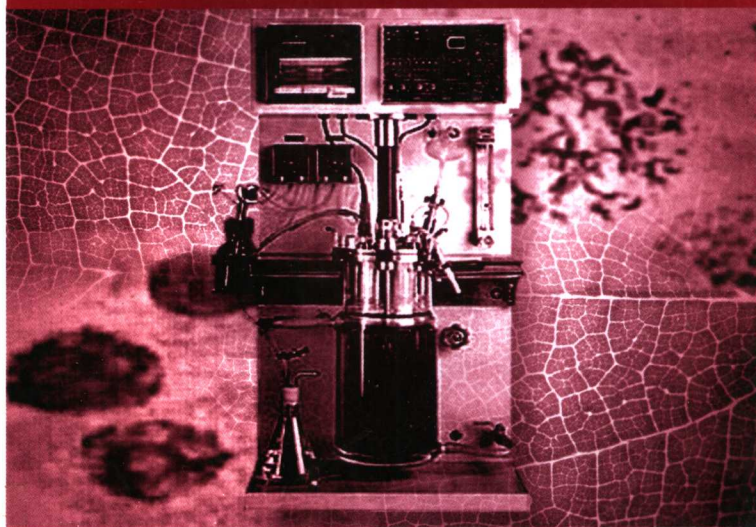


植物细胞 培养工程

元英进 主编 葛志强 副主编



Chemical Industry Press



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

植物细胞培养工程

元英进 主 编

葛志强 副主编



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

植物细胞培养工程 / 元英进主编. —北京: 化学工业出版社, 2004. 3

ISBN 7-5025-5389-4

I. 植… II. 元… III. 植物-细胞培养-研究
IV. Q943. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 033580 号

植物细胞培养工程

元英进 主 编

葛志强 副主编

责任编辑: 孟 嘉

文字编辑: 周 倜

责任校对: 顾淑云 边 涛

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市海波装订厂装订

开本 720 毫米×1000 毫米 1/16 印张 20¼ 字数 282 千字

2004 年 5 月第 1 版 2004 年 5 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-5389-4/Q·88

定 价: 38.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

植物中含有大量有用的次生代谢物质，可以为人类提供药品、色素、调味品、香料、兴奋剂、杀虫剂等。仅就药物而言，美国现有 120 多种处方药是植物药，欧洲也约有 1/4 的处方药来自植物。这些天然产品与人类生活息息相关，有很大使用价值；其中有部分具有特殊用途，且极难得到，价格昂贵。从植物中生产这些物质存在很多缺点，植物受气候、地理和季节的限制，其质量和产量受不可预测的环境因素影响，分离过程复杂而耗资很大。

使用细胞大规模培养技术可以在可控的和可重复的条件下生产天然产物，而不会受到病虫害、地理、气候、季节等因素的影响，并且产物分离、提取操作相对简单。同时也将对保护人类的生存环境起到重要作用。

自 1956 年 Routier 和 Nickell 在一篇专利中首次提出利用植物细胞培养合成次生代谢产物之后，Tulecke 和 Nickell 在辉瑞公司 (Pfizer Corporation) 进行了开创性的研究工作，1967 年 Kaul 和 Staba 对小阿米 (*Ammi visnaga*) 细胞进行了大量培养的研究，推动了植物细胞培养技术的发展。继 1983 年日本三井石油公司首次利用培养的紫草细胞生产出紫草宁之后，已成功地利用培养的黄连、人参和毛地黄细胞分别生产出小檗碱、人参皂苷和地高辛等，之后又对银杏、冬青、长春花、雪莲、白苏等许多植物进行了细胞培养来生产药用的次生代谢物质，发酵罐的规模已达到 75t。从 1991 年 Christen 等人申请了有关红豆杉组织培养的专利以来，植物细胞培养又呈现出新的研究热潮。近年来，在培养体系中紫杉醇含量已提高了 100 多倍，达到 153mg/L，美国 Phytion Catalytic 公司已在德国进行了 75t 发酵罐的实验。

