

第六章

植物细胞悬浮培养及次生代谢产物生产

- **1983年**，日本三井石油化学工业企业在世界上首次成功地采取紫草细胞培养工业化生产紫草宁。



北京锦绣大地农业股份有限公司

www.gldadi.com/index.html

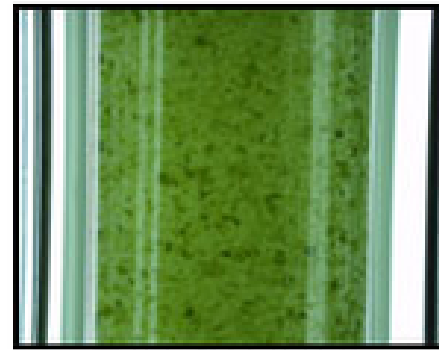
首都“二四八”重大生物医药工程项目



雪莲细胞规模化培养



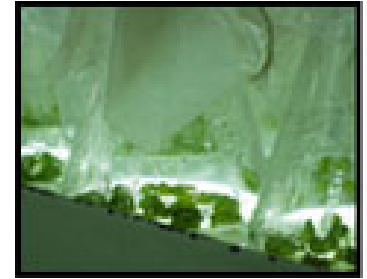
雪莲细胞生物反应器培养



雪莲细胞液体培养



雪莲细胞固体培养
(红色系)



雪莲细胞固体培养
(黄色系)

- 1 植物次生代谢产物概述**
- 2 细胞初代培养**
- 3 高产细胞系筛选**
- 4 植物细胞悬浮培养方法**
- 5 植物次生代谢物质生产**

1.1 植物代谢产物

(1) **初生代谢**：为维持植物正常生长发育所必须代谢。初生代谢过程中形成各种产物为初生代谢产物。初生代谢产物不稳定，在体内轻易发生转化。

(2) **次生代谢**：建立在初生代谢基础上，对于植物正常生长发育非必需代谢，其代谢产物为**次生代谢产物**，次生代谢产物是末端代谢产物，比较稳定，能够在体内积累。

类别	次生代谢产物	用途	
酚类化合物	黄酮	银杏黄酮, 大豆黄酮	治疗心血管疾病
	醌	紫草宁	抗菌、抗炎、抗病毒、止血
	简单酚类	香豆素	香料, 抗菌消炎
萜类	紫杉醇 青蒿素	抗癌 抗疟疾	
生物碱	长春新碱 奎宁	抗癌 抗疟疾	

长春碱: \$ 2 million/kg

长春新碱: \$ 15million/kg



- 李时珍在《本草纲目》中所开列**1892种药品**绝大多数是植物药品，当前仍有约**25%法定药品**来自植物。其药品有效成份均为次生产物。天然次生代谢产物已经超出**2万种**。

次生代谢产物应用：色素、香料、药品、添加剂、工业原料等。



紫杉醇介绍

- 紫杉醇：二萜类化合物
- 最早由太平洋红豆杉 *Taxus brevifolia* 树皮中分离
- 广泛用于治疗卵巢癌、乳腺癌、非小细胞肺癌等十几个癌症
- 当前主要起源于红豆杉属植物

