

案例版

生物工程系列规划教材

细胞工程

王永飞 马三梅 李宏业 主编



科学出版社

案例版生物工程系列规划教材

细胞工程

王永飞 马三梅 李宏业 主编

国务院侨务办公室立项
彭磷基外招生人才培养改革基金资助

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书以细胞工程理论体系为编写主线,全面、系统、简洁地介绍了细胞工程原理及相关技术方法,突出了基本概念,注重学科的前沿进展和现代性,以案例和案例分析的形式强调了细胞工程的实践应用。

全书分为三篇:第一篇为细胞工程基础,主要介绍了细胞工程的概念、研究内容、发展简史、基本技术及其应用,细胞工程实验室及其常用设备和生物安全性等;第二篇为植物细胞工程,主要包括植物细胞工程的基本原理和技术基础、离体快速繁殖和脱病毒技术、胚胎培养和离体授粉、花药和花粉培养、细胞培养及次生物质生产、原生质体培养和体细胞杂交、种质的超低温保存、转基因技术等;第三篇为动物细胞工程,主要包括动物细胞培养所需的基本条件,细胞培养、细胞融合、细胞重组及动物克隆和干细胞技术等。

本书可作为高等院校生物工程、医药、农学及其他相关专业本科生及研究生的教材,也可供相关领域科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/王永飞,马三梅,李宏业主编. —北京:科学出版社,2014.5
案例版生物工程系列规划教材

ISBN 978-7-03-040476-3

I. ①细… II. ①王…②马…③李 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(2014)第081539号

责任编辑:席慧 刘丹/责任校对:杜伟利

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>

北京市农林印务有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年5月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2014年5月第一次印刷 印张:19 1/2

字数:511 000

定价:45.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《细胞工程》编写委员会

主 编 王永飞 马三梅 李宏业

副主编 孙小武 李万昌 屈红霞

编 委 (按姓氏笔画排序)

马三梅 (暨南大学)

王永飞 (暨南大学)

白润娥 (河南农业大学)

孙小武 (湖南农业大学)

李 峰 (上海交通大学)

李万昌 (河南师范大学)

李宏业 (暨南大学)

杨军英 (河南师范大学)

邹克琴 (中国计量学院)

屈红霞 (中国科学院华南植物园)

前 言

细胞工程是生命科学研究中的基本技术之一，应用性非常广泛，也是现代生物工程中所涉及面广泛并紧跟科学前沿的生物技术之一，在生物、农业、医药、食品、水产与养殖、生物资源与环境保护、新物种培育等领域发挥着越来越重要的作用。细胞工程课程更是我国高等院校生物工程、生物技术、生物科学、植物生产、动物生产等专业的核心课程之一。

目前，国内虽然出版了《细胞工程》、《动物细胞工程》及《植物细胞工程》等教材和专著，但这些图书或偏于某一研究方向，或偏于技术层面，或偏于应用层面。随着生命科学的飞速发展，新兴学科的不断涌现，学生所需要学习与掌握的知识和技术越来越多。为了顺应高等教育体制改革和市场经济、社会发展的需求，增加专业课的数量，压缩每门专业课的理论课时是今后的发展趋势。如何在较少的学时内系统地完成课程的教学目标，提高教学质量和教学效率，培养具有探索精神和主动学习能力的人才是教师和学生必须面对和解决的问题。有感于此，我们一直想编写一本既适合教学需要，又兼顾理论研究与实践应用，并能统筹课时需要的细胞工程教材。使学生系统地掌握细胞工程的理论体系、基本原理和实验操作方法，并能结合生产实际，提高学生分析问题、解决问题的能力，培养具有创新思维和创新能力的卓越生物人才。因此，作者在多年从事细胞工程教学和研究的基础上，综合近年来国内外新的研究成果，编写出版了《细胞工程》一书。

本书论述了细胞工程原理及其应用，分为三篇，共 15 章：第一篇（第一章和第二章）为细胞工程基础，主要介绍了细胞工程的概念、研究内容、发展简史及其应用，细胞工程实验室及其常用设备和生物安全性，细胞工程的基本技术等；第二篇（第三章至第十章）为植物细胞工程，主要包括植物细胞工程的基本原理和技术基础、植物离体快速繁殖和脱病毒技术、植物的胚胎培养和离体授粉、花药和花粉培养、植物细胞培养及次生物质生产、原生质体培养和体细胞杂交、植物种质的超低温保存、植物转基因技术等；第三篇（第十一章至第十五章）为动物细胞工程，主要包括动物细胞培养所需的基本条件、动物细胞培养、动物细胞融合、细胞重组及动物克隆技术、干细胞技术等。

本书由王永飞、马三梅、李宏业、孙小武、李万昌、屈红霞、杨军英、白润娥、邹克琴和李峰共同编写。具体分工如下：第一章由李万昌、杨军英和邹克琴编写，第二章由李万昌和邹克琴编写，第三章和第四章由李万昌编写，第五章由白润娥编写，第六章由李万昌和白润娥编写，第七章至第九章由白润娥编写，第十章由李宏业、孙小武和屈红霞编写，第十一章至第十五章由杨军英编写。李峰、王永飞、马三梅和邹克琴编写了一些案例和案例分析，马三梅负责全书思维导图的绘制，李宏业、孙小武、李万昌、屈红霞负责了书稿的修改工作，王永飞和马三梅负责全书的统稿、审稿和定稿。

