

# 人参悬浮细胞系的建立及生长特性研究

张 丹, 边 贞 贞, 杨 广 顺, 张 美 萍, 孙 春 玉, 王 义

(吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

**摘 要:**在建立人参悬浮细胞系的基础上,研究了碳源、氮源、磷源及植物生长调节物质对人参悬浮培养物的影响。结果表明:MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L NAA+0.4 mg/L BA 为最适培养基;接种量 10 g/100mL, 19℃, 100 r/min 转速条件下,人参悬浮细胞系生物量积累最大。

**关键词:**人参;愈伤组织;悬浮培养

**中图分类号:**S 567.5<sup>+</sup>1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)06-0099-04

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey.)为五加科人参属植物,是我国传统的名贵中药材,被誉为“药中之王”,具有大补元气、滋补强壮、安神益智等功能。但其生长缓慢,对自然环境要求严格,易受环境影响。近年来由于我国参地资源越来越少,利用人参的领域却逐渐增加,加之物价、人工费用的上涨,决定了人参价格的理性回升。而我国的人参产品,长期以来一直在以最初级的产品为主要形式出现在市场,落后的产品形态严重地限制了人参事业的发展。因此吉林省近年来大力实施“人参振兴工程”,采取一系列措施为人参应用打开大门,并且卫生部同意把吉林省作为人参“药食同源”的试点<sup>[1]</sup>。它不仅会拉长人参产业的新链条,而且具有巨大的市场潜力<sup>[2]</sup>。人参组织培养方法简便易行,短时间内可获得纯系和大量培养物,成为首选方法。

近年来我国对人参细胞悬浮培养研究较少,且培养技术仍不完善,更缺乏适合大规模悬浮培养的高产、稳定细胞株<sup>[3]</sup>。因此该试验在筛选出增长快速的愈伤组织无性系基础上,进一步建立稳定高产的人参细胞悬浮培养体系。以期为人参细胞培养规模的进一步扩大和实现工业化提供基础,为开发人参新药和药食同源新产品提供物质保证,并为加快人参产业转变及发展方式提供科技支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以 2 a 生人参根(吉林农业大学生命科学学院提供)为外植体,将其置于附加 2,4-D 和 BA 的 MS 培养基上

诱导出愈伤组织,经继代后用铁丝网进行液体静止培养,让愈伤组织得到从固体到液体培养的过渡缓冲,即过渡培养,选择生长及形态都较适合悬浮培养的材料。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 悬浮细胞生长量的测定** 用鲜重(FW)和干重(DW)增加计算法。鲜重为收获的悬浮细胞经 5 000 r/min 离心,用滤纸吸干剩余水分。干重为将鲜重材料置于 60℃ 以下烘干至恒重。鲜重增加量=收获鲜重/瓶-接种鲜重/瓶;干重增加量=收获干重/瓶-接种干重/瓶。

**1.2.2 悬浮细胞皂苷产量的测定** 采用索氏提取法提取皂苷,稍加修改<sup>[4]</sup>。香草醛比色法测定皂苷产量。

**1.2.3 悬浮培养过程中生长曲线和 pH 测定** 取经过过渡培养完的愈伤组织接到 3% 蔗糖浓度的液体 MS 培养基中进行悬浮培养,21℃, 100 r/min 条件下,每 3 d 取样测定干重及皂苷积累量,滤液测 pH, 3 次重复,确定培养周期。

**1.2.4 碳源对悬浮培养物的影响** 取蔗糖浓度为 2%、3%、4%、5% 的液体 MS 培养基,于 21℃, 100 r/min 条件下观察不同蔗糖浓度对悬浮培养物生长和皂苷积累量的影响, 3 次重复,确定碳源浓度。

**1.2.5 不同氮源对悬浮培养物的影响** 在蔗糖浓度为 3% 的无氮源液体 MS 培养基中,添加不同浓度的 KNO<sub>3</sub> 和 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 于 21℃, 100 r/min 条件下观察 KNO<sub>3</sub> 和 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 对悬浮培养物的生长和皂苷积累量的影响, 3 次重复取平均值,确定氮源。KNO<sub>3</sub> 和 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 的组合见表 1。

