

高等学校教材

动物细胞工程与实践

► 李青旺 主编



化学工业出版社

教材出版中心

高等学校教材

动物细胞工程与实践

李青旺 主编

胡建宏 高大威 陈学进 副主编



化学工业出版社
教材出版中心

· 北京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

动物细胞工程与实践/李青旺主编. —北京: 化学工业出版社, 2005. 3

高等学校教材

ISBN 7-5025-6554-X

I. 动… II. 李… III. 动物-细胞工程 IV. Q952

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 015322 号

高等学校教材

动物细胞工程与实践

李青旺 主编

胡建宏 高大威 陈学进 副主编

责任编辑: 杨 菁

文字编辑: 周 倜

责任校对: 郑 捷

封面设计: 藩 峰

*

化学工业出版社 出版发行
教材出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

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

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 27 $\frac{1}{2}$ 字数 733 千字

2005 年 6 月第 1 版 2005 年 6 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6554-X/G · 1680

定 价: 44.00 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

内 容 提 要

本书内容包括目前动物细胞工程十大技术：动物人工授精、动物体外受精控制、动物性别控制、动物胚胎移植、动物发情鉴定与早期妊娠诊断、动物细胞体外培养、动物克隆、动物转基因、动物干细胞、动物胚胎与卵母细胞冷冻保存。本书将“细胞工程”、“动物生殖工程”、“细胞生物学”和“基因工程”四门课有机整合在一起，以知识的运用和实践操作能力培养为重点，突出实践环节；突出图表等直观教学手段，增强直观性，便于自学。

本书可供高等院校生命科学、生物工程、生物制药、生物化工等专业的师生及科研人员使用。

前 言

生物工程是生命科学中一门重要的学科，动物细胞工程又是生物工程中一门最具有基础性、理论性、实践性和创造性的分支学科，也是当前生命科学、生物制药和生物化工等相关学科或专业的一门理论性与实践性很强的专业基础课或专业课。掌握动物细胞工程原理与方法，是提高动物、生物制药与生物化工等产品数量与质量的基础和手段，是我国动物生产、生物制药与生物化工走向现代化、标准化、产业化、商品化发展的需要。本书以生命科学、生物制药与生物化工等专业所需要的基础理论和实践操作技能为前提，重点阐明了动物细胞工程各技术环节的基本原理和实践操作技术。

本书本着科学性、先进性、系统性和实用性的原则，依据高等学校教学特点和当前农业、医学，特别是生物制药与生物化工等学科发展的要求，在教材结构上突出了基础理论与应用技术的有机结合，注重前沿性、实用性与可操作性。例如，将当前动物细胞工程各技术环节最先进理论与技术贯穿于教材中，同时实验内容与教学内容融为一体，既可供教师讲解时使用，也可供学生实践时参考，避免了重复，又保证了各章节内容的系统性和完整性。内容上突出生命科学、生物制药与生物化工产品研究开发中所需的相关基础理论与实用技术，强调理论的科学性和方法的先进性，由此形成了本教材的特色。对于一些较新、偏深的内容，考虑到学科生命科学、生物制药与生物化工的发展，以及一些学有余力的学生自学需要，本书各章节均有涉及，供学生自选学用。因此，本教材既可以作为高等学校生命科学、生物制药、生物化工等以及相关专业的必修教材，也可以作为从事生命科学、生物制药、生物化工等相关产业产品的研究开发人员的自学参考用书。

本书各章编写分工为：第一章胡建宏、王立强编写，第二章李青旺、陈晓宇编写，第三章胡建宏、江中良、李健编写，第四章高大威、赵红卫、龙玲编写，第五章于永生、高大威编写，第六章赵红卫、卜书海、耿果霞、夏凡编写，第七章江中良、高大威编写，第八章陈学进、王立强、耿果霞、胡建宏编写，第九章李青旺、耿果霞、胡建宏编写，第十章李青旺、韩增胜、陈学进、赵红卫编写，制图胡建宏、王立强、夏凡。初稿形成后，由主编李青旺，副主编胡建宏、高大威，参编赵红卫、王立强、陈学进、耿果霞、江中良、卜书海、于永生、韩增胜、陈晓宇、夏凡、龙玲、李健等负责统稿。该书出版之前，特邀请西北农林科技大学著名生殖学专家张岳教授、著名产科学专家王建辰教授审

