

国家科普知识重点图书

高新技术科普丛书

克隆技术

李建凡
编著

化学工业出版社



国家科普知识重点图书

高新技术科普丛书

克 隆 技 术

李建凡 编著

化 学 工 业 出 版 社

·北 京·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

克隆技术/李建凡编著. —北京: 化学工业出版社,
2002.1

(高新技术科普丛书)

ISBN 7-5025-3623-X

I. 克… II. 李… III. 无性系-遗传工程-普及
读物 IV. Q785.49

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2001) 第 090828 号

高新技术科普丛书

克 隆 技 术

李建凡 编著

总 策 划: 陈逢阳 周伟斌

责任编辑: 叶 露 周 旭

责任校对: 李 林

封面设计: 田彦文

*

化学工业出版社出版发行

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64918013

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市云浩印刷厂印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 850×1168 毫米 1/32 印张 5 1/4 字数 127 千字

2002 年 1 月第 1 版 2002 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-3623-X/Q·16

定 价: 12.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

《高新技术科普丛书》编委会

主任

路甬祥 中国科学院院长，中国科学院院士，
中国工程院院士

委员

汪家鼎 清华大学教授，中国科学院院士
闵恩泽 中国石油化工集团公司石油化工科学研究院教授，
中国科学院院士，中国工程院院士
袁 权 中国科学院大连化学物理研究所研究员，中国科学院院士
朱清时 中国科学技术大学教授，中国科学院院士
孙优贤 浙江大学教授，中国工程院院士
张立德 中国科学院固体物理研究所研究员
徐静安 上海化工研究院（教授级）高级工程师
冯孝庭 西南化工研究设计院（教授级）高级工程师

序

数万年来，人类一直在了解、开发、利用我们周围的自然界，同时不断地认识着自身，科学技术也从一开始就随着人类的生存需求而产生和发展着。人类发展史充分验证了邓小平“科学技术是第一生产力”的论断。科学技术的发展，促进了人类文明和社会的发展。

21 世纪是信息时代，21 世纪是生命科技的世纪，21 世纪是新材料和先进制造技术迅速发展和广泛应用的世纪，21 世纪是高效、洁净和安全利用新能源的世纪，21 世纪是人类向空间、海洋、地球内部不断拓展的世纪，21 世纪是自然科学发生重大变革、取得突破性进展的时代。科学技术的发展、新技术的不断涌现，必将引起新的产业革命，对我国这样的发展中国家来说，既是挑战，也是机遇，而能否抓住发展机遇，关键在于提高全民族的科学文化水平，造就一支具有科学精神、懂得科学方法、具有知识创新和技术创新能力的高素质劳动者队伍。所以，发展教育和普及科学知识、弘扬科学精神、提倡科学方法是我们应对世纪挑战的首要策略。为此，1999 年 8 月，江总书记在视察中国科学院大连化学物理研究所时进一步强调了科普工作的重要性：“在加强科技进步和创新的同时，我们应该大力加强全社会的科学普及工作，努力提高全民族的科学文化素质。这项工作做好了，就可以为科技进步和创新提供广泛的群众基础。”

为了普及和推广高新技术，化学工业出版社组织几位两院院士和专家编写了《高新技术科普丛书》。本套丛书的特点是：介绍当今科学产业中的一些高新技术原理、特点、重要地位、应用及产业化的现状与发展前景；突出“新”，介绍的新技术、新理论和新方法不仅经实践证明是成熟、可靠的，而且是有应用前景的实用技

术；力求深入浅出，图文并茂，知识性、科学性与通俗性、可读性及趣味性的统一，并充分体现科学思想和科学精神对开拓创新的重要作用。

《高新技术科普丛书》涉及与我国经济和社会可持续发展密切相关的高新技术，第一批9个分册包括绿色化学与化工、基因工程技术、纳米技术、高效环境友好的发电方式——燃料电池、最新分离技术（如超临界流体萃取、吸附分离技术、膜技术）、化学激光、生物农药等。本套丛书以后还将陆续组织出版多种高新技术分册。相信该套科普丛书对宣传普及科技知识、科学方法和科学精神，正确地理解、掌握科学，提高全民族的素质将会起到积极的作用。

