



山東農業大學
SHANDONG AGRICULTURAL UNIVERSITY

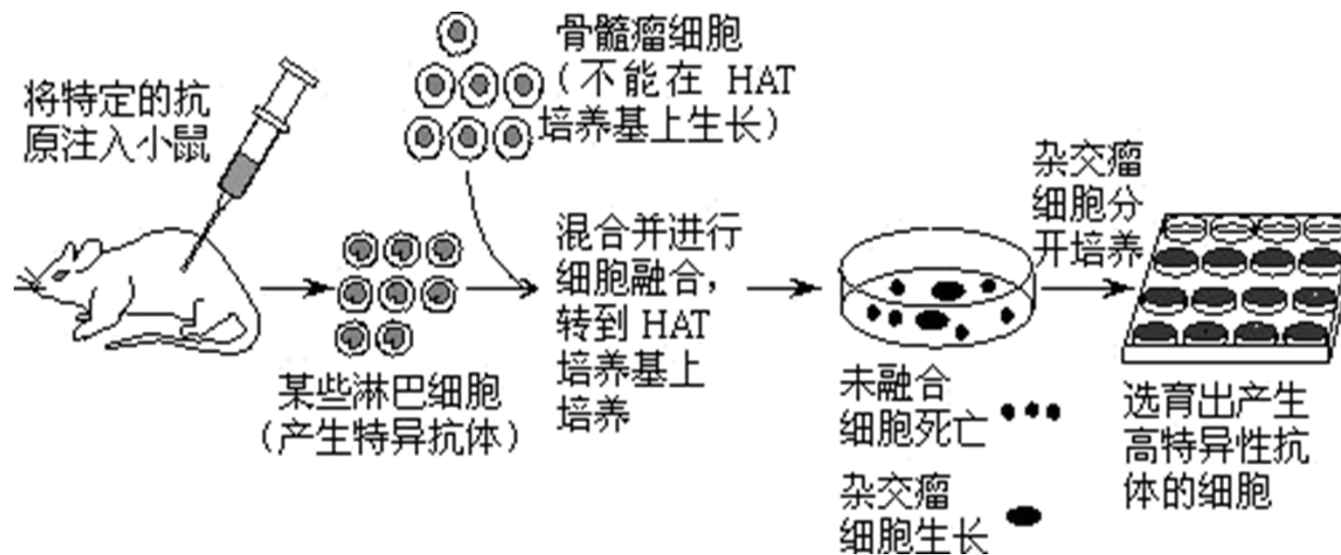
植物细胞培养技术

山东农业大学生命科学学院

- 1. 植物细胞培养

- 从植物体 (或培养物) 上分离获得单细胞 (或小细胞团) 进行离体培养，形成单细胞系 (或诱导再生植株)。

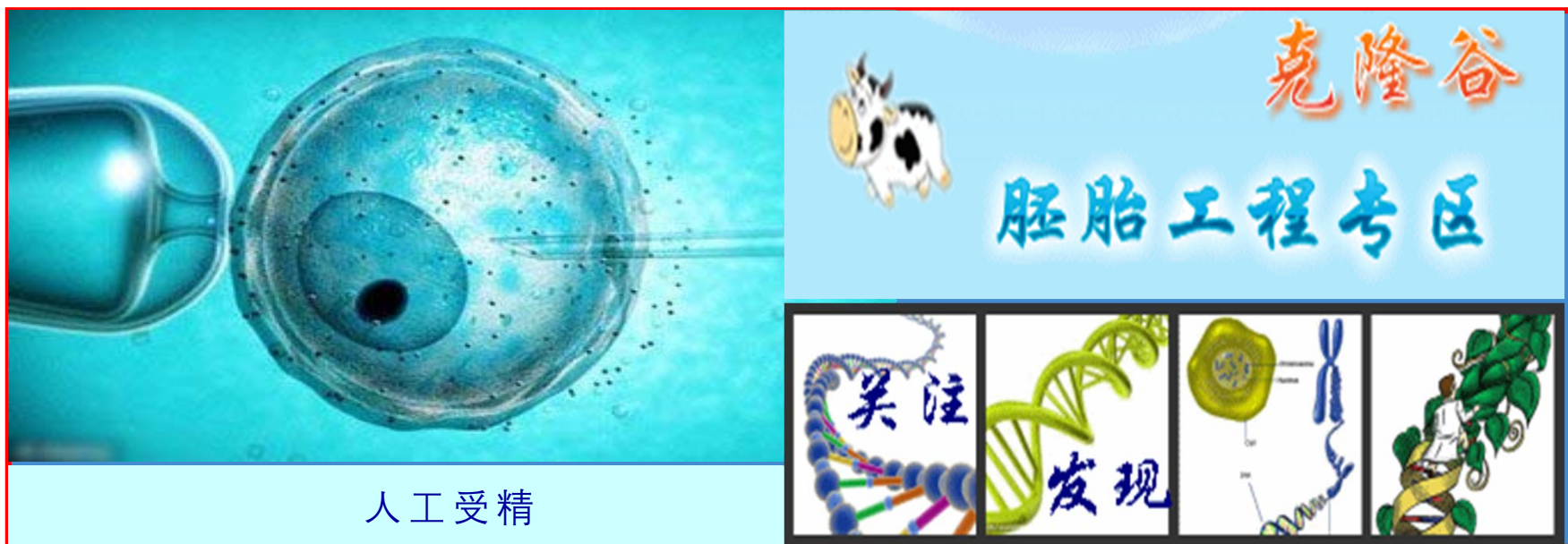
分裂、分化、增殖、生长



植物细胞培养 (plant cell culture)

- 20世纪初尝试分离培养单细胞，经多年探索取得巨大进展，能培养游离细胞产生完整植株。

细胞培养为人工直接操作离体细胞奠定了基础。



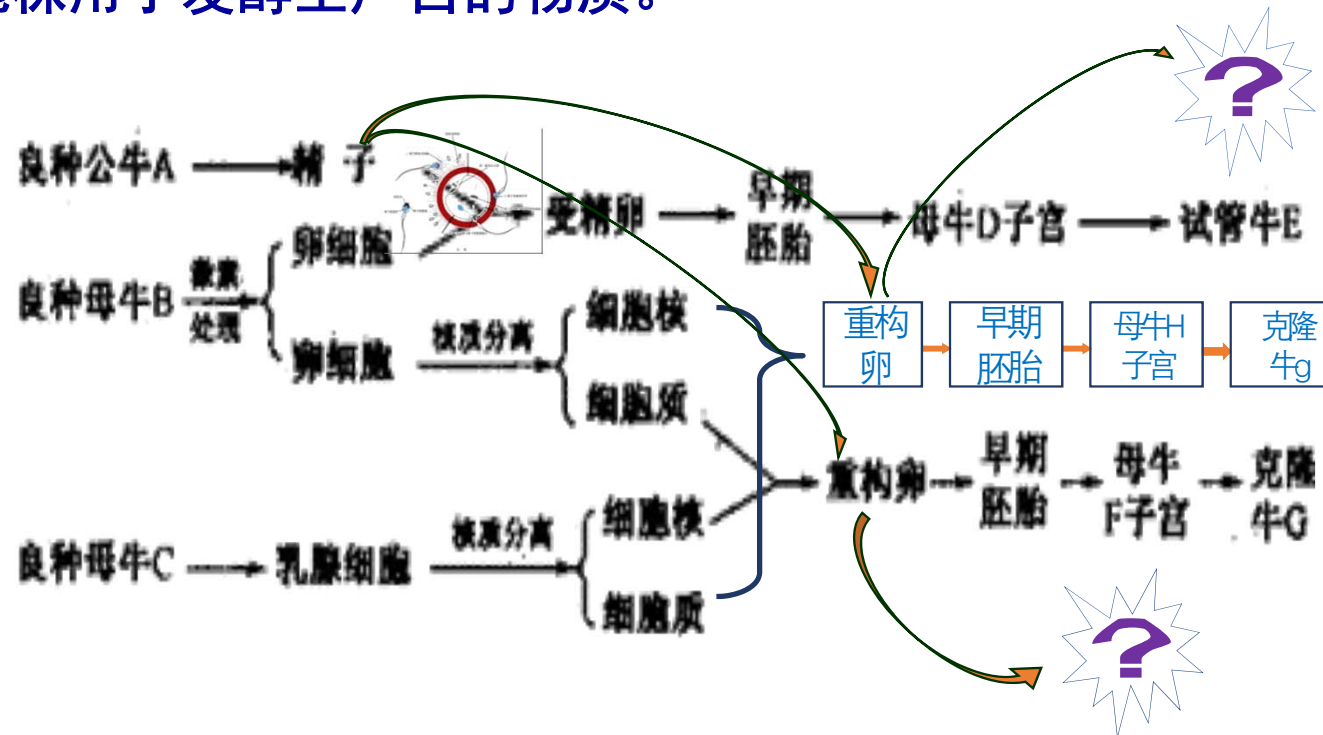
- 2. 重大意义

- ①进行细胞生理代谢及各种因子影响研究。
- 各种物理、化学外源因子可直接作用于单细胞，作用发生快，效果显现快，停止也快，操作简便，易控制。
- ②有利于开展各种细胞生物学方面的研究。
- 用单细胞系统比用完整器官或植株进行细胞代谢等研究更优越。

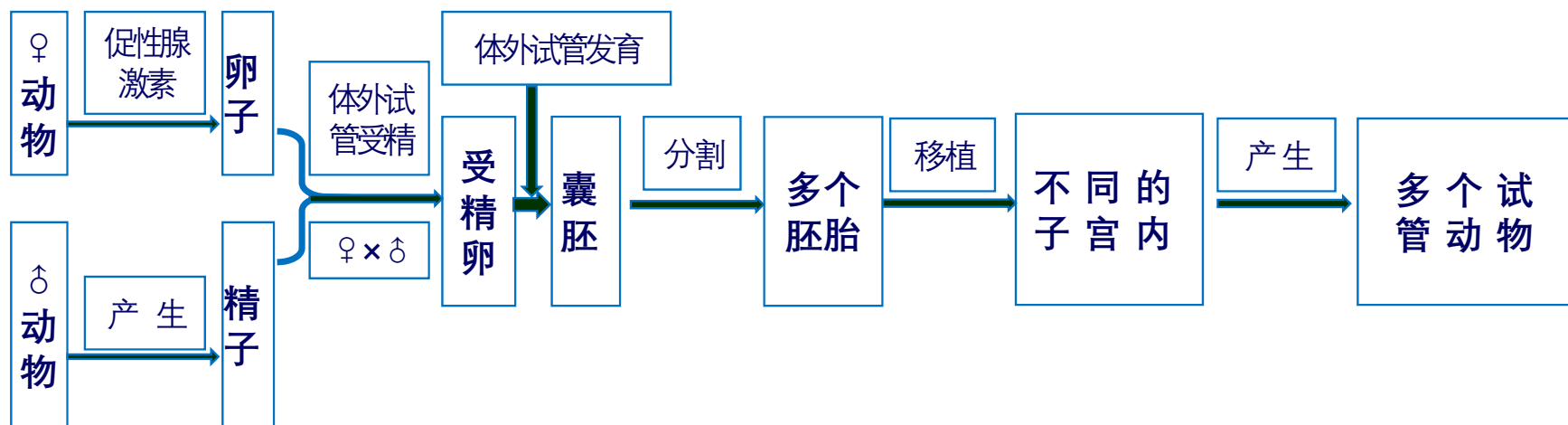


- ③克隆单细胞，获得单细胞无性系

- 培养游离单细胞产生完整植株。
- 培育植物新品种。
- 获得优良细胞株用于发酵生产目的物质。



- ④培养细胞增殖速度快，适合大规模悬浮培养
- 发酵生产有用产物，如细胞次生代谢产物，包括各种有效药用成分等。
- 医药、酶、天然色素等工业生产(新途径)。



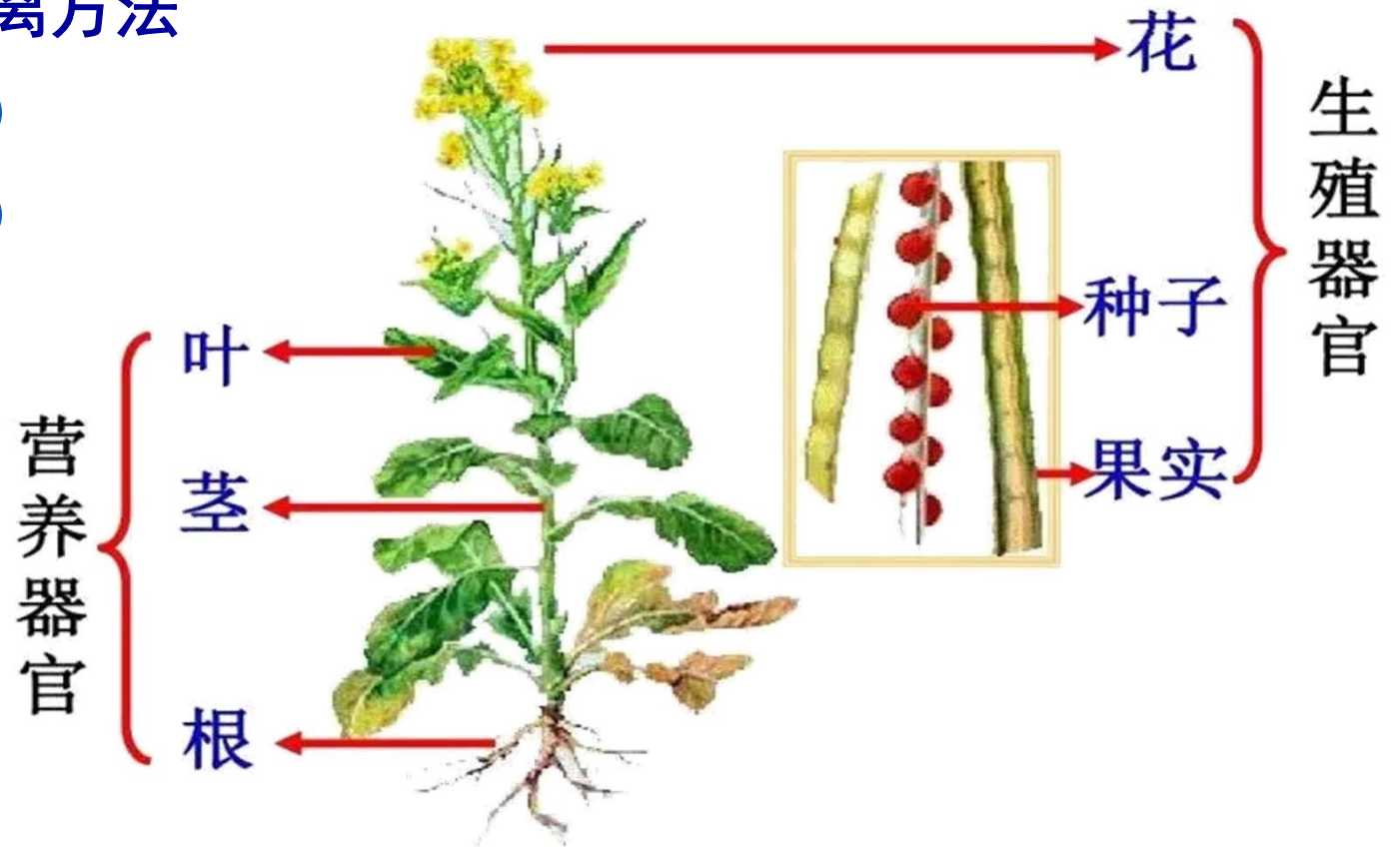
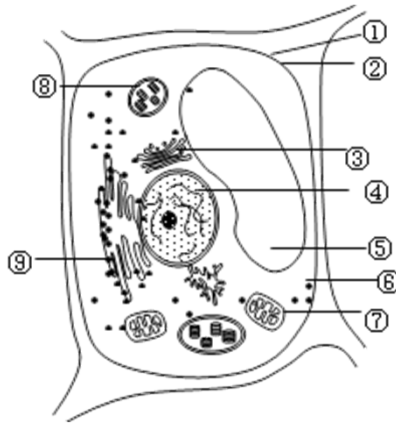
第1节 植物细胞培养技术

一、植物单细胞的获得

- 植物组织单细胞分离方法

- 机械法 (物理法)

- 酶解法 (化学法)



- 实验材料的选择

- 健康植株幼嫩的、结构松散、木质化程度较低、无病虫害的组织材料，组织内部不能带菌，以免影响后续的实验操作。
- 如果要用于与再生有关的实验研究，则应选择低龄的幼年植株，考虑植株的生理状态。



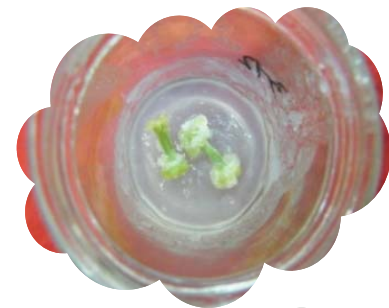
- 实验材料来源

- ①植物有机体

- 幼嫩叶片、根尖、茎尖、幼胚等；幼嫩叶片组织结构较疏松，是最好材料。

- ②组织培养材料

- 愈伤组织、组培苗等。



- 1. 机械法

- 利用器械，单靠机械作用力分离获得单细胞。
- 1980年，用机械法在无菌水中由大豆子叶分离出活细胞。



成功的例子

- → 1965年，由花生叶片制备单细胞。
- 方法1 (不是所有植物叶片都能通过此法得到单细胞)：
 - ① 撕去叶片表皮，暴露出叶肉细胞。
 - ② 用解剖刀把细胞刮下来，直接接种到液体培养基，很多游离细胞培养成活，并持续分裂。
- 方法2 (广泛用于分离叶肉组织细胞)：
 - ① 研钵中放入适量叶片材料和研磨介质，轻轻研磨。
 - ② 将研磨混合物用两层细纱布过滤。
 - ③ 滤液低速离心，细胞沉到离心管底部。



