



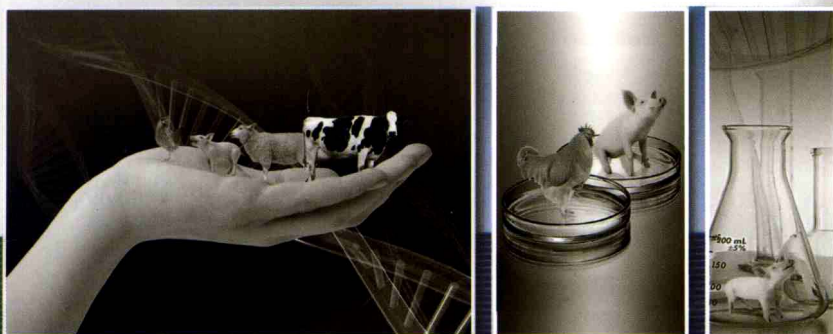
国家出版基金项目  
NATIONAL PUBLICATION FOUNDATION

现代农业高新技术成果丛书

# 动物克隆与基因组编辑

## Animal Cloning and Genome Editing

李宁 主编



中国农业大学出版社

CHINA AGRICULTURAL UNIVERSITY PRESS



国家出版基金项目  
NATIONAL PUBLICATION FOUNDATION

现代农业高新技术成果丛书

# 动物克隆与基因组编辑

Animal Cloning and Genome Editing

李 宁 主编

中国农业大学出版社

· 北京 ·

## 内 容 简 介

本书系统地介绍了动物克隆与基因组编辑技术的基本理论、技术方法及产业化应用前景。全书共 12 章,包括动物基因结构与表达调控、动物基因组编辑技术、动物配子发生受精及繁殖技术、体细胞克隆、鸡转基因技术、动物胚胎干细胞及诱导性干细胞、动物生物反应器、异种器官移植、人类疾病的动物模型、转基因动物新品种培育、转基因动物生物安全评价和转基因动物产业化。近年来克隆与转基因技术迅猛发展,改变了整个生命科学技术和动物品种培育研究的现状,因此本书在系统阐述经典技术体系的同时着重介绍了新技术的技术原理、研究进展及应用成果,力求使本书内容更全面、更广泛、更前沿。

本书是国内第一本系统介绍动物克隆和基因组编辑技术最新成就的专著,可作为高等院校动物科学、动物生物技术的教学参考书,也可作为相关科研工作者和研究生的专业参考书。

### 图书在版编目(CIP)数据

动物克隆与基因组编辑 / 李宁主编. —北京:中国农业大学出版社,2012.6  
ISBN 978-7-5655-0475-4

I. ①动… II. ①李… III. ①转基因动物-研究 IV. ①Q789

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 009135 号

书 名 动物克隆与基因组编辑  
作 者 李 宁 主 编

责任编辑 高 欣 张秀环

责任校对 陈 莹 王晓凤

封面设计 郑 川

出版发行 中国农业大学出版社

社 址 北京市海淀区圆明园西路 2 号

邮政编码 100193

电 话 发行部 010-62818525,8625

读者服务部 010-62732336

编辑部 010-62732617,2618

出版部 010-62733440

网 址 <http://www.cau.edu.cn/caup>

e-mail [cbsszs@cau.edu.cn](mailto:cbsszs@cau.edu.cn)

经 销 新华书店

印 刷 涿州市星河印刷有限公司

版 次 2012 年 6 月第 1 版 2012 年 6 月第 1 次印刷

规 格 787×1092 16 开 26.5 印张 660 千字

定 价 158.00 元

图书如有质量问题本社发行部负责调换

# 现代农业高新技术成果丛书

## 编审指导委员会

主任 石元春

副主任 傅泽田 刘 艳

委员 (按姓氏拼音排序)

