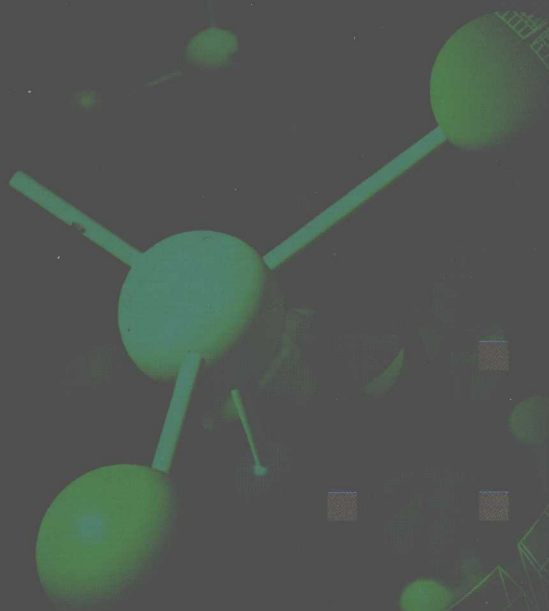


新世纪理工系列

# 细胞工程





新世纪理工系列教材

# 细 胞 工 程

主编 潘求真 岳才军

主审 翁 凡

哈尔滨工程大学出版社

## 内 容 简 介

细胞工程是细胞水平的生物技术,也是该领域中最先应用于生产实践并取得显著效益的应用学科。本书较全面、系统地介绍了细胞工程的基本原理、基本技术及其应用以及学科的最新研究成果。全书共分细胞工程学基础、植物细胞工程、动物细胞工程、微生物细胞工程和组织细胞工程等共二十章。各章在全面总结已有研究成果的基础上,着重对其在农业、医药、食品、环境等领域的应用状况和原理进行全面的介绍。每章后面附有思考题以便于学生复习掌握。

本书可用作综合院校、师范院校以及农林院校生物技术、生物工程及其他生命科学专业的细胞工程课程的教材,也可供其他院校有关专业的相关课程选用,同时也适用于生物及医学研究人员阅读参考使用。

## 图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/潘求真主编.—哈尔滨:哈尔滨工程大学出版社,2009.7

ISBN 978-7-81133-488-3

I.细… II.潘… III.细胞工程 IV.Q813

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2009)第 131859 号

---

出版发行 哈尔滨工程大学出版社  
社 址 哈尔滨市南岗区东大直街 124 号  
邮政编码 150001  
发行电话 0451-82519328  
传 真 0451-82519699  
经 销 新华书店  
印 刷 黑龙江省教育厅印刷厂  
开 本 787mm×1092mm 1/16  
印 张 25  
字 数 622 千字  
版 次 2009 年 7 月第 1 版  
印 次 2009 年 7 月第 1 次印刷  
定 价 45.00

<http://press.hrbeu.edu.cn>

E-mail: heupress@hrbeu.edu.cn

---

## 《细胞工程》编委会

主 编：潘求真 岳才军

副主编：马国达 刘 哲 冯振月

主 审：翁 凡

### 编写人员(按姓氏笔画)

冯振月 黑龙江八一农垦大学

连正兴 中国农业大学

刘 哲 黑龙江八一农垦大学

马国达 黑龙江八一农垦大学

潘求真 黑龙江八一农垦大学

翁 凡 黑龙江八一农垦大学

岳才军 黑龙江八一农垦大学

周佳勃 东北农业大学

# 前 言

细胞工程是现代生物技术的重要组成部分,是当前生命科学中最具活力的学科之一,无论在生命科学基础研究方面还是在生物高科技产业领域,都已取得举世瞩目的成就,并带来了巨大的经济效益和良好的社会效益。因此,细胞工程是目前各高校普遍开设的生物技术和生物工程专业的骨干课程。

我们在多年教学工作和科研的基础上编写了这本教材,力求能够较全面、系统地介绍细胞工程的基本原理、基本技术及其应用,以及学科的最新研究成果,以帮助学生通过学习该门课程能较好地掌握细胞工程的基本内容,达到拓宽知识面、打好专业基础、提高专业能力的目的。