- → 1969年，分离出具有代谢活性的马唐叶肉细胞和微管束鞘细胞。
- → 1969年，获得大量篱天剑叶片组织细胞。
- 从此，由双子叶植物和多种单子叶植物成熟叶片，分离出具有光合和呼吸活性的完整叶肉组织细胞。



机械法的特点 (与酶解法比)

- ①细胞免受化学物质伤害。
- ②不会发生质壁分离。
- ③分离细胞能发生分裂并形成愈伤组织（但只有组织排列松散、细胞间接触面很小时，分离叶肉细胞才能成功，该法并不适用于所有植物材料）。
- ④产量有限，不能满足大量需求。
- ⑤获得的单细胞活力高，适用于细胞生理生化等研究。

- 2. 酶解法

- 用果胶酶处理植物叶片材料，降解细胞间的中胶层，分离出具有代谢活性的单细胞。
- 1968年，用果胶酶处理烟草叶片材料分离叶肉细胞。
- 方法如下：



果胶酶， *pectase*

取烟草展开的幼嫩叶片，表面消毒



用镊子撕去下表皮



用解剖刀将叶片切成4cm×4cm小块



放入经过滤除菌的酶液中



用真空泵抽气，使酶液快速均匀渗入叶肉组织内



在摇床上保温培养，每30min更换 1 次酶液



第 1 次：将换出的酶液弃掉

第 2 次：主要分离出海绵组织细胞

第 3、4次：主要分离出栅栏组织细胞

酶液：0.5%果胶酶+0.8%甘露醇+1%硫酸葡聚糖钾



取 材
↓
清 洗
↓
去 表 皮
↓
切 块
↓
置于酶液中
↓
抽气酶解处理
↓
保温培养细胞获得

实验操作流程

有关的几点说明

- ①酶液中加入硫酸葡聚糖钾，降低酶液中核糖核酸酶的活力，保持原生质膜稳定性，提高游离细胞的产量与质量。
- ②酶解法能得到较均匀一致的海绵组织细胞或栅栏组织细胞。

- ③果胶酶能降解中胶层，软化细胞壁，用酶解法分离细胞时，须给予渗透压保护，防止细胞过度吸水胀裂。

如：甘露醇浓度低于0.3M时，烟草原生质体便在细胞内崩解。

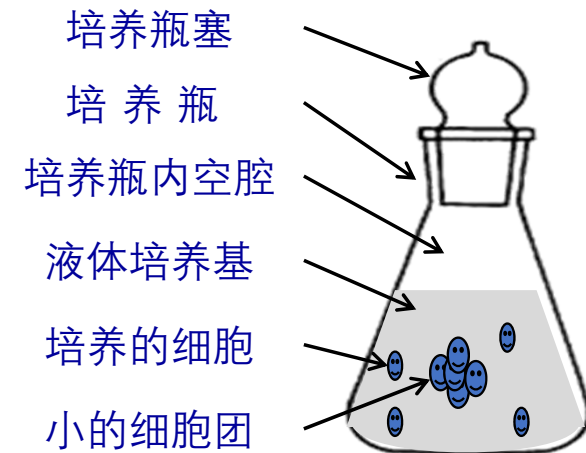
- ④大麦. 小麦. 玉米等单子叶植物，很难用酶解法分离细胞。

这些植物的叶肉细胞较长，在若干地方发生收缩，细胞间可能形成一种互锁结构，阻止细胞分离。

- 3. 由愈伤组织制备单细胞 (方法简便适用广泛)
- ①诱导培养愈伤组织
- 外植体培养诱导产生愈伤组织，把愈伤组织转到相同的新鲜培养基上继代。
- ②获得胚性愈伤组织
- 愈伤组织经过连续频繁继代，不断快速增殖，松散性提高质量改善。
- ③建立悬浮系
- 把愈伤组织转到液体培养基中，置摇床上振荡，建立悬浮细胞培养系。

振荡的几个方面作用

- ①对细胞团施以缓和的作用力，使之破碎成单个细胞，并充分分散悬浮，保持均匀分布。
- ②促进培养基与培养容器内腔的气体交换。
- ③促进培养基循环交流，确保培养环境条件均匀一致。



二、植物单细胞的培养

- 培养单细胞诱导其分裂增殖，形成细胞团进而转接培养形成愈伤组织，再通过诱导分化形成芽、根等器官或胚状体直至长成完整植株。
- 长期培养，细胞在遗传和生理生化上会出现变异(变化)，再生植株的产量.品质.抗病虫性和抗逆性等出现一定差异。研究单细胞无性系获得及特性具有重要意义。

•单细胞培养方法

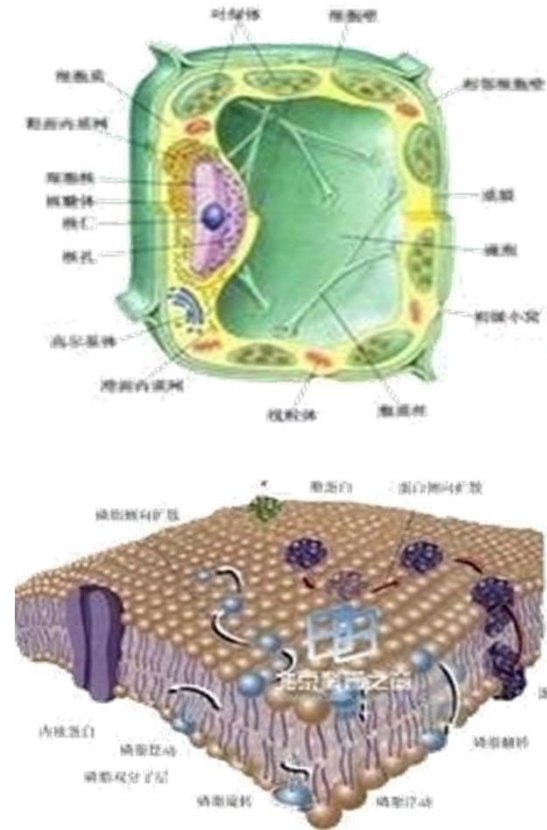
→平板培养法

→看护培养法

→微室培养法

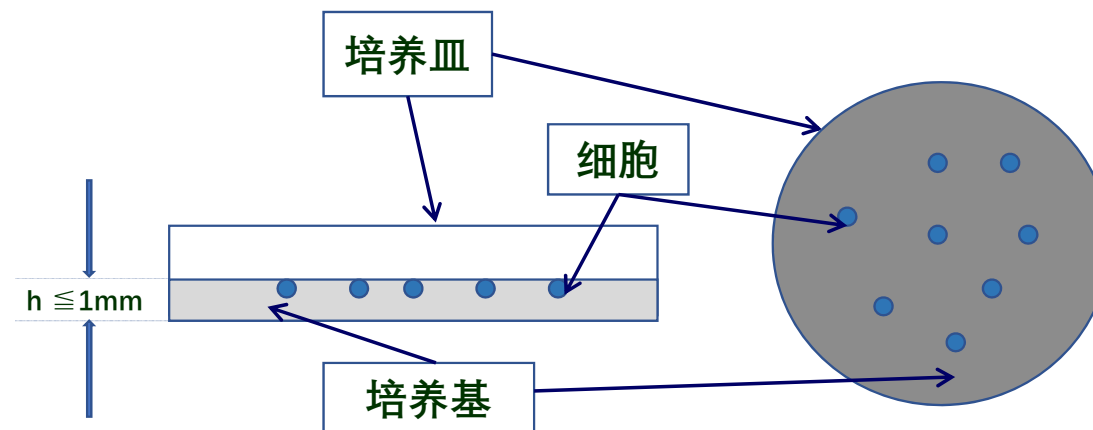
→微滴培养法

→条件培养法



- 1. 平板培养 (常用单细胞培养法)

- 将悬浮培养的细胞，接种到未固化的培养基中，使其与培养基充分混合，再倒入培养皿中，使之充分扩散，铺满培养皿底部，凝固后形成薄层 (厚薄均匀, 厚度 h 小于1mm)，进行培养。



细胞平板培养示意图

实验操作流程

细胞密度测定



细胞密度调整



初始植板密度获得



制备培养平板



平板计数



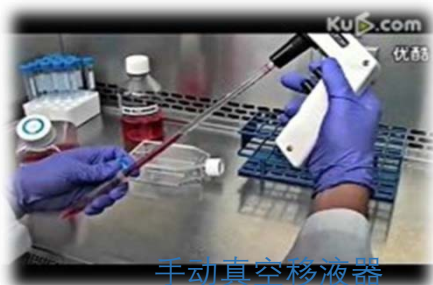
细胞定位



培养与观察

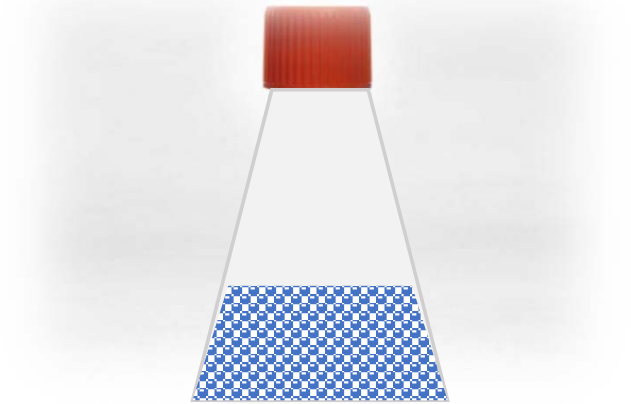


继代培养



- ①细胞密度测定

- 将细胞悬浮培养物过滤，除去较大的细胞团，留下单细胞和小细胞团；
- 充分混匀，然后细胞计数，得到细胞密度 (个/ml)；
- 细胞活力的测定，得到活细胞的密度 (个/ml)；



- ②细胞密度调整

- 如果悬浮培养液的细胞密度大, 可用新鲜培养液稀释达到最终所要求的细胞密度 (如2倍初始植板密度, 2X) 。
- 如果悬浮培养液的细胞密度小, 则要浓缩。可先低速离心使细胞沉淀, 去上清液, 再用液体培养基调节达到所要的细胞密度 (如2倍初始植板密度, 2X) 。

- ③初始植板密度的获得

- 将新鲜培养基 (含0.6%~1%琼脂) 灭菌后冷却到35℃ (这时培养基还没有凝固, 仍呈液体状态), 放到恒温水浴中。
- 将细胞悬浮液接种进去 (或: 1份2X细胞悬浮液+1份新鲜培养基), 充分混合均匀, 并使其细胞含量达初始接种密度 (x)。

- ④制备培养平板

- 倒入培养皿，在桌面上轻轻晃动，使之迅速分散并充分展开铺满整个培养皿底部，静置。
- 当培养基冷却凝固后，细胞能够均匀分布并固定在一层约1mm厚固体培养基中。

- ⑤平板计数

- 用封口膜或石蜡把培养皿封严，将培养皿倒置培养；
- 用放大40倍的双筒倒置显微镜，直接计量细胞数量。

- ⑥细胞定位

- 在培养皿底外的相应位置上对细胞做标记，便于今后分离出单细胞系；
- 相邻细胞相互靠的很近，将来不便分离，则无需标记。

- ⑦培养与观察

- 做好标记，倒置培养皿，25℃暗培养。
- 用OM观察细胞生长情况，20d后计数，记录每只培养皿中出现细胞团的数目。

- ⑧继代培养

- 当细胞团长到一定大小时，将其挑出来，转接到适当固体培养基上，继代培养。
- 实验操作步骤清晰，要求严格，有要达到的具体标准。

培养应注意的事项

- ①培养基选用
- 用的无论是条件培养基还是新合成培养基，其目的是能够在低的起始密度下使细胞生长。
- ②细胞的选择
- 不可选用处在静止期过久的细胞，只有处在分裂旺盛时期的细胞才有较高的分裂能力。
- ③起始密度
- 培养的适宜起始密度因植物种类不同而异，烟草为 $0.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^4$ 个/ml。

- ④温度要求
 - 接种时培养基温度要严格控制，一般不超过35℃，温度低对细胞伤害少，但操作困难，凝固快而使细胞分布不匀，温度过高对细胞产生伤害。
- ⑤避免光照
 - 培养期间，频繁光照对细胞生长不利，镜检次数应尽量减少。
- ⑥薄层培养
 - 单细胞可移植在一薄层液体培养基中。使用液体培养基，细胞位置不固定，要追寻个别细胞及其繁衍的后代比较困难。

- ⑦置板率

- 平板培养基上能长出细胞团的细胞占接种细胞总数的百分数。
- 接种细胞总数等于该平板在铺板时加入的细胞悬浮液的容积与其细胞密度的乘积。
- 细胞团数是指在实验末期对该平板上形成的细胞团数进行直接测定所得的数值。

- 植板率 = $\frac{\text{长出的细胞团数}}{\text{接种细胞总数 (V} \times \text{D)}} \times 100\%$

- V: 细胞悬浮液容积 (ml)

- D: 细胞密度 (个/ml)



- ⑧植板密度

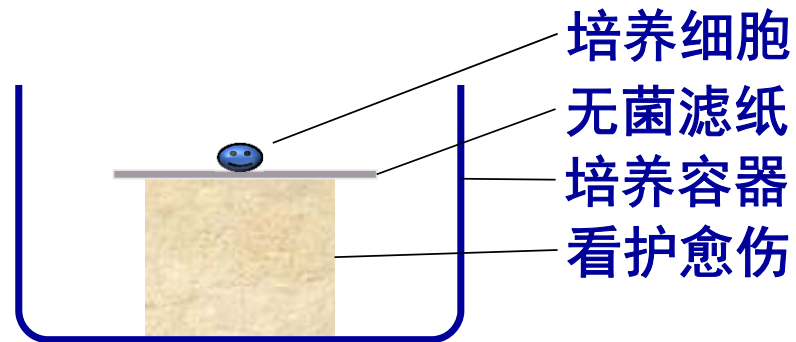
- 在固体或液体培养基中，初始植板密度大于 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^5$ 个/ml时，相邻的细胞分裂增殖形成的新细胞群，很早就混在一起，不可能分植或稀释，难以分离出单细胞。
- 正常条件下，每个物种或基因型都有一个最适植板密度和一个临界植板密度，当低于临界植板密度时细胞就不能分裂。
- 为了在低密度下或对单个细胞进行培养，必须采用某些特殊的方法。

- **2. 愈伤组织看护培养**

- 用同种或异种材料的愈伤组织看护培养细胞。
- 1954年由Muir等设计，把单细胞放在一块活跃生长的愈伤组织上进行培养，在愈伤组织和细胞之间有一片滤纸相隔。

具体做法一

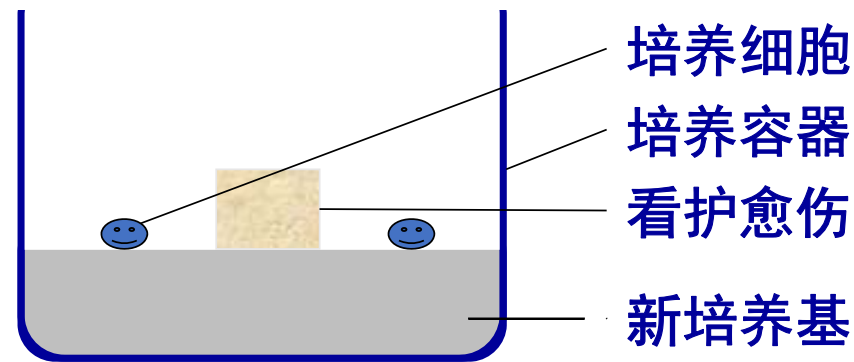
- ①由悬浮培养系或愈伤组织上分离获得细胞。
- ②接种前1天，把1块灭菌滤纸放在愈伤组织上，使其充分吸收组织渗出水分、营养成分和代谢产物，逐渐被润湿。
- ③将分离的单细胞，放到润湿滤纸上。
- ④当细胞长出小的细胞团后挑出来，转接到琼脂培养基上，形成愈伤组织。



