

邓志勇, 曲芬霞, 陈春岚, 等. 响应面法优化鸡血藤悬浮细胞产异黄酮的研究[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 50–53.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.013

响应面法优化鸡血藤悬浮细胞产异黄酮的研究

邓志勇, 曲芬霞, 陈春岚, 陈兵兵, 陈兴田, 吴桂容

(贺州学院化学与生物工程学院, 广西贺州 542800)

摘要:分别通过单因素试验和 Box-Behnken 中心组合试验来优化鸡血藤悬浮细胞产异黄酮的培养基组成和培养条件。响应面法分析指出最佳工艺条件为蔗糖 39.3 g/L, 水解酪蛋白 3.95 g/L, 培养温度 22.7 °C。在此优选工艺下, 鸡血藤悬浮细胞干质量和总异黄酮含量平均值分别为 11.65 g/L 和 5.34 mg/L。总异黄酮含量与预测值 5.41 mg/L 相差比例仅为 2.65%, 说明该模型准确有效。响应面法优化大幅度地提高了鸡血藤悬浮细胞产异黄酮含量, 为鸡血藤异黄酮的深入开发提供了技术基础。

关键词:鸡血藤; 悬浮细胞; 异黄酮; Box-Behnken 中心组合试验; 响应面

中图分类号:R284.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)04-0050-03

鸡血藤是豆科植物密花豆(*Spatholobus suberectus* Dunn.) 的干燥藤茎, 主产广西, 广东、云南也有分布。鸡血藤是补血、活血的传统大宗中药材, 具有促进造血功能、抗炎、抗氧化、免疫调节、镇静催眠等药理作用^[1]。此外, 现代医学研究还发现鸡血藤具有广谱的抗肿瘤和抗病毒活性^[2-3]。药理学研究表明, 鸡血藤药理作用的关键活性成分是异黄酮类化合物, 主要包括大豆黄酮、染料木素、刺芒柄花素和美皂异黄酮这 4 种主要的异黄酮活性成分^[1,4]。中药材植物细胞的悬浮培养可以生产异黄酮, 如怀槐^[5]、野葛^[6]、大豆^[7]等, 但目前尚未有关于鸡血藤悬浮细胞产异黄酮的报道。近年来, 鸡血藤野生资源面临枯竭, 供需矛盾尖锐, 因此开展悬浮细胞产鸡血藤活性成分的研究具有重要意义。本研究采用响应面法优化鸡血藤悬浮细胞的培养基成分, 提高异黄酮活性成分的产量, 为对鸡血藤药效的深入开发提供基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为鸡血藤愈伤组织, 取自鸡血藤嫩叶部位, 通过添加 1.0 mg/L 6-BA (6-苄基氨基嘌呤)、0.5 mg/L NAA (α -萘乙酸)、30 g/L 蔗糖、0.1 g/L 维生素 C 以 MS 培养基诱导愈伤组织^[8]。愈伤组织在(25±1) °C、暗环境下培养, 每 15 d 继代 1 次。愈伤组织经过传代筛选获得浅黄色、疏松颗粒状的愈伤组织培养系, 准备接种。

1.2 细胞悬浮培养条件

将上述愈伤组织(约为 5 g 鲜质量/瓶)接入液体 MS 培养基, 其中添加 0.5 mg/L NAA、1.0 mg/L 6-BA、30 g/L 蔗

糖、0.1 g/L、3 g/L 水解酪蛋白。细胞置于含 100 mL 培养基的 300 mL 三角烧瓶中进行培养, 于(25±1) °C 暗环境下以 100 r/min 的速度摇瓶悬浮培养 12 d, 每组试验设置 3 个重复。

1.3 试验设计

1.3.1 单因素试验设计 在单因素试验设计中, 在初始培养基(碳源: 蔗糖 30 g/L; 氮源: 水解酪蛋白 3 g/L; 培养温度 25 °C) 的基础上分别对碳源种类和浓度、氮源浓度和培养温度进行优化。试验依次进行, 后续试验均应用前面试验得出的最优结果。

