



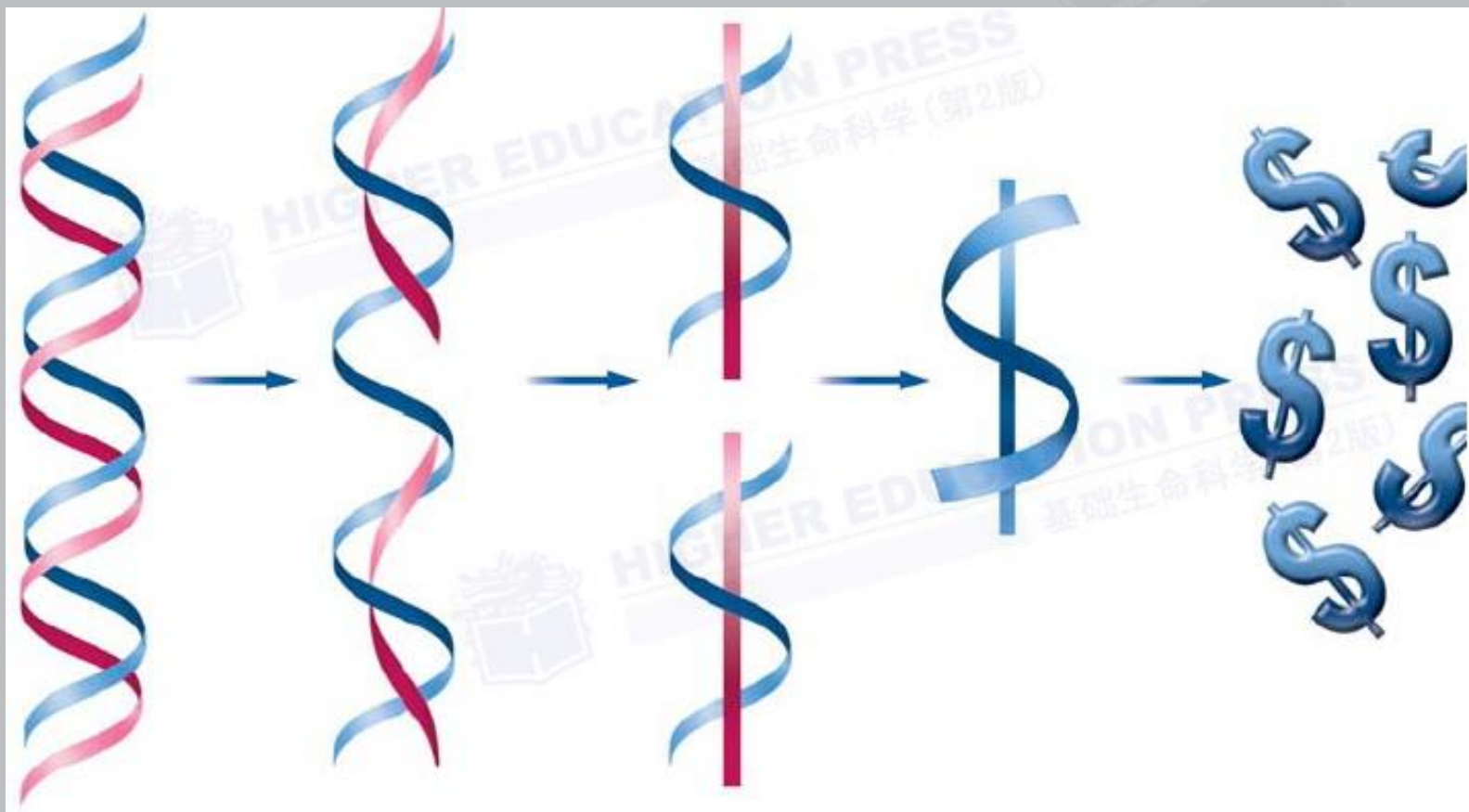
第十二章 生物技术与人类未来

- 第一节 生物技术及其发展历史
- 第二节 重组DNA技术——基因工程
- 第三节 蛋白质工程、发酵工程和细胞工程简介
- 第四节 生物技术 in 农业、医药等方面的应用
- 第五节 生物技术面临的问题与挑战
- 第六节 生物科技造福人类

第一节 生物技术及其发展历史

一、生物技术的定义和特点

- 国际合作与发展组织对生物技术的定义为：生物技术是应用自然科学及工程学的原理，依靠微生物、动物、植物体作为反应器将物料进行加工以提供产品为社会服务的技术。
- 美国政府技术顾问委员会 (OAT) 对生物技术的定义是：应用生物或来自生物体的物质制造或改进一种商品的技术，其还包括改良有重要经济价值的植物与动物以及利用微生物改良环境的技术。该定义强调了生物技术的商品属性。
- 高技术、高投入、高利润是生物技术产业的显著特点。



生物技术的商品属性。

返回

二、生物技术包含的主要内容

- 生物技术通常包括基因工程、细胞工程、发酵工程和蛋白质（酶）工程4个方面内容。其中，以克隆和重组DNA为核心技术的基因工程发展最快，也带动或促进了其他生物技术的发展。
- 现代生物技术实际上是建立在多学科基础之上、涉及面广泛的综合技术。
- 对人类和社会生活各方面影响最大的生物技术领域还可按行业分为农业生物技术、医药生物技术、环境生物技术、海洋生物技术、材料生物技术、能源生物技术等。
- 生物技术按其进行的顺序和性质一般包含以重组DNA等实验室操作为主的上游技术和以发酵工程等为主的工业化生产的下游技术。

- **基因工程**是通过DNA的体外重组，实现不同物种之间基因的转移，或者在基因的水平上设计和改造生物结构和功能，最终获得具有目的性状的生物个体或表达产物。
- **细胞工程**是以组织、细胞和细胞器为对象进行操作，在细胞水平上重组细胞的结构和内含物，或者通过一定规模的细胞培养或组织培养，最终获得所需要的组织、细胞和生物体及其产物。
- **蛋白质（酶）工程**是在对蛋白质结构与功能解析的基础上，对蛋白质结构进行改造，或通过对蛋白质结构的反向设计，选择或改造相应的基因，获得所需要的蛋白质。
- **发酵工程**通过对微生物菌株的选择、培育或改造，对发酵罐和反应器的设计和对发酵工艺的改进，实现目标工程菌或细胞的规模化发酵培养，最终从发酵液或细胞中分离提取所需要的生物工程产品。



(a)



(b)



(c)

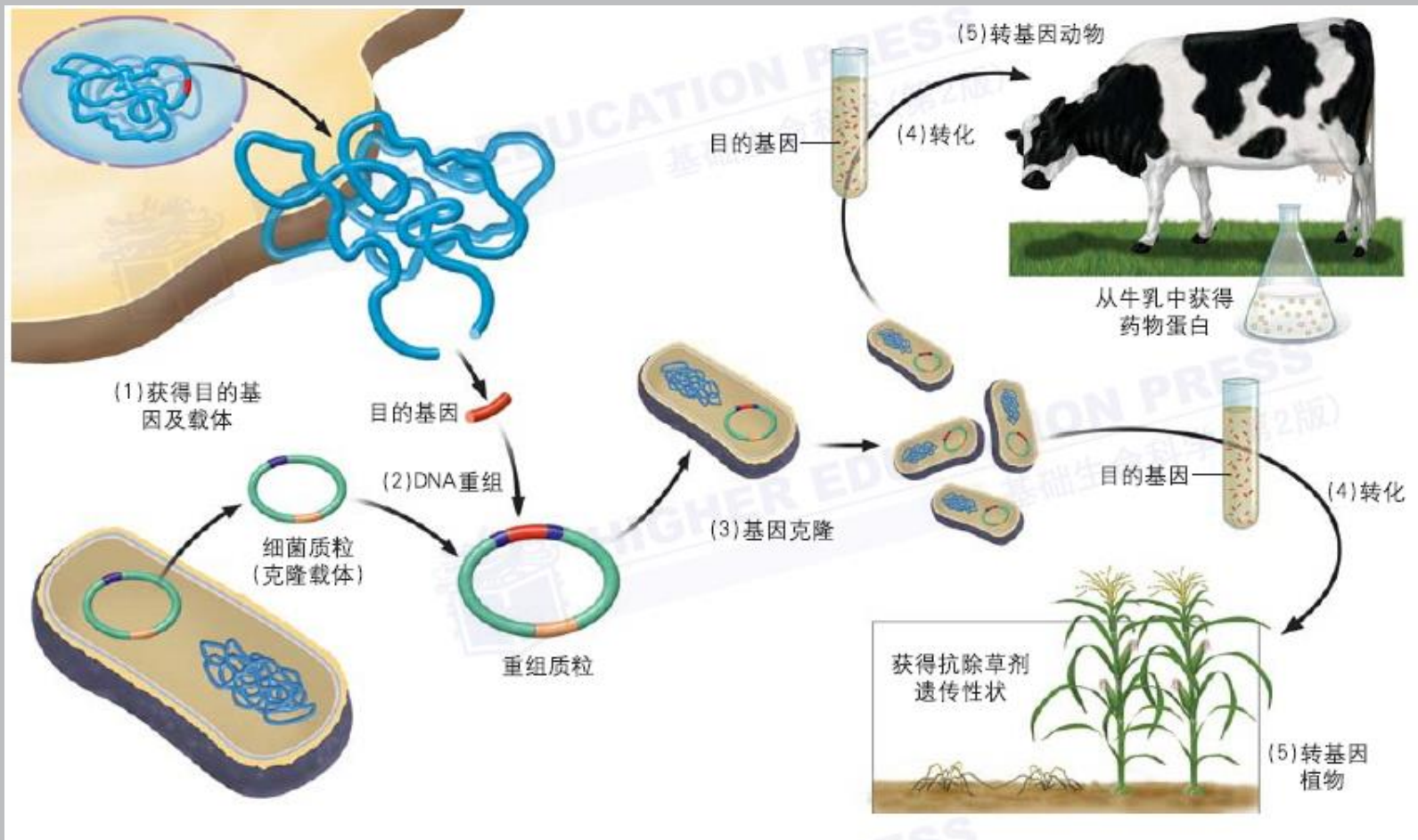
生物技术按其进行的顺序和性质一般包含以重组DNA等实验室操作为主的上游技术和以发酵工程等为主的工业化生产的下游技术。

三、生物技术的发展历史概况

- 以酿酒发酵等为代表的传统生物技术可追溯到19世纪，但直到20世纪后叶，分子生物学领域一系列重大发现和突破才使得现代生物技术蓬勃地发展起来。
- 20世纪70年代以来，基因工程技术的重要成就，为世界农业及粮食生产和制药产业的发展提供了广阔的发展空间。
 - 到20世纪末，世界各国已累计批准了约5 000个（次）转基因作物释放于田间，其中近50个转基因作物产品已经进入市场，转基因作物的种植面积近4 000万公顷，产值达15亿美元。
 - 在中国，正在研究和开发的转基因作物有50多种，涉及各类基因100多个。在生物制药和诊疗方面，近几十年来中国也积累了丰硕的成果。

第二节 重组DNA技术——基因工程

■ 重组DNA操作的一般步骤



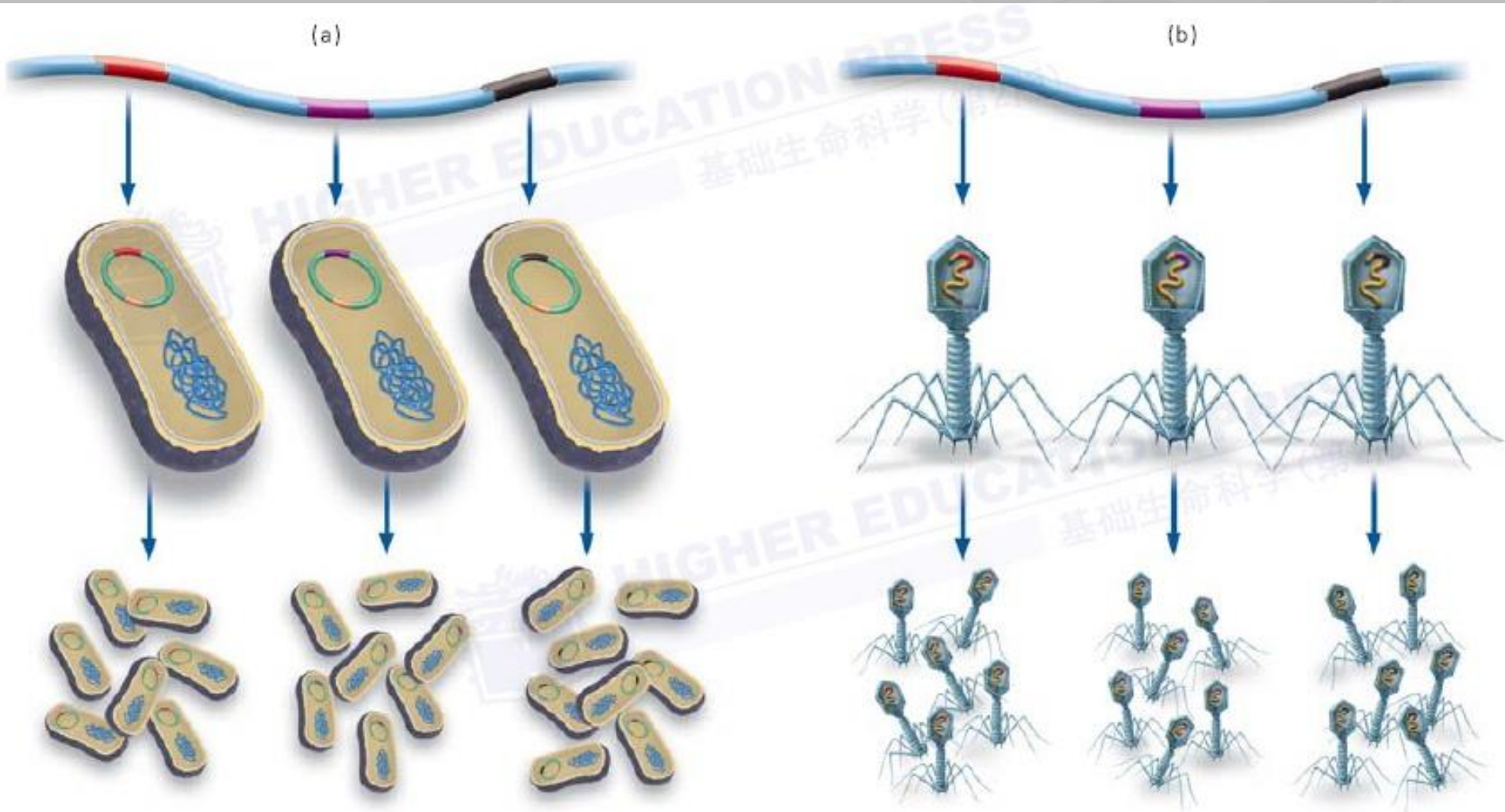
重组DNA操作的一般步骤：

- 1) 获得需要的目的基因（又称外源基因）；
- 2) 目的基因在限制性内切酶和连接酶作用下与载体连接，形成新的重组DNA分子（克隆和筛选）；
- 3) 转化或转染：用重组的DNA分子转化受体细胞，使之进入受体细胞并能在受体细胞中复制和遗传；
- 4) 对转化子即获得外源基因的受体细胞进行筛选和鉴定；（阳性克隆）
- 5) 对获得外源基因的细胞或生物体通过发酵、细胞培养、养殖或栽培等，最终获得所需的遗传性状或表达出所需要的产物。

一、获得目的基因

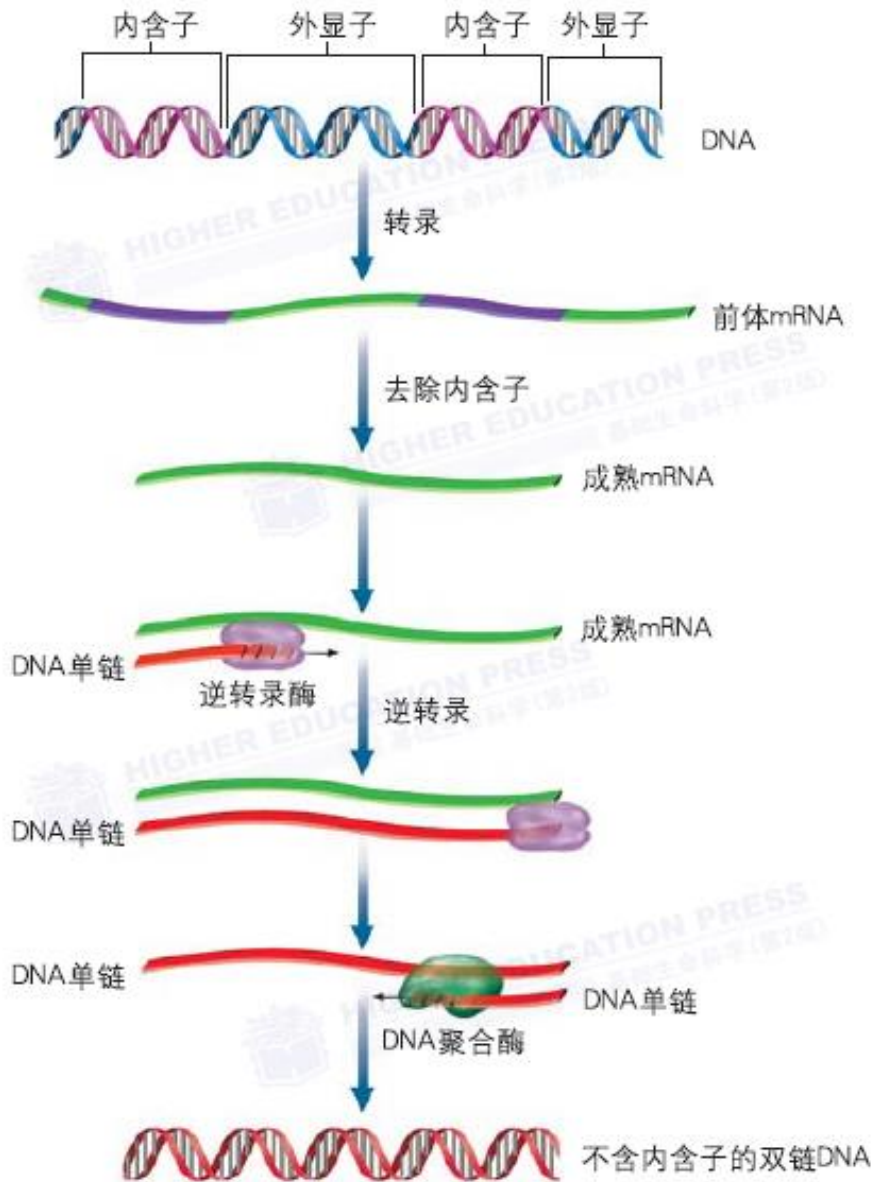
■ 进行DNA重组操作，首先要获得需要的目的基因，最常用的方法包括：

- （1）直接从生物体中提取总DNA，构建基因文库，从中调用目的基因。
- （2）以mRNA为模板，逆转录合成互补的DNA片段。
- （3）利用聚合酶链反应（PCR）特异性地扩增所需要的目的基因片段。



将总DNA包含的基因组各片段分别**克隆**在细菌质粒载体或噬菌体载体上，便构成了该生物的**基因文库**。

返回



逆转录人工合成互补DNA:

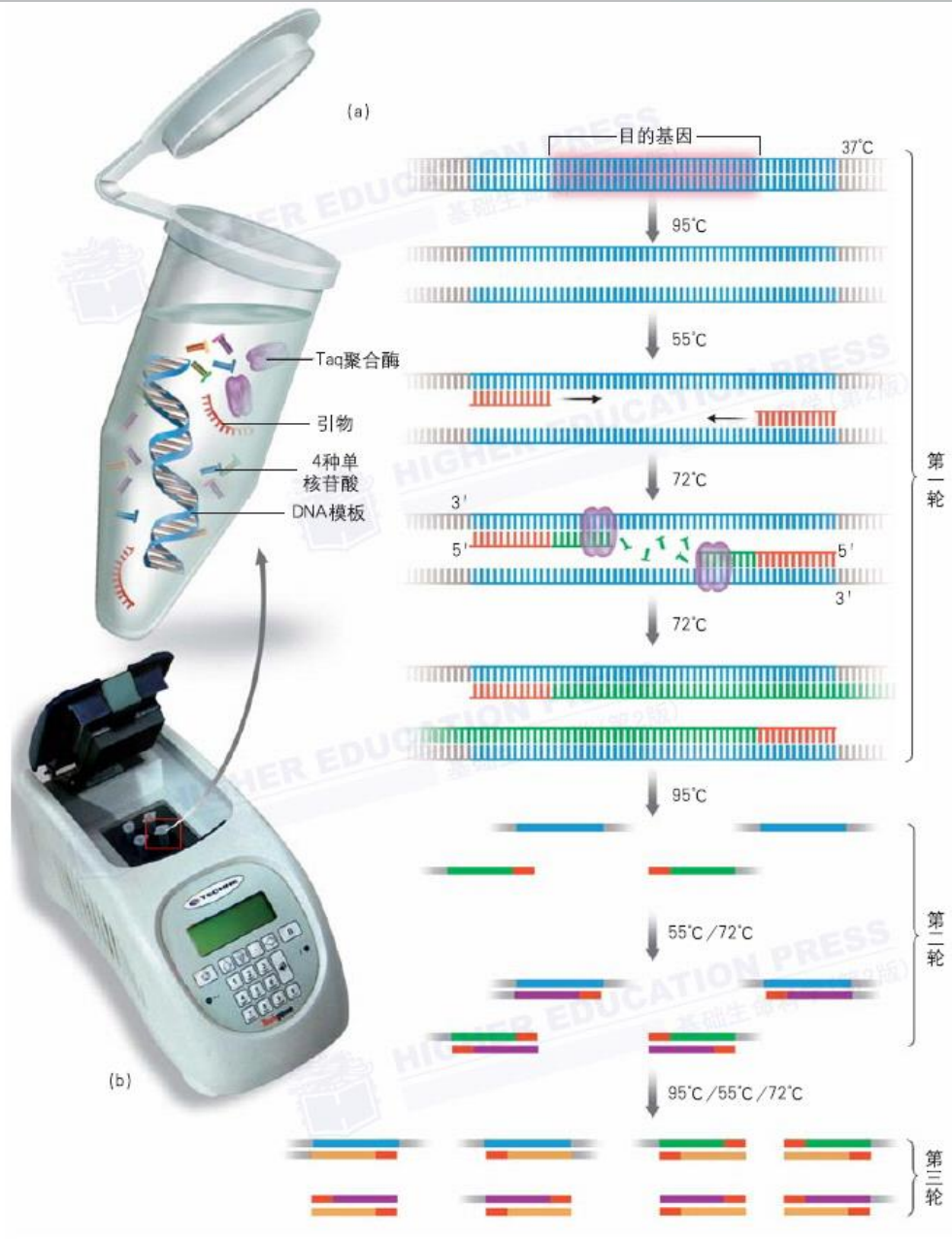
①细胞核内的基因组经过转录，产生出前体mRNA。

②经剪切作用后，除去内含子，形成了成熟mRNA。

③从细胞中分离出所需要的mRNA，再以mRNA为模板，在逆转录酶的作用下，根据碱基互补原则人工合成一段与之互补的DNA片段，这一过程称为逆转录。

④逆转录完成时，RNA被降解。接着，在大肠杆菌DNA聚合酶的作用下，再以第一条DNA为模板，人工合成另一条互补的DNA子链。

- 聚合酶链反应技术即PCR技术是在体外的小试管中通过酶促反应有选择地大量扩增（包括分离）一段目的基因的技术。该技术高效、快捷、特异性好。
- 完成PCR需要在小试管中加入4种物质：
 - （1）作为模板的DNA序列，即从细胞中提取分离的微量总DNA。
 - （2）与计划获取的目的基因双链各自3'端序列相互补的两种DNA引物（人工合成的约20个碱基的短DNA小片段）。
 - （3）TaqDNA聚合酶，该酶具有很好的热稳定性。
 - （4）4种脱氧核苷酸，简写为dNTP（包括dATP，dTTP，dGTP和dCTP）。
- 整个聚合酶链反应在特制的PCR仪中进行，4种反应混合物经历了变性、退火、延伸三步曲。



■ 变性、退火、延伸三步曲：

(1) 变性：在95℃高温下，作为模板的双链DNA解链成为单链DNA。

(2) 退火：反应体系的温度降至55~60℃，使得部分引物与模板的单链DNA的特定互补部位相配对并结合。

(3) 延伸：反应体系的温度回升到72℃左右，TaqDNA聚合酶在该合适温度条件下以目的基因为模板，逐个将4种脱氧核苷酸依照模板DNA的碱基顺序按碱基互补的原则连接在引物之后，使合成的新链延伸，形成互补的DNA双链。新形成的双链DNA又可以作为下一轮反应的模板，如此重复进行30轮循环。

引物设计一般遵循下列原则：

- (1)引物长度以15~30 bp为宜。
- (2)引物碱基尽可能随机分布，避免出现嘌呤、嘧啶堆积现象，引物G+C含量宜在45~55%左右。
- (3)引物内部不应形成二级结构，两个引物之间尤其在3'末端不应有互补链存在。
- (4)引物的碱基顺序不应与非扩增区域有同源性。要求在引物设计时采用计算机进行辅助检索分析。
- (5)引物3'末端碱基:原则上要求引物3'末端与模板DNA一定要配对。
- (6)引物5'末端碱基:PCR反应物5'末端碱基并没有严格的限制，只要与模板DNA结合的引物长度足够，其5'末端碱基可以不与模板DNA匹配而呈游离状态。

PCR反应引物设计:

PCR作为一个体外酶促反应，其效率和特异性取决于两个方面：

- 一是引物与模板的特异结合
- 二是多聚酶对引物的有效延伸

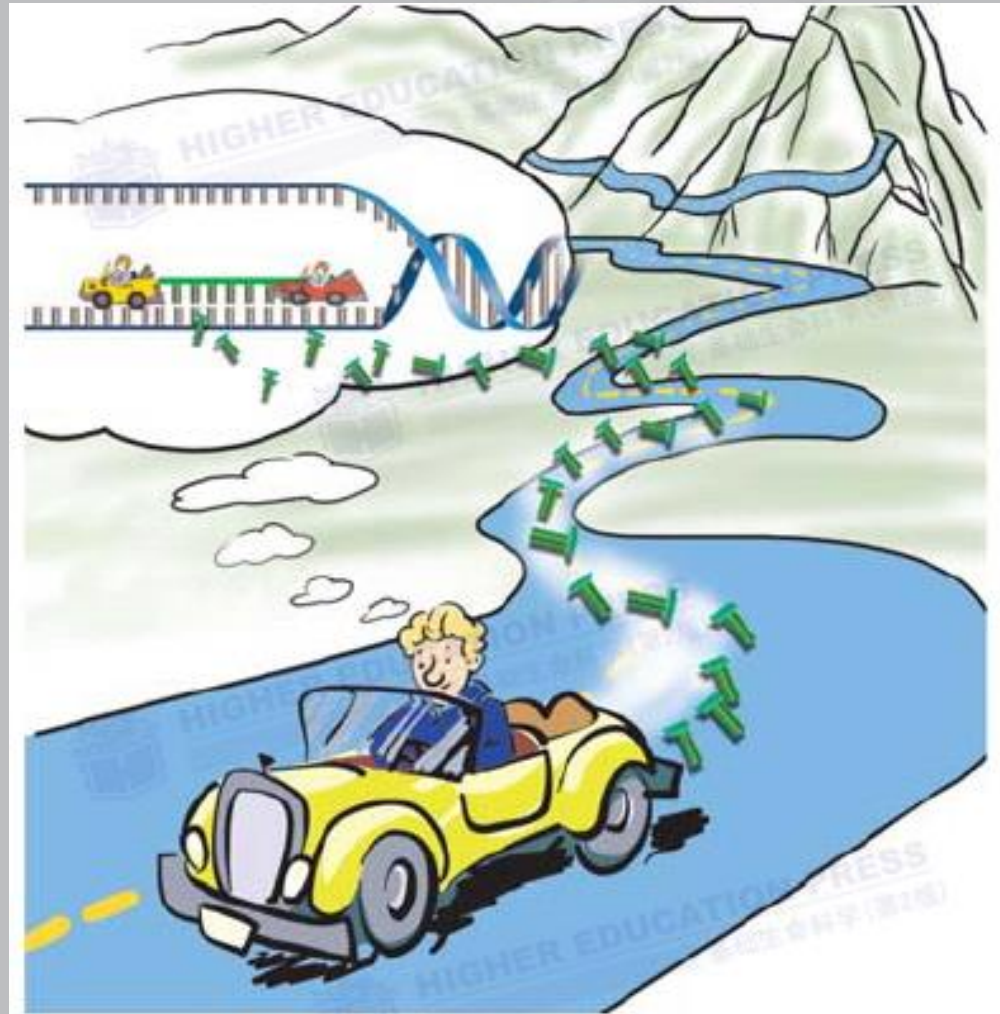
基因组DNA作为模板时，由于其数量的庞大及结构复杂，除了特异扩增外，往往很容易产生非特异性扩增产物。引物设计的总原则就是提高扩增的效率和特异性。

实时定量PCR（Real time-PCR）

普通PCR扩增产物总量变化大。

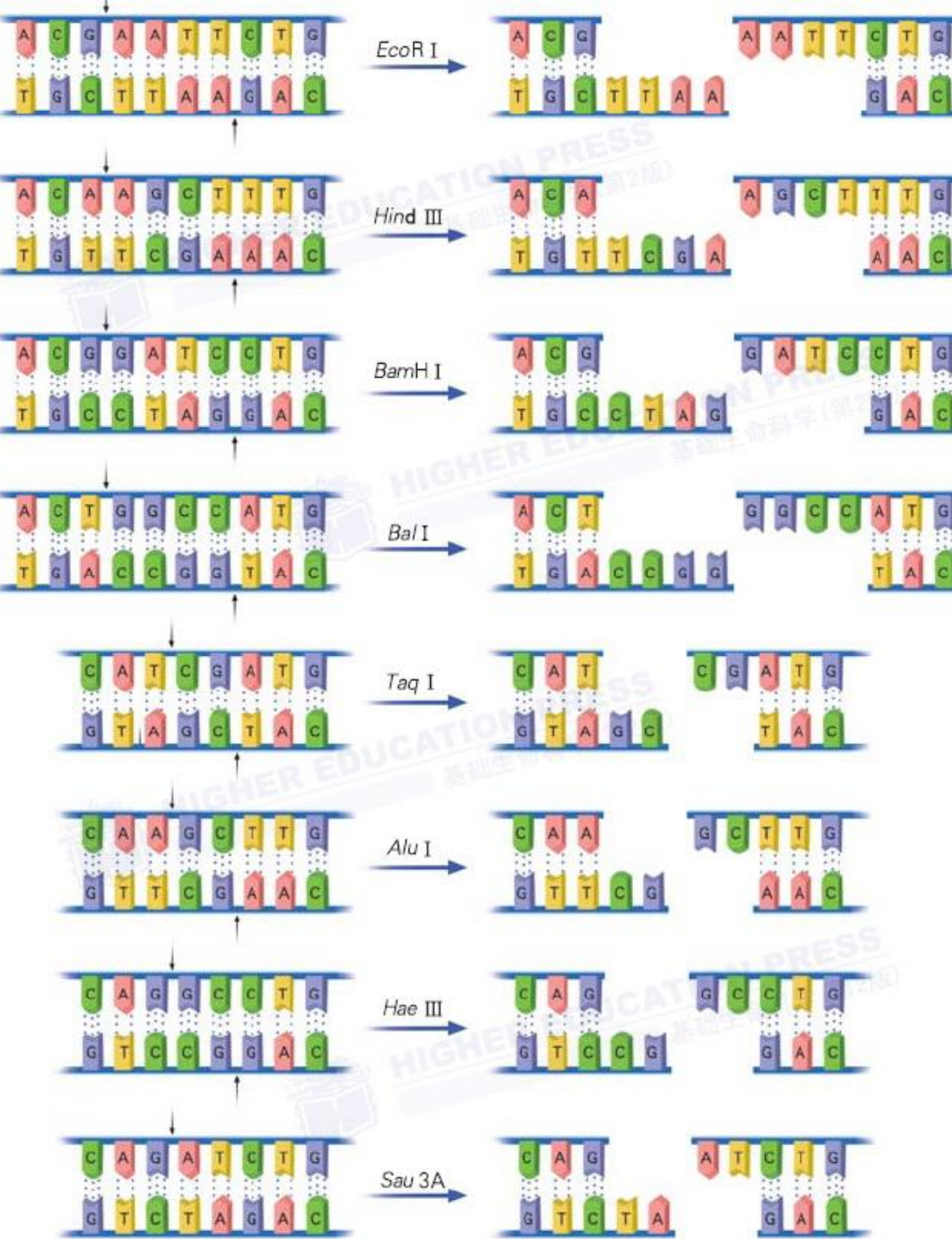
实时定量PCR技术：利用带荧光检测的PCR仪对PCR过程DNA累积作出动态监测。

■ PCR的发明：
1988年由美国科学家Kary Mullis发明；
开汽车时的联想，使他以后发明了PCR技术；
1993年获得了诺贝尔奖。

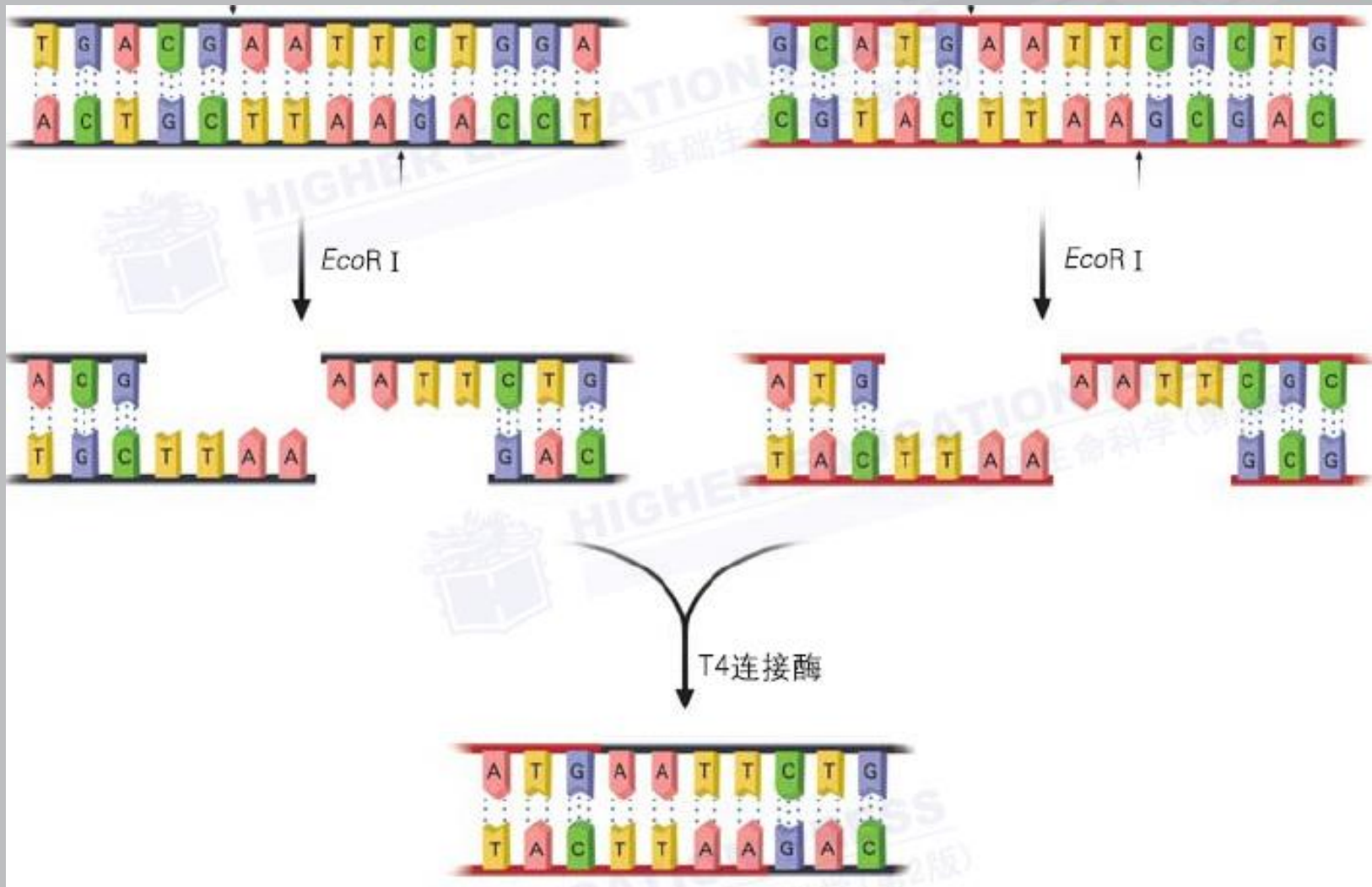


二、基因重组和克隆

- 基因重组和克隆操作最重要的工具是限制性内切酶、载体和宿主菌。
- **限制性内切酶**是从细菌中分离提纯的核酸内切酶，可以识别一小段特殊的核酸序列并将其在特定定位点处切开。
- **载体**是运送目的基因片段进入宿主细胞的工具，目前最常用的载体包括细菌**质粒**（如pUC118）、 λ 噬菌体、cosmid质粒等。
- **基因克隆过程**是通过将携带目的基因的重组DNA分子转入到宿主细胞中来完成的。
- 实验室内一般常用酶切和电泳方法来检查克隆的基因，还可以利用DNA杂交的技术直接鉴定带有重组质粒的细菌克隆。



几种常用的限制性内切酶

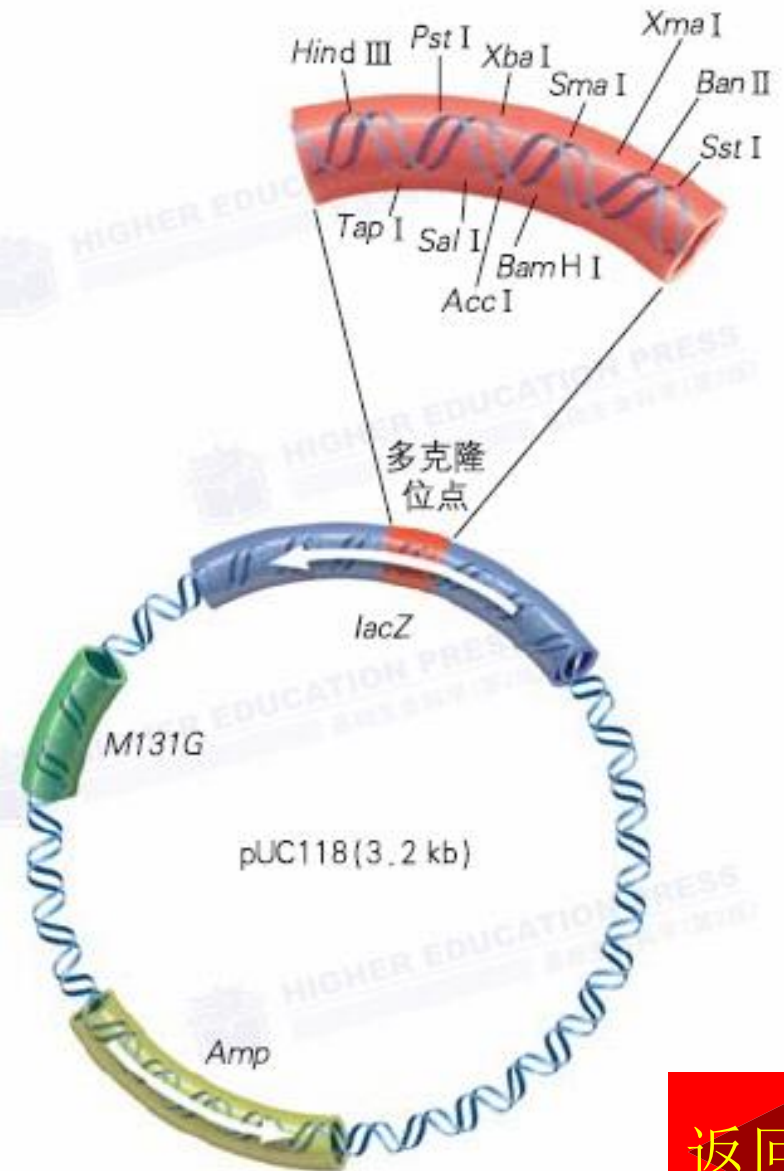


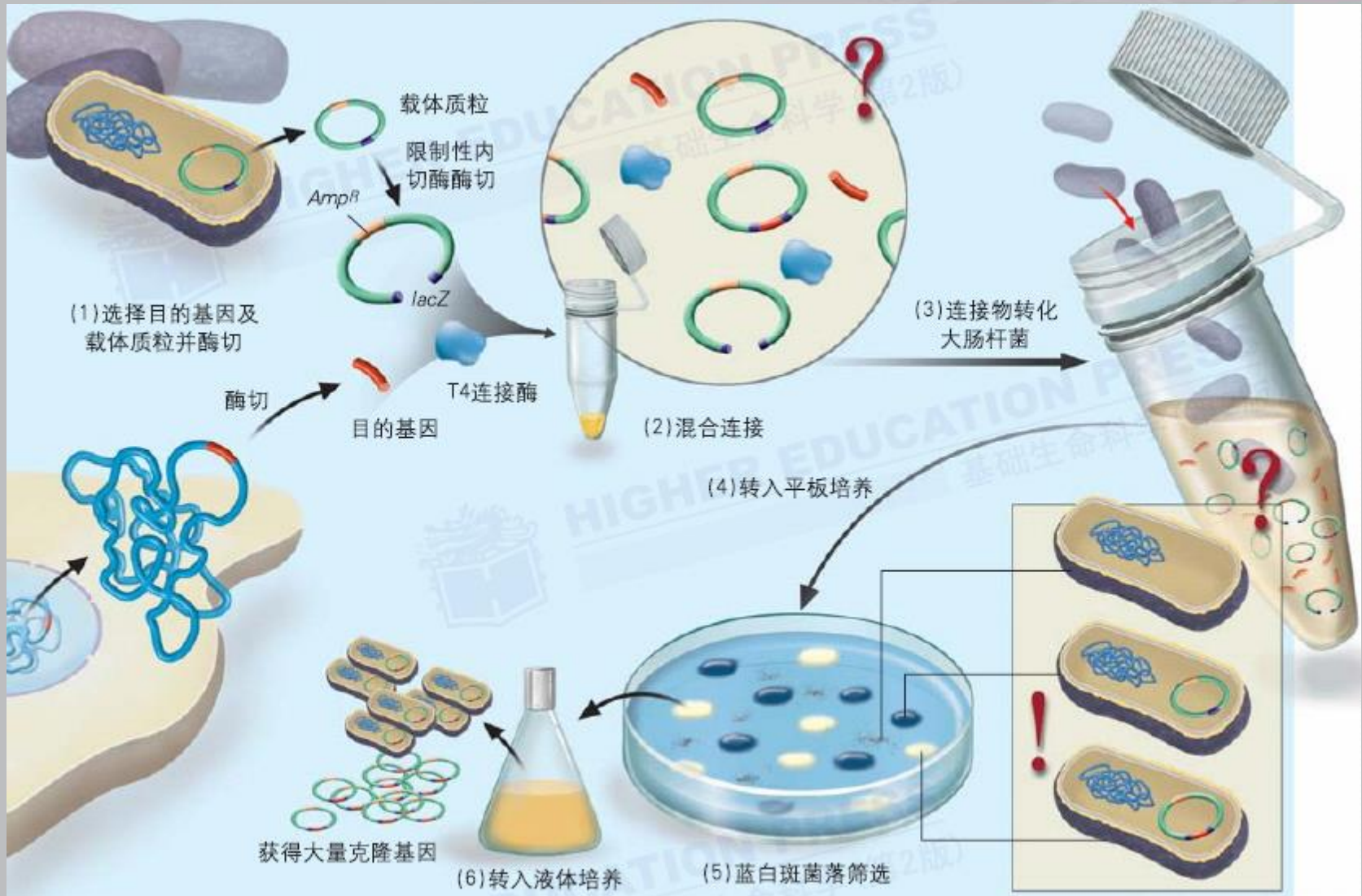
*EcoRI*是最早被发现的限制性内切酶。

返回

实用质粒载体pUC118:

1. 该质粒比较小，可以插入一段较长的DNA片段。
2. 进入宿主细菌细胞后，pUC18在每个细胞中可复制形成约500个拷贝。
3. 在pUC118中有一小段人为设计和插入的具有多种限制性酶切位点的序列，即多克隆位点。
4. pUC118中有一个*lacZ*基因，多克隆位点区就位于*lacZ*基因之中。插入了外源DNA片段的pUC18进入宿主细菌后，在含有X-gal底物的培养基上形成白色菌落，而不是蓝色菌落。
5. pUC118还携带了氨卞青霉素抗性基因，便于筛选。





将目的基因克隆到大肠杆菌细胞中的操作步骤。

返回

基因组DNA文库构建

基因组 DNA文库构建：把某种生物基因组DNA切成适当大小，分别与载体组合，导入微生物细胞，形成克隆。

汇集包含基因组中所有DNA序列的克隆，称为基因组DNA文库。

RNA基本操作技术

在DNA水平上分离真核生物的靶基因难度大：
基因组DNA庞大；大量重复序列；有内含子。

而分离 mRNA→cDNA→目的基因 工作简单，
速度快。

但是，RNA分子：敏感，稳定性差，某些基因的mRNA具有时相和转录的特殊性。

总RNA的提取

1、操作要求高：选择合适的时相、采用适当的条件与材料，避免降解。

2、方法：

Trizol法。由苯酚和异硫氰酸胍组成，可迅速破坏细胞结构，使RNA释放，并保持RNA完整。

3、浓度和纯度鉴定：

通过 OD_{260}/OD_{280} 的比值来鉴定

mRNA的纯化

根据mRNA 3' 端具有polyA尾巴的特点，利用寡聚（dT）-纤维素柱色谱法纯化获得高纯度的mRNA。

cDNA的合成

使用oligo dT或随机引物，通过RT-PCR法（——逆转录酶）。

cDNA文库的构建

获得的含有某种组织器官cDNA信息的噬菌体文库，可用于筛选目的基因、大规模测序、基因芯片杂交等功能。

做法： mRNA→cDNA →载体→大肠杆菌

一个完整的cDNA文库通常包含大于500000的独立克隆。

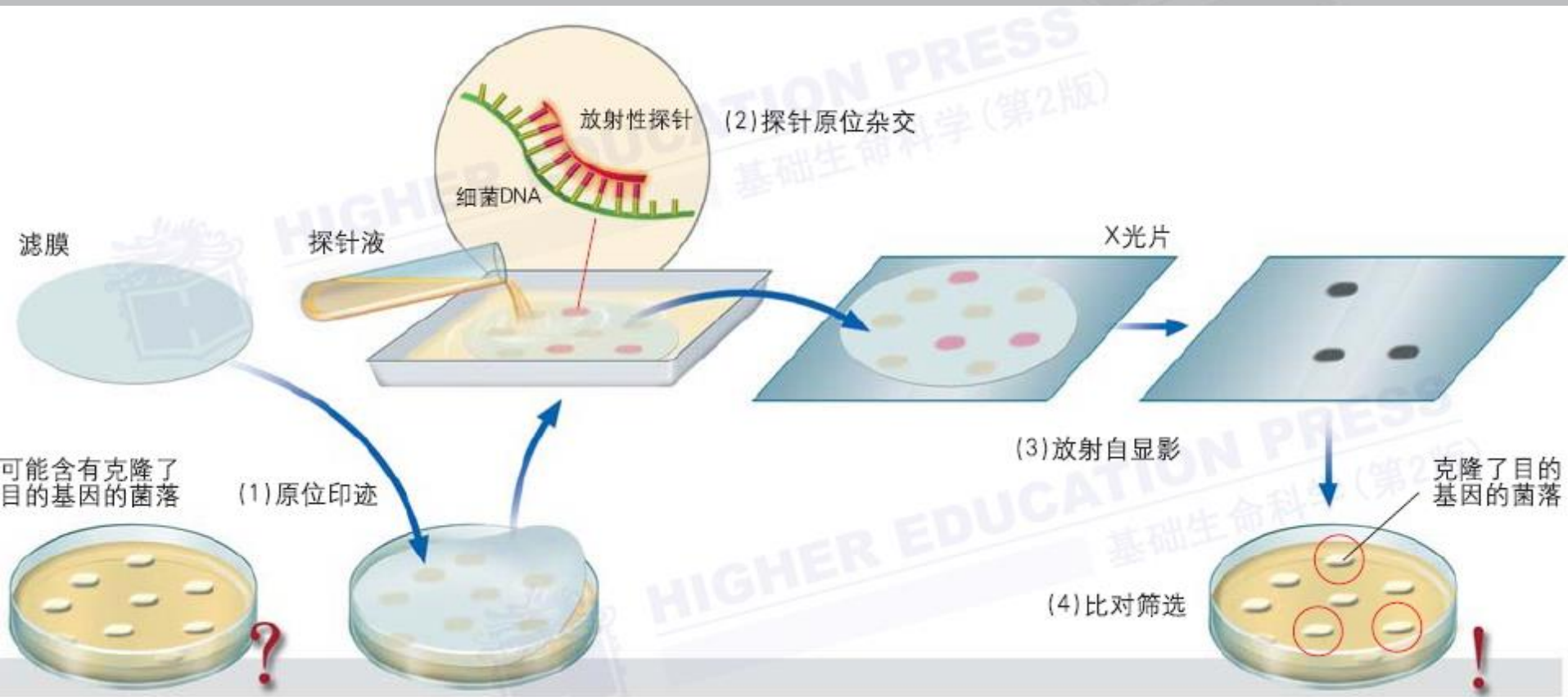
基因文库的筛选

通过某种特定的方法从基因文库中鉴定出含有所需DNA分子的特定克隆过程。

1、核酸杂交法（Southern blotting）

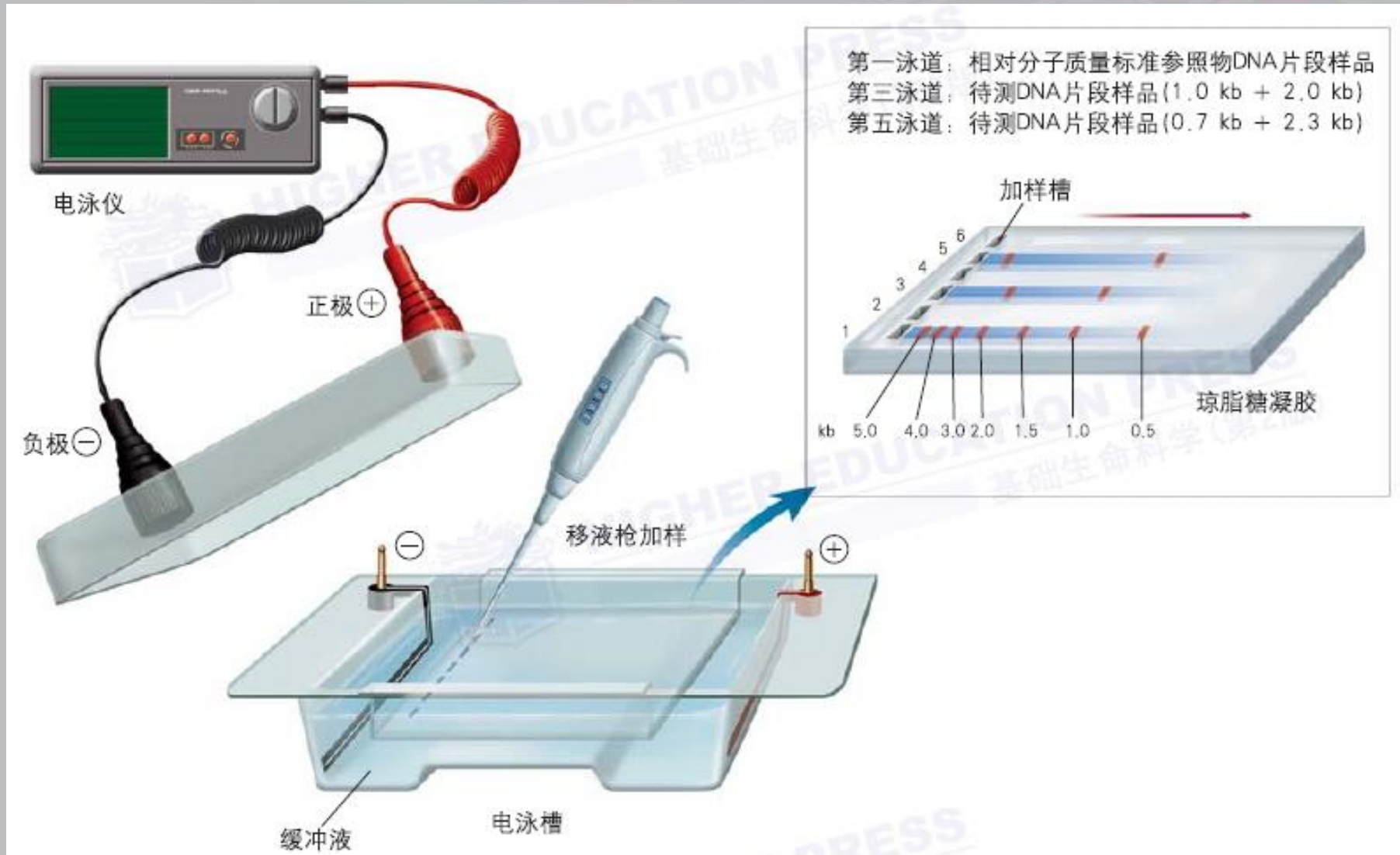
2、PCR筛选法

3、免疫筛选法（Western blotting）：该法适用于对表达文库的筛选。



利用DNA杂交技术直接鉴定携带克隆基因的菌落。

返回



用于分离、纯化和鉴定DNA片段凝胶电泳技术。

返回

DNA基本操作技术

核酸凝胶电泳技术

自从琼脂糖（agarose）和聚丙烯酰胺（polyacrylamide）凝胶被引入核酸研究以来，按分子量大小分离DNA的凝胶电泳技术，已经发展成为一种分析鉴定重组DNA分子及蛋白质与核酸相互作用的重要实验手段。

一种分子被放置到电场中，它就会以一定的速度移向适当的电极。我们把这种电泳分子在电场作用下的迁移速度，叫做电泳的迁移率，它与电场强度和电泳分子本身所携带的净电荷数成正比，与片段大小成反比。

生理条件下，核酸分子中的磷酸基团呈离子化状态，所以，DNA和RNA又被称为多聚阴离子（polyanions），在电场中向正电极的方向迁移。

由于糖-磷酸骨架在结构上的重复性质，相同数量的双链DNA几乎具有等量的净电荷，因此它们能以同样的速度向正电极方向迁移。

琼脂糖凝胶分辨DNA片段的范围为0.2~50kb之间。

聚丙烯酰胺凝胶的分辨范围为1到1000个碱基对之间。

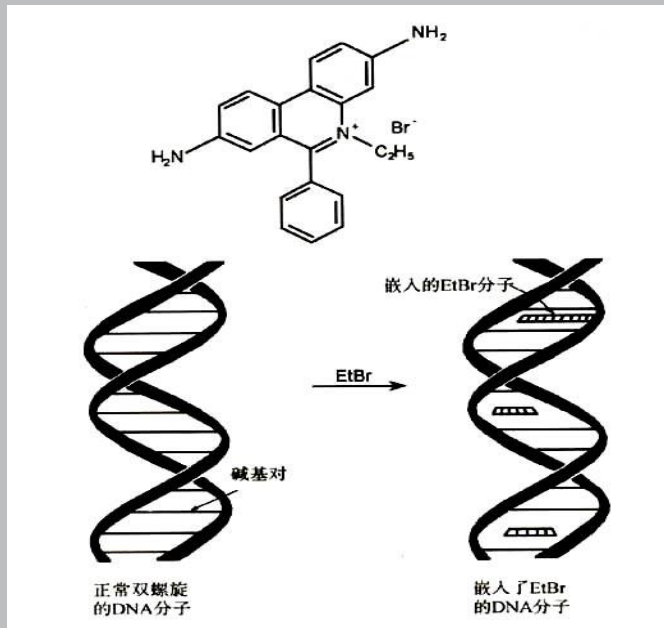
凝胶浓度的高低影响凝胶介质孔隙的大小，浓度越高，孔隙越小，其分辨能力就越强。

表2 琼脂糖及聚丙烯酰胺凝胶分辨DNA片段的能力

凝胶类型及浓度	分离DNA的大小范围（bp）
0.3% 琼脂糖	50 000~1 000
0.7% 琼脂糖	20 000~1 000
1.4% 琼脂糖	6 000~300
4.0% 聚丙烯酰胺	1 000~100
10.0% 聚丙烯酰胺	500~25
20.0% 聚丙烯酰胺	50~1

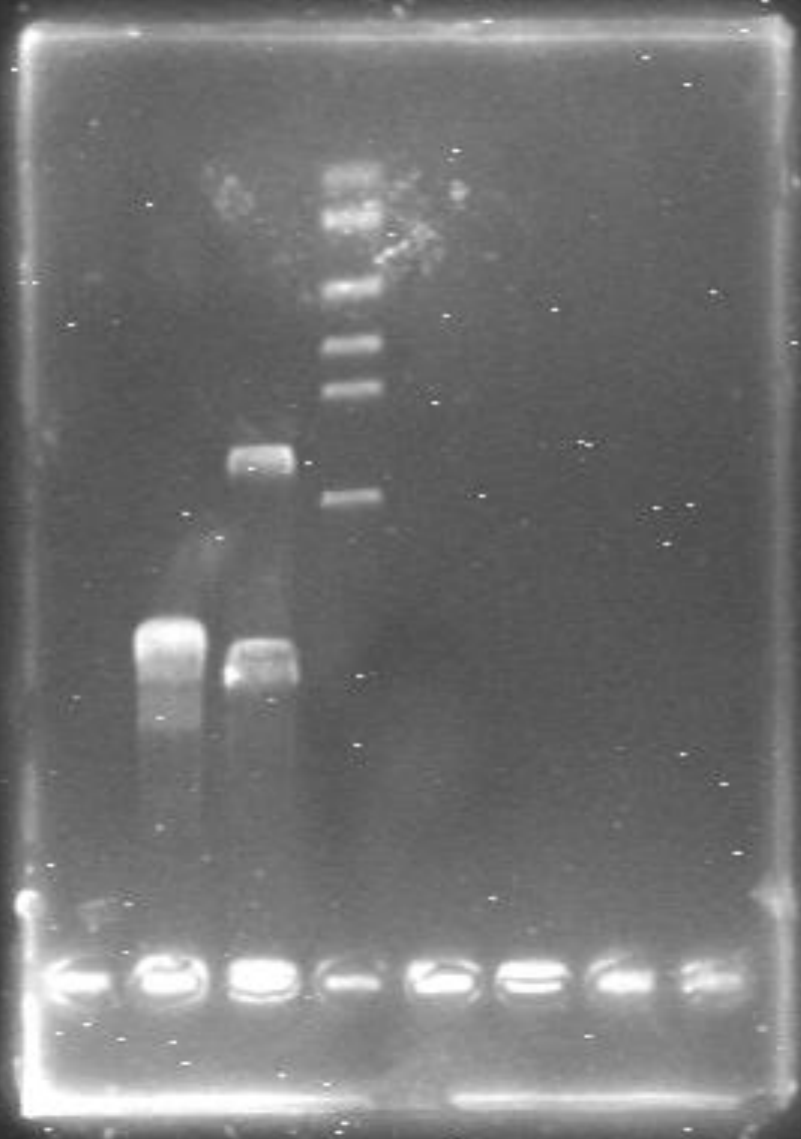
在凝胶电泳中，加入溴化乙锭（ethidium bromide, EtBr）染料对核酸分子进行染色，然后放置在紫外光下观察，可灵敏而快捷地检测出凝胶介质中DNA的谱带部位，即使每条DNA带中仅含有 $0.05\text{ }\mu\text{g}$ 的微量DNA，也可以被清晰地检测出来。

溴化乙锭是一种核酸染料，能插入到DNA或RNA分子的相邻碱基之间，并在300 nm波长的紫外光照射下发出荧光。



溴化乙锭染料的化学结构及其对DNA分子的插入作用。

由于插入了溴化乙锭分子，在紫外光照射下，琼脂糖凝胶电泳中DNA的条带便呈现出橘黄色荧光，易于鉴定。



SNP的理论与应用

SNP: single nucleotide polymorphism, 单核苷酸多态性。

具有很高的遗传稳定性，是继限制性片段长度多态性（**RFLP**）、**RAPD**和微卫星DNA（**SSR**）标记之后的第三代遗传标记。

RFLP（Restriction Fragment Length Polymorphism）技术

RFLP标记是发展最早的DNA标记技术。

RFLP是指基因型之间限制性片段长度的差异，这种差异是由限制性酶切位点上碱基的插入、缺失、失重排或点突变所引起的。

RFLP技术主要包括以下基本步骤：
DNA提取→用限制性内切酶酶切DNA→用凝胶电泳分开DNA片段→把DNA片段转移到滤膜上→利用放射性标记的探针杂交显示特定的DNA片段（Southern杂交）和结果分析。