高旺盛 李 宁 刘庆昌 束怀瑞

佟建明 汪懋华 吴常信 武维华

# 编写人员

主 编 李 宁

副主编 张 然 王媛媛

参 编 毕明君 曹祖兵 崔 丹 陈 磊  
杜旭光 贺 津 胡文萍 李庆原  
刘小娟 鲁 丹 罗俊杰 李金秀  
李 笠 宋致远 隋丹丹 孙照霖  
杨鹏华 王宇航 王 弘 许建香  
叶建华 周光斌 张 伟 张运海  
张广春 赵 杰 王少华

# 出版说明

---

瞄准世界农业科技前沿,围绕我国农业发展需求,努力突破关键核心技术,提升我国农业科研实力,加快现代农业发展,是胡锦涛总书记在2009年五四青年节视察中国农业大学时向广大农业科技工作者提出的要求。党和国家一贯高度重视农业领域科技创新和基础理论研究,特别是863计划和973计划实施以来,农业科技投入大幅增长。国家科技支撑计划、863计划和973计划等主体科技计划向农业领域倾斜,极大地促进了农业科技创新发展和现代农业科技进步。

中国农业大学出版社以973计划、863计划和科技支撑计划中农业领域重大研究项目成果为主体,以服务我国农业产业提升的重大需求为目标,在“国家重大出版工程”项目基础上,筛选确定了农业生物技术、良种培育、丰产栽培、疫病防治、防灾减灾、农业资源利用和农业信息化等领域50个重大科技创新成果,作为“现代农业高新技术成果丛书”项目申报了2009年度国家出版基金项目,经国家出版基金管理委员会审批立项。

国家出版基金是我国继自然科学基金、哲学社会科学基金之后设立的第3大基金项目。国家出版基金由国家设立、国家主导,资助体现国家意志、传承中华文明、促进文化繁荣、提高文化软实力的国家级重大项目;受助项目应能够发挥示范引导作用,为国家、为当代、为子孙后代创造先进文化;受助项目应能够成为站在时代前沿、弘扬民族文化、体现国家水准、传之久远的国家级精品力作。

为确保“现代农业高新技术成果丛书”编写出版质量,在教育部、农业部和中国农业大学的指导和支持下,成立了以石元春院士为主任的编审指导委员会;出版社成立了以社长为组长的项目协调组并专门设立了项目运行管理办公室。

“现代农业高新技术成果丛书”始于“十一五”,跨入“十二五”,是中国农业大学出版社“十二五”开局的献礼之作。它的立项和出版标志着我社学术出版进入了一个新的高度,各项工作迈上了新的台阶。出版社将以此为新的起点,为我国现代农业的发展,为出版文化事业的繁荣做出新的更大贡献。

