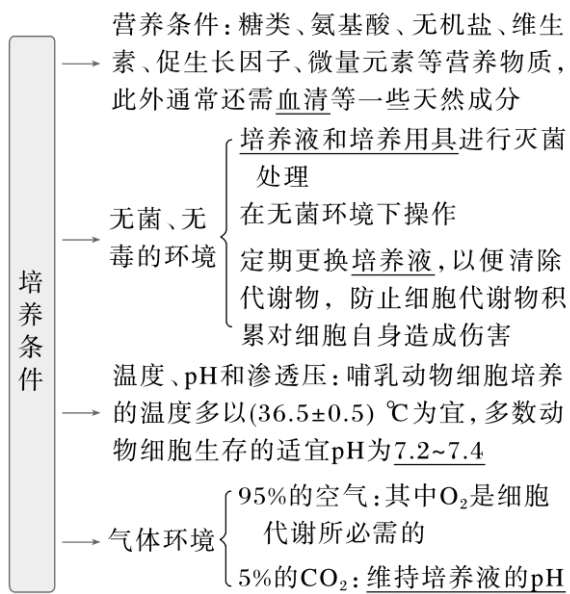
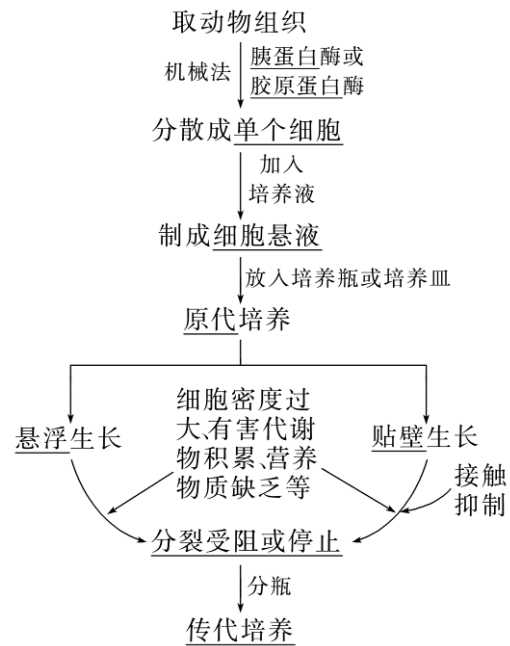


