白桦单细胞培养体系的建立

占爱瑶, 由香玲, 詹亚光*, 付丽楠, 何之龙, 王翀
东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

提要: 以白桦花药(单核靠边期)、种子(萌发)及再生苗的茎段诱导愈伤组织, 在NT_1、NT_2和B_5三种不同的培养基中进行悬浮培养, 筛选出优良的白桦悬浮体系, 而后进行单细胞分离的结果表明, 白桦花药愈伤组织在B_5培养基上生长迅速, 分散性好, 适合于细胞分离。分离得到的单细胞用不同方式培养, 建立了白桦单细胞两步培养法。

关键词: 白桦; 悬浮培养; 优良悬浮体系; 单细胞培养

Establishment of Single Cell Culture of White Birch (*Betula platyphylla* Suk.)

ZHAN Ai-Yao, YOU Xiang-Ling, ZHAN Ya-Guang*, FU Li-Nan, HE Zhi-Long, WANG Chong
College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: In this study, calli of *Betula platyphylla* were induced from three kinds of explants: anther (microspores in monokaryotic stage), the seedling, and the stem of *in vitro* cultured plant. The best growth of calli induced from anther was obtained in the B_5 medium when they were suspended in three media: NT1, NT2 and B5, respectively, also in that medium the anther calli shown good dispersivity in liquid medium, which was suited to single cell separation. The single cell was cultured in different ways, and the white birch two-step single cell culture was established.

Key words: *Betula platyphylla*; suspension culture; fine suspension system; single cell culture

植物组织或细胞培养物由许多不均一的细胞组成, 这些细胞的大小、结构、遗传、生理生化等特性各不相同, 其代谢状态和合成次生代谢物的能力也有很大差别。组织或细胞培养物中细胞的这种杂合性常是造成培养物在连续培养过程中生长和次生代谢产物合成不稳定的因素之一(戴均贵等2000)。而植物悬浮细胞系是进行原生质体培养、细胞融合、外源基因转化、细胞突变体筛选、次生代谢物质生产及体胚发生的极好试材(Yao 等2008)。白桦植株体内所含的三萜化合物白桦酯醇和白桦酯酸等具有抗菌、抗病毒、降脂、利胆和保肝等作用(孟艳秋等2004; 张云峰等2006)。白桦酯酸对人类黑色素瘤、神经外层瘤和恶性脑瘤细胞有特异的细胞毒性, 前几年有人验证它是1-型艾滋病病毒(HIV-1)的特异抑制剂, 其作用有高效低毒的特点(刘志芹等2004)。目前, 白桦三萜类化合物主要来源于白桦树皮, 人们还试图通过其他途径来生产白桦三萜类化合物, 如化学合成、植物组织与细胞培养技术。从长远来看, 通过组织与细胞培养技术生产白桦三萜类化合物可能是一条比较好的途径。在以前的白桦组织培养研究中, 细胞系的筛选都是停留在愈伤组织水平上(詹亚光和杨传平2002), 这样获得的“细胞系”严格地讲只能称为组织系, 其均匀性、高产性和稳定性均有一定限度。采用单细胞克隆技术来筛选优良细胞系可能有助于解决这一问题。

本文在以前工作基础上(王博2008; 董杰等2008; Zeng等2009), 进一步就外植体来源和培养基成分进行研究, 筛选出适合单细胞培养的白桦悬浮培养体系, 并建立了单细胞两步培养法, 进而用这种培养方法得到优质的(如次生代谢产物含量高)单细胞克隆, 以期为白桦细胞次生代谢产物生产的研究提供参考。

材料与方法

1 材料

以白桦(*Betula platyphylla* Suk.)的花药(单核靠

收稿 2009-12-23 修定 2010-03-17
资助 东北林业大学本科生创新项目(091022532)和国家自然科学基金(30872045)。
* 通讯作者(E-mail: yaguangzhan@126.com; Tel: 0451-82191752)。

