



动物细胞工程

原理与实践

● 冯伯森 王秋雨 胡玉兴 编著



科学出版社

内 容 简 介

本书以细胞工程的研究为基础,内容涉及动物细胞工程的各主要知识领域,包括动物细胞工程基础、动物细胞培养、单克隆抗体、胚胎发育等。本书在阐明原理的基础上,着重介绍了其在实验和生产中的应用方法。本书可作为从事细胞生物学、发育生物学教学、科研工作者的工具书,也可供生物技术专业的研究生和本科生参考。

图书在版编目(CIP)数据

动物细胞工程原理与实践/冯伯森等编著.-北京:科学出版社, 2000.3

ISBN 7-03-007492-0

I. 动… II. 冯… III. 动物-细胞工程 IV. Q952

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 10176 号

ZM39/02
科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

科地王印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

2000年3月第一版 开本:850×1168 1/32

2000年3月第一次印刷 印张:11 1/4

印数:1-2800

字数:296 000

定价:26.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换(新欣))

前 言

20 世纪,生物学领域所取得的成就是前所未有的。由于数、理、化科学的原理和实验技术广泛地应用于生物学的各分支学科,推动了生物科学从微观世界、细胞水平,特别是分子水平来研究复杂的生命现象。而在应用研究方面取得的成果极大地促进了农业、畜牧业、食品工业和医药学的发展,作为高新技术支柱之一的生物技术必将对人类社会发展产生越来越大的影响。

现阶段细胞工程技术的成就很多已应用于生产实践中,并取得了很好的社会和经济效益。国内从事细胞工程研究和开发应用的科技人员很多,但目前我国还没有一本较系统地介绍动物细胞工程基础和各研究领域知识的专著。正是出于这个目的,我们着手编著了这本《动物细胞工程原理与实践》。

为了使读者对动物细胞工程知识有较全面的认识和了解,我们在第一部分编写了“动物细胞工程的基础”,这样便于读者在阅读以后的几部分内容时对一些概念和相关知识的理解。后五部分是以专题的形式较系统地介绍了有关知识和研究进展,结合作者的研究实践,着重介绍了各种研究方法和应用技术。我们希望本书可以作为动物细胞工程教学、研究和实践工作者的工具书,同时,也可以供相关专业研究生和本科生学习参考。

本书由王秋雨编写第一、二、六部分,胡玉兴编写第三、四部分,冯伯森编写第五部分,最后由冯伯森负责统稿和校审。由于作者的知识水平和拥有资料的限制,同时也由于细胞工程知识突飞猛进的发展,本书存在的不足和错误在所难免,敬请同行专家、学者和读者批评指正。

编著者

1999.8

44408

目 录

1 动物细胞工程的基础	(1)
1.1 生殖细胞的发生	(1)
1.1.1 精子的发生	(2)
1.1.2 卵子的发生	(12)
1.2 受精作用	(30)
1.2.1 精子的成熟和获能	(30)
1.2.2 精卵识别	(33)
1.2.3 顶体反应	(34)
1.2.4 精子与透明带的相互作用	(36)
1.2.5 精卵质膜融合	(38)
1.2.6 皮层反应	(39)
1.2.7 原核变化及融合	(40)
1.3 早期胚胎发育	(41)
1.3.1 卵裂	(41)
1.3.2 桑椹胚和囊胚	(44)
1.3.3 细胞质定域	(48)
1.3.4 原肠胚	(51)
1.4 动物早期胚胎发育的分子机制	(53)
1.4.1 早期发育的基因表达	(53)
1.4.2 形态变化中的分子机制	(54)
1.4.3 发育时序的分子机制	(58)
1.5 细胞分化	(59)
1.5.1 细胞分化的基本特征	(59)
1.5.2 细胞质在细胞分化中的决定作用	(61)
1.5.3 细胞分化与基因表达	(62)
2 染色体工程	(69)

