



普通高中教科书

生物学

选择性必修3

生物技术与工程

SHENGWUXUE



北京师范大学出版社

普通高中教科书

生物学

选择性必修3
生物技术与工程

主编 付尊英 刘广发

北京师范大学出版社

北师大版



第1章 发酵工程

- 第一节 微生物纯培养物的获得 / 2
- 第二节 微生物纯培养物的选择 / 11
- 第三节 传统发酵技术 / 19
- 第四节 发酵工程的过程与原理 / 25
- 第五节 发酵工程的应用 / 31

第2章 细胞工程

- 第一节 植物细胞工程 / 37
 - 一 植物组织培养技术 / 37
 - 二 植物体细胞杂交技术 / 43
 - 三 植物细胞工程的应用 / 47
- 第二节 动物细胞工程 / 52
 - 一 动物细胞培养技术 / 52
 - 二 动物细胞融合技术 / 57
 - 三 动物细胞核移植技术 / 63
 - 四 干细胞的研究与应用 / 66
- 第三节 胚胎工程 / 71
 - 一 受精和早期胚胎的发育 / 71
 - 二 胚胎工程的技术手段 / 74

第3章 基因工程

- 第一节 基因工程的原理 / 82
- 第二节 基因工程的基本工具 / 86
- 第三节 基因工程的操作程序 / 91
 - 一 目的基因的获得 / 91
 - 二 基因表达载体的构建 / 98
 - 三 目的基因导入受体细胞 / 102
 - 四 目的基因的表达及产物检测鉴定 / 105
- 第四节 基因工程的应用 / 108
- 第五节 蛋白质工程 / 112

第4章 生物技术的安全与伦理问题

- 第一节 转基因产品的安全性引发社会关注 / 118
- 第二节 禁止生殖性克隆人 / 123
- 第三节 生物武器对人类的威胁 / 126



第 1 章

发酵工程

自然界中，大多数植物、动物和微生物是人类的朋友。从早餐的一个馒头、一片面包，我们就开始享受微生物朋友的馈赠了。微生物不仅丰富了食品的种类、提高了食品的品质，还提供了众多治疗疾病的药物、提高农作物产量的菌肥等。人们是如何利用这些微生物为人类提供众多产品的呢？让我们走进实验室，亲自动手，从自然界获得某些微生物；走进工厂，观察人们是怎样提供有利条件使微生物更多、更快合成产物的。

学习目标

1. 在理解利用不同培养基可分离纯化、培养不同微生物且不同微生物合成产物不同的基础上，形成物质与能量观等生命观念，并根据不同微生物的特点，解释工业、农业、环境保护等领域的相关现象。
2. 基于微生物生长和合成产物的特性，运用归纳、概括和推理等科学思维方法，分析自然发酵和发酵工程生产产品的条件，阐释自然发酵，以及发酵工程生产产品的原理。
3. 针对传统发酵食品的制作，结合发酵工程生产产品的实例，通过实验、讨论、调查等科学探究活动，阐述传统发酵和发酵工程的异同及工程技术和微生物发酵有机结合的内涵。
4. 主动关注工业、农业和环境保护等领域的公共问题，运用发酵工程原理，提出解决问题的方法或建议。

第一节 微生物纯培养物的获得

在超市购买酸奶时，你会发现酸奶的配料表中含有生牛乳、乳酸菌（乳杆菌和嗜热链球菌等）、白砂糖以及乳清蛋白等。配料表中的乳酸菌可使生牛乳发酵产生乳酸，是制作酸奶的微生物菌种。这些菌种是怎样获得的呢？



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注获得乳酸菌纯培养物的过程。

工业化生产酸奶所用的乳酸菌，如嗜酸乳杆菌、干酪乳杆菌、嗜热链球菌等都是从自然发酵的酸奶中分离得到的不同乳酸菌的纯培养物。从酸奶中分离乳酸菌的纯培养物，首先，需配制适合乳酸菌生长的培养基，配制的培养基及相关物品经高压蒸汽灭菌后，制成无菌固体平板和试管斜面。接着，用灭菌后的水将自然发酵的酸奶进行系列稀释，取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释度各 0.2 mL 滴加到固体平板上，用无菌涂布器涂布均匀，盖上培养皿。随后，将涂布好的固体平板于 37℃ 倒置厌氧培养 48 h，长出多种微生物的单菌落。最后，分别挑取单菌落接种在不同的试管斜面上，经 37℃ 培养 48 h，得到不同微生物的纯培养物。经过鉴定，选取制作酸奶所需的各种乳酸菌的菌株。

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 从自然发酵的酸奶中分离乳酸菌时，配制的培养基有什么作用？
2. 分离乳酸菌的过程中培养基及相关物品为何要高压蒸汽灭菌？
3. 怎样从含有多种微生物的自然发酵的酸奶中得到不同乳酸菌的菌种？

培养基为微生物的生长提供营养物质

乳酸菌的生长、繁殖需要营养物质。在实验室及生产中，微生物生长所需的营养物质通过培养基（medium）来提供。因此，从自然发酵的酸奶中分离乳酸菌首先需要配制培养基。培养基就是人工配制的适合微生物生长和繁殖的营养基质。培养基的营养成分主要包括碳源、氮源、水、无机盐和微量元素等。

根据物理状态的不同，培养基可分为固体培养基和液体培养基两类。固体培养基是在液体培养基的基础上添加一定量的凝固剂制备而成的。琼脂是常用的凝固剂，在 98℃ 以上

熔化，45℃以下凝固。固体培养基为微生物的生长提供了营养表面。将高温灭菌后熔化的培养基倒入无菌培养皿，凝固后形成固体平板（图 1-1）。将加热熔化的培养基分装到试管中，高温灭菌后斜置，凝固后形成试管斜面（图 1-2）。



图 1-1 固体平板制备

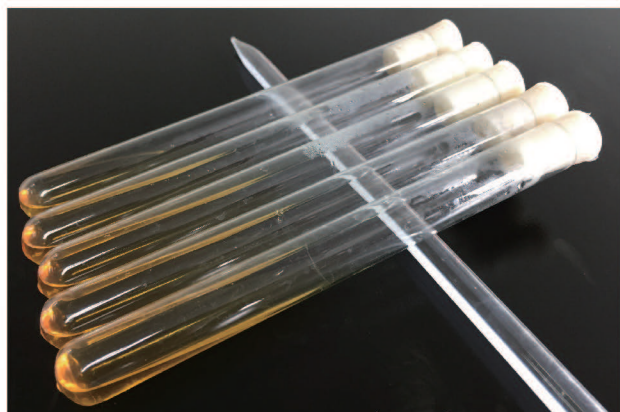


图 1-2 铺制试管斜面

纯培养物的获得需要无菌条件

配制培养基所需的材料及用具中都有微生物的存在。所以在分离乳酸菌时，配制的培养基及相关物品需要高压蒸汽灭菌，杀灭这些微生物。除高压蒸汽灭菌（图 1-3）外，灭菌的方法还有多种，如干热灭菌、火焰灭菌（图 1-4）、过滤除菌等。灭菌就是利用物理或化学的方法杀灭或除去物品中所有微生物的过程。灭菌后的物品被称为无菌物品。灭菌是获得微生物纯培养物的前提。而利用物理或化学的方法杀灭物体表面、人体皮肤、环境中等部分微生物（不包括芽孢）的过程称为消毒，如酒精消毒、巴氏消毒等。对于操作人员的双手，一般是利用酒精消毒的方法杀灭大多数的微生物。



图 1-3 高压蒸汽灭菌



图 1-4 火焰灭菌



小资料

纯培养物

在人为设定的条件下培养、繁殖得到的微生物群体被称为培养物（culture），只有一种微生物的培养物被称为纯培养物（pure culture）。在实验室和生产中，纯培养物也被称为菌株（strain）。

实验室及生产中常用的灭菌和消毒方法如表 1-1 所示。

表 1-1 常用的灭菌和消毒方法

灭菌和消毒方法	使用的设备及物品	过程	适用范围
高压蒸汽灭菌	高压蒸汽灭菌锅	121℃, 103 kPa, 20~30 min	耐高温且灭菌后不需保持干燥的物品, 如培养基、耐热物品、发酵设备等
干热灭菌	电热鼓风干燥箱	160~170℃, 1~2 h	耐高温且灭菌后需要保持干燥的物品, 如分装药物的玻璃瓶、金属器械等
紫外线灭菌	紫外灯	30 W 照射 30 min	局部空间灭菌, 如超净工作台、无菌室
火焰灭菌	酒精灯	烧灼	微生物接种工具, 如接种针、接种环以及接种过程中试管口、锥形瓶口等
过滤除菌	过滤器	用内置微孔滤膜的过滤器过滤	气体、对热不稳定的溶液, 如空气、液体药物等
化学消毒	酒精等化学消毒剂	体积分数为 70%~75% 的酒精擦拭等	皮肤表面等
巴氏消毒	加热器	60~85℃处理 30 min, 或 90~95℃处理 5~10 min	不耐热物品, 如牛奶、果汁等

除了上述实验室和生产中常用的灭菌和消毒方法外, 生活物品的消毒常采用 100℃煮沸 5~10 min 的方法。

在纯培养物的获得过程中, 不仅需要保证培养基、相关物品无菌, 在操作过程中同样需要防止微生物的污染(图 1-5)。在实验室和生产中, 需要环境洁净, 操作人员衣物整洁, 禁止无菌物品和其他物品接触, 同时利用酒精灯制备小的局部无菌区域, 或者利用设备——超净工作台(图 1-6)制备相对较大的无菌区域, 在无菌区域内进行操作, 防止环境中微生物的侵入。这种在操作过程中, 保持无菌物品与无菌区域不被微生物污染的技术, 称为无菌技术。合适的培养基、严格的无菌条件是获得纯培养物的基础。

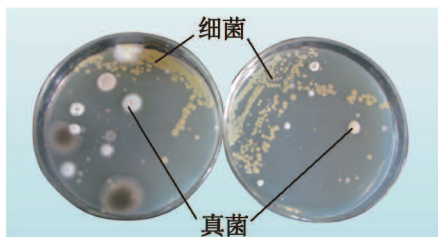


图 1-5 细菌培养中污染的真菌



图 1-6 超净工作台

利用分离纯化技术获得微生物的纯培养物

利用乳酸菌的纯培养物生产酸奶, 可以有效控制酸奶的发酵过程, 防止杂菌对酸奶品质的影响。因此, 微生物纯培养物的获得是发酵生产的基础。从自然发酵的酸奶中得到乳

酸菌的纯培养物首先需要得到单菌落 (colony)。单菌落是由一个微生物细胞在固体培养基上经过生长繁殖形成的肉眼可见的子细胞群。一个单菌落就是一种微生物的纯培养物。从混杂在一起的众多微生物中获得某种微生物的纯培养物：首先，需要在固体平板上将众多的微生物细胞彼此分散开，经过生长繁殖形成单菌落；然后，再通过纯化，即挑取单菌落接种到试管斜面或液体培养基中培养；最终，得到某种微生物的纯培养物。这一技术就是微生物的分离纯化技术。平板划线法和稀释涂布平板法是实验室及生产中进行微生物分离和纯化的常用方法。

平板划线法就是用接种环以无菌操作蘸取少许待分离的材料，在固体平板上进行平行划线或者连续划线 (图 1-7)，微生物细胞的数量随着划线次数的增加或划线的延长而减少，并逐步分散开来，经培养后，可在划线的末端得到单菌落。

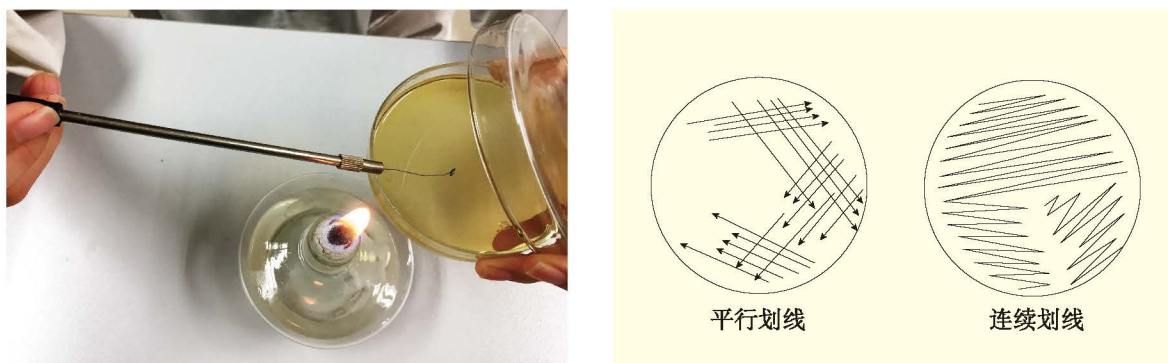


图 1-7 平板划线法分离微生物

如果需要获得更多的单菌落，可采用稀释涂布平板法。首先，将待分离的材料进行系列稀释：用 1 mL 的无菌移液管 (或移液器) 吸取 1 mL 待分离材料原液，加入装有 9 mL 无菌水的试管中，充分混匀，此试管中微生物细胞的浓度是原液浓度的 $1/10$ ，即稀释度为 10^{-1} ；接着，用 1 mL 的无菌移液管从此试管中吸取 1 mL 稀释液加入另一支装有 9 mL 无菌水的试管，充分混匀，此时的稀释度为 10^{-2} ；依此类推，得到系列稀释液 (图 1-8)。

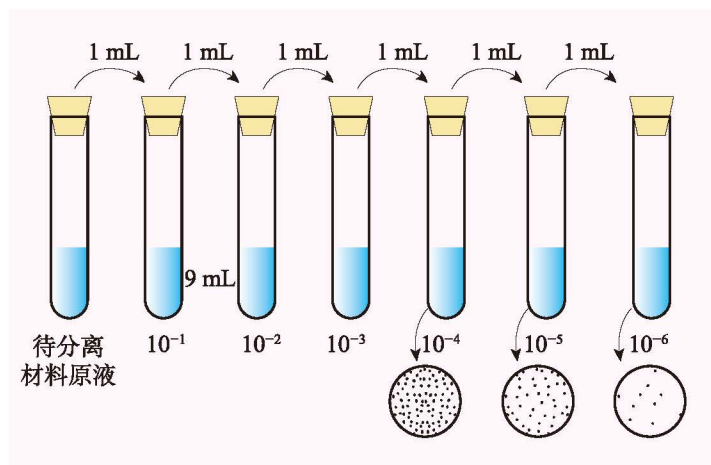


图 1-8 系列稀释示意图

然后,取一定范围的3个稀释度的菌液各0.1 mL或0.2 mL,加到固体平板上,用无菌涂布器涂布均匀(图1-9),经培养即可能得到单菌落。挑取单菌落接种到试管斜面或者液体培养基中进行培养,就会得到微生物的纯培养物。



图1-9 使用涂布器涂布

1881年,科赫(Robert Koch, 1843—1910)建立了微生物纯培养技术,获得了微生物的纯培养物,为微生物的分类、鉴定、生理特性研究以及纯种发酵奠定了基础。此后,从传统开放式的食品发酵发展到利用纯种微生物进行的纯种发酵,人们可以人为控制微生物的生命活动,极大地促进了微生物发酵技术和发酵工业的发展。在微生物纯培养技术的基础上,人们先后建立了补料分批发酵、连续发酵及深层通气培养等技术,并使发酵过程从简单的厌氧发酵发展到好氧发酵,由最初的乳酸、酒精、丙酮、丁醇等厌氧发酵产品发展到现在的抗生素、氨基酸、核苷酸、酶制剂等多种好氧发酵产品,更好地满足了人类的需求。

实践应用 实验

从发酵粉中分离纯化酵母菌

● 目的要求

1. 熟练配制适合酵母菌生长繁殖的培养基。
2. 利用高压蒸汽灭菌方法进行培养基及相关物品的灭菌。
3. 阐明无菌操作的重要性。

● 实验原理

适合酵母菌生长的培养基为马铃薯葡萄糖培养基。利用平板划线法或稀释涂布平板法分离酵母菌菌体,经培养获得单菌落,纯化单菌落,最终得到酵母菌的纯培养物。

● 材料用具

发酵粉，马铃薯；葡萄糖，琼脂；锥形瓶，培养皿，试管，烧杯，量筒，玻璃棒，铁架台，漏斗，天平，高压蒸汽灭菌锅，电磁炉，胶塞，纱布，牛皮纸（报纸），线绳，1 mL 移液管或者移液器及吸头，涂布器，接种环等。

● 方法步骤

1. 配制马铃薯葡萄糖培养基

取去皮切成块的马铃薯 200 g，放入装有 1 000 mL 自来水的烧杯中，加热煮沸 20 min，用 4 层纱布过滤，在滤液中加入葡萄糖 20 g 和琼脂 20 g，加热溶解后，补充自来水至 1 000 mL，不需要调整 pH。

将配制好的培养基分装到锥形瓶和试管中，装量为容器容积的 1/5（图 1-10）。然后将分装好的试管加胶塞，用牛皮纸或报纸包扎，分装好的锥形瓶用封口膜封口（图 1-11）。

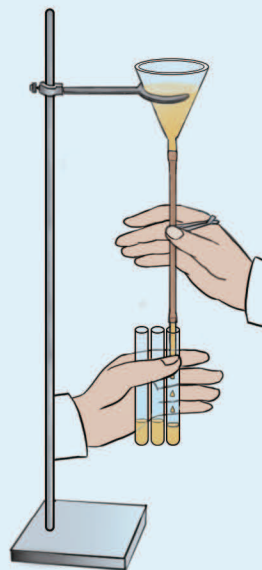


图 1-10 培养基分装到试管中的示意图



图 1-11 试管及锥形瓶包扎

2. 灭菌

用牛皮纸或报纸对需要灭菌的物品进行包扎：培养皿 5 个一组，装有 9 mL 自来水的试管 7 支一组，管口塞入少量棉花的 1 mL 移液管或者装有 1 mL 吸头的吸头盒。将上述物品和分装好的培养基一起放入高压蒸汽灭菌锅内，115℃，灭菌 20 min。



注意

灭菌前保证灭菌锅内有足够的蒸馏水。灭菌结束，压力降为 0 且温度低于 80℃后才可打开灭菌锅，取物品时注意防止烫伤。

3. 制斜面及固体平板

灭菌结束后，取出，待培养基冷却到 $50 \sim 60^{\circ}\text{C}$ ，以一定角度斜置装有培养基的试管；将锥形瓶中的培养基倒入培养皿，每皿约 20 mL。

4. 接种

接种时，注意无菌操作。超净工作台使用前开启紫外灯灭菌 20 min，双手用 70% ~ 75% 的酒精擦拭消毒。注意手晾干后再进行操作，防止手上的酒精被点燃烧伤皮肤。

接种可采用稀释涂布平板法分离酵母菌。称取 0.1 g 发酵粉，加到已经冷却的装有 9 mL 无菌水的试管中，振荡混匀，制成酵母菌悬液。将菌悬液进行系列稀释，至 10^{-6} 。取固体平板，用无菌移液管或移液器吸取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释度的稀释液各 0.1 mL，加到固体平板上，用无菌涂布器涂布均匀，盖上培养皿，室温下静置 5 min 左右，使酵母菌菌体吸附在培养基表面。

接种也可采用连续划线或平行划线的方法分离酵母菌。平行划线的具体过程是在近酒精灯火焰处，一手拿接种环，接种环经火焰灭菌冷却后，蘸取酵母菌悬液，另一手拿固体平板，打开培养皿盖，用接种环在平板上轻轻地平行划线。划完一组平行线后，将培养皿旋转一定角度，接种环经火焰灭菌冷却后，继续划线。每旋转一次，接种环经火焰灭菌一次。操作完成后，合上培养皿。

5. 培养

将涂布或划线的培养皿倒置于恒温培养箱中， 30°C 培养 36 ~ 42 h，即可长出单菌落（图 1-12）。从单菌落上挑取少许细胞，接种到试管斜面上， 30°C 培养 36 ~ 42 h，即可得到酵母菌的纯培养物。

● 思考讨论

1. 稀释涂布平板法和平板划线法各有什么特点？
2. 利用稀释涂布平板法和平板划线法分离酵母菌的结果有什么不同？
3. 怎样防止操作过程中污染杂菌？
4. 为什么要倒置培养皿进行培养？
5. 自然界中所有的微生物是否都能被分离培养出来？

⚠ 注意

紫外线灭菌时，拉下并关严超净工作台前面的玻璃挡板，开启紫外灯灭菌。注意防止紫外线灼伤皮肤和眼睛。灭菌结束，先开启风机，再关闭紫外灯。实验结束后，整理擦拭工作台面，关闭风机，重新开启紫外灯照射 15 min。



图 1-12 酵母菌单菌落



检测评价

1. 某学校的实验课老师从发霉的橘子上分离得到橘青霉，并和学生一起观察青霉菌的形态和繁殖方式。请回答下列问题：

(1) 该老师分离橘青霉的操作顺序是_____，将橘青霉细胞彼此分离的操作有_____。

- | | |
|----------|----------------|
| ① 配制培养基 | ② 系列稀释 |
| ③ 灭菌 | ④ 挑取单菌落 |
| ⑤ 用涂布器涂布 | ⑥ 准备水、培养皿等相关物品 |
| ⑦ 培养 | ⑧ 倒固体平板 |

(2) 本实验中配制培养基的目的是_____。

2. 某制药厂利用地衣芽孢杆菌（一种细菌）发酵生产抗生素杆菌肽，用于治疗耐青霉素的葡萄球菌感染等。近期，在杆菌肽生产过程中，出现了酵母菌污染，严重影响了杆菌肽的产量。技术人员进行了染菌原因分析，并通过一系列的分离纯化，解决了酵母菌污染的问题，稳定了生产。请回答下列问题：

(1) 在生产过程中出现酵母菌污染的可能原因有_____。

- ① 原材料中有酵母菌
- ② 无菌接种有问题
- ③ 培养基灭菌不彻底
- ④ 菌种被酵母菌污染

(2) 如果你是这个企业的技术人员，请提出防止酵母菌污染的建议。

3. 某技术人员设计了青霉素生产菌——产黄青霉菌的诱变育种方案，具体包括：配制培养基，准备相关的培养皿、稀释用水；进行菌种的紫外线诱变；用接种环蘸取诱变后的产黄青霉菌孢子悬液在固体平板上划线；放在恒温培养箱中培养到长出单菌落；挑取单菌落，进行生产青霉素性能的测定。请回答下列问题：

- (1) 此方案中有哪些不合理的步骤？
- (2) 如果按此方案操作可能会出现什么样的结果？
- (3) 请修改完善此方案。



二步混菌发酵法生产维生素 C

维生素 C (VC) 用途非常广泛, 在医疗保健方面可用于防治维生素 C 缺乏症、贫血、发育迟缓和感冒等, 在食品工业方面可作为食品维生素强化剂以及啤酒、香肠、罐头等食品的抗氧化剂。

VC 的传统生产方法是莱氏化学法, 这种方法工序复杂、收率低而且伴有大量有毒气体和废弃物的产生。我国发明了二步混菌发酵法生产 VC 前体。二步混菌发酵法的第一步是利用生黑醋酸杆菌发酵, 第二步是经过另外两种菌的混合发酵, 最终将葡萄糖转化为 VC 前体。然后经内酯化等步骤, VC 前体可转化为 VC。这种生产 VC 的方法工序简单, 收率高, 成本低, 安全, 对环境污染小。目前, 我国发明的二步混菌发酵法生产 VC 的工艺处于世界领先水平。

第二节 微生物纯培养物的选择

在室温下，肉放久了会变臭，牛奶放久了会变酸，苹果放久了会腐烂，橘子放久了会发霉（图 1-13）。这些都是由空气中不同的微生物在不同营养物质上生长造成的。为什么在不同的营养物质上生长的微生物不同呢？与空气相比，土壤中含有更多种类和数量的微生物，这些微生物影响着土壤的肥力。那怎样选择提高土壤肥力的微生物呢？



图 1-13 造成不同水果腐烂的微生物不同



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注在培养基中添加什么成分可以从土壤中选择分离得到解磷细菌的纯培养物和检测解磷细菌数量的方法。

土壤中含有丰富的磷资源，其中只有 1% 左右能被植物吸收利用，其他以无机磷酸盐固体形式存在。解磷细菌可以溶解磷酸盐固体，提高土壤肥力，促进农作物生长。科研工作者通过分离、培养解磷细菌制备菌肥，应用到农业生产中。他们首先取少量土壤，在含有磷酸钙的细菌液体培养基中富集培养 4 天，然后稀释涂布在含有磷酸钙的固体平板上，培养得到能够分解利用磷酸钙的单菌落，即解磷细菌。经过解磷能力的测定筛选出分解能力强的菌株。再利用发酵培养得到大量的菌悬液。在发酵过程中利用显微镜计数法检测细菌的数量，当菌数达到每毫升 2.0×10^8 个时，结束发酵，分装制成液体解磷菌肥，或制成颗粒状的固体解磷菌肥。解磷菌肥经活菌数量测定，达到国家无机磷解磷菌肥的产品质量标准后，应用到农业生产中。目前筛选得到并在农业生产中使用的解磷细菌主要有巨大芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌等。

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 怎样从土壤中选择性地分离解磷细菌？
2. 富集培养有什么作用？
3. 在发酵过程中，进行微生物计数有什么作用？怎样进行显微镜计数？
4. 测定活菌数量有什么意义？用什么方法检测活菌数量？

调整培养基配方可有目的地培养某种微生物

土壤中的细菌众多，但只有解磷细菌能够分泌磷酸酶或者有机酸，溶解并吸收利用磷酸钙，因此才能在以磷酸钙为唯一磷源的固体培养基上生长、繁殖形成单菌落，从而得到解磷细菌的纯培养物。如果土壤中含有的解磷细菌比较少，可以通过含有磷酸钙的细菌液体培养基进行富集培养，增加解磷细菌的数量，从而提高得到解磷细菌单菌落的概率。同理，可用以淀粉为唯一碳源的培养基选择性地培养分泌淀粉酶的微生物，可用以纤维素为唯一碳源的培养基选择性地培养分泌纤维素酶的微生物。利用不同种类微生物分泌的胞外酶不同，能够分解利用的营养物质也不同的特点，通过添加某种营养成分可选择培养某种微生物的纯培养物。

在培养基中添加链霉素、青霉素等，可以抑制多数细菌的生长，有利于分离各种霉菌；在培养基中加入放线菌酮，则可以抑制某些霉菌的生长，有助于分离细菌。利用此特点，在培养基中加入某类微生物生长的抑制剂，可更好地培养所需的微生物。上述具有选择功能的培养基被称为选择培养基。

不同微生物的最适培养基不同。例如：牛肉膏蛋白胨培养基中有机氮源丰富，适合细菌的生长；马铃薯葡萄糖培养基碳源丰富，有机氮源含量少，适合酵母菌和霉菌的生长（图 1-14）。可利用不同的培养基分离不同的微生物。

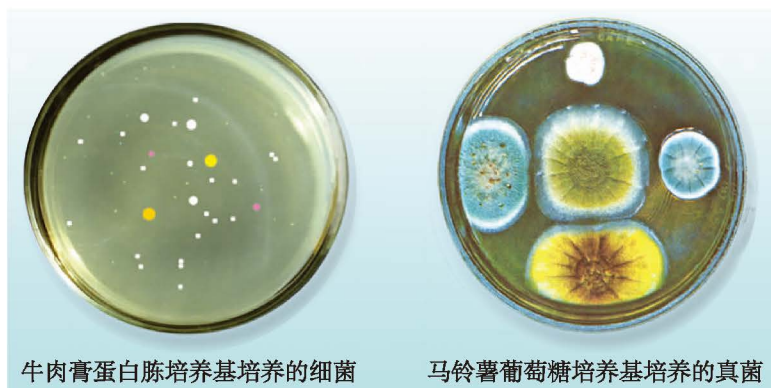


图 1-14 不同的培养基选择培养不同类群的微生物

因此，通过调整培养基的配方可有目的地培养某种微生物。

快速测定微生物数量常用显微镜计数法

显微镜计数法就是将少量待测样品的悬液置于具有确定体积的血细胞计数板上，在光学显微镜下直接计数的方法。

血细胞计数板是一块特制的载玻片（图 1-15），上面由 4 条凹槽构成 3 个平台，中间较宽的平台又被一条短凹槽隔成两半。每一半的平台上刻有一个方格网，方格网共分为 9 个大方格，中间的大方格为计数微生物的计数室。一个血细胞计数板有上、下两个计数室。大方格的边长为 1 mm，面积为 1 mm²，盖上盖玻片后，盖玻片和载玻片之间的高度为 0.1 mm，所以计数室的体积为 0.1 mm³，即 1.0 × 10⁻⁴ mL。

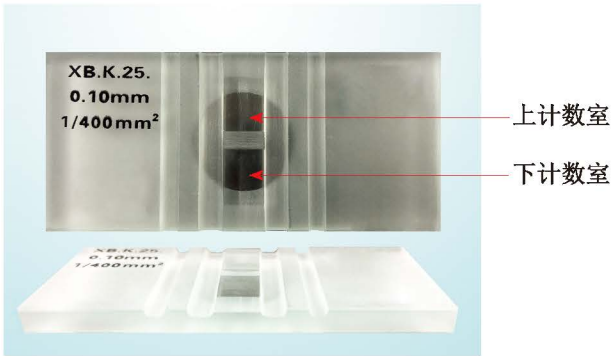


图 1-15 血细胞计数板的结构

血细胞计数板有两种规格：一种是计数室划分为 25 个中格，每个中格又划分为 16 个小格（图 1-16）；另一种是计数室划分为 16 个中格，每个中格又划分为 25 个小格。两种规格的计数室均有 400 个小格。以 25 个中格的血细胞计数板为例，计数时，通常数计数室中间及 4 个角共 5 个中方格的总菌数（*A*），然后求每个中方格中微生物数量的平均数，再乘 25，得到计数室的总菌数，然后除以计数室的体积 1.0 × 10⁻⁴ mL，乘稀释倍数（*B*），得到 1 mL 菌液中的总菌数。

每毫升菌液的总菌数为： $A \div 5 \times 25 \div 10^{-4} \times B = 5AB \times 10^4$ （个）。

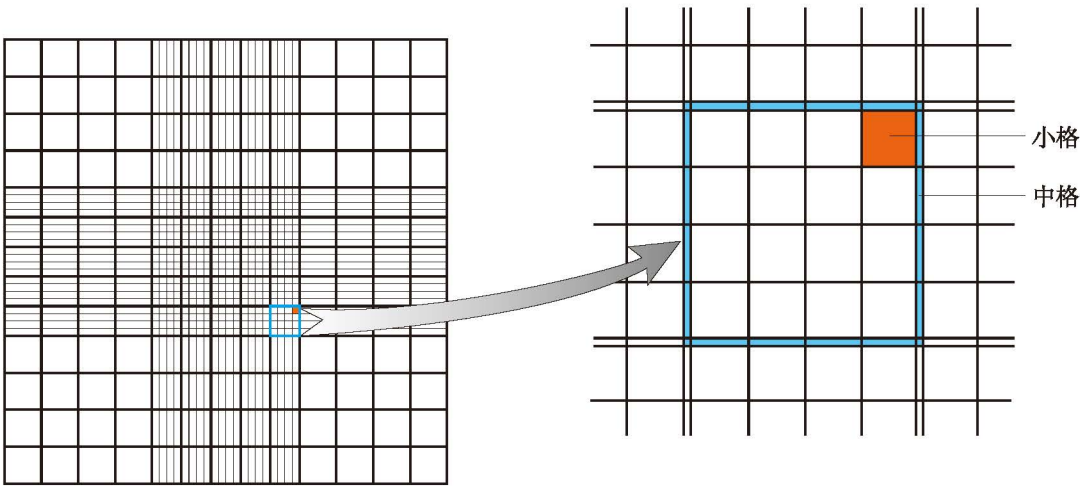


图 1-16 计数室的结构

显微镜计数法是测定微生物数量的常用方法。这种方法能够简便、快速地实时监测发酵过程中微生物的生长、繁殖情况，随时掌控发酵的进程。

测定活菌数量常用稀释涂布平板法

显微镜计数法虽然简便、快速，但是不能很好区分活菌和死菌。在解磷细菌、固氮菌等微生物菌肥以及益生菌等不同活菌制剂中，活菌数所占比例的高低是衡量产品质量的重要依据；在检测食品、药物的含菌数量或污染程度时，活菌的数量直接决定着产品是否合格。因此，需要测定活菌的数量。活菌计数时，常用稀释涂布平板法。分散开的单个活菌能够在固体平板上生长繁殖形成肉眼可见的单菌落，通过统计单菌落的数量计算出样品中活菌的数量，活菌数量用菌落形成单位（colony forming unit, CFU）表示。稀释涂布平板法也是测定微生物数量常用的方法。

活菌计数时，常用3个连续的稀释度涂布平板，每个稀释度需要涂布3个固体平板，共9个固体平板。3个稀释度中，选择一个平板上长有30～300个单菌落的稀释度进行计数（图1-17）。

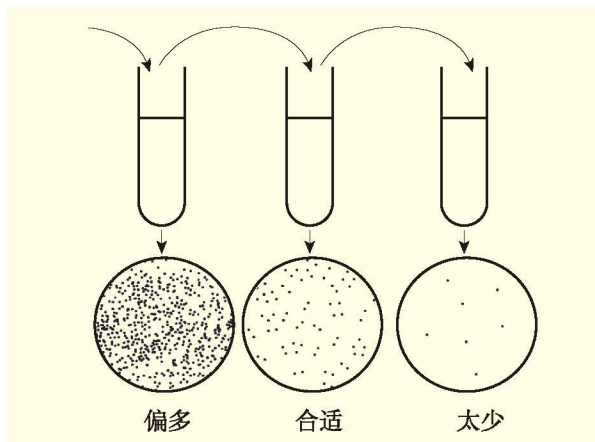


图1-17 每皿菌落数示意图

如某产品活菌计数时，选用 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释度，各取0.2 mL涂布平板。稀释度为 10^{-4} 时，三个平板的菌落数分别为420个、450个、430个；稀释度为 10^{-5} 时，三个平板的菌落数分别为38个、36个、40个；稀释度为 10^{-6} 时，三个平板的菌落数分别为5个、4个、8个。选取 10^{-5} 稀释度进行计数，活菌数为 $(38 + 36 + 40) \div 3 \div 0.2 \div 10^{-5} = 1.9 \times 10^7$ (CFU/mL)。如果合适稀释度的3个平板的菌落数接近，取平均值；如果3个平板的菌落数差距较大，说明实验的重复性差，结果误差较大，需要重新实验；如果3个连续稀释度的平板菌落数都不在30～300个的范围内，则需要调整稀释度，重新实验。

人们已经利用调整培养基的配方筛选出了众多具有某种特殊功能的微生物，广泛应用于酶制剂工业、农业、医药业、环境保护等众多领域。例如，从自然界筛选到了生产淀粉酶、蛋白酶、脂肪酶、纤维素酶等多种酶的微生物，用于酶制剂的生产。在农业方面，筛选出了固氮细菌、尿素分解细菌、解磷细菌等，制成微生物菌肥，用于提高农作物的产量和品质；利用添加了农作物病原真菌的培养基，从土壤中筛选出对病原真菌具有拮抗作用

的细菌，如枯草芽孢杆菌，制成生物农药，用于农作物病害的防治。在医药业，利用引起疾病的病原菌为筛选条件，筛选具有杀灭病原菌作用的微生物，生产抗生素，如青霉素等，用于人类疾病的治疗。在环境保护方面，利用含有有害重金属离子或有害有机物的培养基筛选可以氧化或还原有害重金属离子或者降解有害有机物的微生物，用于污染土壤的修复，这些微生物被形象地称为“先锋微生物”，应用于抗击污染的第一线。

实践应用 实验

土壤中尿素分解细菌的分离纯化和计数

● 目的要求

1. 尝试调整培养基的配方，从土壤中分离分解尿素的细菌。
2. 运用分离纯化微生物的方法得到尿素分解细菌的纯培养物。
3. 利用稀释涂布平板法测定每克土壤中尿素分解细菌的数量。

● 实验原理

分解尿素的细菌能够产生脲酶，将尿素分解生成 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 或 NH_4HCO_3 ，吸收利用其中的 NH_4^+ 。因此，在培养基中添加唯一的氮源——尿素，可从土壤中分离筛选出能够产生脲酶的尿素分解细菌。

尿素分解细菌分解尿素产生的 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 或 NH_4HCO_3 为碱性物质，可在培养基中添加酸碱指示剂——酚红，使尿素分解细菌菌落周围的培养基呈现红色。

● 材料用具

土壤样品； KH_2PO_4 ， Na_2HPO_4 ， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，葡萄糖，尿素，琼脂，酚红，蒸馏水；锥形瓶，培养皿，试管，烧杯，量筒，玻璃棒，铁架台，漏斗，天平，高压蒸汽灭菌锅，电磁炉，胶塞，牛皮纸（报纸），线绳，1 mL 移液管或者移液器及吸头，涂布器，玻璃珠等。

● 方法步骤

1. 配制培养基

培养基的配方为 KH_2PO_4 1.4 g、 Na_2HPO_4 2.1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、葡萄糖 10.0 g、尿素 1.0 g、琼脂 15.0 g、酚红 0.012 g，蒸馏水 1 000 mL。配制时，先称取 0.12 g 酚红溶解到 100 mL 蒸馏水中，配制成 0.001 2 g/mL 的酚红溶液。然后称取 KH_2PO_4 1.4 g、 Na_2HPO_4 2.1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g、琼脂 15.0 g，取酚红溶液 10 mL，加入适量蒸馏水加热溶解后，补加蒸馏水至 900 mL，分装到锥形瓶中，用封口膜封口。单独称取葡萄糖 10.0 g、尿素 1.0 g，加入蒸馏水溶解，终体积为 100 mL。

2. 灭菌

用牛皮纸或报纸对需要灭菌的物品进行包扎：培养皿5个一组，装有9 mL自来水的试管7支一组，管口塞入少量棉花的1 mL移液管或者装有1 mL吸头的吸头盒。此外，将装有90 mL蒸馏水和20粒左右玻璃珠的锥形瓶用封口膜封口。上述物品和配制的培养基一起，121℃，灭菌20 min。葡萄糖和尿素溶液采用过滤除菌。

3. 倒固体平板

灭菌结束后，待培养基冷却至50～60℃，将配制的培养基和过滤除菌的尿素、葡萄糖溶液混合在一起，倒固体平板。

4. 接种

称取农田表层2 cm下的土壤10 g，加入已经冷却的带有玻璃珠和90 mL蒸馏水的锥形瓶中，振荡，充分打散土壤颗粒，制成土壤悬液，并系列稀释到 10^{-6} 。分别取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 三个稀释度，每个稀释度各取0.2 mL稀释液接入固体平板，每个稀释度接3个平板，用无菌涂布器涂布均匀（图1-18）。

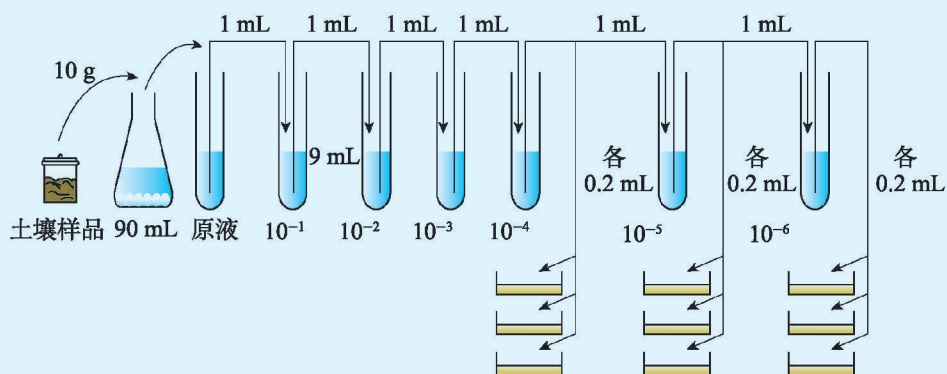


图1-18 系列稀释接种示意图

5. 培养及计数

将接种涂布的固体平板倒置于恒温培养箱中，30℃培养48 h后，根据菌落周围培养基的颜色，进行计数，按下列公式计算1 g土壤中尿素分解细菌的数量。

每克土壤样品中的菌数 = 同一稀释度的菌落平均数 \div 0.2 \div 稀释度 \times 10。

● 思考讨论

1. 实验过程中哪个步骤决定着分离微生物的种类？
2. 固体平板上的菌落数是否合适？如不合适怎样调整？
3. 菌落计数时要注意什么问题？



检测评价

1. 秋天大量的落叶如果焚烧, 不仅浪费落叶中的有机物, 还会严重污染空气。科学家利用从土壤中分离得到的纤维素分解菌将落叶发酵制成有机肥, 很好地利用了落叶中的纤维素, 而且不污染环境。请回答下列问题:

(1) 从土壤中获得纤维素分解菌单菌落的方法有_____, 其中_____也是活菌计数的方法。

①平板划线法

②系列稀释法

③稀释涂布平板法

④显微镜计数法

(2) 从土壤中获得纤维素分解菌的操作顺序是_____。

①倒置培养

②挑取单菌落接种于试管斜面上

③系列稀释涂平板

④灭菌

⑤以纤维素为唯一碳源培养基的制备

⑥制备固体平板

2. 某企业发酵生产解磷细菌菌肥, 企业标准规定当发酵液解磷细菌的浓度达到 2×10^8 个/mL 时, 发酵结束, 分装入库, 经质量抽查合格之后, 投放市场。请回答下列问题:

(1) 发酵结束时用显微镜计数法进行计数, 为了快速、准确计数, 操作正确的是_____。

①发酵液直接计数

②稀释 10 倍后计数

③只需上计数室计数

④上、下计数室计数后取平均值

(2) 产品出库时需要进行活菌计数, 取 0.2 mL 涂布时选择的稀释度为 ()。

A. 10^{-4}

B. 10^{-5}

C. 10^{-6}

D. 10^{-7}

(3) 与施用化肥相比, 在农田中施用菌肥有哪些优点?

