

河蚌培养组织的几种生化成分分析*

张洪渊 石安静 刘克武 龚由彬 罗胜清

(四川大学生物系 成都 610064)

摘要 本文分析测定了三角帆蚌、褶纹冠蚌和背角无齿蚌外套膜培养组织及其培养液中的氨基酸、牛磺酸及钙含量。在珍珠中含量较高的丙氨酸和甘氨酸分别增加 541% 和 91%。三种蚌在培养中牛磺酸含量增加 5.78% 到 3 倍,培养组织的钙含量增加 1 倍左右。同时测定了培养组织的碱性磷酸酶活性,培养组织与河蚌外套膜具有相近的比活及相对酶活。结果表明,河蚌外套膜在离体培养条件下,也具有分泌珍珠质的能力。

关键词 河蚌,培养组织,外套膜,生化成分

河蚌外套膜外表皮细胞具有分泌珍珠质的能力^[1]。应用组织培养技术对海水贝外套膜^[2]及淡水蚌外套膜^[3]进行离体培养均已获得成功。但培养组织能否分泌珍珠质,分泌珍珠质的有效成分如何,均未见报告。据分析,珍珠的重要成分有壳角蛋白、氨基酸、牛磺酸和钙质等^[4]。为了探明河蚌外套膜在离体培养条件下其分泌物的性质,我们对这些组织成分进行了测定。因为在珍珠的形成及珍珠质分泌中细胞的钙质代谢十分活跃,而磷酸酶的活力不仅与钙磷代谢相关,维持细胞内适宜的钙磷比例,而且也是机体内代谢的调节控制因素之一,因此我们对培养组织的碱性磷酸酶活力也同时进行测定,以反映培养细胞的代谢活性。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

实验用淡水蚌为三角帆蚌 [*Hyriopsis cumingii*], 取自南京浦口;褶纹冠蚌 [*Cristaria plicata*], 取自湖南洞庭湖;背角无齿蚌 [*Anodonta woodiana*], 取自成都郊区。共用蚌 63 个,每批 6 个(每种蚌各 2 个),取其外套膜进行组织培养。

测定用氨基酸及牛磺酸对照品为美国 Si-

gma 产品, Sephadex-100 为 Pharmacia 产品,其他试剂为国产分析纯。

1.2 测定方法

1.2.1 组织培养方法 分别取三种蚌的外套膜按文献^[5]的方法进行组织培养。

1.2.2 氨基酸及牛磺酸含量测定 取培养组织的培养液和未培养组织的空白培养液按酸水解法测定。取培养不同时间(5 天、10 天及 15 天)的培养液及空白培养液,以 1500 r/min 离心 10 分钟,各取上清液 2 ml,加 6 mol/L HCl 溶液 2ml,在 110℃ 封管水解 22—24 小时,开管后蒸干,加入 0.5 ml 0.01 mol/L NaOH 溶液,放置 4 小时,用 0.01 mol/L HCl 溶液定容至 5 ml, 备测。

用美国 Beckman 121 MB 氨基酸分析仪按单柱柱生理体液法测定氨基酸及牛磺酸含量。

1.2.3 钙含量测定

1.2.3.1 组织匀浆液钙含量测定 取新鲜背角无齿蚌外套膜外表皮组织及培养 7 天的白色组织块各 2 克,用 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.2)洗 3 次,剪碎后匀浆,并用同种缓冲液定容至 100ml。

* 国家自然科学基金资助项目。

1.2.3.2 组织水解液钙含量测定 取背角无齿蚌外套膜外表皮组织和培养15天的白色组织块各1克,用0.56% NaCl溶液洗三次,加6mol/L HCl溶液10ml,110℃封管水解24小时,开管后蒸干并用0.56% NaCl溶液定容至50ml。

用美国 Jarrell-Ash 公司 ICAP*9000(N+M) 型光谱仪测定钙含量。

1.2.4 碱性磷酸酶 (AKP) 活性测定 AKP 的纯化及活性测定参考 Mckenna 等^[4]的方法并略加修改: 分别取背角无齿蚌外套膜外侧及内侧,以及培养组织,用冷蒸馏水漂洗后剪碎,按1:3 (W/V) 加入预冷的0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.5, 含0.1mol/L NaCl)、匀浆,匀浆液加入预冷的正丁醇20% (V/V),以3000 r/min 离心15分钟后得到粗提取液,再用硫酸铵盐析,取0.4—0.7饱和度沉淀部分,溶

解透析后经 Sephadex G-100 柱 (1.5 × 100 cm) 层析,用0.05 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 洗脱,流速18 ml/小时,收集有活力部分以磷酸苯二钠为底物测其酶活,每15分钟生成10微克酚为1个活力单位。

