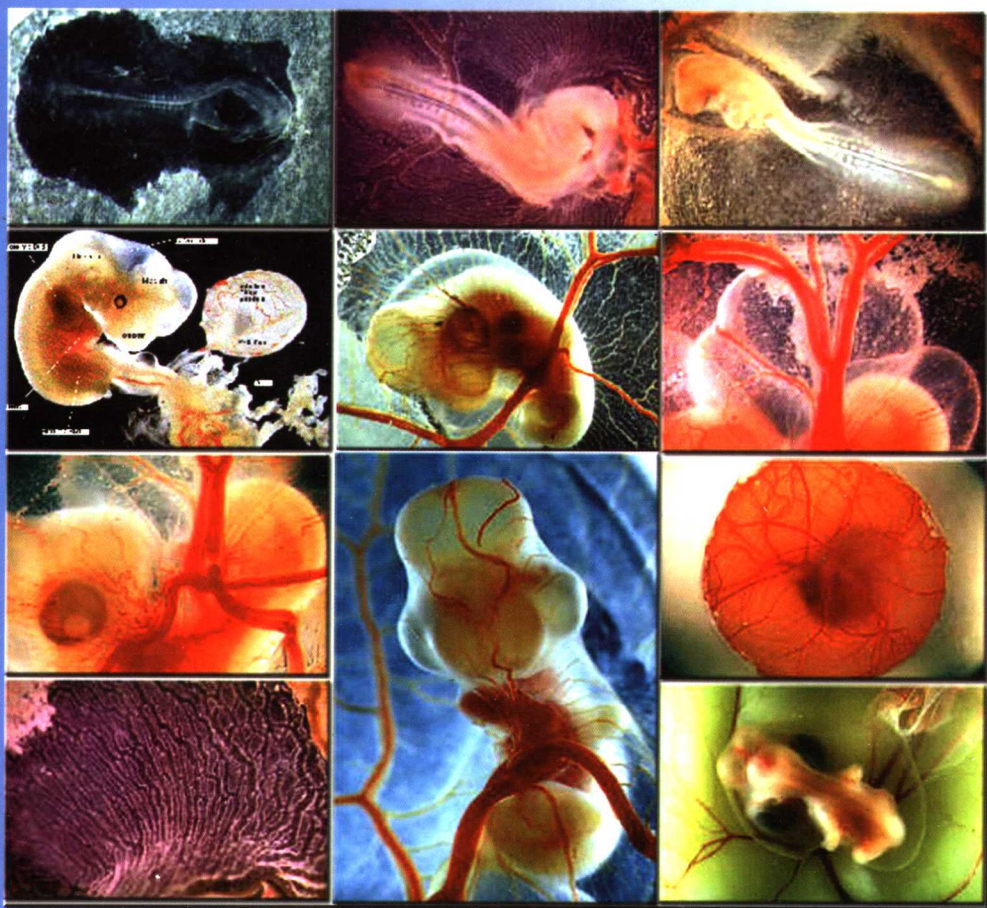


医学发育生物学

主 编 余 鸿 程 基 焱



科学出版社
www.sciencep.com

医学发育生物学

主编 余 鸿 程基焱

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书是编者在参考了国内外现有相关教材和参考书的基础上,为促进医学发育生物学的发展,适应高等医学教育事业的改革,结合国内部分医学院校开设医学发育生物学课程的实际情况,组织部分有多年教学经验的教师编写的。

本书分为三篇,共 21 章,其内容结构与人体胚胎学基本相似。不同之处主要在于:①侧重于发育生物学与临床医学的联系;②强调该领域的新进展;③增加部分关于辅助生殖技术、克隆技术中有争议的问题的介绍,供大家参考和讨论。

本书供高等医药院校医学生使用,也可供相关教师和科技工作者阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

医学发育生物学/余鸿,程基焱主编. —北京:科学出版社,2006. 8

ISBN 7-03-017976-5

I. 医… II. ①余… ②程… III. 医学:发育生物学-医学院校-教学参考
IV. R329. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 102739 号

责任编辑:李国红 / 责任校对:张小霞

责任印制:刘士平 / 封面设计:黄超 黄吉春

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

新蕾印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2006年8月第一版 开本:787×1092 1/16

2006年8月第一次印刷 印张:14 1/4

印数:1—4 000 字数:333 000

定价:29.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

《医学发育生物学》编委会

主 编 余 鸿 程基焱

副 主 编 郭 勇 徐富翠 韩 艺 黄吉春

编 委 (以姓氏笔画为序)

