

## 专题1 基因工程

基因工程是指按照人们的愿望，进行严格的设计，并通过体外 DNA 重组和转基因等技术，赋予生物以新的遗传特性，从而创造出更符合人们需要的新的生物类型和生物产品。由于基因工程是在 DNA 分子水平上进行设计和施工的，因此又叫做 DNA 重组技术。

### 科技探索之路 基础理论和技术的发展催生了基因工程

#### 20 世纪中叶，基础理论取得了重大突破

##### ●DNA 是遗传物质的证明

1944 年，艾弗里等人通过不同类型肺炎双球菌的转化实验，不仅证明了生物的遗传物质是 DNA，还证明了 DNA 可以从一种生物个体转移到另一种生物个体。

##### ●DNA 双螺旋结构和中心法则的确立

1953 年，沃森和克里克建立了 DNA 双螺旋结构模型。

1958 年，梅塞尔松和斯塔尔用实验证明 DNA 的半保留复制。随后不久确立的中心法则，解开了 DNA 复制、转录和翻译过程之谜，阐明了遗传信息流动的方向。

##### ●遗传密码的破译

1963 年，尼伦伯格和马太破译编码氨基酸的遗传密码。

1966 年，霍拉纳用实验证实了尼伦伯格提出的遗传密码的存在。这些成果不仅使人们认识到，自然界中从微生物到人类共用一套遗传密码，而且为基因的分离和合成等提供了理论依据。 公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

#### 技术发明使基因工程的实施成为可能

##### ●基因转移载体的发现

1967 年，罗思和赫林斯基发现细菌拟核 DNA 之外的质粒有自我复制能力，并可以在细菌细胞间转移，这一发现为基因转移找到了一种运载工具。

##### ●工具酶的发现

1970 年，阿尔伯、内森斯，史密斯在细菌中发现了第一个限制性内切酶（简称限制酶）后，20 世纪 70 年代初相继发现了多种限制酶和连接酶，以及逆转录酶，这些发现为 DNA 的切割、连接以及功能基因的获得创造了条件。

##### ●DNA 合成和测序技术的发明

自 1965 年，桑格发明氨基酸序列分析技术后，1977 年，科学家又发明了 DNA 序列分析的方法，为基因序列图的绘制提供了可能，之后，DNA 合成仪的问世又为引物、探针和小分子量 DNA 基因的获得提供了方便。

##### ●DNA 体外重组的实现

1972 年伯格首先在体外进行了 DNA 改造的研究，成功地构建了第一个体外重组 DNA 分子。

#### 重组 DNA 表达实验的成功

1973 年，博耶和科恩选用仅含单一 EcoRI 酶切位点的载体质粒 pSC101，使之与非洲爪蟾核糖体蛋白基因的 DNA 片段重组。重组的 DNA 转入大肠杆菌 DNA 中，转录出相应的 mRNA。这个实验证明了①质粒不仅可以作为基因工程的载体，②重组 DNA 还可以进入受体细胞，③外源基因可以在原核细胞中成功表达，并实现物种之间的基因交流。至此，基因工程正式问世。

#### 第一例转基因动物问世

1980 年，科学家首次通过显微注射培育出世界上第一个转基因小鼠。1983 年，科学家又采用农杆菌转化法，培育出世界上第一例转基因烟草。此后，基因工程进入了迅速发展阶段。

#### PCR 技术的发明

基因工程问世后，1988 年由穆里斯发明的 PCR 技术，使基因工程技术得到了进一步发展和完善。

## 1.1 DNA 重组技术的基本工具

我国拥有自主知识产权的转基因抗虫棉的培育，首先要在体外对含有抗虫基因的 DNA 分子进行“切割”、改造、修饰和“拼接”，然后，导入棉花体细胞内，并使重组 DNA 在细胞中表达。

### 限制性核酸内切酶——“分子手术刀”

切割 DNA 的工具是限制性核酸内切酶，又称限制酶。这类酶主要是从原核生物中分离纯化出来的。它们能够识别双链 DNA 分子的某种特定核苷酸序列，并且使每一条链中特定部位的两个核苷酸之间的磷酸二酯键断开。大多数限制酶的识别序列由 6 个核苷酸组成，例如，*EcoRI*、*SmaI* 限制酶识别的序列均为 6 个核苷酸，也有少数限制酶的识别序列由 4、5 或 8 个核苷酸组成。DNA 分子经限制酶切割产生的 DNA 片段末端通常有两种形式——黏性末端和平末端。当限制酶在它识别序列的中心轴线两侧将 DNA 的两条链分别切开时，产生的是黏性末端，而当限制酶在它识别序列的中心轴线处切开时，产生的则是平末端。

**寻根问底：**根据你所掌握的知识，你能推测限制酶存在于原核生物中的作用是什么吗？

提示：原核生物容易受到自然界外源 DNA 的入侵。限制酶就是细菌的一种防御性工具，限制酶在原核生物中主要起到切割外源 DNA、使之失效，从而达到保护自身的目的。

### 生物技术资料卡：限制酶的命名

用生物属名的头一个字母与种名的头两个字母，组成了 3 个字母的略语，以此来表示这个酶是从哪个生物中分离出来的。例如，一种限制酶是从大肠杆菌（*Escherichia coli*）的 R 型菌株分离来的，就用字母 *EcoR* 表示；如果它是从大肠杆菌 R 菌株中分离出来的第一个限制酶，则进一步表示成 *EcoRI*。

### DNA 连接酶——“分子缝合针”

将切下来的 DNA 片段拼接成新的 DNA 分子，是靠 DNA 连接酶来完成的。根据酶的来源不同，可以将这些酶分为两类：一类是从大肠杆菌中分离得到的，称为 *E. coli* DNA 连接酶；另一类是从 T<sub>4</sub>噬菌体中分离出来的，称为 T<sub>4</sub>DNA 连接酶。这两类酶都是将双链 DNA 片段“缝合”起来，恢复被限制酶切开的两个核苷酸之间的磷酸二酯键。*E. coli* DNA 连接酶只能将双链 DNA 片段互补的黏性末端之间连接起来。而 T<sub>4</sub>DNA 连接酶既可以“缝合”双链 DNA 片段互补的黏性末端，又可以“缝合”双链 DNA 片段的平末端，但连接平末端之间的效率比较低。

**寻根问底：**DNA 连接酶与 DNA 聚合酶是一回事吗？为什么？

提示：（1）DNA 聚合酶只能将单个核苷酸加到已有的核酸片段的 3' 末端的羟基上，形成磷酸二酯键；而 DNA 连接酶是在两个 DNA 片段之间形成磷酸二酯键。

（2）DNA 聚合酶起作用时需要以一条 DNA 链为模板；而 DNA 连接酶是将 DNA 双链上的两个缺口同时连接起来。因此 DNA 连接酶不需要模板。

旁栏思考：想一想，具备什么条件才能充当“分子运输车”？

提示：能自我复制、有一个或多个切割位点、有标记基因位点及对受体细胞无害等。

### 基因进入受体细胞的载体——“分子运输车”

通常是利用质粒作为载体，将基因送入细胞中。质粒是一种裸露的、结构简单、独立于细菌拟核 DNA 之外，并具有自我复制能力的很小的双链环状 DNA 分子。

质粒 DNA 分子上有一个至多个限制酶切割位点，供外源 DNA 片段（基因）插入其中。

携带外源 DNA 片段的质粒进入受体细胞后，在细胞中进行自我复制，或整合到染色体 DNA 上，随染色体 DNA 进行同步复制。

质粒 DNA 分子上有特殊的标记基因，如四环素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因等标记基因，供重组 DNA 的鉴定和选择。

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

在基因工程中使用的载体除质粒外，还有λ噬菌体的衍生物、动植物病毒等。在进行基因工程操作中，真正被用作载体的质粒，都是在天然质粒的基础上进行过人工改造的。

2. 联系你已有的知识，想一想，为什么限制酶不剪切细菌本身的 DNA？

提示：生物在长期演化过程中，含有某种限制酶的细胞，其 DNA 分子中或者不具备这种限制酶的识别切割序列，或者通过甲基化酶将甲基转移到所识别序列的碱基上，使限制酶不能将其切开。这样，尽管细菌中含有某种限制酶也不会使自身的 DNA 被切断，并且可以防止外源 DNA 的入侵。

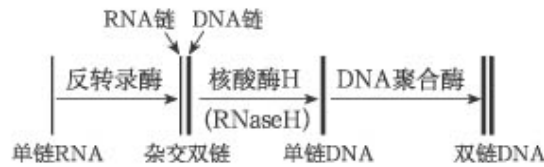
3. 天然的 DNA 分子可以直接用做基因工程载体吗？

提示：自然存在的质粒 DNA 分子并不完全具备作为运载体的条件，都要进行人工改造后才能用于基因工程操作。

## 1.2 基因工程的基本操作程序

**求异思维：**你能推测出由 mRNA 反转录形成 cDNA 的过程大致分为哪些步骤吗？

提示：第一步，**反转录酶**以 RNA 为模板合成一条与 RNA 互补的 DNA 单链，形成 RNA-DNA 杂交分子。第二步，**核酸酶 H**使 RNA-DNA 杂交分子中的 RNA 链**降解**，使之变成单链的 DNA。第三步，以单链 DNA 为模板，在 **DNA 聚合酶**的作用下合成另一条互补的 DNA 链，形成双链 DNA 分子。



### 目的基因的获取

获取目的基因是实施基因工程的第一步。目的基因可以从自然界中已有的物种中分离出来，也可以用人工的方法合成。目的基因主要是指编码蛋白质的基因，例如，与生物抗逆性相关的基因、与优良品质相关的基因、与生物药物和保健品相关的基因、与毒物降解相关的基因，以及与工业所需用酶相关的基因等，也可以是一些具有调控作用的因子。

### 从基因文库中获取目的基因

将含有某种生物不同基因的许多 DNA 片段，导入受体菌的群体中储存，各个受体菌分别含有这种生物的不同基因，称为基因文库。基因文库就像一座图书馆，每一个基因就是一本“书”。如果一座“图书馆”中包含了一种生物所有的基因，那么，我们就可以说这个基因文库很大，就像国家图书馆，这种基因文库叫做基因组文库。也有一些基因文库比较小，就像某个市或某个单位的图书馆，只包含了一种生物的一部分基因，这种基因文库叫做部分基因文库，如 **cDNA 文库**。

怎样从基因文库中得到我们所需的目的基因呢？这还是一件比较复杂的事情，简单地说就是根据目的基因的有关信息，例如，根据基因的核苷酸序列、基因的功能、基因在染色体上的位置、基因的转录产物 mRNA，以及基因的表达产物蛋白质等特性来获取目的基因。

►寻根问底：为什么要构建基因文库？直接从含目的基因的生物体内提取不行吗？

提示：构建基因文库是获取目的基因的方法之一，并不是惟一的方式。如果所需要的目的基因序列已知，就可以通过 PCR 方式从含有该基因的生物的 DNA 中，直接获得。也可以通过反转录，用 PCR 方式从 mRNA 中获得，不一定要构建基因文库。但如果所需要的目的基因的序列完全不知，或只知道目的基因序列的一段，或想从一种生物体内获得许多基因，或者想知道这种生物与另一种生物之间有多少基因不同，或者想知道一种生物在个体发育的不同阶段表达的基因有什么不同，或者想得到一种生物的全基因组序列，往往就需要构建基因文库。

### 生物技术资料卡：基因文库的构建

将某种生物体内的 DNA 全部提取出来，选用适当的限制酶，将 DNA 切成一定范围大小的 DNA 片段，然后，将这些 DNA 片段分别与载体连接起来，导入受体菌的群体中储存，每个受体菌都含有了一段不同的 DNA 片段。也就是说，这个群体包含了这种生物的所有基因，叫做这种生物的基因组文库。如果用某种生物发育的某个时期的 mRNA 反转录产生的多种互补 DNA（也叫 **cDNA**）片段，与载体连接后储存在一个受体菌群中，那么，这个受体菌群群体就叫做这种生物的 cDNA 文库。

