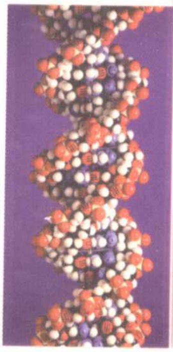
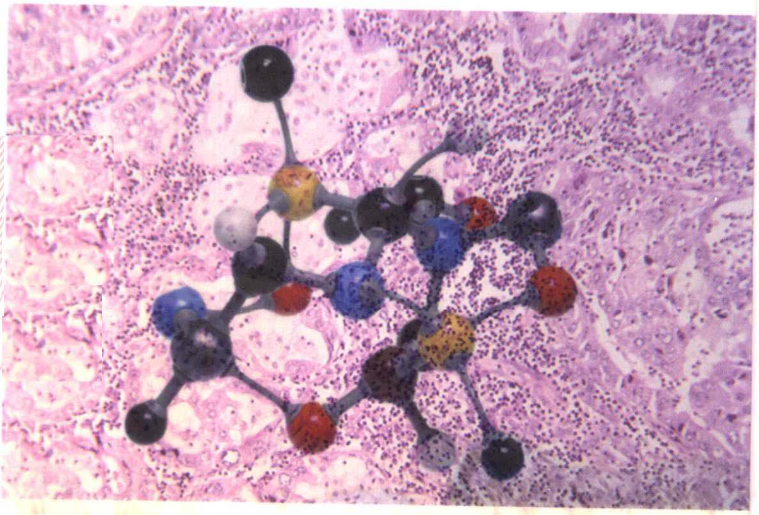
生命科学与生物技术及其产业化

河南省科学技术协会 编





中国科学技术出版社

生命科学与生物技术及其产业化

河南省科学技术协会 编

江苏工业学院图书馆
藏书章

中国科学技术出版社
·北京·

图书在版编目（CTP）数据

生命科学与生物技术及其产业化/河南省科学技术学会编．—北京：中国科学技术出版社，2002.12

ISBN 7-5046-3401-8

Ⅰ.生… Ⅱ.河… Ⅲ.①生命科学-文集 ②生物技术-文集 Ⅳ.Q1-0

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2002）第 087837 号

中国科学技术出版社出版

北京市海淀区中关村南大街 16 号　邮政编码：100081

电话：62179148　62173865

新华书店北京发行所发行　各地新华书店经售

北京市卫顺印刷厂印刷

*

开本：787 毫米 × 1092 毫米　1/16　印张：19.125　字数：480 千字

2002 年 12 月第 1 版　2002 年 12 月第 1 次印刷

印数：1—400 册　定价：108.00 元

（凡购买本社的图书，如有缺页、倒页、脱页者，本社发行部负责调换）

序

20世纪50年代至20世纪末，分子生物学的诞生及生物技术革命的蓬勃兴起，使生命科学在理论和技术上获得了一系列重大突破。进入21世纪，自然科学带头学科由物理学向生命科学转移，随之以基因工程、细胞工程为标志的生物技术也必将成为21世纪最具有远大发展前景的新兴学科和产业。生物技术与生命科学对社会、对经济、对人类本身的影响将越来越大。因此，世界各国，特别是发达国家都制定发展生物技术的战略、发展规划，投入巨资，凝聚人才，大力发展生命科学和生物技术，以抢占生物高科技领域制高点。面对国际生命科学、生物技术迅猛发展的态势，我国从战略高度，把生命技术列为高科技之首，制定了生物技术发展战略目标。按照“有所为、有所不为”的指导思想，集中人力、物力、财力，力争在某些生物技术领域有所突破，在世界生物技术制高点上占有一席之地，以实现中华民族的伟大复兴。这是我们广大科技工作者的历史责任，更是从根本上解决我国众多人口生存的重要条件。

我省是一个人口大省，同时也是一个农业大省，生命科学、生物技术与我省的经济、社会发展息息相关。河南省科学技术协会从战略发展的高度，审时度势，及时组织相关学会及部分地市科协举办生命科学、生物技术及其产业化学术研讨会，对迎接21世纪加入WTO后为生命科学及生物技术领域带来的机遇与挑战，促进我省生命科学及生物技术产业化，推动我省经济可持续发展，具有极为重要的意义。本次研讨会共收录论文70篇，涉及农业、医药、食品、工业等多个领域，代表了我省目前生命科学及生物技术领域发展的整体水平。这些研究成果为新的生物技术开发应用提供了重要的理论依据，具有相当高的学术价值，将有力地推动我省生命科学与生物技术学科的建设与发展，对促进我省生命科学、生物技术产业化也将具有重要的指导作用。希望通过《生命科学与生物技术及其产业化》的出版，使更多的科技工作者了解生物技术的基本内涵和特点，掌握生物技术的发展趋势，结合我省的实际，加强基础应用研究，开发新的产品，形成新的产业，高起点地参与到国际生物技术的竞争，为保证我省在生命科学、生物技术领域占有重要位置，促进我省科技、经济、社会全面发展，做出新的贡献！

