



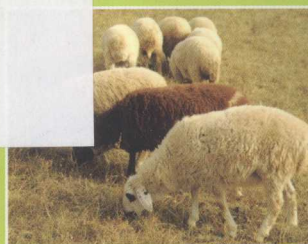
普通高等教育“十一五”国家级规划教材

CELL ENGINEERING

细胞工程

第二版

殷红 主编



化学工业出版社

013069705

Q813

07-2



普通高等教育“十一五”国家级规划教材

CELL ENGINEERING

细胞工程

第二版

殷红 主编



- [77] 王瑞, 康健, 张杰涛. 微囊化细胞或微囊化材料在组织工程中的应用. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(18): 3471-3474.
- [78] 王瑞, 康健, 张杰涛. 微囊化细胞或微囊化材料在组织工程中的应用. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(18): 3471-3474.
- [79] 王瑞, 康健, 张杰涛. 微囊化细胞或微囊化材料在组织工程中的应用. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(18): 3471-3474.
- [80] 王瑞, 康健, 张杰涛. 微囊化细胞或微囊化材料在组织工程中的应用. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(18): 3471-3474.
- [81] 王瑞, 康健, 张杰涛. 微囊化细胞或微囊化材料在组织工程中的应用. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(18): 3471-3474.
- [82] 王瑞, 康健, 张杰涛. 微囊化细胞或微囊化材料在组织工程中的应用. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(18): 3471-3474.
- [83] Wilmut J., Schnieke A. E., McWhir J., Young L. L., and King M. J. Cloning of a human embryo. Nature, 1997, 385: 810-813.
- [84] 吴昭, 成瑞, 肖雷. 新物种诱导多能干细胞的研究进展. 生物科学, 2007, 18(1): 1-5.
- [85] 伍成厚, 熊承郭, 叶秀娟. 被子植物胚珠发育与子房离体培养的研究. 植物学报, 2007, 33(1): 1-5.
- [86] 夏海英, 赵俊丽. 诱导性多能干细胞的研究进展. 生物科学, 2007, 18(1): 1-5.
- [87] 徐永华主编. 动物细胞工程. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [88] 许传俊等. 植物细胞工程. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [89] 薛庆寿主编. 体外培养. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [90] 杨弘超, 周建. 被子植物胚珠发育与子房离体培养的研究. 植物学报, 2007, 33(1): 1-5.
- [91] 杨江文, 李旭峰. 植物细胞工程. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [92] 杨吉成主编. 细胞工程. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [93] 杨武彬, 王磊, 侯典云, 戴霞. 无组织培养技术研究进展. 云南农业大学学报, 2004, 19(3): 154-157.
- [94] 杨学文, 刘飞, 陈双喜. 诱导性多能干细胞的研究进展. 生物科学, 2007, 18(1): 1-5.
- [95] Inyoung Yu, Kijun Hu, Kim Seung-Uhn, et al. Human Blinded Pluripotent Stem Cells from Vector gene Sequences. Science, 2007, 318(5848): 797-801.
- [96] 袁进, 邱正, 袁清, 袁清. 诱导性多能干细胞的研究进展. 生物科学, 2007, 18(1): 1-5.
- [97] 曾斌. 植物细胞工程. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [98] 占爱琴, 袁进, 袁清. 诱导性多能干细胞的研究进展. 生物科学, 2007, 18(1): 1-5.
- [99] 章静波主编. 组织细胞培养技术. 第2版. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [100] 张俊, 陶勇, 张永来. 哺乳动物胚胎干细胞的研究进展. 生物科学, 2007, 18(1): 1-5.
- [101] 张世强, 宋家驹. 测量型光生物反应器的研制. 海洋技术, 2007, 26(1): 1-5.
- [102] 张伟伟, 王瑞, 康健. 微囊化细胞或微囊化材料在组织工程中的应用. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(18): 3471-3474.
- [103] 张朝宇, 王水成, 刘爱群, 姜成旗. 辣椒花药离体培养的研究进展. 植物学报, 2007, 33(1): 1-5.
- [104] 张小建, 李健, 李健. 诱导性多能干细胞的研究进展. 生物科学, 2007, 18(1): 1-5.
- [105] 赵春红主编. 细胞工程. 北京: 化学工业出版社, 2007.



化学工业出版社



北航

C1677782

013069702

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研究的最新成果。全书共分3篇。第1篇为细胞工程基础,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;第2篇为植物细胞工程,主要包括植物的快速繁殖与脱病毒、胚胎和胚乳培养、胚珠和子房培养与离体受精、花粉和花药培养、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和植物种质的超低温保存技术等;第3篇为动物细胞工程,主要包括动物细胞培养的基本技术、细胞融合与杂交瘤技术、细胞重组与动物克隆以及干细胞技术等。

本书可用作综合院校、师范院校以及农林院校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或参考。

CELL ENGINEERING

细胞工程

第二版

图书在版编目(CIP)数据

细胞工程/殷红主编. —2版. —北京:化学工业出版社, 2013.5

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

ISBN 978-7-122-16873-3

I. ①细… II. ①殷… 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(2013)第060975号

责任编辑:赵玉清

文字编辑:张春娥

责任校对:蒋宇

装帧设计:尹琳琳

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印装:大厂聚鑫印刷有限责任公司

787mm×1092mm 1/16 印张14 $\frac{3}{4}$ 字数361千字 2013年9月北京第2版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 30.00 元

