

ShengWu 高职高专  
生物技术类专业系列教材

# 细胞工程技术

(第2版)

主 编 左伟勇 洪伟鸣

XIBAO GONGCHENG JISHU



重庆大学出版社

《细胞工程技术》  
主编：王明华

# 细胞工程技术

王明华 主编



清华大学出版社

## 内容提要

本书系统地介绍了细胞工程的相关理论、基本技术和应用等方面内容。全书共分为13个章,主要包括绪论、细胞工程实验室组成及实验基本操作技术、植物组织和细胞培养、植物原生质体培养和体细胞杂交、植物花药和花粉培养、植物胚胎培养和人工种子、植物种质资源的保存、动物细胞培养所需的基本条件、动物细胞培养技术、动物细胞融合和杂交瘤技术、细胞重组及动物克隆技术、干细胞技术及实训。本书在依循系统性的同时,兼备科学性、先进性和实用性,各章附有本章小结和思考题以便于学生自学,及时掌握有关内容。

本书可供高职高专农林院校生物工程、生物技术、动物药学、园林技术等相关专业学生使用,也可作为相关专业从业者的参考用书。

### 图书在版编目(CIP)数据

细胞工程技术 / 左伟勇,洪伟鸣主编. --2版. --  
重庆:重庆大学出版社,2022.7  
高职高专生物技术类专业系列教材  
ISBN 978-7-5624-8299-4

I.①细… II.①左… ②洪… III.①细胞工程—高等职业教育—教材 IV.①Q813

中国版本图书馆CIP数据核字(2022)第117900号

## 细胞工程技术

(第2版)

主 编 左伟勇 洪伟鸣

策划编辑:袁文华

责任编辑:袁文华 版式设计:袁文华

责任校对:王倩 责任印制:赵晟

\*

重庆大学出版社出版发行

出版人:饶帮华

社址:重庆市沙坪坝区大学城西路21号

邮编:401331

电话:(023) 88617190 88617185(中小学)

传真:(023) 88617186 88617166

网址:<http://www.cqup.com.cn>

邮箱:fxk@cqup.com.cn(营销中心)

全国新华书店经销

重庆市远大印务有限公司印刷

\*

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:12.75 字数:320千

2022年7月第2版 2022年7月第2次印刷

印数:3 001—5 000

ISBN 978-7-5624-8299-4 定价:36.00元

本书如有印刷、装订等质量问题,本社负责调换

版权所有,请勿擅自翻印和用本书

制作各类出版物及配套用书,违者必究

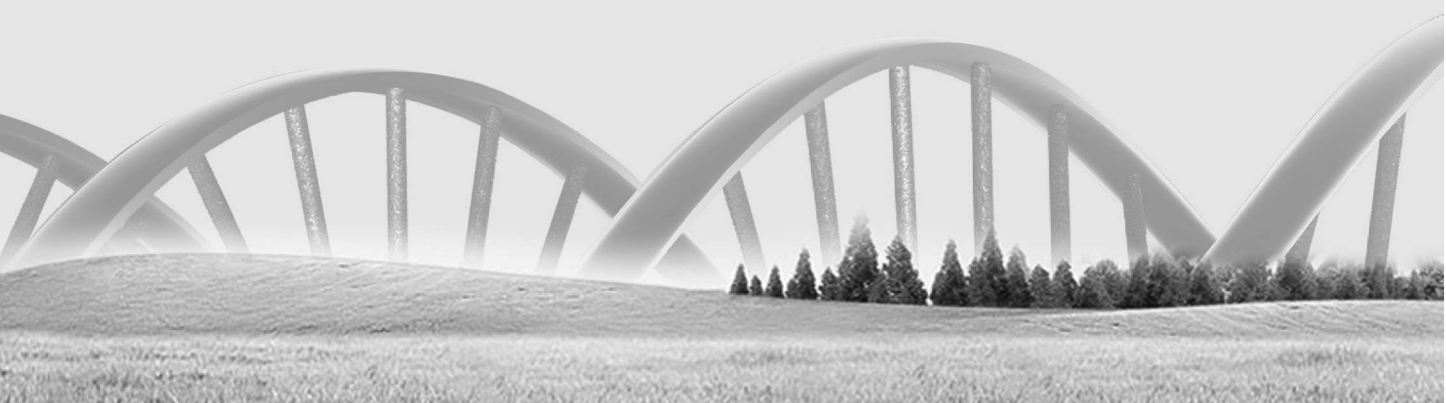
# 高职高专生物技术类专业系列教材

## ※ 编委会 ※

(排名不分先后)