碳源:使用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖及可溶性淀粉作为单独碳源, 维持起始浓度均为 30 g/L, 考察不同来源碳源对发酵后细胞干质量及总异黄酮合成量的影响。在此基础上采用蔗糖为基础碳源, 测试 10、20、30、40、50、60 g/L 起始条件下对发酵后干细胞总质量与总异黄酮合成量的影响。

氮源:调节 MS 培养基中的水解酪蛋白浓度分别为 0.5、1、2、3、4、5 g/L, 经过 12 d 封瓶批次发酵后测量总细胞干质量以及总异黄酮的合成量。

培养温度:分别采用 10、15、20、25、30、35 °C 条件培养鸡血藤悬浮细胞, 考察最终发酵细胞总干质量及总异黄酮的合成量变化。

1.3.2 Box-Behnken 中心组合试验设计 在单因素试验的基础上, 对蔗糖、水解酪蛋白、培养温度进行 Box-Behnken 中心组合试验设计。

1.4 细胞生长和异黄酮含量测定

发酵 12 d 后, 收集鸡血藤细胞培养物, 60 °C 下干燥至恒质量, 细胞生物量为 1 L 培养基收获的细胞干质量(g/L)。将细胞充分研磨后于 95% 乙醇冷浸 24 h, 超声波处理 30 min, 过滤。提取 3 次, 合并滤液, 40 °C 下减压浓缩, 100 mL 乙酸乙酯: 水(体积比 5:1) 混合溶液萃取 3 次。而细胞过滤发酵液经低温冷冻浓缩后直接通过乙酸乙酯萃取抽提。

合并乙酸乙酯抽提液, 于 40 °C 下减压蒸馏。甲醇溶解定容至 5 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后 HPLC 定量分析。色谱条件: Agilent1100 高效液相色谱仪, 色谱柱: Purospher Star

收稿日期: 2015-09-14

基金项目: 广西自然科学基金(编号: 2012GXNSFBA053055)。

作者简介: 邓志勇(1978—), 男, 广西临桂人, 硕士, 讲师, 主要从事植物源农药、农产品开发与利用的研究。Tel: (0774) 5271906; E-mail: dengzhiyong05@163.com。

通信作者: 吴桂容, 博士, 教授, 主要从事植物生理及生态研究。Tel: (0774) 5278661; E-mail: hzwgr510@163.com。

C₁₈柱(4.6 mm i. d. ×250 mm, 5 μm),流动相为甲醇:水:乙酸(体积比 10:10:1)溶液,柱温 25 ℃,进样体积 20 μL,流速 1.0 mL/min,检测波长 260 nm。以外标法计算异黄酮含量,单体标准品分别是大豆黄酮、染料木素、刺芒柄花素和皂苷黄酮(购自 Sigma 公司,纯度为 98%)。总异黄酮含量为细胞内及发酵液上清中异黄酮含量之和,以 1 L 培养液内 4 种异黄酮的总量表示(mg/L)。

1.5 统计分析

试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示($n=3$)。使用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析和多重比较分析(LSD),使用 Design Expert 8.0.6 进行 Box - Behnken 中心组合试验设计和数据回归分析。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

培养基成分和培养温度对鸡血藤悬浮细胞产异黄酮的影响见图 1。碳源和氮源是培养基的主要成分,也是产物产量最重要的限制因子^[9]。在 4 种碳源(浓度均为 30 g/L)中,蔗糖最有利于鸡血藤悬浮细胞培养,细胞干质量和总异黄酮含量均显著高于其他碳源($P<0.05$),优选蔗糖作为碳源(图

1 - A)。在蔗糖浓度的单因素试验中,随着蔗糖浓度的增加,鸡血藤悬浮细胞细胞干质量和总异黄酮含量也随之增加,在蔗糖浓度 40 g/L 时达到最高值,分别为(10.97 ± 0.75) g/L 和 (4.95 ± 0.42) mg/L,继续增加蔗糖浓度细胞干质量和总异黄酮含量不再增加(图 1 - B)。因此,选择 40 g/L 蔗糖作为鸡血藤悬浮细胞培养的碳源。