阅全书，两位专家对本教材的优点与特色给予了充分肯定，同时也提出了宝贵的修改意见。燕山大学高大威、赵红卫、李健，西北农林科技大学胡建宏、江中良、王立强、夏凡等同志参与了书稿的部分校对工作。本书在编写过程中，还得到了燕山大学教务处、环境与化学工程学院，西北农林科技大学动物科技学院有关领导和同事的大力支持和密切配合。为此，我们向所有关心、支持本书编写、出版、发行的同志们表示衷心的感谢。

关于动物细胞工程教科书，目前国内编写出版的较少，细胞工程理论与技术日新月异。我们在编写过程中，参阅了大量有关最新文章、书籍，收集了近几年来我们在该领域的研究结果与教学经验。编写适宜于生命科学、生物制药与生物化工等相关学科发展需要的高等院校细胞工程教材，只是我们的一个初步尝试和探索，希望本教材填补该类教材的不足以及满足当前生命科学、生物制药与生物化工等相关学科教学、科研和生产需要。

由于时间和经验不足，资料收集不全，整理撰写过程中难免有所遗漏、不尽完善及错误之处，我们真诚希望读者使用后多提宝贵意见，以使其逐步完善。

编者

2004年12月

目 录

绪论	1
一、学习细胞工程课程的意义	1
二、动物细胞工程的主要内容	4
三、本教材的主要特色	4
四、当前动物细胞工程研究的主要领域	5
五、发展前景	7
第一章 动物人工授精技术	9
第一节 人工授精技术概况	9
一、人工授精技术的发展简史	9
二、人工授精的意义	9
第二节 人工授精技术	10
一、采精技术	10
二、精液品质鉴定	14
三、精液的稀释	19
四、输精	20
第三节 液态精液的保存技术	23
一、常温保存	23
二、低温保存	24
三、液态精液的运输	27
第四节 冷冻精液的保存技术	27
一、冷冻精液的研究概况	27
二、精液冷冻保存原理	28
三、冷冻精液的制作技术	28
第五节 哺乳类动物的人工授精技术	36
第六节 家禽的人工授精技术	38
一、家禽人工授精概述	38
二、采精技术	39
三、精液品质评定	43
四、精液的稀释	45
五、家禽精液的保存	47
六、家禽的输精技术	48
第七节 野生禽类的人工授精技术	50
一、丹顶鹤的人工授精技术	50
二、鹤鹑的人工授精技术	52
第八节 人工授精及冷冻精液技术的发展前景	52
参考文献	53
第二章 动物体外受精控制技术	55
第一节 体外受精研究简史	55

第二节 卵母细胞的体外成熟	57
一、卵母细胞的获取	57
二、卵母细胞体外成熟的方法	58
三、卵母细胞体外成熟的特征及标志	60
四、几种动物卵母细胞体外成熟培养的方法	61
五、卵母细胞体外成熟的影响因素	62
第三节 精子获能	64
一、精子获能的机制	64
二、精子获能的方法	65
三、影响精子体外获能的因素	66
四、精子获能的判定	67
第四节 体外受精	67
一、精子预处理	67
二、精子活力的提高	68
三、精卵相互作用	69
四、几种动物的体外受精方法	70
五、影响体外受精的因素	72
六、异常受精	74
第五节 早期胚胎体外培养	74
一、体外培养方法	74
二、发育阻滞	75
三、体外培养系统	75
第六节 显微受精	76
一、显微受精的过程	77
二、显微受精的方法	77
三、精子显微注射操作程序	78
四、影响显微受精的因素	81
五、显微受精技术的应用	84
第七节 体外受精技术在动物生产中的意义及前景	85
一、挖掘优良母畜的繁殖潜力, 提高良种公畜的利用率	85
二、缩短动物育种的世代间隔, 提高育种效率	85
三、评定动物精子质量, 了解精子受精潜力	85
四、治疗动物的不孕症	85
五、保护野生动物资源, 拯救濒危动物	85
参考文献	86
第三章 动物性别控制技术	89
第一节 动物性别控制的研究简史	89
第二节 动物性别决定的机理	90
一、性别的两级决定及性别决定基因	90
二、性别决定的发育学机制	92
三、性别决定的遗传学机制	93
四、性别决定的时空特征	94
第三节 SRY 基因结构与表达特性	95