本书在细胞工程基础部分中,主要概括介绍了细胞工程的发展和应用、基本设备及其使用和无菌技术等;在植物细胞工程部分中,主要介绍了包括植物的快速繁殖与脱病毒、胚胎和胚乳培养、植物细胞培养以及次生物质生产、原生质体培养与体细胞杂交技术等;在动物细胞工程部分中,主要介绍了包括动物细胞培养的基本技术、细胞融合与杂交瘤技术、干细胞技术、细胞重组与动物克隆、微生物工程及组织工程等。

全书共分为三编二十章。第一章绪论由潘求真编写;第二章细胞工程实验室及基本技术由岳才军、马国达、潘求真编写;第三章植物细胞工程的基本原理、第四章植物组织培养与器官培养、第五章植物细胞培养、第六章植物原生质体培养和细胞融合、第七章人工种子、第八章植物离体培养下的遗传变异与种质离体保存由岳才军编写;第九章细胞工程的细胞学基础由冯振月编写;第十章动物细胞培养的基本条件由马国达编写;第十一章动物细胞培养技术、第十二章细胞融合技术由刘哲编写;第十三章染色体工程由马国达编写;第十四章胚胎工程由翁凡编写;第十五章克隆动物由冯振月编写;第十六章转基因动物、第十七章干细胞技术、第十八章组织工程由潘求真编写;第十九章细胞工程的应用由连正兴、周佳勃编写;第二十章微生物细胞工程由潘求真、连正兴、马国达编写。全书由潘求真统稿、定稿,由翁凡主审。

潘求真  
2009年5月

# 目 录

## 第一编 细胞工程基础

第一章 绪论 .....	3
第一节 生物工程 .....	3
第二节 细胞工程 .....	7
思考题 .....	12
第二章 细胞工程实验室及基本技术 .....	13
第一节 细胞工程实验室的设备 .....	13
第二节 基本技术 .....	16
第三节 培养室内的无菌操作 .....	18
第四节 灭菌方法 .....	19
第五节 细胞培养基的制备 .....	21
第六节 培养条件控制 .....	30
第七节 细胞污染的检测 .....	32
思考题 .....	35

## 第二编 植物细胞工程

第三章 植物细胞工程的基本原理 .....	39
第一节 细胞全能性及其表达 .....	39
第二节 器官发生 .....	41
第三节 体细胞胚发生 .....	43
思考题 .....	47
第四章 植物组织培养与器官培养 .....	48
第一节 植物离体无性繁殖 .....	48
第二节 植物离体培养脱毒技术 .....	50
第三节 花药和花粉培养及胚胎培养 .....	56
思考题 .....	61
第五章 植物细胞培养 .....	62
第一节 悬浮培养 .....	62

第二节 单细胞培养 .....	67
第三节 植物细胞固相化培养 .....	71
第四节 植物细胞规模化培养与次生代谢产物生产 .....	77
思考题 .....	86
<b>第六章 植物原生质体培养和细胞融合 .....</b>	<b>87</b>
第一节 原生质体研究概况 .....	87
第二节 植物原生质体分离 .....	88
第三节 植物植物原生质体培养 .....	92
第四节 植物原生质体融合 .....	95
第五节 细胞质工程 .....	99
思考题 .....	100
<b>第七章 人工种子 .....</b>	<b>102</b>
第一节 人工种子概念 .....	103
第二节 繁殖体类型及其生产 .....	104
第三节 人工种子包被 .....	105
第四节 人工种子的发展和应用前景 .....	106
思考题 .....	107
<b>第八章 植物离体培养下的遗传变异与种质离体保存 .....</b>	<b>108</b>
第一节 植物细胞培养过程中的遗传变异 .....	108
第二节 体细胞无性系变异的诱导与选择 .....	110
第三节 植物种质资源离体保存 .....	113
思考题 .....	118