版权所有 违者必究

本书编写人员

主编 殷 红

编者 殷 红 郭 斌 赵宇玮

第二版前言

我们编写的《细胞工程》教材自2006年9月问世以来已经6年有余，在此期间，细胞工程领域的发展日新月异，新成果层出不穷。因此，在化学工业出版社和西北大学有关部门的大力支持下，我们在保持第一版原有体系和特色的基础上，参考国内外最新资料，对本教材的内容进行了全面修订，力求使新版教材能够更好地反映细胞工程学科的最新研究成果和最新技术，紧跟学科发展的步伐。

本书的修订工作历时两载，初稿完成后，承蒙曹孜义教授和曹峻岭教授再次认真审阅了书稿并提出了宝贵的指导性意见；在本书的出版过程中，化学工业出版社的有关编辑给予了很大的帮助并付出了辛勤的劳动，再次表示诚挚的谢意。由于细胞工程涉及范围很广，而且该学科发展非常迅速，加之作者水平所限，书中难免会有疏漏和不足，仍请读者不吝赐教，批评指正。

编者

2012年秋于西安

青 春 版

目 次 第 0005

第一版前言

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》也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。但由于该专业起步较晚,相关教材较少,尚不能满足各类院校不同的教学要求。因此,我们在多年教学工作中积累的资料和讲义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。

考虑到本课程一般是在相关专业学生学完植物学、动物学、生物化学、细胞生物学和微生物学等课程之后开设的,因此,在注意教材系统性的同时,本书在内容上尽量避免与其他前期基础课程的重复。本书主要分为3篇:第1篇为细胞工程基础,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;第2篇为植物细胞工程,主要包括植物的快速繁殖与脱病毒、胚胎和胚乳培养、胚珠和子房培养与离体授粉、花粉和花药培养、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;第3篇为动物细胞工程,主要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等。由于学生在微生物学和发酵工程等课程中要学到微生物的细胞培养技术,故本书对此不做介绍。

本书可用作综合院校、师范院校以及农林院校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或参考。

本书的出版得到了西北大学教务处和化学工业出版社的大力支持,获得学校教学改革与教材建设工程项目的资助,并被评为普通高等教育“十一五”国家级规划教材。本书由殷红担任主编,杨淑慎(西北农林科技大学)、郝建国(西北大学)担任副主编。在编写过程中,甘肃农业大学的曹孜义教授和西安交通大学医学院的曹峻岭教授不辞辛劳,在百忙中抽时间以严谨的治学态度仔细审阅了书稿,提出了许多非常宝贵的指导性意见;在本书的出版过程中,出版社有关人员以十分认真负责的态度给予了很大的帮助并付出了辛勤的劳动;在本书的编写和出版过程中还得到了西北大学贾敬芬教授、崔智林教授、王卫卫教授和汪涛老师以及边宇洁老师的大力帮助和支持;生命科学学院的硕士研究生陈娟莉、沈书庆和徐婉茹等同学帮助校核了部分书稿,在此一并表示诚挚的谢意。

