

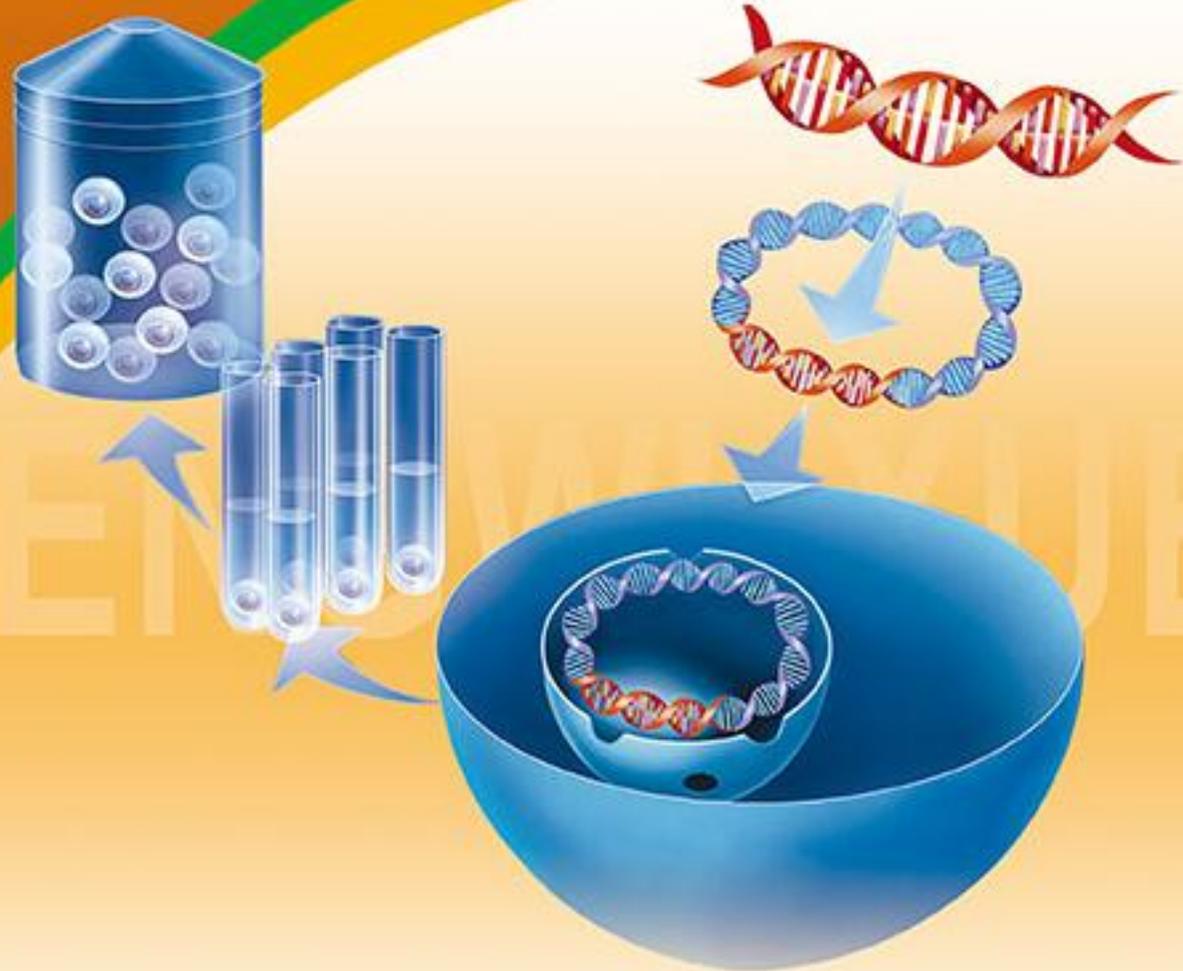


普通高中教科书

生物学

选择性必修3

生物技术与工程



浙江科学技术出版社

普通高中教科书

生物学

选择性必修3

生物技术与工程

主编 刘恩山



 浙江科学技术出版社

主 编 刘恩山

副 主 编 朱立祥 李晓辉

本册执行主编 陈月艳

本册编写人员 (按姓氏笔画排序)

刘 晟 张 超 张 瑾 陈月艳 管 旭

书 名 普通高中教科书·生物学 选择性必修3 生物技术与工程
主 编 刘恩山

出版发行 浙江科学技术出版社
杭州市体育场路347号 邮政编码:310006
办公室电话:0571-85176593
销售部电话:0571-85176040
网 址:www.zkpress.com
E-mail:zkpress@zkpress.com

排 版 杭州兴邦电子印务有限公司
印 刷 浙江新华数码印务有限公司

开 本	890×1240 1/16	印 张	10
字 数	207 000		
版 次	2021年3月第1版	印 次	2021年11月第2次印刷
书 号	ISBN 978-7-5341-8676-9	定 价	12.09元

版权所有 翻印必究

(图书出现倒装、缺页等印装质量问题,本社销售部负责调换)

定价批准文号:浙发改价格[2019]319号、[2020]331号 举报电话:12345、12315

责任编辑 顾旻波 曹梦洁
责任美编 金 晖

责任校对 赵 艳
责任印务 田 文

致同学们

同学们：

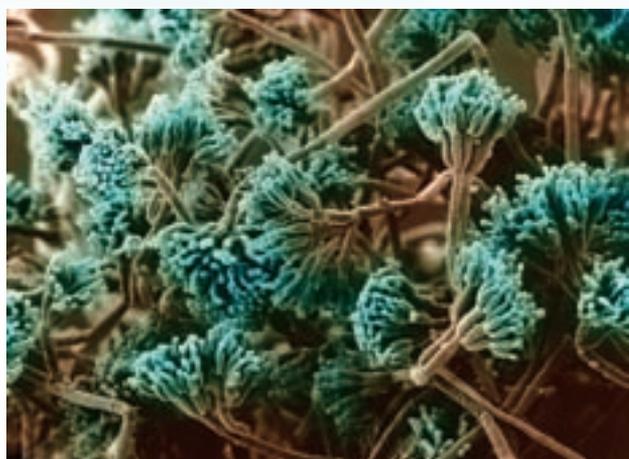
自从有了人类的历史，就有了人类利用生物的历史。现在，我们就要开始学习选择性必修模块《生物技术与工程》了。这一课程是偏重技术实践类的课程，是对高中生物学必修课程知识的进一步拓展和应用。

生物技术（**biotechnology**）是一门既古老又现代的技术。说它古老，是因为它的起源可以追溯到古人的酿酒工艺，其历史几乎与人类的文明史一样源远流长；说它现代，是因为生物技术的产品日新月异，我们所熟知的克隆羊“多莉”、人类基因组被破译、转基因大豆等都是现代生物技术的成果。

生物技术又称生物工程（**bioengineering**）。对生物技术如何下定义，一直是个有争议的问题，常因研究领域不同而有差异。随着生物技术的迅猛发展，1982年，国际合作及发展组织对“生物技术”这一名词进行了定义：生物技术是应用自然科学及工程学的原理，以微生物、动物、植物为反应器，将物料进行加工，以提供产品为社会服务的技术。例如，以酵母菌为反应器制酒、以醋杆菌为反应器制醋、以毛霉为反应器制腐乳、以青霉菌为反应器生产青霉素、以植物细胞为反应器生产抗癌药物紫杉醇、以转基因的大肠杆菌为反应器生产人胰岛素、以羊乳腺为反应器生产治疗人血友病的凝血因子等。可见，生物技术是利用活的生物个体、器官、组织和细胞进行生产，来增加和丰富产品的品种，提高人们的生活质量。

传统的生物技术从史前时代就一直为人们所开发和利用，主要是通过微生物的发酵来生产产品的技术。在殷墟出土的文物青铜器中就

有酒具，表明在公元前15世纪，我国就能酿酒。《尚书》中有“若作酒醴，尔惟曲蘖”的记载，意思是：要做甜酒，你必须用酒曲。醴是甜酒的意思，现在看来酒曲就是酵母菌菌种。17世纪前，尽管人们将微生物用于食品加工等，但是对于微生物本身是“触而不觉、食而不察、得其意而不知其好、受其害而不知其恶”的状态。1676年，列文虎克（Antony van Leeuwenhoek, 1632—1723）用自制的显微镜首次观察到细菌，开启了人类认识微生物世界的大门。微生物学创始人巴斯德（Louis Pasteur, 1822—1895）在面临酒变酸、蚕微粒子病、牛和羊的炭疽病、人狂犬病等具体问题，揭示了发酵的原理，证明发酵、腐败和传染病都与活的微生物有关。自此，人类开始有意识地利用酵母菌等微生物进行大规模发酵，生产酒精、乳酸、面包酵母、柠檬酸等产品。



1928年，英国医生弗莱明（Alexander Fleming, 1881—1955）发现青霉菌能产生青霉素。这一伟大发现不仅在第二次世界大战期间及战后拯救了成千上万人的生命，而且在实现青霉素的工业化生产过程中，逐渐形成了近代生物工程这门快速发展的学科。青霉素的工业开发获得成功，成为近代生物工程的标志。20世纪40年代，以获取微生物

的代谢产物——抗生素为主要特征的抗生素工业成为生物技术的支柱产业。20世纪50—60年代，氨基酸、酶制剂等成为发酵产品的新成员。人们还成功地利用诱变育种的手段获得微生物的突变体，以改良菌种，提高发酵产品的产量。

以微生物发酵为主的生物技术在发展过程中，从家庭走向工厂，从食品加工到应用于生产和生活的各个领域，对提高人们的生活质量和身体健康水平具有重要意义。不过，对微生物进行诱变和选择的过程只能提高微生物某种已有的功能，并不能赋予其新的遗传特性，这就限制了生物技术的应用范围。

科学与技术，如同两个互动的车轮，它们的协调和飞速运转，是现代社会发展的重要特征。1953年，沃森（James D. Watson, 1928— ）和克里克（Francis Crick, 1916—2004）揭示了DNA的双螺旋结构，随后遗传密码的破译等一系列重大科学发现终于使得人们对DNA的操作——将外源目的基因转入某种生物体内并生产有价值的产品成为可能，现代生物技术的主体技术——基因工程应运而生。正如沃森所言：“我和克里克很快就认识到我们的发现在思想意义上的重要性，但我们怎么也料想不到，DNA双螺旋结构的发现竟对科学和社会产生爆炸性的影响……我们不再只是旁观大自

然，而是能实际解读生命的基本蓝图，插手生物的DNA。我们终于能够对付从纤维囊泡症到癌症等不同的遗传疾病，能运用DNA指纹技术推动刑侦案件调查的革命。我们能以先前想不到的有效方法，改善农作物品种……”沃森所言种种，正是基因工程给我们的生活所带来的巨大变化，它带动了现代生



物技术的兴起，并很快产生了许多生命科学的高技术产业。与传统生物技术相比，现代生物技术的一个重要特征是对生物材料的结构或物质进行拆分、修改、增删、重组，以此来满足人类对健康、发展的需求。

根据生物工程的操作对象和操作技术上的差异，生物工程主要包括基因工程 (gene engineering)、细胞工程 (cell engineering)、发酵工程 (fermentation engineering)、蛋白质工程 (protein engineering)、胚胎工程 (embryo engineering)、酶工程 (enzyme engineering) 和生态工程 (ecological engineering)。例如，人们可以利用发酵工程大规模工业化培养青霉菌，以获得青霉素；利用植物细胞工程获得脱病毒的植株；利用动物细胞工程培育出克隆羊、克隆猪、克隆牛；利用基因工程获得被转入了毒蛋白基因的抗虫棉……其中，作为生物工程的主体——基因工程的发展，带动和促进了细胞工程、发酵工程、蛋白质工程等



领域的发展，在食品、医疗、农业、环保等方面产生重大影响。随着生物工程的迅猛发展，生物工程各分支领域之间的界限已趋于模糊，它们相互交叉，相互补充，高度综合。例如，人们可以利用经过改造的大肠杆菌在装有培养液的发酵罐中大量生产人的胰岛素，就是综合运用工程技术的成果，即利用基因工程从分子水平上改变物种的遗传特性，再通过发酵工程来实现其产业化。商品属性是生物技术区别于生命科学的特性之一，高技术、高投入、高产出是生物技术产业的显著特点。如今，生物技术的开发和应用日趋广泛和深入，吸引了越来越多的人从事与生物技术研发和生产相关的职业。

从公元前原始的酿造技术，到20世纪70年代的转基因技术，直至20世纪90年代

的高等哺乳动物无性繁殖技术和21世纪初人类基因组序列的公布，生物技术给人类的生活带来了日新月异的变化。纵观人类文明的历史长河，生物科学技术的发展过程浓缩着人类生活的智慧精华。学习和了解生物技术的内容，可以使我们拓展、延伸和应用已有的生物学知识，拓宽科技视野。本模块内容主要包括发酵工程、细胞工程、基因工程以及生物技术的安全性和伦理问题，在各章内容中，同时安排了丰富的动手实践活动。通过本模块的学习，我们不仅能了解上述生物工程的一般原理和实施过程，还有机会通过实践活动亲自体验生物技术的应用价值。我们还会尝试提出初步的工程学设计构想，设计实践方案并进行实验，既能参与自制一杯美酒、腌制一罐腐乳，体验传统生物技术带给我们的美食享受，又有机会亲自克隆一种植物、体外扩增某一基因，感受现代生物技术的神奇和其对人类生活的巨大影响。在本模块学习过程中，我们要做到以下几方面：努力提升自身理论联系实际意识和能力，关注生活中的生物技术产品及其价值；应用已有生物学知识分析生物工程的理论和技术原理；积极主动进行实验设计并大胆进行实践尝试，在实验过程中积极思考，有所创新，认真撰写实验报告，讨论交流实验结果。

科学技术是一把“双刃剑”，生物技术的发展在为人类带来巨大利益的同时，也给人类带来了某些潜在的威胁和社会伦理问题，引起了各国政府和民众的高度关注和激烈争论。生物工程应在法律和伦理的约束下，以人类需求为目标进行产品的开发，进而推动生物学的不断进步，提高人们的生活质量。本模块内容在呈现各项生物工程的主要原理和技术操作的同时，也从科学、技术、社会相互关联的角度，阐释现代生物科技对人类生活、生产和社会发展的影响，激发我们运用生物科技造福人类的兴趣和志向，同时关注和理性看待生物技术的利与弊。现代生物技术已渗透入我们生活的方方面面，不仅影响我们的物质生活，也在影响或改变着我们的价值观念。DNA不再只是科学家在实验室里的研究对象，转基因食品正逐渐进入人们的生活，基因水平上的疾病诊断和治疗呈现令人期待的应用前景。通过本模块内容的学习，相信同学们会尝试运用生物学的原理，面对健康、饮食、伦理、社会及环境安全等个人和社会问题，做出理性而科学的判断和决策。

目录

第一章 发酵工程 /1

- 第一节 微生物的培养需要适宜条件 /3
- 第二节 纯净的目标微生物可通过分离和纯化获得 /11
- 第三节 发酵工程为人类提供多样的生物产品 /24
- 本章小结 /38



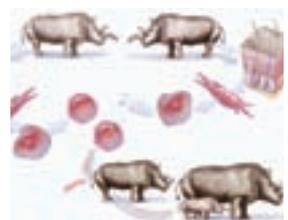
第二章 植物细胞工程 /39

- 第一节 通过植物组织培养可获得完整植株 /41
- 第二节 通过体细胞杂交可获得新的植物体 /55
- 本章小结 /60



第三章 动物细胞工程 /61

- 第一节 细胞培养是动物细胞工程的基础 /63
- 第二节 通过细胞核移植克隆动物 /69
- 第三节 通过细胞融合可产生具有新特性的细胞 /77
- 第四节 对动物早期胚胎或配子进行处理可获得目标个体 /85
- 本章小结 /96

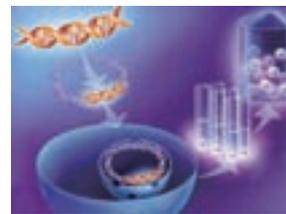


第四章 基因工程 /97

第一节 基因工程赋予生物新的遗传特性 /99

第二节 基因工程及其延伸技术应用广泛 /122

本章小结 /132



第五章 生物技术的安全与伦理 /133

第一节 转基因产品的安全性引发社会的广泛关注 /135

第二节 我国禁止生殖性克隆人 /142

第三节 世界范围内应全面禁止生物武器 /147

本章小结 /152



第一章 发酵工程



利用发酵工程能以更加低廉的成本生产药物

20世纪70年代，中国科学家屠呦呦及其研究团队在青蒿中发现高效抗疟疾药物青蒿素，并因此获得2015年诺贝尔生理学或医学奖。然而，植物中青蒿素含量较低，往往不能满足医疗需求。2013年，美国科学家成功利用经过基因改造的酵母菌，通过发酵工程，大规模工业化生产青蒿素的前体物质——青蒿酸。这一发酵工程产品将使人们有可能以更加低廉的成本抗击疟疾。那么，什么是发酵工程呢？



发酵工程是采用现代工程技术手段，利用微生物的某些特定功能，为人类生产有用的产品，或直接利用微生物的工作过程。发酵工程中的主角是微生物，在发酵工程中，如何纯化、选育、培养目标微生物？除了一些药物以及人们食用的面包、酸奶、酱油、醋、腐乳等，还有哪些人类生产、生活需要的物质是通过发酵工程生产的呢？

学习目标

1. 阐明使用无菌技术可获得纯净的微生物培养物。
2. 概述分离和纯化微生物的平板划线法和稀释涂布平板法。
3. 举例说明通过调整培养基的配方，可有目的地培养某种微生物。
4. 概述测定微生物数量的稀释涂布平板法和显微镜计数法。
5. 举例说明发酵工程在医药、食品及其他工农业生产上有重要的应用价值。

本章学习应聚焦的关键能力

1. 认识无菌技术是获得纯净微生物培养物的重要方法，尝试配制培养基培养酵母菌，学会无菌操作方法。
2. 认识平板划线法和稀释涂布平板法是分离和纯化微生物的重要方法，尝试分离和纯化酵母菌，学会平板划线法和稀释涂布平板法。设计实验方案，有目的地培养某种微生物。
3. 认识稀释涂布平板法和显微镜计数法是测定微生物数量的重要方法，尝试分离和计数能分解尿素的微生物，学会稀释涂布平板法计数微生物。
4. 认识传统发酵技术是生产某些食品的重要方法，尝试制作果酒、果醋和泡菜，学会传统发酵方法。

第一节 微生物的培养需要适宜条件

微生物（microbe）是人们对所有形体微小、肉眼不可见的生物的统称。微生物种类繁多，分布广泛，在自然界中常杂居混生。在培养人们需要的微生物即目标微生物时，一方面需要提供其适宜的生长环境，另一方面需要除掉与目标微生物具有竞争和寄生关系的异种微生物，这就需要一定的操作技术。在培养某种微生物时，防止其他微生物混入，保持无菌物品及无菌区域不被污染的操作技术称为无菌技术（aseptic technique）。那么，微生物的培养需要哪些适宜的条件？无菌技术又是如何实现无菌的呢？

本·节·要·点

- 微生物
- 培养基
- 无菌技术
- 接种

培养基为目标微生物提供适宜的生长环境

我们养一只小猫或者小狗，不仅要给它喂食、喂水，也要考虑它的大小便等问题。培养微生物也一样，需要给它们提供生长所需的各种物质以及满足它们生长繁殖所需的各种条件。培养基（culture medium）就是人们为满足微生物生长繁殖或积累代谢产物的需求而配制的混合养料。

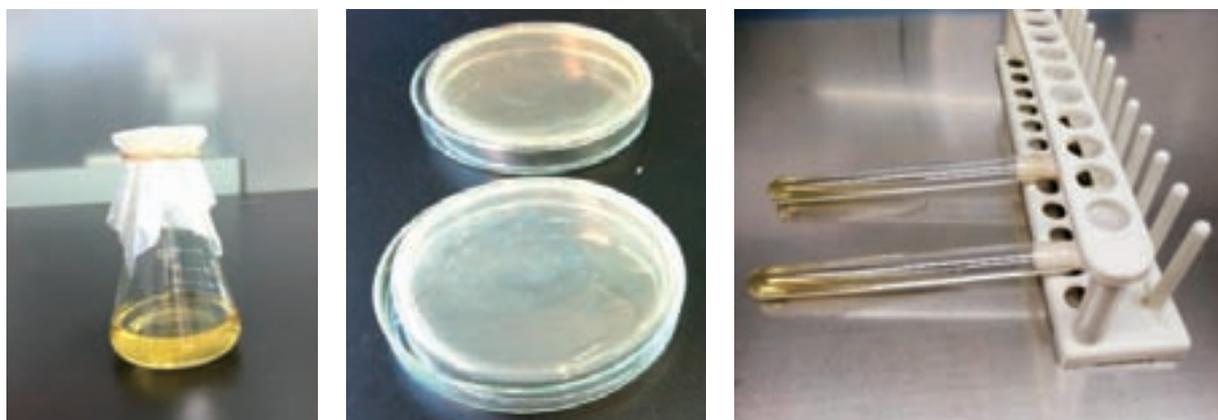
培养基的成分与细胞的化学组成及其在细胞代谢中的作用有关。水在细胞中的含量最高，也是细胞的重要组成成分。因此，培养基中含量最高的也是水。无机盐对于维持细胞的生命活动具有重要意义。在培养基中，无机盐含量的多少不仅会影响微生物细胞的吸水能力，也会影响微生物的代谢及生长。微生物构建自身有机物所需要的碳元素可能来自无机碳，如 CO_2 ，也可能来自有机物。这些为微生物生长提供碳元素的物质统称为碳源。培养基中还必须注意添加足量的含氮化合物，以便微生物能利用这些含氮化合物合成自身的蛋白质等有机物。这些为微生物生长提供氮元素的物质统称为氮源。由于自身的缺陷，有些微生物对培养基成分有特殊的需求，需要在培养基中有针对性地添加某些特定的维生素、氨基酸、嘌呤和嘧啶等有机化合物才能生长，这些化合物统称为生长因子（growth factor）。在满足微生物生长所需的各种物质的同时，还要考虑微生物生活所需要的能量来源。就异养型微生物而言，培养基中的有机物就能满足它们对能量的需求；对于自养型微生物而言，它们需要的是光能或者是化

学反应释放的能量。

概括地说，培养基的成分中应包含微生物生长所需的水、无机盐、碳源、氮源、生长因子等。

培养基的理化特性影响微生物的生长。不同的微生物代谢需求不同，只有满足目标微生物的代谢需求，才能使其快速生长。“细菌喜荤，霉菌喜素”，是说细菌培养基中要含有较高的有机氮，因此常用蛋白胨和酵母提取物等来配制；霉菌培养基一般用可溶性淀粉加无机物配制，或用添加蔗糖的豆芽汁等配制。此外，细菌通常要求在中性偏碱的环境中生长，霉菌要求在中性偏酸的环境中生长，因此在制备培养基时要注意调节培养基的pH。

根据培养基的物理特征可以把培养基分成液体培养基和固体培养基等。液体培养基（liquid medium）（图1-1A）是没有添加凝固剂的培养基，常用于大规模快速繁殖某种微生物。



A. 液体培养基

B. 平板

C. 固体斜面培养基

图1-1 已灭菌的培养基

固体培养基（solid medium）通常是在液体培养基中添加一定量的凝固剂制成的。由于细胞与固体培养基的接触面积较小，细胞与环境间物质交换速度相对较慢，培养基表面的微生物生长速度比在液体培养基中慢。将灭菌后未凝固的固体培养基注入培养皿中，冷凝后制成的固体培养基简称为“平板”（图1-1B）。平板可以让人们清楚地观察到在培养基表面由单个细胞生长繁殖成的菌落，因此常用于微生物的分离、鉴定、活菌计数等。将灭菌后未凝固的固体培养基注入试管，将试管斜放在台面上，培养基冷却后在试管中形成了一个斜面，这样的固体培养基简称为“斜面”（图1-1C），常用于菌种保存（图1-2）。



图 1-2 保存在斜面培养基上的菌种

实验室常用的LB（Luria-Bertani）液体培养基的组成见表1-1。

表 1-1 LB 液体培养基的组成成分

营养物质	来源	主要成分
水		
氯化钠		
蛋白胨	用动、植物蛋白制成的粉末状物质	富含有机氮化合物，也含一些维生素和糖类
酵母浸膏	酵母细胞的水溶性提取物浓缩而成的膏状物质	富含B族维生素，也含有机氮化合物和糖类等

根据培养基的化学成分可以把培养基分成合成培养基和天然培养基等。化学成分完全清楚的培养基称为合成培养基（**synthetic medium**）。一般用于在实验室进行的、要求可重复性强的各种研究工作。用豆芽汁、椰子汁、稻草浸汁、牛奶等这些化学成分还不十分清楚或成分不恒定的天然有机物制成的培养基称为天然培养基（**complex medium**）。天然培养基与合成培养基相比成本较低，除了在实验室常用外，更多地被用于大规模的生物发酵工业。

灭菌和无菌操作技术可以排除非目标微生物的干扰

空气、水、培养容器甚至是培养基材料中都会含有各种微生物。为保证得到的培养物就是所需要的微生物，在培养过程中必须始终保持微生物培养物的种类单一，防止其他微生物混入。微生物细胞是由蛋白质、核酸等化学物质构成的，因此改变微生物所处环境的物理或者化学因素就可抑制微生物的生长甚至将它们杀死。例如，加热可以使蛋白质变性，波长在256~266 nm的紫外线可使菌体的蛋白质和核酸变性，有很强的杀菌作用。

保证器具与培养基无菌是获得微生物“纯”培养物的基础。在实验室培养微生物的过程中，用来除掉各种微生物的简便易行的办法是加热。但某些种类的细菌会在营

养缺乏或代谢产物积累的环境中形成没有繁殖功能的休眠构造，称为芽孢。芽孢的结构与细菌细胞不同，它在休眠期间不进行明显的代谢活动，因而对于加热、紫外线照射和化学药物都具有极强的抵抗能力。例如，热解糖梭菌（*Clostridium thermosaccharolyticum*）的细胞在50℃下经短时间即被杀死，而它的芽孢在132℃下约5 min后再置于适宜的条件下还有10%可能萌发。这就需要使用高压灭菌的方式来消灭器具和培养基中可能存留的各种类型的微生物。

使用高压灭菌锅灭菌时所需的温度、压力和时间是根据要消灭的微生物芽孢等结构的耐热性来确定的。如肉毒梭菌（*Botulinum*）能产生毒性极强的肉毒毒素，纯化结晶的肉毒毒素1 mg能杀死2亿只小鼠。肉毒梭菌的芽孢在pH7.0的100℃沸水中要煮5.0~9.5 h才能被杀灭，当温度提高到115℃加压灭菌时，时间就能缩短到10~40 min，将温度提高到121℃时只需要10 min就能完成。要保证外科手术器械无菌、安全，要在115℃下灭菌30 min或在121℃下灭菌10 min，这样才能杀死致病菌破伤风梭菌（*Tetani*）和产气荚膜梭菌（*Perfringens*）的芽孢。如此看来，在微生物实验中用121℃（1 kg/cm²压力）对实验器具和培养基进行15~20 min的灭菌处理是比较安全的。

灭菌后，要将高压灭菌锅中的实验用具及培养基及时取出。培养基放入超净工作台（图1-3）。实验器具放入60~80℃的烘箱中烘干，除去灭菌时高压蒸汽产生的水分以免金属器械锈蚀。

考虑到高压灭菌锅的使用效率，往往将培养基集中在一个较大的容器中放入高压灭菌锅灭菌。这样灭菌后的培养基不适于直接用来接种，需要分装到较小的培养容器中。因为空气中散布着许多微生物，所以分装最好在超净工作台内的酒精灯火焰旁完成（图1-4）。

在进行分装或接种操作前，将需要使用的、已灭菌的用具从烘箱中取出，放到超净工作台中，然后打开紫外灯和过滤风开关，灭菌30 min。



图1-3 超净工作台



图1-4 在超净工作台中分装

在分装时，应特别注意不要让培养基黏附在三角瓶口、试管口、培养皿内壁上，以免在培养过程中非目标微生物从瓶口沿器皿内壁上的培养基向内生长而发生污染。

有些化合物在较高温度下会分解。例如，尿素受热会分解，葡萄糖在115℃以上会

焦化。因此，采用已在 121 °C 下高压蒸汽灭菌的、孔径最小的 G6 玻璃砂漏斗对尿素、葡萄糖等进行过滤除菌后，再在超净工作台内添加到培养基中。对含葡萄糖的培养基，也可采用适当降低温度、压力（112 °C，500 g/cm²）以及延长时间（30 min）的高压灭菌方法灭菌。

实验中的废弃物存在对环境影响的不确定性，通常为进一步降低培养物被污染的可能，对于接种间、培养间也应定期采用紫外线或药物熏蒸的方法进行灭菌或消毒。例如，培养基若被有害菌体污染，经繁殖后，大量有害菌体可能致病，也会污染环境。因此，在全部培养工作结束后，所有使用过的器皿、废弃物等都必须先经过高压灭菌后再洗涤或倾倒。



小资料

灭菌、消毒与防腐

灭菌、消毒、防腐是实验室及生产生活中控制有害微生物常用的方法。灭菌是采用强烈的物理、化学方法杀灭物体表面以及内部的一切微生物的方法，如对器具和培养基进行高压蒸汽灭菌。消毒则是采用较温和的物理、化学方法仅杀死物体表面或内部一部分不需要的微生物。这种方法对被消毒的物体基本无害，如用消毒剂对皮肤、水果或饮用水进行消毒。防腐是根据微生物生长繁殖的特点，通过控制理化因素抑制微生物生长繁殖的措施，如用除氧剂抑制需氧型微生物的繁殖，采用低温、盐腌、糖渍、干燥等防腐措施保存食物。

接种过程中，防止其他微生物进入培养基是获得纯培养物的关键环节。将目标微生物转移到培养基中的过程称为接种。接种所使用的涂布器或接种环（图 1-5）等工具均需灭菌后再使用。



接种环



涂布器

图 1-5 接种工具

用接种环接种前，要先将接种环的环部、金属丝、金属丝与柄的连接部、连接部的上端在明火上灼烧，使黏附在其表面的微生物在高温中炭化，待接种环冷却后再接种。在使用涂布器接种时，应将涂布器浸泡在75%的酒精中。接种前将表面残留着少量酒精的涂布器在酒精灯火焰上灼烧，冷却后用于涂布。

瓶口或试管口是非目标微生物进入培养体系造成污染的通道。所以在接种过程中，打开塞子后和塞上塞子前都要将瓶口或试管口在酒精灯火焰上灼烧灭菌（图1-6）。

接种时要靠近酒精灯的火焰，利用燃烧产生的上升气流减少空气中微生物落入培养基的可能性。尽量减少各种器皿敞口向上的时间和机会，也能减少因非目标微生物落入而导致的污染。



图1-6 对试管口灼烧灭菌



活动

配制可用于培养酵母菌的马铃薯蔗糖培养基

酵母菌是我们在生活中发面、酿酒时常用的微生物。为了培养酵母菌，必须预先准备好酵母菌培养基。

20%马铃薯蔗糖培养基的配方：去皮马铃薯丝（或小块）20 g，蔗糖2 g，琼脂1.5~2 g，水100 mL（自然pH）。

目的要求

配制液体培养基和固体培养基。

材料用具

马铃薯，蔗糖，琼脂，天平，试管，烧杯，三角瓶，培养皿，封口膜（或纱布），牛皮纸或报纸，橡皮筋，小刀，高压灭菌锅，玻璃漏斗，移液器等。

方法步骤

1. 计算：根据配方计算出配制培养基所需的马铃薯、蔗糖和琼脂的用量。
2. 配制20%马铃薯浸汁：取马铃薯去皮，称取所需量，切成丝或小块，加水至所需量。用酒精灯加热煮沸10 min后，用纱布过滤到500 mL三角瓶中，按所需量加入蔗糖，待其溶化后补足水至所需体积，摇匀。
3. 制备斜面、固体和液体培养基。
液体培养基：将部分上述马铃薯浸汁分装到2个50 mL三角瓶中，每瓶约

20 mL，封口。

斜面培养基：按需要量称取琼脂，将其加入上述 500 mL 的三角瓶中，加热溶化后，用玻璃漏斗将培养基分装到 2 支 18 mm×180 mm 的试管中，每支 5~8 mL。操作提示：①注意控制好温度，防止培养基提前凝固。②不要让培养基粘在试管口。③试管中的液体量约为试管长度的 1/4。试管加棉塞后，用牛皮纸包好。

固体培养基：将用于制备斜面培养基后剩余的培养基分装到 250 mL 三角瓶中，封口。

将上述固体、液体和斜面培养基放入高压灭菌锅，在 1kg/cm²、121℃ 条件下灭菌 20 min，灭菌后将斜面培养基摆成斜面。

4. 制作棉塞。

用棉花制作试管棉塞时，要先确定棉塞的长度和粗细。棉塞长度要保证既塞住瓶口（进入瓶口约 3~4 cm），在瓶口外又要留有一定的长度（约 2 cm），方便在接种时用无名指、小拇指取下来；棉塞粗细也要适当，以不易脱落为度。通常的做法：将棉花铺成一个一定厚度的棉花片，其直径是棉塞所需长度的 3 倍，然后沿直径的平行线对折一次，转 90 度后再向上折卷至形成一个棉塞（图 1-7）。若放入试管口感觉松，就需要打开已卷好的棉塞，向折叠处再添加棉花。做好的棉塞应上大下小，放入试管口后，周围应没有皱褶和缝隙，且容易拔出，但用手提棉塞时，试管又不能掉下来。值得注意的是，由于脱脂棉吸水后容易引起污染，所以制作棉塞应该使用普通棉花，而不能使用医用的脱脂棉。



A. 将棉花铺成圆片 B. 对折后的棉花片 C. 折卷棉花片 D. 做好的棉塞

图 1-7 棉塞的制作过程

讨 论

1. 你认为生活中的哪些现象会使人联想到用马铃薯浸汁制备培养基？
2. 本实验中，煮沸后的马铃薯浸汁为酵母菌的生长提供了哪些成分？
3. 培养基中的琼脂能否成为酵母菌生长的碳源？

思考与练习

一、选择题

1. 在微生物培养实验中，分别采用了高压蒸汽、酒精、火焰灼烧等几种不同的处理方法，这些方法依次可用于杀灭什么部位的杂菌（ ）

- A. 接种环、手、培养基
- B. 培养容器、手、微生物菌种
- C. 培养基、手、接种环
- D. 培养容器、微生物菌种、接种环

2. 在获得某种微生物纯净培养物的过程中，操作的关键是（ ）

- A. 适宜环境条件下培养
- B. 接种纯种细菌
- C. 对所有器皿、培养基灭菌
- D. 用无菌水配制培养基

3. “细菌喜荤，霉菌喜素”的意思是在配制培养基时（ ）

- A. 要调节培养基的pH
- B. 要考虑不同微生物的代谢特性
- C. 要调节培养基的渗透压
- D. 要考虑不同微生物的结构特性

二、简答题

1. 在全部培养工作结束后，所有使用过的器皿为什么必须先经过高压灭菌后再洗涤？

2. 大肠杆菌在液体培养基和固体培养基中的繁殖速度是否相同？请说明理由。

3. 生产实践中，在选择微生物发酵所需要的培养基原料时，往往以野生植物代替栽培植物、以秸秆代替淀粉、以非蛋白氮代替蛋白氮等。请说明利用上述培养基原料的优势。

第二节 纯净的目标微生物可通过分离和纯化获得

人们在研究或利用微生物时需要使用纯种。因为只有使用纯种才能保证实验的可重复性和结果的可靠性，才能保证产品的品质。所以，从混杂的微生物中分离得到目标微生物的纯种就成为培养微生物必须完成的任务。那么，如何从混杂的微生物中分离得到纯种的目标微生物？分离得到的纯种微生物的数量又如何去测定？

本·节·要·点

- 分离
- 纯化
- 平板划线法
- 稀释涂布平板法

采用划线或涂布的接种方法能够实现对目标微生物的分离和纯化

接种是指微生物进入培养基质的过程。一杯牛奶暴露在空气中，会由于微生物落入、生长、繁殖而变质，在此过程中发生了自然接种。挑取目标微生物的纯种将其转移到液体培养基中培养，或在培养基斜面上连续划线用于保存菌种都是人为的接种。在固体培养基上采用划线或稀释涂布的方法接种，通过培养能获得由一个细胞分裂形成的、肉眼可见的、有一定形态构造的子细胞集团，这样的细胞集团称为单菌落。

平板划线法（streak plate method）接种时，通常用接种环蘸取液体培养物或挑取固体表面的微生物后，在固体培养基表面进行连续平行划线（图 1-8A）、扇形划线（图 1-8B）或其他形式的划线，以实现接种的目的。

连续平行划线是从培养基上的一点出发，向左右连续划平行线至覆盖整个培养基表面。扇形划线是从培养基上的一点出发，向多方向多次划线，每划一条线都要将接种环在酒精灯的火焰上灭菌，然后再次从同一起点变换方向划线。多次连续平行划线接种时，划线可分 3~4 次进行。将培养皿旋转一定角度后，不需再次蘸取菌种，只需在上一次划线的末端区域直接开始划线即可（图 1-8C）。

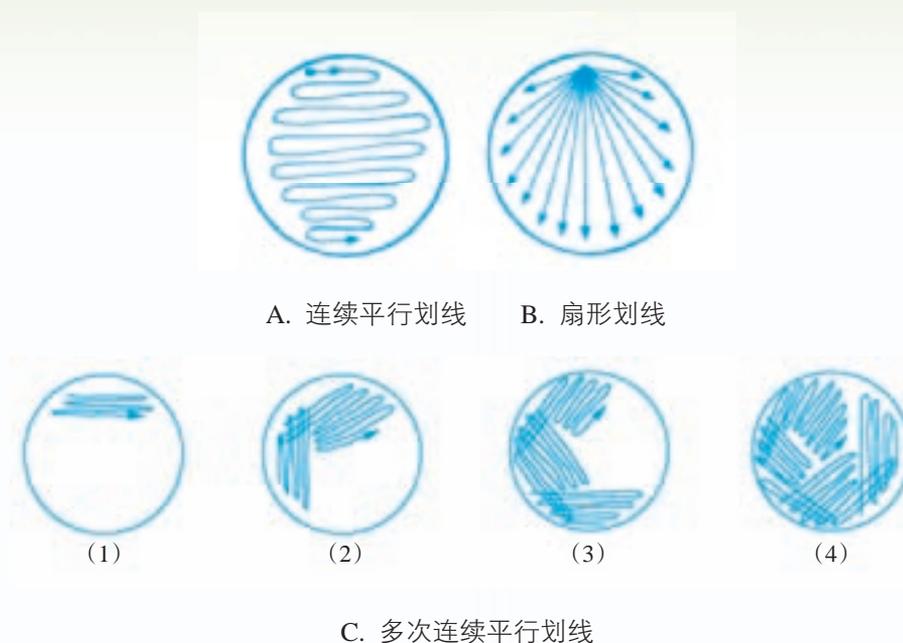


图1-8 平板划线的方法

划线的过程也是对菌种进行分散的过程，这样接种后经过培养，在划线的尾部就能得到单个细胞生长繁殖成的单菌落（图1-9）。

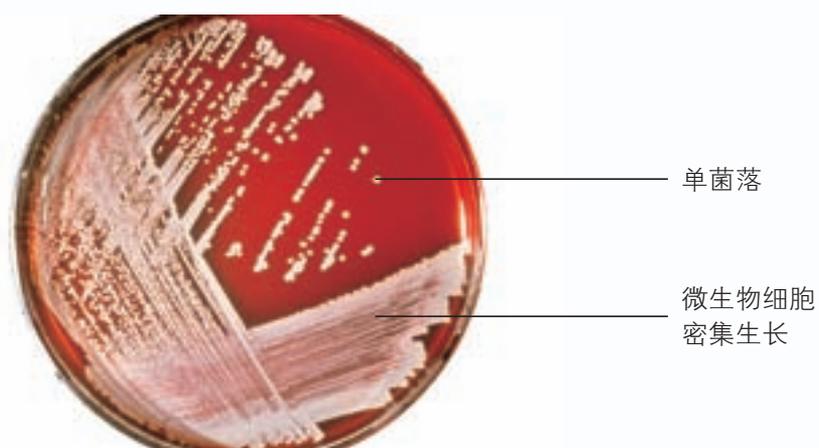


图1-9 多次平行划线的培养结果

稀释涂布平板法（pour spread method）接种时，通常需要先将菌液进行梯度稀释，并在培养皿侧面或底面做好标记后，将稀释度不同的菌液各取0.1 mL，加在固体培养基表面，然后用涂布器将菌液均匀地涂布在培养基表面上进行培养。这样在稀释度适当的固体培养基表面也能得到单个细胞生长繁殖成的单菌落（图1-10）。根据菌落的形状、大小、颜色、边缘或表面光滑与否等特征可以选取目标微生物继续培养。

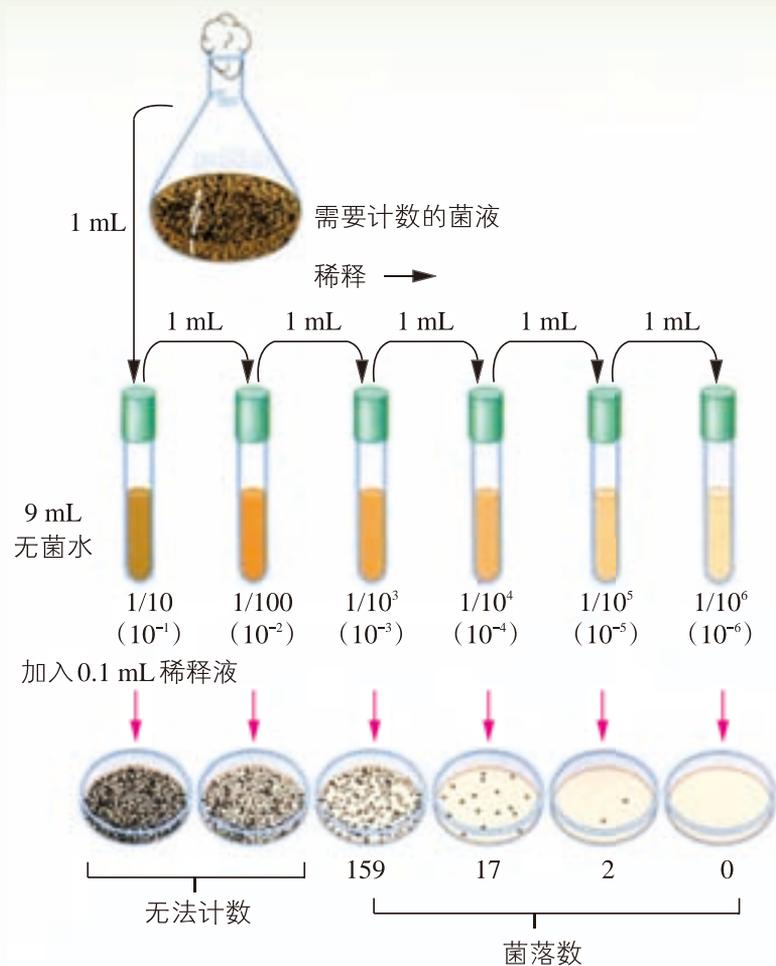


图 1-10 不同稀释度菌液的涂布结果



活动

接种、培养并分离酵母菌

接种是使目标微生物在配制好的培养基上生长的操作。使用特定的接种技术可以在接种之后得到目标微生物的单菌落，实现对目标微生物的分离。

目的要求

1. 用平板划线法或稀释涂布平板法接种酵母菌。
2. 用液体培养基大量扩增酵母菌。

材料用具

已活化的液体培养的酵母菌菌种或土壤悬液等其他样品液，无菌水，已灭菌的液体、固体和斜面培养基，培养皿，玻璃漏斗，移液器，接种环，涂布器，酒精灯，火柴，10 mL 量筒，50 mL 小烧杯，试管架等。

方法步骤

1. 制作平板。按图1-11所示方法对两个直径为90 mm的培养皿进行标记，分别向其中倒入未凝固的固体培养基，使培养基铺满培养皿底部，厚度约2 mm。

2. 接种。

(1) 用平板划线法接种。在用接种环蘸取菌液进行接种前，应在酒精灯火焰上从接种环的圆环处依次向上灼烧灭菌。为避免灭菌后接种环的高温烫死菌种，应在挑取菌种前将接种环贴在培养容器内壁上降温。

初次划线时可参照培养皿底部的标记点进行划线，以保证有最好的划线分离效果。

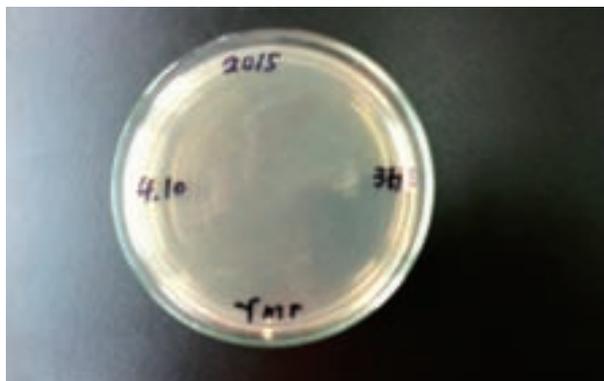


图1-11 在培养皿底部做好标记

(2) 用稀释涂布平板法接种。如图1-12所示，在酒精灯旁涂布。操作提示：①用无菌水对酵母菌菌液进行一定浓度的稀释。②取0.1 mL的稀释菌液加入平板中央。③在使用蘸有酒精的涂布器对平板中的菌液进行涂布时，应先在火焰上使酒精燃烧尽。此时手持涂布器的部位应高于火焰（图1-13），以免酒精沿器具流下，烧伤手指。



图1-12 在酒精灯旁涂布



图1-13 涂布器除去酒精

(3) 将菌种接种到液体培养基中。在无菌条件下用接种环将菌液接种到液体培养基中，同时以不接种菌液的液体培养基作为对照。

3. 培养。将所有培养容器置于 25 ℃ 下培养 24 h。

4. 观察培养结果。获得单菌落后，可挑取菌落，并利用划线法接种至斜面培养基中。

讨 论

1. 判断液体培养基成功接种酵母菌的依据是什么？
2. 如何判断是否分离出酵母菌的单菌落？判断的依据是什么？
3. 在固体培养基表面涂布的菌种是否出现形态、颜色不同的单菌落？你认为出现该现象的原因是什么？
4. 仅从菌落特征是否能够认定你分离出了酵母菌？怎样进行进一步的鉴定？

稀释涂布平板法和显微镜计数法可测定微生物的数量

获得了目标微生物的纯种，就为深入研究这种微生物奠定了基础。接下来可能需要知道这种微生物的繁殖速度，但微生物的个体微小，很难直接观察到它们的数目变化。同时发现，平板上的菌落即使是分开的，也可能难以数清其数量。如果菌落太多，准确数出菌落数并不容易，这会导致最终的计算结果出现较大误差。而菌液稀释度过大，菌落数少，虽然容易准确计数菌落数，但可能存在较大的随机误差。要解决这个问题可以从两个方面着手：一是在保证能准确计数的前提下减小稀释度；二是将相同稀释度下的多组数值取平均值后再进行计算。即：每毫升菌液中微生物细胞的数量 = 某一稀释倍数下至少 3 个培养皿的平均菌落数 ÷ 菌液稀释液体积 × 稀释倍数。例如，当向 3 个培养皿中依次添加 0.1 mL 稀释倍数为 10^5 的菌液后，3 个培养皿中生长的菌落数依次为 25 个、32 个、18 个，计算过程为：

$$(25 + 32 + 18) \div 3 \div 0.1 \times 10^5 = 2.5 \times 10^7 \text{ 个/mL}。$$

这样得到的数值可能更接近真实情况。有了前后两次对菌液稀释涂布的计算结果，就不难算出这种微生物的繁殖速度了。

借助于显微镜、血细胞计数板也能在显微镜下直接对菌液中的酵母细胞进行计数。图 1-14 是一种较常用的血细胞计数板。

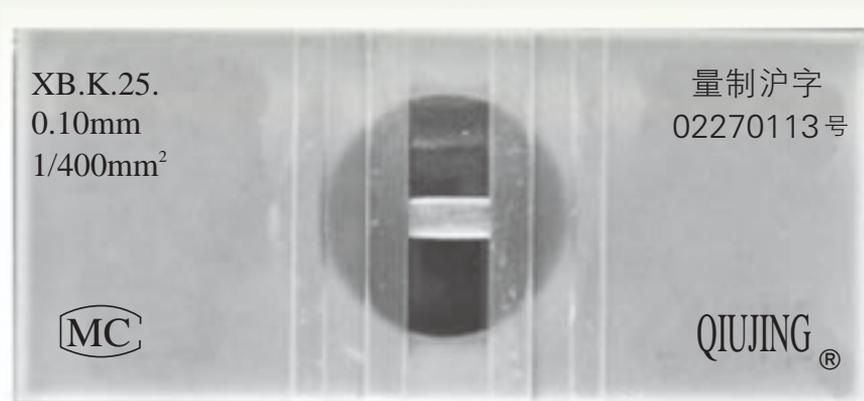


图1-14 血细胞计数板

血细胞计数板由一块比普通载玻片厚的特制玻片制成。玻片中部有四条下凹的槽，将玻片中部分割成三个平台。中央平台比两侧平台低0.1 mm（图1-15）。

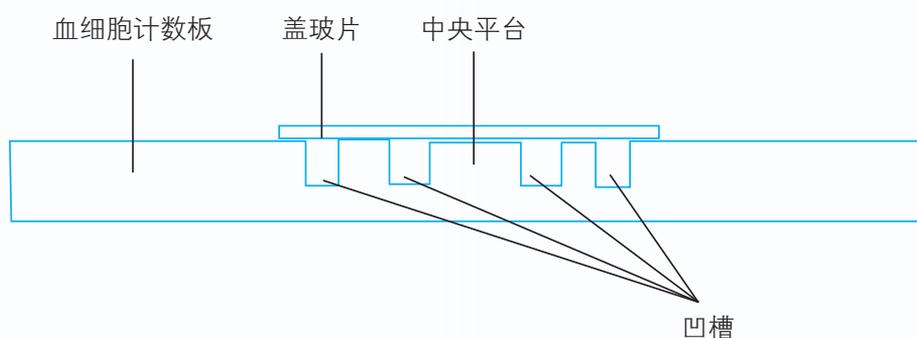


图1-15 血细胞计数板侧面观

中央平台又被一短横槽分成上、下两个部分。中央平台上、下两个部分各刻有一个计数区。在显微镜下可以看到计数区由长、宽各1 mm的9个大方格组成（图1-16）。每个大方格面积为1 mm²。因为中央平台比其两侧的平台低0.1 mm，所以盖玻片下每个大方格内的液体体积=1 mm²×0.1 mm=0.1 mm³。由于血液中的白细胞相对于红细胞数量少、体积大，故计数区正中间的大方格为红细胞计数区，四角的四个大方格是白细胞计数区。红细胞计数区又用双线分成25（或16）个中方格，每个中方格再用单线划分为16（或25）个小方格。

