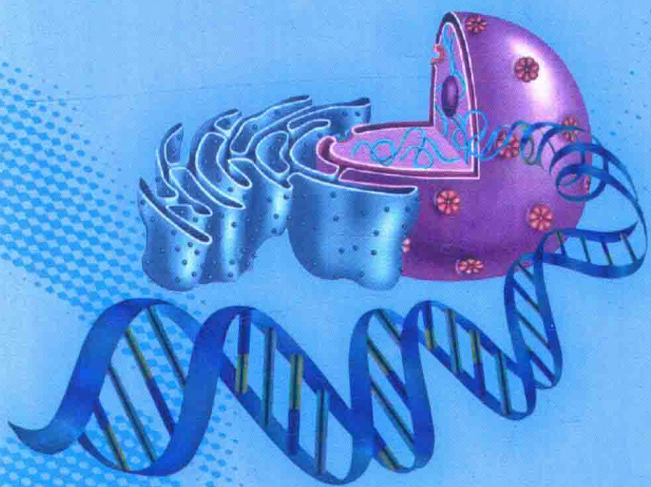




ICourse · 教材
生物技术与生物工程系列



细胞工程 原理与技术

Principles and Technology of
Cell Engineering

主编 余龙江

高等教育出版社



细胞工程 原理与技术

.....
Principles and Technology of
Cell Engineering

主 编 余龙江

副主编 邓 宁 李青旺 付春华

编 者 (按姓氏笔画排序)

王永飞 (暨南大学)

邓 宁 (暨南大学)

付春华 (华中科技大学)

江中良 (西北农林科技大学)

孙秀柱 (西北农林科技大学)

李青旺 (西北农林科技大学)

杨 英 (华中科技大学)

余龙江 (华中科技大学)

陈明洁 (华中科技大学)

单亚明 (吉林大学)

赵 蕊 (黑龙江八一农垦大学)

敖明章 (华中科技大学)

唐 勇 (暨南大学)

黄宜兵 (吉林大学)

康现江 (河北大学)

章焰生 (中国科学院武汉植物园)

内容简介

本书为高等学校 iCourse·教材:生物技术与生物工程系列之一,系统介绍了细胞工程基本原理、关键技术及其应用,以及本领域的最新研究成果,突出细胞工程在解决相关重大理论问题及其实际应用方面的特色。全书分为 13 章,前 3 章主要介绍细胞工程的发展简史、理论和实验基础;第 4 至 7 章主要介绍细胞工程关键技术;第 8 至 13 章主要介绍细胞工程应用实践。本书各章既独立成章又相互联系,内容安排相互衔接,既强调系统性和基础性,又紧扣应用实践。

本书配套的数字课程提供了与纸质教材紧密结合的知识拓展、深入学习、应用案例、视频、动画、本章小结、教学课件、自测题、参考文献等资源,便于教师教学和学生自主学习。

本书可供生物技术、生物工程及相关专业的本科生和研究生使用,也可作为科研工作者的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程原理与技术 / 余龙江主编. -- 北京: 高等教育出版社, 2017.3

iCourse·教材: 生物技术与生物工程系列

ISBN 978-7-04-046213-5

I. ①细… II. ①余… 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 (2016) 第 198457 号

Xibao Gongcheng Yuanli yu Jishu

项目策划 吴雪梅 王 莉 单冉东

策划编辑 王 莉 责任编辑 田 红 特约编辑 赵晓玉 封面设计 王凌波
责任印制 田 甜

出版发行	高等教育出版社	网 址	http://www.hep.edu.cn
社 址	北京市西城区德外大街4号		http://www.hep.com.cn
邮政编码	100120	网上订购	http://www.hepmall.com.cn
印 刷	北京人卫印刷厂		http://www.hepmall.com
开 本	889mm×1194mm 1/16		http://www.hepmall.cn
印 张	15		
字 数	430 千字	版 次	2017 年 3 月第 1 版
购书热线	010-58581118	印 次	2017 年 3 月第 1 次印刷
咨询电话	400-810-0598	定 价	32.00 元

本书如有缺页、倒页、脱页等质量问题,请到所购图书销售部门联系调换

版权所有 侵权必究

物 料 号 46213-00

iCourse · 数字课程 (基础版)

细胞工程 原理与技术

主编 余龙江



iCourse · 教材
生物技术与生物工程系列

登录方法:

1. 电脑访问 <http://abook.hep.com.cn/46213>, 或手机扫描下方二维码、下载并安装 Abook 应用。
2. 注册并登录, 进入“我的课程”。
3. 输入封底数字课程账号 (20 位密码, 刮开涂层可见), 或通过 Abook 应用扫描封底数字课程账号二维码, 完成课程绑定。
4. 点击“进入学习”, 开始本数字课程的学习。