由于本书涉及范围较广,而且该学科发展很快,加之作者水平有限,书中难免有疏漏和不足之处,敬请读者不吝赐教,批评指正。

编著者

2006年6月

目 录

第 1 篇 细胞工程基础

第 1 章 绪论 1

1.1 细胞工程的定义和基本内容 1

1.2 细胞工程中的基本技术 2

1.2.1 细胞培养技术 2

1.2.2 细胞融合技术 3

1.2.3 其他技术 3

1.3 细胞工程发展简史 3

1.3.1 植物细胞工程的发展 3

1.3.2 动物细胞工程的发展 4

1.4 细胞工程的主要应用 5

1.4.1 植物细胞工程的应用 5

1.4.2 动物细胞工程的应用 6

思考题 7

第 2 章 细胞工程中的常用设备 8

2.1 细胞工程实验室常用部分仪器设备 8

2.1.1 水纯化装置 8

2.1.2 超声波清洗器 8

2.1.3 蒸汽压力灭菌器 9

2.1.4 干热灭菌设备 10

2.1.5 过滤除菌装置 10

2.1.6 超净工作台 12

2.1.7 培养箱 12

2.1.8 摇床 13

2.1.9 移液器 13

2.1.10 显微镜 14

2.1.11 显微操作仪 14

2.1.12 冷冻存储设备 15

2.1.13 血球计数板 15

2.2 常用器皿 16

2.2.1 培养器皿 16

2.2.2 金属器械 17

2.3 常用培养用品的清洗 17

2.3.1 玻璃器皿的清洗 17

2.3.2 橡胶制品的清洗 17

2.3.3 除菌滤器的清洗 18

2.3.4 塑料器皿的清洗 18

2.3.5 金属器械的清洗 18

2.3.6 其他 18

2.3.7 常用洗涤液的种类和配制 18

思考题 19

第 3 章 无菌技术 20

3.1 常用灭菌方法及原理 20

3.1.1 热力灭菌 20

3.1.2 电离辐射灭菌 22

3.1.3 紫外线杀菌 23

3.1.4 过滤除菌 23

3.1.5 化学杀菌 23

3.2 无菌操作注意事项 24

3.2.1 无菌操作室的消毒 24

3.2.2 常见污染原因和预防措施 25

3.3 实验室生物安全 26

思考题 27

第 2 篇 植物细胞工程

第 4 章 植物细胞工程的基本原理和 技术基础 28

4.1 植物细胞工程的基本原理 28

4.1.1 植物细胞的全能性 28

4.1.2 植物激素的调控作用 28

4.2 植物细胞和组织培养所需的营养和 环境条件 29

4.2.1 培养基的组成和配制 29

4.2.2 影响植物组织培养的环境条件 32

4.3 外植体的选择及消毒 33

4.3.1 外植体的选择 33

4.3.2 植物材料的消毒 34

4.4 外植体的切取和培养 36

4.4.1 外植体的切取 36

4.4.2 外植体的接种和培养 36

思考题 37

第5章 植物离体快速繁殖和脱病毒

技术 38

5.1 植物的快速繁殖技术 38

5.1.1 快速繁殖的一般技术 38

5.1.2 无糖组织培养技术 42

5.1.3 快速繁殖中应注意的问题 45

5.1.4 快繁实例：月季快繁 47

5.2 植物工厂化育苗 47

5.2.1 工厂化育苗的概念和基本特点 47

5.2.2 工厂化育苗的一般程序 48

5.2.3 工厂化育苗的主要设施 48

5.2.4 操作实例：葡萄试管苗的快速

繁殖及工厂化育苗 49

5.3 无病毒植物的培养 50

5.3.1 脱除植物病毒的方法 50

5.3.2 脱病毒植株的鉴定 54

5.3.3 操作实例：葡萄脱毒及无毒苗

试管繁殖技术 55

思考题 56

第6章 植物的胚胎培养和离体受精 57

6.1 植物的胚胎培养 57

6.1.1 成熟胚的培养 57

6.1.2 幼胚的培养 58

6.1.3 植物胚胎培养的应用 61

6.2 胚珠和子房培养 62

6.2.1 胚珠培养 62

6.2.2 子房培养 63

6.2.3 未传粉子房和胚珠培养产生单

倍体 64

6.3 离体授粉 65

6.3.1 离体授粉技术的基本过程 65

6.3.2 影响离体授粉成功的因素 66

6.3.3 离体授粉技术在杂交育种上的

应用 67

6.3.4 操作实例：小麦雌蕊的离体

授粉 67

6.4 离体受精 68

6.4.1 雌雄配子分离 68

6.4.2 诱导融合 69

6.4.3 合子培养 70

6.5 胚乳培养 71

6.5.1 胚乳培养的基本过程 72

6.5.2 影响胚乳培养的主要因素 73

6.5.3 操作实例：大麦的胚乳培养 75

思考题 76

第7章 花药和花粉培养 77

7.1 花药培养 77

7.1.1 材料的选择 77

7.1.2 预处理 78

7.1.3 培养基 78

7.1.4 培养方式 80

7.1.5 培养条件 80

7.1.6 花粉植株的倍性及染色体加倍 81

7.2 花粉培养 82

7.2.1 材料的选择和预处理 82

7.2.2 花粉的分离 83

7.2.3 花粉培养方法 83

7.3 花药和花粉培养中的白化苗问题 84

7.3.1 白化苗产生的原因 84

7.3.2 植物白化苗研究存在的问题与

展望 87

7.4 操作实例 88

7.4.1 烟草花药培养 88

7.4.2 烟草花粉培养 88

思考题 88

第8章 植物的细胞培养及次生物质

生产 89

8.1 植物的单细胞培养 89

8.1.1 单细胞的分离 89

8.1.2 单细胞培养技术 90

8.2 植物细胞的悬浮培养 93

8.2.1 细胞悬浮培养的一般过程 93

8.2.2 悬浮培养工艺 94

8.3 植物细胞的大规模培养和次生物质

生产 95

8.3.1 细胞株的筛选 97

8.3.2 培养基的选择 97

8.3.3 培养条件的选择 99

8.3.4 生物反应器的选择 99

8.3.5 产物的分离纯化 104

8.3.6 操作实例：伊贝母细胞培养及

生物碱含量测定 105

思考题 106

第9章 原生质体培养和体细胞杂交 107

9.1 原生质体的分离与纯化 107

9.1.1 原生质体的分离 107

9.1.2 原生质体的纯化与活力测定 109

9.2 原生质体培养	111
9.2.1 培养基	111
9.2.2 培养方法	111
9.2.3 原生质体的再生培养	113
9.2.4 操作实例: 三叶半夏的原生质体 培养	114
9.3 体细胞杂交	115
9.3.1 原生质体的选择	115
9.3.2 原生质体诱导融合的方法	116
9.3.3 杂种细胞的选择	118
9.3.4 体细胞杂种的鉴定	119
9.3.5 体细胞杂种的遗传特征	120
思考题	120
第 10 章 植物种质的超低温保存	121
10.1 抑制外植体生长的离体保存方法	121

10.1.1 降低温度	122
10.1.2 降低环境中的氧含量	122
10.1.3 使用生长抑制物质	122
10.1.4 其他方法	122
10.2 离体植物材料的超低温冰冻保存 技术	123
10.2.1 超低温保存原理及基本程序	123
10.2.2 材料的选择	123
10.2.3 材料的预处理	123
10.2.4 冰冻保护剂预处理	124
10.2.5 降温冰冻操作	124
10.2.6 化冻操作	127
10.2.7 化冻材料的活力检测	128
10.2.8 超低温种质保存实例	128
思考题	129

第 3 篇 动物细胞工程

第 11 章 动物细胞培养所需的基本 条件	130
11.1 动物细胞培养基的组成和制备	130
11.1.1 水和平衡盐溶液	130
11.1.2 天然培养基	131
11.1.3 合成培养基	133
11.1.4 无血清培养基	135
11.2 影响动物细胞培养的环境因素	138
11.2.1 温度	138
11.2.2 pH	138
11.2.3 氧气和二氧化碳	139
11.2.4 渗透压	139
思考题	139