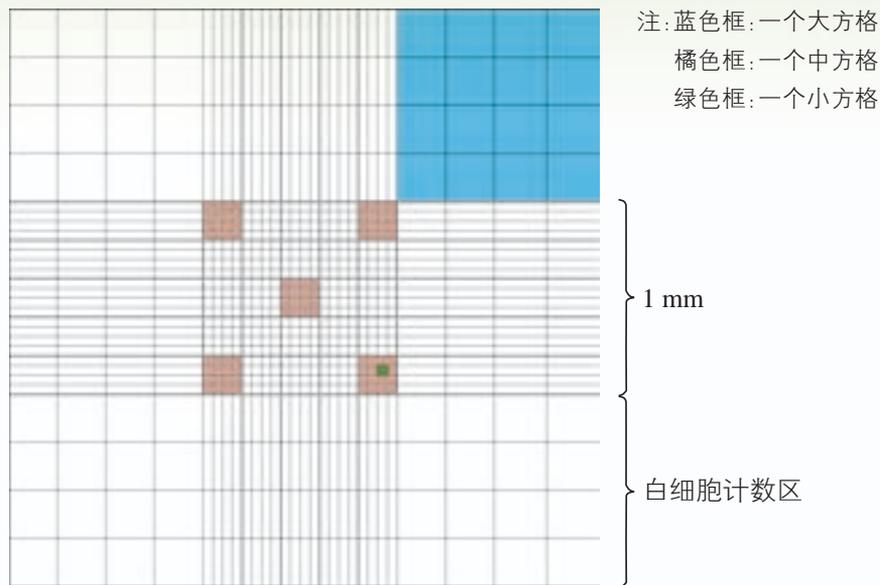


图 1-16 计数区的划分

用显微镜进行酵母细胞计数时，应先将专用的盖玻片盖在计数板上，再用吸管在中央平台盖玻片边缘滴加摇匀的酵母菌悬液（图 1-17），让菌液渗入盖玻片下直至充满计数区。滴加菌液时，一方面要避免菌液滴到盖玻片上，另一方面要注意防止产生气泡，以免影响计数结果。

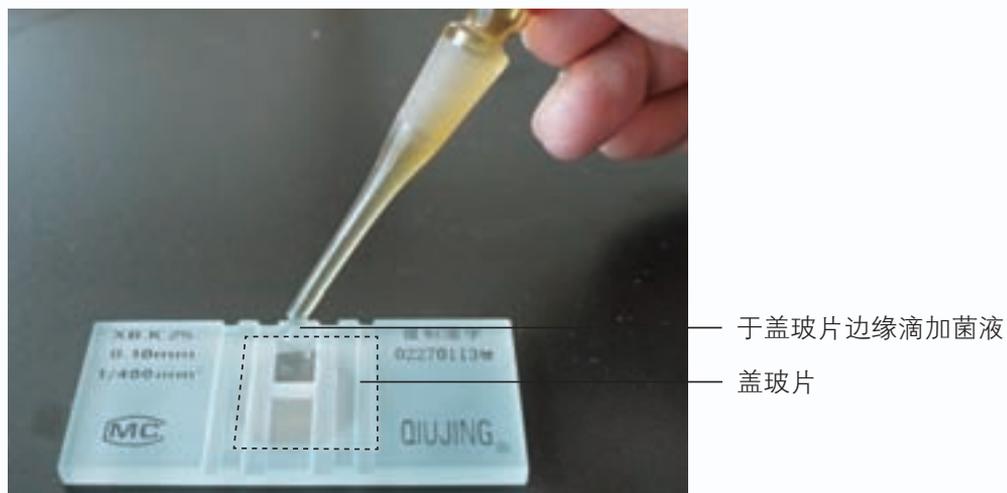


图 1-17 在计数板上加入菌液

考虑到酵母细胞的体积和数量，在显微镜下计数酵母细胞可在红细胞计数区进行。红细胞计数区内的小方格为计数提供了方便，但总计 400 个小方格的计数工作量较大，此时应依据统计学的随机取样原则进行取样来统计酵母菌的细胞数。对有 25 个中方格的红细胞计数区可采用“五点取样”，即选取四个角和正中央的五个中方格（总计 80 个小方格）进行细胞计数。采用“五点取样”时，虽然事先确定了计数的区域，但酵母细胞在中间和四个角上的方格中出现的概率是随机的，所以仍能满足随机取样的要求。



小资料

随机取样原则

当人们面对工作量巨大的一项调查工作时，取样调查是尽快获得可靠调查数据的常用方法。由于调查对象数量巨大，把调查对象划分为若干调查单位有利于调查工作的开展。每个调查单位就是取样时可能抽取到的样本。在抽取样本时要排除人的主观意愿来抽取调查单位，保证总体中的每个样本被抽到的概率均等，这就是随机取样原则。

在计数每一小方格中的细胞数时，为了避免重复计数压在小方格边缘线上细胞的数目，应只计数每一小方格上方和左侧线条上的细胞数（即“数上不数下”“数左不数右”）。为了保证结果的可信度，消除误差，应对同一红细胞计数区中的细胞数进行3次计数后取平均值，再按比例进行换算。因为红细胞计数区的液体体积为 0.1 mm^3 ，所以按下列公式计算就可得到每毫升菌液中的酵母细胞数：

$$\text{酵母细胞个数/mL} = 80 \text{ 个小方格细胞总数} / 80 \times 400 \times 10000 \times \text{稀释倍数}$$

调整培养基的配方和培养方式可有目的地培养某种微生物

不同自然环境中生活着的微生物代谢类型不尽相同。有些微生物不需要以现成的有机物为食，它们能利用光能（如蓝细菌和藻类）或无机物氧化释放的能量将 CO_2 转变为有机物。有些微生物需要以现成的有机物为食，如大多数细菌、真菌和原生动物。有些微生物为需氧型，有些微生物则是厌氧型。有些微生物能固氮，而大多数微生物不能以 N_2 作为氮源。有些菌株由于突变或经人工诱变后丧失了合成某种特定化合物的能力，必须从外界环境获得该物质才能生长繁殖。

许多微生物的代谢方式并不唯一。某些异养型微生物在有有机物存在的情况下可同时将 CO_2 转变为自身的物质，它们只是不以 CO_2 为唯一（或主要的）碳源。同样的，自养型微生物也并非不能利用有机物生长。例如，紫色非硫细菌在没有有机物时可以将 CO_2 转变为有机物，而当有机物存在时，它又可以利用有机物生长；它在有光照和无氧条件下可以利用光能生长，在黑暗和有氧条件下可依靠有机物生长。这种营养方式的可变性提高了微生物在环境中的生存能力。

培养基中营养物质的浓度及比例都会影响微生物的生长。例如，过高的蔗糖浓度会抑制微生物的生长，过低的蔗糖浓度又不能满足微生物生长的需要。在利用微生物

发酵生产谷氨酸时，培养基中的C/N（碳原子与氮原子的摩尔数比）为4：1时菌体大量繁殖，当比值降为3：1时，菌体繁殖减缓。此外，培养基中不同的N/P也会影响微生物的生长繁殖。例如，微囊藻在氮磷比为4.5时生长最好，颤藻在氮磷比为0.45时生长最好。

只有了解微生物的代谢特点，才能更有针对性地为目标微生物提供所需的生长条件，更好地培养微生物，同时节约成本。例如，在培养光能自养型的蓝细菌或藻类时，只需提供水和无机盐，不需提供有机物，但必须提供光照。在对需氧型微生物进行液体培养时，应该进行振荡培养以保证氧气供应。在培养厌氧型微生物时，应静置，甚至在培养基表面添加用于隔绝空气的液体石蜡来满足其对无氧环境条件的特殊需求。

在培养基中添加（或减去）某种化学成分，使得只有某些特定的微生物能够生长，其他微生物均不能生长，这样的培养基称为选择培养基（selective medium）。例如，在培养基中添加了青霉素后，只有对青霉素有抗性的细菌才能生长，对青霉素敏感的细菌则不能生长。而在不添加任何氮源的培养基上，只有能固氮的微生物才能生长。使用选择培养基能从混杂的微生物群体中快速筛选出所需种类的目标微生物，也可以从已知种类的混杂的细胞群体中筛选出特定的细胞。



活动

能分解尿素的微生物的分离与计数

当培养基中只有尿素作为氮源时，只有能分泌脲酶（urease）的微生物才能在该培养基中生长。因为它们可以通过脲酶将尿素降解为氨，作为其生长的氮源。利用这种培养基就可分离出土壤中能产生脲酶的微生物。因为微生物分解尿素产生的氨会使培养基的碱性增强，若在培养基中加入在酸性情况下呈黄色、碱性情况下呈红色的酚红指示剂，就可根据菌落周围是否出现红色区域，进一步鉴定尿素分解菌。在相同培养条件下，圆形红色区域愈大，表明这种菌利用尿素的能力愈强（图1-18）。



图1-18 在有酚红的培养基上分离到的尿素分解菌

目的要求

1. 利用选择培养基分离能产生脲酶的微生物。
2. 观察微生物代谢改变环境 pH 的现象。
3. 利用稀释涂布平板法对微生物进行计数。

材料用具

土壤样品，蛋白胨，酵母提取物，NaCl，琼脂，琼脂糖，葡萄糖，K₂HPO₄，酚红，蒸馏水，尿素溶液，三角瓶，烧杯，培养皿，有塞试管，试管架，移液器，G6玻璃砂漏斗，装有75%酒精的广口瓶，涂布器，酒精灯，火柴，高压灭菌锅，恒温培养箱等。

方法步骤

1. 制备培养基。

(1) 配制 100 mL LB 固体培养基。取 1 g 蛋白胨、0.48 g 酵母提取物、1 g NaCl 和 2 g 琼脂置于 250 mL 三角瓶中，加水至 100 mL，给三角瓶加上封口膜后待灭菌。

(2) 配制 100 mL 尿素固体培养基。取 0.1 g 葡萄糖、0.48 g NaCl、0.48 g K₂HPO₄、1 mg 酚红和 2 g 琼脂糖置于 250 mL 三角瓶中，加水至 60 mL，给三角瓶加上封口膜后待灭菌。

2. 灭菌。

将盛有 9 mL 蒸馏水的 5 支有塞试管、盛有 99 mL 蒸馏水的 250 mL 三角瓶以及盛有未灭菌培养基的三角瓶，在 121 °C 下灭菌 15 min 后待用。尿素溶液由教师用无菌的 G6 玻璃砂漏斗进行过滤除菌处理后待用。

3. 倒平板。

(1) 灭菌结束待培养基冷却至 60 °C 时，在超净工作台内向 100 mL 尿素固体培养基中加入已除菌的尿素溶液 40 mL（内含 8 g 脲），摇匀后分装至 4 个培养皿中，冷却至凝固，备用。

(2) 灭菌结束待培养基冷却至 60 °C 时，在超净工作台内将 100 mL LB 固体培养基分装至 4 个培养皿中，冷却至凝固，备用。

4. 制备土壤细菌悬液。

(1) 将已灭菌的 5 支试管依次标记为 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷。

(2) 将 1 g 采集的土样加入盛有 99 mL 无菌水的三角瓶中，充分振荡，即成 10⁻² 稀释液。取上清液 1 mL，转移至盛有 9 mL 无菌水的带 10⁻³ 标记的试管中，制备出 10⁻³ 稀释液，摇匀。依此方法制备出 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 稀释液，置于试管架上。

5. 接种。

(1) 在培养皿底部做好标记（包括：班级、姓名、日期、接种液稀释度、

LB或尿素)。

(2) 用镊子夹取酒精棉，将手及超净工作台擦拭干净，待酒精挥发后再点燃酒精灯。

(3) 用移液器按照稀释度由大到小的顺序依次取0.1 mL土壤稀释液，并在酒精灯火焰旁分别加入对应标记的培养皿中。

(4) 涂布。将保存在75%酒精中的涂布器放在酒精灯火焰上，燃烧除去酒精。待火焰熄灭后，在酒精灯旁打开培养皿，将稀释液均匀地涂布在培养基表面。

6. 培养。将培养皿倒置，置于37℃恒温培养箱中培养24~48 h (图1-19)。



图1-19 在恒温箱中倒置的平板

讨 论

1. 在接种过程中，若用同一移液器吸取菌液，且不按照稀释度由大到小的顺序依次操作，是否会影响实验结果？为什么？

2. 根据图1-20所示的培养结果，在估算土壤中能分泌脲酶的微生物的数量时，应统计哪个稀释度的培养皿？为什么？

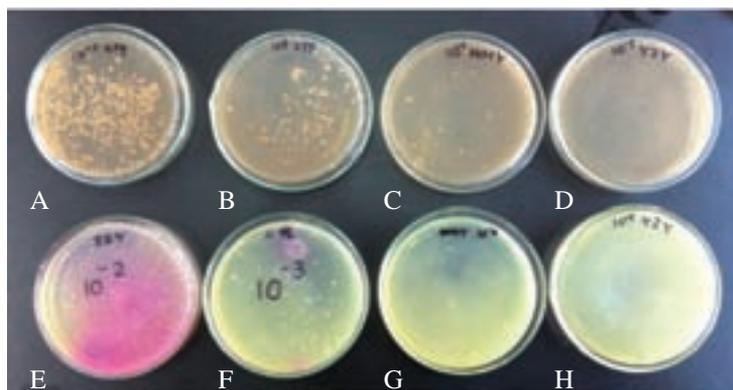


图1-20 培养结果

3. 在图1-20中, 培养皿E中许多菌落周围颜色发生明显改变。这种现象说明了什么?

4. 在图1-20中, 培养皿F中还有许多菌落周围颜色未发生明显改变。针对此现象, 有人认为“这些未变色的菌落有可能是能自生固氮的微生物, 而不是能产脲酶的微生物”。你认为这个解释合理吗? 请说明理由。



课外读

极限稀释法分离目标微生物

乳酸菌在牛奶中繁殖, 会使牛奶变酸, 并使牛奶中的蛋白质凝固。1878年, 微生物学家李斯特 (Joseph Lister, 1827—1912) 通过极限稀释法获得了乳酸菌纯培养。他的做法是: 把作为接种源的已变酸凝固的牛奶进行系列稀释后, 依次接种到新鲜的牛奶中, 并在培养管上标记好接种源的稀释度。经过保温培养后, 从所有变酸凝固的培养管中找出当初接种源稀释度最大的一个培养管, 再将此管变酸的牛奶进行系列稀释后依次接种到新鲜的牛奶中。如此反复进行多次, 得到接种源稀释度最大的一个培养管中的培养物, 就几乎可以认为是一个纯培养。这是因为每次选择保留的都是当初接种源系列稀释中最大稀释度的接种结果, 所以多次稀释后培养管中的乳酸菌很可能是一个菌体经过多次繁殖的后代。今天, 这个方法仍然用于分离那些不能在固体培养基上生长的原生动植物和藻类等。

思考与练习

一、选择题

- 不同微生物的形态结构不同。将某种细菌接种到灭菌后的固体培养基上, 经过一段时间后能得到 ()
 - 无一定形态的群体
 - 菌丝
 - 单个细菌
 - 菌落
- 稀释涂布平板法不仅是分离和纯化微生物的重要方法, 也是测定微生物数量的重要方法。用稀释涂布平板法测定同一土壤样品中的细菌数, 在统计数据时应 ()
 - 随机抽取某个稀释度的培养基, 统计菌落数
 - 将不同稀释度的3个培养基上的菌落数求和
 - 将相同稀释度的全部培养基上的菌落进行计数
 - 随机抽取相同稀释度的3个培养基统计菌落数后求平均值

3. 灭菌和无菌操作是获得微生物纯培养物的基础。在接种、培养、分离酵母菌时, 下列操作正确的是 ()

- A. 用浸泡在 75%酒精中的涂布器直接涂布
- B. 将接种后的培养皿倒置在恒温培养箱中培养酵母菌
- C. 为了防止污染, 接种环经火焰灭菌后应趁热快速挑取菌落
- D. 倒平板时, 应将打开的皿盖放到一边, 以免培养基溅到皿盖上

4. 平板划线是分离和纯化微生物的重要方法。下列关于平板划线操作的做法, 正确的是 ()

- A. 接种环、培养皿等已灭菌, 整个操作过程中不再灭菌
- B. 取出菌种后需马上塞上装菌种试管的棉塞, 然后再划线
- C. 用蘸有菌液的接种环划一条线后, 再次蘸取菌液继续划线
- D. 将接种环灼烧灭菌后, 先在玻璃器皿的内壁上降温再挑取菌种

二、简答题

1. 调整培养基配方为什么能实现对微生物的分离?

2. 由于酶促反应的特异性强, 反应条件温和, 安全无毒, 环境污染少, 因此, 酶制剂在洗涤剂、皮革、纺织、造纸、疾病诊断、制药等领域具有广泛的应用价值。酶制剂大多来自微生物, 要获得能产生某种特定酶的纯种微生物, 关键是掌握分离和纯化技术。请举一例, 说明从自然界中分离能产生某种特定水解酶的微生物的主要过程。

第三节 发酵工程为人类提供多样的生物产品

本·节·要·点

- 发酵食品
- 发酵产物
- 发酵工程
- 菌种
- 菌株

在1675年列文虎克（Antony van Leeuwenhoek, 1632—1723）用显微镜观察到微生物之前，人们是在对微生物无知无觉的情况下食用微生物或它们的发酵产物，享受它们带来的美味；或遭受致病微生物的侵袭，忍受它们带来的痛苦。1861年巴斯德（Louis Pasteur, 1822—1895）用曲颈瓶试验证明了微生物的存在，发现了发酵的原理，为微生物学的发展奠定了坚实的基础。此后，微生物学开始蓬勃发展起来。如今，有关发酵工程的研究已与遗传工程、细胞工程、酶工程等紧密结合，使微生物成为新兴的生物技术的主角，为人们的生活带来许多便利。那么，发酵工程是如何实现工业化生产人类所需产品的？发酵工程又能提供哪些微生物发酵产品？

某些食品、饮料及调味品是运用传统发酵技术生产的

生活中的一些食品、饮料及调味品是经过微生物发酵后制成的。从它们最初进入人们的生活到今天，已经有了几千年甚至上万年的历史。

最早制成的发酵饮料大概要算在游牧社会出现的奶酒。当时人们储备的畜乳在霉

菌、酵母菌的作用下，自然发酵出酒味。这种发酵后的奶可以储存更长的时间，同时还具有与畜乳不同的风味。今天，在我国少数民族中仍保留着用畜乳制酒的习惯，如马奶子酒。人类进入农耕社会后，多余的粮食为先民们酿酒提供了原料。此后，人们在长期酿酒实践的基础上，又利用酒精与水的沸点不同发展出了蒸馏取酒的技术，图1-21为南



图1-21 南美洲先民蒸馏取酒的模型

美洲先民蒸馏取酒的模型。

我国是酱油生产最早的国家。据史书记载，我国远在周朝时期就能以肉类、鱼类为原料，生产多种多样的酱，统称为“醢（音：hǎi）”。北魏时期的贾思勰在《齐民要术》一书中记载了利用黄衣（曲霉）制酱的方法和技艺，还记载了制造酸奶的方法。在西周时，我国就有了高粱美酒变醋的传说。

不仅如此，人们还在各自的生产生活实践中，逐步摸索总结出了在自然接种和混菌培养条件下，利用有益微生物来酿造自己喜爱的风味食品、饮料和调味品的技术。例如，干酪、泡菜、酱、醋和豆豉等的发酵方法。发酵食品中的微生物种类多样。发酵酿制糯米酒和酱油的菌种都是霉菌、酵母菌和乳酸菌，但糯米酒和酱油的风味差别很大。要解释产生这一现象的原因，需要了解一些微生物分类、代谢的知识。

从表1-2中得知，许多传统发酵食品使用的菌种中都包含酵母菌和乳酸菌。其实酵母菌或乳酸菌只是习惯上的归类，并不完全代表当今微生物分类学上的名称。例如，酵母菌只是对进行出芽生殖或裂殖的真核、单细胞微生物的统称，已知的酵母菌至少有56属，约500多种。乳酸菌则是对能够发酵糖类产生乳酸的一类革兰氏阳性细菌的统称，已知的乳酸菌约有430多种。

表1-2 酿制常见的发酵食品、饮料和调味品的原料及菌种

发酵产品	菌种	原料
面包	酿酒酵母	小麦面粉
糯米酒	酵母菌、霉菌、乳酸菌	糯米
酸奶	乳酸菌	牛奶、羊奶
葡萄酒	酵母菌、纤细杆菌	葡萄
黄酒	青霉、毛霉、根霉、酵母菌	糯米、黍米、粳米
啤酒	酿酒酵母	大麦、酒花
酱油	曲霉、酵母菌、乳酸菌	小麦、蚕豆、薯、米
食醋	醋酸菌、曲霉、酵母菌	米、麦、薯等
豆腐乳	曲霉、毛霉、根霉	大豆、冷榨豆粕
泡菜	乳酸菌、明串珠菌	蔬菜、瓜果
奶酪	乳杆菌、乳球菌	鲜牛奶
味精	谷氨酸棒杆菌	糖蜜、淀粉、葡萄糖和玉米浆
β -胡萝卜素	三孢布拉氏霉	淀粉、豆粉、无机盐

表1-3是两种国产食醋发酵菌种中的微生物种类，从中可以看到传统发酵菌种中的微生物在分类上的多样性。

表 1-3 两种国产食醋发酵菌种中的微生物种类

产品名称	发酵微生物
镇江香醋	乳酸菌 (<i>Lactobacillus</i>)
	醋酸菌 (<i>Acetobacter</i>)
	葡糖醋杆菌 (<i>Gluconacetobacter</i>)
	葡萄球菌 (<i>Staphylococcus</i>)
	肠杆菌 (<i>Enterobacter</i>)
	酵母菌属 (<i>Saccharomyces</i>)
山西老陈醋	德克酵母属 (<i>Dekkera</i> sp.)
	酒香酵母属 (<i>Brettanomyces</i> sp.)
	卵孢酵母属 (<i>Oosporium</i> sp.)
	克鲁弗氏酵母属 (<i>Kluveromyces</i> sp.)
	毕赤酵母属 (<i>Pichia</i> sp.)
	植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)
	巴氏醋酸菌 (<i>Acetobacter pasteurianus</i>)

发酵食品的不同风味是由多种因素造成的。不同微生物或同种微生物在不同环境条件下进行的代谢活动，所形成的代谢产物不同，制成的发酵食品的风味也就不同。大多数微生物需要以现成的有机物为食，不过由于它们的结构简单，因此多以分泌胞外酶的方式消化、分解大分子有机物后，再吸收所需的小分子物质。不同的微生物、不同的菌株能够分泌的酶种类不同，分解大分子有机物后形成的产物也就不同，这是导致传统发酵食品产生不同风味的原因之一。例如，传统酿造酱油使用菌种中的曲霉、酵母菌、乳酸菌在酱油发酵过程中分泌的酶不同，它们所发挥的作用就不同(图 1-22)。曲霉中的米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 分泌多种水解酶，分解如豆粕、麸皮、面粉等原料中的蛋白质和碳水化合物，分解产物不仅满足自身需要，也可供菌种中的酵母菌、乳酸菌利用。曲霉代谢生产的醇、酸、醛、酯、酚、缩醛和呋喃酮等多种成分，虽多为微量，却构成了酱油复杂的香气；耐盐性强的鲁氏酵母 (*Saccharomyces rouxii*) 利用葡萄糖、麦芽糖等成分发酵生成乙醇、甘油、琥珀酸及其他微量成分；嗜盐片球菌 (*Pediococcus halophilus*) 则在盐水中发酵产生乳酸。这些代谢产物共同构成了酱油独特的风味。

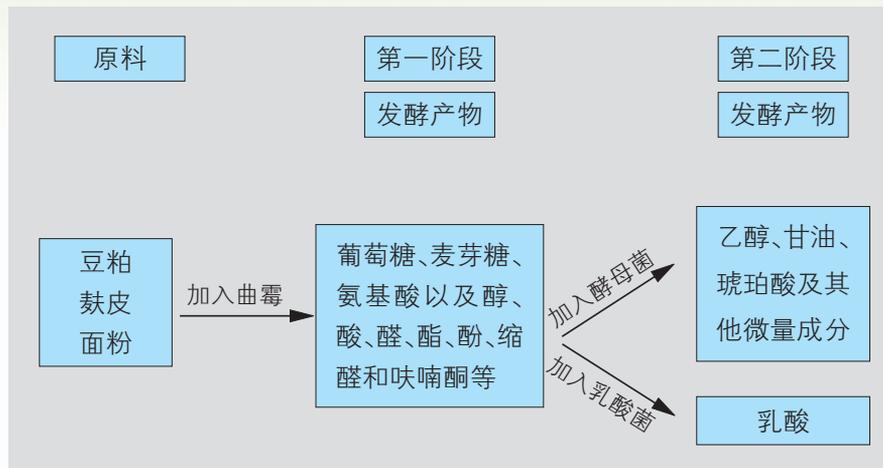


图 1-22 酱油发酵的大致过程及菌种发酵的风味产物

在传统发酵食品的生产中，人们不仅关注菌种中的微生物在分类学上所属的“科”“属”“种”，而且更加关注发酵所用菌株的遗传谱系。菌株是指来自一种微生物的每一个来源不同的纯培养物。因为菌株遗传上的差异会造成发酵产品的风味不同。

混菌发酵也影响发酵食品的风味。传统发酵所使用的菌种是人们在世代的生产生活中不断筛选保留下来的、在自然界中自然存在的“杂居混生”的微生物群落。群落中的不同微生物相互作用可导致发酵制品风味的不同。菌种中不同的微生物可能互利，可能竞争，也可能存在一种排斥其他若干种微生物生长的现象。例如，酸奶发酵过程中的保加利亚乳杆菌（*Lactobacillus bulgaricus*）和嗜热链球菌（*Streptococcus thermophilus*）的特定菌株之间就存在互利的关系，保加利亚乳杆菌代谢产生的小肽和氨基酸可促进嗜热链球菌的生长，而嗜热链球菌代谢产生的甲酸和二氧化碳可刺激保加利亚乳杆菌的生长；酱油发酵菌种中的嗜盐片球菌在盐水发酵前期产生的乳酸，在形成特殊风味的同时也抑制其他存在竞争关系的杂菌的生长；乳酸菌在糯米酒发酵过程中产生的乳酸与酵母菌发酵产生的酒精发生反应生成酯类，同时乳酸菌代谢过程中产生乙醛和双乙酰，它们都与糯米酒特殊的风味有关。

可见，传统发酵菌种中微生物的种类、代谢特点、种间关系等都是造成不同发酵制品的风味和营养物质有差异的原因。



活动

体验传统发酵——利用酵母菌、醋酸菌制作果酒和果醋

一些果实的表面附有许多微生物，如葡萄果实的表面就常常附有肉眼看不见的酵母菌。放置过久的葡萄有时会自然散发出酒味，就是酵母菌发酵的结

果。酵母菌在无氧条件下，通过厌氧呼吸，将葡萄糖氧化为乙醇和二氧化碳。有时放置过久的葡萄也会发出酸味或其他味道，这是其他微生物活动的结果。例如，醋酸菌在有氧条件下可将乙醇氧化为醋酸。

目的要求

1. 认识微生物不同的代谢特点和发酵产物的关系。
2. 尝试制作葡萄酒，并利用葡萄酒制作葡萄醋。

材料用具

新鲜葡萄，干酵母，白糖，凡士林，洁净的矿泉水瓶，洁净的可弯折吸管，小刀等。

方法步骤

1. 制备发酵装置及处理材料。

(1) 制备装置。在矿泉水瓶盖上戳一个小洞，将可弯折吸管的短臂插入小洞（图1-23A），再用凡士林密封吸管与小洞的连接处。待装入葡萄、盖好盖子后，再将吸管长臂插入水中阻止氧气进入（图1-23B）。



A. 将吸管插入瓶盖



B. 将吸管的长臂端插入水中

图1-23 自制的果酒发酵装置

(2) 处理材料。将葡萄用清水洗净、晾干后，连皮挤碎后分别放入编号为1、2的两个矿泉水瓶中。所放入的葡萄体积不要超过矿泉水瓶体积的1/2。为提高酒精产量，可在两个矿泉水瓶中适当添加白糖。

注意：矿泉水瓶中不可加水；不可用不能自动排气的玻璃瓶作为发酵的容器，以免发酵产生的大量气体使瓶子炸裂，造成危险。

2. 发酵。

(1) 将少量干酵母用温水调匀后放入1号矿泉水瓶中，2号矿泉水瓶中不

加干酵母，其他处理同1号。盖好盖子后，将吸管长臂插入水中以阻止氧气进入。

(2) 将两个矿泉水瓶放在25℃左右的环境中发酵。每天定时观察矿泉水瓶内葡萄的变化以及吸管长臂排出气泡的速度。7~10天后，待不再有气体产生时，停止发酵。用小刀在矿泉水瓶壁（液面之上）戳一小洞，将瓶中的上清液倒入相同编号的另一干净矿泉水瓶中，置于冰箱4℃冷藏室中静置保存，即得到自制的葡萄果酒。

3. 选取酒味较重的一瓶，用小刀在发酵液面以上的瓶壁戳一小洞，放置在温暖的环境中。24 h后打开瓶盖就会闻到果酒在有氧条件下发酵产生的果醋的气味。

讨 论

1. 瓶中葡萄的总体积为什么不要超过矿泉水瓶体积的1/2?
2. 制作果醋时，为什么要选取酒味较重的一瓶果酒通入空气?
3. 制作果醋时，为什么要给发酵好的果酒通入空气?



活动

体验传统发酵——利用乳酸菌发酵制作泡菜

泡菜是利用附生在蔬菜表面的植物乳杆菌、短乳杆菌和明串珠菌等发酵制成的。这些微生物一般为厌氧、兼性厌氧或微好氧菌。它们的发酵产物不仅有乳酸，还会有醇、酯等，因而使泡菜具有特殊的风味。

目的要求

体验传统发酵技术，尝试腌制泡菜。

材料用具

新鲜蔬菜（圆白菜、白萝卜等），冷开水，花椒、八角等，白酒，盐，泡菜坛，菜板，菜刀等。

方法步骤

1. 处理材料。
 - (1) 将圆白菜、白萝卜等洗净，切成3~4 cm长的小块。
 - (2) 将泡菜坛洗净，用开水清洗坛子内壁2次，确保没有油脂附着在内壁上。

2. 腌制泡菜。

(1) 用盐和冷开水配制成6%的盐水。取6 g食盐（体积约等于去掉胶垫的啤酒瓶盖中加满水的体积）溶于100 mL冷开水中，按此比例配制成所需体积的盐水。

(2) 将蔬菜、花椒、八角、白酒等放入坛内。

(3) 将盐水加入坛中，没过蔬菜，基本装满泡菜坛。

(4) 盖上泡菜坛盖，用水封住坛口，防止外界空气进入。在腌制过程中须随时加满水。

(5) 蔬菜在泡菜坛内腌制7天左右即可食用。取出腌制好的泡菜后，可以再加入新鲜蔬菜继续腌制。

对于新配制的泡菜原料，如果加入一些陈泡菜汁，可以缩短腌制时间，这是因为陈泡菜汁中有较多的发酵菌。

讨 论

1. 为什么用水封闭坛口？若不封闭会有什么结果？
2. 在泡菜腌制过程中，泡菜坛中冒出气体说明什么？
3. 泡菜腌制不成功的原因可能有哪些？

发酵工程利用现代工程技术及微生物的特定功能，工业化生产人类所需产品

从19世纪中期到20世纪30年代，发酵工业的生产一直停留在工艺简单、操作粗放、规模小、生产效率低下的水平上。第二次世界大战爆发后，对青霉素的需求量急剧增加，迫使人们尝试将传统的固体表面培养改变为液体深层培养。为解决深层培养对无菌、通气、混合的需求，开发出了可通入无菌空气、采用机械搅拌的密封式发酵罐，使发酵所需的占地面积、劳动强度、能量消耗都大大减少，青霉素的产量大幅度提高。为提高发酵产物的分离纯化效率，许多化学、工程学的技术也被应用于发酵工业，使青霉素的提取回收率和产品纯度大幅度提高。随着微生物生理学、生物化学研究的深入，以及高产发酵菌株的不断选育，整个微生物发酵工业获得了迅猛的发展。

微生物发酵是一个复杂的过程。鉴于菌种特性、原料和产物的特点、技术设备的可行性以及成本核算等诸多因素，现代发酵工业大多是采用好氧、液体、深层、分批及单一纯种发酵的方式组合进行的。其中，好氧以及用单一纯种微生物生产单一产品

是现代发酵工业的主流。

微生物工业发酵的基本过程如图 1-24 所示。

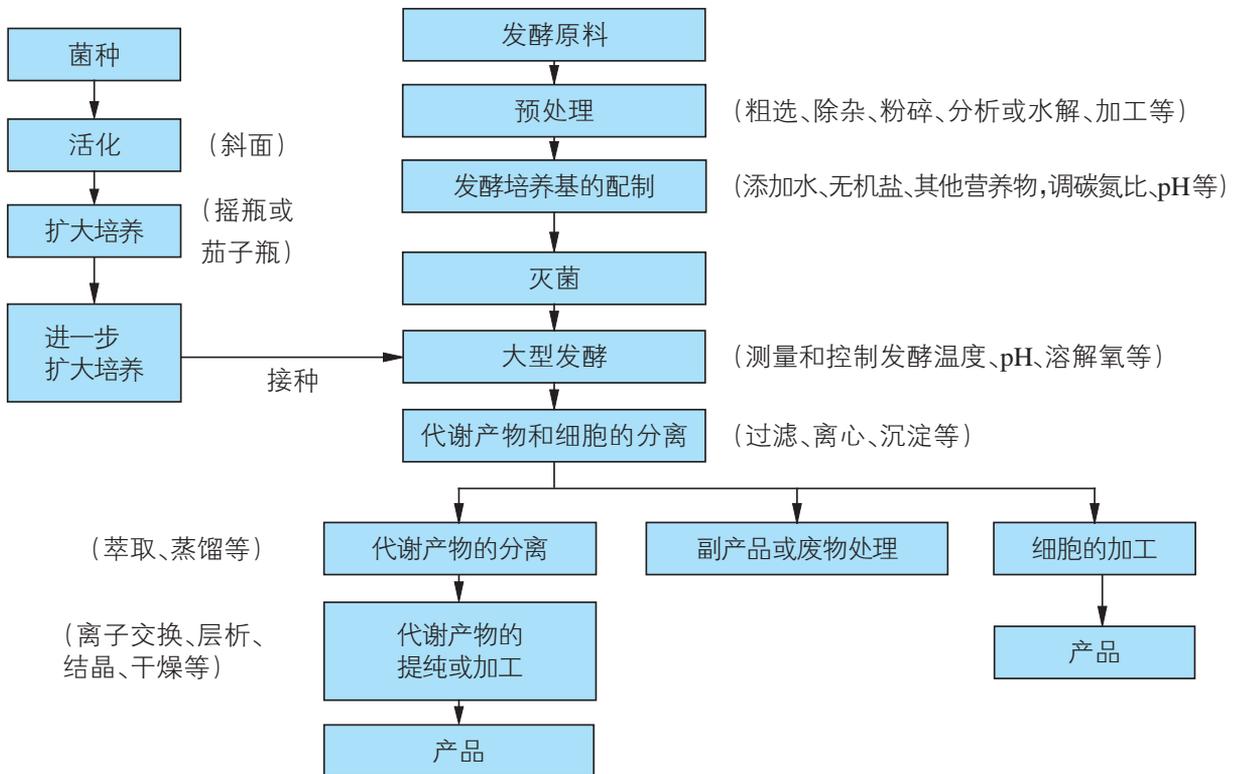


图 1-24 微生物工业发酵的基本过程

选育高产、优质的菌种是发酵工业的前提条件。发酵工业所使用的菌种与在实验室中培养的某种目标微生物不同，需要满足以下 5 个条件：第一，应选择高产的菌种，使菌种的发酵产物中，需要的产物多，不需要的产物少；第二，培养基来源充足且廉价，被转化的效率高；第三，菌种发酵产物易于分离；第四，菌种对环境没有明显或潜在的危害；第五，菌种的遗传特性和生产能力稳定。

要得到符合要求的菌种，需要筛选并不断地选育或改良菌种，以保持菌种健壮旺盛的生命力。减少菌种的传代次数能减小菌种发生自发突变的概率。对于已出现衰退迹象的菌种要进行分离筛选，保留高产的菌株，用于大规模的发酶工业生产。

将菌种扩大培养才能满足大规模生产的需要。在大规模的发酶生产中，需要将选育出的优良菌种经过多次扩大培养，让它们达到一定数量再进行接种，这样可以缩短菌种在发酶罐中发酶的时间。

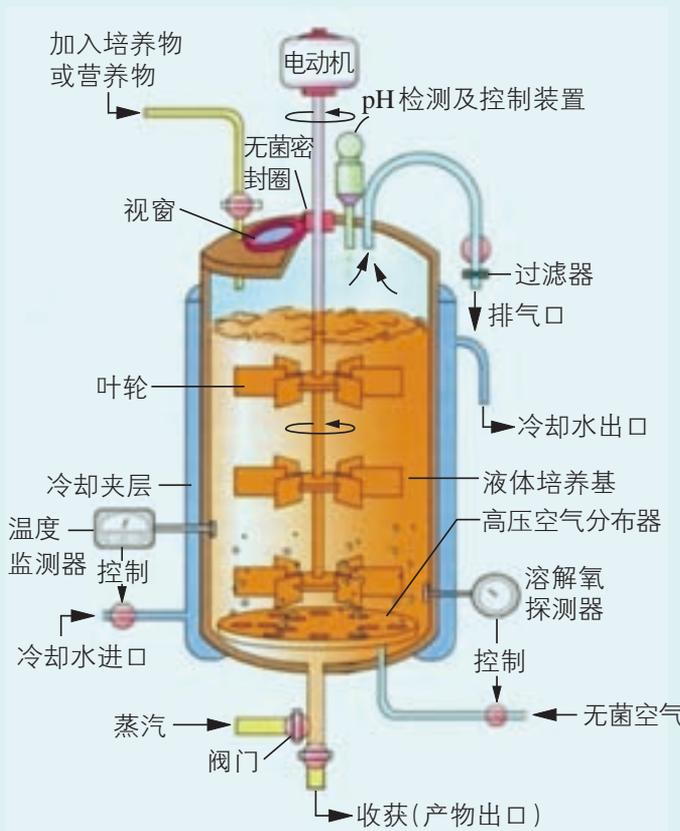
对发酶过程进行控制才能获得所需要的产品。发酶工业中发酶罐的大小取决于生产需要。在密封的罐体上安装各种阀门、管道、传感器、仪表等，以监控发酶过程的营养供给、氧气、温度、pH 等变化。



小资料

发酵控制装置

如图1-25所示，当培养物或营养物从顶部的加料口加入发酵罐后，从底部进入的高温蒸汽能实现对装填在发酵罐中的培养基灭菌。发酵过程的温度由盘绕在发酵罐内壁上的冷、热水管道控制。无菌空气从发酵罐底部进入，经高压空气分布器分散成极小的气泡，使氧从气泡中进入发酵液。电动机驱动搅拌器，带动叶轮旋转。在搅拌器的轴与发酵罐壁之间的密封圈可保证发酵液不被污染。叶轮的搅拌不仅使气泡与发酵液混合，而且使微生物细胞与发酵液中的营养物质接触。



工业发酵罐内部的叶轮及加热或冷却的管道

A. 工业发酵罐的结构与控制装置示意图

B. 工业发酵罐的内部结构

图1-25 工业发酵罐的结构

发酵罐顶部的视窗可以观察微生物的生长状况和产品形成，安装在发酵罐壁上的温度监测器、溶解氧探测器和pH检测及控制装置等检测发酵过程中的温度、氧浓度、pH的变化，向计算机传输信号。计算机根据发酵生产的数学模型实时监测和控制整个发酵过程，保障发酵按预定的最佳过程进行，从而使产品达到预期目标。

控制发酵过程是保证发酵生产高效顺利进行的重要措施。这是因为环境不同，同种微生物的代谢产物可能不同。pH、氧气、温度等会影响微生物的发酵产物。



小资料

发酵环境对微生物代谢产物的影响

酿酒酵母在中性和酸性发酵条件下，可将葡萄糖发酵产生乙醇和二氧化碳，而在碱性条件下的发酵产物则是甘油。通气状况会影响生成的发酵产物种类。例如，在谷氨酸发酵中，适量通气条件下菌种发酵生成谷氨酸，通气不足则发酵生成乳酸或琥珀酸。发酵温度也会影响微生物的代谢途径和方向，从而对发酵产物的生成产生影响。例如，灰色链霉菌的一种嗜冷突变菌株在其他条件相同，发酵温度不同时，会产生完全不同的抗生素：在12℃条件下发酵产物为冷霉素，在28℃条件下发酵产物为抗生素M-81。吸水链霉菌在28℃时的发酵产物为静丝霉素，在37~40℃时的发酵产物为井冈霉素。

另外，菌种在不同的发酵阶段要求的环境条件是不同的。当菌种进入新鲜的培养基后，细胞吸收各种营养物质，代谢产生维持生命活动的氨基酸、核苷酸、多糖、脂类等物质。这些物质的积累与转化使微生物细胞具备细胞分裂的能力，使微生物群体进入一段快速生长和繁殖的阶段。在微生物生长到一定的阶段后，会在细胞代谢的基础上进一步合成一些结构比较复杂的生物碱、抗生素、毒素等化合物。这些物质对微生物自身的生命活动没有明确的功能，却正是人类需要的微生物发酵产物。

分离或提纯发酵产品是工业发酵制取产品必经的步骤。如果发酵的产品是菌体本身（如酵母菌），可采用过滤、沉淀等方法将菌体从培养液中分离出来（图1-26）。

如果发酵产品是微生物的代谢产物，则可采用真空发酵、吸附发酵、萃取发酵等方法进行提取。真空发酵是对发酵罐减压，使易挥发的发酵产物从发酵液中分离出来的技术。例如，酵母菌在发酵液的酒精浓度达到11.4%时不能再产酒精。在发酵罐上施以负压，酒精从发酵液中挥发出来，酒精发酵速率就由原来的7.0 g/(L·h)提高到40 g/(L·h)。吸附发酵是在发酵过程中加入对发酵产物具有特异性或非特异性吸附作用的吸附剂，从而使产物从发酵液中分离出来的技术。例如，当pH低于5.0时，乳酸发酵受到抑制，在发酵液中加入离子交换树脂不仅能使产物乳酸及时脱离发酵液，还能起到调节发酵液pH的作用。萃取发酵是回收和分离生物产物的一项技术，即当两种水溶性高分子聚合物在同一水溶液中各自达到一定浓度后，会互不相溶形成两相系统，不同的生物产物会分配在不同的相中，通过相的分离就可以实现对发酵产物的分

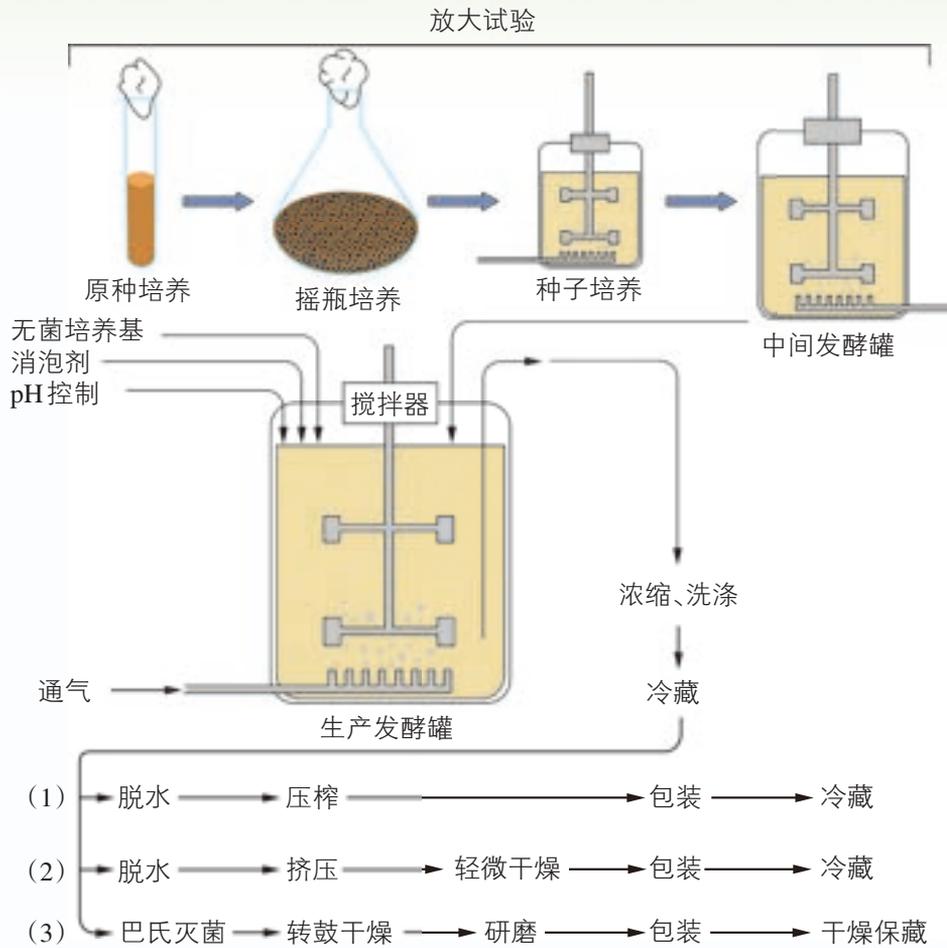


图 1-26 酵母菌的生产过程

离。例如，采用双水相萃取发酵产物 α -淀粉酶时，淀粉酶被萃取到上相中，而发酵过程中同时产生的蛋白酶被萃取到下相中，避免了蛋白酶对淀粉酶的分解。

分离后的生物产品还需要进一步提纯，经过质检合格后才能成为产品。

发酵工程在医药、食品及其他工农业生产上有重要的应用价值

发酵工程具有生产条件温和、原料丰富且价格低廉、废弃物对环境的影响小且容易处理的特点，因此在食品工业、医药工业、冶金工业、农业、环境保护等许多领域得到了广泛的应用，为社会提供了众多的微生物发酵产品（表1-4）。

表 1-4 各行业的微生物工业及其产品举例

名称	产品举例
食品微生物工业	面包酵母、乳酪、味精、酵母提取物、肌苷酸、赖氨酸、甜味素、维生素和食用菌
酿造微生物工业	酿酒酵母、酒、啤酒、食用醋、酱油和柠檬酸
药用微生物工业	青霉素、链霉素、维生素E、赖氨酸和基因工程菌产生的活性肽
医用微生物工业	菌苗、疫苗、诊断试剂、葡聚糖、甾体激素、功能性寡糖和麦角生物碱
环保微生物工业	有益菌剂、分解酚菌剂和石油净化剂
能源微生物工业	燃料乙醇、沼气、氢气和微生物燃料电池
农业微生物工业	赤霉素、阿维菌素、井冈霉素、Bt杀虫剂和菌肥
林业微生物工业	菌根菌剂、放线菌酮、病毒杀虫剂和食用菌
饲料微生物工业	单细胞蛋白、土霉素、蛋氨酸和饲料酵母
兽医微生物工业	土霉素、菌苗、疫苗和诊断试剂
冶金微生物工业	富集铜菌剂、富集铀菌剂
化工微生物工业	丙酮、丁醇、醋酸、衣康酸、PHB和丙烯酰胺
轻工微生物工业	甘油、乳酸、淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶和纤维素酶
石油微生物工业	黄原胶、嗜石油酵母和聚丙烯酰胺
军用微生物工业	菌苗、疫苗、微生物武器检测和预防的产品

微生物发酵的食品和饮料在生活中比比皆是，其产品的品种多、数量大、产值高，应用历史悠久，高居微生物工业的榜首。

绝大多数抗生素也是微生物发酵的产物，或由微生物发酵产物加工而成。抗生素是能抑制微生物生长或杀死微生物的化合物，它们直接来自某种生物，或是由某种生物产生后经过进一步加工而成。

近年来，在医药领域开发的酶抑制剂、免疫调节剂、类激素、抗氧化剂、生物表面活性剂和抗辐射药物等许多新药也是微生物发酵的产物或衍生物。例如，药物普伐他丁是胆固醇合成过程中一种酶的抑制剂，临床上能显著降低患者血液中胆固醇的浓度，且副作用小；环孢菌素A是由11个氨基酸组成的环肽，能阻断抗器官移植的T细胞的活力，但不抑制机体抗感染的B细胞，是一种高效、低毒的抗排异理想药物；利用基因工程技术改造酵母菌而生产的人胰岛素也为千千万万的糖尿病患者减轻了经济负担。2013年初，通过合成生物学手段构建的人工酵母菌菌株，开始大规模工业化生

产青蒿素的前体物质——青蒿酸，这一发酵工程产品将使人类有可能以更加低廉的成本抗击疟疾。

酶制剂是发酵工程对工业化生产的又一贡献。采用发酵工程生产的酶制剂除了应用于食品工业生产中，还广泛应用于洗涤剂生产、纺织、皮革、造纸工业中。例如，味如白糖但甜度高于糖 150 倍的二肽甜味素（阿斯巴甜），原来是利用 L-苯丙氨酸和 L-天冬氨酸由化学催化剂合成，价格昂贵，后来改用嗜热脂肪芽孢杆菌（*Bacillus stearothermo philus*）所产的蛋白酶催化生产，产品价格大幅度下降。许多在极端条件下仍具有功能的酶来自极端环境中的微生物，这些酶通过发酵工程生产，已经在许多高温、高盐、强酸、强碱条件下的工业生产过程中发挥作用。例如，利用耐高温的水生栖热菌（*Thermus aquaticus*）生产的 Taq 酶制剂由于具有高耐热性，在 DNA 体外扩增技术中扮演了不可替代的角色。许多酶制剂在医药、临床诊断和食品毒素鉴定中也被广泛应用。

此外，在医药、保健、食品、化妆品、饲料、农药和肥料等方面有广泛用途的氨基酸、有机酸、醇、维生素、核苷酸，也从天然资源提取和化学合成的生产方式逐步转向通过发酵工程大量生产。

上述实例表明，微生物学的研究推进了人类对自然界中微生物的认识和了解；将微生物学的研究成果与工程技术原理、计算机技术、化工技术有机结合，有目的地生产人们需要的产品，并将继续优化生产技术，生产出造福于人类的多种多样的产品。

思考与练习

一、选择题

1. 发酵工程是重要的生物工程技术，可以为人类提供多样的生物产品。发酵工程主要利用的是哪类生物的细胞（ ）
 - A. 动物
 - B. 植物
 - C. 细菌
 - D. 微生物
2. 菌种的选育是发酵工程的重要环节。菌种是指（ ）
 - A. 一种细菌或真菌的种子
 - B. 微生物的一个分类单位
 - C. 发酵过程中产生的微生物
 - D. 用于获得微生物培养物的微生物
3. 在传统发酵食品的生产中，人们不仅关注菌种中的微生物在分类学上所属的“科”“属”“种”地位，而且更加关注发酵所用菌株的遗传谱系。菌株是指（ ）
 - A. 同种微生物的统称
 - B. 一株含有微生物的植株

