

细胞培养工程

Cell Culture Engineering

陈因良·陈志宏·编著

华东化工学院出版社

Y511/21

细胞培养工程

陈因良 陈志宏 编著

华东化工学院出版社

内 容 提 要

细胞培养工程是将生物工程的实验室成果进行工业开发的重要环节,是生物工程领域的重要组成部分。本书主要介绍动植物细胞的大规模培养方法及其在工业生产中的应用。全书共分7章,主要内容包括:细胞工程基础、动植物细胞培养工艺及反应器、动物细胞培养的下stream工程。

本书可供从事生物工程研究、教学的科研人员和细胞生物制品生产工作者参考,也可用作大专院校生化工程等学科的教材。

(沪)新登字 208 号

细胞培养工程

Xibao Peiyang Gongcheng

陈因良 陈志宏 编著

华东化工学院出版社出版发行

(上海市梅陇路 130 号)

新华书店上海发行所发行

江苏句容排印厂排版

上海长鹰印刷厂印刷

开本 850×1168 1/32 印张 10.75 字数 287 千字

1992 年 11 月第 1 版 1992 年 11 月第 1 次印刷

印数 1—3000 册

ISBN7-5628-0233-5/Q·2 定价 3.55 元

前 言

动、植物细胞培养技术是生物技术生产过程中的一种重要手段。通过动物细胞的大规模培养可以制取常规的基因工程疫苗、新型药用蛋白、单克隆抗体等医药产品,同时植物细胞的培养也已用于农作物的育种、快繁、脱毒,并有望发展生产次生代谢产物的产业。

本书是以动、植物细胞大规模培养进行生物技术产品的生产过程中的工程技术为主线,辅以细胞生物学、以细胞为宿主的DNA重组技术、产品的分离纯化等基础内容而编写的,因此称为《细胞培养工程》。

本书作者陈因良教授和陈志宏讲师,近几年来从事动物细胞培养生产疫苗、单抗的研究,以及动物细胞培养用生物反应器、微载体的研制工作,和相关的教学工作,并卓有成绩。他们曾参阅了不少国内外文献资料,并在实践中积累了不少宝贵经验。鉴于目前还没有一本系统地论述上述内容的出版物,他们毅然挤出时间编写了这本书。这是十分可钦可贺的。

本书内容丰富、全面,既可以全面阅读,作为生化工程等有关专业的教学参考书,又适合根据需要择章参阅。虽然本书在内容选择和编排中尚有可改进的余地,在论述中也可能有不够确切或失误之处,但仍不失是一本理论和实践并重、实用性强、信息量多和具有一定先进性等特色的好的科技参考书。

希望本书的问世,能对从事细胞培养研究、生产和教学工作者有所裨益;并对我国的生物技术发展有所贡献。

俞俊棠

一九九二年四月

于华东化工学院

生化工程研究所

序

细胞培养工程,作为一门生化工程学科领域中迅速发展起来、并具有生物技术与化学工程理工结合特色的新型工程学,无论在基础研究和应用研究方面越来越受到生物技术界的重视。

由于70年代以来,基因工程和杂交瘤技术的迅速发展,通过动、植物细胞培养可以生产出许多与人类健康和生存密切相关的生物技术产品,如从病毒疫苗到干扰素;从诊断试剂到治疗蛋白、生物杀虫剂。并已形成了一支独特的高新技术产业,显示了巨大的工业发展前景。在生物技术研究领域中掀开了新的一章。

动、植物细胞体外培养具有明显的表达产物方面的优点,为传统的微生物发酵技术所无法替代。其中以它们转录后修饰和产物胞外分泌表达最为人们所感兴趣。但是,这些真核细胞由于其固有的生长特点和体外培养的困难性又给人们提供了与传统发酵工程明显不同的研究课题。深入地研究和探讨这些新的学术问题已引起了世界各国生物技术研究工作者的广泛兴趣。以“细胞培养工程”作为一个专门研究领域的国际学术会议至1992年已连续举行了三届。受到关注的课题包括上游基因工程及细胞工程技术、生物反应器技术及生物物质分离纯化的下游技术。尽管“细胞培养工程”发展迅速,大规模培养的产品也已经或正在逐步地进入商品市场,但人们对于细胞培养过程的研究还只是刚刚起步,尚有许多未知的领域需要不断地学习、探讨和研究。