考点一 动物细胞培养

1. 动物细胞培养的条件



2. 动物细胞培养的过程



注意：血清作用：可补充培养液中尚未研究清楚的成分

血清灭菌方法：过滤除菌法

加抗生素可以杀死杂菌，不可杀死病毒。无菌无毒：菌指细菌；毒指代谢废物

原理：细胞增殖

[提醒] 动物细胞培养一般用液体培养基，植物组织培养一般用固体培养基。

(1)细胞贴壁：体外培养的大多数动物细胞往往贴附在培养瓶的瓶壁上。

(2)接触抑制：当贴壁细胞分裂生长到表面相互接触时，细胞通常会停止分裂增殖。

(3)原代培养：分瓶之前的细胞培养，即动物组织经处理后的初次培养。

(4)传代培养：分瓶后的细胞培养。

(5)悬浮培养的细胞直接用离心法收集；贴壁细胞需胰蛋白酶处理，再用离心法收集

(6)培养前分散成单个细胞的原因：①分散后细胞的生长与增殖不会被彼此限制；②分散有利于细胞与培养液充分接触，保证 O_2 与营养的供应和代谢物的及时排出。

(7)用酶两次处理的目的是：第一次使用的目的是使组织细胞分散开；第二次使用的目的是使细胞从瓶壁上脱离下来，便于分散后继续传代培养。

(8)接触抑制和细胞贴壁都离不开细胞表面的糖蛋白，涉及基因的选择性表达。

3. 干细胞培养及其应用

种类	胚胎干细胞	成体干细胞	诱导多能干细胞
来源	早期胚胎	骨髓、脐带血和外周血	体细胞(如成纤维细胞等)
特点	能分化为成年动物体内的任何一种类型的细胞，并进一步形成机体的组织和器官甚至个体	具有组织特异性 只分化成特定的细胞或组织	能诱导分化成类似胚胎干细胞的细胞
应用	分化成心肌细胞、神经元和造血干细胞等	造血干细胞用于治疗白血病等；神经干细胞用于治疗帕金森病、阿尔茨海默病等	治疗小鼠的镰状细胞贫血、阿尔茨海默病、心血管等疾病等

制备 iPS 细胞：包括借助载体将特定基因导入细胞中，直接将特定蛋白导入细胞中或者用小分子化合物等来诱导形成 iPS 细胞。iPS 细胞最初是由成纤维细胞转化而来的，后来发现已分化的 T 细胞、B 细胞等也能被诱导为 iPS 细胞。应用优点：避免免疫排斥反应；几乎没有伦理道德问题。

考点二 动物体细胞核移植技术和克隆动物

1.(1)原理：动物体细胞核具有全能性。生殖方式：无性生殖

(2)类型：哺乳动物核移植可分为胚胎细胞核移植和体细胞核移植，其中胚胎细胞核移植较易成功。

2. 体细胞核移植的过程

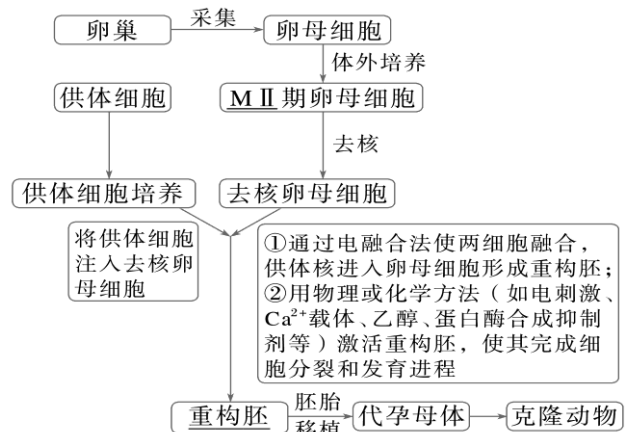
涉及的技术：动物细胞培养、动物细胞融合技术

核移植、早期胚胎培养、胚胎移植

注意：克隆动物的细胞核只来自供体，性别、基因型

决定于供体。细胞质可来自供体和受体卵母细胞。

目前，核移植理论研究较为滞后!!



[提醒] 目前动物细胞核移植技术中普遍使用的去核方法是显微操作法。也有人采用梯度离心、紫外线短时间照射和化学物质处理等方法。这些方法是在没有穿透卵母细胞透明带的情况下去核或使其中的 DNA 变性。

(1)上图中核移植操作是把供体细胞导入去核的卵母细胞透明带下，然后促进细胞融合，该法因对卵母细胞损伤较小且操作简便，现较为常用。还有一种操作是用微型注射针吸出供体细胞核后，直接导入去核的卵母细胞中。

(2)对卵母细胞去核时，实质上是去除纺锤体—染色体复合物。

供体和受体的选择

(1)供体

①提供核的一方一般选用传代 10 代以内的细胞，因为 10 代以内的细胞一般能保持正常的二倍体核型，保证了核供体细胞正常的遗传基础。②提供细胞质的一方选择减数分裂 II 期(M II 期)的卵母细胞，其原因：a.卵母细胞的细胞质内存在激发细胞核全能性表达的物质；b.卵母细胞体积大，便于操作；c.卵母细胞营养物质丰富。

(2)受体：一般选择繁殖性能好的同种雌性生物代孕。

3. 通过体细胞核移植产生的克隆动物属于无性生殖，因为没有经过生殖细胞的结合。

4. 体细胞核移植技术培育的克隆猴没有实现对体细胞供体动物进行 100%的复制，其原因是克隆动物绝大部分 DNA 来自体细胞供体(核供体)动物的细胞核，但其线粒体中的 DNA 同时来自核供体细胞和受体卵母细胞。此外，环境也影响生物性状。

