普通高中教科书

生物学

选择性必修3

生物技术与工程

Biology

江苏凤凰教育出版社
Phoenix Education Publishing, Ltd

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　汪忠

江蘇鳳凰教育出版社
Phoenix Education Publishing, Ltd

普通高中教科书
书　　名　**生物学　选择性必修 3　生物技术与工程**
主　　编　汪　忠
责任编辑　李　炘
出版发行　江苏凤凰教育出版社(南京市湖南路 1 号 A 楼　邮编 210009)
排　　版　南京紫藤制版印务中心
印　　刷　江苏凤凰盐城印刷有限公司(电话:0515-88153008)
厂　　址　盐城市亭湖开发区希望大道中路 70 号(邮编 224001)
开　　本　890 毫米×1 240 毫米　1/16
印　　张　9.25
版　　次　2021 年 6 月第 1 版
印　　次　2021 年 6 月第 1 次印刷
书　　号　ISBN 978-7-5499-9384-0
定　　价　11.12 元
盗版举报　025-83658579

苏教版图书若有印装错误可向出版社联系调换
质量热线:025-83658528　025-83658526

目　录

绪　论 …… 1

第一章　发酵工程

第一节　发酵工程的培养基 …… 5
培养基的类型和基础培养基 …… 6
特殊培养基 …… 7
◆边做边学　搜集有关微生物培养基的资料 …… 8
◆走进实验室　配制马铃薯葡萄糖琼脂培养基 …… 9
第二节　发酵工程的无菌技术 …… 13
发酵工程的灭菌方法 …… 14
发酵工程的灭菌设备 …… 15
发酵工程的无菌操作器具 …… 18
微生物接种和传代的无菌技术 …… 19
◆边做边学　斜面接种和培养酵母菌 …… 20
微生物分离、纯化和培养的无菌技术 …… 21
◆走进实验室　通过平板划线法获得纯化的酵母菌菌落 … 22
◆走进实验室　分离土壤中分解尿素的细菌并进行计数 … 24
第三节　传统发酵技术和产品 …… 27
传统发酵技术的本质是微生物的天然发酵 …… 28
传统发酵技术生产的食品 …… 28
◆边做边学　水果的发酵加工——制作果酒和果醋 …… 30
◆走进实验室　制作酸奶 …… 31
第四节　发酵工程及其应用 …… 34
发酵工程利用了微生物的特定功能 …… 35
发酵工程的一般过程 …… 36
发酵工程应用广泛 …… 39
◆边做边学　调查发酵工程在生活中的应用实例 …… 39

第二章 细胞工程

第一节 植物细胞工程 …… 46
植物组织培养技术 …… 47
◆走进实验室 天竺葵的组织培养 …… 49
植物体细胞杂交技术 …… 52
第二节 植物细胞工程的应用 …… 57
植物组织培养技术的应用 …… 58
植物细胞培养技术的应用 …… 60
第三节 动物细胞工程及其应用 …… 63
动物细胞核移植技术及其应用 …… 64
动物细胞培养技术及其应用 …… 65
动物细胞融合技术及其应用 …… 66
◆边做边学 搜集单克隆抗体在临床上实际应用的资料 … 68
干细胞技术及其应用 …… 69
第四节 胚胎工程及其应用 …… 72
哺乳动物胚胎发育的基本过程 …… 73
体外受精技术 …… 76
胚胎移植技术 …… 78
胚胎分割技术 …… 80

第三章 基因工程

第一节 基因工程及其技术 …… 85
基因工程是在多学科基础上发展而来的 …… 86
基因工程的基本工具 …… 87
聚合酶链式反应(PCR)技术 …… 90
◆走进实验室 利用 PCR 技术扩增 DNA 片段并完成电泳鉴定 …… 91
基因工程的基本操作程序 …… 94
◆边做边学 DNA 的粗提取和鉴定 …… 96

第二节　基因工程的应用价值 …… 102
基因工程在农牧业中的应用价值 …… 103
基因工程在食品业中的应用价值 …… 105
基因工程在医药业中的应用价值 …… 105
第三节　蛋白质工程 …… 109
蛋白质工程是基因工程的延伸 …… 110
蛋白质工程的设计思路与应用 …… 112

第四章　生物技术安全与伦理问题

第一节　转基因产品的安全性 …… 119
日常生活中的转基因产品越来越多 …… 120
转基因产品与技术的安全问题受到关注 …… 122
◆边做边学　开展“转基因食品是否安全”的辩论 …… 122
第二节　我国禁止生殖性克隆人 …… 126
治疗性克隆和生殖性克隆本质不同 …… 127
设计试管婴儿与治疗性克隆 …… 128
◆边做边学　搜集设计试管婴儿技术的资料 …… 128
生殖性克隆人面临诸多问题 …… 129
◆边做边学　搜集我国对待生殖性克隆人态度的资料 … 129
第三节　禁止生物武器 …… 132
生物武器的危害 …… 133
◆边做边学　搜集历史上使用生物武器的资料 …… 133
我国反对生物武器及其技术和设备的扩散 …… 134

绪 论

一、为什么要学习“生物技术与工程”模块？

生物技术和生物工程是既相互联系又有明显区别的两个概念。生物技术是以生物学理论为基础，结合其他基础科学，采用先进的科学技术手段，改造生物体或加工生物原料，以便为人类生产出所需产品或达到某种目的。生物技术不仅与生产相关，在基础研究方面，人们利用该项技术解决了许多过去无法解释的生物学重大问题。生物工程则是利用生物学知识与技术，操纵生物体遗传物质，从而获得具有特定的生物学功能的物质，并形成大规模的工业化生产，以满足人类生产生活的需要。简单地说，生物学是上游学科，偏重于理论性、前沿性和探索性的研究；生物技术是中游学科，偏重于实践与技术手段的研究；生物工程是下游学科，将实验成果转化为实用的产品。那么，我们为什么要学习这些内容呢？

首先，生物技术与工程发展迅猛，它们改变着社会与生活。

21 世纪以来的诺贝尔生理学或医学奖显示，许多科学发现和生物技术与工程有关（表 1）。

表 1　21 世纪以来被授予诺贝尔生理学或医学奖的科学发现

年份	具体发现概述
2001 年	发现细胞周期的关键调节因子
2002 年	发现器官发育和细胞程序性死亡的遗传调控机理
2003 年	在核磁共振成像方面的发现
2004 年	发现嗅觉受体和嗅觉系统的组织方式
2005 年	发现幽门螺杆菌及其与胃炎和胃溃疡的关系
2006 年	发现 RNA 干扰——双链 RNA 引发的沉默现象
2007 年	在利用胚胎干细胞引入特异性基因修饰的原理上的发现
2008 年	发现导致宫颈癌的人乳头状瘤病毒（HPV）
	发现人类免疫缺陷病毒
2009 年	发现端粒和端粒酶如何保护染色体
2010 年	创立了体外受精技术
2011 年	对于先天免疫系统激活原理的发现
	发现树突细胞和其在获得性免疫中的作用
2012 年	发现成熟细胞可被重写成多功能细胞，细胞核重编程技术
2013 年	发现细胞囊泡运输与调节机制
2014 年	发现构成大脑定位系统的细胞
2015 年	发现治疗丝虫寄生虫的新疗法
	发现治疗疟疾的新疗法
2016 年	发现细胞自噬的机制
2017 年	发现控制昼夜节律的分子机制
2018 年	发现负性免疫调节治疗癌症的疗法

1900 年科学的输血技术的应用让无数失血病人的生命得以延续;1928 年青霉素的发现,使由细菌引起的传染病得到有效遏制;1965 年人工合成的牛胰岛素成为第一种“人工合成出来的生命物质”(图 1)……21 世纪以来,发酵工程、细胞工程、基因工程等现代生物技术与工程的发展更加突飞猛进。

图 1　我国科学家在进行牛胰岛素的合成实验

其次,通过学习“生物技术与工程”模块的内容,我们能基于所学内容,积极思考与生物学有关的社会问题,尝试参与社会决策,承担一定的社会责任。

随着社会的发展,生物技术与工程已经越来越广泛地应用到社会生产的各个方面,并对国民经济的增长起到巨大作用。学习“生物技术与工程”模块的内容,有助于我们理解科学、技术、社会的相互关系,包括理解生物科学技术对社会发展的作用,同时也了解技术可能带来的多方面影响。例如,有关生物技术与产品安全性问题备受社会关注,学习了本模块的内容后,我们能利用生物学相关概念和原理,通过逻辑推理阐明个人立场,作出独立的决策。再如,我们能遵循正确的伦理道德,以敬畏生命的观念,针对生殖性克隆等社会热点问题进行科学判断。

二、“生物技术与工程”模块有哪些学习内容?

生物技术与工程对社会的影响早就成为大众关注的问题之一。我们将在“生物技术与工程”模块中学习哪些内容呢?

“生物技术与工程”模块仅选取了生物学相关方面的最基本的内容。例如,我们会学到有关发酵工程、细胞工程、基因工程的相关知识,以及在此基础上认识有关生物技术与工程的安全与伦理问题。这些都将有助于我们形成四个大概念:“发酵工程利用微生物的特定功能规模化生产对人类有用的产品”“细胞工程通过细胞水平上的操作,获得有用的生物体或其他产品”“基因工程赋予生物新的遗传特征”和“生物技术在造福人类社会的同时也可能会带来安全与伦理问题”(图 2)。

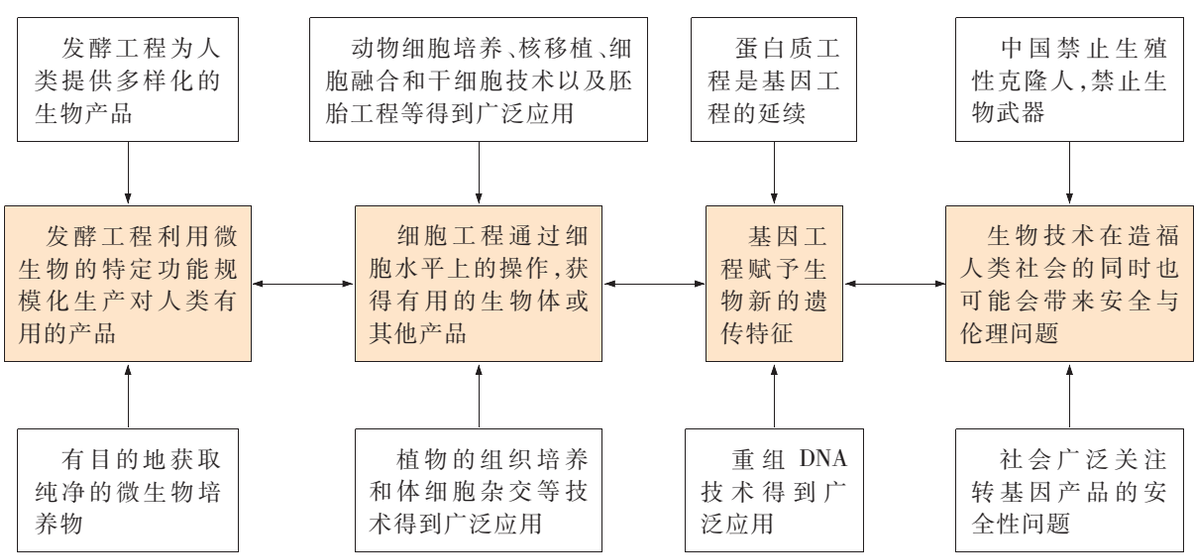


图 2　“生物技术与工程”模块主要学习内容

学习了这些内容，我们能理解日常生活中的腐乳、抗生素等都与发酵工程有关；也能认识到利用组织培养技术可以大规模培养花卉，利用体细胞克隆技术可以培育出克隆羊多莉；还能参与有关转基因产品或生殖性克隆人安全和伦理问题的社会讨论，并作出相应决策等。

三、如何学习“生物技术与工程”模块的内容？

“生物技术与工程”模块要求我们重点理解的大概念和若干重要概念中，有些内容我们在必修模块已经有了初步的了解，有些则可能第一次接触。学习本模块的内容要特别注意以下几个方面。

首先，要积极参与实验活动。

“生物技术与工程”模块是偏重实践类的课程，其中的实验活动是本模块的重要组成内容，也是我们学习的基本形式之一。这些实验活动对我们掌握四个大概念及若干重要概念有很大的帮助。通过实验活动感悟到生物技术与工程在生产生活中的实际应用价值，是我们达成生物学学科核心素养的重要支撑。

“生物技术与工程”模块中的实验活动有的是定性的，有的是定量的。我们不仅要重视定性的实验活动，也要重视定量的实验活动。因为在定量的实验活动中，我们可以学习相关的测量方法，实事求是地记录、整理和分析实验数据，定量表述实验结果，从而了解科学探究的本质。

在实验中我们要注意安全地使用实验器具（如解剖器具、玻璃器皿、酒精灯）和实验药品（如酸、碱试剂），这些也是生物学实验的基本技能。注意妥善处理实验废弃物是实验操作的基本要求，也是环境保护意识的具体体现。

其次，要关注科学、技术和社会的相互关系。

“生物技术与工程”模块的重要主线之一是注重科学、技术和社会的相互关系。科学、技术和社会相互关系的问题涵盖面很广，包括全球的、国家的和地区的科学技术与社会生活、生产发展相关的问题。我们可以结合所学内容，从关注本地区问题开始，或从图书、报刊和网络获取的问题开始，积极思考与生物学有关的社会问题，理解生物科学技术对社会发展的作用，同时也了解生物技术的发展可能带来的多方面影响。

了解科学、技术和社会的相互关系，关注并参与和生物科学技术有关的个人与社会问题的讨论和决策，是生物科学素养的重要组成部分，也是我们形成对自然和社会的责任感的重要途径。我们可以针对具体事例开展调查、研究、讨论等活动，认识生物学与社会发展的紧密联系，并在此基础上尝试参与社会决策。

发酵工程常用的大型发酵罐

第一章

发酵工程

日常生活中，我们所熟知的腐乳、酱、醋、豆豉、泡菜等都是传统发酵技术的产品。现在，在传统发酵技术的基础上，发酵工程迅速崛起，通过大型发酵罐等精良设备和先进技术，人们正在生产出更加多样化的产品。

我们能说出日常生活中与发酵工程有关的产品吗？这些产品是如何生产出来的？发酵工程对我们的生活和生产还有哪些重要影响？

第一节　发酵工程的培养基

说起发酵工程(fermentation engineering),我们首先就会想到培养基。我们一般都有这样的经验,一碗米饭放置在温暖环境下,几天后会长出许多细菌和霉菌,这碗米饭就成了培养细菌和霉菌的培养基。米饭中不仅含有大量的淀粉,还含有一定量的蛋白质和脂肪。当然,发酵工程中的培养基绝不像一碗米饭那么简单。那么,发酵工程中的培养基究竟是什么呢?

积极思维　发酵工程中的培养基究竟是什么呢?

事实:

1. 谈到培养基还需要从琼脂说起。琼脂是从某些藻类细胞中提取出来的物质,主要包括琼脂糖(一种多糖)和小分子果胶两种成分。绝大多数生物包括微生物都不能利用它们。所以,在纯琼脂(含水)培养基上,一般也没有微生物可以生长。但是,如果在琼脂中添加一定量的碳源、氮源物质,就可能成为微生物培养基。

2. 美国一位微生物学家在她八岁的儿子从外面玩耍回来之后,让他用右手在添加了水、碳源和氮源等物质的琼脂培养基上按了一下。接着,她将这个培养皿放在恒温箱中培养了48 h,得到如右图所示的微生物菌落分布(图1-1-1)。

图1-1-1　印有手印的培养基上显示的微生物菌落

思考:

1. **分析**　有人认为,上述事实能说明碳源和氮源等物质是许多微生物生长发育所需要的营养物质。我们认同这样的观点吗?

2. **推测**　根据我们对微生物和动植物的了解,如果发酵工程需要配制培养基以培养某些微生物或动植物细胞,这些培养基应该包括哪些营养物质?

经过思考我们应该会得出这样的结论:培养基应该含有生物生长发育所需的各类营养物质。那么,在发酵工程中会用到哪些培养基?这些培养基中的营养成分都一样吗?怎样配制这些培养基?

培养基的类型和基础培养基

培养基的类型

培养基(culture medium)主要是指为人工培养微生物等而制备的,适合微生物等生长、繁殖或积累代谢产物的营养基质。按照培养基成分的不同,可以将培养基分为天然培养基和合成培养基等类型。天然培养基由动植物组织或微生物细胞以及它们的提取物或粗消化物配制而成,如牛肉膏蛋白胨培养基。天然培养基的主要优点是取材便利、营养丰富、配制简便,缺点是营养成分难以控制、实验结果的重复性较差。天然培养基比较适用于工业化生产。合成培养基由准确称量的高纯度化学试剂加蒸馏水配制而成,如葡萄糖铵盐培养基。合成培养基的优点是化学成分及其含量明确、实验的可重复性好,缺点是配制过程繁琐、成本较高。合成培养基多用于研究和育种。

跨学科视角

实验室配制合成培养基时,常需要采用试剂瓶上有“分析纯”字样的化学试剂。从化学视角来说明什么是分析纯试剂。

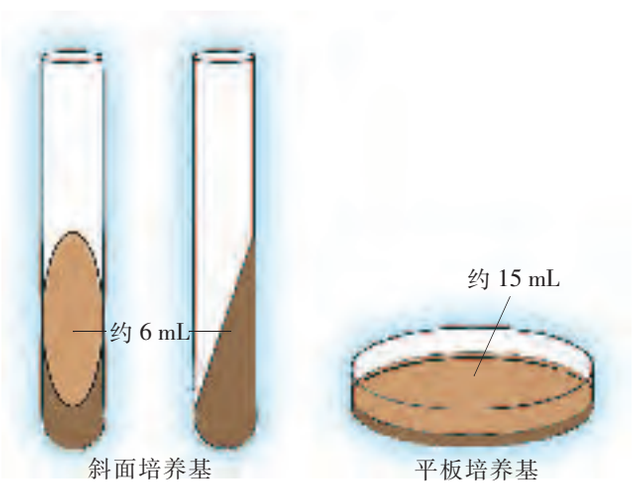


图 1 – 1 – 2　斜面和平板培养基示意图

按照培养基物理性质的不同,可以将培养基分为固体培养基、液体培养基和半固体培养基。配制固体培养基时,需要在液体培养基中添加一定量的凝固剂。琼脂就是一种常用的凝固剂。在液体培养基中加入适量琼脂后,即可配制成固体培养基或半固体培养基。添加琼脂后,利用琼脂加热熔化和冷却凝固的特点,可以配制成用于接种、保存和培养微生物的斜面培养基或平板培养基(图 1 – 1 – 2)。

在配制培养基时,根据拟培养微生物种类和培养目的的不同,有时还要加入维生素等特殊的营养物质,并要调节培养基的 pH 使之满足微生物生长的需要。

按照培养基用途的不同,可以将培养基分为基础培养基(minimum medium)和特殊培养基。

基础培养基

各种培养基的配方虽然不同,但其成分一般都含有水、碳源(主要提供含碳元素的物质)、氮源(主要提供含氮元素的物

质)和无机盐等最基本的物质,这些最基本的物质是大多数微生物对营养条件的基本需求,提供这些基本需求的培养基就是基础培养基。常用的牛肉膏蛋白胨培养基就是一种基础培养基。

碳源是构成微生物体的重要成分,也是微生物生命活动的能量来源。碳源物质主要包括葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉和纤维素等。淀粉是一种能被大多数微生物利用的碳源,但也有一些微生物(如谷氨酸产生菌)不能利用淀粉,而只能利用葡萄糖、果糖、蔗糖和麦芽糖等糖类。

氮源的种类对微生物的生长和代谢的影响是多方面的。氮作为构成微生物细胞中蛋白质和核酸的主要元素,一般可将氮源分为无机氮源和有机氮源。发酵工业中常用的无机氮源包括硝酸盐、铵盐等,有机氮源包括豆饼粉、牛肉膏、蛋白胨、酵母粉等。

无机盐也是培养基的重要成分。例如,磷作为构成磷脂、核酸和 ATP 的必要元素,是微生物生长繁殖所必需的,也是合成多种代谢产物所必需的营养物质。在发酵过程中,微生物从培养基中摄取的磷一般以磷酸盐的形式存在。因此,培养基中磷酸盐的浓度对菌体的生长和产物的合成有一定的影响。为了满足微生物生长、繁殖和生成代谢产物过程中的营养需要,还需要合理添加其他必要的无机盐。

自然界中有一些微生物是自养型微生物。它们的碳源是哪些物质?

特殊培养基

以基础培养基为基础,可进一步配制具有特殊用途的培养基,即特殊培养基。

选择培养基

选择培养基(selective medium)是一种能将某种或某类微生物从混杂的微生物群体中分离出来的特殊培养基。

一类选择培养基是依据某些微生物的特殊营养需求设计出来的。例如,利用以纤维素为唯一碳源的选择培养基,可以分离出能分解纤维素的微生物;利用缺乏氮源的培养基,能分离出固氮微生物。

另一类选择培养基是在培养基中加入某种化学物质,这些化学物质虽然没有营养作用,但可抑制或杀死其他微生物。例如,在选择培养基中添加数滴质量分数为 10%的酚溶液可以抑制细菌和霉菌的生长,培养基上仅有放线菌生长;在培养基中添加亚硫酸铋,可以选择培养出伤寒沙门氏菌;在培养基中添加青霉素、四环素等,通过抑制某些细菌或放线菌的生长,可以选择培养出酵母菌或霉菌等真菌。

很多微生物不能直接利用尿素,而有些微生物能以尿素为氮源。你能设计出以尿素为唯一氮源的选择培养基吗?

鉴别培养基

鉴别培养基(differential medium)是用于快速分类鉴定不同类型微生物的特殊培养基,也可用于分离和筛选产生某种代谢产物(metabolite)的微生物菌种。例如,一些微生物可以产生胞外淀粉酶,将样品微生物培养在添加可溶性淀粉的培养基中,如果其菌落周围形成淀粉水解圈,说明它们是能产生淀粉酶的菌株;一些微生物可以产生乳酸、醋酸或丙酸等代谢产物,将样品微生物培养在添加了溴甲酚紫的培养基中,如果培养基的颜色由紫色转为黄色,说明它们是产酸微生物。

你能简要说明选择培养基与鉴别培养基的主要区别是什么吗?

加富培养基

加富培养基(enrichment medium)也称营养培养基,即在培养基中加入有利于某些微生物生长和繁殖所需的特殊物质,如血液、血清、酵母浸膏、动植物组织液。加富培养基一般用于培养营养要求比较苛刻的异养微生物。例如,培养百日咳博德氏菌需要含有血液成分的加富培养基。从某种意义上来说,加富培养基类似于选择培养基。二者不同的是,采用加富培养基的目的,是增加所需分离的微生物的数量,使其形成生长优势,以分离出该种微生物;采用选择培养基的目的,一般是抑制不需要的微生物生长和繁殖,而使所需要的微生物增殖,再分离出所需微生物。

无论是以微生物为材料的研究,还是利用微生物生产生物制品(如代谢产物),都必须配制相应的培养基,这是发酵工程研究和生产的基础。配制发酵工程所需的培养基,首先需要确定培养基的配方,然后还需要确定相应的配制方法。

边做边学

搜集有关微生物培养基的资料

实践:

1. 通过互联网或图书馆搜集有关微生物培养基的资料,如培养基的种类和主要用途。

2. 搜集培养细菌、酵母菌、霉菌和放线菌的典型培养基配方,也可查阅有关“选择培养基和鉴别培养基”的资料。

讨论:

1. 培养细菌、真菌等不同微生物的培养基的配方有所不同,其原因是什么?

2. 如何设计培养某种微生物的“选择培养基”或“鉴别培养基”?

培养细菌的天然培养基主要有牛肉膏蛋白胨培养基等。牛肉膏蛋白胨培养基的常用配方:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 15~20 g、水 1 000 mL。

知识链接

牛肉膏蛋白胨培养基的配制

按照牛肉膏蛋白胨培养基的配方比例，依次准确地称取相应质量的牛肉膏、蛋白胨、NaCl 放入烧杯中。称取牛肉膏时，常用玻棒挑取，放在小烧杯或表面皿中称量，用热水溶化后倒入烧杯中。也可以将其放在称量纸（防水）上称量，然后连着称量纸一起放入水中。这时稍微加热，牛肉膏便会与称量纸分离，立即取出纸片即可。蛋白胨极易吸潮，在称取时动作要迅速。另外，称量试剂时要严防试剂混杂，一把牛角试剂匙只用于一种试剂，或称取一种试剂后洗净、擦干，再称取另一种试剂，瓶盖也不能盖错。

在上述烧杯中可先加入少于配制培养基所需要量的水，用玻棒搅匀，加热溶解。待试剂完全溶解后，补充加水到所需的总体积。如果配制固体培养基，先将称好的琼脂放入已溶化的试剂中，在琼脂溶化的过程中，需不断搅拌，以防琼脂糊底使烧杯破裂。最后补足所缺的水。

在未调节 pH 前，先用精密 pH 试纸测量培养基的原始 pH。如果 pH 偏酸，可向培养基中逐滴加入物质的量浓度为 1 mol·L^{-1} 的 NaOH 溶液，边加边搅拌，并随时测其 pH，直至 pH 达到要求。反之，则用物质的量浓度为 1 mol·L^{-1} 的 HCl 溶液进行调节。注意 pH 不要调得过酸或过碱，否则，将会影响培养基内各离子的浓度。有些微生物对 pH 的要求比较精确，在调节其培养基的 pH 时，可用酸度计进行测量。

培养基配制好后，可以根据需要趁热用滤纸或多层纱布过滤，或按要求将配制的培养基分装入试管或三角烧瓶内。

分离和培养放线菌通常用高氏Ⅰ号培养基等合成培养基。高氏Ⅰ号培养基的配方为：可溶性淀粉 20 g、KNO_3 1 g、NaCl 0.5 g、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 0.5 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g、琼脂 15~20 g、水 1 000 mL。

无论是配制牛肉膏蛋白胨培养基，还是配制高氏Ⅰ号培养基等，都需要根据培养目的调节培养基的 pH。

对培养基进行灭菌（sterilization）是获得纯净的微生物培养物的前提。配制完成的培养基必须经过灭菌处理才能用于微生物的培养。实验室一般用高压蒸汽灭菌锅（high-pressure steam sterilizer）进行灭菌。

走进实验室

配制马铃薯葡萄糖琼脂培养基

微生物种类繁多，在自然界分布广泛，其中酵母菌与我们的日常生活有密切关系。为了研究酵母菌的特性，需要培养出大量的酵母菌，这就必须配制培养酵母菌的培养基。很多培养基都可以培养酵母菌，本实验通过配制常用的马铃薯葡萄糖琼脂培养基培养酵母菌。

实验目的

学会配制培养基，如培养酵母菌的培养基。

实验原理

酵母菌生长繁殖需要的营养物质有水、碳源、氮源和无机盐等。马铃薯葡萄糖琼脂培养基具有酵母菌生长所需的碳元素、氮元素和其他营养物质。

实验器材和试剂

烧杯、玻棒、试管、培养皿、铁架台、高压蒸汽灭菌锅、酒精灯、pH 试纸，蒸馏水、马铃薯块茎、葡萄糖、琼脂等。

实验步骤

1. 配制培养基

马铃薯块茎 200 g(去皮)，切成小块，加水 1 000 mL 煮烂(用玻璃棒能戳动即可)；用 4 层纱布过滤；取滤液，在滤液中加葡萄糖 20 g 和琼脂 15~20 g；加热溶液，待其中琼脂溶化后补足水至 1 000 mL。需要精确称量试剂时可使用电子天平。

2. 调节 pH

测试并调节培养基的酸碱度时，先用玻璃棒蘸取液态培养基，接触 pH 试纸测试其 pH，再根据实际情况用物质的量浓度为 1 $mol \cdot L^{-1}$ 的 HCl 溶液将培养基 pH 调至 5.5。

3. 分装

待培养基冷却到 50 ℃左右时，将培养基分装到洁净的试管(图 1－1－3)或培养皿中。分装时注意不要污染试管口，随后立即用棉花塞或试管盖盖紧试管口。

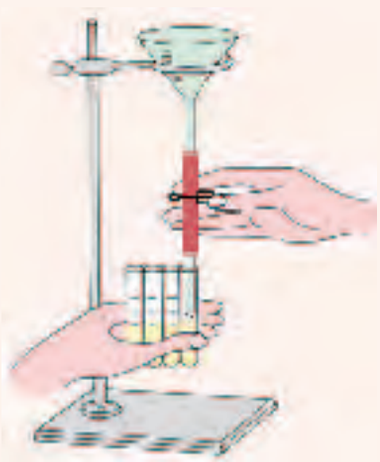


图 1－1－3　分装培养基示意图

若制作斜面培养基，倒入试管中的培养基高度约为试管高度的 1/5。灭菌后，使管内培养基自然倾斜，凝固后即成斜面培养基。

4. 包扎

在试管壁或培养皿底部上注明培养基的名称、组别、配制日期等信息。以 3~5 支培养基斜面试管或 3~5 个培养基平板为一个单位，用牛皮纸包扎起来。

5. 灭菌

采用高压蒸汽灭菌锅灭菌，压力设定为 100 kPa，温度为 121 ℃，灭菌 20 min。

结果与分析

按照配方和配制方法配制的培养基，可留作酵母菌培养实验之用。

除上述培养基外，麦芽汁培养基也是常用的酵母菌培养基。

技能指导

正确和规范操作电子天平

1. 电子天平要正确安放在安全称重室或稳固的工作台上，规避由环境因素带来的气流波动、温度变化、振动和静电等的干扰。

2. 电子天平放置后必须将水平泡调至水平仪中心位置。

3. 电子天平预热是为了保证天平在预热时间内，进行机械性自检和环境温度监测，从而达到天平系统的正常稳定，所以天平在预热状态时最好不要使用和操作。

4. 电子天平使用前必须先用砝码测试其准确度，如果发现存在误差，需先校正，后称重。

只有做到正确和规范操作天平(包括普通天平)，才能帮助我们快速精确地完成称量试剂的工作任务。

本节练习

一、思辨题

1. 科学地选用和设计适合微生物生长需求的培养基是进行微生物实验的前提，培养基的种类各异，下列对各种培养基的分析和实际不相符的是（　　）

A. 天然培养基营养成分丰富且复杂，一般用于发酵工业生产

B. 在液体培养基中添加一定量的琼脂，可以配制成固体培养基

C. 淀粉是一种能被所有微生物利用的碳源，是培养基的主要成分

D. 在选择培养基中滴加一定浓度的酚溶液可以抑制细菌的生长

2. 基础培养基和特殊培养基是生产和科学研究中常用的培养基。请说出它们的区别与联系。

二、应用题

1. 红曲自古以来就被我国人民用于食品的着色。宋代，人们就已经利用红曲霉具有耐酸和耐高温的特性，获得了纯度很高的红曲。

（1）某同学查阅资料得知：红曲霉属真菌门，是异养类微生物。他想要配制适合红曲霉生长的培养基，应该如何进行培养基的配制？

（2）该同学采用单因子实验研究了不同的培养基对红曲霉产色的影响，结果表明：在培养基 pH 为 6.0 时，培养 72 h，红曲霉着色效果最好。这是一个选择培养基的应用实例。我们还能列举出其他选择培养基的应用实例吗？

2. 培养基中的氮源分为有机氮源和无机氮源。这两类物质在微生物培养中的作用有什么不同？如果理解这个问题有困难，可以通过互联网或图书馆查阅相关资料。

走近专业

发酵工程专业的学生在实验室学习操作小型发酵罐

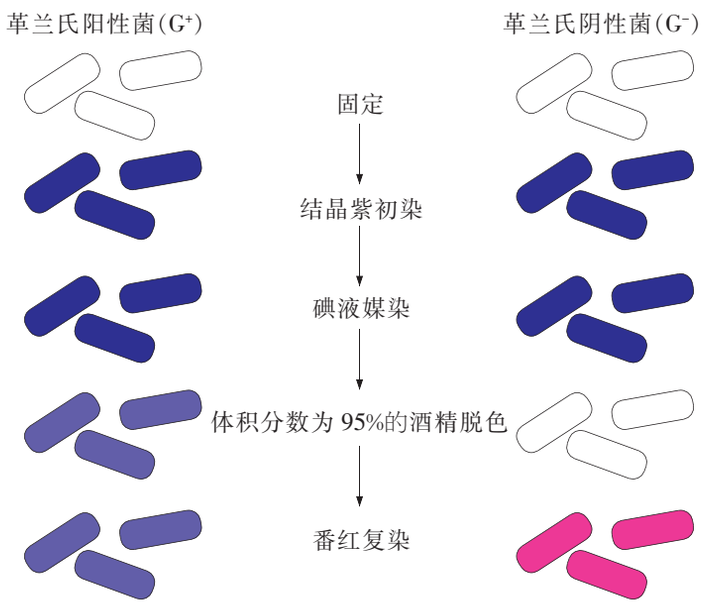
发酵工程

发酵工程是我国重点发展的工程技术之一。发酵工程通过改变遗传物质、调控细胞代谢关键酶及其相应的现代装备，实现细胞的大规模培养，从而获得各种生物活性物质等。发酵工程专业可培养能熟练运用专业知识和技术进行理论研究和生产实践，具有从事该专业实际工作与科学研究工作能力的专门人才。

学生毕业后可从事与发酵工程有关的医药、农业、化工、食品及环保等领域的工作。

如果你想要更多地了解本专业的相关情况，请访问我国关于专业介绍的网站。

革兰氏染色法



革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌示意图

革兰氏染色法是1884年由丹麦科学家革兰（H. C. Gram，1853—1938）发明的，它是细菌学中重要的鉴别染色法。

革兰氏染色的基本步骤：先用初染剂结晶紫进行初染，再用碘液媒染，然后用乙醇（或丙酮）脱色，最后用复染剂（如番红）复染。经此方法染色后，细胞保留初染剂蓝紫色的细菌为革兰氏阳性菌；如果细胞中初染剂被脱色剂洗脱而使细菌染上复染剂的颜色（红色），该菌属于革兰氏阴性菌（左图）。

运用革兰氏染色法可将细菌分为革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌。这是由这两类细菌细胞壁的结构和组成不同决定的。实际上，当用结晶紫初染后，像简单染色法一样，所有细菌都被染成初染剂的蓝紫色。碘作为媒染剂，能与结晶紫结合成结晶紫—碘的复合物，从而增强了染料与细菌的结合力。当用脱色剂处理时，两类细菌的脱色效果是不同的。革兰氏阳性菌的细胞壁主要由肽聚糖形成的网状结构组成，壁厚、类脂质含量低，用乙醇（或丙酮）脱色时细胞壁脱水，使肽聚糖层的网状结构孔径缩小，透性降低，从而使结晶紫—碘的复合物不易被洗脱而保留在细胞内，经脱色和复染后仍保留初染剂的蓝紫色。革兰氏阴性菌则不同，由于其细胞壁肽聚糖层较薄、类脂质含量高，所以脱色处理时，类脂质被乙醇（或丙酮）溶解，细胞壁透性增大，使结晶紫—碘的复合物比较容易被洗脱出来，用复染剂复染后，细胞被染上复染剂的红色。

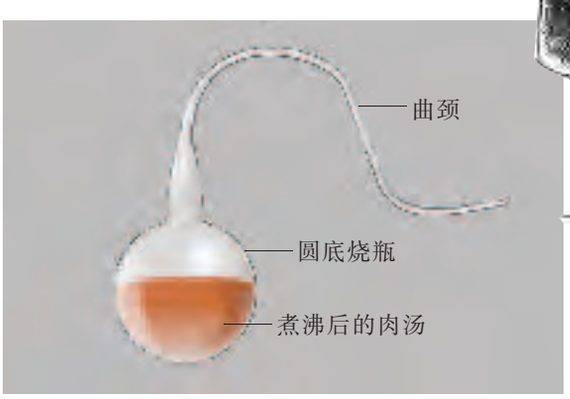
第二节　发酵工程的无菌技术

19 世纪中期以前，人们普遍相信生命现象可以随时随地自然发生。后来，这一观点被科学证明是错误的。但是，随着运用显微镜发现微生物后，人们又开始感到困惑，因为“肉汤腐败”现象说明微生物可能真的会自然发生。那么，肉汤腐败与微生物有什么关系？

积极思维　肉汤腐败与微生物有什么关系？

事实：

1. 许多科学家都想用实证的方法证明微生物的自然发生说是错误的，但都无法设计出实验并得出有说服力的结果。直到 19 世纪 60 年代，法国科学家巴斯德（L. Pasteur，1822—1895）令人信服地解决了这一问题。他设计了一个具有弯曲瓶颈的圆底烧瓶，烧瓶里有煮沸的肉汤。一段时间后，肉汤并没有发生腐败（图 1－2－1）。



巴斯德设计的具有弯曲瓶颈的圆底烧瓶和肉汤

图 1－2－1　巴斯德实验示意图

巴斯德在实验

2. 巴斯德通过高温加热烧瓶中的肉汤，烧瓶通过开口的曲颈和外界相通。这样既能杀死瓶内的各种微生物，又能阻隔外界微生物进入烧瓶。因为没有污染，肉汤就没有发生腐败。巴斯德的这一操作也让人们开始关注无菌操作的重要性。

思考：

1. **分析**　巴斯德的实验能说明微生物与肉汤腐败的关系吗？

2. **推测**　巴斯德的成功取决于他重视实验的无菌操作。分析上述事实，他的无菌操作体现在哪些方面？

巴斯德在实验中注意到无菌操作是他实验成功的保证。日常生活中，我们会用碘伏消毒液擦拭受伤破损的皮肤，从而杀灭伤口部位的部分微生物。那么，在发酵工程实践中无菌操作是如何开展的呢？

发酵工程的灭菌方法

图 1－2－2　发酵工程的无菌操作室

获得纯净的微生物培养物是发酵工程的基础。因此，无菌技术是发酵工程的重要技术之一，是指在操作过程中，保持物品与操作区域的无菌状态并不被微生物污染的技术，其核心是灭菌。发酵工程的培养基含有比较丰富的营养物质，所以很容易受到各种杂菌的污染。而发酵工程的生产过程只有在没有杂菌污染的情况下才能正常进行（图 1－2－2）。

在发酵工程中常采用化学的、物理的方法杀灭或去除设备和相关材料中的微生物。

化学试剂灭菌法

一些化学试剂如甲醛、氯、高锰酸钾，能破坏微生物的蛋白质或细胞结构，具有杀菌作用，可以用作灭菌剂（sterilant）。采用灭菌剂灭菌的方法称为化学试剂灭菌法。由于灭菌剂可能会与培养基中的一些成分发生作用，因此化学试剂灭菌法一般不用于培养基的灭菌。

射线灭菌法

利用紫外线等产生的高能粒子进行灭菌的方法称为射线灭菌法。波长为 200~300 nm 的紫外线有较好的灭菌作用。但紫外线的穿透力弱，一般用于表面和空气的灭菌。X 射线和 γ 射线也常用于灭菌。

问题与讨论

外科医生在做手术前要对手进行消毒处理。有人认为，消毒是将传播媒介上的病原微生物清除或杀灭，但并不能杀死所有微生物（如细菌的芽孢）。

我们同意上述观点吗？消毒和灭菌有什么差别？能说出我们日常生活中常用的消毒方法吗？

干热灭菌法

常用的干热灭菌法包括干热空气灭菌法和火焰灼烧法等。干热空气灭菌的条件一般是 140~160 ℃，2~3 h，主要用于要求保持干燥的实验器具（如培养皿、接种针和移液管）的灭菌；火焰灼烧法常用于接种等操作过程。

湿热灭菌法

利用饱和蒸汽进行灭菌的方法称为湿热灭菌法，一般在温度为 121 ℃、气压约 100 kPa 的条件下维持 15~20 min。因湿热灭菌时蒸汽穿透力大，蒸汽与较低温的物体表面接触凝结

为水时可放出大量能量，吸收了蒸汽水分和热量的菌体蛋白质易变性，在相同温度下湿热灭菌比干热灭菌更有效。

知识链接

发酵工程中培养基的灭菌

在发酵工程中，常采用分批灭菌和连续灭菌两种方式，利用饱和蒸汽对培养基进行湿热灭菌。

培养基的分批灭菌

培养基的分批灭菌是指将配制好的培养基放在发酵罐中，通入蒸汽进行灭菌的过程，也称为实罐灭菌。分批灭菌的过程包括升温、保温和冷却三个阶段，灭菌主要是在保温过程中实现的。分批灭菌对蒸汽压力的要求较低，一般在 3×10^2~4×10^2 kPa 即可。但在灭菌过程中蒸汽用量变化大，造成锅炉负荷波动大。分批灭菌不需要专门的灭菌设备，投资较少，设备相对简单。

培养基的连续灭菌

培养基的连续灭菌是在高温条件下，将配制好的培养基在向发酵罐输送的过程中进行加热、保温、冷却，并实施灭菌的方法。连续灭菌时，培养基能在短时间内加热到保温温度，并能很快被冷却。因此，可在比分批灭菌更高的温度下灭菌，其保温时间很短，有利于减少营养物质的破坏。在连续灭菌的过程中，蒸汽用量平稳，但蒸汽压力一般要求高于 5×10^2 kPa。连续灭菌投资较大、设备相对复杂。

过滤除菌法

通过过滤阻留微生物从而达到除菌目的的方法称为过滤除菌法。工业生产上一般利用过滤除菌法大量地制备无菌空气，用于好氧微生物的发酵。在产品提取过程中，也可以利用过滤除菌法处理料液，以获得无菌产品。

在具体的研究或生产实践中，上述几种方法有时可以结合使用，灭菌效果会更为显著。灭菌是获得纯净的微生物培养物的前提。

发酵工程的灭菌设备

在科学研究或生产实践中，灭菌需要采用相应的灭菌设备。

电热鼓风干燥箱

实验室通常使用恒温控制的电热鼓风干燥箱作为干热灭菌设备。它是具有双层金属壁、中间有隔热石棉板的箱体，其顶端或背面有调气阀，下底夹层装有供通电加热的电炉丝（图 1－2－3）。电热鼓风干燥箱常用于空的玻璃器皿（如培养皿、离心管、移液管）、金属用具（如镊子、手术刀）和其他耐高温的物品（如菌种保藏采用的沙土管、石蜡油、碳酸钙）的灭菌。其优点是使灭菌器皿保持干燥。但带有胶皮或塑料的物品、液体及固体培养基一般不能采用电热鼓风干燥箱干热灭菌。

图 1－2－3　一种电热鼓风干燥箱

菌体蛋白质的变性温度与含水量密切相关，如细菌、酵母菌及霉菌的营养细胞，因为含水量较高，在 50~60 ℃条件下，加热 10 min 即可使其蛋白质变性而达到杀菌效果；对于含水较少的放线菌及霉菌孢子，在 80~90 ℃条件下，加热 30 min 方可杀菌。细菌芽孢含水量低，蛋白质变性温度较高。采用电热鼓风干燥箱干热灭菌时，一般以能否杀死细菌的芽孢作为彻底灭菌的标准，这就需要将温度提高到约160 ℃，加热 2~3 h。

使用电热鼓风干燥箱要按产品说明书进行操作，特别要注意相关的安全事项。例如，不得将易腐、易燃、易爆物品放入箱内干燥灭菌；干燥箱在工作时，必须将风机开关打开，否则会导致电机或传感器烧坏；箱内应经常保持清洁，长期不用应套好防尘罩，放置在干燥的室内等。

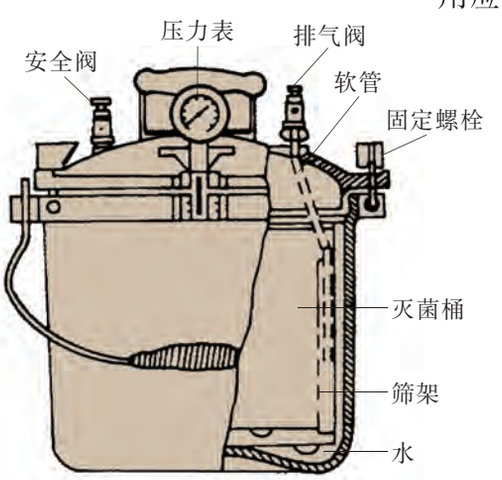


图 1－2－4　一种高压蒸汽灭菌锅的结构示意图

高压蒸汽灭菌锅

采用高压蒸汽灭菌锅进行湿热灭菌是应用广泛的一种灭菌方法。其灭菌原理是在一个密闭的锅内，水的沸点随蒸汽压力的增高而上升，加压的同时提高蒸汽的温度，使锅内的待灭菌物品在一定压力和温度等条件下，杀死其中所有微生物的营养体及其芽孢。

高压蒸汽灭菌锅主要有手动式高压蒸汽灭菌锅(图 1－2－4)和全自动高压蒸汽灭菌锅两类。

使用高压蒸汽灭菌锅时，操作人员必须在现场规范操作，严格控制热源维持灭菌时的压力。锅内压力过高，不仅培养基的营养成分会被破坏，而且高压锅超过耐压范围后可能会发生爆炸，造成伤人事故等。

使用高压蒸汽灭菌锅灭菌，一般须经加水、装锅、加热、排空冷空气、保温保压、出锅等步骤。

加水是指使用前在外层锅内加入适量的水，水量达到水位标记线即可。加水的量不可过少，以防止灭菌锅烧干。

装锅是指将待灭菌物品放在灭菌桶中，灭菌桶不要装得过满，至少留 1/3 空间。然后盖好锅盖，对称地旋紧锅盖四周的固定螺栓。

加热后，随着锅内压力逐渐增加，须打开排气阀，排出锅内残留的冷空气。当压力表指针回降到“0”时，关闭气阀，继续加热。如待灭菌物品较大或不易通气，应适当延长排气时间，务必使冷空气充分排出，再将排气阀关闭。

保温保压是指当锅内压力升至约 103 kPa、温度达到 121 ℃时控制热源，保持压力，维持 15~20 min 后，再关闭电源。

出锅是指当压力表指针降至“0”点，待温度下降后，打开排气阀，旋开固定螺栓，开盖，取出灭菌物品。

灭菌完毕取出物品后，将锅内余水倒出，保持灭菌锅内壁及内胆干燥，并盖好锅盖。

问题与讨论

有经验的同学知道，在高压蒸汽灭菌锅内的压力没有降到“0”点前不能打开高压蒸汽灭菌锅的锅盖。

考虑到放入高压蒸汽灭菌锅内待灭菌的物品可能有玻璃器皿或培养基，如果压力没有降到“0”点，而高压蒸汽灭菌锅的锅盖突然被打开，会发生什么情况？

空气除菌设备

许多微生物产品是通过培养好氧微生物获得的。通常在空气中含有灰尘颗粒和各种杂菌，在阴雨天气或环境污染比较严重的情况下，空气中会悬浮大量的微生物。这些微生物一旦进入营养丰富的培养基中，会很快繁殖，影响发酵过程。因此，空气除菌就成为好氧发酵的关键环节。发酵工程中常采用空气过滤除菌的方法(图 1－2－5)来净化所需空气。

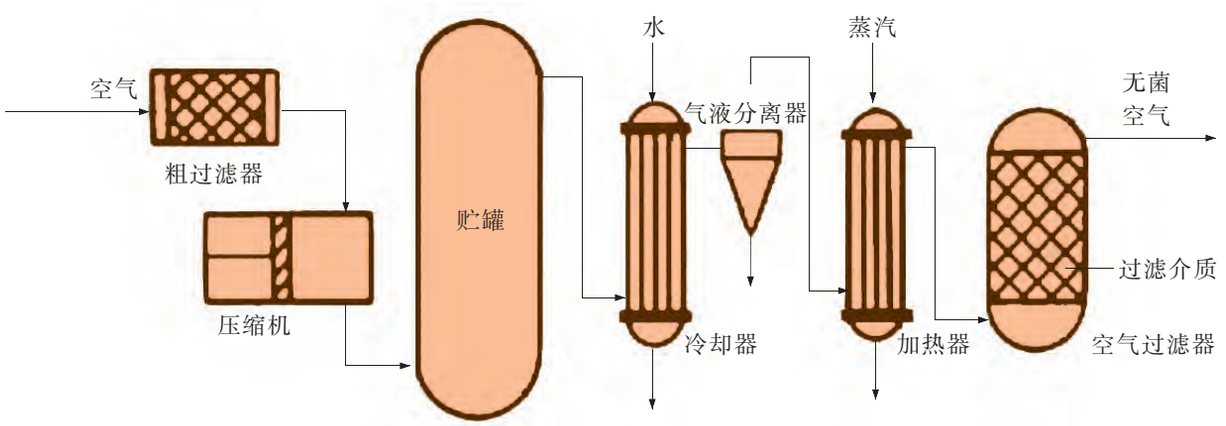


图 1－2－5　空气过滤除菌流程示意图

空气过滤除菌是让含菌空气通过无菌干燥的过滤介质，以阻截空气中所含微生物。这样空气含菌量会降低到一个极低的比例，发酵受污染的概率就会大大减小。也就是说，通过过滤除菌处理的空气可达到几乎无菌的程度，并有足够的压力和适宜的温度，以满足好氧微生物纯培养的需要。

各种不同的发酵过程，对空气无菌程度的要求也不同。例如，酵母菌繁殖得快，对空气的无菌要求相对较低；而制备氨基酸、抗生素等的发酵过程，所需的微生物对空气无菌的要求较高。

有人说空气过滤除菌法能杀死空气中的微生物。你能根据实例质疑他的观点吗？

发酵工程的无菌操作器具

败血症是因致病菌侵入人体血液后，生长繁殖并产生毒素而引发的急性感染病症。你知道医学上是如何防治败血症的吗？

在19世纪中后期，人们对微生物的认识还很肤浅。医生在施行外科手术时还不能注意到无菌操作，患者在手术后因败血症而死亡的现象时有发生。巴斯德曾用实验证明传染病和化脓症是由微生物引起的，他因此建议外科医生将外科手术器具在使用前放在火焰上烧灼，以杀灭微生物。

