

Sheng Wu 高职高专  
生物技术类专业系列规划教材

# 动物细胞分离培养

主 编 郭立达 陈鸣丽



重庆大学出版社  
<http://www.cqsp.com.cn>

高职高专生物技术类专业系列规划教材

# 动物细胞分离培养

主 编 郭立达 陈鸣丽  
副主编 辛胜昌 吴海港  
参 编 焦振霞 潘美英

重庆大学出版社



## 内容提要

本书以“项目+任务”的形式介绍了动物细胞分离培养的知识,全书共分10个项目,项目1为动物细胞分离培养概述,介绍了动物细胞培养的历史背景、实际应用、主要产物,基本过程及要求等基础知识;项目2和项目3介绍了动物细胞培养室的6个工作区域、主要仪器设备的使用及维护;项目4介绍了常用实验器材的清洗、干燥、包装、灭菌及无菌器材的保存;项目5介绍了动物细胞培养用液和培养基的制备;项目6和项目7介绍了动物组织分离和细胞的原代培养及传代培养;项目8和项目9介绍了细胞活力的检测方法和常用的染色方法;项目10介绍了动物细胞冻存、复苏、短期保存的原则和方法。

本书主要供高职高专院校生物技术及应用、生物工程等专业学生使用,也可作为动物细胞工程技术研究、生产和管理人员的岗位职业培训的教材或参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

动物细胞分离培养/郭立达,陈鸣丽主编.—重庆:重庆大学出版社,2015.8

高职高专生物技术类专业系列规划教材

ISBN 978-7-5624-9292-4

I.①动… II.①郭…②陈… III.①动物—细胞分离—细胞培养—高等职业教育—教材 IV.①Q954.6

中国版本图书馆CIP数据核字(2015)第153710号

## 动物细胞分离培养

主 编 郭立达 陈鸣丽

策划编辑:袁文华

责任编辑:陈 力 涂 昀 版式设计:袁文华

责任校对:秦巴达 责任印制:赵 晟

\*

重庆大学出版社出版发行

出版人:邓晓益

社址:重庆市沙坪坝区大学城西路21号

邮编:401331

电话:(023) 88617190 88617185(中小学)

传真:(023) 88617186 88617166

网址:<http://www.cqup.com.cn>

邮箱:[fxk@cqup.com.cn](mailto:fxk@cqup.com.cn)(营销中心)

全国新华书店经销

重庆华林天美印务有限公司印刷

\*

开本:787×1092 1/16 印张:14.5 字数:344千

2015年8月第1版 2015年8月第1次印刷

印数:1—2 000

ISBN 978-7-5624-9292-4 定价:29.00元

本书如有印刷、装订等质量问题,本社负责调换

版权所有,请勿擅自翻印和用本书

制作各类出版物及配套用书,违者必究

# 高职高专生物技术类专业系列规划教材

## ※ 编委会 ※

(排名不分先后,以姓名拼音为序)

总 主 编 王德芝

编委会委员	陈春叶	池永红	迟全勃	党占平	段鸿斌
	范洪琼	范文斌	辜义洪	郭立达	郭振升
	黄蓓蓓	李春民	梁宗余	马长路	秦静远
	沈泽智	王家东	王伟青	吴亚丽	肖海峻
	谢必武	谢 昕	袁 亮	张 明	张媛媛
	郑爱泉	周济铭	朱晓立	左伟勇	



## 高职高专生物技术类专业系列规划教材

### ※ 参加编写单位 ※

(排名不分先后,以拼音为序)