考点三 动物细胞融合技术与单克隆抗体

1. 动物细胞融合技术

概念	使两个或多个动物细胞结合形成一个细胞的技术，融合后的细胞称为 <u>杂交细胞</u>
过程	膜融合→质融合→核融合
常用方法	<u>PEG 融合法、电融合法和灭活病毒诱导法等</u>
成功标志	细胞 <u>核</u> 融合，能进行有丝分裂
原理	细胞膜具有 <u>流动性</u> 的结构特点
意义	突破了有性杂交的局限，使 <u>远缘杂交</u> 成为可能
应用	①成为研究 <u>细胞遗传、细胞免疫、肿瘤</u> 和培育生物新品种等的重要手段； ②发展出杂交瘤技术，制造 <u>单克隆抗体</u>

2. 单克隆抗体的制备

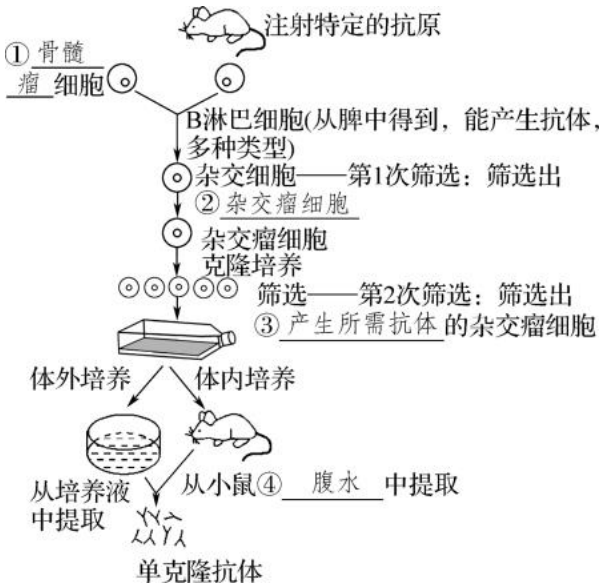
(1)制备原理

①每一个 B 淋巴细胞只分泌一种特异性抗体。(从脾脏获得 B 细胞)

②骨髓瘤细胞能在体外大量增殖。(从骨髓获得骨髓瘤细胞)

③B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合得到的杂交瘤细胞，既能迅速大量增殖，又能产生特定抗体。

(2)制备过程



(1)注射抗原的目的: 使小鼠发生免疫反应, 获得已免疫的 B 细胞。多次注射的目的: 获得更多的已免疫的 B 细胞。

(2)两次筛选的方法和目的不同

第一次是用特定的选择培养基筛选多种杂交瘤细胞: 未融合的细胞和同种细胞融合后形成的细胞都会死亡, 只有融合的杂交瘤细胞才能生长。

第二次是用多孔培养皿(如 96 孔板)克隆化培养和抗体检测, 经多次筛选得到能分泌所需抗体的杂交瘤细胞。利用了抗原—抗体特异性结合的免疫学原理。

(3) 克隆化培养是指由单个细胞分裂增殖获得细胞团的培养过程。将杂交瘤细胞用培养液充分稀释, 接种到 96 孔细胞培养板, 且每个孔中尽量只接种 1 个, 通过培养使其增殖为单克隆。若再次检测抗体为阳性, 就可以大规模生产。

2. 单克隆抗体的优点: (特异性强, 灵敏度高, 能大量制备)能准确地识别抗原的细微差异, 与特定抗原发生特异性结合, 并且可以大量制备。

3. 单克隆抗体的应用

(1)作为诊断试剂, 在多种疾病的诊断和病原体鉴定中发挥重要的作用。

(2)用于治疗疾病和运载药物。(单克隆抗体于癌细胞表面的抗原结合, 将抗癌药物定向运输到癌细胞位置, 杀死癌细胞; 用药量少, 副作用小)

