

CELL ENGINEERING

细胞工程



罗立新 潘 力 郑穗平 编著



华南理工大学出版社

细胞工程

罗立新 潘 力 郑穗平 编著

华南理工大学出版社

·广州·

图书在版编目 (CIP) 数据

细胞工程/罗立新, 潘力, 郑穗平编著. —广州: 华南理工大学出版社, 2003.1
ISBN 7-5623-1893-X

I. 细… II. ①罗… ②潘… ③郑… III. 细胞工程 IV. Q813

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 102590 号

总发行: 华南理工大学出版社

(广州五山华南理工大学 17 号楼, 邮编 510640)

发行部电话: 020-87113487 87111048 (传真)

E-mail: scut202@scut.edu.cn

http: //www2.scut.edu.cn/press

责任编辑: 张 颖

印刷者: 广东农垦印刷厂

开 本: 787×1092 1/16 印张: 9.25 字数: 215 千

版 次: 2003 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

印 数: 1~3000 册

定 价: 16.00 元

版权所有 盗版必究

前 言

20 世纪生物学领域所取得的成就是前所未有的。作为生物工程主体之一的细胞工程, 由于它在技术和仪器设备上的要求不像基因工程那样复杂, 投资少, 而有利于广泛开展研究和推广应用, 因而有着重大的实践意义, 日益得到科学界的重视。细胞工程在应用研究方面取得的成果极大地促进了农业、畜牧业、食品工业和医药学的发展, 作为高新技术支柱之一的细胞工程技术必将对人类社会发展产生越来越大的影响。

本教材是为相关专业学生在修完生物化学、微生物学等课程之后选修而编写的, 目的在于使学生开阔视野、拓宽知识面、扩展工作的适应性, 希望通过学习之后, 能适应学科交叉渗透的发展形势。

本教材题材主要取自最新期刊文献, 在内容安排上, 既考虑到系统性, 又尽量避免与其他课程重复。例如, 关于微生物的细胞培养, 因学生已在微生物学和微生物工程工艺原理课程中学习过, 故未列入本教材; 而对于动物细胞工程中的“胚胎移植”和“雌核发育”技术, 考虑到与本专业有较大距离, 也不再列入。

本书可作为理工科院校生物工程专业、食品工程专业、制药工程专业和环境工程专业本科生的教材, 也可供从事细胞工程技术和实际工作者参考使用。

本书由罗立新主编。全书共分六章, 其中第一章、第四章、第五章、第六章由罗立新编写, 第三章由潘力编写, 第二章由郑穗平编写。限于编者的学识和水平, 书中难免有不妥或错误之处, 敬请读者不吝指正。

本书的出版得到本校教务处、食品与生物工程学院的大力支持, 杨汝德教授百忙中审稿并提出宝贵意见, 对此诚致谢意。

本书在编写过程中, 得到了陶顺、柴容等在插图制作和文字打印等方面的帮助, 在此一并致谢。

编 者

2002 年 9 月于广州华南理工大学

目 录

第一章 绪 论	(1)
第一节 生物工程在经济和社会发展中的地位和作用	(1)
一、生物工程的由来	(1)
二、生物工程的基本概念	(1)
三、生物工程的主要成就和发展动向	(2)
第二节 细胞工程的兴起和成就	(4)
一、细胞工程的兴起和基本内容	(4)
二、细胞工程的主要成就	(6)
第二章 植物细胞培养	(9)
第一节 植物组织培养的意义	(9)
一、初级及次级代谢物的生产	(9)
二、生物转化	(9)
三、天然植物食用色素的生产	(9)
第二节 植物组织培养研究的发展	(10)
第三节 组织培养中常用的术语	(12)
第四节 植物细胞培养实验室设备	(13)
一、无菌操作的工具	(13)
二、培养容器	(13)
三、培养室设备	(14)
第五节 植物细胞培养的培养基	(14)
一、植物细胞培养的培养基组成	(15)
二、培养基的制备	(16)
第六节 实验材料的选择和消毒	(19)
一、材料的选择	(19)
二、材料消毒	(19)
第七节 外植体的切取和培养	(21)
一、外植体的切取	(21)
二、培养方法	(21)
三、培养条件	(22)
第八节 愈伤组织培养	(24)
一、愈伤组织的诱导	(24)
二、愈伤组织的形成	(24)

