The background of the slide features a light blue, semi-transparent image of various cells, likely from a tissue culture, scattered across the surface. The cells are mostly oval or rounded in shape with some internal structure visible. The slide is framed by a black border with a thin red line just inside it.

第十五章 动植物细胞培养

- 动植物细胞培养是指动、植物细胞在体外条件下的存活或生长。此时细胞不再形成组织。动植物细胞培养与微生物细胞培养有很大的不同。

动物细胞培养与微生物培养区别

- 动物细胞无细胞壁，且大多数哺乳动物细胞附着在固体或半固体的表面才能生长；对营养要求严格，除氨基酸、维生素、盐类、葡萄糖或半乳糖外，还需有血清。动物细胞对环境敏感，包括pH、溶氧、温度、剪切应力都比微生物有更严的要求，一般须严格的监测和控制。

植物细胞培养与微生物培养区别

- 植物细胞对营养要求较动物细胞简单。但由于植物细胞培养一般要求在高密度下才能得到一定浓度的培养产物，以及植物细胞生长较微生物要缓慢，长时间的培养对无菌要求及反应器的设计也提出特殊的要求。

动植物、微生物细胞的培养比较

	微生物	动物细胞	植物细胞
大小	1-10	10-100	10-100
悬浮生长	可以	多数细胞需附着表面才能生长	可以，但易结团，无单个细胞
营养要求	简单	非常复杂	较复杂
生长速率	快，倍增时间0.5-5小时	慢，倍增时间15-100小时	慢，倍增时间24-74小时
代谢调节	内部	内部、激素	内部、激素
环境敏感	不敏感	非常敏感	能忍受广泛范围
细胞分化	无	有	有
剪切应力敏感	低	非常高	高
传统变异，筛选技术	广泛使用	不常使用	有时使用
细胞或产物浓度	较高	低	低

动植物细胞培养与产品

- 其产品包括
 - 疫苗
 - 单克隆抗体
 - 免疫调节剂
 - 酶
 - 激素

表 12-2 某些有工业化前途的植物细胞培养产物

名 称	价格(USD/kg)	用 途
长春新碱	≤1000000	抗肿瘤药物
长春花碱	≤3500000	抗肿瘤药物
保加利亚玫瑰油	2000—3000	香料、调味品
毛地黄毒苷	3000	心机能障碍
辅酶 Q-10	600	强心剂
可待因	650	麻醉剂、镇痛药
紫草宁	4000	消炎、抗菌、染料
苦橙花油	1125	香料
吗 啡	600	麻醉剂、镇痛药
当归根油	800	香料、中药
春黄菊油	500	香料、药物
茉 莉	500—2000	香料

第一节 动物细胞培养技术

- 动物细胞体外培养的历史可追溯到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法。在随后的近一个世纪里，随着细胞生物学、培养系统及培养方法等领域的不断丰富和完善，动物细胞培养技术得到了很大的发展。发展至今已成为生物、医学研究和应用中广泛采用的技术方法，利用动物细胞培养生产具有重要医用价值的酶、生长因子、疫苗和单抗等，已成为医药生物高技术产业的重要部分。大规模动物细胞培养在生物技术产业化进程中显示出强大的潜力。

动物细胞培养技术的发展

年份	技术发展概要
1907年	Harrison 创立体外组织培养法。
1951年	Earle 等开发了能促进动物细胞体外培养的培养基。
1957年	Graff 用灌注培养法创造了悬浮细胞培养史上绝无仅有的 $1 \times 10^{10} \sim 2 \times 10^{10}$ cells/L 的记录, 标志着现代灌注概念的诞生。
1962年	Capstle 成功地大规模悬浮培养小鼠肾细胞(BHK), 标志着动物细胞大规模培养技术的起步。
1967年	Van Wezel 用 DEAE-Sephadex A50 为载体培养动物细胞获得成功。
1975年	Sato 等在培养基中用激素代替血清使垂体细胞株 GH3 在无血清介质中生长获得成功, 预示着无血清培养技术的诱人前景。
1975年	Köhler 和 Milstein 成功地融合了小鼠 B-淋巴细胞和骨髓瘤细胞而产生能分泌预定单克隆抗体的杂交瘤细胞。
1986年	Demo Biotech 公司首次用微囊化技术大规模培养杂交瘤细胞生产单抗获得成功。
1989年	Konstantinovti 首次提出大规模细胞培养过程中的生理状态控制, 更新了传统细胞培养工艺中优化控制之理论。

