

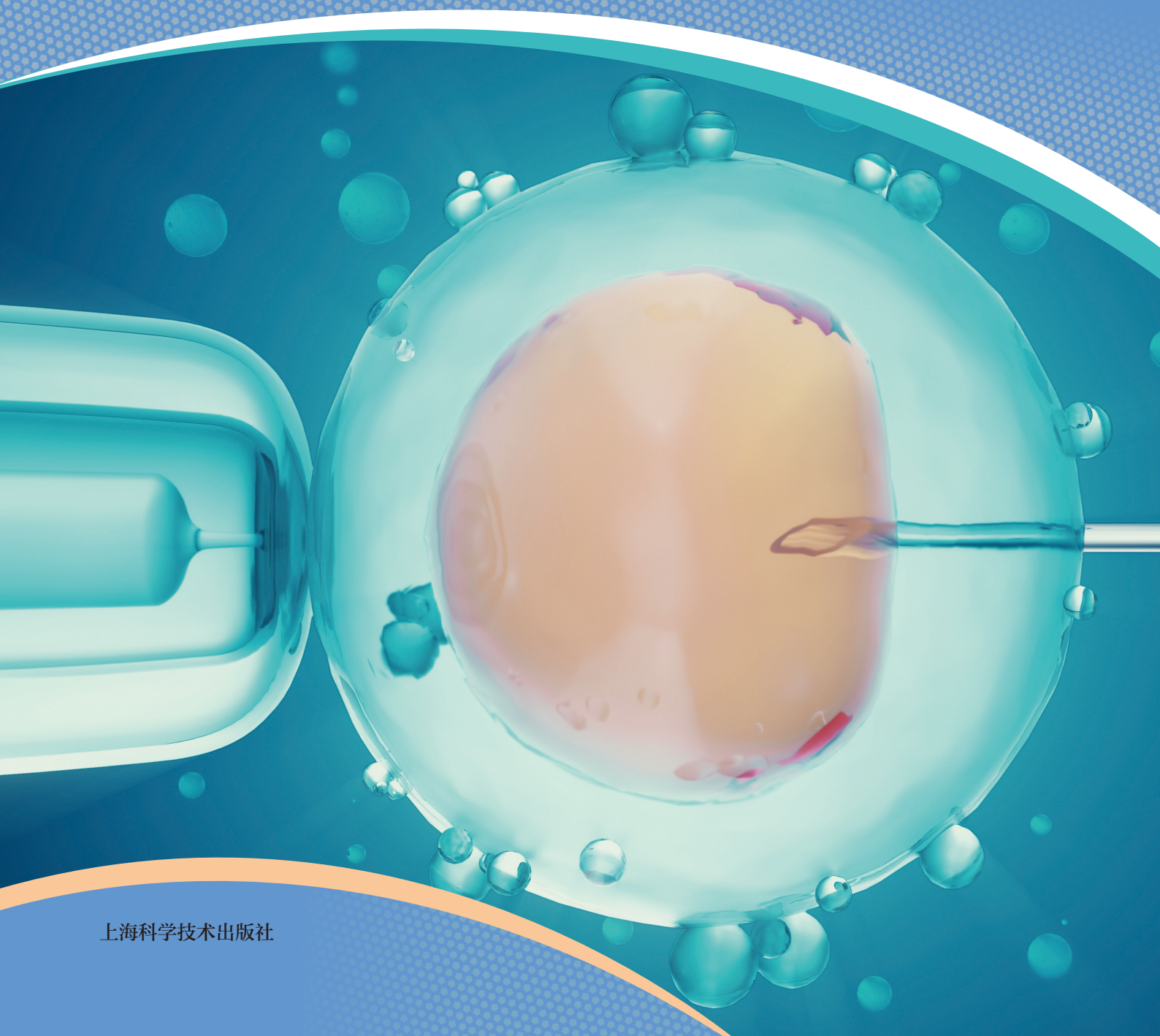


普通高中教科书

生物学

选择性必修 3

生物技术与工程



上海科学技术出版社

普通高中教科书

生物学

选择性必修 3

生物技术与工程



上海科学技术出版社

主 编：赵云龙 周忠良

本册主编：张惠展

编写人员：（以姓氏笔画为序）

马昱澍 李竹青 何俊民 高红亮 鲍晓云

责任编辑：杨 硕 吴 玥

美术设计：蒋雪静

普通高中教科书 生物学 选择性必修3 生物技术与工程

上海市中小学（幼儿园）课程改革委员会组织编写

出 版 上海世纪出版（集团）有限公司 上海科学技术出版社

（上海市闵行区号景路159弄A座9F-10F 邮政编码201101）

发 行 上海新华书店

印 刷

版 次 2023年1月第 版

印 次 2025年8月第 次

开 本 890毫米×1240毫米 1/16

印 张 8

字 数 160千字

书 号 ISBN 978-7-5478-5299-6/G·1037

定 价

版权所有·未经许可不得采用任何方式擅自复制或使本产品任何部分·违者必究

如发现印装质量问题或对内容有意见建议，请与本社联系。电话：021-64848025，邮箱：jc@sstp.cn

全国物价举报电话：12315

声明 按照《中华人民共和国著作权法》第二十五条有关规定，我们已尽量寻找著作权人支付报酬。著作权人如有关于支付报酬事宜可及时与出版社联系。

目录

第 1 章

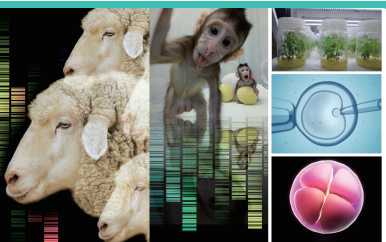
发酵工程 1



- 第 1 节 获得纯种微生物是发酵工程的基础 / 2
 - 探究·实验 1-1 酵母浸粉胨葡萄糖培养基的配制 / 6
 - 探究·实验 1-2 酵母的分离和纯化 / 8
 - 探究·实验 1-3 土壤中分解尿素细菌的分离与计数 / 12
- 第 2 节 发酵工程为人类提供多样化生物产品 / 15
 - 探究·实验 1-4 果酒和果醋的制作 / 17
 - 探究·实验 1-5 酸奶的制作 / 19
 - 探究·活动 1-6 虚拟仿真：发酵条件对微生物发酵的影响 / 24

第 2 章

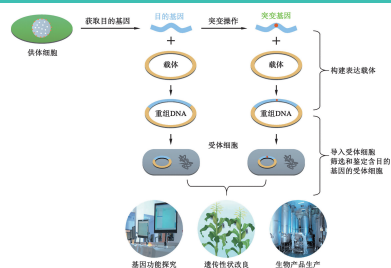
细胞工程 33



- 第 1 节 利用植物细胞工程培育新植株 / 34
 - 探究·实验 2-1 月季的快速繁殖 / 39
- 第 2 节 利用动物细胞工程改良动物细胞 / 43
 - 探究·活动 2-2 收集单克隆抗体的应用实例 / 47
- 第 3 节 利用胚胎工程快速繁育优良动物品种 / 57

第 3 章

基因工程 65



第 1 节	基因工程赋予生物新的遗传特性 / 66
第 2 节	基因工程是一种重组 DNA 技术 / 73
	探究·建模 3-1 模拟限制性内切核酸酶的切割作用 / 75
	探究·实验 3-2 DNA 的提取和鉴定 / 79
	探究·实验 3-3 PCR 扩增 DNA 的原理和操作 / 81
	探究·建模 3-4 模拟 DNA 分子重组 / 83
	探究·实验 3-5 PCR 扩增产物的凝胶电泳鉴定 / 86
第 3 节	蛋白质工程是基因工程的延伸 / 89

第 4 章

生物技术安全与伦理 103



第 1 节	转基因产品的安全性引发社会广泛关注 / 104
	探究·活动 4-1 辩论：转基因食品是否安全？ / 109
第 2 节	生殖性克隆人带来诸多伦理问题 / 111
	探究·活动 4-2 讨论：你是否支持设计试管婴儿？ / 113
第 3 节	全面禁止生物武器 / 115

第

1

章

发酵工程

新鲜的泥土有一种特别的土腥味，散发这种土腥味的微生物可以生产一种抗生素——链霉素，用于治疗曾肆虐人类几千年的肺结核；从甜瓜上的一个霉斑可以找到生产另一种抗生素——青霉素的微生物，这些抗生素的发现和使用极大地增强了人类抵抗细菌性感染的能力……微生物为人类的生存和发展作出了巨大的贡献。那么，如何从自然环境中分离得到生产特定抗生素的微生物？抗生素又是如何在工厂中大规模生产的？这主要是利用了现代生物工程技术中的发酵工程技术。传统发酵主要利用微生物制作酸奶和泡菜等食品；而现代发酵则利用自动化控制和工程化技术体系大规模生产抗生素、蛋白质药物和燃料乙醇等各类产品。发酵工程技术在食品、医药、资源与环境保护等领域有着越来越广泛的应用。



第 1 节

获得纯种微生物是发酵工程的基础

学习目标

- 归纳和概括微生物所需营养物质和生长条件，进一步形成结构与功能等生命观念，并能基于这些观念设计合适的培养基，选择合适的培养和计数方法，有目的地培养纯种微生物。
- 归纳和概括无菌技术对微生物研究和发酵的影响，阐释无菌技术的方法和应用。
- 关注微生物特定功能在生产和生活中的应用。

概念聚焦

- 根据培养微生物的目的，可以有针对性地设计培养基。分离和纯化微生物常用平板划线法和稀释涂布平板法。
- 无菌技术是保障获得纯种微生物的关键技术。

带有酸味的醋、含苦味的啤酒、气味芳香的白酒，都是由谷物发酵而来，却能形成口味截然不同的产品，这都源于微生物的奇妙作用。人们利用微生物发酵制作食品的历史悠久，在此基础上发展而来的发酵工程技术则利用微生物大规模生长和代谢活动生产出更多有价值的产品。微生物是发酵工程的灵魂，不同产品的发酵生产需要使用不同来源、不同种类的微生物。让我们从认识生产抗生素的微生物开始，逐步了解发酵工程。

抗生素的生产菌种

青霉素是人类最早发现的抗生素，现在抗生素的种类已达数千种，临床上常用的也有上百种。这些抗生素都是由不同种类的微生物产生的。

表 1-1 一些微生物生产的抗生素及菌种特征

抗生素	生产菌种	菌种主要特征
青霉素	产黄青霉菌、点青霉菌	霉菌常见于变质的面包、奶酪和水果上，大多为专性好氧的真核微生物
灰黄霉素	灰黄青霉菌	
头孢霉素 C	头孢霉菌	
链霉素	灰色链霉菌	链霉菌是一种放线菌，主要分布在含水量较低、有机物较丰富和呈微碱性的土壤中，多为好氧的原核微生物
卡那霉素	卡那霉素链霉菌	
利福霉素	地中海链霉菌	
土霉素	龟裂链霉菌	
制霉菌素	诺尔斯链霉菌	
井冈霉素	吸水链霉菌	

思考与讨论：

1. 欲大量生产抗生素，就要大规模培养对应菌种的微生物，微生物的培养需要满足哪些条件？
2. 自然界中的微生物种类繁多，而且常常生活在一起，如何才能分离得到生产所需的纯种微生物？

1. 培养基为微生物提供所需营养物质

微生物需要的营养物质 在我们生活的周围，处处都有微生物在繁衍生息。微生物个体微小，在自然界中常常是多种微生物生活在一起。因此，分离、纯化和培养微生物是研究和利用微生物的前提。微生物的生存和生长依赖于适宜的营养物质和生长环境。**培养基**是一种由人工配制的适合微生物生长、繁殖并产生代谢产物的营养基质。只有了解微生物所需的营养物质和生长条件，才能设计出满足微生物培养需求的培养基。以微生物发酵生产维生素 B₂ 的一种培养基配方为例，微生物所需的营养物质一般包括碳源、氮源、生长因子、无机盐和水等（图 1-1）。

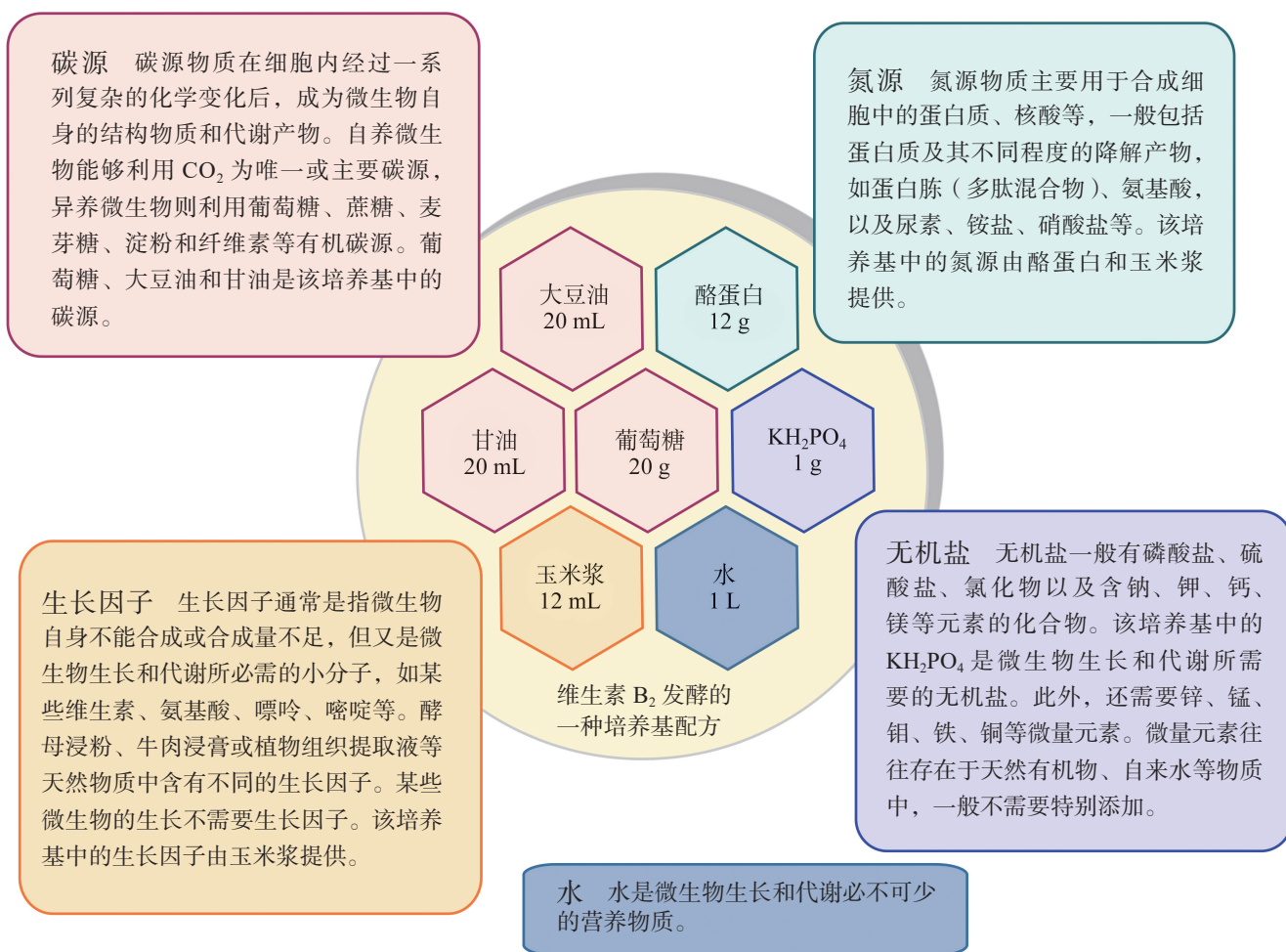


图 1-1 微生物生长所需的营养物质

学习提示

微生物的生长还需要能源。葡萄糖、淀粉等碳水化合物可作为异养微生物的能源。对于不能固氮的微生物来说,蛋白质同时具有氮源、碳源和能源三种功能。

选用或设计培养基首先要考虑选择适宜的营养物质。由于微生物具有不同的营养类型,对营养物质的要求也各不相同,且不同微生物生长、繁殖和代谢产物积累所需的 pH 也不相同。因此,必须根据各种微生物的特点及实验目的选用合适的培养基。

培养基的类型 根据成分来源、物理状态和基本用途,可对培养基进行不同的分类(图 1-2)。

用于工业生产的发酵培养基的原料还应具备来源丰富、价格低廉、质量稳定等特点。例如,常用的碳源有葡萄糖、蔗糖和淀粉水解物等,常用的氮源有玉米浆、黄豆饼粉和各种蛋白水解物等。

根据培养基的成分来源分类

- 天然培养基
- 合成培养基

天然培养基含有蛋白胨、牛肉膏和酵母浸粉等化学组成不确定的成分,如培养常见细菌的牛肉膏蛋白胨培养基。

合成培养基是由化学成分完全确定的物质配制而成的培养基。

根据培养基的物理状态分类

- 液体培养基
- 半固体培养基
- 固体培养基

实验室常用的培养基凝固剂为琼脂,这是一种从海藻中提取的多糖类物质,一般不能被微生物所利用。根据琼脂加入量的不同,培养基呈现不同物理状态:半固体培养基加入量为0.3%~0.7%,固体培养基加入量为1.5%~2.0%。

液体培养基常用于微生物的大量培养;半固体培养基可用于观察微生物的运动和分类鉴定等;固体培养基常用于微生物分离、鉴定、计数和菌种保存等。

根据培养基的基本用途分类

- 通用培养基
- 选择培养基
- 鉴别培养基

通用培养基营养物质齐全,可以满足多种微生物的营养需求。

选择培养基有利于目的微生物生长,使其成为优势菌,从而抑制杂菌生长,如仅以纤维素为碳源的培养基可用来筛选土壤中产纤维素酶的微生物。

鉴别培养基用于区分和鉴定不同微生物,如大肠杆菌在伊红美蓝培养基上的菌落呈现金属光泽的紫黑色。

图 1-2 培养基的不同分类

2. 无菌技术是微生物研究和发酵工程的基础

在微生物发酵培养中，一般使用的是经过分离筛选获得的纯种微生物，全过程不能有杂菌污染，而且所用的微生物也不允许污染环境。这种防止纯种微生物被其他微生物污染，且自身也不污染操作环境的技术称为**无菌技术**。

无菌技术贯穿于微生物分离、纯化、接种、培养及菌种保藏的整个过程。借助于不同的灭菌和消毒手段，可不同程度地减少或完全杀灭环境中的微生物，确保微生物研究和生产顺利进行。灭菌是采用强烈的理化条件使物体内外的一切微生物（包括芽孢）丧失其生长繁殖能力的措施。相比之下，消毒则采用较温和的理化条件，杀死物体内外一部分对人体或动植物有害的病原菌，但对被消毒的对象基本无害。

常用的灭菌方法有高温灭菌、过滤除菌和辐射灭菌等。高温灭菌适用于耐热物品，常用的方法有高压蒸汽灭菌、干热灭菌等。干热灭菌包括火焰灼烧和烘箱干燥灭菌。而含有热敏感物质（如尿素）的培养基以及好氧发酵所需的无菌空气则常用过滤除菌（图 1-3）。过滤除菌是将含菌的液体或气体通过高温灭菌的过滤介质，阻截其中的微生物，以达到除菌的目的。辐射灭菌是利用电离辐射或紫外线辐射等杀灭微生物的方法。紫外线辐射一般用于对物体表面和空气的灭菌，如超净工作台内部和无菌室等。

学习提示

某些细菌产生的芽孢具有高度抗热且很难被化学物质或辐射破坏的特性，这可使细菌度过极端温度、干旱或营养物质匮乏的时期。



图 1-3 过滤器和滤芯



广角镜

高压蒸汽灭菌



图 1-4 手提式高压蒸汽灭菌锅

蛋白质是微生物细胞的重要成分，是生命活动的关键物质。高温可使蛋白质变性，从而达到消灭微生物的目的。在实验室里，将待灭菌的物品放置在盛有适量水的高压蒸汽灭菌锅内（图 1-4），通过加热使锅内的水沸腾而产生蒸汽。待水蒸气将锅内的冷空气驱尽后，继续加热使锅内的气压逐步上升，温度也随之升到 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以上，导致菌体蛋白质变性凝固，从而达到灭菌的目的。当表压为 0.1 MPa 时，温度可达 $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，一般维持 $15\sim 30\text{ min}$ ，即可杀死一切微生物及其孢子或芽孢，这也成为培养基的常规灭菌条件。

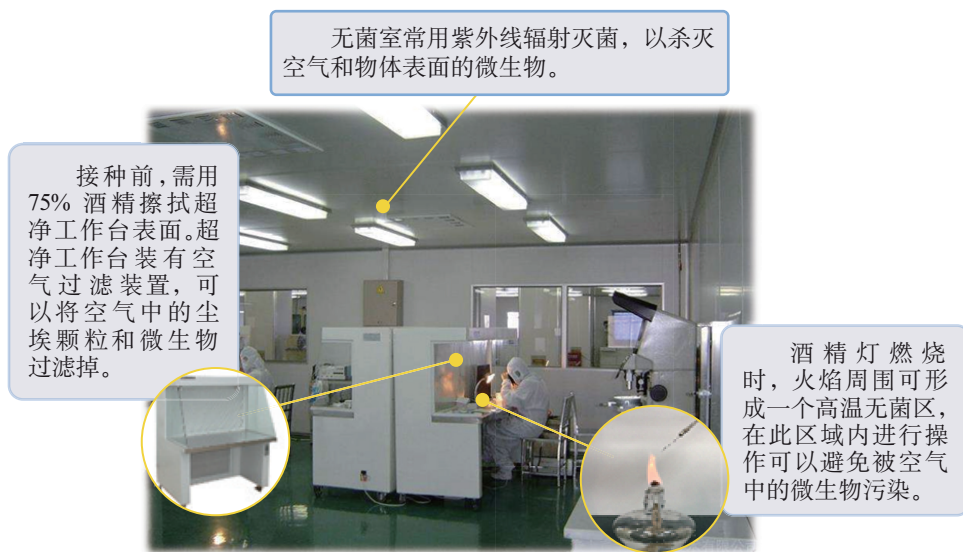


图 1-5 常见的无菌操作室

为了确保微生物实验操作过程中不污染杂菌，还需要人为提供一个无菌区域(图 1-5)。进行微生物实验操作时，操作者的衣着和手需进行清洁和消毒；实验结束时，也一定要洗手，以防止被微生物感染。使用后的培养基丢弃前，一定要进行灭菌处理，以免污染环境。



探究·实验

1-1 酵母浸粉胨葡萄糖培养基的配制

你能想象德国科学家科赫(R. Koch)最早是用马铃薯片作为固体培养基培养细菌吗?之后,他又采用明胶作为培养基的凝固剂,但明胶容易融化。后来,科赫采用了助手建议的琼脂作为凝固剂,效果理想,从而沿用至今。从马铃薯片到琼脂的应用,科学家们发明的固体培养基使得研究人员可将目标微生物从“混居”环境中分离出来。

▶ 实验目标:

学习和掌握配制培养基的一般方法和步骤。

▶ 实验原理:

培养基一般含有微生物所必需的营养物质。酵母浸粉胨葡萄糖培养基中的葡萄糖主要提供碳源,蛋白胨和酵母浸粉主要提供氮源和生长因子。该培养基常用于酵母的培养。

▶ 材料器具:

烧杯、250 mL 三角烧瓶、三角烧瓶塞、量筒、培养皿、

玻璃棒、牛皮纸、纱布、线绳、精密 pH 试纸、酒精灯、火柴、记号笔、1 mol/L NaOH 溶液、1 mol/L HCl 溶液、可加热的磁力搅拌器、天平、灭菌锅、注射器、无菌过滤器、超净工作台等。

实验步骤：

1. 称量：参照表 1-2，称量配制 500 mL YPD 培养基所需的酵母浸粉 5 g、蛋白胨 10 g、琼脂 10 g。单独配制 20%（质量体积比）葡萄糖溶液 50 mL，备用。

2. 溶解：在烧杯中加入酵母浸粉和蛋白胨，并加入约 250 mL 蒸馏水，搅拌均匀，在磁力搅拌器上加热溶解后，再加入琼脂并使之熔化。加热过程中需控制温度，并用玻璃棒不断搅拌。待琼脂充分熔化后，停止加热，补蒸馏水至 450 mL。

3. 调整 pH：用 1 mol/L NaOH 溶液或 1 mol/L HCl 溶液将 pH 调至 6.5。

4. 分装：将烧杯中的培养基趁热倒入 250 mL 三角烧瓶中，每瓶加量约 90 mL，注意不要把培养基沾到瓶口。用瓶塞和牛皮纸包扎封口。

5. 灭菌：将上述培养基与洗净、干燥并包扎好的培养皿一起放入灭菌锅于 121 °C 灭菌 15 ~ 30 min。

6. 倒平板：在超净工作台中，将葡萄糖溶液用无菌过滤器除菌后，加入冷却至 50 °C 左右的培养基中（每 90 mL 培养基加入 10 mL）。混匀后，右手持三角烧瓶，左手将瓶塞拔出并用小拇指夹住，瓶口保持对着酒精灯火焰。然后，左手拿培养皿，将皿盖在火焰附近打开一缝，用酒精灯火焰迅速烧瓶口后，往培养皿中倒入约 15 mL 培养基（图 1-6）。加盖后小心晃动培养皿，使培养基均匀分布在培养皿底部。最后，将培养皿平置于台面上，待凝固后即成平板。

结果分析：

1. 通过什么证据可判断你制作的培养基平板没有被污染？
2. 培养基平板若出现冷凝水，会对微生物的分离纯化产生什么影响？在本实验过程中，你是采取什么方法来防止冷凝水出现的？

表 1-2 酵母浸粉胨葡萄糖（YPD）培养基配方（1 L）

成分	含量
酵母浸粉	10.0 g
蛋白胨	20.0 g
葡萄糖	20.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	补至 1 L



图 1-6 倒平板示意图

3. 分离和纯化微生物常用平板划线法和稀释涂布平板法

自然环境中的微生物常常是混杂在一起的，因此要对其中某种微生物进行研究，就必须获得纯种培养物，以排除其他微生物的干扰。从混杂的微生物群体中，获得只含有某一种或某一株微生物的过程，称为**微生物的分离和纯化**，常用**平板划线法**和**稀释涂布平板法**（图 1-7）。



平板划线法是通过接种环在固体培养基表面连续划线的操作，将聚集的微生物细胞逐步稀释分散到培养基的表面的方法。在数次划线后培养，可以分离到由一个细胞繁殖而来的肉眼可见的子细胞群体，即菌落。



稀释涂布平板法是将菌液进行一系列的梯度稀释，然后将不同稀释度的菌液分别涂布到固体培养基表面的方法。在稀释度足够高的菌液里，聚集在一起的微生物将被分散成单个细胞，从而能在培养基表面形成单个菌落。

图 1-7 平板划线法和稀释涂布平板法示意图及其说明



探究·实验

1-2 酵母的分离和纯化

固体培养基发明后不久，科学家分离出了酿酒酵母，建立了酵母纯种培养方法。纯种酵母被用于酿酒业，使酒的产量和质量有了可靠的保障。可见，分离和纯化微生物是利用微生物资源的重要手段。

▶ 实验目标：

1. 学会平板划线法和稀释涂布平板法的操作方法。
2. 学会观察与区分平板划线法和稀释涂布平板法的实验结果。

► 实验原理：

通过平板划线法和稀释涂布平板法，使微生物在固体培养基上生长，形成由单个细胞繁殖而成的单菌落，从而可以挑取这种单菌落获得纯种培养物。

► 材料器具：

酵母液、接种环、涂布棒、移液器、0.1 mL 和 1 mL 无菌移液器吸头、酒精灯、火柴、试管、试管架、超净工作台、酵母浸粉胨葡萄糖培养基平板、生理盐水、75%（体积比）酒精、烧杯、记号笔、恒温培养箱等。

► 实验步骤：**一、微生物的平板划线**

1. 点燃酒精灯，将接种环在火焰上灼烧灭菌（图 1-8）。

2. 拔掉盛有酵母液的三角烧瓶塞，使三角烧瓶口迅速通过火焰后，将冷却的接种环伸入酵母液中蘸取一环酵母液，再次将三角烧瓶口通过火焰后塞上瓶塞。

3. 小心揭开培养皿盖，以能使接种环轻松进入为宜。将接种环上的酵母液在平板边缘的一块区域连续划“之”字线，然后烧去接种环上的残余菌液，待冷却后，从第 1 区域划线的末端开始往第 2 区域内划线，继续在第 3 区域内重复以上操作。划线时一定要轻，不要划破培养基（图 1-9）。

二、微生物的稀释涂布**1. 酵母液的稀释**

（1）取 6 支试管，分别加入 9 mL 生理盐水后封口，按 $10^1 \sim 10^6$ 的顺序编号，灭菌。

（2）用移液器吸取 1 mL 酵母液，注入 10^1 倍稀释的试管中，混合均匀。

（3）从 10^1 倍稀释的试管中吸取 1 mL 稀释液，注入 10^2 倍稀释的试管中，混合均匀。依此类推，直到完成最后一支试管 10^6 倍的稀释（图 1-10）。

2. 涂布方法

（1）将涂布棒浸在盛有 75% 酒精的烧杯中。

（2）用移液器吸取 0.1 mL 稀释倍数为 10^4 倍的酵母液，

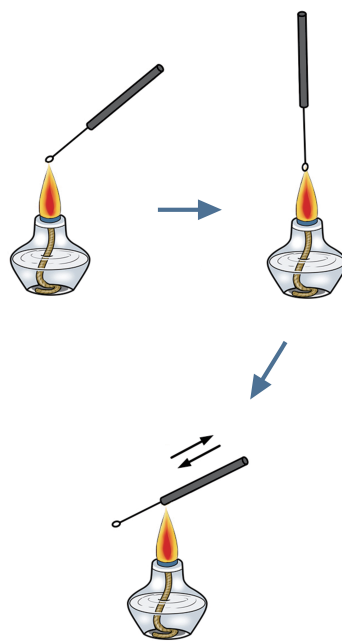


图 1-8 接种环的灭菌示意图

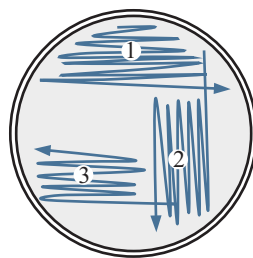


图 1-9 划线方法示意图

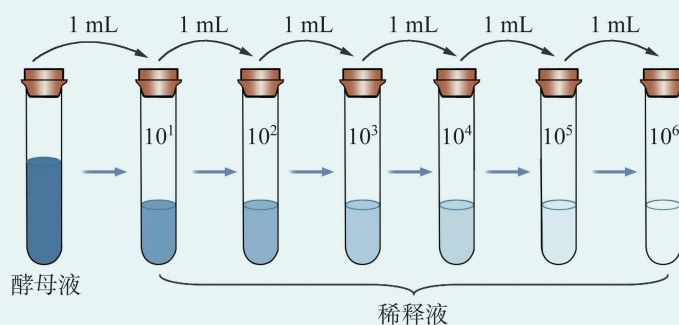


图 1-10 稀释操作示意图

滴加到培养基平板表面的中央。

(3) 取出沾有少量酒精的涂布棒快速穿过火焰，待酒精燃尽后，冷却几秒钟。

(4) 用涂布棒将酵母液均匀地涂布在整个平板的表面，确保整个平板的表面都被覆盖。

(5) 另取培养基平板，重复上述操作，分别涂布 10^5 和 10^6 两个稀释倍数的酵母液。

三、微生物的培养和菌落的观察

将划线和涂布后的平板以及一个未涂布的平板都置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中，倒置培养 24 h 和 48 h 后，分别观察并记录结果。

▶ 结果分析：

1. 平板划线法和稀释涂布法培养的结果有何异同？
2. 采用什么措施能确保获得单菌落？



广角镜

根据菌落特征区分微生物

不同微生物在特定培养基上生长、繁殖所形成的菌落特征有很大差异。而同一种微生物在一定条件下培养，其特征往往有一定的稳定性，由此可以对不同微生物加以鉴别。菌落特征是衡量菌种纯度、辨认和鉴定菌种的重要依据。菌落特征取决于组成菌落的细胞结构和生长行为。特征描述一般包括：菌落的大小、形态、颜色、透明度、隆起状态、边缘特征等（图 1-11）。菌落形态大小也受到邻近菌落的影响。菌落靠得太近，则有限的营养物质、有害代谢物的分泌与积累使菌落生长受到抑制。此外，培养时间的长短也会影响菌落应有特征的表现。



金黄色葡萄球菌



枯草芽孢杆菌



阿维丁链霉菌



酿酒酵母

图 1-11 各种菌落

4. 测定微生物数量可间接了解微生物的生长状况

微生物的生长与繁殖分别表现为细胞物质的增加和细胞数量的增加。测定微生物细胞数量可以间接了解微生物的生长状况，常用方法是稀释涂布平板法和显微镜计数法。

稀释涂布平板法也可以用来进行活菌计数。该方法将待测菌液经适当稀释，涂布在平板上，经培养形成菌落后，统计菌落数。由于一个单菌落是由原样品中一个活的菌体细胞生长繁殖而成，因此，通过统计菌落数并根据其稀释倍数和取样量，可换算出单位样品中的活菌数（图 1-12）。为了保证结果准确，一般选择菌落数在 30~300 的平板进行计数。

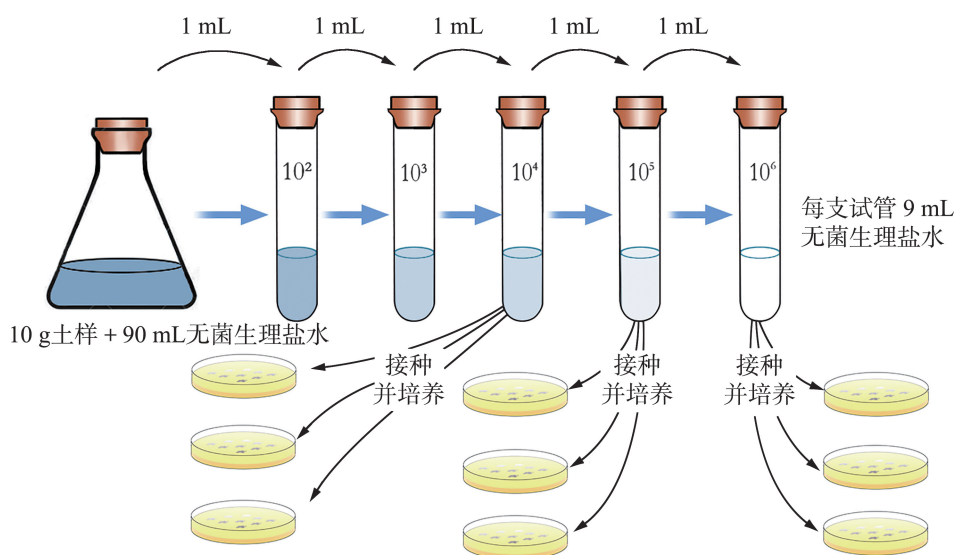


图 1-12 样品的稀释和稀释液的取样培养流程示意图

显微镜计数法是利用血细胞计数板在显微镜下直接观察微生物细胞并进行计数的方法。计数时，将菌液充满计数室，通过对微生物数量的读取，计算原菌液中的微生物数量。该方法具有直观、简便和快速的优点，适用于个体相对较大的酵母细胞和霉菌孢子等微生物的计数。但是，这种方法测得的是所有细胞的总数，不能区别死细胞或活细胞；对运动能力强的活细胞也难以计数。



探究 · 实验

1-3 土壤中分解尿素细菌的分离与计数

土壤是微生物生活的大本营，一些微生物的生命活动增加了土壤的肥力。因此，土壤是寻找和发现有应用潜力的微生物的重要来源。尿素是农业上一种常用的氮肥，但是农作物不能直接利用尿素，只有脲酶将尿素分解成氨之后，才能被农作物利用。土壤中的脲酶是由一类能分解尿素的细菌产生的。

▶ 实验目标：

学会从土壤中分离得到分解尿素细菌的方法；通过计数，统计 1 g 土样中分解尿素细菌的数量。

▶ 实验原理：

若培养基中唯一的氮源是尿素，那么只有能合成脲酶的细菌才能分解尿素，以尿素作为氮源。无法合成脲酶的其他微生物则由于缺乏氮源而不能生长、繁殖。所以，用这种选择培养基就能从土壤微生物中分离出分解尿素细菌。

▶ 材料器具：

土壤样品、烧杯、量筒、250 mL 和 100 mL 三角烧瓶、三角烧瓶塞、15 mm × 150 mm 试管、试管架、培养皿、玻璃棒、涂布棒、移液器、0.1 mL 无菌移液器吸头、酒精灯、牛皮纸、线绳、精密 pH 试纸、火柴、无菌生理盐水、1 mol/L NaOH 溶液、1 mol/L HCl 溶液、记号笔、过滤除菌器、可加热的磁力搅拌器、天平、振荡器、恒温培养箱、超净工作台等。

▶ 实验步骤：

一、配制培养基

1. 参照表 1-3，配制 500 mL LB 琼脂培养基，灭菌，制作平板。

2. 参照表 1-4，配制 500 mL 尿素琼脂培养基，灭菌后待冷却至 60 °C 时，加入过滤除菌后的 10 mL 尿素溶液（内含

表 1-3 LB 琼脂培养基配方（1 L）

成分	含量
胰蛋白胨	10.0 g
酵母浸粉	5.0 g
NaCl	10.0 g
琼脂	20.0 g
蒸馏水	补至 1 L
配制完成后，将 pH 调至 7.0	

0.5 g 尿素), 摇动, 混合均匀后, 制作平板。

二、制备细菌悬液

在无菌条件下, 将 10 g 土样加到有 90 mL 无菌生理盐水的三角烧瓶中, 振荡 10 min, 即成 10^1 倍土壤稀释液。依次用试管稀释制备 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 稀释倍数的土壤稀释液。取样时, 尽量只取悬液。

三、微生物的涂布

取 10^3 、 10^4 和 10^5 倍土壤稀释液各 0.1 mL, 分别加到 LB 琼脂培养基平板和尿素琼脂培养基平板上, 用涂布棒将菌液涂布到整个培养基平板上。

四、微生物的培养、观察和计数

1. 将平板倒置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中培养 24~48 h。观察和统计两种培养基平板上的菌落数。

2. 根据平均菌落数推算样品中分解尿素细菌的数量:

$$\text{每克样品中的菌株数} = (C \div V) \times M$$

其中: C 表示某一稀释倍数下平板上生长的平均菌落数; V 表示涂布平板上所用的稀释液的体积; M 表示稀释倍数。

► 结果分析:

1. 两种培养基平板的菌落数量有何差异? 为什么会出现这种差异?