三、愈伤组织的生长和形态	(26)
第九节 悬浮细胞培养	(27)
一、悬浮细胞的起始培养	(27)
二、植物细胞悬浮培养方法	(28)
第十节 单细胞培养	(30)
一、看护培养技术	(30)
二、平板培养技术	(30)
三、微室培养	(31)
四、影响细胞生长的因子	(31)
五、单细胞无性系之间的差异	(31)
第十一节 器官培养	(32)
一、离体根的培养	(32)
二、茎尖培养	(33)
三、叶培养	(33)
四、花药培养和单倍体育种	(34)
第十二节 胚胎培养	(35)
第三章 动物细胞培养	(36)
第一节 动物细胞培养概论	(36)
第二节 体外细胞培养	(38)
一、动物细胞在体内、外的差异和分化	(38)
二、动物细胞的特点	(40)
三、体外培养动物细胞类型	(40)
四、细胞周期	(42)
五、细胞生存条件	(43)
第三节 动物细胞培养液	(45)
一、培养液的成分及性质	(45)
二、培养液的类型	(47)
三、其他常用液	(60)
第四节 动物细胞及组织培养	(62)
一、取材	(62)
二、分离	(62)
三、细胞计数	(63)
四、常用培养法	(64)
五、细胞系与克隆株	(70)
六、细胞的常规检查	(72)
七、动物细胞的大规模培养	(74)
第四章 细胞融合	(77)
第一节 细胞融合技术的建立和发展	(77)

一、细胞融合的概念和意义	(77)
二、细胞融合技术的建立和发展	(77)
第二节 动物细胞融合和体细胞杂交	(79)
一、促进细胞融合的方法	(79)
二、杂种细胞的选择	(84)
三、细胞杂交的应用	(85)
四、杂交瘤技术	(87)
五、人的单克隆抗体	) 95)
六、杂交瘤细胞的冷冻保存	(97)
第三节 植物原生质体融合和体细胞杂交	(97)
一、原生质体的制备	(98)
二、原生质体的活力鉴定	(99)
三、原生质体的培养	(100)
四、原生质体融合	(102)
五、原生质体融合研究的扩展	(105)
第四节 微生物原生质体融合	(106)
一、微生物原生质体融合的意义	(106)
二、原生质体的制备与再生	(108)
三、原生质体融合与融合体的检出	(111)
四、分离与杂种性质测定	(113)
五、灭活原生质体融合	(113)
六、微生物原生质体融合的实例	(115)
七、微生物原生质体的应用	(118)
第五章 细胞拆合	(120)
第一节 细胞拆合技术与细胞重组	(120)
一、细胞拆合技术的发展概况	(120)
二、细胞拆合与重组的概念和意义	(120)
第二节 细胞拆合的方法	(121)
一、物理拆合法	(121)
二、化学拆合法	(122)
第三节 各种重组细胞的制备	(124)
一、去核细胞(胞质体)的制备	(124)
二、核体的制备	(125)
三、微核体的制备	(125)
四、植物细胞核和无核原生质体的制备	(126)
五、去核细胞的性质	(126)
第四节 细胞的重组及其技术关键	(127)
一、动物的细胞重组及细胞质杂交	(127)

二、植物的细胞重组·····	(127)
三、向动物细胞内引入微核体·····	(128)
四、微生物的细胞核与原生质体融合·····	(128)
五、细胞器与完整细胞的融合·····	(128)
六、生物大分子引入完整细胞·····	(129)
第六章 向细胞内引入高分子物质·····	(130)
第一节 红细胞血影法·····	(130)
一、红细胞血影的制备和封入物质·····	(130)
二、红细胞血影和培养细胞融合·····	(132)
第二节 脂质体法·····	(133)
一、脂质体的制备·····	(134)
二、脂质体在核酸传递中的应用·····	(134)
第三节 脂质体在医药行业的应用·····	(135)
一、热敏脂质体——一种新型热靶向药物载体·····	(135)
二、热敏脂质体的应用·····	(136)

第一章 绪 论

第一节 生物工程在经济和社会发展中的地位和作用

一、生物工程的由来

生物工程也称生物技术或生物工艺，它具有悠久的历史，几乎与人类文明的发展史一样源远流长。实际上，生物工程的发展和应用可追溯到几千年以前，我国早在殷商时期（即公元前 12~11 世纪）就掌握了酿酒技术，两千多年前发明了制酱、造醋工艺。但人类有意识地利用生物技术进行生产是在 19 世纪，当时进行大规模生产的发酵产品有乳酸、酒精、面包酵母、柠檬酸和蛋白酶等初级代谢产物，其技术特征是微生物技术。到 20 世纪 40 年代，以获取微生物的次级代谢产物——抗生素为主要特征的抗生素工业成为生物工程的支柱产业，抗生素制品的生产使医药保健发生革命性进展，改变了人类的医药状况和生活方式。20 世纪 50 年代后，随着微生物代谢调控机制的阐明，氨基酸、核苷酸、酶制剂发酵工业又陆续成为生物工程产业的新成员。

