

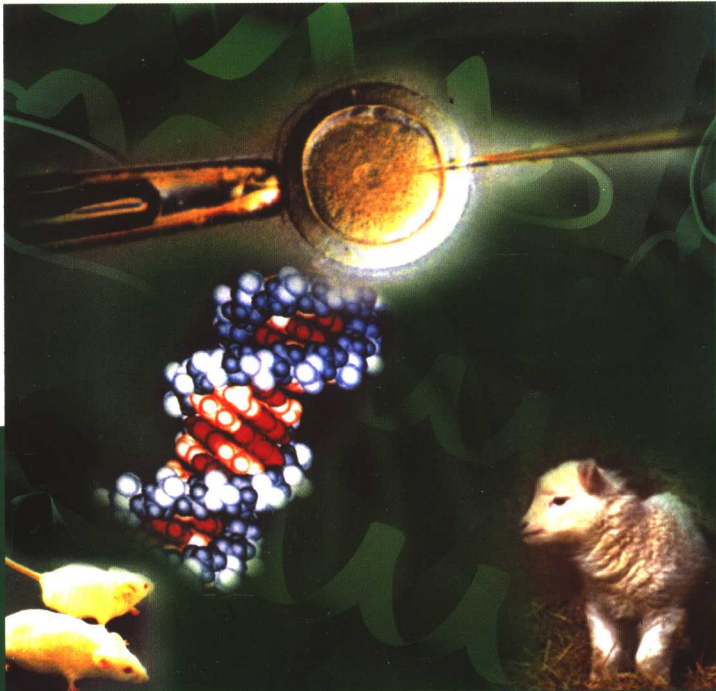


普通高等教育“十一五”国家级规划教材

生物工程 生物技术系列

细胞工程

殷红 主编
曹孜义 曹峻岭 审定



化学工业出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

细胞工程

殷红 主编

杨淑慎 郝建国 副主编

曹孜义 曹峻岭 审定



化学工业出版社

·北京·

本书较全面、系统地介绍了细胞工程的基本原理、基本技术及其应用以及学科的最新研究成果。全书共分3篇：第1篇为细胞工程基础，主要概括介绍了细胞工程的发展和基本设备及其使用和无菌技术等；第2篇为植物细胞工程，主要包括植物的快速繁殖与脱病毒、胚胎和胚乳培养、胚珠和子房培养与离体授粉、花粉和花药培养、植物细胞培养以及次生物质生产、原生质体培养与体细胞杂交技术等；第3篇为动物细胞工程，主要包括动物细胞培养的基本技术、细胞融合与杂交瘤技术、干细胞技术、细胞重组与动物克隆等。

本书可用作综合院校、师范院校以及农林院校细胞工程课程的教材，也可供其他院校有关专业的相关课程选用或参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/殷红主编. —北京：化学工业出版社，2006.7

普通高等教育“十一五”国家级规划教材
ISBN 7-5025-9186-9

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

中国版本图书馆CIP数据核字(2006)第088928号

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

细胞工程

殷红 主编

杨淑慎 郝建国 副主编

曹夜义 曹峻岭 审定

责任编辑：赵玉清

文字编辑：张春娥

责任校对：边涛

封面设计：郑小红

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里3号 邮政编码 100029)

购书咨询：(010)64982530

(010)64918013

购书传真：(010)64982630

[http:// www. cip. com. cn](http://www.cip.com.cn)

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印装

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 14 字数 272千字

2006年9月第1版 2006年9月北京第1次印刷

ISBN 7-5025-9186-9

定 价：24.00元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者，本社发行部负责退换

前 言

细胞工程是现代生物技术的重要组成部分，是当前生命科学中最具活力的学科之一，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，并带来了巨大的经济效益和良好的社会效益。因此，《细胞工程》也是目前各高校普遍开设的生物技术和生物工程专业的骨干课程。但由于该专业起步较晚，相关教材较少，尚不能满足各类院校不同的教学要求。因此，我们在多年教学工作中积累的资料和讲义的基础上编写了这本教材，力求能够较全面、系统地介绍细胞工程的基本原理、基本技术及其应用，以及学科的最新研究成果，以帮助学生通过学习该门课程，能较好地掌握细胞工程的基本内容，达到拓宽知识面，打好专业基础，提高专业能力的目的。