2. 若培养基平板上的菌落数太少, 或是太多, 对计算活菌数量有何影响?

► 拓展探究:

如果本实验使用同一取样地一年中不同时段收集的土壤, 或者同一时间收集不同地区的土壤, 会出现怎样的结果? 想想看, 如何征集这样的“土壤细菌大数据”? 你能从中挖掘出哪些更有趣的结果?

表 1-4 尿素琼脂培养基配方 (1 L)

成分	含量
葡萄糖	10.0 g
尿素	1.0 g
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	20.0 g
蒸馏水	补至 1 L
尿素需要单独过滤除菌; 配制完成后, 将 pH 调至 7.2	



自我评价

1. 橘子、草莓等水果放久了，其表面就可能长出灰白色、黄色或绿色的霉斑，由此可初步判断水果已被霉菌污染。

(1) 霉菌生长所需的碳源物质可能有哪些？

(2) 若接种水果上的霉菌并培养，则表

1-5 中操作步骤正确的是_____。

(3) 用平板划线法和稀释涂布平板法分别接种霉菌于同种培养基上，培养相同时间得到菌落。下列关于两者菌落的描述，正确的是（ ）。

A. 数量基本一致

B. 特征基本一致

C. 分布均匀程度一致

D. 聚集成菌落的程度一致

2. 土壤中微生物的种类繁多，有些是对人类有益的微生物，如能分解尿素的细菌和分解纤维素的细菌，人类将其从土壤中分离出来后可应用于生产实践。表 1-6 显示了分离土壤中微生物的两种培养基配方，其中水解酪素是酪蛋白的水解产物。

(1) 就微生物需要的营养物质而言，甲培养基中有哪几类营养物质？

(2) 根据物理状态，甲培养基与乙培养基分别属于何种培养基？

(3) 若要分离土壤中的纤维素分解菌，应选择哪种培养基？试设计一个对照实验，说明选择培养基的作用。

(4) 纤维素分解菌能够分泌纤维素酶，从而分解纤维素。经分离和纯化的纤维素分解菌在生产和生活中有哪些应用？写出一项应用，并阐述理由。

表 1-5 操作步骤

序号	材料器具	灭菌方法
①	培养皿	75% 酒精擦拭
②	菌种稀释液	紫外线照射
③	接种环	火焰灼烧
④	培养基平板	高压灭菌

表 1-6 培养基配方

甲培养基成分及含量		乙培养基成分及含量	
葡萄糖	10.0 g	纤维素粉	0.5 g
尿素	1.0 g	酵母浸粉	0.5 g
KH ₂ PO ₄	1.4 g	水解酪素	5.0 g
Na ₂ HPO ₄	2.1 g	NaNO ₃	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.2 g	Na ₂ HPO ₄	1.2 g
琼脂	20.0 g	KH ₂ PO ₄	0.9 g
蒸馏水	补至 1 L	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
		KCl	0.5 g
		蒸馏水	补至 1 L

3. 淀粉经过多种淀粉酶水解后可以生成葡萄糖。葡萄糖是一种重要的工业原料。淀粉酶产生菌的主要来源是土壤。已知某种淀粉酶产生菌能在 55 °C 生长，最适生长 pH 为 7.0 ~ 8.0。试设计一个从土壤中筛选此种淀粉酶产生菌的方案。

第2节 发酵工程为人类提供多样化生物产品

传统发酵以生产食品为主，现代发酵产品则涉及人们生产与生活的方方面面，如减少白色污染的可降解塑料聚乳酸、缓解能源危机的燃料乙醇、防治疾病的抗生素和疫苗……**发酵工程**是利用微生物的生命活动大量生产人们所需产品的工程技术体系。人们逐渐掌握了发酵过程中微生物细胞积累代谢产物的规律和特征，能更有效地控制发酵过程。随着发酵过程中工程化体系和自动化控制系统的快速发展，发酵工程正为人类提供越来越多的生物产品。让我们从传统发酵食品开始，深入认识造福人类的发酵工程吧。



酱油的制作

醋、酱油、味精是厨房必备的调味品，你知道它们都是发酵而来的吗？通过图 1-13，你可以初步了解酱油的制作过程。

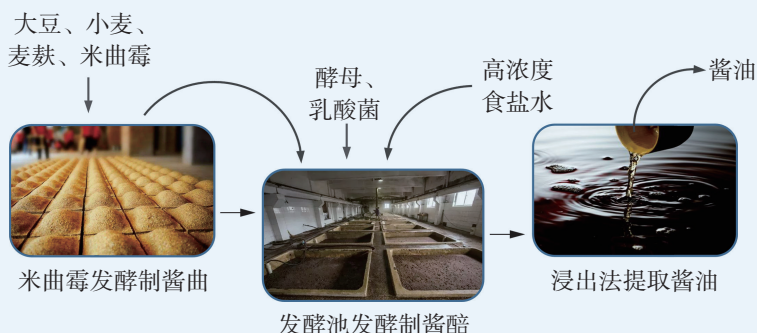


图 1-13 酱油制作工艺流程图

思考与讨论：

1. 根据已有知识分析，米曲霉在发酵制酱曲的过程中起了什么作用？
2. 在发酵池发酵制酱醅的过程中，必须控制哪些条件才能满足乳酸菌和酵母的发酵？
3. 为什么大豆、小麦等原料经过发酵，能产生酱油特有的鲜味？



学习目标

- 结合微生物发酵的实例，基于结构与功能、物质与能量等观念，阐明现代发酵技术的基本原理。
- 在制作发酵食品、模拟发酵过程调控等探究过程中，记录和分析微生物发酵过程的动态变化，阐释微生物发酵的调控过程。
- 关注发酵工程产品的应用，能对发酵技术在生产、生活中的应用提出初步构想。

概念聚焦

- 运用传统发酵技术可以生产果酒、酸奶等食品。
- 微生物的菌种筛选及其生长代谢调控是发酵工程的基础。

1. 运用传统发酵技术生产多种食品

酿酒是最传统的发酵技术之一，我国早在4 000年前的龙山文化时期，就出现了黄酒酿造技术。在长期的生活实践中，人们又逐渐掌握了制作酱油、泡菜、酸奶、奶酪和果酒等传统发酵技术。传统发酵以自然发酵工艺为主，生产过程难以精确控制，主要依靠操作者的经验判断。至今，传统发酵技术仍然应用于很多食品的生产。

学习提示

巴氏消毒法是一种低温杀菌法，主要用于杀死液体中的病原菌，具体的杀菌温度和时间需要按照杀菌对象和它所含微生物的不同来确定。

果酒和果醋 很早以前，人类就发现熟透或刚开始腐烂的果子会发出醉人的香味。随着经验的积累，人类逐渐掌握了制作果酒的技术。公元前3 000年左右，埃及金字塔的壁画就记载了葡萄采摘和葡萄酒的酿造过程（图1-14）。19世纪中期，法国科学家巴斯德（L. Pasteur）指出，酵母在葡萄酒制作过程中起关键作用，并发现葡萄酒变酸是由于细菌的污染。如果把酒加热到62℃，保持30 min，就能杀死其中的微生物，这种方法就是著名的“巴氏消毒法”。



图1-14 记载葡萄采摘及葡萄酒酿造过程的埃及金字塔壁画

果酒是以新鲜水果或果汁为原料、经酵母发酵而成的、含有一定酒精的发酵酒。果酒在发酵过程中发生了一系列复杂的生化反应，最终形成果酒独特的风味和色泽。

果醋是在果酒基础上，进行醋酸发酵酿制而成的饮料醋（图 1-15），兼具水果和醋的香味。果醋中含有机酸、氨基酸、醇类及多种维生素等成分，营养丰富。



图 1-15 制作果酒和果醋的流程示意图



探究·实验

1-4 果酒和果醋的制作

我国水果资源非常丰富，从汉代开始就有果酒生产的相关记载，包括枸杞酒、梅子酒、大枣酒等。果酒以其独特的风味受到人们的喜爱。

▶ 实验目标：

掌握果酒和果醋的制作原理；学习果酒和果醋的制作方法。

▶ 实验原理：

果酒的制作利用了酵母在有氧和无氧条件下的不同生理过程。在有氧条件下，酵母将有机物彻底分解为二氧化碳和水，大量繁殖；在无氧条件下，则进行酒精发酵。果醋是在果酒基础上，利用醋酸菌进行发酵酿制而成。醋酸菌是好氧菌，在氧气充足条件下，可将果酒中乙醇转化为乙醛，再将乙醛转化为醋酸。

▶ 材料器具：

新鲜、成熟的葡萄或苹果等水果、预先制备好的酿酒酵母液和醋酸菌液、烧杯、广口瓶、三孔胶塞、温度计、纱布、硅胶管、止水夹、过滤器、榨汁机、可加热的磁力搅拌器、玻璃酒精计、pH 计、玻璃瓶、蒸馏瓶等。

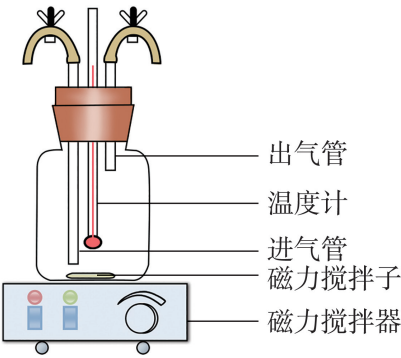


图 1-16 发酵瓶装置示意图

表 1-7 果酒鉴定指标

指标	标准
色泽	具有原果实的真实色泽，清亮透明，无明显悬浮物，无沉淀
香气	具有原果实特有的香气和浓郁的果酒香

实验步骤：

一、果酒的制作

1. 将去梗的水果洗净后捣碎，用榨汁机榨汁，或用纱布滤出果汁。
2. 将果汁迅速倒入灭过菌的发酵瓶内（图 1-16），留出 1/3 的空间，按照果汁 10% 的比例（体积比）加入酵母培养液，塞好瓶塞，夹紧进气管和出气管，在 18~25℃ 条件下厌氧发酵 10~12 d。发酵期间通过打开出气管，间或放气几次。
3. 待发酵结束后，取适量果酒样品进行蒸馏，再用玻璃酒精计检测酒精含量。果酒的酒精含量一般在 15%（体积比）以下。
4. 将酒液过滤，装入经消毒的玻璃瓶中，完成果酒的制作。
5. 记录果酒的色泽、香气等特征。

二、果醋的制作

1. 将制作好的果酒按照 10% 的比例（体积比）加入醋酸菌液，塞好瓶塞。打开进气管和出气管，在 30~35℃ 条件下发酵 3~4 d。
2. 待发酵结束后，用 pH 计测定果醋的 pH。果醋的 pH 一般约为 3。
3. 记录果醋的外观、香气等特征。

结果分析：

1. 与表 1-7 列出的果酒鉴定指标作比较，看看你制作的果酒是否成功？
2. 在制作果酒和果醋的过程中，你认为可以从哪些方面防止产物被污染？

酸奶 酸奶是以牛奶为主要原料，经乳酸菌发酵生产的一种具有较高营养价值的特殊风味产品。用于酸奶发酵的乳酸菌主要是德氏乳杆菌保加利亚亚种和唾液链球菌嗜热亚种。

发酵过程中，牛奶中的糖类、蛋白质被分解成更易消化和吸收的小分子物质，还可产生多种维生素。同时，由于乳酸菌可将牛奶中的乳糖转化成乳酸，因此，酸奶还适合乳糖不耐受的人群饮用。



探究·实验

1-5 酸奶的制作

19 世纪, 俄国科学家梅契尼可夫 (I. I. Mechnikov) 研究发现, 保加利亚的很多百岁老人很喜欢吃一种用牛奶发酵而成的、味道酸酸的“小零食”。梅契尼可夫从中分离出了使牛奶变酸的乳酸菌, 并指出该菌在人体的肠道内可以抑制有害菌的繁殖, 从而逐渐引发人们对酸奶的关注。

▶ 实验目标:

掌握酸奶的制作方法; 了解微生物在生产实践中的应用。

▶ 实验原理:

乳酸菌在发酵过程中产生乳酸, 乳酸可以使牛奶中的蛋白质凝固, 同时产生酸奶独特的风味物质。

▶ 材料器具:

优质全脂奶粉或新鲜牛奶、蔗糖、新鲜优质酸奶或市售酸奶菌粉 (含活菌)、250 mL 三角烧瓶、恒温水浴锅、恒温培养箱、冰箱等。

▶ 实验步骤:

1. 原料配制: 将 12.0 g 全脂奶粉和 5.0 g 蔗糖加入三角烧瓶中, 再加 96 mL 蒸馏水; 或在 100 mL 新鲜牛奶中加入 5.0 g 蔗糖, 摇匀, 用封口膜封好三角烧瓶的瓶口。

2. 消毒: 将上述三角烧瓶置于 85~90 °C 的恒温水浴锅中消毒 15 min, 注意要将瓶中液体部分完全浸没在热水中, 并不时摇动。

3. 冷却: 将消毒好的三角烧瓶冷却至 45 °C 左右。

4. 接种: 开启封口膜, 按约 10% 比例 (体积比) 将新鲜酸奶作为菌种或按 0.1%~1% 的比例 (质量体积比) 将酸奶菌粉接入冷却后的原料中, 充分搅匀, 封好封口膜。

5. 保温: 将接种后的原料置于 40~42 °C 的恒温培养箱中保温 4~6 h (具体时间视凝乳速度而定), 待凝固后从恒温培养箱中取出, 停止发酵。

6. 后熟：已形成凝固态的酸奶在 4℃ 左右的低温下保持 12~24 h。

7. 感官评定：记录酸奶的色泽、组织状态、气味和滋味等特征。

▶ 结果分析：

1. 好的酸奶外观色泽均匀一致，呈乳白色，组织均匀细腻，无大块颗粒，具有酸奶特有的香味且酸甜可口。你制作的酸奶达到这个标准了吗？

2. 若酸奶发酵中污染了杂菌，酸奶会出现什么现象？

2. 发酵工程是生产特定产品的现代生物工程技术体系

现代发酵工业出现在第一次世界大战期间，由于微生物分离纯化和无杂菌发酵技术的建立，英国能够工业化大规模生产丙酮和丁醇，德国则用酵母发酵法生产甘油，产品产量和质量控制水平都大幅度提高；在第二次世界大战时期，青霉素需求量的急剧增加推动了好氧液体发酵技术的发展，建立了完整的好氧发酵技术体系和装备，奠定了现代发酵工程技术的理论和实践基础。

微生物菌种 发酵工业依靠微生物的生命活动，能在生产设备中把各种原料转化成产品。发酵生产所用的菌种是具有特定功能的微生物。利用这些特定功能可以生产人们所需的各种产品。菌种是发酵工业的灵魂。目前，工业生产应用的优良菌种绝大多数是从自然界中分离得到野生型菌株，再经过筛选、纯化和诱变育种后才选育成功的。而采用基因工程改造或构建工业生产菌种，已成为最新、最有力的育种技术手段。



广角镜

微生物菌种的逐级扩大培养

在现代发酵工业中，一些产品如味精、柠檬酸、抗生素等的发酵规模越来越大。因此，发酵前需要准备足够数量且活力旺盛的纯种培养物，即发酵的种子。菌种保藏管中处于休眠状态的菌种需经过斜面培养、三角瓶和种子罐的扩大培养而获得大量的种子，这称为微生物菌种的逐级扩大培养。

种子培养基要求原料精细、营养丰富完全，菌种能够迅速生长；发酵培养基则要求菌种能大量生产目的产物，所用原料廉价且易于获得，两者成分区别很大。在实际生产中，种子罐的培养基成分往往更接近于发酵培养基，因此菌种扩大培养过程也是微生物逐渐适应发酵培养基的过程。

生物反应器 生物工程中为微生物或动植物细胞的生长代谢提供场所，使其大量积累目的产物的装置称为生物反应器。发酵罐（图 1-17）是发酵工业中常用的生物反应器，一般采用计算机自动化控制、自动收集和分析数据，并实现最优条件控制。现代发酵常用的大型发酵罐，规模可以从几十立方米到几百立方米。

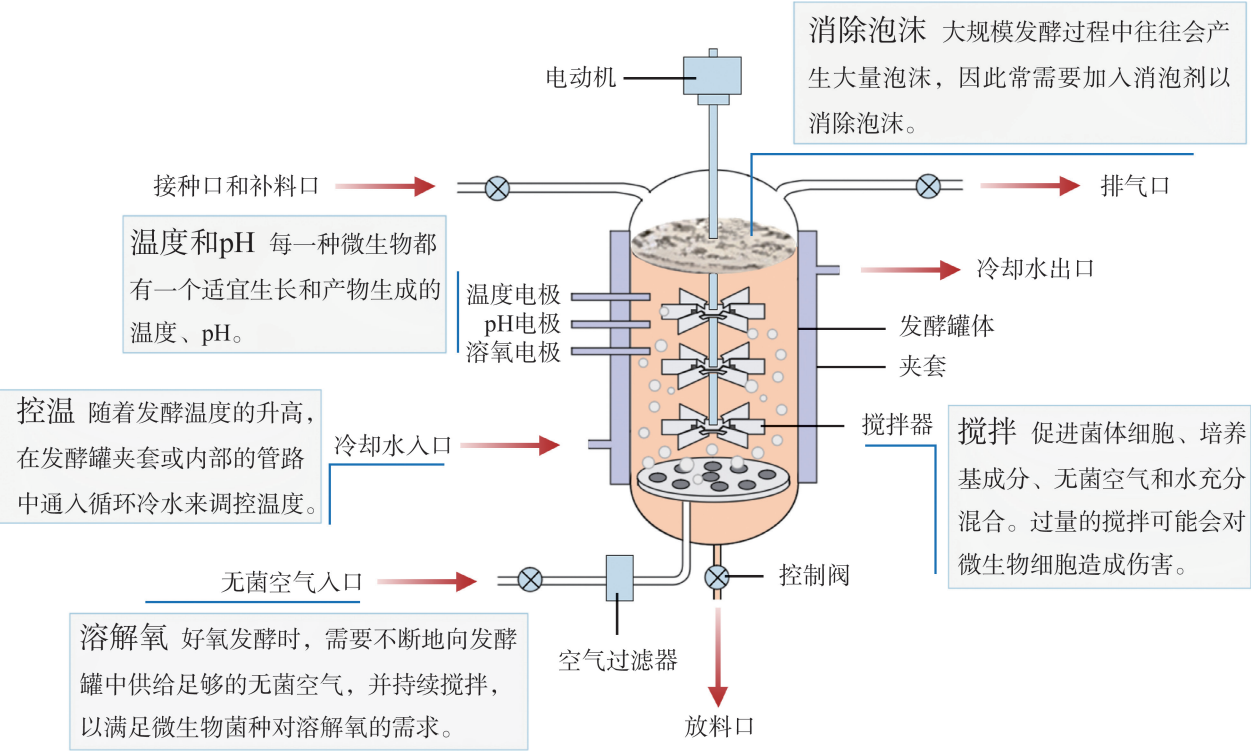


图 1-17 发酵罐结构及工艺控制示意图

现代发酵工业大多数是纯种培养，发酵过程一旦污染杂菌后，杂菌会与生产菌争夺营养，并分泌一些抑制生产菌生长、改变培养液性质或抑制产物合成的有毒副作用的物质，导致产品产量降低、质量下降，造成严重的经济损失。因此，在发酵之前必须采用高压蒸汽对大型发酵罐、培养基和附属设备进行灭菌。

广角镜

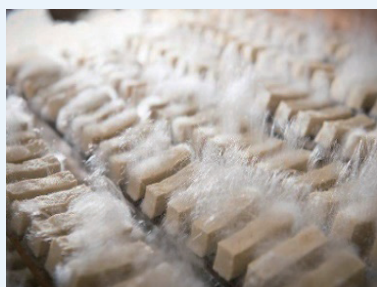
液体发酵与固态发酵

将发酵原料配制成液体培养基，经灭菌后在发酵罐中接入微生物菌种，在发酵过程中通入无菌空气并进行搅拌的培养方法，称为液体发酵。这种方法适用于大规模生产，易于获得混合均一的菌体悬浮液，从而便于对系统进行自动化控制。抗生素、氨基酸、有机酸、酶制剂等许多产品都是通过液体发酵生产的。

与液体发酵不同，微生物生长在潮湿且不溶于水的原料中进行的发酵，称为固态发酵。在我国传统发酵中，白酒、毛豆腐等都是采用固态发酵方法制得的。固态发酵也可以应用于固体废弃物的资源化利用，如农村的堆肥和沼气发酵等（图 1-18）。



(A) 白酒固态发酵



(B) 毛豆腐发酵



(C) 堆肥

图 1-18 不同形式的固态发酵

发酵过程调控 在发酵工业中，从原料到产品的生产过程非常复杂，包含了一系列相对独立的操作环节（图 1-19）。

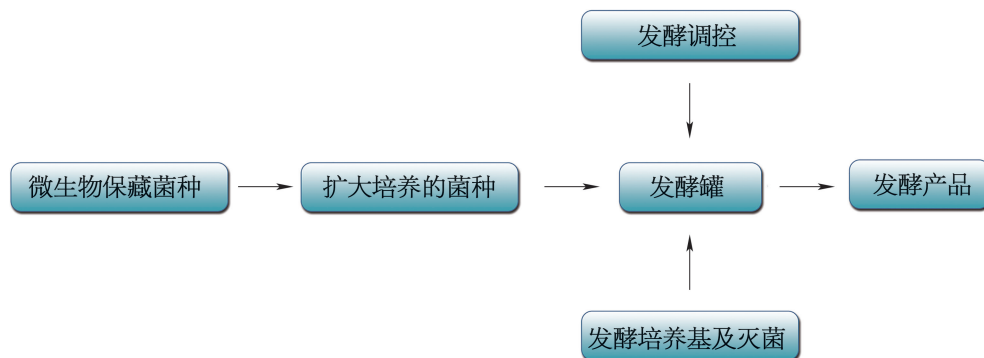


图 1-19 工业发酵流程示意图

发酵过程控制参数主要包括温度、pH、溶解氧、搅拌转速、通气量、营养物浓度和泡沫等。微生物发酵过程可以通过自动控制技术对参数进行实时检测和调控，以满足微生物生长和代谢的要求，发挥其最大生产能力，获得目的产物。在发酵完成后，根据发酵产物性质的不同，人们需要采用不同的方法进行分离并提纯，最终得到商品化的产品。

青霉素作为在临床上广泛应用的抗生素，主要通过微生物发酵进行生产。最初生产菌为点青霉菌，生产能力仅为几十单位/mL 发酵液。在发现适合液体培养的产黄青霉菌（图 1-20）后，生产能力达到 100 单位/mL 发酵液。经不断诱变选育、基因工程改造和发酵条件优化，目前青霉素的生产能力已达到 10 万单位/mL 发酵液。



图 1-20 产黄青霉菌

青霉素培养基的碳源主要是工业用葡萄糖或淀粉的酶水解物，氮源为玉米浆、硫酸铵或氨水，无机盐主要有硫酸钠和磷酸二氢钾等。产黄青霉菌生长的最适温度为 30℃，而生产青霉素的最适温度是 20℃。因此在生产中，将发酵前期温度控制在 26℃左右，发酵后期的温度控制在 23℃左右。青霉素合成的适宜 pH 为 6.5 左右。青霉素发酵对溶解氧水平比较敏感，溶解氧水平主要与无菌空气的通气量及搅拌转速密切相关。发酵过程中还会产生较多泡沫，需要补入消泡剂。

学习提示

空气中的分子态氧在水中称为溶解氧。氧在水中的溶解度很小。在工业生产的好氧发酵中，过低的溶解氧会抑制微生物的有氧呼吸过程，导致副产物增多；过高的溶解氧会影响产物的生成，同时，增加生产成本。



科学史话

青霉素：从发现到工业化生产

1928 年，英国细菌学家弗莱明（A. Fleming，图 1-21）偶然注意到，在培养葡萄球菌的平板中，污染的青霉菌周围没有葡萄球菌生长，形成一个无菌圈。他敏感地认识到这是由于青霉菌分泌了一种能够杀死或阻止葡萄球菌生长的物质所致。随后他发现这种物质具有杀灭多种病原菌的能力，且毒性不大，称之为青霉素。1940 年，英国病理学家弗洛里（H. Florey）和德国生物化学家钱恩（E. B. Chian）通过大量实验证明青霉素可以治疗细菌感染，并建立了提取青霉素的方法。时值第二次世界大战爆发，急需大量青霉素救治伤员，这促使英国和美国的科学家对青霉素的大规模制造工艺进行研究，并于 1945 年实现了青霉素的工业化生产（图 1-22）。同年，弗莱明、弗



图 1-21 弗莱明

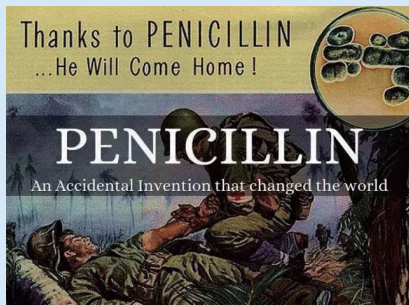


图 1-22 二战时青霉素的宣传画

洛里和钱恩三人由于在研发青霉素上作出的巨大贡献，分享了诺贝尔生理学或医学奖。

早期的青霉素生产采用固体表面培养法，即使用麸皮、豆饼粉等原料与水混合并灭菌后接入产青霉素菌种，置于恒温恒湿的浅盘上培养，并经常翻动以便通气。这种培养方法占地面积大，温度和湿度难以精确控制，且培养基暴露在空气中会造成杂菌污染，发酵水平很低。因此，科学家又探索出液体发酵方法。为了实现液体发酵，科学家解决了多种技术难题。如：为了保证纯种青霉菌的发酵，设计了抗污染的密封发酵罐，接种之前采用高温高压蒸汽对发酵罐及附属设备和培养基进行灭菌；采用换热系统对发酵系统进行冷却，使发酵罐保持适宜的发酵温度；发明了制备无菌空气的设备，保证发酵所需空气的纯净；在发酵罐中增加搅拌装置，加快氧的溶解速度，同时使发酵培养基成分混合均匀。随着设备、技术和工艺问题的解决，青霉素的液体深层发酵法研究成功，极大地提高了发酵效率。后来在青霉素的提取精制中又采用了离心萃取机、冷冻干燥机等新型高效化工设备。这些技术的应用使青霉素发酵的效价提高了数百倍。

青霉素的液体发酵技术开辟了一条全新的工业微生物产品生产道路，就连原来以固态发酵为主的有机酸和酶制剂生产都改成了液体发酵生产，由此诞生了一个新型交叉学科——生物化学工程。

思考与讨论：

1. 从青霉素的发现到实现工业化生产，经过了科研人员艰辛的研究，科学家的探索之路给你什么启示？
2. 你觉得还可以从哪些方面提高青霉素的工业化发酵水平？



探究·活动

1-6 虚拟仿真：发酵条件对微生物发酵的影响

▶ 活动目标：

了解满足微生物发酵所需的条件；通过对发酵条件的虚拟仿真操作，调控微生物的发酵过程。

▶ 活动内容：

1. 针对某种微生物的发酵，通过软件设定发酵条件，并进行仿真实验。

2. 观察和比较不同发酵条件对微生物发酵的影响。

▶ 活动评价：

1. 在微生物发酵的虚拟仿真实验中，你是否通过控制发酵条件达到了实验目的？

2. 通过该实验，你对发酵条件影响微生物发酵有何新的认识？

3. 发酵工程产品在多个领域具有重要应用价值

自 20 世纪 80 年代开始,现代发酵工程技术结合了基因工程、细胞工程等新技术,在医药、食品、化工、材料、农业、能源和环境等领域得以广泛应用(图 1-23),创造了巨大的社会效益和经济效益。

发酵工程与食品工业 我国劳动人民利用发酵技术生产食品历史悠久,形成了各种各样的发酵食品,如老陈醋、黄酒、泡菜和豆腐乳等。传统食品发酵技术起源于食品保藏,用于延长天然食品的保存期,同时也赋予了食品独特的发酵风味。

利用现代发酵技术不仅能提高传统食品的生产效率,而且能发酵生产多种食品添加剂。例如,黄原胶和结冷胶等微生物多糖可作为食品增稠剂;谷氨酸等可作为食品鲜味剂; β -胡萝卜素可作为着色剂和营养强化剂;经大规模培养的乳酸菌等益生菌可直接食用,改善肠道健康。

发酵工程与医药工业 抗生素是最重要的抗感染微生物发酵医药产品。青霉素商业化的成功促进了抗生素工业的蓬勃发展,链霉素的发现使肆虐人类上千年的结核病得到了有效遏制。此后发现的一系列抗生素,如红霉素、头孢霉素和万古霉素等的大量生产和应用,使人类在细菌性传

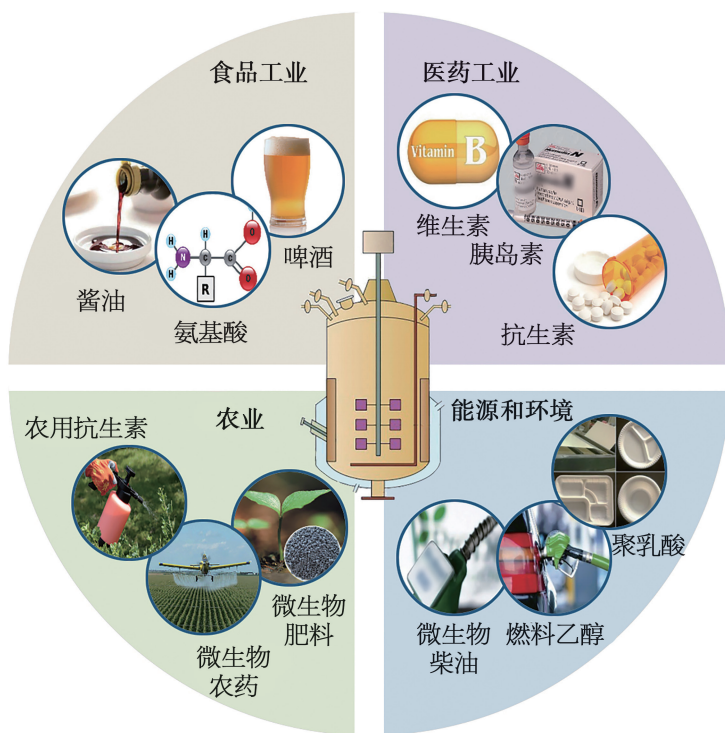


图 1-23 发酵工程产品示例

染病的治疗上获得了极大的进步。

来源于微生物的基因工程药物是通过基因工程构建的菌种发酵生产的生物活性物质。我国已经批准了数十种基因工程药物和疫苗,包括用于抗炎、抗肿瘤和抗病毒的干扰素,增强人体免疫力、提高癌症化疗效果的白介素,治疗严重烧伤者的表皮生长因子,创口修复的成纤维细胞生长因子,治疗糖尿病的胰岛素,婴幼儿及易感者预防乙型肝炎的蛋白多肽类疫苗。



广角镜

酵母合成青蒿素前体——青蒿酸

疟疾是一种由寄生虫引起的严重威胁人类健康的疾病。据世界卫生组织统计:2016年,在91个国家中存在2.16亿疟疾病例,疟疾死亡总数达到44.5万例。2021年,中国疟疾病例由20世纪40年代的约3000万减少至零,是一项了不起的成就。目前治疗疟疾的首选药物是青蒿素,我国科学家屠呦呦因为青蒿素的研究贡献而获得2015年诺贝尔生理学或医学奖。

青蒿素来自黄花蒿(图1-24),由于这种植物种植受季节和地域影响,从中直接提取青蒿素产量低,远远满足不了市场对青蒿素的需求。又因为青蒿素结构复杂,化学合成效率很低且经济上不可行。因此,近年来科学家们尝试利用合成生物学和代谢工程的方法来生产青蒿素。科学家在酵母细胞中导入新的生物合成基因,使之合成出青蒿素的前体物质“青蒿酸”,后者再经过简单化学反应即可合成青蒿素。某制药公司采用发酵方法生产青蒿素,2012年产量达38.7t,相当于近3350hm²耕地的种植产量。该项工作被认为是利用合成生物学技术异源生产植物源天然产物研究的里程碑。

作为一种新技术,微生物合成和发酵技术的潜力巨大。它可以突破传统植物提取的局限,不受地理位置、土壤状况、自然气候环境和灾害的影响,可在工厂里全天候生产,应用前景广阔。



图 1-24 黄花蒿

发酵工程与能源环境 应用微生物技术将天然有机物中贮存的化学能转化为人类所需的可再生、不污染环境、有利于生态平衡的新型能源,已成为缓解能源危机和解决环境污染的重要途径。

有绿色能源之称的燃料乙醇是一种可再生能源，它不仅能够提高燃油品质，而且可以有效减少汽车尾气中温室气体和污染物的排放，在我国、巴西和美国等国家已得到广泛应用（图 1-25）。但传统燃料乙醇是以玉米等粮食作为发酵原料，不仅成本高，而且存在与人争粮的问题，影响我国的粮食安全。我国科研人员利用最新的生物技术研究出木糖专用酵母，可以利用非粮资源的木质纤维素为原料发酵生产乙醇，有利于燃料乙醇在全球的推广应用。

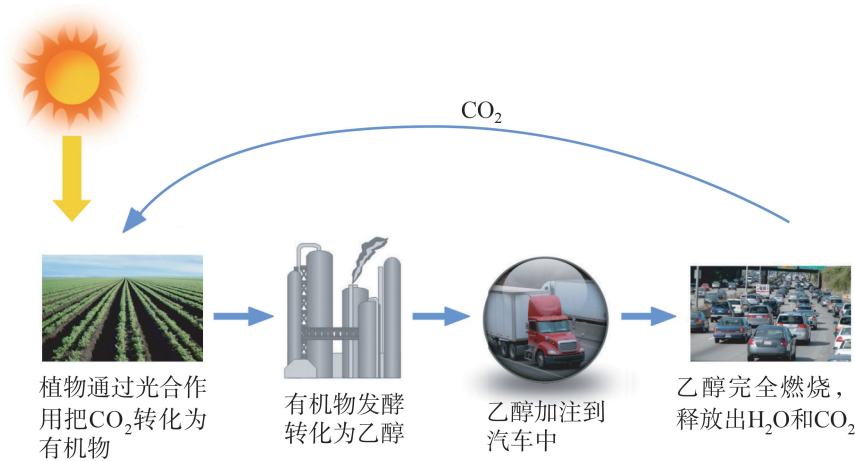


图 1-25 燃料乙醇的再生循环

以石油为原料制造的塑料在自然条件下不易降解，所导致的“白色污染”是一个严重的环境问题。利用微生物发酵法可以生产生物降解塑料，例如，作为第一种商业化生物塑料的聚乳酸就是以微生物的发酵产物乳酸为单体聚合而成的（图 1-26）。除了良好的生物可降解性之外，聚乳酸具有一般石油合成塑料的强度、透明度以及对不良环境的抵抗能力，因而可用于制造各种产品，如生活用塑料制品、农林环保用塑料制品、汽车和建材等领域的复合材料等。

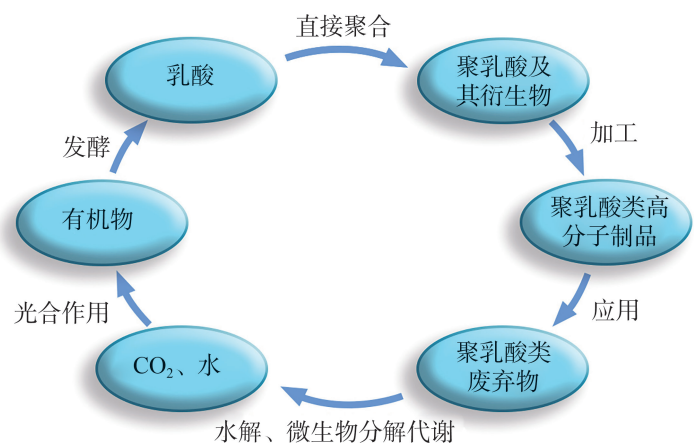


图 1-26 聚乳酸循环应用示意图

现代发酵工程产品的应用领域已从食品、抗生素等的制造拓展到将可再生资源转变为现代社会所需的基础生物化学品和能源。目前,新型发酵设备的研制,大型化、连续化、自动化控制技术的发展,发酵工业的清洁生产等,为发酵工程的发展拓展了新的空间。



生物学与社会

垃圾分类与发酵工程

生活中,我们每天都会产生各式各样的垃圾。2019年7月1日施行的《上海市生活垃圾管理条例》将生活垃圾分为四类:可回收物、有害垃圾、湿垃圾和干垃圾。可回收物通过市场化渠道运往各类再生资源工厂再生利用,变废为宝;有害垃圾通过各类危废处理企业进行无害化处理;干垃圾主要通过焚烧发电和卫生填埋处理。

湿垃圾是日常生活产生的容易腐烂的生物质废弃物,主要是餐饮垃圾和厨余垃圾等,由于其含水量和有机物含量均很高,所以非常适合微生物生长。细菌和真菌等微生物可产生多种生物酶,如蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶、纤维素酶等,对湿垃圾进行快速分解。因此,利用微生物好氧堆肥处理,可降解湿垃圾。但是好氧堆肥的过程中会产生异味,影响周围环境。微生物生长需要适宜的碳氮比、水分、温度、pH等,堆肥时难以控制这些条件。因此,现在多采用密闭厌氧发酵工艺处理湿垃圾。与普通的填埋、焚烧等处理方式相比,密闭厌氧发酵最大的优点是,垃圾发酵产生沼气,而沼气作为一种清洁能源能燃烧发电;厌氧处理后的沼渣干化后可以进一步焚烧发电(图1-27)。

在全球能源紧缺和科技高度发达的今天,生活垃圾是可以加以利用的宝贵资源。城市生活垃圾处理真正实现了无害化、资源化和最大程度的减量化。

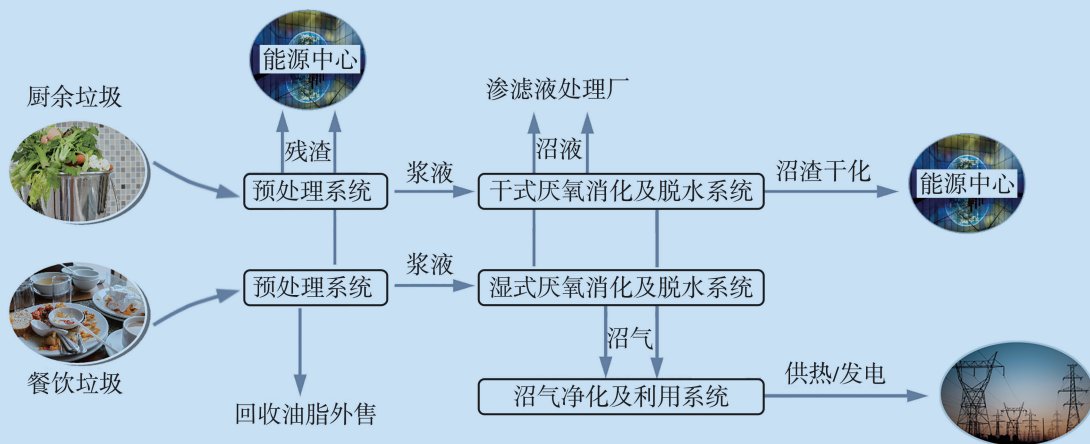


图 1-27 湿垃圾处理流程



自我评价

1. 啤酒、白酒和醋都是利用微生物发酵生产的食品。在制作过程中，不同菌种在合适的生长及产酶条件下，催化不同物质以获得不同产物。图 1-28 是微生物参与谷类发酵的流程示意图。