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

文库类型	cDNA 文库	基因组文库
文库大小	小	大
基因中启动子	无	有
基因中内含子	无	有
基因多少	某种生物的部分基因	某种生物的全部基因
物种间的基因交流	可以	部分基因可以

### 利用 PCR 技术扩增目的基因

PCR 是多聚酶链式反应的缩写。PCR 是一项在生物体外复制特定 DNA 片段的核酸合成技术。通过这一技术，可以在短时

间内大量扩增目的基因。

PCR 的原理和做法并不难，它是利用 DNA 双链复制 的原理，将基因的核苷酸序列不断地加以复制，使其数量呈指数方式增加。利用 PCR 技术扩增目的基因的前提，是要有一段已知目的基因的核苷酸序列，以便根据这一序列合成引物。

扩增的过程是：目的基因 DNA 受热变性后解链为单链，引物与单链相应互补序列结合，然后在 DNA 聚合酶作用下进行延伸，如此重复循环多次。由于延伸后得到的产物同样可以和引物结合，因而每一次循环后目的基因的量可以增加一倍，即成指数形式扩增（约为  $2^n$ ，其中  $n$  为扩增循环的次数）。上述过程可以在 PCR 扩增仪中自动完成。

此外，如果基因比较小，核苷酸序列又已知，也可以通过 DNA 合成仪用化学方法直接人工合成。

### 基因表达载体的构建

基因表达载体的构建是实施基因工程的第二步，也是基因工程的核心。其目的是使目的基因在受体细胞中稳定存在，并且可以遗传给下一代，同时，使目的基因能够表达和发挥作用。因此，一个基因表达载体的组成，除了目的基因外，还必须有启动子、终止子以及标记基因等。

启动子是一段有特殊结构的 DNA 片段，位于基因的首端，它是 RNA 聚合酶识别和结合的部位，有了它才能驱动基因转录出 mRNA，最终获得所需要的蛋白质。终止子相当于一盏红色信号灯，使转录在所需要的地方停止下来。终止子位于基因的尾端，也是一段有特殊结构的 DNA 短片段。标记基因的作用是为了鉴别受体细胞中是否含有目的基因，从而将含有目的基因的细胞筛选出来，如抗生素抗性基因就可以作为这种基因。

寻根问底：将生物的所有 DNA 直接导入受体细胞不是更简单吗？如果这么做，结果会怎样？

提示：有人采用总 DNA 注射法进行遗传转化，即将一个生物中的总 DNA 提取出来，通过注射或花粉管通道法导入受体植物，没有进行表达载体的构建，这种方法针对性差，完全靠运气，也无法确定什么基因导入了受体植物。此法目前争议颇多，严格来讲不算基因工程。

### 将目的基因导入受体细胞

目的基因进入受体细胞内，并且在受体细胞内维持稳定和表达的过程，称为转化。

### 将目的基因导入植物细胞

将目的基因导入植物细胞采用最多的方法是农杆菌转化法。农杆菌是一种在土壤中生活的微生物，能在自然条件下感染双子叶植物和裸子植物，而对大多数单子叶植物没有感染能力。当植物体受到损伤时，伤口处的细胞会分泌大量的酚类化合物，吸引农杆菌移向这些细胞，这时农杆菌中的 Ti 质粒上的 T-DNA 可转移至受体细胞，并且整合到受体细胞染色体的 DNA 上。根据农杆菌的这种特点，如果将目的基因插入到 Ti 质粒的 T-DNA 上，通过农杆菌的转化作用，就可以使目的基因进入植物细胞，并将其插入到植物细胞中染色体的 DNA 上，使目的基因的遗传特性得以稳定维持和表达。由于这种方法比较经济和有效，迄今为止，约 80% 的转基因植物都是通过这种方法获得的。除此之外，还有基因枪法和花粉管通道法等。

基因枪法：基因枪法又称微弹轰击法，是利用压缩气体产生的动力，将包裹在金属颗粒表面的表达载体 DNA 打入受体细胞中，使目的基因与其整合并表达的方法。常用的金属颗粒有钨粉粒子和金粉粒子。这是单子叶植物中常用的一种基因转化方法，但是成本较高。

**花粉管通道法**：这是我国科学家独创的一种方法。在植物受粉后，花粉形成的花粉管还未愈合前，剪去柱头，然后，滴加 DNA (含目的基因)，使目的基因借助花粉管通道进入受体细胞。我国的转基因抗虫棉就是用此种方法获得的，花粉管通道法是一种十分简便经济的方法。

### 将目的基因导入动物细胞

基本的操作程序是：首先将含有目的基因的表达载体提纯，并使 DNA 浓度保持在  $1 \sim 3 \mu\text{m/mL}$ ；然后，从雌性动物体内取出卵(卵可以在体内受精，也可以在体外受精)，采用显微注射仪进行显微注射；再将注射了目的基因的受精卵，经胚胎早期培养一段时间后，再移植到雌性动物的输卵管或子宫内，使其发育成为具有新性状的动物。

### 将目的基因导入微生物细胞

由于原核生物具有一些其他生物没有的特点：繁殖快、多为单细胞、遗传物质相对较少等，因此，早期的基因工程操作都用原核生物作为受体细胞，其中以大肠杆菌应用最为广泛。

大肠杆菌细胞最常用的转化方法是：首先用  $\text{Ca}^{2+}$ 处理细胞，使细胞处于一种能吸收周围环境中 DNA 分子的生理状态，这种细胞称为感受态细胞。第二步是将重组表达载体 DNA 分子溶于缓冲液中与感受态细胞混合，在一定的温度下促进感受态细胞吸收 DNA 分子，完成转化过程。

## 目的基因的检测与鉴定

首先，要检测转基因生物的 DNA 上是否插入了目的基因，这是目的基因能否在受体细胞中稳定遗传的关键。检测方法是采用 DNA 分子杂交技术，即将转基因生物的基因组 DNA 提取出来，在含有目的基因的 DNA 片段上用放射性同位素等作标记，以此作为探针，使探针与基因组 DNA 杂交，如果显示出杂交带，就表明目的基因已插入染色体 DNA 中。

其次，还需要检测目的基因是否转录出了 mRNA，这是检测目的基因是否发挥功能作用的第一步。检测方法同样是采用分子杂交技术，与上述方法不同之处是从转基因生物中提取的是 mRNA，用标记的目的基因作探针，与 mRNA 杂交，如果显示出杂交带，则表明目的基因转录出了 mRNA。

最后，检测目的基因是否翻译成蛋白质。检测的方法与上述方法有所不同，是从转基因生物中提取蛋白质，用相应的抗体进行抗原—抗体杂交，若有杂交带出现，表明目的基因已形成蛋白质产品。

除了上述的分子检测外，有时还需要进行个体生物学水平的鉴定。例如，一个抗虫或抗病的目的基因导入植物细胞后，是否赋予了植物抗虫或抗病特性，需要做抗虫或抗病的接种实验，以确定是否具有抗性以及抗性的程度。又如，有的基因工程产品需要与天然产品的功能进行活性比较，以确定转基因产品的功能活性是否与天然产品相同。

1. 作为基因工程表达载体，只需含有目的基因就可以完成任务吗？为什么？

答：不可以。因为目的基因在表达载体中得到表达并发挥作用，还需要有其他控制元件，如启动子、终止子和标记基因等。必须构建上述元件的主要理由是：

①生物之间进行基因交流，只有使用受体生物自身基因的启动子才能比较有利于基因的表达；

②通过 cDNA 文库获得的目的基因没有启动子，只将编码序列导入受体生物中无法转录；

③目的基因是否导入受体生物中需要有筛选标记；

④为了增强目的基因的表达水平，往往还要增加一些其他调控元件，如增强子等；

⑤有时需要确定目的基因表达的产物存在于细胞的什么部位，往往要加上可以标识存在部位的基因（或做成目的基因与标识基因的融合基因），如绿色荧光蛋白基因等。

2. 根据农杆菌可将目的基因导入双子叶植物的机理，你能分析出农杆菌不能将目的基因导入单子叶植物的原因吗？若想将一个抗病基因导入单子叶植物，如小麦，从理论上说，你应该如何做？

提示：双子叶植物对根瘤农杆菌敏感。裸子植物对该菌也敏感。近年来，也有报道该菌对单子叶植物也有侵染能力。

根瘤农杆菌具有趋化性，即植物的受伤组织会产生一些糖类和酚类物质吸引根瘤农杆菌向受伤组织集中。这些酚类物质通常不存在于单子叶植物中，这也是单子叶植物不易被根瘤农杆菌侵染的原因。

利用农杆菌侵染单子叶植物进行遗传转化时，是需要加上上述酚类物质的，同时单子叶植物种类不同，农杆菌侵染进行遗传转化的效果也有很大差异。

如果想将一个抗病毒基因转入小麦，也可以用农杆菌，但要注意两点：①要选择合适的农杆菌菌株，因为不是所有的农杆菌菌株都可以侵染单子叶植物；②要加趋化和诱导的物质，目的是使农杆菌向植物组织的受伤部位靠拢（趋化性）和激活农杆菌的 Vir 区（诱导）的基因，使 T-DNA 转移并插入到染色体 DNA 上。

3. 利用大肠杆菌可以生产出人的胰岛素，联系前面有关细胞器功能的知识，结合基因工程操作程序的基本思路，思考一下，若要生产人的糖蛋白，可以用大肠杆菌吗？

提示：有些蛋白质肽链上有共价结合的糖链，这些糖链是在内质网和高尔基体上加工完成的，大肠杆菌不存在这两种细胞器，因此，在大肠杆菌中生产这种糖蛋白是不可能的。

4.  $\beta$ -珠蛋白是动物血红蛋白的重要组成成分。当它的成分异常时，动物有可能患某种疾病，如镰刀形细胞贫血症。假如让你用基因工程的方法，使大肠杆菌生产出鼠的  $\beta$ -珠蛋白，想一想，应如何进行设计？

提示：基本操作如下：

①从小鼠中克隆出  $\beta$ -珠蛋白基因的编码序列（cDNA）。

②将 cDNA 前接上在大肠杆菌中可以适用的启动子，另外加上抗四环素的基因，构建成一个表达载体。

③将表达载体导入无四环素抗性的大肠杆菌中，然后在含有四环素的培养基上培养大肠杆菌。如果培养基上长出大肠杆菌菌落，则表明  $\beta$ -珠蛋白基因已进入其中。

④培养进入了  $\beta$ -珠蛋白基因的大肠杆菌，收集菌体，破碎后从中提取  $\beta$ -珠蛋白。

**拓展视野：**历史不能忘记中国科学家对 PCR 的贡献

将 PCR 变成真正成熟技术的“临门一脚”，则是中国科学家钱嘉韵完成的，是她发现并分离了耐高温的 DNA 聚合酶。钱

嘉韵是我国台湾的科学家，她是第一个报道分离耐高温 DNA 聚合酶工作的。

### 知识拓展

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

#### 1. 基因工程载体的构建需要考虑哪些方面的因素？道理何在？

①基因的特点：如果一个来自动物的目的基因含有内含子，就不能用于转基因植物，因为动物中内含子的剪接系统与植物的不同，植物不能将动物基因的内含子剪切掉，只能用该基因的 cDNA。基因的产物如果是一个糖蛋白，那么该基因在原核生物细菌中表达出来的蛋白就可能不具备天然状态下的活性，因为糖蛋白上的糖链是在内质网和高尔基体上加上的，而细菌无这些细胞器。

②要选择强启动子或组织特异性启动子。启动子有强有弱，选择强启动子可以增加转录活性，使基因产物量增多。如果希望基因在生物的某个组织表达，如只在植物种子中表达，就要选择种子中特异表达的启动子。

③要有选择标记基因，如抗生素基因，以便选择出真正的转基因生物。

#### 2. 什么是分子杂交技术的显示带？

Southern 杂交——DNA 和 DNA 分子之间的杂交。目的基因是否整合到受体生物的染色体 DNA 中，这在真核生物中是目的基因可否稳定存在和遗传的关键。基本做法是：