总 主 编 王德芝

编委会委员	陈春叶	池永红	迟全勃	党占平	段鸿斌
	范洪琼	范文斌	辜义洪	郭立达	郭振升
	黄蓓蓓	李春民	梁宗余	马长路	秦静远
	沈泽智	王家东	王伟青	吴亚丽	肖海峻
	谢必武	谢 昕	袁 亮	张 明	张媛媛
	郑爱泉	周济铭	朱晓立	左伟勇	



## 高职高专生物技术类专业系列教材

### ※ 参加编写单位 ※

(排名不分先后)

北京农业职业学院

重庆三峡医药高等专科学校

重庆三峡职业学院

酒泉职业技术学院

甘肃林业职业技术学院

广东轻工职业技术学院

河北工业职业技术学院

漯河职业技术学院

三门峡职业技术学院

商丘职业技术学院

信阳农林学院

许昌职业技术学院

河南职业技术学院

黑龙江民族职业学院

湖北荆楚理工学院

湖北生态工程职业技术学院

湖北生物科技职业学院

江苏农牧科技职业学院

江西生物科技职业学院

辽宁经济职业技术学院

包头轻工职业技术学院

呼和浩特职业学院

内蒙古医科大学

山东潍坊职业学院

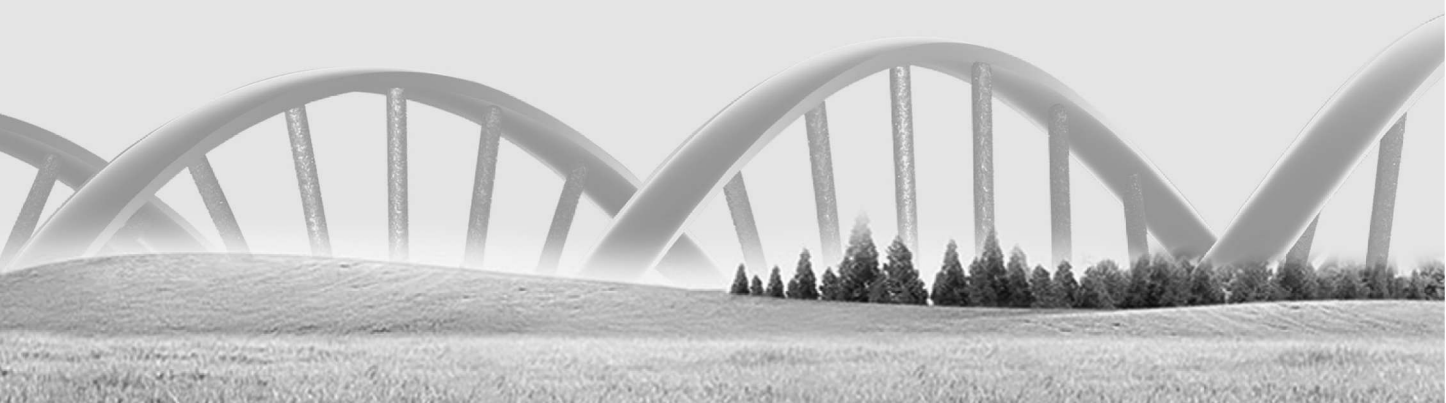
杨凌职业技术学院

宜宾职业技术学院

四川中医药高等专科学校

云南农业职业技术学院

云南热带作物职业学院



# 总序

大家都知道,人类社会已经进入了知识经济的时代。在这样一个时代中,知识和技术,比以往任何时候都扮演着更加重要的角色,发挥着前所未有的作用。在产品(与服务)的研发、生产、流通、分配等任何一个环节,知识和技术都居于中心位置。

那么,在知识经济时代,生物技术前景如何呢?