本书以细胞工程理论体系为编写主线，全面、系统、简洁地介绍了细胞工程的原理及相关技术方法。不但突出了细胞工程相关知识的基本概念，而且注重学科的前沿进展和时代性。以案例和案例点评的形式强调了细胞工程的实践应用；所选的案例具有实用性、典型性和经典性；对学生有一定的启发性，达到学以致用，理论联系实践的目的。通过案例点评培养了学生分析问题、解决问题及创新思维的能力。

本书在每章都列出了本章内容的思维导图，通过图表帮助学生提纲挈领地了解本章内容的整体框架，明白各知识点之间的逻辑关系，掌握本章的知识体系和主要内容，并提高学生对本章内容的理解，增强学生的学习兴趣。此外，每章后面提供了本章小结和思考题，以便学生学习和掌握所学的知识。

本书的编写得到暨南大学、湖南农业大学、河南师范大学、中国科学院华南植物园、河南农业大学、上海交通大学、中国计量学院和科学出版社的指导和关心。本书的出版得到国务院侨务办公室和暨南大学研究生教材建设项目立项，以及彭磷基外招生人才培养改革基金和国家西甜瓜产业技术体系基金的资助。科学出版社对本书的出版也付出了大量的劳动。在此一并表示感谢！编者对本书中所引用的国内外教材、专著及科技期刊等大量资料已尽最大可能列于文后参考文献中，如有遗漏敬请见谅。

细胞工程研究涉及面广，内容更新快；并且教材建设是一项长期而艰巨的任务。加之编者的水平和经验所限，书中难免有疏漏和不足之处，恳请读者批评指正，以便再版时修正。

编者

2014年2月

目 录

前言

全书思维导图	1
--------	---

第一篇 细胞工程基础

第一章 绪论	2
第一节 细胞工程的定义和主要研究内容	2
第二节 细胞工程发展简史	6
第三节 细胞工程的应用	14
本章小结	25
思考题	26
第二章 细胞工程实验室和基本技术	27
第一节 细胞工程实验室	27
第二节 细胞工程实验室常用仪器设备	29
第三节 细胞工程的基本技术	32
第四节 实验室生物安全性	44
本章小结	47
思考题	48

第二篇 植物细胞工程

第三章 植物细胞工程的基本原理和技术基础	49
第一节 植物细胞工程的基本原理	50
第二节 植物细胞和组织培养的一般程序	52
第三节 外植体的选择及消毒	60
第四节 外植体的切取和培养	64
本章小结	69
思考题	70
第四章 植物离体快速繁殖和脱病毒技术	71
第一节 植物快速繁殖技术	71
第二节 植物脱病毒技术	76
第三节 脱毒后植物病毒的鉴定	79
本章小结	85
思考题	85
第五章 植物的胚胎培养和离体授粉	86
第一节 植物胚胎培养	86

第二节	植物胚乳培养和三倍体产生	92
第三节	子房、胚珠培养	94
第四节	离体授粉	97
本章小结	100
思考题	100
第六章	花药和花粉培养	101
第一节	植物单倍体.....	101
第二节	花药培养.....	106
第三节	游离小孢子培养产生单倍体.....	109
第四节	未授粉子房和胚珠培养产生单倍体.....	111
本章小结	112
思考题	113
第七章	植物细胞培养及次生物质生产	114
第一节	植物的单细胞培养.....	114
第二节	植物细胞的悬浮培养.....	121
第三节	植物细胞的大规模培养和次生物质生产.....	127
本章小结	136
思考题	137
第八章	原生质体培养和体细胞杂交	138
第一节	原生质体的分离与纯化.....	138
第二节	原生质体的培养.....	143
第三节	原生质体融合与体细胞杂交.....	146
第四节	体细胞杂交技术的应用.....	152
本章小结	154
思考题	154
第九章	植物种质的超低温保存	155
第一节	抑制外植体生长的离体保存方法.....	156
第二节	离体植物材料的超低温冷冻保存技术.....	157
本章小结	161
思考题	162
第十章	植物转基因技术	163
第一节	植物基因转化的受体体系.....	164
第二节	植物基因转化的方法.....	168
第三节	转基因植物筛选和鉴定方法.....	178
第四节	转基因的安全性及其评价.....	183
本章小结	198
思考题	199