北京农业职业学院

重庆三峡医药高等专科学校

重庆三峡职业学院农林科技系

甘肃酒泉职业技术学院

甘肃林业职业技术学院

广东轻工职业技术学院

河北工业职业技术学院

河南漯河职业技术学院

河南三门峡职业技术学院

河南商丘职业技术学院

河南信阳农林学院

河南许昌职业技术学院

河南职业技术学院

黑龙江民族职业学院

湖北荆楚理工学院

湖北生态工程职业技术学院

湖北生物科技职业学院

江苏农牧科技职业技术学院

江西生物科技职业技术学院

辽宁经济职业技术学院

内蒙古包头轻工职业技术学院

内蒙古呼和浩特职业学院生物化学工程学院

内蒙古医科大学

山东潍坊职业学院

陕西杨凌职业技术学院

四川宜宾职业技术学院

四川中医药高等专科学校

云南农业职业技术学院

云南热带作物职业学院



# 总序



大家都知道,人类社会已经进入了知识经济的时代。在这样一个时代中,知识和技术比以往任何时候都扮演着更加重要的角色,发挥着前所未有的作用。在产品(与服务)的研发、生产、流通、分配等任何一个环节,知识和技术都居于中心位置。

那么,在知识经济时代,生物技术前景如何呢?

有人断言,知识经济时代以如下六大类高新技术为代表和支撑,它们分别是电子信息、生物技术、新材料、新能源、海洋技术、航空航天技术。是的,生物技术正是当今六大高新技术之一,而且地位非常“显赫”。

目前,生物技术广泛地应用于医药和农业,同时在环保、食品、化工、能源等行业也有着广阔的应用前景,世界各国无不非常重视生物技术及生物产业。有人甚至认为,生物技术的发展将为人带来“第四次产业革命”;下一个或者下一批“比尔·盖茨”们,一定会出在生物产业中。

在我国,生物技术和生物产业发展异常迅速,“十一五”期间(2006—2010年)全国生物产业年产值从6 000亿元增加到16 000亿元,年均增速达21.6%,增长速度几乎是我国同期GDP增长速度的2倍。到2015年,生物产业产值将超过4万亿元。

毫不夸张地讲,生物技术和生物产业正如一台强劲的发动机,引领着经济发展和社会进步。生物技术与生物产业的发展,需要大量掌握生物技术的人才。因此,生物学科已经成为我国相关院校大学生学习的重要课程,也是从事生物技术研究、产业产品开发人员应该掌握的重要知识之一。

培养优秀人才离不开优秀教师,培养优秀人才离不开优秀教材,各个院校都无比重视师资队伍和教材建设。多年的生物学科经过发展,已经形成了自身比较完善的体系。现已出版的生物系列教材品种也较为丰富,基本满足了各层次各类型的教学需求。然而,客观上也存在一些不容忽视的不足,如现有教材可选范围窄,有些教材质量参差不齐、针对性不强、缺少行业岗位必需的知识技能等,尤其是目前生物技术及其产业发展迅速,应用广泛,知识更新快,新成果、新专利急剧涌现,教材作为新知识、新技术的载体应与时俱进,及时更新,才能满足行业发展和企业用人提出的现实需求。

正是在这种时代及产业背景下,为深入贯彻落实《国家中长期教育改革和发展规划纲要(2010—2020年)》和《教育部 农业部 国家林业局关于推动高等农林教育综合改革的若干意见》(教高〔2013〕9号)等有关指示精神,重庆大学出版社结合高职高专的发展及专业教学基本要求,组织全国各地的几十所高职院校,联合编写了这套“高职高专生物技术类专

业系列规划教材”。

从“立意”上讲,本套教材力求定位准确、涵盖广阔,编写取材精炼、深度适宜、份量适中、案例应用恰当丰富,以满足教师的科研创新、教育教学改革和专业发展的需求;注重图文并茂,深入浅出,以满足学生就业创业的能力需求;教材内容力争融入行业发展,对接工作岗位,以满足服务产业的需求。

编写一套系列教材,涉及教材种类的规划与布局、课程之间的衔接与协调、每门课程中的内容取舍、不同章节的分工与整合……其中的繁杂与辛苦,实在是“不足为外人道”。

正是这种繁杂与辛苦,凝聚着所有编者为本套教材付出的辛勤劳动、智慧、创新和创意。教材编写团队成员遍布全国各地,结构合理、实力较强,在本学科专业领域具有较深厚的学术造诣及丰富的教学和生产实践经验。

