

 科学出版社



生命科学前沿丛书

北京生物技术和新医药产业促进中心

北京生物工程学会 合作策划

科学出版社生命科学编辑部

杨 晓 黄培堂 黄翠芬 主编

基因打靶技术

生命科学前沿丛书

基因打靶技术

杨 晓 黄培堂 黄翠芬 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

基因打靶技术是一种定向改变生物活体遗传信息的实验手段。它的产生和发展建立在胚胎干细胞技术和同源重组技术成就的基础之上,并促进了相关技术的进一步发展。自20世纪80年代早期胚胎干细胞技术建立及15年前第一例基因剔除小鼠诞生以来,基因打靶的研究进展迅速,给现代生物学和医学研究带来了革命性的变化,并直接引发了现代生物学和医学研究各个领域许多突破性的进展,成为后基因组时代研究基因功能最直接和最有效的方法之一。作者参阅了大量国内外近期文献资料,并结合近年来的工作实践,比较全面地介绍了基因打靶技术的发展及常用的研究策略,力求反映本研究领域最新的研究进展。书中附有基因打靶研究中常用的实验方法和常用数据库,可供从事现代生物学和医学领域的研究和技术人员、教师 and 研究生参阅。

图书在版编目(CIP)数据

基因打靶技术/杨晓,黄培堂,黄翠芬主编. —北京:科学出版社,2002

(生命科学前沿丛书)

ISBN 7-03-010435-8

I. 基… II. ①杨… ②黄… ③黄… III. 基因-定向变异-遗传工程-实验方法 IV. Q78-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 033577 号

责任编辑:马学海 杨兆弘 / 责任校对:宋玲玲

责任印制:刘士平 / 封面设计:马学海 槐寿明

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

*

2003年1月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2003年1月第一次印刷 印张: 17 插页: 1

印数: 1—3 000 字数: 316 000

定价: 39.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈新欣〉)

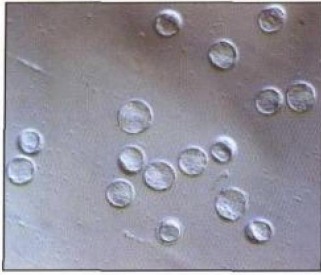


图4.1 注射前的小鼠囊胚。

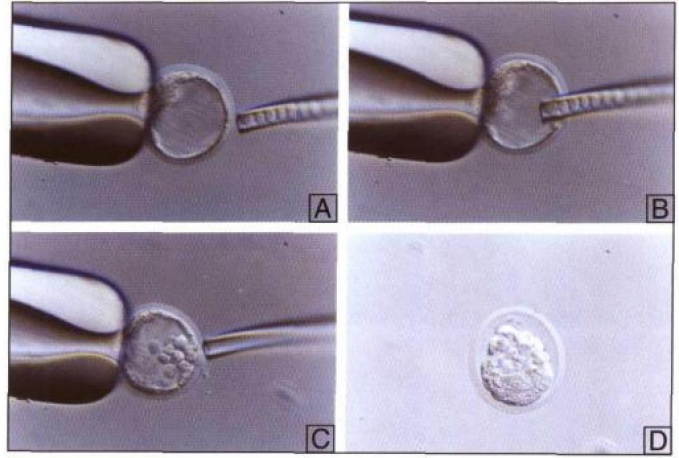


图 4.2 小鼠 ES 细胞经显微注射引入受体囊胚。A. 注射前，持卵管固定囊胚，注射针引入 12 ~ 15 枚 ES 细胞。B. 注射针刺入受体囊胚。C. 将 ES 细胞注入囊胚，小心地退出注射针。D. 体外培养 2h 后的注射后囊胚。

