第13卷 无锡轻工业学院学报 Vol. 13
第2期 JOURNAL OF THE WUXI INSTITUTE OF LIGHT INDUSTRY 1994 No. 2

美洲商陆细胞株系的选择和蛋白质产生情况比较*

陶文沂 张礼星 唐蕾

(发酵工程系)

摘要 美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)是由多基因转译的,在不同细胞株系中这些基因的表达情况有所区别,在商陆愈伤组织培养中分离获得数株色泽有区别的株系,分析其过氧化物同工酶酶谱表明,这些株系在遗传上有区别。同时,这些株系在生长速度,总蛋白质含量、蛋白质组成及部分区域的蛋白质比例上存在较大的差别,其中白色株系具有较明显的优点,对其培养条件进行优化又使总蛋白质含量提高70%,从而用于进一步的研究。

关键词 美洲商陆;美洲商陆抗病毒蛋白;细胞株系;过氧化物同工酶

美洲商陆抗病毒蛋白(Pokeweed Antiviral Protein,PAP)可由美洲商陆(*Phytolacca americana*)叶子(春季,夏季),种子,根及培养细胞中获得,分别记作PAP,PAP-Ⅱ,-S,-R,-C,通称PAPs[2~5]. PAPs各组分在分子量、等电点、*N*端氨基酸序列等特性上具有一定的类似性[6,7,10],Southern blot探计分析表明PAP是由多基因转译的[8],从而在不同的生理状态下,不同的细胞株系中,其表达强度也不一样,进而影响细胞内蛋白及特定蛋白(如PAP)的数量,活性及分子结构等。

本文阐述细胞培养生产PAP时,应寻求高产的细胞株系。通过分割培养及分离获得了数个色泽不同的株系,根据过氧化物同工酶酶谱的异同进行鉴别,比较其生长速度、总蛋白质含量、组成及部分区域蛋白的比例,确定白色株系具有较明显的优点。

1 材料与方法

1.1 培养方法

收稿日期:1993-11-18
* 国家自然科学基金资助项目

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

愈伤组织诱导和继代培养 愈伤组织诱导按前报[11]方法常规进行。培养条件 26±1 C，连续光照 2000Lux 或暗培养，每 2～3 周用接种铲进行转接继代培养，不同颜色的愈伤组织块及时分割分别培养，使用培养基包括 MS，B5，SH 及 2xMS 等。

1.2 细胞破碎方法

1.2.1 *研磨法* 取培养细胞置－20 C冰箱中速冻 3～4h，放入 4 C，pH7.5，0.14mol/L NaCl，0.02mol/L 磷酸缓冲液中，加脱氧胆酸钠达 0.4%，添加少量石英砂，在研钵中研磨 30min，磨成的浆料于 10000r/min5 C离心 15min，取上清液备用。

1.2.2 *超声波法* 取培养细胞稍加匀浆后速冻，加入细胞鲜重 2.5 倍体积的 pH7.5，0.14mol/L NaCl，0.02mol/L 磷酸缓冲液，于 28Amp 声波强度下处理 30min，(夹层冰浴降温)间歇 5 次，每次停 1min. 破碎液于 10000r/min 5 C离心 15min，取上清液备用。

1.3 过氧化物同工酶酶谱分析[1]

培养细胞在－20 C冷冻 2～4h，加 2 倍体积 pH8.3，0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液低温下研磨，悬浮液于 4 C，5000r/min 离心 30min. 取上清液加相同体积的 40%蔗糖液(内含溴酚蓝示踪)，40μL 点样量，在 4 C电泳 16h. 染色采用改良的 Liu 法[9]，用少量 H_2O_2 原液代替 0.6%H_2O_2，并添加适量 EDTA. 染色后用去离子水冲洗 2～3 次，然后在 7%醋酸中保存、照相、并及时确定 R_f. 蛋白质组成的区域分析：取同工酶分析用细胞提取液，加等量的 pH8.3 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液，4%SDS，5% β-巯基乙醇，40%蔗糖组成的蛋白质处理液，于 100 C水浴加热 2min，以 40μL 点样，采用 12.5%SDS-PAGE，在 4 C电泳 8h，电泳结束后经三氯乙酸固定，考马斯亮蓝 R-250 染色，醋酸溶液脱色后，于扫描仪上定量。

1.4 蛋白质定量分析

称取牛血清白蛋白(BSA)溶解于 pH7.5，0.14mol/L NaCl，0.02mol/L 磷酸缓冲液中成 0.5%溶液，以 5，10，15，20，25μL 蛋白样品点样于层析滤纸上，待干，经 20%三氯乙酸固定 20min，0.25%考马斯亮蓝 R-250 溶液染色，7.5%乙酸 5%甲醇组成的脱色液脱色三次，每次 15min，再以含 85%甲醇的 0.12mol/L NaOH 进行洗脱，3mol/L HCl 反显后在 721 分光度计 590nm 处测 OD 值，以 OD 值为纵坐标，以 BSA 的量为横坐标作图，即为标准曲线，可求出斜率 K.

