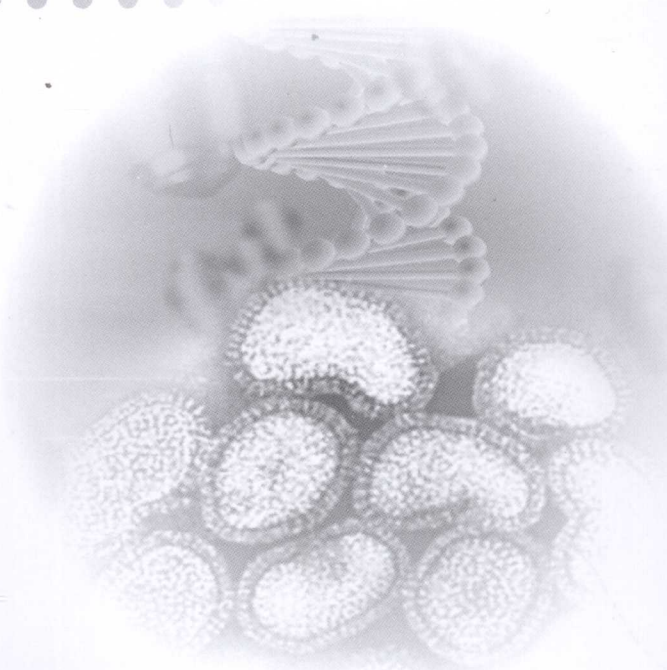




生命科学核心课程系列教材

# 细胞工程

周岩 主编



科学出版社

013031796

Q813

44

生命科学核心课程系列教材

# 细胞工程

主编 周岩

副主编 许君

胡根海

石瑛



Q813  
44

科学出版社

北京



北航

01636479

887180810

## 内 容 简 介

本书系统地介绍了细胞工程的基本理论与技术,内容主要包括细胞工程基础、植物细胞工程和动物细胞工程。全书共分为13章,依次为绪论(细胞工程的研究内容、发展简史和应用前景)、细胞全能性与形态发生、植物细胞工程常规技术、植物脱毒与离体无性繁殖技术、单倍体诱导和染色体加倍、植物胚胎培养、植物细胞培养与次级代谢产物生产、植物原生质体培养和细胞融合、种质离体超低温保存与人工种子、动物细胞培养、动物细胞融合与单克隆抗体、胚胎工程与动物克隆和干细胞技术。本书内容简明,突出基础性和实用性,为了方便学习,教材每章配有知识框、小结、思考题、扩展阅读资料。

本书适合作为高等院校生物工程、生物技术、生物科学、医药和农林类专业的本科教材及相关专业教师和科技人员的参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/周岩主编. —北京:科学出版社,2012

生命科学核心课程系列教材

ISBN 978-7-03-035243-9

I. ①细… II. ①周… III. ①细胞工程-高等学校-教材 IV. ①Q813

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第177012号

责任编辑:席慧 高璐佳 / 责任校对:郑金红

责任印制:阎磊 / 封面设计:迷底书装

科学出版社出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

文林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2012年7月第一版 开本:787×1092 1/16  
2012年7月第一次印刷 印张:19 1/2

字数:496 000

定价:40.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

## 《细胞工程》编委会名单

主 编 周 岩

副主编 许 君 胡根海 石 瑛

编 委 (按姓氏汉语拼音排序)

陈玉栋 (信阳师范学院)

胡根海 (河南科技学院)

石 瑛 (太原师范学院)

许 君 (河南农业大学)

张改娜 (河南科技大学)

赵元增 (河南科技学院)

周 岩 (河南科技学院)

周春娥 (河南师范大学)

# 前 言

细胞工程是现代生物技术的重要组成部分，与基因工程一起代表着现代生物工程发展的最新前沿。随着现代生物技术的迅速发展，细胞工程在生命科学、农业、医药、食品、养殖业、生物资源与环境保护、新物种构建等领域发挥着越来越重要的作用，并产生了显著的社会效益和经济效益。细胞工程也是目前我国高等院校生物类专业普遍开设的主干课程。为促进学生对迅速发展的本学科的学习和了解，编者组织多年从事细胞工程教学和科学研究的同仁，在查阅大量国内外文献资料，归纳和总结本学科最新技术、研究成果及发展动态的基础上，结合在教学和科研过程中的体验，完成了本书的编写工作。

全书共分为 13 章，第 1、2 章主要概述细胞工程的研究内容、发展简史、应用前景、细胞全能性及其理论基础；第 3~9 章介绍植物细胞工程，内容包括植物细胞工程实验室要求及基本操作技术、植物组织培养、植物脱毒与离体无性繁殖技术、单倍体诱导和染色体加倍、植物胚胎培养、植物细胞培养与次级代谢产物生产、植物原生质体培养和细胞融合、种质离体超低温保存与人工种子；第 10~13 章介绍动物细胞工程，主要包括动物细胞培养、动物细胞融合与单克隆抗体、胚胎工程与动物克隆、干细胞技术等。具体分工是：第 1 章、第 2 章由周岩编写；第 3 章、第 5 章、第 8 章由胡根海和张改娜编写；第 4 章、第 9 章由石瑛编写；第 6 章由陈玉栋编写；第 7 章由赵元增编写；第 10 章、第 11 章由许君编写；第 12 章、第 13 章由周春娥编写。

本书内容简明，突出基础性和实用性，力争做到系统、全面、新颖、生动地介绍细胞工程领域的基本理论、主要技术与方法，并反映出该学科的最新进展。为了方便学习，教材每章配有知识框、小结、思考题、扩展阅读资料和相关网站。