课程绑定后一年为数字课程使用有效期。如有使用问题, 请发邮件至:
lifescience@pub.hep.cn

细胞工程原理与技术

主编 余龙江

用户名

密码

验证码

4 5 8 2

进入课程

注册

内容介绍

纸质教材

版权信息

联系方式

细胞工程原理与技术数字课程与纸质教材一体化设计, 紧密配合。数字课程包括知识拓展、深入学习、应用案例、视频、动画、本章小结、教学课件、自测题、参考文献等板块, 充分运用多种形式的媒体资源, 丰富知识的呈现形式, 拓展教材内容, 提升课程教学效果。

高等教育出版社

<http://abook.hep.com.cn/46213>

扫描二维码, 下载 Abook 应用



出版说明

“十二五”期间是高等教育继续深化改革、走以提高质量为核心的内涵式发展道路的关键时期。课程建设是教育教学改革的重要内容，课程建设水平对教学质量和人才培养质量具有重要影响。2011年10月12日教育部发布了《教育部关于国家精品开放课程建设的实施意见》（教高〔2011〕8号），开启了信息技术和网络技术条件下校、省、国家三级精品开放课程建设的序幕。作为国家精品开放课程展示、运行和管理平台的“爱课程（iCourse）”网站也逐渐为高校师生和社会公众认知和使用。截至目前，已有2600多门资源共享课和800多门视频公开课在“爱课程（iCourse）”网站上线。

高等教育出版社承担着“‘十二五’本科教学工程”中国家精品开放课程建设的组织实施和平台建设运营的重要任务，在与广大高校的调研和协作中，我们了解到当前高校的教与学发生了深刻变化，也真切感受到课程和教材建设所面临的挑战和机遇。如何建设支撑学生自主学习和校际共建共享的课程和新形态教材成为现实课题，在教育部高等学校生物技术、生物工程类专业教学指导委员会的指导下，结合我社2009年以来在数字课程建设上的探索和实践，我们提出了“高等学校生物技术与生物工程专业精品资源共享课及系列教材”建设项目，项目建设得到了众多高校的积极响应和广泛参与。2013年5月以来，分别在上海、天津、沈阳、杭州、武汉、无锡、银川等地陆续召开了项目启动会议、主编会议和编写会议。2015年，项目成果“iCourse·教材：生物技术与生物工程系列”陆续出版。

本系列教材涵盖生物技术、生物工程专业15门基础课程和专业课程，在出版形式、编写理念、内容选取等方面体现以下特点：

1. 采用“纸质教材+数字课程”的出版形式。纸质教材与丰富的数字教学资源一体化设计，纸质教材内容精炼适当，并以新颖的版式设计和内容编排，方便学生学习和使用；数字课程对纸质教材内容起到巩固、补充和拓展作用，形成以纸质教材为核心，数字教学资源配合的综合知识体系。

2. 创新教学理念，引导自主学习。通过适当的教学设计，鼓励学生拓展知识面和针对某些重要问题进行深入探讨，增强其独立获取知识的意识和能力，为学生自主学习和教师创新教学方法提供支撑。

3. 强调基础与技术、工程应用之间的紧密联系，注重学生应用能力培养。在讲述理论的同时，通过数字课程对学科前沿进展和工程应用案例进行延伸，在概念引入和知识点讲授上也尽量从实际问题出发，这不仅有利于提高学生的学习兴趣，也有助于加强他们的创新意识和创新能力。

4. 教材建设与资源共享课建设紧密结合。本系列教材是对各校精品资源共享课和教学改革成果的集成和升华，参与院校共建共享课程资源，更可支持各级精品资源共享课的持续建设。

本系列教材以服务于生物技术、生物工程专业课程教学为核心,汇集了各高校学科专家与一线教师的智慧、经验和积累,实现了内容与形式、教学理念与教学设计、教学基本要求与个性化教学需求,以及资源共享课与教材建设的一体化设计,以期对我国生物技术与生物工程专业教学改革和人才培养产生积极影响。

建设切实满足高等教育教学需求、反映教改成果和学科发展、纸质出版与资源共享课紧密结合的新形态教材和优质教学资源,实现“校际联合共建,课程协同共享”是我们的宗旨和目标。将课程建设及教材出版紧密结合,采用“纸质教材+数字课程”的出版形式,是一种行之有效的方法和创新,得到了高校师生的高度认可。尽管我们在出版本系列教材的工作中力求尽善尽美,但难免存在不足和遗憾,恳请广大专家、教师和学生提出宝贵意见与建议。

高等教育出版社

2015年6月

细胞工程是现代生物技术与生物工程的重要组成部分，是细胞生物学与发育生物学和遗传学的交叉领域，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成就，并取得了显著的社会效益和经济效益。细胞工程已成为高等院校生物技术、生物工程及相关专业的主修课程，也是农学、医药等相关专业的重要课程。

