

第三章 动物细胞工程制药

3. 4 基因工程细胞的传代扩增

一、课程目标

掌握动物细胞大规模培养的方法和操作方式

2) 思政育人

通过无菌操作技术的讲解，引导学生树立操作过程不能急于求成，做事情要循序渐进的职业精神。

二、思政案例

1)课程思政教学实例一:无菌操作意识

无菌操作技术是细胞培养的关键技术，培养基或器械灭菌不彻底是细胞污染的首要原因引出“良好的开始是成功的一半”任何事都要提前做好准备工作：操作过程不能急于求成，做事情要循序渐进，尊草守规，细节决定成败实验结束，要做好清理工作，强做事有始有终。

三、课程组织

导入：同学们大家好，上节课我们学习了生产用动物细胞的相关知识。在制药工业生产中，我们需要将获取的动物细胞在体外培养成功，这就需要特殊的环境条件控制和相应的营养成分供给。今天呢，我们来学习第四节基因工程细胞的传代扩增

知识点 1 讲解：动物细胞培养的环境条件

首先我们要先了解细胞要想在**体外培养成功需要什么条件？**

第一是绝对无菌操作；第二是足够的营养供应，排除有害物质包括极其微量的离子掺入；第三是适量氧气供应；第四是随时清除细胞代谢中产生的有害产物；第五是有良好的适于生存的外界环境，包括 pH、渗透压和离子浓度等；最后是及时分种，保持合适的细胞密度。

下面我们来进行主要课程的学习。动物细胞培养的**环境条件**有哪些呢？**第一是细胞培养设备**。动物细胞培养所需的基本环境条件都是通过设备提供的，动物细胞培养实验常用的设备如表所示。

首先是**无菌环境**。无菌是动物细胞培养不同于其他大多数实验技术的主要要求。无菌是通过独立的无菌操作区以及对设备和器皿进行合理的清洗、灭菌达到的。无菌操作应设定于实验室的专用位置，该区域相对固定、僻静，严格与细菌、真菌、酵母、病毒等微生物实验

的其他操作分开。通常动物细胞培养的无菌操作是在洁净台内完成的。**其次是清洗和灭菌。**目的是除去任何影响细胞生长的有害因子，防止外来微生物的污染。器材的清洗一般来说，需经浸泡、刷洗、泡酸和冲洗四个步骤，用过的器材最好尽快地浸泡在 3%的磷酸三钠溶液内过夜，以除去蛋白质和残余细胞等污垢。器材的灭菌主要通过物理方法和化学方法来达到严格无菌的操作过程。物理方法包括紫外线、干热、湿热、过滤等。化学方法包括化学消毒剂、抗生素。**之后是污染检查和处理。**动物细胞培养的污染主要有化学污染和微生物污染两种。化学污染主要是器皿未处理干净，或者培养基中混入了对细胞有毒性或刺激性的化学物质。发生化学污染后的细胞应弃去，重新配制培养基和重新处理器皿。微生物污染主要是细菌、真菌、支原体和病毒。发生微生物污染的细胞要灭活后弃之，并对环境和器皿进行消毒灭菌处理，检查污染物清除干净后方能重新使用。

思政融入：无菌操作技术是细胞培养的关键技术，培养基或器械灭菌不彻底是细胞污染的首要原因引出“良好的开始是成功的一半”任何事都要提前做好准备工作：操作过程不能急于求成，做事情要循序进，尊草守规，细节决定成败实验结束，要做好清理工作，强做事有始有终。

第三是温度。温度对微生物和动植物细胞的培养都很重要，但由于细胞种类不同，他们对温度的要求也有所不同。**哺乳动物细胞**最佳温度是 $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 。**昆虫细胞**最佳温度是 27°C 。不同细胞必须在自己最适温度范围内培养否则当温度过高时细胞退变甚至死亡，温度过低时，会降低代谢和生长速度，影响产量。

第四是溶解氧。氧气是细胞赖以生存的必要条件之一。对于动物细胞来说，它在体内的生存条件一般都低于空气中氧的饱和值的 60%。当采用转瓶培养时，制药培养的液体量不超过总体积的 30%，就可以通过液面的空气交换保证细胞的氧气需求，不必再专门通气。当使用生物反应器进行大量培养时，必须专门通气，补充氧气。在实际生产中常常都是采用不同比例的氧气、氮气、二氧化碳和空气的混合气体，根据需要使用。

第五是 CO_2 ，动物细胞培养时，使用 5% CO_2 。

知识点 2 讲解：动物细胞培养基

1) 动物细胞培养基的基本要求

接下来是本节第二部分内容动物细胞培养基。我们先来看一下**动物细胞培养基的基本要求**。**一是水质。**所有的细胞培养都是在液体环境中完成的，因此水质的好坏直接影响细胞培养成功与否。水中含有多种微量元素，有害的金属离子以及微生物的污染，只有除去这些污染危害才能保证细胞的正常生长。当前处理水质主要采用蒸馏、离子交换、反渗透、电渗析以及高分子材料的过滤。在实际操作中，经常是多种方法联合使用。制备纯水，一般要求金