考虑到本课程一般是在相关专业学生学完植物学、动物学、生物化学、细胞生物学和微生物学等课程之后开设的，因此，在注意教材系统性的同时，本书在内容上尽量避免与其前期基础课程的重复。本书主要分为3篇：第1篇为细胞工程基础，主要概括介绍了细胞工程的发展和应用、基本设备及其使用和无菌技术等；第2篇为植物细胞工程，主要包括植物的快速繁殖与脱病毒、胚胎和胚乳培养、胚珠和子房培养与离体授粉、花粉和花药培养、植物细胞培养以及次生物质生产、原生质体培养与体细胞杂交技术等；第3篇为动物细胞工程，主要包括动物细胞培养的基本技术、细胞融合与杂交瘤技术、干细胞技术、细胞重组与动物克隆等。由于学生在微生物学和发酵工程等课程中要学到微生物的细胞培养技术，故本书对此不做介绍。

本书可用作综合院校、师范院校以及农林院校细胞工程课程的教材，也可供其他院校有关专业的相关课程选用或参考。

本书的出版得到了西北大学教务处和化学工业出版社的大力支持，获得学校教学改革与教材建设工程项目的资助，并被评为普通高等教育“十一五”国家级规划教材。本书由殷红担任主编，杨淑慎（西北农林科技大学）、郝建国（西北大学）担任副主编。在编写过程中，甘肃农业大学的曹孜义教授和西安交通大学医学院的曹峻岭教授不辞辛劳，在百忙中抽时间以严谨的治学态度仔细审阅了书稿，提出了许多非常宝贵的指导性意见；在本书的出版过程中，出版社有关人员以十分认真负责的态度给予了很大的帮助并付出了辛勤的劳动；在本书的编写和出版过程中还得到了西北大学贾敬芬教授、崔智林教授、王卫卫教授和汪涛老师以及边宇洁老师的大力帮助和支持；生命科学学院的硕士研究生陈娟莉、沈书庆和徐婉茹等同学帮助

校核了部分书稿，在此一并表示诚挚的谢意。

由于本书涉及范围较广，而且该学科发展很快，加之作者水平有限，书中难免有疏漏和不足之处，敬请读者不吝赐教，批评指正。

编著者

2006年6月

目 录

第 1 篇 细胞工程基础

第 1 章 绪论	1
1.1 细胞工程的定义和基本内容	1
1.2 细胞工程中的基本技术	2
1.2.1 细胞培养技术	2
1.2.2 细胞融合技术	3
1.2.3 其他技术	3
1.3 细胞工程发展简史	3
1.3.1 植物细胞工程的发展	3
1.3.2 动物细胞工程的发展	4
1.4 细胞工程的主要应用	5
1.4.1 植物细胞工程的应用	5
1.4.2 动物细胞工程的应用	7
思考题	8
第 2 章 细胞工程中的常用设备	9
2.1 细胞工程实验室常用部分仪器设备	9
2.1.1 水纯化装置	9
2.1.2 超声波清洗器	9
2.1.3 蒸汽压力消毒器	10
2.1.4 电热干燥箱	11
2.1.5 过滤除菌装置	11
2.1.6 超净工作台	11
2.1.7 培养箱	13
2.1.8 摇床	14
2.1.9 移液器	14
2.1.10 显微镜	15
2.1.11 显微操作仪	16
2.1.12 细胞冷冻存储设备	16
2.1.13 血球计数板	16
2.2 常用器具	17
2.2.1 培养器皿	17

