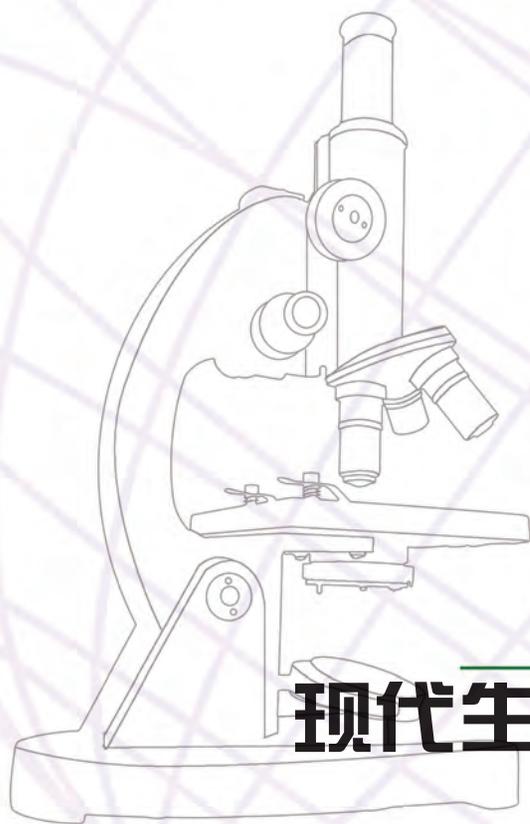


经全国中小学教材审定委员会2004年初审通过
普通高中课程标准实验教科书



生物

现代生物科技专题

选修3

汪忠 主编

主 编 汪 忠

分册主编 汪 忠 李朝晖

编写人员 汪 忠 李朝晖 曹志江

吴国荣 孙传友 余跃林



同学们,当你们畅游在知识海洋时,可曾想到,生物科学与人类社会的关系比其他科学更为密切;当你们漫步在科学丛林时,可曾感知,生物科学就在你我的身边……

回顾生物科学近百年来的发展史,许多重大的事件,如孟德尔遗传规律的发现、基因学说的创立、DNA 分子双螺旋结构的确定、人类基因组计划的完成……仿佛还在昨天;许多伟大的科学家,如孟德尔、摩尔根、沃森……仿佛就在眼前。在如今这瞬息万变的时代,生物科学在迅猛地发展,基因工程、生物克隆、生物芯片等成果的取得,引起了全世界的广泛关注。与此同时,我们还应该知道,千百年来,在这些伟大成果的背后,有许多默默无闻的工作者和无数平凡的事情,所有这些都是生物科学发展进程中不可或缺的、充满生命活力的组成部分!

20 世纪后期,生物科学在物理学和化学等学科发展的基础上取得了长足的进展,已经深入到分子水平探究生命活动的本质。一般来说,新生的交叉学科在很大程度上是未来科学的先驱,而生物科学的研究领域正是产生这些新生学科科学启蒙思想的沃土。难怪许多科学家早就预言,21 世纪生物科学将是自然科学中最为活跃的学科之一。

当今,人类生存环境恶化的倾向对以造福人类为理想目标的科学提出了严峻的挑战,人们对科学进一步发展的期待日益迫切。生物科学在迎接挑战中,不断地丰富着自己。随着数学、技术科学、物理学、化学等学科的不断渗透交融,21 世纪的生物科学必将取得更加重大的突破,呈现出更加欣欣向荣的景象。生活在这样一个激动人心的生物科学时代,我们怎能不兴奋呢!

千鸟竞翔,万马奔腾,是生命的一种壮美;DNA 分子的双螺旋,是生命的一种结构美……同学们,生物科学中蕴含着各种形态的美,让我们在追求美的同时,也用美去感染你我身边的每一个人!

编者
2014 年 6 月

绪 论

关注生物科学新进展

关注生物科学新进展	2
-----------------	---

第一章

基因工程

第一节 基因工程概述	7
基因工程的发展历程	7
基因工程的工具——酶与载体	9
基因工程的实施过程	13
第二节 关注基因工程	21
基因工程的应用	21
转基因生物的安全性问题	28
生物武器的危害性	29
第三节 蛋白质工程	35
蛋白质工程概述	35
蛋白质工程的应用	38



第二章

细胞工程

第一节 细胞工程概述	45
细胞工程的基本技术	46
第二节 植物细胞工程的应用	54
植物组织培养技术的应用	54
植物细胞培养技术的应用	56



第三节 动物细胞工程的应用	61
动物细胞与组织培养	61
动物细胞核移植与体细胞克隆	62
动物细胞融合和单克隆抗体	65

第三章

胚胎工程

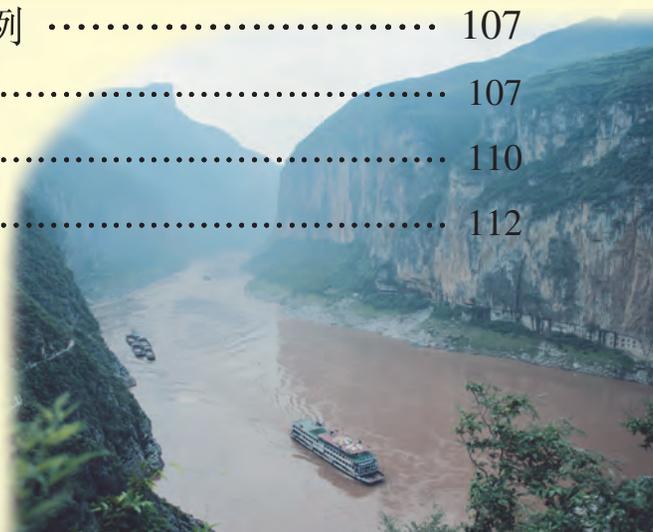


第一节 受精和胚胎发育	72
哺乳动物生殖细胞的发生和体内受精	72
哺乳动物胚胎发育的基本过程	75
第二节 胚胎工程及其应用	81
胚胎工程的主要技术	81
胚胎工程的应用	86

第四章

生态工程

第一节 生态工程及其原理	98
生态工程的概念	98
生态工程的基本原理	99
第二节 生态工程实例	107
治污生态工程	107
生态恢复工程	110
生态农业工程	112



绪 论

关注生物科学新进展

人类基因组测序的部分电泳图

当 21 世纪悄然来临,我们发现关注生命科学发展的人越来越多了。就连电影制片商也接连推出《再生人》、《蜘蛛侠》等源于生物科学重大发现的科幻片。这就是当代生物科学的诱人魅力和巨大影响。21 世纪生物科学与技术正酝酿着新的突破,这会给农业、医疗与卫生保健等领域带来根本性的变化。

- 生物科学是 21 世纪最活跃的学科之一
- 生物科学发展的主要趋势



关注生物科学新进展

学习目标

- 简述生物科学是 21 世纪最活跃的学科之一
- 举例说出生物科学的主要发展趋势

1973 年建立的重组 DNA 技术标志着现代生物技术开始兴起,并应用于生产实践。如今以基因工程、细胞工程等为代表的现代生物技术,正广泛地应用于食品、医药、化工、农业、能源、材料、环境等领域,并取得了令世人瞩目的成就,显示出了不可估量的发展潜力。

生物科学是 21 世纪最活跃的学科之一

生物科学是一门历史悠久的学科。16~18 世纪,生物科学的突出成就是一些分支学科,如解剖学、生理学、分类学、胚胎学等的先后建立和发展。19 世纪是生物科学全面发展的世纪,在这期间创立的细胞学说、生物进化论和遗传理论被称为现代生物科学的三大基石。20 世纪,生物科学发生了巨大的变革,从静态的、定性描述性的学科向动态的、定量实验性的学科转化。在微观层面,对生命本质的探索已经深入到分子生物学水平,人类基因组计划的完成则标志着生物科学新时代的开始。在宏观层面,现代生态学已发展成为以人类为研究主体的、多层次的综合性学科,在解决影响人类发展的全球性问题上,正发挥着越来越重要的作用。

积极思维

为什么说生物科学是 21 世纪最活跃的学科之一?

事实:

不少科学家认为,生物科学在 21 世纪仍将是自然科学中最活跃的学科。什么是热门学科?什么是前沿领域?要回答这两个问题不能从主观愿望出发,而要从当前科学发展的客观实际出发。一般来说,判断科学领域的重要性,首先要看从事这一学科工作的人数,这主要体现在发表的有价值的高水平科学论文的总数上;同时也要参考一个时期内科学上的重大突破,如获得诺贝尔奖的成果等。那么,有大量科学家涌入,并且发表了大量有价值的科学论文的学科必然是热门学

科,不断出现重大突破的领域必然是前沿领域。进入某一学科的科学家越多,发表论文的数量越多,表明这一学科领域越活跃,影响也越大。

对于一篇科学论文的水平和价值的评价,国际上常用发表这篇论文的刊物的水平来衡量。而刊物的水平通常是根据刊物的“影响因子”来判断的。所谓“影响因子”,就是指在全世界范围内对这种刊物所发表的论文的引用情况。每年发表论文数量越多的学科,在有关论文中的相互引用就越频繁,有关刊物的“影响因子”也就越高。刊物的“影响因子”在一定程度上代表了某一学科在国际科学界的活跃程度,反映了这一学科的重要性和它在现代科学发展中的地位。

全世界自然科学范畴内共有 8 000 余种期刊。美国科学信息研究所 (ISI) 是对全世界科学信息收集最完全的权威机构,它出版的科学引文索引 (SCI) 也最具有权威性。SCI 收录了 8 000 余种期刊中较为重要的 4 000 余种,在数、理、化、天、地、生六大分支中,生物科学刊物占总数的 28.6%;而在“影响因子”位列前 10 的刊物中,除著名的多学科综合性刊物英国的 *nature* 和美国的 *Science* 外,全部是生物科学领域的刊物。这充分表明了生物科学在整个自然科学发展中的领先地位。这一情况已经延续多年,并且从近 10 余年的发展趋势来看,这种状况还将延续下去。可以预计,生物科学仍将是整个自然科学领域中最活跃的学科。



图 1 部分以我国科学家的研究成果为封面图的 *nature* 和 *Science*

分析:

举出身边发生的事例,说明生物科学在迅猛发展。

生物科学在 20 世纪已经取得了巨大的成就,在自然科学的发展中也处于领先地位,并正向着前所未有的广度和深度迅速地发展。

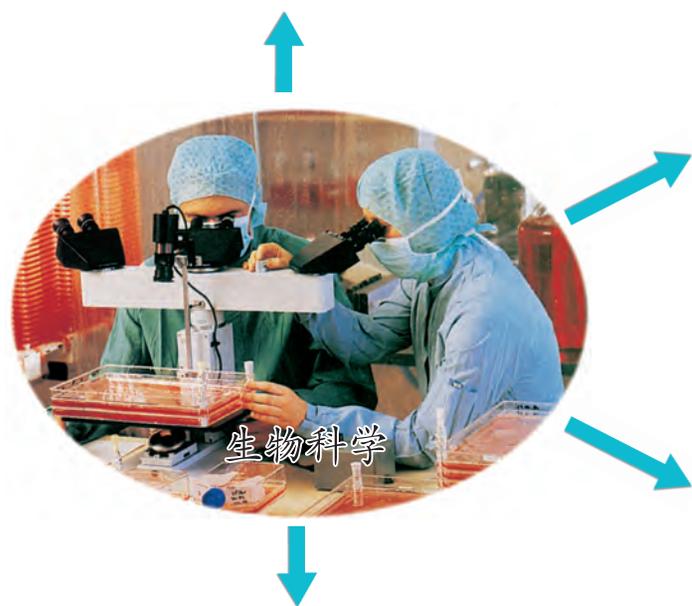
生物科学发展的主要趋势

根据当代自然科学和 20 世纪生物科学发展的规律,许多专家预测:21 世纪生物科学的发展趋势是对生命现象及其本质的研究不断深入和扩大,并向着微观与宏观、基础理论与开发应用等方面全方位地发展(图 2)。



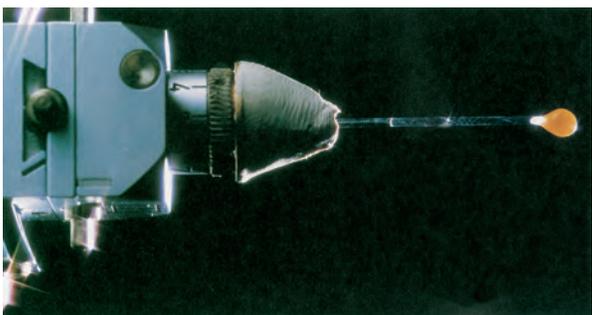
生物科学向着日益深入生命本质的方向发展

生物科学将深入研究细胞、分子和基因,并综合分析它们是如何相互作用而形成复杂生命系统的。图为科学家在进行人类基因组测序。



生物科学向着基础研究和应用研究统一的方向发展

随着生物技术及其产业化发展,生物科学基础研究成果转化为生产力的前景非常广阔。图为利用发酵罐生产药品、食品等。



生物科学向着多学科交叉与融合的方向发展

生物科学与数学、物理、化学、信息技术等学科之间的大综合、大交叉,将从不同侧面、不同层次揭开生命之谜。图为应用 X 射线晶体衍射法测定蛋白质结构。



生物科学向着生物资源保护与可持续利用的方向发展

生物科学将深入地研究生物及其生存环境之间相互作用的规律,并在相关规律的指导下,重视生物资源的保护与可持续利用。图为生物质能开发利用研讨会的宣传海报。

图 2 21 世纪生物科学发展的主要趋势

1. 为什么说生物科学是 21 世纪最活跃的学科之一？它的发展趋势可能是什么？例，阐述生物科学的研究正从生命现象深入到生命活动的本质。
2. 尝试从宏观和微观两个方面列举事



2002 年诺贝尔化学奖

瑞典皇家科学院 2002 年 10 月 9 日宣布，将 2002 年诺贝尔化学奖的一半授予美国弗吉尼亚联邦大学教授约翰·芬恩 (J.B. Fenn) 和日本京都岛津制作所工程师田中耕一 (K. Tanaka)，他们分别创建了使生物大分子软吸附电离的不同方法，使生物大分子的质谱分析成为可能；将另一半授予瑞士联邦技术研究所科学家库尔特·维特里希 (K. Wüthrich)，他创建了利用核磁共振波谱确定溶液中蛋白质等生物大分子三维结构的方法。由于三人在实验方法和技术上的革命性突破，使科学家现在能够快速可靠地确认生物大分子，并获得它们的三维结构。



约翰·芬恩



田中耕一



库尔特·维特里希

他们三人在研究生物大分子的基础分析方法上的创新性成就，不仅促进了生物科学与技术的蓬勃发展，还被广泛应用于新药研发、食品安全、疾病诊断、环境保护、污染监测等方面。



第一章

基因工程

蓝色玫瑰

玫瑰花绚丽多彩,但是自然界里没有蓝色的玫瑰,因为普通玫瑰缺少一种编码合成蓝色色素的基因。有科学家克隆了这种基因,把它导入普通玫瑰,终于使传说中“天上有,地上无”的蓝色玫瑰在人间绽放。你是否对这样的基因工程感兴趣了? 好好学习本章内容吧!

- 基因工程概述
- 关注基因工程
- 蛋白质工程



第一节 基因工程概述

在我国十二生肖中,有一种属相是龙。龙是传说中的一种神奇动物,能呼风唤雨,善腾云驾雾。它的角似鹿、鼻似狮、目似虎、唇似牛、爪似鹰、鳞似鱼、身似蛇,在自然界中显然不存在这样的动物。但是,在不久的将来通过基因工程也许会创造出龙呢!

学习目标

- 简述基因工程的发展历程
- 举例说出基因工程的工具
- 简述基因工程的实施过程

关键词

基因工程

基因工程的发展历程

20世纪50年代初期至70年代,是分子遗传学迅猛发展、快速进步的年代。在这短短的20多年间,许多有关分子遗传学的基本原理相继提出,大量的重要发现不断涌现。

1953年,沃森(J.D. Watson)和克里克(F. Crick)建立了DNA分子双螺旋结构模型。1957年,美国科学家科恩伯格(A. Kornberg)及其合作者首次在大肠杆菌中发现了DNA聚合酶,这是一种可以在体外催化合成DNA的酶,从此拉开了DNA合成研究的序幕。1958年,梅塞尔森(M. Meselson)和斯塔尔(F. Stahl)发现了DNA半保留复制的机理,揭示了基因之所以能够代代相传且准确保留的分子本质。同年,克里克提出了描述遗传信息流向的中心法则,阐明了基因表达过程中遗传信息从DNA到RNA,再到蛋白质的传递途径。

自1961年开始至1966年,经过尼伦伯格(M.W. Nirenberg)和霍拉纳(H.G. Khorana)等科学家的努力,全部64种遗传密码均被成功破译,从而将RNA分子上的核苷酸顺序同蛋白质肽链中的氨基酸顺序联系起来,这是分子遗传学发展过程中影响最为深远的科学发现之一。1967年,罗思(T.F. Roth)和赫林斯基(D.R. Helinski)发现细菌拟核外的质粒具有自我复制能力,并能在细菌细胞之间转移,这一发现为基因的转移找到了一种运转工具。同年,科学家在大肠杆菌细胞中发现了DNA连接酶。

1970年,两位美国科学家特明(H.M. Temin)和巴尔的摩(D. Baltimore)各自在RNA病毒中发现了逆转录酶,进而证明遗传信息也可以从RNA反向传递到DNA,这是对中心法则

的重大补充。同年,史密斯(H.O. Smith)等人从流感嗜血杆菌中分离到第一种特异性很强的限制性核酸内切酶。1977年,英国科学家桑格(F. Sanger)测定了噬菌体 ϕ X174的基因组序列,这是首次完整基因组的测序工作。

上述这些原理的提出和发现的涌现,为基因工程的创立与发展奠定了强有力的理论与技术基础。

1972年,美国斯坦福大学科学家伯格(P. Berg)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核酸内切酶,在体外对猿猴病毒SV40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,结果获得了重组的杂种DNA分子,这种重组DNA分子包含SV40 DNA片段和 λ 噬菌体DNA片段。

1973年,斯坦福大学科学家科恩(S. Cohen)领导的研究小组也成功地利用大肠杆菌质粒(图1-1)进行了另一个体外重组DNA分子实验。他们将一种大肠杆菌的质粒DNA(DNA上有卡那霉素抗性基因)和另一种大肠杆菌的质粒DNA(DNA上有四环素抗性基因)混合后,加入同一种限制性核酸内切酶,对DNA分子进行切割,再用DNA连接酶将酶切片段连接起来形成重组DNA分子。用这种连接后的DNA混合物去转化大肠杆菌,结果发现,在子代大肠杆菌菌落中,有一些表现出了既抗卡那霉素又抗四环素的双重抗性特征。这说明重组质粒的DNA分子上既有卡那霉素抗性基因又有四环素抗性基因。

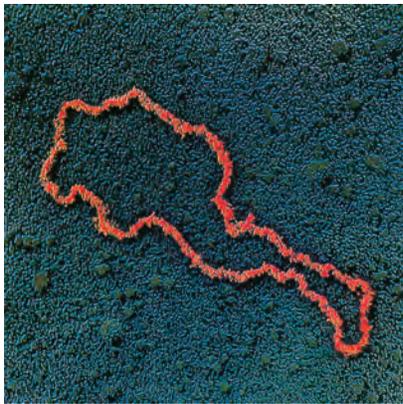


图1-1 电子显微镜下的大肠杆菌质粒

在科恩进行的实验中,重组DNA分子上的两种抗性基因都来源于大肠杆菌。那么,在不同物种之间的DNA能否实现重组呢?为了回答这个问题,科恩和美国加州大学科学家博耶(H. Boyer)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,再把重组的DNA转入大肠杆菌,结果成功转录出了相应的mRNA。这次成功的合作说明了真核生物的基因可以和原核生物的基因进行重新组合,打破了传统的种间遗传物质不能交换的重重壁垒,开创了基因工程。

简单地说,基因工程(gene engineering)是指在体外通过人工“剪切”和“拼接”等方法,对生物的基因进行改造和重新组合,然后导入受体细胞,并使重组基因在受体细胞中表达,产生人类需要的基因产物的技术。基因工程又称为DNA重组技术。

1976年,博耶用质粒为载体,将生长抑制素释放因子的基因转入大肠杆菌,并成功表达。企业家闻讯后拜访了博耶并与之协议成立基因公司,于1977年第一个生产出了治疗肢端肥大症的生长抑制素释放因子。以往生产这种激素,是从动物的

下丘脑中提取,每获 1 mg 需要 10 万只羊。通过基因工程制备的工程菌来生产,要获得 1 mg 这种激素,只需不到 2 L 的培养液。随后,基因工程产品人胰岛素、人生长激素、人干扰素等相继问世,并带来了巨大的经济效益。

1982 年,美国科学家帕米特(R. D. Palmiter)等人采用显微注射法,将带有大鼠生长激素基因的重组 DNA 分子转入小鼠受精卵内,并将早期胚胎植入小鼠体内妊娠,结果分娩出了带有大鼠生长激素基因的小鼠。该小鼠生长迅速,体型是同一胎中其他小鼠的 1.8 倍,称为巨型小鼠(图 1-2)。这一实验的成功表明了外源基因不仅可以转入动物的受精卵基因组中,而且可以在受精卵发育成的新个体中表现出外源基因所决定的性状。



图 1-2 巨型小鼠(后)和正常小鼠(前)

1983 年,美国科学家通过农杆菌转化法培育出了世界上首例转基因植物——转基因烟草。从此之后,以基因工程为基础的生物技术,作为前途远大的高技术产业在世界范围内兴起。

基因工程的工具——酶与载体

“分子手术刀”——限制性核酸内切酶

限制性核酸内切酶,又称限制酶,是基因工程的重要工具之一。限制酶的特异性(专一性)很高,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 1-3)。

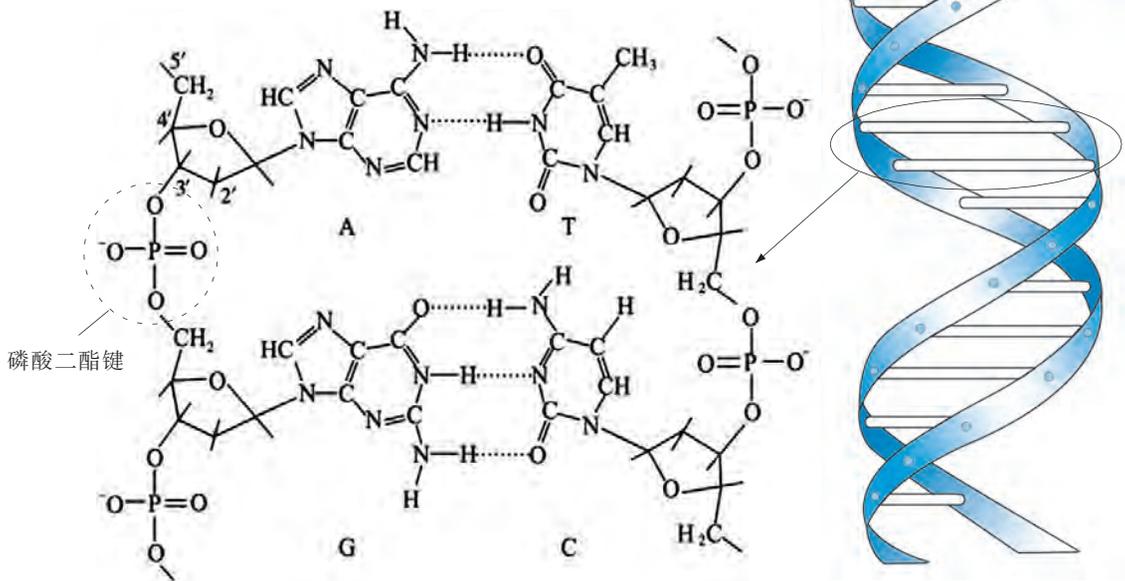


图 1-3 双链 DNA 分子结构与磷酸二酯键位置

科学家已经陆续从近300种微生物中分离出约4000种限制酶。例如,某种限制酶(*EcoR* I)是从大肠杆菌(*Escherichia coli*)的R型菌株分离出来的,用字母*EcoR*表示,其中*E*是生物属名的第一个字母,*co*是种名的头两个字母。它又是从大肠杆菌R型菌株中分离出来的第一种限制酶,就命名为*EcoR* I。

限制酶能识别的特定的脱氧核苷酸序列也被称为识别序列。大多数限制酶识别的序列由6个核苷酸组成。例如,*EcoR* I、*Hind* III和*Bam*HI三种限制酶识别的序列分别为- GAATTC -、- AAGCTT -和- GGATCC -。也有一些限制酶识别的序列由4、5或8个核苷酸组成。识别序列中一般具有回文序列,即在限制酶的切割部位,DNA分子的一条链正向读的碱基顺序(如-CTGCAG-)与另一条链反向读的顺序(如-GACGTC-)完全一致。

限制酶像“分子手术刀”一样,能够切割DNA分子,按照切割方式的不同,可分为错位切和平切两种。错位切是在DNA分子两条链的不同部位进行切割,切割后两个末端均留下一段游离的单链,科学家将这种单链称为黏性末端。平切是在DNA分子两条链上相同的部位进行切割,切割后形成一个平口末端。例如,*EcoR* I的错位切方式如图1-4所示,*Hae* III的平切方式如图1-5所示。

