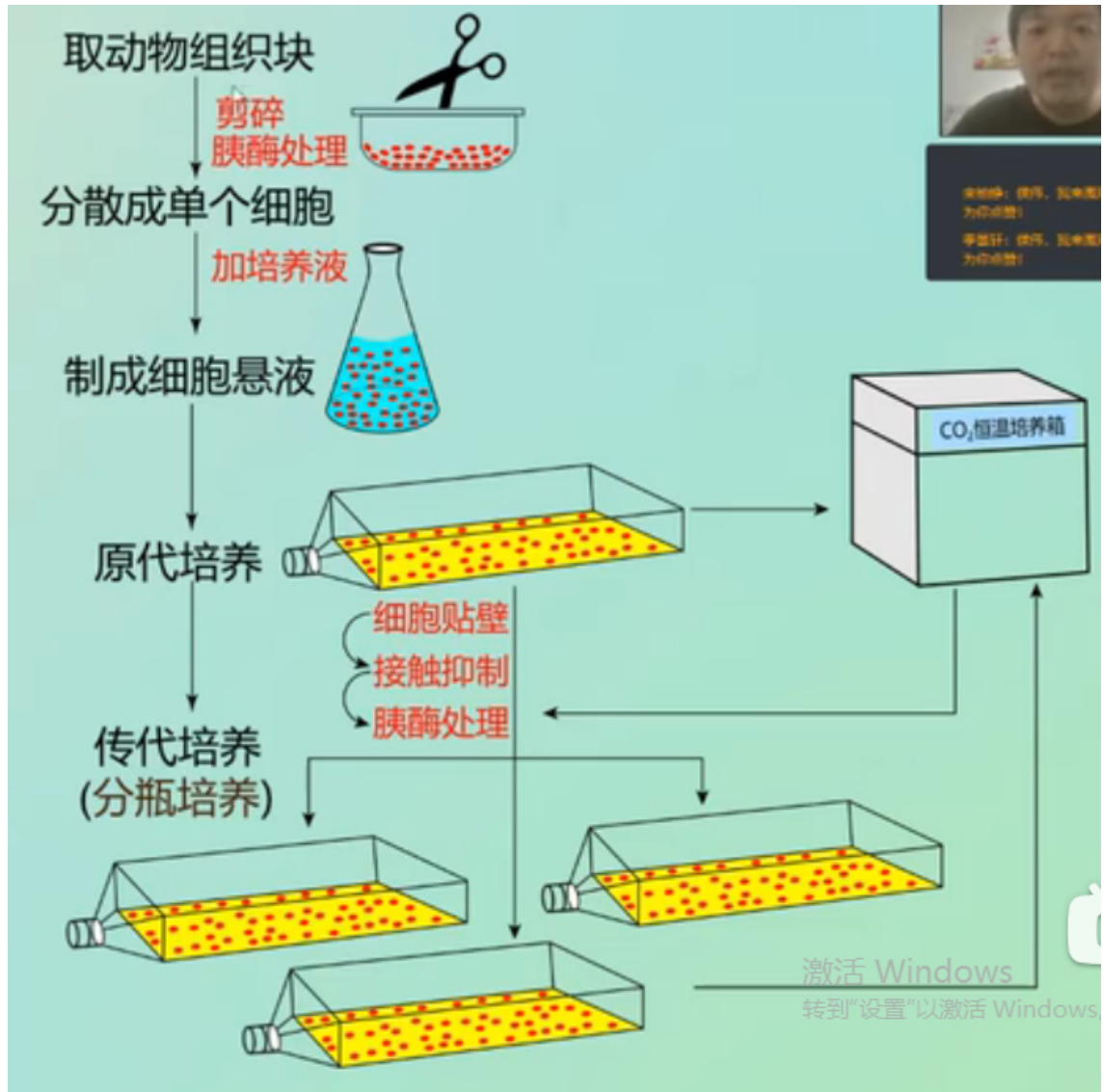


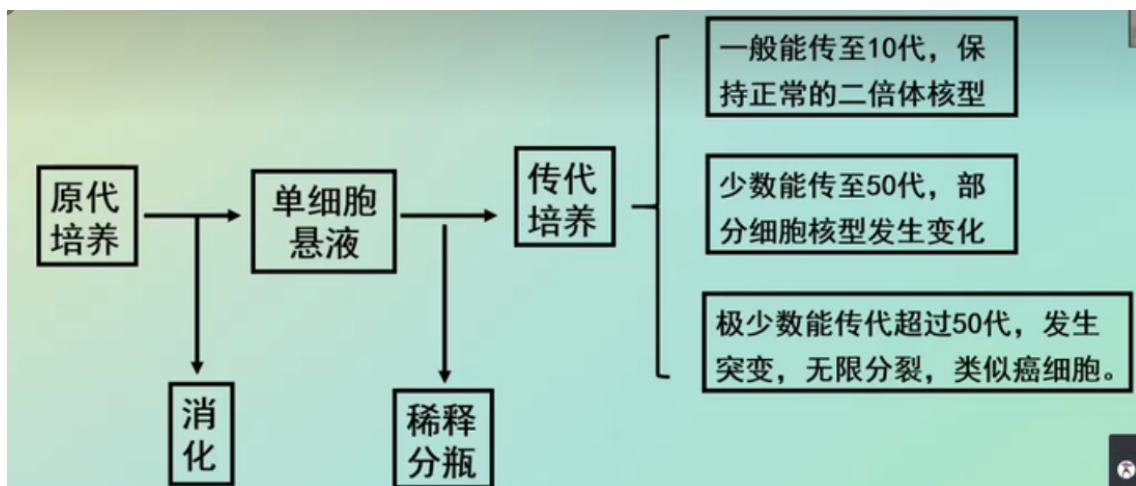
