

香蕉胚性及非胚性悬浮培养的建立及其培养液中阿拉伯半乳糖蛋白含量的测定^{*}

李 佳, 黄学林, 魏岳荣

(中山大学生命科学学院 // 基因工程教育部重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 测定了贡蕉花序外植体起始的胚性细胞悬浮系以及东莞大蕉薄片外植体起始的非胚性细胞悬浮系中, 悬浮细胞分泌到培养基中的 AGPs 的含量。结果显示, 香蕉细胞悬浮系在培养过程中分泌到培养基中的 AGPs 浓度与细胞系的发育状态相关, 胚性细胞分泌的 AGPs 的含量高于非胚性细胞。该结果为今后研究 AGPs 与香蕉悬浮细胞胚性潜能的关系提供了可能性。

关键词: 香蕉; AGPs; 悬浮培养; 胚性细胞

中图分类号: Q945.52 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) S1-0279-04

阿拉伯半乳糖蛋白 (arabinogalactan proteins, AGPs) 是一类富含羟脯氨酸的糖蛋白家族, 在植物中分布广泛^[1]。目前, 对其功能方面的各种证据还存在争议, 但研究表明, AGPs 作为一种信号分子, 在植物离体形态发生中发挥重要作用^[2]。

Yariv 试剂是一种偶氮染料^[3], 当其糖基为 β -葡萄糖基或 β -半乳糖基时, 该试剂可与 AGPs 的糖基发生反应^[1]。目前该试剂已被广泛用于 AGPs 的分离和纯化。有报道显示, 在胡萝卜细胞悬浮培养中, 应用 Yariv 试剂对悬浮细胞向胞外分泌的 AGPs 进行分离纯化, 结果显示 AGPs 的类型随细胞生长发育状态的变化而发生变化, 并且发现添加一定类型的 AGPs 到培养基中可影响悬浮细胞的胚性潜能^[4]。

香蕉 *Musa spp.* 胚性细胞悬浮系是进行香蕉基因改良及突变筛选的良好受体系统。目前, 香蕉悬浮培养体系已经在多种不同的外植体如未成熟合子胚、未成熟花序、高度增殖的芽尖丛 (Scalps) 以及组培苗的假茎中成功建立^[5]。然而目前, 国内外有关香蕉 AGPs 的研究还未见报道。其胚性与非胚性悬浮系中, 细胞是否向外分泌 AGPs 以及分泌量的大小还不清楚。我们在建立香蕉胚性以及非胚性细胞悬浮系的基础上, 对其分泌到培养基中的 AGPs 含量进行了测定, 以期研究该物质的分泌与香蕉悬浮系胚性潜能的关系提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

供试材料贡蕉 *Musa AA Pisang Mas cv. Mas* 未成熟雄花序以及东莞大蕉 *Musa ABB cv. Dongguandajiao* 组培苗来源于广东省农科院果树所。用于合成 Yariv 试剂的原料 p-aminophenyl- β -D-glucopyranoside 及测定 AGPs 浓度所用的标准品 Gum arabic 均购自 Sigma-Aldrich 公司。

1.2 香蕉胚性及非胚性悬浮系的建立

贡蕉胚性细胞悬浮系的建立参照魏岳荣等 (待发表) 的方法。取未成熟雄花序为外植体, 接种在附加 9.0 $\mu\text{mol/L}$ 2, 4-D、4.1 $\mu\text{mol/L}$ 生物素、5.7 $\mu\text{mol/L}$ IAA、5.4 $\mu\text{mol/L}$ NAA 和 87 mmol/L 蔗糖的 MS 培养基中进行愈伤组织诱导。诱导 150 d 后, 将获得的浅黄色松散的胚性愈伤组织转入液体培养基 (ML) 中悬浮培养。ML 为 MS 基本培养基附加 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 2, 4-D、4.1 $\mu\text{mol/L}$ 生物素、680 $\mu\text{mol/L}$ 谷氨酰胺、100 mg/L 麦芽提取物以及 130 mmol/L 蔗糖, pH 值 5.3。按每 2 g 愈伤组织 30 mL 培养基的用量, 加入到 100 mL 的锥形瓶中进行悬浮培养。每 2 周更换一次培养基, 并用 154 μm 孔径筛网过滤去除较大的细胞团。滤液 1 000 g 离心 10 min, 5 mL 收集细胞体积 (Packed cell's volume, PCV) / 30 mL 培养基重新悬浮培养, 继代培养 3 个月后可得到较为分散、均质的胚性细胞悬浮系。