市场需求

- **抗癌一线用药**

销售额年增加率5亿美元

- **理论需求量**

2g /人, 500万人/年

1000kg/年

- **实际销量**

350 kg/年

紫杉醇供需相差十分悬殊

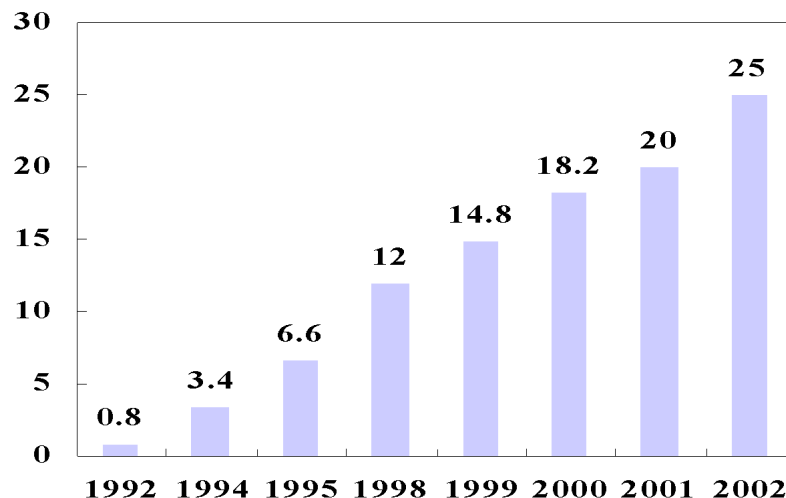


图2：国际紫杉醇销售额（亿美元）

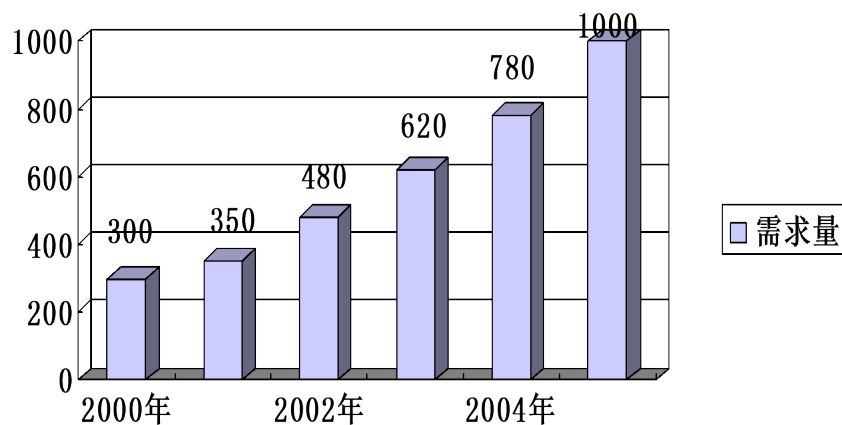


图1：国际紫杉醇原料药需求走势图（单位第10000克）

药源问题

- **红豆杉**

主要原料植物

国家一级保护野生植物，全球十大濒危物种之一

- **生长迟缓 分布有限 Taxol含量低**

树皮中Taxol含量:0.00001-0.069%

3000棵树=10吨树皮=1kg Taxol=500病人



700岁红豆杉惨遭剥皮

药源问题处理方法（一）

一 人工栽培

采取种子繁殖、扦插等无性繁殖方法快速、大面积人工繁育红豆杉幼苗

一 寻找红豆杉替换物

从红豆杉非树皮部位提取
产紫杉醇非红豆杉植物

药源问题处理方法（二）

一 化学合成

- 全合成

1994年取得成功

现有六种路径

- 半合成

以10-DABIII和Baccatin III作为半合成原料取得紫杉醇

药源问题处理方法（三）

— 生物方法

- 组织和细胞培养
- 微生物发酵
- 生物合成
研究阶段
红豆杉生物合成路径基本明确
10种相关酶基因被克隆表示
利用基因工程伎俩改造红豆杉提升紫杉醇产量

1.2 取得植物次生代谢产物方法

从植物中提取

化学合成

植物细胞大规模培养生产次生代谢产物

植物细胞含有**形态全能性，化学全能性**
(在离体条件下能够合成整株植物能合成物质)

