

细胞工程原理与技术

王俊丽 编著

中央民族大学出版社

前 言

细胞工程，是应用细胞生物学和分子生物学的方法在细胞水平或细胞器水平上进行操作，按照人们的意愿来改变细胞内的遗传物质，从而获得新型生物或特种细胞产品、或产物的一门综合性科学技术。细胞工程与基因工程一起代表着生物技术最新的发展前沿，伴随着试管植物、试管动物、转基因生物反应器等相继问世，细胞工程在生命科学、农业、医药、食品、环境保护等领域发挥着越来越重要的作用。

目前已有一些细胞工程类的教材面世，但是在知识体系上存在着这样或那样的问题，有的侧重于植物细胞工程，但涉及动物细胞工程的内容很少；有的侧重于动物细胞工程，但把植物细胞工程的内容大大压缩。编者认为，能够系统、全面体现细胞工程的知识体系，并适合于生物科学与生物技术等专业的本科生和研究生的教材目前仍很缺乏。

由于长期从事细胞工程方面的教学和科研工作，作者在广泛搜集相关资料的基础上，结合自己的研究成果和教学体会，完成了本书的编写工作。在本书的编写过程中，主要参阅了《植物细胞工程》（朱至清编著，化学工业出版社，~~1994~~年）、《细胞工程》（李志勇编著，科学出版社，~~1994~~年）、《植物细胞工程原理与技术》（周维燕主编，中国农业大学出版社，~~1994~~年）、《植物基因工程原理与技术》（王关林、方宏筠主编，科学出版社，~~1994~~年）等相关著作、教材和资料，并引用了部分内容，特此加以说明。

本书力求做到系统、全面、准确地介绍细胞工程领域的主要原理、技术方法以及最新研究动态。但由于自身水平所限，书中难免存在不妥之处，敬请各位专家、读者批评指正。

编 者

圆年 远月

目 录

| | |
|-------------------|-----|
| 绪论..... | (员) |
| 一、细胞工程的定义..... | (圆) |
| 二、细胞工程的发展历史..... | (圆) |
| 三、细胞工程主要研究内容..... | (猿) |
| 四、细胞工程的应用..... | (源) |

上篇 植物细胞工程

| | |
|----------------------------|-----|
| 第一章 组织培养的设备 and 基本方法 | (员) |
| 第一节 实验室及设备 | (员) |
| 一、培养基制备室 | (员) |
| 二、无菌操作室 | (员) |
| 三、培养室 | (员) |
| 四、显微观察室 | (员) |
| 五、温室 | (员) |
| 第二节 器皿的选择与清洗 | (员) |
| 一、配制培养基需要的器皿 | (员) |
| 二、细胞培养需用的器皿 | (员) |
| 三、玻璃器皿的清洗 | (员) |
| 第三节 培养基的配制 | (员) |
| 一、母液的配制 | (员) |
| 二、培养基的配制 | (员) |
| 第四节 材料、器械的消毒与无菌操作 | (员) |

| | |
|------------------------------|-----|
| 一、灭菌的方法 | (圆) |
| 二、植物材料的消毒 | (圆) |
| 三、器械的消毒 | (圆) |
| 四、无菌操作 | (圆) |
| 第二章 植物细胞的全能性与脱分化、再分化 | (圆) |
| 第一节 植物细胞的全能性学说 | (圆) |
| 一、植物细胞全能性概念 | (圆) |
| 二、植物细胞全能性的实现途径 | (圆) |
| 第二节 胚性细胞 | (猿) |
| 一、合子和早期胚胎细胞 | (猿) |
| 二、顶端分生组织中的胚性细胞 | (猿) |
| 三、植物成熟器官中遗留的胚性细胞 | (猿) |
| 第三节 植物细胞的分化 | (猿) |
| 一、植物细胞的分化现象 | (猿) |
| 二、细胞分化的分子遗传学解释 | (源) |
| 第四节 植物细胞的脱分化 | (源) |
| 一、细胞脱分化过程的形态学和生物学变化 | (源) |
| 二、分化细胞脱分化过程中细胞结构的变化 | (源) |
| 第五节 分生细胞的再分化与植株再生 | (源) |
| 第三章 影响植物细胞脱分化和再分化的因子 | (缘) |
| 第一节 培养基对植物细胞脱分化和再分化的影响 | (缘) |
| 一、培养基的组成成分 | (缘) |
| 二、培养基的渗透压 | (缘) |
| 三、培养基的酸碱度 | (缘) |
| 第二节 植物激素对细胞脱分化、再分化的调控 | (缘) |
| 一、植物激素的种类和性能 | (缘) |
| 二、激素类物质对细胞增殖和器官发生的调控作用 | (缘) |
| 第三节 环境条件对细胞脱分化和再分化的影响 | (缘) |