2.1	人工诱导多倍体	(69)
2.1.1	人工诱导多倍体的方法	(70)
2.1.2	多倍体倍性鉴定的方法	(73)
2.1.3	多倍体的应用及发展趋势	(75)
2.2	人工诱导雌、雄核发育	(77)
2.2.1	人工诱导雌核发育的方法	(78)
2.2.2	雌核发育的鉴别	(80)
2.2.3	雌核发育的意义	(81)
2.2.4	雌核发育的现状与展望	(83)
2.2.5	人工诱导雄核发育及展望	(84)
2.3	动物的性别控制	(85)
2.3.1	性别决定与性染色体	(85)
2.3.2	动物性别控制的途径与现状	(90)
3	细胞拆合与重组	(102)
3.1	鱼类、两栖类的细胞核移植	(103)
3.2	哺乳类的细胞核移植	(107)
3.3	克隆动物	(110)
4	细胞培养与单克隆抗体	(127)
4.1	动物细胞体外培养	(129)
4.1.1	动物细胞的特点	(130)
4.1.2	动物细胞的增殖	(133)
4.1.3	细胞群体生长	(134)
4.1.4	动物细胞培养的基本技术	(137)
4.1.5	影响动物细胞生长的环境因素	(165)
4.1.6	运动细胞的大规模培养	(167)
4.2	细胞融合	(169)
4.3	单克隆抗体技术	(180)
4.3.1	杂交瘤技术的基本原理	(185)

4.3.2	杂交瘤技术过程	(187)
4.3.3	单克隆抗体的规模化生产	(191)
4.3.4	单克隆抗体的应用	(192)
4.3.5	T 细胞杂交瘤	(195)
5	胚胎移植和试管动物	(197)
5.1	胚胎移植	(198)
5.1.1	胚胎移植的目的	(199)
5.1.2	超数排卵	(200)
5.1.3	发情的同步化	(208)
5.1.4	胚胎的采集与检查	(211)
5.1.5	移植胚胎	(216)
5.1.6	胚胎移植的应用与发展	(217)
5.2	试管动物	(219)
5.2.1	精子的采集与体外获能处理	(221)
5.2.2	卵母细胞的获得与体外成熟	(222)
5.2.3	体外受精	(230)
5.2.4	受精卵的体外培养	(233)
5.2.5	胚胎移植	(242)
5.3	生殖细胞与胚胎的冷冻保存	(242)
5.3.1	精液冷冻保存技术	(243)
5.3.2	胚胎冷冻保存技术	(247)
5.3.3	卵母细胞的冷冻保存	(253)
5.3.4	胚胎冷冻技术的现状与展望	(254)
6	转基因动物	(259)
6.1	转基因动物的原理与方法	(260)
6.1.1	目的基因的制备	(260)
6.1.2	制备转基因动物的方法	(269)
6.2	各类转基因动物研究的现状	(305)

6.2.1	转基因兔的研究	(306)
6.2.2	转基因猪的研究	(309)
6.2.3	转基因羊和牛的研究	(312)
6.2.4	转基因禽类的研究	(315)
6.2.5	转基因鱼的研究	(320)
6.2.6	转基因昆虫的研究	(321)
6.3	转基因动物的应用	(326)
6.3.1	转基因动物在生命科学基础研究中的应用…	(327)
6.3.2	转基因动物在医药研究领域中的应用	(334)
6.4	转基因动物研究存在的问题及展望	(344)
6.4.1	转基因动物的低效性	(345)
6.4.2	转入基因造成宿主基因突变问题	(346)
6.4.3	转入基因的表达问题	(346)
6.4.4	病毒转基因研究存在的问题	(347)
6.4.5	转基因动物模型与预期不符问题	(347)
6.4.6	乳腺生物反应器的问题	(348)
6.4.7	一些社会问题	(349)

1

动物细胞工程的基础

生殖细胞、受精卵及早期胚胎发育细胞是动物细胞工程操作的主要对象，诸如转基因动物、染色体工程和胚胎工程等都是以这些细胞为实验材料进行的。考虑到以后几章内容的需要，现将有关知识在前面统一作介绍。

1.1 生殖细胞的发生

生殖细胞是动物机体内一种特殊分化的细胞，是个体发生的基础。动物有性生殖 (sexual reproduction) 的最早阶段是配子发生 (gametogenesis)。配子发生包括雄配子 (精子) 的发生和雌配子 (卵子) 的发生，其最终结果是形成成熟的精子和卵子，精子和卵子经过受精作用 (fertilization) 形成受精卵 (fertilized egg)，受精卵是新个体发育的起点。由受精卵经过卵裂 (cleavage)，形成囊胚 (blastula)，囊胚进一步发育进入原肠胚 (gastrula) 阶段，此时细胞已开始分化，形成不同的胚层，而不同胚层的细胞继续分化，形成各种器官原基。有的细胞层局部加厚，如神经板；有的细胞集聚成团，分排列，如体节；有的细胞层折叠、卷曲成管；还有些细胞分散成为单独移动的间充质细胞。通过这些变化，胚胎的各器官才逐步分化定型。

