



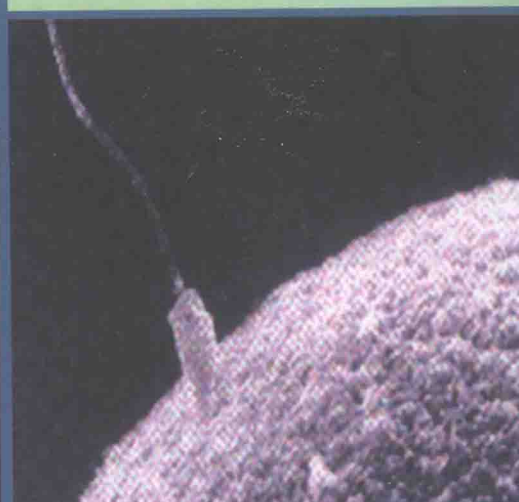
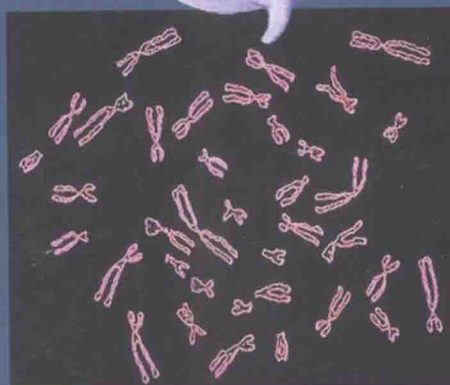
“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

Cell Engineering

细胞工程

(第三版)

安利国 杨桂文 主编



科学出版社

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材

细 胞 工 程

(第三版)

安利国 杨桂文 主编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书入选普通高等教育“十一五”和“十二五”国家级规划教材,是国家级精品课程配套主干教材。主要介绍细胞工程的理论与技术,内容分为三篇:第一篇介绍细胞工程的技术基础,第二篇介绍动物细胞工程,第三篇介绍植物细胞工程。

本书有两个主要特点:一是内容涵盖动物细胞工程和植物细胞工程;二是理论知识与实验指导密切结合,设置了20个实验。一本教材兼有理论教材与实验教材两种功能,比较实用。

本书是生物技术和生物工程专业教材,也可供生物科学、医学、农学、林学等相关专业的师生和从事生命科学相关行业的教学与科研技术人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/安利国,杨桂文主编. —3版. —北京:
科学出版社,2016.3

“十二五”普通高等教育本科国家级规划教材
ISBN 978-7-03-046984-7

I. ①细… II. ①安… ②杨… 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(2015)第 311345 号

责任编辑:陈 露

责任印制:谭宏宇/封面设计:殷 靓

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>

南京展望文化发展有限公司排版

江苏省句容市排印厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005年1月第 一 版 开本:A4(890×1240)

2016年3月第 三 版 印张:15 1/2

2016年3月第十四次印刷 字数:490 000

定价:45.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

《细胞工程》(第三版)编辑委员会

主 编 安利国 杨桂文

编写者 (按姓氏笔画排序)

尤 勇 吕 虎 刘 林 安利国

孙震晓 李玉昌 李师鹏 杨桂文

陈 敏 聂刘旺 徐承水 郭卫东

黄勤妮

第三版前言

细胞工程与基因工程、微生物工程和酶工程等构成了现代生物技术,是生物技术和生物工程专业专业的骨干课程。由于生物技术和生物工程专业历史较短,教材建设尚处于起步阶段。近年来虽已有多本教材面世,但多数都有学科偏向,将动物细胞工程和植物细胞工程这两大部分内容综合在一起的教材较少,这就对学生全面学习和掌握细胞工程带来了不便。无论是动物细胞工程,还是植物细胞工程,都是以细胞生物学为理论基础,具有相同的技术基础。在学科发展过程中,这两部分内容密不可分,在研究思想上相互启发,在研究方法上相互借鉴,合在一起进行介绍和学习,不仅节约时间,还有助于学生分析、比较和综合能力的培养。基于上述考虑,本书将动物细胞工程和植物细胞工程综合起来编写。

本书内容主要分为三部分:第一篇介绍细胞工程的基本技术基础,也就是动物细胞工程和植物细胞工程都需要的基本技术,包括细胞培养的基本设施、基本条件、基本方法、基本技术等;第二篇介绍动物细胞工程,包括细胞培养、细胞融合与单克隆抗体、胚胎工程、干细胞与组织工程、核移植技术与动物克隆、转基因动物与动物生物反应器、动物染色体工程等内容;第三篇介绍植物细胞工程,包括植物组织培养、植物的快速繁殖与植物脱毒、体外单倍体诱导与单倍体育种、植物胚胎培养、体细胞胚胎发生和人工种子、原生质体融合、植物染色体工程、植物转基因技术等。