| | |
|--|-----|
| 一、温度 | (猿) |
| 二、湿度 | (猿) |
| 三、光照 | (猿) |
| 第四节 供体遗传特性与生理状态对细胞脱分化 和再分化的影响 | (猿) |
| 一、供体植物的遗传特性对器官发生的影响 | (猿) |
| 二、供体植物生理状态对器官发生的影响 | (猿) |
| 第四章 植物组织培养与快速繁殖 | (猿) |
| 第一节 植物组织培养快速繁殖技术 | (猿) |
| 一、利用芽和茎尖培养进行快速繁殖 | (猿) |
| 二、利用其他类型外植体进行快速繁殖 | (猿) |
| 三、试管苗开花技术 | (猿) |
| 第二节 组织培养与脱病毒技术 | (猿) |
| 一、茎尖培养脱毒法 | (猿) |
| 二、高温和低温处理脱毒技术 | (猿) |
| 三、化学处理脱毒技术 | (猿) |
| 四、珠心胚培养脱毒法 | (猿) |
| 五、蒜苔圆盘培养脱毒法 | (猿) |
| 第三节 植物病毒的鉴定 | (猿) |
| 一、指示植物法 | (猿) |
| 二、抗血清鉴定法 | (猿) |
| 三、酶联免疫法 | (猿) |
| 四、电子显微镜检查法 | (猿) |
| 五、噬斑检测法 | (猿) |
| 第五章 胚胎培养 | (猿) |
| 第一节 胚培养 | (猿) |
| 一、成熟胚培养 | (猿) |
| 二、幼胚培养 | (猿) |

| | |
|---------------------------|------|
| 三、胚培养的应用 | (页码) |
| 第二节 胚乳培养 | (页码) |
| 一、胚乳愈伤组织的诱导 | (页码) |
| 二、胚乳愈伤组织的分化和植株再生 | (页码) |
| 三、胚乳愈伤组织和再生植株的染色体数目 | (页码) |
| 四、胚乳培养的应用前景 | (页码) |
| 五、胚乳培养的操作实例 | (页码) |
| 第三节 子房、胚珠培养 | (页码) |
| 一、传粉后子房的培养 | (页码) |
| 二、未传粉子房的培养 | (页码) |
| 三、胚珠培养 | (页码) |
| 四、试管受精在育种上的应用 | (页码) |
| 第四节 离体受精与合子培养 | (页码) |
| 一、精子的分离 | (页码) |
| 二、卵细胞的分离 | (页码) |
| 三、精卵离体融合 | (页码) |
| 四、合子的离体培养 | (页码) |
| 第五节 体细胞胚胎发生和人工种子 | (页码) |
| 一、体细胞胚胎发生过程 | (页码) |
| 二、影响胚状体发生和发育的因素 | (页码) |
| 三、人工种子 | (页码) |
| 第六章 花药培养 | (页码) |
| 第一节 花药培养技术 | (页码) |
| 一、花药培养的一般程序 | (页码) |
| 二、影响花药培养的因素 | (页码) |
| 三、花粉植株的倍性及染色体加倍技术 | (页码) |
| 四、雄核发育的途径 | (页码) |
| 第二节 游离小孢子培养 | (页码) |

| | |
|------------------------------|------|
| 一、小孢子的分离方法 | (页码) |
| 二、影响小孢子培养的因素 | (页码) |
| 第三节 单倍体的诱导 | (页码) |
| 一、单倍体在植物遗传育种中的应用 | (页码) |
| 二、诱导单倍体的途径 | (页码) |
| 第七章 原生质体培养与体细胞杂交 | (页码) |
| 第一节 原生质体的分离 | (页码) |
| 一、机械分离方法 | (页码) |
| 二、酶解分离法 | (页码) |
| 第二节 原生质体的培养 | (页码) |
| 一、培养基 | (页码) |
| 二、培养方式 | (页码) |
| 三、影响原生质体培养的因素 | (页码) |
| 第三节 原生质体培养操作实例 | (页码) |
| 一、烟草原生质体培养 | (页码) |
| 二、锦橙原生质体培养 | (页码) |
| 三、水稻原生质体培养 | (页码) |
| 第四节 原生质体融合与体细胞杂交 | (页码) |
| 一、原生质体融合 | (页码) |
| 二、杂种细胞的选择 | (页码) |
| 三、体细胞杂种的鉴定 | (页码) |
| 四、体细胞杂交技术在农业生产中的应用 | (页码) |
| 第八章 体细胞无性系变异与突变体筛选 | (页码) |
| 第一节 体细胞无性系变异的普遍性及遗传学特点 | (页码) |
| 一、体细胞再生植株的变异 | (页码) |
| 二、花粉植株的无性系变异 | (页码) |
| 三、影响无性系变异的因素 | (页码) |
| 四、体细胞无性系变异的遗传学特点 | (页码) |

