

紫茉莉悬浮细胞培养体系的建立

赵倩, 林景卫, 冯雅萍, 陈丽静, 马慧, 钟鸣*

(沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁省农业生物技术重点实验室, 沈阳 110866)

摘要: 为建立紫茉莉(*Mirabilis jalapa* L.)悬浮细胞培养体系,以紫茉莉无菌苗叶片诱导的愈伤组织为材料,筛选紫茉莉悬浮细胞的适宜培养体系。结果表明,紫茉莉愈伤组织在 MS + 2,4-D 1 mg L⁻¹ + KT 0.5 mg L⁻¹ 的液体培养基中悬浮继代培养 3 ~ 4 次,能得到稳定的悬浮细胞系。培养基的 pH 值为 5.5 ~ 5.9,蔗糖浓度为 30 g L⁻¹ 更适合悬浮细胞的生长。紫茉莉悬浮细胞的生长曲线大致呈 S 型。最佳继代培养时间是 10 d,培养液的体积为 40 mL 时,接种量为 7.5 mL,可以较好地保持悬浮细胞系。1 L 培养液中可提取分泌蛋白(0.42 ± 0.15) g。这些有助于对悬浮细胞提取分泌蛋白的研究。

关键词: 紫茉莉; 悬浮细胞; 悬浮培养; 分泌蛋白

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2013.05.012

Studies on Establishment of Suspension Cell System for *Mirabilis jalapa* L.

ZHAO Qian, LIN Jing-wei, FENG Ya-ping, CHEN Li-jing, MA Hui, ZHONG Ming*

(Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Liaoning Province, College of Biological Sciences and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: In order to establish suspension cell system of *Mirabilis jalapa* L., the calli induced from leaves of aseptic seedlings of *M. jalapa* were used as material, the optimum suspension culture system was studied. The results showed that the stable suspension cell system could be obtained after calli were subcultured 3 – 4 times on MS medium with 2,4-D 1 mg L⁻¹ and KT 0.5 mg L⁻¹. The optimum pH was 5.5 – 5.9 with 30 g L⁻¹ sucrose. The growth curve of suspension cells of *M. jalapa* was S-type, and subculture time was about 10 days. The optimum inoculum was 7.5 mL in 40 mL medium. Secretory protein was (0.42 ± 0.15) g extracted from 1 L medium. These were useful for studying secretory protein extracted from suspension system.

Key words: *Mirabilis jalapa* L.; Suspension cell; Suspension culture; Secretory protein

紫茉莉(*Mirabilis jalapa* L.)为紫茉莉科(Nyctaginaceae)紫茉莉属的多年生草本植物,原产热带美洲等地,我国各地均有栽培^[1]。紫茉莉花卉色彩鲜艳,可作为观赏花卉,同时还具有生物量大、生长繁殖快、植株强健等优点。近年来,有研究表明紫茉莉对石油污染土壤有较强的耐受性^[2]。紫茉莉在中低浓度石油污染土壤中生长状况良好,土壤中石油污染浓度及多环芳烃含量均有明显的降低^[3]。因此,紫茉莉可作为修复石油污染土壤环境

的首选植物^[1,4-5]。为探究污染的植物修复分子机制,可通过提取紫茉莉分泌蛋白并研究其表达差异,发掘其耐受性或降解污染物的特点功能分子。通过建立供试植物的悬浮细胞培养体系,是获得其分泌蛋白的常用研究手段^[6]。分泌蛋白由于其自身特性,含量通常较低,因此,建立高效稳定的悬浮体系,是获得细胞分泌蛋白高效表达的必要条件^[7]。影响植物悬浮细胞培养的因素较多,包括激素水平、光照、温度、pH、接种量、剪切力和蔗糖浓度等^[8]。目前

收稿日期: 2012-11-23 接受日期: 2013-01-31

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070448)资助

作者简介: 赵倩(1987~),女,硕士,研究方向为细胞与分子生物学。E-mail: zhaoqian0806@126.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: mingzh1@sina.com