细胞工程所涉及的主要技术领域有细胞培养、细胞融合、细胞拆合、染色体操作及基因转移等诸多方面，其理论知识宽厚，应用十分广泛。近年来，随着互联网发展，教育信息化和国际化日益凸显，学生的学习方式发生了悄然改变，原有教学方式受到越来越大的挑战，需要积极探索适应学生学习方式转变的新型教育教学方式方法。慕课（Massive Open Online Course, MOOC，大规模开放在线课程）顺应时代发展应运而生，同时，翻转课堂、混合课堂等新的教学模式探索逐渐普及。在新的教学模式中，教师角色由讲授者转变为课程电子资源建设者和提供者，以及教学过程的引导者、启发者，充分体现了“以学生为中心”的学习者主体地位，极大促进了学生自主学习、主动探索和创新思维能力的培养。为了进一步提高教学效果和质量，必须建设与此相适应的新形态教材，帮助学生尽快适应新的教学方式。本书正是顺应这一发展需要编写的新形态教材，纸质教材与数字课程一体化设计：纸质教材设置了知识导图、主干内容、思考题和开放讨论题等内容；数字课程提供了与纸质教材配套的知识拓展、深入学习、应用案例、视频、动画、本章小结、教学课件、自测题、参考文献等资源。这种教材构架方式，一方面可以帮助学生更好地理解并掌握知识点，另一方面可以帮助学生重构学习方式，引导学生自主学习和探索，同时给予学生更大的自主选择权。

本书系统介绍了细胞工程基本原理、关键技术及其应用实践，以及本领域的最新研究成果，突出细胞工程在解决重大理论问题及应用实践方面的特色。各章节由在该领域长期进行研究的学者编著，很好地反映了该领域的研究进展。全书分为13章，前3章主要介绍细胞工程的发展简史、理论和实验基础；第4至7章主要介绍细胞工程关键技术；第8至13章主要介绍细胞工程的应用实践。本书各章既相对独立、又相互联系，内容安排相互衔接，既强调系统性和基础性，又紧扣应用实践。通过本教材的学习，学生可全面掌握细胞工程的原理和关键技术，并熟悉细胞工程的应用实践，为学生今后的发展打下良好的理论和技术基础。此外，本书按照研究的思路提出科学问题，并采用各种技术手段求证，并在此基础上提出新的问题，逻辑性强。本书可供高等院校生物技术、生物工程及相关专业的本科生和研究生使用，也可作为科研工作者参考书。

本书由余龙江教授（华中科技大学）担任主编，邓宁教授（暨南大学）、李青旺教授（西北农林科技大学）、付春华副教授（华中科技大学）担任副主编。华中科技大学的陈明洁、敖明章和杨英副教授，河北大学康现江教授，吉林大学单亚明教授和黄宜兵副教授，暨南大学唐勇教授和王永飞副教授，中国科学院武汉植物园章焰生研究员，西北农林科技大学江中良和孙秀柱副教授，黑龙江八一农垦大学赵蕊副教授等老师参与了教材编写。付春华、余龙江对书稿进行了全面统稿和核校。同时，华中科技大学生命科学与技术学院的董艳山、张蒙、王硕、聂琳、戴露丹等研究生参与核校了部分书稿，付出了辛勤劳动。本书出版得到了高等教育出版社的大力支持和全力合作。在此一并表示诚挚谢意。