中国农业大学出版社

2010年12月

# 前 言

---

1996年7月5日,世界上第1只克隆的高等哺乳动物“多莉”绵羊诞生了。这是英国罗斯林研究所威尔穆特博士团队经过多年刻苦攻关的杰作;当论文以封面故事刊登在1997年2月27日《自然》科学杂志时,立即引起了科学界和社会各界的高度关注。毫无疑问,这是近数十年来生命科学技术领域中最重大的突破之一。人们不只是对神奇的高等动物“复制”技术感到震撼,也特别关注这项技术滥用可能造成的社会风险。十多年过去了,事实证明人们担心的克隆技术风险并没有出现,而其对生命科学技术发展却有着极其深远的影响。动物克隆技术出现,催生了治疗性克隆技术,预示着细胞治疗新时代的来临。由于治疗性克隆必须以人类卵母细胞为基础,而人类卵母细胞来源面临着社会伦理的严格限制,这又导致了诱导性干细胞(iPS)技术的诞生。动物克隆技术本身也在飞速地发展,当克隆“多莉”时,威尔穆特博士的团队重构了277个人造胚胎,成功率低于0.4%,而今天克隆效率已经提高了数十倍。在一些发达国家,许许多多优秀种畜都被克隆,并在实际生产中广泛应用,极大地提高了优质动物品种生产的效率,而大多数国家的政府也颁布了克隆动物与普通动物同样安全的法规。动物克隆技术直接改变了大动物转基因技术研究方向,催生了动物基因组编辑技术(genome editing)。实际上,在20世纪80年代末英国PPL药用蛋白治疗公司资助威尔穆特博士团队从事动物克隆技术研发就是为了提高家畜转基因的效率,今天的发展成就,也远远超出了当年的想象。由于大动物缺少胚胎干细胞(ES),不能像小鼠那样对小鼠胚胎干细胞进行各类基因组修饰,然后通过嵌合体制作途径获得基因组精准修饰的个体。克隆技术的出现,使得能够在大大动物体细胞上进行各种各样的基因组编辑后,再利用这些细胞通过克隆技术获得个体。显然,这种技术方法产生基因组修饰动物的效率会高于小鼠嵌合体制备的途径。现在,我们能够对家畜的基因组DNA作任何一种特定的遗传修饰,如定点的插入、缺失、改变单个碱基等。然而,动物克隆和基因组编辑技术的进一步发展面临着更大的困难,动物克隆的机制没有阐明,体细胞克隆和基因组编辑技术的效率较低,还不能实现通量化操作。人才,特别是具有创新性思维的青年人才,是破解这些难题的主力军,而要培育这样的青年才干,需要具有相关科技专著的营养。目前,在世界各国的生命科学技术的书籍,尚没有对动物克隆和基因组编辑技术最新成就进行总结的专著,鉴于这2项技术正迅猛地改变整个生命科学技术和动物品种培育研

发的现状,因此,我们感到有责任编写这样一本专著,希望能够和国内广大同行进行深入交流和相互学习,共同推动我国动物克隆和基因组编辑技术的创新发展。由于我们是第一次编写这样的著作,主要编写者又是来自工作在第一线的青年教师和博士研究生,相关视野和知识范围有限,难免有挂一漏万和不当之处,敬请大家批评指正。

李 宁

2012. 2



# 目 录

<b>第 1 章 动物基因结构与表达调控</b> .....	<b>1</b>
1.1 真核生物的功能基因 .....	1
1.1.1 基因研究的发展 .....	1
1.1.2 真核生物的基因结构 .....	4
1.2 真核生物基因的表达与调控 .....	8
1.2.1 DNA 水平的基因表达调控 .....	9
1.2.2 真核生物转录水平的基因表达调控 .....	11
1.2.3 转录后调控 .....	17
1.2.4 真核生物翻译水平的基因表达调控 .....	20
1.3 应用于转基因动物的基因表达调控 .....	20
1.3.1 组成型启动子 .....	20
1.3.2 特异性启动子 .....	23
1.3.3 诱导型启动子 .....	24
参考文献 .....	27
<b>第 2 章 动物基因组编辑技术</b> .....	<b>32</b>
2.1 动物基因组编辑技术的概述和方法 .....	32
2.1.1 原核期胚胎显微注射技术 .....	32
2.1.2 体细胞核移植技术 .....	32
2.1.3 逆转录病毒载体技术 .....	34
2.1.4 胚胎干细胞技术 .....	35
2.1.5 精子载体技术 .....	36
2.1.6 原始生殖细胞介导技术 .....	37
2.1.7 人工染色体技术 .....	38
2.1.8 基因打靶技术——基因的定点整合技术 .....	40