第一步，将受体生物 DNA 提取出来，经过适当的酶切后，走琼脂糖凝胶电泳，将不同大小的片段分开；

第二步，将凝胶上的 DNA 片段转移到硝酸纤维素膜上；

第三步，用标记了放射性同位素（或生物素）的目的 DNA 片段作为探针与硝酸纤维素膜上的 DNA 进行杂交；

第四步，将 X 光底片压在硝酸纤维素膜上，在暗处使底片感光；

第五步，将 X 光底片冲洗，如果在底片上出现黑色条带，则表明受体植物染色体 DNA 上有目的基因。

Northern 杂交——DNA 和 RNA 分子之间的杂交。它是检测目的基因是否转录出 mRNA 的方法，具体做法与 Southern 杂交相同，只是第一步从受体植物中提取的是 mRNA 而不是 DNA，杂交带的显现也与 Southern 杂交相同。

Western 杂交——蛋白质分子（抗原—抗体）之间的杂交。它是检测目的基因是否表达出蛋白质的一种方法。具体做法是：

第一步，将目的基因在大肠杆菌中表达出蛋白质；

第二步，将表达出的蛋白质注射动物进行免疫，产生相应的抗体，并提取出抗体（一抗）；

第三步，从转基因生物中提取蛋白质，走凝胶电泳；

第四步，将凝胶中的蛋白转移到硝酸纤维素膜上；

第五步，将抗体（一抗）与硝酸纤维素膜上的蛋白杂交，这时抗体（一抗）与目的基因表达的蛋白（抗原）会特异结合。由于这种抗原—抗体的结合显示不出条带，所以加入一种称为二抗的抗体，它可以与一抗结合，二抗抗体上带有特殊的标记。如果目的基因表达出了蛋白质，则结果为阳性。



公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

## 1.3 基因工程的应用

### 一、植物基因工程硕果累累

植物基因工程技术主要用于提高农作物的抗逆能力(如抗除草剂、抗虫、抗病、抗干旱和抗盐碱等)，以及改良农作物的品质和利用植物生产药物等方面。

#### 1、抗虫转基因植物

对农业害虫的防治，大多是依靠化学农药。大量使用化学农药不仅造成了严重的环境污染，损害了人类健康，而且大大增加了生产成本。因此，从某些生物中分离出具有杀虫活性的基因，将其导入作物中，使其具有抗虫性，已成为防治作物虫

害的发展趋势。用于杀虫的基因主要是 Bt 毒蛋白基因、蛋白酶抑制剂基因、淀粉酶抑制剂基因、植物凝集素基因 等。例如，我国转基因抗虫棉就是转入 Bt 毒蛋白基因 培育出来的，它对棉铃虫具有较强的抗性。

Bt 毒蛋白基因是从苏云金芽孢杆菌中分离出来的抗虫基因。当害虫食用含有转基因的植物时，Bt 基因编码的蛋白质会进入害虫的肠道，在消化酶的作用下，蛋白质能够降解成相对分子质量比较小的、有毒的多肽。多肽结合在肠上皮细胞的 特异性受体 上，会导致细胞膜穿孔，细胞肿胀裂解，最后造成害虫死亡。由于 Bt 毒蛋白对哺乳动物无毒害作用，因而广泛用于抗虫转基因植物。

蛋白酶抑制剂基因广泛存在于植物中，它产生的 蛋白酶抑制剂 可与害虫消化道中的蛋白酶结合形成复合物，从而阻断或降低蛋白酶的活性，使昆虫不能正常消化食物中的蛋白质。这种复合物还能刺激昆虫分泌过量的消化酶，引起害虫的厌食反应。

淀粉酶抑制剂基因产生的 淀粉酶抑制剂 可以抑制昆虫消化道中的淀粉酶活性，使害虫不能消化所摄取的淀粉，从而阻断害虫的能量来源。

植物凝集素基因控制植物合成一种糖蛋白，这种糖蛋白可与昆虫肠道黏膜上的某种物质结合，从而影响害虫对营养物质的吸收和利用。

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

## 2、抗病转基因植物

植物像人一样也会生病。引起植物生病的微生物称为 病原微生物，主要有 病毒、真菌 和 细菌 等。

抗病转基因植物所采用的基因，使用最多的是 病毒外壳蛋白基因 和 病毒的复制酶基因；抗真菌转基因植物中可使用的基因有 几丁质酶基因 和 抗毒素合成基因。

由于盐碱和干旱对农作物的危害与细胞内渗透压调节有关，目前科学家们正在利用一些可以调节细胞渗透压的基因，来提高农作物的 抗盐碱 和 抗旱 的能力，这在烟草等植物中已获得比较明显的成果。科学家将鱼的 抗冻蛋白基因 导入烟草和番茄，使烟草和番茄的耐寒能力均有提高。此外，将 抗除草剂 基因导入大豆、玉米等作物，喷洒除草剂时，杀死田间杂草而不损伤农作物。

## 3、利用转基因改良植物的品质

许多食品含有的营养成分并不平衡，例如，豆类食品中，含有蛋氨酸比较少，大米、玉米、小麦则含赖氨酸比较少。这些人体必需的氨基酸缺少后对人的健康不利。科学家将 必需氨基酸含量多的蛋白质编码 基因，导入植物中，或者改变这些氨基酸合成途径中某种关键酶的活性，以提高氨基酸的含量。

番茄含有丰富的维生素，但不耐储存。我国科学家将控制番茄果实成熟的基因导入番茄，获得转基因延熟番茄。我国科学家还成功地将与植物 花青素 代谢有关的基因导入花卉植物矮牵牛中，转基因矮牵牛呈现出自然界没有的颜色变异，大大提高了花卉的观赏价值。

## 二、动物基因工程前景广阔

### 1、用于提高动物生长速度

由于 外源生长激素基因 的表达可以使转基因动物长得更快，因此，科学家们将这类基因导入动物体内，以提高动物的生长速率。

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

### 2、用于改善畜产品的品质

例如，有些人食用牛奶后，对牛奶中的乳糖不能完全消化；也有些人食用牛奶后会出现 过敏、腹泻、恶心等不适症状。为了解决这一问题，科学家将 肠乳糖酶 基因导入奶牛基因组，使获得的转基因牛分泌的乳汁中，乳糖的含量大大减低，而其他营养成分不受影响。

### 3、用转基因动物生产药物

最令人兴奋的是利用基因工程技术，还可以使哺乳动物本身变成“批量生产药物的工厂”。科学家将 药用蛋白基因 与 乳腺蛋白基因 的启动子等调控组件重组在一起，通过 显微注射 等方法，导入哺乳动物的 受精卵 中，然后，将受精卵送入母体内，使其生长发育成转基因动物。转基因动物进入泌乳期后，可以通过分泌的乳汁来生产所需要的药品，因而称为 乳腺生物反应器 或 乳房生物反应器。

### 4、用转基因动物作器官移植的供体

猪的内脏构造、大小、血管分布与人极为相似，而且猪体内隐藏的、可导致人类疾病的病毒要远远少于灵长类动物，是否可以用猪的器官来解决人类器官的来源问题呢？实现这一目标的最大难题是 免疫排斥。目前，科学家正试图利用基因工程方法对猪的器官进行改造，采用的方法是将器官供体基因组导入某种调节因子，以抑制 抗原决定 基因的表达，或设法除去 抗



原决定基因，再结合克隆技术，培育出没有免疫排斥反应的转基因克隆猪器官。

## 5、基因工程药物异军突起

**工程菌**：通过基因工程的方法，使外源基因得到高效率表达的菌类细胞株系一般称为“工程菌”。

干扰素是动物或人体细胞受到病毒侵染后产生的一种糖蛋白。由于干扰素几乎能抵抗所有病毒引起的感染，因此，它是一种抗病毒的特效药。

## 6、基因治疗曙光初照

基因治疗是把正常基因导入病人体内，使该基因的表达产物发挥功能，从而达到治疗疾病的目的，这是治疗遗传病的最有效的手段。复合型免疫缺陷症是一种遗传疾病。一名患有严重复合型免疫缺陷症的女童由于腺苷酸脱氨酶基因缺失，造成体内缺乏腺苷酸脱氨酶；而腺苷酸脱氨酶是人体免疫系统发挥正常功能作用所必需的，因此，女童不能抵抗病原微生物的威胁。研究人员将腺苷酸脱氨酶基因转入取自患者的淋巴细胞中，使淋巴细胞能够产生腺苷酸脱氨酶，然后，再将这种淋巴细胞转入患者体内。半年后，在血液中检测出了被改造的淋巴细胞，女童体内产生的腺苷酸脱氨酶也越来越多，女童产生抗体的能力显著改善。

大部分基因治疗的临床试验，都是先从病人体内获得某种细胞，例如 T 淋巴细胞，进行培养，然后，在体外完成基因转移，再筛选成功转移的细胞扩增培养，最后重新输入患者体内。上述方法虽然操作复杂，但效果较为可靠，称为体外基因治疗。同时，科学家们又千方百计设计出更加简便的基因治疗方法。直接向人体组织细胞中转移基因的治疗方法叫做体内基因治疗。值得提出的是，无论哪一种基因治疗，目前都处于初期的临床试验阶段。

用于基因治疗的基因有三类。第一类是从健康人体上分离得到的功能正常的基因，用以取代病变基因，或依靠其表达产物，来弥补病变基因带来的生理缺陷。第二类是反义基因，即通过产生的 mRNA，与病变基因产生的 mRNA 进行互补，来阻止非正常蛋白质的合成。第三类是编码可以杀死癌变细胞的蛋白酶基因，又叫做自杀基因。

## 7、神奇的基因芯片

基因芯片又叫做 DNA 芯片，寡核苷酸芯片，或 DNA 微阵列。

通过微加工技术，将数以万计、乃至百万计的特定序列的 DNA 片段（基因探针），有规律地排列固定于  $2\text{cm}^2$  的硅片、玻片等支持物上，构成的一个二维 DNA 探针阵列，与计算机的电子芯片十分相似，所以被称为基因芯片。基因芯片主要用于基因检测工作。科学家让芯片上成千上万的探针分子，与被检测的带有标记的基因样品，按碱基互补配对原理进行杂交。然后，通过荧光检测系统对芯片进行扫描，再利用计算机系统，对每一探针上的荧光信号进行比较和检测，从而迅速得出所需要的信息。

### 1.4 蛋白质工程的崛起

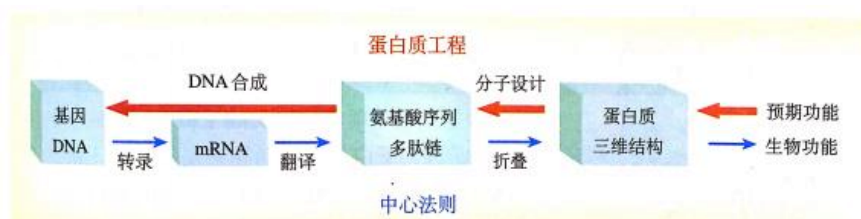
#### 一、蛋白质工程崛起的缘由

基因工程在原则上只能生产自然界已存在的蛋白质，这些天然蛋白质是生物在长期进化过程中形成的，它们的结构和功能符合特定物种生存的需要，却不一定完全符合人类生产和生活的需要。例如，干扰素是动物体内的一种蛋白质，可以用于治疗病毒的感染和癌症，但在体外保存相当困难。如果将其分子上的一个半胱氨酸变成丝氨酸，那么在  $-70^{\circ}\text{C}$  的条件下，可以保存半年。

#### 二、蛋白质工程的基本原理

蛋白质工程的目标是根据人们对蛋白质功能的特定需求，对蛋白质的结构进行分子设计。由于基因决定蛋白质，因此，要对蛋白质的结构进行设计改造，最终还必须通过基因来完成。

天然蛋白质合成的过程是按照中心法则进行的：基因 → 表达（转录和翻译）→ 形成氨基酸序列的多肽链 → 形成具有高级结构的蛋白质 → 行使生物功能；而蛋白质工程却与之相反，它的基本途径是：从预期的蛋白质功能出发 → 设计预期的蛋白质结构 → 推测应有的氨基酸序列 → 找到相对应的脱氧核苷酸序列（基因）。





