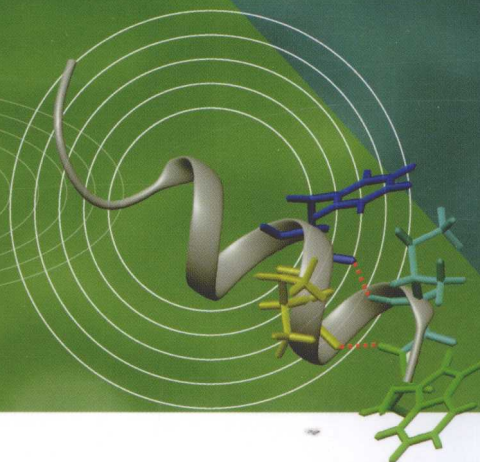




普通高等教育“十一五”国家级规划教材



# 工程细胞生物学

陈志南 主编



科学出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

# 工程细胞生物学

主编 陈志南

科学出版社

北 京

## 内 容 简 介

工程细胞生物学是细胞生物学的重要分支学科,是细胞生物学和细胞工程学的新兴交叉边缘学科。它以细胞生物学的理论和技术体系为基础,以细胞工程学中工程细胞为对象,在分子、细胞等不同层面上,揭示工程细胞的各种生命活动规律,以期按照人们的意图对工程细胞的遗传物质、细胞组分及遗传表型进行重组改造,从而获得有重要应用价值的新型工程细胞表达产物(产品)。可以说,工程细胞生物学是细胞生物学的应用和拓展,同时又为细胞工程学的发展提供重要的理论和技术支撑。因此,工程细胞生物学不仅涉及细胞生物学的基本内容,如生长分化、增殖调控、运输分泌、信号转导和衰老凋亡等基本生命现象,又涵盖细胞工程相关内容,如工程细胞改造及筛选、高密度培养条件、培养体系微环境中的代谢变化等。

本书着重介绍工程细胞生物学基本概念、主要内容、研究方法和技术以及应用现状,并拓展介绍了部分重点实验操作和工程知识。书中设计了部分知识拓展框,以丰富学科进展方面的内容。

本书可作为生命科学、基础医学相关专业本科生、研究生教材,也可供其他相关领域工作人员参考使用。

### 图书在版编目(CIP)数据

工程细胞生物学/陈志南主编. —北京:科学出版社,2011  
普通高等教育“十一五”国家级规划教材  
ISBN 978-7-03-033302-5

I. ①工… II. ①陈… III. ①细胞生物学-高等学校-教材 IV. ①Q2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 281969 号

责任编辑:刘 畅 / 责任校对:钟 洋  
责任印制:阎 磊 / 封面设计:迷底书装

**科学出版社 出版**

北京东黄城根北街 16 号  
邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

**源海印刷有限责任公司 印刷**

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2013 年 2 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013 年 2 月第一次印刷 印张: 47 1/2

字数: 1 192 000

**定价: 98.00 元**

(如有印装质量问题,我社负责调换)

## 编写人员名单

主 编 陈志南

副主编 边惠洁 邢金良 蒋建利 刘宏颀

编 委 (按姓名汉语拼音排序)

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 边惠洁 | 陈妍柯 | 陈志南 | 冯 浩 | 冯 强 |
| 蒋建利 | 李 玲 | 李 郁 | 刘宏颀 | 米 力 |
| 屈 颖 | 宋 斐 | 唐 浩 | 王 彬 | 尉 丁 |
| 吴 佼 | 邢金良 | 杨向民 |     |     |

# 前 言

人类已跨入 21 世纪,当前科学技术迅猛发展、知识经济初显端倪,以生命科学、信息科学、纳米科学、空间科学和能源与环境科学等为代表的学科领域所取得的巨大进步,在很大程度上决定着 21 世纪科学技术的发展方向,并将带来人类生产和生活方式的又一次重大飞跃。科学技术对于人类社会文明进步的革命性作用也必将更加突出地显示出来。

生命科学作为新世纪科学技术领域的带头学科之一,在 20 世纪取得了辉煌的业绩。从 1900 年兰德斯坦纳等发现人类 ABO 血型,到人类基因组计划的成功完成,期间不断有举世瞩目的重大研究成果问世。特别是随着基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程等为基础的生物工程技术的快速发展,生物技术领域产业化得以成功实现,全世界已有数十亿人受益,直接带动了国家和地区经济效益的强劲增长。各国竞相投入巨资予以重点支持,生物技术公司如雨后春笋般层出不穷。

生物工程技术的发展与工程细胞的功能和作用密切相关。工程细胞,包括动物细胞、植物细胞和微生物细胞等,要实现在体外大规模扩增与生长,同样表现出分裂增殖、分化发育、信号转导、衰老凋亡等生命活动现象,就要多层次渗透融合基础细胞生物学研究的进展和成果。此外,工程细胞生物学还涉及工程细胞的筛选和鉴定、构建和改良、高密度培养条件下工程细胞的代谢变化以及物质代谢工程等内容。但目前国内外以工程细胞为对象,全面论述工程细胞生物学基础和工程细胞工程的教材尚缺乏。鉴于国内各高校和科研单位在工程细胞生物学科学研究及人才培养方面的迫切需求,我们在完成编写出版“普通高等教育‘十五’国家级规划教材”《细胞工程》的基础上,经过充分查阅文献资料,结合细胞工程发展趋势,组织力量编写了“普通高等教育‘十一五’国家级规划教材”《工程细胞生物学》。

本教材的编写是一种全新的尝试,力图全面体现细胞工程和细胞生物学两大分支学科的最新进展。教材的名称之所以选定《工程细胞生物学》主要基于两点考虑,其一,区别于细胞工程和细胞生物学同类教材;其二,涵盖细胞工程和细胞生物学两个领域的核心内容。换句话说,本教材既可以看成是关于工程细胞的细胞生物学,也可以认为本书采用了融细胞工程和细胞生物学基础与应用两方面内容于一体、强调理论与技术相结合的新颖结构。