本书的编写力求突出三个特色。

一是内容处理上既要考虑到动物细胞工程与植物细胞工程的相通性与综合性,又要承认它们的特殊性。它们在理论基础和技术基础上有许多相同或相似的地方,但是由于动物细胞和植物细胞在结构上的差异,使得研究技术与手段在许多方面又有着截然不同的不同,教条地生拉硬靠在一起就会造成不伦不类。第一篇主要体现了它们的一致性,第二和第三篇体现其特殊性。

二是内容编写上既考虑到教材的基础性,又考虑到学科发展的先进性。细胞工程是本科生的专业课程,需要提供给学生最基本的知识和技术,但又是发展最为迅速的学科,知识更新周期短,技术创新速度快。编写中选取基本的技术和原理进行系统的介绍,对学科的最新发展力求有所反映,在思考题中特别要求学生学科进展要及时追踪,还向学生推荐了相关网站,提供了本书的专门网页,使学生能得到最新的资料,获得及时的帮助。书中设有专门的实验进行技术训练和研究实践,帮助学生加深对学科知识的理解,掌握实验技术的要领,培养创新意识和创新能力。

三是内容设置上既考虑到教材的理论性和系统性,又考虑到本教材的特殊性和实用性。细胞工程是在学习生物化学、细胞生物学、胚胎学和发育生物学等课程的基础上开设的,因此,没有必要将这些课程内容进行全面复述。本书仅是在每篇开篇集中介绍与本部分紧密相关的基础理论知识,使学习者对研究与实验的原理有比较清晰的了解和比较全面的把握。细胞工程毕竟是一个应用性学科,是一门技术性很

强的课程,大部分内容是对技术的描述和方法的介绍。我们在教学实践中体会到,实验内容紧跟教材内容安排比较实用,可以减少大量的内容重复,有助于学生对所学内容从理论到技术有比较及时和全面的了解。

本书编写期间得到了不少同事和朋友的关心和帮助。科学出版社和山东师范大学及各位作者所在学校给予了很大的支持,参阅了国内外同行的大量资料,在此一并致谢。本书出版后得到了普遍好评,全国 30 多所高校先后选作教材,2008 年获评山东省高等学校优秀教材一等奖,先后入选普通高等教育“十一五”和“十二五”国家级规划教材。本次再版广泛听取了使用学校师生的意见,结合学科的最新进展进行了修订。由于作者水平所限,加上本书涉及范围较广,学科发展快,定有不少疏漏及错误,敬请各位读者不吝赐教,批评指正。