第三篇 动物细胞工程

第十一章	动物细胞培养所需的基本条件	200
-------------	----------------------------	-----

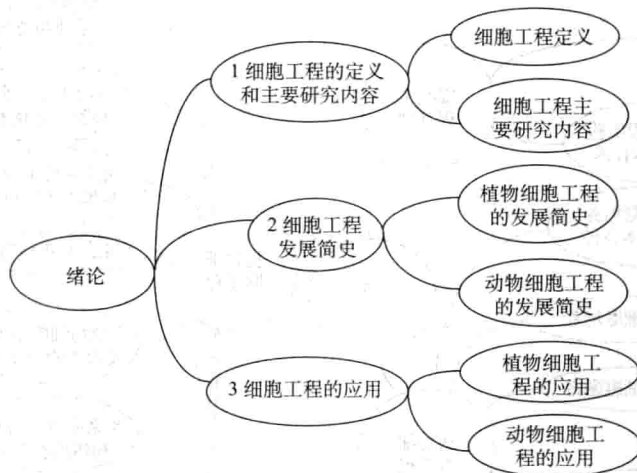
第一节 细胞的营养·····	200
第二节 细胞培养常用培养基·····	204
第三节 影响动物细胞培养的环境因素·····	210
本章小结·····	211
思考题·····	211
第十二章 动物细胞培养 ·····	212
第一节 原代培养·····	212
第二节 细胞株(系)与细胞克隆·····	218
第三节 动物细胞的大规模离体培养·····	221
第四节 动物细胞的保存·····	224
本章小结·····	229
思考题·····	229
第十三章 动物细胞融合 ·····	230
第一节 动物细胞融合技术·····	231
第二节 杂交瘤技术与单克隆抗体生产·····	241
本章小结·····	253
思考题·····	253
第十四章 细胞重组及动物克隆技术 ·····	254
第一节 细胞拆合与重组·····	254
第二节 细胞核移植和动物克隆技术·····	258
第三节 克隆技术的意义及应用前景·····	265
第四节 动物克隆技术中存在的问题·····	268
本章小结·····	269
思考题·····	269
第十五章 干细胞技术 ·····	270
第一节 干细胞研究的发展·····	270
第二节 干细胞的定义和分类·····	271
第三节 干细胞的生物学特点·····	274
第四节 干细胞的分离和培养·····	276
第五节 干细胞的意義及应用前景·····	290
第六节 干细胞技术研究中存在的问题·····	292
本章小结·····	294
思考题·····	294
主要参考文献 ·····	295

第一篇 细胞工程基础

第一章 绪论

细胞工程是指应用细胞生物学、发育生物学、分子生物学的理论和方法，借助类似于工程学的实验步骤或技术，在细胞水平上按照人们的意愿来改变细胞内的遗传物质以获得特定细胞、新型生物或特定细胞产品的有关理论和技术方法的一门综合性学科。

本章主要介绍了细胞工程的定义、主要研究内容、发展简史及其应用情况。本章的思维导图如下：



第一节 细胞工程的定义和主要研究内容

21 世纪以来生命科学的发展非常迅猛，生命科学的一系列重大突破正在迅速孕育和催生新的产业革命。生物医药新产品大量涌现，转基因农作物种植面积大幅增加，生物制造、生物能源、生物环保等一批高新产业群蓬勃发展。生命科学已成为全球发展最快的领域。而在生命科学的快速发展中，细胞工程的发展尤为突出。例如，干细胞培养和移植、生物反应器、克隆动物等，极大地解决了人类面临的一些疑难疾病的治疗难题。

2013年8月美国《福布斯》杂志推出2013年全球最具创新力企业100强名单。其中榜上前10名就有3家生物公司,分别是美国的亚力兄制药(Alexion Pharmaceuticals)、美国的雷杰纳荣制药(Regeneron Pharmaceuticals)和美国的Intuitive Surgical公司。此外,生命科学领域入选的还有美国孟山都(Monsanto)和丹麦的诺和诺德(Novo Nordisk)生物公司。在我国,仅2012年的生物产业总产值就达到了2.4万亿元,维持20%左右增速。在产业规模快速增长的同时,生物产业的经济效益也得以大幅提升,而其他行业只能望其项背。世界各国正处于一个以生物技术为核心的新科技革命的前夜,甚至有人认为,“生物经济”的兴起必将会对当前时代的社会经济发展格局产生重大影响。

生命科学的各个技术领域都离不开细胞工程,如微生物工程中工程菌的构建、植物转基因技术中细胞的培养和基因转化、生化工程中次生代谢物的调控等。从某种意义上讲,细胞工程是现代生物技术的公共技术平台,决定着生物技术的发展,推动着社会的变革。

一、细胞工程的定义

细胞工程(cell engineering)作为生物技术领域里的一个重要分支,是按照一定的设计方案,在细胞、亚细胞、组织和器官水平上改变细胞内的遗传物质以获得特定细胞、组织、器官,新型生物个体或特定细胞产品的一门综合性学科。它融合了细胞生物学、发育生物学、生物化学和分子生物学、药理学、化学工程等多学科的理论和方法。