洛角祥

2000年9月

前 言

科学家预言，21 世纪将是生物学的世纪，而分子生物学、细胞生物学和动物生物技术在其中将起到举足轻重的作用。动物生物技术中的重要方面——动物克隆技术近年来取得了史无前例的进展。自从地球上有了生物，用复制（无性繁殖）的方式增加个体的数量就成了它们进行繁殖的一种方式——这就是自然界发生的克隆。然而，人为的动物个体的复制却是近十几年的事，我们把它叫做克隆技术。它的出现已经给生物科学带来了生机，并推动了畜牧业的发展。但是真正使“克隆”一词不胫而走，使克隆技术家喻户晓的是 1997 年“多莉”羊出世的报道。1997 年 2 月 23 日，在世界权威科学杂志《自然》读者来信栏目刊登了这样一篇论文，题为《来自胎儿和成年乳腺细胞的成活后代》。介绍的是英国爱丁堡罗斯林研究所的科学家 Wilmut 领导的研究小组，首次用一只 6 岁成年母绵羊的乳腺细胞作核供体，经核移植培育出一只绵羊，取名“多莉”，它的基因性状与那只成年母羊完全一致。这一创造性的工作，打破了过去生物学对细胞发育规律的认识，已分化的成年动物体细胞居然能发育成一个新的动物个体。论文不到两页半，但却引起了巨大的反响和震撼，无论是政府首要还是普通老百姓都对“多莉”非常关注，它的出现犹如当年原子弹爆炸一样在每个人心里都引起了强烈的反响。科学家们为它的成功感到高兴，正如著名生物化学家邹承鲁院士所说“多莉的诞生是生物工程技术发展的一个里程碑”。何祚庥院士也认为“能够用动物体细胞发育成一个动物，的确是生命科学的一次飞跃”。“多莉”的出现为克隆技术开辟了广阔的应用前景。人们从这一激动人心的科学事件中看到了机会，许多生物技术公司从此看到未来的商机，看到了它在许多方面潜在的应用前景。

但是与此同时，人们也担心这一技术会用来克隆人类自身，那

将使人类面临严峻的挑战，带来一系列的伦理和宗教问题。正如英国科学家约瑟夫·罗特布拉特所说：“我们耽心的是，在人类科学领域取得的其他进展可能会比核武器更容易产生严重的后果，遗传工程很有可能就是这样一个领域，克隆技术一旦被滥用，社会将会陷入无穷的罪恶之中”。各种议论、担心、抗议和反对，使人们无所适从。克隆究竟是什么，它能有多大作为，对人类是祸是福？

为了从较高层次普及有关克隆的知识，本书以动物克隆技术为主体，详细地介绍克隆技术的历史、发展和未来，以实例说明克隆技术的要点和它的应用。但是克隆技术不是一个孤立的技术，它的发展依赖于生物科学和生物技术的发展。为了引导初涉这一领域的读者深入阅读本书，书中对生物进化和细胞基本知识作了简要的介绍，并对在克隆技术中经常用到的细胞培养和动物繁殖等技术作了较详细的叙述。克隆技术发展的同时，它又对一些新兴技术起到了相辅相成、互相促进的作用。为了使一部分有兴趣的读者深入了解这方面的知识，在第5章介绍了动物基因工程的两个主要方面：转基因动物技术和基因打靶技术。本书还对克隆技术现在和将来可能的应用方面作了初步的介绍。因为本书不是一本技术手册，不可能对每一个技术细节作详细描述，所以专门从事这方面工作的人，还应当参考某些专著和关注国内外克隆技术的发展，使我们的研究始终处在世界前沿。本书可提供科技工作者、企事业管理人员、政府部门领导和大专院校师生和对克隆技术有兴趣的人们参考，并为对此技术深入研究的人们提供了相关的研究机构和互联网站的信息。

本书在编写中参阅了大量的书籍和文献，摘引了一些文字和图表，在此对原作者表示感谢。书中引用的实例尽可能忠于原作者。但是书中内容涉及面宽，加之编者水平有限，疏漏和错误之处在所难免，希望读者批评指正，并提出宝贵意见。

