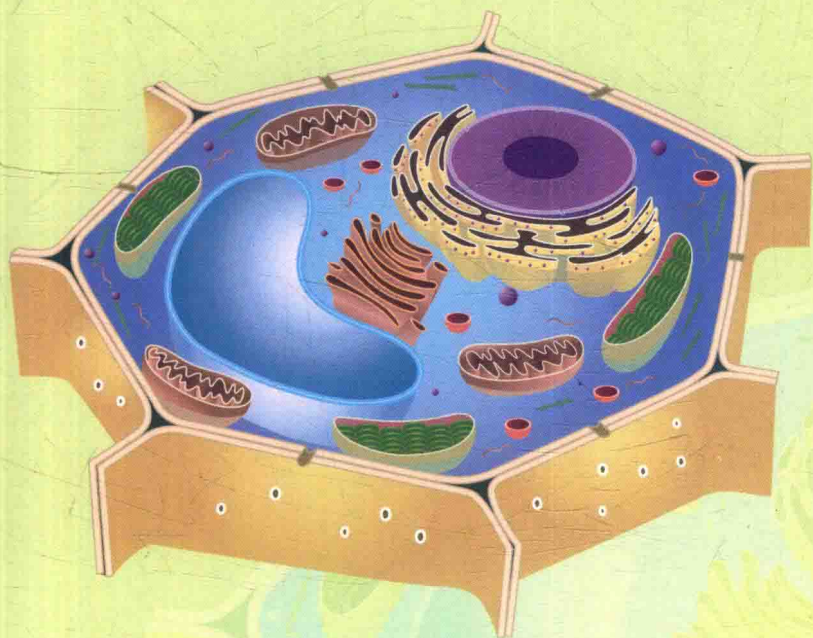


细胞工程 核心技术

刘慧莲 薛 峰 著



科学出版社

细胞工程核心技术

刘慧莲 薛 峰 著



科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书针对细胞工程的学科趋势、技术发展,分为两篇,分别对植物细胞工程和动物细胞工程核心技术进行了阐述,在兼顾经典细胞工程知识体系的基础上,注重学科的前沿进展和现代性。本书主要内容包括绪论,植物花药、花粉、胚胎培养与人工种子,植物离体无性繁殖与脱毒技术,植物细胞培养及次生物质生产技术,植物原生质体培养与体细胞杂交技术,动物细胞培养与冷冻保存技术,动物细胞融合、杂交瘤及单克隆抗体生产技术,细胞重组、核移植及动物克隆技术,动物干细胞技术等。

本书结构合理,条理清晰,内容丰富新颖,可供从事生命科学研究的师生与科研技术人员参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程核心技术/刘慧莲,薛峰著. —北京:科学出版社,2017.11
ISBN 978-7-03-054539-8

I. ①细… II. ①刘… ②薛… III. ①细胞工程 IV. ①Q813

中国版本图书馆CIP数据核字(2017)第228935号

责任编辑:刘 畅/责任校对:王 瑞
责任印制:吴兆东/封面设计:铭轩堂

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>

北京京华虎彩印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2017年11月第 一 版 开本:720×1000 1/16

2018年1月第二次印刷 印张:12 1/4

字数:235 000

定价:49.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

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, 投资较少, 有利于广泛开展研究和推广应用, 因此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产生越来越大的影响。

随着生命科学的飞速发展, 新兴学科的不断涌现, 读者所需要学习与掌握的知识和技术越来越多, 目前国内虽然出版了《细胞工程》《动物细胞工程》《植物细胞工程》等书籍, 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, 这就给读者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, 都以生物学为理论基础, 具有相同的技术基础。在学科发展过程中, 这两部分内容紧密不可分, 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, 还有助于读者分析、比较和对综合能力的培养。基于这项考虑, 编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, 撰写了《细胞工程核心技术》一书。

本书主要论述了细胞工程原理及其应用, 共 9 章, 其中第 1 章绪论为基础概述部分。第一篇(第 2~5 章)为植物细胞工程, 主要包括植物花药、花粉、胚胎培养与人工种子, 植物离体无性繁殖与脱毒技术, 植物细胞培养及次生物质生产技术, 以及植物原生质体培养与体细胞杂交技术等。第二篇(第 6~9 章)为动物细胞工程, 主要包括动物细胞培养与冷冻保存技术, 动物细胞融合、杂交瘤及单克隆抗体生产技术, 细胞重组、核移植及动物克隆技术, 以及动物干细胞技术等。

