

生命科学导论

——健康与疾病

第二章 生命的基本单位——细胞



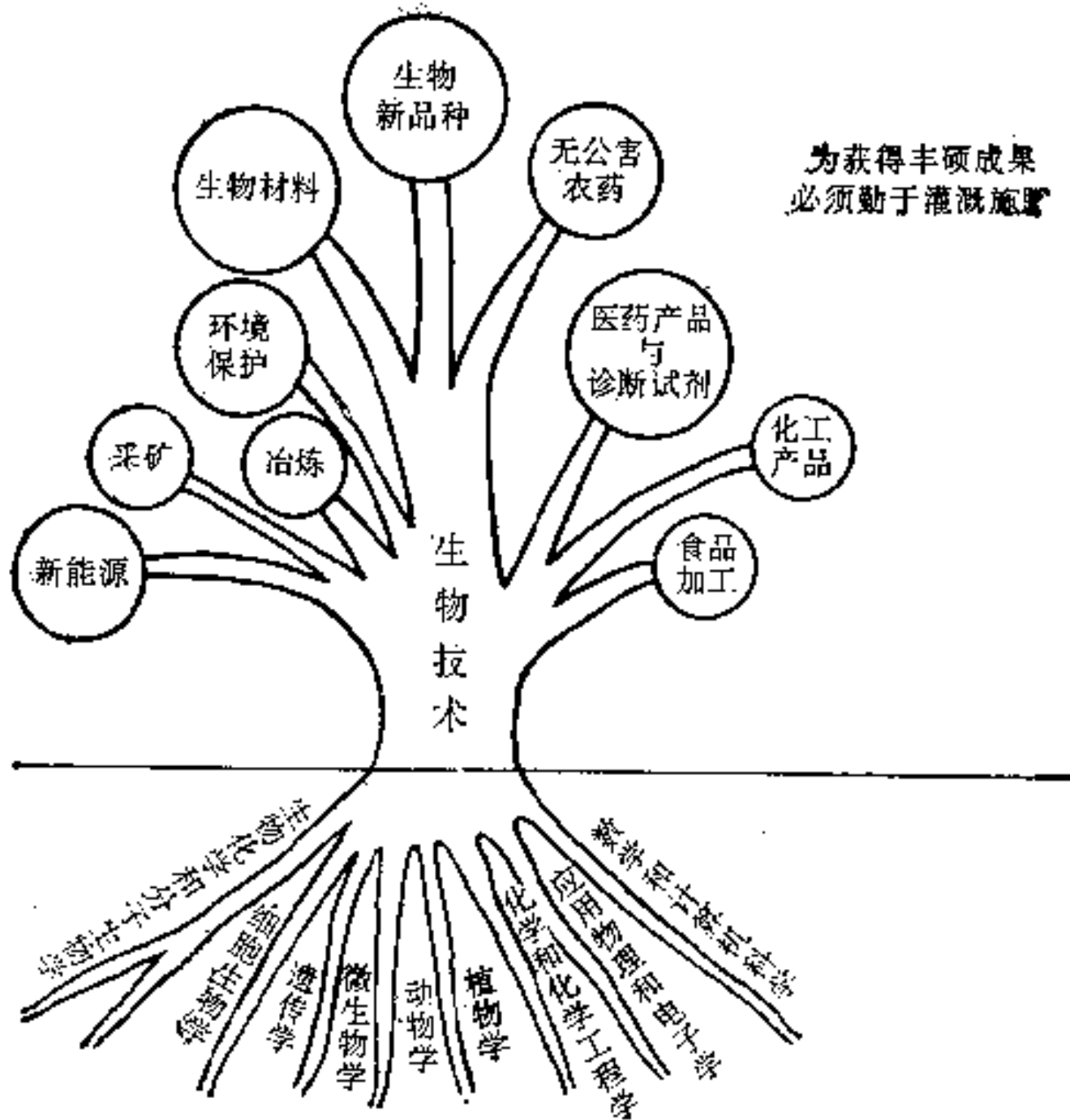
Associate Prof. Chen Yongyan

Contact E mail: yychen08@ustc.edu.cn

***Institute of Immunology,
School of Life Sciences, USTC***

04 细胞工程

1. 细胞工程的概念
2. 细胞工程的研究范畴
