

动物细胞与微生物发酵工程制药

袁建琴 高斌战 著

中国农业科学技术出版社

动物细胞与微生物发酵工程制药

袁建琴 高斌战 著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

动物细胞与微生物发酵工程制药/袁建琴, 高斌战著. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2010. 5
ISBN 978 - 7 - 5116 - 0190 - 2

I. ①动… II. ①袁…②高… III. ①动物 - 细胞工程 - 研究
②微生物 - 发酵 - 应用 - 药物 - 研究 IV. ①Q925②TQ460.38

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 096691 号

责任编辑 张孝安 叔, 霁
责任校对 贾晓红

出版者 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081
电 话 (010) 82109708 (编辑室) (010) 82109704 (发行部)
(010) 82109703 (读者服务部)
传 真 (010) 82109700
网 址 <http://www.castp.cn>
经 销 者 新华书店北京发行所
印 刷 者 北京科信印刷厂
开 本 880 mm × 1 230 mm 1/32
印 张 9.375
字 数 240 千字
版 次 2010 年 5 月第 1 版 2010 年 5 月第 1 次印刷
定 价 30.00 元

—— 版权所有 · 翻印必究 ——

前 言

回顾 20 世纪，生物技术和生物科学的发展非常迅速，已从整体水平进入细胞和分子水平，在基础和应用研究中取得了举世瞩目的成果。自 1982 年第一个基因工程产品——人胰岛素投入市场以来，生物技术得到了迅速发展。以基因组学、功能基因组学、蛋白质组学为主要代表的现代生物技术领域的每一项新进展、新成果，均有力地促进了药学科学的发展和更新，并促进了制药工业技术水平的不断进步。各个与药学相关的学科，如细胞生物学、微生物学、生物化学、有机化学、分子生物学、药物化学和计算机科学等学科的交叉已经并将衍生出一些新的学科增长点，同时也催生出越来越多、越来越完善的生物制药新技术和新方法，这些都将对我国的生物制药行业带来深远的影响。人们最感兴趣的细胞工程、微生物发酵工程和基因工程将是生物技术领域发展的热点，也是生物工程中的主导领域，已为人类创造了众多产品。

由于细胞和微生物种类繁多，特性差异明显，因此，细胞工程和微生物发酵工程的研究范围十分广泛，采用的技术也多种多样，既有



长期以来应用的动植物细胞、微生物和组织培养技术，又有近年来发展起来的细胞融合、原生质体融合和亚细胞显微操作技术。值得重视的是，细胞工程和微生物发酵工程已与生物工程的核心技术——DNA 重组技术结合起来，极大地推进了生物技术的发展，使人类从过去随机盲目改造细胞和微生物，到今天有目的地赋予细胞、微生物某种特性，从而开辟了生物工程发展的新纪元。按照人们所需，有计划、大规模地培养细胞和微生物以获得大量药物及其产品，或者通过改变细胞和微生物的遗传特性，以产生新的细胞和微生物株系，为社会和人类生活提供新的物质需要，是当代科学工作者不可推卸的责任。

本书是笔者根据自身多年的教学经验和企业工作实践，总结了笔者近年来的科研成果，同时参考和吸收了国内外最新的文献资料。全书内容分上下两篇，共计十四章：上篇为动物细胞工程制药（第一章至第十章），著者为山西农业大学袁建琴；下篇为微生物发酵工程制药（第十一章至第十四章），著者为山西省生物制品厂高斌战。两篇内容既相互联系，又相互独立。

鉴于笔者的知识和技术水平有限，本书难免存在疏漏和不足之处，恳请各位专家和广大读者批评指正。

袁建琴 高斌战

2010年2月

内容简介

细胞作为生物体的基本结构单位和功能单位，决定了生物体生长、分化、遗传、变异、衰老和死亡等生命活动。在研究生物生命活动的机制和控制中，必然需要对细胞这个基本单位进行研究。随着细胞生物学和分子生物学等学科的发展，在细胞整体水平或细胞器水平上的研究、开发和利用越来越深入，已使细胞工程成为一门独立的、成熟的生物工程技术。

