

几种有机物对烟草细胞辅酶 Q₁₀形成的影响^{*}

高向阳 康起亮 穆虹 徐凤彩

(华南农业大学生物技术学院, 广州 510642)

摘要 采用细胞悬浮培养的方法, 以烟草红花大金元细胞为材料, 研究了几种有机营养物质、辅酶 Q₁₀ (CoQ₁₀) 合成前体物质及 Co⁶⁰- γ 射线对烟草悬浮培养细胞生长和辅酶 Q₁₀ 形成的影响. 实验证明, 肌醇、酵母膏、盐酸硫胺素对烟草悬浮培养细胞生长和 CoQ₁₀ 含量都有一定的影响. 当 ρ (肌醇) = 100 mg/L 时, 每瓶 CoQ₁₀ 比对照增加了 90 μ g. 当 ρ (盐酸硫胺素) = 4 mg/L 时, 细胞干质量、CoQ₁₀ 含量及总量均随其浓度增加而升高. 当 w (酵母膏) = 0.5% 时, 细胞干质量、CoQ₁₀ 含量和 CoQ₁₀ 总量均最高. 在 CoQ₁₀ 生物合成的前体中, 甲硫氨酸(Met) 对细胞生长无明显作用, 但能促进 CoQ₁₀ 的形成. 实验还证明, Co⁶⁰- γ 射线辐射处理时, 0.52 C/kg 剂量处理可促进 1~3 次继代培养细胞的生长; 1.03 C/kg 剂量处理可促进 1~3 次继代培养细胞 CoQ₁₀ 含量提高.

关键词 烟草细胞; 细胞生长; 辅酶 Q₁₀

中图分类号 Q 5.552

植物是一个天然的生化反应器. 据报道(陈因良等, 1992)目前已发现的 3 万多种天然物质中有 80% 来自高等植物, 随着人口增加, 生态平衡的破坏, 这些植物天然产品的供求矛盾日益尖锐. 利用植物细胞培养技术生产植物天然物质成为当今生物技术的一个热门课题之一. 已有 100 多种天然物质(其中有 10 余种酶)用植物细胞培养技术制备, 有的已进行工厂化生产, 如人参细胞培养生产人参皂甙已达到商品化生产要求(FAO, 1994). 利用烟草细胞培养技术制备 CoQ₁₀ 亦是近年来植物细胞培养技术发展的产物之一, Ikeda 等(1974)从烟草组培细胞中获得 CoQ₁₀ 结晶. 此后, 他及其同事又相继对影响 CoQ₁₀ 形成的有机和无机营养物及物理条件进行了研究(Ikeda, 1978). 本实验在前人工作的基础上, 研究几种有机营养物质对烟草悬浮细胞生长和 CoQ₁₀ 含量的影响.

前人对微生物(Gibson et al, 1978)、动物(Mamose et al, 1972)和植物(Liedvogel et al, 1984)中 CoQ₁₀ 生物合成途径进行了研究, 发现异戊烯转移酶(isopentenyltransferase)是合成 CoQ₁₀ 的关键酶. Liedvogel 等(1984)报道, 来源于甲羟戊酸的类异戊二烯焦磷酸可被马铃薯线粒体吸收形成的 CoQ₁₀ 中间产物. 本实验研究 CoQ₁₀ 生物合成的几种前体物质对 CoQ₁₀ 形成的影响.

1 材料与方法

1.1 材料与主要试剂

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)品种: 红花大金元(HHDJY), 由广东省农科院经作所提供.

