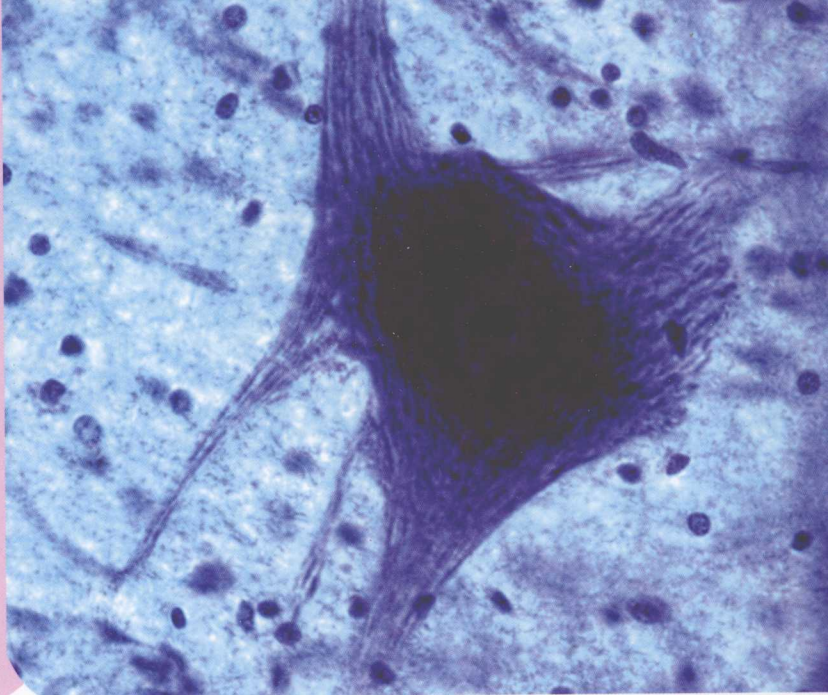




全国高职高专生物类课程
“十二五”规划教材

教育部高等学校高职高专生物技术
类专业教学指导委员会推荐教材



工作过程导向

动物细胞培养**技术**

DONGWU XIBAO
PEIYANG JISHU



NLIC2970819164

● 王永芬 杨爽 主编



华中科技大学出版社
<http://www.hustp.com>

要 容 内

动物细胞培养技术

主 编 王永芬 杨 爽

副主编 赵绪永 谢亚利 田 锦

主 审 边传周(郑州牧业工程高等专科学校)

编 委 (按姓氏笔画排序)

马 辉(郑州牧业工程高等专科学校)

王永芬(郑州牧业工程高等专科学校)

田 锦(北京农业职业学院)

李华玮(郑州牧业工程高等专科学校)

杨 爽(黑龙江生物科技职业学院)

郑 鸣(郑州牧业工程高等专科学校)

赵绪永(郑州牧业工程高等专科学校)

陶海静(郑州牧业工程高等专科学校)

谢亚利(新疆轻工职业技术学院)



NLIC2970819164

华中科技大学出版社

中国·武汉

内 容 提 要

本教材根据高职学生的特点与动物细胞培养技术相关职业岗位的任职要求,以学生综合职业能力培养为核心编写而成,分为基础篇、应用篇、实践技能操作篇三个模块,每个模块下设若干工作项目,工作项目由若干工作任务组成,工作任务后设有思考题和知识拓展栏目。本教材重点讲解了动物细胞培养前的准备工作、原代培养与传代培养操作技术和细胞冷冻保存与复苏技术等基本技能;以病毒的细胞培养、单克隆抗体的制备为载体,详细介绍了动物细胞培养技术在实践中的关键应用;以操作流程为主线,以团队互动、多元化评价的教学组织为特色,设计了十二个实践项目。教材编写力求通俗易懂、图文并茂,可读性强、实用性强;适于高职院校生物类专业、医药类专业以及相关专业的教学使用,同时也可作为生物技术类企业员工培训或其他相关技术人员的学习参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

动物细胞培养技术/王永芬 杨 爽 主编. —武汉:华中科技大学出版社,2012.7
ISBN 978-7-5609-8072-0

I. 动… II. ①王… ②杨… III. 动物-细胞培养-高等职业教育-教材 IV. Q954.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 112198 号

动物细胞培养技术

王永芬 杨 爽 主编

策划编辑:王新华

责任编辑:王新华

封面设计:刘 卉

责任校对:何 欢

责任监印:周治超

出版发行:华中科技大学出版社(中国·武汉)

武昌喻家山 邮编:430074 电话:(027)81321915

录 排:华中科技大学惠友文印中心

印 刷:武汉宏隆印务有限公司

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:14

字 数:336 千字

版 次:2012 年 7 月第 1 版第 1 次印刷

定 价:29.80 元



华中出版

本书若有印装质量问题,请向出版社营销中心调换

全国免费服务热线:400-6679-118 竭诚为您服务

版权所有 侵权必究

全国高职高专生物类课程“十二五”规划教材编委会

主任 闫丽霞

副主任 王德芝 翁鸿珍

编委 (按姓氏拼音排序)

