

· 资源与鉴定 ·

## 罗汉果细胞悬浮培养体系的建立与优化

曾建红<sup>1</sup>, 宋波<sup>2</sup>, 戴平<sup>1</sup>, 段小群<sup>1\*</sup>

(1. 桂林医学院药学院, 广西 桂林 541002; 2. 西华师范大学生命科学学院, 四川 南充 637003)

**[摘要]** 目的: 研究6-BA, 萘乙酸(NAA), 碳源, pH对罗汉果悬浮培养细胞生长的影响, 探讨罗汉果细胞悬浮培养的最适条件。方法: 考察1个培养周期内罗汉果悬浮细胞的鲜重和干重, 绘制生长曲线和生长速率曲线; 采用正交试验设计对6-BA, NAA, 碳源, pH 4因素3水平的组合进行优化。结果: 罗汉果悬浮细胞培养的生长周期约为21 d, 0~6 d为细胞的延滞期, 7~21 d为对数期, 稳定期较短, 第22天进入到衰亡期, 在第21天时细胞鲜、干质量达到最大, 分别为693.0, 416.0 g·L<sup>-1</sup>, 最大生长速率为0.040 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。NAA是影响罗汉果悬浮细胞生长的关键因素, 其影响效应依次为NAA > 6-BA > pH > 碳源。悬浮细胞生长的适宜培养基为MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 4.0%蔗糖为碳源, 初始培养基pH 5.5~6.0。结论: 通过组织培养方式可以成功建立罗汉果细胞悬浮培养体系。

**[关键词]** 罗汉果; 细胞悬浮培养; 生长曲线; 正交设计

**[中图分类号]** R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)02-0124-04

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20111116.1424.005 **[网络出版时间]** 2011-11-16 14:24

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111116.1424.005.html>

## Establishment and Optimization of Cell Suspension Culture System in *Siraitia grosvenorii*

ZENG Jian-hong<sup>1</sup>, SONG Bo<sup>2</sup>, DAI Ping<sup>1</sup>, DUAN Xiao-qun<sup>1\*</sup>

(1. Pharmaceutical School, Guilin Medical College, Guilin 541002, China;

2. Resource and Circumstance College, West China Normal University, Nanchong 637003, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of 6-BA, naphthyl acetic acid(NAA), carbon source and pH on the cell suspension culture, and to explore the optimal conditions for establishing the cell suspension culture system. **Method:** The fresh weight and dry weight were investigated in a cell cycle, the growth curve and growth rate curves were drawn. The combination of 4 factors and 3 levels of 6-BA, NAA, carbon source and pH were optimized by orthogonal test method. **Result:** The growth cycle of *Siraitia grosvenorii* cell suspension culture was 21 days, the lag phase was 0-6 d, the log phase was 7-21 d, there was transient stability in the stable phase, the decline phase achieved on the 22<sup>th</sup> day. The highest fresh weight and dry weight were achieved on the 21<sup>th</sup> day, and reached 693.0 g·L<sup>-1</sup> and 416.0 g·L<sup>-1</sup> respectively, the maximum growth rate reached 0.040 g·L<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. The NAA level was the key factor of establishing the cell suspension culture system of *S. grosvenorii*, the effect of the four factors was NAA > 6-BA > pH > carbon source, the optimal level was MS + 1.0 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.02 mg·L<sup>-1</sup> NAA, 4.0% sucrose and pH 5.5-6.0 initial medium. **Conclusion:** The cell suspension culture system of *S. grosvenorii* can be established successfully by tissue culture.

