

氮素营养与剑麻蛋白酶组培诱导的研究

李 斌¹ 彭志英¹ 何琼英²

(1 华南理工大学 食品工程系, 广州 510641; 2 华南农业大学 农学系)

摘要 以 LS 培养基, 附加特定种类和浓度的氮素, 再加入 2,4-D 4.0 mg/L, NAA 0.4 mg/L, 6-BA 2.5 mg/L, 比较了不同氮素类型, 不同氮源浓度对剑麻愈伤组织细胞生长速率及蛋白酶活力的影响. 结果表明, (1)同时含有铵态氮和硝态氮的无机氮源培养基最有利于剑麻愈伤组织的快速增长; (2)1~10 g/L 的有机氮源有利于提高剑麻蛋白酶的活力; (3)剑麻愈伤组织细胞生长速率与蛋白酶活力呈相斥型生长关系, 因此在剑麻蛋白酶的组培诱导中, 以采取二步培养法为宜.

关键词 剑麻; 组织培养; 氮源; 细胞生长速率; 蛋白酶活力

中图分类号 S 563.8; TS 201.25

剑麻蛋白酶是存在于剑麻叶片中的一种蛋白水解酶, 1964 年由英国剑桥大学的 K. F. Tipton 首次报道. 此后, 国内外许多研究者对该酶的有关特性和应用价值进行了研究(Tipton, 1964; Du Toit, 1976; 孙崇荣等, 1980; 许志强等, 1993; 徐凤彩等, 1993). 结果表明, 剑麻蛋白酶在皮革脱毛(郑有生, 1982)、白银回收(卢浩然, 1993)以及轻工、食品和医药等方面都具有应用潜力. 然而以植物为原料提取酶, 由于植物生长周期长, 受地理、气候和季节等多种因素的制约, 不可能按人类需求大量合成某种物质, 因而严重地阻碍了植物酶制剂的深入研究和广泛应用. 植物细胞培养的成功及细胞生化全能性的证实, 以及近十几年来植物组织和细胞大量培养技术的进步, 为植物酶制剂的研究利用和大规模工业化生产展示了美好前景. 近十几年来, 某些动植物来源的酶已有可能通过组织和细胞培养获得. 日本从烟草细胞的培养中纯化了过氧化物酶、磷酸二酯酶和磷酸酯酶等; 小林节夫(1988)以辣根的形成层诱导愈伤组织, 分离出了细胞生长快, 过氧化物酶产酶能力比原植物高约 7 倍的愈伤组织块. 因此通过植物细胞工程, 有望大幅度地提高植物细胞的产酶能力.

利用植物组织和细胞培养诱导产酶过程中, 细胞生长速率和产酶量是首先要解决的两个主要问题. 氮素是蛋白酶主要组成元素之一, 为此本文在剑麻组织培养中, 着重就不同氮素类型及浓度对剑麻愈伤组织细胞生长速率和蛋白酶活性的影响进行了研究.

1 材料与方法

1.1 供试材料

剑麻外植体取自广州华南植物园和湛江国营东方红农场剑麻品种园. 取幼叶, 消毒后切成约 0.5 cm² 的小块, 接入诱导培养基中, 在 (25±2) °C 的培养室中, 置于 12 h 光照或室内自然光照条件下, 诱导生成愈伤组织.

不同氮素处理的材料为连续继代培养 9 代的剑麻愈伤组织.

1.2 培养基及培养条件

有机态氮素处理的培养基, 以 LS 培养基为基础, 无机态氮素处理的培养基, 以 LS 培养

基去除其中的含氮化合物为基础, 附加 6-BA 2.5 mg/L, 2,4-D 4.0 mg/L, NAA 0.4 mg/L, 琼脂 8 g/L, 蔗糖 30 g/L, pH 5.8~6.0, 按表 1 配制不同氮素类型和浓度的培养基。

接种后的愈伤组织置于(25±2)℃、12 h 光照(50 lx)的环境中培养, 每 5 d 取样 1 次, 分别测定不同氮素类型和浓度培养下的细胞生长速率和蛋白酶活力。每个处理设 3 次重复。