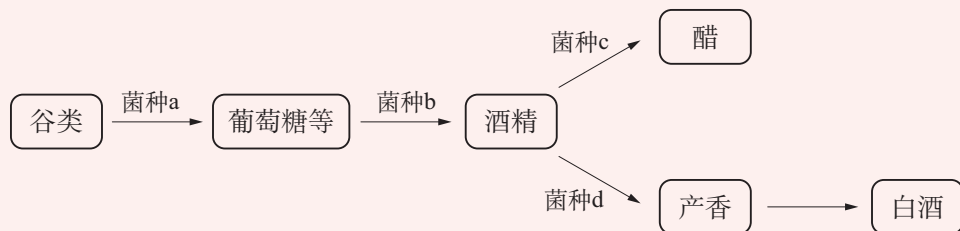


图 1-28 微生物参与谷类发酵流程示意图

- (1) 四种菌种中，哪一种是酵母？在制备酵母菌种时，需如何控制培养条件？
- (2) 若要让菌种 b 和菌种 c 发酵产生相应的产物，你会如何控制环境条件？
2. 龙眼营养丰富，果肉中含有糖类、蛋白质、脂肪、多种微量元素和维生素等物质，其中多糖的含量特别丰富。现欲研发一种兼有龙眼和酸乳双重风味的龙眼酸乳。准备的材料有：龙眼熬煮过滤后的溶液、纯牛奶、木糖醇、某种乳酸菌。
 - (1) 乳酸菌发酵所需的碳源主要来自哪种成分？发酵过程中，pH 会出现怎样的变化？
 - (2) 用文字和“→”表示龙眼酸乳的发酵工艺流程。
3. 发酵过程控制对于整个发酵过程至关重要，有效控制发酵过程才能获得大量的代谢产物。发酵过程中若出现异常现象，如发酵液转稀、发酵液过浓、耗糖缓慢、pH 不正常，可采取哪些处理措施？
4. 工农业生产会产生很多废弃物，如酿酒、味精发酵等过程产生的有机物含量丰富的废水，农业生产中玉米秸秆、橘皮、豆荚等含纤维素类丰富的物质，棉籽粕、菜籽粕等含蛋白质丰富的物质，屠宰场废弃的毛、血、骨等含蛋白质丰富的废料。若利用霉菌、酵母、乳酸菌等微生物将废弃物发酵制成蛋白质饲料，则可拓宽蛋白质饲料的原料资源，更好地发展蛋白质饲料的应用。查阅相关资料，尝试设计一个用常见的生产生活废弃物为原料通过发酵制造产品的实施方案。

本章回顾



本章小结

发酵是指通过微生物有氧或无氧条件下的生命活动，生产和积累人们所需产品的过程。发酵工程是指利用微生物的生命活动大量生产人们所需产品的工程技术体系。运用结构与功能观、物质与能量观等生命观念，设计满足微生物生长所需的培养基；运用稳态与平衡观，调控微生物发酵所需的环境条件，可以大规模地进行微生物发酵，获取人们需要的发酵产品。

现代发酵工程技术在传统发酵技术的基础上，利用自动化控制和工程化技术体系规模化生产各类产品。菌种是发酵工业的基础。发酵罐是发酵工业中常用的生物反应器。运用归纳和概括、演绎和推理等科学思维方法，阐释微生物发酵的调控过程。能针对生活和生产中的问题需求，设计并实施可行的方案。

选用和设计合适的培养基，可以从混杂的微生物群体中分离和纯化微生物，最常用的方法是平板划线法和稀释涂布平板法。用稀释涂布平板法和显微镜计数法，能测定微生物数量。在对特定微生物进行分离、纯化、计数、制作发酵食品、调控发酵过程等科学探究过程中，观察记录实验现象、分析并得出结论、运用科学术语阐明实验结果。

发酵工程产品在医药、食品、化工、能源、健康和环境等领域应用广泛，创造了巨大的社会效益和经济效益。主动关注发酵工程产品的应用现状和发展前景，认识和宣传发酵工程产品在人与自然的可持续发展中的价值。

学业评价

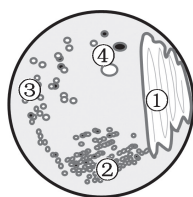
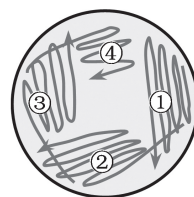
1. 链霉素是一种由灰色链霉菌发酵产生的抗生素，是医学上最先用于治疗结核杆菌感染的药物，为提高链霉素的发酵水平，研究人员进行了下述研究，主要分两步进行。

第一步：种子液的准备。该过程中，需将灰色链霉菌分别接种于甲乙两种培养基中进行培养，配方如表 1-8 所示。

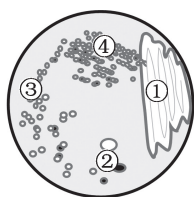
表 1-8 两种培养基配方

甲培养基成分及含量		乙培养基成分及含量	
葡萄糖	10.0 g	葡萄糖	10.0 g
蛋白胨	2.0 g	酵母浸粉	20.0 g
豌豆浸汁	130 粒 /1 L	NaCl	5.0 g
NaCl	2.5 g	K ₂ HPO ₄	0.5 g
CaCO ₃	0.2 g	MgSO ₄ •7H ₂ O	0.5 g
琼脂	20.0 g	蒸馏水	补至 1 L
蒸馏水	补至 1 L	pH	7.8
pH	7.4		

- (1) 说出甲和乙两种培养基的碳源、氮源、无机盐和生长因子。
- (2) 根据物理状态，乙培养基属于哪种培养基？用乙培养基接种菌种的目的是 ()。
- A. 获得菌落，便于观察链霉菌的结构
- B. 便于计算种子液中链霉菌的数目
- C. 扩大培养，获得大量的链霉菌
- D. 使链霉菌从混杂的菌群中分离出来
- (3) 在链霉素的生产过程中，需对灰色链霉菌进行分离和纯化。现将菌液按照图 1-29 方式接种于培养基平板上，图 1-29 接种灰色链霉菌
- ①~④代表划线次序。该接种方法名称是什么？
- (4) 经图 1-29 方式接种后的平板置于合适条件下，培养得到的结果是 ()。



A.



B.



C.



D.

- (5) 上述分离、纯化的过程中, 需采取哪些措施以保证得到纯种灰色链霉菌?

第二步: 优化链霉素的发酵条件。

- (6) 将一定量的种子液接入发酵摇瓶中, 设置不同的温度梯度进行发酵。发酵 96 h 后测定链霉素的产量, 结果如图 1-30 所示。当温度低于 25 °C 或高于 32 °C, 会显著抑制链霉素的合成, 试分析出现这种结果的原因。

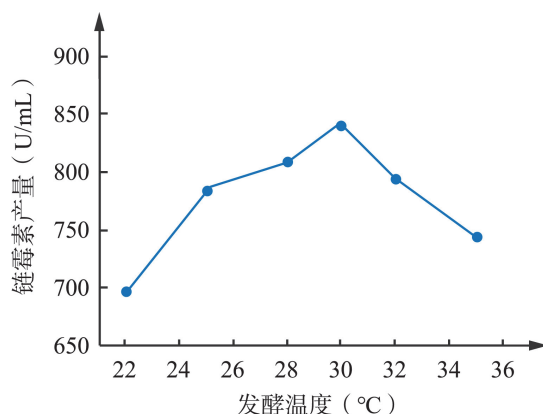


图 1-30 温度对链霉素合成的影响

- (7) 若在发酵 96 h 后继续发酵至 168 h, 研究不同温度对链霉素产量的影响, 应如何设置温度梯度?

- (8) 将不同接种量的种子液接入发酵摇瓶中, 在同等条件下发酵。发酵结束后, 测定发酵液中链霉素的产量, 结果如图 1-31 所示。描述接种量对链霉素发酵的影响, 并分析接种量过低或过高不利于发酵的原因。

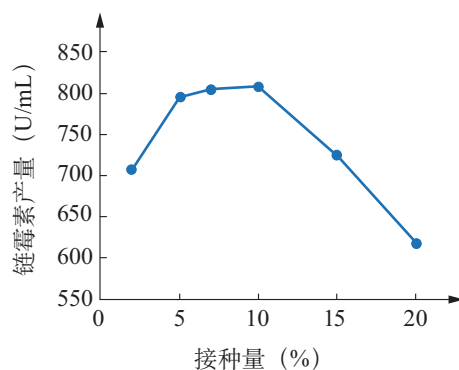


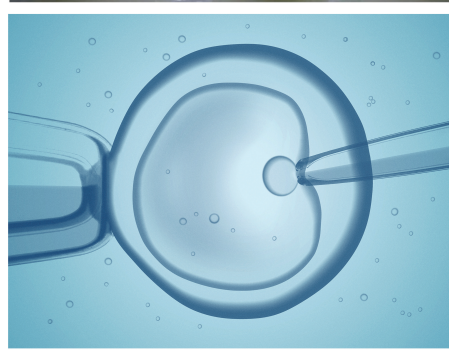
图 1-31 接种量对链霉素发酵的影响

2. 将嗜酸乳杆菌、枯草芽孢杆菌和产朊假丝酵母混合添加入玉米淀粉渣、柠檬酸糟、玉米纤维饲料等副产品中进行发酵, 可以制作高能量、高蛋白质的生物浓缩饲料。发酵过程中, 需通过平板菌落计数测定微生物数量, 以对工艺优化和产品质量进行准确判断。

- (1) 平板菌落计数时, 为什么应采用稀释涂布平板法, 而不是平板划线法?
- (2) MRS 培养基常用于乳酸菌总数的测定, YPD 培养基常用于酵母总数的测定。现用 MRS 培养基平板和 YPD 培养基平板分别测定嗜酸乳杆菌和产朊假丝酵母数量, 但是产朊假丝酵母也能在 MRS 培养基平板上生长, 枯草芽孢杆菌能在 YPD 培养基平板上生长。为准确计数, 你会采用什么方法抑制其他菌种的生长?
- (3) 吸取 0.1 mL 枯草芽孢杆菌 10^6 稀释倍数的稀释液, 涂布于 LB 琼脂培养基平板上, 重复 5 个样本。经培养后获得枯草芽孢杆菌菌落, 菌落数分别为 23、264、189、354 和 212。则每毫升样品中的枯草芽孢杆菌数量为多少?
- (4) 运用发酵技术可将玉米纤维饲料等副产品发酵制作生物饲料, 你如何评价这种应用价值?

第2章 细胞工程

传统农业生产以播种和扦插为主，那么现代农业生产是如何进行植物快速繁殖的呢？2017年诞生在中国的克隆猕猴“中中”和“华华”与1996年诞生的克隆羊“多莉”在科学意义上有什么不同？回答这些问题都离不开现代生物工程与技术的重要组成部分——细胞工程（cell engineering）。细胞工程以细胞生物学和分子生物学为基础，结合现代工程技术手段，在细胞或亚细胞水平、组织水平上进行设计与操作，是构建优良细胞、组织、器官以及生物体的综合性生物工程。



第1节

利用植物细胞工程培育新植株

学习目标

- 在掌握植物组织培养理论的基础上，进一步加强结构与功能相适应和稳态维持的生命观念，并能通过归纳与推理等科学思维方式，理解植物快速繁殖、脱毒等应用实例的技术原理。
- 通过植物快速繁殖的实验操作，阐释组织培养的一般步骤，增强实践动手能力，并能对实验结果展开分析和交流。
- 能够主动关注植物细胞工程技术在社会生产、生活等各方面的应用，认识其对可持续发展的重大推动作用。

概念聚焦

- 植物组织培养包含脱分化和再分化过程。

兰花在我国与“梅、竹、菊”并列，合称“四君子”，是高洁典雅的象征，但兰花的栽培相对困难，因而非常珍贵。1960年，法国的莫瑞尔（G. Morel）建立了世界上第一家“兰花工厂”，首先将组织培养技术应用于兰花上，实现了兰花的大规模培育。包括组织培养在内的植物细胞工程技术，是以植物细胞或组织为操作对象的细胞工程技术。利用植物细胞工程技术，我们可以实现植物的快速繁殖、去除病毒对植株的感染、进行植物的单倍体育种、获得重要的植物次生代谢产物等。我们也可以将植物细胞遗传物质进行重新组合，创造出新的植物体。

兰花的快速繁殖

科学家通过茎尖培养的方法成功实现了兰花的快速繁殖。图 2-1 展示了一种兰花快速繁殖的过程。

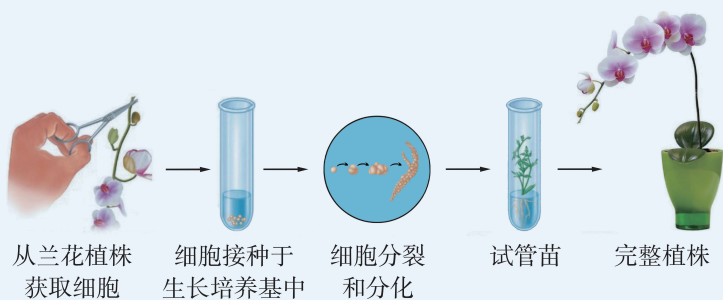


图 2-1 兰花快速繁殖示意图

思考与讨论：

1. 从兰花植株中获取的体细胞，其遗传物质的含量、表达与受精卵相比，有何异同？
2. 为什么部分细胞经过特定的体外操作可以发育成为一个完整的生物体？

1. 植物组织培养技术可将离体器官、组织或细胞再生为完整植株

在细胞学说的基础上，德国植物学家哈伯兰特（G. Haberlandt）于 1902 年提出了植物细胞具有全能性的假设，即离体的植物细胞在合适的条件下能够发育成为完整的植株。遗憾的是，受到当时技术和设备条件的限制，哈伯兰特没能证实自己的假设。1958 年，美国科学家斯图尔德（F. C. Steward）经过十几年的艰苦探索，用野生胡萝卜的根韧皮部组织通过组织培养的方法培育出具有根、茎、叶的完整植株（图 2-2）。1965 年，科学家再用分离出的单个胡萝卜细胞进行培养，也实现了整株植株的再生。从哈伯兰特提出植物细胞全能性的假设，到这一假设得到科学实验的证实，经过了半个多世纪。

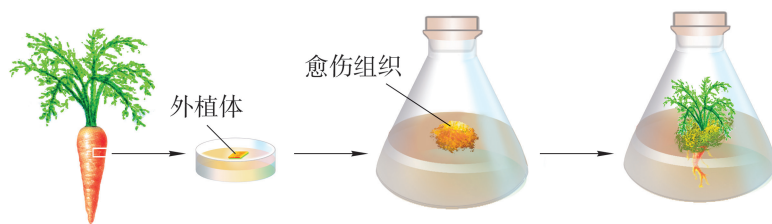


图 2-2 胡萝卜根韧皮部组织培养实验

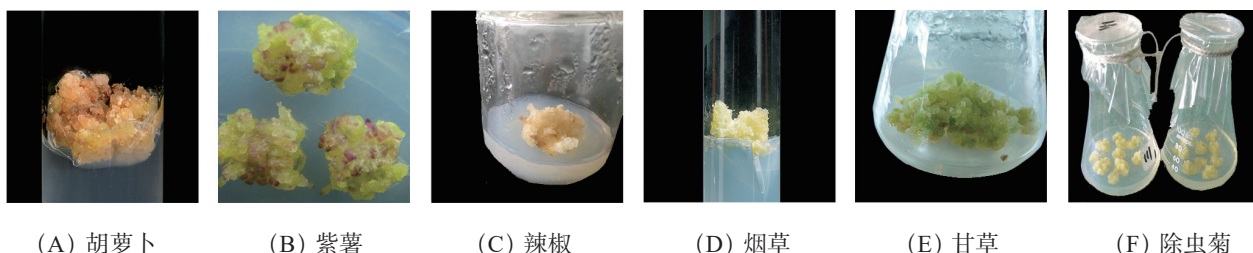
我们已经知道，分化后的细胞虽然在形态、结构与功能上与最初的受精卵存在着显著差异，但仍包含着与受精卵相同的遗传信息。在一定的条件下，分化后的细胞重新获得类似于胚胎细胞一样的分裂和分化能力的过程称为**脱分化**（dedifferentiation）。脱分化后的细胞经过细胞分裂，会形成无组织结构的、松散的细胞团，即**愈伤组织**（图 2-3）。愈伤组织在一定条件下可以重新分化为各种类型的细胞，并进一步发育成完整的植株，这个过程称为**再分化**（redifferentiation）。

概念聚焦

- 借助植物细胞培养技术可以生产次生代谢产物。
- 植物体细胞杂交能够克服远缘植物之间无法进行有性杂交的障碍。

学习提示

理解植物细胞全能性的基础是所有细胞均来自同一受精卵，含有相同的遗传信息。这也体现了结构与功能相适应的生命观念。



(A) 胡萝卜

(B) 紫薯

(C) 辣椒

(D) 烟草

(E) 甘草

(F) 除虫菊

图 2-3 各种植物的愈伤组织

基于植物细胞的全能性理论，将离体的植物细胞、组织或器官（外植体）在适宜的培养条件下经脱分化形成愈伤组织，然后经过再分化，形成芽、根并最终发育成完整植株，这一过程称为**植物组织培养**。

在植物组织培养中，细胞的脱分化和再分化是两个关键步骤。多种内部因素（如植物遗传性状和生理状况等）和外部因素（如营养和环境条件等）会影响这两个步骤。在这些影响因素中，生长素和细胞分裂素的浓度比起着关键作用，它们对愈伤组织的生长和分化产生不同的影响（图 2-4）。

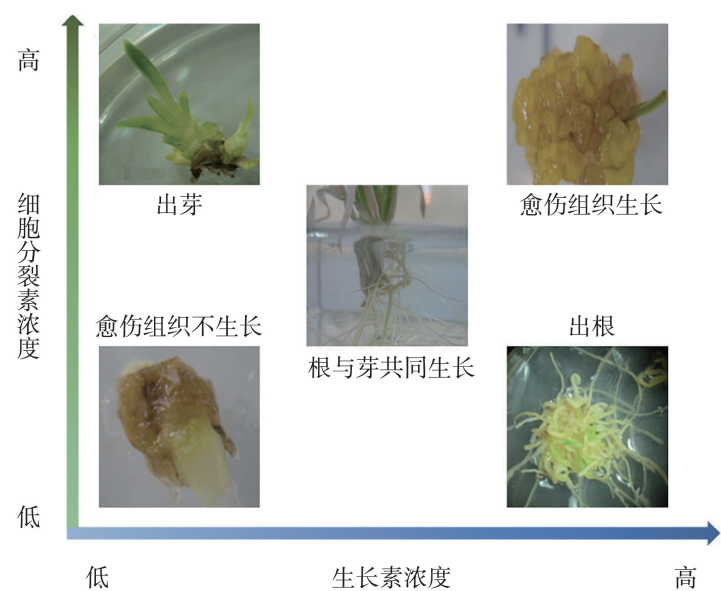


图 2-4 生长素和细胞分裂素的浓度比对愈伤组织分化的影响

植物快速繁殖 将优良植株的茎尖或叶片等器官进行离体培养，在短时间内可以获得大量遗传性状一致的植株，这种技术称为植物快速繁殖技术。继兰花的快速繁殖实现后，该技术得到了快速发展，其适用对象从最初的观赏植物逐渐发展到果树、林木、蔬菜和田间作物。现已有上千种植物可通过组织培养技术进行快速繁殖。我国科学家屠呦呦团队还利用组织培养技术，建立了青蒿国家种质资源库，用于检验不同种质资源的青蒿素含量、耐旱性、抗病虫害等指标，以便寻找出更优质的品种（图 2-5）。



图 2-5 黄花蒿组培苗

植物脱毒 利用植物组织培养技术还可以进行植物脱毒（即降低或去除病毒对植株的感染）。目前已知可以感染植物的病毒有数百种，受到感染的植株通常会出现病斑，其正常生长受到严重影响。绝大多数的病毒是通过植物体内的维管组织传播的，而位于种子植物胚珠中央的珠心组织与周围其他组织没有维管联系，因此通过珠心组织培养可以获得无毒植株。此外，通过离体培养分裂旺盛的茎尖也可以脱除植物病毒（图 2-6）。

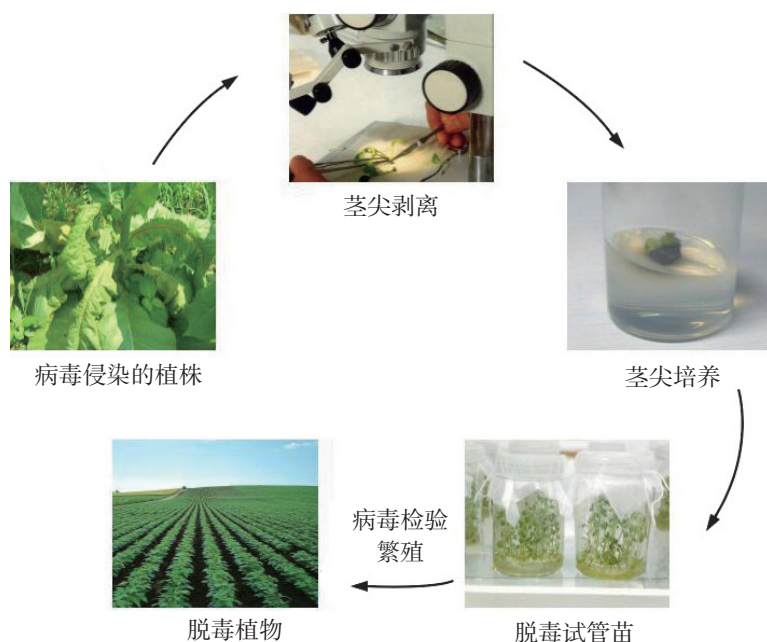


图 2-6 通过离体培养茎尖获得脱毒植株的示意图

单倍体育种 将植物组织培养技术用于花药或花粉的离体培养，可以实现单倍体育种。我国于 20 世纪 70 年代开始单倍体育种的研究，已经取得了很大的进展，迄今共有数十种植物的花粉或花药成功培育成单倍体植株，其中小麦、黑麦、玉米、辣椒、甜菜、白菜、葡萄和苹果等多种单倍体植株均是我国首次培育成功的。

生产次生代谢产物 植物细胞除了能诱导形成完整植株外，还能像微生物一样在生物反应器里进行大规模的悬浮培养，用于生产重要的植物次生代谢产物。次生代谢产物是一类细胞生命活动非必需的小分子有机化合物，其产生和分布通常有种属、器官、组织以及生长发育时期的特异性。例如，紫杉醇是红豆杉属植物中的一种次生代谢产物，它是迄今为止发现的最好的天然抗癌药物之一。红豆杉属植物树皮中紫杉醇的含量极低，

而且树种生长缓慢。通过剥树皮来提取紫杉醇，会导致红豆杉大量死亡（图 2-7）。所以，紫杉醇的产量受到很大限制。



图 2-7 被剥去树皮后无法存活的国家一级珍稀濒危保护植物红豆杉

为了满足市场对紫杉醇的大量需求，同时减少对自然资源的破坏，科学家们正在尝试各种技术路线。其中，植物细胞培养技术可以解决这一难题。通过对红豆杉细胞的悬浮培养，可以从中分离出高纯度的紫杉醇（图 2-8）。

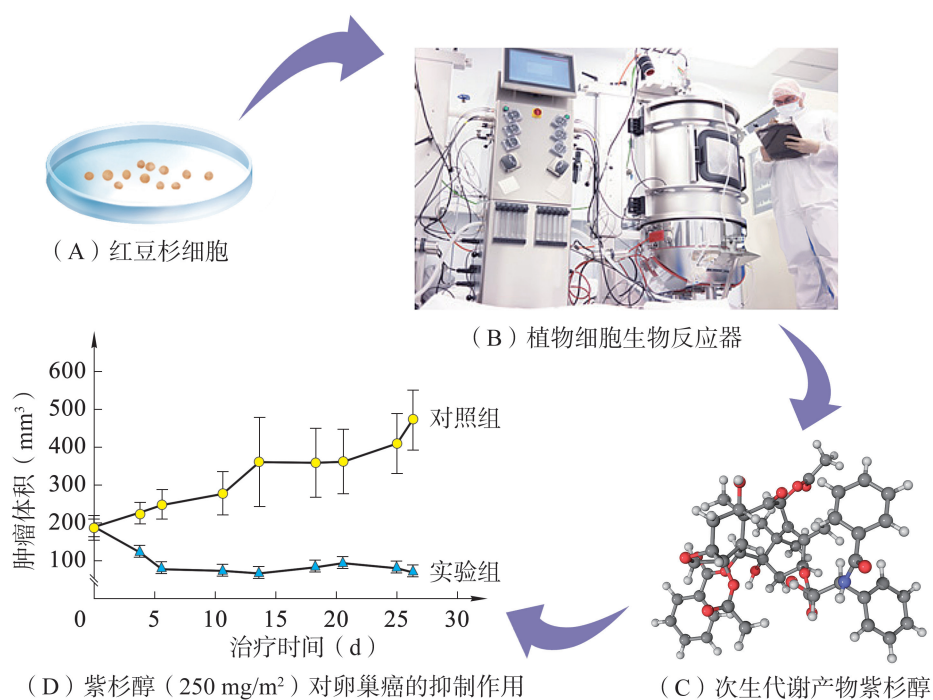


图 2-8 紫杉醇的大规模生产和功效

通过植物细胞大规模培养获得的次生代谢产物还包括其他药物、食品、调料、香精和颜料等。植物细胞培养技术已经成为现代生物技术的一个重要组成部分，并逐步发展为绿色新兴产业中的核心技术。



探究·实验

2-1 月季的快速繁殖

▶ 实验目标：

利用组织培养技术培育月季，掌握植物的快速繁殖技术。

▶ 实验原理：

植物细胞具有全能性，在一定条件下可以经过脱分化和再分化形成完整的植株。

▶ 材料器具：

月季当年生幼嫩枝条、培养瓶、超净工作台、剪刀、镊子、大烧杯、无菌培养皿、无菌滤纸、75% 酒精、9%~10%（质量体积比）的次氯酸钙（即漂白粉）、无菌水、2.0 mg/L 6-BA（6-苄氨基嘌呤，一种细胞分裂素）、0.02 mg/L 和 0.05 mg/L NAA（萘乙酸，一种生长素类似物）、MS 培养基、营养土（蛭石：田园土=1:1）、0.1%（质量体积比）的多菌灵等。

▶ 实验步骤：

1. 选材与消毒

选取枝条中具腋芽的月季嫩茎作为外植体。

将外植体用自来水冲洗干净，分装到烧杯中，然后放在超净工作台上。加入 75% 酒精，预消毒 0.5~1 min；弃酒精，加入 9%~10% 的次氯酸钙，消毒 10 min；弃次氯酸钙溶液，加入无菌水清洗 4~5 次，用无菌滤纸吸尽多余水分备用。

2. 接种

将外植体剪成 1~2 cm 带腋芽的茎段，用镊子夹取、插入 MS 培养基中（插入时应注意方向，不要倒插）。每瓶接种

6~8 块外植体。接种后，用封口膜重新将培养瓶封口。

3. 培养

(1) 诱导芽分化：待外植体长出腋芽后，将其转至芽分化培养基（MS 培养基 + 2.0 mg/L 6-BA + 0.02 mg/L NAA），诱导芽分化，置于培养间培养（光周期 12 h 光照：12 h 黑暗，20 °C，湿度 85% 以上）。每周更换培养基，约 5~6 周后，形成许多丛生芽。

(2) 诱导生根：将上述丛生芽接种于生根培养基（1/2MS 培养基 + 0.05 mg/L NAA）上，置于培养间培养（培养条件同上）。每周更换培养基，约 3 周后长出数条根，形成幼苗。

4. 移栽

幼苗出瓶前炼苗（即采取放风、降温、适当控水等措施对幼苗进行锻炼）2~3 天。出瓶后洗去黏附的培养基，栽植至营养土中，置于温度 20 °C、湿度 85% 以上、适当遮阴且通风的环境中种植，定期用 0.1% 的多菌灵喷雾保苗。

▶ 结果分析：

1. 选取月季嫩茎作为外植体的理由是什么？
2. 比较诱导芽分化和诱导生根的两种培养基中植物激素的添加比例，并分析其原因。
3. 整理并分析影响月季组培苗移栽成活率的主要因素。

2. 植物体细胞杂交技术可创造新植株

植物体细胞杂交又称为植物原生质体融合，是指将不同来源的植物细胞在一定条件下融合形成杂合细胞，并使之分化再生，最终形成新植物体的技术。例如，白菜和甘蓝是两种蔬菜，存在种间生殖隔离。育种专家借助植物体细胞杂交技术培育出了白菜—甘蓝这一新品种（图 2-9）。

与动物细胞不同的是，植物细胞外周覆盖着一层致密而坚硬的细胞壁，这会阻碍细胞之间的融合。因此，为了实现两种不同植物体细胞的融合，首先需要去除细胞壁以制备原生质体（即去除了细胞壁的细胞）。常见的原生质体制备方法包括机械分离或酶解分离，其中酶解分离法使用更为广泛。

学习提示

根据植物细胞壁的物质组成，可用纤维素酶和果胶酶来酶解细胞壁。

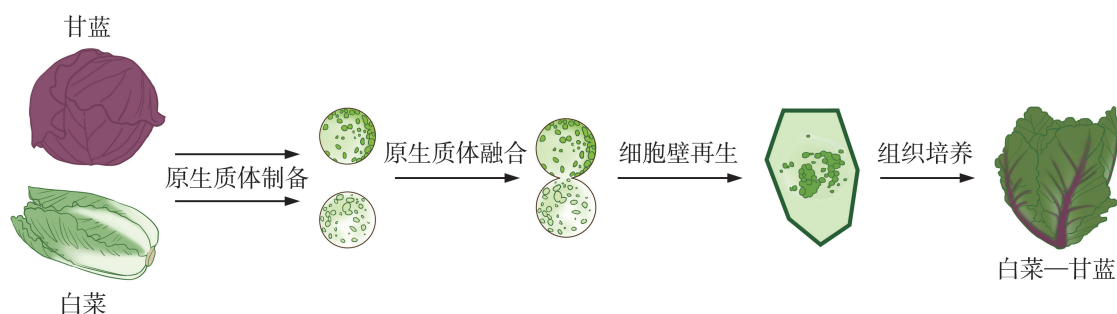


图 2-9 运用植物体细胞杂交技术培育白菜—甘蓝流程图

制备的原生质体可以通过物理或化学方法诱导其融合。图 2-10 中箭头所示是一个成功融合后的杂合细胞，这一细胞既包含来自叶片细胞的叶绿体，也包含来自花瓣细胞的红色液泡。由于诱导操作对于细胞融合没有选择性且融合效率并不高，因此，除了形成不同类型的融合细胞外，还会存在大量未融合的细胞，这就需要使用一系列的方法将发生了融合的杂合细胞筛选出来，并对其进行细胞学和生化分析鉴定。

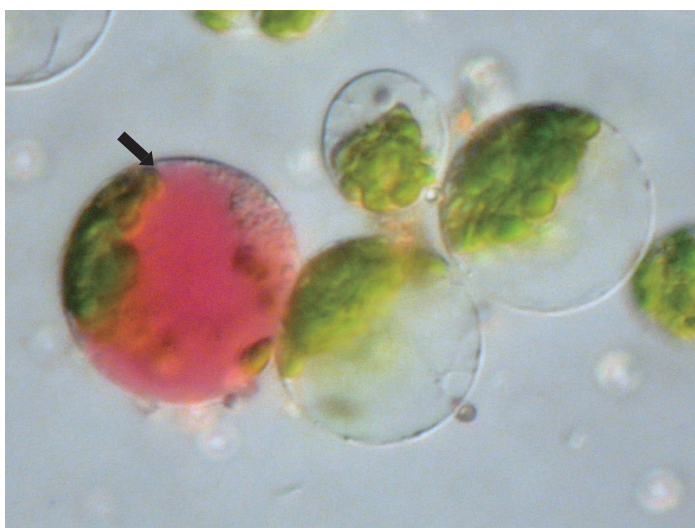


图 2-10 植物叶片细胞与花瓣细胞的原生质体融合 (500 ×)

经筛选和鉴定过的融合细胞，可通过植物组织培养技术获得新植株。植物体细胞的杂交可以避开生殖细胞的受精过程，在亲缘关系较远的物种之间实现遗传物质的融合，从而创造出自然界中没有的新物种。但是也应当看到，大量的植物品种还没有建立起体细胞杂交的融合体系，并且要获得兼有双亲优良性状的杂合细胞还是非常困难的。此外，体细胞杂种植株的遗传稳定性和可育性也有待科研工作者的进一步研究。



广角镜

植物原生质体融合技术

诱导植物原生质体融合的物理方法中，使用比较普遍的是电融合法；化学方法中，使用最广泛的是用聚乙二醇（PEG）促融。此外，还可以使用盐类融合法、高钙离子浓度与高 pH 组合促融法、PEG 与高钙离子浓度和高 pH 组合促融法。



自我评价

1. 阐述植物组织培养的一般步骤，举例说明利用该技术快速繁殖植物的优势和劣势。
2. 所有的植物细胞都可以作为外植体吗，为什么？
3. 尝试整理并比较你所学过的植物育种技术。
4. 科学家通过体细胞杂交的方法，培育出第一个体细胞杂种植物——薯番茄。
 - (1) 将马铃薯和番茄进行有性杂交，能否获得杂种植株？为什么？
 - (2) 能否将马铃薯和番茄的体细胞直接促融？为什么？
 - (3) 由于促融的方法没有选择性且融合效率不高，所以试管内会存在多种细胞。请列举试管内发生两两融合的细胞类型。
 - (4) 杂交成功后获得的薯番茄，既不产马铃薯也不产番茄，请你分析造成这种结果的可能原因。
 - (5) 请归纳薯番茄植株的培育过程中运用了哪些植物细胞工程技术？

第2节 利用动物细胞工程改良动物细胞

2018年2月,中国科学院神经科学研究所科研团队在《细胞》上发表了“中中”和“华华”诞生的研究成果,这是世界首例利用动物细胞工程技术获得的灵长类动物体细胞克隆后代。动物细胞工程是在动物细胞培养的基础上,按照人们的需要,在细胞水平上进行遗传操作,获得人类所需的生物产品、改良或创造新的动物品种的细胞工程技术。它包含了动物细胞与组织培养技术、细胞融合技术、细胞核移植技术、干细胞技术、胚胎工程等多种技术方法。



“中中”和“华华”的诞生

体细胞克隆猴“中中”和“华华”诞生的技术路线如图 2-11 所示。

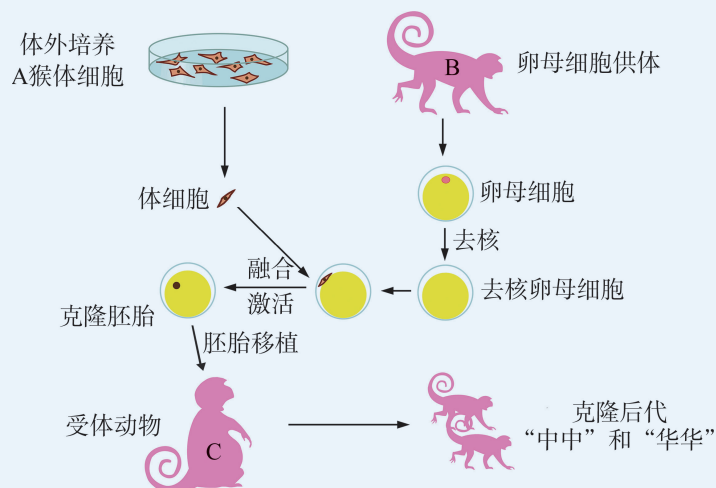


图 2-11 体细胞克隆猴的培育过程

思考与讨论:

1. 培育“中中”和“华华”的过程是无性生殖还是有性生殖,为什么?这一过程运用了哪些关键技术?

2. 图中体细胞取自胚胎猴(A猴)的成纤维细胞,卵母细胞取自B猴,胚胎发育场所是C猴,推测“中中”和“华华”的性状最像谁?为什么?