编者

2001年9月

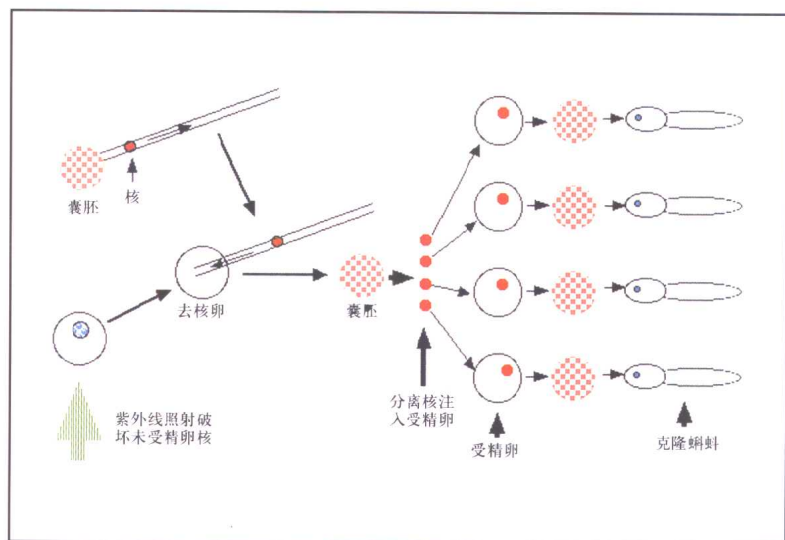


图1-2 Briggs和King的克隆技术路线



图7-5 克隆恒河猴Tetra

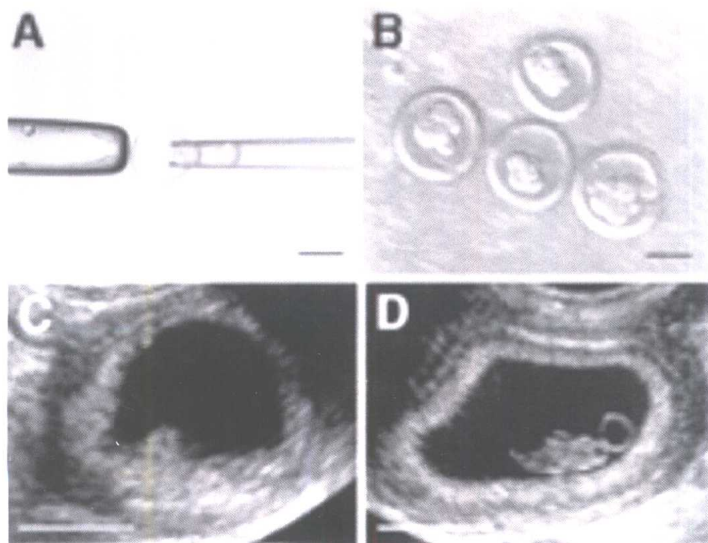


图7-6 胚胎分割操作过程

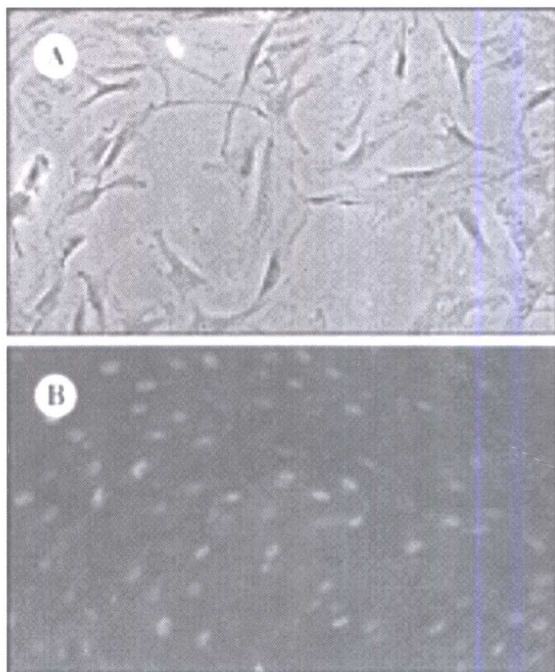


图7-16 转基因成纤维细胞和用PCNA单克隆抗体和FITC结合二抗标记的细胞(自 Cibelli 1998)

内 容 提 要

本书对当前的科技热点——克隆技术作了全面详实的介绍。展现了克隆技术的历史、现状和未来，从分子、细胞、个体等层次上阐述了克隆技术的原理、方法、设备和应用。根据克隆技术的发展方向用一些实例说明了转基因、基因敲除、基因打靶等技术内容。对由克隆引出的伦理、道德、法律问题以及世界各国对克隆的对策和管理进行了分析和探讨。