本书以细胞工程理论体系为撰写主线, 全面、系统、简洁地介绍了细胞工程的原理及核心技术研究, 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, 使本书具有一定的理论深度及知识普及、技术指导广度,

以便达到让专业读者和相关人群通过阅览本书，能够对细胞工程的核心技术有一个完整清晰、准确快速的认知和掌握的目的。

本书在撰写过程中，参阅了国内外同行的大量资料，在此一并致谢。由于细胞工程研究涉及面广，内容更新快，加之编者的水平和经验所限，书中难免有不足之处，恳盼读者给予指正。

编 者

2017年3月

目 录

前言

第 1 章 绪论	1
1.1 细胞工程的基本概念	1
1.2 细胞工程的研究内容	1
1.3 细胞工程的研究任务	4

第一篇 植物细胞工程

第 2 章 植物花药、花粉、胚胎培养与人工种子	7
2.1 植物花药和花粉培养	7
2.2 植物胚胎培养	16
2.3 人工种子	24
第 3 章 植物离体无性繁殖与脱毒技术	31
3.1 植物离体无性繁殖技术	31
3.2 植物脱毒技术	42
3.3 试管苗生产成本核算	48
第 4 章 植物细胞培养及次生物质生产技术	53
4.1 植物的单细胞培养	53
4.2 植物细胞的悬浮培养	59
4.3 植物细胞的规模化培养	61
4.4 植物细胞的生物反应器	68
4.5 植物细胞培养生产次生代谢产物	75
第 5 章 植物原生质体培养与体细胞杂交技术	78
5.1 植物原生质体的分离与纯化	78
5.2 植物原生质体的培养	83
5.3 植物体细胞杂交	91

第二篇 动物细胞工程

第 6 章 动物细胞培养与冷冻保存技术	99
6.1 原代培养	99

6.2	传代培养	105
6.3	细胞系与细胞克隆	106
6.4	动物细胞的大规模离体培养	110
6.5	动物细胞的冷冻保存	120
第7章	动物细胞融合、杂交瘤及单克隆抗体生产技术	122
7.1	动物细胞融合技术	122
7.2	杂交瘤技术	134
7.3	单克隆抗体生产技术	137
第8章	细胞重组、核移植及动物克隆技术	145
8.1	细胞重组技术	145
8.2	细胞核移植技术	149
8.3	动物克隆技术	152
8.4	转基因动物	159
第9章	动物干细胞技术	167
9.1	干细胞概述	167
9.2	胚胎干细胞	173
9.3	成体干细胞	180
9.4	诱导性多潜能干细胞	186
参考文献		189

1

第1章 绪 论

细胞是生物体的基本结构和功能单位。随着细胞生物学和分子生物学的迅猛发展,以培养条件下细胞全能性表达的调控为核心的一门综合性技术科学——细胞工程(cytotechnology)产生和发展起来了,近年来其已经成为现代生物技术的一个重要性领域。本章概括介绍细胞工程的基本概念、研究内容及研究任务等。

1.1 细胞工程的基本概念

细胞工程是指以生物细胞或组织为研究对象,按照人们的意愿进行工程学操作,从而改变生物性状,以获得生物产品,为人类生产和生活服务的科学。细胞工程是现代生物技术的一个重要分支,包括植物细胞工程(plant cell engineering)和动物细胞工程(animal cell engineering)。根据研究水平,分为组织水平、细胞水平、细胞器水平和分子水平等不同的研究层次。广义的细胞工程包括所有的生物组织、器官及细胞离体操作与培养,狭义的细胞工程指细胞融合和细胞培养技术。

1.2 细胞工程的研究内容

细胞工程涉及的范围很广:按研究的生物类型可分为植物细胞工程、动物细胞工程、微生物细胞工程(发酵工程);按实验操作对象可分为器官、组织和细胞培养(organ, tissue and cell culture),细胞融合(cell fusion),细胞核移植(nuclear transplantation),染色体工程(chromosome engineering),干细胞(stem cell),组织工程(tissue engineering),以及转基因生物与生物反应器(transgenic biology and bioreactor)等(图1-1)。

1.2.1 器官、组织和细胞培养

器官、组织和细胞培养是指对生物体的器官、组织或细胞进行离体培养,研究其所需培养系统和条件,如有机营养、无机营养、激素、活性物质、培养基的酸碱度、温(湿)度、光照等营养条件和刺激因素;研究器官、组织和细胞的形态发生规律;或使之形成组织或有机体的技术。