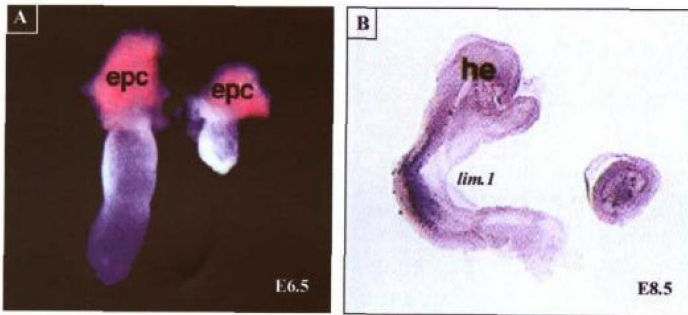


图 5.1.3 *Smad 4* 基因剔除导致小鼠胚胎早期死亡。图 A 显示 *Smad 4* 突变型小鼠胚胎（右）在中胚层形成前发育停滞，左侧为发育至卵柱期的正常对照小鼠。图 B 为胚胎原位杂交的结果，显示 *Smad 4* 突变型小鼠胚胎（右）不表达中胚层分子标记物 *lim 1* 基因 (Yang X et al: Proc Natl Acad Sci. USA, 1998, 95:3667 ~ 3672)。

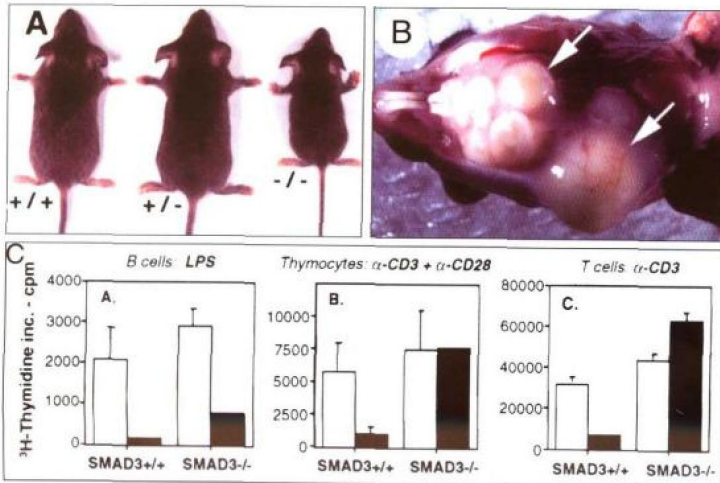


图 5.1.4 *Smad 3* 基因剔除导致小鼠黏膜免疫缺陷。图 A 显示不同基因型小鼠的表型；图 B 显示 *Smad 3* 基因剔除突变体小鼠黏膜系统周围常见的感染；图 C 显示 *Smad 3* 基因剔除 T 淋巴细胞而非 B 淋巴细胞丧失对 TGF- β 的应答 (Yang X et al: EMBO J, 1999, 18:1280 ~ 1291)。

