



全国高等农林院校生物科学类
专业“十二五”规划系列教材

细胞工程

张峰 陈丽静 主编

Cell Engineering



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS



全国高等农林院校生物科学类
专业“十二五”规划系列教材

张峰 陈丽静 主编

细胞工程是生物科学的重要组成部分，也是现代农业生物技术的重要组成部分。本书以细胞工程的基本原理、基本技术和应用为主线，系统介绍了细胞工程的基本概念、基本原理、基本技术和应用。本书可作为高等院校生物科学类、生物技术类、农学类、林学类、水产类、医学类等专业的教材，也可供从事生物科学、生物技术、农业生物技术、医学生物技术等工作的科技人员参考。

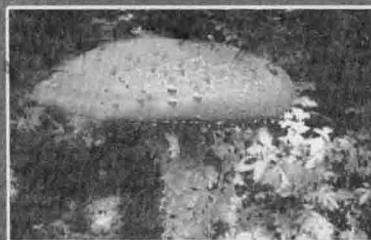
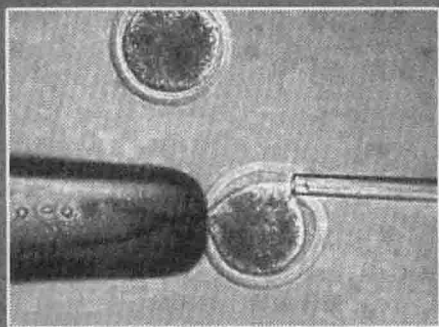
细胞工程

张峰 陈丽静 主编

清华大学出版社

清华大学出版社

Cell Engineering



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS

内 容 简 介

本书是一本详细介绍细胞工程的基础理论、基本技术和最新研究成果的规划教材。全书共分9章,概述了细胞工程的研究内容、发展简史及研究进展;系统介绍了细胞工程研究的基本技术;详细讨论了植物体细胞离体培养及杂交技术,植物生殖细胞离体培养技术,植物体细胞突变和遗传转化技术,种质资源库的建立方法,动物细胞培养技术,干细胞培养技术,以及基于基因技术的动物细胞工程等领域的最新研究成果。

本教材采用了有利于学生快速掌握和融会贯通的编排逻辑,不仅便于读者自学,更有利于培养学生的创新能力和综合素质的提高。本书可作为生物技术、生物工程及生物科学等生物类专业本科生和研究生的教材及相关专业的学生、教师和科技人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/张峰,陈丽静主编. —北京:中国农业大学出版社,2014.7

ISBN 978-7-5655-0969-8

I. ①细… II. ①张…②陈… III. ①细胞工程 IV. ①Q813

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2014)第 092531 号

书 名 细胞工程

作 者 张 峰 陈丽静 主编

策划编辑 孙 勇 潘晓丽

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路2号

电 话 发行部 010-62818525,8625

编辑部 010-62732617,2618

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

经 销 新华书店

印 刷 北京时代华都印刷有限公司

版 次 2014年7月第1版 2014年7月第1次印刷

规 格 787×1092 16开本 18.5印张 457千字

定 价 36.00元

责任编辑 韩元凤

责任校对 王晓凤 陈 莹

邮政编码 100193

读者服务部 010-62732336

出版部 010-62733440

e-mail cbsszs@cau.edu.cn

图书如有质量问题本社发行部负责调换

全国高等农林院校生物科学类专业“十二五”规划系列教材
编审指导委员会
(按姓氏拼音排序)