本教材在内容上分为三个部分,第一部分从总体上介绍工程细胞研究涉及的各种技术;第二部分着重阐述与工程细胞紧密相关的基础知识;第三部分系统论述细胞工程的实际操作和应用技术。本书力图体现的特色是:其一,基础知识与实际应用紧密结合;其二,基本知识与研究进展有机整合;其三,多学科、多层面的系统融合。因此可以说,本教材既体现了生命科学迅猛发展的现实要求,又显示出编写者在理论和技术体系创新上的积极探索。教学过程中,可依据教学对象和学时要求选择相关内容。同时,本书详细的技术规程、操作程序及关键环节参数控制等内容,也可作为相关研究人员手边的工作指南。书中部分研究成果也反映了编者所在单位,在基础和应用研究以及“863”计划等国家课题支持下,在细胞大规模培养技术体系建立方面的研究工作进展。

由于本书涉及的内容较为广泛,又缺乏国内外同类教材可资借鉴,疏漏和不妥之处在所难免,诚望广大读者提出宝贵意见,以便在日后修订时进一步完善。

编 者

2012 年 10 月

# 总 目 录

前言

第一章 绪论 ..... 1

1.1 工程细胞生物学的基本概念 ... 1

1.2 工程细胞学与细胞生物学的联系  
和发展 ..... 5

1.3 工程细胞生物学研究及应用现状  
..... 11

第二章 工程细胞生物学的研究方法和  
技术 ..... 15

2.1 细胞形态学观察技术 ..... 15

2.2 免疫细胞化学技术 ..... 30

2.3 细胞的分离与培养技术 ..... 45

2.4 工程细胞的构建技术 ..... 63

2.5 细胞的三维培养技术 ..... 84

2.6 工程细胞无血清悬浮培养技术  
..... 88

第三章 工程细胞生物学基础 ..... 97

3.1 细胞的基本概念 ..... 97

3.2 细胞核与遗传信息传递 ..... 106

3.3 核糖体与蛋白质的生物合成  
..... 127

3.4 细胞物质的代谢 ..... 143

3.5 细胞内膜系统与蛋白质合成  
分泌 ..... 192

3.6 细胞膜与细胞间或细胞基质间  
相互作用 ..... 212

3.7 线粒体与能量代谢 ..... 256

3.8 细胞骨架与细胞迁徙、伸展和  
运动 ..... 277

3.9 蛋白酶体与细胞内蛋白质降解  
..... 290

3.10 细胞周期及其调控 ..... 304

3.11 细胞分化与基因表达调控  
..... 330

3.12 细胞衰老与凋亡 ..... 341

第四章 工程细胞生物学 ..... 359

4.1 工程细胞的概念和分类 ..... 359

4.2 动物工程细胞基础 ..... 368

4.3 植物工程细胞基础 ..... 426

4.4 工程细胞的构建及改良 ..... 445

4.5 高效表达载体构建 ..... 455

4.6 工程细胞库与质量控制 ..... 487

4.7 工程细胞的增殖及代谢特征  
..... 506

4.8 工程细胞高密度培养工艺与  
目标产品 ..... 547

4.9 工程细胞表达产品的分离纯化  
..... 594

4.10 工程细胞表达产品的质量控  
制 ..... 628

4.11 干细胞工程 ..... 647

4.12 基于工程细胞的研究及应用  
..... 672

4.13 工程细胞工业化放大及应用  
..... 694

附录一 汉英名词对照 ..... 713

附录二 英汉名词对照 ..... 730

# 目 录

## 前言

## 第一章 绪 论

|                                    |   |                          |    |
|------------------------------------|---|--------------------------|----|
| 1.1 工程细胞生物学的基本概念 .....             | 1 | 1.2.1 细胞生物学的历史发展 .....   | 5  |
| 1.1.1 细胞工程和工程细胞的基本概念<br>和分类 .....  | 1 | 1.2.2 细胞工程的历史发展 .....    | 8  |
| 1.1.2 工程细胞生物学的概念、内涵和<br>研究范畴 ..... | 4 | 1.2.3 工程细胞生物学的提出 .....   | 9  |
| 1.2 工程细胞学与细胞生物学的联系和发展<br>.....     | 5 | 1.3 工程细胞生物学研究及应用现状 ..... | 11 |
|                                    |   | 小结 .....                 | 12 |
|                                    |   | 思考题 .....                | 12 |
|                                    |   | 参考文献 .....               | 13 |

## 第二章 工程细胞生物学的研究方法和技术

|                          |    |                       |    |
|--------------------------|----|-----------------------|----|
| 2.1 细胞形态学观察技术 .....      | 15 | 2.3.3 细胞培养技术 .....    | 51 |
| 2.1.1 普通光学显微镜技术 .....    | 15 | 2.3.4 细胞内分子示踪技术 ..... | 58 |
| 2.1.2 倒置相差显微镜技术 .....    | 18 | 小结 .....              | 61 |
| 2.1.3 显微电影摄影术 .....      | 19 | 思考题 .....             | 62 |
| 2.1.4 荧光显微镜技术 .....      | 20 | 参考文献 .....            | 62 |
| 2.1.5 共聚焦激光扫描显微镜技术 ..... | 22 | 2.4 工程细胞的构建技术 .....   | 63 |
| 2.1.6 原子力显微镜技术 .....     | 26 | 2.4.1 细胞融合技术 .....    | 63 |
| 2.1.7 电子显微镜技术 .....      | 27 | 2.4.2 基因克隆技术 .....    | 65 |
| 小结 .....                 | 29 | 2.4.3 基因导入技术 .....    | 68 |
| 思考题 .....                | 30 | 2.4.4 基因表达技术 .....    | 69 |
| 参考文献 .....               | 30 | 2.4.5 基因突变技术 .....    | 76 |
| 2.2 免疫细胞化学技术 .....       | 30 | 2.4.6 基因敲除技术 .....    | 77 |
| 2.2.1 免疫细胞/组织化学技术 .....  | 31 | 小结 .....              | 82 |
| 2.2.2 流式细胞术 .....        | 39 | 思考题 .....             | 82 |
| 2.2.3 免疫磁珠细胞分离技术 .....   | 43 | 参考文献 .....            | 82 |
| 小结 .....                 | 44 | 2.5 细胞的三维培养技术 .....   | 84 |
| 思考题 .....                | 45 | 2.5.1 三维细胞培养概念 .....  | 84 |
| 参考文献 .....               | 45 | 2.5.2 三维细胞培养技术 .....  | 84 |
| 2.3 细胞的分离与培养技术 .....     | 45 | 2.5.3 三维培养介质 .....    | 85 |
| 2.3.1 细胞分离技术 .....       | 45 | 2.5.4 三维培养应用 .....    | 85 |
| 2.3.2 亚细胞分离技术 .....      | 47 | 小结 .....              | 87 |