**[Key words]** *Siraitia grosvenorii*; cell suspension culture; growth curve; orthogonal test

**[收稿日期]** 20110527(001)

**[基金项目]** 广西科技攻关项目(桂科攻0992003A-18); 桂林市科技开发项目(20080307-1); 广西教育厅科研项目(201019LX339)

**[通讯作者]** \* 段小群, 博士, 教授, 从事药用资源开发研究, Tel: 0773-5895058, E-mail: robortduan@163.com

罗汉果来源于葫芦科罗汉果属罗汉果的果实<sup>[1]</sup>,为广西桂林特有的一种珍贵药食两用药用植物。罗汉果甜苷(mogroside)是罗汉果中主要有效成分,具有清热润肺,利咽开音,润肠通便的功能。最近研究表明罗汉果还有抗氧化、抗糖尿病和抗癌的功效<sup>[2]</sup>。罗汉果味道新颖、口味纯正及独特的保健功能而深受人们的喜爱,是肥胖症、高血压、糖尿病患者最好的甜味剂和保健品<sup>[3]</sup>,具有广泛的应用价值。然而由于罗汉果甜苷的提取率仅为1%左右,使得甜苷的价格居高不下<sup>[4]</sup>。产量低、成本高成为制约罗汉果甜苷市场份额的主要因素<sup>[5]</sup>。因此,提高罗汉果甜苷的含量和降低生产成本,成为罗汉果研究的重点。植物细胞培养技术生产次生代谢产物是提高决罗汉果甜苷的含量的有效途径之一,细胞悬浮培养具有繁殖速度快、培养规模大和提供大量均匀一致植物细胞培养物的特点,而目前有关罗汉果悬浮细胞培养国内外尚未见报道。因此,本研究利用罗汉果尖段诱导形成的愈伤组织建立细胞悬浮培养体系,研究4种因素对悬浮培养细胞生长的影响,以期筛选出适宜的培养条件,为建立罗汉果悬浮细胞培养生产罗汉果甜苷的研究奠定理论基础,最终实现通过细胞悬浮培养技术提高罗汉果甜苷产量、降低生产成本的目的。

## 1 材料

选取桂林亦元生现代生物技术有限公司罗汉果种苗基地选育的罗汉果品种青皮果健康植株的茎段,由桂林医学院生药教研室杜泽乡教授鉴定为罗汉果 *S. grosvenorii* (Swingle) C. Jeffery ex Lu et Z. Y. Zhang 的茎。琼脂:NAA(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 F20090119, F20090326),6-BA(上海捷瑞生物工程有限公司,批号 B2145),蔗糖(西陇化工股份有限公司,批号 H6326)。

## 2 方法

**2.1 细胞悬浮培养方法** 参照文献[6]接种和诱导罗汉果茎段愈伤组织,在添加  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA 激素、2.5% 蔗糖、 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  琼脂的 MS 培养基(pH 5.8)上继代培养。选取连续继代3~5次的新鲜、松软易碎的黄白色愈伤组织15g,放入装有50 mL的液体培养基的100 mL 无菌三角瓶中(接种量  $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),置于  $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养箱  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  黑暗条件下悬浮培养24 h后静置,将上层培养基连同单细胞和小细胞团转移到无菌空三角瓶中继续振荡培养,3 d后采用同样的方法再转移1次。7 d后将悬浮细胞经  $40 \text{ } \mu\text{m}$  筛网过滤后接

种到新鲜培养基中继续振荡培养。达到一定体积后转移到大的三角瓶中,用同样的方法继续添加培养基振荡培养。直到达到一定数量的均一稳定的细胞悬浮培养液。细胞悬浮培养温度为  $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ , 光强为  $2000 \text{ lx}$ , 光照时间为  $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

**2.2 细胞悬浮培养体系的建立** 根据文献[6]方法和本实验预试结果,本实验的液体培养基组成为 MS + 6-BA + NAA, 本实验将 6-BA 设 0.2, 0.6,  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  3 个质量浓度梯度, NAA 设 0.02, 0.06,  $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  3 个质量浓度梯度, 蔗糖设 2.0%, 3.0%, 4.0% 3 个质量浓度梯度, pH 设 5.0 ~ 5.4, 5.5 ~ 6.0, 6.1 ~ 6.4 3 个范围, 比较不同 6-BA, NAA 和蔗糖浓度及 pH 对罗汉果细胞生长的影响并确定其最适质量浓度。本实验选用  $L_9(3^4)$  因素水平表进行 4 因素 3 水平试验(表 1), 共设计安排 9 种组合考察最佳的培养条件。