学习目标

- 通过对动物细胞培养关键步骤和培养基特点的学习,强化结构与功能相适应、能量与代谢的生命观念。
- 阐明细胞核移植技术的理论基础,归纳并演绎动物克隆技术及其应用。
- 通过单克隆抗体制备、治疗性克隆等实例的学习,认识动物细胞工程技术可能对未来医学带来的变革,并探讨其对人类社会的影响。

概念聚焦

- 动物细胞培养是在适宜的条件下使细胞生长和增殖的过程。
- 细胞核移植技术是目前动物克隆技术的主要手段。
- 细胞融合技术是单克隆抗体制备的重要技术。



概念聚焦

• 干细胞在生物医学工程中具有广泛的应用价值。

1. 动物细胞培养技术是动物细胞工程的基础

动物细胞培养是指从动物体内取出组织或细胞，在体外模拟体内的生理条件，使之得以生存和生长并维持其结构与功能的技术。培育克隆猴“中中”和“华华”首先就是要利用这种技术保障细胞在体外的存活。

早在1885年，科学家就进行了动物组织离体培养的尝试。结果表明，离体后的动物组织或细胞在人工条件下仍然能够存活。真正意义上的现代动物细胞培养技术始于美国生物学家哈里森(R. G. Harrison)和法国科学家卡瑞尔(A. Carrel)的开创性工作。哈里森采用淋巴液作为培养基，成功培养了蛙胚神经组织。卡瑞尔特别注意到了实验中无菌操作的重要性，并发现鸡胚胎抽提液具有促进细胞生长的作用，成功培养了多种动物组织。随着对动物细胞离体生长机制的不断了解，人们开始广泛使用各种动物血清来促进细胞的生长，并开发出了人工合成的无血清培养基。同时，还设计出许多新型的动物细胞培养反应器，用于规模化培养。



广角镜

无血清培养基

动物细胞培养技术建立早期，直接采用包括血清在内的多种动物体液作为培养基。在研究和了解细胞生长所需成分的基础上，人们逐渐开发了一系列人工合成培养基。其中成分最简单的是低限量基础培养基(MEM)，它包含了无机盐、微量元素、氨基酸、维生素和碳水化合物等20多种成分，但在使用时仍需要添加一定比例的动物血清，以补充细胞生长所必需的蛋白质、激素和生长因子等物质。

动物血清培养基固有的缺点主要是血清的成分复杂，会影响实验结果的分析；此外，不同批次的血清生产质量存在差异，会造成培养结果的不稳定。

为了解决这些问题，科学家们致力于开发成分明确的无血清培养基。通过在基础培养基中添加相应的组分，以达到促进细胞的增殖和生长的要求。这些组分主要包括促进细胞贴壁的细胞外基质、各类生长因子和激素、酶抑制剂和某些蛋白质。这种成分明确的无血清培养基，已经成为细胞生物学基础研究领域的首选材料。

从动物体获取组织后，首先要通过机械法和消化法实现组织细胞的分散。消化法常用胰蛋白酶等试剂对动物组织块进行消化，使细胞从组织中分离出来。首次细胞培养称为原代培养。用于原代培养的动物活体组织往往由多种细胞组成，所以原代细胞培养物往往是多种细胞的混合物。原代培养后，将细胞从培养瓶中分离稀释，传到新的培养瓶中（传代培养），从而逐步分离获得单一类型的细胞（图 2-12）。

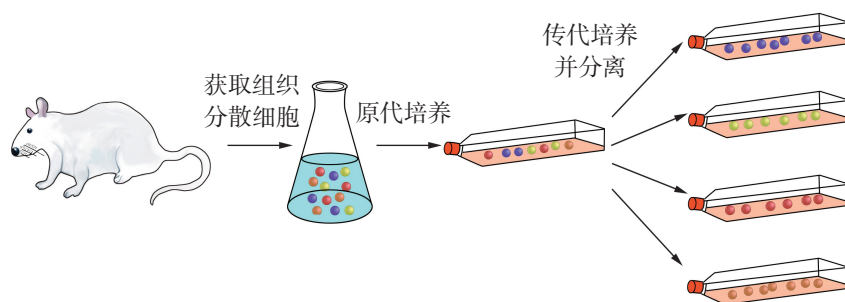


图 2-12 动物细胞培养流程示意图

在培养过程中，动物细胞非常容易受到各种微生物的污染，因此，必须要在严格无菌的环境下进行细胞培养，并在培养液中加入一定量的抗生素以防污染。同时，动物细胞培养对适宜的外界环境设定和维持也有严苛的要求。例如，适宜的培养温度（如哺乳动物细胞和禽类细胞的适宜温度为 $36.5 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）和 pH（7.2 ~ 7.4）是细胞在体外生长的必要条件；动物细胞的生长离不开氧气的供应，培养液中溶解氧水平会直接影响细胞的生长和代谢；通常在 95% 的空气和 5% 的 CO_2 混合气体中培养，其中 CO_2 气体是为保持培养液 pH 的稳定；还需要控制适宜的培养液渗透压；培养液中需包含维持动物细胞生长所必需的营养物质。此外，还要定期更换培养液，以便及时清除代谢产物，防止细胞代谢产物累积对细胞自身产生危害。

2. 动物细胞融合是单克隆抗体制备的关键技术

受精过程是生殖细胞之间的自然融合。此外，科学家陆续发现体细胞之间也会有融合现象：首先是在脊椎动物肿瘤细胞中观察到了多核现象；随后，在骨髓、肺等正常组织及炎症或

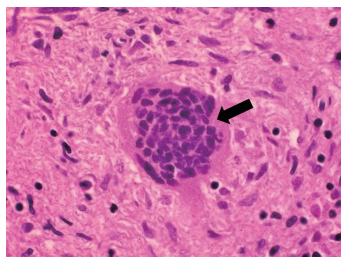


图 2-13 感染带状疱疹病毒后观察到的多核巨细胞 (400 ×)

学习提示

结合细胞膜的流动性，从结构与功能相适应的角度理解融合现象。

坏死部位也都发现了多核现象(图 2-13)。细胞培养技术问世后，体细胞融合在体外培养的肿瘤细胞中得到了验证。现代生物工程中的细胞融合指的是体细胞杂交，即在离体条件下，用人工方法将不同生物或同种生物不同类型的单细胞融合成一个杂合细胞。

某些病毒(灭活)如仙台病毒可以诱发细胞融合形成多核细胞，这一发现开创了细胞人工融合的新领域。除了病毒促融外，细胞融合还可采用物理、化学等手段，使两个甚至多个动物细胞融合形成一个细胞。物理方法如电融合，在高压脉冲电场的作用下，细胞膜表面会形成大量微膜孔，进而发生细胞融合现象。化学方法如聚乙二醇(PEG)或其衍生物，具有比仙台病毒高数百倍的促细胞融合效率。细胞融合技术可以使人们按照预先的设计使不同的细胞融合，创造出新的杂合细胞。

动物细胞融合技术比较突出的成就是单克隆抗体的制备。抗体是机体免疫应答的一个重要组成部分，可以特异性识别抗原。但绝大部分的抗原拥有多个不同的抗原决定簇(即抗原分子中决定抗原特异性并刺激 B 淋巴细胞分化为浆细胞的特定区域)，会同时刺激多个不同的 B 淋巴细胞形成克隆群。所以，针对同一个抗原，机体往往会产生多种抗体。这样形成的抗体通常存在特异性不强、质量不稳定等问题，且经抗原激活后的 B 淋巴细胞也无法在体外长时间培养。那么，是否可以得到针对某一特定抗原决定簇的、高度均一的抗体呢？

科学家们在患骨髓瘤的小鼠体内发现了骨髓瘤细胞，该细胞在体外培养时能无限增殖。于是，科学家便设想：是否可以利用细胞融合技术，将 B 淋巴细胞的单一抗体合成和分泌能力与骨髓瘤细胞的体外无限增殖特性融为一体呢？为了验证这一设想，1975 年，德国科学家克勒(G. Köhler)和阿根廷科学家米尔斯坦(C. Milstein)以绵羊红细胞作为抗原刺激小鼠脾脏的 B 淋巴细胞，获得了能产生抗体的浆细胞，后者在促融剂的作用下与小鼠骨髓瘤细胞发生融合，形成了杂交瘤细胞。通过选择培养基筛选出抗体分泌阳性的杂交瘤细胞，并对其进行克隆培养(图 2-14)。这样获得的杂交瘤细胞既能无限增殖，又能持续分泌高度均一、仅针对某一特定抗原决定簇的抗体，即单克隆抗体。这两位科学家也因此获得了 1984 年度的诺贝尔生理学或医学奖。

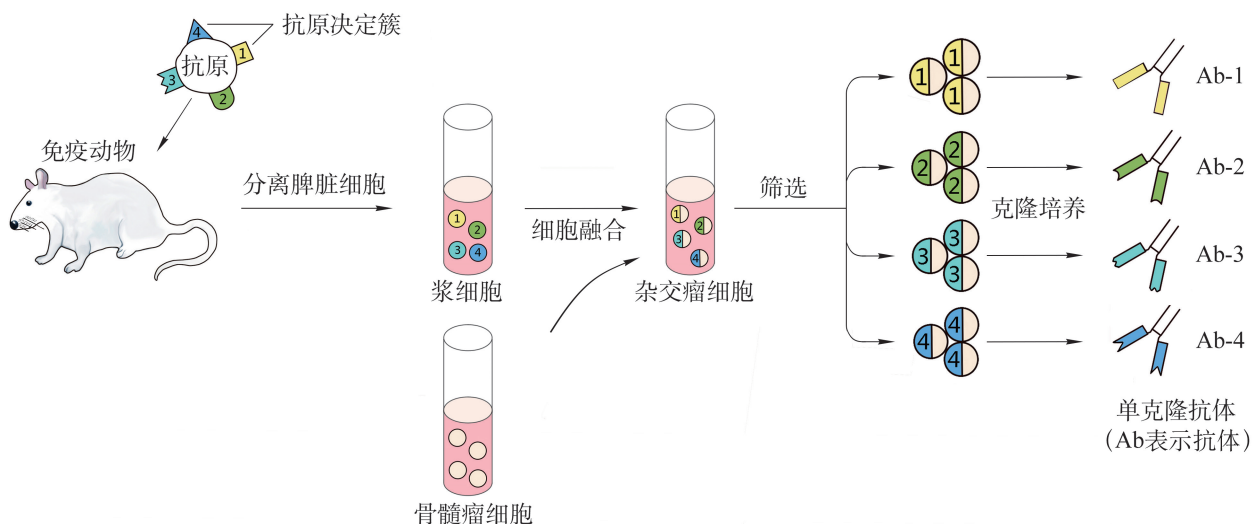


图 2-14 单克隆抗体制备过程示意图

单克隆抗体的高度特异性可用于鉴定各种抗原，对多种疾病的诊断、治疗以及生理过程的检测具有重要价值。例如，利用单克隆抗体的靶向作用，可将针对某一肿瘤抗原的单克隆抗体与化疗药物或放疗物质连接，将其携带至靶器官，直接杀伤靶细胞，降低对健康组织与细胞的伤害（即靶向性治疗）。再如，早孕检测试纸可通过尿液快速检测出受孕妇女胎盘中产生的人绒毛膜促性腺激素（图 2-15）。

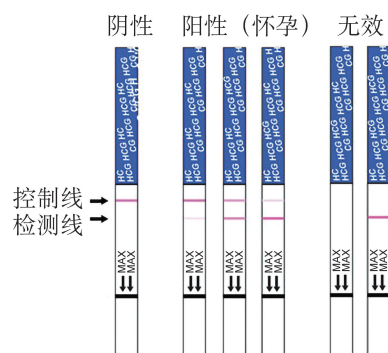


图 2-15 用试纸检测早孕



探究·活动

2-2 收集单克隆抗体的应用实例

活动目标：

单克隆抗体已广泛应用于生物医学领域，对疾病的诊断、治疗以及生理过程的检测具有重要价值。本活动通过资料的收集和分享，了解更多单克隆抗体的应用实例，关注生物技术给人们生产、生活带来的变革。

活动内容：

1. 通过书籍、网络的检索，收集如下内容：

(1) 单克隆抗体在医学检测和诊断中的应用实例；

(2) 单克隆抗体在疾病治疗中的应用实例。

2. 建议以小组形式，将收集的资料整理成海报，在学校或社区进行交流分享，宣传生物技术对人类健康的影响。

活动评价：

结合班级实际，制作评价量表，小组间进行相互评价。

3. 细胞核移植技术是克隆动物的关键技术

细胞核移植是将一种动物细胞的细胞核移植至去核的卵母细胞中，并使重组细胞发育成新胚胎，继而发育成动物个体的过程。所产生的后代具有与细胞核供体基本相同的遗传成分。科学家首先用两栖类动物成功地尝试了此技术，并陆续在绵羊、小鼠、牛、山羊等哺乳动物中获得了胚胎细胞核或体细胞核移植的后代。

细胞核移植技术是目前动物克隆的主要手段。所谓克隆（clone）是指分子、细胞或个体的无性繁殖系，如从一个分子复制成一组分子称为分子克隆；从一个细胞分裂生成一群细胞称为细胞克隆；动植物个体的无性繁殖就是个体克隆。

动物克隆技术通过显微操作，将供体细胞的核移入去核的卵母细胞中（图 2-16），经过人工活化和体外培养后，再移植入代孕母体内，使其发育成为含有与供体细胞相同遗传物质的个体，该过程便是典型的个体克隆。克隆羊“多莉”是人类首次用成年动物的体细胞细胞核移植获得的克隆后代（图 2-17）。

“多莉”的诞生证明了哺乳动物高度分化的体细胞核能够在卵母细胞细胞质的作用下恢复其全能性，为细胞全能性理论增添了有力的实验证据。

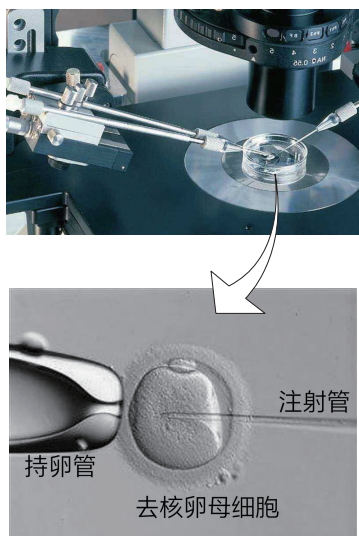


图 2-16 显微注射仪及细胞核移植的显微操作（320×）

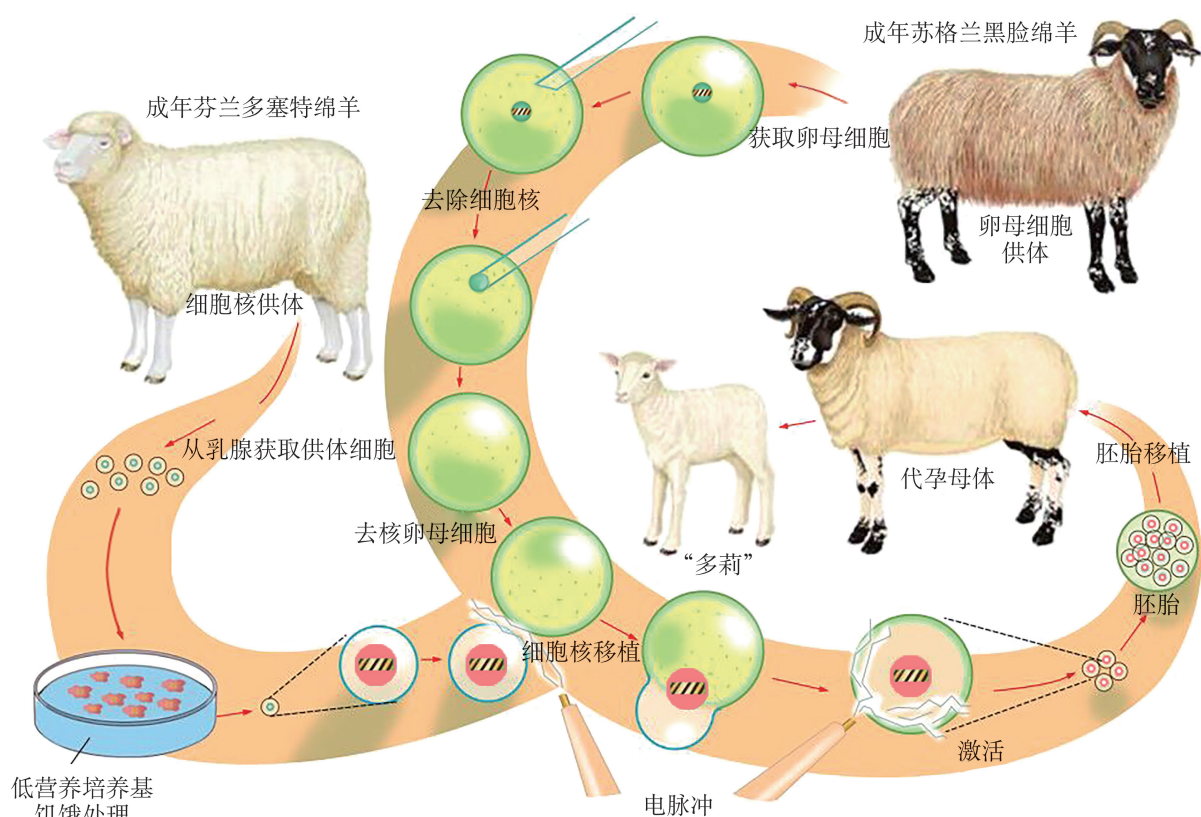


图 2-17 成年动物体细胞克隆后代“多莉”的培育过程

采用体细胞克隆技术成功获得了克隆羊、克隆小鼠和克隆牛后，科学家又向与人类相近的灵长类动物的体细胞克隆发起了挑战。2017 年，在中国上海诞生了世界首例非人灵长类动物体细胞克隆后代“中中”和“华华”（图 2-18）。体细胞克隆猴的成功以及未来基于体细胞克隆猴的疾病模型的创建，将有效缩短药物研发周期、提高药物研发成功率。这将使我国率先发展出基于非人灵长类动物疾病模型的全新医药研发产业链，促进针对阿尔茨海默病、自闭症等脑疾病以及人类免疫缺陷、肿瘤、代谢性疾病的新药研发进程。

克隆技术具有广泛的应用前景。在农牧业中，可将具有特殊期望性状的动物通过克隆产生更多的畜群；在科学研究中，基因完全相同的动物可为有关实验提供最佳的“对照动物”；在制药行业中，人们正在尝试用克隆动物生产具有潜在医疗用途的产品；在野生物种保护中，可利用克隆技术繁殖濒危物种，为生态保护带来了无限希望（图 2-19）。

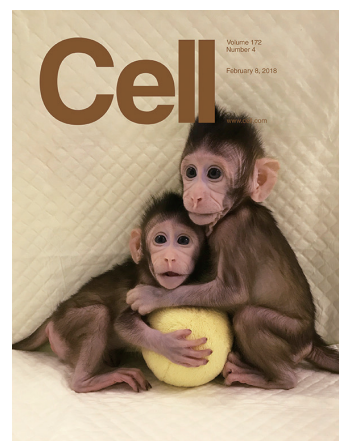


图 2-18 “中中”和“华华”诞生的研究成果被 2018 年 2 月的《细胞》杂志以封面文章方式发表



图 2-19 基于细胞核移植技术的动物克隆应用

然而，克隆技术本身还有很多问题未能解决。不断增加的证据显示，克隆动物的健康水平较差，很多克隆动物表现出诸如肥胖、肺炎、肝功能低下、早衰性死亡等方面的缺陷。例如，克隆绵羊“多莉”寿命仅 6 岁，因身患通常仅在年老绵羊中才会出现的肺部疾病并发症，于 2003 年死亡，而与其共同饲养的非克隆同伴预期寿命可达 12 年。



科学史话

克隆猴的“前世今生”

1958 年，斯图尔德用胡萝卜根的韧皮部组织成功培育出新的植株，证明了植物细胞具有全能性。那么动物细胞是否也具备这种能力呢？

1938 年，德国胚胎学家斯佩曼（H. Spemann）报道了他的实验结果：用头发将蝾螈的受精卵结扎成两部分，并把细胞核推移到一侧，结果发现只有带核的一侧受精卵能够继续发育，而另一侧无核受精卵则处在发育停滞状态；但如果将经过几次分裂的细胞核重新推移到无核侧，则该侧受精卵也能重新开始分裂并发育成个体（图 2-20）。这个开创性试验首次提示：经过几次分裂并初步分化了的动物细胞核依然具有发育成完整个体的能力。

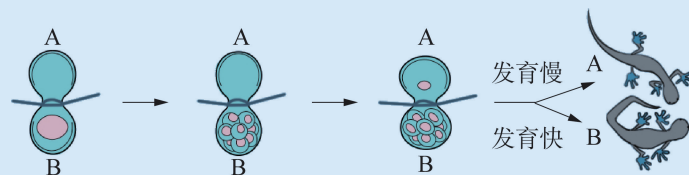


图 2-20 蝾螈受精卵横缢实验

1952 年，研究者们首先在非洲豹蛙中通过胚胎细胞核移植成功获得了克隆后代。在此基础上，科学家们又在其他物种中进行了不断的探索：我国科学家童第周以金鱼和鲫鱼为研究对象，在 20 世纪 60 年代创造性地进行了鱼类不同亚科之间的细胞核移植；1975 年，英国科学家布洛穆豪（D. Bromhall）通过家兔实验证实了哺乳动物的胚胎细胞核移植的可行性。此后，借助哺乳动物的胚胎细胞核移植技术又相继获得了小鼠、绵羊、牛、山羊和猪的克隆后代。然而，这一时期的细胞核移植技术都是采用分化程度较低的胚胎细胞核进行的。

1996 年，“多莉”羊则是人类首次用成年动物的体细胞细胞核进行移植获得的克隆动物，真正开启了哺乳动物的体细胞克隆时代。

“多莉”羊诞生后，多种高等哺乳动物已被成功克隆，但灵长类动物的体细胞克隆技术却一直没有取得成功。在经历了多次失败的尝试后，灵长类体细胞克隆成了世界级难题，甚至被认为是现有技术不可能实现的。中国科学院神经科学研究所的科研团队经过多年的艰苦探索，攻克了一系列技术难题（图 2-21），终于在 2017 年底实现了非人灵长类的体细胞克隆的突破。“中中”和“华华”的诞生标志着动物体细胞克隆技术达到了一个新的高度。

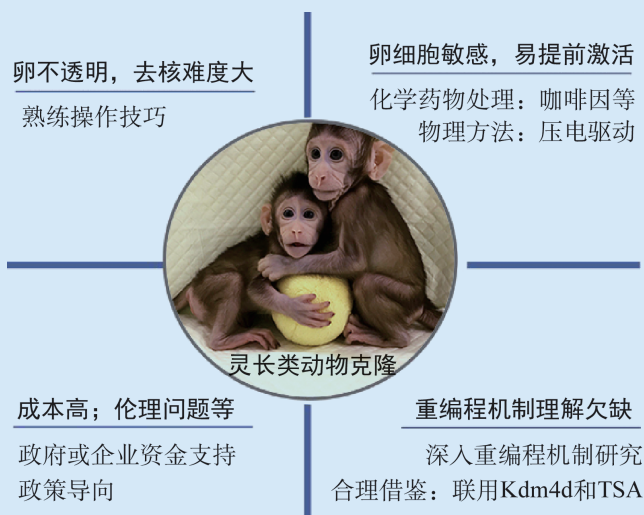


图 2-21 灵长类动物克隆的难点与解决途径

思考与讨论：

1. 从结构和功能相适应的角度阐释，为什么动物细胞全能性的证实相对困难？
2. 试归纳和概括哺乳动物体细胞核克隆技术的科学研究历程，并阐述科学研究取得成功的诸多因素。

4. 干细胞技术是组织或器官修复和再生的主导技术

根据干细胞所处的发育阶段，可以把干细胞分成**胚胎干细胞**和**成体干细胞**。胚胎干细胞是高等动物受精卵发育成囊胚时的内细胞团，能在体外进行培养和传代，并在一定条件下保持

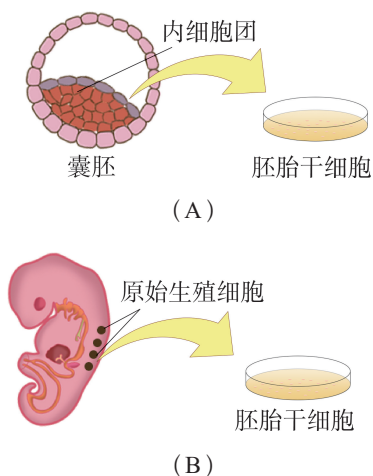


图 2-22 胚胎干细胞的来源

分化的全能性，几乎可以分化出所有的细胞类型。胚胎干细胞特有的分化全能性以及可以无限传代增殖且不改变基因型和表型的生物学特性，决定了它在生物学领域有着不可估量的应用价值。

胚胎干细胞可取自囊胚的内细胞团或是胎儿的原始生殖细胞（图 2-22），其来源非常有限，而且它的获得和使用还涉及非常复杂的伦理问题。鉴于体细胞和干细胞拥有相同的遗传信息，目前可以通过多种技术手段将体细胞诱导形成具有与胚胎干细胞类似分裂和分化能力的干细胞，这样的细胞称为**诱导性多能干细胞**（iPS 细胞），为干细胞的广泛应用提供了基础。

广角镜

治疗性克隆

在哺乳动物的克隆过程中，克隆后代的进一步发育还需要将早期胚胎移植入一个代孕母体的子宫内，我们将这种类型的克隆称为生殖性克隆。治疗性克隆的目的不是产生一个活体生物，而是产生胚胎干细胞，并将其在合适的条件下（如某些生长刺激型蛋白质存在）分化成各种特化细胞乃至形成组织或器官（图 2-23）。如果人们能找到正确的条件，便能培养胚胎干细胞用于修复受损或病变器官，如用来置换因脊髓损伤或心肌梗死而损坏的细胞。

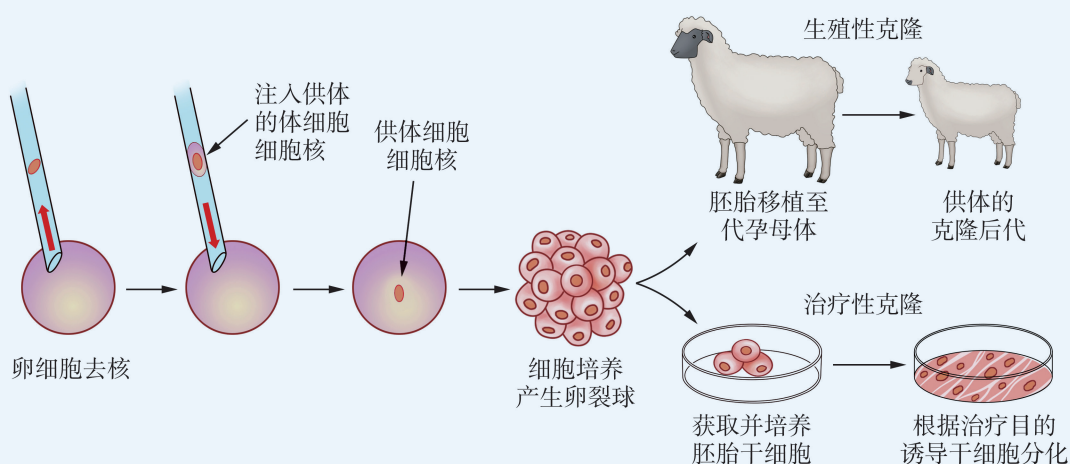


图 2-23 生殖性克隆和治疗性克隆

成体干细胞是分布在成体组织中尚未分化的、具有自我更新潜能的干细胞，在组织或系统的修复和再生中起着关键作用（图 2-24）。

学习提示

胚胎干细胞和成体干细胞的分化潜能有什么不同？

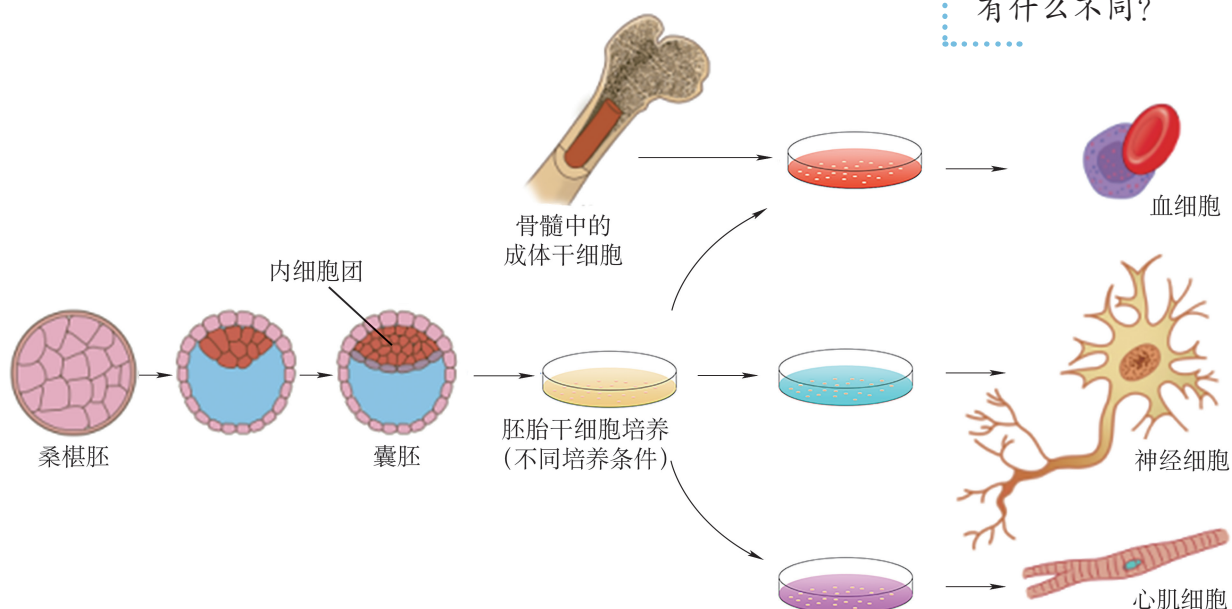


图 2-24 胚胎干细胞和成体干细胞分化潜能示意图

按照分化潜能的大小，可以将成体干细胞分成两种类型。一类是**多能干细胞**，具有分化出多种细胞组织的能力，但不具备发育成完整个体的能力，如骨髓多能造血干细胞，可以分化出多种不同的血细胞（图 2-25）。另一类是**单能干细胞**，只能分化成一种类型或密切相关的两种类型的细胞，如上皮组织基层的干细胞、肌肉中的成肌细胞等。

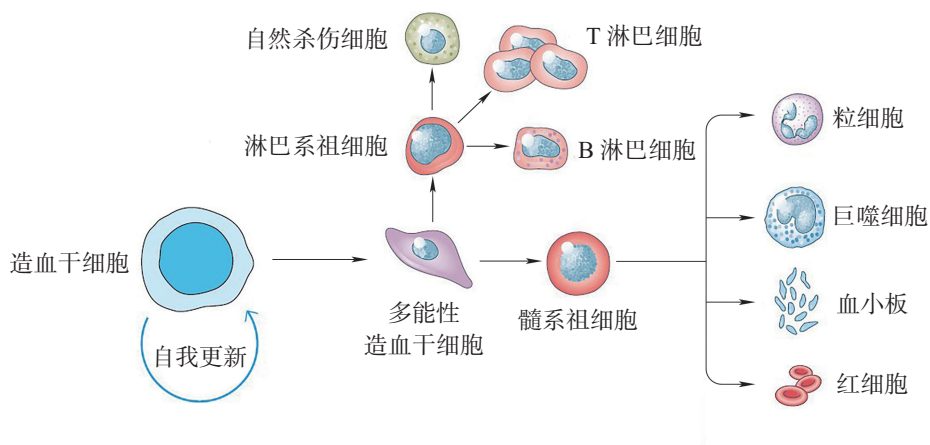


图 2-25 多能造血干细胞能分化形成各种血细胞

早在20世纪50年代,人们就开始使用骨髓移植的方法治疗血液系统疾病。到80年代末,外周血干细胞移植技术开始逐渐替代传统的骨髓移植。随后,又在脐带血中发现了脐血干细胞。与骨髓和外周血干细胞移植相比,脐血干细胞移植具有无来源限制、对人类白细胞抗原(human leukocyte antigen,简称HLA,是决定移植后排斥的主要因素)配型要求较低、不易受到病毒或肿瘤的污染等优点。我国已经掌握了脐血干细胞分离、纯化、冷冻保存和复苏的全套技术,并在上海建立了我国第一个脐血库(图2-26)。



图 2-26 上海市脐血库

此外,胰岛干细胞最初是从尚未发病的糖尿病小鼠胰导管中分离得到的。将胰岛干细胞经体外诱导分化成产胰岛素的胰岛 β 细胞并移植给糖尿病小鼠,接受移植的小鼠血糖浓度控制良好,这为干细胞治疗糖尿病奠定了基础。

皮肤干细胞是另一种成体干细胞。我国科学家发现,人体烧伤皮肤原位处存在着皮肤干细胞。在一定的药物诱导下,这样的皮肤干细胞能使烧伤处的皮肤原位再生。这是我国在皮肤干细胞研究及临床上的重大突破。



自我评价

1. 归纳并整理动物细胞培养技术所需的条件。从结构与功能相适应的角度解释为什么培养动物细胞对渗透压的要求比植物细胞严格?
2. 以克隆猴为例,阐述哺乳动物体细胞克隆的基本流程,分析克隆猴的培育过程中运用了哪些动物细胞工程技术。
3. 对胚胎干细胞、多能干细胞和单能干细胞的分化潜能进行排序,并举例说明它们的应用前景。

4. 生物活性绷带自从在英国诞生后，给皮肤烧伤者带来了福音。该绷带的原理是首先采集一些细胞样本，再让其在特殊的膜片上增殖。5~7天后，将膜片敷在伤口上，膜片会将细胞逐渐“释放”到伤口，并促进新生皮肤层的生长，达到加速伤口愈合的目的。请分析生物活性绷带利用了哪些生物技术，并评价这一产品。
5. 高致病性的甲型流感病毒变异能力强，可以进一步分为 H1N1、H3N2、H5N1、H7N9 等亚型。1918 年曾经引起世界大流行的是毒株 H1N1，近几年该毒株的占比在逐年增加。若要制备针对 H1N1 的单克隆抗体，请简述该抗体的制备步骤并分析其优势。



前沿视窗

诱导性多能干细胞与组织工程

胚胎干细胞具有分化全能性，但其来源有限且涉及复杂的伦理问题；而各种成体干细胞（除造血干细胞外）的采集往往在技术上非常困难，且不具备分化成所有细胞类型的能力。这些因素都限制了干细胞在临床上的应用。由于体细胞与干细胞都携带着相同的遗传信息，因此，只要能对体细胞的遗传信息表达进行重新编程，理论上就能够获得具有与干细胞类似分化能力的细胞。

日本科学家山中伸弥（S. Yamanaka）于 2006 年首先报道了将 4 种转录因子基因组组合转入分化的体细胞中，使其重编程，最终成功获得了类似胚胎干细胞的一种细胞类型，即诱导性多能干细胞（图 2-27）。山中伸弥因此获得了 2012 年的诺贝尔生理学或医学奖。随后，世界各国科学家陆续发现其他方法同样也可以制造这种细胞。

iPS 细胞技术的出现，在干细胞生物学、表观遗传学以及再生医学研究领域都引起了强烈的反响。在基础研究方面，利用 iPS 细胞作为实验模

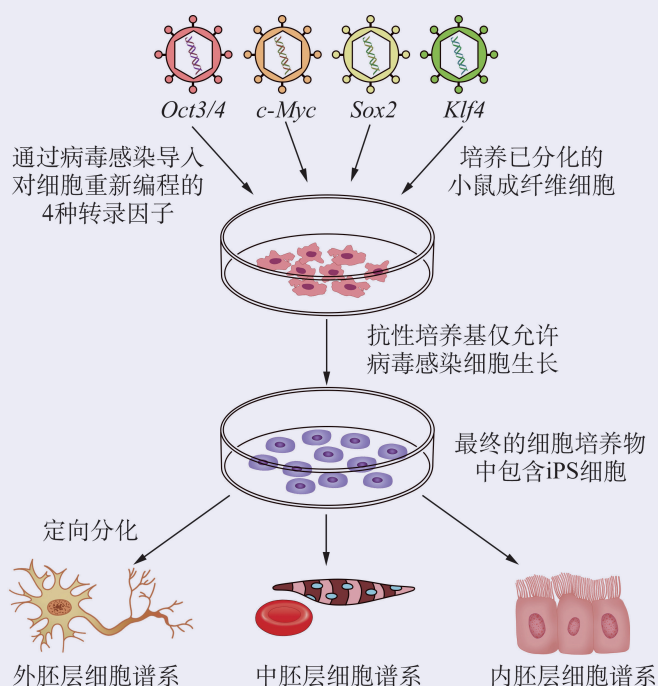


图 2-27 获得诱导性多能干细胞示意图

型，可大大加速对多能性调控机理的深入研究。在实际应用方面，iPS 细胞的获得方法相对简单和稳定，不需要使用卵细胞或者胚胎，这在技术上和伦理上都比其他方法更有优势。iPS 细胞的建立进一步拉近了干细胞与临床疾病治疗的距离，在细胞替代性治疗以及发病机理的研究、新药筛选方面具有巨大的潜在应用价值。我国科学家在 iPS 细胞研究领域取得了一系列重大成果。2009 年，研究团队从小鼠皮肤细胞培育出世界首例来自 iPS 细胞的可育小鼠，证实了 iPS 细胞发育全能性这一关键科学问题。2022 年，我国科学家在国际上首次实现了运用化学小分子将人成体细胞转变为 iPS 细胞。这些重大原创性成果的取得，使我国在干细胞基础理论和应用的一些领域中处于国际引领地位。

组织工程是干细胞应用研究的重要方向之一。组织工程的基本原理是：首先从自体或异体组织中分离干细胞，经体外扩增达到一定的细胞数量后，将这些细胞作为种子细胞种植在预先构建好的聚合物骨架上。在适当的生长条件下，细胞沿着聚合物骨架生长和分化，最终发育成具有特定形态及功能的工程组织。借助组织工程技术，科学家们已经获得了组织工程化的皮肤、骨骼、血管等器官，有望解决临床上急需的人工组织与器官问题（图 2-28）。



图 2-28 世界首例成功移植的组织工程生产的人工气管

第3节 利用胚胎工程快速繁育优良动物品种

正常情况下,牛通常每年产1胎,一生繁殖后代仅16头左右。在畜牧业中,人们对优质肉用牛和奶牛有着更大的需求。怎样才能提高良种母畜的繁殖力呢?解决这个问题需要用到胚胎工程的相关技术。胚胎工程不仅在畜牧业上发挥了重要作用,在解决人类不孕不育症方面也有一定的作用。



试管婴儿技术的资料收集与分析

收集第一代、第二代、第三代试管婴儿技术的资料,整理并归纳三代试管婴儿技术的主要特点。

表 2-1 各代试管婴儿技术主要特点对比

试管婴儿技术	主要特点
第一代	
第二代	
第三代	

思考与讨论:

1. 比较三代试管婴儿技术的异同点,分析并阐明三代试管婴儿技术分别解决了什么问题?
2. 培育试管婴儿的过程中,运用到哪些关键技术?