|                                   |           |                       |    |
|-----------------------------------|-----------|-----------------------|----|
| 思考题 .....                         | 87        | 2.6.3 无血清克隆化技术 .....  | 91 |
| 参考文献 .....                        | 87        | 2.6.4 无血清悬浮驯化技术 ..... | 92 |
| <b>2.6 工程细胞无血清悬浮培养技术 .....</b>    | <b>88</b> | 2.6.5 无血清冻存与复苏 .....  | 94 |
| 2.6.1 无血清培养基 .....                | 88        | 小结 .....              | 94 |
| 2.6.2 无血清培养基的组成及其主要<br>补充因子 ..... | 89        | 思考题 .....             | 95 |
|                                   |           | 参考文献 .....            | 95 |

### 第三章 工程细胞生物学基础

|                                |            |                                         |            |
|--------------------------------|------------|-----------------------------------------|------------|
| <b>3.1 细胞的基本概念 .....</b>       | <b>97</b>  | 3.4.4 核苷酸代谢 .....                       | 182        |
| 3.1.1 细胞是认识生命的一个重要层次<br>.....  | 97         | 小结 .....                                | 191        |
| 3.1.2 细胞生物学的研究进展 .....         | 103        | 思考题 .....                               | 192        |
| 小结 .....                       | 104        | 参考文献 .....                              | 192        |
| 思考题 .....                      | 105        | <b>3.5 细胞内膜系统与蛋白质合成分泌 .....</b>         | <b>192</b> |
| 参考文献 .....                     | 105        | 3.5.1 内质网 .....                         | 192        |
| <b>3.2 细胞核与遗传信息传递 .....</b>    | <b>106</b> | 3.5.2 高尔基复合体 .....                      | 198        |
| 3.2.1 细胞核的结构与组成 .....          | 106        | 3.5.3 溶酶体 .....                         | 202        |
| 3.2.2 染色质与染色体 .....            | 110        | 3.5.4 过氧化物酶体 .....                      | 205        |
| 3.2.3 核仁的结构和功能 .....           | 114        | 3.5.5 蛋白质的分选与细胞结构的装<br>配 .....          | 207        |
| 3.2.4 遗传信息的复制 .....            | 115        | 小结 .....                                | 211        |
| 3.2.5 基因的转录与转录后加工 .....        | 117        | 思考题 .....                               | 211        |
| 3.2.6 遗传信息的翻译及加工 .....         | 120        | 参考文献 .....                              | 212        |
| 3.2.7 基因表达调控 .....             | 123        | <b>3.6 细胞膜与细胞间或细胞基质间相互作<br/>用 .....</b> | <b>212</b> |
| 小结 .....                       | 126        | 3.6.1 质膜的化学组成 .....                     | 212        |
| 思考题 .....                      | 127        | 3.6.2 质膜的结构 .....                       | 216        |
| 参考文献 .....                     | 127        | 3.6.3 质膜的流动镶嵌模型 .....                   | 216        |
| <b>3.3 核糖体与蛋白质的生物合成 .....</b>  | <b>127</b> | 3.6.4 细胞表面的分化 .....                     | 218        |
| 3.3.1 蛋白质生物合成体系 .....          | 128        | 3.6.5 细胞外基质 .....                       | 220        |
| 3.3.2 蛋白质生物合成过程 .....          | 132        | 3.6.6 跨膜运输 .....                        | 226        |
| 3.3.3 蛋白质合成后的分泌及加工修<br>饰 ..... | 139        | 3.6.7 细胞连接 .....                        | 237        |
| 小结 .....                       | 142        | 3.6.8 细胞通信 .....                        | 241        |
| 思考题 .....                      | 143        | 小结 .....                                | 255        |
| 参考文献 .....                     | 143        | 思考题 .....                               | 255        |
| <b>3.4 细胞物质的代谢 .....</b>       | <b>143</b> | 参考文献 .....                              | 255        |
| 3.4.1 糖代谢 .....                | 144        | <b>3.7 线粒体与能量代谢 .....</b>               | <b>256</b> |
| 3.4.2 脂类代谢 .....               | 151        | 3.7.1 线粒体的形态、数量和分布 .....                | 256        |
| 3.4.3 氨基酸代谢 .....              | 167        | 3.7.2 线粒体的结构 .....                      | 257        |