边期)、种子(萌发)及再生苗的茎段为材料进行愈伤组织的诱导。

实验中采用4种培养基: NT_1、NT_2、N_7和B_5, 均添加2%的蔗糖, 固体培养基中添加0.7%琼脂, pH 6.5, 121 ℃高温高压灭菌20 min。NT_1培养基为NT培养基中添加0.02 mg·L^{-1} TDZ和0.4 mg·L^{-1} 6-BA; NT_2培养基为NT培养基中添加0.01 mg·L^{-1} TDZ和0.1 mg·L^{-1} 6-BA; N_7培养基(Simola 1985)中添加了1 g·L^{-1}水解酪蛋白(CH)、2 mg·L^{-1} 2,4-D和0.5 mg·L^{-1} KT; B_5培养基中添加0.6 mg·L^{-1} TDZ、0.2 mg·L^{-1} 6-BA和1 g·L^{-1} CH。

2 方法

2.1 愈伤组织诱导及增殖 将白桦花药(单核靠边期)、种子(萌发)及再生苗的茎段, 分别在B_5、N_7和NT_2培养基上诱导愈伤组织。诱导得到的愈伤组织继续增殖, 30 d继代一次, 选择松散的愈伤组织用于悬浮培养。

2.2 白桦悬浮体系的建立 将分散性好的3种来源的白桦愈伤组织, 按40 g·L^{-1}的量接种于NT_1、NT_2和B_5液体培养基中, 置于转速为120 r·min^{-1}摇床上振荡培养。测定生长曲线, 观察生长状况, 筛选出优良的悬浮体系, 用于单细胞分离。

2.3 单细胞的分离和纯化 主要用过筛的方法。将悬浮培养物经172和76 μm孔径不锈钢丝网过滤2次, 除去大块细胞团, 收集滤液; 53 μm细胞筛过滤, 以除去小的细胞团, 得到单细胞; 再用45 μm的细胞筛纯化单细胞。

2.4 细胞活力和分裂能力观察 用双醋酸盐荧光素(FDA)染色法; 以显微镜观察细胞的分裂、增殖和生长。

2.5 细胞密度的测定 将分离得到的单细胞采用血球计数板进行细胞密度计数, 并用稀释或离心重新悬浮的方法调整细胞密度。

2.6 单细胞的培养 将分离得到的单细胞按10^5个·mL^{-1}接种于B_5培养基上进行单细胞悬浮培养和平板培养, 每隔3 d进行显微观察, 拍下各个时期细胞生长、分裂和增殖的动态变化, 30 d后统计植板率。

结果与讨论

1 愈伤组织的诱导与增殖

将白桦组培苗的茎段、种子(萌发后)和花药(单核靠边期), 分别在NT_2、N_7和B_5培养基上诱导愈伤组织, 选择松散的愈伤组织进行继代, 每20 d继代一次, 继代4次后, 3种愈伤组织均较松散(图1)。

图1 不同来源外植体的愈伤组织

Fig.1 Callus derived from different explants

a: 茎段; b: 种子; c: 花药。

2 白桦优良悬浮体系的筛选

外植体的来源和状态、培养基的成分、接种的起始密度等都影响着木本植物悬浮细胞培养(化青报等2008)。白桦花药愈伤组织在NT_1、NT_2、B_5三种培养基中进行悬浮培养的初期, 3种悬浮培养基中细胞的长势均较好, 生长较快, 细胞均一, 不易褐化。但在NT_1和NT_2两种培养基中, 继代2~3次后, 细胞块较大, 生长速率较慢, 平均每天分别为

3.331 和 3.990 g·L^{-1}; 而在 B_5 培养基中的悬浮细胞分散好, 细胞均一, 生长速率快, 生长速率平均每天为5.201 g·L^{-1}, 是一种优质细胞悬浮培养系, 可用于单细胞分离(图 2)。而茎段和种子的愈伤组织在 NT_1、NT_2、B_5 三种培养基中悬浮培养, 细胞的长势均不好, 块大, 容易褐化, 生长缓慢, 茎段愈伤组织在 NT_1、NT_2、B_5 三种培养基中平均每天的生长速率分别为 3.017、3.251、3.150 g·L^{-1} (图 3); 种子愈伤组织在 NT_1、NT_2、B_5 三种培养基中平均每天的生长速率分别为 2.976、2.925、3.113 g·L^{-1} (图 4)。