和外科手术器具的灭菌一样，各种发酵工程所用器具和设备也要灭菌，这样才能保证发酵工程所需的无菌条件。

接种器具

在无菌条件下将微生物接入培养基的操作过程称为接种(inoculate)。在这一操作过程中，常用的接种器具包括玻璃涂布器、接种针、接种环等(图1－2－6)。

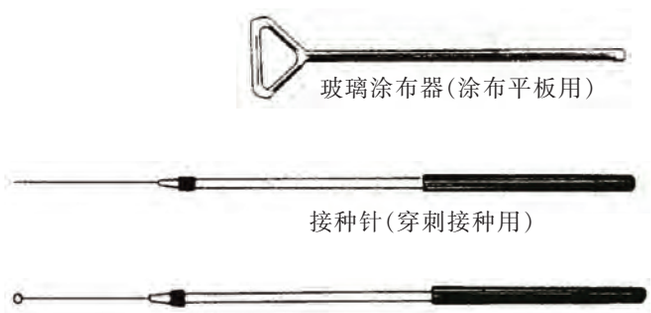


图1－2－6　常见接种器具示意图

接种的方法不同，所采用的接种器具也有区别。例如，玻璃涂布器用于平板稀释涂布接种，接种针用于穿刺接种，接种环用于斜面接种或在平板培养基上划线接种。

转移器具

移液管是用来准确移取一定体积的溶液或分装化学试剂的量器，一般用于转移部分液体培养物、系列稀释微生物或分装化学试剂。具有刻度的直形玻璃管又称为刻度移液管。在需要控制试剂加入量时，一般使用刻度移液管。常用的移液管有1 mL、5 mL、10 mL和25 mL等规格。

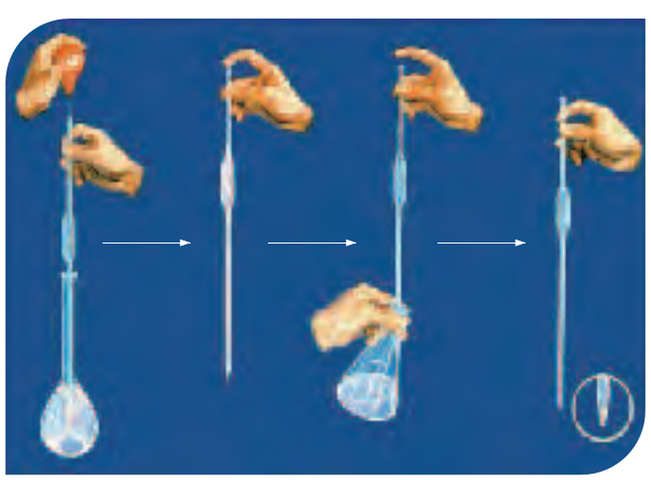


图1－2－7　移液管使用示意图

使用移液管(图1－2－7)的要点是以拇指及中指捏住管颈标线以上的地方，将移液管插入待取溶液液面下约1 cm。移液管不应伸入太多，以免管尖外壁粘有过多溶液；也不应伸入太少，以免液面下降后而吸空。

操作时，一手(如左手)拿着橡皮吸球(一般用60 mL洗耳球)轻轻将溶液吸上，眼睛注视正在上升的液面位置。当液面上升到刻度标线以上约1 cm处时，迅速用另一手(右手)食指堵住管口，取出移液管。用滤纸条拭干移液管下端外壁，并使其与地面垂直，稍微松开手食指，使液面缓缓下降。此时，视线应平视标线，直到弯月状液面下端与标线相切，立即用食指按紧管口，使液体不再流出，并使出口尖端接触容器外壁，以除去尖端外的残留溶液。

将移液管移入准备接受溶液的容器中时，使其出口尖端接触器壁；将容器微倾斜，而使移液管直立；然后放松食指，使溶液自由地顺壁流下；待溶液停止流出后（一般需等待 15 s）将移液管移出。

当取液量很少时（如 0.1 mL），常采用微量取液器。微量取液器可分为固定容量的和可调容量的两种。

超净工作台

超净工作台是一种经过空气净化而形成高洁净操作环境的设备。其净化原理是利用工作台内紫外线灯的杀菌作用，并通过空气过滤器过滤确保工作台内空气的无菌、无污染。

紫外线灯的开启可激发超净工作台内空气中的氧分子形成臭氧分子。臭氧分子有很强的杀菌作用，但也对操作人员的健康有害。因此，超净工作台开机杀菌 30 min 后，需先关掉紫外线灯，约 10 min 后方可使用超净工作台。

超净工作台的优点是操作方便。在各种无菌操作和发酵工程产品的工厂化生产中，超净工作台是理想的无菌操作设备（图 1－2－8）。

图 1－2－8　超净工作台是理想的无菌操作设备

微生物接种和传代的无菌技术

菌种是从事发酵工程实践及微生物学等学科研究的基本材料和重要资源。因此，菌种的传代和保存至关重要。

菌种的传代和保存要考虑菌种的生理、生化特性，尽量让菌种在人工创造的条件下，降低细胞的代谢水平，使细胞基本处于休眠状态，即微生物的生长繁殖受到抑制但又不至于死亡。低温、干燥、缺氧、缺乏营养等环境条件都有抑制微生物生长和代谢的作用。因此低温、干燥、真空是菌种保存的重要条件。

厌氧微生物接触氧气会受到抑制、损伤甚至死亡，常采用穿刺接种（图 1－2－9 左）的方法将其保护在培养基中。厌氧菌可在培养基深处的厌氧环境下生长。

斜面接种（图 1－2－9 右）是常用的菌种传代和低温下保存菌种的方法。

图 1－2－9　穿刺接种（左）和斜面接种（右）示意图

边做边学　斜面接种和培养酵母菌

实践：

1. 准备接种：点燃酒精灯，取两支盛有培养基的试管，其中一支内有菌种，另一支为无菌的斜面培养基。用一只手的拇指和其他四指夹住试管，使管口齐平，管内培养基斜面向上（图 1－2－10）。

2. 接种环灭菌：手持接种环，将接种环的环端和接种时可能进入试管的部分放在酒精灯火焰上，来回灼烧多次，以达到迅速彻底灭菌的目的（图 1－2－11）。

3. 试管口灭菌：在火焰附近用握有接种环的手的小拇指、无名指、中指和掌心拔去两支试管上的试管塞，迅速将试管口通过火焰 2~3 次，以杀灭试管口上的微生物（图 1－2－12）。

图 1－2－10　准备接种

图 1－2－11　接种环灭菌

图 1－2－12　试管口灭菌

4. 挑取菌体：将灭过菌的接种环伸入菌种管（菌种可以购买，也可以通过分离培养和保存得到），先将环部接触培养基斜面顶端或其他无菌体的培养基部位使其冷却，再轻轻挑取少许菌体。在抽出接种环时，注意其带菌部位不要触及管壁或通过火焰（图 1－2－13）。

5. 接种：迅速将上述带菌的接种环伸入待接种的试管中，在培养基斜面上由底部向上轻轻划“Z”型折线，将菌种接种到培养基上。划线时注意不要将培养基的表面划破（图 1－2－14）。

6. 培养：将试管口与试管塞分别通过火焰 2~3 次，迅速塞紧试管。多次灼烧接种环确保无菌，冷却后，放回原处。将接种过菌种的试管放在恒温箱中（温度调至 28 ℃）培养 24 h（图 1－2－15），观察接种和培养的结果。

图 1－2－13　挑取少许菌体

图 1－2－14　划线接种

图 1－2－15　培养酵母菌

讨论：

1. 培养 24 h 后，能观察到的实验结果是什么？如何将酵母菌培养在平板培养基上？

2. 在上述接种和培养过程中，我们注意到了哪些灭菌操作注意事项？

微生物的菌种保存一般需要先挑选典型菌落(colony),再接种在斜面培养基上,按规定的温度和时间培养;待充分生长后,将培养好的装有新鲜菌种的试管用牛皮纸包扎好,置于4 ℃左右的冰箱中保藏,以减缓培养基的水分蒸发,延长保存时间。通常每隔2~3个月重新接种一次,再继续保存。

微生物分离、纯化和培养的无菌技术

平板划线法分离和纯化微生物

平板划线法(streak plate method)是指把含有多种微生物的杂菌样品,通过在特定的琼脂平板表面划线稀释,从而获得单个菌落的方法。具体做法是将微生物样品在琼脂平板表面多次做“由点到线”的稀释划线,经过这样的操作可得到较多独立分布的单个微生物。经过平板培养后,会形成部分由单个微生物生长、繁殖而成的菌落。

由单个微生物增殖形成的菌落,就是这种微生物的纯种菌落。如果不能确定这种菌落是否由单个细胞繁殖而来,还可以反复多次进行平板划线,以确保获得纯种(图1-2-16)。

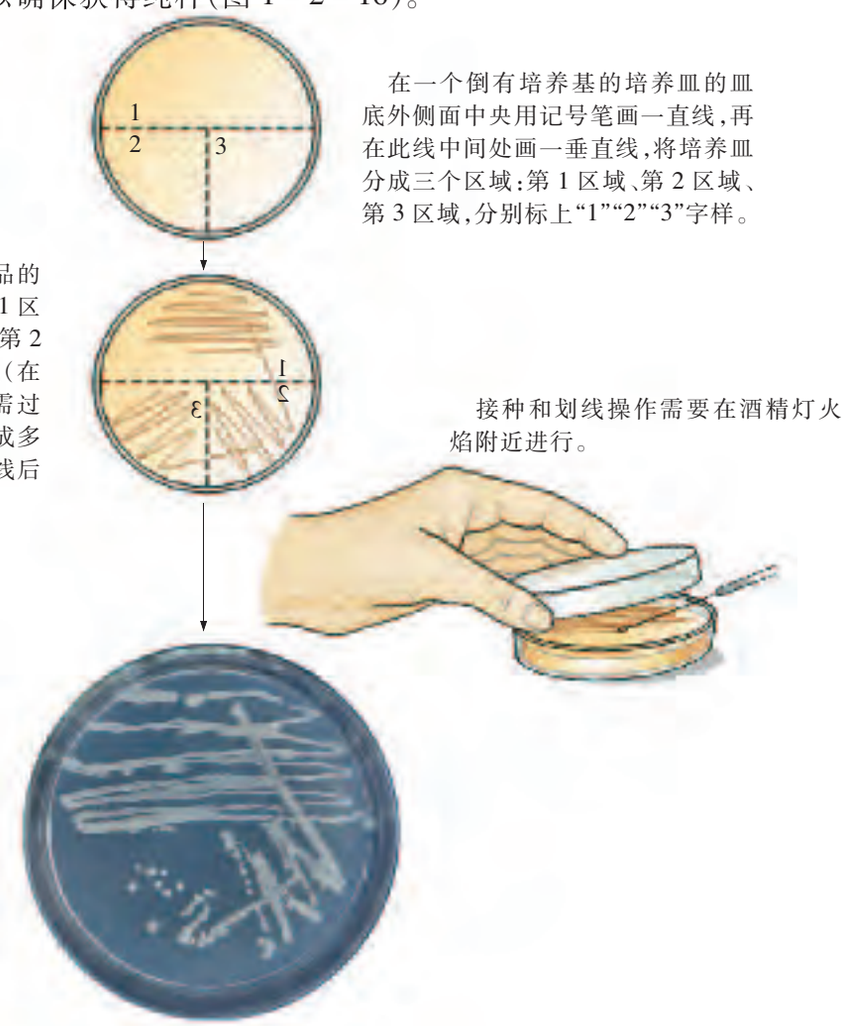


图1-2-16 平板划线法分离和培养酵母菌菌落示意图

走进实验室

通过平板划线法获得纯化的酵母菌菌落

酵母菌是单细胞真菌，可以进行出芽生殖，也可以进行孢子生殖。其培养的最适 pH 为 4.5~5.0，最适生长温度一般为 28~30 ℃，可以用液体培养基培养，也可以用固体培养基培养，但要获得纯化的酵母菌菌落，则需通过固体培养基培养。

实验目的

尝试通过平板划线法获得纯化的酵母菌菌落。

实验原理

马铃薯葡萄糖琼脂培养基能满足酵母菌生长、繁殖的营养需要，利用前面实验中配制的马铃薯葡萄糖琼脂培养基制作平板。

平板划线法是实验室中进行微生物分离和纯化的常用方法之一。在制作好的酵母菌培养基平板上，采用无菌操作技术及平板划线法能够获得纯化的酵母菌菌落。

实验器材和试剂

酵母菌样本（菌种），接种环、酒精灯、恒温培养箱、高压蒸汽灭菌锅，马铃薯葡萄糖琼脂培养基。

实验步骤

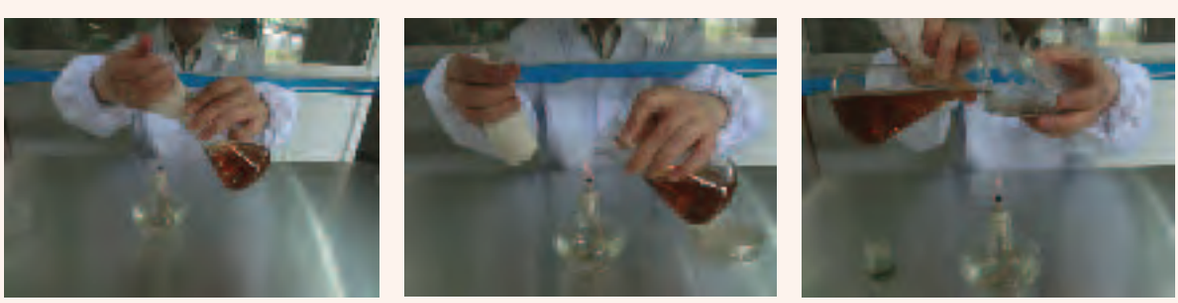
1. 培养基和培养皿灭菌

将配制好的马铃薯葡萄糖琼脂培养基装入锥形瓶，用棉塞塞紧，并用牛皮纸包住棉塞扎在瓶口上，置于高压蒸汽灭菌锅中；用牛皮纸等将培养皿包好（一般 3~5 套一包）后也放入高压蒸汽灭菌锅中，与培养基一起灭菌。

2. 倒平板

将灭好菌的培养基和培养皿取出，置于操作台上，待培养基冷却到 50 ℃左右时进行倒平板操作。

首先，在酒精灯火焰旁一只手拿着装有培养基的锥形瓶，另一只手拔出瓶塞（图 1－2－17a），使瓶口迅速通过火焰 2~3 次（图 1－2－17b），并转动瓶口，确保瓶口被灭菌。再取无菌培养皿，在火焰旁用拇指和食指将培养皿打开（稍大于锥形瓶瓶口），将锥形瓶中的培养基倒入培养皿中（图 1－2－17c）。



a　打开瓶塞　　b　灼烧瓶口灭菌　　c　倒培养基

图 1－2－17　无菌技术倒平板过程示意图

等平板冷却凝固后，将平板倒置（皿盖在下，皿底在上）备用。

3. 划线和培养

参照图 1－2－16,在平板上划线,然后置于28 ℃恒温箱内培养。

结果与分析

培养 24 h 后,若在划线的末端出现不连续的单个菌落,表明酵母菌已经被纯化。如果酵母菌纯化培养失败,其原因很多。例如,接种环在取菌体前曾在酒精灯火焰上灼烧灭菌,此时接种环的温度很高,若不冷却就直接在斜面上挑取菌体,菌体可能因为接触高温接种环而死亡。此外,若第一次划线前挑取的菌体过多,则也有可能无法获得由一个酵母菌形成的单个菌落。

稀释涂布平板法分离和纯化微生物

稀释涂布平板法（spread plate method）也是常用的分离(separation)和纯化(purification)微生物的方法(图 1－2－18)。这种方法是将待分离的材料做一系列的梯度稀释,再取一定量的某一稀释度的菌液涂布平板,然后用无菌的涂布器将菌液均匀地涂布在整个平板表面,使其中的微生物充分分散,培养后在平板培养基表面形成多个单菌落。稀释涂布平板法可用于菌种的分离和纯化,还可以用于微生物计数。

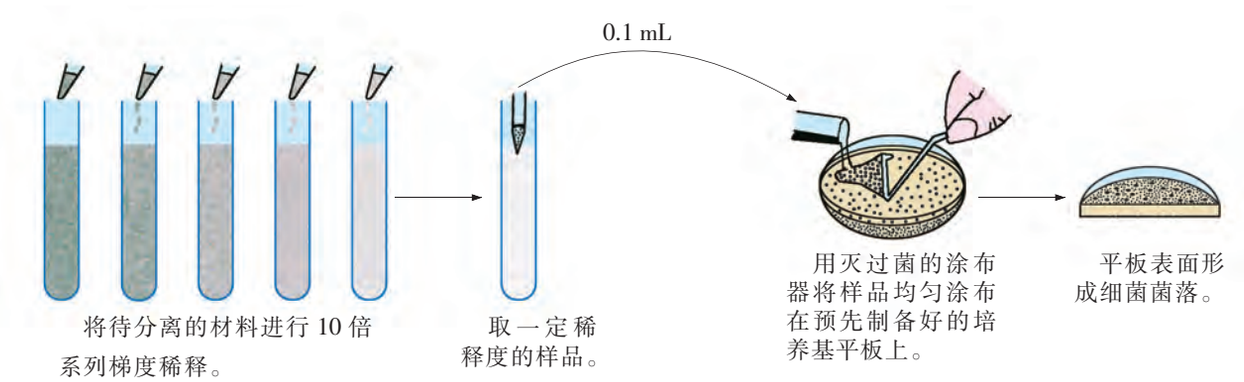


图1－2－18　稀释涂布平板法分离和纯化细菌操作示意图

有些微生物的分离和纯化还可采用混合平板法,即将稀释的少量菌悬液与 50 ℃左右的培养基混合均匀后倒入无菌培养皿中,再将培养皿置于合适温度下培养,这样在培养基表面和内部均可长出单个菌落。

平板划线法的缺点是不能计数,而稀释涂布平板法则能用于微生物的计数。如果经稀释涂布平板法培养出的都是单个细胞增殖形成的菌落,那么统计这些菌落数目,即可计算出单位体积样品中的微生物数量。稀释涂布平板法在食品和水源的微生物污染检测及土壤含菌量测定等方面已经得到广泛应用。

有人说，采用稀释涂布平板法培养和计算得到的微生物的数量比稀释液中实际微生物的数量要少。你同意这样的观点吗？为什么？

走进实验室

分离土壤中分解尿素的细菌并进行计数

土壤中一般都富含有机营养和无机营养，可为多种微生物提供生活所需的营养物质。同时，土壤的温度、湿度等也适合多种微生物的生长，所以土壤中的微生物种类丰富、数量庞大。土壤也因此成为人类开发与利用微生物资源的重要来源。尿素是一种重要的农业氮肥，土壤中以尿素为氮源的细菌能将尿素分解成农作物所需的含氮物质。

实验目的

1. 学会配制选择培养基，以分离出能分解尿素的细菌。

2. 学会采用稀释涂布平板法分离和培养分解尿素的细菌，并进行计数。

实验原理

在自然环境中，多种微生物常常生活在一起，要对其中的某种微生物进行研究，就必须对其进行分离和纯化培养，以排除其他微生物的干扰。由于不同微生物对营养成分、氧、pH 等的要求不同，通过提供要研究的微生物增殖生长的必需条件，或加入某些抑制剂抑制其他微生物的增殖生长，可分离和纯化所需的微生物。

在实验室中利用选择培养基可以筛选和分离某种微生物，然后在高度稀释的条件下，于固体培养基上培养该微生物，形成单个菌落。单个菌落即为纯化培养物，通过对菌落数量的统计，可以计算出样品中的含菌数。

实验器材和试剂

1. 土壤样品。

2. 灭菌处理过的移液管、试管、玻璃涂布器、锥形瓶、培养皿、烧杯，试管架、记号笔、天平、称量纸、洗耳球、酒精灯。

3. 配制以尿素为氮源的 1 000 mL 选择培养基的试剂，包括 KH_2PO_4 1.4 g、Na_2HPO_4 2.1 g、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g、葡萄糖 10.0 g、尿素 1.0 g、琼脂 15.0 g、蒸馏水 1 000 mL、无菌水适量以及调节 pH 的相关试剂。

实验步骤

1. 选取土壤：用小铲取表层以下 3~5 cm 的土壤约 10 g，放入灭菌的信封中备用。

2. 制备土壤悬液：称取 1 g 土壤样品，倒入盛有 99 mL 无菌水的锥形瓶中，振荡约 20 min，充分打散土壤，制成质量浓度为 10^{-2} g·mL^{-1} 的土壤悬液。用无菌移液管吸取 1 mL 土壤悬液注入盛有 9 mL 无菌水的 1 号试管中，配制质量浓度为 10^{-3} g·mL^{-1} 的土壤悬液。取另一支无菌移液管吹吸 1 号试管 3 次，使悬液均匀，再吸取 1 mL 悬液注入盛有 9 mL 无菌水的 2 号试管中，配制质量浓度为 10^{-4} g·mL^{-1} 的土壤悬液。以此类推，依次配制质量浓度为 10^{-5} g·mL^{-1}、10^{-6} g·mL^{-1}、10^{-7} g·mL^{-1}、10^{-8} g·mL^{-1} 的土壤悬液。

3. 配制培养基及制作平板：在大烧杯中将琼脂加水煮沸溶解，分别加入培养基的其他成分，调节 pH 为 7.0~7.2，装入锥形瓶中，灭菌。将已灭菌的选择培养基熔化后，冷却到约 50 ℃，倒入不同编号的培养皿中，迅速盖好培养皿盖，待凝固后即成平板。另设置一组不加氮源的平板，作为空白对照。

建议：若想判断平板在实验前或实验过程中是否被污染，可用等体积无菌水代替土壤悬液另设一组对照。

4. 涂布：从浓度最低的土壤悬液（质量浓度为 10^{-8} g·mL^{-1}）开始，先用无菌移液管吸取 0.1 mL 加入到标记有 10^{-8} 的培养皿中，再分别用无菌移液管从质量浓度为 10^{-7} g·mL^{-1}、10^{-6} g·mL^{-1} 的土壤悬液中各吸取 0.1 mL 加入到标记有 10^{-7}、10^{-6} 的培养皿中，每个浓度设置 3 个重复，在平板上涂布均匀（图 1－2－19）。

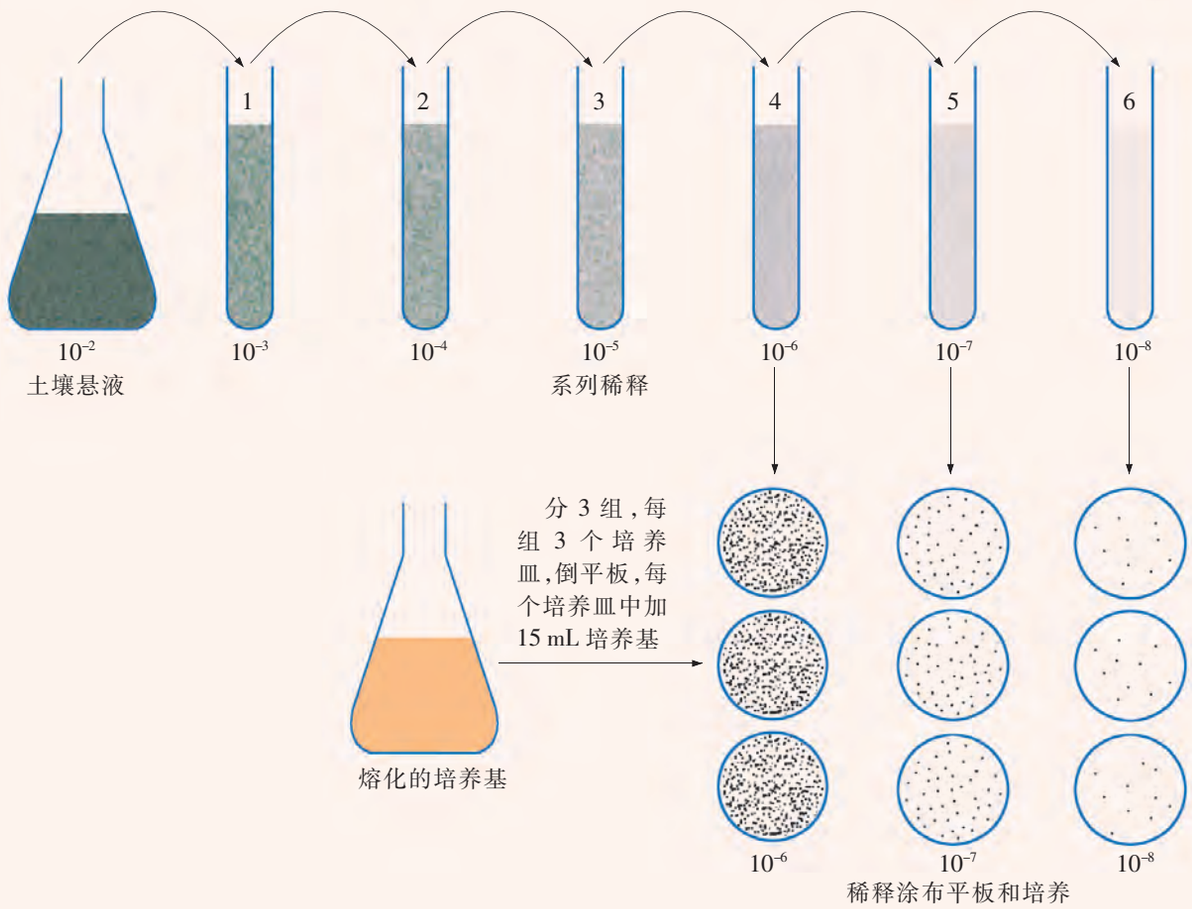


图 1－2－19　用稀释涂布平板法分离微生物并计数的操作示意图

5. 培养与观察：将已经标明培养基种类、培养日期以及样品稀释度的培养皿，倒置于 37 ℃ 恒温箱中培养 1~2 d。每 24 h 观察一次每个培养皿中的细菌菌落。

6. 计数菌落：取出已培养 1~2 d 的平板，统计每个培养皿中的菌落数。计算时，选取菌落数为 30~300 的一组为样本进行统计。每克土壤样品的细菌数=某一稀释度几次重复培养后的菌落平均数×稀释倍数÷涂布所用稀释液体积数。

微生物培养物不可随意丢弃，应对其进行灭菌处理后置于回收桶中，以免造成环境污染！

结果与分析

菌落数目在 30~300 的一组平板上一般可以获得单个分解尿素的细菌菌落。通过统计菌落数，可获得每克土壤样品中分解尿素的细菌数。

本节练习

一、思辨题

1. 采用平板法培养微生物的过程中，使微生物均匀分布在培养基上需要用到的工具是（　　）

A. 接种环　　B. 涂布器　　C. 接种针　　D. 移液管

2. 高压蒸汽灭菌锅是一种常用的灭菌设备，其灭菌原理是利用高温高压条件导致（　　）

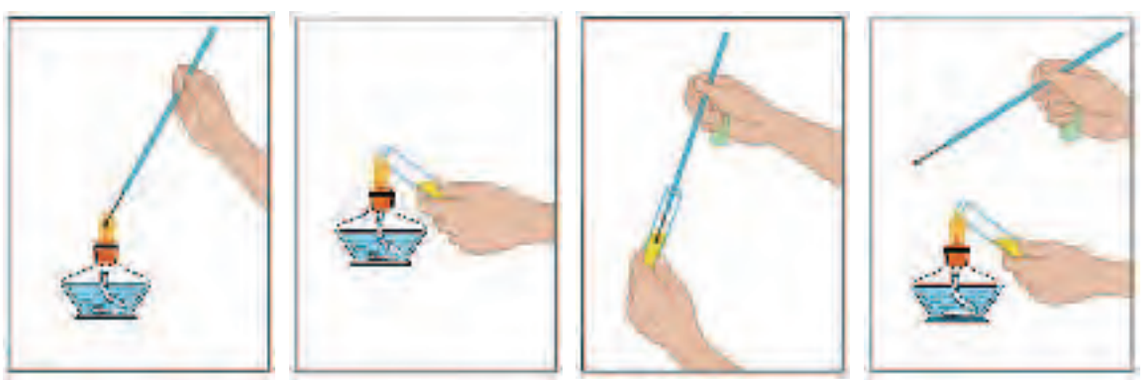
A. 菌体和芽孢都存活　　B. 菌体死亡但芽孢存活

C. 菌体和芽孢都死亡　　D. 菌体存活但芽孢死亡

3. 在无菌操作的条件下，为什么能通过稀释涂布平板法对所培养的微生物进行计数？

二、应用题

1. 无菌操作是微生物分离和纯化培养的基本要求。下图为部分操作步骤示意图。



A　　B　　C　　D

无菌操作步骤示意图（部分）

（1）图 A~D 的操作体现无菌操作的要求了吗？

（2）图 A~D 所示的操作过程使用了哪些器具？你还知道哪些无菌操作的器具？

2. 微生物分离和纯化培养的方法很多，平板划线法和稀释涂布平板法都是常用的分离和纯化的方法。

（1）右图所示的操作过程是哪种方法？这种方法在实践中有什么作用？

（2）在进入发酵工程实验室时，操作人员一般须穿实验服、戴实验帽和防护镜，确保无菌和安全操作。右图显示的操作过程最好在超净工作台上进行。使用超净工作台时有哪些需要注意的安全事项？为什么？

某种无菌操作示意图

如果你想要更多地了解与发酵培养基的制备有关的知识，请参考下列资料。

陈坚，堵国成. 发酵工程原理与技术. 北京：化学工业出版社，2012.

第三章　发酵培养基的制备与灭菌　第二节　发酵培养基的设计

第三节　传统发酵技术和产品

泡菜是一种传统的发酵食品。我国制作泡菜的历史很悠久，对泡菜的制作过程早有记载：“作盐水，令极咸，于盐水中洗菜，即内瓮中。”使用一定浓度的食盐溶液腌渍各种鲜嫩的蔬菜，再经自然发酵而成的腌制品就是我们熟知的泡菜。泡菜的制作真这么简单吗？大家想通过自己制作泡菜来认识传统发酵技术和产品吗？

积极思维　如何制作泡菜？

事实：

1. 制作泡菜的食材可以是洗净的萝卜、大白菜、甘蓝、豇豆、莴苣、芹菜、辣椒等。加工时可将食材处理成条状、片状或块状，沥干或晾干待用。另外，将沸水冷却后加入适量的盐和糖配制成泡菜液。

2. 制作泡菜的步骤如下：将加工好的蔬菜装入瓶中，注入制备好的泡菜液至刚好浸没原料，密封容器，置于阴凉处自然发酵 7~10 d。若要形成独特的风味可适当添加调料。调料包括白酒、料酒、辣椒、八角、花椒、胡椒等。蔬菜上一般会带有乳酸菌、酵母菌等微生物，故制作泡菜时无须人为添加微生物。蔬菜上的乳酸菌等微生物会分解有机物，产生乳酸等物质，使泡菜带有特殊的酸味和香气（图 1－3－1）。

图 1－3－1　泡菜是人们喜爱的一类食品

思考：

1. **解释**　为什么说泡菜是通过传统发酵技术生产的？

2. **概括**　除泡菜外，我们还接触过哪些发酵产品？

我们日常食用的腐乳、豆酱、酒也和泡菜一样，是应用微生物发酵而生产出来的产品。腐乳主要经毛霉发酵生产，豆酱经多种霉菌发酵生产，酒主要经酵母菌发酵生产。这些传统发酵技术的产品都利用了微生物的天然发酵能力。

传统发酵技术的本质是微生物的天然发酵

微生物是微小生物的总称

许多人认为，所有的微生物都是肉眼看不见的生物。你能通过实例质疑这样的观点吗？

绝大多数情况下，微生物是各种个体微小、肉眼不易看见、结构相对简单的生物的总称。微生物的种类繁多（图 1－3－2），其中有的是细胞型生物（如细菌、酵母菌），有的是非细胞型生物（如 DNA 病毒）。

- 微生物
  - 细胞型微生物
    - 原核微生物（细菌、放线菌、蓝细菌、衣原体、支原体等）
    - 真核微生物（酵母菌、霉菌、大型真菌等）
  - 非细胞型微生物　病毒（DNA 病毒、RNA 病毒等）

图 1－3－2　微生物的种类

问题与讨论

天然发酵指人们借助微生物在自然条件（包括有氧或无氧环境）下的生命活动来制备微生物菌体或代谢产物的过程。

尝试以某种食品（如腐乳）为例，推测可能有哪些微生物参与了该食品的发酵过程。

我国传统发酵技术源远流长

由于绝大多数微生物的个体很小，需要借助显微镜才能观察到，所以古代的人们并不知道什么是微生物。但是，在长期的生产活动和日常生活中，人类对微生物的利用却有着悠久的历史，并积累了丰富的经验。考古发现，早在几千年前，古人就已经发明了制曲酿酒的技术。酿酒主要是酵母菌参与的发酵过程，它需要一定的菌种、原料和控制条件，这些内容在古籍中有较为详细的叙述。此外，我们的祖先很早就已经掌握了制醋和制酱的方法。

在农业上，我们的祖先也掌握了制作堆肥和厩肥的技术，他们能利用微生物的发酵作用，将有机质转化成为简单的、可供植物吸收的营养物质。这一技术在北魏时期的农业巨著《齐民要术》中已有详细记载。

由于古人没有认识到微生物与发酵的确切关系，所以传统发酵技术基本都是发酵经验的总结。

传统发酵技术生产的食品

传统发酵是利用天然微生物的代谢活动制造或生产某些产品的过程。人类很早便学会了利用发酵来生产生活用品的技术。在发酵工程诞生之前，人们日常生活中的一些食品，如酒、酱油、醋、奶酪、酸奶，都是人类在没有深入了解微生物的情况下，运用传统的发酵技术制作而成的。

果酒和果醋的制作

果酒是以各种果汁为原料，通过微生物发酵而制成的含有酒精的饮料，包括葡萄酒、苹果酒和梨酒等。葡萄酒是以葡萄为原料酿造而成的，其酒精含量约为 10%~12%。由于酿造工艺的不同，葡萄酒又可分为红葡萄酒（葡萄汁和葡萄皮渣混合酿造）和白葡萄酒（仅用葡萄汁酿造）。

葡萄酒的工业化生产一般是用成熟葡萄果实作为原料，经过清洗、榨汁、酒精发酵、陈酿（后发酵）等制作过程，最后装瓶完成（图 1－3－3）。在葡萄酒的生产中，酵母菌在无氧条件下将葡萄汁中的葡萄糖分解成酒精，当酒精浓度达到一定的生产要求后终止发酵，便得到葡萄酒。

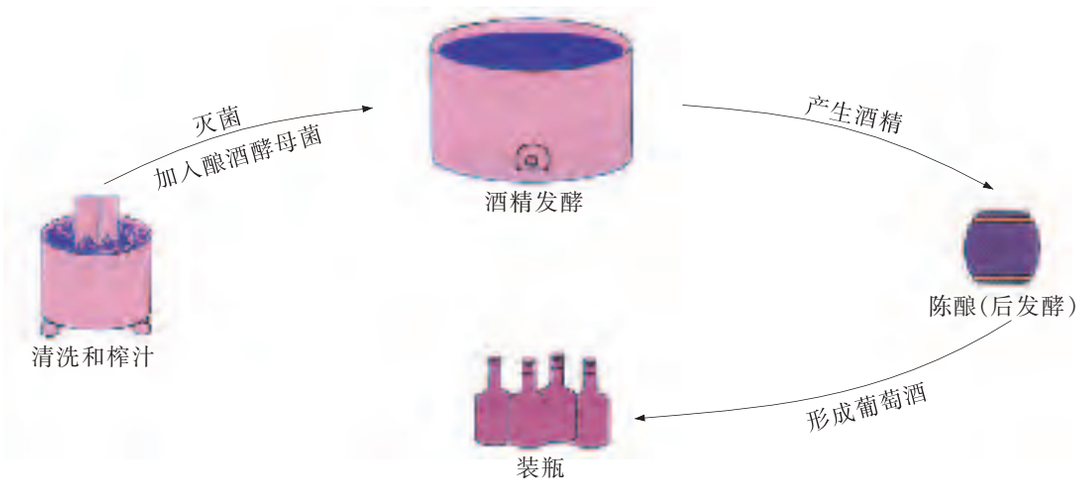


图 1－3－3　酿制葡萄酒的主要过程示意图

在有氧条件下，酵母菌能进行有氧呼吸并大量繁殖新个体；在无氧条件下，酵母菌则进行酒精发酵。酵母菌在无氧条件下将葡萄汁中的葡萄糖分解为酒精和二氧化碳，当酒精浓度达到生产要求后，即可得到葡萄酒。酵母菌细胞呼吸的反应式如下：

$C_6H_{12}O_6+6O_2+6H_2O \xrightarrow{酶} 6CO_2+12H_2O+$能量（有氧条件下）

$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{酶} 2C_2H_5OH+2CO_2+$能量（无氧条件下）

在葡萄酒等果酒的生产中，还广泛使用果胶酶（用以破坏细胞壁）等酶制剂。果胶酶的应用有利于葡萄汁的榨取，还能使酒变得清澈透明。

果醋的酿制是利用醋酸菌的发酵进行的。醋酸菌是好氧细菌，因此可以取适量葡萄酒并加入新鲜葡萄汁在氧气充足的条件下制作果醋。

醋酸菌是生产果醋的主要发酵菌。在果酒基础上的果醋发酵，是一个有氧发酵的过程，在充分供氧的条件下，醋酸菌

根据植物细胞壁的结构和组成成分的知识，你能分析使用果胶酶可以使酒变清澈的原因吗？

能将酒精氧化为醋酸。以酒精为原料，醋酸菌进行醋酸发酵的反应式可以归纳为：

$$C_2H_5OH+O_2 \xrightarrow{酶} CH_3COOH+H_2O+能量$$

在果汁发酵制作果酒和果醋的过程中，为提高果酒的制作效果，可以适当加入葡萄糖和酵母菌；为提高果醋的制作效果，也可直接加入经过分离培养的醋酸菌。

边做边学　水果的发酵加工——制作果酒和果醋

实践：

一、制作葡萄酒

1. 取成熟的紫色葡萄清洗并沥干水备用。清洗葡萄时，要连果柄一起在清水中轻轻漂洗，避免损伤葡萄果皮。

建议： 在酵母菌的自然发酵过程中，起发酵作用的主要是附着在葡萄果皮上的野生型酵母菌。此外，葡萄果皮上还附着有其他微生物，如醋酸菌。

2. 把冲洗后沥干的葡萄切成小块或连皮榨成葡萄汁，移入有盖的、洁净的大广口瓶中，发酵液总量不要超过广口瓶体积的2/3，盖上瓶盖。

建议： 酵母菌是兼性厌氧微生物，即在有氧条件下，能进行有氧呼吸并大量繁殖新个体，其繁殖的最适温度为20 ℃左右；在无氧条件下，酵母菌会进行酒精发酵，适宜温度一般是18~25 ℃。

3. 每隔一段时间轻轻旋松瓶盖放气，当葡萄皮的色素进入葡萄汁时，溶液呈现深红色，10~12 d可完成葡萄酒的制作。注意整个过程应无菌操作。

二、制作葡萄醋

1. 将适量已制备好的葡萄酒倒入一只洁净的大广口瓶中，并加入部分刚刚制取的新鲜葡萄汁。

建议： 醋酸菌是生产果醋的主要发酵菌种。新鲜的葡萄汁中含有醋酸菌，在充分供氧的条件下，醋酸菌能将酒精转化为醋酸。

2. 将纱布罩在大广口瓶上并扎紧瓶口，将大广口瓶置于清洁、无尘或无菌条件下避光培养，温度为30~35 ℃，7~8 d后就可以得到葡萄醋。

讨论：

1. 在酿制葡萄酒的过程中，为什么每隔一段时间就要旋松瓶盖放气呢？制作葡萄醋时加入适量新鲜葡萄汁的原因是什么？

2. 葡萄酒和葡萄醋的制作原理有哪些异同点？

酸奶的制作

除了酵母菌和醋酸菌，乳酸菌也是发酵工业中常用的微生物。通常把发酵过程中产生乳酸的细菌称为乳酸菌。

酸奶一般是以牛奶为原料、乳酸菌参与发酵制作而成的奶制品。酸奶既保留了牛奶的主要营养成分，又因为含有大量的乳酸菌而有新的生理作用。每天摄入适量的酸奶，可以抑制有害菌在肠道中的生长繁殖，从而改善肠道环境，维持肠道微生物的相对平衡。

在日常生活中，我们可以自己制作酸奶。

有很多人爱喝乳酸菌饮料。你知道酸奶和乳酸菌饮料的区别吗？

走进实验室

制作酸奶

酸奶是日常生活中的常见食品。现在市场上的大部分酸奶都是工业化生产的产品。利用简单的材料和器具，自己动手制作酸奶可以体验发酵技术的应用，还可以增添生活的乐趣。

实验目的

学习制作酸奶，感悟发酵技术与日常生活的关系。

实验原理

以牛奶为主要原料，接入一定量的菌种或市售酸奶（其中含有乳酸菌）。随着乳酸菌在牛奶中生长繁殖，牛奶中的乳糖变为乳酸，乳液的 pH 随之下降，乳酪蛋白发生凝集，牛奶成为酸奶。

实验器材和试剂

乳酸菌种（或市售酸奶），烧杯、玻璃棒、奶瓶、天平、恒温水浴锅、恒温培养箱、冰箱、不锈钢锅，鲜牛奶或奶粉、蔗糖。

实验步骤

1. 灭菌：将奶瓶等器皿放在不锈钢锅中，用沸水煮 15 min 以达到灭菌效果。

2. 消毒：将牛奶倒入灭菌后的奶瓶中，倒入的奶液量不要超过奶瓶容积的 2/3，再将牛奶加热至 90 ℃，保温 5 min，或将牛奶置于 80 ℃恒温水浴箱中 15 min。如果采用市售未开封的鲜奶，可直接使用。

上述两步要戴手套，避免烫伤。

建议：可在牛奶中加适量的奶粉和蔗糖，这样发酵效果会更好。

3. 接种：加热灭菌后，待原料奶的温度下降到 43~45 ℃时，向原料奶中加入市售酸奶，接种量为原料奶量的 5%~10%，用玻璃棒搅拌均匀。

4. 分装：如果需要制备更小容量的酸奶，可先将牛奶分装至容积适当的容器中，再进行发酵。这样制成的酸奶可以呈凝乳状态。

分装后，牛奶要基本装满容器，使容器上部留出的空隙尽可能小。

5. 发酵：将分装好的牛奶置于恒温箱中进行发酵。恒温箱的温度保持在 40~43 ℃范围内，培养 3~4 h；或 30 ℃培养 18~20 h。也可以采用更为简便的保温措施进行发酵。

6. 冷却：发酵结束时，将酸奶取出，迅速将其冷却到 10 ℃以下，使酸奶中的乳酸菌停止代谢，以防止酸度过高而影响口感。

结果与分析

本次发酵结束后制成的是原味的凝固型酸奶。

有兴趣的同学可以在酸奶的风味和包装上进行创新设计，以满足自身和家人的个性化需求。

本节练习

一、思辨题

1. 在生活中，果醋是一种很常见的饮品。有同学尝试利用果酒制作果醋，结果没有制作成功，其原因可能是（　　）

A. 在制作果醋的过程中未通入空气

B. 在果酒中添加了醋酸菌

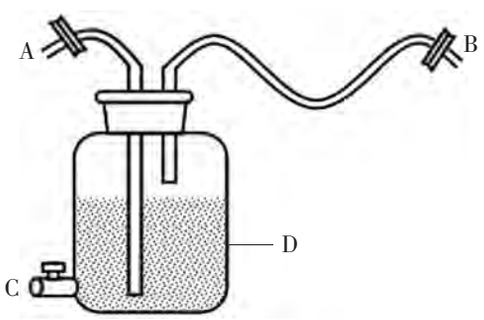
C. 加入了部分新鲜的葡萄汁

D. 灭菌时杀死了除醋酸菌外的其他微生物

2. 泡菜的质量与酸度有关。分析泡菜液中加入过量食盐会对泡菜的酸度产生影响的原因。

二、应用题

某同学设计了一种简易的发酵装置，主要结构包括 A、B、C、D 四部分，如下图所示。



简易发酵装置示意图

（1）上图装置中的 A、B 结构在果酒发酵过程中有什么作用？在果酒发酵结束后，如果用上图装置接着进行果醋发酵，需要对该装置做哪些改动？为什么？

（2）酸奶是很多人喜爱的食品之一，在实验室里我们也尝试制作了酸奶。参照上图所示的简易装置，我们能根据酸奶的制作过程，设计一种制作酸奶的简易装置吗？如果有困难，可以参照市场上销售的家用酸奶机进行设计。

如果你想要更多地了解与传统发酵有关的知识，请参考下列资料。

韩春然. 传统发酵食品工艺学. 北京：化学工业出版社，2010.

第三章　传统发酵粮食食品

课外探究　豆制品的发酵加工——制作腐乳

在日常生活中，人们经常食用各类发酵食品。腐乳是以豆腐为原料，经过发酵加工而成的发酵食品。腐乳味道鲜美、风味独特、营养丰富、价格低廉，深受人们的喜爱。民间有许多自制腐乳的方法。

实验目的

感悟发酵技术与生活的关系。

实验原理

1. 毛霉生长的最适温度为 15~18 ℃，其生长发育大致分为三个阶段：孢子萌发阶段、菌丝生长阶段、孢子形成阶段。

2. 在发酵过程中，毛霉分泌蛋白酶、淀粉酶、脂肪酶等多种酶，这些酶与其他微生物协同作用，使腐乳坯中的各种营养物质生成氨基酸和多种有机酸等。

实验器材和试剂

豆腐，玻璃瓶，相关的配料。

实验步骤

1. 将豆腐切成大约 4 cm × 4 cm×1.5 cm 的小块，微微晾干，制成腐乳坯。在晾干过程中，空气中的毛霉孢子会落到腐乳坯上。

2. 将晾制好的腐乳坯放置在清洁的容器内，彼此之间间隔约 1 cm，与容器内壁之间也要留有空隙；加盖，但要与外界相通，以便通气散热，有利于毛霉生长。

长有毛霉的腐乳坯

3. 如果发现有杂菌，应重新制作。在腐乳坯表面开始长有白色菌丝后，可翻动腐乳坯，以利于毛霉在腐乳坯各部分均匀生长（右图）。当菌丝开始变成淡黄色，并有大量灰褐色孢子形成时，便可停止发酵。用食盐水清洗腐乳坯，用食盐腌制 10 d 左右。整个过程尽可能做到无菌操作。

4. 调料主要包括料酒、香辛料（如八角）、食盐等。加入料酒的目的是抑制杂菌的生长，也使腐乳具有独特的香味；加入香辛料的目的是调节风味，也有防腐的作用。将腌制后的腐乳坯装入瓶内，浸没在配制好的调料中数月。此后，各种微生物会继续发酵（如曲霉具有分解蛋白质的功能），直至形成色、香、味俱佳的腐乳。

结果与分析

在制作腐乳的过程中，不同的调料对腐乳的风味有不同的影响。

有人参照工业化生产腐乳的方法，直接将毛霉孢子接种到腐乳坯上，发现效果很好。

如果你想要更多地了解与腐乳制作技术有关的知识，请参考下列资料。

李瑜. 酱类制品加工技术. 北京：化学工业出版社，2012.