姓 名	所 在 院 校	姓 名	所 在 院 校
蔡庆生	南京农业大学	刘国琴	中国农业大学
蔡永萍	安徽农业大学	刘洪章	吉林农业大学
苍 晶	东北农业大学	彭立新	天津农学院
曹贵方	内蒙古农业大学	秦 利	沈阳农业大学
陈雯莉	华中农业大学	史国安	河南科技大学
董金皋	河北农业大学	宋 渊	中国农业大学
冯玉龙	沈阳农业大学	王金胜	山西农业大学
郭 蓓	北京农学院	吴建宇	河南农业大学
郭立忠	青岛农业大学	吴晓玉	江西农业大学
郭图强	塔里木大学	殷学贵	广东海洋大学
郭兴启	山东农业大学	余丽芸	黑龙江八一农垦大学
郭玉华	沈阳农业大学	张 炜	南京农业大学
李 唯	甘肃农业大学	赵 钢	仲恺农业工程学院
林家栋	中国农业大学出版社	赵国芬	内蒙古农业大学

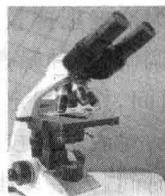
编 审 人 员

主 编 张 峰(内蒙古农业大学)
陈丽静(沈阳农业大学)

副主编 王有武(塔里木大学)
岳才军(黑龙江八一农垦大学)
王 义(吉林农业大学)
孟建宇(内蒙古农业大学)

参 编 (按拼音顺序排序)
贾小平(河南科技大学)
胡颂平(江西农业大学)
刘思言(吉林农业大学)
林景卫(沈阳农业大学)
万永青(内蒙古农业大学)
武春燕(内蒙古农业大学)
于翠梅(沈阳农业大学)

主 审 刘 宝(东北师范大学)



出版说明

生物科学是近几十年来发展最为迅速的学科之一,它给人类的生产和生活带来巨大变化,尤其在农业和医学领域更是带来了革命性的变革。生物科学与各个学科之间、生物科学各个分支学科之间的广泛渗透,相互交叉,相互作用,极大地推动了生物科学技术进步。生物科学理论和方法的丰富和发展,在持续推动传统农业和医学创新的同时,其应用领域不断扩大,广泛应用的领域已包括食品、化工、环保、能源和冶金工业等各个方面。仿生学的应用还对电子技术和信息技术产生巨大影响。生物防治、生物固氮等生物技术的应用,极大地改变了农业过分依赖石化工业的局面,继而为自然生态平衡的恢复做出无可替代的贡献。以大量消耗资源为依赖的传统农业被以生物科学和技术为基础的生态农业所替代和转变。新的、大规模的现代农业将由于生物科学的快速发展而迅速崛起。

生物科学在农业领域中越来越广泛的应用,以及不可替代作用的发挥,既促进了生物科学教育的发展,也为生物科学教育提出了新的更高的要求。农业领域高素质、应用型人才对生物科学类知识的需求具有自身独特的使命和特征。作为培养高素质、应用型人才重要途径和方式的农业高等教育亟须探索出符合实际需求和发展的教育教学模式和内容。为此,中国农业大学生物学院和中国农业大学出版社与全国30余所高等农林院校合作,在充分汲取各校生物科学类专业教改实践经验和教改成果的基础上,经过进一步集成、融合、优化、提升,凝聚形成了比较符合农林院校教学实际、适应性更好、针对性更强、教学效果更佳的教学理念和教材编写思路,进而精心打造了“全国高等农林院校生物科学类专业‘十二五’规划系列教材”。系列教材覆盖了近30门生物科学类专业骨干课程。

本系列教材站在生物科学类专业教育教学整体目标的高度,以学科知识内容关联性为依据,审核确定教材品种和教材内容,通过相关课程教材小规模组合、专家交叉多重审定、编审指导委员会统一把关等措施,统筹解决相关教材内容衔接问题;以统一的编写指导思想因课制宜确定各门课程教材的编写体例和形式。因此,本系列教材主导思想整体归一、各种教材各具特色。

农业是生物科学最早也是应用范围最广的领域,其厚重的实践积累和丰硕成果使得农业高等教育生物科学类专业教学独具特色和更高要求。本系列教材比较好地体现了农业领域生物科学应用的重要成果和前沿研究成就,并考虑到农林院校生源特点、教学条件等,因而具有很强的适用性、针对性和前瞻性。