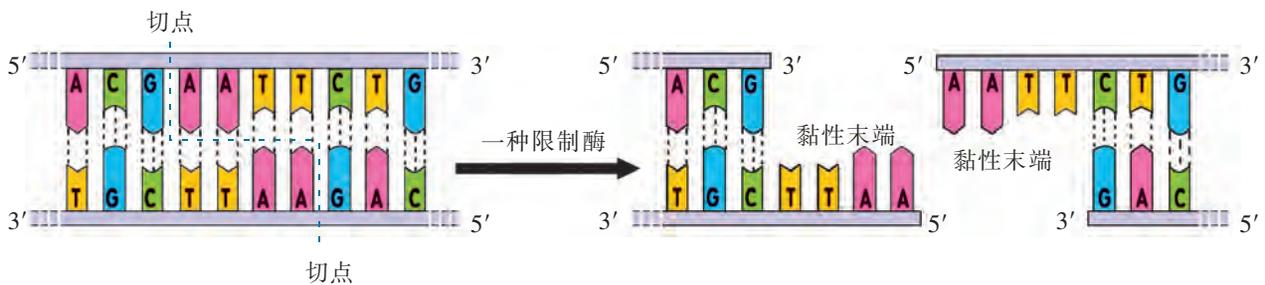


图 1-4 一种限制酶(*EcoR* I)的错位切示意图

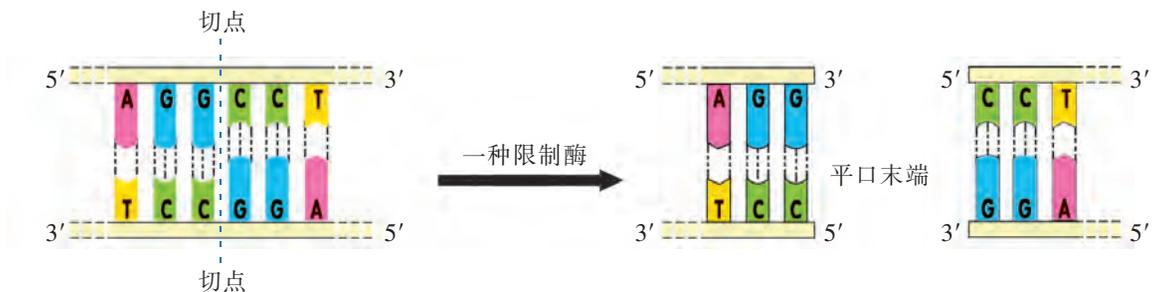


图 1-5 一种限制酶(*Hae* III)的平切示意图

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

基因工程中常用的限制酶针对识别序列进行切割，切割后形成 3' 端黏性末端、5' 端黏性末端或平口末端(表 I)。

表 I 一些常用的限制酶识别的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
<i>Bbu</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— GCATGC —} \\ \text{— CGTACG —} \\ \uparrow \end{array}$	3' 端黏性末端	<i>Not</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— GCGGCCGC —} \\ \text{— CGCCGGCG —} \\ \uparrow \end{array}$	5' 端黏性末端
<i>Hind</i> III	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— AAGCTT —} \\ \text{— TTCGAA —} \\ \uparrow \end{array}$	5' 端黏性末端	<i>Eco</i> R I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— GAATTC —} \\ \text{— CTTAAG —} \\ \uparrow \end{array}$	5' 端黏性末端
<i>Hpa</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— GTTAAAC —} \\ \text{— CAATTG —} \\ \uparrow \end{array}$	平口末端	<i>Alu</i> I	$\begin{array}{c} \downarrow \\ \text{— AGCT —} \\ \text{— TCGA —} \\ \uparrow \end{array}$	平口末端

“分子针线”——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，还必须将基本骨架之间通过磷酸二酯键“缝”上，就像断成两截的梯子，不仅要把中间的踏脚连接起来，还要把两边的扶手接合在一起。所以，基因工程还需要一种被称为“分子针线”的工具酶——DNA 连接酶(图 1-6)。

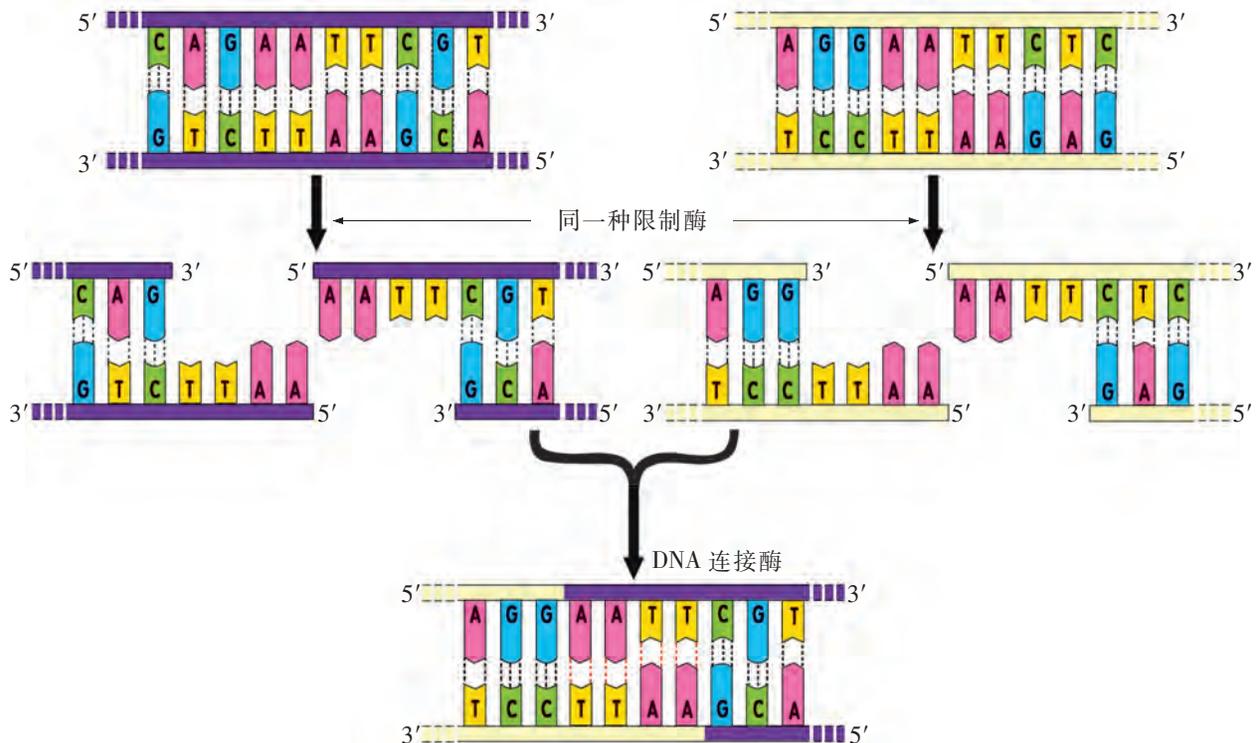


图 1-6 限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶作用示意图

实践:

1. 制作 DNA 分子片段: 参照图 1-6, 分别在两张硬纸板上制作“DNA 分子”片段甲和片段乙, 要求每个片段有 25~35 对碱基,

其中的序列至少有一段为“-GAATTC-”(图 1-7)。

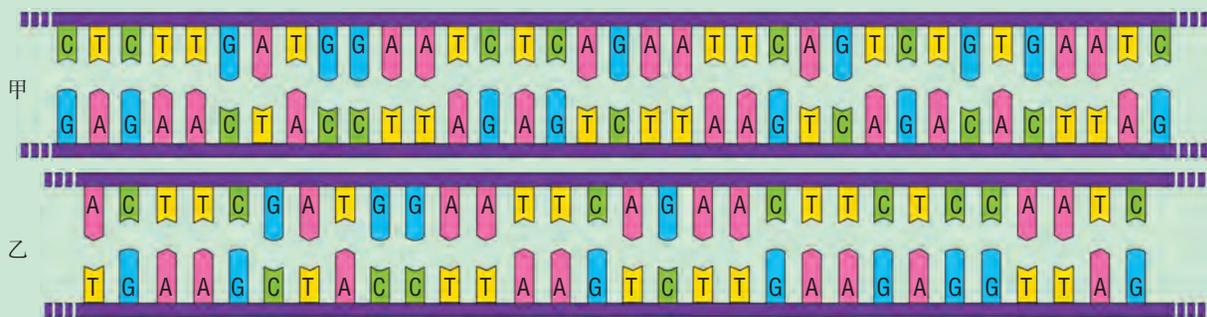


图 1-7 用彩色笔绘制的“DNA 分子”片段

2. 模拟活动:

(1) 在片段甲和片段乙上分别找出 *EcoR* I 能够识别的序列“-GAATTC-”。

(2) 用剪刀模拟 *EcoR* I 在片段甲和片段乙上进行切割, 形成带有黏性末端的 DNA 片段。

(3) 分别从切割甲、乙产生的片段中选择一个, 用透明胶带模拟 DNA 连接酶将两个黏性末端连接起来。

讨论:

在上述活动中为什么要用同一种限制酶切割两种 DNA 分子呢? 在图 1-7 中, 切割后的片段可以连成几种新的 DNA 分子?

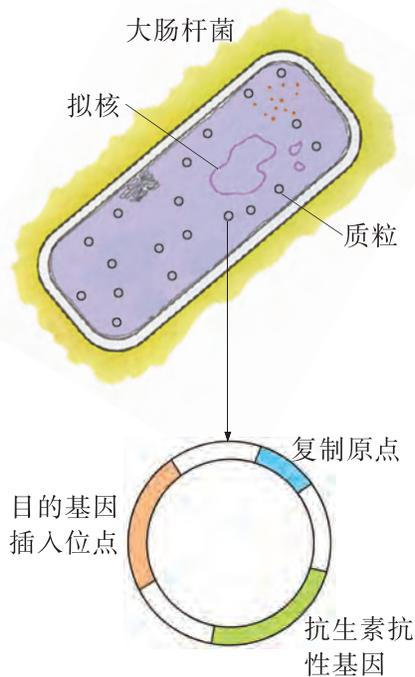


图 1-8 大肠杆菌与质粒载体的基本结构示意图

“分子搬运工”——目的基因进入受体细胞的载体

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。目前, 常用的载体有质粒、λ 噬菌体的衍生物、动植物病毒等。质粒是细菌细胞中一类裸露的、结构简单、独立于细菌拟核 DNA 之外, 并具有自我复制能力的环状 DNA 分子(图 1-8)。它是最早被应用的载体。

质粒 DNA 分子上至少包括: 含有复制原点且能保证在受体细胞中进行独立复制的复制区; 独特的标记基因, 如四环素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因或某些生化表型等标记基因, 用于鉴定和选择重组 DNA 分子; 目的基因(外源基因)插入位点, 即限制性核酸内切酶的切割位点, 便于目的基因的插入。事实上, 在基因工程相关操作中, 被用做载体的质粒一般都是经过人工改造过的。

用限制酶切割质粒和外源 DNA 分子, 并通过 DNA 连接酶的连接, 就能将质粒和外源 DNA 分子组成一个重组 DNA 分子, 即外源基因表达的载体。

基因工程的实施过程

在自然界中,生物体在传宗接代中发生着 DNA 分子的重组,导致产生对生物体有利或有害的变异。这类 DNA 分子的重组不受人的意志控制,因此重组的结果难以预测。基因工程产生的重组 DNA 分子,是根据人的意愿经过严密的设计而形成的,在生物体外实现了不同来源的 DNA 分子的拼接,使得遗传信息朝着预期发生变化。

基因工程涉及多种技术操作,主要包括获取目的基因,构建基因表达载体,将目的基因导入受体细胞,以及目的基因的检测和鉴定等步骤。

1. 获取目的基因

获取目的基因的方法很多,如可通过基因文库获取目的基因,也可通过 PCR 技术扩增目的基因,还可通过化学方法直接人工合成等。

通过基因文库获取目的基因

先用酶切等方法将某种生物细胞的整个基因组 DNA 切割成大小合适的片段,再将这些片段分别与载体连接起来,导入受体菌的群体并储存起来,这样每个受体菌可能分别含有该种生物的不同基因,因此这个群体被称为基因文库。

如果基因文库中包含了某种生物的全部基因,则称为基因组文库;如果基因文库只包含了某种生物的部分基因,则称为部分基因文库。

在需要获取某种目的基因时,怎样从基因文库中得到它呢?在基因文库中,不同的 DNA 片段分别都得到了扩增,因此,只要根据基因的核苷酸序列、基因的功能、基因在染色体上的位置、基因的转录产物 mRNA、基因的表达产物蛋白质等信息,就可以直接从基因文库中获取目的基因。

通过 PCR 技术扩增目的基因

PCR 是多聚酶链式反应 (polymerase chain reaction) 的缩写。这项技术是在体外通过酶促反应有选择地大量扩增目的基因或 DNA 序列的技术。运用 PCR 仪(图 1-9)扩增目的基因的操作比较简单、容易掌握、结果可靠,能在较短的时间里将目的基因扩增百万倍以上。美国科学家穆里斯 (K. B. Mullis) 因发明 PCR 技术于 1993 年获得诺贝尔化学奖。

通过化学方法直接人工合成目的基因

对于比较小的目的基因,在弄清脱氧核苷酸序列后,通过 DNA 合成仪直接人工合成。



图 1-9 一种 PCR 仪

根据 DNA 分子半保留复制原理,PCR 技术能将一个基因不断地加以复制,使其数量呈现指数式增加。在 PCR 中,DNA 聚合酶不能从头开始合成 DNA,只能从 3'端延伸 DNA 链,因此,DNA 复制需要引物。引物是一小段 DNA 或 RNA,它能与模板 DNA 的一段碱基序列互补配对。用于 PCR 的引物

长度一般为 20~30 个核苷酸。

当引物与双链 DNA 解旋后形成的单链按照碱基互补配对原则结合后,DNA 聚合酶就能从引物的 3'端开始延伸 DNA 链,DNA 的合成方向总是从子链的 5'端向 3'端延伸。

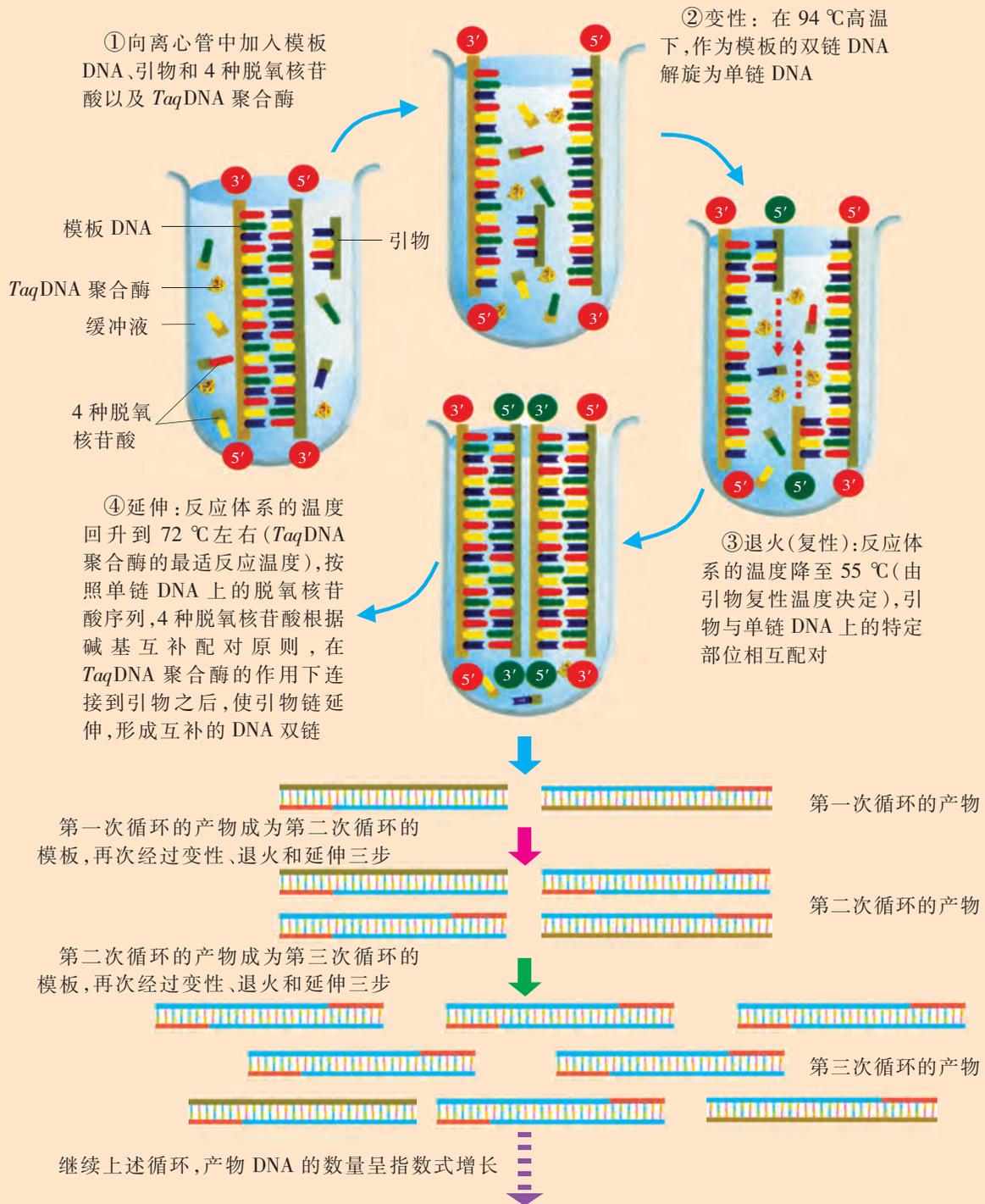


图 I 多聚酶链式反应程序示意图

2. 构建基因表达载体

将外源基因导入受体细胞并使之有效表达，需要先构建基因表达载体，它是实施基因工程的核心步骤，其操作过程是将目的基因与质粒、 λ 噬菌体或一些动植物病毒等在体外进行重组。

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，一个基因表达载体除了目的基因外，还应包括启动子、终止子和标记基因等(图 1-10)。

启动子是位于目的基因上游的一段核苷酸序列，是 RNA 聚合酶识别、结合的部位。它与 RNA 聚合酶的结合就像“开关”一样，驱动基因的转录活动，并引发相应的 mRNA 合成。

终止子是一段特殊的 DNA 片段，是载体上终止目的基因转录的核苷酸序列。

标记基因的作用是为了鉴别受体细胞中是否含有目的基因，以便筛选出含有目的基因的细胞。标记基因主要是抗性基因、某些生化表型基因。例如，抗生素抗性基因就可以作为一种标记基因。

由于受体细胞有可能是动物细胞、植物细胞或微生物细胞，并且目的基因导入受体细胞的方法也不一定相同，因此，构建的基因表达载体会不完全相同。

3. 导入目的基因

将基因表达载体导入受体细胞是实施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

目前，农杆菌转化法是最常用的将目的基因导入植物细胞的方法之一。农杆菌是一种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的酚类化合物，吸引农杆菌向伤口处移动。农杆菌中 Ti 质粒上可转移的 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入到 Ti 质粒的 T-DNA 上，利用农杆菌的转化作用，将其插入植物细胞染色体的 DNA 上，使目的基因的遗传特性得到稳定的维持和表达。

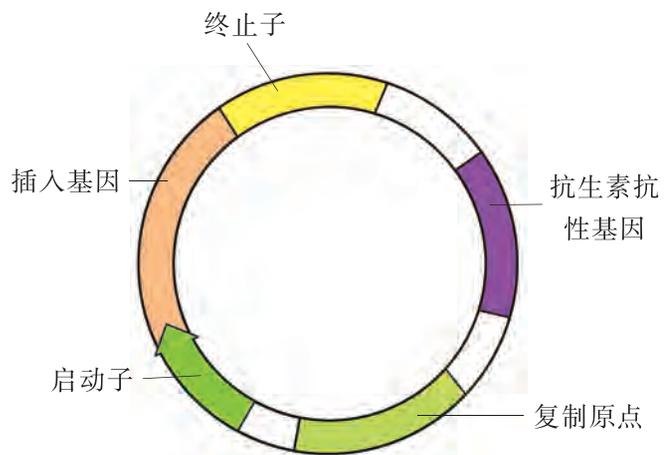


图 1-10 基因表达载体模式图

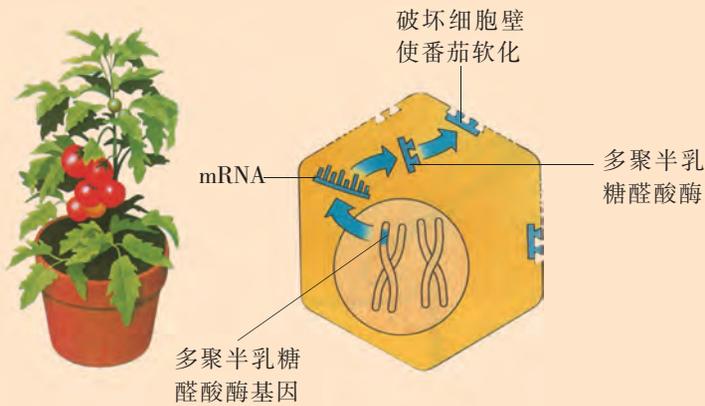


图 1-11 普通番茄及其软化机理

事实：

番茄营养丰富,是人们喜爱的一种果蔬。普通番茄细胞中含有多聚半乳糖醛酸酶基因,控制细胞产生多聚半乳糖醛酸酶,该酶能破坏细胞壁,使番茄软化,不耐贮藏(图 1-11)。科学家通过基因工程将一种抗多聚半乳糖醛酸酶基因导入番茄细胞中,从而获得了抗软化番茄。这种番茄保鲜时间长,利于番茄的储存和运输(图 1-12)。

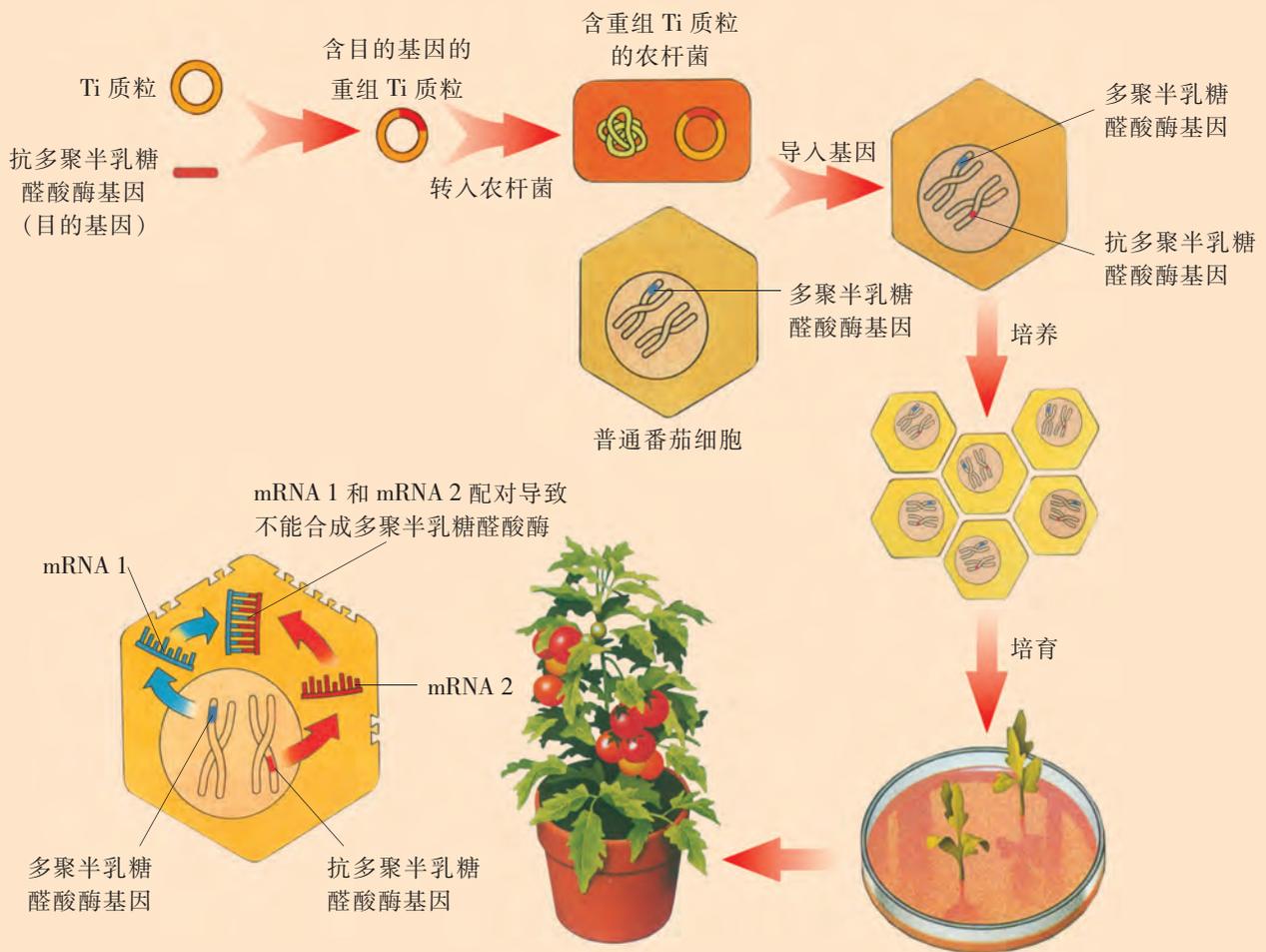


图 1-12 抗软化番茄的培育和抗软化机理示意图

分析：

以大肠杆菌为受体,以人生长激素基因为目的基因,设计并绘图表示通过基因工程生产人生长激素的过程。

此外,还有一些方法也可以将目的基因导入植物细胞。

将目的基因导入动物细胞的方法

显微注射法是将目的基因导入动物细胞的常用方法(图1-13)。一般要先准确掌握母畜的性周期,再加以人工调节,使母畜在预先确定的时间排卵,以保证获得大量的刚刚受精的卵;然后用手术或非手术的方法收集卵,经短暂的离心处理后,放在显微镜下用口径 $1\ \mu\text{m}$ 的玻璃微管向细胞核注射500~600个拷贝的目的基因;最后把这些单细胞胚胎移植到另外一头处于相同性周期的母畜的体内。经过这样处理后,在后代中就会出现1%~3%的转基因动物。效率虽然不高,但结果相当稳定。全世界已在各种动物身上进行了大量的实验,生产出多种转基因动物。

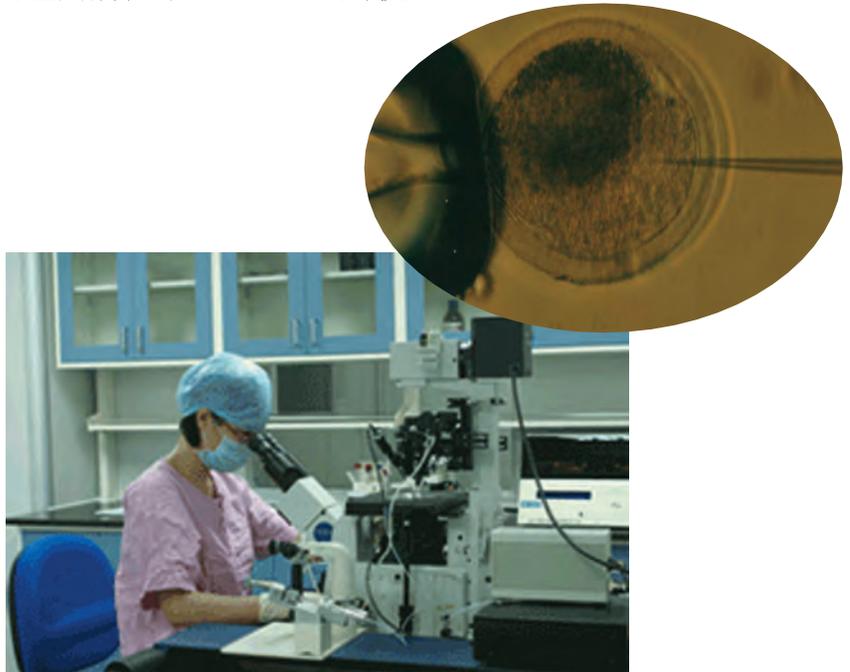


图1-13 显微注射DNA

将目的基因导入微生物细胞的方法

科学家通过实验发现,经过适当处理后,细胞膜对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。例如,大肠杆菌经过 Ca^{2+} 处理,就成为容易受质粒DNA转化的细胞。以大肠杆菌等原核生物为受体细胞的转化过程,一般先用 Ca^{2+} 处理,使其成为一种能够吸收周围环境中DNA分子的感受态细胞,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,在温度适宜的条件下感受态细胞吸收DNA分子,完成转化过程。

4. 检测和鉴定目的基因

在基因表达载体导入受体细胞的过程中,由于操作失误和不可预测的干扰等,并不是所有受体细胞都能按照预先设计的方案获得基因表达载体的,真正获得目的基因并能有效表达的只是其中的一部分。如何筛选出这一部分细胞呢?