2.2 动物基因组编辑技术的策略	46
2.2.1 载体表达策略	46
2.2.2 基因打靶策略	51
2.2.3 新型基因编辑策略	58
2.3 动物基因组编辑技术的困难与展望	72
2.3.1 动物基因组编辑技术亟待解决的问题	72
2.3.2 动物基因组编辑技术展望	73
参考文献	74
<b>第3章 动物配子发生、受精及繁殖技术</b>	<b>79</b>
3.1 精子发生	79
3.1.1 有丝分裂期	79
3.1.2 减数分裂期	81
3.1.3 精子形成期	81
3.1.4 精子体外发生与体外诱导	82
3.2 卵子发生	82
3.2.1 卵子的形态与结构	82
3.2.2 卵原细胞的形成与增殖	83
3.2.3 卵母细胞的生长发育	84
3.2.4 卵母细胞的成熟	84
3.2.5 卵母细胞的体外诱导	84
3.3 受精	86
3.3.1 受精研究简史	86
3.3.2 受精过程	87
3.4 繁殖技术	89
3.4.1 体外受精	89
3.4.2 胚胎移植	93
参考文献	96
<b>第4章 体细胞克隆</b>	<b>99</b>
4.1 体细胞克隆的发展	99
4.1.1 体细胞克隆的相关概念	99
4.1.2 体细胞克隆的发展历史	100
4.2 体细胞克隆的分子机理研究	104
4.2.1 供体细胞核重构	106
4.2.2 卵母细胞的激活	107
4.2.3 供体细胞核重编程	107
4.3 体细胞克隆的技术环节及其影响因素	113
4.3.1 供体细胞准备	113

4.3.2	受体卵母细胞的准备 .....	114
4.3.3	克隆胚胎的构建方法 .....	116
4.3.4	克隆胚胎的激活 .....	117
4.3.5	克隆胚胎的体外培养 .....	119
4.3.6	克隆胚胎的胚胎移植 .....	119
4.4	体细胞克隆的应用前景与存在的问题 .....	120
4.4.1	体细胞克隆的应用前景 .....	120
4.4.2	体细胞克隆存在的问题 .....	124
	参考文献 .....	127
<b>第5章</b>	<b>鸡转基因技术 .....</b>	<b>136</b>
5.1	鸡转基因技术介绍 .....	136
5.1.1	什么是鸡转基因技术 .....	136
5.1.2	为什么要发展鸡转基因技术 .....	137
5.1.3	鸡转基因技术发展现状 .....	143
5.2	鸡转基因技术发展 .....	145
5.2.1	鸡的生殖发育 .....	145
5.2.2	各种技术的发展 .....	149
5.3	胚盘下腔注射慢病毒法制备转基因鸡 .....	154
5.3.1	实验材料 .....	155
5.3.2	准备实验 .....	156
5.3.3	胚盘注射及2次换壳 .....	157
5.3.4	转基因鸡的获得及鉴定 .....	159
	参考文献 .....	160
<b>第6章</b>	<b>动物胚胎干细胞及诱导性干细胞 .....</b>	<b>162</b>
6.1	动物早期胚胎发育 .....	163
6.1.1	小鼠早期胚胎发育概况 .....	163
6.1.2	合子的形成 .....	165
6.1.3	卵裂及其囊胚的形成 .....	166
6.1.4	植入后发育 .....	167
6.1.5	发育中的印迹作用 .....	169
6.2	胚胎干细胞 .....	169
6.2.1	干细胞的定义、分类及其研究意义 .....	169
6.2.2	干细胞研究历史及进展 .....	170
6.2.3	胚胎干细胞基础生物学机制 .....	171
6.3	诱导多能干细胞 .....	177
6.3.1	诱导多能干细胞概述 .....	177
6.3.2	诱导性干细胞基础生物学机制 .....	179