生殖细胞一般的发生过程都要经过增殖期、生长期和成熟期。增殖期是指精原或卵原细胞经过多次有丝分裂而数量不断增多的时期；而生长期是指部分精原或卵原细胞开始生长，体积增

大而成为初级精母（卵母）细胞时期，在此阶段，初级卵母细胞开始积累大量营养物质，合成和储存胚胎发育的各种信息；成熟期则是指初级精母（卵母）细胞经过两次成熟分裂形成成熟的单倍体的精子（卵子）。一个初级精母细胞经过两次成熟分裂形成4个精子细胞，而精子细胞必须经过分化才能成为能运动的精子；而一个初级卵母细胞只能产生一个成熟的卵子和2个或3个极体。

1.1.1 精子的发生

雄性配子的形成是一延续过程，从减数分裂开始，染色体数量减半，经过形态的变化，使单倍体的精子变成成熟的精子（精子发生）。精原细胞是生殖的干细胞（stem cells），经过有丝分裂增加数量。精原细胞的有丝分裂可以是不完全的，子细胞通过细胞质间桥而彼此相连。单个精原细胞分裂成许多细胞质相连的细胞群，就称为克隆（clones）。减数分裂时，细胞分裂也同样是不完全的，所以扩大的细胞群——克隆由无数单倍体的精子细胞组成。细胞之间的原生质联系——细胞间桥在精子形成的最后阶段丢失。

在许多动物内，精子发生时，生殖细胞与特殊体细胞紧密相联系。在哺乳类，睾丸由无数曲精细管组成，在曲精细管内支持细胞（sertoli cell）着生于基膜呈辐射状分布（图 1-1）。在整个精子发生过程中，生殖细胞与支持细胞保持联系。支持细胞形状柱形，底部宽而顶部狭，狭部伸向管腔。精原细胞位于支持细胞和基膜之间，生殖细胞减数分裂和精子的成形是埋在支持细胞的膜状凹陷处或在两邻近支持细胞之间的凹陷处进行的。生殖细胞排列有一定的顺序，精原细胞位于支持细胞的基部，而减数分裂期的细胞和精子细胞位于较高的部位。成熟的精子位于支持细胞顶部由此处释放进入曲精细管的腔内。

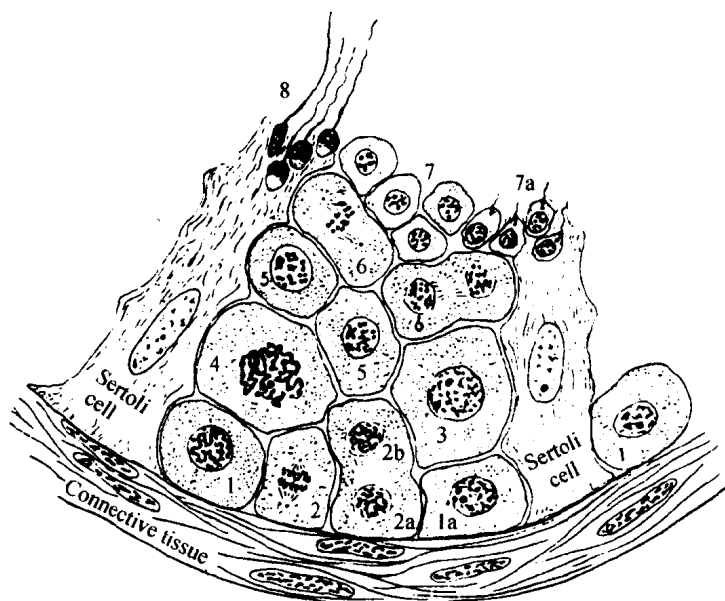


图 1-1 生精细管断面图解，数字示精子发生顺序

1. 精原细胞；2. 精原细胞进行有丝分裂，2a 和 2b 是精原细胞产生的两个子细胞，2a 仍位于管壁的边周，2b 生长成为初级精母细胞；3. 初级精母细胞进行减数分裂；4. 产生两个次级精母细胞；5. 次级精母细胞再进行分裂；6. 形的精子细胞；7. 精子细胞变态 (7a) 而形成精子；8. 7a 和 8 皆埋于支持细胞中。(自 Browder 1984)