- C. 一种微生物的分类单位
- D. 一系列遗传背景相同的微生物

4. 在果酒的制作过程中，发酵的原料和物质成分不同，酒的口味也不同。如果想让酒味浓郁可适当添加白糖，其原因不包括（ ）

- A. 使果酒中的酒精含量更高
- B. 使酵母菌中酶的活性更高
- C. 给酵母菌增殖提供更多的碳源
- D. 给酵母菌发酵提供更多的能源

5. 控制发酵过程中的环境因素有利于持续获得发酵产物。在体验传统发酵技术制作果酒的过程中，给矿泉水瓶安装可弯折吸管的原因是（ ）

①给矿泉水瓶减压；②让酵母菌排出所产生的CO₂；③防止其他微生物进入；④给酵母菌提供氧气

- A. ①③
- B. ②④
- C. ②③
- D. ①④

二、简答题

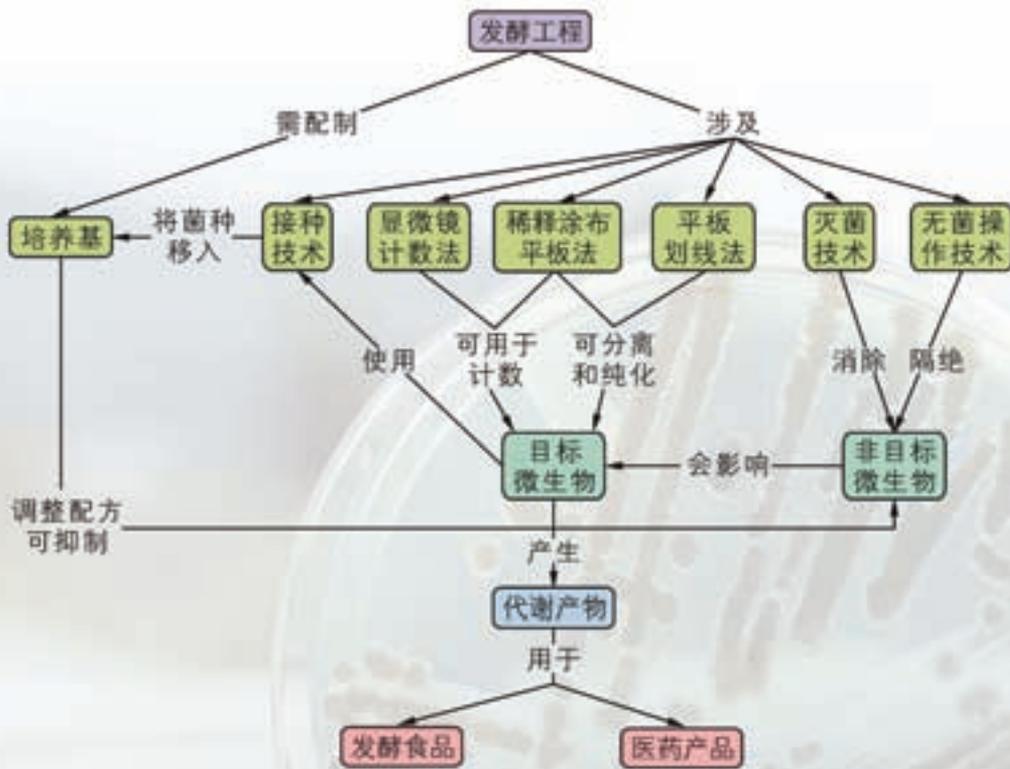
1. 现代发酵工业获得微生物产物的基础是什么？
2. 从传统发酵到近几十年来新研发的发酵工业，在菌种、生产技术和生产产品上有什么区别？

本章小结

微生物的发酵技术涉及配制培养基、灭菌与无菌操作、利用平板划线法以及稀释涂布平板法分离和纯化微生物、显微镜计数等多种技术。人类在很早以前就已开始利用微生物的相关特性制作和加工食品。随着科技的发展，将现代工程技术应用于发酵过程中，可大规模工业化生产人类所需产品，如发酵食品和医药产品等。

本章内容指向“物质与能量观”的形成与应用，某些微生物可在一定环境中分解有机物并获取生命活动所需能量。在这一过程中，所产生的某些物质恰是人类所需的，而发酵工程正是在利用微生物的这些特性规模化生产对人类有用的产品。基于对“物质与能量观”的理解，结合恰当的技术和方法，可设计和优化发酵流程并展开实践，制取发酵食品等人类所需产品。在这一过程中会遇到发酵食品安全等社会议题，应注意结合相关技术监测和减少有害物质的产生，进行明智的决策，践行相应的个人责任与社会责任。

本章知识结构图



第二章

植物细胞工程



利用植物组织培养技术克隆非洲紫罗兰

非洲紫罗兰植株四季开花，花形俊俏雅致。由于其花期长、较耐阴，株型小而美观，盆栽可点缀装饰窗台、茶几等，是优良的室内观赏花卉，也是国际上著名的盆栽花卉。我们可以利用植物组织培养技术来大规模生产非洲紫罗兰，以满足巨大的市场需求。应用植物组织培养技术，可利用一个芽或一片叶等，在一年内繁殖出成千上万株幼苗，使优良品种很快得以推广。植物组织培养技术是植物细胞工程技术之一，那么，什么是细胞工程？植物细胞工程包括哪些内容呢？



细胞工程是指按照一定的设计方案，借助工程学的方法或技术，以生物组织、细胞和细胞器为对象进行操作，在细胞水平上改造生物遗传特性，以获得特定的细胞产物、细胞、组织、器官或新生物体的技术。细胞工程所涉及的范围很广，按技术类型可分为细胞和组织培养、细胞融合、核移植技术等，按生物类型可分为植物细胞工程和动物细胞工程等。动物细胞培养和植物组织培养分别是动、植物细胞工程的基础技术。本章阐述的是植物细胞工程。

学习目标

1. 阐明植物细胞全能性的含义。
2. 概述植物组织培养的过程，举例说明离体培养实现细胞全能性的条件。
3. 概述植物体细胞杂交的过程。
4. 举例说明植物细胞工程有效提高了生产效率。

本章学习应聚焦的关键能力

1. 认识植物组织培养技术是离体获得植物体的重要方法，尝试菊花的组织培养，学会植物组织培养的基本方法。
2. 认识通过植物体细胞杂交可获得新的植物体，加深对科学、技术、社会相互关系的认识，学会运用生物学原理解释生物学社会议题。

第一节 通过植物组织培养可获得完整植株



图2-1 植物试管苗培养室

人们常通过播种种子、扦插、嫁接等方法繁殖植物，但一株植物通过这些方法繁殖出的后代数量是非常有限的。而在一个只有40 m²的既无土

壤又无种子的工业化育苗实验室里，通过植物组织培养（plant tissue culture）技术每年可培育出幼苗100万株。如图2-1所示的培养瓶中的“试管苗”，就是通过该技术克隆出来的。那么，为什么植物组织

培养技术能培养出完整植株？植物组织培养技术是在什么条件下完成的？植物组织培养技术有哪些应用？

本·节·要·点

- 细胞全能性
- 无菌
- 脱分化和再分化
- 人工控制的培养条件



小资料

克 隆

“克隆”是英文单词“clone”的音译，clone源于希腊文“klon”，原意是指用幼苗或嫩枝以营养繁殖方式培育植物。在生物学领域的克隆有下述三层含义：①分子水平基因的克隆，通常指通过重组DNA技术插入某载体的特定DNA片段，在宿主细胞中进行多次复制而形成的分子“群体”；②细胞水平的克隆，指由一个细胞分裂形成的一个细胞群体，例如，当某种抗原侵入动物体时，产生特异性抗体的所有浆细胞是由同一个B细胞分裂形成的，这个浆细胞群就是一个克隆；③个体水平的克隆，是指通过无性繁殖而得到的基因型相同的个体组成的群体。当“克隆”用作动词时，通常是指获得相同遗传背景基因、细胞或个体的技术操作过程。

植物细胞的全能性使离体组织发育成完整植株成为可能

1902年，德国植物学家哈伯兰特（G. Haberlandt，1854—1945）提出了细胞全能性的设想：植物的器官和组织可以不断分割，直至分成单个细胞。离体的单个细胞经过人工培养，能通过细胞分裂而恢复成完整植株。哈伯兰特大胆的设想为植物组织培养的研究与发展奠定了基础。此后，人们在器官、组织、细胞等不同水平上，利用多种植物材料进行了广泛的研究和尝试。

1958年，美国植物学家斯图尔德（F. C. Steward，1904—1993）和德国植物学家赖纳特（J. Reinert，1912—2002）用胡萝卜根的韧皮部单细胞进行培养，得到完整的小植株，第一次通过实验科学验证了哈伯兰特关于植物细胞全能性的设想，由器官到组织再到细胞，单细胞的成功培养成为植物组织培养研究历史上的一个里程碑。

20世纪60年代后，不仅植物组织培养技术日趋完善和成熟，而且形成了以细胞全能性为基础、以细胞脱分化和再分化为调控中心的理论体系。植物组织培养通过与常规育种、转基因技术相结合，显示出了巨大的应用和经济价值。

植物组织培养是指在无菌和人工控制条件下，将离体的植物体器官、组织或细胞等培养在人工配制的培养基上，使其生成完整植株或使其细胞增殖并产生细胞代谢产物的技术。

由于植物组织培养是植物材料在脱离母体的条件下进行的，所以也称为离体培养（culture in vitro）。如图2-2和图2-3所示，用于培养的植物的离体器官、组织等称为外植体（explant）。根据外植体的不同，可将植物组织培养分为器官培养、组织培养、细胞培养、原生质体（protoplast）培养等。



图2-2 以国兰根为外植体的组织培养

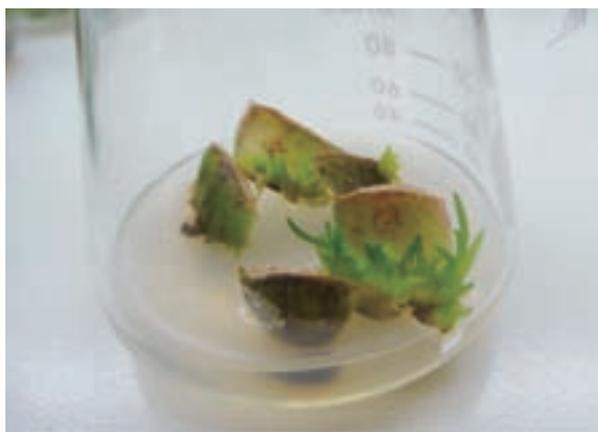


图2-3 以百合鳞茎为外植体的组织培养

生物体内的多数细胞在个体发育过程中丧失了分裂能力，分化成不同类型的细胞，行使独特的生理功能。为什么植物的一个已分化的细胞能在体外培养条件下发育成完整的植株呢？已分化的细胞中遗传物质一般不发生改变，植物的每个生活细胞都具有该植物所包含的全部的遗传信息，因而具有发育成完整植株的潜能，这就是植物细胞的全能性（totipotency）。外植体因脱离了母体的影响，一定条件下能实现其全能性，这是植物组织培养的理论基础。

离体培养条件下，植物细胞全能性的表达是通过细胞的脱分化（dedifferentiation）和再分化（redifferentiation）实现的。离体条件下已分化的细胞经过诱导，失去特有的结构和功能，重新获得分裂能力，称为脱分化。脱分化的细胞不断分裂增殖，产生无组织结构、松散的薄壁细胞团，称为愈伤组织（callus）。愈伤组织细胞在一定条件下，可重新分化为各种类型的细胞，进而形成芽或根等，再生出新的植株，这个过程称为再分化。

图2-4呈现了植物组织培养的一般过程。不过，植物离体培养中常因植物种类和培养方法不同，再生分化成苗的过程也不尽相同。例如，若以植物的茎尖或带芽的茎段为外植体进行培养时，腋芽或顶芽可不经愈伤组织阶段，直接萌生成一株幼苗；当培养基中细胞分裂素浓度较高时，则利于腋芽或顶芽形成丛状苗。

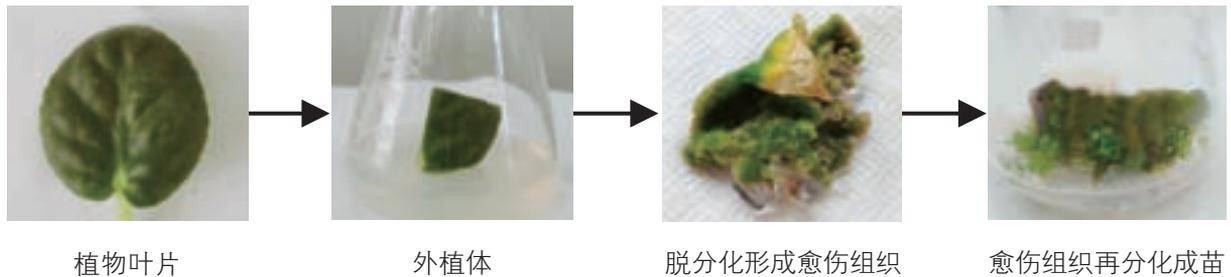


图2-4 植物组织培养的一般过程

由愈伤组织再分化形成完整植株，一般有两种途径：一种是器官发生途径，即首先在一种培养基上诱导形成芽，再在另一种培养基上形成根，因为芽和根都是植物的器官，所以这一途径称为器官发生途径；另一种称为体细胞胚（somatic embryos）发生途径，即由愈伤组织表面形成类似种子胚的结构，这种在离体培养条件下不经过受精过程由体细胞发育成的类似胚的结构称为胚状体，胚状体继续发育成完整的植株（图2-5）。

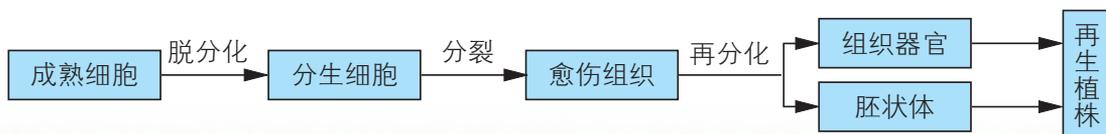


图2-5 愈伤组织再分化为完整植株的途径

小资料

合子胚和体细胞胚

植物进行有性生殖时，亲本产生的精子和卵细胞结合形成合子（受精卵）。在种子形成过程中，合子经细胞分裂、分化，从球形胚、心形胚、鱼雷胚到成熟胚，由合子发育成的胚称为合子胚。在种子萌发过程中，合子胚发育成完整的植株。有性生殖增加了后代的变异性。

体细胞胚（图2-6）虽经历了与合子胚相似的发育过程，但其来源不是合子。体细胞胚可由体细胞分裂分化而来，也可由生殖细胞不受精（如花粉细胞）直接分裂、分化而来；可由外植体经愈伤组织再分化产生，也可不经愈伤组织阶段直接在外植体上发生。

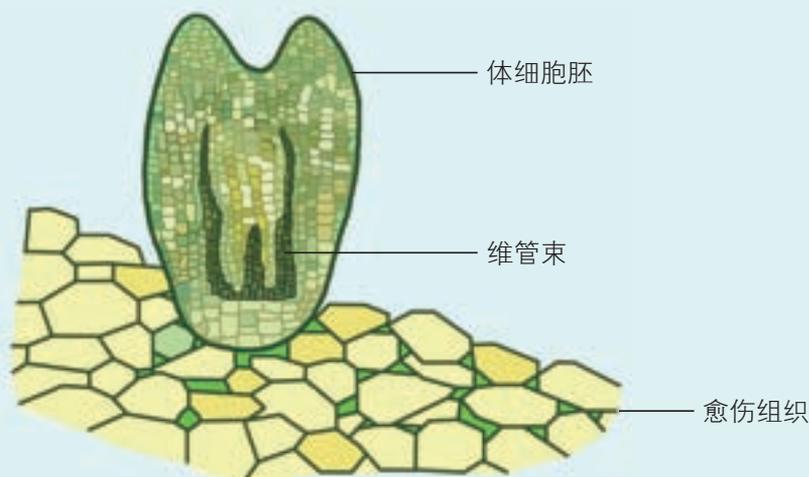


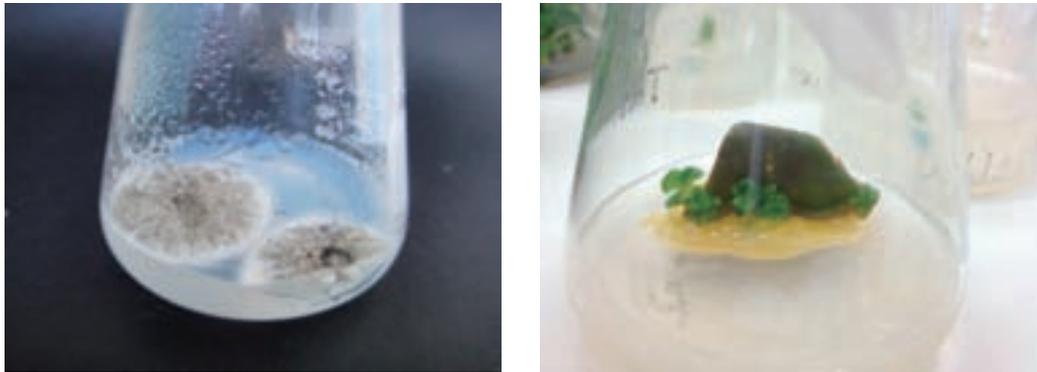
图2-6 体细胞胚示意图

离体植物器官、组织和细胞在适宜条件下方可发育成完整的植株

虽然植物细胞具有全能性，若要使离体植物器官、组织或细胞生长发育成完整的植株，必须使成熟的细胞恢复到分生或胚胎细胞的状态。这需要提供适宜的条件，例如，适宜的温度、无菌条件（aseptic condition）、培养基中适宜浓度和配比的植物激素、充分而全面的营养物质等。

植物组织培养是在严格的无菌条件下进行的。首先，保证培养过程中植物材料不被污染是成功的基础。接种用的外植体取自外部环境，其表面常附有多种微生物，这些微生物一旦被带入培养基，在适宜的环境和营养条件下就会迅速滋生（图2-7），使实验

前功尽弃。用于外植体表面消毒处理的试剂有很多，一定浓度的次氯酸钠、氯化汞和酒精是较常用的消毒剂。多种药剂配合使用消毒外植体，往往具有良好的效果。外植体经消毒后，需要用无菌水多次冲洗，以避免消毒剂长时间作用产生毒害作用。



霉菌污染

细菌污染

图2-7 植物组织培养中的污染现象

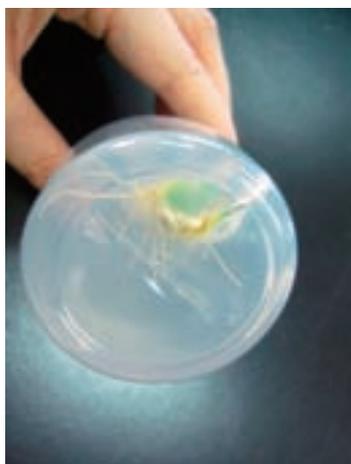
接种器具和培养基一般用高压蒸汽灭菌。培养基中若需要添加在高温灭菌条件下容易被破坏分解的活性物质，则需要将该物质过滤除菌后再在无菌条件下加入已灭菌的培养基中。

接种室和操作台常利用紫外灯照射灭菌。操作者要按照规范的无菌操作流程，在超净工作台中进行外植体的消毒、切割和接种。

培养基能为离体植物材料提供适宜的营养条件。经过多年的研究，人们比较清楚地了解了植物所需要的各种营养成分。植物组织培养的培养基中通常含有水、无机盐、有机营养成分、琼脂、植物激素等物质。无机盐为植物提供必需的矿质元素，根据培养基中这些元素的含量将它们分为N、P、S、K、Mg、Ca等大量元素和Fe、Mn、B、Zn、Cu、Mo、Cl、I、Co等微量元素。有机营养成分中含有糖类、氨基酸、维生素等物质。即使外植体为绿色组织，在培养过程中也往往会逐渐失去叶绿素而使其光合作用受到阻碍，因此，植物需要依赖培养基中的有机碳源，而糖类既可作为碳源和能源物质，又参与维持培养基的渗透压。蔗糖、葡萄糖和果糖是较好的碳源，其中蔗糖最为常用。维生素往往以辅酶的形式参与细胞的蛋白质、脂质、糖代谢等重要活动。

植物激素调控细胞的脱分化和再分化过程。植物生长调节物质包括天然植物激素和人工合成的激素类似物。离体的器官、组织、细胞之所以能够按照人们的设计目标进行细胞分裂和分化、器官形成与个体再生，是因为植物激素起到了重要的甚至是决定性的作用。在培养基的各种成分中，没有哪一种物质比植物激素类物质所产生的影响更大。植物生长素类和细胞分裂素类物质是植物组织培养不可缺少的两类调节物质，两者的浓度和配比在脱分化和再分化中起着关键作用。生长素类和细胞分裂素类物质的比值大时，有利于根的形成；比值小时，则促进芽的形成。如图2-8所示，以矮牵牛叶片为外植体，培养基配方为MS+NAA 0.3 mg/L (NAA: 萘乙酸，为生长素类似物) 时，促

进矮牵牛外植体生根；培养基配方为MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L（6-BA：6-苄氨基腺嘌呤，为细胞分裂素类似物）时，促进矮牵牛外植体愈伤组织的生长和芽的分化。



培养基配方:MS+NAA 0.3 mg/L



培养基配方:MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.2 mg/L

图2-8 植物激素的调控作用

尽管植物生长所需营养物质具有高度的一致性，但不同植物对这些营养成分的需要量有较大差异，同一种植物不同部位的营养要求也不相同。根据不同的培养类型、植物不同的营养需求，可设计不同的培养基配方。如White培养基是最早研究的培养基配方，现仍然在许多生根培养中使用。MS培养基由穆拉西格（Murashige）和斯柯格（Skoog）于1962年设计，是目前使用最广泛的植物培养基（见表2-1）。一种适合某种培养目的的培养基，一般是在已被广泛使用的基本培养基如MS培养基的基础上调整某些成分，再经过一系列实验而确定的。在设计植物培养基时，最常改动的成分就是植物激素类物质的种类和比例。

表2-1 MS培养基成分表

大量元素	mg/L	微量元素	mg/L	微量元素	mg/L	有机成分	mg/L
NH ₄ NO ₃	1650	KI	0.83	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	肌醇	100
KNO ₃	1900	H ₃ BO ₃	6.2	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	烟酸 (维生素B ₃)	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3	Na ₂ -EDTA	37.3	盐酸吡哆醇 (维生素B ₆)	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8	盐酸硫胺素 (维生素B ₁)	0.1
KH ₂ PO ₄	170	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.025			甘氨酸	2

植物组织培养通过多种途径有效地提高生产效率

植物组织培养通过与常规育种、转基因技术等相结合，应用于植物生产的多个领域，取得了可观的经济效益。

组织培养技术可快速繁殖植物 根据培养过程，植物组织培养可分为初代培养（primary culture）和继代培养（subculture）。初代培养是指从植物体上分离下来的外植体的第一次培养。初代培养获得的芽、胚状体等数量都不多，需要进一步增殖培养。将初代培养获得的培养物转移到新的培养基上继续进行扩大培养称为继代培养。继代培养又可以分为第二代培养、第三代培养等。大多数植物每隔4~6周进行一次继代培养，每继代培养一次，培养物一般能增殖3~4倍。正因为培养物可以不断继代培养，所以离体繁殖速度比常规方法通常要快数万倍。

离体繁殖主要以营养器官为外植体，再生个体的遗传性与母体一致，因此快速繁殖的过程就是植物克隆的过程。组织培养再生的个体被称为克隆植物，可以很好地保持品种的优良性状。这对于一些不能用种子繁殖的“名、优、特、新、奇”作物品种意义更大。同时，由于组织培养生产过程可以微型化和精密化，人为控制培养基中的成分和各种环境条件，故可全年连续实验和生产，节约人力、物力。

组织培养技术可用于植物脱毒 现已发现的植物病毒超过500种。很多农作物都带有病毒，特别是进行无性繁殖的植物，如马铃薯、番薯、草莓、大蒜等。据统计，能感染草莓的病毒至少有62种，能感染马铃薯的病毒至少有26种。无性生殖的植物感染病毒后，可由无性繁殖器官不断传播蔓延，使该植物发生退化，甚至导致该植物品种灭绝，给生产造成重大损失。例如，葡萄扇叶病毒使葡萄减产10%~50%，花卉病毒使球根、宿根等花卉严重退化，致使花少而小，甚至畸形、变色。

感病植株并非每个部位都带有病毒。人们早在1943年就发现植物生长点附近的病毒浓度很低甚至无病毒。如果利用组织培养方法，取一定大小的茎尖进行培养，再生的植株有可能不带病毒，从而获得脱病毒苗，再用脱病毒苗进行繁殖，则种植的作物就不会或极少发生病毒。

组织培养技术可用于生产人工种子 如图2-9所示，人工种子（artificial seed）是将植物离体培养产生的体细胞胚、芽、愈伤组织等包埋在含有营养成分和保护功能的物质中而制成的。在条件适宜时，它同普通种子一样可以发芽成苗。

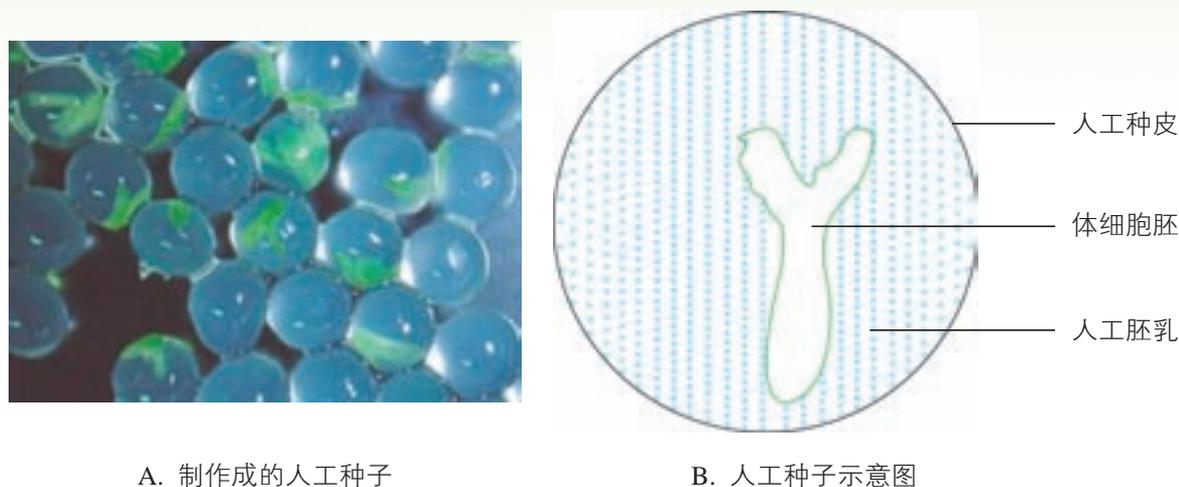


图2-9 人工种子

通常人工种子包括体细胞胚、人工胚乳和人工种皮三部分。其最外层为有机的薄膜包裹（人工种皮），中间含有体细胞胚萌发所需要的营养成分和植物激素（人工胚乳），最里面是体细胞胚等。人工种子的生产过程不受季节限制，可以大量、快速繁殖优良品种，对于生育周期长、育性不良且难于有性繁殖的植物，具有更重要的意义。

组织培养技术可用于细胞代谢产物的工业化生产 植物几乎能生产人类所需要的一切天然有机物，如蛋白质、脂肪、糖类、天然药物、香料、燃料等。因此，通过植物细胞、组织的培养来提取有价值的天然产物，满足人类对植物产品的巨大需求，是植物生物技术领域的研究热点之一。现今能进行细胞培养的植物种类已达400多种，可以产生600多种代谢产物，紫草、人参、黄连等药用植物的细胞培养已达到商业化水平，国际上已获得这方面的专利100多项。利用发酵罐大规模培养植物细胞来生产药物、食品、调料、香料、颜料等，正日益发展成一个新的产业，具有广阔的应用前景。

组织培养技术可用于作物新品种的培育 植物组织培养技术广泛应用于植物育种的各个方面，例如，细胞突变体的筛选、单倍体育种、转基因植物的克隆、植物体细胞杂交等，并已取得显著的成绩。

在组织培养过程中，培养物的细胞处于不断分裂状态，易受培养条件和外界压力（如射线和化学物质等）的影响而发生变异。在细胞和原生质体培养时进行人工诱变，诱变频率大于个体或器官水平，而且在较小的空间内一次可处理大量材料。运用体细胞无性系变异和离体诱变技术已获得一批抗病虫、抗除草剂、耐寒、耐盐碱的品种。

离体培养花药或花粉可获得单倍体，继续用秋水仙素处理单倍体植株，使染色体加倍，可获得纯合可育植株，从而大大缩短育种周期。世界上已成功获得300余种植物的花粉植株。1974年，我国生物学家通过花药离体培养，培育出了烟草新品种——烟草单育1号，之后又育成水稻中花1号、小麦京花1号等品种。

离体的器官、组织、细胞、原生质体常作为外源基因的受体。将植物组织培养与基因工程技术相结合，将外源基因导入离体植物细胞，可以培育出抗逆、高产及优质的转基因植株。例如，中国农业大学成功将高赖氨酸基因导入玉米，获得了赖氨酸含量比对照提高10%的转基因玉米。



活动

菊花的组织培养及幼苗的移栽

本活动以菊花为材料进行组织培养，以实现菊花的快速繁殖。通过调节激素的比例可控制菊花外植体的生长发育。首先用含细胞分裂素相对较多和生长素相对较少的发芽培养基培养菊花茎段，使其长出较多的丛状苗。然后将丛状苗用含有一定浓度生长素的培养基分株培养，使其生根，再将生根的试管植株移至草炭土或蛭石中继续生长，苗健壮后可移栽定植。

目的要求

1. 探究植物激素在菊花的组织培养中的作用。
2. 接种培养菊花外植体使其长出丛状苗，接种菊花试管苗进行生根培养。
3. 尝试用无土栽培技术培养菊花试管苗。

材料用具

盆栽菊花，已灭菌的发芽培养基和生根培养基，75%酒精，无菌水，10%次氯酸钠（或0.1%氯化汞），0.5 mg/mL的NAA母液，0.5 mg/mL的6-BA母液，洗涤灵稀释液，酒精灯，培养瓶，橡皮筋，记号笔，火柴，内装75%酒精的广口瓶，小块纱布，镊子，剪刀，解剖刀，灭菌的培养皿或无菌纸，200 mL及50 mL烧杯，废物缸，无土栽培育苗盘，报纸，喷壶，一定量的珍珠岩和蛭石，高压灭菌锅等。

用于接种的无菌纸的制作方法：用报纸或牛皮纸将若干张适当大小的纸巾包起来，经高压灭菌锅灭菌后，放入干燥箱中烘干备用。

发芽培养基参考配方：MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L

生根培养基参考配方：MS+NAA 0.1 mg/L

方法步骤

1. 菊花外植体的接种与培养。

(1) 提前打开接种室和超净工作台的紫外灯，照射20~30 min后关紫外灯。打开超净工作台的风机，5~10 min后进入接种室操作。

(2) 用温水和肥皂洗手，更换衣服，戴口罩，准备进行接种操作。

(3) 打开超净工作台玻璃隔板，幅度为双手能伸进工作台操作方便即可。如图2-10B所示，用75%酒精擦拭双手、台面及实验用具。

(4) 准备无菌纸。点燃酒精灯，将镊子灼烧灭菌后，用其夹取包在牛皮纸中的无菌纸，平铺在超净工作台台面上。

(5) 外植体消毒。如图2-10A所示，将带芽的菊花枝条剪成一定大小，在洗涤灵稀释液中浸泡2 min，用流水冲洗干净后，在75%酒精中消毒30 s，再用流水冲洗后置于10%次氯酸钠溶液中消毒10 min，或者在0.1%氯化汞溶液中消毒5~7 min，然后用无菌水多次冲洗。消毒后的材料应放在无菌纸或灭菌培养皿中，待接种。



A. 外植体用消毒剂消毒后再用无菌水冲洗 B. 用酒精擦拭双手消毒

图2-10 外植体及操作者的消毒

(6) 分割外植体。如图2-11A和2-11B所示，取已在火焰灭菌后冷却的镊子和剪刀等器具在无菌纸上将菊花枝条切割为1 cm左右的茎段，每一茎段至少带有一个芽。也可根据自己的设计选择菊花的其他器官如叶片为外植体。

(7) 接种。装有培养基的瓶口用酒精擦拭消毒后，打开封口膜，让瓶口旋转通过火焰。如图2-11C所示，用灼烧后冷却的镊子夹取茎段插入培养基中，每瓶可放入1~3个茎段。接种后，瓶口过火焰，封上封口膜，标注接种日期和其他相关信息。



A. 消毒过的枝条

B. 在无菌纸上切割枝条

C. 切割后的茎段接种在培养瓶中

图2-11 外植体的切割和接种

(8) 培养。将接种后的材料置于18~25℃的条件下培养，每天光照10~12h，观察记录外植体的生长状况，直至得到菊花小植株。

2. 菊花试管苗的生根培养。

(1) 将装有试管苗培养瓶的瓶口用酒精擦拭消毒，打开瓶盖，瓶口过火焰，用灼烧后冷却的镊子夹取试管苗。

(2) 在无菌纸上将试管苗分割成单株后，接种在生根培养基中，每瓶培养基插苗4~5棵。

(3) 培养。将试管苗置于培养室培养。保持温度为20~28℃，每天光照10~12h，一星期后，观察试管苗生长情况。2~3星期后，试管苗长出健壮根系。

3. 菊花试管苗的移栽。

(1) 炼苗。将生根的组培苗从培养室取出，打开瓶口，放置1~2天，以提高试管苗对外部环境的适应能力。

(2) 培养基质的灭菌。将蛭石和珍珠岩分别用聚丙烯塑料袋装好，在高压灭菌锅中灭菌20 min，冷却后备用。

(3) 育苗盘的准备。将蛭石和珍珠岩按1:1的比例混合，倒入干净的育苗盘中，用木板刮平，喷水浸透基质，备用。

(4) 试管苗的清洗。用镊子将试管苗轻轻取出，去掉褐化部分，在清水中洗掉根部琼脂，注意不要伤害根系。

(5) 试管苗的栽种。用镊子在基质上插孔，将试管苗有序地移栽至育苗盘中，轻轻覆盖、压实，待盘穴栽满后，喷水至培养基质处于水饱和状态（图2-12）。



图2-12 育苗盘中移栽培养的菊花幼苗

(6) 培养及管理。将育苗盘置于温室中，覆盖保鲜膜以保湿，并定期打开保鲜膜通气。初期避免强光直射，待幼苗成活后除去保鲜膜。培养后期定期浇灌稀释的MS或其他营养液，为促其快速生长提供营养。定期观察和记录幼苗生长状况。

讨 论

1. 不同植物、不同组织的生根和生芽是否都可使用与本实验相同的生长素和细胞分裂素浓度？
2. 本实验用人工合成的激素，而不用植物中存在的天然激素，这是为什么？
3. 你所选用的外植体以及培养基的配方是怎样的？请预测你的实验结果。
4. 通过外植体的培养得到了丛状苗，若要对丛状苗进行继代培养以扩大繁殖而获得更多的试管苗，你认为该如何操作？



课外读

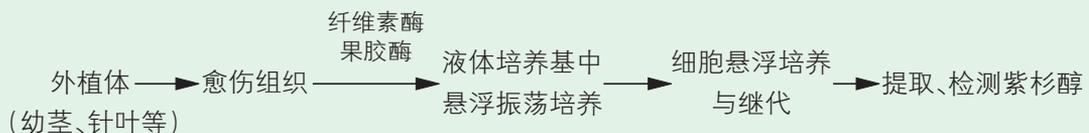
利用红豆杉的愈伤组织与细胞培养生产抗癌药物紫杉醇

紫杉醇 (paclitaxel) 是红豆杉属植物产生的一种复杂的次生代谢产物 (图 2-13), 1963 年美国化学家沃尔 (Monroe E. Wall) 和瓦尼 (M. C. Wani) 等首先从太平洋紫杉树皮中提取。1979 年, 纽约叶史瓦大学 (Yeshiva University) 的分子药理学家霍尔维茨 (Susan B. Horwitz) 发现紫杉醇的抗癌机理: 紫杉醇能和微管蛋白聚合体相互作用, 促进微管聚合并使之稳定, 阻碍了纺锤体的形成, 从而阻碍了肿瘤细胞的分裂, 直至死亡。该药于 1990 年进入 III 期临床试验, 1992 年年底获美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市, 用于治疗对常规化疗无效的卵巢癌和乳腺癌。研究发现, 紫杉醇对多种癌症都有一定的疗效。1995 年, 我国成为第二个生产紫杉醇及注射液的国家。



图 2-13 红豆杉

最初，用于研究和临床试验的紫杉醇都是从短叶红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 树皮中提取的。从 36 株 60 年生大树的树皮中只能提取到大约 1 g 紫杉醇，可治疗一个癌症患者。1991 年，美国国家癌症研究所 (NCI) 为获得 25 kg 紫杉醇，毁树 38000 株。红豆杉生长速度慢，直径为 20 cm 的树需生长 10 年，而目前紫杉醇的年需求量达 500 kg，靠伐树生产紫杉醇的方法根本无法满足人们对紫杉醇的需求。同时过量的人工采伐，使野生资源遭到了极大的破坏，在一些产地红豆杉已经面临灭顶之灾，保护其野生资源和扩大药源已成为当前急需解决的问题。红豆杉属植物共有 11 个种，为了扩大紫杉醇来源，人们试图从其他红豆杉属植物中及红豆杉植株的其他部位提取紫杉醇。红豆杉在我国主要分布于云南、四川、西藏和东北等地，目前已有不少地方进行人工栽培，不过，播种育苗和扦插繁殖虽能在一定程度上缓解矛盾，但不能从根本上解决问题。利用植物组织培养和细胞培养的方法来生产紫杉醇及其合成前体是扩大紫杉醇来源的一条重要途径，已引起国内外学者的广泛关注，并有不少成功的报道。利用植物组织培养技术获得紫杉醇的基本方法如下：



利用离体培养的红豆杉细胞生产紫杉醇能否实现工业化，关键是要提高培养物产量和紫杉醇含量。选择高产细胞系，优化培养条件，保持高产细胞生长与生产特性的稳定性，是一项十分艰巨的任务。

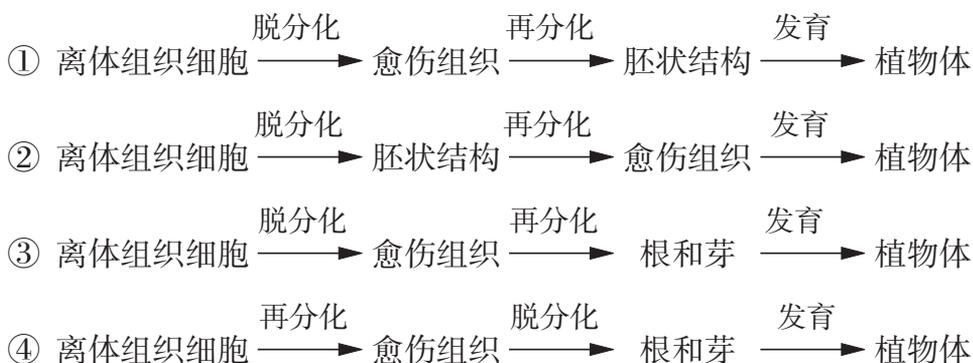
思考与练习

一、选择题

- 植物细胞的全能性是植物细胞工程技术的理论基础。下列关于植物细胞全能性含义的叙述，正确的是 ()
 - 体内不同细胞具有相同的遗传物质
 - 体内不同组织细胞的结构和功能各异
 - 各种细胞具有使后代细胞形成完整个体的潜能
 - 各种细胞都可以有选择地表达细胞中的某些基因
- 离体培养条件下，植物细胞全能性的表达是通过细胞的脱分化和再分化实现的。在此过程中，最重要的调节物质是 ()

- A. 维生素和酶
B. 蔗糖和琼脂
C. 氨基酸和核苷酸
D. 细胞分裂素和生长素类物质

3. 在植物激素的作用下，接种于培养基中的外植体往往会发生“脱胎换骨”的变化。下列关于植物组织培养过程的叙述，错误的是（ ）



- A. ②④ B. ③④ C. ①③ D. ①④

4. 植物组织培养是在严格的无菌条件下进行的。下列关于植物组织培养的技术操作，正确的是（ ）

- A. 培养基在使用之前要放在烤箱中高温灭菌
B. 接种操作可在普通房间的酒精灯火焰旁边进行
C. 解剖刀在火焰上灼烧后需冷却才能用于切割外植体
D. 外植体用化学试剂消毒后需经蒸馏水冲洗才可用于接种

二、简答题

1. 武夷山的乌龙茶通称为武夷岩茶，分布在我国福建省武夷山市，因其独特的生长环境，选育出多种优良品种，其中以“大红袍”最为有名，被列入国家级非物质文化遗产名录的茶类中。植物组织培养作为快速繁殖优良品种的重要手段，是实现武夷岩茶高品质品种大规模生产的途径。请你查阅资料，简述组织培养“大红袍”的外植体、配方及一般过程。

2. 植物组织培养工厂一般包括几个车间，分别具有什么功能？若有条件，请参观本地的植物组织培养工厂。

第二节 通过体细胞杂交可获得新的植物体

番茄和马铃薯都是人们喜爱的食物。图2-14显示的“马铃薯-番茄”，地上结出番茄果实，地下长出马铃薯块茎。这种不同器官虽然生长在一起却是“泾渭分明”的植株，是通过无性繁殖嫁接技术得到的。该“马铃薯-番茄”并不是性状稳定的植物品种，若分



图2-14 马铃薯-番茄或番茄-马铃薯

本·节·要·点

- 植物体细胞杂交
- 原生质体
- 远缘杂交不亲和

别用其

番茄种子和马铃薯块茎进行繁殖，将分别得到马铃薯和番茄两种植物。那么，怎样才能得到“你中有我、我中有你”性状稳定的“马铃薯-番茄”呢？1978年梅尔彻斯（Melchers）等首次利用植物体细胞杂交技术获得了马铃薯和番茄的属间体细胞杂种“马铃薯-番茄”植株。

植物体细胞杂交（plant somatic hybridization）是将两个来自不同种植物的体细胞融合成一个杂种细胞，并将杂种细胞培育成新的植物体的技术。植物体细胞杂交技术是如何实现的？由该技术培育出的新品种有什么特点呢？

成功培养原生质体是植物体细胞杂交技术的基础

1960年英国植物生理学家科金（Cocking）用酶解法去除植物细胞壁，分离出了植物原生质体。1971年科研人员首次由原生质体获得了烟草再生植株。没有了细胞壁的阻碍，原生质体更容易被转入外源基因，是植物基因工程的理想受体。同时，没有了坚硬致密的细胞壁的阻碍，植物细胞之间的融合得以实现，因而，原生质体培养成功

标志着植物细胞工程技术又向前迈进了一步，为植物细胞工程和基因工程的研究提供了先进的实验体系，具有重要的理论研究和实际应用价值。我国科研人员已获得50多种植物的原生质体再生植株。

获得原生质体的具体方法：在0.5~0.6 mol/L的甘露醇（或一定浓度的蔗糖）溶液环境（较高渗透压）下，用纤维素酶和果胶酶混合液处理根尖、叶片、愈伤组织或悬浮培养细胞，消化除去细胞壁，获得球形的原生质体。在用酶解法降解细胞壁之前，先用较高渗透压溶液处理细胞，目的是使细胞处于微弱的质壁分离状态，这样有利于完整的原生质体的释放，防止原生质体被破坏。

由杂种细胞培育出的新植物体可能会具有新的特性

1972年，美国的卡尔森（Carlson）将来自不同种烟草的原生质体融合，通过植物体细胞杂交技术，首次获得了体细胞杂种。植物体细胞杂交过程如图2-15所示。

首先用酶解法获得原生质体，然后通过一定的技术手段如电刺激、离心、振荡、聚乙二醇等诱导，实现原生质体的融合。只要将水解酶去除，融合的原生质体经培养后，能很快再生出新的细胞壁，形成杂种细胞。杂种细胞具有全能性，经过培养能进一步分裂、分化，进而发育成完整的植株。

可见，依据植物细胞全能性原理，植物体细胞杂交技术是将细胞融合技术和植物组织培养技术相结合而发展起来的一项植物育种技术。

由于原生质体融合是在一定密度的细胞群体下进行的，两个不同亲本的原生质体混合后经诱导融合，实际上得到的是各种原生质体的混合物，包括未融合的、部分融合的、同种细胞融合的、不同种细胞融合的原生质体。所以，一个融合体系中的细胞并非均为杂种细胞，同一体系中再生的植株也并非均为体细胞杂种植株。即使得到了杂种细胞，培养过程中也可能出现染色体的丢失、结构异常等情况，因此，杂种细胞的鉴定和筛选以及

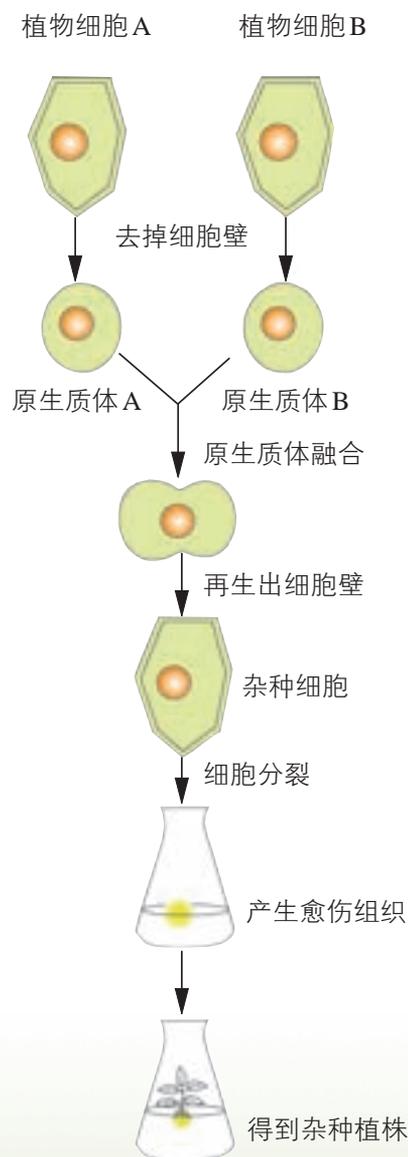


图2-15 植物体细胞杂交示意图

杂种植株的鉴定和选育，是获得真正杂种的必要过程。1978年梅尔彻斯等用植物体细胞杂交技术培育出的马铃薯-番茄“Pomato”，外形倾向于番茄植株，花和叶具有杂种的特点，并结有畸形的小果实，但在根部没有形成块茎。

通过植物体细胞杂交技术，能克服远缘杂交的不亲和性，获得新品种（图2-16）。该技术已经广泛应用于多种植物的育种研究。据不完全统计，至少有400多种植物的原生质体经培养后成功再生出植株，通过原生质体融合已获得多种植物种间、属间甚至是科间的杂种细胞、愈伤组织，有些还进而分化成苗。人们在某些作物的野生种与栽培种之间的体细胞杂交方面，也进行了大量的研究，希望将野生种的抗虫、抗病毒等有益性状转移到栽培种中。例如，利用野生种与栽培种马铃薯进行体细胞杂交，成功获得了抗青枯病的杂种植株（图2-17）。



图2-16 白菜与甘蓝体细胞杂交育成白菜-甘蓝

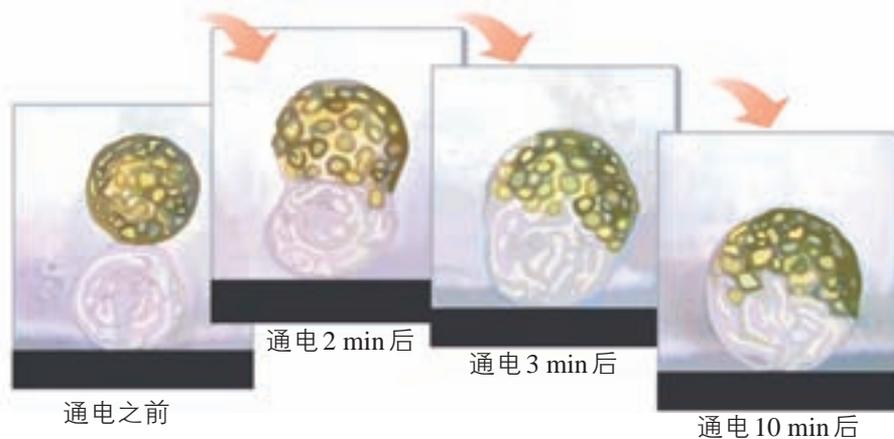


图2-17 利用电刺激法将野生马铃薯与栽培马铃薯进行细胞融合示意图

植物体细胞杂交技术自诞生以来便备受人们关注，科研工作者做了大量的试验与探索，获得了许多具有优良性状的新的植物种质资源。不过，体细胞杂种植株的可育性还有待进一步研究，利用植物体细胞杂交技术培育出的新品种成功应用于农业生产的例子还很少，植物体细胞杂交的潜力还需要科研工作者继续开发与探索。

思考与练习

一、选择题

1. 成功培养原生质体是植物体细胞杂交技术的基础。下列关于原生质体的叙述，错误的是（ ）

- A. 理论上原生质体具有全能性
- B. 原生质体的融合依赖细胞膜的流动性
- C. 原生质体在适宜条件下能再生出细胞壁
- D. 原生质体包括细胞膜、液泡膜及这两层膜之间的细胞质

2. 植物组织培养技术通过与常规育种、转基因技术等相结合，应用于植物生产的多个领域。在下列技术中，不涉及植物组织培养技术的是（ ）

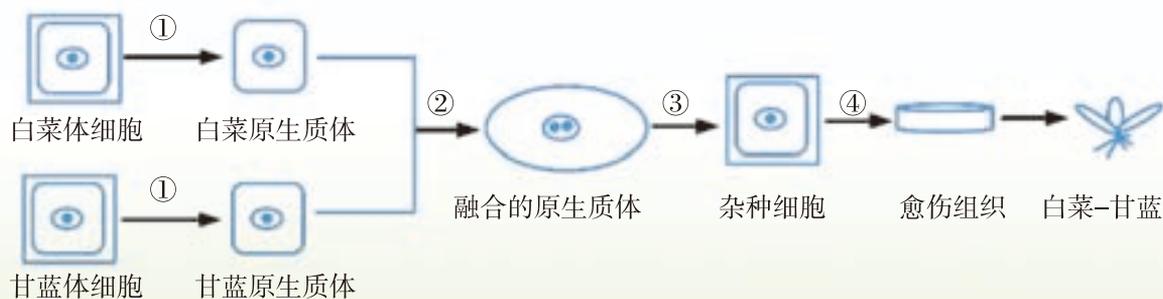
- A. 利用花药离体培养得到单倍体植株
- B. 利用基因工程培育抗棉铃虫的棉花植株
- C. 利用细胞工程培育“番茄马铃薯”杂种植株
- D. 用秋水仙素处理植物幼苗，得到多倍体植株