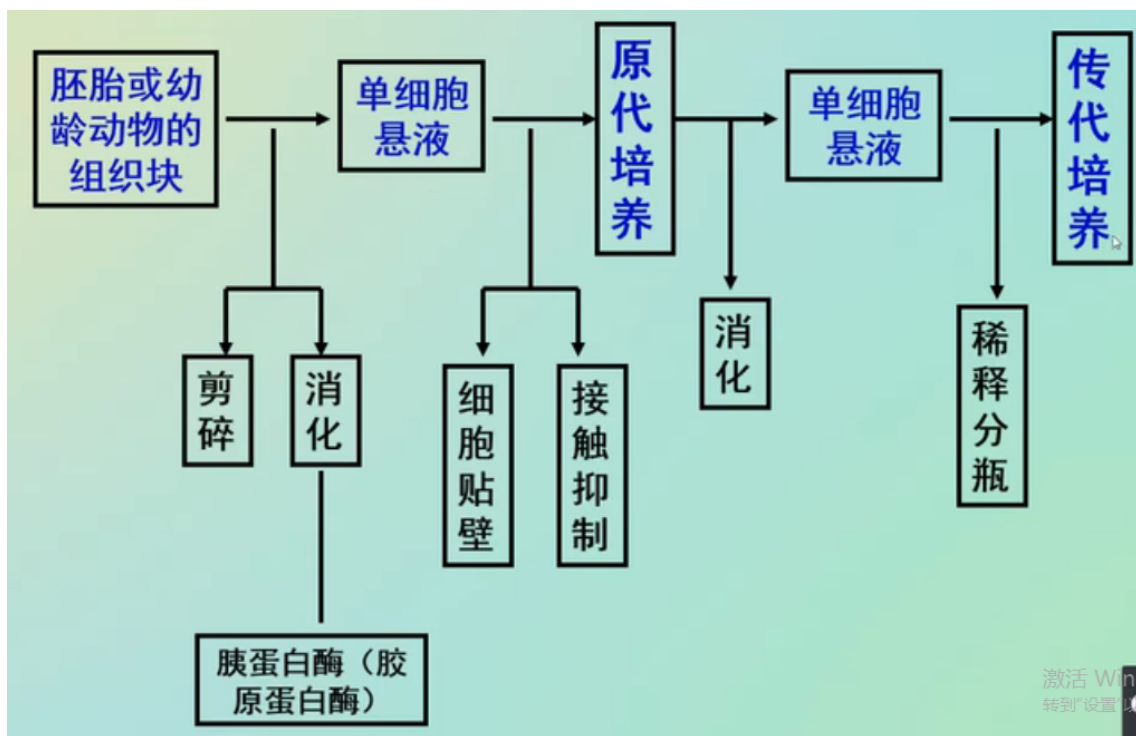
【生物】选必三：动物细胞工程