3. 农药进入环境后, 对人的健康、农业生态平衡和环境均有很多不利影响。为了减少农药对环境的不利影响, 农药污染土壤修复技术引起了研究者的关注。因微生物种类多、分布广、活性强等特点, 微生物修复成了污染土壤修复的主要形式。请回答下列问题:

(1) 利用微生物修复污染土壤的原理是什么?

(2) 有机氯农药毒性大, 难降解。欲从土壤中分离有机氯分解菌, 需要在培养基中添加什么成分?

(3) 怎样保证有机氯分解菌的修复效果?



利用 PCR 技术快速检测食品中的致病微生物

食品污染的种类很多，其中以微生物污染，尤其是致病微生物的污染危害最大。因此，食品微生物检测是食品安全检测中的重要内容。利用稀释涂布平板法检测食品中的微生物数量需要2~3天才能完成，对其中的致病微生物检测还需要特殊的选择培养基鉴别培养。如此繁琐的操作难以满足目前食品微生物快速检测的要求。

PCR技术可在数小时内将极微量的目的基因或某一特定的DNA片段扩增100万倍，然后通过检测人员的分析判定，确定食品是否合格。目前，食品中的金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌、肉毒梭菌、变形弧菌和大肠菌群等都可用PCR技术快速检测。

第三节 传统发酵技术

爽口的泡菜、松软可口的馒头，还有口味丰富的酱油、醋、酱等调味品时常会出现在我们的餐桌上。这些食品和调味品营养丰富，风味独特，受到大家的欢迎。它们是怎样制作的？微生物在其中又发挥了怎样的作用呢？



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注利用自然发酵法酿造酱油的过程。

酱油及酱类酿造调味品起源于我国，迄今已有 3 000 多年的历史。由于风味独特、营养价值丰富，酱油等已成为我国饮食中不可或缺的调味品，并在世界范围内被广泛使用。

利用自然发酵法酿造酱油时，先将大豆浸泡、蒸煮，冷却后与面粉混合，铺摊在空气流通的地方，使空气中好氧的米曲霉、黑曲霉、红曲霉等霉菌大量生长繁殖，这一过程称为制曲。制曲后，混合质量分数 20% 左右的盐水制成酱醅，置于大缸内，在太阳下曝晒，利用太阳的热能促使酱醅发酵成熟（图 1-19）。在发酵过程中定期翻动酱醅，使酱醅的中层、下层均能接触空气。在发酵过程中，乳酸菌发酵产生酸，酵母菌发酵产生醇，这些酸和醇相互作用，生成酯类，赋予了酱油特殊的风味。发酵成熟后，用水喷淋酱醅，收集液体，经巴氏消毒后分装，制成酱油。



图 1-19 自然发酵法生产酱油

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 酿造过程中，制曲有什么作用？
2. 酿造过程中如何控制杂菌？
3. 发酵过程中要定期翻动酱醅的原因是什么？
4. 日常生活中还有哪些食品是通过自然发酵制作的？制作中所用的微生物是否相同？

酱油是通过自然发酵制作的调味品。制曲时，空气中产蛋白酶和产淀粉酶的微生物可在煮熟的大豆和面粉上生长。因此，制曲的过程就是利用大豆和面粉选择培养微生物并为制作酱油提供菌种的过程。空气中的微生物种类很多，有制备酱油所需的微生物，也有不利于酿造的有害微生物，因此在酿造过程中通过加入盐水抑制有害微生物的生长。制作过程中，通过曝晒和翻动酱醅，均匀提高酱醅的温度，并且使酱醅和空气充分接触，保证产蛋白酶和产淀粉酶的好氧微生物的生长，同时抑制厌氧微生物的过度生长。

采用自然发酵法也可制作豆瓣酱、腐乳，利用黄豆和豆腐富含蛋白质的特点，可从空气中选择产蛋白酶的米曲霉、毛霉等作为菌种进行发酵；制作酸奶和奶酪，则是利用牛乳选择易于生长的乳酸菌作为菌种进行发酵。因此，通过自然发酵法制作食品和调味品，利用的是培养基对微生物的选择作用，从制作原料或空气中选择特定的微生物作为菌种。

空气和制作原料中含有多种微生物，有制作发酵食品和调味品所需的微生物，如米曲霉、毛霉、酵母菌、乳酸菌等，也有使其变质的微生物，如大肠杆菌、产气杆菌、芽孢杆菌等。米曲霉、毛霉、芽孢杆菌等为好氧微生物，乳酸菌等为厌氧微生物，酵母菌、大肠杆菌、产气杆菌等为兼性厌氧微生物。因此，制作酱油的过程中，定期翻动酱醅，保证好氧微生物的生长，同时控制酵母菌和乳酸菌的数量，可以避免酱油产生酸味；在酿酒、制作泡菜和酸奶时，需要密封提供厌氧环境，抑制引起变质的好氧微生物的生长；在制作豆瓣酱、酱油、泡菜时，利用高浓度的盐水提供高渗透压，保证耐高盐有益微生物的生长，抑制有害微生物。利用自然发酵法时，人为控制一定的条件可以抑制有害微生物的生长，保证产品的品质。

利用自然发酵制作的酱油具有独特的风味。这是因为酱油制作过程中，米曲霉、黑曲霉等产生蛋白酶，分解大豆中的蛋白质产生多种氨基酸，其中有些氨基酸，如谷氨酸，可以增加鲜味。这些微生物还可产生淀粉酶，分解面粉中的淀粉产生葡萄糖，为其他耐盐的乳酸菌、酵母菌等提供碳源。乳酸菌发酵产生酸，酵母菌发酵产生醇，这些酸和醇相互作用，生成酯类，赋予了酱油独特的风味。腐乳、泡菜、食醋等制作过程中，发酵所用的微生物不同，基质各异，产生的风味物质也各不相同。自然发酵通过多种微生物的相互作用赋予传统发酵食品特殊的风味。

利用自然发酵法制作各种食品和调味品是古代劳动人民智慧的结晶。这种利用多种微生物自然发酵制作产品的技术称为传统发酵技术。日常生活中很多发酵食品是运用传统发酵技术生产的。

利用传统发酵技术不仅可以发酵大豆、豆制品，制作豆豉、豆瓣酱、酱油、腐乳，也可以发酵蔬菜，制作泡菜、酸菜，还可以发酵谷物，生产酒、食醋、馒头等（图 1-20）。传统发酵技术还应用于乳制品行业，生产各种酸奶及奶酪；肉制品同样也可用发酵的方法生产不同的产品，如火腿；茶叶也可以在黑曲霉、青霉、根霉、酵母菌等多种微生物的协同作用下，发酵成不同的茶叶品种。传统发酵技术改善了食材的品质，为人类提供了口味各异、营养丰富的产品。但是一些传统发酵食品含盐量较高，不宜过多食用。



腐乳



泡菜



馒头

图 1-20 几种传统发酵食品

实践应用 实验

实验一 泡菜的制作

● 目的要求

1. 尝试制作传统发酵食品泡菜。
2. 分析总结泡菜制作过程中控制杂菌的方法。
3. 阐述泡菜制作的基本原理。

● 实验原理

泡菜是利用蔬菜自然带有的多种乳酸菌在厌氧条件下发酵制成的。在制作过程中加入质量分数为 20% 左右的盐水可以抑制其他微生物的生长。泡菜发酵过程可以大体分成三个阶段：发酵前期（1~5 天）为产气发酵阶段，一些好氧菌将泡菜坛中的氧气基本耗尽后，乳酸菌开始生长并产酸，此时期由于好氧菌的生长，泡菜中出现亚硝酸盐含量的峰值；发酵中期，耐酸性更强的乳酸菌群开始成为优势菌群，乳酸大量积累，亚硝酸盐逐渐降解；发酵末期，随着乳酸的继续积累，发酵成熟。发酵成熟后，泡菜中的亚硝酸盐含量降至 20 mg/kg 以下，达到我国酱腌菜食品安全国家标准的要求。

● 材料用具

卷心菜（或萝卜、豆角、白菜等）；食盐，大蒜，生姜；泡菜坛等。

● 方法步骤

1. 根据泡菜坛的体积和制作泡菜的量，按照盐与水 1:4 的比例计算所需食盐的量。根据计算，称取食盐加入水中煮沸，冷却后备用。

2. 精选蔬菜，用水洗净，切块，沥干水分。

3. 将沥干的蔬菜和大蒜、生姜放入泡菜坛中，加入冷却至室温的盐水，直至没过所有的材料。

4. 盖上坛盖，用水密封，放于阴凉处发酵 10 天。

● 思考讨论

1. 泡菜制作过程中有哪几种抑制有害微生物生长的措施和方法？泡菜制作过程中的哪些环节会污染杂菌？

2. 在制作泡菜过程中，是否可根据个人口味加入一定量的白糖？加入白糖对泡菜制作会有什么影响？

3. 泡菜为何 10 天之后才可食用？

实验二 传统果酒及果醋的制作

● 目的要求

1. 尝试制作果酒和果醋。

2. 分析比较果酒和果醋制作过程中控制杂菌的方法。

3. 阐述果酒和果醋制作的基本原理。

● 实验原理

制作果酒利用的是酵母菌在无氧条件下通过发酵产生酒精的特性。酵母菌是兼性厌氧菌，广泛存在于空气中、水果表面。在有氧条件下，酵母菌进行有氧呼吸，彻底分解葡萄糖，产生 CO_2 和 H_2O 。在无氧条件下，酵母菌进行无氧呼吸，分解葡萄糖产生酒精和 CO_2 。

制作果醋利用的是醋酸杆菌在有氧条件下将酒精氧化为乙酸的特性。醋酸杆菌存在于空气中、水果表面，尤其是腐烂的水果表面醋酸杆菌数量更多。

● 材料用具

成熟的葡萄；白糖；烧杯，带盖的广口瓶，纱布，天平等。

● 方法步骤

1. 果酒的制作

(1) 将成熟、完好的葡萄从果蒂处剪下，清洗，晾干，去蒂，捏碎，称重。

(2) 按质量分数 20%~25% 加入白糖，混匀。放入带盖的广口瓶中，预留出约 1/3 的空间，密封。室温 25℃ 左右时放置 10~15 天，室温 30~35℃ 时放置 7~8 天。

(3) 发酵结束后，用灭菌的细孔漏勺过滤，滤除葡萄皮和葡萄籽，将滤液分装在玻璃瓶中，得到紫红色的果酒。

2. 果醋的制作

(1) 将成熟、完好的葡萄从果蒂处剪下，清洗，晾干，去蒂，捏碎，用纱布将果汁过滤到提前称重的烧杯中。称重，算出果汁的质量。

(2) 按质量分数 10% 加入白糖，混匀。放入带盖的广口瓶中，密封。25℃ 放置 12 天，取下广口瓶的盖子，用双层纱布覆盖瓶口，再用皮筋固定纱布，摇晃后放置。每天摇晃一次，放置 10 天左右。

(3) 将发酵好的果醋用巴氏消毒法消毒杀菌，得到可直接饮用的果醋。

● 思考讨论

1. 传统果酒和果醋的发酵时间较长，如果想缩短发酵时间，可采取什么措施？

2. 果酒和果醋制作过程中是怎样防止杂菌污染的？

3. 为什么果酒和果醋制作中所加白糖的量不同？



检测评价

19 世纪 50—60 年代，法国的葡萄酒行业出现了前所未有的困境，整桶整桶的葡萄酒酸败，只得倒掉。制造商叫苦不迭，有的甚至因此而破产。1856 年，里尔一家酿酒厂厂主请求巴斯德帮助解决葡萄酒变酸的问题，巴斯德经过研究和不断的实验，把葡萄酒加温至 55℃ 解决了这一问题。请回答下列问题：

(1) 巴斯德用显微镜观察酸败的葡萄酒时，发现主要有两种不同的微生物，分别是_____。

(2) 为什么将葡萄酒加温至 55℃ 可以预防葡萄酒酸败？

(3) 从巴斯德解决葡萄酒酸败的科学方法中，你领悟到了什么？



发酵与制茶

我国制茶工艺精湛，茶种类繁多。根据制作工艺中是否有发酵过程以及发酵程度的不同，茶可分为轻发酵茶、半发酵茶、全发酵茶、后发酵茶。

轻发酵茶是在制作过程中，经杀青、揉捻、干燥，但不经过发酵制成的茶，如绿茶。半发酵茶和全发酵茶是在揉捻之后，进行发酵，即利用茶叶内部的酶氧化茶多酚。发酵程度控制在20%~70%的为半发酵茶，如铁观音、乌龙茶等；发酵程度控制在90%以上的为全发酵茶，如红茶等。真正和微生物发酵相关的茶为后发酵茶。制作后发酵茶还需在揉捻后进行保温、保湿堆放，这一过程称为渥堆。在渥堆过程中大量微生物参与茶叶内含物质的转化，微生物产生的多酚氧化酶、蛋白酶、纤维素酶、果胶酶等将茶叶中的相关成分水解，产生更多的多肽、多糖和膳食纤维等，形成后发酵茶独有的口感和色泽。经后发酵制成的茶统称为黑茶，普洱茶就是黑茶中的常见品种。

第四节 发酵工程的过程与原理

当你走进生产青霉素的厂房，你会发现这里不同于酱油酿造厂一排排整齐的酿造缸，而是几十米高的发酵罐被架在几层高的楼房中。走到厂房的顶层，在搅拌电机发出的轰鸣声中你会看到操作人员在计算机前监控着发酵罐中的情况。那青霉素是怎样利用这些发酵罐生产出来的？青霉素生产与酱油酿造有哪些不同呢？



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注青霉素的生产过程及其与传统发酵食品制作过程的区别。

青霉素在我国于 1953 年正式投入工业化生产，它的生产菌株为好氧的产黄青霉菌。青霉素的生产流程如图 1-21 所示。

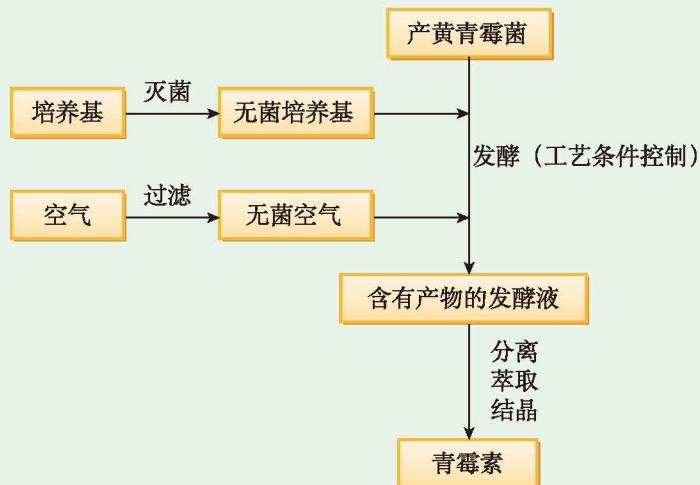


图 1-21 青霉素生产工艺流程图

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 青霉素的生产过程包括哪几个环节？
2. 青霉素的生产过程与传统发酵食品的制作过程有哪些区别？
3. 为什么青霉素生产过程需严格保持无菌？

现代发酵过程主要包括四个环节

工业化生产青霉素首先需要高产的产黄青霉菌（图 1-22）。产黄青霉菌最初是从自然界分离、纯化得到的，经过不断的诱变育种，筛选高产菌株，青霉素的产量不断提高，满足了工业化生产的需要。目前，人们已经从自然界分离得到了众多微生物菌种，经诱变筛选后应用到工业化生产中生产不同的产品，如生产四环素的金色链霉菌、生产柠檬酸的黑曲霉、生产谷氨酸的谷氨酸棒杆菌等。随着生物技术的发展，人们通过改造微生物，还能得到生产人类所需产品的“工程菌”，如利用大肠杆菌工程菌发酵生产干扰素等。因此，利用发酵工程生产产品的首要环节是高产菌株的获得。



图 1-22 光镜下的产黄青霉菌（400×）

工业化生产青霉素需要合适的培养基和充足的空气，为产黄青霉菌的生长、繁殖、合成青霉素提供必要的基础条件；同时还需要培养基及设备的灭菌、空气的过滤除菌及整个发酵过程的无菌控制，保证产黄青霉菌的纯种发酵。目前，利用发酵工程生产产品的微生物众多，有些为好氧微生物，有些为厌氧微生物，发酵生产产品时均为纯种发酵。因此，利用发酵工程生产产品的第二个环节是培养基配制和无菌控制。

随着工程技术的发展，青霉素生产所需的发酵罐也从最初的几十立方米发展到几百、上千立方米，随着发酵罐体积的不断扩大，所需的种子液也不断增多。因此，需要将菌种扩大培养到对数生长期后期得到种子液，此时微生物代谢旺盛且达到较高的菌体浓度。种子液按一定比例接入发酵罐。接入种子液的体积占发酵液总体积的百分比，称为接种量。不同微生物，接种量不同。细菌接种量控制在 1% ~ 5%，放线菌和霉菌的接种量控制在 10% ~ 25%。

产黄青霉菌种子液接入发酵罐后，需要将 pH、温度、溶解氧浓度、培养基浓度等参数控制在合适的范围内。此阶段，以发酵时间为横坐标，以菌体数量的对数为纵坐标绘制曲线，可得到产黄青霉菌的生长曲线。不同微生物的生长曲线不同，但生长曲线基本上可分为迟缓期、对数生长期、稳定期和衰亡期四个时期。青霉素在对数生长期末期开始合成，在稳定期菌体浓度达到最大且不再增加时，青霉素大量合成。因此，在进行工艺控制

时要尽可能延长稳定期，以合成更多的青霉素。发酵一段时间后便可得到含有大量青霉素的发酵液。根据生产目的不同，可将发酵产物分为菌体、初级代谢产物和次级代谢产物。例如：益生菌及菌肥等，发酵得到的是菌体；氨基酸、核苷酸等微生物生长繁殖所必需的物质为初级代谢产物；抗生素、生物碱、色素等与微生物的生长和繁殖无直接关系的物质则为次级代谢产物。初级代谢产物随着菌体数量的增加而增加，产物在对数生长期末期产量最大，因此宜控制发酵在对数生长期末期结束；次级代谢产物则在稳定期大量合成，因此在进行工艺控制时宜尽可能延长稳定期（图 1-23）。初级代谢产物与次级代谢产物虽然发酵时间及阶段控制不同，但发酵过程基本一致，包括种子液的扩大培养和产物的合成两个阶段。因此，利用发酵工程生产产品的第三个环节是种子液的扩大培养和产物的合成。

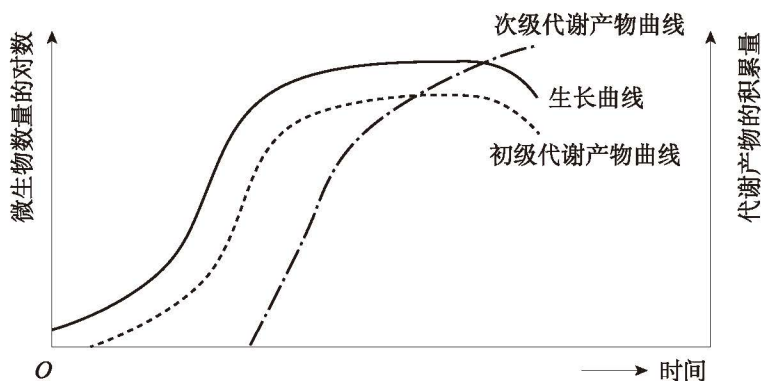


图 1-23 微生物生长和产物积累示意图

含有青霉素的发酵液，经过固液分离、萃取、结晶得到青霉素纯品。不同的发酵产物，分离和提取的方法不同。过滤和离心是常用的固液分离方法，沉淀、萃取、吸附、离子交换是常用的粗提方法，结晶和层析是常用的精提方法。因此，分离和提取是利用发酵工程生产产品的第四个环节。

发酵工程是现代工程技术和微生物发酵相结合的产物

青霉素是利用现代工程技术通过纯种发酵生产的，不同于利用多种微生物自然发酵制作的食品 and 调味品。

泡菜、酸奶、酒等传统发酵食品是由多种微生物自然发酵制作的，无菌要求不高，发酵过程简单，不需要温度、pH 等条件的控制，操作简单，发酵结束后，产物不分离或简单分离。发酵所需设备简单，制作过程多为人工操作，劳动强度较大。整个发酵过程时间长，生产场地占地面积大，受季节的影响大，产量小，产品质量不稳定，产品的种类有限。

随着微生物分离纯化技术的建立、微生物纯培养物的获得、灭菌及无菌接种技术的发展，发酵技术从传统自然发酵发展为纯种发酵。随着工程技术的发展，发酵设备也不再是简单的缸或者罐，而是出现多种类型的大型发酵罐（图 1-24），发酵类型也从固体、半固

体发酵拓展到液体深层发酵。发酵过程利用计算机控制温度、pH、营养物质的含量，通过通入空气和搅拌满足好氧微生物对氧的需求，减轻了劳动强度，缩短了发酵的周期，实现了大规模工业化生产。因此，发酵工程就是利用现代工程技术及微生物的特定功能，工业化生产人类所需产品。



图 1-24 发酵罐（左）及其内部结构（右）

目前，人们利用发酵工程生产了众多的产品，如青霉素、头孢菌素等多种抗生素，谷氨酸、赖氨酸等多种氨基酸，乳酸菌、地衣芽孢杆菌等益生菌菌剂，苏云金芽孢杆菌（Bt）、枯草芽孢杆菌等农用微生物菌剂等。同时，人们利用发酵工程对一些传统发酵产品的生产进行升级改造，实现了大规模的工业化生产，如酸奶、果酒、食醋等的生产。

随着基因工程、细胞工程、蛋白质工程等现代生物技术的发展，发酵工程的应用进一步扩大，已深入工农业生产、医疗保健、环境保护等领域。发酵工程不仅促进了传统产业的技术改造，而且促进了新兴产业的产生，对人类社会产生了深远的影响。

实践应用 调查

调查身边的发酵产品

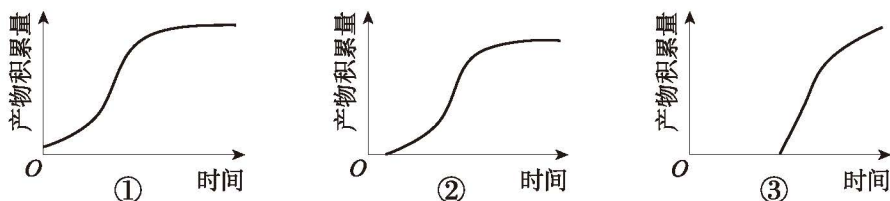
调查可参考以下提示开展。

1. 全班同学分为两组，一组去超市，一组去药店。
2. 去超市的小组重点在调味品区和食品区调查，根据产品说明记录哪些是发酵产品，通过网络查阅这些产品是利用传统方式发酵生产的还是利用发酵工程生产的。去药店的小组重点关注抗生素、氨基酸、核苷酸等药品，记录产品名称，通过网络查阅所记录产品的生产方法，记录哪些是通过发酵生产的。
3. 两组同学汇总之后，全班进行交流，分析、归纳、总结利用传统发酵制作的产品和利用发酵工程生产的产品的不同。

检测评价

1. 发酵粉、谷氨酸和抗生素是我们熟悉的利用发酵工程生产的产品，发酵过程基本一致，但发酵过程的控制不同。请回答下列问题：

(1) 下列示意图中，_____为发酵粉、_____为谷氨酸、_____为抗生素的产物积累示意图。



(2) 怎样控制发酵过程，使上述三种产品得到较高的产量？

2. 葡萄酒的酿造主要经过主发酵和后发酵两个阶段。主发酵是酵母菌经厌氧发酵产生酒精的过程，后发酵是葡萄酒的储藏过程。为了提高产量、缩短发酵周期、控制发酵过程，目前葡萄酒酿造大多采用工业化方式进行。请回答下列问题：

(1) 利用发酵工程生产葡萄酒的优势是 ()。

- A. 人工接种酵母菌，加快主发酵过程
- B. 人工接种酵母菌，缩短后发酵时间
- C. 自动化分装，缩短分装时间
- D. 人工接种酵母菌，合并主发酵和后发酵

(2) 根据葡萄酒的制作原理，设计利用发酵工程生产葡萄酒的工艺流程。

(3) 利用发酵工程生产和传统制作葡萄酒的菌种有什么不同？



开阔眼界

现代工程技术促进生物技术的发展

早在 20 世纪 40 年代初，人们就将工程技术中有关单元操作的概念和方法用于发酵工业，成功解决了发酵罐的设计和操作问题。随后，人们利用工程技术提出了空气过滤器的设计方法，保证了好氧微生物的发酵生产，促进了发酵工程的形成和发展。人们将工程技术应用到酶工业中，酶固定化、酶反应器的研究以及生产过程中各种参数的检测和控制、传感器及计算机控制系统的研究和应用，促进了酶工程的快速发展。工程技术不断发展，很快形成了若干分支工程学科，除发酵工程、酶工程之外，还有细胞培养工程、代谢工程、生物分离工程等。

工程技术与医学、生命科学结合，就形成了医学和生命科学领域中特殊检测、诊断、治疗和机制研究的交叉学科——生物医学工程。利用工程技术研发成功的计算机体层摄影（CT）技术、核磁共振成像（MRI）技术、PCR 技术、凝胶印迹技术等所需的一系列新型仪器设备极大促进了现代医学和现代生物技术的发展。2017 年的诺贝尔化学奖颁给了发明冷冻电子显微镜的三位科学家。冷冻显微技术使生物化学迈向了新的时代，使人们可能获得原子级别分辨率的蛋白质等大分子物质的结构，为研究大分子的结构及功能提供了保障，为开发利用更多蛋白质等大分子物质提供了技术支持。因此，工程技术的发展促进了生物技术的快速发展。

第五节 发酵工程的应用

发酵工程我们的生活密不可分。利用发酵工程可以生产我们日常所需的调味品，如酱油、食醋、味精等，以及治疗疾病用的多种抗生素。除了这些我们熟悉的产品之外，发酵工程还有哪些应用？发酵工程我们的生活又有哪些关系呢？

发酵工程最早开发和应用的是食品行业

食品行业是发酵技术最早开发和应用的行业。利用发酵技术生产食品的数量之大、品种之多、产值之高和历史之久都位于发酵工业的首位。首先，利用现代发酵技术对传统发酵食品进行改进，不仅提高了发酵效率，而且可更好地控制发酵产品的质量。例如，利用发酵工程生产酸奶、果酒、食醋等传统产品。其次，利用发酵工程可以生产更多的食品调味剂、添加剂，丰富食品的风味，增加食品的营养，改善食品的品质，延长食品的保藏期。例如，利用黑曲霉工业化生产酸味剂——柠檬酸，利用谷氨酸棒杆菌生产鲜味剂——味精。还可以利用发酵工程生产 β -胡萝卜素、单细胞蛋白等产品添加到食品中，增加食品的营养。也可利用发酵工程生产安全无毒、品质优良的各种微生物多糖，如黄原胶、结冷胶、短梗霉多糖等，添加到食品中，改善食品的内在结构，增加食品的稠度，改良食品的口感。除此之外，还可以利用发酵工程生产安全、有效的天然防腐剂，如已经广泛应用于食品工业中的乳酸链球菌素、 ϵ -聚赖氨酸、苯乳酸、曲酸等。

发酵工程应用成效最显著的是医药领域

一个国家或地区的医药水平高低直接关系到人民的健康和生活质量。利用发酵工程可从多方面开发新药，改进药品生产方式，提高医疗水平。其中对人类医疗保健事业做出巨大贡献的是抗生素工业。抗生素作为治疗感染性疾病的药物，其产量虽然比不上其他发酵工业产品，但其高药效和丰厚的经济价值使抗生素的发酵生产从发酵工业中独立出来并形成经久不衰的抗生素工业。临床医学上使用的抗生素主要是由放线菌或丝状真菌产生的，广泛用于细菌、真菌感染的治疗及肿瘤的化疗，如抗细菌感染的青霉素、头孢菌素，治疗结核病的卡那霉素、利福霉素，抗真菌感染的灰黄霉素、制霉菌素，抗肿瘤的放线菌素 D 及博来霉素等（图 1-25）。抗生素的应用有效治疗了大部分病原菌引起的疾病。目前，抗生素仍是临床上控制病原菌感染的首选药物。但是过度使用抗生素会使机体中的耐药性病原菌数量增加从而产生耐药性，应注意在医生指导下合理使用抗生素。



图 1-25 多种多样的抗生素药品

除了抗生素之外,利用发酵工程大规模工业化生产的其他药物还有 30 余种,如降血脂药物普伐他汀、洛伐他汀、辛伐他汀,免疫抑制剂环孢菌素 A 等。目前,利用现代发酵技术生产的氨基酸有谷氨酸、赖氨酸、丙氨酸、精氨酸等 15 种氨基酸,都可用于临床治疗;维生素 B₂、维生素 B₁₂ 等维生素,以及皮质醇等激素都可利用发酵工程大规模工业化生产。利用发酵工程不仅可以生产微生物的代谢产物,而且可以大规模培养对人体有益的微生物,制成益生菌菌剂,用于调节人体肠道微生态平衡,保证人体健康。

发酵工程促进了其他工农业的可持续发展

农业是世界上规模最大和最重要的产业,在有的国家,农业产值占总产值的 20% 以上。化肥和化学农药在农业的增产方面发挥了重要的作用,但也带来了严重的问题。过量施用化肥,造成土壤酸化、板结、肥力下降以及水体污染。化学农药的大量使用,造成环境严重污染,生态破坏,害虫抗药性提高,人、畜中毒。因此,农业的可持续发展成为各个国家高度重视的问题。微生物农药和微生物菌肥的生产成为各个国家竞相发展的产业。目前,利用发酵工程大规模工业化生产并投入使用的微生物农药包括细菌杀虫剂、真菌杀虫剂和农用抗生素等。苏云金芽孢杆菌是当今使用最多和最广泛的细菌杀虫剂,广泛用于农、林害虫的防治。苏云金芽孢杆菌杀虫剂不仅杀虫效果好,更重要的是对人、畜安全无害,对植物不产生药害,不影响作物、瓜果、茶等的品质,不伤害有益生物,对环境不造成污染,有利于农业的可持续发展。另一种微生物农药白僵菌杀虫剂(图 1-26)是一种广谱性寄生真菌,它能使鳞翅目、鞘翅目等众多昆虫患病,从而起到杀虫效果。我国研制的寄生真菌还可有效防治农田杂草菟丝子。此外,微生物农药中的农用抗生素不仅能防治多种农、林微生物病害,还能在防治虫害和去除杂草等方面发挥作用。例如,低浓度的放线菌酮可使浮萍枯死,茴香霉素能抑制稗草幼根的生长。利用发酵工程还可以生产固氮菌肥料、根瘤菌肥料、磷细菌肥料、钾细菌肥料和植物促生根际菌肥等。这些微生物菌肥可以缓解长期

大量使用化肥带来的土壤结构破坏、环境污染等问题，促进农业的可持续发展。



图 1-26 白僵菌菌落（上）及白僵菌的杀虫效果（下）

发酵工程除了在食品、医药方面的应用，在其他工业生产领域也有广泛的应用，如利用发酵工程生产酶制剂。目前酶制剂主要有果胶酶、淀粉酶、蛋白酶、凝乳酶、脂肪酶和纤维素酶等，可用于食品加工、物品洗涤、纺织品生产、医疗诊断、纸张和皮革制造等。随着人们对身体健康越来越重视、对环境保护的呼声越来越高，人们对酶制剂的需求越来越大。酶制剂生产虽然起步较晚，但已成为发酵工业中迅速发展的产业。因此，发酵工程在医药、食品及其他工农业生产上有重要的应用价值。

不仅如此，发酵工程在发展新型能源、防治环境污染、保护蓝天碧水等方面也有广阔的应用前景。例如：将纸浆废液中的木质素、纤维素、半纤维素等进行发酵生产清洁能源——乙醇；利用酵母菌循环系统处理食品废水，减轻水体污染；将树叶、杂草、秸秆等纤维素分解生产有机肥，或进一步经酵母菌发酵生产单细胞蛋白，减少树叶、秸秆焚烧，减少大气污染；利用发酵工程生产分解有毒有害物质的菌剂用于污染土壤的修复；利用发酵工程开发和利用尾矿、贫矿等（图 1-27）。

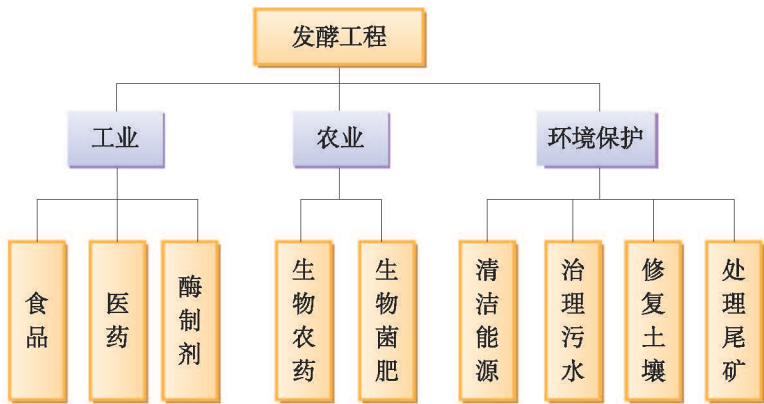


图 1-27 发酵工程的应用



检测评价

有些单细胞藻类、酵母菌和细菌等微生物菌体干重中的蛋白质含量可达到40%~80%，这些蛋白质也被称为单细胞蛋白。单细胞蛋白可添加到饲料中提高饲料的蛋白质含量。请回答下列问题：

- (1) 设计工业化生产单细胞蛋白的工艺流程。
- (2) 利用发酵工程生产单细胞蛋白有哪些优势？
- (3) 选择单细胞生物作为蛋白质的补充来源要注意哪些问题？



开阔眼界

发酵法生产微生物油脂

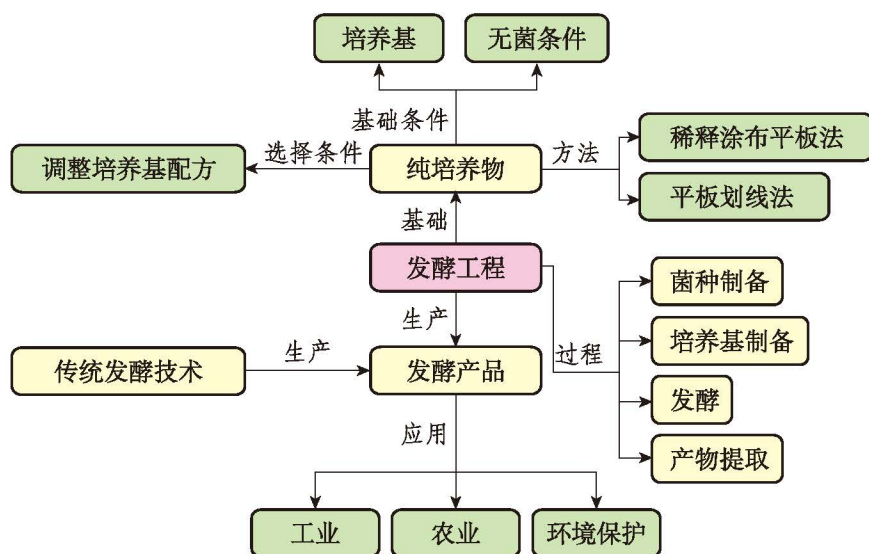
微生物油脂是继动物油脂、植物油脂之后，人类开发的另一类油脂。微生物油脂又称为单细胞油脂，是由酵母菌、细菌及微藻等产油的单细胞微生物在一定培养条件下，在体内大量合成并积累的游离脂肪酸类及其他脂类。

微生物油脂开发最多的是花生四烯酸和二十二碳六烯酸（DHA）。这两种不饱和脂肪酸对新生儿的大脑和视力发育是必不可少的，常用作营养剂添加到婴儿奶粉中。花生四烯酸可以从鸡蛋蛋黄中提取，每提取1 g花生四烯酸需要消耗上千个鸡蛋。各种海洋鱼类中含有丰富的DHA，但是通常为DHA和其他不饱和脂肪酸的混合物，获得纯的DHA需要去除其他的不饱和脂肪酸。二者的提取成本比较高。相比之下，利用微生物发酵法生产花生四烯酸和DHA的成本低而且品质好。目前，大规模工业化生产花生四烯酸主要是利用高山被孢霉，其含油量可达细胞干重的50%，其中花生四烯酸接近一半。DHA可由三种微藻发酵生产，即寇氏隐甲藻、裂壶藻、吾肯氏壶藻。利用寇氏隐甲藻发酵生产DHA，油脂含量占细胞干重的40%，其中DHA占总油脂的45%，而且几乎不含有其他的不饱和脂肪酸，便于分离纯化。利用裂壶藻和吾肯氏壶藻大规模工业化发酵生产DHA，产量大幅度增加，产品主要添加到食用油、食品及饮料中。将上述三种微藻大规模培养，作为饲料添加剂应用到养殖业，可以得到富含DHA的肉制品和禽蛋，满足人类需求。

相信不久的将来，微生物油脂将会应用到更多的配方食品中，产品的消费者也将从特殊人群扩展到所有人群，从而推动微生物油脂的快速发展。

本章小结


● 基础知识梳理



自古以来，人类就利用微生物来加工、保存食品，并通过人为控制无氧、高盐等环境，控制杂菌的数量，保证食品的品质。随着微生物纯培养技术的建立，人们可通过配制培养基、控制无菌条件、利用分离纯化技术，从自然界得到可培养的某种微生物的纯培养物，并通过调整培养基的配方，有选择地得到所需的微生物纯培养物。将微生物纯培养物发酵和现代工程技术有机结合，可以大规模工业化生产人类所需的产品。

● 学科素养提示

基于微生物的多样性和代谢特点，结合获得酵母菌和尿素分解细菌的实践活动，针对人类生活和生产的需求，尝试设计获得微生物纯培养物的方案。运用物质与能量观，论证传统发酵产品的特色和发酵工程的优势，阐释发酵工程的基本原理。结合发酵工程在工业、农业及环境保护领域的应用，尝试提出扩大发酵工程应用的初步构想。



