

第三章 动物细胞工程制药

3.3 生产用动物细胞

一、课程目标

1) 知识学习目标

掌握生产用动物细胞的获得和常用生产动物细胞的特性

2) 思政育人

在当前人类科技发展水平的制约下，人类探索生命本质的过程中仍然离不开实验动物的必要牺牲。原代细胞获得某些环节也会用到实验动物作为实验对象。在细胞生物学实验课程中，教师需要引导同学们树立理性的生命观，理解并接受现代实验动物伦理观。

二、思政案例

1) 课程思政教学实例一：理性的生命观

在人类探索生命世界的进程中，会使用大量实验动物作为实验对象，人类对于生命世界的每一个研究进展，也需要以这些动物的牺牲作为代价。尽管国内外都有一些极端的动物福利主义者声称一切生命绝对平等，但在当前人类科技发展水平的制约下，人类探索生命本质的过程中仍然离不开实验动物的必要牺牲。原代细胞获得中某些环节也会用到实验动物作为实验对象。但是，在当前的人类文明社会中，不滥用实验动物、善待实验动物，在可能的情况下以体外实验代替活体实验等实验动物伦理观念，已经成为生命科学研究的重要法则。在细胞生物学实验课程中，教师需要引导同学们树立理性的生命观，理解并接受现代实验动物伦理观。同时引导学生阅读《实验动物管理条例》《关于善待实验动物的指导性意见》等相关法律法规，从遵从法律法规的角度规范他们善待实验动物的行为。

三、课程组织

导入：同学们大家好，上节课我们介绍了动物细胞的形态、结构、功能、组成代谢以及生理特征，但是在实际的生产过程中，我们对细胞还有更为细致和针对性的要求。所以，这节课我们来学习动物细胞工程制药的第三节生产用动物细胞。

知识点 1 讲解：生产用动物细胞概述

第一部分介绍一下生产用动物细胞的概述。最初要求生产用动物细胞必须是原代细胞，以后放宽至二倍体细胞即可，即使是经过多次传代也可用，但是非二倍体细胞是绝对禁止使

用的，因为担心异倍体细胞的核酸会影响到人的正常染色体，有致癌的危险，由于二倍体细胞传代不会超过 50 代，所以使用受到限制。后来发现异倍体也可使用，并未对机体产生影响，并且可无限使用，对工业生产带来了极大的方便。目前应用于生物制药领域的动物细胞包括原代细胞、二倍体细胞系、转化细胞系以及用这些细胞进行融合和重组的工程细胞系等。

首先给大家介绍**原代细胞**。原代细胞是直接取自动物组织、器官，经过粉碎、消化后获得的细胞悬液。如鸡胚细胞、原代兔肾细胞或鼠肾细胞、淋巴细胞等。用原代细胞生产生物制品常需要大量的动物，费钱费力。这几张照片就是从鸡胚细胞获取原代细胞的操作。

思政融入 教师必须在原代细胞如何获得的这个知识点讲解的过程中，介绍实验动物存在的意义和整个实验教学过程会使用的实验动物种类及操作规范，从而引导同学们思考应该如何对待实验动物、减少不必要的实验动物消耗等重要问题这些问题，可以通过学生间的讨论与教师总结，最终推导出实验动物的伦理要求：不滥用实验动物，善待实验动物，在可能的情况下以体外实验代替活体实验。

然后是**二倍体细胞**。原代细胞经过传代、筛选和克隆，从而从多种细胞成分的组织中挑选并纯化出某种具有一定特征的细胞株。特点包括二倍体；有明显的贴壁和接触抑制特性；有限的增殖能力；无致瘤性。由于该类细胞寿命有限，一般从动物的胚胎组织中获得。如 WI-38(人胚肺二倍体成纤维细胞)、MRC-5(人正常胚肺成纤维细胞)、2BS(人胚肺二倍体细胞)等等。

第三种是**转化细胞系**。通过转化形成，变成了异倍体，有无限增殖能力。转化可自发，在传代过程中自己转变成可无限增殖的细胞；也可人为转化，采用某些试剂处理，或从动物的肿瘤组织中建立的细胞系。优点是无限传代、倍增时间短、对培养条件和生长因子的要求低，适合于大规模工业化生产。

第四种是**工程细胞系**。工程细胞系分为两种，一是**融合细胞系**。动物细胞融合技术，也称动物体细胞杂交技术，是指两个或者两个以上的动物细胞在外力作用下，合并为一个多核细胞的过程。通常采用的是仙台病毒融合法、聚乙二醇融合法、电融合法。另一种是重组工程细胞系。重组工程细胞系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。

思考题 在这里呢，我给大家提一个小问题。细胞都具有自己的染色体，如果两个细胞融合之后，获得的融合细胞的染色体数怎么计算？是不是两个细胞染色体数相加之和呢？同学们可以思考一下。

知识点 2 讲解：真核表达载体

为了要将外源基因在动物细胞中高效表达，首先要将其构建在一个高效表达载体内。目前一般使用的载体有两种。一种是**病毒载体**，另一种是**质粒载体**。病毒载体，如牛痘病毒、腺病毒和逆转录病毒和杆状病毒等。牛痘病毒已被广泛地用来构建成多价疫苗，腺病毒和逆转录病毒载体正被试用于基因治疗中，而杆状病毒载体-昆虫细胞系统已被成功地用于 300 多种外源基因的高效表达。