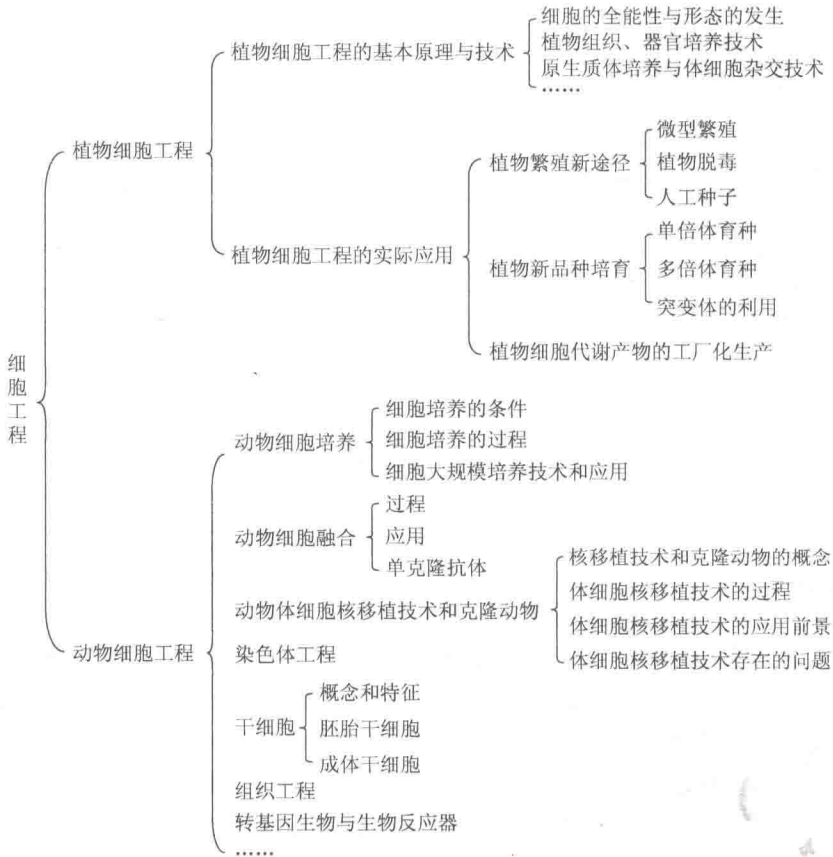


图 1-1 细胞工程的研究内容

1.2.2 原生质体培养

原生质体培养（protoplast culture）指将植物细胞去壁使之游离成原生质体，在适宜培养条件下使细胞壁再生，并进行细胞分裂分化，形成完整个体的技术。

1.2.3 植物胚胎培养

植物胚胎培养（plant embryo culture）是指使胚或具胚器官（如子房、胚珠等）在离体无菌条件下发育成正常植株的技术。

1.2.4 动物胚胎工程

动物胚胎工程（animal embryo engineering）是指以动物胚胎为对象而产生的一系列技术操作，如胚胎移植（embryo transfer）、胚胎冷冻（embryo freezing）、体外授精（in vitro fertilization, IVF）和性别控制（sex control）等。

1.2.5 转基因动植物

转基因动植物 (transgenic animal and plant) 是指将人们需要的目的基因导入受体动植物基因组中, 使外源基因与其发生整合, 并随细胞分裂而增殖, 在动植物体内表达, 并稳定地遗传给后代。

1.2.6 胚胎干细胞

胚胎干细胞 (embryo stem cell, ES 细胞) 是指胚胎或原始生殖细胞经体外抑制分化培养后, 筛选出的具有发育全能性的细胞。ES 细胞可以定向诱导分化为几乎所有种类的细胞, 甚至形成复杂的组织或器官。ES 细胞的研究将在未来的人体发育, 基因功能, 药物开发, 细胞、组织和器官替代治疗中发挥重要作用, 并成为组织器官移植的新资源。

1.2.7 染色体工程

染色体工程 (chromosome engineering) 是指借助于物理和化学等方法, 使生物染色体数目、结构和功能发生改变的技术。

1.2.8 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现象, 产生不亲和的主要原因是花粉在雌蕊柱头上不能萌发, 或花粉管不能通过子房到达胚珠进入胚囊与卵子结合。在体外条件下, 进行植物授精, 对杂交育种有很大的意义, 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利用杂交种的新时代, 使水稻、高粱等自花传粉和常异花传粉作物杂种优势的利用成为现实。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, 从而创造新物种或新的变异类型。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。我国小麦有独特的种质资源和丰富的组织培养经验, 小麦远缘杂交取得了非常优异的成绩。