愈伤组织看护培养示意图1

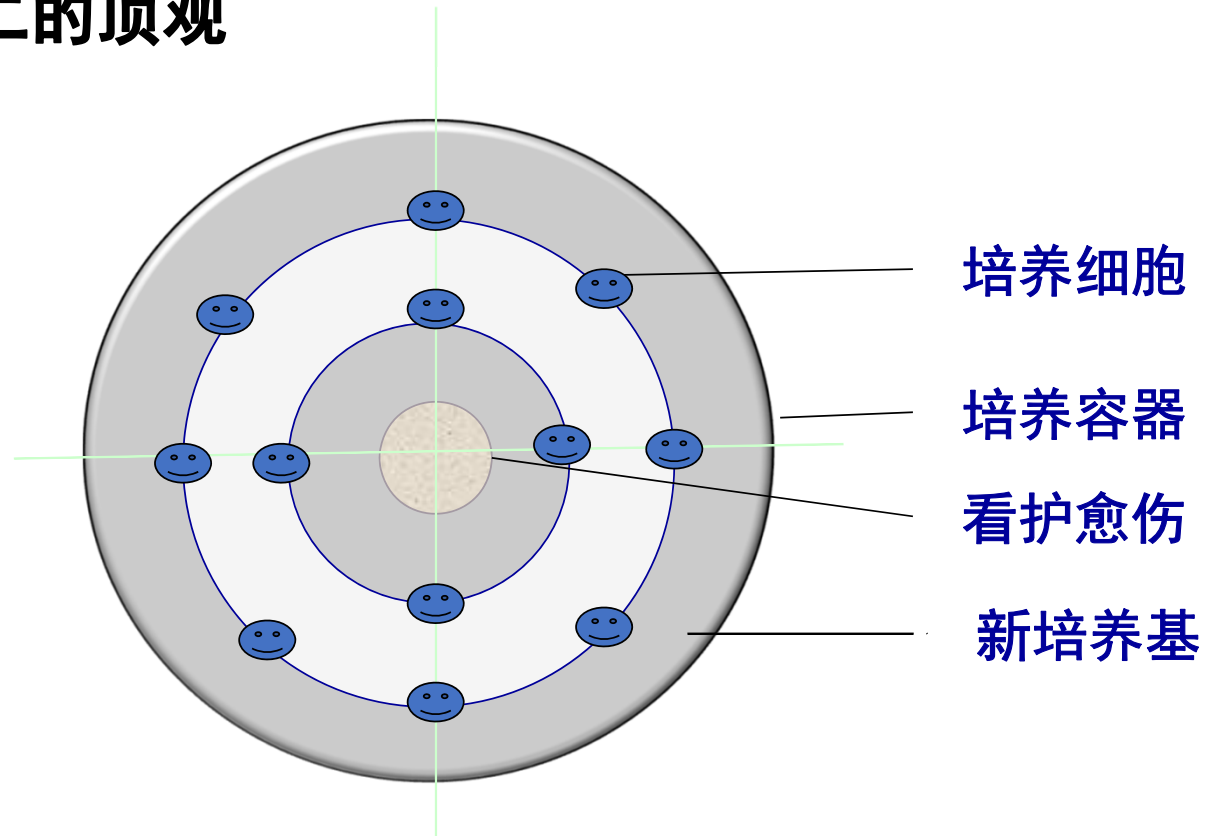
具体做法二

- ①制备新鲜的固体培养基。
- ②获得某种材料愈伤组织。
- ③取适当大小的愈伤组织块（呈立方体或圆柱体），置于新鲜的固体培养基中央，在其周围以适当的半径和间隔接种若干单细胞进行培养。



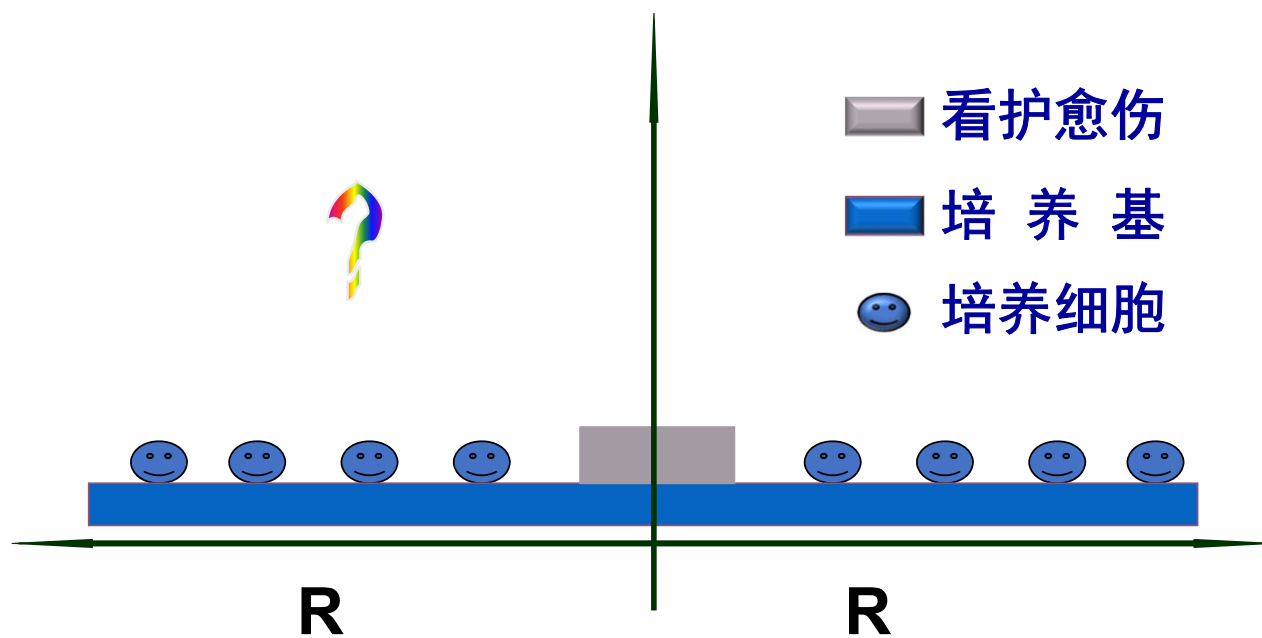
愈伤组织看护培养示意图2

具体做法二的顶观



愈伤组织看护培养示意图3

具体做法二的纵剖面视图



愈伤组织看护培养示意图4

培养应注意的事项

- ①看护愈伤和所要培养的细胞可以属于同一个物种，也可是不同的物种。
- ②直接接种在培养基上不能分裂的离体细胞，在看护愈伤组织的影响下就可能发生分裂。
- ③看护愈伤组织不仅给单细胞提供了营养成分，而且还提供了促进细胞分裂的其他活性物质。
- ④把愈伤组织放在琼脂培养基上，靠近愈伤组织的细胞首先发生分裂，表明愈伤组织释放出的代谢产物促进细胞分裂。

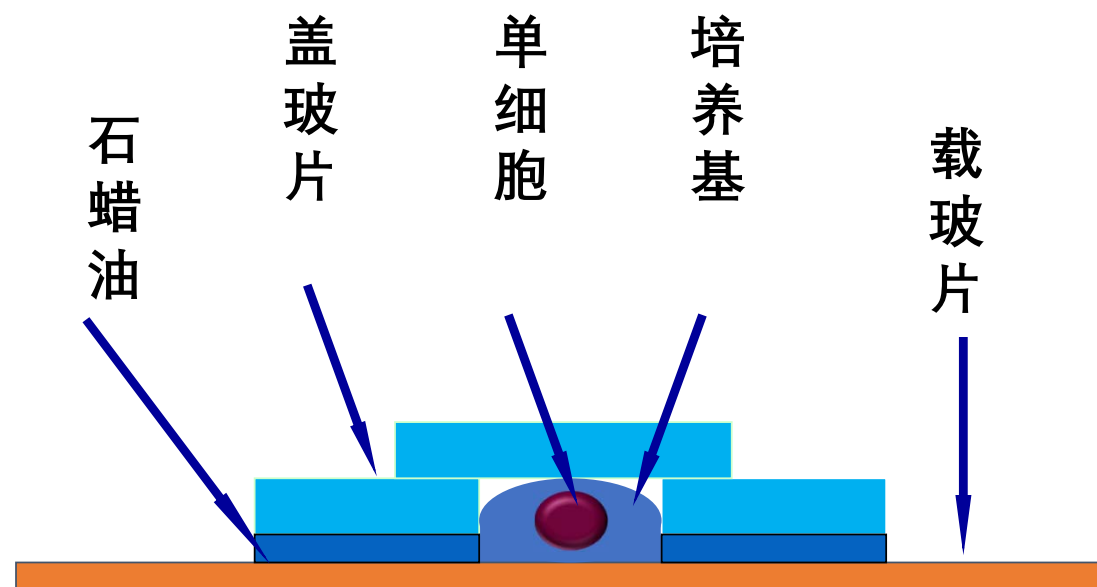
- **3. 微室培养**

- 用条件培养基来代替看护愈伤组织，将细胞置于微室中进行培养。
- 1960年，将细胞放到人工制造的小室中进行培养在培养过程中可以连续进行显微观察，记录细胞生长、分裂和形成细胞团的全过程。

具体做法一

- ①取一滴只含有1个单细胞的培养液，放在一张无菌载玻片上。
- ②在培养液滴四周与其相隔一定距离加上一圈石蜡油（构成微室的围墙）。
- ③在围墙左右两侧再各加一滴石蜡油，再在每滴石蜡油上放一张盖玻片（作为微室的支柱）。
- ④将1张盖玻片架在两个支柱之间（构成微室的屋顶），培养液滴被覆盖于微室之中，石蜡油能阻止微室中水分的丢失，且不妨碍气体的交换。
- ⑤把有微室的载玻片放在培养皿中培养。当细胞团长到一定大小之后，揭掉盖玻片，将其转到新鲜的液体培养基或半固体培养基上培养。

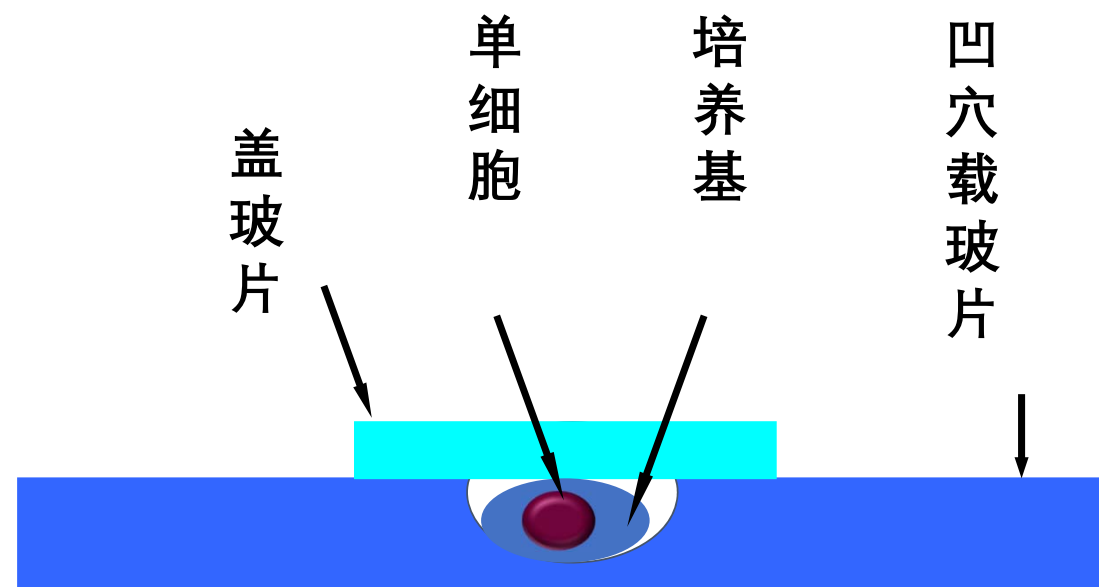
应用微室培养，由1个离体烟草单细胞培养开始，获得了完整的植株。



单细胞微室培养示意图1

具体做法二

- ①将一滴只含有一个单细胞的培养液，置于无菌凹穴载玻片的凹穴中。
- ②在凹穴四周与其相隔一定距离加上一圈石蜡油。
- ③然后将盖玻片架在其上，构成微室。
- ④把载玻片放在培养皿中培养。
- ⑤当细胞团长到一定大小后，揭掉盖玻片，将其转到新鲜的液体培养基或半固体培养基上培养。



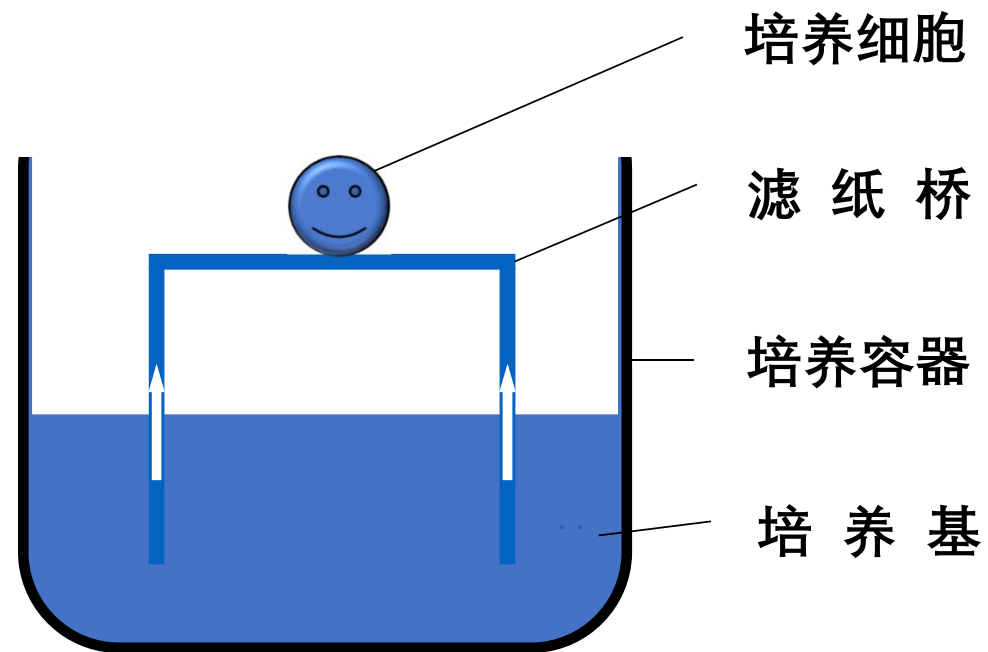
单细胞微室培养示意图2

具体做法三

- ①取一张无菌载玻片，以适当间隔左右各加一滴石蜡油，分别放置一张盖玻片，并使两者之间形成适当的间隔。
- ②在间隔四周加石蜡油，形成连续的环状石蜡油围墙，中间形成适当大小的凹穴。
- ③由悬浮培养物中取一滴只含一个细胞的培养液加于凹穴中。
- ④顶面用盖玻片密封，构成微室，把筑有微室的载玻片置于培养皿中进行培养。
- ⑤当细胞团长到一定大小后，揭掉盖玻片，将其转到新鲜的液体培养基或半固体培养基上培养。
- 1967年，Vasil等用该法由单细胞获得了完整的开花烟草植株。

- **4. 滤纸桥法**

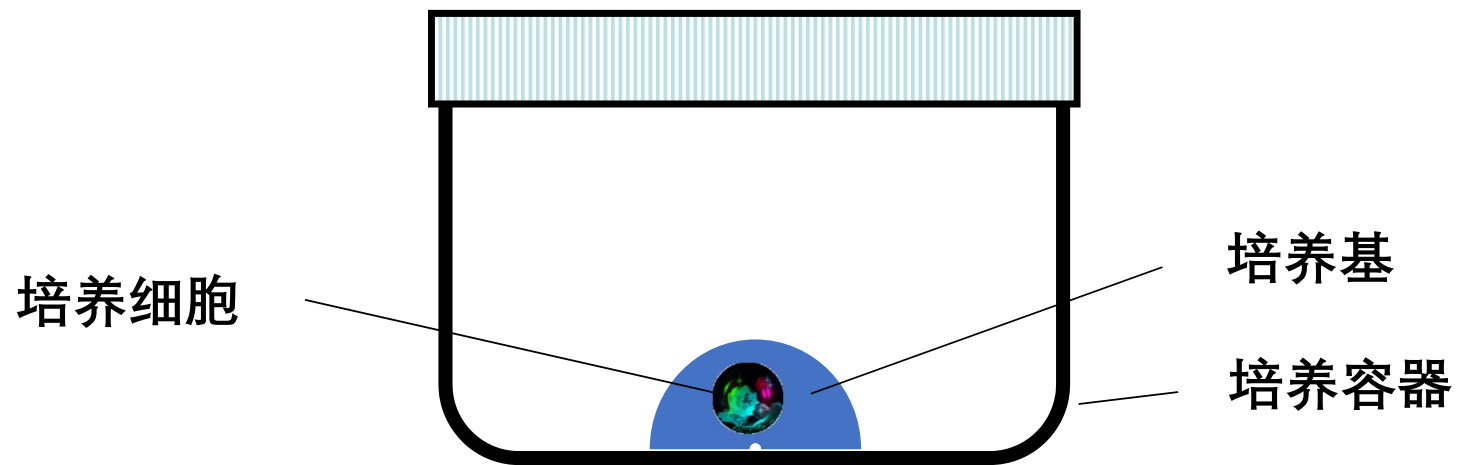
- ①将无菌滤纸剪成适当宽的长条状，折叠两端使之成为滤纸桥的两条支腿。
- ②将适当量条件培养基置于合适的培养容器中。
- ③将滤纸桥的两条支腿插入条件培养基中，滤纸桥通其两条支腿不断从培养基中吸收水分及其它细胞赖以生长的因子，直到滤纸桥变得湿润。
- ④将单细胞接种于湿润的滤纸桥上，把培养容器密封后进行培养。
- ⑤当细胞团长到一定大小之后，将其转到新鲜的液体培养基或半固体培养基上培养。



单细胞滤纸桥培养示意图

- 5. 微滴培养

- 微滴培养可用于单细胞的培养，特别适合于单个原生质体的培养。
- ①取1滴只含1个单细胞的培养液（用条件培养基制备）滴于适当培养容器的底部，形成一半球状液滴。
- ②密封培养容器，置于适当条件下培养；细胞分裂增殖，形成细胞团。
- ③当细胞团长到一定大小之后，将其转到新鲜的液体培养基或半固体培养基上培养。