1.3 细胞生长速率测定

培养细胞生长速率测定按下述公式计算: 每克接种材料的细胞生长速率[g/(L·d)] = (最终收获鲜质量-接种鲜质量)/培养基体积×培养天数×接种材料鲜质量。

表 1 氮素的种类及浓度

ρ 水解乳蛋白/(g·L ⁻¹)	1.0	10.0	30.0	0.0(CK)
ρ 酪蛋白/(g·L ⁻¹)	1.0	10.0	21.4	0.0(CK)
$c_{\text{NH}_4^+}$ /(mmol·L ⁻¹)	10.31	41.23		20.62(CK)
$c_{\text{NO}_3^-}$ /(mmol·L ⁻¹)	9.40	37.58		39.41(CK)

1.4 剑麻蛋白酶活力测定

(1) 待测酶液的制备: 称取供试愈伤组织 2 g, 按 1:4 比例加入 pH 7.0 磷酸缓冲液, 在研钵中研磨至匀浆状, 倒入离心管, 用离心机(4 000 r/min)离心 10 min, 取上清液即为待测酶液。

(2) 酶活力测定: 取待测酶液 0.1×10⁻³ L, 置于试管内, 加入 0.9×10⁻³ L 激活剂(0.1 mol/L pH 7.5 Tris-HCl 缓冲液, 内含 20 mol/L Cys, 1 mmol/L EDTA), 在(37±1)℃恒温水浴上预热 10~15 min, 加入预热在(37±1)℃的酪蛋白溶液 1×10⁻³ L, 准确反应 10 min, 加入三氯醋酸溶液 3×10⁻³ L 终止反应(对照先加三氯醋酸, 后加底物), 静置 20 min 后过滤, 滤液于 275 nm 波长处测定 A₂₇₅。

在上述条件下, 测定样品水解酪蛋白时, 每 1 min 释放出 1 μg 酪氨酸, 即为 1 个酶活力单位, 以 10³ U/L 表示。

2 结果与分析

氮素是蛋白酶分子的基本组成元素之一。为探讨不同氮素类型及浓度对剑麻愈伤组织细胞生长及蛋白酶活力的影响, 作者选择了 4 种类型的氮素, 即水解乳蛋白、酪蛋白这两种有机态氮和铵态氮、硝态氮这两种无机态氮进行研究。

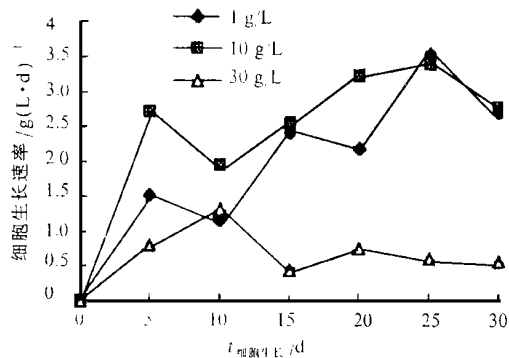


图 1 水解乳蛋白不同质量浓度下的细胞生长速率

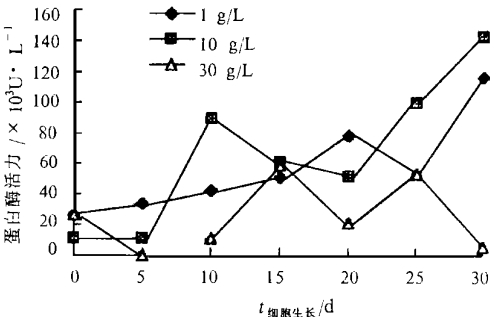


图 2 水解乳蛋白不同质量浓度下的蛋白酶活力

2.1 有机态氮对剑麻愈伤组织细胞生长及蛋白酶活力的影响

(1) 水解乳蛋白的培养结果分析: 在 30 d 的培养周期中, 不同浓度水解乳蛋白对剑麻愈伤组织细胞生长速率和蛋白酶活力影响的动态变化如图 1, 2 所示.