3. 细胞工程的基本技术及其应用



➤改善农业生产，解决世界粮食短缺

➤解决能源危机，治理环境污染

➤制造工业原料，生产贵重金属

➤提高生命质量，延长人类寿命

➤提高作战与防御能力（“生物武器防扩散”国际条约）

1. 细胞工程的概念

在细胞水平上的生物工程（技术）

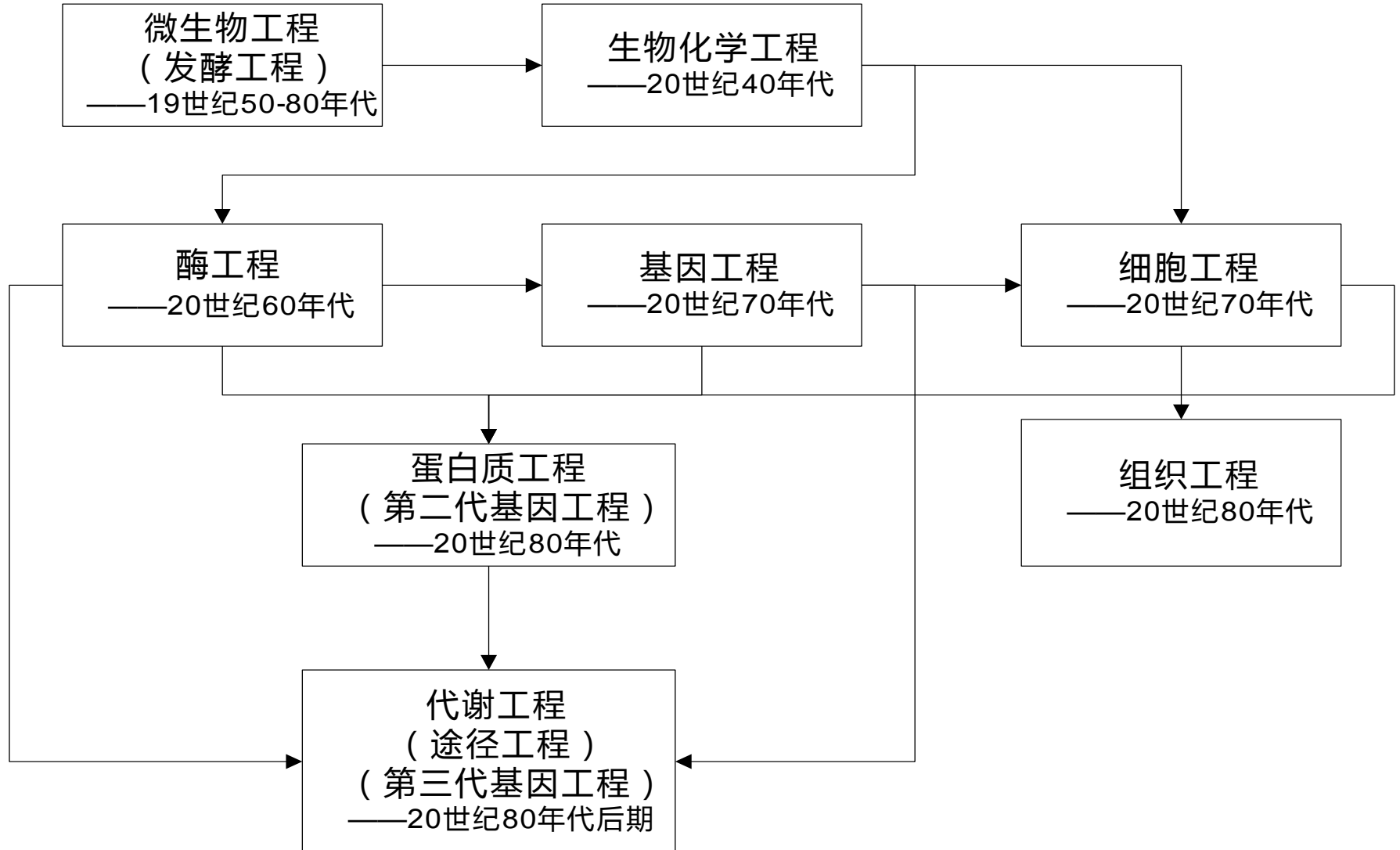
是指通过组织、细胞和细胞器水平（细胞水平）上的筛选或改造，获得有商业价值的细胞株、细胞系或细胞组织，再通过规模培养，获得特殊商品的技术与过程。