国内外对紫茉莉愈伤组织的研究较少,主要是以紫茉莉幼苗不同部位作为外植体,研究不同激素组合对愈伤组织诱导的影响^[9]。而对紫茉莉的细胞悬浮培养体系建立方面还未见报道。本研究以紫茉莉无菌苗诱导的愈伤组织为材料,从细胞形态、继代次数、培养基 pH 和蔗糖浓度等方面,研究紫茉莉悬浮细胞系的特性及分泌蛋白的提取,以期建立紫茉莉高效悬浮培养体系,为进一步研究紫茉莉悬浮细胞产生的分泌蛋白奠定科学基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试紫茉莉(*Mirabilis jalapa* L.)种子采自沈阳农业大学植物园。按照白玉等^[10]的方法诱导培养紫茉莉愈伤组织。取紫茉莉种子若干,冲洗剥皮后,用 75% 乙醇浸泡 8 min, 0.1% 升汞消毒 10 min, 无菌水冲洗 4 次、浸泡 1 h, 剥掉内层种皮,接种于 MS + NAA 0.1 mg L⁻¹ 培养基中,在 25℃,光照强度为 12.5 ~ 25 μmol m⁻²s⁻¹ 的条件下培养,获得无菌苗。将无菌苗叶片切成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,接种于 MS + 2,4-D 1 mg L⁻¹ + NAA 1 mg L⁻¹ + KT 1.5 mg L⁻¹ 培养基上,在 25℃,光照强度为 12.5 ~ 25 μmol m⁻²s⁻¹ 条件下培养。以上试验培养基的蔗糖浓度均为 30 g L⁻¹,琼脂为 7 g L⁻¹, pH 调至 5.8。

1.2 紫茉莉悬浮细胞培养

选取分散性较好、质地较疏松的愈伤组织,接种在 MS + 2,4-D 1 mg L⁻¹ + KT 0.5 mg L⁻¹ 的液体培养基中进行培养,每个 150 mL 的三角瓶中加入液体培养基 40 mL,投入约 2 g 的愈伤组织,培养温度为 25℃,摇床转速为 110 r min⁻¹。培养初期每 5 d 继代 1 次,每次继代时,将培养瓶静置几分钟后,倒掉 2/3 原培养液,然后更换新培养瓶,加入新的培养液。连续继代 3 ~ 4 次后,每隔 12 d 继代 1 次,所建立的细胞悬浮系生长迅速,分散性和均一性较好,颜色呈淡黄色,逐渐获得稳定的悬浮细胞系。

1.3 不同 pH 和蔗糖浓度下的悬浮细胞培养

蔗糖设置 5 个梯度浓度,分别为 10、20、30、40 和 50 g L⁻¹, pH 设置 3 个梯度范围,分别为 5.0 ~ 5.4、5.5 ~ 5.9、6.0 ~ 6.4,配制成不同蔗糖浓度、pH 的液体培养基,对紫茉莉悬浮细胞进行培养。连续培

养 12 d 后测定悬浮细胞增值系数,并观察生长状况,筛选合适的蔗糖浓度和 pH。

1.4 悬浮细胞增值系数的计算

对悬浮培养初期(0 d)及连续培养 12 d 后的培养基进行取样,过滤出愈伤组织,再用干滤纸吸干,称重。每次实验 3 次重复,计算细胞的增值系数,增值系数 = (接种 12 d 后的愈伤组织质量 - 接种时的愈伤组织质量) / 接种时的愈伤组织质量。

1.5 悬浮细胞生长曲线的测定

从稳定的紫茉莉悬浮细胞系中取 5 mL 悬浮培养物,接入新鲜液体培养基中振荡培养,每隔 2 d 取样 1 次,过滤出愈伤组织,再用滤纸吸干水分,称重,连续培养 12 d,每次实验 3 次重复。

1.6 细胞计数

从稳定的紫茉莉悬浮细胞系中取 5 mL 悬浮培养物,接入新鲜液体培养基中振荡培养,每隔 2 d 取 1 mL 悬浮细胞液,滴于载玻片上,在显微镜下观察,采用血球计数板法对悬浮细胞计数,3 次重复,结果取平均值。

1.7 分泌蛋白的提取检测

收集继代培养 10 d 的悬浮细胞培养液 1 L,滤去愈伤组织,将滤液进行冻干浓缩后,在 4℃ 17000 ×g 下离心 25 min,转移上清液;加入 4 倍体积的预冷 TCA-丙酮溶液(含 10% TCA、0.07% β-巯基乙醇),充分混合后于 -20℃ 放置过夜,再在 4℃ 17000 ×g 下离心 20 min,弃上清,沉淀加入预冷的 80% 丙酮溶液(含 0.07% β-巯基乙醇)充分混合,相同条件离心后弃上清;重复 2 次,收集沉淀。沉淀物吹干后在 -80℃ 保存,双向电泳检测。