植物细胞大规模培养存在许多障碍：生物学上，培养细胞的不稳定

影响增长和代谢生产，体细胞克隆不稳定，复杂的次生代谢调节本质等；技术上，细胞剪切敏感性和复杂流变学特性，高细胞密度氧传递限制，混合问题，细胞聚集、贴壁增长等。

本书重点在于阐明如下问题：①如何促进植物细胞高效表达次生代谢产物，如通过采用高产细胞株的筛选、环境条件的调节、添加前体、产物释放技术、两相培养以及固定化培养等策略来促进产物产量。另外，胁迫诱导又成为目前的研究重点，科学家们已对一些诱导子的作用机理有了较为清晰的认识。②从工程角度出发，最具挑战的是过程放大问题。目前大多数植物细胞大规模培养生产药物与商业化生产还有一定的差距，因为在许多情况下，放大必伴随产率的降低，问题主要还在于非牛顿流体中的混合和传质以及流体的剪切力。此外，经济因素和市场调节也对植物细胞培养过程的开发有着重要的影响。③快速发展的植物细胞培养技术已形成自身的一些特点与规律，而最新的植物生理学研究进展也给了植物细胞培养技术新的启示，生化工程专家必须与植物生理学专家结合起来才能最终实现植物细胞培养的工业化。

本书第一章介绍植物细胞培养工程的概念、特点、历史、展望、任务和已有的成果（元英进，王艳东）；第二章介绍植物细胞培养基本技术及主要培养方法（晏琼）；第三章介绍具有工业价值高产植物细胞株的筛选（葛志强）；第四章谈一谈植物细胞培养过程中的几个生物学问题（许明丽，葛志强）；第五章介绍了诱导子在植物细胞培养生产次生代谢产物中的作用（葛志强）；第六章让读者了解植物细胞培养过程技术需求（施中东）；第七章介绍植物细胞反应器与操作策略（韩荣斌，葛志强）；第八章介绍了搅拌式反应器设计过程中应考虑的问题（元英进，葛志强）；第九章介绍植物细胞固定化与固定化细胞反应器（尹德明，商桂敏，葛志强）；第十章介绍植物细胞培养规模放大过程中的影响因素以及应用数学手段研究该过程的可能（元英进）；第十一章介绍了植物细胞培养技术可应用的领域（葛志强）。

本书内容既是对国内外相关领域研究成果的总结，同时也包含作者长期从事植物细胞培养过程中研究实践的积累，具有一定的参考价值。本书不仅适用于高等院校、科研机构、生物工程企业等从事植物细胞培

养科研开发和管理方面的人员，而且也适用于高等院校相关专业的本科生、研究生，以及其他感兴趣的读者。

由于编者自身业务水平有限，书中难免错漏和不当之处，欢迎广大读者提出宝贵意见，以便进一步改进。

编者

2004 年 1 月

目 录

第一章 概述	1
第一节 植物细胞培养工程的概念	2
一、植物细胞培养工程的定义	2
二、植物细胞培养工程的特点	2
三、植物细胞培养工程需解决的问题	3
第二节 植物细胞培养工程的历史与展望	8
一、植物细胞培养工程的历史和现状	8
二、植物细胞培养工程的展望	12
第三节 植物细胞培养工程的任务和已有的成果	14
一、任务	14
二、已有的成果	15
参考文献	16
第二章 植物细胞培养基本技术	19
第一节 植物细胞培养实验室的设施	21
一、洗涤设备的要求和选择	21
二、灭菌和无菌设备的要求和选择	22
三、培养设备的要求和选择	22
四、其他设备的选择	23
第二节 植物细胞培养的基本技术程序	24
一、培养基的组成、配制和灭菌	24
二、植物组织的选取与消毒灭菌处理	33
三、接种和愈伤组织的诱导	35
四、愈伤组织的维持和继代培养	40
五、植物细胞培养中的注意事项	41

第三节 几种典型植物细胞与组织培养	43
一、毛状根的诱导和培养	43
二、冠瘿组织培养	49
三、器官培养	50
参考文献	52
第三章 具有工业价值的植物细胞株的筛选	53
第一节 植物株、细胞株以及活性成分的筛选	54
一、植株筛选与细胞株筛选的相似性及不同点	54
二、天然活性成分的筛选	55
第二节 植物细胞株筛选的方法	56
一、筛选原则	56
二、筛选途径	57
三、筛选方法与筛选过程	59
四、筛选培养基的优化	66
第三节 筛选过程中可用的检测手段	67
一、质谱分析法	68
二、放射免疫测定技术	68
三、酶联免疫吸附测定技术	68
四、流式细胞仪	69
第四节 植物细胞的诱变与筛选	70
一、培养细胞中诱变剂的使用与突变频率的关系	71
二、遗传的变异与外遗传的变异	71
三、突变体的筛选方法	71
四、细胞突变体的鉴定	73
五、诱变与筛选过程中存在的问题	74
第五节 红豆杉细胞的筛选驯化	75
一、技术路线及实施方案	76
二、红豆杉愈伤组织系的建立及细胞系的筛选	76
三、细胞株的定向富集筛选驯化	77
参考文献	78