有人断言,知识经济时代以如下六大类高新技术为代表和支撑。它们分别是电子信息、生物技术、新材料、新能源、海洋技术、航空航天技术。是的,生物技术正是当今六大高新技术之一,而且地位非常“显赫”。

目前,生物技术广泛地应用于医药和农业,同时在环保、食品、化工、能源等行业也有着广阔的应用前景,世界各国无不非常重视生物技术及生物产业。有人甚至认为,生物技术的发展将为人类带来“第四次产业革命”;下一个或者下一批“比尔·盖茨”们,一定会出在生物产业中。

毫无夸张地讲,生物技术和生物产业正如一台强劲的发动机,引领着经济发展和社会进步。生物技术与生物产业的发展,需要大量掌握生物技术的人才。因此,生物学科已经成为我国相关院校大学生学习的重要课程,也是从事生物技术研究、产业产品开发人员应该掌握的重要知识之一。

培养优秀人才离不开优秀教师,培养优秀人才离不开优秀教材,各个院校都无比重视师资队伍和教材建设。生物学科经过多年的发展,已经形成了自身比较完善的体系。现已出版的生物系列教材品种也较丰富,基本满足了各层次各类型教学的需求。然而,客观上也存在一些不容忽视的不足,如现有教材可选范围窄,有些教材质量参差不齐,针对性不强,缺少行业岗位必需的知识技能等。

尤其是目前生物技术及其产业发展迅速,应用广泛,知识更新快,新成果、新专利急剧涌现,教材作为新知识新技术的载体应与时俱进,及时更新,才能满足行业发展和企业用人提出的现实需求。

正是在这种时代及产业背景下,为深入贯彻落实国家中长期教育改革和发展规划、推动高等农林教育综合改革等有关指示精神,重庆大学出版社结合高职高专的发展及专业教学基本要求,组织全国各地的几十所高职院校,联合编写了这套“高职高专生物技术类专业系列教材”。

从“立意”上讲,这套教材力求定位准确、涵盖广阔,编写取材精炼、深度适宜、份量适中、案例应用恰当丰富,以满足教师的科研创新、教育教学改革和专业发展的需求;注重图文并茂,深入浅出,以满足学生就业创业的能力需求;教材内容力争融入行业发展,对接工作岗位,以满足服务产业的需求。

编写一套系列教材,涉及教材种类的规划与布局、课程之间的衔接与协调、每门课程中的内容取舍、不同章节的分工与整合……其中的繁杂与辛苦,实在是“不足为外人道”。

也正是这种繁杂与辛苦,凝聚着所有编者在这套教材付出的辛勤劳动、智慧、创新和创意。教材编写团队成员遍布全国各地,结构合理、实力较强,在本学科专业领域具有较深厚的学术造诣和丰富的教学和生产实践经验。

希望这套教材能体现出时代气息及产业现状,成为一套将新理念、新成果、新技术融入其中的精品教材,让教师使用时得心应手,学生使用时明理解惑,为培养生物技术的专业人才,促进生物技术产业发展做出自己的贡献。

是为序。

全国生物技术职业教育教学指导委员会委员

信阳农林学院生物学教授

高职高专生物技术类专业系列教材总主编

王德芝





# 前 言

(第2版)

细胞工程技术是现代生物工程技术中非常具有现代性和生命力的组成部分,该课程在生物工程与生物技术人才培养中具有重要的作用,是生物工程、生物技术专业的核心课程之一,内容涵盖广泛,包括植物组织培养,植物体细胞杂交、动物细胞培养、动物细胞融合、单克隆抗体、胚胎移植等技术,交叉性强。由于该专业起步较晚,相关教材较少,在此期间,国内外细胞工程技术发展比较迅速,新理论、新技术和新工艺不断涌现,原有教材已不能满足现行专业教学的要求,迫切需要一本适合高职高专院校高素质技术技能人才培养以及行业发展的教材。