系列教材编审指导委员会在教材品种的确定、内容的筛选、编写指导思想以及质量把关等环节中发挥了巨大作用。其组成专家具有广泛的院校代表性、学科互补性和学术权威性,以及



丰富的教学科研经验。专家们认真细致的工作为系列教材打造成为农林院校生物科学类专业精品教材奠定了扎实的基础,在此谨致深深的谢意。

作为重点规划教材,为准确把握教学需求,突出特色和确保质量,教材的策划运行被赋予更为充分的时间,从选题调研、品种筛选、编写大纲的拟制与审定、组织教师编写书稿,直至第一种教材出版至少3年时间,按照拟定计划主要品种的面世需近4年。系列教材的运行经过了几个阶段。第一个阶段,对农林院校生物科学教学现状进行深入的调查研究。2010—2011年,出版社用了近1年的时间,先后多批次走访了近30所院校,与数百位生物科学教学一线的专家和教师进行座谈,深入了解我国高等农林院校生物科学教学的进展状况及存在的问题。第二个阶段,召开教学和教材建设研讨会。2011年12月份,中国农业大学生物学院和中国农业大学出版社组织召开了有30余所院校、100余位教师参加的生物教学研讨会,与会代表就农林院校生物科学类专业教学和教材建设问题进行了广泛和深入的研讨,会上还组织参观了中国农业大学生物学院教学中心、国家级生命科学实验教学示范中心以及两个国家重点实验室,给与会代表留下了深刻的印象和较大的启发。第三个阶段,教材立项编写。在广泛达成共识的基础上,有30多所高等农林院校、近500人次教师参加了系列教材的编写工作。从2013年4月起,系列教材将陆续出版,希望这套凝聚了广大教师智慧、具有较强的创新性、反映各校教改探索实践经验与成果系列教材能够对农林院校生物科学类专业教育教学质量的提高发挥良好的作用。

良好的愿望和教学效果需要实践的检验和印证。我们热切地期待着您的意见反馈。

中国农业大学生物学院

中国农业大学出版社

2013年3月16日



前言

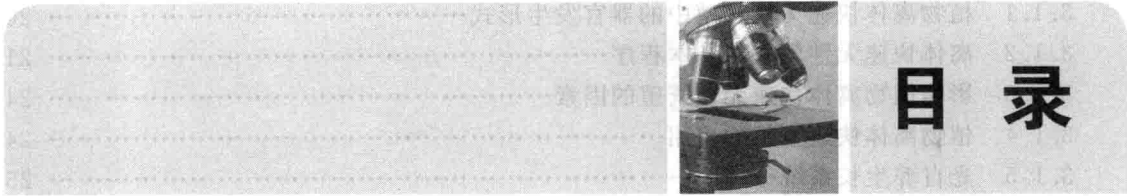
细胞工程是生命科学的重要组成部分,是生命科学产业化链条中的重要环节,是发展最快、最有生命力的学科之一。细胞工程目前已被广泛应用于生命科学的许多领域,并且已经在农、林、医药和一些相关的生产实践中产生了重大的经济、社会效益。细胞工程也是生物技术本科专业的主修课程。

为了使学生及相关科研工作者能够更好地从整体结构上把握细胞工程的内涵,也为了提升教材的可读性和实用性,我们从编写逻辑上进行了突破性的调整。本教材并没有像现有的其他教材一样分为植物细胞工程和动物细胞工程两部分,而是尽量让读者和学生感到动、植物间的相关性及一些通用的技术和原理。为此,我们在编写过程中采用了相同的主线:第一,从细胞层面上,由非干细胞(组织细胞)到干细胞,由体细胞到生殖细胞;第二,在“工程水平”上,由普通细胞到基因干预再到“资源库”的建立;第三,从易于理解的层面上,由浅入深,由基础理论到技术到应用再到规模化生产。同时,也存在一些暗线,如在“基因干预”上,由常染色体(转基因动物)到性染色体(性控)等。如果读者可以紧紧抓住这几条线索,相信会更有利于对细胞工程的学习及研究。