第 12 章 动物细胞培养技术	140
12.1 原代培养	140
12.1.1 取材	140
12.1.2 分离细胞	141
12.1.3 原代培养常用方法	145
12.2 传代培养	146
12.2.1 贴壁生长细胞传代	146
12.2.2 半悬浮生长细胞传代	146
12.2.3 悬浮生长细胞传代	146
12.3 细胞系与细胞克隆	147
12.3.1 细胞系(株)的建立	147
12.3.2 细胞克隆技术	147
12.3.3 克隆的分离	149

12.4 动物细胞的大规模离体培养技术	150
12.4.1 气升式培养系统	151
12.4.2 微载体培养系统	151
12.4.3 中空纤维培养系统	152
12.4.4 微囊培养系统	154
12.4.5 旋转式细胞培养系统	154
12.4.6 大规模动物细胞培养技术的 应用和存在的问题	155
12.5 动物细胞的超低温保存技术	155
12.5.1 冷冻保护剂	156
12.5.2 常规冷冻方法	156
12.5.3 玻璃化冻存方法	156
思考题	157

第 13 章 动物细胞融合和杂交瘤 技术	158
13.1 动物细胞融合技术	158
13.1.1 诱导细胞融合的方法	158
13.1.2 融合细胞的筛选	161
13.1.3 杂交细胞的遗传表型	162
13.2 杂交瘤技术与单克隆抗体生产	162
13.2.1 亲本选择	163
13.2.2 细胞融合	164
13.2.3 杂交细胞的筛选	164
13.2.4 杂交瘤细胞的克隆培养	165
13.2.5 单克隆抗体的生产	165
思考题	166
第 14 章 细胞重组及动物克隆技术	167

14.1	细胞重组技术	168
14.1.1	细胞重组的方式	168
14.1.2	细胞重组原料的制备	168
14.2	细胞核移植和动物克隆技术	170
14.2.1	核移植技术的一般操作程序	170
14.2.2	胚胎细胞核移植	172
14.2.3	体细胞克隆	173
14.2.4	异种克隆	174
14.3	动物克隆技术的意义及展望	174
14.3.1	促进生物学基础问题的研究	175
14.3.2	加速良种繁育, 保护濒危动物	175
14.3.3	培育转基因克隆动物, 生产生物药物	176
14.3.4	与基因和干细胞技术结合, 开展治疗性克隆	176
14.3.5	动物克隆技术中存在的问题	177
	思考题	178

第15章 干细胞技术 179

15.1	干细胞概述	179
15.1.1	干细胞研究的发展	179
15.1.2	干细胞的定义和分类	180
15.1.3	干细胞的生物学特点	181
15.2	细胞分离纯化常用技术	184
15.2.1	利用细胞体积和密度进行分离纯化	184
15.2.2	选择性细胞凝集	185
15.2.3	基于不同黏附特性的细胞分离方法	185
15.2.4	利用细胞表面标志分离纯化细胞的方法	185

15.3	胚胎干细胞	187
15.3.1	胚胎干细胞的分离	187
15.3.2	胚胎干细胞的培养	187
15.3.3	胚胎干细胞的鉴定	189
15.3.4	胚胎干细胞的诱导分化	189
15.3.5	胚胎干细胞的应用前景及存在问题	190
15.4	成体干细胞	192
15.4.1	间充质干细胞	193
15.4.2	造血干细胞	194
15.4.3	成体干细胞的应用前景和存在问题	197
15.5	诱导性多潜能干细胞	199
15.5.1	iPS 细胞的建立	200
15.5.2	iPS 技术的改进	201
15.5.3	iPS 细胞的应用前景和尚待解决的问题	204
	思考题	206

附录 207

附录1	植物组织细胞培养基	207
附录2	一些植物生长物质及其主要性质	213
附录3	动物细胞培养基	214
附录4	无血清培养液的添加成分	219
附录5	一些常用有机物的性质	220
附录5.1	一些碳水化合物及其主要性质	220
附录5.2	一些维生素及其主要性质	221
附录5.3	一些氨基酸及其主要性质	221

参考文献 223

第1篇 细胞工程基础

第1章 绪论

1.1 细胞工程的定义和主要内容

细胞工程 (cell engineering) 是现代生物技术的重要组成部分, 是在细胞水平研究、开发、利用各类细胞的一门技术。其主要内容就是通过无菌操作, 大量培养细胞、组织乃至完整个体, 或者应用细胞生物学和分子生物学等方法进行细胞水平的遗传操作, 以快速繁殖生物个体、改良品种、生产生物产品或活性成分等, 它是在细胞生物学、遗传学、生物化学、生理学、分子生物学、发育生物学、发酵工程等学科交叉渗透、互相促进的基础上发展起来的。

细胞工程涉及的范围很广。根据研究层面, 有组织水平、细胞水平、细胞器水平和分子水平等不同研究层次; 根据研究对象不同, 高等生物的细胞工程可分为植物细胞工程与动物细胞工程。由于植物和动物在细胞结构、生长方式和营养要求等方面有很大不同, 尤其在全能性表现上存在差异, 因此, 虽然植物细胞和动物细胞的离体培养具有一定的相似性, 如基本上都是模拟体内的生长环境, 提供良好的营养条件和物理环境, 使活的组织细胞在体外无菌条件下生长发育的过程; 培养的结果都是培养物在一定程度上表现出与在体内相似的生长行为, 如细胞生长、分裂、分化、代谢等, 但是二者在培养技术、研究内容及深度等方面都存在一些差异。如: ①能进行离体培养的材料范围不同。植物离体培养时可使用的材料比较广泛, 器官和组织 (包括它们的切块)、细胞、原生质体等都可进行培养。不论是幼嫩的尚未分化的细胞组织, 还是成熟的已分化的细胞组织, 都有可能通过适当的培养过程获得再生植株。而动物体外培养的材料主要是分散的细胞和小的组织块等, 较大的、较为成熟的动物器官一般很难在体外环境中长时间维持生命活动。②所需的培养条件不同。虽然离体培养的植物组织细胞在最初阶段处于异养状态, 但在培养后期, 特别是叶片形成后, 就可利用光能进行某种程度上的自养生长, 所以植物的组织和细胞培养大多需在一定的光照条件下进行。而培养的动物细胞是异养的, 必须完全依赖外界所提供的营养才能生长。因而在离体培养时, 动物细胞比植物细胞所需的营养更全面、更复杂, 而且对环境条件的要求也更严格。③生长形式不同。例如, 以植物组织块为材料时, 其生长可能是在表面形成愈伤组织, 也可能是直接分化出根、芽或胚状体。