本书编写时以专业人才培养目标及课程教学大纲为指导,坚持以教学为主导、兼顾学科系统完整性和学生实用的原则,“够用、适用、实用”,以操作技能训练为主体,侧重于实践性教学环节,重视生产基本技能与实践操作能力的培养,使学生能够了解细胞工程的基本知识和基本技术,能够正确有效地运用细胞工程技术从事相关实践工作,掌握细胞工程生产的基本技术和主要生产流程。本书既可供高职高专农林院校生物制药技术、中药制药技术、药品生物技术、园林技术等生物技术类各专业的学生使用,也可作为相关从业者的参考用书。

本书由江苏农牧科技职业学院左伟勇、洪伟鸣担任主编,孙燕(江苏农牧科技职业学院)、张海霞(呼和浩特职业学院)担任副主编,参加编写的有张继玲(江苏农牧科技职业学院)、崔潇婷(江苏农牧科技职业学院)、王永娟(江苏农牧科技职业学院)、宋亮(江苏农牧科技职业学院)。在编写过程中,南京农业大学马海田教授和江苏农牧科技职业学院朱善元教授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。

本书的出版得到了江苏农牧科技职业学院和重庆大学出版社的大力支持,此外,本书学习和引用了同行和相关专业书籍的部分资料,在此向支持本书编写的所有单位和参考文献的作者表示诚挚的感谢。

由于本书涉及范围较广,而且该学科发展较快,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 者  
2022年6月

# 目 录 CONTENTS

## 第 1 章 绪 论

- 1.1 细胞工程的学习内容和任务 ..... (3)
- 1.2 细胞工程与其他现代生物技术的关系 ..... (4)
- 1.3 细胞工程的发展简史 ..... (5)
- 【本章小结】 ..... (7)
- 【复习思考题】 ..... (7)

## 第 2 章 细胞工程实验室及实验基本操作技术

- 2.1 实验室及仪器设备 ..... (11)
- 2.2 细胞工程基本操作技术 ..... (15)
- 【本章小结】 ..... (22)
- 【复习思考题】 ..... (22)

## 第 3 章 植物组织和细胞培养

- 3.1 植物组织与细胞培养原理 ..... (25)
- 3.2 植物离体无性繁殖 ..... (29)
- 3.3 无病毒植物培养 ..... (33)
- 3.4 植物细胞培养 ..... (37)
- 3.5 植物突变体的获得 ..... (41)
- 【本章小结】 ..... (43)
- 【复习思考题】 ..... (44)

## 第 4 章 植物原生质体培养和体细胞杂交

- 4.1 植物原生质体培养和体细胞杂交的概念及意义 ..... (47)
- 4.2 植物原生质体分离 ..... (49)
- 4.3 植物原生质体培养 ..... (53)
- 4.4 植物体细胞杂交 ..... (56)

【本章小结】 .....	(62)
【复习思考题】 .....	(62)
<b>第5章 植物花药和花粉培养</b>	
5.1 花药培养的基本概念 .....	(65)
5.2 培养材料的选取与制备 .....	(65)
5.3 植株再生 .....	(67)
5.4 单倍体植株鉴定和染色体加倍 .....	(71)
【本章小结】 .....	(73)
【复习思考题】 .....	(73)
<b>第6章 植物胚胎培养和人工种子</b>	
6.1 植物胚胎培养的概念和应用 .....	(77)
6.2 植物胚培养 .....	(79)
6.3 植物胚乳培养 .....	(81)
6.4 植物胚珠和子房培养 .....	(83)
6.5 植物离体授粉受精 .....	(85)
6.6 人工种子 .....	(87)
【本章小结】 .....	(89)
【复习思考题】 .....	(90)
<b>第7章 植物种质资源的保存</b>	
7.1 植物种质资源保存类型 .....	(93)
7.2 试管保存 .....	(94)
7.3 超低温保存 .....	(96)
【本章小结】 .....	(99)
【复习思考题】 .....	(99)
<b>第8章 动物细胞培养所需的基本条件</b>	
8.1 动物细胞培养基的组成和制备 .....	(103)
8.2 影响动物细胞培养的环境因素 .....	(107)
【本章小结】 .....	(108)
【复习思考题】 .....	(109)
<b>第9章 动物细胞培养技术</b>	
9.1 原代培养 .....	(113)