### 第三编 动物细胞工程

<b>第九章 细胞工程的细胞学基础 .....</b>	<b>121</b>
第一节 细胞增殖、生长与细胞衰老和死亡 .....	121
第二节 配子发生、受精与胚胎发育 .....	141
第三节 细胞分化 .....	146
思考题 .....	152
<b>第十章 动物细胞培养的基本条件 .....</b>	<b>153</b>
第一节 体内细胞生存的营养条件 .....	153
第二节 影响细胞生长的因素 .....	157
第三节 培养用液及培养基 .....	160
思考题 .....	165
<b>第十一章 动物细胞培养技术 .....</b>	<b>166</b>
第一节 体外培养细胞生长特点 .....	166



第二节 原代细胞培养与建系	172
第三节 原代细胞分离和制作	174
第四节 原代和传代细胞的培养和维持	181
第五节 肿瘤细胞培养	191
第六节 大规模培养技术	196
第七节 细胞冷冻保存与复苏技术	204
思考题	206
<b>第十二章 细胞融合</b>	<b>207</b>
第一节 细胞融合定义	207
第二节 细胞融合基本原理	207
第三节 细胞融合材料	209
第四节 细胞融合技术	209
第五节 细胞融合应用	213
思考题	222
<b>第十三章 染色体工程</b>	<b>223</b>
第一节 染色体概述	223
第二节 动物染色体工程	227
第三节 植物染色体工程	230
第四节 天然染色体介导的基因转移及染色体改造	238
第五节 人工染色体	242
思考题	245
<b>第十四章 胚胎工程</b>	<b>246</b>
第一节 动物的生殖生理	246
第二节 受精与早期胚胎发育	249
第三节 胚胎移植	253
第四节 体外受精	262
第五节 其他胚胎工程技术	277
思考题	283
<b>第十五章 克隆动物</b>	<b>284</b>
第一节 动物克隆技术发展简史及意义	285
第二节 动物克隆技术基本原理	290
思考题	306
<b>第十六章 转基因动物</b>	<b>307</b>
第一节 转基因动物制备	307
第二节 转基因动物应用前景	319
第三节 转基因动物研究存在的问题	325
思考题	326
<b>第十七章 干细胞技术</b>	<b>327</b>
第一节 干细胞	327

第二节 胚胎干细胞 .....	328
第三节 成体干细胞 .....	333
思考题 .....	336
第十八章 组织工程 .....	337
第一节 基本要素 .....	337
第二节 组织工程技术路线与方法 .....	343
第三节 组织工程产品 .....	345
思考题 .....	349
第十九章 细胞工程的应用 .....	350
第一节 在细胞生物学、组织胚胎学和药学方面的应用 .....	350
第二节 在肿瘤研究方面的应用 .....	352
第三节 在免疫学中的应用 .....	353
第四节 在临床各科中的应用 .....	359
思考题 .....	360
第二十章 微生物细胞工程 .....	361
第一节 微生物细胞性状改良技术——原生质体融合 .....	361
第二节 微生物发酵 .....	365
第三节 微生物细胞工程的应用 .....	371
思考题 .....	380
附录 .....	381
附表 1 磷酸缓冲液 .....	381
附表 2 常用平衡盐溶液 .....	382
附表 3 常用细胞系及使用培养基 .....	382
附表 4 部分基本培养基的基本成分 .....	384
参考文献 .....	387

# 第一编

## 细胞工程基础



# 第一章 绪 论

## 第一节 生物工程

### 一、定义

生物工程,也称生物工艺学(biotechnology or bioprocess),一般也称生物技术。生物工程是以生命科学为基础,利用生物体系和工程学原理生产生物制品和创造新物种的一门综合技术。换言之,就是利用生物有机体(从微生物到高等动物)或其组成部分(器官、组织、细胞等)发展新工艺或制造新产品的一种科学技术。