主要试剂: 酵母膏(北京市海淀区微生物培养基制品厂), 盐酸硫胺素, 肌醇(上海试剂厂),

CoQ₁₀ 标样、硼氢化钠、甲羟戊酸、异戊焦磷酸为 Sigma 公司产品、其余试剂为分析纯或生化试剂。

1.2 方法

1.2.1 烟草愈伤组织的诱导、继代和悬浮培养 取盆栽烟草叶片、洗净、用体积分数为 70%乙醇浸泡 5~8 s, 再用质量分数为 0.1% HgCl₂ 溶液消毒 8~10 min, 无菌水冲洗, 切成 0.5 cm×0.5 cm 小块, 接种于诱导培养基(1 #)25 d 后, 转入继代培养基(2 #)继续培养。继代培养产生的疏松愈伤组织转入悬浮培养基(3 #): 将 4 g 疏松愈伤组织接种于 250 mL 三角瓶(含 50 mL 培养基)摇瓶悬浮培养、摇床转速 100 r/min、2 cm 振幅、(28±1) °C 黑暗培养 8 d 后, 吸取上部细胞并过滤, 作为悬浮培养试验种子细胞。各培养基如表 1。

表 1 培养基配方¹⁾

培养基	成分
1 #	Ms+ BA 1.5 mg/L+ NAA 1.0 mg/L
2 #	LS+ BA 0.05 mg/L+ 2,4-D 1.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L
3 #	LS+ BA 0.05 mg/L+ 2,4-D 1.0 mg/L+ NAA 1.0 mg/L+ 酵母膏 15%(质量分数)

1) 1 #、2 # 含质量分数为 0.7% 琼脂, 所有培养基如无说明, w(蔗糖)=3%, pH 5.8, 高压灭菌。

1.2.2 CoQ₁₀ 的提取 参考 Barr 等(1985)的方法并加修改。将烟草细胞与丙酮按 1:2(*m/V*)混合、研磨、过滤、滤渣再重复抽提 2 次、合并滤液, 用 0.5 倍石油醚萃取 2 次, 所得溶液为 CoQ₁₀ 抽提液。

1.2.3 CoQ₁₀ 的含量测定 参考 Crane 方法并加以修改。将上述所得 CoQ₁₀ 的石油醚抽提液于水浴上(60 °C)蒸干, 加上 10 mL 无水乙醇溶解, 取 3 mL 在 275 nm 波长下测定氧化型 CoQ₁₀ 的光吸收值(*A*₁); 加入 0.1 mL 硼氢化钠水溶液充分还原 CoQ₁₀ 的光吸收值(*A*₂), 以无水乙醇为对照, 按下式(Crane, 1959)计算 CoQ₁₀ 的含量:

$$w(\text{CoQ}_{10}) = (A_1 - A_2) \times n \times 10^6 / 142 \times s.$$

式中 *n* 为稀释倍数, *s* 为细胞质量, 142 为 CoQ₁₀ 的体积分数为 1% 无水乙醇溶液在 275 nm 波长下氧化型和还原型吸光值之差。

1.2.4 细胞干质量的测定 按常规恒重法

2 结果

2.1 几种有机物质对烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 含量的影响

2.1.1 肌醇对烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 含量的影响 以 3 # 为基本培养基加入不同体积分数(100~800 mL/L)的肌醇进行悬浮培养, 分别测定细胞干质量、CoQ₁₀ 含量(μg/g)和 CoQ₁₀ 总量(μg/瓶)。结果(图 1)表明, 肌醇可明显促进细胞生长, 当肌醇质量浓度为 100 mg/L 时, 细胞干质量比对照增加了近 1 倍。当肌醇质量浓度为 200 mg/L 时, CoQ₁₀ 总量比对照增加了约 90 μg/瓶; 其余各肌醇浓

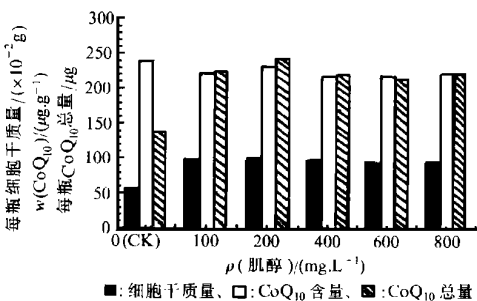


图 1 肌醇对红花大金元烟草细胞生长、CoQ₁₀ 形成的影响

度间细胞干质量、CoQ₁₀ 含量、CoQ₁₀ 总量相差不大. 因此采用 200 mg/L 的肌醇的浓度较为理想.