9.2 传代培养 .....	(119)
9.3 细胞系与细胞克隆 .....	(120)
9.4 动物细胞的大规模离体培养技术 .....	(124)
9.5 动物细胞的超低温保存技术 .....	(129)
【本章小结】 .....	(130)
【复习思考题】 .....	(131)
第 10 章 动物细胞融合和杂交瘤技术	
10.1 动物细胞融合技术 .....	(135)
10.2 杂交瘤技术与单克隆抗体生产 .....	(138)
【本章小结】 .....	(141)
【复习思考题】 .....	(142)
第 11 章 细胞重组及动物克隆技术	
11.1 细胞重组技术 .....	(145)
11.2 细胞核移植技术 .....	(147)
11.3 动物克隆技术的意义及展望 .....	(150)
【本章小结】 .....	(151)
【复习思考题】 .....	(152)
第 12 章 干细胞技术	
12.1 干细胞概述 .....	(155)
12.2 细胞分离纯化常用技术 .....	(156)
12.3 胚胎干细胞 .....	(159)
12.4 成体干细胞 .....	(164)
12.5 诱导性多潜能干细胞 .....	(166)
【本章小结】 .....	(168)
【复习思考题】 .....	(168)
第 13 章 实训	
实训 1 器械的清洗与消毒 .....	(170)
实训 2 细胞培养液的配制(母液的配制、培养基的制备与灭菌) .....	(173)
实训 3 培养材料取材与无菌培养技术 .....	(177)
实训 4 愈伤组织的诱导 .....	(178)
实训 5 植物细胞悬浮培养及种细胞筛选技术 .....	(179)

实训 6	鸡胚成纤维细胞原代分离培养 .....	(180)
实训 7	小鼠胚胎成纤维细胞的原代培养 .....	(182)
实训 8	MDCK 细胞(犬肾细胞) 的传代培养 .....	(184)
实训 9	MDCK 细胞的冷冻与复苏 .....	(186)
实训 10	磷酸钙沉淀法介导细胞转染 .....	(188)

参考文献



# 第 1 章

## 绪 论



## ▶▶ 学习目标

- 理解细胞工程的定义。
- 了解细胞工程的发展历史、主要内容和重要应用,了解细胞工程与其他生物工程的关系。

## ▶▶ 能力目标

- 细胞工程的定义与发展历史。
- 掌握细胞工程的主要内容。

---

生命科学发展异常迅猛,取得了一个又一个的瞩目成就,已成为 21 世纪发展最快的科学领域。在生命科学所取得的成就中,细胞工程所作出的贡献极为突出,新技术不断涌现,如生物反应器、克隆动物、干细胞技术等。作为生命活动的最基本单位,细胞的特殊性决定了个体的特殊性,细胞工程是在细胞学的研究基础上发展起来的,它的优势在于避免了分离、提纯、剪切、拼接等基因操作,只需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,因而能够提高基因的转移效率,在某种意义上讲,细胞工程是现代生物技术重要的基础和技术工具,与其他生物技术密切配合决定着生命科学技术的发展。

---

## 1.1 细胞工程的学习内容和任务

总的来说,细胞工程是应用细胞生物学和分子生物学的理论和方法,按照一定的设计方案,进行在细胞水平上的遗传操作及进行大规模的细胞和组织培养。细胞工程所涉及的范围很广,按主要技术领域来说有细胞与组织培养、细胞融合、细胞核移植、染色体操作及转基因生物等方面。以细胞工程为基础,又发展出一些新领域,如组织工程、胚胎工程和染色体工程等。通过细胞工程可以生产有用的生物产品或培养有价值的植株,并可以产生新的物种或品系,因此它是综合性的生物工程。