首先,应该从DNA水平检测。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和用放射性同位素标记的已知DNA片段(又称为基因探针)。若待测DNA

中有能与探针互补的特异性 DNA 片段,用于示踪的放射性同位素标记会指示出其所在的位置,表明目的基因已插入转基因生物染色体的 DNA 中(图 1-14)。

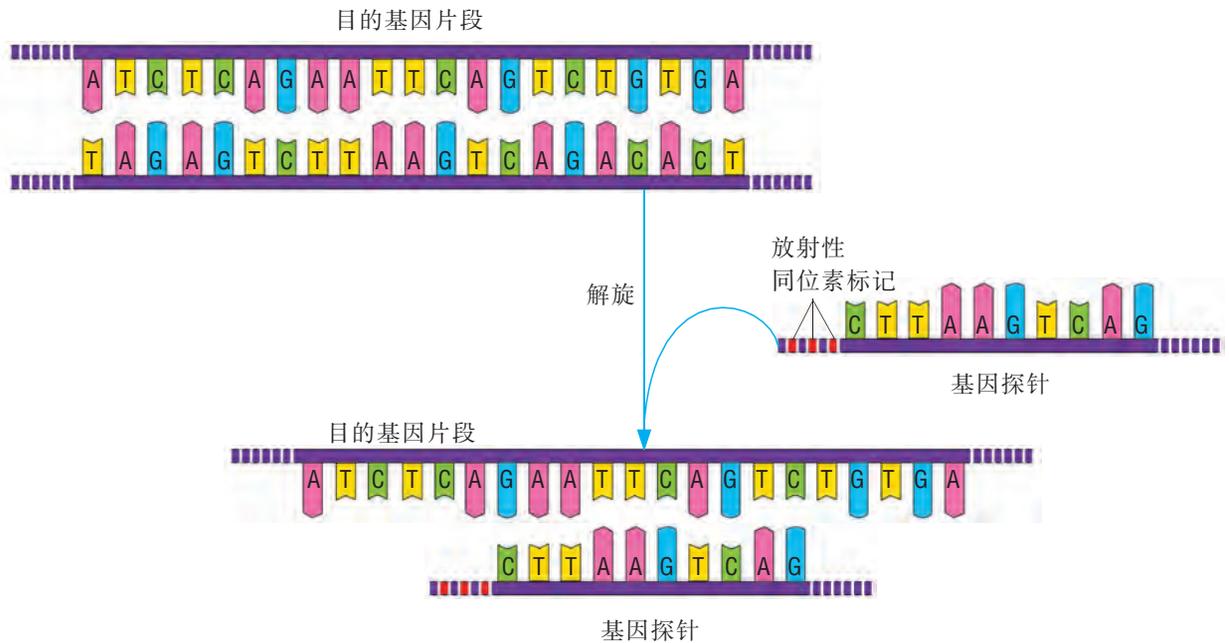


图 1-14 目的基因的检测示意图

其次,还应该从 RNA 水平检测重组体,主要是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。例如,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了相应的 mRNA 分子。

最后,应该从蛋白质水平进行检测。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其生物学特定性状进行检测。例如,对于导入某种鱼的抗冻蛋白基因的转基因番茄,需要先通过栽培获得果实后,再与天然产品比较,确定其是否具有了抗冻性状。

经过几十年来无数科学家的努力,基因工程已经发展成为一项比较成熟的技术。基因重组的受体细胞已经从开始时的大肠杆菌推广到枯草杆菌、酵母菌、霉菌、植物细胞、昆虫细胞、哺乳动物细胞;外源基因不但能够整合到质粒中,而且能整合到细胞的染色体上。

一、单项选择题

1. 下列关于限制性核酸内切酶的叙述中,错误的是 ()

- A. 它能在特殊位点切割 DNA 分子
- B. 同一种限制酶切割不同的 DNA,产生的黏性末端能够很好地进行碱基配对
- C. 它能任意切割 DNA 分子,产生大量的 DNA 片段
- D. 每一种限制性核酸内切酶只能识别特定的核苷酸序列

2. 最早完成体外 DNA 重组的科学家是 ()

- A. 伯格
- B. 帕米特
- C. 科恩
- D. 博耶

3. 下列关于基因工程的叙述中,错误的是 ()

- A. 体外重组 DNA 需要适宜的条件
- B. 基因工程又叫做重组 DNA 技术
- C. 基因工程是现代生物技术的核心
- D. 基因工程的受体细胞必须是大肠杆菌等原核生物

4. 基因工程的主要技术环节依次为 ()

- ① 导入目的基因
- ② 构建基因表达载体

③ 目的基因的检测与表达

④ 获得目的基因

- A. ①②③④
- B. ④②③①
- C. ④②①③
- D. ③②④①

5. 下列关于培育抗软化番茄的叙述中,错误的是 ()

- A. 运载工具是质粒
- B. 受体细胞是番茄细胞
- C. 目的基因为多聚半乳糖醛酸酶基因
- D. 目的基因的表达延缓了细胞的软化

6. 下列有关构建基因表达载体的叙述中,错误的是 ()

- A. 将外源基因导入受体细胞,需要先构建基因表达载体
- B. 基因表达载体能使目的基因进入受体细胞且能有效表达
- C. 进入受体细胞的基因表达载体一般能稳定存在,但不能遗传给后代
- D. 一个基因表达载体除了目的基因外,还应包括启动子、终止子和标记基因等

7. 下列属于检测和鉴定目的基因的方法是 ()

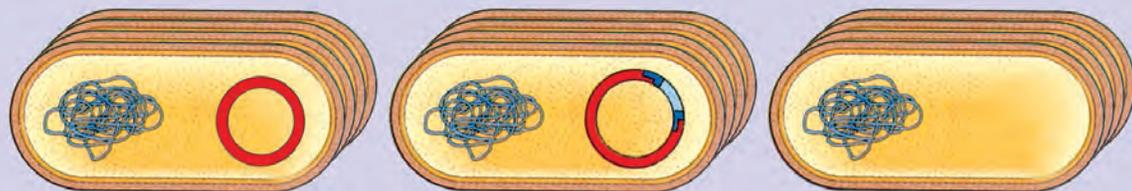
- A. 显微注射法
- B. PCR 技术
- C. 农杆菌转化法
- D. 核酸杂交法

二、技能增进题

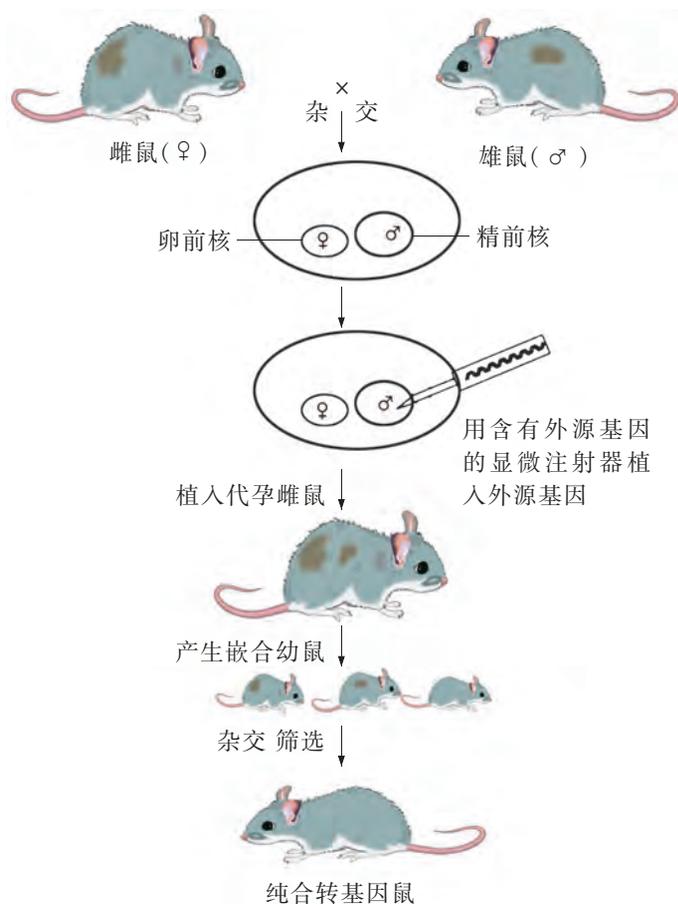
分析证据 客观地分析实验中得到的证据,思考它们能说明什么问题,是科学探究的重要技能之一。

从供体细胞中获取目的基因,与大肠杆菌细胞中的质粒重组,构建成为基因表达载

体,导入去除质粒的大肠杆菌细胞,经培养后发现,有的大肠杆菌克隆含重组质粒,有的含非重组质粒,还有的不含质粒。分析这一证据,你知道其中的原因吗?



显微注射法是目前应用比较广泛、效果比较稳定的培育转基因动物的方法之一。



以转基因鼠为例,首先选择三只鼠,一只雌鼠提供卵细胞,一只雄鼠提供精子,第三只鼠为雌鼠,作为代孕母鼠。给第一只雌鼠注射一种绒毛膜促性腺激素,促使它大量排卵。然后使其与雄鼠交配,从交配完成后的雌鼠输卵管中取出受精卵。精子进入卵细胞后的1h内,精前核和卵前核一般是分开的,等到卵细胞完成减数分裂,卵前核和精前核才进行核配。显微注射就是选择这个时期来完成的。由于精前核比卵前核大一些,容易在显微镜下观察到,于是在对受精卵进行固定的情况下,利用显微注射针可以把外源DNA注射到精前核中。

注射完成之后,通过显微移植手术将受精卵移植到第三只代孕雌鼠的子宫内,受精卵逐步发育为幼鼠。当然,这些幼鼠还必须经过DNA检测,以确认是否转入外源DNA,再通过一系列杂交、筛选,最后获得纯合转基因鼠。





第二节 关注基因工程

基因工程使我们在基因水平上改造生物的遗传特性、创造具有新性状的生物体成为可能。以转基因大豆为原料加工的食用油、治疗糖尿病的胰岛素、导入毒蛋白基因的转基因抗虫棉……众多基因工程产品已明显影响着我们的生活。

基因工程的应用

由于基因工程是从遗传物质基础上对原有生物进行改造,经过改造的生物就会获得某些新的遗传性状。这些生物可能是微生物,也可能是植物或动物,所以基因工程涉及许多生产行业。例如,将一个编码合成抗虫蛋白的基因转移到棉花、水稻等农作物中,这些转基因作物就具有了抗虫能力,基因工程就被应用到了农业领域;将一个编码合成抗虫蛋白的基因转移到杨树、松树等林木中,这些转基因林木也具有了抗虫能力,基因工程就被应用到了林业领域;将编码合成一些激素的基因转移到鲫鱼、牛等动物中,这些转基因动物就具有了相应的新性状,基因工程就被应用到了渔业和畜牧业领域;如果利用转基因的微生物或动物细胞来生产多肽类药物,那么基因工程又被应用到了医学领域……总之,基因工程的应用非常广泛。

植物基因工程已经获得了迅猛发展

植物基因工程在农业生产中已经得到广泛的应用。从1996年开始全世界转基因作物的种植面积大幅增长。据国际农业生物技术应用服务组织发布的年度报告,2012年全球转基因作物种植面积约 1.7×10^8 hm²。按照种植面积统计,全球约81%的大豆、35%的玉米、30%的油菜和81%的棉是转基因产品。报告显示,2012年转基因作物种植面积排在前5位的国家分别是美国、巴西、阿根廷、加拿大、印度。我国种植面积约 4.0×10^6 hm²,居世界第6位,其中绝大部分是转基因抗虫棉(图1-15)。

植物基因工程不仅用于提高农作物的抗除草剂、抗虫、抗

学习目标

- 举例说出基因工程的应用
- 关注转基因生物的安全性问题
- 举例说出生物武器的危害

关键词

转基因生物



图 1-15 通过国家审定并获得转基因生物生产应用安全证书的转基因抗虫棉

病和抗盐碱能力等方面，还用于改善农作物的品质和利用植物生产药物等方面。

抗病转基因植物

许多病原微生物会引起植物患病，这些微生物包括病毒、细菌和真菌。植物病害会使农业生产蒙受巨大损失，有人统计发现农作物产量损失的 1/3 可归因于病害。例如，土豆既是蔬菜，也是粮食。它含有人体必需的 8 种氨基酸和多种维生素。资料显示，19 世纪中叶，由于一种晚疫病（由致病霉菌引起）导致马铃薯茎、叶枯死（图 1-16）和块茎腐烂，欧洲爱尔兰有 100 万人曾因马铃薯产量减半而遭受饥饿。



叶片受害症状



块茎受害症状

图 1-16 马铃薯晚疫病症状

利用基因工程技术，可将一些抗病基因，如病毒的复制酶基因、几丁质酶基因、抗毒素合成基因等导入小麦、甜椒或番茄等作物，获得抗病毒小麦、甜椒或番茄等新品种。

抗虫转基因植物

与植物的病害一样，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已经获得相对丰硕的成果。目前，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 毒蛋白的基因导入植物，包括水稻、玉米、大豆、马铃薯、棉、烟



抗虫棉叶



非抗虫棉叶

图 1-17 转基因抗虫棉有抗虫作用

草、番茄、苹果、核桃、杨树、菊花等。其中,抗虫棉的发展特别迅速。转基因抗虫棉具有抗棉铃虫的作用(图 1-17)。

科学家也已经成功培育出含有编码蛋白酶抑制剂基因、淀粉酶抑制剂基因或植物凝集素基因的转基因抗虫植物。

知识海洋

可用于转基因植物的抗虫、抗病基因

Bt 毒蛋白基因主要是指从苏云金芽孢杆菌中分离出来的抗虫基因。由于该基因编码合成的蛋白质对目标昆虫(如二化螟、三化螟、大螟、稻纵卷叶螟、稻青虫等)特异性强,对人畜安全,现已成为世界上研究最深入、应用最广泛的抗虫基因。目标昆虫取食后,在昆虫肠道的碱性环境中会被降解为具有毒性的活性肽,并与昆虫肠道上皮细胞上的特异性受体相结合,引发细胞膜穿孔,破坏细胞渗透压平衡而使细胞肿胀裂解,最终导致昆虫停止取食而死亡。

蛋白酶抑制剂基因编码合成的蛋白酶抑制剂是对蛋白水解酶有抑制活性的一种蛋白质,普遍存在于植物、动物和微生物中。当蛋白酶抑制剂被昆虫摄食并在体内积累时,它就会抑制昆虫肠道内蛋白水解酶的活性,使昆虫不能正

常消化食物中的蛋白质,并能刺激消化酶的过量合成和分泌,引起害虫的厌食反应。

植物凝集素基因控制植物合成一种糖蛋白(植物凝集素)。植物一旦被害虫摄食,植物凝集素便会在昆虫的消化道内被释放出来,并与肠道黏膜上的某种物质相结合,影响昆虫营养物质的正常吸收和利用。同时,还可能在昆虫的消化道内促进细菌的增殖,对害虫造成损伤。

淀粉酶抑制剂基因编码合成的淀粉酶抑制剂,能抑制昆虫消化道中的淀粉酶活性,使昆虫无法消化所摄取的淀粉并获得生命活动所需的能量。

溶菌酶基因编码合成的溶菌酶具有溶解细菌的作用,目前科学家已经将鸡的溶菌酶基因转入烟草,发现对烟草软腐病具有一定的抗性。

抗逆转基因植物

正如人的一生不会永远一帆风顺一样,植物也不可能一直生活在适宜的环境中,几乎所有的植物在它们的生活过程中都要遇到这样或那样的逆境,包括冻害、盐碱、干旱、水涝等不利的环境条件。这些不利的环境条件都会对农业生产产生不利影响。

在南、北极海洋中,鱼类生活的环境温度常常达到 $-30\sim-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,但是这些鱼类却没有被冻死,是什么原因呢?原来在它们的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,从而避免鱼因体液冻结而死亡。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将这些鱼类编码合成抗冻蛋白的基因转入到植物中去呢?目前,科学家已经成功培育出了抗冻转基因番茄,这类番茄由于具有抗冻性状,保鲜期和贮藏期都大为延长。

盐碱和干旱会因为影响细胞的渗透压而危害作物,科学家成功地利用一些可以调节细胞渗透压的基因来提高作物(如烟草)的抗盐碱和抗干旱的能力。

科学家也成功地将抗除草剂基因导入作物(如大豆、玉米),当我们喷洒除草剂杀死农田中的杂草时,这些具有抗除草剂性能的作物就能安然无恙地独享农田里的营养而茁壮成长。

动物基因工程显示出诱人的应用前景

自 1982 年,帕米特等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,世界各国科学家对转基因技术应用于动物生产的研究产生了极大的兴趣。但由于动物不像植物那样容易通过体细胞培养再生为新的个体,所以对动物基因工程的研究程度远不如对植物基因工程那样深入。近年来,动物基因工程已经是生命科学中最受关注、发展最快的技术之一,动物生产正经历着一场新的革命。动物基因工程在改善畜产品品质、提高动物生长速度、利用转基因动物生产药物、利用转基因动物作器官移植供体等方面,显示出诱人的应用前景。

改善畜产品品质

动物基因工程的重要价值之一是改善畜产品的品质。例如,有些人饮用牛奶后不能完全消化其中的乳糖,会引起乳糖过敏或消化不良。但当科学家将编码乳糖酶的基因导入奶牛基因组后,获得的转基因牛生产出来的牛奶中乳糖的含量就大大降低。

提高动物生长速度

动物基因工程的重要价值也突出地体现在提高动物的生长速度方面。例如,导入外源生长激素基因获得的转基因绵羊,其生长速度明显提高;导入外源生长激素基因获得的转基因鲑鱼,在同样的生长周期中,体重明显大于野生鲑鱼(图 1-18)。



图 1-18 提高动物生长速度

生产药物

目前世界范围内基因工程研究的热点之一是利用转基因动物生产药物。因为这些转基因动物就像一座座生产药物的反应器,所以也把这些转基因动物称为新型生物反应器。培育这类转基因动物一般先要将药用蛋白基因与乳腺蛋白基因的启动子等重组起来,导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，它们分泌的乳汁就成为生产所需药物的原料。例如，科学家将编码合成人抗凝血酶Ⅲ的基因导入山羊乳腺细胞内，培育出能产生人抗凝血酶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表达出血清白蛋白、 α -抗胰蛋白酶、溶菌酶等药物(图 1-19)。此外，科学家也在开展用转基因动物作器官移植供体的研究。



图 1-19 乳腺生物反应器表达示意图

利用基因工程技术导入外源基因培育出的、能够将新性状稳定地遗传给后代的生物称为**转基因生物**(transgenic organism)。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、渔和环保等产业中的应用前景十分广阔。

基因工程和人类健康关系密切

基因工程和人类健康的关系十分密切,突出表现在基因工程药物、基因诊断和基因治疗等方面。

基因工程药物

早在 20 世纪 80 年代初,重组人胰岛素基因工程药物就已经开始投放市场。此后,抗体、疫苗、激素等多种基因工程药物研制成功,被用于肿瘤、心血管病、传染病、糖尿病、类风湿等疾病的预防和治疗。2017 年,由我国独立研发、具有完全自主知识产权的创新性产品“重组埃博拉病毒病疫苗”研制成功并被批准上市,为我国在全球性公共卫生事件爆发时能够有效控制疫情提供了有力的手段。

基因诊断

生物技术的发展影响着人们的生活,我们发现医院里的一些检查结果出来得越来越迅速。这要归功于基因诊断技术的出现。基因诊断又称为 DNA 诊断,是采用基因检测的方法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)或携带病原体(如乙型肝炎病毒)等。

1992年,美国一家公司研制出了世界上第一张基因芯片。它是一种微型的生物化学分析系统,是通过微电子等技术,将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段(也称为探针)有规律地排列并固定/support物上;其工作原理是芯片上的探针与被测

基因片段按照碱基互补配对原则先进行杂交,再通过检测系统等对芯片进行扫描,最后计算机系统对探针上的荧光信号作出比较,从而迅速得出相关信息(图 II)。

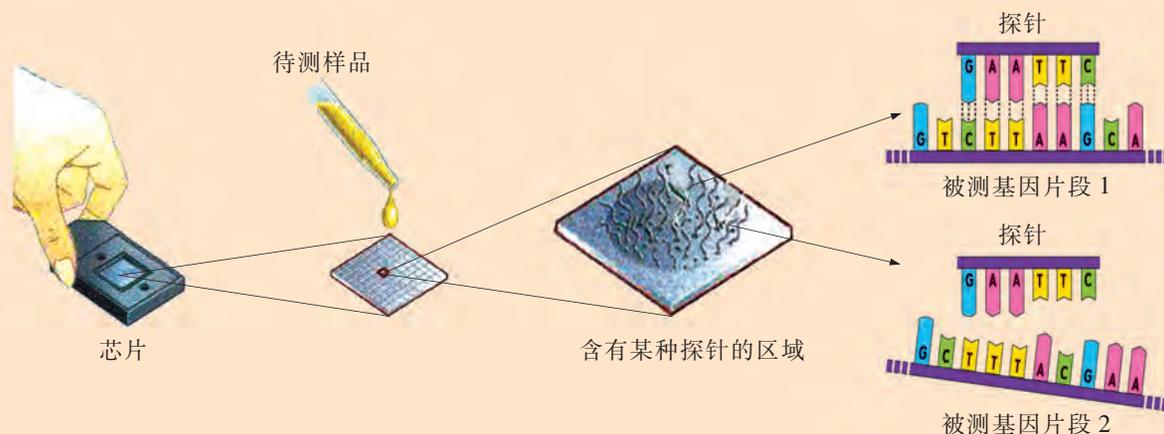


图 II 基因芯片工作原理示意图

随着生物技术的进一步发展,又出现了蛋白质芯片(用蛋白质作为探针)、细胞芯片(用细胞作为探针)和组织芯片(用组织作为探针)等,这些芯片统称为生物芯片。

生物芯片在科学研究上具有重要的作用(如用于基因测序),在实际生活中也具有重要的应用价值。目前,生物芯片主要应用于以下几个方面:

疾病诊断 例如,利用结肠癌生物芯片、胃癌生物芯片等,可以对患者是否患有结肠癌、胃癌等进行早期诊断。

药物筛选 例如,利用生物芯片检验不同的候选药物对肝脏细胞的影响,以确定候选药物是

否有毒性。

食品检测 例如,利用生物芯片检测饮用水是否被病原微生物感染。

环境监测 例如,利用生物芯片快速检测污染微生物或有机化合物对环境的污染程度,通过筛选来寻求保护基因,获得治理污染源的基因产品。

司法鉴定 例如,应用生物芯片技术对犯罪现场的头发、唾液、血液等进行分析,通过 DNA 指纹的对比,可准确快速地确定嫌疑犯。

海关检疫 例如,可利用生物芯片在最短的时间内对报关物品进行快速检测,以确定是否含有我国法律规定禁止进出口的一些生物物种。

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,其基本步骤包括目的基因的转移(如将目的基因重组到病毒基因组中,用重组病毒感染受体细胞并整合到受体基因组内,也可用其他方法如显微注射法);目的基因的表达(使整合在受体基因组中的新基因高效表达);安全措施的实施(必须使新基因在受体细胞表达后不危害细胞和人体自身)。基因治疗在临床治疗中已经得到了一定的应用。例如,1990年,美国国立卫生研究院用腺苷脱氨酶基因治愈了一位患有重度复合型免疫缺陷症的女孩。

事实:

1. 腺苷酸脱氨酶(ADA)基因缺陷症是一种罕见的遗传性免疫缺陷疾病,这种病是由于缺少 ADA 而引起的。ADA 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。这种病只发生在 ADA 基因都存在缺陷的夫妻所生的孩子身上。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 ADA 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1-20)。这次基因治疗的成功标志了基因治疗临床应用阶段的开始。一年之后,又在另一名9岁儿童身上进行了同样的临床试验,也取得了较好的治疗效果。

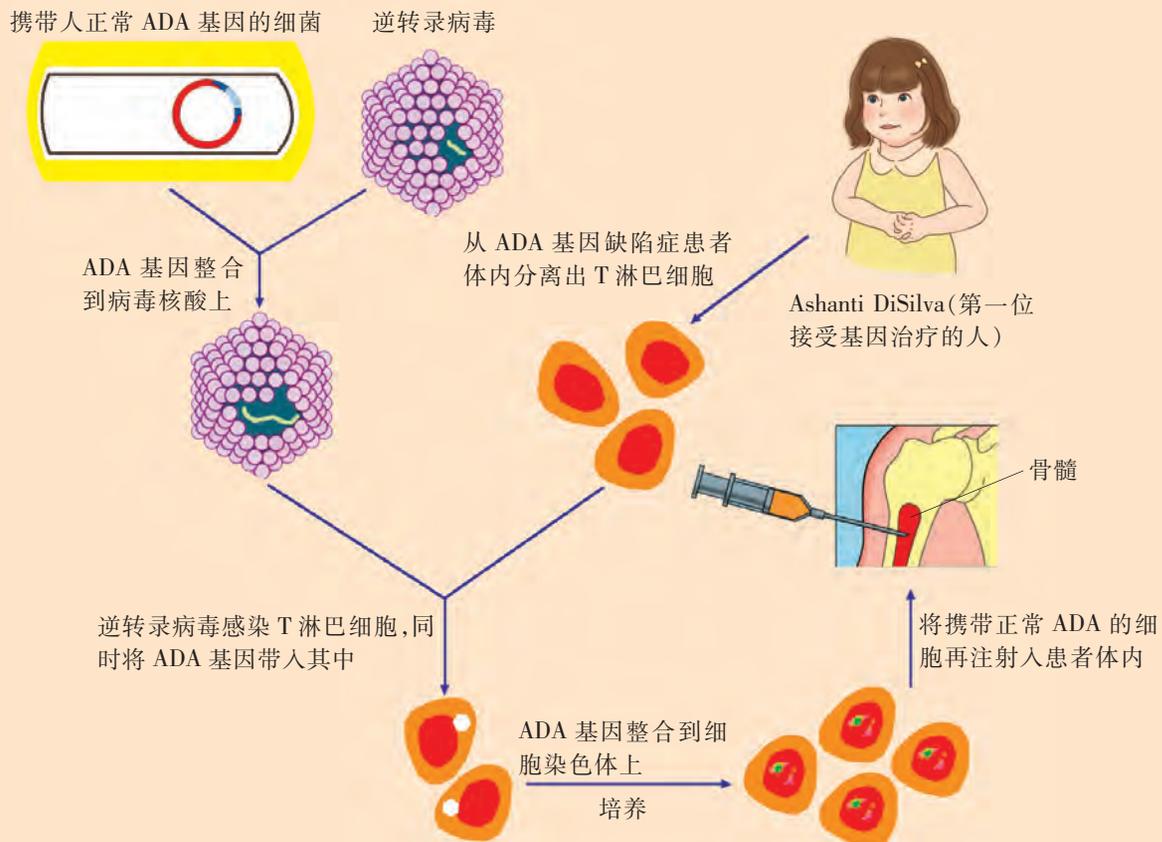


图 1-20 ADA 基因缺陷症基因治疗示意图

讨论:

1. ADA 缺乏症的病因是什么?
2. 基因治疗 ADA 基因缺陷症的过程包括哪些主要步骤?

目前,利用基因治疗的方法治疗肿瘤是科学研究中的最大热点。科学家们发现基因治疗可以通过多种机制达到抗肿瘤的效果。我国的基因治疗走在世界前列,生产的基因治疗药物对肺癌、头颈肿瘤、口腔鳞状上皮癌等多种恶性肿瘤均有较好的疗效。

转基因生物的安全性问题

转基因生物问世的时间虽然不长,但其发展极其迅猛。20世纪80年代后,我国开始了植物基因工程的研究与开发,至2012年,我国转基因植物的栽培面积就达到 $4.0 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 。随着转基因生物种类的不断增多,人们开始关注转基因生物的安全性问题。

课题研究

转基因植物的安全性问题

研究目的:认识转基因植物可能存在的安全性问题。

研究指导:

1. 问题与假设:小组交流有关转基因植物的资料。尝试提出一个感兴趣的有关转基因植物安全性的问题。针对问题,作出假设。

建议考虑:抗除草剂转基因植物的抗性基因会不会漂移到杂草上,从而导致抗药性杂草的产生?以转基因大豆为原料生产的食用油(图1-21)是否应该加贴标签?