学习目标

- 理解胚胎工程的基本原理,了解胚胎工程的应用价值。在此基础上,强化结构与功能相适应和稳态维持的生命观念。
- 主动关注胚胎工程在畜牧业中的应用,并能根据该技术的原理,推理和演绎实现目标最大化的可行方案。

概念聚焦

- 动物胚胎发育的过程经历卵裂、桑椹胚、囊胚、原肠胚等阶段。
- 胚胎工程包括体外受精、胚胎移植、胚胎分割移植等技术。

1. 动物胚胎的形成经历受精及早期发育

像培育试管婴儿这样，对动物早期胚胎或配子进行显微操作和处理以获得目标个体的技术称为胚胎工程。其操作的主要对象是生殖细胞、受精卵以及早期胚胎细胞。胚胎发育是胚胎工程的理论基础。那么，动物胚胎是如何发育的呢？

虽然脊椎动物种类繁多，胚胎发育过程也存在差异，但其早期发育较为相似，分成受精、卵裂、桑椹胚、囊胚、原肠胚与器官形成等阶段（图 2-29）。

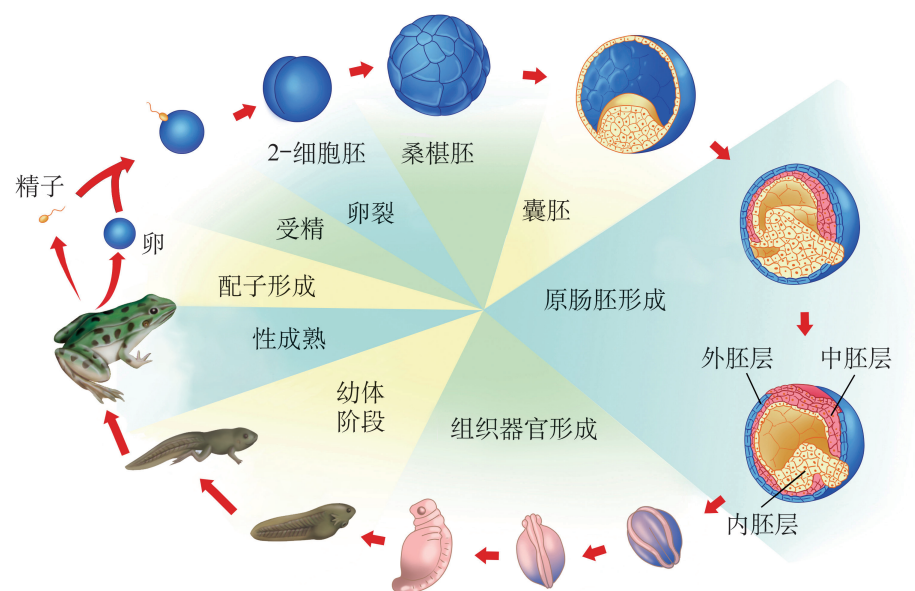


图 2-29 蛙胚胎形成和发育过程示意图

以蛙为例，由于卵黄分布不对称，精子与卵结合之后形成的受精卵分为动物极（发育为外胚层）和植物极（发育为中胚层和内胚层）。受精卵形成后开始卵裂，先分裂成两个细胞，之后细胞通常会逐次倍增，但胚胎的总容积大致不变。受精卵分裂成 16~32 个细胞的阶段，称为桑椹胚。在这个阶段，动物极细胞的分裂频率会超越靠近植物极且含有较多卵黄的细胞群，形成中空的球状胚，称为囊胚。随后形成的原肠胚具有外胚层、中胚层与内胚层，这三种胚层在之后会分化出各种组织和器官，逐渐发育成胚胎。

2. 胚胎工程快速繁育优良动物品种

胚胎工程包括体外受精、胚胎移植、胚胎分割移植等技术。

体外受精是指哺乳动物的精子和卵在人工控制的环境中完成受精过程的技术。这一技术主要包括卵的采集及成熟培养、精子的采集与体外获能、卵与精子的体外受精等环节。体外受精在动物优良品种的繁育中发挥着极为重要的作用。

胚胎移植是将早期胚胎移植到同种且生理状态相同的受体动物体内，使之继续发育成为新个体的技术。胚胎移植实际上是产生胚胎的供体和孕育胚胎的受体分工合作、共同繁育后代的过程（图 2-30）。

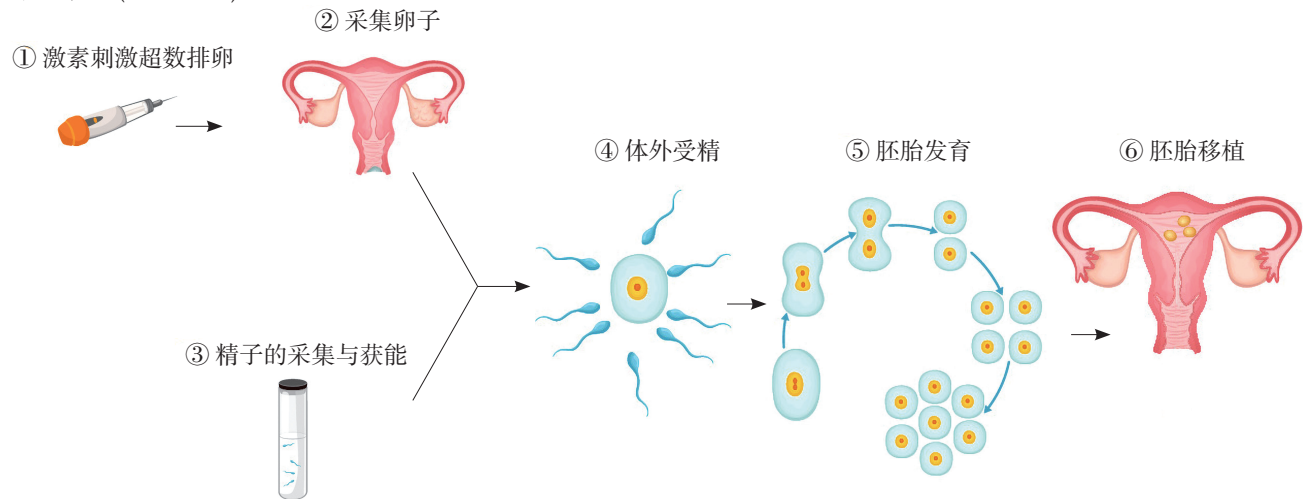


图 2-30 体外受精和胚胎移植过程示意图

哺乳动物胚胎移植的研究由来已久。早在 1890 年，研究人员就将纯种安哥拉白色长毛兔的两个 4- 细胞胚胎植入一只毛色特征完全不同且已和同种交配过的比利时兔的子宫内，生下的幼兔中有两只白色长毛兔和四只比利时兔，从而首次证实了受精卵在受体体内发育的可能性。20 世纪 60 年代以后，随着对动物发育与生殖基础理论研究的深入，人们可对供体进行超数排卵处理，并对受体进行同期发情处理，配合逐步发展起来的非手术取卵方法获取大量卵细胞，胚胎移植技术逐步成熟并广泛应用。在畜牧业中，使用人工授精和冷冻精液的方法可以最大限度地利用优良公畜资源。良种畜群的增加，不仅有赖于优良公畜，同时更取决于优良母畜的数量。胚胎移植能使优良母畜免去冗长的妊娠期，从而产生较多的后代。因此，胚胎移植可以扩大良种雌性配子的推广应用，是提高优良母畜生殖潜力的有效方法。

学习提示

三代“试管婴儿”技术的创建表明生物技术的发展与人们生活的改善密切相关，这也是科研的社会责任。

在动物研究的基础上，英国学者爱德华兹（R. Edwards）和斯特普托（C. Steptoe）最早开展了人类体外受精和胚胎移植技术的研究。1977 年，他们利用腹腔镜取卵，完成体外受精，并在受精卵发育到 8- 细胞胚胎阶段移植入母体子宫内获得妊娠。1978 年 7 月，在英国剑桥大学诞生了世界首例“试管婴儿”。我国首例试管婴儿于 1985 年 4 月诞生于台湾。此后，人类的体外受精和胚胎移植技术得到了进一步的发展和应用，为部分生育困难患者带来了福音。

胚胎分割移植是将一枚胚胎用显微手术的方法分割成几份，经体内或体外培养，然后移植入受体中，以得到同卵双生或同卵多生后代的技术。

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，在显微镜下用分割针或分割刀进行分割。在对囊胚阶段的胚胎进行分割时，还要特别注意将内细胞团均等分割（图 2-31），否则会影响分割后胚胎的恢复和进一步发育。

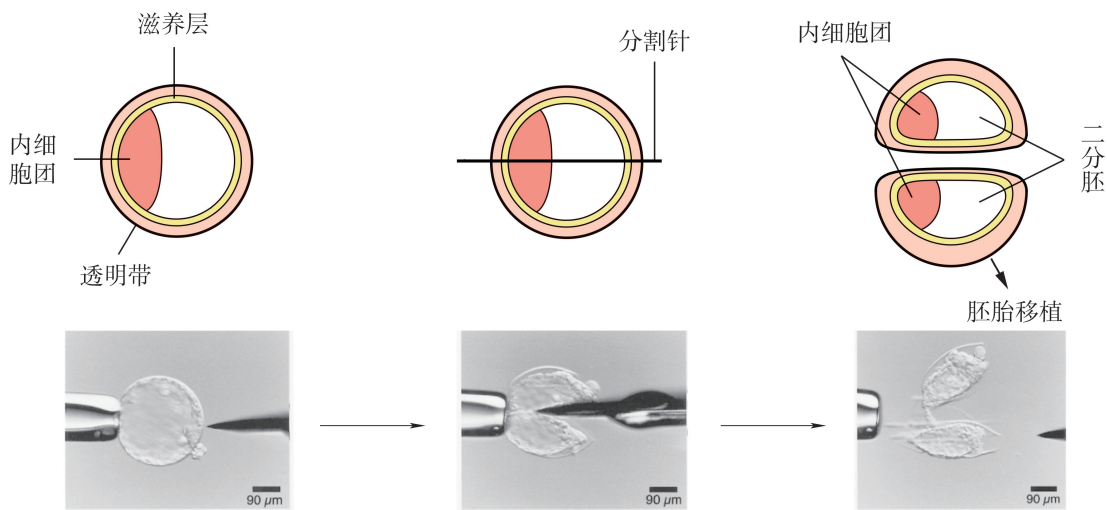


图 2-31 胚胎分割技术示意与显微手术操作

科学家们首先进行了大鼠卵裂球的分离和培养，随后又以小鼠为实验对象，获得了世界首例半胚来源的活体动物。经过多年的发展，胚胎分割移植在理论和技术方法上都已较为完善，尤其是对牛、羊等大型经济动物实施胚胎分割移植技术，可增加胚胎移植中的有效胚胎数、提高妊娠率，从而增加后代数量。与细胞核移植技术相比，胚胎分割移植具有更高的成功率。



自我评价

1. 阐述早期胚胎发育的过程，并结合细胞分化的知识，比较外胚层、中胚层和内胚层细胞遗传物质数量和表达的异同点。
2. 分析并解释胚胎分割成功率与胚胎细胞的分化程度之间的关系。
3. 日本和牛是品质优秀的良种肉牛，其饱和脂肪酸含量很低、营养价值极高。借助胚胎工程可以大大提高和牛的繁殖力，满足市场需求。胚胎工程通常从超数排卵技术（在母牛发情周期的一段时间给予促卵泡激素 FSH 等促性腺激素处理，从而使供体母牛多个卵泡发育成熟并排卵）开始，之后再结合体外受精、胚胎移植等技术来提高繁殖力。
 - （1）据所学知识推测，分泌 FSH 的器官是_____，阐释注射 FSH 促进超数排卵的机理。
 - （2）请整理并比较体外受精和体内受精的异同点。
 - （3）与胚胎移植技术相比，利用克隆技术也可以提高和牛的繁殖力。请阐述利用这两种技术提高和牛繁殖力的区别。
 - （4）结合所学知识，请你设计一套在生产实践中能最大限度提高和牛繁殖力的方案。

本章回顾



本章小结

细胞工程是按照一定的设计方案，以细胞生物学和分子生物学理论和技术为基础，结合现代工程技术手段以及其他学科的科学原理和技术，通过在组织、细胞或亚细胞水平上的实验操作，获得重构的细胞、组织、器官以及生物体，创造优良品种和产品的综合性生物工程。运用结构与功能、物质和能量等生命观念，结合归纳和演绎等科学思维，理解细胞工程的理论基础和技术原理。

植物细胞工程包括组织培养技术和体细胞杂交技术。借助组织培养技术实现植物快速繁殖、植物脱毒培养、次生代谢产物规模化生产等；采用体细胞杂交技术可以克服远缘杂交的不亲和性，创造体细胞杂种植株。经历植物快速繁殖过程，感受细胞工程技术在人类生产、生活中的广泛应用，体会生物技术对人类社会可持续发展具有重要意义。

动物细胞工程包括细胞培养、细胞核移植、细胞融合、干细胞和胚胎工程等应用技术，在医药领域具有巨大的应用潜力，但同时也存在技术和伦理上的问题。在关注和了解相应技术进展的基础上，经历单克隆抗体的临床应用调查，探讨和评价技术进步和人类的关系，增强社会责任感。

胚胎工程包括体外受精、胚胎移植和胚胎分割等技术。借助胚胎工程可以大大提高良种母畜繁殖力，解决人类不孕等问题，从而改善人们的生产和生活。

学业评价

1. 1975 年，科学家建立了淋巴细胞杂交瘤技术，解决了单克隆抗体制备的难题（图 2-14）。在该流程中，从众多细胞中筛选出能产生针对某一特定抗原决定簇的杂交瘤细胞，是单克隆抗体制备的关键。

科学家采用缺失次黄嘌呤 - 鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（HGPRT）基因的骨髓瘤细胞与经绵羊红细胞免疫的小鼠脾脏细胞进行融合，然后将经融合操作后的细胞置于添加了含有次黄嘌呤（H）、氨基蝶呤（A）和胸腺嘧啶（T）的动物细胞培养基（HAT 培养基）中进行筛选，成功得到了杂交瘤细胞。已知氨基蝶呤能阻断次黄嘌呤核苷酸和胸腺嘧啶核苷酸的生物合成（图 2-32）。

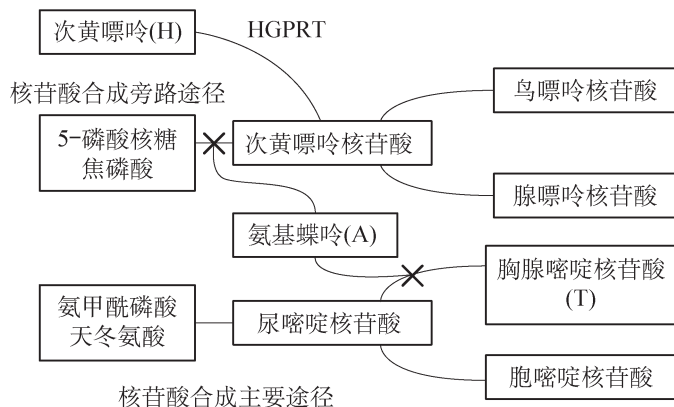


图 2-32 生物体内核苷酸的合成途径

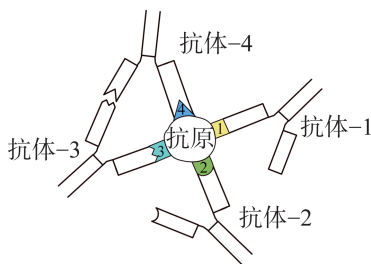


图 2-33 不同的抗原决定簇刺激产生不同的抗体

经过 HAT 培养基筛选出的杂交瘤细胞仍有多种类型，每一种杂交瘤细胞产生的抗体特异性针对某个抗原决定簇（图 2-33）。因此，需要经过第二次筛选才能获得针对某一抗原决定簇的特异性 B 淋巴细胞。第二次筛选通常采用稀释法，即将杂交瘤细胞多倍稀释，接种在多孔的细胞培养板上，使每一孔含一个或几个杂交瘤细胞，而后进行相应的处理以便筛选出所需的单个杂交瘤细胞。

- (1) 细胞融合的过程中，会产生_____种融合细胞（仅考虑细胞两两融合），分析融合细胞的种类并阐明原因。
- (2) 结合核苷酸生成的途径和 HAT 培养基配方，阐明利用该培养基筛选杂交瘤细胞的原理。
- (3) 经 HAT 培养基筛选出的杂交瘤细胞仍有多种类型，下列解释合理的是（ ）（多选）。
 - A. 用于小鼠免疫的抗原带有多个抗原决定簇
 - B. 用于细胞融合的骨髓瘤细胞有多种类型

- C. 经免疫后的小鼠脾脏中有多种浆细胞
- D. 细胞融合所用的促融剂没有选择性
- (4) 结合已学知识及图 2-33, 阐明第二次筛选的原理和方案。
- (5) 运用单克隆抗体进行靶向治疗的优势体现在哪里, 其原因是什么?
- (6) 科学家用相应抗原免疫小鼠, 获得的单克隆抗体是鼠源性的。这种类型的单克隆抗体用于人类疾病的治疗会有何不利影响? 思考并设计能减少甚至杜绝这种影响的特异性抗体制备的技术流程。
2. 牡丹是我国特有的植物, 具有很高的观赏、食用以及药用价值。借助组织培养技术可以满足牡丹需求量不断高涨的问题。由于牡丹基因型及外植体选择的多样性, 其诱导过程中所选培养基也有多种类型。各种培养基中所含的成分有所不同, 这会直接影响到组培苗的生长。现以紫斑牡丹的营养器官为外植体, 并使用不同浓度的细胞分裂素 (BA) 和生长素类似物 (NAA) 配比诱导愈伤组织, 实验结果如表 2-2 所示。

表 2-2 添加不同浓度 BA 和 NAA 的 MS 培养基上紫斑牡丹愈伤组织的形成状况

处理方式及结果	培养基编号								
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
BA (mg/L)	0.5	1.5	3	0.5	1.5	3	0.5	1.5	3
NAA (mg/L)	0.1	0.1	0.1	2	2	2	3	3	3
愈伤组织 诱导成功率 (%)	16.6	0	0	66.6	91.6	33.3	50	75	58.4

- (1) 下列物质可以用作诱导外植体脱分化所需碳源的是 ()。
- A. CO₂ B. 碳酸盐 C. 甘氨酸 D. 蔗糖
- (2) 牡丹组织培养过程中, 下列步骤错误的是 ()。
- A. 对选用的外植体进行灭菌处理, 以保证无菌操作
- B. 外植体接种及愈伤组织诱导需要无菌操作
- C. 在诱导外植体脱分化及再分化的过程中需要多次更换培养基
- D. 为了保证移栽的成功率, 组培苗出瓶前一般需要经过炼苗处理
- (3) 分析表 2-2 数据, 阐述紫斑牡丹组织培养过程中 BA/NAA 的浓度配比与诱导愈伤组织形成之间的关系, 并寻找最合适的浓度配比。
- (4) 牡丹也可用种子进行繁殖, 比较并阐明种子繁殖和组织培养的优缺点。

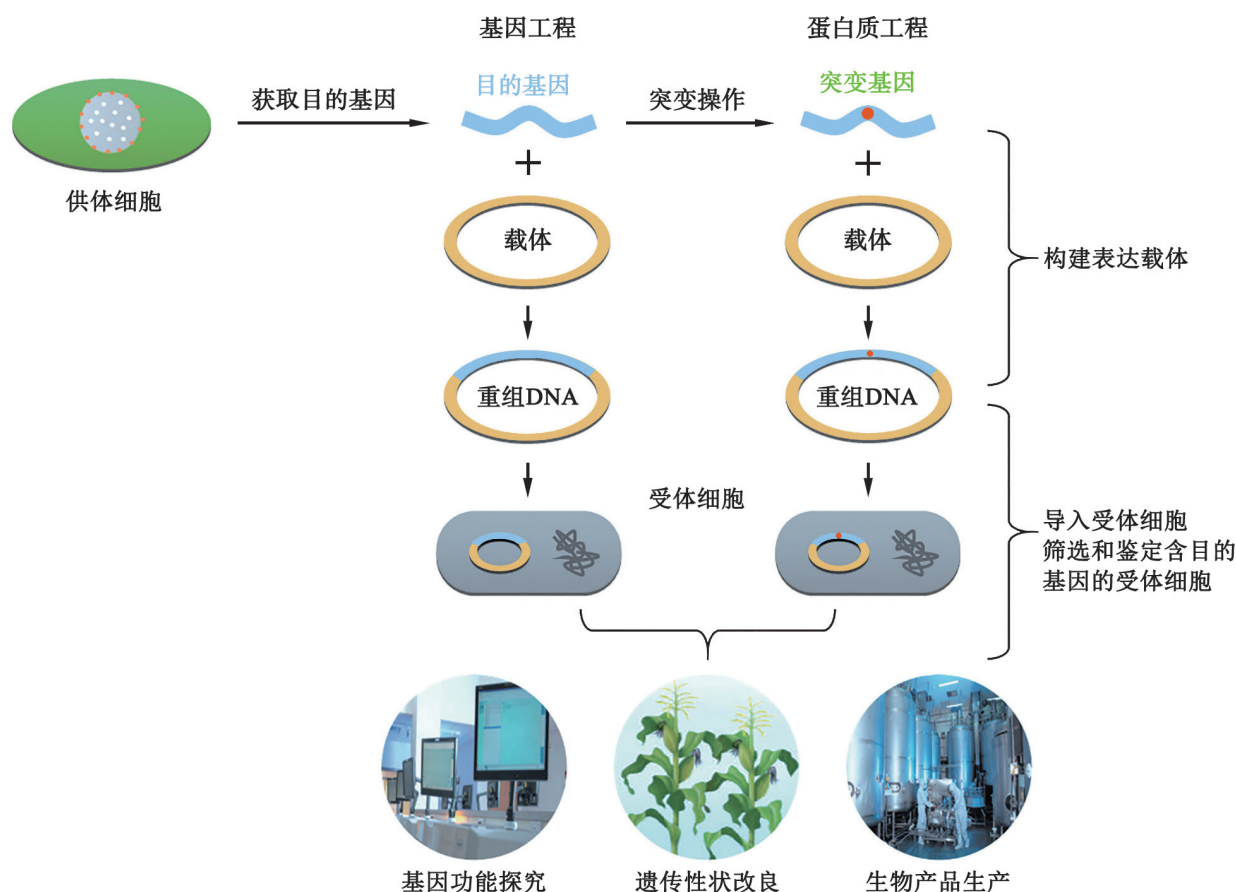
第

3

章

基因工程

20 世纪 70 年代初，美国科学家将不同生物来源的 DNA 片段经体外拼接后，成功导入大肠杆菌中并使之表达，宣告了重组 DNA 技术的诞生。如今，科研人员已能将任何不同来源的 DNA 片段或基因连接在一起，构建出具有生物功能的重组 DNA 分子。重组 DNA 技术不仅广泛用于生物产品的工业化生产以及转基因生物的培育（即基因工程），同时也是基因功能探究和基因治疗的关键技术。天然蛋白质有时难以满足实际应用的要求，利用重组 DNA 技术还可以改造天然蛋白质（例如酶）的基因序列，使之表达出比天然蛋白质性能更为优异的突变蛋白（即蛋白质工程）。



第 1 节

基因工程赋予生物新的遗传特性

学习目标

- 根据自然条件下不同物种间难以交换遗传信息的事实，准确阐述重组 DNA 技术的科学意义，巩固进化与适应观。
- 基于基因工程的基本概念，列举遗传学、微生物学等生物学理论所起的基础作用。
- 结合在人类生活和社会实践中的广泛用途，举例说明基因工程为人类生活品质带来的重大变革，确立利用科学技术造福于人类的价值观和社会责任感。

概念聚焦

- 基因工程（或重组 DNA 技术）的实质是对不同物种的遗传信息进行组合，使其表达出新性状应用于产业化。

据相关组织 2021 年统计，全球成年糖尿病患者数约为 5.37 亿。其中相当一部分患者必须每天依靠注射胰岛素缓解病情，因此全球胰岛素需求量巨大。那么，怎样才能为广大糖尿病患者提供足够量的人源性胰岛素呢？

重组人胰岛素的研制历程

1923 年，年轻的加拿大人班廷（F. G. Banting）在确定了粗制牛胰岛素的降血糖功效和安全性之后，与制药公司合作，以屠宰场的动物胰脏为原料，成功制得了可供糖尿病患者使用的高纯度牛胰岛素。半个世纪后，全球胰岛素的需求量猛增了数百倍，且长期使用动物胰岛素会引发机体内严重的免疫反应。重组 DNA 技术的问世使科研人员敏锐地意识到，这一先进技术有望实现人胰岛素的大规模生产。

1982 年，第一例基因工程产品——重组人胰岛素正式上市。1998 年，我国重组人胰岛素的研制成功大大推动了国内基因工程的产业化进程。

思考与讨论：

基因是控制生物性状的遗传单位，而大肠杆菌和酵母能工业化生产特定功能的蛋白质。如果将人的胰岛素基因导入大肠杆菌或酵母细胞，改变其原有的遗传信息，便能实现人胰岛素的大规模生产。试通过查阅文献资料并结合学过的知识，归纳总结能改变生物遗传信息的方法或技术，与同学交流。

1. 基因工程的诞生是多学科综合发展的成果

基因工程是指将一种或多种生物（供体）的基因与运载工具在体外进行拼接重组，然后转入另一种生物体（受体）内，使之按照人们的意愿遗传并表达出新产物或新性状。由于重组拼接的基因和运载工具都是 DNA 分子，因此，基因工程也称为**重组 DNA 技术**。

对于有性生殖的生物而言，不同物种之间存在生殖隔离，难以进行基因交流；即便生活在同一个栖息地的大多数细菌物种也很难交换遗传信息。重组 DNA 技术诞生的科学意义在于打破这种隔离，使跨物种间基因的定向转移成为可能。

另一方面，发酵工程所用的微生物菌种以及细胞工程所涉及的细胞株，很多都是采用基因工程技术改造过的，因此基因工程是现代生物工程的核心技术。

1973 年，基因工程在遗传学、微生物学、生物化学和分子生物学等生物科学分支学科的基础上问世（图 3-1）。

学习提示

重组 DNA 技术的科学意义在于突破物种之间遗传信息交流的天然屏障，体现进化与适应观。

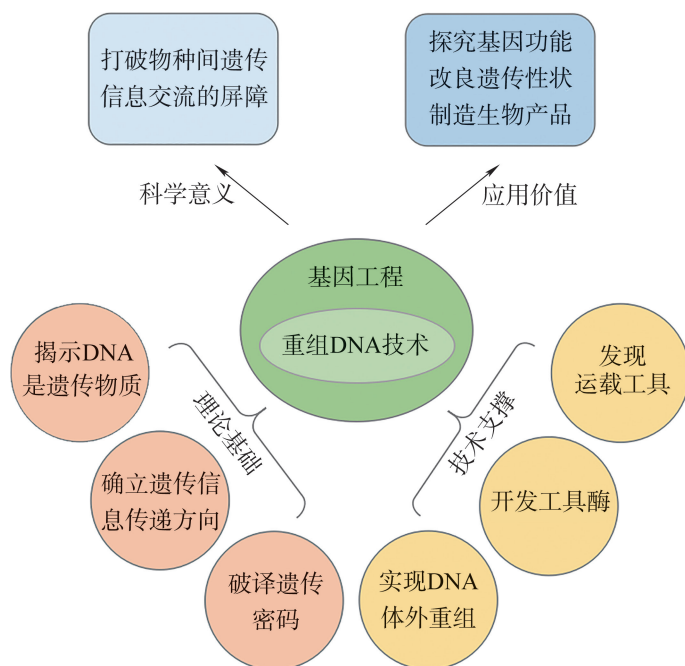


图 3-1 基因工程的理论基础和技术支撑

理论基础 (1) 揭示 DNA 是遗传物质: 1944 年, 著名的肺炎双球菌转化实验不仅揭示了生物体的遗传物质是 DNA, 同时还显示 DNA 可以从一种生物个体转移到另一种生物个体。这项遗传学研究是基因工程中基因转移操作的先驱性工作。

(2) 确立 DNA 双螺旋结构和中心法则: 1953 年, DNA 双螺旋模型的建立促进了 DNA 半保留复制的实验证明。随后不久确立的中心法则解开了 DNA 复制、转录和 mRNA 翻译过程之谜, 阐明了遗传信息传递的方向。这些分子生物学原理为基因工程中提升目的基因的复制和表达水平奠定了基础。

(3) 破译遗传密码: 1963 ~ 1966 年期间, 遗传密码的破译不仅使人们认识到自然界几乎所有生物共用一套遗传密码, 而且为基因的鉴别和合成等提供了理论依据。

技术支撑 (1) 发现运载工具: 1953 年, 发现细菌细胞内除了拟核 DNA 外, 还存在一类具有独立复制能力的小型 DNA (称为质粒), 它们可在细菌细胞之间转移, 这一发现为基因转移找到了一种运载工具。

(2) 开发工具酶: 1970 年, 在细菌中鉴定了第一种能切割 DNA 的酶; 随后, 又相继分离纯化了多种能连接 DNA 和具有其他功能的酶。这些生物化学发现为 DNA 的切割、连接以及基因的获取奠定了技术基础。

(3) 实现 DNA 体外重组: 1972 年, 首次在体外尝试 DNA 的切割和拼接操作, 并成功地构建了第一个体外重组 DNA 分子。

基于上述理论和技术的建立, 1973 年, 美国科学家考恩 (S. N. Cohen) 和博耶 (H. W. Boyer) 等人在体外构建出含有四环素和青霉素两个抗性基因的重组 DNA 分子, 将之导入大肠杆菌后, 这种重组 DNA 分子能稳定复制, 并使大肠杆菌表达出相应的抗生素抗性, 由此宣告了基因工程的诞生。考恩在评价其实验结果时指出, 基因工程技术完全有可能使大肠杆菌具备其他生物物种的特殊生物功能, 如光合作用和抗生素合成等。

微生物以其无性繁殖、生长迅速以及易于基因操作等优势为基因工程的问世作出了重大贡献。每个经基因工程改造过的细胞就如同性能优良的微型生物反应器, 可用来高效生产人们感兴趣的目标产物。然而, 如何控制这些微型生物反应器的数量以及单个微型生物反应器的生产性能, 还需要运用生化工程学的理论和技术。

学习提示

传承和创新是科学永恒的主题, 理论研究是重大工程技术创新的基础。



基因工程的诞生

神话中常常出现各种混血生物，如狮身人兽、牛头怪等，但现实中的生物却不能由不同的物种简单杂合而成。这是因为自然界普遍存在的天然屏障（如生殖隔离）会阻止亲缘关系较远的物种之间进行基因信息交换。那么，我们能否在试管里打破这种物种间遗传信息交换的天然屏障呢？

为了研究这个问题，20 世纪 70 年代初，科学家考恩和博耶等人首先尝试将两种不同来源的 DNA 片段（鼠伤寒沙门氏菌的 RSF1010 和大肠杆菌的 pSC101）在试管里进行拼接，然后将这种重组 DNA 分子导入大肠杆菌细胞中，结果发现这种人工组装的 DNA 分子不仅能准确复制自己，而且还能表达两种 DNA 的遗传信息。紧接着，他们又将另一种亲缘关系较远的金黄色葡萄球菌基因成功导入大肠杆菌中，同样观察到该“外源”基因在大肠杆菌中表达出原来的遗传性状。对上述实验结果进行归纳与概括，他们认为不同物种的细菌可以在实验条件下毫无障碍地进行“交流”（图 3-2）。然而，这一结论是否也能演绎和外推至亲缘关系更远的真核生物物种中呢？随后，他们又参照前人建立的实验程序，成功地将非洲爪蟾的一些基因植入大肠杆菌并获得成功表达，从而证实了他们先前提出的假说：遗传物质 DNA 是可以在保持其功能的前提下进行人为拼接的。自此，宣告了具有划时代里程碑意义的基因工程的诞生。

Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids *In Vitro*

Stanley N. Cohen, Annie C. Y. Chang, Herbert W. Boyer, and Robert B. Helling

PNAS November 1, 1973. 70 (11) 3240-3244;

Article

Authors & Info

Abstract

The construction of new plasmid DNA species by *in vitro* joining of restriction endonuclease-generated fragments of separate plasmids is described. Newly constructed plasmids that are inserted into *Escherichia coli* by transformation are shown to be biologically functional replicons that possess genetic properties and nucleotide base sequences from both of the parent DNA molecules. Functional plasmids can be obtained by reassociation of endonuclease-generated fragments of larger replicons, as well as by joining of plasmid DNA molecules of entirely different origins.

图 3-2 宣告基因工程诞生的经典论文

思考与讨论：

1. 重组 DNA 技术能打破物种间遗传信息交流屏障的理论基础是什么？
2. DNA 重组实验为什么要在亲缘关系不同的受体生物中加以验证？
3. 从基因工程诞生的历程中，你能总结出科学探究有哪些基本规律？

2. 基因工程改善着人类的生活品质

基因工程自 20 世纪 70 年代诞生后,经历了飞速发展,已成为生命科学和生物工程的核心技术。基因工程在医学、农牧业、食品工业等众多领域有着广泛的应用。

医学 由各型肝炎病毒感染所致的急性和慢性肝炎严重威胁人类的健康,是肝硬化和肝癌的主要病因。接种疫苗是有效阻止各型肝炎病毒传染的首选良策。

1981 年,采用人血培养病毒制得的乙肝疫苗率先在美国批准上市。这是人类历史上第一种商业化的乙肝疫苗,象征着人类对抗乙肝的一次革命性突破。但是,有限的来源和高昂的价格使其难以普及,而且存在通过血液感染其他病毒(如艾滋病病毒)的风险也引起了人们的严重担忧。基因工程技术为乙肝疫苗的生产工艺带来了革命性突破:首先,获得乙肝病毒表面蛋白(用作抗原)的基因,然后将其转移至酵母中,可使酵母高效合成乙肝病毒表面抗原蛋白,用作乙肝疫苗。由于酵母易于大规模发酵培养,且整个生产过程能彻底摆脱血液需求和病毒培养,因而通过基因工程大规模生产乙肝疫苗成为了可能。1997 年,我国正式批准利用基因工程技术将酵母改造成“工程菌”用于生产重组乙肝疫苗。之后,国家投入大量资金在全国范围内推行免费接种和补种重组乙肝疫苗,取得了举世瞩目的成功(图 3-3)。



图 3-3 接种重组乙肝疫苗预防乙肝病毒感染

自 20 世纪 80 年代以来,基因工程开始朝着高等动植物物种的遗传性状改良以及人体基因治疗等方向发展。1982 年,科学家将大鼠的生长激素基因转入小鼠体内,培育出具有大鼠雄

健体魄的转基因小鼠（图 3-4）。1990 年，美国首次批准了一项人体基因治疗临床研究计划，对一名因腺苷脱氨酶基因缺陷而患有重度联合免疫缺陷病的儿童进行基因治疗并获得成功，从而开创了基因治疗的新纪元。

农牧业 自古以来，人们在种植农作物时就不断尝试选择性育种。如今，借助重组 DNA 技术可以大大加快育种的进程。转基因抗虫棉是我国拥有自主知识产权的转基因作物。将苏云金芽孢杆菌的有关基因经改造后引入棉花，便可构建出抗虫棉（图 3-5）。这种基因能高效表达无毒性的伴孢晶体蛋白，棉铃虫等食叶性鳞翅目害虫侵害抗虫棉时，其碱性消化液（pH 7.5~8.0）可将摄入的伴孢晶体蛋白水解成毒性肽，导致消化道麻痹而死。转基因抗虫棉的培育成功标志着我国成为世界上第二个独立成功研制抗虫棉的国家。



图 3-4 具有大鼠雄健体魄的转基因小鼠（左）与普通小鼠



图 3-5 普通棉花（左）与转基因抗虫棉（右）

20世纪80年代,研究人员从细菌中获得草甘膦(一种除草剂)抗性基因,并将之导入大豆基因组中,培育出抗除草剂大豆品种,从而在大田中施用草甘膦除草剂时,不会影响大豆的产量。这种转基因大豆于1994年在美国批准种植,成为较早实现大规模商业化推广的转基因作物之一。

食品工业 在食品工业中,氨基酸可用作鲜味剂(如味精)和营养补充剂,具有广泛的用途。全世界每年的氨基酸总产量接近 5×10^6 t,其中谷氨酸的产量约占氨基酸总产量的一半。工业上,通常采用谷氨酸棒状杆菌大规模发酵生产谷氨酸。但天然菌株产量较低,基因工程可改良生产菌株的遗传性状,大幅度提高谷氨酸的产量。



自我评价

1. 从基因工程的定义出发,概括基因工程诞生的理论和技术基础。
2. 如何理解重组 DNA 技术在基因功能探究中的应用价值?
3. 如何理解重组 DNA 技术改变生物体遗传信息的进化学意义?
4. 通过文献检索收集近年来基因工程的应用实例(20项),从以下四个方面对收集的资料进行归纳和分析,在此基础上撰写基因工程新型应用设想方案(200~500字)。
 - (1) 应用领域(医学、农牧、食品、轻工、能源、环境、其他):项目数;
 - (2) 应用性质(基因功能探究、生物产品生产、物种性状改造):项目数;
 - (3) 应用物种(细菌、真菌、植物、动物、人类):项目数;
 - (4) 产品类型(分子、细胞、个体):项目数。

第2节 基因工程是一种重组 DNA 技术

基因工程是如何实现人胰岛素大规模生产的呢？首先必须获取人胰岛素基因（目的基因），其次将之安装在合适的载体上，然后把重组好的 DNA 分子（表达载体）导入合适的受体细胞中，并对目的基因及其表达产物进行鉴定，最后借助这种含重组 DNA 分子的受体细胞大量生产重组人胰岛素。由此可见，重组 DNA 技术的基本操作包括获取目的基因、构建表达载体、导入受体细胞、筛选和鉴定含目的基因的受体细胞等基本步骤。



模拟 DNA 重组

如何才能将人胰岛素基因与另一种 DNA 分子（载体 DNA）重组在一起呢？让我们按照下列方法模拟 DNA 重组的基本过程。

材料准备：如图 3-6 所示，代表人类染色体 DNA 的纸条（长 10 cm、宽 0.5 cm），在上面画出长 2 cm 的红色区域，代表人胰岛素基因；代表另一种 DNA 分子的环形纸条（即载体，直径 5 cm、宽 0.5 cm）。

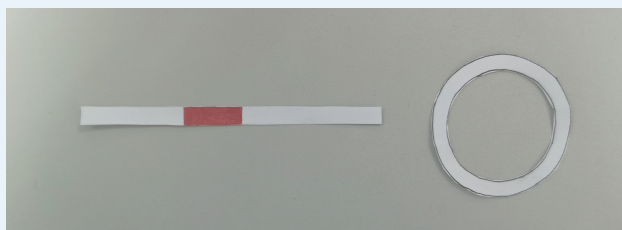


图 3-6 模拟 DNA 重组示意图

实践操作：尝试将人胰岛素编码基因拼接至载体 DNA 特定位点处。

思考与讨论：

为完成上述重组操作，哪些步骤和工具是必需的？



学习目标

- 在准确阐述重组 DNA 技术三大基本工具的基础上，领会并运用 DNA 分子操作的基本原理；结合限制性内切核酸酶的科学发现过程，提升科学思维。
- 在完整阐述基因工程四大操作步骤的基础上，从 PCR 获取目的基因以及目的基因表达产物检测和鉴定中举例总结科学探究的基本程序，并对给定的基因工程项目提出合理的设计操作方案。