表 1  $L_9(3^4)$  因素水平

水平	A 6-BA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	B NAA/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	C 蔗糖/%	D pH
1	0.2	0.02	2.0	5.0 ~ 5.4
2	0.6	0.06	3.0	5.5 ~ 6.0
3	1.0	0.10	4.0	6.1 ~ 6.4

**2.3 悬浮细胞生长量的测定** 自接种日起,每3天取5 mL细胞悬浮液,蒸馏水冲洗3次,真空抽滤后称量鲜重(FCW)。然后将所得细胞置于  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  烘箱中干燥至恒重后称量干重(DCW)。按文献方法计算细胞生长速率<sup>[7]</sup>。

**2.4 统计学方法** 所有计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 统计分析软件对细胞的生长量进行统计学分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 细胞的生长周期** 采用本实验设定的液体培养基条件和培养条件,经振荡悬浮培养后,以细胞干重和细胞鲜重为生长指标,可以看到2种不同生长指标的生长曲线基本一致,均呈“S”型,并明显的分为4个时期:延迟期、对数生长期、稳定期和衰亡期。0~6 d为延迟期,在延迟期培养物增重缓慢。7 d后进入对数生长期,在对数生长期(7~21 d)细胞分裂活跃,培养物增重迅速,在21 d时细胞生物量达到最大值,细胞生物量(鲜重)为  $693.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,干重为  $416.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。无稳定期,第22天很快就进入到衰亡期,生物量呈下降趋势。根据罗汉果细胞生长曲线,确定罗汉果细胞最佳的继代周期为21 d左右。结果如图1。

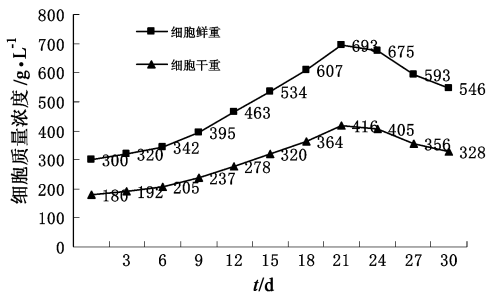


图 1 罗汉果悬浮培养细胞生长曲线

**3.2 细胞生长速率的动力学特征** 培养 0 ~ 6 d 时,细胞生长速率较低,生长速率在第 7 天进行快速生长,第 21 天达到高峰,最大生长速率为  $0.040 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ,从第 22 天开始生长速率开始急剧降低,说明细胞增长速度开始减慢,到第 30 天时,细胞增长速率达到负值,说明此时细胞开始负增长,细胞自溶和死亡。结果见图 2。

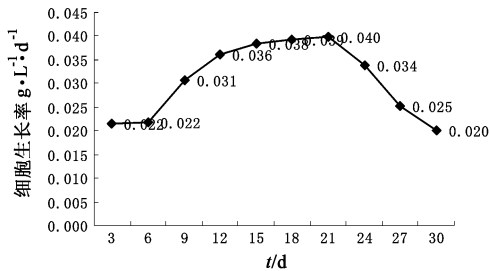


图 2 罗汉果悬浮培养细胞生长速率曲线

**3.3 单因素试验对细胞生长量的影响** 根据正交设计结果,在固定 3 个因素最佳水平条件下,考察另外一个因素水平对细胞生长量的影响。

在固定 NAA 质量浓度为  $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蔗糖质量分数为 4.0%, pH 5.5 ~ 6.0 3 个因素最佳水平条件下,对 6-BA 质量浓度水平进行了考察。结果表明,当 6-BA 质量浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,罗汉果悬浮培养细胞生长量达到最高值,细胞生物量(鲜重)为  $693.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此结果与正交设计的试验结果一致。结果见图 3。

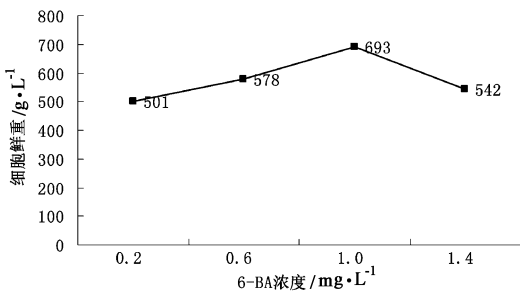


图 3 6-BA 浓度对罗汉果悬浮培养细胞生长量的影响

在固定 6-BA 质量浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蔗糖质量分数为 4%, pH 5.5 ~ 6.0 3 个因素最佳水平条件