实验结果表明, (1)剑麻愈伤组织细胞生长速率和蛋白酶活力均以 10 g/L 的水解乳蛋白效果最佳, 1 g/L 的水解乳蛋白次之, 30 g/L 的水解乳蛋白最差. 水解乳蛋白是植物细胞和组织培养中常用的一种有机氮源, 由 20 多种氨基酸组成. 但已有的研究发现, 其中某些氨基酸如亮氨酸、异亮氨酸等有抑制生长作用, 当乳蛋白达一定质量浓度时, 其抑制生长的作用就表现出来(郑光植等, 1977). 本研究的结果也表现出了这一特性. 因此在剑麻蛋白酶的组培诱导中, 水解乳蛋白以 1~10 g/L 为宜. (2)比较细胞生长速率和蛋白酶活力的动态变化趋势可见, 细胞快速增长时, 蛋白酶活力呈水平或下降的趋势; 而当细胞生长速率减缓时, 蛋白酶活力逐渐提高, 即剑麻愈伤组织细胞生长速率和蛋白酶活力间呈现出一种相斥型的生长关系.

(2) 酪蛋白的培养结果分析: 在 30 d 的培养周期中, 以酪蛋白 3 种不同质量浓度的培养基培养剑麻愈伤组织, 分别测定细胞生长速率和蛋白酶活力的动态变化. 结果如图 3, 4 所示.

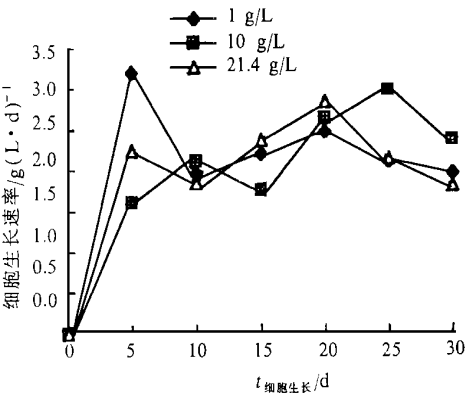


图 3 酪蛋白不同质量浓度下的细胞生长速率

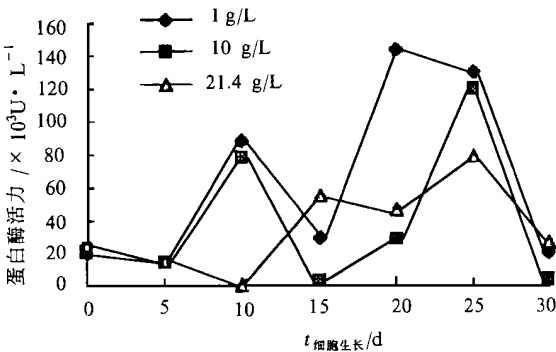


图 4 酪蛋白不同质量浓度下的蛋白酶活力

从图中的动态变化曲线可以看出, 仅就细胞生长速率而言, 酪蛋白 3 种处理质量浓度之间没有明显的差异, 均表现为在培养的最初 5 d, 细胞快速生长, 随后增长势减缓; 而蛋白酶活力, 当酪蛋白为 1 和 10 g/L 时, 具有相似的变化趋势, 在培养的前 5 d, 蛋白酶活力呈下降趋势, 到培养的第 10 d 前后, 出现一个小的活性高峰, 到培养的第 20~25 d 左右, 蛋白酶活力达最高峰, 然后迅速下降; 当酪蛋白达到 21.4 g/L 时, 蛋白酶活力明显低于 1~10 g/L 的处理. 而且不同质量浓度酪蛋白处理的结果, 剑麻细胞生长速率和蛋白酶活力之间也表现为一种负相斥型生长关系. 酪蛋白是剑麻蛋白酶的作用底物, 高质量浓度的酪蛋白对蛋白酶组培诱导的抑制作用, 似表明高质量浓度的酪蛋白可能对剑麻蛋白酶的组培诱导起着反馈抑制的作用. 关于这一点还需进行深入的研究.

2.2 无机态氮源对剑麻细胞生长及酶活力的影响

为了研究不同的无机态氮源对剑麻细胞生长及蛋白酶活力的影响, 我们以 30 d 为一培养周期, 比较了两种摩尔浓度的铵态氮培养基、两种摩尔浓度的硝态氮培养基与同时含有铵态氮和硝态氮的对照培养基的动态变化, 结果如图 5、6、7、8 所示.

