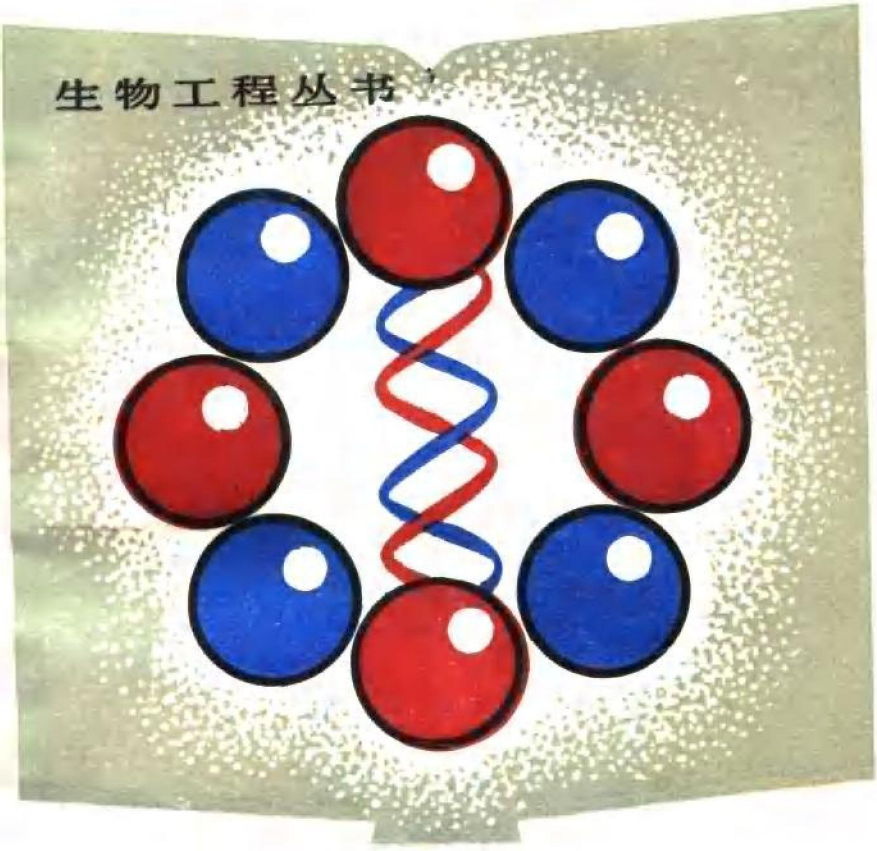
生物工程丛书



细胞工程

焦瑞身 等编著

化学工业出版社

内 容 简 介

本书系《生物工程丛书》之一。书中分三章，分别叙述微生物细胞、植物细胞和动物细胞工程研究的最新技术和各方面的应用。在微生物细胞工程一章，着重介绍细菌、酵母和丝状真菌原生质形成、再生和融合育种的成就，对新的融合技术，如电融合和脂质体的应用也有介绍。植物细胞工程一章，包括原生质体形成和细胞杂交，植物单倍体的诱导形成及应用，植物细胞突变体的筛选与应用，植物次生物质的生产与植物试管苗等。动物细胞工程一章，介绍动物细胞工程所涉及的技术，包括组织培养、细胞融合，拆合和DNA转移，以及动物细胞工程各方面的进展（如细胞杂交瘤和单克隆抗体，淋巴因子，雌核发育与转基因动物）。全书取材新颖，基础与实践并重，可作为大专院校生物工程、微生物、生化工程等专业的主要参考书。

参加本书编写的人员有：焦瑞身、雷肇祖、楼纯菊、宋友礼、郑幼霞、梁平彦、夏镇澳、许智宏、何卓培、刘涤、杨乃博、叶敏、谢宏、黄嘉陵、柯一保、张志新、徐永华、江子卿、顾全保、罗荣生等，承夏镇澳和叶敏同志审阅了部分稿件，最后由焦瑞身同志负责审定全稿。

生物工程丛书
细胞工程
焦瑞身 等编著

责任编辑：张绍祖
封面设计：季玉芳
*
化学工业出版社出版发行
（北京和平里七区十六号楼）
化学工业出版社印刷厂印刷
新华书店北京发行所经销
*
开本787×1092 1/32 印张13字数299千字
1989年11月第1版 1989年11月北京第1次印刷
印 数 1—1,820
ISBN 7-5025-0604-7/Q·4
定 价6.40元