细胞工程按照实验对象可以分为细胞融合技术、胚胎工程技术(包括细胞核移植、胚胎分割等)、染色体工程和组织培养技术等。按照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。与基因工程不同的是,细胞工程避免了分离、提纯、剪切、拼接等基因操作,只需将细胞遗传物质直接转移到受体细胞中形成杂交细胞,这种杂交不仅可以在植物与植物之间、动物与动物之间、微生物与微生物之间进行,甚至可以使动物与植物及微生物之间形成新型的杂交物种,因而能够提高基因的转移效率。细胞杂交技术是认识细胞生命活动规律的一种重要途径与手段。对创造新的动植物和微生物品种具有前所未有的重大意义。

21世纪,随着细胞生物学、分子生物学和细胞遗传学研究的日益深入及相关技术的不断完善,细胞工程在动植物高品质新品种的培育及在医学研究和实践中的应用日益广泛,细胞工程对提高人类的生活质量和健康水平发挥着越来越重要的作用。

二、细胞工程的主要研究内容

细胞工程能用人工方法使不同种细胞的基因或基因组重组到杂交细胞中,或者使基因与基因组由一种细胞转移到另一种细胞中,可以打破种间的障碍转移基因。细胞工程涉及的研究领域相当广泛,就其技术范围而言,既有广泛应用的动植物细胞与组织培养技术,又有细胞融合技术、染色体导入技术、胚胎和细胞核移植技术;从研究水平划分,细胞工程可分为细胞水平、组织水平、细胞器水平和基因水平等几个不同的研究层次。动植物体细胞杂交试验一直是细胞工程中最活跃的领域。用哺乳动物体细胞克隆而获得无性系繁殖胚胎与个体,是细胞工程最具创新的研究之一。通过动物体细胞杂交建立起来的单克隆抗体技术,是细胞工程中最富有成果性的工作范例。总的说来,细胞工程就是利用细胞全能性,采用组织与细胞培养技术对动植物进行修饰,为人类提供优良品种、产品和保存珍贵物种。

(一) 新型物种的培育

植物中存在远缘杂交不亲和及自交不亲和,产生不亲和的原因之一是花粉在雌蕊柱头上不能萌发,或花粉管不能通过子房达到胚珠进入胚囊与卵子结合。在体外条件下,进行植物受精,对杂交育种具有很大的意义,这正是利用细胞工程来实现创造新型的植物物种或品系。采用自然或人工方法可以使两个细胞(或原生质体)融合为一个细胞产生新的物种或品系,这种方法称为体细胞杂交。通过核置换创造核-质杂种,由核-质互作引起的细胞质雄性不育开创了杂交种利用的新时代,使水稻、高粱等自花传粉和常异花传粉作物的杂种优势利用成为现实。在植物育种中,远缘杂交可以把不同种属的特征、特性结合起来,突破种属界限,扩大遗传变异,从而创造新的变异类型或新物种。通过染色体工程技术可以创造同源多倍体、异源多倍体物种,以及异附加系、异代换系和易位系等中间育种材料。中国小麦有独特的种质资源和丰富的组织培养经验,小麦远缘杂交取得非常大的成绩。例如,将小麦与中间偃麦草、长穗偃麦草远缘杂交,已育成一批在生产上推广的品种,如由中间偃麦草育成的‘龙麦1号’、‘龙麦2号’、‘新曙光6号’等春小麦品种。同时,育成的八倍体小偃麦‘远中’1~7号优质、抗病,已成为优良育种亲本。通过属间杂交育成一批小麦新种质,如小麦与山羊草10个种的双二倍体;小麦与黑麦、长穗偃麦草、中间偃麦草的双二倍体、附加系、代换/易位系;小麦与冰草(*Agropyron cristatum*)的附加系和代换/易位系等。我国还将东方旱麦草、新麦草、华山新麦草与小麦杂交成功。竹子与水稻超远缘杂交成功得到比较稳定的‘竹稻966’和‘竹稻989’等。

在动物细胞工程中通过利用细胞融合、胚胎分割、胚胎融合、卵核移植、体外受精、胚胎培养、胚胎移植、显微操作等技术在细胞水平上改造卵细胞,生产出动物新品种。例如,高产奶牛、瘦肉型猪等新品种。1996年,英国罗斯林研究所的生物遗传学家Wilmur成功地通过体细胞克隆法培育出了世界上第一只克隆羊“Dolly”。1993年7月,英国爱丁堡的科学家通过遗传工程技术培育出世界上第一只转基因公鸡。这一科研成果为培育生下的鸡蛋里含有极其贵重药物成分的母鸡创造了条件。这项研究的成功,打破了大多数动物不能进行有性杂交的壁垒,对利用其他物种所含的优良基因改良特定物种,培育理想物种有着重要意义。2009年,世界首例能产生 Ω -3多不饱和脂肪酸的转基因克隆牛在包头创伟实业奶牛基地自然分娩成功。2011年,中国第一人乳铁蛋白转基因克隆奶山羊“欣欣”在山东顺利诞生,这标志着我国生物新品种培育获得重大突破。

