

Суспензионные культуры

- **Суспензионные культуры** - культуры, выращиваемые в жидкой питательной среде во взвешенном состоянии и состоящие из отдельных клеток и их агрегатов.
- Для поддержания клеток во взвешенном состоянии при глубинном культивировании их перемешивают с помощью различных аппаратов.
- Аэрация обеспечивается либо путем непрерывного вращения или качания среды, либо путем ее продувания стерильным воздухом.
- Суспензионные культуры имеют множество преимуществ по сравнению с каллусной тканью, выращиваемой на агаризованной поверхности:
- - более широкие возможности для изучения влияния экзогенных факторов на метаболизм и рост клеточных популяций, поскольку клетки в одинаковой степени становятся доступными для внешнего воздействия;
- - надежное длительное поддержание линии вследствие простоты процессов субкультивирования

- Суспензионные культуры имеют множество преимуществ по сравнению с каллусной тканью, выращиваемой на агаризованной поверхности:
- - более широкие возможности для изучения влияния экзогенных факторов на метаболизм и рост клеточных популяций, поскольку клетки в одинаковой степени становятся доступными для внешнего воздействия;
- - надежное длительное поддержание линии вследствие простоты процессов субкультивирования
- - удобство для проведения биохимических и молекулярно-биологических исследований, а также быстрой регенерации растений;
- - возможность неограниченного набора биомассы для получения БАВ.

➤ Для получения суспензионных культур чаще всего используют каллусную ткань рыхлого типа, которая легко фрагментируется на отдельные клетки и небольшие агрегаты при помещении ее в перемешиваемую жидкую среду.

➤ С этой целью при культивировании каллуса из среды исключают цитокинины или снижают их концентрацию, а концентрацию ауксинов увеличивают.

➤ Первичный каллус использовать нежелательно, т.к. он содержит обычно более плотные агрегаты клеток. среды.

Возможно получение суспензионной культуры непосредственно из эксплантов, помещенных в жидкую среду.

➤ Возникающие на поверхности экспланта каллусные клетки могут отрываться и переходить в среду, давая начало суспензии.

➤ Но это длительный и малоэффективный процесс.

➤ Для некоторых исследований суспензионную культуру клеток получают путем ферментативной мацерации растительных тканей, например, из мезофилла листа, но такую суспензию невозможно поддерживать в течение длительного времени

➤ Для получения первичной суспензии, как правило, используют 2–3 г свежей массы каллусной ткани на 60–100 мл жидкой питательной среды

➤ Для избавления от крупных плотных остатков каллуса, больших клеточных агрегатов ее фильтруют через 1–2 слоя марли, нейлон или отбирают одиночные клетки и мелкие агрегаты путем осаждения крупных агрегатов при отстаивании суспензии в течение нескольких минут.

➤ Колбы помещают на качалку, скорость вращения которой обычно составляет 110–120 об/мин.

➤ Клеточные суспензии обычно требуют регулярного и более частого субкультивирования, чем каллусные культуры.

➤ Часть суспензионной культуры, используемая для пересадки на свежую среду, называется *инокулюм*.

➤ Для каждой линии культуры клеток существует минимальный размер инокулюма, при уменьшении объема которого культура не растет

➤ . Суспензия никогда не бывает однородной, состоящей только из

➤ одиночных клеток.

➤ В лучшем случае последние составляют 50–60 %, остальное приходится на долю групп из 2–10 клеток и многоклеточные агрегаты.

В зависимости от степени агрегированности выделяют:

➤ - слабоагрегированные (до 5–10 клеток),

➤ - среднеагрегированные (более 10 клеток),

➤ - высокоагрегированные суспензии (более 50 клеток в агрегате).

➤ Перспектива получения в суспензии популяции, состоящей исключительно из отдельных клеток, с точки зрения биологии растительной клетки задача представляется малореальной.

➤ Для этого необходимо, чтобы после образования срединной пластинки дочерние клетки расходились до начала их следующего деления.

➤ Для получения суспензионной культуры, проявляющей высокий

уровень клеточной диссоциации, чаще всего прибегают к контролированию состава питательной среды.

➤ Ауксины, как правило, оказывают положительное влияние на процессы диссоциации клеток, а цитокинины, напротив, тормозят их.

➤ Природа углеводов в питательной среде, оказывая влияние на межклеточные контакты через изменение поверхностных полисахаридов, также может играть определенную роль.