虽然此时的生物工程产品在保障人民的身体健康中起了巨大的作用，但这些生物技术产业在整个国民经济中所占的比重不大，起不了举足轻重的作用，并没有引起人们对它的足够重视。高度发达的现代工业给人类带来了前所未有的物质文明与高水平的工业生产效率，但同时也带来了严重的资源短缺、能源危机和环境污染等问题，这些问题完全靠物理、化学本身的作用已无法解决，这就向生物科学发出了共同解决问题的呼声。20 世纪 60 年代后的生物科学与技术化学与物理学的基础上也得到了飞速发展，特别是以 1973 年建立的重组 DNA 技术为标志，细胞生物学、分子生物学、分子遗传学三大学科及 DNA 重组技术、细胞融合技术和连续发酵技术相继建立，出现了真正意义上的生物工程。现代生物工程技术已广泛应用于食品、医药、化工、农业、能源、材料、环境等领域，并取得了令人瞩目的成果，显现出不可低估的潜力，从而使得生命科学成为 20 世纪以来发展最快的学科之一，必将是 21 世纪对人类具有决定影响作用的主要科学技术之一。而受 DNA 重组技术影响最为深刻的生物工程，迅速完成了从传统生物技术向现代生物技术的飞跃转变，从原来的一项鲜为人知的传统产业一跃成为代表着 21 世纪的发展方向，具有远大发展前景的新兴学科和产业。

二、生物工程的基本概念

生物工程是以生命科学为基础，应用自然科学及工程学的原理，依靠微生物、动

物、植物体作为反应器将物料进行加工生产，为社会提供商品和服务的一个综合性技术体系。从更广义的角度来认识，生物工程是人类对生物资源（包括动物、植物和微生物）的利用、改造并为人类提供服务的工程技术。它是综合性的技术科学，是生物学、遗传学、生物化学、分子生物学、发酵工程学等学科相互渗透、紧密结合而发展起来的。生物工程的范围很广，它所包含的实质性内容可以说还没有完全定型，一般概括为四个主要方面，即细胞工程、基因工程、发酵工程、酶工程（或更广义地称为蛋白质工程）。生物工程的应用伸展到食品、医药、化工、农业、渔业、牧业、能源、材料、湿法冶金、采油、环境保护等各个方面，它的成果通过各种产品直接为人类社会的繁荣昌盛，为人类的健康做出贡献。

据报道，1991年，世界上生物工程研究、开发、生产和销售的公司，仅美国、欧洲、日本就有3000余家。1991年，生物制品年销售额达100亿美元，而2000年达到1000亿美元，可见它在国民经济和社会发展中占有何等重要的地位。

三、生物工程的主要成就和发展动向

1. 生物工程的主要成就

作为生物工程基础的发酵工程，在20世纪70年代由于基因工程、固定化细胞（酶）、细胞融合技术的兴起而得到了更快的发展。目前，由微生物发酵大量生产出各种氨基酸、抗生素、酶、核酸、有机酸、醇类制品，提供了大量药物、食品、饲料添加剂及化工原料，产品总值已占世界有机产品的一半。氨基酸的大量生产增进了人类健康，改善了食物风味，并带来巨大的经济效益和社会效益。2000年世界氨基酸的总产值已达300亿美元。传统的单细胞蛋白（包括面包酵母、饲料酵母、石油蛋白、甲醇蛋白等），国外年产量已达到200万t。在制药工业中，筛选了低毒氨基酸糖苷抗生素、抗肿瘤抗生素等。在生物农药的开发方面，一大批新型无公害、高效、专一性强的杀虫剂、除莠剂、植物生长调节剂等微生物新药出现，为加快农业的发展、保护环境提供了有利条件。

在酶工程方面，不仅发现和制备了更丰富的生物酶，而且对酶催化反应的机理、工艺和应用研究都达到了一个新的水平。固定化酶技术的发展使酶工程效率更高、成本更低、产品更加丰富。例如在世界上使用了15000t固定化葡萄糖异构酶生产了200万t以上的果葡糖浆。尤其值得注意的是各种酶电极的研制，对生物工程的发展起着愈来愈重要的作用，许多有机化合物可以通过装有固相化酶或菌体的电化学装置进行监测。这类传感器已经用来测定抗生素、维生素、氨基酸以及生物需氧量（BOD）等。