第 2 章

细胞工程

一片小小的非洲紫罗兰叶片在一年内可培育出 100 万株非洲紫罗兰，“早孕”试纸在 1 分钟内就能检测出女性是否怀孕，利用猕猴的体细胞克隆诞生的“中中”和“华华”首次实现了非人灵长类动物的体细胞克隆，从血液中收集造血干细胞可用于治疗白血病……这些技术是怎么实现的？让我们一起来揭开细胞工程这门新兴的现代科学技术的神秘面纱吧。



学习目标

1. 在理解动植物细胞全能性的基础上，形成结构与功能观等生命观念，并能用结构与功能观解决细胞工程中的问题。
2. 基于动植物细胞的生长特点，运用归纳、概括和推理等科学思维方法，分析动植物细胞生长的条件，阐释细胞工程的基本原理。
3. 针对细胞工程技术的应用，通过资料搜集、实验、讨论、调查等科学探究活动，审视和评估细胞工程在农业、畜牧业、医学及环境保护中的实践价值及可能带来的问题。
4. 主动关注细胞工程的实践应用和安全性问题，运用批判性思维，针对细胞工程带来的社会问题做出理性判断。

第一节 植物细胞工程

1998 年秋天，福建省平和县的果农在蜜柚园中采摘时发现，一棵柚子树结出的果实囊瓣呈现“与众不同”的红色。这种柚子肉质清甜多汁，富含番茄红素和 β -胡萝卜素。为了尽快扩大这种红肉蜜柚（图 2-1）的种植规模，科研人员利用植物细胞工程技术大规模快速培育幼苗，使红肉蜜柚得以推广种植。这一红肉蜜柚品种于 2007 年获农业部授予品种权保护。除此之外，科研人员运用植物细胞工程技术工厂化快速繁殖兰花，使兰花走进千家万户。科研人员是如何利用植物细胞工程技术快速繁殖优质红肉蜜柚和兰花的？植物细胞工程包括哪些技术手段？这些技术有哪些独特的优点呢？



图 2-1 红肉蜜柚

一 植物组织培养技术

大花蕙兰（图 2-2）为兰科多年生草本植物，花色艳丽，花期较长，且多在春节期间开放，具有极高的观赏价值。大花蕙兰多为杂交品种，种子繁殖无法保持其品种特性，且结实率也相对较低。如何在短期内大量繁殖大花蕙兰并保持其优良特性呢？神奇的植物细胞工程技术——植物组织培养（plant tissue culture）技术就能帮助我们实现。植物组织培养技术如何进行呢？



图 2-2 大花蕙兰



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注植物组织培养的过程。

科学家将获取的大花蕙兰新芽、茎尖或幼根等组织或器官，消毒处理后接种到含适量营养物质和激素的 MS 固体培养基上，经培养形成黄绿色的细胞团，即愈伤组织；将愈伤组织移种到含有不同激素的分化培养基上，诱导形成原球茎（图 2-3）。原球茎可以在一年内增殖出几百万个原球茎，而且每个原球茎都

可在生根培养基上诱导分化出芽和根，最终得到完整的试管苗。

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 植物组织培养需要哪些条件？
2. 大花蕙兰的一块组织发育成完整植株经历了哪几个阶段？
3. 一块组织或器官能发育成一个完整植株，说明了什么？

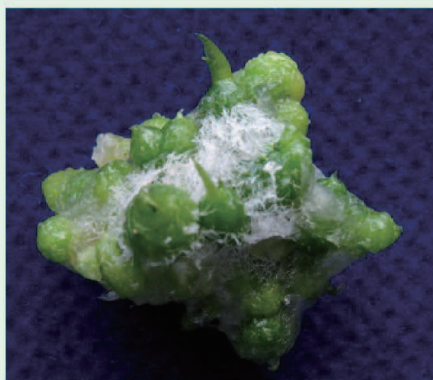


图 2-3 大花蕙兰原球茎

用于离体培养的植物器官、组织和细胞称为外植体。利用外植体培养出完整的植株，首先要经过细胞脱分化过程，获得愈伤组织。细胞脱分化是指已经分化的细胞，经过激素诱导后，失去其特有的形态、结构和功能而转变为未分化细胞的过程。愈伤组织是指一些分化的细胞经过脱分化形成的具有分生能力的一团薄壁细胞。有些植物的愈伤组织经诱导会形成体细胞胚，然后发育成完整的植株；有些植物的愈伤组织经诱导形成原球茎，再分化出芽、根，发育成完整的植株；有些植物的愈伤组织经诱导分化形成丛芽，再生根。总之，愈伤组织在一定的激素诱导条件下，可以再分化出芽、根，进而形成完整的植物幼苗。

外植体发育成完整的植株，首先，需要对外植体及相关用品进行消毒、灭菌等处理以防止微生物污染。其次，离体的器官、组织、细胞不能依赖植物体的光合作用提供营养，需按照植物生长发育过程所需营养人工配制培养基，如 MS 培养基等。同时，脱分化、再分化的过程需要适宜浓度、适当比例的生长素和细胞分裂素等植物激素诱导。根据生长素和细胞分裂素比例的不同，培养基分为分化培养基和生根培养基等。因此，植物组织培养是在一定条件下，将离体的植物器官、组织和细胞在适宜的培养条件下诱导形成愈伤组织，并重新分化，最终形成完整植株的过程（图 2-4）。植物组织培养技术是植物细胞工程的基础技术。

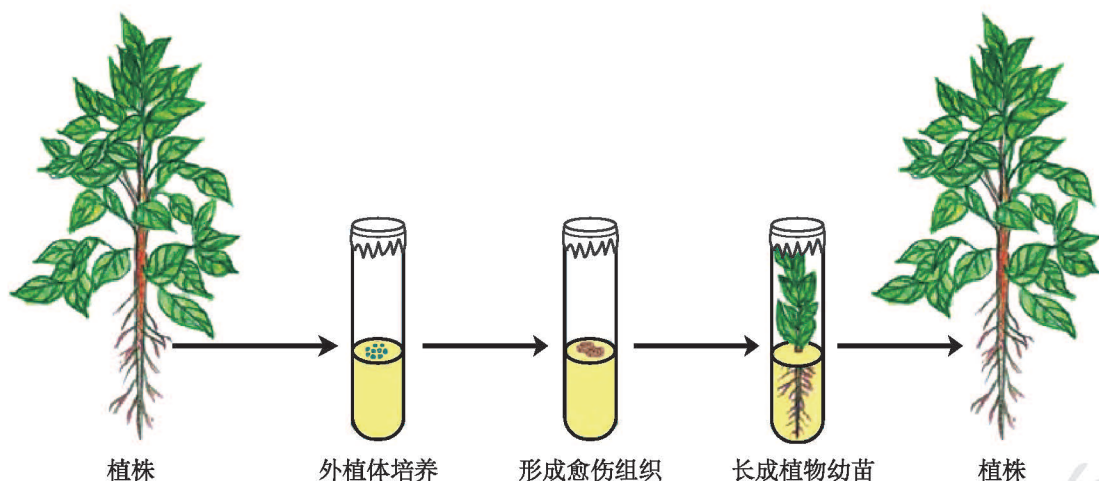


图 2-4 植物组织培养过程示意图

植物体的任何一个细胞，包括体细胞和有性生殖细胞，只要含有这种生物的一套完整遗传信息，都具有发育成一个完整个体的潜能。

植物在生长发育过程中，体内细胞不能表现出细胞的全能性，而是在特定的时间和空间条件下，细胞中的基因选择性表达，控制合成各种不同的蛋白质，使细胞的种类增加，从而分化成植物体的各种组织和器官。植物体细胞在离体条件下，经过一系列的诱导，形成完整的植株，表现出细胞的全能性。因此，植物组织培养技术利用的就是植物细胞的全能性。

植物组织培养技术在农业上已有广泛的应用，如可以使红肉蜜柚、大花蕙兰等优质水果或名贵花卉大量繁殖。很多优良的植物或经济作物都是杂合体，有性繁殖后代会发生性状分离，通过植物组织培养技术进行繁殖能够保持其优良性状，并可以大量生产性状相同的商品苗。目前，人们已经掌握了马铃薯、咖啡、橡胶树、菠萝、甘蔗、苹果等经济植物的快速繁殖技术。

很多植物的代谢产物可以作为药物、工业原料、食品添加剂以及化妆品的原料。中国科学家通过植物组织培养技术，对 400 多种药用植物如天麻、当归、黄连、青蒿、黄花、紫草等进行细胞工厂化生产，已经分离出多种有效次生代谢产物。

植物组织培养技术在影响着传统农业的同时，也改变着人们的日常生活。随着植物细胞工程技术的应用和发展，它在现代人类生活中的地位越来越突出。

实践应用 实验

非洲紫罗兰的组织培养

● 目的要求

1. 利用植物组织培养技术将非洲紫罗兰叶片培育成完整植株。
2. 分析归纳植物组织培养技术的基本过程。
3. 阐述植物组织培养技术的基本原理。

● 实验原理

植物体的活细胞通常具有全能性，在特定的营养和激素条件下，可以脱分化形成愈伤组织。将愈伤组织转移接种到含有特定比例激素的培养基上，就可以诱导其再分化形成丛芽，生根，进而发育成完整的植株。

● 材料用具

非洲紫罗兰叶片（或矮牵牛叶片、菊花花瓣、胡萝卜根）；经过灭菌的脱分化培养基、分化培养基、生根培养基，体积分数为 70% 的酒精，质量分数为 2% 的次氯酸钠溶液，无菌水；50 mL 锥形瓶或大试管，烧杯，酒精灯，恒温培养

箱,超净工作台(或接种箱),高压蒸汽灭菌锅(或普通高压锅),灭菌纸,牛皮纸,标签,酒精棉球,解剖刀,镊子,封口膜,橡皮筋等。

● 方法步骤

1. 外植体消毒

将非洲紫罗兰叶片用自来水充分冲洗干净,用滤纸将叶片表面的水分吸干后置于烧杯中。用酒精棉球擦拭双手消毒(图2-5)。



图2-5 用酒精棉球擦拭双手

在超净工作台上(或接种箱中)将非洲紫罗兰叶片浸入70%的酒精消毒30 s后,立即用无菌水反复冲洗2~3次,再用次氯酸钠溶液浸泡处理10~15 min后,立即用无菌水冲洗2~3次。

2. 接种外植体

用经酒精灯火焰灼烧灭菌后的镊子取出无菌纸平铺在台面上。将消毒后的非洲紫罗兰叶片置于无菌纸上,吸去表面的水分,在无菌纸上用灼烧后冷却的镊子和解剖刀等切割叶片(图2-6)。把分割的部分叶片用镊子接种于脱分化培养基中(图2-7),用封口膜封盖瓶口,并用橡皮筋扎紧。然后,在培养瓶上贴上标签,注明接种植物名称、接种日期、接种者姓名等。



图2-6 在无菌纸上切割外植体



图2-7 接种外植体

3. 培养

将培养瓶置于 23 ~ 26℃ 的恒温培养箱中培养。定期观察和记录愈伤组织的生长情况 (图 2-8、图 2-9)。

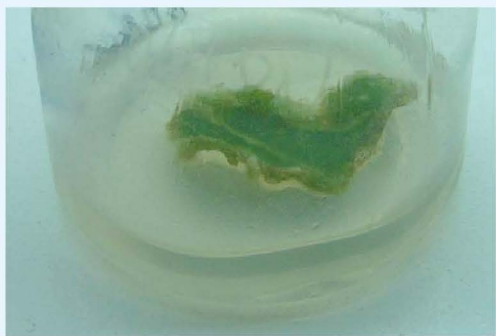


图 2-8 正在脱分化的外植体

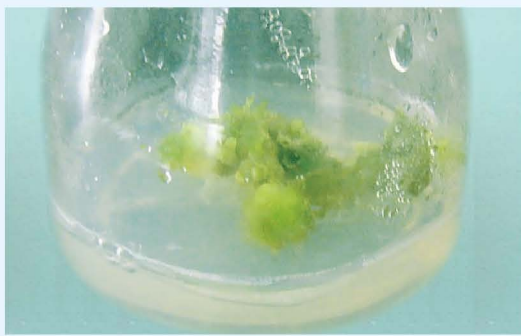


图 2-9 愈伤组织

将生长状况良好的愈伤组织转接到分化培养基 (细胞分裂素比例高于生长素) 上, 置于 23 ~ 26℃ 的恒温培养箱中照光培养, 培养一段时间后, 可观察到愈伤组织分化成丛芽 (图 2-10)。

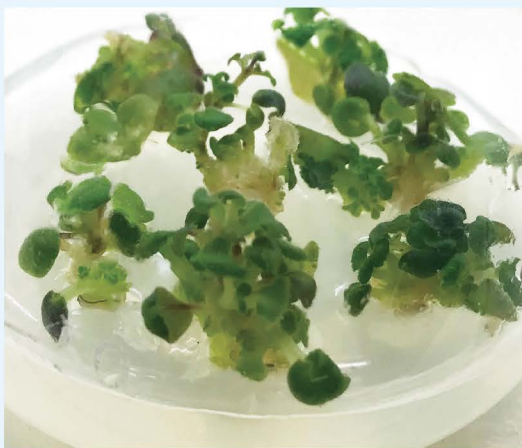


图 2-10 培养瓶中的丛芽

当分化出的丛芽生长到 3 ~ 4 cm 时, 转接到生根培养基 (生长素比例高于细胞分裂素) 上, 继续恒温照光培养。幼苗生根后, 打开瓶盖, 注意保持瓶内的湿度, 对幼苗进行炼苗处理, 待其适应外界环境后, 将幼苗移栽到土壤中。

● 思考讨论

1. 植物组织培养实验过程中造成污染的原因有哪些?
2. 植物组织培养技术有哪些步骤?



检测评价

1. 植物组织培养中除了添加植物生长的各种无机盐离子外, 还需要添加一定浓度的蔗糖和植物激素。请回答下列问题:

(1) 能将植物体的一部分培养成完整植物体的理论基础是 ()。

- A. 分化的植物细胞遗传物质发生改变
- B. 植物细胞可以进行体外有丝分裂
- C. 植物细胞具有发育成完整个体的遗传信息
- D. 植物细胞对无菌条件要求低

(2) 下列关于植物组织培养的叙述, 错误的是 ()。

- A. 培养基中添加蔗糖的目的是提供营养
- B. 培养基中的生长素和细胞分裂素影响愈伤组织的生长和分化
- C. 离体器官或组织的细胞都必须通过脱分化才能形成愈伤组织
- D. 同一株绿色开花植物不同部位的细胞经培养获得的愈伤组织基因相同

2. 1976 年, 中国科研人员首次采用小麦花粉做外植体, 利用单倍体育种方法, 成功地培育出“京花一号”等冬小麦高产品种。新品种小麦穗大粒多, 适应性、抗病性、耐旱能力强, 产量高。请回答下列问题:

(1) 用花粉做外植体培育获得的幼苗不育的原因是什么? 如何处理才能获得能稳定遗传的可育小麦新品种?

(2) 花粉细胞染色体数目是正常体细胞的一半, 为什么还能发育成完整的植株?

(3) 花粉单倍体育种和传统的杂交育种相比, 其优势是什么? 可能存在哪些困难?



开阔眼界

开放式植物组织培养技术

传统的植物组织培养技术对于环境的要求极为严格, 一切都围绕着“无菌”二字, 要求对用品器具进行严格灭菌, 无菌操作接种和无菌环境培养。保持无菌环境, 设备投资大, 技术要求高, 加之植物的种类、取材的时间、处理的方法、消毒的方式等都可能造成污染, 因此污染的控制成为限制植物组织培养技术发展、推广与普及的瓶颈。

近年来兴起的开放式植物组织培养（开放组培）技术可以有效地控制培养过程中的污染，并使培养程序简化，从而降低成本。开放组培在培养基中添加既能高效稳定抑菌又不影响植物生长的广谱性杀菌剂，因此培养基不需经过高压蒸汽灭菌，营养物质和激素损失较少，同时容器内培养基表面无水层积累，瓶内湿度适中，瓶壁水珠少，透光性好，试管苗生长健壮，移栽成活率高。开放组培在接种时也不需要超净工作台，接种效率大大提高。我国科研工作者在开放组培方面进行了大量研究，目前利用农药、消毒剂、防腐剂、抗生素、植物提取物等作为抑菌剂的研究均有报道。

二 植物体细胞杂交技术

2014年英国某园艺公司将马铃薯和番茄的秧苗进行嫁接，成功培育出上结小番茄、下长马铃薯的神奇植物——番茄薯（图2-11）。

我国科学家利用植物体细胞杂交技术培育出了具有优良性状的白菜-甘蓝。培育白菜-甘蓝和培育番茄薯所用的技术有哪些不同？植物体细胞杂交技术是怎样进行的呢？



图 2-11 番茄薯



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注科学家是如何通过体细胞杂交技术获得新植株的。

将白菜叶片细胞（ $2n=20$ ）和甘蓝叶片细胞（ $2n=18$ ）置于浓度为 0.6 mol/L 的甘露醇溶液中，用纤维素酶和果胶酶处理一段时间，去除细胞壁，获得原生质体。二者的原生质体经电场诱导融合，融合产物经组织培养， $10\sim 20$ 天形成肉眼可见的细胞团（愈伤组织），细胞团可转化为绿色球形胚状体。将胚状体转至分化培养基，诱导出大量丛芽。将芽切下并转至生根培养基，绝大部分的芽可以生根而成为完整的植株。对筛选获得的融合再生植株进行根尖染色体计数，发现有些植株含 38 条染色体。

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 要在一定浓度的甘露醇溶液中去掉细胞壁的原因是什么？
2. 促进原生质体融合的方法有哪些？
3. 用简图或简短语言概括植物体细胞杂交技术。

植物细胞的外面是一层细胞壁，这层细胞壁阻碍着植物细胞间的杂交。因此，在进行植物体细胞杂交之前，必须先较高渗透压的甘露醇溶液中，利用纤维素酶和果胶酶去除细胞壁，获得具有活力的原生质体。较高渗透压的甘露醇溶液可以维持植物细胞质膜内外的渗透压平衡，防止水分大量进入原生质体，保持其形态和活力。

两种不同的植物原生质体是怎样融合的呢？科学家发现，即使是质膜紧贴的原生质体也不能自动融合。原生质体之间的融合，必须借助一定的技术手段进行诱导。人工诱导原生质体融合的方法可以分为物理法和化学法两大类：物理法包括离心、振动、电刺激（图 2-12）等，化学法一般采用聚乙二醇（PEG）作为诱导剂来诱导原生质体融合。

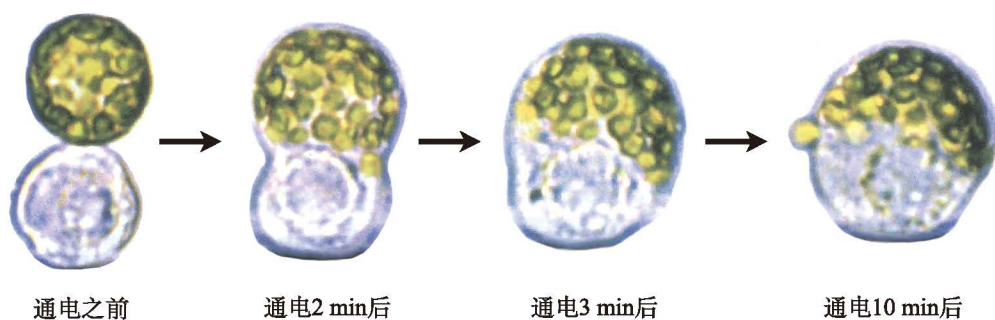


图 2-12 野生马铃薯和栽培马铃薯的细胞融合

融合的原生质体经过组织培养，再生出新细胞壁，形成杂合细胞，杂合细胞经脱分化、再分化过程发育成新植株（图 2-13）。这种将不同植物体细胞在一定条件下融合成杂合细胞，继而培育成新植物体的技术，称为植物体细胞杂交技术。理论上，通过体细胞杂交技术合成的新植株含有融合的两个亲本的所有染色体，能正常进行减数分裂形成配子产生子代。

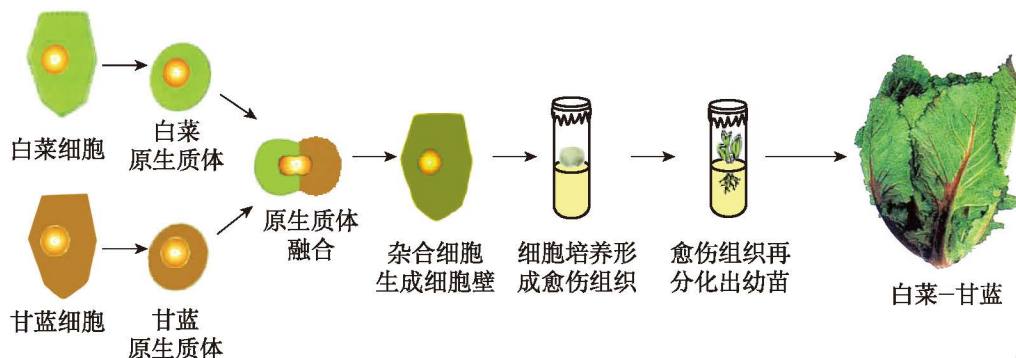


图 2-13 白菜-甘蓝的培育过程示意图

植物体细胞杂交技术可以将不同种、属，甚至是不同科植物的原生质体通过人工方法诱导融合，然后通过离体培养、筛选获得具有人们所需的优良性状的再生植株。通过这项技术，科学家成功培育出生长周期短、耐热性强、易储存的白菜-甘蓝以及抗黑腐病的花椰菜-黑芥等，获得了自然界中原本不存在的新物种，在克服不同生物远缘杂交不亲和的障碍方面取得巨大突破。同时，原生质体培养为单个细胞研究提供了良好的实验技术体系，现在已经广泛应用于植物细胞分裂动态过程、基因表达、细胞壁形成、植物激素作用、物质跨膜运输等研究领域。

实践应用 讨论

两种“番茄-马铃薯”培育技术的不同

20 世纪 70 年代，科学家利用植物体细胞杂交技术获得了“番茄-马铃薯”新植株。可惜的是，这株同时具有两个物种遗传物质的超级植物并没有像科学家期望的那样地上结番茄、地下长马铃薯。但是利用嫁接技术可以获得上结番茄，下长马铃薯的“番茄薯”。请根据所学知识讨论体细胞杂交技术和嫁接技术原理的不同及两种技术各自的优势。

检测评价

1. 花椰菜 ($2n=18$ ，用 MM 表示) 属十字花科，经人工长期定向选育，对黑腐病无抗性。黑芥 ($2n=16$ ，用 NN 表示) 为花椰菜近缘野生种，对黑腐病等多种常见病害具有抗性。我国科学家将紫外线 (UV) 照射处理的黑芥叶肉原生质体和花椰菜下胚轴原生质体融合，获得了抗黑腐病的杂合新植株 (过程见下图)。



①

②

③

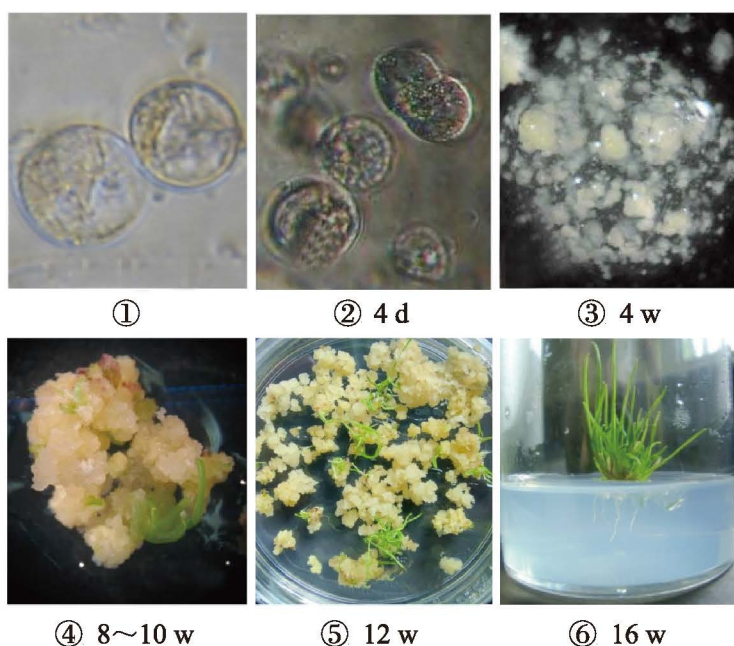
请回答下列问题:

- (1) 用 _____ 酶处理可以获得有活力的原生质体。
- (2) 图①表示 _____ 过程, 诱导过程常用的化学物质是 _____。
- (3) 图②是图①经 _____ 和 _____ 后形成的 _____ 组织。
由图②经 _____ 过程形成图③。理论上获得的杂种植株染色体组成为 _____ (用字母 M 和 N 表示)。
- (4) 已知供体黑芥叶肉原生质体在 UV 处理前后形态上没有明显的区别, 但是在和下胚轴原生质体融合时较易破碎。在培养 3 天之内, 用显微镜观察细胞中是否存在 _____ (细胞器), 作为早期鉴别杂合细胞的标志, 初步筛选出融合细胞。
- (5) 请说出鉴定新植株是否抗黑腐病的方法。
- (6) 对双亲和部分杂合新植株的染色体计数, 结果如下表所示。

植株	花椰菜	黑芥	杂合新植株 H1	杂合新植株 H2	杂合新植株 H3
染色体数 / 条	18	16	58	19	30

根据表中数据, 尝试推测杂合新植株 H2、H3 染色体数目少于 34 (双亲染色体数之和), 杂合新植株 H1 染色体数目大于 34 可能的原因。根据杂合细胞染色体数目推测细胞融合的特点以及这种融合过程中出现的特点可能具有的应用价值。

2. 过度放牧对草原生态环境的破坏, 使优质牧草的培育迫在眉睫。科研人员经研究发现牧草甲生长缓慢、抗病能力强, 牧草乙在水肥适宜的条件下生长迅速但易染病。下图是牧草甲、牧草乙原生质体融合的实验过程。



请回答下列问题：

- (1) 原生质体融合的理论基础是_____。
- (2) 请据图①~⑥简述优质牧草的培育过程。
- (3) 本实验希望获得具有哪些性状的再生杂合新植株？
- (4) 为了获得生命力强的原生质体，在实验过程中应注意哪些问题？



植物细胞工程的应用

兜兰是兰科多年生常绿草本植物（图 2-14），植株小巧，花大而奇特，花色艳丽，花期长，属兰花中的上品，观赏性极强，深受人们喜爱。由于兜兰的常规分株繁殖慢，再加上生态环境的恶化以及人们过度的采挖，兜兰面临极大的生存威胁，许多种类已濒临灭绝。中国科学院华南植物园生物技术育种研究团队在系统收集兜兰种质资源的基础上，利用无菌播种及植物组织培养等技术成功地繁殖出 40 多个原生种兜兰并能进行规模化生产，兜兰属植物的试管繁殖技术已处于世界领先水平。植物细胞工程除了用于快速繁殖兰花之外，还可以用于快速繁殖其他植物吗？植物细胞工程还有其他方面的应用吗？



图 2-14 浅绿色的带叶兜兰（左）和金黄色的杏黄兜兰（右）

工厂化快速繁殖植株

目前，一些优良的观赏植物、经济林木（果）等都实现了利用植物组织培养技术进行大规模无性繁殖（图 2-15），如兰花、杜鹃、月季、柑橘、香蕉、苹果等。人们把用于快速繁殖优良品种的植物组织培养技术，称作植物的微型繁殖技术，也称快速繁殖技术。这种技术不仅可以保持植物的优良性状，还可以快速实现种苗的大量繁殖，实现商品化生产。



图 2-15 微型工厂化快速繁殖植株

作物脱毒提高产量

一些无性繁殖的植物，如草莓、马铃薯，非常容易感染病毒，而且病毒会逐年积累，造成农作物产量降低，品质退化。早在 20 世纪 50 年代，科学家就发现病毒在植株中的分布是不均匀的，成熟的组织和器官中病毒含量高，幼嫩的组织和器官中病毒含量低，植物分生区附近几乎不含病毒。如果切取植株的茎尖进行组织培养，再生的植株就不会再携带病毒，从而获得脱毒种苗（图 2-16）。利用快速繁殖技术对脱毒种苗进行大量繁殖，在短时间内就可以获得大量脱毒苗用于农业生产。



图 2-16 脱毒的马铃薯种苗

目前已经有多种作物成功利用茎尖组织培养技术进行脱毒处理，如马铃薯、草莓、甘蔗、菠萝、香蕉等。采用植物组织培养技术脱毒培养出的幼苗长成的植株比未经脱毒的植株在产量和品质上都有显著的提高。

通过诱变育种或单倍体育种快速培育新品种

植物的愈伤组织在培养过程中，一直处于不断分裂状态，其遗传物质在细胞周期的间期极易受到外界因素的影响而发生突变。因此，育种专家经常利用植物组织先诱导出愈伤组织，然后用射线、化学物质等对愈伤组织进行诱变处理，从再分化得到的植株中筛选出具有优良性状的突变体，进而培育出新品种。

20 世纪 70 年代以来，世界各国的科学家用这种方法已经筛选出抗盐、抗病、高蛋白、

高产的突变体，有些品种已经用于生产，如抗花叶病毒的甘蔗、抗盐碱的野生烟草、抗除草剂的白三叶草等。

利用传统的杂交育种技术选育出能稳定遗传的农作物新品种要经过 5 ~ 6 年的时间，单倍体育种明显缩短了育种年限，能较快地获得纯合体。单倍体育种是通过花药（或花粉）离体培养获得单倍体植株，再经秋水仙素处理使其染色体数目加倍，当年就可以获得稳定遗传的优良品种，节约了大量的人力、物力。单倍体育种已经成为作物育种的新途径。

我国在水稻、小麦、烟草、辣椒等植物的单倍体育种上，处于世界领先地位。在单倍体育种领域，我国科学工作者做出了卓越贡献，早在 1974 年就成功地培育出世界上第一个作物新品种——单育 1 号烟草品种，随后又成功培养出中花 8 号、中花 11 号水稻和京花 1 号小麦等作物新品种。

工厂化生产细胞代谢产物

植物组织培养技术除了在农业上的应用外，另一个重要的应用就是细胞代谢产物的工厂化生产。

植物细胞代谢可以产生一些具有特殊用途的物质，主要包括蛋白质、脂质、糖类、橡胶、香料、生物碱等，其中一些化合物还不能大规模人工合成。如果从植物体内直接提取这些化合物，不仅来源有限，而且生产效率很低。利用植物组织培养技术可以快速、高效地得到大量的细胞或细胞代谢产物。例如，人参是我国名贵药材，因野生资源缺乏，现多用人工栽培，但人工培养生长缓慢。近年来，科学家实现了利用植物组织培养技术大量生产人参皂苷干粉，其生产效率是用人工栽培的人参提取人参皂苷的 100 倍以上，其药用成分和药理活性与栽培人参相似，甚至更加优良（图 2-17）。

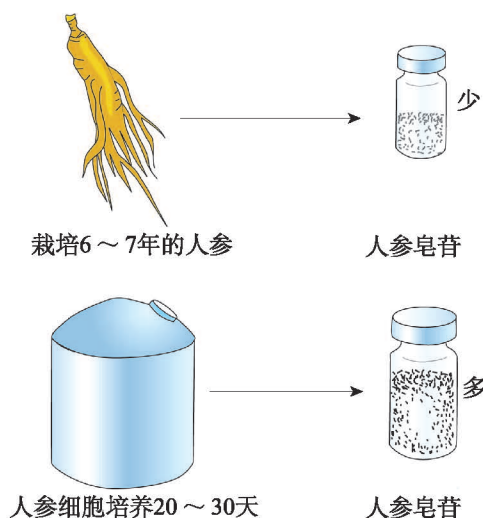


图 2-17 不同方式生产人参皂苷的比较示意图

因此,利用植物组织培养技术,培养植物的某些器官或愈伤组织,筛选出高产、高合成能力和生长较快的细胞株系,继而进行大规模工业化生产,是一条行之有效的途径。现在人参、三七、紫草和银杏的细胞产物都已经成功实现了工厂化生产。植物细胞工程利用快速繁殖、脱毒、次生代谢产物生产、育种等方式有效提高了生产效率。

植物细胞工程的应用,催生了一大批先进实用的研究成果和技术,培育了一批优良品种。在大力推广常规脱毒和快速繁殖技术的同时,加快发展植物快速繁殖生物反应器和光自养微型繁殖技术,将为种苗业带来新的变革。随着植物细胞工程生物反应器技术的完善,应用植物组织培养技术生产植物代谢产物将进一步商业化。

实践应用 调查

调查植物细胞工程的应用

调查可参考以下提示开展。

1. 参观当地的植物园、农业生态园或植物组织培养基地。
2. 调查哪些植物是由组织培养技术培育的,哪些是由体细胞杂交技术培育的。
3. 分析、总结植物细胞工程中两种技术应用的范围有哪些不同、各有哪些优势。

检测评价

植物细胞工程技术包括植物组织培养技术和体细胞杂交技术,在快速繁殖、农作物育种及提高农作物产量等方面具有广泛应用。请回答下列问题:

(1) 下列有关植物细胞工程应用的叙述,不正确的是()。

- A. 利用植物组织培养技术培育脱毒苗,获得具有抗病毒性状的新品种
- B. 利用植物组织培养技术获得的植株能保持亲本的优良性状
- C. 利用植物细胞培养技术可实现细胞产物的工厂化生产
- D. 利用植物体细胞杂交技术可克服不同生物远缘杂交不亲和的障碍

(2) 植物细胞工程技术中可完全遗传亲本性状的技術是_____,如果想获得具有新性状的植株则利用植物细胞工程中的_____技术。

(3) 组织培养技术和体细胞杂交技术各有何优势?



开阔眼界

脱毒马铃薯在中国广泛种植

马铃薯富含淀粉、维生素及钙、钾等矿质元素，易被消化吸收，为人们喜食，有人称誉它为“第二面包”。马铃薯生长周期短，增产潜力大，耐储存，但易感染多种病毒，导致薯块变小、薯块畸形、种薯退化等。近年来，我国科学家利用茎尖组织培养技术结合病毒检测，进行马铃薯脱毒，培育脱毒种薯用于农业生产，有效防止种薯退化，大幅度提高了马铃薯产量。例如，青薯9号、合作88号等，在全国各地广泛种植。

青薯9号是由我国科学家自主研究的马铃薯新品种，其特点是耐旱、高产、品质优良，适于在西部干旱地区种植。青薯9号在甘肃试种后，创下该省旱地马铃薯产量、收入新纪录。目前我国已启动马铃薯主粮化战略，推进将其加工成馒头、面条、米粉等主食。马铃薯将成为继水稻、小麦、玉米之后的第四主粮。

第二节 动物细胞工程

1997年2月，英国罗斯林研究所宣布：维尔穆特（Ian Wilmut, 1944—2023）等人利用体细胞克隆技术培育的只有母亲没有父亲的绵羊“多莉”于1996年7月诞生。这项震惊世界的研究成果将人们的视线引向一个神奇的领域——动物细胞工程。什么是动物细胞工程？动物细胞工程包括哪些主要的技术呢？

一 动物细胞培养技术

在日常生活中，皮肤有时会被烫伤。如果是小面积的严重烫伤，医生会取下患者完好部位的皮肤，移植到伤处，使伤口愈合。如遇大面积的严重烫伤，自身皮肤移植受到限制，如何解决大面积皮肤来源的问题呢？



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注医生如何通过细胞培养技术挽救烫伤女孩的生命。

不满1岁的女孩米歇尔手臂和腿部被沸水大面积严重烫伤。由于米歇尔需要移植的皮肤面积很大，不能用常规的皮肤移植进行治疗。医生尝试在实验室培养皮肤为她进行皮肤移植。他从米歇尔未受伤的皮肤上取下一点样本，剪切成小块后放在培养液中，用解剖刀轻轻刮皮肤，让皮肤上的一些活细胞掉落到周围的液体中，再将细胞吸取到装有培养液的培养瓶中培养。细胞在培养瓶中分裂，数量增多，直至铺满整个培养瓶的底部，3~4个星期后细胞连成了很薄的“皮肤”。医生将这些“人造皮肤”移植到米歇尔的伤处，几个月之后，米歇尔的新皮肤生长良好。这种技术挽救了米歇尔的生命。

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 皮肤细胞培养需要哪些条件？
2. 用于细胞培养的皮肤在培养之前要如何处理？
3. 细胞培养的过程如何进行？
4. 动物细胞培养有哪些特点？

动物细胞培养不同于植物组织培养。动物细胞生活的内环境是液体环境，离体培养动

物细胞要为其提供模拟内环境的液体培养基，其营养成分主要包括无机盐、葡萄糖、氨基酸、维生素和动物血清。除此之外，通常还可在培养液中加入适宜种类、适量的抗生素，以防止培养过程中微生物的污染。动物细胞可在液体培养基中进行有丝分裂，产生更多的子代细胞。用于培养的动物细胞一般取自动物的胚胎或幼龄动物的组织、器官。

成块的组织中细胞和细胞连接在一起，彼此限制了细胞的生长和增殖。因此，进行动物细胞培养时，应先将组织分散成单个细胞。其方法是在无菌的条件下，从动物体内取出组织块，剪碎，加入适量的胰蛋白酶或胶原酶处理一段时间，这样组织就会被消化分散成单个细胞。经过滤、离心后，将沉淀中的动物细胞接种到灭菌的细胞培养液中，制成细胞悬液。再将细胞悬液放入动物细胞培养瓶内，置于二氧化碳恒温培养箱中，控制适宜的二氧化碳浓度和温度进行培养，这个过程称为原代培养。原代培养的细胞分装到几个新培养瓶中继续培养称为传代培养（图 2-18）。培养过程中应定期更换培养液，以便清除代谢产物，防止细胞代谢产物积累对细胞自身造成危害。从动物体获得相关组织，分散成单个细胞后，在适宜的条件下使细胞生长和增殖的过程，称为动物细胞培养。动物细胞培养是动物细胞工程的基础。

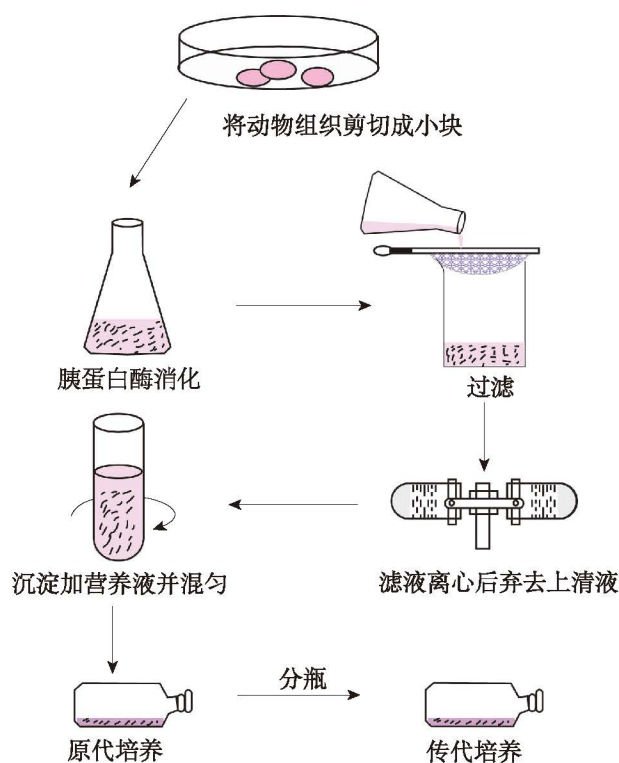


图 2-18 动物细胞培养流程示意图

多数动物细胞都有一个特点——贴壁生长。细胞悬液中分散的细胞很快就会贴附到瓶壁上，这就要求培养瓶或培养皿的内表面光滑、无毒，易于贴附（图 2-19）。原来圆球形的细胞一旦贴壁便迅速铺展（图 2-20），形成多种形态，此后细胞便开始有丝分裂（图 2-21），其数目以指数增长方式迅速增加。当细胞单层分裂生长到表面相互接