陈 芬	陈红霞	陈丽霞	陈美霞	崔爱萍	杜护华	高荣华	高 爽	公维庶	郝涤非
何 敏	胡斌杰	胡莉娟	黄彦芳	霍志军	金 鹏	黎八保	李 慧	李永文	林向群
刘瑞芳	鲁国荣	马 辉	瞿宏杰	尚文艳	宋治萍	苏敬红	孙勇民	涂庆华	王锋尖
王 娟	王俊平	王永芬	王玉亭	许立奎	杨 捷	杨清香	杨玉红	杨玉珍	杨月华
俞启平	袁 仲	张虎成	张税丽	张新红	周光姣				

全国高职高专生物类课程“十二五”规划教材建设单位名单

(排名不分先后)

天津现代职业技术学院	山东畜牧兽医职业学院	汉中职业技术学院
信阳农业高等专科学校	山东职业学院	河北化工医药职业技术学院
包头轻工职业技术学院	阜阳职业技术学院	黑龙江农业经济职业学院
武汉职业技术学院	抚州职业技术学院	黑龙江生态工程职业学院
泉州医学高等专科学校	邵阳师范高等专科学校	湖北轻工职业技术学院
济宁职业技术学院	贵州轻工职业技术学院	湖南生物机电职业技术学院
潍坊职业学院	沈阳医学院	江苏农林职业技术学院
山西林业职业技术学院	郑州牧业工程高等专科学校	荆州职业技术学院
黑龙江生物科技职业学院	广东食品药品职业学院	辽宁卫生职业技术学院
威海职业学院	温州科技职业学院	聊城职业技术学院
辽宁经济职业技术学院	黑龙江农垦科技职业学院	内江职业技术学院
黑龙江林业职业技术学院	新疆轻工职业技术学院	内蒙古农业大学职业技术学院
江苏食品职业技术学院	鹤壁职业技术学院	南充职业技术学院
广东科贸职业学院	郑州师范学院	南通职业大学
开封大学	烟台工程职业技术学院	濮阳职业技术学院
杨凌职业技术学院	江苏建康职业学院	七台河制药厂
北京农业职业学院	商丘职业技术学院	青岛职业技术学院
黑龙江农业职业技术学院	北京电子科技职业学院	三门峡职业技术学院
襄阳职业技术学院	平顶山工业职业技术学院	山西运城农业职业技术学院
咸宁职业技术学院	亳州职业技术学院	上海农林职业技术学院
天津开发区职业技术学院	北京科技职业学院	沈阳药科大学高等职业技术学院
江苏联合职业技术学院淮安	沧州职业技术学院	四川工商职业技术学院
生物工程分院	长沙环境保护职业技术学院	渭南职业技术学院
保定职业技术学院	常州工程职业技术学院	武汉软件工程职业学院
云南林业职业技术学院	成都农业科技职业学院	咸阳职业技术学院
河南城建学院	大连职业技术学院	云南国防工业职业技术学院
许昌职业技术学院	福建生物工程职业技术学院	重庆三峡职业学院
宁夏工商职业技术学院	甘肃农业职业技术学院	
河北旅游职业学院	广东新安职业技术学院	

前言

动物细胞培养技术是一门实践性很强的学科,已经成为当今生命科学各研究领域的基础技术和基本技能,在整个生物技术产业发展中起着关键作用。目前我国各类高等院校中的生命科学类相关专业都纷纷开设了动物细胞培养技术这门课程。在华中科技大学出版社的大力支持下,我们按照教高[2006]16号文件精神要求,以工学结合为突破口,以动物细胞培养工作流程为导向,以学生综合职业能力的培养为本位,以实践性、职业性、应用性为特色,进行了《动物细胞培养技术》高职类教材的开发与建设。

本教材以动物细胞培养技术的“基本技能——实践应用——实操训练”为主线分为三个模块,每个模块下设若干工作项目,工作项目由若干工作任务组成,工作任务后设有思考题和知识拓展栏目。在基础模块和应用模块中,按照学生认知规律和动物细胞培养的基本流程,先介绍细胞培养前的准备工作、原代培养与传代培养操作技术及细胞冷冻保存与复苏技术;然后以病毒的细胞培养、单克隆抗体的制备为载体,介绍动物细胞培养技术在实践中的具体应用。在实践技能操作模块中,设置与生产实践相结合的项目背景,以操作流程为主线,以团队互动、多元化评价的教学组织为特色,激发学生的学习兴趣,提升学生的职业素养。