随着生物工程的发展，尤其是细胞工程和基因工程技术的发展，使得微生物发酵工程制药所用的微生物菌种不仅仅局限于天然微生物的范围，已建立起来的新型工程菌株，可以生产天然菌株所不能产生或产量很低的生物活性物质，拓宽了微生物发酵工程制药的研究范围。

本书内容共分为两篇。上篇为动物细胞工程制药，由山西农业大学袁建琴根据近年来从事动物细胞工程制药的教学和研究工作，总结所取得的科研成果，并参考和吸收国内外最新的文献资料编写而成。主要阐述了动物细胞的形态、生理及培养特性、制药用动物细胞与细胞



凋亡、动物细胞的培养条件和培养基、动物细胞的培养方法和操作方式、动物细胞培养反应器及其检测系统、动物细胞制药工艺、动物细胞制药质量控制、动物细胞产品的制备与研究实例，并对动物细胞制药的前景进行了展望。下篇为微生物发酵工程制药，由山西省生物制品厂高斌战根据近年来从事微生物发酵工程制药的企业工作经验，总结所取得的科研成果，并参考和吸收国内外最新的文献资料编写而成。主要阐述了微生物发酵工程在制药工业中的应用、微生物发酵工程制药基础、微生物发酵工艺与设备以及微生物发酵工程产品的制备实例。

本书理论联系实际，深入浅出，内容丰富，重点突出，通俗易懂，融科学性、使用性和可读性于一体，可供从事动物细胞工程制药、微生物发酵工程制药和其他生物技术研究和生产的相关技术和管理人员，以及生物技术相关学科（生物科学、生物工程和生物技术等）的科技人员、大专院校师生使用和参考。

目 录

CONTENTS

上篇 动物细胞工程制药

第一章 绪论	(3)
第二章 动物细胞的形态、生理及培养特性	(8)
第一节 动物细胞的化学组成和代谢	(8)
第二节 动物细胞的结构及培养时的形态	(11)
第三节 动物细胞的生理及培养特性	(15)
第三章 制药用动物细胞与细胞凋亡	(20)
第一节 制药用动物细胞的要求和获得	(20)
第二节 细胞的衰老和凋亡	(25)
第四章 动物细胞的培养条件和培养基	(35)
第一节 动物细胞的培养条件	(35)
第二节 动物细胞培养基的种类、组成与制备	(44)
第五章 动物细胞的培养方法和操作方式	(53)
第一节 动物细胞培养的一般过程	(53)
第二节 动物细胞的培养方法	(64)
第三节 动物细胞培养的操作方式	(70)



第六章 动物细胞培养反应器及其检测系统	(74)
第一节 导论	(74)
第二节 动物细胞培养反应器的类型及其基本结构	(79)
第三节 动物细胞培养反应器的检测控制系统	(89)
第七章 动物细胞制药工艺	(101)
第一节 对厂房的要求	(101)
第二节 动物细胞的种子保存、运输和鉴定	(107)
第三节 动物细胞制药产物的分离纯化	(113)
第四节 制剂分装、保存和运输	(137)
第八章 动物细胞制药质量控制	(139)
第九章 动物细胞产品的制备与研究实例	(156)
第一节 组织纤溶酶原激活剂生产工艺 ^[郭勇等,2006]	(156)
第二节 不同接毒方法培养鸡痘细胞苗维持液与细胞内 病毒含量的研究	(159)
第十章 动物细胞制药的前景和展望	(168)
参考文献	(182)

下篇 微生物发酵工程制药

第十一章 微生物发酵工程在制药工业中的应用	(191)
第一节 微生物发酵工程制药的发展历程	(191)
第二节 微生物发酵工程在制药工业中的作用	(194)
第三节 国内外微生物发酵工程制药行业现状和发展 前景	(196)
第十二章 微生物发酵工程制药基础	(198)
第一节 微生物基础知识	(198)
第二节 微生物纯培养技术	(206)
第三节 微生物代谢调控	(214)