1.2.9 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包括细胞培养、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。

以动物体细胞核移植、体外授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。

胚胎切割 (embryo bisection) 借助显微操作技术切割早期胚胎成二、四等多等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，因此胚胎分割可看作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。试管婴儿技术的初衷是帮助解决人类的生育疾病，近 30 年发展迅速，目前有近千万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。

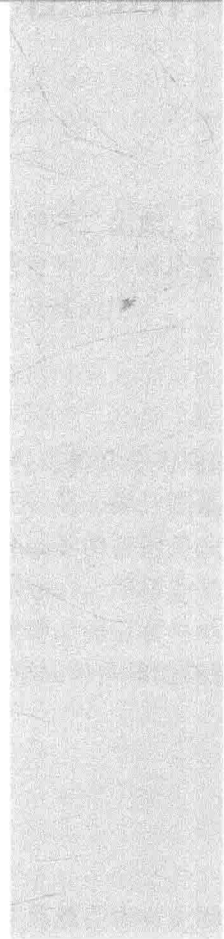
利用植物组织培养技术能快速繁育一些有价值的苗木、花卉、药材和濒危植物。快速繁殖 (简称“快繁”) 是植物组织培养中应用最为广泛的技术，如果快速繁殖的试管苗经过检测证明已经脱除病毒，则可以将脱病毒与快速繁殖结合起来，一举两得。植物通过组织培养，既能保持母体的优良性状又能保持遗传的稳定性，这在生产上具有重要的意义。植物种质资源是研究遗传和育种的重要基础，由于需要保存的植物种质资源很多，而田间保存耗费人力、物力和财力，为了避免优质遗传资源的枯竭和丢失，可以利用植物组织培养技术在试管中或者在低温下长期保存，可大大节省土地和人力。这种方法也方便引种，防止病虫害的传播。

1.3 细胞工程的研究任务

当前生命科学发展迅猛，研究领域、前沿热点不断涌现，生命、医学、人口、农业、环境、资源和能源等领域存在着许多需要依靠生物工程才能解决的问题。细胞工程承担着研究解决生命科学关键问题的重要任务，包括如下的基础研究和应用研究：①离体培养时，细胞、组织、器官所需营养条件和环境条件。②细胞、组织、器官的形态发生规律。③植物的快速脱毒及大量、快速繁殖方法与技术。④原生质体再生植株、亲缘关系不同的细胞融合方法和细胞杂交机制。⑤细胞的遗传、变异规律，新物种的产生与应用研究。⑥种质资源的离体保存机制和方法。⑦胚胎移植、胚胎体外生产及细胞克隆技术。⑧细胞全能性的分子机制、细胞信号转导控制等基本理论的研究。

第一篇

植物细胞工程



2

第2章 植物花药、花粉、胚胎培养与人工种子

随着生态环境的破坏，各国优质和珍贵的物种正在逐渐消失。因此，保护生物多样性成为全世界关注的问题，种质资源的保存也被植物育种工作者所重视。本章主要讲述花药、花粉和胚胎培养与人工种子的培养技术及其应用。

2.1 植物花药和花粉培养

在一个被子植物的典型花药中，依据细胞内染色体的倍性可将其分为两部分：一部分是单倍体细胞，即经过减数分裂形成的小孢子（花粉）；另一部分则是二倍体细胞，如药隔、药壁、花丝等组织。花药培养（anther culture）的目的是改变小孢子的发育途径，所以实际上进行的是花粉培养（pollen culture）。严格意义上来讲，花药培养和花粉培养是不同的，前者属于器官培养的范畴，而后者与单细胞培养类似。但从培养目的上来说，两者都可以在培养中诱导形成单倍体的细胞系，甚至获得单倍体植株，因此两者又是相似的。

2.1.1 花药培养

1. 花药培养的概念及意义

花药培养的工作始于1964年，Guha和Maheswari将花药放在含有琼脂的培养基上培养，后期转入MS培养基，首次诱导曼陀罗花药发育成为单倍体植株。花药培养不需要进行游离花粉的处理，也不需要特殊的培养方法，因此比花粉培养方便快捷，是单倍体培养的主要手段。花药培养通常采用琼脂固体培养基培养，也可以采用液体培养或固液双层培养。