图 1-21 利用转基因大豆生产的食用油

2. 设计与实验:采用调查的方法,收集各种资料和证据。

3. 交流与合作:小组内交流调查方案,分工合作,完成所有调查任务。

4. 结论与反思:分析和评价收集到的资料和证据,得出结论。积极地和其他小组交流,若观点不同,尝试开展讨论。

深入研究:

长期食用某种转基因食品会导致某种“毒素”在人体内积累吗?

对于转基因生物及其产品,我们应该科学地认识、评估和利用,应保障公众对所购食品是否来源于转基因生物拥有知情权。专家呼吁应在转基因食品上加上特殊标识以尊重消费者的选择权利。

在转基因植物的安全性方面,除了要考虑转基因植物的食用安全问题外,还需要考虑其对生态系统的影响。例如,转基因植物的扩散对生物多样性有无影响;导入的目的基因是否会扩散漂移到其他物种体内而导致自然界的混乱;若大面积种植转基因植物,其残体分解物、根分泌物是否会对生态与环境造成大规模的负面效应等。转基因动物也存在着一定的安全性问题,如转基因动物对人体健康的影响、对生态系统的影响等。

到目前为止,真正用于商业生产的转基因生物的种类还是有限的,但是新的转基因生物的培育却在迅猛地发展着。由于转基因生物安全性问题涉及人类社会的科学、健康、经济 and 伦理等各个方面,因此许多国家已建立相应的评估及预警机制,更加理性地利用转基因生物。

生物武器的危害性

许多细菌如霍乱弧菌和炭疽杆菌,病毒如埃博拉病毒和天花病毒等微生物(图 1-22)具有强大的感染性和致病力。

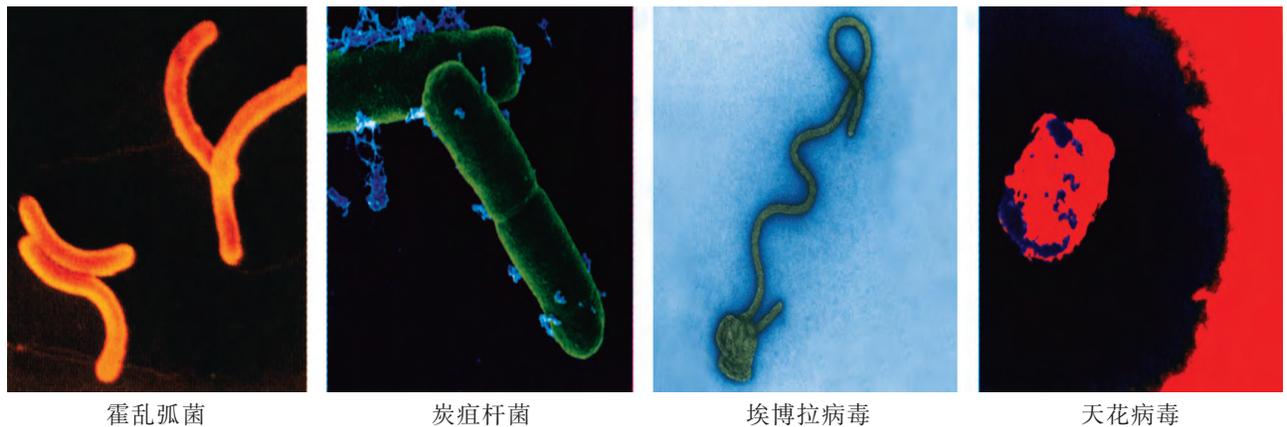


图 1-22 几种致病微生物

当这些致病微生物被用作生物武器时,具有极大的危险性(表 1-1)。例如,埃博拉病毒可在 7 天内使 90% 的感染者死亡。

表 1-1 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,可能致命	疫苗和抗生素可防治
肉毒杆菌	产生的毒素毒性强,能导致中毒而死亡	抗毒素有时能阻止病情发展
鼠疫耶尔森氏杆菌	引起淋巴腺鼠疫(黑死病),死亡率达 90%	疫苗和抗生素可防治
埃博拉病毒	极易传染,致死率很高	至今尚无治疗方法

利用转基因技术,在一些不致病的微生物体内插入致病基因,或在一些致病的细菌或病毒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,可用青霉素等治疗。但若在炭疽杆菌中导入一种内酰胺酶基因,就能降解青霉素,使青霉素失去杀菌作用。这种转基因炭疽杆菌被用作生物武器之后就很难应对。

人类基因组计划的完成也为生物武器的研制创造了条件。例如,对不同种群的基因组成特性的阐明,就有可能被用于研制针对某一特定种群的生物武器。现已发现不同种族人

群对 HIV 的易感性有一定的差别。因此,针对某一种族人群基因组成特征制造的生物武器,便可以杀伤特定的预设对象。

科学技术是一把“双刃剑”,生物科学技术也不例外,它既可能在许多方面造福人类,也可能危害人类。国际刑警组织第一届全球预防生物恐怖会议的召开,显示了世界各国齐心协力用法律和道德规范管好这把“双刃剑”的决心。我们相信生物科学将会朝着真正造福于人类的方向健康发展。

国际刑警组织成立于 1923 年,最初名称为国际刑警委员会。1956 年,该组织更名为国际刑事警察组织,简称国际刑警组织。我国于 1984 年加入该组织,同年组建国际刑警组织中国国家中心局。1995 年,国际刑警组织第 64 届大会在北京成功召开。

由国际刑警组织发起的第一届预防生物恐怖的国际刑警全球会议,于 2005 年 3 月 2 日在法国里昂闭幕。代表们达成共识,要加强各国执法机关、卫生部门等机构之间的全球合作,以共同面对生物恐怖活动的威胁。

谈到生物恐怖袭击,人们不免要回想起 2001 年“9·11”事件后在美国引发巨大恐慌的炭疽病菌信件风波。

炭疽病菌、天花病毒等都有可能被恐怖分子用来制造袭击事件。国际刑警组织的负责人表示,恐怖分子利用生物或化学制品在



图 1-23 警察在检查化学制品

地区、国家,甚至世界范围内制造大规模杀伤性的恐怖袭击的威胁是现实存在的,执法机构在严格执法(图 1-23)时,要与生命科学领域的专家以及科学界的其他专家密切配合、加强沟通,在全球范围内共同防范和面对恐怖分子利用生化武器制造恶性事件的威胁(图 1-24)。

全球刑警合作 共防生物袭击

——国际刑警组织第一届全球预防生物恐怖会议闭幕

本报记者 毛文波

由国际刑警组织发起的第一届预防生物恐怖国际刑警全球会议,2 日在法国里昂正式闭幕。根据国际刑警组织公布的材料,来自全球 155 个国家的 500 多名代表出席了此次大会。代表们通过两天的讨论达成共识,要切实加强各国执法机关、卫生部门等机构之间的全球合作,以共同面对生物恐怖活动的威胁,重点在于建立一个全球执法机构的情报信息中心,加强各世界性组织之间的合作,制定面对生物恐怖危机时的防范机制和程序,建立对专业人员的培训计划,强化执法机关和各相关部门更有效搜集、共享关于生物恐怖威胁的情报信息的方法手段。

谈到生物恐怖袭击,人们不免要回想起 1995 年 3 月日本东京地铁站的沙林毒气事件以及 2001 年“9·11”事件后在美国引发巨大恐慌的炭疽病菌信件风波。根据有关部门分析,类似沙林毒气、炭疽病毒、天花等都有可能被恐怖分子用来制造袭击事件。国际刑警组织的秘书长罗纳德·K·诺贝表示,恐怖分子利用生物或是化学制品在国家、地区、世界范围内制造大规模杀伤性的恐怖袭击的威胁是现实存在的。国际刑警组织主席塞基·塞蒙指出,

执法机构要与生命科学领域的专家以及科学界密切配合与沟通,在全球规模共同防范和面对恐怖分子利用生化武器制造恶性事件的威胁。

据介绍,此次全球会议是国际刑警组织的一个为期两年的全球项目的组成部分,在 2005 年秋季和 2006 年的春、夏两季,国际刑警组织按计划还将分别先后在非洲、亚洲和美洲召开一系列的工作会议。

国际刑警组织成立于 1923 年,最初名为国际刑警委员会,总部设在奥地利首都维也纳。二战期间,该组织迁到德国首都柏林,一度受纳粹组织控制。二战后,该组织恢复正常运转,总部迁到法国巴黎。1956 年,该组织更名为国际刑事警察组织,简称国际刑警组织。1989 年,该组织总部迁到法国里昂。

国际刑警组织机构包括全体大会、执行委员会、秘书处和国家中心局。全体大会为其最高权力机关,由各成员国代表团组成;执行委员会由大会选出的 13 个成员国的代表组成,负责监督大会决议的执行情况,准备大会的工作日程,监督秘书长的管理情况等;秘书处由秘书长和该组织的技术、行政人员组成,负责执行大会和执委会的决议,编辑各种刊物,通缉作案逃犯等;国家中心局是该组织在各国的常设机构,主要负责各国警方同国际刑警组织各成员国之间的合作。截至目前,国际刑警组织共有 181 个成员国。中国于 1984 年加入国际刑警组织,同年组建国际刑警组织中国国家中心局。1995 年,国际刑警组织第 64 届大会在北京成功举行。

国际刑警组织总部建有一个存有 150 余万国际刑事犯罪材料的资料档案库和实验室,用以鉴定货币及其他有价证券真假的实验室。它传递的国际通知分别以红、绿、蓝、黑四色标示轻重缓急和内容主题。国际刑警组织的电子邮件网络系统每年可处理 100 万封阿拉伯文、英文、法文和西班牙文的各种“通报”。

国际刑警组织的宗旨是保证和促进各成员国刑事警察部门在预防和打击刑事犯罪方面的合作。它的主要任务是汇集、审核国际犯罪资料,研究犯罪对策;负责同成员国之间的情报交换;搜集各种刑事犯罪案件及犯罪指控,照片,档案;通报重要案犯线索,通缉追捕重要罪犯和引渡重要罪犯;编写有关刑事犯罪方面的资料等。

【本报巴黎 3 月 2 日电】

图 1-24 国际刑警组织第一届全球预防生物恐怖会议的报道

一、单项选择题

1. 转基因技术在植物品种改良方面应用广泛,其中一项基因工程内容是改造 CO₂ 固定酶。其目的是 ()

- A. 提高光合作用效率
- B. 延长果实的贮藏期
- C. 培育新作物品种
- D. 提高植物的抗性

2. 转基因植物是植物基因工程应用的重要方面,下列描述中正确的是 ()

- A. 全世界转基因作物的种植面积不再增长
- B. 目前的转基因植物只能提高抗虫、抗病能力
- C. 我国研发的抗虫棉在国内占有极少的种植市场
- D. 抗逆转基因植物包括抗冻害、抗盐碱、抗干旱等环境条件的植物

3. 转基因技术可用于改良动物品种,生产人类需要的药用蛋白。下列与生产药用蛋白目的相符合的是 ()

- A. 养殖转生长激素基因鲑鱼
- B. 养殖抗口蹄疫病毒转基因兔
- C. 养殖转乳糖酶基因牛
- D. 从牛乳汁中获得人血清白蛋白

4. 下列关于基因工程应用的叙述中,错

误的是 ()

- A. 改变植物的抗逆性
- B. 增加产品产量的重要途径
- C. 提高植物的光合作用效率
- D. 维持生态平衡的唯一途径

5. 下列各项有关生物技术的叙述中,正确的是 ()

- A. 生物武器虽然有危害,但是人类总是有办法对付它,因此没有必要担心
- B. 苏云金杆菌抗虫毒素蛋白基因所编码的蛋白质具有杀虫特性
- C. 基因诊断与基因治疗在发达国家已被广泛运用并取得了稳定的疗效
- D. 目前仅获得抗虫棉和抗虫水稻两种转基因抗虫农作物

6. 下列关于转基因生物安全性的叙述中,错误的是 ()

- A. 科学家应科学地认识、评估和利用转基因生物
- B. 社会公众在购买相关产品时享有知情权
- C. 转基因生物有可能被用于制造“生物武器”
- D. 转基因生物的研究和利用不会影响生态系统的稳定

二、技能增进题

调查 调查是对事物进行感性认识的方法,常通过访谈或问卷等方式获取相关信息。

第二次世界大战期间,侵华日军就曾大量培养鼠疫、霍乱、炭疽等能致人死亡的传染性病菌。此后,仍然有一些人在研制细菌武器或生化毒剂。例如,一些恐怖组织大量生产肉毒杆菌(见右图)毒素,该毒素可阻滞神经末梢释放乙酰胆碱(神经递质),从而引起肌肉麻痹,当人误食 0.01 mg 肉毒杆菌毒

素即能致死。尝试设计调查表,在社区调查公众对生物武器的知晓程度。运用调查法的关键之一是随机抽取调查样本,查阅资料确定简单的取样方法。



在餐桌上到底有多少转基因食品似乎一直是一个谜。一些人认为,我们的食品中很多都是转基因食品,如转基因番茄;另一些人则认为,在餐桌上除了用于烹饪食品的油以外,没有一种食品是转基因食品。2013年农业部先后批准进口部分国家的几种用作加工原料的转基因作物,并表明“我国至今没有批准任何一种转基因粮食作物种子进口到中国境内种植”。

我国已批准进口用作加工原料的转基因作物有哪些?可以在国内种植吗?

日期: 2013-04-27 15:30 作者: 来源: 农业部农业转基因生物安全管理办公室

目前,经国家农业转基因生物安全委员会评审,已先后批准了转基因棉花、转基因大豆、转基因玉米、转基因油菜4种作物的进口安全证书。除批准了转基因棉花的种植外,进口的转基因大豆、转基因玉米、转基因油菜用途仅限于加工原料。

我国法律规定,进口用作加工原料的农业转基因生物,不得改变用途,即不得在国内种植。我国至今没有批准任何一种转基因粮食作物种子进口到中国境内种植。

提出问题

阅读下面的访谈记录,访谈内容显示我国是严格按照法律法规审批转基因食品的。

**我国严格按照法律法规审批三个转基因大豆新品种
——访农业转基因生物安全委员会副主任委员彭于发**

日期: 2013-06-14 14:04 作者: 来源: 农业部新闻办公室

本网讯 日前,根据我国农业转基因生物安全委员会评审结果,农业部批准发放了巴斯夫农化有限公司申请的抗除草剂大豆CV127、孟山都远东有限公司申请的抗虫大豆MON87701和抗虫耐除草剂大豆MON87701×MON89788三个进口用作加工原料的农业转基因生物安全证书。这三个转基因大豆新品种是如何审批的?这次审批的三个转基因大豆的安全性有保障吗?这次审批了新的转基因大豆品种,会不会增加大豆进口量?记者采访了中国农业科学院植物保护研究所研究员、农业转基因生物安全委员会副主任委员彭于发。

记者:这三个转基因大豆新品种是如何审批的?

彭于发:我国对这三个转基因大豆新品种的安全评审是非常慎重的,是严格按照我国法律法规进行的,从最初递交申请到获得进口用作加工原料安全证书,历时三年左右的时间,这也从一个侧面印证了我国的审慎态度。

如抗除草剂大豆CV127,是2010年3月向农业部提交申请,组织开展了真实性、食用安全、环境安全的相关验证试验。2012年5月在完成上述试验后,递交了安全证书申请,经农业转基因生物安全委员会评审,农业部于2013年6月13日批准发放了进口用作加工原料农业转基因生物安全证书。抗虫大豆MON87701和抗虫耐除草剂大豆MON87701×MON89788也经过了相同的申请、验证、评审和批准过程。

尝试提出你所关心的问题。例如,在我们的餐桌上,到底有没有转基因番茄?

推荐器材

计算机,网络,图书,办公用品等。

作出假设

针对问题,作出假设。例如,针对“餐桌上有没有转基因番茄”的问题,作出“餐桌上没有转基因番茄”的假设。

设计与实施实验

1. 通过图书馆或网络收集证据和数据。例如,查阅我国农业部“农业转基因生物安全证书批准清单”,可以查阅到各省、市、区批准的转基因生物名录。

例如,“2010年第三批农业转基因生物安全证书批准清单(部分)”显示我国农业部批准的转基因生物绝大多数是转基因棉花,没有转基因番茄等食品。

序号	审批编号	申报单位	项目名称	有效期
1	农基安证字(2010)071号	慈溪市农业科学研究所 浙江大学农业与生物技术学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉慈杂7号在长江流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
2	农基安证字(2010)072号	慈溪市农业科学研究所 浙江大学农业与生物技术学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉慈杂6号在长江流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
3	农基安证字(2010)073号	邯郸市农业科学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉邯棉103在黄河流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
4	农基安证字(2010)074号	邯郸市农业科学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉邯棉685在黄河流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
5	农基安证字(2010)075号	邯郸市农业科学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉邯棉328在黄河流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
6	农基安证字(2010)076号	邯郸市农业科学院	cry1Ab/cry1Ac 抗虫棉邯棉301 黄河流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
7	农基安证字(2010)077号	邯郸市农业科学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉邯棉6203在黄河流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
8	农基安证字(2010)078号	邯郸市农业科学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉邯棉6208在黄河流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
9	农基安证字(2010)079号	邯郸市农业科学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉邯棉无216在黄河流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
10	农基安证字(2010)080号	邯郸市农业科学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉邯棉1692在黄河流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日
11	农基安证字(2010)081号	邯郸市农业科学院	转 cry1Ab/cry1Ac 基因抗虫棉邯棉7860在黄河流域棉区生产应用的安全证书	2010年12月30日-2015年12月30日

从世界范围看,转基因作物的种植情况如何呢?农业部网站有说法。

全球转基因油菜、番木瓜、番茄和苜蓿批准种植情况如何?

日期: 2013-04-27 15:20 作者: 来源: 农业部农业转基因生物安全管理办公室

(1) 油菜 目前,全球共批准转基因甘蓝型油菜13例、白菜型油菜2例共15例转基因油菜的种植,涉及的性状包括耐除草剂、育性改变和品质改良3类。2010年全球种植转基因油菜700万公顷,占全球油菜总面积的21%。我国共批准7种转基因油菜进口用作加工原料,未商业化种植。

(2) 番木瓜 目前全球批准种植转基因番木瓜的有两个国家,美国和中国,都是抗环斑病毒番木瓜。美国批准两例转基因番木瓜的种植,其外源基因都是环斑病毒外壳蛋白基因,种植地点主要在美国迈阿密。我国批准一例转基因抗环斑病毒番木瓜在广东种植,外源基因是环斑病毒复制酶基因,种植面积0.67万~2.00万公顷。

(3) 番茄 卡尔琴(Calgene)公司开发的转基因耐贮藏番茄是世界上最早批准进入商业化种植的转基因作物之一。目前,国外共批准6例转基因番茄的商业化种植,其中5例为延熟(耐贮藏)番茄,1例为抗虫番茄。我国也曾批准3例耐贮藏番茄、1例抗病毒转基因番茄,目前未大规模商业化种植。

(4) 苜蓿 美国、加拿大和日本均批准了由孟山都公司研发的转基因耐除草剂苜蓿的种植。目前,美国种植的苜蓿中,95%以上均为转基因苜蓿。

我国农业部网站显示了发放的转基因作物应用安全证书以及相关的种植状况。

我国发放了哪些转基因作物生产应用安全证书? 其种植情况如何?

日期: 2013-04-27 15:23 作者: 来源: 农业部农业转基因生物安全管理办公室

截至目前,我国共批准发放7种转基因植物的农业转基因生物安全证书,即1997年发放的耐贮藏番茄、抗虫棉花安全证书,1999年发放的改变花色矮牵牛和抗病辣椒(甜椒、线辣椒)安全证书,2006年发放的转基因抗病番木瓜安全证书,2009年发放的转基因抗虫水稻和转植酸酶玉米安全证书。

2010年我国转基因棉花种植330多万公顷,转基因番木瓜有少量种植,其余已发放安全证书的转基因植物未大面积应用。

资料显示,1997年我国就已发放了耐贮藏番茄的安全证书,但并没有大面积应用。

2. 调查或访谈。例如,对超市、农场或农贸公司等进行调查,搜集证据和数据。许多证据表明,市场上的番茄新品种是常规育种的产物。

得出结论

根据证据和数据,市场上的番茄一般不是转基因番茄。

目前,已知许多疾病是由单个基因缺陷或突变引起的,这类疾病叫做单基因疾病。最初的基因治疗是用一个正常基因来代替缺陷基因,以治疗因缺陷基因导致的某种酶或蛋白质缺失或者不足而引起的疾病。这就像是给基因动了手术一样,因此,一般形象地将基因治疗称为“分子外科手术”。随着科技的发展,凡是采用分子生物学的方法和原理,在核酸水平上开展的疾病治疗的方法都可以称为基因治疗。基因治疗的方法有多种,需根据患者病变基因的实际情况而采取不同的措施。

基因置换:用正常的外源基因替换病变细胞的致病基因,使细胞内的DNA恢复正常状态,这种方法效果最为理想,但是就目前的技术而言还有困难。

基因修正:将致病基因发生突变的碱基序列予以纠正,而正常部分则予以保留。这种方法对操作的要求较高,有一定的难度。

基因修饰:将目的基因导入病变细胞或其他细胞,从而使病变细胞的功能恢复正常,或使原有的某些功能得以加强。在这种治疗方法中,缺陷基因仍然存在于细胞内,目前的基因治疗大多采用这种方式。

基因抑制:通过导入能干扰、抑制一些有害基因表达的外源基因,以达到治疗疾病的目的。如通过抑制一些癌基因的表达,从而抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞分化或凋亡。

基因封闭:是指利用反义技术封闭某些特定基因的表达以达到抑制有害基因表达的目的。反义技术是以mRNA为靶分子,用特定的可与靶分子互补的DNA或RNA分子与mRNA形成双链,从而抑制基因翻译的技术。

目前,基因治疗的应用范围已从最初单基因缺陷病,发展到帕金森综合征、心脏病等多基因疾病,其中大约2/3的临床试验是针对癌症的。据报道,用基因治疗的方法防治胃癌已经在动物实验中获得了成功。医学专家们预期,基因治疗将从根本上纠正发病原因,彻底改变“头疼医头、脚疼医脚”的传统治疗方法,会成为医学中的又一次革命。



基因工程药物



第三节 蛋白质工程

1965年,我国科学工作者首次人工合成了结晶牛胰岛素,成为轰动世界的大事。人工合成蛋白质对人类认识生命、揭示生命奥秘具有重要作用。20世纪80年代初,在蛋白质晶体学、结构生物学和分子生物学的基础上发展起来的蛋白质工程,为认识和改造蛋白质提供了强有力的手段。

蛋白质工程概述

蛋白质工程(protein engineering)是指通过物理化学与生物化学等技术了解蛋白质的结构与功能,并借助计算机辅助设计、基因定点诱变和重组DNA技术改造基因,以定向改造天然蛋白质,甚至创造自然界不存在的蛋白质的技术。蛋白质工程一般过程是先根据新蛋白质预期功能设计相关蛋白质结构,进而设计对应的氨基酸序列,在此基础上合成可产生新蛋白质的相关脱氧核苷酸序列(基因),再利用基因工程技术合成新的蛋白质。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1-25)。

学习目标

- 简述蛋白质工程的一般过程
- 举例说出蛋白质工程的应用和发展

关键词

蛋白质工程

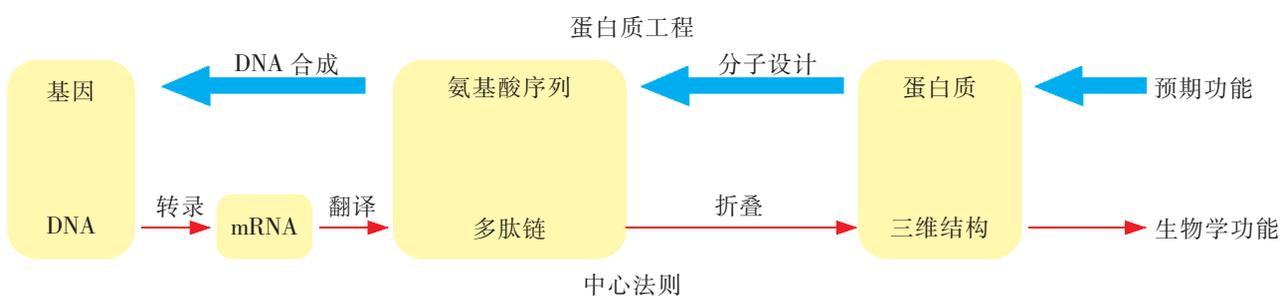


图1-25 蛋白质工程一般过程示意图

在掌握了蛋白质基本结构信息的基础上,可利用基因工程的方法对蛋白质进行改造。根据蛋白质被改造部位的多少,可以将这种改造分为“大改”、“中改”和“小改”。

“大改”是指根据氨基酸的性质和特点,设计并制造出自然界中不存在的全新蛋白质,使之具有特定的氨基酸序列、空间结构和预期功能。

“中改”是指改变蛋白质分子中某一个多肽链片段或一个

特定的结构。

“小改”是指通过基因工程中的定点诱变技术,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,以改善蛋白质的性质和功能。基因的定点诱变技术是改变蛋白质结构的核心技术之一。

积极思维

在基因水平上是如何实现对蛋白质的改造的?