本书编写过程中得到有关专家、同仁及科学出版社编辑的大力支持和帮助，在此表示诚挚的感谢！

尽管编写组付出了很多心血和努力，但由于细胞工程领域更新发展速度很快，编者水平有限，书中难免有疏漏之处，敬请广大读者批评指正，以便再版时修正。

编 者

2012 年 6 月

# 目 录

## 前言

<b>第1章 绪论</b> .....	1
1.1 细胞工程基础 .....	1
1.2 细胞工程的发展史 .....	3
1.3 细胞工程与其他相关学科的联系及其应用 .....	4
本章小结 .....	11
思考题 .....	12
<b>第2章 细胞全能性与形态发生</b> .....	13
2.1 细胞全能性 .....	13
2.2 植物细胞全能性的实现途径 .....	16
2.3 植物的形态建成 .....	17
2.4 植物体细胞胚胎发生 .....	18
2.5 基因表达与位置效应及器官分化信息传递 .....	19
本章小结 .....	22
思考题 .....	23
<b>第3章 植物细胞工程常规技术</b> .....	24
3.1 植物细胞工程所需的基本条件 .....	24
3.2 植物细胞工程中的无菌技术 .....	32
3.3 培养基及其配制 .....	40
3.4 细胞工程的基本程序 .....	45
3.5 外植体的褐变与玻璃化苗 .....	51
3.6 培养基母液的配制与保存 .....	57
3.7 MS 固体培养基的配制与灭菌 .....	61
本章小结 .....	63
思考题 .....	64
<b>第4章 植物脱毒与离体无性繁殖技术</b> .....	65
4.1 植物脱毒与离体无性繁殖概述 .....	65
4.2 植物脱毒的原理和方法 .....	67
4.3 离体无性繁殖技术 .....	73
4.4 马蹄莲试管苗的离体培养 .....	83
4.5 马铃薯茎尖培养脱毒及脱毒苗的鉴定 .....	85
本章小结 .....	86
思考题 .....	87

---

<b>第5章 单倍体诱导和染色体加倍</b> .....	88
5.1 单倍体培养及其意义 .....	88
5.2 雄核发育机制及其影响因素 .....	93
5.3 花药和花粉培养 .....	104
5.4 单倍体植株的染色体加倍 .....	113
5.5 花粉植株的倍性鉴定 .....	115
5.6 花药（或花粉）培养白化苗问题 .....	117
5.7 离体花药和花粉培养实验 .....	118
本章小结 .....	121
思考题 .....	122
<b>第6章 植物胚胎培养</b> .....	123
6.1 胚胎培养的内容及意义 .....	123
6.2 合子胚培养 .....	125
6.3 胚胎培养的其他类型 .....	127
6.4 胚胎培养案例 .....	131
本章小结 .....	134
思考题 .....	134
<b>第7章 植物细胞培养与次级代谢产物生产</b> .....	135
7.1 细胞的分离与培养 .....	135
7.2 细胞培养的技术关键 .....	143
7.3 细胞规模化培养与次级代谢产物生产 .....	148
7.4 植物细胞培养生物反应器 .....	161
7.5 体细胞无性系变异与突变体筛选 .....	167
7.6 细胞悬浮培养与细胞生长量计量实验 .....	168
本章小结 .....	173
思考题 .....	174
<b>第8章 植物原生质体培养和细胞融合</b> .....	175
8.1 原生质体的分离与纯化 .....	175
8.2 原生质体的培养 .....	185
8.3 原生质体融合 .....	192
8.4 向日葵原生质体的游离和融合 .....	206
本章小结 .....	208
思考题 .....	209
<b>第9章 种质离体超低温保存与人工种子</b> .....	210
9.1 基本概念 .....	210
9.2 种质的超低温保存 .....	211
9.3 人工种子 .....	214
本章小结 .....	217

---

思考题 .....	218
<b>第 10 章 动物细胞培养</b> .....	219
10.1 动物细胞培养的特点与应用 .....	219
10.2 动物细胞培养技术 .....	224
本章小结 .....	231
思考题 .....	232
<b>第 11 章 动物细胞融合与单克隆抗体</b> .....	233
11.1 动物细胞融合 .....	233
11.2 单克隆抗体 .....	239
本章小结 .....	243
思考题 .....	243
<b>第 12 章 胚胎工程与动物克隆</b> .....	244
12.1 动物胚胎发育的基本过程 .....	244
12.2 体外受精 .....	249
12.3 胚胎移植技术 .....	253
12.4 胚胎冷冻保存技术 .....	259
12.5 动物克隆技术 .....	260
12.6 转基因动物 .....	272
本章小结 .....	279
思考题 .....	280
<b>第 13 章 干细胞技术</b> .....	281
13.1 基本概念 .....	281
13.2 干细胞的生物学特性 .....	282
13.3 干细胞培养体系的建立 .....	284
13.4 干细胞的应用 .....	292
本章小结 .....	295
思考题 .....	296
<b>主要参考文献</b> .....	297



# 第 1 章 绪 论

细胞工程 (cell engineering) 是在细胞学的研究基础上发展起来的, 其操作对象是细胞或组织, 基本技术是细胞与组织培养。细胞工程与其他生物技术密切配合, 为其他生物技术提供了基础和平台。在人类告别 20 世纪步入 21 世纪的 10 多年里, 生命科学发展异常迅猛, 取得了一个又一个令人瞩目的成就, 震惊世界, 它推动着科学的进步、促进着经济的发展、影响着社会的进步, 成为 21 世纪发展最快的领域。在这些生命科学的伟大成就中, 细胞工程所作出的贡献极为突出, 如克隆动物、干细胞、生物反应器等就是细胞工程的典型结晶。细胞是生命活动的最基本单位, 为基因的表达和产物的合成提供了基础和载体。基因工程中基因的表达, 微生物工程中工程菌的构建, 酶工程、生化工程和蛋白质工程中蛋白质的合成等都离不开细胞工程。某种意义上来说, 基因工程是现代生物技术的核心, 而细胞工程则是它的基础和公用平台, 基因工程和细胞工程的结合决定着生物技术的发展。