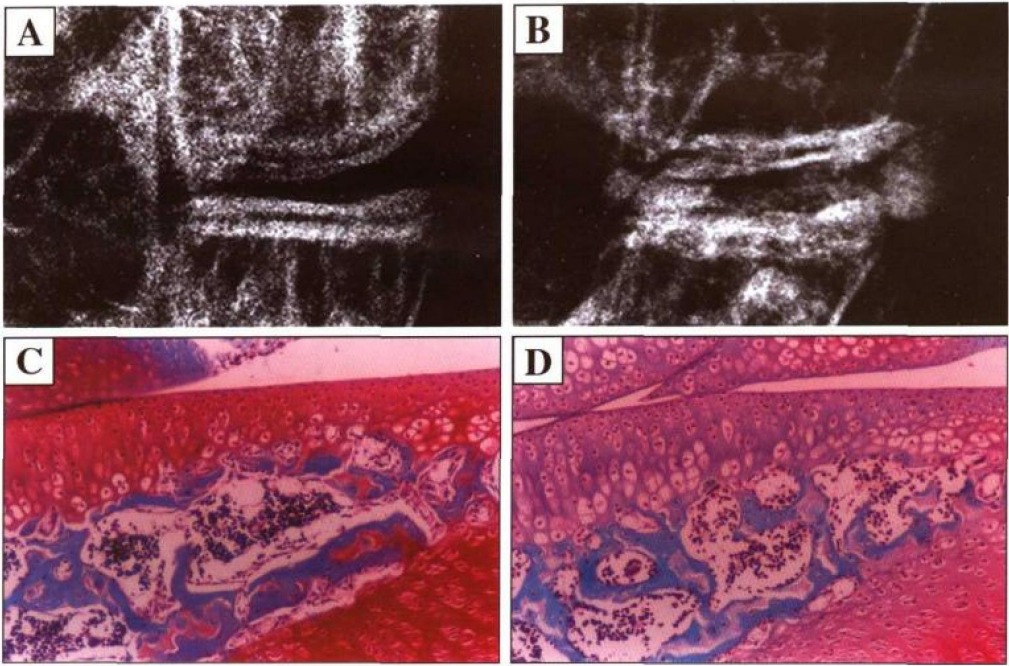
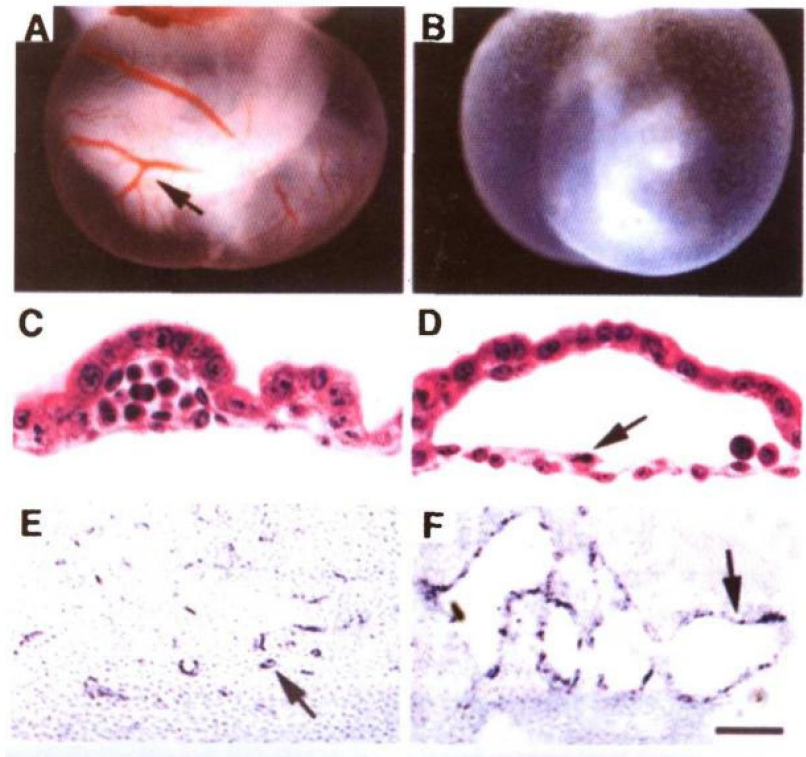


图 5.1.5 *Smad3* 基因剔除导致小鼠发生骨关节炎。X 光照射分析显示 7 月龄 *Smad3* 基因剔除突变型小鼠 (B) 脊椎关节变形及异常骨化。藏红 O 染色显示 *Smad3* 基因剔除突变型小鼠 (D) 蛋白糖表达明显降低。A、C 为同窝对照小鼠 (Yang X et al: J Cell Biology, 2001, 153:35 ~ 46)。

图 5.1.6 *Smad5* 基因剔除导致小鼠血管发育异常。图中 A、B 分别为野生型 (A) 和突变型 (B) 小鼠胚胎期 9.5d 的卵黄膜，显示 *Smad5* 基因剔除小鼠卵黄膜没有正常的血管网络。组织学分析显示 *Smad5* 基因剔除小鼠具有血管内皮细胞，但血管直径异常增大 (D)。E、F 分别为对照小鼠 (E) 和突变小鼠 (F) 肢芽用 CD31 抗体进行免疫组化分析的结果，蓝色着色细胞为 CD31 阳性的血管内皮细胞 (Yang X et al: Development, 1999, 126 (8):1571 ~ 1580)。



《生命科学前沿丛书》专家委员会

主任委员：吴 旻

委 员：（按汉语拼音排序）

陈永福	陈 竺	范云六	贺福初
黄大昉	李家洋	李衍达	马大龙
强伯勤	沈倍奋	王琳芳	

《基因打靶技术》编辑委员会

主 编：杨 晓 黄培堂 黄翠芬

编 委：（按汉语拼音排序）

陈红星	程 萱	崔 芳	郝振明
黄翠芬	黄培堂	林福玉	刘 兵
毛春明	孙岩松	孙彦洵	谭焕然
谭晓红	王友亮	杨 晓	张雅丽
周 江			

总 序

近年来，生命科学的发展进入了黄金时期，由人类基因组计划衍生出一批新兴技术——“e-cell”、“克隆技术”、“转基因技术”、“生物信息学”等等，如雨后春笋般呈现在人们面前。