### 二、发展简介

#### (一)第一代生物工程

早在4 000多年前,我国就有以酿酒为代表的古老生物技术;1680年,列文虎克制成了显微镜,才知道有微生物的存在;1857年,巴斯德证实酒精发酵是由活酵母引起的;到了19世纪末至20世纪30年代,许多工业发酵陆续出现,例如乳酸、酒精、面包酵母、丙酮、柠檬酸、淀粉酶等的生产。至此以工业微生物过程生产发酵产品为代表的真正意义上的生物工程才正式诞生了。上述产品大多数是发酵过程的产物;产物的化学结构比较简单,属于初级代谢产物;生产过程也比较简单,对设备的要求不高,规模不大。

#### (二)近代生物工程

1928年,英国人弗莱明发现了青霉素;1940年,弗罗里和钱恩等实现了人工提取、并经过临床证实具有卓越疗效和低毒的青霉素,但大规模制备却非常困难;1941年,英美开始合作对青霉素大规模生产技术进行研究和开发;1943年,生产工艺取得突破,从而使青霉素的产量和质量大幅度的提高,不久,链霉素、金霉素、新霉素等相继问世。抗生素工业的兴起标志着工业微生物的生产进入了一个新的阶段。

与第一代生物工程产品相比,这一个时期的特点是:①产品种类多,包括初级代谢产物、次级代谢产物,以及生物转化,酶反应等产品;②技术要求高,生产过程需要在无菌条件下进行;③大多数过程为好气发酵;④发酵规模巨大。

#### (三)现代生物工程

1953年,美国的沃森和克里克发现了DNA双螺旋结构,为DNA的重组奠定基础;1974年,美国的波依耳和科恩首次在实验室实现基因的转移;从而使人们有可能在实验室中组建按照人们意志设计的新生命。

20世纪70年代后,随着基因重组、细胞和组织培养、酶的固定化、动植物细胞的大规模培养、现代化生物反应器和计算机的应用以及产品分离、纯化等技术的飞速发展,生物工程进入了一个新的发展阶段——现代生物工程阶段。

以重组 DNA 等先进技术为核心的现代生物工程技术的创立和发展,为生命科学注入了新的活力,她所提供的实验方法和手段极大地促进了传统生物学科(如植物学、动物学、遗传学、生理学、生物医学等)的深入研究。现代生物工程目前已被广泛应用于食品、化学、农业及环保等领域,为这些行业带来了新的技术革命。

现代生物技术及其产品的特点是运用了 DNA 重组、细胞融合等技术的成果。一些正在开发或已经开始生产的 DNA 重组技术产品有干扰素、胰岛素、生长激素及其相关因子、淋巴细胞活素、血纤维蛋白溶解剂、疫苗、胸腺素、白蛋白、凝血因子、促红细胞生长素、促血小板生长素、降血钙素、绒毛促性腺激素、抗血友病因子Ⅲ、乙型肝炎疫苗,以及氨基酸、食品加工酶、单细胞蛋白、生物杀虫剂、生物杀菌剂、生物完全降解塑料等。其中最具有代表性生物技术产品为转基因生物、克隆动物。①美国:40%以上的农田种植了基因改良作物;②中国:转基因作物和林木已经达到 20 多种。转基因棉花、大豆、马铃薯、烟草、玉米、花生、菠菜等已进行了田间试验;抗虫棉已经开始规模化商品生产;③英国:1997 年首次成功地采用体细胞克隆出绵羊“多莉”——细胞工程。

现代生物工程的特点除了可以从以上生物产品得到体现,同时还可以从其日益与其他众多基础学科的交叉得到体现。现代生物工程是在已有的传统生物技术基础上发展起来而又与多学科交叉的一门综合性的高新技术。它不仅结合了微生物学、细胞生物学、遗传学、生物化学、生物学、农学等传统基础科学的相关理论和技术,更是结合了现代分子生物学、化学工程、机械工程、微电子学、电子计算机与自动控制、生物材料、生物信息学、生物医学等当代先进的理论和工程技术方面这些学科的最新成果,生物工程得到了迅速发展,体现了当前生物科学的最新科研成果,另一方面,它也不断地赋予工程科学以新的生命。