## 1.1 细胞工程基础

### 1.1.1 细胞工程的概念

细胞工程 (cell engineering) 是按照一定的设计方案, 通过在细胞、亚细胞或组织水平上进行实验操作, 获得重构的细胞、组织、器官及个体, 创造优良品种和产品的综合性生物工程。细胞工程涉及的范围很广, 按生物类型可分为动物细胞工程、植物细胞工程和微生物细胞工程; 按实验操作对象可分为细胞与组织培养、细胞融合、细胞核移植、染色体操作和转基因工程等。以细胞工程为基础派生出不少以工程冠名的新领域, 如组织工程、胚胎工程和染色体工程等。

### 1.1.2 细胞工程的研究内容

#### 1) 细胞与组织培养

细胞培养 (cell culture) 和组织培养 (tissue culture) 都属于离体培养 (*in vitro culture*), 是指细胞和组织在离体条件下的生长和增殖。细胞的离体培养称为细胞培养; 组织的离体培养称为组织培养。细胞与组织培养技术是细胞工程的最基本技术, 细胞融合、细胞核移植、染色体工程、转基因工程和胚胎工程等细胞工程技术都离不开细胞或组织培养, 近年来兴起的组织工程和生物反应器就是在细胞与组织培养技术基础上直接发展起来的。

#### 2) 细胞融合

细胞融合 (cell fusion) 又称细胞杂交 (cell hybridization), 是指两个或两个以上的细胞融合形成一个细胞的过程。在自然情况下发生融合的现象称为自然融合; 用人工方法使细胞间发生融合的技术称为人工诱导融合。细胞融合的范围很广, 不同种类之间, 甚至动物与植物的细胞之间都能发生融合, 细胞融合已成为研究细胞功能、遗传、免疫、药物和新品种培

育的重要手段。利用细胞融合技术而发展起来的单克隆抗体技术，已成功地应用到基础生命科学研究和医药生产的各个领域，极大地促进了生命科学的发展，取得了极为可观的经济效益，是应用最成功的生物技术之一。

### 3) 细胞核移植

细胞核移植 (nuclear transplantation) 是利用显微操作技术将细胞核与细胞质分离，然后再将不同来源的核与质重组，形成杂合细胞的技术。克隆动物“多莉”羊的诞生使细胞核移植技术引起了全世界的关注。

### 4) 染色体工程

染色体工程 (chromosome engineering) 是指把单个染色体或染色体组转入或移出受体细胞，从而形成新的染色体组合和遗传构成的技术。该技术可以广泛应用于优良品种的培育，如多倍体育种已经成为常规的育种技术。近年来发展起来的人工染色体技术为基因组研究、基因转导和基因治疗等提供了重要手段和途径。

### 5) 胚胎工程

胚胎工程 (embryo engineering) 是以生殖细胞和胚胎细胞为对象进行的细胞工程操作，主要技术包括体外受精、胚胎移植和胚胎切割等。胚胎工程在畜牧业生产上已经得到广泛的推广应用，成为常规的畜牧优良品种繁育技术。

### 6) 干细胞与组织工程

干细胞 (stem cell) 是动物体内具有分化潜能，并能自我更新的细胞，分为胚胎干细胞和组织干细胞。胚胎干细胞来自囊胚期的内细胞团，属于全能干细胞，每个细胞都可以发育成一个完整个体。组织干细胞存在于成体组织中，数量很少，属于单能或多能干细胞，可以定向分化成一种或几种不同的组织。干细胞在体外可以诱导分化为不同的组织，为临床移植和细胞治疗带来了希望。骨髓和皮肤干细胞早已应用到了临床。组织工程 (tissue engineering) 是在干细胞基础上发展起来的，是干细胞与材料科学相结合，将自体或异体组织的干细胞经体外扩增后种植在预先构建好的聚合物骨架上，在适宜的生长条件下干细胞沿聚合物骨架迁移、铺展、生长和分化，最终发育形成具有特定形态和功能的工程组织。目前已成功地在体外培养了人工软骨、皮肤等多种组织。

在植物中类似动物的干细胞是胚性细胞 (embryogenic cell)，包括合子与早期胚胎细胞、顶端分生组织中的胚性细胞、成熟器官中遗留的胚性细胞等。合子、早期胚胎细胞和顶端分生组织的胚性细胞与动物的胚胎干细胞相似，可以分化形成各种组织和器官。根端分生组织的胚性细胞、成熟器官中遗留的胚性细胞则与动物的组织干细胞相似，只能分化为特定的组织，如根端分生组织的胚性细胞只能分化为根。

### 7) 转基因生物与生物反应器

(1) 转基因动物生物反应器。转基因动物 (transgenic animal) 是通过基因工程技术将外源的目的基因导入生殖细胞或早期胚胎细胞，并整合到受体细胞的基因组中，经发育形成的所有细胞都包含有目的基因的动物个体。目的基因在器官或组织中进行特异性高表达的转基因动物称为动物生物反应器 (animal bioreactor)。目前，研究较多的有乳腺生物反应器、血液生物反应器和膀胱生物反应器等。其中乳腺生物反应器最引人注目，已经进入产业化。