|                                  |     |                                |     |
|----------------------------------|-----|--------------------------------|-----|
| 3.7.3 线粒体的化学组成和酶的定位 .....        | 259 | 思考题 .....                      | 303 |
| 3.7.4 线粒体的功能 .....               | 260 | 参考文献 .....                     | 303 |
| 3.7.5 线粒体的半自主性 .....             | 268 | <b>3.10 细胞周期及其调控</b> .....     | 304 |
| 3.7.6 核编码蛋白质的线粒体转运 .....         | 271 | 3.10.1 细胞周期的概念 .....           | 304 |
| 3.7.7 线粒体的起源与发生 .....            | 274 | 3.10.2 细胞周期的时相 .....           | 306 |
| 小结 .....                         | 276 | 3.10.3 细胞分裂 .....              | 307 |
| 思考题 .....                        | 277 | 3.10.4 细胞周期的调控 .....           | 315 |
| 参考文献 .....                       | 277 | 小结 .....                       | 328 |
| <b>3.8 细胞骨架与细胞迁徙、伸展和运动</b> ..... | 277 | 思考题 .....                      | 329 |
| 3.8.1 细胞骨架的概念 .....              | 278 | 参考文献 .....                     | 329 |
| 3.8.2 细胞质骨架 .....                | 279 | <b>3.11 细胞分化与基因表达调控</b> .....  | 330 |
| 3.8.3 细胞核骨架 .....                | 281 | 3.11.1 细胞分化的基本概念 .....         | 330 |
| 3.8.4 细胞膜骨架与细胞外基质的关系 .....       | 282 | 3.11.2 细胞分化的分子基础 .....         | 331 |
| 3.8.5 细胞骨架及其相关蛋白 .....           | 284 | 3.11.3 影响细胞分化的因素 .....         | 332 |
| 3.8.6 细胞骨架与信号转导 .....            | 285 | 3.11.4 细胞分化基因表达的调控过程 .....     | 333 |
| 3.8.7 细胞骨架与细胞迁移运动 .....          | 287 | 3.11.5 细胞分化与细胞外基质的关系 .....     | 334 |
| 3.8.8 细胞骨架间的相互作用 .....           | 288 | 3.11.6 异常分化与肿瘤发生 .....         | 335 |
| 3.8.9 细胞骨架与疾病 .....              | 289 | 小结 .....                       | 340 |
| 小结 .....                         | 289 | 思考题 .....                      | 340 |
| 思考题 .....                        | 290 | 参考文献 .....                     | 340 |
| 参考文献 .....                       | 290 | <b>3.12 细胞衰老与凋亡</b> .....      | 341 |
| <b>3.9 蛋白酶体与细胞内蛋白质降解</b> .....   | 290 | 3.12.1 细胞衰老(aging)的定义与特征 ..... | 341 |
| 3.9.1 蛋白酶体的结构 .....              | 291 | 3.12.2 细胞衰老发生的机制 .....         | 342 |
| 3.9.2 泛素-蛋白酶体系统 .....            | 292 | 3.12.3 细胞凋亡及其主要特征 .....        | 344 |
| 3.9.3 蛋白酶体的功能 .....              | 293 | 3.12.4 细胞凋亡的分子机制 .....         | 345 |
| 3.9.4 细胞内两条蛋白质降解途径之间的关系 .....    | 298 | 3.12.5 其他细胞死亡形式 .....          | 348 |
| 3.9.5 蛋白酶体与疾病 .....              | 301 | 小结 .....                       | 356 |
| 3.9.6 蛋白酶体抑制剂 .....              | 302 | 思考题 .....                      | 357 |
| 小结 .....                         | 303 | 参考文献 .....                     | 357 |

## 第四章 工程细胞生物学

|                             |     |                           |     |
|-----------------------------|-----|---------------------------|-----|
| <b>4.1 工程细胞的概念和分类</b> ..... | 359 | 思考题 .....                 | 368 |
| 4.1.1 工程细胞的概念 .....         | 359 | 参考文献 .....                | 368 |
| 4.1.2 工程细胞的分类 .....         | 359 | <b>4.2 动物工程细胞基础</b> ..... | 368 |
| 小结 .....                    | 368 | 4.2.1 动物工程细胞培养基础 .....    | 368 |

|                              |     |                                      |     |
|------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|
| 4.2.2 培养液和培养环境 .....         | 373 | 参考文献 .....                           | 485 |
| 4.2.3 动物细胞培养液和添加剂 ...        | 378 | <b>4.6 工程细胞库与质量控制</b> .....          | 487 |
| 4.2.4 无血清无蛋白培养 .....         | 380 | 4.6.1 三级细胞库 .....                    | 487 |
| 4.2.5 培养环境与细胞发酵 .....        | 383 | 4.6.2 工程细胞库的建立 .....                 | 487 |
| 4.2.6 细胞培养的载体 .....          | 388 | 4.6.3 工程细胞库细胞系(株)历史<br>资料 .....      | 489 |
| 4.2.7 生物反应器 .....            | 390 | 4.6.4 细胞库质量控制 .....                  | 491 |
| 4.2.8 胚胎细胞工程基础 .....         | 398 | 4.6.5 工程细胞维持与培养方法 ...                | 497 |
| 4.2.9 染色体工程基础 .....          | 412 | 4.6.6 建库细胞的管理 .....                  | 500 |
| 小结 .....                     | 425 | 小结 .....                             | 501 |
| 思考题 .....                    | 426 | 思考题 .....                            | 501 |
| 参考文献 .....                   | 426 | 参考文献 .....                           | 501 |
| <b>4.3 植物工程细胞基础</b> .....    | 426 | 附录一:细胞库细胞资料样表 .....                  | 502 |
| 4.3.1 植物细胞工程基本概念 .....       | 427 | 附录二:细胞污染检测——细菌与霉菌<br>.....           | 503 |
| 4.3.2 植物细胞与组织培养 .....        | 427 | 附录三:支原体检测方法——DNA 荧<br>光染色法 .....     | 504 |
| 4.3.3 植物原生质体培养 .....         | 430 | <b>4.7 工程细胞的增殖及代谢特征</b> .....        | 506 |
| 4.3.4 植物细胞融合工程 .....         | 432 | 4.7.1 工程细胞的生长增殖与细胞<br>凋亡 .....       | 506 |
| 4.3.5 植物染色体工程 .....          | 433 | 4.7.2 工程细胞营养代谢特征 .....               | 526 |
| 4.3.6 植物细胞质工程 .....          | 434 | 4.7.3 工程细胞产物合成特征 .....               | 541 |
| 4.3.7 转基因植物 .....            | 436 | 小结 .....                             | 544 |
| 4.3.8 植物细胞工程的应用 .....        | 441 | 思考题 .....                            | 545 |
| 小结 .....                     | 444 | 参考文献 .....                           | 545 |
| 思考题 .....                    | 444 | <b>4.8 工程细胞高密度培养工艺与目标产品</b><br>..... | 547 |
| 参考文献 .....                   | 445 | 4.8.1 工程细胞培养方式 .....                 | 547 |
| <b>4.4 工程细胞的构建及改良</b> .....  | 445 | 4.8.2 工程细胞培养基 .....                  | 551 |
| 4.4.1 细胞融合技术 .....           | 446 | 4.8.3 工程细胞代谢与控制 .....                | 563 |
| 4.4.2 杂交瘤细胞的制备 .....         | 448 | 4.8.4 工程细胞培养工艺——流加<br>培养 .....       | 566 |
| 小结 .....                     | 454 | 4.8.5 工程细胞高密度培养工艺优化<br>.....         | 576 |
| 思考题 .....                    | 454 | 4.8.6 工程细胞培养过程的监测与<br>控制 .....       | 584 |
| 参考文献 .....                   | 454 | 4.8.7 过程控制的基本类型 .....                | 585 |
| <b>4.5 高效表达载体构建</b> .....    | 455 | 4.8.8 细胞环境在线检测的应用 ...                | 592 |
| 4.5.1 典型真核表达载体 .....         | 455 | 小结 .....                             | 593 |
| 4.5.2 影响载体表达的控制元件 ...        | 456 | 思考题 .....                            | 593 |
| 4.5.3 提高真核载体表达水平的策略<br>..... | 458 | 参考文献 .....                           | 594 |
| 4.5.4 利用定点整合提高抗体的表达<br>..... | 459 |                                      |     |
| 4.5.5 工程细胞研究应用现状 .....       | 466 |                                      |     |
| 4.5.6 工程细胞的稳定性 .....         | 479 |                                      |     |
| 小结 .....                     | 484 |                                      |     |
| 思考题 .....                    | 485 |                                      |     |