本教材的编写体现“以就业为导向、必需、够用”的原则,不仅关注到了高职学生特点与动物细胞培养技术相关职业岗位要求的有机结合,而且在语言上力求通俗易懂,言简意赅,在形式上讲究图文并茂,可读性强。本教材适于高职院校生物类专业、医药类专业以及相关专业的教学使用,同时也可作为生物技术类企业员工培训或其他相关技术人员的学习参考用书。

本教材的编写得到郑州后羿制药有限公司、洛阳普莱柯生物工程有限公司、郑州方欣生物科技有限责任公司等生物制品类企业专家们的悉心指导,得到了参编院校领导和老师的大力支持和帮助,国家级教学名师、生物技术及应用专业国家级教学团队带头人——郑州牧业工程高等专科学校边传周教授对全书进行了审



订,华中科技大学出版社的编辑们为本书的出版付出了艰辛的劳动,在此本书作者特向他们表示衷心的感谢!

由于动物细胞培养技术发展迅速,企业生产工艺更新快,编者深感知识浅薄,能力、水平有限。虽然经过多次讨论修改,但疏漏之处在所难免,敬请各位专家同仁批评指正,并欢迎广大读者提出宝贵意见。

编 者

2012年3月

目录

模块一 基础篇	1
项目一 认识动物细胞培养技术	1
任务1 动物细胞培养技术的内涵与应用	1
任务2 体外培养动物细胞的生物学特性	11
任务3 动物细胞培养工作的基本要求和工作的方法	23
项目二 动物细胞培养前的准备工作	26
任务1 认识动物细胞培养室	26
任务2 动物细胞培养用品的清洗、消毒和灭菌	43
任务3 动物细胞培养用液的配制	48
项目三 动物细胞培养的常规操作	68
任务1 动物细胞的原代培养	68
任务2 动物细胞的传代培养	79
任务3 培养细胞的常规检查和生物学检测	84
任务4 细胞污染的检测与排除	93
任务5 动物细胞的大规模培养	99
项目四 动物细胞冷冻保存、复苏及运输	113
任务1 动物细胞的冷冻保存	114
任务2 动物细胞的复苏	117
任务3 动物细胞的运输	119
模块二 应用篇	122
项目一 病毒的细胞培养	122
任务1 病毒的结构及生物学特性	122
任务2 细胞培养法用于病毒的分离和培养	127
任务3 病毒的鉴定技术	140
项目二 单克隆抗体生产技术	147
任务1 杂交瘤细胞的制备	148
任务2 杂交瘤细胞生产单克隆抗体	155



模块三 实践技能操作篇 162

项目一	动物细胞培养常用设备的使用.....	168
项目二	酸液的配制及酸缸的使用.....	169
项目三	实验器材的清洗、包装和消毒	172
项目四	培养用液与培养基的配制.....	175
项目五	鸡胚成纤维细胞的原代培养.....	177
项目六	小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养.....	179
项目七	培养细胞的死、活鉴别试验	182
项目八	培养细胞的常规检查.....	184
项目九	MDCK 细胞(犬肾细胞)的传代培养	187
项目十	MDCK 细胞的冷冻与复苏	189
项目十一	PRRSV 的 Marc145 细胞培养	191
项目十二	抗伪狂犬病病毒 gG 蛋白单克隆抗体的 制备.....	195

附录 200

附录 A	组织培养常用术语.....	200
附录 B	组织培养常用缩写词.....	203
附录 C	实验室常用细胞株简介.....	205
附录 D	实验室常用细胞目录.....	209

主要参考文献 213

模块一

基础篇

动物细胞培养是指从动物体内取出组织或细胞,在体外模拟体内环境使其生长繁殖,并维持其结构和功能的一种培养技术。动物细胞培养广泛应用于生物学和医学的各个领域,且在整个生物技术产业的发展中具有关键作用。本模块是动物细胞培养技术的基础篇,主要讲述动物细胞培养的基础知识和常规操作技术,包括动物细胞培养技术的内涵和基本要求、动物细胞培养前的准备工作、动物细胞的原代培养、动物细胞的传代培养、培养细胞的常规检查和生物学检测、污染的检测和排除、动物细胞的大规模培养、动物细胞的冷冻保存与复苏等。通过本模块的学习,不仅可使学生熟悉动物细胞培养实验室的布局、常用仪器设备的功能和使用方法,掌握动物细胞培养的常规实验技术,而且可培养学生的团队合作精神,让学生养成良好的实验习惯和无菌操作意识。