单细胞微滴培养示意图

- **6. 条件培养基培养**

- 条件培养基广泛地用于各种形式的细胞培养。
- 当合成培养基中的细胞或细胞培养物由于起始密度太低而不能发生分裂时，可采用条件培养基进行培养。

- **条件培养基**

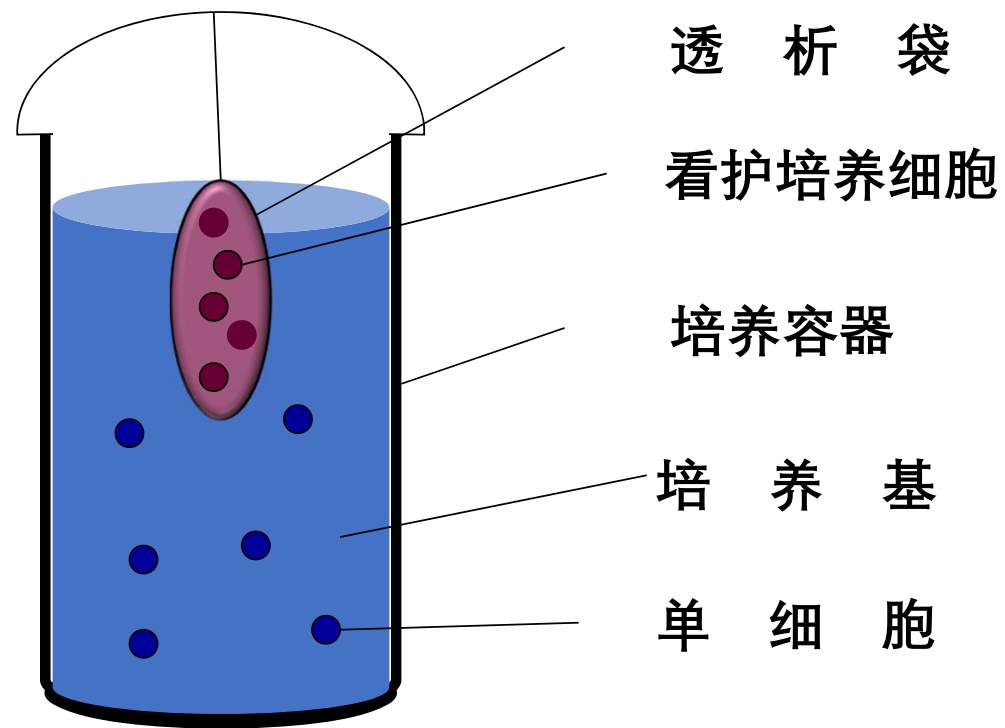
- 指已经用来培养过某种植物材料的培养基。
- 在一定量培养基中加入适当密度的细胞，培养一定时间后，这些细胞就会向培养基中分泌一些物质，使培养基条件化。

条件培养基的制备

- ①制备一定量的新鲜培养基。
- ②接种一定（适当）量的细胞。
- ③在一定的条件下。
- ④培养一定的时间。
- ⑤滤掉其中的细胞，制成液体或固体培养基。
- 利用条件培养基可提高单细胞培养物存活和分裂的能力，用来培养单细胞或低密度细胞群体。



- 在液体培养中，把高密度细胞悬浮培养物 (看护培养物) 装在一个透析管内，用线悬挂在三角瓶内，瓶内装有低密度细胞培养基。
- 看护培养物产生的代谢物可扩散到低密度培养基中，增加了促进细胞生长的活性物质，丰富了合成培养基的成分，满足了低密度细胞群体对生长条件的要求。



单细胞培养示意图

- 7. 影响单细胞培养的因子

- 培养基成分和初始植板密度是单细胞培养成败的关键，二者互相依赖。
- 当细胞的初始植板密度较高时 ($10^4 \sim 10^5$ 个/ml)，使用与悬浮培养或愈伤组织培养成分相似的合成培养基即可。
- 初始植板密度较小时，就须在培养基中加入椰子汁、水解酪蛋白、酵母浸出物等化学成分不确定的天然物质，有效地取代影响细胞分裂的群体效应。

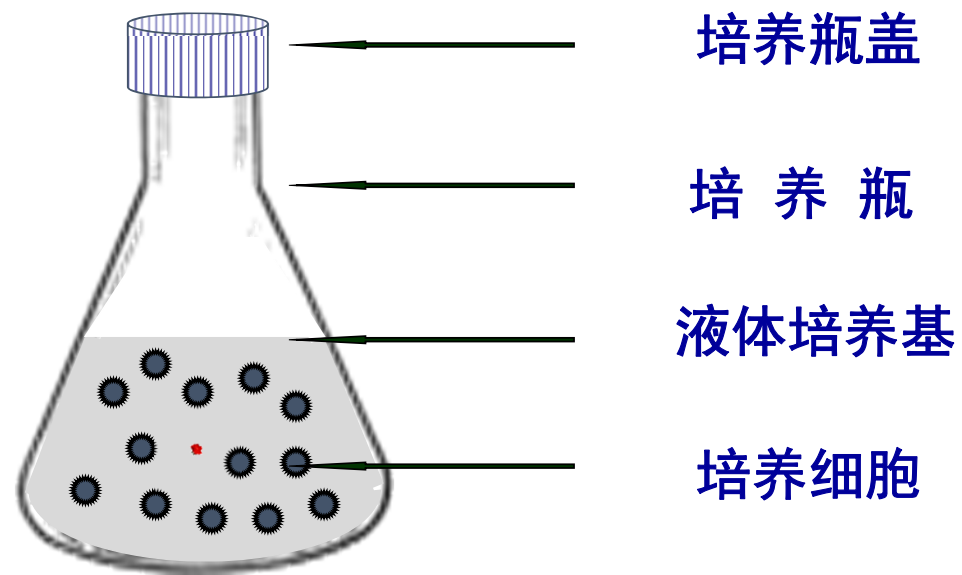
- 低密度植板的旋花属植物细胞须加入一种细胞分裂素和几种氨基酸，而这些物质对其愈伤组织培养并不必要。
- 细胞能够合成某些分裂必需的化合物，只有当这些化合物达临界值后，细胞才能分裂。在培养中，细胞不断地把这些化合物释放到培养基中，直到在细胞与培养基之间达到某种平衡。

- 初始植板密度较高时，达到平衡的时间比较低时早，当初始植板密度低于临界值时，永远也达不到这种平衡状态，细胞就不能分裂
- 使用含有这些化合物的条件培养基，则可在相当低的初始植板密度下使细胞发生分裂。
- CO_2 可诱导低密度细胞发生分裂。在某些物种的悬浮培养中，如果在培养容器中保持一定的 CO_2 压力，可使有效初始植板密度下降到600个/mL。

三、植物细胞的悬浮培养技术

(一) 悬浮培养的方法

- **悬浮培养** 将游离的植物细胞，按一定的密度悬浮在液体培养基中进行培养。
- 是从愈伤组织的液体培养基础上发展起来的。



植物细胞悬浮培养示意图

- 1950年以来，从实验室培养瓶的悬浮培养发展到大容量的发酵罐培养，从不连续培养发展到半连续和连续培养。
- 1980年以来，植物细胞培养作为生物技术的一个组成部分，正在发展成为一门新兴的科技产业体系。

- 悬浮细胞培养的优点：

- ①培养细胞均匀一致，数量大质量高，有保证；
- ②细胞增殖速度快(比愈伤组织)；
- ③适宜大规模培养(成为细胞工程中独特的产业)。

- 细胞悬浮培养的类型：

①分批培养

基础

②半连续培养

③连续培养

应用

(二) 分批培养(batch culture)

- 1. 分批培养的概念
- 把一定量的种子细胞接种(分散)在一定容积(量)的液体培养基中进行培养，建立起悬浮细胞培养体系。

- **2. 分批培养的特点**

- 分批培养的细胞处在人工模拟生态系统中，历经从建立到消亡的全过程，随着培养细胞接种成活，快速而大量增值，群体数量急剧扩大，营养物质快速而大量消耗，细胞有害代谢产物快速而大量释放，环境快速而全面恶化，越发不适于细胞存活生长，进而细胞生长减缓，直至死亡解体，系统消亡。

进一步解读或说明

- ①培养过程除了气体和挥发性代谢产物可同外界环境进行有限交换外，一切都是密闭的。
- ②当培养基主要成分或某一种成分耗尽时，细胞停止生长分裂。
- ③所用培养容器一般是100~250ml三角瓶，每瓶装20~75ml培养基。
- ④为使细胞不断增殖，必须及时继代，保证环境适宜，营养充足均衡。

- ⑤继代方法，从培养瓶中直接取出部分悬浮液 (尽量含单细胞多些)转接到成分相同的新鲜培养基中 (一般约稀释5倍)；
- ⑥必要时，也可用纱布或不锈钢网过滤，除去较大细胞团。用滤液接种，提高后续培养物中单细胞比例。
- ⑦培养用的液体培养基因物种而异，凡适合愈伤组织生长的培养基，除去琼脂后，均可作为悬浮细胞培养基。

- **3. 分批培养细胞生长曲线**

- 在分批培养中，细胞数目会不断发生变化，呈现出细胞生长周期。
- 在整个生长周期中，细胞数目增加的变化大致呈现“S”形，称为“S”曲线。
- S 曲线是培养细胞生长的群体数量随着培养时间而变化的群体动态曲线。

- 根据曲线所反映出的培养系统本身实际情况的特点，可以把曲线分为延滞期、对数增长期、直线生长期、缓慢生长期和静止期五个时期或阶段。
- 每个时期都有其特点，描述应涉及三个方面：
 - ◆ 细胞个体本身情况
 - ◆ 环境变化情况
 - ◆ 群体动态变化情况

- ①延滞期

- 接种初期增长慢，细胞在适应新的环境，特点：
 - →细胞生长缓慢，很少分裂；
 - →细胞数目几乎不增加，曲线比较平缓；
 - →环境最佳，营养丰富而尚未大量消耗，细胞有害代谢产物未被大量释放，各种生态因子适宜。

- 此时期，实际上是接种细胞在逐步适应新环境的过程，即适应期。
- 离体细胞要正常生长，必须与其环境建立某种平衡关系，如细胞内外环境的激素含量要达到一定水平且保持一定比例，满足细胞正常生长需要。
- 建立稳定的平衡关系需要一定的时间和其它条件，如种子细胞初始接种的数量等。

- **初始接种量**

- 细胞要接种成活所必须的最少接种的量或密度。
- 不同的植物细胞，初始接种量不同，甚而差别较大。
- 如果实际接种量少于其初始接种量，则接种不成活，因为太少量的细胞不能与新环境建立起平衡关系。

初始接种量也称初始接种密度

- 平衡关系建立与多种因素有关，如种子细胞质量 (即活力)、培养基、培养条件等。
- 此时，尽管细胞表现出相对安静的状态，但是，细胞的活力是最佳的，只是作为潜在因素存在。
- 随着平衡关系的建立，细胞逐步适应了新环境，活力也随而表现出来，生命活动迅速进入活跃状态，生长加快。

- ②对数增长期

- 细胞与环境建立起平衡关系后，细胞迅速进入快速生长阶段，即对数增长期，特点：
 - → 细胞生长分裂活跃，数目迅速增加；
 - → 细胞群体动态变化缓慢，S曲线缓慢上升；
 - → 环境很好，营养未被大量消耗，各种因子都适宜于细胞生长。

对数增长期(logarithmic phase)

- 就单个细胞而言，此时处在整个分批培养中生长最快的时期，细胞数量倍增所需时间最短，细胞活力表现最高水平。
- **代时**：分批培养细胞增殖1代所需要的时间。
- **最短代时**：分批培养细胞繁殖1代所需最短时间，因不同植物而异。
- 烟草为48h，蔷薇36h，菜豆 24h。
- 分批培养最短代时就出现在对数生长期。此时，单个细胞最活跃，曲线却比较平缓而上升速度不大，因为细胞基数太少所致。随着培养进行，系统中细胞数量的积累，其群体效应就会快速显现出来。

- ③直线生长期

- 细胞数量增长最快的时期，单位时间内细胞数目增长大致恒定，细胞数目增长速度随即达到最高峰，即直线生长期；特点：
 - →细胞增长速度逐渐下降，由快到慢下降呈现加速度；
 - →系统中细胞基数变大，随着细胞生长增殖，群体数量快速增加，此时，曲线呈直线上升。
 - →随着培养的继续，细胞数量大量而快速增加，营养物质大量而快速消耗，细胞有害代谢产物大量而快速释放，环境快速恶化，越发不适宜于细胞的生长。

直线生长期(linear phase)

- ④缓慢生长期

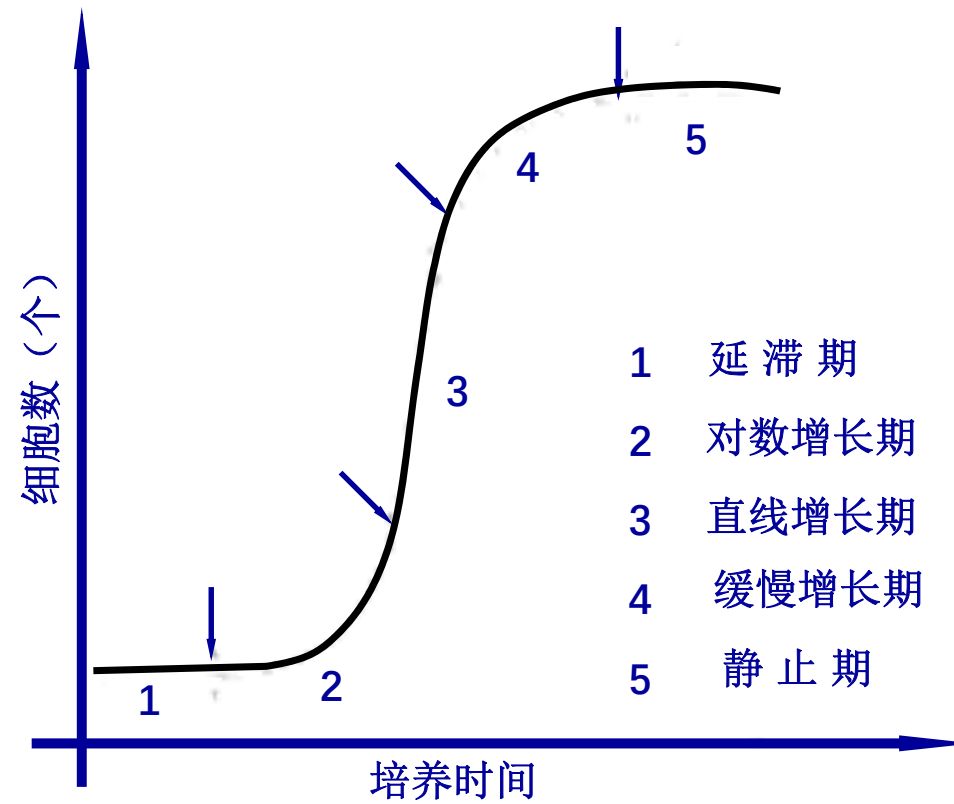
- 培养基某些营养物耗尽或有毒代谢物积累，细胞生长与数量增长逐渐变慢而进入缓慢期：
 - →细胞生长缓慢，细胞活力快速下降。
 - →系统中细胞数量达到最大值，继续增长缓慢。
 - →营养物质消耗殆尽，有害代谢产物快速而大量积累，极有可能出现了限制生长的因子，PH等各种生态因子变化大而不适合细胞需要，环境恶化，不适宜于细胞生存与继续生长分裂增殖，细胞出现死亡或解体。

缓慢生长期 (retard phase)

- ⑤静止期

- 细胞生长极其缓慢，进而趋于完全停止的状态，越来越多的细胞开始死亡和解体，进入静止期。

静止期(station-ary phase)



植物细胞分批培养生长曲线

- **4. 分批培养的应用**

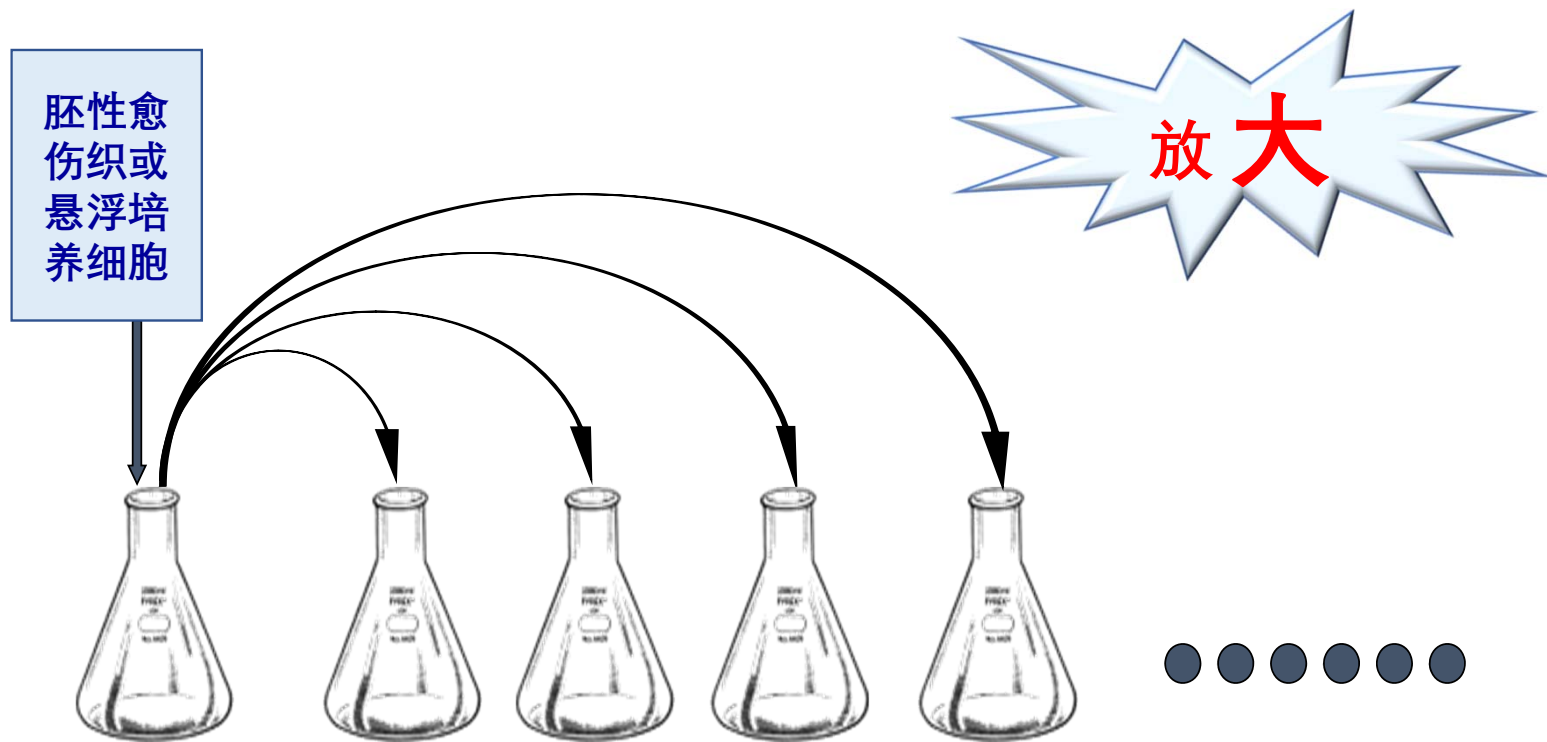
- 分批培养对研究细胞生长代谢并不是一种理想的培养方式。
- 在分批培养中，细胞生长代谢方式、培养基成分不断改变，没有一个稳定的生长期，细胞数目、代谢产物、酶的浓度等也不能保持恒定。