1.5 设备

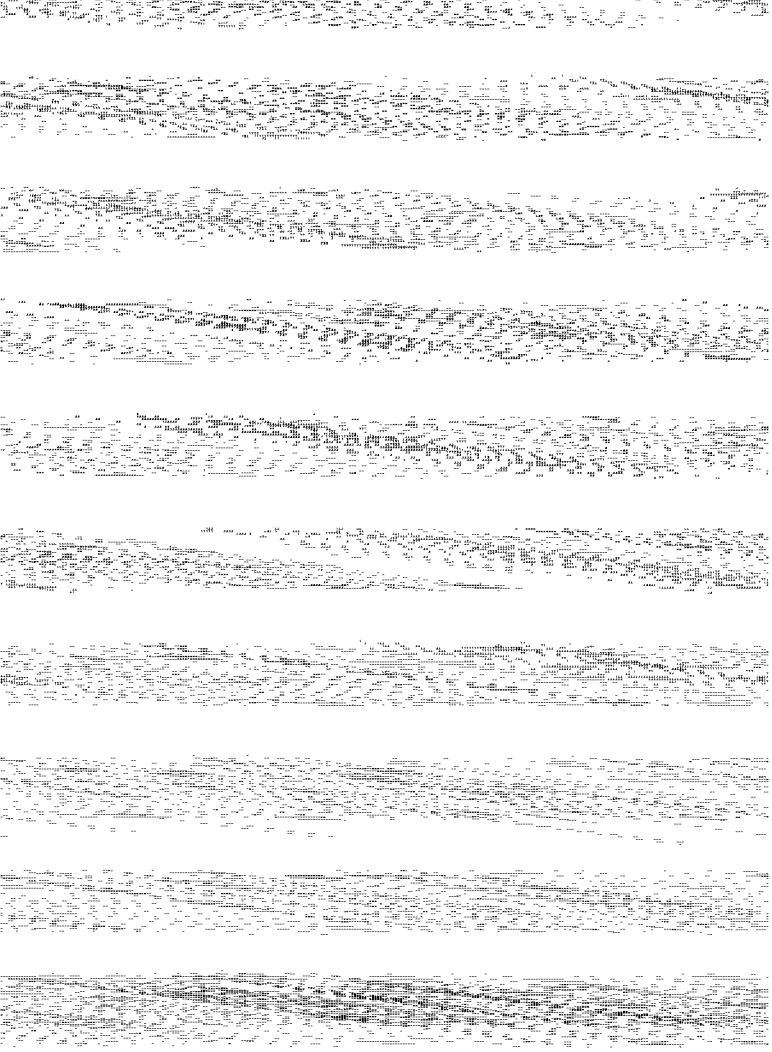
超声波破碎仪 MSE Soniprep 150(英国 Fisons 公司)；高速冷冻离心机(吉林图门离心机厂)；电泳仪 DYY-Ⅲ4 型(北京六一仪器厂)；岛津 CS-910-Dual-Wavelenth TLC Scanner.

2 结 果

2.1 细胞株系的选择

2.1.1 *不同细胞株系的生长比较* 在愈伤组织继代培养过程中，自发产生一些不同颜色的愈伤组织细胞，在转接时将不同颜色的组织块进行仔细分割，继续转接，经数代分割及培养后获得不同的细胞株系。为比较这些不同株系细胞的生长情况，将它们分别按相似量接种到 MS 培养基上，15d 后比较其生长情况，结果如表 1，粉红色细胞株生长速率为最高。

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

R_f0.29 谱带为共同的特征,而红色株系的 R_f0.41 谱带、粉红色株系 R_f0.29 谱带、灰色株系 R_f0.35 谱带及白色与灰色株系所共同存在的 R_f0.16 R_f0.19 谱带则为各株系分别具有的特征,由此可推测 4 个株系遗传上有区别。