项目一 认识动物细胞培养技术

有人认为,做细胞培养工作,只要掌握了培养技术,细胞生长了,就算大功告成,其他的似乎无关紧要。这是一种片面的观念。从事细胞培养不能仅满足于技术操作,尤其在设备完善和科技快速发展的今天,掌握培养方法并非难事,更为主要的,一是需要明白各种操作的基本原理,二是具备判断细胞生长好坏以及是否发生污染的能力,三要熟悉体外培养细胞的生存条件、细胞的生物学性状和与此有关的基本理论知识。这些对于科研工作者和辅助技术人员都是必要的。本项目主要阐述动物细胞培养技术的内涵与应用、体外培养的动物细胞的生物学特性及动物细胞培养的基本要求和工作的方法。通过本项目的学习,了解动物细胞培养的发展史,掌握动物细胞培养的基本概念、优缺点以及动物细胞培养在生产领域中的应用。



任务1 动物细胞培养技术的内涵与应用

一、细胞培养的基本概念

细胞培养是一种体外培养技术,细胞培养和传统的组织培养既有区别又有联系。



体外培养(in vitro culture)是指从生物体活体内取出组织(多指组织块),在模拟体内特定的生理环境等条件下,进行培养,使之生存并生长。体外培养可分为细胞培养、组织培养和器官培养。

(1) 细胞培养(cell culture)是指细胞(包括单个细胞)在体外条件下的生长。动物细胞培养(animal cell culture)是指将从动物活体内取出的组织用机械或消化的方法分散成单细胞悬液,然后模拟体内环境,进行培养,使其生存、生长并维持其结构与功能的技术。动物细胞培养的对象为单个细胞或细胞群,细胞不再形成组织,但在实际工作中,常将它扩展至组织培养与器官培养。

(2) 组织培养(tissue culture)的本意是指从体内取出组织和细胞,模拟体内生理环境,在无菌、适当温度和一定营养条件下,使之生存和生长并维持其结构和功能的技术。但在培养组织的过程中,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不变,生存环境的改变、培养时间过长,特别是反复传代,都很容易导致细胞发生变化或出现单一化现象,即趋向于变成单一类型细胞,最终便也成了细胞培养。

(3) 器官培养(organ culture)的对象是器官的原基、器官的一部分或整个器官(一般是胚胎器官),应用和组织培养相似的条件,使之在体外生存、生长并保持一定的结构和功能特征的技术。器官培养的对象在体外也可能发生一定程度的分化,但始终保持着器官的基本结构和功能特征。

体外培养过程如图 1-1 所示。

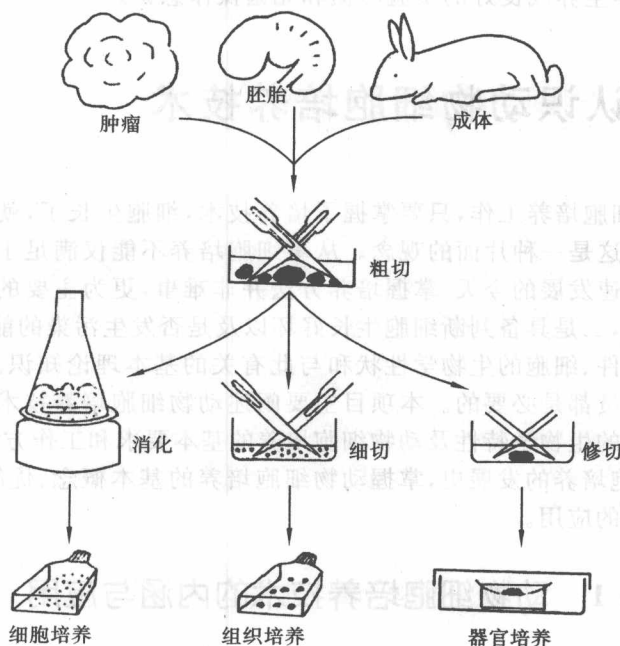


图 1-1 体外培养过程

二、动物细胞培养的发展史

细胞培养技术的发展经历了百余年的时间,现已广泛应用于生物学和医学等研究领域。1885年,德国人 W. Roux 用温热的生理盐水在体外培养鸡胚髓板,使之存活了数天,第一次取得组织块人工培养的成功,并首次采用了“tissue culture”这个词组,被认为是组织培养的萌芽实验。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,使之存活了 72 h,并观察到了细胞生长现象。

现代细胞培养是从 R. Harrison 和 A. Carrel 两人开始的。1907年,Harrison 参考前人的经验,创建了盖玻片覆盖凹窝玻璃悬滴培养法(图 1-2)。此法的基本技术是在无菌条件下,将蛙胚髓管部的小片神经组织接种于一加有蛙淋巴液的盖玻片上,然后翻转盖玻片,使组织小片和淋巴液悬挂在盖玻片的表面,再将这块盖玻片密封在一个下凹的载玻板之上。通过这种技术,在体外培养存活了数周,并观察到了神经细胞突起的生长过程,建立了体外培养组织和细胞的基本模式系统,Harrison 被称为动物细胞培养的奠基人。