4.涉及的技术和原理: 动物细胞融合技术(利用细胞膜的流动性)、动物细胞培养技术(利用细胞增殖原理)

资料: 选择性培养基筛选出杂交瘤细胞的原理

①细胞合成 DNA 包括 D 和 S 两条途径, 其中 D 途径能被氨基蝶呤阻断。

②免疫的 B 淋巴细胞中有这两种 DNA 的合成途径, 但它不能分裂增殖, 其本身也不能在体外长期存活。

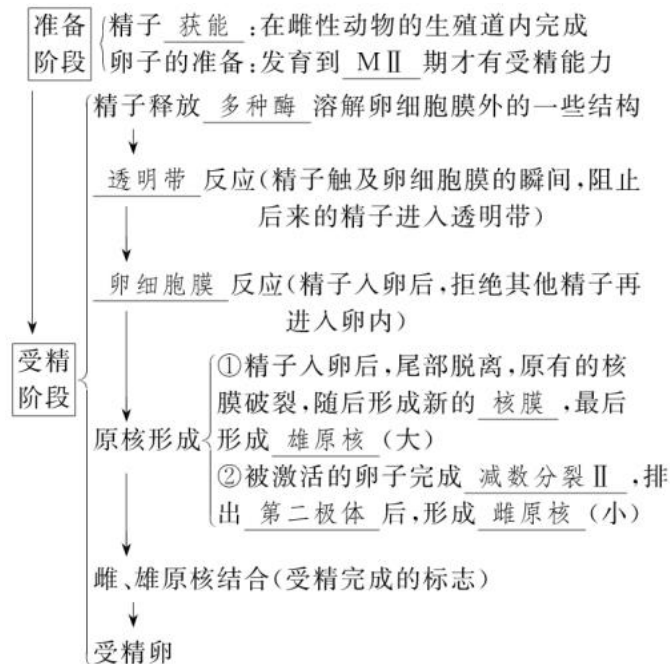
③鼠骨髓瘤细胞中只有 D 途径, 没有 S 途径, 但它能不断分裂增殖。如果它的 D 途径被阻断的话, 它会因不能合成 DNA 而死亡。

根据上述资料, 利用特定的选择培养基筛选杂交瘤细胞的具体方法是在培养基中加入氨基蝶呤进行培养, 一段时间后收集存活细胞。原理是氨基蝶呤可以阻断 DNA 的 D 合成途径, 所以未融合的骨髓瘤细胞及融合的骨髓瘤细胞和骨髓瘤细胞不能在该培养基生长, 而未融合的 B 淋巴细胞及融合的 B 淋巴细胞不能长期存活, 只有 B 淋巴细胞和骨髓瘤细胞融合的杂交瘤细胞才可以在培养基中长期存活与繁殖。