希望本套教材能体现出时代气息及产业现状,成为一套将新理念、新成果、新技术融入其中的精品教材,让教师使用时得心应手,学生使用时明理解惑,为培养生物技术的专业人才,促进生物技术产业发展作出自己的贡献。

是为序。

全国生物技术职业教育教学指导委员会委员  
高职高专生物技术类专业系列规划教材总主编

王德芝

2014年5月







## 前言

《动物细胞分离培养》是根据高职高专生物技术专业高素质、创新型技术技能人才培养要求,紧密结合动物细胞培养的规范标准及专业教学改革编写而成。同时,本书纳入近年来动物细胞培养的新技术、新知识及动物细胞培养在新领域的应用,使其与产业技术的发展同步。

本书坚持“理论简明、够用”的原则,突出适用性,突出实践教学,力求阐明技能相关的基本理论和知识,按照动物细胞培养的岗位设置和岗位技能要求,以培养学生的实际工作能力为核心,贯穿实用为主、应用为重的职业教育理念,对课程内容的选择标准作了根本性改革,打破以知识传授为主要特征的传统学科课程模式,转变为以具体项目为载体、以实际工作任务为中心组织课程内容,使学生在完成具体项目的过程中构建相关理论知识,培养工作技能,发展职业能力,以方便学习者形成完整的检测技能体系,充分体现高等职业教育与生产实际紧密联系的特点。本书主要供高职高专院校生物技术及应用、生物工程等相关专业学生使用,也可作为动物细胞工程技术研究、生产和管理人员的岗位职业培训的教材或参考用书。

本书以项目和任务的形式编排,内容上共分10个项目,项目1为动物细胞分离培养概述,介绍了动物细胞培养的历史背景、实际应用、主要产物,基本过程及要求等基础知识;项目2和项目3介绍了动物细胞培养室的6个工作区域、主要仪器设备的使用及维护;项目4介绍了常用实验器材的清洗、干燥、包装、灭菌及无菌器材的保存;项目5介绍了动物细胞培养用液和培养基的制备;项目6和项目7介绍了动物组织分离和细胞的原代培养及传代培养;项目8和项目9介绍了细胞活力的检测方法和常用的染色方法;项目10介绍了动物细胞冻存、复苏、短期保存的原则和方法。书中内容比较全面,各院校在教学过程中可根据实际情况,酌情选择教学内容。

本书由郭立达(河北工业职业技术学院)、陈鸣丽(武汉职业技术学院)担任主编;辛胜昌(北京大学深圳研究生院)、吴海港(河南信阳农林学院)担任副主编;焦振霞(河北工业职业技术学院)、潘美英(成都千禧莱医药科技有限公司)参与了编写。具体编写分工为:项目1、项目6由郭立达编写;项目2、项目3由焦振霞编写;项目4、项目5由吴海港编写;项目7、项目10由陈鸣丽编写;项目8由辛胜昌编写;项目9由潘美英编写;全书最后由郭立达统稿。



本书编写中参考了本专业的有关教材和其他文献,还得到各位编者所在院校和重庆大学出版社的大力支持,谨在此一并表示感谢。

由于编者水平有限,疏漏和欠妥之处在所难免,恳请读者提出宝贵意见。

编者

2015年5月

# 目 录 CONTENTS

## 项目 1 动物细胞分离培养概述

- 任务 1.1 动物细胞分离培养的发展及应用 ..... (2)

## 项目 2 动物细胞培养室的设计

- 任务 2.1 动物细胞培养室的设计 ..... (21)