王巧稚 伍丽娜 杨小红 吴雨岭

余 鸿 邹礼乐 陈 滢 赵宏贤

徐富翠 郭 勇 梅欣明 黄吉春

彭 柯 韩 艺 程基焱

前 言

为促进医学发育生物学的发展,适应高等医学教育事业的改革,结合国内部分医学院校开设医学发育生物学课程的实际情况,本书的主编组织了部分有多年医学发育生物学教学经验的教师编写了本书,希望能对该领域感兴趣的广大同行和同学提供帮助。

本书分为三篇,共 21 章,其内容结构与人体胚胎学书籍基本相似。不同之处主要在于:①侧重于发育生物学与临床医学的联系;②强调该领域的新进展;③增加部分关于辅助生殖技术、克隆技术中有争议的问题的介绍,供大家参考和讨论。

在编写过程中,编者主要参考了国内外现有的相关教材和参考书,也利用网络资源获取了一些相关资料和信息。本书的出版是建立在广大在发育生物学领域做出贡献的先驱们的成就之上的,在此对这些学者们表示衷心感谢。

各位编者是在繁忙的教学和科研工作中挤出时间来完成编写任务。由于时间仓促和编者水平有限,书中难免有不妥甚至错误之处,恳请广大同行及师生提出宝贵意见,以提高编者的水平及本书的价值,以便再版时修订。

编 者

2006 年 6 月

目 录

第一篇 医学发育生物学总论

第一章 绪论	(3)
第二章 生殖细胞的发育	(13)
第三章 受精、卵裂与胚泡形成(第1周)	(24)
第四章 胚盘形成(第2周)	(34)
第五章 中胚层形成与胚层分化(第3~8周)	(37)
第六章 胎膜和胎盘	(46)
第七章 孪生、多胎与联体双胎	(54)
第八章 畸形学概论	(64)
第九章 胚胎发育机制	(72)

第二篇 医学发育生物学各论

第十章 心血管系统的发生	(85)
第十一章 颜面和颈的发生	(97)
第十二章 消化系统和呼吸系统的发生	(106)
第十三章 泌尿系统和生殖系统的发生	(116)
第十四章 神经系统、眼和耳的发生	(126)
第十五章 内分泌腺的发生	(142)
第十六章 骨和四肢的发生	(149)
第十七章 免疫系统和体腔系膜的发生	(155)

第三篇 辅助生殖技术与克隆技术

第十八章 辅助生殖技术的发展简史	(181)
第十九章 不育不孕症	(188)
第二十章 辅助生殖技术的临床应用	(200)
第二十一章 克隆技术概论	(212)

第一篇

医学发育生物学总论



第一章 绪 论

一、医学发育生物学研究的内容与意义

医学发育生物学是研究人体从胚胎发生、生长发育至衰老死亡的生命过程中所发生的变化和规律的科学,是传统胚胎学的深入和发展,是发育生物学的一个重要组成部分。其研究范围主要涉及胚胎发育的遗传物质基础,生命的启动,精子和卵子的相互作用,单细胞如何发育为成体,细胞如何分化而构成组织、器官和系统,以及发育过程的各个阶段基因是如何表达、调控,从而导致新个体的形成等,因而发育生物学已成为当今胚胎学最重要的分支学科。

发育生物学又是实验胚胎学、分子胚胎学、细胞生物学、分子遗传学和分子生物学等学科相互渗透而发展建立起来的一门交叉学科,其内容涉及多个学科,即应用各个学科中的先进理论和技术来探讨发育中的问题,尤其是分子生物学技术的发展、转基因动物和“克隆”技术的诞生,为发育生物学不断注入新鲜血液。从某种意义上来说,发育生物学不仅是现代生命科学的重要基础学科,而且已成为或正在成为与人类生活、生产密切相关的应用科学。

在自然界中,发育过程可以说是最令人着迷的过程之一。发育生物学家就是对发育过程中的各个方面进行研究,其中包括控制发育过程的原因和分子事件以及发育过程中有机体的结构变化。发育生物学家将有机体一生中以时间推移所发生的事件与其所导致的形态与功能的变化联系起来。正是由于该学科具有动态的一面,强调了变化,从而赋予了该学科极大的魅力,使其成为一门极具挑战性的学科。

二、发育生物学发展简史

(一) 古希腊发育生物学的开端

古代梵文和古埃及文献都曾对胚胎的描述,而第一个系统地从事发育学研究的是麦斯多尼·亚里士多德(Macedonian Aristotle,公元前384~322年),他写了第一本动物学教科书以及生殖和发育方面的论文。对于有机体是如何产生的,亚里士多德强调以下4点:①自发生殖,因为当时认为苍蝇和爬虫可能是自发生殖的;②出芽产生;③雌雄同体;④两性生殖。在他看来,卵子是卵生(oviparous)动物的繁殖工具,而哺乳动物、人及一些其他的胎生动物没有卵,雌性向后代提供均质物质,雄性提供精液,精液才是后代形体形成的