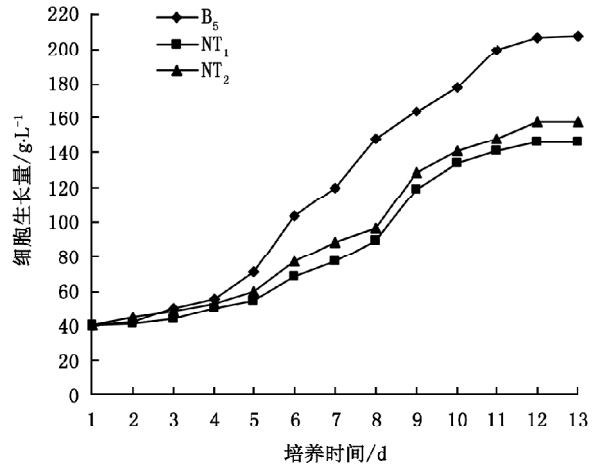

图 2 不同培养基中的花药愈伤组织生长变化
Fig.2 Growth of anther callus in different medium

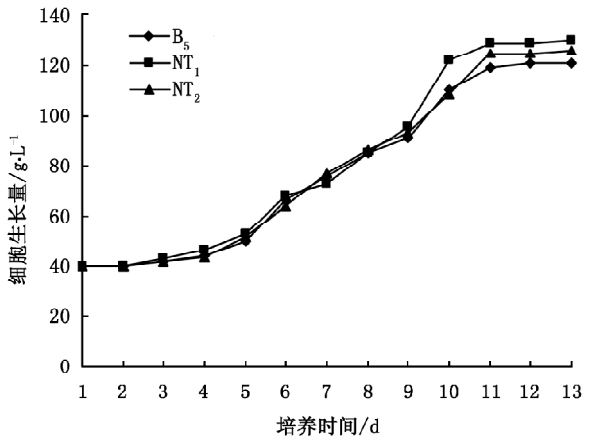

图 3 不同培养基中茎段愈伤组织的生长变化
Fig.3 Growth of stem callus in different medium

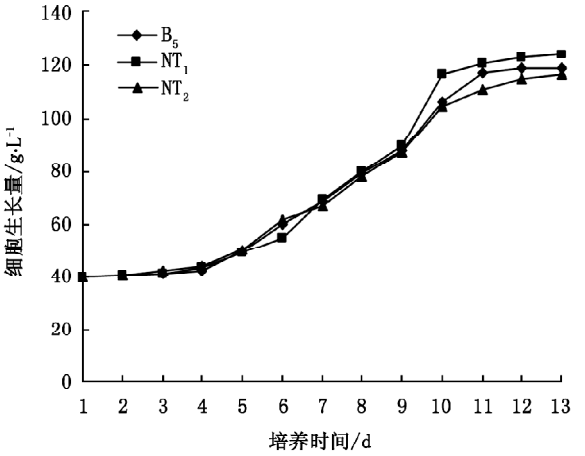

图 4 不同培养基中种子愈伤组织的生长变化
Fig.4 Growth of seed callus in different medium

3 白桦单细胞的分离和培养方式的筛选

在单细胞克隆的研究中, 获取分散细胞的方法有物理方法、化学方法和酶法 3 类。物理方法最有潜力, 它操作方便, 不会改变细胞的生理生化特性, 对正常细胞的生长和分化以及生物合成的研究比较适用, 因而用得较普遍(查宏波等 2004)。本文也用了此方法。将 B_5 培养基中培养优良的白桦花药悬浮培养液以 76 和 53 μm 孔径不锈钢丝细胞筛过滤 2 次去细胞团, 收集滤液, 此时单细胞含量占 60% 以上, 再用 45 μm 的细胞筛纯化单细胞, 将细胞筛上的单细胞用培养液冲入到灭过菌的三角瓶里, 细胞液里的单细胞占 80% 以上(图 5-j)。用 FDA 染色法(徐林林等 2006)鉴定细胞活力为 82.3% (图 5-c、d)。

4 单细胞培养方式的选择

在单细胞培养方式(单细胞悬浮培养、浅层培养、平板培养及看护培养)中, 我们采用了单细胞悬浮培养和平板培养两种方式进行了白桦单细胞培养的初步研究。将分离得到的单细胞分别按 10^5 个·mL^{-1} 接种于 B_5 液体和固体培养基中进行单细胞悬浮培养和平板培养, 每隔 3 d 进行一次显微观察, 拍下各个时期细胞生长、分裂和增殖的动态变化, 结果(图5)表明, 单细胞悬浮培养比平板培养的细胞分裂更快, 分裂率和植板率都较高, 得到的单细胞克隆较多(表 1)。但悬浮培养不适合单细胞克隆的