本书共设9章,第1章绪论由内蒙古农业大学的张峰与吉林农业大学的王义编写;第2章由沈阳农业大学的于翠梅编写;第3章由沈阳农业大学的陈丽静与内蒙古农业大学的武春燕编写;第4章由河南科技大学的贾小平编写;第5章由塔里木大学的王有武编写;第6章由江西农业大学的胡颂平编写;第7章的第1节由内蒙古农业大学的万永青编写,第2~3节由吉林农业大学的刘思言编写;第8章由黑龙江八一农垦大学的岳才军编写;第9章的第1~5节由内蒙古农业大学的孟建宇编写,第6~7节由沈阳农业大学的林景卫编写。全书共经历了3次修改和校对,分别是参编人员的自审、互审和东北师范大学的刘宝教授的主审,最后由张峰和陈丽静完成统稿。在此,非常感谢内蒙古农业大学生命科学学院的马宇星、马靖靖、张萍、邵科等在最后的校稿和统稿过程中的努力工作,也感谢所有编写人员对本书的巨大贡献,最后衷心感谢中国农业大学出版社给予我们向全国同行呈现本书的机会。

由于我们水平有限,经验不足,且该领域发展极快,疏漏与不妥之处在所难免,恳请读者批评指正。

张峰于内蒙古农业大学
2013年10月



第 1 章 绪论	1
1.1 细胞工程学简介	1
1.1.1 基本概念	1
1.1.2 研究内容	1
1.2 细胞工程学发展简史	3
1.2.1 探索和创建阶段	3
1.2.2 迅速发展和应用阶段	4
第 2 章 细胞工程基本技术	7
2.1 实验室设置	7
2.1.1 实验室组成	7
2.1.2 基本设备配置	8
2.1.3 培养器皿与器械用具.....	10
2.2 基本技术.....	10
2.2.1 洗涤技术.....	10
2.2.2 灭菌、消毒技术	11
2.3 培养条件.....	13
2.3.1 光照.....	13
2.3.2 温度.....	13
2.3.3 湿度.....	14
2.3.4 pH 值	14
2.3.5 渗透压.....	14
2.3.6 通气条件.....	14
2.4 离体培养的营养需求.....	15
2.4.1 无机盐类.....	15
2.4.2 有机化合物.....	16
2.4.3 植物激素.....	17
2.4.4 其他.....	18
复习思考题	19



第3章 体细胞离体培养及杂交	20
3.1 植物离体快速无性繁殖技术	20
3.1.1 植物离体快速无性繁殖中的器官发生形式	20
3.1.2 离体快速无性繁殖的基本程序	21
3.1.3 影响植物离体快速无性繁殖的因素	24
3.1.4 植物离体快速繁殖的应用	24
3.1.5 光自养生长系统	25
3.1.6 应用实例	29
3.2 植物脱毒技术	29
3.2.1 病毒在植物体内的分布、传播和危害	29
3.2.2 脱毒的方法及原理	30
3.2.3 脱毒苗的鉴定、保存及繁殖	32
3.2.4 植物组培脱毒的应用及操作实例	35
3.3 试管苗规模化生产	35
3.3.1 试管苗商业性生产的工艺流程	35
3.3.2 试管快速繁殖生产设计	37
3.4 单细胞培养	38
3.4.1 单细胞培养的概念与意义	38
3.4.2 单细胞培养方法	39
3.4.3 影响单细胞培养的主要因素	42
3.5 胚状体发生与人工种子	43
3.5.1 植物体细胞胚胎的概念	43
3.5.2 植物体细胞胚胎的发生途径	43
3.5.3 植物体细胞胚胎的应用——人工种子技术	45
3.6 植物原生质体培养和体细胞杂交	48
3.6.1 原生质体的分离和纯化	48
3.6.2 原生质体的培养	51
3.6.3 原生质体融合与植物体细胞杂交	58
3.7 细胞的大规模培养	70
3.7.1 悬浮细胞的培养	70
3.7.2 细胞的固定化培养	73
3.7.3 细胞大规模培养反应器及参数调控	74
3.7.4 细胞大规模培养应用及发展前景	74
3.7.5 次生代谢产物的生产	75
复习思考题	76
第4章 生殖细胞离体培养	78
4.1 花药和花粉培养	78
4.1.1 花药培养与花粉培养的概念与意义	78
4.1.2 花药培养与花粉培养的程序	79