第四章　酱类制品加工实例　第一节　发酵型酱类制品加工实例

第四节　发酵工程及其应用

大肠杆菌是与我们日常生活关系非常密切的一类细菌。在科学家发现它们之后相当长的一段时间内，它们一直被当作正常肠道菌群的组成部分，而不是致病菌。直到20世纪中叶，人们才认识到一些特殊类型的大肠杆菌具有相当强的毒性。由于它们繁殖得非常快，一旦传播开来将造成严重疫情。那么，它们繁殖得有多快呢？

积极思维　大肠杆菌的繁殖有多快？

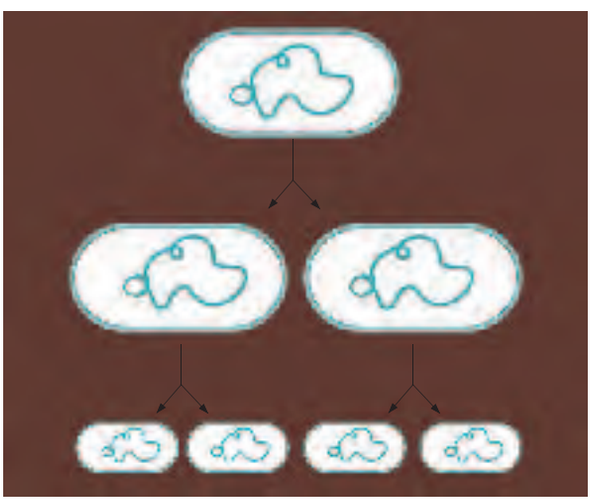


图1－4－1　大肠杆菌繁殖示意图

事实：

1. 大肠杆菌是原核生物，细胞拟核内有一个环状的双链DNA分子。细胞分裂前，DNA分子会进行复制。分裂时一般是以简单的二分裂方式进行无性繁殖的(图1－4－1)。

2. 在适宜条件下，大肠杆菌分裂一次仅需要20~30 min。以分裂一次需要20 min为例，在最佳条件下，一个大肠杆菌8 h后理论上可达到1 600多万个，10 h后可超过10亿个……

3. 实际上，大肠杆菌在生长和繁殖过程中，会消耗大量的营养物质，环境pH也会发生改变，所以大肠杆菌不可能始终如上面的描述般大量增殖。

思考：

1. **计算**　人的肠道环境非常适合大肠杆菌的生长和繁殖。利用计算器计算一个大肠杆菌在人的肠道中24 h后，理论上能达到的数量。

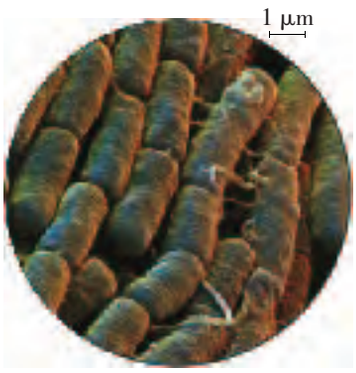
2. **推理**　大肠杆菌是一类细菌。基于日常生活中多种细菌影响我们生活的实例(如肉汤腐败)，推理细菌除了繁殖快之外，可能还会具有的特征。

繁殖快是细菌等微生物的一项特定功能，发酵工程还充分利用微生物的其他特定功能，为人类生产各类有用的产品或提供相关服务。那么，微生物还有哪些特定功能呢？这些特定功能又是如何被发酵工程所利用的呢？

发酵工程利用了微生物的特定功能

微生物种类主要包括细菌、真菌和病毒等。微生物的体积很小。例如，常见的细菌（球菌、杆菌和螺旋菌）一般需要在电镜下才能观察到（图 1－4－2）。

葡萄球菌扫描电镜照片



枯草杆菌扫描电镜照片

霍乱弧菌扫描电镜照片

图 1－4－2　三类细菌的形态

通过前面的活动，我们已经感悟到微生物具有生长旺盛、繁殖快的特定功能。在发酵工程液体培养中，接种后细菌细胞数量会呈几何级数增长。

微生物体形微小、类群庞杂、种类繁多，它们还具有一些共同的特定功能和特点。

微生物具有吸收多、转化快的特定功能。资料表明，能够发酵乳糖的大肠杆菌在 1 h 内可分解重达其自重 1 000~10 000 倍的乳糖；产朊假丝酵母合成蛋白质的能力要比大豆强 100 倍。微生物吸收多、转化快的特定功能为发酵工程产生大量代谢产物提供了保障。

微生物具有适应性强、易变异的特定功能。这为通过育种大幅度地提高菌种的生产性能提供了保障。例如，1943 年时，每毫升青霉素发酵液仅能生产约 20 单位青霉素，而目前每毫升青霉素发酵液已能产出超过 5 万单位的青霉素。

微生物还具有种类多、分布广的特点。据鉴定，已发现的微生物有 20 多万种，且不断有新种被发现。许多微生物分别具有抵抗冷、热、酸、碱、高压、高辐射和适应有氧或无氧等环境的特定功能。这些微生物可分布于土壤、水体、大气等各种环境，甚至分布于冰川、火山口等极端环境，可根据需要在发酵工程中将这些特定功能加以利用。

微生物种类繁多不仅体现在物种的种类上，还体现在微生物的生理代谢类型上。例如，有能分解石油或纤维素的微生物，有能通过化能合成作用或光合作用产能的微生物，有能分解氰化物、酚、多氯联苯等有毒物质的微生物，有能合成各种

复杂有机物的微生物。

发酵工程利用了微生物的这些特定功能生产多种多样的产品，且应用范围不断扩大。有资料表明，仅利用大肠杆菌即可生产 2 000~3 000 种蛋白质；人类发现的抗生素已经超过9 000 种，其中绝大多数来自微生物。

发酵工程的一般过程

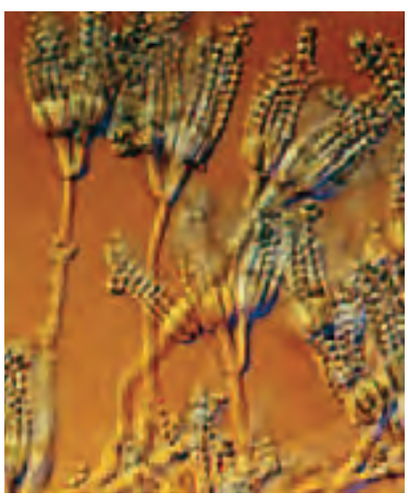


图 1－4－3　青霉(1 000×)

发酵工程常用的微生物主要有细菌(如大肠杆菌、醋酸杆菌、乳酸杆菌)、放线菌(如链霉菌)和真菌(如青霉菌)(图 1－4－3)。随着发酵工程的不断发展，动植物细胞、病毒等也逐步被应用到工业发酵之中。从日常饮用的酒、酸奶，调味的醋、酱油、味精等，到医用的抗生素、激素、疫苗等，都可通过发酵工程进行大规模生产。

在微生物纯培养技术日益成熟、现代发酵设备日趋先进的基础上，**采用现代工程技术手段，利用微生物或动植物细胞的特定功能，在人工控制的环境下生产满足人类需求的特定产品等的工程技术称为发酵工程。**

发酵工程不再是一种仅仅利用微生物代谢活动进行生产的简单工艺，而是一个综合了微生物学、化学工程、基因工程、细胞工程、机械工程和计算机软硬件工程的多学科综合工程。

知识链接　　发酵工程的由来和发展

发酵工程的由来和发展可分为以下几个阶段：

1. 天然发酵阶段

公元前 4000~公元前 3000 年，古埃及人已熟悉酒、醋的酿造方法；我们的祖先在公元前 6000~公元前 2000 年间，已发明制曲酿酒工艺，春秋战国时期已能制酱、酿醋。但当时人们还没有认识微生物。

2. 纯培养阶段

1857 年，法国科学家巴斯德在研究酒精发酵的过程中，逐步发现不同类型的发酵是由不同的微生物引起的；1905 年，德国科学家柯赫（H. H. R. Koch，1843—1910）建立了微生物的纯培养技术。人们逐渐了解微生物的作用，掌握微生物培养的方法，使人为控制微生物的发酵过程成为可能。发酵罐的发明和应用，使得发酵工业逐步进入近代工业的行列。这个时期的产品主要有酒精、丁醇、有机酸、酶制剂等，这些物质都是由相应的微生物经发酵产生的代谢产物。

3. 深层培养阶段

1928 年，英国细菌学家弗莱明（A. Fleming，1881—1955）发现了由青霉菌分泌的青霉素能够抑制葡萄球菌的生长与繁殖。1945 年，人类开始采用机械搅拌通气技术（也称为深层培养技术）大规模地生产青霉素。这极大地推动了抗生素工业乃至整个发酵工业的发展。

4. 发酵工程阶段

1973 年，美国科学家科恩(S. N. Cohen，1935—　)和伯耶(H. Boyer，1936—　)将外源基因和质粒在体外进行重组，并将这种重组 DNA 分子导入大肠杆菌，最终使得外源基因得以表达。它为基因工程的理论发展和实际应用奠定了基础。此后，世界各国的研究人员很快寻找到许多基因分离、鉴定和克隆的方法，不但培养出高产量的基因工程菌，而且能使工程菌产生自身没有而植物、动物或人体具有的多种外源蛋白，如胰岛素、生长激素、多种单克隆抗体等基因工程药物和产品。

发酵工程一般包括发酵原料的预处理、发酵培养基的配制、菌种选育和扩大培养、发酵生产和产物的分离与提纯等主要步骤(图 1－4－4)。

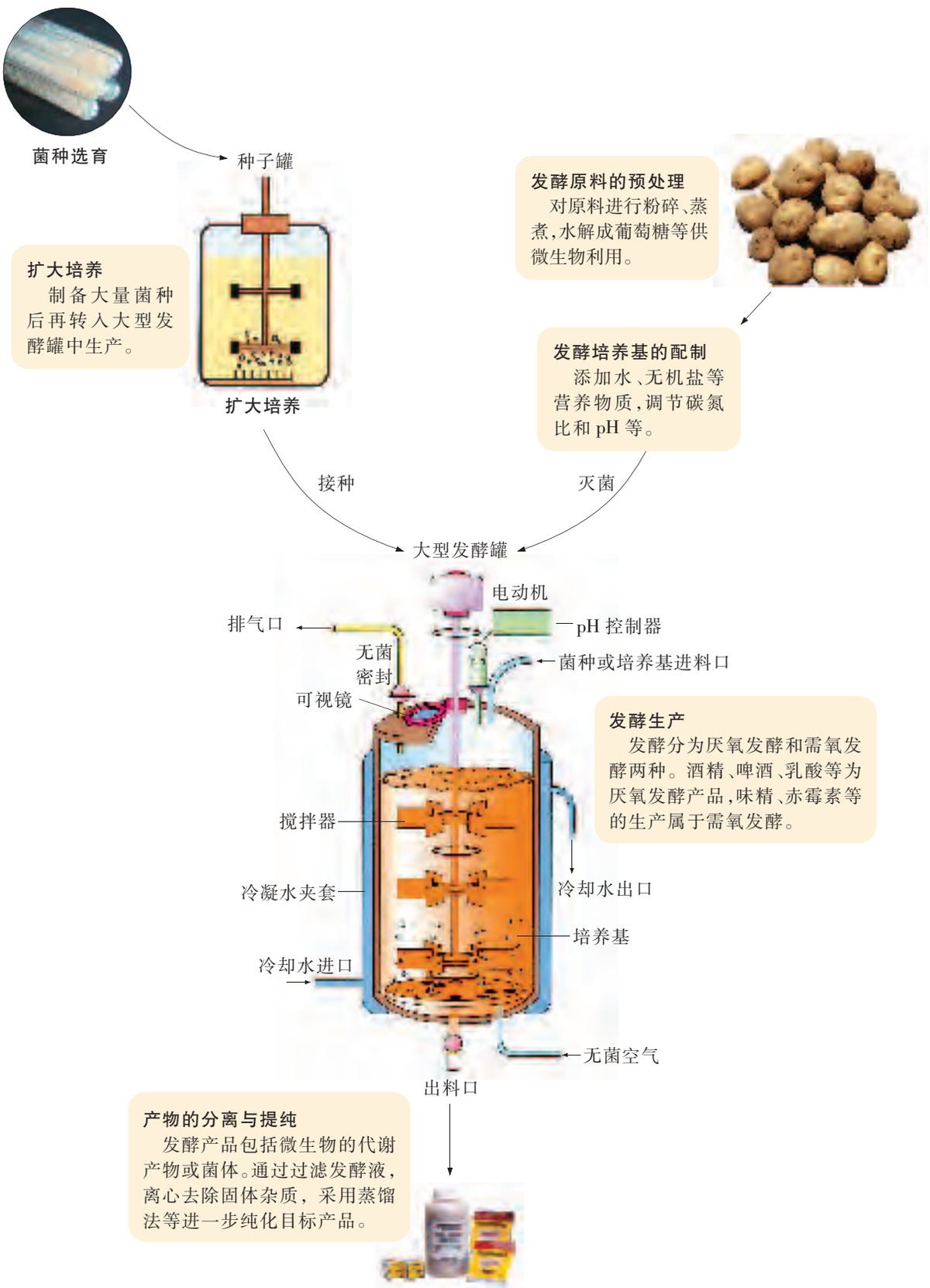


图 1－4－4　发酵工程的一般过程示意图

现在，发酵工程已经发展到可以利用计算机对发酵过程进行自动调节控制的阶段。例如，氧含量的调节可以通过通气量和搅拌的速度来实现，温度的调节可以通过发酵罐夹层或蛇形管中的冷却水的热交换作用来实现，pH 的调节可以通过在培养基中添加酸或碱等来实现。

根据发酵过程的操作方式不同，可将工业发酵分为分批发酵和连续发酵等。

积极思维

什么是分批发酵方式？

事实：

1. 目前有些产品的生产采用分批发酵方式，即一次投料、一次接种、一次收获的间歇发酵方式。

2. 在分批发酵过程中，单细胞微生物（如细菌）的生长状况随着发酵罐中各种物质浓度的变化表现出一定的规律。根据不同培养时间里细菌数量的变化，可以作出一条反映细菌在整个培养期间数量变化规律的曲线，称为生长曲线（图 1－4－5）。该曲线说明，单细胞微生物细胞群体（如细菌）在整个培养过程中主要经历了延滞期、对数期、稳定期和衰亡期等生长时期。

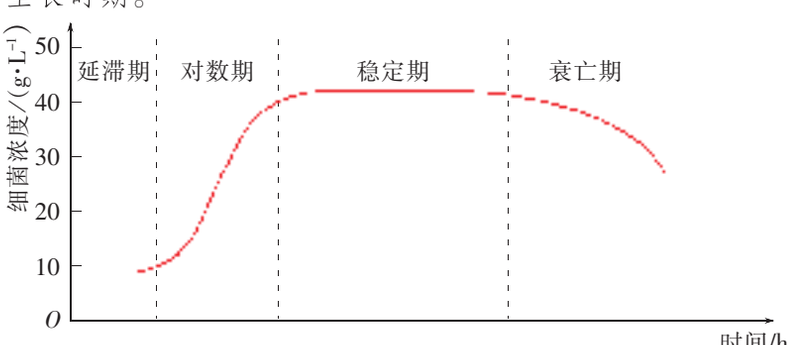


图 1－4－5　分批发酵中的细菌生长曲线

思考：

1. **分析**　尝试推测单细胞微生物生长曲线形成的原因。

2. **预测**　描述单细胞微生物（如细菌）在连续发酵的状态下的生长情况。

细菌等微生物在刚接种到一个新的环境之后，需要经历一个短暂的适应时期，称为延滞期。延滞期内微生物一般不增殖。接着，微生物进入对数期，此时细胞分裂增殖旺盛，活微生物数量增长速率最高。随着生长速率和数量的增加，微生物浓度呈几何级数增长。由于此时微生物的代谢活性高、生命力强，在生产上常作为“种子”，是科学研究中理想的实验材料。随后微生物的生长速率维持相对稳定，进入稳定期，这时如能及时补充营养物质或分离代谢产物，改善培养条件，可延长稳定期。随着

培养基中营养物质的消耗，代谢产物的积累和 pH 等环境条件的变化，微生物生长受到影响，生长速率降低，死亡速率逐步增加，活的微生物量逐步减少，进入衰亡期。此时微生物代谢活性降低，呈现衰老和自溶现象。

问题与讨论

针对分批发酵衰亡期的问题，技术人员又设计出一种补料分批发酵方式。补料分批发酵是一种半连续发酵。

到了分批发酵的中后期，要维持这种补料分批发酵方式，我们应采取哪些措施？

为了更好地克服分批发酵所存在的缺点，技术人员又设计了连续发酵的方式，即在一个培养基可流动的装置（如发酵罐）中，以一定的速率不断地放出老的培养基和代谢产物，同时不断添加新的培养基和调节相关发酵条件（如 pH），使发酵过程保持相对稳定。连续发酵有单罐连续发酵和多罐连续发酵等方式。连续发酵的主要优点在于简化了发酵罐的多次灭菌、清洗、出料等步骤，缩短了发酵周期，提高了设备的利用率和单位时间产量等。目前，这种方法在酒精、丙酮和丁醇等产品的生产中得到了成功的应用。

随着数学、物理学、化学和工程学等多学科交叉产生的技术进步，比如传感器技术和计算机技术的应用，大型发酵设备普遍地和智能控制系统相联系，实现了对影响发酵过程的多种因素的智能化和自动化控制，产物分离纯化的效率也得到了大幅度提高。

发酵工程应用广泛

发酵工程可以生产出多种类型的产物，这些产物和我们的生活密不可分，这使得发酵工程在社会经济发展中的地位和作用日益凸显。

边做边学　调查发酵工程在生活中的应用实例

实践：

1. 全班每四人一组，进入超市、药店和农贸市场等场所，调查利用发酵工程生产的产品种类。

2. 选取一种常见的发酵工业产品，到相关企业参观，了解其发酵生产过程。

3. 利用互联网或图书馆资源，查阅发酵工程应用的相关资料，并对资料按照相关应用领域进行分类。

4. 以小组为单位，在课堂上进行交流。

讨论：

1. 发酵工程在生活中有哪些重要应用？

2. 发酵工程的前景如何？说出你的理由。

发酵工程的主要产品

随着现代生物技术的发展，人们已经能够对微生物进行细胞水平和分子水平上的改良，甚至可以创造出新的微生物发酵菌种。这使发酵工程的发酵水平得到大幅度提高，发酵产品的种类不断增加。常见的发酵工程产品类型如表 1－4－1 所示。

表 1－4－1　发酵工程产品的主要类型

产品类型	主要产物
微生物菌体细胞	酵母菌、食用菌、微生物农药
微生物酶类	各种酶、酶制剂和各种曲类
微生物代谢产物	初级代谢产物，如氨基酸、有机酸、有机溶剂、核苷酸、蛋白质、核酸和维生素；次级代谢产物，如抗生素、生物碱和植物激素类似物
微生物转化产物	利用微生物代谢过程中的某种酶或酶系，将一种化合物转化成含有特殊功能基团的产物。例如，将甘油转化为二羟基丙酮，将葡萄糖转化为葡萄糖酸，将甾体转化成甾体激素
工程菌发酵产物	通过基因工程和细胞工程创造出许多具有特殊功能的“工程菌”，用发酵技术生产更多更好的产品，发挥更大的经济效益
动植物细胞的产物	通过大规模培养木瓜细胞，生产木瓜蛋白酶；利用植物细胞培养技术生产天然食用色素等

发酵工程的应用领域

人类利用微生物生产各种产品已有数千年的历史。最初，微生物的应用仅限于食品发酵。随着近代微生物工程与发酵工程的发展，发酵工程应用领域逐渐扩展到医药、食品、农业以及环境保护、能源及冶金等诸多行业。

发酵工程在医药业中的应用主要包括生产各种抗生素、酶、氨基酸、激素和免疫制剂。这些产品是微生物等在其生命活动过程中所产生的、具有生理活性的代谢产物或其衍生物，是人类控制感染疾病、保障身体健康以及用于防治动植物病虫害的重要药物（表 1－4－2、表 1－4－3）。

表 1－4－2　发酵工程生产的部分抗生素

生产菌种	抗生素	主要治疗疾病
产黄青霉	青霉素	脑膜炎、骨髓炎、肺炎
卡拉链霉	卡拉霉素	结核病
红链霉	红霉素	肺炎、败血症
灰色链霉	链霉素	肺结核

表 1－4－3　发酵工程生产的功能酶

生产菌种	功能酶	主要功能
黑曲霉	纤维素酶	畜禽生产上用于提高饲料利用率
曲霉	葡聚糖酶	预防龋齿
芽孢杆菌及链霉菌	纤溶酶	治疗血栓性疾病

发酵工程可生产许多具有治疗作用的氨基酸。例如，有证据表明，精氨酸等可以治疗高氨血症（尿素合成障碍导致的血氨浓度升高）等疾病。

发酵工程还可生产甾体激素（类固醇激素），如氢化可的松（糖皮质激素）；生物制品，包括菌体、代谢产物及免疫制剂；酶抑制剂，如神经氨酸酶抑制剂（抗病毒药）。

随着基因工程的发展，治疗糖尿病的胰岛素、抗肿瘤的干扰素、乙肝疫苗等药物已经能通过发酵工程进行大规模生产，为人类健康作出了重要贡献。

发酵工程在食品业中的应用除了体现在酿造酒、醋、酱油等传统酿造业外，还用于生产调味品或发酵食品等（表 1－4－4）。

表 1－4－4　发酵工程在食品业中的部分应用

生产菌种或酶	产品类型	主要产品
米曲霉、酵母菌、乳酸菌	调味品	酱油
谷氨酸棒状杆菌	调味品	味精
毛霉、黑根霉	发酵食品	腐乳
酵母菌	含醇饮料	啤酒
毛霉、根霉、酵母菌	含醇饮料	黄酒
红曲霉	食品添加剂	红曲色素
克拉克须霉	食品添加剂	β-胡萝卜素

发酵工程还可以用于生产甜味剂（如葡萄糖、麦芽糖）和应用于食品加工（如生产各种单细胞蛋白）等。

发酵工程在农业中的应用也很广泛，包括生产生物农药、生物增产剂、生物除草剂以及饲料添加剂等。

生物农药主要包括真菌杀虫剂（如白僵菌杀虫剂）、细菌杀虫剂（如苏云金杆菌 Bt 杀虫剂）等。生物增产剂主要有微生物肥料和微生物饲料，例如，接种固氮菌可增加土壤氮肥的肥力；而发酵饲料、青贮饲料和单细胞蛋白都是很好的微生物饲料。生物除草剂也有应用，例如，我国科学家用专门寄生于菟丝子上的某种真菌制成防治农田杂草菟丝子的除草剂。饲料添加剂包括通过发酵工程生产的氨基酸、维生素、调味剂等。

你还知道哪些发酵工程在农业中应用的实例？

发酵工程在其他领域的应用也很广泛。例如，发酵工程的产物淀粉酶、脂肪酶、蛋白酶、纤维素酶在纺织、皮革制造、造纸等行业中都发挥着重要作用，发酵工程还可以应用于污水处理或沼气发酵等方面。

本节练习

一、思辨题

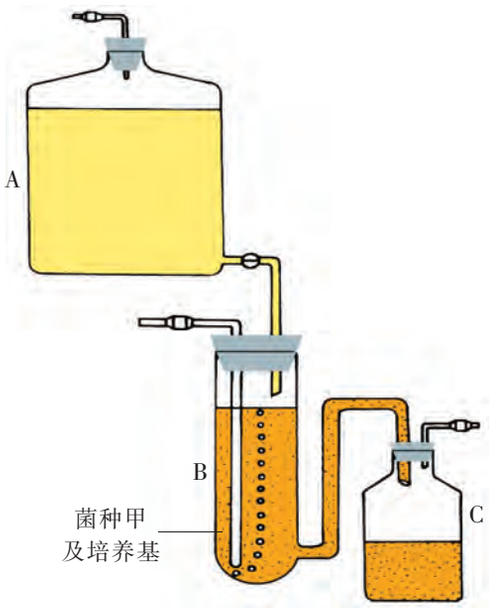
1. 下列生活用品的生产，与发酵工程无直接关系的是（　　）

A. 沼气　　B. 天然气　　C. 味精　　D. 啤酒

2. 个体微小是微生物的重要特点之一。这一特点与微生物成为发酵工程的常用材料有什么关系？

二、应用题

1. 发酵工程是大规模工业化的微生物发酵过程。右图是一位学生针对某种氨基酸的生产设计的实验装置示意图。



发酵生产实验装置示意图

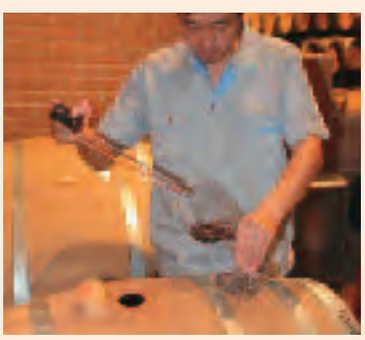
（1）从该学生设计的流程图中的装置 A 分析，他设计的装置 A 的作用是什么？他采用的是分批发酵方式，还是连续发酵方式？

（2）如果该生产过程采用的是菌种甲，发酵过程需要氧，产品是某种氨基酸，尝试在右图中标出供氧装置和产品位置。

2. 日常生活中的很多产品都是通过发酵工程生产的。在工业发酵生产过程中常用一些细菌作为菌种进行发酵，这些细菌在经过一段时间的发酵后，容易积累酸性物质而导致菌体代谢缓慢。如果上述简易装置是发酵罐的结构示意图，我们能设计一种延长细菌发酵生产过程的方案，或者提出一种保持发酵过程中发酵液 pH 稳定的思路吗？

3. 通过互联网或图书馆，搜集有关计算机在生物发酵工程方面应用的资料。有兴趣的话，可以整理归纳相关研究现状和预期进展的资料，与班上其他有兴趣的同学交流。

走近职业


发酵技术员在进行酒类发酵检测工作

发酵技术员

随着科学技术的发展，工业发酵日益受到人们的重视，反应设备自动化、连续化程度越来越高，使发酵水平在原有基础上日益提高和创新。发酵技术员应熟悉发酵罐的基本结构及工作原理，有大型发酵罐操作的能力，熟悉抗生素、氨基酸、原料药等的生产工艺流程。

许多具备微生物学、生物工程、化工、制药等相关专业大专及以上学历的人在从事发酵技术员的工作。

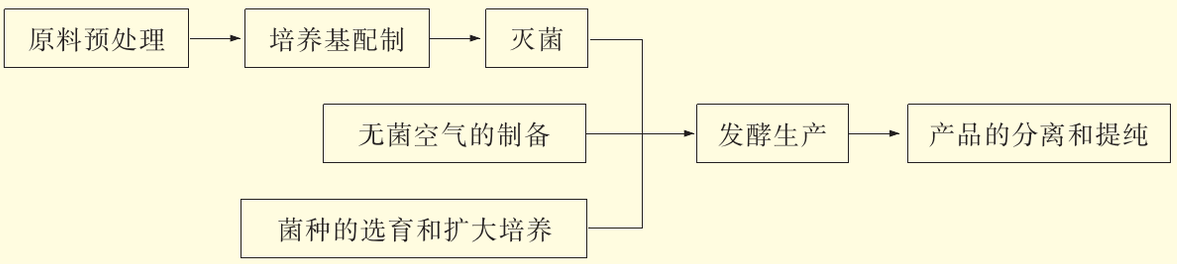
如果你想要更多地了解本职业的相关情况，请访问我国关于职业介绍的网站。

本章小结

概念回顾

●**获得纯净的微生物培养物是发酵工程的基础。**无菌技术是指在操作过程中,保持无菌物品与无菌区域不被微生物污染的技术。实验中可以通过调整培养基的配方(特殊培养基)来有目的地培养某种微生物,可以通过平板划线法和稀释涂布平板法进行微生物的分离和纯化。

●**发酵工程能为人类提供多种多样的产品。**发酵工程利用现代工程技术及微生物的特定功能,规模化生产人类所需产品,它们在医药业、食品业及其他工农业生产上有重要的应用价值。发酵工程的基本过程可以简要归纳和概括为下图。



发酵工程基本过程示意图

素养提升

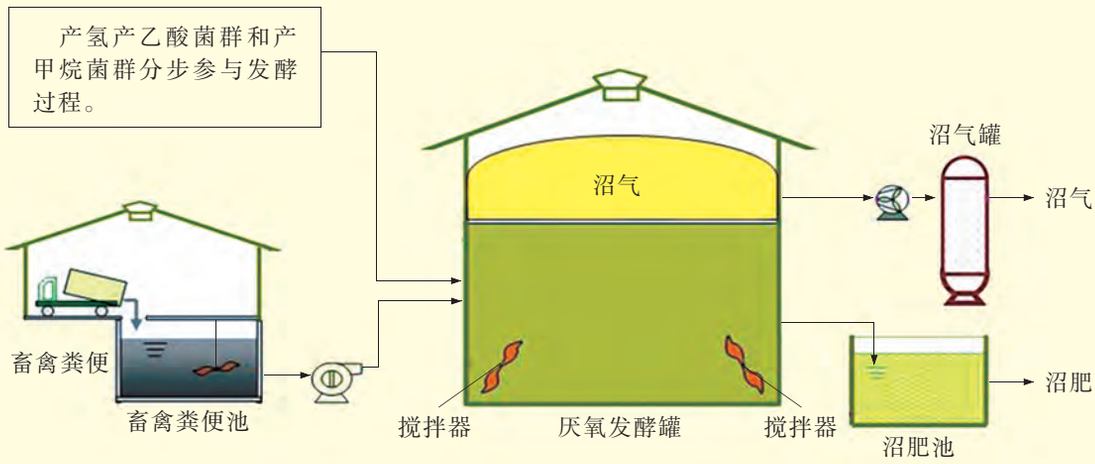
●能通过微生物实验操作,掌握相关实验技能;能通过配制培养基、灭菌、接种和培养等实验操作过程,掌握微生物培养的基本技能;能通过平板划线法和稀释涂布平板法的操作,掌握微生物分离和纯化的基本方法。

●感悟到生物科学、技术和社会的关系越来越密切。通过利用乳酸菌发酵“制作酸奶或泡菜”的活动及利用酵母菌、醋酸菌分别“制作果酒和果醋”的活动,感悟到发酵工程的应用价值,体会到发酵工程正在改变着我们的社会和生活。

●能自己设计实验方案、实施实验、收集和整理相关资料、分析数据和证据、撰写实验活动报告等;面对日常生活中与发酵工程有关的问题,能基于证据运用生物学基本概念和原理,积极参与讨论和决策;对于相关社会热点问题,也能依据科学的观点,理性地参与讨论。

本章练习

1. 发酵工程的应用十分广泛，沼气发酵工程便是应用实例之一。通过沼气发酵可以解决养殖场粪污染问题，并能获取清洁能源。沼气发酵进程分为水解液化、酸化和甲烷化三个阶段，每一个阶段都需要不同微生物参与，下图为沼气发酵工程的简易示意图。



沼气发酵工程示意图

（1）观察上述沼气发酵工程示意图，畜禽粪便中的有机物质（如未消化的秸秆、杂草）可以看作发酵工程的培养基。与基础培养基比较，该培养基的碳源、氮源及多种无机盐分别是什么？

（2）产氢产乙酸菌群和产甲烷菌群在沼气发酵过程中的作用是相互协调的，它们在沼气发酵过程中的作用分别是什么？

（3）沼气发酵工程中的菌种是需要通过纯培养获得的。推测能否采用平板划线法获得纯化的产甲烷菌？如果不清楚，请查阅相关资料，再和大家交流。

（4）在我们的生活用品中，有哪些是需氧发酵产品？有哪些是厌氧发酵产品呢？

2. 发酵工程在医药上的应用非常广泛。例如，青霉素是产黄青霉菌在有氧条件下产生的一种非常重要的抗菌药品。参照沼气发酵过程示意图，设计一个简要的生产青霉素的发酵工程流程图。在这一过程中需要应用哪些无菌操作技术？如果回答这些问题有困难，可以向老师请教，或通过互联网查找有关资料。

如果想要更多地了解与本章有关的内容，请访问：
微生物学、细胞工程学、基因工程学、现代生物技术等相关网站。

利用显微操作技术进行细胞融合

第二章
细胞工程

对“组织培养花卉”“单克隆抗体”“干细胞捐赠”“克隆羊多莉”“试管婴儿”等词汇我们已经不感到陌生了，有些甚至已经出现在我们的日常生活中。其实，它们都和细胞工程有关。

那么，什么是细胞工程？细胞工程包含哪些技术？在工农业生产中如何利用这些技术？这些技术在社会发展和日常生活中还有哪些应用前景？

第一节　植物细胞工程

当我们食用香蕉、草莓等水果的时候，可能没有想到除了传统的栽培方式外，它们还可以通过植物组织或细胞培养生产出来。植物组织或细胞培养的理论基础是细胞全能性(cell totipotency)。科学家为证实植物细胞具有全能性，付出了50多年的艰辛努力。我们从科学家证实植物细胞全能性的史实中能学到什么？

积极思维——从科学家证实植物细胞全能性的史实中能学到什么？

事实：

1. 1902年，奥地利植物学家哈伯兰特（G. Haberlandt，1854—1945）预言，离体的植物细胞具有全能性，在合适的条件下能够发育成为完整的植物体。随后，许多科学家为此开展了相关的研究。

2. 1937年，有科学家用胡萝卜根的小块组织，在人工培养条件下成功地诱导出分化程度低、具有分裂能力的愈伤组织(callus)。但他们仍然未能从愈伤组织中诱导出芽和根。

3. 1958年，美国植物学家斯蒂瓦特（F. C. Steward，1904—1993）等人用胡萝卜韧皮部的组织块（图2－1－1）培养出完整植株，这一植株能够开花结果。至此，科学家终于证实了哈伯兰特50多年前的预言。

图2－1－1　从胡萝卜根的小块组织诱导出愈伤组织

4. 科学研究是人类探索未知、揭示真理的过程。实证是科学研究的重要方法，是一个提问、假设、对假设进行验证的过程。如果验证与假设相符了，这种假设就可能得到认可；反之，就需要重新验证或者提出新的假设，并进一步验证。

思考：

1. **分析**　科学家耗时50多年的研究能证实植物细胞具有全能性吗？

2. **概括**　实证是科学研究的本质之一。基于这一视角，我们应该如何对待生物学课程的实验或探究活动？

科学家在证实植物细胞具有全能性后，通过培养植物的组织获得了一批又一批所需植株。此后，植物组织培养技术也渐趋成熟。让我们先从植物组织培养内容开始，学习植物细胞工程的知识吧！

植物组织培养技术

植物组织培养(plant tissue culture)**技术是利用细胞全能性，在无菌条件下，将离体的植物器官、组织、细胞或原生质体**(protoplast)**等，在培养基上培养，使其发育成部分或完整植株的技术**。在生产实践中，花药、茎尖或叶片的组织培养已被广泛应用到植物种质资源保存、脱毒植株的获得和快速繁殖等领域。植物组织培养技术的具体步骤主要包括：

选材

用于植物组织培养的材料如离体的植物器官、组织、细胞或原生质体，统称为外植体(explant)。植物的茎尖、根尖、幼嫩的叶片、花药是植物组织培养中常用的外植体。在利用不同的外植体进行培养时，需要对材料进行选择。例如，在利用胡萝卜的根进行组织培养时，一般是选取含有形成层的部分作为外植体(图 2－1－2)。

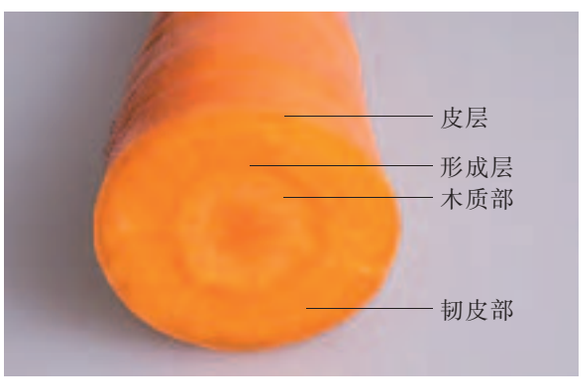


图 2－1－2　胡萝卜根横切面的结构示意图

消毒

可用消毒剂(如酒精、过氧化氢溶液、次氯酸钠溶液)除去外植体表面的微生物。消毒后的外植体需要用无菌水充分冲洗，以避免消毒剂对外植体的生长、分化过程产生不良影响。

接种

无菌条件下，将外植体置于适宜的培养基上的操作称为接种。细胞生长和植株生长所需的营养条件既有一定区别，又基本相似。接种用的培养基一般都要含有适量的水分、无机盐、碳源、氮源、维生素以及植物激素等。在植物组织培养中，培养基的碳源一般采用蔗糖或葡萄糖。

诱导脱分化

外植体的细胞大多已经分化，在进行植物组织培养时，首先要诱导外植体的细胞脱分化(dedifferentiation)。将已有特定结构和功能的植物组织，在一定的条件下，诱导其细胞改变发育途径，逐步失去原有的分化状态，转变为具有分生能力的细胞，这一过程称为植物细胞脱分化。植物细胞脱分化后形成愈伤组织。愈伤组织是一团没有特定形态、结构和功能的薄壁细胞，一般处于旺盛分裂状态。具有分生能力的植物组织或细胞更容易被诱导形成愈伤组织。

诱导再分化

愈伤组织生长一段时间后，将其移植到新的培养基上继续培养，经诱导分化，形成芽和根等器官，或进一步发育成完

整植株。这一过程称为再分化。在适当的培养条件下，愈伤组织再分化后可发育为新植株，也可诱导形成胚状体（类似种子中胚的结构）。

问题与讨论

根据来源不同，胚状体分为体细胞胚和生殖细胞胚两种。体细胞胚一般来源于植物二倍体的体细胞（如根、茎、叶的组织），可以发育为正常可育的植株。

推理一下，生殖细胞来源的胚状体怎样才能发育成正常可育的植株？

由于外植体种类和培养目的不同等原因，维持细胞生长和诱导细胞分化的条件不尽相同，所用培养基的成分也有所不同。研究表明，培养基中生长素和细胞分裂素的相对浓度会影响愈伤组织再分化为根和芽的过程。例如，烟草愈伤组织在生长素浓度/细胞分裂素浓度的比值高的情况下，有利于根的形成；反之，则有利于芽的形成。而当生长素和细胞分裂素浓度相当时，会促进愈伤组织的生长。此外，培养基 pH 等也对再分化过程有影响。

炼苗移植

对分化形成的幼小植株需要进行炼苗，使之逐渐适应自然环境，以保证幼苗移植到大田能顺利成活。炼苗成功后，可以将植株移栽到大田，用于生产。

以某种植物茎尖为外植体的组织培养主要过程如下图所示（图 2－1－3）。

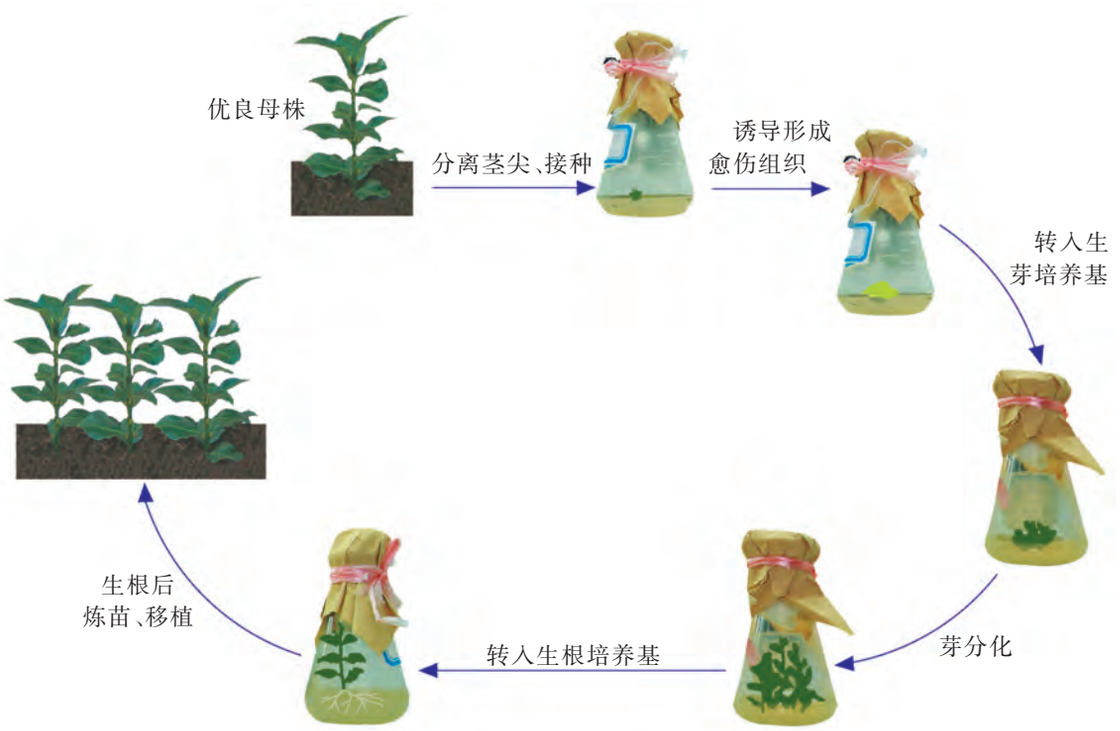


图 2－1－3　某种植物茎尖组织培养过程示意图

走进实验室

天竺葵的组织培养

一株花卉繁殖后代，若用分株法进行繁殖，一般一年只能繁殖出几株到几十株新植株；而采用植物组织培养技术，一年则可以繁殖出几万甚至数百万株新植株。

实验目的

1. 学会配制植物组织培养的培养基（如 MS 培养基），学会外植体的制备、接种、消毒、灭菌等多项技术。

2. 掌握植物激素在愈伤组织再分化等过程中的作用，学会合理使用植物激素。

3. 尝试进行植物组织培养，关注植物组织培养技术在生产中的应用。

实验原理

1. 植物体的每个体细胞都携带了来自受精卵的完整的基因组。当植物细胞脱离了原来植物体的组织、器官而处于离体状态时，经过适当处理后，它们在适宜的培养基上，经过脱分化、再分化，可发育成完整的植株。

2. 组织培养得到的试管苗是非常幼嫩的植株。它们生长在试管或培养瓶内，在恒温、高湿、弱光、无菌和有完全营养供给的条件下，植物表面蜡质和角质层等保护组织不发达，气孔数目少，有叶绿体但光合作用能力差。这样的试管苗一般要经过炼苗，以逐渐适应自然环境下的生长条件。

实验器材和试剂

1. 天竺葵（如香叶天竺葵、马蹄纹天竺葵）幼嫩叶片。

2. 高压蒸汽灭菌锅、超净工作台、光照培养箱（图 2－1－4）、冰箱、烘箱、摇床、显微镜、镊子、剪刀、解剖刀、酒精灯、定时器、温度控制器、培养架、锥形瓶、天平、酸度计、电炉等。

3. MS 母液、酒精、氯化汞、氢氧化钠、吲哚丁酸、萘乙酸和 6–苄氨基嘌呤等。

图 2－1－4　光照培养箱

实验步骤

1. 培养基的配制与灭菌

植物组织培养中常用的培养基是 MS 培养基。MS 培养基含有 20 多种营养成分，包括大量元素如 N、P、S、K、Ca、Mg，微量元素如 B、I、Cu、Mn、Zn、Mo、Co、Fe，还包括甘氨酸、维生素、肌醇、烟酸等有机物。

实验室通常先配制 MS 培养基母液并置于 4 ℃的环境下保存。实验时再根据需要，用 MS 培养基母液制备 MS 培养基（见后面的“技能指导”）。

（1）配制 MS 培养基：配制 1 L MS 培养基时，先量取已配制好的母液 Ⅰ 50 mL 以及母液 Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ各 5 mL，放入烧杯中混合均匀；再称取蔗糖 30 g、琼脂 9 g 放入 2 000 mL 的烧

杯中，加蒸馏水 800 mL 后，边加热边搅拌，使液体呈半透明状。

将配好的混合液倒入琼脂溶液中，并根据培养目的适当加入植物激素，再加入蒸馏水定容至 1 L，并调节溶液的 pH（一般为 7.0）。

（2）分装与灭菌：趁热将培养基进行分装，通常将培养基倒入 500 mL 的烧杯中，再倒入 50 mL 或 100 mL 的锥形瓶中。倒入培养基的量一般为锥形瓶容量的 1/5~1/4，倒入时不要让培养基粘到瓶口或瓶壁上。

分装完毕后，及时用牛皮纸封盖瓶口，并用线绳捆扎好。

将分装好的培养基连同剪刀、镊子等器具一起放入高压蒸汽灭菌锅中，在 121 ℃下灭菌 20 min。等培养基自然冷却后，置于 30 ℃的培养室中观察 3 d，以检查是否彻底灭菌。培养基通常在 4~10 ℃的环境下储藏备用。

2. 外植体的选择与制备

植物组织培养的各项操作均需要在无菌室中或超净工作台上进行。工作台消毒后，摆放好解剖刀、镊子、酒精灯等器具以及经过消毒处理过的外植体、用于接种的无菌培养基等。

（1）外植体的选择：选用天竺葵的幼嫩叶片作为外植体。

（2）外植体的制备：取天竺葵幼嫩的叶，流水冲净后，用体积分数为 70%的酒精浸泡 10 s（时间过长会伤害植物细胞），再用无菌水冲洗 2~3 次后，用无菌滤纸吸干表面水分，浸没在质量分数为 0.1%的氯化汞溶液中约 5 min。

氯化汞有毒，回收氯化汞溶液以保护环境。

从氯化汞溶液中取出叶片后，立即用无菌水漂洗 4~6 次，清除残余消毒液。再用无菌试纸吸干叶表面水分后，在无菌条件下，切去天竺葵叶柄，将叶片从叶脉处剪开，再切成 1 cm×1 cm 小片作为外植体，并放入无菌培养皿中备用。

3. 接种

制备好外植体后，在无菌条件下，左（右）手持装有培养基的无菌锥形瓶，将锥形瓶的瓶盖打开并攥在右（左）手中。左（右）手持瓶靠近火焰，使瓶口旋转通过火焰。右（左）手用灭过菌的镊子夹取外植体，放入培养基中，一般每瓶接种 6~8 块。在接种过程中，每次夹取外植体前要灼烧接种器具，防止交叉污染。

在外植体放入无菌培养基时，一般将天竺葵叶背面接触培养基。

接种后，用瓶盖或瓶塞盖好，并在锥形瓶上贴上标签，写明组织培养的材料名称、接种日期和接种人姓名或小组序号。

4. 诱导脱分化与再分化

将接种了天竺葵叶组织块的锥形瓶置于培养箱或培养室中，在 15~25 ℃等条件下培养（图 2－1－5）。当外植体脱分化形成愈伤组织后，转入生芽培养基中。

图 2-1-5　诱导脱分化

待愈伤组织在分化芽的培养基上再分化出幼芽后(图 2－1－6),转接到生根的培养基上(图 2－1－7)。在温度约为 25 ℃、光照强度为 2 000~3 000 lx 的光照培养箱内继续培养,每天光照 14~16 h。

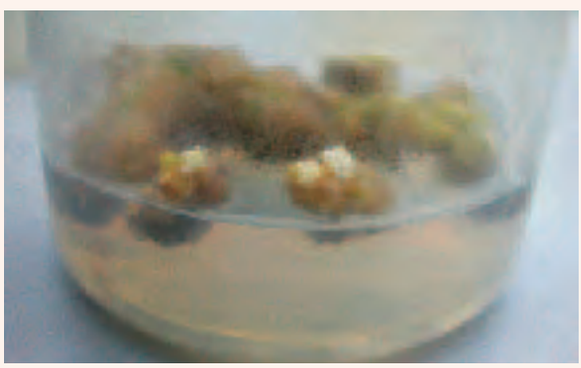


图 2－1－6　诱导愈伤组织分化出芽

图 2－1－7　把幼芽转接到生根培养基上

分化芽的培养基和分化根的培养基是分别在 MS 培养基的基础上,根据需要添加生长素类和细胞分裂素类生长调节剂如萘乙酸、6–苄氨基嘌呤配制而成的。例如,马蹄纹天竺葵分化芽的培养基主要成分为 MS、6–苄氨基嘌呤(质量浓度为 1.0 $mg \cdot L^{-1}$)和萘乙酸(质量浓度为 0.5 $mg \cdot L^{-1}$),香叶天竺葵生根的培养基是以 MS 培养基为基础,加入吲哚丁酸(质量浓度为 0.1 $mg \cdot L^{-1}$)制成的。

5. 炼苗与移植

分阶段揭开锥形瓶的瓶盖,再培养几天后,用流水清洗试管苗(图 2－1－8),除去根部的培养基,将幼苗移植到消过毒的蛭石或珍珠岩等环境中生活一段时间后,再移栽到大田土壤中。

图 2－1－8　已生根的试管苗

结果与分析

外植体接种后,培养 2 周左右,逐渐长出瘤状的愈伤组织。

当愈伤组织长到 1.0~1.5 cm 时,进行试管苗的培养。愈伤组织在分化芽的培养基上培养 4~6 周,长出芽;转接到生根的培养基上,大约培养 1~2 周可见幼根。

这些现象的出现及变化与植物种类、品种都有关系。此外,在组织培养过程中,还有多种因素会对实验结果造成影响。例如,选择外植体时,通常选择分裂能力强的部位如茎尖、芽、幼叶、根尖、幼嫩的种子等。最好在植物生长开始的时期取材,若在植物生长末期或已经进入休眠期取材,则外植体会对诱导反应迟钝或无反应,愈伤组织不易形成。培养基中营养成分、激素种类与配比以及培养基的 pH 等也会影响实验结果。如果能参照相关文献资料或实践经验,注意器具的灭菌以及培养时的温度、光照等因素,效果会更好。

技能指导

MS 培养基母液的配制

配制 MS 培养基需要利用 MS 培养基母液。配制 MS 培养基母液的配方见下表。

MS 培养基母液的配制

母液种类	化合物名称	称取量/mg	定容体积/mL
大量元素（母液Ⅰ）	NH_4NO_3 KNO_3 $CaCl_2·2H_2O$ $MgSO_4·7H_2O$ KH_2PO_4	33 000 38 000 8 800 7 400 3 400	1 000
微量元素（母液Ⅱ）	KI H_3BO_3 $MnSO_4·4H_2O$ $ZnSO_4·7H_2O$ $Na_2MoO_4·2H_2O$ $CuSO_4·5H_2O$ $CoCl_2·6H_2O$	166 1 240 4 460 1 720 50 5 5	1 000
铁盐（母液Ⅲ）	$FeSO_4·7H_2O$ Na_2–EDTA·$2H_2O$ （乙二胺四乙酸二钠盐）	5 560 7 460	1 000
有机物（母液Ⅳ）	肌醇 烟酸 盐酸吡哆醇（维生素 B_6） 盐酸硫胺素（维生素 B_1） 甘氨酸	20 000 100 100 100 400	1 000

以配制 1 L MS 培养基为例，需加入母液Ⅰ50 mL、母液Ⅱ5 mL、母液Ⅲ5 mL、母液Ⅳ5 mL，最后加无菌水定容至 1 L。

在植物组织培养的不同阶段，根据需要利用植物激素（如 2,4–二氯苯氧乙酸、萘乙酸、6–苄基腺嘌呤和维生素类）等，让组织更好地生长，所以在配制培养基（如诱导芽分化的培养基）时需要添加相应的激素。

植物体细胞杂交技术

植物体细胞杂交（plant somatic hybridization）研究是从 20 世纪 60 年代大量制备原生质体技术建立后才开始的。1972 年，科学家研究出第一个体细胞杂种植物（烟草）。1978 年，科学家又首次将番茄和马铃薯体细胞杂交，获得属间杂种细胞。

植物体细胞杂交技术

植物体细胞杂交技术主要是指将自发或人工融合的杂种细胞培育成新品种植物体的技术。植物体细胞杂交技术主要包

括原生质体的制备、原生质体融合的诱导、杂种细胞筛选和培养、杂种细胞脱分化和再分化以及杂种植株的再生和鉴定等环节(图 2－1－9)。

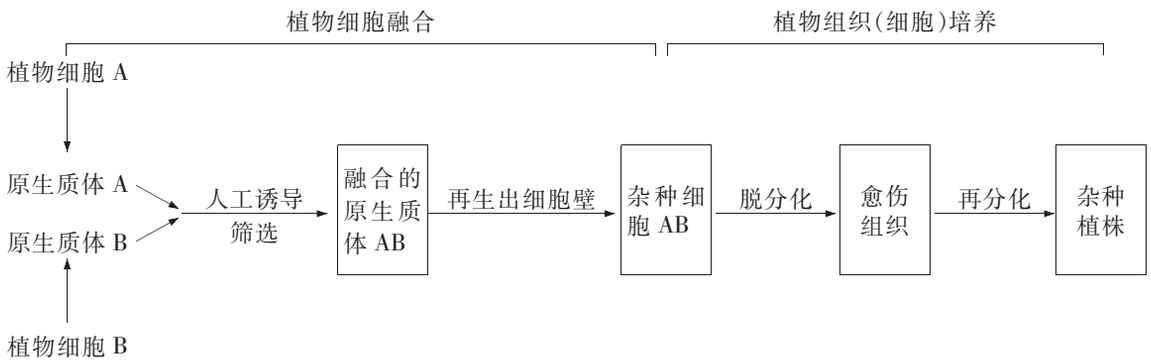


图 2－1－9　植物体细胞杂交技术过程概览

开展植物体细胞杂交首先要获得原生质体。原生质体既可从各种植物的叶肉细胞、根尖细胞获取，又可由组织培养产生的愈伤组织转化而来。

问题与讨论

1960 年，英国科学家创造性地应用酶解的方法首次成功地用番茄幼苗的根制备出大量的原生质体。

从植物细胞壁的结构和组成成分特点出发，尝试说明制备原生质体所用的酶和使用这些酶的原因。

制备原生质体的基本过程是先用酶解的方法（如纤维素酶和果胶酶）去除细胞壁，然后用低速离心等方法分离纯化得到原生质体。所获得的原生质体经活性鉴定后，用于细胞培养或体细胞杂交。原生质体与植物细胞一样，具有细胞全能性。原生质体不仅能在促融剂的作用下融合，在一定条件下还能摄入 DNA 片段、质粒、病毒、细菌、细胞器等外源物质或结构，是植物细胞工程进行遗传操作的良好材料。