### 1.1.1 学习内容

#### 1) 动植物细胞与组织培养

细胞培养和组织培养都属于体外培养,是指从生物体内取出细胞或组织,模拟体内的生理环境,在无菌、适温和丰富的营养条件下,使离体细胞或组织生存、生长并维持结构和功能的技术。细胞与组织培养技术是细胞工程技术的最基本的技术,其他的细胞工程技术都离不开细胞或组织培养,近年来发展起来的组织工程和生物反应器就是在细胞与组织培养技术上直接发展起来的。

#### 2) 细胞融合

细胞融合又称为细胞杂交,是在自发或人工诱导下,两个或两个以上不同基因型的细胞或原生质体融合形成一个杂种细胞。细胞融合范围广,可作为一种重要手段广泛应用于细胞、遗传、免疫、药物和新品种培育的研究中,如利用细胞融合技术发展起来的第三代抗体技术——单克隆抗体技术,已成功地应用到生命科学基础研究和药物生产等领域,创造了可观的经济和社会效益,促进了生命科学的发展。

#### 3) 细胞核移植

细胞核移植,就是利用显微操作技术,将细胞核与细胞质分离,然后再将不同来源的细胞核和细胞质进行重组,形成杂合细胞。细胞核移植技术主要是用来研究胚胎发育过程中细胞核和细胞质的功能,以及两者间的相互关系,并探讨有关遗传,发育和细胞分化等方面的一些基本理论问题。克隆动物“多莉”羊的诞生使细胞核移植技术引起了全世界的关注。

#### 4) 染色体工程

染色体工程是按人们需要来添加或削减一种生物的染色体,或用别的生物的染色体来替换,可分为动物染色体工程和植物染色体工程两类。这项技术不仅广泛应用于优良品种的培育,如多倍体育种技术已经成为很常规的育种技术,而且也是基因组研究、基因转导和基因治疗等研究的有效手段和途径。

#### 5) 胚胎工程

胚胎工程是以生殖细胞和胚胎细胞为对象进行的细胞工程操作,主要技术包括体外受精、胚胎移植、胚胎切割等。这些技术进一步挖掘了动物的繁殖潜力,为优良畜禽品种的大量繁殖,稀有动物的种族延续提供了有效的解决办法。它在畜牧业和制药业等领域发挥着重要

作用,具有光明的应用前景。

#### 6) 干细胞与组织工程

干细胞是一类未分化的细胞或原始细胞,具有自我更新和分化潜能的细胞。根据来源分类,可分为胚胎干细胞和组织干细胞。胚胎干细胞来自受精卵分裂发育成囊胚时的内层细胞团,胚胎干细胞具有全能性,可以自我更新并具有分化为体内所有组织的能力。组织干细胞存在于成体组织中,数量很少,属于单能或多能干细胞,可以定向分为一种或多种不同的组织。因为干细胞在体外可以诱导分化为不同的组织,为临床移植和细胞治疗带来希望。组织工程是以干细胞研究为基础发展起来,将干细胞与工程材料学相结合,将自体或异体组织的干细胞经体外扩增后种植在预先构建好的聚合物骨架上,在适宜的生长条件下干细胞沿聚合物骨架迁移、铺展、生长和分化,最终发育形成具有特定形态及功能的工程组织。它有望解决临床上急需的人工组织与器官问题,且进展极为迅速,已经成为干细胞应用的主要方向。

#### 7) 转基因生物与生物反应器

转基因生物包括转基因动物和转基因植物。转基因动物是通过基因工程技术把外源的目的基因导入生殖细胞或早期胚胎并整合到受体细胞的基因组中,经发育形成所有的细胞都包含目的基因的动物个体。相对于转基因动物,转基因植物制备较为简单,是通过基因工程技术将外源的目的基因导入植物细胞后直接进行诱导培养就可再生出转基因植株,当这些转基因植株开花结果时,所改变的遗传性状就可以通过种子遗传给下一代植株。将目的基因在器官或组织中进行特异性高表达的转基因动物称为动物生物反应器,目前研究较多的有乳腺生物反应器、血液生物反应器等,其中乳腺生物反应器已经开始进入产业化。能够生产某些重要蛋白质和次生代谢物的转基因植物称为植物生物反应器,目前研究最多的是生产抗体和疫苗的植物生物反应器。

