

第七章 植物细胞工程制药

7.4 植物细胞培养的基本技术

一、课程目标

1) 知识学习目标

掌握药用植物细胞培养的原理和基本方法及药物生产的控制

2) 思政育人

矛盾对立统一的哲学思考——辩证思维

本节通过介绍植物激素的两重性，理解事物事物的发展变化是由于矛盾运动造成的，矛盾是指事物自身所包含的既相互排斥又相互依存，既对立又统一的关系。马克思主义认为任何事物都是作为矛盾统一体而存在的，矛盾是事物发展的源泉和动力。

二、思政案例

课程思政教学实例一：辩证思维

植物生长激素具有两重性：既能促进植物生长，也能抑制生长；既能促进发芽，也能防止落花落果，也能疏花疏果。生长素所发挥的作用，因浓度、植物细胞的成熟情况不同而有较大的差异。事物的发展变化是由于矛盾运动造成的，矛盾是指事物自身所包含的既相互排斥又相互依存，既对立又统一的关系。马克思主义认为任何事物都是作为矛盾统一体而存在的，矛盾是事物发展的源泉和动力。

三、课程组织

导入：通过前面的学习，我们已经了解了植物细胞的形态和生理特性，那么，利用植物细胞生产有药用价值的次级代谢产物，就需要培养植物细胞，如何培养植物细胞呢？下面我们介绍第四节，植物细胞培养的基本技术。植物细胞培养的基本技术包括植物材料的准备、培养基的制备、选择培养方法等。

知识点 1 讲解：植物材料的准备

首先来看植物材料的准备，用于植物组织培养的外植体，必须是无菌的。为什么要无菌呢，同学们想一想，我们选取的外植体，如果是来自温室或者是生长在大田里植物，它们的种子、幼苗、器官、组织等等，这些材料可能带有很多微生物，我们培养外植体的时候用的培养基营养非常丰富，微生物会非常喜欢，它们在培养基中会大量繁殖，从而抑制我们要培养的外植体的生长。因此培养前必须对外植体进行严格的灭菌处理。

那么如何对外植体进行灭菌呢，我们可以选择一些表面灭菌剂对植物组织进行处理。用于植物组织培养的表面灭菌剂很多。原则上应该尽可能选择那些灭菌后容易除去或容易分解的试剂。灭菌剂的选择和处理时间的长短，取决于所用材料对试剂的敏感性，敏感的外植体的灭菌时间不宜过长；而不敏感的材料，灭菌的时间应该适当延长。常用的灭菌剂有次氯酸钙、次氯酸钠和氯化汞。

这张表中列举了经常使用的灭菌剂的灭菌效果。次氯酸钙国内一般用市售的工业用漂白粉，因为工业用漂白粉中有效氯含量不稳定，所以经常使用过滤后的过饱和溶液。这种溶液特别适用于草本植物和柔软组织的灭菌处理，灭菌时间一般为 5~30min。氯化汞灭菌效果最好，但去除也最困难，并且灭菌时间不宜过长，以免损伤或杀死植物细胞。氯化汞作为休眠种子的灭菌剂最为理想，适用浓度为 0.1%，灭菌时间一般为 2~10min，用于有较厚种皮的休眠种子灭菌时，可以延长到 20min 或更长时间。

这张表中列出了不同植物组织(器官)的灭菌时间和顺序。在每年的 6 月至 9 月，气候温暖潮湿，是各种霉菌繁殖的高峰季节，灭菌处理更要特别严格，要尽可能降低微生物的污染机会。

知识点 2 讲解：培养基及其组成

植物材料灭菌后，就可以进行培养了。下面需要确定用和什么培养基来进行培养，那么**培养基是由什么组成的呢**，接下来我们介绍培养基及其组成。培养基实际上是植物离体器官、组织或细胞等的“无菌土壤”，它的特点是营养成分是可以调控的。植物组织和细胞培养所用的培养基种类比较多，但通常都含有无机盐、碳源、有机氮源、植物生长激素、维生素等化学成分。应用最广的是 MS 培养基和 LS 培养基。在植物细胞培养所用到的培养基中，一些必需营养物质如氮、磷、钾、钙、镁等，它们的加入与否、浓度的高低、各组分的相对浓度等都会对培养结果产生重大影响，甚至起到关键性的作用。我们接下来一一进行介绍。