|                                 |     |                                    |     |
|---------------------------------|-----|------------------------------------|-----|
| <b>4.9 工程细胞表达产品的分离纯化</b> .....  | 594 | <b>4.12 基于工程细胞的研究及应用</b> .....     | 672 |
| 4.9.1 工程细胞表达产品回收与纯化 .....       | 594 | 4.12.1 工程细胞的实验室研究及应用 .....         | 672 |
| 小结 .....                        | 627 | 4.12.2 细胞黏附,细胞分泌,物质运输等分子机制研究 ..... | 672 |
| 思考题 .....                       | 627 | 4.12.3 细胞-细胞共培养体系的建立 .....         | 682 |
| 参考文献 .....                      | 627 | 4.12.4 细胞-细胞外基质的模型系统 .....         | 683 |
| <b>4.10 工程细胞表达产品的质量控制</b> ..... | 628 | 4.12.5 基质金属蛋白酶与细胞外基质重建 .....       | 685 |
| 4.10.1 工程细胞表达产品的物化指标测定 .....    | 629 | 4.12.6 绿色荧光蛋白转染表达 .....            | 686 |
| 4.10.2 目标产品的生物学活性测定 .....       | 641 | 4.12.7 药物筛选 .....                  | 689 |
| 4.10.3 目标产品的安全性评价 .....         | 644 | 小结 .....                           | 693 |
| 4.10.4 目标产品的稳定性 .....           | 646 | 思考题 .....                          | 693 |
| 小结 .....                        | 646 | 参考文献 .....                         | 693 |
| 思考题 .....                       | 646 | <b>4.13 工程细胞工业化放大及应用</b> .....     | 694 |
| 参考文献 .....                      | 646 | 4.13.1 工程细胞表达重组蛋白药物及其应用 .....      | 694 |
| <b>4.11 干细胞工程</b> .....         | 647 | 4.13.2 工程细胞表达疫苗及其应用 .....          | 701 |
| 4.11.1 干细胞概念与分类 .....           | 647 | 4.13.3 工程细胞表达抗体及其应用 .....          | 703 |
| 4.11.2 胚胎干细胞建系与定向分化 .....       | 648 | 4.13.4 工程细胞的发展前景 .....             | 709 |
| 4.11.3 成体干细胞建系与定向分化 .....       | 655 | 小结 .....                           | 711 |
| 4.11.4 肿瘤干细胞 .....              | 660 | 思考题 .....                          | 711 |
| 4.11.5 干细胞的研究与应用 .....          | 667 | 参考文献 .....                         | 712 |
| 小结 .....                        | 670 |                                    |     |
| 思考题 .....                       | 670 |                                    |     |
| 参考文献 .....                      | 670 |                                    |     |
| <b>附录一 汉英名词对照</b> .....         | 713 |                                    |     |
| <b>附录二 英汉名词对照</b> .....         | 730 |                                    |     |

# 第一章 绪 论

## 1.1 工程细胞生物学的基本概念

工程细胞生物学是细胞生物学的重要分支学科,是细胞生物学和细胞工程学的新兴交叉边缘学科。工程细胞生物学的研究内容不仅涉及细胞生物学的基本内容,如细胞的生长分化、增殖调控、运输分泌、信号转导和衰老凋亡等基本生命现象;同时又涵盖细胞工程相关内容,如工程细胞的改造及筛选、高密度培养条件及优化、培养体系微环境中的代谢变化及调节等。

### 1.1.1 细胞工程和工程细胞的基本概念和分类

#### 1.1.1.1 细胞工程的概念和研究范畴

细胞是包含了全部生命信息和体现生命所有基本特点的独立生命单位,对细胞结构和活动的研究是一切生命科学的重要基础。20世纪70年代末至80年代初,随着细胞生物学和分子生物学突飞猛进的发展,人类已经可以在探索细胞生命活动规律的基础上,在细胞和基因的水平上干预和改造生物的遗传性状,从而依照人类的意愿,设计出新的生物基因蓝图,然后据此制造出新的生命体。正如德国著名哲学家尤根·米特斯特拉斯所指出的:“我们的科学知识正在把我们逐渐推到一种不仅能够知道我们的(生物)本质,而且还能加以改变的位置上。”细胞工程就是这样一门新型学科。

细胞工程,是指应用现代细胞生物学、分子生物学、遗传和发育生物学等理论与方法,通过类似工程学的步骤,在细胞整体水平和细胞器水平上进行遗传操作,重组细胞的结构和内含物,按照人们的意愿改变生物的结构和功能,即通过细胞融合、核质移植、染色体或基因移植以及组织、细胞培养等方法,快速繁殖和培养出人们所需要的新物种、新产品的生物工程技术。通俗地讲,细胞工程是在细胞水平上做手术,也称细胞操作技术。例如,细胞融合技术避免了分离、提纯、剪切、拼接等基因操作,只需将细胞遗传物质直接转移到受体细胞中,就能形成杂交细胞,因而能提高基因转移效率。