自然植物和细胞培养紫草宁含量比较

生产方式	生产周期	紫草宁含量（%干重）
完整植物	2~3年	1~2
植物细胞培养	3周	14

• **细胞培养是生产次生代谢产物理想路径：**

①缩短周期，提升生产效率

植物细胞培养生产周期为**15-30d**；而完整植株生长短则几个月，长则多年，如木瓜**8个月**，而紫草为**5年**

②易于管理，减轻劳动强度

③培养在无菌条件下进行，可排除病虫害干扰

④可探索新合成路线，取得新有用物质

1.3 植物细胞悬浮培养：即是将植物细胞或小细胞团在液体培养基中进行大规模培养技术。



成功悬浮细胞培养体系必须满足3个条件：

分散性良好，细胞团较小，普通在 **30~50**个细胞以下，在实际培养中极少有完全由单细胞组成植物细胞悬浮系。

细胞分裂快，均一性好，细胞形状和细胞团大小大致相同，悬浮系外观为大小均一小颗粒，培养基清澈透亮，细胞色泽呈鲜艳乳白或淡黄色。

有效成份含量高。

次生产物产量=细胞量*细胞次生代谢产物产率

↓
可控

↓
遗传原因决定

植物细胞培养含有**周期长、细胞抗剪切能力弱、易聚团**等特点。

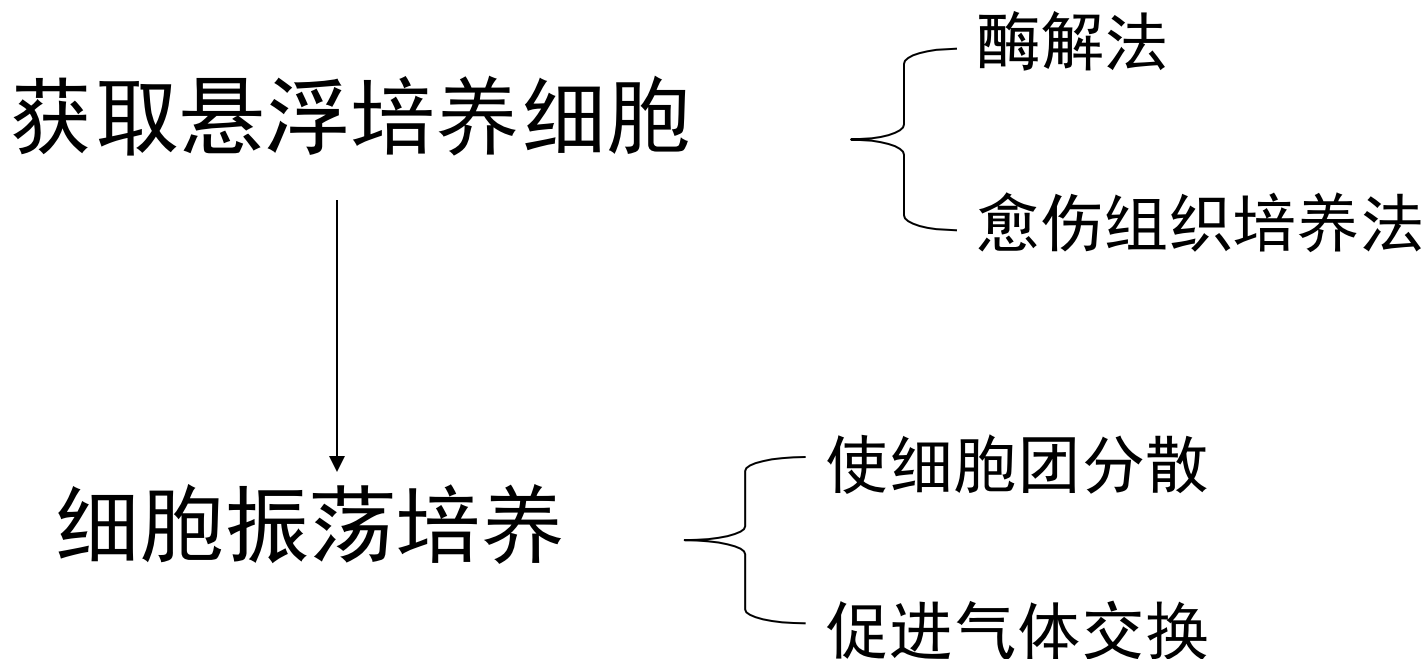
植物细胞培养反应器设计不但要考虑有利于细胞生长，还要考虑有利于**产物积累和分离**。