Carrel 在进一步改进组织培养技术方面也作出了很大贡献,他把严格的外科无菌操作引进到组织培养技术中来。1912年,Carrel 用血浆包埋组织块外加胎汁的培养法,并采用了更新培养基和分离组织的传代措施,在没有抗生素的情况下,培养鸡胚心肌组织长达数年之久。他指出,用反复传代的方法使细胞系存活三四年之久是可行的。1923年,他又设计了卡氏培养瓶(Carrel flask)(图 1-3)。使用这种瓶容易避免组织的偶然性污染,扩大组织的生存空间,同时也能简化许多维持长期培养所需的操作。卡氏培养瓶至今仍被实验室采用。

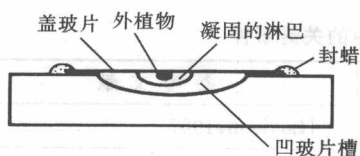


图 1-2 Harrison 悬滴培养法

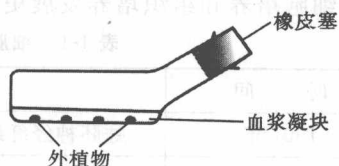


图 1-3 卡氏培养瓶

从 20 世纪 50 年代起,细胞培养开始进入迅速发展的阶段。相继有很多学者从改进培养操作方法、培养容器和培养基三个方面,进行了很多革新。在卡氏培养瓶设计原理的启示下,相继出现了各种类型的培养瓶、培养皿、试管、多孔培养板。培养基也由天然动物血浆改进为人工合成培养基,促细胞生长物质也由胎汁改进为动物血清。与此同时,培养操作方法的革新也非常迅速。1952—1957年,Sanford 和 Dulbecco 等人采用胰蛋白酶消化处理和应用液体培养基的方法,建立了单层细胞培养技术,此后单层细胞培养技术便成为组织培养普遍应用的技术,并建立了许多细胞系和细胞株,大大促进了组织培养技术的发展。1952年,Gey 等建立了第一个连续的人细胞系,即 HeLa 细胞系;随着 X 射线照射的饲养层概念被引入克隆技术,1955年 Puck 克隆了 HeLa 细胞。20 世纪 50 年代也是化学合成培养基快速发展的年代,并最终导致无血清培养基的问世。

20 世纪 50 年代末,随着生物科学和技术的相互渗透,遗传学和生物化学的相互结



合,出现了分子遗传学、分子生物学、细胞工程等新兴科学,这些新科学的形成和发展都与细胞培养有着密切关系。

1962年,Okata发现仙台病毒(Sendal virus)可诱发艾氏腹水瘤细胞融合形成多核细胞,为动物细胞融合技术的发展奠定了基础。1975年,诺贝尔医学和生理学奖获得者 Cesar Milstein 和 Geoger Kohler 将免疫小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞进行融合,获得了既能在体外无限繁殖,又能产生特异性抗体的杂交瘤细胞,有力地促进了免疫学的发展。

细胞培养技术发展迅速,试管植物、试管动物、转基因生物反应器等相继问世。以色列科学家用胚胎干细胞培养出人类心脏组织,它可以正常跳动;美国科学家培养出造血先驱细胞,中国科学家培养出胃和肠黏膜组织等。1977年,英国科学家利用胚胎工程技术成功地培养出世界首例试管婴儿;1997年,英国科学家首次克隆出绵羊“多利”;2001年,英国科学家又培育出首批转基因猪。

早在20世纪30年代,细胞培养技术就已传入我国。张钧、鲍鉴清曾分别在上海和北平倡导过细胞培养方法,并进行了一些实验工作。1952年,鲍鉴清在天津建立了组织培养实验室并编写了《组织培养技术》,之后,北京、上海、武汉、长春等地也相继建立了一些用于研究或制备生物制品的细胞培养室。20世纪60年代细胞培养技术有了进一步的发展。20世纪70年代后,细胞培养技术在我国已不再是个别实验室所拥有的技术,而成为医学和生物学研究中普遍应用的手段。近二十年来我国已建立了人和各种动物肿瘤及其他细胞系。细胞培养技术已被广泛用于生物学和医学研究的各个领域,包括用各种理化措施诱发遗传欠缺细胞株、应用细胞杂交瘤技术制备单克隆抗体、用培养细胞检测环境中可疑致癌物质、癌基因转染和细胞转化等。

细胞培养和组织培养发展史中的关键事件见表1-1。

表 1-1 细胞培养和组织培养发展史中的关键事件

时 间	事 件	参 考 文 献
1907 年	蛙神经纤维在体外的生长	Harrison,1907
1912 年	鸡结缔组织外植块培养,心肌收缩达2~3个月	Carrel,1912;Burrows,1912
1916 年	胰蛋白酶消化和外植块传代	Rous and Jones,1916
20 世纪二三十年代	成纤维细胞系传代	Carrel and Ebeling,1923
1925—1926 年	器官培养的体外分化	Strangeways and Fell,1925,1926
20 世纪 40 年代	抗生素用于组织培养	Keilova,1948
1943 年	小鼠成纤维细胞系 L-细胞的建立,第一个连续细胞系	Earle et al,1943
1948 年	L-细胞的克隆化	Sanford et al,1948
1949 年	病毒在细胞培养中的生长	Enders et al,1949
1952 年	胰蛋白酶用于复制传代,病毒蚀斑实验	Dulbecco,1952