而基因工程的发展，已产生了大量的转基因植物、转基因动物、转基因食品、转基因药品，大量与人类健康密切相关的基因都已得到克隆和表达，胰岛素、生长激素、细胞因子及多种单克隆抗体等基因工程药物已正式生产上市。仅美国就已批准了40余种基因工程药物、疫苗和注射用单克隆抗体。

基因工程应用于植物育种发展很快。将外源基因引入植物细胞并得到表达的例子已有很多。所转移的外源基因不仅有植物本身的基因，也包括微生物、动物乃至人类的基因。转基因作物由于可被赋予一些新的性能而呈现与传统作物不同的优点，因而被人们

称为“第二次绿色革命”。20世纪80年代初期,美国最早进行转基因食品的研究。到了1997年,美国已能生产出34种转基因食品,如苦苣、土豆、西葫芦、玉米、番木瓜、大豆、番茄,并形成了可观的产业规模。1997年,全球转基因食物种植面积约1100万 hm^2 ,1998年上升到2810万 hm^2 ,增幅接近160%。据专家估计,到2010年,其种植面积将增加到6000万 hm^2 ,届时世界转基因食物的市场总收入将达3000亿美元,其中转基因种子收入就可达1200亿美元。

基因工程可通过基因分割、剪接、转移等使动植物按人的意愿呈现一些特殊的优势性能。例如:①培育抗病虫害、抗逆、抗除草剂作物。美国科学家将壳质酶基因引入植物,获得了抗真菌病害的转基因植物。将抗除草剂基因导入植物,已培养出抗除草剂高粱、小麦、大豆和玉米。国内外都培养出抗病虫害转基因棉花、水稻、玉米和马铃薯。这类高抗性转基因作物可减少传统品种由于病害及其他外因侵扰造成的减产,从而提高了作物产量。另一方面,由于减少了农药的使用量,从而减少了污染,保证了食品的安全性。②培育高营养和特殊功能的食品。通过基因工程,可有目的地培养某些具有高营养价值作物品种,以满足人们对食品营养的更高需求。例如,富含高色氨酸、高蛋白转基因玉米、含高不饱和脂肪酸的转基因油类、含丰富易消化肽的转基因大豆都已培育成功。

在某些植物中导入某些具有保健功能和治疗功能的基因,可培育出对人体具有保健和疗效功能的食品。如美国正在研制高含量抗癌物质的西红柿,可用于生产血红蛋白的玉米,含丰富异黄酮(防止心脏病)的大豆以及含有疫苗的香蕉和马铃薯等。在动物研究方面,已利用人体基因注入动物中,获得的子代动物某些器官具有人体蛋白,可从中提取人体需要的药物蛋白。由于转基因动物的特征可遗传后代,比通过其他方法获取成本要低得多。通过基因工程改造牛奶,可获得具有特殊成分的牛奶,如增加奶中乳铁蛋白,增加奶中溶菌酶,降低奶中的脂肪,或增加奶中的抗病因子等,从而提高牛奶的保健价值和市场价值。另外,通过基因工程,可使某些动植物加快生长,增加产量。有的转基因猪可显著提高饲料转化率,使猪的生长加快,有的转基因羊可增加产毛量,而转基因鱼可以快速生长。

在细胞工程方面,由于与基因工程技术相结合,因而也得到了迅速发展,特别是在农业生产中发挥着重要作用。细胞工程技术的利用避免了直接从动、植物整体提取产物所受到的资源限制及环境条件的影响,为某些珍稀植物的快速繁殖、植物的复壮等提供了可行的方法。细胞工程发展到今天,不再仅仅停留在细胞组织培养方面,而是包含了细胞融合、细胞改造等技术。通过不同植物或动物细胞之间的融合,可获得杂种细胞,从而培养出新的动植物杂交种。在动物方面,采用胚胎工程技术,获得大量能为人类提供更多、更好动物产品的家畜和珍稀奇特的观赏动物,使牲畜迅速实现良种化。此项技术在羊、牛,尤其是在奶牛方面已获得成功,并已建立起了高产奶牛的繁育体系和生产体系。

总之,现代生物工程技术已在农业、医药、轻工业、食品、环保、海洋和能源等许多方面得到广泛的应用;同时,医药生物技术、农业生物技术等一些新型产业正在迅速形成。

2. 生物工程的发展动向

(1) 新技术交织应用, 育种跨越生物“界”的鸿沟。DNA 重组技术、细胞融合和拆合技术将更加紧密配合用以改造生物的遗传性状, 将陆续推出聚集动物、植物、微生物多种优良性状于一体的新品种。