➤ Так, введение в питательную среду сахарозы, галактозы и раффинозы способствовало формированию клеточных агрегатов.

➤ Выращивание клеток с добавлением целлюлолитических ферментов (мацерозим, пектиназа, целлюлаза) в сочетании с осмотиком увеличивало дисперсность суспензии.

**Условия,
благоприятствующие
растяжению
клеток и
тормозящие их
деление,
способствуют
максимальной
диссоциации
клеток в
суспензии.**

➤ Наиболее простой и распространенный - накопительное или периодическое культивирование.

➤ В этом случае размножение популяции клеток осуществляется в закрытой системе в постоянном объеме питательной среды.

➤ Создание достаточной аэрации является условием хорошего размножения клеток и их активной деятельности.

➤ В лабораторных условиях обычно используют сосуды объемом 100–250 мл, с небольшим объемом питательной среды – 20–70 мл.

➤ Способ, при котором клетки выращиваются в проточном режиме, называется непрерывным культивированием.

➤ Непрерывное культивирование осуществляется в открытых системах, т.е. таких системах, в которых происходит, с одной стороны, приток питательной среды, а с другой – отток среды или биомассы.

➤ Непрерывные культуральные системы подразделяют на полупроточные и проточные.

➤ Крупномасштабное культивирование осуществляется в сосудах объемом до нескольких десятков литров – ферментерах.

➤ По сравнению с глубинным выращиванием в колбах на качалке при культивировании клеток в ферментерах появляются принципиально новые возможности, связанные с их конструкцией.

➤ Способ, при котором клетки выращиваются в проточном режиме, называется непрерывным культивированием.

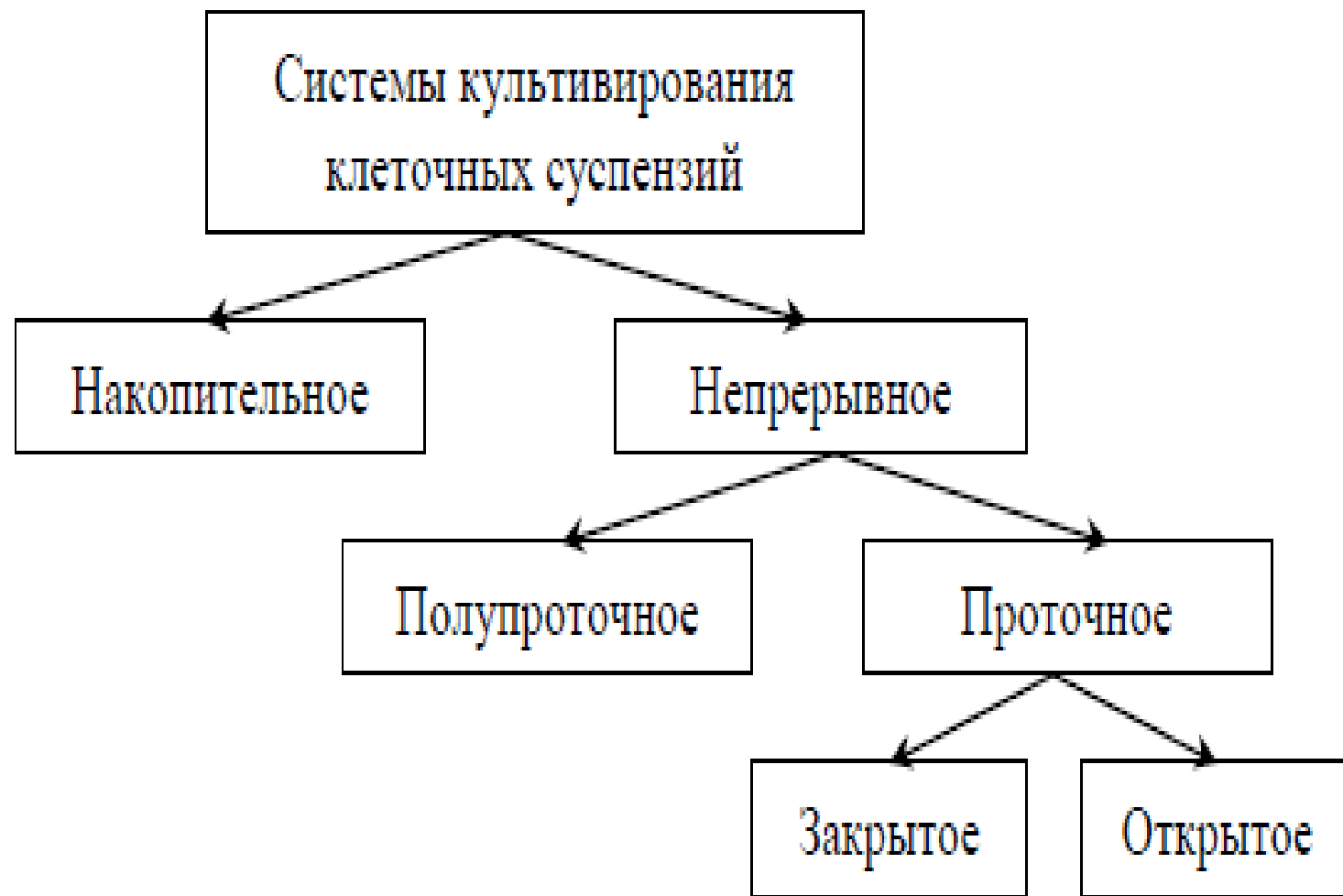
➤ Непрерывное культивирование осуществляется в открытых системах, т.е. таких системах, в которых происходит, с одной стороны, приток питательной среды, а с другой – отток среды или биомассы.

