

# 一个快速测定悬浮培养植物细胞生物量的方法的建立\*

侯学文<sup>1</sup>, 郭 勇<sup>2</sup>

(1 华南农业大学资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 华南理工大学生物工程系, 广东 广州 510641)

**摘要:** 以悬浮培养的玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa*) 细胞为材料, 分别探讨了胞外过氧化物酶活力与培养细胞生物量、胞外蛋白浓度与培养细胞生物量之间的相关关系。结果表明, 胞外过氧化物酶与培养细胞生物量之间相关性较差, 而胞外蛋白浓度与培养细胞生物量之间却具有高度相关性, 因此通过胞外蛋白浓度的测量, 可以对培养细胞的生物量作出快速的推算。

**关键词:** 玫瑰茄细胞; 胞外过氧化物酶; 胞外蛋白浓度; 细胞生物量

中图分类号: Q 945 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2001)04-0504-05

## The Found of a New Method to Rapidly Measure Biomass of Suspension Plant Cell Culture

HOU Xue - Wen<sup>1</sup>, GUO Yong<sup>2</sup>

(1 College of Natural Resources and Environment, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;

2 Bioengineering Department of South China University of Technology, Guangzhou, 510641, China)

**Abstract:** A roselle cell strain was used to study the relationship between medium peroxidase activity and biomass, and the relationship between medium protein concentration and biomass, respectively. The results showed that the linear relationship between medium peroxidase activity and biomass was not high, but the linear relationship between medium protein concentration and biomass was very high. The biomass of suspension plant cell culture could be calculated through this equation at acceptable accuracy.

**Key words:** Roselle cell; Medium peroxidase activity; Medium protein concentration; Biomass

在植物细胞悬浮培养过程中, 如何快速、准确地测定培养细胞的生物量一直是一个难题。这是因为植物细胞的体积比微生物细胞约大一千倍; 且在悬浮培养条件下, 大多数植物细胞以大小不等的细胞团存在, 因此利用浊度法来估测植物细胞的生物量就会产生不可接受的偏差。直接取样测定细胞鲜重、干重或细胞压积, 然后再推算出整个培养体积的生物量, 这些方法会受到取样代表性和不能在线检测的局限, 而且误差也较大。植物细胞的营养元素大多为电解质, 且营养物质的吸收消耗与细胞的生物量之间存在着较为紧密的相关关系, 因此发展出了利用测定细胞培养液的电导率来表征细胞生物量的电导法 (Buite-laar 等, 1991)。利用电导法来估测培养细胞的生物量具有一定的准确度, 且可实现在线检

\*收稿日期: 2000-11-30, 2001-03-01 接受发表

作者简介: 侯学文 (1969-) 男, 副教授, 博士, 主要从事植物次生代谢产物研究。

测，但电导法有时受到有机营养物及代谢废物的干扰。本研究以分散性较好的玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa*) 细胞株为模式系统，尝试从植物细胞的生化代谢角度出发，找到其它更为简便的测算方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料与培养条件

以华南理工大学生物工程研究室培养多年的玫瑰茄 (*Hibiscus sabdariffa*) 白色细胞株为实验材料。将固体培养基上的愈伤组织转入 1000 mL 三角瓶 (含 400 mL B<sub>5</sub> 培养基) 制作种子瓶，然后在相同的液体培养基中传代 1~2 次，使细胞更适应液体培养环境，以保证实验结果的准确可靠。试验采用 100 mL 的三角瓶，装液量为 50 mL，培养液 pH 值调至 5.8，分装后经 121℃ 灭菌 15 min，植物生长调节剂为 4.5 μmol/L 2, 4-D 和 2.3 μmol/L KT。接种量为每瓶 5 mL 种子液，即每瓶 1.5 g 鲜细胞，蔗糖浓度为 2%、3%、4%、5%，摇床转速 130 r/min，光暗比为 16:8，培养周期为 14 d，每 2 d 取样测定一次 (侯学文等, 1998)。

1.2 生物量的测定：取样后用布氏漏斗抽滤，用蒸馏水洗涤两次并抽干，在万分之一的光电分析天平上称重，此定为鲜重。

1.3 培养液中过氧化物酶的测定：参照廖兆周 (1988) 的方法。

1.4 培养液中蛋白质的测定：参照 Bradford (1976) 的方法。

## 2 实验结果与讨论

### 2.1 在不同蔗糖浓度下，悬浮培养玫瑰茄细胞的生长曲线及其方程

蔗糖在植物细胞培养中，既作为能源物质，又是构架物质，可见蔗糖在维持植物细胞的生长方面具有不可缺少的作用；但蔗糖也是一具基质抑制效应的物质，即超过一定浓度后，反而对细胞的生长具有抑制作用。由图 1 可以看出，蔗糖对玫瑰茄细胞的生长随着浓度不同而表现出不同的影响，在 2% 至 4% 浓度范围内，蔗糖是作为限制性基质而存在，因此在此浓度范围内，玫瑰茄细胞的生长随蔗糖浓度的增加而增加；而在 4% 浓度以上，蔗糖就表现出基质抑制效应。