(2) 基因工程药物、疫苗研究与开发突飞猛进。新的生物治疗制剂的产业化前景十分光明, 21 世纪整个医药工业将面临全面的更新改造。

(3) 转基因植物和动物取得重大突破。现代生物工程在农业上的广泛应用作为生物技术的“第二次浪潮”在 21 世纪将全面展开, 给农、牧业生产带来革命性的变化。

(4) 阐明生物体(目前主要有人类、水稻、小鼠、细菌、酵母、果蝇等)基因组及其编码蛋白质的结构与功能是当今生命科学发展的一个主流方向。与人类重大疾病相关的基因和与农作物产量、质量、抗性等有关基因的结构与功能及其应用研究是今后一个时期研究的热点和重点。

(5) 基因治疗取得重大进展, 有可能革新整个疾病的预防和治疗领域。估计 21 世纪初, 恶性肿瘤、艾滋病等严重疾病的防治有望取得突破。

(6) 随着第二代基因工程(蛋白质工程技术)的发展, 它将分子生物学、结构生物学、计算机技术结合起来, 形成一门高度综合的学科。

(7) 国际上信息技术的飞速发展渗透、到生命科学领域, 形成了引人注目、用途广泛的生物信息学。全球通讯网络的日趋扩大和完善也大大加速了生物技术的研究、应用和开发。

第二节 细胞工程的兴起和成就

一、细胞工程的兴起和基本内容

细胞工程是应用细胞生物学的方法, 有计划地改变细胞遗传物质并使之增殖, 从而生产有用的产物或引向成体化的综合科学技术。它是生物学、细胞学、遗传学、生物化学、发酵工学等学科交叉渗透、互相促进而发展起来的。细胞工程涉及动物、植物和微生物, 一般认为细胞工程包括: 细胞大量培养及控制生长、增殖并引向成体化等一系列技术、细胞融合技术、细胞拆合技术、向细胞内引入高分子物质。

以微生物为材料进行细胞遗传与育种的研究有很多优点, 主要是微生物繁殖快、世代时间短、单倍体期较长。在一定条件下, 很短时间即能生长出大量相对同源的种群, 便于筛选大量基因型。高等动植物就没有这些有利条件, 在细胞遗传与育种上受到很大限制。然而, 自从植物细胞“全能性”学说的提出(G. Haberlandt, 1902 年)和证实(Steward, 1958 年; Guha 和 Maheshwari, 1964~1967 年), 导致了近代细胞生物学方面许多新技术的兴起。例如, 经过离体组织、细胞或花药、花粉培养获得单倍体植株等, 大大改变了植物育种的面貌, 高等植物也能像微生物一样进行实验操作, 使得在大发酵罐中像生产抗生素那样生产各种植物代谢产物有了可能性; 酶制剂(如纤维素酶、果胶

酶)的大量生产,又为制备原生质体创造了条件;20世纪60年代初,Cocking等人用酶溶解植物细胞壁,制备了大量有活力的原生质体,为原生质体实验系统奠定了基础。

在这期间,冈田善雄(1958年)发现紫外线灭活的仙台病毒可引起艾氏腹水瘤细胞彼此融合。由于仙台病毒能够稳定地诱发动物细胞融合而引起众多科学家的兴趣,1965年,Harris和Watkins进一步成功地将人细胞和鼠细胞融合在一起,证明了在动物界中体细胞融合没有种和属的界限,并证明这种融合细胞能存活。动物体细胞融合的进展激发了植物体细胞杂交工作的开展,Power,Cummins和Cocking(1970年)首先用化学诱变剂成功地融合了植物细胞的原生质体,为植物体细胞融合奠定了基础。

研究植物细胞融合的科学工作者,在运用原生质体的基础上,又广泛试验各种化学试剂诱导原生质体融合,寻找具有较高融合效率的化学物质。1974年加拿大科学家做出了重大突破,Kao和Michayluk发现用聚乙二醇(PEG)和 Ca^{2+} 作融合促进剂,能有效使植物原生质体融合,显著提高融合率,这是原生质体融合技术的重大进展,迅速推动了这项技术的基础研究与应用研究。以后的工作表明PEG也能促使动物细胞融合。1975年原生质体融合技术已扩展运用到微生物中,Ferenczy首先报导PEG促使真菌融合,以后的成功报导泛及酵母、霉菌、细菌、放线菌等多种微生物的种间以至属间,使细胞融合技术继动、植物之后,在微生物中也形成了实验体系。至此,应用原生质体和发展操纵它们的方法,已引起实验生物学的“无声革命”。