本书的重点在于动物克隆技术，介绍了从基因转导、细胞培养到动物个体的繁殖方法，并给出了大量的相关数据，使读者能够更加客观地了解克隆技术以及重大意义。

另外本书还提供了相关研究机构和互联网站的有关信息，以使对克隆技术感兴趣的读者方便地深入了解该技术的有关问题。

本书适用于非本专业的科技工作者，企事业单位领导人员，政府领导和大专院校师生。

目 录

第 1 章 绪论	1
1.1 克隆概念	1
1.2 克隆研究的主要内容	2
1.2.1 供核细胞的来源和特性	2
1.2.2 细胞质受体的来源和特性	3
1.2.3 重构胚核质适应机理	3
1.2.4 克隆技术支持体系研究	4
1.2.5 重构胚胎体内和体外培养技术	4
1.2.6 克隆技术实用化研究	4
1.3 克隆研究的历史	4
1.4 克隆研究的现状	8
第 2 章 生物的进化	12
2.1 地球的形成	12
2.2 生命的起源	13
2.3 生物进化	13
2.3.1 原生动物的出现	13
2.3.2 双胚层动物	14
2.3.3 三胚层动物	14
2.3.4 脊椎动物	15
第 3 章 细胞	18
3.1 细胞生物学基础	18
3.1.1 细胞的发现	18
3.1.2 细胞的概念	18
3.1.3 细胞的结构与功能	20
3.1.4 细胞增殖	22
3.2 细胞培养技术	25
3.2.1 基本概念	25

3.2.2	体外培养细胞的基本类型	25
3.2.3	细胞培养的基本设备	26
3.2.4	常用培养基的准备	31
3.2.5	克隆技术中常用的培养基	33
3.2.6	细胞培养步骤	34
3.2.7	外源基因导入细胞的方法	35
3.3	胚胎干细胞	36
3.3.1	胚胎干细胞的特点	36
3.3.2	胚胎干细胞的培养和建系	38
3.3.3	胚胎干细胞的应用	39
第4章	动物的繁殖	40
4.1	繁殖机理	40
4.1.1	配子的形成	40
4.1.2	精子的形成	41
4.1.3	卵泡的发育与排卵	42
4.1.4	受精作用	43
4.1.5	胚胎的发育	45
4.2	动物繁殖生物技术	46
4.2.1	胚胎移植技术	46
4.2.1.1	胚胎来源	47
4.2.1.2	胚胎的采集	51
4.2.1.3	胚胎的保存	51
4.2.1.4	受体动物的准备	51
4.2.1.5	胚胎移植	52
4.2.2	试管动物技术	52
4.2.2.1	卵母细胞的来源	52
4.2.2.2	卵母细胞的体外培养和成熟	53
4.2.2.3	体外受精	53
第5章	动物基因工程	55
5.1	转基因动物技术	55
5.1.1	转基因的构建	55
5.1.1.1	转基因的基本结构	55
5.1.1.2	转基因鸡表达载体的构建	57

5.1.2	转基因动物培育方法	57
5.1.2.1	原核胚的显微注射法	57
5.1.2.2	单细胞阶段的显微注射法制备转基因鸡	58
5.1.2.3	胚胎干细胞法	61
5.1.2.4	反转录病毒载体法	61
5.1.2.5	体细胞转染和胚胎克隆法	62
5.1.2.6	原始生殖细胞介导法	62
5.1.2.7	精子载体法	63
5.1.2.8	脂质体介导精子作载体导入外源基因法	63
5.1.3	转基因的检测	63
5.1.4	基因构件功能的检测	63
5.1.4.1	体外方法	64
5.1.4.2	活体组织 DNA 直接注射法	64
5.1.4.3	诱导泌乳法	64
5.1.5	基因表达的检测	64
5.1.5.1	表达产物的测定	64
5.1.5.2	报告基因的应用	65
5.1.6	组织特异性表达系统	66
5.1.6.1	乳腺表达系统	66
5.1.6.2	血液表达系统	66
5.1.6.3	膀胱表达系统	67
5.1.6.4	禽类输卵管表达系统	67
5.1.6.5	昆虫体液表达系统	68
5.1.6.6	精液表达系统	69
5.1.7	转基因动物作为食物引起的社会反响	69
5.1.8	各国的对策	69
5.1.9	关于转基因动物安全性	70
5.1.10	转基因动物的管理	70
5.2	基因打靶技术	71
5.2.1	同源重组	72
5.2.2	载体的设计和构建	75
5.2.2.1	插入型载体	75
5.2.2.2	置换型载体	75