触时，细胞就停止分裂增殖，不再继续生长，这是动物细胞培养的第二个特点——接触抑制（图 2-22）。

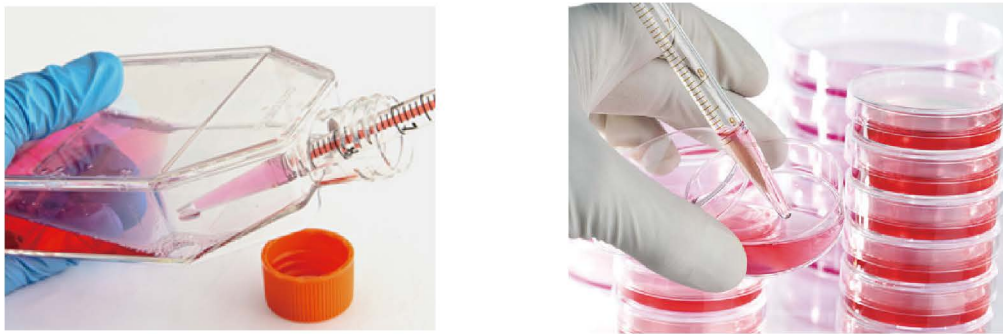


图 2-19 用于动物细胞培养的培养瓶（左）和培养皿（右）

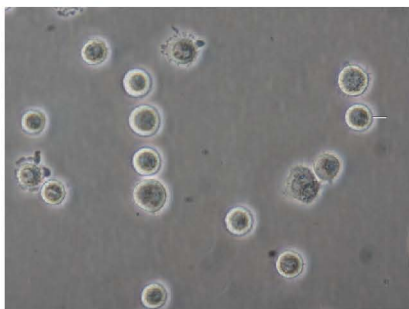


图 2-20 圆球形细胞刚开始
铺展贴壁生长（100×）

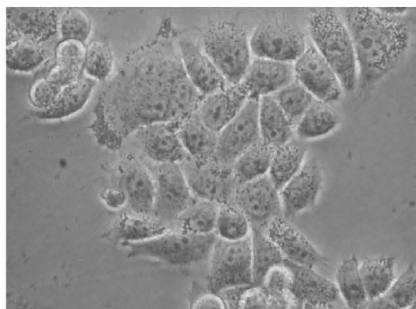


图 2-21 培养的动物细胞贴壁生
长并进行有丝分裂（100×）

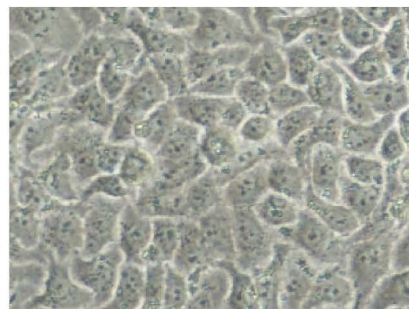


图 2-22 细胞单层贴壁生长铺满
瓶壁后出现接触抑制（100×）

铺满培养瓶或培养皿整个表面的细胞需要重新用胰蛋白酶处理，然后按照一定的比例分装到新的培养瓶中继续培养，这样细胞就解除接触抑制，继续传代增殖生长。有些特殊的动物细胞，如肿瘤细胞可以悬浮培养，在无菌环境下，将细胞悬液放在摇床上振荡培养或放在生物反应器中悬浮培养。

动物细胞培养的第三个特点——分裂次数有限性。动物细胞生长到 10 代左右出现生长停滞，大部分细胞衰老死亡。少数细胞度过“危机”，继续生长增殖，传代到 40~50 代时，绝大部分细胞出现死亡危机，极少数癌变细胞因为遗传物质发生改变，可无限传代。目前使用或冷冻保存的正常细胞通常为 10 代之内，以保证细胞正常的二倍体核型。

动物细胞培养技术在科研和实践中有广泛的应用。科学家通过培养正常细胞或各种病变细胞，用于生理、病理、药理等方面的研究，如用于筛选抗癌药物，为治疗和预防癌症及其他疾病提供理论依据。许多有重要药用价值的生物制品，如干扰素、单克隆抗体、疫苗等，都可以借助动物细胞的大规模培养进行生产。培养的动物细胞既可以作为基因工程的受体细胞，又可以通过显微镜检查细胞形态和染色体畸变，检测有毒物质及其毒性。科学家还在尝试用培养的人体细胞构建组织、器官，用于临床器官移植，目前已经成功地获得人造皮肤和膀胱（图 2-23）。

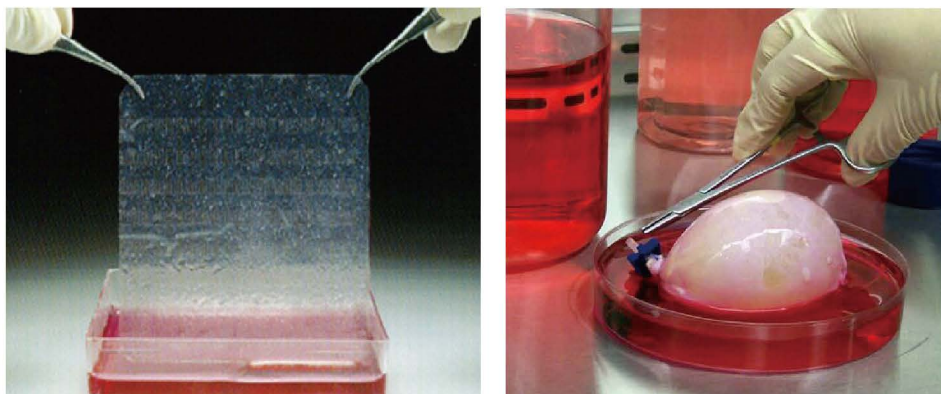


图 2-23 细胞培养构建的人造皮肤（左）和膀胱（右）

实践应用调查

调查动物细胞培养技术的应用

调查可参考以下提示开展。

1. 全班同学分为两组。一组调查利用动物细胞培养技术培育人造皮肤的过程及人造皮肤在医学领域的具体应用。另一组调查利用动物细胞培养技术构建人造膀胱的过程和具体应用实例。

2. 全班将调查的资料进行交流，归纳人造皮肤和人造膀胱的应用价值，讨论动物细胞培养技术在其他人造器官方面的应用。

检测评价

1. 某科研团队开发了一种治疗抑郁的新药，需要研究确定这种药物对大脑神经元的影响。他们利用刚出生的小鼠，分离得到小鼠的神经元进行细胞培养，然后进行相关离体实验。请回答下列问题：

(1) 利用刚出生的小鼠进行神经元培养，是因为刚出生小鼠的神经元（ ）。

- A. 容易产生各种变异 B. 具有更强的全能性
C. 取材十分方便 D. 具有更强的分裂能力

(2) 动物细胞培养的特点是（ ）。

- ①细胞贴壁生长 ②进行有丝分裂 ③多层生长 ④接触抑制
⑤进行减数分裂 ⑥培养过程遗传物质可能发生改变 ⑦分裂次数有限性

- A. ①②④⑥⑦ B. ①②③④⑤ C. ①③④⑥⑦ D. ①③④⑤⑥

(3) 一般来说, 动物细胞体外培养需要满足的条件是 ()。

①无毒的环境 ②无菌的环境 ③合成培养基需加动物血浆(血清)

④温度与体温相近 ⑤有 O_2 , 无 CO_2 ⑥有 O_2 , 有 CO_2

A. ①②④⑤ B. ①②④⑥ C. ①②③④⑤ D. ①②③④⑥

2. 连续降水造成某铜矿厂厂区溶液池底部黏土层被掏空, 近万立方米的污水顺着排洪涵洞流入河流, 导致部分河段污染。环保部门除了检测水体中含有的污染物种类、含量, 观察水生动物死亡情况之外, 还可以用动物细胞培养技术, 在细胞水平检测水体污染程度。利用下列实验材料和用具, 设计检测水体污染的实验方案。

实验材料: 活的小鼠胚胎。

试剂用具: 胰蛋白酶、动物细胞培养液、适宜浓度的结晶紫溶液、滴管、培养皿、剪刀、锥形瓶、培养瓶、二氧化碳恒温培养箱、载玻片、盖玻片、显微镜、小鼠正常体细胞有丝分裂各时期高倍显微照片等。

请回答下列问题:

(1) 说出设计实验的原理。

(2) 写出实验流程或实验步骤。

(3) 如何科学、合理地记录实验结果?



开阔眼界

体外重建人角膜内皮用于角膜移植

人角膜内皮(HCE)由单层内皮细胞镶嵌而成, 人成年后单层内皮细胞就失去了分裂能力, 局部细胞损伤后只能依靠邻近细胞扩张和移行来填补缺损区。一旦HCE细胞密度低于维持内皮细胞生理功能的临界密度, 角膜将出现不可逆的病变——角膜内皮盲。目前, 临床治疗角膜内皮盲的唯一途径就是角膜移植, 但由于供体角膜高度匮乏, 我国每年能进行的角膜移植手术只有3 000~4 000例, 绝大多数患者因得不到移植角膜而无法重见光明。

2009年, 我国科学家开始尝试利用动物细胞体外培养构建可用于角膜移植的组织工程人角膜内皮(TE-HCE)。2016年该研究团队在体外成功构建出了形态结构与HCE高度近似的最“年轻”的TE-HCE, 并对猕猴进行角膜移植, 移植后能使猕猴角膜逐渐恢复透明度和厚度。体外构建的高密度TE-HCE有望作为捐献角膜内皮的等效替代物, 用于角膜内皮异常疾病的临床治疗。

二 动物细胞融合技术

1970 年，两位科学家在证明质膜流动性时进行了人-鼠细胞的融合实验，得到了人-鼠融合细胞，实现了不同种属动物细胞的融合。此实验的成功不仅证明了质膜的流动性，而且为动物细胞融合（cell fusion）技术的建立和应用奠定了基础。那么，动物细胞融合是如何进行的？动物细胞融合技术又有哪些应用呢？

利用促融手段使两个或多个动物细胞融合成一个细胞



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注动物细胞融合过程如何进行。

人-鼠细胞融合时，科学家首先用发绿色荧光的荧光素标记小鼠细胞抗体，用发红色荧光的荧光素标记人细胞抗体，然后用灭活的仙台病毒进行诱导，诱导后加入已经标记的两种抗体。在荧光显微镜下进行观察时，科学家发现融合细胞刚开始为一半发绿色的荧光，一半发红色的荧光，40 min 之后，两种荧光在融合细胞表面均匀分布（图 2-24）。

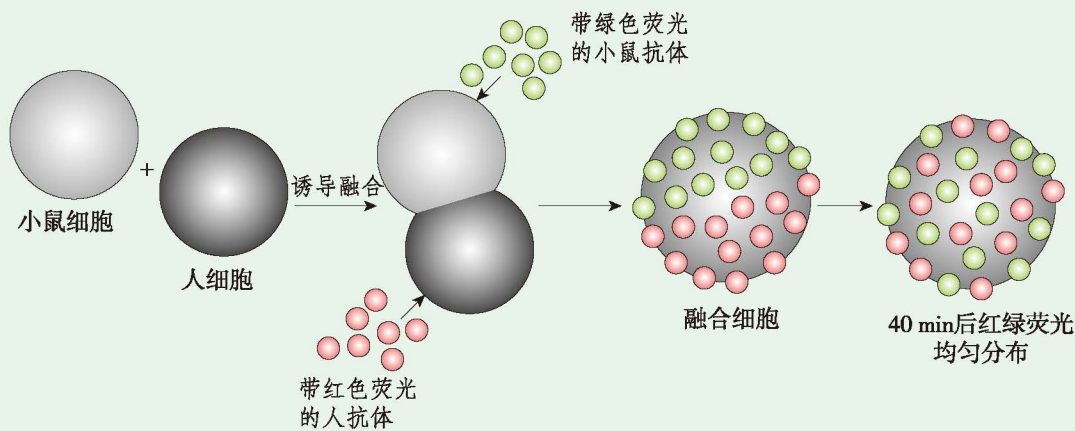


图 2-24 人-鼠细胞融合实验示意图

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 不同种类的动物细胞能融合的原因有哪些？
2. 促进动物细胞融合的技术手段有哪些？
3. 动物细胞融合的过程如何进行？

细胞融合在生物界中自然存在，受精就是雌雄生殖细胞间的自然融合。细胞之所以能融合是因为质膜具有一定的流动性。

动物细胞质膜表面有具有识别作用的糖蛋白,不同种类动物细胞,即使相互紧贴在一起也不易发生自动融合。因此,需要为细胞融合提供一些特殊的诱导因素,如电刺激、PEG、灭活病毒等。在这些诱导因素的作用下,质膜会发生一定程度的损伤,依赖于质膜的流动性从而实现细胞融合。融合后的细胞最初是多核的,之后由于细胞有丝分裂,前期核膜消失,从而使来源于多个细胞的染色体在纺锤丝的牵拉下移动、排列,末期在细胞两极出现新的核膜,将不同来源的染色体包裹在同一细胞核中,从而实现细胞的真正融合(图2-25)。通过物理、化学或生物学等手段,使两个或多个动物细胞结合形成一个细胞的过程称为动物细胞融合,也称细胞杂交。



小资料

灭活病毒促融合原理

病毒表面含有的一些蛋白质和酶,能与质膜表面的糖蛋白特异性结合并发挥作用,使细胞相互凝聚,质膜上的磷脂分子和蛋白质分子重新排布,细胞发生融合。

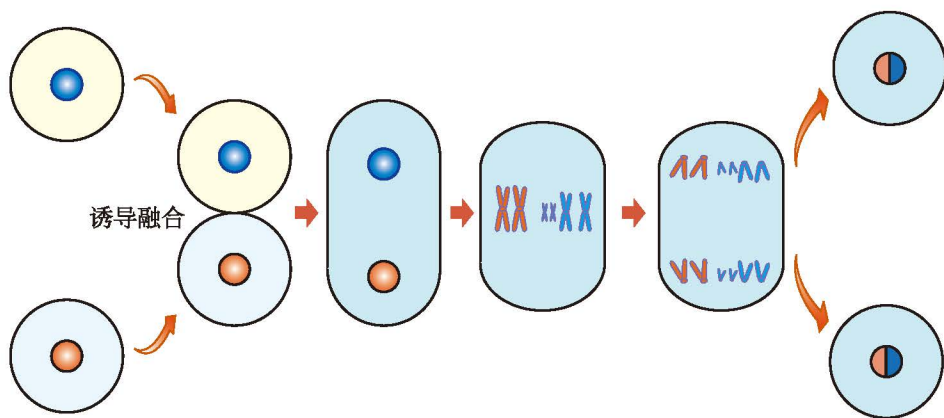


图2-25 动物细胞融合过程模式图

动物细胞融合技术突破了有性杂交中生殖隔离的局限,使远缘杂交成为可能。至今,种间、属间、科间,甚至动物和植物之间的细胞融合都已经获得成功。目前,该技术已经成为细胞生物学、遗传学、免疫学、病毒学研究以及癌症、膜蛋白等领域研究的重要手段。特别是利用动物细胞融合技术制备单克隆抗体已经在临床医学方面得到广泛应用。

利用细胞融合技术生产单克隆抗体



寻找证据 阅读

阅读下面资料,重点关注科学家是如何利用细胞融合技术制备单克隆抗体的。

B细胞能产生特异性抗体,但是B细胞不能在体外培养液中大量增殖。如

何获得既能在体外大量增殖又能产生特异性抗体的 B 细胞呢？1975 年，英国科学家米尔斯坦（César Milstein, 1927—2002）和德国科学家科勒（Georges Köhler, 1946—1995）在前人工作的基础上，大胆创新，将一种能产生特定抗体的 B 细胞与能在体外无限增殖的骨髓瘤细胞进行融合，使所得的融合细胞既能产生特异性抗体，又能无限增殖。他们将羊的红细胞注射到小鼠体内，使小鼠产生免疫反应，从经免疫的小鼠脾中，得到了抗羊红细胞的抗体。这说明在小鼠的脾中形成了产生特异性抗体的 B 细胞。他们又设法将小鼠的骨髓瘤细胞与从脾中获得的 B 细胞融合，再用特定的选择培养基进行筛选。在该培养基上，未融合的亲本细胞、融合的具有同种核的细胞停止生长或只能存活几天，只有 B 细胞和骨髓瘤细胞融合的细胞才可以大量生长、增殖。他们对上述经选择性培养的杂交瘤细胞进行克隆化培养和抗体检测，经多次筛选，获得了既能快速、无限增殖，又能分泌大量特异性抗体的细胞。将杂交瘤细胞在体外条件下进行大规模培养，或注射到小鼠腹腔内增殖，这样，从细胞培养液或小鼠腹水中，就可以提取出大量的单克隆抗体。这种抗体特异性强，灵敏度高，且能大量制备。由于米尔斯坦和科勒的杰出贡献，他们获得了 1984 年的诺贝尔生理学或医学奖。

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 单克隆抗体有哪些优点？
2. 选择 B 细胞和骨髓瘤细胞进行融合的目的是什么？
3. 单克隆抗体制备的过程包括哪几步？

哺乳动物感染细菌、病毒等病原体后，体内的 B 细胞在抗原的刺激和淋巴因子的作用下，增殖分化为浆细胞，产生能与抗原特异性结合的免疫球蛋白——抗体，从而消灭病原体，保护机体。

科学家发现，对于一个抗原的刺激，每个 B 细胞只能合成并分泌一种识别抗原特定区域——抗原决定簇的特异性抗体。一个抗原可有多个不同的抗原决定簇，因此一个抗原可刺激 B 细胞产生多种浆细胞，不同的浆细胞可产生针对不同抗原决定簇的多种抗体。这种由同一抗原诱导产生的针对多个抗原决定簇的抗体称为多克隆抗体。多克隆抗体在检测和治疗疾病上特异性不强，灵敏度不高。只含有针对一个抗原决定簇的抗体称为单克隆抗体。单克隆抗体与多克隆抗体相比，纯度高，特异性更强，能准确识别抗原物质并与之特异性结合。因此，单克隆抗体在诊断上，具有准确、高效、简易、快速的特点。

要想获得大量的单克隆抗体，首先需要利用动物细胞融合技术得到能够无限增殖的针对单一抗原决定簇的杂交瘤细胞，然后将杂交瘤细胞进行体内或体外培养，获得单克隆抗体。具体过程如下：用提纯的特定抗原免疫实验动物，从其脾中获取针对不同抗原决定簇

的多种 B 细胞；用灭活的病毒或 PEG 诱导 B 细胞和骨髓瘤细胞进行融合；用选择培养基筛选出杂交瘤细胞；利用抗原-抗体特异性结合的特点，对体外培养的杂交瘤细胞再次进行筛选，得到能产生特定抗体的杂交瘤细胞；将能产生特定抗体的杂交瘤细胞进行体内或体外培养，获得单克隆抗体（图 2-26）。细胞融合技术是单克隆抗体制备的重要技术。

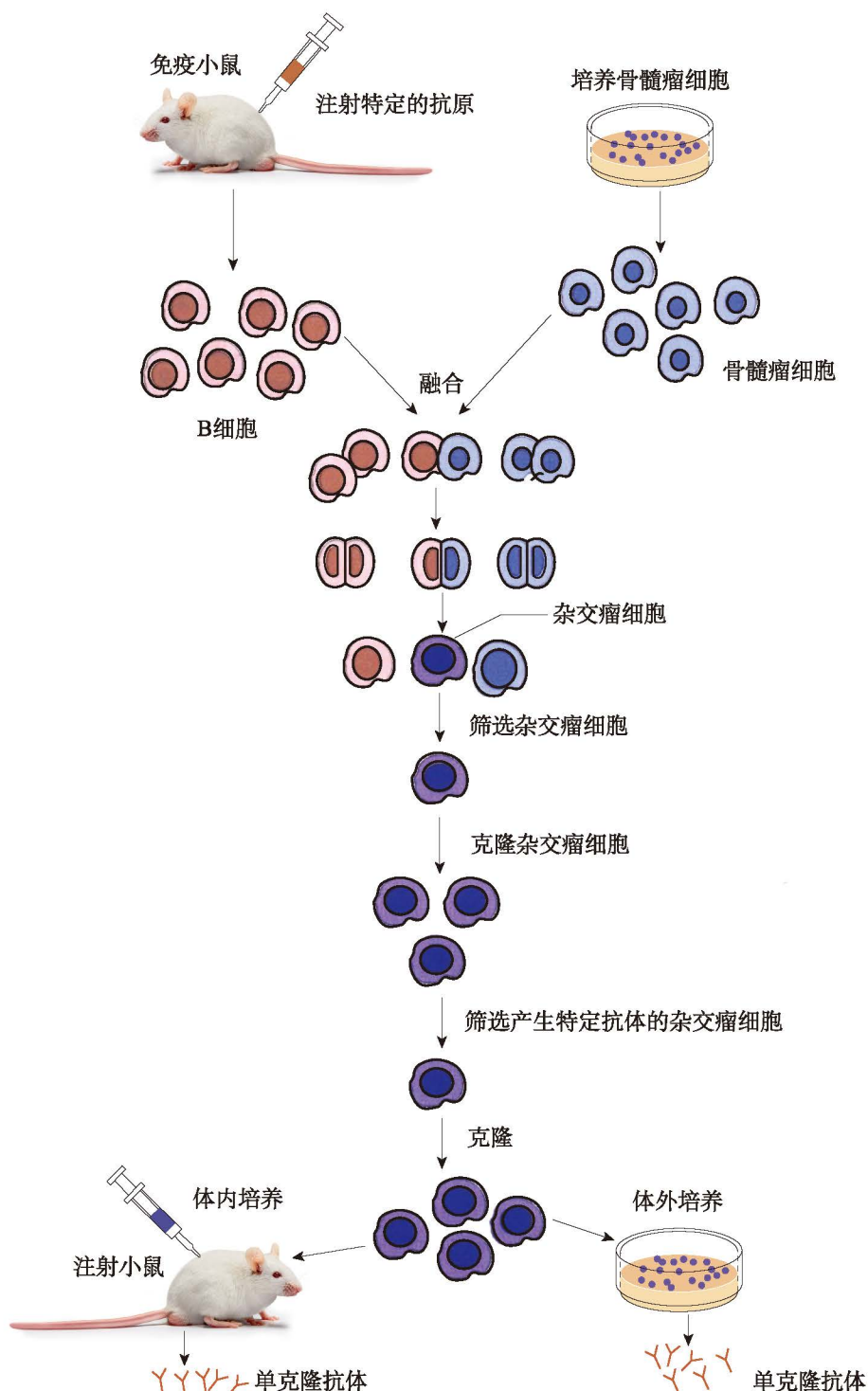


图 2-26 单克隆抗体制备过程示意图

单克隆抗体因其在诊断上具有准确、高效、简易、快速的特点，被广泛应用于人类疾病及动植物病害的诊断和病原体的鉴定。在治疗上，还可以将抗癌细胞的单克隆抗体与药物结合，制成“生物导弹”，注入患者体内，借助单克隆抗体的导向作用，将药物定向带到癌细胞所在位置，既可以杀死癌细胞，又不损伤正常细胞。现今，全球已经报道的用于诊断和治疗的单克隆抗体有 500 多种，它们在疾病的诊断和治疗中发挥着重要作用。

实践应用 探讨

探讨血清抗体和单克隆抗体的制备方法及其特点

被狗咬伤后，需要注射抗狂犬病血清和疫苗。抗狂犬病血清制备时需要将灭活的狂犬病病毒注射到兔或马的血管内，一定时间后，动物体内产生抗体，然后抽取血液，经分离提纯，得到抗狂犬病血清，这就是血清抗体。

早孕试纸可以快速检测是否妊娠，其原理是利用细胞融合技术生产人绒毛膜促性腺激素（HCG）的单克隆抗体，然后将单克隆抗体制备成能够快速显色的试纸，通过检测尿液中是否含有 HCG，判定是否怀孕。利用 HCG 的单克隆抗体早孕试纸进行检测，不仅准确率可达到 99.9%，而且极低浓度的 HCG 也可被检测到。早孕试纸操作简单、反应快速，短时间内就可读取结果。

通过上述两个应用实例，探讨血清抗体和单克隆抗体的制备方法有哪些不同，二者应用时有哪些特点。

检测评价

1. 科学家在研究基因定位时，将人的缺乏次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶的突变细胞株（HGPRT⁻）和小鼠的缺乏胸苷激酶的突变细胞株（TK⁻）进行融合，然后利用选择培养基进行筛选，发现长期在选择培养基中存活的融合细胞中都含有人的第 17 号染色体。请回答下列问题：

- (1) 题干中的选择培养基适合哪类细胞的生长？
 - (2) 从上述结果中可以确定人的 _____ 基因位于 _____ 号染色体上。
 - (3) 下列叙述中，不合理的是（ ）。
- A. 与人和小鼠细胞相比，融合细胞发生了遗传物质的改变
 - B. 研究方法中需要选择适当的培养液和细胞融合诱导技术
 - C. 融合细胞一定表现出人们期望的性状
 - D. 通过该研究可发现人的某一特定基因与特定染色体的对应关系

2. HCG 是受孕后体内分泌的一种糖蛋白激素。在妊娠早期, HCG 的浓度迅速升高, 检测尿中的 HCG 即可证实妊娠。科学家据此并结合细胞工程技术发明了早孕检测试剂, 可在受精 10 天左右测出是否怀孕。请回答下列问题:

(1) 科学家以 HCG 为抗原制备出单克隆抗体。下列叙述正确的是 ()。

- A. 用纯化的 HCG 反复注射到小鼠体内, 产生的抗体为单克隆抗体
- B. 体外培养单个 B 细胞可以获得大量针对 HCG 的单克隆抗体
- C. 等量 B 细胞和骨髓瘤细胞经诱导融合后的细胞均为杂交瘤细胞
- D. 利用该单克隆抗体可快速诊断出是否怀孕

(2) 请根据所学知识, 设计制备早孕检测试剂的实验方案, 写出详细的关键步骤。

(3) 使用此试剂检测快捷、准确、高效的原因是什么?



开阔眼界

人源化单克隆抗体抗癌药物的研制

单克隆抗体药物主要针对恶性肿瘤、免疫性疾病、糖尿病等的治疗。制备单克隆抗体药物技术难度较高, 一直被国外药企垄断。我国科研人员从 1999 年开始尝试单克隆抗体药物在癌症治疗领域的临床应用研究。2005 年, 科研人员研发、生产出全球第一个以表皮生长因子受体 (EGFR) 为靶点的人源化单克隆抗体药物, 这也是我国本土研发的第一个基因重组人源化单克隆抗体药物。该药获国家食品药品监督管理局批准注册为 I 类新药, 于 2008 年 4 月上市。

我国本土研发的第一个基因重组人源化单克隆抗体药物利用了分子靶向技术, 可以像“生物导弹”一样直击癌变细胞, 且基本不会损伤健康细胞。这比“敌我不分”的放疗和化疗手段产生的副作用要小得多。该药物既能提高患者的生存质量, 又能减轻患者的药费负担。该药对于头颈部肿瘤、鼻咽癌、胰腺癌、乳腺癌、神经胶质瘤、非小细胞肺癌等多种癌症有较好的治疗效果, 在一定程度上, 延长了患者的生存时间。

三 动物细胞核移植技术

1962 年,英国发育生物学家戈登(John Gurdon, 1933—)利用玻璃微管将非洲爪蟾小肠上皮细胞注入细胞核失活的卵母细胞中,部分重组细胞发育为蝌蚪。50 年后他因这一开创性的研究成果获得诺贝尔生理学或医学奖。1963 年,中国科学家童第周(1902—1979)成功建立了鱼类的细胞核移植技术。此后,科学家开始尝试用细胞核移植方法进行无性繁殖哺乳动物的实验。1996 年,世界上第一只只有母亲没有父亲的克隆羊“多莉”在英国诞生。科学家是怎么培育出“多莉”的呢?



寻找证据 阅读

阅读下面资料,重点关注核移植的操作过程。

1996 年 7 月,维尔穆特等人利用核移植技术培育出的克隆羊“多莉”诞生于英国罗斯林研究所。“多莉”培育的过程如图 2-27 所示。

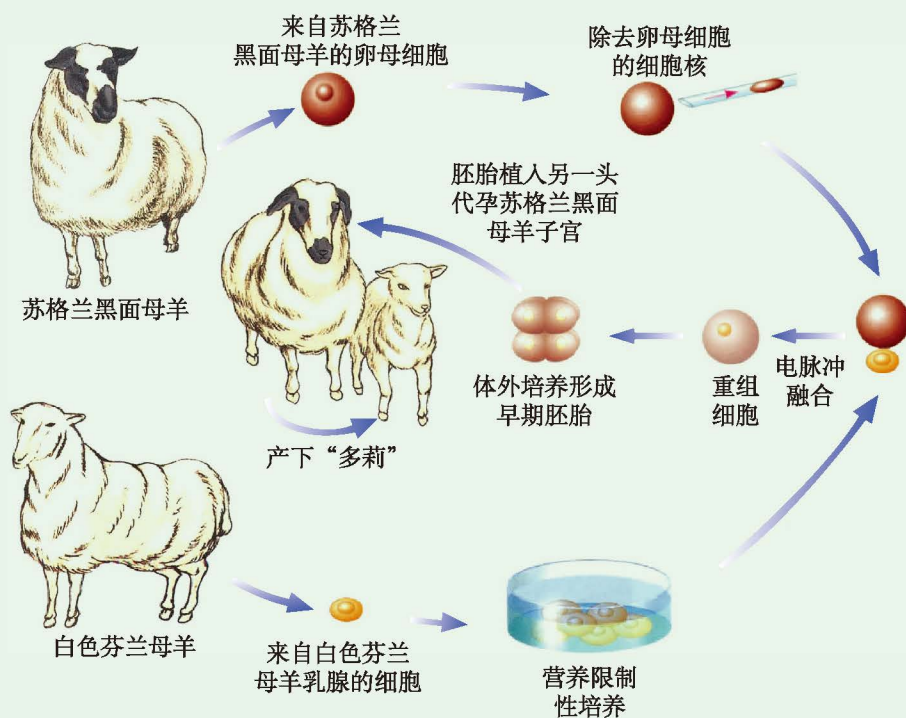


图 2-27 克隆羊“多莉”的培育过程示意图

根据阅读获得的信息,思考下列问题:

1. 白色芬兰母羊和苏格兰黑面母羊分别为“多莉”的诞生提供了什么?
2. “多莉”的遗传物质只来自白色芬兰母羊吗?“多莉”的性别由什么决定?
3. 提供卵母细胞的母羊和代孕母羊均选择黑面绵羊的原因是什么?
4. 体外培养的动物细胞不能发育成动物幼体可能的原因是什么?

维尔穆特科研团队取白色芬兰母羊（供体）乳腺的细胞和苏格兰黑面母羊（受体）的去核卵母细胞，通过适当电刺激使它们融合，获得重组细胞。体外培养重组细胞，使其分裂为早期胚胎，再将早期胚胎移植到代孕苏格兰黑面母羊的子宫内。这看似简单的过程实际上是历经 434 次不断探索的缩影，最终科学家只成功获得了一只“外貌”完全遗传白色芬兰母羊特征的克隆羊“多莉”。

植物组织培养技术充分证明高度分化的植物细胞依然能在适宜的条件下表现出全能性。动物细胞的全能性则随着动物细胞分化程度的提高而逐渐受到限制，发育成完整个体的潜能逐渐减弱，目前很难通过类似植物组织培养的办法获得克隆动物。通过核移植技术获得的重组细胞，借助于卵母细胞的发育能力，由体细胞核主导逐渐发育成新的个体，体现了动物细胞核的全能性。动物细胞核移植一般是将体细胞核移入一个去核的卵母细胞中，并使重组细胞发育成新胚胎，继而发育成动物个体的过程。

哺乳动物核移植分为胚胎细胞核移植和体细胞核移植。因为动物胚胎细胞分化程度低，恢复其全能性相对容易，而动物体细胞分化程度很高，其全能性表达困难，所以动物体细胞核移植的难度明显高于胚胎细胞核移植，而灵长类动物体细胞核移植技术更难。我国首次利用体细胞核移植技术成功克隆了非人灵长类动物“中中”“华华”（图 2-28），在世界范围内引起关注。



图 2-28 克隆猴“中中”“华华”

体细胞核移植在医药卫生、畜牧业等领域有广泛的应用。转基因克隆动物可以作为生物反应器，生产凝血因子等珍贵的医药蛋白；通过核移植技术获得的胚胎干细胞经过诱导分化，形成相应的组织、器官后，可以用于组织、器官的移植（图 2-29）；利用体细胞

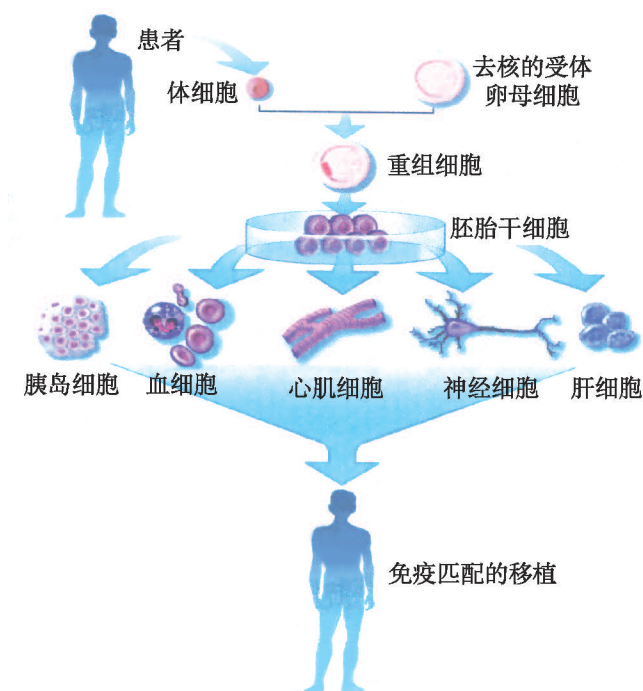


图 2-29 体细胞核移植技术用于治疗人类疾病示意图

克隆技术可以加速遗传改良进程，促进优良种畜的繁育；通过核移植技术还可以增加濒危物种的存活数量。



检测评价

1. 科学家在培育克隆羊时，分别将乳腺上皮细胞、胚胎成纤维细胞和早期胚胎细胞与去核卵母细胞融合，形成重组细胞，发育成重组胚胎。这三种不同的供体细胞核移植形成的重组胚胎受孕率（妊娠母羊数 / 受体母羊数）分别为 7.69%、40% 和 51.85%。请回答下列问题：

(1) 根据上述情况，下列描述不正确的是 ()。

- A. 早期胚胎细胞作为细胞核的供体细胞妊娠成功率最高
- B. 克隆羊的遗传信息与细胞核的供体细胞完全相同
- C. 体细胞核移植难度高于胚胎细胞核移植
- D. 重组细胞发育与去核卵母细胞的细胞质有关

(2) 下列对动物核移植技术的描述不正确的是 ()。

- A. 哺乳动物细胞核移植包括胚胎细胞核移植和体细胞核移植，后者的难度更高
- B. 体细胞核移植的过程中，可通过显微操作去除卵母细胞中的细胞核
- C. 体细胞核移植过程通常采用去核的卵母细胞作为受体细胞
- D. 通过体细胞核移植方法生产的克隆动物遗传物质全部来自供体细胞核

2. 2003 年《细胞研究》杂志上的一篇文章介绍了上海交通大学医学院科研团队分别将一位 5 岁男孩和两位成年男性的包皮细胞、一位女性的面部细胞作为细胞核供体，移入去除细胞核的新西兰兔卵母细胞，成功使融合后的细胞发育到胚胎阶段，从而得到胚胎干细胞。该实验的成功使科学家看到了人类器官移植的美好前景。请回答下列问题：

(1) 根据上述信息，结合核移植知识，设计实验方案，培育可用于临床移植的器官。(说出供体、受体和实验操作的关键流程。)

(2) 目前核移植技术在应用上存在哪些问题？你如何看待这些问题？



开阔眼界

中国“克隆之父”——童第周

早在 20 世纪 60 年代初，生物学家童第周就带领他的团队开始研究金鱼、鲤

鱼、鲫鱼等不同物种的鱼之间的细胞核移植技术。1973年，童第周及其带领的科研团队利用细胞核移植技术，成功地获得了第一批人工新鱼种——鲤鲫移核鱼。他们将鲤鱼的囊胚细胞核移植到鲫鱼去核的未受精卵中，发现重组细胞发育成的个体的一些性状介于两种鱼之间。由童第周主持用英文撰写的论文发表在1980年第4期的《中国科学》(*Scientia Sinica*)上，论文报道了中国成功获得具有“发育全能性”克隆鱼的消息。这是世界上报道的第一例发育成熟的异种间的胚胎细胞克隆动物。童第周因这项卓越的贡献而成为克隆动物研究的先驱，被誉为中国“克隆之父”。



童第周及其夫人叶毓芬
进行实验研究

四 干细胞的研究与应用

我们的皮肤意外受伤后一段时间就可痊愈，这是皮肤的干细胞不断增殖分化修复创面的结果。有些患者手术切除60%的肝脏，两周后肝脏的大小和功能就可恢复正常，新生的肝脏细胞从何而来？2015年8月，在《自然》(*Nature*)杂志上发表的一篇研究论文中，科学家确定了能够分化为功能性肝细胞的干细胞，解开了关于肝脏不断新生的细胞到底从何而来的谜团。什么是干细胞？近年来干细胞的研究为什么受到科学界的青睐呢？

干细胞是一类具有自我更新和分化潜能的细胞

干细胞是具有增殖和分化潜能的细胞，具有自我复制更新能力，在一定条件下，它可以分化成多种功能的细胞。根据发育阶段，干细胞可分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)和成体干细胞。按照分化潜能的大小，干细胞可分为三种类型。第一类是具有发育成完整个体潜能的细胞，称为全能干细胞，胚胎干细胞就是全能干细胞；第二类是具有分化出多种细胞、组织潜能的细胞，但失去了发育成完整个体的能力，发育的潜能受到一定的限制，称为多能干细胞，如骨髓多能造血干细胞；第三类是只能向一种类型或密切相关的两种类型细胞分化的细胞，称为专能干细胞，也称单能干细胞或定向干细胞，如上皮组织的基底层干细胞、肌肉中的成肌细胞(图2-30)。

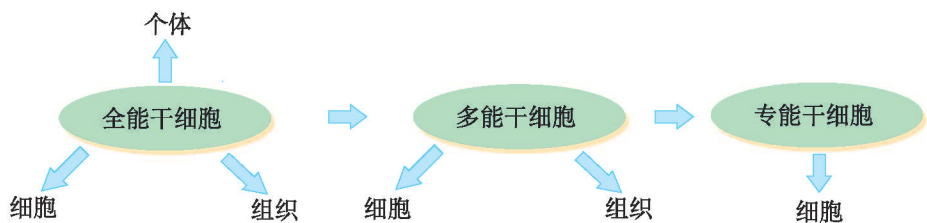


图 2-30 干细胞类型

当受精卵分裂发育成早期胚胎——囊胚时，胚胎细胞在囊胚腔内成团存在，称为内细胞团。从内细胞团中分离出的细胞即为胚胎干细胞（图 2-31）。胚胎干细胞形态上表现为体积小，细胞核所占比例大，核仁明显。功能上，胚胎干细胞是高度未分化的细胞，具有发育的全能性，能分裂并分化出动物所有的组织、器官，包括生殖细胞。在体外培养的条件下，胚胎干细胞可以增殖而不发生细胞分化成为永久性细胞系。在必要的时候可以对胚胎干细胞进行冷冻保存，便于以后的研究或使用。