2.1.2 盐酸硫胺素对烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 的影响

以 3 # 为基本培养, 采用 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 六个浓度的盐酸硫胺素分别进行悬浮培养试验, 测定细胞干质量、CoQ₁₀ 含量、CoQ₁₀ 总量, 结果(图 2)表明, 不加盐酸硫胺素(对照)时, 细胞干质量为 0.712 8 g/瓶, $w(\text{CoQ}_{10})=95 \mu\text{g/g}$. 随着盐酸硫胺素浓度的增加 CoQ₁₀ 含量和细胞干质量均有较大提高, 当其质量浓度为 4.0 mg/L 时, CoQ₁₀ 质量分数增至 373 $\mu\text{g/g}$, 细胞干质量达 0.962 7 g/瓶, CoQ₁₀ 的总量达 359 μg /瓶, 当其质量浓度增加到 8.0 mg/L 时, 细胞干质量和 CoQ₁₀ 含量均有所下降, 但仍比对照有所增加.

2.1.3 酵母膏对烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 形成的影响

以 3 # 为基本培养基, 采用质量分数分别为 0、0.05%、0.15%、0.30%、0.50% 的酵母膏进行悬浮培养试验. 结果(图 3)表明, 酵母膏对细胞生长、CoQ₁₀ 含量、CoQ₁₀ 总量均有一定的促进作用. 当其质量分数为 0.15% 时, 细胞干质量、CoQ₁₀ 含量、CoQ₁₀ 总量最高.

2.2 甲硫氨酸(Met)对烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 形成的影响

试验对 3 # 为基本培养基, 分别采用质量分数为 0.05、5.0、10.0、20.0 mg/L 的 Met 对烟草悬浮培养细胞生长和 CoQ₁₀ 形成进行试验. 结果(图 4)表明, 各浓度的 Met 对烟草细胞生长无明显的作用, 但较明显地促进 CoQ₁₀ 的形成. 其中 Met 浓度为 10 mg/L 时, CoQ₁₀ 含量、总量最高, 含量比对照提高了 42.2%. 所以 Met 浓度以 10 mg/L 为好.

2.3 Co⁶⁰- γ 射线辐照处理对烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 形成的影响

用 0.52 C/kg 和 1.03 C/kg 剂量辐照处理愈伤组织后, 接种于 2 # 培养基, 每个处理 6 瓶, 每瓶接种 6 g, 以未处理细胞为对照. 25 d 后测细胞干质量, CoQ₁₀ 含量, 连续继代培养 5 代以上, 分别测定各代的细胞干质量、CoQ₁₀ 含量的变化, 结果如图 5、图 6. 图 5 表明, Co- γ 射线处理对悬浮培养细胞生长有较大影响, 其中 0.52 C/kg 处理可促进细胞生长, 而 1.03 C/kg 处理则明显地对细胞生长不利. 这种效果在辐照后前 3 次继代培养尤为明显, 到第 5 次继代培养时处理与对照趋向一致.