起因。

亚里士多德认为,塑造形体的要素是能量,为了达到物种特异性的结果,形成要素必须拥有一个最终结果的“预存思想”,因此,最终的原因和最终的能量将是灵魂。他说过,“它(灵魂)导致跟它相类似的个体产生。它的本质已经存在了,它仅仅维持它的存在,第一级灵魂能产生物种。”亚里士多德将灵魂区分为带来生命的营养灵魂、赋予感觉的动物感觉灵魂和导致思考的精神灵魂。营养灵魂赋予植物再生的能力,也是动物发育成形的能力。在动物中,这一物质由母亲提供,哺乳动物则以排卵的方式提供。当时认为,精子将雌性物质凝集,激发并控制其发育。亚里士多德对营养灵魂的存在和营养灵魂如何遗传的解释是模棱两可的:它存在于雌性物质中还是精液里呢?与此相反,第二级灵魂,动物灵魂,只能从精液遗传下来,从父亲传递到未来的孩子体内。动物灵魂控制感情和运动。精神灵魂是外在的,无痛楚的,纯能量的,“通过某个门”从外界进入人体。

亚里士多德对西方文明的影响持续了许多世纪,可能是由于他的赫赫威名,人们默默地接受了他对生养、受精和雌性决定等的论断。

(二) 发育生物学的复兴

16世纪,胚胎学复兴。在Padua学校,Vesalius等人进行过卵巢和睾丸的解剖。Coiter详尽地研究了鸡胚发育,提出了卵子在卵巢中发生的观点,因而被视为胚胎生物学之父。

英国解剖学和生理学家哈维以发现脊椎动物机体的血液循环而著称。尽管哈维崇拜亚里士多德,但他仍坚持认为,自发生殖仅限于低等有机体,而在昆虫中,发育意味着变态(metamorphosis),即从已有的形态转化到另一种形态。他还认为,高等动物的发育并不仅仅是变形(transformation),还有后天发生的,即创造合成。也就是说,从均质的物质进行创造性的合成,逐渐形成新的统一体。哈维写道,“尽管出乎人们意料,我们坚持认为,所有动物,即使是胎生动物及人类本身,都产生于卵细胞,首先是怀孕,继而胎儿发育都源于一种或另一种卵细胞,正如各种植物的种子一样。”即“生命来自卵”。然而,哈维所说的哺乳动物的卵与现代卵子含义不同,哈维所说的卵更像在子宫这个“壳”里的胚泡(blastocyst)。真正的哺乳动物卵子是由冯·贝尔(Carl Ernst von Baer)发现的。

(三) 预成论与机械论

继罗马博物学家Pliny之后,瑞士学者Gessner报道,雌体怀孕后,生出一个肉团,随后把它舔成形。他可能尚未受到机械主义哲学的影响。而他的同胞von Haller坚持彻底否定后成论,在这一点上,他与显微解剖的创建者虎克的观点一致。1683年,虎克写道,“人胎儿,尽管不如一粒豌豆大,却五脏俱全。”虎克在精液内发现了微小生物,后来,贝尔将其更名为精子细胞(spermatozoa)。虎克设想,他可能会看到雏形人(homunculi),即微小动物内的微小预成人。当时认为,雏形人增大后成为胚胎。

同样,人们试图在所谓的昆虫卵——“蛹(pupae)”中看到微型的蚂蚁及蝴蝶成虫。正如植物的叶子与花来自芽一样,预先存在的人只需逐渐展开。预成论产生了一些难以解释的问题。例如:若个体发育仅仅是预先形成状态的逐渐展开,难道所有世代在世界之初就已经存在了吗?答案是层层包裹:一代包裹着另一代。按Vallisneri计算,远古母亲——夏

娃的卵巢内含有两亿个这样的小人,一个套一个。这个储备量直到世界末日也足够。

显微镜展示出了细胞,降低了看到预成形机体大小的限制,显微学家们不仅展示了卵细胞,还显示了精子。有人声称,预形成的雏形人预先存在于卵子(卵源论者)或精子(微小动物论者,雏形人论者)中。卵源论者的代表是著名的解剖学家马尔皮基和斯瓦默丹。

如果丢失的身体部分只能来自预形成的部分,部分身体的再生又如何解释呢?