《生物工程丛书》编辑委员会

主任 焦瑞身（中国科学院上海植物生理研究所）

委员 （按姓氏笔划排列）

李载平（中国科学院上海生物化学研究所）

李致勋（复旦大学遗传学研究所）

陈骝声（上海科技大学生物工程系）

俞俊棠（华东化工学院生化工程研究所）

熊振平（上海医药工业研究所）

前　言

当前，以生物工程（生物技术）、微电子、新材料、新能源、海洋工程和空间技术等为主要内容的新技术革命浪潮正在以万钧之势席卷世界各国，迅猛发展。在新技术革命中，生物工程又是各国优先发展的领域，它不仅在近期内能提供新的产业，且为解决人类社会所面临的许多重大问题，如人口和食物、能源和资源、环境和保健等问题发挥重要作用，展示美好的前景。

生物工程的发展将对各国的经济发展带来重大的影响。例如，经济发达国家正在致力于可再生能源（生物物质）的利用，企图代替石油进口，这将减少对石油能源的依赖。又如各国利用固定化菌体或固定化酶大规模生产高果糖浆代替蔗糖，使世界市场糖的价格大幅度下降。再如巴西，开展以酒精代替石油的十年计划，到目前为止，全国汽车所需燃料的43％已使用酒精，而且，由于发酵法制酒精这项生物工程的发展，为巴西创造了500 万人新就业机会。显然，对巴西人民生活和国家经济发展起到引人注目的作用。

我国从“六五”计划期间就把生物工程作为重点发展的新技术之一，而且在许多方面已经取得可喜的进展，“七五”计划的规模更加宏大。随着各项计划的落实，生物工程将在医药、农业、工业、食品等方面开拓新的领域，创造巨大的社会效益和经济效益，为国民经济开辟新的原料途径，甚至导致新的产业结构。例如：应用农副产品，生物物质代替矿产资源等。我国幅员广大，具有丰富的生物资源，这是发展生物工程基本条

件之一。毫无疑问，生物工程的发展将为我国十亿人民的物质生活和四化建设大业发挥巨大作用。

为了推动我国生物工程的发展，以具有一定科技知识的读者为主要对象，出版一套全面介绍生物工程的丛书是十分必要的。《生物工程丛书》的目的就是配合这一需要，介绍当代国内外生物工程几个活跃领域的情况，既深入浅出地介绍基础知识和近期的应用，也展示今后的发展方向。当代生物工程一般分为微生物工程、酶工程、细胞工程和基因工程，本丛书均有专册分别予以介绍。为了使读者概括了解当代生物工程的内容，专有一册《生物工程概论》以飨读者。

再者，生物工程是一个知识和技术密集的技术科学，它的基础学科是微生物学、生物化学、遗传学以及生化工程等。因此，我们又邀请有经验的专家编写了《微生物学基础》、《生物化学基础》和《生化工程基础》，作为学习生物工程的入门，希望对读者了解生物工程各个方面是有益的。

本丛书是编辑部邀请国内活跃在生物工程各个领域的专家编写，他们或从事科研，或进行实际生产，都是在百忙之中进行写作，大家的共同愿望是希望这套丛书对有志于从事生物工程工作的读者有所裨益，为我国生物工程的发展出一份力。

焦瑞身

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

目　录

第一章　微生物细胞工程……1
第一节　概述……1
第二节　微生物细胞融合基础知识……3
一、微生物细胞融合技术……3
二、微生物细胞融合基础知识……7
第三节　原核细胞的原生质融合……24
一、革兰氏阳性细菌的原生质体融合……24
二、革兰氏阴性细菌的原生质体融合……32
第四节　真核细胞的原生质体融合……34
一、酵母菌的原生质体融合……34
二、丝状真菌原生质体融合……47
第五节　原生质体融合的新技术——电融合……59
第六节　脂质体在传递DNA中的应用……66
一、脂质体的成分和结构……67
二、脂质体的制备……69
三、几种脂质体的比较……71
四、脂质体在核酸传递中的应用……72
第七节　通过原生质体融合病毒的传递……77
一、原生质体融合传递病毒……79
二、原生质体摄入病毒……87
第二章　植物细胞工程……92
第一节　原生质体培养和细胞杂交……94
一、植物原生质体培养……94
二、植物细胞杂交……112

