

生物工程专业综合素质培养型系列教材

细胞工程

Cell Engineering

刘士旺 主编



科学出版社

细胞工程

细胞工程

Cell

Engineering

第2版



9 787304 111111 >

生物工程专业综合素质培养型系列教材

细胞工程

刘士旺 主编

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书共 11 章,主要包括植物细胞工程、动物细胞工程和微生物细胞工程等相关内容。全书以细胞工程技术为主线,突出其基本概念,兼顾基础知识和前沿领域,注重现代生命科学领域的新技术应用。

本书可作为生物技术、生物科学和生物工程专业的专业课教材,也可供从事生命科学研究的科研技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/刘士旺主编. —北京:科学出版社,2013.1
生物工程专业综合素质培养型系列教材
ISBN 978-7-03-036012-0

I. ①细… II. ①刘… 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 268554 号

责任编辑:刘 畅 / 责任校对:刘小梅
责任印制:阎 磊 / 封面设计:科地亚盟

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>

北京市安泰印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 2 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2013 年 2 月第一次印刷 印张:18

字数:451 000

定价:36.00 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 刘士旺

副主编 陈付学 黄 俊

编 委 (以姓氏笔画为序)

尤玉如 浙江科技学院

毛建卫 浙江科技学院

刘士旺 浙江科技学院

陈付学 上海大学

胡伟莲 浙江科技学院

徐 晖 浙江科技学院

徐 涛 浙江理工大学

徐晓辉 中国计量学院

黄 俊 浙江科技学院

梁五生 浙江大学

戴德慧 浙江科技学院

魏培莲 浙江科技学院

前 言

细胞工程是生物工程研究的重要组成部分,一切以细胞为材料的工程技术研究均可归入细胞工程研究的范围。细胞工程是一门应用性非常强的前沿学科,涉及的学科知识较多,新的研究技术和研究手段不断出现,植物细胞、动物细胞及微生物细胞等领域的研究成果丰富和发展了细胞工程的知识和应用范围。细胞工程是生命科学研究中非常活跃的前沿领域,该领域目前取得的成就有目共睹。植物细胞与组织培养、细胞转基因工程、动物胚胎工程、干细胞培养、微生物细胞工程等研究给人们带来了可喜的细胞工程应用前景,细胞培养与转基因的安全性及试管动物等工程技术同样引起人们的广泛关注。

目前已有部分教材对细胞工程领域的研究成果进行了整理和出版,但有些偏向于某一个研究方向,有些偏向于技术层面,还有些偏向于应用层次;再者,目前高校人才培养的大类招生与通识教育模式,导致学校为增加实践教学环节而压缩专业课课时。针对以上情况,编写一部既适合本科教育教学需要,又兼顾理论研究与实践应用,并能统筹课时需要的教材非常必要。

本书的特点是理论与实际相结合,既有较全面的细胞工程基础知识和基本理论分析,又有很典型的细胞工程案例的实用示范,理论性和实用性都较强。本书较适合用作生物工程、生物技术及生物科学等生命科学领域的教材,也可供从事生命科学领域研究工作的相关人员阅读参考。

本书参编人员均在各专业学科一线工作,是有着丰富理论与实践经验的生物工程领域专家。全书共 11 章,其中第一章由尤玉如、刘士旺编写;第二章由黄俊、刘士旺编写;第三章由徐晓辉、梁五生编写;第四章由徐涛、梁五生编写;第五章由戴德慧、胡伟莲编写;第六章由梁五生、徐晓辉编写;第七章由陈付学编写;第八章由刘士旺、毛建卫编写;第九章由刘士旺、毛建卫、徐晖编写;第十章由刘士旺、毛建卫、魏培莲编写;第十一章由魏培莲、徐晖、毛建卫编写。刘士旺负责全书的统稿、审稿和定稿。

细胞工程研究涉及面广,内容和要求变化快,加之编者水平有限,书中难免会有疏漏和不妥之处,恳请广大读者批评指正,谢谢!