2.2.2 金属器械	18
2.3 常用器材的清洗	18
2.3.1 玻璃器材的清洗	19
2.3.2 橡胶制品的清洗	19
2.3.3 除菌滤器的清洗	19
2.3.4 塑料器皿的清洗	20
2.3.5 金属器械的清洗	20
2.3.6 常用洗涤液的种类和配制方法	20
思考题	20
第3章 无菌技术	21
3.1 常用灭菌方法及原理	21
3.1.1 热力灭菌	21
3.1.2 电离辐射灭菌	24
3.1.3 紫外线杀菌	24
3.1.4 过滤除菌	24
3.1.5 化学杀菌	24
3.2 无菌操作注意事项	26
3.2.1 无菌操作室的消毒	26
3.2.2 常见污染原因和预防措施	27
3.3 实验室生物安全	28
思考题	29
第2篇 植物细胞工程	
第4章 植物细胞工程的基本原理和技术基础	30
4.1 植物细胞工程的基本原理	30
4.1.1 植物细胞的全能性	30
4.1.2 植物激素的调控作用	31
4.2 植物细胞和组织培养所需的营养和环境条件	31
4.2.1 培养基的组成和配制	31
4.2.2 影响植物组织培养的环境条件	35
4.3 外植体的选择及消毒	36
4.3.1 外植体的选择	36
4.3.2 植物材料的消毒	37
4.4 外植体的切取和培养	39
4.4.1 外植体的切取	39
4.4.2 外植体的接种和培养	39
思考题	40

第 5 章 植物离体快速繁殖和脱病毒技术	41
5.1 植物的快速繁殖技术	41
5.1.1 快速繁殖的一般技术	41
5.1.2 快速繁殖中应注意的问题	45
5.1.3 操作实例：月季快速繁殖	47
5.2 无病毒植物的培养	47
5.2.1 脱除植物病毒的方法	48
5.2.2 脱病毒植株的鉴定	52
5.2.3 操作实例：葡萄脱毒及无毒苗试管繁殖技术	54
思考题	54
第 6 章 植物的胚胎培养和离体授粉	55
6.1 植物的胚胎培养	55
6.1.1 成熟胚的培养	55
6.1.2 幼胚的培养	55
6.1.3 植物胚胎培养的应用	59
6.2 胚珠和子房培养	60
6.2.1 胚珠培养	60
6.2.2 子房培养	62
6.2.3 未传粉子房和胚珠培养产生单倍体	63
6.3 离体授粉（试管受精）	64
6.3.1 离体授粉技术的基本过程	65
6.3.2 影响离体授粉成功的因素	65
6.3.3 离体授粉技术在杂交育种上的应用	66
6.3.4 操作实例：小麦雌蕊的离体授粉和受精	67
6.4 胚乳培养	67
6.4.1 胚乳培养方法	68
6.4.2 操作实例：大麦的胚乳培养	70
思考题	71
第 7 章 花药和花粉培养	72
7.1 花药培养	72
7.1.1 材料的选择	72
7.1.2 预处理	73
7.1.3 培养基	73
7.1.4 培养方式	74
7.1.5 培养条件	75
7.1.6 花粉植株的倍性及染色体加倍	75
7.2 花粉培养	76

7.2.1	材料的选择和预处理	77
7.2.2	花粉的分离	77
7.2.3	花粉培养方法	78
7.3	花药和花粉培养中的白化苗问题	79
7.4	操作实例	80
7.4.1	烟草花药培养	80
7.4.2	烟草花粉培养	81
	思考题	81
第8章	植物的细胞培养及次生物质生产	82
8.1	植物的单细胞培养	82
8.1.1	单细胞的分离	82
8.1.2	单细胞培养技术	83
8.2	植物细胞的悬浮培养	86
8.2.1	细胞悬浮培养的一般过程	86
8.2.2	悬浮培养工艺	88
8.3	植物细胞的大规模培养和次生物质生产	89
8.3.1	细胞株的筛选	91
8.3.2	培养基的选择	91
8.3.3	培养条件的选择	92
8.3.4	生物反应器的选择	93
8.3.5	产物的分离纯化	97
8.3.6	操作实例：伊贝母细胞培养及生物碱含量测定	99
	思考题	100
第9章	原生质体培养和体细胞杂交	101
9.1	原生质体的分离与纯化	101
9.1.1	原生质体的分离	101
9.1.2	原生质体的纯化与活力测定	104
9.2	原生质体培养	105
9.2.1	培养基	105
9.2.2	培养方法	106
9.2.3	原生质体的再生培养	108
9.2.4	操作实例：三叶半夏的原生质体培养	110
9.3	体细胞杂交	110
9.3.1	原生质体的选择	111
9.3.2	原生质体诱导融合的方法	111
9.3.3	杂种细胞的选择与鉴定	112
9.3.4	杂种植株的鉴定	114