研究对象：动植物细胞（原生质体），细胞器、染色体、细胞核、胚胎

核心技术：细胞培养与繁殖

目的：获得新性状、新个体、新物质

细胞工程是现代生物技术的桥梁和纽带



2. 细胞工程的研究范畴

按生物类型：

- 动物细胞工程
- 植物细胞工程
- 微生物细胞工程

按实验操作对象：

- 细胞与组织培养
- 细胞融合
- 细胞核移植
- 染色体工程
- 胚胎工程
- 干细胞与组织工程
- 动物克隆
- 转基因生物与生物反应器

3. 细胞工程的基本技术

- 细胞培养技术
- 细胞融合技术
- 细胞器（细胞核）移植技术
- 染色体工程技术
- 胚胎工程技术
- 转基因技术

3.1 细胞培养技术

从活的机体中取出组织或细胞，分散成单个细胞，模拟机体内的生长条件，在体外建立无菌、适温和一定营养条件等，使其在体外环境中继续生长繁殖的过程，并维持其结构和功能的技术。

细胞培养的基本方法：无菌操作技术

防止污染是决定细胞培养成败的关键，无菌概念和无菌操作必须贯穿整个培养过程的始终。

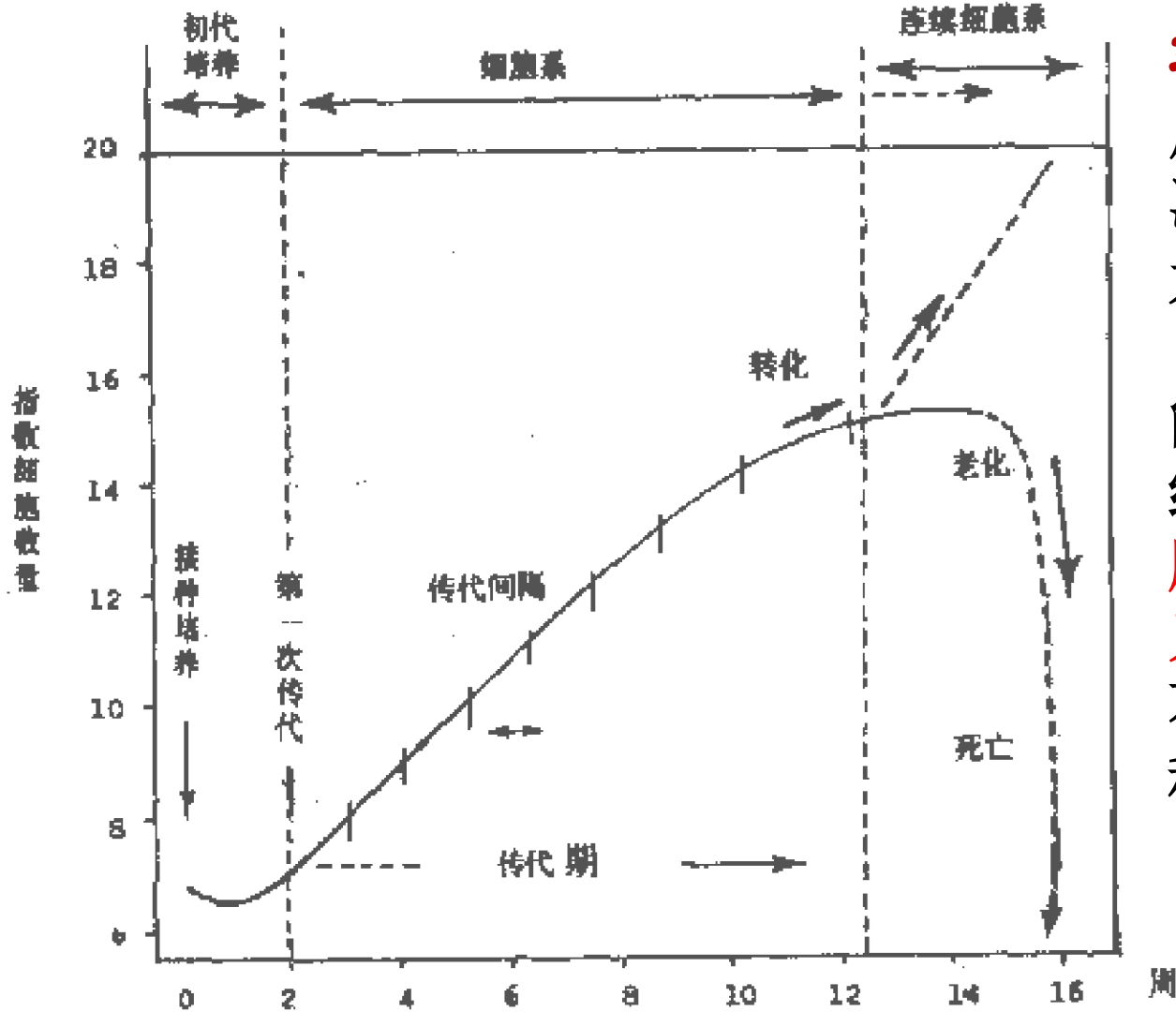
污染：在细胞培养中，凡是与培养无关的杂质的混入培养系统。包括微生物（真菌、细菌、支原体和病毒等）、化学物（影响细胞生存的非细胞所需的化学成分）、细胞（非同种的其他细胞）。