(二) 优良动植物的快速繁育与资源保存

动植物细胞与组织培养可分为三个层次上的培养:细胞培养、组织培养和器官培养。动植物细胞与组织培养技术最显著的价值在于优良植物的快速繁育与代谢产物的大量制备方面。

以动物体细胞核移植、体外受精为核心的克隆技术在珍贵动物资源保护上发挥着重要作用。动物胚胎早期细胞核具有全能性,而胚胎以后各个时期的细胞核难以体现全能性,即分化难以逆转,多数生物学家转向以未成熟的胚胎细胞克隆动物的领域。动物体细胞克隆技术又称体细胞核移植技术或无性繁殖技术,它是用动物特定发育阶段的核供体(体细胞核)及相应的核受体(去核的原核胚或成熟的卵母细胞、卵细胞)不经过有性繁殖过程,进行体外重构,并通过重构胚的胚胎移植,从而达到扩繁同基因型动物种群的目的。体细胞克隆的类

型有两种,一种是同种体细胞核移植,科学家用取自一只6岁成羊的乳腺细胞成功培育出一只克隆羊,开创了成年哺乳动物克隆的先河。第二种是异种体细胞核移植,陈大元等将大熊猫的子宫上皮细胞、骨骼肌细胞和乳腺上皮细胞的细胞核移入去核的兔卵母细胞后,分别有9.9%、6.8%和11.7%的重构卵发育到囊胚。这不仅开创了大熊猫体细胞移核的先例,而且是首次大熊猫体细胞核的异种移核,对大熊猫的快繁及保护提供了希望。我国童第周和美籍华人牛满江在鱼类和两栖类中进行核移植,成功地得到了核质杂交品种。

胚胎切割(embryo bisection)借助显微操作技术切割早期胚胎成二、四等多份再移植给受体母畜,从而获得同卵双胎或多胎动物。来自同一胚胎的后代有相同的遗传物质,因此胚胎分割可看成是动物无性繁殖或克隆的方法之一。利用胚胎切割技术可以实现动物优良品种的快速大量繁殖。牛胚胎分割技术是在牛胚胎移植技术的基础上发展起来的技术。因此通过胚胎分割技术,可以人工制造同卵双胎或多胎,可成倍地增加胚胎数和产犊数,从而迅速扩大良种奶牛群,加速奶牛业的发展。此外通过胚胎分割技术还可获得性别和遗传上完全相同的同卵孪生或多生后代,为遗传学、生理学、营养学等研究提供宝贵试验材料。试管婴儿技术的初衷是帮助解决人类的生育疾病。自诞生之后近20多年发展迅速,目前约有400万试管婴儿诞生并开始孕育下一代。同时与之相关的衍生技术也不断得到发展。例如,用基因筛选方法获得更健康的不携带家族致癌基因的婴儿设计技术也在英国出现。

利用植物组织培养技术能快速繁育一些有价值的苗木、花卉、药材和濒危的植物。快速繁殖是植物组织培养中应用最为广泛的技术,如果快速繁殖的试管苗经过检测证明已经脱除病毒,则可以将脱病毒与快速繁殖结合起来,一举两得。植物通过组织培养,既能保持母体的优良性状又能保持遗传的稳定性,这在生产上具有重要的意义。植物种质资源是研究遗传和育种的重要基础。由于需要保存的植物种质资源很多,而田间保存耗费人力、物力和财力。为了避免优质的遗传资源的枯竭和丢失,可以利用植物组织培养技术在试管中或者在低温下长期保存,可大大节省土地和人力。这种方法也方便引种,防止病虫害的传播。

(三) 其他方面的研究

新“干细胞”时代已经到来,人类离“器官工厂”不再遥远。在胚胎干细胞研究领域,人类胚胎干细胞建系技术已取得较大进展,已实现了人类胚胎干细胞向神经干细胞的分化;完成了小鼠生殖嵴细胞的建系工作,初步探讨了小鼠胚胎干细胞向血管内皮细胞、神经前体细胞及表皮干细胞定向分化的技术;组织干细胞的分离纯化、培养扩增及定向诱导分化为骨、软骨、神经、血液、肝脏、心肌、角膜等的工作也有明显进展。利用细胞培养技术在体外人工控制细胞分化、增殖并生长成需要的组织,并使之工程化批量产出,用来修补或修复由于意外损伤等引起的功能丧失的体内组织,满足临床和康复的需要,并有可能对一些尚没有根治办法的疾病,如恶性肿瘤、糖尿病、心脏病、早老性痴呆症、帕金森病、脑卒中和其他疾病提供解决方案。但是,目前我国干细胞研究机构均小型分散,低水平重复现象严重,对于干细胞生物学的基础理论研究不够,影响其持续性发展。因此在组织器官工程产业方面还没有形成竞争力。2013年,日本京都大学专家开发的诱导性多功能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)面世,动物可以成为培育人体器官的“器官工厂”。日本政府也已经批准利用动物胚胎和iPS细胞来培育人类器官的研究。

干细胞治疗是当前的热门研究方向,但由于干细胞治疗存在诸多基础性问题尚未解决,因而给研究者带来一些挑战和难题。心肌梗死是一种严重的心血管疾病,发病率和病死率

高, 严重威胁人类健康。美国匹兹堡大学的科学家成功利用干细胞在器皿中培养出能自发收缩的人类心脏组织。在我国, 北京大学生命科学学院研究团队也成功利用小分子化合物诱导方法, 让一个普通体细胞可能孕育出新生命。