9.3.5 体细胞杂种的遗传特征	114
思考题	115
第10章 植物种质的超低温保存	116
10.1 抑制外植体生长的离体保存方法	116
10.1.1 降低温度	117
10.1.2 降低环境中的氧含量	117
10.1.3 使用生长延缓剂	117
10.1.4 其他方法	117
10.2 离体植物材料的超低温冰冻保存技术	117
10.2.1 材料的选择	117
10.2.2 材料的预处理	118
10.2.3 冰冻保护剂预处理	118
10.2.4 降温冰冻操作	119
10.2.5 化冻操作	121
10.2.6 化冻材料的活力检测	121
10.2.7 超低温种质保存实例	122
思考题	122

第3篇 动物细胞工程

第11章 动物细胞培养所需的基本条件	123
11.1 动物细胞培养基的组成和制备	123
11.1.1 水和平衡盐溶液	123
11.1.2 天然培养基	124
11.1.3 合成培养基	125
11.1.4 无血清培养基	127
11.2 影响动物细胞培养的环境因素	130
11.2.1 温度	130
11.2.2 pH	131
11.2.3 溶解氧和二氧化碳	131
11.2.4 渗透势	131
思考题	131
第12章 动物细胞培养技术	132
12.1 原代培养	132
12.1.1 取材	132
12.1.2 解离释放细胞	133
12.1.3 原代培养常用方法	137
12.2 传代培养	139

12.2.1	贴壁生长细胞传代	139
12.2.2	半悬浮生长细胞传代	139
12.2.3	悬浮生长细胞传代	140
12.3	细胞系与细胞克隆	140
12.3.1	细胞系(株)的建立	140
12.3.2	细胞克隆技术	140
12.3.3	克隆的分离	143
12.4	动物细胞的大规模离体培养技术	145
12.4.1	气升式培养系统	145
12.4.2	微载体培养系统	146
12.4.3	中空纤维培养系统	147
12.4.4	微囊培养系统	147
12.4.5	大规模动物细胞培养技术的应用和存在问题	149
12.5	动物细胞的超低温保存技术	150
12.5.1	冷冻保护剂	150
12.5.2	常规冷冻方法	150
12.5.3	玻璃化冻存方法	150
	思考题	151
第13章	动物细胞融合和杂交瘤技术	152
13.1	动物细胞融合技术	152
13.1.1	诱导细胞融合的方法	152
13.1.2	融合细胞的筛选	154
13.1.3	杂交细胞的遗传表型	155
13.2	杂交瘤技术与单克隆抗体生产	155
13.2.1	亲本选择	156
13.2.2	细胞融合	157
13.2.3	杂交细胞的筛选	158
13.2.4	杂交瘤细胞的克隆培养	158
13.2.5	单克隆抗体的生产	158
	思考题	159
第14章	细胞重组及动物克隆技术	160
14.1	细胞重组技术	161
14.1.1	细胞重组的方式	161
14.1.2	细胞重组原料的制备	161
14.2	细胞核移植和动物克隆技术	164
14.2.1	核移植技术的一般操作程序	164
14.2.2	胚胎细胞核移植	166