2 结果和分析

2.1 愈伤组织的诱导及悬浮细胞系的建立

将分散性好、质地疏松的紫茉莉愈伤组织(图 1: A)接入液体培养基后,新的愈伤组织不断生长,每隔 5 d 继代 1 次,在培养初期有褐化现象,经过 3 ~ 4 次继代以后悬浮细胞迅速增殖,细胞状态良好,分裂旺盛,分散性和均一性均良好,颜色呈淡黄色(图 1: B)。

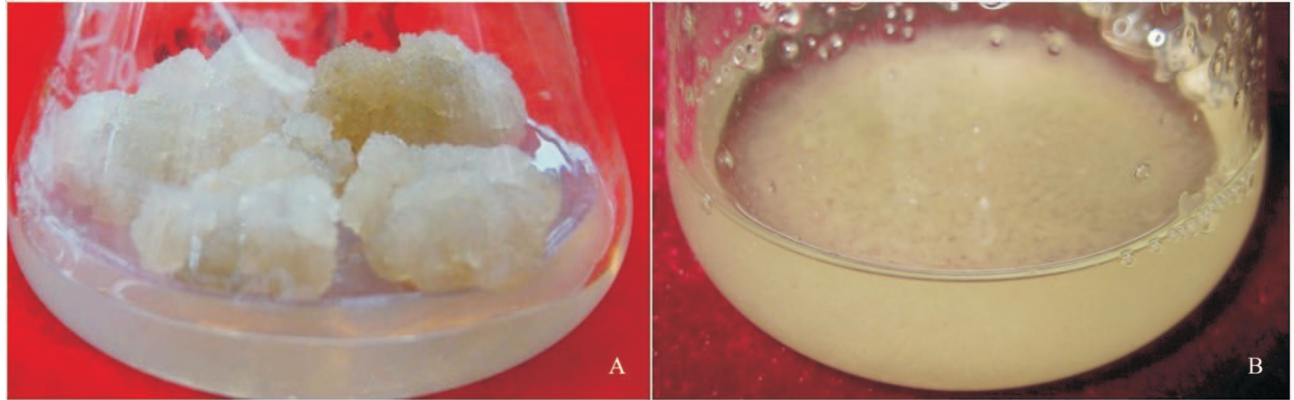


图1 紫茉莉的愈伤组织(A)和悬浮细胞(B)

Fig. 1 Calli (A) and suspension cells (B) of *Mirabilis jalapa*

2.2 继代次数对细胞形态的影响

在紫茉莉愈伤组织悬浮继代培养的初期,体系中悬浮细胞的形态、大小及数量随继代次数而变化。在第一次继代培养时,体系中大部分为成团的愈伤组织,颗粒较大,较混浊,在倒置显微镜下观察,细胞多数成团,聚拢紧密,保持较旺盛的分裂能力(图2:A)。当继代次数为2~3次时,体系中的细胞团颗粒大小、分散性及均一性较好,悬浮液颜色呈淡黄色,比较粘稠,在倒置显微镜下观察,分裂的

细胞团增多,每个细胞团大多由10~20个单细胞组成(图2:B)。随着继代次数的逐渐增加,悬浮系的颗粒分布更加均匀,体系中的由3~5个单细胞组成的小细胞团及单细胞数量也随之增多,大多呈球形或椭球形(图2:C,D)。