(2) 转基因植物生物反应器。转基因植物 (transgenic plant) 的制备比转基因动物相对简单。通过基因工程技术将外源的目的基因导入植物细胞后直接进行诱导培养就可以再生出转基因植株。当这些转基因植株开花结果时，所改变的遗传性状就可以通过种子遗传给下一代

植株。转基因棉花、大豆、油菜和玉米等已经开始了大面积的种植。我国转 *Bt* 基因抗虫棉的推广已取得了巨大成功,使农药的使用量减少了 70%~80%,大幅度降低了生产成本,减少了环境污染。能够生产某些重要蛋白质和次级代谢产物的转基因植物称为植物生物反应器 (plant bioreactor)。目前,研究最多的是生产抗体和疫苗的植物生物反应器。

## 1.2 细胞工程的发展史

无论是动物细胞工程还是植物细胞工程,都是在细胞与组织培养的基础上发展起来的,其研究历史可追溯到 19 世纪中期。从其诞生至今,大体经历了探索、奠基和迅速发展 3 个主要阶段。

### 1.2.1 探索阶段

自 1839 年 Schwann 和 Schleiden 建立细胞学说后,细胞学研究有了飞速的发展。Hertwig 和 Strasburger 分别于 1876 年和 1884 年在动物和植物中观察到了受精和精卵细胞融合现象; Fleming 于 1882 年在动物细胞中发现了有丝分裂; Strasburger 于 1880 年发现了植物的有丝分裂。van Beneden 和 Strasburger 分别于 1883 年和 1886 年在动物和植物细胞中发现了减数分裂。这一时期的细胞学研究,尤其是细胞分裂与增殖的发现,为细胞与组织培养技术的创立奠定了重要的实验基础。

1902 年, Haberlandt 提出了植物细胞全能学说 (cell totipotency), 并开展了植物的细胞和组织培养实验,但受当时条件限制没有取得成功。经过半个世纪的不懈努力,直到 1958 年, Steward 由胡萝卜韧皮部组织经诱导培养成功获得了再生植株。以组织培养为基础,花粉培养、器官培养相继获得成功,植物快繁、脱毒和大规模培养技术也实现了产业化。

动物组织培养技术最早由 Harrison 于 1907 年创立。当时他的主要目的是想通过神经组织的体外培养弄清神经纤维的起源问题,设计了悬滴培养法,建立了一套无菌操作技术,并在体外培养神经细胞获得成功,观察到神经纤维发生的动态过程。后来,在培养基和培养方法上做了大量改进与创新,动物细胞培养技术不断完善。以细胞培养为基础发展起来的胚胎工程、干细胞和组织工程已成为生物技术中最具活力的领域,细胞的大规模培养技术也取得了很大进展。

### 1.2.2 奠基阶段

尽管细胞培养是细胞工程中非常重要的技术,但也仅仅是为细胞工程的诞生奠定了基础,真正意义上的细胞工程应该是从细胞融合开始的。因为细胞融合是按照人们的设计对细胞进行工程操作,并构建新的细胞。早在 19 世纪上半叶,人们就在多种生物中发现了多核现象,并推测多核细胞是由单个细胞彼此融合而形成的。然而,用实验的方法直接实现细胞的融合则是在细胞培养技术建立以后。Okata 于 1962 年发现仙台病毒 (Sendai virus) 可诱发艾氏腹水瘤细胞融合成多核细胞体,为动物细胞融合技术的创立做了奠基性工作。直到今天该方法仍然被应用。植物和微生物的原生质体融合技术是在动物细胞融合技术的基础上发展起来的,迄今为止,人们已经进行了大量的动物、植物和微生物的细胞融合实验,包括种内、种间、属间、科间,甚至动、植物间细胞的融合,培育出了许多新品种,创造了极大的经济价值。其中,单克隆抗体技术是细胞融合中最成功的典范。1975 年 Milstein 与 Kohler 合作,

将绵羊红细胞免疫过的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合，得到了既能在体外无限繁殖又能产生特异性抗体的杂交瘤细胞，导致了免疫学技术的革命，他们二人也因此获得了诺贝尔生理学或医学奖。

### 1.2.3 迅速发展阶段

细胞核移植的构想最早由德国胚胎学家 Spemann 于 1938 年提出，认为早期胚胎细胞具有高度的分化潜力，将胚胎的细胞核移植到去核卵母细胞中可以发育为新的胚胎。1952 年，Briggs 和 King 将北美洲的豹蛙囊胚的细胞核移入去核的卵母细胞中，获得了北美洲豹蛙的胚胎克隆后代，证实了 Spemann 的伟大设想。1962 年，Gurden 将南非爪蟾蝌蚪期肠上皮细胞核移植到被紫外线破坏了细胞核的卵母细胞内，获得了发育正常的个体。哺乳动物的胚胎细胞核的移植实验开始于 1975 年 Bromball 在家兔上所做的工作，其后相继获得了小鼠、绵羊、牛、家兔、山羊和猪的胚胎细胞核克隆后代。1997 年，“多莉”羊的诞生标志着哺乳动物的体细胞核克隆时代的到来，小鼠、牛、猪、骡子等许多动物都获得了体细胞的克隆后代。