原生质体融合可以是自发融合，也可以是诱导融合。植物原生质体自发融合的效率比较低，一般需要采用一定的外力来诱导原生质体的融合。

科学家在长期的实验探索中建立起多种诱导植物原生质体融合的方法。其中，效率高且对原生质体伤害小的方法主要是化学融合法和物理融合法，如聚乙二醇法(PEG)和电融合法。

植物体细胞杂交技术在植物育种上的意义

将植物体细胞杂交技术应用于植物育种，可以克服不同种植物之间杂交的不亲和障碍，打破生殖隔离，实现远缘物种之间的核质融合，再通过培养便可获得新品种植株。目前，利用该技术已经培育出多种具有优良性状的新品种，如“白菜—甘蓝”（图 2－1－10）。

图 2－1－10　“白菜—甘蓝”的培育过程示意图

与普通白菜相比，“白菜—甘蓝”具有生长周期短、耐热性强、易贮藏等优点。由此可见，通过植物体细胞杂交可以逾越种间、属间的杂交屏障，这是培育新品种的一条有效途径。目前，已经获得的属间体细胞杂交的组合还有萝卜和甘蓝、烟草和番茄、马铃薯和番茄、水稻和稻稗等。

随着植物细胞杂交技术的不断完善，获得杂种再生完整植株的范围不断扩大，但是，杂种后代遗传性状不够稳定、再生植株寿命较短等问题还有待进一步去研究与突破，以期更好地改变传统育种方式，为人类提供更加丰富的产品。

本节练习

一、思辨题

1. 形成愈伤组织对植物组织培养很重要。下列各项中，与离体培养的愈伤组织特性相符的是（　　）

A. 愈伤组织是一些有特定结构的细胞组成的

B. 已经分化的植物细胞形成愈伤组织的过程叫作植物细胞再分化

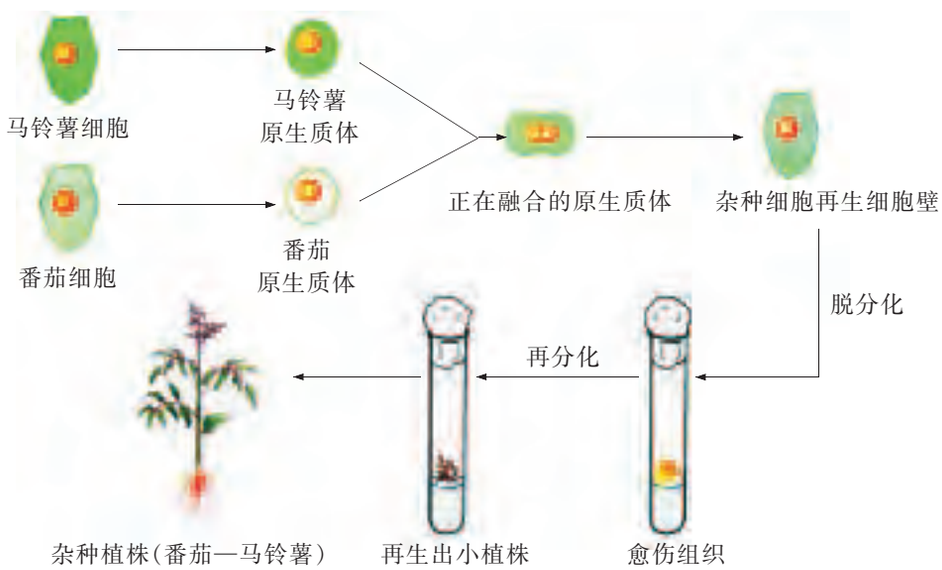
C. 愈伤组织在一定的培养条件下可以分化形成胚状体

D. 愈伤组织一旦形成就一定能分化形成根、芽等器官

2. 植物组织培养常用的 MS 培养基包含哪些主要营养成分？如何配制 MS 培养基？

二、应用题

科学家设想培育出一种地上能结番茄、地下能结马铃薯的作物。可是两个不同物种之间存在生殖隔离，在自然状态下不能完成杂交育种。有人运用植物细胞工程技术，设计了育种新方案（下图）。



番茄—马铃薯培育过程示意图

（1）上述培育过程中运用了哪些植物细胞工程技术？简要描述这些技术的一般过程。

（2）上述过程能打破不同物种间生殖隔离的原因是什么？

走近职业

植物工厂技术员在抽样测量作物生长状态数据

植物工厂技术员

植物工厂是一个通过高精度控制设施内的环境，实现农作物连续生产的高效农业系统。植物工厂技术员利用计算机对植物生长和繁育的温度、湿度、光照、CO_2 以及营养液等进行控制，并适时、适量精准施用相应的植物激素，使设施内作物几乎不受自然条件制约而完成生长。

许多接受过农学、植保、园艺等相关专业专科以上学历教育或经过相应的专业培训获得技术资质的人在从事植物工厂技术员的工作。

如果你想要更多地了解本职业的相关情况，请访问我国关于职业介绍的网站。

课外探究　　月季花药的组织培养

我国在利用花药进行组织培养方面的研究发展迅速，并被广泛应用到农业、林业生产中。利用花药进行组织培养，形成的幼苗中既有二倍体植株，又有单倍体植株，因此，需要对培养出的幼苗进行选择。

提出问题

尝试提出用某种月季品种的花药作为材料，并应用植物组织培养技术培育月季的问题。例如，如何采用某种月季的花药来培育月季的问题。

实验器材和试剂

某种月季的花药；剪刀，接种环，镊子，盖玻片，载玻片，无菌培养皿，无菌滤纸，光学显微镜，超净工作台；体积分数为 70%的酒精，质量分数为 0.1%的氯化汞溶液，用于消毒的酒精棉球，无菌水，醋酸洋红溶液，体积分数为 40%的醋酸溶液，MS 培养基，IAA，2,4-D，KT（激动素）等。

作出假设

对提出的问题作出假设。例如，在月季的初花期（一般在每年 5 月初），选择适合的花药，用 MS 培养基并添加适量的生长素等激素来培育花药。

设计实验

根据假设，考虑选用哪些器材和采用何种方法进行实验。

实施实验

按小组设计的培养方案进行实验，仔细观察实验现象，记录实验现象和数据。

1. 试剂配制

醋酸洋红溶液的配制：将 100 mL 体积分数为 45%的醋酸溶液放入烧瓶中，加热至沸腾后，缓慢加入 1 g 洋红，继续加热，待洋红溶解后冷却过滤备用。

培养基的配制：采用 MS 培养基，并在 1 000 mL 培养基中添加 0.4 mg 2,4-D、0.2 mg KT 和 4 mg IAA，调节 pH 至 5.8。

2. 材料选取

选择未开放的花蕾作为实验材料，对这些花蕾中的花药进行取样，并用醋酸洋红染色法对其染色，通过镜检来确定花药是否处于适宜的发育期（如减数分裂末期的花药）。

3. 材料消毒

先将适宜的花蕾用体积分数为 70%的酒精浸泡约 30 s，取出后用无菌水清洗，用无菌滤纸吸干花蕾表面的水，再放入质量分数为 0.1%的氯化汞溶液中浸泡 2~4 min，取出后用无菌水冲洗 3~5 次。

4. 接种与培养

在无菌条件下，将消毒后的月季花蕾置于培养皿中的无菌滤纸上，用无菌镊子剥去花萼、花冠，露出雄蕊，再用镊子夹住花丝取下花药，迅速接种到培养基上。每瓶接种 5~6 枚花药，在 25 ℃和无光照条件下进行培养。在幼小植株形成后再给予光照。

结果与讨论

观察实验现象，花药经过 20~30 d 培养后，会开裂，长出愈伤组织或胚状体等。将愈伤组织转移到分化培养基上培养，可发育成完整植株。

将探究结果用实验报告、照片或实物等形式与同学和老师进行交流。

第二节　植物细胞工程的应用

生物学上的种子是指裸子植物和被子植物特有的繁殖器官，是由胚珠发育而成的。而农业、林业生产上的种子是指农作物和林木的种植材料或者繁殖材料，包括籽粒、果实、根、茎、苗、芽、叶、花等。现在，又出现了一类新种子——人工种子。那么，什么是人工种子呢？

积极思维　什么是人工种子？

事实：

1. 人工种子是指将在植物组织培养中得到的胚状体和具有养分的人工胚乳包埋在具有保护功能的人工种皮中，在适宜的条件下能够生根发芽的颗粒体(图 2－2－1)。

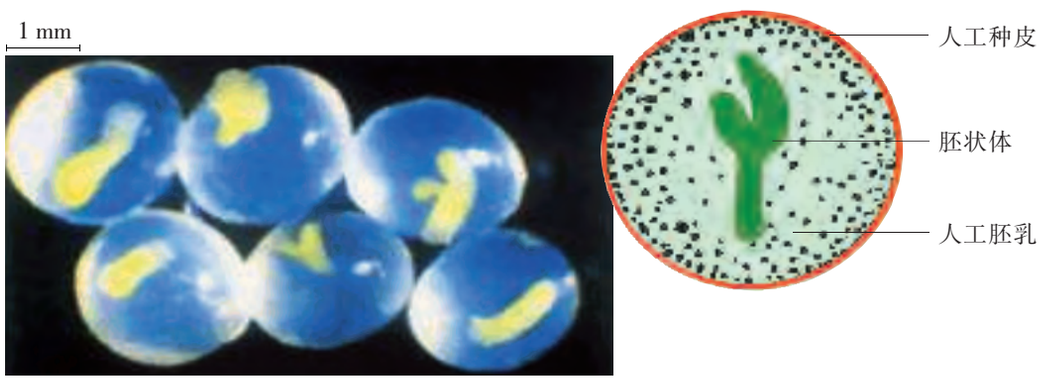


图 2－2－1　人工种子及其基本结构示意图

2. 人工胚乳的主要成分包括无机盐、糖类和蛋白质等营养物质。制备人工胚乳时，可以先将这些物质包裹在微胶囊中，再把微胶囊和胚状体一起包埋在人工种皮内。所以，人工种子的生产过程包括植物组织培养获得胚状体以及人工种皮对胚状体和人工胚乳的包埋等。

思考：

比较　与天然种子相比，人工种子可能具有哪些优越性？

人工种子不仅制种快，而且制种不受季节限制；人工胚乳可提供更好的营养供应，还可提供相应成分增强抵抗疾病的能力。制作人工种子的胚状体是通过组织培养获得的。除了人工种子外，植物组织培养技术在农业、林业生产上还有更为广泛的应用。

植物组织培养技术的应用

植物组织培养与传统的无性繁殖相比，有什么优势？

快速繁殖

为保持植物的优良性状，传统的农业生产常采用嫁接、扦插等无性繁殖的方法。现在，利用植物组织培养技术不仅可以保持优良植物品种的遗传特性，而且可以实现种苗的快速繁殖，植物组织培养技术也因此被称为“快速繁殖技术”。在进行植物组织培养的过程中，幼苗在实验室的培养瓶中生长发育，所以又被称为“微型繁殖技术”。

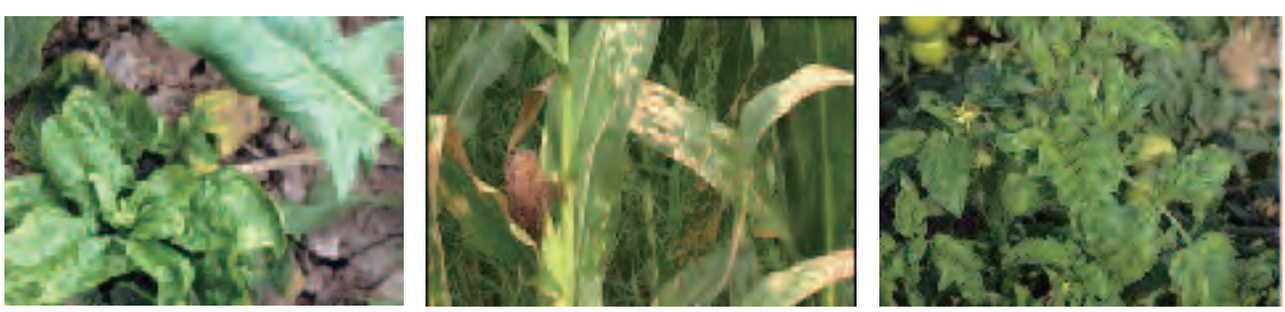
目前，人们已利用植物组织培养技术批量生产蔬菜、果树、林木和花卉（如蝴蝶兰）（图 2－2－2）等的种苗。

图 2－2－2　利用植物组织培养技术繁殖蝴蝶兰

利用植物组织培养技术繁殖植物，是在人工控制下进行的工厂化生产，不受季节和恶劣天气的影响，可以进行全年连续生产，大大提高了生产效率。

培育脱毒植物

植物病毒一般是通过损伤部位入侵植物体的。侵入植物体的病毒在细胞中会大量增殖并感染相邻的细胞，最终扩散至整个植株。植物病毒的种类很多，如感染甜菜的病毒、感染玉米的病毒、感染番茄的病毒，它们在植物体内的大量增殖会导致植物患病（图 2－2－3）并影响产量或品质。



甜菜病毒病　　玉米病毒病　　番茄病毒病

图 2－2－3　植物病毒导致植物患病

科学家早就发现，植物生长点部位的病毒浓度很低甚至无病毒。这是因为这些部位没有维管束，病毒难以进入。采用植物茎尖组织培养的方法，便可以大量繁殖脱毒植物种苗。例如，马铃薯、甘蔗、草莓、菠萝、菊花、百合和康乃馨等的脱毒苗的培育都是通过茎尖组织培养实现的。除了利用茎尖外，还可以利用花药培养来实现脱毒。利用植物组织培养技术进行植物脱毒可以降低或者去除病毒的感染，培育出大量的脱毒种苗。

知识链接　　**植物脱毒的物理方法和化学方法**

目前，植物脱毒主要有物理方法、化学方法和生物方法。

物理方法

高温处理又称为热疗法，其原理是一些病毒对热不稳定。病毒一般在高于常温的温度下(35~40 ℃)2~4 周即钝化失活，失去侵染能力，而植物在这样的条件下基本不受伤害。这种方法对感染苹果花叶病毒或康乃馨病毒等植株的脱毒十分有效。

低温处理也称冷疗法，其原理是降低温度，使病毒活力下降。例如，感染菊花矮化病毒的植株经过 5 ℃处理 4 个月可以获得近 70%的脱毒苗。

化学方法

植物脱毒的化学方法一般指利用嘌呤和嘧啶类似物或抗生素等化学药品处理患病植株的方法。该方法的原理是抑制植物体内病毒的复制。例如，放线菌酮能抑制植物原生质体中病毒的复制。

种质保存

植物细胞全能性的发现和证实还为植物种质资源的长期保存开辟了一条新途径。许多植物的组织培养物在液氮中超低温保存以后，仍能保持很高的存活率而再生出新植株，并保持原来的遗传特性。例如，胡萝卜和烟草的悬浮细胞超低温保存 6 个月以后仍然能恢复生长并分化出植株。超低温保存的植物材料，可以是植物的悬浮细胞，也可以是愈伤组织或胚状体，还包括原生质体、花粉、幼胚、芽或茎尖分生组织等。

超低温保存植物材料的原理与保存动物材料的原理一样，在−196 ℃的条件下，活细胞内的物质代谢和生命活动几乎完全停止，细胞、组织、器官在超低温保存过程中不会引起遗传性状的改变，也不会丧失形态发生的潜能。

在植物自然资源受到过度开发和严重破坏的情况下，利用人工种质库长期保存珍稀的濒危植物更加迫在眉睫。同时，这样的方法比保存植物的种子更为有利和经济，还能在需要的时候迅速且大量地繁殖植物。

问题与讨论

种质库是主要用来保存种质资源(一般为种子)的保存设施。有人认为，建立种质库保存种质资源的方法，对那些依靠营养器官繁殖的植物种类也很重要。

想一想，还有哪些植物材料可以通过种质库加以保存？

植物细胞培养技术的应用

图 2－2－4　可提取紫杉醇的红豆杉

植物细胞代谢产物的工厂化生产

植物生长到一定阶段后，会通过代谢合成一些物质，它们可能对该植物无明显生理功能，也不是该植物生长和繁殖所必需的，但这些植物细胞代谢产物可能是珍贵的药物等。早在 20 世纪 60 年代，科学家就设想：利用工业化手段培养植物细胞以获得大量细胞代谢产物。如今，经过科学家们的不懈努力，这种设想变成了现实。人们已经从植物细胞培养中获得了许多重要的细胞代谢产物，并产生了巨大的社会效益和经济效益。例如，金鸡纳树细胞产生的代谢产物奎宁是治疗疟疾的良药之一。我国科学家也通过植物细胞培养的方法，成功地培养了国家一级珍稀濒危保护植物红豆杉（图 2－2－4）的细胞，并从中提取出重要的抗肿瘤药物——紫杉醇。

此外，植物细胞培养技术也成为工业化生产相关植物产品的一条有效途径。这些植物产品不仅可以是药物（如人参皂苷），也可以是食品添加剂（如食用色素、甜味剂）。植物细胞培养技术还可以用于农副业生产。例如，大规模培养桑叶的叶肉细胞，可制作成家蚕的饲料，解决养蚕业的饲料供应问题。

利用植物细胞培养技术生产具有生理活性的代谢产物或其他产品，不仅快速、高效，而且不受季节、外部环境等条件的限制。

单倍体育种

20 世纪 20 年代，科学家首次在自然界发现高等植物曼陀罗的单倍体植株，它与正常二倍体植株相比，叶小、株矮、生存能力弱且高度不育。但是，单倍体的发现对如何在育种中缩短育种周期、获得纯系植株等具有重要意义。

为什么说常规的杂交育种方法需要较长时间才能获得具有稳定遗传特性的优良品种？

通过常规的杂交育种（cross breeding）方法培育新品种，一般需要花费较长时间才能筛选出具有稳定遗传特性的新品种。而通过单倍体育种（haploid breeding）方法培育新品种，可以大大缩短育种的年限，且可以获得具有稳定遗传特性的优良品种，节约了人力物力。单倍体的诱导与利用是植物细胞工程成功应用的典型范例。

单倍体的育种思路是，先通过培育小孢子，获得单倍体植株幼苗，再诱导其染色体数目加倍，从而获得纯合二倍体植株（图 2－2－5）。

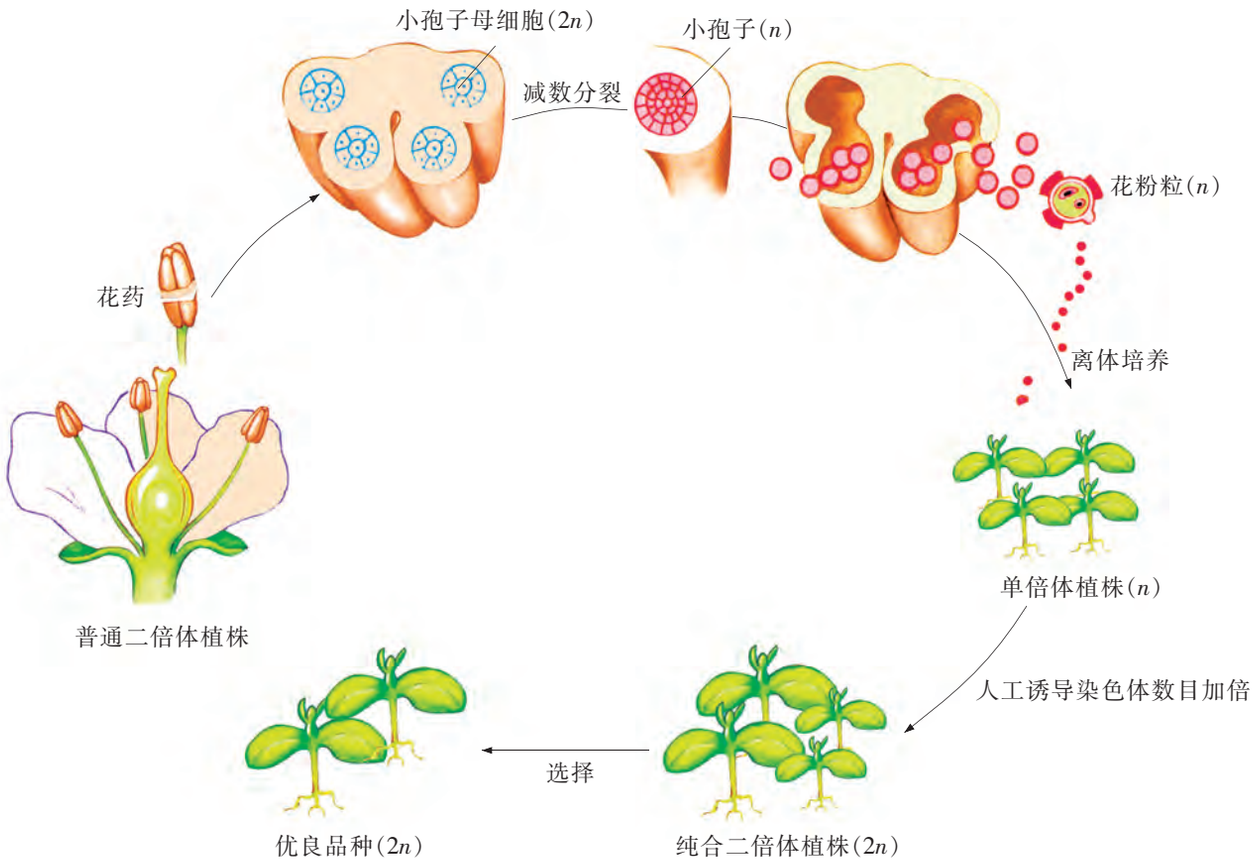


图 2－2－5　单倍体育种的过程示意图

成熟的花药由花药壁和花粉囊及其中的花粉等结构组成。经过适当的诱导，花粉囊中的花粉可发育成单倍性的胚状体或愈伤组织，最终形成单倍体植株。在诱导单倍体植株的某些阶段（如形成愈伤组织时期或幼胚时期），一般用质量分数为 0.02%~0.4%的秋水仙素溶液处理 2~3 d，然后按常规途径培养，就可能获得染色体数目加倍的，能正常生长发育并开花、结果的二倍体植株。

问题与讨论

花药是雄蕊的重要组成部分，每个花药一般由 2~4 个花粉囊组成。有人认为，花药经组织培养后形成的幼苗既可能是二倍体幼苗，又可能是单倍体幼苗。

试从花药结构的视角，对上述观点加以分析。

我国科学家应用单倍体育种方法培育出的小麦、黑麦、玉米单倍体植株在世界上属于首创，并由此培育出了相应的作物新品种。

植物细胞工程涉及植物学、植物生理学、分子生物学、细胞生物学、生物化学、发育生物学、遗传学等，在实际工作过程中也还存在着很多尚未解决的问题，有待我们进一步去探索。

本节练习

一、思辨题

1. 下列技术或过程与植物细胞工程无关的是 （　　）

A. 培育玉米单倍体植株　　B. 培育无病毒的康乃馨花卉

C. 天竺葵营养器官的嫁接与扦插　　D. 培养红豆杉细胞生产紫杉醇

2. 仔细观察下面三幅图，哪些是无性繁殖？哪些是有性繁殖？

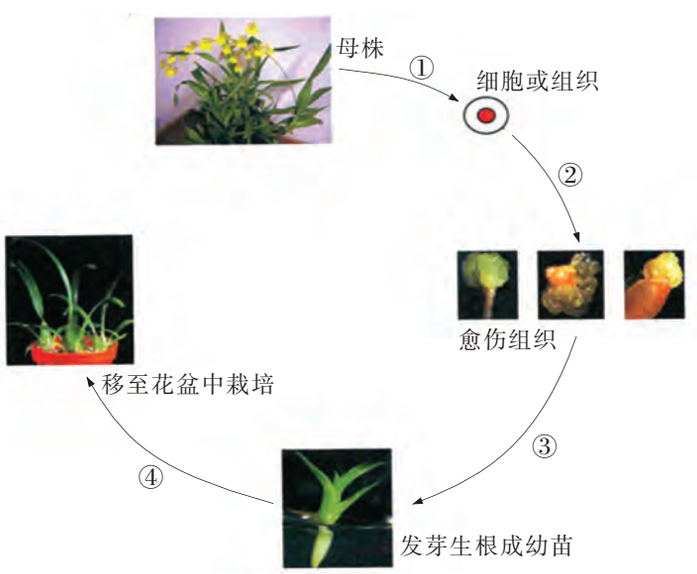
A. 月季的扦插

B. 向日葵的种子萌发

C. 文心兰的组织培养

二、应用题

植物细胞工程在粮食与蔬菜生产、果树和林木生产、花卉栽培等领域得到了广泛应用。下面是某农科院利用植物组织培养技术批量生产文心兰的过程示意图。



批量生产文心兰过程示意图

（1）阅读上述示意图后分析：利用植物组织培养技术生产文心兰植株和利用传统的植物繁殖技术相比有什么优势？

（2）在闷热的环境中，文心兰容易发生病害。可采用什么方法培育无病毒的文心兰？

如果你想要更多地了解与植物细胞工程有关的知识，请参考下列资料。

柳俊，谢从华. 植物细胞工程. 2 版. 北京：高等教育出版社，2011.

第三章　植物细胞工程技术原理　第七章　植物体细胞杂交

第三节　动物细胞工程及其应用

科学家早就提出将胚胎细胞核移植到去核卵母细胞中可以构建新胚胎的设想。此后，科学家陆续用实验证实家兔、小鼠、绵羊、牛、山羊和猪的胚胎细胞核移植是可行的。1997 年 2 月，《自然》杂志上一则有关克隆羊多莉诞生的报道轰动了全世界。为什么克隆羊多莉会轰动全世界？

积极思维　为什么克隆羊多莉会轰动全世界？

事实：

1996 年 7 月，英国科学家韦尔穆特(I. Wilmut，1944—　)等人采用成年绵羊的乳腺细胞(动物体细胞)进行核移植，成功培育出世界上首例体细胞核移植克隆羊多莉（图 2－3－1），由此翻开了动物克隆史上崭新的一页。

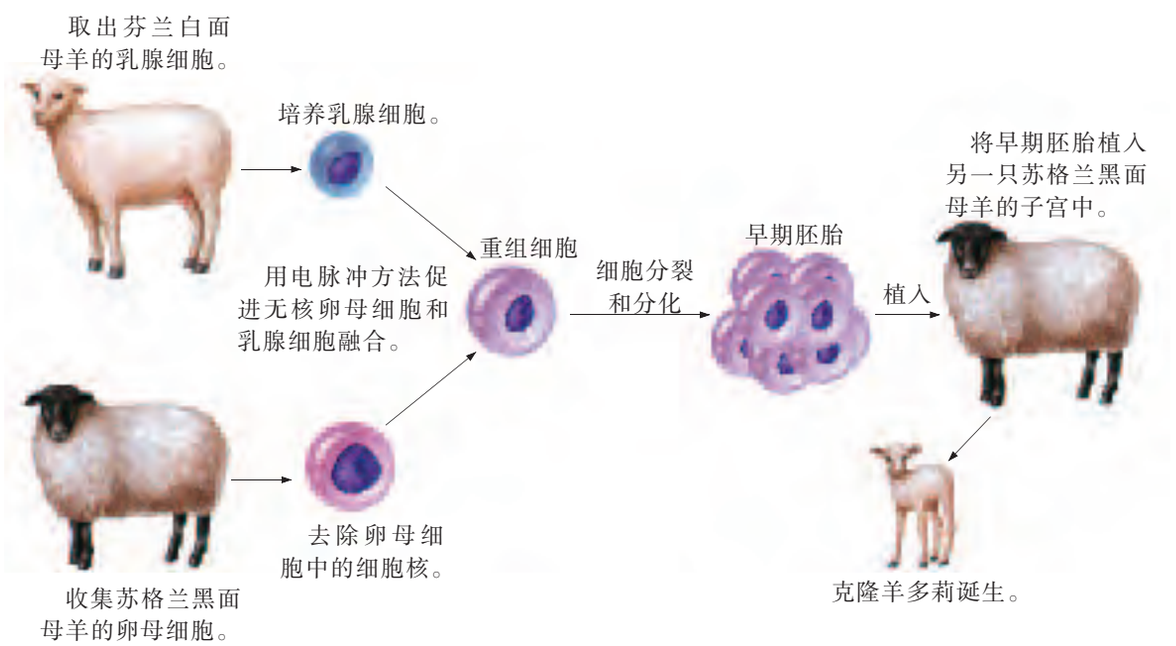


图 2－3－1　克隆羊多莉培育过程示意图

思考：

解释　试分析克隆羊多莉的性状与芬兰白面母羊相似的原因。

克隆羊多莉是人类首次采用成年动物的体细胞获得的后代，这证明哺乳动物体细胞核在卵母细胞细胞质的支持下，也和植物细胞一样具有全能性。目前，利用动物核移植技术进行动物克隆已经进入广泛应用的阶段。

动物细胞核移植技术及其应用

动物细胞核移植技术

动物细胞核移植(animal cell nuclear transfer)技术和动物细胞培养、动物细胞融合、干细胞应用技术都是动物细胞工程的重要技术。

以哺乳动物为例，**动物细胞核移植技术是指把一个动物细胞的细胞核移植到一个已经去除细胞核的成熟卵母细胞中，并使重组细胞发育为一个新的胚胎，继而发育为动物新个体的技术。**根据供核细胞的不同，动物细胞核移植主要分为胚胎细胞核移植和体细胞核移植两种类型。由于动物体细胞的分化程度较高，实现动物体细胞核移植的难度明显高于胚胎细胞核移植。

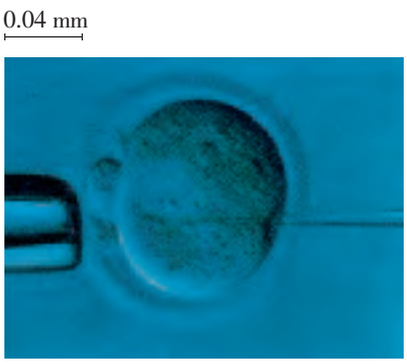


图 2－3－2　显微操作

动物细胞核移植技术也是一种克隆技术。克隆不仅仅是指无性繁殖，还包括遗传上完全相同的分子、细胞或来自同一祖先的生物个体的无性繁殖群体。世界上已经培育出的克隆羊、克隆牛等克隆动物大多是通过动物细胞核移植技术实现的。用体细胞核移植技术进行的克隆就是体细胞克隆。这一过程需要利用显微操作的方法(图 2－3－2)，将供体的体细胞核注入受体的去核卵母细胞中，重组细胞经过培养后生长发育成胚胎。

我国科学家也为动物细胞工程作出了重要贡献。例如，童第周(1902—1979)是将细胞核移植研究应用于鱼类品种改良的先驱者。他和他的团队不仅成功地应用细胞核移植技术，而且创造性地将鲤鱼的胚胎细胞核移植到鲫鱼的去核卵细胞内，培育出了“鲤鲫鱼”。

动物细胞核移植技术的应用

动物体细胞核移植技术的应用非常广泛，对促进畜牧业的发展、培育优良畜种、生产实验动物和转基因动物、拯救濒危动物、保护动物资源都具有一定的应用价值。

问题与讨论

大熊猫被誉为“活化石”和“中国国宝”，它是世界自然基金会的形象大使，也是世界生物多样性保护的物种之一。2008 年，我国宣布世界首张大熊猫基因组图谱绘制完成。

我们能不能设计一个运用动物体细胞核移植技术繁殖大熊猫的方案呢？

在畜牧业生产中，利用体细胞核移植技术可以加速家畜遗传改良的进程，促进优良畜群的繁育；在保护濒危物种方面，利用体细胞核移植技术增加动物数量的工作也已经初见成效。

动物细胞培养技术及其应用

动物细胞培养技术

20 世纪初，美国一位生物学家从蛙胚中分离出一些神经组织，并将这些组织和分散的单个细胞在无菌条件下置于青蛙淋巴液中进行培养，这些组织和细胞存活了数周之久。该实验开创了动物细胞培养的先例。**动物细胞培养**（animal cell culture）**技术是指从动物体内获得相关组织，分散成单个细胞后，模拟体内环境，在温度适宜、营养充足、无菌等条件下培养，使其继续生长、增殖的技术**。动物细胞培养是动物细胞工程的基础。

在无菌条件下，取出动物组织块，剪碎，用培养液漂洗。然后用胰蛋白酶等处理，形成分散的悬浮细胞。低速离心、洗涤，将分散的细胞接种到含有相应培养液的培养皿中进行培养。细胞不断分裂，直至铺满整个培养皿底部，形成一层细胞。最后将细胞转移到新培养液中，可继续进行培养以传代（图 2－3－3）。

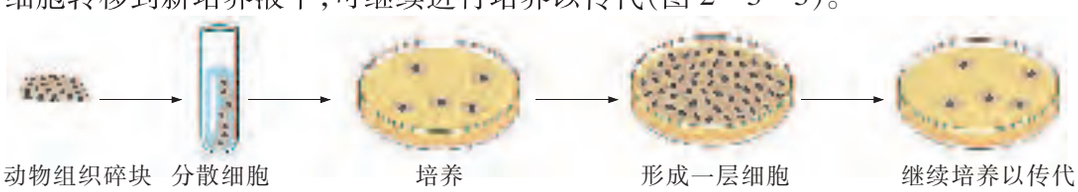


图 2－3－3　动物细胞培养过程示意图

动物细胞培养需要严格的环境条件，包括温度、pH、合适的气体（如氧和二氧化碳）和营养物质等。培养某种动物细胞时的温度、pH 应与该种动物的体温、内环境 pH 相近。例如，培养哺乳动物细胞的最适温度一般为 37 ℃，最适 pH 范围为 7.1~7.3。大多数细胞在低氧时不能很好存活，氧浓度过高也会对细胞产生毒性，抑制其生长。二氧化碳的含量则会影响培养液的 pH。

动物细胞培养需要多种物质，如葡萄糖、氨基酸、无机盐、微量元素、维生素和促生长因子。因此，动物细胞培养需要选择合适的培养基。血清含有许多维持动物细胞生长增殖和保持动物细胞生物学性状不可缺少的物质。因此，在合成培养基中通常需加入一定量的动物血清，以满足动物细胞培养的营养需要。

这里提到的促生长因子是动物细胞培养所需要的物质。你认为它们可能是哪些物质呢？

在动物细胞培养过程中，需要对培养基和培养器具进行无菌处理，以保证动物细胞培养处于无菌环境中，必要时可添加适量的抗生素。此外，还需要定期更换培养液，因为代谢产物积累过多也会危害动物细胞持续生长和存活。

动物细胞培养技术的应用

动物细胞培养可分为原代培养和传代培养。**原代培养是指**

从供体获取细胞或组织后进行的初次培养。任何动物细胞的培养均需从原代培养开始，刚刚离体的动物组织或细胞的生物学特性未发生很大变化，这一阶段培养的细胞与体内细胞的生长特性相近，很适合用于药物测试和基因表达等实验研究。随着培养时间的延长，体外培养的细胞经增殖不断增加数量，当细胞数量增加到一定程度后，由于培养空间的限制、营养物质的消耗及有害代谢产物的积累等，细胞的生长和增殖便会逐渐减缓。**这时需要将原代培养的细胞继续转接到新的培养基上继续培养，这一过程称为传代培养。**一般情况下，传代培养10~50次后，细胞增殖速度便会逐渐减缓，甚至完全停止，有些细胞可能还会发生癌变。

你知道用手术中切除的肿瘤细胞进行原代培养，对抗癌药物的研究有什么价值吗？

动物细胞培养技术为细胞或细胞器加工改造提供了大量的动物细胞原材料。用于动物细胞培养的细胞既可以是正常的细胞，如构建人造皮肤的表皮细胞；又可以是病变的细胞，如用于科学研究的海拉细胞（宫颈癌细胞）。动物细胞培养技术除了广泛应用于重组蛋白、抗体、病毒疫苗等生物医药产品的工业化生产外，同时还应用于基因治疗、细胞治疗、组织工程、药物筛选和毒性检测等相关领域的基础研究和临床实践等。

动物细胞融合技术及其应用

动物细胞融合技术

细胞融合技术是研究细胞间遗传信息转移等的有效途径之一。**动物细胞融合**（animal cell fusion）**技术是指在一定的条件下将两个或多个动物细胞，通过物理、化学或生物方法，结合形成一个细胞的技术。**

在体外培养条件下，生物细胞会自发融合，但是频率极低。因此，一般都需要人为促进细胞融合。动物细胞融合的方法主要有生物方法、化学方法和物理方法。

科学家发现一些病毒可以促使细胞融合，如仙台病毒、疱疹病毒、腮腺炎病毒。这些病毒可以与细胞质膜发生作用，使细胞紧密凝集，直至融合。其中，仙台病毒在细胞融合中的应用较为广泛（图2－3－4）。

但是，病毒引入细胞后，可能会对细胞的生命活动产生一定的干扰。后来，科学家利用化学试剂诱导动物细胞融合。其中，聚乙二醇诱导融合法因其使用方便且诱导细胞融合的成功率高，是较为常用的细胞融合方法。当然，聚乙二醇也有一定的局限性，如有一定毒性，对某些细胞（如卵细胞）不适用。

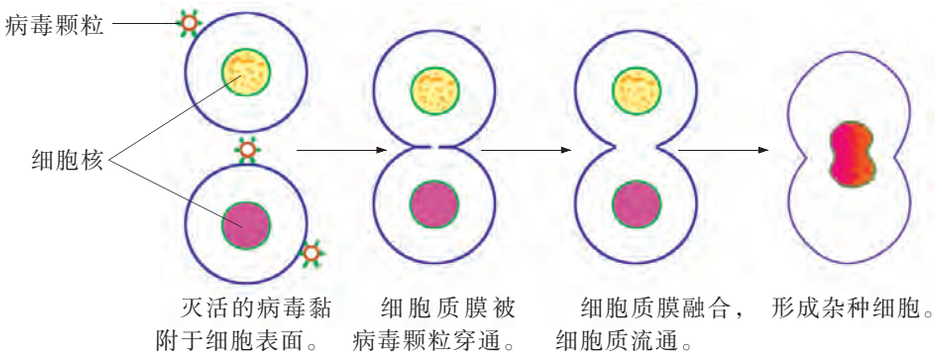


图 2－3－4　利用仙台病毒诱导动物细胞融合的过程示意图

跨学科视角

聚乙二醇分子因能改变细胞质膜的结构，而被广泛地作为促进细胞融合的化学试剂，用于促进形成杂种细胞。

从化学视角看，为什么聚乙二醇分子能改变细胞质膜的结构？

目前，科学家也常采用电场诱导融合法等物理方法进行细胞融合。物理方法对细胞伤害小，易操作、控制和观察，目前已被广泛应用，成为细胞融合的重要技术手段。

在各种方法的促融合作用下，细胞质膜出现粘连、破裂和融合，进而发生细胞质融合和细胞核的融合，最终形成杂种细胞。人工诱导细胞融合后，可能产生多种类型的细胞，因此需要对细胞进行筛选，挑选出所需要的细胞。

通过人工诱导细胞融合，不仅能使同物种细胞发生融合，也能使不同物种的细胞之间发生融合。动物细胞融合技术是动物细胞工程的核心技术之一。

动物细胞融合技术的应用

由于动物细胞融合技术可以将不同物种动物细胞的遗传特性在融合细胞中实现重组，这项技术在基因治疗、疾病诊断等领域展现出美好的前景。

单克隆抗体（monoclonal antibody）的制备技术是在动物细胞融合技术上发展起来的。例如，哺乳动物的浆细胞能产生抗体，对抗侵入体内的细菌和病毒等病原体，保护身体健康。为了增强人体的免疫力，临床上常常需要大量的特定抗体。由于用传统方法制备的是含有多种抗体的混合抗体，不能专一性地对付某一类病原体，因而治疗效果不佳。若采取单个浆细胞进行无性繁殖形成细胞群，这样的细胞群就能产生化学性质单一、特异性强的抗体，即单克隆抗体。科学家针对浆细胞在体外培养条件下不能无限增殖的问题，利用肿瘤细胞（如骨髓瘤细胞）具有无限增殖的特性，成功地设计出一个制

哺乳动物的浆细胞是体液免疫中的重要效应细胞。你能说出浆细胞在体液免疫中的作用吗？

备单克隆抗体的实验方案。实验室制备单克隆抗体可通过动物体内培养或体外培养两种途径获得(图 2－3－5),工业化制备单克隆抗体一般通过体外培养获得。

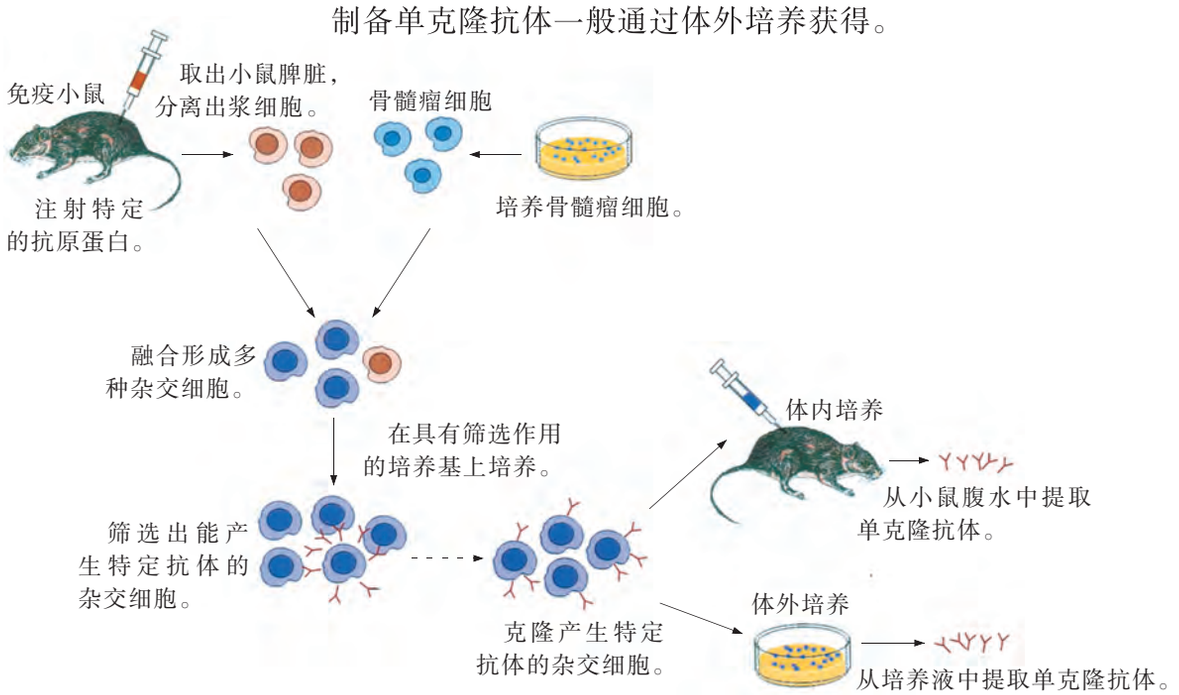


图 2－3－5　单克隆抗体的制备过程示意图

边做边学　搜集单克隆抗体在临床上实际应用的资料

实践:

1. 每个小组选择单克隆抗体在临床上实际应用的一个具体方面，如疾病的诊断或疾病的治疗,从书籍、网络、药店等途径收集资料,或是到医院或相关研究所实地采访调查。

2. 小组汇总搜集的资料,并进行整理分析,撰写调查报告。

3. 各个小组以图片或者表格的形式,在班级中将搜集的资料和分析、归纳的结果进行交流与分享。

讨论:

1. 单克隆抗体在临床上的实际应用与单克隆抗体的特性有什么关系?

2. 单克隆抗体在临床上可能有哪些实际应用?