由于本书涉及的知识面较广，而且该领域及相关学科发展很快，加之时间紧、任务重，编者业务水平有限，书中难免存在不足甚至瑕疵，敬请读者不吝赐教，以便及时更正和完善。

编 者

2016年8月

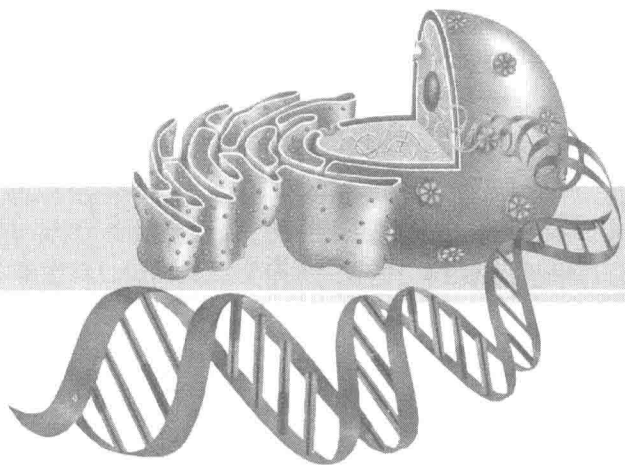
目 录

1 绪论	1	2.4.3 人工细胞	19
1.1 细胞工程概述	2	3 细胞工程实验基础	21
1.1.1 细胞工程概念	2	3.1 细胞工程实验室的规划设计及常用	
1.1.2 细胞工程基本内容	3	仪器设备	22
1.2 细胞工程发展简史	7	3.1.1 基本实验室	22
1.2.1 探索期	7	3.1.2 辅助实验室	24
1.2.2 奠基期	8	3.2 无菌操作技术	25
1.2.3 蓬勃发展期	8	3.2.1 培养用品的清洗	25
1.3 细胞工程发展前景	9	3.2.2 灭菌原理与方法	25
1.3.1 细胞工程理论发展前景	9	3.2.3 无菌操作技术	26
1.3.2 细胞工程技术发展前景	10	3.2.4 无菌操作技术的注意事项	27
1.3.3 细胞工程应用前景	10	3.2.5 污染的检测与控制	27
1.4 细胞工程学习方法	10	3.3 培养基的设计与优化	28
2 细胞工程理论基础	12	3.3.1 植物细胞培养基的设计与优化	28
2.1 细胞全能性	13	3.3.2 动物细胞培养基的设计与优化	29
2.1.1 细胞全能性定义	13	4 细胞组织培养技术	32
2.1.2 细胞全能性研究历史	14	4.1 植物细胞组织及器官培养技术	33
2.1.3 细胞全能性应用	15	4.1.1 植物细胞和组织培养	34
2.2 细胞分化与脱分化	15	4.1.2 植物器官培养	36
2.2.1 细胞分化	15	4.1.3 植物细胞组织开放式培养	38
2.2.2 细胞脱分化	16	4.2 动物细胞组织及器官培养技术	38
2.3 细胞融合	17	4.2.1 动物细胞培养	39
2.3.1 细胞融合的概念	17	4.2.2 动物组织培养	46
2.3.2 细胞融合的基本原理	17	4.2.3 动物器官培养	48
2.4 合成生物学与人工细胞	18	5 细胞融合技术	50
2.4.1 合成生物学概述	18	5.1 细胞融合技术概述	51
2.4.2 合成生物学关键技术	18		

5.1.1 细胞融合方法	51	7.4.2 干细胞治疗的困境和对策	114
5.1.2 融合细胞的筛选	54		
5.2 细胞融合技术发展历程	55	8 植物细胞大规模培养生产天然活性物质	119
5.3 动物细胞融合——杂交瘤技术	56	8.1 植物细胞大规模培养生产天然活性物质概述	121
5.3.1 杂交瘤技术概述	56	8.1.1 植物细胞大规模培养概念	121
5.3.2 单克隆抗体制备基本原理	57	8.1.2 植物细胞大规模培养生产天然活性物质特点	121
5.3.3 单克隆抗体制备基本流程	58	8.2 植物细胞大规模培养生产天然活性物质的关键技术	121
5.3.4 杂交瘤细胞的筛选	65	8.2.1 植物细胞系建立	121
5.3.5 单克隆抗体细胞株的建立	66	8.2.2 高产细胞系选育	122
5.4 植物细胞融合技术	66	8.2.3 高产细胞系保存	122
5.4.1 植物原生质体制备	67	8.2.4 植物细胞放大培养技术及工艺	123
5.4.2 植物原生质体培养	69	8.2.5 产物分离纯化	124
5.4.3 植物原生质体融合	71	8.3 植物细胞大规模培养生产天然活性物质的调控	124
5.4.4 植物体细胞杂种植株的鉴定	72	8.3.1 植物细胞大规模培养的诱导表达调控	124
6 细胞拆合与克隆技术	74	8.3.2 植物细胞响应外界刺激积累次生代谢物合成的信号转导途径	125
6.1 细胞拆合	75	8.3.3 植物天然活性物质合成的分子调控机制	125
6.1.1 细胞拆合技术发展概况	75	8.4 植物细胞大规模培养生产贵重药物应用实例	126
6.1.2 细胞拆合技术	76	8.4.1 紫杉醇生物合成的代谢调控	126
6.1.3 细胞器重组	78	8.4.2 人参皂苷生物合成和次生代谢调控	129
6.1.4 转染色体核移植技术	79		
6.2 克隆技术	80	9 植物组织快速繁殖生产试管苗	132
6.2.1 克隆的概念和分类	80	9.1 植物快速繁殖的概述	134
6.2.2 克隆技术研究进展	81	9.1.1 植物快速繁殖的概念	134
6.2.3 胚胎分割技术	86	9.1.2 植物快速繁殖的特点	134
6.2.4 哺乳动物克隆	89	9.2 植物脱毒培养技术	134
		9.2.1 植物脱毒和快速繁殖的意义	134
7 干细胞技术	97	9.2.2 植物脱毒培养的方法及原理	135
7.1 干细胞概述	98	9.2.3 植物脱毒苗的鉴定	135
7.1.1 干细胞定义	98	9.3 人工种子	136
7.1.2 干细胞分类	99	9.3.1 人工种子的概念	136
7.2 干细胞制备方法	100	9.3.2 人工种子各构成部分的特点	136
7.2.1 胚胎干细胞制备方法	100	9.3.3 人工种子的储藏	137
7.2.2 成体干细胞制备方法	104		
7.2.3 诱导多能干细胞制备方法	107		
7.2.4 肿瘤干细胞制备方法	109		
7.3 干细胞研究进展	111		
7.3.1 胚胎干细胞研究进展	111		
7.3.2 成体干细胞研究进展	112		
7.3.3 诱导多能干细胞研究进展	113		
7.4 干细胞临床应用	114		
7.4.1 干细胞及其衍生产品上市情况	114		