体外培养细胞的分型

悬浮细胞

贴壁细胞

细胞的生长曲线



细胞系

原代培养物经首次传代成功即称为细胞系。

能够连续传代的细胞叫做**连续细胞系或无限细胞系**；

不能连续培养的称为**有限细胞系**。

原代培养：初次培养，原代细胞

继代培养：传代分离，重新培养

每一代细胞的生长曲线

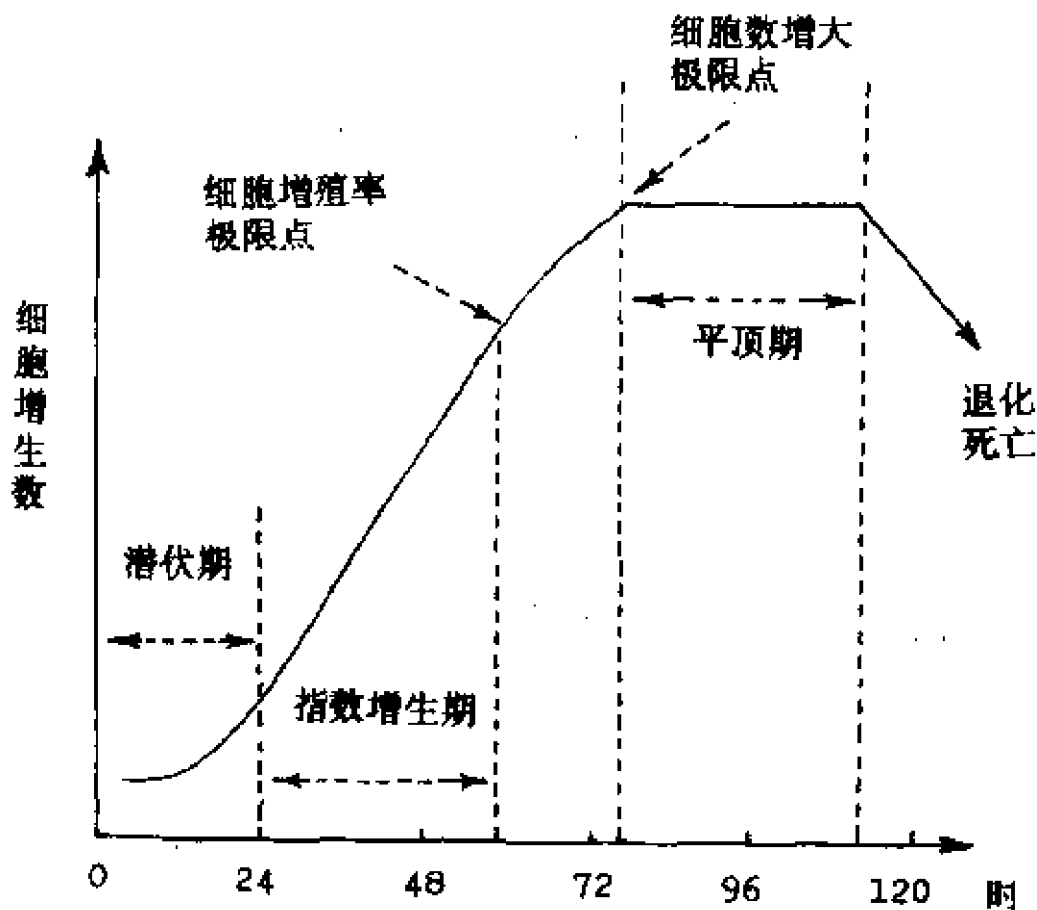


图 1-6 体外培养细胞一代增殖生长过程

细胞的“一代”是指从细胞接种到分离再培养的一段时间。
(传代)

动物细胞的大规模培养技术

是指在人工条件下（设定pH、温度、溶氧等），在细胞生物反应器中高密度大量培养动物细胞用于生产生物制品的技术。

3.2 细胞融合技术

通过培养和诱导，两个或多个细胞合并成一个双核或多核细胞的过程称为细胞融合或细胞杂交

灭活的病毒（仙台病毒）

化学物质（聚乙二醇）

电融合技术

1975年，Kohler和Milstein创立了 单克隆抗体技术

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1984

"for the discovery of the principle for production of monoclonal antibodies"

杂交瘤技术：

是利用融合的杂交瘤细胞，经克隆化，产生针对特定抗原决定簇的抗体，并让其在体外培养液或小鼠腹腔中传代不断产生抗体的技术。

HAT选择性培养的原理

主要途径被氨基喋呤所阻断

骨髓瘤细胞：补救途径也被阻断；

脾细胞：虽然含有HGPRT（次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶）或TK（胸腺嘧啶核苷激酶），但在体外只能存活5~7d；