第十三章	微生物发酵工艺与设备	(232)
第一节	微生物发酵的基本过程	(233)
第二节	微生物发酵的操作方式	(251)
第三节	微生物发酵工艺控制	(253)
第四节	微生物发酵设备	(264)
第十四章	微生物发酵工程产品的制备实例	(267)
参考文献	(284)

上
篇



动物细胞工程制药

袁建琴

第一章 绪 论

讲到动物细胞制药，我们就有必要首先了解细胞是怎样被发现的。人类认识细胞的历史并不长。众所周知，细胞是一切生命有机体的基本结构和功能单位，但是没有显微镜的出现就不可能发现细胞。1590年，荷兰眼镜制造商 J. Aanssen 和 Z. Janssen 父子制造了第一台复式显微镜，标志着人们向微观世界迈出了第一步。1665年，英国物理学家 Roberhooke 用自己设计和制造的显微镜观察了切成薄片的软木，第一次描述了植物细胞的构造，并首次用拉丁文 cell 这个词来称呼他所看到的类似蜂巢样极小的封闭小室，实际上这只是死细胞留下的细胞壁。直到 1680 年，荷兰科学家 A. V. Leeuwenhoek 用设计较好的显微镜观察到了原生动物、人类精子、鲑鱼的红细胞、牙垢中的细菌等许多动植物的活细胞与原生动物的细胞结构，成为第一个看到活细胞的人。进入 19 世纪后，随着生物学基础研究的发展和显微镜技术的改进与提高，对细胞的观察取得了一系列的新成果。于是，1838 年德国植物学家 M. J. Schleiden 提出细胞是一切植物结构的基本单位，并且是一切植物赖以发展的根本实体。1839 年，德国动物学家 M. J. Schwann 把这一学说扩大到动物学界，从而形成了细胞学说，即：一切植物、动物都是由细胞组成的，细胞是一切动植物结构和功能的基本单位。在此基础上，细胞学作为一门独立的生物科学逐渐孕育而成，进一步推动了对细胞内部结构和细胞生命活动的研究。恩格斯将该学说列为 19 世纪自然科学的三大发现之一。



细胞培养 (Cell culture) 技术现已广泛应用于生物学、医学研究等领域, 成为生物领域一门重要分支。它起源于 1885 年, 德国人 W. Roux 用温热生理盐水在体外培养鸡胚髓板, 使之存活了数天, 并首次采用了 “Tissue culture” 这个词, 第一次获得组织块人工培养的成功, 这一实验被认为是动物组织体外培养的萌芽实验。直到 1907 年, 美国生物学家用单盖片覆盖凹窝玻璃的悬滴培养法, 以青蛙的凝固淋巴液作为培养基, 从蝌蚪的脊索中分离出神经组织, 使来自两栖类神经组织的神经细胞存活了数周, 并且还观察到从神经细胞中长出了神经纤维, 而且向培养液中伸出了轴突, 与脑、脊髓神经细胞在体内分化的情况非常类似。Harrison 的实验不仅解决了神经纤维的起源问题, 而且还创立了体外组织培养技术, 特别是动物细胞的组织培养方法, 成为动物细胞培养的奠基人。以后 Carrel 对培养条件进行了改进, 并十分注意培养中的无菌操作技术, 他用血浆包埋组织块外加胚胎浸汁的培养法, 通过采用更新培养基和分离组织的传代措施, 完善了经典的悬滴培养法。1923 年, 他又设计了用卡氏瓶培养法来扩大组织生存的空间, 为组织培养的发展奠定了基础。随着基因工程技术等相关技术的发展, 动物细胞工程在理论和应用两方面均获得了快速发展。1949 年, Enders 和他的同事发表了第一篇关于在培养细胞中生长病毒的报告, 为以后采用细胞培养技术生产疫苗奠定了基础。1951 年, Earle 等开发了能促进动物细胞体外培养的人工合成培养基 (Synthetic medium)。1957 年, Graff 用灌注技术 (Perfusion technology) 创造了悬浮细胞培养 (Suspension culture) 史上绝无仅有的细胞密度高达 $(1 \sim 2) \times 10^{10}/L$ 的记录, 标志着现代灌注概念的诞生。1958 年, 日本的 Okada 发现已灭活的仙台病毒可以诱使艾氏腹水瘤细胞细胞融合, 从此开创了动物细胞融合的崭新领域。细胞融合技术的最重大发展和应用就是杂交肿瘤技术。1962 年, Capstick 成功地大规模悬浮培养小鼠肾细胞, 标志着动物细胞大规模培养技术的起步。1967 年, Van Wezel 以 DEAE Sephadex A50 为载体培养动物细胞获