在现代生命科学发展的近 20 余年中，跨学科、跨领域融合以及新思想、新方法的不断涌现，使生命科学的各个分支领域的前沿以惊人的速度不断取得突破性进展。现代生命科学所展现的美好未来，也诱使人们以前所未有的热情关注着生命科学的最新发展。

近年来，我国生命科学研究力求与世界先进水平同步，密切注视着生命科学前沿研究的最新动态，从事生命科学前沿研究队伍的核心力量越来越年轻化，青年生命科学家的最新科研成果更新率及知识刷新率越来越快。为此，《生命科学前沿丛书》将优秀青年科学家的最新研究进展展示给大家，对生命科学领域近年来的新技术、新成果、新问题作了精辟的介绍。

愿我国的生命科学能更上一层楼！

北京生物工程学会理事长

2002 年 9 月

序

生命科学是本世纪的热门研究领域之一。人们长期以来就不断探索生命的奥秘，关于生命活体运转机制的研究已成为多种学科研究的焦点。从科学发展的规律看，科学家除了要有理论的思维和明确的探索目标外，还须有良好的实践手段以验证其理论的正确性；理性认识的不断深入，又促使更新颖的技术建立，如此反复循环，科学探索得以逐步地向纵深发展。

20 世纪中叶，DNA 双螺旋学说的建立奠定了基因是生物遗传物质的基础，其结构是可以认识的。经过 DNA 重组技术的操作，人们发现基因重组、缺失、突变、插入等与生物的进化有着密切的关系，从而大大促进了生命科学研究的发展。由于生物高技术的迅速发展，它已成为生物学特别是医学生物学前进的依托。2001 年人类基因组密码框架的破译，是人类认识生命的一个里程碑。目前正进入后基因组时代，特别是基因功能的研究正成为科学家当前奋斗的方向。生物机体的生、老、病、死的规律，已在基因水平、细胞水平、组织水平上全面展开，整体水平的研究是重要的一环。我们看到基因打靶技术是研究定向改变生物遗传信息的手段，是了解生物体正常发育及疾病发展机制的十分有用的研究工具。国际上分子生物学的研究已普遍采用该技术，而我国正在起步。为了尽快推广此项新技术，军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室经过两年实践，已取得一定经验，因此组织了全室科技人员，整理近年国内外发表的文献资料，结合实践体会，撰写本书，以供国内同行开展本项工作参考。由于生物高技术发展迅速，更简便、更有效的技术将不断涌现，本书只能起到抛砖引玉的作用，不当之处还请读者多多指正。

黄翠芬

2001 年 11 月 22 日

前 言

人类基因组工作框架图的正式发表,标志着人类真正进入了功能基因组学研究的新时代。生物学的研究模式也随之发生了巨大的变化,系统化、整体化和综合化的趋势越来越明显。功能基因组学研究的主要技术手段包括生物信息学、生物芯片、蛋白质组学等。此外,功能基因组学的研究还将会在极大程度上依赖于对模式生物的研究。通过基因打靶对模式生物的遗传物质进行修饰并研究其相关的表型,可以提供基因异常导致疾病的直接证据,快速解析相关的分子途径和机制。与酵母、果蝇、线虫、大鼠等模式生物相比,小鼠作为研究用脊椎动物,尤其是哺乳动物的模式生物具有其特有的优势。首先,小鼠是具有较短世代周期的哺乳动物,组织细胞的生理结构、功能特征和生化途径与人类相似;且繁育能力强,易于在实验室条件下维持。其次,小鼠基因组规模(3×10^9 bp)与人类基因组近似,许多染色体区域中同样的基因以同样的次序排列。利用小鼠拥有的众多近交系,可在相对均一的遗传背景下展开分析。最重要的是,转基因技术和基因打靶技术的发展已使得对小鼠遗传物质按预期方式进行活体修饰成为可能。