一、动物细胞形态

1, 成纤维细胞型

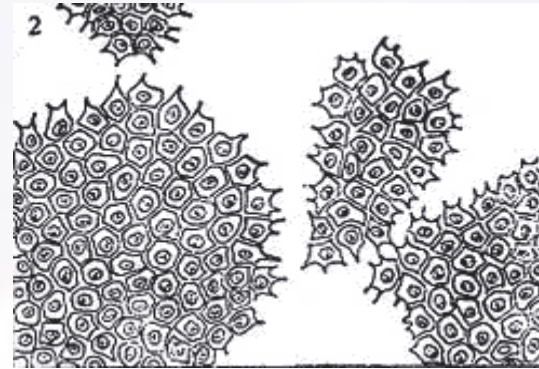
- 这种细胞形态与体内成纤维细胞形态相似故而得名。细胞体呈梭形或不规则三角形，中央有圆形核，胞质向外伸出2~3个长短不同的突起。细胞群常借原生质突连接成网，生长时呈放射状、漩涡或火焰状走行。除真正的纤维细胞外，凡由中胚层间充质来源的其他组织细胞，如血管内皮、心肌、平滑肌、成骨细胞等，也多呈成纤维细胞形态。



成纤维细胞型

2, 上皮细胞型

- 这种细胞呈扁平的不规则三角形，中央有圆形核，生长时常彼此紧密连接单层细胞片，起源于外胚层和内胚层组织的细胞，如皮肤表皮及衍生物(汗腺、皮脂腺等)。肠管上皮、肝、胰和肺泡上皮细胞。培养时皆呈上皮型。



上皮细胞型

3, 游走细胞型

- 这种细胞的培养需要在支持物上生长，一般不连接成片，细胞胞质经常出现伪足或突起，呈活跃的游走和变形运动，速度快而且方向不规则。此型细胞不很稳定，有时亦难和其他型细胞相区别，在一定条件下，如培养基化学性质变动等，它们也可能变为成纤维细胞型。



游走细胞型

4，多形性细胞型

- 除上述三种细胞外，还有一些组织和细胞，如神经组织的细胞等，难以确定它们的稳定形态，可统归多形性细胞。



多形性细胞型

二、动物细胞培养基组成及制备

1、培养基的组成

- 天然培养基
- 合成培养基

天然培养基

- 营养成分高，也最为有效。但成分复杂，个体差异大，来源也缺乏，因而使用受到限制。
- 动物血清是细胞培养中用量最大的天然培养基，血清含有丰富的营养物质，包括大分子蛋白质和核酸等，对动物细胞的生长繁殖具有促进作用。同时，血清对细胞贴壁和保护亦有明显作用，且能中和有毒物质的毒性，使细胞不受伤害。

合成培养基

- 根据天然培养基的成分，用化学物质模拟合成的，具有一定的组成。
- 优点：它给细胞提供了一个近似体内生存环境，又便于控制和标准化的体外生存环境。

合成培养基

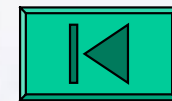
- 目前所有细胞培养室都已采用经标准化生产、组份和含量都相对固定的各种合成培养基。尽管现代的合成培养基成份和含量已经较为复杂，但仍然不能完全满足体外培养细胞生长的需要。在合成培养基中都或多或少的要加入一定比例的天然培养基加以补充。目前多采用胎牛血清、小牛血清、马血清等，比例从百分之几到百分之几十不等，要根据需要而定。其他各种天然培养基也可根据需要加入。