20 世纪 70 年代中期，基因重组技术与细胞工程技术的结合，使细胞工程发展到了一个新的阶段，产生了转基因动物和转基因植物。1974 年，Jaenisch 和 Mintz 首次报道向小鼠囊胚注射 SV40 DNA 后，发育成的小鼠的部分组织中检测到了 SV40 的 DNA 序列，但是，这还不是真正意义上的转基因动物。第一只转基因动物是 Gordon 等通过向小鼠的单细胞胚胎的原核注射纯化的 DNA 后获得转基因小鼠。1983 年，Palmiter 和 Brinster 将大鼠的生长激素基因转入小鼠，生产出生长速度极快的超级小鼠（硕鼠）。在此后的几年里，转基因动物的研究及以改进经济性状为目标的兔、羊、猪、牛、鸡和鱼等转基因动物陆续问世。除了转基因鱼外，多数转基因动物并没有达到预期目标。这一时期，乳腺生物反应器的研究也取得明显进展。在 Gordon 于 1987 年获得分泌组织纤溶酶原激活因子 tPA 的转基因小鼠后的数年内，转基因羊、猪、牛的乳腺生物反应器相继研究成功，利用乳腺生物反应器生产出了多种生物药物，如凝血因子 IX、凝血因子 XIII、抗胰蛋白酶、tPA、红细胞生成素（EPO）等。动物克隆及干细胞技术与转基因动物技术相结合，大大加快了动物生物反应器的研究与应用进程，显示了极为诱人的前景。

1983 年，利用根癌农杆菌介导法转化烟草获得了世界上第一株转基因植物。从此，转基因植物的研究取得了飞速发展，多种抗病虫、抗除草剂的转基因植物相继问世。目前，利用植物生物反应器生产的药物、色素、食品添加剂、酶、农药等次生物质和活性物质已达 300 多种。

细胞工程是一个非常年轻富有活力的学科。从诞生到现在还不到百年的历史，组织培养技术与其他生物技术已经一起成为世界经济中最具活力的支柱性产业，产生了巨大的经济效益和社会影响。相信随着人们对生命科学认识的不断深入，细胞工程技术会得到更快的发展，在解决困扰人类生活的入口、资源与环境等重大问题上会有更大的作为。

## 1.3 细胞工程与其他相关学科的联系及其应用

### 1.3.1 细胞工程与其他相关学科的联系

#### 1) 植物组织培养与生物学科的关系

随着现代生命科学与技术的不断进步，尤其是外源激素的应用，组织培养不仅从理论上

为相关学科提供了广泛的实验证据,而且一跃成为一种大规模、批量工厂化生产种苗的新方法,并在生产上得到广泛的应用。植物组织培养既是一门相对独立的学科,同时又与其他生物学科有着密切的联系,它为植物学、植物生理学、植物遗传育种学、胚胎学、解剖学、分子生物学、细胞生物学、生物工程等学科研究植物生长发育、抗性生理、激素及器官与胚胎发生机制等提供了许多良好的试材和有效、快速的方法与途径。

#### 2) 植物组织培养学科的建立依赖于生物学科理论的发展

植物组织培养的重要理论基础是植物学、植物生理学、遗传学、发育学及微生物学等学科,在这些学科快速发展的基础上形成了植物组织培养学科。只有对生物细胞的结构、机能及发育特征等有了深入了解,才有可能对其进行控制培养;也只有对细胞遗传物质的本质有了清楚的认识,才有可能对其进行定向培养。由于植物组织培养是一个综合性的实验技术体系,每一项技术均涉及其他有关领域,它的研究和利用更需要相关技术的协作和补充。

#### 3) 植物组织培养为生物学研究提供新的实验体系

植物离体培养技术使人们可以在人工控制和模拟条件下对植物进行研究和改造,这不仅排除了自然环境中不可预测性因素的干扰,而且还可以大大缩短研究周期,加速相关学科的研究进程。组织培养在理论上是研究细胞学、遗传学、发育学、生物化学和药理学等学科的重要手段。

细胞融合、核移植为人类定向改造生物遗传性状提供了有效技术途径。细胞培养使开展多细胞生物的单细胞生命活动研究成为可能,从而促进了人类对生命活动的认识。植物试管内传粉授精技术、子房培养技术、利用未成熟花药进行单倍体育种技术、细胞悬浮培养技术、看护培养技术及植物茎尖脱毒快速繁殖技术等,都极大地丰富了植物学研究的手段,拓展和加深了植物学研究的广度与深度。利用单细胞培养技术研究植物光合代谢是非常理想的方法,如在细胞生化合成研究中,通过组织培养查明了烟碱(俗称尼古丁)在烟草中的合成部位;在植物病理学中,可用单细胞或原生质体培养快速鉴定植物的抗病性、抗逆性,几天内就可获得抗性结果。

#### 4) 植物组织培养与其他生物技术相互促进

植物生物技术是按人类的意愿有目的地改良植物的一种新技术,是当前世界新技术革命的一个重要组成部分。植物遗传转化技术属于生物技术的组成部分,虽然不直接属于植物组织培养,但与组织培养紧密相关。植物组织培养既是遗传转化的基础,又是遗传转化获得种质材料并用于生产的桥梁,在基因表达及调控的研究上组织培养技术为其提供了有效方法。

### 1.3.2 细胞工程的应用

#### 1) 植物细胞工程的应用

植物组织和细胞培养技术具有取材少、培养材料经济、培养条件可人为控制、生长周期短、繁殖率高、管理方便和利于自动化控制等特点,因此在生产和研究中得到了广泛的应用。

离体快速繁殖和脱毒技术是目前植物组织培养中应用最多、最广泛和最有效的一个方面。植物组织培养主要应用于以下几个方面。

(1) 快速繁殖技术。快速繁殖技术(**rapid propagation**)也称微繁殖技术(**micropropagation**),是利用组织培养方法将植物体某一部分的组织小块进行培养并诱导分化成大量的小植株,从而达到快速无性繁殖目的的技术。其特点是繁殖速度快、周期短、不受季节气候等的影响,并可实现工业化生产。这一技术已有几十年的历史,现已基本成熟。新育成及新引进品种、