事实:

1. 通过改变蛋白质肽链中的个别氨基酸或一段氨基酸序列可以实现对蛋白质的改造。
2. 改变蛋白质肽链中的个别氨基酸时,通常采用定点诱变技术(图 1-26),从而获得人类所需要的目的蛋白质。

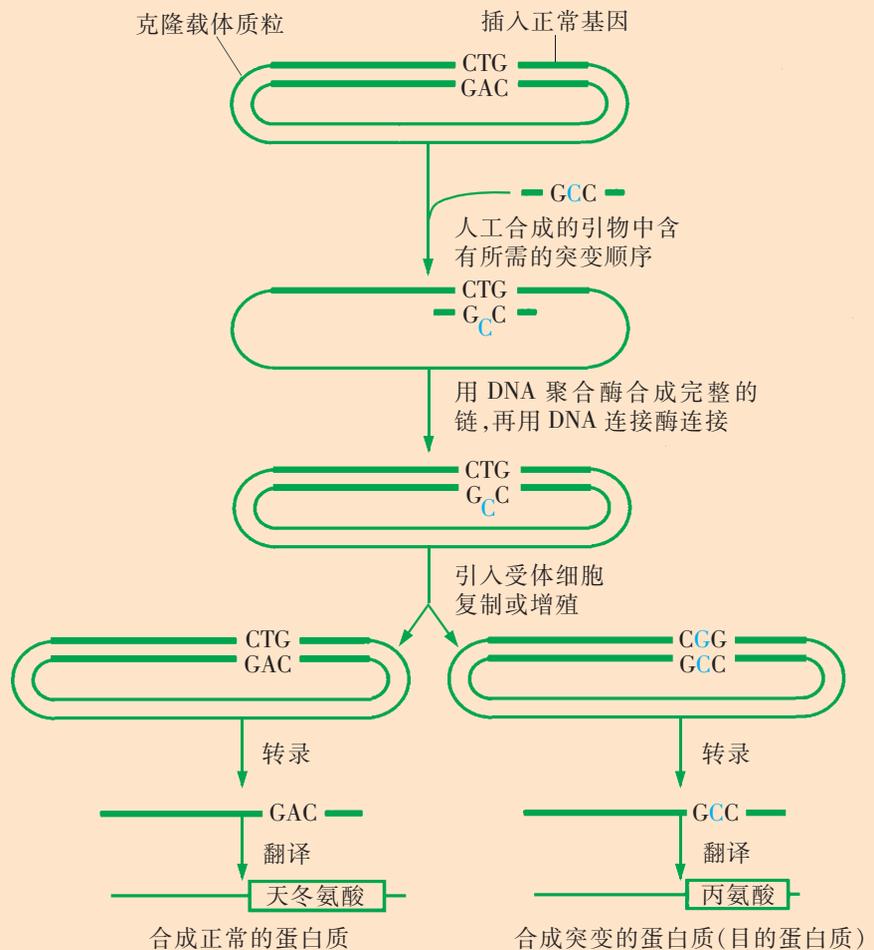


图 1-26 蛋白质的定点诱变过程示意图

分析:

为什么说蛋白质的定点诱变过程是在基因水平上对蛋白质进行的改造呢?

基因定点诱变技术的具体操作方法较多,其中PCR技术是目前常用的方法之一。一般先通过PCR扩增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。

每一种蛋白质都具有特定的空间结构(图1-27),对于已知空间结构的蛋白质,可以采用定点诱变技术在蛋白质肽链中引入替代氨基酸,从而改变其结构,有目的地改造蛋白质的功能。例如,用于治疗病毒感染和癌症的干扰素是从动物体内提取的,在体外保存很困难。科学家将其分子上的一个半胱氨酸改成丝氨酸,在-70℃条件下分子的保存期大大延长。又如,将胰岛素B链由第28位的脯氨酸、第29位的赖氨酸改为第28位的赖氨酸、第29位的脯氨酸,获得单体速效胰岛素,可避免胰岛素分子形成聚合体,以保证其效能的及时发挥。该速效胰岛素已通过临床试验。

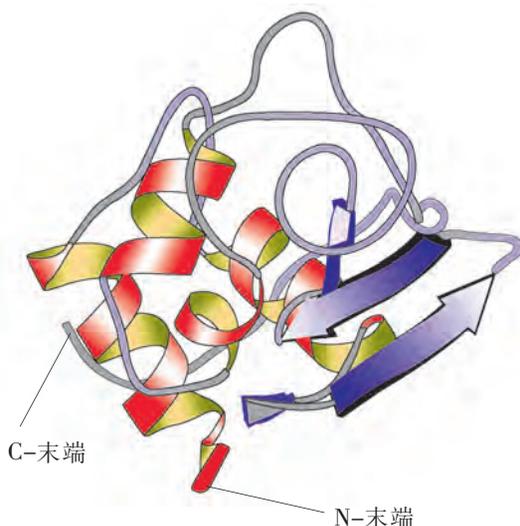
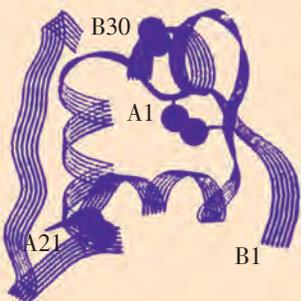


图1-27 溶菌酶的空间结构示意图

知识海洋

胰岛素与蛋白质工程

1953年,英国生物化学家破译出牛胰岛素的全部结构信息,其中含两条多肽链,由17种51个氨基酸组成(图III)。



图III 胰岛素结构示意图

1958年,由中科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。这为蛋白质工程的理论和技术的发展作出了积极的贡献。

当人体胰岛素供应不足或胰岛素在靶细胞中

不能发挥正常生理作用时,就会引发糖尿病。随着患病时间的延长,糖尿病患者体内的代谢会紊乱。如果病情得不到有效控制,可导致眼、肾、神经、血管和心脏等组织、器官的慢性并发症,甚至危及生命。随着人们生活方式的改变和生活水平的提高,糖尿病已成为一种常见病,发达国家糖尿病的发病率已高达5%~10%。

由于胰岛素注射到人体皮下后,要经过较长时间才能进入血液,而且进入血液中的胰岛素又会不断地被分解,因此患者体内无法维持相对稳定的胰岛素浓度。一些糖尿病(胰岛素缺乏型糖尿病)患者需每天注射胰岛素2~3次,这给患者带来巨大的痛苦和不便。利用蛋白质工程获得稳定、长效甚至可以口服的胰岛素便成为患者的迫切需求。

经过不懈的探索,科学家们发现胰岛素进入血液速度缓慢的主要原因是胰岛素分子会聚合成二聚体或多聚体。科学家们通过优化设计和定点诱变,将胰岛素分子上的2个氨基酸加以改变,使改造后的胰岛素既保持了天然胰岛素分子的主要构象,又能解聚为单体,结果既提高了胰岛素进入血液的速度,又高效发挥了其效能。

目前,空间结构完全清楚的蛋白质的数量还比较少,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。非定点诱变技术在对蛋白质进行改造时虽然不像定点诱变技术那样有目的性和针对性,但由于突变位点多,有时会产生意想不到的改造效果。

蛋白质工程的应用

蛋白质是生物体几乎所有的生命活动的承担者,如生长、发育、代谢、运动、光合作用和固氮作用等都离不开蛋白质。随着蛋白质工程的发展,大量新型的具有特定功能的蛋白质将在工业、农业、医药和环境保护等方面发挥重要作用。

蛋白质工程可以通过改造酶的结构,有目的地提高酶的热稳定性。工业化生产中的酶促反应要求所使用的酶具有高度的稳定性和催化活性,特别是对高温的稳定性。一般来说,热稳定性高的酶也具有较强的耐酸、耐碱和耐有机溶剂的能力。研究发现,在高温下,酶肽链中的天冬酰胺和谷氨酰胺容易发生脱氨反应,导致酶的结构被破坏,进而丧失功能。若将天冬酰胺和谷氨酰胺转变为其他氨基酸,就可以有效地提高酶的热稳定性。例如,酵母菌的丙糖磷酸异构酶上有两个天冬酰胺,在分别转变为苏氨酸和异亮氨酸后,酶的热稳定性提高了近 50%。此外,在蛋白质分子中引入二硫键也可以显著提高蛋白质的热稳定性。

在生物工程制药领域,蛋白质工程也有广泛的应用。例如,天然抗体可以增强机体的免疫力,但是对于像癌症这样的疾病,还需要通过蛋白质工程人工合成或改造抗体,使之对某些肿瘤细胞具有特异的识别能力和杀伤力。科学家发明的利用鼠源杂交瘤抗体来处理癌细胞的方法,对癌细胞有一定的杀伤力,但也有导致机体高度过敏的副作用。为了解决这一问题,科学家又对该抗体进行了改造,生产出效果良好的鼠—人嵌合抗体(图 1-28)。

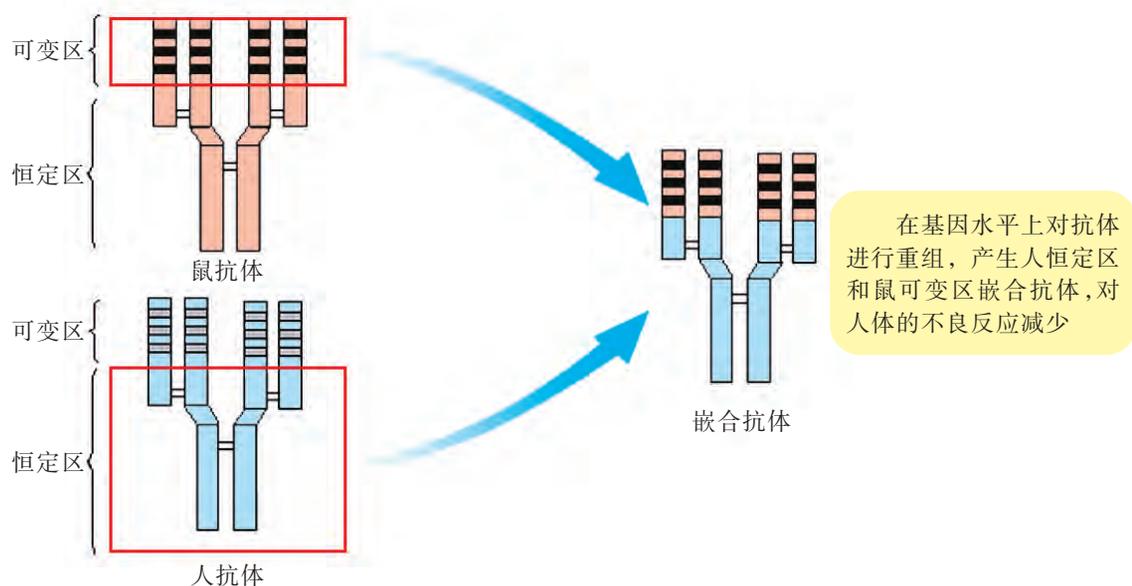


图 1-28 鼠—人嵌合抗体形成过程

又如,一种纤维蛋白溶解酶原激活因子(t-PA)可以在临床上用于溶解血栓块,医治心肌梗死等疾病。通过蛋白质工程,将 t-PA 分子中的天冬酰胺替换为谷氨酰胺后,t-PA 在血液循环中的停留时间就会大大延长。

SARS 的传染性非常强,对病人的危害极大。2003 年出现的 SARS 大流行,给我国的经济发展和人民健康造成了巨大损失。为此,我国科学家成立了联合攻关小组,加紧对 SARS 病毒(图 1-29)进行研究。

有一种蛋白质芯片就是针对 SARS 研制出的高效检测系统,它含有 5 种蛋白质的抗原及相应的配套对照蛋白。这 5 种蛋白质是 SARS 病毒的 5 种主要蛋白质——N 蛋白、E 蛋白、S 蛋白、M 蛋白和 3CL 蛋白。它们有序地排列在一种新型的高分子芯片基质上,能检测出送检血清样品中针对芯片上相应抗原的特异性抗体,从而鉴定出哪种血清样品异常。使用蛋白质芯片检测某人是否感染 SARS 病毒,从送检血清样品到取得检测结果,只需要 1.5 h。

这种蛋白质芯片不仅用于 SARS 病人的确诊和 SARS 疑似病人的诊断,还可用来

观察某人感染 SARS 病毒之后体内特异性抗体的动态变化,帮助监测病情的发展。

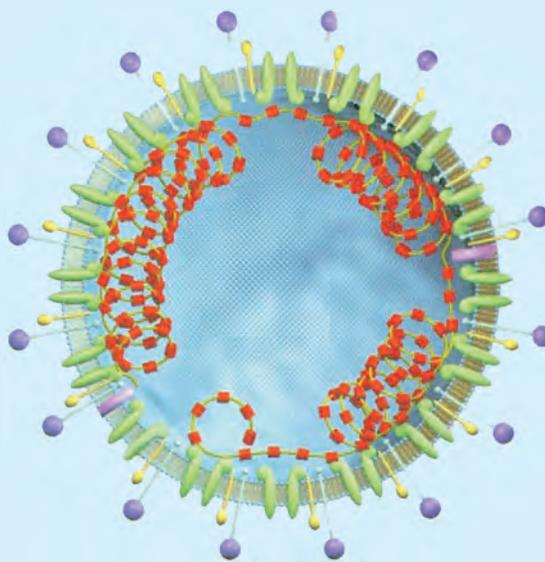


图 1-29 引起 SARS 的冠状病毒结构模式图

通过基因工程,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我们生产和生活的需要。例如,玉米中赖氨酸的含量一般较低,原因是细胞内的赖氨酸浓度会影响赖氨酸合成的酶,如天冬氨酸激酶的活性。通过蛋白质工程将天冬氨酸激酶中第 352 位的苏氨酸变成异亮氨酸时,玉米叶片和种子中的赖氨酸就可能增加。

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。当然,蛋白质工程中还有许多理论和技术问题有待研究和探索,但是可以相信,蛋白质工程的发展前景一定非常广阔。

一、单项选择题

1. 下列关于蛋白质工程和基因工程比较的描述中,错误的是 ()

A. 和蛋白质工程不同,基因工程原则上只能生产自然界中已有的蛋白质

B. 和基因工程相比,蛋白质工程是定向改造天然蛋白质和创造新蛋白质的技术

C. 蛋白质工程又被称为第二代基因工程

D. 蛋白质工程的产物表达过程不遵循中心法则

2. 下列关于蛋白质工程的叙述中,错误的是 ()

A. 蛋白质工程的实现需要多学科技术的参与

B. 蛋白质工程可能创造出新的蛋白质

C. 蛋白质工程通过改造基因最终改造蛋白质

D. 定点诱变技术用于蛋白质的“中改”

3. 下列属于蛋白质工程应用实例的是 ()

A. 巨型小鼠 B. 鼠—人嵌合抗体

C. 多莉羊 D. 结晶牛胰岛素

4. 下列有关蛋白质工程的叙述中,错误的是 ()

A. 蛋白质工程的基础是基因工程,它与基因工程在本质上没有什么区别

B. 科学家一般使用定点诱变技术研究

天然蛋白质的功能

C. 在蛋白质的肽链之间引入二硫键有利于蛋白质的稳定

D. 通过蛋白质工程可以获得符合人类需要的蛋白质

5. 蛋白质工程汇集了当代分子生物学等学科的一些前沿领域的最新成就,它把核酸与蛋白质结合、蛋白质空间结构与生物功能结合起来研究。蛋白质工程将蛋白质与酶的研究推进到崭新的时代,为蛋白质和酶在工业、农业和医药方面的应用开拓了诱人的前景。例如,葡萄糖异构酶在工业上应用广泛,为提高其热稳定性,一些科学家在确定第138位甘氨酸为目标氨基酸后,对编码葡萄糖异构酶的基因进行体外定点诱变,以脯氨酸替代甘氨酸。含突变体的重组质粒在大肠杆菌中表达。他们发现突变型葡萄糖异构酶比野生型的酶热半衰期长1倍,酶的热稳定性得到提高。这说明 ()

A. 蛋白质工程与基因工程的核心技术完全不同

B. 蛋白质工程是直接诱变蛋白质结构发生变化

C. 蛋白质工程能创造符合人类需要的蛋白质

D. 蛋白质工程的结果都能提高酶的热稳定性

二、技能增进题

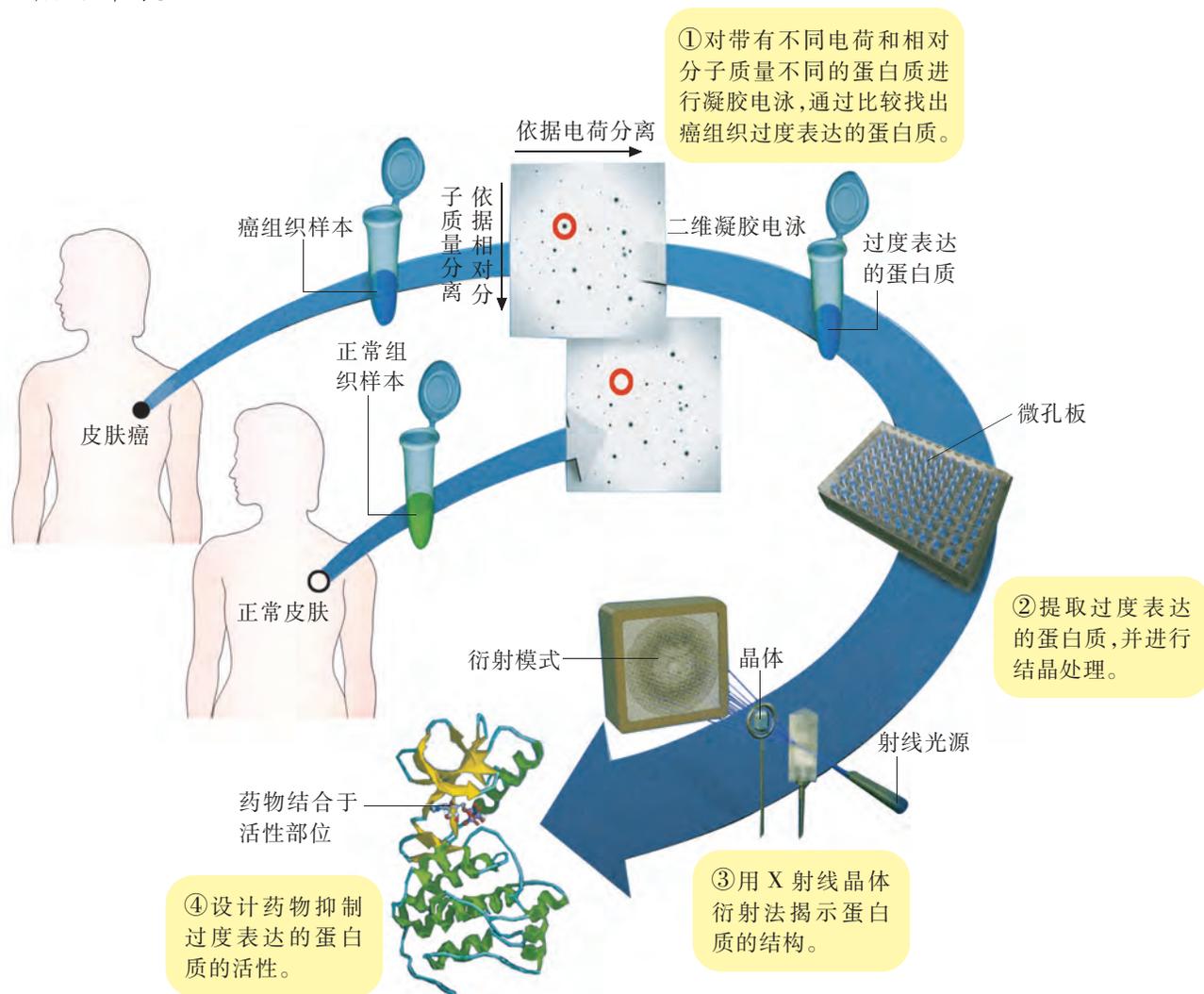
推理 推理是由一个或几个已知的判断(前提)推出新判断(结论)的过程。

饭后30~60 min,人血液中胰岛素的含量通常达到高峰,120~180 min内恢复到基础水平。而目前临床上使用的胰岛素制剂注射后120 min后才出现高峰且持续180~240 min,这种情况与人的生理状况不相符合。许多实验表明,胰岛素在高浓度时以二聚体形式存在,低浓度时主要以单体形式存在。参照本

节知识海洋“胰岛素与蛋白质工程”中的描述,通过推理,说明设计速效胰岛素的原则为什么是避免胰岛素形成聚合体。



蛋白质组学的研究对象是蛋白质组。蛋白质组学研究不仅为探索生命奥秘提供了必需的理论和技术基础，也给人类健康事业带来了巨大的利益，它可能蕴藏着开发疾病诊断的新方法和研制药物的新线索，如利用蛋白质组学开发治疗皮肤癌的新药。



利用蛋白质组学开发治疗皮肤癌新药的过程示意图

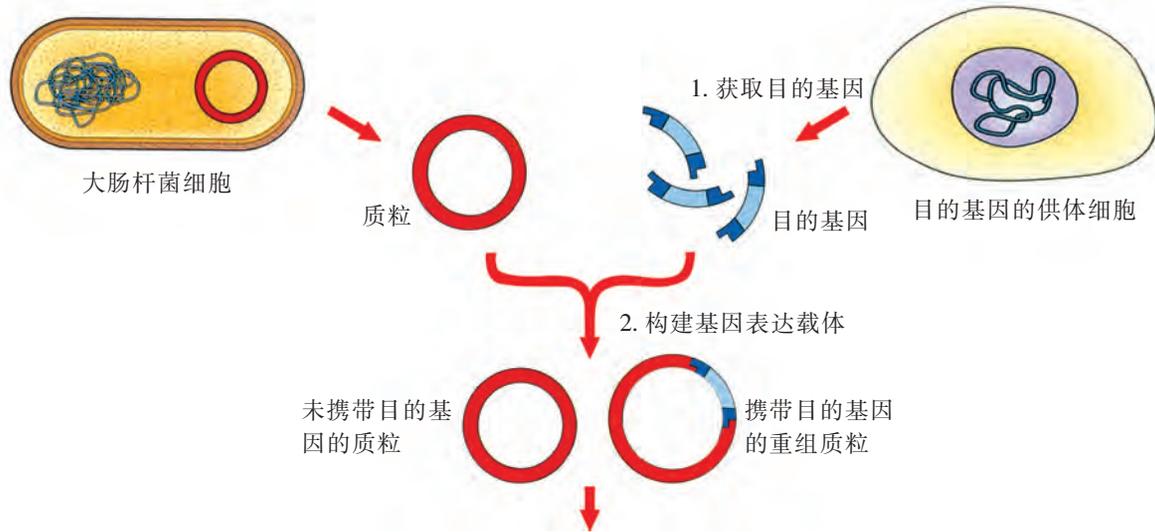
蛋白质组学是一个新兴领域,目前尚处于发展初期,仍有许多问题有待探索。



本章自主小结

基因工程又称为重组 DNA 技术,包括基因的分离、体外重组转移以及在受体细胞内的复制和表达等过程。

可以学习通过绘制流程图的方式,对本章内容进行自主小结。



在完成上述有关获得目的基因和构建基因表达载体流程图的填写后,思考下列问题,并尝试通过绘制流程图的方式对本章的其他内容进行小结。

1. 什么是基因工程?它是如何诞生和发展的?为什么说酶、载体是基因工程的工具?作为载体的质粒需要具有哪些基本结构?你能简要叙述利用限制性核酸内切酶切割 DNA 获得带有黏性末端和平口末端的过程吗?

2. 你能简要说出基因工程的一般过程和技术吗?如何获取目的基因?如何构建基因表达载体?如何将目的基因导入植物细胞?如何将目的基因导入动物细胞?如何将目的基因导入微生物细胞?如何检测和鉴定目的基因?

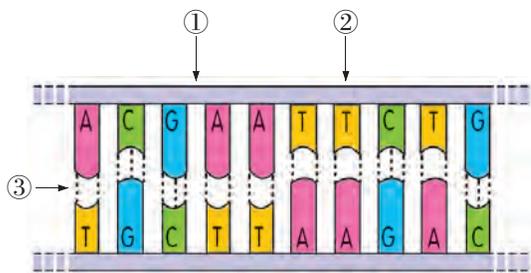
3. 尝试概述植物基因工程、动物基因工程的主要成果。你能将转基因抗虫植物的培育过程以流程图的方式表达出来吗?你能以 ADA 基因缺陷症的基因治疗原理示意图说明基因治疗的基本步骤吗?

4. 你能通过绘制鼠—人嵌合抗体的形成过程流程图的方式描述蛋白质工程的一般过程吗?

5. 举例说出转基因生物和转基因食品的安全性问题。举例说出培育转基因生物的价值和可能带来的安全性问题。为什么在超市出售的食用油包装上要注明生产食用油的原料是“转基因”或“非转基因”产品?什么是生物武器?它们有哪些危害?