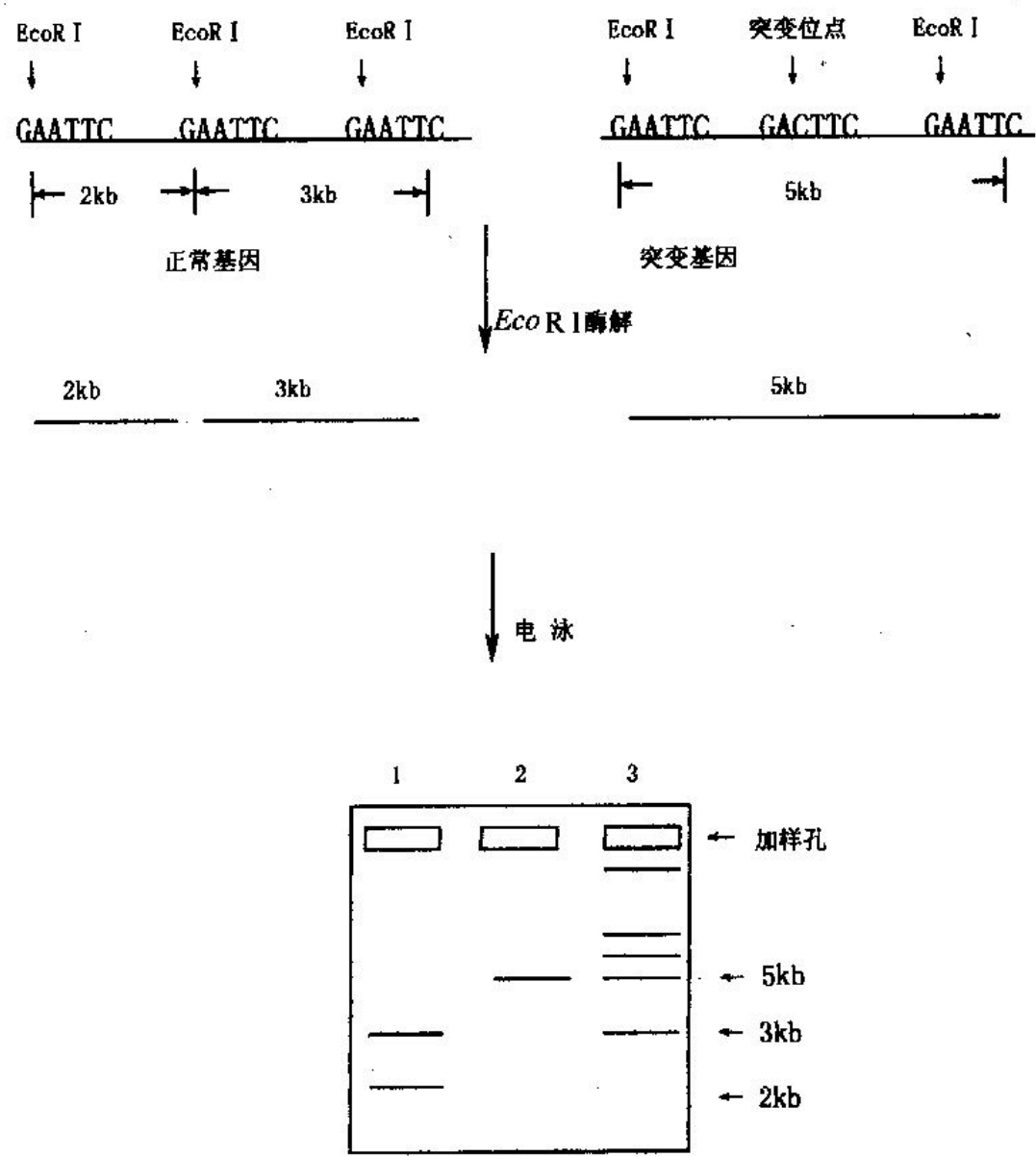


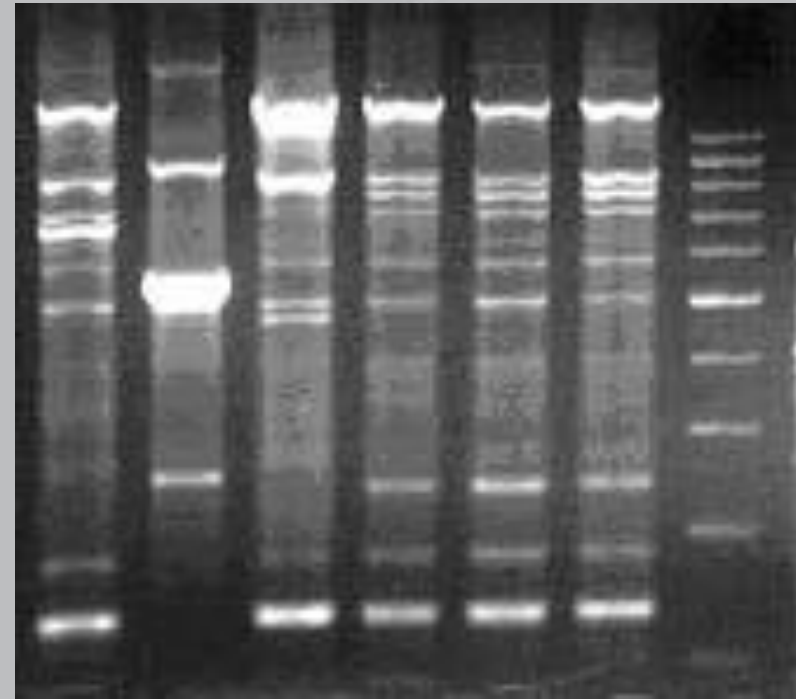
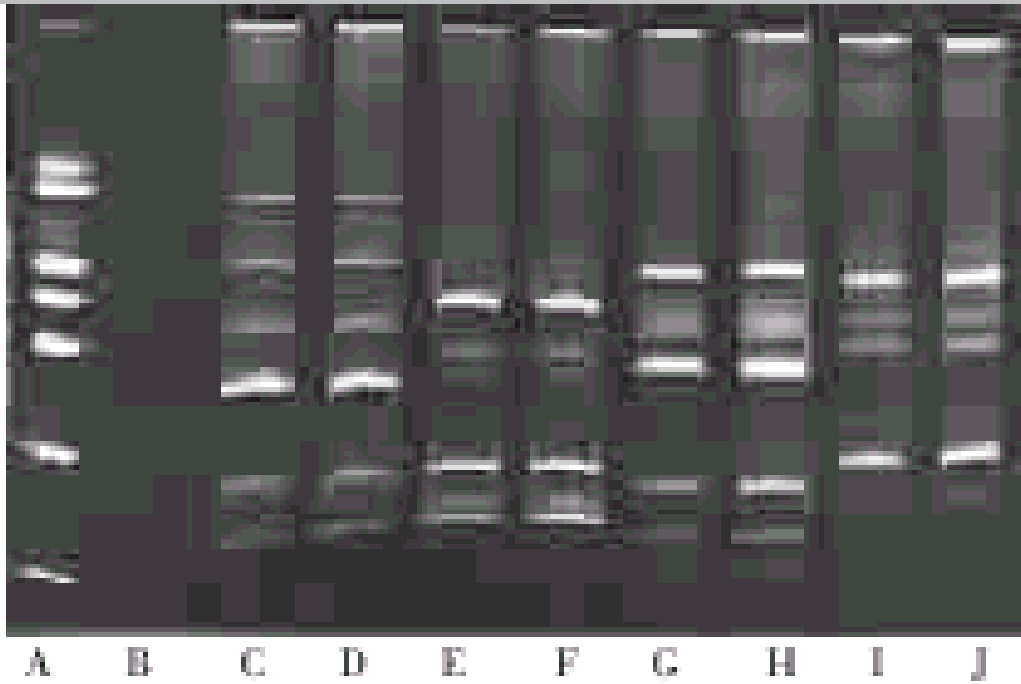
图1-6 RFLP形成的机理及其检测示意图
1. 正常基因; 2. 突变基因; 3. 分子量标准



RAPD技术

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 技术是建立在 PCR 基础之上的一种可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的分子技术。

其以基因组DNA为模板,以单个人工合成的随机多态核苷酸序列(通常为10个碱基对)为引物,在热稳定的DNA聚合酶(Taq酶)作用下,进行PCR扩增。扩增产物经琼脂糖或聚丙烯酰胺电泳分离、溴化乙锭染色后,在紫外透视仪上检测多态性。扩增产物的多态性反映了基因组的多态性。RAPD技术现已广泛的应用于生物的品种鉴定、系谱分析及进化关系的研究上。



SSR (simple sequence repeats) 技术

微卫星DNA：重复单位序列最短，只有2~6bp，串联成簇，长度50~100bp，又称为短串联重复序列 (Short Tandem Repeat STR)。广泛分布于基因组中。

SSR标记的基本原理：

根据微卫星序列两端互补序列设计引物，通过PCR反应扩增微卫星片段，由于核心序列串联重复数目不同，因而能够用PCR的方法扩增出不同长度的PCR产物，将扩增产物进行凝胶电泳，根据分离片段的大小决定基因型并计算等位基因频率。

SNP的应用

- 1、人类基因单体的绘图
- 2、SNP与疾病易感基因的相关性分析
- 3、指导用药与药物设计

SNP检测技术

传统SNP检测方法：RFLP、PCR-SSCP、DHPLC等，最终均需通过凝胶电泳分析，通量受到限制，并只能判断有无，而不知碱基类型。必须进行**DNA**测序。

基因分型：利用数据库已有SNP进行特定人群序列和发生频率研究，包括如下方法：

- 1、**基因芯片技术**：通过优化芯片杂交程序，使探针只与完全互补的序列杂交，而不与含有单个错配碱基序列杂交。
- 2、**Taqman技术**：运用了荧光共振能量转换（FRET）技术。
- 3、**分子信标技术**：也运用了FRET技术。
- 4、**测序法**

Taqman技术

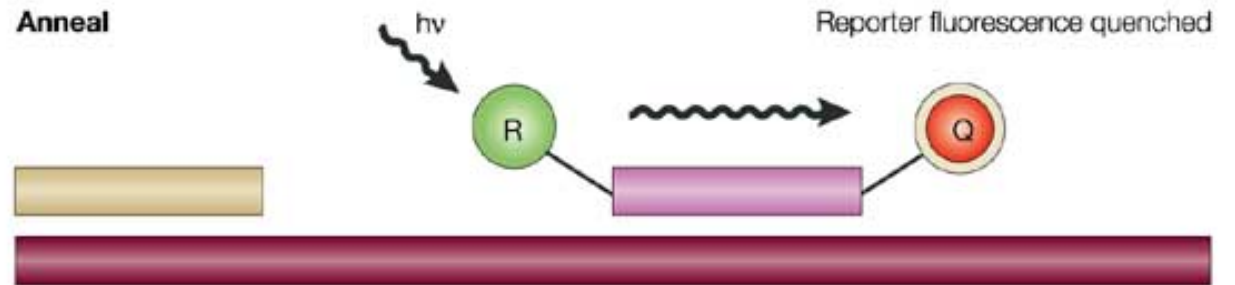
a Denature

Primer



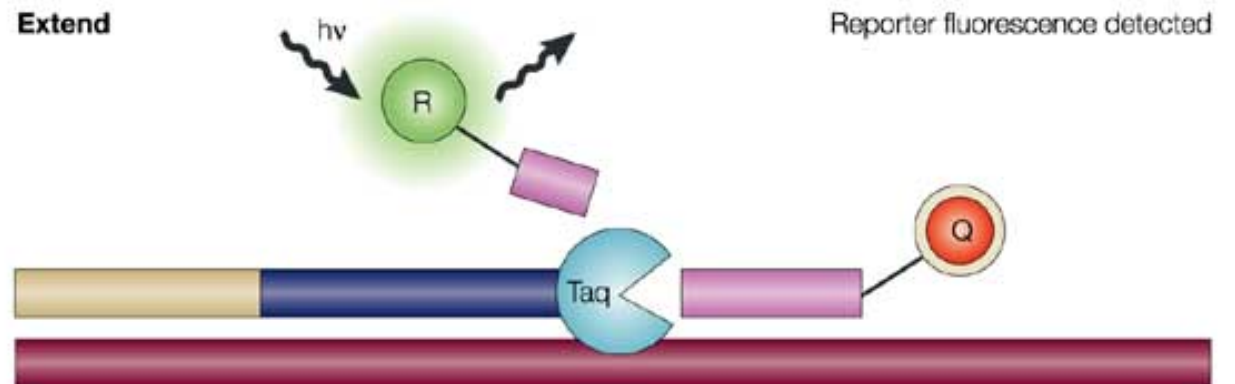
Anneal

Reporter fluorescence quenched



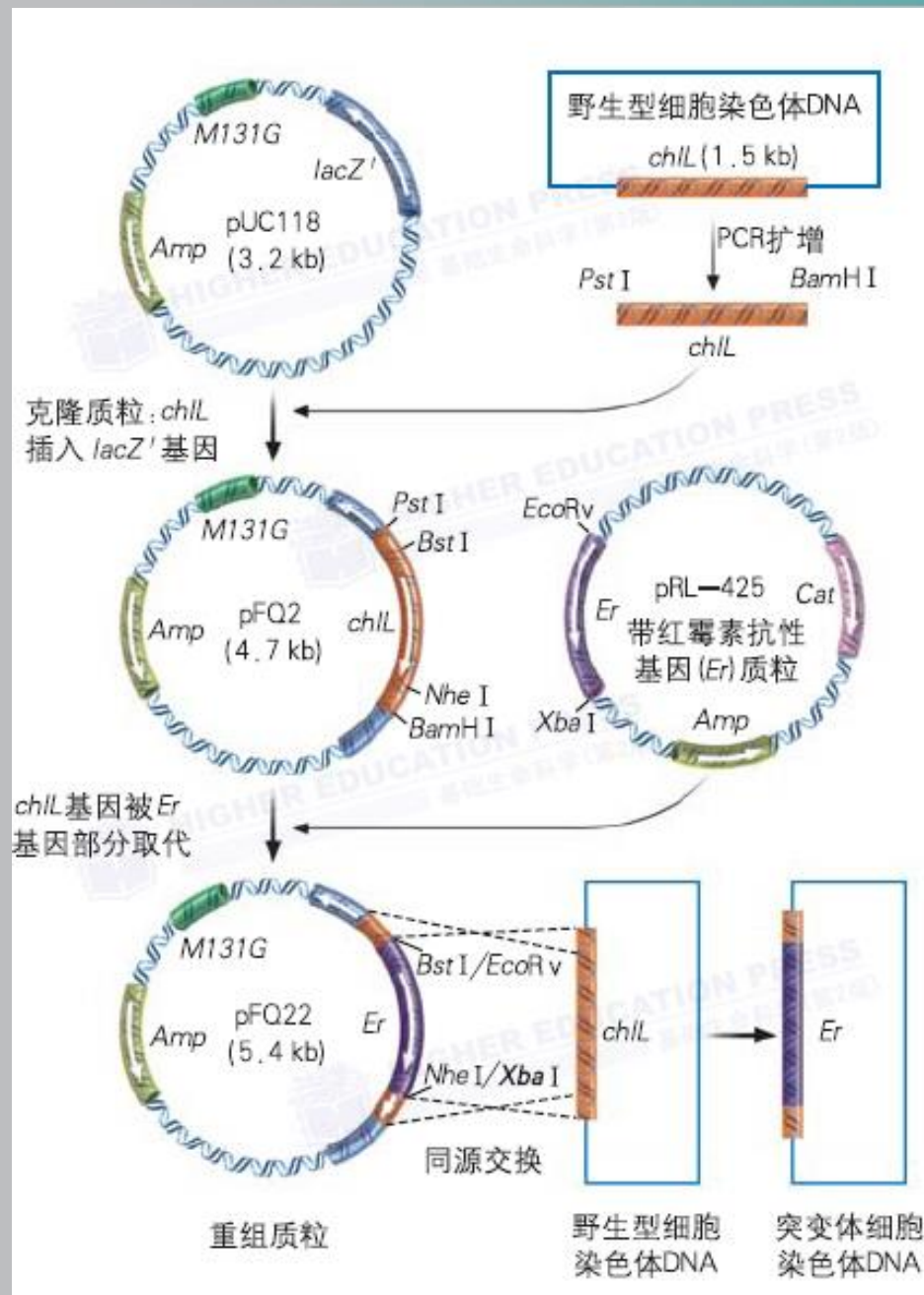
Extend

Reporter fluorescence detected



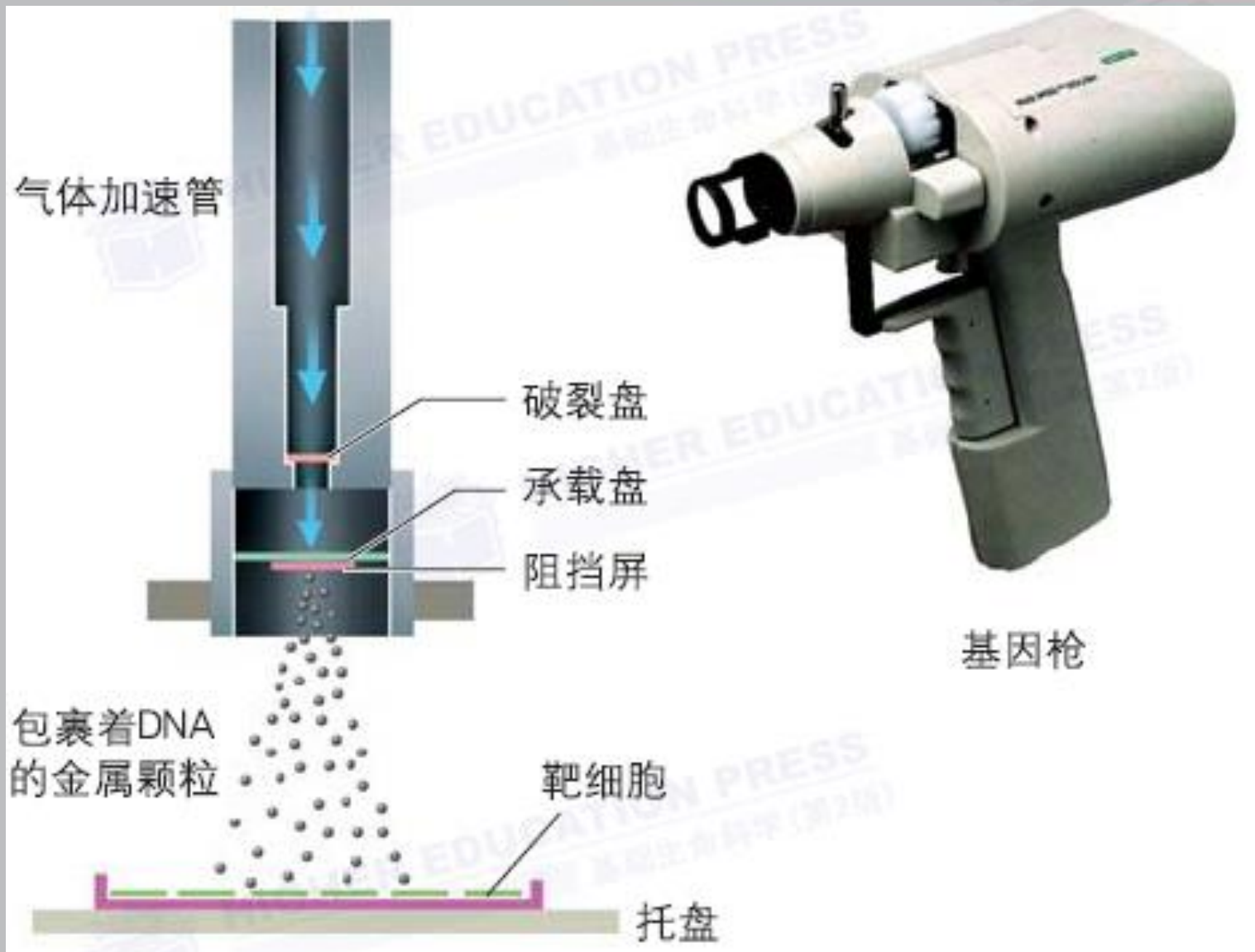
三、转化受体细胞和转化子筛选

- 基因克隆以后使目的基因在合适的宿主细胞中表达，产生需要的基因表达产物或使宿主生物具备所需要的性状，同时，该外源目的基因还能在宿主细胞中稳定地遗传。这一过程就是遗传转化。宿主细胞就是接纳外源DNA的细胞，它们可以是细菌等原核生物，也可以是植物或动物细胞。
- 如果需要让克隆的基因表达和产生大量的编码蛋白，往往将该基因插入到一种表达载体中，用带有目的基因的表达载体再转化大肠杆菌，对大肠杆菌进行大量培养使该目的基因大量表达和积累，分离纯化后可以获得需要的产品。
- 通过DNA体外重组技术构建的重组质粒还可以直接用以转化蓝藻等原核生物或其他一些原生生物如单细胞绿藻等。



构建缺失 *chL* 基因的蓝细菌突变株

- 植物和动物的遗传转化常用的方法包括载体法转化和基因的直接转移。
- 利用农杆菌介导的转化是以经过改造的农杆菌Ti质粒为载体，将外源基因转入植物细胞中。
- 基因的直接转移方法包括：
 - (1) 利用高压电脉冲的电激穿孔作用把外源DNA引入动植物细胞或组织中。
 - (2) **基因枪法**，用粒子枪把表面吸附有外源DNA的金属微粒高速地射入动植物细胞或组织中。
 - (3) 微注射法，利用显微注射仪等将外源DNA直接注入细胞核或细胞质中。对于植物细胞，常用除去了细胞壁的原生质体为受体；对于动物细胞，常用的受体包括受精卵、胚胎干细胞等。



基因直接转移的基因枪法。

转化是一个自然存在的过程。细菌处于容易吸收外源DNA状态叫**感受态**，用理化方法诱导细胞进入感受态的操作叫致敏过程。重组DNA转化细菌的技术操作关键就是通过**化学方法**，人工诱导细菌细胞进入一个敏感的感受态，以便外源DNA进入细菌内。

这项技术始于Mandel和Higa1970年的观察，他们发现细菌经过冰冷的 CaCl_2 溶液处理及短暂热休克后，容易被 λ 噬菌体DNA感染，随后Cohn于1972年进一步证明质粒DNA用同样的方法也可进入细菌。

转化原理：

将快速生长中的大肠杆菌置于经0℃预处理的低渗氯化钙溶液中，使细胞膨胀，细胞膜通透性发生变化，易与外源DNA相粘附并在细胞表面的复合物。

42℃下做短暂热刺激，复合物便会被细胞所吸收。在全培养基中生长一段时间使转化基因实现表达，就可涂布于选择性培养基中分离转化子。

转化(transformation)

特指以质粒DNA或以它为载体构建的重组子导入细菌的过程。

转染 (transfection)

是指噬菌体、病毒或以它作为载体构成的重组子导入细胞的过程。

转导 (transduction)