## 项目 3 动物细胞分离培养设备的使用及维护

- 任务 3.1 吸管和移液枪的熟练使用 ..... (28)
- 任务 3.2 无菌操作区常用仪器设备的使用及维护 ..... (30)
- 任务 3.3 培养区常用仪器设备的使用及维护 ..... (37)
- 任务 3.4 储存区常用仪器设备的使用及维护 ..... (40)
- 任务 3.5 准备区常用仪器设备的使用及维护 ..... (42)
- 任务 3.6 清洗和消毒灭菌区常用仪器设备的使用及维护 ..... (46)

## 项目 4 无菌器材的准备

- 任务 4.1 常用实验器材的清洗和干燥 ..... (56)
- 任务 4.2 常用实验器材的包装 ..... (64)
- 任务 4.3 常用实验器材的灭菌 ..... (67)
- 任务 4.4 无菌操作训练 ..... (73)

## 项目 5 动物细胞用液的制备

- 任务 5.1 培养用液的制备 ..... (83)
- 任务 5.2 培养基的制备 ..... (92)

项目 6 动物细胞的原代培养	
任务 6.1 动物组织分离和细胞的原代培养·····	(118)
项目 7 动物细胞的传代培养	
任务 7.1 动物细胞的传代培养·····	(135)
任务 7.2 细胞生长曲线的绘制·····	(142)
项目 8 细胞的活力检测	
任务 8.1 细胞的活力检测·····	(155)
项目 9 细胞的形态学观察	
任务 9.1 培养细胞的固定·····	(167)
任务 9.2 培养细胞的常规染色·····	(169)
任务 9.3 细胞免疫化学染色·····	(176)
任务 9.4 透射电镜细胞样品和扫描电镜细胞样品的制备·····	(184)
项目 10 细胞的冻存、复苏、保存和运输	
任务 10.1 动物细胞的冻存·····	(198)
任务 10.2 动物细胞的复苏·····	(206)
任务 10.3 组织细胞的保存和细胞运输·····	(211)
附 录	
附录 1 常用培养液成分及配方·····	(216)
附录 2 无血清培养基的选择·····	(218)
参考文献·····	(220)

# 项目1

## 动物细胞分离培养概述

### 【知识目标】

- 了解动物细胞培养技术的历史背景。
- 熟悉动物细胞培养的实际应用及主要产物。
- 掌握动物细胞培养的基本过程。
- 掌握动物细胞分离培养的基本要求。

### 【技能目标】

- 能准确描述动物细胞培养的基本过程。

## 【项目简介】>>>

动物细胞分离培养是指从动物活体体内分离组织,利用机械或消化的方法分散成单细胞悬液,然后放在类似于体内生存环境的体外环境中,进行孵育培养,使其生存、生长并维持其结构与功能的方法。动物细胞培养的对象为单个细胞或细胞群,这些细胞很难再形成组织。

动物组织培养是一个和动物细胞培养相近的概念,指从生物体内取出活的组织(多指组织块)在体外进行培养的方法。组织培养的对象在体外可发生分化并保持组织的结构和功能,但不具备器官的结构与功能。在组织培养过程中,由于细胞的移动(运动)和其他一些环境因素的影响,现代的培养技术尚不能在体外维持组织的结构和机能长期保持不变。培养时间越长,发生变化的可能性越大,结果常使单一类型的细胞保存下来,最终成为细胞培养。而所谓的细胞培养,也并不意味着细胞彼此是独立的,细胞在培养中的生命活动和体内细胞一样,仍然是相互依存的,呈现出一定的“组织”特性。所以,组织培养和细胞培养的概念并无严格区别,有时会笼统地放在一起。要注意的是,组织培养这一概念在过去常常用来泛指所有的体外培养,即是器官培养、组织培养和细胞培养的总称。