编 者

2012 年 8 月

目 录

前言

第一章 绪论	1
第一节 细胞工程的研究内容和任务	1
一、研究内容	1
二、研究任务	5
三、细胞工程相关分支学科	5
第二节 细胞工程发展历史	7
一、探索期	7
二、成熟期	8
三、迅速发展期	10
第三节 细胞工程研究热点领域	13
第四节 细胞工程学习方法	18
一、掌握细胞工程相关基本理论	18
二、掌握细胞工程相关研究方法和实验技术	18
三、掌握必要的文献信息检索途径	18
四、细胞工程应用研究进展	18
思考题	19
第二章 细胞工程实验室及实验基本操作	20
第一节 实验室及仪器设备	20
一、实验室	20
二、仪器设备	22
第二节 细胞工程基本操作	24
一、清洗	24
二、消毒灭菌	25
三、无菌操作	28
第三节 培养基及其配制	29
一、植物细胞培养基及其配制	29
二、动物细胞培养基及其配制	35
思考题	44
第三章 植物组织培养	45
第一节 外植体及其培养	45
一、外植体的选择	45
二、外植体消毒处理	46
三、外植体的接种	47
四、外植体的培养条件.....	47

第二节 愈伤组织	49
一、愈伤组织的形成和增殖	50
二、影响愈伤组织培养的因素	52
第三节 愈伤组织的再分化与器官建成	54
一、植物细胞的全能性	54
二、细胞分化、脱分化与再分化	55
三、愈伤组织的分化与器官建成	56
第四节 植物试管苗的生根	58
一、试管内生根	59
二、试管外生根	60
第五节 植物试管苗的移栽	61
一、试管苗的驯化	61
二、试管苗的移植	62
三、影响试管苗移植成活率的因素	63
第六节 植物细胞扩大培养	63
一、悬浮培养	64
二、单细胞培养	66
第七节 植物细胞的大规模培养	67
一、概述	67
二、植物细胞规模化培养体系的建立	68
三、影响植物细胞规模化培养的因素	70
第八节 植物细胞反应器	72
一、植物细胞反应器类型及其特点	72
二、用于植物细胞培养的反应器	72
三、反应器的设计与放大	75
四、植物细胞培养动力学	79
五、植物细胞反应器控制技术	82
第九节 植物细胞培养与次生代谢产物生产	84
一、植物细胞次生代谢产物的主要类型	84
二、植物细胞次生代谢产物积累的特性	86
三、提高植物细胞次生代谢产物产量的方法	86
四、利用植物细胞大规模培养生产次生代谢产物实例	89
思考题	90
第四章 植物脱毒快速繁殖	91
第一节 植物组织脱毒	91
一、植物组织脱毒的概念与意义	91
二、植物组织脱毒方法及基本原理	92
三、植物组织脱毒基本技术规程	97
四、影响植物组织脱毒的因素	99
第二节 植物病毒检测方法	99

一、植物形态学检测法	99
二、指示植物检测法	100
三、抗血清检测法	100
四、组织细胞检测法	100
五、酶联免疫吸附测定法	100
六、直接组织斑免疫测定法	102
七、胶体金免疫层析法	102
八、以核酸为基础的检测方法	103
附:植物组织脱毒实例分析	105
一、马铃薯茎尖培养脱毒方法	105
二、三叶半夏脱毒组培	105
思考题	107
第五章 植物体细胞杂交	108
第一节 植物细胞原生质体制备	108
一、植物细胞原生质体分离	109
二、植物细胞原生质体纯化	112
三、植物细胞原生质体活力测定	113
四、影响植物细胞原生质体制备的因素	114
第二节 植物原生质体培养与保存	118
一、植物原生质体培养基选择	118
二、原生质体的培养方式	119
三、植物原生质体保存方法	121
四、影响植物原生质体培养的因素	122
第三节 植物体细胞杂交控制技术	123
一、植物体细胞杂交概述	123
二、植物体细胞杂交一般规程	125
三、影响植物体细胞杂交的因素	131
附:植物愈伤组织原生质体与体细胞杂交操作实例	132
芝麻原生质体培养	132
思考题	134
第六章 植物转基因技术	135
第一节 植物基因转化受体体系	135
一、叶盘受体体系	135
二、原生质体受体体系	136
三、悬浮细胞受体体系	136
四、愈伤组织受体体系	136
五、胚状体受体体系	137
六、活体受体体系	137
第二节 植物基因转化方法	137
一、农杆菌介导法	137