稀缺品种、优良单株、濒危植物和基因工程植株等都可通过离体快速繁殖及时提供大量优质种苗。目前很多观赏植物、园艺作物、经济林木、无性繁殖作物等都利用离体快速繁殖提供苗木。

(2) 植物的去病毒技术。植物的去病毒技术也称脱毒技术 (**virus eradication**)，是微繁殖技术的一个分支。植物病毒病严重地影响着农业生产，植物病毒的种类很多，而且可以通过维管束传导。因此，无性繁殖的植物一旦染上病毒，就会代代相传，越趋严重。常见的马铃薯、草莓等出现一年比一年小的“退化”现象就是病毒造成的。过去人们曾试用过多种物理、化学及生物防治的方法，但收效甚微。情况严重时，只能采取拔除并销毁病株的方法。自 20 世纪 50 年代初，Morel 和 Martin 发现用茎尖培养方法可以从严重感染病毒的大丽花植株得到无病毒苗，以及 Morel 在 1960 年又利用茎尖培养获得无病毒的兰花以来，利用茎尖培养技术已在多种植物，尤其是许多园艺植物中解决了病毒危害的问题，此后，还建立了通过愈伤组织培养脱病毒等多种获得无病毒苗的方法。目前，应用组织培养脱毒技术已在无性繁殖的农作物（甘薯、甘蔗等）、果树（苹果、葡萄等）、蔬菜（马铃薯、大蒜等）和花卉（兰花、水仙等）等许多植物的常规生产上得到应用，提高了产量或恢复了原品种的优良性状。

(3) 花药、花粉培养和育种。花粉是单倍体，在离体条件下培养诱导成的单倍体花粉小植株，其隐性基因可以不受显性基因的影响而表达，便于选择。经人工加倍后，就可获得纯合二倍体。

1964 年，印度植物学家 Guha 和 Maheshwari 首次对毛叶曼陀罗花药进行培养获得许多胚状体 (**embryoid**)，并证明胚状体直接起源于花粉粒，最终从胚状体进一步发育得到单倍体植株。目前，世界上至少有 34 个科，88 个属，300 多种植物的花药培养成功获得完整植株。花药和花粉组织培养能缩短育种周期、简化选育程序，已成为一种在植物育种上十分有效的技术。现已育成一大批高产优质品种，并在生产中得到推广应用。

(4) 原生质体培养和体细胞杂交。无壁的植物原生质体仍具有在一定条件下长成完整植株的全能性。由于原生质体的膜很薄，所以给实验操作带来不少便利。自 1960 年英国科学家 Cocking 用酶法去除植物细胞壁获得大量有活力的原生质体以来，植物原生质体的分离和培养已经取得了很大进展。烟草、胡萝卜、矮牵牛、石刁柏、颠茄、芸薹、曼陀罗、石龙芮、金鱼草、马铃薯等植物已从原生质体再生成完整的植株，但在禾谷类、豆类和纤维作物等重要经济作物上进展缓慢。原生质体的分离和培养技术为通过体细胞融合实现远缘细胞杂交奠定了基础，也为外源基因导入等遗传操作及许多细胞生物学基础研究提供了良好的材料。随着原生质体培养体系的不断完善，除成功获得一批远缘体细胞杂种外，细胞融合技术近年来已在一些重要作物的育种中得到初步应用。

(5) 次级代谢产物的生产。植物中存在许多人工难以合成但具有显著药用或经济价值的特殊物质。由于环境恶化和人类需求量的日益增大，许多植物资源正面临枯竭的危险。利用植物组织或细胞大规模培养来生产人类所需要植物所特有的产物，受到了世界许多国家和科学工作者的极大重视，并已取得令人振奋的进展。目前，能利用植物细胞工程生产的次级代谢产物包括药物、香精、食品、化工产品等许多类型，有些已投入工业化生产，预计今后还将有更大发展。

(6) 植物种质资源的保存和交换。植物种质资源的保存有两大难题，一是由于环境遭受破坏，遗传资源日益枯竭，造成有益基因的丧失；二是常规田间保存耗资巨大，而且在遇到自然灾害时往往束手无策，难以达到万无一失的目的。利用离体植物组织和细胞超低温保存

技术,既可以长期保存种质,也可大大节约人力、物力和土地,同时也便于种质资源交换和转移,防止病虫害的人为传播,具有广阔的应用前景。

## 2) 动物细胞工程的应用

(1) 生物制品生产。20世纪50年代,动物细胞大规模培养技术的建立和发展大大促进了生物活性物质、药品和疫苗的生产。例如,人们可以在反应器中大规模培养动物细胞,待细胞长到一定密度后,接种病毒,病毒再利用培养的细胞进行复制,从而产生大量病毒,用于制备疫苗。基于动物细胞培养技术生产的病毒疫苗(减毒的活病毒或是灭活的病毒),在过去的几十年里,已经拯救了成千上万人和动物的生命。若能获得可分泌目标蛋白的细胞系,用大规模细胞培养技术还可以生产多种药用蛋白质产品。自20世纪70年代以来,随着基因重组技术及杂交瘤技术的建立和发展,许多外源蛋白质基因可转入动物细胞并能大量扩增,使动物细胞能够高质量地表达有价值的蛋白质,如酶、细胞因子、干扰素、生长激素等。同时,杂交瘤技术使得各种单克隆抗体可以通过杂交瘤细胞分泌产生,这些单抗现已在多种疾病的诊断和治疗中得到了广泛的应用。单抗与化学药物、放射性同位素或毒素蛋白结合后,具有导向携带各种治疗药物攻击靶细胞的特性,已被应用于抗肿瘤和其他多种疾病的治疗研究。