动物细胞培养

1. 概念：从动物机体中取出相关的组织，将它分散成单个细胞，然后放在适宜的培养基中，让这些细胞生长和增殖。



2. 过程：



说明：

- 接触抑制：细胞在贴壁生长过程中，随着细胞分裂，数量不断增加。最后形成单层细胞。此时细胞间相互接触，细胞分裂和生长停止。
- 核型：是指染色体组在有丝分裂中期的表型，是染色体数目、大小、形态特征的总和。
- 选用胚胎或幼龄动物的组织块的原因：分裂能力强，容易培养；
- 贴附性细胞的特点：存在**细胞贴壁**和**接触抑制**。
- 进行传代培养的原因：动物组织消化后经过初次培养已经贴满瓶壁，出现接触抑制，细胞不再分裂。一次传代培养，细胞分裂3到5次就又会再次出现接触抑制，需要用胰蛋白酶消化后才能继续传代培养。
- 用胰蛋白酶分散细胞，说明细胞间的物质主要是蛋白质。
- 不能使用胃蛋白酶分散细胞，因为多数动物细胞培养的适宜pH为7.2—7.4，胃蛋白酶在此环境中没有活性，而胰蛋白酶在此环境中活性较高。
- 胰蛋白酶处理时间不能太长。

3. 条件：

【无菌、无毒的环境】

- 对培养液和所有培养用具进行**灭菌**处理；
- 在细胞培养液中加入一定量的**抗生素**，以防培养过程中的污染；

- **定期更换培养液**，以清除代谢产物，防止细胞代谢产物积累对细胞自身造成危害。

【营养】

- 细胞体外培养所需的营养物质与体内基本相同，例如，糖、氨基酸、**促生长因子**、无机盐、微量元素等。将细胞所需的上述营养物质按照其种类和所需的数量严格配制而成的培养基，称为合成培养基。
- 在使用合成培养基时，通常需要加入**血浆、血清**等一些天然成分。

【温度和 pH】

- 细胞体外培养的适宜温度一般与动物的提问相近。
- 多数细胞生存的适宜 pH 为 7.2 – 7.4。

【气体环境】

- 细胞培养所需气体主要有 O₂ 和 CO₂，O₂ 是细胞代谢所必需的，CO₂ 的主要作用是**维持培养液的 pH**。
- 进行细胞培养时，通常采用培养皿或松盖培养瓶，将其置于含 95% 空气加 5%CO₂ 的混合气体的培养箱中进行培养。

4. 植物组织培养和动物细胞培养的比较

项目	植物组织培养	动物细胞培养
原理	植物细胞的全能性	细胞增殖
培养基性质	固体培养基	液体培养基
培养基特有成分	蔗糖、植物激素	葡萄糖、动物血清
培养结果	植物体	大量动物细胞
培养目的	快速繁殖、培育无病毒植株	获得细胞或细胞分泌蛋白