二、基因枪转化法	138
三、PEG 介导法	140
四、花粉管通道法	140
五、其他转化方法	140
第三节 转基因检测技术	142
一、形态特征检测	142
二、报告基因检测	143
三、分子生物学方法检测	144
第四节 转基因植物的研究成果及安全性	146
一、转基因植物的研究成果	146
二、转基因植物的安全性	147
思考题	148
第七章 动物细胞培养	149
第一节 动物细胞体外培养	149
一、动物细胞与组织培养类型	149
二、动物细胞培养特性	150
三、动物细胞取材与分离	151
四、动物细胞同步化获得方法	154
五、动物细胞保存	156
第二节 动物细胞传代培养	157
一、动物细胞悬浮培养	158
二、动物细胞贴壁培养	158
第三节 动物细胞固定化培养	159
一、固定化培养材料	159
二、固定化培养条件	161
第四节 动物细胞大规模培养	162
一、微载体培养	163
二、中空纤维培养	164
三、微囊化培养	166
第五节 干细胞培养工程	166
一、干细胞定义	166
二、干细胞研究意义	168
三、动物干细胞工程技术	169
四、干细胞技术的应用前景和研究中存在的问题	176
第六节 动物细胞反应器	179
一、动物细胞反应器基本原理	179
二、动物细胞反应器类型与特点	180
三、动物细胞反应器设计	184
四、动物细胞反应器应用前景	185
思考题	185

第八章 动物细胞染色体工程	186
第一节 动物多倍体诱导	186
一、天然多倍体.....	186
二、人工诱导多倍体.....	186
第二节 雌雄核发育和性别控制	190
一、雌核发育.....	190
二、雄核发育.....	192
三、性别控制.....	192
第三节 染色体片段转移和特定位点重组技术	193
一、染色体片段转移技术.....	193
二、染色体特定位点重组技术.....	194
思考题	194
第九章 转基因动物	195
第一节 转基因动物的制备	195
一、目的基因导入.....	195
二、转基因胚胎培养与移植.....	200
三、转基因动物鉴定.....	200
第二节 转基因动物应用前景	200
一、转基因动物在基础生物学研究中的应用.....	200
二、转基因动物在医药领域的应用.....	201
三、转基因动物在畜牧业和渔业生产中的应用.....	205
第三节 转基因动物研究存在的问题	205
一、技术性问题.....	205
二、社会性问题.....	206
思考题	207
第十章 胚胎工程	208
第一节 概述	208
一、发展历史.....	208
二、研究意义.....	209
第二节 胚胎工程的技术方法	210
一、胚胎移植相关技术体系.....	211
二、胚胎分割技术体系.....	219
三、胚胎干细胞技术.....	224
第三节 试管动物	226
一、概述.....	226
二、试管婴儿.....	226
三、试管婴儿主要技术环节.....	228
四、胚胎工程技术的现状分析.....	229
思考题	232

第十一章 微生物细胞工程原理	233
第一节 微生物细胞工程概述	233
一、微生物细胞工程定义	234
二、微生物细胞工程意义	234
三、微生物细胞工程应用	234
第二节 微生物细胞工程菌种	235
一、微生物细胞工程菌种来源	236
二、微生物细胞工程菌种分离	236
三、微生物细胞工程菌种选育	237
四、微生物细胞工程菌种保存	244
第三节 微生物细胞工程代谢调控	246
一、代谢类型	246
二、代谢调控	247
第四节 微生物细胞发酵工艺控制技术	248
一、微生物细胞发酵参数检测	248
二、微生物细胞的发酵类型	250
三、微生物发酵动力学	251
第五节 微生物细胞发酵下游加工技术	257
一、微生物细胞发酵下游加工的特点和重要性	258
二、微生物细胞发酵下游加工基本原理	259
三、微生物细胞发酵下游加工的一般程序和操作单元	259
第六节 微生物细胞工程的应用	264
一、微生物细胞工程在食品工业中的应用	264
二、微生物细胞工程在农业中的应用	264
三、微生物工程在轻工业中的应用	265
四、微生物细胞工程在化工能源产品中的应用	265
五、微生物细胞工程在环境保护中的应用	266
六、微生物细胞工程在医药卫生中的应用	266
附：微生物细胞工程应用实例分析	268
一、抗生素发酵生产	268
二、氨基酸发酵生产	269
思考题	271
主要参考文献	272