6.4	干细胞治疗研究及临床应用	181
6.4.1	造血干细胞移植治疗血液系统疾病及肿瘤	181
6.4.2	干细胞——糖尿病患者的希望	183
6.4.3	干细胞治疗烧伤和皮肤溃疡	184
6.4.4	神经干细胞——神经变性疾病患者的希望	185
6.5	伦理与规则	186
6.5.1	争论的由来	187
6.5.2	争论的焦点	188
6.5.3	规则的制定	189
6.5.4	真理是不变的,伦理是发展的	189
	参考文献	190
<b>第7章</b>	<b>动物生物反应器</b>	<b>197</b>
7.1	动物生物反应器概述	197
7.1.1	动物生物反应器的概念	197
7.1.2	动物生物反应器简史	197
7.2	转基因动物生物反应器的种类	200
7.2.1	动物血液生物反应器	201
7.2.2	动物膀胱生物反应器	202
7.2.3	动物唾液腺生物反应器	202
7.2.4	动物禽蛋生物反应器	203
7.2.5	家蚕生物反应器	204
7.2.6	动物乳腺生物反应器	204
7.3	转基因动物乳腺生物反应器的应用	205
7.3.1	转基因动物乳腺生物反应器的发展及现状	205
7.3.2	转基因动物乳腺生物反应器的技术路线	208
7.3.3	转基因动物乳腺生物反应器的国内外产业化现状	210
	参考文献	212
<b>第8章</b>	<b>异种器官移植</b>	<b>215</b>
8.1	器官移植的历史与现状	215
8.1.1	远古时代	215
8.1.2	器官移植的产生和发展	216
8.1.3	异种器官移植的先驱	216
8.1.4	异种器官移植的近现代发展	217
8.2	正在进行的异种器官移植	218
8.2.1	胰岛移植	219
8.2.2	体外灌注	219
8.2.3	神经细胞移植	219

8.2.4 其他细胞或组织移植 .....	220
8.3 异种器官移植所面临的生理学及解剖学障碍 .....	221
8.4 异种器官移植中的免疫学障碍及解决办法 .....	222
8.4.1 异种器官移植的免疫学障碍简介 .....	222
8.4.2 免疫学障碍的应对办法 .....	229
8.5 内源性病毒的潜在风险 .....	239
8.5.1 PERV 简介 .....	239
8.5.2 PERV 的感染性 .....	241
8.5.3 去除和抑制内源性病毒的方法 .....	241
参考文献 .....	244
<b>第 9 章 人类疾病的动物模型 .....</b>	<b>251</b>
9.1 概论 .....	251
9.1.1 动物疾病模型的定义 .....	251
9.1.2 动物疾病模型的分类 .....	252
9.1.3 动物疾病模型的选择 .....	253
9.1.4 动物疾病模型的制作 .....	255
9.1.5 动物福利 .....	257
9.2 常用实验动物 .....	258
9.2.1 秀丽隐杆线虫 .....	258
9.2.2 果蝇 .....	259
9.2.3 斑马鱼 .....	260
9.2.4 啮齿类 .....	262
9.2.5 猪 .....	264
9.2.6 非人灵长类 .....	265
9.3 常见疾病的动物模型 .....	266
9.3.1 神经系统疾病 .....	266
9.3.2 心血管系统疾病 .....	270
9.3.3 糖尿病 .....	274
9.3.4 听力 .....	274
9.3.5 肿瘤 .....	276
参考文献 .....	276
<b>第 10 章 转基因动物新品种培育 .....</b>	<b>287</b>
10.1 转基因动物新品种培育概述 .....	287
10.1.1 动物品种和品系 .....	287
10.1.2 动物新品种培育的传统方法 .....	289
10.1.3 转基因动物新品种培育发展史 .....	290
10.1.4 动物传统育种与转基因育种的异同 .....	291