第二节　原生质体摄入细胞器……150
一、原生质体摄入微生物或藻类……153
二、原生质体摄入细胞核、叶绿体、染色体……156
第三节　植物单倍体的诱导形成及其应用……168
一、　引言……168
二、花药和花粉的培养……170
三、其他诱导形成单倍体的途径……193
四、单倍体的应用……196
第四节　植物细胞突变体的筛选及其利用……204
一、引言……204
二、突变的发生……207
三、诱变或分离所用的材料……209
四、变异体的分离和鉴定突变体的步骤……210
五、筛选出的突变体和变异体……212
六、突变细胞系的利用……215
第五节　细胞培养和次生物质生产……219
一、序言……219
二、培养系统……224
三、影响次生物质产量的因素……230
四、提高次生代谢产物产量的方法……237
五、展望……242
第六节　植物的试管繁殖……249
一、引言……249
二、花卉……250
三、林木……258
四、果树……264
五、农作物、牧草的器官发生与试管繁殖……271
六、蔬菜作物……283
七、药用植物……287

八、讨论 ……292
第三章 动物细胞工程……296
第一节 什么是动物细胞工程……296
第二节 动物细胞工程所涉及的主要技术领域……298
一、组织培养……298
二、细胞融合……313
三、细胞拆合……328
四、染色体转移……339
五、DNA介导的基因转移……350
第三节 动物细胞工程的发展概况……357
一、细胞杂交方面……357
二、雌核发育……385
三、转基因动物……395

第一章　微生物细胞工程

第一节　概　　述

微生物细胞工程的含义是应用微生物细胞进行细胞水平的研究和生产，具体内容应包括各种微生物细胞的培养、遗传性状的改变、微生物细胞的直接利用或获得细胞代谢产物等。因此，微生物细胞工程应包括下列内容。

1）微生物的培养——不同微生物的营养要求以及包括发酵罐（反应器）在内的各种培养方法，已在本丛书的《微生物工程》一书中详细介绍。

2）遗传性状的改变——改变微生物细胞的遗传性状，目的不外为了进行基础性遗传学研究或者是为了选育高产菌株。前者在《遗传学基础》和《微生物学基础》中都有介绍。进行微生物育种的途径很多，主要是物理和化学因素诱变后选育的常规育种以及重组 DNA 技术（或称基因工程），这两方面内容分别在《微生物工程》和《基因工程》两分册中论述。近年应用很广，而且技术操作与条件要求都比较简单的微生物原生质体融合日益受到人们的重视，这是本书第一章微生物细胞工程主要讨论的内容。

3）微生物细胞的应用——包括应用微生物细胞本身如做为单细胞蛋白（SCP），或者利用微生物细胞进行有用产物的生产。这两方面也都已在《微生物发酵工程》一书中介绍了。另外从60年代开始的固定化技术的发展，已使固定化酶和固定

化菌体在生产上发挥了巨大作用。固定化细胞应属微生物细胞工程范围，不过这部分内容在《酶工程》一书中已有讨论，所以本书不再重复。

从上述对本丛书的内容编排上来看，本分册第一章微生物细胞工程，主要应讨论原生质体的形成、再生和融合。

为什么要重视微生物细胞原生质体的融合呢？主要理由有两个方面。

第一，原生质体融合是进行细胞遗传重组的最简便方法，其优点很多，特别是在不具有接合作用的菌株之间，或者对感受态尚不了解的菌株，除去细胞壁之后，原生质之间可比较容易地进行细胞质融合，再进而核融合，这样可达到遗传重组的目的。

第二，通过重组 DNA 技术（遗传工程），携带外源 DNA 的载体（质粒），在适当条件下可进入到受体细胞，如pBR 322 可比较容易地进入大肠杆菌细胞之中。但在链霉菌，酵母菌，丝状真菌，这种转化是十分困难的。因此，消除细胞壁的原质体就是当前将重组 DNA 技术用于上述微生物所不可少的一步。为使重组 DNA 技术成功，受体菌原生质体的形成与再生，都是十分关键的。