- 分批培养细胞没有一个长期稳定的生长环境，细胞生长本身也不稳定，这样一来，无法用于实验或研究。
- 分批培养是细胞培养实验与工业应用的基础，其它任何形式的细胞培养应用技术，都是在此基础上发展而来的。
- 分批培养在实验和生产上具有重要指导意义。

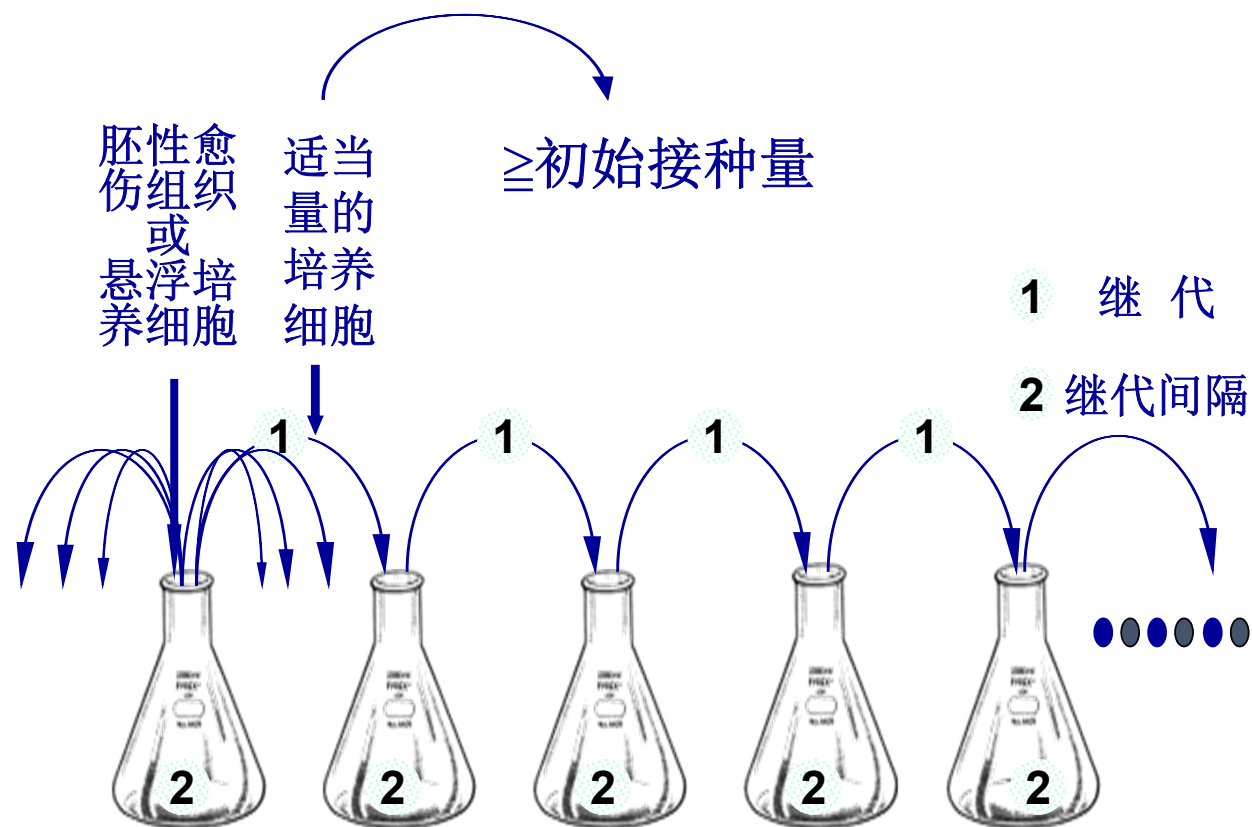
实验指导意义

- 实验中，培养的细胞主要是用于各种实验操作，随用随取，要求处在培养状态的细胞，要始终保持很高的活力，以备使用。
- 处在缓慢生长期和静止期的细胞，活力下降，全能性逐渐丧失，甚至，很多细胞已经死亡解体，不宜用于实验，尤其是以再生为目的的实验或研究。

- 为保持培养细胞始终处在高活力状态，就要使培养稳定保持在对数增长期和直线增长期。
- 通常是通过不断更换新的培养基，更新培养环境来实现的。
- 继代 (亦称为继代培养，或放大，或放大培养)
- 将悬浮细胞转接到新的培养基，放大培养。

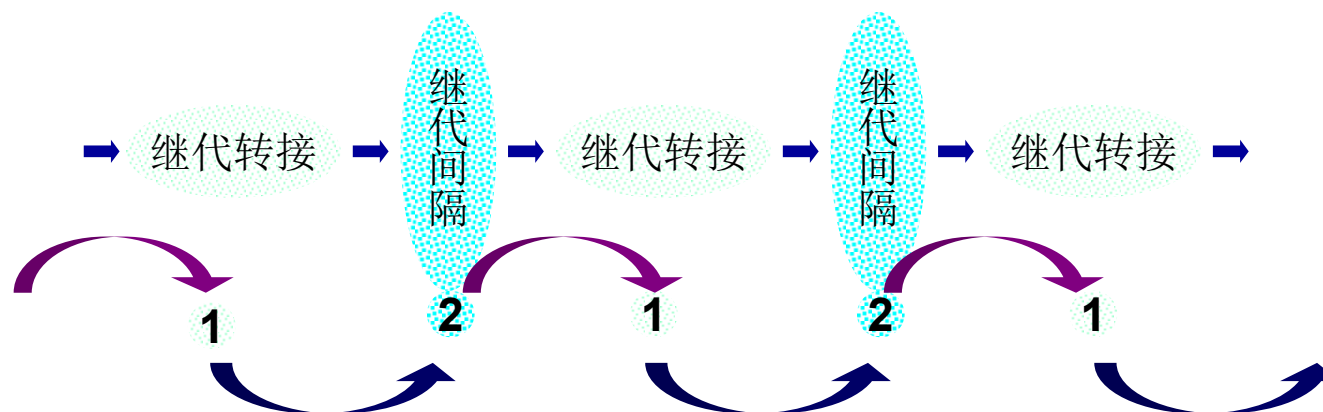


植物细胞悬浮培养继代示意图



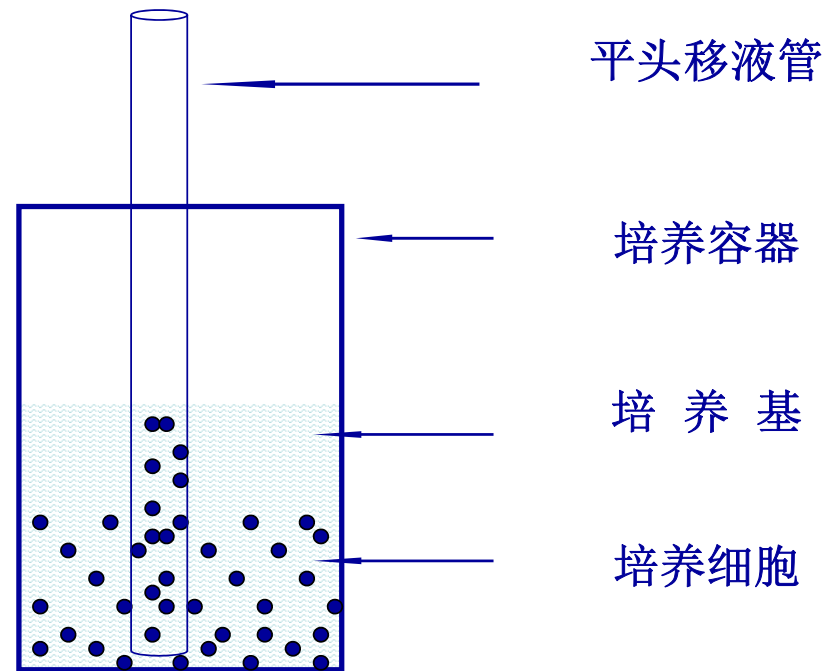
植物细胞悬浮继代实验操作示意图

- **继代间隔** (亦称继代时间)
- 上次转接后到下次转接之间的间隔时间，即相邻的两次继代操作的时间，也是每次继代后的培养时间。

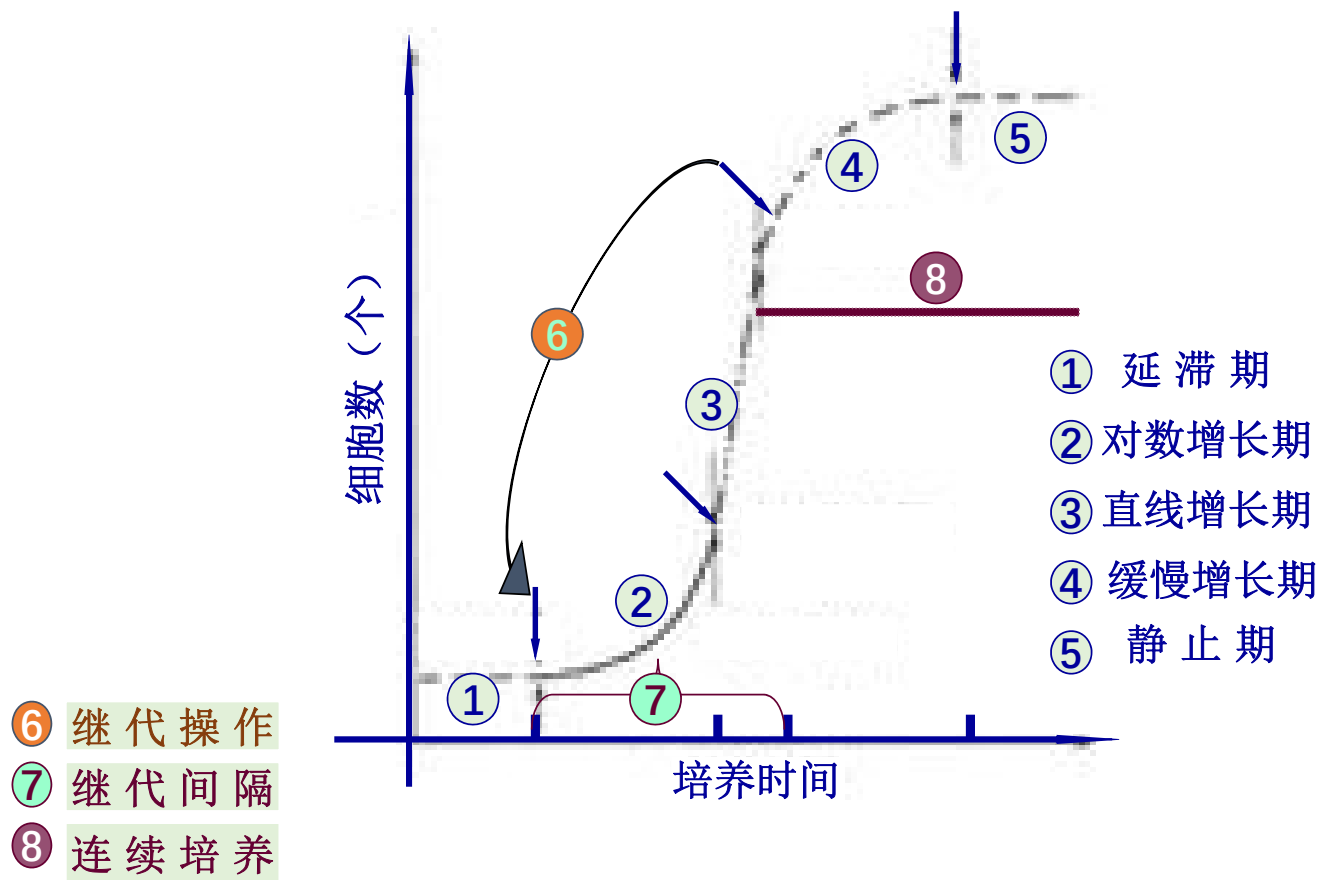


植物细胞悬浮持续继代操作示意图

- 用HR水稻幼胚胚性愈伤组织建立悬浮细胞培养体系：
- 150ml三角瓶，约100ml/瓶N₆B₅液体培养基，每次接种约10ml的种子细胞，继代间隔2.5d。
- 让培养瓶静置一会儿，细胞沉降于培养瓶底部，用平口(平头)移液管自培养瓶底部吸取约10ml细胞与培养基混合物，转接于新的培养基中。



水稻细胞悬浮继代种子取样示意图



继代间隔 $\leq$ ②+③ 图示

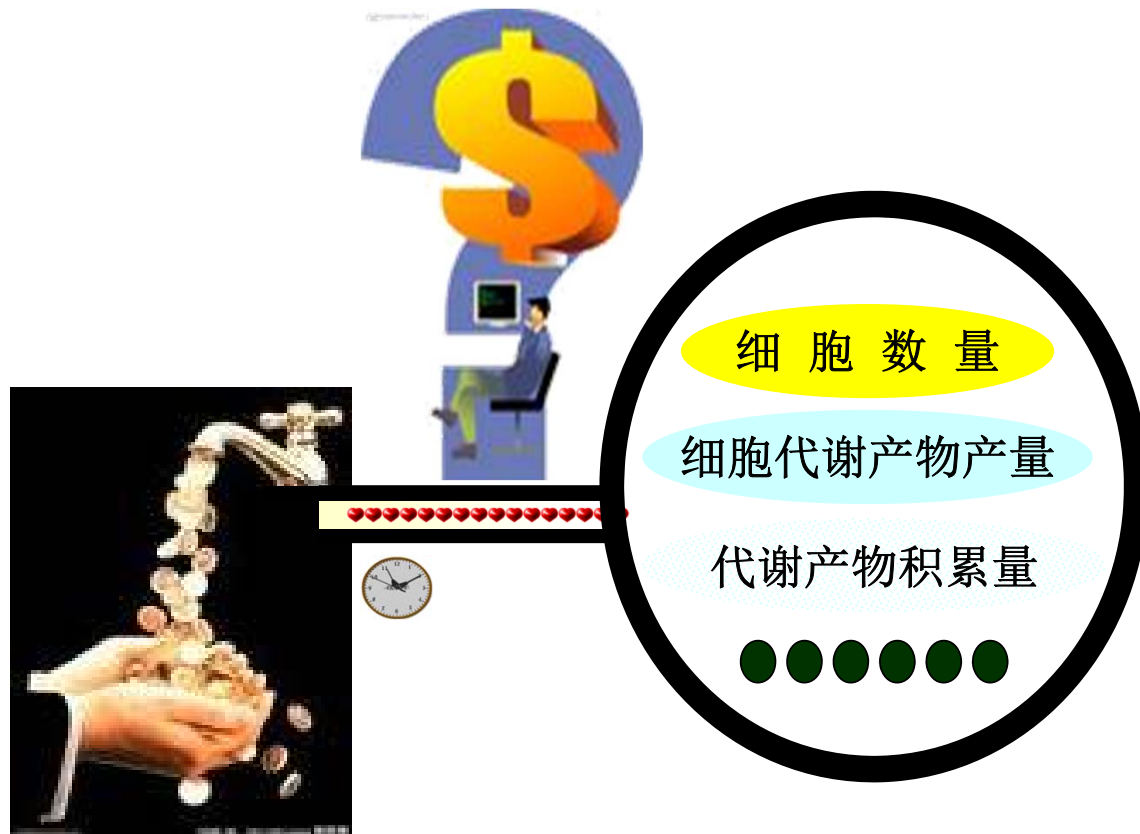
生产指导意义

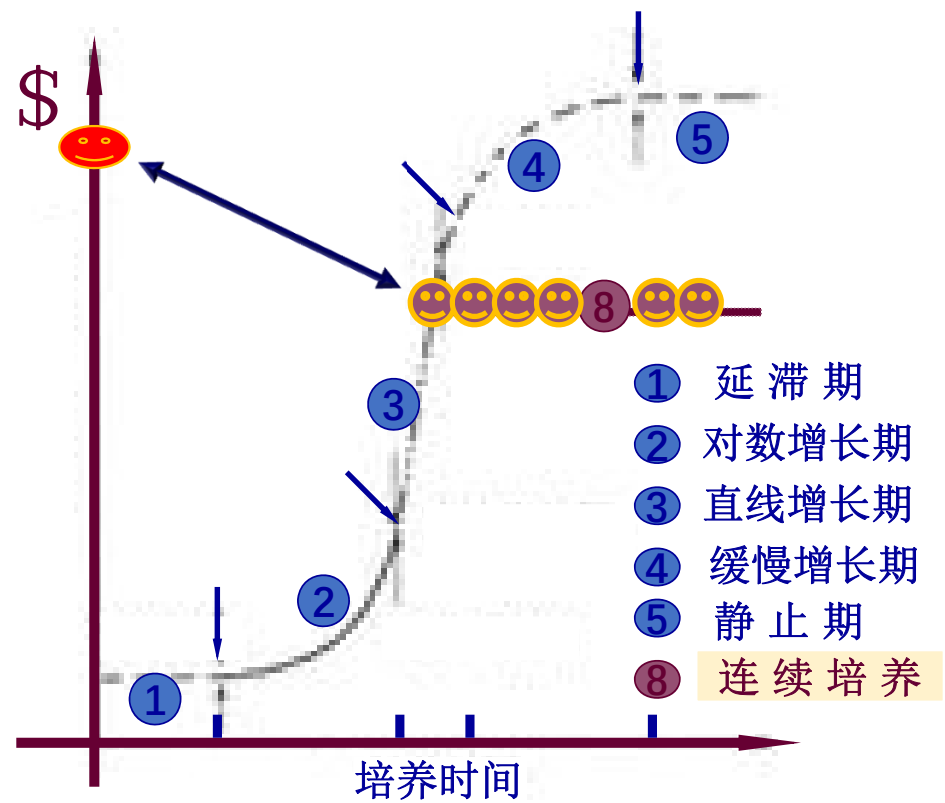
- 我们必须要注意，学校、课本、课堂与实验教学所传授的纯理论与生产实践应用的关系与差别，更要注意二者之间的转化或转换，更何况学习者与生产者的思维与工作目的也不同。
- 我们在此讨论的植物细胞离体培养，就只是针对细胞本身展开的，没有附加任何企图或意义。