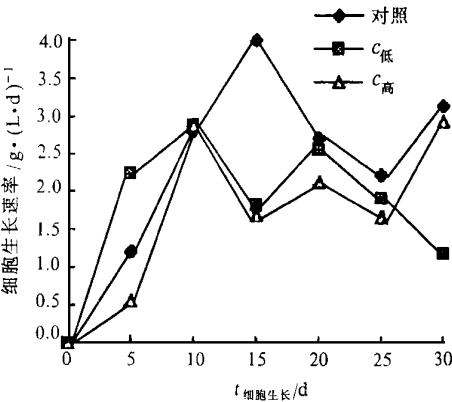


图 5 铵态氮的细胞生长速率

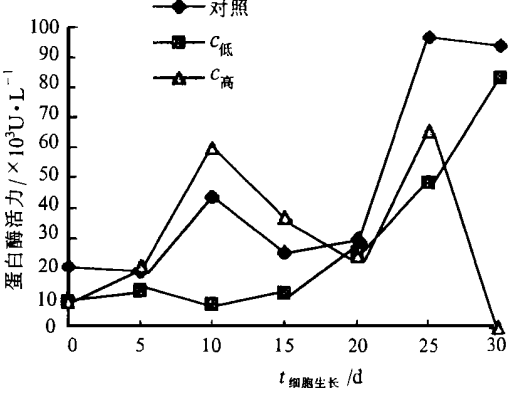


图 6 铵态氮的蛋白酶活力

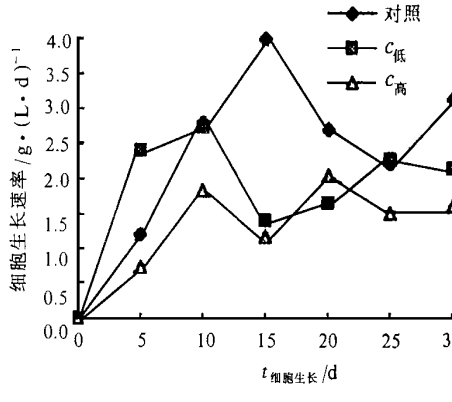


图 7 硝态氮的细胞生长速率

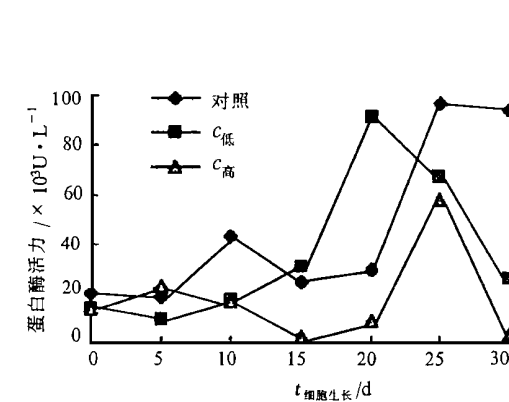


图 8 硝态氮的蛋白酶活力

图 5、7 结果显示, 无论以铵态氮作氮源还是以硝态氮作氮源, 无论低摩尔浓度处理还是高摩尔浓度处理, 剑麻愈伤组织细胞生长速率都具有极相似的变化趋势, 即在培养的前 10 d 增长迅速, 随后明显下降, 继而缓慢增长; 而同时含有铵态氮和硝态氮的对照培养基, 细胞快速增长持续到第 15 d, 尔后才明显下降, 因而在处理和对照之间出现了峰顶和峰谷的最大差异; 图 6、8 的蛋白酶活力表现出双峰增长趋势, 即在培养的第 10 d 前后出现一个小活性峰值, 至第 20~25 d 时, 出现一个大的高峰值; 无机态氮源的诱导结果, 剑麻愈伤组织细胞生长速率和蛋白酶活力也表现为相斥型生长关系。

不同无机态氮处理的结果说明, 单纯的铵态氮或硝态氮处理, 无论对于剑麻愈伤组织细胞生长速率的增长, 还是对于蛋白酶活力的提高, 效果都不如同时含有铵态氮和硝态氮的处理效果好。因此在剑麻组培中以采用复合无机态氮源为佳。