华东化工学院是国内首先以工程学的观点研究细胞培养过程的高校科研单位。近年来,该院对培养过程的调控、细胞培养介质、培养基的优化、细胞培养生物反应器及生物大分子物质的分离纯化进行了较为广泛的研究。本书作者作为1990年全国“大规模细胞培养技术短训班”的主要组织者,近几年来参与了上述细胞培养工程的研究工作,收集了国内、外在这一领域中的发展动向,将自己学习和实践的体会与国内、外研究动态综合,编写了“细胞培

养工程”一书,供从事或有兴趣于这一领域研究和工作的广大科技人员参考。

本书以上游技术、反应器工程及下游分离纯化为主线,综合有关培养工程中生物技术知识和生化反应工程与反应器设计知识。介绍了分离纯化的工程问题。

在本书编写过程中,得到了张元兴副研究员的支持,并提出了宝贵意见。全书最后由俞俊棠教授审阅。由于编者知识有限,也正是由于细胞培养工程具有多学科交叉的特点,书中错误和片面性必然存在,希望读者予以指正。我们真诚的愿望是该书能起到一个抛砖引玉的作用。

陈因良 陈志宏

一九九二年四月

目 录

第 1 章 绪论	1
第 2 章 细胞工程基础	6
2.1 细胞	6
2.1.1 细胞的基本共性	6
2.1.2 原核细胞与真核细胞	7
2.1.3 细胞增殖及其调控	13
2.1.4 病毒	20
2.2 动物细胞基因工程	22
2.2.1 概述	22
2.2.2 病毒和细胞基因的克隆	24
2.2.3 真核病毒载体	24
2.2.4 选择性标记	28
2.2.5 基因转移方法及受体细胞	29
2.2.6 暂时性基因表达	31
2.2.7 永久性基因表达	32
2.2.8 转基因动物	34
2.3 植物细胞基因工程及原生质体融合	35
2.3.1 原生质体融合	35
2.3.2 植物细胞基因工程概述	38
2.4 杂交瘤技术	39
2.4.1 杂交瘤技术的基本原理	39
2.4.2 杂交瘤细胞的建立	42
2.4.3 单克隆抗体的大规模生产	47
2.4.4 使用单克隆抗体的风险	49
2.4.5 单克隆抗体的应用	50
第 3 章 动物细胞培养技术	57
3.1 清洗与消毒	57
3.1.1 清洗	57
3.1.2 消毒	59

3.2 动物细胞培养基	60
3.2.1 培养基的组成	60
3.2.2 无血清培养基	61
3.2.3 培养系统对培养基设计的要求	70
3.2.4 培养基的选择	70
3.2.5 其它常用液	71
3.3 动物细胞常用培养方法	73
3.3.1 贴壁培养	76
3.3.2 悬浮培养	79
3.3.3 细胞生长的检测	79
3.3.4 微载体培养系统	90
3.3.5 包埋培养	101
3.3.6 微囊化培养	109
3.4 动物细胞冻存、复苏及运输	112
3.4.1 细胞冻存与复苏	112
3.4.2 细胞的运输	114
3.5 昆虫细胞和病毒的培养	114
3.5.1 概述	114
3.5.2 昆虫细胞、杆状病毒的基本知识	116
3.5.3 昆虫细胞大量培养工艺	121
第4章 动物细胞反应工程	139
4.1 动物细胞反应的环境因素	139
4.1.1 温度	139
4.1.2 pH 值	140
4.1.3 营养成分	140
4.1.4 溶氧及气体环境	142
4.1.5 渗透压	142
4.1.6 其它因素	142
4.2 动物细胞反应过程	142
4.2.1 糖代谢	143
4.2.2 蛋白质代谢	145
4.2.3 类脂代谢	147