表 1 KNO<sub>3</sub> 和 NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 的组合 mg/L

No.	1	2	3	4
KNO <sub>3</sub>	0	1 900	1 900	0
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0	0	1 650	1 650

**1.2.6 磷酸盐对悬浮培养物的影响** 在蔗糖浓度为 3% 的无磷源液体 MS 培养基中添加 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的浓度为

**第一作者简介:**张丹(1986-),女,在读硕士,研究方向为植物分子生物学与基因工程。E-mail:mdjzd2620@126.com。

**责任作者:**王义(1964-),男,博士,教授,硕士生导师,研究方向为植物细胞工程。E-mail:wanglaoshi2007@tom.com。

**基金项目:**长春市科技计划资助项目(2008138)。

**收稿日期:**2011-12-26

0、85、170、340 mg/L,于21℃,100 r/min 条件下观察其对悬浮培养物生长和皂苷积累量的影响,3次重复,确定磷源浓度。

1.2.7 激素对悬浮培养物的影响 在蔗糖浓度为3%的液体MS培养基,21℃,100 r/min 条件下,选择2,4-D、NAA、BA 和 KT 为单因素试验因子进行初筛范围的确定。并在单因素优化试验的基础上,进行正交设计 $L_{16}(4^4)$ ,根据生长量和皂苷积累量2项指标来确定激素的最优组合。

1.2.8 摇床相关参数正交设计优化培养条件 在蔗糖浓度为3%的液体MS培养基,21℃,100 r/min 条件下,以接种量、装液量、摇床转速和温度4个参数进行正交设计 $L_{16}(4^4)$ ,根据生长量和皂苷积累量2项指标来优化培养条件。

## 2 结果与分析

### 2.1 人参愈伤组织诱导及过渡培养

诱导出的人参愈伤组织进行过渡培养后,得到生长旺盛、质地疏松、颜色较浅的愈伤组织进行下一步培养(图1)。

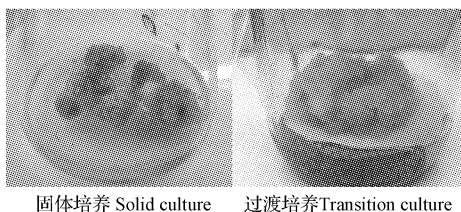


图1 不同培养方式对培养物的影响

Fig. 1 The effect of different culture way with culture

### 2.2 人参细胞悬浮系的建立及培养条件的优化

2.2.1 人参细胞的生长及皂苷积累曲线 由图2可知,人参悬浮细胞生长曲线基本为“S”型,第24天时鲜重增加达到最高为25.83 g,第27天时为25.33 g,之后开始下降。皂苷产量在21 d以后开始显著上升,30 d时产量达到最高值0.34 g/L。综上得出,最适培养周期为30 d。

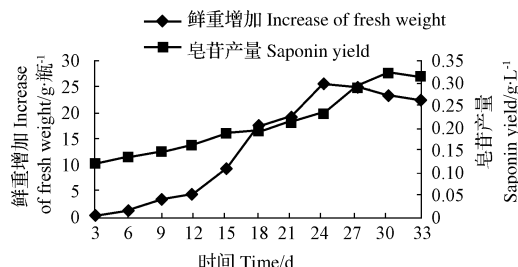


图2 人参悬浮细胞生长及皂苷积累曲线

Fig. 2 The growth curve and saponin synthesis of panax ginseng cell liquid culture