制备单克隆抗体靶向制剂是单克隆抗体在临床上实际应用的一个方面。科学家已经相继研制出一些化疗药物与单克隆抗体结合制成的单克隆抗体靶向制剂。实验显示,这些单克隆抗体靶向制剂对肿瘤细胞有较好的选择性杀伤作用。

由于单克隆抗体可以高度特异性地识别抗原,它在疾病诊断上也有一定的临床价值。例如,在肿瘤发展过程中,可能在血清等体液中表达某些抗原,单克隆抗体可以用来检测这些相关抗原是否表达及其表达水平，从而作为肿瘤诊断的辅助方法;用同位素标记某种单克隆抗体,可以诊断结肠癌肿瘤病灶是否已经转移等。

有研究成果显示，科学家已经开始利用单克隆抗体进行导向手术的新尝试，其目的是利用同位素标记的单克隆抗体在体内显示肿瘤位置，用以指导手术范围。这样既可以彻底地切除肿瘤，又可以避免切除过多的健康组织，以提高患者手术后的生活质量。

当然，科学家还在进行更为深入的研究，单克隆抗体在临床上的应用会日益广泛。

干细胞技术及其应用

干细胞（stem cell）是指动物（包括人）胚胎及某些器官中同时具有自我更新和分化能力的细胞。

干细胞在形态上具有共性，通常呈圆球形或椭圆球形，细胞体积小，核相对较大。根据干细胞所处的发育阶段，将其分为胚胎干细胞和成体干细胞。根据干细胞的分化潜能，将其分为全能干细胞、多能干细胞和单能干细胞三类。

全能干细胞具有形成完整个体的分化潜能。胚胎干细胞就是全能干细胞，是从早期胚胎内细胞团分离出来的一种高度未分化的细胞系，具有与早期胚胎细胞相似的形态特征和很强的分生能力，可以分化成为全身 200 多种细胞类型，并进一步形成机体的所有组织、器官。

多能干细胞具有分化出多种细胞组织的能力。例如，骨髓多能造血干细胞可分化出多种细胞（图 2－3－6），但失去了发育成完整个体的能力。

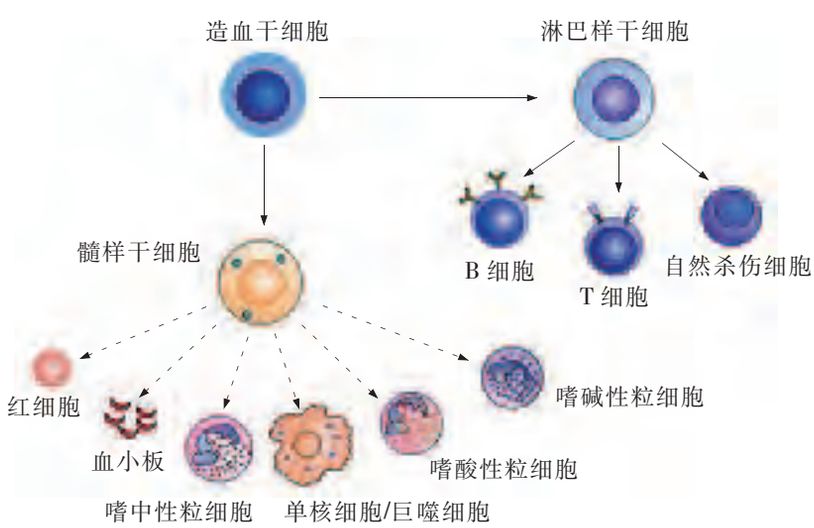


图 2－3－6　骨髓多能造血干细胞分化出多种细胞示意图

单能干细胞是一些持续停留在某种组织中的干细胞。当组织受到外伤、老化、疾病等损伤时，这些细胞就能增殖分化，产生新的组织来代替，以保持机体平衡。这些干细胞只能向一种类型或密切相关的细胞类型分化，如上皮组织基底层的干细胞、肌肉中的成肌细胞。

干细胞技术是在细胞培养技术上发展起来的一项新技术。1999 年，干细胞研究进展被《科学》杂志评选为该年度世界十大科学成果之首，并于 2000 年再度被评为世界十大科学成果。干细胞技术在生物医学工程领域的应用前景也日益凸显。

干细胞技术应用于疾病治疗

研究表明，神经系统疾病、糖尿病、心脏疾病、肾脏疾病、

如果确定某人因为其胰岛中的B细胞功能丧失，不能分泌胰岛素而患糖尿病。你能设计出采用干细胞技术治疗这种糖尿病的方案吗？

肝脏疾病和癌症等许多疾病，都有望借助干细胞技术得到治疗。科学家已经能够在体外鉴别、分离、纯化、扩增和培养人体胚胎干细胞，并以这样的干细胞为“种子”，培育出一些人体组织器官。自身干细胞的移植可避免产生排斥反应，对一些采用传统治疗方法疗效较差的疾病具有较好的效果。例如，利用培植皮肤干细胞的技术可以治疗大面积烧伤的患者。

干细胞的生物学特性决定了其广泛的应用价值。经过10余年的研究，科学家们已建立了一系列成熟规范的干细胞体外培养体系。利用干细胞具有多分化潜能的特性，人们在体外培养环境中给予干细胞一定的诱导条件，就可以将其定向分化为特定类型的细胞。将这些特定的细胞进一步培养，可以移植至机体相应的病变区域，使其代替原本失去功能的病变组织细胞，从而达到治疗相应疾病的目的，如心血管疾病、糖尿病、恶性肿瘤、骨及软骨缺损、阿尔茨海默病和帕金森病。

干细胞移植技术能再造出全新的、正常的甚至更年轻的细胞、组织或器官，通过采集外周血、骨髓或脐带血，利用专用的干细胞分离液，提取、纯化后得到的干细胞可应用于临床治疗。例如，通过静脉注射等方法将干细胞输入阿尔茨海默病患者体内，利用干细胞具有自我复制和分化的能力，可以修复阿尔茨海默病患者体内受损的细胞，使机体功能重建，从而达到治疗该疾病的目的。

图2－3－7　中国造血干细胞捐献者资料库图标

2001年，我国成立了中华骨髓库。它是中国造血干细胞捐献者资料库，能为患者检索与其配型匹配的捐献者，这给需要移植造血干细胞的患者带来了希望。中国造血干细胞捐献者资料库图标由四颗红心围绕红十字组成(图2－3－7)，倡导公民为此献出爱心。

干细胞技术应用于新药研制和开发

胚胎干细胞可分化出任何组织类型的正常细胞，这为开发新药提供大量的标本，大大减少了新药研究所需的动物数量，降低了研究成本，也改进了研发药品及其安全性检验的方法。

利用人类干细胞或用干细胞培养出来的组织、器官测试各种药物的药效、毒理特性，会比用其他动物(如小鼠)更能反映人体的状况，这可能发展成为一种新的药物筛选模式。

此外，对人胚胎干细胞的研究，可以帮助人们理解复杂的人体发育过程，并促进对人胚胎发育的基础研究，揭示人的发育机制及影响其发育的因素。

本节练习

一、思辨题

1. 当我们需要培养用于药物测试的某种动物细胞时，这些细胞大多取自该种动物出生不久的幼龄动物的器官或组织，其主要原因是这样的组织细胞（　　）

A. 容易产生各种变异　　B. 分化程度都非常低

C. 能进行原代培养和传代培养　　D. 能产生单克隆抗体

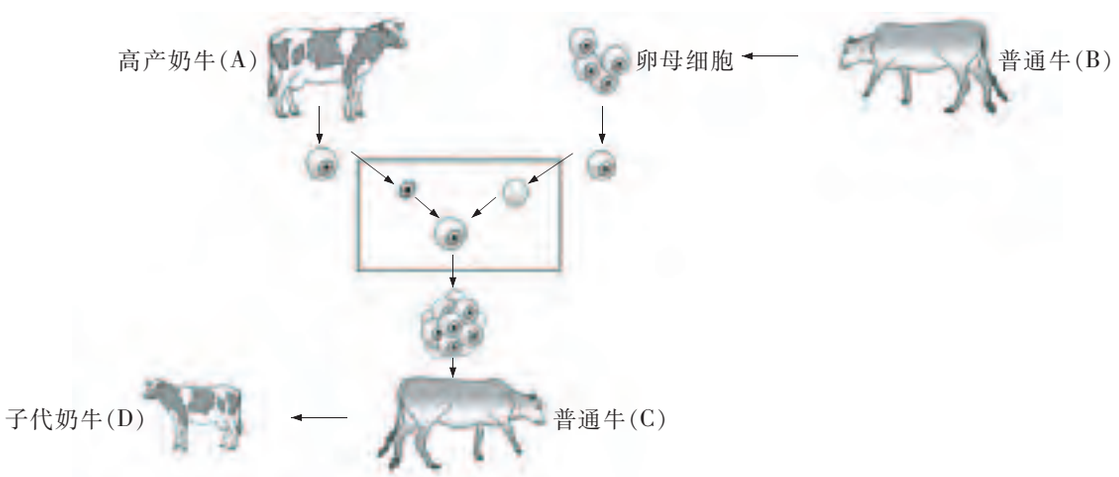
2. 动物细胞融合是一种无性杂交的方法。科学家将 A、B 两种动物细胞在仙台病毒的诱导下进行融合，然后进行细胞培养。根据 A、B 两种细胞的生活环境（下表）以及融合细胞只能生长在选择基Ⅱ上的事实，尝试说明如何分离融合细胞？

不同细胞的生活环境对照表

A 细胞	只能在选择培养基Ⅰ上生长，生长环境的 pH 为 4~6
B 细胞	只能在选择培养基Ⅱ上生长，生长环境的 pH 为 7~8

二、应用题

高产奶牛产仔量不高，有人利用一种高产奶牛（A），采用动物细胞核移植技术，培育出许多高产奶牛（D）。其培育方案见下图。



高产奶牛培育方案示意图

（1）上述奶牛（D）的核基因型应该与哪头牛的基因型一样？奶牛（D）的体细胞中含有哪几头牛的基因？这个培育过程说明奶牛的哪些性状是受细胞核控制的？为什么？

（2）在培育奶牛（D）的过程中是否需要采用动物细胞培养技术？如果需要，在哪个步骤采用？动物细胞培养可能有哪些应用？

第四节　胚胎工程及其应用

19 世纪 70 年代，科学家用显微镜首次观察到海胆的精卵结合全过程。10 年后，科学家又观察到马蛔虫细胞的减数分裂过程。这些成果的发现使人们对动物的受精过程以及胚胎发育(embryogenesis)的研究更加深入。那么，哺乳动物的精卵是如何完成受精(fertilization)的呢？

积极思维　哺乳动物的精卵是如何完成受精的？

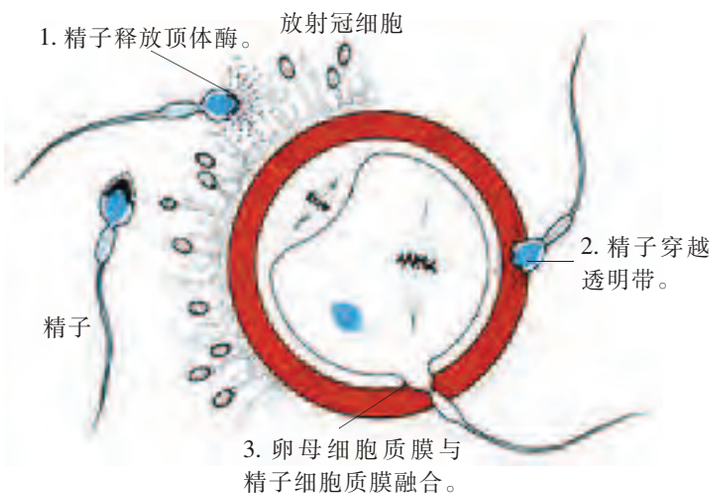


图 2－4－1　精卵受精过程示意图

事实：

1. 哺乳动物卵巢中的卵原细胞经增殖形成初级卵母细胞。初级卵母细胞经减数第一次分裂，形成第一极体和次级卵母细胞，并停止分裂；受精后被精子激活，次级卵母细胞继续完成减数第二次分裂。

2. 哺乳动物受精过程包括：一个精子穿入次级卵母细胞后，会立即引起透明带及细胞质膜发生一系列变化，形成阻止其他精子进入的屏障；进入次级卵母细胞的精子头部形成雄原核，刺激次级卵母细胞迅速完成减数第二次分裂，卵细胞核形成雌原核(图 2－4－1)。

3. 精子进入次级卵母细胞标志着受精过程的开始，而当雄原核和雌原核相互融合时，标志着受精过程的完结。融合产生的新细胞称为受精卵，新生命的胚胎发育由此开始。

思考：

1. **概括**　简述哺乳动物受精的主要过程。

2. **解释**　由一个受精卵形成多细胞胚胎是细胞有丝分裂的结果吗？

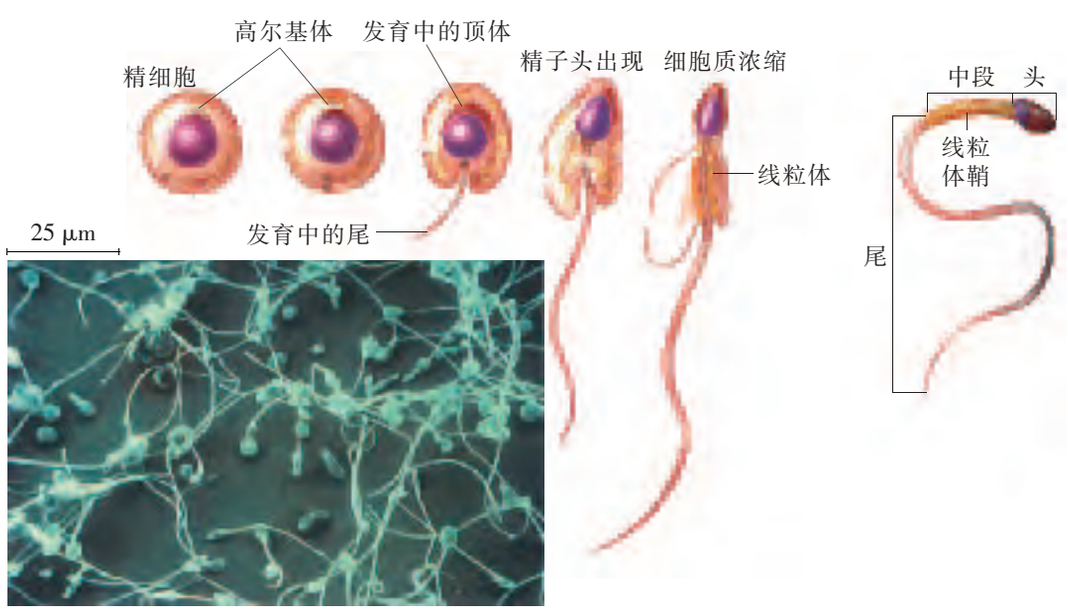
后来，科学家通过模拟自然受孕的过程，逐渐洞悉胚胎发育的每一环节。这些都为胚胎工程（embryo engineering）的核心技术——体外受精（in vitro fertilization）和胚胎移植(embryo transfer)等技术的发展奠定了必要的基础，也促进了动物胚胎工程的迅猛发展，拓展了胚胎工程的应用领域。

哺乳动物胚胎发育的基本过程

哺乳动物睾丸的曲细精管是产生精子的部位。动物个体性成熟后，曲细精管内壁上的精原细胞形成初级精母细胞，每个初级精母细胞经过减数分裂形成 4 个精细胞，再经过分化（变形）过程形成精子，每个精子中都含有一个染色体组。精子的发生是依附在支持细胞上进行的，支持细胞为精子的发生提供营养，精子形成后进入曲细精管的管腔中。

知识链接　　哺乳动物精细胞分化（变形）过程

哺乳动物的精子是在睾丸的曲细精管中逐步形成的：位于曲细精管管壁中的精原细胞通过有丝分裂先形成大量的精原细胞，其中部分精原细胞发育成初级精母细胞；初级精母细胞进行减数分裂，形成的精细胞染色体数量减半；精细胞经过分化（变形）形成精子（下图）。其中，高尔基体发育成顶体，中心体发育成精子的尾，线粒体聚集在中段形成线粒体鞘。



人精子扫描电镜图

哺乳动物精细胞分化（变形）示意图

哺乳动物卵细胞的发生是在雌性动物的卵巢中开始的。一个初级卵母细胞最终可能产生三个极体和一个卵细胞，它们的细胞中都含有一个染色体组。哺乳动物及其他许多脊椎动物的卵细胞发育在出生后会停止一段时间，直到雌性动物发育到性成熟期才继续发育。哺乳动物的初级卵母细胞经过减数分裂逐步形成成熟的卵子。减数第一次分裂是在排卵前完成的，排卵后，随着精子进入次级卵母细胞继续减数第二次分裂，一个次级卵母细胞分裂形成一个成熟的卵子和第二极体。雌、雄原核逐渐融合，形成受精卵。

你能说出卵细胞和卵母细胞概念的异同点吗？

当卵细胞质膜和透明带之间出现两个极体、雌雄原核融合时，表示受精作用已经完成，胚胎发育由此开始。哺乳动物的**胚胎发育是指受精卵发育成幼体的过程，包括桑椹胚**(morula)、**囊胚**(blastula)、**原肠胚**(gastrula)**等主要发育阶段。**

在人的胚胎发育中，受精卵一旦形成，便开始从输卵管移向子宫腔，在移动的同时，受精卵经过细胞分裂，形成囊胚并植入子宫内膜。从受精完成至第 1 周末为胚卵期。在这一时期，胚胎开始着床，囊胚进一步发育(图 2－4－2)。

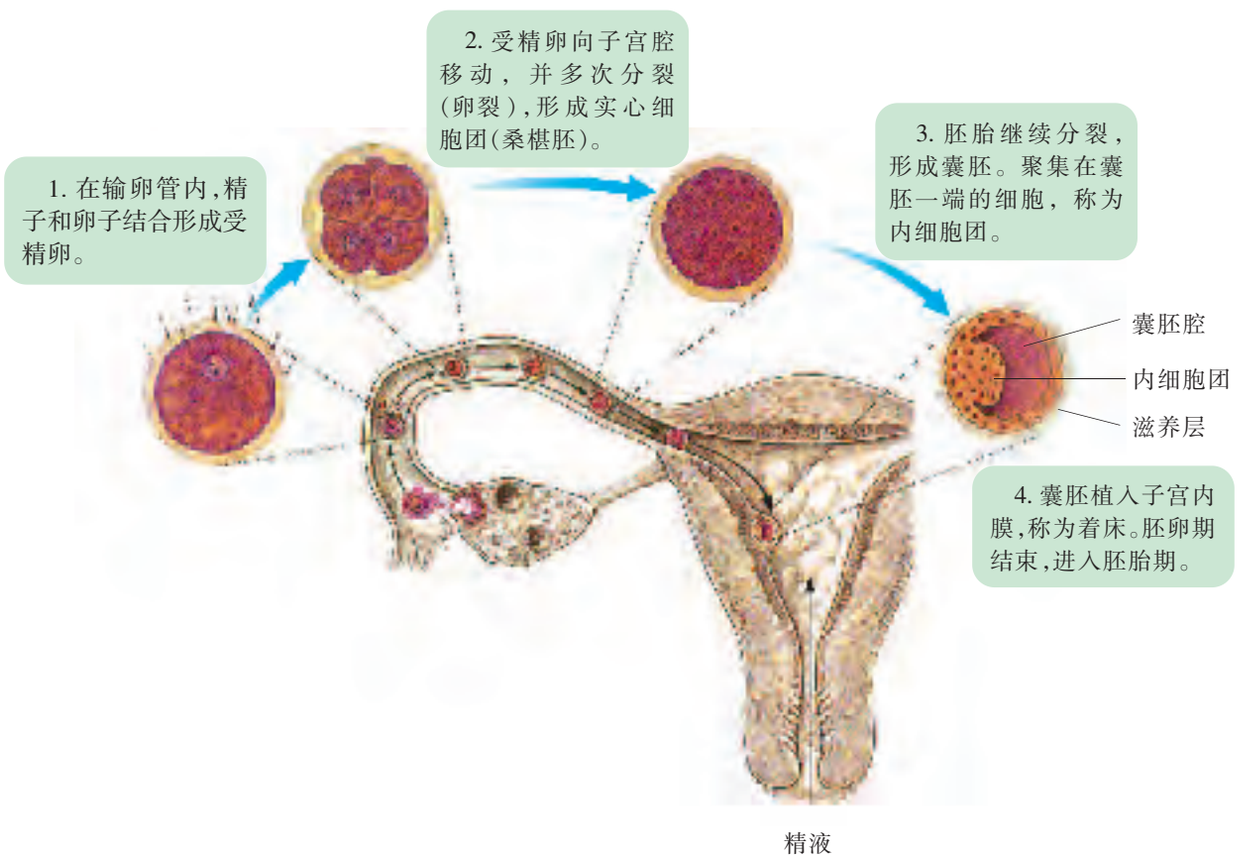


图 2－4－2　人的受精与胚卵期胚胎发育过程示意图

从第 2 周开始至第 8 周为胚胎期。囊胚植入子宫内膜过程中，囊胚壁逐渐发育为滋养层，内细胞团逐渐发育形成二胚层的胚盘，然后继续发育为三胚层的原肠胚。

从第 3 周开始，二胚层胚盘中的部分细胞增殖分化形成中胚层。随着三个胚层的分化，三胚层逐渐发育为各种器官的原基。胚盘发育为胚体，胚体凸入羊膜腔，浸泡在羊水中，胎盘逐渐形成。约在第 3 周末，心脏出现。

从第 4 周开始，三胚层逐渐发育，形成眼、耳、鼻等器官的原基；第 4 周末，神经系统开始发生；第 8 周末，各器官原基形成，胚体初具人形，胚胎期发育结束。

回顾初中阶段所学知识，你能说出什么是囊胚、原肠胚和胎盘吗？

从第 9 周开始，进入胎儿期，各器官系统继续发育，多数器官逐渐出现不同程度的功能活动；从第 9 周到第 12 周，胎儿的头部仍占优势，躯体长高，脑部继续增长，眼睑闭合，眼内出现视网膜，从外生殖器可辨性别；从第 13 周到第 16 周，胎儿小脑变得突出，一般感觉器官分化，耳郭伸出，出现闭眼和吸吮的动作；从第 17 周到第 20 周，出现睫毛和眉毛，胎毛覆盖皮肤；21 周后，胎儿继续发育直至出生。

从第 4 周开始，随着各类器官的分化，胎儿躯体也不断长大（图 2－4－3）。

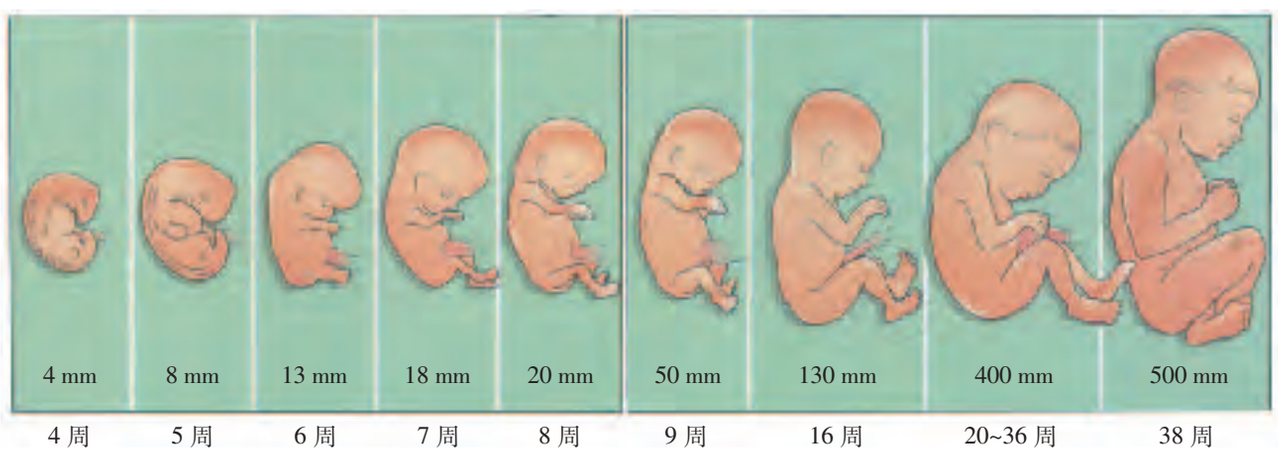


图 2－4－3　人胚胎发育和躯体长大过程及体长变化示意图

为胎儿健康出生，孕妇在上述妊娠期间要进行产前检查和产前诊断，确保优生。

放眼社会　产前检查和产前诊断很重要

产前检查是孕妇妊娠期间的常规检查，其目的是通过对孕妇和胎儿的监护及早预防和发现相关问题，及时提出医学建议，以降低孕产妇死亡率和胎儿死亡率。

对一些特殊孕妇还需进行产前诊断。我国原国家卫生部为保障母婴健康，提高出生人口素质而颁布的《产前诊断技术管理办法》第十七条规定：……对羊水过多或者过少的，胎儿发育异常或者胎儿有可疑畸形的，怀孕早期时接触过可能导致胎儿先天缺陷的物质的，有遗传病家族史或者曾经分娩过严重先天性缺陷婴儿的，年龄超过 35 周岁的孕妇，医师应建议其进行产前诊断。例如，对 15~22 周的孕妇进行抽血检查，若发现为 21 三体、18 三体疑似患者，应建议她们进一步进行染色体核型检查；对 18~24 周的孕妇进行超声检查时，要系统检查胎儿头颅、颜面部、脊柱、心脏、腹部脏器、四肢、脐动脉等结构，筛查胎儿有无解剖学畸形。

该管理办法的第二十七条还规定：开展产前诊断技术的医疗保健机构不得擅自进行胎儿的性别鉴定。对疑似患伴性遗传病的胎儿需要进行性别鉴定的，由省、自治区、直辖市人民政府卫生行政部门指定的医疗保健机构按照有关规定进行鉴定。

体外受精技术

采集一定发育阶段的精子和卵母细胞是实施体外受精技术的重要环节。**体外受精技术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。**其基本原理是人工模拟体内环境，包括营养、温度、pH 等，促使卵母细胞成熟，同时使精子获能，最终完成受精作用等。这项技术现已日趋成熟，成为一项重要而常规的动物繁殖技术。体外受精技术包括采集精子、采集卵母细胞和体外受精等主要步骤。

采集精子

采集动物精子的方法主要是假阴道法。假阴道通过模仿发情的雌性动物在交配时阴道的压力、温度和润滑度等条件，创造了适合采精的环境。采精者可手持假阴道，利用假台畜让被采精动物在模拟交配时将精液射入假阴道内，从而达到采集精子的目的(图 2－4－4)。

图 2－4－4　利用假台畜采精

采集的精子可以立即使用或冷冻保存待用。由于精液中含有精子获能的抑制因子，冷冻液中还含有防冻剂等成分，精液中含有一定量的死精子，一般需要分离并获取有活力的精子。

跨学科视角

用液氮贮藏家畜精液，精子能被很好地保存很长时间，需要时可供家畜人工授精使用。

从物理学视角看，液氮的哪些特点对家畜精子的保存有作用？

采集卵母细胞

采集卵母细胞的方法主要有抽吸法、机械破碎法等。

采集较大型的动物如牛、猪的卵母细胞时，一般采用抽吸法。这是一种从活体卵巢中采集卵母细胞时的常用方法。技术人员操作时借助超声波探测仪和内窥镜等进行，将注射器针头刺入卵泡中一并吸出卵泡液和卵母细胞，再在显微镜下进行筛选。该方法的优点是可以有目的地选择卵泡，分离得到适当成熟程度的卵母细胞。活体采卵对于充分发挥优良母畜的繁殖潜力具有一定意义。

知识链接

人卵泡的发育

人卵泡的形成和在卵巢中的储备是在胎儿期完成的。人的胚胎性别分化后，雌性胎儿卵巢内的卵原细胞经过有丝分裂增加其数量，其中部分卵原细胞发育为初级卵母细胞。由于它们被卵泡细胞所包围，一般称之为卵泡。

新生儿（女性）出生时卵巢内约有 15 万~50 万个卵泡。青春期以后，卵泡逐渐减少，女性一般只有 300~400 个卵泡能发育成熟，其余卵泡均发育到一定程度即自行退化。

有些哺乳动物和人一样，卵泡的发育也始于胚胎时期。一般认为，哺乳动物出生后卵巢内卵泡不可更新，但仍有科学家在不断研究卵巢中是否存在生殖干细胞。这可能对生殖医学以及干细胞研究等具有深远意义。

采集较小型的动物如小鼠、兔的卵母细胞时，一般采用机械破碎法。这是一种从宰杀后的雌性动物卵巢上采集卵母细胞的方法。技术人员操作时，将刚宰杀的雌性动物体内摘出的卵巢置于培养皿中，用针头刺破卵巢和卵泡，再在显微镜下对卵母细胞进行筛选。该方法的优点是可以得到各种成熟程度的卵母细胞，缺点是在刺破卵巢和卵泡的过程中有可能刺伤卵母细胞。对于较小型的动物，还可以采用促性腺激素处理的方法，使其超数排卵，这样获得的卵母细胞可以直接与获能后的精子进行体外受精。

如果采集到的卵母细胞尚未成熟，需通过体外培养使之成熟。经过体外培养后，一般要通过相关的形态观察指标（如 7 d 后的囊胚发育率）对卵母细胞的体外成熟情况进行评价。

体外受精

哺乳动物的交配往往发生于发情的开始或发情盛期，排卵则发生于发情结束前后，这既保证了精子能先于卵母细胞到达受精部位，也给精子留了充足的获能时间。精子获能后发生膜流动性的增加、膜对 Ca^{2+} 通透性提高、胞内环磷酸腺苷（cAMP）浓度的升高、表面电荷降低以及游动方式等一系列变化，其重要意义在于增强了精子的代谢能力和运动能力。

问题与讨论

精子获能是一个十分复杂的过程，其重要意义之一是增强了精子的代谢能力。

根据所掌握的知识，我们知道细胞代谢包含的内容十分广泛，这里所说的代谢能力主要是指什么？

获能后的精子会引起 Ca^{2+} 内流到精子内，同时伴随精子细胞质膜通透性的改变和胞内 pH 升高，刺激顶体反应的发生。顶体反应主要发生在精子头部。透明带中的某种糖蛋白是精子的受体，使精子与卵子进行特异性的结合。精子

头部前端与卵母细胞透明带接触后，顶体外膜与精子头部的细胞质膜融合，顶体破裂释放出的顶体酶溶解卵母细胞周围的放射冠和透明带，精子即可穿过透明带到达卵母细胞表面。随着精子进入卵母细胞，雄原核与雌原核融合，最终形成受精卵。

家兔、猪等动物的精子，放入人工配制的获能液中，经培养即可获能；牛、羊等动物的精子，可放入一定浓度的肝素或相应的 Ca^{2+} 载体溶液中，诱导精子获能。

在人为控制的适宜条件下和专用的受精溶液中，获能的精子和培养成熟的卵母细胞放在一起培养一段时间，可以在体外完成受精过程（图 2－4－5）。

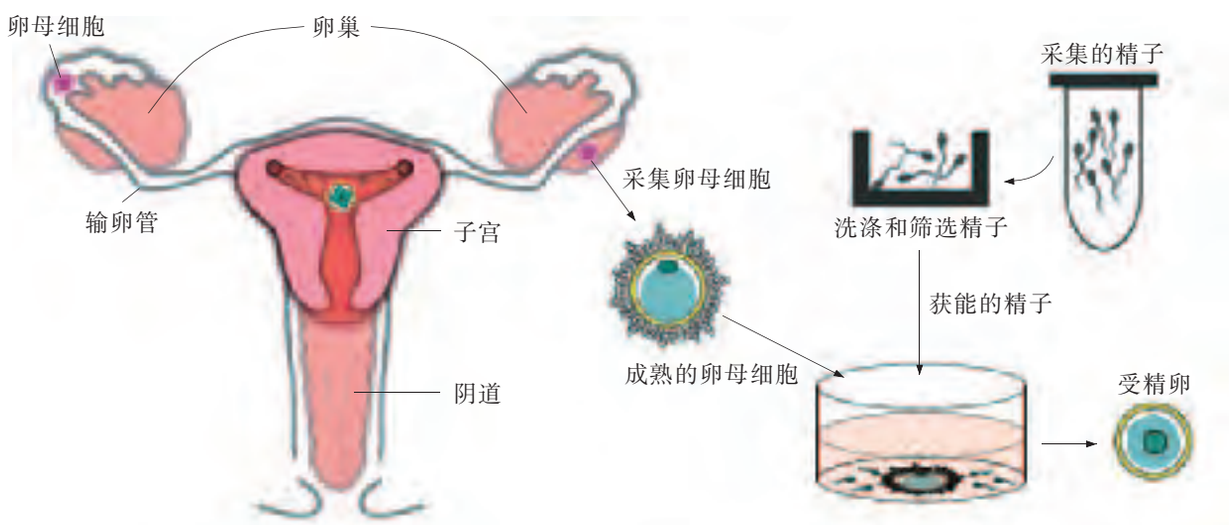


图 2－4－5　体外受精过程示意图

日趋成熟的体外受精技术可用于研究哺乳动物生殖细胞的发生、受精和早期胚胎发育机制等。在家畜品种改良探索过程中，体外受精技术为胚胎生产提供了经济而高效的方法，对充分利用优良种质资源、缩短家畜繁殖周期、加快品种改良速度等具有重要价值。

胚胎移植技术

胚胎工程是指对动物的胚胎进行人为操作和处理以获得目标个体的技术，包括体外受精、胚胎移植和胚胎分割等现代生物技术。

精子和卵母细胞结合后，将受精卵移入相应的培养液中培养。培养液的基本成分主要包括维生素、氨基酸、蛋白质、无机盐和糖类等。待培养的胚胎发育到特定的阶段后，再进行移植。

像这样将良种雌性动物配种后，从其生殖道取出早期胚

胎或通过体外受精及其他方式(如转基因、核移植)得到的受精卵或胚胎，再移植到同种的同时发情排卵但未经配种的其他雌性动物的体内，使它们进一步发育为新个体的技术，称为胚胎移植技术。

19 世纪末，科学家当时以兔为实验对象成功地完成了哺乳动物的胚胎移植。20 世纪 30~70 年代，胚胎移植成为当时生物学研究的主要方向之一，在多种家畜如绵羊、山羊、猪、牛和马上相继获得成功。20 世纪 60 年代后，科学家开始采用激素对供体进行超数排卵处理，并对受体进行同期发情处理。此后，胚胎移植技术发展迅猛，成为畜牧业中广泛使用的一种技术。

胚胎移植实际上是产生胚胎的供体和孕育胚胎的受体共同繁殖后代的过程。这一技术又被形象地称为“借腹怀胎”。

移入子宫的外来胚胎，在受体体内会不会发生免疫排斥反应？为什么？

动物胚胎移植过程一般分为供体和受体的选择、供体和受体同期发情处理、供体的超数排卵处理和受精、胚胎收集以及胚胎移植(图 2－4－6)。

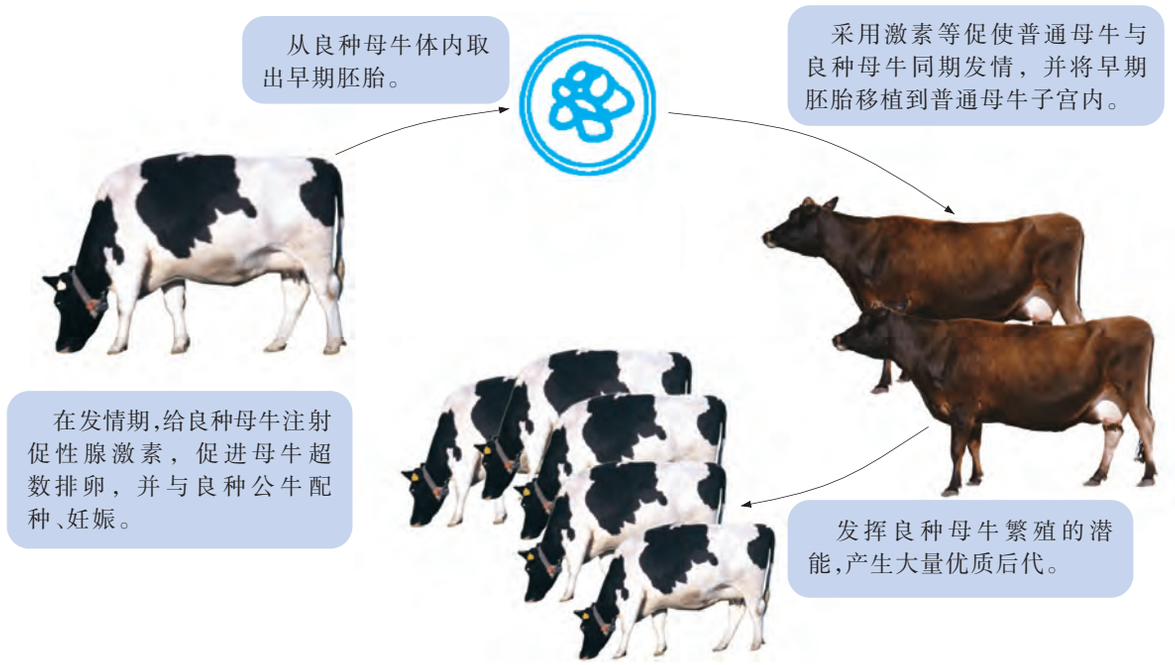


图 2－4－6　牛胚胎移植过程示意图

胚胎移植作为胚胎工程中的一项技术具有重要的应用价值。例如，胚胎移植能发挥优良母畜的繁殖能力，迅速扩大优良畜种数量，加速优良畜种的推广应用；能缩短世代间隔，提高家畜改良速度；能长期保存冷冻胚胎，便于优良品种的种质运输和保存。同样，胚胎移植也是胚胎分割和核移植等技术已成为基础生物学研究的重要手段。

胚胎分割技术

1942 年，科学家成功地对大鼠二细胞胚胎进行了分离和培养。后来，一些科学家尝试着把绵羊八细胞胚胎分割成 4 份，每份 2 个细胞，再将它们植入母羊子宫内，结果母羊成功地产下 4 只小羊。**像这样，用机械方法将早期胚胎平均分割成二分胚、四分胚甚至八分胚，经培养后植入受体，以得到同卵双生或同卵多生后代的技术称为胚胎分割**（embryo bisection）**技术**。这种技术被视为一种胚胎克隆方法。

胚胎分割常需要利用显微操作仪进行操作。在操作时，应选择形态正常、发育良好的桑椹胚或囊胚，在盛有操作液（含有质量分数为10%~20%的血清）的培养皿中用分割针或分割刀片将胚胎切开。如果切割的是囊胚，一定要均等分割内细胞团；然后再将吸出的半个胚胎注入一个已经清空的透明带中或直接将其移植到受体中。

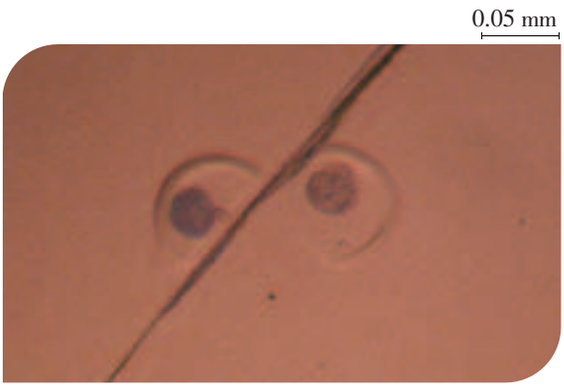


图 2－4－7　二分胚分割

胚胎分割技术不仅能使可供胚胎移植的胚胎数目成倍增加，而且可以产生遗传性能相同的后代。这对畜牧业生产和科学研究都有重要价值。例如，正常情况下，一头良种奶牛一生约可产犊 10 头，如用胚胎分割技术进行胚胎分割并移植到其他用作“寄母”的普通母牛子宫内，就可以获得大量的良种奶牛。在实际应用中，胚胎分割以二分胚的移植成功率最高。我国相继对猪、牛、马、绵羊、山羊、家兔和小鼠等动物进行了二分胚分割（图 2－4－7），并应用到胚胎移植中。

知识链接　胚胎分割的方法

显微针分割法　该法适用于卵裂球阶段的胚胎。操作时在显微操作仪下将胚胎固定，用显微针在透明带上做一切口，将卵裂球从透明带中移出，并吹吸卵裂球使之离散，将其装入 2 个预先准备好的空透明带内，进行移植。该方法具有较高的同卵双生率，但操作程序复杂。

显微刀分割法　该法适用于对桑椹胚和早期囊胚进行分割。在显微操作仪下固定胚胎，用显微刀片将胚胎均匀地一分为二，分别装入空透明带中，进行移植。

酶软化透明带后显微分割法　用质量分数为 0.5%的链霉蛋白酶溶液软化胚胎透明带。若是紧密化胚胎（如桑椹胚），则需在无钙、无镁的平衡盐溶液中处理 20 min，使胚胎去紧密化。将胚胎固定，把针置于欲分割的胚胎上面，使其与胚胎呈 30°，对准胚胎的正中平分线徐徐下压，即可将一个胚胎分割成两半。

酶消去透明带后显微分割法　用质量分数为 0.25%~0.5%的链霉蛋白酶溶液消去胚胎透明带，然后用显微针或显微刀将裸胚一分为二。

本节练习

一、思辨题

1. 胚胎工程技术与人们的生活有着越来越密切的关系。下列各项技术中，不属于胚胎工程主要技术的是（　　）

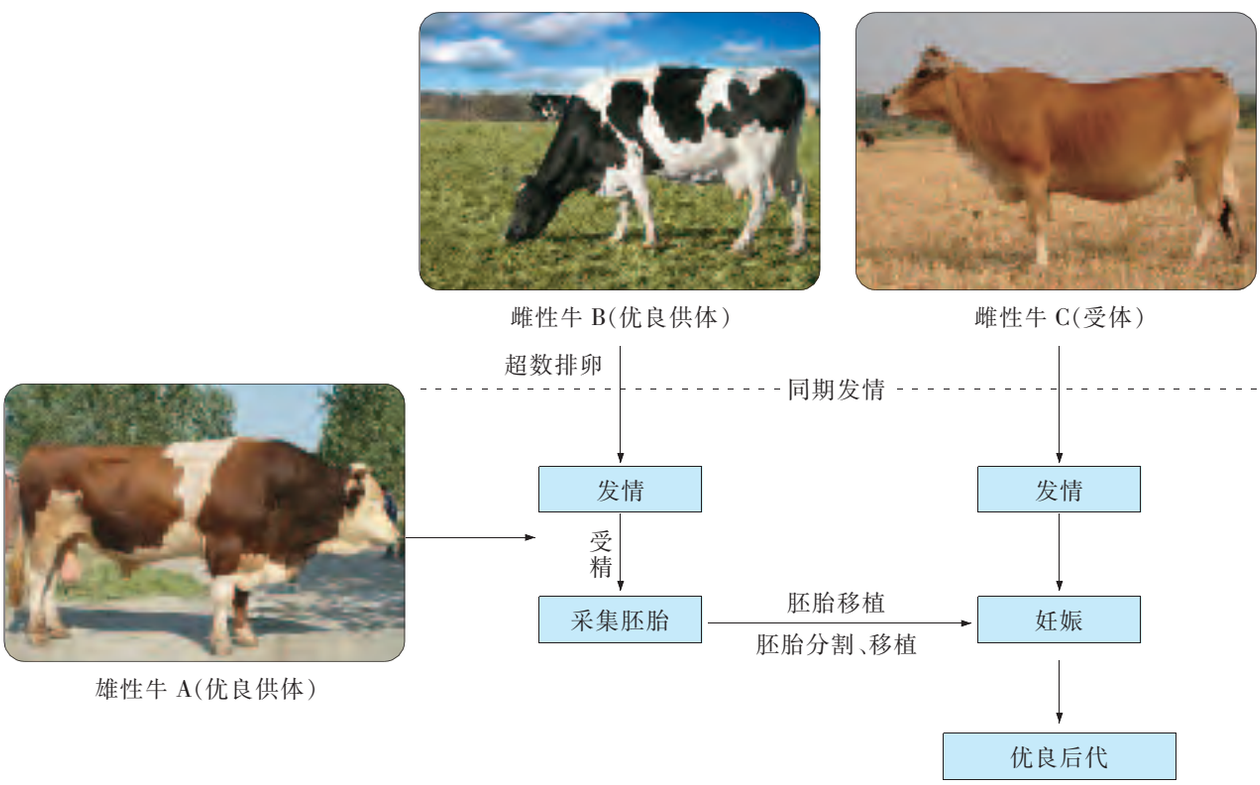
A. 体外受精技术　　B. 胚胎移植技术

C. 胚胎分割技术　　D. 器官移植技术

2. 通过本节的学习，我们能评估胚胎工程在生产和生活中的应用可能带来的风险吗？尝试以一个实例作为证据加以说明。

二、应用题

自然条件下，牛的繁殖率非常低，一般一头牛一年只能繁殖一头牛犊。胚胎工程技术能促进优良种畜的快速繁殖。下图为通过胚胎工程技术培育试管牛的过程示意图。



试管牛培育示意图

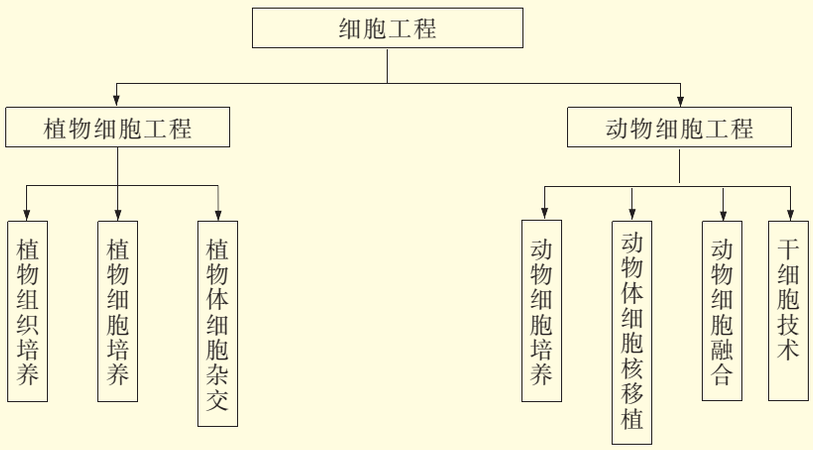
(1)在上述试管牛的培育过程中，人为干预了其中的哪些环节？尝试简要叙述对这些环节进行干预的设计目的。

(2)结合胚胎工程的原理和相关技术，尝试对上述方案提出修改建议，并简要说明修改的原因。

本章小结

概念回顾

●**植物细胞工程和动物细胞工程包括很多技术。**这些技术还在迅猛发展，具体可以简要地归纳和概括为下图。



细胞工程概念图

●**对动物早期胚胎或配子进行显微操作和处理(胚胎工程技术)可以获得目标个体。**胚胎工程包括采集精子和卵母细胞、体外受精、胚胎移植和胚胎分割等技术。其中胚胎移植和胚胎分割是胚胎工程的重要技术，它们在农牧业生产上有非常重要的应用价值。

素养提升

●基于植物细胞工程的知识和技术原理，能解决相关问题。例如，针对如何大量培育某种防护林苗木的问题，能提出构想，并设计出恰当的组织培养方案。

●通过“搜集单克隆抗体在临床上实际应用的资料”等活动，感悟到细胞工程的广泛应用前景，并能认识到生物科学技术对社会发展的作用。

●基于植物细胞融合技术可以打破物种间的生殖隔离，动物细胞核移植技术在保护濒危物种等方面具有应用价值和胚胎工程在农牧业生产上具有一定的应用价值等事实，能认识到细胞工程正在对社会、经济和人类生活产生越来越大的影响。

本章练习

1. 针对本章所学的有关植物细胞工程和动物细胞工程的内容，有位同学采用列表比较的方式归纳为下表。

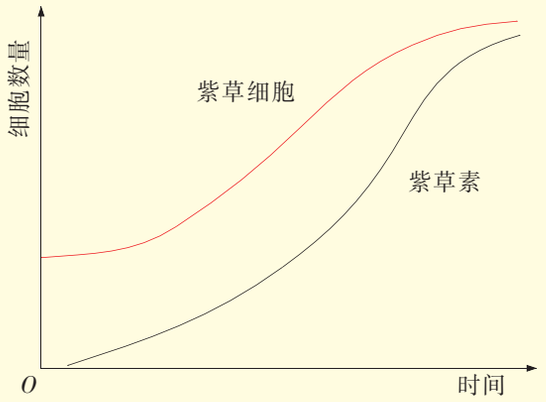
细胞工程相关概念对比

比较内容	植物细胞工程	动物细胞工程
技术手段	植物组织、细胞培养及植物体细胞杂交等	动物细胞培养、动物细胞核移植和动物细胞融合及干细胞技术等
特殊处理	_____ 法去除细胞壁	_____ 酶处理制备细胞悬浮液
融合方法	物理方法、化学方法	物理方法、化学方法、_____ 方法
典型应用	脱毒植物的培育、种间植物 _____ 等	_____ 抗体的制备等
培养基	含有水、无机盐、有机物、_____ 及琼脂等天然附加物	含有葡萄糖等且一定量的 _____ 不可缺少

(1)该同学对其中的划线部分内容不十分肯定，尝试帮他完成上述表格的填写。

(2)动物细胞培养中，组织细胞彼此间紧靠在一起，通过胰蛋白酶可以较好地使细胞彼此分散开。那么用胃蛋白酶是不是也可以呢？为什么？

2. 紫草素是紫草细胞的代谢产物，可作为生产治疗烫伤药物的原料。某研究小组用组织培养技术在反应器中通过培养紫草细胞生产紫草素。右图记录了探究过程中紫草细胞数量、紫草素产量随培养时间发生的变化。

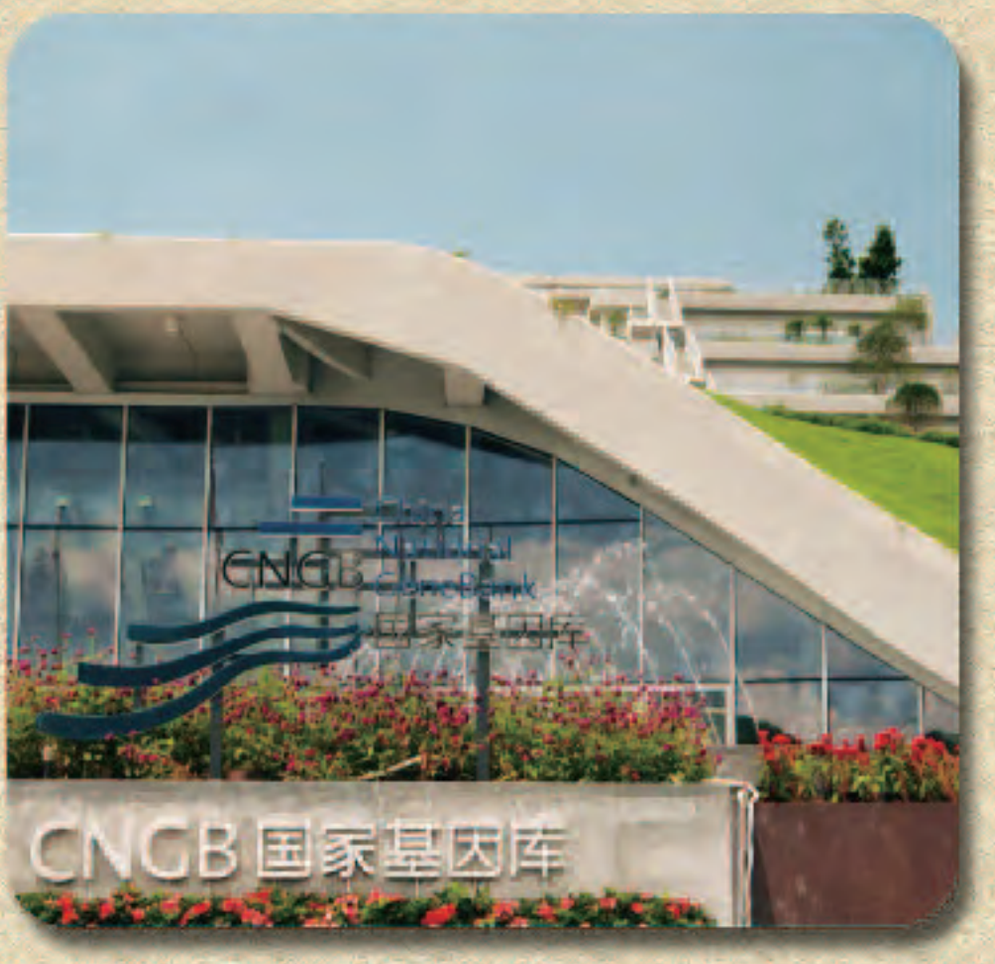


紫草细胞生产紫草素数量变化图

(1)据图分析，紫草细胞的生长呈现什么增长规律？为什么？

(2)不断通入无菌空气并进行搅拌可以提高紫草素的产量，为什么？如何通过设计一个实验验证这一假设？

如果想要更多地了解与本章有关的内容，请访问：
微生物学、细胞工程学、基因工程学、现代生物技术等相关网站。



我国国家基因库一隅

第三章 基因工程

2016 年，我国国家基因库正式运营。基因库里的基因资源是重要的国家战略资源，包括我国特有的遗传资源、生物信息和基因数据。有人认为，农耕时代的核心资源是耕地，工业时代的核心资源是能源，而现代的核心资源之一则是基因。

建立基因库真的如此重要吗？什么是基因工程？基因与基因工程有什么关系？基因工程会给人类社会和我们的日常生活带来哪些影响？

第一节　基因工程及其技术

我们可能还不清楚什么是基因工程(gene engineering),但对“转基因食品安全性”的争议会有所耳闻。自科学家发现 DNA 分子双螺旋结构以来,基因工程的研究和应用取得了飞速的发展。了解巨型小鼠的培育过程,有助于我们了解什么是基因工程。

积极思维　巨型小鼠是怎样培育的?

事实:

1. 1982 年,美国科学家帕米特(R. D. Palmiter,1942—)等人采用显微注射法,将带有大鼠生长激素基因的重组 DNA 分子导入小鼠受精卵内,将其培育成早期胚胎后再植入代孕小鼠体内继续发育。

2. 小鼠妊娠并成功分娩出携带有大鼠生长激素基因的小鼠。在同样生长条件下,这种转入大鼠生长激素基因的小鼠生长快、体型大,成鼠的体重是同一胎中普通小鼠的 1.8 倍,有“巨型小鼠”之称(图 3 – 1 – 1)。

图 3 – 1 – 1　普通小鼠(前)和巨型小鼠(后)

思考:

归纳　巨型小鼠与普通小鼠在基因组成上有什么不同?尝试描述培育巨型小鼠的主要过程。

培育巨型小鼠只是基因工程发展过程中的典型案例之一。随着相关学科研究的不断深入,基因工程及其技术也得到迅猛发展。那么,基因工程是如何在多学科基础上快速发展的呢?