5.2.3	靶细胞来源	77
5.2.4	打靶载体导入细胞技术	77
5.2.5	基因打靶技术程序	78
5.2.6	中靶细胞的筛选和富集	78
5.2.7	基因打靶的类型	79
5.2.8	基因打靶的应用	80
5.2.8.1	基因敲除的应用	80
5.2.8.2	基因功能的修饰	81
5.2.8.3	基因表达的调控	82
第 6 章	微生物和分子克隆	83
6.1	微生物的克隆	83
6.1.1	微生物概念	83
6.1.2	微生物的形态和结构	84
6.1.2.1	原核微生物	84
6.1.2.2	真核微生物	85
6.1.2.3	非细胞微生物	85
6.1.3	微生物的繁殖	86
6.1.4	微生物的培养	87
6.1.4.1	常用器具	87
6.1.4.2	培养基	88
6.1.4.3	微生物纯培养方法	88
6.1.5	基因工程菌	89
6.2	分子克隆技术	90
6.2.1	DNA 重组分子的制造	90
6.2.2	重组 DNA 的克隆	91
第 7 章	动物克隆技术	95
7.1	哺乳动物克隆技术	95
7.1.1	克隆实验室主要设备	96
7.1.2	卵母细胞的来源	96
7.1.3	核供体细胞的来源	97
7.1.4	哺乳动物的核移植	98
7.2	胚胎分割	99
7.3	胚胎细胞克隆	101

7.3.1	供核胚的来源和卵裂球的分离	101
7.3.2	核移植	101
7.3.3	多代克隆技术	101
7.4	胚胎干细胞克隆	102
7.5	胎儿成纤维细胞核移植	103
7.6	成体细胞克隆	104
7.6.1	明星“多莉”的克隆	104
7.6.1.1	技术要点	105
7.6.1.2	供核细胞来源	105
7.6.1.3	供核细胞培养	106
7.6.1.4	胞质供体	106
7.6.1.5	卵母细胞的去核	106
7.6.1.6	去核卵母细胞的激活	106
7.6.2	檀香山技术	106
7.6.2.1	技术特点	107
7.6.2.2	供核细胞	107
7.6.2.3	卵母细胞的采集和去核	107
7.6.2.4	卵母细胞激活	108
7.6.2.5	重构胚的移植	108
7.6.3	转基因克隆技术	108
7.6.3.1	构建载体	109
7.6.3.2	体细胞的培养和基因转染	109
7.6.3.3	转染细胞的鉴定	110
7.6.3.4	核移植	110
7.6.4	基因打靶转基因克隆技术	110
7.6.4.1	目的基因(靶基因)的选择	110
7.6.4.2	打靶载体的构建	111
7.6.4.3	基因打靶转基因克隆羊产生过程	111
7.6.5	异种动物克隆	113
第8章	克隆技术的应用	117
8.1	克隆技术在畜牧业生产上的应用	118
8.2	转基因动物生产	120
8.2.1	转基因动物研究存在的问题	120

8.2.2 克隆技术在转基因动物生产中的优势	122
8.3 特殊动物基因资源的保护	123
8.3.1 珍稀动物保护	123
8.3.2 天然抗布鲁氏病牛的克隆	125
8.3.3 美国野黄牛 (gaur) 的克隆	125
8.4 克隆技术和实验动物	126
8.4.1 实验动物种类	126
8.4.2 克隆技术与实验动物	128
8.5 异种器官移植	129
8.5.1 概述	129
8.5.2 可能的风险	130
8.5.3 排异反应	131
8.5.4 器官移植的管理	133
第9章 克隆技术的是非	134
9.1 克隆技术存在的问题	134
9.1.1 克隆动物生产费用	134
9.1.2 克隆动物成活率	134
9.1.3 克隆动物个体生理或免疫缺陷	135
9.1.4 克隆动物的早衰现象	135
9.2 克隆人的争论	137
9.2.1 争论的由来	137
9.2.2 技术问题	138
9.3 影响克隆成功率的因素	139
9.3.1 克隆成功率	139
9.3.2 影响克隆成败的可能因素	141
9.4 克隆展望	141
附录一 有关网站	143
附录二 进行克隆研究的主要单位	144
参考书目	146