杂交瘤细胞：从脾细胞中获得所缺乏的酶类，又有组织培养条件下生长能力。

次黄嘌呤（H）、氨基喋呤（A）及胸腺嘧啶核苷（T）的HAT选择性培养基

DNA生物合成途径及HAT培养基的选择机制

单克隆抗体（**Monoclonal antibody, McAb**）由一个浆细胞（抗体形成细胞）大量增殖形成的克隆产生的抗体，在理化性质、分子结构、遗传标记和生物学特性等均完全相同的抗体，也称为第二代抗体。

- 1、特异性抗原的发现及提纯
- 2、单克隆抗体的导向治疗
- 3、病理组织定位诊断中的应用
- 4、用于淋巴细胞分类、鉴定、结构与功能的研究
- 5、临床生化诊断中的应用
- 6、应用抗T细胞**McAb**可防止器官移植排斥反应及治疗某些自身免疫病。

3.3 细胞器（细胞核）移植技术

细胞拆合技术：把细胞核和细胞质分离开来，然后把不同来源地细胞质和细胞核相互结合，形成核质杂交细胞。

物理法：机械吸核，微细管注射

化学法：松胞素B处理细胞排核，细胞融合

核移植技术---动物克隆的应用

1. 利用核移植技术，**研究生物学的基本问题**（细胞分化、基因调控、核质关系……）
2. 提供遗传上完全一致的**实验动物**（为实验室研究和动物的药物实验，克服个体间的遗传差异）；
3. 制备转基因克隆动物，进行**生物药物生产**（珍贵医用蛋白：美国抗凝血因子III，英国 α -1-抗胰蛋白酶）；
4. **培育优良畜种**，扩大良种种群（畜牧业生产）；
5. 开展**异种动物克隆**，拯救濒危动物
6. **治疗性克隆**：克隆技术与胚胎干细胞技术相结合，为人类的细胞、组织和器官移植开辟新途径