3. 植物细胞工程通过细胞水平的操作获得有用的植物体或相关产品。下列关于植物细胞工程应用的叙述，错误的是（ ）

- A. 利用组织培养技术培育脱毒苗，获得具有抗病毒的新品种
- B. 利用组织培养技术获得人工种子，能保持亲本的优良性状
- C. 利用细胞培养技术获得紫草素，实现了细胞产物的工业化生产
- D. 利用体细胞杂交技术获得“白菜-甘蓝”，克服生物远缘杂交不亲和障碍

二、简答题

下图是“白菜-甘蓝”杂种植株的培育过程。



请回答下列问题：

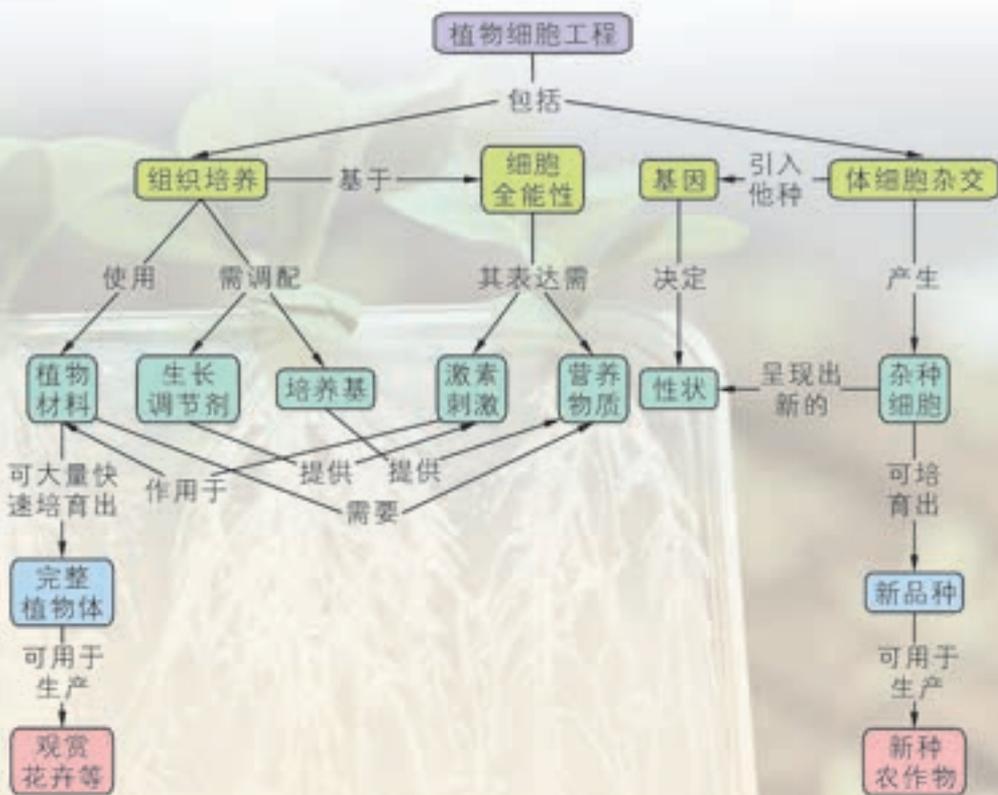
- (1) 步骤①需要用到的试剂是什么？
- (2) 步骤②所用的方法有哪些？
- (3) 经过步骤③得到的杂种细胞和融合的原生质体的区别是什么？
- (4) 杂种细胞能发育成“白菜-甘蓝”植株的理论基础是什么？

本章小结

植物细胞工程通过细胞水平的操作获得有用的植物体或相关产品，这包括植物组织培养和植物体细胞杂交等技术。植物细胞工程可用于生产观赏花卉、培育农作物新种等。

本章内容指向“物质与能量观”及“稳态与平衡观”的形成与应用。植物细胞工程技术中，需要为外植体提供满足其适宜的营养和激素调控条件的培养基。外植体利用培养基中的营养物质，在一定的激素综合调控下，通过细胞分裂和分化，实现细胞的全能性或产生特定的代谢产物。本章内容同时指向“结构与功能观”的形成与应用。植物体的每个活细胞都具有一套完整的基因，因而都具备经诱导后发育为完整植株的潜能，若这套基因中引入了他种植物的基因并成功表达，那么细胞就会呈现出新的性状。植物细胞工程正是利用了基因（结构）与性状（功能）间的关系，通过细胞水平的操作，如组织培养和体细胞杂交，获得人类所需的植物体或产品。在这一过程中，通过不断地设计、改进和实践，可逐渐优化相应的工艺流程和相关技术，有效地提高生产效率，更好地满足人类的需求。

本章知识结构图



第三章

动物细胞工程



世界首个“人造牛肉汉堡”问世

2013年8月，世界上第一个“试管汉堡”在英国伦敦问世。这个汉堡中的“牛肉饼”是荷兰科学家通过在体外培养牛的干细胞而得到的，其成本超过32万美元。研究人员希望这种“人造肉”的问世有助于解决全球肉类紧缺问题。细胞培养是动物细胞工程的基础技术。那么，研究人员的愿望能够实现吗？未来的某一天，我们可以不依赖动物饲养而工业化地生产物美价廉的某种肉类食品吗？除了细胞培养，动物细胞工程还包括哪些技术呢？



依据植物细胞的全能性原理，能够在细胞水平上克隆植物，培育植物新品种。那么，能利用动物细胞培养技术克隆出动物个体吗？如果将不同种动物的细胞融合，能够培育出具有新性状的动物个体吗？轰动世界的克隆羊“多莉”是如何培育出来的？通过“试管婴儿”技术孕育出新生儿与一般的生殖过程有什么不同？本章将会揭示这些问题的答案。动物细胞工程常用的技术手段包括动物细胞培养、动物细胞核移植、动物细胞融合等。

学习目标

1. 概述动物细胞培养的过程，举例说明动物细胞培养的应用价值。
2. 概述利用核移植技术克隆动物的过程和原理，举例说明动物细胞核移植技术的应用价值。
3. 概述利用动物细胞融合技术制备单克隆抗体的过程，举例说明单克隆抗体在医学等方面的应用价值。
4. 概述胚胎工程技术的一般过程，举例说明胚胎工程技术的应用价值。

本章学习应聚焦的关键能力

1. 认识收集信息、归纳概括是审视生物学社会议题的重要方法，尝试收集单克隆抗体在临床上实际应用的资料，学会收集信息、归纳概括的基本方法，并关注生物学社会议题。
2. 认识动物细胞培养、动物细胞核移植、动物细胞融合是动物细胞工程常用的技术手段，加深对科学、技术、社会相互关系的认识，学会运用生物学原理解释生物学社会议题。

第一节 细胞培养是动物细胞工程的基础

动物组织和细胞的培养萌芽于19世纪。科研人员在培养基的成分、培养装置、培养技术等方面进行了深入研究，使动物细胞培养技术日趋完善。动物细胞培养技术是其他动物细胞工程技术的基础。那么，动物体细胞在体外进行培养需要什么条件？怎样培养？

本·节·要·点

- 原代培养
- 传代培养
- 培养基
- 二氧化碳培养箱
- 无菌无毒条件



小资料

体外培养皮肤细胞治愈烧伤患者

米歇尔在被洗澡的热水烫伤时还不到1岁，她的手臂和腿部大面积烫伤，医生担心她有生命危险。通常治疗烫伤的方法是：取下身体其他部位的完好皮肤，移植到伤处，使皮肤愈合。但是，像米歇尔一样的大面积烧伤患者缺乏足够的自体皮肤，异体皮肤移植又往往会因免疫排斥反应而需再度植皮。米歇尔的医生决定尝试一种新方法：在实验室用米歇尔的皮肤细胞培养“皮肤”，再进行培养皮肤的移植。医生从米歇尔未受伤的皮肤上取了少许样本，并将皮肤细胞在体外培养。三四个星期后，细胞增殖并形成很薄的皮肤组织，这些薄薄的“皮肤”移植后足以覆盖米歇尔的伤口。几个星期后，米歇尔的皮肤愈合，这种通过细胞培养技术得到的“皮肤”挽救了米歇尔的生命。

动物体细胞可在体外适宜条件下进行培养

动物细胞培养（animal cell culture）是从动物体获得相关组织，分散成单个细胞后，在适宜环境下让细胞生长和增殖的过程。

生物体内的细胞可以通过机体的代谢、调节和保护等机制，使细胞的营养、生长条件、抵抗有害因子的能力等方面处于最佳状态。体外培养的细胞由于失去了对整体

的依赖性，因此对实验室的培养条件提出了更高的要求。相对来说，与植物组织培养相比，动物细胞培养需要提供成分更复杂的培养基，控制更严格的无菌条件，创造更稳定的环境条件。

动物细胞的生长和增殖需要适宜的温度、湿度、pH、气体条件。二氧化碳培养箱(图3-1)可模拟类似体内的生长环境条件而用于动物细胞培养。大多数情况下，细胞生长的最适宜温度是37℃，温差一般不超过±0.5℃。如果温度达到40℃以上，细胞很快死亡。培养箱不仅提供了适宜的温度，还能控制稳定的pH环境，大多数细胞适宜的pH为7.2~7.4，偏离此范围对细胞产生有害影响。造成培养基pH波动的主要物质是细胞代谢产生的CO₂，为了解决这一问题，可采用开放式培养的方式，使细胞代谢产生的CO₂及时溢出培养器皿，再通过给培养箱提供恒定的5%的CO₂浓度，使之与培养基中的NaHCO₃处于平衡状态，调节pH的相对稳定。95%的空气可以保证细胞呼吸对氧气的需要。



图3-1 二氧化碳培养箱及二氧化碳气罐

培养动物细胞需要提供无菌、无毒的条件。防止污染是决定细胞培养成败的关键，无菌意识和无菌操作应贯穿整个培养过程的始终。培养的细胞一旦被污染，多数无法挽回，需尽快弃之，以防止污染扩大而影响其他细胞。可见，防止污染，预防是关键。除了培养材料、培养基、培养环境、操作过程严格控制无菌外，在培养基中加入抗生素也能抑制细菌和真菌的生长，从而预防污染。常用的抗生素有青霉素、链霉素、卡那霉素和庆大霉素等。动物细胞培养液中常含有在高温条件下变性失去功能的物质，如血清等，因而对培养液的这些成分采用过滤除菌。此外，为防止细胞代谢产生的有毒物质危害细胞，应定期更换培养液。

动物细胞的生长和增殖需要充足的营养物质。培养动物细胞的培养基通常为液体

培养基，其基本成分包括水、无机盐、氨基酸、维生素、糖类、生长因子等。按培养基来源可分为天然培养基（*natural medium*）和合成培养基（*synthetic medium*）。天然培养基主要来自动物体液或动物组织分离提取液，如血清、淋巴液、鸡胚浸出液等。天然培养基的成分与细胞在体内需要的成分比较接近，含有丰富的营养物质及各种生长因子等，渗透压、pH 也与体内环境相似，但其成分复杂，来源受限。合成培养基是根据细胞生存所需物质的种类和含量，用人工方法模拟合成的，便于对各种成分进行人工控制和标准化。由于人们并没有完全了解动物细胞所需要的全部物质，实际工作中往往将天然培养基与合成培养基结合使用，如在合成培养基中添加一定比例的血清或其他天然成分。

动物细胞培养包括原代培养和传代培养

动物细胞培养的一般过程如图 3-2 所示，包括原代培养（*primary culture*）和传代培养（*passage culture or subculture*）。



图 3-2 动物成纤维细胞的培养过程

原代培养是指细胞或组织离开有机体后的首次培养。取材是原代培养的第一步，所取动物组织块一般体积大于 1 mm^3 。若直接培养组织块，只有处于周边的少量细胞可以生存和繁殖，大部分中间细胞因不能获得穿透能力有限的营养物质而代谢不良。为

了获取大量生长良好的细胞，必须先把组织细胞分散开，使细胞解离出来。

解离细胞的方法是先将组织块剪碎，用胰蛋白酶或胶原蛋白酶等消化处理一段时间，使组织松散，细胞分开。再将分散的细胞制成细胞悬液，进一步接种至培养瓶中，在人工控制的培养条件下，进行原代培养。

体外培养的动物细胞往往具有贴附生长和接触抑制等特点。贴附是有机体细胞在体内生存和生长发育的基本方式，包括细胞与细胞间的相互接触和细胞与细胞外基质之间的相互接触。正是基于细胞这种贴附生长的特征，使得不同细胞之间结合而形成组织，也使得细胞和周围环境之间保持联系。体外培养时，绝大多数细胞仍然保持了贴附生长的特性，必须贴附在某一固相支持物上如培养瓶壁上生长。来源于血液、淋巴组织的细胞以及某些肿瘤细胞不需要贴附在支持物上，而是呈悬浮生长状态。

接触抑制是体外细胞培养时贴附型细胞生长的特性。一般情况下，正常的细胞在培养过程中不停顿地活动和运动，其外周的细胞膜呈现一些特征性的皱褶样活动。但是，当细胞由于移动而相互靠近发生接触时，细胞不再移动，接触区域的细胞膜皱褶样活动停止，最终细胞分裂停止，这种现象称为接触抑制（图3-3）。由于细胞之间有接触抑制的特性，一般的正常细胞并不重叠于其他细胞之上生长，而是单层生长（图3-4）。癌细胞由于无接触抑制而能够继续移动和增殖，导致细胞向三维空间扩展，发生堆积。因此，是否接触抑制可作为区别正常细胞与癌细胞的标志之一。

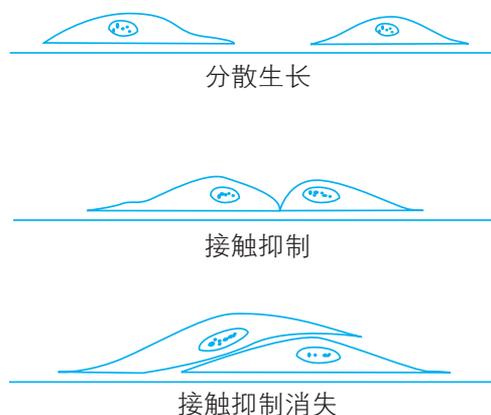


图3-3 细胞的接触抑制

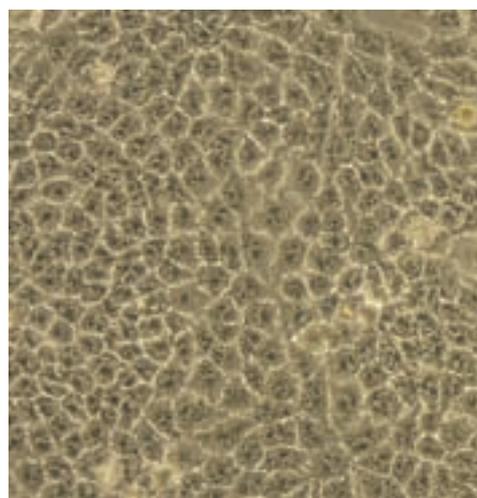


图3-4 单层生长的肝细胞 (100×)

随着时间的延长，体外培养的细胞数量不断增加。当增长到一定程度后，由于发生接触抑制或培养空间的限制及营养物质的消耗枯竭，生长会逐渐减慢，甚至停止并死亡。因此，需要将原培养瓶内的细胞分离并稀释后转到多个培养瓶中，在新的培养基中进行传代培养。一般来说，原代培养的贴壁细胞达到生长基质的80%表面面积后可进行传代培养。若传代过晚，可影响下一代细胞的动能状态。贴壁生长的细胞需经酶消化制成细胞悬液后才能传代。

原代培养物经首次传代成功后即成细胞系 (cell line)。如图3-5所示,能连续培养下去的细胞系称为连续细胞系 (continual cell line) 或无限细胞系,不能连续培养下去的细胞系称为有限细胞系 (finite cell line)。二倍体细胞通常为有限细胞系,如人的成纤维细胞可传30~50代,相当于150~300个细胞周期。连续细胞系被认为是发生转化了的细胞系 (遗传物质发生改变),有的连续细胞系是恶性细胞系,有的连续细胞系虽已获得了不死性 (immortality),但保留接触抑制现象,不致癌,是良性无限细胞系。

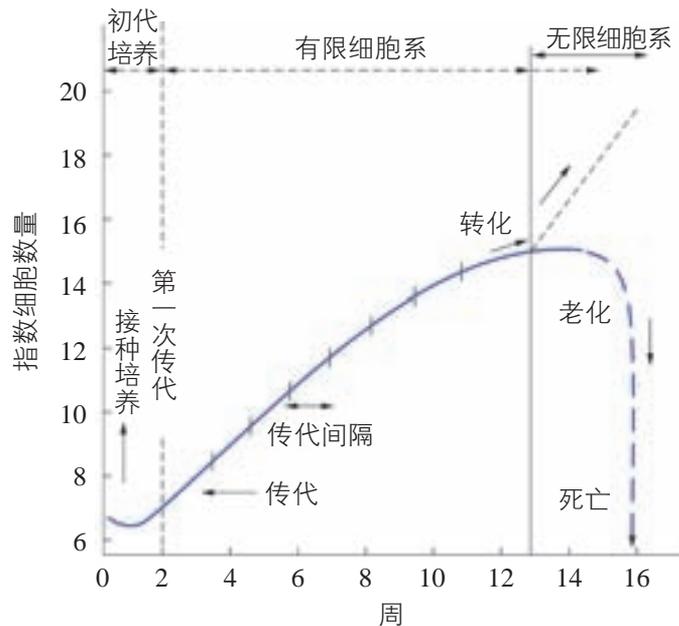


图3-5 培养细胞的生命期

通过一定的选择或纯化方法,从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊性质的细胞称为细胞株 (cell strain)。细胞株一般具有恒定的染色体组型、病毒敏感性或抗性及其他生化特性。可以连续多次传代的细胞株称为连续细胞株 (continual cell strain),可传代次数有限的细胞株称为有限细胞株 (finite cell strain)。可见,细胞系是泛指可传代的细胞,细胞株是具有特殊性质的细胞系。

细胞株是细胞系经过进一步的克隆培养得到的。把一个单细胞从群体中分离出来单独培养,使之繁衍成一个新的细胞群体的技术,称为细胞克隆 (cell cloning) 或克隆培养 (clone culture)。细胞克隆的最基本要求是:必须保证分离出来的细胞是一个而不是多个,即必须肯定所建成的克隆来源于单个细胞。经过克隆培养后的细胞群,由于来源于一个共同的祖细胞,基因型一致,遗传性状均一,是研究遗传规律和生理特性的重要材料。

细胞是构成生物有机体的基本结构和功能单位。在动物细胞、组织培养技术还不成熟的时期,研究人员主要选取整个动物体或其组织、细胞予以固定,然后通过观察来了解细胞的形态结构和生命活动。动物细胞培养技术完善之后,能直接观察到培养细胞的动态变化过程,从而能直接观察、分析细胞的形态结构和真正意义上的生命活

动。培养正常或病变的细胞，可用于生理、病理、药理等方面的研究，例如，细胞全能性的揭示、细胞周期调节控制的分析、癌变机理和衰老原因、抗癌药物的筛选、有毒物质的检测等研究，都与细胞培养技术密不可分。

细胞培养在现实生活中具有重要意义，如皮肤细胞的培养用于烧伤患者的皮肤移植，其他器官的细胞培养用于相关损伤组织器官的修复等。借助于某些细胞的大规模培养获得细胞代谢产物，如获得动物疫苗、干扰素、单克隆抗体等有重要价值的生物制品，是动物细胞培养的重要应用之一。世界首个“人造牛肉汉堡”的问世，让我们对通过大规模动物细胞培养来获得动物性食品的可行性怀有期待。

思考与练习

一、选择题

1. 动物细胞培养是从动物体获得相关组织，分散成单个细胞后，在适宜环境下让细胞生长和增殖的过程，是动物细胞工程的基础。关于动物体细胞培养过程中细胞的活动或特性，下列叙述错误的是（ ）

- A. 细胞通常贴壁生长
- B. 细胞进行有丝分裂
- C. 细胞之间有接触抑制现象
- D. 细胞的遗传物质均发生改变

2. 动物细胞可在体外适宜条件下进行培养。下列关于动物细胞所需的培养条件的叙述，错误的是（ ）

- A. 无毒、无菌的环境
- B. 温度与动物体温相近
- C. 合成培养基中通常需加动物血清
- D. CO_2 能调节培养液 pH，但是不需要 O_2

二、简答题

1. 举例说出动物细胞培养的应用价值。

2. 美国电影《永生的海拉》的主人公 Henrietta Lacks 是 20 世纪 50 年代一位身患癌症的黑人女性。1951 年医学研究者从她身上获取了癌细胞，结果却引出了令人震惊的医学突破，不仅改变了许多人的命运，甚至改变了整个医学界。请收集“海拉细胞系”的资料，并回答下列问题：

- (1) 简要描述“海拉细胞系”的用途。
- (2) 为什么说“海拉细胞系”也是细胞株？

第二节 通过细胞核移植克隆动物

1997年2月23日，苏格兰罗斯林研究所（The Roslin Institute）在英国的《自然》杂志上刊登论文，宣布世界上首例来源于哺乳动物体细胞的克隆羊“多莉（Dolly）”问世。多莉的诞生轰动了全世界，有人为之欢呼，有人为之恐慌，培育出“多莉”的核移植技术也受到了全世界广泛的关注，成为生命科学研究热点。也许你对克隆羊“多莉”早有耳闻，但是你知道吗，其实早在20世纪五六十年代，胚胎学家就利用核移植技术培育出了克隆蛙和克隆鱼等。那么，什么是核移植技术？核移植是如何实现的？通过核移植克隆出的动物更像谁？

本·节·要·点

- 动物细胞核全能性
- 核移植
- 动物体细胞克隆
- 生殖性和治疗性克隆

将体细胞核移入一个去核卵细胞后形成的重组细胞可发育成动物个体

早在1938年，德国胚胎学家斯佩曼（Hans Spemann，1869—1941）就提出将胚胎细胞的细胞核移植到去核的卵细胞中构建新胚胎的设想。1952年，美国的布里格斯（Robert W. Briggs，1911—1983）和金（Thomas J. King，1921—2000）将两栖类动物豹蛙囊胚细胞的核移植到去核的卵中，使重组细胞发育成能摄食的蝌蚪，这说明早期的胚胎细胞核具有发育的全能性。布里格斯和金的工作开启了克隆技术的第一次浪潮，美国、英国、中国、法国、日本的科学家很快进入这一领域。

1962年，我国实验胚胎学主要创始人童第周（图3-6）首次将核移植的技术应用于鱼类。为了研究细胞核与细胞质的作用以及它们之间的关系，童第周等以金鱼和鳊鱼为材料，进行了细胞核移植实验，并成功获得了幼鱼。他们的实验证明，金鱼和鳊鱼的囊胚细胞没有分化，细胞核仍然具有发育的全能



图3-6 童第周在进行显微操作实验

性。童第周等人还进行了鲤鱼和鲫鱼之间的核移植研究，将鲤鱼囊胚细胞的核移植到鲫鱼去核的卵中，得到的克隆鱼有些性状似鲤鱼，有些性状则似鲫鱼。

如图3-7所示，动物细胞核移植（nuclear transplantation）是指将体细胞核移入一个去核的卵母细胞中，并使其发育成动物个体的过程。利用该技术培育出的动物称为克隆动物。

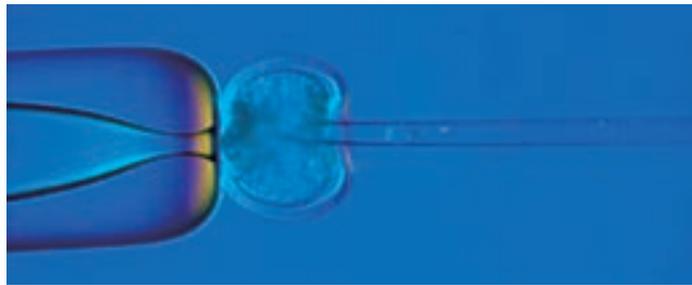


图3-7 应用显微技术进行细胞核移植

通过细胞核移植克隆出的动物与供核体具有相同遗传物质

在一个相当长的历史时期，动物细胞的分化被认为是不可逆的，这是因为在动物发育过程中，细胞的发育潜能逐渐变窄。因而发育程度不同的细胞，其动物细胞全能性的表现程度不同。受精卵能分裂分化出各种组织细胞进而发育成完整的个体，因此，受精卵具有全能性。高等动物（如两栖类、哺乳类）的受精卵第一次卵裂所得到的2个子细胞，全能性没有丧失，都可以发育成完整个体，形成同卵孪生个体。随着胚胎发育的继续，细胞在形态和功能上高度特化，已经分化的细胞不再分化为其他细胞，甚至终生不再分裂，如高度分化的神经细胞。不过，各种特化细胞的细胞核基因组仍然完整，理论上具有发育的全能性。

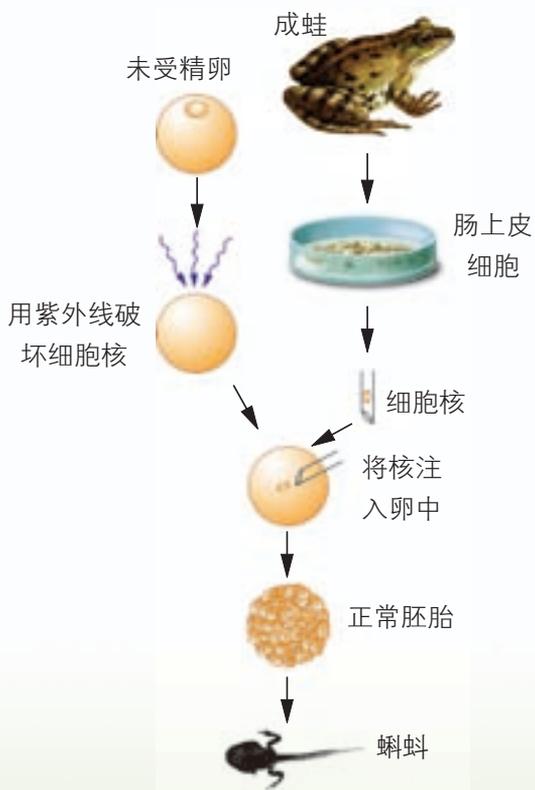
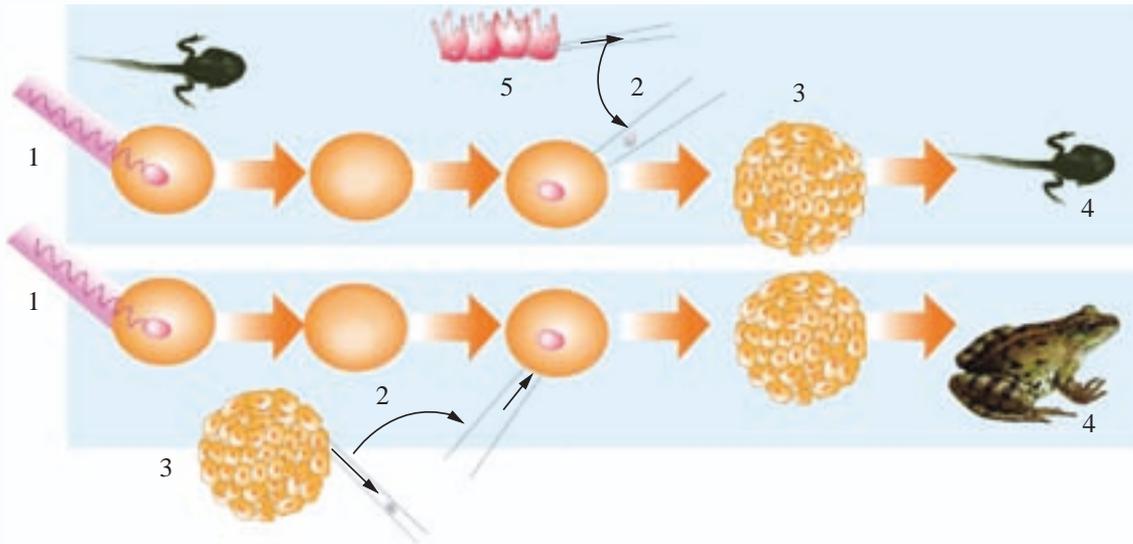


图3-8 肠上皮细胞核移植形成蝌蚪

童第周等人的实验证明，早期胚胎细胞（如囊胚期细胞）的细胞核具有发育的全能性。1958年，英国牛津大学的生物学博士戈登（John Bertrand Gurdon，1933—）和同事从蛙的肠上皮细胞中提取出细胞核并移植到去

核卵中，其中4%的核移植卵发育成了蝌蚪（图3-8）。

1978年，童第周等将黑斑蛙成体红细胞的细胞核移植到去核未受精的卵中，使重组细胞发育成了正常的蝌蚪。可见，动物成熟体细胞的细胞核仍然具有脱分化和使其后代细胞再分化实现全能性的能力。不过，实验证明，胚胎细胞核的移植成功率远高于成体细胞，例如，蛙的肠上皮细胞核移植，1%~2%的重组细胞形成蝌蚪；囊胚细胞核移植，50%的重组细胞形成蝌蚪或可育成蛙（图3-9）。



1. 紫外线破坏未受精卵核 2. 细胞核移到无核卵 3. 囊胚 4. 发育结果 5. 肠上皮细胞

图3-9 蛙肠上皮细胞和胚胎细胞核移植

低等动物细胞的全能性一般比高等动物容易体现。随着克隆技术的发展，越来越多的研究者尝试进行哺乳动物的克隆。相对鱼类和蛙，哺乳动物的卵细胞体积小（人的卵细胞直径约 $100\ \mu\text{m}$ ），核移植需要借助精密的显微操作仪和高效率的细胞融合法。同时，哺乳动物核移植得到的胚胎需要在体内发育，这些问题都增加了哺乳动物核移植技术的难度。1981年，科学家首次完成了小鼠核移植实验。实验分两步：第一步，将小鼠囊胚细胞的细胞核移植到去核受精卵中，将重组细胞培养到囊胚；第二步，将早期胚胎植入同步孕鼠子宫中。结果，诞生了由重组细胞克隆而来的鼠仔，而且发育为能生育的成年小鼠。小鼠胚胎细胞的成功克隆掀起了动物克隆的又一次浪潮。不过，以哺乳动物成熟体细胞为供核体的体细胞克隆直到克隆羊“多莉”的问世才算成功。

如图3-10所示，这一体细胞克隆过程如下：选取三只母羊，将一只母羊（苏格兰黑面母羊）的卵细胞的核吸出，取出第二只母羊（白色芬兰母羊）的乳腺上皮细胞的核与去核的卵细胞融合，形成重组细胞，并促使其分裂发育成早期胚胎。胚胎发育到一定程度时再将它植入第三只母羊（苏格兰黑面母羊）的子宫中，由它孕育并产下克隆羊“多莉”。“多莉”的性状酷似提供乳腺上皮细胞细胞核的6岁白色芬兰母羊，它是这只母羊的克隆。

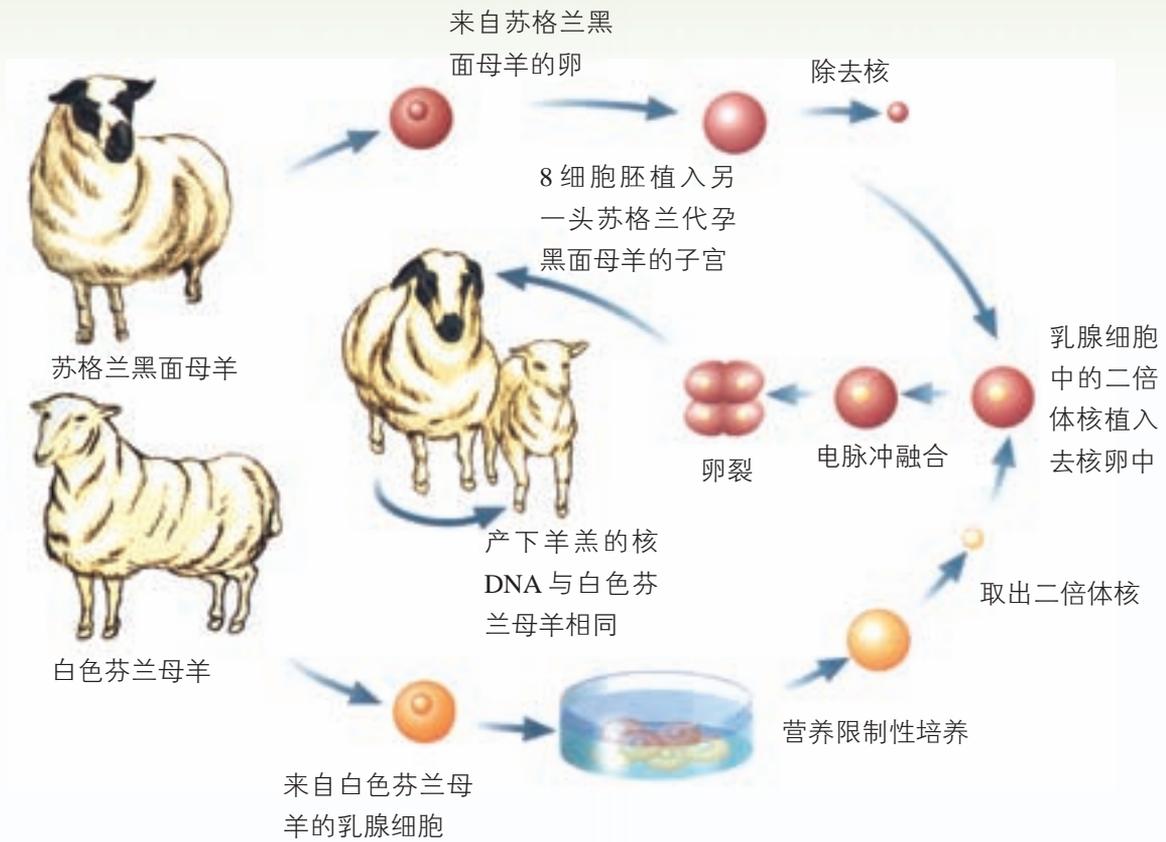


图3-10 绵羊“多莉”克隆过程

羊成熟体细胞的成功克隆进一步证明：①高度分化的细胞经过一定技术处理，也可回复到类似受精卵时期的功能，表现出全能性；②在胚胎和个体发育中，细胞质具有调控细胞核发育的作用。



小资料

卵细胞的细胞质调控重组细胞的核基因表达

根据分子细胞生物学机理可以说明克隆羊获得成功的原因：重组卵细胞最初分裂时虽然复制了DNA，但基因的转录并未开始。同时，供体核DNA开始丢失来源于乳腺细胞的调节蛋白，而正是这些调节蛋白最初阻止了核基因的表达。在重组卵细胞开始第三次分裂时，原乳腺细胞的调节蛋白便全部被卵细胞质中的蛋白因子替换了，因此核DNA被重新编排，胚细胞开始表达自己的基因，进而调控胚在代孕母亲子宫中的进一步发育。因此，罗斯林研究所的科研人员采用电脉冲细胞融合技术，选择分裂3次时的细胞进行移植，并在核移植前对乳腺细胞进行了特殊处理，例如，调节培养基中的牛血清浓度等，以利于细胞核的一系列变化和细胞融合后基因表达的分子开关的启动。

“多莉”的消息一传出，多种动物克隆的消息便从世界的各个角落传出来，同时又一次掀起动物克隆的浪潮，克隆出了牛、羊、猪、鼠、兔等。

克隆技术诞生之初，研究的主要目的是探讨胚胎细胞分化问题，例如，童第周等开展的鱼类核移植等研究，主要是想搞清楚细胞核与细胞质的关系问题。进入21世纪，核移植技术除了研究生物学的基本问题外，还在药物生产、优良种畜的培育和繁殖、拯救濒危动物、治疗性克隆等方面，具有令人期待的实际应用价值。例如，我国研究人员在2002年1月，以牛耳壳成纤维细胞成功克隆出高产奶牛和优质肉用黄牛。在“多莉”诞生之前，罗斯林研究所就曾培育出一只乳汁中含治疗血友病药物原料的转基因羊，被一家公司以50万英镑的高价买去。如果利用体细胞大批“复制”这只羊，就可挽救更多血友病患者的生命。1999年，中国科学院动物研究所的陈大元教授等将成年大熊猫的体细胞核移入去核的兔卵中，得到了异种重组细胞发育成的早期胚胎，说明异种动物间核移植的可能性。

从克隆鱼、克隆蛙到克隆哺乳类动物，细胞核供体的选择从胚胎细胞到成熟的体细胞，尽管核移植技术不断发展和完善，但仍不尽成熟，通过核移植技术克隆动物还存在着成功率低、某些克隆动物早衰等问题。相信随着动物克隆技术的理论研究不断深入，技术不断优化，会有更广阔的应用前景。



小资料

体细胞克隆猴“中中”和“华华”

《西游记》中的孙悟空法力无边，只需要拔毫毛轻轻一吹，就能立刻变出一模一样的千百个分身。如今，类似的场景也有望在现实中呈现。2017年11—12月，中国科学院神经科学研究所培育出两只体细胞克隆猕猴“中中”和“华华”（图3-11）。



图3-11 克隆猴“中中”和“华华”

在“多莉”诞生以后，马、牛、兔、猫、狗、骆驼等哺乳类动物的体细胞克隆相继成功，但与人类相近的灵长类动物的体细胞克隆一直未被攻克。中国科学家利用与产生克隆羊“多莉”类似的核移植方法，通过表观遗传学修饰促进体细胞核重新编程，提高体细胞克隆胚胎的囊胚质量和代孕猴的怀孕率，成功克隆出非人灵长类动物。“中中”和“华华”的出世，不仅证实了猕猴可以用体细胞来克隆，还意味着在短期可以产生遗传背景上相同的大批猴群，以非人灵长类作为实验动物模型来研究人类的疾病与健康。



课外读

体细胞核移植与诱导多能干细胞

2012年诺贝尔生理学或医学奖分别颁发给来自英国的戈登和日本的山中伸弥（Shinya Yamanaka, 1962— ）两位科学家，以表彰他们的重大发现：成熟分化的细胞可以重新编写发育程序，逆转成为能够发育成机体各种组织的未成熟细胞。

戈登是英国发育生物学家。1962年，他发表了关于体细胞核移植的重要论文，证实成熟体细胞的基因组仍携带正常生物体发育所需的全部信息，从而开启了人类对于细胞发育程序和命运逆转的思考。山中伸弥是日本医学家。2006年，山中伸弥研究团队最终应用4种转录因子逆转了成熟体细胞发育的进程，使成熟体细胞重新编程，变为具有多能性的未成熟细胞。山中伸弥对于诱导多能干细胞的探索研究正是基于50年前戈登的实验和理论基础。

长久以来人们认为，分化细胞的细胞核已失去启动发育的多能特性。1958年，戈登选择两栖类动物——非洲爪蟾进行核移植实验：通过紫外线照射去掉卵细胞的核，取出成熟分化的肠上皮细胞的细胞核，转移到去核的卵细胞中。最终这个重组卵细胞发育成蝌蚪，且有少数蝌蚪具有正常功能特性。戈登因此得出结论：成熟体细胞的细胞核仍具有逆转回多能特性的潜力，当将其移植到卵细胞中时，可启动发育进程，产生全部的体细胞类型。戈登的实验首次证实，成熟分化的体细胞基因组仍携带所有细胞分化的指令信息。戈登成为后来各种生物克隆实验的奠基人。

体细胞核移植实验需将细胞核取出，并进一步注射到去核的卵细胞中。这

一过程步骤烦琐，技术要求高超。能否不通过去核、取核和核移植技术，而应用分子生物学技术，将成熟分化的体细胞完全诱导逆转回归成未成熟的多能状态呢？2006年，日本科学家山中伸弥在小鼠体内破译了将体细胞重编程使其逆转回原始干细胞的过程。这些重新编写了发育程序，具有向机体各种细胞分化能力的未成熟细胞，被山中伸弥命名为诱导多能干细胞（induced pluripotent stem cell, iPS cell）。

iPS细胞的实验始于对胚胎干细胞（embryonic stem cell, ES cell）的研究。1998年，人的ES细胞在体外培养成功，掀起了干细胞研究的浪潮，但ES细胞可能会涉及使用人类胚胎的伦理问题以及移植后的免疫排斥问题。山中伸弥参考了戈登和威尔穆特（Ian Wilmut, 1944—）等前辈在体细胞核重编程方面的研究，设想一些维持ES细胞多能性的因子极有可能会诱导体细胞具有多能性，于是他开始尝试寻找在ES细胞中特异表达或发挥关键作用的转录因子。到2004年，山中伸弥带领他的团队共获得24个可能诱导多能性的候选因子，并将它们全部一次性导入小鼠皮肤的成纤维细胞，结果发现一些成纤维细胞确实呈现出与ES细胞非常相似的形态结构和功能。之后，他们将导入的基因数目逐个减少，最终确定仅用4种转录因子c-Myc、Oct3/4、Sox2和Klf4的组合就足以诱导成纤维细胞转变为iPS细胞，其中Oct3/4的作用最为重要。2007年，山中伸弥团队应用这4个因子成功诱导出人的iPS细胞，这些人iPS细胞与人ES细胞在形态、基因表达等性状上都非常相似。由于c-Myc属原癌基因，考虑到其明显的致瘤性，在以后的研究中去掉了这个因子，发现仅用Oct3/4、Sox2和Klf4也可获得功能正常的iPS细胞。而用Oct3/4和Klf4两种因子，甚至仅用Oct3/4一种因子就可诱导小鼠神经干细胞重编程形成iPS细胞。随后，不同动物的iPS细胞也相继被诱导出来。除了成纤维细胞，小鼠骨髓细胞、肝细胞、胃上皮细胞、胰腺细胞等也可产生iPS细胞。人iPS细胞可从皮肤的成纤维细胞、角质细胞、造血祖细胞等诱导生成。iPS细胞与ES细胞具有高度相似性，且不存在伦理质疑和可能的异体排斥问题。将大鼠iPS细胞注射入有胰腺发育遗传缺陷的小鼠囊胚中，结果在小鼠体内发育出大鼠的胰腺，这提示未来利用iPS细胞制造人类器官的应用前景。

思考与练习

一、选择题

1. 科学家利用核移植技术克隆出了多种动物。下列关于动物核移植技术的叙述, 正确的是 ()

- A. 胚胎细胞核移植比成熟体细胞核移植成功的难度大
- B. 核移植过程中可通过显微操作去除卵细胞中的细胞核
- C. 核移植时, 提供细胞核和去核卵细胞的动物都应均为雌性
- D. 通过核移植方法培育的克隆动物遗传物质全部来自供体细胞核

2. 核移植技术除了研究生物学的基本问题外, 在药物生产、优良种畜的培育和繁殖、拯救濒危动物、治疗性克隆等方面, 具有重要的实际应用价值。下列关于动物细胞核移植技术应用的叙述, 错误的是 ()

- A. 细胞核移植技术可用于优良种畜的培育
- B. 细胞核移植技术可用于人的生殖性克隆
- C. 核移植技术与干细胞诱导技术结合, 可用于修补人体损伤的器官
- D. 核移植技术可用于转基因动物的克隆, 以保持转基因动物的性状

二、简答题

1. 鱼类、两栖类、哺乳动物通过核移植技术克隆时是否都包括胚胎移植的技术环节? 为什么?