本项目主要介绍动物细胞分离培养的历史背景、实际应用、主要产物、基本过程及要求等基本知识,并侧重于动物细胞分离培养过程中主要操作技能的培训。

## 【重点作业】>>>

1. 观看相关录像资料,了解动物细胞分离培养的过程和发展。
2. 查阅相关文献资料,分组讨论动物细胞培养的重要意义和应用前景。

## 【工作任务】>>>

# 任务 1.1 动物细胞分离培养的发展及应用

---

### 应知词汇

组织培养、细胞培养、接触抑制、细胞株、单克隆抗体等。

---

## 1.1.1 动物细胞培养简介

### 1) 发展历史

细胞是一切生命有机体的基本结构和功能单位。显微镜的出现,使人们得以顺利地发现了细胞。1590年,荷兰眼镜制造商 J.Janssen 和 Z.Janssen 父子制作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,英国人 Robert Hooke 用自己设计和制造的显微镜观察了植物栎树皮的薄片,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的极小的封闭状小室。直到 1680年,荷兰人 Leeuwenhoek 才用自制的

显微镜观察到了原生动物的精子、鲑鱼的红细胞、牙垢中的细菌等标本,成为第一个看到活细胞的人。

动物细胞培养技术起源于19世纪末的某些胚胎学技术。1885年,德国人W Roux最先尝试使组织脱离机体而生存,他用温热的生理盐水在体外培养鸡胚髓板,使之存活了10 d,并首次采用了“组织培养”这个词,第一次获得组织块人工培养成功。这一实验被认为是动物组织体外培养的萌芽实验。之后,1887年,Arnold把白细胞收集在盛有盐水的盘里,观察到白细胞的运动。1906年,Beebe和Ewing用盖玻片悬滴培养法,以动物血清做培养基,培养狗淋巴细胞存活了72 h,并曾见到细胞生长现象。直到1907年,美国生物学家Harrison用单盖玻片覆盖凹窝玻璃的悬滴培养法,以青蛙的凝固淋巴液为培养基,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,而且还开创了动物组织培养的先河,成为动物细胞培养的奠基人。后来,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,以扩大组织的生存空间,为组织培养的发展奠定了基础。在卡氏瓶培养法的启发下,相继出现了各类型培养瓶、培养皿、试管、多孔培养板的培养法。1955—1957年,Sanford和Dulbecco等人发明了用胰蛋白酶消化分离组织细胞的方法,建立了单层细胞培养技术。

细胞培养液的研究也随着组织培养技术的改进而不断发展。早期细胞培养采用天然培养基(胎汁、血浆和血清)。天然培养基成分虽然接近体内状态,但其组成复杂,是成分不明确的混合物,因而会影响对某些实验产物的提取和实验结果的分析。1951年,Eagle开发了能促进动物细胞体外培养的人工合成培养基。人工合成培养基的出现又促进了细胞培养技术的发展和应。目前,绝大多数人工合成培养基使用时还需添加血清。随着单克隆抗体制备、细胞生长因子和细胞分泌产物的研究,又开发了无血清细胞培养基的研究技术。1975年,Sato等人用激素、生长因子等替代血清,使垂体细胞株培养获得成功。近20年来,已有几十种细胞株在无血清培养基中生长和繁殖。目前,正常组织肝细胞和胰腺细胞等无血清培养的研究也在探索之中。

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,至目前我国学者在动物细胞工程领域也作出了卓越成就。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、科间都获得了具有独特性状的核质重组鱼。体细胞克隆方面,我国上海、山东也成功克隆出了山羊和牛。细胞培养技术不再是个别实验室所拥有的技术,而成为医学和生物医学研究中普遍应用的技术。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,高新技术的引进,实验室条件的改进等,极大地推动了细胞培养技术的发展。加上各种新技术如放射性核素标记、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。

细胞培养技术已经成为当今生命科学各领域的基础技术和基本技能,它也是细胞工程、基因工程和生物医学工程的重要研究手段。肿瘤、感染、创伤和器官移植等问题的研究,也都

与细胞培养技术相关。因此,学习细胞培养技术及操作要领,是生命科学工作者必备的知识 and 技能。随着细胞培养技术和其他技术的迅猛发展,动物细胞培养技术在我们日常生活中将会发挥越来越重要的作用。