蛋白质浓度按 Lowry 法^[5]测定。

组织培养及测定工作从89年3月至92年5月,共培养10批。氨基酸、牛磺酸及钙含量各测定3批,碱性磷酸酶活性测定4批。各取其平均值。

2 结果

2.1 氨基酸含量

测定了背角无齿蚌的空白培养液及培养5天的培养液中氨基酸含量,结果见表1。

2.2 牛磺酸含量

表1 空白培养液与5天后培养液中氨基酸含量比较 (μmol/L)

氨基酸种类	空白培养液	5天后培养液	相差值	相对增加量 (%)
丙氨酸	165.72	1063.63	897.81	541.76
谷氨酸	201.10	837.40	636.30	316.56
赖氨酸	128.78	295.70	166.92	129.62
苏氨酸	156.50	319.11	162.61	103.90
缬氨酸	188.80	367.36	178.56	94.58
甘氨酸	143.40	274.06	130.66	91.12
组氨酸	84.91	154.20	69.29	81.60
天门冬氨酸	180.50	327.17	146.67	81.26
缬氨酸	196.38	309.92	113.54	57.82
甲硫氨酸	61.66	93.70	32.04	51.96
精氨酸	207.68	303.42	95.74	46.10
亮氨酸	328.56	417.20	88.64	26.98
胱氨酸	132.84	159.10	26.26	19.77
异亮氨酸	183.44	214.50	31.04	16.92

表2 培养组织与未培养组织培养液中的牛磺酸含量 (μmol/L)

结果	未培养	背角无齿蚌			三角帆蚌			褶纹冠蚌		
		5天	10天	15天	5天	10天	15天	5天	10天	15天
测定值	14.53	45.27	52.43	69.22	15.37	19.27	21.54	21.56	26.04	28.62
增加值		30.74	37.90	54.69	0.84	4.74	7.01	7.03	11.50	14.09
相对增加量 (%)		211.60	260.84	376.39	5.78	32.62	48.25	48.38	79.22	96.97

表 3 未培养与培养组织匀浆液及组织水解液中的钙含量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)

结 果	未 培 养 组 织		培 养 组 织 块	
	匀浆液	水解液	匀浆液(培养 7 天)	水解液(培养 15 天)
测定值	2.19	4.71	4.62	8.82
增加值			2.43	4.11
相对增加量(%)			111.0	87.3

表 4 外套膜不同部位及其培养物的碱性磷酸酶活力

测试样品	组织重量 (g)	总蛋白 (mg)	总活力 (U)	比活 (U/mg)	相对活力 (U/g 组织)
外套膜	8.0	0.28	10.88	38.8	1.36
外套膜外侧	5.0	0.34	9.08	26.7	1.82
外套膜内侧	6.0	0.17	12.75	75.0	2.13
外套膜外侧培养组织	2.9	0.13	4.85	37.3	1.67

三种蚌培养细胞 5 天、10 天及 15 天后的培养液与未培养组织的空白培养液比较,牛磺酸的含量均有增加,并随着培养时间的延长增加量愈多(表 2)。

2.3 钙含量

背角无齿蚌培养 7 天的白色组织块匀浆液与未培养组织匀浆液比较,其钙含量增加 1 倍。培养 15 天的白色组织块与未培养组织水解液比较,钙含量增加约 87%(表 3)。

2.4 碱性磷酸酶活性

测定了背角无齿蚌外套膜外侧、内侧及膜外侧组织培养物的碱性磷酸酶活性。外套膜外侧与内侧酶的比活及相对酶活有较大差异,外侧组织培养物的相对活力接近于未培养的外套膜外侧,但其比活比未培养外侧组织高,而低于内侧组织(表 4)。

3 讨 论

3.1 无论海水蚌或淡水蚌的外套膜在离体条件下培养,其细胞均具有增殖和分泌的能力^[1,2]。在组织培养过程中,可观察到有机珍珠质的颜色、形状和透明度^[1]。从本文对培养组织培养液的分析结果,构成蛋白质的氨基酸含

量普遍增高,最高的增长达 5 倍以上。说明细胞在培养过程中,其氨基酸和蛋白质合成代谢是十分旺盛的。在天然珍珠中含量较高的丙氨酸、甘氨酸和天门冬氨酸^[3]分别增长 5 倍、0.9 倍和 0.8 倍。结果表明培养组织的分泌活动与珍珠质的形成具有某些相关性。

3.2 珍珠作为名贵的中药材,其重要有效成分的牛磺酸^[6,7],在三种蚌培养组织的培养液中其含量均增加,而且随培养时间的延长,其增加量愈多(表 2)。三种蚌比较,背角无齿蚌含量增加最多,褶纹冠蚌其次,三角帆蚌较少。从人工育珠实践看,褶纹冠蚌形成珍珠的速度快,产量高,但珍珠粗糙;三角帆蚌成珠速度较慢,而珠质好,光泽细腻。在离体培养中相同时间内,褶纹冠蚌分泌的牛磺酸比三角帆蚌多,这与活体内珍珠形成的速度一致。背角无齿蚌成珠速度也比褶纹冠蚌慢,但在体外培养相同时间,分泌的牛磺酸却更多,这可能是由于背角无齿蚌在全国分布广,适应环境能力较强,而且从本地采集的蚌具有较强的代谢活力。其余两种蚌均从外地运回,不大适应现有养殖条件而造成一定差异。