- 离体细胞培养技术用于工业发酵生产，直接获得细胞有用代谢产物，制造出高质量商品投放市场获得高额利润，从而实现最大经济效益。



- 涉及发酵生产企业效益的因素很多，就发酵本身而言，主要有以下几个方面：
 - 系统中细胞总数量
 - 细胞代谢产物的产量
 - 细胞代谢产物的积累量
 - 其它因素
- 每一个因素都与终效益没有直接的必然的一一对应的成正或负相关联系，但是都有关系。



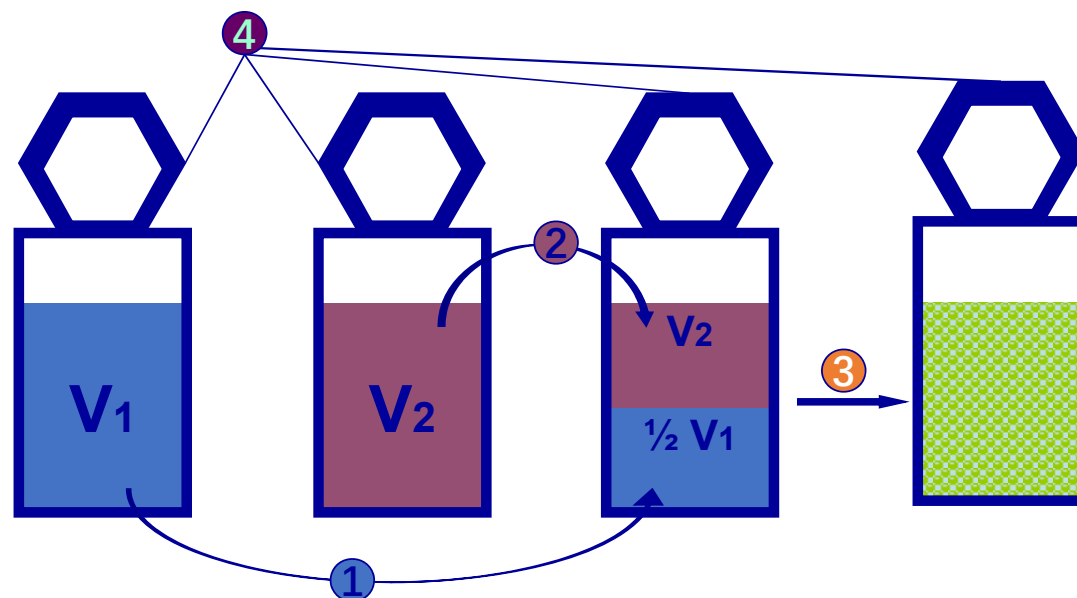


与生产关系示意图

- 如何消除延滞期
- 一般情况下，延滞期在实验和生产上是不能出现的，通常可采取如下两类方法消除：
 - ①加大初始接种的量
 - ②采用条件培养基

(二) 半连续培养

- 利用培养罐进行细胞大量培养的一种方式。
- 在半连续培养中，当培养罐内细胞数目增殖到一定量后，倒出一半细胞悬浮液于另一个培养罐内，再分别加入新鲜培养基继续进行培养，如此这样频繁地进行再培养。



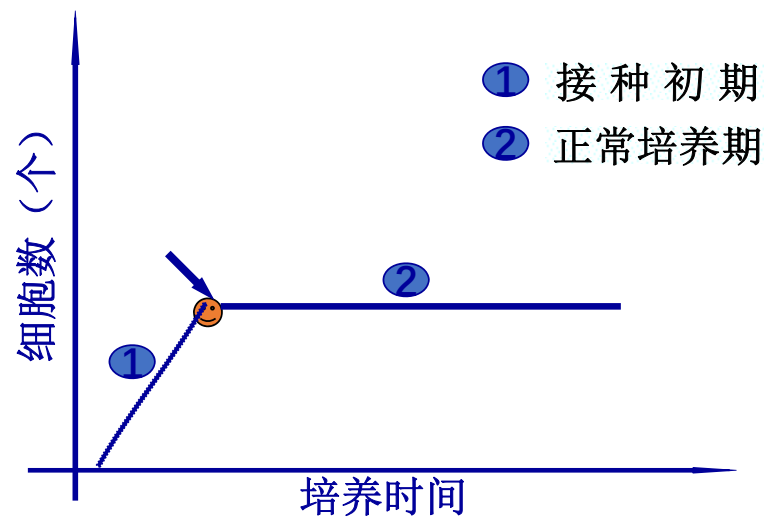
V_1 :悬浮细胞混合液 V_2 :新鲜培养基
① ② ③ 为操作步骤 ④ 培养瓶 (罐)

半连续培养示意图

- 半连续培养能够重复获得大量均匀一致的培养细胞供生化研究用。
- 用此法培养玉米胚乳细胞，可长时间保持对数生长状态，每天每升培养液中的细胞鲜重增长3.6~4.5g。
- 1972年，用此法培养烟草细胞，培养5d后，每天可收获和取代50%的细胞培养物。
- 菜豆和花生等多种植物进行了半连续培养，为小规模成批培养或其他发酵罐的培养提供了一致的接种材料。

(三) 连续培养 (continuous culture)

- 1. 连续培养的概念
- 利用特制的培养容器进行大规模细胞培养的一种方式。



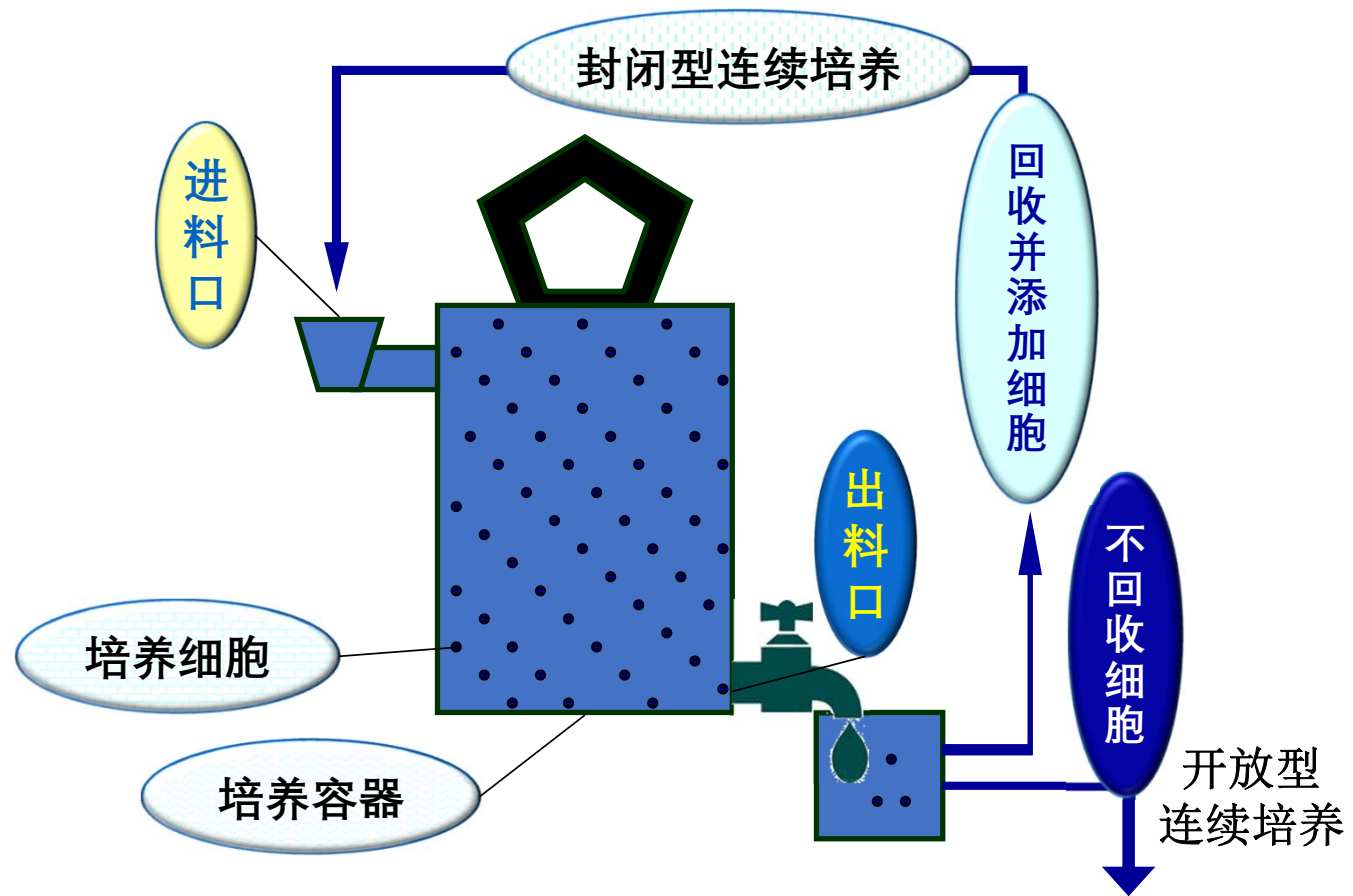
植物细胞连续培养生长线

连续培养的特点

- 在连续培养中由于不断注入新鲜培养基，排掉旧的培养混合物，保证养分的充足供应，不会出现悬浮培养物发生营养亏缺的现象。
- 连续培养可在培养期间内使细胞长久地保持在对数生长期中，细胞增殖速度快。
- 连续培养适于大规模工厂化生产。

• 2. 连续培养的分类

- 根据对排出混合液中的细胞回收添加与否，连续培养又可分为：
 - ① 封闭型连续培养
 - ② 开放型连续培养



植物细胞连续培养示意图

- ①**封闭型连续培养**

- 在培养过程中，排出的旧培养液由加入的新鲜培养基进行补充，进出数量保持平衡，从而使培养系统中营养物质的含量总是超过细胞生长的需要，同时，将悬浮在排出液中的细胞经机械方法收集后再放回到培养系统中。

- **特点：**

- 在这种培养方式中，随培养时间延长，细胞密度会不断增加。
- 用此方法培养假挪威槭细胞，在4L的培养系统中进行，用虹吸方法把陈旧的培养液不断吸出，并不断注入新鲜培养基以保持培养容积不变。

- ②开放型连续培养

- 通过建立一套自动控制系统来调节培养基注入的数量和培养液的总体积，不使限制细胞生长的因子出现，创造一个稳定的培养细胞生长的环境。
- 在开放连续培养中，注入的新鲜培养液的容积与流出的培养液容积相等，其中细胞的密度也保持恒定，并通过调节流入和流出的速度，使培养细胞的生长速度保持在一个稳定状态，流出的细胞数相当于培养系统中新细胞的增加数。悬浮在排出液中的细胞不再收集放回到培养系统中。

- **3. 开放型连续培养的调控**

为了保持在开放型连续培养中细胞增殖的稳定性，可采取两种方法加以控制：

① 浊度恒定式

② 化学恒定式

- ①浊度恒定式

- 在浊度恒定培养中，新鲜培养基是间断注入的，受细胞密度增长所引起的培养液浑浊度增加的控制。可以选定一种细胞密度，当超过这个细胞密度时，使细胞随着培养液一起排出，以保持细胞密度的恒定。
- 在浊度恒定的连续培养装置中，有一个细胞密度观测窗，用一支比浊计或分光光度计来测定培养液中细胞的浑浊度：新鲜培养液流入量与旧培养液流出量都受光电计自动控制。
 - 培养液中细胞密度增加时，光透量减少，从而给培养液入口一个信号，加入一定量的新培养液，同时流出等量的旧培养液，保持体积不变。当光透过量增加时，会自动停止新鲜培养液的注入和旧培养液的流出。

- ②化学恒定式

- 在化学恒定式培养中，为使细胞密度保持恒定状态，可采用两种方法。
- →以固定速度注入新鲜培养基，将培养基内的某种营养成分（如氮、磷或葡萄糖）的浓度调节成为一种生长限制浓度，从而使细胞的增殖保持稳定状态。在这种培养基中，除生长限制成分以外的其他成分的浓度都保持在细胞生长所需要的水平上，而生长限制因子被调节在一定水平上，它的任何增减都可由细胞增长速度的增减反映出来。

- → 控制培养液进入的速度，使细胞稀释的速度正好和细胞增殖的速度相同，因此培养液中细胞密度一直保持恒定状态。
- 化学恒定式的最大特点是通过限制营养物质的浓度来控制细胞的生长速度。
- 在大规模细胞培养工业上有巨大应用潜力。
- **4. 连续培养的应用**
- 连续培养是植物细胞培养的重要进展，对于植物细胞代谢调节研究、各种因子对细胞生长的影响以及对次生物质的生产等都有重要意义。

(四) 悬浮细胞的继代

在悬浮培养过程中，为了保持一定的悬浮培养细胞增殖速度和增殖量，应定期做继代培养，最适的周期一般为1~2周，但实际所需的时间和接种量应视不同细胞系和实验需要而定。

- 继代时间为1周的细胞系可用1:4的接种量；
- 继代时间为2周的可用 1:10的接种量。
- 接种时，可用口径稍大的移液管进行，待培养瓶中大的细胞团下沉后，立即吸取溶液上部单细胞和小细胞团接种。

- 在悬浮培养中，细胞刚进入静止期之初，细胞悬浮液达到最大生产量，就必须进行继代培养，因为处在静止期的细胞悬浮液保存时间太长会引起细胞的大量死亡和解体，因此观察进入静止期后的天数，保持细胞活力的变化很重要，这样可确定细胞培养的时间，及时进行继代培养。
- 有的植物细胞一到静止期，马上需要继代培养，有的在静止期之前细胞增殖减慢时即可继代。
- 为了加速细胞增殖，有的甚至在对数生长期末就进行继代。

- 培养的悬浮细胞从开始到结束，整个周期的长短是由细胞密度、延迟期长短和生长速率等因素所决定的。
- 一般起始细胞密度应在 $0.5 \times 10^5 \sim 2.5 \times 10^5$ 个 / ml，培养过程中可增殖到 $1 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个 / ml。
- 全部细胞平均分裂4~6次。
- 许多细胞系经历18~25d就能完成此增殖过程。
- 如使用贮备的静止期的细胞，时间会更长；
- 而使用对数生长期的细胞，则只需要6~9d

- 继代最容易造成污染的危险来自瓶口的边缘。接种时，手和移液管不得接触瓶口，接种前后都应用火焰灼烧瓶口。
- 为了避免由于污染造成细胞系的损失应独立地保持两套亚细胞系。
- 现在有许多分裂迅速、分散性好的细胞系可在液氮(-196°C)下保持。
- 在继代培养中，要定期检查是否有微生物污染：
 - ①可凭借细胞的色泽、培养液面的清澈度等判断
 - ②可在显微镜下观察。
 - ③可在营养丰富的培养基平板上接种细胞培养物，以检查污染物的生长。

- 在悬浮培养中，为了用于研究细胞分裂和细胞代谢，一般使用同步培养物或部分同步培养物。
- 因为与非同步培养相比，在同步或部分同步培养中，细胞周期内的每个事件都表现得更为明显和一致。

(五) 培养细胞的同步化

同步培养

- 在培养基中大多数培养细胞都能同时通过细胞周期(G1、S、C2和M)的各个阶段。
- 同步性的程度以同步百分数表示。

- 一般情况，悬浮培养细胞是不同步的，为了取得一定程度的同步性，研究者已进行了各种尝试。
- 同步性程度，不应只由有丝分裂指数来确定，还可以由某一瞬间处于细胞周期某一特定点上的细胞所占的百分数表示；
- 也可由一个短暂具体的时间内通过细胞周期某一点 (如进入有丝分裂) 的细胞的百分数表示；
- 或者全部细胞通过细胞周期某一点 (如进入有丝分裂后期) 所需总时间占细胞周期时间百分数表示。