2. 2001年, 美国生物技术公司利用1980年死于圣地亚哥的一只雄性爪哇野牛的冷冻皮肤细胞, 克隆出了爪哇野牛, 虽然这头克隆牛因为细菌感染而在出生的两天后死亡, 但是它的成功克隆为保护濒危物种提供了可能的途径。请你设计一个简要的利用冷冻皮肤细胞克隆爪哇野牛的方案。

第三节 通过细胞融合可产生具有新特性的细胞

与植物体细胞杂交技术中的原生质体融合类似，动物细胞工程中也包括细胞融合技术。细胞融合（cell fusion）就是在一些融合因子的作用下，将两个或两个以上的细胞合并成一个细胞的技术。细胞融合可以在基因型相同的细胞间进行，也可以在基因型不同的同种生物细胞间以及亲缘关系非常远的不同种生物细胞间进行。通过细胞融合可以产生具有新特性的细胞，因此，这一技术已经成为研究细胞遗传、细胞免疫、肿瘤等的重要手段。那么，两个动物细胞是如何融合成一个细胞的？细胞融合技术有什么应用？

本·节·要·点

- 动物细胞融合
- 杂交瘤技术
- 单克隆抗体

两个或多个动物细胞经诱导可融合形成一个细胞

动物细胞就像植物的原生质体一样，即使相互紧贴在一起也不会自动发生融合，需要提供一些特殊的诱导因素，如聚乙二醇处理、电流刺激或病毒诱导等。在这些诱导因素的作用下，细胞膜会发生一定程度的损伤，细胞就可以实现相互粘连而融合在一起了（图3-12）。

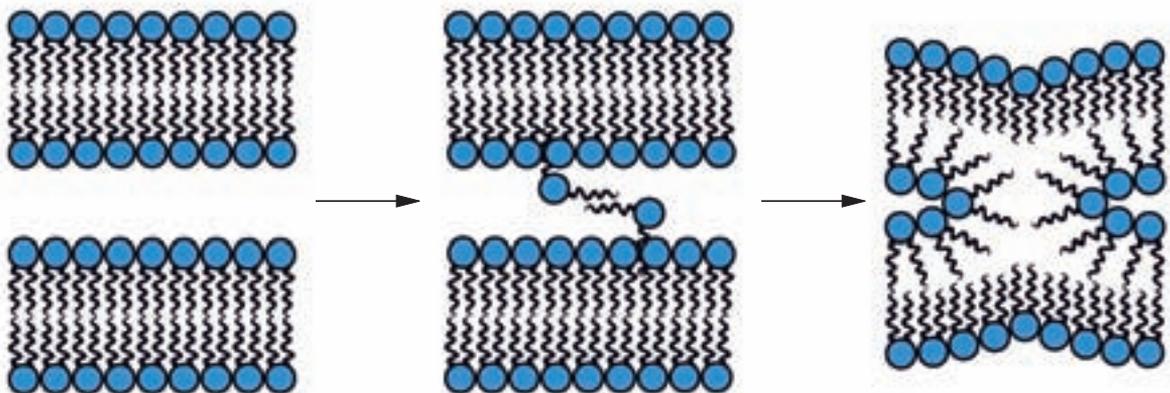


图3-12 细胞融合示意图

细胞融合的现象早在19世纪就已经被发现了。1838年在肿瘤中观察到了细胞融合

后产生的多核细胞。此后在有病毒感染的病理组织如天花脓包周围、受水痘损害的皮肤、麻疹患者的扁桃体中陆续发现多核细胞。1875年首次观察到了脊椎动物（蛙类）血液细胞的融合现象。虽然很早就发现了细胞融合的现象，但受当时科技发展水平的限制，人们对这一现象并没有给予足够的重视。

直到20世纪50年代末，日本学者冈田善雄（Okada, 1928—2008）发现仙台病毒（HVJ流感病毒）可以促进腹水癌细胞（ETC）进行细胞融合，至此，才真正开启了人们对细胞融合技术的探索。1965年，研究证实了灭活的病毒在适当条件下确实可以诱导动物细胞融合（图3-13）。随着1967年人鼠融合细胞中，人的染色体优先丢失现象的发现，细胞融合在染色体基因定位上的应用价值得以充分显现，1970年，开始利用融合细胞作为实验材料系统绘制人类基因图。

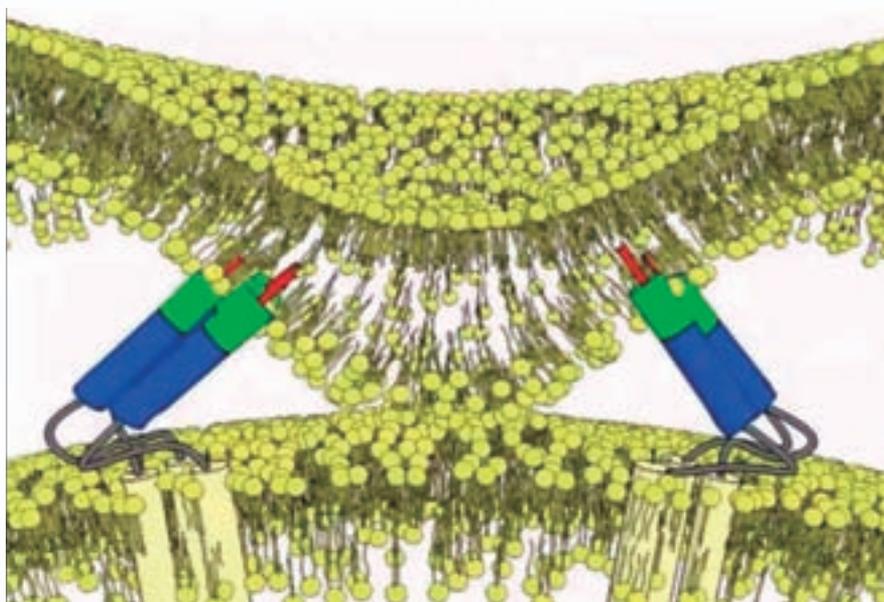


图3-13 病毒促进细胞融合示意图

小资料

通过人—鼠杂交细胞丢失人的染色体可进行基因定位

把小鼠的瘤细胞和人的成纤维细胞的悬液混合在一起，再加入一定浓度的经紫外线灭活的仙台病毒，会使两细胞发生融合，随之细胞核也发生融合，从而成为单核的杂种细胞系。这些杂种细胞有以下几个特点：

1. 杂种细胞内的染色体本应是小鼠的40条加人的46条共86条，实际上小鼠的40条染色体全部保留下来了，而人的染色体逐代丢失。几个细胞世代后，人的46条染色体只剩下少数几条（一般只剩下1~5条）。经过100个细胞

世代后，人的染色体甚至可能完全消失。

2. 杂种细胞内小鼠和人的基因可同时表达，它们各自控制一定蛋白质的合成。可以根据氨基酸的种类、数量和排列顺序的不同来区分这些不同组分的蛋白质。

3. 杂种细胞内，人与小鼠的染色体是易于区分的。

上述动物杂种细胞的特征，给人类进行染色体的基因定位研究创造了有利条件。因为在杂种细胞内人的染色体是逐代丢失的，而且是随机丢失的，所以可以获得一系列含有人的各种不同染色体的杂种细胞系（包括含单个人类染色体的杂种细胞），这恰为后续的研究提供了很好的实验材料。因为在杂种细胞内人和小鼠的基因可以同时表达，那么，这一系列的杂种细胞系，由于各自带有人的不同的染色体，其上的基因也就不同，因此基因的表达也必然不同，这样就可根据这些基因表达的不同而把某基因定位于某一特定的染色体上。例如，一个缺乏 β -半乳糖酶的小鼠突变细胞系，只要带有人的第22号染色体，便能合成这种酶，这就说明编码这种酶的基因位于人的第22号染色体上。

1975年，细胞融合技术被应用于免疫学领域，利用淋巴细胞和癌细胞的融合，培育单克隆抗体。此技术导致了细胞免疫学领域的一次革命性变化。随着对细胞融合技术研究的深入，陆续发现了化学物质聚乙二醇（PEG）、电脉冲诱导（图3-14）、激光融合等技术也可以诱导动物细胞融合。时至今日，有关诱导动物细胞融合的方式还在不断推陈出新，为该技术的继续发展提供着充足的动力。

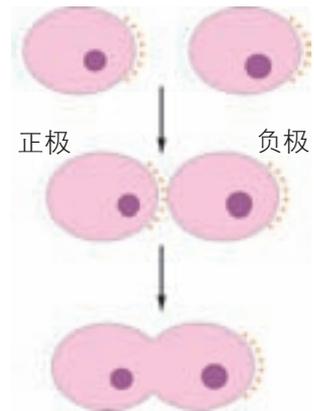


图3-14 电融合原理示意图

细胞融合技术是制备单克隆抗体的基础

我们知道，抗体是免疫系统中重要的免疫活性物质。抗体结合相应的抗原，促进白细胞吞噬、清除抗原，使机体得到保护，抗体在临床中具有广泛的应用价值。利用抗原抗体反应，可以诊断和防治多种疾病，还可用于细胞中抗原物质的定位及其功能的研究等。由于抗原抗体反应的高度特异性，制备高纯度的抗体十分必要。传统获得抗体的方法是在给动物注射相应抗原后从其血清中进行分离提取。但血清中获取的是多克隆抗体，也就是有很多种抗体混合在一起。多克隆抗体能够识别很多种抗原，导致特异性差，很多时候不能真正满足临床应用和研究的需求。有没有什么方法可以帮

助我们获得特异性强、纯度高的抗体呢？

生物体内有上亿种B淋巴细胞，而每一种B淋巴细胞只产生一种特异的抗体。由一个B淋巴细胞增殖形成的细胞群所产生的单一型抗体分子就称为单克隆抗体（monoclonal antibody）。

那么，我们是否可以通过大量地体外培养一种B淋巴细胞来获得特异的单克隆抗体呢？通过研究发现，正常培养条件下，B淋巴细胞的寿命有限，其在体外培养时是不能无限生长繁殖的。

为了得到可以临床使用的单克隆抗体，各国的研究者进行了长期的探索，1975年英国人米尔斯坦（César Milstein, 1927—2002）和德国人科勒（Georges Jean Franz Kohler, 1946—1995）在前人的工作基础上巧妙地设计了一种可以大量得到单克隆抗体的技术。他们利用仙台病毒使经羊红细胞免疫的、从小鼠脾脏分离的B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合。寿命有限的B淋巴细胞与具有无限繁殖能力的骨髓瘤细胞融合，经筛选后就可以获得既能产生特异性抗体，又能在正常培养条件下进行无限增殖的杂交瘤细胞。通过对杂交瘤细胞进行传代培养，就能长久地得到针对羊红细胞的单克隆抗体了（图3-15）。

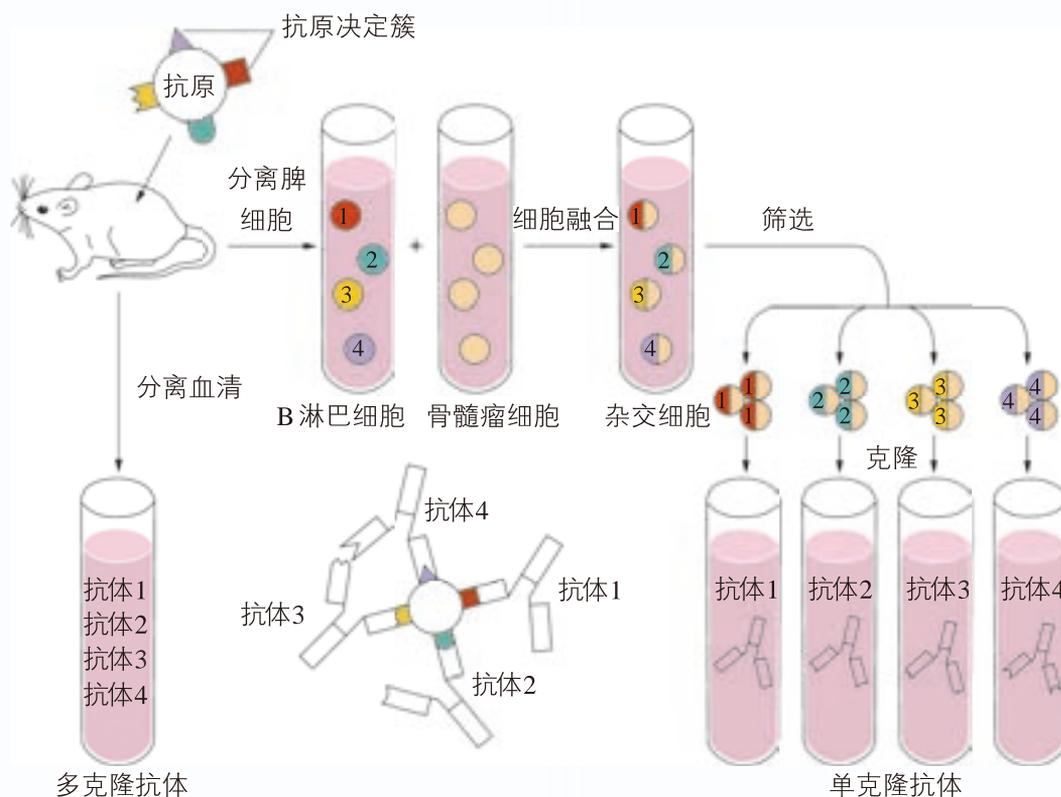


图3-15 血清分离抗体与单克隆抗体的比较

综上所述，通过细胞融合技术制备单克隆抗体的基本方法可以总结如下：用外界抗原刺激动物（如小鼠、兔子等），使其发生免疫反应，使B淋巴细胞产生抗体；利用仙台病毒或聚乙二醇等融合因子进行诱导，使能产生抗体的B淋巴细胞与可以无限传

代的骨髓瘤细胞融合；经过筛选，获得既能产生特异性抗体，又能无限增殖的杂交瘤细胞；通过对杂交瘤细胞的克隆培养，获得单克隆抗体（图3-16）。

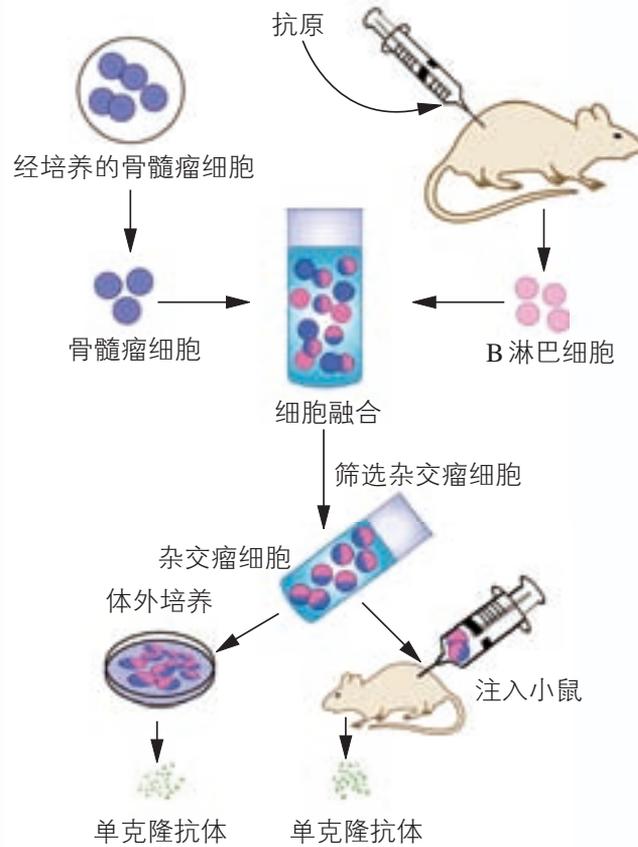


图3-16 单克隆抗体的制备流程

单克隆抗体的最大优点是：纯度高，可大量制备，在应用时具有特异性强、灵敏度高的特点。

利用单克隆抗体的优点，我们可以将其作为特异性的探针，研究相应抗原蛋白的结构、细胞学分布及功能。除此之外，单克隆抗体还可以成为解决生物学和医学等许多重大问题的有效手段：用单克隆抗体可以快速、准确地诊断和治疗一些疾病。例如，儿童连续高热不退，医生就要诊断其原因是由于感冒还是脊髓灰质炎导致的。一般诊断这样的疾病需要4~6天，但4天后再确诊为脊髓灰质炎并进行治疗就会延误治疗时机，这时很容易造成儿童肢体的残疾，也就是小儿麻痹后遗症。如果利用脊髓灰质炎病毒的单克隆抗体做诊断试剂，在10分钟内就可以确诊，这样就可以避免延误治疗时机。另外，如果将抗癌药物连接到专门识别某种肿瘤细胞的单克隆抗体上，单克隆抗体就会像“生物导弹”一样携带抗癌药物准确地聚集到肿瘤细胞，专一地杀死肿瘤细胞，这样就避免了抗癌药物在消灭肿瘤细胞的同时对人体正常细胞的损伤。



活动

收集单克隆抗体在临床上实际应用的资料，并进行交流分享

单克隆抗体以其特异性强、灵敏度高、纯度高、可大量制备等优点，自其产生以来就迅速得到了广泛的应用，尤其是在临床上的使用，解决了很多疾病的诊断和治疗难题。

目的要求

请利用图书馆和互联网收集有关单克隆抗体在临床上实际应用的资料。

活动提示

每位同学收集好资料后，要阅读、筛选资料，整理出核心要点，完成一份读书报告，并与同学交流。

讨论

1. 单克隆抗体作为诊断试剂有哪些应用？
2. 单克隆抗体用于治疗疾病有哪些应用？
3. 单克隆抗体作为运载药物有哪些应用？



课外读

利用HAT选择培养基筛选杂交瘤细胞

细胞融合是一个随机的物理学过程。在小鼠脾脏中分离的B淋巴细胞和小鼠骨髓瘤细胞混合细胞悬液中，经融合后细胞将以多种形式出现。例如，融合的B淋巴细胞和瘤细胞、融合的B淋巴细胞和B淋巴细胞、融合的瘤细胞和瘤细胞、未融合的B淋巴细胞、未融合的瘤细胞以及细胞的多聚体形式等。正常的B淋巴细胞在培养基中仅能存活5~7天，无需特别筛选；细胞的多聚体形式也容易死去，未融合的瘤细胞则需进行特别的筛选去除。

细胞DNA合成一般有两条途径。主要途径是由糖和氨基酸合成核苷酸，进而合成DNA，叶酸作为重要的辅酶参与这一合成过程。另一辅助途径是在次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷存在的情况下，经次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)和胸腺嘧啶核苷激酶(TK)的催化作用合成DNA。融合所用的瘤细胞是经毒性培养基选出的HGPRT⁻细胞株，即为缺少DNA辅助途径的瘤细

胞。细胞融合的选择培养基中有3种关键成分：次黄嘌呤（hypoxanthine, H）、氨基蝶呤（aminopterin, A）和胸腺嘧啶核苷（thymidine, T），所以取三者的字头称为HAT培养基。氨基蝶呤是叶酸的拮抗剂，可阻断瘤细胞利用正常途径合成DNA，所以融合所用的瘤细胞及瘤细胞与瘤细胞融合的细胞不能在该培养基中生长。只有B淋巴细胞和瘤细胞融合的细胞具有亲代双方的遗传性能，才可在HAT培养基中长期存活与繁殖（图3-17）。

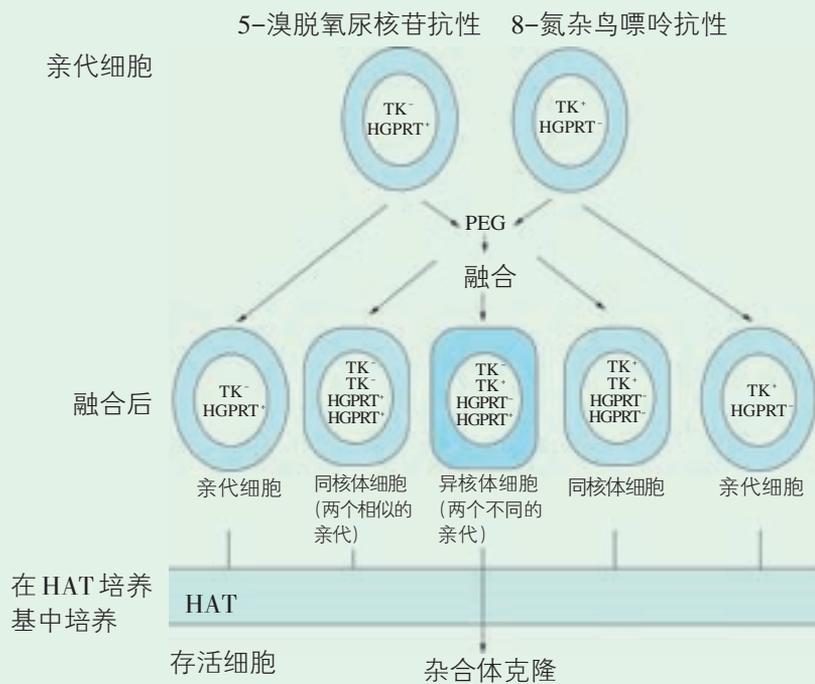


图3-17 体细胞融合及融合后杂交瘤细胞的筛选

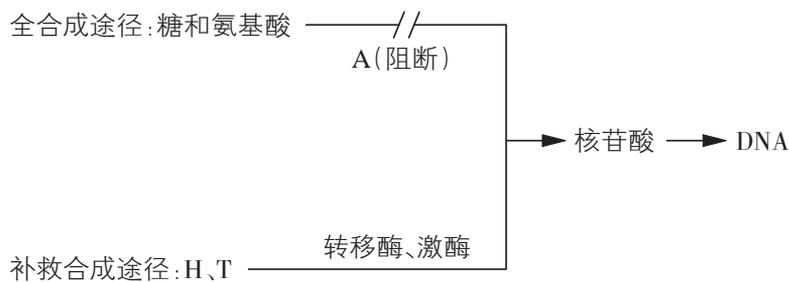
思考与练习

一、选择题

- 利用B淋巴细胞和癌细胞的融合，培育单克隆抗体，导致了细胞免疫学领域的一次革命性变化。下列关于单克隆抗体制备的叙述，正确的是（ ）
 - 为避免病毒感染，需用聚乙二醇诱导骨髓瘤细胞和B淋巴细胞融合
 - 先利用特定的抗原蛋白饲喂小鼠，再从小鼠脾脏中分离出B淋巴细胞
 - 体外培养杂交瘤细胞一般需要在培养液中添加动物血清和一些抗生素
 - 单克隆抗体制备技术和植物体细胞杂交技术均依据细胞的全能性原理
- 人们对于细胞结构、功能和生理特性的认识是成功制备单克隆抗体的理论基础。单克隆抗体制备过程中，未涉及的生物学原理是（ ）

- A. 细胞膜具有一定的流动性
- B. 一个B淋巴细胞只能产生一种抗体
- C. 高度分化的动物细胞核具有全能性
- D. 肿瘤细胞在体外培养时可以无限增殖

3. 核苷酸合成有两个途径，物质A可以阻断其中的全合成途径（下图）。正常细胞内含有补救合成途径所必需的转移酶和激酶，制备单克隆抗体时选用的骨髓瘤细胞中缺乏转移酶。现用加入H、A、T三种物质的HAT培养基来筛选特定的杂交瘤细胞。下列关于筛选原理的叙述，正确的是（ ）



- A. 杂交瘤细胞因为可以进行上述两个途径，所以能在HAT培养基上大量增殖
- B. 免疫的B细胞及其互相融合细胞因全合成途径被A阻断而在HAT培养基上不能增殖
- C. 骨髓瘤细胞及其互相融合细胞因无法进行上述两个途径而在HAT培养基上不能增殖
- D. HAT培养基上筛选出的所有杂交瘤细胞既能大量增殖又能产生高纯度的目标抗体

二、简答题

1. H18杂交瘤细胞产生的抗人肝癌单克隆抗体HAb18对人体肝癌的靶向治疗具有重要的意义，但H18杂交瘤细胞在培养过程中的凋亡现象制约着细胞的高密度培养以及生产能力的提高。请查阅相关资料并运用所学知识，说一说如何获得H18杂交瘤细胞并通过技术改造使H18杂交瘤细胞的抗凋亡能力增强。

2. 假如你掌握了动物细胞融合技术，你想用它来解决什么问题？

第四节 对动物早期胚胎或配子进行处理可获得目标个体

与植物细胞工程不同，在目前技术条件下，我们还无法通过直接对完全分化的动物细胞、组织进行培养而获得动物个体。不过，我们可以通过对动物早期胚胎或配子进行处理来获得目标动物个体。那么，什么是动物早期胚胎？对动物早期胚胎进行怎样的处理就能获得目标动物个体？

早在1890年，英国人希普（Walter Heape, 1855—1929）将安哥拉兔的早期胚胎移植到已接受交配的比利时母兔输卵管内，结果该母兔分娩出6只小兔，其中2只小兔具有白化安哥拉兔特征。这是世界首例胚胎移植成功的例子，之后类似的胚胎移植在绵羊和山羊中也取得成功。在此基础上，哺乳动物的体外受精和胚胎体外培养技术得到了很大发展。自1982年世界上第一胎试管牛犊问世以来，体外受精已在十多种哺乳动物中获得成功，产下了“试管动物”（图3-18）。

本·节·要·点

- 胚胎发育
- 体外受精
- 胚胎移植
- 胚胎分割
- 胚胎干细胞



图3-18 试管山羊(右)

除了以上提及的胚胎移植、体外受精、胚胎体外培养外，在这个领域的研究还包括胚胎分割、胚胎干细胞培养等多项技术。由于这些技术是针对胚胎发育过程的，人们把这些生物技术统称为胚胎工程。胚胎工程操作的主要对象是生殖细胞、受精卵和早期的胚胎细胞。

胚胎形成经过了受精及早期胚胎发育等过程

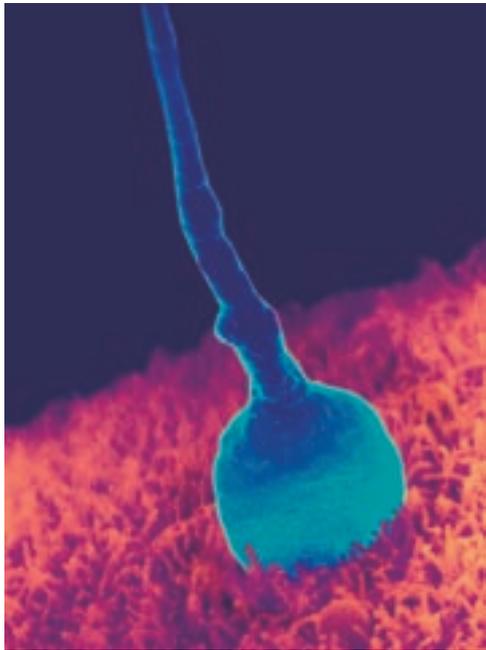


图3-19 精卵结合过程中的扫描电镜图
(16000×, 经后期着色处理)

一个复杂的生命体是由一个受精卵发育而来的，而受精卵是由一个精子与一个卵细胞结合形成的（图3-19）。动物的受精卵一旦形成，便进入胚胎发育的阶段，最终发育成一个结构复杂、充满生命活力的幼体孵化出来或从母体内分娩出来或者孵化出来。这是一个神奇的过程，当一个鲜活的生命出现在眼前，很难想象它只是源自一个细胞。

受精作用是精子与卵细胞结合形成受精卵的过程。以人为例，在受精作用过程中，精子和卵细胞会利用其表面的特异性识别蛋白进行精卵识别，这也是只有同种动物才能精卵结合的原因之一。精卵识别后，精子的头部开始通过与卵的细胞膜融合进入卵细胞。精子的头部进入卵细胞后不久，精核就与卵核相遇，此时精核的核膜溶解，并且体积变大，形成雄原核，同时卵子完成减数第二次分裂，释放了第二极体后，卵细胞核核膜溶解，体积变大，形成雌原核。然后雄原核与雌原核彼此的染色体会合在一起，最终形成新核。这样，受精卵的染色体数目又恢复到体细胞的水平。另外，精子的头部进入卵细胞还启动了卵内的一系列活动，如阻止后续精子入卵、激活受精卵的分裂等（图3-20）。

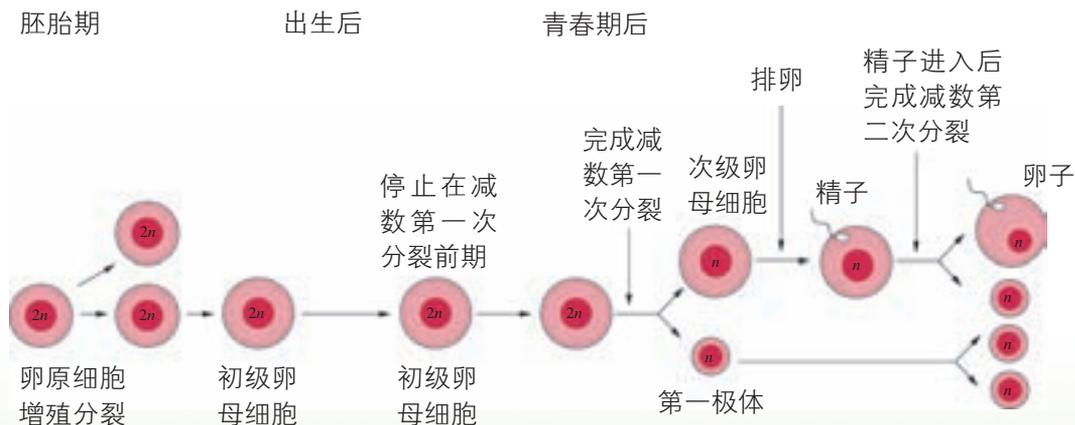


图3-20 人卵细胞的形成及受精作用过程示意图



小资料

受精膜的形成

自然界中，大多数动物都是单精子受精。只要有一个精子入卵，其他的精子就会被“拒之门外”。

经过大量的研究发现，在精子入卵的刹那，卵内储存的钙离子释放出来，并且从精子入卵处开始迅速地波及整个卵细胞，出现了一种奇特的“钙波”，从而快速地阻挡其他精子的进入。

紧接着，受钙离子的激发，卵膜下数以千计的皮质小泡将其内含物释放到细胞膜与外层的卵黄膜之间的空隙中。这些黏多糖类的物质具有非常高的吸水性和膨胀能力，可迅速地使卵黄膜撑起，并同卵黄膜一起构成受精膜，永久性地阻断其他精子的进入。

早期胚胎发育的过程，始于受精卵。受精后，受精卵开始进行有序的有丝分裂，这个过程称为卵裂。早期的卵裂速度很快，以一个蛙的受精卵为例，其在43 h内可分裂成37000个细胞，平均每小时分裂出约860个细胞。由于卵裂速度快，细胞还来不及长大，下一次分裂就已经开始，所以卵裂过程所产生的细胞会越来越小，但总体积基本不变。胚胎发育的2~8细胞期，其中的每一个细胞都具有全能性，即均可以发育成一个完整的个体。

卵裂的速度主要取决于受精卵中卵黄物质的含量和分布。一般情况下，卵黄含量低的一极（动物极）的卵裂速度高于卵黄含量高的一极（植物极）。当卵裂进行到16~32个细胞时，细胞紧密连接成一个细胞团，此时称桑葚胚。随着细胞继续分裂，细胞间逐渐出现小的腔隙，它们最后汇合成一个大腔，成为中空的细胞团，这个细胞团表面由细胞构成，其内部是空的或只有卵黄，没有细胞结构，此时的胚胎称为囊胚，中间的腔（或被卵黄填充的部分）称为囊胚腔。囊胚外表是一层扁平细胞，称为滋养层，胚胎的附属结构或胚外结构如绒毛膜、胚盘等就是由滋养层发育形成的。囊胚内部的细胞团不断增殖分化，将发育成完整的胚胎（图3-21）。

哺乳动物的卵裂过程与两栖动物不同，受精卵形成一天后才开始卵裂，而且速度缓慢，一般12~24 h完成一次。最初几次的卵裂是在母体的输卵管中进行的，卵裂中的胚胎借助输卵管纤毛的运动朝子宫的方向迁移。当受精卵进入子宫时，胚胎已经发育成具有内细胞团、滋养层和囊胚腔的囊胚。囊胚进入母体子宫后植入子宫内膜中（图3-22）。

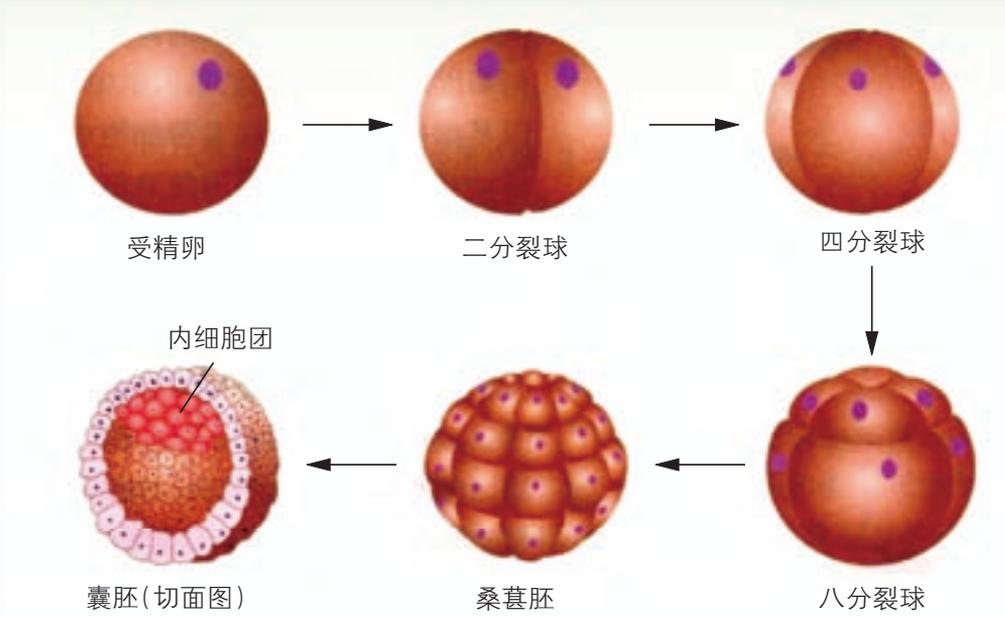


图3-21 两栖动物的卵裂和囊胚形成

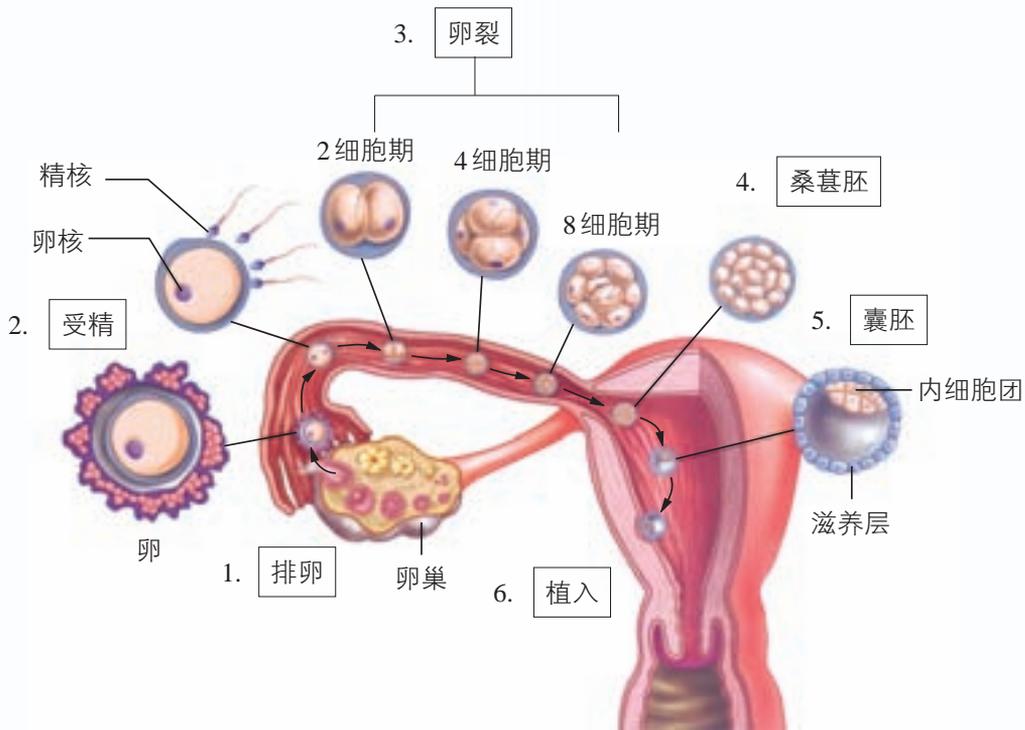


图3-22 人卵细胞受精到受精卵卵裂后植入的过程

在卵裂过程中，尽管早期胚胎细胞在体积和数目上发生了很大变化，但细胞的功能和发育潜能基本没有改变。正是这一特性为早期胚胎进行人为干预和遗传性改造提供了可能性。

囊胚形成后会进一步发育，囊胚内的细胞不断增殖分化，并通过剧烈而有序的运动

动，使囊胚细胞重新组合，最终形成具有三个胚层的原肠胚。位于原肠胚最外侧和最内侧的细胞形成外胚层和内胚层，内、外胚层之间的细胞形成了中胚层，各个胚层在此后的胚胎发育过程中，将按各自的发育途径分裂和分化为相应的细胞和组织，即原肠胚的内、中、外三个胚层逐渐分化形成各种器官原基（图3-23）。最先形成的是脑和脊髓原基——神经管，随后各种器官原基相继形成，如眼原基、肢芽等。此时，体形模式逐渐建立，经过进一步的生长和发育，最终形成幼体。

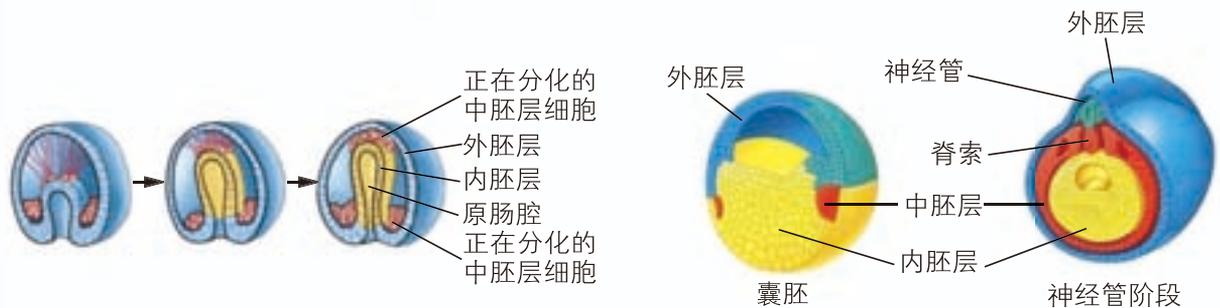


图3-23 原肠胚形成过程与器官原基形成示意图

受精卵经不断分裂形成了 $5 \times 10^{12} \sim 7 \times 10^{12}$ 个细胞，并由此产生一个生物体。这是生命的奇迹！人们在感叹奇迹的同时，更希望能够利用动物胚胎发育过程和特征的相关知识，为人类做出更大的贡献。为此，人们采用工程的手段，干预一些经济动物、实验动物甚至人类的早期胚胎发育过程，从而形成了一项新的生物技术——胚胎工程。

通过体外受精、胚胎移植和胚胎分割可对胚胎进行处理并发育成个体

胚胎工程的研究对象主要限定于哺乳动物。研究的重点内容有体外受精、胚胎体外培养、胚胎移植、胚胎分割等。

体外受精是指哺乳动物的精子和卵子在体外人工控制的环境中完成受精过程的技术。它的基本原理是人工模拟体内环境，包括营养、温度、pH等，使初级卵母细胞发育成熟，同时使精子获能，最终完成受精作用，并有计划地保存胚胎等。体外受精技术现已日趋成熟，成为一项重要且常规的动物繁殖生物技术（图3-24）。

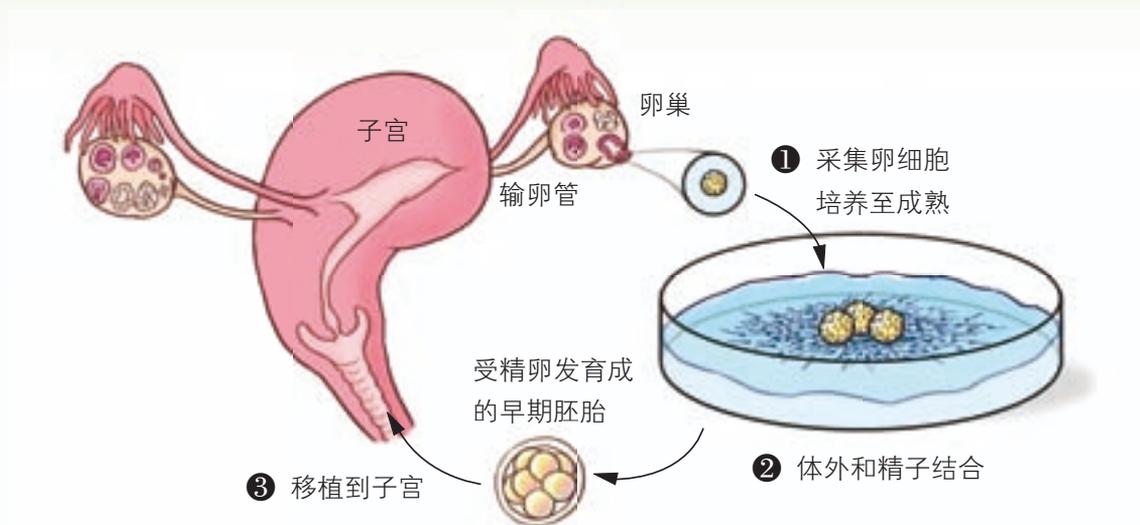


图3-24 体外受精获得试管动物示意图

利用体外受精获得试管动物的过程如下：

(1) 人工采集精子。将成熟的精子放入培养液中培养，使精子达到获能状态，这样才能穿入卵细胞内部。在胚胎工程中，常用人工采集的方式采集精液。采集的精液通常需要加入特殊的稀释液，并在低温下保存，待需要时使用。精子在5℃时可存活一个星期，如需要长时间保存，则须将精液保存在液氮（-196℃）环境中。

(2) 采集卵细胞。可以从卵巢中采集处于不同发育时期的卵细胞，也可以从输卵管或子宫内采集卵细胞。在正常情况下，哺乳动物一次排卵数量极其有限，单胎动物一次排卵一枚，多胎动物一次排卵几枚至几十枚。如果经垂体产生的促性腺激素（促卵泡激素和促黄体生成激素）处理，雌性动物排卵数可增加几倍至几十倍。这种人为注射外源促性腺激素，促使卵巢排出较正常情况下更多的成熟卵细胞的方法称为超数排卵。采卵技术包括手术采卵（冲洗输卵管采卵）和非手术采卵（子宫冲卵）。对于家兔、绵羊、山羊和猪等中小型农畜通常用冲洗输卵管采卵方法，而牛的采卵则主要采用非手术法。冲洗输卵管采卵是比较常用的方法，可将输卵管取出冲洗，也可在活体中进行。冲洗输卵管采卵的回收率高于子宫冲卵，但子宫冲卵为无创伤性采卵，为重复超数排卵提供了可能性。

(3) 人工体外受精。获能的精子和成熟后的卵细胞在体外合适的环境下共同培养一段时间，便可受精。

将受精卵或胚胎移植到雌性动物子宫内生长发育，最后经分娩产仔就得到了试管动物。



精子获能与人工受精

哺乳动物精子的发生是在睾丸内完成的，精子需要通过交配过程进入雌性动物生殖道，与卵子结合完成受精作用。1951年，研究发现刚刚排出的精子不能立即与卵子受精，必须在雌性动物生殖道发生相应的生理变化后，才能获得受精能力。他们将这一生理现象称为“精子获能”。这一发现加速了对精子获能机理的研究，并且找到了使精子在体外获能的物质，实现了各种哺乳动物的精子在体外条件下的获能。

人工受精的方法有体外受精和显微受精两种。体外受精就是采集雌性动物的卵细胞和雄性动物的精子，使其在试管中受精；显微受精又称辅助受精，其过程是将完整精子或精核用显微操作仪注入卵周隙或卵胞质，激活卵母细胞并完成受精（图3-25）。显微受精过程不受精子的数量、活力等因素的影响。

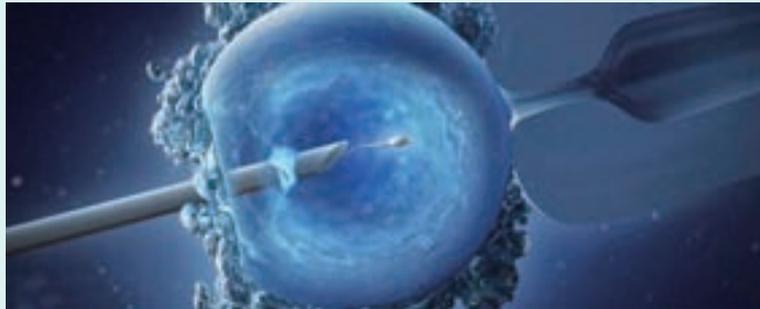


图3-25 显微受精

从人工受精形成受精卵后，到将胚胎移植到雌性动物子宫内生长发育，这一期间需要应用人工创造的环境，对早期胚胎进行体外培养。由于胚胎不同发育时期生理代谢的需求不同，进行胚胎体外培养时，必须配制一系列含有不同成分的培养液，培养不同发育时期的胚胎。哺乳动物的胚胎培养液成分一般都比较复杂，除一些无机盐和有机物外，还需要添加维生素、激素、氨基酸、核苷酸等营养成分，以及血清等物质。

当胚胎发育到适宜的阶段时，可将其取出向受体移植或冷冻保存。

不同的动物胚胎移植的时间不同，例如，牛、羊一般要培养到16细胞阶段（桑葚胚）或囊胚阶段才能进行移植，小鼠和家兔等实验动物可在更早的阶段移植，人的体外受精胚胎即试管胚胎，可在4细胞阶段移植。

由于哺乳动物胚胎发育条件异常复杂，胚胎培养比组织培养和细胞培养困难得

多。目前只能对少数物种不同阶段胚胎进行培养，尚未有从受精卵到新生儿的全体外胚胎培养技术。

人工体外受精技术的广泛应用，为畜牧业带来了巨大的收益，也为提高人们的生活质量做出了很大贡献。动物的人工体外受精同自然交配相比，公畜的配种效率显著提高，如一头公牛采用人工体外受精技术，一年可配种万头以上的母牛。这样，不仅可以使优良的公畜繁育更多的后代，还可以最大限度地减少种公畜的饲养数量，节约饲养成本。同时优良公畜的精液可长期保存且易于运输，这也省去了大型公畜运输的麻烦。

胚胎移植是胚胎工程的重要环节。由于无法进行全体外胚胎培养，胚胎移植成为胚胎工程中获得后代的唯一方法。胚胎移植（embryo transfer）是指将雌性动物的早期胚胎或通过体外受精及其他方式得到的胚胎，移植到同种的、生理状态相同的其他雌性动物的体内，使之继续发育为个体的技术。其中，提供胚胎的个体称为“供体”（donor），接受胚胎的个体称为“受体”（recipient）。胚胎移植实际上是生产胚胎的供体和孕育胚胎的受体共同繁殖后代的过程。在胚胎工程中通过任何一项技术，如转基因、核移植或体外受精等获得的胚胎，都必须移植给受体才能获得后代。因此，移植是胚胎工程的最后一道“工序”。

以运用胚胎移植技术繁殖良种山羊为例，人们可以选择经济价值较高、遗传性状优良的母畜，经过激素处理，使其超数排卵后受精，然后将发育的早期胚胎分别移植到同期发情的代孕母羊的子宫内，通过代孕母羊妊娠产仔。这个“借腹怀胎”的技术让良种雌性动物可以专门提供胚胎，而代孕的任务让一般品种的雌性动物来完成，这个过程不但可以充分发挥优良母畜的繁殖潜力，而且还可以在短期内获得大量目标个体。



小资料

超数排卵

我们知道，一头母牛在自然情况下每次只能排1个卵，也就是说，母牛一般每胎只产一头小牛。能不能让动物多排卵呢？超数排卵技术最终解决了这一难题。在母牛发情期的第9天到第14天的时候，给母牛注射一种促排卵剂，这种促排卵剂主要含促性腺激素，它能促使只产生1个成熟卵的卵巢一次排出10多个甚至40个以上的成熟卵。为了培育优良品种，首先要选择良种母牛，使之多排卵。由于母牛产卵多，人工受精后，可能形成很多胚胎。把胚胎移植到代孕母牛的子宫里，就能生下许多优良品种的小牛。1951年，牛的人工受精、胚胎移植技术研究成功，70年代中期这项技术就开始应用到畜牧业生产上。

胚胎分割能提高胚胎利用率。受到同卵多胞胎的启示，我们能不能将一个胚胎人为地分割成几份，从而提高胚胎的利用率呢？基于这样的思考，胚胎分割技术逐渐地发展和成熟起来。

1978年，将小鼠的桑葚胚一分为二，获得了成功。1979年，分割绵羊胚胎获得同卵羔羊。20世纪80年代后，人们建立了系统的胚胎分割方法，并相继得到1/4和1/8分割胚胎的后代。一般情况下，仍然以二分胚胎的分割移植效率最高，胚胎分割也已成为提高家畜胚胎利用率的重要手段之一。

胚胎分割（embryo division）是指借助显微操作技术将早期胚胎切割成几等份，再移植到代孕动物子宫中发育，产生同卵多仔后代的技术（图3-26）。

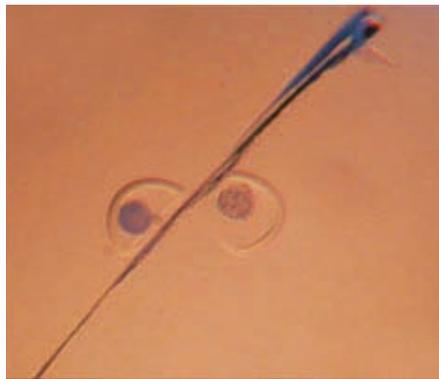


图3-26 胚胎分割的显微操作(80×)

胚胎分割的基本过程是：将发育良好的早期胚胎（囊胚或囊胚期以前的胚胎）移入含有培养液的培养皿中，在显微镜下用切割针或切割刀把胚胎分割开，或者采用酶处理等方式将早期胚胎中的细胞分散开。分割的胚胎或细胞直接移植给受体，或在体外培养到囊胚阶段，再移植到受体体内，着床发育产仔（图3-27）。

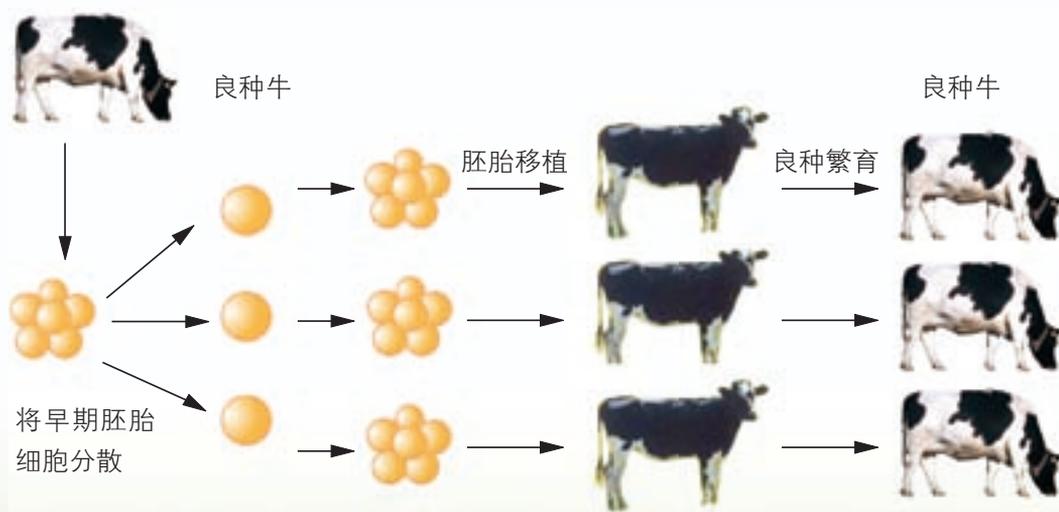


图3-27 胚胎分割过程示意图

我国从1986年开始有胚胎分割成功的报道，通过胚胎分割的研究已获得胚胎二分割的后代有小鼠、家兔、猪、山羊、绵羊和牛等；胚胎四分割的后代有小鼠、绵羊和牛等。由于用胚胎分割可获得同卵孪生后代，成倍增加胚胎数量，因此在畜牧生产上常利用该技术来快速繁殖优良种畜。胚胎分割还可以用来培养遗传特性相同的动物群，为生物学、医学、药学和畜牧学的研究提供实验动物，如运用同卵孪生后代作实验材料，可消除遗传差异，提高实验结果的准确性。胚胎分割取样还可以用于胚胎性别的鉴定及遗传检测。

尽管胚胎分割技术已在多种动物实验中取得成功，但是仍然存在很多问题，还需深入研究。例如，同一胚胎分割后获得的后代，在理论上遗传性状应该完全一致，但事实并不是这样，人们发现6~7日龄牛胚胎分割后，同卵双生牛的毛色和斑纹并不完全相同，而在2个细胞阶段分割，却表现出遗传的一致性。这种现象与胚胎细胞的分化有密切关系，但我们对不同阶段胚胎细胞的分化时间和发育潜力了解还很不够，需要进一步研究。

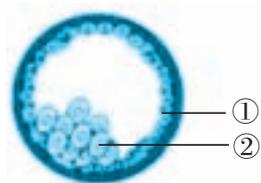
思考与练习

一、选择题

1. 认识动物的胚胎发育过程是实施胚胎工程的基础。下列关于动物胚胎发育过程的叙述，错误的是（ ）

- A. 胚胎发育的起点是受精卵
- B. 原肠胚具备内、外两个胚层
- C. 受精卵首先通过卵裂发育成桑葚胚
- D. 胚胎发育过程包括细胞的分裂和分化

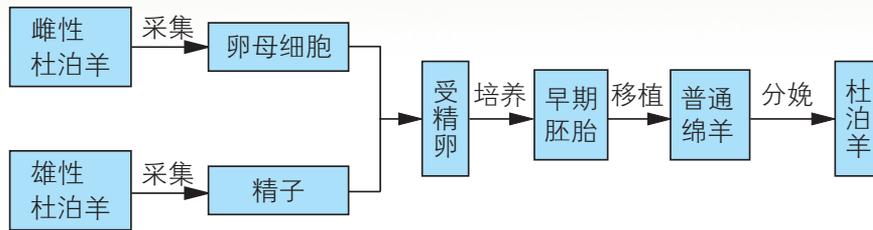
2. 高等哺乳动物的受精卵开始细胞分裂后，经桑葚胚、囊胚、原肠胚和组织器官的分化，最后发育成一个完整的幼体，完成胚胎发育的全过程。下列叙述错误的是（ ）



- A. 滋养层将来发育成胎膜和胎盘的一部分
- B. 此图是囊胚期示意图，①②依次称之为滋养层、内细胞团
- C. 内细胞团经过均等分割、胚胎移植等过程可获得同卵双胞胎
- D. 滋养层细胞形态结构不同于内细胞团，但不是细胞分化的结果

3. 杜泊羊以生长速度快、肉质好等优点，被称为“钻石级”肉用绵羊。科研工作

者通过胚胎工程快速繁殖杜泊羊的流程如下图所示，下列叙述正确的是（ ）



- A. 从卵巢中采集的卵母细胞可直接与获能的精子进行体外受精
- B. 为了进一步扩大繁殖规模，可通过胚胎分割技术获得同卵双胞胎
- C. 为避免代孕绵羊对植入胚胎产生排斥反应，应注射免疫抑制剂
- D. 为了获得更多的卵母细胞，只能用雌激素对雌性杜泊羊进行处理

二、简答题

1. 在自然情况下，牛、马等母畜通常一年产一胎，一生繁殖后代仅仅16只左右。采用胚胎移植，由代孕母畜承担妊娠产子的任务，使优良母畜免去了较长的妊娠期，其胚胎取出后不久即可再次发情、配种和受精，从而能在一定时间内产生较多的后代。请以牛胚胎移植为例，说一说胚胎移植的流程。