续表

时 间	事 件	参 考 文 献
1952 年	从宫颈癌中建立第一个人细胞系 (HeLa) 核移植	Gey et al, 1952 Briggs and King, 1952
1954 年	成纤维细胞运动的接触抑制 在猴肾细胞中制备脊髓灰质炎疫苗	Abercrombie and Heaysman, 1954 Griffiths, 1991
1955 年	在同源饲养层上克隆化 HeLa 细胞 合成培养基问世 合成培养基需要血清生长因子	Puck and Marcus, 1955 Eagle, 1955, 1959 Sanford et al, 1955; Harris, 1959
20 世纪 50 年代后期	认识到支原体 (PPLO) 感染的重要性	Coriell et al, 1958; Nelson, 1960
1961 年	正常人细胞有限生命期的定义 细胞融合-体细胞杂交	Hayflick and Moorhead, 1961 Sorciul and Ephrussi, 1961
1962 年	BHK21 的建立和转化 (垂体和肾上腺肿瘤) 分化的维持	Macpherson and Stoker, 1962 Buonassisi et al, 1962; Yasamura et al, 1966
1963 年	3T3 细胞和自发性转化	Todaro and Green, 1963
1964 年	胚胎干细胞的多能性 在琼脂上选择转化细胞	Kleinsmith and Piece, 1964 Macpherson and Montagnier, 1964
1964—1969 年	用 WI38 人肺成纤维细胞生产狂犬病、风疹疫苗	Wiktor et al, 1964; Andzaporidze, 1968
1965 年	中国仓鼠细胞无血清克隆化 异核体细胞——人-小鼠杂种细胞	Ham, 1965 Harris and Watkins, 1965
1966 年	神经生长因子 大鼠干细胞瘤的分化	Levi-Montalcini, 1966 Thompson et al, 1966
1967 年	表皮生长因子 HeLa 细胞交叉污染 细胞增殖的密度限制 成淋巴样细胞系	Hooher and Cohen, 1967 Gartler, 1967 Stoker and Rubin, 1967 Moore et al, 1967; Gerper et al, 1969; Miller et al, 1971
1968 年	培养的正常成肌细胞保持分化状态 停泊非依赖性的细胞增殖	Yaffe, 1968 Stoker et al, 1968
1969 年	造血细胞的集落形成	Metcall, 1969, 1990
20 世纪 70 年代	层流超净台的问世	Kruse et al, 1971; Collins and Kennedy, 1979
1973 年	DNA 转移, 磷酸钙	Graham and Van der Eb, 1973
1975 年	成纤维细胞生长因子 杂交瘤-单克隆抗体	Gospodarowicz et al, 1975 Kohler and Milstein, 1975



续表

时 间	事 件	参 考 文 献
1976 年	胚胎干细胞的全能性 补充生长因子的无血清培养基	Illmensee and Minz, 1976 Hayashi and Sato, 1976
1977 年	证实许多细胞系被 HeLa 细胞交叉 污染 3T3 饲养层和皮肤培养	Nelson-Rees and Flandermeyer, 1977; Rheinwald and Green, 1977
1978 年	MCDB-选择性无血清培养基 基质相互作用 细胞形态和生长控制	Ham and McKeehan, 1978 Gospodarowicz et al, 1978; Reid and Rojkind, 1979 Folkman and Moscona, 1978
20 世纪 80 年代	基因表达调控 癌基因, 恶性和转化	Darnell, 1982 Weinberg, 1989
1980 年	从 EHS 肉瘤提取基质细胞周期调控	Hassell et al, 1980
1980—1987 年	SV40 引起的永生化 众多特化细胞系的建立	Evans et al, 1983; Nurse, 1990 Huschtscha and Holliday, 1983 Peehl and Ham, 1980; Hammond et al, 1984; Knedler and Ham, 1987
1983 年	重组的皮肤培养物	Bell et al, 1983
1984 年	在哺乳动物细胞中生产重组组织型 纤溶酶原激活物	Collen et al, 1984
20 世纪 90 年代	利用转化细胞以工业化的规模进行 生物制药	Butler, 1991
1991 年	人成体间充质干细胞的培养	Caplan, 1991
1998 年	组织工程软骨 人胚胎干细胞培养	Aigner et al, 1998 Thomson et al, 1998
2000 年至今	人类基因组计划; 基因组学、蛋白质 组学、遗传缺陷和表达失误 组织工程探索	Dennise et al, 2001; Atala and Lanza, 2002 Vunjak-Novakovic and Freshney, 2004
2010 年	WAVE 生物反应器平台灵活用于多 种宿主细胞培养工艺和规模放大	Kristin DeFife, 2010; Leigh Pierce, 2010