Lazzaro Spallanzani 第一个实现了人工授精(artificial insemination)。他报道说,在没有精子的条件下,青蛙卵就降解了。以狗作实验材料,他最终证明,要产生一个新个体,需要精液和卵子共同存在,从而结束了预成论的争论(尽管他错误地认为精液中游动的微小动物是寄生虫)。

(四) 后天发生论和活力论

沃尔夫重新开始了对鸡胚的研究,他也看到了从均质的卵黄物质发育而来的新形态,并描述了后来变为成体结构的生殖叶(germ leaves),这就是生殖层(germ-layer)理论的雏形。和史前的亚里士多德一样,也像所有他以后的活力论者一样,沃尔夫得到的结论是,存在一种非物质(非颗粒)的东西,它是生命特有的力量。Friedrich Blumentach 假想出一种尤其在生理上起作用的“成形力(formative compulsion)”,它可通过生殖细胞遗传。许多赫赫有名的生物学家都是活力论者,其中包括冯·贝尔,他发现了几种哺乳动物的卵子,并进行了深入的研究。贝尔得出结论,所有的脊椎动物都从生殖层上以基本相同的途径发育而来。他建立了冯·贝尔法则(von Baer law),即所有脊椎动物只有在通过一个非常相近的胚胎期之后,才发生了发育途径的分化。基于这个规则,海克尔提出了非常有争议的“个体发育(ontogenetic)”或“生物发生规则”。这一理论坚持认为“个体发育是系统发育的缩微重演”。

1880年,Wilhelm His 发表了《人胚胎的解剖学》,激发了人们对于人类胚胎学的兴趣。

法国实验胚胎学始于其形态学的研究传统。圣·伊莱尔是一个动物学家,他致力于解释异常发育(畸形)的原因,一度被研究鸡胚发育时粗略的方法所困扰。1886年,其同胞 Laurent Chabry 开始用更易得的具被膜的卵研究畸形发育。从此,非脊椎动物卵成为研究早期动物发育的首选卵来源。

(五) 20 世纪初的推动力和进步

从1860年以来,有了大量重要发现,实验胚胎学、细胞生物学、遗传学的时代开始了。发育遗传学的第一个先锋,是一个眼睛几乎瞎了的预言家魏斯曼,他预见到了基因的重要性,在他的生殖质理论中描述了他的染色体的自我复制决定子假说,现在刚刚被 Eduard Strasburger 和 Walter Flemming 等研究者发现。但是,魏斯曼认为,胚胎中决定子的不同分布,导致并指导了细胞的分化。

将人们的注意力引向细胞核(nucleus),将其视为遗传位置的是 Hertwig 兄弟的功劳。他们认识到精子和卵子细胞核融合的重要性。他们还以海胆卵为材料,鉴别出第二极体并看到了卵细胞内的这些姐妹细胞的核。在那段时间,海胆胚胎是最为重要的研究材料。

Theodor Boveri 对蛔虫卵进行了仔细观察并睿智地解释了实验,从而推动了染色体理论(chromosomal theory)的发展。Boveri 第一次用实验显示了染色体对发育的重要意义,

他还意识到细胞核与细胞质间的相互作用,这一点后来被 Morgan、Driesch 及 Boveri 本人在海胆胚胎中证实。Boveri 还是第一个提出梯度假说的人。

Wilson 也证明了胞质决定的重要性,他还发现了昆虫的性染色体。

大多数现代发育生物学的创始人,包括 Boveri、Wilson、Driesch 和 Morgan,除了研究海胆和其他海洋无脊椎动物卵子以外,他们还进行了水螅(hydrozoans, tubularia)的再生实验,这方面较早的榜样是瑞士学者 Abraham Trembley,他早在 1740 年就对水螅进行了精细的研究,并做了详细的记录。这些再生研究标志着现代实验生物学的开端。

(六) 从灵魂到当今的发育信息

与此密切相关的是 Wilhelm Roux 以青蛙卵、Hans Driesch 以海胆卵所做的实验以及 Thomas Hunt Moran(于 1933 年第一个获得诺贝尔奖的生物学家)建立的遗传学领先模式生物——果蝇(drosophila)。

Driesch 进行的经典实验包括:分离由受精卵分裂形成的两个姐妹细胞(分裂球),分离后的细胞产生完整的海胆幼虫。这一实验证明,活体并非机械论者所想的机器,因为没有任何一台机器拆开后能够恢复原来的模样。Driesch 复活了亚里士多德主义者的术语“生机(entelechy)”,他赋予它的实体是“知识”、“信息”。因此,他提前使用了“信息”这一术语,这是 Norbert Wienen 1942 年才引入的一个科学概念。但是,Driesch 的生机是不可理解的,它没有生理载体,这与现代物质的分子遗传信息大相径庭。Driesch 还提到了位置信息的观点,声称“一个细胞将来的命运是由它在整体中的位置所决定的功能”。