得成功。1975年, Sato等在培养基中用激素代替血清使垂体细胞株GH3在无血清介质中生长获得成功, 预示着无血清培养(Culture in serum-free medium)技术的诱人前景。1975年, Kohler和Milstein成功地融合了小鼠B淋巴细胞和骨髓瘤细胞而产生能分泌预定单克隆抗体的杂交瘤细胞(Hybridoma cell), 免疫学取得了重大突破。1986年, Demo Biotech公司首次用微囊化(Microencapsulation)技术大规模培养杂交瘤细胞(Hybridoma cell)生产单克隆抗体获得成功。1989年, Konstantinovti首次提出大规模细胞培养过程中生理状态控制, 更新了细胞培养工艺中优化控制的理论。1997年, 英国Wilmot领导的小组用体细胞核克隆出了绵羊“Dolly”, 把动物细胞工程推上辉煌的顶峰。

细胞是生物体结构和功能的基本单位, 在研究生物生命活动的机制和控制中, 必然需要对细胞这个基本单位进行研究, 因此, 有必要寻求在离体条件下培养细胞的方法, 这就诞生了细胞培养技术。所谓细胞与组织培养, 就是将细胞或组织从机体取出, 在体外模拟机体内的生理条件下进行培养, 使离体细胞或组织生存和生长, 并维持其结构和功能的一门技术。近年来随着细胞生物学、分子生物学、生物化学和基因工程学等一系列学科和技术的发展, 原先的细胞培养技术已发展成为一门崭新的学科——细胞工程学(Cell engineering)。尽管它还很年轻, 但它已成为当今高技术——生物工程研究领域不可缺少的一部分, 并已在国民经济的许多部门, 包括制药工业中发挥了巨大的作用。细胞工程是以细胞为单位, 按人们的意志, 应用细胞生物学、分子生物学和工程学等理论和技术, 有目的地进行精心设计, 精心操作, 使细胞的某些遗传特性发生改变, 从而达到改良或产生新品种的目的, 以及使细胞增加或重新获得产生某种特定产物的能力, 从而在离体条件下进行大量培养、增殖, 并提取出对人类有用的产品。这是一门应用科学和工程技术, 它包括真核细胞的基因重组、导入、扩增和表达的理论和技术, 细胞融合的理论和技术, 细胞器特别是细胞核移植的理论和



技术, 染色体改造的理论和技術, 转基因动、植物的理论和技術, 细胞大量培养的理论和技術, 以及将有关产物提取纯化的理论和技術。动物细胞工程是细胞工程的一个重要分支, 是建立在动物细胞培养、细胞融合和细胞拆合技术基础之上发展起来的。它主要从细胞生物学和分子生物学的层次, 根据人类的需要, 深入探索和改造生物遗传种性的同时, 应用工程技术手段, 大量培养细胞或动物本身, 以期收获细胞或其代谢物以及可供利用的动物。如上所述, 细胞是一切动、植物生命体的基本组成单位。细胞虽小(直径 $10\mu\text{m}$ 左右), 但却非常精密、复杂, 并有着巨大的生产效率, 可以生产出许许多多维持机体生命所必需的产物。因此很早以前人们就考虑到要很好地利用这个“加工厂”。