### 三、现代生物工程的特点与组成

在与生物工程相关的众多学科中,生物学、化学和工程学是与其关系最为密切的三门基础科学。它们与生物工程学科的关系见图 1-1。生物工程与生物学、化学等基础理论科学的区别显而易见,后者为前者提供某种生物产品的理论支撑,而生物工程的对象是有生命的物质,这是与化学工程等其他工程类学科最明显的不同。

从研究或操作层面上而言,微观上生物工程涉及的有染色体操作、细胞重组等,宏观上有试管植物乃至几千升的发酵罐。

生物工程主要包括有发酵工程、酶工程、细胞工程、基因工程、生物化学工程、蛋白质工程(第二代基因工程),其关系见图 1-2。

由于现代生物工程技术之间存在着相当紧密地联系,彼此相互作用,相互影响,很难用图解的方式准确地表达它们之间的关系。在现代生物工程中,细胞工程是除生物化学工程之外涉及面最为广泛的一门技术,几乎涉及到所有其他几大生物工程,它也是除基因工程之外的另一个最能代表生物工程发展的一门科学技术。现代生物工程所取得的许多里程碑式

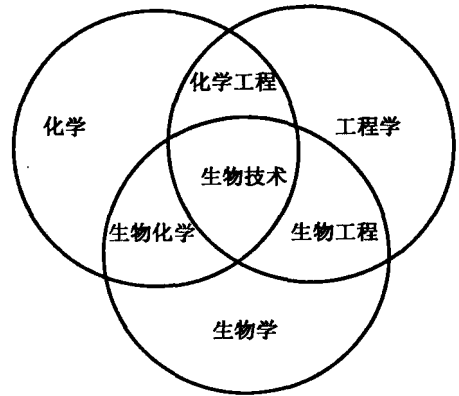


图 1-1 生物工程与其他学科的关系  
(引自俞俊棠等《生物工艺学》)

的成果都与细胞工程有关,有些甚至是细胞工程领域中的重大发现。

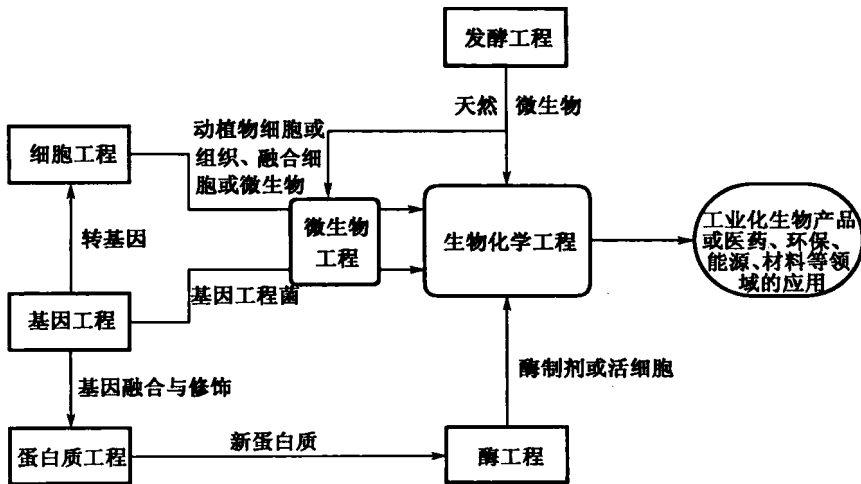


图 1-2 生物工程六个组成技术间的关系

### (一) 发酵工程

发酵工程是指利用微生物的特定性状,通过现代工程技术,在反应器中生产有用的物质的一种技术。发酵工程是生物技术实现工业化的基础,包括了整个生物工艺的过程。

发酵工程产品包括食品、医用和农用抗生素(绝大部分)、氨基酸、工业用酶、味精、维生素 B<sub>2</sub> 等。

传统的发酵技术与现代生物工程中基因工程、细胞工程、蛋白质工程、酶工程等相结合,便进入到了微生物工程阶段。微生物工程包括菌种选育、菌体生产、代谢产物的发酵以及微生物机能的利用等。现代微生物工程利用的发酵对象中,除包括传统的天然微生物外,还包括动物和植物细胞、重组细胞、基因工程菌等。