由 Hans Spemann(1935 年诺贝尔奖获得者)和其学生 Hilde Mangold 以两栖动物胚胎为材料,用精细新颖的外科手术方法进行了命运决定事件和胚胎中不同部分之间的具有诱导性相互作用的研究,实验最为成功之处在于发现了组织者。

DNA 作为遗传信息载体的作用于 1953 年由 Watson 和 Crick 首次进行了解释,而胞质决定子与 DNA 的相互作用及细胞间的信号交换是最近几年研究中的主要目标。

由于基因学家 E. B. Lewis 等的开创性研究,果蝇已经成为遗传和分子发育生物学的参考模型。Brenner 成功地建立了另一个模型系统——线虫。

许多研究工作者重返传统研究,以分子生物学方法来深化研究工作,其中包括 Eric Davidson(海胆)、Marc Kirschner(爪蟾,细胞周期)、John B. Gurdon(胚胎诱导)和 Lewis Wolpert(位置信息,鸟肢芽的形态形成)。

发育生物学的另一开拓者是英国的数学家 Alan Turing。基于数学推理的理论概念,他正在发展计算机模拟生物模式形成的方法。

(七) 我国发育生物学所取得的成就

在我国,自 20 世纪 50 年代以来,发育生物学家已开始了有关发育生物学问题的研究。1961 年,胚胎学家朱洗教授成功地进行了单性生殖研究,生产出世界上第一只无父的母蟾蜍并产卵传种,成为当时世界的创举。1973 年,童第周教授等从鲫鱼的卵子中提取出核酸物质,经纯化注入到金鱼的受精卵中,结果使部分金鱼的后代由双尾鳍变为单尾鳍。实验证明,不同种属的细胞质成分也能影响基因的活性表达。进入 20 世纪 80 年代以来,我国的

胚胎学研究有了长足的进步,尤其是在生殖工程和计划生育工作中取得了许多成果。1988年,我国首批“试管婴儿”先后在北京、湖南等地诞生。中国科学院的发育生物学研究所为专门从事发育生物学研究的机构,我国的转基因鱼、转基因鼠和转基因羊等都曾在那里诞生。经过几代人的努力工作,我国发育生物学科已建立起来了,教学与科研队伍逐步壮大。相信在此基础上,今后发育生物学更会进一步发展,赶上国际先进水平,为祖国的现代化建设和人类的进步做出贡献。

三、发育生物学的研究方法

发育生物学是一门实验性很强的学科,很多重要的发育理论和发育模型都是在大量实验结果的基础上建立起来的。其中涉及各种各样的研究技术和方法,既有传统的胚胎学和细胞学方法,又有新发展的分子生物学方法。这里仅就发育生物学研究中的几种常用的和主要的研究方法简介如下。

(一) 活体标本的直接观察

直接观察,特别是活体胚胎的直接观察可提供一个良好的胚胎全貌及其在发育过程中迅速的动态变化。观察生活细胞的结构和变化需用相差显微镜。如果应用活体染料则可对某些特殊细胞和细胞群的迁移进行追踪观察。显微电镜照相术对整个胚胎或细胞群发育的研究是一有效工具。其方法是将活体标本在显微镜下摄成电影,经放映可显示发育过程的一系列变化,如卵裂和神经纤维生长的缩时电影片、胚泡从透明带里孵出的缩时电影片。

(二) 制片标本的观察

当需要研究发育过程某一阶段或某种情况时,则可将标本固定制片进行观察,胚胎切片常需制作连续切片以观察结构之间的相关性。目前,石蜡切片仍为研究胚胎的经典方法。19世纪,胚胎学家已利用整体胚胎所做的连续切片进行重建,以了解整个胚胎内部的立体结构(图1-1)。

扫描电子显微镜可显示整个胚胎或胚胎部分结构(细胞、组织或器官)的表面立体形态。近些年来透射电子显微镜已应用于观察胚胎的超微结构。

(三) 胚胎免疫组织化学技术

免疫组织化学(immunohistochemistry)是应用抗原抗体结合原理,检测组织细胞内多肽、蛋白质等大分子物质的分布。这种方法的特异性强,敏感度高,近年来发展迅速,应用广泛,成为胚胎学科的重要研究手段。尤其是单克隆抗体技术的成功以及标记技术的不断改