2.3 不同细胞株系的蛋白组成及区域分析比较

对不同细胞株系破碎获得的上清液进行 SDS-PAGE 后,将平板凝胶放置于扫描仪上进行定量分析,结果如图 2 及表 3 所示。4 种株系电泳图谱基本相似,但浓密程度有明显区别,就 29kd 谱带而言,白色株系中此带成突出的分离峰,红色株系中成小峰处于 32kd 峰的尾部,而灰色、粉红色株系中则此峰几乎不能鉴出。由于文献报道中PAP 分子量有变动范围,这里我们暂以 24～32kd 区域作为 PAP 比较的相对指标,则其占总蛋白的比例可见表 3,白色株系此区域蛋白质量占总量的 49.1%. 综合考虑相对生长速率、细胞总蛋白含量和区域百分比,可见白色株系具有优越性。

表 3 不同细胞株系区域蛋白分析及综合比较

细胞株系	*Cp* (%)	*Ct* (mg/gDCW)	*R* (1/d)	*I*
粉红色	37.5	239.0	12.0	10.75
红色	32.8	220.9	10.7	7.75
白色	49.1	320.2	7.6	11.94
灰色	—	157.5	3.8	—

注:*Cp* 总蛋白中 24-32kd 部分蛋白的含量

Ct 细胞中总蛋白含量

R 相对生长速率

I 综合指数

$I = Cp \times Ct \times R$,表明部分蛋白的生成速率

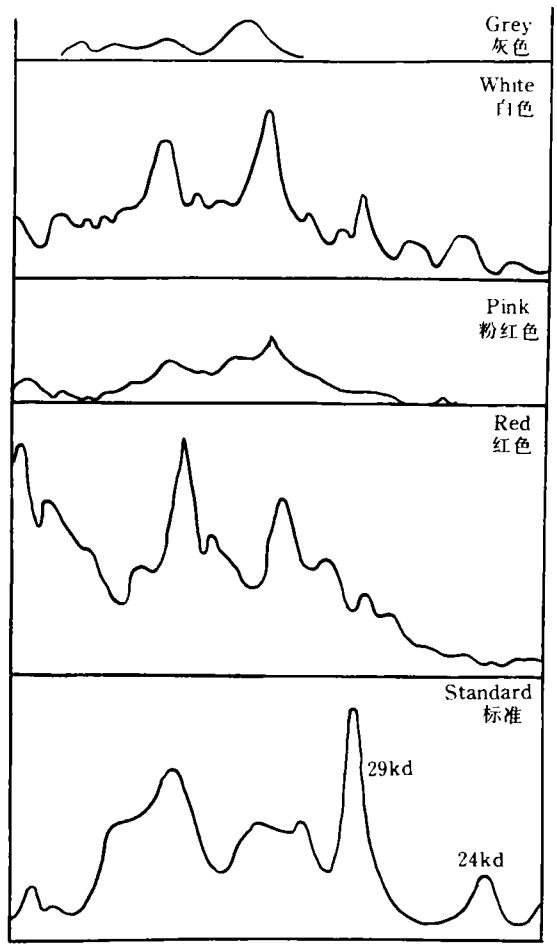


图 2 蛋白质电泳扫描图

2.4 白色细胞株系的培养条件初探

无机氮或有机氮供给量的变化可以影响蛋白质的合成,植物生长调节物质能促使或抑制细胞的生长和分裂,基于这两方面考虑,在对白色细胞株系进行培养条件优化时首先选 NH_4NO_3,谷氨酰胺,生长素和细胞分裂素(KT 和 6BA)4 个因子各 3 个水平,按正交表 $L_9(3^4)$安排试验。

由正交试验结果和方差分析结果(表 4)知,以上 4 个因子中对产量影响最大的是无机氮源浓度,为显著性因子,其它三个因子的影响都不显著。从极差分析确定的比较适宜的条件为:$A_3B_3C_1D_2$,即:无机氮源 12.25×10^{-2}mol/L,谷氨酰胺 40mg/L,KT 1.0μmol/L,2,4-

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

D 1.1μmol/L.

表4 培养条件正交试验结果及分析

表头设计

水平	A 无机氮	B 谷氨酰胺	C 细胞分裂素	D 2,4-D
1	6×10^{-2}mol/L	0	KT 1.0μmol/L	0
2	8×10^{-2}mol/L	20mol/L	6-BA 1.1μmol/L	1.1μmol/L
3	12.25×10^{-2}mol/L	40mol/L	6-BA 2.2μmol/L	2.2μmol/L

正交试验结果

试验序号	因子 A	B	C	D	蛋白质含量 (mg/gDCW)
1	1	1	1	1	251.2
2	1	2	2	2	281.2
3	1	3	3	3	253.4
4	2	1	2	1	382.2
5	2	2	3	2	410.3
6	2	3	1	3	496.4
7	3	1	3	2	460.0
8	3	2	1	3	520.0
9	3	3	2	1	539.5
K_1	785.8	1093.4	1267.6	1201.0	
K_2	1288.9	1211.5	1202.9	1237.6	$T=3594.2$
K_3	1519.5	1289.3	1123.7	1155.6	
K_1	261.9	364.5	422.5	400.3	
K_2	429.6	403.8	401.0	412.5	
K_3	506.5	429.8	374.6	385.2	
R	244.6	65.3	47.9	27.3	