4.2.4 核酸代谢	147
4.3 动物细胞反应工艺学	149
4.3.1 分批式培养	150
4.3.2 流加式培养	153
4.3.3 半连续式培养	154
4.3.4 连续式培养	155
4.4 动物细胞反应动力学	157
4.4.1 细胞比生长速率	157
4.4.2 营养物质比消耗速率	162
4.4.3 产物比生成速率	163
4.4.4 细胞培养过程动力学	164
4.5 细胞培养工程的放大	176
4.5.1 培养基组成	178
4.5.2 限制细胞生长的因素	180
4.5.3 污染的控制	181
4.5.4 产物表达的控制	182
4.5.5 硬件和过程设计参数	183
4.5.6 产物回收	185
第5章 动物细胞培养生物反应器	187
5.1 概述	187
5.2 气升式细胞培养生物反应器	188
5.2.1 气升式生物反应器构型及原理	188
5.2.2 反应器操作	191
5.2.3 无菌控制	191
5.2.4 过程控制及自动化	192
5.2.5 混合和传质	193
5.2.6 静压	195
5.2.7 细胞生长和产物形成	196
5.2.8 连续培养	197
5.3 中空纤维管生物反应器	199
5.4 通气搅拌生物反应器	201
5.4.1 笼式通气搅拌生物反应器	201

5.4.2 双层笼式通气搅拌器生物反应器	204
5.4.3 传递特性的分析	205
5.5 无泡搅拌反应器	209
5.5.1 膜	209
5.5.2 膜搅拌器	210
5.5.3 传质性能	210
5.5.4 材料的性能	211
5.5.5 反应器和过程开发	211
5.6 流化床生物反应器	212
5.7 陶质矩形通道蜂窝状生物反应器	213
5.8 细胞的剪切敏感性和生物反应器设计	214
5.8.1 积分剪切因子	215
5.8.2 平均剪切速度	216
5.8.3 可尔莫格罗夫(Kolmogorov)旋涡长度	217
5.8.4 旋涡长度模型	219
5.8.5 反应器设计中对剪切应力的估算	220
5.9 细胞培养灌注系统	222
5.10 动物细胞反应器的控制	225
5.11 细胞培养用微载体	229
5.11.1 概述	229
5.11.2 动物细胞贴壁生长机理	231
5.11.3 微载体的种类	233
5.11.4 国产微载体的开发	242
第6章 植物细胞培养技术	249
6.1 概述	249
6.2 基本培养技术	250
6.2.1 植物组织培养概念	250
6.2.2 材料准备	251
6.2.3 植物细胞培养基	253
6.2.4 植物细胞培养方法	257
6.3 植物细胞培养工艺	273
6.3.1 间歇培养	273

6.3.2 连续培养	273
6.3.3 固定化细胞培养	274
6.4 植物细胞培养动力学	275
6.4.1 植物细胞培养的影响因素	275
6.4.2 植物细胞培养中氧的消耗及传质动力学	282
6.4.3 固定化细胞培养的传质及反应动力学	284
6.5 植物细胞培养反应器	285
6.5.1 机械搅拌生物反应器	287
6.5.2 非机械搅拌生物反应器	288
6.5.3 鼓泡塔与气升式反应器	289
6.5.4 填充床反应器	290
6.5.5 流化床反应器	291
6.5.6 膜反应器	292
第7章 动物细胞培养的下游工程	295
7.1 预处理	295
7.1.1 沉淀	295
7.1.2 离心	295
7.1.3 过滤	297
7.2 浓缩	299
7.2.1 沉淀法	299
7.2.2 吸附/洗脱	303
7.2.3 超离心	306
7.2.4 超滤	308
7.2.5 不同浓缩方法的比较	308
7.3 动物细胞培养产物的纯化	308
7.3.1 概述	308
7.3.2 动物细胞培养营养产物蛋白纯化	311
7.3.3 病毒的纯化	321
7.4 动物细胞培养病毒的灭活	325
7.4.1 灭活动力学	325
7.4.2 灭活剂	326
参考文献	331