5. 应用

- 可以用于制备药物，比如病毒疫苗、干扰素、单克隆抗体等；
- 用于基因工程技术中常用的受体细胞；
- 用于检测有毒物质，判断某种物质的毒性。

干细胞培养及其应用

干细胞

- 概念：动物和人体内仍保留的少数具有分裂和分化能力的细胞。在一定条件下，干细胞可以分化成其他类型的细胞。
- 分布：存在于早期胚胎、骨髓和脐带血等多种组织和器官中；
- 分类：按照来源，干细胞分为胚胎干细胞和成体干细胞等。
 - 胚胎干细胞（ES 细胞）：来源是早期胚胎，功能是具有分化为成年动物体内的任何一种类型的细胞，并进一步形成机体的所有组织和器官甚至个体的潜能。
 - 成体干细胞分为造血干细胞、神经干细胞和精原干细胞。

【造血干细胞】来源：成体的骨髓、外周血和脐带血中；功能：分化成白细胞、红细胞等多种血细胞；

【神经干细胞】来源：成体的神经组织；功能：分化成神经细胞；

【精原干细胞】来源：成体的睪丸；功能：分化成精原细胞。

诱导多能干细胞 (iPS 细胞)

- 1. 概念：通过体外诱导小鼠成纤维细胞，获得了类似胚胎干细胞的一种细胞，称为诱导多能干细胞，简称 iPS 细胞。
- 2. 制备方法：①将特定基因或特定蛋白导入细胞中；②用小分子化合物等诱导形成。
- 3. 优点：①诱导过程无需破坏胚胎；②iPS 细胞可以来源于病人自身的体细胞，将它移植回病人体内后，理论上可以避免免疫排斥反应。