总的来讲, 植物材料在离体培养条件下有较强的生长、分裂及分化能力, 而且由各种外植体分化成完整植株的全过程均可在体外进行; 而动物组织在体外培养条件下的生长形式主要以细胞的存活生长、有限增殖以及一定程度的分化为特征。培养的动物细胞虽然也能发生脱分化现象, 但在目前条件下, 还不能像植物细胞那样重返全能的未分化特征。一些高度分

化的动物细胞也很难在体外恢复分裂增殖活动,存活时间也很有限。

1.2 细胞工程中的基本技术

1.2.1 细胞培养技术

细胞培养是生物技术各领域的基础技术和重要的研究手段之一,大多数的动植物细胞,只要有适宜的条件,就能在体外的培养容器中生长和增殖。

1.2.1.1 植物细胞培养

由于植物细胞具有发育的全能性,即在适宜的条件下,一个来自已分化的根、茎、叶等组织的细胞,经过离体培养可以发育成同其亲本一样的完整植株。不管培养或操作的对象是植物胚胎、器官、组织或细胞,培养的目的都是为了使细胞全能性向操作者所需的方向表达,对培养结果起决定作用的都是植物细胞具有全能性,因此,所有类型的植物外植体的培养均属植物细胞培养(也即植物组织培养或称植物组织和细胞培养)范畴。由于植物细胞培养技术中培养的是脱离植物母体的部分,所以该技术也叫植物的离体培养(*culture in vitro*)。根据需要还可将该技术进一步细分,如,根据培养对象不同,可以分为:植株培养(*plant culture*),如试管苗或小植株的培养;胚胎培养(*embryo culture*),即成熟或未成熟的离体胚或胚珠的培养;器官培养(*organ culture*),包括对植物的根尖、茎尖、叶片、茎段、花器官各部分和未成熟果实等的培养;愈伤组织培养(*callus culture*),即从植物各外植体增殖而形成的愈伤组织的培养;细胞培养(*cell culture*),即分散的细胞或小的细胞团的培养;原生质体培养(*protoplast culture*),即去除细胞壁的裸露原生质体的培养等。根据培养方法不同可以分为:平板培养(*plate cultivation*)、微室培养(*microchamber culture*)、悬浮培养(*suspension cultivation*)等。还可根据培养目的分为:离体授粉(*in vitro pollination*)、试管嫁接(*test tube micrografting*)等。

植物离体培养的基本过程一般如下:①从健康植株的特定部位或组织,选取用于细胞和组织培养的起始材料(即外植体, *explant*)——可以是离体的植物器官(根、茎、叶、花、果实等)、组织(形成层、胚乳、皮层等)、细胞(体细胞和生殖细胞等)以及原生质体等。②选用次氯酸钠、漂白粉、升汞和酒精等消毒剂对外植体的表面进行消毒,接种在人工配制的培养基上,建立无菌培养体系。③外植体在适当的培养条件下,一般先形成愈伤组织,再由愈伤组织分化出芽和根,最终形成小植株;也可从植物组织培养物诱导胚状体发生而再生植株。

1.2.1.2 动物细胞培养

动物细胞培养有两种方式:一种是非贴壁培养,一般用于血液、淋巴细胞、肿瘤细胞,包括杂交瘤细胞和一些转化细胞等的培养,这些细胞可采用类似于微生物培养的方式进行悬浮培养。另一种是贴壁培养,大多数动物细胞需贴附于带适量正电荷的固体或半固体表面才能进行培养。

动物细胞培养的一般步骤是:①在无菌条件下从动物体内取出适量组织,剪切成小薄片或小块。②采用酶消化法或机械解离等方法使细胞分散。③将分散的细胞制成悬液,以一定的细胞密度接种于培养基中,在适宜条件下进行原代培养,并适时进行传代培养。

1.2.2 细胞融合技术

在两个或多个细胞相互接触后,其细胞膜发生分子重排,导致细胞合并、染色体等遗传物质重组的过程称为细胞融合。动物细胞融合与植物细胞融合的原理和步骤基本相似,不同之处主要是植物细胞融合前必须先脱壁制备成原生质体。

细胞融合过程主要包括以下几个步骤:①制备原生质体。由于植物细胞具坚硬的细胞壁,因此需用合适的酶液将其细胞壁降解后才有可能进行融合,而动物细胞则无此障碍。②诱导细胞融合。将两亲本细胞(或原生质体)的悬液调至一定的细胞密度,按比例混合后,一般采用聚乙二醇(PEG)等化学促融剂诱导融合,或用电激诱导的方法促进融合。③筛选杂合细胞。将上述诱导融合后的混合液移到特定的筛选培养基上,让杂合细胞生长,而其他未融合细胞不能生长,藉此获得具有双亲遗传特性的杂合细胞。