下,对 NAA 质量浓度水平进行了考察。结果表明,当 NAA 质量浓度为  $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,罗汉果悬浮培养细胞生长量达到最高值,细胞生物量(鲜重)为  $693.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此结果与正交设计的试验结果一致。结果见图 4。

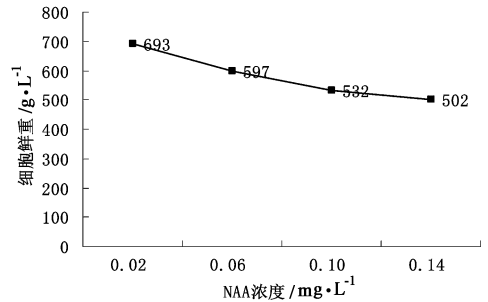


图 4 NAA 浓度对罗汉果悬浮培养细胞生长量的影响

在固定 6-BA 质量浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA 质量浓度为  $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 5.5 ~ 6.0 3 个因素最佳水平条件下,对蔗糖浓度水平进行了考察。结果表明,当蔗糖浓度为 4.0% 时,罗汉果悬浮培养细胞生长量达到最高值,细胞生物量(鲜重)为  $693.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此结果与正交设计的试验结果一致。结果见图 5。

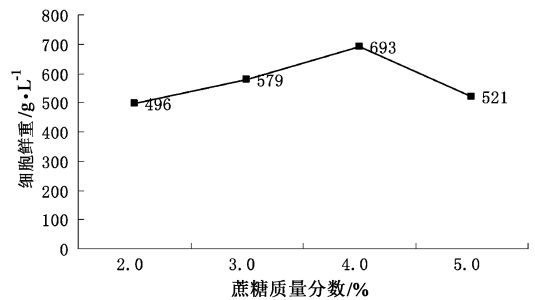


图 5 蔗糖浓度对罗汉果悬浮培养细胞生长量的影响

在固定 6-BA 质量浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA 质量为  $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、蔗糖浓度为 4.0% 3 个因素最佳水平条件下,对 pH 水平进行了考察。结果表明,当 pH 5.5 ~ 6.0 时,罗汉果悬浮培养细胞生长量达到最高值,细胞生物量(鲜重)为  $693.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此结果与正交设计的试验结果一致。结果如图 6。

**3.4 正交试验对细胞生长量的影响** 根据  $L_9(3^4)$  正交表进行试验,并对试验结果进行极差分析,确定影响细胞生长的主要因素和水平,每次试验接种量为  $300 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据正交试验结果可以看出,  $R_b > R_a > R_d > R_c$ ,即在考察的 4 个影响细胞生长的因素中, NAA 和 6-BA 的浓度是主要的影响因素,而 pH 和蔗糖浓度影响相对较小。最佳培养条件应为

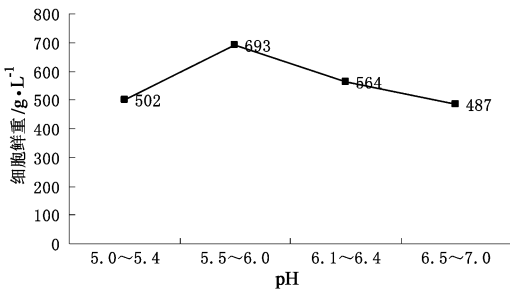


图6 pH对罗汉果悬浮培养细胞生长量的影响

$A_3B_1C_3D_2$ , 即液体培养基为  $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA + 蔗糖 4.0%, 培养基初始 pH 5.5 ~ 6.0。结果见表 2。