20世纪70年代初,细胞工程进入了一个崭新的阶段,诞生了细胞拆合工程。真核细胞的核、质相互关系,是长久以来受到重视的课题之一。去核细胞与核移植实验在提供细胞内的基因表达与调控方面的资料起着重要的作用。而产生去核细胞的大多数实验途径,长期都是倚仗显微外科手术进行的。用这种方法获得成功的去核细胞仅局限于一些原生动物和两栖类动物卵子或硬骨鱼的卵子等,这些都是体积较大的细胞类型,在较小的哺乳类体细胞进行实验则收效甚微。Carter于1967年发现细胞松弛素B(Cytochalasin B,简称CB)能诱发体外培养的小鼠L细胞的排核作用。Prescott等于1972年首先应用离心术结合CB分离哺乳类细胞的胞质体获得成功,为研究哺乳类细胞的核、质相互关系、细胞质基因的转移开创了新的途径。

由于细胞核、质分离技术与细胞融合技术的发展,已使细胞工程中这两项技术汇合起来,建立了细胞重组技术。可以使胞质体与完整细胞融合,构成胞质杂种细胞;胞质体与核体融合,构成重组细胞;把微核化细胞导入完整细胞,构成微细胞异核体。1982年,Ferenczy在真菌中应用这些技术,使核与原生质体的融合取得成功。这项技术对于研究核与核、核与胞质之间的相互作用及微生物代谢产物的调控过程有重大意义,也已成为育种工作的一条新途径。

最近20年,细胞工程技术与基因工程技术更紧密地结合起来,使动物胚胎移植技术进入实用化阶段;培育出了抗病毒、抗除草剂、抗虫害、高蛋白的各种农作物品种,也培养出了携带人的生长激素基因的猪和鱼,得到了转基因大、小白鼠,家兔,绵羊,山羊,猪和牛,并从这些动物的血液、乳汁中得到了有医用价值的蛋白质和各种细胞因子。

总之,细胞工程技术正处于兴旺发展期,无论在生物学基础研究,还是在生物高技

术产业化领域中,都将继续提供细胞工程技术应用的舞台。可以预计,细胞工程技术必然会在 21 世纪获得更大的发展。

二、细胞工程的主要成就

作为生物工程主体之一的细胞工程,是在细胞水平上改造生物的遗传物质,它在技术和仪器设备上的要求,不像基因工程那样复杂,也不需要昂贵的材料,投资少,有利于广泛开展研究和推广,有着更大的实践意义,正得到科学界的日益重视。已经成为培育新种,生产有用代谢产物,生产人抗体,研究核、质相互关系和细胞各部分功能的重要手段。对深入探索细胞代谢途径、细胞内基因表达及其调控诸方面细胞生物学领域内的重大课题产生深远的影响。

1. 植物细胞工程方面

植物细胞培养可以参照工业发酵的方法进行深层培养,在较短周期内获得大量难得的、有用的物质。例如人参细胞的培养,不仅比栽种人参时间大为缩短,而且细胞内有效成分也比天然人参根的含量高 5 倍;用烟草细胞培养制备心脏病特效药——辅酶 Q_{10} ,比天然植株含量高 16~17 倍;1984 年,日本用黄连细胞生产黄连素碱已进入工厂化生产阶段。

细胞和组织培养法使传统的作物育种实现工厂化,不但效率高、成本低,还可以改良作物品质,将某些人类需要的特性进一步发展。有些珍稀植物利用常规有性繁殖方法比较缓慢,可以利用其组织进行组织培养,通过培养培育出新的植株,从而实现大规模地快速无性繁殖。在美国、日本等发达国家,一些高价值的花卉、果树、蔬菜、油料、糖类作物及名贵中草药都进行细胞培养育苗并已进入工厂化生产阶段。早在 1990 年,日本就开发了药用人参无性系苗的大量生产方法,每年供应市场种苗 1000 万株;当归组织培养苗的年生产能力也达 18 万株。又如在试管中繁殖种苗,既可以保证苗木无菌、无病毒感染,又无需占用大片土地。从一个嫩枝茎尖可以育出 10 万株苹果苗,仅需一年零四个月就开花结果。如今,科学家可以用 7 周时间便让玫瑰开花;10 株玫瑰 9 个月发展到 4 万株;7 年才开花的荔枝,仅 12 个月便能结果。