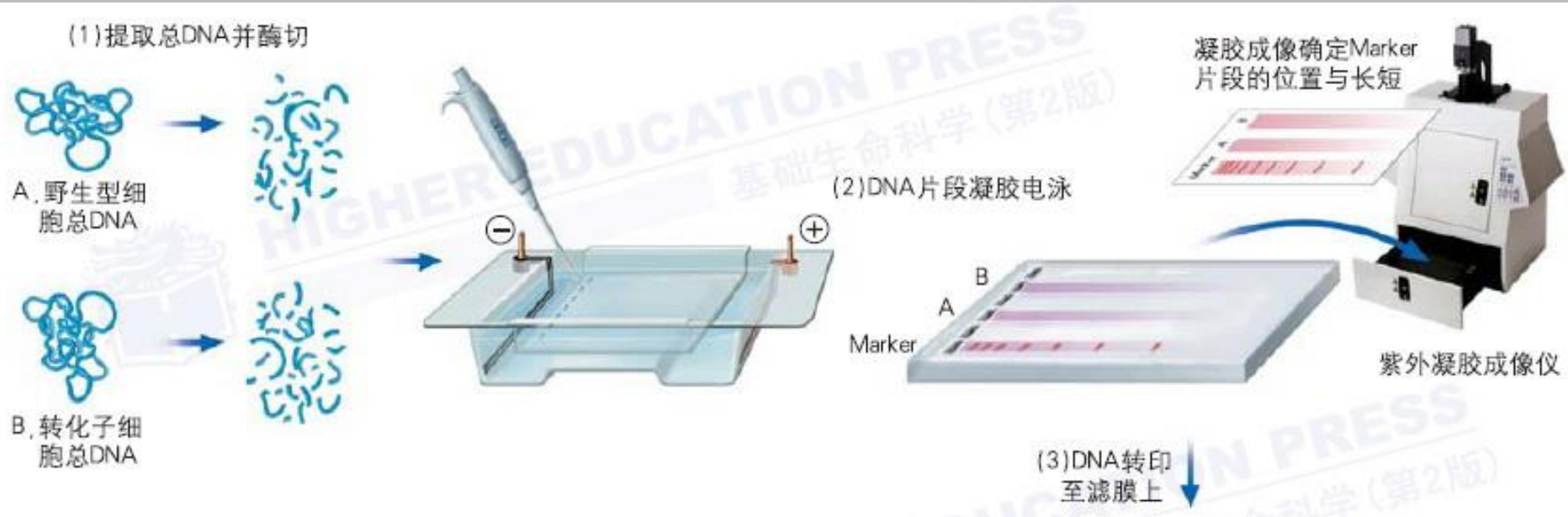
以噬菌体为媒介，将外源DNA导入细菌的过程。

上述概念往往容易混淆。

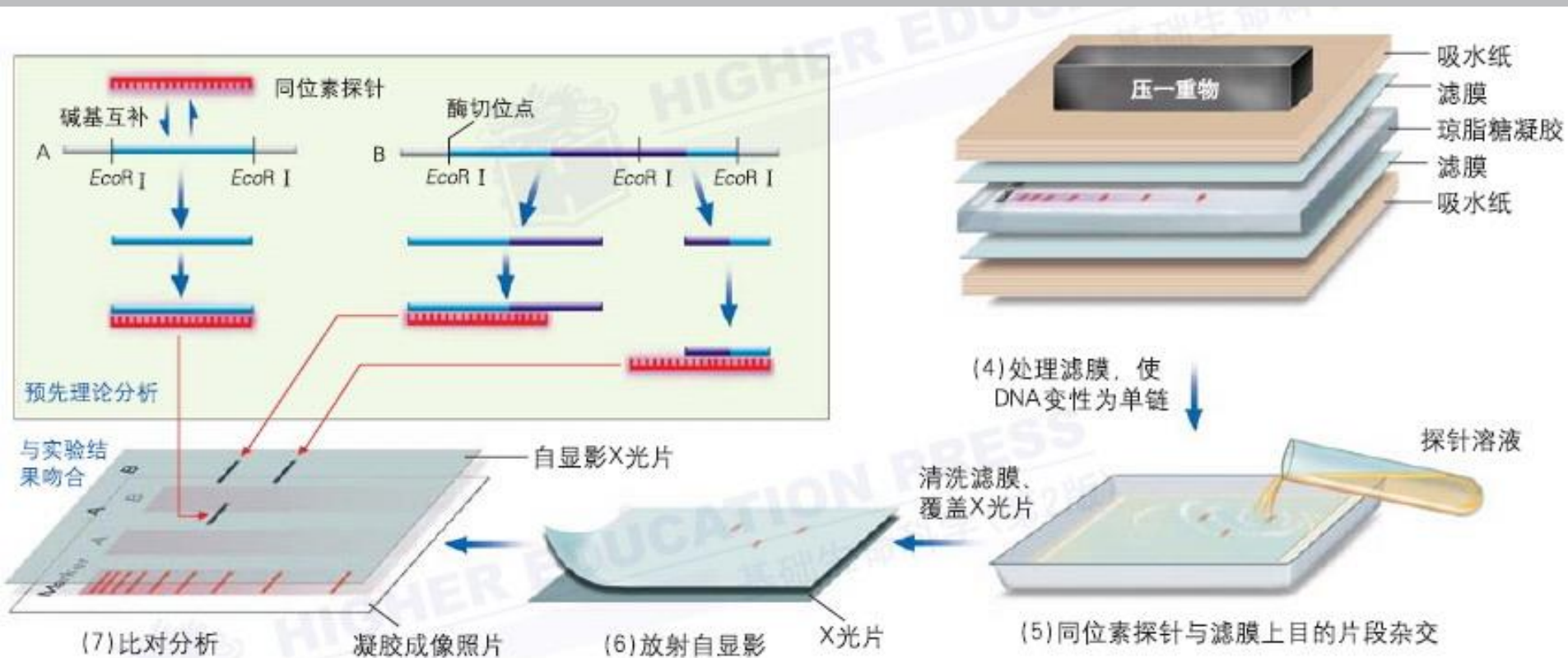
四、转化子分析——Southern印迹

■ 通过PCR、酶切、连接、克隆、转化、筛选等一系列DNA的操作，获得了转基因的生物（又称转化子）后，常用核酸杂交的方法对转基因生物中外源目的基因的情况进行检测和分析。

①提取总DNA后进行酶解。②对酶解产物做凝胶电泳。



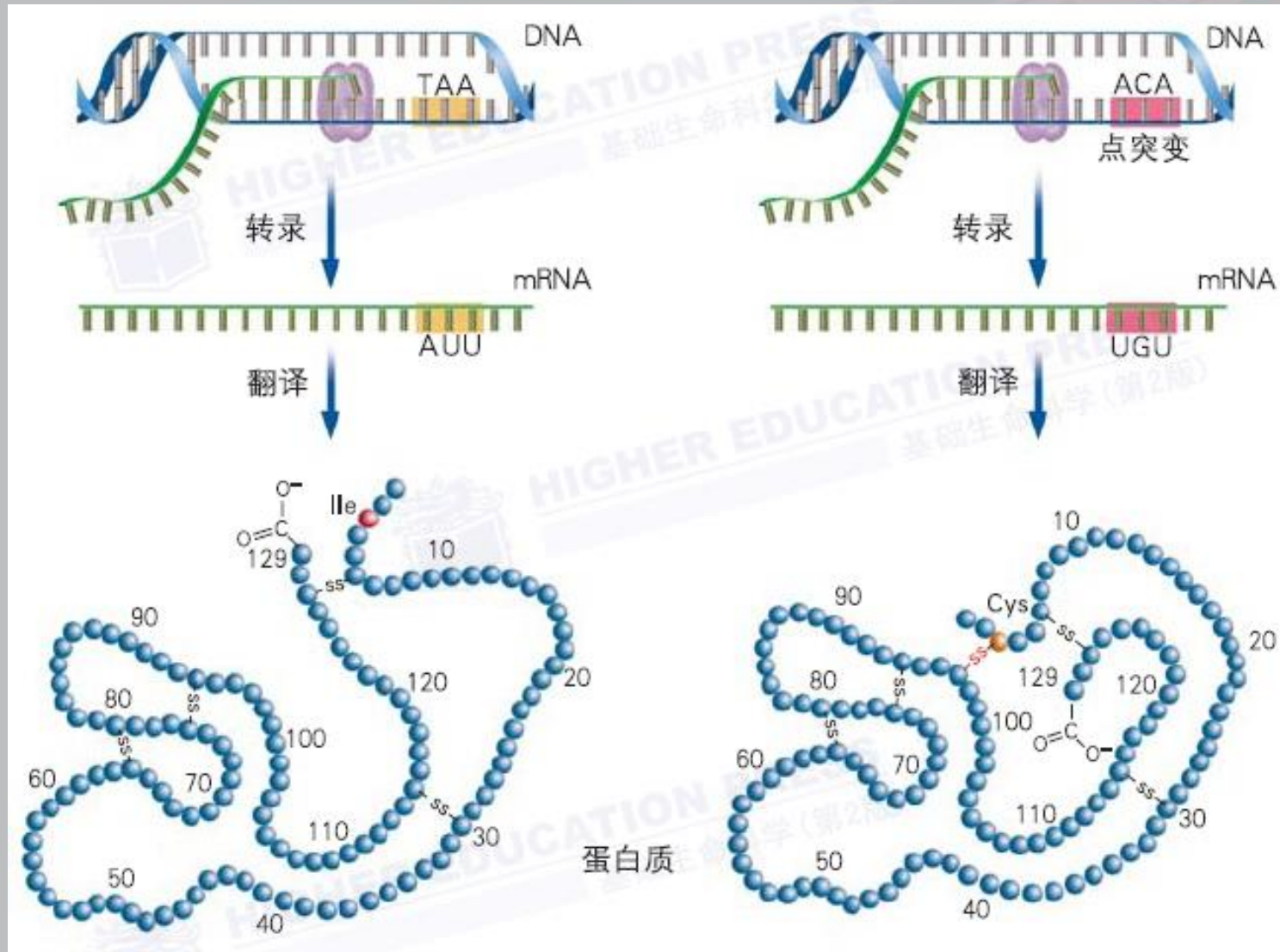
③DNA转印至滤膜上。④对滤膜及DNA做变性处理，使双链DNA解开成为单链分子。⑤加入与外源目的基因部分序列互补、并带有放射性同位素DNA探针，与外源目的基因的DNA变性单链杂交形成双链分子。⑥冲洗除去多余探针分子，进行放射自显影。⑦比对分析。



第三节 蛋白质工程、发酵工程和细胞工程简介

一、蛋白质工程

- 蛋白质工程就是在对蛋白质的化学、晶体学、动力学等结构与功能认识的基础上，对蛋白质人工改造与合成，最终获得商业化的产品。在现阶段，蛋白质工程主要是改造和表达现有的蛋白质，包括通过修改氨基酸序列来改善蛋白质的结构或构象，以提高蛋白质的活性、稳定性和产率。
- 蛋白质工程的主要步骤通常包括：①分离纯化目的蛋白。②测定氨基酸序列。③测定蛋白质的结构。④了解蛋白质的结构变化对活性与功能的影响。⑤设计基因改造方案。⑥分离、纯化新蛋白，功能检测后投入实际使用。如通过引入二硫键提高酶的热稳定性。



通过在蛋白质分子中导入二硫键提高酶的热稳定性。

返回

二、发酵工程

- 现代**发酵工程**主要是指利用微生物、包括利用DNA重组技术改造过的微生物在全自动发酵罐或生物反应器中生产某种商品的技术。发酵工程的产品从食品、药品、精细化工产品到许多工业用原料等，范围非常广泛。
- 现代发酵工程是分子生物学、生物代谢、微生物生长动力学、**大型发酵罐**或生物反应器研制、化工原理密切结合和应用的结果。
- 一般发酵工程包括以下基本步骤：①菌种选育和改造获得工程菌等。②细胞大规模培养即发酵过程。③生产活性的诱导。④菌体及产物的收获，从细胞或培养液中分离纯化所需要的代谢产物。



(a)



(b)

用于微生物发酵实验的大型发酵罐。

- 基因重组及微生物育种技术属于上游技术，微生物的发酵生产技术是其中的生物反应工程，发酵液及微生物细胞中的产物分离到产品的制作技术则是生物技术产品研制过程的下游技术。
- 发酵工程下游技术的工艺流程一般可包括：预处理、提取、精制和成品制作4个阶段。

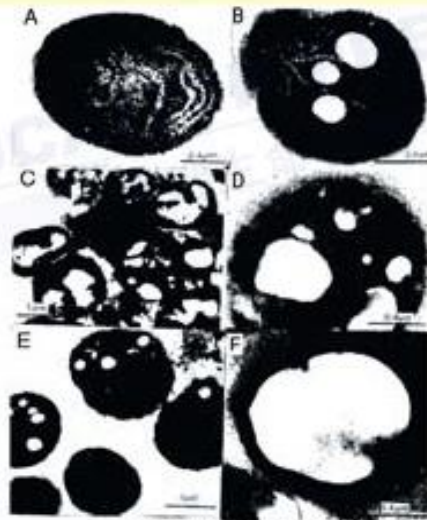
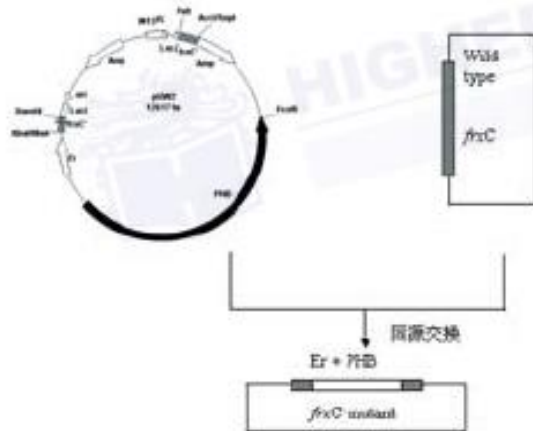


表 12-2 部分现代发酵工程产品种类

抗菌素	有机酸	抗肿瘤剂	神经系统药物
色 素	除草剂	抗氧化剂	各类气体化合物
类固醇	杀虫剂	心血管药物	有机化学溶剂
核苷酸	多肽类	抗病毒剂	免疫调节剂
酶制剂	氨基酸	维生素	食品与饮料

此外研究人员，利用发酵工程还开发生产出了名为聚β-羟基丁酸脂的生物可降解塑料。

重组质粒pGW2转化野生型细胞以及突变体的筛选

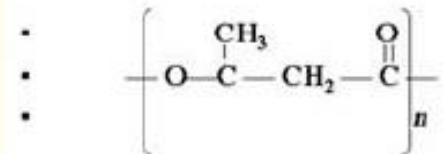


透射电镜下细胞的形态

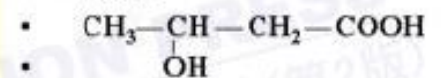
A、B平衡生长细胞；C、D限氮培养细胞；
E限磷培养细胞；F限氮培养后产生的电子透明颗粒(PHB)

PHB分子结构

- Poly-β-Hydroxybutyrate
- Poly-3-Hydroxybutyrate (PHB)



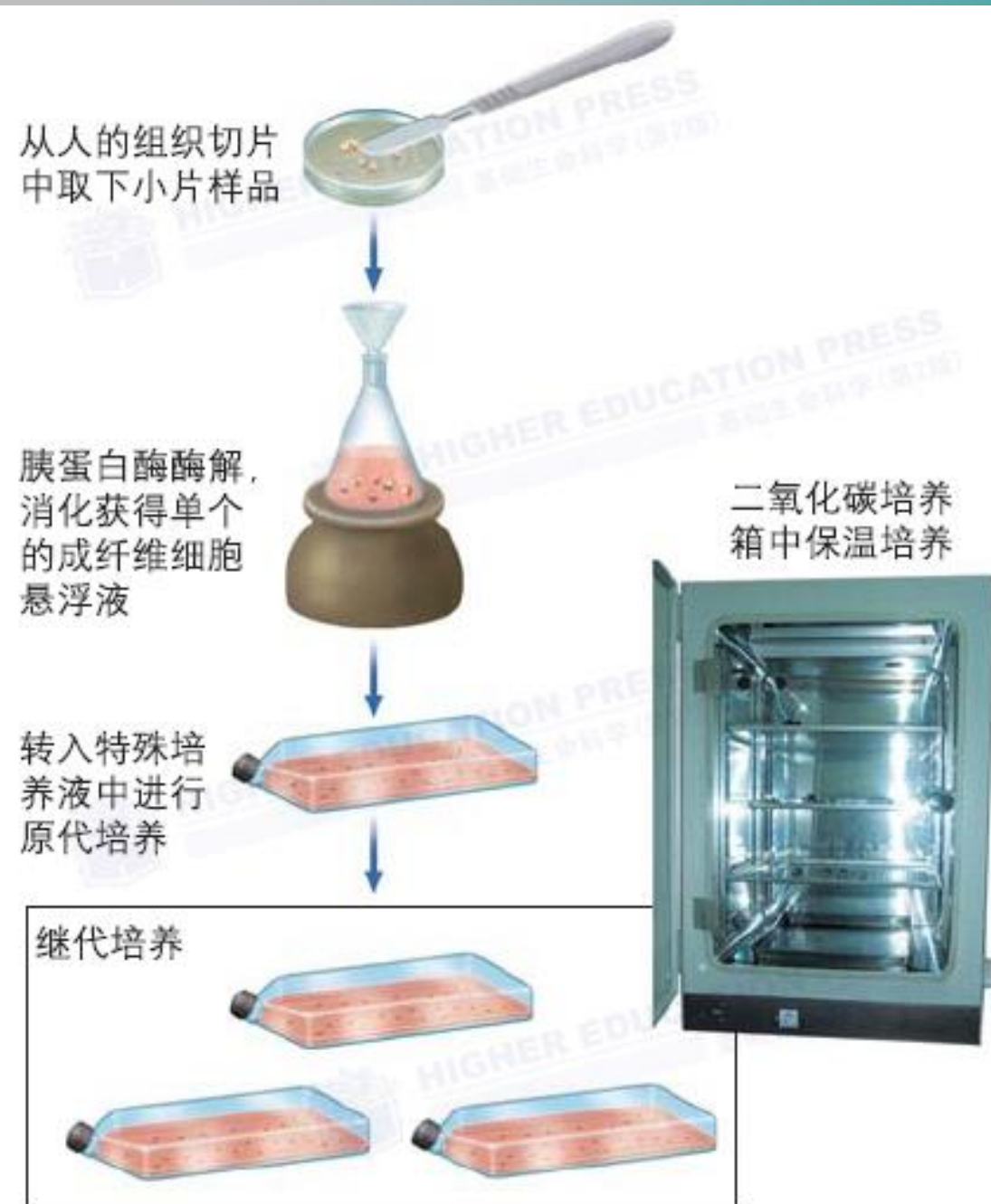
• 单体为:



• n 可取600-25 000

三、细胞工程

- **细胞工程**是指通过组织、细胞和细胞器水平上的筛选或改造，获得有商业价值的细胞株、细胞系或细胞组织，再通过规模培养，获得特殊商品的技术与过程。
- **动物细胞培养**：体外培养可分为**原代培养**与**继代培养**。
- **动物细胞培养的操作步骤**包括：
 - (1) 对动物体的胚胎、肌肉、肾等组织经酶解消化分离出单个细胞。
 - (2) 将分散的细胞转入含有葡萄糖、氨基酸和无机盐的特殊培养液中，于二氧化碳培养箱中进行保温培养。
 - (3) 再将原代细胞分装到多个扁形的瓶中进行继代培养。