合成培养基

- 合成培养基的种类虽多，但一般都含有
 - [氨基酸](#)
 - [维生素](#)
 - [碳水化合物](#)
 - [无机盐](#)
 - [有机添加剂](#)
 - [血清](#)

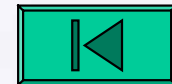
氨基酸

- 必需氨基酸是动物细胞本身不能合成的，因此，在制备培养基时需加入必需氨基酸，另外还需要半胱氨酸和酪氨酸。而且由于细胞系不同，对各种氨基酸的需要也不同。有时也加入其他非必需氨基酸，氨基酸浓度常常限制可得到的最大细胞密度，其平衡可影响细胞存活的生长速率。在细胞培养中，大多数细胞需要谷氨酰胺作为能源和碳源。



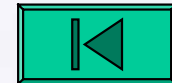
维生素

- Eagle基本培养基中只含B族维生素，其他维生素都靠从血清中取得。血清浓度降低时，对其他维生素的需求更加明显，但也有些情况，即使血清存在，它们也必不可少。维生素限制可从细胞存活和生长速率看出，而不是以最大细胞密度为指标。



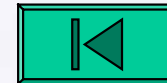
碳水化合物

- 碳水化合物是细胞生命的能量来源，有的是合成蛋白质和核酸的成分，主要有葡萄糖、核糖、脱氧核糖、丙酮酸钠和醋酸钠等。



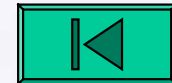
无机盐

- 无机盐是细胞的重要组成部分之一，它们积极参与细胞的代谢活动。无机盐中 Na^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 、 SO_4^{2-} 、 PO_4^{3-} 和 HCO_3^- 等金属离子及酸根离子是决定培养基渗透压的主要成分。对悬浮培养，要减少钙，可使细胞聚集和贴壁最少，碳酸氢钠浓度与气相 CO_2 浓度有关。



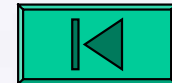
有机添加剂

- 复杂培养基都含有核苷、柠檬酸循环中间体、丙酮酸、脂类、氧化还原剂如抗坏血酸、谷胱甘肽等及其他各种化合物。同样，当血清量减少时，必须添加这种化合物，它们对克隆和维持这些特殊细胞有益。



血清

- 组织细胞培养中常用的天然培养基是血清。这是因为血清中含有大量的蛋白质、核酸、激素等丰富的营养物质，对促进细胞生长繁殖，粘附及中和某些物质的毒性起着一定的作用。最常用的是小牛血清，胎牛血清。人血清用于一些人细胞系。大多数动物细胞培养必须在培养基中添加血清，但在许多情况下，细胞可在无血清条件下维持和增殖。

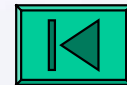


2、培养基制备以及制备过程中应考虑的因素

- pH值
- 缓冲能力
- 渗透压
- 粘度

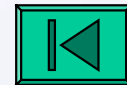
pH值

- 多数细胞系在pH=7.4下生长得很好。尽管各细胞株之间细胞生长最佳pH值变化很小，但一些正常的成纤维细胞系以pH=7.4~7.7最好，转化细胞以pH=7.0~7.4更合适。据报道，上皮细胞以pH=5.5合适。为确定最佳pH值，最好做一个简单的生长实验或特殊功能分析。



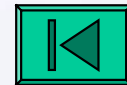
缓冲能力

- 碳酸盐缓冲系统由于毒性小、成本低、对培养物有营养作用，因此比其他缓冲系统用得更多。在生理pH值条件下的缓冲能力差。



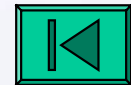
渗透压

- 多数培养细胞对渗透压有很宽的耐受范围，一般常用冰点降低或蒸汽压升高测定。如果自己配培养基，可通过测定渗透压防止称量和稀释等造成的误差。



粘度

- 培养基的粘度主要受血清含量的影响，在多数情况下，对细胞生长没有什么影响。在搅拌条件下，用羧甲基纤维素增加培养基的粘度，可减轻细胞损害。这对在低血清浓度或无血清下条件下培养细胞显得尤为重要。