基因工程是在多学科基础上发展而来的

20 世纪 50~70 年代，是生命科学在遗传学、微生物学、生物化学和分子生物学等学科领域取得丰硕成果的时期，这些领域的重大发现不断涌现。

1957 年，美国科学家科恩伯格(A. Kornberg，1918—2007)等首次在大肠杆菌中发现了 DNA 聚合酶。这种可以在体内外催化合成 DNA 的酶是研究DNA 合成的必备工具。

1967 年，罗思(T. F. Roth)和海林斯基(D. R. Helinski)发现，细菌除拟核外还有一种具有自我复制能力的环状 DNA 分子，即质粒(plasmid)(图 3－1－2)，它们能在细菌细胞之间转移。这一发现为基因转移找到了一种转运工具。同年，科学家在大肠杆菌细胞中又发现了 DNA 连接酶(DNA ligase)。

1970 年，特明(H. M. Temin，1934—1994)和巴尔的摩(D. Baltimore，1938—)两位美国科学家各自在 RNA“肿瘤”病毒中发现了逆转录酶。同年，史密斯(H. O. Smith，1931—)等人又从流感嗜血杆菌中分离到一种特异性很强的限制性内切核酸酶(restriction endonuclease)。

1972 年，美国科学家伯格(P. Berg，1926—)领导的研究小组完成了世界上首次 DNA 分子体外重组。他们使用同一种限制性内切核酸酶，在体外对猿猴病毒的 DNA 和 λ 噬菌体的 DNA 分别进行酶切，再用 DNA 连接酶将两者的酶切片段连接起来，获得了重组的 DNA 分子。这种重组 DNA 分子包含猿猴病毒 DNA 片段和 λ 噬菌体 DNA 片段。

1973 年，美国科学家科恩(S. N. Cohen，1935—)领导的研究小组成功地利用大肠杆菌质粒进行了另一个体外重组 DNA 分子实验。他们将一种含有卡那霉素抗性基因的大肠杆菌质粒和另一种含有四环素抗性基因的大肠杆菌质粒混合后，加入同一种限制性内切核酸酶，对 DNA 分子进行切割，用 DNA 连接酶将酶切片段连接起来形成重组 DNA 分子。这种重组质粒转化大肠杆菌获得成功。

接着，科恩和美国科学家博耶(H. Boyer，1936—)合作，将非洲爪蟾核糖体蛋白基因的 DNA 片段与大肠杆菌的质粒进行重组，再用重组质粒转化大肠杆菌，成功转录出相应的 mRNA。这说明真核生物的基因可以在原核生物中进行表达。

1976 年，科学家用质粒为载体，将生长激素释放抑制因子基因转入大肠杆菌，并于 1977 年首次生产出治疗肢端肥大症、巨人症的生长激素释放抑制因子。在这之前，生长激素释放抑制因子是从动物的下丘脑中提取的，10 万只羊的下丘脑仅能提取出1 mg。通过基因工程制备的工程菌来生产这种激素只需

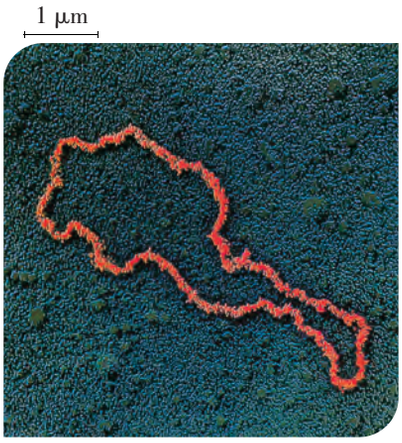


图 3－1－2　扫描电镜下的大肠杆菌质粒

你知道什么是生长激素释放抑制因子吗？通过推理，你能说出它与生长激素之间有什么关系吗？

不到 2 L 的培养液便可获得 1 mg 激素。随后，人胰岛素、人生长激素等基因工程产品相继问世，产生了巨大的经济效益和社会效益。

1977 年，英国科学家桑格(F. Sanger，1918—2013)测定了一种噬菌体的基因组序列，这是人类首次对完整基因组的核苷酸排列顺序进行测定。

基因工程正是在遗传学、微生物学、生物化学和分子生物学等众多学科长足进步的基础上发展而来的。

你能推测出利用基因工程生产人胰岛素的基本过程吗？

基因工程的基本工具

基因工程又称为 DNA 重组技术，**是指在体外通过人工“剪切”和“拼接”等方法，将外源目的基因与载体 DNA 进行组合形成重组 DNA，然后导入受体细胞，并使其在受体细胞中表达，产生人类需要的基因产物的技术。**DNA 重组技术需要的基本工具包括“分子剪刀”“分子黏合剂”和“分子搬运工”。

“分子剪刀”——限制性内切核酸酶

限制性内切核酸酶又称限制酶(restriction enzyme)，是基因工程的重要工具之一。**限制酶的特异性(专一性)很强，能识别 DNA 分子上特定的脱氧核苷酸序列，并使每条链中特定部位的两个脱氧核苷酸之间的磷酸二酯键断开**(图 3－1－3)。

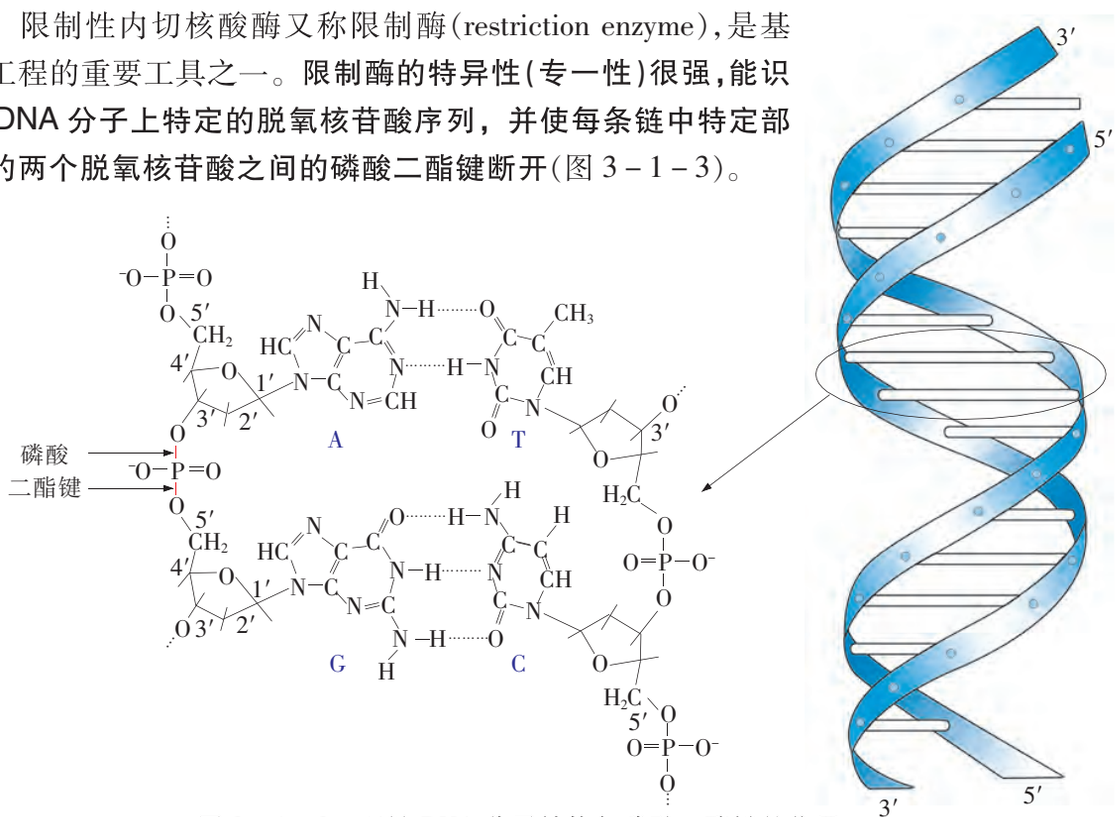


图 3－1－3　双链 DNA 分子结构与磷酸二酯键的位置

限制酶的切割方式有错位切和平切两种。错位切是在 DNA 分子两条链的不同部位进行切割，切割后形成的两个 DNA 分子片段的末端均留下一段游离的单链，这种单链称为黏性末端。例如，限制酶 *Eco*R Ⅰ 的错位切产生由 4 个脱氧核苷酸组成的黏性末端(图 3－1－4)。

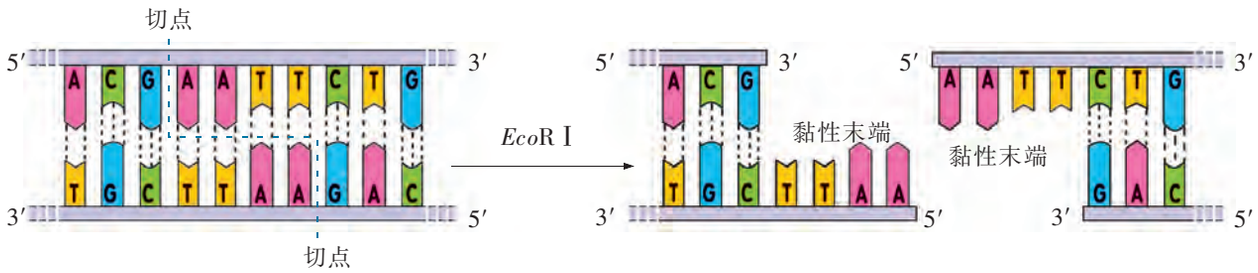


图 3－1－4　限制酶 *Eco*R Ⅰ的错位切示意图

平切是在 DNA 分子两条链上相同的部位进行切割，切割后形成平末端。例如，限制酶 *Hae* Ⅲ的平切结果如图 3－1－5 所示。

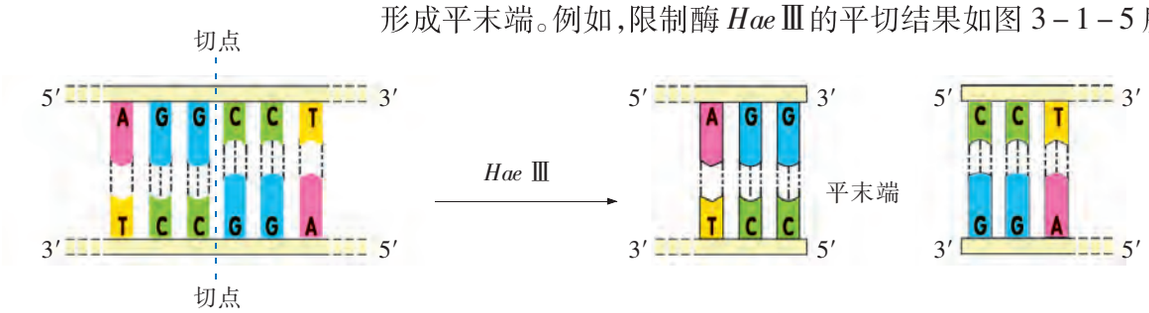


图 3－1－5　限制酶 *Hae* Ⅲ的平切示意图

知识链接

常用的限制酶

在基因工程中，科学家常根据需要，采用一定的限制酶识别 DNA 分子上的不同序列并进行切割。切割后的 DNA 分子会形成 3′端黏性末端、5′端黏性末端或平末端（下表）。

一些常用的限制酶识别序列与切割产生的末端类型

限制酶	识别序列与切割部位	产生的末端类型	限制酶	识别序列与切割部位	产生的末端类型
***Bbu* Ⅰ**	5′– GCATGC –3′ 3′– CGTACG –5′	3′端黏性末端	***Not* Ⅰ**	5′– GCGGCCGC –3′ 3′– CGCCGGCG –5′	5′端黏性末端
***Hind* Ⅲ**	5′– AAGCTT –3′ 3′– TTCGAA –5′	5′端黏性末端	***Eco*R Ⅰ**	5′– GAATTC –3′ 3′– CTTAAG –5′	5′端黏性末端
***Hpa* Ⅰ**	5′– GTTAAC –3′ 3′– CAATTG –5′	平末端	***Alu* Ⅰ**	5′– AGCT –3′ 3′– TCGA –5′	平末端

把两种来源不同的 DNA 分子用同一种限制酶来切割，可形成相同的末端。那么，怎样将切割的片段重新连接起来呢？

“分子黏合剂”——DNA 连接酶

对于两个具有黏性末端的 DNA 分子，通过碱基互补配对可以将黏性末端的两条链之间的碱基连接起来。而要形成重组 DNA 分子，还必须使基本骨架之间通过磷酸二酯键“缝”上，就像断成两截的梯子，不仅要把中间的踏板连接起来，还要把两边的扶手连接在一起一样。所以，**基因工程还需要一种被称为“分子黏合剂”的工具酶——DNA 连接酶**（图 3－1－6）。

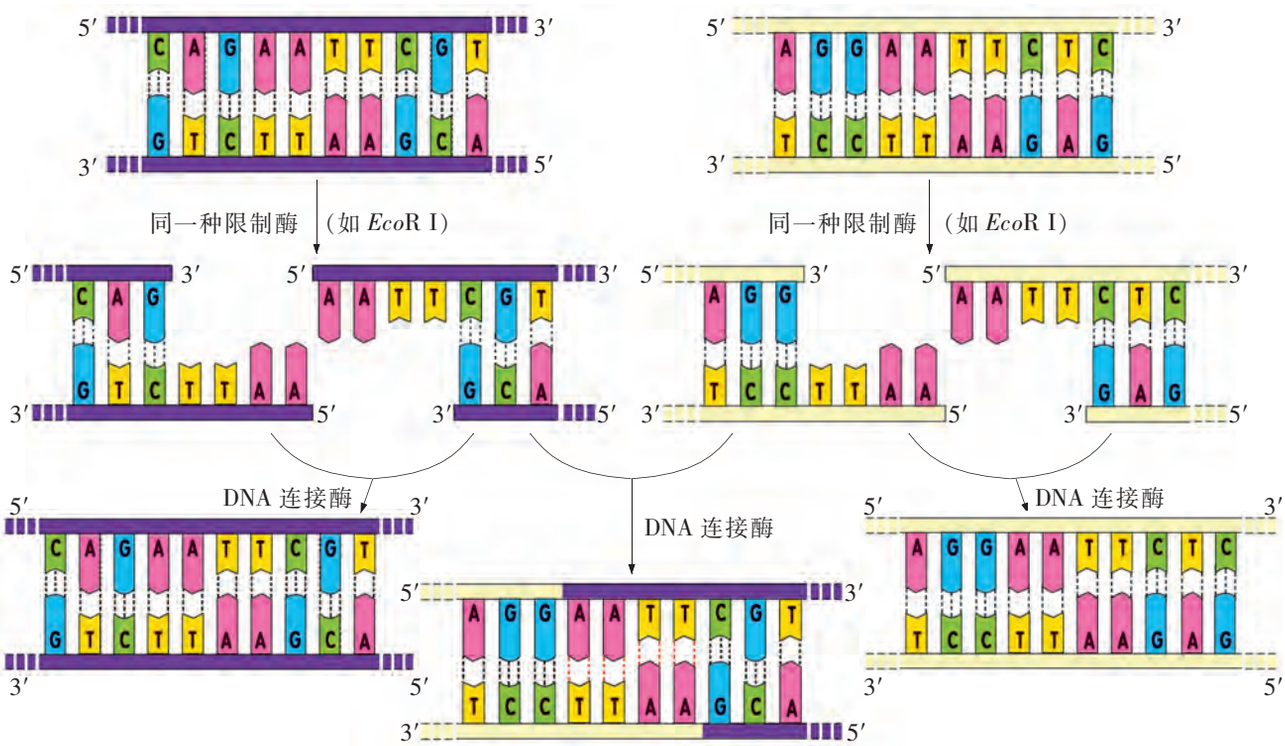


图 3－1－6　限制酶和 DNA 连接酶的作用示意图

DNA 连接酶广泛存在于各种生物体内，在 DNA 复制、修复以及体内外重组过程中起着重要作用。早期用于基因工程的 DNA 连接酶主要源于大肠杆菌和 T4 噬菌体。从大肠杆菌分离得到的 *E.coli* DNA 连接酶，可以用于连接具有黏性末端的 DNA 分子；由 T4 噬菌体基因编码的 T4 DNA 连接酶，可以用于连接具有黏性末端或平末端的 DNA 分子。

图 3-1-6 中列举了 3 种 DNA 分子产物，想想有没有其他可能的组合。

“分子搬运工”——载体

将外源基因导入受体细胞，并使其在受体细胞中稳定遗传和表达，还需要一定的“分子搬运工”，基因工程上将它们称为载体（vector）。目前，常用的载体有质粒、λ 噬菌体的衍生物、动物病毒等。质粒是最早被应用的载体。

质粒载体应该具有的 DNA 序列包括：复制原点；适合的标记基因，如四环素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因，以用于鉴定和选择重组 DNA 分子；多种限制酶的切割位点，如目的基因（外源基因）插入位点。事实上，基因工程上用作载体的质粒一般都是经过人工改造过的。用同一种限制酶切割质粒和目的基因，并利用 DNA 连接酶将它们连接起来，就能将质粒和目的基因组成一个重组质粒（图 3－1－7）。

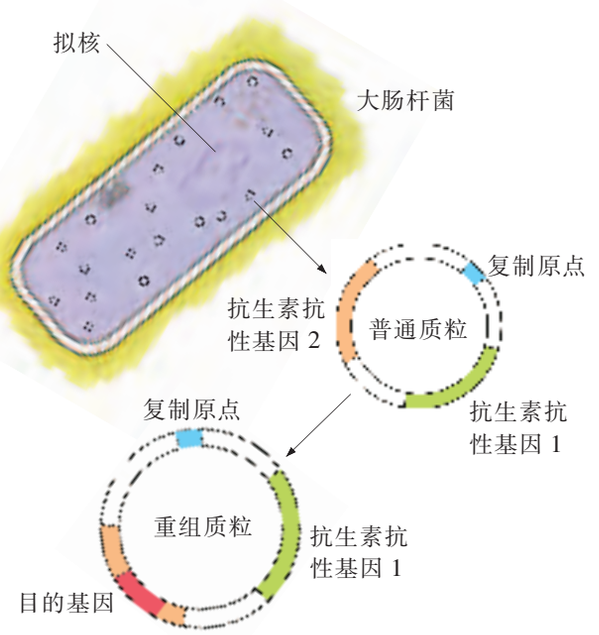


图 3－1－7　重组质粒构建示意图

聚合酶链式反应(PCR)技术

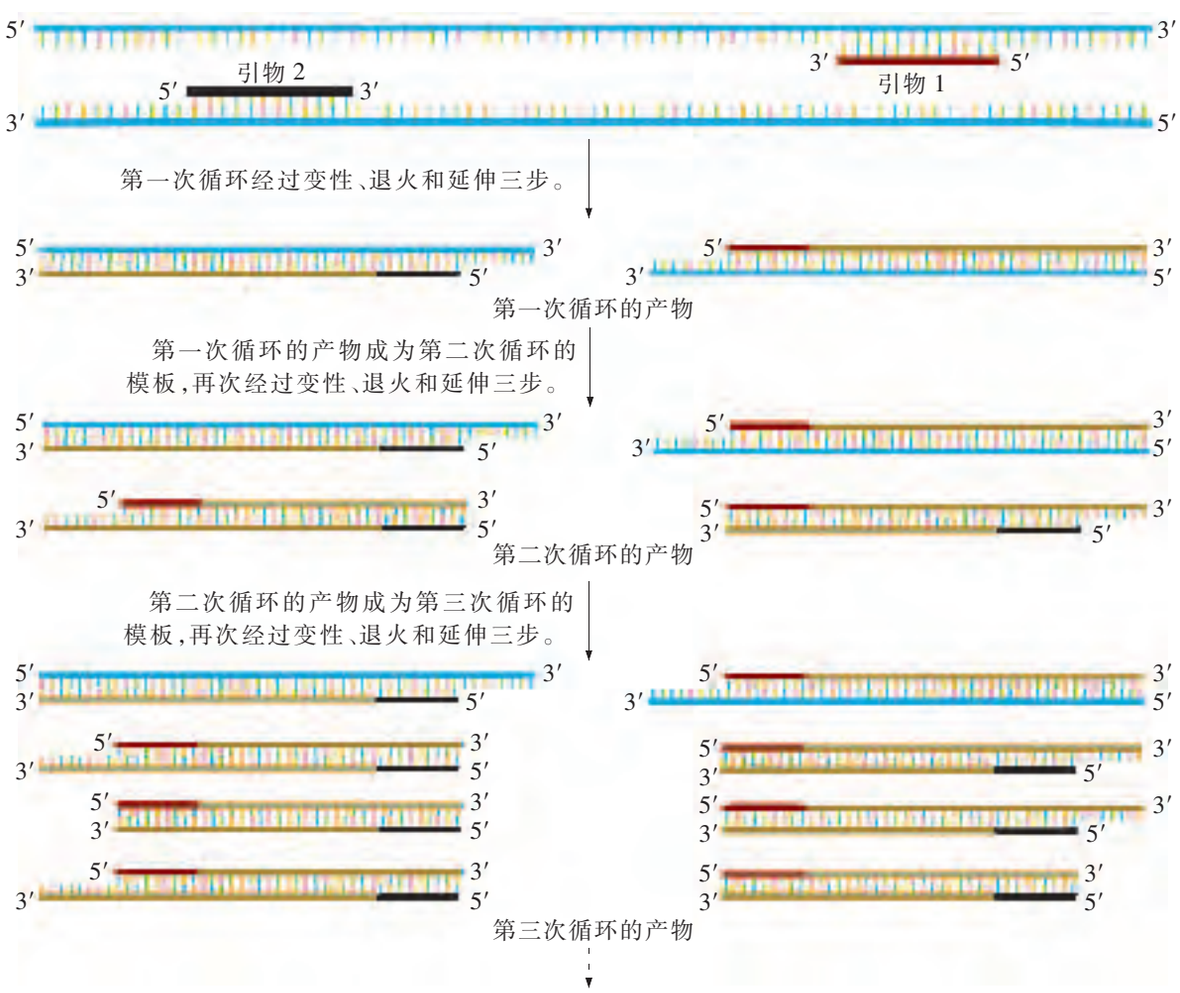
聚合酶链式反应(polymerase chain reaction,PCR)是目的DNA片段(目的基因)的体外扩增技术。在向PCR管中加入一定量的模板DNA、引物对、4种dNTP、缓冲液和热稳定的DNA聚合酶(*Taq*酶)、Mg^{2+}等后,设置好反应程序,启动PCR仪,它会自动完成反应步骤。

1. 变性:在约94 ℃高温下,作为模板的双链DNA解旋(变性)为两条单链DNA。

2. 退火:反应体系的温度降至约55 ℃,2条引物分别与对应单链DNA上的特定部位配对。

3. 延伸:反应体系的温度回升到约72 ℃(*Taq*酶催化作用的最适反应温度),4种脱氧核苷三磷酸根据碱基互补配对原则,在*Taq*酶的作用下连接到引物3′端之后,使引物链延伸,并形成互补的DNA双链。

完成上述第一次循环后,PCR仪会按设定接着进行第二次、第三次……循环。整个过程如图3-1-8所示。



继续上述循环,产物DNA的数量呈指数式增长。最后在约72 ℃保持7~10 min,使产物延伸完整。

图3-1-8 聚合酶链式反应程序示意图

美国科学家穆里斯（K. B. Mullis，1944—2019）因发明“PCR 技术”而获得了 1993 年诺贝尔化学奖。目前，PCR 技术已经广泛应用于医学及分子生物学等领域，不仅在病原体鉴定、遗传病诊断、免疫学研究、癌基因探索及某些疾病治疗等方面都取得了许多重大成果，而且在古生物学、法医学等方面也有广泛的应用。

走进实验室

利用 PCR 技术扩增 DNA 片段并完成电泳鉴定

PCR 技术是分子生物学研究的重要技术之一。利用 PCR 技术，只需从各种生物样本中提取少量的 DNA，就可以在体外对其中的特定片段进行快速复制，获得大量的目的 DNA 片段。

实验目的

1. 尝试运用 PCR 仪扩增 DNA 片段。

2. 关注 PCR 技术的应用。

3. 学习琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段的方法和技术。

实验原理

PCR 类似于 DNA 的天然复制。扩增 DNA 片段的过程包括变性、退火和延伸等步骤的多次循环。理论上，每经过一个循环，样本中 DNA 片段的数量增加一倍，新形成的链又可成为新一轮循环的模板，经过 n 个循环后，DNA 片段数量可扩增至原先的 2^n 倍。

典型的 PCR 反应体系包括：DNA 模板、反应缓冲液、dNTP（dATP、dGTP、dCTP、dTTP）、人工合成的 DNA 引物对、*Taq* 酶等。

本实验是以大肠杆菌 K_{12} DNA 为模板，运用 PCR 仪扩增碱性磷酸酶基因（*AKP*）。

此外，在不同阶段，还需要控制 PCR 仪反应系统的不同温度。

利用 PCR 仪完成 DNA 片段的扩增与 DNA 的体内复制过程有所不同，具体区别见表 3－1－1。

表 3－1－1　PCR 和体内 DNA 复制的差异

比较项目	PCR	细胞核内 DNA 复制
场所	试管中	细胞内
方式	半保留全连续局部区域复制	半保留半不连续全链复制
起始位点	引物 3′端	复制起始位点
酶	仅一种 DNA 聚合酶（*Taq* 酶）	多种酶
反应条件	温度变幅大	温和
解旋	高温解旋	解旋酶解旋
引物	DNA 片段，保留在复制的子链中	RNA 片段，不保留在复制的子链中
产物	引物界定的片段	核基因组
循环次数	人为设置	与细胞分裂同步

实验器材和试剂

大肠杆菌 K_{12} *AKP* 的正向引物和反向引物序列交由生物公司合成相应的引物对：

正向引物为 5′GTCGCGGATCCATGTCACGGCCGAGAC3′(*Bam*HⅠ)；

反向引物为 5′GCGACAAGCTTTATTTCAGCCCCAGAG3′(*Hind*Ⅲ)；

引物溶液的物质的量浓度：10 μmol·mL^{-1}。

PCR 仪(图 3－1－9)、琼脂糖凝胶电泳系统、凝胶成像仪或紫外透射仪、微孔加热器(微量恒温仪)。

DNA 模板、dNTP 混合物、*Taq* 酶、双蒸水、10× PCR 缓冲液(图 3－1－10)。

微量取液器、PCR 管、枪头等。

图 3－1－9　一种 PCR 仪

图 3－1－10　部分实验试剂

实验步骤

1. PCR 扩增目的基因 *AKP*

(1)采用微量取液器(结构和使用方法见附录)，在 0.2 mL PCR 管内配制 50 μL 反应体系

dNTP 混合物(2.5 mmol·L^{-1})	4 μL
10× PCR 缓冲液	5 μL
正向引物(10 μmol·mL^{-1})	2 μL
反向引物(10 μmol·mL^{-1})	2 μL
模板 DNA	1 μL
Taq 酶	1 μL(1U)
双蒸水	35 μL

(2)按下述程序进行扩增

①94 ℃	预变性	5 min
②94 ℃	变性	1 min
③55 ℃	退火	1 min
④72 ℃	延伸	2 min

⑤重复步骤②~④，30 个循环。

⑥72 ℃延伸 7~10 min。

在运行反应程序前，应该详细了解使用 PCR 仪的安全措施。

2. 电泳分析

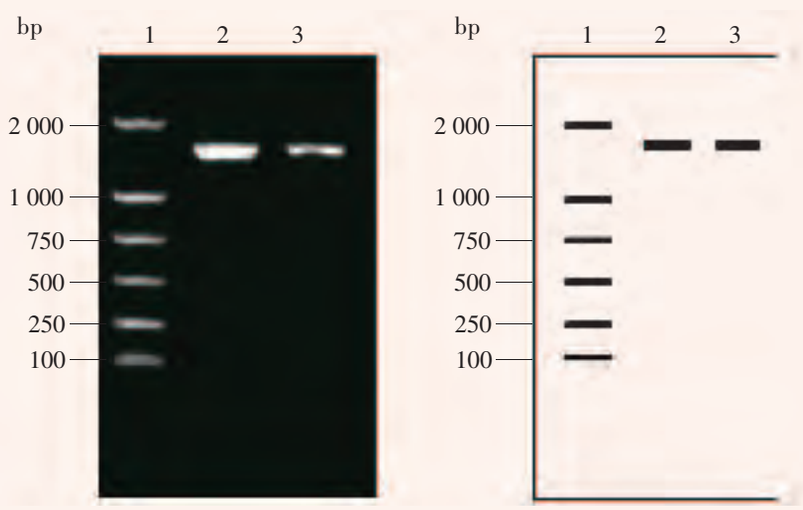
有条件的学校可以组织学生查阅琼脂糖凝胶电泳的相关知识，并配制相关试剂，利用该技术检测本实验的 PCR 扩增产物。进行此实验需要配制质量分数为 1%的琼脂糖凝胶液(1× TAE)、50 μL PCR 扩增产物和 6 μL 凝胶加样缓冲液等试剂，操作时维持恒压 80 V 1.5~2 h。

开展电泳鉴定实验时，采用凝胶成像仪或紫外透射仪观察和记录电泳结果。

结果与分析

大肠杆菌 K_{12} *AKP* 长 1 482 bp，电泳结果如图 3－1－11 所示，显示长度正确。

DNA 相对分子质量标准(2 000、1 000、750、500、250、100 bp)。



结果照片图　　结果示意图

注：图中 1 为 DNA Marker DL 2 000，2~3 为大肠杆菌 K_{12} 碱性磷酸酶基因 *AKP*。

图 3－1－11　PCR 扩增产物电泳结果图

建议：如果实施 PCR 实验有困难，也可利用软件进行模拟 PCR 操作。

技能指导

微量取液器的结构和使用方法

微量取液器是一类精确移取微量液体的器具。它们的结构基本相同，包括推动按钮、卸枪头按钮、调节轮、吸液杆等(右图)。微量取液器一般可分为两种。一种是固定容量的，常用的有 100 μL、200 μL 等多种规格。另一种是可调容量的取液器，常用的有 5 μL、10 μL、20 μL、200 μL 等几种。

使用微量取液器时，用拇指和食指旋转取液器上部的旋钮，使数字窗口出现所需要移取溶液的体积的数字。然后，按照微量取液器的使用说明进行规范操作。

微量取液器的结构

基因工程的基本操作程序

基因工程的基本操作程序包括目的基因的获取、基因表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞，以及目的基因及其表达产物的检测鉴定等步骤。

1. 目的基因的获取

目的基因的获取是基因工程的第一步。获取目的基因的方法很多。例如，通过化学方法直接人工合成目的基因，通过筛选基因文库(gene library)获取目的基因。

通过化学合成法直接人工合成目的基因是获取目的基因的重要手段之一。对于比较小的目的基因，在明确脱氧核苷酸序列后，可以通过 DNA 合成仪(图 3－1－12)直接人工合成。

图 3－1－12　一种 DNA 合成仪

全基因或较大基因的全部化学合成成本昂贵，使用半合成的方法可以降低成本，从而利于普及采用。合成时只需要合成基因的部分寡核苷酸片段（3′末端具有 10~14 个互补碱基），在适当条件下退火得到模板—引物复合体，在 dNTP 存在的条件下，通过 Klenow 酶(能将双链 DNA 的突出 5′端补平的 DNA 聚合酶)等的作用，合成相应的互补链，再用相应的 DNA 连接酶修复缺口，获得两条完整的互补双链(图 3－1－13)。所形成的双链 DNA 片段，可经处理插在适当的载体上。

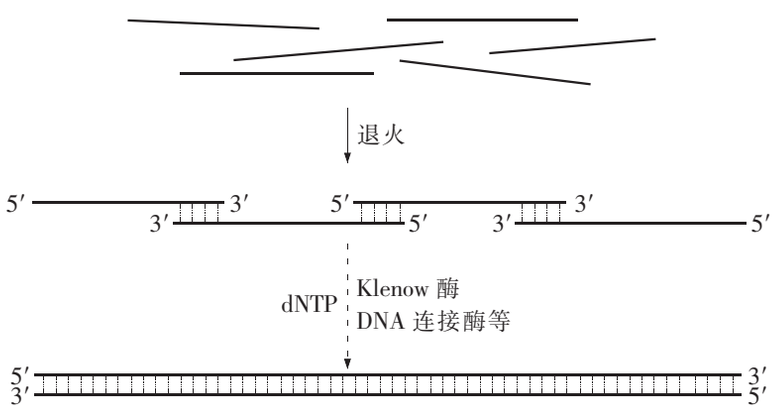


图 3－1－13　某种基因的化学合成过程示意图

通过基因文库获取目的基因的来源可分为基因组文库和 cDNA 文库。

基因组文库(genomic library)是指含有某种生物体全部基因片段的重组 DNA 的克隆群体。构建基因组文库时，先将提纯的原核生物或者真核生物的基因组 DNA 酶解成合适长度的随机片段，然后将这些片段与适当的载体进行体外重组，经体外包装、转染宿主细菌，得到一组含有不同 DNA 片段的重组 DNA 分子群体。受体菌群中的不同个体便可能分别含有该种生物

有人把基因文库比喻成基因图书馆。你能理解其含义吗？

的不同基因拷贝，整个菌群所含有的基因拷贝便可能涵盖了该生物的所有基因，即构成了该生物的基因文库。

从基因组文库中筛选某目的基因，一般采用核酸探针杂交的方法，将某基因的已知片段作为筛选的探针，在基因组文库中筛选含有目的基因的菌落，进行扩增、分离回收而获得目的基因。

构建 cDNA 文库主要包括从组织细胞中提取 mRNA，逆转录成 cDNA，与适当载体连接后转化宿主，这种包含着细胞全部 mRNA 信息的 cDNA 克隆集合称为该组织细胞的 cDNA 文库。构建合适的 cDNA 文库已成为获取真核生物目的基因的常用方法。

知识链接

转座子标签法获得目的基因

转座子是染色体上一段可以移动的基因，其分子本质是一段能够插入到寄主基因组新位点的特异的 DNA。科学家发现，不但在原核生物中有大量转座子，在酵母、果蝇以及哺乳动物等多种真核生物中也存在转座子。在转座过程中，原来位置的 DNA 片段(转座子)并未消失，发生转移的只是转座子的拷贝。基因发生转座可引起插入突变，使插入位置的基因失活并诱导产生突变型，或在插入位置上出现新的编码基因。转座子标签法是通过转座子在染色体上的插入和整合，把转座子作为基因定位的标签来检测出突变基因的位置和克隆出突变基因的方法。

利用转座子克隆外源基因的主要操作步骤有：(1)已分离得到的转座子与选择标记构建成含转座子的质粒载体；(2)将含转座子的质粒载体导入到目标生物基因组中；(3)利用 PCR 等技术鉴定转座子 DNA；(4)以转座子序列为探针，筛选插入的突变体，分离转座子的两端相邻序列基因。

除化学合成目的基因之外，上述所有通过其他方法获取的目的基因均源自自然界已有物种的 DNA。因此，从已有物种中提取 DNA 具有重要价值。从细胞中直接提取 DNA 或 RNA，然后通过限制酶酶切或 RNA 的逆转录获得目的基因。获得基因组 DNA 或 mRNA 的基本过程主要有 3 步：首先裂解细胞使核酸分子释放出来，然后从释放出来的细胞成分中分离核酸分子，最后纯化获得核酸分子。

DNA 提取的方法有很多，不同生物(植物、动物、微生物)的 DNA 的提取方法有所不同，不同种类或同种类的不同组织因其细胞结构及所含成分的不同，提取的方法也有差异。提取 DNA 也应考虑对 DNA 纯度的要求和实验条件选择不同的方法。例如，提取质粒 DNA 时，常常先用碱裂解法获取质粒，再提取质粒 DNA。纯化 DNA 通常利用了 DNA 与 RNA、蛋白质等物质在理化性质方面的差异。

如果你想要更多地了解与获取目的基因方法有关的知识，请参考下列资料。

李修平. 基因工程技术方法及其典型应用研究. 北京：中国纺织出版社，2018.

第四章　目的基因的获取途径分析

DNA 的粗提取和鉴定

实践：

中学实验室中一般利用常见的生物材料，如鸡血，进行 DNA 的粗提取和鉴定实验。

一、DNA 的粗提取

1. 制备鸡血细胞液。取质量浓度为0.1 g·mL^{-1}的柠檬酸钠溶液（防止血液凝固）100 mL 和新鲜鸡血 180 mL，注入 500 mL 烧杯中，充分搅拌。将混合均匀的鸡血细胞液置于 4 ℃冰箱内，静置 1 天，使血细胞沉淀。

2. 取出准备好的鸡血细胞液 5~10 mL，注入50 mL 烧杯中，并向烧杯中加入20 mL 蒸馏水，搅拌 5 min。用垫有纱布的漏斗过滤（图 3－1－14），取其滤液。

图 3－1－14　漏斗过滤

3. 取物质的量浓度为 2 mol·L^{-1}的 NaCl 溶液 40 mL 加入滤液中，用玻璃棒沿同一方向轻轻搅拌，使其混合均匀。

4. 取适量蒸馏水沿烧杯内壁缓缓加入，同时用玻璃棒沿同一方向轻轻搅拌，观察烧杯中有无丝状物出现。当丝状物不再增加时，停止加入蒸馏水。

5. 用玻璃棒将丝状物挑起，这就是含有一定杂质的 DNA（图 3－1－15）。

建议：在 DNA 提取液中加入适量冷却的、体积分数为 95%的乙醇溶液时，DNA 的絮状物会从滤液中析出。

安全使用药品和器具！

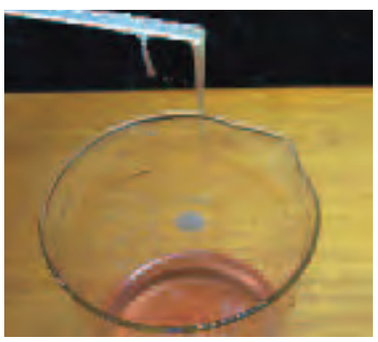


图 3－1－15　DNA 的粗提取物

二、DNA 的鉴定

1. 将分离的丝状物放入物质的量浓度为 2 mol·L^{-1}的 NaCl 溶液中，使其溶解。

2. 利用二苯胺、冰醋酸、浓硫酸配制二苯胺试剂。向上述溶液中滴加二苯胺试剂后，沸水浴加热数分钟（图 3－1－16），溶液出现蓝色。当蓝色不再加深时，取出试管，冷却，仔细观察后会发现，DNA 含量高的溶液蓝色较深。

图 3－1－16　沸水浴加热

建议：在酸性条件下，DNA 与二苯胺发生反应，溶液呈蓝色，因此，常用二苯胺试剂鉴定 DNA。

讨论：

1. 在 DNA 的粗提取中，步骤 2 和步骤 4 两次加入蒸馏水的作用相同吗？

2. DNA 的粗提取完成后，如果要进一步纯化上述含有杂质的 DNA，应该怎么做？

2. 基因表达载体的构建

人们构建的基因表达载体不仅要使目的基因进入受体细胞并有效表达，而且要能稳定存在且遗传给后代。所以，**基因表达载体除了目的基因外，还应该包括复制原点**（origin of replication）、**启动子**（promoter）、**终止子**（terminator）**和标记基因**（marker gene）**等**（图 3－1－17）。复制原点要能与特定的受体细胞相匹配，使外源基因在受体细胞中能稳定复制并遗传。启动子是位于目的基因上游的一段 DNA 序列，也是 RNA 聚合酶识别、结合的部位。RNA 聚合酶与启动子的结合能驱动基因开始转录，进而合成出相应的 mRNA。终止子是位于目的基因下游的一段 DNA 片段，是终止目的基因转录的脱氧核苷酸序列。标记基因的作用是初步筛选出接受了目的基因的受体细胞。常用的标记基因有抗性基因（如抗生素抗性基因）或某些生化标记基因。

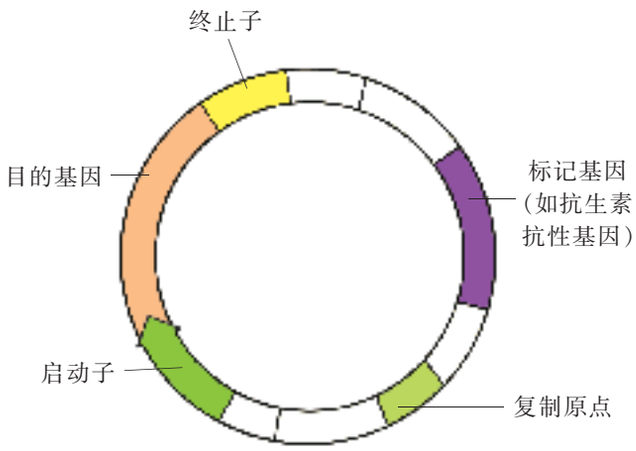


图 3－1－17　基因表达载体模式图

知识链接

载体的种类

了解一些有关载体种类的知识，对理解基因工程中克隆载体和表达载体结构和作用的内容有帮助。

载体是将外源 DNA 或基因导入宿主细胞进行扩增或表达的工具。按功能分类，载体有克隆载体和表达载体两类。

克隆载体是最基本的载体。从病毒、质粒或高等生物细胞中获取的 DNA 均可以作为克隆载体。在克隆载体上插入适当大小的外源 DNA 片段，再将重组后的载体引入宿主细胞中，可以在宿主细胞中通过克隆获取目的基因。

在基因工程操作中，有时需获取目的基因的编码蛋白。要使外源基因（目的基因）能在宿主细胞中表达，必须将它放入带有基因表达所需要的各种调控元件的载体中，这类载体就是表达载体。例如，表达载体 pKK223-3 是一个具有典型表达结构的大肠杆菌质粒，其基本骨架不仅需要来自 pBR322 和 pUC 的质粒复制起点和氨苄青霉素抗性基因，还需有相应的启动子和终止子，以及有多克隆位点可装载要表达的目的基因。

当然，也有一些载体兼有克隆载体和表达载体的特点。

3. 将目的基因导入受体细胞

将构建好的基因表达载体导入受体细胞是基因工程的重要步骤。受体细胞不同，导入目的基因的方法也不尽相同。

将目的基因导入植物细胞的方法主要是农杆菌转化法。农杆菌是一类生活在土壤中的微生物，能在自然条件下感染双子叶植物或裸子植物，但不会感染大多数单子叶植物。当双子叶植物或裸子植物受到损伤时，伤口处的细胞会分泌大量

由于受体细胞的不同，导入目的基因的方法也不尽相同。那么，构建的基因表达载体会不会相同呢？

的酚类化合物，吸引农杆菌向伤口处移动。农杆菌含有 Ti 质粒，上面有一段转移 DNA(T-DNA)，能进入受体细胞，并整合到受体细胞染色体的 DNA 上。农杆菌转化法就是将目的基因插到农杆菌 Ti 质粒的 T-DNA 特定区段上，再通过 T-DNA 将其插入植物细胞染色体的 DNA 上，使目的基因得到稳定的遗传和表达(图 3－1－18)。

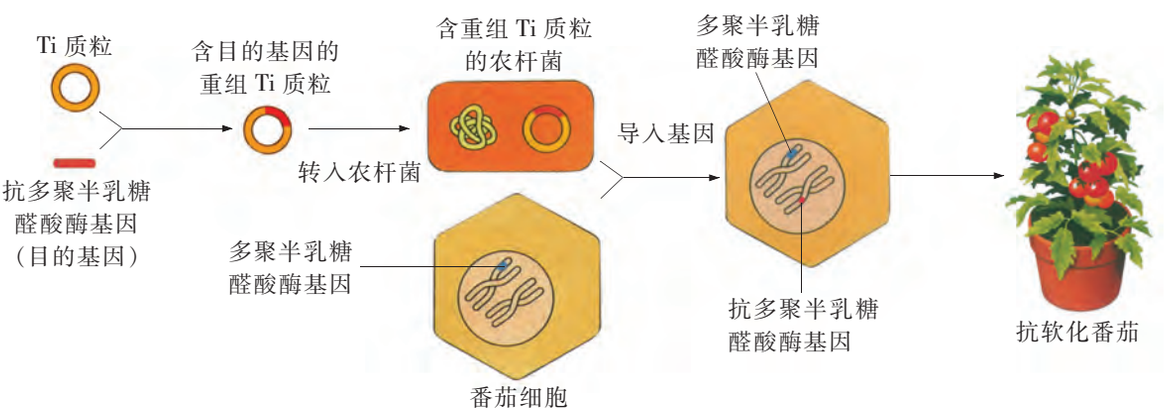


图 3－1－18　农杆菌转化法示意图

将目的基因导入哺乳动物细胞的方法主要是显微注射法。操作时一般要先准确掌握母畜的发情周期，再加以人工调节，使母畜在预先确定的时间排卵并受精；然后收集受精卵(若未受精需进行体外受精)，经适当处理后，放在显微镜下用口径为 1 μm 的玻璃微管向其注射含 500~600 个拷贝的目的基因的载体；最后把这些受精卵移植到处于相同发情周期的母畜子宫内，由此发育而来的个体就会出现一定数量的转基因动物。也有科学家用病毒 DNA 与目的基因一起构建的载体，去感染受体动物细胞，也能使目的基因导入动物细胞内。

实验表明，感受态细胞由于细胞质膜通透性改变而容易接受外来的 DNA。你能推测其原理吗？

将目的基因导入微生物细胞的方法和导入动植物细胞的方法不同。科学家通过实验发现，经过适当处理(如用 Ca^{2+}处理)后，细胞质膜对 DNA 的通透性会发生改变，细胞变得容易接受外来的 DNA，处于这种状态的细胞称为感受态细胞。用一定浓度的 $CaCl_2$ 溶液处理大肠杆菌便能使其成为感受态细胞。然后再将这些感受态细胞和重组的基因表达载体混合于缓冲液中，在适宜的温度下便可完成转化过程。转化后的细胞在相应的培养基上培养，经过筛选可以得到带有目的基因的微生物。

4. 目的基因及其表达产物的检测鉴定

基因导入受体细胞后，能否有效地表达目的基因并产生相应的性状，需要进一步做筛选和鉴定。

首先，从 DNA 方面进行检测。DNA 分子杂交法就是一

种检测方法，其基本原理是具有一定同源性的两条 DNA 单链，在一定条件下（适宜的温度等）可以按照碱基互补配对原则形成双链。杂交过程中，杂交的双方是待测的 DNA 和用放射性同位素或荧光标记的已知 DNA 片段，后者又被称为基因探针（gene probe）。若待测 DNA 中有能与基因探针互补的特异性 DNA 片段，用于示踪的放射性同位素标记或荧光标记会指示出其所在的位置，表明目的基因已经插入转基因生物的 DNA 分子中（图 3－1－19）。

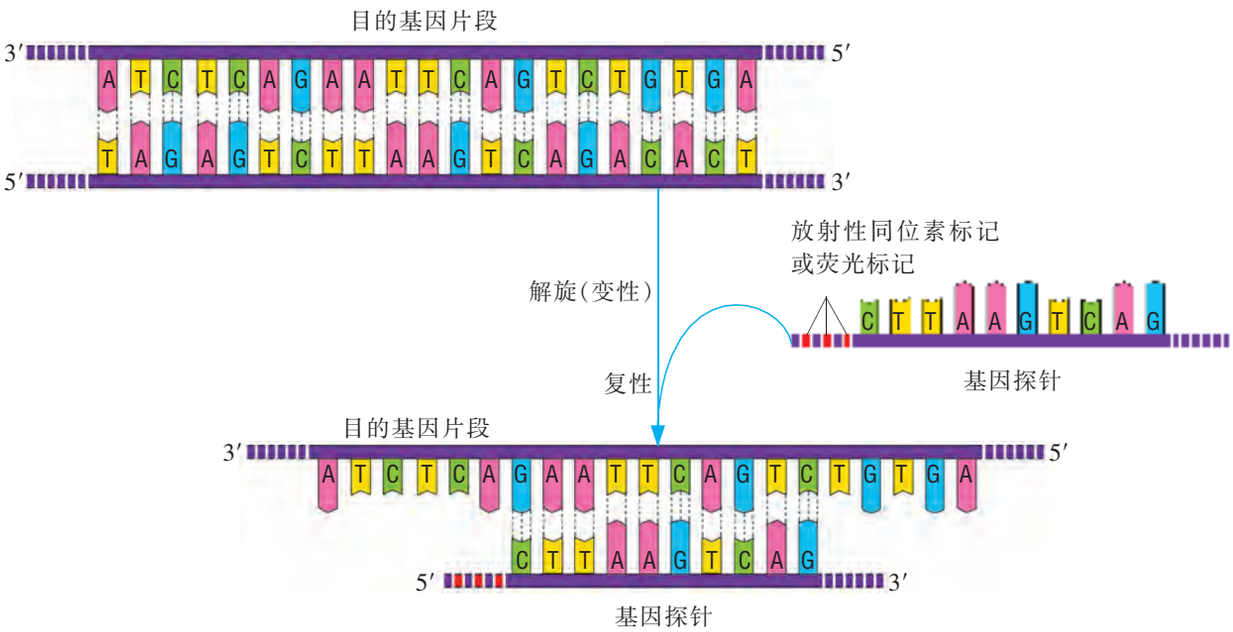


图 3－1－19　目的基因的检测示意图

其次，从 RNA 方面检测受体细胞。检测目的基因是否能发挥其功能，即是否转录出相应的 mRNA 分子。这种检测可以采用上述分子杂交技术，从待测转基因生物细胞中提取 mRNA 分子，用已标记的目的基因片段作为探针与 mRNA 杂交，如果有杂交带出现，表明目的基因转录出相应的 mRNA 分子。

最后，从蛋白质方面进行检测。一般先从待测转基因生物中提取蛋白质，再用相应的抗体进行抗原—抗体杂交。如果有杂交带出现，说明目的基因已经表达出相应的蛋白质。

为了培育某些特定性状，有时还需要从个体水平对生物的特定性状进行鉴定。例如，对于导入某种鱼的抗冻蛋白基因的转基因番茄进行个体检测，需要栽培转基因番茄获得果实后，再与天然产品比较，确定其是否具有了抗冻性状。

经过科学家几十年的努力，基因工程已经发展成为一项比较成熟的技术。转基因的受体细胞已经从开始时的大肠杆菌扩大到了枯草杆菌、酵母菌、霉菌、植物细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞，展现出美好的应用前景。

本节练习

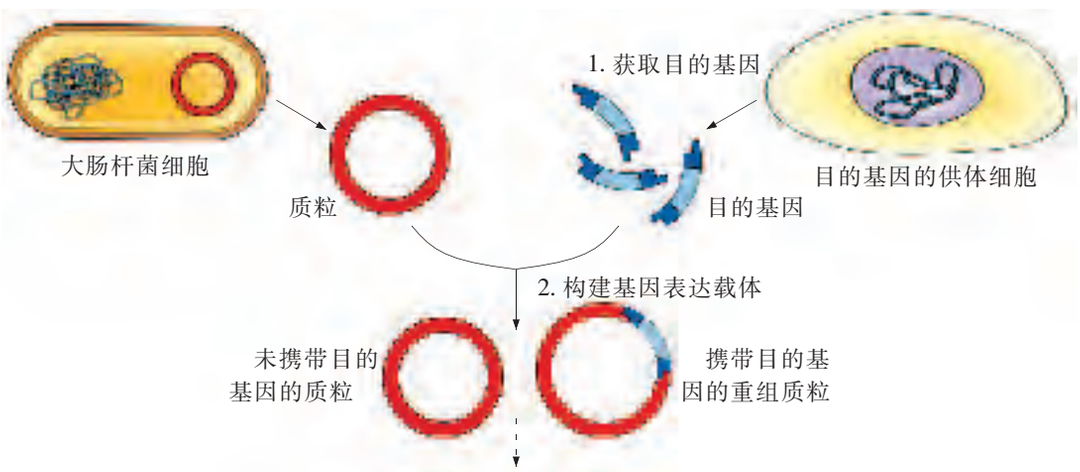
一、思辨题

1. 在基因工程中，常用人工改造后的质粒作为目的基因的载体。这样的质粒一般由哪些部分组成？

2. 目的基因导入受体细胞有多种方法。如果培育某种转基因哺乳动物，可采用什么方法将目的基因导入动物受体细胞？

二、应用题

1. 人们利用基因工程的方法成功培育出转基因抗虫棉，下图是该基因工程的第一步和第二步的示意图。



基因工程流程示意图（部分）

（1）基因工程的第一步是获取目的基因，获取目的基因的方法有哪些？

（2）基因表达载体由哪些主要部分组成？其中的标记基因有什么作用？

（3）简要描述在基因工程的上述两个步骤中要用到的“基本工具”及其作用。

2. 假如想通过基因工程的相关操作获得导入抗虫基因的转基因烟草植株，可以运用什么方法从个体水平对其进行鉴定呢？如果有困难，可以向老师请教或通过互联网查找答案。

走近职业

基因技术工程师正在操作PCR仪

基因技术工程师

基因技术工程师主要从事基因调取、克隆及载体构建等实验工作及制订实验具体计划，负责订单及实验准备工作，落实项目的进度目标；能对实验中出现的问题提出解决方案；并且掌握分子克隆相关实验技能，具有分子克隆工作经验，熟悉工艺流程。