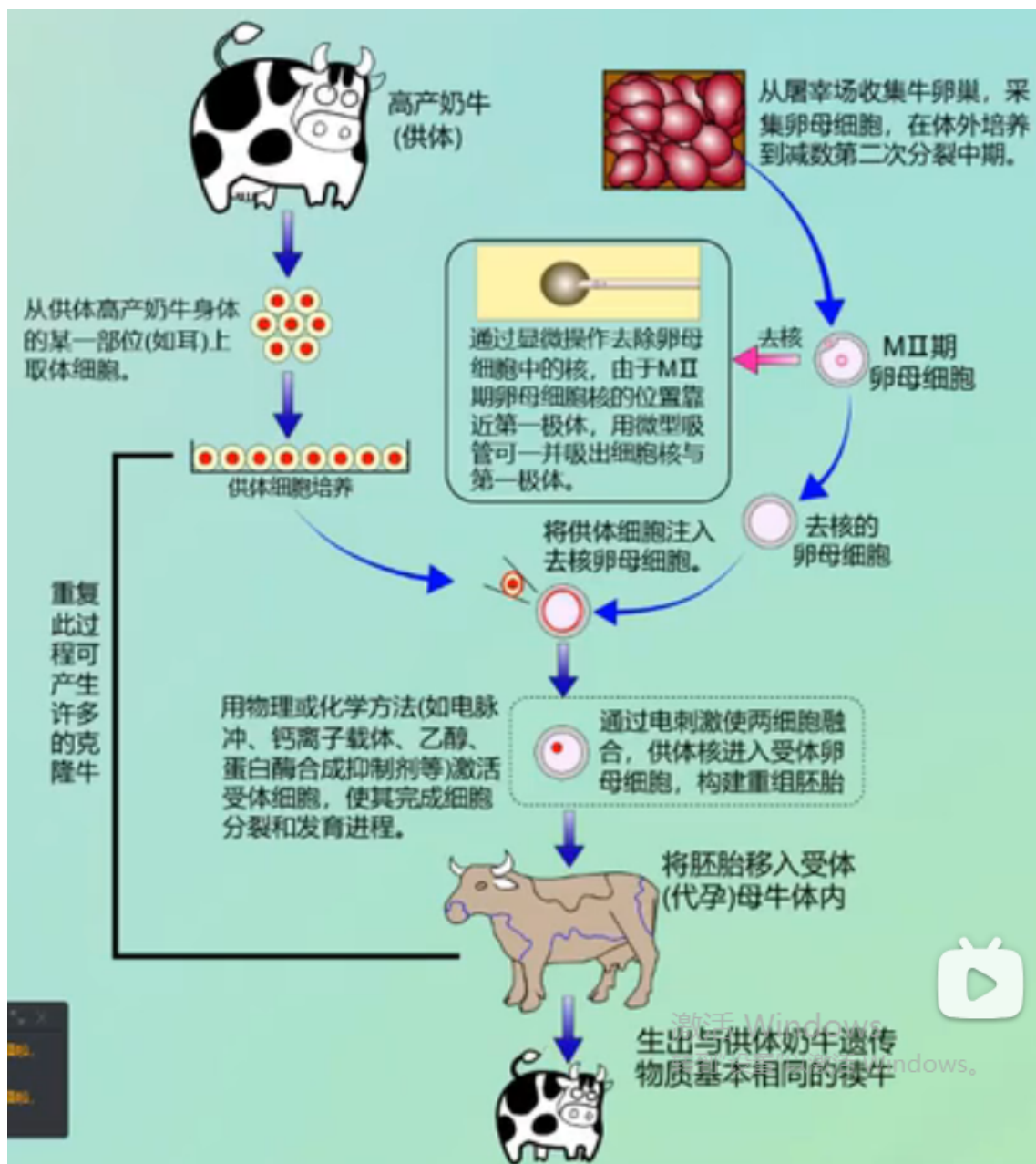
干细胞应用

有着自我更新能力及分化潜能的干细胞，与组织、器官的发育、再生和修复等密切相关，在医学上有着广泛的应用。

类型	应用
造血干细胞	治疗白血病及一些恶性肿瘤放疗或化疗后引起造血系统、免疫系统功能障碍等疾病
神经干细胞	治疗神经组织损伤和神经系统退行性疾病（如帕金森病、阿尔兹海默症等）
诱导多能干细胞（iPS 细胞）	可治疗小鼠的镰状细胞贫血症，在治疗阿尔兹海默症、心血管疾病等领域研究也取得了新进展。

动物体细胞核移植技术

- 1. 简介：高度分化的植物组织仍然保持着全能性，但动物细胞的全能性会随着**分化程度**的提高而逐渐受到限制，分化潜能逐渐变弱。因此，用动物细胞克隆的动物，实际上是通过核移植实现的（将体细胞的核移到去核的卵母细胞中）。
- 2. 概念：将动物一个细胞的细胞核移入去核的卵母细胞中，使这个重新组合的细胞发育成新胚胎，继而发育成动物个体的技术。
- 3. 原理：动物细胞核的全能性。
- 4. 类型：
 - 体细胞核移植：由于体细胞分化程度高，全能性难以表现，所以较难实现；
 - 胚胎细胞核移植：由于胚胎细胞分化程度低，全能性容易表现，所以较容易实现。
- 5. 过程：
 - 从供体高产奶牛身体的某部位取体细胞，培养供体细胞（动物细胞培养）；
 - 从卵巢采集卵母细胞，培养到**减数第二次分裂中期**；
 - 通过**显微操作**去除卵母细胞的细胞核，由于 M II 期卵母细胞核的位置靠近第一极体，用微型吸管可一并析出细胞核与第一极体；
 - 将供体细胞注入到卵母细胞外的**透明带**位置（注意不需要分离出供体细胞的细胞核）。
 - 通过**电刺激**使**供体细胞膜**和**卵母细胞膜**融合，供体核进入卵母细胞，构建重组胚胎。
 - 用物理（如电脉冲）或化学方法（如钙离子载体）激活受体细胞，使其完成分裂和发育过程。
 - 早期胚胎培养、胚胎移植。