适合植物细胞培养反应器应含有**适宜氧传递、良好流动性和较低剪切力**。

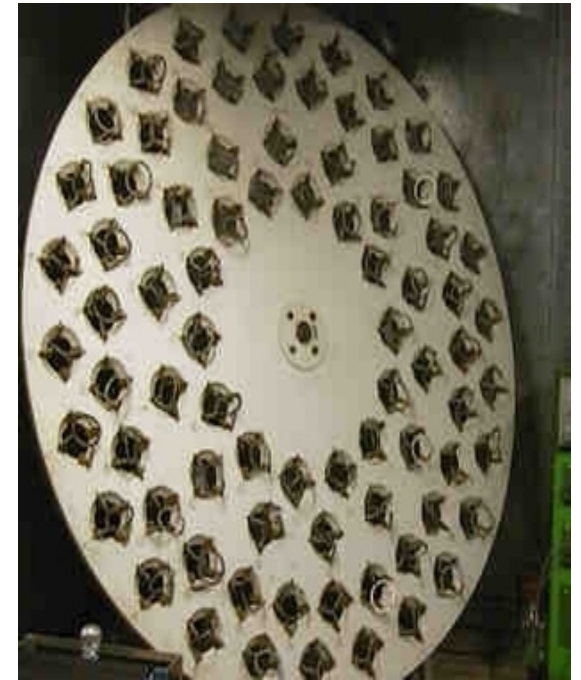
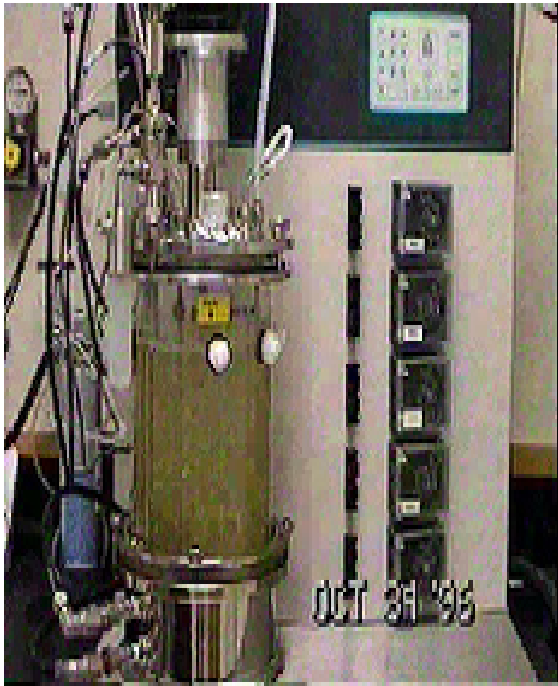
2 细胞初始培养