概念聚焦

- 重组 DNA 技术包含获取目的基因、构建表达载体、导入受体细胞、筛选和鉴定含目的基因的受体细胞等基本操作阶段。

1. DNA 重组需要三种基本工具

概念聚焦

- 重组 DNA 技术的三大基本工具包含限制性内切核酸酶、DNA 连接酶、载体。
- PCR 技术是模拟细胞内 DNA 复制过程的一种体外 DNA 扩增程序，具有目的基因获取和转基因生物鉴定等广泛用途。

学习提示

限制性内切核酸酶只有在识别并结合 DNA 的特定序列结构之后，才能发挥切割 DNA 分子的功能，这充分体现了生命大分子结构与功能之间的对应关系。

通过模拟 DNA 重组操作，你可以发现若将人胰岛素基因插入环形 DNA 分子的特定位置处，必须进行的操作步骤是“切”和“接”。那么，如何才能对肉眼甚至光学显微镜都无法看清的 DNA 分子进行切和接的操作呢？

限制性内切核酸酶 20 世纪 60~70 年代，限制性内切核酸酶的发现使人们能够对双链 DNA 分子进行精确切割。目前，在细菌中已发现了上千种限制性内切核酸酶，每一种限制性内切核酸酶识别双链 DNA 特定的序列，长度通常为 4~8 个碱基对 (bp)，称为识别序列。例如，限制性内切核酸酶 *EcoRI* 的识别序列为 5'-GAATTC-3'；而 *PstI* 的识别序列则为 5'-CTGCAG-3'。如图 3-7 所示，当限制性内切核酸酶与双链 DNA 的识别序列结合后，便能断裂识别序列内部或两侧相邻两个脱氧核苷酸之间（即切割位点）的化学键，从而切开 DNA 分子的两条链。无论 *EcoRI* 还是 *PstI*，切割后形成的双链 DNA 片段末端会呈单链突出，但两种酶切产物的单链突出方向有所不同。从图中还可以看到，如果线形 DNA 分子两个端点的单链突出部分呈序列互补性且方向相同，那么它们便能在较低温度下重新“粘”在一起（即互补碱基之间形成氢键），这样的单链末端称为**黏性末端**。

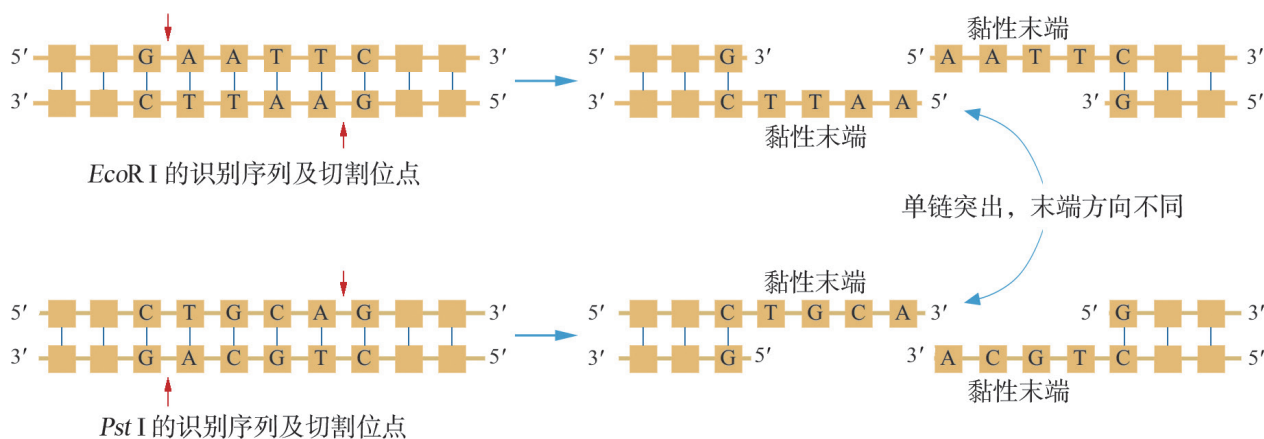


图 3-7 限制性内切核酸酶识别特定 DNA 序列并在切割位点切开 DNA



探究·建模

3-1 模拟限制性内切核酸酶的切割作用

► 建模目标：

用纸片构建具有 *EcoRI* 识别序列的 DNA 双链模型。

如图 3-7 所示，已知 *EcoRI* 的切割位点在 G 与 A 之间，尝试用剪刀在纸片上把这个位点剪断。

► 结果分析：

1. *EcoRI* 只能切割 G 与 A 之间的化学键，要把该 DNA 片段切割为两部分，还需要破坏什么键？什么因素可以破坏这个键？结合 DNA 的分子结构谈谈你的看法。
2. 思考并解释这个键是如何断裂的？
3. 尝试总结用限制性内切核酸酶从 DNA 上切下某个特定区域需要满足什么条件？



思维训练

细菌合成限制性内切核酸酶的意义是什么？

在微生物培养中，人们观察到生长在大肠杆菌某些菌株（如 K 株）中的噬菌体不能在其他菌株（如 B 株）中存活，或者生长能力受到严重限制。于是便产生这样的疑问：大肠杆菌不同菌株对噬菌体生长的这种限制是由什么决定的？为了解答这一问题，研究人员作了如下的实验设计：将 B 株或 K 株分别与其他大肠杆菌菌株按一定比例混合培养，然后再用噬菌体感染这种细菌混合培养物。结果显示，从其他大肠杆菌菌株中释放出来的噬菌体感染 B 株或 K 株的能力也大打折扣。进一步深入分析发现，这种限制效应是由细菌产生的一种酶所引起的，这种酶能识别“外源”噬菌体 DNA 中的特异性位点并裂解之，因而就被命名为“限制性内切核酸酶”。更为奇妙的是，为了保护其自身的 DNA 免遭自己产生的限制性内切核酸酶切割，细菌还会表达一种 DNA 甲基化酶，催化限制性内切核酸酶识别序列内某种碱基的甲基化（即修饰效应），从而使其抗限制性内切核酸酶的切割。不难想象，如果外源入侵的 DNA 在此类细菌菌株中偶然站住脚，同样会被宿主细胞内的甲基化酶所修饰，从而形成对限制性内切核酸酶切割作用的“免疫”。细菌的这种限制-修饰机制相当于脊椎动物体内的先天性免疫系统，不具备免疫记忆功能。

思考与讨论：

1. 为了确保限制 - 修饰机制的正确有效运行，细菌应如何协调表达限制性内切核酸酶和 DNA 甲基化酶？
2. 细菌表达限制性内切核酸酶有利于抵御外源 DNA 的入侵，那么限制性内切核酸酶相当于脊椎动物免疫系统中的什么组分？
3. 细菌这种限制 - 修饰机制对外来入侵者为什么不具备免疫记忆功能？
4. 查阅资料：细菌会采用什么机制对第一波入侵的外源 DNA（如 λ 噬菌体 DNA）产生记忆？

DNA 连接酶 黏性末端之间在低温下形成的氢键并不牢固，若要使两个黏性末端牢固地连为一体，便需要使用另一种工具：DNA 连接酶。大多数生物的 DNA 连接酶能封闭双链 DNA 分子中的单链“缺口”，即一条链上相邻两个脱氧核苷酸之间断开的化学键（共价键），因此特别适合将两个黏性末端牢固地连为一体（图 3-8）。

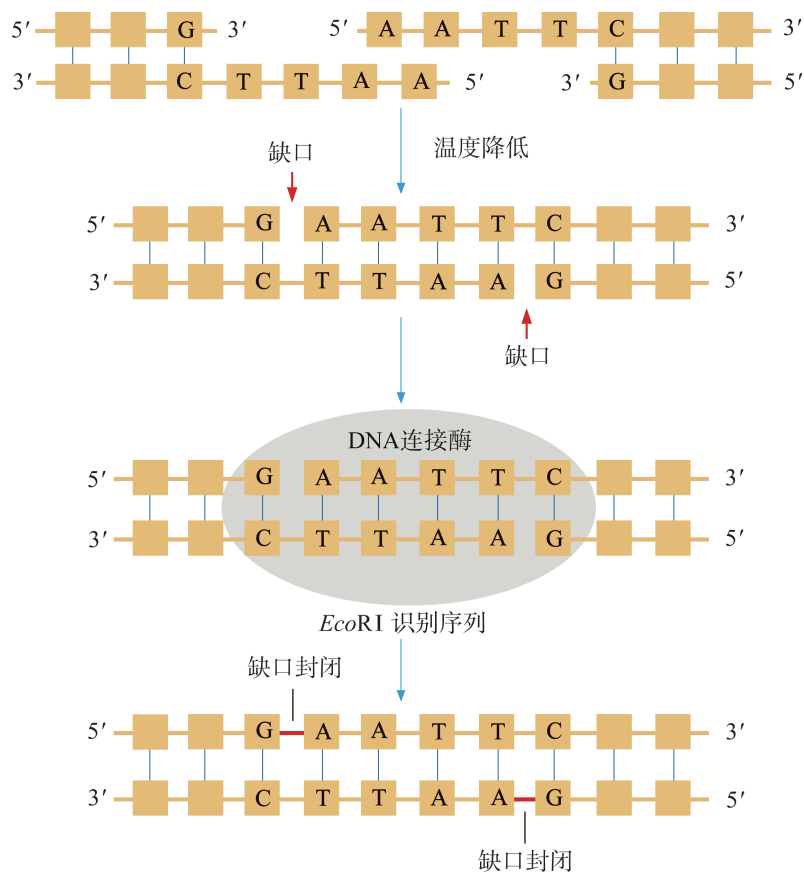


图 3-8 DNA 连接酶作用示意图

载体 将外源基因导入受体细胞中，为什么要使用载体呢？大部分 DNA 片段（尤其是目的基因）并不具备可遗传的自我复制能力，因为缺少复制所必需的特定 DNA 序列。而且，即便一个 DNA 片段能在原供体细胞中复制，这种复制能力一般情况下也难以在受体细胞中正常发挥。因此，要让外源 DNA 在受体细胞中复制，就需要一种合适的运载工具为其提供在受体细胞中复制的能力，这种用于重组 DNA 技术的运载工具称为**载体**。也就是说，任何具备在受体细胞中独立复制性能的 DNA 分子，理论上均可用作基因工程的载体。

生物界至少存在两大类能独立于拟核 DNA 或染色体 DNA 而自主复制的小型 DNA 分子，即广泛存在于微生物细胞内的质粒 DNA 以及存在于大多数生物体内的病毒 DNA。大多数质粒是一类双链环状 DNA 分子（图 3-9）。质粒并非其宿主正常生长所必需，但大都携带抗生素抗性基因，因而能帮助宿主抵御环境不利因素的影响。病毒不仅能在宿主细胞中自主复制，还能通过感染将其 DNA 高效导入宿主细胞中。

学习提示

除了质粒 DNA 和病毒 DNA 外，生物体内还存在其他能独立于染色体 DNA 而自主复制的小型 DNA，它们的结构与功能均有别于质粒 DNA 和病毒 DNA。

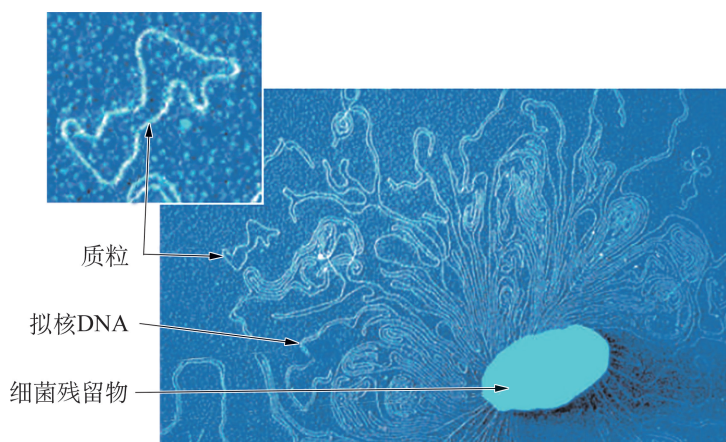


图 3-9 电子显微镜照片显示一个细菌破裂后拟核 DNA 和质粒的透射电子显微镜照片（2 700 ×，左上角为单个质粒的放大图）

2. PCR 是获取目的基因的主要方法

目的基因是人们为了达到基因工程特定目标而导入受体细胞的基因。例如，在规模化生产人胰岛素的基因工程中，人胰岛素基因就是目的基因。从供体生物的 DNA 中有效分离和克隆目的基因是基因工程各项产业化应用的前提，也是基因工程项目实施的首要阶段。

采用何种方法分离获得特定的目的基因，取决于我们对目的基因背景知识的了解程度。如果目的基因的部分序列已知，可采用**聚合酶链式反应**（Polymerase Chain Reaction, PCR）；如果目的基因的完整序列已知，还可采用化学合成法；如果基因序列未知，则采用基于大规模筛选的方法获得。

PCR 是一项模拟细胞内 DNA 复制过程的 DNA 体外扩增技术，由美国科学家穆勒斯（K. B. Mullis）于 20 世纪 80 年代中期首创。利用这项技术可由微量的 DNA 样品特异、高效、准确地扩增特定区域的 DNA 序列。采用 PCR 扩增技术获取目的基因需要 DNA 模板、引物、DNA 聚合酶、四种脱氧核苷三磷酸（dNTP）以及缓冲液系统。由于几乎所有生物来源的 DNA 聚合酶只能在一段与模板 DNA 发生碱基互补配对的单链核酸（称为引物）存在的条件下，才能催化 DNA 链的延伸聚合反应，因此，PCR 扩增目的基因的前提条件是目的基因两侧的序列已知，以便人工化学合成 DNA 引物。PCR 的基本程序如图 3-10 所示。

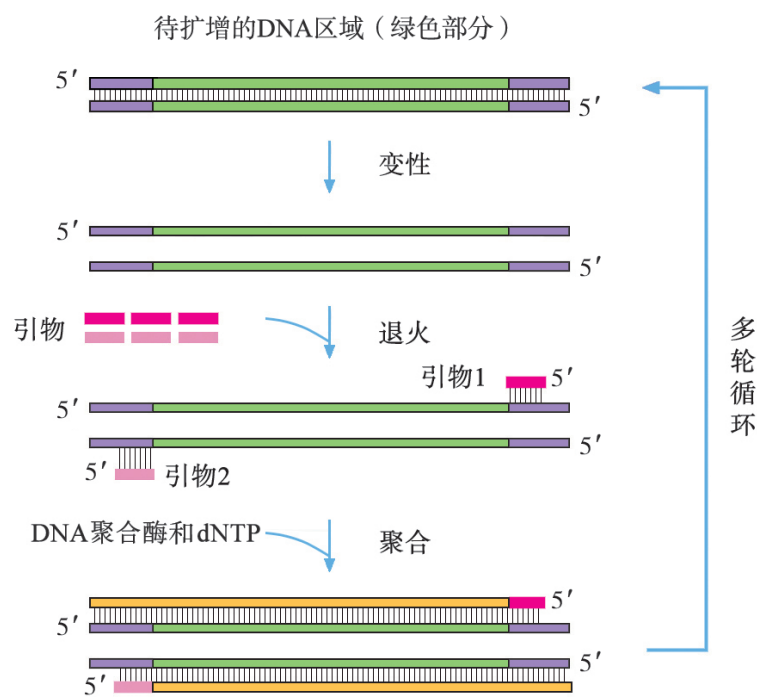


图 3-10 PCR 的基本程序

- (1) 变性：系统温度升至 95 ℃，使待扩增双链 DNA 样品变性，形成单链模板；
- (2) 退火：系统温度缓慢降至 55 ~ 68 ℃，使两条不同的引物分别与两条单链 DNA 模板结合；

(3) 聚合：系统温度升至 75 ℃左右，DNA 聚合酶催化从两条引物的一端以相反方向合成新的 DNA 子链。

重复上述操作 n 次，理论上即可从 1 分子的双链 DNA 模板扩增至 2^n 个分子。上述系统温度升降均由 PCR 扩增仪 (图 3-11) 自动完成。



图 3-11 PCR 扩增仪



探究 · 实验

3-2 DNA 的提取和鉴定

▶ 实验目标：

在了解细胞内生物大分子组成和性质的基础上，掌握 DNA 提取和鉴定的实验原理，熟悉各步实验操作程序。

(一) DNA 的提取和分离

▶ 实验原理：

在一定浓度的乙醇或异丙醇溶液中，DNA 溶解度下降，可沉淀形成纤维状絮团，飘浮其中。

▶ 材料器具：

哺乳动物肝脏、10% (质量体积比) 十二烷基硫酸钠 (SDS)、NaCl、乙醇、蒸馏水、50 mL 离心管、漏斗、10 mL 量筒、移液管、解剖刀、玻璃棒、试管、试管架、手套、天平、纸巾、培养皿、纱布等。

▶ 实验步骤：

1. 配制 50 mL 生理盐水：取 50 mL 离心管，将 0.45 g NaCl 溶解到 50 mL 蒸馏水中，备用。
2. 取另外一支 50 mL 离心管，装入 10 mL 乙醇，盖上管盖，放置冰箱冷藏。
3. 用解剖刀将肝脏样品切成小块，取一药匙肝脏样品放入培养皿中。
4. 培养皿中放入 10 mL 生理盐水，用药匙碾压、磨碎肝脏，使其在生理盐水中产生悬浮的肝脏细胞。

5. 在试管架上放置一支试管，再在试管上放置一支漏斗，将纱布折成四层，放入漏斗中形成过滤装置。将肝脏悬浮液倒入漏斗，经纱布过滤，收集肝细胞悬浮液。

6. 用移液管取 0.5 mL 十二烷基硫酸钠（SDS）至肝细胞悬浮液试管中，轻轻晃动，混合溶液。

7. 用移液管移取约 4 mL 肝细胞悬浮液到另一支试管中。

8. 握住试管，使其微微倾斜，缓缓加入已预冷的 8 mL 乙醇。

9. 将试管放到试管架上，观察肝细胞悬浮液和乙醇混合液的接触面。在乙醇混合液的接触面上会慢慢形成絮状白色物质，这种物质就是溶液中析出的 DNA。

10. 缓缓将玻璃棒伸入试管，当玻璃棒穿过 DNA 层时，轻轻转动玻璃棒，使析出的 DNA 缠绕在玻璃棒上。

（二）DNA 的鉴定

▶ 实验原理：

DNA 大分子的脱氧核糖在酸性条件下加热，能与二苯胺发生反应，生成蓝色化合物。

▶ 材料器具：

二苯胺试剂（质量体积比为 1% 的冰醋酸溶液）、移液管、试管若干。

▶ 实验步骤：

1. 将上述缠绕在玻璃棒上的 DNA 样品放入 3 mL 蒸馏水中，加热 15 min，促进 DNA 溶解。

2. 取上述 DNA 溶液 1 mL 于另一支试管中，加入 2 mL 二苯胺试剂，混匀。

3. 上述混合液于 60 °C 加热 15 min，观察并记录实验结果。

▶ 结果分析：

1. 乙醇为什么要冷却？

2. 在本实验中，SDS 的作用是什么？

3. 如果提取得到的 DNA 样品中混有 RNA 和蛋白质杂质，这些杂质会与二苯胺反应吗？为什么？



探究 · 实验

3-3 PCR 扩增 DNA 的原理和操作

▶ 实验目标：

在掌握 PCR 扩增技术工作原理的基础上，熟悉 PCR 所需的试剂、操作条件和仪器使用。

▶ 实验原理：

PCR 是体外合成特定 DNA 片段的一种方法，变性、退火、聚合三步基本程序组成一个循环，通过多次循环反应使目的 DNA 得以迅速扩增。

▶ 材料器具：

PCR 扩增仪、移液器、PCR 管、PCR 体系等。

PCR 体系由 DNA 模板、目的基因特异性引物、反应缓冲液（ $10 \times \text{PCR buffer}$ ）、 2 mmol/L 脱氧核苷三磷酸底物 dNTPmix（dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2 mmol/L ）、耐热 DNA 聚合酶（Taq 酶）、双蒸水（ ddH_2O ）构成。

▶ 实验步骤：

1. 在冰浴中按表 3-1 中的次序加样，将各成分加入 0.2 mL 无菌 PCR 管中。

2. 将上述混合液稍加离心，立即置于 PCR 扩增仪中执行扩增。PCR 参数一般设置如下： 95°C 预变性 $3\sim 5 \text{ min}$ ，进入循环扩增阶段： 95°C $40 \text{ s} \rightarrow 68^\circ\text{C}$ $30 \text{ s} \rightarrow 75^\circ\text{C}$ 60 s ，循环 $30\sim 35$ 次，最后在 75°C 保温 7 min 。

3. 结束反应，PCR 产物放置于 4°C 保存，待电泳检测或 -20°C 长期保存。

▶ 结果分析：

1. 添加各种反应试剂时，为什么要在冰浴中？
2. PCR 和体内 DNA 复制有什么异同点？

表 3-1 PCR 体系配方

成分	含量
反应缓冲液	$5 \mu\text{L}$
dNTP mix (2 mmol/L)	$4 \mu\text{L}$
引物 1 ($10 \mu\text{mol/L}$)	$2 \mu\text{L}$
引物 2 ($10 \mu\text{mol/L}$)	$2 \mu\text{L}$
耐热 DNA 聚合酶 ($2 \text{ U}/\mu\text{L}$)	$1 \mu\text{L}$
DNA 模板 ($10 \text{ pg}/\mu\text{L} \sim 1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$)	$1 \mu\text{L}$
双蒸水	补至 $50 \mu\text{L}$



思维训练

PCR 扩增技术为什么要使用引物和耐热 DNA 聚合酶?

迄今为止,在几乎所有生物体内发现的 DNA 聚合酶都不能以单个脱氧核苷酸为起点,将游离的脱氧核苷三磷酸从头聚合形成多核苷酸链,而只能将脱氧核苷酸掺入到一段已存在的核苷酸链(即引物)上。就大多数生物而言,引物通常为 6~8 个碱基长度的单链 RNA 分子。

由于引物是根据碱基互补配对原理(即形成氢键)“搭在”DNA 模板特定区域上的(该过程称为“退火”),因此,在较低的温度下,引物可能会与不完全配对的 DNA 模板区域结合,造成 PCR 扩增产物的多样化(即非特异性)。此外,随着扩增轮数的递增,DNA 扩增产物的浓度(也包括黏度)急剧上升,严重影响 PCR 系统中的分子扩散,直至过早终止扩增反应。因此,PCR 的连续多轮循环必须在高温条件下进行,而 PCR 技术的核心便是耐热 DNA 聚合酶的发现,此类耐热酶大都来自生活在温泉中的嗜热细菌。

一般而言,衡量 PCR 的质量指标包含:(1)特异性:扩增产物纯净单一,引物长度和退火温度是关键影响因素。(2)准确性:扩增产物的序列忠实于模板 DNA 序列,与所用高温聚合酶的保真性有关。(3)有效性:扩增产物高产量,与酶量和镁离子浓度有关。

思考与讨论:

1. 大多数生物体在细胞内为什么使用短链 RNA 作为 DNA 复制的引物?新生 DNA 链中为什么不含 RNA 成分?
2. PCR 中的“退火”和聚合温度如何保证聚合的特异性?
3. 引物在 PCR 扩增目的基因中的两大关键作用是什么?

3. 切割和连接是构建表达载体的主要方式

将 PCR 扩增获得的目的基因和合适的载体用相应的限制性内切核酸酶切割出黏性末端(简称“切”),然后加入 DNA 连接酶将两者连接为一体(简称“接”),形成含目的基因且能表达的表达载体,该过程称为表达载体的构建。



探究 · 建模

3-4 模拟 DNA 分子重组

► 建模目标：

模拟重组 DNA 分子（即表达载体）的构建。

► 材料器具：

白纸、胶带、红色和绿色 A4 纸、剪刀。

► 建模步骤：

1. 将红色 A4 纸剪成 3 cm × 10 cm 的长条，代表目的基因。在纸条两侧写上图 3-12 中限制性内切核酸酶 *Bam*HI 的识别序列。

2. 将绿色 A4 纸剪下 3 cm × 28 cm 的长条，并粘成圆环，代表质粒载体。在圆环上两处分别写上图 3-12 中 *Bam*HI 和 *Mbo*I 识别序列。

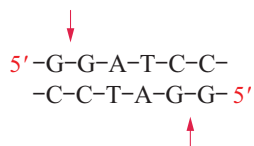
3. 按照 *Bam*HI 和 *Mbo*I 的切割位点，将上述目的基因两侧及质粒都用剪刀剪开。

4. 将配对的黏性末端用胶带粘在一起，使目的基因插入质粒中，构成重组 DNA 分子。

► 结果分析：

1. 观察切开的目的基因和质粒，其黏性末端有何特点？
2. 切开的目的基因和质粒能够连接的原因是什么？
3. 与小组同学比较并讨论连接结果，这个结果是唯一的吗？
4. 若目的基因用 *Bam*HI 切开，但质粒用 *Mbo*I 切开。两种 DNA 混合连接后，含载体的 DNA 分子共有哪几种类型？重组 DNA 分子中目的基因两侧还存在 *Bam*HI 或 *Mbo*I 的识别序列吗？这一结果意味着什么？

*Bam*HI 识别序列和切割位点：



*Mbo*I 识别序列和切割位点：

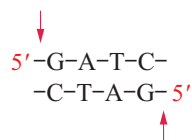


图 3-12 *Bam*HI 和 *Mbo*I 两种限制性内切核酸酶的识别序列和切割位点

通过上述 DNA 的重组的模拟可以得知，如果目的基因和载体均用相同的限制性内切核酸酶切开，那么它们都带有相同的黏性末端，因而可在较低温度下（一般在 4 ~ 26 °C）“粘”在一起，并在 DNA 连接酶的作用下封闭所有的缺口，成为稳定的重组 DNA 分子。但在此过程中，需要注意下列问题：(1) 由于目

的基因两侧的黏性末端相同，因而能以正反两种方式等概率接入载体，但在基因工程大多数应用中，只有一种方式是可用的。(2) 由于载体片段两侧的黏性末端也相同，因而在连接时载体两个黏性末端可以自我环化，导致载体“空载”(即非重组 DNA 分子)。(3) 根据 DNA 连接酶的工作原理，目的基因和载体 DNA 只需黏性末端相同便能有效连接，也就是说，两种 DNA 并不必须用同一种酶切开。(4) 如果使用两种识别序列不同、但黏性末端相同的限制性内切核酸酶分别切开目的基因和载体 DNA，那么两者连接后原来的限制性内切核酸酶识别序列会消失，也就是说，不能用相应的限制性内切核酸酶从重组 DNA 分子中重新“卸下”目的基因。

4. 将 DNA 分子导入受体细胞

经连接操作后的 DNA 分子只有导入受体细胞，才能借助细胞内的基因表达系统使目的基因所蕴含的遗传信息得以表达。受体细胞可以是微生物、植物或动物细胞，完全由基因工程的应用性质而定。例如，采用基因工程技术改良农作物的性状，受体细胞显然来自相应的植物。

在自然条件下，DNA 很难进入细胞。为了大幅度提高 DNA 分子进入受体细胞的效率，通常需要对受体细胞进行特殊的处理，这一操作称为转化(简称“转”)。转化的方法可以采用物理方法(如电击法)、化学方法(如氯化钙法)、生物方法(如农杆菌法)等。即使如此，转化成功的效率也只有 $10^{-4} \sim 10^{-2}$ ，因而需要高效筛选出接纳了 DNA 分子的受体细胞。为了做到这一点，转化后的细胞需要经过一段时间的培养，使得用于筛选的性状得以表达，这个过程称为扩增(简称“增”)。

5. 借助标记基因筛选和鉴定含目的基因的受体细胞

由于在转化操作中，只有少数细胞能接纳 DNA 分子，而且进入受体细胞的 DNA 分子还有可能含有空载质粒。因此，需要借助有效的实验技术快速、准确地找到正确导入(甚至高效表达)目的基因的受体细胞，这一过程称为筛选与鉴定(简

称“检”)。

筛选含目的基因的受体细胞常用抗药性筛选法和显色筛选法。抗药性筛选法实施的前提条件是载体 DNA 携带抗生素的抗性基因。例如, 大肠杆菌 pBR322 质粒含有氨苄青霉素抗性基因 (Amp^r) 和四环素抗性基因 (Tet^r), 这些可供筛选使用的功能性基因称为标记基因。如果外源 DNA 插在质粒 pBR322 的 *Bam*HI 位点处, 则只需将转化扩增的细菌涂布在含有氨苄青霉素 (Amp) 的固体平板上, 理论上能长出的菌落便是转化成功的克隆 (图 3-13)。上述筛选获得的转化成功克隆中有两种类型, 即含重组质粒的克隆和含空载质粒的克隆。为了进一步区分这两类克隆, 需要采用图 3-13 中 (B) 所示的方法进行第二轮筛选。由于外源 DNA 片段在 *Bam*HI 位点的重组导致载体 DNA 的 Tet^r 基因插入灭活, 含重组质粒的克隆呈 $Amp^r Tet^s$ 表型 (上标 “r” 代表抗性; “s” 代表敏感); 而含空载质粒的克隆则为 $Amp^r Tet^r$ 表型。因此, 含重组质粒的克隆只能在 Amp 平板上生长; 而含空载质粒的克隆可出现在同时含 Amp 和 Tet 的平板上。

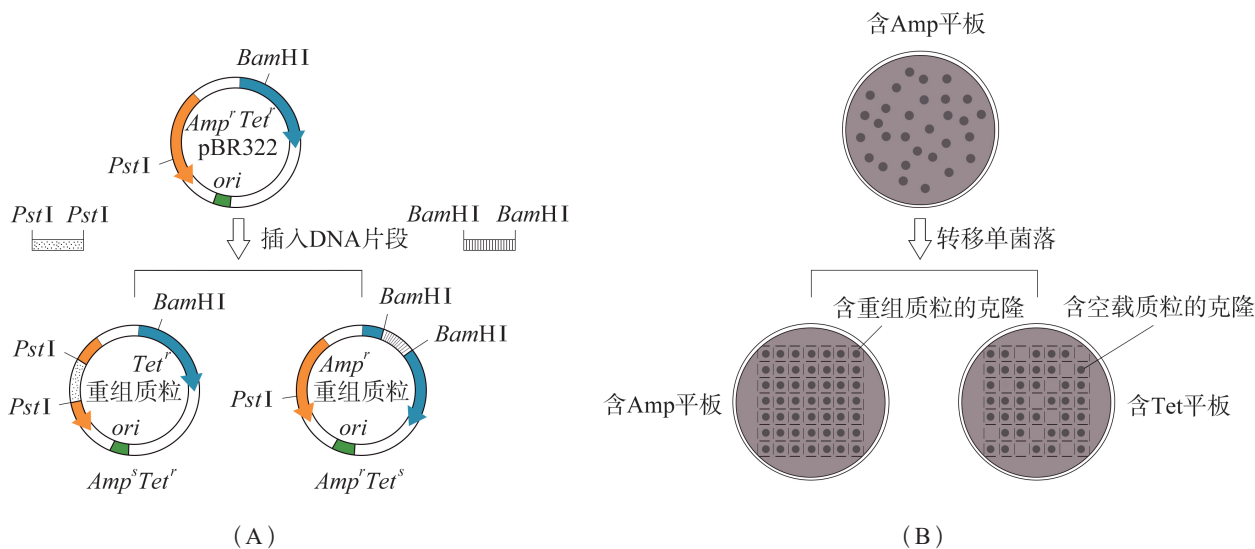


图 3-13 抗药性筛选法的工作原理

很多大肠杆菌的质粒上含有 $lacZ'$ 标记基因, 其表达的酶蛋白可将一种无色的化合物 (X-gal) 水解成蓝色产物。重组 DNA 技术常用的大肠杆菌质粒 pUC18/19 同时携带 Amp^r 和 $lacZ'$ 两个标记基因。将外源 DNA 插在 $lacZ'$ 标记基因内部的任何限制性内切核酸酶切割位点处, 将转化扩增的细菌涂布在同时含有 Amp 和 X-gal 的固体培养基上, 在长出来的克隆中, 白色克隆即为含重组质粒的克隆 (图 3-14)。

学习提示

在基因内部插入一段 DNA 通常会导致该基因功能的丧失，这也体现了结构与功能相适应的生命观念。

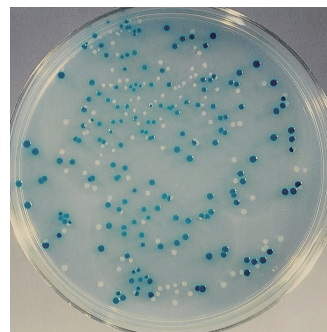
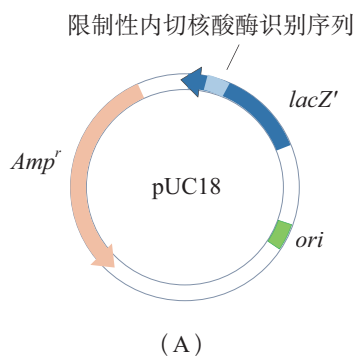


图 3-14 显色筛选法的工作原理及结果

除了上述两大类标记基因外，在产业化生产用于食品和药品的基因工程产品时，出于安全考虑，还需要使用其他无害的标记基因以及相应的筛选方法。

经抗药性或显色筛选获得的含目的基因的受体细胞还需进一步鉴定重组在载体上的目的基因位置是否正确以及是否能高效表达，这需要使用 PCR 技术和基因表达产物（蛋白质）的结构和功能分析技术。



探究·实验

3-5 PCR 扩增产物的凝胶电泳鉴定

▶ 实验目标：

了解琼脂糖凝胶电泳的工作原理，熟悉 DNA 琼脂糖凝胶电泳的基本操作。

▶ 实验原理：

由于核苷酸的磷酸基团使 DNA 片段带负电荷，所以电泳开始前应将负电极插在凝胶板上靠近 DNA 样品的一端，将正电极插在另一端。通电后，DNA 片段会通过凝胶向正极方向“泳动”。凝胶电泳主要根据核酸分子的大小和结构将它们分离开来。

▶ 材料器具：

探究实验 3-3 中获得的 PCR 扩增产物、Tris 碱、冰醋酸、琼脂糖、5× 上样缓冲液（市购）、移液器、1.5 mL 离心管、微波炉、电泳梳、胶模板、电泳槽、电泳仪、紫外灯（或核

酸蛋白检测仪)等。

实验步骤：

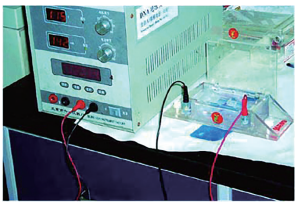
- 1. 按表 3-2 配方配制 50 × TAE 电泳缓冲液。
- 2. 将上述 50 × TAE 电泳缓冲液稀释 50 倍 (即 1 × TAE), 用 1 × TAE 电泳缓冲液配制 50 mL 浓度为 0.7% (质量体积比) 的琼脂糖悬浮液, 在微波炉中加热至琼脂糖溶解 (溶液澄清)。
- 3. 待琼脂糖溶液冷却至 50 °C 左右, 倒入已放置了电泳梳的胶模板中, 凝胶厚度为 3~5 mm。
- 4. 待琼脂糖凝胶完全凝固后, 将凝胶连同胶模板一起放入盛有 1 × TAE 电泳缓冲液的电泳槽中, 使电泳缓冲液没过凝胶约 1 mm, 然后轻轻拔去电泳梳。
- 5. 将 PCR 扩增产物溶液 (即 DNA 样品) 与 5 × 上样缓冲液按 4 : 1 比例混匀后, 用移液器取 3~10 μL (体积视 DNA 浓度而定) 的上述混合液, 缓缓加入琼脂糖凝胶的样品槽内。
- 6. 盖上电泳槽后通电, 电压为 80~100 V, 使 DNA 向正极泳动 (图 3-15)。
- 7. 当上样缓冲液中的蓝色染料泳动至琼脂糖凝胶全长的三分之二时, 切断电源, 取出凝胶, 在紫外灯 (或核酸蛋白检测仪) 下观察 DNA 电泳条带。

结果分析：

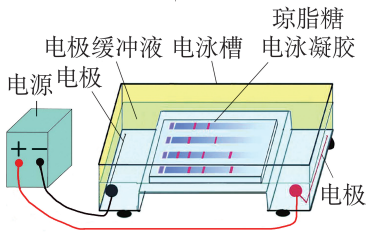
- 1. DNA 的什么性质导致其能在凝胶中泳动?
- 2. 利用凝胶电泳技术能测定特定基因中的碱基序列和基因在染色体 DNA 中的准确位置吗?
- 3. 如何才能比较准确地测定目的基因的长度?

