

从烟草悬浮细胞制备辅酶 Q₁₀的初步研究*

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 采用细胞悬浮的方法, 从4个烟草品种(系)中筛选出辅酶 Q₁₀含量较高的黄花大金元。以其悬浮培养细胞为材料, 比较了几种植物生长调节剂对细胞生长和辅酶 Q₁₀含量的影响。结果表明, 0.1~0.2 mg/L 的 BA 和 KT 对烟草细胞有显著的促进作用, 但使辅酶 Q₁₀含量略有降低; 0.5~8.0 mg/L 的 2,4-D 可显著提高辅酶 Q₁₀含量, 但当其浓度高时对细胞生长不利; IAA 和 NAA 对烟草细胞生长和辅酶 Q₁₀含量均无明显作用。此外, 烟草悬浮培养细胞经丙酮抽提, 石油醚萃取, 通过硅胶柱层析获得辅酶 Q₁₀结晶, 回收率达 59.2%; 用 HPLC 检测其纯度达 97.7%。

关键词 烟草; 细胞悬浮培养; 辅酶 Q₁₀

中图分类号 Q 552

辅酶 Q₁₀(Coenzyme Q₁₀, CoQ₁₀)为 2,3-二甲氧基-5-甲基-1,4-二苯醌的侧链带有 10 个类异戊二烯的衍生物, 广泛存在于动物、植物和微生物中, 故又称泛醌 10。它极易被氧化还原, 是呼吸链上的一个重要的电子/氢载体, 可从 NADH 脱氢酶、磷酸甘油脱氢酶、酯酰辅酶 A 脱氢酶、琥珀酸脱氢酶等黄素中接受电子。因此, CoQ₁₀在医药上有着重要用途, 已广泛用于心脏疾病、细菌和病毒感染疾病、癌症的综合治疗, 以改善机体的免疫功能等(Folkers, 1985; Yamamure, 1985)。目前 CoQ₁₀在国外用化学合成法(古练权等, 1984)和微生物发酵法(Shuse, 1985)生产。国内尚未批量生产, 药源依赖进口。利用植物生物工程生产 CoQ₁₀国内外报道甚少。Ikeda (1974)等从烟草组织培养细胞中分离到一种黄色结晶, 并证明为 CoQ₁₀。此后他及其同事又对 CoQ₁₀形成的理化条件进行了研究(Ikeda et al, 1976a; 1976b; 1977; 1978), 发现不同烟草细胞及其不同的营养条件下 CoQ₁₀的含量均不同。作者在前人工作的基础上, 采用细胞悬浮培养技术, 对烟草品种(系)、几种植物生长调节剂进行了筛选, 并对烟草 CoQ₁₀进行了纯化, 获得结晶, 用 HPLC 进行了纯度检测。

1 材料和方法

1.1 材料与主要试剂

烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 4 个品种(系): K326、Co176、Ne82、黄花大金元(HHDJY)均由广东省农科院经作所提供。

主要试剂: 6-糠基氨基嘌呤(6-Furfuryl amino purine, KT)、6-苄基氨基嘌呤(6-Benzyl amino purine, BA)、2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)均由上海生物化学研究所生产, α -萘乙酸(NAA)、3-吲哚乙酸(IAA)、CoQ₁₀标样、硼氢化钠均由 Sigma 公司生产, 其余试剂均为分析纯或生化试剂。

1998-12-20 收稿 康起亮, 男, 27 岁, 硕士

* 广东省自然科学基金(960452)资助项目

1.2 方法

1.2.1 烟草细胞悬浮培养 以LS为基本培养基,附加15 g/L酵母膏和3 g/L的蔗糖,pH 5.8.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,摇床速度为100 r/min(振幅为2 cm),(28±1)℃,黑暗培养8 d后,吸取上部细胞并过滤,作为悬浮培养的种子细胞.

1.2.2 细胞干质量 采用常规称重法测定.

1.2.3 CoQ₁₀含量测定 参考Crane(1959)的方法测定CoQ₁₀的含量.将CoQ₁₀加入10 mL无水乙醇溶解并定容,取3 mL在275 nm波长下测定其氧化型吸光值(A_1),然后加0.1 mL 7 g/mL NaH₄B水溶液使其充分还原,在同一波长下测其还原型光吸收值(A_2).均以无水乙醇为对照.按下式计算CoQ₁₀含量:

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

式中 $w(\text{CoQ}_{10})$ 为每克干细胞中CoQ₁₀的含量(μg), n 为稀释倍数, S 为细胞干质量(g), 142 为10 g/L CoQ₁₀的无水乙醇溶液在275 nm波长下氧化型和还原型光吸收值之差.