2. 查找资料并思考：如何使体外培养的胚胎干细胞保持增殖不分化？

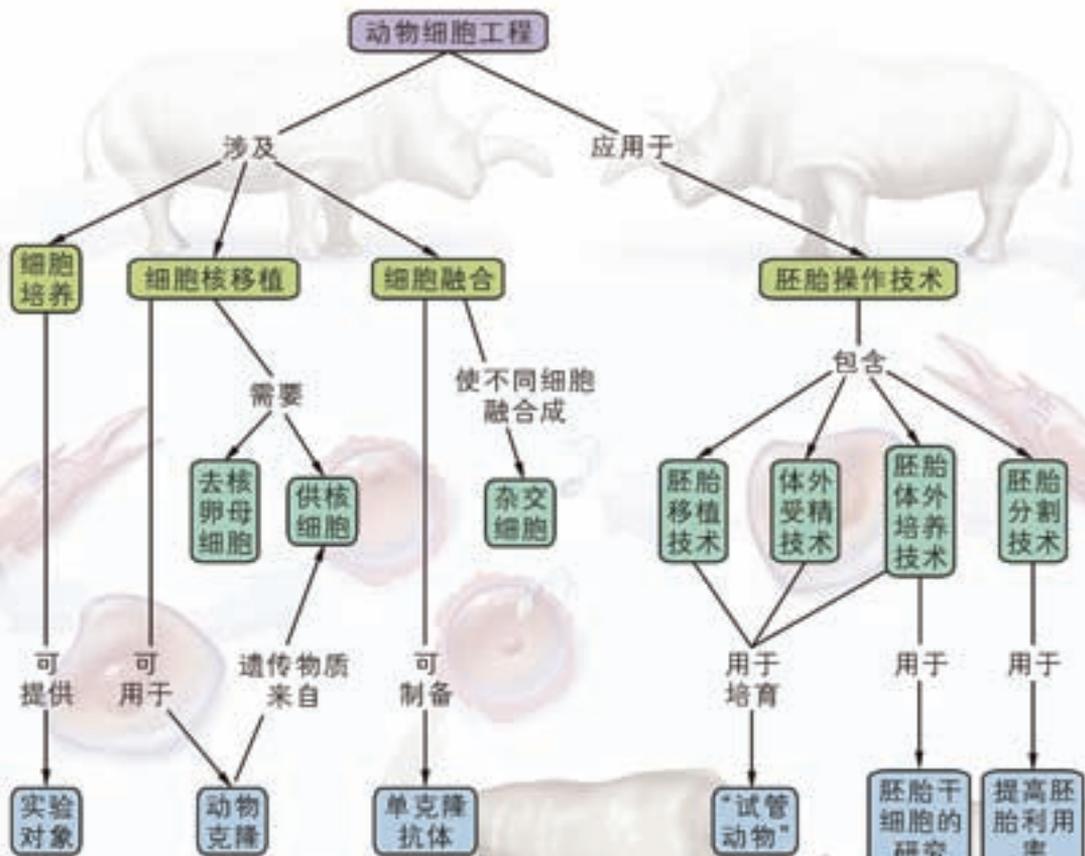
本章小结

动物细胞工程通过细胞水平的操作，获得有用的动物细胞、组织、器官、个体或相关产品，这涉及细胞培养、核移植、细胞融合、胚胎及干细胞操作等多项技术。

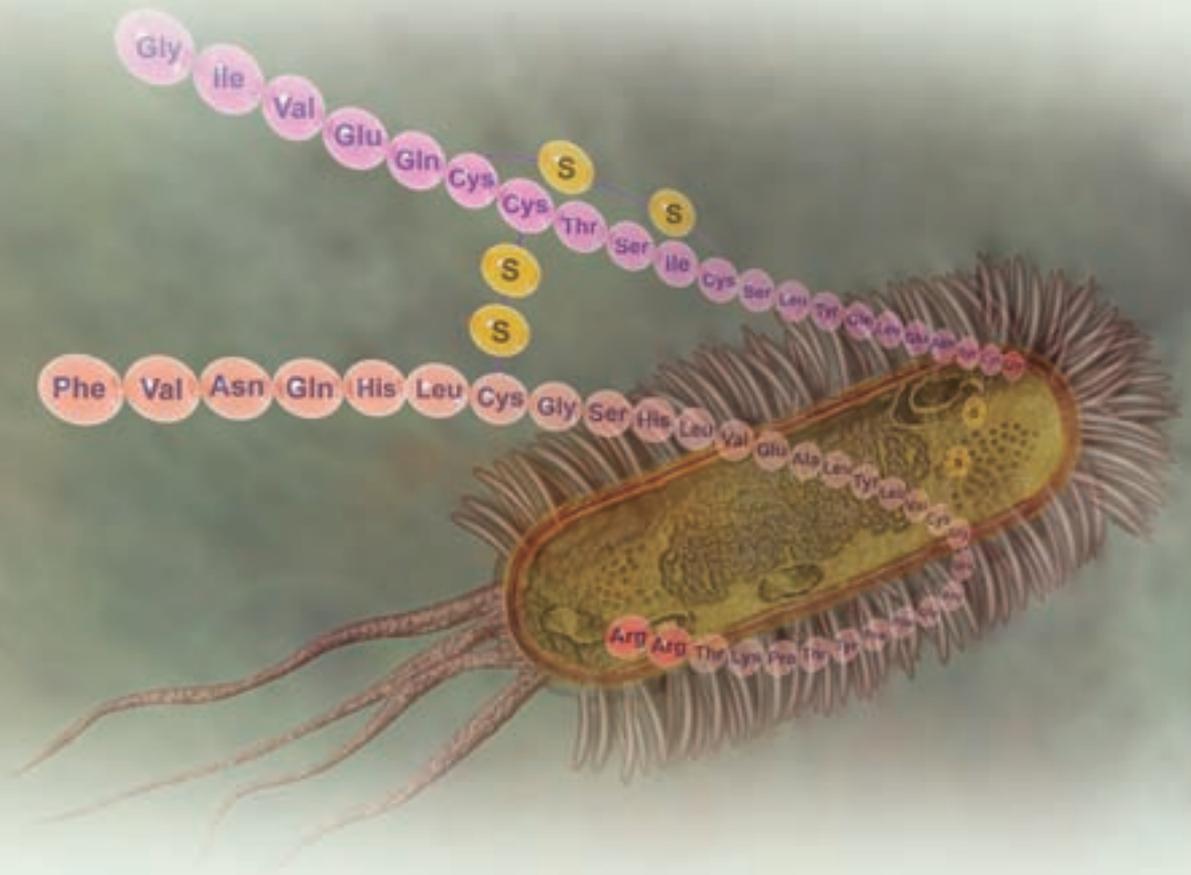
本章内容指向“物质与能量观”及“稳态与平衡观”的形成与应用。动物细胞培养是动物细胞工程的基础技术，培养过程中需要为动物细胞提供能满足其营养需求的培养基，同时调节控制适宜的与内环境类似的稳定的各种理化条件，从而使培养的细胞通过分裂和分化，产生特定的代谢产物或实现个体的发育和生长。

本章内容同时指向“结构与功能观”的形成与应用。细胞的生命活动受控于细胞核，由核中的基因决定其性状，而引入其他细胞的基因可呈现多项人类所需性状。此外，通过受精作用形成受精卵，发育为含有胚胎干细胞的早期胚胎，进而着床于子宫的过程也是以相应的基因和结构为基础的。动物细胞工程正是利用了基因（结构）与性状（功能）、生殖细胞与受精以及胚胎的结构和胚胎发育过程间的关系，通过细胞水平的操作，实现人类的需求。在这一过程中，需要尊重生命的基本规律，基于事实和证据，积极运用相关认识和科学思维方法，探讨、审视或论证动物细胞与胚胎工程的相关社会议题，如单克隆抗体的制备、动物克隆、胚胎干细胞研究等，并做出理性解释和判断。

本章知识结构图



第四章 基因工程



运用转基因大肠杆菌生产人胰岛素

早期治疗糖尿病的胰岛素是从牛或猪的胰脏中提取的，由于其个别的氨基酸序列和人胰岛素不一样，使用后会引发人体内的免疫反应。1982年2月5日，著名学术期刊《科学》发表了科学家运用基因工程技术使大肠杆菌合成人胰岛素的研究成果。此项基因工程技术经过完善，最终实现了大肠杆菌能够在装有培养液的发酵罐中大量生产人胰岛素，再经加工制成药品。通过基因工程获得的人胰岛素不仅价格低廉，而且疗效好，拯救了大批糖尿病患者。那么，什么是基因工程？科学家是如何完成上述过程的呢？



目前，我们可以从拥有几百万对碱基的DNA分子中分离出带有特定基因的DNA片段，并在生物体外将两个不同来源的DNA片段连接起来，这使我们能有针对性地定向操控生物的性状。DNA重组技术开启了基因工程的大门，使我们能在基因水平上诊断、治疗、研究疾病，指证犯罪嫌疑人，并且有效地培育出性状优良的农牧业新品种等。随着基因测序技术的发展，人类建立了共享的生物信息数据库，从而能更快速、更高效地研究包括人类在内的多种生物基因组的结构和功能。核酸以及蛋白质的序列比对为疾病的诊断、进化的研究提供了崭新的视角。基因工程正以一种前所未有的发展速度迈入了大数据的新时代。

学习目标

1. 概述基因工程的建立过程。
2. 说明基因工程工具酶和载体的作用。
3. 阐明基因工程的基本操作程序。
4. 概述蛋白质工程的原理。
5. 关注并举例说明基因工程和蛋白质工程改善了人类的生活品质。

本章学习应聚焦的关键能力

1. 认识物质的提取和鉴定是生物学基本方法，尝试DNA的粗提取与鉴定，学会物质提取与鉴定的基本方法。
2. 认识PCR是扩增DNA片段的基本方法，尝试PCR扩增DNA片段，学会PCR的基本方法。
3. 认识凝胶电泳是鉴定特定DNA序列的基本方法，尝试凝胶电泳法鉴定特定DNA序列，学会凝胶电泳的基本方法。
4. 加深对科学、技术、社会相互关系的认识，学会运用生物学原理解释社会议题，进行个人决策。

第一节 基因工程赋予生物新的遗传特性

多个生物学分支学科的发展为基因工程的诞生提供了理论基础，重要工具的发现为基因工程的实现提供了技术支持。在此基础上建立的基因工程包括一系列操作程序，可以使生物获得新的遗传性状。那么，什么是基因工程？基因工程需要什么工具？如何进行？

本·节·要·点

- 基因工程
- 工具酶
- 载体
- 基因工程的基本操作

基因工程是在多个生物学分支学科的基础上发展而来

基因工程是指有意识地把一个人们所需要的基因转入另一个生物体中，使后者获得新的遗传性状或表达所需要产物的技术。通过在分子水平上对基因进行直接操控，打破常规育种难以突破的物种间的界限。基因工程的核心是构建重组的DNA分子，因此早期也将基因工程称为重组DNA（recombinant DNA）技术。兴起于20世纪70年代初的基因工程给生命科学的研究注入了无限生机和希望，它的建立离不开遗传学、微生物学、生物化学和分子生物学等多个学科的发展。

早期的遗传学家虽然发现了基因的传递规律和基因在染色体上的定位方法，但并不知道基因的分子本质，因而无法对基因直接进行研究。20世纪，一批分子生物学家经过不懈地努力证明了DNA是遗传物质，确立并逐步完善了“中心法则”，阐明了遗传信息的传递和表达的机制。遗传密码的破译，为基因在不同种生物细胞内进行表达的设想奠定了理论基础。因为，除了极个别情况，自然界中不同生物共用一套遗传密码，这意味着同一个基因在不同生物体内将会表达出相同的蛋白质。例如，人的胰岛素基因在大肠杆菌细胞内能利用同人类一样的遗传密码合成人的胰岛素。

20世纪70年代生物技术的发展，使得科学家直接操作DNA的梦想得以实现。对DNA进行分子操控，最重要的是对DNA分子的剪切、连接及复制，微生物学家发现的工具酶、载体起到了至关重要的作用。随着基因工程技术不断革新，越来越多的转基因生物相继出现，开始影响我们生活的方方面面。

对 DNA 进行剪切、连接和复制是实现重组 DNA 技术的基础

基因工程重要工具的发现将体外重组 DNA 技术变为现实。

限制性内切核酸酶可以在特异的位点将庞大的 DNA 分子剪切开。自然条件下，一个 DNA 分子通常会有很多基因；基因与周围序列的界限很“模糊”，仅仅是核苷酸的排列顺序有所不同。虽然使用物理方法可以将 DNA 分子破坏成小片段，但是 DNA 断裂的位置是随机的。因此，早期研究基因遇到的最大困难就是无法将感兴趣的基因分离出来，直到在微生物中发现了可以在特异的位点将庞大的 DNA 分子剪开开的限制性内切核酸酶。

限制性内切核酸酶 (restriction endonuclease)，简称“限制酶”，主要存在于细菌等微生物中。它能破坏外源 DNA，如侵染细菌的噬菌体 DNA，“限制”病毒在细菌内的寄生，而细菌自身 DNA 经过相应的化学修饰则不会被限制酶破坏。限制酶的保护作用是细菌等进化出的一种防御机制。此外，限制性内切核酸酶破坏 DNA 的方式是将外源 DNA 分子从内部剪切成片段，而不是从 DNA 两端逐步剪切核苷酸，故名为“内切核酸酶”。

限制性内切核酸酶能够识别双链 DNA 上特定的一小段核苷酸序列，并催化其中特定的两个核苷酸之间的磷酸二酯键水解，使得 DNA 双链在特定的位置断开。识别序列通常是 4~8 个核苷酸对，以 6 个核苷酸对最为常见。断开后的 DNA 末端分为两种：如果末端有凸出的单链部分称为黏性末端 (sticky end)；如果 DNA 末端没有单链部分称为平末端 (blunt end)。不同菌株含有不同的限制酶，不同限制酶的识别序列一般也各不相同 (图 4-1)。例如，发现于大肠杆菌中的限制酶 *EcoR* I 的识别序列如图所示，两条链从 5' → 3' 方向的识别序列均为 GAATTC，*EcoR* I 剪切两条链的位置均在 G 与 A 之间，剪切后形成了黏性末端。

用限制性内切核酸酶剪切不同的 DNA 分子，得到的不同来源的 DNA 片段具有能互补配对的黏性末端或平末端，这正是能将不同来源的 DNA 片段连接起来的基础。

DNA 连接酶能将 DNA 片段连接成一个重组 DNA 分子。完全互补的黏性末端能通过氢键暂时连接在一起，但并不稳定。发现于微生物的 DNA 连接酶可以将不同来源的 2 个 DNA 分子的双链通过磷酸二酯键分别连接起来，形成一个稳定的重组 DNA 分子

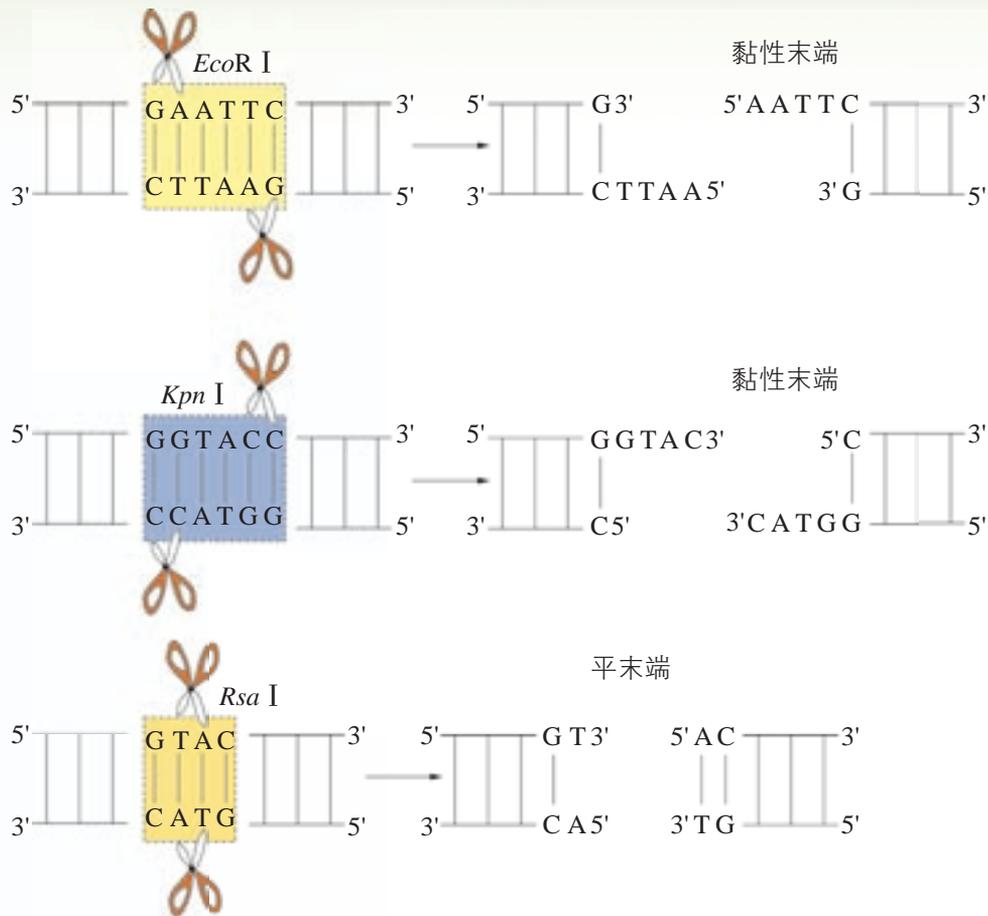


图4-1 限制性内切核酸酶剪切DNA示意图

(图4-2)。有的DNA连接酶也可以将平末端连接起来。从大肠杆菌中分离的*E.coli* DNA连接酶仅能连接黏性末端，而从T4噬菌体中分离的T4 DNA连接酶既可以连接两个互补的黏性末端，也可以连接两个平末端。

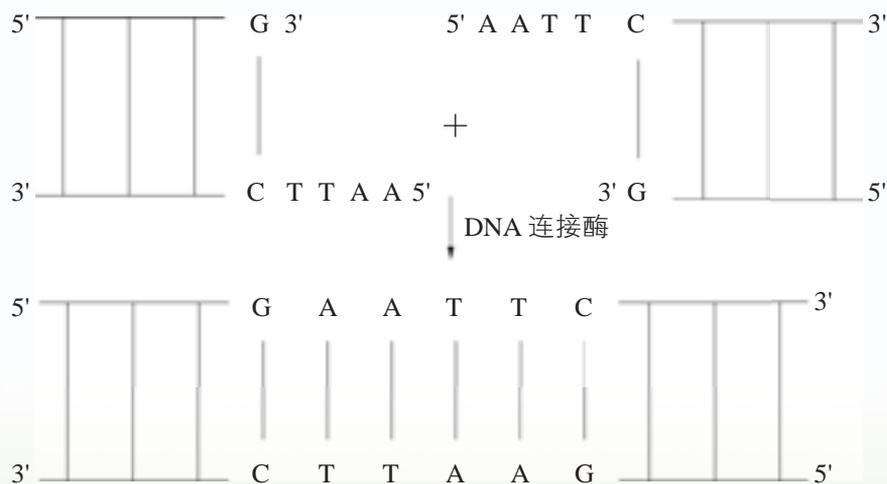


图4-2 DNA连接酶的连接作用示意图

外源DNA片段借助载体可在受体细胞内进行复制。多数外源DNA片段自身很难在受体细胞内成功复制，需要与含有复制起点（origin of replication）的DNA分子相连才行，这种具备自主复制能力的DNA分子称为载体（vector）。它能与外源DNA相连接并将其送入受体细胞中进行扩增。

理想的载体应具有以下3个特征：①含有复制起点，能够独立自主复制并稳定存在；②含有一种或多种限制酶的识别序列，方便外源基因插入载体中；③具有筛选作用的标记基因，以便能够通过表型鉴别含有载体的细胞。天然的载体很难满足上述全部要求，现多用人工改造后的载体。

如图4-3所示，质粒（plasmid）是独立于细菌拟核DNA之外的较小的环状DNA分子，是一种常用载体。大多数质粒的受体细胞是细菌，质粒在细菌内可以独立自主复制，具有多种限制酶识别序列，其携带的基因也会控制细菌的某些性状。如图4-4中的质粒，因为含有标记基因——氨苄青霉素抗性基因（*amp^r*）和四环素抗性基因（*tet^r*），可使用含有这两种抗生素的培养基筛选含有此质粒的细菌。

除质粒外，有些动、植物病毒及噬菌体也可作为载体。

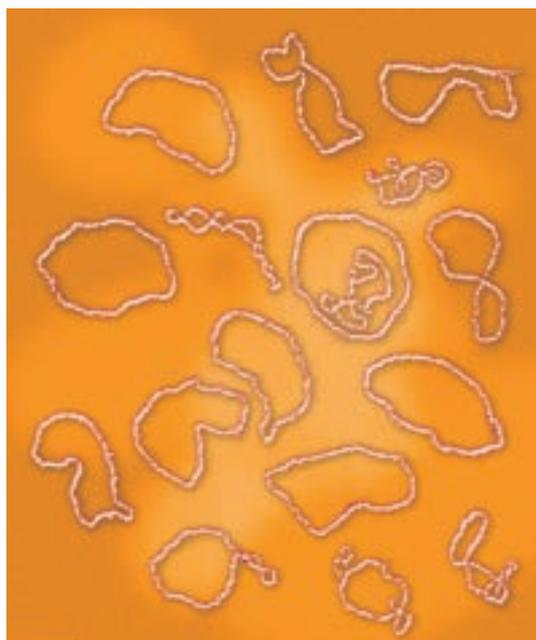


图4-3 细菌质粒的透射电镜图
(100000×, 经后期着色处理)

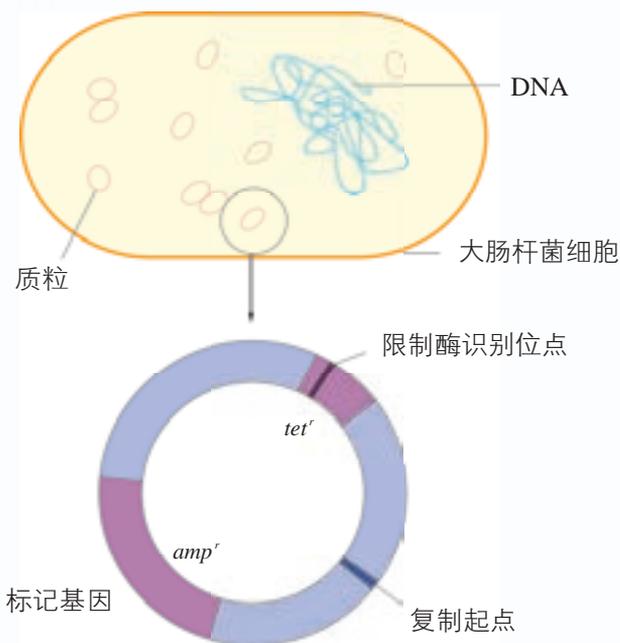


图4-4 质粒结构示意图



活动

DNA的粗提取和鉴定

从目标生物中提取分离DNA，是进行基因工程操作的基础。利用DNA与其他物质成分在物理、化学性质上的差异，通过一定的方法，去除其他成分，提取DNA。

细胞核内的DNA与蛋白质结合成染色体，提取核DNA先要破坏细胞，幼嫩的植物材料如果经过冷冻后再研磨，细胞结构容易被破坏；用十二烷基硫酸钠(SDS)处理材料，能使核蛋白变性并与DNA分离；乙二胺四乙酸二钠(EDTA)能抑制DNA酶活性，防止核DNA被酶解。

DNA在2 mol/L的NaCl溶液中溶解度高，且Na⁺与DNA形成钠盐；DNA钠盐不溶于酒精而某些蛋白质能溶于酒精，若在提取液中加入95%的冷酒精，能使DNA钠盐形成絮状沉淀物而析出。

在沸水浴的条件下，DNA遇二苯胺会被染成蓝色。

目的要求

1. 明确DNA的粗提取和鉴定的原理。
2. 尝试对植物细胞中的DNA进行粗提取。

材料用具

新鲜香蕉果肉或菜花，培养皿，烧杯，量筒，玻璃棒，尼龙纱布，研钵，试管，试管架，漏斗，天平，离心管，离心机，水浴锅，在-20℃条件下冷冻的95%酒精等。

二苯胺试剂：先配制A、B溶液。A液配方是1.5 g二苯胺、100 mL冰醋酸、1.5 mL浓硫酸；B液是体积分数为0.2%的乙醛溶液。然后取0.1 mL B液滴入10 mL A液中混匀。溶液需现配现用。

研磨液：先将10.1 g三羟甲基氨基甲烷(Tris)溶于50 mL的蒸馏水中，再用2 mol/L的盐酸调至pH 8.0，然后加入116.9 g NaCl、37.2 g乙二胺四乙酸二钠、20 g十二烷基硫酸钠。待上述药品全部溶解后，再用蒸馏水定容至1000 mL。

方法步骤

1. 研磨。称取10 g香蕉果肉，放入研钵中，倒入10 mL研磨液，充分研磨。
2. 过滤。在漏斗中垫上尼龙纱布，将研磨液过滤入离心管中。
3. 离心。用天平称量装有液体的离心管的质量，将质量相近的离心管配

对，放置于离心机相对位置。以 3000 r/min 的转速离心 2 min，取上清液倒入小烧杯中。

4. 加冷酒精。向小烧杯中倒入体积是上清液两倍的冷酒精，静置 3~5 min，可见白色的絮状物出现（图 4-5）。用玻璃棒缓缓搅动，絮状物会缠在玻璃棒上（图 4-6）。

5. 鉴定。取两支试管，一支试管中加入提取出的絮状物，并加入 2 mL 二苯胺试剂；另一支只加入 2 mL 二苯胺试剂。用 95 °C 水浴锅加热 10 min，注意观察两支试管中溶液颜色的变化。



图 4-5 加入冷酒精后析出的絮状物



图 4-6 缠在玻璃棒上的白色絮状物

讨 论

1. 实验结果说明絮状物中含有什么？
2. 鉴定时，为什么要设置只加入二苯胺试剂的试管？
3. 实验中研磨生物材料、倒入冷酒精的目的分别是什么？

基因工程的一系列操作可使生物获得新的遗传特性

基因工程的基本操作步骤包括获取目的基因、构建重组 DNA 分子、将重组 DNA 分子导入受体细胞、检测目的基因及其表达产物等。目的基因是指人们感兴趣、想研究的基因，如图 4-7 中的人胰岛素原基因。

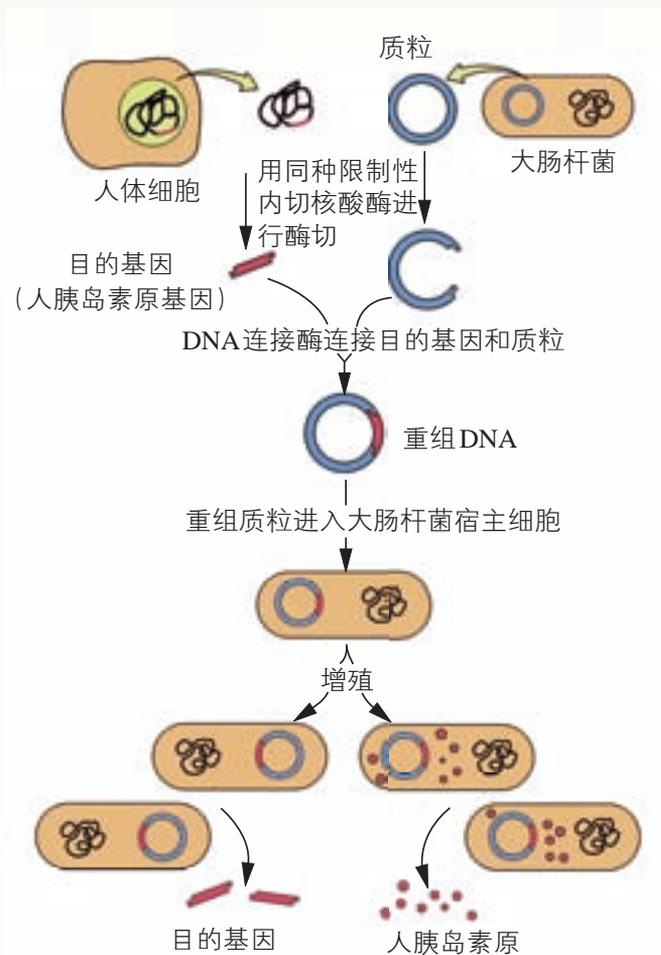


图4-7 基因工程的基本操作步骤示意图

如图4-8所示，真核细胞与原核细胞基因的结构并不完全相同。原核细胞基因中编码蛋白质的核苷酸序列是连续的，两端不能编码蛋白质的核苷酸序列对其具有调控作用，如启动子（promoter）位于基因的“上游”，有RNA聚合酶结合的位点，控制转录的开始；终止子（terminator）位于基因末端，当RNA聚合酶到达时，释放出RNA产物，转录结束。

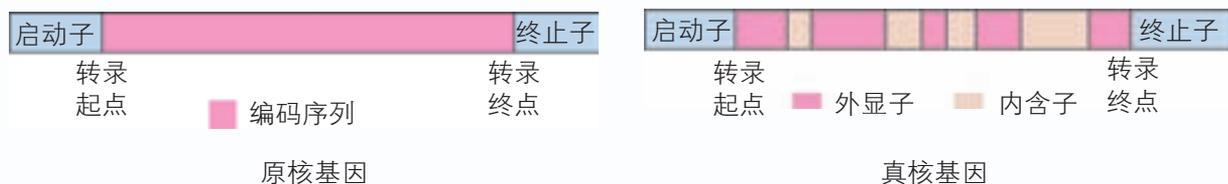


图4-8 基因结构示意图

真核细胞基因也具有启动子、终止子等调控序列，但是编码蛋白质的核苷酸序列是不连续的。编码蛋白质的序列称为外显子（exon），外显子之间不能编码蛋白质的序列称为内含子（intron）。不同基因内含子和外显子的数目及长度是不同的。外显子和

内含子均会被转录成RNA，再经过切去内含子对应部位、连接外显子对应部位等RNA加工过程，形成可以直接用于翻译的mRNA（图4-9）。

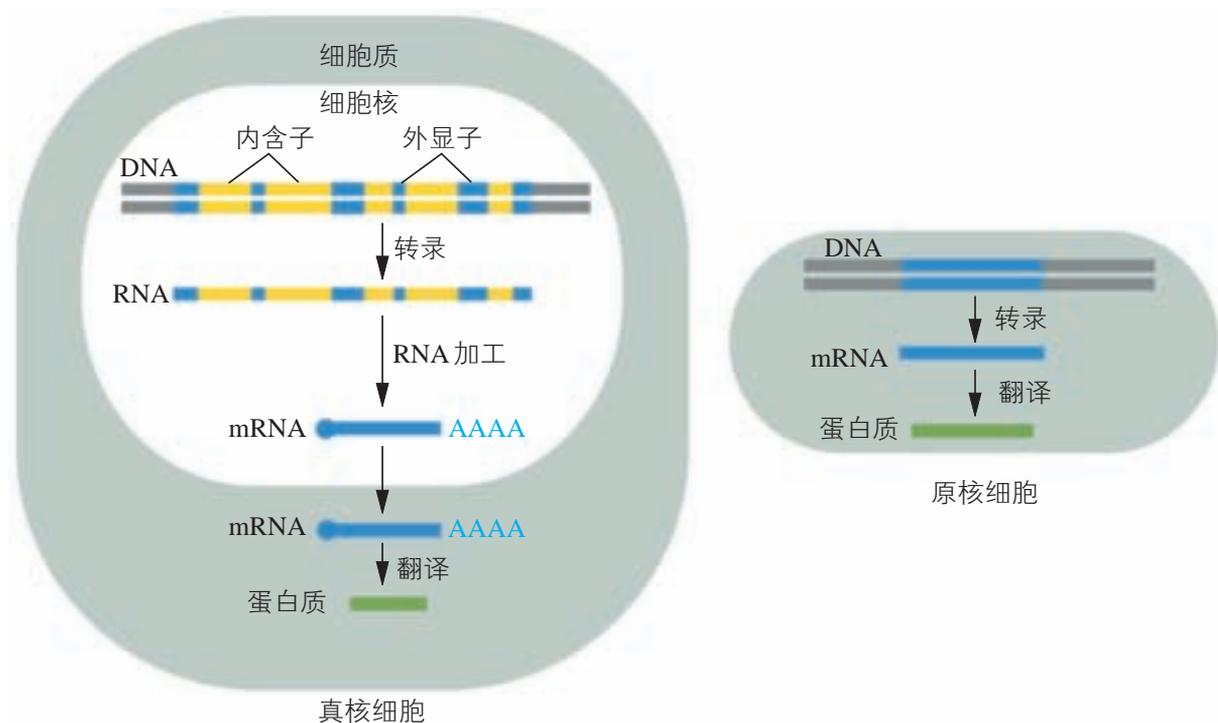


图4-9 真核细胞与原核细胞中基因表达过程示意图

获取目的基因是基因工程操作的第一步。想操作或分析目的基因，就要先获得大量高纯度的目的基因。

用化学合成法可以将核苷酸按照特定顺序一个一个地连接起来，由此合成目的基因。化学合成法需要已知目的基因全部序列，且成本较高，适于合成序列较短的基因。

借助载体建立基因文库是获取目的基因的一种常用方法。把某种生物的基因组DNA切成适当大小，分别与载体组合，导入微生物细胞，形成克隆，如图4-10所示。基因组中所有DNA序列克隆的总汇被称为基因组文库（genomic library）。

如果只想研究某些编码蛋白质的DNA序列，“翻阅”浩瀚的基因组文库就显得过于繁复了。利用成熟的mRNA可以构建出cDNA文库（cDNA library）。其基本方法是：从特定的组织或细胞中提取并纯化全部mRNA，然后在逆转录酶等酶的催化下，以mRNA为模板合成互补的DNA，即cDNA。最后，借助载体，利用与构建基因组文库相同的方法构建cDNA文库。由于基因的选择性表达，不同组织细胞的cDNA文库是不同的，同一组织细胞在不同的发育阶段，cDNA文库也会有差异。例如，胰岛素基因的cDNA只能在由胰岛β细胞建立的cDNA文库中找到。

通过聚合酶链式反应体外扩增特定的DNA是获取目的基因的另一种常用方法。聚

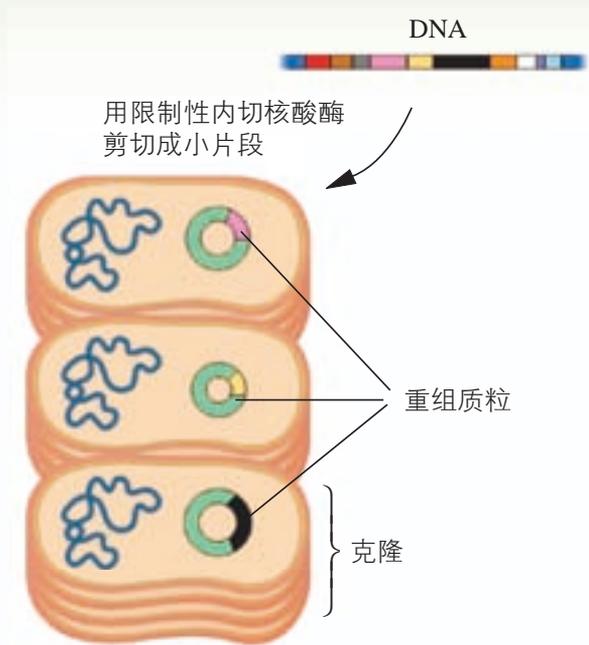


图4-10 构建基因组文库示意图

合酶链式反应（polymerase chain reaction）技术简称为PCR技术，是在DNA聚合酶作用下，在体外进行DNA大量扩增的一种分子生物学技术。该技术具有简便、快速、灵敏的特点，已广泛应用于医学诊断、法医鉴定、古生物学研究等方面。

PCR技术是对体内DNA复制过程的模仿，也需要模板、原料、酶和引物等。待扩增的DNA分子是模板，原料是4种脱氧核苷三磷酸，即dNTP，N代表A、T、G、C四种碱基。DNA聚合酶发挥作用时需要一小段双链核酸启动，因此在体外需要根据目的基因的核苷酸序列人工合成两段短的单链DNA，即引物，分别可以与两条DNA模板链复制起始端互补配对成小段双链。

PCR过程（图4-11）包括多次循环，每个循环分为3个步骤。①变性：模板DNA双链在高温下（90~95℃）氢键断裂，解旋成2条DNA单链，这个过程称为变性。②退火：温度降低（50~60℃）后，2个引物分别与各自互补的DNA单链结合，称为退火。③延伸：分别以两条DNA单链为模板，4种脱氧核苷三磷酸为原料，耐高温的Taq DNA聚合酶在适宜的温度（约72℃）下，以引物与模板形成的小段DNA双链区为起点，催化合成一条新的DNA互补链。设置PCR仪的温度进行上述反应并重复循环多次，每一次循环后DNA的量可以增加一倍，DNA呈指数形式扩增。扩增DNA片段的起点和终点由2个引物决定。

PCR产物可利用电泳技术来鉴定，该技术是分离、鉴定、纯化核酸和蛋白质的常用方法。电泳是指带电粒子在电场作用下，向与其携带电荷相反的电极迁移的过程。不同带电粒子因分子大小、形状、所带电荷等因素不同，迁移速率也会有所差异。核酸是带有负电的生物大分子，其迁移速率主要受核酸片段长度的影响。在电场强度一

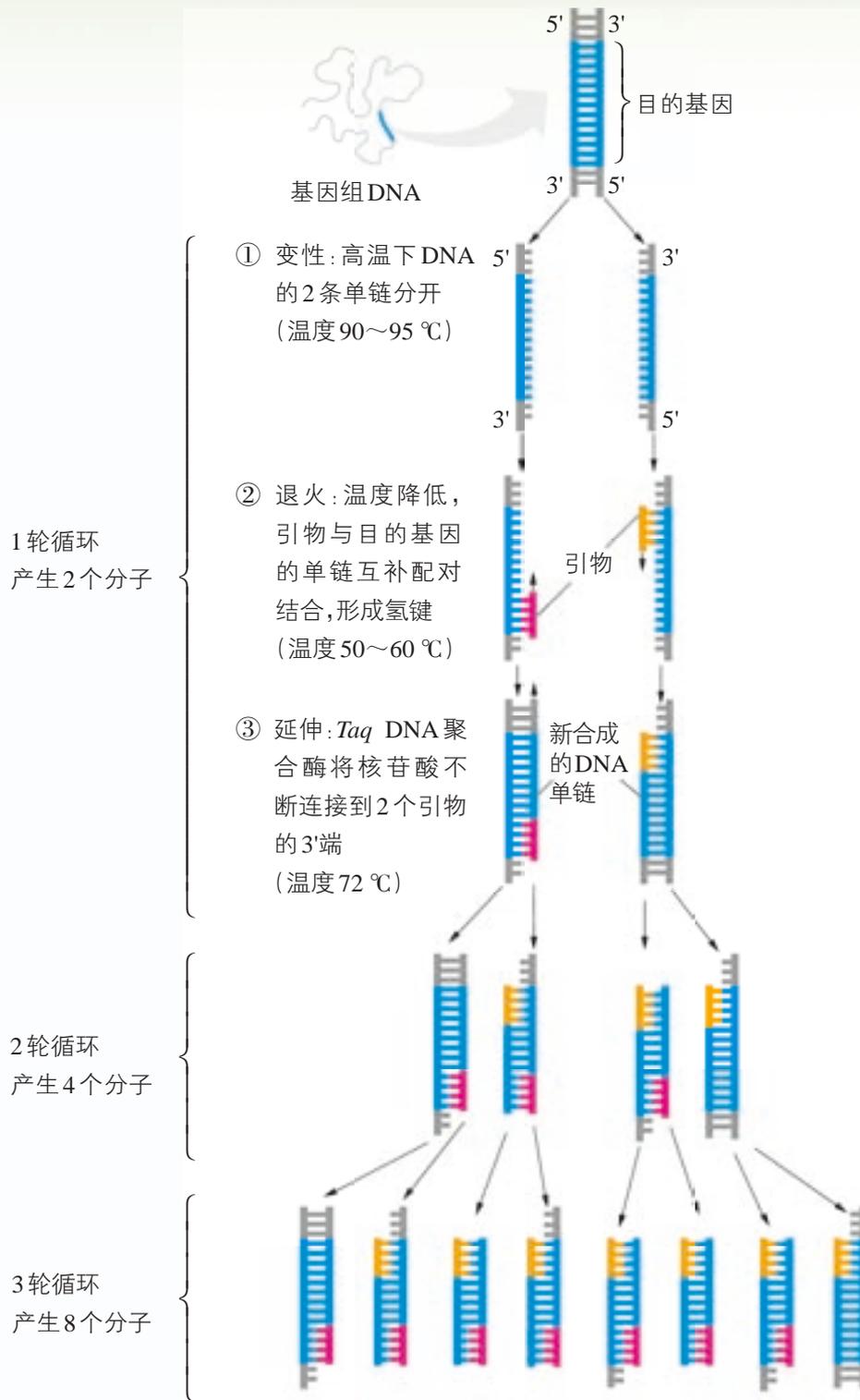


图4-11 PCR原理示意图

定时，核酸分子越大，向正极迁移速率越慢。电泳时常使用凝胶作为介质，凝胶的孔隙可起到分子筛的作用；凝胶浸没于电泳缓冲液中（图4-12A）。电泳缓冲液的作用是在电泳过程中维持合适的pH，并使溶液具有一定的导电性，利于核酸迁移。DNA片段根据长度大小在凝胶上分开，形成不连续的条带，每个条带包含的DNA片段长度是相

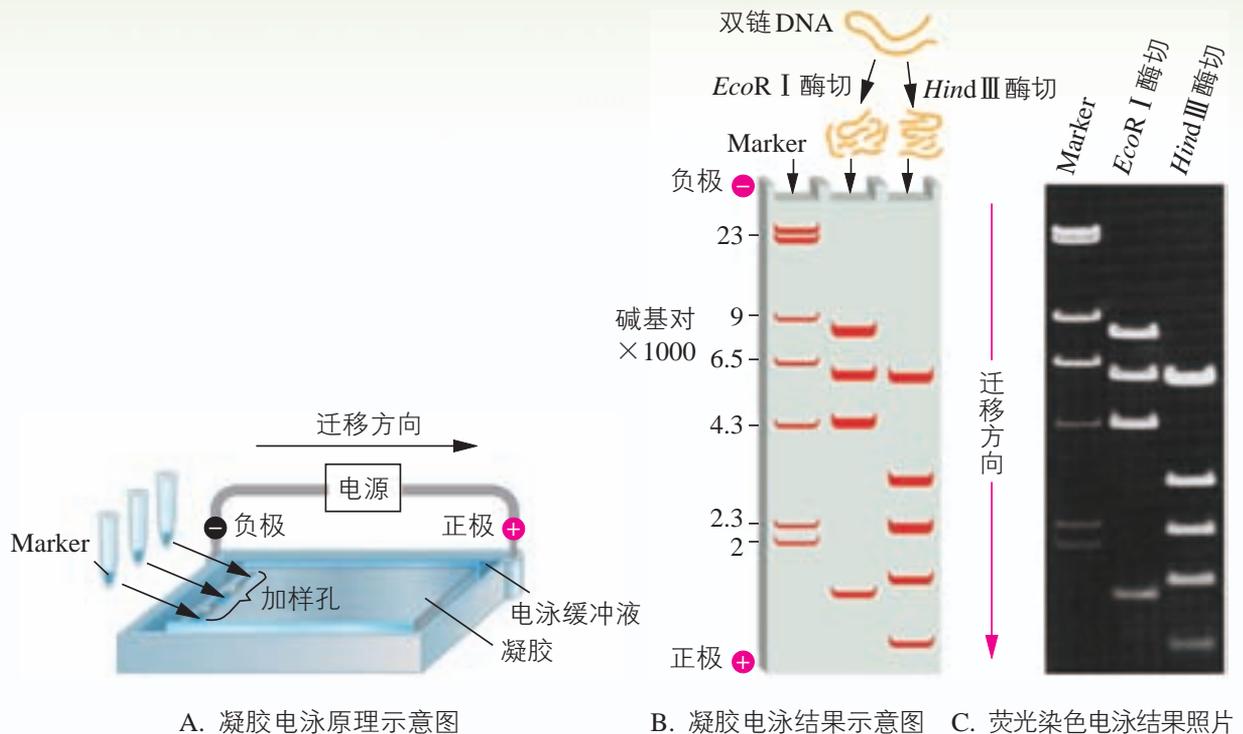


图4-12 凝胶电泳原理与结果图

同的（图4-12B、C）。DNA本身是无色的，可以用荧光或放射性染料对DNA进行标记，或使用亚甲基蓝将DNA染成蓝色。含有DNA条带的凝胶可以用刀片切割下来，回收凝胶中的DNA，从而达到提纯的目的。核酸分子的大小常用碱基对数（base pair, bp）进行描述。DNA相对分子质量标准物（DNA Marker）是一组已知长度和含量的标准DNA片段混合物，在电泳中能作为参照物。不同的DNA Marker所含DNA片段长度和含量是不同的。



活动

PCR 扩增DNA片段及凝胶电泳鉴定

聚合酶链式反应（PCR）是一种体外扩增特定基因或DNA片段的技术，经过多次循环变性、退火、延伸三个步骤，可获得大量的目的基因或DNA片段。本活动使用PCR技术扩增酵母细胞中编码核糖体RNA的DNA部分片段，长度为841 bp，再通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定。使用亚甲基蓝对凝胶进行染色，再用75%酒精以及蒸馏水脱色，观察并分析琼脂糖凝胶中DNA条带。

本活动扩增的序列广泛存在于真菌中，多样性程度较高，常用于鉴定病原真菌，选择用于酿酒的酵母菌株，通过比对PCR产物序列推测亲缘关系。

目的要求

1. 尝试利用PCR技术扩增DNA片段。
2. 利用琼脂糖凝胶电泳技术对DNA扩增产物进行鉴定。

材料用具

PCR仪，微量移液器及枪头，微量离心管，培养皿，三角瓶，封口膜，橡皮筋，冰盒，记号笔，三脚架，玻璃板，微波炉或水浴锅，离心机等；琼脂糖凝胶电泳设备，包括梳子、胶盒、水平电泳槽和电泳仪。（注意：枪头、微量离心管使用前需进行高压蒸汽灭菌。）

材料：食用高活性干酵母，即酿酒酵母。酵母细胞悬液：称取0.1 g干酵母粉，置于盛有100 mL无菌蒸馏水的三角瓶中，盖上封口膜并用橡皮筋绑好，摇匀后在温暖的环境下活化2 h。

PCR相关试剂：以下溶液在-20℃条件下冷冻保存，使用前置于冰盒内或冰块上。

- (1) 市售10×扩增缓冲液（含Mg²⁺）。
- (2) 市售10 mmol/L 4种脱氧核苷三磷酸（dNTP）。
- (3) 市售2 U/μL *Taq* DNA聚合酶（U为酶活力单位，定义为30℃、最适pH、底物浓度饱和的条件下，1 min转化1 μmol底物所需要的酶量）。
- (4) 无菌水：将双蒸水在高压灭菌锅中灭菌，制成无菌水。
- (5) 10 μmol/L引物A溶液：序列为5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'。用无菌水将市售引物稀释成10 μmol/L溶液。
- (6) 10 μmol/L引物B溶液：序列为5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'。用无菌水将市售引物稀释成10 μmol/L溶液。

电泳相关试剂：

(1) Tris-硼酸（TBE）电泳缓冲液：将市售50×电泳缓冲液稀释50倍。或配制5×TBE电泳缓冲液：称取54 g Tris、27.5 g 硼酸溶于800 mL蒸馏水中，加入20 mL的0.5 mol/L EDTA，调节pH到8.0，加水定容至1 L，室温保存备用，使用时稀释5倍。

(2) 市售6×上样缓冲液（loading buffer）：内含甘油可以增加样品密度，确保DNA能够沉入加样孔内；含有少许溴酚蓝作为电泳指示剂，电泳时溴酚蓝迁移速率较快，在其迁移出凝胶前关闭电泳仪电源。

(3) 市售DNA相对分子质量标准物（Marker）。

染色相关试剂：

(1) 0.1%亚甲基蓝溶液：称取0.1 g亚甲基蓝溶于100 mL蒸馏水中。避免接

触皮肤和眼睛，避光保存。

(2) 75%酒精。

(3) 保存于4℃条件下的蒸馏水。

或使用0.002%亚甲基蓝溶液：将2 mL的0.1%亚甲基蓝溶液加入10 mL电泳缓冲液中，再加88 mL蒸馏水，避光保存。

方法步骤

1. PCR扩增。

使用微量移液器将表4-1所示的PCR体系各成分加入0.2 mL已灭菌的微量离心管中，注意酵母细胞悬液需摇匀后再吸取，用微量移液器反复吹吸使反应液混合均匀，如图4-13、图4-14所示。以3000 r/min的转速离心30 s，使反应液集中于微量离心管的底部。如图4-15所示，将微量离心管放入PCR仪中，设置反应条件见图4-16。扩增后的PCR产物可储存在-20℃条件下。

表4-1 PCR体系配方

成分	体积
10×扩增缓冲液	5 μL
dNTP	2 μL
引物A	4 μL
引物B	4 μL
<i>Taq</i> DNA聚合酶	1 μL
无菌水	32 μL
酵母细胞悬液	2 μL
总体积	50 μL

注意：使用微量移液器前，必须先装好相应的已灭菌的一次性吸液枪头，避免液体进入微量移液器内部。推动按钮共有2挡停顿，一直按到底是第2挡。吸取液体时，先转动调节轮至目标体积（不要超出微量移液器量程），按压推动按钮至第1挡并缓慢抬起吸取相应体积的液体。放出液体时，再次按压推动按钮至第2挡，液体全部流出后抬起按钮，推动卸枪头按钮卸掉用过的枪头。枪头在每吸取一种溶液后更换一次，避免用手接触枪头。



图4-13 微量移液器



图4-14 混合PCR体系



图4-15 PCR仪

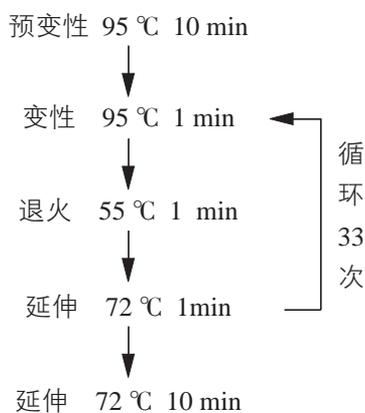


图4-16 PCR条件流程图

2. 琼脂糖凝胶电泳。

(1) 制备琼脂糖凝胶。称取琼脂糖0.25 g，加到盛有25 mL电泳缓冲液的三角瓶中。将三角瓶盖上封口膜并用橡皮筋绑住后，用微波炉或沸水浴加热，使琼脂糖溶化呈透明状。将溶化的琼脂糖倒入胶盒（图4-17），若琼脂糖中有气泡，可用枪头除去。待凝胶完全凝结，小心拔出梳子，凝胶上梳齿的位置成为加样孔（图4-18）。将装有凝胶的胶托从胶盒中取出，放入电泳槽内，加样孔一端朝向负极，向电泳槽中加入电泳缓冲液，使其没过凝胶。

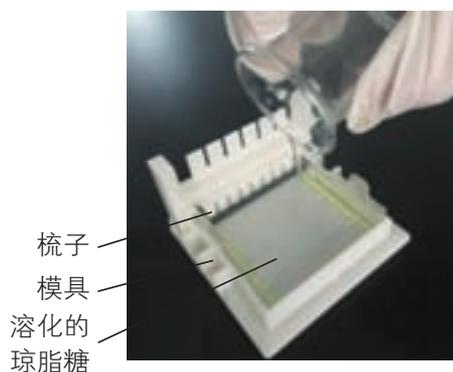


图4-17 向胶盒中倒入溶化的琼脂糖

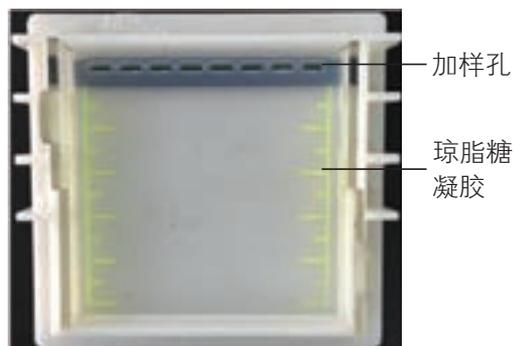


图4-18 凝结的琼脂糖凝胶

(2) 加样。用微量移液器向 $50\ \mu\text{L}$ PCR 产物中加入 $10\ \mu\text{L}$ $6\times$ 上样缓冲液，并反复吹吸混合均匀。如图4-19所示，将 $20\ \mu\text{L}$ 样品混合液缓慢加到加样孔内。将 $20\ \mu\text{L}$ DNA Marker 与 $4\ \mu\text{L}$ $6\times$ 上样缓冲液混合均匀，全部加到加样孔内；若市售 DNA Marker 已含有上样缓冲液，则无需混合，直接加样 $25\ \mu\text{L}$ 。每加样一次需更换一次枪头。