第一章 绪 论

细胞工程(cell engineering)是以生物的细胞、组织或器官为研究对象,运用工程学原理,通过类似于工程学的研究方法设计研究目标,按照人们的意愿在细胞器水平上改变细胞内的遗传物质,以获得新的生物物种、生物品种或特种生物细胞产品的一门综合性工程学科。细胞工程与基因工程、酶工程、发酵工程和蛋白质工程一起构成了生物学学科中新兴的生物工程研究领域。

细胞工程不但丰富和拓展了生物工程研究的内容,促进了生物工程应用研究的发展,而且使传统生物学认为不可能发生的生物事件成为可能,在后基因组时代,细胞工程可以大显身手。众所周知,生物界总是亲子相像、世代相传,这是由于子代和亲代之间具有相同或相似的遗传信息。要想创造出新品种,传统方法是进行不同生物间的有性杂交,此法必须考虑不同物种间的亲缘关系。但是,由于物种间的生殖隔离,不同物种间的远缘杂交是无法实现的。例如,猪和牛、霉菌和大肠杆菌、马铃薯和番茄等,应用传统方法很难实现杂交育种。而采用细胞工程,可以使不同物种间的杂交成为可能。例如,在植物细胞工程方面,马铃薯和番茄细胞融合培育出了马铃薯番茄(pomato)植株;在动物细胞工程方面,通过人和小鼠细胞杂交实验搞清了人的许多基因在染色体上的位置,人的某些基因在猪的胚胎发育中得到表达,为胚胎工程提供了广阔的前景。另外,利用细胞工程技术进行胚胎干细胞的研究,使基因治疗、细胞治疗和器官移植成为可能;试管动物和胚胎移植的研究,使优良畜种快繁和品种改良得以迅速发展。

第一节 细胞工程的研究内容和任务

一、研究内容

(一) 按照细胞工程研究种类,细胞工程可以分为三类

1. 植物细胞工程

以植物细胞为实验材料,进行实验目标设计和操作,创造新的植物品种或者培育新的植物性状的工程创造技术。

2. 动物细胞工程

以动物细胞为实验材料,进行实验目标设计和操作,创造新的动物品种或者培育新的动物性状的工程创造技术。

3. 微生物细胞工程

以微生物细胞为实验材料,进行实验目标设计和操作,创造新的微生物品种或者培育新的微生物性状的工程创造技术。

(二) 按照细胞工程操作对象,细胞工程可以分为四类

1. 细胞培养工程

组织、器官或细胞培养(tissue, organ or cell culture)指利用生物体各部分组织、器官或细

胞进行离体培养(*in vitro* culture)或者扩大培养,使之形成愈伤组织(callus)或细胞群体的技术和方法,从而创造新的物种、获得扩大细胞或者获得新的性状(图 1.1)。

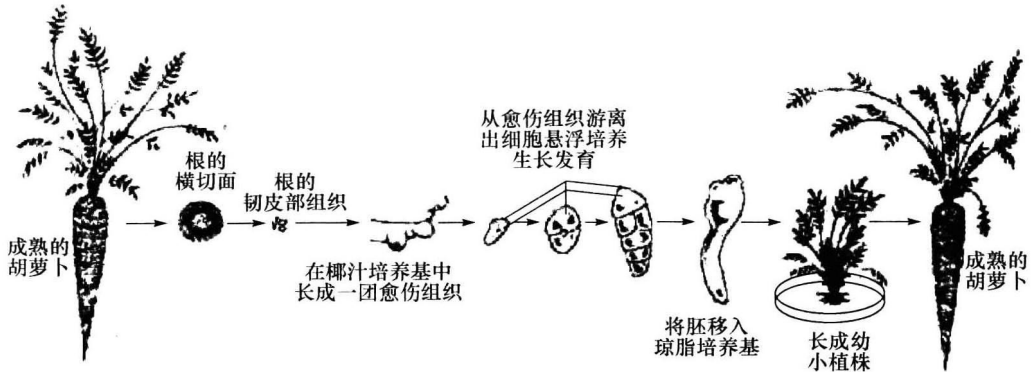


图 1.1 胡萝卜单细胞发育成植株(王蒂 2007)