- 实现悬浮培养细胞同步化方法主要有两种。
- **1. 饥饿法**
- 先对细胞断绝供应一种进行细胞分裂所必需的营养成分或激素，使细胞停滞在 G1期或G2期，经过一段时间的饥饿后，当重新在培养基中加入这种限制因子时，静止细胞就会同时进入分裂。
- 长春花悬浮培养中，先使细胞受到磷酸盐饥饿4d，然后再把它们转入到含有磷酸盐的培养基中，结果获得了较高的同步性；
- 烟草悬浮培养细胞受细胞分裂素的饥饿后获得同步；
- 胡萝卜细胞受生长素饥饿后也取得了同步化的效果。

- **2. 抑制法**

- 使用DNA合成抑制剂，如 5-氨基尿嘧啶、胸腺嘧啶脱氧核苷等，可使培养细胞同步化。用这些核苷酸类似物处理细胞，阻止DNA的合成，细胞周期只能进行到G1期，细胞都滞留在 G1期和S期的边界上，当抑制剂除去后，细胞就进入同步分裂。

(六) 细胞悬浮培养的培养基

用来建立生长快、易散碎的愈伤组织的固体培养基取掉琼脂后即用于建立该物种的细胞悬浮培养系，但常需要进行调整。

- 调节生长素与细胞分裂素的比例可提高细胞的分散程度。
- 在活跃生长的悬浮培养物中，无机磷酸盐的消耗很快，常成为限制因子。

- 把烟草悬浮培养物保存在含有一种标准MS无机盐的培养基中，培养72h内磷酸盐的浓度几乎降到零
- B5和ER两种培养基适用于高等植物的细胞悬浮培养，要求细胞地初始接种密度不少于 5×10^4 个/ml
- 当初始接种密度较低时，培养基中须加入其它成分。细胞悬浮培养的温度、光照、转速等条件皆可在摇床上设定。

(七) 培养基的振荡

在悬浮培养中，为了改善液体培养基中培养材料的通气状况，均衡营养条件，保持培养基系统生态环境一致性，需进行培养基的不断振荡。

- **1. 旋转式摇床**

- 在分批悬浮培养中，旋转式摇床至今仍是一种应用最广泛的设备。摇床载物台上装有瓶夹，不同大小的瓶夹可以调换，以适应不同大小的培养瓶，摇床的转速是可控制的。
- 对大多数植物组织来说，以转速30~150rpm为宜，冲程范围为2~3cm，转速过高或冲程过大会造成细胞破裂。
 - ①根据摇床形状，可分为立式的和卧式的。
 - ②根据夹持方式，可分为铁抓式的和弹簧式的。

- **2. 慢速转床**

- 1952年，Steward进行胡萝卜细胞培养时设计的。
- 转床在一根略微倾斜的轴上平行安装若干转盘，转盘上装有固定瓶夹，转盘向一个方向转动，培养瓶也随之转动，瓶中的培养物交替地暴露于空气或液体培养基中，转速 $1\sim 2\text{rpm}$ ，培养时若需照光，在床架上可安装日光灯。

- **3. 自旋式培养架**

- 适用于大容量的悬浮培养：转轴与水平面成 45° 角。转速为80~110rpm，这种装置上可以放置两只10L的培养瓶，每瓶可装4.5L培养液。



- **4. 往复式振荡摇床**

- 通过往复式振荡运动使培养物悬浮，并均匀分散。
- 现不常用。



四、培养细胞蛋白质和DNA含量变化

- 1. 蛋白质含量的变化
- 有关细胞培养中可溶性蛋白质含量和组分的变化有大量的报道，尽管有些报道不尽相同，但变化趋势是相近的。
- 在可溶性蛋白质含量上，各类材料中胚性愈伤组织的蛋白质含量远高于非胚性愈伤组织，其中水溶性和盐溶性蛋白含量最多表明胚性愈伤组织代谢活性高于非胚性愈伤组织。

- 相反，在非胚性细胞系中游离氨基酸高于胚性细胞系，当细胞分化和胚胎发生受阻时，细胞内游离氨基酸增加。
- 这些研究结果表明，体细胞胚发生过程中存在着活跃的蛋白质合成，而这些蛋白质合成为体细胞胚发生和发育奠定了分子基础。
- 从体细胞胚发生中有特异蛋白质的形成推测，这些蛋白质既可作为调控因子，又可作为结构蛋白和酶蛋白起作用。
- 如胡萝卜、水稻、玉米和豌豆等的体细胞胚发生中有特异性蛋白质形成，其分子质量为45~55ku
- 苜蓿体细胞胚发生中的50ku蛋白质可作为胚胎发生的分子标记。

- **2. DNA含量的变化**

- 细胞分裂增殖的分子基础是 DNA复制，细胞分化的分子基础是基因的差异表达，多细胞生物形态发生的基础是细胞分化。
- 诱导红豆草胚轴获得愈伤组织，建立胚性细胞系和非胚性细胞系，利用 ^3H -胸苷标记，研究了这两种细胞系的DNA合成动态。

- 结果表明，标记物大量渗入胚性细胞系中表现出DNA合成十分活跃，而且DNA合成只限于核大、圆形的胚性细胞和细胞团。
- 在小麦、水稻等体胚发生的同位素标记中也产生了相同的结果。
- 胚性细胞DNA复制为细胞增殖奠定了物质基础，为细胞分化提供了条件，说明DNA合成与细胞分化中基因差别表达的关系。

五、影响细胞培养的因素

- 1. 培养基
- 适合愈伤组织培养的培养基，不一定完全适合悬浮细胞的培养，但能诱发愈伤组织的培养基可以作为确定最适悬浮细胞培养基的依据；

- 同时还要研究生长素及细胞分裂素的配比对细胞聚集性的影响，选择使细胞容易分离的培养基；一般来说：
- N6、MS、B5等适合于单子叶植物细胞悬浮培养；
- MS、B5、LS、SL等适用于双子叶植物细胞悬浮培养。
- 当培养细胞发生褐变、生长缓慢或停止时应及时更换或调整培养基；
- 悬浮细胞培养基中需附加水解酪蛋白、椰子汁、脯氨酸等；
- 条件培养基更适合于单细胞培养和低密度细胞培养；
- 悬浮培养细胞往往比固体培养需要更高的硝态氮和铵态氮(达60mM)。

- 在活跃生长的悬浮培养物中无机磷酸盐的消耗很快，不久会变成一个限制细胞分裂生长的因素；
- 如烟草悬浮在MS无机盐培养基中，3d后磷酸盐的浓度几乎下降为0。
- 即使将磷酸盐的浓度提高到原来水平的3倍，5d内也会被细胞全部耗尽。
- 为此，设计了含磷高的B5和ER两种培养基

- **2. 细胞密度**

- 细胞密度是指单位体积内的细胞数目，常以每毫升培养液中含有多少个细胞表示。
- 培养基的成分和起始细胞密度对单细胞培养成败有重要影响。
- 起始密度指细胞培养最低的有效密度，即能使细胞分裂、增殖的最低接种量，低于这个密度细胞便不能分裂，甚至很快死亡。

- 不同培养方式要求不同的起始密度，悬浮培养最低有效密度一般为 $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$ 个/ml；
- 但不同植物有差异：
- 烟草为 $0.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^4$ 个/ml；
- 茄子花粉为 4×10^5 个/ml；
- 假挪威槭为 $9 \times 10^3 \sim 15 \times 10^3$ 个/ml。

- 在条件培养基或看护培养下，培养细胞的起始密度可降低。较低的细胞密度可防止分裂的细胞团之间聚集，容易获得单细胞无性系。
- 一般细胞培养的起始密度较高，容易诱导细胞的分裂，细胞植板率
(发生分裂的细胞占接种细胞的百分数)增加。
- 随着起始密度减小，细胞植板率降低，同时细胞对培养基的要求变得更加复杂。

- 如假挪威槭在进行愈伤组织培养时，用基本培养基效果就很好，而在进行单细胞培养时，就必须在基本培养基中再加入细胞分裂素、赤霉素和几种氨基酸才能使细胞发生分裂。
- Kao等配制了KM-8P培养基，其中含有无机盐、蔗糖、葡萄糖、14种维生素、6种核酸碱和4种三羧酸循环中的有机酸，即使起始细胞密度降低到25~50个/ml，植板的细胞也能发生分裂；
- 用水解酪蛋白 (250mg / L) 和椰子汁 (20mg / L) 取代氨基酸和核酸，有效植板细胞密度则可降到1~2个/ml。

- **3. 植物生长调节剂**

- 细胞培养使用激素时，除了需考虑它们对启动细胞分裂和加快细胞分裂速度的影响外，还要考虑它们对悬浮培养细胞分散性的影响。
- 细胞悬浮培养时，常发生自然聚集现象，即群集现象，这种群集现象影响单细胞无性系的形成。

- 4. pH和CO₂浓度

- 常用的培养基缓冲能力很弱，不适合细胞悬浮培养。
- 在悬浮培养时，pH有相当大的变动。
- 如pH4.8~5.4的培养基，在细胞培养时会迅速增加。
- 如培养颠茄细胞时发现，细胞分散性与KT浓度有关。
- 当加入2.0mg / L NAA时，培养细胞的分散性决定于KT的浓度，KT为0.1mg / L时，分散性最好。
- 在培养基中加入2,4-D、少量水解酶 (纤维素酶和果胶酶)或加入酵母提取液类物质能够增加细胞的分散度。

- 加入EDTA使铁和其他金属离子长期处在可利用状态，防止这些离子的沉淀和氧化。
- 硝态氮和铵态氮之间进行调整可作为稳定pH的一种方法；
- 也可加入一些固体的缓冲物，如敞溶的磷酸氢钙、磷酸钙或碳酸钙也可稳定培养液的pH。
- 二氧化碳对细胞培养没有太大影响，但在低密度细胞培养中，对于诱导细胞分裂可能有重要的意义，如在假挪威槭和其他一些植物的悬浮培养中，在培养瓶内保持一定的二氧化碳分压，可使有效细胞密度由大约 1×10^4 个 / ml 下降到600个 / ml。

第2节 细胞生长量和活力测定

一、悬浮培养中细胞生长的测定

- 悬浮培养中，为了计算细胞的繁殖速度，常常要测定细胞的增殖指标，可用以下方法进行计量。

- **1. 细胞计数**

- 由于在悬浮培养中总存在着大小不同的细胞团，因而由培养瓶中直接取样很难进行可靠的细胞计数。
- 为提高细胞计数的准确性，可先用铬酸(5%~8%)或果胶酶(0.25%)对细胞和细胞团进行处理，以增加细胞的分散性。
- Street等进行槭树 (*Acer ssp.*) 细胞计数的具体方法是：
- 把1份培养物加入到2份 8%三氯化铬溶液中，在70℃下加热2~15min，然后将混合物冷却，用力振荡10min，混合均匀后，用血球计数板进行细胞计数。

- 2. 细胞总体积及细胞密实体积

- 将已知体积的均匀分散的悬浮液放入 1个15ml的刻度离心管中，在2000g离心5min。可得到细胞沉积的体积，细胞密实体积 (*packed cell volume, PCV*) 以每毫升培养液中细胞总体积的毫升数表示。

- **3. 细胞鲜重和干重**

- 把悬浮培养物倒在下面架有漏斗的已知重量的尼龙丝网上，用水洗去培养基，真空抽滤以除去细胞上多余的水分，再称量即可得到细胞的鲜重。用已知重量的干尼龙丝网按上述方法收集细胞，在60℃下干燥12h再称量。细胞的干重以每毫升培养物或每 10^6 个细胞的重量来表示。

- **4. 细胞有丝分裂的指数**

- 有丝分裂指数是指在一个细胞群体中，处于有丝分裂的细胞占细胞总数的百分数。指数越高，表明细胞进行分裂的速度越快反之则越慢。
- 有丝分裂指数只反映群体中每一个细胞用于分裂所需时间的平均值，在一个活跃分裂的悬浮培养物中，分裂指数可以反映细胞分裂的同步化程度，一个迅速生长的细胞群体其有丝分裂指数为3%~5%。

- 悬浮培养的细胞先用固定液处理；
 - 然后将固定的悬浮液滴于载玻片上；
 - 染色并做镜检；
 - 至少统计500个细胞。
-
- 虽然有丝分裂指数的测定是研究细胞生长的有用技术，但它受许多因子的影响，如完成一个细胞周期所需的时间、有丝分裂持续的时间、非同期性和死细胞的百分数、细胞群体中同步化的程度等；
 - 因此单独测定有丝分裂指数还不能精确反映某一培养物的细胞分裂的同步化程度。

- 测定有丝分裂指数的方法比较简单。对于愈伤组织一般是采用孚尔根染色法，先将愈伤组织用1M HCl在60℃水浴中水解后染色，然后在载玻片上按常规方法镜检随机检查 500个细胞，统计其中处于分裂期间和处于有丝分裂各个时期的细胞数目计算出分裂指数。

- **5. 细胞植板率**

- 利用平板法培养单细胞或原生质体时，常以植板率来表示能分裂长出细胞团的细胞占接种细胞总数的百分数：植板率的计算公式如下：
- 其中每个平板上接种的细胞总数，等于铺板时加入的细胞悬浮液的容积和每单位容积悬浮液中细胞数的乘积。

- 每个平板上形成的细胞团数，则可以在实验末期直接测定。
- 一般初始细胞密度较高时，可以获得较高的植板率，但由于植板后相邻细胞形成的细胞群落常混在一起，给分离单细胞无性系带来困难。
- 理想结果应是在较低细胞密度条件下能得到尽可能高的植板率。

- 正常条件下每个物种都有一个最适的植板密度，同时也有一个临界密度，低于这个临界密度时，细胞就不能发生分裂。
- 采用特殊的培养方法和选择适合的培养基，可以提高低密度细胞培养条件下的植板率。

二、培养细胞活力的测定

- 1. 相差显微术法
- 在光学显微镜下，根据细胞质环流和正常细胞核的存在与否，即可鉴别出细胞的死活。利用相差显微镜可以得到明显清晰的图像。用亮视野显微镜也可以观察。
- 2. 四唑盐还原法(TTC法)
- 活细胞由于呼吸作用可产生还原力，可将三苯四唑氯化物 (*2, 3, 4-triphenyl tetrazolium chloride, TTC*)还原成红色染料，据此可测定细胞的呼吸效率，反映细胞的代谢强度。

- 一般可在显微镜下观察视野中被染色细胞的数目，计算出活细胞的百分率。
- 也可以将还原的TTC红色染料用乙酸乙酯提取出来，用分光光度计进行测定(520nm)，计算细胞的相对活力。
- 这个方法使观察结果定量化，但单独使用时，在有些情况下不能得到可靠的结果。

- 3. 荧光素二乙酸法

- 荧光素二乙酸法 (*fluoracetin diacetate, FDA*) 可以对活细胞染色。
- 用丙酮制备0.5%的FDA贮备液, 置于0℃下保存。当进行细胞活力测定时, 将FDA贮备液加入到细胞或原生质体悬浮液中, 加入的数量以使最终浓度为0.01%为准。
- 为了保持细胞或原生质的稳定性, 可适当加入一种渗透压稳定剂。保温5min后, 用一台带有适当的激发片和吸收片的荧光显微镜对细胞进行检查

- FDA 既不发荧光也不具有极性，能自由地穿越细胞膜进入细胞内部。在活细胞内FDA 被酯酶分解，产生荧光的极性物质—荧光素。
- 由于荧光素不能自由穿越细胞膜，因而就在活细胞中积累起来，而在死细胞中不能积累。所以，在荧光显微镜下观察到产生荧光的细胞，表明是有活力的细胞；相反不产生荧光的细胞，是无活力的细胞：细胞活力以发绿色荧光的活细胞的百分数表示。

- 4. 伊凡蓝染色法

- 是FDA的互补法。用0.025%伊凡蓝 (*evadns blue*)溶液处理细胞，只有死细胞和活力受损伤的细胞能够吸收这种染料，而完整的活细胞不能摄取或积累这种染料。凡是不染色的细胞均为活细胞。但染色时间不宜过长，否则活细胞也会逐渐积累染料而染上色。细胞活力以未染色的活细胞数占总观察细胞数的百分数。

$$\text{细胞活力} = \frac{\text{未染色的细胞数}}{\text{总观察的细胞数}} \times 100\%$$

第3节 植物细胞培养的应用

一、植物次生代谢产物的生产

- 生产的有用化合物种类很多：

碳水化合物、蛋白质、糖、氨基酸、机物、酶、生物碱、抗生素、生长素、黄酮类、酚类、色素、皂苷、甾体类、萜类、单宁等。

- 1. 生产天然的植物成分
- (1) 植物次生化合物生产
- 主要有生物碱、抗菌剂、利血平、橡胶、类固醇、糖类衍生物、天然色素等。
- 海巴戟体内皮层细胞可合成蒽醌，贮存于根外皮层细胞中，蒽醌可以制造染料。
- 该植物细胞培养物中，蒽醌含量比根高20倍(以干重计)；以每细胞含量计，培养细胞比根的外皮层细胞高2~3倍。

- 天然色素可用来作为合成药物、食用色素和维生素的原料，研究愈伤组织合成天然色素的能力对于生物化学和轻工业的发展非常重要。
- 从光下培养的胡萝卜愈伤组织能分离出紫红色、橙红色、绿色、黄白色4种愈伤组织株系。
- 其中紫红色愈伤组织能够合成大量的花青苷，而胡萝卜素含量少。
- 另外，红光能使胡萝卜愈伤组织中叶绿素a、叶绿素b以及胡萝卜素的含量增加。

- 紫草中含紫草色素，可作为轻工业原料，中国从新疆紫草中筛选出高产细胞株系，其紫草色素含量比原植物根提高4~8倍。
- 长春花细胞和愈伤组织培养物能合成数量较高的利血平和阿马灵。
- 长春花根中这两种生物碱的总含量一般低于干重的0.5%，但在某些品系中可高达1%。
- 长春花愈伤组织培养12年后，还能继续合成利血平。