动物克隆存在的问题

- 成功率低（**1~5%**）
- 理论研究相对于技术研究而言较为滞后
- 体细胞克隆后代有可能出现老化现象
- 核移植的技术环节尚需不断完善

社会及伦理问题

3.4 染色体工程技术

是人们按照一定的设计，有计划地消减、添加或代换同种或异种染色体，从而达到定向改变遗传特性和选育新品种的一种技术

动物染色体工程：

染色体倍性改造

染色体结构改造

人工染色体的利用

3.5 胚胎工程技术

指对动物早期胚胎或配子所进行的各种显微操作和处理技术。

理论基础：哺乳动物的受精卵和早期胚胎的发育规律

胚胎移植技术

体外受精技术

胚胎分割技术

性别鉴定技术

体细胞克隆技术

转基因胚胎技术

胚胎干细胞培养

3.6 转基因技术

是指使用基因工程或分子生物学技术，将遗传物质导入活细胞或生物体中，产生基因重组现象，并使之表达并遗传的相关技术。

转基因生物

转基因动物

转基因植物

转基因微生物

转基因动物与动物生物反应器

转基因动物

是指借助基因工程技术将外源基因导入受体动物染色体内，外源基因与动物基因整合后随细胞的分裂而扩增，在体内表达并能稳定地遗传给后代的动物。

转基因动物建立流程

外源目的基因的制备