一、哺乳动物的 SRY 基因	95
二、SRY 蛋白的 DNA 结合活性	96
三、SRY 的靶基因	97
第四节 动物早期胚胎性别鉴定的方法	97
一、细胞遗传学方法	98
二、生物化学微量分析法	99
三、免疫学方法	99
四、分子生物学方法	101
第五节 X 精子、Y 精子的分离方法	106
一、X 精子与 Y 精子的区别	106
二、X 精子、Y 精子的分离技术	108
第六节 性别控制的其他方法	111
第七节 家禽的性别决定、分化、鉴定及控制	112
一、家禽的性别决定	112
二、家禽的性别分化	112
三、家禽的性别鉴定	113
四、家禽的性别控制	114
第八节 现代动物性别控制技术的发展前景	116
参考文献	118
第四章 动物胚胎移植技术	120
第一节 胚胎移植的研究概况	120
一、胚胎移植的发展简史	120
二、胚胎移植技术在动物生产中的意义	121
第二节 胚胎移植的基本原则及技术	123
一、胚胎移植的基本原则	123
二、胚胎移植技术	124
参考文献	153
第五章 动物发情鉴定与早期妊娠诊断技术	155
第一节 动物发情鉴定技术	155
一、动物发情鉴定的发展概况	155
二、发情鉴定方法	156
第二节 动物早期妊娠诊断技术	166
一、动物早期妊娠诊断的发展简史	167
二、母畜早期妊娠诊断的方法	167
参考文献	183
第六章 动物细胞体外培养技术	185
第一节 细胞体外培养的设备器具	185
一、细胞体外培养的主要设备仪器	185
二、细胞体外培养的主要培养器具	187
第二节 细胞体外培养用液	191
一、缓冲液	191
二、平衡盐溶液	192
三、培养基	193

四、消化液·····	203
五、抗生素液·····	204
第三节 细胞培养的基本方法与过程·····	204
一、原代培养·····	204
二、传代培养·····	213
三、体外培养的基本技术·····	215
第四节 不同动物细胞培养·····	223
一、上皮类细胞培养·····	223
二、结缔组织类细胞培养·····	231
三、肌肉组织类细胞的培养·····	233
四、神经组织类细胞培养·····	235
第五节 影响细胞体外生长的因素·····	237
一、营养成分与生长基质成分·····	237
二、温度条件对细胞生长的影响·····	237
三、气相环境对细胞生长的影响·····	238
四、培养液的 pH 对细胞生长的影响·····	239
五、辐射对细胞生长的影响·····	239
六、超声波对细胞生长的影响·····	240
七、影响细胞生长的其他因素·····	241
第六节 细胞体外培养技术的应用·····	241
一、在细胞生物学上的应用·····	241
二、在肿瘤学方面的应用·····	242
三、在微生物学领域的应用·····	243
四、在免疫学方面的应用·····	244
五、在药理学领域的应用·····	244
六、大规模细胞培养在生产实践上的应用·····	245
七、在现代生物技术领域的应用·····	245
参考文献·····	246
第七章 动物克隆技术·····	249
第一节 动物克隆的研究简史·····	249
一、胚胎分割·····	249
二、胚胎细胞核移植·····	250
三、胚胎干细胞核移植·····	251
四、体细胞核移植·····	251
五、异种动物的细胞核移植(异种克隆)·····	252
第二节 动物克隆的原理及技术路线·····	252
一、动物克隆的原理·····	252
二、动物克隆的技术路线·····	254
第三节 动物克隆的方法·····	255
一、核移植所需仪器设备·····	255
二、动物克隆的方法·····	255
第四节 动物克隆的影响因素·····	270
一、影响胚胎分割效果的主要因素·····	270