安利国

2015 年 12 月

目 录

第三版前言

绪论 / 1

0.1 细胞工程简介 / 1

0.2 细胞工程的发展史 / 2

第一篇 细胞工程的技术基础

第1章 细胞培养的设施与基本条件 / 7

1.1 细胞工程实验室的设置 / 7

1.1.1 动物细胞工程实验室的设置 / 7

1.1.2 植物细胞工程实验室的设置 / 8

1.2 常用仪器与设备 / 8

1.2.1 动物与植物细胞工程实验室通用的仪器 设备 / 8

1.2.2 动物细胞工程实验室的常用仪器设备 / 12

1.2.3 植物细胞工程实验室的常用仪器设备 / 14

1.3 实验室的生物安全 / 14

第2章 清洗与消毒 / 16

2.1 清洗 / 16

2.1.1 玻璃器皿的清洗 / 16

2.1.2 胶塞的清洗 / 17

2.1.3 塑料制品的清洗 / 17

2.1.4 G₆除菌滤器的清洗 / 17

2.1.5 不锈钢除菌滤器的清洗 / 17

2.1.6 包装 / 17

2.2 消毒 / 18

2.2.1 物理灭菌法 / 18

2.2.2 化学消毒法 / 19

实验1 器械的清洗与消毒 / 20

第3章 细胞培养的基本方法 / 22

3.1 无菌操作技术 / 22

3.1.1 实验器具和材料的准备 / 22

3.1.2 培养室和超净台的消毒 / 22

3.1.3 洗手和着装 / 23

3.1.4 无菌培养操作 / 23

3.2 培养细胞的观察 / 23

3.2.1 相差显微镜观察 / 24

3.2.2 培养细胞的观察 / 25

3.3 细胞培养中常用的染色方法 / 26

3.3.1 活体染色 / 26

3.3.2 染料排除检测法 / 26

3.4 细胞培养的污染和检测 / 27

3.4.1 污染途径 / 27

3.4.2 污染对培养细胞的影响及检测 / 28

3.4.3 污染的预防 / 29

3.4.4 污染的排除 / 29

第二篇 动物细胞工程

第4章 细胞培养 / 33

4.1 培养细胞的生物学特征 / 34

4.1.1 体外培养细胞的分型 / 34

4.1.2 培养细胞的生长特点 / 35

4.1.3 培养细胞的生长与增殖过程 / 35

4.1.4 培养细胞的遗传学特征 / 37

4.1.5 体内外细胞的差异及培养细胞的分化 / 37

4.2 细胞培养液 / 38

4.2.1 细胞培养的常用液体 / 38

4.2.2 培养基 / 39

4.3 细胞的基本培养技术 / 45

4.3.1 原代培养 / 46

4.3.2 传代培养 / 49

4.3.3 常用培养技术 / 50

4.4 细胞系和细胞株的建立 / 58

4.4.1 细胞系和细胞株的种类 / 58

4.4.2 建立细胞系(或株)的要求 / 59

4.4.3 细胞系和细胞株的鉴定 / 59

4.5 细胞的冻存、复苏和运输 / 60

4.5.1 细胞的冻存 / 60

- 4.5.2 细胞的复苏 / 60
- 4.5.3 细胞的运输 / 60
- 实验2 细胞培养液的配制 / 62
- 实验3 原代细胞培养 / 63
- 实验4 培养细胞的增殖及活力测定 / 65
- 实验5 细胞的传代培养 / 67
- 实验6 细胞的冻存和复苏 / 68
- 第5章 细胞融合与单克隆抗体 / 69**
 - 5.1 单克隆抗体技术 / 70
 - 5.1.1 单克隆抗体技术的原理 / 70
 - 5.1.2 杂交瘤制备 / 71
 - 5.1.3 单克隆抗体的大量制备 / 77
 - 5.2 人源性单克隆抗体制备 / 78
 - 5.2.1 EB病毒转化技术 / 78
 - 5.2.2 细胞工程单克隆抗体技术 / 79
 - 5.2.3 人单抗制备技术的发展 / 82
 - 5.3 单克隆抗体在医学上的应用 / 84
 - 5.3.1 单克隆抗体靶向制剂 / 84
 - 5.3.2 单克隆抗体在肿瘤诊断与治疗中的应用 / 85
- 实验7 动物细胞融合 / 87
- 第6章 胚胎工程 / 88**
 - 6.1 胚胎发育的基本过程和机制 / 88
 - 6.1.1 胚胎发育的基本过程 / 89
 - 6.1.2 胚胎发育的基本机制 / 93
 - 6.2 体外受精 / 96
 - 6.2.1 体外受精的研究历史 / 96
 - 6.2.2 体外受精技术 / 96
 - 6.3 胚胎移植技术 / 98
 - 6.3.1 胚胎移植的研究历史 / 98
 - 6.3.2 胚胎移植技术 / 99
 - 6.4 胚胎分割技术 / 100
 - 6.4.1 胚胎分割的方法 / 101
 - 6.4.2 分割胚的培养 / 101
 - 6.4.3 胚胎分割目前存在的问题和发展前景 / 102
 - 6.5 早期胚胎的体外培养 / 102
 - 6.5.1 胚胎的发育阻滞 / 102
 - 6.5.2 克服胚胎发育阻滞的方法 / 103
 - 6.6 胚胎冷冻保存技术 / 104
 - 6.6.1 抗冻保护剂和冷冻溶液 / 104
 - 6.6.2 胚胎的冷冻方法 / 104
 - 6.7 动物的性别控制 / 105
 - 6.7.1 动物的性别决定 / 105
 - 6.7.2 性别控制的方法与技术 / 106
 - 6.7.3 性别控制的意义 / 109
- 实验8 哺乳动物体外受精和早期胚胎的体外培养 / 111
- 第7章 干细胞与组织工程 / 113**
 - 7.1 胚胎干细胞 / 114
 - 7.1.1 胚胎干细胞的研究概况 / 114
 - 7.1.2 胚胎干细胞的生物学特性 / 114
 - 7.1.3 胚胎干细胞的建系 / 115
 - 7.1.4 ES细胞的鉴定 / 116
 - 7.1.5 ES细胞的应用前景及面临的难题 / 117
 - 7.2 成体干细胞 / 118
 - 7.2.1 造血干细胞 / 118
 - 7.2.2 神经干细胞 / 118
 - 7.2.3 胰岛干细胞 / 119
 - 7.2.4 皮肤干细胞 / 119
 - 7.3 组织工程 / 119
 - 7.3.1 组织工程化皮肤 / 119
 - 7.3.2 组织工程化骨骼 / 120
 - 7.3.3 组织工程化血管 / 120
 - 7.3.4 组织工程化管状器官 / 120
 - 7.3.5 组织工程化腺体器官 / 120
- 第8章 核移植技术与动物克隆 / 122**
 - 8.1 核移植技术 / 122
 - 8.1.1 核移植技术的类型 / 122
 - 8.1.2 核移植技术的一般操作程序 / 123
 - 8.2 核移植技术的应用 / 124
 - 8.2.1 核移植技术的应用 / 124
 - 8.2.2 核移植技术存在的问题 / 125
- 实验9 鱼类核移植实验 / 126
- 实验10 哺乳类细胞核移植实验 / 127
- 第9章 转基因动物与动物生物反应器 / 128**
 - 9.1 转基因动物的培育技术 / 128
 - 9.1.1 基因显微注射法 / 129
 - 9.1.2 逆转录病毒感染法 / 129
 - 9.1.3 胚胎干细胞介导法 / 130
 - 9.1.4 精子载体导入法 / 130
 - 9.1.5 YAC介导的基因转移 / 130
 - 9.1.6 转基因细胞核移植技术 / 131