1.2.4 CoQ₁₀的抽提、分离与纯度检测 参考Barr等人(1985)方法并稍加修改,用丙酮抽提.烟草细胞与丙酮(按1:2 m/V)混合,研磨,过滤,滤渣重复2次,合并滤液后用0.5倍滤液体积的石油醚萃取,即为抽提液.100 g湿细胞获得300 mL抽提液,蒸发浓缩至20 mL,经硅胶柱层析纯化.硅胶(60~325 孔/cm²)烘至恒质量,加60 g/L的水活化,上柱(1.0 cm×20.0 cm),用体积分数为4%的乙醚-石油醚溶液平衡,加样后用体积分数为4%的乙醚-石油醚混合液浓度线性洗脱,流速1 mL/min,5 mL/管,收集黄色部分洗脱液.水浴(60℃)蒸发除去有机溶剂,加5 mL无水乙醇溶解,密封置冰箱(4℃)结晶,2 d结晶完全,离心(10 500 r/min,4℃,10 min),收集结晶.

采用高效液相色谱法(HPLC)进行纯度检测(Wanger等,1995):色谱柱为20 rba×CDS 7 μ ,流动相是体积分数为60%无水乙醇的甲醇溶液,流速1 mL/min、波长283 nm、进样量30 μL 、标样和样品浓度为4.9 $\mu\text{mol/L}$.

2 结果

2.1 CoQ₁₀与烟草品种(系)的关系

不同烟草品种(系)悬浮培养细胞8 d后,细胞中CoQ₁₀含量如表1.

从表1可见,不同品种(系)烟草细胞中CoQ₁₀含量差异较大,其中HHDJY细胞中含量最高, $w(\text{CoQ}_{10}) = 189 \mu\text{g/g}$,NC最低 $w(\text{NC82}) = 46 \mu\text{g/g}$,二者相差4.1倍多.

表1 不同烟草品种(系)悬浮培养细胞CoQ₁₀含量

品种(系)	NC82	Co176	K326	HHDJY
$w(\text{CoQ}_{10})/(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})^{1)}$	46	97	55	189

1)每克干细胞质量

2.2 烟草细胞生长与CoQ₁₀含量的关系

烟草细胞生长与CoQ₁₀含量的关系如图1.

从图1可见,悬浮培养第4 d到第6 d为细胞生长的对数增长期,第6 d细胞干质量达到最大,第8 d CoQ₁₀含量和CoQ₁₀总量达到最大,这与Tsutomu等(1976)的结果相似.

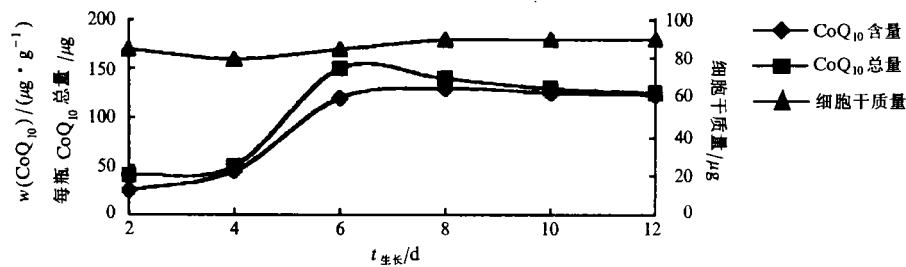


图 1 烟草细胞生长与 CoQ₁₀含量的关系

2.3 几种植物生长调节剂对烟草细胞生长和 CoQ₁₀含量的影响

以 LS 为基本培养基,用不同浓度 BA、IAA、NAA、2,4-D 分别进行实验,结果(表 2)表明,各参试浓度的 BA、KT 对烟草细胞生长有显著的促进作用,但各浓度间差异不明显,而 CoQ₁₀ 含量略下降;IAA、NAA 对细胞生长和 CoQ₁₀ 含量均无明显影响,但各浓度间有一定差异;2,4-D 不利于细胞生长,却能明显提高 CoQ₁₀ 含量。