| | |
|----------------------------|------|
| 第二节 无性系变异在育种上的应用 | (页码) |
| 一、人工诱发突变体 | (页码) |
| 二、突变体的筛选 | (页码) |
| 三、突变体筛选实例 | (页码) |
| 第九章 植物细胞培养 | (页码) |
| 第一节 植物细胞大量培养技术 | (页码) |
| 一、愈伤组织的诱导和悬浮细胞系的建立 | (页码) |
| 二、高产细胞系的筛选与保存 | (页码) |
| 三、植物细胞大量培养 | (页码) |
| 四、植物细胞两相培养技术 | (页码) |
| 五、植物细胞固定化培养 | (页码) |
| 第二节 影响植物细胞大量培养的因素 | (页码) |
| 一、光照 | (页码) |
| 二、搅拌 | (页码) |
| 三、通气 | (页码) |
| 四、培养基成分 | (页码) |
| 五、温度 | (页码) |
| 六、pH值 | (页码) |
| 七、接种量 | (页码) |
| 八、胁迫因子 | (页码) |
| 九、诱导子 | (页码) |
| 十、前提物质 | (页码) |
| 第十章 转基因植物 | (页码) |
| 第一节 植物基因工程的目的基因 | (页码) |
| 一、植物抗病虫害基因 | (页码) |
| 二、抗非生物胁迫、改良作物产品质量的基因 | (页码) |
| 第二节 植物转基因研究动态 | (页码) |
| 一、农作物转基因研究动态 | (页码) |

| | |
|--|--------|
| 二、果树转基因研究进展 | (园园) |
| 第三节 植物基因转化受体系统的建立 | (园园) |
| 一、植物基因转化受体系统应具备的条件 | (园园) |
| 二、基因转化受体系统的类型及其特性 | (园园) |
| 第四节 外源基因的导入 | (园园) |
| 一、农杆菌质粒介导法 | (园园) |
| 二、植物病毒载体介导法 | (园园) |
| 三、 阅读 的直接导入 | (园园) |
| 四、种质系统介导基因转化 | (园园) |
| 第五节 转基因植物的筛选与检测 | (园园) |
| 一、转基因植物的筛选 | (园园) |
| 二、转化体的选择培养 | (园园) |
| 三、转基因植物的分子生物学检测 | (园园) |
| 第六节 根癌农杆菌 栽 质粒介导基因转化 | (园园) |
| 一、根癌农杆菌的生物学特性 | (园园) |
| 二、根癌农杆菌转化程序及操作 | (园园) |
| 三、根癌农杆菌 栽 质粒转化的方法 | (园园) |
| 四、农杆菌转化系统的评述 | (园园) |
| 第七节 外源基因的基因枪导入法 | (园园) |
| 一、基因枪技术的优点 | (园园) |
| 二、基本方法 | (园园) |
| 第八节 改进转基因技术 | (园园) |
| 一、转基因植物中外源 阅读 的整合位点和拷贝数 ... | (园园) |
| 二、转基因植物中外源基因的沉默 | (园园) |
| 三、提高外源基因表达水平的策略 | (园园) |
| 四、目前植物转基因技术所面临的问题 | (园园) |
| 五、转基因植物的安全性 | (园园) |

下篇 动物细胞工程

| | |
|--------------------------|--------|
| 第十一章 动物细胞与组织培养 | (猿源) |
| 第一节 动物细胞的特点及细胞与组织培养 | |
| 的发展历史 | (猿源) |
| 一、动物细胞的特点 | (猿源) |
| 二、动物细胞与组织培养的定义 | (猿缘) |
| 三、发展历史 | (猿缘) |
| 四、动物细胞的体外培养生长特点 | (猿苑) |
| 第二节 动物细胞、组织培养的基本技术 | (猿怨) |
| 一、动物细胞体外培养特点 | (猿怨) |
| 二、体外培养细胞的生长与增殖过程 | (肆园) |
| 三、动物细胞培养的传统方法 | (肆员) |
| 四、原代培养和传代培养技术 | (肆圆) |
| 五、动物细胞大规模培养技术 | (肆缘) |
| 六、动物细胞生物反应器培养 | (肆苑) |
| 七、动物细胞体外培养实例 | (肆怨) |
| 第三节 组织工程 | (猿园) |
| 一、组织工程的定义 | (猿园) |
| 二、组织培养 | (猿员) |
| 第四节 器官培养 | (猿缘) |
| 一、器官培养的特点 | (猿缘) |
| 二、器官培养技术 | (猿远) |
| 第五节 干细胞 | (猿园) |
| 一、干细胞的特性 | (猿园) |
| 二、成体干细胞 | (猿源) |
| 三、胚胎干细胞 | (猿缘) |
| 四、干细胞培养与诱导分化的意义 | (猿源) |