三、动物细胞培养的优点和缺点

细胞培养是一种方法和技术,也是一门实验科学,在现代医学和生物科学研究中应用极为广泛,这与其一系列的优点是分不开的,具体包括以下几个方面。

(1) 研究对象是活的离体细胞。根据要求可始终保持细胞的活力,并可长时间监控、检测,甚至定量评估一部分活细胞的情况,包括其形态、结构和生命活动等。

(2) 研究内容便于观察、检测和记录。利用细胞培养技术研究细胞的生命活动规律,可以很方便地采用各种实验技术和方法来观察、检测和记录。例如,通过倒置相差显微镜等直接观察活的细胞;应用缩时电影技术、摄像或者通过闭路电视长时间连续记录和观察培养细胞的体外生长情况,可以直观揭示培养细胞的生命活动规律以及对所施加因素的反应;利用同位素标记、放射免疫等方法检测细胞内的物质合成和代谢变化等。

(3) 研究条件可以人为地控制。进行体外细胞培养实验时,可以根据需要控制 pH 值、温度、O₂ 浓度、CO₂ 浓度等物理化学条件,并且可以做到相对的恒定。同时,可以施加化学、物理、生物等因素作为实验条件,这些因素同样可以处于严格控制之中。细胞培养技术使得在细胞存活的基础上独立研究细胞的生命活动、逐项研究细胞生存条件和细胞功能成为可能。

(4) 样品的特征和均一性。细胞培养可同时提供大量均一性较好的细胞群,降低实验成本。取自一般组织的样本,其细胞类型多样,即使是来源于同一组织,也不可能做到均一性。但是体外培养一定代数的细胞,所得到的细胞系或细胞株则可达到细胞类型单一、细胞周期同步、生物学性状基本相同以及对实验因素反应一致等。这是因为每次传代时细胞随机混合,培养条件的选择性压力利于最有活力的细胞生长,进而产生性质较均一的培养物。需要时,还可采用克隆化等方法使细胞达到纯化。因此,细胞系的特征在经过几次传代后可能固定下来,如果储存于液氮中则该特性可永久保持。由于实验的复制样品基本上是相同的,因此不需要进行变异性的统计学分析。由于细胞培养可以提供大量均一性较好的实验样本,有时可比体内实验成本低得多。例如,一个需要 100 只鼠才能得出结论的实验可能只用 100 片盖玻片或几个多孔培养板就可获得具有相同统计学意义的结果。

(5) 经济性、规模化和机械化。在进行体外培养对某种物质的筛选和重复性实验时,培养细胞可以受到低浓度、成分明确的试剂的直接作用,而体内注射时 90% 的试剂因排泄或并未分布到所研究的其他组织中而丢失,因此体外实验更经济,并且可避免动物实验存在的法律、道德和伦理问题。多孔培养板和自动化技术方面的新进展也使细胞培养更加经济有效,细胞培养已成为生物制品、单克隆抗体和基因工程制品等的生产手段。通过扩大细胞培养系统容量,可以大规模培养动物细胞以生产生物制品。目前,利用动物细胞大规模培养技术所生产的生物产品包括酶、单克隆抗体以及多种疫苗等生物制品或基因工程产品。

细胞培养的优点见表 1-2。

表 1-2 细胞培养的优点

范 畴	优 点
生理-化学环境	控制 pH 值、温度、渗透压、可溶性气体
生理条件	控制激素和营养物质的浓度
微环境	调控基质、细胞-细胞间相互作用及气体弥散
细胞系均一性	可应用选择性培养基,克隆化方法
性质确定	易用细胞学和免疫染色来完成



续表

范 畴	优 点
保存	在液氮中保存
真实性和可信性	可鉴别并记录其来源、历史及纯度
复制和变异性	易定量分析
节省试剂	容积减少,直接作用于细胞,成本较低
CXT 控制	可确定剂量、浓度(c)和时间(t)
机械化	可微量滴定和自动化
减少动物的使用	药物、化妆品等的细胞毒性实验和筛选

当然,细胞培养虽然具有以上一系列的优点,但也有以下几点不足之处。

(1) 细胞培养环境与体内环境相比,仍有很大的差异。组织和细胞离体以后,独立生存在人工培养环境中,即使当前模拟体内技术发展很快,但与体内环境相比,仍有很大差异。因此在利用培养细胞做实验对象时,不应视为与体内细胞完全一样,轻易得出与体内等等的结论。