表 2 几种生长调节剂对细胞生长和含量的影响

ρ (生长调节剂)/(mg·L ⁻¹)		0.02	0.20	1.00
BA	$w(\text{CoQ}_{10})/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	135	125	118
	每瓶细胞干质量/g	0.952 6	1.019 4	0.974 7
KT	$w(\text{CoQ}_{10})/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	138	139	130
	每瓶细胞干质量/g	1.125 4	1.113 9	1.243 7
IAA	$w(\text{CoQ}_{10})/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	157	140	155
	每瓶细胞干质量/g	0.745 7	0.771 7	0.638 2
NAA	$w(\text{CoQ}_{10})/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	142	118	107
	每瓶细胞干质量/g	0.742 3	0.620 2	0.567 0
2,4-D	$w(\text{CoQ}_{10})/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	201	247	228
	每瓶细胞干质量/g	0.851 8	0.854 7	0.717 3
CK	$w(\text{CoQ}_{10})/(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1})$	168	174	162
	每瓶细胞干质量/g	0.802 4	0.886 7	0.790 0

2.3.1 不同浓度的 KT 对细胞生长和 CoQ₁₀含量的影响 以 LS 为基本培养基(CK),用不同浓度的 KT 分别进行实验,测定不同浓度的 KT 对细胞和 CoQ₁₀含量的影响,结果(图 2)表明,KT 可以有效地促进细胞生长,各处理细胞干质量平均比对照增加 0.315 9 g/瓶,每瓶的 CoQ₁₀总量略有增加,但 CoQ₁₀含量却略有降低。不同 KT 浓度间,细胞干质量、CoQ₁₀质量分数及总量相差 不大,其变化范围分别为每瓶 1.122 ~ 1.121 g,127 ~ 132 μg/g,每瓶 141 ~ 147 μg。

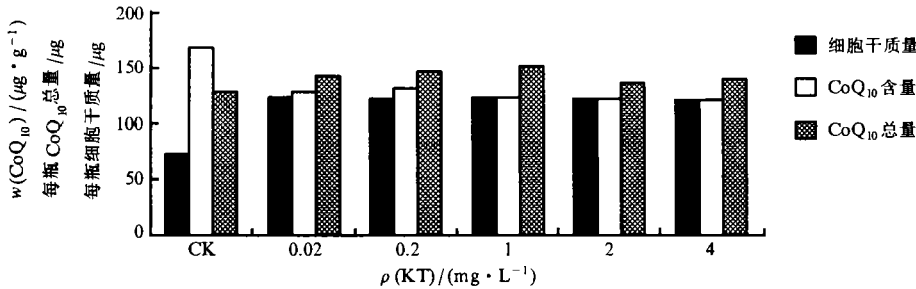


图 2 不同浓度的 KT 对细胞生长和 CoQ₁₀含量的影响

2.3.2 不同浓度的 2,4-D 对细胞生长和 CoQ_{10} 含量的影响 以 LS 为基本培养基(CK),用不同浓度的 2,4-D 分别测定其对细胞生长和 CoQ_{10} 含量的影响. 结果(图 3)表明,当 2,4-D 质量浓度由 0~8.0 mg/L 时, CoQ_{10} 质量分数由 164~332 $\mu\text{g/g}$,而细胞干质量却由 0.761 1 g/瓶降至 0.377 0 g/瓶. 说明高浓度的 2,4-D 有利于 CoQ_{10} 含量增加,却抑制了细胞生长. 从 CoQ_{10} 总量(g/瓶)来看,2,4-D 质量浓度以 0.5~1.0 mg/L 为佳,其 CoQ_{10} 总量在 191~187 μg /瓶之间,比对照增加了 62 μg /瓶.