1.1.1.1 精子发生的内分泌调节

脊椎动物生殖细胞分化是受类固醇激素——睾丸激素 (testosterone) 的控制，睾丸激素由特殊体细胞——睾丸间质细胞 (leydig) 合成，睾丸间质细胞分布在曲精细管之间的间隙内，睾丸激素通过扩散进入曲精细管而刺激精子发生。睾丸间质细胞产生睾丸激素是受脑下垂体释放的促性腺激素所调节；此激素称为促黄体 (生成) 激素 (luteinizing hormone, LH)，有时也称为间质细胞刺激素 (interstitial cell-stimulating hormone, ICSH)。

另一种脑垂体促性腺激素是卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)。它对精子发生也起调节作用。卵泡刺激素首先作用于支持细胞, 在哺乳类, FSH 对支持细胞的作用是刺激释放雄激素结合蛋白质 (androgen binding protein, ABP)。此蛋白质对睾丸激素有很大的亲和力, 它的功能是保留类固醇在曲精细管内对精子发生作用。

1.1.1.2 精子结构

哺乳类精子的二个主要部分是头部和尾部。头部主要由细胞核组成, 头部前端是顶体 (acrosome), 顶体包围核的前端形成帽状, 顶体的后缘部分是后顶体区 (postacrosomal region)。尾部分成颈、中段、主段和末段四部分。颈部细并形成头部和尾部的连接, 中段的特征是围绕尾部有一线粒体鞘。

精子的电镜结构: 头部主要由核组成, 含致密的染色体。从头部的纵切面可观察到顶体是夹在外质膜和核膜之间, 顶体由内外顶体膜包围。在细胞核的前端顶体向前凸出形成顶体尖段 (apical segment), 在一些动物顶体尖段非常显著, 有特殊的特殊形态; 而在人类, 顶体尖端小而不显著 (图 1-2)。

顶体内的无定形物质含有很强的水解酶, 当精子到达卵的附近, 就产生顶体反应 (acrosome reaction), 引起质膜和外顶体膜呈囊泡状而脱落, 顶体内的酶就释放。这些酶协助精子穿入卵子周围的卵膜。

顶体的后部较狭, 称为赤道段 (equatorial segment)。在受精时只有赤道段完整保留, 而其余部分在顶体反应时消失。赤道段的功能很重要, 因为在受精时首先是精子的赤道段和卵子相接触。在后顶体区部分, 质膜下面有一厚层物质, 其组分尚不了解。

顶体和细胞核决定了精子头部的形态, 在不同的动物中, 形态也不一样, 其在功能上的重要意义尚未知。

精子质膜外表面存在有多种凝集素受体 (lectin receptor)。

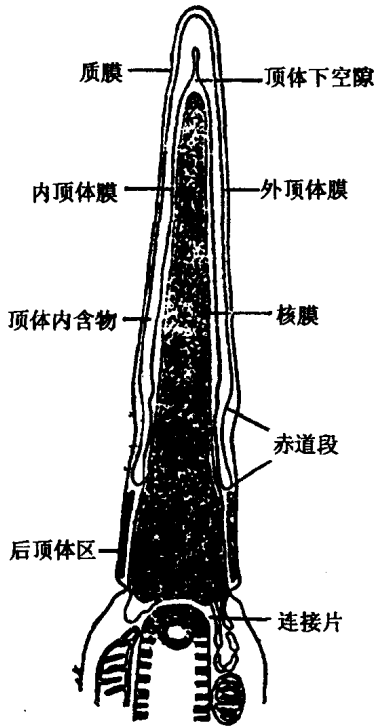


图 1-2 哺乳类精子头部纵切面模式图，细胞核黑色

所谓凝集素受体是指分布于细胞表面的糖蛋白 (glycoprotein)、糖脂 (glycolipid) 或糖复合物 (glycoconjugates)。受体中的糖分子主要由一些单糖或寡糖组成，如半乳糖、氨基半乳糖、甘露糖、岩藻糖、N-乙酰氨基半乳糖、N-乙酰氨基葡萄糖、N-乙酰氨基甘露糖、N-乙酰神经氨酸 (唾液酸) 等。这些糖分子以糖苷键同膜蛋白分子中的丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 残基相连或同糖鞘脂相连接。这些呈分支状的糖分子可与凝集素 (lectin) 发生专一性的结合。如伴刀豆素 A (concanavalin A) 与 D-甘露糖和 D-葡萄糖结合；麦芽凝集素 (wheat germ agglutinin,