(2) 动物克隆的应用。采用动物胚胎细胞和体细胞核移植技术,目前已经成功地克隆出包括鼠、猪、牛、羊、兔和猴在内的大量动物。这些技术的发展和运用,为加快动物繁殖、培育优良畜种、保护珍稀动物等开辟了新的途径。克隆动物的遗传背景相同,因此它们也是模拟疾病和开展对生长、发育、衰老及健康机理等方面研究的良好实验材料。细胞核移植技术在细胞治疗和组织工程等领域的应用中也有着重要作用。

(3) 干细胞技术的应用。自20世纪90年代末以来,干细胞研究不断取得突破性进展。利用干细胞的无限增殖能力和多项分化潜能等,通过体外培养干细胞,诱导干细胞定向分化或利用转基因技术处理干细胞改变其特性,就有可能利用干细胞造福人类。目前各类造血干细胞移植技术已经逐渐成熟并在临床上得到常规应用。作为细胞治疗与组织工程的种子细胞,干细胞为修复组织器官损伤和退行性病变细胞的替代治疗带来了新的希望。将其作为疾病基因治疗的载体,则有可能解决目前基因治疗中所面临的用作载体的细胞在体外不能被稳定改造和传代的问题。胚胎干细胞与基因定位整合技术相结合,对于研究基因在胚胎发育中的表达与功能,揭示不能在体内充分证明的分子调控机制也具有重要的作用。胚胎干细胞可以经过体外诱导,为人类提供各种组织类型的细胞,为药物筛选、鉴定及其毒理的研究提供了便利,也有助于人类疾病细胞模型的建立及新药开发。目前,干细胞生物学的研究几乎涉及所有生物医药领域,对生命科学和人类健康都具有重大意义。

综上所述,细胞工程无论在生命科学基础研究方面,还是在生物高科技产业领域,都已取得举世瞩目的进展,并为人类带来了巨大的经济效益和良好的社会效益。

## 1.3.3 植物组织培养的应用及展望

植物组织培养研究领域的形成,不仅丰富了生物科学的基础理论,而且还在实际应用中呈现出了巨大的价值,显示了其无穷的魅力。

### 1.3.3.1 植物组织培养的应用

#### 1) 在植物育种中的应用

植物组织培养已广泛应用于植物育种,在增加植物遗传变异性、植物品种改良、培育新

品种或创制新种质、缩短育种周期、提高育种效率等方面发挥了独特的优势。

(1) 单倍体育种。离体花药或花粉培养的单倍体育种 (haploid breeding) 法, 与常规方法相比, 可以在短时间内得到作物的纯系, 从而缩短育种年限, 节约人力、物力, 加快育种进程, 较快地获得优良品种。通过花药培养, 1974 年, 中国育成了世界上第一个作物新品种——‘单育 1 号’烟草品种。据不完全统计, 我国用花药或花粉培育出的植物已超过 22 个科, 52 个属, 160 个种, 尤其在水稻、小麦、烟草、柏树、橡胶、辣椒、大白菜等植物的单倍体育种工作中处于领先地位, 已培育出许多著名品种, 如小麦‘花培 1 号’、‘净化 1 号’, 水稻‘中花 1 号’, 辣椒‘海花 1 号’等, 并已大面积推广应用。

(2) 培育远缘杂种。在植物种间杂交或种以上的远缘杂交中, 受精后障碍导致杂交不育给远缘杂交带来了许多困难。采用胚、子房、胚珠培养和试管授精等手段, 可以使杂交胚正常发育并成功地培养出杂交后代, 通过无性系繁殖获得数量多、形状一致的群体。最早成功的例子是利用杂种胚培养克服了两个亚麻栽培种的杂交胚败育, 并获得种子。这一技术已在桃、柑橘、菜豆、南瓜、百合、鸢尾等 50 多个科、属的远缘杂种胚中获得成功。例如, 远缘杂交种“白兰”(大白菜×甘蓝)就是通过杂种胚的培养得到的。用胚乳培养可以获得三倍体植株, 为诱导形成三倍体植物开辟了一条新途径, 玉米的离体子房培养, 经体外授粉可以得到种子。早期发育幼胚因太小难以培养的种类, 还可采用胚珠和子房培养来获得成功。利用胚珠和子房培养也可进行试管授精, 以克服柱头或花柱对受精的障碍, 使花粉管直接进入胚珠而受精。

利用胚培养技术可拯救杂种胚, 获得一些有用的材料或品种, 已取得了明显的效果。这些都表明将植物组织培养应用于育种实践时能建立起新的育种系统, 加速植物育种的进程。

(3) 体细胞杂交。体细胞杂交 (somatic hybridization) 是打破物种间生殖隔离, 实现有益基因的种间交流, 改良植物品种, 创造植物新类型的有效途径。通过原生质体融合, 可部分克服有性杂交不亲和性, 从而获得体细胞杂种, 创造新物种或新类型。通过这一途径, 目前已成功育成了细胞质雄性不育烟草与水稻的杂种、野生稻与栽培稻体细胞的杂种、马铃薯栽培种与野生种的杂种、番茄栽培种与其野生种的杂种、甘薯栽培种与野生种的杂种、马铃薯与番茄的杂种、甘蓝与白菜的杂种、柑橘类杂种等一批新品种 (系) 和育种新材料, 获得了 40 余个种间、属间, 甚至科间的体细胞杂种或愈伤组织, 有些还进而分化成苗。