外源目的基因的导入



携带有外源目的基因的细胞筛选



培养系统和宿主动物的选择

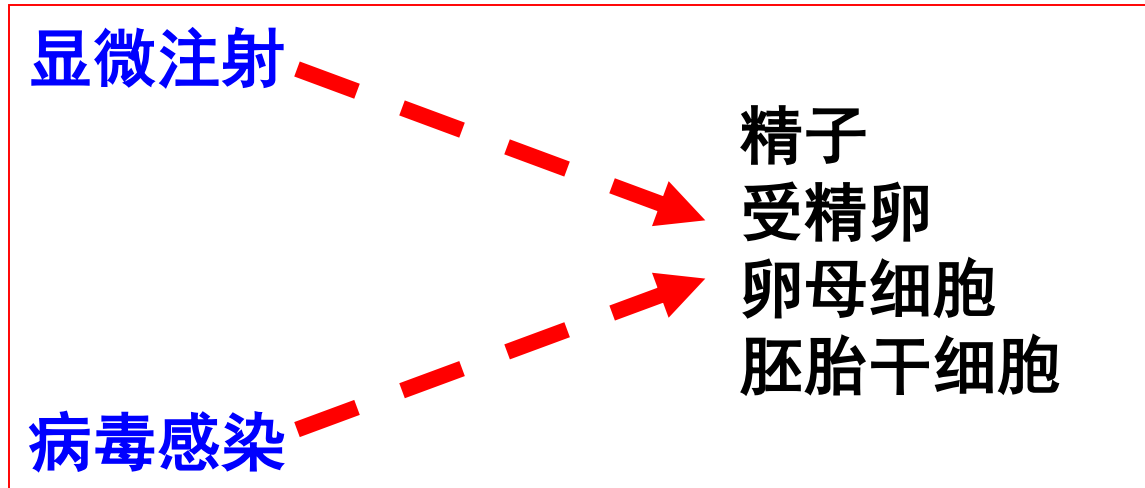


转基因细胞胚胎发育及鉴定



转基因动物品系的筛选和鉴定

外源目的基因的导入

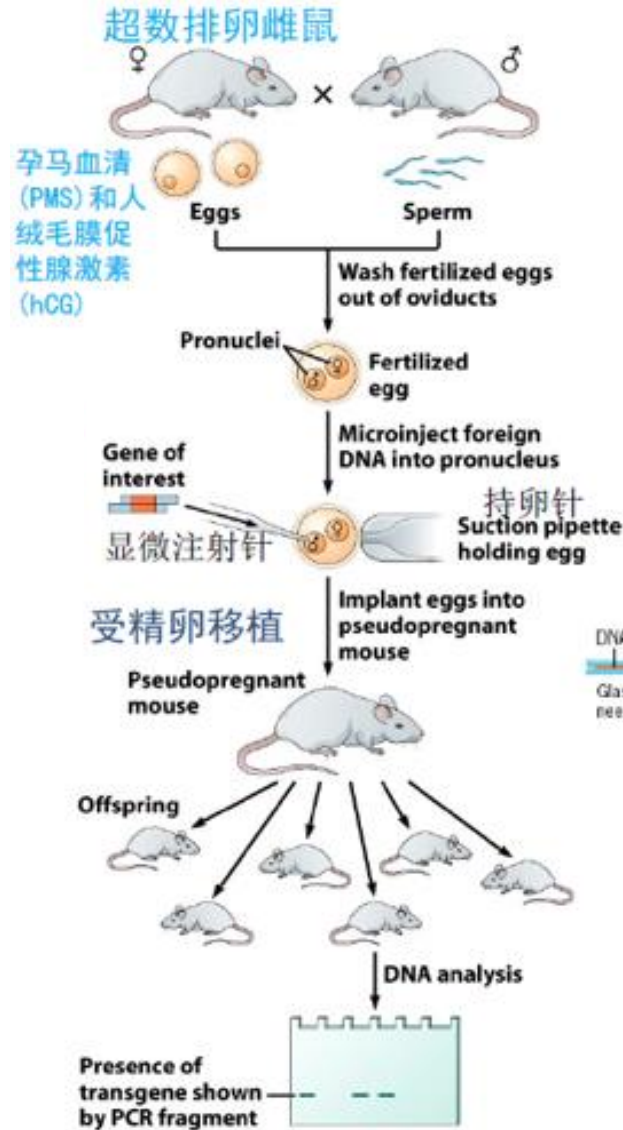


细胞核移植技术 — — — — — 体细胞

转基因动物：显微注射法

优点： 制备简单
外源基因容量大
应用范围广

缺点： 设备要求高
易对胚胎造成机械性损伤
DNA整合效率低
插入位点随机
基因组重排易位缺失
多拷贝首尾串联相接



首例表达人生长激素基因的转基因小鼠就是用这种方法获得的。

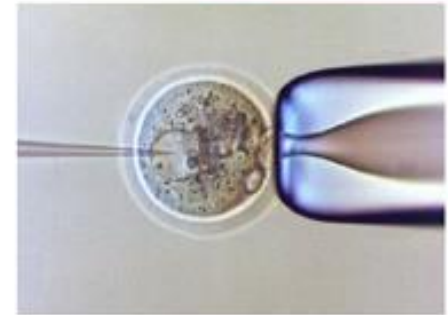
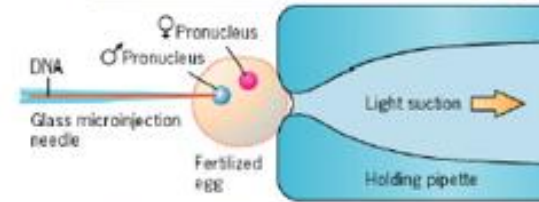
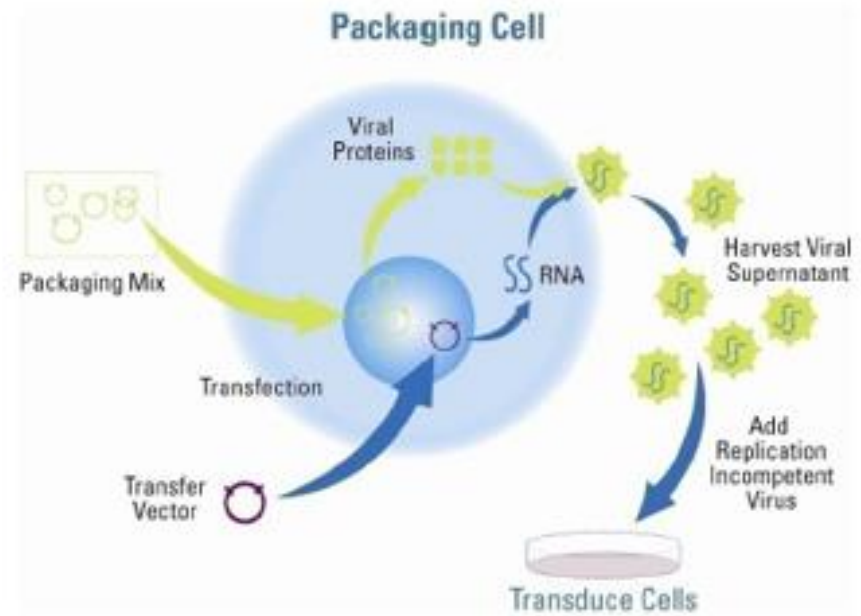


Figure 6-14
Genes and Genomics: A Short Course (3e)
© 2007 W. H. Freeman and Company

