

不同碳源对悬浮培养玫瑰茄细胞呼吸强度及产生辅酶 Q 的影响

侯学文 郭 勇

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

8: 548.6

摘 要 以蔗糖、葡萄糖、可溶性淀粉为 3 种不同碳源, 以 B₅ 培养基为基础, 研究在不同碳源情况下, 悬浮培养玫瑰茄细胞的生长, 以及培养过程中细胞的氧消耗速率, 同时也考察了在整个细胞生长过程中, 辅酶 Q 的含量变化。结果表明, 蔗糖和葡萄糖能有效支持玫瑰茄细胞的生长, 其细胞活力也高, 表现在呼吸强度较高; 可溶性淀粉不能被植物细胞利用, 不仅表现在细胞生物量低, 而且细胞活力差, 呼吸水平也较低。

关键词 碳源; 悬浮培养; 玫瑰茄; 呼吸强度; 辅酶 Q

The effects of carbon sources on the growth and respiration of suspension Roselle cell

Hou Xuewen Guo Yong

(Department of Bioengineering, South-China University of Technology, Guangzhou 510641)

Abstract Based on B₅ medium, sucrose, glucose and soluble starch were used as carbon sources to study the growth state of suspension Roselle cell. The oxygen respiration and coenzyme Q content were also studied through whole culture time. The results showed that sucrose and glucose were good carbon sources which could support the growth of Roselle cell, and the cells had high respiration rate showed that the cell had high viability. But the soluble starch couldn't support the growth of Roselle cell, and the cell with low viability.

Key words Carbon source; suspension culture; Roselle; respiration rate; coenzyme Q

从热带植物玫瑰茄 (Roselle) 的花萼中诱导出了一株白色细胞株, 该细胞株生长速度快, 悬浮培养时没有明显的结团现象, 基本上达到单分散状态, 因而是研究不同条件下细胞的生理反应的理想材料。

辅酶 Q, 又称泛醌, 是线粒体上呼吸链中进行电子传递的重要载体, 它的含量是细胞色素 C 的十多倍。泛醌在生物能学中是一很重要物质。在高等植物细胞内仅存在着 CoQ₁₀, 而在微生物中尚含有不同侧链长度的泛醌。在人类疾病之中, 有不少是因为能量产生出现了问题, 因此 CoQ 对这类疾病有一定疗效, 如肌萎缩和心脏病; CoQ 也可用作抗氧化剂和免疫增强剂。

1998-03-13 收稿

第一作者简介: 侯学文, 男, 1969 年出生, 博士, 生物学专业。

1 材料与方 法

1.1 供试材料与培养条件

以本实验室诱导的玫瑰茄白色细胞株为实验材料, 先将固体培养基上的愈伤组织转入 1 000 mL 三角瓶 (含 400 mL 培养液) 制作液体培养种子瓶, 然后在液体培养基中传代 1~2 次, 使细胞分散度更佳, 以便细胞适应液体培养环境。所有试验采用 100 mL 三角瓶, 装液量 50 mL, 培养液 pH 调至 5.8, 分装后经 121 ℃ 灭菌 15 min, 接种量约为 1.5 g 鲜细胞/瓶。采用如下 3 种不同的碳源配方: A: B₅ 培养基加 3% 蔗糖; B: B₅ 培养基加 3% 葡萄糖; C: B₅ 培养基加 0.5% 可溶性淀粉, 植物激素均为 4.5 μmol/L 2,4-D 与 2.3 μmol/L Kt, 摇床转速 130 r/min, 培养周期为 16 d, 温度 25 ℃, 每 2 d 取样测定一次。

1.2 生物量的测定 取样后, 用布氏漏斗抽干, 然后在万分之一光电分析天平上称重, 此定为鲜重。将湿细胞放入 60 ℃ 的干燥箱中, 经 2 d 后至恒重, 同样称量得干重。

1.3 植物细胞呼吸强度的测定 采用瓦氏微量呼吸检压仪, 参照北京大学生物系编《生物化学实验指导》进行⁽¹⁾。先测得反应瓶常数, 然后在每个反应瓶中加入 0.5 g 鲜细胞, 再加入 3 mL 抽滤所得培养液, 其余操作均按实验指导书进行。

1.4 辅酶 Q 含量的测定 参照 Crane 等⁽²⁾的方法。

1.5 培养液中总糖含量的测定 蒽醌法⁽³⁾。

2 实验结果与讨论

2.1 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞的生长曲线

不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞的生长行为明显不同, 在其它营养条件充分且相同的情况下, 能被细胞利用的碳源能有效地支持植物细胞的生长, 获得大致相同的生物量, 如蔗糖和葡萄糖, 而不能被植物细胞利用的碳源, 则难以有效地支持植物细胞的生长, 如可溶性淀粉。

比较图 1、图 2 的生长曲线可以看出, 以鲜重计和干重计时, 它们的对数生长期及比生长速率有较大差异, 这种差异可能是由胞内营养物质贮存的多寡所造成的。在接种入新鲜培养基后, 在前 4 d 细胞量未见明显增多的情况下, 细胞干重却有成数倍的增加, 这可能是因