4.1.3	花药与花粉培养操作实例	82
4.2	胚胎培养	83
4.2.1	胚培养	83
4.2.2	胚乳培养	86
4.2.3	胚珠和子房培养技术	88
4.2.4	离体受精	90
4.3	单倍体育种	96
4.3.1	单倍体育种的概念及优越性	96
4.3.2	单倍体育种的应用举例	97
	复习思考题	99
第5章 体细胞突变和遗传转化技术		100
5.1	体细胞无性系变异	100
5.1.1	体细胞无性系变异的概念	100
5.1.2	体细胞无性系变异的遗传基础	100
5.1.3	体细胞无性系变异的类型	108
5.2	突变体的筛选	109
5.2.1	突变体筛选的意义及目标	110
5.2.2	突变体筛选的原理	110
5.2.3	突变体筛选的方法	111
5.2.4	突变体筛选的程序	115
5.2.5	突变体筛选的应用	115
5.3	遗传转化	119
5.3.1	遗传转化的受体系统	119
5.3.2	遗传转化方法	121
5.3.3	转基因植株的再生及检测	127
5.3.4	转基因植物的研究成果及安全性	138
	复习思考题	147
第6章 种质资源库建立		148
6.1	植物种质资源的常温限制生长保存	148
6.1.1	常温限制生长保存的概念	148
6.1.2	常温保存的方法和原理	148
6.1.3	常温保存应用实例	149
6.2	植物种质资源的中低温保存	150
6.2.1	中低温保存的概念	150
6.2.2	中低温保存的方法和原理	150
6.2.3	中低温保存实例	151
6.3	植物种质资源的超低温保存	151
6.3.1	种质资源超低温保存的发展概况	151
6.3.2	种质资源超低温保存的方法和原理	152



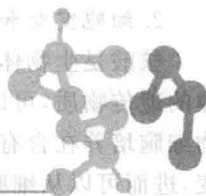
6.3.3 超低温保存的程序	152
6.3.4 超低温保存实例	155
复习思考题	156
第7章 动物细胞培养	157
7.1 体细胞体外培养技术	157
7.1.1 细胞培养方法	157
7.1.2 细胞的冷冻保存和复苏	163
7.1.3 体外培养动物细胞的生物学特性	164
7.1.4 细胞系的演化	164
7.1.5 体外培养细胞的去分化	166
7.1.6 培养细胞常规检查和特性鉴定	167
7.1.7 动物克隆的基本原理	175
7.2 动物细胞融合	176
7.2.1 细胞融合的基本概念与方法	176
7.2.2 细胞融合的机理	179
7.2.3 杂交细胞的筛选	179
7.2.4 融合细胞的克隆化培养	180
7.2.5 杂交瘤技术和单克隆抗体	181
7.3 生殖细胞体外培养技术	187
7.3.1 体外受精技术	187
7.3.2 胚胎移植技术	192
7.3.3 胚胎冷冻保存技术	199
复习思考题	202
第8章 干细胞培养	204
8.1 干细胞及其分类	204
8.1.1 什么是干细胞	204
8.1.2 干细胞生物学特征	204
8.1.3 干细胞分类	206
8.1.4 干细胞的定位	207
8.2 胚胎干细胞的分离与培养	207
8.2.1 ES 细胞的分离	207
8.2.2 ES 细胞的培养	209
8.2.3 ES 细胞的特性	213
8.2.4 ES 细胞的鉴定	213
8.2.5 ES 细胞的传代和冷冻保存及解冻	215
8.3 胚胎干细胞的诱导分化	215
8.3.1 ES 细胞体外分化的基本原理	215
8.3.2 ES 细胞体外分化的特点	215
8.3.3 ES 细胞体外分化的模式	216



