

生物制药技术



第三章 细胞工程制药

General

细胞工程制药

Introduction

- ➔ ● 1 细胞工程制药概述
 - 1.1 概念及内容
 - 1.2 主要细胞工程药品
- 2 细胞融合技术
- 3 动物细胞融合技术（抗体制药）
- 4 适配子和肽配体
- 5 生物转化生产甾体药物

细胞工程的概念

应用细胞生物学和分子生物学等学科的理论技术，按照人们的需要，有计划、大规模地培养生物组织和细胞以获得生物及其产品，或者通过改变细胞的遗传组成以产生新的种或品种，为社会和人类提供需要。

理论基础

方法和手段

产品

细胞工程制药的主要内容

- 细胞融合技术
 - 原生质体融合：微生物、植物
 - 动物细胞融合：动物（单克隆抗体）
- 细胞培养技术
 - 微生物
 - 植物
 - 动物
- 生物转化



细胞工程制药的主要产品

- 新的微生物、植物和动物品种
- 单克隆抗体
- 疫苗、菌苗
- 细胞因子等生理活性物质
- 微生物保健品
- 甾体激素（类固醇）

General

细胞工程制药

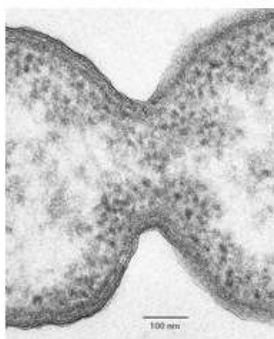
Introduction

- 1 细胞工程制药概述
- ➔ ● 2 细胞融合技术
 - 2.1 概念及分类
 - 2.2 基本步骤
 - 2.3 原生质体融合技术
- 3 动物细胞融合技术（抗体制药）
- 4 适配体和肽配体
- 5 生物转化生产甾体药物

细胞融合的概念及分类

人为地使两种不同的生物细胞在同一培养器中，用无性的人工方法进行直接接触，产生能同时表达两个亲本细胞有用性状的细胞杂交技术。

- 微生物原生质体融合
- 植物原生质体融合
- 动物细胞融合



细胞融合的基本步骤

- ➔ ◎ 标记亲本细胞的选择
- ➔ ◎ 细胞融合
- ◎ 杂种细胞的筛选
- ◎ 有用性状的检测

- ◎ 酶缺失型
- ◎ 抗药性
- ◎ 营养缺陷型

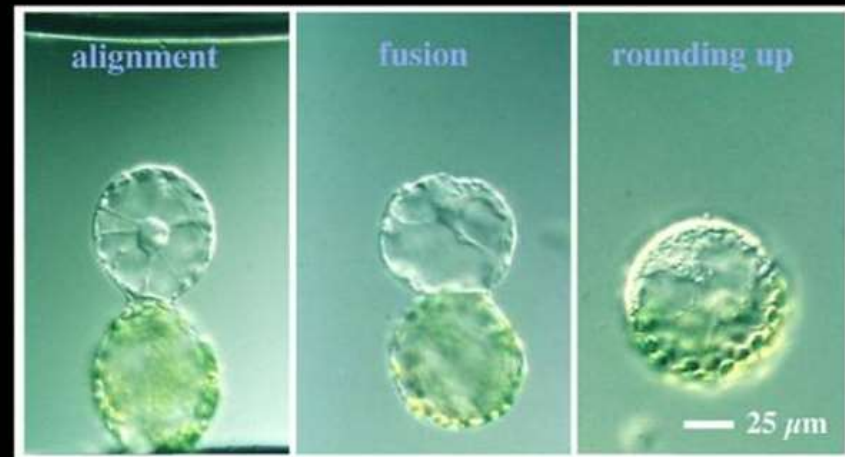
细胞融合的方法

- 离心力或冷渗透
- 仙台病毒、副流感病毒
- PEG（聚乙二醇）
 - 降低膜电位
 - 脱水作用使细胞膜结构破坏和细胞变形
- 电融合
 - 细胞在交变电场中成串珠状排列，直流高压电脉冲击穿细胞达到融合
 - 或先用PEG聚合，再用直流高压电脉冲融合



电融合

Electrofusion of Selected Single Cells

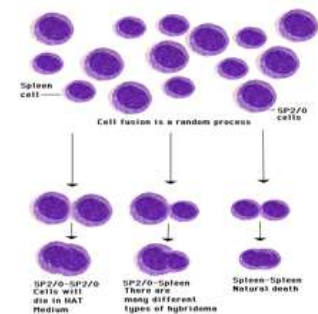


影响细胞融合的因素

- 促溶剂
- T: 37°C
- pH: 7.4~7.8
- 空气中氧的含量: >20%
- 离子类型: Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等
- 离子强度: 0.1mol/L
- 其它

细胞融合的基本步骤

- ④ 标记亲本细胞的选择
- ④ 细胞融合
- ➡ ④ 杂种细胞的筛选
- ④ 有用性状的检测



筛选原理: 培养过程中利用选择性培养基，终止同型双核、同型多核、异型多核以及未融合的两亲本细胞的繁殖，而仅允许异型双核细胞繁殖。

杂种细胞的筛选方法

- HAT选择系统 (杂交瘤技术)