- 9.2 转基因动物的应用 / 131
 - 9.2.1 改良动物品种 / 131
 - 9.2.2 生物制药 / 131
 - 9.2.3 建立诊断和治疗人类疾病的动物模型 / 131
 - 9.2.4 生产可用于人体器官移植的动物器官 / 132
 - 9.2.5 基因治疗 / 132
 - 9.2.6 基因打靶 / 133
 - 9.2.7 转基因动物应用面临的问题 / 133
- 9.3 动物乳腺生物反应器 / 134
 - 9.3.1 动物乳腺生物反应器的制备 / 134
 - 9.3.2 动物乳腺生物反应器的优点 / 135
 - 9.3.3 动物乳腺生物反应器的应用 / 135
 - 9.3.4 动物乳腺生物反应器存在的问题 / 136

实验 11 磷酸钙沉淀法转染细胞 / 138

实验 12 电穿孔和电融合技术 / 139

第 10 章 动物染色体工程 / 141

- 10.1 动物染色体倍性改造 / 141
 - 10.1.1 动物的多倍体育种 / 141
 - 10.1.2 动物的单倍体育种 / 144
- 10.2 动物染色体结构的改造 / 145
 - 10.2.1 染色体片段的删除和重排 / 145
 - 10.2.2 染色体的易位工程 / 146
- 10.3 人工染色体 / 146
 - 10.3.1 酵母人工染色体 / 146
 - 10.3.2 细菌人工染色体 / 147
 - 10.3.3 哺乳类人工染色体 / 147
 - 10.3.4 人工染色体的应用 / 147

推荐网址 / 149

第三篇 植物细胞工程

第 11 章 植物组织培养 / 153

- 11.1 植物组织培养的理论基础 / 154
 - 11.1.1 植物的无性繁殖 / 154
 - 11.1.2 植物细胞全能性理论 / 154
 - 11.1.3 植物细胞的脱分化和再分化 / 154
- 11.2 植物组织培养 / 156
 - 11.2.1 实验材料的清洗和消毒 / 157
 - 11.2.2 培养基 / 158
 - 11.2.3 接种 / 163
 - 11.2.4 种质保存 / 163
 - 11.2.5 植物细胞的大规模培养技术 / 165

实验 13 植物组织培养培养基的配制 / 169

实验 14 植物细胞的悬浮培养及其次生代谢产物的生产 / 171

实验 15 植物叶片的脱分化和再分化培养 / 173

第 12 章 植物的快速繁殖 / 174

- 12.1 植物快速无性繁殖 / 174
- 12.2 植物脱毒 / 175
- 12.3 植物快速繁殖和试管苗工厂化生产中的注意事项 / 176

实验 16 月季快繁 / 178

第 13 章 体外单倍体诱导与单倍体育种 / 179

- 13.1 植物小孢子发育过程 / 179
- 13.2 花药和花粉培养 / 180
 - 13.2.1 花药培养 / 180
 - 13.2.2 花粉培养 / 180
 - 13.2.3 小孢子母细胞培养 / 181
- 13.3 花药与花粉培养方法 / 182
 - 13.3.1 材料的选择 / 182
 - 13.3.2 材料的预处理 / 183
 - 13.3.3 培养基 / 184
 - 13.3.4 接种与再生植株的培育 / 185
- 13.4 单倍体育种在生产实践中的应用 / 186

第 14 章 植物胚胎培养 / 188

- 14.1 胚培养 / 188
 - 14.1.1 成熟胚培养 / 188
 - 14.1.2 幼胚培养 / 188
 - 14.1.3 胚培养的意义 / 189
- 14.2 子房培养 / 190
- 14.3 被子植物胚乳培养 / 191
 - 14.3.1 植物胚乳的发育特性 / 191
 - 14.3.2 影响胚乳培养的因素 / 191
 - 14.3.3 胚乳培养的意义 / 191