在氮源的单因素试验中,也发现与蔗糖浓度类似的趋势。水解酪蛋白(氮源)的浓度为 4 g/L 时,鸡血藤悬浮细胞干质量和总异黄酮含量均达到最大,分别为(9.75 ± 0.68) g/L 和 5.05 ± 0.45 mg/L,因此选择 4 g/L 水解酪蛋白作为鸡血藤悬浮细胞培养的氮源(图 1 - C)。

此外,在植物细胞的培养中,培养温度是重要的条件限定因子^[10]。随着培养温度的升高,鸡血藤悬浮细胞干质量和总异黄酮含量增加(图 1 - D)。当温度为 20 ℃时细胞干质量最高(11.95 ± 0.78) g/L,温度为 25 ℃时总异黄酮含量最高(5.05 ± 0.45) mg/L,而温度继续上升总异黄酮含量大幅下降。综合考虑细胞干质量与总异黄酮含量,选择培养温度为 25 ℃以获得最大的异黄酮产量。

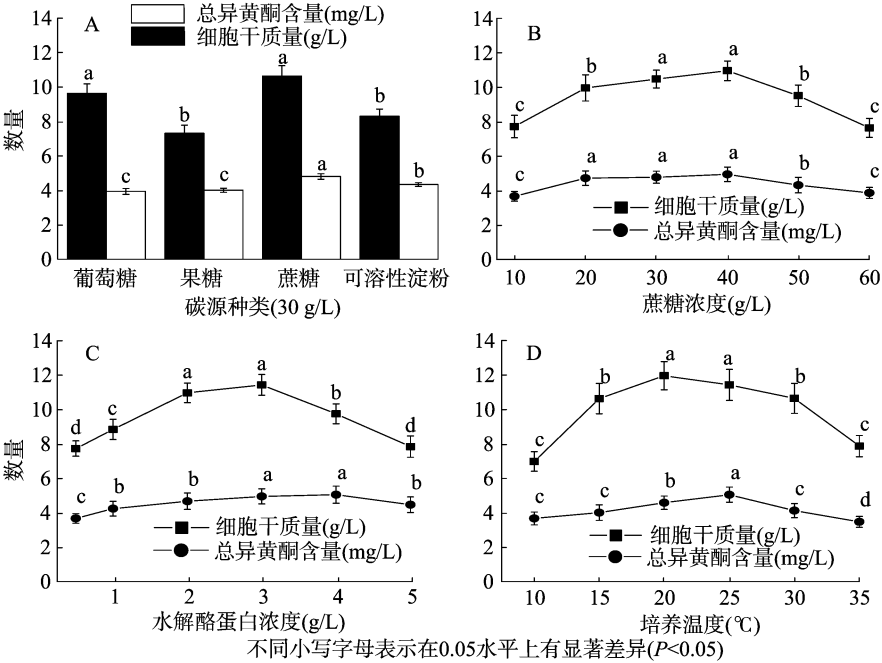


图1 培养基成分和培养温度对鸡血藤悬浮细胞产异黄酮的影响

2.2 Box - Behnken 中心组合试验

根据单因素试验结果,以总异黄酮含量(Y)为量化指标,选取蔗糖(A)、水解酪蛋白(B)、培养温度(C)进行 Box - Behnken 中心组合试验设计,每个因素的低、中、高试验水平分别以 -1、0、1 进行编码,中心组合因素水平见表 1。Box - Behnken 中心组合设计试验方案和试验结果见表 2。

表 1 Box - Behnken 中心组合因素水平

水平	A:蔗糖 (g/L)	B:水解酪蛋白 (g/L)	C:培养温度 (℃)
-1	35.0	3.5	22.5
0	40	4	25
1	45.0	4.5	27.5

对响应值进行多元二次回归拟合分析,得到以下回归预测模型:总异黄酮含量 $Y = 5.09 + 0.08A + 0.11B - 0.19C + 0.12AB + 0.30AC + 0.29BC - 0.25A^2 - 1.21B^2 + 0.032C^2$ 。对回归模型拟合度及其显著性进行检测,结果见表 3。其中回归方程 $P < 0.001$,达到极显著水平。模型的确定系数为 0.970 3,经调整后为 0.936 8,表明仅有 7% 的总异黄酮含量变异不能用该模型拟合,而拟合方程残差图基本为一条直线,说明此回归模型能极好地对试验结果进行拟合。