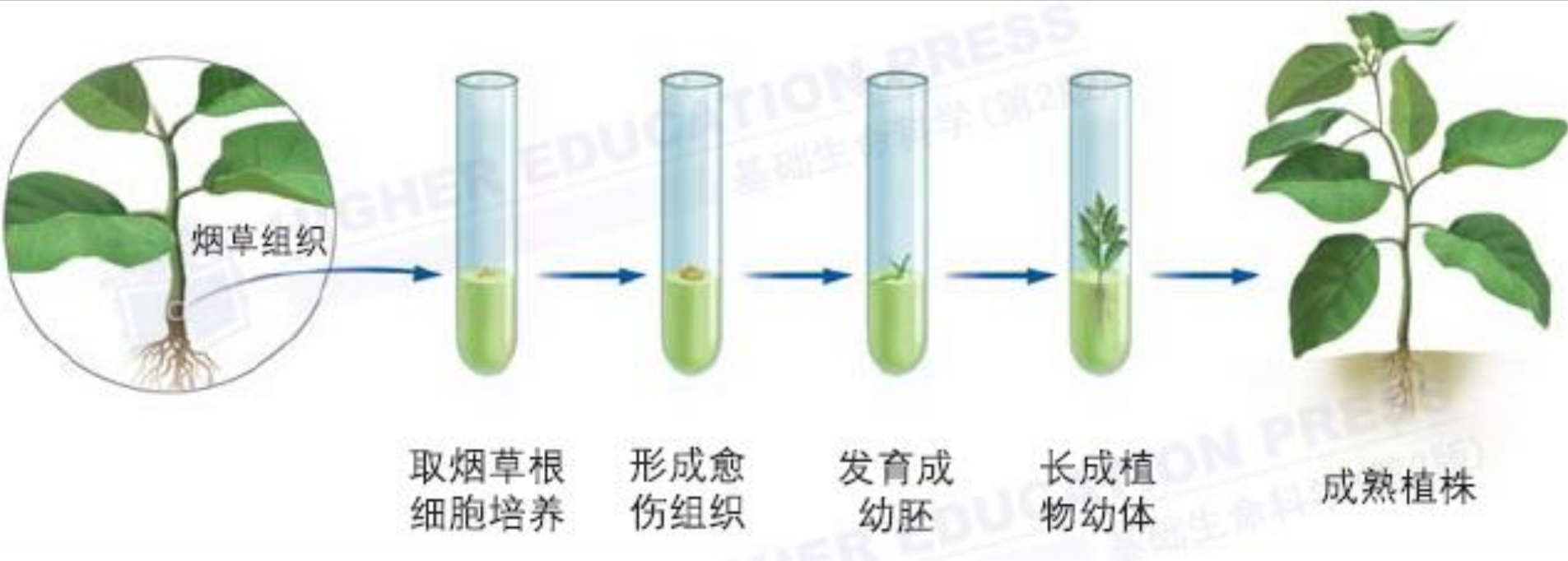
动物细胞培养的操作步骤。

返回

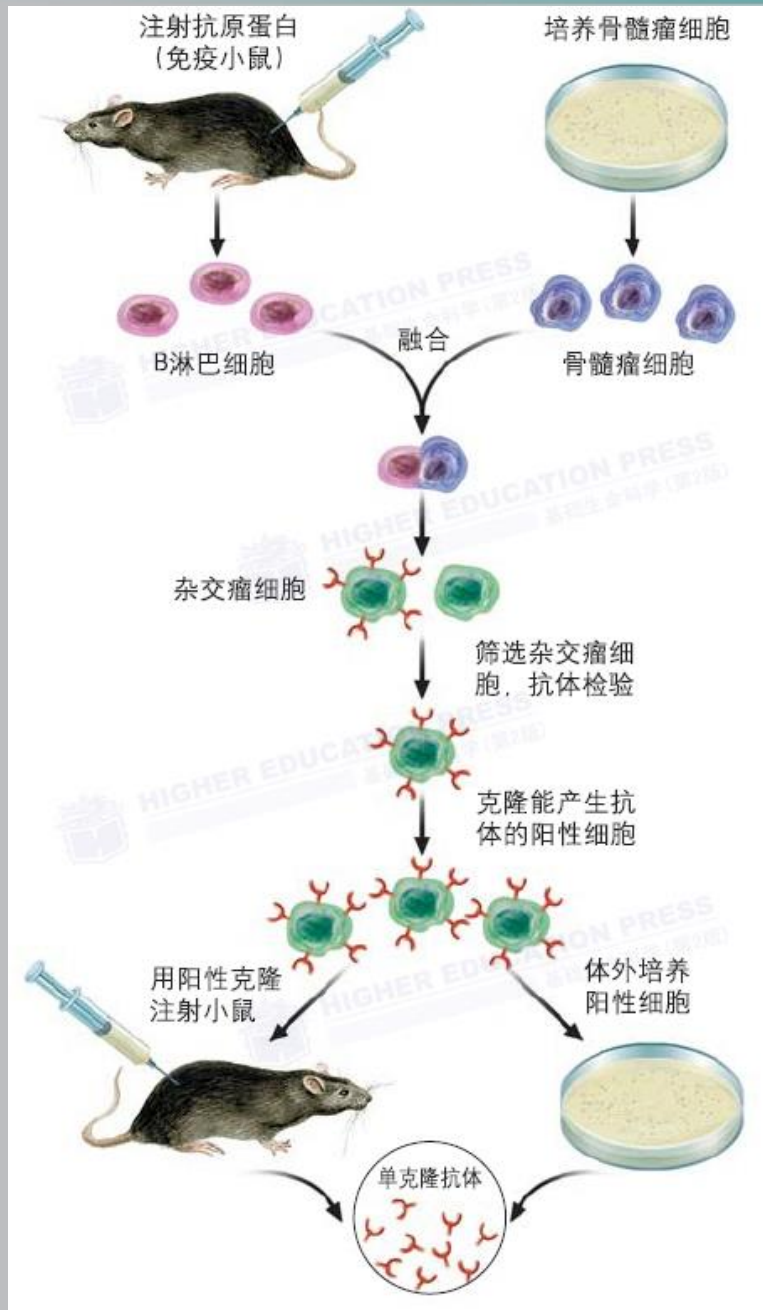
■植物细胞培养与动物细胞相比有较大的差异。一些单细胞的低等植物如单细胞藻类的大规模培养成为细胞工程的重要组成部分，原因是微体藻类本身的优点与特征：

- (1) 没有根、茎、叶，整个植物体都具有营养价值，只有极少的细胞部分难以消化。
- (2) 有些单细胞微藻含有大量的蛋白质，有些单细胞微藻含有其他具有特殊商业用途的精细化学成分。
- (3) 微藻具有很高的高产潜力，可通过调节种群密度，搅拌使细胞运动，获得高效的太阳能利用与转化。
- (4) 生活史可控制，生产周期短。
- (5) 不需要土壤，不与农业争土地。可利用海水进行大规模培养和生产，开发海洋。
- (6) 可连续培养，每天收获，生产过程易自动化。

高等植物细胞具有全能性。从高等植物的幼胚以及根、茎、叶、花和果实等不同器官的组织中分离的单个细胞，经过特殊培养形成愈伤组织，并可进一步诱导生成完整的植株。利用细胞分离改造及组织培养技术，可从植物细胞中获得大量需要的产物。



- **细胞融合**是将不同种类的两种细胞经过特殊处理后放在一起，在促融因子作用下发生融合，形成杂种细胞。
- **细胞重组**是把不同种类细胞的细胞器重新组合装配，包括核的移植、叶绿体移植、核糖体重建及线粒体装配等。**核移植技术**是借助于显微操作把一个细胞中的核吸出，再注射到另一个除去核的细胞中。
- **杂交瘤技术**是通过细胞融合产生特异杂交瘤细胞，进而使杂交瘤细胞产生单一的抗体（**单克隆抗体**），在医药业用作药物和诊断试剂。
- **制备单克隆抗体的过程**涉及细胞培养、细胞融合等多种步骤。单克隆抗体技术现已应用于临床诊断和疾病的治疗，在癌症的研究治疗中也具有应用潜力。



制备单克隆抗体的过程涉及细胞培养、细胞融合等多种步骤。

第四节 生物技术在农业、医药等方面的应用

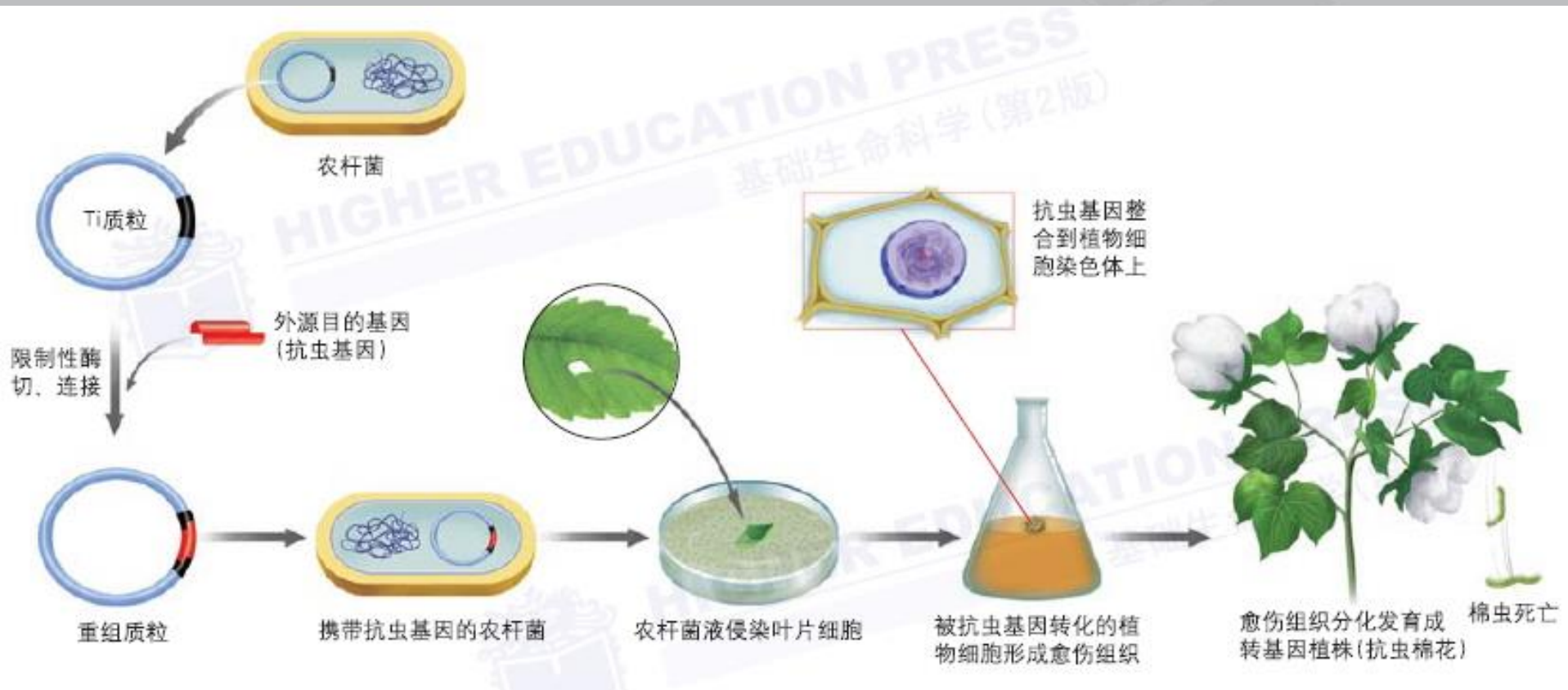
一、农业生物技术

- 基因工程技术在农业上的应用最为广泛。目前转基因动物主要应用于促进动物生长，改善畜产品的产量，提高动物的抗病性和**生产药用蛋白**等。畜牧业中的基因工程产品还包括动物疫苗、生长激素等。
- 植物基因工程在种植业生产上显示了更好的应用前景。如用**农杆菌Ti质粒转化植物**培养出具有抗化学除草剂的转基因植物，**转基因番茄**，转*Bt*基因作物等。
- 基因工程技术还被应用于环境保护，如利用转基因微生物吸收环境中的重金属，降解有毒有害化合物，处理工业废水等方面的研究已经取得了许多进展。



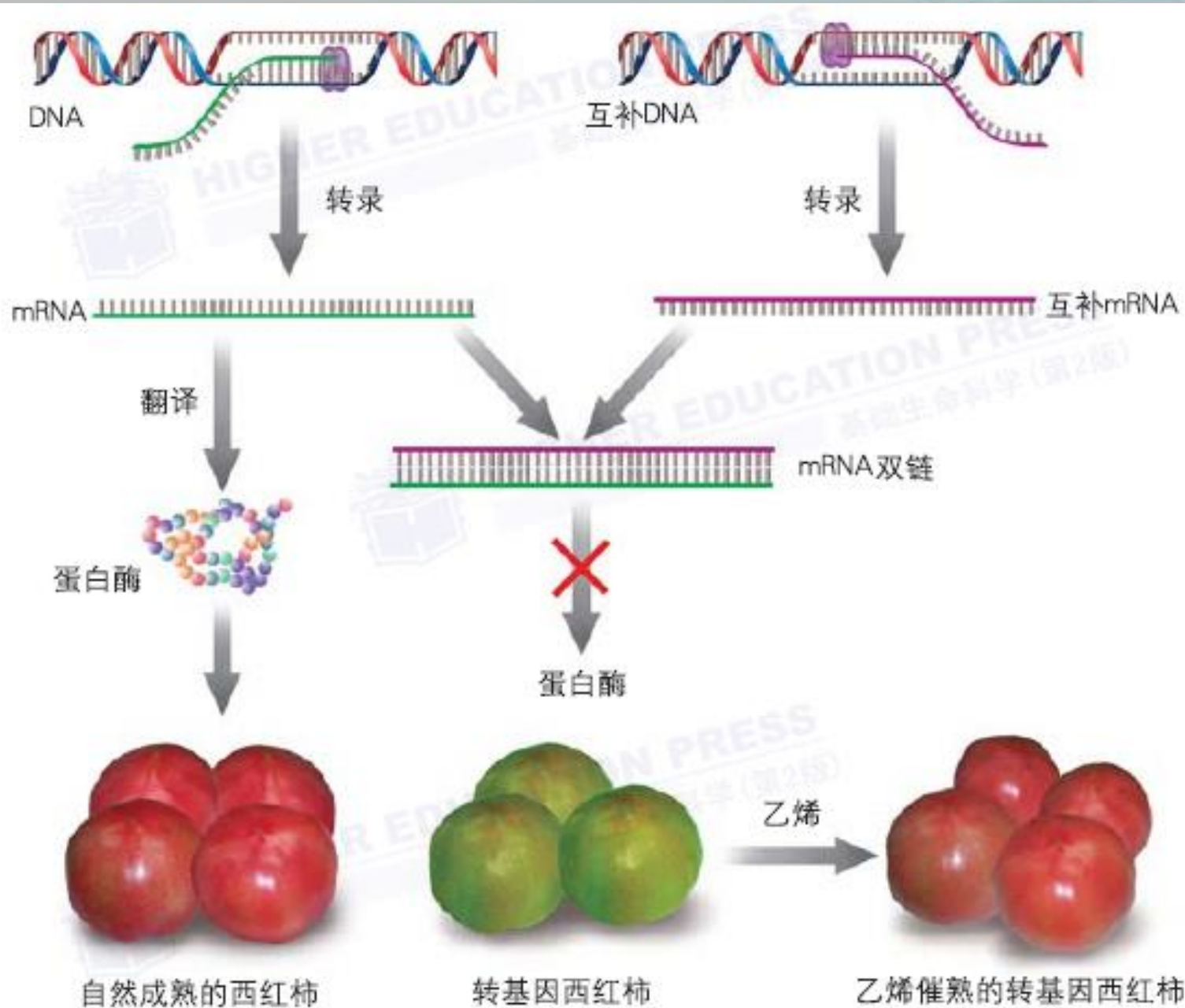
科学家从利用基因工程技术获得的转基因羊的羊奶中，提取出了一种治疗心脏病的药物tPA。

返回



用携带了外源基因的农杆菌Ti质粒转化植物原生质体，发育成具有新性状的完整植株——转基因植物。

返回

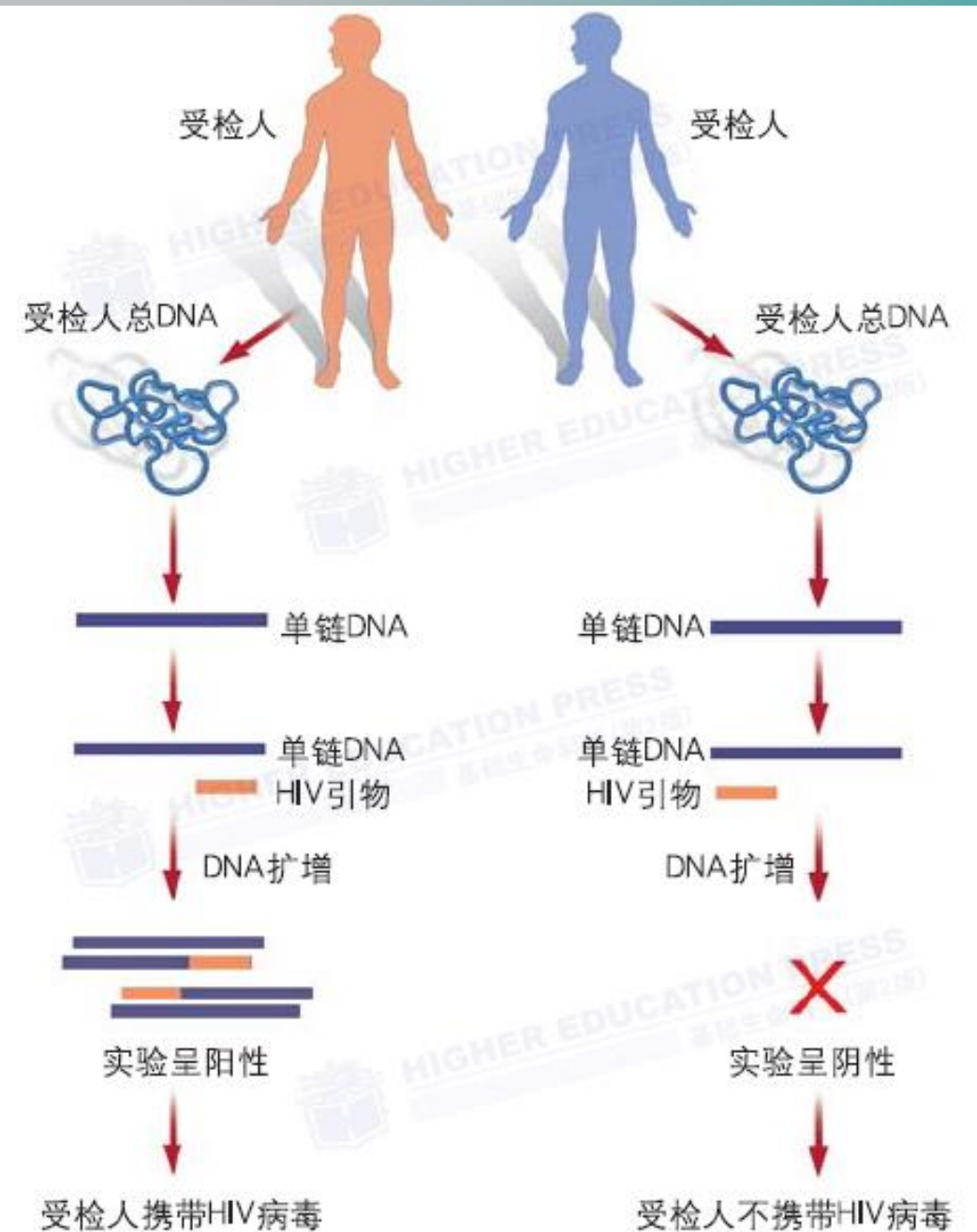


转基因番茄。

返回

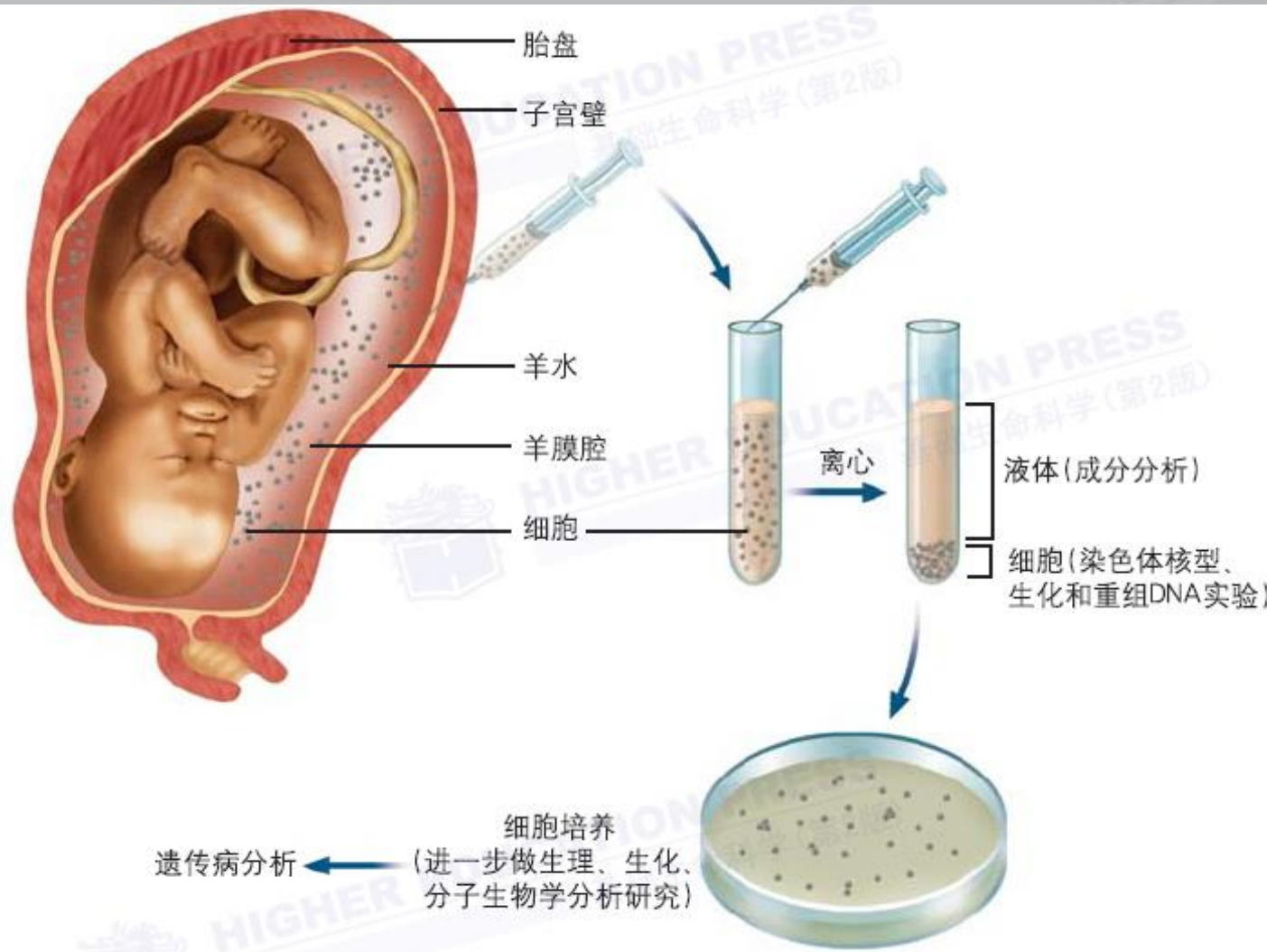
二、分子诊断

- 在临床上，分子生物学技术的应用首先为传染性疾病的诊断开辟了崭新的途径。利用PCR技术或PCR与分子杂交标记相结合，可以快速准确地检测出病原性物质。分子生物学技术应用于传染性疾病的诊断具有专一性强，灵敏度高，且抗干扰好和操作快速简便等优点。
- 人类遗传性疾病可用分子生物学技术做出早期诊断。胎儿出生前诊断应用最多的方法是羊水和胎盘绒毛膜检测，如镰形细胞贫血症胎儿出生前的基因组型分析。
- 特异性互补寡核苷酸法：该方法根据被检基因特定的DNA序列人工合成两种特异性的寡核苷酸分子探针（ASO），一种与正常的基因序列完全互补，另一种与突变的基因序列完全互补。