第 1 章 绪 论

1907 年,美国生物学家 Harrison 在无菌条件下,以淋巴液为培养基成功地在试管中培养了蛙胚神经组织达数周,创立了体外组织培养方法。1951 年,Earle 等开发了能促进动物细胞体外培养的培养基,同时,在细胞生物学、培养系统及培养方法等领域也取得了不少进展。这标志着近代动物细胞培养技术的开端,和该技术已开始用于一些细胞生物制品的生产。

70 年代后期,随着基因工程(也称重组 DNA)技术的发展,外源基因在微生物中表达获得成功。人们认为,大多数原来由动物细胞产生的蛋白质可以在原核细胞(如细菌)和简单真核细胞(酵母)中产生。与动物细胞相比,细菌和酵母系统不仅简单,而且生产率高,比繁殖快的动物细胞还要高 40 倍。加上原核细胞基因工程技术和大量培养技术的巨大成就,则使之大有取代动物细胞之势。然而,由于种种原因,不少生物活性蛋白至今只能在动物细胞中表达。基因工程细菌和酵母系统生产蛋白质存在着严重的不足,即原核细胞产生的蛋白质缺乏转录后修饰能力,如缺乏蛋白质限制性酶切位点、二硫键、特殊的糖基化、磷酸化、羧基化、酰胺化作用以及形成天然蛋白质精确的三维结构的环境等。细菌和酵母通常不能分泌蛋白质类物质,因而需要破碎细胞,这样给产物分离带来困难。同时,其还容易受外源毒素的污染。而动物细胞则能克服细菌和酵母的上述不足。

80 年代,随着基因工程技术的发展以及细胞融合技术的进一步发展,许多外源蛋白基因可转染至动物细胞中并能扩增数千倍,使得动物细胞能够高质量地表达有价值的蛋白。同时,杂交瘤技术使得各种各样单克隆抗体可以通过杂交瘤细胞分泌产生。因此,利用大规模动物细胞培养技术生产各种生物制品得到了很大的

发展。

通过动物细胞培养大致可生产如下几类生物制品：

(1) 病毒疫苗 如 口蹄疫(FMD)、狂犬(rabies)、小儿麻痹症(polio),乙型肝炎(HBsAg)疫苗等。

(2) 非抗体免疫调节剂 如 干扰素(IFN)、白介素(IL)、集落刺激因子(CSF)、B 细胞生长因子(BCGF)、T 细胞替代因子(TRF)、迁移抑制因子(MIF)、巨噬细胞激活因子(MAF)。

(3) 多肽生长因子 如 神经生长因子(NGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、血清扩展因子(SF)、表皮生长因子(EGF),纤维粘结素(Fibronectin)。