- 三七愈伤组织中，三七皂苷的含量可达干重的10.25%，而原植物体内仅为6.06%。
- 三分三的愈伤组织中，莨菪碱含量可达干重的0.55%，而原植物体中只有0.14%。
- 通过组织或细胞培养，产生的药用成分已有200多种。

- **(2) 存在的问题**

- **①在很多情况下，有些细胞培养物不能产生这些天然化合物或者比正常植株产量低。**

- 这可能有形态、细胞和生理上的原因。培养细胞与完整植株不同，缺少完整植株所具有的那种进行系统转化反应的能力；
- 对能够促成天然产物合成的营养条件和其他培养条件缺乏了解。
- 已知，在培养细胞中生物碱的产量受培养物的生长阶段、培养基成分、培养条件(如光照、温度)以及细胞基因型等的影响。

- **②细胞在遗传上的不稳定性。**

- 在进行细胞培养的过程中，这些高产的细胞系会发生合成这些化合物能力降低的情况。为了维持生产，就必须对能够合成这些化合物的细胞进行不断的筛选，选择那些稳定和高产的细胞系，从而使细胞培养成为进行某些天然化合物工业生产的一种有效手段。

- **2. 生物转化**

- 利用生物系统通过生理生化反应(水解、加氢、羟基化作用、氧化还原及脂化反应等)，将有机物分子转化为新的化合物。
- 利用细胞培养进行生物转化有两种方法：
 - ①给细胞提供在一般情况下，植物所不具备的底物化合物（如人工合成的化合物、中间产物类似物或其他物种的植物产物）目的是要得到在自然界中所不存在的化合物；

- ②给细胞提供植物天然产物中间体(如某种化合物的前体)，提高该种天然化合物在细胞中的产量。
- 植物细胞能使加入的基质发生生化反应。一般来说，糖苷类物质要比糖苷配基有较高的应用价值，如糖苷配基—卡哈苳配基没有甜味，而糖苷卡哈苳生物苷可作为一种增甜剂。
- 在甜叶菊的细胞培养物中，细胞能使卡哈苳配基和葡萄糖通过脱水作用转化为卡哈苳苷和卡哈苳生物苷；
- 除此以外，细胞培养物还能酵解其他化合物，如苯酚、类固醇、强心苷等。

- 苯丙氨酸是莨菪碱生物合成的前体，莨菪碱在医药上用于扩大瞳孔、镇痉、节制分泌等。
- 在振荡培养的曼陀罗愈伤组织培养液中加入0.2%苯丙氨酸，1周后莨菪碱的产量比对照增加2倍。
- 在振荡培养中，苯丙氨酸加入的时间不同，莨菪碱的产量也不一样。

- **3. 细胞的工厂化生产**

- 植物很多次生代谢产物是药物、染料、香精和色素等的重要来源：
人们探索通过植物细胞的大量培养，来生产这些化合物；
- 或是利用培养细胞对外供的前体化合物或中间产物进行生物转化。
- 利用单细胞培养的方法，将植物体内合成某种特殊物质能力强的细胞筛选出来，使之投入工厂化生产。

- 植物细胞的工厂化生产途径大致包括三个步骤：高产细胞株的选择；种子细胞培养；细胞的规模培养。
- ①高产细胞株的选择
- 将分离纯化的细胞以一定密度进行平板培养，使之形成细胞团(使不同细胞团间隔一定距离)，形成不同细胞株。
- 根据不同培养目的对细胞株进行鉴定，选择出高产、优质的细胞株。

- **②种子细胞培养**

- 对高产的细胞株或细胞无性系进行扩大繁殖，以获得大量的培养细胞，用作大量培养时的接种材料。

- **③细胞的规模培养**

- 将选择到的目的单细胞无性系用发酵罐或生物反应器进行工厂化细胞培养，生产所需要的植物化合物。

二、突变体选择

- 高等植物突变育种的缺点之一是对多细胞有机体进行诱变处理后会形成嵌合体，通过细胞培养进行突变体选择可以改变这种情况。
- 利用细胞培养进行突变体选择，多采用离体的单倍体细胞，因为它能加强获得隐性突变体的机会。

- 细胞培养可在很小空间操作大量潜在植株，如100ml烟草细胞悬浮液有 1×10^7 个以上细胞。
- 在经诱变和未经诱变处理的研究中，都已分离出大量的突变细胞系，还得到再生植株。
- 细胞培养进行突变体选择的方法有几种，最简单的直接选择法适用于抗性变异的细胞选择。

- **具体方法：**
- 在培养基中加入某种对正常细胞有毒害的物质，当多数细胞死去之后，把少数能存活的细胞分离出来，然后转入含更高浓度同样毒素的培养基上，进一步检验这些细胞的突变性质。
- 用此法已分离出许多细胞系，如抗氨基酸类似物、抗抗生素、抗除草剂、抗各种真菌毒素和抗高盐浓度的细胞系等。

- 硝酸还原酶可催化硝酸还原成亚硝酸，加入氯酸盐，硝酸还原酶也可将氯酸盐还原成亚氯酸盐。
- 氯酸盐对植物细胞有毒害作用，而亚氯酸盐毒害性比氯酸盐高几百倍。
- 如果目标表现型不具有选择上的优势，即细胞未产生某种抗性物质，而是产生了一种代谢形式或表现形式的性状，可使用间接选择法（负选法）。
- 如在抗氯酸盐细胞的选择中，分离出了硝酸还原酶缺失突变的细胞系；

- 在培养基中加0~80mM氯酸钠(钙)此浓度的氯酸盐本身还不足以杀死植物细胞，如果细胞含有硝酸还原酶，氯酸盐被还原为亚氯酸盐，高毒性亚氯酸盐将这些含有硝酸还原酶活力的细胞都杀死，存活下来的只有硝酸还原酶缺失的突变细胞。
- 这些细胞没有这种酶，也没有亚氯酸盐生成，所以在筛选抗氯酸盐的突变细胞中，结果获得了硝酸还原酶缺失型突变体。
- 这种突变体不仅抗氯酸盐，而且在体细胞杂交研究中，还可用作互补选择的标记。

- 要想从细胞培养中分离出真正的突变体，还需进行一系列的研究，并对分离出的突变细胞系的特性进行鉴定，如生理生化方面的研究、培养突变细胞再生植株(M1)、检验组织培养中突变性状能否遗传给再生植株、检验后代在植株水平上突变性状的表达状况以及进行遗传方面的研究等。

三、诱导多倍体

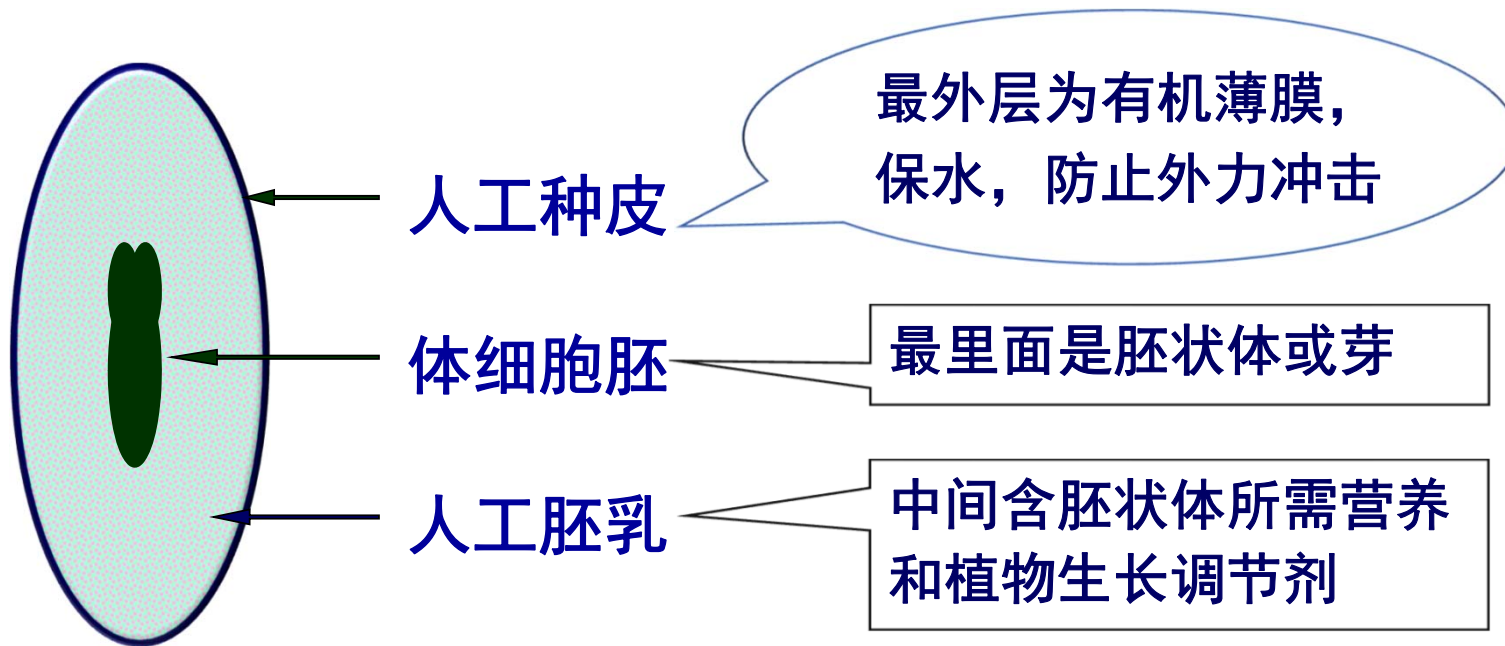
- 为了克服远缘杂种的不育性，需染色体数目加倍。
- 在甘蔗属植物中有很多遗传不育杂种，通过染色体加倍而恢复其育性，就能使杂种在育种工作中得到充分利用；
- 采用细胞培养方法可以达到这个目的。
- 甘蔗细胞培养产生大量多倍体植株。从经过50mg / L秋水仙素处理4d的一个甘蔗杂种细胞培养中获得1000多个再生植株其中大约48%的染色体数目加倍。
- 利用培养过程中染色体的自发加倍现象也可使单倍体细胞加倍，获得纯合二倍体植株，在遗传育种上有重要的意义。

第4节 人工合成的种子

一、人工种子的概念及意义

- 1. 人工种子的概念（又称合成种子）
- 指离体培养条件下的植物材料，通过繁殖获得大量的高质量的成熟胚状体，把这些胚状体外面包上有机化合物作为保护胚状体及提供营养的种皮，创造出与真种子类似的结构。

- 人工种子包括体细胞胚、人工胚乳和人工种皮三部分。



人工种子的结构示意图

- 人工种子是当前体细胞胚胎学及遗传学研究重点。
- 1977年，提出高速度、大规模生产繁殖胚状体的设想及人工种子的概念。
- 1981年，研究了芹菜和莴苣体细胞胚的包埋技术后，就有了许多人工种子的报道。
- 不同植物种类诱导繁殖体的方法以及对作物遗传稳定性要求的不同，人工种子繁殖体的种类多种多样。
- 任何繁殖体，无论是膜胶包裹的或者是裸露干燥的，只要能发育成完整植株，均可称为人工种子。

- **2. 人工种子的分类** (1984年将人工种子分四类)

- **①裸露或休眠繁殖体**

鸭茅草干燥胚状体含水量降到13%，有些还能成株。休眠微鳞茎、微块茎不加包裹成株率也较高，对种皮包裹要求不严格，可直接种植。

- **②种皮包裹的繁殖体**

胡萝卜干燥胚，由一层聚氯乙烯包裹，胚重新水合后能发芽，有些休眠的微鳞茎、原球茎可外包一层种衣。

- **③水凝胶包裹的胚状体、不定芽等繁殖体**

用水凝胶包裹胚状体，其中加入多种养分或激素而促进发芽，如水凝胶包埋的苜蓿体细胞胚；

- **④液胶包埋系统**

含水的繁殖体处于液胶包埋带中，如甘薯的体细胞胚。

- 3. 人工种子的优点

- 人工种子在本质上属于无性繁殖体，其优点表现在：

- ①使自然条件下不易结实或种子昂贵的材料能快速繁殖和保存。

- ②繁殖速度快，以一个体积为12L的发酵罐计算，在二十几天内可产生胡萝卜体细胞胚1 000万个。

- ③固定杂种优势，可使F1杂种优势多代利用，使优良单株快繁成无性系而多代利用保持杂种材料的遗传稳定性。

④由于从任何材料都能得到胚状体，为基因工程技术应用于生产提供桥梁。

⑤在人工种子的制作中，加入各种营养成分或生长调节剂调节植物生长，提高植物抗逆性。

⑥常规种子繁殖每年消耗大量粮食供播种人工种子在一定程度上可取代天然种子而节约粮食，同时人工种子体积小，贮运方便，而且可以像天然种子那样播种育苗。

二、人工种子制备技术

- 1. 胚状体的诱导

- ①将胡萝卜天然种子表面消毒，在无菌条件下发芽成无菌苗。

- ②切割下胚轴或子叶，接种在MS培养基(含2, 4-D 0.5~1.5mg / L)上，诱导形成胚性愈伤组织, 将胚性愈伤组织悬浮在MS0培养基中，诱导产生体细胞胚。

- 每7~10d更换一次培养液，振荡培养。

- 扩大繁殖量或继代培养。

- **2. 成熟与干燥**

- 繁殖体必须同步增殖并达到成熟方可用于人工种子的制备。体细胞胚诱导成功后，必须转入成熟培养基，如针叶树所用的体细胞胚的成熟培养基有三个特点：

①在培养基中减少或除去激素。由于激素减少，早期发育的幼胚停止生长，从而使胚状体的同步性提高；

②加入ABA，有助于营养成分积累，胚中的脂肪、淀粉及蛋白质含量增加，与合子胚发育情况类似，如在培养基中加入8~12 μ MABA，可促进针叶树胚状体的成熟；

③加入PEG，使胚中水分减少，不会发生质壁分离，类似天然种子成熟过程的自然脱水现象，提高人工种子抗逆能力。

- 研究发现，经过干燥的繁殖体，其人工种子的成株率可明显提高，但某些植物有降低的趋势。
- 如苜蓿体细胞胚含水量降到 8%~15%，在室温条件下贮存12个月仍有发芽能力。用ABA处理成株率为70%，否则成株率为0。
- 目前已有十几种作物进行了人工种子干燥处理的研究，其中有：
- 胡萝卜、鸭茅草、芹菜、大豆、油菜、苜蓿、小麦、葡萄、莴苣、松树等，其繁殖体大多为体细胞胚。

- **3. 人工种子的包裹**

- 根据繁殖体的特点，人工种子胚乳中可以附加多种成分，使其获得优异的性能。
- 如加入大量元素成分可促进种子萌发生长。
- 在缺少某种微量元素的土壤中，可针对性地加入该元素。
- 添加微量的农药可抵御播种时病虫害对人工种子的侵袭。
- 1986年，首先用海藻酸钠作为人工种子的包裹材料，它不仅具有一定的硬度，起保护和支持作用，而且内部可添加多种营养成分及附加成分，有助于人工种子萌发。

- 常见的人工种子的包裹方法：
- ①离子交换法
- 水凝胶珠状人工种子的制备可采用络合凝胶点滴法，将胚状体与 2 %海藻酸钠混合在一起，滴入适量的+2价或+3价金属盐溶液，如硝酸钙(100mM)或氯化钙(1%)，钙离子与钠离子发生离子交换反应，点滴在30rain内完全能形成胶珠。

- 如将胡萝卜悬浮培养物进行过滤，筛选0.6~2.0mm的体细胞胚，将它们悬浮在1%~5%海藻酸钠溶液中(凝胶状态)。
- 用口径 4mm的滴管将体细胞胚与凝胶一起滴入 0.1M氯化钙溶液中固化人工种子呈小球体，无菌水冲洗。
- 由此得到的人工种子，可在不同基质上萌发生长

- ②干燥法

- 用2.5%的聚氯乙烯作为包裹介质，然后使其干燥固化。

- ③冷却法

- 用0.25%的Celrite胶包埋，冷却固化。
- 形成的珠状人工种子可在表面涂加胶囊膜，可使种子润滑且易流动，以避免胶囊粘在一起，阻止水分蒸发。过去采用Elva4260涂膜，后来用一些二氧化硅化合物（如Tullanox和Cab-O-sil）。

- 人工种子技术是在组织培养基础上发展起来的新兴生物技术，具有工厂化大规模制备、贮藏和推广优良种质等优点。
- 人工种子研究范围已由过去的模式植物如胡萝卜、苜蓿和芹菜等，转向具有重要经济价值的粮食作物、观赏植物及药用植物等。是作物良种繁殖的新技术。

三、人工种子贮藏与萌发

- 农业生产受季节性限制，要求人工种子能保质保量地贮藏一定时间，以适应生产要求。
- 人工种子含水量较大，常温下容易失水变干，其保存是目前研究的一个难题。
- 人工种子放在低温(4℃)下贮存有一定效果，但时间稍长，其萌发率明显降低；
- 对人工种子进行脱落酸、蔗糖、低温及干燥处理，可延长贮藏时间；
- 如polyox干燥固化制作的胡萝卜人工种子，在4℃黑暗下可存活16d，用低温及脱落酸处理，存活率可从4%提高到 20%，最高可达58%。

- 目前多数人工种子萌发率较低，在正常土壤条件下萌发成苗率就更低。
- 人工种子萌发的幼苗中，弱苗和畸形苗较多其主要原因是人工种子的质量问题，包括体细胞胚的发育和完熟程度、遗传变异的影响等。
- 研究表明，在培养基中加入脱落酸，可明显提高胚状体的质量，增加成株率。
- 用不良环境压力法如次氯酸钠刺激法、高浓度糖法，诱导胡萝卜人工种子，可提高其发芽成苗的能力。