| | |
|------------------------|------|
| 第十二章 动物细胞融合 | (猿园) |
| 一、动物单细胞的获得 | (猿园) |
| 二、细胞融合技术 | (猿园) |
| 三、动物细胞融合技术的应用 | (猿园) |
| 第十三章 胚胎工程 | (猿园) |
| 第一节 胚胎工程发展历史及意义 | (猿园) |
| 一、胚胎工程的定义 | (猿园) |
| 二、胚胎工程的发展历史及意义 | (猿园) |
| 第二节 胚胎工程的技术方法 | (猿园) |
| 一、体外受精 | (猿园) |
| 二、胚胎移植 | (猿园) |
| 三、胚胎分割 | (猿园) |
| 四、胚胎融合 | (猿园) |
| 五、动物的性别控制与胚胎性别鉴定 | (猿园) |
| 六、胚胎冷冻保存技术 | (猿园) |
| 第三节 试管动物 | (猿园) |
| 一、试管动物的定义 | (猿园) |
| 二、试管动物的培养流程 | (猿园) |
| 三、试管婴儿 | (猿园) |
| 第十四章 细胞重组与克隆技术 | (猿园) |
| 第一节 细胞重组 | (猿园) |
| 一、细胞重组的特点与意义 | (猿园) |
| 二、细胞重组技术 | (猿园) |
| 第二节 克隆技术 | (猿园) |
| 一、克隆的定义 | (猿园) |
| 二、克隆的技术方法 | (猿园) |
| 第十五章 转基因动物 | (猿园) |
| 第一节 动物转基因技术 | (猿园) |

| | |
|-----------------------------------|------|
| 一、显微注射法 | (猿园) |
| 二、逆转录病毒法 | (猿猿) |
| 三、胚胎干细胞法 | (猿猿) |
| 四、精子载体法 | (猿猿) |
| 五、体细胞核移植法 | (猿猿) |
| 六、受体介导法 | (猿园) |
| 七、提高动物基因转化率的策略 | (猿园) |
| 第二节 转基因动物的应用 | (猿园) |
| 一、转基因动物在生命科学基础研究中的应用 | (猿园) |
| 二、转基因技术在动物育种中的应用 | (猿猿) |
| 三、转基因动物在医学研究中的应用 | (猿猿) |
| 四、转基因动物研究中存在的问题及展望 | (猿猿) |
| 第三节 基因治疗 | (猿园) |
| 一、基因治疗的概念 | (猿园) |
| 二、基因治疗的现状与展望 | (猿园) |
| 附录：实验技术 | (猿猿) |
| 实验一 融合培养基母液的配制 | (猿猿) |
| 实验二 培养基的配制与灭菌 | (猿猿) |
| 实验三 植物培养材料的灭菌与接种 | (猿猿) |
| 实验四 种胚的离体培养 | (猿猿) |
| 实验五 愈伤组织的诱导 | (猿园) |
| 实验六 悬浮细胞系的建立 | (猿猿) |
| 实验七 植物原生质体的制备与融合 | (猿猿) |
| 实验八 草莓遗传转化实验(农杆菌介导法) | (猿猿) |
| 实验九 水稻悬浮细胞的遗传转化实验 (基因枪法) | (猿猿) |
| 实验十 动物组织的消化培养及单细胞的获得 | (猿猿) |
| 主要参考文献 | (猿猿) |

绪 论

生物技术是以生命科学为基础，利用生物体系（包括微生物、植物、动物的有机体或其组成部分，如器官、组织、细胞、原生质体等）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。生物技术主要包括细胞工程、基因工程、发酵工程、酶工程、蛋白质工程和生化工程。