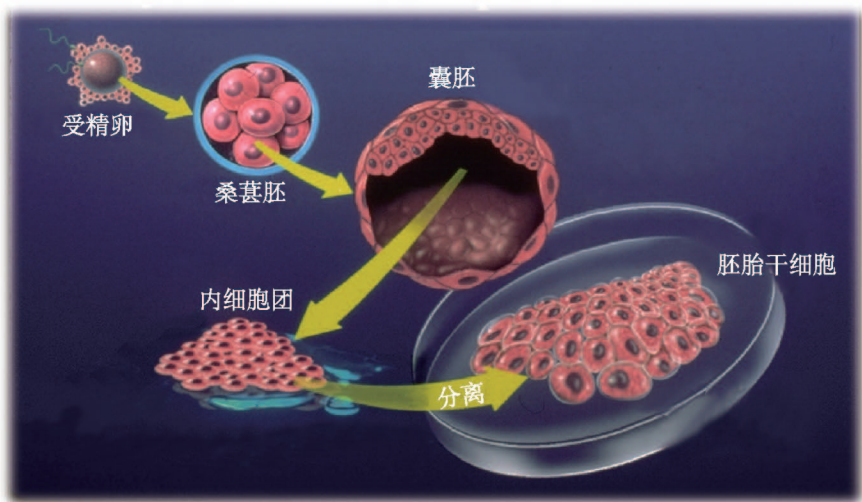


图 2-31 受精卵发育成囊胚过程及胚胎干细胞的获得示意图

干细胞在生物医学工程中有广泛的应用价值

干细胞在再生医学领域的应用是难点，也是国际竞争的热点。截至 2018 年，与干细胞和细胞治疗相关的研究已经三度获得诺贝尔生理学或医学奖。

胚胎干细胞是研究细胞分化的理想材料。培养胚胎干细胞的关键是培养体系，这种培养体系能促进干细胞的生长，同时抑制干细胞的分化。培养胚胎干细胞时，先在培养皿底部制备一层细胞，这层细胞一般为输卵管上皮细胞或胚胎成纤维细胞，称为饲养层，然后把干细胞接种在饲养层上面。也可以用添加了抑制因子的培养液代替饲养层。

继续培养接种在饲养层上的胚胎干细胞，直至形成的内细胞团突出饲养层，然后用酶消化获得单个细胞，置于新鲜培养液中培养。在培养液中加入分化诱导因子，如牛磺酸、丁酰环腺苷酸等化学物质，就可以诱导胚胎干细胞向不同类型的组织细胞分化，如心肌细胞、神经细胞和免疫细胞等（图 2-32），这为揭示细胞分化和细胞凋亡的机制提供了有效手段。

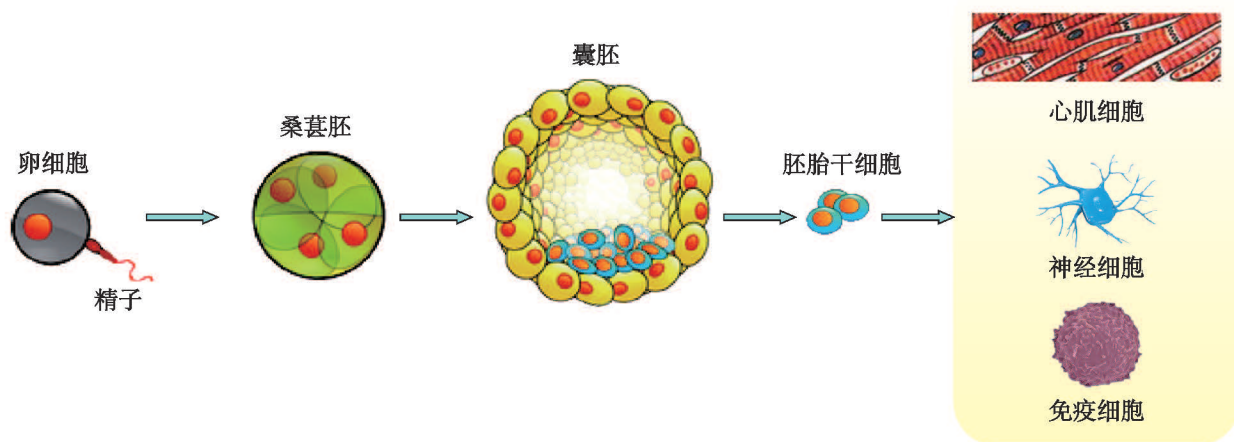


图 2-32 体外诱导胚胎干细胞的分化示意图

胚胎干细胞可用于治疗人类的某些疾病。体细胞克隆技术为生产患者自身的胚胎干细胞提供了可能。把患者的体细胞核移植到去核卵母细胞中形成重组细胞，体外培养获得囊胚，从囊胚内细胞团分离得到胚胎干细胞。目前，科学家已经成功分离到人的胚胎干细胞。获得的胚胎干细胞可以定向分化为所需要的特定细胞类型，如神经细胞、肌细胞、血细胞、胰岛细胞等。科学家正尝试用这些细胞治疗由于细胞坏死、退化或功能异常而引起的疾病，如帕金森病、阿尔茨海默病、截瘫、I 型糖尿病等。这些细胞还可以进一步培育出移植用的细胞、组织和器官，用于解决临床上存在的供体器官不足和器官移植后免疫排斥的问题。因此，干细胞在生物医学工程中有广泛的应用价值。

因为胚胎干细胞能够不断自我更新且具有发育多潜能性，所以曾被认为是细胞替代疗法中很有希望的供体细胞来源。但是，由于人胚胎干细胞的建立需要大量的卵细胞，而且涉及破坏发育中的人的囊胚，这些问题引发了争议，并限制了人胚胎干细胞的研究以及在临床上的应用。为了解决胚胎干细胞面临的伦理问题，人们在不断寻求新的建立全能干细胞的方法。科学家通过逆转录病毒介导等方法，在分化的体细胞中表达某些特定转录因子，诱导体细胞的重编程而获得与胚胎干细胞相似的细胞。这些细胞可不断自我更新并具有发育多潜能性，因此被命名为诱导多能干细胞（iPS 细胞）。近年来，科学家利用 iPS 细胞进行再生医学领域的研究和应用时，发现长期体外培养的 iPS 细胞有可能发展为肿瘤细胞，在应用干细胞治疗时会出现干细胞致癌性和免疫排斥反应等。因此，未来 iPS 细胞的应用研究仍然任重而道远，科学家还需要付出不懈的努力。

干细胞的应用前景吸引着众多科学家投入这一领域的研究。目前,胚胎干细胞的分离、培养体系的研究,以及胚胎干细胞的选择、检测和全能性的维持,是当前生命科学研究的热门课题。胚胎干细胞和 iPS 细胞不仅在研究人的胚胎发育等领域有积极意义,而且在研究疾病的发生、移植治疗、基因治疗、药物筛选和药物开发等方面具有重要价值。



检测评价

1. 从囊胚内细胞团分离出的 ES 细胞以及从新生个体获取的成体干细胞均可用于白血病、I 型糖尿病等疾病的治疗。下列关于 ES 细胞的叙述,不正确的是()。

- A. 形态上表现为体积小,细胞核明显
- B. 体外培养可以增殖而不分化
- C. ES 细胞可以用来培育人造组织、器官
- D. ES 细胞是一种成体干细胞

2. 研究发现,直肠癌患者体内存在癌细胞和肿瘤干细胞。用姜黄素治疗,会引起癌细胞内 BAX 等凋亡蛋白高表达,诱发癌细胞凋亡;而肿瘤干细胞因膜上具有高水平的 ABCG2 蛋白(一种 ATP 结合转运蛋白),能有效排出姜黄素,从而避免凋亡,并增殖分化形成癌细胞。下列关于肿瘤干细胞及癌症治疗等说法不正确的是()。

- A. 肿瘤干细胞与癌细胞中基因的执行情况不同
- B. 肿瘤干细胞的增殖及姜黄素的排出都需要消耗 ATP
- C. 编码 BAX 蛋白和 ABCG2 蛋白的基因都属于原癌基因
- D. 用 ABCG2 抑制剂与姜黄素联合治疗,可促进肿瘤干细胞凋亡

3. 佛罗里达大学研究团队从尚未发病的糖尿病小鼠的胰岛导管中分离出胰岛干细胞,并在体外成功地将这些细胞诱导分化成产生胰岛素的胰岛 B 细胞。之后研究人员用小鼠进行相关移植实验,以寻找用干细胞治疗糖尿病的有效途径,实验分组如下表所示。

分组	小鼠	处理	血糖含量
实验组	糖尿病小鼠	移植适量由胰岛干细胞分化的胰岛 B 细胞	正常范围内
对照组 1	糖尿病小鼠	不处理	居高不下
对照组 2	正常小鼠	不处理	正常范围内

请回答下列问题:

- (1) 设置对照组2的目的是什么?
- (2) 根据实验结果,得出的实验结论是什么?



开阔眼界

生命银行——脐带血库

脐带血是胎儿娩出断脐后,脐带结扎断离,残留在胎盘和脐带中的血液。脐带血中的造血干细胞是一种具有分化成多种细胞、组织潜能的多能干细胞,可用来治疗多种血液系统疾病和免疫系统疾病,如白血病、淋巴瘤、再生障碍性贫血以及某些实体肿瘤等。脐带血中的干细胞具有免疫原性低、移植后排斥反应轻的特点。即使配型不全相合也可用脐带血中的干细胞进行移植。而且,脐带血的采集相对便利、成本低。目前,脐带血造血干细胞移植技术逐步成熟,脐带血造血干细胞移植使用数量逐年上升,世界脐带血库联盟数据显示脐带血的综合使用比例超过1/10,已经成为造血干细胞临床移植术的新选择,脐带血也成为继骨髓和外周血后的第三大造血干细胞来源。脐带血库也被形象地称为“生命银行”。

脐带血库分为自体脐带血库和异体脐带血库,即“私人库”和“公共库”。“公共库”是产妇自愿免费捐献的脐带血库,是“取之于大众、为大众服务”的脐带血库。因此,国家积极提倡捐赠脐带血,增大“公共库”脐带血的基数,提升配型成功的概率,使更多的人受惠。

第三节 胚胎工程

牛奶是优质蛋白质的重要来源。荷斯坦奶牛原产于荷兰，是世界上产奶量最大的奶牛品种，单头牛年产量可超过 10 000 kg，是普通奶牛产奶量的 3~4 倍。我国引进一头成年荷斯坦奶牛需 3 万~5 万元人民币，成本很高。牛一般一胎只生一只牛犊，一生只生育四五次。如何利用胚胎工程技术，加快荷斯坦奶牛的繁育步伐，造福人类？胚胎工程包括哪些技术呢？如何操作？

一 受精和早期胚胎的发育

动物交配时，数量巨大的精子游向卵子，最终只有一个精子和卵子结合，使卵子受精，开始胚胎的发育。哺乳动物的受精和早期胚胎的发育过程是怎样进行的呢？

受精是胚胎发育的起点

自然情况下，哺乳动物受精是在雌性动物的输卵管中完成的，包括受精前的准备阶段和受精阶段。

多种动物的雄性个体刚排出的精子，不能立即与卵子结合，必须在雌性生殖道内发生相应的生理变化后，才能获得受精能力，这一生理现象称为精子获能。动物排出的卵子成熟程度有差异，有些是初级卵母细胞，如马、狗等；有些是次级卵母细胞，如猪、羊等。这些卵子都要在输卵管中进一步成熟，在排出后 2~3 h，当达到减数第二次分裂的中期时，才能和精子结合。

哺乳动物的受精过程主要包括：精子穿越放射冠和透明带，精子入卵，原核形成及雌、雄原核融合（图 2-33）。

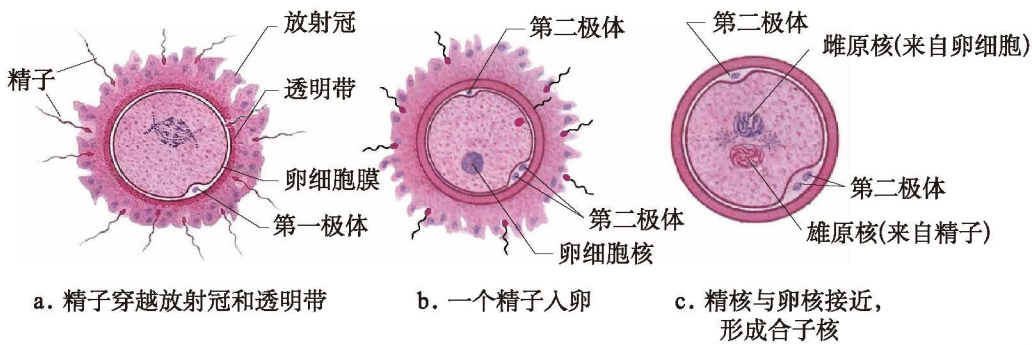


图 2-33 哺乳动物受精过程示意图

获能后的精子和卵子相遇时,首先发生顶体反应。放射冠是包围在卵子透明带外面的高柱状细胞群,精子所释放的酶可溶解这些细胞之间的物质,形成精子穿越放射冠的通路。穿过放射冠的精子立即与透明带接触,酶随后将透明带溶解出一条孔道,精子借助自身运动穿越透明带,并接触卵细胞膜。在精子触及卵细胞膜的瞬间,会产生阻止其他的精子进入透明带的生理反应——透明带反应,该反应是防止多个精子进入透明带造成多精子入卵受精的屏障。

只有穿过透明带的精子才能与卵细胞膜接触。卵细胞膜表面有大量的微绒毛,当精子与卵细胞膜接触时,立即被微绒毛抱合,随后,精子外膜和卵细胞膜相互融合,精子入卵。精子入卵后,卵细胞膜会立即发生生理反应,进一步阻止多精入卵。

精子入卵后尾部脱落,原有的核膜破裂,之后形成一个比原来精子核大的新核,这个核称为雄原核。与此同时,精子入卵后被激活的卵子完成减数第二次分裂,排出第二极体后,形成雌原核。

雌、雄原核充分发育后,相互接触,体积缩小、合并,来自父母双方的两组核染色体合二为一,形成一个含两个染色体组的受精卵。

早期胚胎发育经过卵裂、桑葚胚、囊胚等阶段

受精卵在输卵管内形成后开始进行有丝分裂和胚胎发育。根据胚胎形态的变化,可将早期发育的胚胎分为以下几个阶段。

胚胎发育的早期有一段时间是在透明带内进行的,这一时期称为卵裂期。该过程的特点是:细胞有丝分裂产生的细胞数量不断增加,但胚胎的总体积不增加甚至略有减小。当胚胎细胞数目达到16~32个时,胚胎形成致密的细胞团,形似桑葚,叫作桑葚胚。这一阶段前的每个细胞都具有发育成完整胚胎的潜能,属于全能胚胎干细胞。桑葚胚进一步发育,胚胎的内部出现了含有液体的囊腔——囊胚腔,这一时期的胚胎叫作囊胚。囊胚在子宫内壁着床(图2-34)。

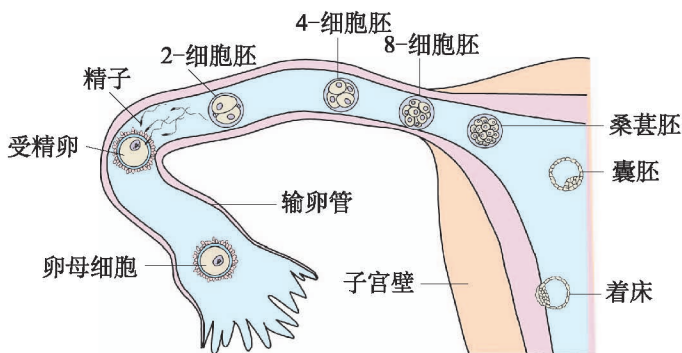


图 2-34 早期胚胎发育场所及过程示意图

囊胚内的内细胞团,将来发育成胚胎的各种组织;而沿着透明带内壁扩展和排列的、个体较小的细胞,称为滋养层细胞,它们将来发育成胎膜和胎盘,为胚胎提供营养。

随着胚胎的进一步发育,囊胚进一步扩大,导致透明带破裂,胚胎从其中伸展出来,这一过程叫作孵化。囊胚孵化后,内细胞团细胞再进一步发育,逐渐分化形成各种组织、器官和系统。综上所述,胚胎形成经过了受精及早期发育等过程。



检测评价

有资料显示男性不育的比例逐年增加。临床上确定男性不育的原因前需对其精液进行多项指标的检测，如下表所示。

精液量	pH	液化时间	每毫升精液精子数	精子畸形率	死精率	精子活力（前向运动精子定量）
2 ~ 6 mL	7.2 ~ 8.6	约 30 min	6 000 万 ~ 2 亿	≤ 30%	≤ 50%	第 1 小时：≥ 60% 第 2 小时：≥ 50%

请回答下列问题：

（1）正常精细胞形成精子的过程中，细胞的很多结构退化消失，但保留了大量线粒体，因为线粒体可以合成精子运动所需的（ ）。

A. 乙醇 B. ATP C. 胰岛素 D. 淀粉

（2）表中统计精子畸形率和精子活力的意义是什么？

（3）受精时只有一个精子和卵子结合，那为什么男性的精液中精子数还要满足一定数量才可育？

（4）若某男性的精子数量少且成活率低，如何借助辅助生殖技术拥有自己的子女？



开阔眼界

“精子获能”的发现

早在 1878 年，德国人申克就以家兔和豚鼠为材料，开始探索哺乳动物的体外受精技术，但一直没有获得成功。1951 年，美籍华人张明觉和澳大利亚科学家奥斯丁同时发现，用各种方法处理取自附睾的精子，都无法使这些精子和卵子在体外受精。他们后来发现在多种动物中，进入雌性生殖道的精子，必须在其中运行一段时间，发生相应的生理变化后，才能获得与卵子受精的能力，即精子获能现象。

1959 年，张明觉从一只交配 12 h 后的母兔子宫内冲取精子（体内获能的精子），从另外两只超数排卵处理的母兔输卵管中收集卵子，使精子和卵子在体外人工配制的溶液中完成受精。正常卵裂的 36 枚胚胎被移植到 6 只代孕母兔子宫内，其中 4 只妊娠，并产下 15 只健康的小兔。这是世界上首批试管动物，它们的正常发育标志着体外受精技术的成熟。



胚胎工程的技术手段

20 世纪 70 年代,我国胚胎学专家以每个 2 000 元的价格从加拿大引进了 1 000 个荷斯坦奶牛的胚胎,并将其移植到黑龙江当地奶牛的子宫中,借腹怀胎,成功产下荷斯坦奶牛。胚胎移植是如何进行的?胚胎移植有哪些优点?除此之外,胚胎工程还有哪些技术手段呢?



寻找证据 阅读

阅读下面资料,重点关注体外受精、胚胎分割和胚胎移植等技术操作。

2013 年 11 月初,两只具有生长发育快、耐热、适应干燥气候等特点的优质纯种陶赛特试管羊在青海海北高原现代生态畜牧业科技试验示范园诞生。这两只试管羊是怎样培育出来的呢?科研人员首先选择几只身体健康的 4~6 周龄陶赛特品种母羊,使用超数排卵技术给其注射促性腺激素,一段时间后用注射器从母羊卵巢的卵泡中将卵子取出,在实验室内模拟母羊的体内环境,使卵子在体外成熟;同时采集陶赛特品种公羊精液,经过获能处理后与卵子在体外环境中受精,得到受精卵;体外培养受精卵后,获得早期胚胎,再将早期胚胎移植给经过同期发情处理的普通藏系母羊,胚胎在藏系母羊子宫内膜着床后继续发育,直至幼体娩出。

科研人员在此基础上,可将早期胚胎分割成若干等份后再进行胚胎移植,提高胚胎利用率。

根据阅读获得的信息,思考下列问题:

1. 体外受精包括哪几个主要步骤?
2. 培育试管动物需要什么操作技术?
3. 面临优质胚胎资源稀缺问题,对提高胚胎利用率,你能提出哪些建议?

体外受精是指精子和卵子在体外人工环境中融合

哺乳动物的体外受精主要包括精子的获取、卵母细胞的采集和受精三个主要步骤。

常用人工采集的方式获取精液,且在体外受精前,要对精子进行获能处理。通常采用的体外获能方法有培养法和化学诱导法两种。对于啮齿动物、家兔、猪等动物的精子,一般采用培养法,即将取自附睾的精子,放入人工配制的获能液培养一段时间获能;对于

牛、羊等家畜的精子常采用化学诱导法，即将精子放在一定浓度的肝素溶液中，用化学药物诱导精子获能。如果需要长期保存，则可将精液保存在液氮（ -196°C ）环境中。卵母细胞的采集有三种方法，即超数排卵采集、活体卵巢采集以及屠宰后的母畜卵巢采集。

正常情况下，哺乳动物一次排卵数量有限。单胎动物一次排卵一枚，多胎动物一次排卵数枚。用促性腺激素处理雌性动物，其排卵数可增加几倍甚至几十倍，此方法叫超数排卵。采集卵母细胞的方法有冲洗输卵管采卵和子宫冲卵两种方法。对于猪、羊等动物，用超数排卵采集的卵母细胞已经发育成熟，为次级卵母细胞（M II 期），不经培养，可直接进行体外受精。而对于马、狗等动物，采集到的卵母细胞为初级卵母细胞（M I 期），需要在体外培养成熟后才可进行受精。

从活体卵巢采集就是借助超声波探测仪、内窥镜或腹腔镜直接从活体动物的卵巢中吸取卵母细胞。屠宰后的母畜卵巢采集就是从刚屠宰的母畜体内摘出卵巢，经洗涤、 $30 \sim 37^{\circ}\text{C}$ 保温，在无菌条件下采集卵母细胞。这两种方法采集到的卵母细胞均需要培养成熟后才能与精子受精。

获能的精子和培养成熟的卵子，一般情况下都可以在获能溶液中或专用的受精溶液中完成受精过程（图 2-35）。用显微镜检查受精情况，若已受精，可看到第二极体和雌、雄原核形成。

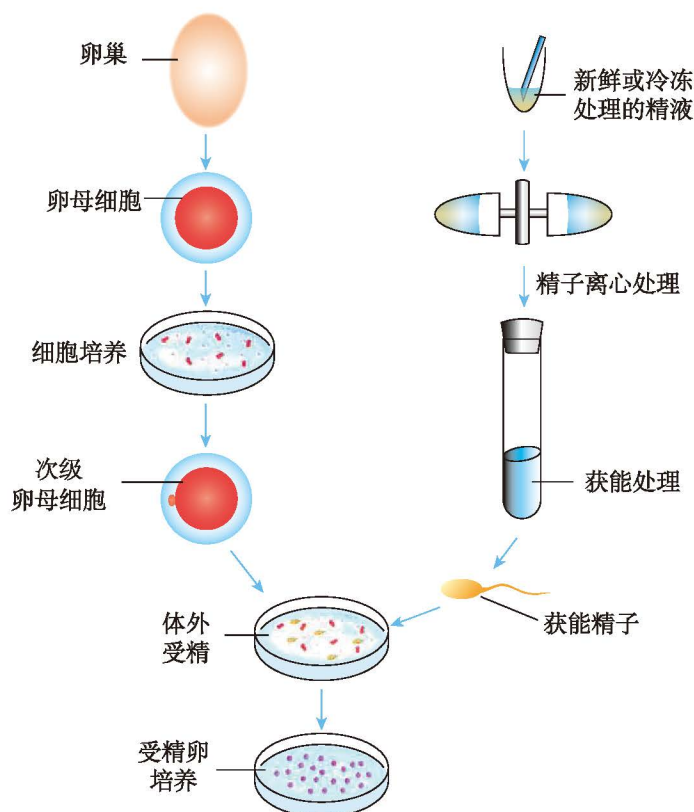


图 2-35 哺乳动物未成熟卵母细胞体外受精过程示意图

精子和卵子体外受精后，将受精卵移入配制好的培养液继续进行早期胚胎培养。由于

不同动物、不同胚胎发育时期生理代谢的需求不同,进行体外胚胎培养时,需配制含有不同成分的培养液。当胚胎发育到适宜阶段时,可将其取出进行胚胎移植、胚胎分割或冷冻保存。

胚胎分割是将早期胚胎分割成若干等份

为了提高优质胚胎利用率,还可以采用胚胎分割(embryo splitting)的方法增加子代数量。胚胎分割通常是指采用机械方法将早期胚胎桑葚胚或囊胚分割成两等份或更多等份,经移植获得同卵双胞胎或多胎的技术(图2-36)。来自同一胚胎的后代具有相同的遗传物质,因此,胚胎分割可以看成是动物的无性繁殖或克隆的方法之一。

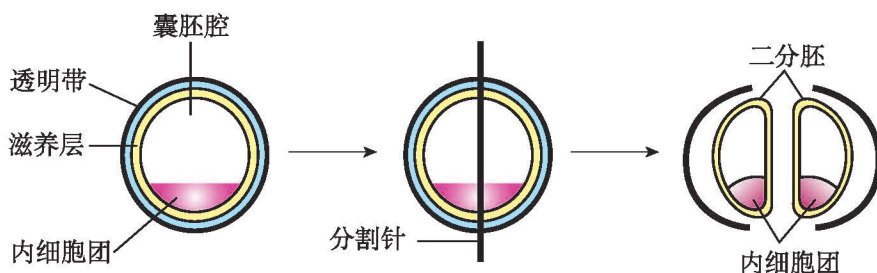


图 2-36 均等的胚胎分割示意图

利用胚胎分割技术可以进一步扩大优良家畜的繁殖数量,还可以培育遗传特点完全相同的动物群,为生物学、医学、药学和畜牧学等的研究提供实验动物。不均等的胚胎分割(图2-37)可以进行细胞、分子水平的检测,如DNA检测、性别鉴定等。

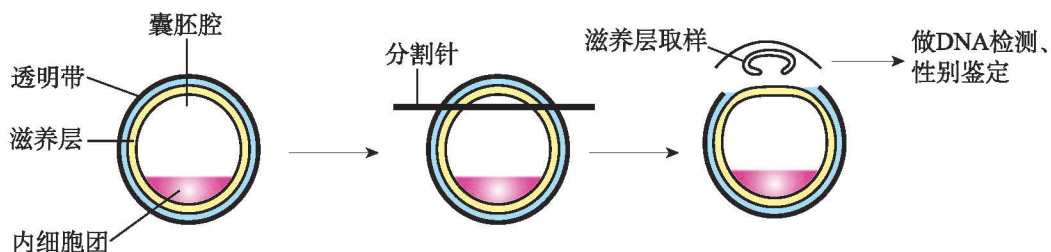


图 2-37 不均等的胚胎分割示意图

胚胎移植是将早期胚胎移植到代孕母畜体内

将体外受精得到的早期胚胎或者胚胎分割得到的分割胚胎移植到适龄母畜中,产下新的个体,这一过程称为胚胎移植(embryo transfer)(图2-38)。

胚胎移植时,要求受体动物的发情同步化。除了对自然发情家畜进行选择外,还通常采用孕酮等激素类似物诱导处理,使受体动物处于同期发情状态。



图 2-38 胚胎移植过程示意图

胚胎工程技术包括体外受精、胚胎分割和胚胎移植等技术。体外受精技术使优良牲畜的遗传潜力得到最大限度发挥，胚胎分割技术、胚胎移植技术可使优良公、母畜的繁殖潜力都得以充分发挥。通过体外受精、胚胎分割、胚胎移植技术，可以加快优良种畜的繁殖速度，对某些哺乳动物进行性别控制。利用胚胎冷冻技术，可以建立优良品种的胚胎库，保存优良或濒危物种。胚胎工程技术作为增加种畜数量、提高种畜质量、保存种畜资源、促进引进优质种畜的有效手段，极大促进了我国牛、羊养殖业的快速发展。在人类遗传学上，可以利用试管婴儿技术（体外受精和胚胎移植）解决不育不孕问题，甚至可以通过筛选胚胎等方法避免遗传病患儿出生。据统计，目前我国试管婴儿的成功率已经达到 50% 左右，处于世界先进水平。



实践应用 调查

调查我国胚胎工程技术的应用成果

调查可参考以下提示开展。

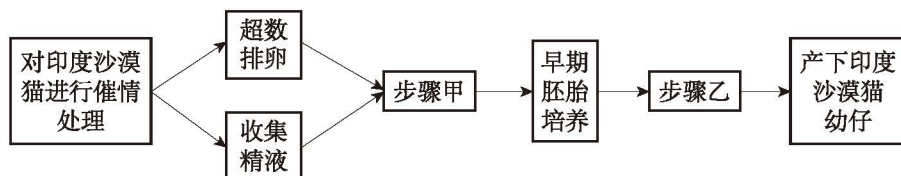
1. 将全班同学分为两组。一组同学以“体外受精”和“畜牧业”为关键词，利

用网络搜集我国体外受精和胚胎移植技术在畜牧业上的应用成果。另一组同学以“胚胎分割”和“畜牧业”为关键词,利用网络搜集我国胚胎分割和胚胎移植技术在畜牧业上的应用成果。

2. 小组之间进行交流,并归纳、总结出我国胚胎工程技术在畜牧业上的应用成果。

检测评价

1. 印度沙漠猫是一种珍稀猫科动物,利用胚胎工程技术,可以通过让家猫代孕而繁育,主要步骤如下图所示。



请回答下列问题:

(1) 下列叙述正确的是()。

- A. 步骤甲、乙分别是指精子获能、胚胎分割
- B. 诱导超数排卵所注射的激素只能作用于特定细胞
- C. 受精卵发育成早期胚胎所需营养主要来源于营养液
- D. 步骤甲使用的培养液和早期胚胎培养液成分完全相同

(2) 下列关于体外受精技术叙述正确的是()。

- A. 获取的精子经获能后才能进行体外受精
- B. 采集的卵母细胞应立即与精子共同放入培养液中才能形成受精卵
- C. 精子和卵子受精形成受精卵后即可移入母体子宫
- D. 精子与卵子相遇后,会发生顶体反应,防止多精入卵

2. 某生物公司从澳大利亚进口少量萨福克羊的冷冻雌性、雄性胚胎,想利用胚胎工程技术,将国外优质萨福克羊的胚胎移植到本地大尾羊和新疆细毛羊的子宫中,直接生产纯种萨福克羊。请回答下列问题:

(1) 进口的冷冻胚胎少,可采用什么技术增加子代的数量?

(2) 请设计利用少量冷冻胚胎快速、批量繁育纯种萨福克羊的方案(用文字、流程图表示均可)。

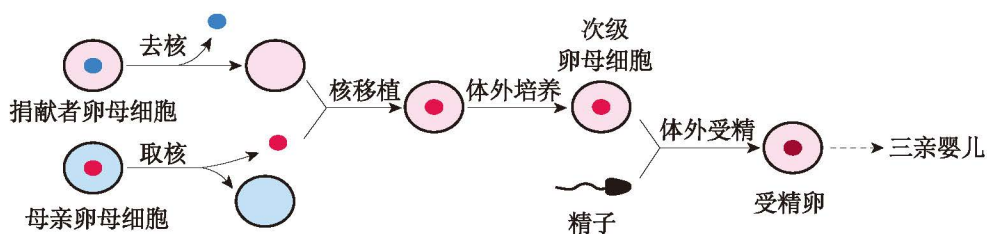
(3) 为什么该生物公司进口的冷冻胚胎既有雌性又有雄性?这与只进口雌性胚胎相比有什么优点?



“三亲婴儿”的诞生

2015年2月，英国议会下院通过一项历史性法案，允许以医学手段培育“三亲婴儿”，即利用“一父两母”三人遗传物质共同育子，最终产生了世界上首个“一父两母”三亲育子的试管婴儿。该过程是将母亲卵母细胞的细胞核移植到捐献者去核的卵母细胞中，体外培养后与父亲已获能的精子结合，经体外受精形成受精卵，由该受精卵发育的婴儿为“三亲婴儿”。

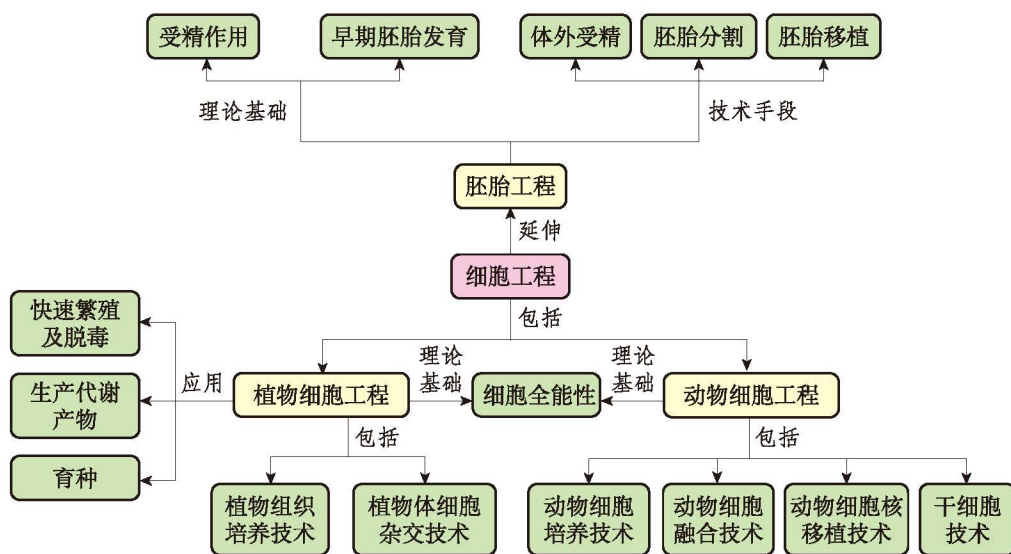
这项技术的基本思路是用健康女性卵母细胞的线粒体，替换掉母亲有缺陷的卵母细胞线粒体，防止后代患线粒体基因控制的遗传病，所以有人将这项技术称为“线粒体替代法”。这个通过传统试管婴儿技术的延伸技术诞生的新生儿，拥有自己父亲、母亲的基因，同时携带捐献者卵子的少部分基因。也就是说，在基因层面，新生儿有两位母亲、一位父亲。



“三亲婴儿”的培育过程示意图

本章小结

● 基础知识梳理



细胞工程包括植物细胞工程、动物细胞工程和胚胎工程。细胞工程的建立基于动植物细胞全能性的发现及体外培养技术的建立。植物细胞工程技术在花卉、林木、农作物等优良品种的繁殖和细胞代谢产物的工厂化生产上已经得到广泛的应用。动物细胞工程主要涉及动物细胞培养技术、动物细胞融合技术、动物细胞核移植技术及干细胞技术等，在临床医学及濒危动物挽救、快速繁殖优良动物品种等方面应用广泛。胚胎工程主要有体外受精、胚胎分割和胚胎移植技术。胚胎工程加速了优良动物的繁育速度，为畜牧业的发展创造更大的空间，同时一定程度上解决了人类不育不孕的难题，并可达到优生优育的目的。

●学科素养提示

基于动植物细胞的全能性，结合植物组织培养实践活动以及动物细胞培养技术调查，运用结构与功能观、局部与整体观，说明细胞工程的基本原理。结合细胞工程在农业、畜牧业及医学领域的应用，针对人类生产和生活的某一需求，选取细胞工程中的技术和方法，提出初步的工程学构想和解决方案。基于细胞工程的基本概念，在关注细胞工程取得巨大成就的同时，就其研究和应用中可能带来的安全性和社会伦理问题表明自己的观点并展开讨论。



第 3 章

基因工程

转基因抗虫棉的大面积种植减少了农药的使用，增加了棉农的收入，保护了生态环境。基因工程胰岛素和基因工程疫苗的使用缓解了人类的疾病痛苦，减轻了患者的经济负担，促进了健康水平的提高。从 20 世纪 70 年代初诞生至今，基因工程取得了许多激动人心的成果。基因工程产品已经走进了我们的日常生活。你知道生产这些基因工程产品需要哪些条件吗？转基因抗虫棉是通过什么方法获得的呢？让我们一起走近基因工程。



学习目标

1. 在理解基因工程原理的基础上，形成细胞遗传物质的结构和功能观等生命观念，并能用结构和功能观解决基因工程中的问题。
2. 基于基因工程的原理和过程，运用归纳、推理等科学思维方法，设计 DNA 重组的实验方案，并通过实验获得 DNA 重组分子。
3. 针对基因工程的应用，通过实验、讨论、交流等科学探究活动，阐释基因工程的广泛应用给人类生活带来的深刻变化。
4. 主动关注基因工程应用带来的安全性问题，做出正确的判断。

第一节 基因工程的原理

1972年,美国斯坦福大学的伯格(Paul Berg, 1926—2023)等人把一种猿猴病毒的DNA与 λ 噬菌体DNA分子连接起来,产生了一种新的重组DNA分子。这是世界上第一个重组DNA分子。1973年,科恩(Stanley Cohen, 1935—)和博耶(Herbert Boyer, 1936—)等人把两个不同质粒的DNA拼接起来,构成一个重组质粒,并将该重组质粒导入大肠杆菌,使导入的基因表达,第一次完整地建立起了基因克隆体系,被视为基因工程诞生的里程碑。那么,什么是基因工程?它的原理是怎样的?基因工程技术是怎样发展起来的?

基因工程是在体外进行的重组DNA技术



寻找证据 阅读

阅读下面资料,重点关注重组胰岛素的生产过程。

糖尿病是一种常见的内分泌疾病,患病原因是胰腺中胰岛细胞分泌的胰岛素不足。为了治疗糖尿病,有的患者要经常注射胰岛素。20世纪20年代,人们开始从猪、牛胰腺中提取胰岛素。但是,从动物胰腺中提取胰岛素成本高、产量低。而且猪胰岛素与人胰岛素有1个氨基酸不同,因此容易发生免疫反应,影响药物效果。

1978年,科学家克隆了编码人胰岛素的基因,将该基因与一种叫作“质粒载体”的DNA结合,导入大肠杆菌,获得了含有人胰岛素基因的大肠杆菌。这些大肠杆菌细胞就像一个个高效运转的生产车间,制造出大量的重组人胰岛素蛋白,再从这些大肠杆菌中将人胰岛素蛋白提取出来,就能制成注射用胰岛素。1982年,通过这种方法获得的胰岛素投入市场,使胰岛素售价大大降低,给全世界数亿糖尿病患者带来了福音。

根据阅读获得的信息,思考下列问题:

1. 怎样改造大肠杆菌才能生产人的胰岛素?
2. 还能利用此技术生产其他产物吗?