➤ Непрерывные культуральные системы подразделяют на полупроточные и проточные.

➤ Последние, в свою очередь могут быть открытыми и закрытыми.

➤ Полупроточный режим выращивания основан - отбор определенной части клеточной суспензии через определенные интервалы времени и разбавления оставшейся части свежей средой.

➤ Оно применяется в основном для получения больших масс суспензии с целью ее дальнейшего биохимического исследования.



Способы культивирования клеточных суспензий

Полупроточный режим

```
graph TD; A[Полупроточный режим] --> B[Отбор определенной части клеточной суспензии через определенные интервалы времени и разбавления оставшейся части свежей средой.]; B --> C[Для получения больших масс суспензии с целью ее дальнейшего биохимического исследования.];
```

Отбор определенной части клеточной суспензии через определенные интервалы времени и разбавления оставшейся части свежей средой.

Для получения больших масс суспензии с целью ее дальнейшего биохимического исследования.

Удаление
часть
суспензии
(клеток)



Полупроточный режим

Разбавление свежей пит.средой

```
graph TD; A[ПРОТОЧНЫЙ] --> B[ЗАКРЫТЫЙ]; A --> C[ОТКРЫТЫЙ]
```

ПРОТОЧНЫЙ

ЗАКРЫТЫЙ

ОТКРЫТЫЙ

**Свежая
пит.среда
поступает**

**Старая
пит.среда в том
же объеме
удаляется**

**Закрытый проточный
режим**

**Клетки остаются в системе в
течение всего цикла
выращивания**

Закрытый проточный режим

В систему постоянно подается свежая питательная среда, а старая удаляется в том же объеме. Клетки остаются в системе в течение всего цикла выращивания

Такие системы могут быть применимы для оптимизации образования метаболитов, а также для изучения **цитодифференцировки**, **поскольку** в данном случае клетки будут длительный период поддерживаться в неделящемся состоянии.

Открытый проточный режим

Функционируют на принципе баланса между притоком свежей питательной среды и удалением равного объема клеточной суспензии.

- Позволяют исследовать изменения при переходе от одного равновесного состояния к другому,
- сравнивать биосинтетический потенциал клеток
- выбрать оптимальный режим для получения максимального количества вторичных метаболитов

**Приток питательной
среды**

```
graph TD; A[Приток питательной среды] --> B[Открытый проточный режим]; B --> C[Отток равного объема клеточной суспензии];
```

Открытый проточный режим

**Отток равного объема клеточной
суспензии**

**Баланс между притоком свежей
питательной среды и удалением.**

- Такие системы позволяют:
- - исследовать изменения при переходе от одного равновесного состояния к другому,
- -сравнивать биосинтетический потенциал клеток различных клонов в условиях, способствующих одинаковой скорости роста,
- -выбрать оптимальный режим для получения максимального количества вторичных метаболитов
- Скорость роста и плотность клеточной популяции определяются скоростью поступления среды (скоростью разбавления), т.е. подачей лимитирующего фактора и других компонентов среды.
- В турбидостате рост клеток популяции поддерживается на определенном уровне благодаря регулированию оптической плотности культуры.