(4) 筛选培育突变体。在细胞和组织培养过程中, 培养的细胞无论是愈伤组织还是悬浮细胞均处在不断分生状态, 容易受培养条件和外界条件 (如射线、化学物质等) 的影响而产生变异。因此, 人们采用紫外线、X射线、 $\gamma$ 射线对培养物照射, 或者在培养基中加入叠氮化物等化学诱变剂, 以提高突变频率及选择效率, 利用单细胞诱变, 具有便于筛选和无嵌合性等特点, 可极大地提高育种的速度与效率, 使其成为从细胞水平来改良植物品种的重要途径。此外, 花药、原生质体、愈伤组织也可以作为诱发突变的外植体。20 世纪 70 年代以来, 人们已诱发筛选出植物抗病、抗寒、耐热、高赖氨酸、高蛋白质、矮秆高产、抗除草剂、生理生化变异等所需要的大量突变体, 有的已培育成新品种, 如抗花叶病毒的甘蔗无性系、抗 1%~2% NaCl 的野生烟草细胞体系、抗除草剂的白三叶草细胞株系等。

(5) 转基因育种。转基因育种 (transgenic breeding) 就是利用分子生物学方法把目标基因切割下来, 通过克隆、表达载体构建和遗传转化使外来基因整合进植物基因组的育种方法。这种新技术克服了植物育种中的盲目性, 提高了育种的预见性, 已成功应用于植物抗病虫性、抗逆性及品质改良等方面。目前通过转基因育种已获得马铃薯、番茄、水稻、瓜类、棉花、



大豆等一大批植物新品种，并已大面积应用于农业生产。

(6) 种质资源的保存。种质资源 (germplasm resource) 是植物育种的基础，而自然灾害、生物间竞争和人类活动造成大量物种面临或已经消失，尤其是一些珍贵濒危植物资源的绝迹更是一种不可挽回的损失，但常规的田间保存耗费大量的人力、物力和土地，使得种质资源流失的情况时有发生。利用组织培养技术保存植物种质，可大大节约人力、物力和土地；且不仅保存手续简便、极易长途运输，便于地区间及国际交流；还可以用来生产和保存无病原的植物种质资源。例如，胡萝卜和烟草等植物的悬浮培养细胞，在 $-196\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温下可贮藏半年之久，再置于常温条件下时又能恢复生长，并分化出植株；柳橙胚愈伤组织所产生的胚状体和茎芽，经过3~5年的继代培养，仍能保持旺盛的分化能力，且染色体未发生任何变异；草莓茎尖在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下茎培养物可以保持生活力达6年之久。

### 2) 在植物脱毒和快速繁殖上的应用

(1) 无病毒 (virus-free) 的培养。病毒病是植物的严重病害，种类达500种以上，给农业生产造成极大的经济损失。研究发现，病毒在植物体内的分布是不均一的，老的组织和器官病毒含量较高，幼嫩的、未成熟的组织和器官病毒含量较低，生长点几乎不含病毒或病毒较少。因此，利用茎尖分生组织培养、再生的植株有可能不带病毒，从而获得无病毒小苗，再用脱毒苗进行繁殖，获得的植株就不会或极少发生病毒病，显著地提高了植物的产量和品质。目前利用茎尖脱毒技术在主要经济作物（如甘蔗、菠萝、香蕉、草莓、甘薯、马铃薯等）和园林观赏植物（如菊花、香石竹、唐菖蒲、水仙、郁金香、百合、大丽花、白鹤芋等）上已大量运用，取得了显著的经济效益和社会效益。因此，不少地区都建立了无病毒苗的生产中心，开展无病毒苗的培养、鉴定、繁殖、保存、利用和研究。形成了一套规范的系统程序，极大地促进了无毒苗的产业化发展。

(2) 快速繁殖种苗。快速繁殖技术是植物组织培养在生产上应用最广泛也最有效的一项技术。它可通过茎尖、茎段、鳞茎盘等产生大量腋芽；或通过根、叶等器官直接诱导产生不定芽；或通过愈伤组织诱导产生不定芽。由于组织培养具有周期短、增殖率高并能全年生产等特点，加上培养材料和试管苗的小型化，可在有限的空间短期内培养出大量的幼苗。以一个茎尖或一小块叶片为基数，经组织培养，一年内可增殖到几万至几百万个植株。因此，对于一些繁殖系数低、不能用种子繁殖的“名、优、特、新、奇”植物品种，以及脱毒苗，新育成、新引进和稀缺种苗，优良单株，濒危植物和转基因植株等都可以通过离体快速繁殖，短期内即可极大地提高其繁殖系数。目前，观赏植物、园艺作物、经济林木、药用植物等无性繁殖作物部分或大部分都实现了离体快速繁殖，试管苗已形成产业化并大量涌现国际市场。例如，美国的Wyford国际公司年产组织培养苗3000万株，包括花卉、蔬菜、果树及林木；以色列的Benzur苗圃，年产组织培养苗800万株。据统计，中国快速繁殖的植物已超过443种，进入工业化生产的主要有香蕉、甘蔗、桉树、葡萄、苹果、脱毒马铃薯、脱毒草莓、非洲菊、芦荟等。

### 3) 植物有用次级代谢产物生产中的应用

利用组织或细胞的大规模培养，几乎可生产出人类所需要的一切天然有机化合物，如蛋白质、脂肪、天然药物、香料、生物碱、橡胶、色素及其他活性化合物等。这些化合物许多都是高等植物的次级代谢产物，有些化合物还不能大规模地人工合成，而靠植物产生的这些化合物极其有限，远不能满足社会需求。因此，利用组织培养的方法，培养植物的某些器官和愈伤组织，并筛选出高产、高合成能力、生长快的细胞株系，进行工业化生产，是一条行