杆状病毒做载体有其独特的优点：

一是该病毒基因组是双链 DNA，容易进行重组；

二是插入 7-8kb 的 DNA 不影响正常病毒粒子的形成；

三是多角体蛋白和病毒粒子的形成无直接关系，因此用外源基因更换多角体蛋白基因，仍能形成有感染力的病毒粒子；

四是多角体蛋白基因有非常强的启动子，产生的蛋白质可占全部蛋白质的 20-30%；

五是用光学显微镜可看到多角体，容易以此为标记物来挑选阳性克隆；

六是用家蚕杆状病毒，还可在蚕体直接表达外源基因。

另一种真核表达载体就是质粒。而且常常是穿梭质粒载体，即在细菌和哺乳动物细胞两者体内都能扩增。构建此类载体一般含有如下基本成分：

1. **允许载体在细菌体内扩增的质粒序列**。多数含有质粒 pBR 322 或其衍生载体 pAT 153 的序列，包括能使质粒在细菌体内复制的起始位点和抗生素标记基因。

2. **含有能使基因转录表达的调控元件**，在 5' 端转录启动需要有启动子，包括帽状位点 (RNA 转录起始点) 上游约 30 碱基处的 TATA 框和上游 70-90 碱基处的 CA AT 框序列和增强子。当前构建载体的许多启动子序列都来自病毒。此外，在基因 3' 端应有终止序列、RNA 3' 端的切割序列和 polyA 序列等。近来有人在载体里加入显性活动调控区 (DCR) 序列，以此来克服因载体整合在宿主基因组位点而产生的表达水平降低。

3. **能用以筛选出外源基因已整合的选择标记**。一般有两类标记：一类仅适合用于密切相关的突变细胞株。另一类是显性作用基因，它能使氨基糖苷抗生素-新霉素磷酸化而失活，从而使原来对新霉素敏感的哺乳动物细胞一旦获得含该基因的载体后，就能在含该抗生素的培养基中存活。

四、选择性增加拷贝数的扩增系统。基因扩增是外源基因在哺乳动物细胞内高效稳定表达的一种特殊形式。最常用的是编码二氢叶酸还原酶的基因。

我们介绍了真核表达载体的分类及特征，那么请同学们思考一下，真核表达载体和原核表达载体的区别是什么？同学们可以从表达重组元件，基因标记以及表达方式来进行区别。

知识点 3 讲解：细胞转染技术

下面我们介绍第三部分是细胞转染技术质粒载体是通过转染进入宿主细胞的。外源 DNA 掺入真核细胞的过程为转染。常规的转染技术分为瞬时转染和稳定转染两种。瞬时转染时外源 DNA/RNA 不整合到宿主染色体中，因此一个宿主细胞中可以存在多个拷贝数，产生高水平的表达，但通常只维持几天，多用于启动子和其他调控元件的分析。稳定转染时外源 DNA 既可以整合到宿主染色体中，也可以作为一种游离体存在。外源 DNA 整合到染色体中概率很小，大约 $1/10^6$ 的转染细胞能整合。这张图是 DNA 导入动物细胞的常用方法。主要有融合法，化学法，电穿孔法，物理法，病毒法。最常见的就是电穿孔法和脂质体介导法。最新出现的阳离子聚合物转染技术，以其使用宿主范围广、细胞毒性小和转染效率高而广受青睐。

知识点 4 讲解：基因工程细胞筛选和扩增

外源基因经稳定转染导入细胞后，需经过一系列筛选和扩增，获得稳定、高效表达目的蛋白的工程细胞株，将工程细胞株扩增、冻存构建主细胞库和工作细胞库用于接下来的生产。筛选方法是利用表达载体上的选择性标记。如能赋予氨甲喋呤抗性的 **dhfr** 基因，能赋予抗霉酚酸抗性的 **gpt** 基因等等。此外，为提高外源基因在细胞中的拷贝数，还需要筛选出来的单克隆细胞的基因进行扩增。

知识点 5 讲解：细胞库的建立及保存

第五部分是细胞库的建立及保存除原代细胞外的其他细胞株、细胞系，无论是二倍体细胞、转化细胞还是融合细胞或经重组的工程细胞，一旦建立后都需要建立细胞库加以保存。按《中国药典》2010 年版规定，细胞库分为三级管理，即原始细胞库、主细胞库和工作细胞库。**原始细胞库**内的细胞是由一个原始细胞群体发展成传代稳定的细胞群体，或经过克隆培养而形成的均一细胞群体。在特定条件下，将一定数量、成分均一的细胞悬液，定量均匀分装，置于液氮或 -130°C 以下冻存，即为原始细胞库。

原始细胞库储存时需有详细档案：

一是该细胞系的历史包括来源、年龄、性别和细胞分离的方法以及所用的培养材料等；二是该细胞系的特性包括形态、生长的特性、种源的特性等；三是对各种有害因子检查的结果。

主细胞库取原始细胞库细胞，通过一定方式进行传代、增殖后均匀混合成一批，定量分装，保存于液氮或 -130°C 以下，经验证合格后，即主细胞库。最后是生产用细胞库：从原始细胞库来，或从单一冻存管来，或从多个冻存管在融化即刻混合在一起的，然后经培养扩增

到一定数量后，再分装储存形成的细胞库。生产用细胞库也必须建立档案，而且需要进行无菌性和无细胞交叉污染的检查，生产时需确定其最高使用的传代数。

知识总结： 本节我们需要掌握目前应用于生物制药领域的生产用动物细胞，包括原代细胞、二倍体细胞、转化细胞、工程细胞系。掌握什么是真核表达载体，细胞转染技术以及基因工程细胞筛选和扩增。理解细胞库的概念、分类及建立细胞库的意义。同学们，今天我们就讲到这里，谢谢大家，咱们下节课见。