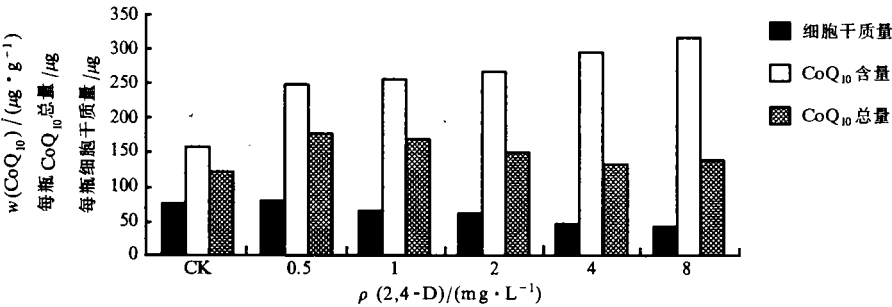


图 3 不同浓度的 2,4-D 对细胞生长和 CoQ_{10} 含量的影响

2.3.3 不同浓度的 2,4-D 和 KT 的组合效应 同样以 LS 为基本培养基(CK),选用 KT 质量浓度为 0.02、2.0 mg/L 与质量浓度为 0.5、1.0、2.0、4.0 mg/L 的 2,4-D 进行组合实验,分别测定细胞生长和 CoQ_{10} 含量. 结果(图 4)表明, $\rho(\text{KT})=2.0\text{ mg/L}$ 各组合,细胞干质量普遍比 $\rho(\text{KT})=0.02\text{ mg/L}$ 各组合高,而 CoQ_{10} 含量稍低, $\rho(\text{KT})=0.02\text{ mg/L}$ 和 $\rho(2,4\text{-D})=2.0\text{ mg/L}$ 组合时, $w(\text{CoQ}_{10})=227\text{ }\mu\text{g/g}$,总量为每瓶 230 μg .

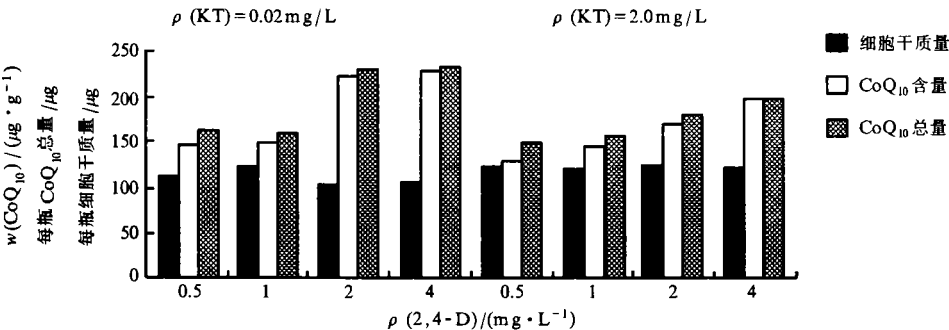


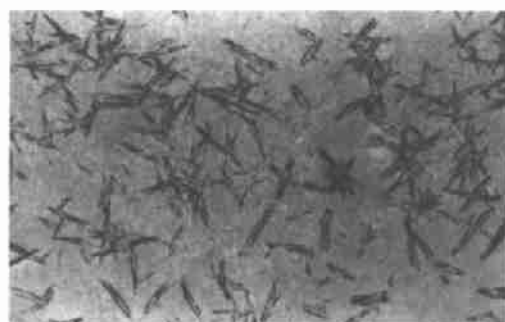
图 4 不同浓度 2,4-D 和 KT 组合效应

2.4 CoQ_{10} 的分离纯化与纯度检测

100 g 烟草细胞(鲜质量),经丙酮抽提,石油醚萃取,获得 300 mL CoQ_{10} 石油醚液,蒸发浓缩至 20 mL,经硅胶层析纯化,可获得 CoQ_{10} 黄色针状结晶 723 μg (图 5). 回收率达 59.2%. 纯化结果如表 3. 结晶 CoQ_{10} 经 HPLC 检测表明,其纯度为 97.7%.

表3 烟草悬浮细胞中 CoQ₁₀的分离纯化

步骤	总体积 /mL	w(CoQ ₁₀) /(μg·g ⁻¹)	回收率 /%
抽提	300	1221	100
硅胶柱 层析	25	723	59.2

图5 烟草悬浮细胞 CoQ₁₀结晶(200×)

3 讨论

Ikeda(1976)发现不同品种的烟草培养细胞中的 CoQ₁₀含量不同,笔者用4个烟草品种(系)的悬浮培养细胞实验也得到相似的结果。进一步的研究(Ikeda,1980)表明,尽管烟草组培细胞 CoQ₁₀的含量高于大豆幼苗,但 CoQ₁₀与线粒体中其它电子或氢载体的比例相近。他们进一步对高产 CoQ₁₀细胞品系进行研究,发现高产型比低产型细胞内的线粒体产量高4.3倍,而每毫克线粒体所产生 CoQ₁₀接近,这样便初步推断 CoQ₁₀含量与线粒体数目和体积有关。