(3) 电泳。如图4-20所示，盖上电泳槽盖，连接好电极插头后再接通电源。将直流电泳仪的电压设置成 $80\ \text{V}$ ，开始电泳。 $25\ \text{min}$ 后关闭电源，停止电泳。注意观察溴酚蓝不要迁移出凝胶。

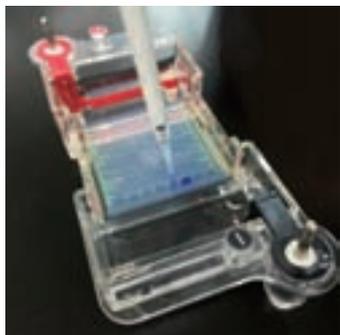


图4-19 加样



图4-20 电泳

3. 染色。

染色方案1:

(1) 将凝胶放入培养皿，倒入 0.1% 亚甲基蓝溶液，没过凝胶约 $5\ \text{mm}$ ，染色 $8\ \text{min}$ 。轻轻晃动培养皿，让染液进入凝胶下表面与培养皿之间，不要留有气泡。染液使用后可回收利用。

(2) 倒入 75% 酒精没过凝胶约 $5\ \text{mm}$ ，不断晃动培养皿 $1\sim 1.5\ \text{min}$ 。再倒去酒精。

(3) 加入冷的蒸馏水进行脱色。当出现清晰的蓝色区带时，倒去蒸馏水终

止脱色。此过程中可更换被染蓝的蒸馏水。如果凝胶在蒸馏水中浸泡过久，条带颜色会变淡直至无色。

染色方案2:

向盛有凝胶的培养皿中倒入0.002%亚甲基蓝溶液，没过凝胶约5 mm。轻轻晃动培养皿，让染液进入凝胶下表面与培养皿之间。盖上培养皿盖，4℃冷藏过夜。第二天观察到清晰的蓝色区带时，倒去染液，终止染色。染液可回收利用。

4. 观察。

在桌上铺一张白纸，在光下手持盛有凝胶的培养皿距白纸5 cm以上，找到较为清晰的条带。蓝色条带即为DNA所在位置（图4-21），注意观察条带的数目和位置。再将凝胶置于平的透明玻璃板上，放在三脚架上面进行观察并拍照。

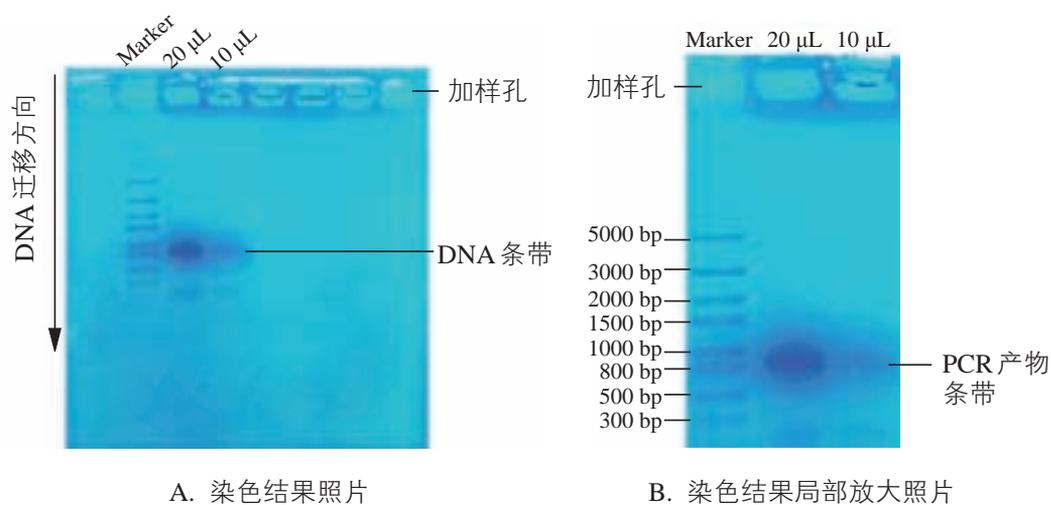


图4-21 琼脂糖凝胶染色结果及局部放大照片

用直尺紧贴凝胶表面测量DNA条带迁移距离，即每个DNA条带中央到加样孔的距离（图4-22），记录于下表中。根据已知Marker每个条带的位置和相应DNA片段长度，推测PCR产物长度。

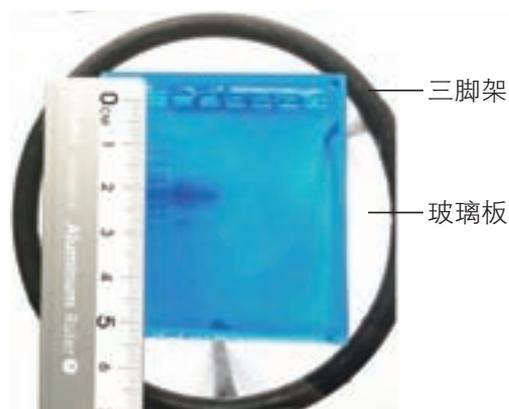


图4-22 用直尺测量DNA条带迁移距离

项目	DNA Marker						PCR 产物
DNA 片段长度/bp							
迁移距离/cm							

讨 论

1. 本实验活动的对照组应该如何设计?
2. 请根据本活动中提供的引物序列, 写出 PCR 产物两端的 DNA 双链序列。

利用表达载体构建重组 DNA 分子是基因工程操作的第二步。克隆基因可以获得大量的 DNA 分子, 不仅用于基因诊断、法医鉴定、判断物种亲缘关系等研究工作, 还可以用于指导合成大量、稀有的蛋白质产物, 如胰岛素、干扰素和抗癌药物等。用于大量扩增外源 DNA 的载体, 称为克隆载体 (cloning vector)。使目的基因既能扩增又能表达出相应蛋白质的载体, 称为表达载体 (expression vector)。表达载体包含适当的转录和翻译信号, 例如, 真核基因要在细菌中持续高水平地表达, 质粒上除了复制起点、标记基因和多个限制酶的识别序列外, 还需要加入细菌的启动子、终止子等。

如图 4-23、图 4-24 所示, 用同种限制性内切核酸酶剪切含有目的基因的 DNA 片段以及表达载体, 然后用 DNA 连接酶将它们连接起来, 可完成体外重组, 形成重组的 DNA 分子。

将目的基因导入受体细胞是基因工程操作的第三步。接受目的基因的细胞称为受体细胞。根据受体细胞类型可选择不同的基因导入方法。

自然条件下, 细菌的转化效率很低, 通过化学和物理方法的处理可以增强细菌捕获外源 DNA 的能力, 成为感受态细胞 (competent cell)。因钙离子能促进细菌摄取外源的 DNA, 科学家常使用 CaCl_2 溶液

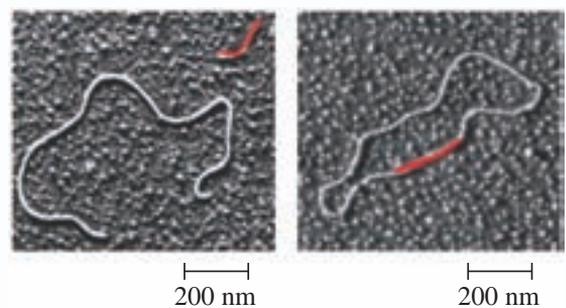


图 4-23 重组质粒形成前(左)后(右)电镜照片

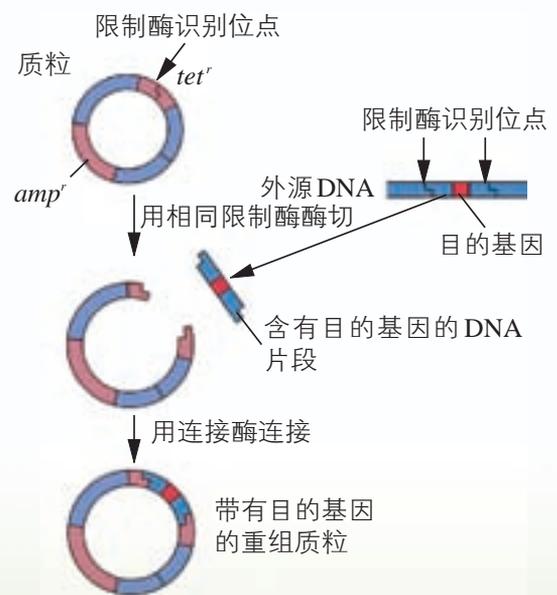


图 4-24 构建重组质粒示意图

制备感受态细胞，进而转入外源DNA。如将大肠杆菌放于低温、低浓度的CaCl₂溶液中，造成细胞膨胀，细胞膜通透性改变，成为感受态细胞。再在低温条件下将大肠杆菌与重组DNA分子混合，使外源DNA黏附于受体细胞表面，最后进行短暂的热刺激处理，使外源DNA转入细胞。

将目的基因导入动物细胞时，常使用显微注射法。1982年，科学家将含有生长激素基因的重组DNA片段，通过显微操作仪注射到受精卵内还未融合的雄性细胞核中(图4-25)，体外培养一段时间后再将胚胎移植到雌性小鼠子宫内，获得了成功转入目的基因的体型大、生长快的“超级小鼠”(图4-26)。

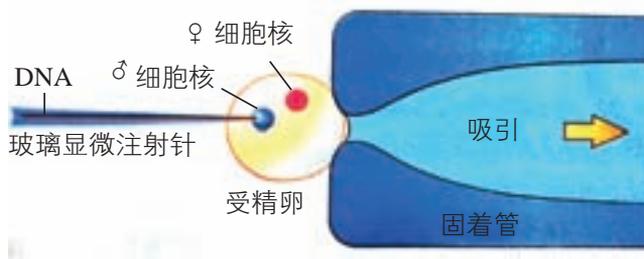


图4-25 显微注射法示意图



图4-26 普通鼠与生长速度加快的转基因鼠

将目的基因导入植物细胞时，常使用农杆菌转化法。自然条件下，根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的Ti质粒(tumor inducing plasmid)上的T-DNA片段能整合到植物染色体DNA中。因此，将目的基因插入质粒的T-DNA中，用重组Ti质粒转化农杆菌，再让农杆菌感染植物细胞，目的基因就会随T-DNA整合到植物染色体DNA中，最后通过植物组织培养技术可培育出完整的转基因植株(transgenic plant)，如图4-27所示。

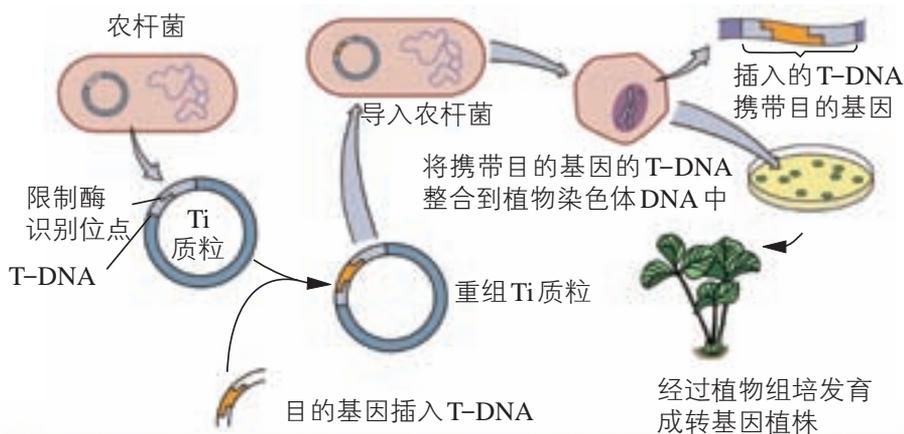


图4-27 利用农杆菌培育转基因植物示意图



小资料

运用电击法、基因枪法与花粉管通道法导入目的基因

电击法又称电穿孔法，通过短暂的电脉冲在细胞膜上形成纳米级临时性的小孔，DNA 由此进入受体细胞。

基因枪法是将 DNA 吸附在金属颗粒的表面，通过基因枪高速打入植物细胞并整合到植物 DNA 中表达，通过该方法甚至可将目的基因导入叶绿体等细胞器中。

花粉管通道法是我国科学家周光宇在 1987 年独创的。将重组 DNA 滴加到植物受粉后形成的花粉管通道内，进入卵细胞、合子或早期胚胎细胞中。此方法直接、简便且经济，已应用于水稻、小麦、棉花、大豆等多种植物中。

检测目的基因及其表达产物是基因工程操作的第四步。目的基因及其表达产物的检测和鉴定可从 DNA、RNA、蛋白质和个体性状四个方面来进行。通过检测 DNA 可确定目的基因在受体细胞内是否稳定存在；检测 RNA、蛋白质以及个体水平上是否出现相应性状，可得知目的基因是否正确表达。

借助载体上的标记基因可以检测目的基因是否在受体细胞中稳定地存在并遗传。例如，某些应用于大肠杆菌的质粒具有氨苄青霉素抗性基因和 *Lac Z* 基因两种标记基因，可使大肠杆菌具有青霉素抗性并能够合成 β -半乳糖苷酶，该酶能催化无色的 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚-D-半乳糖苷) 分解为半乳糖和蓝色的 5-溴-4-氯靛蓝，使菌落呈现蓝色。将目的基因插入这种质粒上的 *Lac Z* 基因中，使该基因失活，再将重组质粒导入大肠杆菌中，从而使含有重组 DNA 的大肠杆菌在含有 X-gal 和青霉素的培养基上形成白色菌落；而只导入不含目的基因的载体的大肠杆菌则形成蓝色菌落，不含有载体的大肠杆菌无法生长 (图 4-28)。

PCR 和核酸分子杂交技术可更加精准地鉴定受体细胞中是否转入了目的基因。运用 PCR 技术检测的简要步骤是：根据目的基因的序列设计 PCR 引物，利用待检 DNA 为模板进行 PCR，再通过电泳或 DNA 测序技术鉴定 PCR 产物。核酸分子杂交是指两个不同来源核酸单链的核苷酸之间碱基互补配对的过程。核酸分子杂交利用核酸探针



图 4-28 利用含有青霉素和 X-gal 的培养基鉴定大肠杆菌克隆

检测特异的核苷酸序列，核酸探针是带有放射性或荧光标记的具有特定核苷酸序列的DNA或RNA。利用探针检测目的基因的简要方法是：用化学方法使待检的DNA变性成单链并固定在硝酸纤维素膜上，然后加入探针，在适当的条件下探针与互补的目的基因片段形成双链。漂洗硝酸纤维素膜去除未互补结合的探针后，若硝酸纤维素膜仍具有放射性或荧光，则可判断待检DNA中含有目的基因。

运用核酸分子杂交技术还可检测受体细胞中是否含有目的基因转录出的mRNA。如果能检测到目的基因转录出的mRNA，则说明目的基因在受体细胞内成功转录。

运用抗原-抗体杂交技术可以检测目的基因是否表达出相应的蛋白质。该方法以目的基因表达出的蛋白质为抗原，制备能与其特异性结合的并能被放射性或荧光标记的抗体。如果能探测到目的蛋白，则说明目的基因在受体细胞内成功表达。

观察测定个体是否表现出目的基因控制的特定性状并稳定遗传，是判断转基因成功的直接证据。

 小资料

Southern、Northern和Western印迹

现代生物技术中有3个鉴定技术的名称很有规律，它们是怎么来的呢？其实第一个技术的名称源自科学家的姓氏。

首先是英国分子生物学家萨瑟恩（Edwin Southern, 1938— ）发明了一项鉴定特异DNA片段的方法（图4-29）：提取细胞的DNA，用限制酶剪切成大量DNA片段，通过琼脂糖凝胶电泳进行分离；将DNA变性成单链并固定到一种特殊的膜上，形成印迹，此时DNA条带仍不可见；与带有标记的核酸探针进行杂交，当探针遇到与之互补的DNA序列时，就杂交形成被标记的条带——杂交带；洗去游离的探针，通过荧光或放射性的显影检测可观察到被标记的条带。他用自己的姓氏命名了这项技术——Southern印迹（Southern Blotting）。

后来又有科学家用相似的技术，制作有RNA印迹的膜与探针进行杂交，鉴定特异的RNA片段，命名为Northern印迹。通过抗原-抗体杂交鉴定蛋白质的技术，则被科学家命名为Western印迹，又名“蛋白质免疫印迹”。后两者的名称均与科学家的姓氏无关，只是单纯地保持了技术名称上的连贯性。

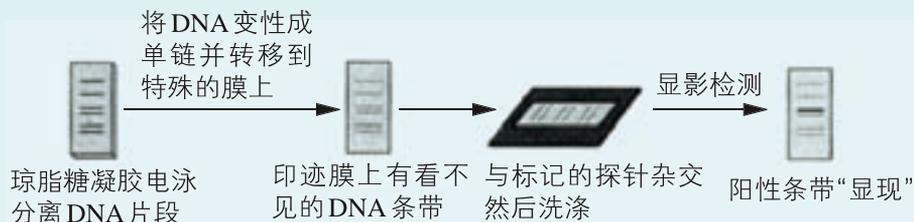


图4-29 Southern印迹原理示意图



PCR 技术研究史话

1957年科恩伯格 (Arthur Kornberg, 1918—2007) 发现并提取大肠杆菌 DNA 聚合酶 (最适温度为 37 °C) 后, 就曾探讨在体外进行 DNA 复制的可能性, 他也因此项成就而荣获 1959 年诺贝尔生理学或医学奖。随后科学家掌握了体外合成短链 DNA 技术, 合成的短链 DNA 可作为引物。早期的 DNA 合成技术是以 1 条 DNA 单链为模板, 在 1 个引物的启动下每次只合成 1 条互补的 DNA 单链, 合成的终点不确定, 合成效率极低, 价格也十分昂贵, 人们认为这项技术没有什么实际价值。事情发生转机是在 1983 年一个周末的晚上,

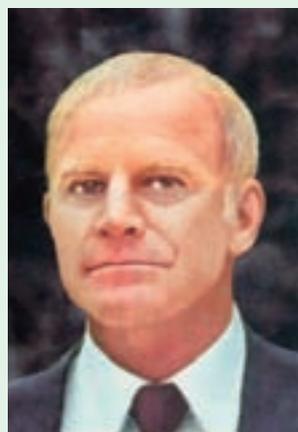


图 4-30 穆利斯

美国生物化学家穆利斯 (Kary Mullis, 1944—2019) (图 4-30) 开车回家, 公路上的两排路灯和相对行驶的车辆让他感到似曾相识: 两排路灯犹如 DNA 的双链, 反向行驶的车辆像是 DNA 聚合酶, 面对面地合成单链 DNA。他突然想到分别以 DNA 的 2 条单链为模板, 在 2 个引物的启动下分别合成 2 条互补的单链。一轮复制之后, 1 个双链 DNA 分子就扩增成 2 个双链 DNA 分子。再次高温使 2 个双链 DNA 分子解旋成 4 个单链 DNA 模板, 复制后成为 4 个双链 DNA 分子。如此反复, DNA 分子数每复制一次就增加一倍, 以 2 的指数倍扩增。

穆利斯最初对于 PCR 的设想, 在他和技术纯熟的实验员共同努力下终于日趋成熟, 穆利斯也因发明 PCR 技术独享 1993 年诺贝尔化学奖。但是, PCR 技术的成本仍然很高, 因为从大肠杆菌中提取的 DNA 聚合酶不耐高温, 高温解旋时会失活, 每复制一轮都要加入新的酶。好在 1976 年我国台湾生物学家钱嘉韵 (图 4-31), 从黄石公园热泉生态系统获得的水生栖热菌中, 分离出耐高温 DNA 聚合酶, 命名为 *Taq* DNA 聚合酶, 其最适温度为 72 °C。1985 年 *Taq* DNA 聚合酶成功纯化后, 开始应用于 PCR 技术。因 *Taq* DNA 聚合酶耐热性强, 特异性高, 扩增片段长, 简化了操作, 降低了成本, 使得 PCR 技术具有真正的实践意义, 因此, 1989 年, *Taq* DNA 聚合酶被著名杂志《科学》誉为“年度分子”。随着材料科学的发展, 早期由



图 4-31 我国台湾生物学家钱嘉韵

随着材料科学的发展, 早期由

三个水浴锅构成的PCR仪（图4-32）经过改进，现在已经能够自动精确控温（图4-33），大大降低了操作的难度，使PCR技术变得简便易行。

如今，PCR技术广泛地应用在医疗、法医鉴定等众多行业，《纽约时报》曾经这样评价PCR技术：PCR是如此的重要，将生物学划分成了PCR前时代和PCR后时代。



图4-32 1987年的PCR仪



图4-33 可变温的PCR仪

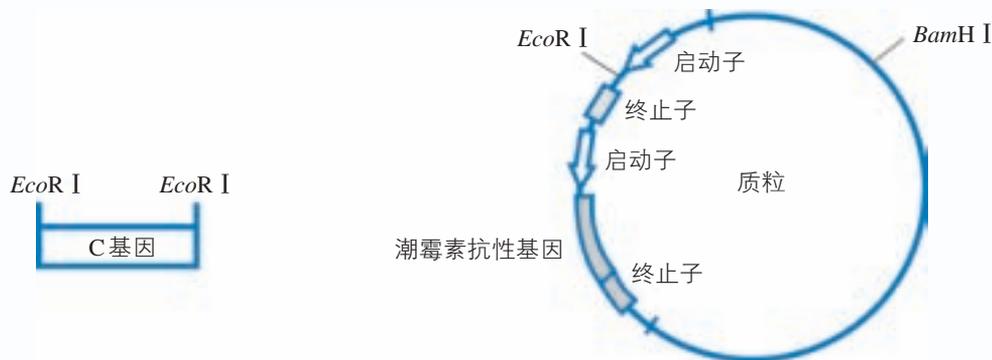
思考与练习

一、选择题

- 在基因工程操作中限制性内切核酸酶是不可缺少的工具。下列关于限制性内切核酸酶的叙述，错误的是（ ）
 - 限制性内切核酸酶也可以识别和剪切RNA
 - 限制性内切核酸酶可以从某些原核生物中提取
 - 限制性内切核酸酶的活性受温度和pH等因素的影响
 - 一种限制性内切核酸酶只能识别一种特定的脱氧核苷酸序列
- SPL蛋白是植物中广泛存在的一类调控基因转录的分子。不同植物的SPL蛋白结构不同，但均有一个大约由80个氨基酸构成的结构相同的功能区，可识别并结合到某些基因的特定区域。SPL基因最初是从植物花序cDNA文库中得到的。下列叙述正确的是（ ）
 - SPL基因能在花序细胞中表达
 - SPL可催化特定基因的翻译过程
 - SPL是由80个氨基酸构成的蛋白质
 - SPL在不同绿色植物中功能差异较大
- 用人的胰岛素基因制成DNA探针检测下列物质，不能形成杂交分子的是（ ）

- A. 人胰岛 α 细胞的 mRNA
 B. 人肝细胞的 DNA
 C. 人胰岛 α 细胞中的 DNA
 D. 人胰岛 β 细胞的 mRNA

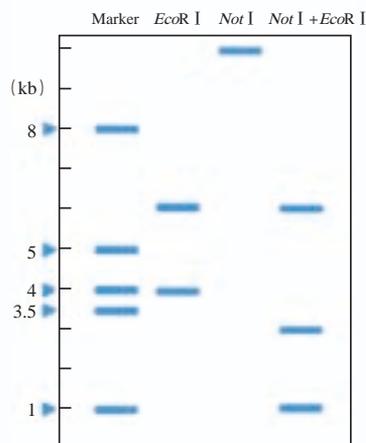
4. 为了增加菊花花色类型, 研究者从其他植物中克隆出花色基因 C, 拟将其与质粒重组, 再借助农杆菌导入菊花中。下列操作与实验目的不符的是 ()



- A. 用限制性内切核酸酶 *EcoR* I 和 DNA 连接酶构建重组质粒
 B. 在培养基中添加卡那霉素, 筛选被转化的菊花细胞
 C. 用分子杂交方法检测 C 基因是否整合到菊花染色体上
 D. 用含 C 基因的农杆菌侵染菊花愈伤组织, 将 C 基因导入细胞

二、简答题

1. 用限制性内切核酸酶 *EcoR* I、*Not* I 单独或联合剪切同一种 DNA 分子, 获得的 DNA 片段电泳结果如下图所示, 最左边为 DNA Marker, 1kb 为 1000 个碱基对。请画出原 DNA 分子的形状, 标出限制酶的识别序列位置及其之间的距离。



2. 人葡萄糖脑苷脂酶 (hGC) 缺乏症是一种常染色体隐性遗传病, 患者因为基因缺乏不能合成 hGC, 导致脾脏肿大、梗死和破裂, 所以通常活不过 10 岁。传统的治疗方法是从人的胎盘中提取 hGC 后注入人体, 因而治疗价格十分昂贵。科学家现已将 hGC 基因成功转入烟草中, 并高效表达。请你设计该项基因工程技术的一般流程。

第二节 基因工程及其延伸技术 应用广泛

本·节·要·点

- 基因工程的应用
- 蛋白质工程的设计流程

1982年，利用转基因大肠杆菌生产的人胰岛素，成为第一个被批准用于治疗人体疾病的基因工程药物。如今，基因工程及其延伸出的蛋白质工程已经影响到我们生活的方方面面。那么，基因工程是如何影响我们生活的？什么是蛋白质工程？蛋白质工程又是如何进行的？

基因工程改善了人类的生活品质

20世纪80年代以来，基因工程技术发展日新月异，极大地推动了医疗制药、法医鉴定、农牧业育种、环境保护等行业的发展。

首先，应用基因工程技术诊断、治疗、研究疾病领域发展迅速，主要在四个方面取得了引人瞩目的成果。

第一，运用核酸分子杂交、PCR等技术进行基因诊断。一方面，核酸分子杂交和PCR技术常用来检测患者自身携带的缺陷基因。例如，引起镰刀形贫血症的基因突变，使血红蛋白基因缺少一个限制性内切核酸酶 *Mst II* 的识别序列，因为该识别序列 5' -CCTGAGG-3' 中的 A 突变成 T。检测时，先用PCR技术扩增待检者基因的相应片段，然后用 *Mst II* 剪切扩增后的DNA，经琼脂糖凝胶电泳分离酶切后的DNA片段，并结合DNA分子杂交技术，则可判断待检者的基因组成，如图4-34所示。另一方面，灵敏度极高的PCR技术常用于诊断患者是否感染某种病原体。例如，设计特异扩增HIV病毒部分基因片段的PCR引物，使用PCR技术检测患者少量血液或细胞中的DNA，根据凝胶电泳结果就可以判断患者是否携带HIV病毒。甚至在感染的早期，就能从血液中直接检测到微量的病毒基因，如图4-35所示。

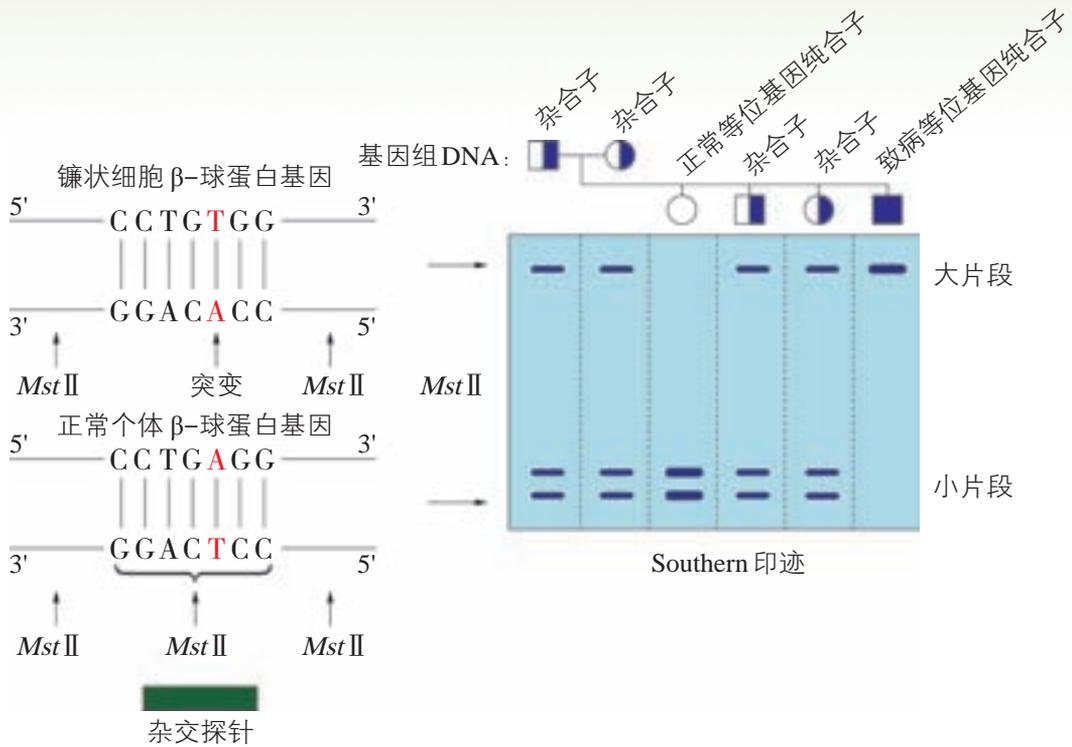


图 4-34 镰刀形贫血症基因检测

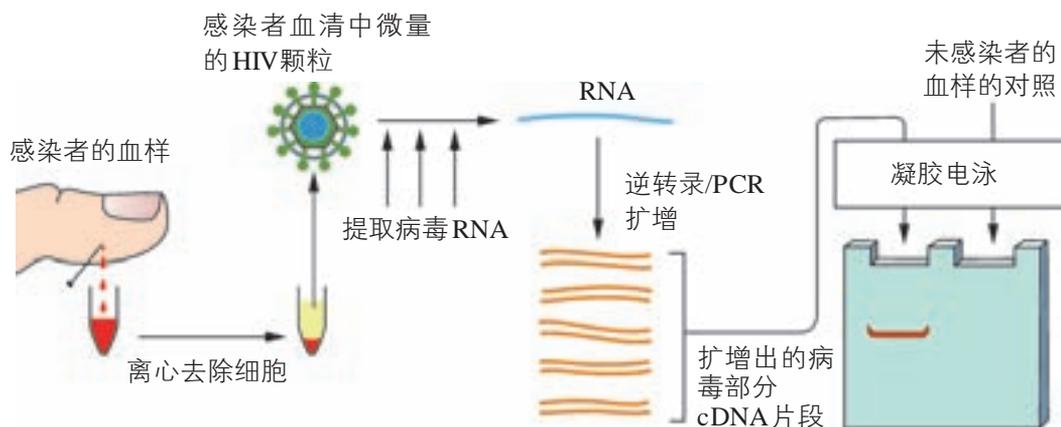


图 4-35 运用 PCR 技术检测血液中是否存在 HIV 病毒基因组

目前，人们运用 PCR 并结合其他技术，不仅可以在患者未发病，甚至出生前就能确诊其是否患有镰刀形贫血症、血友病等疾病，还可以根据某些核苷酸序列的特异性差异来推测某人患阿尔茨海默病以及癌症等疾病的风险。随着基因测序技术进一步发展，有望研制出专门针对个人基因特点的药物。

第二，向患者体内导入正常基因进行基因治疗。基因治疗是指向有基因缺陷的细胞中引入正常功能的基因，以纠正或补偿基因的缺陷，从而达到治疗的目的。基因治疗主要针对一些严重威胁人类健康的遗传病，如血友病、恶性肿瘤等。基因导入细胞的过程常以修饰过的病毒为载体，如腺病毒和逆转录病毒。

1990年美国完成了世界首例重症免疫缺陷病的基因治疗。1994年，美国科学家以修饰过的腺病毒为载体，首次对一位囊性纤维病患者进行了基因治疗。1991年，我国进行了世界上首例B型血友病的基因治疗临床实验。2003年，我国食品药品监督管理局为世界首个癌症基因治疗药物颁发了新药证书——治疗恶性肿瘤的重组人p53腺病毒注射液。

虽然已经有一些运用基因治疗成功的临床实验，但是基因治疗仍面临着很多挑战。科学家要继续探索如何控制转入的基因在正确的时间和空间表达出适量的蛋白质产物，同时确保基因的插入不会影响其他基因的正常功能。

 小资料

RNA 干扰技术开辟基因治疗新天地

RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术通过向细胞或生物体内注入短的双链RNA分子诱导细胞内含有相同或相似序列的mRNA持续降解，从而阻断特定基因的表达，是一种快速、简单研究基因功能的方法。这些小RNA片段还会遗传到子代细胞中，造成可遗传的基因沉默。如图4-36所示，科学家运用RNA干扰技术研究线虫某个基因的功能，发现RNA干扰后的线虫受精卵中的雌核和雄核无法迁移到一起融合，从而推断该基因与受精卵早期发育有关。

科学家正在尝试用RNA干扰技术在肿瘤发病的各个环节进行阻断来治疗肿瘤，部分实验已获得阶段性成果。



图4-36 正常的线虫受精卵(A)和RNA干扰后的线虫受精卵(B)

第三，利用转基因生物生产基因工程药物。利用基因工程技术生产有应用价值的药物是全球发展最快的产业之一。可将相关药物基因转入动物、植物和微生物体内。转基因植物也可用于生产药物蛋白，如人血红蛋白、小儿麻痹症疫苗等；利用转基因鼠、兔、羊、猪、牛的乳腺可以生产多种转基因产品，如人凝血因子VIII、人白细胞介素-2、牛乳清蛋白等。哺乳动物的乳腺作为生物反应器生产蛋白质类药物有以下优点：乳汁可

以连续合成；频繁采集不会对动物产生危害；乳汁成分相对简单、明确，便于药物的提纯。图4-37所示的山羊转入了人抗凝血酶的基因，科学家从其乳汁中可以方便地提取人抗凝血酶，用于防止手术中血液凝固，或者治疗在血管中形成血块的罕见遗传病。大肠杆菌等微生物遗传物质简单、操作方便，可以在价格低廉的培养基中快速生长，因此，转基因微生物成为理想的合成蛋白质的分子工厂。



图4-37 转入人抗凝血酶基因的山羊(A)和含有人抗凝血酶的羊奶(B)

第四，转基因动物可为研究疾病机理提供模型。借助转基因技术，人们不仅可以获得基因、改造基因，还可以“敲除”某些基因。例如，通过在基因中插入DNA片段使该基因永久失活，再通过观察转基因生物性状变化，可以推测该基因的功能。因而转基因动物也成为研究致病机理和测试治疗方法的理想模型。例如，科学家发现敲除肠碱性磷酸酶基因的小鼠更容易发胖，从而推测该基因有“保持身材”的作用，也许不久的将来肥胖会被“根治”，如图4-38所示。

其次，应用基因工程技术进行法医鉴定，能保护受害者权益。法医鉴定包括个体识别、亲子鉴定等内容，因为涉及鉴定犯罪嫌疑人、被害人、拐卖儿童、确定遗产继承人等司法工作，是维护社会和谐稳定的重要一环。早期常通过血型或抗原-抗体杂交技术鉴定犯罪嫌疑人，这需要有大量、新鲜的样品，并且结果的特异性不强，一般只能用于排除犯罪嫌疑人，而不能指证。基因工程的崛起，为法医提供了强大的鉴定手段。



图4-38 相比于野生型小鼠(下),敲除肠碱性磷酸酶基因的小鼠(上)更容易发胖

除了同卵双胞胎外，我们每个人都拥有自己独特的DNA。经过限制酶剪切、电泳、与标记的探针进行核酸分子杂交，得到的图谱也是特异的，就像人的指纹一样，所以科学家称之为DNA指纹（DNA fingerprint）。图4-39中1~9号DNA指纹来自9个没有血缘关系的人，而10~11号DNA指纹来自一对双胞胎。从1988年DNA技术应用于法医鉴定以来，鉴定方法的特异性随着技术的改进不断增强。随着PCR技术的引入，20个细胞的DNA经过扩增就足够用于鉴定，因此，几滴血或是一根头发上的毛囊细胞都可以成为指证犯罪嫌疑人或进行亲子鉴定的重要证据。

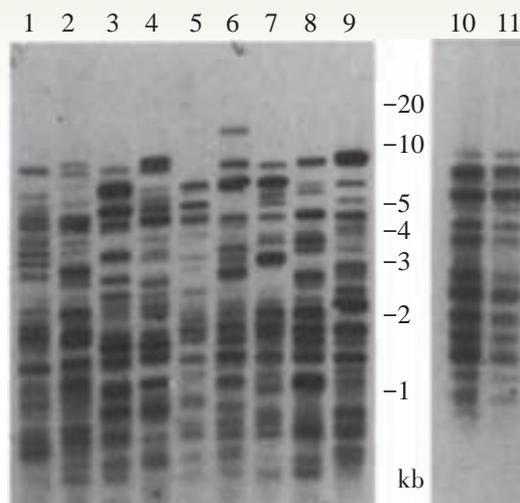


图4-39 DNA指纹

我国的法医曾通过分析犯罪现场遗留的DNA成功拘捕了20余年前谋杀案的犯罪嫌疑人。美国1992年启动的无罪工程（the Innocence Project）也通过DNA鉴定技术帮助无辜的犯罪嫌疑人洗脱罪名。截止到2016年9月，无罪工程已成功帮助344名无辜“犯罪嫌疑人”免罪，其中包括20名“死刑犯”，他们平均含冤入狱的时间为14年。

此外，应用基因工程可培育具有优良性状的农牧业品种。通过基因工程，很多农作物在抗虫、抗病、抗逆、产品的品质等方面不断被改良。如图4-40所示，我国自主研发将苏云金芽孢杆菌Bt毒蛋白基因转入棉花，培育出抗虫棉。当棉铃虫等害虫吞噬抗虫棉后，Bt毒蛋白在害虫的肠道中会被蛋白酶水解成小的有毒片段，结合于肠细胞表面受体，破坏细胞，最终造成害虫死亡；将鱼的抗冻蛋白基因导入番茄中可提高其抗寒能力；将抗除草剂草甘膦的基因转到烟草、番茄、马铃薯等植物中，以便在喷洒草甘膦时杀死田间杂草而不损伤作物；向番茄中导入相关基因，阻碍与乙烯生成相关的酶的合成，获得的转基因番茄的乙烯含量远远低于普通番茄，延长了保存期，便于长途运输。



图4-40 我国自主研发的抗虫棉(左)与普通棉花(右)比较

获得生长快、体型大、性状优良的转基因动物一直是研究的热点。例如，将来自大肠杆菌中编码丝氨酸转乙酰酶和乙酰丝氨酸硫氢化酶的基因转入羊中，获得的转基因羊能够利用胃中的硫化氢合成半胱氨酸，提高羊毛产量。转入乳糖酶基因的奶牛产出的牛奶，则受到乳糖过敏或消化不良的人群的欢迎。

最后，基因工程技术可用于保护生

态环境。自然条件下，有些微生物具有采矿或分解有毒污染物的宝贵能力，科学家将这些微生物的基因进行改造，获得了拥有珍贵性状并易于培养的转基因工程菌。有的工程菌能够摄取环境中的铜、铅等重金属，并在体内转化为硫酸铜、硫酸铅等易于提取的化合物，在矿产日益枯竭的今天意义重大；有的工程菌能够降解氯化烃和其他有毒的化合物，处理石油泄漏污染问题。



小资料

运用基因工程构建最小基因组——合成细胞的诞生

2010年，文特尔（John Craig Venter, 1946— ）及其团队设计创造了有史以来第一个合成细胞，即这些细胞完全由人工合成的拥有582970个碱基对的生殖支原体基因组控制。合成细胞的构建主要包括如下环节（图4-41A）：①运用化学合成法合成、组装、扩增DNA片段；②将合成的DNA片段导入酵母菌中，进一步组装出完整的生殖支原体基因组并克隆；③提取完整的生殖支原体基因组并导入受体细胞山羊支原体中，然后去除受体细胞原本的基因组。该细胞就是轰动科学界的人工细胞，被命名为合成体（synthia）（图4-41B）。文特尔团队的工作开创了一门崭新的学科——合成生物学（synthetic biology）。而后，科学家在最初的一代合成体基础上不断精简基因。2016年3月25日，该团队发表的三代合成体的基因组长度约为531kbp（千碱基对），比已知自然界中

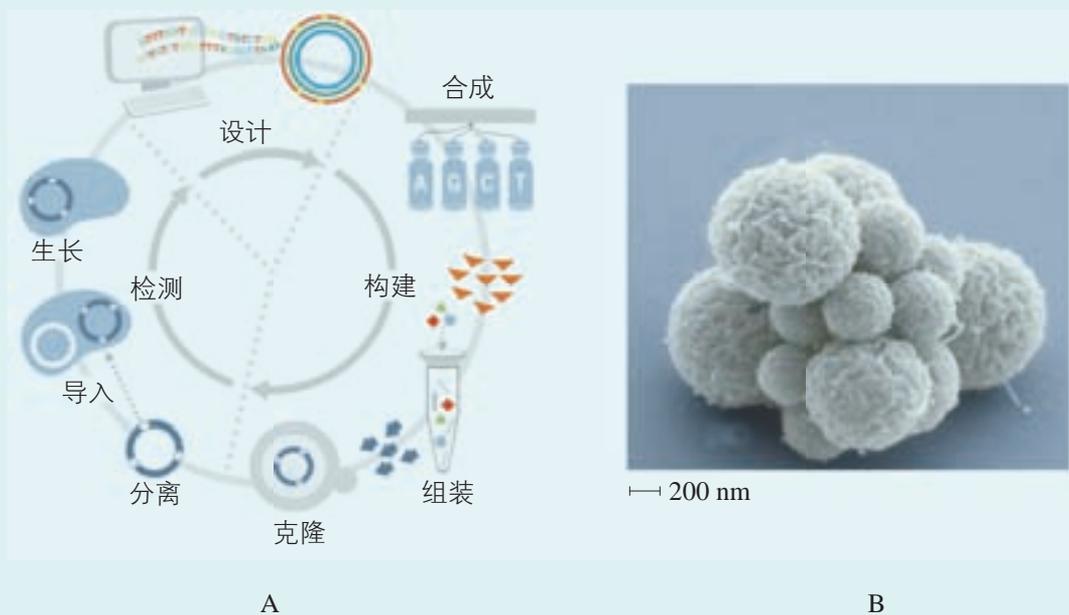


图4-41 通过“设计—构建—检测”循环创造出三代合成体(A)
大小各异的三代合成体细胞(B)

存在的最小细菌基因组（生殖支原体，约580kb）还要小，仅含有473个基因，其中149个基因的功能仍未知，但是如果删掉这些序列，支原体就不能维持正常生长。科学家希望通过构建能够维持细胞生命的最小基因组来探索生命的核心基因。文特尔团队还计划在最小基因组上添加不同的基因，获得能够产生燃料的细菌或清除工业废弃物的细菌。

蛋白质工程是基因工程的延伸

运用基因工程技术将外源目的基因导入受体细胞后，目的基因的表达结果有时并不理想，合成的蛋白质不能很好地行使功能，无法满足人们的需求。这是因为蛋白质的结构与功能是进化的结果，与特定的物种相适应。例如，科学家将人体内的抗病毒糖蛋白 β -干扰素cDNA导入大肠杆菌中并进行表达，尽管获得了大量的蛋白质，但多数蛋白质形成了二聚体，总体抗病毒活性只有天然蛋白的10%。这是因为 β -干扰素在第17、31、141位上有3个半胱氨酸，第31位和第141位的半胱氨酸形成了二硫键，剩下的第17位半胱氨酸则容易与另外一个干扰素分子的半胱氨酸形成二硫键。而在人体内，由于有其他的分子辅助， β -干扰素不会形成二聚体。因为改变蛋白质中的氨基酸序列可改变蛋白质的结构，进而改变其功能，因此，替换掉第17位的半胱氨酸成为研究的目标。

20世纪60年代，“中心法则”揭示出生物大分子间遗传信息遵循的规律，科学家意识到有可能在基因层面对蛋白质的氨基酸序列进行精确调控，即通过设计和改造编码蛋白质的基因，从而改变氨基酸序列，最终获得特定功能的蛋白质。在基因工程的基础上，蛋白质工程诞生了。在干扰素的研究中，科学家通过基因工程技术将 β -干扰素第17位半胱氨酸密码子对应的cDNA改为了丝氨酸密码子对应的cDNA，表达出的蛋白质不再形成二聚体，活性与天然蛋白相似而且稳定性更高。

蛋白质工程首先要建立蛋白质功能与结构的联系，然后依据所需蛋白质的功能，设计改造天然蛋白质的空间结构，推测出其氨基酸的序列，并根据“中心法则”逆推出基因的核苷酸序列，进而利用基因工程技术改变DNA上特定位点的核苷酸序列，最终将改造了的基因导入受体细胞后进行表达。可见，蛋白质工程是通过设计和改造编码蛋白质的基因获得特定功能的蛋白质。



小资料

运用PCR技术可以改变目的基因上特定位点的核苷酸

设计并合成诱变引物，该引物特定位点的碱基与模板上的碱基不互补配对，但是其余大多数碱基与模板能够配对。因此在适当的条件下，仍可以进行PCR。克隆出的PCR产物相应位点的核苷酸序列与模板不同，从而表达出的蛋白质特定位点的氨基酸有所不同。

以测序为基础建立的基因数据库是人类共有的财富

2003年人类基因组计划测序完成，这个由多个国家参与、历时十余年、投资巨大的项目是人类历史上的一个里程碑式的成就，我国也参与其中并做出很大的贡献。在那之后，基因测序技术不断发展，不仅速度越来越快，而且成本也越来越低。科学家正在研究的测序技术有望把人类基因组测序的时间压缩到6个小时，成本缩减到900美元。

测序技术的发展使得人类获得了海量的生物数据。为了能够有效地储存并解读这些数据，多个国家和机构建立了庞大的生物信息数据库。数据库信息不仅通过互联网共享，还定期交换数据进行更新。现在通过访问互联网，任何人都可以方便地检索出需要的信息。科学家也能通过比对核酸或蛋白质的序列重新审视生命进化的历程，深度解码个人的遗传信息。因此，在测序技术的推动下和生物信息技术的支持下，基因工程也以崭新的姿态迈入了大数据时代。



课外读

提供基因表达数据的诊断方法——基因芯片

20世纪90年代，科学家发明了基因芯片 (gene chip)，可以一次检测上千种基因的表达。

基因芯片是一块固定着大量化学合成DNA单链的基片 (图4-42)，DNA单链的序列和位置均已知。每条DNA单链一般有20多个核苷酸，相当于一个探针。在1.28 cm×1.28 cm的面积上可以微缩30万个DNA单链。检测的简要过程是：提取细胞中的mRNA，逆转录生成cDNA。用荧光标记cDNA后，使其与

基因芯片进行核酸分子杂交。洗脱未结合的cDNA，再用自动化显微镜扫描荧光。根据芯片上固定的待检cDNA单链的位置和序列，使用计算机推算出所转录的mRNA种类。

基因芯片已经广泛地用于科学研究和临床诊断，特别是能够快速区分癌细胞的种类，有助于医生选择合适的治疗方案。



图4-42 基因芯片

思考与练习

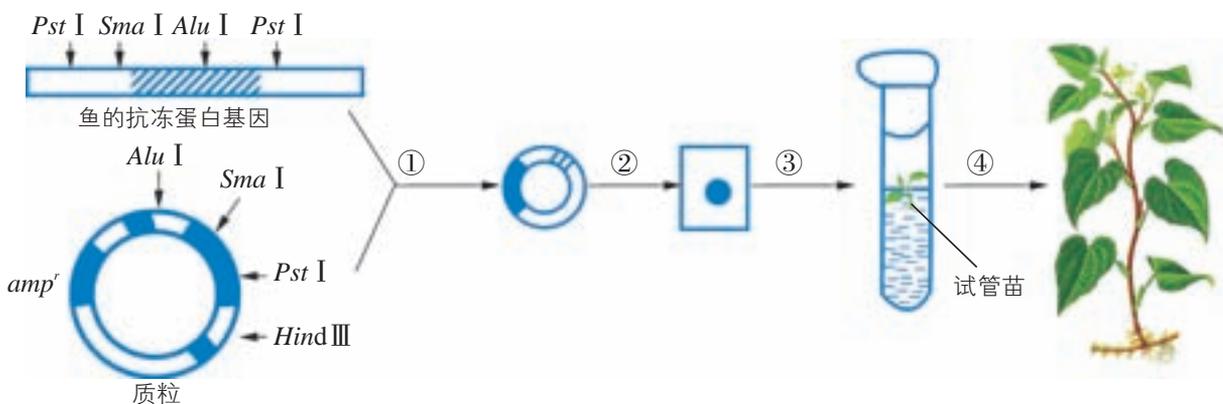
一、选择题

1. 下列关于蛋白质工程的叙述，错误的是（ ）

- A. 基因工程是蛋白质工程的关键技术
- B. 蛋白质工程是对蛋白质分子的直接改造
- C. 蛋白质工程获取的是自然界不存在的蛋白质
- D. 实施蛋白质工程的前提条件是了解蛋白质结构和功能的关系

2. 下图为转基因抗冻番茄培育过程的示意图（其中 amp^r 为抗氨苄青霉素基因）。

下列叙述错误的是（ ）



- A. 过程④中可利用目的基因作为探针对植株进行筛选
- B. 可同时选用限制酶 Pst I、 Sma I 对含目的基因的DNA进行剪切
- C. 过程②可采用农杆菌转化法将含目的基因的表达载体导入受体细胞
- D. 质粒上的抗性基因有利于筛选含目的基因的细胞和促进目的基因的表达