二、影响哺乳动物胚核移植和体细胞核移植效果的因素	272
第五节 动物克隆技术的应用及发展前景	276
一、胚胎分割技术存在问题及在动物生产中的意义	276
二、胚细胞核移植和体细胞核移植目前存在的主要问题	277
三、胚细胞核移植和体细胞核移植技术的应用前景	279
参考文献	282
第八章 动物转基因技术	285
第一节 转基因技术的概述	285
一、转基因的分离与重组	285
二、转基因导入卵或胚胎	287
三、转基因的整合和表达	287
四、基因导入胚胎的培养和移植	289
五、转基因动物外源 DNA 检测	289
第二节 转基因的导入方法	291
一、显微注射法	291
二、逆转录病毒感染法	292
三、体细胞克隆法	293
四、胚胎干细胞介导法	294
五、精子载体法	295
六、基因打靶	296
七、原始生殖细胞技术	299
八、磷酸钙沉淀法	300
九、电转移法	300
十、脂质体载体法	300
十一、嵌合体	302
第三节 家禽转基因	303
一、家禽的胚胎移植	303
二、家禽转基因的方法	303
三、家禽转基因技术存在的问题	307
四、转基因技术在家禽遗传育种中的应用	307
第四节 转基因动物技术的发展	309
一、传统方法研究转基因动物的局限性	309
二、基因打靶与核移植	309
三、克隆技术与转基因技术结合的必要性和必然性	311
第五节 转基因动物技术的应用	313
一、在基础理论方面的研究应用	313
二、在畜牧兽医生产中的应用	313
三、在医学领域中的应用	315
第六节 动物生物反应器	318
一、乳腺生物反应器	318
二、鸡输卵管生物反应器	322
第七节 转基因动物研究中存在的问题及发展对策	324
一、转基因动物存在的问题	324

二、动物转基因问题的对策	326
参考文献	328
第九章 动物干细胞技术	331
第一节 胚胎干细胞的特性	331
第二节 胚胎干细胞分离克隆的方法	332
一、分化抑制物的选择和培养基的设计	332
二、早期胚胎的选择	334
三、早期胚胎的操作及培养	334
四、早期胚胎培养 ES 细胞的分离	336
五、ES 细胞的鉴定	337
六、ES 细胞的冷冻保存	338
第三节 胚胎干细胞系的建立	339
一、ES 细胞分离材料的获取及处理方法	339
二、ES 细胞的分化抑制培养	340
三、ES 细胞系的建立及保存	345
第四节 动物胚胎干细胞分离与克隆	350
一、小鼠胚胎干细胞的分离与克隆	350
二、牛胚胎干细胞的分离克隆	352
三、猪胚胎干细胞的分离与克隆	354
四、猕猴胚胎干细胞的分离与克隆	355
第五节 PGCs 建立胚胎干细胞系的方法	356
一、饲养层的制作	356
二、PGCs 的分离	357
三、PGCs 的培养条件	357
四、PGCs 分离克隆 EG 细胞识别与建系	358
五、PGCs 分离克隆 ES 细胞的影响因素	359
六、PGCs 分离克隆 ES 细胞存在问题及发展前景	360
第六节 胚胎干细胞分离克隆的影响因素	362
一、饲养层	362
二、胚龄	363
三、培养液	364
四、生长、抑制因子	364
五、遗传背景	365
六、培养方式	366
七、其他因素	366
第七节 动物胚胎干细胞的应用前景	366
一、生产克隆动物	366
二、生产转基因动物	367
三、生产用于人类器官移植的动物器官, 建立人类遗传病研究动物模型	368
四、家畜性别控制	369
五、作为胚胎发育的模型, 研究胚胎发育的基因调控	370
六、研究真核细胞基因表达与调控	371
七、研究外源基因在动物发育中的作用	371