下面介绍本章的内容。

1. 微生物细胞融合基础知识——以细菌原生质为例，比较详细地讨论细胞壁的结构，溶解细胞壁的酶，促融合剂的作用，原生质体融合所需的条件，融合子的检出及有关的计算。

2. 原核细胞的原生质体融合——包括革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌种间与属间的融合。

3. 真核细胞的原生质体融合——包括酵母菌和丝状真菌的种内、种间和属间等融合，这已成为酵母菌和丝状真菌遗传

育种的重要方法。

4. 原生质体融合新技术——除应用促融合剂外，近年有一些新技术问世，如电融合仪器，受到科研人员的注意。对此，本书也作了介绍。

5. 如上所述，原生质体的应用主要是通过细胞原生质体的融合，进行遗传重组，从中选育具有所需遗传性状的融合子和重组子。除应用两种原生质体进行融合外，尚有另一种新技术，就是脂质体的应用。原理是将遗传物质包裹在由磷脂形成的称之谓脂质体的小囊中，这种脂质体性质上与原生质体相近，可以进行融合，从而将脂质体中的遗传物质转移到原生质体中。在药物学研究中，脂质体可将药物转移到所要作用的靶组织中，可以得到更好的药理效应。脂质体在遗传工程中的应用已有报道，看来这方面也是有前途的新技术之一。

6. 原生质体融合，通常是在两种原生质体（种内、种间或属间）间进行，使两个原生质体中的遗传物质进行交换。线粒体，叶绿体等细胞器和病毒也可通过融合进行传递。关于线粒体的传递，在酵母原生质体融合部分作了介绍。本章最后一节中特别叙述病毒通过原生质融合的传递。

（焦瑞身）

第二节 微生物细胞融合基础知识

一、微生物细胞融合技术

无论是微生物基础理论的研究，还是它的应用开发，首要的前提是先要获取带有各种遗传标记的微生物变种。有两种经典的手段可以改变或者更新微生物的遗传性状：突变和重组。

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

突变是微生物遗传物质——基因结构的改变。突变又分自发突变和诱发突变两类。在通常情况下，突变对微生物本身无益而有害，经过自然选择即被淘汰。另有一些突变对微生物有益，使得它在生存竞争中得以取胜，繁衍后代。再有一些微生物突变，虽然对它本身有害，却具有一定的经济价值，可为人们所利用。依靠突变，特别是人工诱发的突变（诱变），可以获得具有优良经济性状的产质俱佳的变种、或者得到新的微生物产品。虽然到目前为止，突变和选择是目前最常用的，也是最有效的菌种改良手段之一，但它的使用仍然有局限性。在育种实践中往往可以观察到，一种诱变剂多次作用于同一个微生物以后，诱变的效果将逐渐降低。可能这是由于诱变剂对微生物遗传物质的作用部位常常不是分散而是固定在若干遗传位点上的缘故。因此，同一种诱变剂反复作用后，微生物的反应便变得“迟钝”起来。更换另一种诱变剂，使用多了，也会出现同样的现象。改变微生物遗传性状的另一种手段是重组。重组是把两种基因组成不同的生物遗传物质经过转移作用合并到一个个体之中、然后通过供体和受体双方遗传物质彼此交换部分遗传结构、从而使微生物的遗传结构发生较大的变化、结果出现遗传性状改变的过程。导致遗传物质发生重组的生物学途径有：（1）杂交（在低等生物中是接合），这是完整的活细胞之间的接触，导致遗传物质转移的过程；（2）转化，从供体微生物细胞内抽提出来的游离 DNA 直接穿过受体细菌细胞壁进入细胞中的过程（此时受体细菌处于能接受外源 DNA 的细胞生理状态，称为感受态）；（3）转导，通过温和噬菌体把细菌 DNA 片段从一个细菌转入另一个细菌细胞中的过程。所有这些重组手段局限性都很大，因为具有这几种重组机制的生物并不多，因此人们对大多数生物遗传背景的了解知之甚少，而对于具有