(4) 酶 如 组织血纤维溶酶原激活剂(t-PA), VII、VIII 因子等。

(5) 激素 如 红细胞生成素(EPO)、促黄体生成素(LH)、促滤泡素(FSH)等。

(6) 病毒杀虫剂 如 杆状病毒等。

(7) 肿瘤特异性抗原 如 癌胚抗原(CEA)等。

(8) 单克隆抗体

(9) 细胞本身

(10) 皮肤重植

大规模培养动物细胞生产生物制品大约始于本世纪 50 年代, Earle 等开发出细胞培养基之后, 主要是用于生产病毒疫苗。最初的生产方法是采用成百上千只体积小的培养瓶, 后来又改用滚瓶培养, 使玻璃瓶的表面利用率得以提高, 同时也增加了体积。1967 年, Van Wezel 开发了适合贴壁细胞生长的微载体, 使得动物细胞的培养能够在搅拌釜式反应器中进行, 从而大大提高了生产率。微载体培养系统现在已广泛应用, 最大达 2000L 规模。1975 年, Kohlor 和 Milstein 创立了细胞融合技术, 使得悬浮细胞的培养变得十分迫切, 气升式反应器被应用于杂交瘤细胞的培养以生产单克隆抗体, 到 1986 年, 最大达 10,000L。1972 年, Knazek 开发了中空纤维反应器, 使得细胞密度大为提高, 但由于种种原因,

迄今为止，生产上应用还很少。1978年，Lim 还开发了细胞微囊化技术，将非贴壁依赖性细胞包含在较小的颗粒状微囊中，使培养在搅拌釜式或气升式反应器中进行，并可放大至 1000L 规模。除了大规模动物细胞培养系统以外，人们对培养基也进行了不少研究。动物细胞培养基中的血清不仅成本高，而且对后处理极为不利，因此，人们先后开发了不少适合不同细胞生长的无(或低)血清细胞培养基，然而由于血清的特殊作用及其复杂性。目前，完全无血清培养应用范围尚不广泛。

总之，在过去的近一个世纪里，人类对动物细胞培养技术进行了大量研究开发，并取得了不少进展。尽管如此，目前的技术水平远不能满足细胞生物制品研究开发和生产的要求，随着动物细胞培养技术的应用日趋广泛，它具有广阔的发展前景，需要进一步研究和开发的工作，概括起来大致包括如下几方面：

- 1) 动物细胞基因工程技术和杂交技术。
- 2) 新型细胞培养反应器及其培养技术。
- 3) 无血清、低蛋白或无蛋白培养基。
- 4) 新型微载体研制技术及微囊化技术。
- 5) 产物分离纯化技术。

在将来，动物细胞或组织体外培养还可能用于体外生物分析系统进行毒理学研究。在医药、食品、化妆品行业中，由于越来越多的物质需要进行毒性检验，人们正寻求新的方法来代替活动物试验。一种可靠的检验方法需要完全确定的细胞或组织培养程序及其代谢和生长动力学规律，而目前对细胞代谢和生长动力学的研究状况以及在线检测水平还远不足以设计出确定的培养系统。因此，动物细胞代谢和动力学的研究是一个重要的研究领域，它对动物细胞培养的工艺过程优化具有重要意义。

鉴于此，本书将着重讨论上述这几个方面的内容。

与动物细胞培养相比，植物细胞培养的研究开展得比较早，但目前工业规模的应用却较少。德国植物学家 G.Haberlandt 是植物细胞培养的创始人。早在 19 世纪末，他就从一些高等植物中分

离出细胞并在简单营养液中保持存活。但是，当时却没有观察到细胞生长和分裂的现象。到了 20 世纪，不少人开始从事植物细胞培养的研究。然而，由于植物细胞生长速率很慢，分裂时间又长，因此进展不快。直到 30 年代，植物细胞培养研究才取得突破性进展，人们发现，通过细胞或组织培养可能使植物再生，这为今天应用组织培养技术进行植物的大规模繁殖奠定了基础。1939 年，Gautheret、Nobercourt 和 White 分别成功地培养了烟草、萝卜、杨树等细胞并形成层组织，至此，植物组织培养才真正开始。1956 年，Routier 和 Nickell 首先申请了用植物细胞培养生产化学物质的专利。从此，应用细胞培养生产有用的次级代谢产物的研究取得了很大进展，越来越多的植物细胞被筛选出来进行培养。但是，初始培养成功却难以建立合成产物的细胞系，直到 70 年代，随着植物基因工程技术的发展，外源基因或 DNA 片段可以引入植物细胞内，从而建立起能生产特殊产物的转化细胞。通过培养这种细胞可以获得人们所需的产物。对于有些产物，其浓度甚至能接近或超过完整植物中的水平。同时，在大规模培养技术方面也取得了巨大进展。目前在日本，开发了 20,000L 搅拌釜式反应器用以培养烟草细胞；在德国，对用于大规模植物细胞培养的气升式反应器也进行了研究；不少实验室还致力于开发固定化植物细胞培养系统，还有不少人在进行细胞生物学、生物化学以及细胞生长与产物合成的关系等方面的基础研究。很显然，植物细胞生物技术的