八、研究同源重组序列长度与外源基因整合效率的关系·····	371
九、研究细胞分化的机制·····	371
十、在脑修复中的作用·····	372
第八节 神经干细胞·····	372
一、神经干细胞的特征·····	373
二、神经干细胞的分布·····	373
三、神经干细胞的分化诱导·····	373
四、神经干细胞的体外培养·····	373
五、神经干细胞在神经损伤修复中的应用前景·····	376
第九节 造血干细胞·····	377
一、造血干细胞的基本特性·····	377
二、造血干细胞的鉴别·····	378
三、造血干细胞的细胞表型及其功能测定·····	378
四、造血干细胞细胞周期的调控·····	379
五、造血干细胞的分离纯化·····	380
六、造血干细胞体外扩增与定向诱导分化·····	381
七、造血干细胞相关的细胞治疗与基因治疗·····	381
八、造血干细胞移植的新资源·····	382
九、造血干细胞的应用前景·····	383
参考文献·····	383
第十章 动物胚胎与卵母细胞冷冻保存技术 ·····	387
第一节 胚胎冷冻技术·····	387
一、胚胎的冷冻原理·····	387
二、胚胎的冷冻方法·····	390
三、几种哺乳动物胚胎超低温冷冻保存方法·····	400
四、半胚冷冻·····	402
五、胚胎的解冻方法·····	403
六、胚胎冷冻效果的鉴定·····	405
第二节 卵母细胞的冷冻技术·····	406
一、卵母细胞冷冻的发展简史·····	406
二、卵母细胞冷冻保存的原理·····	411
三、冷冻对卵母细胞结构的影响·····	413
四、卵母细胞的获取、分级与冷冻·····	415
五、卵母细胞的解冻·····	417
六、卵母细胞冷冻效果的鉴定·····	418
七、影响卵母细胞冷冻效果的因素·····	418
第三节 胚胎及卵母细胞冷冻保存的挑战与展望·····	419
一、胚胎冷冻存在的问题·····	419
二、卵母细胞冷冻存在的问题·····	420
三、应用前景展望·····	421
参考文献·····	421
附录 培养基 ·····	424

绪 论

任何生命有机体都由细胞构成，生命活动的基本单位是细胞。生物的生殖、发育、衰老、新陈代谢、遗传等一切生命现象都是以细胞为基础的。动物的生长、发育、生殖、衰老、死亡也是依靠细胞增殖、分化、衰老、凋亡来实现的。例如，大脑的活动靠 10^{12} 个细胞调节，一切疾病发生机制以细胞病变为起因。因此，采用有效的手段，对细胞进行控制，已经成为现代生物工程技术研究和发展的的重要手段，细胞工程就是人们按照自己的愿望，通过各种物理和化学手段改造细胞的结构、调控细胞功能与生理活动过程，以期更好地创造特定功能或用途的细胞、组织器官、新物种或新产品来满足人们的需要。细胞工程是生物制药和生物化工以及其他相关学科必需的基础专业课或专业课。所以，深入掌握细胞工程原理和技术，不但可以逐步提高人们对细胞增殖、分化与衰老机理的认识，而且更重要的是可以有效利用细胞潜在的生物学特性与功能创造新的产品，以满足人类日益增长的物质需要。

