

紫菜细胞悬浮培养^①

何培民^② 王素娟

(上海水产大学养殖系, 200090)

收稿日期 1991年6月20日

关键词 条斑紫菜, 离体细胞, 悬浮培养, 气升式反应器

提要 用酶解技术获得条斑紫菜离体细胞并对其进行细胞悬浮培养研究; 对藻体不同部位的细胞分化发育方式, 不同悬浮器具培养效果及不同起始培养的细胞密度进行了探索。结果表明: 用气升式生物反应器培养细胞效果最佳, 起始培养的细胞密度可达 1×10^5 细胞/ml, 细胞存活率达 85%。

我国在生物技术应用于紫菜育苗上的研究工作已取得了较大的进展, 特别是王素娟等^③ (1990年) 研究的条斑紫菜体细胞快速育苗技术初步进入实用阶段。为了使该项技术进一步完善, 迫切需要建立大规模细胞培养技术。目前国外已广泛应用气升式反应器来培养植物细胞而且也开始研究用它来进行动物细胞、昆虫细胞的培养以及微生物发酵, 但在我国这项工作还处于起步阶段。气升式生物反应器剪切力小, 结构简便, 造价低, 用其来培养细胞以获得大量苗种, 将是紫菜体细胞育苗技术今后的研究方向。本实验就是在以前工作的基础上, 用条斑紫菜离体细胞为材料进行细胞悬浮培养, 通过气升式生物反应器建立紫菜细胞悬浮培养系统, 为海藻大规模细胞培养打下基础。

1 材料与方 法

1.1 种藻来源

本实验用的条斑紫菜采集于江苏启东海丰

村海区, 采集日期为 1991 年 3 月 8 日。采集的紫菜经阴干后放入塑料薄膜袋中用低温冰箱保存备用。

1.2 细胞分离与收集

方法同文献[4]。

1.3 悬浮培养

1.3.1 MS 系统 用磁力搅拌器(MS)搅拌悬浮培养, 容器为 1 L 的三角瓶。

1.3.2 ES 系统 用电动搅拌器(ES)搅拌悬浮培养, 容器为 5~10 L 的圆柱形玻璃缸(直径为 20 cm, 高为 30~60 cm)。

1.3.3 AL 系统 用气升式生物反应器充

① 本文为国际科学基金会赞助课题, 得到华东化学学院陈国良、陆健老师的指导及许峰、赵华全同学的大力协助, 谨致谢忱。

② 为本刊通讯员。

③ 王素娟、何培民、周一红, 1990。条斑紫菜体细胞快速育苗技术的研究。

气悬浮培养,其容器为:

AL_a 系统 2 L 的长圆柱形玻璃缸(直径为 10 cm,高为 50 cm)。

AL_b 系统 自制的 20 L 长方柱水箱(边长为 20 cm,高为 70 cm)。

AL_c 系统 华东化工学院提供的 9 L 长圆柱形生物反应器(直径为 14 cm,高为 76 cm)。

1.4 培养条件

培养基为 1.020~1.030 比重的 MES 液^[1],温度 20℃,光源为荧光灯,光强为 1 500~3 000 Lux,光照周期为 12 L:12D。

2 结果与讨论

2.1 种藻筛选

在挑选种藻时尽量选取易于细胞苗形成的藻体部位。

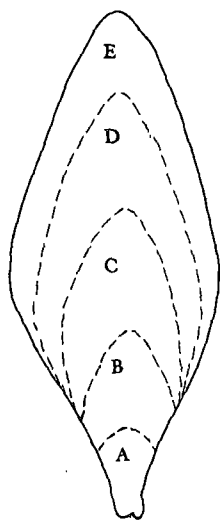


图 1 藻体 5 个区的划分

Fig. 1 Division of 5 sections in thalli

如图 1 所示,可把藻体大致分为 5 个区。A 区的细胞为长条形。B 区的细胞液泡化。A 区和 B 区的细胞都已老化,细胞很少分裂。C 区细胞易分裂为细胞团,少数细胞可分裂为不规则的单细胞苗。D 区细胞易于形成单细胞苗及细胞团。E 区细胞则易于形成单细胞苗,果孢子或果