WGA) 则与 N-乙酰氨基葡萄糖结合; 大豆凝集素 (soybean agglutinin, SBA) 与 N-乙酰氨基半乳糖结合; 蓖麻凝集素 (ricinum communisagglutinin, RCA) 与 D-半乳糖结合; 荆豆凝集素 (ulex europaeus agglutinin, VEL) 与 L-岩藻糖结合; 而马蹄蟹凝集素 (limulus polyphemus agglutinin, LPA) 则与 N-乙酰神经氨酸结合等等。各类凝集素对和它们结合的糖分子中各个碳原子上的羟基具有专一性, 此外, 对糖苷键以及对所结合的糖分子在糖链中的部位都具有专一性。

迄今为止, 人们已在多种动物精子表面发现了十几种凝集素受体, 其中较为常见的约有 10 种 (表 1-1)。在精子的发生、发育和成熟过程中, 膜表面凝集素受体的种类也在发生着变化。比

表 1-1 精子表面凝集素受体

凝集素	专一结合的糖	受体名称	动物
伴刀豆素 A (Con A)	α -D-甘露糖, α -D-葡萄糖 Con A	Con A	羊、小鼠、兔
大豆凝集素 (SBA)	N-乙酰-D-氨基半乳糖	SBA 受体	羊、小鼠、豚鼠
蓖麻凝集素 I (RCA-I)	β -D-半乳糖	RCA 受体	羊、小鼠、兔
花生凝集素 (PNA)	β -D-半乳糖-D-乙酰氨基半乳糖	PNA 受体	羊、小鼠、大鼠
麦芽凝集素 (WGA)	N-乙酰-D-氨基葡萄糖	WGA 受体	羊、小鼠、大鼠
扁豆凝集素 (LCA)	α -D-甘露糖	LCA 受体	大鼠、小鼠
豌豆凝集素 (PSA)	α -D-甘露糖	PSA 受体	大鼠
荆豆凝集素 I (UEA-1)	α -L-岩藻糖	UEA 受体	大鼠、小鼠
双花扁豆凝集素 (DBA)	N-乙酰-D-氨基半乳糖	DBA 受体	小鼠、豚鼠
羊蹄甲凝集素 (BPA)	N-乙酰-D-氨基半乳糖	BPA 受体	小鼠

如牛精子在睾丸内发生过程中, 其表面的凝集素受体是随着精子顶体发生而变化。当前顶体颗粒逐渐融合形成顶体时, PNA、RCA-I、SBA、ConA、WGA 等受体逐渐消失, 相反, SBA、

UEA-I、DBA 受体逐渐出现。这种凝集素受体的存在与精子成熟、获能、精卵结合等各种生理机能均有密切关系。

精子头部虽然形状各异，但受精时，头部的形状没有明显的作用。因为在精卵结合之前，能影响精子形状形成的顶段在顶体反应时已消失。

精子的尾部结构复杂，产生鞭毛运动使精子游向卵子。精子尾部的运动装置是由位于中央的两个中央微管和外周围有九个成对的微管所组成，这个结构称为轴丝 (axoneme)。应用高倍电镜观察，发现成对微管的小微管的外形不同。一个是完整的管状呈圆筒状；而另一个是不完整筒状呈 C 状，开口于圆筒形管状的壁上。成对微管有臂状附属物向外突出 (图 1-3)。轴丝用特殊染料染色后就可分辨出微管的结构，它们由细小原纤维组成。中央一对微管和外周成对微管中的圆筒状小微管相同，每个小微管由 13 个原纤维 (protofilaments) 组成；而 C 形小微管由 10 个原纤维组成。这些原纤维主要由蛋白质微管蛋白 (tubulin) 所组成。成对微管上的臂状突起是由另一种蛋白质组成，此类蛋白质称为力蛋白 (dynein)，具有 ATP 酶活力，负责转变化学能为机械运动。