属离子含量很低。动物细胞制药用水，要求去热源。

二是 pH。 pH 的高低对细胞各种酶的活性、细胞壁的通透性以及许多蛋白的功能都有重要的影响。动物细胞培养的最适 pH 为 7.2~7.4，低于 6.8 或高于 7.6 时会对细胞产生不利影响，严重时会引起细胞退变甚至死亡。为了保持液体环境的 pH 的稳定，一般要加入缓冲溶液，最常用的是 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲系统、 $\text{NaHCO}_3/\text{CO}_2$ 缓冲系统。

三是渗透压。 动物细胞没有细胞壁，所以需要外界环境提供一个合适的渗透压来维持细胞的生存。不同的细胞对于外界渗透压的要求不同，比如原代细胞较传代细胞敏感。所以在细胞培养的所有操作中，为了使与细胞接触的所有液体都保持有较合适的渗透压 pH，一般都需要使用平衡盐溶液 (balanced salt solution, BSS)，它由无机盐和葡萄糖组成为调整培养液的渗透压，一般采用**加减 NaCl** 的方法。

2) 细胞培养基的种类和组成

动物细胞培养基的研究从发展历史看，大致可以分为 4 类：天然培养基、合成培养基、无血清培养基和化学限定培养基。

先来看一下**天然培养基**。最初的体外细胞培养，都是采用天然培养基。天然培养基主要是取自动物体液或从动物的组织中分离提取。优点是营养成分丰富，培养效果好，缺点是成分复杂，来源受限。天然培养基种类很多，主要包括血浆凝块、血清、淋巴液、胚胎浸液以及羊水、腹水等。

下面是**合成培养基**。合成培养基是对细胞体内生存环境中各种已知物质在体外人工条件下的模拟。优点是成分明确，组分稳定，可大量生产供应。其组成大致如下：**氨基酸**：是细胞合成蛋白质的原料。所有细胞都需要 12 种必需氨基酸。此外还需要谷氨酰胺，它在细胞代谢中有重要作用。几乎是所有细胞重要的碳源和氮源。**维生素**：细胞生长代谢中大多数的酶、辅酶是依靠维生素来形成的。**维生素**分为两大类，一类为水溶性，另一类为脂溶性。**糖类**：培养基中的糖类包括葡萄糖、核糖、脱氧核糖、醋酸钠等，主要提供细胞生长的能量，也参与合成蛋白质和核酸。

无机盐离子：培养基中含有的钠、钾以及微量元素如铁、锌、钙等等。**血清**：血清中含有丰富的营养物质，包括大分子蛋白和核酸等，对细胞生长繁殖有很重要的作用。血清可以分为胎牛血清、小牛血清、马血清、兔血清及人血清等，最广泛使用的是胎牛血清和小牛血清。血清外观一般为透明、无溶血、淡黄色的液体，灭活后颜色略深。下面的图片就是我们常用的血清。

思考题：目前合成培养基的应用广泛，那么有哪些常用的合成培养基呢？像 LB 培养基、NGM

培养基， 还有哪些， 请同学们自己思考一下。

第三是无血清培养基。现在大多数人工合成培养基都需要加入不同浓度的血清才能培养细胞。血清除了提供细胞生长的营养成分之外， 还能促进细胞 DNA 的合成。但是由于血清成分复杂， 对一些要求较高的基础性研究的结果影响较大， 同时血清中也含有一定的细胞毒性物质和抑制性物质， 影响细胞的正常生长。因此很多培养工作需要采用无血清的培养基。**优点是** ①提高了细胞培养的可重复性， 避免了血清差异所带来的细胞差异； ②减少了由血清带来的病毒、 真菌和支原体等微生物污染的危险； ③供应充足、 稳定； ④细胞产品易于纯化； ⑤避免了血清中某些因素对有些细胞的毒性； ⑥减少了血清中蛋白对某些生物测定的干扰， 便于结果分析。

目前已经有市售**无血清培养基**。无血清培养基中都是在合成培养基内加入不同种类的添加剂所构成， 大致有以下几类：

一是**激素和生长因子**： 使用最多的是胰岛素， 可促进糖原和脂肪酸的合成， 对细胞生长有刺激作用。

二是**结合蛋白**： 最经常被补充的是铁传递蛋白和白蛋白。为了便于纯化， 有时可用硫酸亚铁、 柠檬酸铁、 葡萄糖酸铁代替铁传递蛋白。

三是**贴附和伸展因子**： 目前多数无血清培养基只适用于悬浮细胞， 真正能用以培养贴壁细胞的很少， 也很贵， 原因在于它们均缺少必需的贴附和伸展因子， 除这些因子外， 有的还添加维生素 A 酸和重组的小肽， 它可与细胞的受体结合。