许多具有生物科学专业本科及本科以上学历的人在从事基因技术工程师的工作。

如果你想要更多地了解本职业的相关情况，请访问我国关于职业介绍的网站。

课外探究　从植物组织中提取 DNA

植物组织 DNA 的制备与动物组织 DNA 的制备原理大致相同，为了更方便地获得 DNA，一般采用幼嫩组织或组织培养物作为材料，置于冰箱中冷藏后使用。

提出问题

植物细胞具有细胞壁，提取植物组织细胞中的 DNA，不仅要破坏细胞质膜，还要破除细胞壁。怎样从植物组织细胞中提取出比较纯净的 DNA？

实验器材

草莓果实；冰箱，研钵，研杵，50 mL 烧杯，纱布，滤纸，玻璃漏斗，玻璃棒；含十二烷基硫酸钠(SDS)的洗涤剂，物质的量浓度分别为 0.14 $mol \cdot L^{-1}$ 和 2 $mol \cdot L^{-1}$ 的 NaCl 溶液，清水，冰乙醇，二苯胺试剂等。

作出假设

针对提出的问题作出假设。例如，针对植物组织细胞的结构特点，并结合含十二烷基硫酸钠(SDS)的洗涤剂能破坏细胞质膜、使 DNA 与蛋白质分离的特点，作出假设：在研磨植物组织时，加入石英砂和洗涤剂，有利于破碎细胞壁、破坏细胞质膜，使细胞核 DNA 释放，利于提取出 DNA；利用盐析法去除蛋白质，可以提取出较纯净的 DNA。

设计和实施实验

1. 破碎细胞：将储藏在冰箱中的草莓(约 15 g)取出，置于研钵中研磨。加入 5 mL 物质的量浓度为 2 $mol \cdot L^{-1}$ 的 NaCl 溶液、洗涤剂 2~3 滴，用研杵快速研磨。

2. 获取 DNA：

(1)取 50 mL 小烧杯一个，将一层纱布覆在杯口，将研磨得到的混合物过滤，取滤液。

(2)向滤液中加入物质的量浓度为 0.14 $mol \cdot L^{-1}$ 的 NaCl 溶液(此步骤参照动物细胞 DNA 提取方法)，用玻璃棒沿一个方向轻轻搅拌，至烧杯中有丝状物出现。

(3)将含 DNA 丝状物的溶液倒入玻璃漏斗(漏斗上覆盖滤纸置于小烧杯上)，DNA 丝状物呈黏稠状留在滤纸上。

(4)取 50 mL 烧杯 1 个，向烧杯内注入 15 mL 物质的量浓度为 2 $mol \cdot L^{-1}$ 的 NaCl 溶液。将滤纸上的黏稠物移至 NaCl 溶液中，用玻璃棒轻轻地沿一个方向不停地搅拌，使黏稠物尽可能多地溶解于溶液中。

(5)向上述含 DNA 的 NaCl 溶液中加入等体积的冰乙醇，至烧杯中出现白色絮状物。

建议：粗提取 DNA 时，可略去上述步骤(2)(3)(4)，直接向研磨获得的滤液中加入等量冰乙醇。

3. 鉴定 DNA：用玻璃棒取出烧杯中白色絮状物，移入已加入 5 mL 物质的量浓度为 2 $mol \cdot L^{-1}$ 的 NaCl 溶液的试管中，与二苯胺试剂共热。

结果与分析

加入二苯胺试剂的 DNA 提取液变蓝，说明植物细胞中含有 DNA，DNA 含量越多，蓝色越深。实验材料还可以选用花椰菜幼嫩的花、洋葱鳞片叶等。

第二节　基因工程的应用价值

从人类认识基因到基因工程的迅猛发展只有短短一个多世纪，这期间无数科学家取得了卓著的研究成果，这些成果已经造福于人类。基因工程给了人们无限遐想的空间，而它的不断发展又将人类带入了实现梦想的年代。想一想，基因工程会有哪些应用价值呢？

积极思维

基因工程有哪些应用价值？

图 3－2－1　一种野生稻

事实：

1. 从远古时代的植物驯化到 20 世纪初植物育种学的建立，人类无时无刻不在努力进行动植物的遗传改良，希望能让它们更好地为人类服务。

2. 传统的育种方法从遗传学本质上讲，是以自然条件下的基因突变体为种质基础，以有性杂交为基因导入手段，以选择优良基因型重组体为目的的植物性状改良过程。例如，我国祖先利用野生稻（图 3－2－1）逐渐培育出栽培水稻的过程，依靠的就是传统育种方法。

3. 由于远缘杂交会受到生殖隔离的影响，传统的育种方法一般难以在短时间内获得新的突破。

4. 基因工程开辟了一条基因在植物、动物、微生物等不同生物之间的“交流”新途径。

思考：

1. **推理**　基于上述事实和已学知识，尝试推测基因工程有哪些应用价值。

2. **创新**　我们此刻最想通过基因工程创造出什么样的新成果？这个想法能利用现有的基因工程技术完成吗？

基因工程让人类的某些遐想早就成为现实。目前，我国批准了番木瓜、棉花的转基因品种的种植，也批准进口转基因大豆、油菜、玉米等作为加工原料。更多的转基因产品正在实验过程中。那么，基因工程在农牧业、食品业和医药业中到底具有哪些应用价值呢？

基因工程在农牧业中的应用价值

利用基因工程技术培育的、能稳定遗传外源基因所决定的性状的生物称为转基因生物(transgenic organism)。这些可改造的生物既可以是微生物,也可以是植物或动物,所以,基因工程的应用是非常广泛的。

植物基因工程硕果累累

植物基因工程在提高农作物的抗除草剂、抗虫、抗病和抗盐碱能力等方面大显身手。

转基因抗病植物的生产带来效益。

许多微生物会引起植物病害,这些微生物包括病毒、细菌和真菌。

番木瓜环斑病在全球的番木瓜产地都有发生(图 3 – 2 – 2),在中国南方的多个省份也广泛流行。番木瓜环斑病毒是一种变异性很强的 RNA 病毒,不同地区的毒株感染番木瓜的能力差异较大。

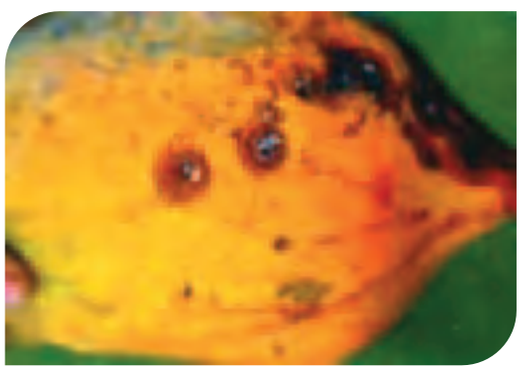


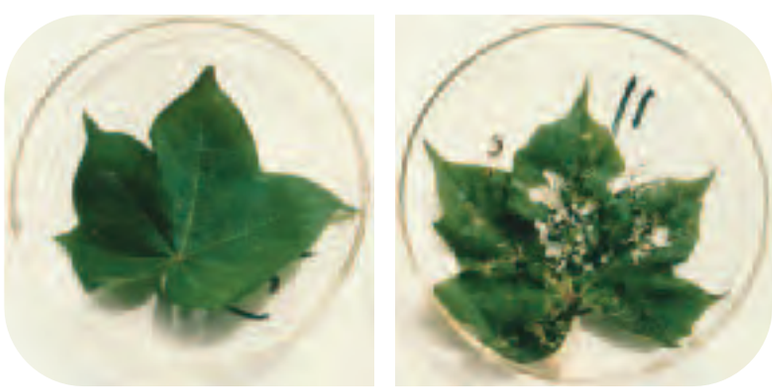
图 3 – 2 – 2　患番木瓜环斑病的果实

在中国的番木瓜主要产地——华南地区,发现了 4 个番木瓜环斑病毒毒株,其中“黄点花叶”株是优势毒株。科学家将这个毒株的复制酶基因转入番木瓜细胞内,培育出具有很强抗病性能的转基因品系——“华农 1 号”。

近年来,科学家利用基因工程技术,将一些特定的基因,如病毒的复制酶基因和衣壳蛋白基因以及几丁质酶基因、植物抗毒素基因导入小麦、甜椒或番茄等作物,获得了抗病的小麦、甜椒或番茄等新品种。

转基因抗虫植物已广泛投入生产。

与病毒引起的植物的病害一样,虫害给农作物造成的损失也十分巨大。转基因抗虫植物的研究也已取得许多成果。例如,科学家已将从苏云金杆菌中分离出来的编码苏云金杆菌 Bt 毒蛋白的基因导入棉细胞,培育出了转基因抗虫棉(图 3 – 2 – 3)。转基因抗虫棉对棉铃虫等具有很强的抗性。此外,转基因抗虫水稻、玉米、大豆、马铃薯、烟草、番茄、苹果、核桃、杨树和菊花等抗虫品种也相继问世。



抗虫棉叶　　非抗虫棉叶

图 3 – 2 – 3　转基因抗虫棉有抗虫作用

转基因抗逆植物的培育带来新希望。

几乎所有的植物在它们的生长过程中都会遇到冻害、盐碱、干旱、水涝等逆境条件。

在地球的南、北两极，环境温度常常达到零下几十度，生活在这些地区海洋里的鱼类血液中含有大量的抗冻蛋白。这些抗冻蛋白可以降低鱼类体液的冰点，使鱼类免于因体液冻结而死亡。对于许多有经济价值的植物而言，冻害是影响其产量和品质的重要因素。那么，能不能利用基因工程手段将这些海洋鱼类细胞中编码抗冻蛋白的基因转入到植物细胞中去呢？答案是肯定的。科学家已经成功地将该基因转入番茄细胞，培育出转基因抗冻番茄。这类番茄由于具有抗冻性状，保鲜期和贮藏期都大为延长。

转基因抗冻番茄是动物基因在植物体内成功表达的实例。你还知道哪些远缘杂交的实例？

盐碱和干旱因影响细胞的渗透压和水分供应而危害作物，科学家已成功地向某些作物（如烟草）转入一些可以调节细胞渗透压的基因来提高作物的抗盐碱和抗干旱的能力。

动物基因工程显示出诱人的应用前景

自 1982 年帕米特等人将大鼠生长激素基因转入小鼠受精卵中，获得了生长快、体型大的巨型小鼠以后，世界各国的科学家便对转基因技术应用于动物生产的研究产生了极大的兴趣，动物基因工程的研究也取得了不少成果。

动物基因工程的重要价值之一是改善畜牧产品的品质。例如，猪肉中一般含有较多的饱和脂肪酸，而对人体健康有重要价值的 ω–3 脂肪酸（不饱和脂肪酸）含量较少。科学家利用动物基因工程将 ω–3 脂肪酸去饱和酶基因转入猪胚胎细胞中，培育成可产生较多 ω–3 脂肪酸的转基因猪。

提高动物的生长速度也是动物基因工程的重要价值之一。例如，转入外源生长激素基因获得的转基因绵羊的生长速度明显提高；转入外源生长激素基因获得的转基因三文鱼，在同样的生长周期中，体重明显大于野生三文鱼（图 3 – 2 – 4）。

转基因绵羊生长速度明显提高

转基因三文鱼体重明显大于野生三文鱼

图 3 – 2 – 4　动物基因工程的应用举例

运用基因工程改良动植物品种，最突出的优点是能打破常规育种难以突破的物种之间的界限。基因工程使原核生物与真核生物之间、动物与植物之间，甚至人与其他生物之间的遗传物质相互重组和转移成为可能，在农、林、牧、渔等产业中的应用前景十分广阔。

基因工程在食品业中的应用价值

基因工程在农牧业中的广泛应用，还体现在食品业中。从世界范围看，水稻、玉米、马铃薯、小麦、黑麦、甘薯、大豆、豌豆、向日葵、油菜、甜菜、莴苣、胡萝卜、黄瓜、茄、芦笋、草莓、猕猴桃、梨、苹果、葡萄、香蕉等许多转基因食品已进入商业化生产。其中，大豆、玉米和油菜所占的种植面积很大。

植物品质改良已经成为植物基因工程的研究热点，主要包括植物蛋白质、糖类、脂肪品质的改良以及维生素种类和含量的改良等方面。例如，将与淀粉合成有关的基因转入水稻，以改善其蒸煮品质和食味品质；将与脂质合成有关的基因转入大豆、油菜，以改善油脂品质。还有科学家通过改变植物代谢过程，培育出富含 β-胡萝卜素的水稻、高赖氨酸含量的玉米等作物。

此外，基因工程在氨基酸、助鲜剂、甜味剂等食品添加剂的生产，以及广泛应用于食品制造业的淀粉酶、纤维素酶、脂肪酶、蛋白酶的大规模生产方面也大显身手。

我国对转基因食品的研究和应用采取了积极扶持、严格监管的政策，我国的转基因技术研究在某些领域已达到国际先进水平。

你知道在自家的厨房里有哪些由基因工程生产的食品添加剂吗？

基因工程在医药业中的应用价值

基因工程和人类健康的关系密切，主要表现在基因工程药物和基因治疗(gene therapy)**等方面。**

基因工程药物

早在 20 世纪 80 年代初，基因工程药物——重组人胰岛素就已经开始投放市场。此后，利用转基因工程菌已经生产出了 60 多种基因工程药物，如细胞因子、抗体、疫苗、激素。这些基因工程药物可用于肿瘤、心血管病、传染病、糖尿病、类风湿等疾病的预防和治疗。

转基因动物可以成为生产转基因药物的反应器，它们是一种新型的生物反应器。一般做法是，先将药用蛋白基因与乳腺蛋白基因的启动子等重组起来，转入哺乳动物的受精卵中，再让这些受精卵在母体内生长发育成转基因动物。

当这些转基因动物进入泌乳期后，它们分泌的乳汁中便含有大量所需药物。例如，科学家已获得能产生人抗凝血酶Ⅲ的山羊乳腺生物反应器。该药物用于治疗发病率较高的遗传性抗凝血酶缺乏症。目前，科学家还利用牛等大型哺乳动物的乳腺生物反应器生产血清白蛋白、α-抗胰蛋白酶、溶菌酶等药物（图 3－2－5）。

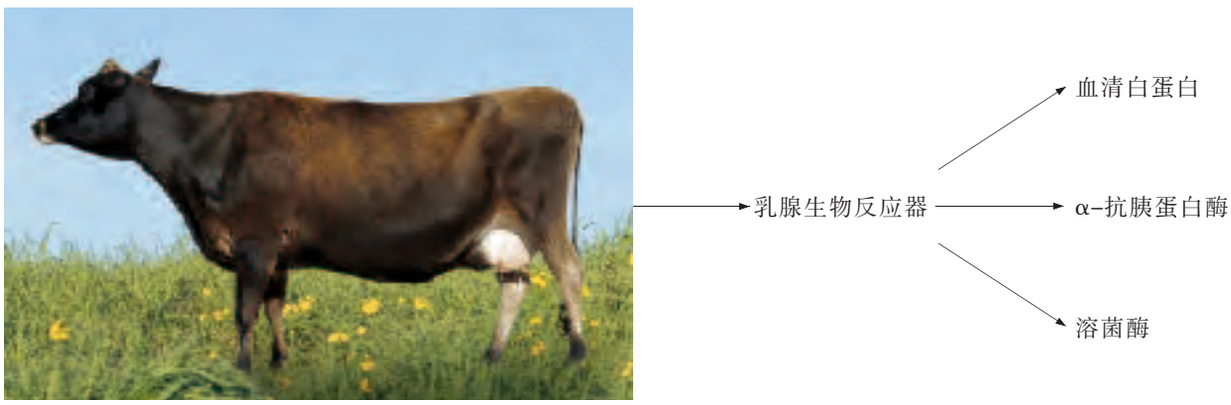


图 3－2－5　乳腺生物反应器生产药物示意图

除了乳腺生物反应器之外，还有膀胱生物反应器、输卵管生物反应器等。

基因治疗

基因治疗是指利用正常基因置换或弥补缺陷基因的治疗方法，包括基因诊断（gene diagnosis）、基因分离、载体构建、目的基因导入等多项技术。与动物转基因技术不同的是，人体基因治疗因受伦理和法律的约束，目前主要限于体细胞功能缺陷的矫正。广义的基因治疗包括所有从 DNA 水平采取的治疗某些疾病的措施和技术。

基因诊断是采用多种方法确定和定位病变基因的过程。例如，利用探针（一段已知基因的核苷酸序列）和分子杂交情况，来判断患者是否出现了基因异常（如遗传病患者的基因缺陷）等。

基因治疗有体内和体外两种途径。体内途径是将分离出来的带有治疗作用的基因通过载体转入患者体内的某些细胞，直接纠正或弥补缺陷基因的功能；体外途径则是采用转基因技术将带有治疗作用的基因导入病毒基因组，再用病毒感染受体细胞（患者细胞），治疗基因整合到受体基因组后，受体细胞经体外培养、增殖后导入患者体内。例如，1990 年，美国国立卫生研究院采用体外途径，用腺苷脱氨酶基因有效治疗了一名患有腺苷脱氨酶基因缺陷症的女孩。

积极思维　如何治愈腺苷脱氨酶基因缺陷症患者?

事实:

1. 腺苷脱氨酶基因缺陷症是一种罕见的遗传性免疫缺陷疾病,是由于缺少腺苷脱氨酶而引起的。腺苷脱氨酶缺乏者有反复受感染的危险,其中许多人在出生后几个月内就会死亡。如果一名儿童从双亲的一方遗传了有缺陷的基因,从另一方遗传了正常的基因,则这名儿童不会患这种疾病。

2. 1990 年 9 月,美国医生对一名患有该基因缺陷症的 4 岁女孩,进行了人类历史上的首次基因治疗(图 3 – 2 – 6)。这次基因治疗的成功标志着基因治疗临床应用阶段的开始。一年之后,科学家们在另一名 9 岁儿童身上又进行了同样的临床实验,也取得了较好的治疗效果。

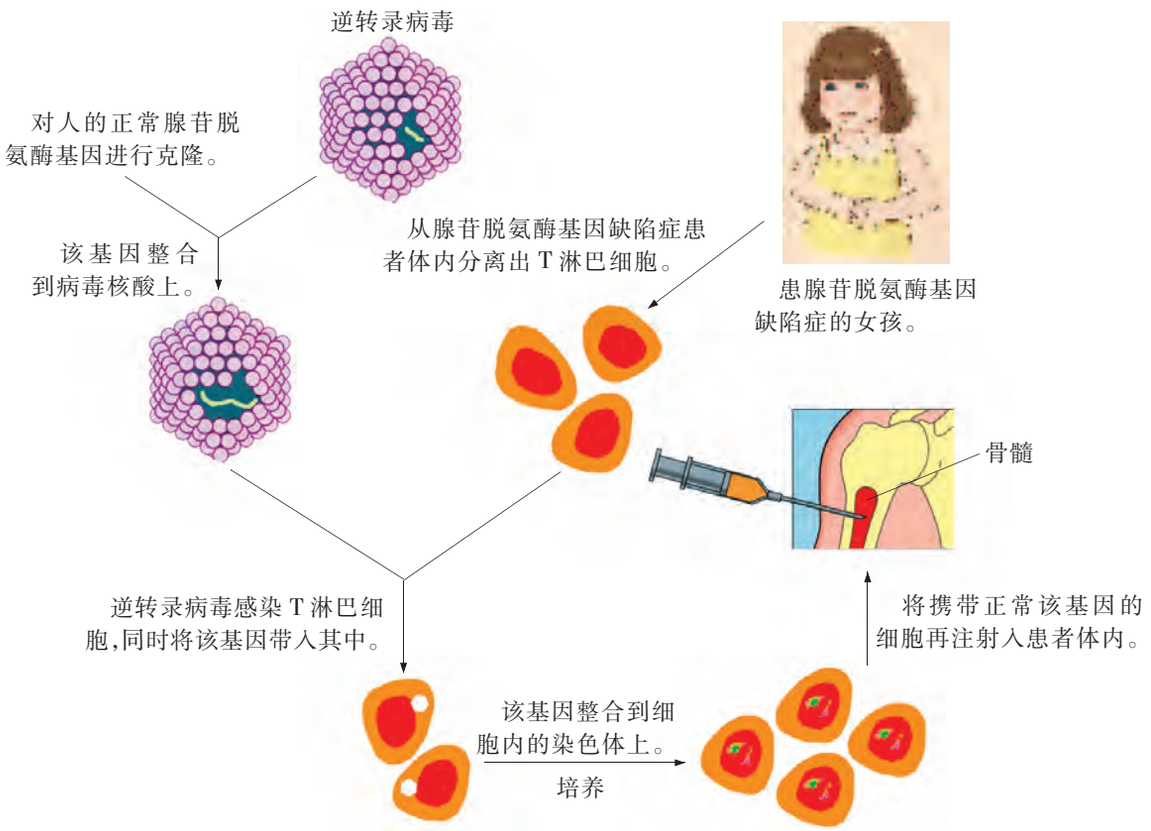


图 3 – 2 – 6　腺苷脱氨酶基因缺陷症的基因治疗示意图

思考:

1. **分析**　腺苷脱氨酶基因缺陷症的病因是什么?

2. **归纳**　上述病症的基因治疗过程包括哪些主要步骤?

目前,基因治疗在利用造血干细胞以及在靶向肝脏、心脏和视网膜等方面都取得了一定成效。

本节练习

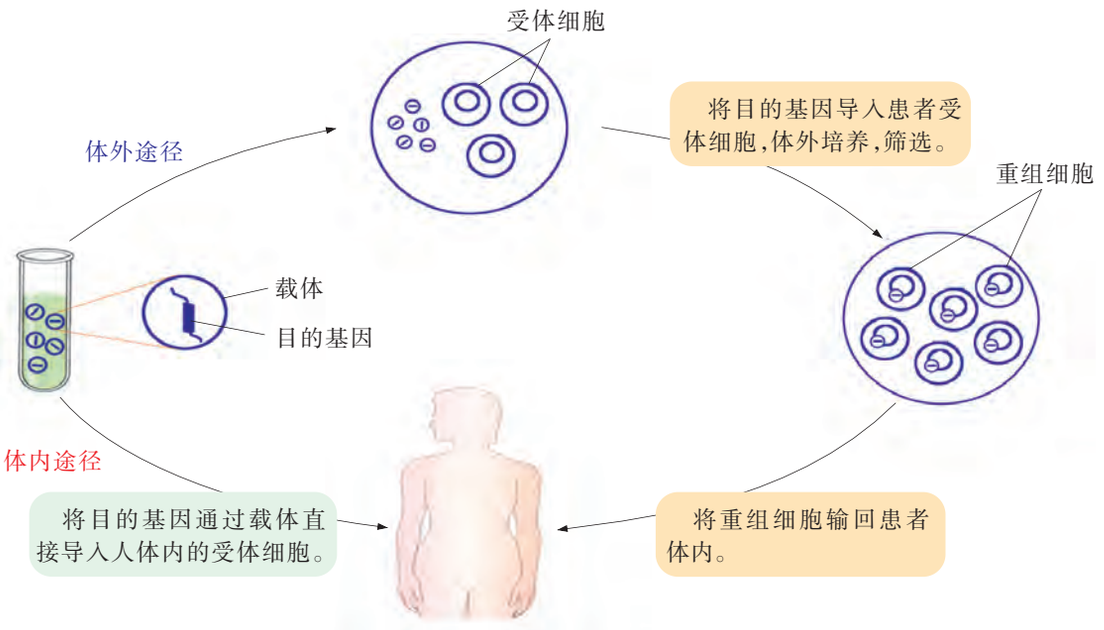
一、思辨题

1. 人们期待利用基因工程药物预防和治疗疾病，也对基因治疗寄予了很大希望。我们能依据相关原理，推测基因工程药物和基因治疗的应用前景吗？

2. 相互交流搜集到的基因工程在农牧业或食品业上应用的实例。

二、应用题

有证据表明，基因工程（基因治疗）为遗传病的治疗开辟了新途径（下图）。



基因治疗示意图

（1）根据上述两种基因治疗途径示意图，说出两种基因治疗途径的区别。

（2）已知白化病是一类较为常见的遗传病，患者体内缺少一种酪氨酸酶。人体中酪氨酸酶基因位于体细胞第 11 号常染色体上。尝试根据基因治疗的原理，设计一套治疗白化病的基因治疗方案。

走近职业

生物制药技术员在进行某些生化指标的测定工作

生物制药技术员

生物制药技术员主要从事制药企业的生产、技术管理工作；能够完成细胞分离、细胞培养、制剂制备等工作，熟悉工作流程以及相关技术；掌握细胞生物学技术、细胞培养技术和细胞生理功能、生化指标的测定技术。

许多具有生物工程或相关专业本科以上学历的人在从事生物制药技术员的工作。

如果你想要更多地了解本职业的相关情况，请访问我国关于职业介绍的网站。

第三节　蛋白质工程

1985 年度诺贝尔化学奖授予豪普特曼(H. A. Hauptman,1917—2011)和卡尔(J. Karle,1918—2013),原因是他们研究出一套可从化合物结晶体的 X 射线衍射图像推断出该化合物分子结构的方法。这一方法也被应用于改造蛋白质分子如胰岛素分子。科学家为什么要改造胰岛素分子?

积极思维　科学家为什么要改造胰岛素分子?

事实:

1. 1958 年,由中国科学院上海生物化学研究所、上海有机化学研究所和北京大学生物系组成的联合协作组,开始探索用化学方法合成牛胰岛素。1965 年,协作组完成了结晶牛胰岛素的全化学合成。经过鉴定,这种人工合成的结晶牛胰岛素在结构、生物活性、物理化学性质上都与天然的牛胰岛素完全一样。2015 年,中国邮政为纪念这一重要成果发行了纪念邮票(图 3 – 3 – 1)。

图 3 – 3 – 1　纪念人工合成结晶牛胰岛素五十周年的邮票

2. 科学家发现经皮下注射的天然胰岛素进入血液的速率较为缓慢,其主要原因是胰岛素分子会聚合成二聚体或多聚体。这影响了胰岛素功能的及时发挥。

3. 科学家将胰岛素分子上的 2 个氨基酸加以改造,使改造后的胰岛素既能保持天然胰岛素分子的主要构象,又能保持为单体,从而提高了胰岛素进入血液的速率。

思考:

1. **分析**　科学家为什么要改造胰岛素分子?

2. **描述**　科学家是如何改造胰岛素分子的?

迄今已有 1 000 种以上的蛋白质的一级结构被研究确定,如胰岛素、胰核糖核酸酶、胰蛋白酶。科学家一直在努力通过蛋白质工程(protein engineering)改造现有的一些蛋白质,以获得比“原版”蛋白质更加适合人类需要的新蛋白质产品。那么,什么是蛋白质工程呢?

蛋白质工程是基因工程的延伸

蛋白质工程的一般过程

蛋白质工程是指以蛋白质分子的结构规律及其与生物功能的关系为基础，对编码该蛋白的基因进行有目的的设计改造，以改造现有蛋白质或制造新的蛋白质。这些蛋白质满足了人类的生产和生活的需要。蛋白质工程的一般过程是先根据新蛋白质的预期功能设计蛋白质结构，进而设计对应的氨基酸序列，在此基础上改造或合成可以产生新蛋白质的相关 DNA 序列（基因），再利用基因工程技术合成新的蛋白质（图 3－3－2）。因此，基因工程是蛋白质工程的关键技术。蛋白质工程又被称为第二代基因工程。

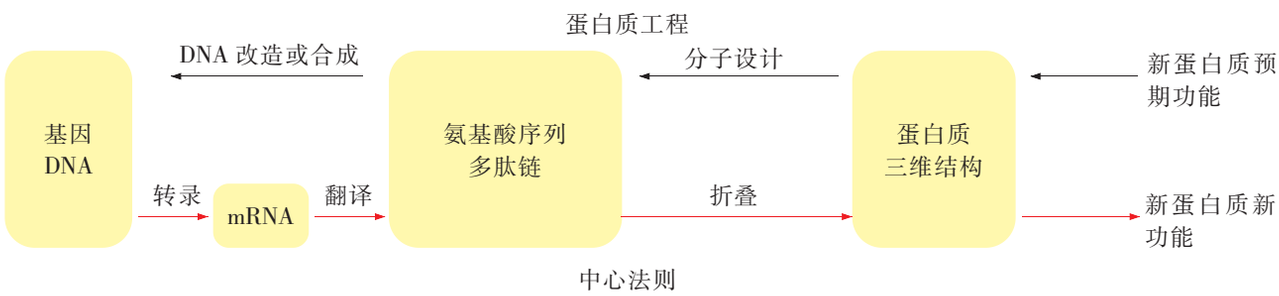


图 3－3－2　蛋白质工程的一般过程示意图

利用基因工程，原则上只能生产自然界中已经存在的蛋白质。这些蛋白质不一定符合人们生产和生活的需要。蛋白质工程不仅能更充分地利用自然界中存在的蛋白质，而且能在分子水平上对蛋白质进行再设计和改造，进而创造出自然界中不存在的蛋白质。例如，水蛭素是水蛭的唾液腺分泌的一种效果很好的凝血酶抑制剂，是由 65 个氨基酸组成的蛋白质。通过蛋白质工程将其第 47 位的天冬酰胺变成赖氨酸或精氨酸时，这种新的蛋白质抗凝血效率可提高 4 倍。

蛋白质工程首先要获取基因和蛋白质的结构数据

蛋白质工程首先需要获得和分析目标蛋白质的相关信息，包括基因及蛋白质的结构数据。那么，如何获得和分析这些数据呢？

GenBank 是目前全球最为著名的生物大分子数据库，由美国国家生物技术信息中心（National Center for Biotechnology Information，NCBI）建立并负责维护。GenBank 中最常用的是序列文件。序列文件的基本单位是序列条目，包括核苷酸排列顺序和注释两部分。GenPept 是由 GenBank 中的核酸序列翻译而得到的蛋白质序列数据库。一般可以通过 Entrez 数据库查询系

统对 GenBank 进行查询。Entrez 数据库查询系统是一个将核酸、蛋白质序列和基因图谱、蛋白质结构数据库整合在一起的综合数据库查询系统。

通过基因改造生产目标蛋白质

在掌握了蛋白质基本结构信息的基础上，蛋白质工程可以针对相关基因进行改造，即基因的体外定向突变，生产出符合人类需求的目标蛋白质。大面积的定向突变一般采用基因全合成的方法，而含有单一或少数几个突变位点的基因定向突变则可采用多种策略。引物定点引入法实质上是一种寡聚核苷酸介导的定点诱变(site-directed mutagenesis)，它能在克隆基因内直接产生各种点突变和区域突变，从而有目的地改造蛋白质分子中某活性部位的一个或几个氨基酸残基，最终达到改善蛋白质的性质和功能的目的。定点诱变法的一般过程如图 3－3－3 所示。

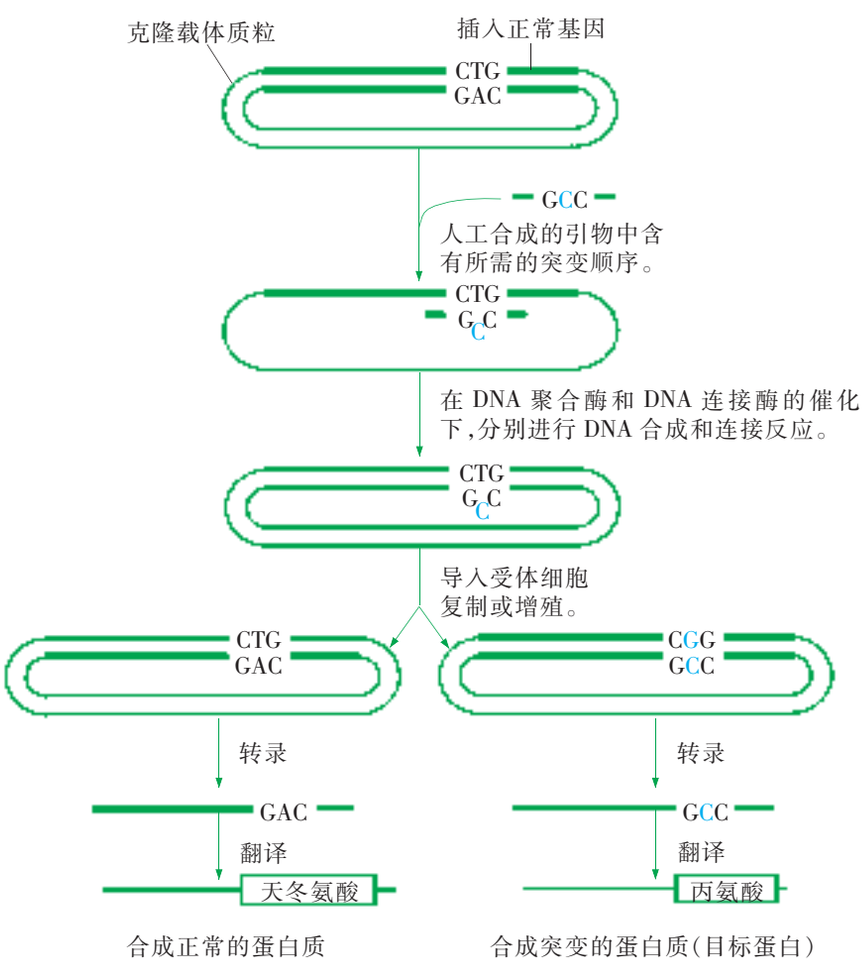


图 3－3－3　定点诱变法过程示意图

定点诱变技术的具体操作方法较多，一般过程是先通过PCR扩增已获得定点突变的基因，再通过基因工程的方法，将突变基因导入受体细胞，经过转录和翻译就可合成所需的蛋白质。

目前，对于那些不能预先确定诱变位点的蛋白质，可采用非定点诱变技术来进行蛋白质改造。非定点诱变技术的目的性和针对性不够强，但由于突变位点多，有时会产生意想不到的改造效果。

蛋白质工程的设计思路与应用

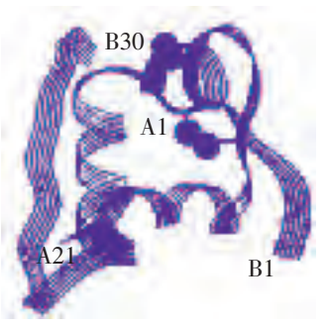


图 3－3－4　人胰岛素的空间结构示意图

蛋白质工程的应用十分广泛。对于已知空间结构的蛋白质，如人胰岛素（图 3－3－4），可以采用定点诱变技术，通过改变其结构便可有目的地改造蛋白质的功能。例如，将人胰岛素 B 链第 28 位的脯氨酸残基、第 29 位的赖氨酸残基分别改为赖氨酸残基和脯氨酸残基，便可获得单体速效胰岛素，这样便能避免胰岛素分子形成聚合体，以保证其效能的及时发挥。

生物体内的酶有数千种，但目前能直接被运用于工业化生物转化反应的酶只有几十种，绝大多数酶类在大规模体外反应时，或丧失原有的催化特异性，或在高温高压及存在有机溶剂条件下会发生变性。因此，利用蛋白质工程改造蛋白质（酶）具有广阔的应用前景。

提高蛋白质（酶）的稳定性

引入二硫键是提高蛋白质（酶）稳定性的一种思路。热稳定的蛋白质一般都具有抗有机溶剂和极端 pH 的能力。二硫键是稳定蛋白质分子空间结构最关键的一种共价键，在蛋白质分子中引入二硫键能显著提高其稳定性。例如，T4 溶菌酶是一个广泛应用于食品、医药工业的酶，由于其催化速率随温度升高而升高，所以，提高它的热稳定性是提高其工业应用价值的关键。T4 溶菌酶分子含有两个未形成二硫键的半胱氨酸。实验表明，向 T4 溶菌酶引入二硫键能提高 T4 溶菌酶的热稳定性。

跨学科视野

一般来说，动物体内的酶催化作用的最适温度是 35~40 ℃，而植物体内的酶催化作用的最适温度是 40~50 ℃，细菌和真菌体内的酶催化作用最适温度差别较大，有的酶最适温度可高达 70 ℃。

从化学视角看，物质的热稳定性反映了物质在一定条件下发生化学反应的难易程度。酶的热稳定性说明了什么？

转换氨基酸残基是提高蛋白质(酶)的稳定性的另一种思路。在高温下,蛋白质分子中天冬酰胺和谷氨酰胺的侧链上的酰胺基会发生脱氨反应,进而损害其结构和功能。因此,在不影响酶催化活性的前提下,将天冬酰胺和谷氨酰胺残基转换为其他合适的氨基酸残基,可以提高蛋白质的热稳定性。例如,酵母菌的丙糖磷酸异构酶的两个亚基中各含有两个天冬酰胺残基,分别用苏氨酸和异亮氨酸残基替代,大幅度提高了酶的热稳定性。

改善酶的催化活性

大量酶蛋白的 X 射线晶体衍射结果显示,酶的催化活性中心附近有少数关键性氨基酸残基,在很大程度上决定了酶的催化活性。转换氨基酸残基是改善酶催化活性的一种主要思路。例如,将嗜热芽孢杆菌酪氨酰–tRNA 合成酶分子中的一个苏氨酸残基改变为丙氨酸或脯氨酸残基时,酶的活性大幅提高。此外,删除末端部分氨基酸序列或某些肽段等也可以改善某些酶的催化活性。

消除酶的被抑制特性

通过转换氨基酸残基可以消除酶的被抑制特性。例如,枯草芽孢杆菌蛋白酶是一种丝氨酸型蛋白酶,它具有广谱的蛋白质降解能力。但该酶会因漂白剂的抑制作用而无法用作洗涤添加剂。如果将该酶分子中第 222 位的甲硫氨酸残基转换成半胱氨酸残基或丙氨酸残基,酶的活性将不再受漂白剂的抑制。

第三代基因工程——途径工程

细胞内所有的生理生化过程都是由系列酶促反应以及选择性的物质运输系统来实现的,且是可调控的。在大多数情况下,细胞内这些过程需要经历多步酶促反应,而这些反应又以串联的形式组合成为途径,其中前一反应的产物是后一反应的底物。

途径工程利用 DNA 重组技术对生物体内的固有代谢途径进行倾向性和功利性的设计、修饰和改造,在活的生物细胞内通过基因操作,局部设计、改造和更新固有的代谢途径,以达到认识生命、改造生命和优化生命的目的。

生物细胞自身固有的物质和能量代谢途径对于实际应用而言并非最优,因此人们需要对之进行功利性修饰,途径工程的基本理论及其应用战略就是在这一发展背景下形成的。1974 年,科研人员在假单胞菌属的恶臭假单胞菌和铜绿单胞菌两个菌种中分别引入几个稳定的重组质粒,显著提高了两者对樟脑和萘等复杂有机物的降解活性,这是途径工程技术的第一个应用实例。在此之后,人们更加注重途径工程的应用,通常表现在对细胞内特定物质和能量代谢途径进行功利性改造,并积累了多个成功的范例。

近年来,虽然众多学者对这一学科的名称及定义有多种界定,但其基本内涵得到了一致的公认,并以途径工程冠名。

本节练习

一、思辨题

1. 实施蛋白质工程时，为什么首先要获取相关基因和蛋白质的数据？在对蛋白质结构进行改造时，PCR 技术发挥了什么作用？

2. 生物数据库的知识与正在迅猛发展的生物信息学有关。什么是生物信息学？

二、应用题

1. 基因工程是蛋白质工程的关键技术，蛋白质工程是基因工程的延伸。有人对基因工程和蛋白质工程的关系进行了比较，并归纳为下表。

基因工程与蛋白质工程的比较

比较项目		基因工程	蛋白质工程
原理		基因重组	中心法则
区别	过程	获取目的基因→构建表达载体→导入受体细胞→目的基因的检测与鉴定	预期蛋白质功能→设计蛋白质结构→推测氨基酸序列→合成DNA→表达出蛋白质
	实质	定向改造生物的遗传特性，以获得人类所需要的生物类型或生物产品（基因的异体表达）	定向改造蛋白质的分子结构以生产人类所需要的蛋白质
	结果	生产自然界中已有的蛋白质	生产自然界中没有的蛋白质
联系		蛋白质工程是第二代基因工程	

上表的比较是否正确？如果有不妥之处，尝试进行修改。

2. 科学家采用定点诱变的方法构建 T4 溶菌酶的新蛋白质，发现其中一种新蛋白质的第 9 和第 164 位氨基酸残基被转换为半胱氨酸残基，并形成一个二硫键。这种新蛋白质的热稳定性会有什么变化？这项技术的要点是什么？

3. 某种微生物合成的一种蛋白酶与人体消化液中某种蛋白酶的结构和功能很相似，只是前者热稳定性较差，进入人体后容易失效。尝试根据本节课所学知识提出改造该种微生物蛋白酶的思路。

如果你想要更多地了解与蛋白质工程有关的知识，请参考下列资料。

李维平. 蛋白质工程. 北京：科学出版社，2013.

第一章　绪论　第一节　蛋白质工程概论

课外阅读

基因工程病毒疫苗

传统的疫苗主要是灭活或减毒的病原体，这类疫苗具有病原体的所有抗原成分，能激发机体的免疫保护能力。例如，防治百日咳的疫苗属于灭活疫苗，防治麻疹的疫苗属于减毒疫苗。

传统疫苗在疾病的预防中也有明显的局限性。例如，不管是灭活的还是减毒的病毒疫苗，它们都必须经过培养动物或细胞来生产。一方面，产量低，成本高，生产人员需要防护；另一方面，生产出来的灭活疫苗存在灭活不彻底的危险，而减毒疫苗有恢复突变的危险；再一方面，有些疾病如艾滋病，用传统的疫苗预防效果不佳。

从20世纪80年代中期开始，DNA重组技术的日益成熟为制造新一代重组疫苗提供了新的思路，研究人员可用基因工程技术改造、设计和生产理想的疫苗。

减毒疫苗

传统的减毒疫苗制备往往通过将野生型的病毒在不适宿主或不适培养条件下培养而获得，这些野生型病毒在不适的宿主或温度下可能会产生某些突变，改变原来的毒性。现在采用基因工程的方法，可定向地敲除某些有毒基因，制成减毒疫苗。例如，单纯疱疹病毒主要感染皮肤、黏膜和神经组织，引起多种疾病，并有潜伏感染的倾向，威胁人类健康。科研人员开展了敲除毒力基因以制备减毒疫苗的研究。

活体重组疫苗

直接将抗原基因重组到一种更安全的病毒载体上，将重组后的病毒用作疫苗，这样的疫苗称为活体重组疫苗。活体重组疫苗所表达的抗原构象与来源病毒中的完全一致或非常相似，因此具有更高的免疫原性，能激发很强的免疫应答，起到很好的免疫防护作用。例如，科学家已经将艾滋病毒的 *gag* 基因重组到复制缺陷型腺病毒载体中，这种携带 *gag* 基因的重组腺病毒免疫后的小鼠显示出对HIV有良好的免疫能力，相关的临床实验也在进行中。

本章小结

概念回顾

●**基因工程是一种重组 DNA 技术。**基因工程主要包括:目的基因的获取、基因表达载体的构建、将目的基因导入受体细胞、目的基因及其表达产物的检测鉴定等阶段。DNA 重组技术需要 3 种基本工具:限制性内切核酸酶、DNA 连接酶和载体。基因工程所需的 3 种基本工具的比较如下表所示。

基因工程 3 种基本工具比较

项目	限制性内切核酸酶	DNA 连接酶	载体
作用	切割脱氧核苷酸链中的磷酸二酯键	通过磷酸二酯键连接脱氧核苷酸链	携带目的基因导入受体细胞
专一性	有,识别和切割特定脱氧核苷酸序列	无,连接不同脱氧核苷酸序列的 DNA 链	无,可携带多种 DNA 片段或基因
作用特点	错位切形成特定的黏性末端,平切形成平末端	连接 DNA 分子黏性末端或平末端	载体质粒必须具有复制原点、标记基因、多种限制酶的切割位点

●**聚合酶链式反应(PCR)技术是一种将目的 DNA 进行体外扩增的技术。**运用 PCR 技术扩增目的基因的过程主要包括 3 个步骤:变性、退火和延伸。

●**蛋白质工程是基因工程的延伸。**人们根据基因工程的原理,通过对蛋白质设计和改造,可以获得性状和功能更符合人类需求的蛋白质。

素养提升

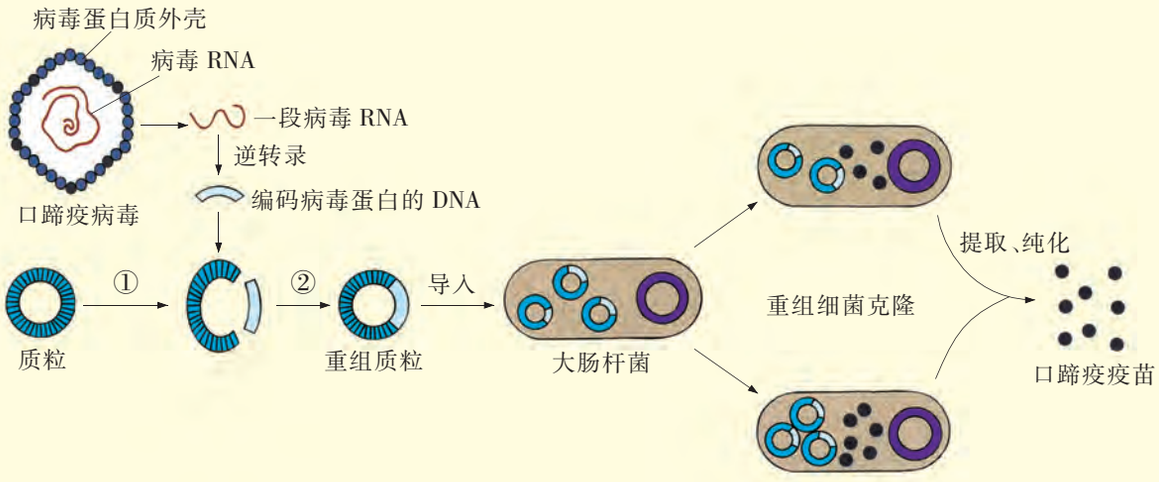
●能尝试针对人类生产或生活的某一需求,恰当选用基因工程的方法,提出初步的工程学构想,进行简单的设计和制作。

●基于对转基因抗虫植物、转基因抗病植物和转基因抗逆植物的培育等植物基因工程成功案例的分析,能设计基因工程药物的生产、基因诊断和基因治疗等方案。

●能基于基因工程广泛应用的事例,感受到科学、技术和社会的相互关系。例如,蛋白质工程在制药和酶结构改造方面已经具有应用价值;途径工程是对细胞内特定物质和能量代谢途径进行深入改造的技术,应用前景非常广阔。

本章练习

1. 口蹄疫是猪、牛、羊等主要家畜及野生偶蹄动物共患的一种急性接触性传染病，口蹄疫疫苗能有效控制该疾病的发生和传播。应用基因工程等生物技术可以大规模生产口蹄疫疫苗（下图）。



口蹄疫疫苗生产流程示意图

（1）在上述利用基因工程生产口蹄疫疫苗的流程中，①和②过程分别需要什么酶？目的基因、基因表达载体分别是什么？目的基因是如何导入大肠杆菌的？

（2）如果要采用基因探针检测目的基因是否已经被导入受体细胞，尝试说出具体方法和步骤。

（3）什么叫重组细菌克隆？这一步骤的目的是什么？重组基因的受体除了常用的大肠杆菌外，还有哪些其他受体（细胞）？

（4）在一定的条件下，人也会感染口蹄疫。应用基因工程生产口蹄疫疫苗等药物预防和治疗动物和人体疾病属于基因治疗吗？为什么？

2. 蛋白质工程在生物制药上有广泛的应用。如果已经确认某种新蛋白质可能具有特殊的抗癌功能，其氨基酸序列也已经确认，如何通过蛋白质工程生产这种新药？如果回答有困难，可以向老师请教或通过互联网查找答案。

如果想要更多地了解与本章有关的内容，请访问：
微生物学、细胞工程学、基因工程学、现代生物技术等相关网站。

我国自主研发培育的转基因抗虫棉长势喜人

第四章

生物技术安全与伦理问题

20 世纪 90 年代，棉铃虫曾在我国大部分棉区持续性大暴发，给棉花生产带来了严重影响。利用基因工程培育转基因抗虫棉是解决棉铃虫危害的一种主要方法。农作物各种转基因品种的陆续问世为农作物的高产、优质、抗病虫害奠定了基础。

转基因抗虫棉存在安全与伦理问题吗？在我们的生活中还有哪些转基因生物及其产品？它们存在哪些安全与伦理问题呢？

第一节　转基因产品的安全性

当我们面对番茄、玉米、大米、胡萝卜等食品时，可能不会去想其中会不会有转基因产品。但是，我们一定会在是否购买转基因大豆油的问题上，参与过家庭的相关决策。其实，问题的焦点就是转基因食品是否存在安全问题。那么，我国的转基因食品是安全的吗？

积极思维　我国的转基因食品是安全的吗？

事实：

1. 农业转基因生物安全委员会是我国农业转基因生物安全管理的权威评价机构，是保障农业转基因生物食用安全和环境安全重要的技术支撑机构。目前，我国依据该委员会的评价结论，批准了转基因棉花、番木瓜等作物的生产应用安全证书，批准了用作加工原料的转基因大豆、玉米、油菜等作物的进口安全证书。但是，我国还没有批准任何一种转基因粮食作物的商业化种植。

2. 我国规定转基因食品要在产品标签上进行相关标注，让消费者有知情权和选择权。例如，我国超市中销售的一种大豆油标注了该油的加工原料为转基因大豆（图 4－1－1）。世界上许多国家也和我国一样进行标注。

图 4－1－1　我国超市中销售的一种大豆油

思考：

1. **思辨**　根据上述事实，我们还会对我国批准上市的转基因食品的安全性产生怀疑吗？

2. **解释**　如果现在有人认为我国批准上市的转基因食品安全性是有问题的，我们应该如何向他解释？

我国批准上市的转基因产品的安全性是有保障的。许多人对日常生活中越来越多的转基因产品的安全性仍存有疑虑，是因为他们对转基因产品了解得不多。只有深入地了解这些产品，我们才能真正地认识它们。