第四章 植物细胞培养过程中的几个生物学问题	79
第一节 培养细胞的分裂与分化	79
一、培养细胞的分裂	79
二、细胞的遗传稳定性	85
三、植物细胞的分化	86
四、植物细胞的脱分化	93
第二节 植物细胞的全能性与再分化	94
一、全能性的概念	94
二、全能性的研究	95
三、全能性的实现途径和形式	96
四、植物细胞的再分化	97
第三节 植物细胞的凋亡	100
一、动植物细胞凋亡的异同点	102
二、植物生长发育中的凋亡现象	103
三、植物细胞凋亡的特征	104
四、植物细胞凋亡的调控	105
五、凋亡与次生代谢的关系	106
参考文献	106
第五章 诱导子在植物细胞培养生产次生代谢产物中的	
作用	109
第一节 诱导子的概念与分类	109
一、概念	109
二、分类	109
三、诱导子的选择原则	110
四、诱导作用机制的研究层次与研究方法	110
第二节 非生物诱导子及其应用	111
一、水杨酸	112
二、茉莉酮酸	114
三、稀土	118
四、诱导子与前体共同作用	119

第三节 生物诱导子及其应用	120
一、真菌诱导子	120
二、内生诱导子	122
三、微生物酶诱导子	122
四、微生物诱导子的作用方式	123
五、生物诱导的方法	123
第四节 诱导体系中各因素对产物合成的影响	124
一、诱导子的专一性	124
二、诱导子浓度	124
三、诱导子接触的时间段	125
四、细胞品系	125
五、诱导的时间进程	126
六、细胞培养体系中细胞的生长阶段	126
七、生长调节因子的影响	126
八、培养条件和营养组分	127
第五节 诱导子的作用机制	127
一、信号受体	127
二、信号识别阶段	129
三、信号转导阶段	129
四、细胞效应阶段	131
五、植物细胞内参与信号转导的分子及其作用	132
参考文献	136
第六章 植物细胞培养过程技术需求	139
第一节 培养体系的流变学特性	140
一、流体流变学分类	140
二、培养液的流变学特性	142
三、研究培养液流变学特性的常用方法	146
四、培养液流变学特性的研究实例	148
第二节 植物细胞培养体系的混合	154
一、营养物传递方式	154

二、反应器内的混合·····	155
三、氧需求和供应·····	157
第三节 剪切力对悬浮培养细胞的影响·····	161
一、搅拌式反应器中剪切力的产生·····	162
二、剪切力对植物细胞的影响·····	163
三、剪切力对细胞影响的可能机制·····	164
四、研究植物细胞剪切敏感性的方法·····	166
五、作为反应器设计的指标·····	168
六、植物细胞剪切敏感性研究实例·····	168
参考文献·····	174
第七章 植物细胞反应器与操作策略 ·····	177
第一节 植物细胞培养动力学·····	177
一、生长动力学·····	177
二、产物生产动力学·····	183
第二节 植物细胞培养反应器·····	185
一、用于植物细胞培养的反应器·····	185
二、反应器的比较与选择·····	196
三、反应器的设计与放大·····	197
第三节 反应器操作策略·····	208
一、间歇培养·····	209
二、流加操作·····	210
三、连续培养·····	211
四、两段培养·····	212
参考文献·····	212
第八章 搅拌式反应器设计中应考虑的问题 ·····	213
第一节 搅拌的积极作用和不利影响·····	214
一、积极作用·····	214
二、不利影响·····	219
第二节 搅拌式反应器设计需要考虑的因素·····	221
一、叶轮转速·····	222

二、叶轮类型·····	222
三、通气速率·····	223
四、表面通气贡献·····	224
五、气泡聚合(融合)作用·····	224
六、细胞团的形成·····	225
七、鲜重/干重·····	225
第三节 植物根培养反应器及氧传递方式·····	226
一、反应器内的根培养·····	227
二、根培养反应器的设计原则·····	229
三、通气式氧传递模式·····	230
四、对流流动式氧传递·····	231
五、滴流式氧传递·····	233
参考文献·····	236
第九章 植物细胞固定化与固定化细胞反应器·····	237
第一节 细胞固定化的优点与方法·····	238
一、固定化的优点·····	238
二、固定化的方法·····	240
第二节 固定化细胞的培养策略和影响机制·····	255
一、培养策略·····	255
二、影响机制·····	256
第三节 植物细胞固定化反应器·····	259
一、胶粒固定反应器·····	260
二、膜反应器·····	261
三、一般的流程及操作方式·····	266
四、膜反应器存在的问题·····	267
第四节 固定化细胞的产物合成与释放能力·····	268
一、产物合成能力提高·····	268
二、促进产物的释放·····	270
三、促进目的产物释放的措施·····	270
参考文献·····	272