### 1.1.2 学习任务

通过学习,掌握细胞工程(包括动物细胞和植物细胞)的基本理论、原理和应用,研究在离体培养条件下,细胞、组织或器官所需营养条件和环境条件;细胞、组织或器官的形态发生规律;植物材料的快速大量繁殖方法;细胞融合方法和机理;再生个体的遗传和变异;种质资源的离体保存机理和方法;动物胚胎移植、胚胎体外生产及动物克隆技术等;改良生物品种,为人类造福。

## 1.2 细胞工程与其他现代生物技术的关系

现代生物技术是指基因工程、酶工程、细胞工程和发酵工程四大生物工程。细胞工程是现代生物技术的重要组成部分,细胞工程既是一门相对独立的学科,同时又与其他生物学科有着紧密的联系。

细胞工程技术为生物工程、发酵工程、生物化学工程提供融合细胞、筛选出稳定的动植物细胞系等培养对象。同时,细胞工程又借鉴这两者的一些相关技术,如生物反应器工程、在线检测与分析技术、发酵工艺等进行动植物细胞的大规模培养,生产活性代谢产物和单克隆抗

体、疫苗等药物。反过来,这些产品又可作为生物化学工程生产其他生物制品的原材料。

细胞工程利用基因工程的一些技术,如转基因技术实现转基因动物的制备,实现转基因生物反应器、人体器官的动物来源培养、基因重组细胞的培养等。

细胞工程可以通过细胞融合、转基因等技术改变生物的遗传性状或实现新型生物的构建,这样就为蛋白质药物或酶制剂生产提供了可能途径。转基因动植物生物反应器如乳腺生物反应器更为蛋白质药物或其他活性产品的生产提供了载体。动植物细胞大规模培养也逐渐成为活性物质生产的较好选择。

## 1.3 细胞工程的发展简史

### 1.3.1 植物细胞工程的发展

#### 1) 探索阶段(1902—1929)

细胞工程的理论基础是细胞学说和细胞全能性学说。在 Schleiden 和 Schwann 创立的细胞学说基础上,1902年,德国植物学家 Haberlandt 提出器官和组织可分割至单个细胞,提出植物细胞具有全能性,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 Kotte 和 Robbins 发现分生组织只能进行有限生长。1925年,Laibach 亚麻种间杂种幼胚培养,得到杂种植物。这些工作虽然是初步的,但为植物组织培养技术的建立和发展起了先导作用。

#### 2) 奠基阶段(1930—1959)

在这一阶段,建立了两个与培养技术有关的重要模式:一是培养基模式;二是激素调控模式。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、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,Gautheret 和 Nobecourt 培养块根和树木形成层使其生长。White、Cautheret 和 Nobecourt 确立的植物组织培养的基本方法成为以后各种植物组织培养的技术基础。1934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 培养烟草茎段时,发现腺嘌呤或腺苷可解除生长素对芽生长的抑制作用。1955年,Skoog 和 Miller 提出了植物激素控制器官形成的概念,指出通过改变培养基中生长素和细胞分裂素的比率,可以控制器官的分化,即生长素和细胞分裂素高促进根的分化,低则促进茎和芽的分化。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。

#### 3) 应用研究阶段(1960至今)

1958年,Steward 和 Reinert 以胡萝卜根的悬浮细胞诱导形成体细胞胚并分化成完整的小植株,使细胞全能性理论得到证实,这是植物组织培养的第一大突破,影响深远。1960年,Cocking 用酶法成功分离原生质体,开创了植物原生质体培养和体细胞杂交工作,这是植物组