轴丝外周围有 9 条外致密纤维 (outer dense fibers)，每条外致密纤维与一个成对微管相平行。纤维在尾部的前半段较粗，而在后半段逐渐变细。纤维的粗细和长度在不同的哺乳类动物是不一样的。有的纤维很粗并和整个尾部一样长，而另一些纤维很细，长度只到精子尾部的主段处就结束。这些致密纤维使精子尾部坚硬，但它们的功能和组成未知。

精子的颈部是尾部着生的基础，此区的主要结构是外凸的连接片 (connecting piece) 和精子头部的凹陷处相连接，在连接片和精子头部之间的空隙有细的纤维使尾部和头部相连接。在连接区后，连接片由九根节柱 (segmented-columns) 组成，九根节柱和尾部的九根外致密纤维的前端相连接。在连接片的凹陷处有一中心粒——近侧中心粒 (proximal centriole)，当精子尾部发育

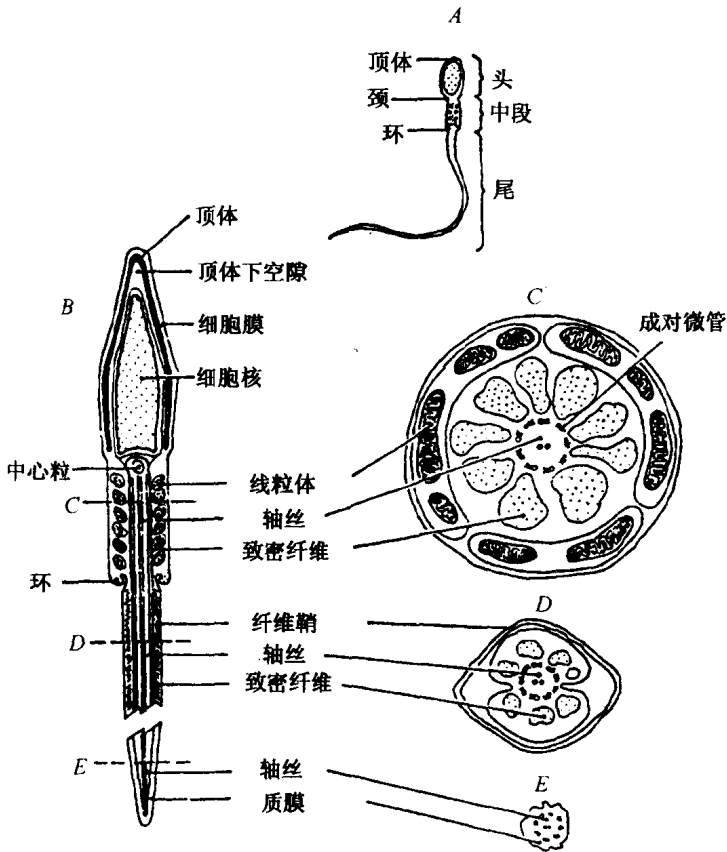


图 1-3

A. 哺乳类精子的模式， B. 示内部结构，
 C.D.E. 为中段、主段和末段的模切面

时，远侧中心粒（distal centriole）也出现，但当连接片发育时，则远侧中心粒已退化。

精子中段（middle piece）的特征是围有长的线粒体鞘；线粒体鞘包在轴丝外呈螺旋状。线粒体为精子的推进运动提供所需能量。中段的末端有一称为环（annulus）的结构，在环后面轴丝被纤维鞘（fibrous sheath）包围。此部分就是尾部的主段。纤维

鞘由两条柱和两条外致密纤维相接。两条外致密纤维终断后，在主段的其余部分纵行柱直接和两个成对微管相接；两个成对微管位于致密纤维之内侧。在精子尾部的尖端，纵行柱和肋骨状纤维鞘消失中断。纵行柱和肋骨状纤维鞘的终点就是精子主段和末段的连接处。