二〇〇二年十二月二十日

目　　录

一、生命科学与生物技术

细胞工程……………………………………………………………… 陈　颖　李玉昌　(3)
跨膜蛋白酶及 ADAMTS 研究进展…………………………………… 林俊堂　李玉昌等 (17)
人工神经网络技术在肺癌诊断中的应用研究……………………… 吴逸明　吴拥军等 (32)
细胞凋亡、疾病与中药对凋亡的调控…………………………………… 苗明三　(36)
动物胚胎干细胞的生物学特性及应用进展………………………… 斛智莲　李德远等 (47)
转基因的分子生物学基础：机制，效率与策略……………………………… 张贵星　(51)
基因体外诱变技术及其应用………………………………………… 胡　渝　蒋培霞等 (57)
人肺癌脆性组胺酸三联体基因突变的研究………………………… 李春阳　吴逸明等 (61)
动物乳腺生物反应器的研究现状和前景…………………………… 斛智莲　贺伟强　(65)
细胞因子、黏附分子、一氧化氮在脑型疟发病中的作用………… 赵振宇　薛长贵等 (69)
肝脏再生因子及其作用……………………………………………………… 李玉昌　(74)
胎盘多肽抗肿瘤生物活性研究……………………………………… 韩绍印　丁兰平等 (77)
仙人掌酸性提取物降血糖作用研究………………………………… 徐　霞　许洪洋等 (81)
布鲁氏菌蛋白变应原的实验及应用研究…………………………… 郝宗宇　李恪梅等 (83)
河南省首例产志贺氏毒素 E.coli 0157:H7 感染的流行病学
　调查研究……………………………………………………………… 刘国华　马　宏等 (89)
来自腹泻合并急性肾衰病人疫区的 99 株 E.coli 0157：H7 的
　鉴定结果……………………………………………………………… 夏胜利　张　锦等 (92)
2001 年河南省食品中食源性致病菌污染状况研究 ………………… 廖兴广　张秀丽等 (96)
河南大别山有尾两栖动物资源……………………………………………… 陈晓红　(100)

二、生物医药及其产业化

生物医药产业现状与未来 ……………………………………………………… 王云龙　(105)
基因工程及转基因技术 ……………………………………………… 韩亚伟　徐存拴　(114)
分子生物学技术与中医药发展 ……………………………………… 苗明三　孙艳红等 (128)
生物学技术在中药研究中的应用 ……………………………………………… 苗明三　(132)
基因芯片技术在药物研究中的应用 ………………………………… 张秋荣　杜　斌等 (136)
抗肿瘤药物纳米制剂的研究进展 …………………………………… 张振中　杜　斌等 (138)
加入世界贸易组织后我国生物制药业面临的挑战和对策 ………… 赵永星　张培强等 (141)
发展有中国特色的生物医药事业 …………………………………… 陈再强　朴　宏等 (145)

三、生物技术在农业、林业、畜牧业中的应用

河南省农业植物生物技术研究进展 ……………………………………………… 铁双贵　(151)

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

烟草转儿丁质酶基因及烟叶中转基因成分的检测研究 ………… 时　焦　韩锦峰等 (153)
两个玉米矮花叶病显性互补抗病基因的发现和定位 ………… 吴建宇　丁俊强等 (158)
异戊烯基转移酶基因导入刺槐及转基因植株再生 ………………… 牛正田 (162)
马铃薯病毒的分子检测技术 ……………………………… 吴兴泉　吴祖建等 (165)
大白菜双单倍体高效育种技术研究及产业化 ……………… 原玉香　蒋武生等 (169)
食用百合组织培养与快速繁殖技术的研究 ………………… 蒋武生　原玉香等 (173)
转基因抗虫棉的研究及其关键配套技术 …………………… 贺桂仁　刘亚平等 (176)
DNA 分子标记在玉米遗传育种上的应用进展 ……………… 王金召　乔　旭等 (180)
林业生物技术与发展趋势 ……………………………………………… 丁向阳 (184)
浅议我省东亚飞蝗的可持续治理 ……………………………………… 吕国强 (188)
生物技术与植物保护 ………………………………………… 吴双平　张军成等 (192)
生物技术——新世纪林业的希望 …………………………… 牛正田　孔维鹤等 (195)
无公害饲料添加剂寡聚糖在畜牧生产中的应用 …………… 张世军　张和平等 (198)
国内外绿色生态饲料及添加剂的研究与开发现状 ………… 章练红　于聚然等 (203)
一个以氨基酸为选择剂离体下获得的超早抽穗小麦材料 ……… 李友勇　刘卫中 (207)
转基因抗虫棉的推广与应用前景 …………………………… 王继发　张喜姣 (210)
芝麻渍涝伤害与活性氧代谢的关系 ………………………… 刘华山　韩锦峰等 (213)
小麦新品系郑优 8 号与亲本遗传特点初步分析 …………… 马香花　周秋锋等 (216)
三十烷醇微乳剂应用研究 …………………………………… 王金山　王　伟等 (218)
周口地区适合用白僵菌防治榆兰金花虫 …………………… 刘中山　韩　风等 (220)
应用 ABT 生根粉及地膜覆盖法扦插石榴试验研究 ………… 李志华　刘志军等 (222)
调亏灌溉对冬小麦水分利用效率影响的生理机制 ………… 孟兆江　刘安能等 (224)
棉花灌水指标的试验研究 …………………………………… 刘祖贵　孙景生等 (228)
苗期土壤水分条件对秋黄瓜生长与前期产量的影响 ……… 王和洲　陈金平等 (233)
农田土壤污染与农产品质量研究 …………………………… 李洪亮　班宜民等 (238)
脱毒甘薯的产量潜力分析 …………………………………… 廖平安　靳文奎等 (242)