二、培养技术

- 动物细胞大规模培养与实验室培养相比，培养条件更严格，控制难度更大，动物细胞的体外培养有两种类型：
 - 一类是贴壁依赖性细胞（非淋巴组织的细胞和许多异倍体体系的细胞）。这一类需采用贴壁培养。
 - 非贴壁依赖性细胞（来源于血液、淋巴组织的细胞，肿瘤细胞和某些转化细胞）。这一类可采用类似微生物培养的方法进行悬浮培养。

1, 贴壁培养

- 指大多数动物细胞在离体培养条件下都需要附着在带有适量正电荷的固体或半固体的表面上才能正常生长, 并最终在附着表面扩展成单层。

贴壁培养的基本操作过程

- 采集活体动物组织；
- 在无菌条件下采用物理(机械分散法)或化学(酶消化法)的方法将活体动物组织分散成细胞悬液；
- 细胞悬液过滤、离心、纯化、漂洗；
- 接种到加有适宜培养液的培养皿(瓶、板)中，再放入二氧化碳培养箱进行培养。

2，悬浮培养

- 是指少数悬浮生长型动物细胞在离体培养时不需要附着物，悬浮于培养液中即可良好生长。

悬浮培养的基本操作过程

- 采集活体动物组织；
- 活体动物组织分散、过滤、纯化、漂洗；
- 接种于适宜培养液中，置于特定的培养条件下培养。

悬浮培养的优点

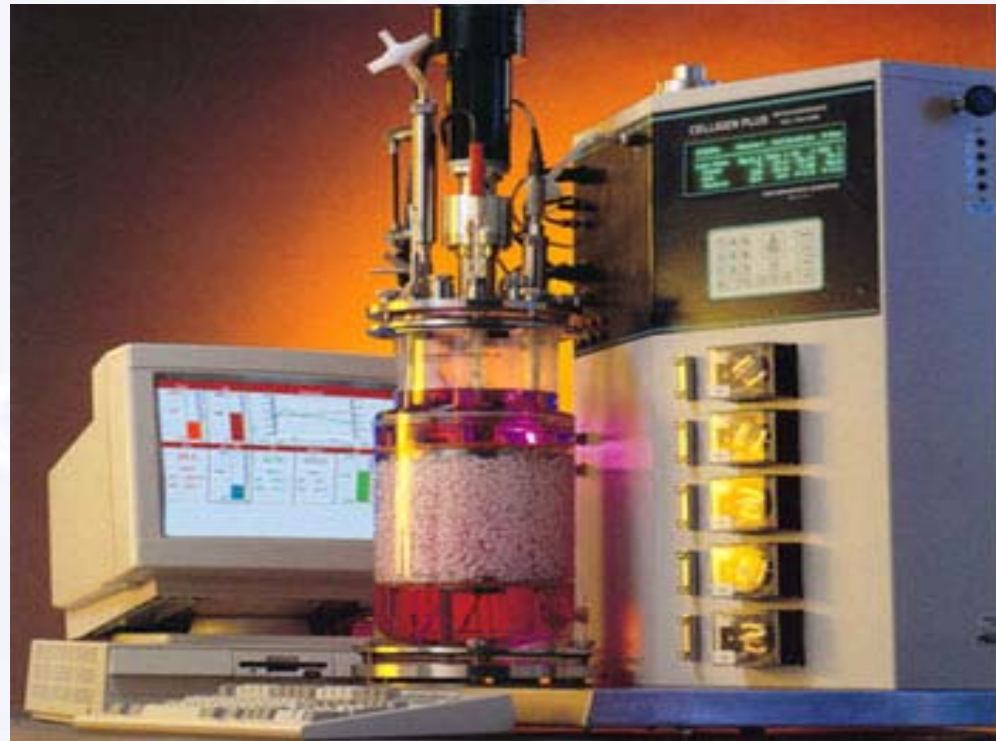
- 传代时不需要再分散，只需按比例稀释后即可继续培养。
- 细胞增殖快，产量高，培养过程简单，是大规模培养动物细胞的理想模式。