相对稳定的非胚性细胞悬浮系是以东莞大蕉薄

^{*} 收稿日期: 2005-02-02

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (701126); 广东省科技攻关项目 (ZKM3010N)

作者简介: 李佳 (1975 年生), 女, 博士研究生; 通讯联系人: 黄学林; E-mail: ls17@zsu.edu.cn

片外植体所诱导的愈伤组织为起始材料并参照 Okole 和 Schulz^[6] 及 Ganapathi 等^[7] 的方法建立。取东莞大蕉假茎横切薄片为外植体诱导愈伤组织, 所用培养基为附加 27 $\mu\text{mol/L}$ 2, 4-D、1 $\mu\text{mol/L}$ IAA、1 g/L 活性炭以及 87 mmol/L 蔗糖的改良 B5 培养基, 其 pH 值为 5.8。将诱导出的愈伤组织进行悬浮培养, 所用培养基为去除活性炭及琼脂粉并添加 0.90 $\mu\text{mol/L}$ Zeatin 的上述改良 B5 培养基 (pH 值为 5.3)。悬浮培养在 100 r/min 的转速下暗培养。每周更换一次培养基, 1 个月后培养物游离出大量单细胞和小细胞团。将悬浮物用 70 μm 孔径筛网过滤后, 滤液在 1 000 g 下离心 10 min, 5 mL PCV/30 mL 培养基重新悬浮培养, 每周更换新鲜培养基, 培养约 3 个月后, 悬浮细胞失去胚性潜能, 可建立相对稳定的非胚性细胞悬浮系。

1.3 AGPs 含量的测定

取从贡蕉未成熟雄花中获得的半年胚性细胞悬浮系以及东莞大蕉薄片诱导获得的半年非胚性细胞悬浮系的培养液, 参照 Kreuger 等^[4] 的方法, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 000 g 离心 5 min, 以去除细胞和细胞团, 上清用半透膜 (YM 5, 000) 对无菌蒸馏水透析过夜 (4 $^{\circ}\text{C}$), 袋内溶液冷冻, 备用。

Yariv 试剂参照 Kreuger 等^[8] 的方法制备, 将 2 mmol p-aminophenyl β -D-glucopyranoside 溶解在 12 mL 的 0.5 mol/L HCl 中, 加入 2 mmol NaNO_2 , 溶解后, 缓慢加入间苯三酚溶液 (0.5 mmol 间苯三酚/25 mL 双蒸水) (pH 9.0)。之后将混合液的 pH 值用 0.5 mol/L NaOH (初始) 和 0.1 mol/L NaOH (后期) 保持在 9.0, 2 h 后, pH 值稳定。加入等体积甲醇, 产生的沉淀通过离心 (3 000 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 15 min) 收集, 并在双蒸水中重新悬浮, 再离心, 以上操作始终保持在 0 $^{\circ}\text{C}$ 。取沉淀在 50 $^{\circ}\text{C}$ 下干燥, 制成粉剂或贮液 (1 mg/mL), 室温保存。

培养液中 AGPs 浓度测定用 SRD (Single radial gel diffusion)^[9] 方法。配 4 mL 胶体积, $w=1\%$ 琼脂糖、0.4 mL 的 1.5 mol/L NaCl、40 μg Yariv 试剂, 加热煮沸。取 3.5 mL 倒入预热的平底玻璃皿 (5 $\times$ 7 cm), 室温下冷却, 形成统一厚度的胶 (1 mm)。用吸管在胶上打孔, 孔径统一为 1.2 mm。将 Gum arabic 稀释成梯度浓度, 点样 (1 μL /孔), 室温过夜, 注意保持湿润。第 2 天, 测色环直径, 将直径的平方与 Gum arabic 质量浓度做曲线。样品溶液的测定方法同上, 对照标准曲线确定样品溶液中 AGPs 的浓度。