四是其它有利于**细胞生长的因子和元素**： 它们包括有消除氧自由基损害的谷胱甘肽， 某些微量元素， 如硒等。

第四是化学限定培养基。化学限定培养基是指培养基中的所有成分都是明确的， 不含有动物蛋白， 也不添加植物水解物， 而是使用了一些已知结构域功能的小分子化合物， 如短肽、 植物激素等。最后是营养添加物。营养添加物是在培养过程中需要根据营养物的消耗进行特定的营养添加物的流加， 缓解培养后期营养物质匮乏的现象， 为代谢产物的表达提供充足的物质基础。

知识点 3 讲解： 动物细胞培养方法

第三部分知识是动物细胞的培养方法。动物细胞的培养方法， 一般根据细胞种类分为**原代培养和传代培养**； 又可根据培养基的不同分为液体培养基和固体培养基； 还可以根据培养细胞状态不同分为贴壁培养和悬浮培养。

培养细胞的第一步是要得到细胞。所以我们先来介绍一下细胞的分离。为了进行细胞培

养，首先要从生物体取得细胞，目前获取细胞的方法有两种，即离心分离和消化分离。

离心分离法：主要用于从含有细胞的体液，如血液、羊水、胸腹水中分离细胞，800-1000r/min 离心 5-10min。

消化分离法：将生物体的组织块剪碎；用消化液消化，使组织松散成细胞悬液；用缓冲液洗涤、离心、去除残留的消化液；获得所需细胞。

第二是细胞计数。第一种计数方法是自动细胞计数器计数。原理是让一定体积的细胞悬液流经一个小孔，并在两个电极间通过，此时通过的细胞就会对电极间的电流产生干扰而使电压发生改变，这样就会在电子计数器上形成一个信号被记录下来。自动细胞计数器计数是只要细胞经过就会读取一个信号，这样优点是计数速度快，同时缺点也很明显，就是无法分辨活细胞和死细胞，也会误将细胞结团记录为单个细胞，使计数值偏低。

第二种是血细胞计数器计数 这个是最常用也是最经济的技术方法。具体是先根据情况用培养基稀释细胞悬液，然后用吸管吸取少量悬液，滴在计数板上的盖玻片一端，让液体自动流经盖片下方间隙，勿留气泡。稍候片刻，镜下观察并计算出四角大格内的细胞数。如图上所示。压线者只计上线和右线的细胞。**计算公式**如下(细胞数)个/mL=(四大格细胞总数)/4×10⁴。

第三种是**结晶紫细胞核技术法**。该原理是结晶紫染液属碱性染料，低渗，有螯合钙离子的作用，可使细胞分散解离和破碎，将细胞核染成蓝色。染色后取样在血球计数板上镜检，计数细胞核即细胞数。下图是染色后镜下观察到的画面。

第四是**MTT 染色计数法**。该原理是活细胞内的线粒体脱氢酶能将 MTT 转变为不可溶性的紫色的甲臜结晶，可溶于二甲亚砜(DMSO)。MTT 结晶形成的量与细胞数成正比。用酶标仪在 490nm 处测定其吸光值，可间接反映活细胞数量。下图是 MTT 实验操作中加入 DMSO 后的颜色变化。颜色越深说明活细胞越多。

知识点 4 讲解:细胞传代

1) 细胞传代

无论悬浮细胞的培养还是贴壁细胞的培养，当细胞增殖到一定程度的时候，由于各种因素的影响，细胞会出现接触抑制的现象，因此细胞的密度不可能无限制增加。如不及时分种，细胞会死亡，脱落。所以在细胞培养的过程中要注意及时传代。有两种不同形态的细胞传代方法。一是悬浮细胞传代：摇匀后取一定量细胞悬液，计数后根据密度要求加入定量培养基，然后再分种。二是贴壁细胞传代：贴壁细胞的传代需要经过消化液消化后分种。

2) 细胞冻存和复苏

细胞的冻存采用液氮低温(-196℃)冻存，同时加保护剂如甘油和二甲亚砜。需要注意，冷冻速度以1℃/min的速度下降为宜。此外，细胞冻存需要注意以下几点：一是冻存前一天换液培养；二是细胞密度以 $1-2 \times 10^6$ 个/ml为宜；三是冻存用培养基应与实际使用的一致，DMSO要过滤除菌；四是检查冻存管的密封性；五是标签要写上细胞名称，编号和冻存日期。

细胞复苏总的要求就是快融。需要注意几点。一是操作中注意防护，戴面罩和手套；二是从液氮中取出后，立即丢入37-40℃温水的搪瓷杯中，并搅动加速融化；三是用乙醇消毒冻存管外表；四是尽早除去二甲亚砜，离心，换新鲜培养液；五是隔天观察细胞生长情况，再换液一次。

知识总结：本节内容我们介绍了**基因工程细胞传代扩增**的相关知识。体外细胞培养的环境条件控制包括无菌环境、温度、溶解氧和CO₂等。之后我们介绍了动物细胞培养基，主要学习了细胞培养基对水质、pH和渗透压的要求以及细胞培养基的种类和组成。最后一部分是动物细胞培养方法，我们从细胞分离、细胞计数、细胞传代和细胞冻存复苏进行了学习。通过本节学习，使我们能够掌握动物细胞传代扩增的必须条件和基本操作，为动物细胞大规模培养提供技术和理论基础。