一、学习细胞工程课程的意义

1. 细胞是生命活动的基本单位

从细胞角度来说，任何生命有机体都由细胞构成。生命的繁殖、生长、发育、神经活动、遗传等一切生命现象都以细胞为基础。动物生长发育、寿命的维持都必须依赖细胞不断地增殖、分化、衰老、凋亡来调控。多细胞生物有机体根据其发育程度大多由数百乃至万个细胞构成。高等动物有机体由无数个功能与形态结构不同的细胞构成。有人统计成人有机体大约含 10^{14} 个细胞，刚生出的婴儿机体含有 2×10^{12} 个细胞。人的大脑活动是靠 10^{12} 个细胞相互协调而进行的。一切疾病的发病机制也是由细胞的病变而引起的。1g 哺乳动物的肝或肾组织大约有 2.5 亿~3 亿个细胞。人体内大约有 200 多种不同类型的细胞，根据其分化程度又可划分为 600 多种，它们的形态结构与功能虽然差异很大，但都是由一个早期受精卵通过增殖、分裂、分化而来的。在多细胞生物机体中，功能相同的细胞群体构成机体的组织，但它们又保持着形态与结构的独立性，每个细胞均具有自己一套独立完整的结构体系，构成有机体基本结构单位。每一个细胞，不论低等生物或高等生物的细胞，单细胞生物或多细胞生物的细胞，结构简单或复杂的细胞，未分化或分化的细胞（除个别终末分化的细胞外），性细胞或体细胞，都包含着全套的遗传信息，即全套的基因，也就是说它们具有遗传的全能性。在有机体一切代谢活动与执行功能的过程中，细胞呈现为一个独立的、有序的、自动控制性很强的代谢体系。在细胞内与试管内的生化过程根本不同点是，细胞表现为有严格程序的、自我控制的代谢体系，这是由细胞自身结构的装置及其协调性所决定的，是长达 10 亿年进化的产物，细胞结构完整性的任何破坏，都会导致细胞代谢的有序性与自控性的失调。因此，细胞与农业、医业、生物高技术产品发展都有着密切关系，在解决人类面临的重大问题，促进社会和经济发展中将会发挥重要的基础作用。

2. 细胞工程是提高生物生产性能的主要技术措施之一

在生产实践中，任何生物的生产性能均主要取决于两个方面，一是品种特性，二是繁殖性能。对于品种特性来说，一个物种的优良或低劣主要取决于它的遗传基础，遗传基础的改进和提高，又必须依赖于物种遗传与改良理论和技术的进步，这也是任何一个物种能否继续生存的基本条件。但是，任何动植物品质改进，都必须从构成有机体的基本单位细胞入手，通过采用物理、化学等手段，对细胞中遗传物质 DNA 片段进行交换（替换）、插入、敲除

或者早期受精卵细胞、体细胞中细胞物质的交换、克隆，原有的物种品质才可以得到改良。动物细胞工程就是基于这一要求，借助物理、化学等手段来交换更新细胞物质的遗传结构或通过受精卵细胞内细胞以及其他物质的交换而达到改造细胞遗传特性和生理功能的目的，从而有效提高动植物的生产性能和产品质量。因此，动物细胞工程等技术的运用，在当前提高动物生产性能方面已成为最基本、最重要的技术措施之一。

3. 动物细胞工程是揭示生物奥妙的主要研究手段

任何生物体都是一个非常复杂的有机体。人类尽管经过了许多年的艰苦探索，但是对于生物体与自然的某些关系，以及生物体本身自我调节的机制还远未搞清楚。随着十几年来分子生物学技术的研究进展，调控生物的主要遗传物质——基因已逐渐被人类所认识。然而，对于基因如何调控生物某些特定性状的机制，以及基因本身如何受外界某些因素的调控等许多问题，仍需人们进行长期不懈的努力。

如何有效开展上述问题的研究？目前采取的惟一有效手段就是利用现代遗传理论、动物生殖生理学和细胞工程技术。例如，转基因动物的研究、体细胞克隆、干细胞克隆定向分化、目标基因的整合及表达调控等研究，都离不开细胞工程理论与技术的支撑。所以，细胞工程理论与技术既是提高动物生产性能的主要技术措施，又是揭示生物奥妙的必不可少的主要研究手段。

4. 动物细胞工程是新物种产生的主要技术途径

在农牧业生产中，新的优良高产个体的产生，必然会给今后的农牧业生产带来深刻的影响。在过去的研究中，新品种的产生，一是通过杂交改良，二是通过遗传物质染色体的偶然突变。可是这两种途径，不但耗费时间太长，而且所培育的物种不一定完全符合人们的愿望。伴随着现代细胞工程理论与技术的不断发展，今后动物新品种的产生主要依赖于细胞基因导入和细胞克隆技术。但是无论借用哪一种技术，又都必须以细胞工程理论和技术为指导。例如，为了育成一个新的特定个体，可采用定向细胞导入某一决定优良高产的基因，或者通过优良个体卵细胞和体细胞克隆等方法，但这种技术能否顺利产生新的个体，都必须采用同期发情、卵细胞体外成熟培养、体外受精、早期胚胎培养和胚胎移植等一系列细胞工程技术。当一个新的生物品种通过上述途径产生后，优良高产个体的选育、高产群体的扩大，仍离不开细胞工程理论与技术的指导。很显然，动物细胞工程理论及技术不但是动物繁衍壮大的基础，也是今后不断揭示生物本质，以及培育生物新品种的主要技术途径。