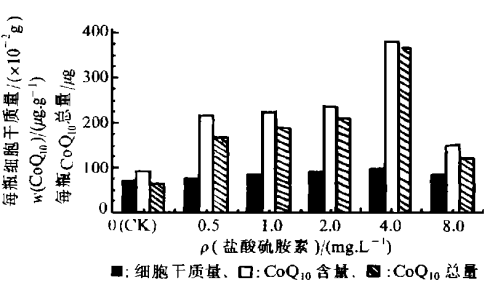


图 2 盐酸硫胺素对红花大金元烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 形成的影响

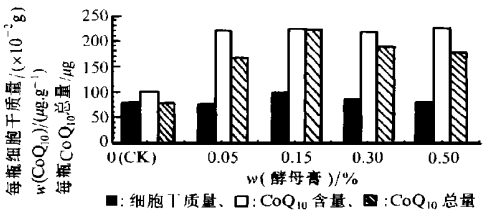


图 3 酵母膏对红花大金元烟草细胞生长的影响

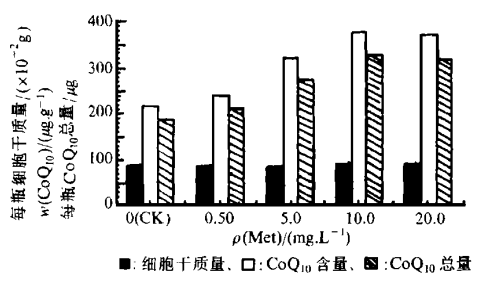


图 4 Met 对红花大金元烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 含量的影响

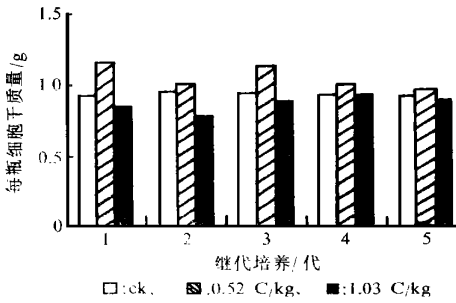


图 5 Co- γ 射线对红花大金元烟草细胞生长的影响

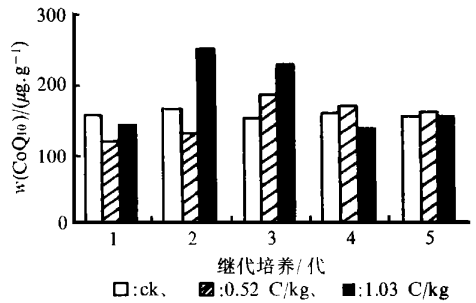


图 6 Co- γ 射线对红花大金元烟草细胞 CoQ₁₀ 含量的影响

图 6 表明, Co- γ 射线处理对 CoQ₁₀ 形成同样有较大影响, 尤其是处理的第 2、第 3 次继代培养, 1.03 C/kg 处理使 CoQ₁₀ 质量分数由对照的 161 $\mu\text{g/g}$ 提高到 252 $\mu\text{g/g}$, 而 0.52 C/kg 处理效果不明显.

3 讨论

Ikeda 等(1977)对影响烟草细胞 CoQ₁₀ 含量的无机营养物质做了较为深入的研究. 本实验在前人工作的基础上, 研究了盐酸硫胺素、肌醇、酵母膏对烟草细胞生长和 CoQ₁₀ 形成的影响. 这 3 种物质对烟草细胞生长有较大的促进作用, 其中盐酸硫胺素可显著增加烟草细胞 CoQ₁₀ 含量, 此外, 我们还以 3 # 为基本培养基测试了丙氨酸(Ala)、苯丙氨酸(Phe)、亮氨酸(Leu)对红花大金元烟草悬浮培养细胞的生长和 CoQ₁₀ 形成的影响. 当各采用质量浓度为 0、0.5、5.0 mg/L 分别进行实验时, 结果表明: 在各参试浓度下, 3 种氨基酸对红花大金元悬浮培养细胞生长和 CoQ₁₀ 形成无明显影响. 这与 Packter 等(1962)报道的 Ala、Phe、Leu 加入培养基后, *Aspergillus fumigatus* 细胞中 CoQ₁₀ 含量增加的结果不同. 这表明不同细胞对营养要求有所不同.

如上所述, CoQ₁₀ 生物合成途径已经清楚. 酪氨酸(Tyr)、对羟苯甲酸、甲羟戊烯焦磷酸, 均是 CoQ₁₀ 生物合成的前体物质. Lawson 等(1960)报道老鼠肾、心、肺可吸收外源甲羟戊酸合成 CoQ₁₀. Ramasama(1985)报道老鼠体内 CoQ₁₀ 的苯环来自于 Tyr. Liedvgel(1984), 来源于甲羟戊酸的异戊烯焦磷酸可被马铃薯吸收形成 CoQ₁₀ 的中间产物, 而甲羟戊酸则不能被吸收利用. 我们曾试验: Tyr、对羟苯甲酸、甲羟戊酸、异戊烯焦磷酸对红花大金元烟草细胞 CoQ₁₀ 形成, 均无明显作用(结果中未列出), 只有 Met 能明显提高 CoQ₁₀ 含量. Met 作为甲基供体与 CoQ₁₀ 中苯环甲基化有关 (Lawson, 1960). 这些表明 CoQ₁₀ 生物合成途径在各种生物中虽基本相似, 但各种生物合成 CoQ₁₀ 的前体物质可能不尽相同.