在动物体中只有少数种类的细胞适于悬浮培养

- 培养过程中，为确保细胞呈单颗粒均匀悬浮状态，需采用搅拌或气升式反应器，以较低搅拌速度及一定速度通入含5%CO₂的无菌空气，保持细胞悬浮态并维持培养液溶解氧。
- 此外不同细胞悬浮条件亦异，为使细胞不致凝集、成团或沉淀，在配制培养基的基础盐溶液中不加钙和镁离子。间歇或连续更换部分培养液，可维持pH值，若使用HEPES缓冲盐溶液时尚可不必连续通入含5%CO₂空气。

悬浮培养的反应器

- 气升式反应器
- 笼式通气搅拌罐
- 中空纤维管
- 陶质矩形通道蜂窝状生物反应器



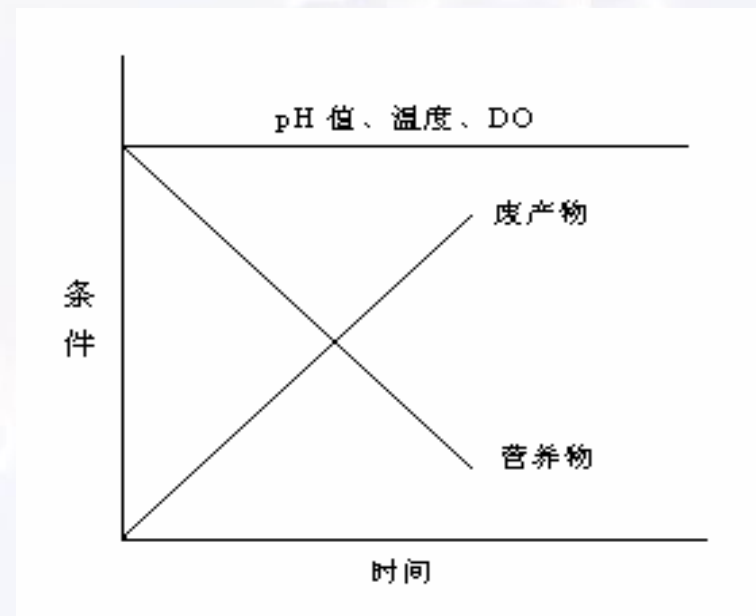
笼式通气搅拌罐

3， 培养方式

- 动物细胞无论是贴壁培养或是悬浮培养，均可采用
 - 分批式；
 - 分批补料式；
 - 半连续式；
 - 连续式。
- 从培养系统来看，主要采用
 - 固定化培养系统；
 - 微载体系统，且以灌注式连续培养方式为佳。

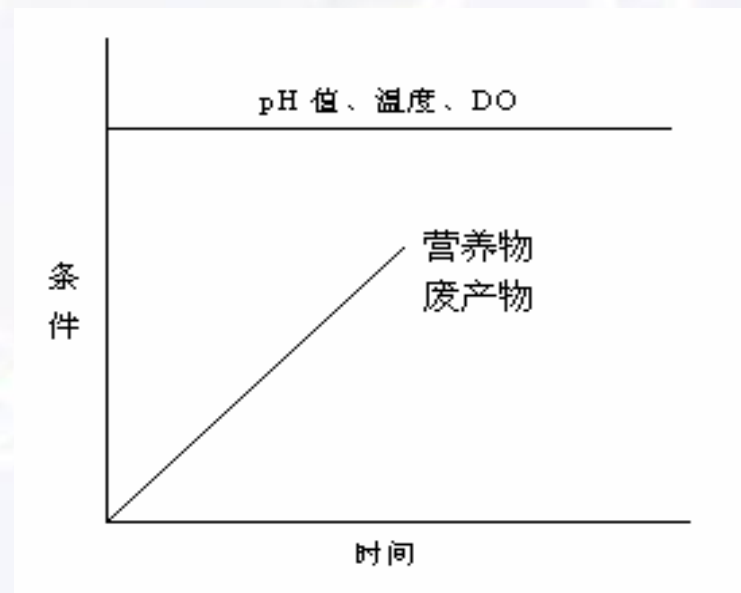
分批式培养(Batch culture)