2 结果与讨论

2 种香蕉悬浮细胞系培养半年后, 其细胞形态特征见图 1。贡蕉胚性细胞悬浮系中多为细胞团, 其细胞圆形、细胞质浓厚, 细胞核明显 (图 1: A); 而大蕉非胚性细胞悬浮系中, 细胞多为单细胞, 其形状不规则, 细胞质稀疏, 细胞核不明显 (图 1: B)。这与胡萝卜 *Daucus carota* L. 的胚性与非胚性细胞形态特征相似^[4]。

AGPs 是一类蛋白多糖物质, 结构上包括 90% 以上的大的、异质性、高度分支的糖链和 1%~10% 的核心蛋白^[1]。由于二者成分的变化以及相互连接方式的变化, 导致该类物质的种类繁多, 其结构、性质及功能也就各有差异。但 AGPs 的典型特征是可特异性地与 Yariv 试剂发生沉淀反应^[1]。前人发现 Gum arabic 也可与 Yariv 试剂反应, 并且其反应强度与浓度的相关曲线和 AGPs 与 Yariv 试剂反应时的相关曲线相同^[9]。因此可以用 Gum arabic 作为 AGPs 含量的标准参照物。

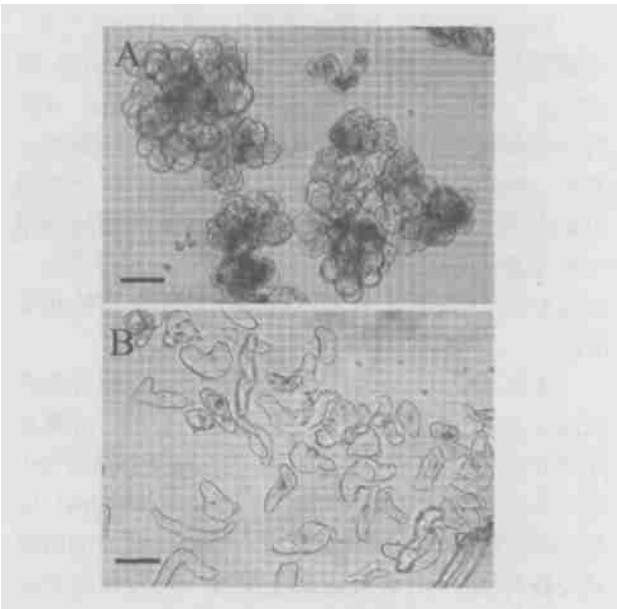


图 1 2 种香蕉细胞悬浮系建立半年后的细胞形态

Fig 1 The morphology of cells in two kinds of suspensions in banana after half year culture.

A: 贡蕉 *Musa AA Pixing Mas* cv. *Mas* 胚性悬浮细胞;
B: 东莞大蕉 *Musa ABB* cv. *Dongguandajiao* 非胚性悬浮细胞 (bar=40 μm)