Watanable 等(1982)报道通过物理诱变提高了培养细胞中的生物素含量. Zheng 等(1982)用 Co⁶⁰- γ 射线处理 *Anisodus acutangulus* 愈伤组织, 较大程度地提高了细胞生长比速率和莨菪碱的含量. 我们以 0.52 C/kg 和 1.03 C/kg 2 个剂量进行 γ 射线辐照诱变处理, 发现处理后对第

1 到第 3 代培养细胞的生长和 CoQ₁₀ 含量有较大影响, 其中 0.52 C/kg 处理能促进细胞生长, 而 1.03 C/kg 处理则使 CoQ₁₀ 含量增加, 这种变化的原因还有待进一步研究。

参 考 文 献

- 陈因良, 陈志宏. 1992, 细胞培养工程, 上海: 华东化工学院出版社, 294~297
- Barr R, Frederick L. The isolation and characterization of coenzyme Q₁₀ and related compounds. In: Chichester L G ed. Coenzyme Q: biochemistry, bioenergetics and clinical application ubiquinone. New York: Oxford Univ Pr, 42~44
- Crane F L, Lester R L, Widmer C, et al. 1959. Study on electron transport system, XVIII, Isolation of coenzyme Q (Q 257) from beef heart mitochondria. Biochim Biophys Acta, 32: 73~79
- FAO. 1994. Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolites. Canada: Bio International Pr, 73~77
- Gibson F, Young I G. 1978. Isolation and characterization of intermediates in ubiquinone biosynthesis. In: Folker K ed. Methods in enzymology: Vol 2. New York: Academic Pr, 600~609
- Ikedo T, Matsumoto T, Kato K, et al. 1974. Isolation and identification of ubiquinone Q₁₀ from cultured cells of tobacco. Agr Biol Chem, 38(11): 2 297~2 298
- Ikedo T, Matsumoto T, Noguchi M. 1978. Effects of auxins on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. Phytochemistry, 17: 1 879~1 883
- Ikedo T, Matsumoto T, Noguchi M. 1977. Effects of inorganic nitrogen sources and physical factors on formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. Agric Biol Chem, 41(7): 1 197~1 201
- Lawson D E M. 1960. The mechanism of action of hydrocortisone on mitochondrial metabolism. J Biochem, 74: 38~43
- Mamose K, Rudney H. 1972. 3-Polyprenyl-4-hydroxybenzoate synthesis in the inner membrane of mitochondria from *Phycomyces blakesleei*. J Biol Chem, 247: 3 930~3 940
- Packer N M, Glover J. 1962. Biosynthesis of ubiquinone 50 in the mould *Aspergillus fumigatus* Fresenius. Biochim Biophys Acta, 58: 531~537
- Ramasarma T. 1985. Metabolism of coenzyme Q. New York: Marcel Dekker Inc Pr, 131~140
- Watanabe K, Kraak M H S. 1982. The selection of cultured plant cell lines producing high levels of biotin. Phytochemistry, 21(3): 513~516

Effects of a few Organic Substances on the Formation of Coenzyme Q₁₀ in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Cells in Suspension Culture

Gao Xiangyang Kang Qiliang Mu Hong Xu Fengcai

(College of Biotechnology, South China Agric. Univ, Guangzhou, 510642)

Abstract With suspension cultured cells of tobacco, the effect of organic nutrient, precursors of CoQ₁₀ and Co⁶⁰γ-ray irradiation on cell growth and CoQ₁₀ formation was studied. It showed that myoinositol and