考点四 胚胎工程的理论基础

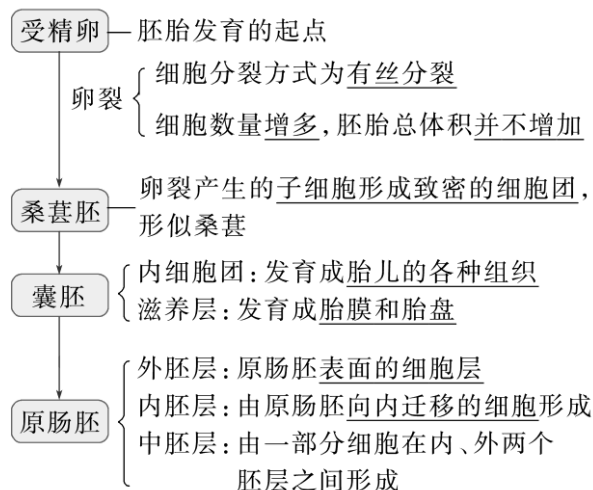
1. 受精

- (1)概念: 精子与卵子结合形成合子(即受精卵)的过程。
 (2)场所: 在自然条件下, 哺乳动物的受精在输卵管内完成。
 (3)过程



[提醒] ①精子获能是指精子获得受精“能力”，而不是获得能量；排卵是指卵子从卵泡中排出，而不是卵泡从卵巢中排出。

- (1) 受精的标志是在透明带和卵细胞膜之间观察到两个极体或者观察到雄原核和雌原核；而受精完成的标志是雌、雄原核融合。
 (2) 阻止多精入卵的第一道屏障是透明带反应（精子触及卵细胞膜时），第二道屏障是卵细胞膜反应（精子入卵时）。
 (注：透明带是由糖蛋白组成的一种结构，是精卵识别的基础之一。)
- ### 2. 胚胎早期发育



[提醒] 桑葚胚的细胞和囊胚期内细胞团的细胞都具有全能性。(细胞分化时期从囊胚期开始)

- 卵裂期的特点: ①细胞分裂方式: 有丝分裂, 发生在透明带内。
 ②有机物: 有机物总量不断减少, 但有机物种类增加。
 ③细胞体积: 胚胎总体积不变或略有减小, 但细胞数目增多, 所以每个细胞体积减小。