自20世纪80年代早期胚胎干细胞技术建立及15年前第一例基因剔除小鼠诞生以来,在小鼠进行基因打靶的研究进展迅速,给现代生物学研究带来了革命性的变化。Oliver Smithies最早于1985年在哺乳动物细胞中实现了同源重组。他和Mario Capecchi的研究小组两年后在胚胎干细胞中分别实现了基因的定位剔除。目前,在胚胎干细胞进行同源重组已经成为一种对小鼠染色体组上任意位点进行遗传修饰的常规技术。通过对这些突变小鼠的表型分析,许多与人类疾病相关的新基因的功能已得到阐明,并直接导致了现代生物学研究各个领域许多突破性的进展。因此,美国国立卫生研究院(NIH)前任院长Harold Varmus在第11届国际小鼠基因组会议上指出,NIH敏锐地意识到小鼠遗传学通过一种动物整体的研究策略正在全面地改变科学的面貌。目前,研究者不仅可以通过简单的基因剔除改变活体的遗传信息,也可以精确地小鼠染色体组中引入点突变,甚至可以删除大至几个分摩的染色体组片段或制造特异的染色体易位。对基因打靶进行时空上的调控也变为现实,并成为在脊椎动物成体中研究基因功能的重要手段。可以预测,与日俱增的突变小鼠品系及其研究结果将提供越来越多的基因在脊椎动物发育和各种生理病理过程中功能的立体图卷,最终将促进人类对生命现象本质的理解。

编 者

2002年3月

• v •

目 录

1 基因打靶技术的发展简史及其应用前景	(1)
1.1 基因打靶技术的概念	(1)
1.2 胚胎干细胞技术的发展	(2)
1.3 同源重组技术的发展	(3)
1.4 基因打靶技术在生物医学研究中的应用前景	(4)
1.4.1 基因打靶技术在基因功能研究中的应用	(4)
1.4.2 应用基因打靶技术研制人类疾病动物模型	(5)
1.4.3 应用基因打靶技术改良动物品系和研制动物反应器	(6)
2 基因打靶的策略及载体设计	(10)
2.1 完全基因剔除	(10)
2.1.1 构建载体的一般原则	(11)
2.1.2 置换型载体	(13)
2.1.3 插入型载体	(16)
2.1.4 影响中靶效率的因素	(18)
2.1.5 体细胞打靶	(21)
2.2 基于 Cre-LoxP 重组酶系统的条件基因打靶	(25)
2.2.1 Cre-LoxP 重组酶系统	(25)
2.2.2 构建基因打靶载体要考虑的问题和 LoxP 的合理运用	(27)
2.2.3 条件基因打靶	(30)
2.2.4 表达 Cre 重组酶的转基因小鼠	(34)
2.3 用基因打靶技术引入精细突变	(44)
2.3.1 “Hit and Run”法	(44)
2.3.2 双置换法	(46)
2.3.3 “标记和置换”法	(47)
2.3.4 利用 Cre-LoxP 系统引入点突变	(48)
2.4 大片段染色体的重排和删除	(50)
2.4.1 放射线诱导的缺失突变	(50)
2.4.2 Cre-LoxP 介导的染色体重组	(51)
2.5 随机基因剔除——基因诱捕	(57)
2.5.1 诱捕载体的设计	(58)
2.5.2 基因诱捕载体导入 ES 细胞的方法	(62)

2.5.3	诱捕 ES 细胞的筛选和鉴定	(63)
2.5.4	基因诱捕研究的应用及其前景	(65)
2.6	ENU 诱导点突变与大规模基因突变和功能研究	(69)
2.6.1	ENU 诱变的机制	(70)
2.6.2	ENU 诱导的突变类型和诱变效率	(71)
2.6.3	ENU 剂量对不同小鼠品系的影响	(71)
2.6.4	ENU 诱导突变的策略	(72)
2.6.5	ENU 诱导突变表型的筛选	(77)
2.6.6	ENU 诱导点突变的鉴定	(78)
2.6.7	ENU 诱变研究的应用前景	(79)
2.7	利用基因敲入技术制备转基因动物	(81)
2.7.1	利用基因敲入技术制备转基因动物的策略	(82)
2.7.2	基因敲入法制备转基因动物的应用	(85)
2.7.3	结语	(90)
3	中靶胚胎干细胞的筛选	(94)
3.1	胚胎干细胞的分离和培养	(95)
3.1.1	ES 细胞的培养基	(95)
3.1.2	成纤维细胞用作 ES 细胞的饲养层细胞	(96)
3.1.3	小鼠 ES 细胞的分离	(98)
3.1.4	ES 细胞的鉴定	(101)
3.2	打靶载体转染 ES 细胞	(103)
3.2.1	电穿孔法转染 ES 细胞的条件	(104)
3.2.2	选择合适的抗性培养基	(104)
3.3	对发生同源重组的单克隆的筛选	(105)
3.3.1	阳性 ES 克隆的挑取	(106)
3.3.2	阳性 ES 克隆的冻存	(107)
3.3.3	ES 克隆基因组 DNA 的制备	(107)
3.3.4	PCR 法筛选中靶 ES 细胞	(107)
3.3.5	Southern 杂交法筛选中靶 ES 细胞	(108)
3.4	ES 细胞的体外诱导分化研究	(109)
3.4.1	ES 细胞体外诱导分化为肌细胞的研究	(111)
3.4.2	ES 细胞体外定向分化为神经元和神经胶质细胞	(112)
3.4.3	胚胎干细胞定向造血细胞分化的研究	(115)
4	由中靶细胞获得突变体动物的方法	(126)
4.1	通过囊胚显微注射法获得嵌合体小鼠	(126)
4.1.1	小鼠的饲养和管理	(126)