9.3.4 人工种子的应用	137	11.2.1 药物筛选概述	178
9.4 植物组织快速繁殖生成试管苗技术	138	11.2.2 细胞工程药物筛选技术	179
9.4.1 植物试管苗形成途径	138	11.2.3 高通量细胞筛选模型	181
9.4.2 试管苗的形成过程	139	11.2.4 高通量细胞筛选新技术	182
9.4.3 试管苗形成过程存在的问题与 对策	141	11.3 单克隆抗体的应用	182
9.4.4 试管苗的应用	142	11.3.1 单克隆抗体在医学检验中的 应用	182
9.5 植物组织快速繁殖生产试管苗的应用 实例	143	11.3.2 单克隆抗体在农牧业及食品安全 中的应用	183
9.5.1 经济作物马铃薯的快速繁殖	143	11.3.3 单克隆抗体药物在疾病治疗中的 应用	183
9.5.2 药用植物金线莲的快速繁殖	144		
9.5.3 景观植物香石竹的快速繁殖	145		
10 植物细胞工程育种	147	12 胚胎移植与试管动物	186
10.1 植物体细胞杂交育种	149	12.1 受精与胚胎发育	187
10.1.1 植物体细胞杂交概述	149	12.1.1 受精	187
10.1.2 植物体细胞杂交育种过程	150	12.1.2 胚胎发育	189
10.1.3 植物体细胞杂交育种的应用	152	12.2 胚胎移植	192
10.2 多倍体与单倍体育种	154	12.2.1 概述	192
10.2.1 多倍体育种	154	12.2.2 发情控制技术	192
10.2.2 单倍体育种	155	12.2.3 胚胎移植	193
10.3 分子标记辅助育种	158	12.2.4 胚胎移植的影响因素	197
10.3.1 分子标记辅助育种的概念与 意义	159	12.3 体外受精与试管动物	197
10.3.2 用于分子标记辅助育种的分子 标记	159	12.3.1 体外受精技术在动物生产中的 重要性	198
10.3.3 分子标记在植物育种中的应用	165	12.3.2 卵母细胞的体外成熟	198
10.4 体细胞突变体育种	165	12.3.3 精子获能	200
10.4.1 体细胞突变体	165	12.3.4 体外受精	201
10.4.2 体细胞突变体育种过程	167		
10.4.3 体细胞无性系变异的应用	168	13 转基因动物及其应用	204
10.4.4 体细胞无性系变异育种存在的 主要问题	169	13.1 转基因动物概述	206
10.5 基于细胞工程的植物转基因育种	169	13.1.1 转基因动物研究发展简史	206
11 动物细胞工程制药	172	13.1.2 转基因动物的效率	207
11.1 动物细胞培养生产疫苗	173	13.1.3 动物转基因的结构	208
11.1.1 疫苗生产用细胞基质及其特性	174	13.1.4 动物转基因的表达特性	209
11.1.2 疫苗生产用新细胞系 / 株建立 技术	177	13.1.5 转基因动物的安全性	209
11.1.3 动物细胞培养生产疫苗进展	178	13.2 转基因动物生物反应器	210
11.2 动物细胞工程药物筛选	178	13.2.1 转基因动物生物反应器的类型	210
		13.2.2 转基因动物生物反应器制备的 基本流程	213
		13.2.3 转基因动物生物反应器存在的 问题及展望	213
		13.3 转基因动物模型	214

13.3.1 转基因动物制备方法	215	13.3.4 人类疾病转基因动物模型	221
13.3.2 动物转基因载体分类	218	13.3.5 转基因动物的研究	223
13.3.3 转基因动物的鉴定	219	13.4 转基因动物的应用	225



绪 论

● 1.1 细胞工程概述

细胞工程概念；细胞工程基本内容

● 1.2 细胞工程发展简史

探索期；奠基期；蓬勃发展期

● 1.3 细胞工程发展前景

细胞工程理论发展前景；细胞工程技术发展前景；细胞工程应用前景

● 1.4 细胞工程学习方法

细胞工程是现代生物技术的重要组成部分之一，是在细胞水平研究、开发和利用各类细胞的一门综合性科学技术。高等生物的细胞工程根据其研究对象可分为动物细胞工程、植物细胞工程。细胞工程对于细胞的研究可以分为分子水平、细胞器水平、细胞水平、组织水平等不同研究层次。细胞工程基本原理包括细胞全能性、细胞分化与脱分化等。细胞工程基本技术包括细胞培养技术、细胞融合技术、细胞拆合技术、干细胞技术等。细胞工程主要内容涉及培养和操作细胞、组织乃至个体，以达到改良品种、快速繁殖生物个体、生产生物制品和治疗疾病等目的，从而为人类及其生存环境服务。

通过本章学习，可以掌握以下知识：

1. 细胞工程的基本概念和基本内容；
2. 细胞工程的发展简史；
3. 细胞工程的发展前景。

知识导图



关键词

细胞工程 发展简史 基本原理 关键技术 主要应用 发展前景

1.1 细胞工程概述

1.1.1 细胞工程概念

细胞工程是现代生物技术的重要组成部分之一，是在细胞水平研究、开发和利用各类细胞的一门综合性科学技术。细胞工程是在基础生物学科和生物工程学科交叉渗透、互相促进的基础上发展起来的，以细胞生物学、遗传学、生物化学、分子生物学、发育生物学、免疫学等基础学科为理论依据，以基因工程、蛋白质工程、代谢工程、发酵工程、酶工程、生物化学工程等生物工程技术为支撑。细胞工程主要内容涉及培养和操作细胞、组织乃至个体，以达到改良品种、快速繁殖生物个体、生产生物产品和治疗疾病等目的，从而为人类及其生存环境服务。