细胞分批式培养的生长曲线与微生物细胞的生长曲线基本相同。在分批式培养过程中，可分为延滞期、对数生长期、减速期、平稳期和衰退期等五个阶段。



分批补料式培养(Fed-batch culture)

根据分批补料控制方式不同，有两种分批补料式培养方式：无反馈控制流加和有反馈控制流加。



半连续式培养(Semi-continuous culture)

- 半连续式培养是在分批式培养的基础上，将分批培养的培养液部分取出，并重新补充加入等量的新鲜培养基，从而使反应器内培养液的总体积保持不变的培养方式。

连续式培养(Continuous culture)

- 动物细胞的连续培养一般是采用灌注培养。灌注培养是把细胞接种后进行培养，一方面连续往反应器中加入新鲜的培养基，同时又连续不断地取出等量的培养液，但是过程中不取出细胞，细胞仍留在反应器内，使细胞处于一种营养不断的状态。

固定化培养法

- 动物细胞限制或定位于特定空间位置的培养技术谓之细胞固定化培养法。动物细胞几乎都可采用固定化方法培养。固定化方法有：
 - 吸附法（所用载体有陶瓷颗粒、玻璃珠及硅胶颗粒）
 - 包埋法（将细胞包埋于琼脂、琼脂糖、胶原及血纤维等海绵状基质中）

固定化培养优点

- 细胞可维持在较小体积培养液中生长；
- 细胞损伤程度低；
- 易于更换培养液；
- 细胞和培养液易于分离；
- 培养液中产物浓度高，简化了产品分离纯化操作。

固定化培养装置

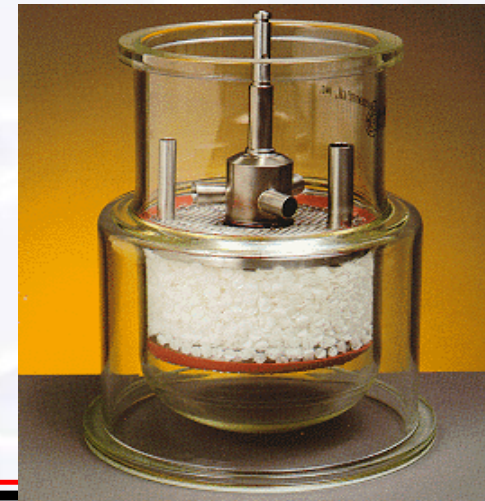
- 多层平板装置
- 螺旋卷膜培养器
- 多层托盘式培养器
- 卷带式培养器
- 中空纤维及流化床式培养器

中空纤维培养器优点

- 细胞生长密度高，可达 10^8 个 / 毫升以上，细胞处于接近生理状态的理化梯度中；
- 营养物质可有效分布，代谢废物可及时排除；
- 细胞培养可达数月，易于实现连续培养；
- 细胞分泌的蛋白质浓度高。产品纯度可高达60%~90%；利于降低成本；
- 反应器体积小并可用于培养多种细胞。

微载体培养方法

- 将动物细胞吸附于微载体表面，在培养液中进行悬浮培养，使细胞在微载体表面长成单层的培养方法称为微载体培养法或微珠培养法。
- 制备微载体的材料主要有：
 - 葡聚糖（DEAE-Sephadex A₅₀及A₂₅）
 - 塑料
 - 明胶
 - 玻璃
 - 纤维素