发酵工程：指利用微生物的特定性状，通过现代工程技术，在生物反应器中生产有用物质的一种技术。

酶工程：就是利用酶、含酶细胞的催化作用完成某些重要化学反应，采用适当的生物反应器，工业化地生产人类所需的产品或达到某一特殊目的的一门技术。

蛋白质工程：指基于对蛋白质结构与功能关系的理论，利用生物技术手段对蛋白质的 ~~阅读~~ 编码序列进行有目的的改造，并分离、纯化蛋白质，从而获取具有优良性质或适用于工业生产条件的全新蛋白质的技术。

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实验室成果转化为生产力过程中的带有共性的工程技术问题。包括发酵工艺、过程检测与控制、反应器的设计与应用、产品的提取纯化等下游加工工艺。

基因工程：就是在分子水平上，提取或合成不同生物的遗传物质，在体外切割、再和一定的载体拼接重组，然后把重组的 ~~阅读~~ 分子引入细胞或生物体内，使这种外源 ~~阅读~~ 在受体细胞中进行复制与表达，按人们的需要繁殖扩增基因，或生产不同的产物或定向地创造生物的新性状，并能稳定遗传给后代。

一、细胞工程的定义

细胞工程是指应用细胞生物学、发育生物学、遗传学和分子生物学等方法，通过类似于工程学的步骤，在细胞或细胞器水平上按照人们的意愿来改变细胞内的遗传物质，以获得新的生物物种、品种或特种细胞产品的一门综合性技术。

二、细胞工程的发展历史

细胞工程的理论基础是细胞学说和细胞全能性学说。1838年，施莱登和施旺建立了细胞学说，细胞学研究进入快速发展阶段。德国学者戈特利布·科赫(1858年)在发表的《植物细胞离体培养实验》的论文中提出了细胞全能性的观点。戈特利布·科赫(1858年)进行了幼胚的离体培养，在含有糖、无机盐、氨基酸和植物提取物的培养基上，培养萝卜和辣根菜的幼胚，发现离体幼胚均可充分发育，并且可以提前萌发成苗。

1898年，藤田武夫培养亚麻种间杂交幼胚获得成功，并得到杂交种。从20世纪50年代起，幼胚培养被用来挽救远缘杂交早期败育的胚胎，因此可以认为，幼胚培养和胚胎拯救(藻菌杂交)技术是最早应用的植物细胞工程技术。

20世纪70年代，植物组织培养技术基本建立。李继侗(1958年)将7毫米以上的银杏胚培养成功，并且发现加入胚乳汁可以促进离体胚的生长。1970年，辛普森发现月族维生素、吲哚乙酸对植物生长具有促进作用。1971-1972年，辛普森、斯科菲尔德和曼迪科分别建立了植物组织的连续培养物，使离体的植物组织可以在人工培养基上不断生长，从而奠定了现代组织培养的基础。

20世纪80年代初，悦德曼等人用纤维素酶来分离植物原生质体并获得成功。分离得到的原生质体在培养过程中，可长出新

壁，进行分裂和分化，最终形成完整植株。获得成功的植物有胡萝卜、矮牵牛、油菜、石刁柏等。

在动物学界，1962年美国生物学家哈里森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，开创了动物细胞培养的先河。

德国胚胎学家 赫特林格(1962年)认为，早期胚胎细胞具有高度的分化潜能，将胚胎的细胞核移植到去核卵母细胞中，可以发育为新的胚胎。月野泽和 远藤(1966年)把非洲豹蛙囊胚的细胞核移到去核的卵母细胞中，得到了非洲豹蛙的胚胎克隆后代，从而证实了 赫特林格的观点。

韵藻(1970年)发现仙台病毒(藻可诱发艾氏腹水瘤细胞融合，形成多核细胞，为动物细胞融合技术的发展奠定了基础。诺贝尔医学和生理学奖获得者 悦和 远藤(1975年)将免疫小鼠的脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞进行融合，获得了既能在体外无限繁殖，又能产生特异性抗体的杂交瘤细胞，有力地促进了免疫学的发展。

细胞工程技术发展迅速，试管植物、试管动物、转基因生物反应器等相继问世。以色列用胚胎干细胞培养出人类心脏组织，可以正常跳动，以及美国培养的造血先驱细胞、中国培养的胃和肠黏膜组织等。1978年英国利用胚胎工程技术成功地培育出世界首例试管婴儿，1986年英国首次克隆出绵羊“多莉”，1999年英国又培育出首批转基因猪。

随着科学的发展和人们对生命科学的深入探索，细胞工程技术必将会在工业、农业、环境保护、资源利用等领域发挥越来越重要的作用。

三、细胞工程主要研究内容

根据研究对象的不同，可将细胞工程分为微生物细胞工程、