实验 17 植物幼胚培养 / 192

实验 18 玉米成熟胚的培养 / 193

第 15 章 体细胞胚胎发生和人工种子 / 194

- 15.1 愈伤组织与体细胞胚胎发生 / 194
 - 15.1.1 愈伤组织的诱导 / 194
 - 15.1.2 愈伤组织器官的发生 / 195
- 15.2 人工种子 / 195

15.2.1	人工种子的制备 / 196	17.1.3	植物的单倍体育种 / 211
15.2.2	人工种子的研究现状 / 198	17.2	植物染色体非整倍体改造 / 213
第 16 章 植物原生质体融合技术 / 199		17.2.1	染色体的削减 / 213
16.1	植物原生质体的制备 / 199	17.2.2	染色体的添加 / 214
16.1.1	植物原生质体的分离 / 199	第 18 章 植物转基因技术 / 216	
16.1.2	影响植物原生质体数量和活力的因素 / 200	18.1	植物基因转化技术 / 217
16.1.3	植物原生质体的纯化 / 200	18.1.1	农杆菌介导转化法 / 217
16.1.4	植物原生质体的培养方法 / 201	18.1.2	基因枪介导转化法 / 218
16.2	植物原生质体的融合 / 201	18.2	转基因植物 / 219
16.2.1	植物原生质体的融合技术 / 201	18.2.1	植物抗虫基因工程 / 220
16.2.2	融合体 / 202	18.2.2	植物抗病基因工程 / 220
16.3	杂种细胞的筛选 / 203	18.2.3	植物抗逆基因工程 / 220
16.3.1	遗传互补选择法 / 203	18.2.4	植物品质改良的基因工程 / 220
16.3.2	可见标记法 / 203	18.2.5	植物叶绿体基因工程 / 220
16.4	体细胞杂种的鉴定 / 203	18.2.6	植物生物反应器 / 220
16.5	体细胞融合的意义 / 204	实验 20 土壤农杆菌的转化实验 / 222	
实验 19 植物体细胞原生质体的制备及融合 / 205		推荐网址 / 223	
第 17 章 植物染色体工程 / 207		参考文献 / 224	
17.1	植物染色体倍性改造 / 207	附录 / 229	
17.1.1	染色体加倍技术 / 207	英文专业名词索引 / 234	
17.1.2	植物的多倍体育种 / 209		

绪 论

提 要

本章对细胞工程的主要研究内容和技术进行了简要介绍,对细胞工程的发展历史进行了简要回顾。细胞工程是在细胞学的研究基础上发展起来的,其操作对象是细胞或组织,基本技术是细胞与组织培养。细胞工程与其他生物技术密切配合,为其他生物技术提供了基础和平台。

在人类告别 20 世纪步入 21 世纪的近 10 年的时间里,生命科学发展异常迅猛,取得了一个又一个令人瞩目的成就,震动着世界,推动着科学的进步,促进着经济的发展,影响着社会的进程,成为新世纪发展最快的领域。在生命科学的这些伟大成就中,细胞工程(cell engineering)所作出的贡献极为突出,克隆动物、干细胞、生物反应器等就是细胞工程的典型结晶。细胞是生命活动的最基本单位,为各种基因的表达和产物的合成提供了基础和载体。基因工程中基因的表达,微生物工程中工程菌的构建,酶工程、生化工程和蛋白质工程中的蛋白质的合成等都离不开细胞工程。从某种意义上来说,基因工程是现代生物技术的核心,而细胞工程则是它的基础和公用平台,基因工程与细胞工程的结合决定着生物技术的发展。

0.1 细胞工程简介

细胞工程是按照一定的设计方案,通过在细胞、亚细胞或组织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生物工程。细胞工程所涉及的范围很广,按生物类型可以分为动物细胞工程、植物细胞工程和微生物细胞工程,按实验操作对象可以分为细胞与组织培养、细胞融合、细胞核移植、染色体操作、转基因生物等。以细胞工程为基础,发展派生出了不少以工程冠名的新领域,如组织工程、胚胎工程、染色体工程等。

1. 细胞与组织培养

细胞培养(cell culture)和组织培养(tissue culture)都属于体外培养(*in vitro* culture),是指生物细胞和组织在离体条件下的生长和增殖。细胞的离体培养称为细胞培养,组织的离体培养称为组织培养。细胞与组织培养技术是细胞工程的最基本技术,细胞融合、细胞核移植、染色体工程、转基因生物、胚胎工程等细胞工程技术都离不开细胞或组织培养,近年来发展起来的组织工程和生物反应器就是在细胞与组织培养技术上直接发展起来的。