2. 细胞染色体工程

染色体工程(chromosome engineering)指借助于物理、化学等方法,对染色体进行操作,使生物染色体数目、结构和功能发生改变,从而创造新的物种和获得新的性状的技术方法与手段(图 1.2)。

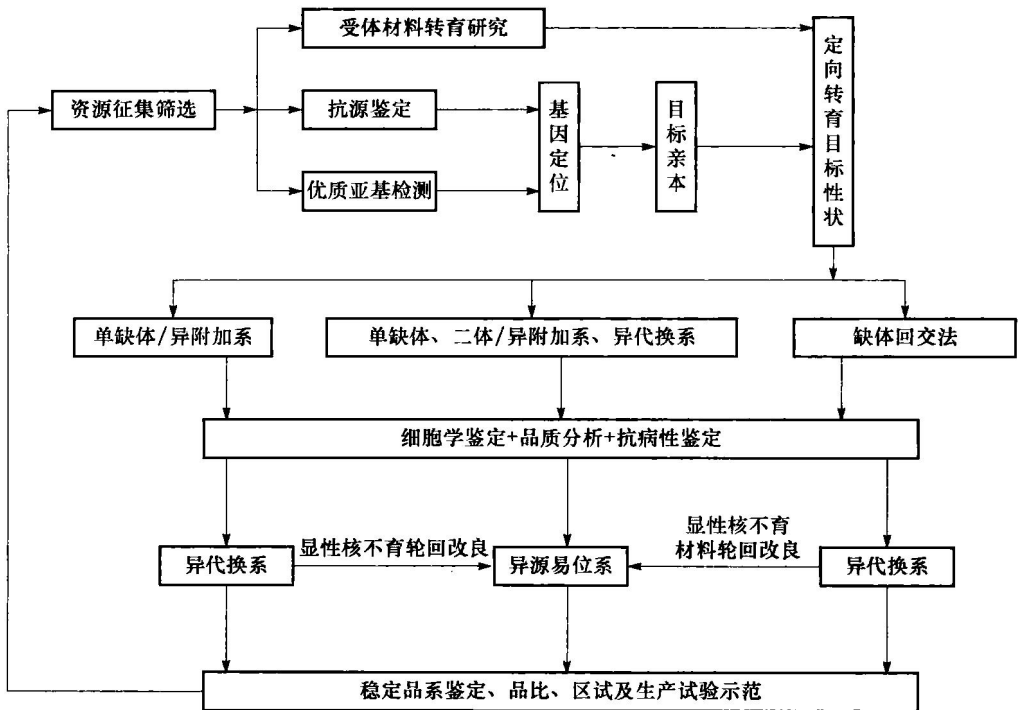


图 1.2 冬小麦染色体工程育种技术路线图(李森等 2008)

3. 细胞原生质体培养工程

原生质体培养(protoplast culture)指将微生物细胞或植物细胞破壁后形成原生质体,对原生质体进行生物与化学技术操作,改变原生质体的遗传性状,然后在适宜的培养条件下,依

据细胞全能性使其再生细胞壁,并进行细胞分裂与分化,形成完整个体,从而创造新的物种和获得新的性状。原生质体培养主要技术控制过程为:

植物细胞(微生物细胞)→原生质体制备→原生质体再生→植株(微生物细胞)

4. 胚胎培养工程

动物或植物胚胎培养(embryo culture)指使胚或具胚器官的生物体细胞在离体无菌条件下发育成正常生物体的技术方法,从而实现快速繁殖与复壮细胞或胚胎细胞恢复等。

(三) 按照细胞工程研究目的,细胞工程可以分为六类

1. 细胞转基因

指用细胞工程结合基因工程的方法将人们需要的目的基因导入受体基因组中,使外源基因与其基因整合在一起,随细胞分裂而增殖,并稳定地遗传给后代,创造基因工程细胞,实现创造新物种的工程技术和手段(图 1.3)。