2.3 响应面图分析

响应面图分析可以直观地显示优化区域以及各因素对产量的影响^[10],根据回归方程得到的响应面图见图 2。比较 3 个响应面图可知,培养基碳源和氮源交互效应对总异黄酮含

表 2 Box - Behnken 中心组合设计方案和试验结果

试验编号	A	B	C	Y (mg/L)
1	-1	-1	0	5.07
2	1	-1	0	5.10
3	-1	1	0	4.03
4	1	1	0	4.00
5	-1	0	-1	2.47
6	1	0	-1	5.08
7	-1	0	1	3.52
8	1	0	1	3.86
9	0	-1	-1	5.01
10	0	1	-1	4.98
11	0	-1	1	5.05
12	0	1	1	5.10
13	0	0	0	3.04
14	0	0	0	5.15
15	0	0	0	4.41
16	0	0	0	3.45
17	0	0	0	5.14

表 3 Box - Behnken 回归模型显著性检测结果

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
模型	7.820	9	0.870	17.18	0.000 9 ***
A:蔗糖	0.047	1	0.047	0.39	0.045 3
B:酪蛋白	0.100	1	0.100	2.82	0.024 2
C:培养温度	0.290	1	0.290	1.43	0.163 2
AB	0.057	1	0.057	0.47	0.513 2
AC	0.360	1	0.360	3.00	0.127 0
BC	0.340	1	0.340	2.81	0.137 7
A ²	0.260	1	0.260	2.13	0.187 6
B ²	6.160	1	6.160	50.89	0.000 2
C ²	<0.000 1	1	<0.000 1	0.037	0.853 9
残差	0.850	7	0.120		
失拟项	0.840	3	0.280	398.46	<0.000 1
纯误差	<0.000 1	4	<0.000 1		
所有项	8.670	16			

量的影响较大,表现为交叉响应面图中曲面较陡峭;培养温度和碳源交互效应影响较小,表现为交叉响应面图中曲面较平滑;培养温度和碳源的交互效应居中。此结果与回归方程得

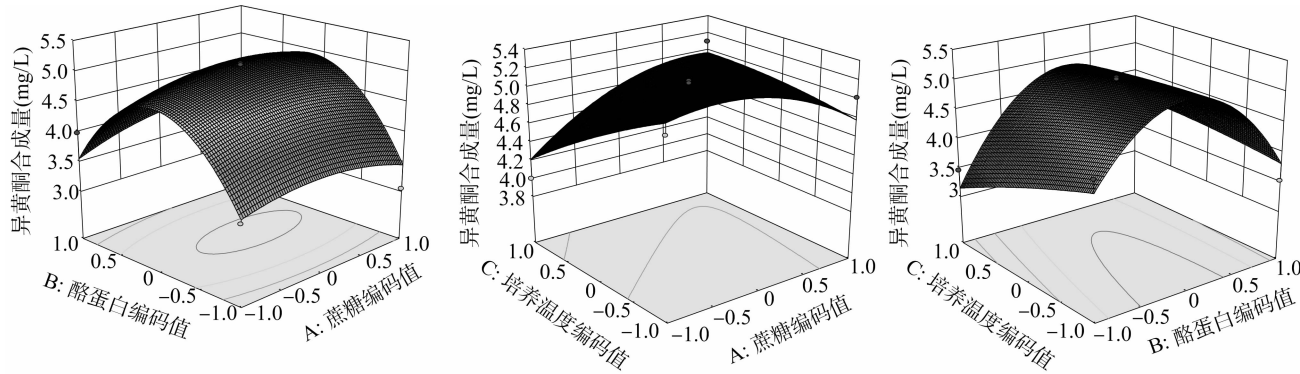


图2 蔗糖(A)、水解酪蛋白(B)、培养温度(C)与总黄酮含量的响应面

到的结果是一致的,3 个因素的 F 值大小依次为水解酪蛋白(B) > 培养温度(C) > 蔗糖(A)。可见,培养基中最主要限制因子的是氮源(酪蛋白)的含量,而培养温度对鸡血藤细胞干质量和总异黄酮含量也有较大影响。