重要经济价值的工业微生物来说，更是所知廖廖，这样便妨碍了有性重组在微生物育种中的实际应用。原因之一是微生物细胞中存在着天然屏障——细胞壁。细胞壁的存在，使细胞与细胞之间缺乏沟通的渠道，不能进行遗传物质的传递。但是近年来由于在微生物中引入了细胞融合新技术，即原生质体融合新技术，从而打破了不能充分利用遗传重组的局面。

对细胞融合现象的观察可以追溯到上一个世纪，而其实际应用则首先在动植物细胞中实现。在植物细胞方面，Michel（1937）用0.5M $NaNO_3$ 处理两个原生质体，使它凝集、融合。动物细胞方面，1958年罔田善雄发现，用紫外线灭活的仙台病毒（HVJ）可以诱发艾氏腹水瘤细胞融合，产生多核体。其后，不少人尝试制备微生物原生质体。1972年，匈牙利Ferenczy等首先报道在微生物中的原生质体融合，他们采用原生质体融合技术，使白地霉（*Geotrichum candidum*）营养缺陷型形成强制性异核体。1976年Fodor和Alföldi报道了巨大芽孢杆菌（*Bacillus megaterium*）的原生质体融合。与此同时Schaeffer等报道枯草杆菌（*Bacillus Subtilis*）的原生质体融合。两篇报道的作者们所选用的遗传标记均为营养缺陷型标记。酵母菌的原生质体也在同一年发表。 Sipiczki和Ferenczy报道了粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）营养缺陷型的原生质体融合。同一年在原生质体融合研究上的重要进展是真菌种间原生质体融合的成功，如构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）和烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）的种间原生质体融合，娄地青霉（*Penicillzum roquefortii*）与产黄青霉（*Penicillium Chrysogenum*）的种间原生质体融合。翌年，*Hopwood* 等报道了重要工业微生物链霉菌（*Streptomyces*）的原生质体融合。1979年，Matagne 等报道了藻类衣藻（*Chlamydomonas re*

inhardtii）细胞壁突变型的体细胞融合。

在微生物系统中，原生质体的诱发融合是一种相当新颖的遗传操作手段。图1-1是微生物原生质体融合过程的示意图。原生质体融合的基本过程是真菌、细菌和放线菌等微生物，经培养后获得大量菌体细胞，用脱壁酶（蜗牛酶、溶菌酶等）处理脱壁，制成原生质体（处理过程必须在高渗溶液中进行）。将两种不同菌株的原生质体混合在一起，通过高效促融合剂有机化合物聚乙二醇(Polyethlyene glycol，简称PEG)促使原生质体聚集，彼此接触、融合，洗去PEG后，使融合的原生质体在合适的培养基平板上再生出细胞壁，并生长繁殖，形成