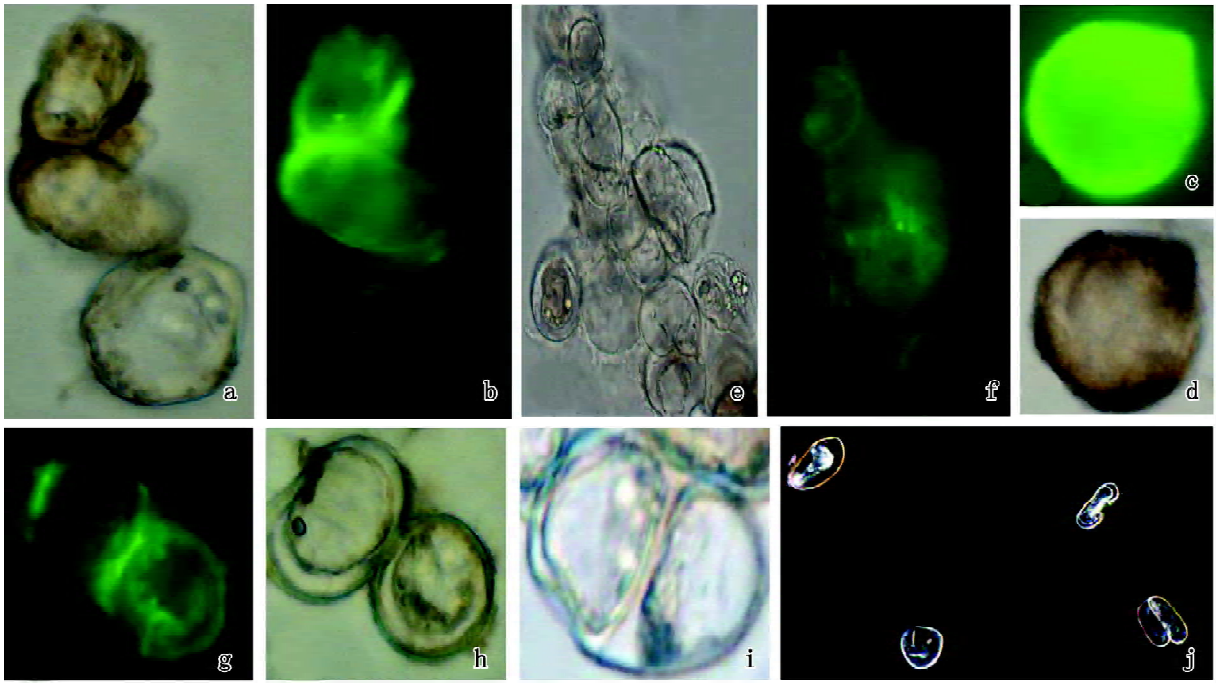

图5 单细胞的生长和分裂

Fig.5 Growth and division of single cell

a、b: 平板培养6 d后分裂的三细胞团; c、d: 分离得到的有活力的单细胞; e、f: 悬浮培养12 d的多细胞团; g、h: 悬浮培养3 d的二细胞团; i: 正在分裂的细胞; j: 80%以上单细胞。

表1 不同培养方式对细胞分裂率和植板率的影响

Table 1 Effects of different culture methods on cell division rate and plating efficiency

培养方式	培养时间 /d			
	3	6	9	30
单细胞悬浮培养	多为单细胞, 二细胞团为11.44%, 三细胞团为3.03%	二细胞团或多细胞团为35.21%	多细胞团为46.21%, 有较多可见的愈伤组织	植板率为11.29%
单细胞固体培养	多为单细胞, 二细胞团为9.25%, 三细胞团为2.44%	二细胞团或多细胞团为23.8%	多细胞为35.3%, 有个别愈伤组织可见	植板率为6.33%