通过植物细胞培养可以生产许多具有药用价值的代谢产物或者化工产品。例如, 人参中的人参皂苷是重要的强身剂, 希腊洋地黄中的洋地黄苷可以治疗心血管病, 玫瑰花中的玫瑰精油是重要的香料等。利用动物细胞培养技术可以制取单克隆抗体、疫苗、生长因子等。此外细胞工程在生物能源方面也有应用。例如, 利用细胞工程技术, 使蓝藻、绿藻、光合细菌等一些单细胞生物在特定条件下产生氢气, 这对于洁净新能源的开发、减少环境污染具有巨大的社会价值与经济价值。德国波恩大学植物所哈珀为首的生物学家们利用不同的技术, 促使绿藻在光照的作用下, 生成了人们梦寐以求的氢气, 而且产量可观。

DNA 疫苗是一种最新的分子水平的生物技术疫苗, 利用生物技术制备的分子水平的疫苗, 包括基因工程亚单位疫苗、合成肽疫苗、基因工程活疫苗、DNA 疫苗及转基因植物疫苗。应用基因工程技术把编码保护性抗原的基因与能在真核细胞中表达的载体重组, 这种目的基因与表达载体的重组 DNA 可直接注射(接种)到动物(如小鼠)体内, 目的基因可在动物体内表达, 刺激机体产生体液免疫和细胞免疫。转基因植物疫苗用转基因方法将编码有效免疫原的基因导入可食用植物细胞的基因中, 免疫原即可在植物的可食用部分稳定地表达和积累, 人类和动物通过摄食达到免疫接种的目的。常用的植物有番茄、马铃薯、香蕉等。例如, 用马铃薯表达乙型肝炎病毒表面抗原已在动物试验中获得成功。这类疫苗尚在初期研制阶段, 它具有口服、易被儿童接受等优点。

人工授精、胚胎移植等技术已广泛应用于畜牧业。精液和胚胎的液氮超低温(-196°C)保存技术的综合使用, 使优良公畜、禽的交配数与交配范围大为扩展, 并且突破了动物交配的季节限制。

第二节 细胞工程发展简史

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。人类进入 21 世纪以来, 细胞工程取得了许多令人瞩目的研究成果。细胞工程作为生物技术的发展前沿, 伴随着试管植物、试管动物、转基因生物反应器等相继问世, 细胞工程已经渗透到生命科学、农业、医药、食品、环境保护等许多领域, 细胞工程正在为人类做出巨大的贡献。有些技术和生产的制品在实践中已经得到成熟应用。例如, 各类疫苗、类毒素、抗毒素、各类干扰素、酶制品、免疫调节剂、血浆蛋白、转移因子、淋巴因子、抗生素、生物活性物质、单克隆抗体色素、香味物质等生物制品均可以借助于动植物细胞大规模培养获取。细胞工程给人们带来了巨大的经济和社会效益。

一、植物细胞工程的发展简史

植物细胞工程是以植物组织细胞为基本单位, 在离体条件下进行细胞和组织的培养繁殖, 使细胞的某些生物学特性按人们的意愿发生改变, 从而改良品种或创造新物种, 或获得有用物质的过程。植物细胞工程是在植物组织培养的基础上发展起来的, 因此, 植物细胞工程也是广义概念上的植物组织培养。

细胞学说的产生和细胞全能性学说的提出为植物组织培养技术的产生奠定了理论基础。

纵观植物细胞工程的发展历史,大致可划分为细胞培养技术的探索阶段、细胞培养技术建立阶段和应用研究3个阶段。

(一) 细胞培养技术探索阶段 (1902~1929年)

1838年, Schleiden发表“植物发生论”,认为无论怎样复杂的植物都由细胞构成。1839年, Schwann发表“关于动植物结构和生长一致性的显微研究”,提出了细胞学说(cell theory)。自Schwann和Schleiden提出细胞学说后,细胞学研究有了飞快的发展。Strassburger于1884年在植物中观察到了受精和精卵细胞融合现象。接着他又发现了植物的有丝分裂和减数分裂。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在营养溶液中培养了单细胞,首次提出植物细胞全能性的概念。他提出植物单细胞在适当条件下,具有再生成为完整植株的潜在能力,但受当时条件所限没有成功。在此思想指导下,许多科学家从事组织培养研究。1904年,德国植物胚胎学家Hanning用萝卜和辣根的胚进行离体培养,提早长成了小植株,胚培养首次获得成功。1922年, Knudson对兰花幼胚进行培养获得幼苗,克服了兰花种子发芽难的困难。同年, Kotte和Robbins对豌豆、玉米、棉花等的茎尖、根尖进行了离体培养,发现培养的分生组织只能进行有限的生长。1925年, Laibach进行亚麻种间杂种幼胚培养,成功得到了杂种植物,证明了胚培养在植物远源杂交中利用的可能性。