四、生物技术在发酵与食品工业中的应用

河南省生物技术产业现状与发展对策 …………………………………… 刘仲敏 (247)
生物技术在污水处理中的应用及其进展 …………………… 方　平　刘安邦等 (249)
烟叶优势微生物及其对霉菌的拮抗作用研究 ……………… 朱大恒　韩锦峰 (253)
国内外酒精工业现状及发展趋势 …………………………… 刘仲敏　慕　琦等 (256)
生物技术在食品工业中的应用 ……………………………… 沈祥坤　王瑞国 (260)
河南省实施燃料乙醇工程中的问题与措施 ……………………………… 李　魁 (263)
甲醇酵母表达系统 …………………………………………… 李春丽　李德远 (265)
酒精废糟液的综合治理与开发利用 ………………………… 刘　戈　刘安邦等 (268)
我省轻工食品领域生物技术产业化的现状与发展方向 …………………… 王岁楼 (270)
发展高活性干酵母工业生产选育菌种是关键 ……………… 马守章　陈德立 (273)
黑米乳酸发酵饮料的研制 …………………………………… 方　平　慕　琦等 (277)

发酵法生产 HMB …………………………………………………… 杜风光　刘　钱　(280)
饮料加工过程中的危害分析与关键点控制 ……………………… 原德树　沈祥坤　(281)
酱油的食品安全问题与预防措施 ……………………………………………… 周文凤　(286)
功能性食品——谷胱甘肽汤圆的开发和应用 …………………… 陈　希　陈书民等 (289)
低醇啤酒 ………………………………………………………………………… 王平诸　(293)

一、生命科学与生物技术

细 胞 工 程

陈　颖　李玉昌

（河南师范生命科学院　新乡　453002）

细胞工程是在细胞水平上的生物工程，是细胞生物学与遗传学及分子生物学的交叉领域，细胞工程能使不同种细胞的基因或基因组用人工方法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，并使超过种的转移成为可能。由此人们开始探索人工创造新的遗传型细胞的尝试。动植物体细胞的杂交试验是当前细胞工程中最活跃的领域，通过动物体细胞杂交而获得的单克隆抗体的技术的建立是细胞工程中最富成果性的工作之一。

具体的讲，细胞工程是以细胞为基本单位，在离体条件下进行培养，繁殖或人为地使细胞某些生物学特征按照人们的意愿发生改变，从而来改变生物品种和创造新品种或加速繁殖动植物个体，或获得有用物质的过程。

1. 细胞工程的主要技术

1.1　无菌操作的技术

在细胞工程的具体操作中所有的实验都要求在无菌的条件下进行。无菌室应定期用紫外线或化学试剂消毒，实验前后还应各消毒一次。无菌室外应有缓冲室，实验人员在此换鞋、更衣等，做好准备后方可进入无菌室。所有的操作都应在超净台上进行才能达到较高的无菌要求。其次，对生物材料进行彻底的消毒与除菌是实验成功的前提，实验所用的一切器械、器皿和药品都应进行灭菌和除菌。操作中实验人员应戴无菌手套。

1.2　细胞培养技术

细胞培养指动物、植物和微生物细胞在体外无菌条件的保存和生长。首先，取材和除菌，除淋巴细胞可直接抽取外，植物材料在取材后，动物材料在取材前都要用一定的化学试剂进行严格的表面清洗和消毒。有时还需借助某些特定的酶对材料进行预处理，以期得到分散生长的细胞。其次，根据各类细胞的特点配制细胞培养基，对培养基进行灭菌或除菌，最后将接种后的培养基放到培养室或培养箱中，提供各类细胞生长所需的最佳培养条件，如温度、光照、氧气及二氧化碳等。但细胞达到一定生物量时应及时收获或传代。

细胞培养的优点

1.2.1　研究的对象是活细胞。实验过程中根据要求始终保持细胞的活力，并可长时期地监控，检测甚至定量评估一部分活细胞的情况，其形态、结构和生命活动等，这一点是其他方法无法取代的。