4.1.2	供体囊胚的制备	(128)
4.1.3	囊胚的显微注射	(130)
4.1.4	胚胎移植	(132)
4.1.5	嵌合体的鉴定和传代	(134)
4.1.6	基因打靶突变小鼠的维持	(136)
4.2	通过胚胎聚合法获得完全 ES 细胞来源的胚胎或嵌合体小鼠	(138)
4.2.1	用于胚胎聚合的 ES 细胞的准备	(139)
4.2.2	聚合用胚胎的准备	(139)
4.2.3	ES 细胞与胚胎的聚合	(144)
4.2.4	聚合体胚胎的培养和转移	(147)
4.2.5	剖腹产	(147)
4.2.6	二倍体或四倍体嵌合体胚胎的鉴定	(147)
4.2.7	完全 ES 细胞来源胚胎及嵌合体胚胎的应用和前景	(148)
5	基因打靶在现代生物学研究中的应用实例	(153)
5.1	应用基因剔除技术研究 <i>Smads</i> 基因的功能	(153)
5.1.1	SMADs 的结构及分类	(154)
5.1.2	SMADs 介导的信号转导	(156)
5.1.3	用基因剔除技术研究 <i>Smads</i> 基因在脊椎动物体内的功能	(158)
5.1.4	小结	(162)
5.2	葡萄糖激酶基因剔除及成年型糖尿病模型	(165)
5.2.1	MODY 的研究概况	(165)
5.2.2	葡萄糖激酶基因	(166)
5.2.3	MODY 的动物模型及葡萄糖激酶基因剔除	(168)
5.3	人类疾病的基因打靶小鼠模型	(172)
5.3.1	小鼠基因组学研究进展	(172)
5.3.2	小鼠模型的发展及特性	(174)
5.3.3	基因打靶小鼠作为人类疾病动物模型的研究	(175)
5.3.4	基因打靶小鼠作为人类疾病模型的问题与展望	(182)
5.4	核移植法研制突变体动物	(184)
5.4.1	生产突变体动物的传统方法	(185)
5.4.2	核移植方法的发展过程	(186)
5.4.3	影响核移植效率的因素及存在的问题	(187)
5.4.4	近期核移植的进展	(188)
5.4.5	基因打靶与核移植技术相结合的优势	(190)
5.4.6	基因打靶与核移植技术相结合的应用前景	(191)