1.1.1.3 精子发生的基因表达及调节

和任何分化过程一样，精子发生是由特定的基因组来控制。由于某些物种有突变体，那么根据突变体基因所引起的精子缺陷，就能很好地说明精子发生中基因调控的机理。人的精子发生中有一种突变，由这个突变所产生的精子不能运动，当然也是不育的精子。这种综合症状很明显，能和常染色体的隐性突变体，一样遗传。当电镜检查这种基因突变所产生的精子时，发现尾部的轴丝发育不全，组成轴丝的外周二联体微管上缺乏动力蛋白臂。此基因的正常等位基因能编码动力蛋白的合成。这说明动力蛋白在这种运动中的重要性。

在小鼠中，也发现控制精子形态发生的一种基因位点——P 位点 (P locus)。P 位点上具突变体等位基因的纯合子小白鼠精子的电镜检查指出，它们形成不正常的头部，所以其正常精子头部的形成必须依靠野生型等位基因 (wild type allele) 的表达。

当精子形成出现染色质浓缩时，密集的染色质缺乏转录活性，因而对精子形成时所必需的转录合成活动必须在精子形成开始之前完成。对一些动物进行精子细胞染色质丧失转录活性的研究指出，在染色体上转录 RNA 是在精原细胞和初级精母细胞中完成的。不同动物 RNA 合成能力丧失的确切时间是不同的。如果蝇在初级精母细胞时期，RNA 合成就会终止。而小鼠的转录活性可持续到两次减数分裂以后一个很短的时期。遗传学的证据表明，在小鼠精子发生减数分裂前和单倍体细胞期都出现基因的转录活性。如果小鼠是一个由突变基因影响精子形成和功能发育所形成的杂合体，其基因转录活动在减数分裂之前就已完成，则

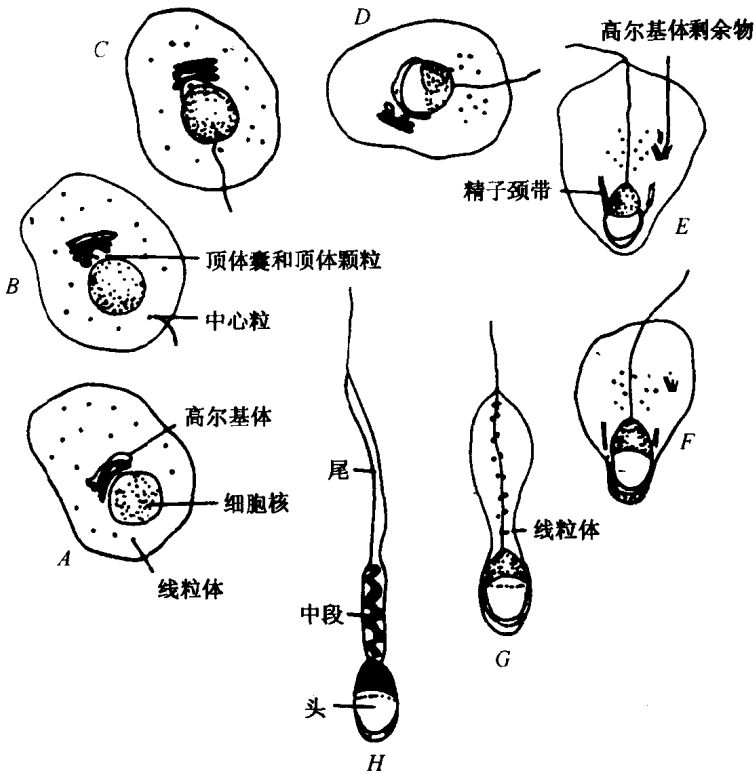


图 1-4 从精子细胞转化为精子的各期
 A—C. 高尔基体变化期；D、E. 顶体帽形成期；
 F、G. 顶体期；H. 成熟期。
 (自 Saunders, 1982, 仿 Clermont 和 Leblond, 1955)

会产生单一类型的配子。因为转录时，其突变基因和其相对的野生型等位基因都可呈现出转录活性。事实上，绝大多数影响精子发生的基因位点，当其杂合时，都可产生一种单一类型的精子，但也有例外，如“七位点”上的等位基因能在减数分裂后的单倍体细胞中显现出转录活性。分子生物学和放射自显影术表明：rRNA 和 tRNA 的合成均能在精子细胞中测出。但上述合成活动在精子形成中细胞核开始浓缩伸长时则完全停止。在 RNA 停止