如果有疑难,可以和同学、老师进行探讨,也可以通过查阅图书馆资料和网络,寻求问题的答案。相信你一定能够正确回答上述问题!

1. 下列关于 DNA 分子片段示意图的说法中,正确的是 ()



- A. 限制性核酸内切酶可作用于①处
- B. ②处碱基缺失可导致染色体结构变异
- C. DNA 的黏性末端都是序列 GAATTC
- D. DNA 连接酶作用于③处

2. 下列关于基因工程的叙述中,正确的是 ()

- A. 基因工程经常以抗生素抗性基因为目的基因
- B. 细菌质粒是基因工程常用的载体
- C. 常用两种限制性核酸内切酶处理含目的基因的 DNA 和载体的 DNA
- D. 为培育抗除草剂的作物新品种, 导入抗除草剂基因时只能以受精卵为受体

3. 采用基因工程的方法培育抗软化番茄, 下列导入目的基因的做法中,正确的是 ()

- A. 将抗多聚半乳糖醛酸酶注射到番茄受精卵中
- B. 将抗多聚半乳糖醛酸酶基因注射到番茄受精卵中
- C. 将抗多聚半乳糖醛酸酶基因与质粒重组后导入细菌, 用该细菌感染番茄的体细胞, 再进行组织培养
- D. 将抗多聚半乳糖醛酸酶基因与细菌质粒重组, 注射到番茄的子房并进入受精卵

4. 基因工程是在 DNA 分子水平上进行设计并操作的, 在基因操作的过程中, 不进行碱基互补配对的步骤是 ()

- A. 获得目的基因
- B. 制备重组 DNA 分子
- C. 转化受体细胞
- D. 目的基因的表达和检测

5. (多选)通过 PCR 技术可以 ()

- A. 获得被扩增的基因
- B. 获得被扩增的 DNA 片段
- C. 测定 DNA 的碱基序列
- D. 测定基因的精微结构

6. (多选)下列物质中,可应用蛋白质工程按人的意愿定向改造的是 ()

- A. 磷脂分子
- B. 白细胞介素-2
- C. 胰岛素
- D. 甲状腺激素

7. 通过蛋白质工程可获得具有耐碱、耐热、抗氧化等各种特性的蛋白酶。

请根据蛋白质的定点诱变原理, 完成下图所示的改造蛋白酶的几个步骤:



8. 应用转基因技术, 通过抑制某种促进果实成熟的激素的合成, 可防止番茄果实早熟; 通过抑制某种破坏细胞壁的酶的合成, 可防止番茄果实软化。这些转基因番茄新品种的贮藏时间比普通番茄长。请回答:

(1) 促进果实成熟的激素是_____, 可破坏细胞壁的酶是_____。

(2) 在培育转基因番茄的操作中, 所用的基因的“剪刀”是_____, 基因的“针线”是_____, 基因的“运输工具”是_____。

第二章

细胞工程

显微操作

你听说过对细胞进行解剖的技术吗？人们不仅可以运用这一技术研究细胞内的精细结构，还能借助显微操作技术对细胞进行改造。细胞工程已发展成为拥有细胞培养、细胞分化的定向诱导、细胞融合和显微注射等技术的生物工程。你想生产各种药物治病救人吗？你想开发清洁能源保护生物圈吗？细胞工程将助你实现梦想！

- 细胞工程概述
- 植物细胞工程的应用
- 动物细胞工程的应用

第一节 细胞工程概述

细胞是生命活动的基本单位。对于生物个体来说,几乎每一个体细胞中,都蕴含着该生物体的所有遗传信息。利用细胞再造生命个体,一直是人类在改造自然过程中的一个梦想。而今天,这个梦想由于细胞工程的发展正在逐步实现。

学习目标

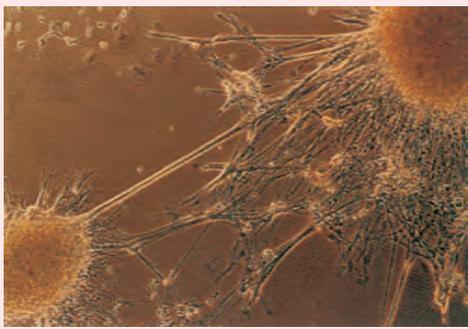
- 简述细胞工程的基本技术
- 举例说出细胞工程的应用

关键词

细胞工程

回眸历史

细胞工程的发展



1907年,美国科学家哈里森(R. Harrison)培养蛙胚神经组织,观察到细胞的生长现象,并记录到存活数周的细胞,开创了动物细胞培养的先河。



1937年,法国科学家高特里特(R.J. Gautheret)等人几乎同时离体培养了胡萝卜组织,并使细胞增殖。这是首次成功进行的植物组织培养。



1972年,美国科学家卡尔逊(P.S. Carlson)等人用硝酸钠作为促融合因子,成功地将2个不同种的烟草细胞原生质体进行融合,获得了世界上第一个体细胞杂交植株。

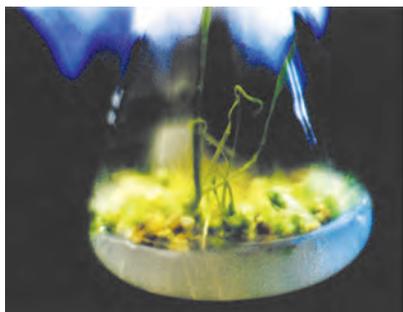


1996年,英国科学家韦尔穆特(I. Wilmut)等人利用成年芬兰白面母羊体细胞的细胞核与苏格兰黑面母羊的去核卵细胞首次克隆出绵羊“多莉”。

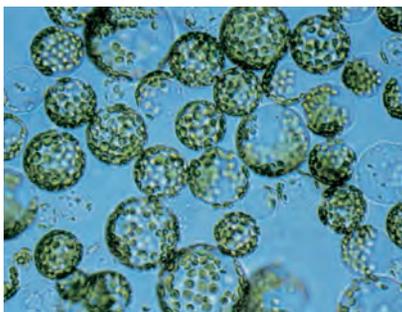
细胞工程的基本技术

细胞工程(cell engineering)是指应用细胞生物学和分子生物学的原理和方法,通过细胞或细胞器的水平上的操作,按照人的意愿去改变细胞内的遗传物质或获得细胞产品的综合性科学技术。目前,细胞工程已成为生物工程的重要组成部分。

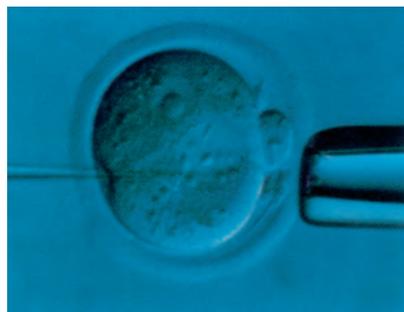
根据操作对象的不同,可以将细胞工程分为植物细胞工程和动物细胞工程等。根据所使用技术的不同,可以将细胞工程技术分为植物组织培养技术、细胞融合技术和细胞核移植技术等(图 2-1)。



植物组织培养技术



细胞融合技术



细胞核移植技术

图 2-1 常用的细胞工程技术

植物组织培养技术

生物体的细胞在形态、结构和功能上存在很大的差异,但是几乎每一个细胞内都具有发育成为完整个体所必需的全套遗传物质,因此,这些含有该物种全套遗传物质的细胞都具有发育成为一个新的生物个体的潜能,细胞的这种特性称为**细胞全能性**(cell totipotency)。植物的体细胞在适宜的条件下可培育成完整的正常植株,就是细胞全能性的有力证据。

植物组织培养(plant tissue culture)是指依据细胞全能性原理,在无菌条件下,分离植物的器官、组织、细胞或原生质体,并在培养基上培养,在适宜的条件下使其发育成部分或完整植株的技术(图 2-2)。



组织培养材料的选择与制备



诱导形成愈伤组织



愈伤组织培养成完整植株

图 2-2 石斛组织培养成完整植株的几个过程

用于植物组织培养的材料,如离体的植物器官、组织、细胞或原生质体等称为外植体。植物的茎尖、根尖、幼嫩的叶片、花药(花粉)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,所选材料的组织细胞要具有分裂能力,例如,利用胡萝卜的根进行组织培养时,一般选取含有形成层的部分作为外植体(图 2-3)。



图 2-3 胡萝卜根的结构示意图

在用外植体进行植物组织培养时,诱导已经分化的细胞在一定条件下脱分化形成愈伤组织,再分化形成胚状体或直接分化形成根和芽,并进一步发育形成完整的植物体,是植物组织培养的主要步骤(图 2-4)。



1. 选材 选择生长较好的胡萝卜根作为材料,用清水洗净并削去外皮,然后将其切成厚度约为 1 cm 的小段。操作前一定要用酒精棉球擦洗双手消毒。



2. 消毒 将胡萝卜片用体积分数为 70% 的酒精溶液消毒 30 s 后用无菌水洗净,接着用体积分数为 20% 的次氯酸钠溶液处理 30 min 后再用无菌水冲洗多次,切取含有形成层的组织小块(约 1 cm³)为外植体。



3. 接种 将外植体接种到适宜的培养基上,用锡箔或塑料膜等封住瓶口并扎紧,瓶壁贴上标明材料名称、接种日期和培养人姓名(组别)的标签。



4. 诱导脱分化 将接种后的外植体放在 23~26 ℃ 恒温、避光等条件下培养。注意检查材料是否被污染,观察愈伤组织的生长情况,并定期记录所观察到的现象。



5. 诱导再分化 一段时间后,选取生长良好的愈伤组织转接到特定的分化培养基上继续培养,在适宜的条件下,愈伤组织能分化出根、茎等器官。



6. 炼苗移植 愈伤组织分化出根、茎等营养器官后,最终发育成完整植株(试管苗)。但试管苗必须经过炼苗、移栽大田才能发育成为正常的胡萝卜植株。

图 2-4 胡萝卜根组织培养的主要过程

进行植物组织培养时,首先用消毒剂除去外植体表面的微生物,在无菌条件下将外植体置于适宜的培养基上。由于外植

体不同、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也不尽相同,因此,需要根据情况配制不同的培养基。由于细胞生活和植物生长所需的营养条件基本相似,培养基一般要含有水分、无机盐、碳源、氮源、维生素等。

外植体的细胞已经高度分化,因此在进行植物组织培养时首先要诱导细胞脱分化,形成愈伤组织。愈伤组织是一团没有特定的形态、结构和功能,并处于旺盛分裂状态的薄壁细胞。愈伤组织生长一段时间后,再移植到新的培养基上继续培养,诱导分化形成根、芽等器官的过程,称为再分化。再分化后,继续培育,愈伤组织可发育为一株新的完整的小植株。在一定的培养条件下,也可诱导愈伤组织形成胚状体。胚状体是类似胚的结构,具有胚芽和胚根,在合适的条件下可发育成为新的植株。

知识海洋

组织培养基的成分及其作用

目前,在植物组织培养中应用的培养基一般含有五类成分。

水 一般用蒸馏水或去离子水配制培养基,煮沸过的自来水也可以使用。

无机盐 包括大量元素和微量元素。大量元素有 N、P、K、S、Ca、Mg 等,微量元素有 Mn、Zn、Cu、B、Mo、Fe 等。

有机物 主要有糖类、维生素和氨基酸。糖类为培养物提供所需要的碳源,并有调节渗透压的作用。常用的是质量分数为 2%~4% 的蔗糖,有时也加入葡萄糖和果糖等。一般来说,以蔗糖为碳源时,离体的双子叶植物的根长得较好;而以葡萄糖为碳源时,单子叶植物的根长得较好。植物能够利用的其他形式的碳源有麦芽糖、半乳糖、甘露糖和乳糖,有的还能利用淀粉。维生素类主要有硫胺素(维生素 B₁)、吡哆素(维生素 B₆)、烟酸(维生素 B₃)、泛酸(维生素 B₅)、氨基酸类主要有甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺等。

天然附加物 一些天然有机物,如椰子乳、酵母菌提取物、玉米胚乳、麦芽浸出物或番茄汁等,有利于愈伤组织的诱导和再分化。

生长调节剂 常用的有生长素类、细胞分裂素类和赤霉素类(图 I)。常用的生长素类如 2,4-D、萘乙酸、吲哚乙酸、吲哚丁酸被用于诱导细胞的

分裂和根的分化。吲哚乙酸易被光和酶氧化分解,所以加入的浓度较高,常为 1~30 mg·L⁻¹;萘乙酸、2,4-D 的浓度则以 0.1~2 mg·L⁻¹ 为宜。细胞分裂素类有激动素、6-苄基腺嘌呤、异戊烯基腺嘌呤、玉米素等,它们可以促进细胞分裂和诱导愈伤组织或器官分化出不定芽,它们常用的浓度为 0.01~1 mg·L⁻¹。在原代培养中,一般都要加入激素类物质,但随着继代培养次数的增加,加入量可逐代减少。离体培养物的根和芽的分化取决于各种激素间的比例。此外,赤霉素对刺激培养细胞的伸长也具有一定的作用。



图 I 几种激素举例

研究表明,培养基的碳源一般采用蔗糖或葡萄糖。培养基中生长素和细胞分裂素的相对浓度影响愈伤组织分化为根和芽的过程:生长素的含量高于细胞分裂素时,主要诱导根原基的形成;而当细胞分裂素的含量高于生长素时,主要诱导芽原基的形成。

由于培养基的营养十分丰富，微生物极易在培养基上生长繁殖，因此，需要对外植体采用酒精、过氧化氢等进行消毒。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生长分化产生影响。在整个植物组织培养过程中都要保持严格的无菌条件。

此外，培养基的离子平衡、pH 等也是影响植物组织培养中外植体细胞生长和分化的重要因素。

细胞融合技术

细胞融合技术是采用自发或人工的方法使两个或多个细胞融合为一个细胞的技术。在促融合因子的作用下，细胞膜发生粘连、破裂，细胞质发生融合，进而发生核融合，形成杂种细胞。常用的促融合方法有生物法（如病毒诱导融合法）、化学法（如聚乙二醇诱导融合法）、物理法（如电场诱导融合法）等。植物细胞融合前还需要用纤维素酶等去除细胞壁。

知识海洋

细胞融合的方法

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。

病毒诱导融合法 早在 1954 年，科学家就观察到麻疹病毒能使培养它们的细胞发生融合而形成多核体。后来人们又发现其他许多病毒，如仙台病毒、疱疹病毒、天花病毒、腮腺炎病毒、新城鸡瘟病毒等，都可以促使细胞融合。这些病毒都有一个共同的特点，就是在病毒外面都包有薄膜，这层薄膜也称为病毒囊膜。它可以与细胞膜发生作用，使细胞紧密凝集，直至融合。仙台病毒的应用最为广泛。用灭活的仙台病毒诱导细胞融合的优点是融合率较高，对各种动物细胞都适宜，并且仙台病毒能在鸡胚中大量繁殖，容易培养；缺点是仙台病毒不稳定，在保存过程中融合活性会降低，并且制备过程比较烦琐。此外，病毒引入细胞后，可能会对细胞的生命活动产生干扰。

聚乙二醇诱导融合法 20 世纪 70 年代，科学家们发现许多化学药物，如聚乙二醇、溶血卵磷脂、高浓度钙离子等，能促进细胞融合；同时也发现一些药物，如植物凝集素、聚精氨酸、聚赖氨酸等，具有辅助融合的作用。在众多化学药物中，聚乙二醇的“本领”最高，它促进细胞融合的能力

比仙台病毒强几百倍，已发展成为促进细胞融合的“主角”之一。聚乙二醇是一种吸水性很强的大分子物质，能使细胞膜表面的水分和电荷发生变化，促进细胞发生凝集。细胞膜的紧密接触，导致膜分子发生交换、重排，最后细胞膜融合，细胞合二为一。聚乙二醇使用方便，诱导细胞融合的频率高，但是它有一定的毒性，对某些细胞（如卵细胞）不适用。

电场诱导融合法 20 世纪 80 年代，科学家们又发明了电场诱导融合法——将细胞放在正负电极之间，施加高电压。在高电压下，由于细胞表面带有许多电荷，导致细胞靠近正极的一端负电荷聚集，而靠近负极的一端正电荷聚集，由于异性相吸的作用，细胞就会像糖葫芦一样串在一起，相邻的细胞膜紧密接触，这时再施加一个强大的脉冲电流，细胞膜有可能因此受损而产生小孔，由于膜分子的运动，在小孔处的两层细胞膜就会混合在一起，导致细胞融合。在著名的“多莉”羊克隆过程中，就应用了电场诱导融合技术。这项技术有许多优点，如诱导细胞融合的频率高，对细胞无毒害作用，操作简便，可重复性好。

运用细胞融合技术，可以在一定条件下把不同种生物的体细胞融合形成杂种细胞，并把杂种细胞培育成新的生物体，这种技术被称为体细胞杂交技术。

事实:

1. 植物体细胞杂交技术是一种非常实用的育种手段,可以克服不同种的植物之间杂交的不亲和障碍,实现远缘物种之间的核质组合,从而获得新品种植株。目前,利用该项技术已经培育出多种优良品种,如“白菜—甘蓝”(图 2-5)等。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。

2. 原生质体是指去除植物细胞壁后裸露的植物细胞结构等。用于细胞工程的原生质体主要来源于各种植物的叶片、根尖等部位,此外也可从组织培养产生的愈伤组织中获得原生质体。

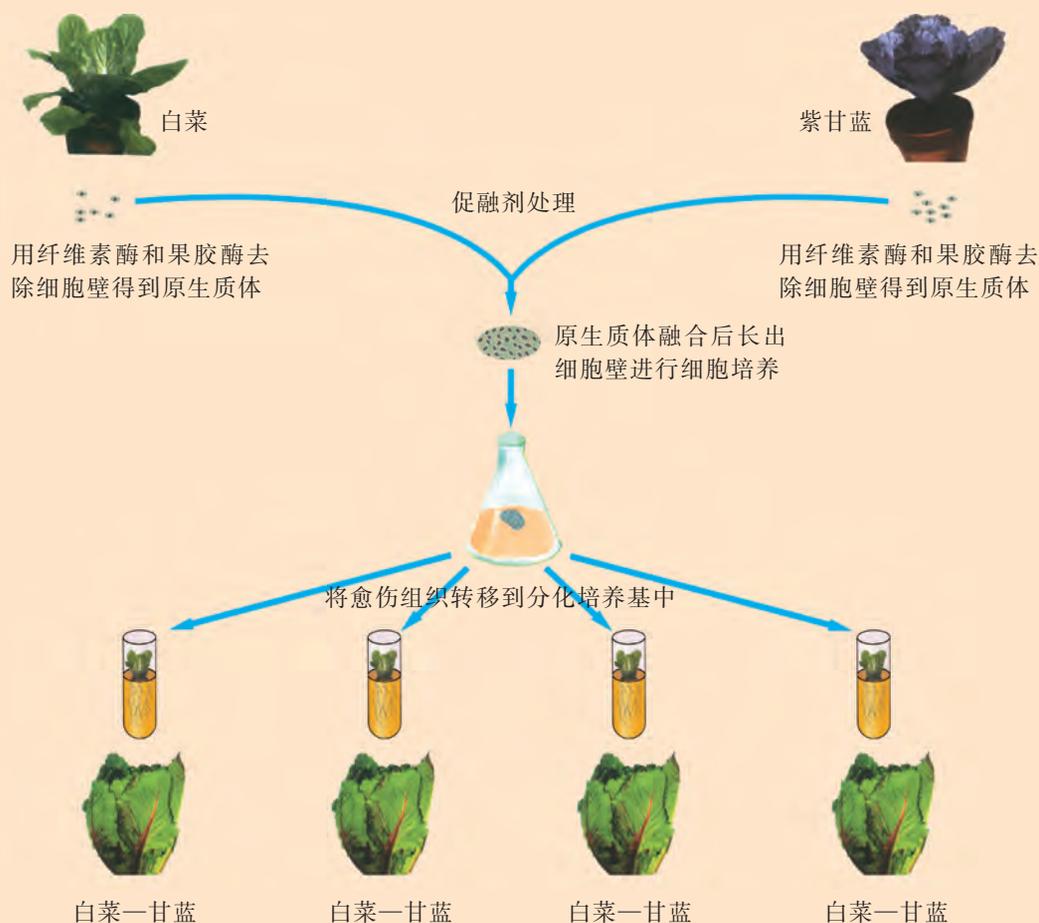


图 2-5 “白菜—甘蓝”的培育过程示意图

分析:

1. 上述培育过程应用了植物细胞工程中的哪些技术?
2. 有人将马铃薯和番茄的体细胞进行杂交,希望能够培育出一种新型植物,它的地上部分能结出番茄果实,地下部分能长出马铃薯块茎。你能设计相关技术方案吗?

植物体细胞杂交技术证明,人们可以逾越种间、属间的杂交屏障培育出新的生物。

细胞核移植技术

目前,动物细胞培养技术已经取得了长足的发展。对于动物细胞全能性的研究发现,动物胚胎细胞的分化潜能较高,体细胞的分化潜能较低。而现有的动物细胞培养技术还不能像植物细胞的组织培养那样,将动物的体细胞直接培养成完整的动物体。克隆羊、克隆牛等克隆动物大多是通过细胞核移植技术来实现的。

动物细胞核移植技术是把一个动物细胞的细胞核移入一个已经去除细胞核的卵母细胞中,使其重组并发育为一个新的胚胎,最终发育为一个动物个体的技术。

最早使用的核移植技术是利用显微操作的方法将卵母细胞的细胞核取出,再注入其他细胞的细胞核。例如,用微吸管将原生动物或鱼类、两栖类,甚至哺乳类动物的一个卵母细胞的细胞核去除,再用微吸管吸取另一个细胞的细胞核注入去核卵母细胞中,组成新的杂种细胞,再进行细胞培养。

随着显微技术的发展,还可以用类似的技术移植细胞中的各种细胞器。

从理论上说,应用细胞工程技术不仅可以在不同的植物之间、动物之间、微生物之间进行物种间的杂交,甚至可以在植物、动物和微生物之间进行物种间的杂交,以形成前所未有的新物种。细胞工程领域中的某些科研成果已对传统的伦理观念提出了挑战。

细胞工程的所有实验都要求在无菌条件下进行,稍有疏忽都可能导致实验失败。细胞工程的实验室要定期用紫外线、化学试剂消毒,实验前还应进行消毒。超净工作台是最基本的实验设备,一切操作都应在超净工作台中进行,这样才能达到较高的无菌要求(图2-6)。对生物材料进行彻底地消毒是实验成功的前提,实验所用的一切器械、器皿和药品应进行灭菌,实验人员的双手也应进行消毒或戴无菌手套。

在细胞工程应用中,有的改变了传统的育种方式、生产方式,有的为人类提供了更加丰富的产品。随着细胞工程的不断发展和完善,它不仅在农业、林业生产中被广泛应用,还在医疗领域得到广泛应用,如利用植物细胞工程开发和生产各种药物等,丰富了人类战胜各种疾病的手段。所有这些都说明,细胞工程在今天业绩斐然,明天还将发挥更大的作用。



图 2-6 无菌操作

一、单项选择题

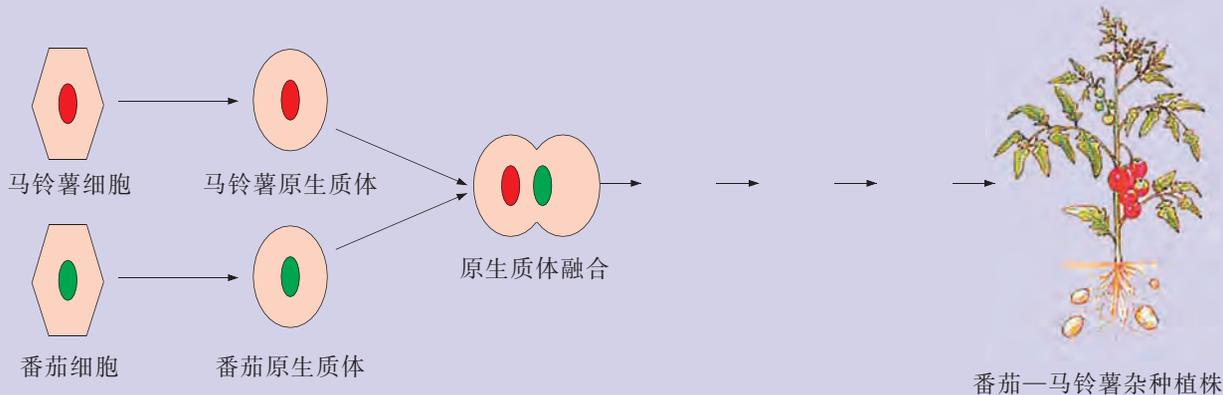
- 下列关于细胞工程技术的叙述中,错误的是 ()
 - 在细胞或细胞器的水平上进行操作
 - 植物细胞间融合时需去除细胞壁
 - 核移植时主要借助显微操作仪器
 - 已经培育出动植物之间杂交的新品种
- 下列技术中,一般来说不属于细胞工程范围的是 ()
 - 组织培养
 - 细胞核移植
 - 基因芯片的应用
 - 细胞融合
- 下列与细胞工程无关的技术是 ()
 - 克隆羊“多莉”的产生
 - 2种烟草体细胞杂交获得新植株
 - 利用植物组织培养技术培育郁金香
 - 不同品种的葡萄之间的嫁接
- 在植物组织培养中,下列有关愈伤组织的叙述,正确的是 ()
 - 愈伤组织是一些有特定结构的细胞
 - 已经分化的植物细胞形成愈伤组织的过程叫做植物细胞再分化
 - 愈伤组织在一定的培养条件下可以形成胚状体
 - 愈伤组织一旦形成,就不可能分化形成根、芽等器官
- 下列细胞工程技术中,培育出的个体的遗传物质没有发生改变的是 ()
 - 植物组织培养
 - 动物细胞融合
 - 细胞核移植
 - 真菌细胞融合
- 培养下列哪种生物与培育“白菜—甘蓝”使用的技术相同 ()
 - 胡萝卜组织培养
 - 胡萝卜—羊角芹
 - 鲤鲫核质杂交鱼新品种
 - 转基因大豆
- 细胞工程的所有实验都要求在无菌条件下进行。下列描述中正确的是 ()
 - 实验操作可在超净工作台或通风的环境中进行
 - 实验室必须用紫外线才能达到灭菌的目的
 - 实验所用器械、器皿和试剂都必须进行消毒
 - 实验者的双手应进行消毒或戴无菌手套