14.2.3 体细胞克隆	167
14.3 动物克隆技术的意义及展望	168
14.3.1 加速良种繁育	169
14.3.2 保护濒危动物	169
14.3.3 利用转基因克隆动物进行生物药物生产	169
14.3.4 异种器官移植	170
14.3.5 治疗性克隆	170
14.3.6 动物克隆技术中存在的问题	170
思考题	172
第15章 干细胞技术	173
15.1 干细胞研究的发展	173
15.2 干细胞的定义和分类	174
15.2.1 定义	174
15.2.2 分类	174
15.3 干细胞的生物学特点	175
15.3.1 胚胎干细胞	175
15.3.2 成体干细胞	176
15.4 干细胞的分离和培养	177
15.4.1 细胞分离纯化常用技术	177
15.4.2 胚胎干细胞的分离和培养	179
15.4.3 成体干细胞的分离和培养	184
15.5 干细胞技术的应用前景和研究中存在的问题	187
15.5.1 干细胞的应用前景	187
15.5.2 干细胞研究中面临的问题	190
思考题	191
附录	192
附录1 植物组织细胞培养常用培养基	192
附录2 一些植物生长物质及其主要性质	200
附录3 动物细胞培养基	200
附录4 无血清培养液的添加成分	206
附录5 一些常用有机物的性质	207
附录5.1 一些碳水化合物及其主要性质	207
附录5.2 一些维生素及其主要性质	208
附录5.3 一些氨基酸及其主要性质	209
参考文献	210

第 1 篇 细胞工程基础

第 1 章 绪 论

1.1 细胞工程的定义和基本内容

细胞工程 (cell engineering) 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技术。其主要内容就是通过无菌操作, 大量培养细胞、组织乃至完整个体, 或者应用细胞生物学和分子生物学等方法进行细胞水平的遗传操作, 以快速繁殖生物个体、改良品种、生产生物产品或活性成分。它是在细胞生物学、遗传学、生物化学、生理学、分子生物学、发育生物学、发酵工程等学科交叉渗透、互相促进的基础上发展起来的。

细胞工程涉及的范围很广: 根据研究水平, 有细胞水平、组织水平、细胞器水平和分子水平等不同研究层次; 根据研究对象不同, 高等生物的细胞工程可分为植物细胞工程与动物细胞工程。由于植物和动物在细胞结构、生长方式和营养要求等方面有很大差别, 尤其在全能性表现上存在差异, 因此, 虽然植物细胞和动物细胞的离体培养具有一定的相似性, 如基本上都是模拟体内的生长环境, 提供良好的营养条件和物理环境, 使活的组织细胞在体外无菌条件下继续生长发育的过程; 培养的结果都是培养物在一定程度上表现出与在体内相似的生长行为, 如细胞生长、分裂、分化、代谢等, 但是二者在培养技术、研究内容及深度等方面都存在一些差异。如: ①能进行离体培养的材料范围不同。植物离体培养时可使用的材料比较广泛, 器官和组织 (包括它们的切块)、细胞、原生质体等都可进行培养。不论是幼嫩的尚未分化的细胞组织, 还是成熟的已分化的细胞组织, 都有可能通过适当的培养过程获得再生植株。而动物体外培养的材料主要是分散的细胞、组织块、一些小的不太成熟的器官或器官外植块等, 并且较大的、较为成熟的动物器官一般很难在体外环境中长时间维持生命活动。②所需的培养条件不同。虽然离体培养的植物组织细胞在最初阶段处于异养状态, 但在培养后期, 特别是叶片形成后, 就可利用光能进行某种程度上的自养生长, 所以植物的组织和细胞培养大多需在一定的光照条件下进行。而培养的动物细胞是异养的, 必须完全依赖外界所提供的营养才能生长。因而在离体培养时, 动物细胞比植物细胞所需的营养更全面、更复杂, 而且对环境条件的要求也更严格。③生长形式不同。例如: 以植物组织块为材料时, 其生