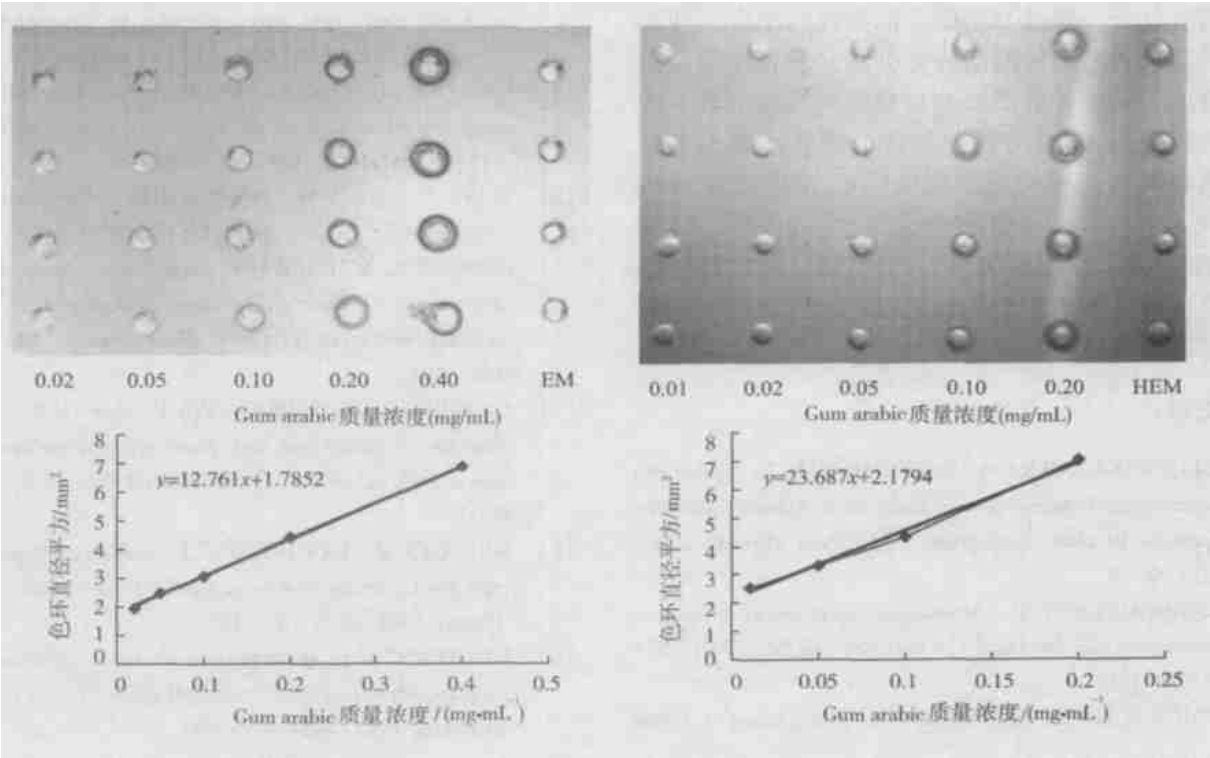


图2 香蕉胚性悬浮系及非胚性悬浮系的培养液中 AGPs 含量测定 (细胞密度同为 5 mL PCV)

Fig.2 The detemrination of AGPs concentration in the mediums of embryogenic and non-embryogenic suspension cultures of banana (The density of cells was 5 mL PCV).

A 和 B 中前 5 列为 Gum arabic 标准物, 最后一列为样品。以 Gum arabic 与 Yariv 试剂反应的色环直径平方 (mm²) 与梯度浓度 (mg/mL) 做出标准曲线。EM: 贡蕉 *Musa AA Pisang Mas* cv. *Mas* 半年胚性细胞悬浮培养液; NEM: 东莞大蕉 *Musa ABB* cv. *Dongguandajiao* 半年非胚性细胞悬浮培养液

图2为2种香蕉细胞悬浮系培养液进行SRD测定的结果, 从图2可见, 培养液中所含的AGPs可与凝胶中的Yariv试剂发生沉淀反应, 形成色环; 同时, 梯度浓度的Gum arabic也同样可与Yariv试剂反应。测定结果显示, 贡蕉胚性细胞悬浮系及大蕉非胚性细胞悬浮系, 在细胞密度相同的情况下, 其培养液中AGPs的质量浓度分别是70.8 mg/L及56.7 mg/L (图3)。胚性细胞悬浮培养液中的AGPs含量比非胚性细胞悬浮培养液中的高出25%。

胡萝卜悬浮细胞系中, 非胚性细胞以及胚性细胞悬浮培养的培养液中, 观察到分泌到胞外的AGPs类型及含量有所不同, 且随着其发育阶段的变化而变化^[4]。我们的结果也同样显示, 胚性细胞悬浮系与非胚性细胞悬浮系分泌到培养基中的AGPs含量有所差异, 胚性细胞悬浮培养液比非胚性细胞悬浮培养液高。我们推测, 这种差异可能是由于胚性悬浮系中细胞分裂更加活跃, 代谢旺盛, 因此相对来说分泌到胞外的AGPs分子则较多; 也可能是两种悬浮系分泌到培养基中的AGPs类型不同, 各种类型分泌的量也有所不同, 而导致其总浓度的差异。