高等生物的细胞工程根据研究对象可分为动物细胞工程、植物细胞工程。细胞工程对于细胞的研究可分为分子水平、细胞器水平、细胞水平、组织水平等不同层次。按照细胞的结构组成及其发育来分，细胞工程研究对象主要包括染色体、细胞核、原生质体、全细胞、受精卵、胚胎、组织或个体。

1.1.2 细胞工程基本内容

(1) 细胞工程基本原理

人类之所以能够对动植物细胞、组织及个体进行操作,主要基于动植物细胞的全能性及其细胞分化与脱分化理论。

① 细胞全能性 细胞全能性是指生物个体的体细胞都具有该个体的全套遗传信息,经过分裂与分化之后,仍然具备发育成完整个体的潜能和特性。受精卵及早期的胚胎细胞都具有细胞全能性。事实证明,对于植物细胞,即使是发育成熟和高度分化的体细胞,仍具有发育成完整植株的能力,并且广泛应用于植物细胞工程的实践中。与植物细胞相比,动物体细胞全能性的实现还很困难。对于动物细胞,特别是高等动物细胞,随着胚胎的发育,细胞逐渐丧失了发育成为完整个体的能力,仅具有分化成为多种细胞类型及构建组织的潜能,即由全能性细胞逐渐分化成为多能或单能干细胞,有些细胞甚至高度分化,成为不能再脱分化的体细胞。具有分化形成多种不同类型细胞或组织的潜能的细胞称为多能干细胞,如胚胎干细胞;仅具有分化形成某一种类型细胞潜能的细胞称为单能干细胞,如肌肉干细胞等。对于动物体细胞的细胞核而言,仍然具有全能性,前提是要将动物体细胞的细胞核转移到去核的卵母细胞中,才能重新发育成为完整个体。早期利用两栖类动物进行实验证明,将蛙的上皮细胞的细胞核植入去核的卵子中,仍然可以发育成为蝌蚪甚至青蛙,这一实验证明了细胞核具有全能性。动物细胞核的全能性也是多莉羊产生的理论基础。

② 细胞分化与脱分化 细胞分化是生物发育的基础与核心,也是细胞生物学、发育生物学和遗传学的重要交汇点。现代分子生物学证据表明,细胞分化是由于基因选择性表达各自特有的专一性蛋白,从而导致生物形态、结构和功能上的差异。多细胞有机体是由多种不同类型的细胞组成的,而这些细胞是由一个受精卵经过细胞分裂和分化而来。在个体发育过程中,由一种相同类型的细胞经过分裂后逐渐在形态、结构和功能上形成稳定性差异,从而产生不同细胞类型和群体的过程称为细胞分化。一个经过分裂和分化后高度成熟的细胞再转化为分生状态,并形成未分化的细胞团或愈伤组织的现象称为脱分化。植物细胞脱分化比动物细胞要容易。植物细胞脱分化的难易程度与植物种类、年龄、组织和细胞的生理生长状态等有关,一般单子叶植物和裸子植物比双子叶植物脱分化难,成年比幼年植物组织脱分化难。细胞脱分化是植物细胞工程实践的重要理论依据,植物细胞在一定条件下经过脱分化可形成愈伤组织和胚状体,愈伤组织和胚状体又可发育成为完整的植株。应用这一细胞工程理论,可以大规模快速繁殖植物个体。此外,经过脱分化的植物细胞还可以用于大规模培养生产具有重要应用价值的次级代谢产物。

一般认为,动物细胞很难进行脱分化。但近来,Jayaraj Rajagopal 等(2013)发现小鼠气管上皮中分化的分泌细胞有“去分化”成为对成年气管起干细胞作用的基细胞的能力。研究表明定型细胞类型向干细胞的“去分化”,对于高等脊椎动物在不同器官中以及在受伤情形下的再生能力可能具有更为普遍的贡献。

(2) 细胞工程关键技术

① 细胞培养技术 细胞培养技术是细胞工程应用的最基本技术,是指将离体的细胞、组织或器官置于人工配制的培养基中,并在一定培养条件下进行培养。由于植物细胞与动物细胞在细胞全能性潜能上的巨大差异,二者细胞培养技术具有非常大的区别。植物细胞可以进行器官、组织、胚胎、细胞、原生质体等的离体培养,并且可以利用植物外植体诱导愈伤组织,愈伤组织可以进行驯化建立细胞系,也可以进行组织幼苗快繁。而动物细胞的全能性潜能很弱,通过细胞或组织培养无法获得完整的个体,仅干细胞培养可获得某些组织或器官。动物细胞主要进行离体细胞或组织培养获得具有治疗作用的细胞或具有药物价值的产物。

a. 植物细胞培养技术 植物细胞培养技术根据培养对象不同,可以分为:植株培养(如试管苗和

小植株的培养), 器官培养(如根、茎、叶、花等的培养), 愈伤组织培养(植物外植体经过诱导产生脱分化的愈伤组织, 进行培养), 胚胎培养(离体胚或胚珠的培养), 细胞培养(分散细胞或小细胞团培养), 原生质体培养(植物细胞去除细胞壁后得到原生质体, 进行培养)。植物细胞培养根据培养基状态不同, 可以分为固体培养基培养和液体培养基悬浮培养。