- Для этого подходят суспензии с низкой плотностью клеток и высокой удельной скоростью роста.
- Регуляция равновесного состояния может осуществляться по принципу:
- -турбидостата
- - хемостата, разработанных при культивировании микроорганизмов.
- В хемостатном режиме непрерывное культивирование зависит от лимитирующего фактора, роль которого выполняет один из компонентов питательной среды.
- Скорость роста и плотность клеточной популяции определяются скоростью поступления среды (скоростью разбавления), т.е. подачей лимитирующего фактора и других компонентов среды.

- В турбидостате рост клеток популяции поддерживается на определенном уровне благодаря регулированию оптической плотности культуры.
- Для этого подходят суспензии с низкой плотностью клеток и высокой удельной скоростью роста.
- Турбидостат снабжен фотоэлектрическим элементом, чувствительным к мутности культуры.
- Оптическая система, определяющая плотность клеток, связана с реле, через которое в случае увеличения плотности клеток поступает сигнал на включение протока.

- Рост клеточной популяции поддерживается на определенном запрограммированном уровне автоматически.
- Хемостатный и турбидостатный режимы применяют с целью стабилизации суспензионной культуры в определенном состоянии роста и поддержания его неограниченное время.
- Препятствиями к культивированию клеток высших растений в проточном режиме являются их высокая чувствительность к повреждениям, агрегированность, длительное время генерации.

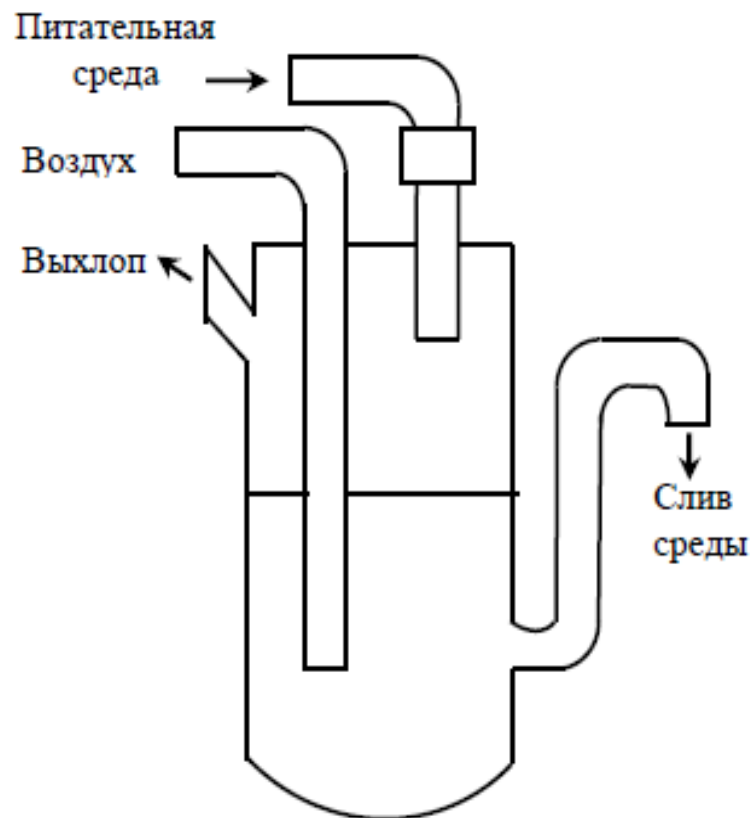
Хемостат

Зависит от **лимитирующего фактора**, роль которого выполняет один из компонентов питательной среды.