2. 细胞融合

细胞融合(cell fusion)又称细胞杂交(cell hybridization),是指两个或两个以上的细胞融合形成一个细胞的过程。在自然情况下细胞发生融合的现象称为自然融合。用人工方法使细胞间发生融合称为人工诱导融合。细胞融合的范围很广,在不同种类之间,甚至动物与植物的细胞之间都能发生融合,成为研究细胞、遗传、免疫、药物和新品种培育的重要手段。利用细胞融合技术而发展起来的单克隆抗体技术,已成功地应用到了基础生命科学研究和医药生产的各个领域,极大地促进了生命科学的发展,创造了极为可观的经济效益,是应用最为成功的生物技术之一。

3. 细胞核移植

细胞核移植(nuclear transplantation)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

的核与质重组,形成杂合细胞。克隆动物“多莉”羊的诞生使细胞核移植技术引起了全世界的关注。

4. 染色体工程

染色体工程(chromosome engineering)是把单个的染色体或染色体组转入或移出受体细胞,从而形成新的染色体组合和遗传构成。该技术可以广泛应用于优良品种的培育,如多倍体育种已经成为很常规的育种技术。近年来发展起来的人工染色体技术为基因组研究、基因转导和基因治疗提供了重要手段和途径。

5. 胚胎工程

胚胎工程(embryonic engineering)是以生殖细胞和胚胎细胞为对象进行的细胞工程操作,主要技术包括体外受精、胚胎移植、胚胎切割等。它在畜牧业生产上已经得到广泛的推广应用,成为常规的畜牧优良品种繁育技术。

6. 干细胞与组织工程

干细胞(stem cell)是动物体内具有分化潜能、并能自我更新的细胞,分为胚胎干细胞和组织干细胞。胚胎干细胞来自囊胚期的内细胞团,属于全能干细胞,每个细胞都可以发育为一个完整个体。组织干细胞存在于成体组织中,数量很少,属于单能或多能干细胞,可以定向分化为一种或几种不同的组织。由于干细胞在体外可以诱导分化为不同的组织,为临床移植和细胞治疗带来了希望。骨髓和皮肤干细胞早已应用到了临床,挽救了无数的生命,改变了无数人的生存质量。神经干细胞和胰岛干细胞即将走上临床。组织工程是在干细胞基础上发展起来的,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了人工软骨、皮肤等多种组织。

在植物中类似动物的干细胞是胚性细胞(embryogenic cell),包括合子与早期胚胎细胞、顶端分生组织中的胚性细胞、成熟器官中遗留的胚性细胞。合子、早期胚胎细胞和茎端分生组织的胚性细胞与动物的胚胎干细胞相似,可以分化形成各种组织和器官。根端分生组织的胚性细胞、成熟器官中遗留的胚性细胞则与动物的组织干细胞相似,只能分化为特定的组织,如根端分生组织的胚性细胞只能分化为根。

7. 转基因生物与生物反应器

(1) 转基因动物

转基因动物(transgenic animal)是通过基因工程技术将外源的目的基因导入生殖细胞或早期胚胎,并整合到受体细胞的基因组中,经发育形成所有细胞都包含目的基因的动物个体。将目的基因在器官或组织中进行特异性高表达的转基因动物称为动物生物反应器(animal bioreactor)。目前,研究较多的有乳腺生物反应器、血液生物反应器和膀胱生物反应器等。其中,乳腺生物反应器最为引人注目,已经开始进入产业化。

(2) 转基因植物

转基因植物(transgenic plant)的制备比转基因动物相对简单。通过基因工程技术将外源的目的基因导入植物细胞后直接进行诱导培养就可以再生出转基因植株。当这些转基因植株开花结果时,所改变的遗传性状就可以通过种子遗传给下一代植株。转基因棉花、大豆、油菜和玉米等已经进行了大面积的种植。我国转基因 Bt 抗虫棉的推广已取得了巨大的成功,使农药的使用量减少了 70%~80%,大幅度降低了生产成本,还减少了环境污染。能够生产某些重要蛋白质和次生代谢产物的转基因植物称为植物生物反应器。目前,研究最多的是生产抗体和疫苗的植物生物反应器(plant bioreactor)。

0.2 细胞工程的发展史

1. 细胞与组织培养

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。

自从 1839 年施旺(Schwann)和施莱登(Schleiden)建立了细胞学说后,细胞学研究有了飞速发展。Hertwig 和 Strassburger 分别于 1876 年和 1884 年在动物和植物中观察到了受精和精卵细胞融合现象。Flamming 于 1882 年在动物细胞中发现了有丝分裂,Strassburger 接着发现了植物的有丝分裂。Van Beneden 和 Strassburger 分别于 1883 年和 1886 年在动物和植物细胞中发现了减数分裂。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 提出了细胞全能学说 (cell totipotency), 并开展了植物的细胞和组织培养试验, 但受条件所限当时没有成功。经过半个世纪的不懈努力, 直到 1958 年 Steward 用胡萝卜的韧皮部组织经诱导培养成功获得了再生植株。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。