1.2.2　研究的条件可以人为地控制，这也是另外的实验方法，如体内实验是难以比拟的。进行体外的细胞培养实验时，根据需要包括 pH、温度、O_2 张力、CO_2 张力等物理化学的条件，并且可能做到很精确以保持其相对的恒定。同样，也可以施加化学、物理和

生物等因素作为条件而进行实验、观察。这些因素可以处于严格控制之下。

1.2.3 研究的样本可以达到比较均一性。通过细胞培养一定的代数后，得到的细胞系可以达到均一性而使同一类型的细胞需要时，可采用克隆化等方法使细胞纯化。

1.2.4 研究的内容便于观察、检测和记录。可采用各种技术和方法来观察、检测和记录，充分地满足实验的要求。如通过倒置相差显微镜，电镜分析细胞的超微结构，同位素标记等。

1.2.5 研究的范围比较广泛，各种学科可利用细胞培养进行研究，可供实验的来源众多。

1.2.6 研究的费用相对经济。能提供在同一时期，条件相同，性状相似的实验样本。但是体外培养的组织或细胞与体内仍存在差异，特别是分化的问题。任何组织或细胞置于体外培养后，其细胞形态和功能都有会发生一定的改变。应把体外培养的细胞视作一种既保持动物体内原细胞一定的性状、结构和功能，又具有某些改变的特定细胞群体，而不能将之与体内的细胞完全等同。体外培养的细胞，尤其是反复传代，长期培养者，有可能发生染色体非二倍体改变等情况。

细胞培养是一种研究活组织和活细胞的良好方法，利用这一技术可进行多方面的研究。

(1) 细胞与细胞之间的相互作用：如黏着作用，接触抑制，密度抑制等。

(2) 细胞内部与细胞外部之间的作用：细胞对外界刺激的反应，药物对细胞的作用。

(3) 细胞内胞质的活动：如能量代谢及蛋白质的合成。

(4) 细胞质与细胞核之间的流动：如 RNA 自胞核至胞质的转移。

利用细胞培养的技术已生产出多种生物制品。如病毒疫苗、表皮生长因子及干扰素、白介素等生长因子或生物调节剂激素、单克隆抗体等。

1.3 细胞融合技术

两个或多个细胞相互接触后其细胞膜发生分子得排，导致细胞合并，染色体等遗传物质重组的过程为细胞融合。细胞融合是细胞工程的重要基本技术，其主要过程包括：①制备原生物体，由于微生物及植物细胞具坚硬的细胞壁，因此，通常需用酶将其壁降解，动物细胞则无此障碍。② 诱导细胞融合。两亲本细胞的悬浮液调制一定的细胞密度，按 1:1 混合后，逐渐滴入高浓度的聚乙二醇（PEG）诱导融合，或用电激的方法促进融合。③ 筛选染合细胞。将上述混合液移到特定的筛选培养基上，让杂合细胞有选择地生长，其他未融合细胞无法生长。借此获得具有双亲遗传特性的杂合细胞。

上述细胞培养技术，细胞融合技术及其他有关实验原理和技术的细节将在以下部分分述。

2. 微生物细胞工程

微生物是一个相当笼统的概念，既包括细菌、放线菌这样小的原核微生物，又涵盖菇类和霉菌等真核生物。由于微生物细胞结构简单，生长速度快，实验操作方便，有些微生物的遗传背景已经研究得相当深入，因此，微生物已在国民经济的不少领域，如抗生素与发酵工业、防污染与环境保护、节约资源与能源再生、灭虫害与农林发展等众多方面发挥了非常重要的作用。本单元从细胞工程的角度，概述通过原生质体融合的手段改造微生物

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

种性，创造新变种的途径与方法。

2.1 原核细胞的原生质融合

细菌是最典型的原核生物，它们都是单细胞生物。革兰阳性与革兰阴性细菌细胞壁成分有很大的差异，因此，决定了它们对溶菌酶的敏感性有很大差异。

溶菌酶广泛存在于动植物，微生物细胞及其分泌物中。它能特异性地切开肽聚糖中N-乙酰胞壁酸与N-乙酰葡萄糖胺之间的β-1，4-糖苷键，从而使革兰阳性菌的细胞壁溶解。在处理革兰阴性菌时，除了溶菌酶外，一般还要添加适量的EDTA（乙二胺四乙酸），才能除去它们的细胞壁，制得原生质体或原生质球。