首先来看第一种营养成分，无机盐，基本培养基是由各种浓度的无机盐溶液组成的，这些无机盐又分为大量元素和微量元素。大量元素是指使用浓度大于 30mg/L 的无机元素，

包括 N、S、P、K、Mg、Ca、Cl 和 Na，而微量元素是指浓度低于 30mg/L 的无机元素，如 Fe、

B、Mn、I 和 Mo，以及极微量的 Cu 和 Zn。我们知道磷是磷脂的组成成分，也是原生质、细胞核和生物膜的重要组成成分。植物对磷的消耗很快，但机体自身可以产生磷满足需要。培养基中的磷通常以磷酸盐的形式添加。大多数培养基中的无机氮都是以铵盐和硝酸盐的形式提供的。有些培养基是添加其中一种，有些是两种同时添加。同时添加时要注意两种形态氮的比例对组织的细胞分裂和分化有显著影响。比如较高水平的硝酸盐有利于细胞增殖和胚性愈伤组织的诱导，而较高水平的铵盐能促进器官分化和体细胞胚的形成。镁离子、钾离子和钙离子对细胞的代谢来说是不可缺少的。如镁离子是物质转运过程中的必需因子之一，参与多种酶的辅酶和激活子的合成。钾离子和钙离子，具有抑制某些酶活性的作用，如抑制糖酵解中的丙酮酸激酶的活性。但有时钙离子也能起到保持某些酶的活性或稳定性的作用，例如 NAD-激酶、蛋白激酶、 α -淀粉酶。微量元素的作用是参与辅因子的形成，并可以诱导酶的合成，如镍在烟草、水稻和大豆细胞悬浮培养中诱导脲酶的合成。硼对膜的功能、通透性等都有十分重要的作用。

下面我们介绍第二种营养成分，碳源。植物细胞培养物通常都是异养细胞。因此，人们经常使用糖类、肌醇作为碳源，有时也用甘油等物质代替。有些培养物还可通过同化二氧化碳来获得所需的能量，也就是所谓的光自养培养物。在某些情况下，培养基固化剂，例如琼脂也可作为补充能量和碳源使用。此外，在愈伤组织的诱导和培养中，某些天然提取物，如 10%的椰子乳、0.5%的酵母提取物或 5%~10%的番茄汁也可以作为碳源。

第三种营养成分，植物生长调节剂。植物激素是指植物代谢过程中自身形成的植物生长调节剂，在极低浓度($<1\text{Pmol/L}$) 时即能调节植物的生长和发育过程，并能从合成部位转运到作用部位而发挥作用。植物激素是天然产生的调节物质。到目前为止，已经发现植物组织中可以形成 6 种植物激素，即生长素、分裂素、赤霉素、脱落酸、乙烯和油菜素内酯。那么什么是植物生长调节剂呢，植物生长调节剂既包括刚刚提到的植物激素，也包括人工合成的具有生理活性的化合物。植物组织和细胞培养物的生长过程，主要取决于生长素和细胞分裂素的比例。高浓度生长素和低浓度分裂素刺激细胞分裂，而低浓度生长素和高浓度分裂素则刺激细胞生长。但过量的赤霉素和酚类化合物能掩盖上述现象。对于正常生长的植物来说，它们自身也合成一定量的内源激素，来保证植物各组织、器官的正常分化、生长。

但对于植物培养细胞来说,除了极个别植物组织能够合成足够量内源植物激素外,绝大多数植物组织和细胞培养基中,必须加入一定量的植物生长调节剂。

思政融入:植物生长激素具有两重性:既能促进植物生长,也能抑制生长;既能促进发芽,也能防止落花落果,也能疏花疏果。生长素所发挥的作用,因浓度、植物细胞的成熟情况不同而有较大的差异。事物的发展变化是由于矛盾运动造成的,矛盾是指事物自身所包含的既相互排斥又相互依存,既对立又统一的关系。马克思主义认为任何事物都是作为矛盾统一体而存在的,矛盾是事物发展的源泉和动力。

第四种营养成分,有机氮源。植物组织和细胞培养实验中使用较多的有机氮源为蛋白质水解产物(如谷氨酰胺)或各种氨基酸。有机氮源对细胞的早期生长有利,氨基酸的加入主要是为了代替或增加氮源的供应,但需要注意的是苏氨酸、甘氨酸和缬氨酸可以灭活谷氨酰胺合成酶的活性,从而降低氮的利用;与此相反,精氨酸通常具有补偿这种灭活作用的能力。第五种营养成分,维生素。植物细胞通常是维生素自养型的,但大多数情况下,自身合成的量都不能满足植物细胞的需要。所以大多数培养基,除了必须加入的B族维生素(如B1、B6和泛酸)外,通常还需要加入一定量的生物素和肌醇。