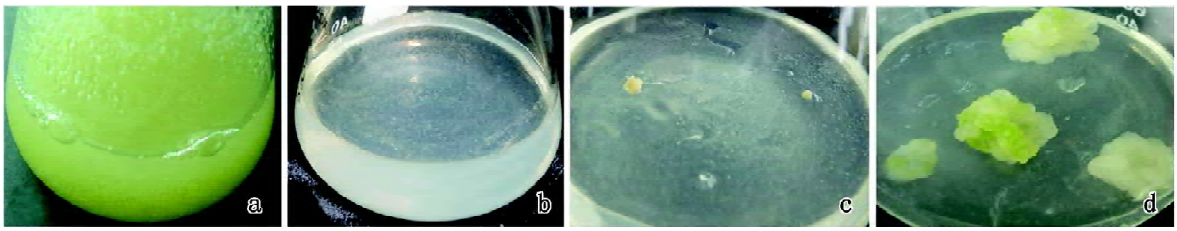

图6 花药悬浮培养细胞及单细胞生长

Fig.6 Anther suspension cells and growth of single cell

a: B_5培养基中的花药悬浮细胞; b: 单细胞悬浮培养7 d后的单细胞; c: 单细胞平板培养10 d后的单细胞克隆; d: 继代培养30 d后的单细胞克隆。

进一步生长和单细胞克隆的挑选, 所以建议采用下面介绍的两步培养法。

5 单细胞的两步培养法

从优良的悬浮培养细胞中分离的单细胞, 按10^5个·mL^{-1}接种于B_5液体培养基上进行单细胞悬浮培养7 d后, 接种于B_5固体培养基中进行平板培养, 当单细胞克隆可见时, 继而挑选出来进行继代培养, 建立了白桦单细胞两步培养法, 即单细胞悬浮培养和平板培养相结合的方式(图6)。

本文以单核靠边期的白桦花药为外植体, 进行愈伤组织诱导, 在B_5培养基上进行悬浮培养, 建立了一个优良的适合单细胞分离的白桦悬浮培养体系。采用物理的方法进行单细胞分离, 对白桦单细胞培养进行了初步研究。

参考文献

查宏波, 李启任, 王东, 陈敏(2004). 粉叶小檗愈伤组织单细胞克隆. 生物技术通报, (1): 43~46

戴均贵, 朱蔚华, 吴蕴祺, 胡秋, 张大勇(2000). 银杏单细胞克隆研究. 中国中药杂志, 25 (10): 593~596

董杰, 齐凤慧, 詹亚光(2008). 茶条槭悬浮培养体系的建立与没食子酸合成的优化条件. 植物学通报, 25 (6): 734~740

化青报, 翟晓巧, 段艳芳(2008). 木本植物悬浮细胞培养影响因素研究. 河南林业科技, 28 (2): 13~16

刘志芹, 张庆云, 宋丽杨, 胡迎庆, 李俊清(2004). 白桦皮和白桦叶体外抗真菌作用研究. 天津药学, 16 (3): 3~4

马莲菊, 高峰, 于翠梅, 刘世强(2002). 玉米细胞悬浮系的建立与单细胞培养效果. 沈阳农业大学学报, 33 (6): 449~451

孟艳秋, 赵临襄, 王趫, 吕明心, 刘丹(2004). 五环三萜类化合物的构效关系. 中国新药杂志, 13 (12): 1098~1102

王博(2008). 促进白桦(*Betula platyphylla* Suk.)培养物中三萜物质积累的初步研究[学位论文]. 哈尔滨: 东北林业大学

徐林林, 芦笛, 陆巍, 张荣铣, 杨清(2006). 水稻悬浮细胞系的建立及培养条件对生物产量的影响. 植物生理学通讯, 42 (4): 612~616

詹亚光, 杨传平(2002). 白桦愈伤组织的高效诱导和不定芽分化. 植物生理学通讯, 38 (2): 111~114

张宁, 司怀军, 王蒂(2004). 马铃薯单细胞分离技术的研究. 中国马铃薯, 18 (4): 193~197

张云峰, 魏东, 邓雁如, 郭祀远, 陈峰(2006). 三萜皂苷的生物活性研究新进展. 中成药, 28 (9): 1349~1351

Simola LK (1985). Propagation of plantlets from leaf callus of *Betula pendula* f. *purpurea*. Sci Hortic, 26: 77~85

Yao N, Zhang ZY, An XM, Yang K (2008). Establishment of cell suspension line of *Populus tomentosa* Carr. For Stud China, 10 (3): 158~161

Zeng FS, Wang WW, Zhan YG, Xin Y (2009). Establishment of the callus and cell suspension culture of *Elaeagnus angustifolia* for the production of condensed tannins. African Biotechnol, 8 (19): 5005~5010