二、技能增进题

表达与交流 交流必须通过表达,表达的主要方式是语言。而图示的表达方式形象直观,更有助于交流。

20世纪60年代,一些科学家热衷于培

育地下结马铃薯、地上长番茄的植物,但很难成功。利用植物体细胞杂交技术,“番茄—马铃薯”植物就可能被成功培育。请你完成下列培育流程图,并与他人交流。





在细胞培养过程中,可能会发生各种意外,如细菌、霉菌或病毒的感染,培养箱温度失控等。另外,细胞在长期的培养过程中可能发生生物学特性的变异。因此,需要将细胞像种子一样保存起来。在细胞工程中,人们往往需要随时获得各种各样的细胞作为研究和实验材料,因此希望有一个细胞库,在细胞库里以妥当的方法保存种类繁多的细胞,以方便人们取用。

保存细胞的方法主要是降低温度。超低温(液氮 -196°C)冷冻保存是长期保存细胞的常用方法。细胞在超低温的环境下,其生长代谢活动降到最低点,处于休眠状态,可以长期保存。

超低温保存的关键是要预先将细胞进行冷冻保护处理。细胞内含有大量的水分,这些水分在低温下会冻结成冰。在结冰过程中,会形成大量的冰晶,很容易对细胞造成损伤。因此,如果细胞不进行冷冻保护处理,就直接进行超低温保存,会造成细胞的大量死亡。冷冻保护处理就是在细胞培养液内加入一定含量的冷冻保护剂,再进行超低温处理,这时,细胞就逐渐进入“休眠”状态,可以安然地“睡”上许多年。当人们需要这些细胞的时候,可以随时将它们取出解冻,细胞便会马上“苏醒”过来,再经过培养,就能迅速生长。



第二节 植物细胞工程的应用

学习目标

- 举例说出植物组织培养技术的应用
- 举例说出植物细胞培养技术的应用

关键词

快速繁殖技术
单倍体育种

绿色植物是生物圈中的重要成员,是自然界中最重要的自养生物,是人类赖以生存的基础。随着现代生物技术,特别是植物细胞工程的发展,植物组织培养、植物细胞培养及其代谢产物的工厂化生产、植物原生质体培养与体细胞杂交等都已成为现实。这对传统的生产方式产生了“革命性”的影响。

植物组织培养技术的应用

快速繁殖

为保持植物的优良性状,人们常采用嫁接、扦插等无性繁殖的方法繁殖植物。植物组织培养技术可以保持优良植物品种的遗传特性。

植物组织培养技术实现了种苗高效、快速繁殖,也被称为“快速繁殖技术”。植物组织培养时,需要严格执行一定的程序,幼苗在实验室的培养瓶中生长发育,整个生产过程实现微型化、精密化,所以又被称为“微型繁殖技术”。

目前,人们已利用快速繁殖技术进行蝴蝶兰、生菜、无子西瓜和杨树等的批量生产(图 2-7)。

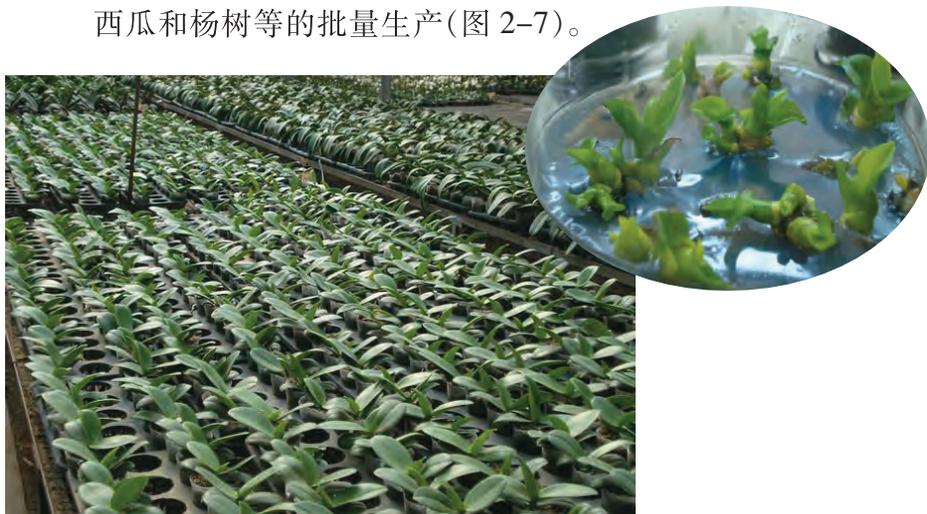


图 2-7 快速繁殖蝴蝶兰

利用植物组织培养技术繁殖植物,是在人工控制下进行的集约化生产,不受季节和恶劣天气的影响,可以全年进行连续生产,生产效率大大提高。

培育无病毒植物

由于植物细胞的细胞壁可以抵抗病毒的入侵，因此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其相邻的细胞，最终扩散至整个植株。植物病毒的种类很多。例如，感染甜菜的病毒、感染玉米的病毒、感染番茄的病毒等。这些病毒在植物体内的大量增殖会导致作物产量和品质下降(图 2-8)。



甜菜病毒病



玉米病毒病



番茄病毒病

图 2-8 病毒影响作物的产量和品质

培育无病毒作物对农业生产具有重要意义。科学家发现，植物分生组织细胞中极少含有病毒甚至不含病毒。他们采用培养茎尖生长点的方法或结合热处理法，通过组织培养除去绝大多数植物的病毒，可以大量繁殖无病毒植物。例如，马铃薯、甘薯和甘蔗等作物，草莓、菠萝和香蕉等水果，以及菊花、百合、康乃馨等花卉的脱毒苗的培育都获得了成功。

人工种子

天然种子一般是由种皮和胚(有些还有胚乳)构成的。种皮起保护作用；胚由胚芽、胚轴、胚根和子叶构成，将来发育成植株；胚乳或子叶含有大量的营养物质，是种子萌发和生长所不可缺少的营养来源。

利用植物组织培养技术可以获得大量的胚状体，再由胚状体生产人工种子：由植物组织培养得到的胚状体是不能直接用于播种的，必须有保护层，即用人工种皮将其包埋后才可以用于农业生产；如果要保持胚状体的活力和有利于人工种子的萌发，制备人工种皮所用的材料应该有韧性、透气、对胚状体无毒害作用；人工胚乳的主要成分应该含有无机盐、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，人工种子是指将在植物组织培养中得到的胚状体、不定芽、顶芽或腋芽，包埋在具有养分和保护功能的包被中，得到的在适宜的条件下能够生根发芽的颗粒体。人工种子的生产包括植物组织培养诱导胚状体的发生、胚胎发育同步化的控制以及人工种皮的包埋等过程。

实践：

1. 观察人工种子及其基本结构(图 2-9)。

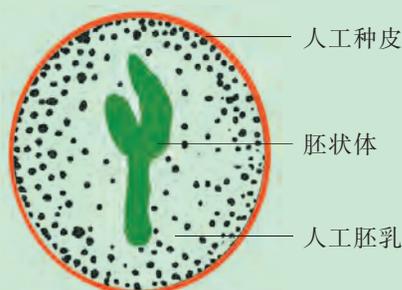
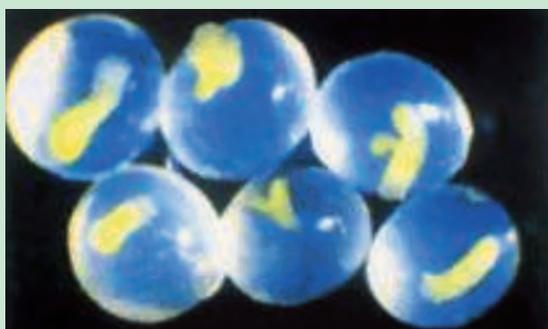


图 2-9 人工种子及其基本结构示意图

2. 模拟制作胚状体:取胡萝卜根或马铃薯块茎等,用刀片切削成胚状体样,模型大小以花生种子的大小为准,注意一端为胚芽,另一端为胚根。将胚状体模型放入清水中。

3. 模拟制作人工胚乳:将少量无机盐、麦芽糖、蛋白质等加入质量分数为 1.5%~2.0%的琼脂溶液,制备“人工胚乳”。

4. 模拟制作人工种皮:将花生沿缝剥

开,取出花生种子,选用果皮做“人工种皮”。

5. 制作人工种子:将人工胚乳和人工胚状体加入“人工种皮”,制成“人工种子”。

讨论：

1. 说出人工种子的基本结构及其作用。

2. 在生产人工种子时,人工胚乳和胚状体分别有哪些来源?

人工种子有许多优点,如不受环境因素的制约,一年四季都可以进行工厂化生产;繁殖速度快,可在短时间内提供大量种苗;胚状体是经人工无性繁殖产生的,有利于保存该种系的优良性状等。这些优点使人工种子在濒危植物保护、经济植物快速繁殖等方面具有广阔的应用前景。

植物细胞培养技术的应用

植物细胞代谢产物的工厂化生产

植物细胞在生命活动中会产生多种代谢产物,这些物质是植物生长到一定阶段产生的化学物质(也称为植物细胞次生代谢产物)。早在 20 世纪 60 年代,科学家就提出利用工业化手段培养植物细胞以获得大量植物细胞次生代谢产物的大胆设想。如今,经过科学家们的大量研究,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植物细胞次生代谢产物,并在实践应用上获得了巨大成功。例如,利用金鸡纳树生产的次生代谢产物奎宁是治疗疟疾的良药。我国科学家

也通过植物细胞培养的方法，成功地培养了我国一级珍稀濒危保护植物红豆杉（图 2-10）的细胞，并从中提取出重要的抗肿瘤药物——紫杉醇。

由于植物细胞培养的全部过程都是在人为提供的培养基和环境条件下进行的，因此这一过程具有细胞生长周期短、条件可控等特点。目前，植物细胞培养技术的利用已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、食品添加剂生产的宝贵原料，还可用于工农业生产（图 2-11）。例如，大规模培养桑等植物细胞，可制作成家蚕的饲料，解决因养蚕业的扩大带来的饲料供应紧张的问题。

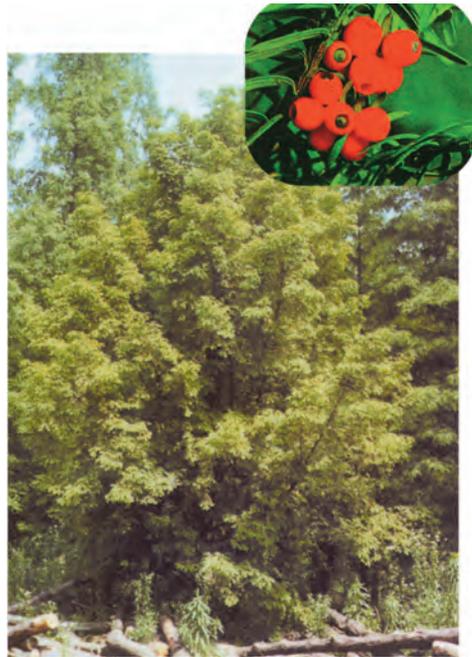


图 2-10 可提取紫杉醇的红豆杉



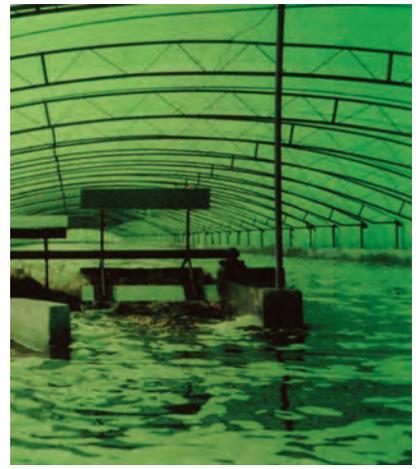
药用原料

培养人参细胞，提取人参皂苷，用于生产保健药品和美容护肤用品。



食品添加剂

培养并从植物细胞中提取各种天然的香精、食用色素、甜味剂等。



保健食品

大量培养螺旋藻，用于制作多种营养与保健食品。

图 2-11 植物细胞培养的应用

总之，利用植物细胞培养技术生产具有生理活性的植物细胞次生代谢产物，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

单倍体的诱导与利用是植物细胞工程成功应用的另一范例。

1921 年，科学家首次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、生活力弱且高度不育。但是，单倍体的发现对如何在育种中缩短育种周期、获得纯系等方面具有重要意义。

1924年,有科学家提出在育种中通过培育单倍体植株,再加倍获得纯种二倍体植株的设想(图 2-12)。这一精巧的育种方法的核心问题是单倍体植株的诱导与栽培。此后,科学家们广泛开展了这方面的研究。

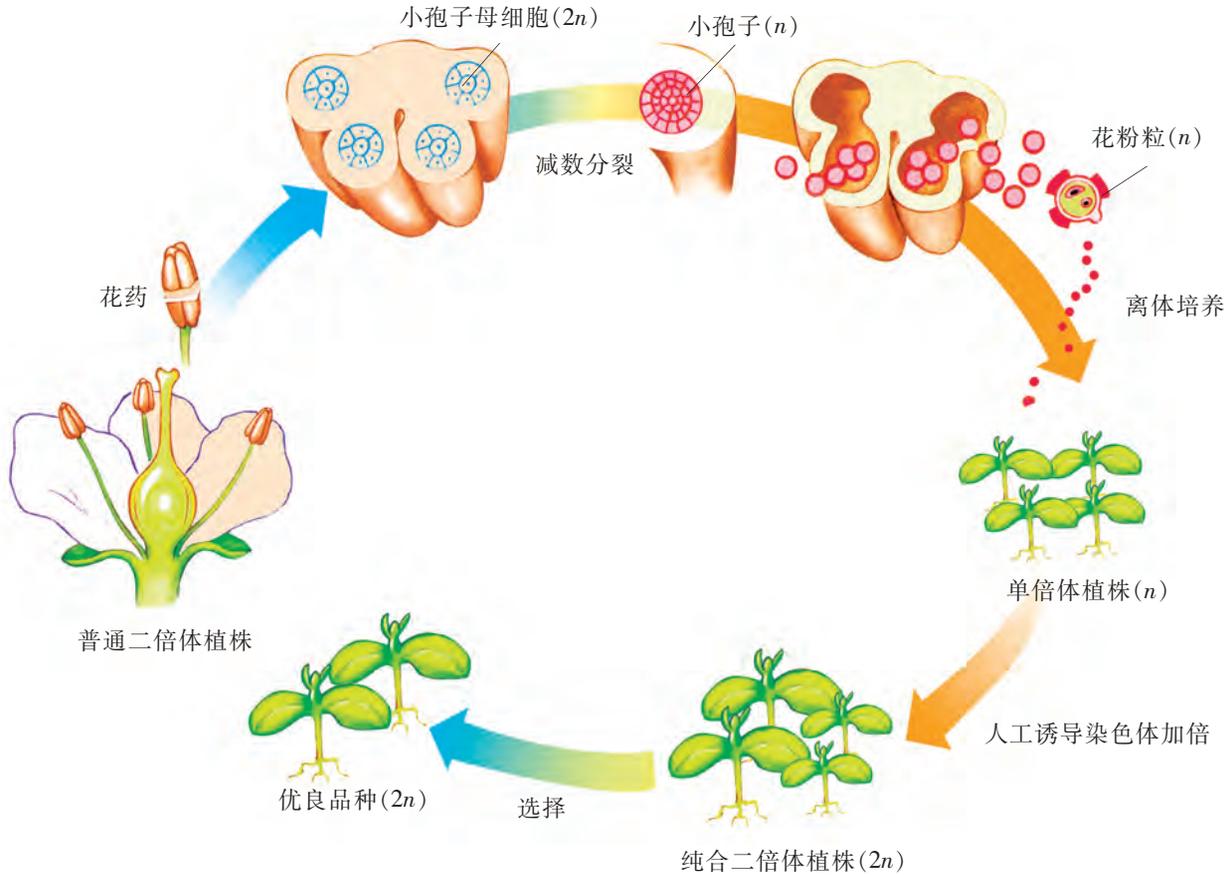


图 2-12 单倍体育种的过程示意图

花药由花药壁和花粉囊等构成。经过适当的诱导,花粉囊中的花粉可发育成单倍体胚,或脱分化形成愈伤组织,最终形成单倍体植株。在诱导单倍体植株的各个阶段(如愈伤组织、幼胚及小苗),若用质量分数为 0.2%~0.4%的秋水仙素溶液处理 24~48 h,就可能获得染色体数目加倍的、能正常开花和结果的二倍体植株。

从 1970 年开始,我国应用单倍体育种方法,已成功培育出小麦、小黑麦、玉米、辣椒、油菜等新品种,有些品种在世界上还是首创。例如,以冬小麦花药为材料培育而成的冬小麦京花 1 号、京花 3 号,粒大粒多、抗病性强、茎秆较矮、适应性较广。

植物细胞工程涉及许多学科,如植物学、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。

一、单项选择题

- 人们利用快速繁殖技术可以高效、快速地获得大量种苗,下面关于此技术的叙述,错误的是 ()
 - 严格执行一定的程序
 - 生产过程微型化
 - 直接在大田中生长发育
 - 生产过程不受季节和天气的影响
- 在人工种子中,将来发育成新植株的部分是 ()
 - 种皮
 - 胚乳
 - 胚状体
 - 胶囊
- 下列有关植物细胞培养技术应用的叙述,错误的是 ()
 - 通过工业化的细胞培养可获得人们需要的植物次生代谢产物
 - 植物细胞培养可以进行工厂化生产
 - 植物细胞培养的产物可以为生产药物、食品等提供原料
 - 植物细胞培养只能在药用植物中进行
- 下列过程中,利用的是植物细胞培养技术的是 ()
 - 在未受粉的雌蕊柱头上涂抹生长素类似物,获得无子番茄
 - 培育马铃薯的脱毒苗
 - 利用生物反应器悬浮培养人参细胞,提取人参皂苷
 - 制作人工种子
- 下列过程与植物细胞工程无关的是 ()
 - 培育单倍体植株
 - 培育无病毒的康乃馨花卉
 - 培养红豆杉细胞生产紫杉醇
 - 嫁接与扦插
- 下列有关单倍体育种的叙述中,错误的是 ()
 - 染色体为 $2n$,则花粉粒的染色体为 n
 - 单倍体植株经人工诱导染色体加倍后,可得到纯合二倍体植株
 - 我国已成功培育出小麦、玉米的单倍体植株
 - 花粉粒染色体数为 n ,则离体培养的单倍体植株染色体数一定为 $2n$

二、技能增进题

观察与思考 观察是仔细察看事物的现象、变化等;思考指针对某一个或多个对象进行探究、推理、综合等思维的活动。

观察与思考是进行生物学研究的基础,仔细观察下列图片,思考哪些是无性繁殖,哪些是有性繁殖。



A. 月季的扦插



B. 向日葵的种子萌发

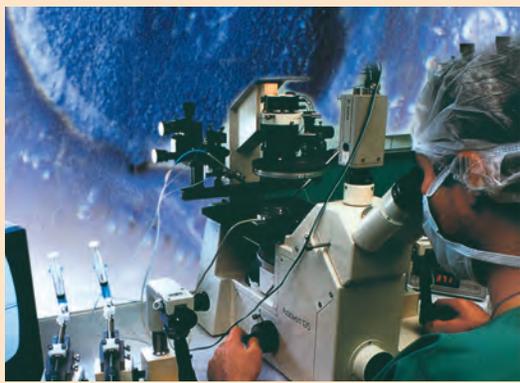


C. 石斛的组织培养

花粉培养

由于花药培养时一些二倍体的花药壁细胞亦可形成愈伤组织,从而增加了培育单倍体植株的难度。1974年有科学家用挤压法分离花粉进行培养。他们取下烟草成熟花蕾,在5℃放置48h后进行表面消毒,取出花药。让花药在28℃的液体培养基上漂浮培养并光照预处理4天。然后用器械挤破花药,制成花粉悬液。经过滤、离心、培养,只得到约5%的花粉植株。其成功率低的原因,一方面是由于挤压损伤了花粉,另一方面可能由于缺乏“花药因子”,花粉生长、发育欠佳。为了克服上述缺点,1977年,一些科学家提出了自然散开法收集花粉的方法。他们将花蕾或幼穗在7℃冷处理2周后,让其在适当的液体培养基表面培养,待花药自然开裂散落出花粉后,离心收集花粉,置于含肌醇和谷酰胺的培养基中生长。虽然本方法使花粉成株率有所提高,但与花药培养相比仍然低得多。不过这些花粉培养一旦成功,则可较明确地判断为单倍体植株。

虽然用花药与花粉培养单倍体植株目前都已取得长足的进展,但白化苗出现过多仍是亟待解决的问题。



走近职业

生物技术工作者

生物技术工作者是指从事生物技术研究与开发的专业人员,主要通过改造生物体或加工生物原料,为人类生产和生活作出贡献。生物技术的研究领域包括细胞工程、基因工程、发酵工程、酶工程、蛋白质工程。生物技术工作者一般应具有生物科学、生物技术及相关专业大学本科以上学历。

(图为生物技术工作者在使用显微操作仪)



第三节 动物细胞工程的应用

动物细胞工程作为细胞工程的重要组成部分,是在细胞生物学和分子生物学的理论指导下,根据人类的需要,一方面深入探索并改造动物的遗传特性,另一方面应用工程技术手段,大量培养动物细胞。随着克隆羊“多莉”等一批无性繁殖动物的诞生,人类对动物生命的改造,包括人类对自身的改造,已经进入到一个崭新的阶段。

学习目标

- 简述动物细胞与组织培养的过程
- 举例说出细胞融合和单克隆抗体
- 关注克隆技术的伦理问题

动物细胞与组织培养

动物细胞工程开始于 20 世纪初,一般包括动物细胞与组织培养、细胞核移植、体细胞克隆、细胞融合、单克隆抗体制备等技术。动物细胞与组织培养是指在体外模拟动物体内环境,将动物细胞或组织在温度适宜、营养充足、无菌等条件下培养,使其继续生长、增殖并维持原有结构和功能的技术(图 2-13)。这项技术是动物细胞工程的基础。用于培养的动物细胞与组织大多取自动物胚胎或出生后不久的幼龄动物的器官或组织,如肾、肺、肌肉等。

关键词

体细胞克隆 细胞融合

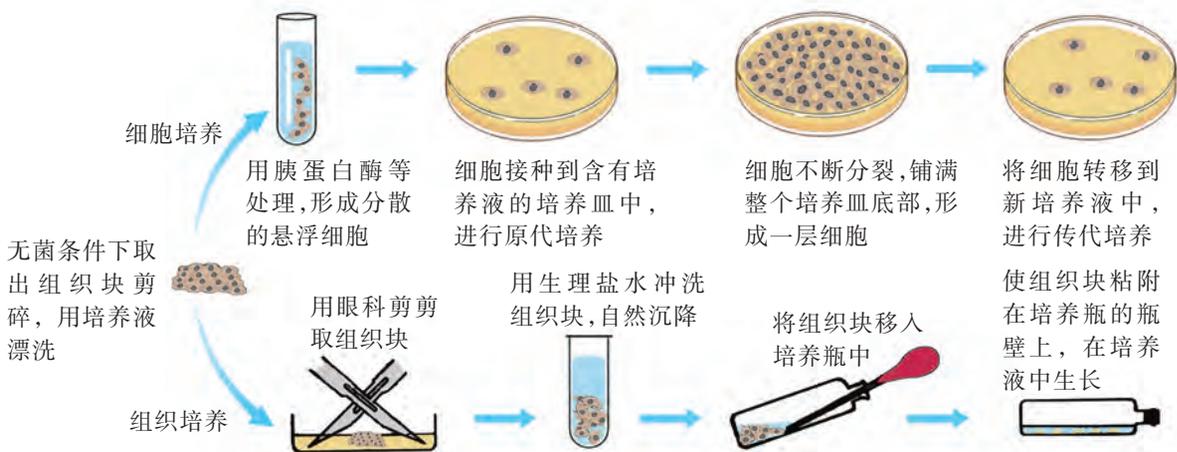


图 2-13 动物细胞与组织培养过程示意图

动物细胞培养与动物组织培养的方法类似,主要区别是动物细胞培养过程中需要用胰蛋白酶等使组织块中的细胞离散,而动物组织培养过程中不需要使细胞离散开。

动物细胞培养需要严格的环境条件,包括温度、pH、气体

和营养物质等。例如,培养哺乳动物细胞的最适温度为 36.5 °C 左右,最适 pH 范围为 7.2~7.4。容器中 O₂ 的含量直接影响细胞的代谢活动,CO₂ 的含量则影响培养环境的 pH。动物细胞培养需要多种物质,如葡萄糖、氨基酸、无机盐、微量元素和促生长因子等。只有满足了这些基本条件,细胞才能在体外正常存活和生长。

动物细胞与组织培养都需要选择合适的培养基。根据营养物质的来源不同,一般可将培养基分为天然培养基和合成培养基。天然培养基主要取自动物血清、动物组织提取液和鸡胚汁等,具有成分复杂、营养价值高的特点。合成培养基是人工配制的,具有成分明确、便于控制实验条件的特点。由于缺乏天然培养基中的某些无法替代的成分,在合成培养基中一般仍需加入一定量的动物血清,以满足动物细胞与组织培养的需要。

当然,整个培养过程还需对培养基和培养器具进行无菌处理,保证细胞培养处在无菌环境中,必要时可添加适量的抗生素,以避免污染。定期更换培养液也很重要,因为代谢产物积累过多也会对细胞自身造成危害。

一般来说,各种动物细胞与组织都可以进行体外培养,其中幼体细胞与组织比老龄细胞与组织更容易培养;分化程度低的细胞与组织比分化程度高的细胞与组织更容易培养;肿瘤细胞与组织比正常细胞与组织更容易培养。动物细胞与组织的体外培养可分为原代培养和传代培养。任何动物细胞与组织的培养均需从原代培养开始,原代培养是指从供体获取细胞与组织后的初次培养。由于组织或细胞刚刚离体,细胞的生物学特性未发生很大变化,在这一阶段中,培养的细胞最接近体内组织或细胞的生长特性,很适合用于药物测试、基因表达等实验研究。随着培养时间的延长,体外培养的细胞数量会不断增加,当细胞数量增加到一定程度后,由于培养空间的限制、营养物质的消耗等,细胞的生长和增殖会逐渐减缓。将原代培养的细胞分离稀释后转入新的培养瓶中继续培养,称为传代培养。一般情况下,传代培养 10~50 次后,细胞增殖会明显减缓,甚至完全停止。

动物细胞与组织培养为疫苗、干扰素、单克隆抗体等生物制品的大规模生产提供了全新的手段。

动物细胞核移植与体细胞克隆

克隆一词来源于希腊语,原意是指利用枝条扦插或嫁接进行无性繁殖。现在,克隆已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。例如,进行细菌实验时,在培养皿中观察到的一个个菌落,其实就是细菌的克隆。