④细胞中 DNA 含量：伴随细胞分裂，细胞数目增多，总 DNA 含量增多，但每个细胞中核 DNA 含量保持相对稳定。

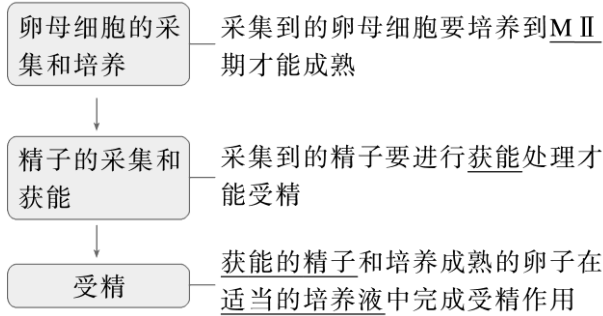
4. 孵化

- (1)概念：囊胚进一步扩大，透明带破裂，胚胎从其中伸展出来的过程。（孵化之前营养物质由卵细胞提供）
- (2)意义：如果不能正常孵化，胚胎就无法继续发育。

考点五 胚胎工程技术及其应用

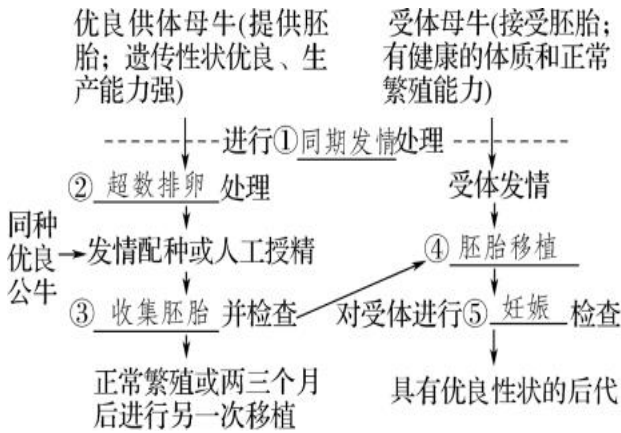
1. 体外受精

(1)过程



体外受精的意义：
是提高雌性动物繁殖能力的有效措施，
可以为胚胎移植提供可用胚胎。

3. 胚胎移植的过程

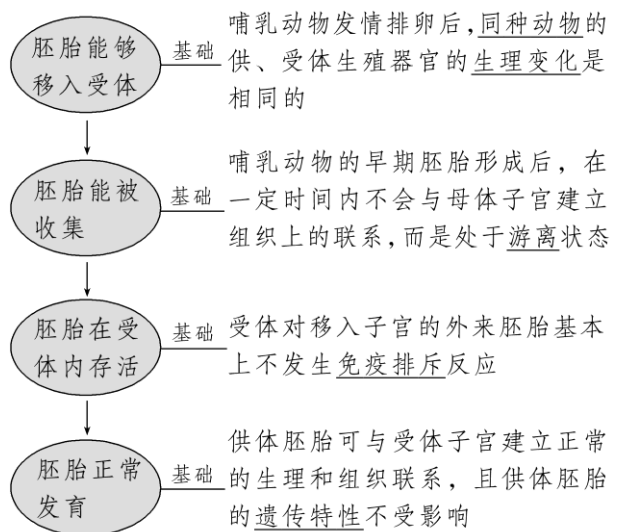


2. 胚胎移植

(1)概念理解



4. 胚胎移植的生理学基础

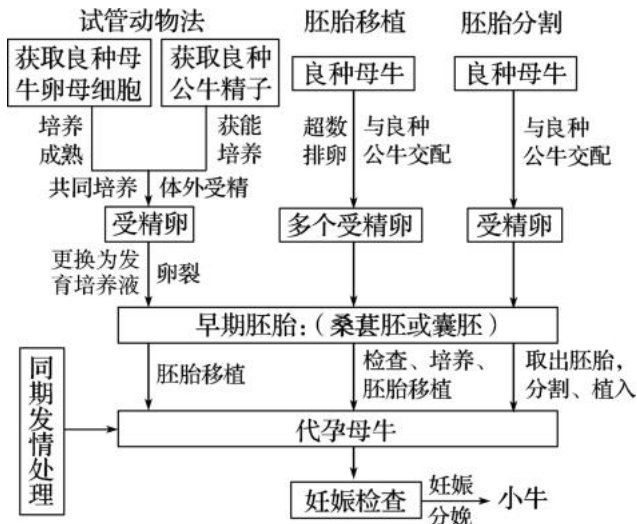


5. 胚胎分割

概念	采用机械方法将早期胚胎切割成 2 等份、4 等份或 8 等份等，经移植获得同卵双胞胎或多胎的技术
选择的胚胎	发育良好的、形态正常的桑葚胚或囊胚 (原因：桑葚胚或囊胚的内细胞团细胞具有发育的全能性)
注意事项	将囊胚的内细胞团均等分割(原因：防止影响分割后胚胎的恢复和进一步发育)
后代的特点	具有相同的遗传物质 (表型不一定相同, 因为受环境影响)
生殖方式	无性生殖(无性繁殖、克隆)

胚胎移植前进行性别鉴定的方法：取滋养层细胞做 DNA 分析。

6. 胚胎工程操作流程(以牛为例)



(2) 用外源促性腺激素对供体进行超数排卵处理。同期发情: 孕激素或前列腺素处理

(3) 胚胎移植过程中的两次检查: 第一次在移植前, 对收集的胚胎进行检查, 检查胚胎质量等; 第二次在移植后, 对受体母畜是否妊娠进行检查。

(4) 胚胎移植或胚胎分割的两个时期: 桑葚胚和囊胚。

(5) 胚胎分割一般以二等份为主(分割成活和移植成功率高)。

7. 生物工程技术应用组合

(1) 转基因植物培育: 基因工程 + 植物组织培养。

(2) 转基因动物培育: 基因工程 + 动物细胞培养(早期胚胎培养) + 胚胎移植。

(3) 克隆动物培育: 核移植 + 动物细胞培养(早期胚胎培养) + 胚胎移植。

(4) 植物体细胞杂交: 酶工程 + 原生质体融合 + 植物组织培养。

(5) 试管动物培育: 体外受精 + 动物细胞培养(早期胚胎培养) + 胚胎移植。

考点六 植物细胞工程

1. 植物组织培养技术

(1) 理论基础: 植物细胞的全能性。

(2) 流程



①脱分化: 在一定的激素和营养、黑暗等条件的诱导下, 已经分化的细胞失去其特有的结构和功能, 转变成未分化的细胞, 进而形成愈伤组织的过程。

②愈伤组织: 脱分化产生的不定形的薄壁组织团块。(代谢类型: 异养需氧)