植物组织细胞离体培养一般经历以下步骤: 外植体选择, 从植株特定部位选取细胞、组织或器官为起始材料; 外植体表面消毒, 一般使用次氯酸钠、漂白粉、氯化汞或乙醇进行表面消毒, 再接种到固体培养基上; 愈伤组织诱导, 一般先诱导愈伤组织形成, 再由愈伤组织在特定条件下分化出芽或根, 最终形成完整植株。此外, 合适的外界环境也是保证植物组织培养成功的重要条件。如温度, 植物组织细胞培养大多数情况下的最适温度为 25℃ 左右, 因植物种类不同而有所不同, 但是, 一般不会超出 20~28℃。再如光照, 在培养初期和愈伤组织阶段, 一般采用暗培养, 这是由于光照会抑制外植体形成愈伤组织。而进入分化阶段, 则要给予适度光照。

在进行植物细胞培养时, 离体培养的细胞、组织和器官等所需要的各种营养物质均由培养基提供, 因此培养基是决定培养物能否正常生长或能否达到培养目标的前提条件之一。与完整的植物培养类似, 植物细胞和组织离体培养也需要培养基中具有各种有效成分, 以保证植物组织细胞的正常生长。植物细胞培养基一般由水、无机成分、维生素、碳源、植物激素等组成。无机成分主要包括大量元素(如 N、P、K、Ca、Mg、S)和微量元素(如 Fe、Mn、Zn、Cu、Mo、Cl 等), 以上元素都是以无机盐的形式添加到培养基中。植物细胞和组织培养需要糖类(也称碳源)提供碳骨架和能源。最常用的碳源是蔗糖, 此外还有葡萄糖和果糖。培养基内添加维生素, 有利于离体培养物的发育, 最重要的是 B 族维生素, 如硫胺素、生物素、叶酸、烟酸等。此外, 肌醇能使培养的组织快速生长, 有利于胚状体和芽的形成。植物激素对于植物细胞和组织培养起非常关键的调节作用, 常用植物激素包括生长素类和分裂素类。生长素的作用主要是促进细胞生长和根的形成, 天然生长素是吲哚乙酸(IAA), 天然细胞分裂素是玉米素(ZT)。实际应用中, 常用到人工合成的生长素, 如 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-D)、萘乙酸(NAA)、吲哚丁酸(IBA)等。细胞分裂素的作用主要是促进细胞分裂和芽的形成, 常用的细胞分裂素类物质有激动素(KT)、6-苄基氨基嘌呤(6-BA)等。

b. 动物细胞培养技术 动物细胞培养一般进行离体细胞的培养, 主要步骤包括: 在无菌条件下, 从动物体特定部位取出适量组织, 用剪刀剪碎; 采用机械解离和酶消化的方法分散细胞; 将分散的细胞制成悬液, 进行原代和传代培养。动物细胞有两种培养方式, 一种是贴壁培养, 大多数动物细胞需要在带正电荷的固体或半固体表面才能进行生长培养; 另一种为非贴壁培养, 一般用于血液和淋巴细胞、肿瘤细胞等的培养, 这类细胞可以像微生物那样进行悬浮培养。

提供尽可能与体内生长接近的环境, 是培养动物细胞的基本要求。包括合适的营养物质、激素和生长因子、温度、酸碱度、渗透压等。动物细胞培养基一般分为天然培养基、合成培养基和无血清培养基。早期动物细胞培养工作一般采用动物体液或动物组织中的天然成分作为培养基, 称为天然培养基, 常用的有血清、血浆、组织、胚胎提取液、水解乳蛋白和胶原等。其中, 血清是应用最广泛的天然培养基, 含有丰富的营养物质以及动物细胞生长所必需的生长因子等。合成培养基是指人工合成的培养基, 主要成分包括氨基酸、维生素、糖类、无机离子等。使用人工合成培养基培养细胞, 一般仍要补充一定量的血清。无血清培养基是不需要添加血清就可以维持细胞在体外较长时间繁殖的合成培养基。其成分包括基础培养基和添加组分两部分。添加组分包括促贴壁物质、促生长因子、酶抑制剂、结合蛋白和转运蛋白等。

② 细胞融合技术 两个细胞相互接触后, 细胞膜发生分子重排, 细胞合并, 染色体等遗传物质重组的过程称为细胞融合。细胞融合可以分为生物个体自然状态下发生的自发融合以及人工操作的人工诱导融合。大多数情况下, 细胞融合指的是人工诱导融合。动物细胞、植物细胞的融合过程和原理相似。不同之处在于具有细胞壁的植物细胞需要去除细胞壁后才能进行细胞融合。