(二) 培养技术建立阶段 (1930~1959年)

在这一阶段,植物组织培养建立了两个与培养技术有关的重要模式,一是培养基模式,二是激素调控模式。1934年, White等用番茄根尖的组织进行培养,获得了第一个活跃生长的番茄无性繁殖系。正式提出了植物细胞全能性理论,他认为每个植物细胞都含有一套和亲本相同的遗传信息,具有发育成完整植株的能力。同年,法国科学家Gautheret培养山毛柳、黑杨的形成层组织,获得愈伤组织。1937年, White和Went等分别发现B族维生素和吲哚乙酸(indole acetic acid, IAA)对培养的离体根生长具有重要作用。1938年, Gautheret在培养山毛柳、黑杨成功获得愈伤组织的基础上,在培养柳树的培养基中,加入IAA和B族维生素等,使形成层的生长大为增加。同年, Nobecourt培养胡萝卜根和马铃薯的块茎薄壁组织,获得愈伤组织。将愈伤组织置于琼脂培养基上继续培养,可无限发生细胞增殖,形成愈伤组织。首次从液泡化的薄壁细胞建立愈伤组织培养物。White、Gautheret、Nobecourt等科学家被誉为植物组织培养的奠基人。他们在此基础上建立了植物组织培养的综合培养基,包括无机盐成分、有机成分和生长刺激因素。这是随后创立的各种培养基的基础,同时也建立了植物组织培养的基本方法,成为当今各种植物组织培养的技术基础。1939年, White成功地培养了烟草细胞、萝卜细胞,至此,植物组织培养才真正开始。我国也很早就进行了相关的植物组织培养研究。1933年,我国科学家李继桐和沈同在研究银杏胚的培养时,通过把银杏的胚乳提取物加入到培养基中使得其胚培养获得成功。1952年, Morel和Martin首次通过茎尖分生组织培养获得大丽花的无毒植株。1955年, Miller发现了激动素,并发现激动素比腺嘌呤活性高3万倍,并提出改变细胞分裂素和生长素的比例,能够调节植物的根和芽的形成。1957年, Skoog和Miller提出了植物激素控制器官形成的概念,指出通过改变培养基中生长素和细胞分裂素的比例,可以控制器官的分化,即生长素和细胞

分裂素高促进根的分化，低促进茎和芽的分化。1958年，Steward和Reinert以胡萝卜根的悬浮细胞诱导分化成完整的小植株，发现了体细胞胚，为细胞离体培养中研究形态发生机制开拓了新的领域。Miller和Skoog在椰子汁中发现了细胞分裂素，并于1962年发表了“促进烟草组织快速生长的培养基组成”，这就是现在普遍使用的Murashige-Skoog (MS) 培养基。这一发现为植物细胞用于生产次级代谢物提供了前景。

(三) 应用研究阶段 (1960~)

20世纪六七十年代以来，国内外植物细胞工程发展很快。随着研究的进步，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，细胞原生质体融合技术使植物细胞的培养技术进入了一个新的发展阶段。细胞融合是指用自然或人工的方法，使两个或几个不同的细胞融合成一个细胞的过程。1960年，英国学者Cocking用酶解法分离出植物细胞原生质体，进行了原生质体培养和细胞杂交工作，使组织培养进入了一个新的领域。1970年，Power首次成功实现原生质体融合。1971年，Takebe等从烟草原生质体得到再生植株，原生质体植株再生首次获得成功。1972年，Carlson等通过两个烟草物种原生质体的融合，获得了第一个体细胞杂种植株。1973年，Nitch采用花药预培养的方法，首次获得了烟草花粉植株。1978年，Melchers进行了马铃薯和番茄的融合实验，获得了第一个属间杂种植株。到目前为止，组织培养、原生质体培养、细胞融合已在烟草、矮牵牛、胡萝卜等种间杂种，以及马铃薯和番茄、曼陀罗和颠茄、烟草和矮牵牛等属间杂种中都已获得了再生植株。

在常规的杂交育种中，育成一个新品种一般需要8~10年，而用细胞工程技术对杂种的花药进行离体培养，可大大缩短育种周期，一般提前2~3年，而且有利优良性状的筛选。利用细胞工程技术进行作物育种，是迄今人类受益最多的一个方面。中国在这一领域已达到世界先进水平，以花药单倍体育种途径，培育出的水稻和小麦品种或品系有近百个。

植物细胞工程技术使现代花卉生产发生了革命性的变化。1960年，法国学者Morel提出了利用茎尖离体快速繁殖兰花的方法，在此基础上，国际上相继建立了“兰花工业”，取得了巨大的经济效益和社会效益。在兰花工业取得效益的影响下，欧洲很多国家建立了植物微繁公司，重点是繁殖那些经济价值比较高的植物，如玫瑰、香石竹、百合、晚香玉、万年青、桂花和橡皮树等。对很多重要经济植物、药用植物、名贵花卉等也全面展开研究与开发，现在，世界兰花市场上有150多种产品，其中大部分都是用快速微繁殖技术得到的试管苗。从此，市场供应摆脱了气候、地理和自然灾害等因素的限制。至今，已报道的花卉试管苗有360余种。已投入商业化生产的有几十种。中国对康乃馨、月季、唐菖蒲、菊花、非洲紫罗兰等品种的研究较为成熟，大量商品化产品销往港澳及东南亚地区。