2.3 pH和蔗糖浓度对细胞生长的影响

通过比较不同pH和蔗糖浓度对悬浮细胞增值系数的影响,选择合适的培养基pH和蔗糖浓度。

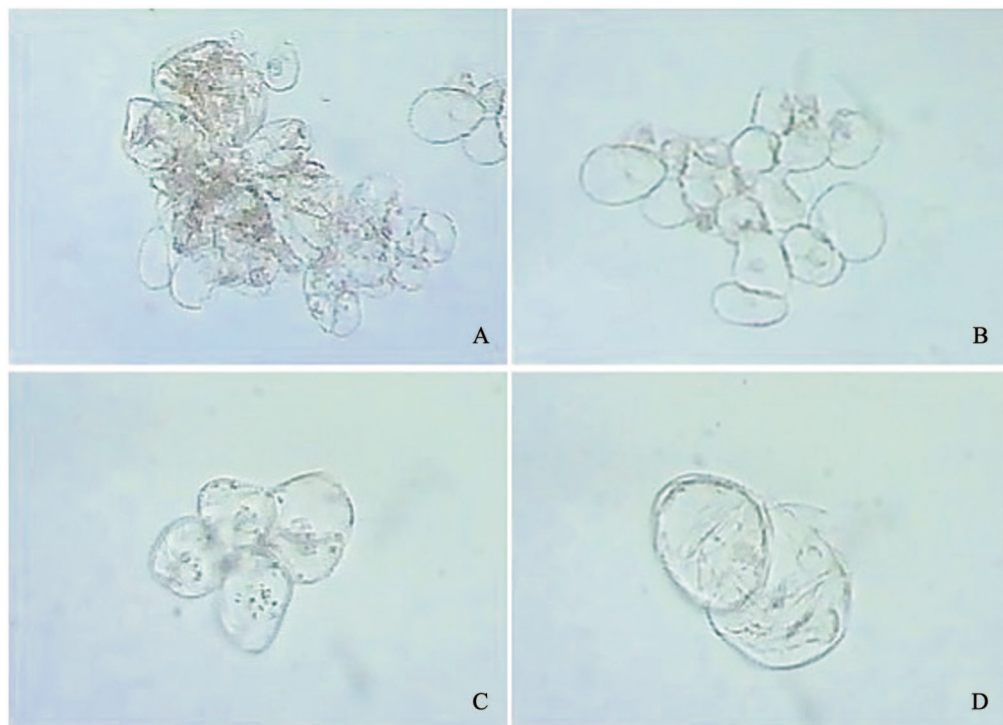


图2 继代次数对悬浮系中细胞团的影响。A: 继代1次; B: 继代2~3次; C,D: 继代4次以上。

Fig. 2 Effect of subculture times on suspension cell group. A: 1 times; B: 2-3 times; C,D: Over 4 times.

由表 1 可知,当培养基 pH 为 5.5~5.9 时,紫茉莉悬浮细胞的增值系数最大,细胞生长最旺盛, pH 高于或低于这一范围时,都不利于悬浮细胞生长。悬浮细胞的增值系数随蔗糖浓度的增加而增加,当蔗糖浓度达到 30 g L^{-1} 时,增值系数达到最大,而当蔗糖浓度继续增大时,悬浮细胞增值系数却减小,蔗糖浓度达到 50 g L^{-1} ,增值系数急剧减小,说明细胞生长反而受到高浓度蔗糖的抑制。因此,当 pH 为 5.5~5.9,蔗糖浓度为 30 g L^{-1} 时,更适合悬浮细胞的生长。在这个条件下,紫茉莉悬浮细胞更旺盛,不易褐化。

表 1 pH 和蔗糖浓度对悬浮细胞增殖系数的影响

Table 1 Effects of pH and sucrose on multiplication coefficient of suspension cells

蔗糖(g L^{-1}) Sucrose	pH		
	5.0~5.4	5.5~5.9	6.0~6.4
10	1.7	1.8	1.6
20	2.0	2.6	1.7
30	3.7	4.7	3.5
40	3.2	4.2	3.1
50	1.8	2.2	1.6

2.4 细胞生长曲线

通过细胞计数绘制紫茉莉悬浮细胞的生长曲线。从图 3 可见,紫茉莉悬浮细胞系的生长曲线大致呈 S 型。紫茉莉悬浮细胞的整个生长周期可分为停滞期、对数生长期、平台期等 3 个特征时期。在 0~4 d 细胞数目增长不明显,生长缓慢,此时为停滞期;在 4~10 d 进入对数生长期,悬浮细胞状

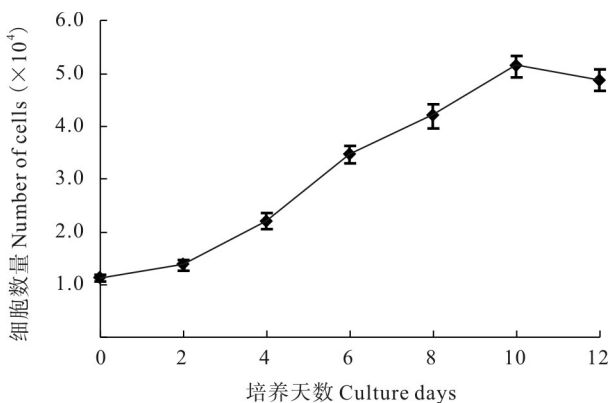


图 3 悬浮细胞的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of suspension cells of *Mirabilis jalapa*