重组人胰岛素生产的过程就是将人的编码胰岛素的基因与质粒在体外进行拼接重组,

然后导入大肠杆菌，并使编码胰岛素的基因表达的过程（图 3-1）。因此，基因工程的原理就是将外源基因经过剪切加工，与一个具有自我复制能力的 DNA 载体在体外进行拼接和重组，得到重组 DNA，再将重组 DNA 导入另外一种生物体细胞，外源基因随着细胞的繁殖进行复制和表达，使生物体获得新的性状。其中，提供外源基因的生物体为供体，接受重组 DNA 的生物体细胞为受体，常用的受体有大肠杆菌、酵母菌、动物细胞等。供体、受体和载体是基因工程的三大要素。供体中，除了 RNA 病毒外，几乎所有生物的基因都存在于 DNA 中，所以用于外源基因重组拼接的载体也均为 DNA 分子。上述技术被称为重组 DNA 技术（recombinant DNA technique），而基因工程就是在体外进行的重组 DNA 技术。



小资料

质粒

质粒（plasmid）是游离于细胞拟核或染色体之外、能够独立复制的小型环状双链 DNA 分子，存在于细菌、放线菌、酵母菌等生物中。

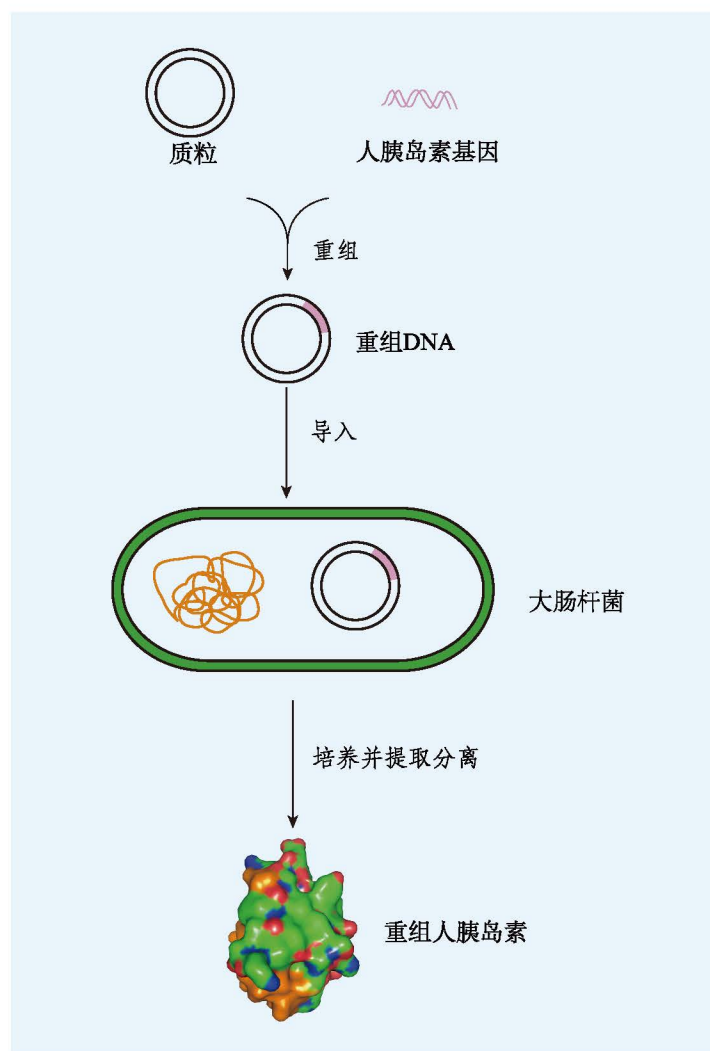


图 3-1 重组人胰岛素生产过程示意图

从基因工程诞生之初,人们就开始将该技术应用于大规模生产与人类健康密切相关的产品,特别是在基因工程疫苗的开发和利用领域发展迅速。慢性乙型肝炎(乙肝)是一种常见的传染性疾病,严重威胁人类健康。接种乙肝疫苗是预防乙肝病毒感染的最有效方法。基因重组乙肝疫苗是利用基因工程技术,构建含有乙肝病毒表面抗原(HBsAg)基因的重组质粒,导入酵母细胞,生产乙肝表面抗原蛋白。然后破碎酵母细胞,提取、纯化制成疫苗,肌肉注射即可。自1988年我国成功研制基因重组乙肝疫苗以来,因其具有生产成本低、价格低、免疫接种后安全可靠等优点,已经被广泛使用。

遗传学等学科快速发展为基因工程奠定了理论基础

19世纪,在发现蛋白质的基础上,1869年瑞士生物学家米歇尔首次从细胞核中分离得到了DNA。直到1944年,艾弗里等人利用两种不同类型的肺炎双球菌进行的著名的转化实验,首次证明了DNA是遗传物质,是遗传信息的载体。1953年,沃森和克里克提出了DNA分子的双螺旋结构模型。DNA分子结构模型的提出,为遗传信息传递机制的研究提供了可能。1958年,梅瑟生和斯达尔提出了DNA半保留复制机制,解决了DNA的自我复制和世代交替问题。随后,1961年,布伦纳、雅各布和梅瑟生发现了mRNA;1966年,尼伦伯格和马太成功破译了编码氨基酸的密码子。这些发现促进了“中心法则”的提出。1970年,克里克综合了许多科学家的研究成果提出了完善的“中心法则”,阐明了遗传信息的流动与表达机制。因此,随着遗传学和分子生物学的快速发展,科学家经过不断探索,确定了遗传物质DNA分子的双螺旋结构,阐明了遗传信息传递的“中心法则”,破译了遗传密码,为基因工程的建立奠定了理论基础。

同时,生物化学和微生物学的发展,使基因工程的建立成为可能。1957年,DNA聚合酶在大肠杆菌中被发现。10年后,DNA连接酶被发现。1970年,科学家分离出了第一种限制性内切核酸酶。伴随着质粒的发现和分离,上述研究成果为基因工程提供了必要的工具,为基因工程的实现提供了保障。因此,基因工程是在遗传学、微生物学、生物化学和分子生物学等学科基础上发展而来的。



检测评价

1. 20世纪90年代,我国科学家利用基因工程技术,将含有苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因(Bt抗虫基因)的植物表达载体导入棉花,创造了具有我国自主知识产权的转基因抗虫棉。后来,我国科学家又研发出可同时表达Bt抗虫基因和豇豆胰蛋白酶抑制剂基因的双价转基因抗虫棉,使我国在抗虫棉的研究及应用领域达到了国际先进水平。

请回答下列问题:

(1) Bt 转基因抗虫棉的研发不需要用到的实验原材料是 ()。

- A. 苏云金芽孢杆菌 B. 质粒载体
C. 大肠杆菌 D. 棉花叶片

(2) 简述研发转基因抗虫棉的技术原理。

(3) 用简图的形式描述双价转基因抗虫棉的培育过程。

2. 大肠杆菌是基因工程中常用的受体菌, 在工业化生产中常采用高密度培养。但是在高密度培养中, 大肠杆菌产生的乙酸达到一定浓度时会抑制大肠杆菌的生长, 影响其产量。有研究发现枯草芽孢杆菌中含有的乙酰乳酸合成酶可以改变细胞的代谢, 大幅度减少乙酸的生成。请回答下列问题:

(1) 利用基因工程技术, 怎样减少大肠杆菌工程菌在培养过程中产生的乙酸?

(2) 怎样在构建大肠杆菌工程菌的同时解决大量产生乙酸的问题?



开阔眼界

戊型肝炎疫苗的研制

戊型肝炎是由戊型肝炎病毒引起的一种急性传染性肝炎, 发病率和死亡率都很高, 对育龄妇女、慢性肝病患者、老年人和婴幼儿感染性更强。数据显示, 戊型肝炎的死亡率已快速上升到各型病毒性肝炎的首位。目前, 针对戊型肝炎感染还没有特异性的治疗药物, 研制有效预防戊型肝炎的疫苗就成为最好的选择。

戊型肝炎病毒是一种 RNA 病毒, 其基因组含有 *ORF1*、*ORF2* 和 *ORF3* 三个基因。其中 *ORF2* 编码的结构蛋白 (pORF2) 位于病毒表面, 构成病毒的衣壳。该蛋白质也是戊型肝炎病毒的表面抗原, 其中的一部分可以作为疫苗起到预防戊型肝炎的作用。我国科研工作者利用基因工程技术, 首先将戊型肝炎病毒的 RNA 通过反转录得到 DNA, 经过体外重组, 使编码部分 pORF2 蛋白的 DNA 在大肠杆菌中表达, 经过提纯制成戊型肝炎疫苗。历时 14 年投入约 5 亿元人民币, 研制成功的戊型肝炎疫苗于 2012 年用于临床, 在戊型肝炎的预防上发挥了重要作用。我国研制成功的世界首支戊型肝炎疫苗是利用大肠杆菌系统表达类病毒颗粒, 开创了与酵母、昆虫细胞、哺乳动物细胞并行的第四种基因工程疫苗研发路径。

第二节 基因工程的基本工具

1967年发现的DNA连接酶被形象地称为DNA片段的“分子黏合剂”，1970年发现的限制性内切核酸酶被形象地称为剪切DNA分子的“分子剪刀”。除此之外，完成DNA分子体外重组还需要运载DNA分子的“分子运输车”。这三种基因工程必备工具的实质是什么？它们有什么特点呢？

限制性内切核酸酶可以特异性切割DNA分子

能够特异性切割DNA分子的酶是限制性内切核酸酶（restriction endonuclease），也称为限制酶。限制酶通常特异性识别4~8个碱基对，一般为反向重复序列，并在其中的特定位置进行切割。如常用的限制性内切核酸酶 *EcoR* I，它是在大肠杆菌（*Escherichia coli*）R菌株中被发现的第一个限制性内切核酸酶，所以被命名为 *EcoR* I。它能识别5'-GAATTC-3'这样的序列，并且在G和A之间进行序列切割。*EcoR* I交错切割DNA，形成两条单链末端，它们之间正好是互补配对的，称为黏性末端（sticky end）。而 *EcoR* V则可以识别5'-GATATC-3'这样的序列，在T和A之间的对称线处切割，产生的末端称为平末端（blunt end）（图3-2）。

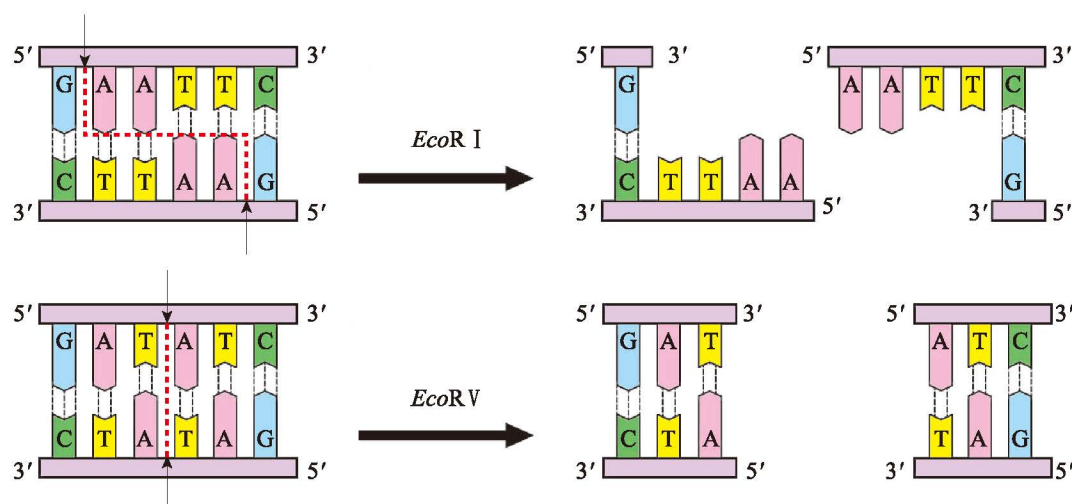


图 3-2 限制性内切核酸酶切割 DNA 分子示意图

限制性内切核酸酶主要存在于微生物中。几十年来，科学家已经分离纯化出几千种限制性内切核酸酶，它们可以识别不同位点的碱基序列，并且以不同方式特异性切割DNA双链分子。

DNA 连接酶可以将 DNA 片段连接在一起

限制性内切核酸酶可以将 DNA 分子切割成不同大小的片段，然而要将不同来源的 DNA 片段组成新的 DNA 分子，还必须将它们彼此连接并封闭起来。1967 年，世界上几个实验室几乎同时发现了一种能够在两条 DNA 链之间催化形成磷酸二酯键的酶。这种能够连接 DNA 片段的酶是 DNA 连接酶（ligase）。这种酶需要在一条 DNA 链的 3'-末端具有一个游离的羟基（—OH），在另一条 DNA 链的 5'-末端具有一个磷酸基团（—P），只有在这种情况下，才能发挥其连接 DNA 分子的作用（图 3-3）。

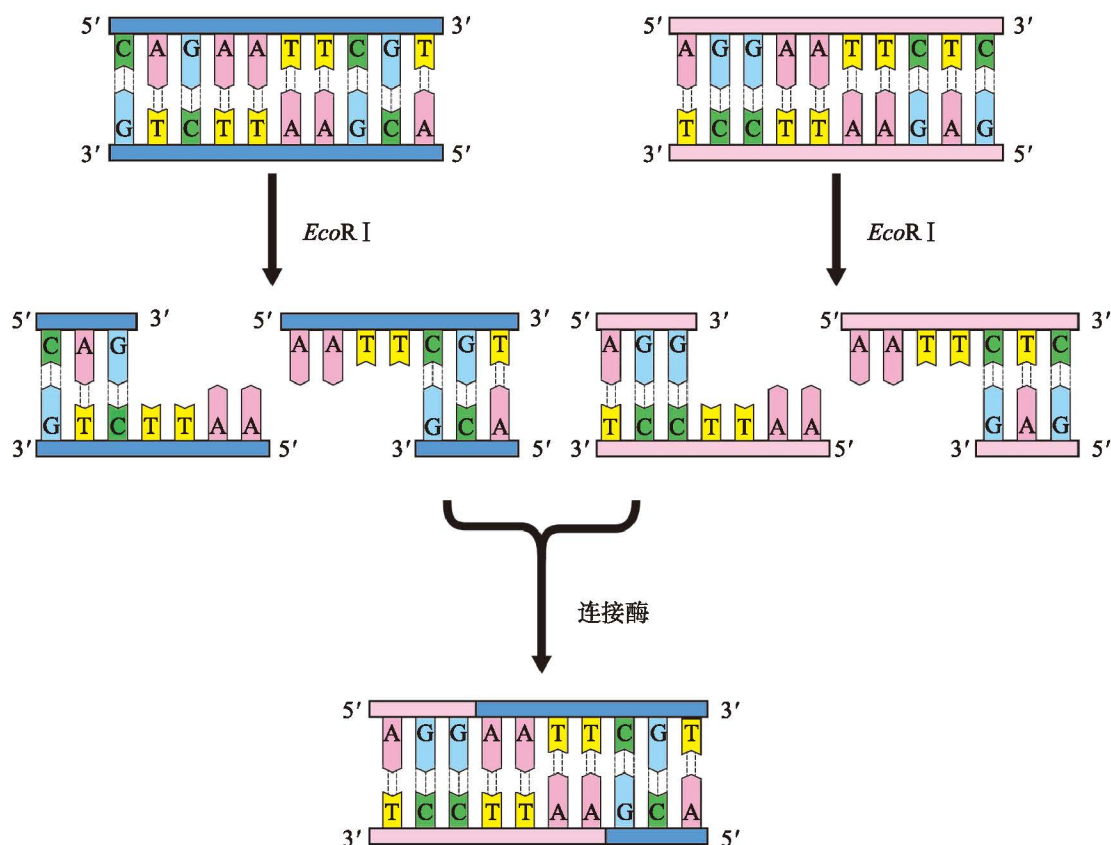


图 3-3 DNA 连接酶连接具有相同黏性末端的 DNA 分子示意图

值得注意的是，DNA 连接酶并不能连接两条单链的 DNA 分子，被连接的 DNA 分子必须是双螺旋的一部分。实际上，DNA 连接酶封闭的是双螺旋 DNA 分子的缺口（nick），即在双链 DNA 的某一条链上两个相邻核苷酸之间失去一个磷酸二酯键所出现的单链断裂。

载体是 DNA 分子的运载工具

重组 DNA 技术的重要环节，是把一个外源基因导入生物细胞，并使它得到扩增。然

而一个外源 DNA 片段是很难进入受体细胞的,即使进入细胞,一般也不能进行复制和功能的表达。在基因工程中,通常是将外源 DNA 片段利用载体(vector)送入生物细胞。

作为 DNA 分子的运载工具,载体一般具有三个特性:第一,载体必须含有一个复制起点,能够独立于宿主染色体进行自主复制;第二,载体要含有用于筛选的标记基因,如抗药性,以便于鉴定含有载体的细胞;第三,载体要含有一个或多个限制性内切核酸酶的识别切割位点,从而便于 DNA 片段插入载体的特定位点。

在基因工程中,最常用的载体是质粒(图 3-4)。天然质粒经过人工改造后,更加适合运载外源 DNA。它们一般非常小,在大肠杆菌内能自主复制,形成多个拷贝,带有某种抗性基因,能在细胞之间自由穿梭。

除了质粒载体外,还有噬菌体载体、病毒载体、人工染色体等。它们来源不同,结构不同,大小不同,能够运载的 DNA 分子大小也有很大差别。

限制性内切核酸酶、DNA 连接酶和载体是实现 DNA 重组技术的三种基本工具。我们可以利用限制性内切核酸酶切割外源 DNA 分子和载体,分别获得具有黏性末端的目的基因片段和载体;利用 DNA 连接酶将具有黏性末端的目的基因和载体连接在一起,组成一个重组 DNA 分子。

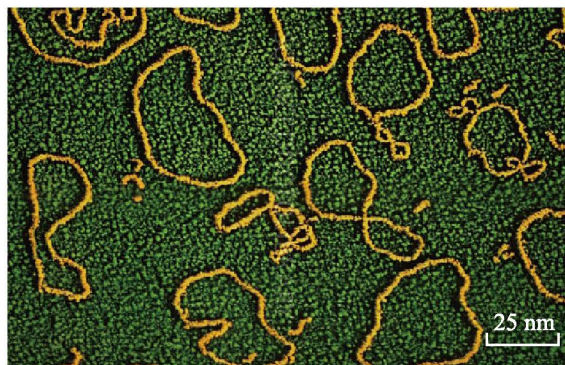


图 3-4 透射电镜下的环状质粒 DNA 分子



小资料

人工染色体

人工染色体(artificial chromosome)指人工构建的含有天然染色体基本功能单位的载体系统。常见的人工染色体有细菌人工染色体、酵母人工染色体、哺乳动物人工染色体等。

实践应用 实验

外源 DNA 与载体结合的模拟实验

● 目的要求

1. 模拟限制性内切核酸酶、DNA 连接酶和载体进行外源 DNA 切割、连接。
2. 阐明限制性内切核酸酶、DNA 连接酶和载体的功能。

● 实验原理

限制性内切核酸酶能够特异性识别并切割 DNA 分子,外源 DNA 片段根据碱基互补配对的原则与切割后的载体分子进行重组。

● 材料用具

剪刀, 胶带, 印有外源 DNA 和质粒载体 DNA 序列的纸片。

● 方法步骤

1. 用剪刀分别将虚线方框内的外源 DNA 和质粒载体 DNA 剪下。
2. 用胶带将 pUC18 质粒首尾相接, 连成环状。
3. 用剪刀模拟限制性内切核酸酶 *EcoR* I 的作用, 在特定部位剪切外源 DNA 和质粒载体 DNA。
4. 用胶带模拟 DNA 连接酶连接相应的部位。

外源DNA序列

5'-GCG**GAATTC**ATGAGTAAAGGA.....GATGAACTATACTAAG**GAATTC**CCG-3'
3'-CG**CTTAAG**TACTCATTTCCT.....CTACTTGATATGATT**CTTAAG**GC-5'

pUC18质粒载体部分序列

.....**GAATTC**GAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT.....
.....**CTTAAG**CTCGAGCCATGGGCCCCCTAGGAGATCTCAGCTGGACGTCGGTACGTT**CGAA**.....

● 思考讨论

1. *EcoR* I 是如何特异性识别和切割外源 DNA 和质粒载体的?
2. 你能连接出几种 DNA 分子? 如何辨别其是否正确?



检测评价

1. 目前, 我们已大量利用大肠杆菌工程菌工业化生产人的干扰素, 用于病毒性疾病的治疗。构建大肠杆菌工程菌的过程包括基因的剪切、重组、导入及表达等。请回答下列问题:

(1) 重组过程中需要 *EcoR* I 切割的 DNA 分子有_____。

- | | |
|--------|-----------|
| ①干扰素基因 | ②大肠杆菌 DNA |
| ③质粒 | ④人的基因组 |

(2) DNA 连接酶连接的 DNA 片段有_____。

- | | |
|----------------|-----------------|
| ①干扰素基因片段 | ②质粒 DNA 片段 |
| ③具有平末端的 DNA 分子 | ④具有黏性末端的 DNA 分子 |

2. 某研究团队从沙漠野生怪柳中克隆了一个耐盐碱基因 *TcSR 1*。该团队用 *Bgl* II 切割目的基因 *TcSR 1*，用 *Bam*H I 切割质粒载体 V3，经过体外重组和转化，最终获得了能够在盐碱地生长的杨树新品种。请回答下列问题：

- (1) 分别用 *Bgl* II 和 *Bam*H I 切割目的基因和载体的目的是什么？
- (2) 切割后获得的目的基因与载体是怎样连接的？重组 DNA 分子还能够被 *Bgl* II 或 *Bam*H I 识别并切割吗？为什么？
- (3) *TcSR 1* 转化到杨树中，使杨树具有了哪些优良性状？
- (4) 种植耐盐植物是利用和改良盐碱地的重要措施。请你说说除了种植耐盐碱杨树以外，如何通过基因工程更好地利用盐碱地。



开阔眼界

限制性内切核酸酶的发现

1967 年阿尔伯等人在研究 λ 噬菌体侵染大肠杆菌不同菌株时发现，修饰的 λ 噬菌体 (K) 侵染大肠杆菌 K 菌株时，侵染率为 100%，侵染大肠杆菌 B 菌株时，侵染率为 0.01%，表明大肠杆菌 B 菌株限制了 λ 噬菌体 (K) 的侵染。进一步研究表明，在原核生物体内存在着限制系统和修饰系统。限制系统的作用是通过限制酶的作用，破坏入侵的外源 DNA，使得外源 DNA 对生物细胞的入侵受到限制。修饰系统的作用是生物自身的细胞通过修饰酶的作用甲基化修饰自身的 DNA 分子，避免自身限制酶的破坏。

基于上述的研究，1970 年史密斯和内森从流感嗜血杆菌中分离得到第一个限制性内切核酸酶，提出了有关限制性内切核酸酶的细胞保护机制，指出限制性内切核酸酶能识别特定的 DNA 序列。1978 年，史密斯、内森和阿尔伯因此荣获诺贝尔生理学或医学奖。

第三节 基因工程的操作程序

20 世纪 90 年代, 中国农业科学院利用基因工程技术将 Bt 抗虫基因导入棉花, 创造了具有我国自主知识产权的转基因抗虫棉, 打破了跨国公司的垄断。Bt 基因来源于苏云金芽孢杆菌, 其表达的蛋白质对鳞翅目昆虫有专一杀伤作用, 对于植物和包括人在内的动物没有毒害作用。转 Bt 基因抗虫棉的种植, 能够减少 60% 以上的农药用量和 10% 以上的劳动力投入。那么, 转 Bt 基因抗虫棉是怎样获得的呢?

一 目的基因的获得

20 世纪初, 科研工作者发现了具有杀虫作用的苏云金芽孢杆菌。在随后的几十年里, 苏云金芽孢杆菌菌剂的研发和应用得到了快速发展。1990 年, 世界首例转 Bt 基因抗虫棉问世, 目前转基因抗虫棉已在多国大面积种植。转 Bt 基因抗虫棉中的 Bt 抗虫基因是怎么获得的呢?



寻找证据 阅读

阅读下面资料, 重点关注 Bt 抗虫基因的获得方法。

最初科学家筛选基因序列未知的 Bt 抗虫基因时, 先将 Bt 菌体裂解, 除去蛋白质、脂质, 离心得到菌体 DNA; 利用限制性内切核酸酶将菌体 DNA 切成大小不等的 DNA 片段, 并利用相同的限制性内切核酸酶酶切 λ 噬菌体, 利用 DNA 连接酶将不同的菌体 DNA 片段与 λ 噬菌体连接, 侵染大肠杆菌, 得到含有菌体所有 DNA 片段的大肠杆菌群体。根据杀虫效果进行筛选, 得到具有杀虫效果的大肠杆菌克隆, 从而获得 Bt 抗虫基因。科学家解析出 Bt 抗虫基因序列后, 大量获得抗虫基因变得方便快捷, 只需以 Bt 的质粒 DNA 为模板, 利用 PCR 技术就可以快速扩增得到目的基因。

根据阅读获得的信息, 思考下列问题:

1. 基因序列未知时怎样获得目的基因? 需要哪些条件?
2. 若要获得高等植物在不同发育阶段表达的功能基因, 用上述从菌体整个基因组中获得目的基因的方法是否可行?
3. 已知基因序列之后, 又有哪些方法可以获得目的基因?

从基因组文库中分离目的基因

在基因序列未知时,获得目的基因需要建立基因组文库,从文库中根据目的基因的特点筛选目的基因。这是最早用来获得目的基因的方法,也称为“鸟枪法”或“散弹枪法”。

建立基因组文库首先需要提取高质量的基因组 DNA。提取原核微生物的基因组 DNA 时,可采用碱裂解法破碎细胞,也可用超声破碎法破碎细胞。从动植物组织中提取 DNA 时,则需在液氮(-196°C)中研磨组织材料。冷冻可将组织材料冻裂,方便研磨,低温可以降低 DNA 酶的活性。破碎细胞后,需要将 DNA 和蛋白质、脂质等杂质分离,这也是得到高质量 DNA 的关键。加入十二烷基硫酸钠(SDS),其可以和蛋白质、脂质等结合形成沉淀,经过离心,得到含有 DNA 的上清液。上清液经过酚、氯仿洗涤,用无水乙醇或者异丙醇沉淀、离心即可得到纯化的 DNA 沉淀。不同生物(植物、动物、微生物)的 DNA 的提取方法有所不同,不同种类或同一种类的不同组织因其细胞结构及所含的成分不同, DNA 分离提取方法也有差异。但 DNA 提取的原理和实验流程大致相同(图 3-5)。

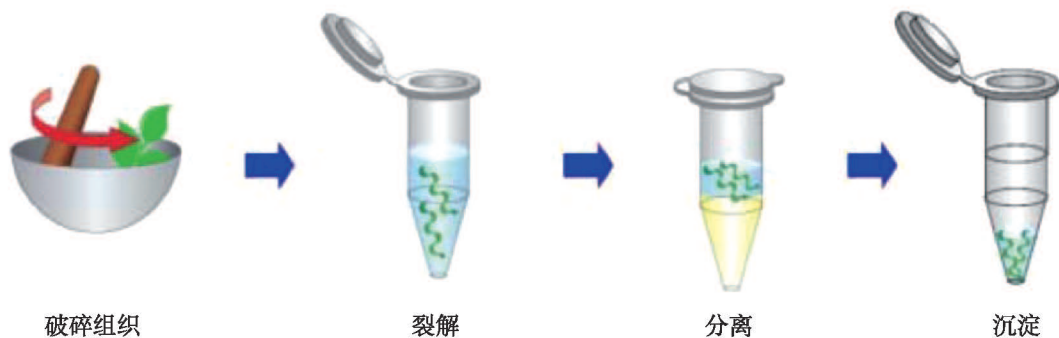


图 3-5 DNA 提取流程示意图

“鸟枪法”分离目的基因的主要步骤是:首先提取基因组 DNA,然后进行“散弹射击”建立基因组文库,即将提取的基因组 DNA,利用限制性内切核酸酶酶切成大小不等的 DNA 片段,选择合适的载体,利用相同的限制性内切核酸酶进行酶切,在 DNA 连接酶的作用下将不同大小的 DNA 片段与载体连接,导入受体细胞,然后根据载体的特性进行固体平板筛选、扩增、保存,得到基因组文库(图 3-6)。之后,可根据不同 DNA 片段编码的蛋白质功能不同,从中找出含有所需目的基因的细胞。人们利用这一方法已获得多种抗虫、抗病毒基因。用这种方法获取目的基因,操作简便,但工作量大,且具有一定的盲目性。目前,此方法更多用于 DNA 测序。

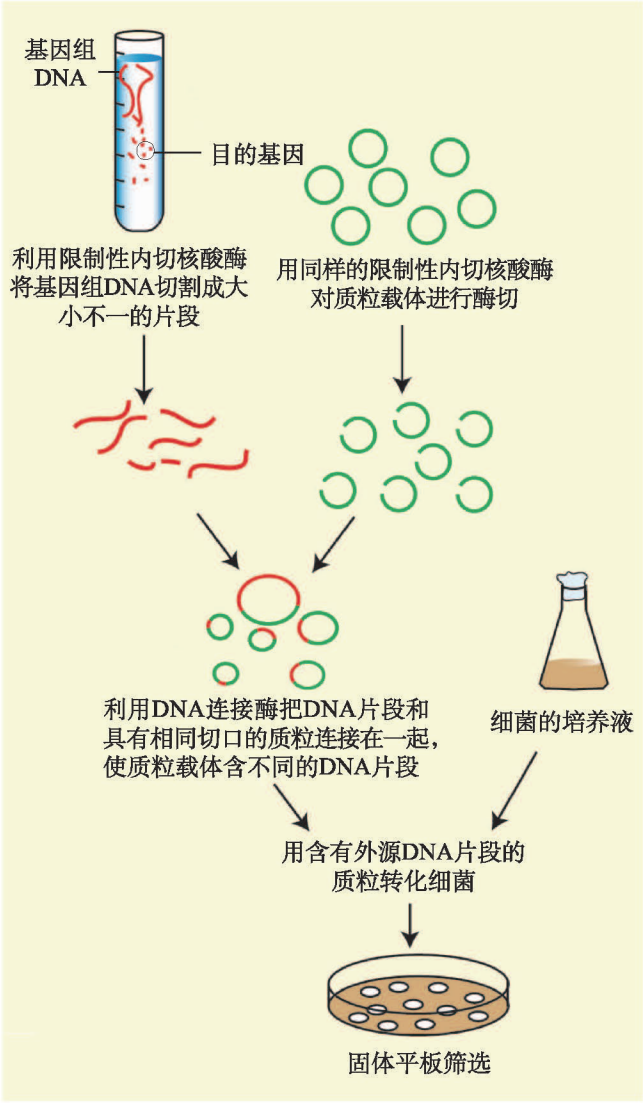


图 3-6 基因组文库构建流程示意图

从 cDNA 文库中获得目的基因

与原核生物相比，利用基因组文库分离真核生物在特定发育阶段或组织中特异表达的功能基因难度大且复杂程度高。这是因为真核生物的基因组 DNA 数量庞大，基因组 DNA 中含有内含子，而且在特定发育阶段或组织中特异表达的功能基因不同。在这种情况下，利用特定发育阶段或特定组织中所转录的 mRNA，可以比较容易地筛选到特异表达的功能基因。

利用 mRNA 筛选目的基因需要建立 cDNA 文库。以某一生物特定发育阶段所转录的所有 mRNA 为模板，在反转录酶的作用下合成互补的单链 DNA，即单链 cDNA，再以

单链 cDNA 为模板合成双链 cDNA，经限制性内切核酸酶酶切，在 DNA 连接酶的作用下将大小不同的 cDNA 片段与适当的载体连接，导入受体细胞，然后根据载体的特性进行筛选、扩增，即可得到 cDNA 文库。

cDNA 文库可反映某种生物特定发育阶段、特定组织中的编码基因，因此 cDNA 具有组织特异性。cDNA 文库在研究特定发育阶段、特定组织或细胞中基因组的表达状态以及表达基因的功能鉴定等方面具有独特的优势，从而在研究个体发育、细胞分化、细胞周期调控、细胞衰老及死亡等生命现象时具有更为广泛的应用价值。因此，cDNA 文库也是研究工作中获得全新目的基因常用的文库。

利用化学反应合成目的基因

在已知目的基因序列或已知蛋白质氨基酸排列顺序可以反推出基因序列时，可以利用化学反应人工合成目的基因。目前常用的方法是固相磷酸三酯合成法。人工合成目的基因时，首先将一个核苷酸的 5'-羟基用保护基团保护起来，连接到固相材料上；然后脱掉保护基团，使第一个核苷酸的 5'-羟基和第二个核苷酸的 3'-端发生缩合反应；接着将第二个核苷酸的 5'-羟基用保护基团保护起来，通过氧化作用，使第一个和第二个核苷酸稳定连接在一起；继续脱掉第二个核苷酸 5'-羟基的保护基团，和第三个核苷酸的 3'-端发生缩合反应。重复上述步骤，直到所要求的核苷酸一个一个被连接上。利用化学反应人工合成 DNA 始于 20 世纪 70 年代。目前，人们已经根据化学法合成 DNA 的原理，设计生产了 DNA 自动合成仪。

利用 PCR 快速扩增目的基因

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）诞生于 20 世纪 80 年代。PCR 是在体外的小离心管中通过酶促反应有选择地大量快速扩增目的基因的方法。

PCR 的原理类似于生物体内的 DNA 双链复制过程，在特制的 PCR 仪上进行。完成 PCR 需要几种成分：作为模板的 DNA，人工合成的 DNA 引物，*Taq* DNA 聚合酶，4 种三磷酸脱氧核糖核苷（dNTP），镁离子（ Mg^{2+} ）。PCR 包括 20 ~ 50 个不等的重复扩增循环，每个循环由以下三个基本步骤组成。（1）变性（denaturation）：加热使模板双链 DNA 在高温（94℃）下变性，解链成为单链 DNA。（2）复性（renaturation）：反应体系降温至合适温度（引物和模板结合的温度），模板与引物按照碱基互补配对原则结合，形成模板-引物复合物。（3）延伸（extension）：反应体系温度回升到 72℃并维持一段时间，耐热的 *Taq* DNA 聚合酶以单链 DNA 为模板，在引物的指导下，利用 4 种 dNTP，按照 5' 到 3' 的方向复制合成互补的 DNA（图 3-7）。

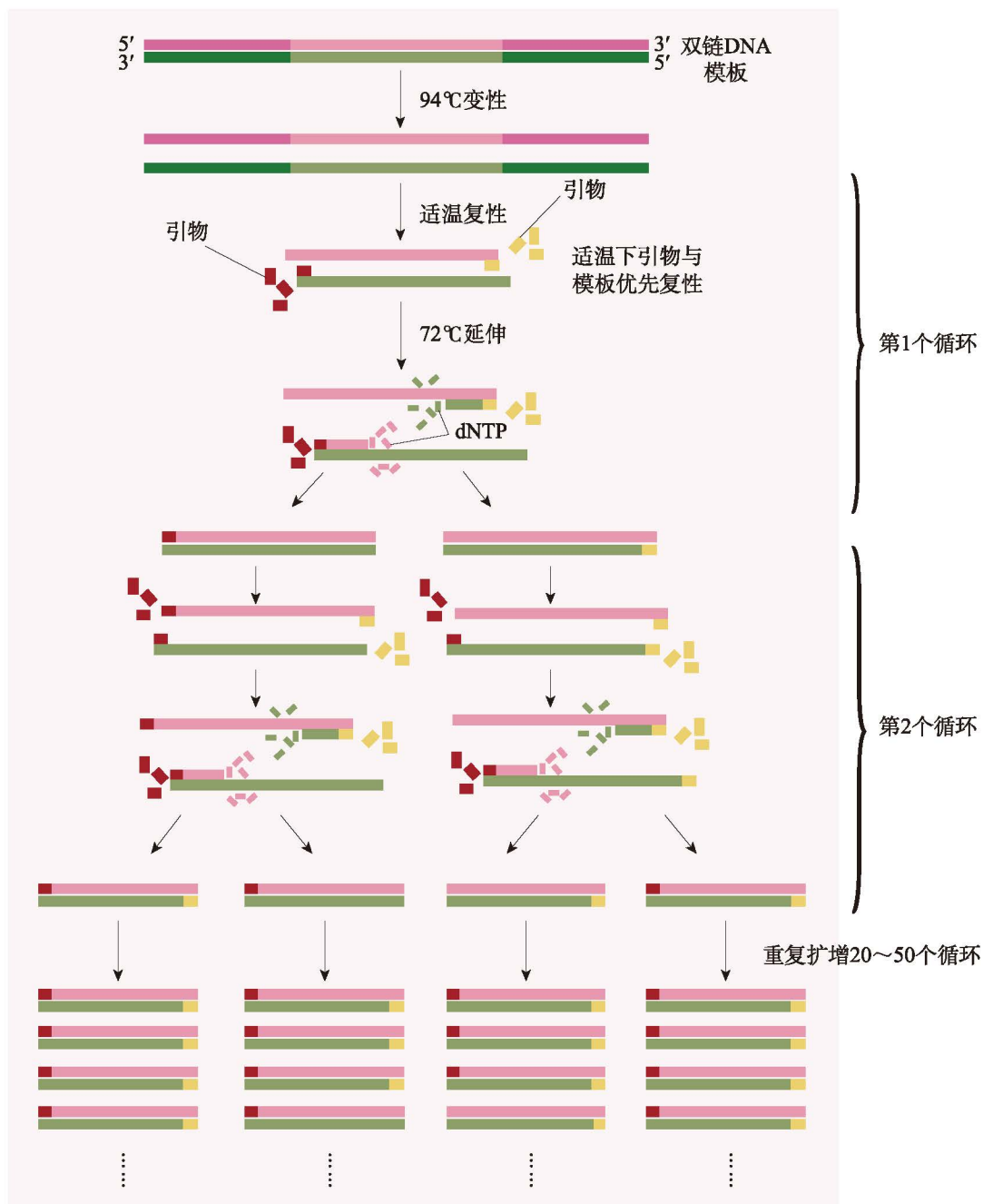


图 3-7 PCR 反应模式图

PCR 因为具有操作简便、灵敏度高、特异性强、对原始材料的质量要求低等优点，被认为是 DNA 操作技术的重要发明和革命。PCR 技术在分子生物学、医学、考古学、农业、动植物检疫许多领域得到了广泛应用。例如，在细菌和病毒类疾病检测、遗传疾病诊断、肿瘤筛查和诊断中，都可采用 PCR 技术。相信随着科技的发展和进步，PCR 技术会更多地服务于人类生活。

实践应用 实验

DNA 片段的扩增和琼脂糖凝胶电泳检测

● 目的要求

1. 熟练运用 PCR 扩增和琼脂糖凝胶电泳检测技术。
2. 阐明 PCR 体外扩增目的基因的原理。

● 实验原理

PCR 是在模板 DNA、引物和 4 种 dNTP 的存在下, 依赖于 DNA 聚合酶的酶促合成反应。PCR 由变性—复性—延伸三个基本反应步骤构成。为了实现目的基因的大量扩增, 以上述反应为一个周期, 循环进行 20~50 个周期后, 目的基因的拷贝数可以增加上百万倍。

琼脂糖凝胶电泳是一种非常简便的快速分离、纯化、鉴定 DNA 的方法。琼脂糖凝胶具有大小一致的滤孔, 带有大量负电荷的 DNA 分子在外加电场的作用下可以通过这些滤孔向正极泳动。DNA 片段在凝胶中的泳动速率主要取决于其分子大小, 因此, 大小一致的 DNA 分子会在凝胶的一定位置形成 DNA 条带。核酸染料与核酸结合后能产生很强的荧光信号, 在紫外光透射下可清晰呈现。

● 材料用具

模板 DNA 溶液 (可以用香蕉 DNA 粗提液或者质粒 DNA 溶液); *Taq* DNA 聚合酶, PCR 缓冲液, dNTP 溶液, DNA 引物 (可以用 10 个碱基的随机引物), 电泳缓冲液, 样品上样缓冲液, 核酸染料 (如 GoldView), 无菌水, 琼脂糖; PCR 仪, 电泳仪, 凝胶成像仪, 0.2 mL 离心管, 微量移液器及吸头等。

● 方法步骤

1. DNA 片段的 PCR 扩增

(1) 在冰浴的 0.2 mL 离心管中加入 PCR 反应体系所需的各种成分 (PCR 缓冲液、模板 DNA 溶液、DNA 引物、dNTP 溶液、*Taq* DNA 聚合酶、无菌水), 混匀。

(2) 将离心管放入 PCR 仪, 输入并运行反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 50℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 终延伸 10 min; 降至 4℃ 保温。

2. 扩增产物的电泳检测

(1) 配制质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶溶液, 制成胶板 (含有适量的核酸染料)。在 PCR 扩增的 DNA 样品中加入适量的上样缓冲液, 混匀后, 取适量加入胶孔, 100 V 稳压电泳 0.5 h。

(2) 电泳结束后, 将胶板放在凝胶成像仪上, 观察、扫描图像。

● 思考讨论

1. 在离心管中混合 PCR 所需成分时, 应该注意哪些环节?
2. PCR 扩增的 DNA 样品在电泳时, 胶孔应该靠近电泳槽的正极还是负极? 为什么?
3. 总结实验结果, 撰写实验报告, 在小组内进行交流。



检测评价

科研人员在青海盐湖中分离得到一株嗜盐单胞菌。该菌可以在 NaCl 质量分数为 10% ~ 25% 的条件下生长。因此, 科研人员计划从该菌中分离耐盐相关基因转化到农作物里, 获得转基因耐盐植物。请回答下列问题:

- (1) 从嗜盐单胞菌中获得耐盐相关基因的方法有 ()。
 - A. 从该菌的基因组文库中获得耐盐相关基因
 - B. 从该菌的 cDNA 文库中通过分子杂交筛选获得耐盐相关基因
 - C. 利用 PCR 技术扩增耐盐相关基因
 - D. 利用化学合成的方法获得耐盐相关基因
- (2) 试设计从嗜盐单胞菌中获得耐盐相关基因的具体实验流程。



开阔眼界

我国科研人员成功构建大熊猫基因组 DNA 文库

大熊猫是我国特有的珍稀动物。2003 年为抢救性保护大熊猫这一珍稀物种, 我国政府启动了大熊猫的离体保护工程。该工程的主要内容之一就是通过建立大熊猫的基因组 DNA 文库, 达到保护其遗传资源, 并为相关的基础科学研究提供基因材料平台的目的。2007 年, 浙江大学科研人员以细菌人工染色体为载体, 建立了高容量的大熊猫基因组 DNA 文库。该基因组文库包含 205 800 个人工染色体克隆, 保存在 2 100 块 96 孔培养板上, 平均每个克隆含有 97 kb 的大熊猫 DNA, 覆盖大熊猫基因组约 6.8 倍。从该文库中获得任何一个目的基因的概率为 99.93%。

二 基因表达载体的构建

获得 Bt 抗虫基因后，还需要借助载体将其导入棉花细胞，才能使棉花植株获得抗虫特性。那么 Bt 抗虫基因是怎样和载体连接的呢？



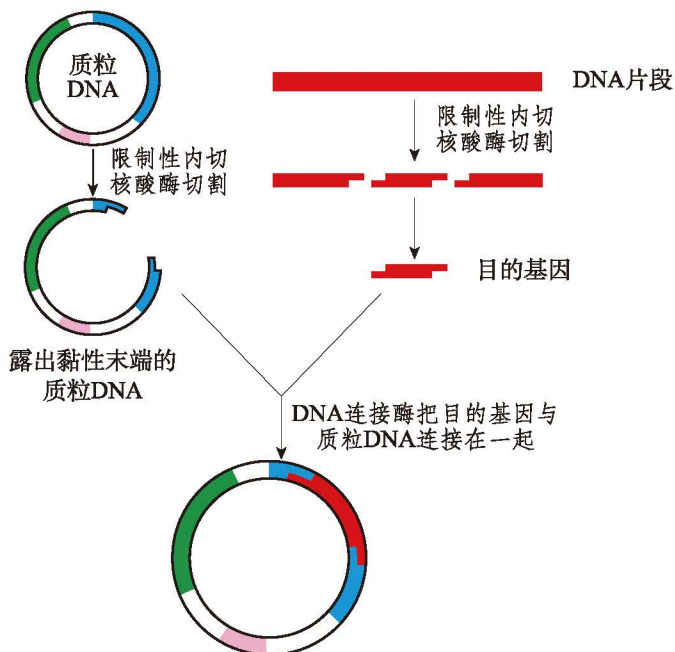
寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注构建 Bt 抗虫基因表达载体的过程。

科研人员将获得的 Bt 抗虫基因，用限制性内切核酸酶 *Bam*H I 和 *Nde* I 进行双酶切，得到 Bt 抗虫基因片段，再用同样的限制性内切核酸酶处理表达载体，然后用 DNA 连接酶将 Bt 抗虫基因片段和表达载体连接在一起，获得含有 Bt 抗虫基因的表达式载体。

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 为什么要构建含有 Bt 抗虫基因的表达式载体？
2. 构建表达式载体时，Bt 抗虫基因和表达式载体为什么要用相同的限制性内切核酸酶切割？
3. 载体有哪些类型？构建的表达式载体有什么特点？



含有目的基因的重组质粒 DNA (表达式载体)

图 3-8 目的基因表达式载体的构建示意图

外源的 DNA 片段导入另一种生物细胞后，往往会被该细胞分泌的酶分解消化掉，不能进行表达。如果将目的基因连接到载体上，目的基因就可能逃过受体细胞的防御系统，免遭破坏。

构建表达式载体是在多种酶的作用下完成的。以质粒载体为例，首先要用限制性内切核酸酶切割质粒，使环状质粒断裂，露出 DNA 末端，然后用同样的限制性内切核酸酶切割目的基因，使目的基因产生相同的 DNA 末端。这样，在 DNA 连接酶的作用下，切割后的质粒与切割后的目的基因就能连接在一起，形成一个含有目的基因的新环状质粒——目的基因表达式载体 (图 3-8)。

目前用于基因工程的载体有多种, 根据用途的不同, 分为克隆载体与表达载体。如果将目的基因和载体连接导入受体细胞后, 目的基因会在受体细胞内大量复制, 但不一定表达, 这样的载体为克隆载体; 使目的基因在受体细胞内表达翻译蛋白质的载体, 为表达载体。根据载体来源的不同, 表达载体分为质粒载体、噬菌体载体、病毒载体等。病毒由于容易侵入宿主细胞, 已经越来越多地被改造成表达载体。

表达载体通常由启动子、目的基因、终止子、标记基因和复制原点构成。启动子是转录时 RNA 聚合酶结合的位点; 复制原点是 DNA 复制的起点, 发挥带动目的基因复制的功能; 标记基因一般为抗生素抗性基因, 当受体细胞为微生物时可用于筛选含有目的基因的受体细胞, 如果受体细胞为植物细胞或动物细胞, 则标记基因不是表达载体的必要组分。目的基因表达载体的构建是实施基因工程的第二步, 也是基因工程的关键。目前, 已有多种原核表达载体和真核表达载体在基因工程中得到应用。

实践应用 实验

大肠杆菌质粒 DNA 的提取和鉴定

● 目的要求

1. 尝试从大肠杆菌中提取质粒 DNA 并鉴定。
2. 阐明质粒 DNA 提取和鉴定的原理。
3. 了解用质粒 DNA 构建表达载体的方法。

● 实验原理

用碱裂解法释放质粒 DNA 和基因组 DNA, 释放出来的 DNA 遇到强碱环境会变性。用酸性乙酸钾溶液中和混合液使其呈中性, 小分子的质粒 DNA 快速复性溶解, 而大分子的线性基因组 DNA 不能复性。离心后, 质粒 DNA 在上清液中, 而基因组 DNA 与细胞碎片、蛋白质等一起沉淀。通过这种方法即可将质粒 DNA 从细菌中提取出来。利用 DNA 遇二苯胺变蓝的特性对 DNA 进行鉴定。

● 材料用具

含有质粒的大肠杆菌; LB 培养基, 溶液 I (质量分数为 1% 的葡萄糖, 50 mmol/L EDTA, 25 mmol/L Tris-HCl pH 8.0), 溶液 II (质量分数为 1% 的 SDS, 0.2 mmol/L NaOH), 溶液 III (5 mol/L 乙酸钾, pH 4.8), 灭菌蒸馏水, 无水乙醇, 二苯胺试剂; 锥形瓶, 微量移液器, 吸头, 酒精灯, 1.5 mL 离心管, 离心机, 试管, 试管夹等。

● 方法步骤

1. 培养大肠杆菌。在超净工作台内取 1 mL 含有质粒的大肠杆菌溶液，接种于装有 100 mL LB 培养基的锥形瓶中（图 3-9），37℃ 振荡培养 10~12 h。



图 3-9 接种大肠杆菌

3. 裂解菌体，DNA 变性和沉淀杂质。加入 0.1 mL 溶液 I，剧烈振荡离心管，使菌体分散混匀。室温下放置 5 min。加入新配制的 0.2 mL 溶液 II，盖紧管口，快速温和颠倒离心管数次（图 3-11），以混匀内容物（切勿振荡），冰浴 5 min。



图 3-11 颠倒离心管混匀

2. 离心收集菌体。取 1.5 mL 培养液倒入 1.5 mL 离心管，10 000 g 离心 30 s（图 3-10）。弃上清液，将离心管倒置于吸水纸上，使液体尽可能流尽。

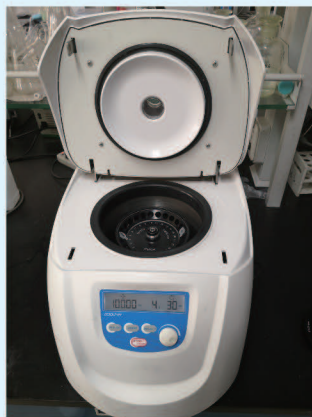


图 3-10 离心管放入离心机

4. 质粒 DNA 复性溶解。加入 0.15 mL 预冷的溶液 III（图 3-12），盖紧管口，将离心管温和颠倒数次混匀内容物，见白色絮状沉淀，在冰上放置 5 min。

5. 离心，取上清液。将离心管 10 000 g 离心 10 min。取上清液移入干净的 1.5 mL 离心管。



图 3-12 加溶液 III

6. 沉淀质粒 DNA。向离心管中加入 2 倍体积的预冷的无水乙醇 (图 3-13), 混匀后, 在 -20°C 冰箱中静置 20 min。



图 3-13 加入预冷无水乙醇

7. 离心, 溶解质粒 DNA 沉淀。将离心管 $10\,000\text{ g}$ 离心 10 min, 弃上清液 (图 3-14)。经室温干燥, 加入 $50\text{ }\mu\text{L}$ 无菌蒸馏水, 使 DNA 充分溶解。



图 3-14 弃上清液

8. 检测 DNA。取两支试管, 分别加入 1 mL 蒸馏水, 其中一支加入提取的质粒 DNA 溶液。向两支试管中分别加入 1 mL 二苯胺试剂, 混匀后, 放入沸水中加热 5 min。待试管冷却后, 观察并比较两支试管中溶液的颜色 (图 3-15)。

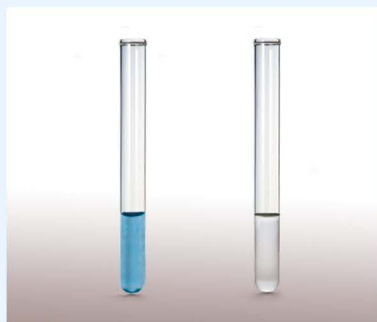


图 3-15 与二苯胺的颜色反应结果

● 思考讨论

1. 溶液 I、II、III 的主要作用是什么?
2. 简述利用大肠杆菌质粒 DNA 构建表达载体的过程。

检测评价

癌症患者进行化疗或放疗之后, 体内白细胞数量大幅度降低, 可以注射粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 增加白细胞的数量。在自然条件下, 此细胞因子的含量很低, 很难获得。某科研团队将编码人 GM-CSF 的基因导入大肠杆菌, 大量生产重组 GM-CSF, 满足了临床需求。请回答下列问题:

(1) 怎样获得编码人 GM-CSF 的基因?

(2) 构建 GM-CSF 表达载体需要 ()。

- ①同一种限制性内切核酸酶 ②具有某些标记基因的质粒 ③RNA 聚合酶
④编码人 GM-CSF 的基因 ⑤DNA 连接酶 ⑥启动子 ⑦终止子
- A. ①②③④⑤⑥⑦ B. ①②④⑤⑥⑦
C. ②④⑥⑦ D. ①②④⑤

三 目的基因导入受体细胞

构建了含有 Bt 抗虫基因的表达载体后，还需要将表达载体导入棉花细胞，才有可能使棉花植株具有抗虫特性。表达载体是怎样导入棉花细胞的？如果受体细胞是微生物或动物细胞，表达载体导入细胞的方式又有哪些区别呢？



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注表达载体进入棉花细胞的方式。

科研人员在构建含有 Bt 抗虫基因的表达载体后，利用花粉管通道法将表达载体导入棉花的受精卵细胞。他们在给棉花授粉后，向子房中注射表达载体溶液，将获得的种子培育成植株，经过抗虫效果筛选得到转基因抗虫棉植株。但随着研究不断进行，科研人员发现土壤中有一种农杆菌，这种细菌中含有 Ti 质粒，能够将目的基因转移到植物细胞的基因组中，从而引起植物细胞的变化。于是，科研人员利用 Ti 质粒构建表达载体，运用农杆菌转化目的基因，能够更快地获得转基因植株。

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 表达载体导入受体细胞的方法根据什么来确定？
2. 表达载体导入植物细胞的方法有哪些？
3. 为何农杆菌转化法会在植物基因工程中占主导地位？

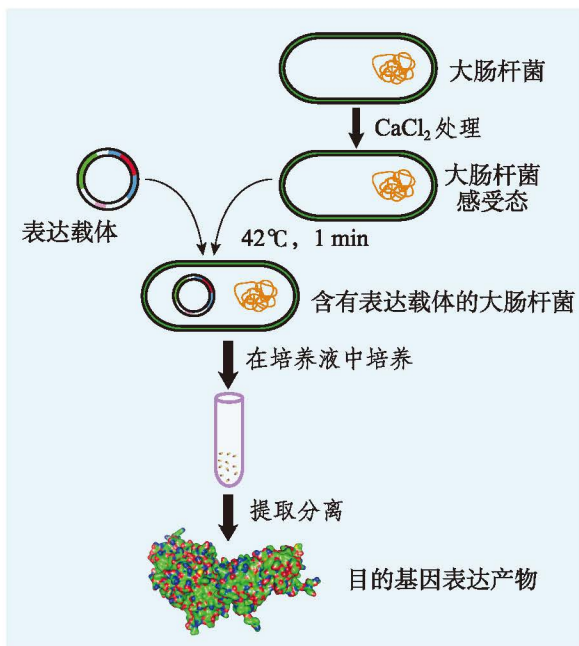


图 3-16 表达载体的转化、表达示意图

携带目的基因的表达载体进入受体细胞并且稳定表达的过程，称为转化。根据表达载体类型和受体细胞类型的不同，所采取的转化方法也不同。

基因工程诞生之初，人们主要利用大肠杆菌作为受体细胞，将表达载体通过热激的方法导入大肠杆菌细胞。大肠杆菌细胞经过一定浓度的 CaCl_2 处理，质膜的通透性会发生变化，很容易吸收外界环境中的 DNA 分子，这种细胞称为感受态细胞。将携带目的基因的表达载体 DNA 与感受态细胞混合，在 42°C 的条件下进行短暂热激处理，DNA 分子就进入了大肠杆菌细胞。随着大肠杆菌的繁殖，在很短时间内就能获得大量的表达产物（图 3-16）。

将表达载体导入植物细胞的方法有：花粉管通道法、农杆菌介导的遗传转化法和基因枪法。

花粉管通道法是在授粉后向植物子房中注射含有目的基因的 DNA 溶液，利用植物在开花、受精过程中形成的花粉管通道，将外源 DNA 导入受精卵细胞，并进一步整合到受体细胞的基因组中，受精卵最终发育成为带有目的基因的新个体。具体操作方法有微注射法、柱头滴加法、花粉粒携带法、子房注入法等。花粉管通道法已经成功地用于小麦、玉米、大豆、棉花等多种农作物，并得到抗病、抗虫、抗逆性增强的变异后代，有些甚至已经形成成品系应用于生产。但是，利用该方法获得性状稳定的后代需要经过多代的自交纯化，工作效率较低且后代的遗传情况比较复杂，这限制了此方法的广泛应用。

农杆菌介导的遗传转化法是目前植物转基因技术中常用的方法。农杆菌是一种土壤细菌，它侵染植物细胞后，会使植物细胞形成肿瘤。受感染的细胞可产生正常细胞所不能产生的生物碱，被农杆菌用作碳源和氮源。人们发现在农杆菌中存在一种环形的 Ti 质粒，该质粒上的一段 DNA 能够从一个细胞转移到另一个细胞，这段 DNA 被称为转移 DNA (transfer DNA, T-DNA)。T-DNA 上包含有高等植物的生长素编码基因和细胞分裂素编码基因，可以插入植物基因组，引起植物细胞的变化。T-DNA 转移频率很高，而且 Ti 质粒上可插入几百至几千个碱基大小的 DNA 片段，因此 Ti 质粒可以作为载体将目的基因转移到植物受体细胞中（图 3-17）。

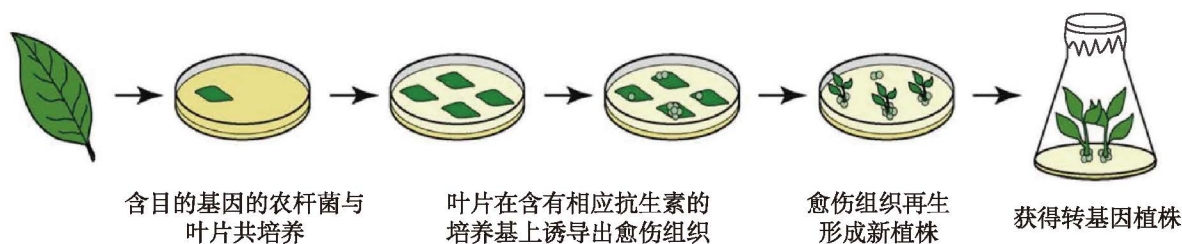


图 3-17 农杆菌介导的遗传转化法示意图

迄今发展起来的植物转基因技术中，农杆菌介导的遗传转化法占据主导地位。目前，双子叶植物的转基因多数都是利用该方法，如转基因烟草、转基因番茄、转基因杨树等。经过不断努力，近年来农杆菌介导的遗传转化法在水稻等禾本科植物上也取得了成功。例如，我国科学家利用这一技术成功培育了抗虫水稻、抗除草剂水稻、耐盐碱水稻等。农杆菌介导的遗传转化法的优点是转化频率高、成本低、操作相对简单，而且转基因后代的遗传组成比较容易分析。

此外，一些单子叶植物多采用基因枪法进行转化。基因枪法又被称为微弹轰击法，主要原理是：将带有目的基因的载体 DNA 溶液与金粉或钨粉混匀，使 DNA 吸附于金属颗粒表面，然后在基因枪的一个真空小室中，利用高压放电将带有 DNA 的金粉或钨粉轰击

进入受体，实现遗传转化（图 3-18）。

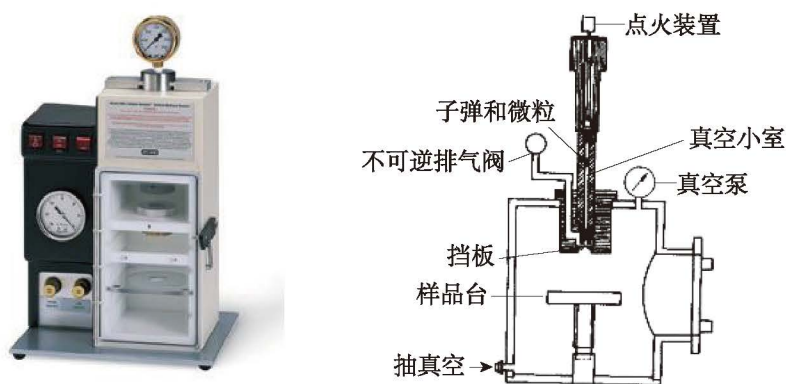


图 3-18 常见的台式基因枪（左）及其结构示意图（右）

显微注射法是将带有目的基因的载体导入动物细胞最常用的方法。在显微镜下，将 DNA 注射到受精卵细胞或者培养的细胞中（图 3-19），目的基因可以与受体细胞基因组融合，再将其移植到雌性动物的子宫内发育，得到具有目的基因的转基因动物。1982 年，科学家用这种方法成功地将大鼠生长激素重组基因导入小鼠的受精卵，得到了个体明显超大的“超级小鼠”，这是人类创造的第一例转基因动物。



图 3-19 显微注射（400×）

检测评价

科研工作者构建了含有人干扰素基因的表达载体，然后导入大肠杆菌生产重组人干扰素，并用于慢性肝炎及肿瘤的临床治疗。请回答下列问题：

（1）下列关于干扰素表达载体导入大肠杆菌的叙述，正确的是（ ）。

- A. 常用大肠杆菌作为受体细胞是因为其容易接受外源 DNA 分子
- B. 首先用 Na^+ 处理大肠杆菌，使之处于感受态
- C. 感受态大肠杆菌吸收 DNA 分子需要适宜的温度和酸碱度
- D. 重组人干扰素表达载体要进入感受态大肠杆菌需要经一定温度的短暂热激处理

（2）怎样提高大肠杆菌的转化效率？

四 目的基因的表达及产物检测鉴定

将基因导入棉花细胞，只有很少的一部分再生棉花植株能够接受 Bt 抗虫基因并表达 Bt 抗虫蛋白。怎样才能知道哪些植株接受了 Bt 抗虫基因？哪些接受 Bt 抗虫基因的植株表达了 Bt 抗虫蛋白呢？

当受体细胞是真核生物细胞时，将目的基因导入受体细胞后，目的基因需要整合到受体细胞的基因组上才能真正表达。因此，首先要检测的是该基因是否整合到了受体细胞的基因组上。经常采用的方法是 PCR 检测或分子杂交检测。可以根据目的基因的序列设计引物，通过 PCR 进行扩增，如果能够扩增出目的基因片段，说明该基因已经整合到了受体细胞中。还可以把目的基因片段用放射性同位素、生物素或荧光进行标记，与受体生物的基因组 DNA 进行杂交，如果目的基因已经整合到受体细胞的基因组上，那么标记的基因片段就会与其结合，通过特殊的仪器就能够检测出来。斑点印迹是一种最简单的 DNA 分子杂交技术（图 3-20），可以高效地检测出含有目的基因的受体细胞。

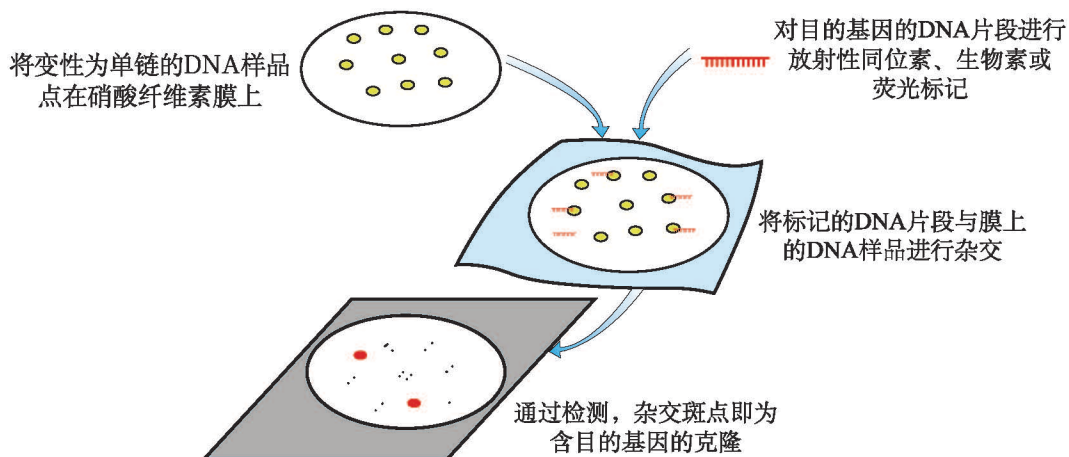


图 3-20 斑点印迹示意图

PCR 检测和分子杂交检测结果只能说明目的基因是否整合到了受体细胞的基因组上，而目的基因是否转录出 mRNA，还需要从转录水平上进行检测。通常提取受体细胞的总 RNA，将其中的 mRNA 反转录成 cDNA，进行 PCR；或者直接进行 RNA 的分子杂交检测。

目的基因整合到受体细胞基因组上，转录出 mRNA，最终能否翻译出有功能的蛋白质至关重要，因此，还需要进行蛋白质检测。从受体细胞中提取蛋白质后，进行电泳分离，然后利用目的蛋白的抗体进行检测。

如果目的基因的表达产物具有明显的表型性状，那么，还要根据目标性状的有无来判断目的基因是否表达。例如，在同样的生长条件下，转抗病基因的木瓜长势良好，而非转基因的木瓜却遭到了病害的侵袭，说明目的基因已经在受体中表达，从而能够抵抗病害。

转 Bt 基因抗虫棉能够产生杀死棉铃虫的毒素蛋白，表明 Bt 基因已经在棉花植株内得到了表达（图 3-21）。



图 3-21 转 Bt 基因抗虫棉（左）和非转基因棉（右）对比

这些传统的目的基因表达及产物检测鉴定方法一般要花费较长时间，对实验条件要求严格。科研人员根据目的基因表达的蛋白质特性，采用免疫学的方法，研制出了转基因快速检测试纸。例如，国内多家生物公司开发了转 Bt 基因快速检测试纸，可以在 10 min 内检测出叶片、种子等样品中是否含有 Bt 基因。该试纸灵敏度高，使用方便，价格较低，已经在检验检疫部门广泛使用。

当受体细胞为原核细胞时，表达载体导入受体细胞后，表达载体独立于 DNA 分子之外，检测时只需提取质粒直接进行限制性内切核酸酶酶切，测序即可。检测目的基因是否转录、翻译出目的蛋白时，只需从受体细胞或培养液中提取蛋白质，进行电泳分离，然后再利用相应抗体进行检测。

抗虫棉的研制过程包括 Bt 基因的获取、Bt 基因表达载体的构建、携带目的基因的表达载体导入棉花细胞以及在棉花植株中的表达。概括来说，基因工程的基本操作程序主要包括目的基因的获取、基因表达载体的构建、目的基因导入受体细胞和目的基因及其表达产物的检测鉴定等步骤。

科研人员利用基因工程研制成功了多种转基因工程菌生产人类所需的药品，如干扰素、白细胞介素等；还研发了多种转基因植物，其中转基因抗虫棉和抗病毒番木瓜在我国已有种植。目前，基因工程在农业、医药业、环境保护等领域均有广泛的应用。



检测评价

我国某科研团队从杨树中克隆得到了一个具有抗旱功能的蛋白激酶编码基因 (*SnRK*), 构建了含有该基因和潮霉素抗性基因的表达载体, 并利用农杆菌成功将其导入山杨 T89 品种的愈伤组织中, 利用含有潮霉素的培养基筛选出了再生植株。请回答下列问题:

(1) 该研究对目的基因表达的检测方法有_____。

- ①潮霉素抗性筛选 ②DNA 水平检测
- ③转录水平检测 ④抗旱性状检测

(2) 经检测, 有些再生杨植株不具有抗旱能力, 其可能的原因是_____。

- ①潮霉素培养基筛选时, 潮霉素浓度过低出现筛选误差
- ② *SnRK* 基因插入载体位点有误, 使 *SnRK* 基因不能表达
- ③ *SnRK* 基因没有连接到表达载体中, 所以没有耐盐抗旱的性状
- ④农杆菌介导后, *SnRK* 基因没有整合到受体细胞基因组上



开阔眼界

“国境转基因产品精准快速检测关键技术及应用” 荣获国家科学技术奖

我国每年进口大量农产品, 均需进行转基因成分检测, 但在检测过程中长期存在复杂转基因成分精准检测难、转基因鉴定方法空缺等问题。经过科研人员长达 15 年的研究, “国境转基因产品精准快速检测关键技术及应用” 解决了转基因产品筛选检测、品系鉴定、高通量精准检测等一系列技术难题, 提高了转基因产品的精准快速检测技术水平, 有效避免了国际贸易争端, 荣获 2015 年度国家技术发明奖二等奖。该研究成果不仅提升了我国在农产品国际贸易争端中的话语权, 而且可有效防止非法转基因产品流入我国。

第四节 基因工程的应用

基因工程技术能够跨越物种界限,实现生物基因的改良或者转移。基因工程自1973年诞生以来,发展十分迅速。1982年,重组人胰岛素成为第一例基因工程药物上市,开创了转基因微生物产业化发展的先河;1996年,转基因植物在美国开始大规模产业化种植;2006年,世界上第一个利用转基因动物乳腺生物反应器生产的人用蛋白药物——人抗凝血酶在欧洲获批上市。经过几十年的时间,基因工程已经广泛应用于农业、食品、医药、化工、环境保护、能源等领域,不断改善人类的生活品质。那么,基因工程都取得了哪些主要成就呢?

基因工程在农牧业取得丰硕成果

1994年,美国农业部和美国食品与药品管理局批准了第一例转基因作物——延熟保鲜转基因番茄进入市场。1996年,全球转基因作物种植面积达到 $1.6 \times 10^6 \text{ hm}^2$,在随后的二十几年中,转基因技术的应用得到了迅速发展,已成为近代育种史上发展最快、效率最高的作物改良技术。据国际农业生物技术应用服务组织发布的权威统计结果,2019年,全世界有29个国家进行了转基因作物商业化生产,全球转基因作物种植总面积约 $1.9 \times 10^8 \text{ hm}^2$ 。从全球单个作物的种植面积来看,2019年全球转基因棉花应用率为79%,转基因大豆应用率为74%,转基因玉米应用率为31%,转基因油菜应用率为27%(图3-22)。转基因作物的种植在减少农药施用、降低病虫害损失、改善环境、减少劳动力投入等方面取得了良好的效果。

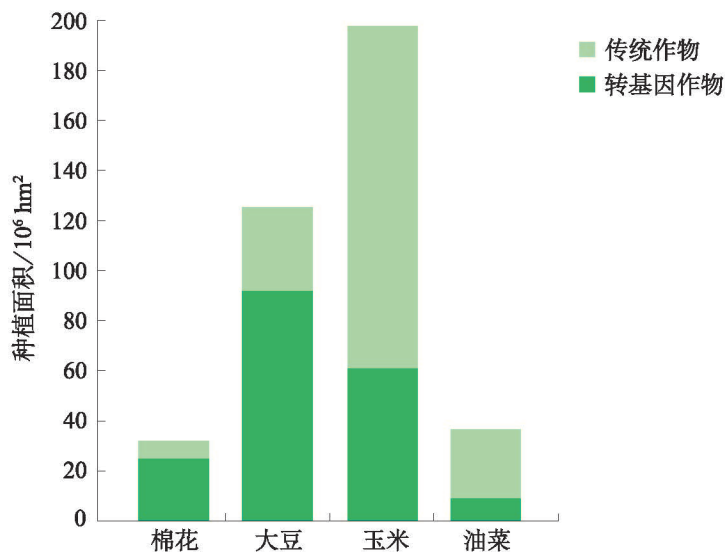


图 3-22 2019 年全球棉花、大豆、玉米及油菜种植面积

全球已商品化的转基因植物有玉米、大豆、棉花、油菜、甜菜、苜蓿、南瓜、番木瓜、马铃薯、杨树和茄子等。截至 2019 年，我国批准种植的转基因植物有 2 种，分别是棉花、番木瓜（图 3-23）。

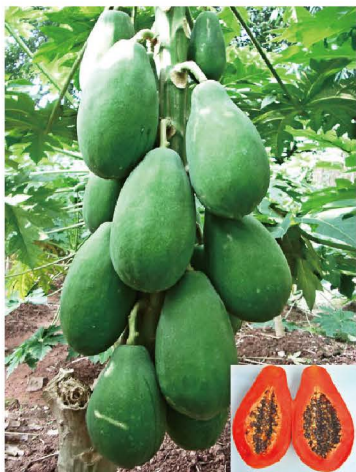


图 3-23 转基因番木瓜

2015 年，中国种植了 $3.7 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 转基因抗虫棉（棉花总种植面积为 $3.8 \times 10^6 \text{ hm}^2$ ）和 7 000 hm^2 抗病毒番木瓜。其中，种植转基因抗虫棉的农民人数超过 660 万，收益约 100 亿元人民币。转基因作物的推广大幅度减少了农药的使用。在中国，棉花曾经是喷洒农药最多的作物，但在种植转基因抗虫棉后，杀虫剂的使用量已经下降了 80%。

基因工程在牧业中也有广泛应用。例如，科学家成功利用基因工程技术获得了转人乳铁蛋白基因的转基因牛。该牛的后代中，母牛乳汁里的人乳铁蛋白含量可达 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 。

基因工程在食品行业应用广泛

基因工程不仅在农牧业取得了丰硕的成果，在食品原料改良、食品加工等食品行业也有广泛的应用。在食品原料改良方面，科学家利用基因工程成功研发了油酸含量高的大豆，相应得到了油酸含量高的大豆油。这种大豆油稳定性好，具有良好的抗酸败和抗氧化的特点，适合煎炸和烹调。科学家还利用基因工程将高蛋氨酸谷类的基因转移到大豆中，克服了豆类蛋白质蛋氨酸含量低的缺陷，使豆类蛋白质的营养更丰富。

在食品加工方面也有很多基因工程应用的实例。例如：凝乳酶是生产奶酪的关键酶，最初来自未断奶的小牛胃黏膜，科学家利用基因工程技术将小牛胃黏膜细胞中的凝乳酶编码基因导入大肠杆菌，大量生产凝乳酶；科学家利用基因工程技术，通过大肠杆菌大量生产一种甜度高、热量低的甜味剂；低聚糖具有一定的保健功能，科学家通过向乳酸菌中导入低聚糖合成基因的方式，生产含有低聚糖的发酵乳制品。还可以利用基因工程改造发酵食品的菌株，改善发酵食品的风味。基因工程在发酵行业的应用使发酵食品的原料品质更好，营养更全面，更有益于人类的健康。

基因工程药物具有广阔前景

基因工程诞生之后，科学家就着手进行基因工程药物的开发和利用。1989年，我国科学家成功获得重组人干扰素，实现了国产基因工程药物零的突破。目前我国已批准上市的基因工程药物和疫苗有重组人胰岛素、重组人生长激素、重组人干扰素、重组成纤维细胞生长因子、重组人表皮生长因子、白细胞介素、治疗乙型和丙型病毒性肝炎的干扰素、治疗类风湿的干扰素、预防乙肝的乙肝疫苗等20余种。

近几年，基因工程抗癌药物研究不断取得突破。例如，治疗肺癌的基因工程导向药物注射到肺癌患者体内后，能在肺部识别出肺癌细胞并杀死它们，但不会伤害其他正常的细胞。这种基因工程导向药物，能够像导弹一样专门识别癌细胞，然后再攻击它们。用这种药物辅助或替代传统的放疗、化疗方式，就能避免传统放疗、化疗带来的免疫系统损坏、身体机能衰退等问题。

基因工程菌在环保能源领域具有巨大应用空间

农田长期过量施用农药，严重破坏了生态平衡，造成土壤、水体及食品中残留毒性增加，给人畜带来潜在危害。如何消除农药污染、保护环境已成为当今世界一个迫切需要解决的问题。为减少或消除农药使用带来的环境污染，科学家开发出了高效基因工程菌，生产水解酶，这些酶可以分解有机磷类、氯苯类、氨基甲酸酯类等农药，净化环境。利用基因工程技术，科学家将降解芳烃、萜烃、多环芳烃、脂肪烃的4种菌体基因连接起来，成功构建了可同时降解4种有机物的“超级细菌”，用来清除石油污染。基因工程菌在处理城市垃圾、污水等方面具有广阔的应用前景。

社会的发展加速了人类对能源的消耗，寻找新能源已成为亟待解决的世界性问题。生物质能源是一种绿色的新能源。基因工程生物质能源就是把稻草秸秆、玉米秸秆、木薯、甘蔗等，与高效的基因工程菌一起发酵后制作出燃料乙醇等生物能源。我国广西等地建有专门生产木薯燃料乙醇的现代化工厂，这些乙醇配合一定比例的汽油，作为汽车的燃料，节省了大量汽油。

基因工程在农牧、食品及医药等行业的广泛应用改善了人类的生活品质。在转基因技术应用20多年后，全世界科学家对“基因组或基因编辑”的新生物技术的潜力充满期待。许多不同的基因编辑技术成为研究的热点。利用基因编辑技术可以在预先确定的位置切割DNA并精确地插入碱基或者在基因组的最佳位置改变单核苷酸从而使表达最大化。这项新技术的“真正力量”在于其编辑和更改单个或多个生物自身基因（而非转基因）的能力，对重要的性状进行编码，产生有用的非传统转基因的改良生物。目前，针对该技术，科学家已经在作物产品开发、人类疾病治疗等方面进行了有益的探索，预计该技术将给基因治疗领域带来新的革命。



检测评价

科学家将能控制芳烃、萜烃、多环芳烃、脂肪烃降解的 4 种基因组合到同一菌株中，创造了一种被称为“超级细菌”的新菌株，可用于环境污染的治理。请回答下列问题：

(1) 有关“超级细菌”描述正确的是 ()。

A. 将 4 种不同的基因分别构建表达载体导入同一菌株，构成了多质粒的“超级细菌”

B. 将 4 种不同的基因连接在一起构建一个表达载体导入同一菌株，构成了“超级细菌”

C. 在“超级细菌”中，4 种不同的基因整合到了核 DNA 上

D. 可用核 DNA 作为模板，设计 4 种基因的引物进行 PCR，检测“超级细菌”是否同时含有 4 种基因

(2) “超级细菌”在应用过程中降解能力逐渐降低的原因可能是什么？

(3) 创造“超级细菌”的主要步骤有哪些？

(4) 针对我国目前水体污染现状，利用基因工程技术，设计污水处理的方案。



开阔眼界

基因工程拯救了番木瓜

番木瓜深受消费者喜爱。然而，1948 年在美国夏威夷发现的番木瓜环斑病毒给全世界番木瓜的生产带来了毁灭性灾难，各种农药对这种病毒都毫无作用。1965 年，番木瓜环斑病毒在中国暴发成灾，导致番木瓜的产量降低超过 90%。随着 1990 年全球首例转基因番木瓜研制成功，各国科学家相继开发出了多种抗环斑病毒的转基因番木瓜，并投入市场。其中，“华农 1 号”转基因番木瓜于 2006 年获得我国农业部颁发的安全证书，是我国第一例获准进行商品化种植的转基因果树。2012 年，对深圳市场随机抽取的 57 份番木瓜样品进行的检测表明，其中 52 份是转基因番木瓜。如果没有基因工程，那么我们今天可能就吃不到番木瓜了。

第五节 蛋白质工程

胰岛素已经广泛应用于临床治疗糖尿病。常规胰岛素多以二聚体、六聚体和结晶的形式存在，而胰岛素发挥生理功能时，必须从多聚体解离成单体，再以单体形式与受体结合。为改善常规胰岛素的治疗效果，是否能从基因工程入手，对编码胰岛素的基因进行修饰，改造胰岛素的分子结构，使其不能聚合呢？



寻找证据 阅读

阅读下面资料，重点关注人工改造合成的胰岛素与天然胰岛素的不同。

胰岛素是由 51 个氨基酸组成的双链（A、B 链）蛋白质激素，A 链含有 21 个氨基酸，B 链含有 30 个氨基酸。两条肽链之间由 2 个二硫键连接，A 链的第 6 位和第 11 位氨基酸残基之间也由二硫键相连。研究人员将胰岛素 B 链上编码第 16 个或第 26 个氨基酸的密码子由天然形式中编码酪氨酸的密码子改变为编码丙氨酸的密码子，分别得到了 [B16Ala] 胰岛素和 [B26Ala] 胰岛素。检测证明，这两种人工改造的胰岛素丧失了自身聚合能力，但保留了全部的生物活性，注射到体内后可以快速降低血糖。之后，研究人员又研发得到了 [B9Asp] 胰岛素、[B27Glu] 胰岛素、[B28Lys] 胰岛素等。这些通过蛋白质工程改造获得的具有高性能的速效胰岛素具有非常广阔的临床应用前景。

根据阅读获得的信息，思考下列问题：

1. 高性能的速效胰岛素是如何获得的？
2. 为什么改变了一个氨基酸的密码子，就能改变胰岛素的自身聚合能力？
3. 从胰岛素的人工改造过程，你能得到什么启发？

蛋白质工程需要改造蛋白质的编码基因

通过改造胰岛素 B 链上的几个氨基酸的密码子，改变胰岛素分子中的几个氨基酸，改变了蛋白质的结构和性质，从而获得高性能的速效胰岛素。因此，根据基因工程原理，进行蛋白质设计和改造，可以获得性状和功能更符合人类需求的蛋白质。这就是蛋白质工程（protein engineering）。蛋白质工程是基因工程的延伸。

蛋白质工程首先要对目标蛋白质进行结构上的设计，掌握蛋白质活性中心的结构，了解构成活性中心的各个氨基酸残基及其侧链基团的位置，然后利用基因工程原理，定点改变负责编码蛋白质的基因序列，从而合成更符合人类需求的蛋白质。具体的改造过程包括：根据需要的蛋白质功能设计蛋白质结构，推测氨基酸序列，设计改造 DNA 序列，通过转录和翻译获得具有所需生物功能的蛋白质（图 3-24）。



图 3-24 蛋白质工程示意图

蛋白质工程可以获得性状和功能更符合人类需求的蛋白质

在现阶段，蛋白质工程主要是通过修改氨基酸序列来改善现有蛋白质的结构和构象，提高蛋白质的活性和稳定性。蛋白质工程能够根据人类需求更快、更有效地改造蛋白质，为人类服务。

例如，研究人员通过在蛋白质分子中导入二硫键，提高了蛋白酶的热稳定性。他们用定点突变的方法，改变 DNA 上的脱氧核糖核苷酸，从而改变了 mRNA，使编码第 3 个氨基酸的核苷酸序列由 AUU 变成 UGU，相应的氨基酸则由异亮氨酸变成了半胱氨酸。这个半胱氨酸可以和第 97 位上的半胱氨酸形成二硫键，增强热稳定性（图 3-25）。

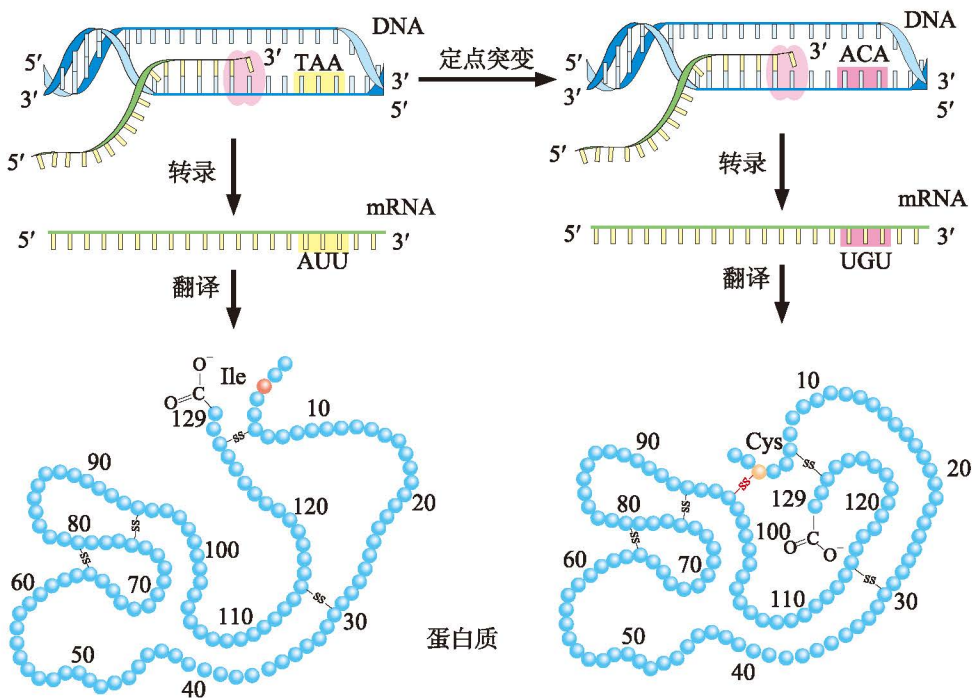


图 3-25 用定点突变技术提高蛋白酶的热稳定性示意图

科学家还通过定点诱变的方法,对苏云金芽孢杆菌中的毒素蛋白进行了改造,达到了提高毒性、扩大杀虫谱的目的。通过蛋白质工程,将干扰素结构上的两个半胱氨酸改为丝氨酸,就可以使其保存半年,而活性不受影响。在植物、微生物体内有一种能与重金属镉、汞等结合的金属硫蛋白。该蛋白质由 61 个氨基酸组成,包括 α 和 β 两个不同的组成部分。其中, α 部分有 11 个半胱氨酸,容易结合镉、汞等,结合能力比 β 部分高出 1 000 倍。科学家对编码该蛋白质 β 部分的碱基序列进行改造,改造后的基因可编码具有两个 α 部分的蛋白质。将这个改造后的基因连接到表达载体上,导入受体细胞,可显著提高植物、微生物吸附重金属的能力,保护生态环境。

上述实例说明,蛋白质工程就是依据人类需要对原有蛋白质结构进行基因改造,生产目标蛋白的过程。蛋白质工程为改造蛋白质的结构和功能提供了新的途径,推动了蛋白质和酶学研究的发展,并在工业、农业、医药业和环境保护领域得到了快速应用。



检测评价

1. 苏云金芽孢杆菌中的杀虫晶体蛋白 Cry 具有杀虫毒性,但 Cry 蛋白存在杀虫谱窄、毒力有限等问题,制约了其在农业生产中的进一步应用。科学家通过定点突变,将 Cry 蛋白第 168 位的组氨酸替换为精氨酸后, Cry 蛋白对烟草天蛾的毒性提高了 3 倍;将 Cry 蛋白第 282 位、第 283 位的丙氨酸和亮氨酸分别替换成甘氨酸和丝氨酸后, Cry 蛋白对舞毒蛾的毒性提高了 7 倍。请回答下列问题:

(1) 对 Cry 蛋白改造描述正确的是 ()。

- A. 直接改造 Cry 蛋白
- B. 直接改造 Cry 蛋白的 mRNA
- C. 改造编码 Cry 蛋白的基因
- D. 重新合成新的基因

(2) 如果将第 168、第 282、第 283 位的氨基酸全部替换, Cry 蛋白对舞毒蛾的毒性 ()。

- A. 增加 7 倍
- B. 增加 3 倍
- C. 增加 21 倍
- D. 不确定,需要重新检测

(3) 基因工程和蛋白质工程在利用苏云金芽孢杆菌方面有哪些不同?