(2) 体外培养的动物细胞对营养的要求比较高。动物细胞培养液中往往需要多种氨基酸、维生素、辅酶、核酸、嘌呤、嘧啶、激素和生长因子等,在很多情况下还需加入 10% 的胎牛血清或新生牛血清。

(3) 动物细胞生长缓慢,对环境条件要求严格。动物细胞培养必须在严格的无菌条件下进行,因为动物细胞的生长比常见的污染微生物都要慢得多。此外,与微生物不同,正常状态下多细胞动物的细胞不能孤立存在,因而如果没有一个复杂的环境刺激和血浆或组织液的作用,它们将不能维持独立的存活状态。动物细胞培养不仅需要严格的防污染措施,同时还需用空气、氧、二氧化碳和氮的混合气体进行供氧和调节 pH 值。

(4) 量的问题。细胞培养的一个主要局限性在于所付出的大量劳动和物质只能够生产相当少的一些组织。对于绝大多数小型实验室,每批的实际最大产量可能只有 1~10 g 细胞,一个较大型的实验室,如稍作努力并在设备上多些投入,每批的产量则有可能达到 10~100 g,100 g 以上的产量则意味着达到了企业化的小规模生产水平,这是大多数实验室难以做到的。用培养的方式来生产细胞所需的投入要比直接用动物组织高出 10 倍,因此,当要采用培养的方法生产 10 g 以上的组织时,就必须提供足以令人信服的理由。

(5) 不稳定性是许多连续性细胞系所面临的主要问题。这是由它们的染色体组成不稳定所导致的。即便是未转化的细胞经过短期培养,细胞群体中生长速率和分化能力上的异质性也能导致细胞代与代之间的差异。

四、动物细胞培养技术的应用

现代生物技术包括基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程,这些技术的发展几乎都与细胞培养有密切的关系,特别是在生物和医药领域,细胞培养具有特殊的作用。比如基因工程药物或疫苗在研究和生产过程中很多是通过细胞培养来实现的,基因工程乙肝疫

苗大多是以 CHO 细胞作为载体,基因工程抗体药物的制备也离不开细胞培养;细胞工程领域更离不开细胞培养技术,杂交瘤单克隆抗体的研究和制备完全是通过细胞培养来实现的;发酵工程和酶工程也与细胞培养密切相关。总之,细胞培养在整个生物技术产业的发展中起到了核心作用。

(1) 动物细胞培养技术在生物学基础研究中的应用。

体外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 细胞生物学。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、营养、代谢以及病变等微观过程。

② 遗传学研究。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。

③ 病毒学研究。细胞培养为病毒的增殖提供了场所,细胞是分离病毒最好的和最方便的基质,利用细胞培养可准确进行病毒定性和定量的研究。另外,用细胞进行病毒增殖也是制备减毒活疫苗和诊断用抗原的一种主要方法。用培养的动物细胞代替实验动物做斑点分析,不仅方法简便、准确,而且重复性好。

(2) 动物细胞培养技术在临床医学上的应用。

① 可用于疾病的诊断。目前,人们已经能够用羊膜穿刺技术获得脱落于羊水中的胎儿细胞,经培养后进行染色体分析或甲胎蛋白检测,可诊断出胎儿是否患有遗传性疾病或先天畸形,以此可避免先天残疾儿的诞生。现在用这种方法已能检测出几十种代谢性遗传缺陷疾病和先天畸形疾病。我国的科学工作者改进了淋巴细胞的培养方法,从而使癌基因携带者的染色体表现出明显高于常人的畸变率,这就从细胞分子水平揭示了癌症的病理、病因,并为癌症的早期诊断和预防提供了科学依据。

② 可用于临床治疗。目前已有将正常骨髓细胞经大量培养后植入造血障碍症患者体内进行治疗的报道。另外,利用动物细胞培养技术生产的生物大分子制品也可用于治疗某些代谢缺陷疾病,如利用动物细胞培养技术生产的重组人促红细胞生成素(rHuEPO)在临床上可用于治疗肾衰性贫血、癌症患者化疗后贫血,并对择期手术者的自身输血血液储备有极显著的效果。

③ 可用于新药筛选和药物效应的检测。例如,可用于化学合成药物药效研究、中药有效成分筛选与鉴定等。采用体外培养的动物细胞测试药物效应,不仅比用动物做实验经济,而且药物能直接与细胞接触,获得的实验结果更迅速、直观。同时,检测具有组织特异性的药物时,可选用相应的细胞,如检测抗癌药物可选用癌细胞,检测治疗肝病的药物可选用肝细胞。

(3) 动物细胞培养技术在动物育种上的应用。

在胚胎工程中,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为一种较成熟的技术而应用于家畜的繁殖生产中。另外,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。胚胎干细胞的研究成果和克隆羊“多利”的问世已为动物遗传育种开辟了一条新途径。