革兰阴性菌细胞融合的主要过程：

分别培养带遗传标志的双亲本菌株至对数生长中期，此时细胞壁最容易被降解；

分别离心收集菌体，以高渗培养基制成菌悬液，以防止以下阶段原生质体破裂；

混合双亲本，加入适量溶菌酶，作用20~30min；

离心后的原生质体，用少量高渗培养基制成菌悬液；

加入10倍体积PEG（40%）促使原生质体凝集，融合；

数分钟后，加入适量高渗培养基稀释；

涂布于选择培养基进行筛选。

对于革兰阴性细菌而言，在加入溶菌酶数分钟后，应添加0.1mol/L $EDTANa_2$ 共同作用5~20min。

2.2 真菌的原生质体融合

真菌主要有单细胞的酵母类和大细胞菌丝真菌类。同样的，降解它们的细胞壁，制备原生质体是细胞融合的关键。

可在含有渗透压稳定剂的反应介质中加入消解酶进行酶解，也可用蜗牛酶进行处理。

真菌原生质体融合的要点与前述细胞融合类似，一般都以PEG为融合剂，在特异选择培养基上筛选融合子。但由于真菌一般都是单倍体，融合后，只有那些形成真正单倍重组体的融合子才能稳定传代。具有杂合双倍体和异核体的融合子遗传特性不稳定，尚需经多代考证才能最后断定是否为真正的杂合细胞。

3. 植物细胞工程

植物细胞工程是在细胞水平上对离体培养的器官，组织和细胞进行遗传操作，实现农作物和经济植物的品种改良、快速繁殖及有用代谢产物的生物合成等。植物细胞工程是建立在植物离体组织培养基础上的一种生物工程技术。

3.1 植物组织培养

在无菌条件下，将离体的植物器官、组织、细胞以及原生质体培养在人工配制的培养基上，给予适当的培养条件，使其长成完整的植株。

1920年德国植物生理学家Haberlandt提出，人们可以培养植物的体细胞成为人工胚，限于当时的技术和水平，培养未能成功。1934年美国植物生理学家White培养番茄的根，建立了活跃生长的无性繁殖系并能继代培养。1943年White提出了植物细胞全能性学说，使植物组织培养成为一门新兴学科。

植物组织培养经历以下5个阶段：

3.1.1　预备阶段

(1) 选择合适的外植体是本阶段的首要问题。外植体能被诱发产生无性增殖系的器官或组织切段，如一个芽，一个茎。外植体的选择一般以幼嫩的组织或器官为宜。

(2) 除去病原菌及杂菌。选择外观健康的外植体，尽可能除净外植体表面的各种微生物是成功进行植物组织培养的前提。

(3) 配制适宜的培养基。由于物种的不同，外植体的差异，组织培养的培养基多种多样，一般较高的生长素对细胞分裂素比值有利于诱导外植体产生愈伤组织；反之，促进胚芽和胚根的分化。

3.1.2　诱导去分化阶段：外植体是已分化或各种器官的切段。组织培养的第一步就是让这些器官切段去分化，使各细胞重新处于旺盛有丝分裂的分生状态，因此，培养基中应添加较高浓度的生长素类激素。

3.1.3　继代增殖阶段：愈伤组织长出后经过4~6周的迅速细胞分裂，原有培养基中的水分及营养成分大部分已耗失，细胞的有害代谢物已在培养基中积累，因此，必须进行移植，即继代增殖。

3.1.4　生根成芽阶段：愈伤组织只有经过重新分化才能形成胚状体，继而长成小植株。所谓胚状体是指在组织培养基中分化产生的具有芽端和根端类似合子胚的构造。光照是本阶段必备的外因。

3.1.5　移栽成活阶段：生长于人工照明玻璃瓶中的小苗，要适时移栽室外以利生长。移植时应能保证在适度的光、温、湿条件下进行。

3.2　植物细胞培养和次生代谢物和生产

植物中含有数量极为可观的次生代谢物质。据保守的估计，目前已发现的植物天然代谢物已超过2万种。然而植物生长缓慢，即使是大规模人工栽培仍然不能从根本上满足人类对经济植物日益增长的需求。1956年，Routier和Nickell就提出工业化培养植物细胞以提取其天然产物的大胆设想。1968年Reinhard等首先将这种设想转变为现实。以后分别培养植物细胞获取其中人参皂角苷和维斯纳精。目前世界最大批量工业化培养细胞（烟草细胞）已达到20t。我国连续拨款资助工业化培养红豆杉细胞生产抗肿瘤药物紫杉醇的研究，目前已达到60mg/L的世界先进水平。依靠植物将特殊物质转化为更有效的生理活性物质，被认为是植物细胞培养应用方面的一个最有希望的领域，它比用微生物和化学合成更容易实现某化合生化学结构的特性修饰，用希腊毛地黄悬浮培养，使其类固醇骨架的第12碳元素进行专一性的羟基化成为强心剂。

工业化植物细胞培养系统主要有两大类：悬浮细胞培养系统，适于大量快速地增殖细胞，但往往不利于次生物质的积累；固定化细胞培养系统，细胞生长缓慢而次生物质含量相对较高。

迄今，人类通过植物细胞培养获得的生物碱、维生素、色素、抗生素以及抗肿瘤药物等不下50多个大类，其中已有30多种次生物质的含量在人工培养时已达到或超过亲本植物的水平。