### 三、蛋白质工程的概念

蛋白质工程：是指以蛋白质分子的结构规律及其生物功能的关系为基础，通过基因修饰或基因合成，对现有蛋白质进行改造，或制造一种新的蛋白质，以满足人类生产和生活的需求。也就是说，蛋白质工程是在基因工程的基础上，延伸出来的第二代基因工程，是包含多学科的综合科技工程领域。

### 四、蛋白质工程的进展和前景

蛋白质工程是一项难度很大的工程，目前成功的例子不多，主要是因为蛋白质发挥功能必须依赖于正确的高级结构，这种高级结构十分复杂，而目前科学家对蛋白质的高级结构的了解还很不夠，要设计出更加符合人类需要的蛋白质还需经过艰辛的探索。我们相信，随着科学技术的深入发展，蛋白质工程将会给人类带来更多的福音。

#### 旁栏思考题

1. 你知道人类蛋白质组计划吗？它与蛋白质工程有什么关系？我国科学家承担了什么任务？

提示：人类蛋白质组计划是继人类基因组计划之后，生命科学乃至自然科学领域一项重大的科学命题。2001 年，国际人类蛋白质组组织宣告成立。之后，该组织正式提出启动了两项重大国际合作行动：一项是由中国科学家牵头执行的“人类肝脏蛋白质组计划”；另一项是以美国科学家牵头执行的“人类血浆蛋白质组计划”，由此拉开了人类蛋白质组计划的帷幕。

2. 对天然蛋白质进行改造，你认为应该直接对蛋白质分子进行操作，还是通过对基因的操作来实现？

答：毫无疑问应该从对基因的操作来实现对天然蛋白质改造，主要原因如下：①任何一种天然蛋白质都是由基因编码的，改造了基因即对蛋白质进行了改造，而且改造过的基因可以遗传下去。如果对蛋白质直接改造，即使改造成功，被改造过的蛋白质分子是无法遗传的。②对基因进行改造比对蛋白质直接改造要容易操作，难度要小得多。

#### 2.1.1 植物细胞工程的基本技术

植物的花瓣属于高度分化的组织，利用它来培育出新的植株，首先要通过细胞的脱分化过程，培养出愈伤组织，然后再从愈伤组织分化形成小植株。这里所说的细胞脱分化就是让已经分化的细胞，经过诱导后，失去其特有的结构和功能而转变成未分化细胞的过程。在植物中，一些分化的细胞，经过激素的诱导，可以脱分化为具有分生能力的薄壁细胞，进而形成植物的愈伤组织。愈伤组织在一定的培养条件下，又可以再分化出幼根和芽，形成完整的小植株。

为什么植物的一瓣花瓣就可以培育出完整的植株呢？我们知道，具有某种生物全部遗传信息的任何一个细胞，都具有发育成完整生物体的潜能，也就是说，每个生物细胞都具有全能性的特点。因此，在理论上，生物的任何细胞都具有发育成完整植株的潜力。但是，在生物的生长发育过程中，细胞并不会表现出全能性，而是分化成各种组织和器官。这是因为在特定的时间和空间条件下，细胞中的基因会有选择性地表达出各种蛋白质，从而构成生物体的不同组织和器官。

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

#### 植物组织培养技术

实验：胡萝卜的组织培养

实验原理：植物体的根、茎、叶细胞一般都具有全能性，在一定的营养和激素等条件下，可以脱分化形成愈伤组织。将愈伤组织转接到含有不同激素成分的培养基上，就可以诱导其再分化生成胚状体或丛芽，进而发育成完整的小植株。植物组织培养的全过程，证明了分化的植物细胞，仍具有形成完整植株所需要的全部基因。

#### 方法步骤

1. 将胡萝卜根用自来水充分洗净，削去外皮，并切成段（约 10cm）。用酒精棉球擦手消毒。
2. 在超净工作台（或接种箱）上将胡萝卜段用酒精溶液消毒 30 s 后，立即用无菌水清洗 2 — 3 次，再用次氯酸钠溶液处理 30 min 后，立即用无菌水清洗 2~3 次。
3. 用无菌的滤纸吸去胡萝卜段表面的水分。然后，在消毒瓷砖上，用无菌的解剖刀将胡萝卜段切成 1 cm 厚的横切片，再选取有形成层的部位，切取 1 cm<sup>3</sup>左右的小块。
4. 将胡萝卜组织块接种到培养基上，用锡箔纸封盖瓶口，并用橡皮筋扎紧。然后，在培养瓶上贴上标签，写明材料名称、接种日期和小组编号。
5. 将接种后的胡萝卜组织块，放在 23~26℃ 恒温避光条件下培养。4d 后，检查培养材料的污染情况；14d 后，观察愈伤组织的生长状况。然后，在恒温箱中继续避光培养。在培养过程中，注意定期观察和记录愈伤组织的生长情况。
6. 培养一段时间后，将生长良好的愈伤组织转接到分化培养基上，培养一段时间后，胡萝卜的愈伤组织就可以诱导出

试管苗。然后将试管苗移栽到大田，培养成正常植株。

### 讨论

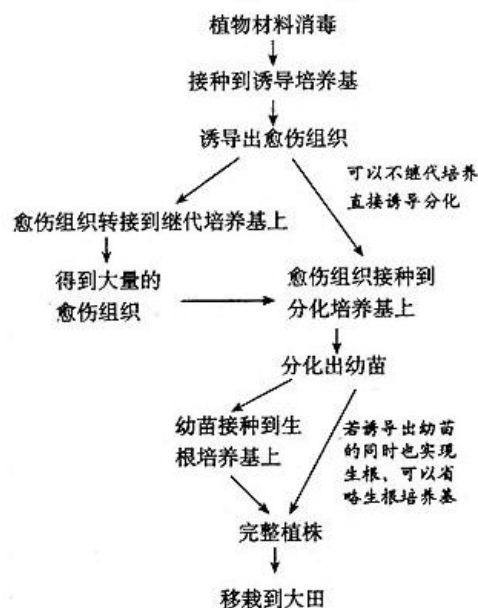
1. 在组织培养实验中，为什么要强调所用器械的灭菌和实验人员的无菌操作？

提示：植物组织培养中用到的培养基含有丰富的营养成分，有利于培养物的生长，然而各种杂菌同样也可以在上面迅速生长，所以植物组织培养过程中污染现象经常发生。培养基一旦被污染，迅速生长的各种杂菌不但会和培养物争夺营养，而且这些杂菌生长的过程中会生成大量对培养物有害的物质，导致培养物迅速死亡。造成培养基污染的因素有很多，一般包括：外植体带菌、培养瓶和各种器械灭菌不彻底、操作人员操作不规范等。所以在组织培养实验中用到的各种器械都要进行彻底地灭菌，实验人员操作一定要规范，避免带入杂菌。

2. 在本实验中，切取胡萝卜块根时强调要切取含有形成层部分，原因是这部分容易诱导形成愈伤组织。请思考一下，胡萝卜的其他部分（如茎、叶、花），是否也能培养成小植株？

提示：能，只是诱导愈伤组织比较困难。

3. 请根据上面的实验过程，概括出植物组织培养技术的流程简图。



培养基的组成：固体培养基大多数都是由无机营养成分、有机营养成分、激素、琼脂四部分组成。

通过上面的实验，我们可以总结出：植物组织培养就是在无菌和人工控制条件下，将离体的植物器官、组织、细胞，培养在人工配制的培养基上，给予适宜的培养条件，诱导其产生愈伤组织、丛芽，最终形成完整的植株。

### 植物体细胞杂交技术

科学家尝试将番茄和马铃薯杂交，试图培育出一种地上长番茄、地下结马铃薯的“超级作物”。但是，不同的两种生物之间，存在着天然的生殖隔离，用传统的有性杂交方法不可能得到二者的杂种后代。经过长期的实验，科学家们采用体细胞杂交的方法，终于得到了“番茄—马铃薯”杂种植株。

在进行体细胞杂交之前，必须先利用纤维素酶和果胶酶去除这层细胞壁，获得具有活力的原生质体。杂交过程中的另一个关键环节，是原生质体间的融合。进行原生质体间的融合，必须要借助一定的技术手段进行人工诱导。人工诱导的方法基本可以分为两大类—物理法和化学法。物理法包括离心、振动、电激等；化学法一般是用聚乙二醇（PEG）作为诱导剂来诱导细胞融合。

植物体细胞杂交就是将不同种的植物体细胞，在一定条件下融合成杂种细胞，并把杂种细胞培育成新的植物体的技术。

虽然科学家们历尽艰辛，终于实现了两个物种间的杂交，可惜这株同时具有两个物种遗传物质的超级植物，并没有如科学家所想像的那样，地上长番茄、地下结马铃薯。尽管如此，这项研究还是在克服不同生物远缘杂交的障碍上，取得了巨大的突破。

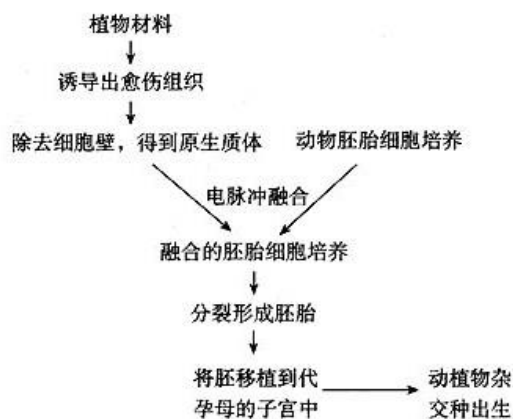
### 思考与探究

1. 为什么“番茄—马铃薯”超级杂种植株没有如科学家所想像的那样，地上长番茄、地下结马铃薯？

提示：生物基因的表达不是孤立的，它们之间是相互调控、相互影响的，所以马铃薯—番茄杂种植株的细胞中虽然具备两个物种的遗传物质，但这些遗传物质的表达受到相互干扰，不能再像马铃薯或番茄植株中的遗传物质一样有序表达，杂种植株不能地上长番茄、地下结马铃薯就很自然了。

2. 自然界中有一种含有叶绿体的原生动物——眼虫，说明植物的细胞器同样可以在某些动物细胞中存活，请探讨：动物细胞与植物细胞之间可以实现杂交吗？如果理论上可行，请设计出具体实验方案。

提示：根据眼虫的特点，动物细胞和植物细胞之间在理论上是可以实现杂交的。具体的实验方案可以设计如下：



### 一、植物繁殖的新途径

#### 1、微型繁殖

植物组织培养技术不仅可以保持优良品种的遗传特性，还可以高效快速地实现种苗的大量繁殖，因此人们形象地把用于快速繁殖优良品种的植物组织培养技术，叫做植物的微型繁殖技术，也叫快速繁殖技术。

#### 2、作物脱毒

马铃薯和草莓都是无性繁殖的作物，它们感染的病毒很容易传播给后代。病毒在作物体内逐年积累，就会导致作物产量降低，品质变差。科学家们发现植物分生区附近（如茎尖）的病毒极少，甚至无病毒。因此，切取一定大小的茎尖进行组织培养，再生的植株就有可能不带病毒，从而获得脱毒苗。

#### 3、神奇的人工种子

农业、林业生产离不开种子，但不少树木需要生长数年后才能结出种子；一些作物优良杂种的后代也会因发生性状分离而丧失其优良特性。另外，常规种子的生产还会受到季节、气候和地域的限制，并且需要占用大量的土地来实现制种。