第十章 植物细胞培养规模的放大	275
第一节 规模放大的潜力	275
一、规模放大的基本原则	276
二、不同细胞体系的规模效应	278
第二节 规模放大后的细胞生长	280
一、规模放大后影响细胞生长的因素	280
二、生长动力学和数学模型	285
第三节 规模放大后的产物生产	288
一、生产阶段的影响因素	288
二、产物生成动力学和数学模型	291
参考文献	292
第十一章 植物细胞培养技术的应用领域	295
第一节 代谢产物的生产	296
一、药物	296
二、植物性杀虫剂	298
三、色素和化妆品	299
第二节 生物转化	300
一、植物细胞转化特性	300
二、提高转化率的方法	301
三、生物转化的产物	305
第三节 人工种子	307
一、人工种子的优点	307
二、人工种子的制作与贮藏	308
参考文献	310

第一章 概 述

植物细胞可以产生多种有用物质，可以为人类提供药品、色素、调味品、香料、兴奋剂、杀虫剂等。但由于植物资源缺乏以及环保要求，限制了这些重要物质的生产和工业化。1939 年 Gautheret 和 White 等人首次正式建立的植物组织培养技术解决了这一重要问题之后，世界各国的科技人员对植物细胞培养技术进行了深入研究并取得了极大的发展。20 世纪 60 年代后，植物细胞培养成为研究和生产植物次生代谢产物的非常有发展潜力的技术。进入 70 年代，随着分子遗传理论、DNA 重组、单克隆抗体等生物技术的突破，工程技术人员采用了连续培养和固定化新技术，改变物理化学因素调节细胞产物的合成，通过诱变产生高产细胞株，使植物细胞加快生长，与整体植株相比有效成分含量提高，使得植物细胞培养技术获得了新生，进而发展成为一种精细的实验技术。80 年代后，部分植物细胞培养生产次生代谢物的产业化更将植物细胞培养

工程推到一个新高度。由于植物细胞生长缓慢、有效成分含量低、遗传稳定性差和对剪切力敏感等许多问题的存在,植物细胞培养仍没有形成产业体系,但相信经过生物学家和工程技术人员共同努力,这些问题最终会得到解决,植物细胞培养工程将为未来的生活发挥重要作用。

第一节 植物细胞培养工程的概念

一、植物细胞培养工程的定义

植物细胞培养工程是生物技术领域里的一个重要分支。植物细胞培养工程包括通过植物幼胚、原生质体、细胞、组织、器官的培养,生产重要次生代谢产物、新的植物个体(种苗的快速繁殖),以及进行植物细胞生理生化和遗传学研究的一个工程学和生物学相结合的交叉学科。

二、植物细胞培养工程的特点

2 植物细胞培养工程结合生物与工程技术两大学科领域的知识,对通过植物细胞获得人类有用物质的过程进行研究和开发。从植物细胞培养这一技术手段讲,有以下特点。

第一,植物细胞培养比植株有更快的代谢速度,在培养物中细胞生长的开始(或启动)会导致细胞团的快速分化,形成一种固定的细胞生长周期^[1]。这也是植物细胞能够作为研究次生代谢路径的优良模型体系的优点之一。与栽培的整株植物相比,用植物细胞培养方法生产有价值的天然产物还有以下优点:①代谢产品的生产便于进行人工调控;②培养在无菌条件下进行,可排除病菌和虫害的侵扰;③可以探索新的合成路线和获得新的有用物质等。

第二,植物细胞培养与动物细胞相比有以下优越性:动物细胞大部分为贴壁生长,需要黏附在支持物上,这样就使得大规模培养受到限制,而植物细胞大部分为悬浮培养,无需支持物,因此可以大规模培养;此外,植物细胞由于具有细胞壁,对剪切力的敏感性要小于动物细胞;动物细胞由于培养基中一般需要血清,所以成本昂贵,但植物细胞