目前细胞工程的主要研究领域包括:①动、植物细胞和组织培养;②细胞融合育种与单克隆抗体;③细胞核移植与克隆;④染色体工程育种;⑤发育基因调控与人体器官培养技术等。细胞工程涉及的技术领域是对细胞不同结构层次的改造,包括细胞整体层次,如细胞培养、细胞融合等;细胞器层次,如核移植、细胞拆合、染色体倍性或组成改变等;分子层次,如基因操作技术等。随着基因工程技术、基因转移技术和干细胞工程技术的发展,细胞工程在理论和应用两方面获得了快速发展。

根据细胞类型的不同,细胞工程具体分为动物细胞工程、植物细胞工程和微生物细胞工程。首先,动物细胞与植物细胞相比,在遗传和生理特性等方面都有很大的不同:①动物细胞没有叶绿体和细胞壁,其物质与能量代谢途径与植物细胞不同;②高等动物的细胞在动物体内生长时,既相互依赖又相互制约,在神经及体液调节下形成了一种非常复杂的内环境,动物细胞在体内受整体调节制约的程度和复杂度,都是植物细胞不能相比的;③动物细胞分化的程度和类别也

比植物细胞更高、更复杂,脱分化非常困难;④与植物细胞不同,动物细胞除卵细胞外,都只有遗传上的全能性而没有细胞上的全能性;⑤在体外培养时,除癌细胞和血细胞外,正常的动物细胞都有贴附于支持物生长的特性,并且发生接触抑制,而停止分裂和增殖;⑥所有高等动物细胞都是有寿限的,细胞分裂最多不能超过 50 代次分化,而植物细胞没有寿限。随着细胞生物学、分子生物学和细胞遗传学研究的日益深入及相关技术的长足发展,动物细胞工程得到了迅速发展,并且在医学研究和实践中应用日益广泛。当今,动物细胞工程对提高人类的生活质量和健康水平,发挥着越来越重要的作用。

微生物作为可以独立存在的个体,其生长代谢的特点与植物、动物有着显著的区别,可由其自身完成其基本功能。微生物细胞工程以微生物细胞为研究对象,利用微生物发酵作用,通过现代工程技术手段来生产有用物质,或者把微生物直接应用于生物反应器技术。此外,对微生物细胞的改造也属于微生物细胞工程的研究内容,在遗传育种、微生物发酵、环境保护和农药生产工业上具有重要意义。其应用从人们日常饮用的酒、乳酸、调味的醋、酱油,到抗生素、激素、疫苗等,无一不是微生物发酵的产物;在农业和环境保护方面,用于土壤改良,减少土壤里的残毒,增加土壤肥力和制造对人无毒副作用的微生物农药、微生物肥料和微生物饲料;在农药生产方面,利用细菌、病毒、真菌等病原微生物防治作物的病虫害本身就是一种无污染的新兴生物农药。

### 1.1.1.2 细胞工程的主要研究内容

细胞工程依遗传操作的不同,可分为细胞融合工程、基因工程、细胞拆合工程、染色体及染色体组工程;依培养技术的不同,可分为大规模细胞培养技术和干细胞工程。

#### 1) 细胞融合工程

细胞融合(cell fusion)又称细胞杂交(cell hybridization)。它是指在自然条件下或用人工方法(生物的、物理的、化学的),使两种或两种以上的体细胞合并形成一个细胞,这是一种不经有性生殖过程而得到杂种细胞的方法。在多细胞生物中,它是一种基本的发育与生理活动。

自发的动物细胞融合概率很低,1962 年日本学者冈田善雄发现灭活的仙台病毒可诱导小鼠艾氏腹水癌细胞彼此融合。20 世纪 60 年代后期,研究人员发明了只让杂种细胞存活并传代的技术,该技术使未发生融合的亲本细胞及非两亲本融合的细胞在传代过程中被淘汰。1975 年, Milstein 和 Kohler 将小鼠骨髓瘤细胞与羊红细胞免疫过的小鼠淋巴细胞融合,形成杂种细胞,能分泌抗羊红细胞抗体,用于制备单克隆抗体。细胞融合可实现任意细胞间的融合而不受亲缘关系的限制,这就拓宽了遗传变异的范围。细胞融合技术具有巨大的应用潜力,如医学上的单克隆抗体的生产和植物界新物种的培育等。尽管细胞融合的重要性如此之大,但细胞的融合过程是如何在基因控制下发生和发展的,人们一直没有搞清楚。

#### 2) 基因工程

基因工程即重组 DNA 技术,是从基因水平改造生物遗传组成,进而改变细胞的表型,所以将其纳入细胞工程的范畴。它是一种按照人类的意愿,定向改变生物遗传性状的技术工程,即采用类似工程设计的方法,按照预先设计将不同来源的目的基因在体外切割、拼接和重新组合,形成重组基因,然后通过运载体导入宿主细胞,使其在宿主细胞内复制和表达以获得新生物产品、改变生物原有的遗传特性或创造出具有新遗传性状的生物新品种。

### 3) 染色体工程和染色体组工程

染色体工程是按照预先的设计,添加、消除或替代同种或异种染色体的全部或一部分,从而达到定向改变生物遗传性状或选育新品种的目的。它是从染色体水平改变细胞遗传组成的细胞工程技术,主要分为动物染色体工程和植物染色体工程两种。动物染色体工程主要采用对细胞进行显微操作的方法来达到转移基因的目的;而植物染色体工程目前主要是利用传统的杂交、回交等方法来达到改变染色体的目的。染色体工程目前主要应用于植物遗传育种领域。

染色体组工程是在人为设计的技术路线下添加、消除同种或异种染色体组以达到定向改变生物遗传性状的目的。

### 4) 细胞拆合工程

细胞拆合工程又称细胞质工程,研究真核细胞的核、质相互关系,以及细胞器,细胞胞质基因的转移等细胞拆合的技术。该技术主要研究内容是进行细胞组分的分离和融合,研究细胞质和细胞器的添加和替代。具体操作方法是物理或化学方法将细胞质与细胞核分开,再进行不同细胞间核质的重新组合,重建成新细胞。常用的技术就是细胞核移植、胞质体(去核细胞)与完整细胞的融合、细胞器导入完整细胞及大分子直接导入细胞等。其目的是创造出细胞质与细胞核的杂种细胞,这种杂种细胞便有可能出现遗传的变异,出现胞质遗传与胞核遗传的重新组合。细胞拆合最成功的例子是克隆羊“多莉”的诞生。它是通过无性繁殖制备与母体在遗传上一致的克隆动物,即将其母体体细胞的核与去核卵子的细胞质人工重组,借助于卵子的发育能力,制造成的高等动物克隆。