③再分化: 光照下, 愈伤组织重新分化成芽、根等器官的过程。

(3)植物激素在植物组织培养中的作用

生长素/细胞分裂素(相对比值)	植物组织的发育方向
高	有利于根的分化, 抑制芽的形成
低	有利于芽的分化, 抑制根的形成
适中	促进愈伤组织的形成
简记: “高”根, “低”芽, “中”愈伤	

[拓展提升] ①诱导愈伤组织分化时, 一般要**先诱导其生芽, 然后诱导其生根**, 可通过控制培养基中生长素和细胞分裂素的比例来实现。

②光照: 在愈伤组织诱导阶段, 对有些植物来说, 避光培养有利于细胞脱分化形成愈伤组织。当愈伤组织再分化出芽和叶时, 一定要有光照, 有利于叶片内**叶绿素**的合成。

③植物组织培养中所需的碳源一般为**蔗糖**, 少数为葡萄糖和果糖, 原因是**蔗糖既可提供充足的碳源, 又可维持相对适中的渗透压, 而葡萄糖和果糖在与蔗糖提供相同数量碳源的前提下, 其造成的渗透压可能过高。**

为避免杂菌在培养基上迅速生长消耗营养, 同时防止有些杂菌危害培养物的生长。植物组织培养过程中需进行无菌操作:

①培养基灭菌(高压蒸汽灭菌); ②外植体要进行消毒处理(酒精、次氯酸钠、无菌水冲洗); ③接种的无菌操作(各种器械要彻底灭菌、无菌滤纸、酒精灯火焰旁、封口膜或瓶盖封住瓶口); ④无菌箱中培养; ⑤除去封口膜一段时间后, 再移栽到消过毒的环境中**生存一段时间**(“**炼苗**”)。

植物细胞工程的应用

1. 植物繁殖的新途径: 快速(微型)繁殖、作物脱毒。

优点: 能保持**优良品种的遗传特性**; 可以快速大量地培育新个体, 有利于进行工厂化培养; 选材少, 周期短, 便于自动化管理。

2. 作物新品种的培育: **单倍体育种**(如花药/花粉离体培养)、**突变体的利用**(用射线、化学物质等处理培养的细胞后筛选)。

3. 细胞产物的工厂化生产: 获取植物**次生代谢物**, 如紫杉醇、人参皂苷的生产。一般只需培养到愈伤组织阶段, 从细胞培养液中获得产物。具有不占用耕地, 几乎不受**天气、季节**等的限制等优点, 还可克服单个细胞次生代谢产物少的特点。

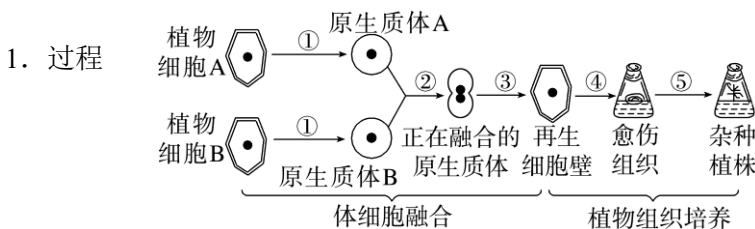
注意: (1)幼嫩的组织脱分化较为容易, 如茎尖、根尖、形成层细胞, 而植物的茎、叶和成熟的组织则较难。另外, 幼嫩的芽尖、茎尖**几乎不含病毒或病毒很少**, 作为植物组织培养材料容易实现作物脱毒。