2.2.2 人参细胞培养过程中pH的变化 由图3可知,培养初期pH开始下降,到第12天达到最低4.2,随后培

养液的pH开始上升,到第24天,pH达到5.6,之后一直维持在5.2左右。

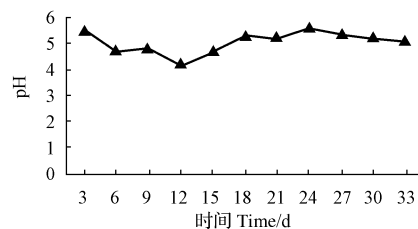


图3 培养过程pH的变化

Fig. 3 The change of pH during culture

2.2.3 不同碳源浓度对悬浮培养物的影响 由图4可知,在3%蔗糖浓度下达到最高,而后随着蔗糖浓度的进一步提高,细胞生长量和皂苷积累量均呈下降趋势。

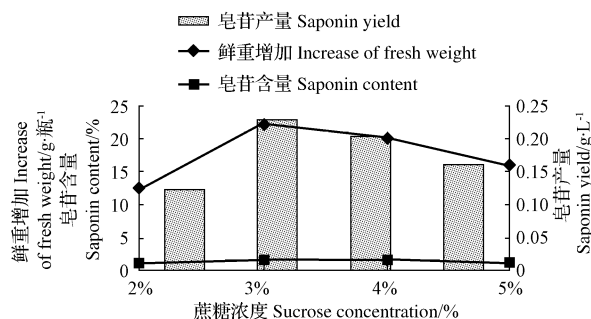


图4 不同蔗糖浓度对悬浮培养物的影响

Fig. 4 The effect of different sucrose concentration on suspension cell

2.2.4 不同氮源及浓度对悬浮培养物的影响 由图5可知, $\text{NH}_4^+$ 和 $\text{NO}_3^-$ 二者配合使用。鲜重增加量和皂苷积累量都较高,因此在皂苷合成中所需氮的形式不是单一的,既需要硝态氮也需要氨态氮,只有二者相互配合才能达到最佳效果。

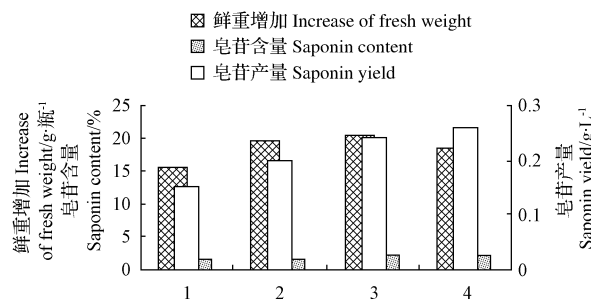


图5 不同氮源及浓度对悬浮培养物的影响

Fig. 5 The effect of different nitrogen source and consistence on suspension cell

2.2.5 不同磷酸盐浓度对悬浮培养物的影响 由图6可知,当磷酸盐浓度为0 mg/L时,鲜重几乎未增加,皂苷含量也很低,随磷酸盐浓度的增加鲜重与皂苷积累量也增加,当浓度为170 mg/L时,达到最高,随后又有所下降。因此该试验得出,磷酸盐浓度为170 mg/L时较为适合人参细胞的培养。

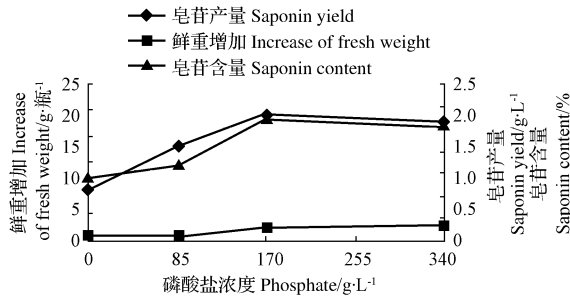


图6 不同起始磷酸盐浓度对培养物的影响

Fig. 6 The effect of different in initial phosphate concentration on suspension cell