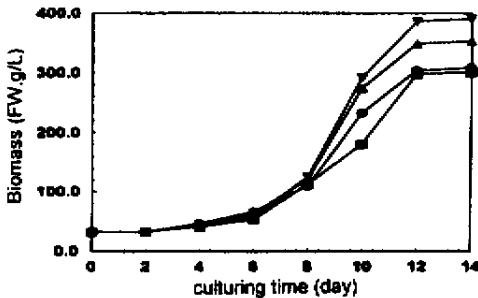


图 1 不同蔗糖浓度下，悬浮培养玫瑰茄细胞的生长曲线

Fig. 1 The growth curve of suspension roselle cell under different sucrose concentration

●— 2% sucrose ▲— 3% sucrose ▼— 4% sucrose ■— 5% sucrose

细胞在对数生长期的比生长速率可以很好地反映细胞的生长状况，细胞比生长速率的定义为细胞在单位时间内的增长量，写成公式为： $\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$

对上式积分得： $\ln X = \mu t + A_0$ ，其中 X 为生物量 (g/L)，t 为时间 (d)， $\mu$  为比生长速率 ( $d^{-1}$ )， $A_0$  为积分常数，其生物学意义为接种量的自然对数。

根据图 1 中的数据，利用最小二乘法求得不同蔗糖浓度下，玫瑰茄细胞的生长曲线方程及比生长速率如下：

(1) 2% 蔗糖： $\ln X = 0.2507t + 2.7715$ ， $\mu_{2\%} = 0.2507$ ， $r = 0.9899$

(2) 3% 蔗糖： $\ln X = 0.2748t + 2.6503$ ， $\mu_{3\%} = 0.2748$ ， $r = 0.9856$

(3) 4% 蔗糖： $\ln X = 0.2994t + 2.4609$ ， $\mu_{4\%} = 0.2994$ ， $r = 0.9842$

(4) 5% 蔗糖： $\ln X = 0.2818t + 2.3603$ ， $\mu_{5\%} = 0.2818$ ， $r = 0.9932$

### 2.2 胞外过氧化物酶活力与细胞生物量的关系

过氧化物酶起着清除细胞代谢过程中产生的有害过氧化物的作用。研究表明，过氧化物酶与细胞壁的组成成分纤维素和木质素的合成，以及与组成细胞膜成分的固醇合成有关 (Lampert, 1986)。这些物质均为植物细胞不可缺少的组分，显然过氧化物酶活力也就可能与细胞的生物量之间建立起一定联系，实验结果如图 2 所示：

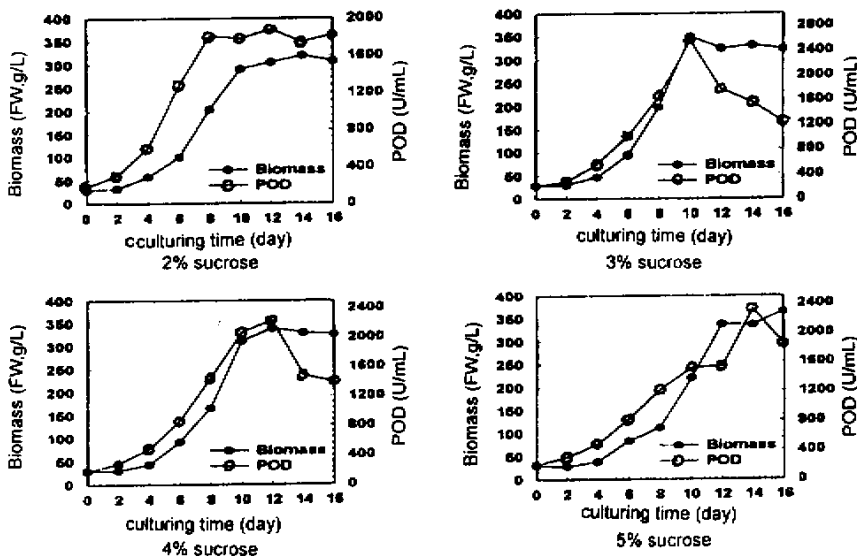


图 2 玫瑰茄细胞悬浮培养过程中，胞外过氧化物酶活力与细胞生物量的关系

Fig.2 The relationship between intracellular peroxidase and biomass during suspension culture of Roselle cell

由图 2 可以看出，在整个细胞培养周期中，胞外过氧化物酶的活力增加并不与细胞生物量的增长完全同步。特别在对数生长后期至培养末期，在细胞生物量继续增加的时候，过氧化物酶活力却表现出下降趋势；而在对数生长前、中期，胞外过氧化物酶活力积累与细胞生物量存在一定的正相关关系。计算表明，二者之间线性关系并不十分显著 ( $r <$