3. 科学家为提高玉米中赖氨酸含量，计划将天冬氨酸激酶的第352位的苏氨酸变

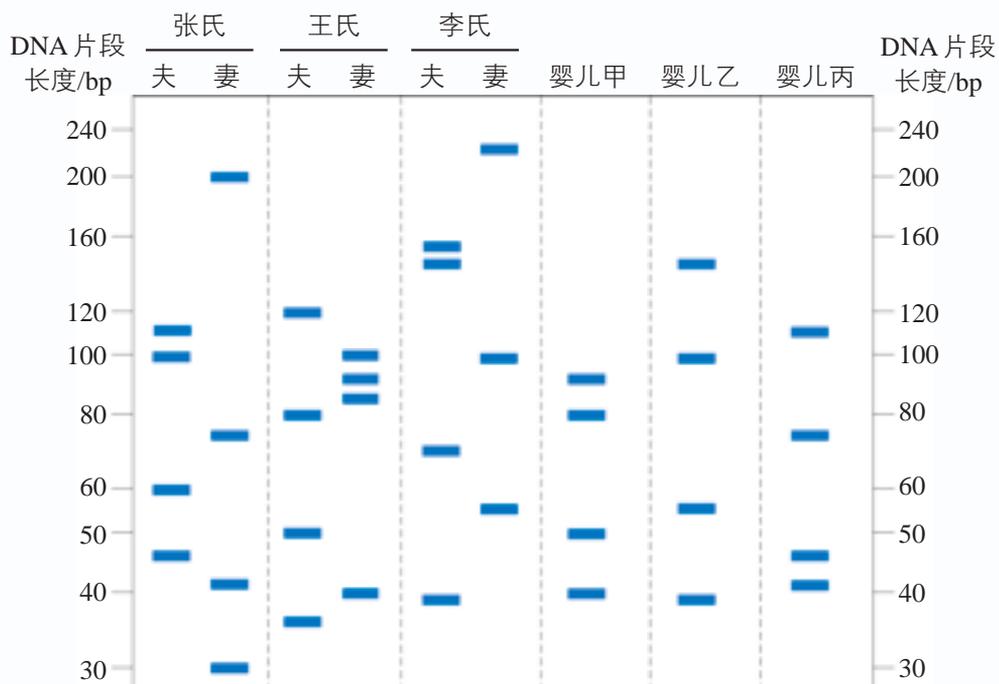
成异亮氨酸，将二氢吡啶二羧酸合成酶中第104位的氨基酸由天冬氨酸变成异亮氨酸。为此，操作正确的是（ ）

- A. 直接改造上述两种蛋白质的空间结构
- B. 对指导上述两种酶蛋白合成的mRNA进行改造
- C. 利用诱变育种技术促使上述两种酶蛋白的基因突变
- D. 利用基因工程技术对控制上述两种酶蛋白的基因进行改造

二、简答题

1. 强直性肌营养不良（MD）症是成年人肌营养不良症中最普遍的一种，约每8000人中有1人患病。该疾病的特征是渐进性肌肉退化，由基因突变引起。该基因的正常基因含有5~30个CAG重复拷贝，突变MD等位基因含有50~2000个CAG重复拷贝。现已知MD正常基因和突变基因的全部序列，请设计一个检测方案用于诊断胎儿细胞的基因组DNA中是否存在突变的MD基因。

2. 基因工程中的DNA指纹技术是鉴定亲缘关系的一种重要手段。因为子女的每对同源染色体中，各含有从父母那里获得的一份拷贝，所以在进行指纹比较时，子女DNA指纹中的所有条带应是双亲DNA指纹条带的组合。下图为用于亲子鉴定的DNA分型示意图。



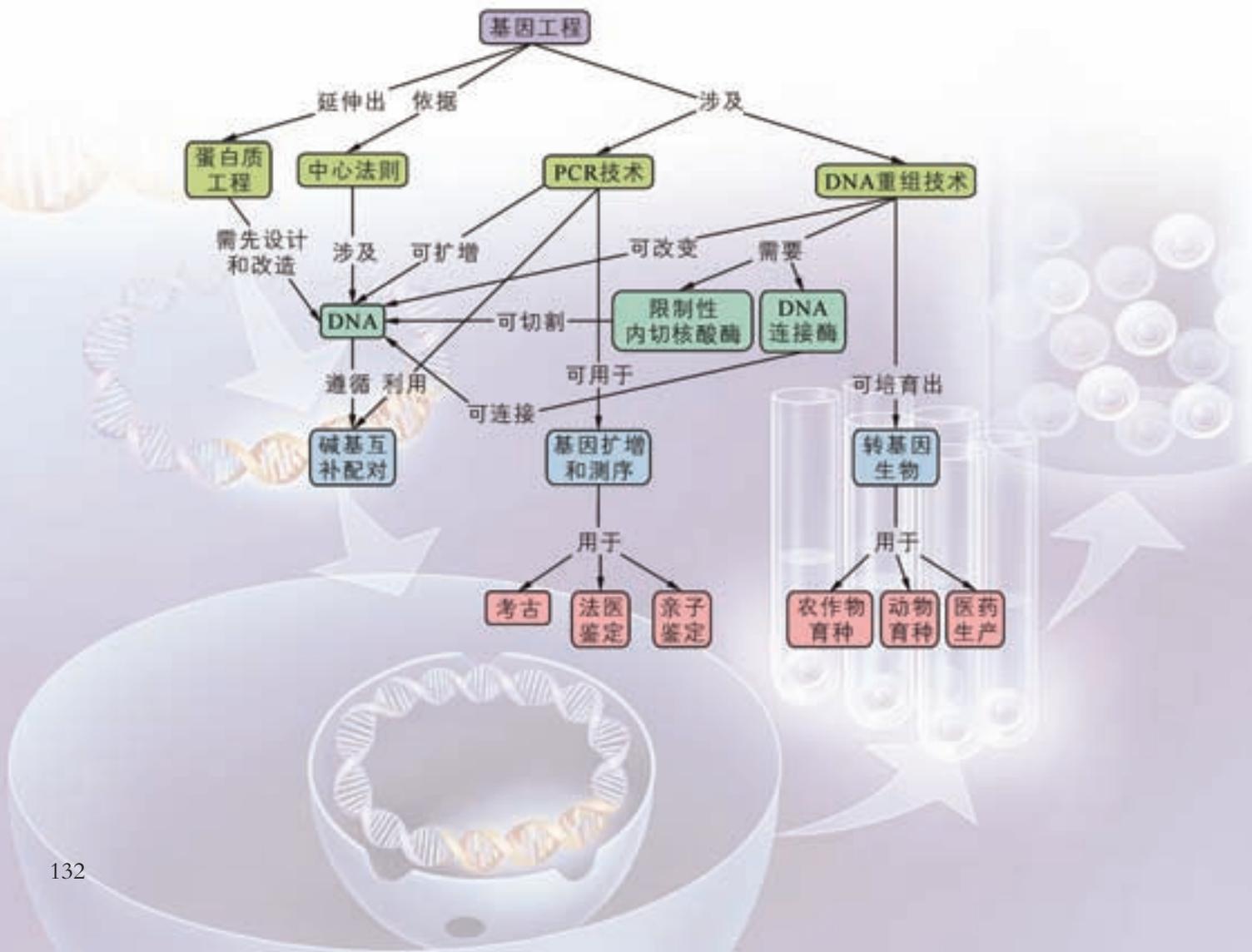
请判断甲、乙、丙婴儿的父母分别是哪一对夫妻？

本章小结

基因工程涉及DNA重组和PCR等技术，其延伸工程是蛋白质工程。构建重组DNA分子是基因工程的核心，PCR技术可实现对片段DNA的扩增，蛋白质工程在基因水平上实现对蛋白质氨基酸序列的改造。基因工程及其延伸的蛋白质工程，可进行基因扩增、测序，或培育出转基因生物，在考古、法医鉴定、亲子鉴定、农作物育种、动物育种或医药生产等多个领域具有广泛应用，有助于实现人类生活品质的提升。

本章内容指向“结构与功能观”的形成与应用。DNA是遗传物质，具有双螺旋结构，可依据碱基互补配对进行半保留复制，经过转录形成RNA分子进一步翻译为由氨基酸序列构成的蛋白质，进而决定其功能。基因工程及其延伸的蛋白质工程正是基于中心法则，根据人类的需要改造基因，进而改变氨基酸序列，生产出目标蛋白。这需要根据不同的工程需求，设计出合理的实践方案，以实现基因的扩增、测序，获得所需的蛋白质。在这一过程中会遇到与基因工程相关的社会议题，应运用相关认识和科学思维方法，基于事实和证据展开探讨、审视或论证，进而做出理性解释和判断。

本章知识结构图



第五章

生物技术的安全与伦理



转基因大豆

草甘膦作为常用的除草剂会把普通大豆植株与杂草一起杀死。20世纪80年代，孟山都公司研究人员从矮牵牛中克隆获得了草甘膦抗性基因，并将该基因导入大豆基因组中，进而培育出抗草甘膦大豆品种。这种转基因大豆于1994年被美国食品与药品管理局（FDA）批准，较早成为商业化大规模生产的转基因作物之一。随着转基因作物的推广，人们开始担心转基因的安全性以及转基因食品是否危及人类健康的问题，但科学界的共识是转基因作物的安全性是可以保证的。那么，关于“转基因”的争议，你是怎样思考的呢？



当代生命科学之所以成为世界自然科学的热点和重点，主要有两方面的原因：第一，分子生物学的突破性成就，使生命科学在自然科学中的地位发生变化；第二，生物技术（biotechnology）为人类生活带来了巨大的变化，就像炸药的研制成功和原子能科学的发展那样，生物技术也可能成为一把“双刃剑”。

学习目标

1. 举例说出日常生活中的转基因产品，探讨转基因技术在应用过程中带来的影响。
2. 举例说出生殖性克隆人面临的伦理问题，分析说明我国为什么不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验。
3. 举例说明历史上生物武器对人类造成了严重的威胁与伤害，认同我国反对生物武器及其技术和设备的扩散。

本章学习应聚焦的关键能力

1. 认识收集信息、归纳概括是审视生物学社会议题的重要方法，尝试收集“转基因食品是否安全”的文献资料，学会收集信息、归纳概括的基本方法，并关注生物学社会议题。
2. 通过收集关于设计试管婴儿的资料，尝试小组讨论“是否支持设计试管婴儿”，学会收集信息、归纳概括的基本方法，并关注生物学社会议题。
3. 通过收集历史上使用生物武器的资料，尝试分析其造成严重危害，学会收集信息、归纳概括的基本方法，并关注生物学社会议题。

第一节 转基因产品的安全性引发社会的广泛关注

人们正在意识到，“转基因”离我们的生活越来越近。我们吃的食物，我们穿的衣服，我们为了预防疾病而接种的疫苗……都有可能是转基因的产品。正因为如此，在享受着“转基因”给我们的生活带来便利的同时，转基因生物及其相关产品的安全性问题也引起了人们的重视。那么，什么是转基因生物？什么是转基因产品？如何理性看待转基因技术的应用？

本·节·要·点

- 转基因生物
- 转基因食品
- 转基因技术的安全性

转基因产品已经进入人们的日常生活

转基因生物（genetically modified organism, GMO）是指含有重组DNA的生物。我们平时常说的转基因食品（genetically modified food, GMF）就是转基因生物本身或其加工产品，它可来自转基因的植物、动物、微生物等。现阶段的转基因食品主要来自转基因作物（genetically modified crops）。

自1985年第一种转基因作物——转基因烟草问世后，转基因作物以迅猛的势头发展起来。1986年，抗除草剂烟草获得成功；1994年，美国批准第一个转基因作物产品——延熟保鲜转基因番茄进入市场；2000年，全球种植转基因作物达4420万 hm^2 ，创造经济效益达30亿美元。

转基因作物的大本营在美洲。2000年，仅在美国，转基因作物的种植面积就占全世界转基因作物种植面积的70%，而且每年都在不断增加（图5-1）。若再加上加拿大和阿根廷，这三个国家的转基因作物种植面积占全世界的98%。同一年，我国转基因抗虫棉的推广面积达 $3.7 \times 10^5 \text{hm}^2$ ，防治棉花害虫农药用量明显减少。

转基因作物之所以能在全球迅速推广种植，是因为种植转基因作物给农民带来了巨大利益，甚至改变了他们的命运。例如，转基因抗虫玉米抵抗住了玉米螟的危害，而这种害虫曾经造成美国玉米种植者每年超过10亿美元的损失。当我国华北地区的棉农面对棉红铃虫的危害束手无策，几乎陷入绝望之时，转基因抗虫棉的出现使他们走出了困境，挽救了当地的棉花种植业。目前，世界上已经有超过15个国家使用转基因

作物生产转基因食品。

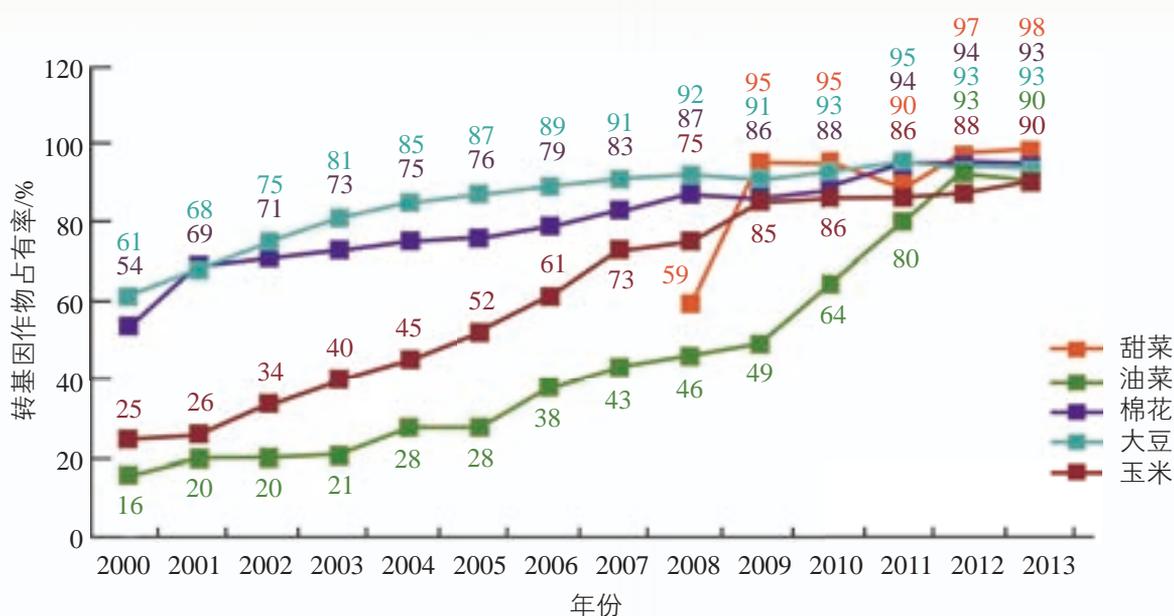


图5-1 美国转基因作物占有率

注:油菜占有率是根据全球数据而不是美国数据。
来源:ISAAA(国际农业生物技术应用服务组织)。

此外，转入生长激素基因的转基因猪和转基因鱼的问世，有效地提高了养猪业和渔业的产量。

转基因技术除了在食品和农业方面发挥重要作用外，在健康、医学以及环境保护方面也做出了积极的贡献。

一些转基因农作物产品像黄金米、日本健稻和含疫苗的马铃薯、防腹泻的蔬菜等，正以增进人类健康为目的而发展起来，如黄金米含有较多的β-胡萝卜素，它对于缺乏维生素A的人非常有益。

尝试将人体内制造有用蛋白质的基因转移至绵羊或母牛体内，并在乳汁中实现表达已经取得成功，利用它们能生产治疗血友病的凝血因子IX。此外，运用基因工程菌生产的基因工程药物如生长激素，在治疗侏儒症等疾病方面发挥着重要作用。

泄漏的原油和废弃的石油注入海洋，对所有生物的安全构成威胁。这些污染物可以通过生物降解将其消除，但生物降解是缓慢地发生在细菌和其他微生物体内的自然过程，它们虽然能够将石油分解为无害的分子，但需要较长时间。针对这一棘手问题，科学家采用转基因手段创造出了能同时分解多种烃类的细菌，这种被称为“超级菌”的生物可以帮助我们有效、迅速地分解石油，为环境保护开辟了一条全新的道路(图5-2)。



图 5-2 各种转基因生物

理性看待转基因技术的应用

随着转基因产品进入我们日常生活的方方面面，转基因技术的安全性问题也引起了人们的关注（图5-3）。



图5-3 转基因技术的安全性引发了人们的思考和关注

由于科学发展水平的限制，目前科学家对基因结构、基因间的相互作用以及基因的调控机制等都了解得相当有限，再加上转移的基因虽然是功能已知的基因，但不少是异种生物的基因。同时，外源基因插入宿主基因组的部位往往是随机的，因此在转基因生物中，有时候会出现一些人们意想不到的情况。这一切令环保人士忧心忡忡，在全世界引发了激烈的争论，争论的关键问题有两个：一是转基因食品的安全性，二是转基因作物的环境安全性。

转基因食品的安全性尤其令人关注。人们除了担心转入的外源基因或基因产物是否对人畜有毒外，还对转入了控制过敏源基因的植物产品是否会对过敏人群造成不利影响颇有顾虑。美国内布拉斯加大学的一个研究小组将巴西坚果中富含蛋氨酸的蛋白质基因转入大豆，结果发现这种转基因大豆汁对人的皮肤有刺激作用，可诱发强烈的过敏反应。在这之后，科学家就不再种植这种转基因大豆了。

转基因作物的环境安全性同样也是一个非常重要的问题。转基因作物的环境安全性主要体现在以下两个方面：

第一，由于导入新的外源基因，转基因作物获得或增强了生存竞争和繁殖能力，使其在很多方面都强于亲本或野生种。若被推广种植，这些转基因作物释放在自然环境中的机会就特别大，因其具有野生种所没有的各种抗性，将会迅速地成为新的优势种群，进而也可能变为“杂草”，影响生态平衡。例如，加拿大商业化种植具有抗除草剂及自播种特性的转基因油菜，仅几年后，便在农田中发现了对多种除草剂具有耐抗性的杂草化油菜植株。据专家预言，这种杂草化的转基因油菜，将可能成为加拿大草原地区危害最为严重的野草。杂草化的转基因作物作为外来品种进入自然生态系统，因具有较强“选择优势”，可能会影响植物基因库的遗传结构，淘汰原来栖息地上的物种及其他遗传资源，致使物种呈单一化趋势，造成生物数量剧减，甚至会使原有物种灭绝，导致生物多样性受到严重影响。

第二，在自然条件下，栽培作物种内、栽培作物与其近缘野生种间、栽培作物和杂草之间都有可能发生基因漂移，即转入的基因可能会从转基因植物的体内扩散到环境中。转基因作物中的一些抗除草剂、抗杀虫剂和抗病毒的抗性基因就有可能通过花粉杂交等途径向其同种或近缘野生种转移（图5-4），使其获得转基因生物体的抗性特征，成为对其他作物构成严重威胁的“超级杂草”。转基因抗虫作物长期、大规模种植，再加上“超级杂草”的产生，会对目标害虫和非目标害虫起到选择的作用，从而可能导致侵染力和致病性更强的“超级害虫”出现，对生态环境造成更大的危害。有研究表明，转Bt基因抗虫棉对第一、第二代棉铃虫有很好的抵抗作用，但第三代、第四代棉铃虫已对该转基因棉产生了抗性。

转基因产品既具有潜在的巨大经济效益，也可能存在一定的风险性，因此，如何理性看待转基因技术的应用，怎样才能达到人类趋利避害的目标已是当务之急。随着对转基因生物认识的逐步深入，人们从一开始的恐惧和极其严格的限制，逐渐认识到



图5-4 基因漂移

可以通过科学的检测和管理，控制转基因生物可能带来的负面影响。

建立合理的风险评价原则是科学管理的基础，科学家以及各国政府和国际组织都在积极努力，希望找到既能确保安全，又能研究、开发和利用好转基因技术的适用原则。目前，各国政府和科学家均制定了符合科学道理、适合各国国情的法律和法规，每一例转基因产品在准予商业化生产之前都必须经过严格的检测和审批。

对转基因生物的管理大体上可以分为三类：第一类是以美国、加拿大等转基因产品生产和出口大国为代表，认为转基因产品的安全性与传统生物技术没有本质区别，管理应针对生物技术产品，而不是生物技术本身。美国政府从1983年起就设立专项研究基金，对转基因植物等生物技术产品的生物安全研究给予持续、重点的支持。第二类是以欧盟及其成员国为代表，认为转基因技术本身具有潜在的危险性，只要与转基因相关的活动，都应进行安全性评价并接受管理。欧盟对于转基因植物的管理是非常严格的，其对转基因产品管理的原则是，认为转基因技术这一制造转基因食品的方法在本质上是不安全的，因此不论一种食品是否符合安全标准，只要它是通过转基因技术制造的，都必须通过严格的管制。2002年欧盟《新食品法》规定，如果经基因工程修饰使得新食品或食品成分不再等同于已经上市的食品，则应对该基因工程食品加贴特殊标签。第三类介于两者之间，对生物安全问题始终给予密切关注和高度重视，并陆续出台了一些政策、法规，我国就属于这一类。我国在高度重视转基因技术研发的同时，也十分重视转基因农作物的安全性评价和管理。我国早在1993年就颁布了《基因工程安全管理办法》，为转基因生物安全管理提供了基本框架。根据这一基本框架，农业部于1996年颁布了《农业生物基因工程安全管理实施办法》，1997年又发布了《关于贯彻执行〈农业生物基因工程安全管理实施办法〉的通知》，并于同年成



图5-5 《农业转基因生物安全管理条例及其配套规定》

立了农业生物基因工程安全委员会和农业生物基因工程安全管理办公室。2001年国务院颁布了《农业转基因生物安全管理条例》，2002年1月5日，农业部发布了《农业转基因生物进口安全管理办法》《农业转基因生物标识管理办法》《农业转基因生物安全评价管理方法》等配套规定（图5-5），使得我国对转基因生物的安全管理更加完善具体。2015年10月1日开始实施的《中华人民共和国食品安全法》也对转基因食品的安全管理做了明确的规定。这些政策、法规的颁布与实施使我国基因安全管理开始纳入依法行政的轨道，也给其他发展中国家提供了有益借鉴。

目前，围绕基因工程技术及其产品引发的争论，并不仅仅是基因工程技术发展过程中的独有现象，纵观历史上科学技术的产生与发展过程，不难发现，任何新技术的形成与发展都不可避免地要受到社会因素的影响。社会需求引导了它的出现，社会生产、生活中的应用推动了它的发展，不同社会意识形态之间相互斗争的结果决定了它的发展方向，这一过程并不是事先可以预测的。应当看到，基因工程技术及其产品具有较大的社会需求，它被人们寄予了缓解饥饿与贫穷的期待，也凝聚着人们改善生活质量、提高生活水平的美好憧憬，这就是它赖以存在与发展的意义。若害怕以基因工程技术为主的生物技术研究可能带来的负面效应而禁止其发展，就很可能使本国蒙受巨大损失，甚至在国际竞争中败下阵来。对于任何一项科学技术，零风险是不存在的，也不可能绝对安全，因噎废食、无所作为或许才是最大的风险。



活动

收集文献资料，就“转基因食品是否安全”展开辩论

科学技术就像一把双刃剑。与火药、核能等许多重大发明一样，转基因技术在造福人类的同时，也可能带来潜在的负面影响。

目的要求

请利用图书馆和互联网收集有关“转基因食品是否安全”的资料。

活动提示

每位同学收集资料后，提出自己的观点，并展开辩论。

讨 论

1. 思考你的观点与对方观点是否完全对立？
2. 你会选择转基因食品吗？
3. 通过查阅资料，了解我国为保证转基因食品的安全性，都采取了哪些监控和预防措施。试想你自己就是未来我国转基因食品安全政策法规的制定者，请提出你的意见和建议。

思考与练习

一、选择题

1. 下列属于转基因生物引起食品安全问题的证据的是（ ）
 - A. 世界上数以亿计的人口食用转基因农作物
 - B. 转基因产品经过了多环节、严谨的安全性评价
 - C. 转基因生物合成的营养物质与天然品种没有差别
 - D. 转基因生物合成的某些蛋白质可能对某些人造成过敏反应
2. 有人说：“转基因生物所转移的只是一种自然界中已经存在的外源基因，它并不会改变生物原有的分类地位，充其量只能说是具有某种新特征的同一种物种。”上述说法中是否是“同一物种”，关键应该看转基因生物与原来的生物是否具有（ ）
 - A. 生殖能力
 - B. 地理隔离
 - C. 生殖隔离
 - D. 能否杂交

二、简答题

在一次关于转基因食品是否安全的辩论会上，有辩论者这样说：“当不同的利益集团为了各自的利益各抒己见、夸夸其谈时，当一些农产品富裕国意欲阻止或延缓转基因技术前进的脚步时，世界上那些在温饱线上挣扎、在营养不良中受煎熬的人却对转基因食品这项极具潜力的新技术寄予了希望。”他们认为，转基因食品并不比传统食品有更多的风险，饥饿与贫穷才是最大的敌人，生存才是首要问题。你如何理解这段话的含义？

第二节 我国禁止生殖性克隆人

本节要点

- 生殖性克隆人
- 治疗性克隆
- 生命伦理学

2001年4月初，一条爆炸性新闻轰动了全世界：“意大利医生安蒂诺里（Severino Antinori）要克隆人了！”这条消息不但使各国的科学家感到震惊，而且还引起了各国政府的恐慌。科学家感到震惊的是，在当前克隆技术远未达到一定水平的时候，安蒂诺里竟敢用人来做此实验，真是“科学狂人”；而各国政府担心的是，一旦克隆人出生，将引发一系列的社会伦理

道德和法律方面的问题，使社会增加许多不稳定因素，这怎么得了！于是，全世界反对克隆人的呼声一浪高过一浪。为此，6个欧洲国家还制定了“禁止克隆人”的法律，将克隆人视为非法行为。那么，什么是克隆人？为什么禁止生殖性克隆人？

生殖性克隆人面临诸多伦理问题

其实，克隆人和克隆动物在技术上是同样的，人类已经克隆出了羊、牛、猴等高等动物，为什么不可以克隆人呢？正是这种想法使得安蒂诺里有了“克隆人计划”。但是，安蒂诺里忽视了这样一个事实：人类对动物的克隆技术还未成熟，成功率还很低。例如，英国科学家在克隆羊的实验中，总共用了277个卵细胞，只获得了13个胚胎，最后只克隆出一只羊，这就是大家都熟悉的“多莉”。真正的科学实验具有可重复性，但生产“多莉”的研究所也难以很快用同样方法获得第二只克隆羊；同时，“多莉”只存活了几年，它死前在遗传、生理方面表现出许多衰老特征，留下了大量尚待研究解决的问题；除此之外，克隆的动物在遗传上是完全相同的，一种特定病毒或其他病原体的感染，可能带来严重灾难。以上这些问题不解决就盲目地克隆人，不但违背了科学原则，而且也是对人类社会的不负责任。如果在克隆人的过程中出现了大量有缺陷的个体，“他们”是否会给社会造成极大的负担？如果在一个经济还不发达、法律还不健全的国家出现了一群“他们”，其生活保障由谁来负责？当其生存受到影响时，“他们”就会成为社会的不稳定因素，谁能保证“他们”不会为了生存而犯罪呢？即使以人为克隆对象的目的是为了满足不同人类的某些愿望，如将克隆人作为器官移植的备用品或替代人类进行某些不宜亲自进行的活动等，试想，被克隆的人，其生理性状

是完全受到控制的，“他们”是否具有自然人的基本人权？“他们”能否有完整正常的生活？这样一个生活在他人目的和价值下的“人”，“他们”在社会生活中的悲观心理和宿命感可能比正常生育出来的人更强烈。“他们”这种因特殊身份而产生的心理缺陷，有没有可能产生新的社会问题（图5-6）？



图5-6 克隆人问题引起了世界很多国家的关注与反对

生命科学的发展必须接受生命伦理的规范和制约，否则，生物技术就如脱缰的野马，有可能会对人类造成极大的伤害。生命伦理是指在生命科学研究和技术应用中应当遵循的道德标准。生命伦理已经成为一个国际性的问题，为唤起公众对生物技术中伦理问题的关注，人们开始对相应伦理加以规范，逐渐形成了四大原则：自主、不伤害、善行和公正。自主是指尊重人的尊严、价值，尊重实验对象，任何实验必须取得他们自愿、自行的同意。不伤害是指一种研究不能对实验人群、实验者造成伤害。善行是指生命科学要为人类造福，使每一个人都健康和幸福。公正包括资源分配的公正、利益分享的公正和风险承担的公正。这些都是生命伦理的基础原则，人们必须在这些原则的规范下进行生命科学研究。

面对生殖性克隆人所带来的诸多伦理问题，现阶段条件下，我们只能对它说“不”，因为，人类不仅要懂得应用科学，更应关心人类本身，保证让生物技术成果造福于人类。



世界各国政府对生殖性克隆人的反应

一些生物技术发达的国家，大都对生殖性克隆人采取明令禁止或者严加限制的态度。

1. 1998年1月，欧洲19个国家在法国巴黎签署了一项有关严格禁止克隆人的协议。这是国际上第一个禁止克隆人的文件。它禁止各签约国的研究机构或个人使用任何技术创造与一个活人或死人基因相似的人，否则将重罚。

2. 美国：2001年7月31日，美国国会众议院通过了一项全面禁止克隆人的法案。

3. 英国：1990年，英国通过的《人类受精和胚胎学法案》，认为克隆人类胚胎的研究是非法的。2001年11月22日，英国政府公布一项新法案，明令禁止通过克隆技术复制人类个体，即“生殖性克隆”，成为世界上第一个立法反对生殖性克隆的国家。

4. 德国：1991年德国实行《胚胎保护法》，严格禁止人类胚胎干细胞研究以及克隆胚胎干细胞。2000年11月，德国卫生部提出一项新的《生殖医学法》草案，再次强调在德国不允许进行胚胎干细胞的培育研究。

5. 意大利：2001年3月，意大利众议院批准了政府于1998年签署的加入欧洲禁止克隆人协议。

6. 日本：2000年4月14日，日本内阁会议通过关于《限制对人的克隆技术的法律》草案，禁止克隆人，违者最高将被判处5年徒刑。

我国不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验

由于克隆人可能带来复杂的后果，联合国大会法律委员会自2001年以来一直在讨论禁止生殖性克隆人的国际立法问题。由于各国在是否将治疗性克隆也列入禁止之列的问题上争执不休，该委员会2004年底决定放弃制定禁止克隆人国际公约，转而寻求通过一项不具法律约束力的政治宣言。2005年2月18日，第59届联合国大会法律委员会以71票赞成、35票反对、43票弃权的表决结果，以决议的形式通过一项政治宣言《联合国关于人的克隆宣言》，要求各国禁止有违人类尊严的任何形式

的克隆人。

中国政府坚持反对生殖性克隆、支持治疗性克隆的立场（图5-7）。

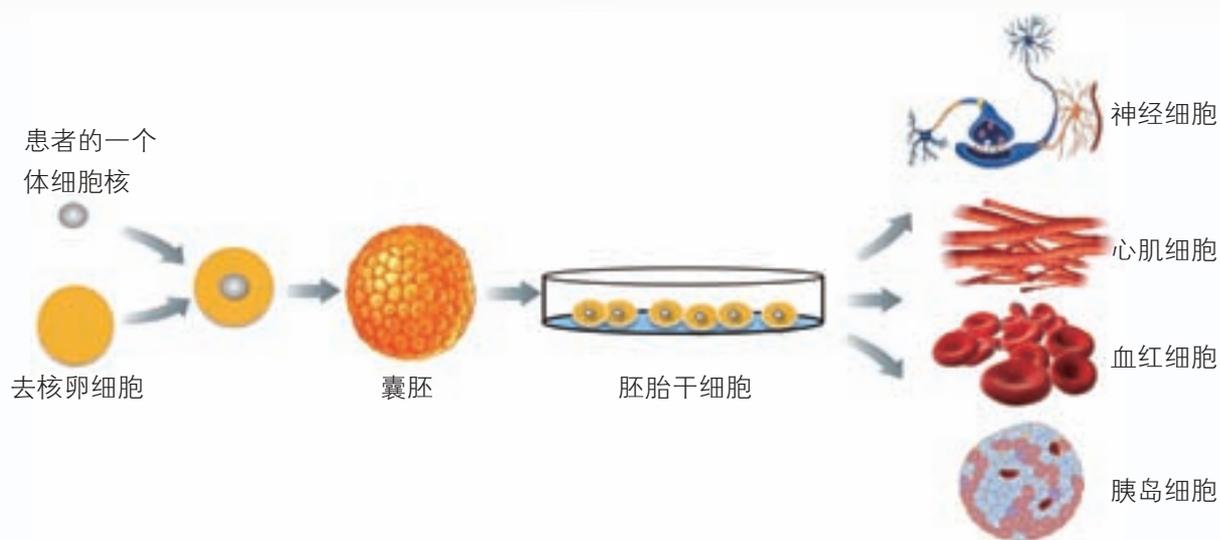


图5-7 治疗性克隆示意图



小资料

生殖性克隆与治疗性克隆

有关人类胚胎的克隆性研究主要分为两种类型：一种是生殖性克隆，即克隆人研究，就是以产生新个体为目的的克隆。用生殖技术制造完整的克隆人，目的是产生一个独立生存的个体。另一种是治疗性克隆，即从克隆胚胎中提取干细胞，然后将之培养成人们所需要的各种人体器官。其做法是先从需要救治的患者身上提取细胞，然后将该细胞的遗传物质植入一个去除了细胞核的卵细胞中，该卵细胞开始自行分裂，直至形成一个早期胚胎（若该早期胚胎被植入代孕妇女子宫中，便能发育成克隆人），从这个早期胚胎中即可提取对生命成长发育起主干作用的细胞——胚胎干细胞。胚胎干细胞经过相应的技术处理，便可发展成该患者需要的各种组织，由于再造的细胞及组织的基因与患者的基因相同，因而以前的器官移植治疗方法中经常出现的排斥反应问题便得到了彻底的解决。通过这项技术，因疾病引起的器官功能衰竭、意外事故引起的伤残等，都能得到有效的治疗与治愈。

治疗性克隆的目的是为了获得治疗所用的克隆细胞，因此不会像生殖性克隆那样产生严重的道德、伦理、社会或法律问题。在严格监管下进行的治疗性克隆研究，不仅不会损害人类尊严，相反，对挽救人类生命和增进人类健康有着广阔前景和巨大潜力。

生殖性克隆与治疗性克隆有着本质的不同。人的生殖性克隆违反人类繁衍的自然法则，损害人类作为自然人的尊严，引起严重的道德、伦理、社会和法律问题。与世界许多国家一样，中国政府已通过法律手段明令禁止人的生殖性克隆。2003年12月24日，科技部和卫生部联合下发了12条《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》，明确申明中国禁止进行生殖性克隆人的任何研究。我国不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验。



活动

收集关于设计试管婴儿的资料，在小组内讨论“是否支持设计试管婴儿”

谈到试管婴儿的诞生，容易使人联想到“克隆人”，但试管婴儿的基础是有性生殖，与“克隆人”不是一个概念。设计试管婴儿又称为治疗性试管婴儿，是指在试管婴儿技术的基础上，为确保小孩具有某些长处或者避免某些缺陷，在出生以前就对他（她）的基因构成进行了选择的那一类孩子。

目的要求

请利用图书馆和互联网收集有关设计试管婴儿的资料。

活动提示

每位同学收集资料后，在小组内讨论“是否支持设计试管婴儿”并提出自己的论点和论据。

讨论

你是否支持设计试管婴儿？请说明理由。

思考与练习

1. 试想，假如人们的长相都一样，将会给社会带来什么影响？
2. 我国政府坚持反对生殖性克隆、支持治疗性克隆的立场。在就“治疗性克隆”研究问题上，你的观点是什么？有什么证据支持你的观点？

第三节 世界范围内应全面禁止生物武器

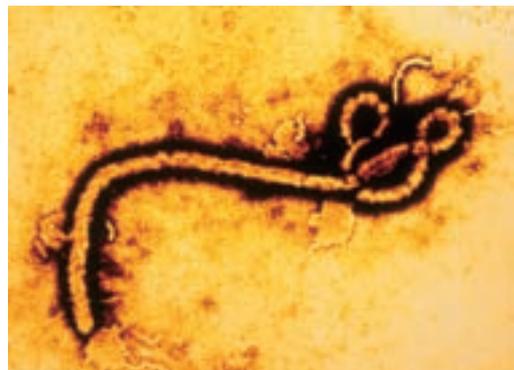
2014年，西非暴发的埃博拉出血热疫情震惊了全球。罹患此病，会出现发热、呕吐、疼痛、出血等症状，绝大多数患者最后会因失血过多、多发性器官衰竭而死去。埃博拉病毒（图5-8）是人类有史以来已知的最可怕的病毒之一，埃博拉出血热在最初流行时，几乎造成90%以上的患者死亡。有人担心，恐怖组织会利用埃博拉病毒制造生物武器，用于恐怖袭击，这样的担忧进一步加剧了国际社会的恐慌情绪。生物武器素来令人谈虎色变，在2001年“9·11”事件后，美国频频发生炭疽杆菌的袭击，导致数人死亡，曾使整个世界为之惶恐。那么，什么是生物武器？生物武器对人类有什么威胁？为什么我国反对生物武器及其技术和设备的扩散？

本·节·要·点

- 生物武器
- 生物战剂
- 《禁止生物武器公约》



A. 外形结构示意图



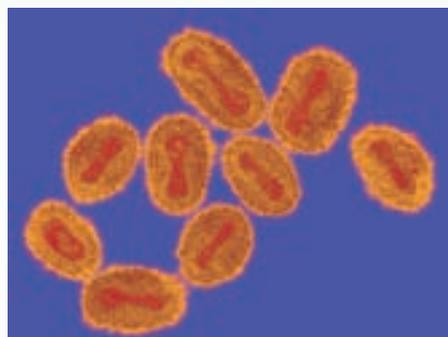
B. 电镜照片(160000×,经后期着色处理)

图5-8 埃博拉病毒

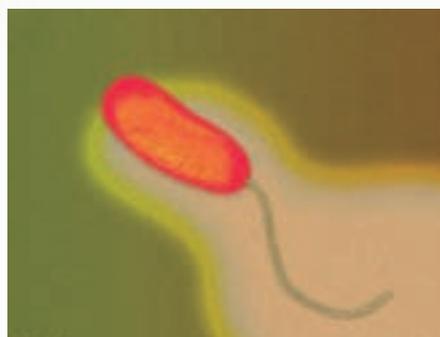
生物武器对人类造成了严重的威胁与伤害

生物武器是指有意识地利用致病微生物、毒素、昆虫侵袭敌人的军队、人口、农作物或牲畜等目标，以达到战争目的的一类武器。生物武器一般由致病微生物、毒素、昆虫以及装载它们的容器和投掷物组成，其中起伤害作用的微生物、毒素又称生

物战剂（图5-9）。



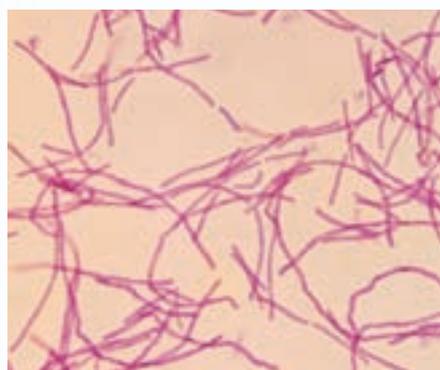
天花病毒(65000×,经后期着色处理)



霍乱弧菌(59400×,经后期着色处理)



鼠疫杆菌(1000×)



炭疽杆菌(650×)

图5-9 能充当生物战剂的病原体



小资料

生物战剂的分类

根据联合国签署的《禁止生物武器公约》（全称为《禁止发展、生产、储存细菌（生物）及毒素武器和销毁此种武器公约》），目前常规生物战剂有以下六类：

1. 细菌类生物战剂。主要有炭疽杆菌、鼠疫杆菌、霍乱弧菌、野兔热杆菌、布氏杆菌等。
2. 病毒类生物战剂。主要有黄热病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、天花病毒等。
3. 立克次体生物战剂。主要有流行性斑疹伤寒立克次体、Q热立克次体等。
4. 衣原体类生物战剂。主要有鸟疫衣原体等。
5. 毒素类生物战剂。主要有肉毒杆菌毒素、葡萄球菌毒素等。
6. 真菌类生物战剂。主要有粗球孢子菌、荚膜组织胞浆菌等。

在人类从显微镜下认识到微生物之前，人们便已经开始使用致病微生物作为自相残杀的工具。早在3000多年前，小亚细亚的赫梯王国便将染上了兔热病的绵羊放入敌对国的城池中，传染瘟疫，使得敌国的军队和民众死亡无数。在古罗马时代的战争中，攻城的一方也会将尸体、粪便和老鼠等用投石车发射到被围困的城池中，使得尸体和污物上携带的微生物引发城内瘟疫，这种手段一直持续到中世纪蒙古人进攻欧洲。几百年前，欧洲人入侵美洲时，故意向美洲土著人赠送天花患者用过的毛毯，由于美洲之前并无天花病毒，土著人对此完全没有免疫力，结果在恐怖的生物武器袭击下，美洲土著人大批死亡。

20世纪，随着生物学和医学的进一步发展，生物武器也得到了各大国的重视。第一次世界大战期间，德国就曾用间谍撒播马鼻疽杆菌及炭疽杆菌，感染协约国军队的骡马，从而削弱敌军的后勤能力。第二次世界大战期间，英国特工用手枪刺杀纳粹头目海德里希，子弹头上就掺入了肉毒素，导致这个杀人魔王感染身亡。日军的731部队更是罪恶累累，10年间用我国同胞进行活体试验，遭杀害者达3000人。第二次世界大战期间，日军在我国浙江、湖南、河南等地撒布伤寒杆菌、鼠疫杆菌和霍乱弧菌，致使霍乱流行，死者数以万计。

相对于常规武器、核武器和化学武器等，生物武器最大的特点是有传染性，这也是它最令人恐怖的一点（图5-10）。核武器固然有放射性，但这些放射性和留存量会自然减少，随着时间的推移影响也会渐渐消失。而生物武器中包含的微生物本身是会繁殖的，这意味着在一定的条件下，生物战剂可能自行增多，影响范围越来越大，感染的人越来越多。



图5-10 生物武器具有极大危险性

除此之外，生物武器的携带和投放相对简单，既不需要使用如核武器那样相对庞大和精密的机械，也不像化学试剂的储存、运输那样麻烦。极端情况下，一个人散布的一些日常物品，便可将致命的病原体带入敌方的军营和城区，使人防不胜防。而且，一些生物气溶胶可以随风飘散到较远地区，杀伤范围可能达到上千平方千米。

生物武器的研发门槛也比核武器和其他高精尖常规武器要低得多，而对于人员的杀伤力和环境的破坏力则是相当巨大的，正因为如此，生物武器被称为“穷国的原子弹”。

生物武器最可怕的一点是无差别的杀伤。只要爆发，如果防治不得力，可能造成疫情不断蔓延，不分军队和平民，对一切疫区的人无差别杀伤，而且通常平民遭受的伤害更为严重，再加上其使用门槛低，易于扩散，极有可能成为恐怖组织进行袭击的

重要工具。

由于生物武器造成危害的特殊性，生物袭击还可能导致军队和平民极大的恐慌情绪。例如，1991年海湾战争期间，由于害怕伊拉克使用生物武器和化学武器，以色列特拉维夫机场的旅客们戴上了防毒面具。这种恐慌情绪很可能使一座城市、一个地区甚至一个国家陷入混乱或瘫痪状态。可见，生物武器对人的危害不仅是身体上的，还有心理上的。

我国反对生物武器及其技术和设备的扩散

生物武器已经极大地威胁到人类的生存，因此制止生物武器在全球扩散是国际社会面临的重大挑战之一。为此，国际社会采取了一系列的措施（图5-11）。

1971年9月28日，美国、英国、苏联等12个国家联合向第26届联合国大会提出《禁止生物武器公约》草案，经联合国大会通过决议，决定推荐此公约。1972年4月10日，该公约分别在华盛顿、伦敦和莫斯科签署。1975年3月26日，公约生效。各国在自愿的基础上遵守该公约。1984年9月20日，中国决定加入此公约。1984年11月15日，中国分别向英、美、苏政府交存加入书，公约同日对中国生效。

《禁止生物武器公约》的主要内容是：缔约国在任何情况下不发展、不生产、不储存、不取得除和平用途外的微生物制剂、毒素及其武器，也不协助、鼓励或引导他国取得这类制剂、毒素及其武器；缔约国在公约生效后9个月内销毁一切这类制剂、毒素及其武器；缔约国可向联合国安理会控诉其他国家违反该公约的行为。中国坚决支持禁止生物武器的主张，奉行不发展、不生产、不储存生物武器的政策，并反对扩散生物武器。

尽管如此，世界上少数国家发展生物武器的步伐却一天也没有停止过。因此，战争狂人、恐怖集团用生物武器制造瘟疫的威胁仍不能排除，人类同传染病的斗争仍没有结束，我们不能放松警惕。生物武器尽管威胁大，杀伤力强，但如果能有完善的防护系统，也可以大大减少破坏。

现代生物武器的防护，主要包括预警体系、防控体系和疫苗库。

预警体系可以帮助我们尽早发现疫情，发现越早，控制越及时，则损失越小。预警体系既需要卫生部门和民众自身信息反馈的有效机制，也包括各种新技术的运用，如可探测悬浮生物战剂的新式雷达。

防控体系是指对已经发现的疫情进行有效的控制，减少感染，控制损失。这也包括排查传染源，使用新的抗体技术以及有效的防护服、防毒面具（图5-12），并采取措



图5-11 生物危害标识

施，紧急隔离感染人员，杀灭可能传染的鼠类、昆虫、鸟类等。

疫苗库则是要预先储备和及时更新疫苗，通过疫苗来对抗致病微生物。

我们相信，在与瘟疫的斗争中，人类也许无法取得全盘的胜利，但是能赢得一场又一场的战役，因为我们拥有最强大的武器——科学方法和现代医学技术。只要我们善用现代科学技术，避免危害，造福人类，定能将罩在人类头上的生物武器阴云驱散。



图5-12 身穿防护服的工作人员



活动

收集历史上使用生物武器的资料，并分析其严重危害

在以往的战争中，传染病常常是导致军事失利的一个重要因素。从古希腊的城邦之战到近现代的世界战争，可谓不胜枚举，其中很多战例是人为使用生物武器所致。

目的要求

请利用图书馆和互联网收集有关历史上使用生物武器的资料。

活动提示

每位同学收集资料后，在小组内进行交流，思考并分析生物武器的严重危害。

讨论

1. 举例说出生物武器对人类的威胁。
2. 谈谈你对禁止使用生物武器的看法。

思考与练习

1. 人类社会的发展史同时也是一部人类与瘟疫的斗争史。请查阅资料，说一说人类历史上曾经有过哪些瘟疫大流行。

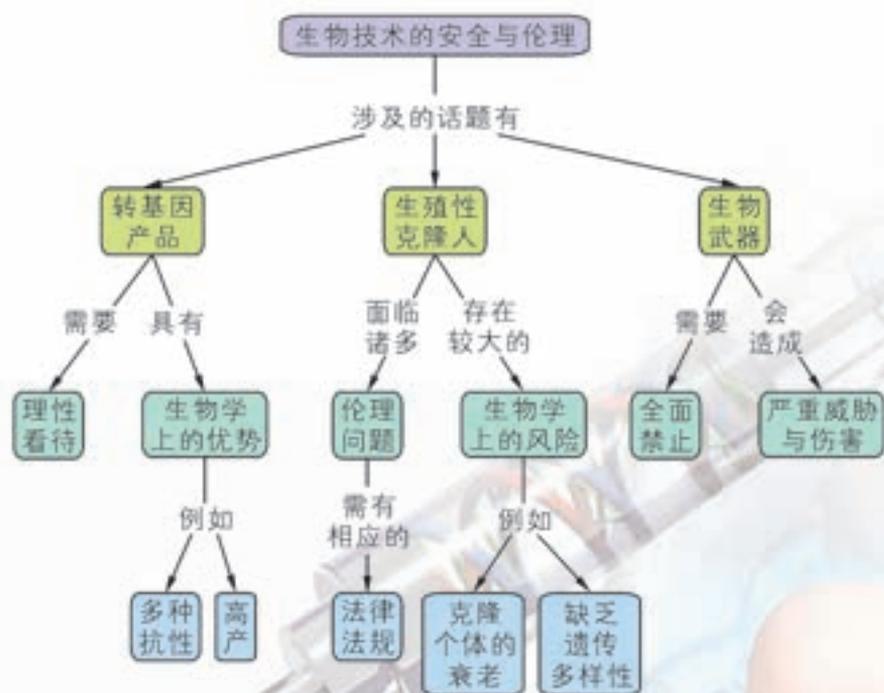
2. 试想，如果我们遭受了“未知生物战剂”的生物武器攻击，我们应该采取怎样的应对措施？

本章小结

生物工程技术突飞猛进的发展，引发了人类社会在生产和生活方面的巨大变化。其影响如同双刃剑一般，在造福人类的同时，也可能会给人类生活、地球环境、经济发展和道德伦理带来冲击和隐患，这其中备受关注的话题就包括转基因产品、生殖性克隆人以及生物武器等。

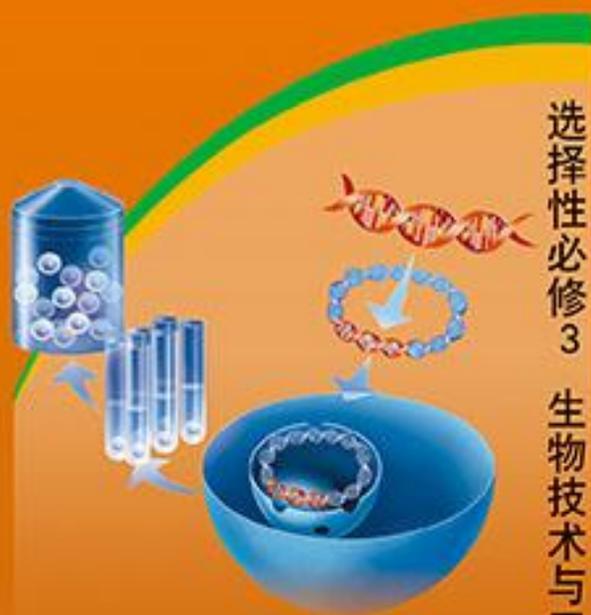
如何对待现代生物工程技术，是每一个公民都要面临的问题。这需要针对不同的生物工程技术，根据对“结构与功能”“物质与能量”“进化与适应”以及“稳态与平衡”等生命观念的理解和认识，以造福人类、尊重生命规律的态度和价值观，基于事实与证据评估生物工程技术的价值和风险，做出科学思考和决策。例如，应科学看待经检测和认证后的转基因食品进入日常生活；制定相应的法律法规禁止生殖性克隆人，以避免其所面临的诸多伦理问题；应在世界范围内全面禁止生物武器，以消除其对人类带来的严重威胁与伤害。

本章知识结构图



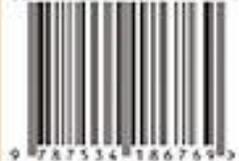
生物学

选择性必修3 生物技术与工程



定价批准文号：浙发改价格〔2019〕319号、〔2020〕331号 举报电话：12345、12315

ISBN 978-7-5341-8676-9



9 787534 186769 >

定价：12.09元

YOUJ
365优教
大学生共享家教联盟

致力于用榜样的力量提升学生成绩的共享家教平台

中国家庭教育学会荣誉会员单位

985/211 大学生 1对1 上门辅导

找家教就像叫“代驾”一样简单
家长们都在偷偷用的家教预约神器

记得拍照留存哦



扫码关注 预约上门

关注送200元优惠券

小初高全科辅导

学霸云集任您挑

学历真实可担保



与优秀大学生同行，激发孩子无限潜能



微信搜索公众号：365优教网

咨询热线：4000-711-365

YOUJ 优教

既是找老师，更是找榜样

家教老师全国招募中