表 3-2 50 × TAE 电泳缓冲液配方

成分	含量
0.5 × 10 ⁻³ mol/L EDTA (pH=8.0)	100 mL
Tris 碱	242.0 g
冰醋酸	57.1 mL
蒸馏水	补至 1 L



(A)



(B)

图 3-15 凝胶电泳示意图

6. 构建转基因动植物需要针对特定受体细胞进行操作

如果构建多细胞的转基因动植物, 还需将表达载体导入可发育成动植物个体的受体细胞中, 例如动物的生殖细胞 (精细胞和卵细胞)、受精卵 (或早期胚胎细胞)、诱导性多能干细胞等, 植物的愈伤组织 (或其他组织的原生质体)、生殖细胞或胚胎组织等。

DNA 显微注射是动物细胞基因转移普遍采用的一种物理转化方法，其基本操作程序如下：通过激素疗法使雌鼠超数排卵，并与雄性小鼠交配后从其输卵管内取出受精卵，用吸管将受精卵固定在倒置显微镜上，然后借助玻璃注射针向受精卵注入 DNA 溶液；将注射了 DNA 的受精卵移植到母鼠子宫中发育，继而繁殖转基因小鼠子代。此外，当采用动物病毒（如腺相关病毒和慢病毒）DNA 作表达载体时，可以通过病毒感染的方式将目的基因高效导入动物细胞中。

植物细胞的常用转化方法是用含有表达载体的根瘤农杆菌感染受体细胞。此外，也可用含有表达载体的植物病毒直接感染植物的叶或茎等组织，这些病毒能将目的基因迅速扩散至整株植物。由于植物的愈伤组织能再生出整株植物，因此转基因植物的构建要比转基因动物的构建更加简便。

转基因动植物培育出来后，仍需要使用 PCR 等技术确认转基因是否获得成功，以及目的基因在动植物体内是否正确表达。



自我评价

1. 阐述质粒的化学本质及其在重组 DNA 技术中的作用。
2. 概括凝胶电泳分离 DNA 片段的工作原理。
3. 归纳并阐明利用 pBR322 质粒筛选出含重组质粒大肠杆菌的机理及方案。
4. 假如你希望利用重组 DNA 技术大规模制造乳糖酶蛋白。试将下列必须实施的步骤按先后次序排列：① 找到含乳糖酶基因的克隆；② 将质粒导入细菌中并使其长成克隆；③ 分离乳糖酶编码基因；④ 创建包含乳糖酶基因的重组质粒。
5. 将限制性内切核酸酶 *EcoRI* 与含有 5'-CGAATTCTAGCGAATTCGCGA-3' 序列的 DNA 分子混合足够时间，能产生多少种 DNA 片段？
6. 如果用一种限制性内切核酸酶切割一定长度的 DNA 分子，其一端集中排列了该限制性内切核酸酶三处识别序列，在用凝胶电泳分离酶切片段后，电泳条带会呈现怎样的分布？
7. 耐热 DNA 聚合酶的发现是 PCR 技术得以广泛使用的基础。搜集资料查明它的来源，并用进化和适应的观念解释该现象。根据 DNA 复制的原理，阐明为何要使用耐热 DNA 聚合酶？
8. PCR 技术自从问世以来就得到广泛的关注和应用，搜集资料归纳和概括该项技术的应用实例，并尝试演绎出新的用途。

第3节 蛋白质工程是基因工程的延伸

人胰岛素在使用过程中容易聚合成多分子形式，阻断胰岛素从注射部位进入血液，从而延缓其降血糖的作用。另外，胰岛素进入血液循环后容易被降解，患者需要反复注射。上述两方面均与胰岛素分子的氨基酸序列有关。借助蛋白质工程可以定向设计、改变这些氨基酸，降低其聚合作用，使胰岛素快速发挥作用，同时可提高胰岛素在患者体内的稳定性。



由蛋白质的氨基酸序列推演基因序列

已知某多肽链的一段氨基酸序列是：

……丙氨酸－色氨酸－赖氨酸－甲硫氨酸－苯丙氨酸……

思考与讨论：

1. 如何推演出决定这一段肽链的 DNA 序列？
2. 确定了目的基因的碱基序列后，怎样才能获得改造的目的基因？

1. 蛋白质工程在基因水平上设计和改造蛋白质

重组 DNA 技术使得分离、克隆任何天然存在的基因并令其在特定受体细胞中表达成为可能，这项技术所使用的目的基因均是天然存在的，因而表达出的产物仍为天然蛋白质。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适应特殊环境而生存的需求，但不一定都能完全符合人类生产和生活的需要。比如，人类常规主食（尤其是水稻和玉米）中的必需氨基酸（如赖氨酸）含量偏低；工业用酶在高温和有机溶剂生产环境中容易失活；药物蛋白多肽在机体内半衰期较短等。



学习目标

- 从蛋白质工程的基本定义出发，举例说明基于基因工程原理设计和改造蛋白质分子的研究意义和产业化应用价值。
- 在理解蛋白质工程设计原理的基础上，运用结构与功能观和进化与适应观阐明定点突变和定向进化的蛋白质工程基本策略，并分析蛋白质工程基本过程所涉及的科学思维基本要素。

概念聚焦

- 蛋白质工程是在 DNA 分子水平上改变蛋白质的氨基酸序列，使其表达出比天然蛋白质性能更为优异的突变蛋白。

概念聚焦

• 蛋白质工程包含特定基因的定点突变和定向进化。定点突变是指改变 DNA 的特定序列；而定向进化是指随机改变 DNA 的序列，然后选择具有特定功能的突变蛋白。

以蛋白质结构与功能相统一的生命观念为指导，采用重组 DNA 技术在 DNA 分子水平上改变基因的序列和结构，可以对天然蛋白进行理性改造，甚至可以设计并制造出全新的非天然蛋白，以满足人类生产与生活的需求。这种由人为突变或设计基因进而操纵蛋白质结构和性质的过程，称为**蛋白质工程**，又称第二代基因工程。

蛋白质工程包括修饰改造天然蛋白和设计制造全新蛋白两个方面。修饰改造天然蛋白存在两大类操作策略，即基因的定点突变和定向进化。在 DNA 水平上改变蛋白质特定位点的氨基酸序列，称为基因的定点突变；而在 DNA 水平上随机改变蛋白质任一位点的氨基酸序列，则称为基因的定向进化。修饰改造天然蛋白（图 3-16）一方面可实现氨基酸序列改造，优化其功能；另一方面还可以确定多肽链中某个氨基酸在蛋白质结构和功能上的作用，以收集有关氨基酸线性序列与其空间构象和生物功能之间的对应关系，为设计制作新型的突变蛋白提供理论依据。因此，修饰改造天然蛋白实质上是一个模拟自然界进化与

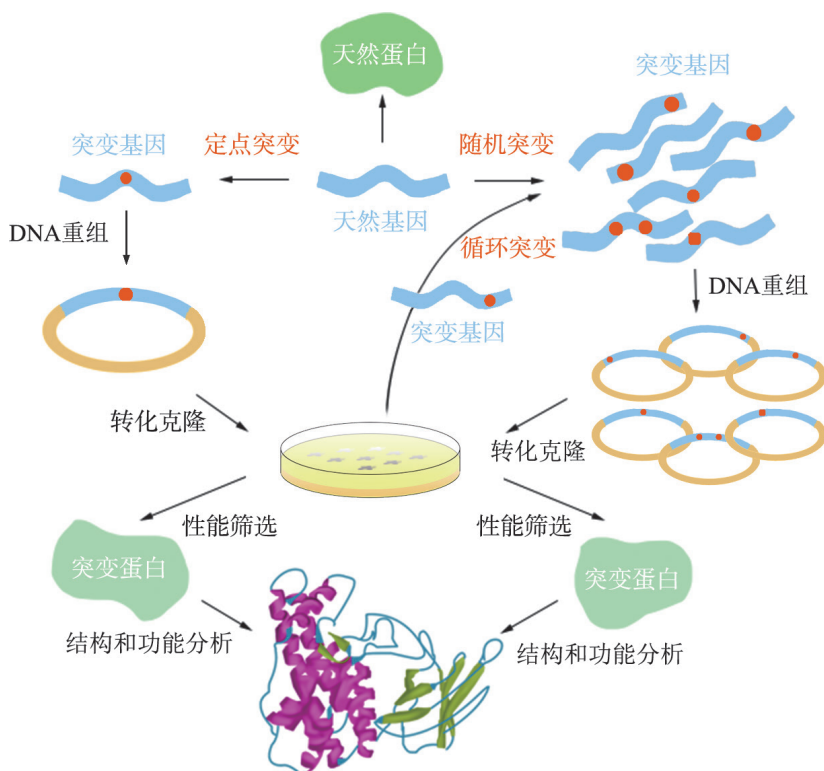


图 3-16 蛋白质工程修饰改造天然蛋白策略的基本流程示意图

适应的循环渐进过程,可将数千万年的自然进化历程缩短为数月、数周甚至数天的实验室过程(如通过图 3-16 中所示的循环突变)。

蛋白质工程的另一关键方面是根据我们所掌握的蛋白质结构与功能基本信息设计制造全新蛋白。假设蛋白质平均由 200 个氨基酸构成,按常见氨基酸种类进行估计,氨基酸序列的可能性高达 20^{200} 种,但自然界中天然蛋白质的氨基酸序列大约只有 10^{12} 种。数十年来,人们采用定点突变和定向进化策略修饰改造的天然蛋白种类只是沧海一粟,而设计制造全新蛋白的理念就是在更广泛的氨基酸序列海洋里开发自然界并不存在、但理论上可行的蛋白质资源。

2. 蛋白质工程根据人类需要改造目标蛋白质

借助蛋白质工程设计和改造新型突变蛋白,具有不可估量的经济和社会效益。让我们结合具体案例了解如何借助定点突变策略改造蛋白质的基因结构,进而产生突变蛋白的大致过程。

定点突变 研究表明,人胰岛素样生长因子的结构和性质与人胰岛素高度相似,但它不像人胰岛素那样容易聚合形成多分子。比较这两种蛋白质的结构发现,人胰岛素样生长因子在与人胰岛素 B 链对应的第 28 位和第 29 位氨基酸分别是赖氨酸和脯氨酸,而人胰岛素在这两处的氨基酸序列正好颠倒,因而推测这是人胰岛素形成多分子形式的关键原因。为了证实这一猜想,需要更换人胰岛素这两个位点的氨基酸顺序。那么,怎样才能做到这一点呢?

已知,人胰岛素 B 链基因中编码第 28 位脯氨酸和第 29 位赖氨酸的序列分别为 CCC 和 AAG。因此,只需在人胰岛素基因中将原来的“CCCAAG”序列改造成“AAGCCC”,理论上便能在受体细胞中产生两处氨基酸序列颠倒的突变型人胰岛素。由于人胰岛素 B 链基因较短,按照设计好的编码序列进行化学合成,是获取这种突变型目的基因的首选方法。另外,也可采取图 3-17 所示的 PCR 方案获取突变型目的基因(PCR 方案对较长的目的基因编码序列更经济):首先人工化学合成含有突变序列的突变引物和不含突变序列的正常引物,然后使用这两种引物

学习提示

基因工程涉及天然基因的重组,表达产物的结构和功能基本上没有改变;而蛋白质工程旨在对蛋白质的结构和功能进行设计和改造,获得性能更符合人类需求的蛋白质。蛋白质设计从预期的生物学功能出发,去改造蛋白质的结构,充分体现了结构和功能的统一。

学习提示

PCR 中的引物不一定与模板 DNA 完全互补，只要适当降低退火温度，也能“搭”在模板 DNA 链上起聚合引导作用。

以人胰岛素基因为模板进行 PCR。研究证实，由这种突变的目的基因表达的突变型人胰岛素不再聚合成多分子形式。将这种突变型人胰岛素注射进入患者体内，降血糖速率大为提高，因而这种突变型人胰岛素被称为“单体速效胰岛素”（又称“赖脯胰岛素”，图 3-18）。

L-天冬酰胺酶是治疗儿童白血病的有效药物，但在临床应用中因其并非人体蛋白常常引起过敏反应，因此降低免疫原性是该药研究开发的重要内容。采用定点突变技术将细菌来源的 L-天冬酰胺酶某位赖氨酸更换为丙氨酸，形成新型的 L-天冬酰胺酶突变蛋白，其免疫原性比天然酶蛋白下降 2.5 倍，且活性保持不变（图 3-19）。

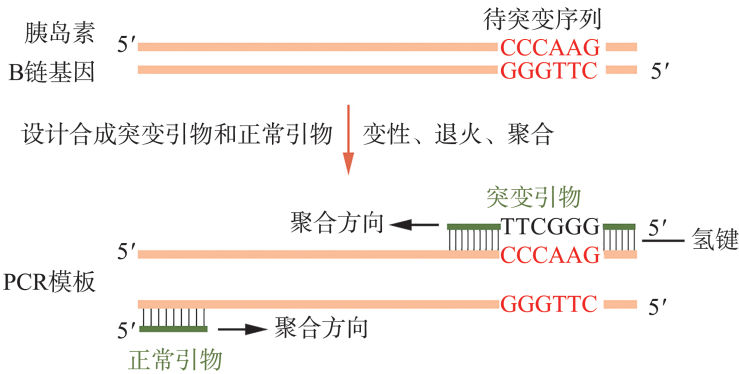
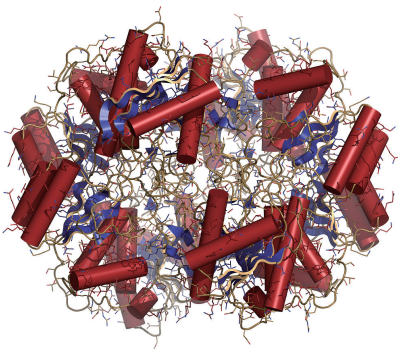


图 3-17 PCR 合成人胰岛素突变基因的引物设计



图 3-18 赖脯胰岛素药品



(A) 用于指导蛋白质工程改造的 L-天冬酰胺酶三维结构



(B) 用于治疗各种细胞性白血病、淋巴瘤、黑色素瘤的新型 L-天冬酰胺酶成药

图 3-19 采用蛋白质工程技术改造和开发新型 L-天冬酰胺酶

再如,心脑血管疾病引发的血栓(即血液中主要由蛋白质构成的固体颗粒)并发症严重威胁人类生命,全世界每年死于心脑血管疾病的人数高达1 500万人,居各种疾病死亡率首位。因此,研制高效、特异、安全的溶栓药物一直是药物开发领域的热门课题。临床上常将人组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)用作溶解血栓、抢救心肌梗死(心脏血管被血栓堵塞)患者的特效药。然而,t-PA存在体内半衰期短和诱发颅内出血等缺陷。为了提高t-PA临床应用的可行性,科研人员采用蛋白质工程的定点突变策略,开发了一系列体内半衰期长、血栓溶解效率高、颅内出血倾向大幅度降低的优质t-PA突变蛋白,如TNK型t-PA(图3-20)。



(A) 急性心肌梗死抢救现场

(B) TNK 型 t-PA 注射液

图 3-20 采用蛋白质工程技术改造和开发人组织型纤溶酶原激活剂

定向进化 进化到今天的生物体基因都是最优的吗?我们能不能在实验室里模拟并加速自然进化过程呢?基因的定向进化有助于解答这些问题。这项技术的基本操作是在体外对特定基因实施随机突变,然后借助适当的筛选程序准确、迅速地获得所需要的突变基因。比如,针对某个特定的基因采用PCR技术进行扩增,在过程中通过改变反应条件(如使用低保真度的DNA聚合酶)故意让DNA复制发生随机错误,便能创建一系列随机突变的新基因序列;然后再将这些新基因序列导入合适的受体细胞中,表达出相应的一系列随机突变蛋白;最后,根据我们的需求从中筛选出具有特定优良功能或结构的目的蛋白。

设计制造全新蛋白需要根据已经掌握的蛋白质结构与功能

学习提示

蛋白质工程的定点突变和定向进化操作充分体现了进化与适应的生命观念。

的关系，借助特殊的电脑程序自行设计、拼装感兴趣的全新基因序列，然后借助重组 DNA 技术使之表达，进而检测这种全新蛋白的性能是否能达到设计标准。



广角镜

在实验室模拟并加速蛋白质分子的自然定向进化

2018 年的诺贝尔化学奖授予了在实验室里模拟和加速蛋白质 / 酶分子自然定向进化方面作出杰出贡献的三位科学家：美国的阿诺德 (F. H. Arnold)、史密斯 (G. P. Smith) 和英国的温特 (S. G. P. Winter)。其中，阿诺德发展了随机突变和杂交基因片段以获得高效能酶分子的定向进化技术 (图 3-21)；而史密斯和温特则创建了多肽和抗体的噬菌体展示技术，用于一次性筛选大量随机突变或全新设计的蛋白质或多肽分子 (图 3-22)。

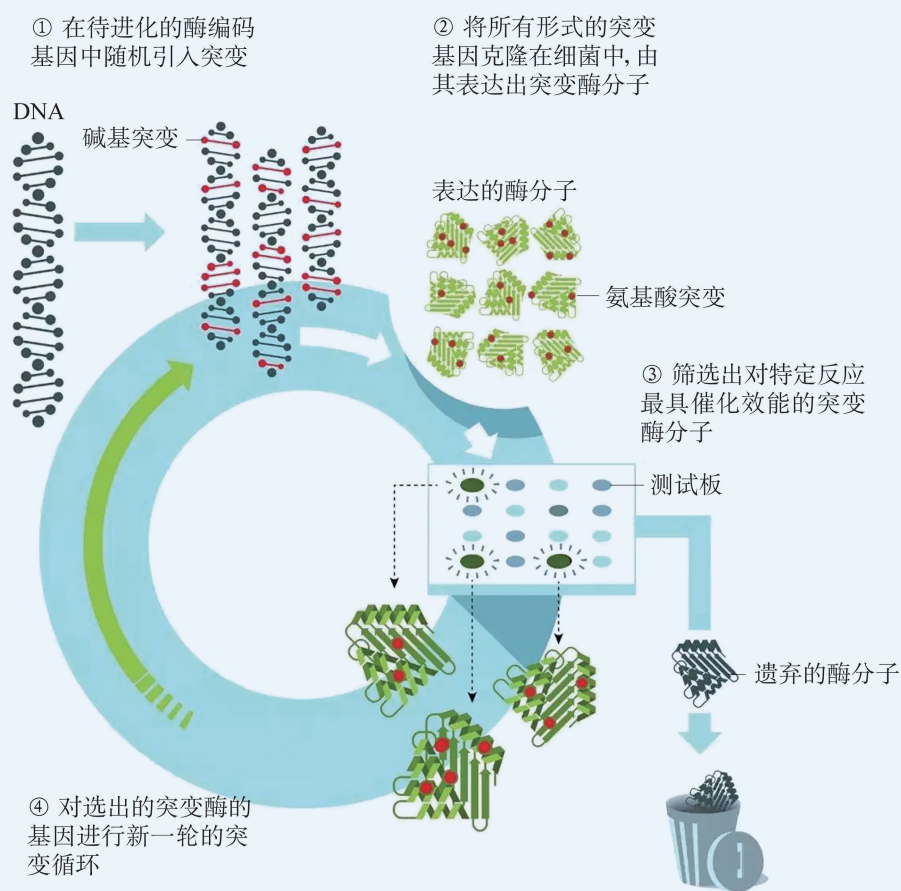


图 3-21 随机突变以获得高效能酶分子

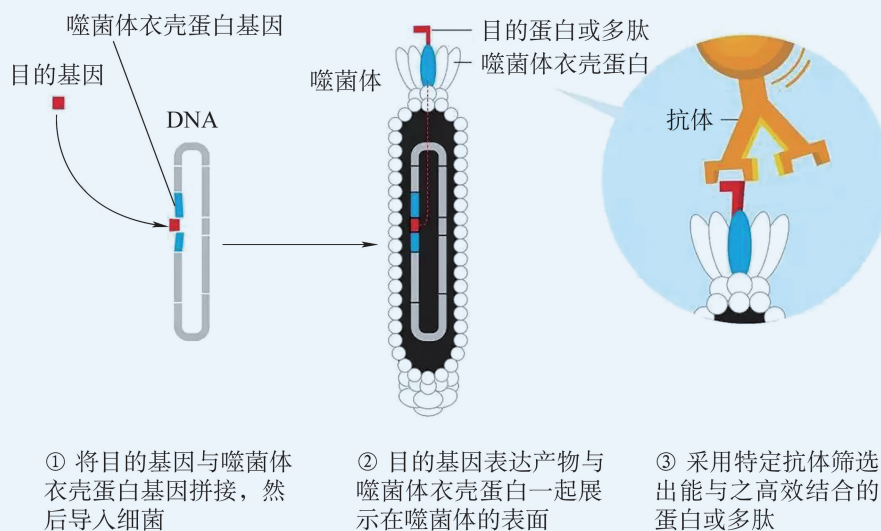


图 3-22 多肽和抗体的噬菌体展示技术



自我评价

1. 阐述蛋白质工程的设计思路，并区分定点突变与定向进化的概念差异。
2. 指出基因工程与蛋白质工程之间的密切联系。
3. 对天然蛋白质进行改造，你认为直接对蛋白质分子进行操作还是通过基因操作来实现更好？请阐述理由。



基因治疗

就单基因突变或缺陷所导致的疾病而言，向患者体内输入正常版本的基因至少在理论上有可能矫正遗传病，这便是人体基因治疗的基本策略。

1990年，美国批准了世界首例人体基因治疗的临床研究计划，对一名因腺苷脱氨酶基因（*ADA*）缺陷而患有重度联合免疫缺陷病（SCID）的儿童（终身只能生活在保护性的“气泡”中，被称为“泡泡儿”，图3-23）进行基因治疗。这一项目最终获得成功，从而开创了基因治疗的新纪元。临床医学研究人员定期从患者血液中分离免疫细胞，用携带正常 *ADA* 等位基因的病毒表达载体感染这些免疫细胞，然后将这些得以矫正的细胞回输至患者体内，即所谓的“间接体内疗法”。



图 3-23 重度联合免疫缺陷病患儿

然而，这种治疗方案在给 SCID 患者带来福音的同时，却也暴露出严重的副作用：四名接受治疗的患者后来发展为白血病，其中一名患者因治疗基因的插入激活了癌基因而死亡。基因治疗给人们带来了希望，但

很少有证据能显示其应用的安全性和有效性。尽管如此，临床和学术界仍在坚持不懈地探究更新更严格的安全治疗策略。

经过 20 多年的研究，基因治疗终于日渐成熟，不仅上千项基因治疗方案正在等待临床试验审批，而且少数几项已获准上市。2003 年，我国批准了头颈部肿瘤基因治疗药物。2012 年，欧洲药品管理局（EMA）批准用于基因治疗重度胰腺炎（脂蛋白脂酶缺乏症）的药物。同年，EMA 还批准了一项针对罕见免疫疾病的儿科基因治疗方案。2017 年，美国食品和药品管理局（FDA）终于批准了该国的首例基因治疗用剂，该用剂是一种受体蛋白经蛋白质工程设计和改造过的患者自体 T 细胞，用于治疗某些儿童和青少年的急性淋巴细胞白血病（ALL）。

生理性 T 细胞受体（TCR，图 3-24A）只有在受到抗原刺激后才能发挥免疫效应，而肿瘤表面抗原较难激活 T 细胞。用特异性识别特定肿瘤表面抗原的单链抗体（scFv）取代 TCR 的 $\alpha\beta$ 链，同时对 TCR 复合物进行结构改造，构成所谓的嵌合型抗原受体（CAR，图 3-24B）。与生理性 T 细胞受体（TCR）复合物相比，第二代嵌合型抗原受体（CAR）在结构上发生了很大改变。将

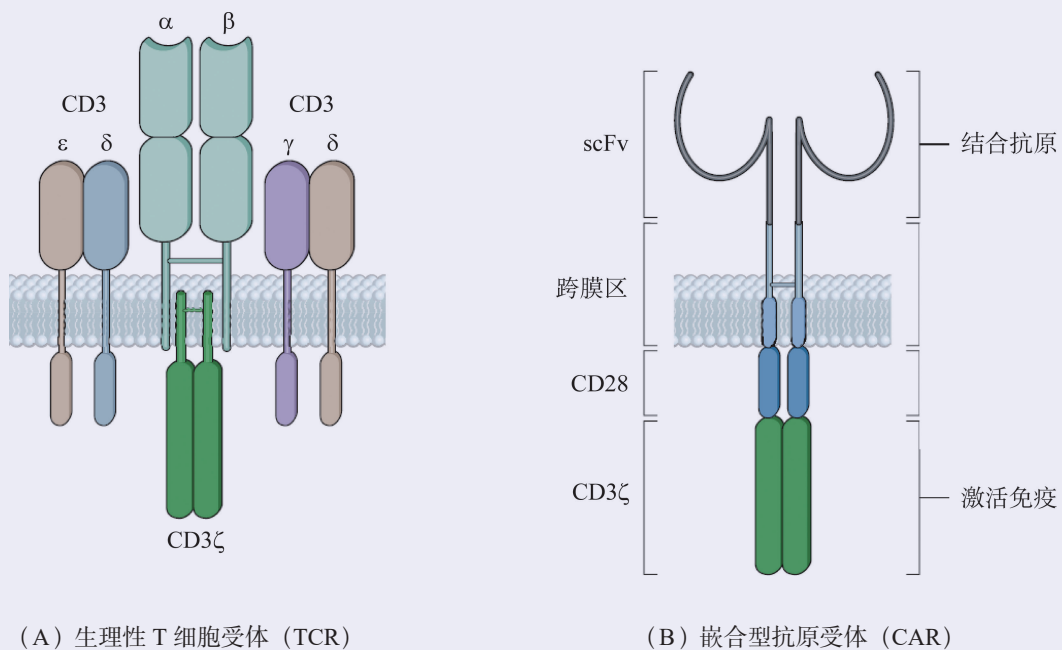


图 3-24 生理性 T 细胞受体复合物及第二代嵌合型抗原受体

这种携带工程化 CAR 的 T 细胞作为治疗用剂输回患者体内，此类疗法统称为 CAR-T 细胞疗法。在体内，这种工程化 CAR 能指导 T 细胞识别并杀死表面上带有相应抗原的肿瘤细胞。然而，科学研究没有止境，人们担心这种第二代 CAR-T 细胞输回患者体内后是否会形成新的免疫原性。

综上所述，以首例基因治疗临床试验（补充或更换 *ADA* 基因）为代表的众多策略均属于忠实于原基因编码序列的基因工程；而以 CAR-T 细胞疗法（修饰或改造受体蛋白）为代表的新型策略则属于第二代基因工程——蛋白质工程。

本章回顾



本章小结

将一种或多种生物（供体）的基因与载体在体外进行拼接重组，然后转入另一种生物（受体）体内，使之按照人们的意愿遗传并表达出新的性状，这种能高效突破物种间遗传信息交流屏障的技术称为基因工程（或重组DNA技术）。基因工程的产业化应用已深入到人类生活的方方面面。

重组DNA分子技术包含四大基本步骤：获取目的基因、构建表达载体（切、接）、导入受体细胞（转、增）、筛选和鉴定含目的基因的受体细胞（检）。就有性生殖的多细胞生物而言，针对生殖细胞、早期胚胎或具有全能性的其他细胞进行的基因操作可培育出各种转基因动植物，即动植物转基因技术。

PCR是获取目的基因最简便、快速、有效和灵敏的方法，该技术模拟细胞内DNA复制过程，通过变性、退火、聚合的多轮循环，实现特定DNA区域的体外生物合成。扎实的理论研究是工程技术新发明的基石，而运用先进的工程技术造福于人类则是科学研究的社会责任。

构建表达载体需要三种基本工具：限制性内切核酸酶、DNA连接酶、载体。载体的基本功能是为外源基因（或DNA片段）提供复制功能；限制性内切核酸酶对特定DNA序列的识别和切割作用体现了结构与功能观；而限制性内切核酸酶的发现则是一个典型的科学探究过程，其中包含了科学思维的关键要素。

采用多种物理学、化学和生物学方法可将任何物种来源的DNA导入任何类型的受体细胞，实现遗传信息无障碍的广泛交流。但是，哪些细胞接纳了外源基因以及这些基因能否在受体细胞中正常表达，还需要借助多种技术加以筛选和鉴定。

蛋白质工程是指在DNA分子上改造基因编码序列，进而借助基因工程由改造的基因表达性能优异的突变蛋白，直至设计制造自然界不存在的全新蛋白，以满足人类生产与生活的需求。基因的定点突变和定向进化是蛋白质工程的两大主要策略，它们分别体现了结构与功能观和进化与适应观。



学业评价

1. 在人类胰岛 β 细胞中，胰岛素基因最初表达的是由 110 个氨基酸残基 (aa) 构成的胰岛素原前体分子 (图 3-25)，其 N 端的 S 区在新生多肽链进入内质网腔后被切除，形成无活性的胰岛素原 (即 B-C-A)，其中 A 区与 B 区借助二硫键 (共价键) 相连。随后，胰岛素原被转运至高尔基体。当机体接到胰岛素的需求指令后，高尔基体内的肽酶再切除胰岛素原中的 C 区，形成 A 区与 B 区相连的活性胰岛素 (三个二硫键的正确搭配为胰岛素活性所必需)。

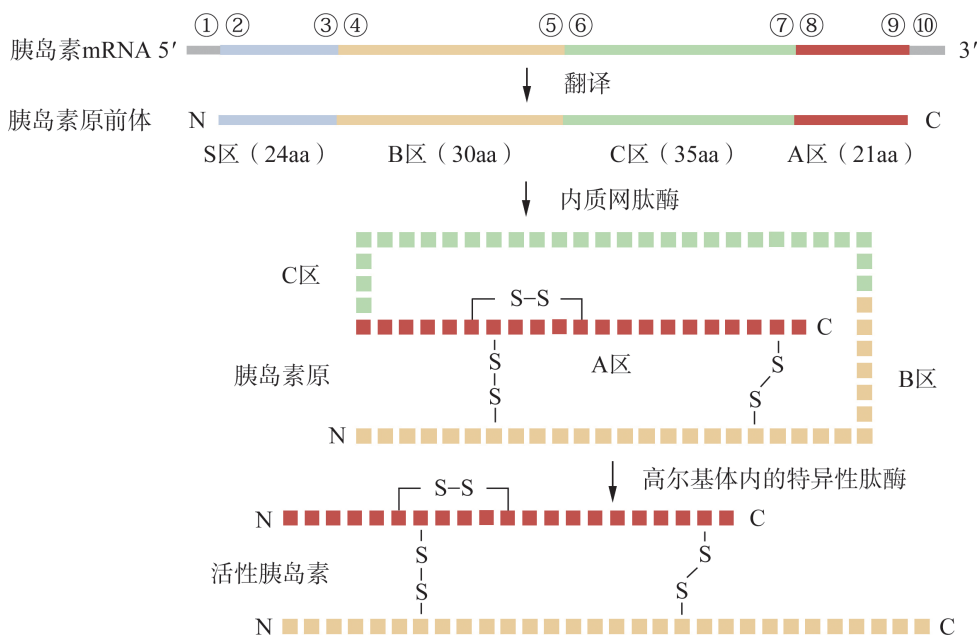


图 3-25 人胰岛素在胰岛 β 细胞中的生物合成

鉴于活性胰岛素仅含 A 区和 B 区，科研人员最初设计的人胰岛素基因工程生产技术路线是：首先化学合成 A 区和 B 区编码序列，然后分别与相同的质粒连接，构建成表达载体 pIA1 和 pIB1。将这两种重组 DNA 分子分别导入大肠杆菌，便能分别表达人胰岛素的 A 区和 B 区。经分离纯化后，将 A 区与 B 区混合，使其自然形成三个二硫键。由此技术路线 (即 AB 表达法) 生产的重组人胰岛素成本高昂。

为了降低生产成本，科研人员重新审视了 C 区的作用，他们认为在胰岛 β 细胞内 C 区很可能起到正确组装 A 区和 B 区的“脚手架”作用。为了验证这一假说，他们以胰岛 β 细胞的 mRNA 为原料，采用 PCR 技术获取胰岛素原编码序列，然后依照上述工艺制备 B-C-A，最后再用特殊的酶模拟

细胞内的过程将 C 区切除（图 3-26）。结果表明，由此技术路线（即 BCA 表达法）生产的人胰岛素基因工程产品成本大幅度降低。

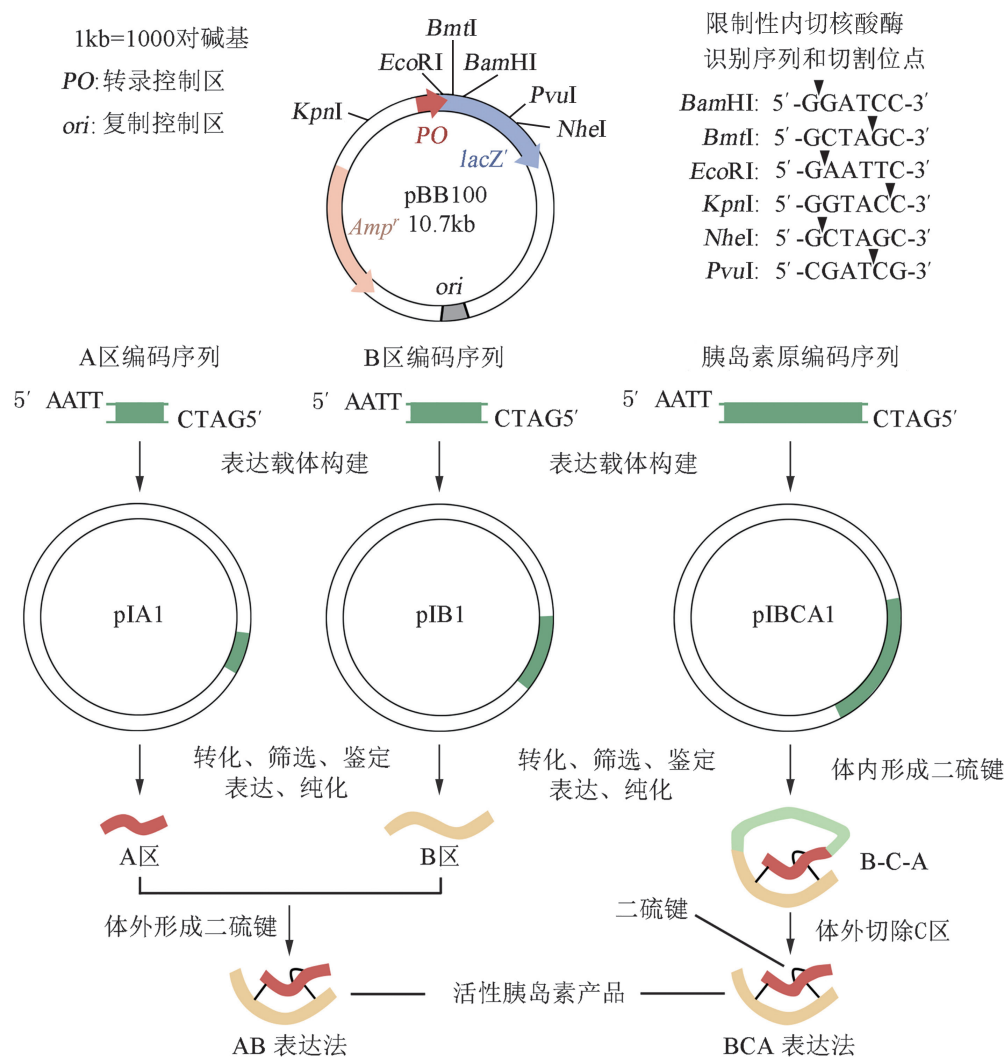


图 3-26 采用基因工程技术在大肠杆菌中生产人胰岛素

- (1) 制药公司为什么要用基因工程技术取代动物胰脏分离纯化工艺生产治疗用胰岛素？
- (2) 使用“观察、提问、设计、实施、讨论”等词汇复述基因工程生产人胰岛素的科学探究过程。
- (3) 根据中心法则判断，胰岛素原目的基因的获取在实施 PCR 之前需要进行什么操作？
- (4) 基于 PCR 获取人胰岛素原目的基因时，应设计并合成的两条引物是图 3-25 胰岛素 mRNA 处的（ ）。

A. ①和⑩ B. ②和⑨ C. ③和⑧ D. ④和⑨

- (5) 据图 3-26 分析, 用什么限制性内切核酸酶切开质粒 pBB100, 才能确保与 A 区、B 区、B-C-A 编码序列分别连接?
- (6) 当单个 A 区编码序列与正确切开的质粒 pBB100 连接后, 表达载体会有哪些类型的分子 (或序列)? 为什么?
- (7) 若质粒 pBB100 上 *Eco*RI 位点与 *Bam*HI 位点之间距离可忽略不计, 用 *Bmt*I 和 *Kpn*I 联合酶切表达载体 pIBCA1, 凝胶电泳后可观察到的 DNA 条带数目为 ()。
- A. 1 B. 2 C. 3 D. 4
- (8) 在 B 区编码序列、正确切开的质粒 pBB100 与 DNA 连接酶混合并连接后, 转化大肠杆菌。为了筛选到接纳了表达载体 pIB1 的菌落 (克隆), 需要在培养基中添加什么试剂? 含表达载体的菌落 (克隆) 呈什么颜色?
- (9) 为什么采取 BCA 表达法生成胰岛素的成本大大低于 AB 表达法? 据此推断利用基因工程生产蛋白质产品应遵循什么原则?