**人工种子：**就是以植物组织培养得到的胚状体、不定芽、顶芽和腋芽等为材料，经过人工薄膜包装得到的种子。人工种子在适宜条件下同样能够萌发生成幼苗。

**胚状体：**是指在组织培养过程中，在植物组织块或愈伤组织上产生的一种结构，它与正常受精卵发育形成的胚有类似的结构和发育过程。其不同的发育阶段，也可以用正常胚发育中各个时期的术语来描述，如原胚、球形胚、心形胚、鱼雷形胚等。

思考 1、为了促进胚状体的生长发育，还可以向人工种皮中加入哪些物质？

分析：可以加入适量的养分、无机盐、有机碳源以及农药、抗生素、有益菌等。为了促进胚状体的生长发育，还可以向人工种皮中加入一些植物生长调节剂。

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

### 二、作物新品种的培育

**单倍体育种：**常规选育出一个可以稳定遗传的农作物优良品种，一般要经过 5—6 年的连续筛选。而单倍体育种则是通过花药培养获得单倍体植株，染色体加倍后当年便可得到稳定遗传的优良品种，这样就极大地缩短了育种时间，节约了大量的人力物力。单倍体育种已成为作物育种的一条新途径。

**突变体的利用：**在植物的组织培养过程中，由于培养细胞一直处于不断的分生状态，因此容易受到培养条件和外界压力（如射线、化学物质等）的影响而产生突变。从这些产生突变的个体中可以筛选出对人们有用的突变体，进而培育成新品种。

**体细胞诱变育种：**在作物育种中，可以对植物的愈伤组织进行化学或物理的诱变处理，促使其发生突变，再通过诱导分化形成植株。从这些植株中筛选出高抗、高产、优质的突变体，就可以培育成新品种。

### 三、细胞产物的工厂化生产

组织培养技术除了在农业上的应用外，还广泛应用于另一个重要的领域，即细胞产物的工厂化生产。这些细胞产物包括蛋白质、脂肪、糖类、药物、香料、生物碱等。

**视野拓展：**植物生长调节剂在组织培养中的神奇作用

培养基中常用的植物生长调节剂一般可以分为生长素类、细胞分裂素类和赤霉素类。此外，脱落酸 (ABA) 和多效唑 (PP<sub>333</sub>) 也可以用于植物的组织培养。

**生长素类：**在组织培养中，生长素用于诱导细胞的分裂和根的分化。常用的生长素有 IAA（吲哚乙酸）、IBA（吲哚-3-丁酸）、NAA（萘乙酸）和 2, 4-D（2, 4-二氯苯氧乙酸）。其中 IBA 和 NAA 广泛用于诱导分化生长物的生根，并能与细胞分裂素互相作用而促进茎的增殖。2, 4-D 常用于植物愈伤组织的诱导和生长，但它趋向于抑制植物形态的发生，所以在分化培养基中很少利用。

**细胞分裂素类：**在培养基中细胞分裂素的主要作用是促进组织细胞的分裂或从愈伤组织和器官上分化出不定芽。比较常用的细胞分裂素有 6-BA（6-苄基腺嘌呤）、KT（激动素、呋喃氨基嘌呤）和玉米素。其中 6-BA 一般用于诱导植物的愈伤组织分化出丛芽，而 KT 的作用主要是刺激培养物的细胞加速分裂，加快培养物的生长速度。

**赤霉素类：**赤霉素类植物生长调节剂的主要作用是刺激培养细胞的伸长，所以在组织培养中一般使用赤霉素来刺激分化的丛芽或小植株快速长高。赤霉素在高温下极易降解，一般是在过滤除菌后再加入到已经高温灭菌的培养基中。

生长素与细胞分裂素的协同调控作用在组织培养中非常重要，人们常把它们称为“激素杠杆”。例如，当生长素与细胞

分裂素的比例适中，且生长素含量高于细胞分裂素时，主要诱导植物组织脱分化和根原基的形成；而当细胞分裂素的效应高于生长素时，则主要诱导植物组织再分化和芽原基的形成。另外，植物生长调节剂在培养基中的用量要考虑组织内源激素的含量。

## 2.2 动物细胞工程

动物细胞工程常用的技术手段有动物细胞培养、动物细胞核移植、动物细胞融合、生产单克隆抗体等，其中动物细胞培养技术是其他动物细胞工程技术的基础。

### 2.2.1 动物细胞培养和核移植技术

动物细胞培养就是从动物机体中取出相关的组织，将它分散成单个细胞，然后，放在适宜的培养基中，让这些细胞生长和增殖。

#### 动物细胞培养的过程

成块的组织中细胞与细胞靠在一起，彼此限制了细胞的生长和增殖，因此，进行细胞培养时，首先将组织分散成许多单个细胞。方法是从健康动物体内取出组织块，剪碎，用胰蛋白酶或胶原蛋白酶处理一段时间，这样组织就会分散成单个细胞。然后，用培养液将分散的细胞稀释制成细胞悬液，再将细胞悬液放入培养瓶内，置于适宜环境中培养。悬液中分散的细胞很快就贴附在瓶壁上，称为细胞贴壁。培养贴附性细胞时，细胞要能够贴附于底物上才能生长增殖，这就要求培养瓶或培养皿的内表面光滑、无毒，易于贴附。以后，细胞进行有丝分裂，数量不断增多，当贴壁细胞分裂生长到表面相互接触时，细胞就会停止分裂增殖，这种现象称为细胞的接触抑制。人们通常将动物组织消化后的初次培养称为原代培养。

贴满瓶壁的细胞需要重新用胰蛋白酶等处理，然后分瓶继续培养，让细胞继续增殖。这样的培养过程通常被称为传代培养。传代培养的细胞一般传至 10 代后就不易传下去了。一般来说，细胞在传至 10~50 代左右时，增殖会逐渐缓慢，以至于完全停止，这时部分细胞的细胞核型可能会发生变化。当继续传代培养时，少部分细胞会克服细胞寿命的自然极限，获得不死性，这些细胞已经发生了突变，正在朝着等同于癌细胞的方向发展。目前使用的或冷冻保存的正常细胞通常为 10 代以内，以保持细胞正常的二倍体核型。

**寻根问底：**胰蛋白酶真的不会把细胞消化掉吗？

提示：胰蛋白酶除了可以消化细胞间的蛋白外，长时间的作用也会消化细胞膜蛋白，对细胞有损伤作用，因此必须控制好胰蛋白酶的消化时间。

**旁栏问题：**进行动物细胞传代培养时用胰蛋白酶分散细胞，说明细胞间的物质主要是什么成分？用胃蛋白酶行吗？  
公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

提示：用胰蛋白酶分散细胞，说明细胞间的物质主要是蛋白质。多数动物细胞培养的适宜 pH 为 7.2~7.4，胃蛋白酶在此环境中没有活性，而胰蛋白酶在此环境中活性较高。

**小知识：**1957 年，科学家采用胰蛋白酶消化处理和应用液体培养基的方法，获得单层细胞培养。单层培养法的出现，对细胞培养的发展起了很大的推动作用。此后单层细胞培养成为细胞培养普遍应用的技术。

#### 动物细胞培养的条件

**无菌、无毒的环境：**首先应保证被培养的细胞处于无菌、无毒的环境，即对培养液和所有培养用具进行无菌处理。通常还要在细胞培养液中添加一定量的抗生素，以防培养过程中的污染。此外，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。

**营养：**细胞体外培养所需营养物质与体内基本相同，例如，需要有糖、氨基酸、促生长因子、无机盐、微量元素等。将细胞所需的上述营养物质按其种类和所需数量严格配制而成的培养基，称为合成培养基。由于人们对细胞所需的营养物质还没有完全搞清楚，因此，在使用合成培养基时，通常需加入血清、血浆等一些天然成分。

**温度和 pH：**细胞体外培养的适宜温度一般与动物的体温相近，哺乳动物多以  $36.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  为宜。多数细胞生存的适宜 pH 为 7.2~7.4。

**气体环境：**细胞培养所需气体主要有  $\text{O}_2$  和  $\text{CO}_2$ ， $\text{O}_2$  是细胞代谢所必需的， $\text{CO}_2$  的主要作用是维持培养液的 pH。进行细胞培养时，通常采用培养皿或松盖培养瓶，将其置于含 95% 空气加 5%  $\text{CO}_2$  的混合气体的培养箱中进行培养。

**小知识：**在科学研究中，有时需要明确界定培养液的成分，而血清中由于含有许多未知成分，会对研究结果有所影响，因此，在进行细胞培养时，也可采用无血清培养。无血清培养基是在基本培养基中添加一些已知的促进细胞生长和增殖的物质。

### 动物细胞培养技术的应用

许多有重要价值的生物制品，如病毒疫苗、干扰素、单克隆抗体等，都可以借助动物细胞的大规模培养来生产。

动物细胞是基因工程技术中常用的受体细胞，因此，基因工程也离不开动物细胞的培养。

培养的动物细胞还可以用于检测有毒物质，判断某种物质的毒性。

科学家培养正常或各种病变的细胞，用于生理、病理、药理等方面的研究，如用于筛选抗癌药物等，为治疗和预防癌症及其他疾病提供理论依据。

### 动物体细胞核移植技术和克隆动物

高度分化的植物组织仍保持着全能性，但动物细胞与植物细胞不同，动物细胞的全能性会随着动物细胞分化程度的提高而逐渐受到限制，分化潜能逐渐变弱。因此，目前还不能用类似植物组织培养的方法获得完整的动物个体，用动物体细胞克隆的动物，实际是通过核移植来实现的。

动物核移植是将动物的一个细胞的细胞核，移入一个已经去掉细胞核的卵母细胞中，使其重组并发育成一个新的胚胎，这个新的胚胎最终发育为动物个体。用核移植的方法得到的动物称为克隆动物。

哺乳动物核移植可以分为胚胎细胞核移植和体细胞核移植。由于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高，恢复其全能性十分困难，因此，动物体细胞核移植的难度也就明显高于胚胎细胞核移植。

### 体细胞核移植的过程

下面以克隆高产奶牛为例，来说明体细胞核移植的大致过程。

①从供体高产奶牛身体的某部位取体细胞，培养供体细胞（动物细胞培养）；

②从卵巢中采集卵母细胞，培养到减数第二次分裂中期；

③通过显微操作去除卵母细胞的核。由于 MII 期卵母细胞核的位置靠近第一极体，用微型吸管可一并吸出细胞核与第一极体；

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

④将供体细胞注入到卵母细胞外的透明带位置；

⑤通过电刺激使供体细胞膜和卵母细胞膜融合，供体核进入受体卵母细胞，构建重组胚胎；

⑥用物理（如电脉冲）或化学方法（如钙离子载体）激活受体细胞，使其完成分裂和发育进程。

⑦早期胚胎培养、胚胎移植。

讨论：

1. 在体细胞的细胞核移植到受体卵母细胞之前，为什么必须先去掉受体卵母细胞的核？

提示：为使核移植的胚胎或动物的遗传物质全部来自有重要利用价值的动物提供的体细胞。

2. 用于核移植的供体细胞一般都选用传代 10 代以内的细胞，想一想，这是为什么？

提示：10 代以内的细胞一般能保持正常的二倍体核型。

3. 你认为用上述体细胞核移植方法生产的克隆动物，是对体细胞供体动物进行了 100% 的复制吗？为什么？

提示：克隆动物绝大部分 DNA 来自于供体细胞核，但其核外还有少量的 DNA，即线粒体中的 DNA 是来自于受体卵母细胞。所以，用教材中所述的方法克隆的动物不是供核动物完全相同的复制。

此外，即便动物的遗传基础完全相同，但动物的一些行为、习性的形成与所处环境有很大关系，核供体动物生活的环境与克隆动物所生活的环境不会完全相同，其形成的行为、习性也不可能和核供体动物完全相同，从这一角度看，克隆动物不会是核供体动物 100% 的复制。

**生物技术资料卡：**目前核移植技术中普遍使用的去核方法是显微操作去核法。还有人采用其他方法，如梯度离心、紫外光短时间照射、化学物质处理等。这些方法是在没有刺破透明带或卵母细胞质膜的情况下，去除细胞核或使卵细胞核 DNA 变性，从而达到去核的目的。

### 拓展视野：核移植技术发展简史

早在 1938 年就有人提出核移植技术，但将它作为研究细胞分化的一种方法，却仅限于两栖类动物。早期的试验结果显示，受精卵最初几次分裂的细胞具有全能性；当胚胎进一步分化时，细胞就丧失了全能性，这时如果去掉胚胎的部分细胞，胚胎就不能发育为一个完整的个体。