孢子囊、精子囊。

因此,可选择藻体的 C 区和 D 区部位为酶解细胞材料。

2.2 不同悬浮培养器具的比较

分别用 MS 系统,ES 系统进行搅拌悬浮培养,AL 系统进行充气悬浮培养紫菜离体细胞,其结果见表 1。

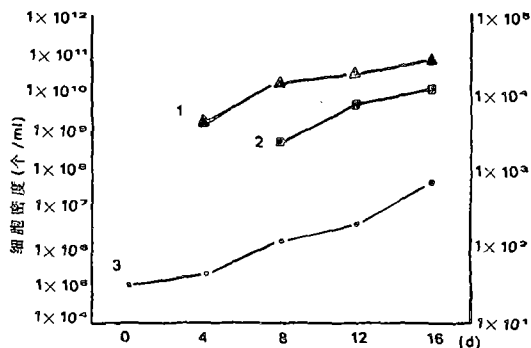


图 2 细胞生长及细胞团数和细胞数的变化

Fig. 2 Changes of cell, aggregate and seedling numbers

1. 细胞生长, 2. 细胞团, 3. 细胞数

从表 1 看出,气升式生物反应器是较理想的悬浮培养工具,其细胞存活率高,细胞苗生长快。如细胞培养 16 d 后,其细胞苗的长度为 130μm;而在 MS 系统中,苗长只有 50μm。这是因为气升式生物反应器剪切力小,细胞存活率高,同时含氧量高。

2.3 气升式生物反应器

先后试用了 3 种不同的生物反应器,其结果见表 2。

从表 2 可看出,具有圆底且带有导流管的 AL_c 的混和效果最好,且气量只有 0.15~0.20 L/L. M,为其它两种的 10~30%,具有进行高密度细胞培养的潜力。

气升式生物反应器,不仅适合于植物细胞培养,而且由于其剪切力小,混和均匀,动物细胞、昆虫细胞及微生物发酵也倾向于用气升式生物反应器。

2.4 细胞生长及倍增时间

用 AL_0 反应器培养紫菜细胞的三次实验中,细胞起始培养密度均为 1×10^5 细胞/ml,培养 16 d 后,细胞存活率均在 70~85% 范围内,其结果如图 2 所示。

从图 2 可看出,紫菜细胞的倍增时间为 7~8d。细胞一般在第 4 天开始陆续分裂,第 8

表 1 不同悬浮培养器具的比较

Tab. 1 Comparisons of different tools for suspension culture

器具	转速或气量	含氧量 (mg/L)	存活率 (%)	细胞团率 (%)	细胞苗数 (棵/ml)	苗长 (μm)
MS	150~200 rpm	9.4	25~76	57.7	9×10^3	50
ES	80~200 rpm	8.7	25~43	68.5		
AL	0.15~1.5 L/L·M	10~11	50~85	71.5	3×10^4	130

表 2 不同气升式生物反应器的比较

Tab. 2 Comparisons of different airlift reactors

类型	底部形状	容量 (L)	径高比	导流管	气量 (L/L·M)	悬浮效果	存活率 (%)
AL_0	平底	2	1:5	无	1~1.5	+	50~85
AL_0	漏斗形底	20	1:3.5	无	0.5~0.7	++	50~80
AL_0	圆底	9	1:6.8	有	0.15~0.20	+++	50~80

表 3 不同细胞密度培养的比较

Tab. 3 Comparisons of different cells density

细胞密度 (细胞/ml)	光照强度 (lux)	细胞大小 (μm)	存活率 (%)	细胞团数 (个/ml)	细胞苗数 (棵/ml)	苗长 (μm)
1×10^5	1 100~4 500	14~20	85	45×10^4	5×10^3	50
5×10^5	500~4500	10~16	74	3.5×10^4	25×10^3	40
1×10^6	300~4500	10~12	23	3.3×10^4	5×10^3	30