2.2.6 激素对悬浮培养物的影响 经激素优化培养筛选出4种激素的培养浓度范围,分别为:2,4-D 1.0~4.0 mg/L;NAA 0.5~2.0 mg/L;KT 0.2~0.6 mg/L;BA 0.2~0.6 mg/L,在此基础上进行正交实验。由表2可知,A和C的极差较高,是鲜重及皂苷产量增加的关键性因子,而B、D影响较小。对于鲜重及皂苷增加量的影响效果均依次为2,4-D>NAA>BA>KT。水平与组合选优:以试验因子的总计数为依据,得出以鲜重为指标的最佳激素配比:2,4-D 3.0 mg/L、BA 0.2 mg/L、NAA 2.0 mg/L、KT 0.4 mg/L;以皂苷产量为指标的最佳激素配比为:2,4-D 2.0 mg/L、BA 0.4 mg/L、NAA 2.0 mg/L、KT 0 mg/L。

表2 激素优化正交实验方案与结果

Table 2 Orthogonal design test plan and result

No.	A (2,4-D) /mg · L <sup>-1</sup>	B (BA) /mg · L <sup>-1</sup>	C (NAA) /mg · L <sup>-1</sup>	D (KT) /mg · L <sup>-1</sup>	鲜重增加 Increase of fresh weight/g · 瓶 <sup>-1</sup>	皂苷产量 Saponin yield /g · L <sup>-1</sup>
1	1(1.0)	1(0)	1(0.5)	1(0)	19.83	0.183
2	1(1.0)	2(0.2)	2(1.0)	2(0.2)	21.37	0.203
3	1(1.0)	3(0.4)	3(1.5)	3(0.4)	19.87	0.211
4	1(1.0)	4(0.6)	4(2.0)	4(0.6)	21.89	0.215
5	2(2.0)	1(0)	2(1.0)	3(0.4)	22.32	0.268
6	2(2.0)	2(0.2)	1(0.5)	4(0.6)	20.73	0.257
7	2(2.0)	3(0.4)	4(2.0)	1(0)	21.75	0.318
8	2(2.0)	4(0.6)	3(1.5)	2(0.2)	20.37	0.279
9	3(3.0)	1(0)	3(1.5)	4(0.6)	25.66	0.197
10	3(3.0)	2(0.2)	4(2.0)	3(0.4)	28.15	0.202
11	3(3.0)	3(0.4)	1(0.5)	2(0.2)	23.78	0.199
12	3(3.0)	4(0.6)	2(1.0)	1(0)	27.61	0.189
13	4(4.0)	1(0)	4(2.0)	2(0.2)	20.67	0.213
14	4(4.0)	2(0.2)	3(1.5)	1(0)	21.33	0.208
15	4(4.0)	3(0.4)	2(1.0)	4(0.6)	19.78	0.235
16	4(4.0)	4(0.6)	1(0.5)	3(0.4)	18.78	0.187
K1	82.96	88.48	83.12	90.52		
K2	85.53	91.58	89.13	86.55		
K3	105.20	85.18	89.54	89.12		
K4	80.56	89.01	92.46	88.06		
k1	0.812	0.861	0.826	0.898		
k2	1.122	0.870	0.903	0.894		
k3	0.787	0.963	0.887	0.868		
k4	0.843	0.870	0.948	0.904		
R1	24.64	6.40	9.34	4.33		
R2	0.335	0.102	0.122	0.036		

2.2.7 摇床相关参数对悬浮培养物的影响 由表3可知,A和B的极差较高,是影响悬浮细胞鲜重及皂苷产量增加的关键性因子,其次是因素C和D,影响较小。对于鲜重及皂苷增加量的影响效果均依次为接种量>装液量>摇床转速>温度。水平与组合选优:以各试验因子的总计数为依据,得出以鲜重增加量为指标的摇床相关参数的最佳培养条件为:接种量为10 g/瓶、装液量为100 mL、摇床转速为80 r/min、温度为21℃。以皂苷产量为指标的最佳培养条件为:接种量为10 g/瓶、装液量为120 mL、摇床转速为100 r/min、温度为19℃。