1.2.3 其他技术

近年来,动物克隆和干细胞技术等发展很快,已成为细胞工程中新的亮点。另外,染色体工程、组织工程、胚胎工程和转基因技术等生物技术领域中的高新技术也是在细胞工程的基础上发展起来的;酶工程、生化工程等也离不开细胞工程。因此,从某种意义上讲,细胞工程是生物技术的基础,是生命科学领域中最具活力的技术之一。

1.3 细胞工程发展简史

1.3.1 植物细胞工程的发展

1.3.1.1 萌芽阶段:理论渊源和早期的尝试(20世纪初至30年代中期)

在 Schleiden 和 Schwann 创立的细胞学说基础上,德国植物生理学家 Haberlandt 在 1902 年提出了植物细胞全能性的概念,认为植物细胞有再生出完整植株的潜在能力。他培养了几种植物的叶肉组织和表皮细胞等,限于当时的技术和水平,培养未能成功,但在技术上是一个良好的开端。1922 年, Haberlandt 的学生 Kötter 和 Robbins 采用无机盐、葡萄糖和各种氨基酸培养豌豆和玉米的茎尖,结果形成缺绿的叶和根,并能进行有限生长。1925 年, Laibach 将亚麻种间杂交不能成活的胚取出来进行培养,使杂种胚成熟,继而萌发。这些工作虽然是初步的,但对植物组织培养技术的建立和发展起到了先导作用。

1.3.1.2 奠基阶段:植物离体培养技术的建立(20世纪30年代中期到50年代中期)

1934 年,美国植物生理学家 White 培养番茄根,建立了活跃生长的无性繁殖系,并能进行继代培养,在以后的 28 年间转接培养 1600 代仍能生长。利用根系培养物,他们研究了光、温度、pH 以及培养基组成等对根生长的影响。1937 年,他们首先配制成由无机盐和有机成分组成的 White 培养基,发现了 B 族维生素等对离体根生长的重要性。在此期间, Cautheret 和 Nobecourt 培养块根和树木形成层使其生长。White、Cautheret 和 Nobecourt 建立的培养方法,成为以后各种植物组织培养的技术基础。1941 年, Overbeek 等在基本培养基上附加椰乳(CM),使曼陀罗心形期的胚离体培养能成熟。1943 年, White 正式提出植物细胞“全能性”学说并出版了《植物组织培养手册》,使植物组织培养开始成为一门新兴学科。1948 年, Skoog 和 崔澈在烟草茎切段和髓培养以及器官形成的研究中,发现腺嘌呤或腺苷可以解除吲哚乙酸(IAA)对芽形成的抑制,并诱导成芽,从而确定腺嘌呤/IAA 比例是根和芽形成的控制条件。1955 年, Miller 等发现了比嘌呤活力高 3 万倍的激动素,

此后,细胞分裂素与生长素的比值成为控制器官发育的模式,大大促进了植物组织培养的发展,而且至今仍是植物组织培养技术的关键之一。

1.3.1.3 蓬勃发展阶段(20世纪50年代末至今)

1958年,Steward等使悬浮培养的胡萝卜髓细胞形成了体细胞胚,并发育成完整植株。该实验充分证明了植物细胞的全能性学说,这是植物组织培养的第一大突破,影响深远。1960年,Cocking成功地用酶法分离原生质体,开创了植物原生质体培养和体细胞杂交工作,这是植物组织培养的第二大突破。1960年,Morel通过培养兰花茎尖,使其脱病毒并快速繁殖,该技术很快在兰花生产中得到广泛应用。在其高效益的刺激下,植物离体微繁殖技术和脱病毒技术得到了迅速发展,实现了试管苗的产业化,取得了巨大的经济效益和社会效益。1964年,Guha和Maheshwari成功地从曼陀罗花药培养出花粉单倍体植株,从而促进了植物花药单倍体育种技术的发展。另外,1956年,Routin和Nickell首次申报了利用植物细胞培养技术生产天然产物的专利,1959年,Tulecke和Nickell首次将微生物培养用的发酵工艺应用到高等植物细胞的悬浮培养中。目前,利用生物反应器大规模培养植物细胞生产次生产物方面已取得很大成就,并且日益发展为一个新兴产业。

1.3.2 动物细胞工程的发展

美国生物学家Harrison是公认的动物组织培养的创始人。1907年,他以淋巴液为培养基,观察了蛙胚神经细胞突起的生长过程,首创了体外组织培养法。1912年,Carrel把外科无菌操作的概念和方法引入了组织培养中,将鸡胚心肌组织块培养在血浆和鸡胚提取液的混合物内,并将原代细胞进行了长期的传代培养。1940年,Earle首创了从单个细胞进行克隆培养的方法,还建立了可以无限传代的小鼠结缔组织L细胞系。Carrel和Earle的工作令人信服地证明了动物细胞有可能在体外培养条件下无限生长。1951年,Earle等开发了能促进动物细胞体外培养的人工培养液,更进一步促进了动物细胞培养技术的发展和应

用。1954年,美国微生物学家索尔克利用原代培养的猴肾细胞制备的脊髓灰质炎疫苗首先进入工业化规模生产;1962年,Capstick等人将BHK(幼年仓鼠肾)细胞成功地进行了类似微生物细胞的悬浮培养,标志着动物细胞培养工业化应用的突破性进展。

1957年,冈田善雄等发现,已经灭活的仙台病毒可以诱使艾氏腹水肿瘤细胞融合,从此开创了动物细胞融合的崭新领域,植物细胞融合技术也是在动物细胞融合的基础上发展起来的。