植物的花粉是花粉母细胞经减数分裂形成的，其染色体数目只有体细胞的一半，叫作单倍体细胞（haploid cell）。用离体培养花药的方法，使其中的花粉发育成一个完整的植株，即单倍体植株（haploid plant）。目前，花药培养这一细胞工程技术已经成为植物育种和种子生产的重要手段，我国在花药培养和单倍

体育种工作上一直处于国际领先水平。

2. 花药培养的基本程序

花药培养与其他组织培养一样,技术要求相对简单,基本程序:花药培养材料的选择→材料灭菌→接种→诱导培养→再生单倍体植株。

(1) 花药培养材料的选择 花药培养材料选择的关键在于选取花粉处于一定发育期的花药,花药采集时期与培养成败有很大的关系。一般来讲,被子植物的花粉发育过程经历三个阶段,即第一期四分体时期、第二期单核期(小孢子阶段)、第三期双核期和三核期(雄配子体阶段)。单核期又分为单核早期、单核中期(单核中央期)、单核晚期(单核靠边期)。实验证实,只有那些发育到特定时期的花粉对离体刺激才最敏感。对大多数植物来说,单核中期和晚期是诱导花粉胚或花粉愈伤组织的最佳时期,尤其是单核晚期,是花粉诱导的关键时期。小麦、玉米处于单核中期的花粉培养效果最好。烟草、曼陀罗和水稻的花粉,从单核中期至双核早期都可接受离体诱导。在天竺葵和番茄中,分别从四分体和单核中期的花粉中得到了最佳的培养效果。可见不同植物的花粉对离体培养有其特定的、最敏感的发育时期。然而,对大多数植物而言,单核期(包括早、中、晚期)的花粉比较容易培养成功。

(2) 材料灭菌 采集花蕾最好从健壮无病植株中选材,因为未开放的花蕾中的花药被花被包裹,本身处于无菌状态。花药在消毒前,应先进行预处理,将花蕾剪下放入水中,在4~5℃冰箱内保持3~4d。低温贮藏后,进行花药的灭菌消毒。消毒后在超净工作台上取出花药接种,接种密度要适当大,以便发挥集体效应。接种密度高时愈伤组织诱导率也高,这可能是花药组织分泌的活性物质相互作用的结果。

(3) 接种 在超净工作台上用镊子剥去部分花冠,露出花药,夹住花丝取出花药置培养皿中。不要直接夹花药,以免损伤。用长柄(枪状)镊子夹住花丝,将花药接种于培养基上,或用接种环蘸取花药接种于培养基上(图2-1、图2-2)。接种密度宜高,以促进“集体效应”的发挥,有利于提高诱导率。

(4) 诱导培养

1) 培养条件。

A. 温度。接种后的花药要放到培养室中进行培养,离体培养的花药对温度比较敏感,早期多在25~28℃下进行培养。现在经过实验发现,不少植物的花药在较高温度培养更好,特别是最初几天经过一段高温培养,出愈率会明显提高。

B. 光照。对光照的要求在物种间差异更为明显。

2) 培养方式。花药的培养方式主要有三种:一是在琼脂固化培养基表面培养;二是在加入30%聚蔗糖(ficoll)的液体培养基表面漂浮培养;三是利用液-固双层培养基培养,既能保持较高的接种密度,又使培养基不容易失水。

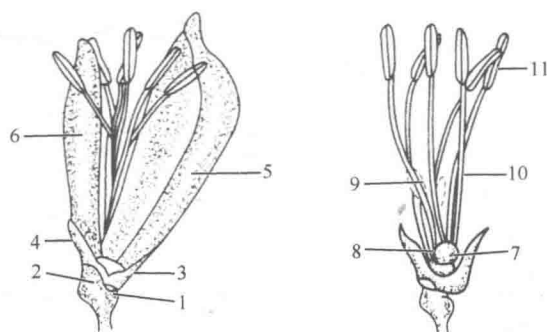


图 2-1 水稻颖花的结构

1. 第一副护颖; 2. 第二副护颖; 3. 第一护颖; 4. 第二护颖; 5. 外颖; 6. 内颖; 7. 浆片;
8. 子房; 9. 柱头; 10. 花丝; 11. 花药