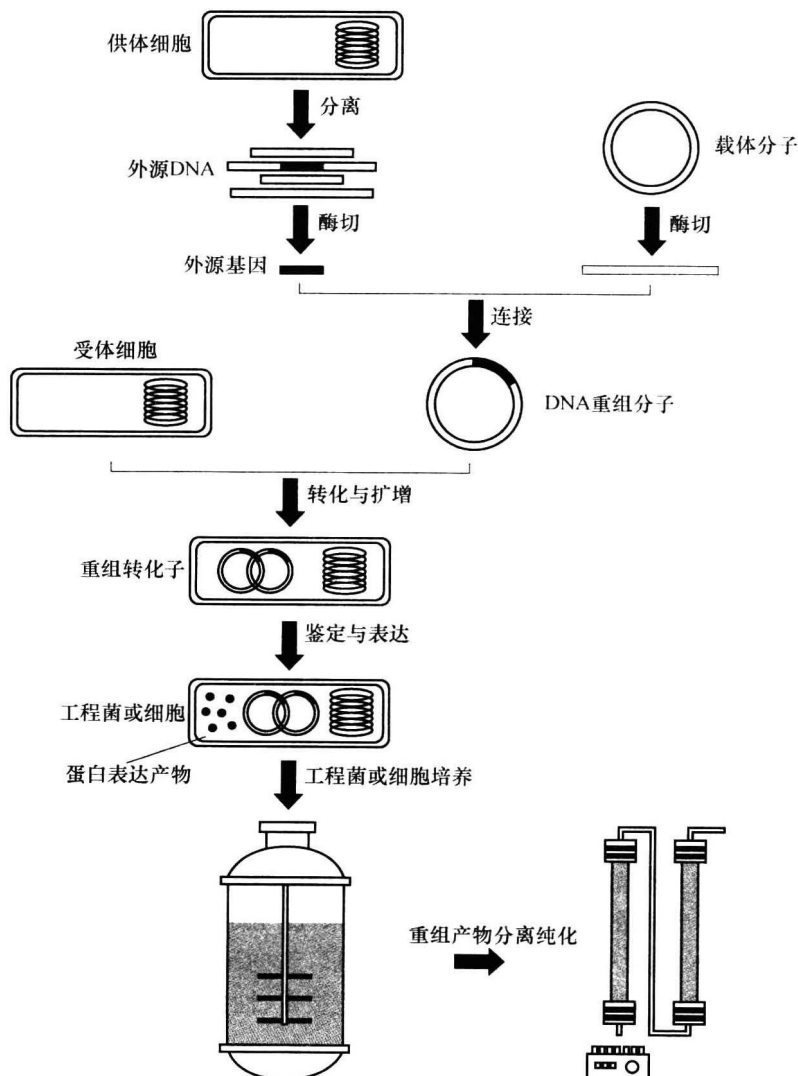


图 1.3 基因工程流程图(张惠展 2005)

2. 胚胎移植

动物胚胎移植(embryo transfer)指将动物体内发育的早期胚胎分离出来,将其移植到同期发情的其他未受孕母体生殖道内,代孕产生个体的技术。试管动物(tube animal)指利用精子和卵子的体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)、显微受精(microfertilization)、胚胎体外培养和移植技术所获得的各种动物(图 1.4)。

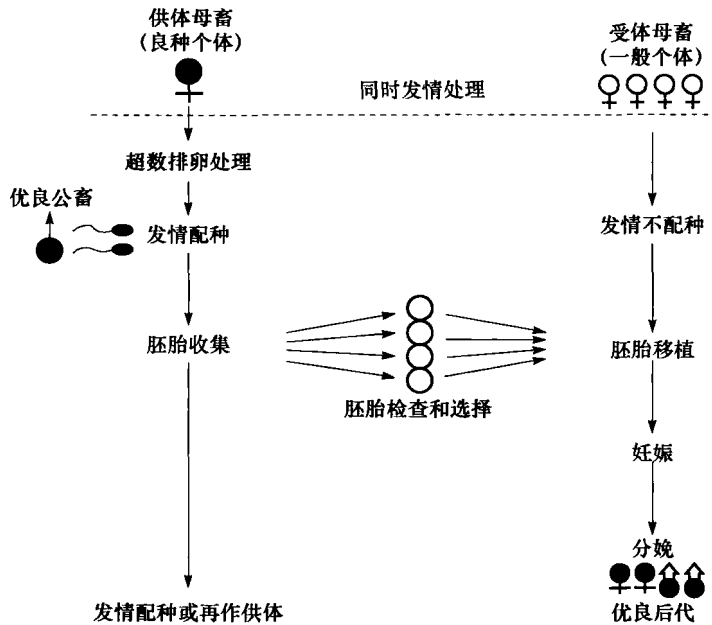


图 1.4 胚胎移植(李青旺 2005)