### (二) 酶工程

酶是由生物体产生的具有催化活性的蛋白质。其特点是特定催化某个化学反应,自身不参与反应,反应效率高、反应条件温和、反应产物污染少、能耗低、反应容易控制等。

酶工程就是利用酶的催化作用,采用适当的生物反应器工业化生产人类所需的产品或达到某一特殊目的的一门生物工程技术。它是酶学理论与化工技术相结合而形成的一项高新技术。

酶工程开发生产的酶主要有氧化还原酶类、转移酶类、水解酶类、裂解酶类、连接酶类、异构酶类。

酶工程应用于食品工业、轻工业、医药工业等。例如固定化青酶酰胺酶可以连续裂解青霉素,生产 6-氨基青霉烷酸;葡萄糖淀粉酶、 $\alpha$ -淀粉酶、葡萄糖异构酶,三酶连续作用于淀粉,可以生产高果糖浆;蛋白酶用于皮革脱毛、脱胶、洗涤剂工业;固定化酶可以治疗先天性缺酶病或是器官缺损引起的某些功能衰竭等。生活中常见的加酶洗衣粉、嫩肉粉等就是酶工程的典型生活应用实例。

酶工程的研究和应用范围:①天然酶的分离纯化、鉴定、生产;②酶的固定化作用;③酶

生物反应器的研制和应用。

### (三)蛋白质工程

蛋白质是含碳、氢、氧、氮、硫等元素的化合物,其基本单位是氨基酸。蛋白质是遗传物质 DNA 的表达产物,是生命活动中最重要的物质之一,它们在活细胞中担任各种分解、合成、信号传递、运送等各种生命活动。每一类蛋白质都有其固定的特征,这与它们的基本构成单位有关。

蛋白质种类繁多,根据它们在生物体内所起的作用不同可分为:①酶蛋白。生物体内产生的专一高效的生物催化剂;②运载蛋白。在生物的物质代谢中有很重要的作用;③结构蛋白。生物体的膜、核、细胞器等结构中含有大量的蛋白质亚基;④抗体。是生物体内的免疫防御系统;⑤激素。生物体产生的特殊的、微量的蛋白质。

蛋白质工程是利用生物技术手段对蛋白质的 DNA 编码序列进行有目的的改造并分离、纯化蛋白质,从而获得自然界没有的、具有优良性质或是适用于工业生产条件的全新蛋白质技术。

蛋白质工程的研究方向主要包括:①基因水平上的蛋白质改造。通过基因融合或基因定位诱变等手段改变蛋白质的结构和功能,将 DNA 合成技术用于蛋白质功能片断多肽基因的合成,可创造结构和功能全新的蛋白质;②蛋白质修饰。在酶工业领域中,对蛋白质分子进行化学修饰,提高蛋白质的稳定性和催化能力,或更适合酶固定化而用于实践。在临床医学上,可延长蛋白质药物的半衰期,改变其免疫原性,提高对蛋白酶的抗性。

### (四)基因工程

基因工程即重组 DNA 技术,根据人们的意愿对不同生物的遗传基因进行切割、拼接、或重新组合,再转入生物体内生产出人类所期望的产物,或创造出具有新遗传性状的生物类型的技术。

基因工程使人们可以克服种间的遗传障碍、定向培养创造出自然界所没有的新的生命形态,以满足人类社会的需要。

基因工程一般包括以下几个步骤:①取得符合人们要求的 DNA 片断,这种 DNA 片断称为“目的基因”;②将目的基因与质粒或病毒 DNA 连接成重组 DNA;③将重组 DNA 引入某种细胞;④将表达外源基因的细胞挑选出来。