3.3　植物细胞原生质体融合及培养

植物远缘杂交育种中，由于杂交不亲和限制而难以成功，解决这一问题的方法即杂种胚培养，离体授精和授粉之外还可采用植物体细胞杂交技术——原生质体融合，原生质体

是去掉细胞壁的裸露植物细胞。它们无论来源如何都具有彼此融合的能力。

1960年英国学者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的工作，是植物组织培养的第二个突破。1972年Carlson首先报道了属间体细胞杂交成功，原生质体培养对于实现远缘细胞杂交和外源基因导入奠定了基础。

3.3.1 原生质体的融合

(1) 化学法诱导融合：化学法诱导融合一直是细胞融合的主要方法。尤其是PEG结合高钙、高pH诱导融合法已成为化学法诱导细胞融合的主流。PEG处理原生质体，只发生凝集现象。加入高钙、高pH溶液稀释后，紧挨着的原生质体间才出现大量的细胞融合。这是一种非选择性的融合，既可发生于同种细胞之间，也可能在异种细胞中出现，高浓度的PEG结合高钙、高pH溶液对原生质体有一定的毒性，因此，诱导融合的时间要适中。处理时间过短，融合频率降低；处理时间过长，则将因原生质体活力明显下降而导致融合失败。Jeloder近年介绍，以丙酸钙取代氧化钙作为融合剂，细胞融合频率和植板率都有明显提高，甚至超过了电激融合法。

(2) 物理法诱导融合：1979年Senda发明了微电极法诱导细胞融合。1981年Zimmermann等提出了改进的平行电极法。现介绍如下：

将双亲本原生质体以适当的溶液悬浮混合后，插入微电极，接通一定的交变电场。原生质体极化后顺着电场排列成紧密接触的珍珠串状。此时瞬间施以适当强度的电泳冲，则使原生质体质膜被击穿而发生融合。

这种操作实际上是供体与受体原生质体对等融合的方法。要筛选得到符合需要且能稳定传代的杂合细胞是相当难的。最近，能提出以X射线、伽马射线、纺锤体毒素或染色体缩剂等对供体原生质体进行前处理。轻剂量处理可造成染色体不同程度的丢失、失活、断裂和损伤，融合后实现仅有少数染色体甚至是DNA片段的转移；致死量处理后融合则可能产生没有供体方染色体的细胞质杂种。利用所谓的不对称融合方法，大大提高了融合体的生存率和可利用率。

经上述融合处理后再生的细胞株可分为：①亲本双方的细胞和细胞质都能融合为一体，发育成为完全的杂合植株，这种例子不多；②融合细胞由一方细胞核与另一方细胞质构成，可能发育为核质异源的植株，亲缘关系越远，某个亲本的染色体被丢失的现象越严重；③融合细胞由双方胞质及一方核或再附加少量他方染色体DNA片段构成；④原生质体融合后两个细胞核尚未融合时就过早地被新出现的细胞壁分开，以后它们各自分生长成嵌合植株。

截至1995年，世界上约有180种植物的原生质体培养再生植株取得成功。利用原生质体进行体细胞杂交也取得一些进展，由于远缘的体细胞杂种存在生殖障碍和遗传不稳定性，一般不能作为独立的育种方法存在，近年来原生质体不仅用于细胞杂交，而且更多的用于体细胞无性系变异和基因转化研究，成为遗传工程的一个重要组成部分。

3.4 单倍体植物的诱发与利用

单倍体生物指细胞中仅含一组染色体的个体。1924年Blakeslee等提出了在育种中培植利用单倍体生物，然后加倍获得正常二倍体植株的设想。其核心问题是单倍体植株的成功诱导与栽培。由于技术上的限制，1964年才由Guha等人在人工诱导毛叶曼陀罗单倍体株成功。到20世纪80年代末，世界范围的人工诱导单倍体株已达34科88属约250种，

其中约 1/5 是我国科学工作者建立的。

3.4.1 花药培养：通过花药培养，以加速后代纯合，快速组合多种性状，缩短育种进程，简化选育程序，已育成一大批高产优质品种在生产中得到应用。花药由花药壁和药粉囊构成。经过适量的诱导，花粉囊中的花粉（单倍体）可能去分分机时发育成单倍体胚或愈伤组织，最终形成花粉植株。由于花药中含有至今成分不明的水溶性“花药因子”只有当培养基中的“花药因子”积蓄到一定程度，添加外源激素才会奏效。因此，适当密植花药是必需的。在花药培养中双倍体植株所占百分比过高的问题仍未得到根本解决。

3.4.2 花粉培养：在花药培养时一些二倍性的药壁细胞亦形成愈伤组织，于是 1974 年 Nitsch 等首创用挤压法分离划分进行培养的方法。首先取出花药，进行预处理。然后用器械挤破花粉，制成花粉悬液，经过滤，离心，培养，但其成功率低。另一方面可能由于缺乏“花药因子”，花粉生长、发育欠佳所致，为克服上述缺点，1977 年 Sunderland 等提出了自然散开法收集花粉的方法。将花蕾或幼穗在 7℃冷处理两周后，让其在适当的液体培养基表面培养。待花药自然开裂散落出花粉后，离心收集花粉。