为培养基内的营养物质被快速大量地吸收入胞内的缘故。而在细胞生长后期, 细胞鲜重还在继续增加的时候, 细胞干重却开始呈下降趋势, 这也可能是因为胞内营养物质被消耗掉, 含水量上升的缘故, 从实验结果来看, 以鲜重计的生长曲线较能准确地反映细胞的生长情况。为了能使以干重计的生长方程与实际情况相吻合, 人们提出了活性细胞的概念, 即将细胞的干重减去胞内所含的营养物质的量 (如各种糖类、磷酸根、硝酸根等), 这样做可能所得结果更客观一些, 但毕竟相当繁琐, 不如直接用鲜重计的生长曲线简便、直观。

2.2 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞的总糖消耗曲线

在以蔗糖、葡萄糖为碳源的配方中, 至培养末期, 糖类基本上被消耗殆尽, 再加之获得了满意的

表 1 不同碳源下反映细胞生长状况的重要数据比较
Table 1 The comparasion of parameters of suspension Roselle cell under different carbon sources

碳 源	对数生长期 (FW)	比生长速率 (FW)	倍增时间 (FW)	对数生长期 (DW)	比生长速率 (DW)	倍增时间 (DW)
A. 3% 蔗糖	4~14	0.2204	3.1450	0~12	0.2508	2.7637
B. 3% 葡萄糖	4~14	0.2104	3.2944	0~12	0.2170	3.1942
C. 0.5% 可溶性淀粉	不明显					

生物量, 可以认为3%蔗糖、葡萄糖是能有效支持植物细胞生长的优良碳源, 而可溶性淀粉由于植物细胞不能分泌淀粉酶, 因而不能将可溶性淀粉酶解成单糖后再被植物细胞利用, 故在培养末期, 仍有较高比例的淀粉存在, 再从所获得的较低的生物量来看, 表明可溶性淀粉对玫瑰茄细胞培养而言不是一种良好的碳源。

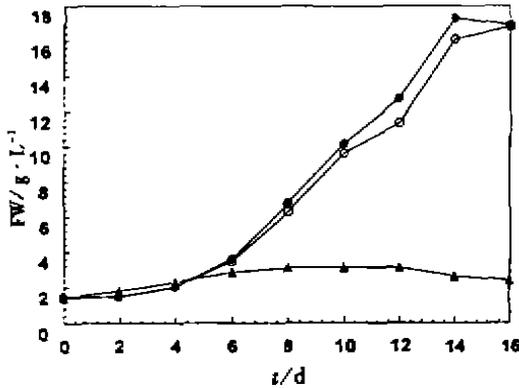


图1 不同碳源下玫瑰茄细胞的生长曲线
(以鲜重计)

Fig. 1 The growth curve of suspension Roselle cell under different carbon sources (FW)

●—3%蔗糖 ○—3%葡萄糖 ▲—0.5%可溶性淀粉
●—3% sucrose ○—3% glucose ▲—0.5% soluble starch

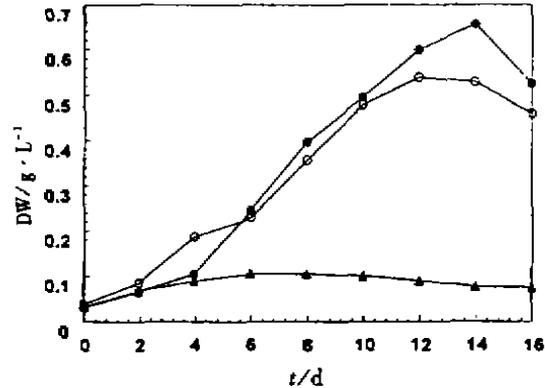


图2 不同碳源下玫瑰茄细胞的生长曲线
(以干重计)

Fig. 2 The growth curve of suspension Roselle cell under different carbon sources (DW)

●—3%蔗糖 ○—3%葡萄糖 ▲—0.5%可溶性淀粉
●—3% sucrose ○—3% glucose ▲—0.5% soluble starch

2.3 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞的呼吸强度

呼吸强度是反映细胞活力的重要指标, 呼吸强度高表示细胞生活力强, 细胞有氧代谢旺盛; 呼吸强度低则说明细胞有氧代谢活动差, 产生能量少, 细胞生活力较低。本实验采用瓦氏微量呼吸检压仪, 系统跟踪了不同碳源下培养玫瑰茄细胞的呼吸强度。结果表明, 细胞的呼吸强度并不与细胞的生长曲线相一致, 即在对数生长的前期, 如A、B两种配方均在第6d, 呼吸强度达到最大值, 然后呼吸强度逐渐下降。这表明, 细胞在接入新鲜培养基中后, 细胞吸收营养物质后代谢即刻活跃起来, 利用有氧代谢产生的大量能量, 积极进行物质与能量贮备, 来实现细胞的快速大量增殖。在对数生长中后期, 呼吸强度虽然有所下降, 但仍维持一个较高的水平, 继续保持着细胞对数生长期的能量需求。在培养末期, 随着营养物的消耗殆尽,