态良好,具有较高的生活力,细胞数目急剧增加;在 10~12 d 进入平台期,细胞数量达到峰值之后增长减缓,这可能是由于随着培养时间的延长,培养基中的营养成分被大量消耗,细胞活性下降,代谢产物严重积累,大量衰败的细胞聚集在瓶壁上,不利于悬浮细胞系的生长。因此,紫茉莉细胞在悬浮培养的过程中最佳继代培养时间是 10 d。

2.5 不同接种量对细胞生长的影响

悬浮细胞的起始密度对于建立稳定的体系有重要影响,过高或过低均不利于建立稳定的再生体系,对细胞培养周期也有影响。分别从稳定的 40 mL 悬浮培养液中分别吸取 2.5 mL、5 mL、7.5 mL、10 mL 的悬浮细胞进行培养,从图 4 可见,接种量为 2.5 mL (即起始密度过低)时,悬浮细胞生物量增长十分缓慢,在 0~8 d 基本处于停滞状态,小细胞团和单细胞很难增殖,8 d 过后悬浮细胞才开始生长起来。悬浮细胞的生长量随着接种量的增加而增加,达到最大生物量所需的时间也随之缩短,当接种量为 5 mL 时,在 10~12 d 即达到最大的生物量;当接种量为 7.5 mL 时,在 8~10 d 悬浮细胞的生物量已接近峰值。而接种量为 10 mL (即起始密度过高)时,悬浮细胞在 0~4 d 快速增殖,悬浮培养体系能迅速获得较大的生物量,此时生物量呈对数增长趋势,4 d 之后,由于体系中的养份被消耗,细胞系营养不足而导致细胞增长缓慢,生物量变化不明显,且容易出现褐化。因此,本试验中当紫茉莉悬浮细胞体系的培养液体积为 40 mL 时,以 7.5 mL 的接种量为宜。

2.6 分泌蛋白的提取检测

从继代培养 10 d 的 1 L 悬浮细胞培养液中提

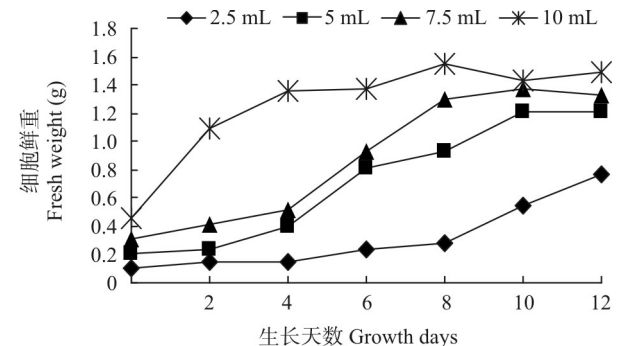


图 4 接种量对悬浮细胞生物量的影响

Fig. 4 Effects of subculture quantity on growth of suspension cells

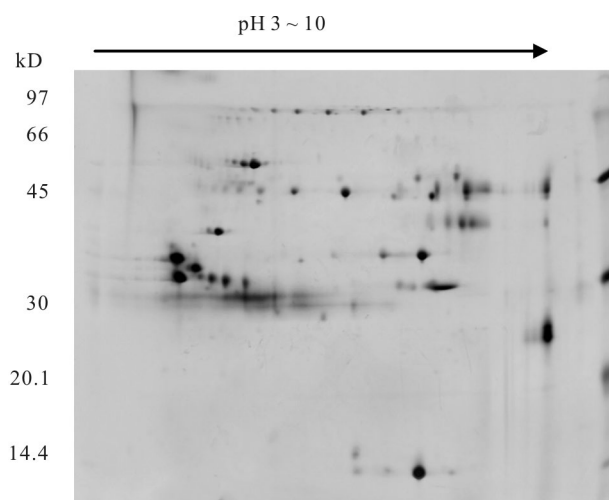


图5 紫茉莉悬浮细胞分泌蛋白 2-DE 图谱

Fig. 5 2-DE map of secretory proteins from *Mirabilis jalapa* suspension cells

取分泌蛋白,最终可获得 (0.42 ± 0.15) g 的分泌蛋白。经双向电泳检测,这些分泌蛋白获得了较好的分离。

3 讨论

植物悬浮细胞的形态、大小及数量均受继代培养次数影响^[8]。经过多次继代培养,细胞悬浮液通常由浑浊逐渐变澄清,愈伤组织由较大颗粒逐渐变小,细胞形状也由不规则变为规则的球形、椭球形。此时的悬浮细胞生长更旺盛,均一性好,能够建立稳定的悬浮细胞体系。