虽然以花粉或花粉培养单倍体植株的研究已取得长足的进展，但白化苗过多仍是亟待解决的问题。

3.4.3 未授粉子房或胚珠的培养：1976 年 Scan Noeum 首先从大麦的未授粉子房培养获得单倍体植株。该领域的工作目前开展的不多，但由于诱导出的植株大多是单倍体绿苗，因此，这可能是一个充满希望的发展方向。

胚珠培养：就是设法提供胚生长发育的合适内外环境，使这种幼小胚发育成种子或长成植株。优点：即使处于合子期的细胞也可离体培养成功，胚珠为发育中的幼胚提供了一个“母体环境”，培养技术比胚培养简化和容易得多，发育至球形胚以后的胚珠，较易培养成功，子房中存在两种细胞：性细胞和体细胞，它们都能产生胚状体，进而分化和发育成植株，可能产生来自于子房壁和胚组织的二倍体植株，和不源于胚囊内的卵细胞、助细胞、反足细胞或大孢子四分体等组织的单倍体植物。

3.4.4 杂交法获得单倍体植株：杂交，特别是远缘杂交，杂种胚在胚胎发育过程中往往会将一方亲本的染色体逐步排除，最终得到仅含一方染色体的单倍体植物。1970 年 Kasha 培育出了普通大麦的单倍体胚和植株，由本方法得出的单倍体胚长成的植株都是绿苗，这是本方法的突出优点。

3.4.5 单倍体培养物的加倍：我们之所以要得到单倍体培养物（愈伤组织、幼胚以及植株），其目的是为了对它们进行染色体加倍，从而获得纯合正常二倍体植物。在诱发单倍体植株的各阶段，都可用 0.2% ~ 0.4% 秋水仙素处理 24 ~ 48h，即可得到二倍体植株。

3.5 人工种子的研制

人工种子是一处含有植物胚状体或芽，营养成分、激素以及其他成分的人工胶囊。1978 年植物组织培养学家 Muralshige 在第四届国际植物组织细胞培养大会上提出的设想，由人工种皮、人工胚乳、胚状体三部分组成。人工种子的研制仍有一些关键技术尚未攻克，如人工种皮的性能尚不尽人意，胚状体如何让它处于健康的休眠状态，人工种子怎样做到既能延长其保存时间又不明显降低萌发率等。有理由相信，人类终将实现工业化生产植物种子。

4. 动物细胞工程

动物细胞工程是细胞工程的一个重要分支，它主要从细胞生物学和分子生物学的层次，根据人类的需要，一方面深入探索、改造生物遗传种性；另一方面应用工程技术的手段，大量培养细胞或动物本身，以期获得细胞或其代谢产物以及可供利用的动物。

动物细胞工程其研究对象可分为两大类：一类是体细胞工程，即淋巴细胞杂交瘤和抗体工程；另一类是生殖细胞和早期胚胎细胞工程或称之为发育工程或胚胎工程。

4.1 动物细胞培养法

4.1.1 细胞培养：无菌取出目的细胞所在组织，以培养液漂洗干净，用锋利无菌刀具切割多余部分，将所需组织切成小组织块支解离液离散细胞，低速离心洗涤细胞后，将目的细胞吸移培养瓶培养。

培养的主要方法：①微导管培养法；②微载体培养法；③微胶囊培养法

4.1.2 无血清培养：直至20世纪70年代初，才用塑料培养皿和含确定化学成分如盐、氨基酸和维生素的液体培养基取代早期的血浆凝块法。但大多数培养中仍有一定比例的成分不清楚的生物物质，如马血清、胎牛血清等。这样的培养基目前仍用于大多数常规的细胞培养工作中。但这些培养基对于确定某种特殊类型的细胞生长和分化的特殊需求是不适宜的。这样促进了无血清培养基的出现由基础培养基和替代血清的补充因子组成。它的使用，不仅为细胞的生长、繁殖，分化的调节和机制的研究提供了有力的工具，而且为现代生物技术奠定了基础。

4.1.3 培养物的传代：动物细胞具有接触抑制现象，因此在培养生长一定时期后，要进行传代培养。

4.1.4 培养物和长期保存：培养物的保存一般有两种方法：经典传代法和冷冻保存法。经典传代法：Carrel是经典传代法的创始人和杰出代表。这种方法使培养物始终处于活跃生长状态，但操作手续繁琐，维持费用较高。冷冻保存法有操作简单、保存期长的特点，如液氮保存法。

4.1.5 细胞组织培养污染的防治：一般性细菌污染可试用氨苄青霉素或链霉素除菌。若是霉菌应小心地铲除菌丝，在培养基中加制霉菌素。支原体感染比较棘手，即使以100mg/ml的卡那霉素处理后，也只能抑制其繁衍但不能根除。