培养成本比较低廉,培养基组成简单,因此,降低了目的产物生产的成本。

第三,与微生物培养相比,植物细胞体积较大、聚集成团,比微生物生长慢,特别是其对剪切力的敏感性要大于微生物,只能在相对低的剪切力下操作,这样势必引起混合不充分而影响营养物质的传递;其次,植物细胞的生理和代谢活动较低,仅要求较低的氧传递速率,过高的通气速率反而抑制细胞生长和产物合成;此外,植物细胞生长缓慢,发酵时间长,维持无菌操作也更为困难。

总体上,植物细胞培养工程可使优良母本快速繁殖,种质资源得到保存和发展,快速获得新的无性变异系;不受地理、季节和气候条件的限制;节省土地,降低成本,生产周期短,可大大提高经济效益;可代替整体植株在工厂内连续生产所需产物;可通过添加抑制剂等使生物合成按照人的意志进行;可通过诱变筛选获得高产细胞株,并且可以进行特定的生物转化获得新的有用物质;可加快育种和繁殖过程,减少劳动,节省空间。

三、植物细胞培养工程需解决的问题

由于一些瓶颈问题的限制,到目前为止植物细胞生产次生代谢产物实现产业化的例子并不很多。这些瓶颈问题包括^[2]:第一,基础知识的缺乏。一般地,次生代谢产物的生物合成路径都非常复杂,不仅需要多步繁杂的过程,同时还涉及上百种酶的参与。以紫杉烷的生物合成为例,现阶段比较明确的也只有牻牛儿苗基牻牛儿苗基焦磷酸合成酶^[3]和紫杉烯合成酶^[4]的研究较为深入,其他酶类仍在研究之中。为了更好地实现合成过程的人工调控,必须对其合成过程进行较为细致的研究。第二,经济可行性。对于许多次生代谢物,比如食品成分,利用植物细胞培养方式的成本要高于它的经济价值。目前,植物细胞培养中次生代谢产物浓度和产量都较低。事实上,代谢产物的终产量要依赖于其日产量、生物体的生长速率及主要的生物量水平,因此提高培养体系生产效率时需要生物和工程两方面知识的综合应用。经济可行性问题需通过稳定高产株系的建立^[5]、培养条件优化解决。而要实现高生物量水平,需要为细

胞提供充足的生长空间以及养料；同时目的产物向培养液中分泌的体系是非常理想的^[6]，这样利于降低后续分离成本。要实现这些目的，除了要对生长动力学、体系形态、细胞与细胞间的关系有清楚认识外，对代谢物生物合成路径的研究尤显重要。

1. 细胞聚集成团

植物细胞通常比微生物个体大且生长速度慢。植物细胞的长度约10~100 μm ，形状多为球形或圆柱形^[7]。因细胞分化后不易分离，而且在间歇培养的后期分泌胞外多糖，所以常易聚集成团。聚集体常包括上百个细胞，直径能达几个毫米。用图像分析和筛析技术发现不同细胞系、不同细胞年龄、不同培养条件下细胞团的形式也不同。Wagner 和 Vogelmann^[8]发现长春花悬浮物由摇瓶向气升式反应器放大过程中，从聚集体颗粒到单个细胞其形态学均发生了改变。另外颗粒的分布也受环境因素的影响。细胞颗粒过大一方面会影响反应器的混合及操作，另一方面导致大细胞团内的营养欠缺。但由于一定大小的细胞颗粒对细胞的生长及次生代谢物的形成有利，因而控制细胞颗粒大小是反应器设计与操作应考虑的一个重要因素。尽管未分化体系中细胞间作用的机理还有待进一步研究，但 Shuler^[9]的研究已经表明次生代谢物的产率可能受胞间联系程度的影响，因此也必受到在放大过程中聚集体颗粒形态变化的影响。

2. 流变学

聚集体颗粒、颗粒间相互作用、高的细胞浓度以及胞外多糖的分泌最终导致整个发酵液具有高黏性，表现为非牛顿流体特性。Tanaka^[10]发现长春花细胞培养液中当细胞浓度大于10g/L时呈假塑性。植物细胞悬浮液与许多微生物悬浮液一样，表观黏度依赖于细胞的年龄、形态和细胞颗粒的大小以及培养液中细胞的浓度。另外因为用细胞浓度作为黏度的关联因子可能掩盖了培养过程中因细胞尺寸与水含量不同造成的影响，所以悬浮细胞与聚集体颗粒的形态学对悬浮液表观黏度的影响需要进一步研究。培养液的流变学特性对混合和氧传递的影响很大，如假塑性流体高剪切下表观黏度低，此时在桨区因高剪切混合及气泡分散较好，而远离桨区表现高的表观黏度而导致混合及氧传递差。培养液的流