长可能是在其表面形成愈伤组织，也可能是直接分化出根、芽或胚状体。

总的来讲，植物材料在离体培养条件下有较强的生长、分裂及分化能力，而且由各种外植体分化成完整植株的全过程均可在体外进行；而动物组织在体外培养条件下的生长形式主要以细胞的存活生长、有限增殖以及一定程度的分化为特征。培养的动物细胞虽然也能发生脱分化现象，但在目前条件下，还不能像植物细胞那样重返全能的未分化特征。一些高度分化的动物细胞也很难在体外恢复分裂增殖活动，存活时间也很有限。

1.2 细胞工程中的基本技术

细胞工程涉及的技术主要包括以下几个方面。

1.2.1 细胞培养技术

细胞培养是生物技术各领域的基础技术，也是细胞工程、基因工程和生物医学工程等的重要研究手段。大多数动植物的细胞，只要有适宜的条件，就能在体外的培养容器中生长和增殖。

1.2.1.1 植物细胞培养

由于植物细胞具有发育的全能性，即在适宜的条件下，一个来自已分化的根、茎、叶等组织的细胞，经过离体培养可以发育成同其亲本一样的完整植株。不管培养或操作的对象是植物胚胎、器官、组织或细胞，培养的目的都是为了使细胞全能性向操作者所需的方向表达，对培养结果起决定作用的都是植物细胞具有全能性，因此，所有类型的植物外植体的培养均属植物细胞培养（也即植物组织培养或称植物组织和细胞培养）范畴。由于植物细胞培养技术中培养的是脱离植物母体的部分，所以该技术也叫植物的离体培养（culture *in vitro*）。根据需要还可将该技术进一步细分，如根据培养对象不同，可以分为：植株培养（plant culture），如试管苗或小植株的培养；胚胎培养（embryo culture），即成熟或未成熟的离体胚或胚珠的培养；器官培养（organ culture），包括对植物的根尖、茎尖、叶片、茎段、花器官各部分和未成熟果实等的培养；愈伤组织培养（callus culture），即从植物各外植体增殖形成的愈伤组织的培养；细胞培养（cell culture），即分散的细胞或小的细胞团的培养；原生质体培养（protoplast culture），即去除细胞壁的裸露原生质体的培养等。根据培养方法不同可以分为平板培养（plate cultivation）、微室培养（microchamber culture）、悬浮培养（suspension cultivation）等。还可根据培养目的分为离体受粉（*in vitro* pollination）、试管嫁接（test tube micrografting）等。

植物离体培养的基本过程如下：①从健康植株的特定部位或组织选取用于细胞和组织培养的起始材料（即外植体，explant）——可以是离体的植物器官（根、茎、叶、花、果实等）、组织（形成层、胚乳、皮层等）、细胞（体细胞和生殖细胞等）以及原生质体等。②用次氯酸钠、漂白粉、升汞和酒精等消毒剂对外植体的表面进行消毒，接种在人工配制的培养基上，建立无菌培养体系。③外植体在适当的

培养条件下，一般先形成愈伤组织，再由愈伤组织分化出芽和根，最终形成小植株；也可由外植体或愈伤组织细胞经液体悬浮培养诱导胚状体发生，再长成植株。

1.2.1.2 动物细胞培养

动物细胞培养有两种方式：一种是非贴壁培养，一般用于血液、淋巴细胞、肿瘤细胞，包括杂交瘤细胞和一些转化细胞等的培养，这些细胞可采用类似于微生物培养的方式进行悬浮培养。另一种是贴壁培养，大多数动物细胞需贴附于带适量正电荷的固体或半固体表面才能进行培养。

动物细胞培养的一般步骤是：①在无菌条件下从动物体内取出适量组织，剪切成小薄片或小块。②采用酶消化法和机械解离等方法使细胞分散。③将分散的细胞制成悬液，以一定的细胞密度接种于培养基中，在适宜条件下进行原代培养，并适时进行传代培养。

1.2.2 细胞融合技术

在两个或多个细胞相互接触后，其细胞膜发生分子重排，导致细胞合并、染色体等遗传物质重组的过程称为细胞融合。动物细胞融合与植物细胞融合的原理和步骤基本相似，不同之处主要是植物细胞融合前必须先脱壁制备成原生质体。