日常生活中的转基因产品越来越多

基因工程自 20 世纪 70 年代兴起后，发展十分迅速。在这期间，转基因技术的发展尤其迅猛，已成为现代生物技术的核心技术之一。转基因技术在农业、林业和医药卫生等领域都得到广泛应用。随着研究的深入，应用转基因技术获得的转基因产品也越来越多。

转基因植物产品

转基因植物(transgenic plant)产品是指基因组中含有利用转基因技术转入外源基因的植物及其产品。转基因植物一般具有高产、优质、抗病毒、抗虫、抗寒、抗旱、抗涝、抗盐碱或抗除草剂等特性。转基因抗虫棉、转基因抗病毒番木瓜、转基因耐储存番茄和转基因抗除草剂大豆等较常见。

图 4－1－2　转基因番木瓜“华农 1 号”

番木瓜含有丰富的营养并具有一定的药用价值。番木瓜环斑病毒会导致番木瓜严重减产甚至绝收。为了消除该病毒对番木瓜产业的危害，科学家培育出抗环斑病毒的转基因番木瓜。1993 年，转环斑病毒衣壳蛋白基因的番木瓜品种在美国诞生。1997 年，该品种被批准商业化种植，挽救了美国的番木瓜产业。我国科学家随后也自主研发了能够抗相应病毒毒株的转基因番木瓜。华南农业大学研发的“华农 1 号”(图 4－1－2)在 2006 年获得我国当时的农业部颁发的安全证书，已在广东省生产应用。转基因番木瓜是我国批准种植的少数转基因作物之一。

图 4－1－3　转基因抗虫棉“中棉所 41”

我国科学家还将杀虫机理不同的两种抗虫基因(Bt 杀虫基因和修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因)同时转入到棉花中，培育出转基因双价抗虫棉。这两种杀虫蛋白功能互补且协同增效，可以增强抗虫棉的抗虫性。例如，“中棉所 41”是我国自主研发的双价转基因抗虫棉(图 4－1－3)。这种抗虫棉于 2001 年通过国家转基因作物商品化许可，2002 年通过全国农作物品种审定委员会审定并命名，2002 年后开始在黄河流域种植。该转基因抗虫棉具有抗棉铃虫、枯萎病和黄萎病等特性。这标志着我国在转基因抗虫棉的研究及应用领域达到了国际先进水平。

目前，还有许多优良品系的转基因植物品种正在研发中。

另外，科学家还利用转基因植物或离体培养的转基因植物细胞，生产外源基因的表达产物等。

转基因动物产品

转基因动物（transgenic animal）产品是指基因组中含有利用转基因技术转入外源基因的动物及其产品。转基因动物转入的外源基因通常有生长激素基因、高泌乳量基因和抗病毒基因等，它们往往具有生长快，生长周期短或产仔、产卵多，泌乳量高或抗病等特性。

科学家已经在牛、羊、猪、鸡、鱼等家养动物的转基因研究和开发中取得了一定成果。2015 年，美国批准了全球首例转基因动物食品——转基因三文鱼上市。与非转基因三文鱼相比，该种转基因三文鱼在寒冷气候中依然能分泌生长激素，比非转基因三文鱼生长得更快（图 4－1－4）。

图 4－1－4　转基因三文鱼（上）与非转基因三文鱼（下）对比

问题与讨论

转基因产品的相继问世，有人认为是好事，解决了粮食短缺等问题；有人认为转基因动物产品应谨慎对待。

根据所学的知识，我们对此有何看法？说明理由。

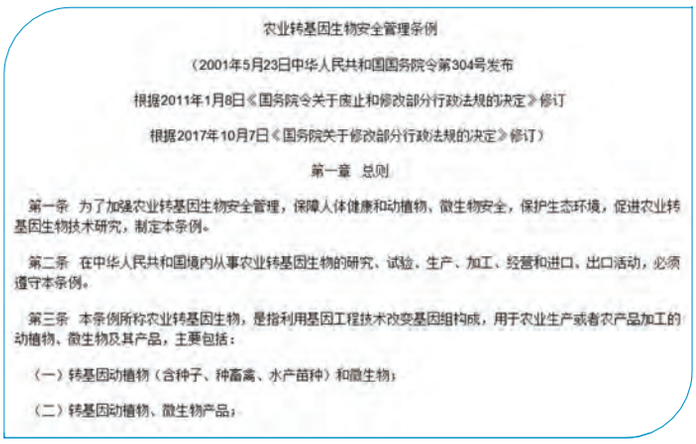
转基因微生物产品

转基因微生物（transgenic microorganism）产品是指基因组中含有利用转基因技术转入外源基因的微生物及其产品。与动、植物转基因技术不同的是，微生物转基因技术具有周期短、效果显著、控制性强的特点，因而广泛应用于生物医药和酶制剂行业。

目前，科学家已经能将有机物合成酶（如氨基酸合成酶）等的基因转入相应的微生物宿主细胞中，利用微生物的快速繁殖来大量生产代谢产物。例如，将牛胃蛋白酶的基因转入细菌体内，由细菌生产这种动物来源的酶，解决了奶酪工业中牛胃蛋白酶来源不足的问题；科学家还把控制植物产生甜味蛋白的基因转入细菌，用以大量生产新型甜味剂。另外，胰岛素、白细胞介素、α-高温淀粉酶、乙肝疫苗和抗生素等也都可以通过转基因的酵母菌、大肠杆菌等的发酵实现规模化生产。我国于 2015 年批准了重组大肠杆菌 TR2 表达的鸡 α-干扰素、重组大肠杆菌 MP-4 表达的猪 α-干扰素的生产应用安全证书。

你能够接受使用转基因微生物产品吗？为什么？

转基因产品与技术的安全问题受到关注



农业转基因生物安全管理条例

（2001年5月23日中华人民共和国国务院令第304号发布

根据2011年1月8日《国务院令关于废止和修改部分行政法规的决定》修订

根据2017年10月7日《国务院关于修改部分行政法规的决定》修订）

第一章 总则

第一条 为了加强农业转基因生物安全管理，保障人体健康和动植物、微生物安全，保护生态环境，促进农业转基因生物技术研究，制定本条例。

第二条 在中华人民共和国境内从事农业转基因生物的研究、试验、生产、加工、经营和进口、出口活动，必须遵守本条例。

第三条 本条例所称农业转基因生物，是指利用基因工程技术改变基因组构成，用于农业生产或者农产品加工的动植物、微生物及其产品，主要包括：

（一）转基因动植物（含种子、种畜禽、水产苗种）和微生物；

（二）转基因动植物、微生物产品；

图 4－1－5　国务院发布《农业转基因生物安全管理条例》

我国政府一贯重视转基因技术和转基因产品的安全问题，并发布了相关的管理条例（图 4－1－5）。近年来，我国批准进口的转基因作物，如转基因大豆、转基因玉米和转基因油菜，只允许作为原料进行规定的食品加工。例如，用进口的转基因大豆或油菜籽生产大豆油或菜籽油 。

随着越来越多的转基因食品出现在日常生活中，社会上对转基因技术与转基因食品的安全性也争议不断。

边做边学　开展“转基因食品是否安全”的辩论

实践：

1. 全班分为“正方”和“反方”两个辩论大组。正方的观点是“经过严格审批的转基因食品安全有保障”，反方的观点是“转基因食品的安全性很难得到保障”。

2. 同学们自愿加入正方或反方。双方成员各自通过互联网或图书馆搜集相关资料。在大组内交流所搜集的资料，并将重要资料归纳整理成资料卡。

3. 推荐代表大组参加辩论的选手，分别担任一辩手、二辩手、三辩手和四辩手。班级推选辩论主持人 1 名和评判人员 3~5 名（可邀请教师参加）。

4. 辩论会开始后，正、反方的一辩手先阐明自己一方的基本观点，二辩手、三辩手主要针对本方观点与对方观点中的问题进行辩论，四辩手则总结和升华本方观点。正方和反方交替辩论。

5. 在自由辩论阶段结束后，进行观众提问，双方各自回答。最后由评判人员作出评判。

讨论：

1. 在生活中，我们可能面对的转基因食品有哪些？为什么要生产这些转基因食品？

2. 通过辩论，我们对转基因技术和转基因食品的安全性有了哪些新认识？

自转基因食品问世以来，人们开始担忧这些食品是否会产生负面影响。例如，农作物转入了外源基因后，其营养成分会不会发生改变？人们食用转基因食品后，转入的基因会不会对人类的健康产生影响，甚至引发一些疾病？转入的基因所控制合成的蛋白质或多肽会不会引发过敏体质的人群发生过敏反应？

许多国家会在转基因食品标签上加注特殊标识，让消费者明确看到所购食品是否来源于转基因生物。这种做法尊重了消费者的知情权和选择权。

在转基因植物和转基因动物及其产品安全性方面，除了要考虑食用安全问题外，还需要考虑其对生态系统安全性的影响。例如，转基因植物的扩散对生物多样性有无影响；转入的基因是否会扩散到其他物种体内，从而导致自然界原有物种的混乱；大面积种植转基因植物，其残体分解物、根部分泌物是否会对生态环境造成负面效应；转基因动物对生态系统的稳态是否会产生影响等。

放眼社会

我国农业转基因研究情况

2016 年 4 月 13 日，我国当时的农业部曾就农业转基因有关情况举行发布会。发布会指出，我国自 2008 年开始实施转基因重大专项研究，取得了显著成效。

一是自主创新能力显著提升，基因克隆技术已经达到世界先进水平，克隆了 137 个重要基因，获得了 1 036 项专利。

二是产品研发和产业化能力稳步提高，培育出一批抗虫水稻、抗虫玉米、抗除草剂大豆新品系，育成新型转基因抗虫棉新品种 147 个，减少农药使用 40 万吨，增收节支社会经济效益 450 亿元。

三是安全保障能力显著增强，已布局建设了转基因生物安全评价和检测监测技术平台，研制了一批转基因生物安全评价和检测监测新技术、方法、标准，形成了稳定的人才队伍，完全有能力确保转基因产品研发和产业化的安全。

目前，国际专业机构对转基因产品的安全性已有权威结论：通过批准上市的转基因产品都是安全的，这些经过安全性评价的转基因产品的安全性是有保障的。

我国每年都发布新的转基因生物安全证书批准清单。例如，2019 年 1 月发布了 2018 年农业转基因生物安全证书（生产应用）批准清单和农业转基因生物安全证书（进口）批准清单。

由于转基因技术在应用过程中可能带来的安全问题涉及科学、健康、经济和伦理等诸多方面，因此许多国家已建立相应的评估及预警机制，以便更加理性地利用转基因技术。

我国已建立了转基因作物的生物安全评价和监测的网络及技术体系，强化了对转基因抗虫棉、转基因抗虫水稻、转植酸酶基因玉米、转基因抗除草剂大豆的全程安全监测和评估技术体系。例如，某种转植酸酶基因玉米只有在获得转基因生物安全证书后，才能在规定的地域和期限内种植（图 4－1－6），并受到相应的安全监测。

图 4－1－6　一种转基因生物安全证书（生产应用）

本节练习

一、思辨题

1. 人们经常讨论有关转基因大豆油的安全问题。但是，为什么很少有人对转基因抗虫棉的安全问题提出质疑呢？转基因作物的安全问题仅仅是食用安全吗？

2. 如何理性看待转基因技术和转基因产品？

二、应用题

1. 在我国市场上究竟有多少种转基因产品呢？一位同学带着这样的问题，进行了调查并将结果归纳成下图。

我国市场转基因产品调查图

对该同学的调查和归纳结果，有人表示认同，有人提出质疑。质疑者认为：目前我国市场上根本没有大豆、玉米或甜菜的转基因产品。我们的观点是什么？

2. 近年来，我国相关文件明确提出要加强对公民进行转基因安全性的科学普及。

（1）我们周围的亲朋好友对转基因食品持什么态度？如何用所学知识说服他们理性地看待转基因技术和转基因产品？

（2）重视转基因技术的研究与应用非常重要。如何从粮食安全的角度理解这样的观点？

3. 研究表明，转基因抗虫棉的大面积种植有效遏制了棉铃虫害，也显著地降低了化学农药的使用量。但是，科研人员也发现，棉田中一种体型很小的盲蝽蠓却容易爆发成灾。有人认为这与大面积种植转基因抗虫棉有关。我们应如何看待这种观点？如果回答问题有困难，可以请教老师或通过互联网寻找答案。

课外阅读

转基因生物产业生产的安全问题

转基因生物技术产业是高科技产业，大规模生产对安全管理也有一些需要特别关注的问题。例如，如何保证目的基因编码的蛋白没有过敏原，如何防止转基因生物的扩散，如何防止重组基因（包括目标基因、选择标记基因和报告基因）的扩散，如何处理转基因生物的废弃物，如何防止对环境产生污染等。

生产基地需要有隔离带，防止转基因生物扩散

转基因农作物的大田周围应有隔离带，最好还要在附近种植不接受转基因花粉的其他作物作为缓冲区。植物花粉通过风媒或虫媒进行传播，都有一定的有效距离。由于隔离带和缓冲区的存在，可以防止花粉扩散。家畜、家禽养殖场也应有隔离墙，严防转基因动物逃逸。

生产基地严格消毒，以阻止细菌或病毒携带重组基因转移

在构建原核生物 DNA 重组体时删除了载体自身重组和转移功能，但在外源病毒作用下转入生物体内的基因有可能发生再重组和被包装，从转基因生物中逃逸。因此严格的隔离和消毒措施是必要的，尤其在家畜、家禽饲养场。

集中处理转基因生物的废弃物

转基因生物产业生产的废弃物数量庞大，为防止重组基因扩散，所有废弃物都要集中处理。

防止对环境产生污染

转基因生物对环境最主要的污染是“基因污染”。例如，抗虫害基因和抗除草剂基因的扩散，会对环境产生污染，要加强监测，以防止抗性基因的扩散。

此外，还应关注如何防止转基因生物对生态平衡的破坏。

第二节　我国禁止生殖性克隆人

随着生物工程及技术应用的进步，相关伦理问题也随之凸显。科学发展会导致人与人、人与社会、人与自然之间产生伦理矛盾。以试管婴儿技术为例，尽管试管婴儿技术从产生的那一天开始就饱受争议，但该技术仍然向前发展，因为它为许多想要拥有后代的家庭带来了希望。在科学发展过程中，试管婴儿技术遇到过哪些伦理问题呢？

积极思维　试管婴儿技术遇到过哪些伦理问题呢？

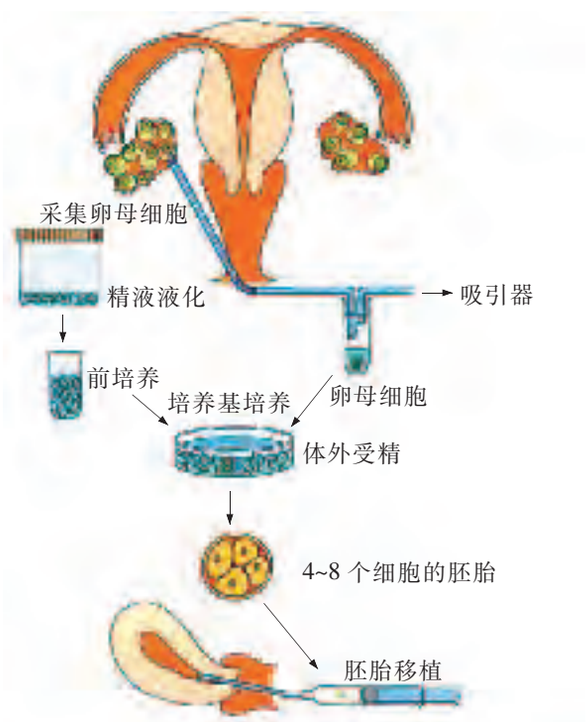


图 4－2－1　试管婴儿技术的一般过程示意图

事实：

1. 世界首例试管婴儿路易丝于 1978 年 7 月诞生在英国。截至 2015 年，全世界已有超过 500 万例试管婴儿诞生。但人们对试管婴儿技术的探索并不止于此。英国科学家因试管婴儿技术获得 2010 年诺贝尔生理学或医学奖。试管婴儿技术过程如图 4－2－1 所示。

2. 世界首例试管婴儿路易丝的父母是一对不孕夫妇，在尝试试管婴儿技术之前，他们 9 年的孕育过程均以失败告终。但是，在路易丝诞生之初也曾引发伦理争议，有媒体用“潘多拉魔盒已被打开”等字眼来形容她的出生。更有人担心“试管婴儿”的出生会破坏伦理关系等。路易丝成年后结婚并在 28 岁时通过自然受孕的方式成功产下一名男孩。

思考：

1. **推理**　根据试管婴儿技术一般过程示意图，尝试推理该技术可能产生的伦理问题。

2. **思辨**　针对上述可能的伦理问题，提出有效的应对措施。

试管婴儿技术的伦理问题逐步得到了解决。而随着克隆技术的发展日益成熟，对其可能产生的伦理问题也引发了争论。“如何引导克隆技术正确发展”“如何尽可能减少克隆技术产生的伦理问题”成为我们每个公民必须面对的新问题。

治疗性克隆和生殖性克隆本质不同

1959 年，科学家通过体外受精，获得世界上首例“试管动物”——试管兔，为哺乳动物体外受精技术奠定了基础。1973 年，科学家在牛早期胚胎超低温冷冻保存方面获得成功，使胚胎移植技术日臻完善。随着动物细胞工程技术的成熟，克隆技术在人类疾病治疗等方面的应用也有了相应的发展。

人的生殖性克隆(reproductive cloning)是指以产生新个体为目标的克隆，即产生一个独立生存的个体；而人的治疗性克隆(therapeutic cloning)不以得到克隆的个体为目的。两者虽然都应用了动物细胞工程技术、克隆技术等，但根本目的不同。

治疗性克隆的一般过程包括三个步骤：把患者体细胞的细胞核转移到去核卵母细胞中形成重组细胞，使重组细胞在体外发育成早期胚胎(如囊胚)；再从早期胚胎内分离出胚胎干细胞，诱导获得的胚胎干细胞定向分化为所需的特定细胞(如神经细胞、肌肉细胞或血细胞)和特定的组织或器官；最后用健康的细胞、组织或器官去替代患者因缺血、炎症等死亡的细胞、组织或需要移植的器官(图 4－2－2)。

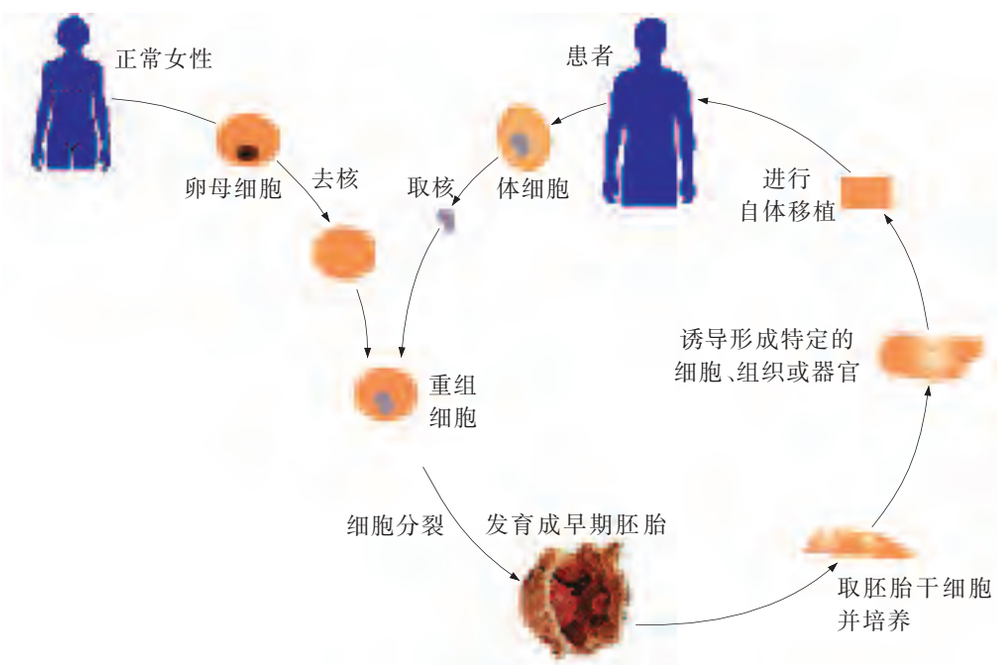


图 4－2－2　治疗性克隆的一般过程示意图

问题与讨论

据报道，2015 年，我国共完成肾移植手术 7 131 例，仅次于美国，位居世界第二位。但肾移植后期受者要克服排斥反应，还要接收免疫抑制治疗，这些问题成为影响受者生存的关键。

从器官移植角度看，治疗性克隆为什么具有广阔的发展前景？

治疗性克隆有可能解决器官移植过程中的免疫排斥反应，完成没有免疫排斥反应的治疗，也为可供移植的细胞、组织和器官来源不足的问题提出新的解决方案。

图 4－2－3　我国的一例试管婴儿诞生

设计试管婴儿与治疗性克隆

目前，人类辅助生殖技术已取得了长足的进步。人工授精和试管婴儿等辅助生殖技术的突破为不孕家庭带来了福音。医生不仅可以通过人工授精的方法将男性精液注入女性生殖道或子宫腔内，让精子和卵子自然结合，使女性得以妊娠；也可以通过试管婴儿技术，将卵子与精子从人体内取出并在体外受精、培养，再将发育而成的早期胚胎移植到母体子宫内，完成生殖过程。近年来，我国试管婴儿技术也得到了快速发展（图 4－2－3）。

目前，试管婴儿技术已发展到设计试管婴儿技术阶段。设计试管婴儿又称为治疗性试管婴儿，这一技术能避免存在某些缺陷的婴儿出生。

边做边学　搜集设计试管婴儿技术的资料

实践：

1. 小组成员相互合作，协同完成任务。

2. 制定好调查方案，包括确定好调查内容、调查方法、调查目的等。

3. 可以通过互联网或图书馆查阅相关的资料，也可以到医院采访医生等医疗工作者以获取资料。

4. 小组成员针对搜集的资料进行分析，明确案例中实施设计试管婴儿的目的。

5. 在小组讨论的基础上，参加班级举行的“是否支持设计试管婴儿”的讨论。

讨论：

我们是否支持设计试管婴儿？为什么？

图 4－2－4　我国首例设计试管婴儿诞生

简单地说，设计试管婴儿的实施过程是将一对夫妻的精子、卵子进行体外受精，并进行早期胚胎培养。待胚胎培养到一定阶段，再进行遗传学分析（如基因检测），将无基因缺陷的胚胎植入女性子宫中，使其继续发育为胎儿。

2012 年 6 月 29 日，我国首例设计试管婴儿在广东省中山医院诞生（图 4－2－4）。女婴的父母均为地中海贫血基因的携带者，女婴的姐姐确诊为重度地中海贫血症患者，通过设计试管婴儿技术诞生的该女婴却很健康。健康的妹妹可为患病的姐姐提供造血干细胞。借助设计试管婴儿技术，患遗传病的夫妻有望生育出健康的后代，同时，需要相应干细胞移植的患者也能得到治疗。可见，设计试管婴儿的诞生是运用治疗性克隆技术的实例。

生殖性克隆人面临诸多问题

1997 年 2 月，英国罗斯林研究所韦尔穆特科研组宣布体细胞克隆羊多莉培育成功。它是世界上第一例经体细胞核移植培育出来的哺乳动物，它的诞生标志着克隆技术领域研究取得了巨大突破。

2005 年，第 59 届联合国大会批准了联合国大会法律委员会通过的《联合国关于人的克隆的宣言》。宣言要求各国考虑禁止违背人类尊严的一切形式的人的克隆。中国、英国、比利时、法国、印度等赞成治疗性克隆的国家对此投了反对票。

边做边学　搜集我国对待生殖性克隆人态度的资料

实践：

1. 以小组为单位，通过互联网和图书馆搜集对待生殖性克隆人态度的资料。

2. 小组内交流各自搜集并已初步归纳的资料，在此基础上进一步按主题整理和归纳资料。例如，推荐组内一名同学将生殖性克隆面临的技术问题的资料整理和归纳起来，推荐另一名同学将生殖性克隆面临的伦理问题的资料整理和归纳起来等。

3. 班级内交流各小组搜集并经过整理和归纳的资料。针对不认同的观点，进一步搜集资料。

讨论：

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？

我国政府的一贯立场是，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，反而会对挽救人的生命和增进人体健康发挥积极影响；而对任何生殖性克隆人实验不赞成、不允许、不支持、不接受。

生殖性克隆人的技术尚未完全成熟

迄今为止，克隆动物的成功率还很低。例如，为培育克隆羊多莉，科学家尝试了 277 次体细胞核移植实验。

2003 年 2 月，科学家发现多莉羊患上了进行性肺病，这是绵羊的不治之症。而此前科学家还发现多莉羊已患有关节炎，这是一种老年绵羊才会患的疾病。研究人员对多莉羊实施了安乐死。多莉羊的遗体被制成标本（图 4－2－5），存放在苏格兰国家博物馆。绵羊的寿命一般为 12 年左右，而多莉羊只活了 6 年。多莉羊的早逝再次引发人们对克隆动物技术安全性的担忧。理性地审视和发展克隆技术已成为科学家和全社会共同关注的内容。

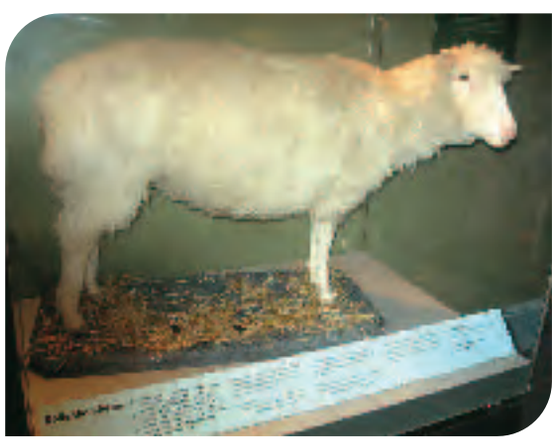


图 4－2－5　苏格兰国家博物馆的克隆羊多莉的标本

生殖性克隆人面临伦理等问题

生殖性克隆人的伦理问题一直备受关注(图 4－2－6)。

图 4－2－6　生殖性克隆人的伦理问题备受关注

生殖性克隆人面临众多伦理问题。例如,每个人都有自己的亲生父母,而通过生殖性克隆产生的人是对个体的复制,那么个人与克隆出来的个体是母女(或父子),还是兄弟(或姐妹)？这些问题都将破坏传统家庭的稳定性。

生殖性克隆人面临很多道德问题。例如,人类社会有大家都认可的家庭道德、婚姻道德和社会公德等,而生殖性克隆人会动摇人类道德的根基,如两性爱情、家庭血缘和社会责任。再如,每个生命都具有自己的独特性,而克隆人是对供体的复制,这将损害个人的尊严,破坏个人的独特性。

生殖性克隆人也面临不少社会问题。例如,生殖性克隆人与供体的相貌、DNA 和指纹等一模一样，假若此时克隆人进行了违反法律的活动,又该如何辨别出犯罪分子呢？这将扰乱社会的正常活动和秩序,会使由两性生育形成的血缘关系所构成的社会结构和社会关系面临问题。

生殖性克隆人同时也面临着法律问题。生殖性克隆人会产生如亲子关系、血缘关系、监护人和遗产继承问题。例如,用体细胞克隆出来的人与细胞提供者既不是亲子关系，也不是兄弟姐妹关系,这与一般的父母子女关系大相径庭;再如,依现行的监护法律制度,监护人都是限定于一定范围内的亲属,而克隆人的监护职责该由谁来承担呢?

问题与讨论

许多人认为,生殖性克隆人一旦问世,将面临伦理、道德、社会、法律等问题。

设想一下,如果自己的家庭里出现一个生殖性克隆人,会产生哪些具体问题?

我国在 2003 年由当时的科技部和卫生部出台的《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》中明确规定“禁止进行生殖性克隆人的任何研究”。

本节练习

一、思辨题

1. 近年来，克隆技术的发展取得了巨大突破。在日常生活中，我们遇到过与克隆技术有关的问题吗？

2. 不同国家的政府对待生殖性克隆人的态度是不同的。我们认同我国政府对待生殖性克隆人研究的态度吗？为什么？

二、应用题

1. 我国中科院神经科学研究所团队率先攻克了体细胞克隆灵长类动物这一世界难题。他们首次成功培育出体细胞克隆猴，分别叫中中和华华（下图右）。猴子与人类同属灵长类，此前克隆灵长类动物在技术上存在着不可逾越的障碍。克隆猴的诞生打破了这个障碍，也再次引起人们对于克隆人的担忧和猜测。

克隆羊多莉

21 年

克隆猴中中和华华

？年 → 克隆人

从 1997 年宣布克隆羊多莉（上图左）的出生，到 2018 年克隆猴中中、华华的诞生，这期间一些科学家试图克隆人。举例说出克隆人面临哪些伦理问题。

2. 应用分析与比较的方法，对生殖性克隆与治疗性克隆进行列表阐述。

生殖性克隆与治疗性克隆的比较

比较项目	生殖性克隆	治疗性克隆
含义		
用到的技术		
目的		
……		

如果你想要更多地了解与基因工程的安全性有关的知识，请参考下列资料。

何水林. 基因工程. 2 版. 北京：科学出版社，2016.

第十章　基因工程及其产品安全性管理　第一节　基因工程的安全性问题

第三节　禁止生物武器

1995 年，一部美国电影《恐怖地带》的上映引发了轰动。影片中非洲扎伊尔的一个雇佣军兵营中流行起一种奇怪的疾病，人员不断死亡。傍晚，一架直升机飞越军营上空，投下了巨型炸弹，整个兵营在一瞬间全被毁灭……这部电影的一开始就留下了许多悬念：士兵们患的是什么疾病？为什么不去救治这些患病的士兵，而是要炸毁整个兵营？这部电影想说明什么？

积极思维　电影《恐怖地带》说明了什么？

事实：

1. 电影镜头首先聚焦在 20 世纪 90 年代：美国传染病研究所上校军医山姆接到上司的指示，与同事一起前往非洲扎伊尔考察一种奇怪的病毒。与此同时，一名美国青年在发病村庄附近的树林中捕捉到一只小白脸猴，并将其带回美国。

图 4－3－1　电影《恐怖地带》剧照

2. 剧情越来越紧张：山姆采集到的病毒与 1967 年发现的病毒极为相似。而后者曾经被军方用来制造生物武器（biological weapons）。那只小白脸猴在美国被放生后，一种神秘的疾病很快在一个城镇蔓延，军方发现后准备投放空气燃烧弹将该城镇和病毒一起毁灭。

3. 电影结尾：山姆等人为阻止军方罪行而逃脱围堵，找到了那只猴子，并研制出新的疫苗，及时拯救了疫区城镇的民众（图 4－3－1）。

思考：

1. **思辨**　影片中病毒的原型是埃博拉病毒。以生物武器为题材的小说和影视还有很多，这说明了什么？

2. **归纳**　说出生物武器的危害性。

《恐怖地带》是一部以现实生活和科学背景为依据的电影，它表达了人们对生物武器危害性的强烈关注，值得爱好和平的人们深思。生物武器有哪些危害？如何阻止生物武器的使用呢？

生物武器的危害

病原微生物会对人类的健康造成伤害，使用由病原微生物制造出的生物武器则会给人类带来巨大的灾难。

许多病原微生物危害人类健康

许多细菌和病毒，如炭疽杆菌、肉毒杆菌（图 4－3－2）、鼠疫杆菌和埃博拉病毒，具有强大的感染性和致病力。它们对人类健康有极大的危害（表 4－3－1）。例如，肉毒杆菌分泌的毒素是目前已知的毒性极强的毒素之一，它会破坏人的神经系统、麻痹肌肉等；埃博拉病毒可以在很短时间内致感染者死亡。

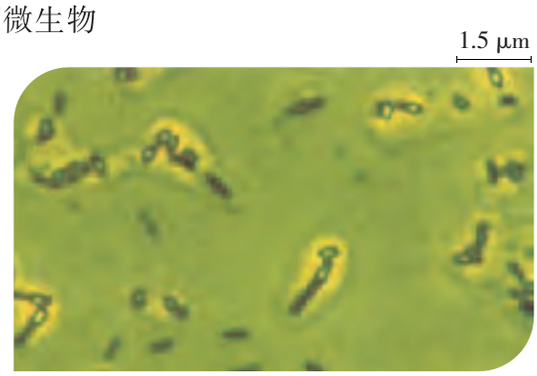


图 4－3－2　肉毒杆菌

表 4－3－1　几种致病微生物的危害与控制

微生物名称	危　害	控　制
炭疽杆菌	能引起炭疽病，可致患者死亡	疫苗和抗生素可防治
肉毒杆菌	产生的毒素毒性强，能导致中毒者死亡	抗毒素有时能阻止病情发展
鼠疫杆菌	引发鼠疫（黑死病），致死率很高	疫苗和抗生素可防治
埃博拉病毒	极易传染，致死率很高	疫苗处于研制推广阶段

生物武器对人类造成严重的威胁与伤害

生物武器是指利用包括病毒、立克次氏体、衣原体、细菌、真菌等危害极大的致病微生物或毒素等生物活性物质，制作成的具有杀伤性、破坏动植物生长的各种武器和器材的总称。将生物武器直接或间接地（如通过食物、生活用品）投放使用，会造成军队、平民、牲畜和农作物大规模患病乃至死亡。

边做边学　搜集历史上使用生物武器的资料

实践：

1. 以小组为单位通过互联网或图书馆搜集世界范围内有关生物武器使用的资料。

2. 有条件的学校可以组织参观相关纪念馆或观看纪实影像资料片。例如，在“侵华日军第七三一部队遗址”中有细菌实验室遗址和病毒实验室遗址等。这样能使学生更深刻地感悟生物武器曾对人类造成的严重威胁与伤害。

3. 各小组归纳整理搜集到的资料，并在组内或全班范围内进行交流。

讨论：

1. 历史上出现过哪些生物武器？

2. 生物武器给人类造成了哪些严重危害？

早在第一次世界大战期间，德国军队曾以炭疽杆菌毒杀英国和法国军队进口的载重马和驴，致使大量牲畜死亡。这是近代战争中使用生物武器（当时称为细菌武器）的典型证据之一。

第二次世界大战期间，日本大规模研制生物武器，并在中国东北地区建立研制细菌武器的第七三一部队（图 4－3－3）

和 100 细菌部队(图 4－3－4)。他们拿活人做细菌实验,进行活体解剖,来分析细菌武器的实验结果。有确凿的证据表明,他们曾对我国多个省的广大地区施放鼠疫杆菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌和炭疽杆菌等,给我国人民带来巨大灾难。据报道,1940 年,日军在我国浙江宁波地区投撒带有鼠疫杆菌的跳蚤,从而引发鼠疫,致使我国大量无辜平民致病或死亡。

图 4－3－3　侵华日军第七三一部队遗址

图 4－3－4　侵华日军 100 细菌部队遗址

生物武器有极强的致病性和传染性,受害者发病后又会互相传播,危害极大。

放眼社会

应对生物武器伤害的防护措施

一旦发现生物武器使用迹象,要立即积极采取防护措施。

做好个人防护和集体防护

接到防护指令后,立即戴上防护口罩,扎紧裤脚和袖口,上衣塞入裤腰,颈部围上毛巾,以减少感染的可能性。利用个人消毒用品擦拭暴露的皮肤;利用战斗间隙,销毁服装、武器和车辆上的相关微生物及其毒素;服用预防药物,补充接种疫苗,并接受医学观察。

对污染区要及时标志和隔离

发动广大军民对工事、住房、仓库和交通要道,进行消毒、杀虫和灭鼠。对生物战剂采用烈火烧煮或浸喷药液等方法彻底清除。

加强疫区管理

一旦发现鼠疫、霍乱、天花等烈性传染病人,要尽快封锁疫区,组织好检疫工作。传染病人原则上应就地隔离治疗,不作远距离转送,减少病疫传播。

我国反对生物武器及其技术和设备的扩散

制造和使用生物武器比制造和使用化学武器更为便捷,一般只要采用一定的微生物培养技术,就能将少量致病菌种置于有关的设备中进行大规模培养。同时,生物武器不像常规武器那样需要保存在庞大的军械仓库里,只要冷藏少量菌种即可。一旦爆发战争,可以利用这些菌种在短时间内培育出大量致病微生物,并制造出足够多的生物武器。这便是有些好战分子对研究生物武器如此热衷的原因。

20 世纪 70 年代以后,分子生物学取得了突破性进展,以基因重组技术为代表的基因工程应运而生。利用转基因技术,

生产危害性更大的生物武器也成为可能。例如，在一些不致病的微生物体内插入致病基因，或在一些致病的微生物中插入能对抗普通疫苗或药物的基因，就会培育出新的致病微生物或新的抗药性增强的致病微生物。这些微生物可能被制造成容易储存、便于携带、毒性更强的生物武器。例如，炭疽病是由炭疽杆菌引起的疾病，可用青霉素等药物加以治疗。如果在炭疽杆菌中转入一种控制内酰胺酶合成的基因，这种新型的炭疽杆菌就能通过该酶降解青霉素而成为抗青霉素的菌种。这种转基因炭疽杆菌被用作生物武器之后造成的危害就更大。

人类基因组计划的完成确认了不同种族的基因组成的特异性，也为生物武器的研制创造了新的条件。例如，现已发现不同种族人群对 HIV 的易感性有一定的差别，这种差别的遗传机制一旦被确定，就有可能被用于研制针对某一种族人群的生物武器。

历史证明，使用生物武器会使人类遭受灾难。为什么有些国家或个人还要研制生物武器呢？

问题与讨论

任何事物都有其两面性，科学技术自然也有它的利端和弊端。它既可以造福人类，又可能给人类带来灾难。

以分子生物学取得突破性进展对生物武器的影响为例，说说我们应该如何抑制其弊端。

灭绝人性的生物武器曾经给人类造成深重灾难(图 4－3－5)。在铭记过去的同时，我们更要警惕和避免历史悲剧的重演，维护世界和平。人类也一直在为世界和平努力奋斗着。早在 1925 年，在国际联盟主持的日内瓦裁军大会上，有关国家就签署了《禁止在战争中使用窒息性、毒性或其他气体和细菌作战方法的议定书》。这是人类社会第一次明确禁止在战争中使用细菌作战方法的协定书。1975 年正式实施了联合国《禁止细菌(生物)及毒素武器的发展、生产及储存以及销毁这类武器的公约》。该公约规定禁止发展、生产、储备和使用生物武器。中国曾是生物武器的受害国之一，按照公约要求，一直奉行不发展、不生产、不储存、不取得除和平用途外的微生物制剂、毒素及其武器的原则。

图 4－3－5　侵华日军第七三一部队用活人进行鼠疫感染试验

如果你想要更多地了解与生物武器有关的知识，请参考下列资料。

珍妮·吉耶曼. 周子平译. 生物武器. 2 版. 北京：三联书店，2016.

第四章　秘密分享与日本的生物武器计划　第十章　生物武器　制止扩散

本节练习

一、思辨题

1. 什么是生物武器？简述生物武器的危害。

2. 我国是一个爱好和平的国家，也是曾经遭受生物武器伤害的国家。我国政府对生物武器的态度是什么？我们为什么认同这种态度？

二、应用题

1. 人们可以利用微生物造福人类，也可以利用其制造生物武器给人类带来灾难。1988 年公映的电影《黑太阳 731》是一部揭露侵华日军发动细菌战罪恶的影片，生物武器的危害在该片中被暴露无遗。影片中的部分场景见下图。

鼠疫杆菌制造池

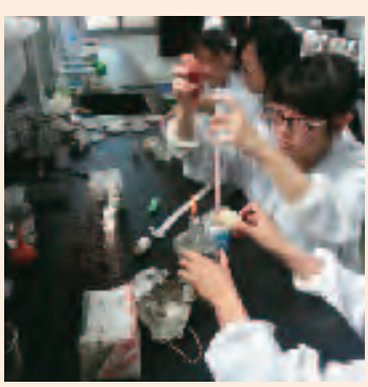
生物武器研制现场

（1）也许我们看过许多战争题材的影视剧，会感同身受那些身处战火之中的人民的疾苦。如果战争中使用了生物武器，我们能想象出当时的场景吗？

（2）结合所学内容并查阅相关资料，说出历史上生物武器使用的实例，并列举其对人类造成的伤害。

2. 随着现代科技的发展，有些新的致病微生物被发现，它们的危害可能更大。通过互联网或图书馆搜集近年发现的致病微生物的相关资料，分析和归纳这些资料。

走近专业


微生物学专业的学生正在做实验

微生物学

微生物学专业是培养从事现代微生物高新生物技术的理论研究与实践领域工作人员的专业之一。该专业的学习主要包括从分子、细胞或群体水平上，研究微生物的形态结构、生长繁殖、生理代谢、遗传变异、生态分布和分类进化等生命活动基本规律的内容。

该专业学生毕业后可从事与发酵工程、细胞工程、基因工程和医学卫生等领域有关的工作。

如果你想要更多地了解本专业的相关情况，请访问我国关于专业介绍的网站。

课外阅读

禁止细菌(生物)及毒素武器的发展生产及储存以及销毁这类武器的公约(部分条款)

禁止细菌(生物)及毒素武器的发展生产及储存以及销毁这类武器的公约的部分条款如下。

第一条　本公约各缔约国承诺在任何情况下决不发展、生产、储存或以其他方法取得或保有:

一、凡类型和数量不属于预防、保护或其他和平用途所正当需要的微生物剂或其他生物剂或毒素,不论其来源或生产方法如何;

二、凡为了将这类物剂或毒素使用于敌对目的或武装冲突而设计的武器、设备或运载工具。

第二条　本公约各缔约国承诺尽快但至迟应于本公约生效后9个月内,将其所拥有的或在其管辖或控制下的凡属本公约第一条所规定的一切物剂、毒素、武器、设备和运载工具销毁或转用于和平目的。在实施本条规定时,应遵守一切必要的安全预防措施以保护居民和环境。

第三条　本公约各缔约国承诺不将本公约第一条所规定的任何物剂、毒素、武器、设备或运载工具直接或间接转让给任何接受者,并不以任何方式协助、鼓励或引导任何国家、国家集团或国际组织制造或以其他方法取得上述任何物剂、毒素、武器、设备或运载工具。

第四条　本公约各缔约国应按照其宪法程序采取任何必要措施以便在该国领土境内,在属其管辖或受其控制的任何地方,禁止并防止发展、生产、储存、取得或保有本公约第一条所规定的物剂、毒素、武器、设备和运载工具。

第五条　本公约各缔约国承诺,在解决有关本公约的目标所引起的或在本公约各项条款的应用中所产生的任何问题时,彼此协商和合作。本条所规定的协商和合作也可在联合国范围内根据联合国宪章通过适当的国际程序进行。

本章小结

概念回顾

●**日常生活中的转基因产品越来越多。**我们面临的转基因产品远不止转基因抗虫棉或转基因三文鱼等动植物产品，更多的是转基因微生物产品。部分转基因产品归纳为下表。

常见转基因产品列表

转基因植物产品	转基因动物产品	转基因微生物产品
转基因抗虫棉、转基因抗病毒番木瓜、转基因耐储存番茄、转基因抗除草剂大豆	转基因三文鱼以及转入外源生长激素基因、高泌乳量基因等的动物	牛胃蛋白酶、新型甜味剂、胰岛素、白细胞介素、α-高温淀粉酶、啤酒酵母、乙肝疫苗、抗生素

●**转基因产品的安全性引发社会广泛关注。**我国政府要求对市场销售的转基因产品加注特殊标识，让公众拥有知情权和选择权，同时成立了国家农业转基因生物安全委员会，强化全程安全监测和评估技术体系。转基因技术在应用过程中的安全问题一直受到全社会的关注。

●**中国禁止生殖性克隆人，坚持世界范围内应全面禁止生物武器的立场。**我国政府不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验，支持治疗性克隆研究。我国明确反对生物武器及其技术和设备扩散，支持联合国相关禁止生物武器的公约。

素养提升

●基于事实和证据，能认识到在国家的管控下，转基因技术和转基因产品都是安全的。

●通过参与“搜集设计试管婴儿技术的资料”“搜集历史上使用生物武器的资料”等活动，能用事实和证据参与相关社会问题的决策。

本章练习

1. 不同转基因番木瓜品种转入的外源基因不同，有的转入的是环斑病毒衣壳蛋白基因，有的是转入环斑病毒的复制酶基因。试分析下列问题。

（1）简要阐述上述两种转基因番木瓜的转基因操作过程。

（2）我国科学家自主研发的抗病毒转基因番木瓜为什么能获得有关部门颁发的安全证书？

2. “设计试管婴儿”不是随心所欲地编辑、改变婴儿的遗传物质，而是根据预防某些疾病的需要，将经遗传分析无基因缺陷的胚胎植入母体内继续发育成健康胎儿的过程。根据所学知识回答相关问题。

（1）“试管婴儿”的精子与卵子的结合场所是什么？胚胎是在哪里生长发育成胎儿的？

（2）“设计试管婴儿”与“试管婴儿”之间最主要的区别是什么？

（3）为什么说“设计试管婴儿”的培育过程属于治疗性克隆，而不属于生殖性克隆范畴？我国政府为什么反对生殖性克隆，而支持治疗性克隆？

3. 2002 年我国首家“生命银行”——协和脐血干细胞自体储存库正式向市民开放，每个家庭都可把孩子出生时的脐血放在“生命银行”-196 ℃的液氮低温罐中保存。日后，当孩子患血液疾病或恶性肿瘤等病症时，便可取出脐血干细胞进行移植治疗。脐血干细胞移植治疗有什么优点？

4. 在日常生活中，我们还遇到哪些有关生物技术安全与伦理问题？我们能基于所学生物学知识参与这些问题的讨论吗？尝试举一个实例加以说明。

如果想要更多地了解与本章有关的内容，请访问：
微生物学、细胞工程学、基因工程学、现代生物技术等相关网站。

中英文名词对照及索引

B

标记基因(marker gene)97

C

纯化(purification)23

D

代谢产物(metabolite)8

单倍体育种(haploid breeding)60

动物细胞核移植(animal cell nuclear transfer)64

动物细胞培养(animal cell culture)65

动物细胞融合(animal cell fusion)66

单克隆抗体(monoclonal antibody)67

DNA 连接酶(DNA ligase)86

蛋白质工程(protein engineering)109

定点诱变(site-directed mutagenesis)111

F

发酵工程(fermentation engineering)5

分离(separation)23

复制原点(origin of replication)97

G

高压蒸汽灭菌锅(high-pressure steam sterilizer)9

干细胞(stem cell)69

J

基础培养基(minimum medium)6

鉴别培养基(differential medium)8

加富培养基(enrichment medium)8

接种(inoculate)18

菌落(colony)21

基因工程(gene engineering)85

聚合酶链式反式(polymerase chain reaction, PCR)90

基因文库(gene library)94

基因组文库(genomic library)94

基因探针(gene probe)99

基因治疗(gene therapy)105

基因诊断(gene diagnosis)106

M

灭菌(sterilization)9

灭菌剂(sterilant)14

N

囊胚(blastula)74

P

培养基(culture medium)6

平板划线法(streak plate method)21

胚胎发育(embryogenesis)72

胚胎工程(embryo engineering)72

胚胎移植(embryo transfer)72

胚胎分割(embryo bisection)80

Q

启动子(promoter)97

S

受精(fertilization)72

桑椹胚(morula)74

生殖性克隆(reproductive cloning)127

生物武器(biological weapons)132

T

脱分化(dedifferentiation)47

体外受精(in vitro fertilization)72

W

外植体(explant)47

X

选择培养基(selective medium)7

稀释涂布平板法(spread plate method)23

细胞全能性(cell totipotency)46

限制性内切核酸酶(restriction endonuclease)86

限制酶(restriction enzyme)87
Y
愈伤组织(callus)46
原生质体(protoplast)47
原肠胚(gastrula)74
Z
植物组织培养(plant tissue culture)47
植物体细胞杂交(plant somatic hybridization)52
杂交育种(cross breeding)60
质粒(plasmid)86
载体(vector)89
终止子(terminator)97
转基因生物(transgenic organism)103
转基因植物(transgenic plant)120
转基因动物(transgenic animal)121
转基因微生物(transgenic microorganism)121
治疗性克隆(therapeutic cloning)127

后　记

自 2004 年在全国实验区实验以来，全国广大教师、学生和教研人员以及专家、学者在广泛实践的基础上，对本套教科书的实验本提出了许多建设性的意见，这对进一步完善教科书的质量起到了积极的作用。这次在根据教育部颁发的《普通高中课程方案》《普通高中生物学课程标准（2017 年版）》修订本套教科书的过程中，编写组又在许多实验学校召开座谈会，广泛听取生物学教师的意见，也进一步获得了学科专家、教育专家、心理学家的指导和帮助，使得本套教科书在原有基础上，更加反映课程标准，更加贴近学生生活，更加关注学生的学习过程，有利于培养学生多样化的学习方式，促进每一个学生的核心素养全面提升。

本套教科书共 5 册，其中必修 2 册，选择性必修 3 册。必修包括“分子与细胞”“遗传与进化”，选择性必修包括“稳态与调节”“生物与环境”“生物技术与工程”。学生在修完必修模块的基础上，进行选择性必修的学习。每模块（册）教学用 36 学时，计 2 学分。

本套教科书由汪忠担任主编，陈建秀、许晓凤担任副主编，殷志敏、吴红漫担任本册教科书主编，王苏豫、孙传友、许晓风、岑芳、倪晓青、汪忠、吴红漫、吴举宏、姜兴明、郭军英、徐旭士、龚祝南等（按姓氏笔画排序）参加本册教科书的编写。

在编写本册教科书的过程中，我们也得到了广大高中生物学教师和教研部门的大力支持和帮助（包括试读、试教和预做部分实验等），这为教科书的质量提升奠定了基础。在此向他们致以诚挚的谢意！

本册教科书出版之前，我们通过多种渠道与教科书选用作品（包括照片、画作）的作者进行了联系，得到了他们的大力支持。对此，我们表示衷心的感谢！但仍有部分作者未能取得联系，恳请入选作品的作者与我们联系，以便支付稿酬。

由于时间仓促，书中难免有错漏之处，恳请广大教师、学生和教研人员以及专家、学者提出宝贵意见。

ISBN 978-7-5499-9384-0
9 787549 993840
定价：11.12元
绿色印刷产品
审批号：苏费核（2021年）0381号
举报电话：12315

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