方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方和	F-值	显著性
因素 A	93844.6	2	46922.3	83.42	**
因素 B	6486.4	2	3243.2	5.76	
因素 C	3462.9	2	1731.5	3.08	
因素 D (误差项)	1125.0	2	562.5		
总 计	104919.0	8			

注：$F_{0.05}(2,2)=19.0$，$F_{0.01}(2,2)=99.0$

由此得到一个改良 MS 培养基，NH_4NO_3 的用量改为 4150mg/L(相当 N 浓度 12.25×10^{-2}mol/L)．在此培养基上接种白色细胞株，总蛋白含量达 545.0mg/gDCW，比 MS 培养

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基上该细胞株的蛋白含量(320.2mg/gDCW)提高了 70%.

3 讨 论

美洲商陆细胞株系在人工培养条件下表现出以下不同色译细胞群体,对于筛选高产的细胞株是有用的,这里挑选获得的白色变异株蛋白含量明显高于其它株系,但生长速度并不是最高,在选择中必须综合考虑生长速度、蛋白总量、有效蛋白百分比等参数,从而得到目的物高产株。过氧化物酶是植物体内较为活跃的酶,对植物形态、生长、分化等生理现象都有作用,在研究分化和遗传学时是很有效的标记,利用过氧化物同工酶酶谱分析可确定不同细胞株系的遗传区别,并由此指导进一步的育种工作。

参 考 文 献

1 冯万祥,赵伯龙. 生化技术. 湖南科技出版社,1988

2 Barbieri L, Aron GM, Irvin JD et al. Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from the seeds of Phytolacca americana L. (pokeweed). Biochemistry J. 1982,203:55

3 Barbieri L, Bolognesi A, Cenini P et al. Ribosome-inactivating proteins from plant cell in culture. Biochemistry J. 1989,257:801

4 Bolognesi A, Barbieri L, Abbondanza A et al. Purification and properties of new ribosome-inactivating proteins with RNA N-glycosidase activity. Biochimica et Biophysica Acta,1990,1087:293

5 Irvin JD, Kelly T, Robertus JD. Purification and properties of a second antiviral protein from Phytolacca americana which inactivates eukaryotic ribosomes. Archives of Biochemistry and Biophysics 1980,200:418

6 Irvin JD. Pokeweed antiviral protein. Pharmac. ther. 1983,21:371

7 Kung SS, Kimura M, Funatsu G. The complete amino acid sequence of antiviral protein from the seeds of pokeweed (Phytolacca americana). Agric Biol Chem,1990,54:3301

8 Lin Q, Chen ZC, Antoniw JF et al. Isolation and characterization of a cDNA clone encoding the antiviral protein from Phytolacca americana. Plant Molecular Biology,1991,17:609

9 Liu EH. A simple method for determining the relative activities of individual peroxidase isoenzymes in a tissue extract. Analytical Biochemistry,1973,56:149

10 Myers DE, Irvin JD, Smith RS. Production of a pokeweed antivial protein(PAP)-containing immunotoxin, B43-PAP, directed against the CD19 human B lineage lyphoid differentiation antigen in highly purified or for human clinical trial. J of Immuno. Methods,1991,136:221

11 Wenyi Tao, DiCosmo F. Production and purification of pokeweed antiviral protein by cell culture of Phytolacca americana. In Zeidler G, Whitaker JR, Haard N et al. (ed), Proceedings of the First International Conference on Food Science and Technology,1991,P411

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Selection of the Cell Lines of *Phytolacca americana* and Comparison on Protein Production

Tao Wenyi Zhang Lixing Tang Lei
(Dept. of Fermn. Eng.)

Abstract Pokeweed antiviral proteins (PAP) are translated from multigenes. There are some differences on the gene expression extent between the different cell lines. Several cell lines with different colors are seperated from the callus of *Phytolacca americana*. The chromatographic analysis of peroxidase isoenzymes showed the genetic differences between these lines. And there are obvious differences on growth rate, total protein content, protein composition and the proportion of special proteins. The culture condition of the white cell line, the best one, is optimized and the total protein content from this cell lines increased by 70%. The potentiality is shown for further research.

Key-words *Phytolacca americana*; Pokeweed antiviral protein (PAP); Cell line; Peroxidase isoenzyme

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net