动物的组织培养技术最早由 Harrison 于 1907 年创立。当时他的主要目的是想通过神经组织的体外培养弄清神经纤维的起源问题, 设计了悬滴培养法并建立起一套无菌操作技术, 在体外培养神经细胞获得成功, 并观察到了神经纤维发生的动态过程。后来, 在培养基和培养方法上作了大量的改进与创新, 动物细胞培养技术不断完善。以细胞培养为基础发展起来的胚胎工程、干细胞和组织工程已成为生物技术中最具活力的领域, 细胞的大规模培养技术也取得很大进展。

2. 细胞融合

尽管细胞培养是细胞工程中非常重要的技术, 但也仅仅是为细胞工程的诞生奠定了基础。真正意义上的细胞工程应该是从细胞融合开始, 因为细胞融合是按照人们的设计对细胞进行工程操作, 并建构新的细胞。早在 19 世纪上半叶, 人们就在多种生物中发现了多核现象, 并推测多核细胞是由单个细胞彼此融合而形成的。然而, 用实验的方法直接实现细胞的融合则是在细胞培养技术建立后。Okata 于 1962 年发现仙台病毒 (Sendai virus) 可诱发艾氏腹水瘤细胞融合成多核细胞体, 为动物细胞融合技术的创立做了奠基性的工作, 直到今天该方法仍被应用。植物和微生物的原生质体融合技术是在动物细胞融合技术的基础上发展起来的, 迄今为止, 人们已经进行了大量的动物、植物和微生物的细胞融合, 包括种内、种间、属间、科间, 甚至动、植物间细胞的融合, 培育出了许多新品种, 创造了极大的经济价值。其中, 单克隆抗体技术是细胞融合中最成功的典范。1975 年 Cesar Milstein 与 Geoger Kohler 合作, 将羊红细胞免疫过的小鼠脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合, 得到了既能在体外无限繁殖又能产生特异性抗体的杂交瘤细胞, 导致了免疫学技术的革命, 他们二人也因此获得了诺贝尔医学及生理学奖。

3. 细胞核移植

细胞核移植的构想最早由德国胚胎学家 Spemann 于 1938 年提出, 他认为早期胚胎细胞具有高度的分化潜力, 将胚胎的细胞核移植到去核卵母细胞中可以发育为新的胚胎。1952 年 Briggs 和 Kings 将非洲豹蛙囊胚的细胞核移入去核的卵母细胞中, 获得了非洲豹蛙的胚胎克隆后代, 证实了 Spemann 的伟大设想。1962 年 Gurden 将南非爪蟾蝌蚪期肠上皮细胞核移植到被紫外线破坏了细胞核的卵母细胞内, 得到了发育正常的个体。哺乳动物的胚胎细胞核的移植实验开始于 1975 年 Bromhall 在家兔上所做的工作, 其后相继获得了小鼠、绵羊、牛、家兔、山羊和猪的胚胎细胞核克隆后代。1997 年“多莉”羊的诞生标志着哺乳动物的体细胞核克隆时代的到来, 小鼠、牛、猪、骡子等许多动物都获得了体细胞的克隆后代。

4. 转基因生物

20 世纪 70 年代中期, 基因重组技术与细胞工程技术的结合, 使细胞工程发展到了一个新的阶段, 产生了转基因动物和转基因植物。1974 年, Jaenisch 和 Mintz 首次报道向小鼠囊胚注射 SV40 DNA 后, 发育成的小鼠的部分组织中检测到了 SV40 的 DNA 序列, 但是, 这还不是真正意义上的转基因动物。第一只转基因动物是 Gordon 通过向小鼠的单细胞胚胎的原核注射纯化的 DNA 后获得的。1983 年 Palmiter 和 Brinster 将大鼠生长激素基因转入小鼠, 生产出生长速度极快的超级小白鼠 (硕鼠)。在此后的几年里, 转基因动物的研究以改进经济性状为目标, 兔、羊、猪、牛、鸡和鱼等转基因动物陆续问世。除了转基因鱼外, 多数转基因动物并没有达到预期目标。这一时期, 乳腺生物反应器的研究却取得明显进展。在 Gordon 于 1987 年获得分泌组织纤溶酶原激活因子 tPA 的转基因小鼠以后的数年内, 转基因羊、猪、牛的乳腺生物反应器便相继研究成功, 利用乳腺生物反应器生产出了多种生物药物, 如凝血因子 IX、凝血因子 XIII、抗胰蛋白酶、tPA、红细胞生成素 (EPO) 等。动物克隆及干细胞技术与转基因动物技术相结合, 大大加快了动物生物反应器的研究与应用进程, 显示了极为诱人的前景。