植物细胞工程的另一个应用是通过转基因操作改良作物品质。自从1983年首次获得转基因烟草植物后，转基因植物细胞工程蓬勃发展，对人们的生活产生的影响也越来越大。转基因植物可通过原生质体融合获得。转基因技术有可能改变植物的某些遗传特性，不仅可以改良作物特性，还可培育高产、优质、抗病毒、抗虫、抗寒、抗旱、抗涝、抗盐碱、抗除草剂等作物新品种。而且可用转基因植物或离体培养的细胞，来生产外源基因的表达产物，如人的生长素、胰岛素、干扰素、白细胞介素-2、表皮生长因子、乙型肝炎疫苗等已在转基因植物中得到表达。

1986年，首批转基因植物被批准进入田间试验，至今国际上已有30个国家批准数千例

转基因植物进入田间试验,涉及的植物种类有40多种。一些转基因植物已经进行商业化生产。1994年,美国Calgene公司研制的转基因延熟番茄首次进入商业化生产,到1998年年底有30多例转基因植物被批准进行商业化生产。中华人民共和国农业部(以下简称农业部)也已于1997年批准了转基因延熟番茄的商业化。目前全球转基因生物新品种已从抗虫和抗除草剂等第一代产品,向改善营养品质和提高产量的第二代产品,以及作为工业、医药和生物反应器等第三代产品转变。

二、动物细胞工程的发展简史

细胞工程是应用细胞生物学和分子生物学方法,在细胞水平上进行遗传操作,改变细胞的遗传特性和生物学特性,以获得具有特定生物学特性的细胞和生物个体的技术。动物细胞工程是在动物细胞培养、细胞融合和细胞拆合技术及干细胞技术基础上发展起来的。随着基因工程技术、基因转移技术和干细胞技术的发展,动物细胞工程在理论和应用两方面获得快速发展。

(一) 动物细胞培养

动物细胞工程学的历史可追溯到细胞学说创立以后的19世纪下半叶。随着对细胞认识的逐渐深入,实验胚胎学得到了较大发展。出于对机体组织结构和功能研究的需要,组织或细胞体外培养技术应运而生。细胞培养是细胞工程技术必不可少的过程,是生物技术中最核心、最基础的技术。细胞培养既为研究细胞的结构和功能提供了基础,简化了生命活动的机制和控制研究;又可收集其代谢产物,获得有药用价值的生物产品。

早在19世纪,胚胎学家就尝试在体外条件下,维持胚胎组织存活并进行移植,以研究胚胎发育的过程。1907年,洛克菲勒研究所的美国胚胎学家Harrison首创了悬滴培养法,成功培养了蛙胚神经管区细胞,并观察到从中长出的轴突细胞(神经纤维),他的技术具备了现代动物细胞培养的技术雏形。同时,该研究所的Carrel发现了鸡胚浸出液能促进某些细胞的生长,并首次把无菌观念引入组织培养技术中。1909年,Harrison和Carrel完善了动物组织或细胞培养的技术体系,奠定了动物细胞培养体系的理论和技术基础。1914年,Thomson建立了器官培养技术,以后又被Strangeway和Fell所发展。1923年,Carrel设计了卡氏培养瓶,并将其应用于细胞培养实验中,这成为后来动物细胞大规模培养的基本模式。1925年,Maximow改良了悬滴培养法,建立了双盖片法。1926年,Strangeway设计了表玻璃培养法。1933年,Gey发明了细胞旋转管培养法,避免了传统静置培养导致的细胞和周围物质环境接触不均匀的现象。1940年,Earle建立了可以无限传代的一个C3H小鼠的结缔组织L细胞系。1948年,Sardord创立了分离细胞培养方法,第一次成功地从单层细胞分离出单个细胞,使建立遗传性状相同的细胞株成为可能。1953年,Gay以人的肿瘤组织为材料,建立了第一个人体细胞系——人宫颈癌HeLa细胞系。1955年,Eagle开发了人工细胞培养基,加速了细胞培养技术的发展进程,也扩展了细胞培养的范围。1962年,Capstick等首次成功地进行了仓鼠肾细胞的大规模悬浮培养。随之,肾上腺细胞、垂体细胞、肝细胞、肌细胞和神经细胞等的培养相继尝试成功。1967年,Van Wezel首次提出了“微载体”培养系统,使贴壁依赖型细胞贴附在微载体上悬浮于液体培养基中生长。“微载体”培养系统现已广泛应用,是当前贴壁依赖型细胞大规模培养的主要方法。1972年,Knazek首次报道了中空纤维培养系统,同时,微囊化培养技术也应运而生。目前,用于动