6 基因打靶技术存在的问题及对策	(195)
6.1 打靶载体设计引起的问题	(195)
6.1.1 不完全剔除	(195)
6.1.2 其他基因编码区或者调控元件的删除	(196)
6.1.3 筛选标记基因对表型的影响	(197)
6.2 表型解释中存在的问题	(198)
6.2.1 基因冗余和代偿机制	(198)
6.2.2 遗传背景对小鼠表型的影响	(200)
6.2.3 修饰基因对表型的影响及应用	(202)
6.2.4 亚效等位基因	(204)
6.3 关于解决基因打靶研究中存在问题的建议	(205)
6.4 总结	(206)
7 附录 1 常用实验方法	(210)
7.1 靶基因 cDNA 探针的克隆	(210)
7.2 靶基因基因组 DNA 片段的筛选和克隆	(211)
7.2.1 从小鼠基因组细菌人工染色体(BAC)文库中筛选基因组 DNA 片段	(211)
7.2.2 从小鼠基因组噬菌体文库中筛选基因组 DNA 片段	(216)
7.3 Northern 杂交分析	(220)
7.3.1 组织和细胞总 RNA 的提取	(220)
7.3.2 在含甲醛的凝胶上进行 RNA 电泳	(220)
7.3.3 将 RNA 转移至硝酸纤维素膜并进行杂交	(221)
7.3.4 采用 mRNA 膜进行 Northern 杂交	(222)
7.4 小鼠的基因型分析	(222)
7.4.1 从鼠尾提取基因组 DNA	(222)
7.4.2 采用 PCR 法鉴定小鼠的基因型	(223)
7.4.3 小鼠早期胚胎的基因型鉴定	(224)
7.5 常规组织学分析:苏木素-伊红染色	(225)
7.5.1 石蜡标本的包埋	(225)
7.5.2 石蜡切片	(225)
7.5.3 苏木素和伊红染色液的配制	(225)
7.5.4 常规石蜡切片苏木素-伊红(HE)染色程序	(226)
7.6 免疫组化分析	(226)
7.7 普通原位杂交	(227)
7.7.1 ³⁵ S 标记的单链 RNA 探针的制备和纯化	(227)
7.7.2 组织切片的处理及原位杂交	(228)

7.7.3	漂洗和曝光	(229)
7.7.4	乳胶曝光和显影	(230)
7.8	整体原位杂交	(230)
7.8.1	地高辛(DIG)标记的 RNA 探针的制备	(230)
7.8.2	胚胎的固定	(231)
7.8.3	胚胎的预处理和杂交	(231)
7.8.4	漂洗和抗体标记	(232)
7.8.5	显色反应	(232)
7.9	小鼠的全骨架制备	(233)
7.10	利用藏红 O 染色检测小鼠骨切片中蛋白多糖的含量	(234)
7.11	小鼠组织的 lac Z 染色	(234)
7.11.1	组织切片的 lac Z 染色	(234)
7.11.2	整体胚胎的 lac Z 染色	(235)
8	附录 2 常用溶液和缓冲液的配制	(236)
8.1	常用试剂的配制	(236)
8.2	杂交试验中用于降低背景的封闭液	(241)
8.3	蛋白水解酶类	(242)
8.4	M ₂ 和 M ₁₆ 溶液的配制	(243)
8.4.1	贮存液成分	(243)
8.4.2	M ₂ 溶液的配制	(243)
8.4.3	M ₁₆ 溶液的配制	(244)
9	附录 3 常用参考书和数据库	(243)
9.1	常用参考书	(248)
9.2	常用基因打靶和转基因小鼠资源网站	(245)
9.2.1	主要数据库精选	(245)
9.2.2	遗传工程突变体小鼠	(246)
9.2.3	特定小鼠品系	(248)
9.2.4	ENU 诱变数据库	(249)
9.2.5	基因打靶操作手册	(249)
9.2.6	乳腺转基因数据库	(250)
9.2.7	商业和其他供应者	(250)
后记		(251)

1 基因打靶技术的发展简史 及其应用前景

1.1 基因打靶技术的概念

基因打靶技术是一种定向改变生物活体遗传信息的实验手段^[1,2]。通过对生物活体遗传信息的定向修饰（包括基因灭活、点突变引入、缺失突变、外源基因定位引入、染色体组大片段删除等），并使修饰后的遗传信息在生物活体内遗传，表达突变的性状，从而研究基因功能等生命科学的重大问题，以及提供相关的疾病治疗、新药筛选评价模型等。基因打靶技术的发展已使得对特定细胞、组织或者动物个体的遗传物质进行修饰成为可能。它的产生和发展建立在胚胎干细胞（embryonic stem cell, ES 细胞）技术和同源重组技术成就的基础之上，并促进了相关技术的进一步发展。它的原理和操作流程如图 1.1.1 所示。具体方法：首先