8.3.4	ES 细胞体外诱导分化方法	216
8.4	成体干细胞	217
8.4.1	神经干细胞	218
8.4.2	造血干细胞	218
8.5	干细胞和干细胞技术的应用	220
8.5.1	建立哺乳动物发育的体外模型	220
8.5.2	利用 ES 细胞生产转基因动物	221
8.5.3	细胞和基因治疗	221
8.5.4	作为新药开发的工具细胞	223
8.5.5	器官培养	224
8.5.6	干细胞研究中存在的问题	224
	复习思考题	225
第 9 章	基于基因技术的动物细胞工程	226
9.1	常用转基因技术	226
9.1.1	DNA 显微注射法	226
9.1.2	胚胎干细胞转导	227
9.1.3	精子转导	228
9.1.4	载体转导	229
9.1.5	基因打靶	230
9.2	转基因动物的基本程序	234
9.2.1	显微注射用 DNA 的制备	234
9.2.2	受精卵的获取	235
9.2.3	显微注射和移植	238
9.3	转基因动物的鉴定	240
9.3.1	转基因小鼠分析用组织 DNA 的制备	240
9.3.2	PCR 鉴定转基因小鼠	241
9.3.3	Southern 印迹杂交分析法鉴定转基因小鼠	242
9.4	纯合子转基因小鼠的建立	243
9.4.1	纯合子转基因小鼠的培育	243
9.4.2	纯合子转基因小鼠的鉴定	244
9.5	转基因动物的应用	247
9.5.1	生物反应器	247
9.5.2	动物品种改良	250
9.6	动物染色体工程	251
9.6.1	动物单倍体育种	252
9.6.2	动物多倍体育种	254
9.6.3	染色体的显微操作技术	257
9.6.4	染色体转移技术	258



9.7 动物性别控制技术	259
9.7.1 动物性别控制原理	260
9.7.2 动物性别控制途径	261
复习思考题	264
附录 专业名词中西文对照	266
参考文献	269



1.1 细胞工程学简介

1.1.1 基本概念

细胞工程学是近40年来迅速发展起来的一门新兴学科,它是应用现代细胞生物学、发育生物学、遗传学和分子生物学的理论与方法,按照一定的设计方案,通过在亚细胞、细胞、组织或器官的不同水平上进行实验操作,获得重构的细胞、组织、器官以及个体,创造优良品种和产品的综合性的生物工程。它是以细胞学为理论依据,在生理、生化、形态、胚胎、微生物、遗传、病理等多学科领域里发展,现在已渗入到生命科学的各个领域,成为生命科学的重要研究手段和研究技术。细胞工程是当代生命科学中最有生命力的一门学科,也是当代生物技术产业化链条中最重要的一环。

1.1.2 研究内容

1. 细胞体外培养及杂交技术

细胞离体培养主要包括体细胞及生殖细胞的体外培养技术(*in vitro culture*)。细胞的体外培养是指通过生物细胞和组织在离体条件下的生长和增殖,来获得优良植物的快速繁育,或品质优良动物的繁殖,或制备大量细胞代谢产物等,是细胞工程学的最基本的技术。细胞体外培养不仅实现了植物离体快速无性繁殖、植物脱毒以及单倍体育种等高效益工程,也为克隆动物、转基因动物以及生物反应器的发展奠定了坚实的基础。