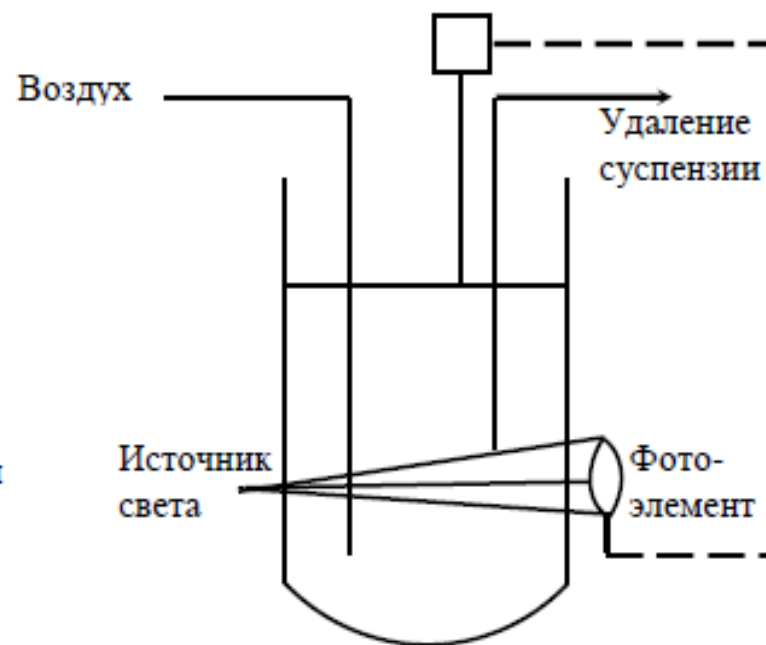
Турбидостат

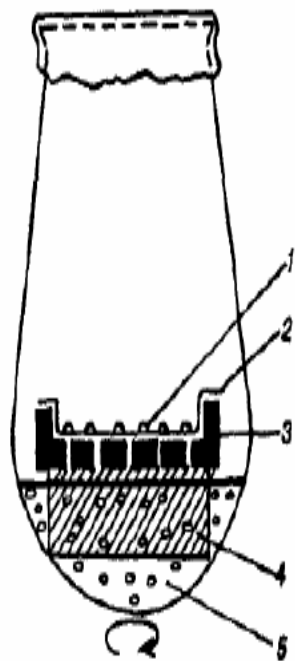
Рост клеток популяции поддерживается на определенном уровне благодаря **регулированию оптической плотности культуры**.

Хемостат



Турбидостат





Использование культуры суспензионных клеток в качестве «кормящего слоя» для выращивания одиночных клеток:

- 1 – колонии клеток; 2 – фильтровальная бумага; 3 – алюминиевая сетка;
- 4 – пенополиуретан; 5 – суспензия клеток.