1952 年, 美国学者布里格斯和金将豹蛙囊胚细胞的核移植到去核卵中, 得到了能够发育的胚胎。他们改进了核移植技术后, 在正常分裂的卵中有 80% 可以发育成幼蛙。这些研究结果表明, 细胞的全能性虽然随着细胞分化程度的提高而逐渐受到限制, 但细胞核仍含有保持该物种遗传性的全部基因, 也就是说高度分化细胞的细胞核仍保持有全能性。

20 世纪 70 年代, 我国科学家运用核移植技术, 将鲤鱼囊胚细胞的细胞核, 移植到已去核的鲫鱼未受精卵中, 培养出鲤鲫移核鱼, 这样的鱼兼有鲫鱼和鲤鱼的特点并且具有正常的生殖能力。

20 世纪 80 年代, 哺乳动物的核移植研究有了很大的进展。1981 年, 瑞士学者伊尔曼斯和霍普将小鼠胚胎的细胞核注入去核的受精卵中, 获得了胚胎细胞核移植的小鼠。以后, 人们用体内或体外成熟的卵母细胞代替了受精卵作为受体细胞, 相继得到了胚胎细胞核移植的各种动物, 如绵羊、牛、小鼠、兔、猪等。但体细胞核移植技术一直未能成功。直到 1997 年英国学者维尔穆特等宣布用成年绵羊乳腺细胞得到体细胞核移植后代, 才获得了突破性的进展, 这就是轰动世界的绵羊多利。多利的诞生说明成年动物的体细胞核移植技术获得了成功。在以后的几年中, 各种体细胞克隆动物, 如小鼠、牛、山羊、猪以及各种转基因克隆动物也相继问世。

### 2.2.2 动物细胞融合与单克隆抗体

#### 动物细胞融合

动物细胞融合也称细胞杂交, 是指两个或多个动物细胞结合形成一个细胞的过程, 融合后形成的具有原来两个或多个细胞遗传信息的单核细胞, 称为杂交细胞。

动物细胞融合与植物原生质体融合的基本原理相同, 诱导动物细胞融合的方法与植物原生质体融合的方法也类似, 常用的诱导因素有聚乙二醇(PEG)、灭活的病毒、电激等。

细胞融合技术突破了有性杂交方法的局限, 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获得了成功。利用细胞融合技术而发展起来的杂交瘤技术, 为制造单克隆抗体开辟了新途径。

**生物技术资料卡:** 灭活病毒诱导细胞融合的原理是病毒表面含有的糖蛋白和一些酶能够与细胞膜上的糖蛋白发生作用使细胞互相凝聚, 细胞膜上的蛋白质分子和脂质分子重新排布, 细胞膜打开, 细胞发生融合。灭活是指用物理或化学手段使病毒或细菌失去感染能力, 但是并不破坏这些病原体的抗原结构。

#### 单克隆抗体

长期以来, 人们为了获得抗体, 采用的方法是向动物体内反复注射某种抗原, 使动物产生抗体, 然后, 从动物血清中分离所需抗体。这种方法不仅产量低、纯度低, 而且制备的抗体特异性差。

动物在免疫反应的过程中, 体内产生的特异性抗体种类可多达百万种以上, 但是每一个 B 淋巴细胞只分泌一种特异性抗体。因此, 要想获得大量的单一抗体, 必须克隆单一的 B 淋巴细胞, 形成细胞群。遗憾的是, 在体外培养条件下, 一个 B 淋巴细胞是不可能无限增殖的, 怎样解决这一问题呢?

公众号: 汉水丑生, 专注于生物高考和教学

#### 单克隆抗体的制备

用羊的红细胞对小鼠进行注射, 使小鼠产生免疫反应, 从产生免疫反应小鼠的脾脏细胞中, 他们得到了抗羊红细胞的抗体, 这说明在小鼠的脾细胞中形成了相应的B 淋巴细胞。他们又设法将鼠的骨髓瘤细胞与脾细胞中产生的 B 淋巴细胞融合, 再用特定的选择性培养基进行筛选。在该培养基上, 未融合的亲本细胞和融合的具有同种核的细胞都会死亡, 只有融合的杂种细胞才能生长。这种杂种细胞的特点是既能迅速大量繁殖, 又能产生专一的抗体。对上述经选择性培养的杂交瘤细胞, 还需进行克隆化培养和抗体检测, 经多次筛选, 就可获得足够数量的能分泌所需抗体的细胞。最后, 将杂交瘤细胞在体外条件下做大规模培养, 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了。

#### 单克隆抗体的应用

单克隆抗体最主要的优点在于它的特异性强、灵敏度高, 并可能大量制备。

##### ①作为诊断试剂

由于单克隆抗体纯度高、特异性强, 所以能准确地识别各种抗原物质的细微差异, 并跟一定抗原发生特异性结合, 因此, 单克隆抗体在诊断的应用上, 具有准确、高效、简易、快速的优点。

例如, 在受精后不久, 胎盘滋养层细胞就会分泌人绒毛膜促性腺激素(HCG), 在孕妇的尿液中大量存在, 而在非妊娠妇女尿液中几乎不含有。“早早孕诊断试剂盒”, 灵敏度很高, 在妊娠的第 8 天就可以做出诊断, 其起核心作用的物质是抗人绒毛膜促性腺激素单克隆抗体。

## ②用于疾病检测

甲胎蛋白（AFP）是一种特异性较强的肿瘤标志物，用甲胎蛋白作为抗原免疫小鼠，制备抗 AFP 单克隆抗体，并与含有放射性同位素的标记物连接，单克隆抗体携带放射性标记物通过血液可到达全身几乎所有组织。由于肿瘤细胞表面的 AFP 会和单克隆抗体特异性的结合，所以放射性同位素标记物就不断积累在肿瘤上。通过一定的显影技术就可以发现肿瘤所在。

## ③用于治疗疾病和运载药物

如果把抗癌细胞的单克隆抗体跟放射性同位素、化学药物或细胞毒素相结合，制成“生物导弹”，注入体内，借助单克隆抗体的导向作用，能将药物定向带到癌细胞所在位置，在原位杀死癌细胞。



公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

## 专题 3 胚胎工程

胚胎工程是指对动物早期胚胎或配子所进行的多种显微操作和处理技术，如体外受精、胚胎移植、胚胎分割、胚胎干细胞培养等技术。经过处理后获得的胚胎，还需移植到雌性动物体内生产后代，以满足人类的各种需求。

1890 年，英国剑桥大学的生物学家将纯种安哥拉兔的两个 4 细胞胚胎移入一只纯种比利时兔的输卵管内，成功地产下两只纯种安哥拉子兔。这个实验首次证实同种动物的胚胎在异体动物体内发育的可能性。

### 3.1 体内受精和早期胚胎发育

#### 精子的发生

哺乳动物精子的发生是在睾丸内完成的。雄性动物从初情期（相当于人的青春期）开始，直到生殖机能衰退，在睾丸的曲细精管内不断进行着生殖细胞的增殖，源源不断地产生精子。各种家畜精子发生的过程大体可以分为三个阶段。

第一阶段，位于曲细精管管壁的精原细胞进行数次有丝分裂，产生大量的精原细胞，其中部分精原细胞经过染色体复制和其他物质的合成，进一步形成初级精母细胞。

第二阶段，初级精母细胞连续进行两次分裂（即减数分裂，包括 M I 和 M II）；第一次分裂产生两个次级精母细胞，每个次级精母细胞再分裂一次产生两个含单倍染色体的精子细胞。

第三阶段，圆形的精子细胞经过变形，其中的细胞核变为精子头的主要部分，高尔基体发育为头部的顶体，中心体演变为精子的尾，线粒体聚集在尾的基部形成线粒体鞘。同时，细胞内的其他物质浓缩为球状，叫做原生质滴，随精子的成熟过程向后移动，直到最后脱落。对于多数家畜来说，精子在睾丸内形成的时间为两个月左右。

#### 卵子的发生

卵子的发生是在雌性动物的卵巢内完成的。动物的胚胎在性别分化以后，雌性胎儿卵巢内的卵原细胞，就通过有丝分裂的方式不断增加其数量，并进一步演变为初级卵母细胞，这时，它被卵泡细胞包围，形成卵泡。初级卵母细胞需经过减数分裂才能变为成熟的卵子。减数第一次分裂是在雌性动物排卵前后完成的，其结果产生一个次级卵母细胞和第一极体，进入输卵管，准备与精子受精。减数第二次分裂是在精子和卵子结合的过程中完成的，次级卵母细胞经分裂产生一个成熟的卵子和第二极体。当在卵细胞膜和透明带的间隙可以观察到两个极体时，说明卵子已经完成了受精，这是判断卵子是否受精的重要标志。

哺乳动物卵泡的形成和在卵巢内的储备，是在出生前（即胎儿时期）完成的，这是精子和卵子在发生上的重要区别。

1. 一个卵泡中能形成几个成熟的卵子？答：正常情况下，一个卵泡只能形成一个成熟的卵子。

2. 排卵是指卵子从卵泡中排出，还是指卵泡从卵巢中排出？答：是指卵子从卵泡中排出。

3. 刚排出的卵是成熟的卵子吗？它在母体的什么部位与精子受精？

答：刚排出的卵子尚未完全成熟，仅完成第一次减数分裂，需要在输卵管内进一步成熟，直到第二次减数分裂的中期



才能与精子结合完成受精过程。排出的卵子是在输卵管内与精子受精的。

### 受精

受精是精子与卵子结合形成合子（即受精卵）的过程。它包括受精前的准备阶段和受精阶段。在自然条件下，受精是在雌性的输卵管内完成的。

#### 准备阶段 1—精子获能

刚刚排出的精子，不能立即与卵子受精，必须在雌性动物生殖道发生相应的生理变化后，才能获得受精能力。1951 年，张明觉和奥斯汀发现了这一生理现象，并把它称为“**精子获能**”。这一发现加速了科学家对精子获能机理的研究，并且找到了使精子在体外获能的物质，实现了各种哺乳动物精子在体外条件下的获能。

#### 准备阶段 2—卵子的准备

卵子一般在排出后 2—3h 才能被精子穿入。一些实验证据表明，卵子在受精前也要经历类似精子获能的过程。动物排出的卵子成熟程度不同，有的可能是初级卵母细胞，如马、犬等，有的可能是次级卵母细胞，如猪、羊等。但它们都要在输卵管内进一步成熟，当达到减数第二次分裂的中期时，才具备与精子受精的能力。

### 受精阶段

哺乳动物的受精过程主要包括：**精子穿越放射冠和透明带，进入卵细胞膜，原核形成和融合。**

获能后的精子与卵子相遇时，首先发生顶体反应，使顶体内的酶释放出来。放射冠是包围在卵子透明带外而的卵丘细胞群，精子所释放的顶体酶可直接溶解卵丘细胞之间的物质，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，顶体酶随后将透明带溶出一条孔道，精子借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，会产生阻止后来的精子进入透明带的生理反应，这个反应称做透明带反应，它是防止多个精子进入透明带，引起多精子入卵受精的第一道屏障。

只有穿过透明带的精子才能与卵细胞膜接触。由于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一种生理反应，拒绝其他精子再进入卵内，这种生理反应称做卵细胞膜反应。这是防止多精入卵受精的第二道屏障。

精子入卵后的另一个变化，是尾部脱离，并且原有的核膜破裂；随后，精子形成一个新的核膜，最后形成一个比原来精子核还大的核，叫做雄原核。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，雌原核一般略小于雄原核。

雄、雌原核充分发育后，相向移动，彼此接触，二者体积缩小、合并，两组核染色体合为一组，形成一个含二倍染色体的合子，也就是受精卵。受精过程至此结束，受精卵的发育也由此开始。

**小知识：**多数哺乳动物的第一极体不进行减数第二次分裂形成两个第二极体。

### 胚胎发育

合子形成后即在输卵管内进行有丝分裂，开始发育。

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。其特点是：细胞分裂方式为有丝分裂，细胞的数量不断增加，但胚胎的总体积并不增加，或略有缩小。