10.2 基因修饰小鼠作为新品种培育模型	292
10.2.1 改良经济性状基因	292
10.2.2 增强抗病性基因	297
10.2.3 环保型鼠	298
10.3 转基因猪新品种培育	299
10.3.1 增强抗病能力	299
10.3.2 提高产肉率和改善肉品质	310
10.3.3 环保型猪	313
10.4 转基因牛新品种培育	314
10.4.1 增强抗病能力	314
10.4.2 改善乳品质	320
10.4.3 提高产肉率和改善肉品质	328
10.5 转基因羊新品种培育	330
10.5.1 改良生长性状	330
10.5.2 增强抗病能力	331
10.5.3 改善乳品质	332
10.5.4 改良毛色毛质	333
10.6 其他转基因动物新品种培育	333
10.6.1 转基因鱼新品种培育	335
10.6.2 转基因兔新品种培育	339
10.7 转基因动物新品种的培育现状及产业化	339
10.7.1 转基因动物新品种的培育现状	339
10.7.2 转基因动物新品种的产业化	341
10.7.3 展望	342
参考文献	342
<b>第 11 章 转基因动物生物安全评价</b>	<b>347</b>
11.1 生物安全概念的由来和定义	347
11.1.1 生物安全概念的由来	347
11.1.2 生物安全的定义	348
11.2 转基因动物生物安全研究的产生和意义	349
11.3 全球有关转基因生物安全的立法机构与政策法规	349
11.3.1 欧洲及俄罗斯	350
11.3.2 北美洲	351
11.3.3 亚洲	352
11.4 转基因动物生物安全研究的内容	354
11.4.1 环境安全	355
11.4.2 动物健康与福利	357
11.4.3 人类健康与食品安全	359

11.5 转基因动物生物安全评价的原则和方法	361
11.5.1 转基因动物生物安全评价的原则	361
11.5.2 转基因动物生物安全评价方法	362
11.6 转基因动物生物安全评价的现状和发展趋势	364
参考文献	367
<b>第12章 转基因动物产业化</b>	<b>375</b>
12.1 国内外转基因动物产业化现状	375
12.1.1 国际转基因动物产业化现状	375
12.1.2 我国转基因动物产业化现状	378
12.2 转基因克隆动物产业化相关公司的发展现状	384
12.2.1 转基因克隆动物产业化市场概述	384
12.2.2 国内外转基因克隆动物产业化公司	385
12.2.3 转基因克隆动物产业化市场现状与展望	396
12.3 各国推进转基因生物产业化进展情况	397
12.3.1 世界各国对转基因生物的态度	397
12.3.2 各国生物技术产业的发展及融资情况	403

# 第 1 章

## 动物基因结构与表达调控

### 1.1 真核生物的功能基因

#### 1.1.1 基因研究的发展

基因是编码蛋白质、RNA 等具有特定功能的遗传信息的基本单位,是基因组上的一段 DNA 序列。地球上每个生物体的遗传特性是由该生物体的基因组决定的。基因组是一段很长的核苷酸序列,能够提供构建机体所需的所有基本信息。基因组从功能上可分为功能不同的基因(gene)。不同生物的基因组含有的基因数量相差很大,其中人类含有约 25 000 个基因,而在一些低等生物中仅含个几百个基因。

##### 1.1.1.1 基因的雏形——遗传因子的诞生

1865 年 2 月,遗传学的奠基人孟德尔(Gregor Johann Mendel,1822—1884)在奥地利自然科学学会会议上汇报了自己植物杂交的研究结果,并在次年于奥地利自然科学学会年刊上发表了著名的《植物杂交试验》的论文。文中提出,生物体每一个性状都是通过遗传因子来传递的,遗传因子是独立的遗传单位。这样把可观察的遗传性状和控制它的内在的遗传因子联系起来,遗传因子作为基因的雏形名词诞生了。

##### 1.1.1.2 核酸的发现

1868 年,瑞士化学家米歇尔(F. Miesher,1844—1895)先从脓细胞分离出细胞核,用碱抽提再加入酸,得到一种氮和磷含量特别丰富的沉淀物质,当时称它为核质。1872 年,他又从鲑鱼的精子细胞核中发现了大量类似的酸性物质,随后有人在多种组织细胞中同样发现了这类物质的存在。由于这类物质都是从细胞核中提取出来的,又都具有酸性,因此,被称为核酸。多年以后,才有人从动物组织和酵母细胞中分离出含蛋白质的核酸。