细胞杂交又称细胞融合(*cell fusion*),是指在人为干预下,使两种或两种以上的体细胞合并、染色体等遗传物质重组,不经过有性生殖过程而得到杂种细胞的方法。1975年, Cesar Milstein 与 Geoger Kohler 合作得到的既能在体外无限繁殖,又能产生特异性抗体的杂交瘤细胞,导致了免疫学上的革命,也从真正意义上确立了细胞工程学科的诞生。

虽然细胞融合技术突破了种间限制,但是细胞核移植技术(*nuclear transfer technique*)又进一步升华了细胞杂交技术。细胞核移植技术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细胞质重组,形成杂合细胞。1977年,克隆动物“Dolly”羊的诞生使细胞核移植技术引起了全世界的关注。它是通过无性繁殖技术得到的与母体在遗传上一致的高等克隆动物。“Dolly”羊是将母体的体细胞核与去核卵子的细胞质人工重组,借助于卵子的



发育能力,重新长成和母体遗传性状相同的生物体。目前,小鼠、牛、猪、骡子等许多动物都获得了体细胞的克隆后代。

2. 细胞突变和基因转化技术

核酸是生物体重要的遗传物质,它编码了生命体的各种遗传性状。通过改变或修饰生物体的遗传物质,可以直接获得人类所需的特殊性状。细胞突变技术(cell mutation)是指将生物细胞培养在含有一定营养物质的化学培养基上,用生化或物理方法诱导细胞遗传物质的改变,进而可以从细胞水平上大量筛选拟定目标突变体的技术。细胞突变体的诱导和筛选在植物方面是一个研究比较活跃的领域。目前,已在不少于 15 个科的 45 种植物细胞中筛选出了 100 多个植物细胞突变体或变异体,主要包括抗病性、抗逆性、抗除草剂、抗氨基酸或氨基酸类似物的突变体等。

转基因技术(又称遗传转化技术),就是指利用分子生物学和基因工程技术,将人工分离和修饰过的基因导入到目的生物体的基因组中,并使其在后代中得以表达,从而达到改造生物体目的生物技术。目前建立的各种基因转化方法均是以受体材料的离体培养技术为基础的。与传统育种技术相比,转基因技术所转移的基因不受生物体间亲缘关系的限制,且一般是经过明确定义的基因,功能清楚,后代表现可以准确预期。如果将此项技术在染色体水平上进行操作,即按照预先的设计,借助于物理或化学等方法,把特定的染色体或染色体组转入或移出受体细胞,使生物染色体数目、结构和功能发生改变,进而获得生物遗传新性状,便称为染色体工程(chromosome engineering)。随着转基因技术的日趋完善,转基因生物在农业、医药、工业及人们日常生活等方面日益显示出独特的优越性和广阔的发展前景,如植物的抗病害、作物产量的提高、动植物品种改良、各类生物反应器等。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、基因治疗及性别控制,以及在动植物单倍体和多倍体的育种方面,提供了重要手段和途径。

3. 植物种质资源库

随着人类对自然资源的开发利用和干扰程度的不断加大,生物资源的种类也正在加速减少,这方面尤其表现在植物方面。种质资源库的建立解决了人类长期贮存各类生物种质的需要,同时也克服了一般植物种子贮存方法的局限性,保护种质不受病虫害侵染,便于国际种质交流和植物的快速繁殖。种质保存(germplasm conservation)是利用天然或人工创造的适宜环境条件保存种质资源,来保持其高的活力和遗传完整性(genetic integrity)。植物种质资源库是通过离体保存(in vitro preservation)技术即将离体培养的植物细胞、组织、器官或试管苗保存于低温或超低温人工环境下,抑制其生长,保持其遗传物质稳定性来建立的。冷冻生物学和植物离体快速繁殖技术相结合的种质资源库技术,目前已成为保存生物种质资源的最重要方法。其保存的方法有常温限制生长保存、中低温保存和超低温保存 3 种。