2.4 最佳工艺条件预测和试验验证

通过上述回归模型求偏导,得出培养基成分和培养温度的最佳工艺条件为蔗糖 39.3 g/L,水解酪蛋白 3.95 g/L,培养温度 22.7 ℃。在此工艺条件下培养 5 批,鸡血藤悬浮细胞干质量和总异黄酮含量平均值分别为 11.65 g/L 和 5.34 mg/L。总异黄酮含量与预测值 5.41 mg/L 相差比例仅为 2.65%,说明该模型准确有效,能反映试验实际情况。

3 结论与讨论

分别通过单因素试验和 Box - Behnken 中心组合试验来优化鸡血藤悬浮细胞产异黄酮的培养基组成和培养条件。单因素试验结果指出碳源优选为蔗糖,培养基配方为蔗糖 40 g/L,水解酪蛋白 4 g/L,培养温度 25 ℃。进一步进行 Box - Behnken 中心组合试验,结果指出最佳工艺条件为蔗糖 39.3 g/L,水解酪蛋白 3.95 g/L,培养温度 22.7 ℃。验证试

验中,此优选工艺下鸡血藤悬浮细胞干质量和总异黄酮含量平均值分别为 11.65 g/L 和 5.34 mg/L。总异黄酮含量与预测值 5.41 mg/L 相差比例仅为 2.65%,说明该模型准确有效,能反映实际试验情况。响应面法优化后,鸡血藤悬浮细胞产异黄酮比初始培养条件提高了 12.31%。响应面法优化大幅度提高了鸡血藤悬浮细胞产异黄酮含量,为鸡血藤异黄酮的深入开发提供了技术基础。

参考文献:

[1]符影,程悦,陈建萍,等. 鸡血藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 中草药,2011,42(6):1229-1234.
[2]程悦,符影,王志宇,等. 鸡血藤提取物中缩合鞣质的含量测定及其抗肿瘤活性初步研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2011,50(2):75-80.
[3]曾凡力,程悦,陈建萍,等. 鸡血藤醇提物体外抗病毒活性研究[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(1):16-20.
[4]丁平,仰铁锤,林振坤,等. 鸡血藤化学成分的指纹图谱研究[J]. 华西药学杂志,2010,25(4):461-463.
[5]罗建平,曹磊,潘利华,等. 稀土元素对怀槐悬浮培养细胞异黄酮合成及氧化还原态的影响[J]. 应用与环境生物学报,2008,14

姜上川,梅超,王小芳,等. PPR 蛋白 APPR6 参与 ABA 调控拟南芥种子萌发与幼苗生长[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):53-57.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.014

PPR 蛋白 APPR6 参与 ABA 调控拟南芥种子萌发与幼苗生长

姜上川,梅超,王小芳,张大鹏

(清华大学生命科学学院,北京 100084)

摘要:植物激素脱落酸(ABA)参与调控植物生长发育各个阶段,并在植物对多种胁迫的抗逆反应中起着重要作用。PPR 基因家族是拟南芥最大的基因家族之一,PPR 蛋白在调控植物生长发育与响应逆境胁迫过程中发挥重要作用,然而参与 ABA 信号转导的线粒体 PPR 蛋白仍有待进一步研究。本研究发现拟南芥线粒体 PPR 蛋白 APPR6 的 2 个 T-DNA 插入突变体在萌发与萌发后幼苗早期生长过程中对外源 ABA 超敏,报道 APPR6 参与 ABA 信号转导为进一步阐明线粒体 PPR 蛋白的作用机制以及复杂的 ABA 信号网络提供了新的信息。