##### 1.1.1.3 基因概念的具体化

1909 年,丹麦遗传学家约翰逊创造了“基因”这一术语,用来表达孟德尔的遗传因子,但还



只是提出了遗传因子的符号,没有提出基因的物质概念。摩尔根(Thoman Hunt Morgan, 1866—1945)和他的学生们利用果蝇作了大量的潜心研究。1926年,他的巨著《基因论》出版,从而建立了著名的基因学说。他还绘制了著名的果蝇基因位置图,首次完成了当时最新的基因概念的描述,即基因以直线形式排列,它决定着—个特定的性状,而且能发生突变并随着染色体同源节段的互换而交换。它不仅是决定性状的功能单位,而且是一个突变单位和交换单位。至此,人们对基因概念的理解更加具体和丰富了。但基因到底是何物?其物质结构和化学组成怎样?它是怎样决定遗传性状的?当时一无所知。

#### 1.1.1.4 核酸——遗传信号的载体

20世纪20年代,德国生理学家柯塞尔(A. Kossel, 1853—1927)和他的学生琼斯(W. Johnew, 1865—1935)、列文(P. A. Levene, 1896—1940)的研究结果证明了核酸的化学成分及其最简单的基本结构。核酸由4种不同的碱基即腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C)及核糖、磷酸组成。

1928年,生理学家格里菲斯(J. Griffith)在研究肺炎球菌时发现,肺炎双球菌有2种类型。其中一种是S型双球菌,外包有荚膜,不能被白细胞吞噬,具有强烈毒性;另一种是R型双球菌,外无荚膜,容易被白细胞吞噬,没有毒性。他设计了肺炎双球菌实验(参考图1.1),并证实了这种能转移的物质。格里菲斯把它命名为转化因子。

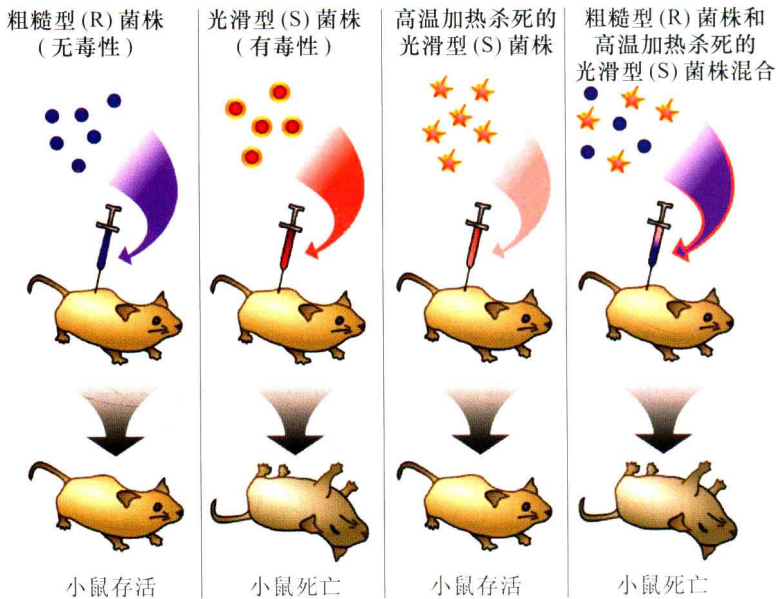


图 1.1 肺炎双球菌转化实验示意图

1944年,研究结果证明,转化因子就是核酸(DNA),DNA是将R型肺炎双球菌转化为S型双球菌的信息载体。

1949年,鲍林(L. C. Pauling, 1901—1994)与合作者在研究镰刀型细胞贫血症时推测基因决定着多肽链的氨基酸顺序。至此,20世纪40年代末至20世纪50年代初,基因是通过合成特定蛋白质以控制代谢的方式来决定性状的原理变得清晰起来。