利用PCR技术或PCR与分子杂交标记相结合，可以快速准确地检测出病原性物质。

返回



胎儿出生前
诊断应用羊水和
胎盘绒毛膜检测
遗传病。

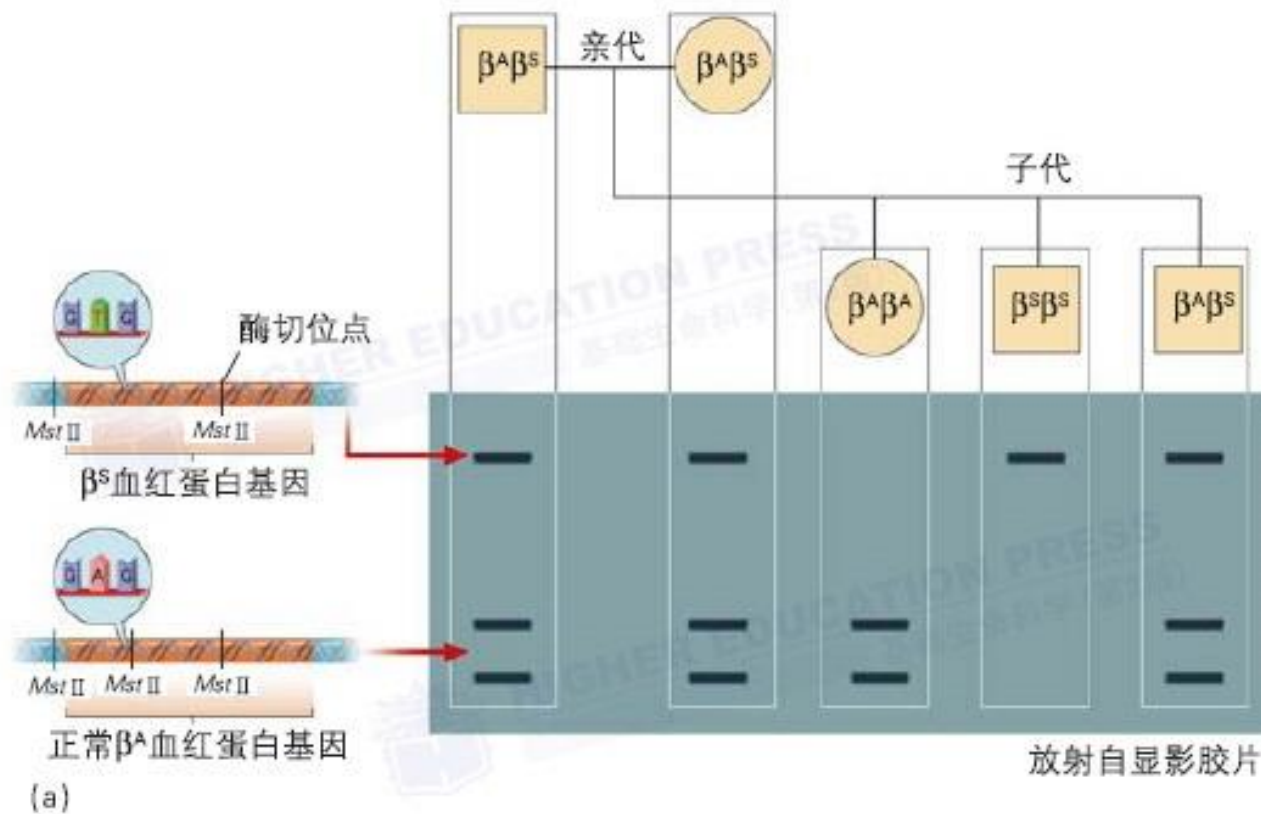


正常红细胞

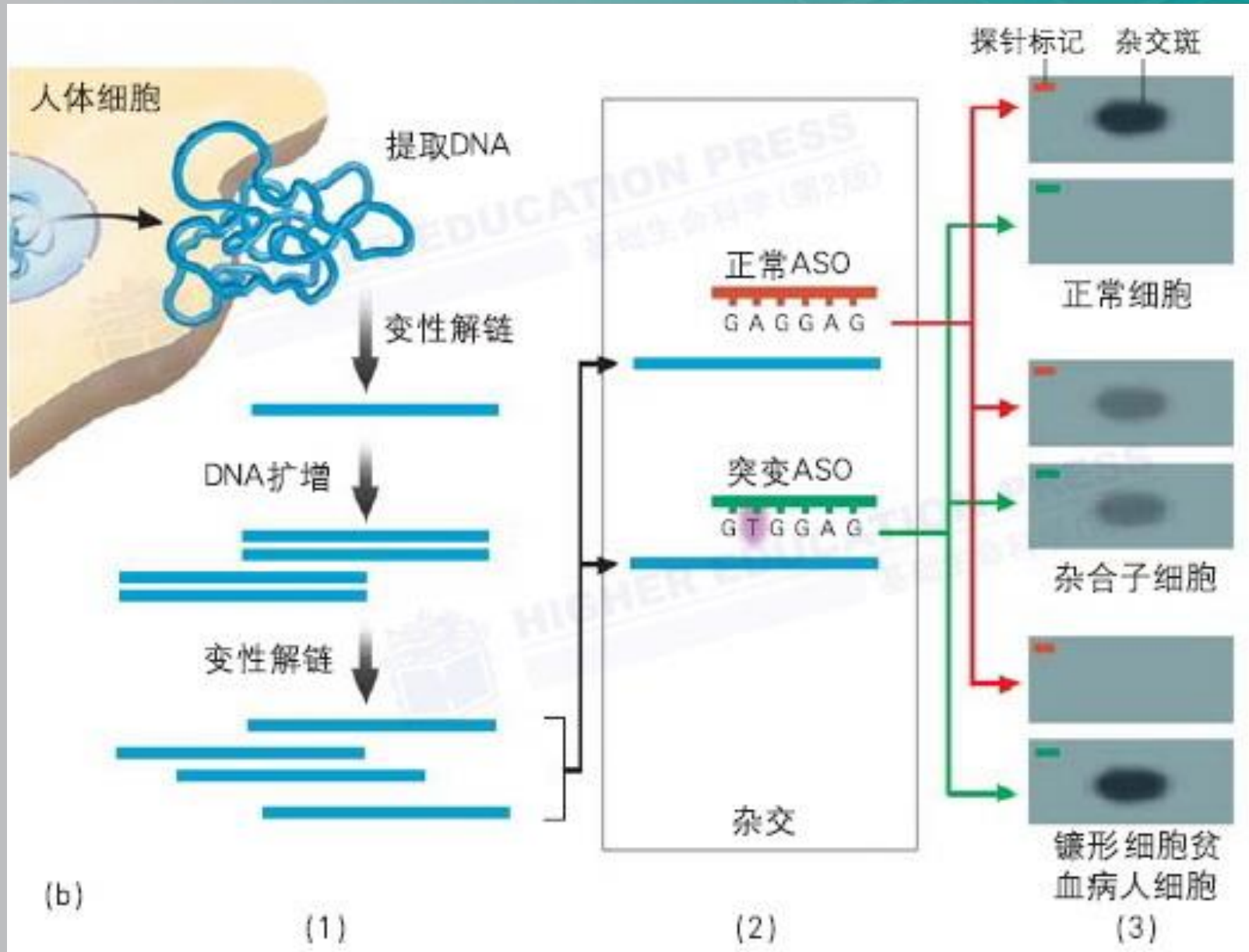


镰形红细胞

镰形细胞贫血症的早期诊断。



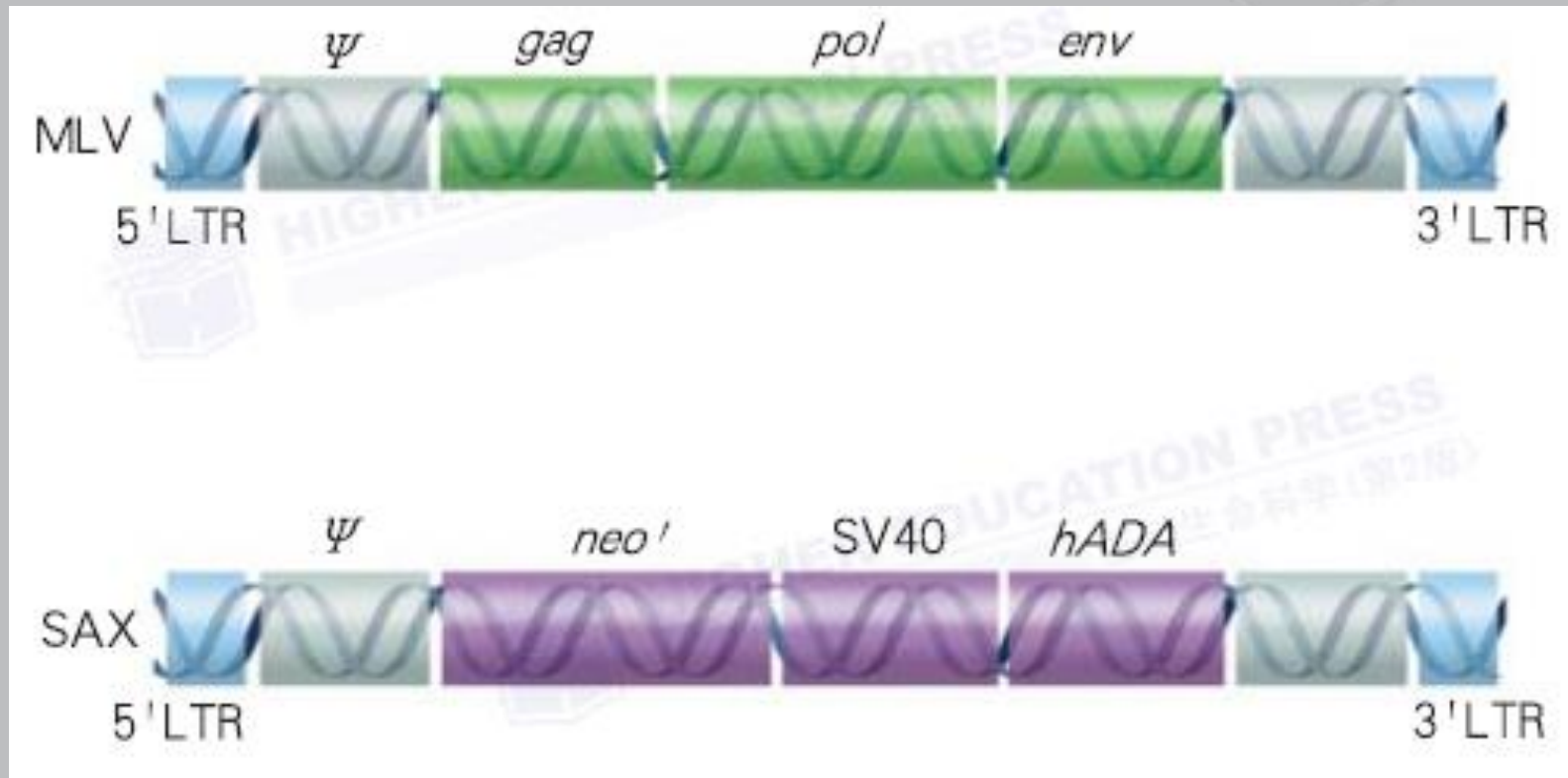
返回



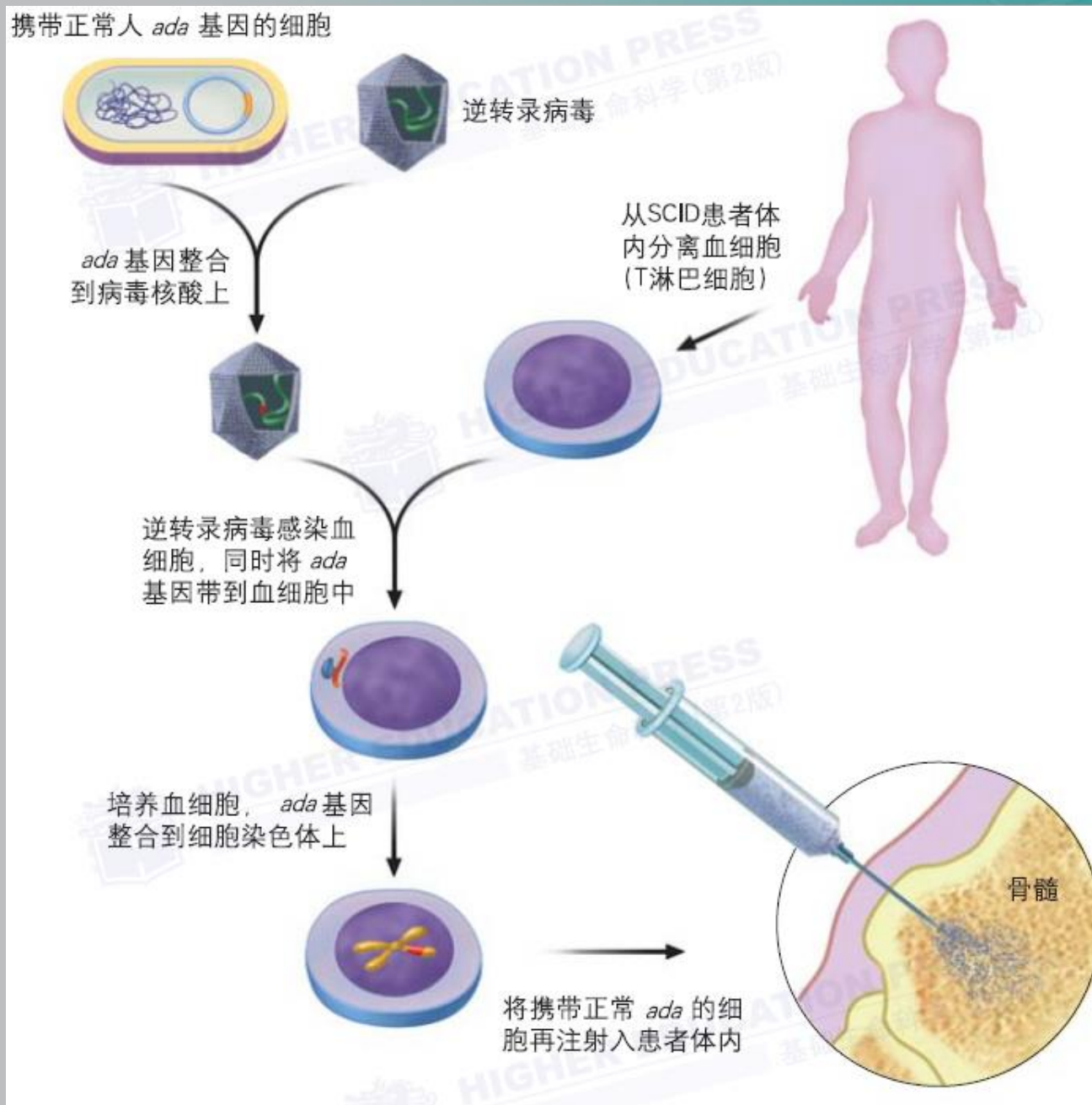
镰形细胞贫血症的ASO方法诊断。

三、基因治疗

- **基因治疗**就是利用基因工程技术来治疗人类遗传性疾病和多因素疾病。
- 基因治疗通常需要在DNA水平上认识发病机制，掌握了基因的克隆分离、体外操作和适量表达的技术，还要应用合适的载体或基因转移系统（如逆转录病毒）将人正常的结构基因以及相关的调节序列送入到人体组织和细胞中去，使之稳定、安全地表达。如重症综合性免疫缺乏症（SCID）的基因治疗。
- **RNA干扰技术**在基因治疗研究中显示了良好的应用前景，所谓RNA干扰（RNAi）技术，就是利用一小段双链RNA（dsRNA）导入人体或其他哺乳动物细胞中，使特定的基因表达产生沉默。