表3 培养条件正交实验方案与结果

Table 3 Orthogonal design test plan and result

No.	A 接种量 Inoculation amount/g · 瓶 <sup>-1</sup>	B 装液量 Liquid amount /mL	C 摇床转速 Rotate-speed /r · min <sup>-1</sup>	D 温度 Temperature /℃	鲜重增加 Increase of fresh weight/g · 瓶 <sup>-1</sup>	皂苷产量 Saponin yield /g · L <sup>-1</sup>
1	1(1)	1(60)	1(80)	1(19)	19.65	0.201
2	1(1)	2(80)	2(100)	2(21)	20.73	0.215
3	1(1)	3(100)	3(120)	3(23)	22.39	0.221
4	1(1)	4(120)	4(140)	4(25)	20.66	0.232
5	2(5)	1(60)	2(100)	3(23)	19.66	0.216
6	2(5)	2(80)	1(80)	4(25)	20.51	0.193
7	2(5)	3(100)	4(140)	1(19)	21.19	0.205
8	2(5)	4(120)	3(120)	2(21)	21.55	0.237
9	3(10)	1(60)	3(120)	4(25)	25.22	0.272
10	3(10)	2(80)	4(140)	3(23)	27.61	0.257
11	3(10)	3(100)	1(80)	2(21)	28.65	0.269
12	3(10)	4(120)	2(100)	1(19)	25.77	0.311
13	4(15)	1(60)	4(140)	2(21)	20.37	0.218
14	4(15)	2(80)	3(120)	1(19)	20.11	0.213
15	4(15)	3(100)	2(100)	4(25)	21.09	0.232
16	4(15)	4(120)	1(80)	3(23)	21.12	0.226
K1	83.43	84.90	89.93	86.72		
K2	82.91	88.96	86.70	91.30		
K3	107.25	93.32	89.82	90.78		
K4	82.69	89.10	89.83	87.48		
k1	0.869	0.907	0.889	0.930		
k2	0.851	0.878	0.935	0.939		
k3	1.109	0.927	0.982	0.920		
k4	0.899	1.006	0.912	0.929		
R	24.56	8.42	3.23	4.58		
r	0.258	0.128	0.093	0.019		

### 3 结论与讨论

在该试验中,新诱导出的人参愈伤组织质地较硬,不适合悬浮培养,先经过渡培养,让愈伤组织得到从固体到液体的过渡缓冲,试验证明,这种过渡培养有利于悬浮系的驯化。在碳、氮、磷源方面,蔗糖浓度3%时培养物生长状况最佳,超过此浓度则受到抑制,这与Akalezi等<sup>[5]</sup>的研究基本相符。这可能是因为低糖浓度下,细胞生长随糖的耗尽而停止;而在高糖浓度中,由于高渗透压环境使得细胞对培养基中其它营养成分的吸收有一定抑制作用。氮源是细胞生长的重要营养物质,适量的氮源可以促进细胞生长和代谢产物的合成。该试验

结果表明,单独使用  $\text{NO}_3^-$  有利于鲜重的增加,但不利于人参皂苷的积累,只有加入适量的  $\text{NH}_4^+$  才能获得较高的皂苷含量。因此认为,皂苷的合成所需氮的形式不是单一的,既需要硝态氮也需要氨态氮,只有二者配合且比例适中才能达最佳效果。而磷酸盐对细胞的生长影响较大,这可能是因为磷是细胞膜和核酸的重要组成部分,缺少磷细胞的分裂和增殖都很难发生,而磷盐过多又会对生物量和皂苷的积累产生抑制效应。该试验进一步证实了人参细胞悬浮培养和发酵培养可以用 pH 作为培养进程的间接指标,这是因为在培养液中 pH 趋于稳定时,细胞的生长量与皂苷积累量都将趋于最大值,此结果为工业化生产提供一定的基础数据。另外由于不同浓度的植物生长调节物质对细胞分裂和生长的启动机制和能力是不同的,该试验进行了生长调节物质的初筛,所得结果与唐巍等<sup>[6]</sup>测得的单一激素对人参细胞基质的优化得到的结果相一致。并在此基础上对其进行了正交实验分析,结果表明,2,4-D 对悬浮细胞的生长和皂苷积累的影响最大;BA 和 NAA 对培养物的生长也明显提高;而无论是以鲜重增加还是皂苷产量为指标测得的结果中,KT 对培养物都没有较高增长。考虑到人参细胞悬浮培养的目的在于增加皂苷产量,并且以降低成本为原则,得出悬浮细胞培养的最适激素组合为:2,4-D 2.0 mg/L、BA 0.4 mg/L、NAA 2.0 mg/L。

