

· 小方法 ·

一种改进的烟草悬浮细胞继代方法

赵文明, 杨万年*

华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079

在植物细胞悬浮培养过程中, 对影响细胞系均一性和质量的细胞团块形成的克服方式一般有2种。一是分级过滤继代, 即用不同目数的细胞筛除去大的细胞团块和细胞碎片, 将小细胞团和单细胞转移到新培养基中作继代培养。此方法操作繁琐, 容易污染。另一种是取上层细胞悬液继代, 继代时先摇匀悬浮细胞, 静置几秒钟后, 用移液管把一定体积的上层细胞悬浮转移到新的培养基中培养(李浚明 2002; Chawla 2004)。此方法操作较简单, 但要得到好的悬浮细胞, 必须频繁继代且不易控制所转移细胞的质和量, 转移细胞时静置时间太短, 大细胞团常常堵塞移液管口, 放置时间过长则会导致转移的细胞量过少, 难于形成细胞系。为此我们介绍一种改进的悬浮细胞继代方法, 操作简单, 可以得到均一的悬浮细胞。

取大约 1 g 烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv Wisconsin-38)愈伤组织, 转入盛有 40 mL MS+0.5 mg·L⁻¹ 2,4-D+0.25 mg·L⁻¹ KT培养基的 150 mL 三角瓶中, 置于摇床上以 120 rpm 的转速于 25 °C 下震荡培养。每周继代 1 次, 取出一部分旧的培养基转移到新鲜培养基中。1 个月后, 采用 2 种方法继代。一种仍采用普通的更换培养基方法, 旧培养基与新鲜培养基的比例为 1:4, 新鲜培养基 20 mL, 每 8 d 继代 1 次。另一种则采用改进的方法, 每 8 d 继代 1 次, 旧培养基与新鲜培养基的比例为 1:2, 新鲜培养基为 20 mL。操作时用大拇指将 5 mL 移液器的按钮完全按下, 让吸头伸到三角瓶底。放松大拇指后快速提起移液器, 再快速放下, 吸头仍旧伸到瓶底。这样细胞悬浮液会在提起和放下过程中被吸起。如此回复 2~3 次, 可吸到 5 mL 的细胞悬浮液, 然后转移到新鲜培养基中。反复进行以上步骤。操作时要迅速, 提起移液器时不可脱离液面, 即吸头口一直保持在细胞悬浮液中。测定生长周期时, 2 种不同继代方法的悬浮细胞各 3 瓶, 为便于抽干水分, 先用 200

目尼龙滤器过滤, 再用中速滤纸抽干。称量滤纸和细胞的总重量减去滤纸的湿重(滤纸湿重预先称)即为细胞鲜重。结果可以总结为以下两点。

(1)改进的方法所得到的悬浮细胞系以小细胞团为主, 呈淡黄色, 没有大的细胞团(图 1-a)。一般只需经过 2 次继代, 即可得到分散性好的细胞;(2)改进方法继代后的细胞周期约为 15 d, 明显分为滞后期、对数生长期、直线生长期和停滞期(图 2)。对数生长期细胞倍增时间约为 2 d, 这



图1 两种继代方法得到的烟草悬浮细胞
a: 改进的方法; b: 普通的方法。

收稿 2006-12-07 修定 2007-04-09
* 通讯作者(E-mail: zwmxp@mails.ccn.edu.cn; Tel: 027-67867223)。

和李浚明(2002)的结果一致。对数生长期和直线

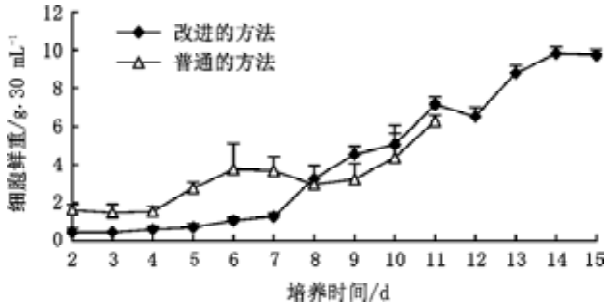


图2 烟草悬浮细胞系的生长周期

生长期长达 8 d, 生长达到高峰时的细胞鲜重比刚继代时的增加 21 倍。而普通方法因继代的材料较多, 整个细胞周期约为 11 d, 但生长周期的各个时期不如前者明显, 生长达到高峰时的细胞鲜重增加约 3 倍。改进方法的细胞周期容易确定, 细胞对数生长期长。

参考文献

- 李浚明(2002). 植物组织培养教程. 北京: 中国农业大学出版社, 78~80
- Chawla HS (2004). Introduction to Plant Biotechnology. Beijing: Science Press, 57~73