2. 利用木聚糖酶进行纸浆漂白时,可以大幅度减少氯化物的用量,减轻造纸工业对环境的污染。纸浆漂白需要在高温碱性条件下进行,因此需要耐热耐碱的

木聚糖酶。根据生产需要,科学家将木聚糖酶的第110位的丝氨酸和第154位的天冬氨酸都突变为半胱氨酸,从而在该蛋白质的第110位和第154位形成一个二硫键,并在羧基末端将第162位的谷氨酰胺突变为组氨酸或酪氨酸,使木聚糖酶在65℃时的半衰期从不到1 min 延长到63 min,减少了纸浆漂白时木聚糖酶的用量,提高了生产效率。请回答下列问题:

(1) 科学家对木聚糖酶的改造过程是怎样的?

(2) 有研究表明,在木聚糖酶中特定部位引入精氨酸可以增加木聚糖酶的离子键数目,从而增加酶在碱性环境中的稳定性。根据这一研究结果,请利用蛋白质工程技术设计改造木聚糖酶,提高其在碱性条件下的稳定性。

(3) 利用蛋白质工程技术,针对目前水体污染,提出治理的构想和初步方案。



开阔眼界

木质纤维素降解酶的分子改造研究取得新进展

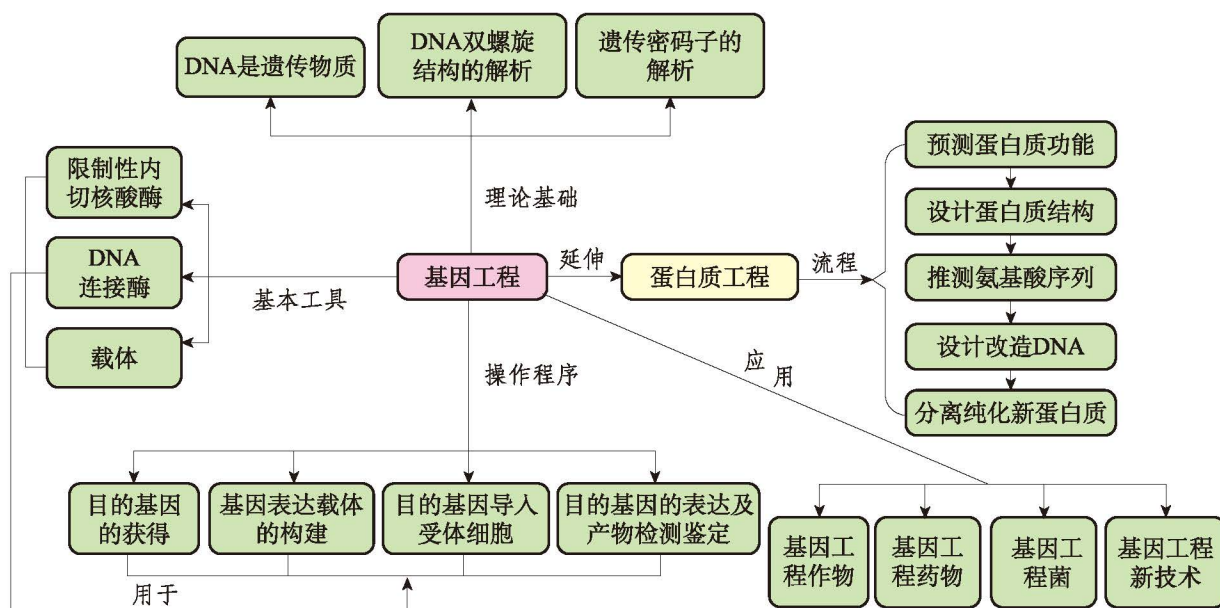
木质纤维素是地球上较为丰富的可再生资源之一,能将其降解为葡萄糖的纤维素酶是一个复合酶系,具有广泛的应用价值。利用蛋白质工程手段对纤维素酶分子进行改造,开发热稳定性好和活力高的纤维素酶,对降解木质纤维素底物具有潜在的巨大优势。

我国科学家通过基因家族改造、随机突变等手段,研究了酶蛋白的结构与功能关系,获得了多种耐热性或活力大幅度提高的人工酶。根据已知的晶体结构,科学家采用计算机预测软件进行设计和预测,通过定点突变的方法将一种纤维素酶在50℃时单位体积培养液中的酶活力提高了30倍,催化效率大幅度提高。

这些研究有利于降低木质纤维素降解的生产成本,增加经济效益,在工业化生产中具有重要意义。

本章小结

● 基础知识梳理



基因工程的实质是将一种生物体的基因与载体在体外进行拼接重组，然后导入另一种生物体，使之按照人们的意愿稳定遗传并表达出新的产物。遗传学、微生物学、生物化学与分子生物学等学科的发展为基因工程的诞生奠定了理论基础。限制性内切核酸酶、DNA 连接酶和基因工程载体的发现为基因工程的实现提供了技术保证。通过目的基因的获得、基因表达载体的构建、目的基因导入受体细胞、目的基因的表达及产物检测鉴定等过程，可以获得新的产物或具有新特征的生物体。在基因工程的基础上诞生了蛋白质工程，可设计、改造蛋白质。基因工程广泛应用于农业、医药、化工、环境保护、能源等领域。

● 学科素养提示

运用结构与功能观，结合外源 DNA 与载体重组模拟、PCR、质粒提取及鉴定等科学探究活动，阐释基因工程的基本原理。针对人类生产和生活某些方面的需求，利用基因工程技术，尝试提出解决问题的初步构想及方案。基于重组 DNA 分子的特性，举例说明基因工程在农业、工业、医药及环境保护领域的广泛应用。关注基因工程给人类生产和生活带来的深刻影响，理性分析基因工程的发展历程，正确认识其在应用过程中可能带来的安全性问题。



第 4 章

生物技术的安全与伦理问题

人们利用现代生物技术取得了许多惊人成就，越来越多的转基因产品出现在我们的生活中，转基因、克隆等专业名词也逐渐为人熟知。现代生物技术在造福人类社会的同时，其安全性问题也引发社会的广泛关注。一方面，有人抵制转基因产品，认为转基因产品会对人类和自然造成巨大威胁；另一方面，随着科技的不断进步，现代生物技术又在如火如荼地迅速发展。那么，我们该如何客观看待并用好这把“双刃剑”呢？



学习目标

1. 针对转基因技术的应用及安全性问题，通过调查、搜集、交流、讨论等活动，运用归纳、概括等科学思维方法，阐释转基因产品对人类生活的影响。
2. 针对生殖性克隆人面临的伦理问题，运用批判性思维，理解并支持我国对生殖性克隆人实验“不赞成、不允许、不支持、不接受”的政策。
3. 针对生物武器的危害，通过调查、搜集、交流、讨论等活动，阐释生物武器的危害，支持我国禁止生物武器的政策。
4. 主动关注生物技术的发展和应用以及生物武器的危害，主动向其他人宣传我国所持观点，热爱科学，关爱生命。

第一节 转基因产品的安全性引发社会关注

20 世纪 90 年代,我国大部分棉区暴发棉铃虫灾害,棉农谈“虫”色变。当时,国际上已研发出转基因抗虫棉,我国想引进必须高价购买相关技术。令人欣慰的是,我国科学家通过不懈的努力最终使中国拥有了自己的转基因抗虫棉(图 4-1)。现在,像抗病毒番木瓜、重组人表皮生长因子、白细胞介素等众多转基因产品已走进我们的生活。随着转基因技术的广泛应用,有关转基因产品的安全性问题也引发社会的广泛关注。那么,什么是转基因产品?转基因产品的出现对我们的生活有哪些影响?如何看待转基因产品的安全性问题呢?



图 4-1 我国自行研发的 Bt 棉对棉铃虫有显著的抗性

转基因产品已经进入日常生活



寻找证据 调查

针对日常生活中出现的转基因产品,走访社区、农户或市场进行调查。

根据调查获得的信息,思考下列问题:

1. 你家里有转基因食品吗?平时你吃到过哪些转基因食品?
2. 药店有哪些转基因药品?
3. 当地是否栽培或饲养转基因生物?它们对当地的经济发展有何意义?
4. 市场上售卖的转基因产品有明确标识吗?

转基因产品，顾名思义就是通过基因工程技术将一种或几种外源性基因转移到某种特定的生物体中，并使其有效地表达出相应的产物（多肽或蛋白质），这些具有外源基因的生物体或提纯的表达产物称为转基因产品。随着基因工程技术的不断发展，越来越多的转基因产品不断涌现并被广泛应用于农业、畜牧业、医药、环境保护等领域。

农业生产上，一些转基因作物，如水稻、小麦和大豆，通过转入外源基因，具有了抗化学除草剂的特性。在使用化学除草剂大面积灭除田间杂草时，这些转基因作物可以免受伤害，从而促进农业机械化发展，提高作物经济效益。我国农业科研人员自主培育的转基因抗虫棉，不但有效克制了棉铃虫，还大大减少了农药使用量，保护了环境。科学家还利用分子生物学手段，将某种花卉中的特定基因转移到其他花卉植物中去，使这些植物在花色、花形、抗逆性等方面有所改变，提高观赏价值。这些转基因花卉满足了人们的观赏需求，为人们的生活增添色彩（图 4-2）。



图 4-2 改变花色的转基因矮牵牛花

畜牧业生产上，转基因技术在促进动物生长、改良畜产品品质以及饲料加工等方面得到广泛应用。科研人员在传统育种方法的基础上，结合各种现代生物技术，已经可以在高等生物中表达具有特定功能的基因，目前已有转基因鱼、鸡、牛等多个成功案例。在饲料加工方面，转基因技术也有广泛应用。例如，利用转基因大肠杆菌发酵生产的纤维素酶可将家畜饲料中的植物纤维素分解成易吸收的小分子糖类，从而提高动物饲料的营养利用率。

转基因技术在生物制药方面也有重要的应用。例如，注射乙肝疫苗是预防乙型肝炎的重要手段，然而传统乙肝疫苗产量低且不安全，乙肝疫苗的供应犹如杯水车薪，远不能满足需要，而且偶尔还会因注射疫苗引发乙型肝炎。20 世纪 80 年代，利用转基因技术将乙肝病毒基因中负责表达表面抗原的基因转入快速生长繁殖的酵母菌。随着酵母菌的生长繁殖，乙肝病毒的表面抗原大量表达，经提纯后制成乙肝疫苗。转基因乙肝疫苗不仅产量大幅度提高，而且安全性有了保证。乙肝疫苗的大量生产使我国的新生儿获得了免费接种的机会。自 1982 年世界上第一种基因工程药物——重组人胰岛素投放市场以来，利用转基因技术生产的药品已有几十种，其中包括细胞因子、抗体、疫苗、激素等。这些药品可以用来预防和治疗人类肿瘤、心血管疾病、糖尿病、类风湿，以及多种传染病等。

可见，转基因产品已经进入日常生活。此外，基因工程技术还被应用于环境保护，可利用转基因微生物进行重金属污染土壤的修复，降解有毒、有害化合物，处理污水等。

转基因技术的应用具有两面性

转基因作物有效地降低了病虫害，提高了作物产量，全球转基因作物的种植面积在不断增加。利用转基因技术生产的多种重组药物等，帮助人们提高了生活质量。但是，人们在享受利用转基因技术取得的成果的同时，有关转基因生物安全性问题的争论也不绝于耳。争论的焦点在于转基因生物的环境安全性及转基因食品（genetically modified food）的安全性。

环境安全性即转基因生物是否会对环境构成威胁，转入的基因是否会从转基因生物的体内漂移到环境中（图4-3），破坏生态环境，打破原有物种间的生态平衡。例如，带有抗除草剂基因的转基因作物与其近缘野生种杂交，那么，将有可能产生带有抗除草剂基因的“超级杂草”。但是，由于物种间的生殖隔离，这种杂交成功的概率很低。假如真的出现使除草剂失去作用的“超级杂草”，随着技术的发展，人类还会发明新的技术手段，解决这一问题。

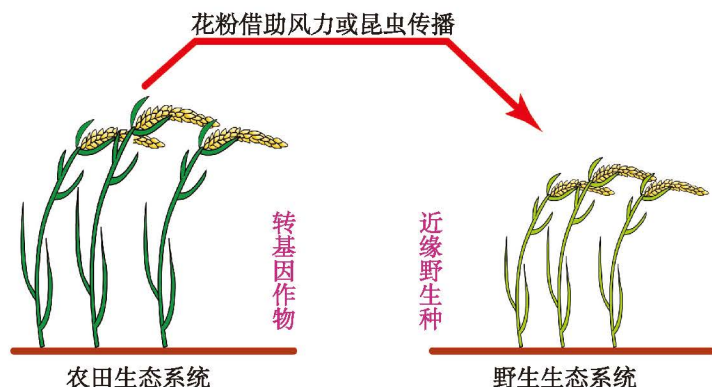


图4-3 基因漂移示意图

转基因食品的安全性同样受到关注。人们担心转入的外源基因或基因产物对人畜有害，担心外源基因表达的产物引起人群过敏或其他不良后果。国际社会对转基因食品安全性的评价基本分为两种：一种是强调结果评估的美国模式，不管采用什么技术，只针对研究出来的产品进行评估；另一种是强调过程评估的欧盟模式，只要使用转基因技术，都对技术过程进行评估。我国不仅对产品、过程进行评估，而且增加了大鼠三代繁殖试验等指标。因此，我国对转基因食品的安全性评价，不管是从产品标准上还是技术程序上，都是世界上最严格的评价体系。

作为生物技术的核心之一，转基因技术正在成为生物农业、生物医药、生物制造等现代生物产业的关键技术。我国关于转基因技术发展的政策是明确的，也是一贯的，将继续坚持自主创新，确保安全，依法管理。一方面，加强科学研究，尽快研发出具有自主知识产权的新品种，在国际转基因技术领域占领制高点，防止受制于人；另一方面，要重视转基因技术在应用过程中带来的影响。在推广和应用上保证安全性，制定严格的法律法规，并且有一整套科学评价机制和多部门配合的监管链条来保证安全性。

转基因产品正越来越多地影响着人类社会经济以及生活的各个方面，在肯定生物技术给人类生活带来巨大贡献的同时，我们应正确认识其存在的潜在安全性问题。随着生命科学的不断发展，通过风险评估及安全性知识的积累，人类对转基因产品的安全性将会进一步了解和掌握。

实践应用 辩论

转基因食品是否安全

近年来，转基因产品取得了令人瞩目的发展，它带给人类巨大利益的同时，有些人对其应用的安全性也提出质疑，问题的焦点集中在转基因产品对人体健康和生态环境带来的影响上。利用网络或者图书馆等搜集我国目前已有的转基因食品的种类、转基因食品转入的外源基因及外源基因表达产物的功能。从上述三个方面以“转基因食品是否安全”为题，提出自己的观点和论据，并展开辩论。

检测评价

1. 2013年10月19日，网友自发组织在华中农业大学举办转基因大米的相关活动。活动包括两部分内容，一是举办相关科普活动和讲演，二是在当日的晚宴上品尝一种转Bt基因的大米和一种转 β -胡萝卜素基因的“黄金大米”。请回答下列问题：

- (1) 两种转基因大米和传统大米相比有哪些优势？
- (2) 举办转基因大米品尝活动的目的是什么？
- (3) 根据品尝活动参与者的反映是否可以在市场推广上述两种转基因大米？

2. 转Bt基因抗虫棉可以有效地用于棉铃虫的防治。有科学家预言，此转基因抗虫棉独立种植若干代以后，也将出现不抗虫的植株。目前，在农业生产中，大田种植转基因抗虫棉的同时，会间隔种植少量非转基因的棉花或其他作物，供棉铃虫取食。请回答下列问题：

- (1) 间隔种植少量非转基因棉花的目的是()。

- A. 维持棉田物种多样性
- B. 减缓棉铃虫抗性基因频率增加的速度
- C. 使食虫鸟有虫可食
- D. 维持棉田生态系统中的能量流动

- (2) 转基因抗虫棉独立种植若干代以后会出现不抗虫植株的原因是什么？



转基因棉的昨天、今天与明天

20世纪90年代以前,小小的棉铃虫每年给中国棉农造成巨大的经济损失。为防治棉铃虫,农民不得不大量使用农药,不可避免地造成环境污染和人畜中毒事故。1993年,中国农业科学院的科研人员培育出拥有我国自主知识产权的高抗虫转基因棉花株系,使中国成为继美国之后,第二个成功将抗虫基因导入棉花的国家,打破了美国抗虫棉对我国市场的垄断格局。由于转基因棉花是植入抗虫细菌——苏云金芽孢杆菌的基因,所以也称转Bt基因抗虫棉。转Bt基因抗虫棉能有效克制棉铃虫,它是中国第一代转基因棉花。1999年,国产抗虫棉开始商业化种植。据统计,转Bt基因抗虫棉推广7年后,农药使用量减少 6.5×10^5 t,农田环境污染指数降低21%。棉铃虫减少,降低农药使用量的同时还大大降低了农民因使用农药导致中毒的概率。

随着时间的推移,人们渐渐发现随着农药使用量大幅下降,原来棉田的次要害虫逐渐成为危害棉花的主要因素。为什么会出现这种现象?转基因棉还能否继续种植?中国农业科学院的科研人员经过多年实地监控与研究发现:转Bt基因抗虫棉大面积种植有效遏止了棉铃虫成灾,化学农药使用量显著降低,却给盲蝽象的种群增长提供了温床,致其暴发成灾。问题找到了,也坚定了科研人员继续走转基因抗虫棉道路的信心。如今,立足于生态平衡,以改善纤维品质、提高作物产量、增强抗逆性等为主要目标的第二代转基因棉花正成为科研人员的主攻方向。

第二节 禁止生殖性克隆人

1996年7月5日克隆羊“多莉”诞生。“多莉”的诞生轰动全世界，因为它是世界上首例没有经过精卵结合，而由人工胚胎放入绵羊子宫直接发育成的动物个体。科学家认为，“多莉”的诞生标志着人类通过体细胞克隆动物已成为可能，哺乳动物的克隆成功，标志着生命高科技领域已经进入一个崭新阶段。人们不禁思考：这是否意味着用同样的方法有可能制造出克隆人？出现克隆人会带来怎样的问题呢？

生殖性克隆人面临伦理问题

克隆羊“多莉”是人们首次成功用体细胞克隆出的动物个体，它的问世实现了真正意义上的生物复制，标志着生命高科技领域进入了一个新的阶段。此后，体细胞克隆牛、鼠、山羊、猪、猫和兔也相继诞生。克隆技术为解决目前在基础医学、药学和畜牧业生产等领域棘手的难题，为保护地球生物多样性等开辟了一条独特的途径。在克隆技术给人类带来福音的同时，能否运用无性繁殖手段克隆人的问题也成为自然科学家、伦理学家和法学家争论的焦点，引起各国政府的高度重视。

首先，克隆人违背了生命伦理学的基本原则，即不伤害、有利、尊重和公正的原则。利用克隆技术随意制造生命，是一种对生命不尊重、不负责、不公平的行为。克隆技术只能复制出基因型相同的生物学个体，不能克隆出具有不同心理、行为、社会特征的人，有悖于生命的独特性，侵犯了人的尊严。同时，有选择性地克隆人还会造成更为可怕的“基因歧视”，有违平等和公正。克隆人把生命过程变成一个人工随意控制的过程，违背了生命自主原则。

其次，克隆人是反自然、反进化、反社会的，违背生命和谐的原则。生物从无性生殖到有性生殖是生物进化的结果。有性生殖能使后代通过遗传和重组，体质更健康，生命力更强。克隆人只有来自一个亲本的遗传物质，会导致人类基因的退化，会破坏人类基因的多样性，导致社会群体的自然性基因生态失衡。因此，克隆人违背了自然生殖法则和进化规律，导致生命力的退化。克隆人还会造成人伦关系的模糊，破坏家庭结构的完整性。生殖性克隆人的出现，使得人类繁衍不再需要男女两性参与，可能导致夫妻关系和家庭关系的解体，破坏了人类传统的家庭、生育观念和模式。同时，克隆人可能导致人类性别比例失调。人类在自然生育中性别比例基本保持在1:1，克隆人技术无须进行性别鉴定便事先可知是男是女。因此，克隆人技术一旦被有性别偏向观念的区域和国家采用，很容易导致人

口性别比例失调，由此引发一系列严重的社会和伦理问题。可见，生殖性克隆人面临着众多伦理问题。

我国禁止生殖性克隆人实验

针对生殖性克隆人，国际组织和各国政府纷纷制定政策和法规禁止生殖性克隆人实验，其主要原因来源于克隆技术带来的伦理问题。

欧洲理事会在1997年4月通过了《人权与生物医学公约》，禁止为了单纯研究的目的创造人类胚胎。1997年5月，在第50届世界卫生大会上，191个成员国一致通过反对克隆人的决议，指出将克隆技术用于人体个体复制，无论在道义上还是伦理上都不能被接受，人体克隆技术违背了人类的尊严和道德观。决议还呼吁有关人员自觉避免参加克隆人的研究活动。联合国教育、科学及文化组织在1997年11月通过《世界人类基因组与人权宣言》规定禁止进行与人类尊严相违背的生殖性克隆人实验。1998年1月，19个国家和组织在巴黎共同签署了严格禁止克隆人实验的《欧洲理事协议》。

我国政府于1997年就明确表示了反对克隆人研究。2001年10月在联合国教育、科学及文化组织会议上，我国政府表示坚决反对克隆人，不支持任何生殖性克隆实验。2003年12月，我国科学技术部和卫生部联合发布了《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》，当中明确规定“禁止进行生殖性克隆人的任何研究”。我国不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验。

实践应用 讨论

讨论是否支持“设计试管婴儿”

“设计试管婴儿”又称“治疗性试管婴儿”，是指为确保婴儿避免某些缺陷，在出生以前就对他的基因构成进行了选择的一类婴儿。2002年2月22日，在英国诞生了第一个胚胎基因经过特别筛选的婴儿，这也是第一个获得官方批准出生的“设计试管婴儿”。2012年6月29日，我国首例“设计试管婴儿”诞生。

通过搜集国内外有关“设计试管婴儿”的资料，进行小组讨论，就是否支持“设计试管婴儿”阐明自己的观点。



检测评价

我国政府的态度是禁止生殖性克隆人，不接受任何生殖性克隆人的实验，原因是（ ）。

- A. 大多数人对克隆人的研究持否定态度
- B. 克隆人不是正常的个体
- C. 克隆人冲击了现有的婚姻、家庭和两性关系等传统的伦理道德观念
- D. 克隆人的技术性问题无法得到解决



开阔眼界

治疗性克隆

依据克隆的目的不同，可将克隆技术分为治疗性克隆与生殖性克隆。治疗性克隆，是指从患者身上提取体细胞植入去核卵母细胞内形成重组胚，将重组胚在体外培养成为囊胚，然后从囊胚中分离出胚胎干细胞，定向培育成患者需要的各种组织、器官用于治疗疾病的一种技术。治疗性克隆不同于生殖性克隆，它是以提高人类的生命质量、促进医学科技的发展和进步为目的的，因此，在伦理上可以接受。目前世界上大多数国家对治疗性克隆技术采取相对宽容的接受和支持态度。我国支持治疗性克隆的研究和应用。

第三节 生物武器对人类的威胁

历史上,生物武器不仅给人类造成极大危害,也给人类留下许多创伤。时至今日,还时而发生与生物武器有关的恐怖事件。20世纪日本侵华战争期间,日本军国主义者曾在战俘和中国平民身上大量试验生物战剂。他们在中国11座城市抛撒携带鼠疫杆菌的跳蚤等昆虫,造成鼠疫暴发,致使大量中国百姓死亡。那么,生物武器到底是一种什么样的武器,对人类会产生哪些危害呢?为什么国际社会要全面禁止研制和生产生物武器呢?

生物武器曾对人类造成极大危害



寻找证据 阅读

阅读下面资料,重点关注什么是生物武器以及生物武器对人类造成的危害。

资料1.早在2 000年前,罗马人就通过将动物死尸抛入水井、污染敌人水源的方法,置敌人于不利局面,这可以说是最早的生物武器。

资料2.1346年,鞑靼人围攻卡法人的城市,用抛石机将鼠疫患者的尸体抛入城内。结果疾病不仅使卡法人屈服,而且据医学专家推测,这一事件还导致鼠疫横扫整个欧洲,死亡人数达2 500万。

资料3.日本在侵华战争期间,秘密成立了多支细菌部队,实施惨无人道的活体实验。此外,日本侵略者还通过飞机播撒以及向江河水源投放鼠疫、霍乱、伤寒的病原菌等方式实施细菌战,残害了几十万中国民众。

资料4.2001年,美国发生了多起炭疽邮件事件。从9月22日到11月13日,恐怖分子将含有炭疽芽孢的白色粉状物置于信封内寄出,收信人有参议员、杂志编辑、电视台及广播电台工作人员等。在邮件分送、开启过程中,有关场所的环境也受到炭疽芽孢的污染。

根据阅读获得的信息,思考下列问题:

1. 哪些生物可以用作生物武器?人类应如何预防?
2. 历史上生物武器对人类造成了哪些威胁与伤害?

生物武器(biological weapon)是指有意识地利用致病微生物、毒素或携带病菌的动物侵袭敌方的军队及其他人员、农作物或牲畜等目标,以达到战争目的的一类武器。生物武器一般由致病微生物、毒素以及盛装它们的容器和投掷物组成,其中起伤害作用的微生

物、毒素和其他生物活性物质又称生物战剂 (biological agent)。

例如,日本曾在侵华战争期间大量研制、生产和使用生物武器,包括鼠疫杆菌、霍乱弧菌、伤寒杆菌、副伤寒杆菌、炭疽杆菌、肺炎军团杆菌及杀伤家畜和农作物的生物战剂,并采用人工投送、飞机撒播带菌媒介(昆虫、杂物)或者使用陶瓷细菌弹(图 4-4)、土陶昆虫炸弹等方法在我国领土投放。这些生物战剂均为细菌类战剂。此外,被恐怖主义组织及恐怖分子用于恐怖活动的生物战剂还有立克次体类和毒素类战剂。

按照性质划分,生物战剂可以分为:细菌类,如鼠疫杆菌、炭疽杆菌、霍乱弧菌、布氏杆菌等;病毒类,如黄热病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、天花病毒、马尔堡病毒等;立克次体类,如 Q 热立克次体、流行性斑疹伤寒立克次体等;衣原体类,如鸟疫衣原体;毒素类,如肉毒杆菌毒素、葡萄球菌肠毒素等;真菌类,如球孢子菌、组织胞浆菌等。



图 4-4 陶瓷细菌弹

按照对人畜危害作用的大小,生物战剂可以分为致死性战剂和失能性战剂两大类。致死性战剂造成人或牲畜病死的概率很高,通常可以超过 50 %,有些甚至超过 90 %,如炭疽杆菌、肉毒杆菌毒素等。失能性战剂是指对人畜造成危害,使其暂时失去活动力的生物战剂。这类战剂也会致人死亡,但病死率不到 10 %,委内瑞拉马脑炎病毒和布氏杆菌就属于这一类。

按照有无传染性,生物战剂可以分为传染性战剂和非传染性战剂两大类:传染性战剂的传播速度很快,会对流行区域内的居民构成很大的威胁,如鼠疫杆菌、天花病毒等;非传染性战剂只对染毒者起作用而不会传染给他人,如肉毒杆菌毒素。

生物武器传染性强,持续时间长。有些生物武器可引起人与人之间的传染,这是其他武器没有的效果。病原微生物从感染到出现症状需要 24 小时至 6 周的潜伏期,而不像其他武器那样攻击后效果立刻显现,这就意味着生物武器能持续地、长时间地攻击对方。它所引发的传染性疾病的流行,会长期污染环境和危害人体的健康。

生物武器杀伤范围大,难防难治。当施放生物战剂气溶胶时,在气象、地形适宜的条件下可造成较大范围的污染。空气、水体、食品、昆虫等都有可能成为生物战剂的传播载体。吸入、皮肤接触、食用、昆虫叮咬都可能成为生物战剂侵入人体的途径。同时,潜伏期的存在意味着当人们察觉之时,袭击早已实施,这就为偷袭创造了条件,而且可能和自然暴发的疾病相混淆,给防御带来很大的麻烦。因此,生物武器一旦为恐怖分子掌握,后果不堪设想。

由于生物武器造成危害的特殊性,生物武器袭击极易引起人们极大的恐慌情绪。这种恐慌情绪很可能使一座城市、一个地区,甚至一个国家陷入混乱或瘫痪状态。可见,历史上生物武器对人类造成了严重的威胁与伤害。

禁止生物武器技术和设备的扩散

生物武器极大地威胁到人类的生存，因此，禁止生物武器在全球的扩散是国际社会面临的重大挑战之一，国际社会为此采取了一系列的措施。

1971年9月28日，由美国、英国、苏联等12个国家联合向第26届联合国大会提出《禁止细菌（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》（以下简称《禁止生物武器公约》）草案，联合国大会通过决议，决定推荐此公约。1972年4月10日该公约分别在华盛顿、伦敦和莫斯科签署。1975年3月26日公约生效，各国在自愿的基础上遵守该公约。我国坚决反对生物武器及其技术和设备的扩散，并于1984年11月15日正式成为《禁止生物武器公约》缔约国。截至2017年9月，全世界已有179个国家成为该公约的缔约国。

《禁止生物武器公约》中明确指出：缔约国在任何情况下不发展、不生产、不储存、不取得除和平用途外的微生物制剂、毒素及其武器；也不协助、不鼓励、不引导他国取得这类制剂、毒素及其武器；缔约国在公约生效后9个月内销毁一切这类制剂、毒素及其武器；缔约国可向联合国安理会控诉其他缔约国违反该公约的行为。

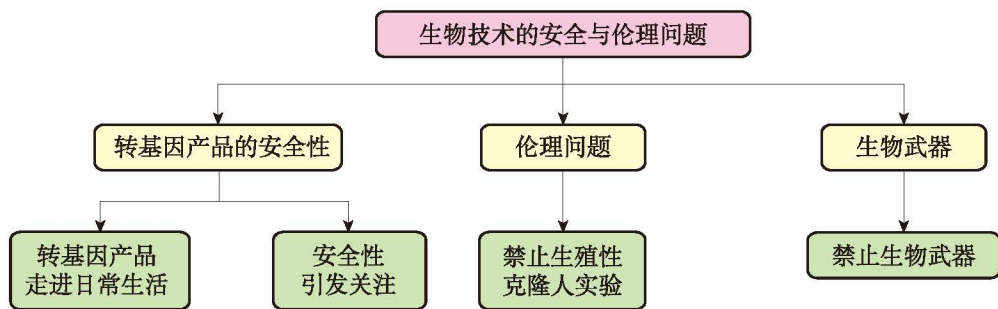
实践应用 搜集

搜集历史上使用生物武器的资料

以社会实践形式到当地历史档案馆、博物馆、爱国主义教育基地进行走访，调查当地历史上受生物武器威胁和伤害的情况，并以“禁止生物武器，我们在行动”为题在校园内举办一场宣传活动。

本章小结

● 基础知识梳理



转基因产品是转基因生物表达出的相应产物（多肽或蛋白质）。在农业、畜牧业、医药、环境保护等许多领域，转基因生物和转基因产品发挥着越来越大的作用。转基因食品也渐渐走进大众的生活，提高人类的生活质量。我们应当用科学的态度来看待各种转基因产品。

生殖性克隆是经无性繁殖以产生新个体为目的的克隆。对于生殖性克隆人，我国政府坚持“四不”态度，即不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验。

生物武器是指有意识地利用致病微生物、毒素或携带病菌的动物侵袭敌方的军队及其他人员、农作物或牲畜等目标，以达到战争目的的一类武器。回顾历史，生物武器对人类造成极大危害。我国坚决反对生物武器及其技术和设备的研制与扩散。

● 学科素养提示

结合调查、辩论、讨论等活动，举例说明转基因食品对人类生活的影响，关注生殖性克隆人的伦理问题，说明生物武器的危害，支持我国的相关政策，宣传我国所持观点。面对日常生活或社会热点话题中与生物技术和工程相关的话题，基于证据，运用生物学基本概念和原理，就生物技术与工程的安全和伦理问题表明自己的观点。

后 记

北师大版《普通高中教科书 生物学》是根据经全国中小学教材审定委员会2004年初审通过的《普通高中课程标准实验教科书 生物》(主编:刘植义 付尊英)修订而成的。本次修订以教育部制定的《普通高中生物学课程标准(2017年版2020年修订)》为依据,力图在落实课程标准要求的基本理念,完成课程标准中课程目标、课程内容和学业质量等要求的基础上,全面提升教科书的水平。编写组着力围绕培养学生生物学学科核心素养、帮助学生构建生物学大概念进行总体设计,注重从真实情境出发,引导学生通过科学探究获取证据,再通过科学思维构建概念,进而形成生命观念,力求在解决实际问题中培养学生的社会责任意识,最终做到培养并提升学生的生物学学科核心素养。

本套教科书由付尊英和刘广发担任主编,潘紫千、白文忠、李连杰和乔文军担任副主编,乔文军、朱正歌、白文忠、万五星、边艳青(以教科书模块前后为序)担任分册主编。本套教科书的核心编写人员有(以教科书模块前后为序)刘欣、张斌、胡彬、肖振龙、朱正歌、侯金海、刘彤、王梦奇、白文忠、裴柳、张雪倩、乔萌萌、宋洁莲、陈华、闫白洋、边艳青、毕诗秀、周春江、周予新、齐永平、李冰。

本册教科书由边艳青担任主编,主要编写人员有边艳青、毕诗秀、周春江、周予新。参与本册教科书编写、讨论的人员还有葛荣朝、赵宝华、石振华、党凤良、赫子瑞、王梦奇、乔萌萌、张静洁、王亚琴、翁永良。

感谢钟佑秀、李姗泽、李倩为本册教科书提供图片。

在教科书编写过程中,许多学科专家、教研员以及一线教师对教科书的修改给予了热情的帮助,同时也提出了许多宝贵的意见和建议,在此一并表示感谢!

希望广大师生在使用过程中提出宝贵意见,以便我们进一步修改和完善。欢迎来电来函与我们联系:北京师范大学出版社高中生物学编辑室(100088), (010) 58802799, gzswx@bnupg.com。

北京师范大学出版社