2. 1980 年, 科学家在第七届国际血栓与止血会议上首次提出了采用组织型纤溶酶原激活剂 (t-PA) 治疗血栓疾病 (如急性心肌梗死) 的尝试。然而, 抢救急性心肌梗死患者需要注射大剂量的人 t-PA 基因工程产品, 此时往往会损害机体正常的凝血系统, 诱发颅内出血等严重副作用。这种副作用可归结为 t-PA 促进血栓溶解的特异性不高。为了提升 t-PA 作为临床急救药物的可行性, 研究人员采用蛋白质工程的定点突变策略开发了一系列颅内出血倾向大幅度降低的优质 t-PA 突变蛋白。

人 t-PA 由 527 个氨基酸残基构成 (图 3-27)。基础研究显示, 第 84 位的半胱氨酸至少对 t-PA 结合并促进血栓溶解的特异性具有重要影响。研究人员在 DNA 水平上将该处的半胱氨酸编码序列定点突变为丝氨酸编码序列, 发现所形成的突变蛋白不但溶解血栓的特异性和有效性明显提升, 而且在体内存留的时间也大幅度延长。

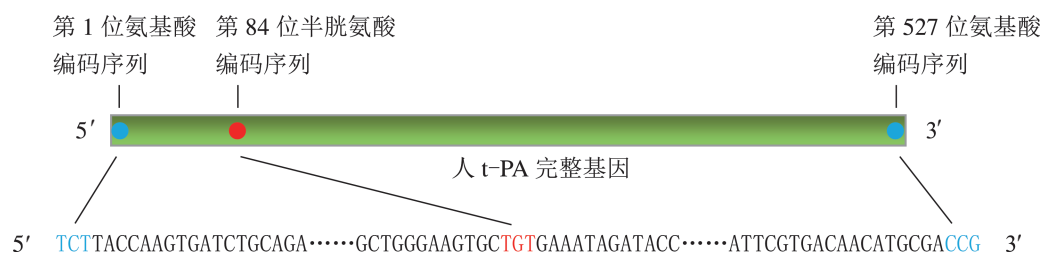


图 3-27 人 t-PA 基因的部分编码序列

- (1) 通过一处氨基酸的置换便能有效改变 t-PA 的性能, 结合这一结果谈谈你对生物大分子结构与功能相统一的认识。
- (2) 在人 t-PA 目的基因已经获得的条件下, 如果采用基于 PCR 的定点突变策略合成相应的突变基因 (即将第 84 位的半胱氨酸编码序列替换成丝氨酸的编码序列), 那么两条突变引物的序列应如何设计 (提示: 引物序列限定 20 个碱基)?
- (3) 根据 PCR 的工作原理思考: 要想获得完整的 t-PA 突变基因, 仅凭上述设计的两条突变引物能奏效吗? 为什么? 图 3-17 显示的只是突变引物的设计思路, 试用图解的方式表述利用 PCR 技术合成完整突变基因的大致过程。
- (4) 突变基因最终需要与特定的质粒重组才能构建表达载体。为了与质粒高效连接, t-PA 突变基因的两端应携带相应的限制性内切核酸酶识别序列, 正确的做法是 ()。
- A. 将限制性内切核酸酶识别序列设计在两条引物的 3' 端
 - B. 将限制性内切核酸酶识别序列设计在两条引物的 5' 端
 - C. 将限制性内切核酸酶识别序列设计在两条引物的中部
 - D. 将限制性内切核酸酶识别序列设计在一条引物的 3' 端和另一条引物的 5' 端
- (5) 提高 t-PA 促进血栓溶解特异性的关键, 是要探究 t-PA 蛋白中哪种或哪些氨基酸对血栓成分 (即纤维蛋白) 的亲合力负责。一般而言, 与血纤维蛋白结合越牢固, t-PA 的特异性就越强。试参照 2018 年诺贝尔化学奖得主史密斯和温特发明的技术 (图 3-22), 设计能筛选与血纤维蛋白结合最强的 t-PA 突变蛋白的技术路线。

第4章 生物技术安全与伦理

生物技术的飞速发展在给人类带来巨大社会和经济效益的同时，也不可避免地引发人们对新兴生物技术安全性的担忧。生物安全是指采取一系列有效预防和控制措施，杜绝生物技术应用对生态环境和人体健康带来潜在威胁。

有些生物技术还对人们的传统观念造成极大的冲击，在持有不同价值观的人群中引发激烈争论，形成生物伦理问题。生物伦理是指以人类生命为核心、同时兼顾其他物种的道德关系基本准则。生物伦理学有四个原则：首先是尊重原则，尊重个人在非外力胁迫下自主行使知情同意权；其次是不伤害原则和有利原则，即每个人不应受到伤害，若伤害不可避免时，受到的伤害应最小化且利益最大化；最后是公正原则，每个人不因金钱、地位、智力、年龄、信仰等差异而受到不同对待。





第 1 节

转基因产品的安全性引发社会广泛关注



学习目标

- 通过查阅文献资料，基于事实和生物学原理，探讨转基因技术在应用过程中的正负面影响。
- 通过调查转基因产品的标识及知情度，关注转基因技术在社会生活中的应用现状及其安全性。

概念聚焦

- 转基因产品已普遍存在于日常生活中。
- 转基因技术在应用过程中与人体健康、环境安全、生物伦理、国家安全等方面有着密切联系。

大米、玉米、瓜果蔬菜、植物油是我们每天都会食用的常见农产品。如果告诉你它们是转基因产品，你会怎么想？是惊叹于转基因技术创造了奇迹，还是担心转基因食品会对健康造成危害？或是兼而有之？



食用油调查与分析

对超市里的食用油产品进行调查，观察包装上的标识，按照其是否为转基因食品进行分类，并填写下表。将你的调查结果与同学们交流分享。

表 4-1 食用油调查

品牌名称	是否有转基因标识	在超市中的占有率估值	备注

思考与讨论：

1. 汇总班级同学的调查结果，统计所调查区域中转基因食用油和非转基因食用油的出现比例。
2. 为什么要对转基因或者非转基因食品进行标识？你在购买食品时会关注该产品是否是转基因产品吗？为什么？

1. 转基因产品已经进入日常生活

自古以来，人类的餐桌上就有通过各种传统育种方式改造的食材。今天，重组 DNA 技术正迅速取代传统的育种方式，使得科学家能按照人类需求去改造生物。

转基因生物即基因修饰型生物体 (genetically modified organism, GMO)，是指利用现代分子生物技术，将一种或几种外源基因转移到某种特定的生物体中，改造生物的遗传物质，使其营养与消费品质等方面更加符合人们的需要。作为转基因产品的主要类别——转基因食品，又称基因修饰型食品 (genetically modified food, GMF)，是指从转基因生物获得的食物，目前主要为植物和植物制品 (图 4-1)。

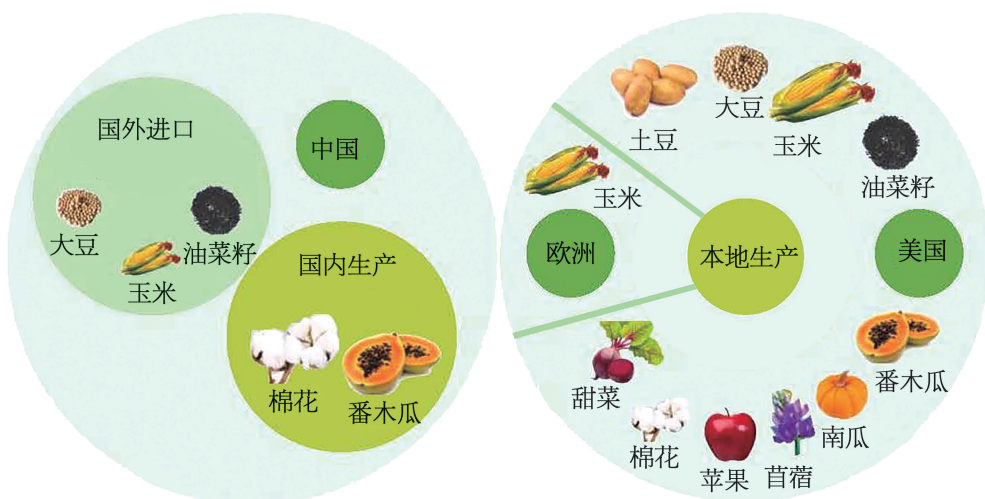


图 4-1 我国常见的转基因作物及美国和欧洲生产的主要转基因作物

1983 年，世界上最早的转基因作物——抗除草剂转基因烟草诞生于美国。1994 年，第一个转基因食品——延熟保鲜番茄在美国获批上市。从此以后，转基因作物的研究发展迅速。大豆、棉花、玉米和油菜是世界上种植面积最大的四种转基因作物，转基因抗病毒番木瓜等水果也已大范围推广种植并食用。还有许多转基因蔬菜，如茄子、马铃薯、花菜、南瓜等，已进入实验田阶段。除了植物外，2015 年，美国批准了转帝王鲑生长激素基因的三文鱼上市。

转基因微生物在实际生产应用中也取得了明显的成效，如化工行业的丙酮和丁醇，食品行业的柠檬酸和味精，医药行业的氨基酸和抗生素等，大都通过转基因微生物规模化生产。转

基因疫苗和转基因药物是重组 DNA 技术应用最为成功的两大类产品。转基因疫苗和药物成本低、效率高且安全可靠。若没有转基因技术,很多疾病将缺少防治药物,医药费用也会变得昂贵。

不知不觉,转基因产品已随处可见,往往我们可能还未意识到,却已经在接触和使用转基因产品,享受着转基因产品带来的好处(图 4-2)。



图 4-2 转基因产品的应用

2. 转基因技术的应用带来正负两面的影响

转基因作物具有众多优势:延熟作物可提高农产品耐贮性,转基因大豆可提高榨油的出油率,抗虫作物可减少杀虫剂的使用,抗除草剂作物可在喷洒了除草剂的农田中生长,抗逆境作物可降低农作物对种植环境的要求等。抗虫、抗逆境、抗感染等改造都可增加作物产量,减少杀虫剂、化肥等的使用量,降低生产成本,同时又保护土壤,对缓解资源限制、保护生态环境起到重要作用。随着人口、能源和环境之间矛盾的日益突出,培育高产、优质且多抗的转基因作物被认为是解决这些矛盾的最具有潜力的途径之一。正因为如此,全球转基因作物的种植面积从1996年到2019年间,由 $1.7 \times 10^4 \text{ km}^2$ 增至近 $1.9 \times 10^6 \text{ km}^2$ 。目前,转基因作物种植大国是美国、巴西、阿根廷、加拿大、

印度等。2019年,中国转基因作物种植面积为 $3.2 \times 10^4 \text{ km}^2$, 占全球转基因作物种植面积的 1.7%, 居世界第 7 位。

在转基因作物带来巨大经济效益和生态效益的同时,其食品安全和环境安全的潜在风险也越来越受到广泛关注,成为媒体报道、社交网络的热门话题(图 4-3)。那么,转基因食品是否会对人体健康造成伤害?有人认为机体可能会吸收转基因食品中的外源基因(或外源基因表达的蛋白质产物),真会这样吗?

学习提示

主动关注转基因食品的相关报道,做出理性解释和判断,承担相应的社会责任。



图 4-3 关于转基因产品的媒体报道

从生物学原理角度看,转基因食品的外源基因及其表达的蛋白质产物同普通食品中所含有的基因及蛋白质一样,都会被人体消化为小分子物质,因此并不会因食用转基因食品而改变人的遗传特性。但是,鉴于我们人类对生命科学的认识仍然十分有限,社会公众及业内人士对转基因食品的安全性仍存在不同见解。因此,目前转基因作物的构建倾向于采取相同或相似植物物种的天然基因与调控元件相组合,以提高转基因作物的安全性。

除了食品安全外,种植转基因作物是否会对环境造成破坏?尽管转基因作物的种植都是在可控制的范围内进行,但人们仍担心转基因作物可能会成为自然界的“外来品种”,对生物多样性构成威胁。此外,一些抗除草剂转基因作物的种植反而增加了除草剂的消耗,对环境造成更大污染。

转基因技术还涉及一些伦理方面的问题。例如,素食主义者也许不愿意食用和接受含有动物基因的产品;将人类基因转入食用动物或动物饲料中,以及将转基因动物器官移植给人体,

也存在伦理学上的异议。

再如，部分公司有意在转基因植物种子中设计了阻止传代的基因序列，使种子不能传代，转基因植物不能留种。这种从保护专利角度的做法已被禁止，因为如果是大面积推广种植的主粮，很可能在某时刻产生无粮可种的被动局面，使国家粮食安全与人民生存受到威胁。

转基因产品与人体健康、环境安全、生物伦理甚至国家安全均密切相关，科学家们一直在对转基因产品的安全性问题进行全方位的系统研究，各个国家对转基因技术都制定了符合本国利益的政策和法规。1993年，我国制定了《基因工程安全管理办法》。1996年，我国农业部颁布了《农业生物基因工程安全管理实施办法》，并据此成立管理转基因作物的农业生物基因工程安全委员会和农业生物基因工程安全管理办公室。2002年，农业部颁布了《农业转基因生物标识管理办法》，加强对农业转基因生物的标识管理（图4-4），规范农业转基因生物的销售行为，引导农业转基因生物的生产和消费，保护消费者的知情权。这些法规的制定都是为了最大限度地保证转基因技术和产品的安全性，符合“知情同意”的伦理学原则，让消费者自行决定是否食用转基因食品。我国提出加强转基因技术及其安全性的研究，慎重对待转基因主粮的种植，也符合不伤害和有利原则。再有，根据公平原则，在不同人群的转基因食品供应上不应区别对待。



图4-4 各种转基因相关通用标识



广角镜

《农业转基因生物标识管理办法》

《农业转基因生物标识管理办法》于2001年7月11日经农业部第五次常务会议通过，自2002年3月20日起施行，于2017年11月修订。

根据《农业转基因生物标识管理办法》的规定，凡在中国境内销售列入农业转基因生物标识目录的农业转基因生物，应当进行标识；未标识和不按规定标识的，不得进口或销售。标识的标注方法为直接标注为“转基因××”。转基因农产品的直接加工品，标注为“转基因××加工品（制成品）”或者“加工原料为转基因××”。

若用农业转基因生物或用含有农业转基因生物成分的产品加工制成的产品，但最终销售产品中已不再含有或检测不出转基因成分的产品，标注为“本产品为转基因××加工制成，但本产品中已不再含有转基因成分”或者标注为“本产品加工原料中有转基因××，但本产品中已不再含有转基因成分”。

必须进行标识的首批农业转基因生物产品共有 5 类 17 种（图 4-5）。

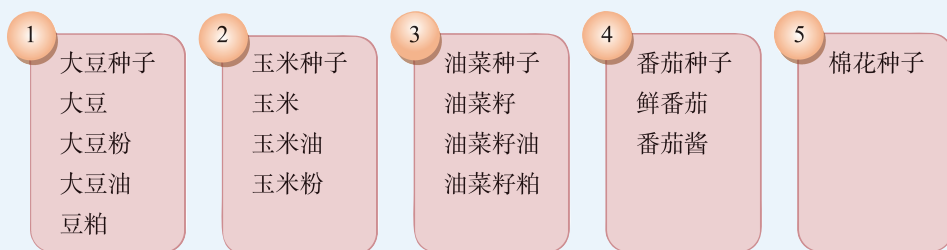


图 4-5 首批进行标识的农业转基因生物产品



探究·活动

4-1 辩论：转基因食品是否安全？

▶ 活动目标：

运用批判性思维，辩证地看待转基因食品的安全性。

▶ 活动内容：

1. 收集不同国家和地区的转基因生物研发和安全评估、法规、政策、科研单位实验数据，以及转基因食品的销售情况等资料，开展辩论。

2. 也可进行角色扮演，通过扮演政府官员、科学家、转基因食品供应商、消费者以及新闻媒体等角色，从各自角度出发，表达其立场。

▶ 活动评价：

1. 在活动中，你运用了批判性思维中的哪些技能，是否达到了目标？

2. 本次活动后，你觉得应该如何向家人或公众介绍转基因食品？

学习提示

批判性思维的重要技能包括：基于数据而不是观点建立令人信服的论证；精准地运用证据为论证辩护；清楚地表达论证及其语境；有序呈现增强说服力的证据；避免言过其实的结论；洞察他人论证的陷阱和漏洞；识别论证的逻辑错误等。



自我评价

1. 举例说出日常生活中的转基因产品。
2. 归纳和概括转基因技术对人类健康和生态环境的影响。
3. 试从食品安全和环境安全两个角度来评价转苏云金芽孢杆菌抗虫基因大豆、转冷水鱼抗冻基因番茄、转矮牵牛草甘膦抗除草剂基因大豆这三种转基因植物的安全性。
4. 害虫损伤番茄叶片后，番茄叶片会释放出一种类激素因子并扩散到茎和其他叶片上，该物质能启动蛋白酶抑制剂基因。蛋白酶抑制剂能抑制害虫的消化酶，使得害虫因无法消化食物而致死。人们尝试将番茄的蛋白酶抑制剂基因导入玉米，让玉米获得与番茄相似的抗虫性状，以防治玉米螟。你会食用这种转基因玉米吗？为什么？

第2节 生殖性克隆人带来诸多伦理问题

你看过有关克隆人的小说或电影吗？你能想象走在大街上遇见一个和你一模一样的人，这个人不是你的双胞胎，但却拥有与你完全相同的基因吗？如今，伴随着克隆技术的日趋成熟，克隆猴“中中”和“华华”已培育成功，克隆人的出现还会远吗？如果这一切成为现实，你是否接受克隆人？



克隆人

搜索有关克隆人的科幻小说、电影等资料，填写下表，并与同学们交流分享。

表 4-2 克隆人资料收集

作品名称	关于克隆人的主要描述	可能存在的伦理问题

思考与讨论：

- 1. 什么是克隆人？
- 2. 你怎样看待克隆人？

1. 生殖性克隆人面临诸多伦理问题

我们已经学习过有关克隆技术的概念，通常所说的“克隆人”，可以区分为人体的生殖性克隆与治疗性克隆两类。目前，生殖性克隆人无论是在技术、还是伦理层面都面临着许多问题。



学习目标

- 通过搜集资料，举例说出生殖性克隆人面临的伦理问题。遵循正确的伦理道德，能对生殖性克隆人的社会热点议题进行科学判断。
- 认同我国对生殖性克隆人实验不赞成、不允许、不支持、不接受的态度，形成敬畏生命的观念。

概念聚焦

- 生殖性克隆人面临社会、伦理、道德、人权和人口压力等方面的问题。
- 我国不赞成、不允许、不支持、不接受任何生殖性克隆人实验。

首先,从技术上来说,“克隆人”尚不完善。克隆是采用人工手段对体细胞核及DNA进行操作,该过程可能出现基因变异。目前实验表明,动物克隆成功率只有2%,而且大部分克隆出的动物带有先天性的缺陷和疾病,甚至夭折。如果克隆出来的不是正常个体,那么实施克隆试验的人将负有什么样的道德和法律责任呢?

其次,克隆人将带来社会、伦理、道德、人口压力等多方面的问题。大量基因结构完全相同的克隆人会打破遗传多样性,可能会引起人类社会发展的倒退、性别比例失调,并有可能诱发新型疾病的广泛传播。人类繁殖后代的过程若不再需要两性共同参与,这将会对现有的社会关系、家庭结构造成难以估量的巨大冲击。克隆人的身份难以认定,还将导致人伦关系混乱。克隆人也可能因自己的特殊身份而产生心理缺陷,形成新的社会问题。甚至有些人认为克隆人的目的是提供器官移植的供体,或使其代替人从事一些较危险的工作乃至星际旅行等——这都将使人类面临“克隆人是不是人”“克隆人能否作为工具、研究对象或医疗用品”等伦理难题。

2. 中国禁止生殖性克隆人实验

目前,大多数国家对生殖性克隆人的态度是不支持的,并以法律形式加以严格限定。“多莉”羊的诞生地——英国最早制定了相关规定。2001年6月,英国立法禁止生殖性克隆人。2002年2月,联合国举行的关于拟定《反对生殖性克隆人国际公约》会议上,我国代表表明了立场:反对克隆人,不赞成、不允许、不支持、不接受任何克隆人实验,但主张对治疗性克隆和生殖性克隆加以区别。2003年,我国卫生部公布的《人类辅助生殖技术规范》对实施辅助生殖技术人员的行为准则作了规定,其中第15项规定:“禁止克隆人”。科技部、卫生部公布的《人胚胎干细胞研究伦理指导原则》第4条规定:“禁止进行生殖性克隆人的任何研究。”

学习提示

科学研究和技术发展均应承担特定的社会责任。

对于治疗性克隆,中国政府持不反对态度。早期的治疗性克隆采用的是胚胎干细胞,这必然要毁坏人类胚胎。因此,该技术从一开始就存在伦理争议。现今,由日本科学家发明的诱导性多能干细胞技术已成功培养出肝、肾、胃、皮肤等器官或组织,避免了采用胚胎干细胞对胚胎的毁损。但该项技术也还

存在肿瘤发生率升高等弊病。如果上述问题能得以解决，必将使治疗性克隆得到更好的发展。



探究·活动

4-2 讨论：你是否支持设计试管婴儿？

自1978年首名试管婴儿诞生以来，全球估计共有超过800万名试管婴儿来到人世。试管婴儿技术是一种体外受精—胚胎移植技术。目前，已从第一代的经典法、第二代单精子显微注射法，发展到第三代植入前胚胎遗传学诊断筛查法。第三代技术可对体外受精发育的胚胎逐个进行基因分析，并筛选出一个没有遗传缺陷的胚胎移植到母亲体内。试管婴儿技术的应用，使得生育与性行为分离，传统家庭模式面临解体，部分人甚至把这一技术当做延迟生育的“保险”。此外，多余胚胎如何处理、试管婴儿的代孕问题等也引起巨大伦理争论。为规范试管婴儿技术的应用，我国颁布的《人类辅助生殖技术管理办法》等配套管理文件中，对试管婴儿技术及其实施机构、实施技术的规范管理也加以明确。

► 活动目标：

了解设计试管婴儿的技术；客观评价设计试管婴儿技术及其应用。

► 活动内容：

1. 阅读以下案例并搜集关于设计试管婴儿的资料。

案例1：2008年，英国医生为一名27岁携带乳腺癌基因的不孕妇女进行胚胎筛选，在15个胚胎中找到2个不含有致癌基因的健康胚胎，再将之植入母体子宫。

案例2：2012年6月29日，中国首例设计试管婴儿诞生。婴儿的父母均为地中海贫血基因的携带者，已育有一个重度地中海贫血症的女儿。为了拥有一个健康的孩子，婴儿的母亲通过试管婴儿技术受孕，并在胚胎植入体内之前进行遗传学诊断，挑选出一个不携带地中海贫血基因的胚胎。

案例3：2016年，“三亲婴儿”哈桑在英国诞生。由于哈桑母亲的线粒体DNA上携带致病基因，因此，医生取母亲的

卵细胞核和父亲的精子，以及另一位女性捐赠者的去核卵细胞，孕育出“三亲”的哈桑（图4-6）。

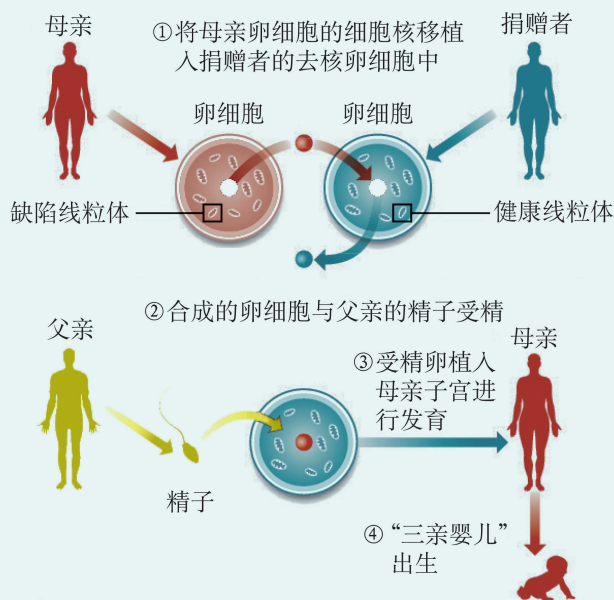


图4-6 “三亲婴儿”的诞生过程示意图

2. 小组讨论，基于资料表达自己的观点，并阐述理由。

▶ 活动评价：

1. 在讨论中，你是否展示了你的真实想法？是否有理有据地阐述了你的想法？
2. 你是否支持通过基因修饰技术设计试管婴儿？为什么？



自我评价

1. 简述生殖性克隆和治疗性克隆的主要区别。
2. “技术上的可行不等于伦理上的可为”，你如何看待这句话？
3. 有人设想通过克隆人来代替人类从事某些危险性工作，比如星际探险等，请谈谈你的看法。
4. 某对夫妇的第一个孩子出生9个月后，因脊髓性肌萎缩症夭折。脊髓性肌萎缩症是一种常染色体隐性遗传病，经遗传咨询后发现，该对夫妇都携带致病基因，但表型正常。为了生育一个健康的孩子，该对夫妇使用了胚胎植入前遗传学诊断技术，生育了3个健康的孩子。请思考这个技术操作过程中可能涉及的伦理问题。

第3节 全面禁止生物武器

提起大规模杀伤性武器，你可能会最先想到核武器或化学武器。然而，在战争中更让人恐怖的是生物武器。生物武器不同于其他武器，会随着时间的推移而产生更大的危险性。你知道什么是生物武器吗？它会造成哪些可怕的后果呢？历史上，人类受到生物武器的严重威胁与伤害有哪些？



生物武器的严重危害

借助书籍、网络等渠道查阅有关资料或走访相关人士，了解历史上曾经使用过生物武器的战争，并就其中一种生物武器详尽了解其造成的危害。将调查结果制作成海报等形式，与同学们交流分享调查结果。

思考与讨论：

1. 什么是生物武器？
2. 与其他武器相比，生物武器有何特点？会带来哪些可怕的后果？
3. 当今各国对生物武器及其技术和设备的扩散持怎样的立场？

1. 生物武器对人类造成严重的威胁和危害

生物战是用微生物或生物毒素（包括自然的、改造过的或基因工程制备的）开展对敌方的人、畜、植物和生态环境进行攻击的战争。由用于生物战的微生物制剂（包括细菌、病毒、生物毒素、真菌等）和各种施放装置构成的用来杀伤人员、牲畜和毁坏农作物的特种武器，均属于**生物武器**。

学习目标

- 通过搜集历史上使用生物武器的资料，运用生物学原理，分析并阐述生物武器带来的严重危害。
- 关注生物武器及其危害，认同中国反对生物武器及其技术和设备的扩散，主动宣传关爱生命的观念和知识。

概念聚焦

- 生物武器对人类造成严重的威胁与伤害。
- 我国反对生物武器及其技术和设备的扩散。

已知可以作为生物武器的致命微生物约有 160 种，它们一旦进入机体便能大量繁殖，破坏机体功能，导致机体发病甚至死亡。目前，公认的对人类危害最大、最易散播的被用于制造生物武器的细菌和病毒是炭疽杆菌、肉毒杆菌、鼠疫杆菌和天花病毒（图 4-7）。埃博拉、SARS、拉沙热等病毒也可能被用作生物武器。

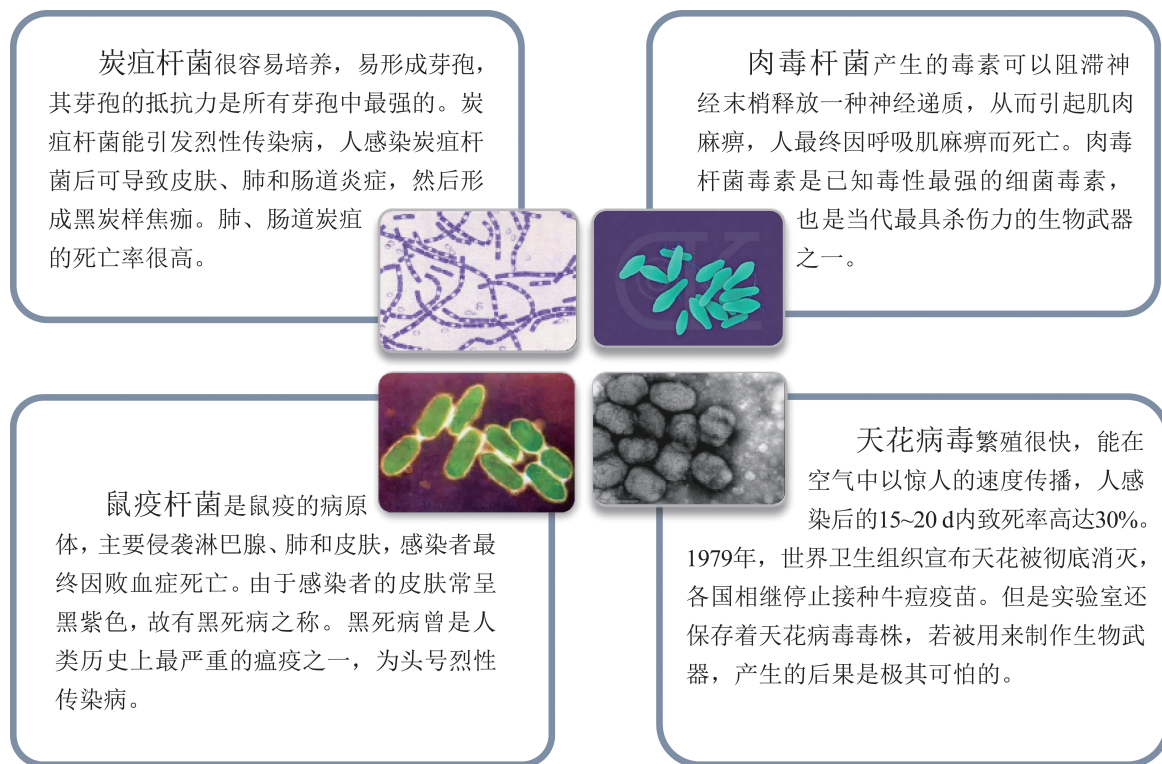


图 4-7 对人类危害最大、最易传播的被用于生物武器的 4 种细菌和病毒

人类历史上第一次有明确记载的生物战发生于 1346 年，蒙古军队围攻卡法城（位于现克里米亚地区），将患鼠疫死亡的动物尸体投入敌方的水源中，以此来传染并击溃城内的守军。17 世纪，西方殖民者故意将己方天花病患者使用过的毛毯及衣物等散发或留弃给没有抵抗力的北美印第安人。在天花的肆虐下，几个原先有数百万人口的主要印第安部落衰减到只剩数千人或完全灭绝。第一次世界大战时期，德军曾使用炭疽、马鼻疽等对敌方的军民和战马进行攻击。在第二次世界大战中，侵华日军建立了从事细菌战的 731 部队，培养鼠疫、霍乱等传染性病菌，在战俘甚至平民身上试验，并在多地投放，造成我国军民众多的伤亡。

2001年“9·11”恐怖袭击后数日，恐怖分子又通过邮寄含干燥炭疽杆菌芽孢粉末的信件发动了生物恐怖袭击，共造成多人感染炭疽（图4-8）。

随着分子生物学领域的不断开拓，人们不禁担心重组DNA技术也可能被用于制造毁灭性武器，即基因武器。基因武器不易被发现且难以防护，可能造成巨大伤亡。

生物恐怖和生物战使用的都是生物武器，只是使用的场合不同和目的有所差异，在战场上使用就称为生物战，被用于恐怖活动就称为生物恐怖。

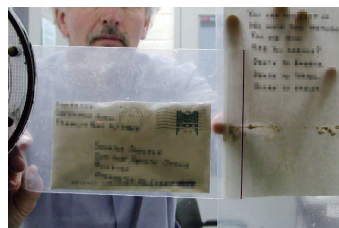


图4-8 含有炭疽杆菌芽孢粉末的恐吓信件



广角镜

生物武器的防护措施

1. 对生物战剂气溶胶的防护（图4-9）

（1）呼吸道防护：戴上防护口罩或防毒面具。用毛巾、简易口罩、手帕、衣物等捂住口鼻，也能起到一定的防护作用。

（2）眼睛防护：戴上防毒、防风眼镜或蒙上透明塑料布。

（3）皮肤防护：穿防毒衣或防疫服，扎紧袖口、领口、裤脚口，戴手套，穿靴套。

2. 对带菌昆虫的防护

（1）门窗或出入口安装纱窗、纱门，挂上用防虫药物浸泡过的门帘。

（2）利用各种材料包扎暴露的皮肤，及时除去接触衣物的小虫或动物。

（3）抹驱避剂（如防蚊油等），防止带有生物战剂的昆虫叮咬。

3. 预防接种

对在污染区或要进入污染区的人员，在判明施放生物战剂种类前提下，采取有针对性的疫苗接种和口服抗菌、抗病毒药物等方法。

4. 消毒处理

对生物战剂污染的房屋、器具用福尔马林或过氧乙酸进行熏蒸，或进行通风；对污染的服装用煮沸或用1%高锰酸钾溶液浸泡消毒。

5. 杀虫和灭鼠

昆虫、鼠类等是生物战剂传播的主要媒介物，采取消毒、杀虫、灭鼠等措施可消灭生物战剂的媒介物，以预防传染病的产生和蔓延。



图4-9 对生物战剂气溶胶的防护

2. 中国全面反对使用生物武器

生物武器由于致病性强，多数具有传染性，用量少且普遍易感；传播的手段简便多样，发病有潜伏期，导致不能及时发现并进行有效的预防和治疗；制备较容易、花费小等特点，是极具威胁的大规模杀伤性武器。因此，制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。

1972 年 4 月 10 日，苏联、美国和英国分别签署了《禁止试制、生产和储存并销毁细菌（生物）和毒剂武器公约》（简称《禁止生物武器公约》），于 1975 年 3 月 26 日生效。1984 年 11 月 15 日，我国也加入了这一公约。截至 2017 年 2 月，该公约共有 178 个缔约国（图 4-10）。《禁止生物武器公约》主要内容是：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；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国家违反该公约的行为。该公约对于禁止和销毁生物武器、防止生物武器扩散发挥了不可替代的重要作用。



图 4-10 《禁止生物武器公约》缔约国会议



(A) 放射性



(B) 生物危害



(C) 有毒

图 4-11 安全标识

如今，生物恐怖正日益威胁着国际和平和人类安全。生物技术的发展增加了生物恐怖的威胁性，必须警惕有可能发生的生物恐怖活动。在举办奥运会、博览会等重大活动和集会时，以及在地铁、车站、机场等人员密集场合更应做好防范生物恐怖的工作（图 4-11）。中国将一如既往与各方加强磋商与合作，共同为实现《禁止生物武器公约》的崇高目标，使人类彻底摆脱生物武器的威胁而不懈努力。



广角镜

生物安全

生物安全是国家安全的重要组成部分。为了维护国家安全,防范和应对生物安全风险,保障人民生命健康,我国自2021年4月15日起施行《中华人民共和国生物安全法》,对国门生物安全查验和现代口岸核生化有害因子防控有明确要求:

国家建立首次出境或者暂停后恢复进境的动植物、动植物产品、高风险生物因子国家准入制度。

国家采取一切必要措施防范生物恐怖与生物武器威胁。

国务院有关部门和有关军事机关根据职责分工,加强对可被用于生物恐怖活动、制造生物武器的生物体、生物毒素、设备或者技术进出境、进出口、获取、制造、转移和投放等活动的监测、调查,采取必要的防范和处置措施。



生物学与社会

基因工程技术所面临的伦理问题

人类基因组计划所面临的伦理问题主要有:基因隐私权、机会不均等、基因专利、基因歧视等。

人类基因组计划是一项宏伟的科学壮举,其任务是确定人类基因组DNA的全部核苷酸序列,并鉴定每个基因的位置和结构。这项计划始于1990年,由6个国家共同发起,中国也参与其中。人类基因组实际上是由一组个体的基因组汇编而成的一套参考基因组。截至目前,已经完成很多个体的完整基因组,超过2000种疾病相关基因已被鉴定。在此基础上,科学家进一步完成了人类遗传作图,这是应用遗传学技术构建能显示基因及其他特征序列在基因组上位置的大型图谱。

遗传作图方面的进展也提出了个人隐私问题。例如,每个人在出生时便创建其DNA图谱,那么,理论上我们几乎能将每一件刑事案件与嫌犯匹配,因为在实施暴力犯罪时总会留下DNA证据。但是,作为社会的一部分,我们是否准备牺牲自己的基因隐私权?基因隐私权涉及每一个公民对自己身体以及基因信息的隐私权与科学家们分享研究资料权利之间的冲突。

又如,基因治疗是以获得患者的全部遗传信息为前提的,人类的疾病需要提供正常基因来治疗。如何采集DNA样本,从伦理的角度讲必须做到让患者“知情、同意”。基因资源的特异性又使得不同种族和肤色的人种之间的基因可能受到不平等对待,即存在着基因的歧视和机会的不均等。因此,要求技术实践的主体必须遵循安全、知情同意、保密和公正等伦理原则。



自我评价

1. 说出生物武器的概念，概括生物武器与常规武器的不同点。
2. 英国科学家霍金说：“从长远来看，我更担心的是生物武器。核武器的生产需要庞大的设备，而生物武器的制造在一个小小的实验室里就能完成。人们根本无法控制世界上所有的实验室。也许有意或无意之中，我们就制造了某种可能彻底毁灭人类的病毒。”你认同霍金的观点吗？谈谈你的看法。
3. 我国从 2018 年起在上海举办中国国际进口博览会。为了精心办好进博会，在首届会展中就投入使用了最新的融合了光场、太赫兹、金属探测等多种技术的智能安检系统。你认为类似大型活动还应该运用哪些安全防范技术？为什么？

本章回顾



本章小结

随着重组 DNA 技术的发展，更多的转基因产品出现在我们的生活之中。我们接触和使用转基因产品，享受其带来的好处。但同时，转基因产品在人类健康、环境安全等方面对社会的影响也已引起广泛的关注。

克隆技术可分为生殖性克隆和治疗性克隆。目前生殖性克隆人无论是在技术还是伦理层面都存在着许多问题。我国政府反对克隆人，不赞成、不允许、不支持、不接受任何克隆人实验。设计试管婴儿也面临着伦理问题。

生物武器在人类历史上对人类造成严重的威胁与伤害，生物恐怖也日益威胁着当前的国际和平和人类安全。应在世界范围内全面禁止生物武器，重点防范生物恐怖的发生。

以基因工程、细胞工程、发酵工程等为代表的现代生物技术的迅猛发展，日益影响和改善着人类的生产和生活方式。但生物技术发展过程中所面临的伦理问题、安全问题等值得我们冷静思考并做出相应行动。我们应充分估计生物技术对社会各方面所产生的冲击，努力克服生物技术所带来的负面影响。



学业评价

1. 1998年3月,某国专利局批准了某种子公司的专利:将一种阻止传代的基因序列插入到作物基因组中。种子公司在种子出售前向种子的表面喷上一种诱导剂,农民播种后种子可以长成正常的植株,结出成熟的种子,其有效成分也不受影响。但收获的种子在第二年再种植时不能正常发芽。公司只告诉农民必须每年购种,但未告知原因。

- (1) 该种子是通过何种生物技术获得?
- (2) 导入该种子的基因序列是否表达? 该种子的有效成分不受影响的原因是什么?
- (3) 有关该种子的安全性分析,正确的是()。
 - A. 对人类健康造成危害
 - B. 对生态环境造成危害
 - C. 对所转基因的传播造成影响
 - D. 对农民留种造成影响
- (4) 该种子公司的这项专利涉及哪些伦理学原则? 请给出理由。

2. 随着基因技术的发展,基因检测日趋便利。一名年轻女性在基因检测后发现BRCA-1基因阳性,该基因是乳腺癌的易感基因,保险公司调阅她的基因检测报告后便拒绝承保健康保险;2001年,某公司曾从部分雇员中采集血样进行基因缺陷检测,试图依据检测结果来确定员工的雇佣和升迁。许多人既担心基因信息的泄露,不敢进行基因检测,又害怕不做检测而失去工作以及预防疾病、改善健康的机会。

- (1) 以下涉及生物伦理的观点,错误的是()。
 - A. 基因工程技术实践的主体必须遵循安全、知情同意、不伤害和公正等伦理原则
 - B. 尊重个人在非外力胁迫下自主行使知情同意权
 - C. 针对不同人群的智力、信仰和地位等差异可不同对待
 - D. 生物技术不应伤害个人,若伤害不可避免时,受到的伤害应最小化
- (2) 上述材料中违反了生物伦理中的()(多选)。
 - A. 尊重原则
 - B. 不伤害原则
 - C. 有利原则
 - D. 公正原则
- (3) 你愿意获得这样一张基因身份证吗? 说明你的理由。

后记

本册教材根据教育部颁布的《普通高中生物学课程标准（2017年版2020年修订）》编写并经国家教材委员会专家委员会审核通过。

编写过程中，上海市中小学（幼儿园）课程改革委员会专家工作委员会，上海市教育委员会教学研究室，上海市课程方案教育教学研究基地、上海市心理教育教学研究基地、上海市基础教育教材建设研究基地、上海市生命科学教育教学研究基地（上海高校“立德树人”人文社会科学重点研究基地）及基地所在单位华东师范大学给予了大力支持。还有许多学科专家、教育专家、教研人员及一线教师给我们提出了宝贵意见和建议，我们感谢所有对教材编写、出版提供帮助与支持的同仁和各界朋友！特别感谢陈华对本册教材编写作出的贡献。对于教材中选用的图片等作品，我们已通过多种渠道联系作者或通过购买取得授权，对此我们深表感谢！但仍有部分作者未能取得联系，恳请入选作品的作者与我们联系，以便支付稿酬。

我们深知，由于时间和精力所限，教材中还存在不足之处。希望广大教师、学生及家长在使用本册教材过程中能提出宝贵意见和建议，并反馈给我们，使我们的教材更加完善。

2020年5月

本册教材图片提供信息：

本册教材中的图片由视觉中国、IC photo、中国全球图片总汇（第2章章首图左上）等提供。

生物学

选择性必修3
生物技术与工程

SHENGWUXUE



绿色印刷产品

ISBN 978-7-5478-5299-6



9 787547 852996 >