关键词:脱落酸(ABA);APPR6;PPR 蛋白;种子萌发;幼苗生长;拟南芥

中图分类号: Q945.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0053-05

PPR (pentatricopeptide repeats) 蛋白是拟南芥中最大的细胞核编码的蛋白家族之一,最早在拟南芥基因组序列中发现^[1]。在拟南芥中约有 450 个 PPR 蛋白,其他陆生植物基因组序列中可编码更多^[2-3],并且来自不同种属的 PPR 蛋白具有高度同源性。PPR 蛋白的主要结构特征是以 35 个氨基酸为重复单位连续排列,串联重复可达到 30 次^[2]。PPR 蛋白在细胞内主要分布在线粒体与叶绿体中,在线粒体和叶绿体等细胞器 RNA 代谢过程中起着重要作用^[3],包括 RNA 剪接^[4-6]、稳定^[7]、编辑^[8-11]、加工^[12]以及蛋白质翻译起始和核糖体组装等^[13]。大量研究表明,PPR 具有直接结合 RNA 功能,通过 PPR 基序形成的螺旋结构直接结合 RNA,或与其辅助因子共同结合 RNA^[2-3]。近年来结构生物学研究为进一步阐明 PPR 蛋白的识别机理与识别密码奠定基础^[14]。

脱落酸(ABA)是植物体内最重要的激素之一,参与调控植物生长发育各个阶段,并在植物应对干旱、渗透、盐、低温等

非生物胁迫以及病虫害等生物胁迫的响应中起着重要作用^[15-16]。定位在线粒体或叶绿体的 PPR 蛋白在调控植物生长发育与逆境胁迫响应的过程中发挥重要作用^[2-3]。有的 PPR 蛋白还与雄性胞质不育有密切联系^[17-18]。目前人们在拟南芥中已经发现几个线粒体定位的 PPR 蛋白参与了 ABA 信号转导过程,包括 ABO5^[4]、SLO2^[9]、SLG1^[10]、AHG11^[11]、PPR40^[19]与 PCN^[20]等,这几种 PPR 蛋白通过调控线粒体中活性氧(ROS)的变化参与 ABA 信号转导过程。然而在拟南芥庞大的 PPR 蛋白家族中,仍有更多可能参与 ABA 信号转导的线粒体 PPR 蛋白有待鉴定。

最近研究发现拟南芥线粒体 PPR 蛋白 APPR6 参与调控胚胎发育过程^[21]。APPR6 (Atlg77360)的 3 个 T-DNA 插入突变体 SALK_045714 (appr6-1)、SALK_091917 (appr6-2)和 SALK_061950 (appr6-3)的杂合体中,仅 3/4 的种子能够萌发并且没有纯合体植株;另外 1/4 纯合体种子在发育的角果中颜色透明、胚胎发育迟缓,成熟后干种子体积小、皱缩,在土中不能直接萌发,而在含有蔗糖的 MS 培养基上表现为生长发育严重滞后、植株矮小等^[21]。然而对于 APPR6 在拟南芥中的其他功能仍有待研究。

本研究通过鉴定 APPR6 另外 2 个 T-DNA 插入突变体 SALK_078430 (appr6-4)与 SALK_005601 (appr6-5)在种子萌发与萌发后幼苗早期生长过程中对 ABA 的响应,发现 APPR6 参与 ABA 信号转导,为进一步阐明线粒体 PPR 蛋白的作用机制以及 ABA 信号网络奠定基础。

(3):362-365.

[6]方从兵,李贺勤,宛晓春,等. 不同理化因子对野葛悬浮培养细胞生长及异黄酮合成的影响[J]. 中国中药杂志,2006,31(19):1580-1583.

[7]梁晓芳,朱学艺,李红芳. 前体和诱导子对大豆悬浮细胞中异黄酮积累的影响[J]. 厦门大学学报:自然科学版,2009,48(1):113-118.

[8]吴桂容,陈春岚,曲芬霞,等. 鸡血藤嫩叶愈伤组织诱导最佳培养

基的筛选[J]. 现代农业科技,2009,37(18):93-94.

[9]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.

[10]Sugiyama M. Historical review of research on plant cell dedifferentiation[J]. Journal of Plant Research,2015,128(3):349-359.

[11]张安宁,刘连成. 响应面法优化香菇液体发酵条件[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):200-203.