细胞融合过程主要包括以下几个步骤：①制备原生质体。由于植物细胞具坚硬的细胞壁，因此需用合适的酶液将其细胞壁降解后才有可能进行融合，而动物细胞则无此障碍。②诱导细胞融合。将两亲本细胞（或原生质体）的悬液调至一定的细胞密度，按比例混合后，采用聚乙二醇（PEG）等化学促融剂诱导融合，或用电激诱导的方法促进融合。③筛选杂合细胞。将上述诱导融合后的混合液移到特定的筛选培养基上，让杂合细胞生长，而其他未融合细胞不能生长，藉此获得具有双亲遗传特性的杂合细胞。

1.2.3 其他技术

近年来，动物克隆和干细胞技术等发展很快，已成为细胞工程中新的亮点。另外，染色体工程、组织工程、胚胎工程和转基因技术等生物技术领域里的高新技术也是在细胞工程基础上发展起来的，酶工程、生化工程等也离不开细胞工程，因此，从某种意义上讲，细胞工程是生物技术的基础，是生命科学领域中最具活力的技术之一。

1.3 细胞工程发展简史

1.3.1 植物细胞工程的发展

1.3.1.1 萌芽阶段：理论渊源和早期的尝试（20世纪初至30年代中期）

在 Schleiden 和 Schwann 创立的细胞学说基础上，德国植物生理学家 Haberlandt 在 1902 年提出了植物细胞全能性的概念，认为植物细胞有再生出完整植株的潜在能力。他培养了几种植物的叶肉组织和表皮细胞等，限于当时的技术和水平，培养未能成功，但在技术上是一个良好的开端。1922 年 Haberlandt 的学生 Kötter

和 Robbins 采用无机盐、葡萄糖和各种氨基酸培养豌豆和玉米的茎尖，结果形成缺绿的叶和根，并能进行有限生长。1925 年 Laibach 将亚麻种间杂交不能成活的胚取出来进行培养，使杂种胚成熟，继而萌发。这些工作虽然是初步的，但为植物组织培养技术的建立和发展起了先导作用。

1.3.1.2 奠基阶段：植物离体培养技术的建立（20 世纪 30 年代中期到 50 年代中期）

1934 年美国植物生理学家 White 培养番茄根，建立了活跃生长的无性繁殖系，并能进行继代培养，在以后的 28 年间转接培养 1600 代仍能生长。利用根系培养物，他们研究了光、温度、pH、培养基组成等对根生长的影响。1937 年他们首先配制成由无机盐和有机成分组成的 White 培养基，发现了 B 族维生素等对离体根生长的重要性。在此期间，Cautheret 和 Nobecourt 培养块根和树木形成层使其生长。White、Cautheret 和 Nobecourt 确立的植物组织培养的基本方法成为以后各种植物组织培养的技术基础。1934 年，White 正式提出植物细胞“全能性”学说并出版了《植物组织培养手册》，使植物组织培养开始成为一门新兴学科。1941 年 Overbeek 等在基本培养基上附加椰乳（CM），使曼陀罗心形期的胚离体培养能成熟。1948 年 Skoog 和 崔激在烟草茎切段和髓培养以及器官形成研究中，发现腺嘌呤或腺苷可以解除吲哚乙酸（IAA）对芽形成的抑制，并诱导成芽，从而确定腺嘌呤/IAA 比例是根和芽形成的控制条件。1955 年 Miller 等发现了比嘌呤活力高 3 万倍的激动素。此后，细胞分裂素与生长素的比值成为控制器官发育的模式，大大促进了植物组织培养的发展，而且至今仍是植物组织培养技术的关键之一。