在植物细胞培养中最常用的生长调节剂是生长素和细胞激动素,生长调节因子种类和浓度对细胞的生长和期望获得的有用物质的含量都有很大的影响(Fosket,1977;Furuya,1971;Klamt,1978)。Furuya等(1988)发现2,4-D能有效促进 CoQ₁₀的形成。作者用BA、KT、2,4-D、IAA、NAA分别进行实验,发现细胞激动素类物质有效地促进烟草悬浮细胞生长而不利 CoQ₁₀含量的提高。而2,4-D则恰好相反。IAA、NAA对烟草悬浮细胞生长和 CoQ₁₀的含量都没有明显的影响。高浓度激动素类物质易使悬浮细胞成团,不利于细胞分散和生长,作者通过KT与2,4-D的配合使用,找出一个较好的生长调节剂浓度组合,基本克服了细胞生长和 CoQ₁₀含量不一致的矛盾,每瓶 CoQ₁₀总量(g)比对照提高77%,同时悬浮培养细胞经多次继代培养后仍保持良好的分散性和生命力。

利用烟草细胞悬浮培养制备 CoQ₁₀达到细胞和 CoQ₁₀产率高的目的,受到许多因素,如营养物质供应、CoQ₁₀代谢中关键酶调控、培养模式等等的影响,这些有待于进一步研究。另外,就是尽量使 CoQ₁₀回收率高。笔者采用硅胶吸收层析法,一步从抽提液中获得 CoQ₁₀结晶,纯度约97.7%,其回收率达59%,为理论值的74%,亦简便易行。

参 考 文 献

- 古练权,徐建兴. 1984. 泛醌类化合物研究进展. 有机化学,48(6):413~422
- Crane F L, Lester R L, Widmer C, et al. 1959. Study on electron transport system. Biochem Acta,32:73~79
- Folkers K. 1985. Basic chemical researches on coenzyme Q₁₀ and integrated clinical research on therapy of disease. In: Chichester L G, ed. Bioenergetist and Clinical Application of Ubiquinone. New York:Oxford Univ Pr, 457~458
- Fosket D E, Volk M J, Goldsmith M R. 1977. Polyribosome formation in relation to cytokinin-induced cells division in

- suspension cultures of *Max* [L] Merr.. Plant Physiol, 60:554 ~ 556
- Furuya T, Kojima H, Synono K. 1971. Regulation of nicotine biosynthesis by auxine in tobacco callus tissues. Phytochemistry, 10:59 ~ 63
- Klamt D. 1976. Cytokinin effects on protein synthesis of in vitro of higher plants. Plant Cell Physiol, 17:71 ~ 76
- Ikeda T, Matsumoto T, Koto K. 1974. Isolation and identification of ubiquinone Q₁₀ from cultured cells of tobacco. Agr Biol Chem, 38(11):2 297 ~ 2 298
- Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. 1976a. Formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. Phytochem, 15:568 ~ 569
- Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. 1976b. Effect of nutritional factors on plant cells in suspension culture. Agr Biol Chem, 40(9):1 765 ~ 1 770
- Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. 1977. Effect of inorganic nitrogen source and physical factors on formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. Agr Biol Chem, 41(7):1 197 ~ 1 201
- Ikeda T, Matsumoto T, Noguchi M. 1978. Effect of auxins on formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. Phytochem, 17:1 879 ~ 1 883
- Ikeda T, Matsumoto T, Kisaki T. Subcellular distribution of ubiquinone and content of tobacco plant cells in carrier in the mitochondria isolated from tobacco cultured cells. Agr Biol Chem, 44(1):135 ~ 142
- Wagner A M, Wanger M J. 1995. Measurements of in vivo ubiquinone reduction levels in plant cells. Plant Physiol, 108:277 ~ 283
- Yamamura Y. 1985. A survey of therapeutic uses of coenzyme Q. In: Chichester L G, ed. Bioenergetics and Clinical Application of Ubiquinone. New York: Marcel Dekker Inc, 479 ~ 501

Studies on the Preparation of Coenzyme Q₁₀ from Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Cells in Suspension Culture

Kang Qiliang Mu Hong Xu Fengcai

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

Abstract A tobacco cell strain of HHDJY was selected by suspension culture from 4 tobacco strains cultivated in South China on the level of CoQ₁₀. By using this tobacco cell strain, the effects of several plant growth regulation on the cell growth and content of CoQ₁₀ were studied. The growth of the cells was greatly enhanced by 0.1 ~ 0.2 mg/L BA and KT. 2,4-D could increase the content of CoQ₁₀ but became unfavorable to cell growth when the concentration was high. IAA and NAA had no effect on cell growth and content of CoQ₁₀. Moreover, CoQ₁₀ crystal was obtained from suspension cells with acetone abstraction, petroleumbenzene extraction and silica chromatography. The recovery of CoQ₁₀ was 59.2%, and the purity reached 97.7%.

Key words tobacco cells; suspension culture; coenzyme Q₁₀

【责任编辑 李 玲】