细胞系株之间的交叉污染的防范有一点必须突出强调：在一个工作区内不能同时放置两种以上的细胞株，除非由于细胞融合等工作需要的暂时存放。两种细胞株不能共用培养器具，即使器具消毒后也是如此。

4.2 细胞融合

细胞融合现象最初是在动物细胞中发现的。20世纪50年代，日本学者用仙台病毒诱导了异种动物细胞的融合。到60年代，细胞融合技术很快发展起来。细胞融合的范围也扩展到了植物细胞和微生物细胞。到目前，属间，种间，科间甚至真菌，植物，动物界都取得了满意的结果。细胞融合的主要方法有以下3种。

4.2.1 病毒诱导的细胞融合：除仙台病毒诱导细胞融合外，副黏液病毒、天花病毒和疱疹病毒都可诱导细胞融合。

4.2.2 化学诱导融合：PEG诱导细胞融合，是诱导细胞融合的主要方法。

4.2.3　电激诱导：详见植物细胞工程。

4.3　体细胞工程即淋巴细胞杂交瘤和抗体工程

4.3.1　淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体：动物受到抗原刺激后可发生免疫反应，产生相应的抗体，这一职能是由B淋巴细胞来承担的。B淋巴细胞只能产生一种抗体，因此，要想获得大量纯一的抗体，就必须使一个B淋巴细胞大量增殖。1975年英国科学家Milestein和Kohlder开创了单克隆技术，解决了抗血清的异质性问题。由于在正常培养条件下，B淋巴细胞的寿命有限，使免疫动物中的每个产生抗体的B淋巴细胞与具有无限繁殖能力的骨髓瘤细胞进行融合产生杂种细胞，再从各种各样的杂种细胞混合物中，筛选出既能产生特殊的抗体，又能在组织培养条件下无限繁殖的杂种细胞，这种细胞称为杂交瘤。

杂交瘤技术最重要的优点是：可以从不纯的抗原分子中获得单克隆抗体，甚至在所需抗原仅占抗原混合物中极少比例的情况下，也能获得该抗原的单克隆抗体。

Mistein和Kohler创立的淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体，不仅在免疫学本身的各个方面起了根本性的变化，而且延伸到生命科学的全部领域中，使之得到了广泛而深入的应用。

4.3.2　抗体工程：目前单克隆抗体用于临床疾病治疗问题之一是由于其绝大多数来源于小鼠，对人体而言它是一种异体蛋白，会引起人体产生人抗鼠抗体（HAMA），若再过度使用小鼠单抗，HAMA便与小鼠单抗结合，不仅会中和单抗体使之失效，还会产生有害的过敏反应，因此，相应出现了抗体工程。它包括嵌合抗体，重构抗体，单链抗原结合区，单功能域抗体及全套抗体的研究，其主要目的使鼠源性抗体“人源化”。

（1）嵌合抗体：它应用DNA重组技术将鼠源单抗的可变区（V区）基因与人免疫球蛋白（1g）的恒定区（C区）基因相连接，构建成嵌合基因，导入宿主细胞进行表达，制成嵌合抗体，由于该抗体已“人源化”，其免疫原性已大为降低。在初期临床试验中，人源化嵌合抗体能够解决一些问题，且半衰期可以延长许多倍，但尚不能解决免疫原性问题，有的嵌合抗体仍引起免疫反应。

如用分泌抗人乙型脑炎病毒中和抗体的杂交瘤细胞作材料，构建成基因组文库，再用探针分别筛选重轻链的功能性可变区基因，分别插入带有人抗体重链恒定区基因和轻链恒定区基因的质粒中，构建成人鼠嵌合基因的重链基因和轻链基因，在脂质体和介导体下将嵌合的重链基因共转染骨髓细胞，经过选择培养基筛选，再用反向被动血凝抑制实验筛选出一株细胞，其抗体特异性比原抗体效价更高，有证据表明确属人-鼠嵌合抗体。

（2）重构抗体：它是将动物抗体中的高可变区（又称补体决定区），与人抗体相应的区域交换而重新构建抗体的补体决定区，以进一步“人源化”降低单抗的免疫原性。

（3）单链抗原结合蛋白：由一个短的人工设计的多肽接头接轻链V区的C末端与重链V区的N末端相联接，如果多肽接头设计合理，能保证β片层结构的正确构型，同时保留了如CDRS序列，则在大肠杆菌表达系统中可表达出具有抗原结合活性的融合蛋白，目前已构建近10种单链抗原结合蛋白。

（4）单功能域抗体：抗体是由轻重两条链的易变区基因装配而成，但单一重链VH区就已具有抗活性。有学者用PCR法扩增出了抗体的VH区基因，并克隆表达出大量的单功能域抗体，它克服了过去单克隆研制的繁琐程序，以其快速、多样与有效性预示着巨大的应用和商业价值。如构建了鼠抗人胰腺癌单克隆抗体PS-QR单链抗体可变区基因，并将

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com