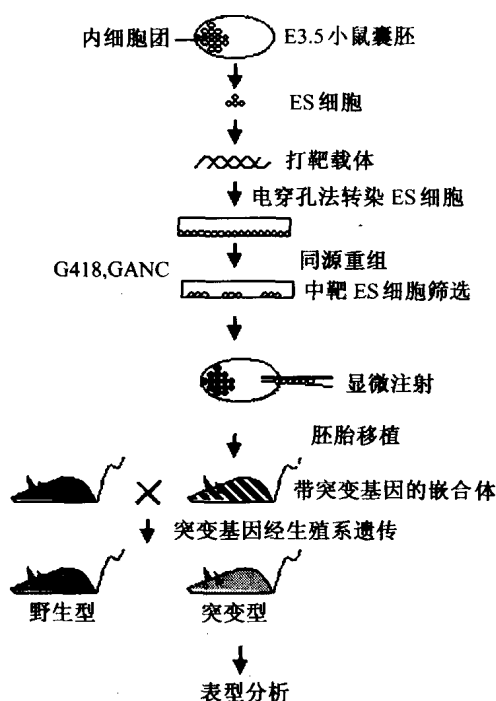


图 1.1.1 基因打靶的主要技术步骤

要获得 ES 细胞系, 利用同源重组技术获得带有研究者预先设计突变的中靶 ES 细胞。通过显微注射或者胚胎融合的方法将经过遗传修饰的 ES 细胞引入受体胚胎内。经过遗传修饰的 ES 细胞仍然保持分化的全能性, 可以发育为嵌合体动物的生殖细胞, 使得经过修饰的遗传信息经生殖系统遗传。最终获得的带有特定修饰的突变动物为研究者提供一个特殊的研究体系, 可以在生物活体中研究特定基因的功能。目前, 在 ES 细胞进行同源重组已经成为一种对小鼠染色体组上任意位点进行遗传修饰的常规技术。通过基因打靶获得的突变小鼠已经超过千种 (相关数据库参见文献 [3]), 并正以每年数百种的速度增加。通过对这些突变小鼠的表型分析, 许多与人类疾病相关的新基因的功能已得到阐明, 并直接导致了现代生物学研究各个领域许多突破性的进展。

1.2 胚胎干细胞技术的发展

干细胞是指一类具有无限分裂能力的细胞, 它们能通过一次不对称分裂在复制自己的同时产生不同类型的细胞^[4]。ES 细胞是从着床前的哺乳类胚胎中分离的全能干细胞, 具有在体外不分化的增殖能力, 经过长期体外培养后仍然具有分化成所有 3 种胚层的发育潜能^[5]。

对 ES 细胞的研究可以追溯到 20 世纪 50 年代对小鼠胚胎进行体外培养的实验。Whitten^[6]于 1956 年成功地应用补充了牛血清白蛋白的培养基培养受精卵, 使单细胞的受精卵在体外发育到囊胚阶段。其后, Brinster^[7]于 1965 年建立了微滴培养技术, 用于着床前小鼠胚胎的培养。McLaren 等^[8,9]对输卵管移植和子宫移植条件进行了优化, 并最终使得通过胚胎移植从体外培养的胚胎产生活的小鼠成为一种常规的技术。10 年后, Gardner^[10]建立了将分离的细胞注射入宿主囊胚获得嵌合体小鼠的方法。这一方法的成功建立使得研究者有可能系统地检测经过体外操作的胚胎细胞的分化全能性。

1970 年, Stevens^[11,12]作为先驱者成功分离了小鼠胚胎瘤细胞 (embryonal carcinoma, EC) 并将其作为模式体系研究胚胎细胞的全能性。几年后, Brinster^[13], Mintz 和 Illmensee^[14], 以及 Papaioannou^[15]等证实胚胎瘤干细胞可以整合入宿主囊胚并分化成多种正常成年组织, 但没有胚胎瘤细胞整合入生殖系的报道。1981 年, Evans 和 Martin 分别独立地从正常的小鼠囊胚中分离了 ES 细胞^[16,17]。与大多数 EC 细胞不同, ES 细胞具有完全正常的核型。尤其重要的是, Bradley^[18]随后证实通过显微注射引入囊胚的 ES 细胞可以分化为成体的各种组织并整合入生殖系。小鼠 ES 细胞的分离和应用是 ES 细胞技术发展过程中的里程碑, 它与同源重组技术的结合使得在生物整体水平上定向改变和修饰哺乳类动物的遗传物质成为可能。在此基础上发展起来的基因打靶技术革命性地改变了生命科学研究的面貌, 成为研究基因功能的有力手段。