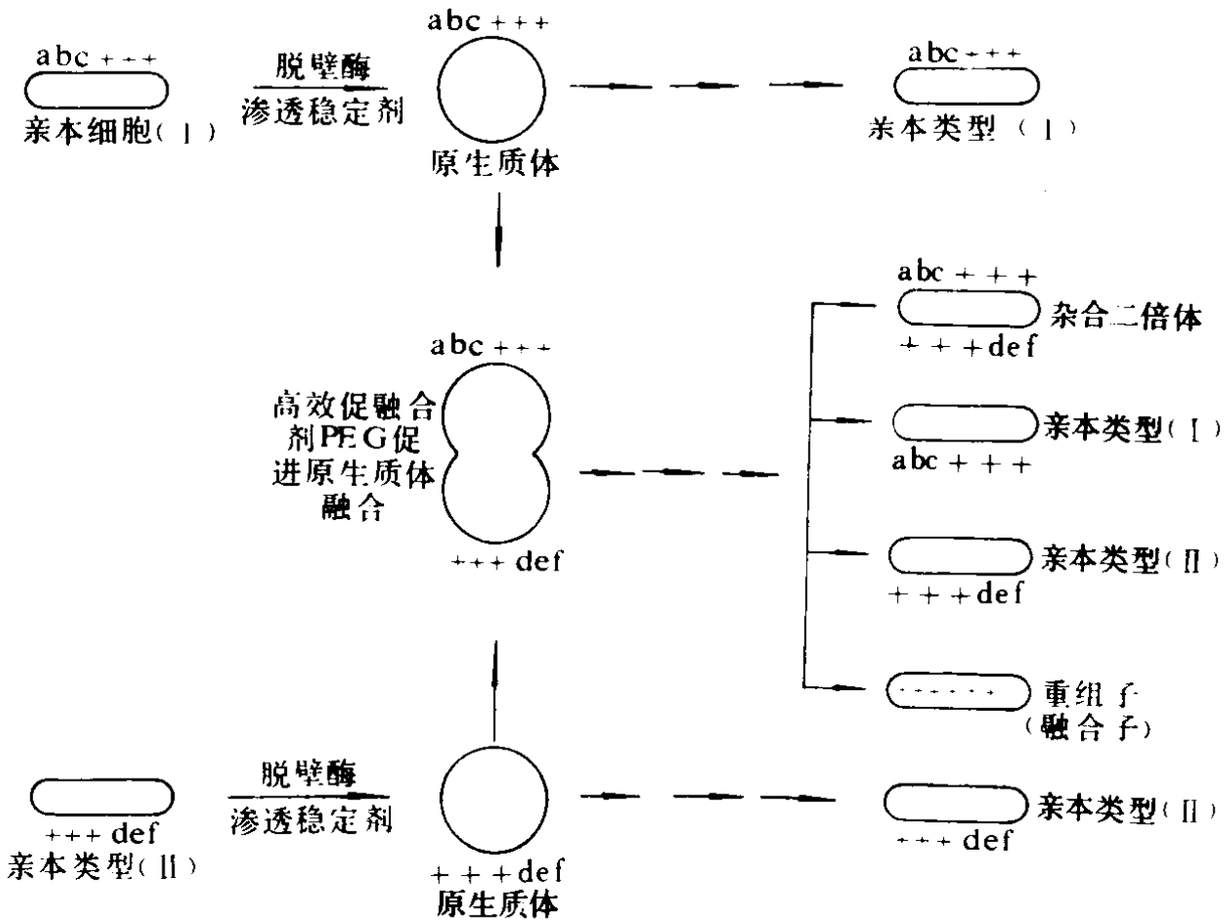


图 1-1 微生物原生质体融合简单示意图

a，*b*，*c*，*d*，*e*，*f*—亲本细胞遗传标记（营养缺陷型）；

菌落，最后测定参与融合的性状重组或产量变化的情况。

微生物原生质体融合研究的历史虽然只有十来年的工夫，但进展甚快，主要原因是微生物细胞结构比较简单，生长迅速，操作方便，遗传学研究也比较深入。原生质体融合还有一个很突出的优点是所需的仪器设备、工具酶等条件相当简单，只需要能观察活体细胞、原生质体的相差显微镜、细胞壁脱壁酶、促融合剂聚乙二醇等即可开展工作。普通的微生物实验室都具备这样的条件。因此，通过这一手段改良工业上重要菌株较有希望。原生质体融合的基础理论和生产应用的潜力，目前日益引起人们的注意和广泛的兴趣。

二、微生物细胞融合基础知识

微生物是一类形体比较微小、其个体一般不能用肉眼看到，需要用显微镜放大几十乃至上千倍才能看清楚的一类低等生物。大多数微生物都具有细胞结构。根据进化的程度及细胞结构分化的程度，可以把微生物分成两大类：原核生物和真核生物。细菌和蓝绿藻（*blue-green algae*，现名*cyanobacteria*属于原核生物。其他藻类、真菌和原生动物属于真核生物。原核生物细胞和真核生物细胞两者最重要的差别在于核的结构。真核细胞有一真正的细胞核，即由核膜包围的结构，核膜内是含有遗传物质的染色体结构。原核细胞则没有真正的核，其遗传物质包含于裸露在细胞内的单个DNA分子中。

1. 细菌细胞壁的结构

上面已经提到，细菌细胞壁是一道天然屏障，把细胞内含物与细胞外环境隔离开来。细胞壁赋予细胞的刚性和一定的形状。细菌细胞壁的化学成分与所有真核生物完全不同，是区别原核生物和真核生物的一个重要指标。一般放大上千倍的光学

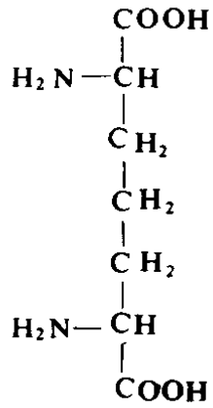
显微镜很难看清楚细菌细胞壁的结构，但用电子显微镜观察细菌细胞的超薄切片时，细菌细胞壁的若干细节可以清晰地看到。