3. 细胞克隆

克隆细胞(cloned cell)是细胞的无性繁殖,指不经两性细胞的结合,个体不断增殖,复制出性状、特征和基因型相一致的个体。

4. 细胞产物改性

通过生物或者化学的方法,将生产代谢产物活性低的细胞转化为活性高的细胞,从而实现细胞改性,达到产生高活性的次生代谢产物细胞的方法与技术。

5. 细胞发酵培养

利用液体发酵或者固体发酵培养的方法,实现功能细胞量的积累,达到生物工程获得高产生物、高产制品或高含量生物细胞次生代谢产物的方法与技术。

6. 细胞融合与细胞杂交

利用不同细胞优良性状的互补特性,开展细胞之间的融合技术与杂交实验,是提供新的生物性状或获得新的生物制品的一种重要的方法与技术(图 1.5)。

随着研究工作的不断深入和生命科学的持续发展,新的研究内容、研究技术、研究手段层出不穷,例如,植物组织脱毒培养技术、人工种子制造技术、性别鉴定与控制技术、动植物种质资源离体保存技术等。

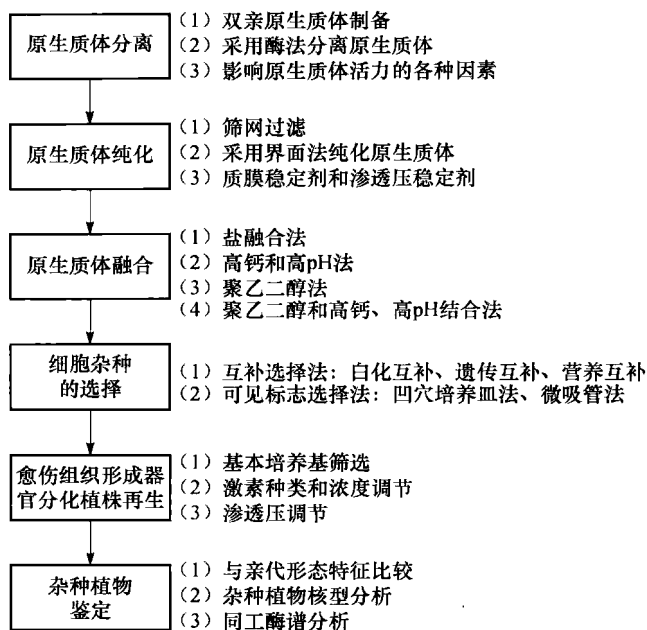


图 1.5 植物细胞融合过程(吴殿星 2004)

二、研究任务

当前生命科学发展十分迅速,研究领域、前沿热点不断更新,生命、医学、人口、环境、资源和农业等领域面临许多需要依靠细胞工程才能解决的问题。细胞工程学的研究任务十分艰巨,承担着研究解决生命科学关键问题的重要任务。这些研究任务包括基础研究和应用研究,既涉及基本理论和方法技术,如细胞全能性的分子机制、细胞信号传导控制等;又涉及技术应用与技术开发,如细胞快速繁殖脱毒技术、细胞生产单克隆抗体技术等。细胞工程研究任务主要表现在以下几个方面:

- (1) 离体培养条件下,细胞、组织或器官所需营养条件。
- (2) 离体培养条件下,细胞、组织或器官所需环境条件。
- (3) 细胞、组织或器官的形态发生规律。
- (4) 细胞的快速脱毒及大量繁殖方法与技术。
- (5) 亲缘关系不同的细胞融合方法和细胞杂交机制。
- (6) 细胞原生质体形成、再生和原生质体诱变新物种的机制与应用规律。
- (7) 细胞的遗传和变异规律,新物种的生产与应用研究。
- (8) 细胞种质资源的离体保存机制和方法。
- (9) 胚胎移植、胚胎体外生产及细胞克隆技术等。
- (10) 改良生物细胞品种,创造新的生物种类的方法与技术。

三、细胞工程相关分支学科

细胞工程研究内容十分丰富,涉及许多其他相关学科的理论 and 基本知识,细胞工程研究对