1972 年第一批重组 DNA 分子诞生;次年,几种不同来源的 DNA 被装入载体后,被转入大肠杆菌中得到表达。

1982 年美国 Lilly 公司首先将重组胰岛素投放市场——标志着第一个基因工程药物的诞生。目前有或正在开发的基因工程药物有单克隆抗体、疫苗、基因治疗药物、干扰素、白介素、生长因子、重组可溶性受体、反义药物、人生长激素、凝血因子、集落细胞刺激因子、促红细胞生成素、SOD 等。

### (五)生物化学工程

生物化学工程(简称生化工程)是由生物科学与化学工程相结合的交叉学科,主要研究将生物技术的试验室研究成果转化为生产力过程中的带有共性的工程技术问题,是生物技术的一个重要组成部分。

现代生物化学工程的重点研究方向大致为:①新型生物反应器系统及相关培养和放大技术、工艺的研究与开发;②新型分离方法和设备的研究开发;③描述生物反应过程的数学



模型的建立;④生产过程的在线检测和控制手段的完善。

## 第二节 细胞工程

### 一、定义

细胞是生物体的基本结构单位和功能单位。细胞生物学与分子生物学的发展细化,从而出现了细胞工程这一新型学科。

细胞工程应用细胞生物学和分子生物学的方法,通过类似于工程学的步骤,在细胞整体水平和细胞器水平上,按照人类的意愿来改变细胞内的遗传物质以获得新型生物或特种细胞产品的一门综合性科学技术。

以细胞工程的关键技术之一的细胞融合为例,细胞工程的优势在于避免了分离、提纯、剪接、拼接等基因操作,只需要将细胞遗传物质直接转移到受体细胞中就能够形成杂交细胞。从植物到植物、从动物到动物、从微生物到微生物,甚至可打破物种分类界限而形成前所未有的杂交物种。

需要说明的是:①细胞工程的绝大多数操作是以细胞或其组成部分和构成的组织、器官为对象;②按照组成关系,细胞工程的研究对象主要有染色体、细胞核、原生质体、整个细胞、受精卵、胚胎、组织或器官等;③例外:转基因动物,是在基因水平上的转基因技术。

转基因动物的制备与经典的微生物、植物的转基因技术有着显著的不同——体现在基因转入的对象和技术方法上。

### 二、细胞工程的发展简介

1. 以细胞融合为例:1838年,马勒在脊椎动物肿瘤细胞中观察到了多核现象;1849年,罗宾在骨髓中也发现多核现象;1855~1858年,在肺组织、各种正常组织、发尖、坏死部位发现多核现象。

2. 在植物界领域中:1902年,哈泊兰德(德国植物学家)就预言植物细胞的全能型;1934年,温特(荷兰植物学家)发现生长素对植物生长的作用;1937年,高特里特、诺比考特(法国科学家)几乎同时立体培养了胡萝卜组织,并使细胞增殖;1960年,科金(英国诺丁汉大学教授)创造性地用酶解得方法,首次成功地从番茄幼苗的根部制备大量的原生质体;1972年,卡尔森等(美国)用 $\text{NaN}_3$ 作为融合诱导剂,将来自不同种的两个烟草原生质体进行融合,获得世界上第一个体细胞杂种植株。

3. 在动物界领域中:1907年,哈里森(美国生物学家)采用盖玻片悬滴培养蛙胚神经组织,存活数周,而且观察到细胞生长现象——开创动物细胞培养的先河;1965年,哈里斯、沃特金斯证明灭活的病毒在控制的条件下,可以诱导动物细胞的融合。

4. 细胞工程发展到今天,借助细胞工程技术可以把生命像积木那样组装起来,进行细胞水平上的生命组合。马格特、彼得斯(美国耶鲁大学教授)利用黑毛鼠、白毛鼠、黄毛鼠的受精卵(8细胞),获得黑、白、黄三种颜色的“组装鼠”;英国、美国还“组装”成功绵羊和山羊的嵌合体——绵山羊。

5. 试管植物、试管动物、克隆动物、转基因生物反应器等:1977年,英国采用胚胎工程技