## 2) 动物细胞培养技术的应用

### (1) 生产天然药用蛋白(疫苗、干扰素等)

利用动物细胞大规模培养技术生产大分子生物制品始于 20 世纪 60 年代,当时是为了满足生产口蹄疫(FMD)疫苗的需要。后来随着大规模培养技术的逐渐成熟和转基因技术的发展与应用,人们发现利用动物细胞大规模培养技术来生产大分子药用蛋白比原核细胞表达系统更有优越性。

早期的乙肝疫苗是从乙肝病毒(HBV)携带者血液中提取的,有效成分主要是亚病毒颗粒。这种疫苗具有较高的免疫原性,但大规模生产受到原料来源的限制,而且提取物需要高度纯化,必须避免混有感染性 Dane 颗粒。因此不仅制造成本高,而且有安全隐患。

为了开发一种既安全又价格低廉的疫苗,最初人们尝试把编码 S 多肽的序列导入大肠杆菌构建工程菌生产重组乙肝疫苗,但结果表达水平极低,这可能是由于表达产物对受体菌的强烈毒性。20 世纪 80 年代初开始选择酿酒酵母表达重组乙肝疫苗,同样以 S 基因为目的基因,将构建的基因表达载体导入酿酒酵母,重组酵母能表达出平均直径为 22 nm 的球形颗粒,其结构和形态均与天然亚病毒颗粒相同,主要差别是重组酿酒酵母合成的颗粒中 S 蛋白未糖基化修饰,且含有酵母特异性的脂类化合物,如麦角固醇等。尽管有差别,但由于重组酵母表达出的亚病毒颗粒与天然亚病毒颗粒具有相同的优势抗原决定簇,也具有免疫活性。美中不足的是重组酿酒酵母合成的 S 蛋白只有 2%~5%能转配成 22 nm 颗粒,而未装配的 S 蛋白等组分的免疫原性只有亚病毒颗粒的千分之一,因而用重组酿酒酵母生产的疫苗单位效价低。

为提高疫苗的免疫活性,研究者利用甲基营养菌巴斯德毕赤酵母作为受体细胞生产重组疫苗,用相似的方法构建重组毕赤酵母工程菌,表达出来的 S 蛋白几乎全部形成颗粒结构,单位效价提高了数十倍。显示出比酿酒酵母系统更大的优越性。

早在 1981 年,法国巴斯德研究所和美国西奈山医学中心在哺乳动物细胞中成功表达了乙肝表面抗原。1991 年中科院联合长春生物制品研究所等单位研制成功了由中国仓鼠卵巢细胞(CHO)细胞系表达的基因工程乙肝疫苗,并于 1992 年上市,该疫苗是以 S 蛋白为靶抗原的乙肝疫苗。在接受 S 蛋白为靶抗原的乙肝疫苗的人群中,有 10%以上的成年人不产生免疫反应,另有 5%~10%的人群只有弱反应。进一步的研究结果表明,M 和 L 抗原蛋白对 S 型重组疫苗具有显著的增效作用,普遍认为是这两种抗原在 HBV 与肝细胞的作用中扮演重要角色。由 3 种抗原组成的复合型乙肝疫苗可以诱导那些对 S 蛋白缺乏响应的人群产生免疫反应。巴斯德研究所在 CHO 细胞中表达了含 S 和 M 基因的乙肝疫苗,并于 1993 年批准上市。中国科学家用 CHO 细胞系,也成功地表达了含 S 和 L 基因表达产物的乙肝疫苗。以色列一家公司用 CHO 细胞生产了一种新型疫苗,这种疫苗含 S、M 和 L 3 种基因表达的蛋白,在 CHO 细胞中形成直径 22 nm 的球形颗粒,含有包膜上所有的抗原。与重组酵母乙肝疫苗相比,CHO 细胞系生产的乙肝疫苗具有同样甚至更高的免疫原性,与血源性疫苗没有差异,且分离方法简单。