5. 动物细胞工程是生物制药和生物化工产品生产的主要技术措施

生物技术生产的药品与传统药物生产方式不同，它们是复杂的蛋白分子和活性多肽。大多数生物技术药物必须以活性哺乳动物细胞或微生物细胞通过发酵来制备。常规制药主要有4种途径。一是利用动物组织器官、血液及排泄液直接提取。二是利用植物细胞直接提取，目前大多数中草药都通过此途径生产。三是利用基因工程提取目标基因转入酵母细胞、大肠杆菌等细胞经过发酵、培养，大量克隆，然后粉碎细胞提取，再合成生物药品。四是目标基因导入哺乳动物细胞，通过细胞体外培养、克隆，提取生物有效成分。但是，前4种方法都有许多不足之处。①用植物细胞生产药品，来源有限，例如，从红豆杉树皮提取抗癌药物，此树生长缓慢，现生存数量极少。其次，用植物细胞生产的药品结构不一致，副作用大。②用动物组织器官、血液、排泄液提取药品，易于引起疾病传播，同时来源十分有限，例如，生长激素的提取，需要大量的动物脑垂体器官，胰岛素的提取需要大量的猪、牛等动物胰腺。③应用微生物生产药品虽然目前较为广泛应用，但微生物无法对目标基因表达的真核蛋白进行翻译后正确修饰（如糖基化、乙酰化等），虽能加工，但程度低，最终造成结构不一致，副作用大。目前利用微生物生产药品大多必须通过基因工程下游技术再构建，但通过重组构建生产药品成本很高。④应用细胞体外克隆生产药物，目前细胞体外培养技术不太成

熟,成本也较高。如何解决上述制药中存在的问题,目前最有效途径之一就是利用动物细胞工程与基因工程相结合,即通过基因工程提取、合成目标基因,导入动物早期受精卵细胞,生产转基因动物,然后通过转基因动物乳腺合成分泌生物活性药品,直接利用或提取。

目前全球已有生物技术制药公司 2000 多家,其中美国 1300 家,欧洲 700 家,较大的生物技术公司多分布在美国。2000 年生物技术药品总销售额超过 200 亿美元,未来市场将持续增长,年增长率超过 20%,预计 2006 年全球市场将达到 320 亿美元左右。许多科学家预计,到 2010 年,全世界 70% 的药品都将被细胞工程生物药品取代。因此,细胞工程技术将会是今后生物制药的主要生产技术途径。

6. 动物细胞工程是人类今后器官移植、修复、再生的主要技术途径

异源器官移植可能是今后解决世界范围内普遍存在的器官短缺的有效途径。最早人类试图用猴子、猩猩作为人类器官移植的来源,后来许多研究发现人类艾滋病最早可能来源于猴子或猩猩,另外,猴子或猩猩与人类十分相近,通过器官移植也可能给人类传播各种猴子或猩猩自体拮抗而人类易感的疾病。后来,人们逐渐发现猪可作为人类器官移植的来源。猪器官的体积、性状及 DNA 与人类基本上相似,是理想的肾、心、肝等器官供应者,并且猪的妊娠期短、产仔数多、后代生长快,饲养管理简单,不存在伦理学方面的问题,这也是猪作为人类器官移植供体动物的优势。但是,猪作为器官移植出现的主要问题是异种器官移植时易产生超急性排斥反应(HAR),从而阻止了这一进程。HAR 发生的免疫学基础是器官移植时自发产生的细胞毒素异源反应抗体与猪内皮细胞上的碳水化合物结构的物质结合,从而导致补体激活。人类补体激活受一系列被称为补体活性调节因子负调节,这些因子包括衰变促进因子(DAF)、膜辅助蛋白(MCP)以及 CD59。目前研究的重点是基于对补体激活的阻断,使转基因猪的免疫类型与人类一致,克服异种器官移植所产生的排异反应。2003 年 1 月 2 日,总部设在苏格兰的英国 PPL 医疗公司称,克隆多莉羊的几位英国科学家已经克隆出 15 头幼猪,它们身上没有人体排斥的基因,从而解决了猪器官移植时常会出现的排异现象。科学家预言,异体器官移植将会成为现实,它将会给人类器官移植业带来一场革命。我国 863 计划也生产转 DAF 基因猪。这些研究结果表明,通过转基因技术创造能供给人类器官的转基因猪,这是一个非常诱人的研究领域。