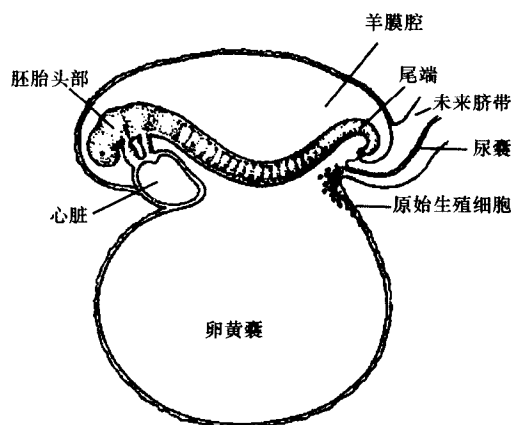


图 1-1 三周人胚

进和灵敏度的提高,使此项技术的进展日新月异,在研究中广泛得到应用。胚胎的多肽和蛋白质种类很多,具有抗原性。从被免疫动物的血清中提出抗体,以荧光素、酶或铁蛋白等标记,再用这种标记抗体处理组织切片或细胞,标记抗体即与细胞内相应蛋白质(抗原)发生特异性结合,通过一般光学显微镜、荧光显微镜电镜观察,即可检测蛋白质合成的部位与分布。

标记抗体与抗原结合方式有两种。一种是直接法,即如上述用标记抗体与样品中的抗原直接结合。这种方法操作简便,但灵敏度不够满意。另一种是间接法,是将分离的抗体或抗血清(第一抗体)作为抗原给另一种动物,制备出该抗体(抗原)的抗体(第二抗体),再用标记物标记第二抗体,然后用第一抗体和第二抗体先后处理样品,最终形成抗原-第一抗体标记第二抗体复合物。间接法的灵敏度比直接法更高。

(四) 胚胎原位杂交

1. 全胚原位杂交

全胚原位杂交(whole embryo in situ hybridization)是广泛用于胚胎发育调控基因表达研究的一种技术。近年来该技术发展较快,不仅可以检测到较弱的杂交信号,而且可以多色杂交,检测多个基因的表达情况。

全胚原位杂交的基本原理是用各种标记物标记与体内特定 mRNA 互补的 RNA 分子(反义 RNA),以它们作为探针与动物的整体胚胎进行原位杂交,然后用相应的抗体来检测特异探针的分布情况。

全胚原位杂交有单色与双色全胚原位杂交两种,两者探针的制备、胚胎的固定杂交及洗脱方法步骤相同,只是检测方法有所不同。前者只用一种标记物标记探针,与胚胎杂交,然后对探针用相应的抗体进行检测;后者用两种不同的标记物(如 DIG-11-dUTP、生物素-11-dUTP 等)分别标记两个探针,同时与胚胎杂交,然后对两个探针分别用相应的抗体进行检测。

2. 胚胎组织切片原位杂交

原位杂交是研究胚胎基因表达的常用方法。虽然全胚原位杂交简单易行,但在许多情况下该方法还达不到研究的要求,因而需要在胚胎的组织切片上进行杂交,在胚胎的组织切片上进行原位杂交的有利因素在于不存在探针不能渗入到胚胎内部的问题。

(五) 发育基因的启动子分析

启动子调控作用分析是研究胚胎发育基因功能的一种重要方法,特别是在研究基因时空表达的分子机制方面,更是有突出的作用。通常,启动子分析包括基因特异调控序列、启动子和增强子元件的鉴别,它们都是基因转录活性的重要调控单元。启动子分析的第一步是将一系列大小不同的启动子的片段克隆到含有报告基因的载体中,然后通过比较这一缺失系列中启动子的活性,找到启动子中具有调控能力的序列。随后,将被鉴定出来的调控序列分为更小的片段,并且克隆到含有异源活性启动子和报告基因的载体中,再次比较缺失系列启动子的活性,以确定调控序列中的最关键序列。最后,可通过野生型启动子中单

个碱基的点突变,进一步确定基因的关键调控元件。

有多种方法可用于体内启动子分析,如转基因动物、显微注射等,在不同的动物中可选用不同的方法,但比较而言,转基因动物法较为费时,而且需要一些特殊条件,而显微注射法较为简单。

(六) 基因表达的核糖核酸酶保护分析

核糖核酸酶保护实验是定量分析基因转录水平的常用方法之一,它对 mRNA 的分析具有灵敏度高(比 Northern 杂交和斑点杂交灵敏 8~10 倍)、特异性强的特点。另外,核糖核酸酶保护实验还可用于转录起始位点的确定、内含子/外显子边界的确定、选择性剪接分析以及确定转入到胚胎中的核酸的降解率等方面的研究。