我国花药培养和单倍体育种技术在国际上处于领先地位。其中小麦、玉米、甘蔗、橡胶、杨树、柑橘等近 40 种植物的花粉植株在我国首先培育成功,有些品种推广面积已达 16 万 hm^2 以上。用组织培养快速繁殖的“桂糖十一号”甘蔗苗比常规繁殖育苗法的效率提高 1000 倍;运用远缘杂交与染色体工程技术培育成抗病、抗旱、抗干热风等特性的“小偃六号”小麦新品种,目前已推广到全国 10 多个省区,种植 66 万 hm^2 ,累计增产小麦 50 万 t。这些都为农业生产带来了明显的经济效益。

虽然植物细胞工程取得了较大的发展,但从总的发展看这仅仅是开始。细胞融合及再生植株至今主要在茄科、十字花科、散形花科植物内进行,而在粮食作物、经济作物中开展较少,所得植株的遗传性能很不稳定。

2. 动物细胞工程方面

动物细胞工程的一个突出成就就是胚胎移植,它使牲畜迅速实现良种化。胚胎移植技术从 20 世纪 60 年代起应用于畜牧业,许多国家如英、美、德、加拿大、澳大利亚、

新西兰和丹麦等都建立了经营胚胎移植的商业性机构。美国采用这项技术，在短短的几年就实现了全国奶牛良种化，而传统的杂交改良至少需要 15~20 年的时间。从母牛的一个胚胎获得多头小牛，是现代畜牧业的又一飞跃，把胚胎一分为二，再将半份胚胎分别移植到两头母牛身上，这是国外一些农场和商业家畜公司已经采用的方法，有的用四分之一胚胎移植产生牛仔，这对于迅速扩增品质优良的牲畜，无疑有着很高的经济效益。

用于大量制备单克隆抗体的 B 淋巴细胞杂交瘤技术，是当今生命科学领域中可以和 DNA 重组技术相提并论的又一重大成就。单克隆抗体是一种良好的抗癌剂，又可用于免疫诊断试剂，而且精确度很高。目前，已有几千种单克隆抗体产品面市，其应用范围从早孕检测到激素缺陷性疾病的检测。还有近 70 种用于治疗肿瘤、艾滋病和其他疾病的单克隆抗体处于临床试验阶段。

动物细胞工程技术还在生物制药领域发挥了巨大作用，由动物细胞大规模培养技术生产的产品在生物高技术产品中的销售额在 1990 年便已超过 50%。更为重要的是，许多细胞工程产品在以前不可能获得足够的数量用于治疗，或者生产成本极其昂贵，现在只需将编码某一目的蛋白的基因转染至动物宿主细胞，经动物细胞大规模培养便能获得大量的可供临床使用的生物制品。例如人生长激素的生产，过去一般是从已故病人的脑垂体中提取这种用于治疗身材矮小的激素，为了获得治疗一个病人剂量的生长激素，需要从成千上万个人脑垂体中提取，因而生产的生长激素极其有限，而且这种生产工艺具有传染克雅氏疾病的危险。目前，用表达人生长激素的基因工程细胞株，经动物细胞大规模培养可以获得大量的产品满足临床的需要，而且不会传染疾病，使用产品更加安全。再如人促红细胞生成素 (EPO) 的生产，以前需要从 2500L 再生障碍性贫血病人的尿液中提取极微量的 EPO 用于实验室分析，而现在通过大规模培养基因工程细胞生产的 EPO 已经治疗了成千上万的肾性贫血的病人，1998 年的全球销售额已达 30 亿美元。

动物细胞工程在药物定向释放系统、基因治疗、细胞治疗以及组织工程等新的治疗方法中起到重要的作用，而且在疫苗的生产、基因工程和抗体工程的药物筛选、开发和生产中发挥了关键的作用。特别是将外源基因在哺乳动物的乳腺中特异表达的乳腺生物反应器技术的发展，更是将药用蛋白质的生产带到一个前所未有的高度，以转基因动物的乳腺组织生产药用蛋白，这是生产药用蛋白质的全新生产模式，已经成为生物工程领域发展的重要方向。荷兰 Phraming 公司制备了含有人乳铁蛋白和促红细胞生成素的转基因牛，英国爱丁堡 PPL 制药公司已培育成功 α_1 -抗胰蛋白酶转基因羊，美国 GTC 公司开发凝血酶原 III 转基因羊，我国科学家也在 1998 年 2 月获得了可在乳汁中表达生产药用蛋白凝血因子 X 的转基因山羊。据专家预测，到 2005 年，仅美国的乳腺生物反应器生产的药物年销售额将达到 350 亿美元，到 2010 年，所有基因工程药物中利用乳腺生物反应器生产的份额将达到 95%。