培养基中适宜的 pH 值和蔗糖浓度有利于悬浮细胞的生长。一般认为 pH 能影响悬浮细胞的质膜透性、细胞呼吸代谢、多胺代谢和蛋白质合成等,以及生长调节物质进出细胞及其在胞内的存在方式^[11],因而间接影响培养物生长、分化和物质积累。蔗糖是植物细胞生长和代谢最适的碳源,适当增加蔗糖浓度可以增加细胞活力,为细胞的生长和代谢提供能量,促进细胞增殖和生长。同时,蔗糖是一种渗透调节剂,对细胞的代谢有重要影响。但当蔗糖浓度过高时,反而会抑制细胞生长,这可能是由于高浓度的蔗糖会导致培养液渗透压增大,使细胞失水引发质壁分离以及酶钝化失活等,从而影响细胞生长^[12]。

在细胞悬浮培养的初期,悬浮体系中营养物质充足,细胞数目稳定增长。继续培养,随着营养

物质的消耗,以及细胞在新陈代谢过程中分泌一些有毒物质到培养液中,致使部分细胞开始衰老死亡^[13-14]。悬浮细胞初始接种量是悬浮培养中的一个重要指标,与悬浮细胞的生长状况联系紧密。初始密度过高或过低不仅会影响细胞培养周期,而且易使悬浮细胞发生褐化现象^[15],不利于稳定细胞体系的建立。悬浮细胞需要达到一定的初始密度才能进行生长分裂,可能是由于细胞分裂的启动,需要细胞内某种条件因子达到一定的内源水平。在液体条件下细胞间仍然存在物质及信号的交换,起始培养的细胞密度过低时,来自相邻细胞的信号分子的量不能在短时间达到细胞生长的需求,因此抑制了细胞的进一步增殖^[16]。初始密度较高时,虽然细胞间物质及信号交换容易达到细胞分裂所需的内源水平,使细胞生长迅速启动,表现为细胞迟滞期缩短,但悬浮细胞的初始密度过高,细胞生长又会迅速消耗培养基中的大量养分,进而导致细胞过早衰老死亡。因此,选择既能使细胞生长获得最大的增长速率,又不会引起养分浪费的适接种量是悬浮细胞培养过程中一个重要的因素。

紫茉莉作为一种修复石油污染土壤的首选植物,提取其分泌蛋白、研究其耐胁迫的分子机制有重要意义。本研究结果与 Kim^[6]和陈莉^[17]等的相一致,证实长势良好、质地均一的悬浮细胞体系,可用于分泌蛋白的表达提取。因此,通过建立紫茉莉的细胞悬浮体系,并在细胞体系中进行有机污染物胁迫处理,可以获得紫茉莉的分泌型功能蛋白的差异表达,有助于揭示污染土壤生物修复植物紫茉莉耐受石油污染物及与根际微生物互作降解污染物的分子机制。本研究通过对紫茉莉愈伤组织进行液体悬浮培养,利用细胞计数、观察细胞形态、计算细胞生长周期、确定接种量等手段,成功建立了紫茉莉悬浮细胞培养体系。这些研究为提取悬浮细胞分泌蛋白、研究胁迫机制奠定了基础。

参考文献

- [1] Chen X, Hu X H, Xiao Y A, et al. Floral syndrome and breeding system of *Mirabilis jalapa* L. [J]. Chin J Ecol, 2008, 27(10): 1653-1658.
陈香, 胡雪华, 肖宜安, 等. 紫茉莉的花部综合特征与繁育系统 [J]. 生态学杂志, 2008, 27(10): 1653-1658.
- [2] Peng S W, Zhou Q X, Cai Z, et al. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis jalapa* L. in a field plot experiment [J]. J Hazard Mat, 2009, 168(2/3): 1490-1496.