核糖核酸酶保护实验的基本原理是,以待分析的目标 DNA 序列作为模板,用反转录的方法合成与之互补的放射性标记的探针。将此探针加入到 RNA 混合物中后,它便可与目标 RNA 杂交,形成双链 RNA。由于该双链对核糖核酸酶具有抵抗力,因此,杂交体系中未杂交的样品 RNA 及过量的探针全部被核糖核酸酶消化,只剩下杂交形成的双链 RNA。核糖核酸酶失活后,通过凝胶电泳和放射自显影检测被保护的 RNA 探针的量,即 RNA 样品中目标 RNA 的量。

(七) 抑制性差减杂交技术

抑制性差减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)最早见于 1996 年 6 月 Clontch 公司、加州大学旧金山分校和俄罗斯科学院合作的研究报道,是一种简便而高效的通过比较两种总 mRNA,而克隆只存在于其中一种总 mRNA 中特异表达产物的新方法。例如,可以快速从不同细胞系、不同组织间或同一细胞系、同一组织在不同条件下(如发育时间的差异、病理性差异等)克隆出差别表达基因。其基本原理是以抑制 PCR 为基础的 DNA 差减杂交。抑制 PCR 是利用 DNA 链内退火优于链间退火,比链间退火更稳定的特点,使非目的系列片段两端反向重复系列在退火时产生类似于“锅柄”的结构,无法与引物配对,选择性地抑制了非目的基因片段的扩增。同时,该方法运用了杂交二级动力学原理,即高丰度的单链 cDNA 在退火时产生同源杂交的速度要快于低丰度的单链 cDNA,从而使原来在丰度上有差别的单链 cDNA 相对含量达到基本一致。

(八) 放射自显影术

放射自显影术是将某种放射性核素或是放射性核素标记的物质注入生物体内或置入培养液中,使放射性核素或放射性核素标记的物质与细胞或组织内的某些物质相结合,以达到对该物质的定位研究,其精确程度往往胜于组织化学方法。

光镜观察下的放射自显影片的制作:可将胚胎或胚胎的部分结构置于含有放射性核素标记的氨基酸或核酸(RNA, DNA)前身物的溶液中,经一定时间后,将胚胎从溶液中取出,制成石蜡切片并染色。切片表面裱贴感光底片或涂敷乳胶。与胚体内蛋白质或核酸相结合的放射性核素,在曝光期间其射线作用于底片或乳胶使之感光,经显影、定影后凡有放射性核素所在的部位,底片或乳胶上则出现细小的黑色银颗粒。从银粒的分布可对细胞或组

织内标记的某种蛋白质或核酸(RNA,DNA)进行定位和定性。目前放射自显影尚可结合电镜进行观察。

过去,放射自显影术仅限于对组织中不溶性物质的定位研究。如今,对于可溶性物质(如类固醇激素等)亦可达到定位的目的。

(九) 示踪法

胚胎生长发育是一种动态过程。细胞迁移即细胞位置上的变化,因而多种类型的标记物被用来追踪胚胎中细胞移动情况。示踪法中经典研究方法之一是活体染色法,即将对活细胞无毒性或毒性很小的染料[如尼罗蓝硫酸盐(nile blue sulfate)或中性红(neutral red)]注入胚体内,被体内某些细胞所摄取,对于这些细胞则可在较长时期内追踪观察其位置上的变化。这种方法曾用于观察两栖类原肠胚形成时细胞的移动。有人应用无活性的炭颗粒[如血炭(blood charcot)]作为标记物,以观察鸡胚内邻近原条细胞的移动情况。

胚胎衍化过程从受精卵开始。在细胞分裂和分化过程中,细胞内可合成高度特异性蛋白质。应用荧光抗体法,可对特异性蛋白质进行定位,从而有助于证实哪些细胞内含有这种特异性蛋白,达到示踪的目的。

利用放射性核素标记细胞内成分(如核糖核酸)所做的放射自显影片,对细胞的移行可做出精确的定位。其缺点是标记物可随细胞分裂而逐渐减少。因而,对于迅速分裂的细胞,借此方法进行较长时间的追踪是不够理想的。

鹤鹑-鸡标记系统是人们在鸟类胚胎研究中设计的一种自然标记系统。在鹤鹑的细胞核中,核仁总是与一团或几团异染色质相聚。这些异染色质块可用 Feulgen-Ressenbeck 染色法清楚地显示出来。用苏木精染色时,鹤鹑细胞的核仁着色深而大,当把鹤鹑胚的细胞移植到鸡胚中时,仍然保持其细胞核的上述特征,成为一种自然标记细胞,很容易与鸡胚细胞鉴别开来。取鹤鹑胚的一部分如一段神经嵴等位同步地移到鸡胚中,嵌合胚能够正常发育,在发育的不同时期取材,制片观察,就可以清楚地知道神经嵴细胞的迁移情况,这克服了上述其他示踪方法的缺点。