### 5) 干细胞工程

干细胞工程是在细胞培养技术的基础上发展起来的一项新的细胞工程。它是利用干细胞的增殖特性、多分化潜能及其增殖分化的高度有序性,通过体外培养干细胞、诱导干细胞定向分化或利用转基因技术处理干细胞改变其特性的方法,以达到利用干细胞为人类服务的目的。

其主要研究内容,一方面,胚胎干细胞的研究,如建立胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)系,并利用 ES 细胞的发育多能性即环境因素对细胞分化发育的影响,定向诱导细胞分化为特定的细胞,如肌细胞、神经细胞等,作为细胞移植的新来源。另一方面,成体干细胞的研究主要包括:成体组织干细胞的分离培养和植入体内,更新机体病变的组织器官恢复正常功能;成体组织干细胞作为基因治疗的靶细胞;研究体内有效激活成体组织干细胞的方法,增强其功能。

### 6) 大规模细胞培养技术

大规模细胞培养技术是细胞工程中重要的组成部分,是在人工条件下高密度大规模培养动、植物细胞,用来生产生物技术产品的技术。如今这一技术已广泛应用于现代生物制药的研究和生产中。它的应用大大减少了用于疾病预防、治疗和诊断的实验动物,为生产疫苗、细胞因子、生物产品乃至人造组织等产品提供了强有力的工具。

根据细胞的生长特性,可分为贴壁细胞和悬浮细胞。就其培养方法而言可概括为悬浮培养和固定化培养。就操作方式而言,可分为分批式、补料-分批或流加式、半连续式、连续灌流式 4 种操作方式。大规模培养技术的建立,使各种生物制品,如单抗、红细胞生成素、疫苗和病毒杀

虫剂等的生产得到了很大的发展。

### 1.1.1.3 工程细胞的概念和分类

经典意义上,工程细胞即基因工程细胞,是经过改造并被转入了基因的细胞。具体地讲,是指采用基因工程技术或细胞融合技术对宿主细胞的遗传物质进行修饰改造或重组,获得具有稳定遗传的独特性状的细胞系。通过改造的工程细胞获得或提高了重组蛋白类药物表达的产量和质量。从细胞工程这个大的概念上讲,凡是由细胞工程技术包括细胞融合工程、基因工程、细胞拆合工程和染色体工程构建的细胞,或用于细胞工程培养技术如干细胞工程、大规模培养技术的细胞均属于工程细胞的概念范畴。在本书中,工程细胞主要指后者,即用于大规模培养技术制备生物技术药物的动物细胞。

工程细胞依据组织器官来源包括原核细胞、动物细胞、植物细胞、酵母细胞、昆虫细胞和干细胞等;依据构建方法和应用分为基因工程细胞、组织工程细胞等;依据生长方式可分为贴壁细胞和悬浮细胞;依据生存期分为有限细胞系和永生化细胞系。

尽管近年来工程细胞的构建取得了重大进展,但目前工程细胞的构建都沿袭经验的方法。例如,在工业生物制药领域普遍采用的工程细胞系构建策略仍然需要费时费力的克隆筛选,常常耗时几个月。更为主要的是,没有可靠的预测或模拟克隆株在大规模生物反应器条件下细胞生长特性和产物分泌能力的办法,致使筛选的克隆株在大规模生产条件下难以再现小规模实验条件下相同的细胞生长和产物分泌能力。因而,这些策略都存在很大程度的可变性和不稳定性。究其根本原因在于,缺乏对哺乳动物细胞培养过程变化最本质的理解,缺乏对细胞遗传学机制的理解,缺乏对工程细胞的生物学和生理学行为的理解,特别是缺乏对如何获得能够分泌高产率、高质量蛋白质的工程细胞的细胞与分子生物学机制的理解。

分泌抗体或重组蛋白的工程细胞不同于自然来源的体内细胞,含有有意识的人为的改造,因而其表型及其应用均具有定向性和目的性。另外,工程细胞的获得也是有一定的选择性的。其筛选条件是多种多样的,除了细胞本身的改造以适应细胞的高密度、高产率培养外,还包括培养条件、培养规模、生产和市场需求等。因此随着细胞工程的不断发展,工程细胞的基础和应用研究也不断扩展和深入。因而,对工程细胞生物学行为研究的需求也日益迫切。

## 1.1.2 工程细胞生物学的概念、内涵和研究范畴

### 1.1.2.1 工程细胞生物学的概念和内涵

工程细胞生物学以细胞生物学的理论和技术体系为基础,以细胞工程学中的工程细胞为对象,在分子、细胞等不同层面上,揭示工程细胞的各种生命活动规律,以期按照人们的意图对工程细胞的遗传物质、细胞组分及遗传表型进行重组改造,从而获得有重要应用价值的新型工程细胞表达产物(产品)。可以说,工程细胞生物学是细胞生物学的应用和拓展,同时又为细胞工程学的发展提供重要的理论和技术支撑。目前,工程细胞生物学这一领域所涉及的研究内容已成为国外细胞工程及生物制药尤其是抗体制药领域的重要发展方向和趋势。

### 1.1.2.2 工程细胞生物学研究范畴

工程细胞生物学主要对于工程细胞在体外长期培养条件下的生物学行为的适应与调控机制进行研究。

(1) 研究工程细胞在体外规模化培养条件下的细胞生长代谢等分子细胞生物学行为的改变

及其调节机制,包括:工程细胞的永生化,工程细胞的葡萄糖转运及代谢、脂代谢及其调节,细胞的氨基酸代谢调节与细胞生长凋亡的关系,无血清培养条件下的细胞体积变大、液泡出现等适应性改变、细胞抵抗“失巢”而黏附聚集成团,以及细胞高密度生长代谢的营养需求等规模化培养中的关键问题。阐明这些现象本质与分子机制,为工程细胞的规模化培养提供全面性、系统性、新颖性和可操作性的理论指导。