人工诱导细胞融合过程的主要步骤包括：根据操作需要，选择适合的亲本细胞；原生质体制备，由于植物细胞和微生物细胞具有细胞壁，阻碍细胞融合的发生，因此必须去掉细胞壁制成原生质体才能进行下一步的细胞融合，而动物细胞没有这种障碍；细胞融合诱导，将两亲本细胞（或原生质体）悬液调制一定浓度比例混合，采用化学、物理或生物方法促进融合；杂合细胞筛选，将诱导融合的细胞悬液移到特定的筛选培养基中，只有杂合细胞能够生长，而未融合或自融合的细胞均不能生长，从而获得具有双亲遗传特性的杂合细胞。

③ 细胞拆合技术 细胞拆合是指将不同来源的胞质体与核体进行重组而得到重组细胞的过程。胞质体是指除去细胞核后由膜包裹的无核细胞。核体是与细胞质分离得到的细胞核，带有少量细胞质并且有质膜包裹。细胞拆合技术是随着核-质关系的研究而逐步发展起来的细胞工程技术。细胞拆合方式一般包括以下几种：一是胞质体与核体重新组合形成重组细胞；二是微细胞与完整细胞重组形成微细胞异核体，其中，微细胞是指由一条或几条染色体和少量细胞质，由完整质膜包裹而成的核质体；三是胞质体与完整细胞重组形成胞质杂种。

细胞拆合是实现动物克隆的理论与技术基础。20 世纪 60 年代，我国著名科学家童第周和牛满江教授在异种核质关系研究方面取得了举世瞩目的成就。他们取出鲤鱼胚胎囊胚期细胞的细胞核，放入鲫鱼的去核受精卵中，结果部分重组细胞发育成鱼。经过实验确认，这些鱼确实为杂合鱼，它们的口须和咽区像鲤鱼，脊椎骨的数目像鲫鱼，而侧线鳞片数目介于二者之间。而且血红蛋白及血清鉴定分析也支持杂种鱼的结论。20 世纪 90 年代，利用幼胚细胞核克隆哺乳动物的技术已经成熟，其中，最让世界瞩目的是 Wilmut 博士于 1997 年 2 月在 *Nature* 杂志上宣布用成年绵羊乳腺细胞的细胞核克隆出绵羊“多莉”。

知识拓展 1-1
童第周和克隆鱼

④ 干细胞技术 在动物研究领域，一般认为，干细胞是来自胚胎、胎儿或成体内，在一定条件下具有无限自我更新和增殖能力，以及具有不同程度分化潜能的一类细胞。根据干细胞来源，可将其分为胚胎干细胞和成体干细胞，成体干细胞又包括造血干细胞、神经干细胞、肝干细胞、肌干细胞，以及皮肤表皮干细胞等。干细胞根据分化潜能又可分为全能干细胞、多能干细胞和单能干细胞。随着生物技术的快速发展和不断完善，科学家通过生物技术手段诱导体细胞转变为多能或单能干细胞。干细胞技术在动物克隆和改良、疾病治疗等领域具有广阔的应用前景。器官中单能干细胞的准确应用对于相应疾病的治疗起到关键作用，例如，造血干细胞对于白血病的治疗，心肌干细胞对于心脏疾病的治疗等。

在植物研究领域，韩国学者 Eun-Kyong Lee 从植物的形成层中分离得到形成层干细胞，并应用这类干细胞培养进行相应的次级代谢产物生产，与传统的脱分化植物细胞培养相比，形成层干细胞培养表现出明显的生长快、产量高等优势。

（3）细胞工程主要应用

① 植物组织快繁生产试管苗 离体组织的快速繁殖和脱病毒技术是目前植物细胞工程应用最多、最广泛和最有效的。利用组织培养的方法将植物体的某一器官或器官的一部分组织小块进行培养，并且诱导分化为小植株，可以实现大规模无性快速繁殖。该技术应用目前已非常成熟，而且繁殖速度快、周期短，不受季节气候等外界自然环境影响，可以实现优质种苗的大规模工业化生产。

植物容易受到病毒侵害，严重影响植物方面的农业和园林生产。例如马铃薯、草莓如果感染病毒，就会出现一年比一年瘦小的退化现象。人们曾经尝试过采用物理、化学等方法来防治，但是效果甚微，感染病毒情况严重时，为避免造成传染，必须采取拔除并且销毁的方法，造成较大损失。20 世纪 50 年代，Morel 和 Martin 通过茎尖培养的方法从严重感染病毒的大丽花植株得到无病毒苗。此外，科学家还建立了通过愈伤组织培养生产无病毒苗的方法。目前，很多植物通过组织培养技术获得了脱病毒的无性繁殖苗，并在农业生产的农作物、果蔬、花卉等领域得到大规模应用，例如甘薯、香蕉、苹果、葡萄、马铃薯、大蒜、兰花、水仙等。