2.5 不同细胞密度培养的比较

共设 1×10^5 , 5×10^5 和 1×10^6 细胞/ml 3 个细胞密度组,用 AL_0 生物反应器培养,结果见表 3。从表 3 可看出, 1×10^5 细胞/ml 组效果最好,其次为 5×10^5 细胞/ml 组,而 1×10^6 细胞/ml 最差。随着细胞密度增大,细胞存活率降低,同时细胞苗的生长较慢。如培养 10d 时, 1×10^5

天细胞团数达 $1.5 \sim 3.2 \times 10^4$ 个/ml,为起始培养细胞数的 15~32%,且细胞苗数达 1.6×10^4 棵/ml。培养 12~16 d,细胞团数可达 $2 \sim 6 \times 10^4$ 个/ml,细胞苗数可达 $1 \sim 3 \times 10^4$ 棵/ml,最长的细胞苗可达 130 μm ,细胞苗中的细胞可达 40 多个。

细胞/ml 组的苗最长可达 50 μm ,而 1×10^6 细胞/ml 组的苗最长只为 30 μm ;第 16 天时,前者苗最长可达 200 μm ,而后者只为 50 μm 。

综上所述,用气升式生物反应器培养紫菜细胞效果最好,其细胞存活率可达 85%,起始培养的细胞密度可达 1×10^5 细胞/ml,细胞倍增时间为 7~8 d。随着研究的深入,可以在极小

的育苗室培育出大量的细胞苗种,为紫菜体细胞育苗技术提供了可能。

参考文献

- [1] 王素娟等,1986.坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究.海洋与湖沼 17(3):217~221。
- [2] 王素娟等,1987.坛紫菜营养细胞和原生质体培养的研究.Ⅱ.直接育苗下海养殖实验研究.海洋科学 11(1):1~7。
- [3] 方宗熙等,1986.紫菜营养细胞的酶解和在水产养殖中的应用,海洋科学 10(3):46~47。
- [4] 何培民、王素娟,1991.条斑紫菜细胞苗培养及其总氮量和氨基酸分析.水产学报 15(1):50~56。
- [5] 戴继勋等,1988.紫菜叶状体细胞酶法分离及其养殖研究,生物工程学报 4(2):133~137。
- [6] Chen, L. C. M., 1986. Cell development of *Porphyra minima* (Rhodophyceae) under axenic culture. *Botanica Marina* 24:435—9.
- [7] Martin, S. M., 1980. Mass culture systems for plant cell suspension. In: *Plant Tissue Cultures as a Source of Biochemicals*, ed. E. G. Staba, Boca raron, Florida. CRC Press. 149—146.
- [8] Polne—Fuller, M. & Aharon, G., 1984. Developmental studies in *Porphyra*. I. Blade differentiation in *Porphyra perforata* as expressed by morphology, enzymatic digestion, and protoplasts, regeneration. *J. Phycol.* 20:609—16.
- [9] Wood, L. A. & P. W. Thompson, 1987. Application of the airlift fermenter. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 15: 131—143.

CELL SUSPENSION CULTURE IN PORPHYRA

He Peimin and Wang Sujuan

(Aquaculture Department of Shanghai Fisheries University, Shanghai, 200090)

Key Words: *Porphyra yezoensis*, Isolated cells, Suspension culture, Airlift bioreactors

Received: June 20, 1991

Abstract

In this experiment, the cells were isolated enzymatically from thalli in *Porphyra yezoensis* and cultured with suspension method. The comparison of development direction of cells in different sections of thalli, the comparison between different tools for cell suspension culture and the comparison between different cell densities were made. The results showed that the highest ratio of live cells could reach as high as 85% when cells cultured with 1×10^5 cells/ml of initial density.