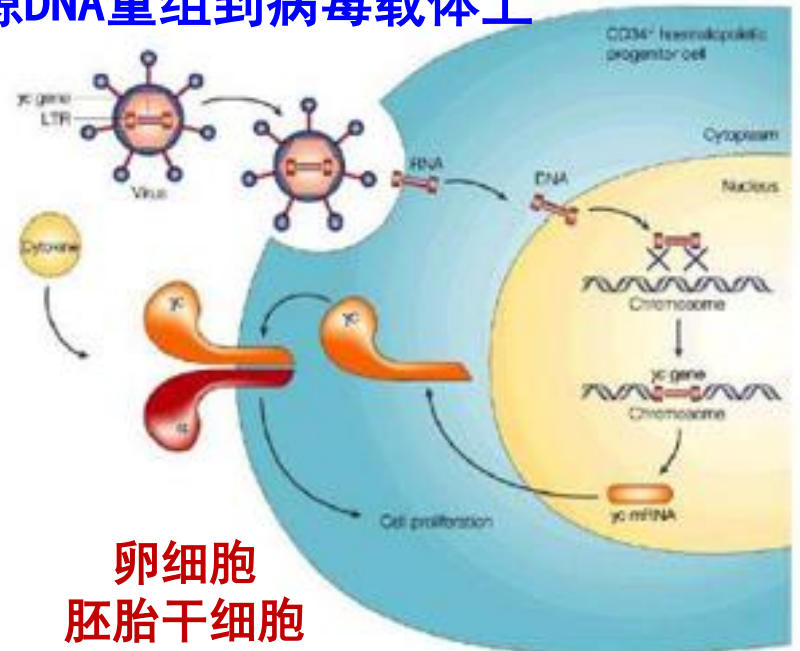
转基因动物：病毒感染法

优点：整合效率高
单拷贝整合
多个物种适用
无需特殊设备

缺点：外源基因大小受限（9.5kb）
随机整合
高胚胎致死率



1) 将外源DNA重组到病毒载体上



2) 病毒感染宿主细胞而将外源基因整合到宿主染色体上

转基因动物的应用

1. 研究基因的结构与功能，了解动物生命现象的内在本质
2. 动物新品种的培育
3. 构建医用或食用的蛋白反应器
4. 建立诊断和治疗人类疾病的动物模型
5. 可作为器官移植的供体
6. 基因治疗
7. 基因打靶

动物生物反应器

一般把目的片段在器官或组织中表达的转基因动物叫**动物生物反应器**。

利用动物器官作为药物生产的工厂

- Hemoglobin (血红蛋白)
- Antithrombin III (抗凝血酶III)
- Albumin (白蛋白)
- EPO (促红细胞生成素)
- Tissue plasminogen activator (组织纤维蛋白溶原酶激活因子)
- Protein C (C蛋白)
- Factor VIII (抗凝血因子IX)、Factor IX
- Fibrinogen (血纤维蛋白原)
- Alpha 1-antitrypsin (α 1-抗胰蛋白酶)



安全、高效、廉价
乳腺反应器
血液反应器
膀胱反应器

- 细菌不能产生大的蛋白质复合体、大分子量的分子。
- 体外培养真核细胞的产物往往不具备生物活性，也不能实现药物蛋白大规模生产。
- 转基因动物作为生物反应器表达的产物具有稳定的生物活性；产品质量高，易于提纯；产品成本低，实现大规模生产。

基因治疗

指将外源功能性目的基因导入患者体内，通过调控目的基因的表达，抑制、替代或补偿缺陷基因，从而恢复受累细胞、组织或器官的生理功能，达到疾病治疗目的。

- ✓ 生殖细胞基因治疗
- ✓ 体细胞基因治疗

基因打靶技术

基因剔除：运用**DNA**同源重组原理，迫使所导入的外源基因与小鼠基因组中特定的内源基因（目的基因或靶基因）发生同源重组（定点整合或基因打靶），而获得的内源目的基因缺失或功能丧失的转基因技术。

基因替换：由于外源基因与动物基因组中特定的内源基因发生同源重组而相关的两个内源基因中的一个基因的编码区被另一个基因的编码区的拷贝所置换的转基因技术。

转基因动物应用面临的问题

- 目的基因整合与表达的效率较低，或者引起宿主细胞基因突变
- 转基因动物的负面效应：不育、胚胎死亡、流产、四肢畸形等异常现象。
- 研究费用高，需要相当的财力支持
- 基础理论研究薄弱
- 生物安全性问题
- 动物伦理问题