细胞培养技术自20世纪50年代传入我国, 经20世纪70年代的发展, 我国科技工作者辛勤工作, 不断攻克难关, 在动物细胞工程领域取得了可喜的成果。20世纪60年代, 童第周及其合作者在鱼类和两栖动物中进行了大量核移植实验, 在探讨核质关系方面做出了重大贡献。如亲缘关系远近不同的鱼类之间可以进行多种核质组合, 在变种间、属间及科间都获得了具有独特性状的核质重组鱼。1985年, 中国科学院上海细胞生物学研究所研制成功抗北京鸭红细胞和淋巴细胞表面抗原的单克隆抗体, 同时还与有关医学部门合作, 成功地制备了抗人肝癌和肺癌的单克隆抗体。1991年, 中国科学院建立了非营利性的细胞库, 目的是收集、保存和提供人、实验动物和野生动物的细胞, 为生物学基础研究和生物技术服务。1993年已经编目的可以供应的细胞株有204种。目前, 国内的一些单位正在探索用“生物导弹”对癌症进行早期诊断和治疗。细胞库的建成, 细胞培养用品、培养基、血清、试剂及细胞株(系)的商品化, 高技术的引进, 实验室条件的改进等, 极大地推动了动物细胞制药的发展。加上各种新技术如电镜观察技术、放射性核素标记、单细胞显微注射、荧光免疫、电泳技术、细胞融合杂交瘤技术、DNA转染和细胞转化、分子杂交等的普遍使用, 使实



验研究从细胞水平深入到分子水平。

以动物细胞为宿主细胞也生产出了多种重要的生物制品。从1967年起,在中试规模发展起来的这项技术被设计并应用于工业规模口蹄疫(FMD)病毒疫苗的生产,口蹄疫疫苗是动物细胞大规模培养方法生产的主要产品之一。生产厂商是 Wellcome (现为 Cooper 动物保健) 集团,生产厂分布于欧洲、非洲和南美洲的 8 个国家。这些厂家使用 5 000L 的细胞罐生产当地特定血清型的 FMD 病毒,到 1976 年,这些工厂每年生产多于 100 万 L 的疫苗,到 1983 年,规模就达到了大约 200 万 L,相当于 3.50×10^8 支单价疫苗。Wellcome 还用同样的技术用 BHK21 细胞制造兽用狂犬疫苗。美国 Genentech 公司应用 SV40 为载体,将乙型肝炎病毒表面抗原基因插入哺乳动物细胞内进行高效表达,已生产出乙型肝炎疫苗。英国 Wellcome 公司采用 8 000L Namalwa 细胞生产 α -干扰素。英国 Celltech 公司用气升式生物反应器生产 α 、 β 和 γ 干扰素;用无血清培养液在 10 000L 气升式生物反应器中培养杂交瘤细胞生产单克隆抗体。美国 Endotronic 公司用中空纤维生物反应器大规模培养动物细胞生产出免疫球蛋白 G、A、M 和尿激酶、人生长激素等。目前已实现商业化的产品有:乙脑疫苗、口蹄疫疫苗、狂犬病疫苗、牛白血病病毒疫苗、脊髓灰质炎病毒疫苗、乙型肝炎疫苗、疱疹病毒疫苗、巨细胞病毒疫苗、 α 和 β 干扰素、血纤维蛋白溶酶原激活剂、凝血因子 VIII 和凝血因子 IX、促红细胞生成素、松弛素、生长激素、蛋白 C、免疫球蛋白、尿激酶、激肽释放酶及单克隆抗体等。这些药品在疾病预防、临床诊断和治疗,包括病毒、癌症、心血管病、血液病、内分泌病及贫血等疾病和外伤方面都有着重要意义。现在,动物细胞培养已经不再只是实验室的工具,它的重要性已经被人们充分认识到,已成为日趋完善的一项技术,动物细胞制药已经成为世界许多国家竞相发展的一个重要的新兴产业,前景十分广阔。