微载体培养优点

- 兼具单层培养和悬浮培养的优势，且是均相培养。
- 细胞所处环境均一，放大容易。
- 培养操作可系统化、自动化，障低了污染发生的机会。

三、培养条件控制

- 动物细胞生长缓慢，又具有锚地依赖性，培养时为防止污染，除反应器密封性能良好外，尚需添加抗生素，培养过程还要求培养器、管道及接头处所用材质不可释放出对细胞有毒害的物质。
- 在分批培养时，随着细胞生长，营养消耗，必然产生乳酸等代谢物的积累，引起细胞衰退死亡，需更换培养液或移植继代培养。

- 动物细胞培养过程亦应控制一定的环境条件，如培养温度、溶解氧、pH、罐压及搅拌速度等。
- 动物细胞对环境变化适应能力较微生物细胞小得多，故条件控制精密度要求更高。其中特别重要的是溶解氧和pH的控制。

四、动物细胞培养存在的问题

- 细胞密度低，细胞生产率低，产物浓度也很低。
- 细胞群体在大规模、长时间培养过程中分泌产物能力的丢失或产物活性的降低依然是细胞培养领域深感棘手的问题。
- 动物细胞培养基，培养设备以及培养用微载体颇为昂贵，限制了细胞培养工程在发展中国家的开展。

五、动物细胞培养发展的方向

- 总方向：大型化、自动化、精巧化、低成本、高细胞密度、高目的产品产量。
 - 开发能高密度生长、能分泌大量目标产品的细胞系。
 - 开发细胞生长性能优良、解离细胞容易，并能重复使用的新型廉价微载体。
 - 研制更大规模的高无菌条件的生物反应器和剪切力小、混合性能良好的新型搅拌系统。
 - 传感器、自动控制技术的应用
 - 开发新型无血清培养基

第二节 植物细胞培养技术

- 在人工控制下高密度大量培养有益植物细胞技术称之为植物细胞大规模培养，其目的在于通过细胞工业规模培养，获得细胞、初级及次级代谢产物，为药品、食品及化工行业提供服务。尽管植物细胞实验室与工业化培养在技术上有许多相似之处，但培养方式、设备及条件和培养基等亦有很大差别。

一、培养基

- 培养基的成分由无机盐类、碳源、维生素、植物生长激素、有机氮源、有机酸和一些复合物组成。
- 选择培养基的基本原则：
 - ✓ 需要根据不同培养对象、培养目的及培养条件探索适宜培养基。
 - ✓ 选择的培养基在培养过程使细胞总体积倍增时间1天左右为宜。

二、培养方式

- 悬浮培养法
 - 分批培养法
 - 半连续培养法
 - 连续培养法
- 固定化培养法

1, 分批培养法

- 主要采用气升式反应器，其培养过程用通气代替搅拌，细胞产量高于平叶轮培养器。本培养方法中植物细胞生长规律与微生物相似，随着细胞增长，培养液营养物质不断下降。细胞增长过程也分为延迟期、对数生长期、转换期、静止期及衰减期等阶段。

2, 半连续培养法

- 在反应器中投料和接种培养一段时间后，将部分培养液和新鲜培养液进行交换的培养方法称之为半连续培养法。反应过程通常以一定时间间隔进行数次反复操作以达到培养细胞与生产有用物质的目的。

3，连续培养法

- 采用连续培养反应器，在投料和接种培养一段时间后，以一定速度连续采集细胞与培养液，并以同样速度供给新鲜培养基，此种培养方式可使细胞生长环境长期维持恒定。
- 连续培养法细胞生产能力一般较分批法高，但因细胞生长缓慢，培养时间长，要维持系统无菌状态，技术条件要求相当苛刻。

4，固定化培养法

- 固定化培养采用固定化反应器，这类反应器有网状多孔板、尼龙网套及中空纤维膜等形式。
- 固定化培养法的优点在于细胞位置固定，易于获得高密度细胞群体及建立细胞间物理学和化学联系，维持细胞间物理化学梯度，利于细胞组织化，易于控制培养条件及获得次生产物。

三、影响细胞培养因素

- 细胞种质影响
- 外界因素影响
 - 光照影响
 - 温度影响
 - 培养基成分的影响
 - 搅拌方式与通气的影响