- 酶缺失选择系统

- 抗药性筛选系统

- $ArBs^+ AsBr^- \longrightarrow ArBr^-$

- 营养互补选择系统

- $A^-B^+ + A^+B^- \longrightarrow A^+B^+$



(原生质体融合)

细胞融合的基本步骤

- ① 标记亲本细胞的选择

- ② 细胞融合

- ③ 杂种细胞的筛选

- ④ 有用性状的检测

- ⑤ 免疫学反应

- ⑥ 遗传标记

- ⑦ 核酸分子杂交



有用性状：杂种细胞能产生一些对人类有用物质的性状或对人类生活有用的性状。

原生质体融合

将两个亲株的细胞壁分别通过酶解作用加以除去，使其在高渗环境下释放出只有原生质膜包裹着的球状原生质体，然后将它们混合，在外力作用下助融，使它们的细胞质和遗传物质充分融合，形成融合细胞的过程。

原生质体制备

促融剂助融

融合细胞生成

叶肉细胞的原生质体

Leaf Protoplasts



原生质体融合的基本步骤

① 筛选得到有遗传标记的亲本细胞

② 原生质体制备

- 预处理: EDTA、青霉素等
- 细胞壁破壁: 酶法、机械法

③ 原生质体融合

- PEG相对分子量4000~6000, 最终浓度30%~40%, CaCl_2 浓度0.5mol/L

④ 原生质体再生

⑤ 融合子筛选

⑥ 有用性状测定

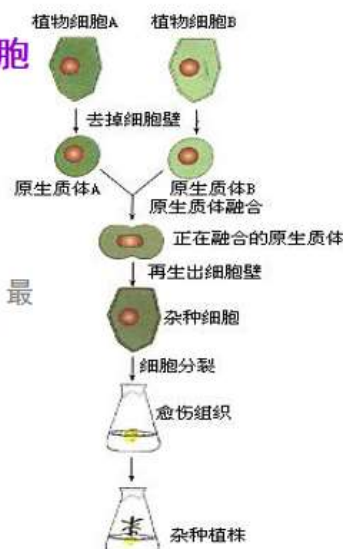
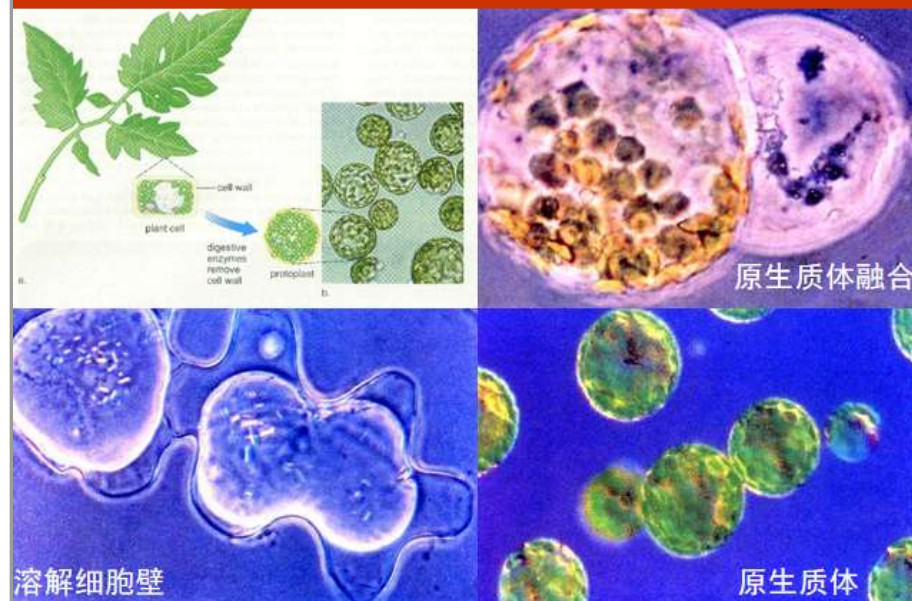


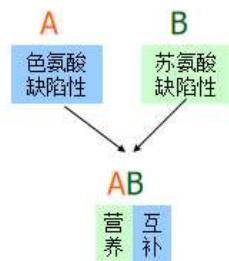
图 4-7 植物体细胞杂交过程示意图

原生质体与原生质体融合



融合子的筛选

- 遗传互补筛选法
- 抗性互补筛选法
- 物理特性筛选法
- 生长特性筛选法
 - 粉蓝烟草、朗氏烟草



酶法破壁

• 制备微生物原生质体常用酶

- 溶菌酶、溶葡萄球菌素（细菌、放线菌）、纤维素酶、壳多糖酶（霉菌）、蜗牛酶、酵母细胞壁裂解酶（酵母）

• 制备植物原生质体常用酶

- 纤维素酶、果胶酶、半纤维素酶



图 4-4 “白菜—甘蓝” 照片