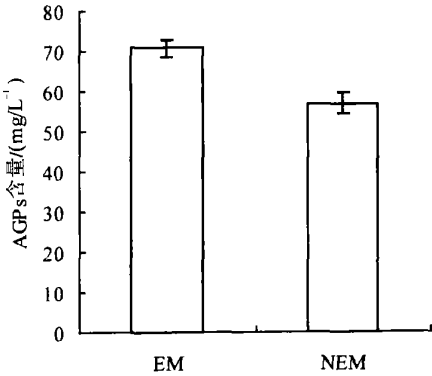


图3 香蕉胚性悬浮系及非胚性悬浮系的培养液中 AGPs 含量的测定结果

Fig.3 The contents of AGPs in the mediums of embryogenic and non-embryogenic suspension cultures of banana
EM: 贡蕉 *Musa AA Pisang Mas* cv. *Mas* 半年胚性悬浮细胞培养液; NEM: 东莞大蕉 *Musa ABB* cv. *Dongguandajiao* 半年非胚性悬浮细胞培养液

AGPs 在植物生长发育中的作用已有所研究, 并提出了几种作用模式^[2], 推测 AGPs 是作为一种

胞外信号分子，通过与细胞表面受体的结合，使得细胞内部某些基因被激活或被抑制，或者是对蛋白质的合成、转运等造成影响。有研究发现胡萝卜成熟胚中提取的 AGPs 可诱导胡萝卜非胚性细胞系胚性潜能的恢复，而非胚性细胞系中提取的 AGPs 则可完全抑制胚性细胞的发育^[4]。因此，研究 AGPs 在香蕉悬浮细胞的发育以及分化中是否能够发挥作用以及发挥怎样的作用对于香蕉胚性细胞悬浮系的改良和优化具有重要的意义。

参考文献:

[1] MAJEWSKA-SAWKA A, NOTHNAGEL E A. Update on extra-cellular matrix: The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development [J]. Plant Physiol, 2000, 122: 3—9.

[2] SHOWALTER A M. Arabingalactan proteins: structure, expression and function [J]. Cell Mol Life Sci, 2001, 58: 1399—1417.

[3] YARIV J, LIS H, KATCHALSKI E. Precipitation of Arabic

acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes [J]. Biochem J, 1967, 105: 1c—2c.

[4] KREUGER M, VAN HOLST G J. Arabino-galactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L [J]. Planta, 1993, 189: 243—248.

[5] 魏岳荣, 李哲, 李佳, 等. 香蕉生物技术研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(5): 64—68.

[6] OKOLE B N, SCHULTZ F A. Micro-cross sections of banana and plantains (*Musa* spp.): morphogenesis and regeneration of callus and shoot buds [J]. Plant Science, 1996, 116: 185—195.

[7] GANAPATHI TR, SUPRASANNA P, BAPAT V A, et al. Somatic embryogenesis and plant regeneration from male flower buds in banana [J]. Curr Sci, 1999, 76(9): 1228—1231.

[8] KREUGER M, VAN HOLST G J. Arabino galactan protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L [J]. Planta, 1995, 197: 135—141.

[9] VAN HOLST G J. Quantification of arabinogalactan protein in plant extracts by single radial gel diffusion [J]. Analytical Biochem, 1985, 148: 446—450.

Establishment of Embryogenic and Non Embryogenic Suspension Cultures of Banana and Determination of Arabinogalactan proteins Concentration in the Medium

LI Jia, HUANG Xue lin, WEI Yue rong

(The Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education // School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The concentrations of the AGPs secreted into the medium by the cells of embryogenic suspension culture derived from immature male flowers of *Musa AA Pisang Mas* cv. *Mas* and non embryogenic suspension culture derived from micro cross sections of *Musa ABB* cv. *Dongguandajiao* were determined. The results showed that the concentration of AGPs was connected with the developmental situation of the suspension cells and was higher in the medium of embryogenic suspension culture. This could provide the feasibility to study the connection between AGPs and embryogenic competence of suspension cells in banana.

Key words: banana; arabinogalactan proteins; suspension culture; embryogenic cells