6. 说明：

- 使用卵母细胞作为受体细胞的原因：①卵母细胞大，好操作；②含有的营养物质丰富；③含有促进细胞核全能性表达的物质；
- 核移植之前，去掉受体卵母细胞核的原因：保证核移植动物的核遗传物质全部来自有利用价值的动物提供的细胞；
- 用于核移植的供体细胞一般都选用传代 10 代以内的细胞，原因是为了保持正常二倍体的核型；
- 细胞核一直生产的克隆动物对体细胞供体细胞并没有进行 100% 的复制，因为核外有少部分 DNA（如线粒体 DNA）来自受体卵母细胞。
- 克隆羊多莉是世界上第一例经体细胞核移植出生的动物。它的培育成功，在理论上证明了分化了的动物细胞核也具有全能性；
- 目前核移植技术中普遍使用的去核方法是显微操作去核法。还有梯度离心、紫外光短时间照射、化学物质处理等其他方法。这些方法是在没有刺破透明带卵母细胞质膜的情况下，去除细胞核或使卵细胞核 DNA 变性，从而达到去核的目的。
- 通过核移植的方法得到的动物称为克隆动物。

7. 应用

- 医药卫生领域，转基因克隆动物可以作为生物反应器，生成许多珍贵的医用蛋白；

- 治疗人类疾病时，转基因克隆动物细胞、组织和器官可以作为异种移植的**供体**；
- 人的核移植胚胎干细胞经过诱导分化，形成相应的组织、器官后，可以用于组织器官的移植。

动物细胞融合

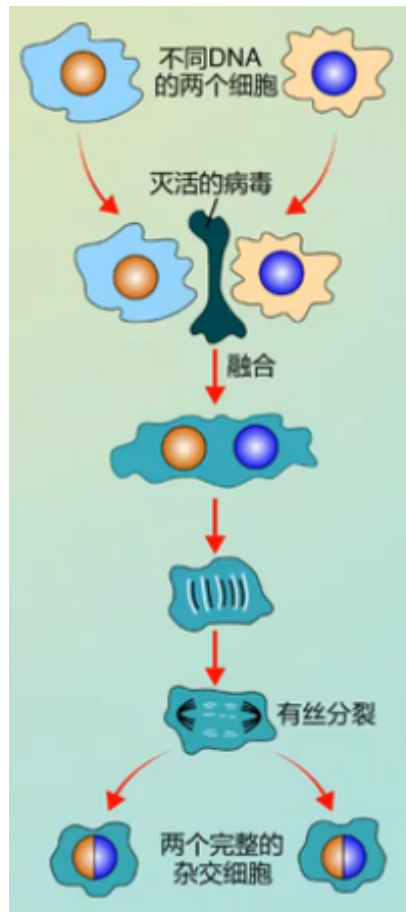
1. 概念：将两个或多个动物细胞融合为一个细胞的工程，又称**细胞杂交**。融合之后的单核细胞具有原来的两个或多个细胞的遗传信息，称为杂交细胞。

2. 原理：与植物原生质层融合的基本原理相同，都是**磷脂分子重新排布**。

3. 诱导融合的方法：

与植物原生质层融合的方法类似，常用的诱导因素有离心、震荡、电激、聚乙二醇（PEG），此外诱导动物细胞融合还可用**灭活的病毒**。

- 灭活病毒诱导融合的原理：灭活病毒表面含有糖蛋白和一些酶，可以与细胞膜表面的糖蛋白发生作用使细胞互相凝聚，细胞膜上的蛋白质分子和脂质分子重新排布，细胞膜打开，细胞发生融合。
- 灭活：用物理或化学的方法使病毒或细菌失去感染能力，但不破坏其抗原结构。



4. 意义：突破了有性杂交方法的局限，使得远缘杂交成为可能。这一技术成为研究细胞遗传、细胞免疫、肿瘤和生物新品种培育等的重要手段。特别是利用细胞融合技术而发展起来的杂交瘤技术，为制造单克隆抗体开辟了新途径。