3 结论

综合比较各种氮素组成和浓度的作用结果可以看出, (1) 剑麻愈伤组织细胞生长速率, 以同时含有铵态氮和硝态氮的处理最佳, 其次为有机态氮, 而仅含铵态氮或硝态氮的单一无机态氮源最差; (2) 剑麻蛋白酶活力, 就不同氮源类型比较, 有机态氮源处理的蛋白酶活力高

于无机态氮源的处理;有机态氮源不同质量浓度处理结果表明,在 $1 \sim 10 \text{ g/L}$ 的范围内,有利于蛋白酶活力的提高,当有机态氮源达到 $20 \sim 30 \text{ g/L}$ 时,对蛋白酶活力表现出一种抑制作用.且高质量浓度有机态氮源上生长的愈伤组织,细胞生势衰退,愈伤组织颜色日渐变黄、发褐;(3)上述各种处理的结果均表现出一种共同的变化规律,即剑麻愈伤组织细胞生长速率与蛋白酶活力之间呈现出一相斥型生长关系.这表明剑麻愈伤组织的细胞生长与剑麻蛋白酶活力的提高是矛盾着的两个方面.因此,在进入剑麻蛋白酶诱导大量培养阶段时,应采用两步培养法,第一步的前期培养,主要以促进细胞快速生长为目的,此阶段以同时含有铵态氮和硝态氮的无机态氮作氮源为佳;第二步,进行蛋白酶的诱导培养,此阶段以添加 $1 \sim 10 \text{ g/L}$ 的有机态氮作氮源为佳.通过二步培养法,以达到既使细胞快速生长,又获得较高的蛋白酶产量的目的.

参 考 文 献

- 卢浩然. 1993. 中国麻类作物栽培学. 北京: 农业出版社, 535~537
- 孙崇荣, 柴常星, 方深高, 等. 1980. 一种新的植物蛋白酶——剑麻疏基蛋白酶. 科学通报, (3): 138~140
- 许志强, 徐凤彩, 李明启. 1993. 剑麻蛋白酶分离纯化及特性研究. 植物学报, 35(3): 171~178
- 徐凤彩, 李明启. 1993. 番麻蛋白酶的分离纯化及其部分特性研究. 生物化学与生物物理学报, 25(1): 25~30
- 郑有生. 1982. 龙舌兰麻 11648 蛋白酶猪皮脱毛制革报告. 广西热作科技, (1): 17~19
- 郑光植, 梁 峰. 1977. 药用植物组织培养的研究. 三分三愈伤组织的生长, 莨菪碱和东莨菪碱合成的化学调节. 植物学报, 19(3): 209~215
- 小林节夫. 1988. 植物组织培养的次生代谢产物. VII 酶(过氧化物酶). 细胞生物学杂志, 10(1): 25~26
- Tipton K F. 1964. Fractionation of Proteolytic Enzyme from sial (*Agave sisalana*) on DEAE-cellulose. Biochem Biophys Acta, 92: 334~340
- Du Toit P J. 1976. Isolation and Partial Characterization of a Protease from *Agave americana variegata*. Biochem Biophys Acta, 429: 895~899

EFFECTS OF NITROGEN ON TISSUE CULTURE AND AGAVAIN-SH INDUCEMENT OF *Agave sisalana*

Li Bin¹ Peng Zhiying¹ He Qiongying²

(1 Dept. of Food Engineering, South China Univ. of Tech., Guangzhou, 510641;

2 Dept. of Agronomy, South China Agric. Univ.)

Abstract

Callus as cultured in LS medium added with 2, 4-D 3 mg/L , NAA 0.4 mg/L , 6-BA 2.5 mg/L , and effects of various kinds and concentrations of nitrogen on its growth rate and special activity of agavain-SH were studied. The results showed that the medium containing both ammonium and nitrate as nitrogen nutrition was the best for the fast growth of the callus, that the medium containing $1 \sim 10 \text{ g/L}$ of organic nitrogen was effective for improving the special activity of agavain-SH, and that the callus growth rate of *Agave sisalana* was negatively correlated with the special activity of agavain-SH. For these reasons the tissue culture and agavain-SH inducement of *Agave sisalana* should be better to performed by two-stage culture method.

Key words *Agave sisalana*; tissue culture; nitrogen; callus growth rate; special activity of agavain-SH