1973 年, 农杆菌 Ti 质粒的发现为植物的基因转导提供了方便的工具, 从此, 转基因植物的研究取得了飞速发展, 多种抗虫、抗除草剂转基因植物相继问世, 利用植物生物反应器生产的药物、色素、食品添加剂、酶、农药等次生物质和活性物质已经达 300 多种。

细胞工程是一个非常年轻富有活力的学科, 从诞生到现在还不到 100 年的历史。细胞工程技术与其他

生物技术一起已经成为世界经济中最具活力的支柱性产业,产生了巨大的经济效益和社会影响。相信随着人们对生命科学认识的不断深入,细胞工程技术会得到更快的发展,在解决困扰人类的人口、资源与环境等重大问题上会有更大的作为。

思 考 题

1. 细胞工程是一个什么样的学科? 它的主要学科背景是什么?
2. 细胞工程在现代生物技术中处于何种地位?
3. 细胞工程的主要研究内容和研究技术有哪些?
4. 简述细胞工程的发展历史。在细胞工程的建立和发展中哪些工作起到了关键性的作用?
5. 追踪细胞工程研究与应用的最新进展,并预测其发展趋势。

第一篇

细胞工程的技术基础

第 1 章

细胞培养的设施与基本条件

提 要

本章主要介绍细胞工程实验室的设置及其所需的基本条件。

细胞工程实验室与其他一般实验室的主要区别在于,要求保持严格无菌环境,避免微生物及其他有害因素的影响。一般来讲,它应能进行六方面的工作:无菌操作、培养、制备、清洗、消毒灭菌处理和储藏。植物细胞工程实验室还有其特殊的设置,如具有光照条件的培养室、试管苗需要温室和移植驯化室等。

细胞工程实验室通用的仪器设备主要有超净工作台、二氧化碳培养箱、倒置显微镜、电热干燥箱、水纯化装置、低温冰箱、高压蒸汽消毒器等。

在进行细胞与组织的培养时,要注意实验室的生物安全,保证培养物不会对实验人员和环境造成污染,尤其是含有病原体的生物材料的培养。

生物体内的细胞可以通过机体的调节、代谢和保护等机制而使其营养、环境、生长条件、抵抗有害因子能力等方面处于最佳状况。而体外培养的细胞由于失去了对整体的依赖性,对实验室细胞培养的设施条件和人员素质提出了较高的要求。细胞培养是一项在体外长期进行的频繁操作工作,所用的培养基非常适合于微生物生长,所以预防培养细胞受到污染是细胞培养成功与否的关键。为了最大限度地创造既适合于细胞生长又可防止污染的环境,在培养过程中对细胞培养的设施、操作规程和检测方法等都制定了严格的规范要求。

1.1 细胞工程实验室的设置

1.1.1 动物细胞工程实验室的设置

动物细胞工程实验室要求严格保持无菌环境,避免微生物及其他有害因素的影响。一般来讲,它应能进行六方面的工作:无菌操作、培养、制备、清洗、消毒灭菌处理和储藏。各区最好分别设置于相连的各个房间,特别是无菌操作室最好能单独设置。如都安置在一大实验室内,则无菌操作区与清洗、消毒灭菌区应分别位于两端,而制备、储藏和培养区位于此两区之间。

1. 无菌操作室

无菌操作室是相对密封、防尘、防菌的工作空间,在结构和消毒方面都有其基本的要求。理想的无菌操作室应划分为更衣间、缓冲间及操作间三部分。更衣间供更换衣服、鞋子及穿戴帽子和口罩。缓冲间位于更衣间与操作间之间,目的是保证操作间的无菌环境,同时可放置离心机及某些必需的小型仪器。无菌操作间则专用于无菌操作(如细胞培养等),大小要适当,且顶部不宜过高,以保证紫外线的有效灭菌效果,墙壁光滑、无死角以便清洗和消毒。无菌操作间的空气消毒须用紫外灯,或者安装无臭氧紫外线消毒器或电子消毒灭菌器。无菌操作在超净工作台上进行。

2. 培养与观察室

本区对无菌的要求虽不如无菌操作区那样严格,但仍需清洁而无灰尘,因此也应在干扰少而非来往穿行的区域。孵育可在培养箱或可控制温度的温室中进行,后者费用较高,一般实验室多采用培养箱进行。

3. 制备室

在该区主要进行培养液及有关培养用液体等的制备。在使用天平、pH 计、磁力搅拌器等设备完成制