单克隆抗体

1. 传统抗体：

- 获取方法：从人或动物体内反复注射某种抗原，使得动物获得抗体，并从动物的血清中提取抗体。
- 缺陷：产量低、纯度低；是**多克隆抗体**，特异性差。

2. B 淋巴细胞的特点：

当病原体感染哺乳动物后，哺乳动物体内会产生相应的 B 淋巴细胞。同一种抗原可能会产生高达几十万中特异性抗体。但一个 B 淋巴细胞只产生一种特异性抗体。由于 B 淋巴细胞不可无限增殖，我们可以通过将 B 淋巴细胞与癌细胞融合形成杂交细胞从而获得单抗体。

3. 技术手段：动物细胞融合和动物细胞培养。

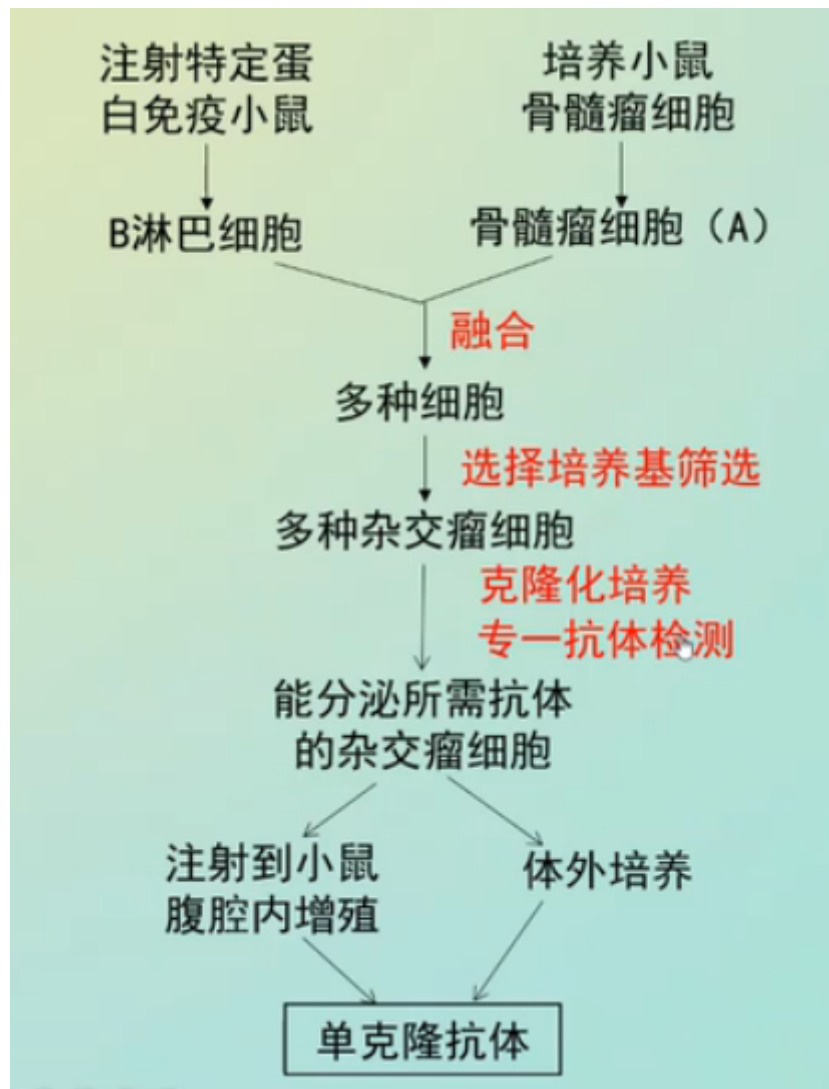
4. 原理：

- 每一种 B 淋巴细胞只产生一种特异性抗体；
- 细胞膜具有一定的流动性和细胞增殖。

5. 制备过程中所涉及三种细胞的特点：

- B 淋巴细胞：只产生一种特异性抗体，但寿命有限（即**专一性**）；
- 骨髓瘤细胞：能在体外无限增殖（即**无限增殖性**）；
- 杂交瘤细胞：由 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合得到，既具有**专一性**也具有**无限增殖**。