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。

**桑椹胚：**当胚胎细胞数目达到 32 个左右时，胚胎形成致密的细胞团，形似桑椹，叫做桑椹胚。实验证实，这一阶段前的每一个细胞都具有发育成完整胚胎的潜能，属于全能细胞。

**囊胚：**桑椹胚进一步发育，细胞开始出现分化。聚集在胚胎一端，个体较大的细胞，称为内细胞团（ICM），将来发育成胎儿的各种组织，而沿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。

随着胚胎的进一步发育，胚胎的内部出现了含有液体的囊腔——囊胚腔，这个时期的胚胎叫做囊胚。囊胚进一步扩大，会导致透明带的破裂，胚胎从其中伸展出来，这一过程叫做孵化。

**原肠胚：**囊胚孵化后，再进一步发育，内细胞团表层的细胞形成外胚层，下方的细胞形成内胚层。这时的胚胎称为原肠胚，由内胚层包围的囊腔叫做原肠腔。滋养层则发育为胎儿的胎膜和胎盘。

### 3.2 体外受精和早期胚胎培养

#### 体外受精

哺乳动物的体外受精主要包括卵母细胞的采集、精子的获取和受精等几个主要步骤。

#### 卵母细胞的采集和培养

对于实验动物如小鼠、兔，以及家畜猪、羊等，采用的主要方法是：用促性腺激素处理，使其排出更多的卵子，然后，从输卵管中冲取卵子，直接与获能的精子在体外受精。

**小知识：**超数排卵处理的做法是给供体注射促性腺激素，使一头母畜一次排出比自然情况下多几倍到十几倍的卵子，用于体外受精和早期胚胎培养。

对于大家畜或大型动物，如牛，采用的主要方法是：从屠宰场已屠宰母畜的卵巢中采集卵母细胞，也可以借助超声波探测仪、内窥镜或腹腔镜等工具，直接从活体动物的卵巢中吸取卵母细胞。采集的卵母细胞，都要在体外经人工培养成熟后，才能与获能的精子受精。

#### 精子的采集和获能

收集精子的方法有假阴道法、手握法和电刺激法等。

假阴道法是采用仿生学的方法，模仿发情雌性动物阴道环境设计的装置，它能够满足雄性动物交配时对压力、温度和润滑度的要求，同时配有与采精动物相适应的活台畜或假台畜。使用假台畜时，要训练被采精动物爬跨台畜，并将精液射入假阴道，以便收集。

手握法不需要任何设备，徒手或戴上乳胶手套，直接把握雄性动物的阴茎，给予适当的压力和刺激，就可引起射精。这种方法只适于猪和犬等体型较小，易于控制的家畜。

电刺激法是将动物麻醉后，用特制的电极伸入动物的直肠，直接刺激位于腰荐部的射精中枢神经，引起射精。这种方法多用于野生或经济动物。

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、家兔和猪等动物的精子，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中，培养一段时间后，精子就可获能；对于牛、羊等家畜的精子常采用化学法，即将精子放在一定浓度的肝素或钙离子载体 A23187液中，用化学药物诱导精子获能。

#### 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或专用的受精溶液中完成受精过程。精子和卵子一般要放在培养

#### 胚胎的早期培养

精子与卵子在体外受精后，应将受精卵移入发育培养液中继续培养，以检查受精状况和受精卵的发育能力。哺乳动物胚胎的培养液成分一般都比较复杂，除一些无机盐和有机盐类外，还需添加维生素、激素、氨基酸、核苷酸等营养成分，以及血清等物质。

不同动物胚胎移植的时间不同，例如，牛、羊一般要培养到桑椹胚阶段或囊胚阶段才进行移植，小鼠和家兔等实验动物可在更早的阶段移植，人的体外受精胚胎，即试管胚胎，可在8~16个细胞阶段移植。

### 3.3 胚胎工程的应用及前景

#### 一、胚胎移植

##### 1、胚胎移植的概念

胚胎移植是指，将雌性动物体内的早期胚胎，或者通过体外受精及其他方式得到的胚胎，移植到同种的生理状态相同的其他雌性动物的体内，使之继续发育为新个体的技术。

其中提供胚胎的个体称为“供体”，接受胚胎的个体叫“受体”。胚胎移植实际上是生产胚胎的供体和孕育胚胎的受体共同繁殖后代的过程。

在胚胎工程中通过任何一项技术，如转基因、核移植，或体外受精等技术获得的胚胎，都必须移植给受体才能获得后代。因此，胚胎移植又是胚胎工程其他技术的最后一道“工序”。

##### 2、胚胎移植的现状和意义

进行胚胎移植的优势是可以充分发挥雌性优良个体的繁殖潜力。在这项技术中，供体的主要职能变为只生产具有优良遗传特性的胚胎，繁重而漫长的妊娠和育仔的任务由受体取代，这就大大缩短了供体本身的繁殖周期。同时，在对供体实行超数排卵处理后，可获得多枚胚胎，经移植可得到多个后代，使供体生产下的后代数是自然繁殖的十几倍到几十倍。

### 3、胚胎移植的生理学基础

第一，哺乳动物发情排卵后，不管是否妊娠，在一段时间内，同种动物的供、受体生殖器官的生理变化是相同的，这就为供体的胚胎移入受体提供了相同的生理环境。

第二，哺乳动物的早期胚胎形成后，在一定时间内不会与母体子宫建立组织上的联系，而是处于游离状态，这就为胚胎的收集提供了可能。

第三，大量的研究已经证明，受体对移入子宫的外来胚胎基本上不发生免疫排斥反应，这为胚胎在受体内存活提供了可能。

第四，供体胚胎可与受体子宫建立正常的生理和组织联系，但移入受体的供体胚胎的遗传特性，在孕育过程中不受任何影响。

#### 讨论：

1. 在胚胎移植操作中，怎样才能使胚胎在移植前后所处的生理环境保持一致？例如，供、受体的发情时间要一致吗？供体胚胎移入受体子宫的位置，应与在供体内的位置相同或相似吗？

答：应对供体和受体母畜进行同期发情处理，使它们的生理条件达到同步或一致，这样才能使供体的胚胎移入受体后有相同或相似的生存条件，这是胚胎移植成功与否的关键。因此，必须做到供、受体母畜的发情时间一致。同时还要做到移入受体子宫胚胎的位置应该与其在供体内的位置相同或相似，移入胚胎一侧的受体子宫角对应的卵巢必须有黄体存在。

2. 概括胚胎移植的实质。

答：可以把胚胎移植简单概括为早期胚胎在相同生理环境条件下空间位置的转移。

### 4、胚胎移植的流程

①对供、受体母牛进行选择，并用激素进行同期发情处理（多种激素，主要是孕激素，配合使用前列腺素和促性腺激素）。对供体母牛的要求是生产和遗传性能优良；对受体母牛的要求是健康、繁殖能力正常。

②用促性腺激素对供体母牛做超数排卵处理。

③超数排卵的母牛发情后，选择同种优秀的公牛进行配种或人工授精。

④胚胎的收集：配种或输精后第7天，用特制的冲卵装置，把供体母牛子宫内的胚胎冲洗出来（也叫冲卵）。

⑤冲卵后，对胚胎进行质量检查。这时的胚胎应该发育到桑椹胚或囊胚阶段。

⑥将收集的胚胎直接向受体移植或放入-196℃的液氮中保存。

⑦胚胎的移植：

手术法：引出受体子宫和卵巢，将胚胎注入子宫角，缝合创口。

非手术法：将装有胚胎的移植管送入受体母牛子宫的相应部位，注入胚胎。

⑧对受体母牛进行是否妊娠检查。

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

⑨受体母牛产下胚胎移植的犊牛。

## 二、胚胎分割

胚胎分割：是指采用机械方法将早期胚胎切割成2等份、4等份或8等份等，经移植获得同卵双胎或多胎的技术。来自同一胚胎的后代具有相同的遗传物质，因此，胚胎分割可以看做动物无性繁殖或克隆的方法之一。

胚胎分割所需要的主要仪器设备为实体显微镜和显微操作仪。

进行胚胎分割时，应选择发育良好、形态正常的桑椹胚或囊胚，将其移入盛有操作液的培养皿中，然后，用分割针或分割刀进行分割。对于不同发育阶段的胚胎，分割的具体操作不完全相同。

具体操作时，用分割针或分割刀片将胚胎切开，吸出其中的半个胚胎，注入预先准备好的空透明带中，或直接将裸半胚移植入受体。在对囊胚阶段的胚胎进行分割时，要注意将内细胞团均等分割，否则会影响分割后胚胎的恢复和进一步发育。

实践证明，采用胚胎分割技术产生同卵多胚的可能性是有限的，到目前为止，最常见的是经分割产生的同卵双胎，而同卵多胎成功的比例都很小。

## 三、胚胎干细胞

哺乳动物的胚胎干细胞简称 **ES 或 EK 细胞**，是由早期胚胎或原始性腺中分离出来的一类细胞。ES 细胞具有胚胎细胞的特性，在形态上，表现为体积小、细胞核大、核仁明显；在功能上，具有发育的全能性，即可以分化为成年动物体内任何一种组织细胞。另外，在体外培养的条件下，ES 细胞可以增殖而不分化。对它可以进行冷冻保存，也可进行遗传改造。

随着组织工程技术的发展，通过 ES 细胞体外诱导分化，还可以培育出人造组织器官，解决目前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。

ES 细胞也是研究体外细胞分化的理想材料。ES 细胞在饲养层细胞上（一般为输卵管上皮细胞，在干细胞培养时，可作为提供干细胞分裂、增殖的营养细胞）或在添加抑制因子的培养液中，能够维持不分化的状态。在培养液中加入诱导分化因子，如牛黄酸、丁酰环腺苷酸等化学物质时，就可以诱导 ES 细胞向不同类型的组织细胞分化，这为揭示细胞分化和细胞凋亡的机理提供了有效的手段。

公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学

#### 四、SRY—PCR 胚胎的性别鉴定技术

对移植前的胚胎进行性别鉴定，然后移入受体，可以控制后代的性别，这种控制是在精子和卵子受精后，胚胎本身已经有了性别的前提下进行的。目前最有应用前景的方法是 SRY—PCR 法。

操作的基本程序是：先从被测胚胎中取出几个细胞（一般取滋养层细胞），提取 DNA，然后用位于 Y 染色体上的性别决定基因，即 SRY 基因的一段碱基作引物，用胚胎细胞中的 DNA 为模板，进行 PCR 扩增（如果胚胎细胞种有 SRY 基因，则这种 PCR 可以扩增出 SRY 基因），最后用标记的 SRY 基因片段作为探针检测扩增产物进行检测。出现阳性反应者，胚胎为雄性；出现阴性反应者，胚胎为雌性。这种方法准确率高达 90%以上。

### 专题四 生物技术的安全性和伦理问题

转基因生物存在安全性问题的原因是：

- ①目前对基因的结构、基因间的相互作用及基因的调控机制了解有限。
- ②目的基因往往是异种生物的基因。
- ③外源基因插入宿主基因组的部位是随机的。

转基因生物主要在食物安全、生物安全和环境安全三个方面存在争论。

对待转基因技术的正确做法是：趋利避害，不能因噎废食。

治疗性克隆是指利用克隆技术产生特定的细胞和组织用于治疗疾病。生殖性克隆是指将克隆技术用于生育，即用于产生人类个体。

对待克隆人，中国政府的态度是禁止生殖性克隆人。

中国政府一再重申四不原则：不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人的实验。但是，中国不反对治疗性克隆。

### 专题五 生态工程

#### 一、生态工程的概念

生态工程是指人类应用生态学和系统学等学科的基本原理和方法，通过系统设计、调控和技术组装，对已被破坏的生态环境进行修复重建，对造成环境污染和破坏的传统生产方式进行改善，并提高生态系统的生产力，从而促进人类社会和自然环境的和谐发展。

#### 二、生态工程的基本原理

生态工程建设的目的就是遵循自然界物质循环的规律，充分发挥资源的生产潜力，防止环境污染，达到经济效益和生态效益的同步发展。与传统的工程相比，生态工程是一类少消耗、多效益、可持续的工程体系。

传统经济模式正在毁坏水、大气、土壤和生物资源，消耗地球赠给我们的自然资本。为了实现可持续发展，经济发展必须符合生态学规律，走生态经济之路。生态经济主要是通过实行“循环经济”的原则，使一个系统产出的污染物，能够成为本系统或者另一个系统的生产原料，从而实现废弃物的资源化，而实现循环经济最重要的手段之一就是生态工程。

##### 1、物质循环再生原理

生物体的 C、H、O、N、P、S 等元素都不断进行着从无机环境到生物群落，又从生物群落到无机环境的循环过程，就是

生态系统的物质循环。

土壤的肥力主要取决于含 N 和 P 的无机盐的含量,农作物从土壤中不断吸收含有 N 和 P 的无机盐用于合成蛋白质和核酸等有机大分子。农民收获庄稼后,一部分 N 和 P 元素就从农田生态系统流出。为了保持农作物的高产,就需要给农田生态系统不断输入 N 和 P 元素。当今大多数国家的土壤肥力,都严重地依赖于化学肥料,而在古代是根本没有化肥投入的。

思考 1、我国古代的“无废弃物农业”是如何维持土壤肥力的?