(十) 显微外科技术

显微外科术是显微镜下进行手术操作的技术,有着很大的优越性。在基础医学方面,显微外科术促进了实验胚胎学的发展。开始是部分切除术,即切除胚胎的一部分,进而观察胚胎在部分结构缺损下将会产生什么样的后果。如有的学者将两细胞时期蛙胚的两个细胞完全分开,结果每个细胞均能发育成一完整的个体。从而为反对谬误的先成论学说提供了实验依据。

在胚胎发生的最早阶段,胚胎的某一组织能显著地影响相邻的另一组织的发生,称为诱导作用,如脊索能诱导中枢神经系统的发生。关于这种诱导现象也是在应用显微外科移植手术下才取得的。

通过显微外科进行的另外一些实验,如切取小块胚胎组织置于人工培养环境内生长或植入宿主营养供应好的部位(在鸟类常移植至尿囊绒毛膜上,哺乳类则移植于眼晶状体或腹膜血管区域),发现有些胚胎原基在不受其他组织的影响下有着明显的自我分化能力。

由此说明移植的细胞内有着足以直接向器官分化发育的信息。为了探讨核与胞质的关系,国内外胚胎学家已深入到了核移植范畴。

近些年来,胚胎移植技术的临床应用也取得了很大的进展。如在“试管婴儿”的研究中,现已采用显微注射技术,即把一个活动能力强、生命力旺盛的精子,借助于显微操作仪把它直接注射到围卵周隙或注入到卵细胞质内,形成受精卵并开始卵裂,再将这个胚卵移回到母体子宫继续发育,这样降生的婴儿称为“第二代试管婴儿”。

(十一) 培养技术

研究胚胎发育的最有趣和有效方法之一为培养法,可将整个胚胎或胚胎成分置于人工环境内生长。可分为细胞培养、组织培养或器官和整个胚胎培养,每一类型的培养原理基本上是一样的。人工培养液尽可能与它在胚内所处的环境类似。理想的培养液是完全由化学物所配制的,但一般需加入生物制品(如血清或整个胚胎提取液),以供给必需的生长因子。目前的培养液中一般需要5%~15%的动物或人的血清。血清中的成分十分复杂,有些成分对所培养的胚胎细胞不是必需的,甚至还有抑制作用,即使所需,也不一定是最佳浓度,因而无血清培养,甚至无蛋白培养已成为亟待解决的问题。目前市场上已有各种无血清培养液出售。

要了解组织或器官本身的生长分化特点,应用离体培养法具有一定的优越性,它可免除体内各种复杂因素的影响,并可控制实验条件,进行有关因素的分析。如将甲状腺与垂体一并培养,可观察垂体对胚胎甲状腺的形态和功能分化的影响。

近年来,联合培养法已应用于动物受精卵、人受精卵的培养。如将人的受精卵与猴的肾小管上皮或牛的输卵管上皮一起体外培养,结果人受精卵卵裂球非常健壮,达到胚泡期的比率明显提高。

(十二) 生殖工程

以人工的方法进行生育的技术称为生殖工程(reproductive engineering),它是以人工授精与胚胎移植为中心,还包括低温冻储精子、卵子、显微注射等技术。人类体外受精与胚胎移植的研究开始于20世纪60年代。英国Edwards和Stephoe两位学者经过近20年的辛勤工作,终于在1978年7月25日诞生了世界上第一例“试管婴儿”(test tube baby)。目前,“试管婴儿”已遍及全球,近几万例之多。培育“试管婴儿”,包括药物诱发超排卵、采集卵子、采精与精子体外获能、人工授精、体外培养与胚胎移植等步骤,但主要是超排卵、人工授精和体外培养、胚胎移植这三项关键性技术,又称培育试管婴儿的“三关”。

(十三) 转基因技术

转基因技术(transgene)是生殖工程与遗传工程相结合而产生的一种新的技术方法。

基因转移是利用物理、化学或生物学手段将外源基因导入受体细胞并使之表达的一种技术。采用转基因技术培养的动物叫转基因动物(transgene animal)。

转基因技术为改造生物品种开辟了前景广阔的新途径,把优良性状基因通过基因转移导入原来不具备这些性能的生物体内,达到改良品种的目的。采用此技术可培育生长快或