1952年Briggs发现胚胎早期细胞的核具有发育成整个体的全能性;而发育到胚胎后期以后的核难以重演胚胎发育的过程。而1964年Gurdon用非洲爪蟾体细胞核进行的核移植实验提示了体细胞核仍具有遗传全能性。他们的工作为动物细胞核遗传全能性的研究和动物克隆技术的发展起到了巨大的推动作用。

20世纪60年代,童弟周教授及其合作者独辟蹊径,在鱼类和两栖类中进行了大量的核移植实验,在探讨核质关系方面做出了重大贡献。

1975年,Köhler和Milstein巧妙地创立了淋巴细胞杂交瘤技术,获得了珍贵的单克隆抗体,不仅在免疫学上取得了重大突破,而且对动物细胞的工业化应用产生了深远的影响。现已用动物细胞培养技术生产出了多种天然蛋白质产品,取得了良好的社会效益和巨大的经济效益。

1981年,Illmensee等首先用小鼠幼胚细胞核克隆出正常小鼠;进入90年代,利用幼胚细胞核克隆哺乳动物的技术已几近成熟。1997年,Wilmot领导的小组用体细胞核克隆出了

“多莉 (Dolly)” 绵羊, 使得哺乳动物的体细胞克隆成为了现实。1981 年, Evans 和 Kaufman 从小鼠囊胚中分离获得了内细胞团并建立了胚胎干细胞系, 开创和推动了胚胎干细胞研究的迅速发展。1998 年, Thomson 等成功建立了人胚胎干细胞系, 1999 年成体干细胞的“可塑性”又被发现, 其后干细胞研究不断取得新的进展, 使人们看到了在体外培育所需的细胞、组织甚至器官, 用于临床修复或取代人体内的坏损或病变组织器官的美好前景。2006 年, Takahashi 和 Yamanaka 从小鼠成纤维细胞建立了诱导性多潜能干细胞 (iPS 细胞), 又使得干细胞的研究向临床应用迈进了新的一步。世纪之交的这一系列重大突破和进展, 不仅对生命科学研究具有重要的理论价值, 对人类健康具有重要意义, 而且存在着巨大的潜在经济效益, 其应用前景十分广阔。

1.4 细胞工程的主要应用

1.4.1 植物细胞工程的应用

植物组织和细胞培养技术具有取材少、培养材料经济、培养条件可人为控制、生长周期短、繁殖率高、管理方便以及利于自动化控制等特点, 因此在生产和研究中得到了广泛的应用。

1.4.1.1 离体快速繁殖和脱病毒技术

离体快速繁殖和脱病毒技术是目前植物组织培养应用最多、最广泛和最有效的一个方面。

(1) 快速繁殖技术 快速繁殖技术 (rapid propagation) 也称微繁殖技术 (micropropagation) 等, 是利用组织培养方法, 将植物体某一部分的组织小块进行培养并诱导分化成大量的小植株, 从而达到快速无性繁殖的目的。其特点是繁殖速度快、周期短、不受季节气候等的影响, 并可实现工业化生产。这一技术已有几十年历史, 现已基本成熟。对新育成或新引进品种、稀缺良种、优良单株、濒危植物和基因工程植株等都可以通过离体快速繁殖及时提供大量优质种苗。目前, 很多观赏植物、园艺作物、经济林木、无性繁殖作物等都可用离体快速繁殖技术提供苗木。

(2) 植物的去病毒技术 植物的去病毒技术也称脱毒技术 (virus eradication), 是微繁殖技术的一个分支。植物的病毒病严重影响着农业生产。植物病原病毒的种类很多, 而且可以通过维管束传导, 因此, 无性繁殖的植物一旦染上病毒, 就会代代相传, 越趋严重。常见的马铃薯、草莓等一年比一年小的“退化”现象就是病毒造成的。过去人们曾试用过多种物理、化学及生物防治的方法, 都收效甚微。情况严重时, 只能采取拔除并销毁病株的方法。自从 20 世纪 50 年代初, Morel 和 Martin 发现用茎尖培养方法可以从严重感染病毒的大丽花 (*Dahlia pinnata*) 植株得到无病毒苗, 以及 Morel (1960) 又利用茎尖培养获得无病毒的兰花以来, 利用茎尖培养技术已在多种植物, 尤其是许多园艺植物中解决了病毒危害问题。此后, 还建立了通过愈伤组织培养脱病毒等多种获得无病毒苗的方法。目前, 应用组织培养脱毒技术已在无性繁殖的农作物 (甘薯、甘蔗等)、果树 (苹果、葡萄等)、蔬菜 (马铃薯、大蒜等) 和花卉 (兰花、水仙等) 等许多植物的常规生产中得到应用, 提高了产量或恢复了原品种的优良性状。

1.4.1.2 花药、花粉培养和育种

花粉是单倍体, 在离体条件下培养诱导成的单倍体花粉小植株, 其隐性基因可不受显性

基因的影响而表达,便于选择。经人工加倍后,就可获得纯合二倍体。自从 Guha 和 Maheshwari 首次从植物花药培养出花粉植株以来,世界上已有多种植物成功地获得了花粉植株。花药和花粉培养能缩短育种周期,简化选育程序,已成为一种在植物育种工作上十分有效的技术。现已育成一大批高产优质品种,并在生产中得到推广应用。其他技术如未授粉胚珠和子房培养也可以用于单倍体育种,在其基础上建立的离体授粉受精技术,既可用于植物生殖生物学的基础研究,又在杂交育种等方面也有重要意义。胚培养技术等可拯救杂种胚,获得一些有用的材料或品种。这些都表明,植物组织培养能应用于育种实践,加速植物育种的进程。