3.3 化学成分分析表明,珍珠的主要成分为

钙质、淡水珠和海水珠相似,含碳酸钙91.7%^[9]。外套膜具有三个突起:生壳突起、感觉突起和缘膜突起,一般认为生壳突起分泌贝壳最外层的黑褐色角质层,生壳突起以内向壳顶方向的一小部分上皮细胞分泌石灰质的、无光泽的棱柱层^[8,9]。在离体培养下,形成贝壳素的黑褐色组织和形成珍珠质的白色组织其钙含量均增加,具有富集钙的能力。由表3可见,分泌珍珠质的白色组织的匀浆液和水解液钙含量分别增加111.0%和87.3%,说明在组织培养中,细胞的钙质代谢是十分旺盛的。

3.4 碱性磷酸酶是一种具有低专一性的膜酶,在细胞内不仅与多种物质代谢的调节控制相关,而且参与钙磷代谢,维持细胞内适宜的钙磷比例。在贝类,Beedham^[10]和Kado^[11]指出,碱性磷酸酶与蛋白质的分泌有关。从测定外套膜及其不同部位和外套膜培养组织的该酶活性来看,培养组织的比活及相对活力均接近于整个外套膜(表4),说明在培养过程中细胞仍进行着正常的钙磷代谢和蛋白质分泌活动。

综上所述,从培养组织几种生化成分的分析表明,河蚌外套膜分泌珍珠质的细胞在体外适宜的条件下进行培养,能利用培养液中供给的营养成分,合成珍珠药用的有效成分之一的牛磺酸及珍珠中所含的各种氨基酸,同时还能

富集培养液中的钙,以用于珍珠质的形成。从培养液的氨基酸含量及培养组织碱性磷酸酶的活性测定,表明培养细胞具有旺盛的蛋白质合成和分泌活动。这些结果可能为利用组织培养技术来生产药用珍珠质提供基础依据。

参 考 文 献

- 1 石安静.河蚌外套膜的组织培养.水产学报,1983,7(2): 153—157.
- 2 町井昭.真珠の培養研究.組織培養.1977,3(4): 96—105.
- 3 王顺年、张洪亮、汪慧等.合浦珍珠贝有效成分研究.海洋药物,1985,(1): 23—26.
- 4 McKenna, M. J. and Koyama, I. Comparison of human alkaline phosphatase classes. *Biochem. J.* 1979, 181: 67.
- 5 Lowry, O. H. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193: 265—275.
- 6 巫中德、王少玲、梁多欣等.珍珠精母注射液有效成分的研究.海洋药物,1984,(1): 1—2.
- 7 陈再智、王国华、雷坚等.珍珠精母注射液提取物牛磺酸的药理作用研究.海洋药物,1984,(2): 63—65.
- 8 小林新二郎、渡部哲光,(熊大仁译).珍珠的研究.北京:农业出版社.1965,250—259.
- 9 蔡英亚、张英、魏若飞.贝类学概论.上海:上海科学技术出版社,1979.31—34.
- 10 Beedham, G. E. Observations on the mantle of the lamellibranchia. *Quart. Micr.* 1958,99: 188—197.
- 11 Kado, Y. The distribution of alkaline phosphatase in mantle tissue of bivalves. *Jour. Sci. Hiroshima Univ., ser B*, 1984, 15: 183—188.

ANALYSIS ON SEVERAL BIOCHEMICAL COMPONENT OF THE CULTURED TISSUE OF FRESH WATER OYSTER

ZHANG Hongyuan SHI Anjing LIU Kewu GONG Youbin LUO Shengqing

(Department of Biology, Sichuan University, Chengdu 610064)

ABSTRACT Content analyses were made for amino acid, taurine, and calcium which are existed in the cultured tissue and cultured solution of the mantle of fresh water oyster (*Hyriopsis cumingii* Lea, *Cristaria plicata* Leach, *Anodonta woodiana* Lea). These components can be seen in nature pearls. The contents of Alanine and Glycine were higher in the culture solution than in the control culture solution by 541% and 91% respectively. The contents of taurine in the culture solution with three fresh water oysters were found to increase 5.78% to 300% than those in the control one, calcium in the cultured tissues was increased about 1 time than that in the control solution too. The specific and relative

activities of alkaline phosphatase were similar for both nature and cultured tissues of mantles in this experiment. The results showed that the mantle cells cultured in artificial condition can secrete materials which are naturally produced by nacre.

Key words Fresh water oyster, Mantle, Cultured, tissue, Biochemical component.