细菌细胞的形态可用光学显微镜观察。为了便于观察，往往需要用染料使细胞染上颜色，以增加菌体细胞的反差。染料是有机化合物，不同的染料对不同的细胞成分有不同的反应，有的染料对某种细胞成分亲和力强，对其他成分分别相反。常用的染料中有许多是带正电荷的（阳离子），与细胞中带负电荷的组分如核酸等结合牢固，如亚甲蓝，结晶紫等。另一类染料带负电荷（阴离子）而与带正电荷的细胞组分如蛋白质相结合，如曙红、酸性复红等。

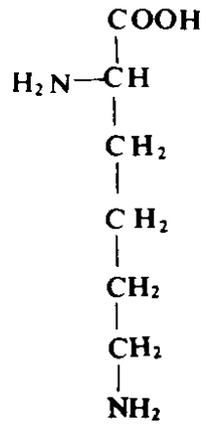
在细菌学中，一种重要的染色方法是革兰氏染色法，它是一种鉴别染色法。所有细菌用这种方法染色后出现两种类别的反应：革兰氏阳性反应和革兰氏阴性反应。反映了这两类细菌细胞壁的重要差别。革兰氏染色步骤如下：先用结晶紫使细胞染上蓝紫色，洗涤，除去多余染料，再用碘液处理，I_2和结晶紫形成一复合物，使结晶紫固定在细胞内。然后用酒精或丙酮脱色、I_2—结晶紫复合物可溶解于酒精或丙酮中。革兰氏阳性菌不被脱色，革兰氏阴性菌则被脱色。脱色处理后，用藏红复染，使革兰氏阴性菌染上红色。置显微镜下观察，革兰氏阳性菌细胞呈蓝紫色，而革兰氏阴性细胞则呈红色。

出现革兰氏染色阳性和阴性差别的原因在于两者细胞壁的不同。革兰氏阳性菌细胞壁有一层相当厚实坚硬的结构，革兰氏阴性菌细胞壁则是相当复杂的多层结构，其中也包括一层与革兰氏阳性菌一样的坚硬结构层，其化学组成为肽聚糖，它是由二种糖的衍生物及一段短肽编织起来的网状结构。其中糖的衍生物有两种：*N*-乙酰葡糖胺和*N*-乙酰胞壁酸，两者以β-

1，4 键相连，*N*-乙酰葡糖胺接*N*-乙酰胞壁酸，再按*N*-乙酰葡糖胺，以此重复，形成一长分子链，两条这样的长分子链间由一段短肽结构相连。这段短肽包括*L*-丙氨酸、*D*-谷氨酸、内消旋二氨基庚二酸和*D*-丙氨酸。内消旋二氨基庚二酸有时被赖氨酸所代替。二氨基庚二酸与赖氨酸结构差异如下：



二氨基庚二酸



赖氨酸

所有革兰氏阴性菌中以及部分革兰氏阳性菌的细胞壁短肽含有二氨基庚二酸，而大多数革兰氏阳性球菌则是赖氨酸而不是二氨基庚二酸。个别革兰氏阳性菌还含有其他氨基酸。

肽聚糖细胞壁结构的一个重复单位结构图示如图1-2。

图1-2是大肠杆菌(*Escherichia coli*)及大多数革兰氏阴性菌细胞壁的结构单位。在一些细菌中，还存在其他氨基酸。这段短肽把一条条长链*N*-乙酰葡糖胺(G)—*N*-乙酰胞壁酸(M)—G—M—连接起来，构成肽聚糖层，肽和聚糖链连接的方式见图1-3。

在革兰氏阳性菌中，间桥氨基酸的变化最大，可以是四肽氨基酸中任何一种，也可能是其他氨基酸，如甘氨酸、苏氨酸、丝氨酸和门冬氨酸。但在间桥中从未发现过下列氨基酸：支链氨基酸、芳族氨基酸、含硫氨基酸、组氨酸、精氨酸和脯氨酸。

在革兰氏阳性细菌中，除了肽聚糖为主要成分外，还有一

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com