表 1-1 植物细胞培养的发展

时 期	进 展
1890s	Haberlandt 首创了植物细胞培养
1930s	从植物细胞培养进行植物再生
1950s	开始植物细胞大规模培养
1960s	原生质体融合技术的开发
1970s	植物细胞基因工程的发展，日本开发大规模烟草细胞培养系统
1980s	固定化细胞技术，天然产品合成系统的进一步开发，日本开发紫草宁、小檗碱生产系统

研究在 70 年代取得了巨大进展。表 1-1 展示了植物细胞培养的发展过程。

植物细胞大规模培养技术主要用于生产有价值的次级代谢产物。这些产物利用化学合成法生产往往很不经济。有些产物则只能来源于植物，而许多有价值的植物在自然条件下生长在热带或亚热带地区，因而要受自然条件的影响；更为严重的是，有些植物从种植到收获要花几年时间，并又很难选出高产植株。因此，通过大规模培养植物细胞来生产这类有价值的产品具有十分重要的意义。通过植物细胞培养生产的产品大致有如下几类：

1) 医药 如 可待因、吗啡、莨菪胺、阿托品、长春花碱、多巴、天仙子胺、薯蓣皂苷配基、奎宁、长春新碱、蛇根碱等。

2) 食品类 如 花色素苷、紫草宁，香草、芹菜、草莓、葡萄、西红柿、芦笋，薄荷、玫瑰、茉莉、广藿香、檀香木、柠檬等。

3) 农药 如 除虫菊脂、鱼藤酮等。

可见植物细胞培养在农业、医药、食品、化妆品、香料等行业的生产中具有巨大潜力和广阔应用前景，因此，开展此领域的研究是大有前途和意义的。

第2章 细胞工程基础

2.1 细 胞

2.1.1 细胞的基本共性

细胞是生命活动的基本单位。一切有机体均由细胞构成,只有病毒是非细胞形态的生命体。细胞具有极其复杂的化学成分与细微的结构,但组成细胞的基本化学元素则仅有氧(O)、碳(C)、氢(H)、氮(N)、磷(P)、硫(S)、钙(Ca)、钾(K)、铁(Fe)、钠(Na)、氯(Cl)、镁(Mg)等,这些化学元素构成细胞功能与结构所需要的许多无机化合物与各种生物分子。构成细胞结构的基本生物大分子是:核酸、蛋白质、脂类与糖类。这些分子一般以复合分子的形式,如核蛋白、脂蛋白、糖蛋白或糖脂等组成细胞的重要结构。在亚显微结构水平上,细胞的基本结构可分为三种体系:

1) 主要由脂蛋白构成的生物膜系统,如细胞膜、核膜以及一些重要细胞器:线粒体、高尔基体、内质网、溶酶体与液泡等的封闭膜。

2) 主要由核酸蛋白成分构成的颗粒与纤维结构系统,如染色质与核仁基质,以及核蛋白体等。

3) 由蛋白质构成的细胞骨架(主要是微丝与微管)、中心体、纺锤体与纤毛、鞭毛等专门的结构。

构成各种生物机体的细胞种类繁多,但所有细胞均有共同的基本点:

1) 所有的细胞表面均有一层脂蛋白成分的生物膜,即细胞膜,使细胞能与周围环境保持相对独立性和一定的外形,造成相对稳定的细胞内环境,并主要通过细胞膜与周围环境进行物质交换。