知识点 2 讲解: 培养方法

选好植物材料和培养基后,下面就可以进行植物组织培养了,那么植物组织培养的方法有哪些,如何进行选择呢,接下来我们介绍植物组织培养的方法。植物组织培养的方法很多,可以采用不同的分类方法进行分类。如按照培养对象,可以分为原生质体培养、单倍体细胞培养;按培养方式可分为悬浮细胞培养和固定化细胞培养;按培养基类型可以分为固体培养和液体培养。无论是固体培养还是液体培养都必须控制温度,一般温度保持在 25 ± 1 ℃。

大多数植物材料的培养都需要光照。

液体培养系统又包括小规模悬浮培养和大规模的成批培养、半连续和连续培养。下面主要讨论植物细胞大规模培养系统,即成批培养、半连续和连续培养,并简要介绍固定化培养法。**第一种培养方法,成批培养法,**将培养基一次性地加入反应器中,接种、培养一定时间后收获细胞的操作方式称为成批培养法。由于植物细胞培养中,次级代谢产物的大量累积往往发生在细胞生长的稳定期,所以人们据此设计了植物细胞的两步培养法,也就是用两个生物反应器,第一个反应器用于细胞生物量的累积,第二个反应器用于次级代谢产品的生产。日本科学家使用这种方法成功地开发出了世界上第一个植物细胞工程商品—紫草宁,他们

通过提高第二个反应器中 Ca^{2+} 浓度的方法，大幅度增加了培养液中的紫草素含量，从而实现了生物工程法大规模(工业化)生产紫草素。

第二种培养方法，半连续培养法。在反应器中投料和接种培养一段时间后，将部分培养液和新鲜培养液进行交换的培养方法称为半连续培养法。半连续培养可以认为是一种具有定时进出装置的成批培养系统。每间隔一天或两天收获一部分培养物(最多可达 50%)，然后再加入新鲜培养基，通过调整收获细胞的数量和次数来保持细胞重量的恒定。

第三种培养方法，连续培养法。连续培养法是利用连续培养反应器，在投料和接种培养一段时间后，以一定速度连续采集细胞和培养液，并以同样速度供给新鲜培养液以使细胞生长环境长期维持恒定的方法。一般来说，由于连续培养法培养时间长，所以细胞的生产能力要比成批培养法高，但从另一方面讲，因为细胞生长缓慢，培养时间长，要维持系统的无菌状态，技术条件要求就比较苛刻。因此，在培养特定细胞或生产次级代谢产物时，人们又设计出了二阶段连续培养法。也就是在第一罐中投入适于细胞增长的培养基(即生长培养基)并连续加入该培养基，而在第二罐中投入适于产生次级代谢产物产生的培养基(即生产培养基)。两罐间通过管道连接，第一罐培养液不断流入第二罐，同时第二罐培养液不断放出。可以大大提高细胞生长速度。如用这种方法生产烟草细胞，在第一罐中加入适合细胞增殖的培养基，第二罐中加入低氮源培养基，可以使细胞生长速度达到 63L/h。

第四种培养方法，固定化培养法。固定化培养采用的固定化反应器有网状多孔板、尼龙网套和中孔纤维膜等多种类型。将细胞固定在尼龙网套内，或固定在中孔纤维反应器的膜表面，或固定在网状多孔板上，放入培养液中进行培养，或连续流入新鲜培养液，进行连续培养及连续收集培养产物。固定化培养法的突出优点是细胞位置固定，容易获得高密度细胞群体，有利于细胞组织化，容易控制培养条件，能够获得较高含量的次级代谢产物。有人将辣椒细胞固定在聚氨基甲酸乙酯泡沫中，生命力维持在 23 天以上，辣椒素产量较悬浮培养细胞提高了 1000 倍。

知识总结:一下这一节的内容，这一节我们介绍了三部分内容，第一部分，植物材料的准备；第二部分，我们介绍了培养基及其组成，重点介绍了培养基中的无机盐，碳源，植物生长调节剂，有机氮源，维生素对培养过程的影响，最后一部分，我们介绍了培养方法的选择，重点介绍了成批培养法，半连续培养法，连续培养法和固定化培养法。