表2  $L_9(3^4)$  正交试验

No.	A 6-BA /mg·L <sup>-1</sup>	B NAA /mg·L <sup>-1</sup>	C 蔗糖 /g·L <sup>-1</sup>	D pH	FCW /g·L <sup>-1</sup>
1	1	1	1	1	570.0
2	1	2	2	2	510.0
3	1	3	3	3	543.0
4	2	1	2	3	493.0
5	2	2	3	1	420.0
6	2	3	1	2	450.0
7	3	1	3	2	693.0
8	3	2	1	3	580.0
9	3	3	2	1	390.0
$K_1$	1 623.0	1 756.0	1 600.0	1 380.0	
$K_2$	1 363.0	1 510.0	1 393.0	1 653.0	
$K_3$	1 663.0	1 383.0	1 656.0	1 616.0	
R	17 688.9	23 974.9	12 794.9	14 621.6	
优水平	$A_3$	$B_1$	$C_3$	$D_2$	

#### 4 讨论

植物激素在细胞悬浮培养中起着重要的作用,适当提高激素浓度有利于松脆型愈伤组织的获得<sup>[8]</sup>。罗汉果悬浮细胞在 6-BA 质量浓度为 0.2, 0.6, 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,生物量增加随着 6-BA 质量浓度的增加而增加,仅当 6-BA 质量浓度为 1.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , NAA 质量浓度为 0.10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时,生物量反而下降为 390.0  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本实验发现,6-BA 质量浓度固定时,NAA 质量浓度过高时,生物量增加值下降,表明过高的激素浓度组合可能会抑制悬浮培养的愈伤组织的生长。

糖类物质是植物组织培养和细胞培养中最常用的碳源和能源,蔗糖是植物细胞培养中较常用的一种碳源物质<sup>[9]</sup>。由于植物细胞的种类以及生长状

态各异,对碳源浓度需求存在差别。用蔗糖作碳源时,碳源的浓度对植物悬浮细胞的影响还体现在其通过调节渗透压而对植物细胞的生长状态起到一定的作用<sup>[10]</sup>。本研究在固定激素水平和 pH 范围的基础上,加入不同浓度的蔗糖,考察罗汉果黄悬浮细胞的生长情况,结果表明当蔗糖质量分数为 4.0% 时,有利于罗汉果悬浮细胞的生长。

综上所述,本实验确定了罗汉果细胞悬浮培养的生长周期为 21 d;NAA 质量浓度是影响罗汉果悬浮细胞生长的关键因素;罗汉果细胞生长的适宜条件为  $MS + 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  6-BA +  $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  NAA, 4.0% 蔗糖为碳源,初始培养基 pH 5.5 ~ 6.0。总之,通过组织培养方式可以成功建立罗汉果细胞悬浮培养体系,对罗汉果工业化生产具有一定的指导意义。同时要注意到影响细胞悬浮培养的因素较多,本研究只考查了部分影响因素,有关其他的多种影响因素,本课题组正在做进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] 中国药典.一部[S].2005:387.
- [2] 吴和珍,朱艳平,杨艳芳,等.罗汉果植株不同器官的抗氧化活性[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):176.
- [3] 曾祥林.广西特产植物罗汉果研究进展[J].广西医学,2009,31(8):1182.
- [4] 陈继丽,娄子强.罗汉果化学成分及其开发利用[J].热带农业科技,2008,31(3):25.
- [5] 卢曦,曾建红,申响宝,等.罗汉果悬浮培养细胞的生长和罗汉果甜苷积累的动力学研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(15):235.
- [6] 莫长明,白隆华,马小军,等.罗汉果组培苗繁育标准操作规程研究[J].时珍国医国药,2008,19(9):2092.
- [7] 李明军,李萍,赵喜亭,等.怀牛膝细胞悬浮培养及多糖含量变化的研究[J].西北植物学报,2008,28(3):494.
- [8] 谢从华,柳俊.植物细胞工程[M].北京:高等教育出版社,2004:79.
- [9] 魏琴,王丽,傅体华,等.油樟悬浮培养及次生代谢产物的诱导[J].植物学通报,2008,25(5):591.
- [10] 艾江宁,贾景明.高山红景天细胞悬浮培养生长和产物积累动力学[J].沈阳药科大学学报,2009,26(8):653.

[责任编辑 邹晓翠]