(2)突变体的利用中, 培养的愈伤组织处于不断增殖状态, 易发生**基因突变**, 从而得到突变体。

(3)细胞产物的工厂化生产利用了**细胞增殖**的原理。

(4)细胞产物的工厂化生产中, 用液体培养基培养愈伤组织的细胞, 培养过程中可加以搅拌, 一是增加培养液中的**溶解氧**; 二是有利于细胞与培养液**充分接触**。

考点七 植物体细胞杂交技术



(1)过程①为去除**细胞壁**获得原生质体, 用到的酶是**纤维素酶和果胶酶**。

(2)过程②为**原生质体的融合**, 人工诱导的物理法包括**电融合法、离心法**等, 化学法包括**聚乙二醇(PEG)融合法**、

高 Ca^{2+} —高 pH 融合法等。

(3)过程③为融合的原生质体再生出细胞壁（高尔基体、线粒体活跃），这是原生质体融合成功的标志。

(4)过程④为脱分化，过程⑤为再分化。

意义：植物体细胞杂交技术在打破生殖隔离，实现远缘杂交育种

注意：(1)植物体细胞杂交的结果不是形成杂种细胞，而是要经过组织培养形成杂种植株。

(2)植物细胞融合成功的标志是再生出新的细胞壁，植物体细胞杂交成功的标志是形成杂种植株。

(3)植物体细胞杂交过程中没有有性生殖细胞的结合，因此应为无性生殖。(注意区分“植物体细胞杂交”和“杂交”，后者是有性生殖。)

(4)获得杂种植株的变异类型属于染色体变异。与多倍体育种一样，都是通过改变细胞内的染色体数目来改变遗传物质，从而改变生物的性状。但不同的是，杂种植株的染色体数通常是两个不同种亲本细胞染色体数目之和，属于异源多倍体。

(5)去壁后原生质体活性可能下降或消失，一般需要测定活性残余情况，如用台盼蓝染色法（有活性的原生质体无色），或利用细胞内酶活性进行测定。

植物体细胞杂交与多倍体育种的比较

比较项目	植物体细胞杂交	多倍体育种	
不同点	原理	膜的流动性和细胞的全能性	染色体数目的变异
	方法	原生质体融合和植物组织培养	秋水仙素或低温处理萌发的种子或幼苗
	染色体来源	一般来自不同种的生物	一般来自同种生物(异源多倍体来自不同生物)
相同点	都是通过改变细胞内的染色体数目来改变遗传物质，从而改变生物的性状		

动物细胞培养和植物组织培养的比较

项目	动物细胞培养	植物组织培养
原理	细胞增殖	植物细胞的全能性
取材	动物胚胎或幼龄动物的组织、器官	外植体(离体植物器官、组织、细胞)
培养基性质	液体培养基(又称培养液)	固体培养基
培养基主要成分	糖类、氨基酸、无机盐、维生素等营养物质；一些天然成分，如血清	有机营养成分、无机营养成分、植物激素
特殊环境条件	气体环境：95%的空气+5%CO ₂	脱分化一般不需要光，再分化一般需要光照
结果	获得大量细胞	一般获得新的植株
关键过程	制细胞悬液→原代培养→传代培养	脱分化→再分化
相同点	均需无菌操作，需要适宜的温度、pH 等条件	

植物体细胞杂交与动物细胞融合的比较

比较项目	植物体细胞杂交	动物细胞融合
原理	细胞膜的流动性、细胞的全能性	细胞膜的流动性、细胞增殖
融合前处理	先除去细胞壁	先使细胞分散开
使用的酶	纤维素酶和果胶酶	胰蛋白酶或胶原蛋白酶
诱导手段	电融合法、离心法(物理法)；PEG 融合法、高 Ca^{2+} —高 pH 融合法(化学法)等	PEG 融合法、电融合法、灭活的病毒诱导法等
结果	杂种植株(发生染色体数目变异)	杂交细胞(发生染色体数目变异)