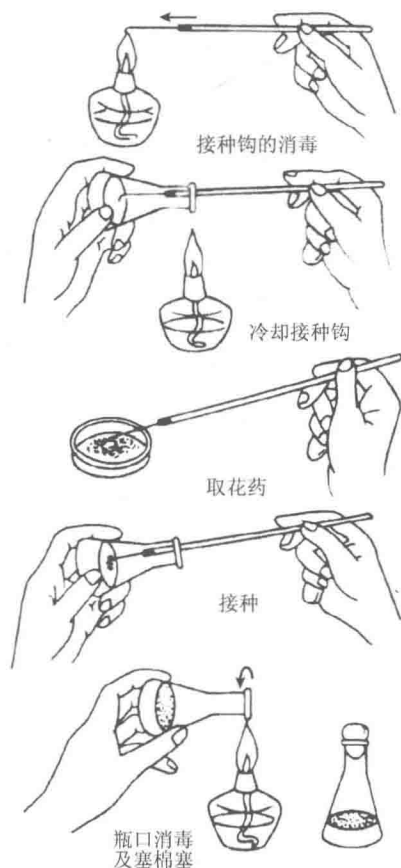


图 2-2 花药接种程序

(5) 再生单倍体植株 通过花药培养诱导单倍体植株再生模式有两种途径(图 2-3): ①经胚状体的再生途径, 即培养花药中的花粉在药室内侧首先分裂形成

原胚多细胞团，然后经过球形胚、心形胚、鱼雷形胚等发育阶段，最后以胚状体形式突出于花药壁。例如，烟草花药培养中，首先接种花药于 MS 培养基上，一周后花粉粒明显膨大，两周后逐渐形成球形胚、心形胚和鱼雷形胚，约三周时有淡黄色胚状体形成，至光照条件下培养后再生出具根、茎、叶的完整植株。②经过愈伤组织、器官分化的再生途径，一般花药接种于含 $1\sim 2\text{mg/L}$ 2, 4-D 的培养基上，花药内的花粉经多次分裂形成单倍体愈伤组织，然后将其转移到分化培养基上，使单倍体愈伤组织分化出不定芽和形成不定根，从而获得单倍体植株，如苹果。但是，两条途径并不是完全独立的，许多植物可以通过改变培养基种类及添加成分而改变单倍体的诱导形成途径或使两种途径并存。

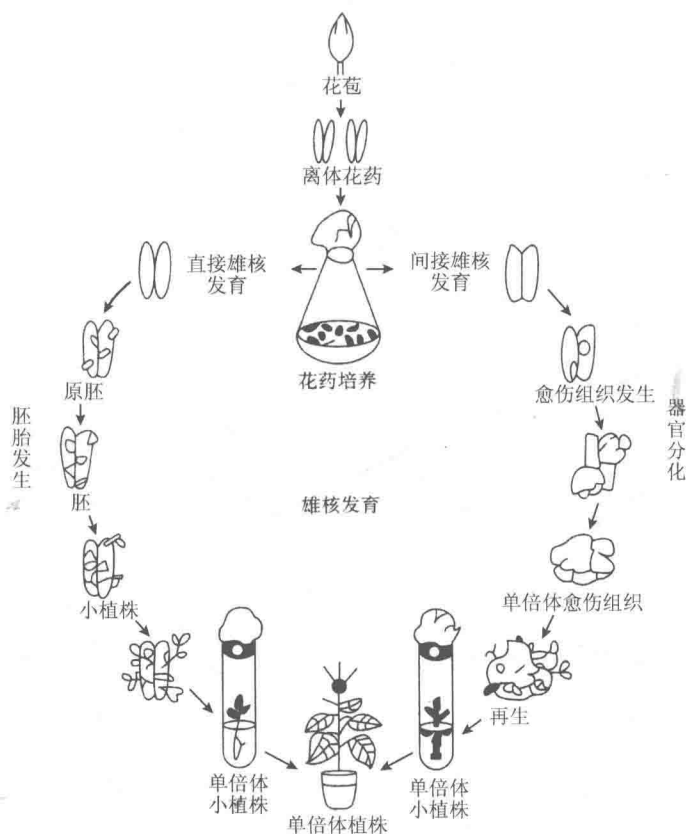


图 2-3 花药培养与植株再生

2.1.2 花粉培养

花粉培养是指把花粉从花药中分离出来，以单个花粉粒作为外植体进行离体培养的技术。花粉细胞是单倍体细胞，通过花粉培养可获得单倍体植株而用于育