分析:通过积极种植能够固氮的豆科作物,以及收集一切可能的有机物质,包括人畜粪便、枯枝落叶、残羹剩饭、河泥等,把它们转变为有机肥料,施用到农田中,改善了土壤结构;培育了土壤中的微生物;实现了土壤养分如氮、磷、钾及微量元素的循环利用。

## 2、物种多样性原理

一般而言,物种繁多而复杂的生态系统具有较高的抵抗力稳定性。因为,物种繁多意味着营养结构(食物链和食物网)复杂,生态系统的自我调节能力强,抵抗力稳定性高。

反例:我国的“三北防护林”,虽然取得了巨大的生态和经济效益,但也存在不少问题。例如,辽宁西部章古台地区,最初进行林带建设时,单一种植了大片的樟子松林。由于植物种类单一,动物种类也较少。松毛虫肆虐时,因为缺少天敌,很多地方的樟子松奄奄一息。同样的原因,前几年因为杨树天牛,将宁夏、内蒙等地的十几亿株杨树毁于一旦。

正例:由珊瑚虫和某些藻类共生组成的珊瑚礁区,物种繁多,系统稳定。不同生物在珊瑚礁区占据不同的位置,它们通过食物链关系相互依存,使得珊瑚礁就算是在养分稀少的深海中,也能保持很高的生物多样性。

## 3、协调与平衡原理

处理好生物与环境的协调与平衡,需要考虑环境承载力(又称环境容纳量)。如果生物的数量超过环境承载力的限度,就会引起系统的失衡和破坏。

公众号:汉水丑生,专注于生物高考和教学

反例 1:水葫芦泛滥成灾。

反例 2:我国西北一些地区年降雨量小于 450mm,是只适宜种植灌木和草的地区,但却被硬性规定种植属于乔木的杨树。生态的不适应使许多地方的杨树长成半死不活的“小老头”状。

思考 2、在我国西北地区进行防护林建设时,应选择哪些特征的树种?

分析:抗寒、耐旱、适应性强的沙棘,耐盐碱力较强的沙枣等植物。

思考 3、如果在该地区发展畜牧养殖业,你认为应该注意什么问题?

分析:合理放牧,牲畜数量不能超过草地的承载量。

## 4、整体性原理

人类处在一个“社会—经济—自然”复合而成的巨大系统中。进行生态工程建设时,不但要考虑到自然生态系统的规律,更重要的是,还要考虑到经济和社会等系统的影响力。

实例:在进行林业工程建设时,一方面要号召农民种树,另一方面要考虑贫困地区农民的生活问题,如粮食、烧柴及收入等。国家推行退耕还林、退耕还草政策,会给农民相应的补助。

思考 4、在进行生态工程建设时,为什么会出现“前面栽树,后面砍林”的现象?

分析:只考虑了生态问题,忽略了经济和社会问题,农民的生计得不到保障。

## 5、系统学和工程学原理

### ①系统的结构决定功能原理

采用分布式结构,即各计算机均和两个或两个以上的计算机相联,工作的可靠性要比采用集中式和环式结构的可靠性高。因为在这种结构中,一般局部故障,不至于造成整个网络的瘫痪。

例如,我国南方水网地区的桑基鱼塘模式,就是把很多单个生产系统通过优化组合,有机地整合在一起,成为一个新的高效生态系统,大大提高了系统生产力。

桑基鱼塘模式包含鱼塘养鱼系统、桑树养蚕系统、甘蔗种植系统、家畜养殖系统和制糖厂等多个子系统。这些子系统之间是相互联系的。例如,蚕的排泄物可以作为鱼的食物,家畜的排泄物可以作为鱼的食物,种植的甘蔗可以作为制糖厂的生产原料,制糖厂的糖渣可以作为家畜的食物,鱼塘里的塘泥可以用来种植桑树和甘蔗。



图 5-4 三种计算机网络结构示意图

## ②系统整体性原理

系统各组分之间要有适当的比例关系，只有这样才能顺利完成能量、物质、信息等的转换和流通，并且实现**总体功能大于各部分之和**的效果，即“ $1 + 1 > 2$ ”。例如，珊瑚礁之所以能够保持很高的系统生产力，得益于珊瑚虫和藻类组成的高效的植物—动物营养循环。通常情况下，失去了共生藻类的珊瑚虫会死亡，那里的生物多样性也将锐减，从而造成系统的崩溃。

练习 1、写出下列生态工程基本原理对应的实例。

物质循环再生原理：①

物种多样性原理：② ③ ⑥

协调与平衡原理：④ ⑦

整体性原理：⑧

系统学和工程学原理：⑤

①无废弃物农业；

②单一人工林容易遭受虫害；

③珊瑚礁能够在养分稀少的深海中保持很高的物种多样性；

④水葫芦扩散到野外后泛滥成灾；

⑤桑基鱼塘，把单个生产系统优化组合，大大提高系统生产力

⑥大片种植樟子松林，容易遭受虫害；

⑦在我国西北一些只适合种植灌木和草地区硬性规定种植属于乔木的杨树；

⑧进行林业工程建设时，出现了“前面造林，后面砍林”的现象

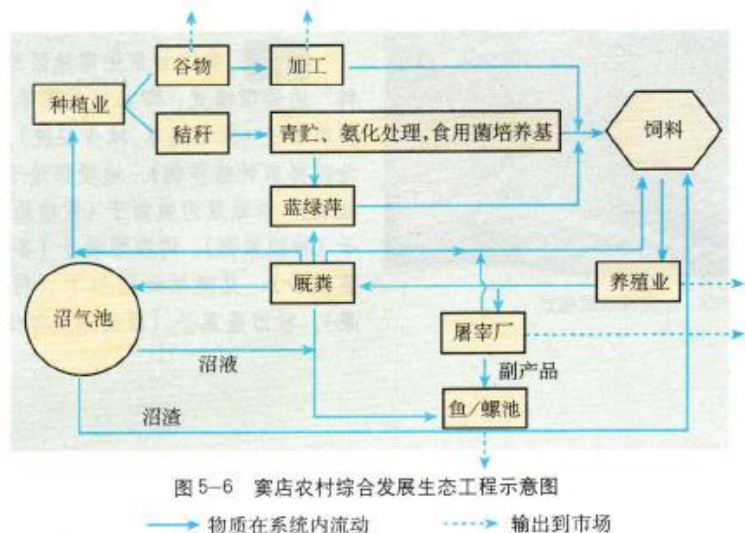
### 拓展视野：

沼气是利用人畜粪便等物质，经过一系列复杂的厌氧（厌氧/需氧）发酵过程，产生的富含甲烷气体的燃料。在实践中，人们还发现，沼气和底渣可用做再生饲料、肥料、食用菌培养基等。例如，底渣处理后可以作为猪、牛的饲料和食用菌的培养基；沼气液则可以通入养鱼池，用于促进浮游生物的生长，增加鱼的饵料；沼液和底渣还是优良的作物肥料。同时，沼气生态工程还可以减轻环境污染。

沼气工程充分利用了物质循环再生的原理。由于它在物质、能量多级充分利用和转化方面独特的纽带作用，大大促进了农村以农牧结合为中心的多种经营。

## 三、生态工程的实例和发展前景

### 1、农村综合发展型生态工程



思考 5、在这一案例中，主要运用了哪些生态工程的基本原理？

分析：物质循环再生原理、整体性原理、物种多样性原理

### 2、小流域综合治理生态工程

实例：我国甘肃陇南地区总结出了“九子登科”的治理模式：即山顶戴帽子（封山育林），山腰系带子（还林还草，减少径流），坡地修台子（坡地改梯田种植作物），地埂锁边子（种植作物保护地埂），荒地荒沟栽苗子（营造薪柴林），山脚种果子（种植果园），沟底穿靴子（各种拦截坝、堤，拦蓄泥沙），见缝插针钉扣子（利用零星地种植林果），秋田盖罩子（覆盖地膜等保土耕作措施）。

小流域治理模式是应用生态工程的整体性原理、协调与平衡原理，以及系统学和工程学等原理，通过保土蓄水、耕作措施、林草措施等工程和生物措施，层层设防来控制土壤侵蚀。目前，小流域治理已经从开始时的单纯造林和减水、减沙等



工程，逐渐转移到生态经济型模式上，目标是建立稳定、持久、高效的复合系统，获得最大的生态和经济效益。

### 3、大区域生态系统恢复工程

为了控制荒漠化的发展和水土流失，改善生态环境，提高人民的生活水平，我国实施了一系列森林或草原植被恢复的生态工程、水土保持的生态工程等，如退耕还林还草生态工程、防沙治沙生态工程，“三北”（“三北”指华北北部、东北大部 and 西北大部）防护林生态工程等等。

思考 6、大区域生态系统恢复工程主要运用了哪些生态工程的基本原理？

分析：物种多样性原理、协调与平衡原理、整体性原理。

### 4、湿地生态恢复工程

湿地是水域和陆地的自然过渡形态。湿地被誉为地球的“肾脏”，具有蓄洪防旱，调节区域气候，控制土壤侵蚀，自然净化污水，为迁飞的鸟类和多种动、植物提供栖息地，以及为人们提供休闲娱乐的环境等功能。

思考 7、当初人们为什么要围湖造田？

分析：①解决粮食短缺问题；②片面强调经济发展，没有认识到湖泊的巨大生态调节功能。

思考 8、为什么说“退耕还湖”是一项巨大的系统工程？实施这一工程面临的主要困难是什么？

分析：①因为退耕还湖不仅包括退耕地为湖区，还包括退耕后湖区上游以及湖区周围的生态环境保护工作；②退耕还湖工程的主要困难是原耕地上居民的迁移后要解决迁出居民的生活和就业等问题。

湿地生态恢复工程就是采用工程和生物措施相结合的方法，如废水处理、点源和非点源污染控制、土地处理工程，以及植物物种的引进种植等，使受到干扰的湿地得以恢复。在湿地的周围，还应建立缓冲带，以尽量减少人类的干扰，使湿地依靠自然演替等机制恢复其生态功能。

### 5、矿区废弃地的生态恢复工程

为加速恢复矿区生态环境，人们采用的措施包括人工制造表土、多层覆盖、特殊隔离、土壤侵蚀控制、植被恢复工程等。其中，关键在于植被恢复，以及为植被恢复所必需的土壤微生物群落的重建。由于矿区废弃土地的水分状况很差，特别是养分极其贫瘠，导致植被很难恢复。因此，恢复矿区生态环境，就要首先通过机械方法平整压实土地，人工制造表土，然后再种植适应能力强的草和树。待到土壤情况得到改善之后，才可以种植优良牧草并发展配套的养殖产业。

思考 9、矿区废弃地的生态恢复工程主要运用了哪些生态工程的基本原理？

分析：整体性原理、协调与平衡原理、系统学与工程学原理等。



公众号：汉水丑生，专注于生物高考和教学