0.75), 因此如用过氧化物酶进行生物量的测算会出现较大误差。

### 2.3 胞外蛋白浓度与细胞生物量的关系

植物细胞在培养过程中不仅吸收营养物质, 而且还向培养液中分泌蛋白质、有机酸等; 如果假定培养细胞在对数增长过程中, 单个细胞分泌的蛋白量维持在大致相同的范围内, 这样从理论上就可建立起胞外蛋白浓度与细胞生物量之间的关系。为了考查这种理论假设的可行性, 设计了不同蔗糖浓度下胞外蛋白浓度与细胞生物量相关性的实验, 实验结果如图 3 所示:

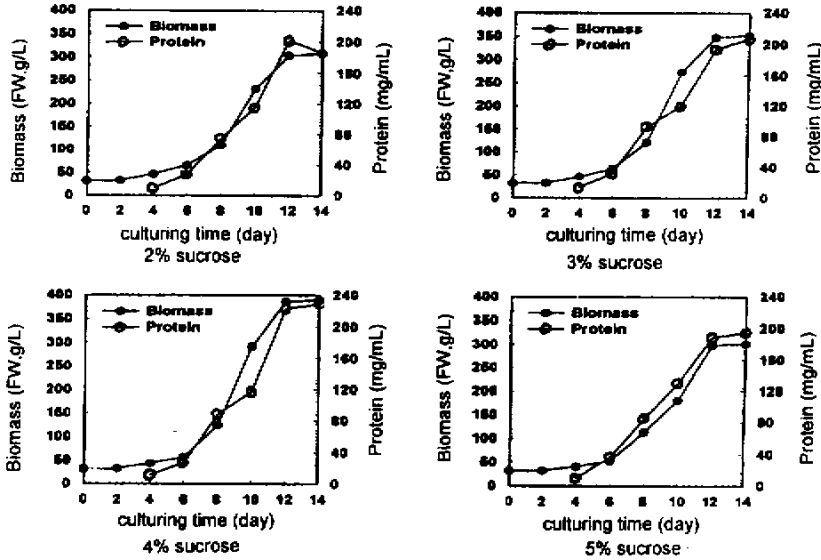


图 3 玫瑰茄细胞悬浮培养过程中, 胞外过蛋白质浓度与细胞生物量的关系

Fig.3 The relationship between intracellular protein and biomass during suspension culture of roselle cell

由图 3 可以看出, 在接种后 2 d, 由于细胞尚未开始生长, 检测不到培养液中有蛋白存在。但在 4 d 后, 随着细胞生长的启动, 胞外蛋白浓度也随着细胞的生长而增加, 显示出了十分良好的相关性。利用最小二乘法求得胞外蛋白浓度与培养细胞生物量的线性方程如下:

$$(1) 2\% \text{ 蔗糖: } y = 1.4181x + 29.80, \quad r = 0.9771$$

$$(2) 3\% \text{ 蔗糖: } y = 1.7816x + 9.10, \quad r = 0.9607$$

$$(3) 4\% \text{ 蔗糖: } y = 1.7151x + 20.51, \quad r = 0.9576$$

$$(4) 5\% \text{ 蔗糖: } y = 1.4420x + 7.18, \quad r = 0.9863$$

由此可见, 在不同蔗糖浓度下, 胞外蛋白浓度与细胞生物量之间均具有良好的相关性, 说明我们的前述假设具有实际可行性; 利用考马斯亮兰法测定蛋白浓度简便、快速, 一旦建立起胞外蛋白浓度与细胞生物量之间的相关方程, 我们只需要测定发酵液中蛋白浓度便可快速地推算出细胞生物量, 因而本法是大规模植物细胞发酵中检测细胞生物量的一个比较理想的方法。

### 3 讨论

在植物细胞培养过程中, 培养细胞的生物量一直是一个值得关注的指标, 获得该指标的方法有: (1) 直接法: 在培养过程中部分取样测定细胞鲜重、干重、细胞压积, 然后再推算出整个培养体系的细胞生物量; (2) 物理法: 利用细胞生物量与某些物理指标的联系进行估测, 如浊度法、电导法; (3) 生化代谢法: 利用细胞生化代谢物与细胞生物量之间建立起的联系来进行估测, 如本文所探讨的过氧化物酶活力法和胞外蛋白浓度法。各种方法均有其优缺点, 相比而言, 本文所建立的胞外蛋白浓度法, 不论是从其测定的简便性, 还是准确度来看, 都不失为一个较好的方法。

### 〔参考文献〕

- 侯学文, 郭勇, 1998. 不同氮源对悬浮培养玫瑰茄细胞的生长及硝态氮同化指征的影响 [J]. 广西植物, **18** (2): 169 ~ 172
- 廖兆周, 1988. 斑茅及其杂种的过氧化物酶同工酶 [J]. 植物学报, **30** (2): 214 - 219
- Bradford M M, 1976. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantity of protein utilizing the principle of protein - dye binding [J]. *Anal Biochem*, **72**: 248 ~ 254
- Buitelaar R M, Langenhoff A A M, Heidstra R, *et al*, 1991. Growth and thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two - liquid - phase bioreactors [J]. *Enzyme Microb Technol*, **13**: 487 ~ 494
- Lampert D T A, 1986. Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidase [M]. In Greppin H, Pencil C, Gasper T, ed. Switzerland: University of Geneva