干扰素是细胞因子家族中最早被发现的,是人和动物细胞受到适宜刺激条件下产生的



微量的、具有高度生物学活性的糖蛋白,其生物学效应是通过干扰素与细胞膜上的特异性受体结合来启动的。不同的干扰素各自通过与细胞表面的特异性受体结合,通过复杂的蛋白质-蛋白质相互作用的瀑布反应,激发细胞内的信号传递,通过级联反应改变某些干扰素敏感基因的转录,从而发挥各自的生物学效应,如诱导细胞对病毒攻击产生耐受性、调节绝大多数免疫功能、调节多种类型细胞的生长和分化、维持某些动物细胞早期胚胎发育。

干扰素类药物的临床应用始于20世纪50年代末期。在早期的临床应用过程中,干扰素主要是从人血中分离纯化获得的。干扰素具有种属特异性,临床上只能使用人源干扰素,且由于人体内干扰素的含量极少,因此临床应用受到限制。

随着生物技术手段的迅猛发展,人们逐渐克服了干扰素人工生产的难题,使得干扰素类药物的临床应用得以发展。20世纪70年代后期,动物细胞培养技术快速发展使得干扰素的大规模生产得以实现。癌细胞能无限增殖,且分泌的干扰素比正常细胞要多,因而被广泛应用于大规模生产干扰素,而且杂交瘤技术的发展也促进了高敏度的干扰素免疫测定的发展。20世纪80年代,重组DNA技术进一步促进了干扰素的大规模生产,满足了临床上的大量使用。目前,绝大多数的干扰素已经能够在多种表达系统中表达,如大肠杆菌、霉菌、酵母和其他一些动物细胞系,其中绝大多数临床使用的干扰素是由大肠杆菌系统表达的。

### (2) 基因重组蛋白的临床应用

哺乳动物细胞培养表达制备治疗性重组蛋白质药物已成为当今生物制药领域中的主流技术。目前有60%以上的重组蛋白质药物的生产采用哺乳动物细胞培养技术。哺乳动物细胞制备的蛋白质药物质量高,它们与天然蛋白质具有相似的理化性质和生物学功能。以默克、基因泰克等国际大公司为代表的大规模流加培养生产工艺,其反应罐体积可以达到10 t以上,蛋白表达浓度为1.0~2.0 g/L。我国从2000年开始逐渐发展了该项技术,虽然起步较晚,基础较差,但经过努力实现了该项技术的突破。

### (3) 制备单克隆抗体

单克隆抗体是将产生抗体的单个B淋巴细胞同肿瘤细胞杂交,获得既能产生抗体,又能无限增殖的杂交细胞,并以此生产抗体的技术。其原理是B淋巴细胞能够产生抗体,但在体外不能进行无限分裂;而肿瘤细胞虽然可以在体外进行无限传代,但不能产生抗体。将这两种细胞融合后得到的杂交瘤细胞具有两种亲本细胞的特性。免疫反应是人类对疾病具有抵抗力的重要因素。当动物体受抗原刺激后可产生抗体。抗体的特异性取决于抗原分子的决定簇,各种抗原分子具有很多抗原决定簇,因此,免疫动物所产生的抗体实为多种抗体的混合物。用这种传统方法制备抗体效率低、产量有限,且动物抗体注入人体可产生严重的过敏反应。此外,要把这些不同的抗体分开也极困难。近年来,单克隆抗体技术的出现,是免疫学领域的重大突破。