1.3.1.3 蓬勃发展阶段（20 世纪 50 年代末至今）

1958 年 Steward 等使悬浮培养的胡萝卜髓细胞形成了体细胞胚，并发育成完整植株。该实验充分证明了植物细胞的全能性学说，这是植物组织培养的第一大突破，影响深远。1960 年 Cocking 用酶法分离原生质体成功，开创了植物原生质体培养和体细胞杂交工作，这是植物组织培养的第二大突破。1960 年 Morel 通过培养兰花茎尖，使其脱病毒并快速繁殖，该技术很快在兰花生产中广泛应用。在其高效益的刺激下，植物离体繁殖技术和脱病毒技术得到了迅速发展，实现了试管苗的产业化，取得了巨大的经济效益和社会效益。1964 年 Guha 和 Maheshwari 成功地从曼陀罗花药培养出花粉单倍体植株，从而促进了植物花药单倍体育种技术的发展。另外，1956 年 Routin 和 Nickell 首次申报了利用植物细胞培养技术生产天然产物的专利，1959 年 Tulecke 和 Nickell 首次将微生物培养用的发酵工艺应用到高等植物细胞的悬浮培养。目前，利用生物反应器大规模培养植物细胞生产次生产物方面已取得很大成就，并在日益发展成为一个新兴产业。

1.3.2 动物细胞工程的发展

美国生物学家 Harrison 是公认的动物组织培养的创始人。1907 年，他以淋巴液为培养基，观察了蛙胚神经细胞突起的生长过程，首创了体外组织培养法。1912

年, Carrel 把外科无菌操作的概念和方法引入了组织培养中, 将鸡胚心肌组织块培养在血浆和鸡胚提取液的混合物内, 并将原代细胞进行了长期的传代培养。1940 年 Earle 首创了从单个细胞进行克隆培养的方法, 还建立了可以无限传代的小鼠结缔组织 L 细胞系。Carrel 和 Earle 的工作令人信服地证明了动物细胞有可能在体外培养条件下无限生长。1951 年, Earle 等开发了能促进动物细胞体外培养的人工培养液, 又进一步促进了动物细胞培养技术的发展和运用。

1954 年美国微生物学家索尔克利用原代培养的猴肾细胞制备的脊髓灰质炎疫苗首先进入工业化规模生产; 1962 年 Capstick 等人将幼年仓鼠肾 (BHK) 细胞成功地进行了类似微生物细胞的悬浮培养, 这标志着动物细胞培养工业化应用的突破性发展。

1958 年冈田善雄发现, 已经灭活的仙台病毒可以诱使艾氏腹水肿瘤细胞融合, 从此开创了动物细胞融合的崭新领域, 植物细胞融合技术也是在动物细胞融合的基础上发展起来的。

20 世纪 60 年代, 童弟周教授及其合作者独辟蹊径, 在鱼类和两栖类中进行了大量核移植实验, 在探讨核质关系方面做出了重大贡献。1975 年, Köhler 和 Milstein 巧妙地创立了淋巴细胞杂交瘤技术, 获得了珍贵的单克隆抗体, 不仅在免疫学上取得了重大突破, 而且对动物细胞的工业化应用产生了第二次促进。现已有许多用动物细胞培养技术生产的天然蛋白药物, 取得了良好的社会效益和巨大的经济效益。

1997 年, Wilmut 领导的小组用体细胞核克隆出了“多莉 (Dolly)”绵羊, 使哺乳动物的克隆成为了现实。1998 年, Thomason 等成功建立了人胚胎干细胞系, 1999 年成体干细胞的“可塑性”又被发现, 其后干细胞研究不断取得新的进展, 使人们看到了在体外培育所需的细胞、组织甚至器官, 可用于临床修复或取代人体内的坏损或病变组织器官的美好前景。20 世纪末这一系列的重大突破和进展, 不仅对生命科学研究具有重要的理论价值, 对人类健康具有重要意义, 而且存在着巨大的潜在经济效益, 其应用前景十分广阔。

1.4 细胞工程的主要应用

1.4.1 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、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。

1.4.1.1 离体快速繁殖和脱病毒技术

离体快速繁殖和脱病毒技术是目前植物组织培养应用最多、最广泛和最有效的一个方面。

(1) 快速繁殖技术 快速繁殖技术 (rapid propagation) 也称微繁殖技术 (micropropagation) 等, 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