3. 微生物细胞工程方面

微生物细胞工程主要是在生物药品生产上的应用。生物药品主要包括抗生素、生物活性物质、疫苗等内容，它适用于疾病的诊断、预防及治疗。抗生素工业已有近 60 年

的历史，抗生素工业的出现与发展，也可以说是象征着细胞工程的诞生与发展。因为抗生素工业从开始就是建立在诱变育种、不断提高抗生素产量和质量基础上的。如利用理化因素诱发突变，使青霉素的效价提高了几千倍；通过原生质体融合得到的产头孢菌素菌株，产量比先前提高 40%；酿酒酵母和糖化酵母的种间杂交成功，获得糖化和发酵的双重能力；日本味之素公司用细胞融合法，使产生氨基酸的短杆菌杂交，获得比原菌产量高 3 倍的赖氨酸产生菌和苏氨酸高产新菌株。

环保的重要内容是消除环境中的有害废物或者变废为宝，以达到生态的良性循环，增进人类的身体健康。为此，细胞工程在环保中的作用就是要培育出新型的微生物、藻类、植物等。例如，美国有位科学家获得了一种专门分解煤和石油中所含硫化物的细菌，该菌具有分解硫化物的能力，一周内就能分解煤和石油中绝大部分的硫化物。再如，有人从垃圾中分离出一种细菌，专门消化农药 2,4,5-T (三氯苯氧基醋酸，是一种类似 2,4-D 的剧毒农药)，从中获得细菌本身生长所需的碳源和能源。

综上所述，从 Kohler 和 Milstein 1975 年建立小鼠淋巴细胞杂交瘤技术制备单克隆抗体算起，细胞工程仅有不到 30 年的历史，但在如此短的时间内细胞工程却以惊人的速度在以上介绍的植物细胞与组织培养、再生植株、单克隆抗体、生物制品、食品工业、畜牧业、能源、环保等方面获得了可喜的进展。这些进展既初步显示了细胞工程的强大生命力，又给人们提出了许多更艰巨的任务。

第二章 植物细胞培养

第一节 植物组织培养的意义

植物体本身具有很强的生物合成能力,其所能合成的化合物种类之多、范围之广,可能是其他生物无法相比的。目前已知的天然化合物有 30 000 多种,其中 80% 以上来自于植物,可见,高等植物在天然物质中所扮演的重要角色。这些天然物质由于结构复杂,大部分无法用人工方法如有机合成来制造取代。近年来,现代文明的发展将自然环境逐渐破坏而缩小,使得高经济价值的天然化合物的利用和发现更加困难。而植物细胞培养与常规的农业生产相比更具有许多无可比拟的优越性。

植物细胞大规模培养的产物有种苗、细胞、初级代谢物、次级代谢物和生物大分子等等。其中,许多产物已在医药、食品、化工、农业及林业中得到广泛的应用。

一、初级及次级代谢物的生产

众所周知,来源于植物的药品、香料、色素、油类及乳胶等产物在人类生活中具有重要作用。人类已应用的 30 000 多种天然物质中有 80% 以上来源于植物。目前来自植物细胞培养的有用物质有 400 种左右,包括色素、固醇、生物碱、维生素、激素、多糖、植物杀虫剂及生长激素等数十个类别。植物细胞培养生产的各类初级及次级代谢产物均为可再生资源,有取之不尽、用之不竭的生物量。其生产不受地理环境及气候等自然条件的影响,是值得重视和开发的生物量。目前已实现工业化培养的细胞有烟草、人参、紫草、洋地黄及黄连等多种。今后有希望实现工业化生产的品种有苦瓜细胞的类胰岛素、喜树细胞的喜树碱及油麻藤细胞的左旋多巴等。深信不久将会有更多植物细胞产品实现工业化生产。

二、生物转化

利用植物培养细胞为酶源使某种前体化合物生成相应产物的技术称之为生物转化,也叫植物细胞转化。植物细胞内含有催化酯化、氧化、还原、皂化、羧基化、异构化、甲基化、羟基化、环氧化、葡萄糖基化及去甲基化等反应的酶类,可使相应的原料生成有用化合物,如毛地黄细胞培养物可使毛地黄毒素转化为 β -甲基地高辛。

三、天然植物食用色素的生产

食用色素是食品的重要成分,近年来随着医学毒理学和生物学试验研究工作的不断