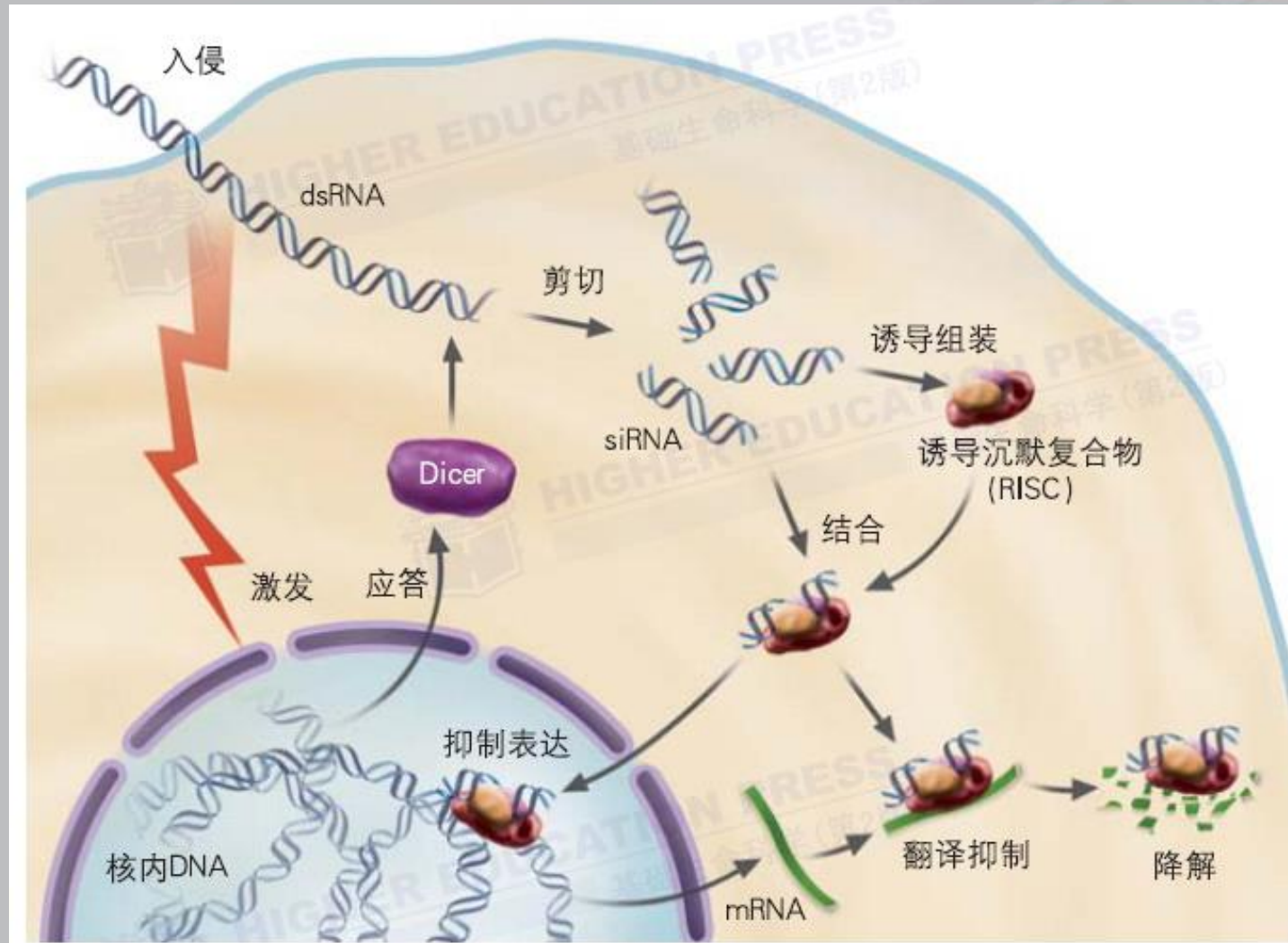


逆转录病毒作为基因治疗的转移系统



转基因T淋巴细胞注射到人体骨髓组织中治疗重症综合性免疫缺乏症。

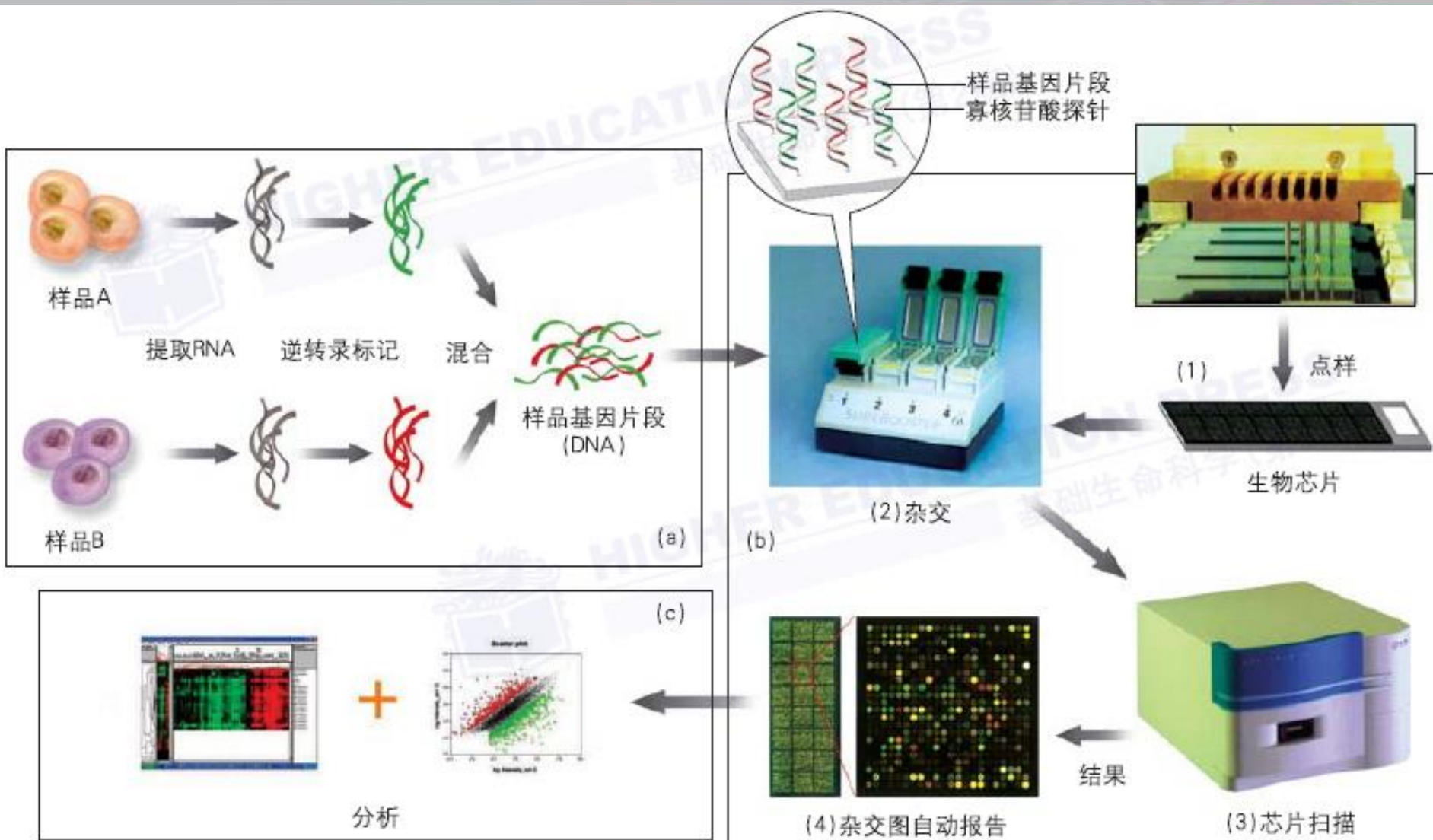
返回



RNA干扰技术原理示意图

四、生物芯片技术

- **生物芯片**是指本身贮存有大量的生物信息，并能够对生物分子或组分进行高通量快速并行处理和分析的薄型固体器件。
- 目前最主要的生物芯片都是**DNA芯片**或**基因芯片**，它们是DNA杂交探针技术与半导体工业技术相结合的结晶。该技术系指将大量（通常每平方厘米点阵密度高于400）探针分子固定于支持物上后与带荧光标记的DNA样品分子进行杂交，通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取样品分子的数量和序列信息。
- DNA芯片由于同时将大量探针固定于支持物上，所以可以一次性对样品大量序列进行检测和分析。



DNA芯片

返回

- 通过设计不同的探针阵列、使用特定的分析方法可使该技术具有多种应用价值，如基因表达谱测定、突变检测、多态性分析、基因组文库作图及杂交测序等。
- DNA芯片可用于大规模筛查由基因突变所引起的疾病，预计DNA芯片诊断技术不久将会在疾病的分子诊断方面得到广泛的应用。
- 人类基因组计划完成后，利用DNA芯片分析基因组及发现新基因等具有很大的优势。DNA芯片技术用于基因组分析时，具有样品用量小、信息量大、分析方法简易快速、自动化程度高等多项优点。
- 生物芯片具有仪器体积小、重量轻、便于携带等特点，作为一项全新的技术，具有集成化、并行化、高通量、自动化和微型化的优势，在许多领域具有广泛的应用。

第五节 生物技术面临的问题与挑战

一、转基因技术的安全性问题

- 科学是一把双刃剑，生物技术的发展为人类带来了巨大的利益，也带来了某些潜在的威胁和社会伦理等问题。
- 基因工程是现代生物技术发展最快的领域，其核心技术是在基因水平上进行操作（如**转基因食物**），改变已有的基因，改良甚至创造新的物种。
- DNA是生命的蓝图，基因一旦被改动，一方面可能引起生物体内一系列未知的结构与功能的变化；另一方面，转基因操作对生物体的影响会通过遗传传递，产生无数拷贝并代代相传。
- 如果转基因技术应用不当，一旦产生不良后果，其危害会不断扩展和传递。

生物转基因技术



转基因黄瓜

转基因西红柿

转基因小麦

转基因水稻

转基因玉米

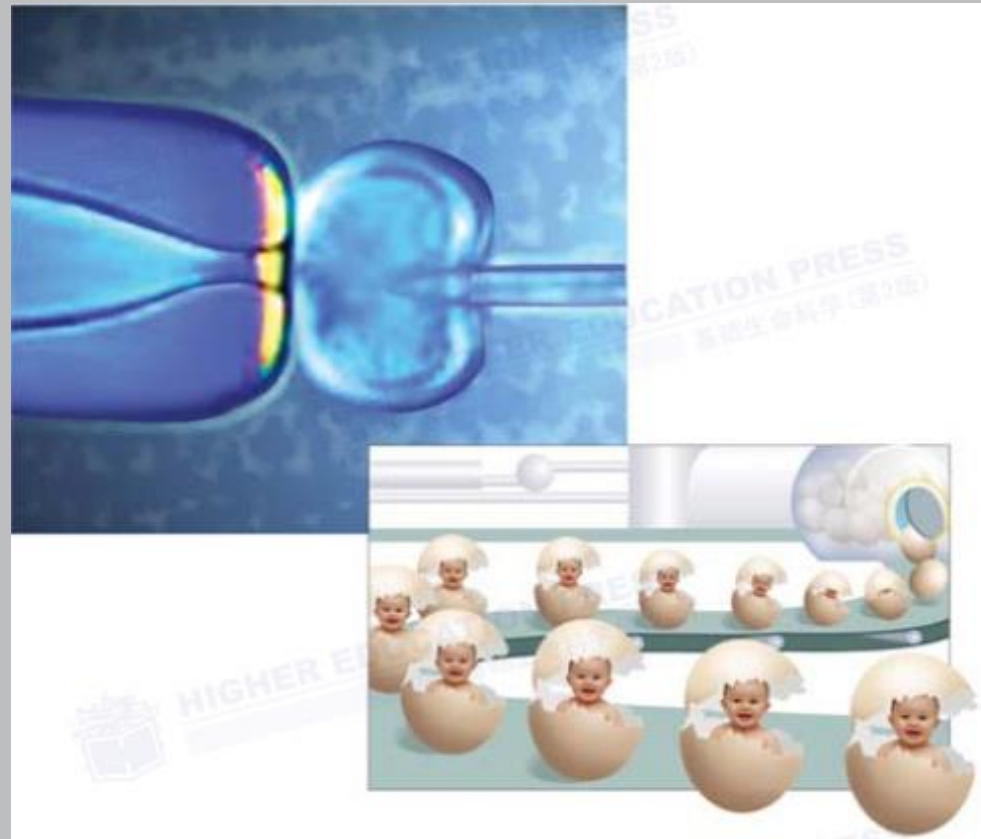
转基因大豆

转基因食物

返回

二、克隆人的伦理问题

- 从理论和技术层面上来看，实现人的克隆是完全可能的。
- 克隆动物技术发展引发的威胁人类社会现有法律、伦理、道德和观念的问题是人类必须面对的严峻挑战。
- 应该支持用于医学和维护人类健康的克隆研究实验。



三、个人基因信息的隐私权问题

- 作为人类基因组计划的一部分，还特别设立了人类基因信息利用的伦理、法律和社会影响计划，称之为ELSI项目。ELSI项目主要关注以下4方面：
 - (1) 在应用和解释基因信息时的隐私权和公正性。
 - (2) 基因信息由实验室研究向实际医疗应用的转化。
 - (3) 人类基因组计划参与者相互协调和成果发布。
 - (4) 公众与专业教育。
- 个人的基因信息资料由谁来负责保管、保护和保密，有基因缺陷或差异的人在社会活动中是否能受到真正平等和公正的对待。

四、基因治疗的应用范围问题

- 从社会伦理和人类自身安全考虑，基因治疗仍然需要限制或规范在一定的应用范围中。
- 涉及基因治疗应用范围的另一个问题是基因治疗技术是否不仅限于疾病治疗，还可用于增强人的体能。

五、生物技术引发的其他问题

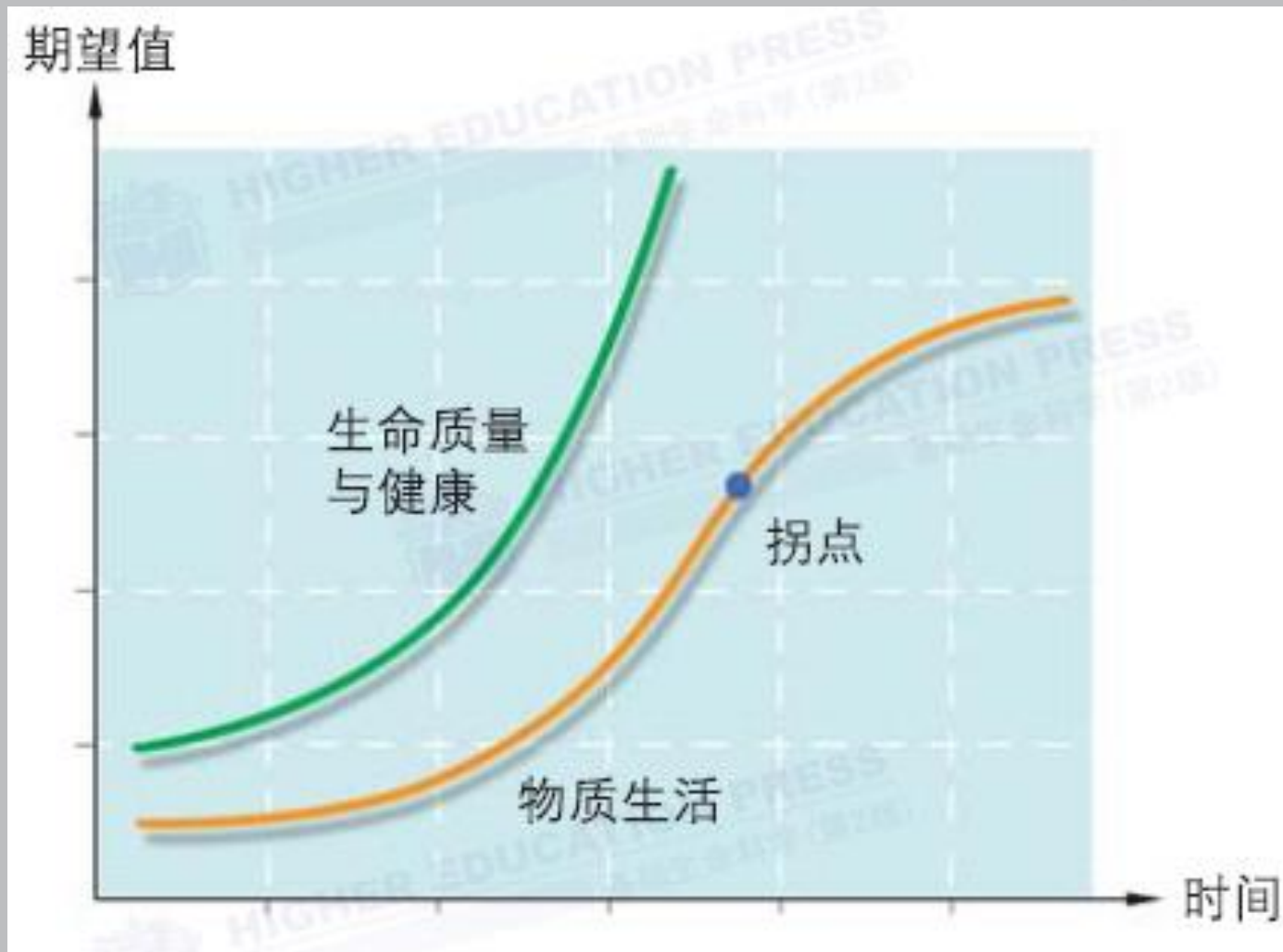
- 生命伦理学专家提出了自主、有利、不伤害、公正四原则来面对生物科技引发的伦理难题。
- 生物技术除了引发伦理问题，还引发了许多社会问题。
- 在加强生命科学基础知识学习的基础上，由自己对这些问题做出判断。

第六节 生物科技造福人类

一、21世纪是生物科技大发展的世纪

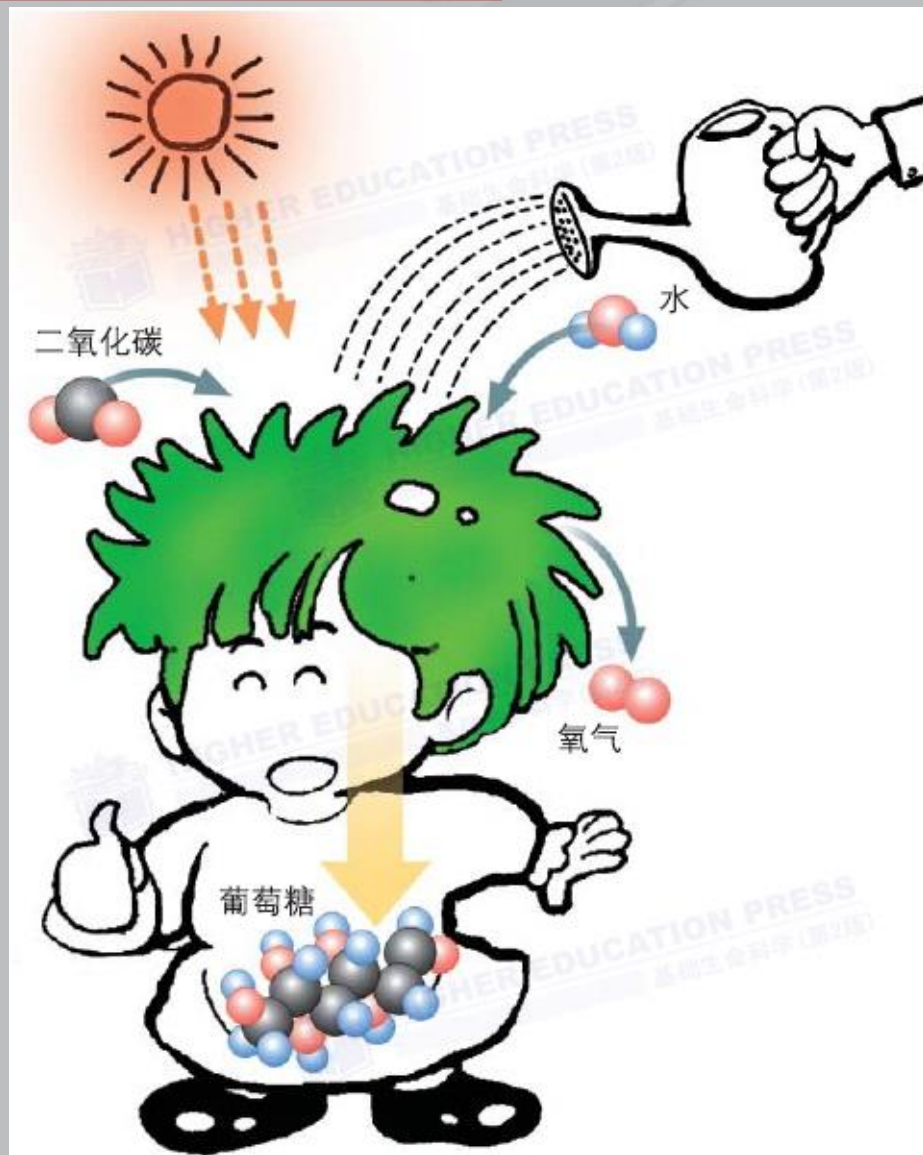
- 生物技术发展的正面作用要远远大于负面作用，而且在实践和发展中，人类也有智慧和能力来面对并逐步解决好由生物技术引发的一系列问题。
- 解决人类生存与发展面临的一系列重大问题和挑战，在很大程度上将依赖于生命科学的发展。生命科学对人类经济、科技、政治和社会发展的作用是全方位的。
- 与生命科技发展同步，人类社会进入21世纪以后，生物技术产业正在全世界范围内高速成长。继信息技术产业拉动信息经济以后，生物技术产业拉动生物经济的时代即将到来。

21世纪的人类对生命质量和生命健康的追求与期望会越来越高。



二、生命有形，梦想无限——代结束语

- 生命之美不但在“形”，更在其内在的规律及本质。人是生命的最高级形式，人体之美不但在“形”，更在其创新的思维和梦想。
- 生命是一种艺术，这种艺术的精彩与魅力就在于：生命有形，梦想无限！



本章摘要

生物技术是“应用生物或来自生物体的物质制造或改进一种商品的技术，其还包括改良有重要经济价值的植物与动物以及利用微生物改良环境的技术”。高技术、高投入、高利润是生物技术产业的显著特点。生物技术通常包括基因工程、细胞工程、发酵工程和蛋白质（酶）工程4个方面内容。

重组DNA技术是基因工程的核心技术。一般重组DNA操作通常包括：①获得目的基因。②与克隆载体连接形成重组DNA分子。③用重组DNA分子转化受体细胞。④对转化子进行筛选和鉴定。⑤对获得外源基因的细胞或生物体通过发酵、细胞培养、养殖或栽培等，最终获得所需要的遗传性状或表达出所需要的产物。获得目的基因的常用方法包括直接从生物体中提取总DNA，构建基因文库，从中调用目的基因；以mRNA为模板，人工合成互补的DNA片段；利用聚合酶链反应（PCR）特异性地扩增所需要的目的基因片段等。可用紫外分光光度计测定DNA溶液的纯度和浓度。限制性内切酶是从细菌中分离提纯的核酸内切酶，可以识别一小段特殊的核酸序列并将其在特定位点处切开。凝胶电泳是用于分离、纯化和鉴定DNA片段最常规的实验技术。可利用载体转化法和基因的直接转移等技术将外源目的基因转入合适的宿主细胞中进行表达，用Southern印迹进行检测和分析。

分子诊断是利用分子生物学的手段如PCR、限制性酶切、克隆、核酸杂交等对多种疾病，特别是对遗传性疾病作出早期诊断的技术。在临床上，分子生物学技术的应用为传染性疾病和其他疾病的诊断开辟了崭新的高效途径。利用基因工程技术来治疗人类遗传性疾病和多因素疾病称为基因治疗。RNAi是一种操纵基因表达、使特定基因沉默的新技术，它有望用于基因治疗或基因药物的研制。基因治疗的研究和应用对疾病的防治具有良好的应用前景。

目前最主要的生物芯片是DNA芯片或基因芯片，它们是DNA杂交探针技术与半导体工业技术相结合的结晶。该技术系指将大量探针分子固定于支持物上后与标记的DNA样品分子进行杂交，通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取样品分子的数量和序列信息。生物芯片具有仪器体积小、重量轻、便于携带等特点，在医学、化学、新药开发、司法鉴定、农业技术和食品技术领域具有广泛的应用。

蛋白质工程的主要步骤通常包括：从生物体中分离纯化需要改造的目的蛋白；测定其氨基酸序列；借助于核磁共振和X射线晶体衍射等实验手段，尽可能地了解蛋白质的二维重组和三维晶体结构；设计各种处理条件，了解蛋白质的结构变化，包括折叠与去折叠等对其活性与功能的影响；对编码该蛋白的基因设计改造方案，使蛋白质的活性中心或整个构象发生变化；分离、纯化新蛋白，功能检测后投入实际使用。

现代发酵工程主要是指利用微生物，包括利用经过DNA重组技术改造过的微生物在全自动发酵罐或生物反应器中生产某种商品的技术。一般发酵工程的步骤包括菌种选育；细胞大规模培养即发酵过程；生产活性的诱导；菌体及产物的收获和从细胞或培养液中分离纯化所需要的代谢产物。

细胞工程是指通过组织细胞和细胞器水平上的筛选或改造，获得有商业价值的细胞株、细胞系或细胞组织，再通过规模培养，获得特殊商品的技术与过程。细胞工程包括动物细胞工程和植物细胞工程。制备单克隆抗体涉及细胞培养、细胞融合等多种步骤。即向小鼠体内注射特定的抗原蛋白，从免疫后的小鼠脾中分离出能分泌特定抗体的B淋巴细胞。将B淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，从获得的杂交细胞中筛选出能产生特定抗体的克隆。单克隆抗体技术已应用于临床诊断和疾病治疗，单克隆抗体药物又被称为医药领域的分子导弹。

转基因技术的安全性问题、克隆人的伦理问题、个人基因信息的隐私权问题、基因治疗的应用范围问题等都是当今人类面临的由生物技术引发的新问题。21世纪，生命科学成为自然科学的带头学科，并将人类社会推进到“生物技术和生物经济的时代”。