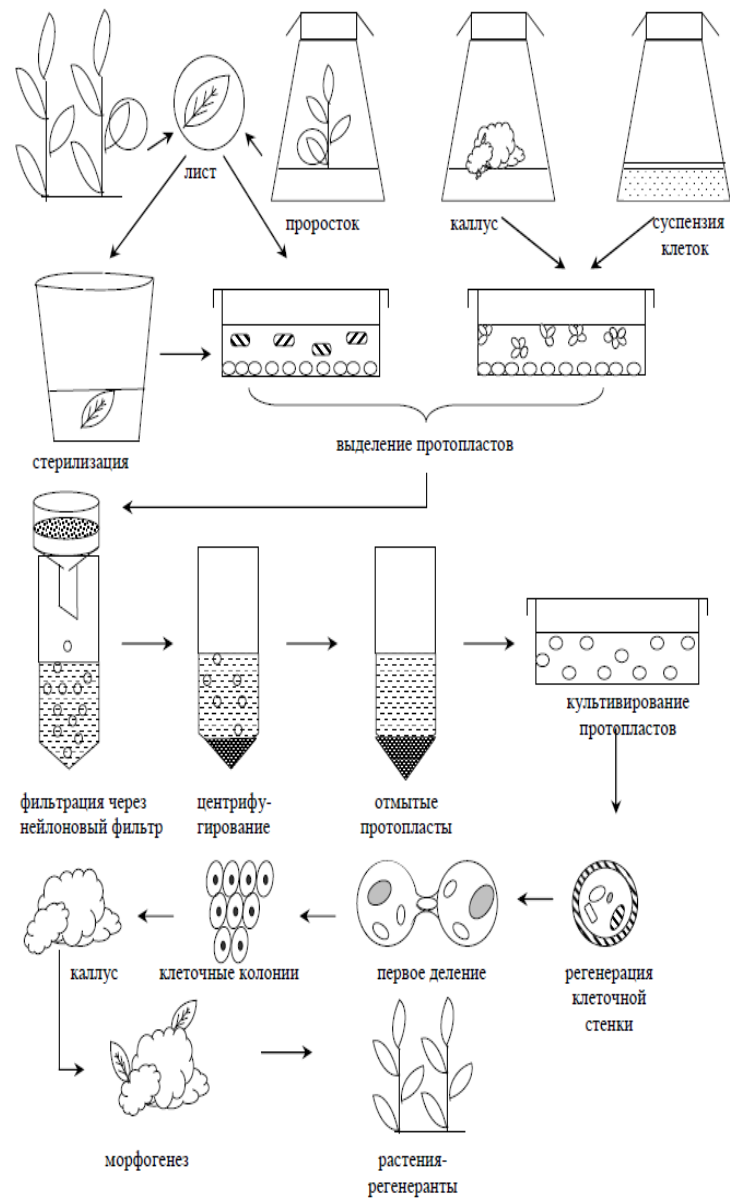


Схема получения и культивирования протопластов из клеток растений

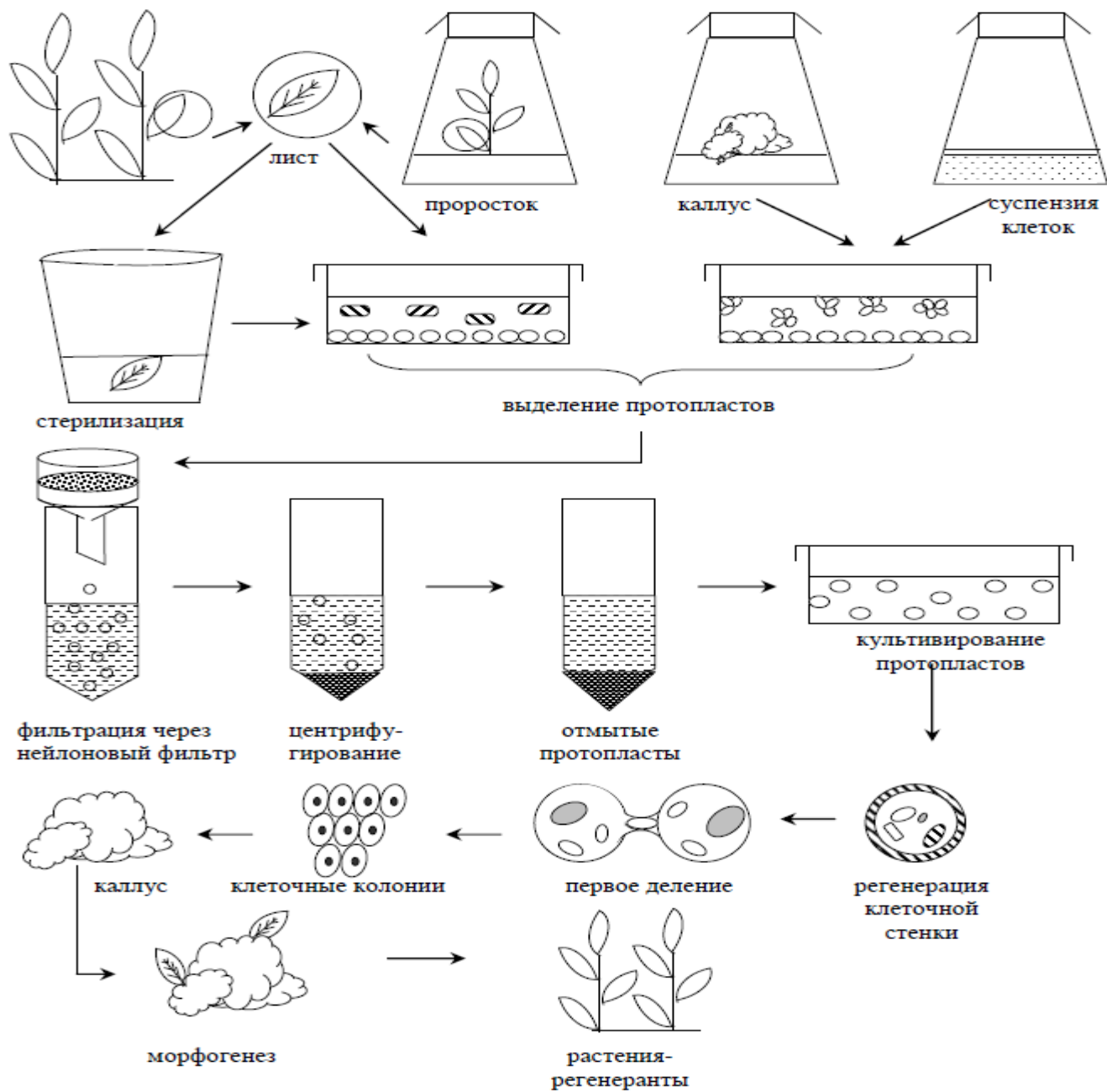


Рис. 4.6. Схема получения и культивирования протопластов из клеток растений