- [3] Peng S W. Petroleum contaminated soil remediation of flower plants [D]. Tianjin: Naikai University, 2009: 36–39.
彭胜巍. 石油污染土壤的花卉植物修复研究 [D]. 天津: 南开大学, 2009: 36–39.
- [4] Peng S W, Zhou Q X, Zhang H, et al. Responses of seed germination of 8 ornamental plants to petroleum contamination [J]. *Acta Sci Circ*, 2009, 29(4): 786–790.
彭胜巍, 周启星, 张浩, 等. 8种花卉植物种子萌发对石油烃污染土壤的响应 [J]. *环境科学学报*, 2009, 29(4): 786–790.
- [5] Liu J N, Zhou Q X, Sun T, et al. Feasibility of applying ornamental plants in contaminated soil remediation [J]. *Chin J App Ecol*, 2007, 18(7): 1617–1623.
刘家女, 周启星, 孙挺, 等. 花卉植物应用于污染土壤修复的可行性研究 [J]. *应用生态学报*, 2007, 18(7): 1617–1623.
- [6] Kim S T, Kang Y H, Wang Y M, et al. Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor [J]. *Proteomics*, 2009, 9(5): 1302–1313.
- [7] Agrawal G K, Jwa N S, Lebrun M H, et al. Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins [J]. *Proteomics*, 2010, 10(4): 799–827.
- [8] Fang W J, Han L B, Zeng H M. Research advances in factors affecting establishment of plant cell suspension culture [J]. *Biotechn Bull*, 2005(5): 11–15.
方文娟, 韩烈保, 曾会明. 植物细胞悬浮培养影响因子研究 [J]. *生物技术通报*, 2005(5): 11–15.
- [9] Zaccari M, Jia G X, Chen X L, et al. Regeneration and transformation system in *Mirabilis jalapa* [J]. *Sci Hort*, 2007, 111(3): 304–309.
- [10] Bai Y, Gao Y, Zhao Q, et al. Study on optimization of hormone level in callus induction of *Mirabilis jalapa* L. [J]. *Hort Seed*, 2012(7): 52–54.
白玉, 高月, 赵倩, 等. 紫茉莉愈伤组织诱导的激素优化研究 [J]. *园艺与种苗*, 2012(7): 52–54.
- [11] Zhang M P, Wang Y, Sun C Y, et al. Effect of pH and inoculum size on suspension cell from *Panax quinquefolius* [J]. *J Chin Med Mat*, 2003, 26(10): 701–702.
张美萍, 王义, 孙春玉, 等. 基质pH值和接种量对西洋参愈伤组织悬浮培养物的影响 [J]. *中药材*, 2003, 26(10): 701–702.
- [12] Zhang J, Gao W Y, Wang J. Studies on sucrose concentration and nitrogen source in the system of cell suspension culture of *Periploca sepium* Bunge [J]. *Chin Pharm J*, 2011, 46(2): 98–101.
张坚, 高文远, 王娟. 杠柳细胞悬浮培养体系中蔗糖浓度与氮源的考察 [J]. *中国药学杂志*, 2011, 46(2): 98–101.
- [13] Deng S F, Yang Y, Lai Z X. Callus induction and establishment of suspension cell line of *Ardisia crenata* Sims [J]. *J Trop Subtrop Bot*, 2012, 20(1): 33–38.
邓素芳, 杨旸, 赖钟雄. 朱砂根愈伤组织培养及悬浮细胞系建立 [J]. *热带亚热带植物学报*, 2012, 20(1): 33–38.
- [14] Xu S Q, Li X D, Zhang J G. Callus induction and establishment of cell suspension culture system for *Thymus vulgaris* L. [J]. *Acta Agri Bore-Occid Sin*, 2011, 20(10): 112–119.
徐世千, 李晓东, 张建国. 百里香愈伤组织的诱导及细胞悬浮培养体系的建立 [J]. *西北农业学报*, 2011, 20(10): 112–119.
- [15] Swapna M, Biswajit G, Sumita J. Establishment of forskolin yielding transformed cell suspension cultures of *Coleus forskohlii* as controlled by different factors [J]. *J Biotechn*, 2000, 76(1): 73–81.
- [16] Li J M, Zhu Y D J. *Plant Tissue Culture* [M]. Beijing: China Agricultural University Press, 2005: 80–100.
李浚明, 朱登云. *植物组织培养教程* [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2005: 80–100.
- [17] Chen L. Study on selection of alfalfa protein suspension cell with high yield and its kinetics of metabolism [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2011: 70–77.
陈莉. 苜蓿高产蛋白悬浮细胞系的筛选及其反应动力学研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011: 70–77.