1.4.1.3 原生质体培养和体细胞杂交

无壁的植物原生质体仍具有在一定条件下长成完整植株的全能性。由于原生质体的膜很薄,所以给实验操作带来了不少便利。自从 Cocking 用酶法去除植物细胞壁以来,已有 300 多种植物的原生质体培养获得成功,为通过体细胞融合实现细胞杂交奠定了基础,也为外源基因导入等遗传操作以及许多细胞生物学基础研究提供了良好的材料。随着原生质体培养体系的不断完善,除成功获得一批体细胞杂种外,细胞融合技术近年来已在一些重要作物的育种中得到了初步应用。

1.4.1.4 次级代谢产物的生产

植物中存在着许多难以人工合成、但具有显著药用或经济价值的特殊物质。由于环境恶化和人类需求量的日益增大,许多植物资源正面临枯竭的危险。所以,利用植物组织或细胞大规模培养来生产人类需要的植物所特有的产物,受到了世界许多国家和科学工作者的极大重视,并已取得令人振奋的进展。目前,能用植物细胞工程生产的次级代谢产物包括药物、香精、食品、化工产品等许多类型,有些已投入工业化生产,预计今后还将会有更大的发展。

1.4.1.5 植物种质资源的保存和交换

植物种质资源的保存有两大难题:一是由于环境破坏,遗传资源日趋枯竭,造成有益基因的丧失;二是常规田间保存耗资巨大,而且在遇到自然灾害时往往达不到万无一失的目的。利用离体植物组织和细胞超低温保存技术,既可长期保存种质,还可大大节约人力、物力和土地,同时也便于种质资源的交换和转移,防止病虫害的人为传播,应用前景广阔。

1.4.2 动物细胞工程的应用

1.4.2.1 生物制品生产

20 世纪 50 年代动物细胞大规模培养技术的建立和发展,大大促进了生物活性物质、药品和疫苗的生产。例如,人们可以在反应器中大规模培养动物细胞,待细胞长到一定密度后,接种病毒,病毒再利用培养的细胞进行复制,从而产生大量病毒。基于动物细胞培养技术生产的病毒疫苗,在过去的几十年里,已经拯救了成千上万人和动物的生命。若能获得可分泌目标蛋白的细胞系,用大规模细胞培养技术还可以生产多种药用蛋白产品。自 20 世纪 70 年代以来,随着基因重组技术以及杂交瘤技术的建立和发展,许多外源蛋白基因可转入动物细胞并能大量扩增,使动物细胞能够高质量地表达有价值的蛋白质,如酶、细胞因子、干扰素、生长激素等。同时,杂交瘤技术使得各种单克隆抗体可以通过杂交瘤细胞分泌产生,这些单抗现已在多种疾病的诊断和治疗中得到了广泛应用。单抗在与化学药物、放射性同位素或毒素蛋白结合后,具有导向携带各种治疗药物攻击靶细胞的特性,已被用于抗肿瘤和其他多种疾病的治疗研究。

1.4.2.2 动物克隆

采用动物胚胎细胞和体细胞核移植技术,目前已经成功地克隆出了包括鼠、猪、牛、羊、兔和猴等在内的大量动物,异种克隆也已有成功的例证。这些技术的发展和运用,无疑为加速动物繁殖、培育优良畜种、保护珍稀动物等开辟了新的途径。由于克隆动物的遗传背景相同,因此它们也是模拟疾病以及开展对生长、发育、衰老和健康机理等方面研究的良好实验材料。细胞核移植技术在治疗性克隆等领域的应用中也具有重要作用。

1.4.2.3 干细胞技术

20世纪末以来,关于干细胞的研究不断取得突破性的进展。利用干细胞的无限增殖能力和多向分化潜能等特征,通过体外培养干细胞,诱导干细胞定向分化或利用转基因技术处理干细胞改变其特性,就有可能利用干细胞造福于人类。目前,各类造血干细胞移植技术已经逐渐成熟并在临床上得到常规应用。作为细胞治疗与组织工程的种子细胞,干细胞技术为修复组织器官损伤和退行性病变的细胞替代治疗带来了新的希望。将其作为疾病基因治疗的载体,则有可能解决目前基因治疗中所面临的用作载体的细胞在体外不能被稳定改造和传代的问题。胚胎干细胞与基因定位整合技术相结合,对于研究基因在胚胎发育中的表达与功能,揭示以前不能在体内充分证明的分子调控机制也具有重要的作用。胚胎干细胞可以经过体外诱导,为人类提供各种组织类型的细胞,这为药物筛选、鉴定及其毒理的研究提供了便利,也有助于人类疾病细胞模型的建立及新药开发。而成体干细胞可塑性的发现以及具有和胚胎干细胞类似生物学特征的iPS细胞研究的突破性进展,由于不涉及胚胎干细胞所面临的伦理、宗教及免疫排斥等问题,为干细胞的研究和应用开辟了更为广阔的空间。目前,干细胞生物学的研究几乎涉及了所有生物医药领域,对生命科学和人类健康都具有重大意义。

综上所述,细胞工程无论在生命科学基础研究、还是在生物高科技产业领域,都已取得举世瞩目的进展,并为人类带来了巨大的经济效益和良好的社会效益,而且还将获得更大的发展。

思 考 题

1. 什么是细胞工程?其主要研究内容和基本技术有哪些?
2. 在植物细胞工程和动物细胞工程的建立和发展过程中,哪些工作起到了关键性的作用?
3. 植物细胞和动物细胞培养技术有哪些主要区别?
4. 简述细胞工程的应用和发展前景,并追踪其最新进展。