试验中取得适宜于悬浮培养细胞系过程称为细胞初始培养。

2.1 建立悬浮系



培养方式：



搅拌培养；

旋转振荡培养；

旋转培养

2.2 建立良好悬浮系关键步骤

1. 选择适宜外植体

双子叶植物：幼胚、成熟胚、下胚轴、叶片

单子叶植物：幼胚、成熟胚、幼穗、花药等

2. 诱导疏松愈伤组织；

培养基

愈伤组织异质性；

继代培养

3. 选择适宜培养基；

基本培养基+CTK/AUX+天然复合物

eg:SH+NAA3.0+BA1.0+CM/YE

培养基PH

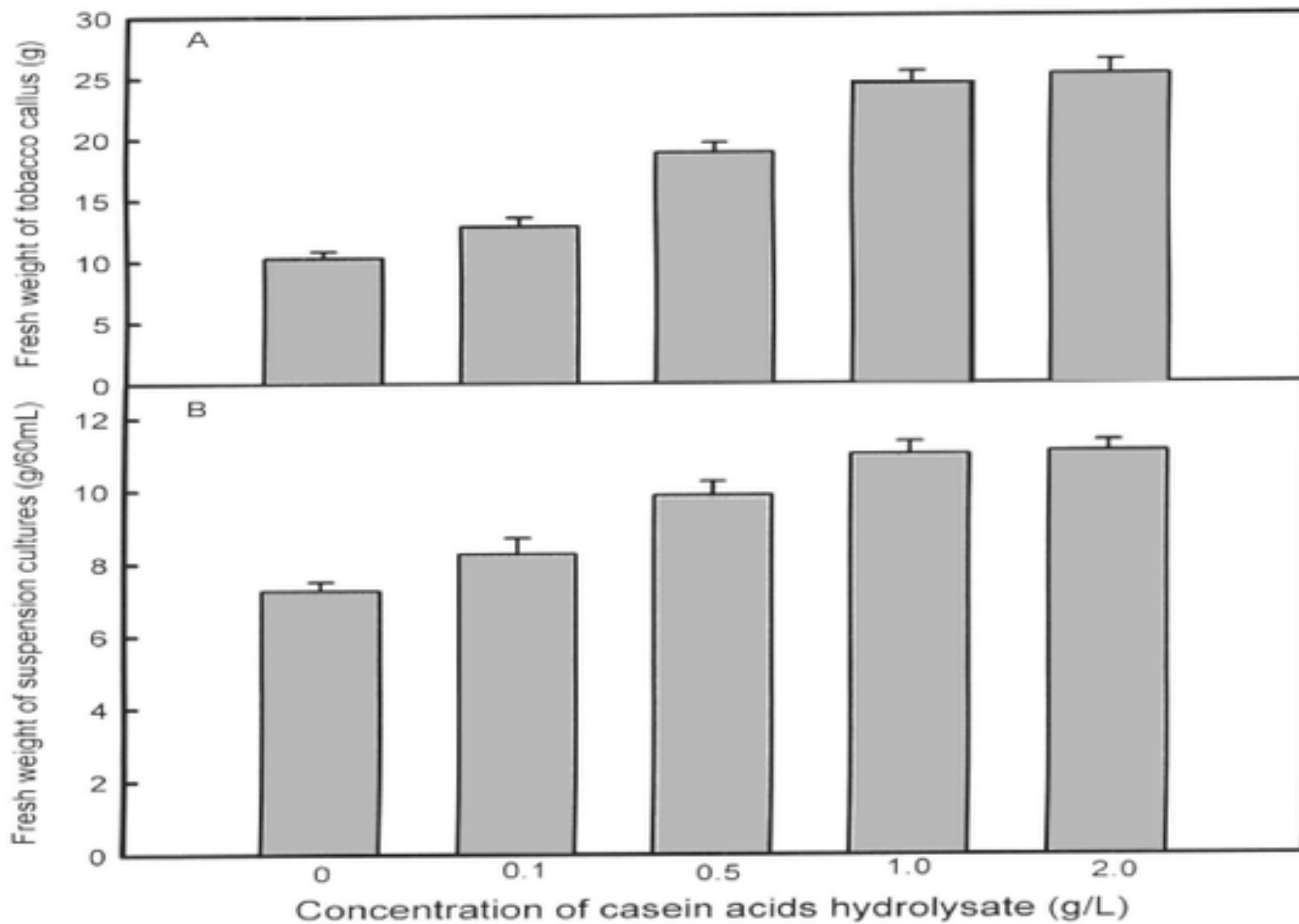


图 1 水解酪蛋白对烟草愈伤组织(A)和悬浮培养细胞(B)生长的影响

李忠光, 龚明..7

4. 悬浮培养早期控制

转速，光，温度

5. 悬浮细胞继代与选择

继代中搜集小细胞团

条件培养基：新鲜培养基

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/696142215132010155>