培养观察和分析, 才能确定真正属于突变的克隆系。经过几代继代培养才能逐渐稳定下来。这和大多数利用克隆技术筛选高产细胞的报道是一致的<sup>[15]</sup>。本试验在筛选银杏愈伤组织的茂盛上, 对银杏细胞克隆进行了大量的筛选, 其生长速度最高为 0.42g fw/g Fw · d, 完全克服了银杏细胞的褐变问题, 这是影响细胞生长速率的重要因素。另外, 细胞的继代数、培养基的选择及其添加不同的物质等也是影响细胞生长速率的因素。

#### 参考文献:

- [1] 游松, 姚新生, 陈英杰. 银杏的化学及药理研究进展[J]. 沈阳药学院学报, 1998, 5(2): 142-148.
- [2] 陈学森, 张艳敏, 李健, 等. 叶用银杏资源评价及优选的研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 215-219.
- [3] 程水源, 顾曼如, 束怀瑞. 银杏叶黄酮研究进展[J]. 林业科学, 2000, 36(6): 110-115.
- [4] 韩迎山. 植物细胞培养生产天然产物的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(1): 19-22.
- [5] 莫小路, 黄学林. 银杏悬浮培养细胞的生长、分化与萜内酯化合物的积累[J]. 生物工程学报, 2004, 23(3): 445-449.
- [6] 杨林. 银杏愈伤组织的形成及其黄酮类化合物的产生[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 13(3): 48-51.
- [7] 邓秀新, 章文才. 培养基及培养条件对银杏愈伤组织黄酮产量的影响[J]. 园艺学报, 1997, 24(4): 373-377.
- [8] 徐刚标, 何方, 陈良昌. 银杏愈伤组织诱导与继代培养的研究[J]. 中南林业学院学报, 1999, 19(3): 32-36.
- [9] 秦卫东, 高明侠, 吕兆启. 银杏愈伤组织培养及其黄酮生物合成的初步探讨[J]. 食品科学, 2002, 23(11): 38-41.
- [10] 戴均贵, 朱蔚华, 吴蕴祺, 等. 银杏单细胞克隆研究[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(10): 593-597.
- [11] 周平, 郑光植. 红花细胞克隆的平板培养[J]. 植物学报, 1989, 31(7): 505-511.
- [12] Ham RG. Dilution plating and nutritional considerations. Animal cells, in: tissue culture methods and applications [M]. New York: Academic press, 1973.
- [13] Kao K N. Chromosomal behaviour in somatic hybrids of soybean Nicotiana glauca[J]. Molec Gen Genet, 1977, 150: 225-230.
- [14] Stiert R, Street HE. Studies on the growth in culture of plant cells X. Further studies on the conditioning of culture media by suspensions of Acer pseudoplatanus L. cell [J]. J Exp Bot, 1971, 22: 96-106.
- [15] Dougal K. Cell cloning and the selection of high yielding strains. In: Constabel F. Vasil Keds., cell culture and somatic cell genetics of plants (Vol. IV) [M]. New York: Academic Press, 1987. 117-124.



## 法科学家发现导致人们爱上油腻食品的受体

法国科学家最近发现, 动物对油腻食物的偏好来自于舌头味觉感应组织中的一个受体, 它专门负责感应脂类食物。

据新一期的法国《科学与未来》杂志报道, 法国国家农艺研究所以及勃艮第大学科学家日前发现, 老鼠舌头感应组织上的受体 CD36 有特殊作用——感应脂类味道。由于与人们过去知道的感应“酸、甜、苦、咸”等味道的受体不同, 它将成为一个新的味道感受受体。

受体 CD36, 又被称为“脂肪或脂肪酸运输器”, 实际上是一种糖蛋白, 其他许多身体组织中也有它的身影, 它的主要功能是储存脂肪。由菲利普·贝斯纳尔领导的科研小组发现, 当让老鼠体内促使受体 CD36 生成的基因失效后, 老鼠就失去了原先对油腻食物的青睐。而老鼠嘴部原先对脂类的消化感应系统功能也全部丧失。贝斯纳尔由此认为, 在人类体内也应该存在受体 CD36。当然, 人体可能更加复杂, 可能只有一些人会对于脂类或油腻食品特别喜好。不过这已经足以解释为什么有些人特别喜欢吃油腻食品了。