用体细胞核移植技术进行的克隆称为体细胞克隆。这一过程需要将供体体细胞的细胞核注入受体去核卵细胞中,经过培养后发育成胚胎,进而形成动物个体。

历史长河

动物细胞核移植技术的建立和发展

第一个提出对动物进行细胞核移植实验的人是德国胚胎学家汉斯·施佩曼(H. Spemann),他因发现胚胎发育中背唇的“组织中心”作用而获1935年诺贝尔生理学或医学奖。他构想了一个“奇异的实验”:取出一个卵细胞的细胞核,再把取自发育到后期胚胎的一个细胞核移入这个去核卵细胞。但由于当时的技术原因,他没能找到将细胞核导入卵细胞的方法。

1952年,美国的两位科学家罗伯特·布里格斯(R. Briggs)和托马斯·金(T.J. King)首先利用两栖类动物卵细胞建立了细胞核移植技术。与哺乳类动物比较,两栖类动物的卵数量较多,容易获得,而且体积较大,操作方便,因此被选作为实验材料。20世纪60年代初,英国剑桥大学的约翰·戈登(J. Gurdon)将非洲爪蟾蝌蚪的小肠上皮细胞核移植到非洲爪蟾未受精的去核卵细胞中,培育出

非洲爪蟾的蝌蚪。

在大量低等动物实验成功之后,研究人员开始将目光转向哺乳动物。随着技术手段的发展,哺乳动物的细胞核移植实验开始进入一个令人瞩目的新阶段。1981年,瑞士和美国的一些科学家首次对小鼠卵细胞进行核移植,实验获得成功。他们将囊胚内细胞团细胞的核移入去核的受精卵中,经培养发育到囊胚期,再将此胚胎植入代孕小鼠的子宫内,最后产下两雌一雄仔鼠,并发育成可育的个体。

我国的细胞核移植研究开始于20世纪50年代,主要的研究对象是两栖类和鱼类。1961年,童第周等以金鱼和鲫鲢鱼为材料,进行不同鱼类之间的细胞核移植,用以研究杂交细胞核与纯种细胞核在发育功能上的差异以及生物细胞的细胞质对细胞核的影响。

1996年7月,英国科学家维尔穆特等人采用成年绵羊的乳腺上皮细胞,通过细胞核移植技术,获得了世界上首例体细胞核移植克隆羊“多莉”(图2-14),由此翻开了动物克隆史上崭新的一页。2018年1月25日,我国科学家在国际权威期刊《细胞》上发表文章,利用体细胞核移植技术首次成功地克隆出“中中”“华华”两只猕猴。猕猴和人同属于灵长类,此前克隆非人灵长类动物在技术上存在着许多困难,也因此成为世界性生物技术难题。这次体细胞克隆猴的成功培育,预示着我国将成为非人灵长类动物模型的主要研发基地。

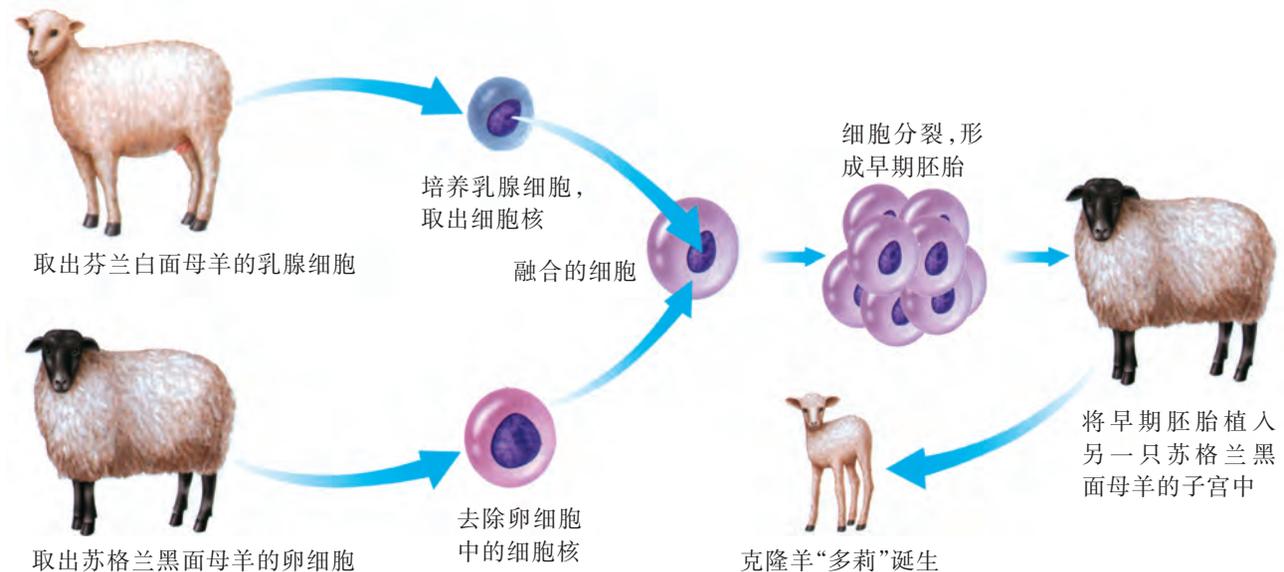


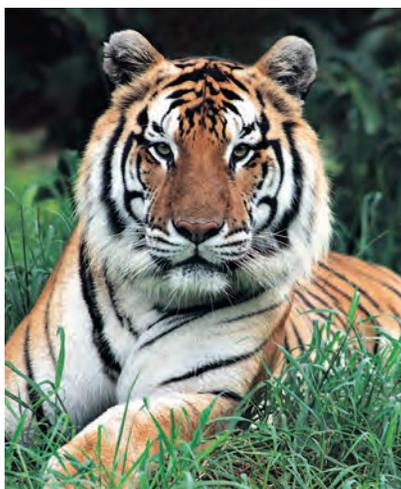
图 2-14 克隆羊“多莉”的产生过程示意图

在医药卫生领域,转基因克隆动物可以作为生物反应器,生产许多重要的医用蛋白;在治疗人类疾病时,转基因克隆动物细胞、组织和器官可以作为异种移植的供体用于组织器官的移植。此外,研究克隆动物和克隆细胞可使人类更深入地了解胚胎发育及人体衰老的过程;用克隆动物做疾病模型,能使人们更好地追踪和研究疾病的发展过程以便更有效地治疗疾病。

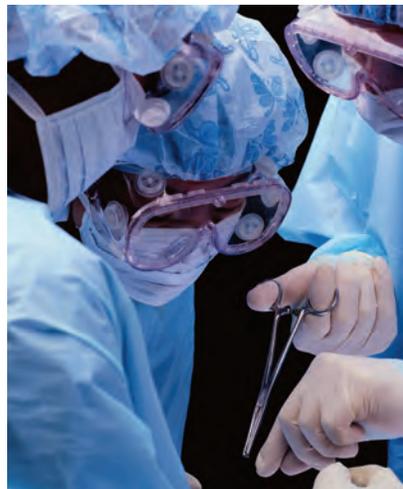
克隆技术在克服动物种间杂交繁殖障碍、创造新物种等方面具有重要的科学意义和潜在的经济价值。克隆技术特别是体细胞克隆技术自问世至今,已经展现了广阔的应用前景(图 2-15)。



利用克隆技术大量复制实验动物,减少实验误差



利用异种动物借腹妊娠,挽救珍稀动物



利用患者自身的细胞培育新的组织或器官以治疗疾病

图 2-15 克隆技术应用举例

体细胞克隆技术在畜牧业、医药卫生以及其他领域有着广泛的应用前景。在畜牧生产中,利用体细胞克隆技术可以加速家畜遗传改良进程,促进优良畜群的繁育;在保护濒危物种方面,有望利用体细胞克隆技术增加这些动物的存活数量。

在培育“多莉”的过程中,科学家共进行了 277 次乳腺细胞核移植实验,最终只获得这一只克隆羊“多莉”。这说明动物体细胞克隆实验的成功率还很低,克隆过程中还有许多技术有待进一步完善。但我们相信,随着克隆技术的进一步发展,其应用范围将日益广泛。

同时,社会上对克隆动物的安全性问题引发了一些争议,人们备加关注克隆动物(人)的安全性和伦理问题。例如,如何看待治疗性克隆(克隆人体器官)或生殖性克隆(克隆人)的问题就争议不断。

事实：

1. 克隆羊“多莉”的问世，很快在全世界引发了一场治疗性克隆和生殖性克隆的大讨论。
2. 人与绵羊均属于哺乳动物，而且试管婴儿等人类辅助生殖技术目前已经相当成熟。
3. 有人设计了生殖性克隆和治疗性克隆的技术路线(图 2-16)。

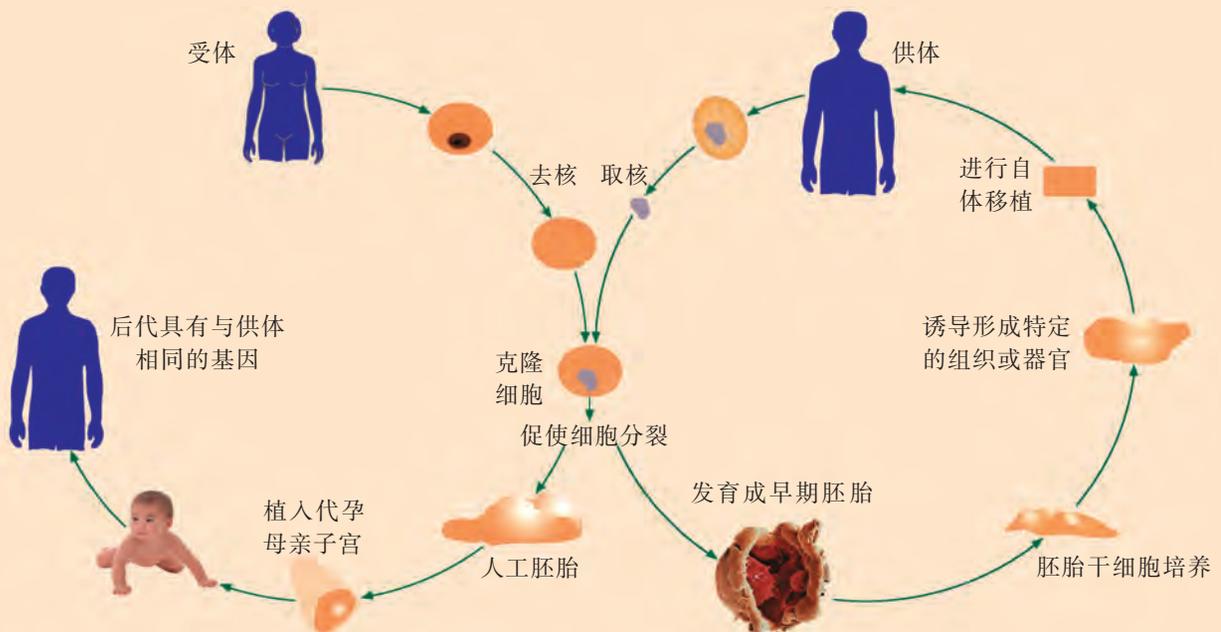


图 2-16 生殖性克隆(左)和治疗性克隆(右)的技术路线

分析：

1. 根据图 2-16，从社会伦理等方面思考，生殖性克隆会引发哪些社会问题？
2. 许多国家明确禁止生殖性克隆，有些国家支持治疗性克隆，生殖性克隆与治疗性克隆的区别在哪里？请你在图 2-16 中指出应阻断哪一步以阻止生殖性克隆的进行。

动物细胞融合和单克隆抗体

细胞融合技术是研究细胞间遗传信息的转移、染色体上的基因定位等的有效途径。动物细胞融合是指在一定的条件下将两个或多个动物细胞融合为一个细胞的过程。科学研究表明，不同类型的动物细胞之间能进行融合，形成杂种细胞，如鼠—鸡、鼠—猴杂种细胞等。

动物细胞融合技术的最重要的用途之一是制备单克隆抗体。

事实：

1. 高等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,维护身体健康。为了增强人体的免疫力,临床上常常需要大量的医用抗体。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,因而治疗效果较差。若采取单个的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。可惜的是,在体外培养条件下,浆细胞不能无限增殖。

2. 在体外培养条件下,肿瘤细胞(如骨髓瘤细胞)具有无限增殖的特性。

3. 根据上述事实,科学家大胆想象并设计了制备单克隆抗体的方案(图 2-17)。

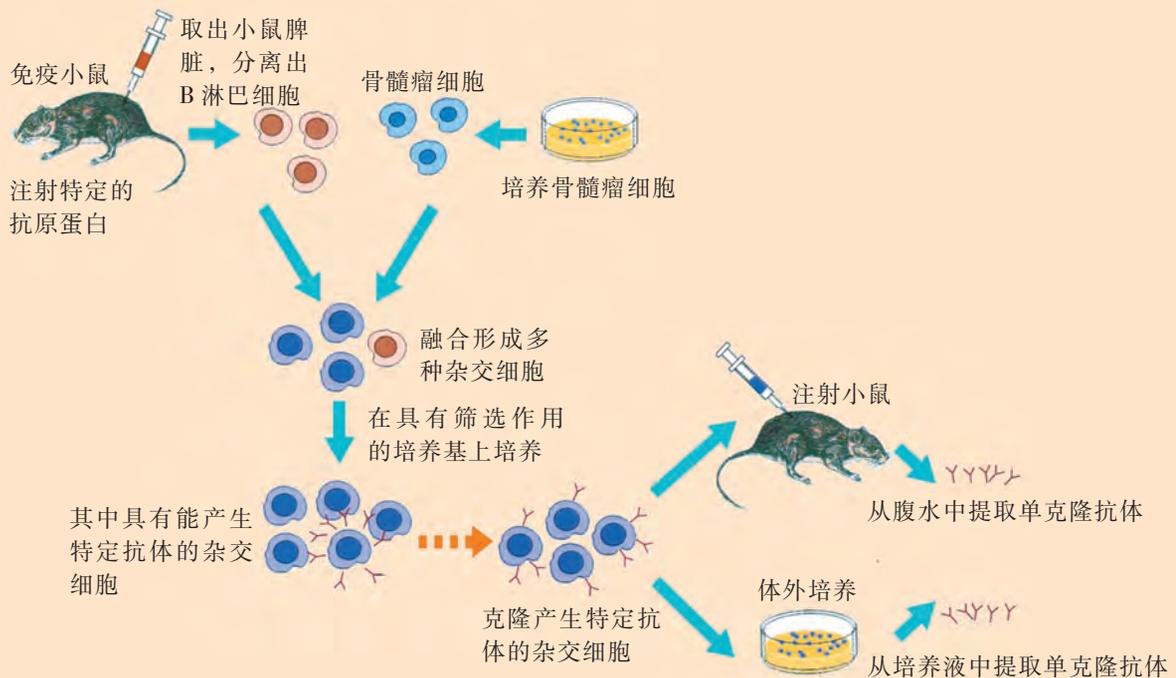


图 2-17 单克隆抗体的制备过程

分析：

本设计方案的巧妙之处在哪里？

开发治疗恶性肿瘤的抗体是单克隆抗体研究中最活跃的领域之一。据统计,目前进入临床试验的单克隆抗体中有30%以上用于治疗各种肿瘤,如大肠癌、淋巴瘤、白血病等。单克隆抗体还可以用于治疗由于免疫系统紊乱导致的疾病,如类风湿性关节炎、牛皮癣、系统性红斑狼疮、哮喘、过敏性鼻炎等。器官移植后会发生移植排异,根据免疫移植的治疗原则,制备的针对免疫细胞或分子的单克隆抗体具有较明显的治疗效果,副作用较小。

一、单项选择题

1. 下列关于动物细胞培养的叙述中,错误的是 ()

- A. 用于培养的细胞大多取自动物胚胎或幼龄动物体
- B. 需要使用胰蛋白酶等获得分散的悬浮细胞
- C. 动物细胞培养时最适温度为 20 ℃
- D. 动物细胞培养时需要选择合适的培养基

2. 动物细胞培养过程的顺序是 ()

- ① 原代培养 ② 传代培养
- ③ 胰蛋白酶处理组织,形成分散的悬浮细胞

- A. ①②③ B. ①③②
- C. ②①③ D. ③①②

3. 下列关于克隆技术的叙述中,错误的是 ()

- A. 20 世纪末克隆技术已经完全成熟
- B. 在畜牧业、医药业有广阔的应用前景
- C. 可能会带给人类许多负面的影响
- D. 克隆实际上是一种无性繁殖方式

4. 下列关于体细胞克隆的叙述中,错误的是 ()

- A. 供体提供体细胞的细胞核
- B. 受体提供去核卵细胞的细胞质

- C. 细胞核移植是体细胞克隆的关键步骤
- D. 克隆出的后代与供体的遗传物质和表现型完全一致

5. 下列关于动物体细胞克隆的意义的描述中,你认为不恰当的是 ()

- A. 转基因克隆动物可以作为生物反应器,产生医用蛋白
- B. 治疗人类疾病时,转基因克隆动物的细胞、组织和器官有可能作为异种移植的供体
- C. 克隆技术在克服动物种间杂交障碍、创造新物种等方面具有一定的意义
- D. 克隆技术在保护濒危动物方面可以发挥较大的作用,而对人类治疗性克隆完全没有意义

6. 下列关于单克隆抗体的叙述中,错误的是 ()

- A. 单克隆抗体可以治疗如大肠癌等恶性肿瘤
- B. 单克隆抗体可以治疗免疫系统紊乱导致的疾病
- C. 使用单克隆抗体对免疫细胞的副作用较大
- D. 单克隆抗体可用于治疗器官移植后的排异作用

二、技能增进题

分析与比较 分析就是将研究对象的整体分为不同部分、层次等,并分别地加以考察的认识活动;比较是经常使用的一种科学方法,它既要研究事物之间的共同点,又要分析

事物之间的不同点。在生物学研究中,常常要根据实验的异同来寻求科学的结论。

尝试用表格形式(见下表)比较植物组织培养技术与动物体细胞克隆技术的异同。

	植物组织培养技术	动物体细胞克隆技术
原理		
繁殖类型		
...		

在动物体细胞克隆领域,我国也经历了与世界相似的发展历程。在“863”计划等国家大型科技项目的大力支持下,通过科学家不懈的努力,我国取得了一系列重大进展。

体细胞克隆山羊 1999年10月,中国科学院发育生物研究所和扬州大学合作研究,取普通山羊体细胞在体外培养,并将外源基因整合到体细胞的染色体中,然后挑选出已含有外源基因的体细胞进行克隆,进而得到转基因体细胞克隆羊。此法克服了显微注射法的缺点,成功率大幅度提高。同时,这也使得大规模生产转基因羊技术取得突破性进展。2000年6月,西北农林科技大学研究组采集山东小青羊的耳皮肤细胞,经过体外培养和核移植等操作过程,成功地获得了体细胞克隆山羊。

体细胞克隆牛 2002年1月,中国科学院动物研究所等成功地获得体细胞克隆荷斯坦奶牛和盖普威种公牛。克隆牛供核体细胞来源于两头优质成年牛的牛耳成纤维细胞,一头是高产荷斯坦奶牛,另一头是盖普威种公牛,受体卵细胞来源于鲁西黄牛的卵巢。此次共生产克隆牛14头,其中13头为荷斯坦牛,1头为盖普威牛。同年,中国农业大学研究组利用冀南纯种小母牛的卵细胞和耳皮肤细胞成功地克隆出第一头中国优质黄牛——红系冀南牛。

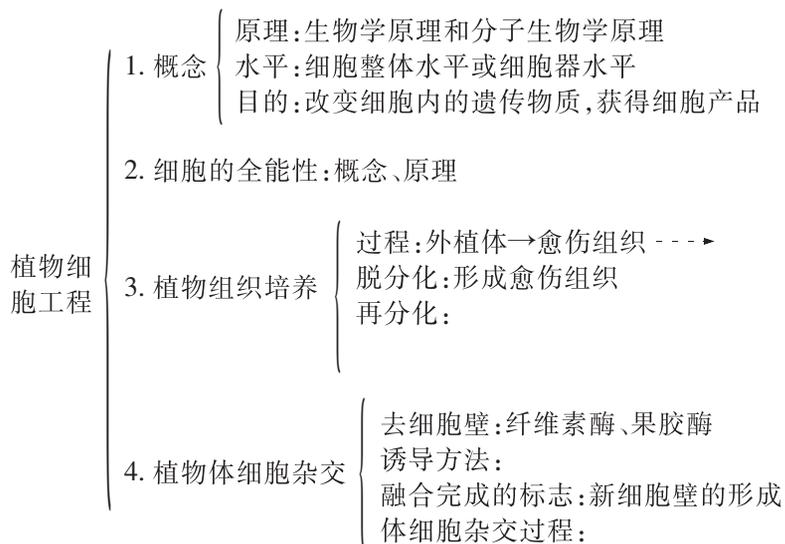
以上成果的获得充分表明,我国科学家已经掌握了动物体细胞克隆的关键技术,标志着我国动物克隆研究已跻身于世界先进行列。



本章自主小结

细胞工程已成为生物工程的重要组成部分。细胞工程可以分为植物细胞工程、动物细胞工程等。根据使用技术的不同,又可将细胞工程技术分为植物组织培养技术、细胞融合技术和细胞核移植技术等。

可以学习通过归纳表的方式,对本章内容进行自主小结。例如,对植物细胞工程的内容进行如下小结。



在完成上述有关植物细胞工程归纳表的填写后,思考下列问题,并尝试通过归纳表的方式对本章的其他内容进行小结。

1. 举例说出细胞工程的发展事例。细胞工程所使用的主要技术包括哪些?
2. 什么叫细胞的全能性?简要叙述植物组织培养概念的内涵。利用胡萝卜的根进行组织培养的基本过程是怎样的?什么是愈伤组织?愈伤组织发育为完整植株需要什么条件?
3. 什么叫细胞的融合技术?常用的融合技术有哪些?什么叫植物体细胞杂交技术?为什么说“白菜—甘蓝”克服了种间的杂交屏障?
4. 什么叫细胞核移植技术?为什么细胞工程技术要求在无菌条件下实施?无菌操作要注意哪些方面?
5. 植物组织培养技术有哪些应用?简述人工种子的基本结构和制备过程。植物细胞培养技术有哪些应用?简述单倍体育种的基本过程。
6. 简述动物细胞和组织培养的基本过程。什么是克隆技术?克隆羊是怎样产生的?如何看待克隆的利与弊?单克隆抗体有哪些用途?它是如何制备的?

如果有疑难,可以和同学、老师进行探讨,也可以通过图书馆和网络,寻求问题的答案。相信你一定能够正确回答上述问题!

1. 下列不需植物组织培养技术的是

()

- A. 花药离体培养获得单倍体植株
- B. 离体培养胡萝卜组织和细胞
- C. 培育转入产碱杆菌基因的拟南芥
- D. 用柳树枝条扦插繁殖

2. 下列叙述中,与细胞杂交无关的是

()

- A. 利用电场和聚乙二醇等促进细胞融合
- B. 借助显微操作仪,利用微吸管进行细胞核移植
- C. 用纤维素酶除去细胞壁形成原生质体
- D. 运用基因定点诱变技术改造酶的结构

3. 植物组织培养的过程一般可以归纳为: ① $\xrightarrow{\text{脱分化}}$ ② $\xrightarrow{\text{再分化}}$ ③ \longrightarrow ④。下列叙述中,错误的是

()

- A. ③可能是胚状体
- B. ②可能是愈伤组织
- C. ③ \rightarrow ④可能是炼苗移植
- D. ③可用于生产人工种子

4. 将胡萝卜韧皮部细胞培养成幼苗时,培养基中不需要的成分是

()

- A. 蔗糖和氨基酸
- B. 生长素和细胞分裂素
- C. 水和无机盐
- D. 纤维素酶和果胶酶

5. 研究植物体细胞杂交的目的是

()

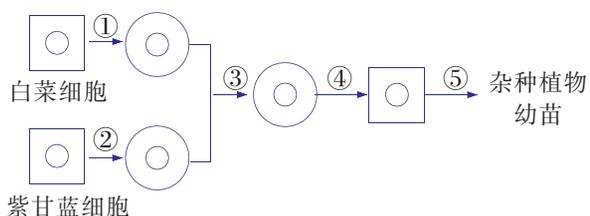
- A. 逾越物种间障碍获得杂种植株
- B. 打破细胞壁障碍产生杂种细胞
- C. 原生质体融合获得多倍体植株
- D. 通过愈伤组织进行无性繁殖

6. 下列关于动物细胞培养的叙述中,错误的是

()

- A. 实验材料常取自动物胚胎或幼龄动物
- B. 动物血清含有合成培养基缺乏的成分
- C. 动物细胞培养可获得大量分泌蛋白
- D. 胰蛋白酶被用于动物组织培养

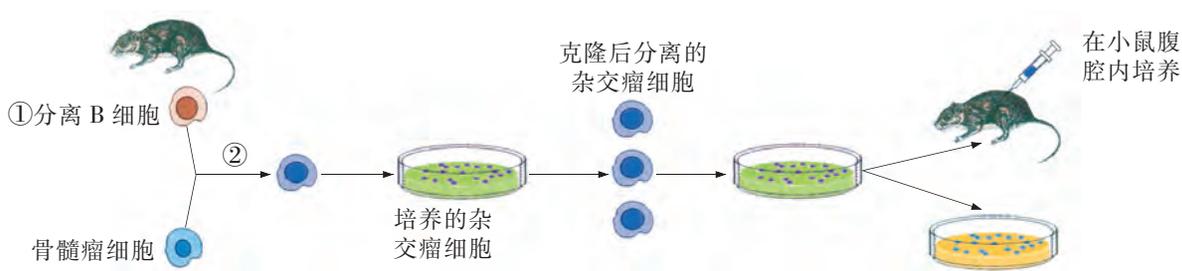
7. 请根据下图,回答相关问题:



(1) 过程①②应使用_____处理细胞,以去除植物细胞壁获得_____。

(2) ③的结果是形成_____,过程⑤中进行的细胞分裂方式是_____,该过程诱导形成的_____经过分化形成杂种植物幼苗。

8. 下图是某同学设计的生产破伤风杆菌抗体的实验方案,请据此回答:



(1) 该方案实施前,应将_____注入小鼠体内,以获得产生相应抗体的_____。

(2) 图中②为_____过程,常用_____作为诱导剂,该杂交细胞继承了_____,不

仅能分泌_____,还可在体外培养条件下_____。破伤风杆菌抗体最终可以从_____和_____中提取。

(3) 该方案的目的是_____。