(2) 研究工程细胞在体外规模化培养条件下的蛋白质合成分泌生物学行为的改变及其调控机制。体外培养条件下的工程细胞其重组蛋白、抗体等合成分泌的生物学行为不同于自然来源的体内 B 淋巴细胞等,有其特殊性,如体外长期培养和高产率分泌常常导致产物发生质与量的改变,尤其是在进行生物反应器培养时,各种理化参数,如搅拌通气、工艺放大,以及不同培养批次间细胞培养环境及生物反应器操作条件的改变可对抗体的分泌量、分泌抗体的质量均产生重要的影响。阐明这些现象本质与分子机制,为提高工程细胞抗体分泌量及产率提供重要的理论指导。

## 1.2 工程细胞学与细胞生物学的联系和发展

由于工程细胞生物学是细胞生物学的重要分支学科,是细胞生物学和细胞工程学的新兴交叉边缘学科,因而,细胞生物学和细胞工程学的历史发展即生动展现了工程细胞生物学的历史发展。在其各自的历史发展中,二者交互影响,相互推动,最终形成了一门新兴学科——工程细胞生物学。

### 1.2.1 细胞生物学的历史发展

从研究内容来看细胞生物学的发展可分为 3 个层次,即显微水平、超微水平和分子水平。从时间纵轴来看细胞生物学的历史大致可以划分为 4 个主要的阶段。

第一阶段:细胞的发现及细胞学说的创立。从 16 世纪后期到 19 世纪 30 年代,是细胞发现和细胞知识的积累阶段。通过对大量动、植物的观察,人们逐渐意识到不同的生物都是由形形色色的细胞构成的。

第二阶段:实验细胞学(experimental cytology)时期。从 19 世纪 30 年代到 20 世纪初期,细胞学说形成后,开辟了一个新的研究领域,在显微水平研究细胞的结构与功能是这一时期的主要特点。形态学、胚胎学和染色体知识的积累,使人们认识了细胞在生命活动中的重要作用。细胞学的发展主要是采用实验的手段研究细胞学的问题,其特点是从形态结构的观察深入到生理功能、生物化学、遗传发育机理的研究。由于实验研究不断同相邻学科结合、相互渗透,导致了一些重要分支学科的建立和发展:细胞遗传学(cytogenetics)、细胞生理学(cytophysiology)、细胞化学(cytochemistry)。1893 年 Hertwig 的专著《细胞与组织》(*Die Zelle und die Gewebe*)出版,标志着细胞学的诞生。其后 1896 年哥伦比亚大学 Wilson 编著的《发育与遗传学中的细胞》(*The Cell in Development and Heredity*)、1920 年墨尔本大学 Agar 编著的《细胞学》(*Cytology*)都是这一领域最早的教科书。

第三阶段:细胞生物学的诞生。20 世纪 30~70 年代,电子显微镜技术出现后,把细胞学带入了第三个发展时期,这短短 40 年间不仅发现了细胞的各类超微结构,而且也认识了细胞膜、线粒体、叶绿体等不同结构的功能,使细胞学发展为细胞生物学。Robertis 等 1924 年出版的《普通细胞学》(*General Cytology*)在 1965 年第四版的时候定名为《细胞生物学》(*Cell Biology*),这

是最早的细胞生物学教材之一。

第四阶段:分子细胞生物学时期。从20世纪70年代基因重组技术的出现到当前,细胞生物学与分子生物学的结合越来越紧密,研究细胞的分子结构及其在生命活动中的作用成为主要任务,基因调控、信号转导、肿瘤生物学、细胞分化和凋亡是当代分子细胞生物学的研究热点。

### 1.2.1.1 显微镜的发明与细胞的发现

没有显微镜就不可能有细胞学诞生。

(1) 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。

(2) 1665年,英国人 Hook 首次描述了植物细胞(木栓),命名 cella。

(3) 1680年,荷兰人 Leeuwenhoek 当选为英国皇家学会会员,他一生中制作了200多台显微镜和400多个镜头,用设计较好的显微镜观察了许多动植物的活细胞与原生动物。

(4) 1752年,英国人 Dollond 发明消色差显微镜。

(5) 1812年,苏格兰人 Brewster 发明油浸物镜,改进了体视显微镜。

(6) 1886年,德国人 Abbe 发明复消色差显微镜,并改进了油浸物镜,至此普通光学显微镜技术基本成熟。

(7) 1932年,荷兰籍德国人 Zernike 成功设计了相差显微镜(phase contrast microscope),并因此获1953年度诺贝尔物理学奖。

(8) 1932年,德国人 Knoll 和 Ruska 发明电子显微镜,1940年,美国、德国制造出分辨力为0.2nm的商品电子显微镜。

(9) 1981年,瑞士人 Binnig 和 Rohrer 在 IBM 苏黎世实验中心(Zurich Research Center)发明了扫描隧道显微镜而与电子显微镜发明者 Ruska 同获1986年度的诺贝尔物理学奖。

### 1.2.1.2 细胞学说

(1) 1809年,法国人 Lamarck 提出:“一切生物体都是由细胞构成的。只有具有细胞的机体,才有生命。”

(2) 1802年,法国植物学家 Brisseau Milbel 指出:“植物的每一部分都有细胞存在。”

(3) 1824年,法国生理学家 Dutrochet 进一步描述了细胞的原理。

(4) 1838年,德国植物学教授 Schleiden 发表“植物发生论”,认为无论怎样复杂的植物都由形形色色的细胞构成。

(5) 1838年,德国解剖学教授 Schwann 通过研究 Schleiden 的细胞形成学说,提出了“细胞学说”(cell theory)这个术语;并于1939年发表了“关于动植物结构和生长一致性的显微研究”。Schwann 提出:有机体是由细胞构成的;细胞是构成有机体的基本单位。

(6) 1855年,德国人 Virchow 提出“一切细胞来源于细胞”的著名论断,进一步完善了细胞学说。把细胞作为生命的一般单位,以及作为动、植物界生命现象的共同基础的这种概念立即得到了普遍接受。

### 1.2.1.3 细胞学的发展

(1) 1839年,捷克人 Pukinye 用 protoplasm 这一术语描述细胞物质,“Protoplast”为神学用语,指人类始祖亚当。

(2) 1879年,德国人 Flemming 观察了蝶螈细胞的有丝分裂,于1882年提出了 mitosis 这一