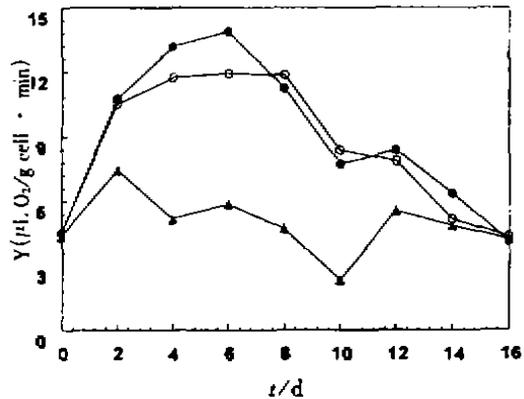


图3 不同碳源下玫瑰茄细胞总糖消耗曲线
Fig. 3 The time course of total sugar of suspension Roselle cell under different carbon sources

●—3%蔗糖 ○—3%葡萄糖 ▲—0.5%可溶性淀粉
●—3% sucrose ○—3% glucose ▲—0.5% soluble starch

细胞的呼吸强度已降至与初接种时相当的水平, 这反映细胞已经进入维持呼吸的阶段。以蔗糖为碳源的 A 配方最大呼吸强度比以葡萄糖为碳源的 B 配方略大, 说明蔗糖是比葡萄糖略好的碳源。由于可溶性淀粉不能支持玫瑰茄细胞的生长, 反映在细胞活力上也比上述两种配方有较大的差距。

2.4 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞的辅酶 Q 产生曲线

在酵母中, 辅酶 Q₁₀ 的生物合成受到氧含量和分解代谢物阻遏的调控^[4]。当酵母在厌氧条件下生长时, 仅能检测到极微量的 CoQ, 但当转入有氧发酵时, 辅酶 Q 的含量会急剧增加。但植物细胞

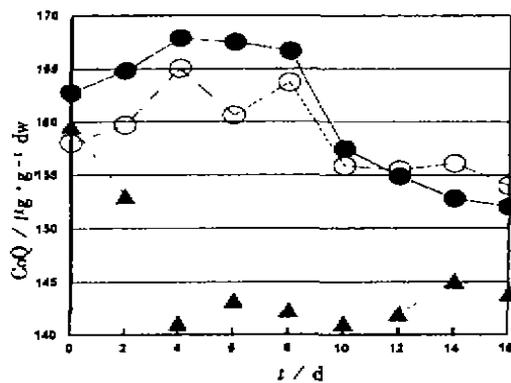


图4 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞的呼吸强度曲线

Fig. 4 The respiration strength of suspension Rosell cell under different carbon sources

●—3% 蔗糖 ○—3% 葡萄糖 ▲—0.5% 可溶性淀粉
●—3% sucrose ○—3% glucose ▲—0.5% soluble starch

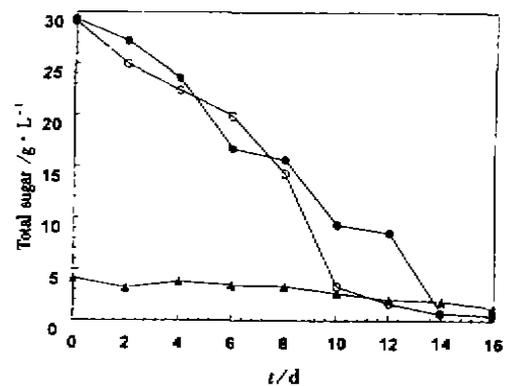


图5 不同碳源下悬浮培养玫瑰茄细胞的辅酶 Q 产生曲线

Fig. 5 The time course of coenzyme Q of suspension Rosell cell under different carbon sources

●—3% 蔗糖 ○—3% 葡萄糖 ▲—0.5% 可溶性淀粉
●—3% sucrose ○—3% glucose ▲—0.5% soluble starch

需耗氧生长, 同时限于实验条件, 我们不能获得含不同溶氧水平的培养体系, 因而不能获得氧含量对 CoQ 产生调控的知识。葡萄糖是典型的具分解代谢物阻遏效应的碳源, 在实验中也确实发现, 以葡萄糖为碳源的配方, 培养细胞的辅酶 Q 含量比采用其它碳源的略低, 这似乎也说明了植物细胞的辅酶 Q 的合成也具有分解代谢物阻遏效应。

参 考 文 献

- 1 北京大学生化教研室编. 生物化学实验指导. 北京: 高等教育出版社, 1990. 9~11
- 2 Crane F L, Lester R L, Widmer C, et al. Studies on the electron transport system. XVII. Isolation of Coenzyme Q (Q₁₇₃) from beef heart and beef heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1959, 32: 73~79
- 3 薛应龙编. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1985
- 4 Gordon PA, Stewart PR. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1969, 177: 358~360