在摇床参数方面,该试验选取了接种量、装液量、摇床转速和温度 4 个因素。结果表明,接种量的影响最大,李弘剑等<sup>[7]</sup>认为这可能与细胞建立内源水平的时间长短有关。但接种量过多会造成营养物质的传递受阻,

培养基里的营养供不应求,同样对细胞生长不利。其次是装液量,无论是以鲜重增加量还是皂苷产量为指标,都具有较好的增加;而摇床转速和培养温度在该试验范围内产生的影响较小。考虑到人参细胞悬浮培养的目的在于增加皂苷产量,而且就工业化生产来讲,节约成本又是工业化生产的必备前提条件,得出悬浮细胞培养的最适培养条件为:接种量为 10 g/瓶、装液量为 100 mL、摇床转速为 100 r/min、温度为 19℃。

该试验利用人参细胞悬浮培养技术生产大量人参细胞及其药用活性成分,为人参细胞的大规模工业化生产及有效成分的大规模提取提供了理论和现实基础。但对于人参组织细胞的皂苷工业化生产以及新药研究方面还需进一步的探索,相信在不远的将来必定会有一个大的飞跃。

### 参考文献

- [1] 赵锐,金慧. 吉林人参产业发展战略浅论[J]. 人参研究,2009(4):2-4.
- [2] 李向高. 人参产业的创新战略[J]. 吉林农业大学学报,2002,24(5):1-5.
- [3] 李晓蕙,陈蕾. 植物细胞培养技术的发展与应用[J]. 安徽农学通报,2006,12(5):74-75.
- [4] 李闯,王义,张美萍,等. 人参不同部位皂苷成分的 HPLC 测定[J]. 吉林中医药,2010,30(4):347-348.
- [5] Akalizi C O, Liu S, Li Q S, et al. Combined effects of initial sucrose concentration and inoculum size on cell growth and ginseng saponin production by suspension cultures of *Panax ginseng* [J]. Process Biochem,1999,34(6-7):639-642.
- [6] 唐巍,吴绛云. 人参悬浮细胞系的建立及其生长特性的研究[J]. 生物技术,1996(1):26-29.
- [7] 李弘剑,张毅,郭勇. 生物量对黄花蒿悬浮培养细胞生长的影响[J]. 暨南大学学报,1997,18(5):93-96.

## Studies on Establishment and Characterization of Suspension Cells in *Panax ginseng*

ZHANG Dan, BIAN Zhen-zhen, YANG Guang-shun, ZHANG Mei-ping, SUN Chun-yu, WANG Yi  
(College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118)

**Abstract:** The experimental was established on the basis of the *Panax ginseng* suspension cells. The culture conditions of carbon source, nitrogen source, phosphate and different growth regulars were researched. The results showed that the optimal medium for suspension culture was: MS+2.0 mg/L 2,4-D+2.0 mg/L NAA+0.4 mg/L BA. On the basis of inoculation was 10 g/100 mL, culture temperature was 19℃ and rotation ratio was 100 r/min, the biomass accumulation of the *Panax ginseng* suspension cells was the largest.

**Key words:** *Panax ginseng*; callus; suspension culture