6. 过程：



步骤：

1. 用羊的红细胞对小鼠进行注射，使小鼠产生免疫反应，从产生免疫反应的小鼠的脾脏细胞中，得到抗羊红细胞的抗体，这说明小鼠的脾中形成了相应的 B 淋巴细胞；
2. 将鼠的骨髓瘤细胞与脾脏细胞中产生的 B 淋巴细胞融合，再用特定的选择性培养基进行筛选；培养基上，**未融合的清本细胞和融合的具有同种核的细胞都会死亡**，只有融合的杂种细胞才能生长。这种杂种细胞具有**迅速大量繁殖、产生转移抗体**的特点。

3. 对上述经选择性培养的杂交瘤细胞，进行**克隆化培养和抗体检测**，经多次筛选，得到足够数量的能分泌所需抗体的细胞。
4. 将杂交瘤细胞在体外条件下做大规模培养，或注射到小鼠腹腔内增殖，这样，从**细胞培养液或小鼠腹水**中，就可以提取出大量的单克隆抗体。

说明：

- 过程中遇到的选择培养基含有氨基蝶呤，细胞合成 DNA 有 D 和 S 两种途径，其中 D 途径能被氨基蝶呤阻断。人淋巴细胞中有 D 和 S 两种合成途径，但一般不分裂繁殖。鼠骨髓瘤细胞中只有 D 途径，没有 S 途径。
- 从多种杂交瘤细胞中选出我们需要的杂交瘤细胞采用的是有限稀释法。其原理是：将杂交瘤细胞培养液稀释后滴入多孔板，如果稀释度足够高，多孔板的一个孔里就可能只有 1 个杂交瘤细胞，培养之后，用标记的抗原等检测每个小孔上清液里是否含有我们需要的特异性的抗体。这样经过多次克隆化培养以及有限稀释法的筛选，就能选出需要的那种杂交瘤细胞。
- 对于传统抗体是**多克隆抗体**，由于细菌表面有多种糖蛋白分子都可以作为抗原刺激实验动物的 B 淋巴细胞，而一种 B 淋巴细胞只识别细菌表面的一种特定的糖蛋白并产生一种对应的抗体。因此实验动物血液会出现多重针对该细菌的抗体，但每一种抗体只能特异性的和细菌表面的一种特异性糖蛋白分子结合。
- 出现未融合的细胞是因为融合的成功率不是百分之百；出现融合的具有多种核的细胞是因为融合是随机的。
- 由于从小数脾脏中分离的 B 淋巴细胞是多种，所以融合的杂交瘤细胞也是多种。

7. 优点：特异性强、灵敏度高并可大量制备。

8. 应用

- 用于诊断试剂：由于单克隆抗体纯度高、特异性强，所以能准确的识别各种抗原物质的细微差异，病根抗原发生特异性结合。因此，单克隆抗体在诊断的应用上，具有准确、高效、简易、快速的优点。
- 用于疾病监测：例如，甲胎蛋白（AFP）是一种特异性较强的肿瘤标志物，用甲胎蛋白作为抗原免疫小鼠，制备抗 AFP 单克隆抗体，并与含有放射性同位素的标记物连接，单克隆抗体携带放射性标记物通过血液可到达全身几乎所有组织。由于肿瘤蛋白表面的 AFP 会和单克隆抗体特异性结合，所以放射性同位素标记物就不断积累在肿瘤上。通过一定的显影技术就可以发现肿瘤所在。
- 用于治疗疾病和运载药物：如果把抗癌细胞的单克隆抗体跟放射性同位素、化学药物或细胞毒素相结合，就可以制造出“生物导弹”，注入体内，借助单克隆抗体的导向作用，能将药物定向带到癌细胞所在位置，在原位杀死癌细胞。