另外,单克隆抗体在药物方面也有所研发,单克隆抗体药物研究已被列入我国863计划和国家重点攻关项目。目前,中国已有2个治疗性单抗产品获准生产,3个治疗性产品处在临床试验阶段,多个抗体药物处于临床前研究阶段,已批准的诊断性单抗有31个。武汉生物制品研究所抗肾移植单抗OKT<sub>3</sub>(注射用鼠源性抗人T淋巴细胞CD<sub>3</sub>抗原单克隆抗体)最早批准上市,具有免疫抑制作用,可逆转对移植器官的排斥反应。目前国内正在进行临床前研究的抗体药物有:抗CEA嵌合抗体(北京赛科药业),用于治疗结肠癌;抗破伤风抗体(军科院),用

于预防破伤风;抗乙型脑炎单抗(中科院遗传所),用于乙型脑炎;抗 FabC1027(医科院医生所),用于治疗肝癌。

#### (4) 筛选新药

药物筛选是针对特定的要求和目的,通过适当的方法和技术(主要有基因组学、蛋白质组学、代谢组学、计算生物学、生物芯片技术、微流控芯片技术等),在一定的可选择范围内,进行药物优选的过程。因此,药物筛选包括新药研究过程中的处方筛选,根据特定目的选择符合要求的药物。通过规范化的实验手段从大量化合物或者新化合物中选择对某一特定作用靶点具有较高活性的化合物的过程。

药物筛选的过程从本质上讲就是对化合物进行药理活性实验的过程,随着药物开发技术的发展,对新化合物的生理活性实验从早期的验证性实验,逐渐转变为筛选性实验,即所谓的药物筛选。作为筛选,需要对不同化合物的生理活性作横向比较,因此药物筛选的实验方案需具有标准化和定量化的特点。随着组合化学和计算化学的发展,人们开始有能力在短时间内大规模合成和分离多种化合物,因而在现代新药开发流程中药物筛选逐渐成为发现先导化合物的主要途径之一。

细胞水平的药物筛选是更接近生理条件的一种药物筛选模型,其模型是拟设计药物作用的靶细胞,应用细胞培养技术获取所需细胞,将这些细胞与候选化合物相互作用,通过与生化水平筛选类似的检测技术测定化合物的作用能力,从而对化合物进行筛选。

细胞水平的药物筛选的准确率更高,但是需要建立细胞模型,操作更复杂,成本更高,数据之间的平行性较差,另外由于技术的限制,有些靶标还不能进行细胞水平的药物筛选。

#### (5) 培养转基因动物

目前,由于细胞培养技术、细胞融合技术、细胞杂交技术以及转基因技术的创建与相互结合,使得人们能够在细胞水平操作并改变动物的基因进行遗传物质的重组。这样就可以按照人类的需要大幅度地改变生物的遗传组成,从而使新品种的培育在实验室中即可完成,可大大缩短育种进程,且使育种工作更加经济有效。胚胎干细胞的研究成果和克隆羊多莉的问世可以说已为动物遗传育种开辟了一条新途径。

#### (6) 在生物学基础研究中的应用

离体培养的动物细胞具有培养条件可人为控制且便于观察检测的特点,因而可广泛应用于生物学领域的基础研究中。

①在细胞生物学上,动物细胞培养可用于研究动物的正常或病理细胞的形态、生长发育、细胞营养、代谢以及病变等微观过程。如神经细胞的增殖、突起生长、相互识别、刺激传递等机理就是通过进行各种神经细胞的培养才弄清楚的。

②在遗传学研究中,除可用培养的动物细胞进行染色体分析外,还可结合细胞融合技术建立细胞遗传学进行遗传分析和杂交育种;在胚胎工程中通过体外培养卵母细胞并进行体外受精、胚胎分割和移植已发展成了一种较成熟的技术而应用于家畜的繁殖生产中。

③分离和培养具有多潜能性的胚胎干细胞,还可用于动物克隆、细胞诱导分化、动物育种的研究,并可作为基因转移的高效表达载体。

④在病毒学研究中用培养的动物细胞代替试验动物做斑点分析,不仅方法简便、准确、而且重复性好。在病毒类产品工业化生产过程开发方面,现已建立起集生物反应器、微载体和