4. 干细胞技术

干细胞的研究始于 19 世纪,干细胞(stem cells)是一类具有无限或较长期的自我更新能力(self-renewing)和多向分化潜能的原始细胞;在一定条件下,可以分化成为多种功能细胞。由于可以对干细胞进行体外遗传操作、选择和冻存而不失其多能性,所以在特定条件下可诱导分化成人们所需要的细胞、组织和器官等并用于临床治疗。如将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及功能的工程

组织。目前已成功地在体外培养获得了人工软骨、皮肤等多种组织。干细胞技术在生物学基础研究、农业以及移植医学上所具有的广阔应用前景,其发展必将引起人类临床医学的一场革命。

1.2 细胞工程学发展简史

作为一门新兴的边缘性学科,细胞工程与其他学科相比,尽管只有近百年的发展历史,但在全世界科学工作者的共同努力下,目前已经取得了长足的进步。

1.2.1 探索和创建阶段

1. 植物细胞工程的发展

在 Schleiden(1838)和 Schwann(1839)所提出的细胞学说的推动下,20世纪初,德国植物学家 Haberlandt(1902)首次进行了离体细胞培养试验,并预言植物的单个细胞具有发育成完整植株的潜能。大约在1910年前后,植物组织培养工作受动物血清培养经验的影响,以植物组织液作为培养基的研究获得了可喜成果。1922年,美国的 Robbinst 和德国的 Kotte 分别报道了豌豆、玉米、棉花的茎尖培养获得成功,这是有关茎尖培养成功的最早实验。1929年 Laibach 把亚麻科种间杂交形成的不能成活的种子中的胚剥出,在人工培养基上培养至成熟,从而证明了胚培养在远缘杂交中应用的可能性。

1934年,法国的 Gautheret 在山毛柳和黑杨等形成层组织的培养中发现了 B 族维生素和 IAA(indole-3-acetic acid,吲哚-3-乙酸,最初曾称为异植物生长素)的作用,揭示了 B 族维生素和生长素的重要意义。1937年 White 通过研究 B 族维生素对离体根生长的重要性,发明了 White 培养基。1939年 Nobecourt 用胡萝卜建立了连续生长的组织培养基本方法,成为以后各种植物组织培养的技术基础。因此 Gautheret, White 和 Nobecourt 一起被誉为植物细胞工程学的奠基人。20世纪的四五十年代,Skog(1944)和我国的崔澂(1951)发现腺嘌呤或腺苷不但可以促进愈伤组织的生长,而且还可以解除 IAA 对芽形成的抑制作用,并诱导成芽,从而确定了腺嘌呤与生长素的比例是控制芽和根形成的主要条件之一。

2. 动物细胞工程的发展

在动物细胞方面,发展相对植物晚了几年。1907年,美国胚胎学家 Ross Harrison 采用盖玻片悬滴培养法,观察到了蛙胚神经细胞突起的生长过程,并由此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,并将鸡胚心肌组织原代细胞进行了长期的传代培养。之后,Carrel 于1923年发明了卡氏培养瓶。1925年,Maximow 改良了悬滴培养法,建立了双盖玻片法。1926年,Strengeway 设计了表面皿培养法。从此动物细胞培养技术基本建立。

20世纪50年代开始以后,细胞工程技术的研究无论在植物还是动物方面都日益繁荣。在植物方面:1952年,Morel 和 Martin 通过培养大丽花茎尖获得了脱毒植株。1954年 Muir 在液体培养基及滤纸中进行单细胞培养获得成功。1957年,Skog 和 Miller 提出了改变生长素对细胞分裂素比率可以控制组织培养中根和茎的分化。1958—1959年 Reinert 和 Steward 分别报道在胡萝卜愈伤组织培养中获得了体细胞胚,并获得了再生植株,这是人类第一次实现