器官修复、再生是继器官移植研究之后人类试图探索的人类器官克隆、病变修复的另一个技术途径。细胞工程中的干细胞克隆及定向分化研究目前已成为人类器官克隆、病变修复、更新的主要技术途径。人类器官病变主要由细胞代谢功能失常、信号通路中断、细胞坏死等而引起。如何像机器零件一样更新修复人体器官已成为当前医学界亟待探索的问题。干细胞克隆就是在组织器官中特定部位分离具有全能性的不同原始细胞,经过体外培养,使其不断成倍扩增。干细胞定向分化是利用干细胞发育的多能性在体外不同的培养基中分化为不同的组织细胞。人类如果某一器官病变,一种途径是利用生物材料构成相应的器官支架或模型,通过对该组织器官干细胞的分离,定向分化、克隆,细胞将附着在支架上不断扩增生长,组成相应的克隆器官,然后再移植给器官病变的病人,即器官克隆。另一种途径是从病变组织器官中分离出干细胞,通过体外定向分化,大量克隆,然后再注入到该病变的组织器官中,取代病变坏死的细胞,即组织器官病变的修复或干细胞治疗。目前国际上通过干细胞克隆、定向分化,干细胞皮肤、干细胞眼角膜已经在临床上广泛应用,同时通过干细胞注入的组织器官病变修复也已获得成功。另外,通过细胞工程中细胞克隆和基因工程技术构建新的动物疾病模型(如人类目前难以治愈的癌症、艾滋病、肝炎、糖尿病等),有助于更好地研制新的生物药品以有效应对人类各种疑难疾病的治疗。预计不远将来,利用细胞工程生产的人类器官移植、病变器官修复、更新,将会像机器零件的更新一样在临床上获得广泛应用。很显然,动物细胞工程技术不但在生物制药中越来越显示出它的巨大功能,而且在人类

器官移植、修复、更新过程中也将会发挥更大作用。

7. 动物细胞工程是珍稀动物保护、扩繁的主要技术手段

我国特有珍稀动物,如大鲵(娃娃鱼)、大熊猫、藏羚羊、林麝等大多处于濒临灭绝边缘,例如,林麝是我国仅有十分珍贵的药用动物,所产麝香既是高级香水的重要组成成分,又是治疗心脏病药救心丸中不可缺少的必需成分。目前国际上1kg麝香价值大约5万美元。但是近几年来,由于大量偷猎和其生息地环境严重破坏,林麝生存数量不足两千多只。大熊猫、藏羚羊与林麝所处命运相同,也处于濒临灭绝边缘。如何有效保护扩繁这些十分珍贵的动物,满足人类不断需要,惟一有效途径就是利用细胞工程技术中细胞体外培养、细胞冷冻长期保存、体外受精、人工授精、卵细胞或体细胞同种异种克隆、胚胎移植等手段,保护这些动物并使其供人类长期利用。很显然,动物细胞工程不但广泛应用于农业、医业,而且在稀有珍贵野生动物有效保护利用中也将是一个主要的技术平台。

8. 动物细胞工程是农产品、生物制品参与国际市场竞争的需要

我国加入WTO后,对农业、医业来说,既有机遇又有挑战。从我国农业、医业生产现状看,与发达国家相比,仍然有较大差距。表现在,农业、医业(药品)总体数量少,质量很差;农产品、医药生产加工技术十分落后(特别是中药业),很难进入国际市场。毫无疑问,我国农产品、医药品要在国际上取得一定份额,就必须加强发展,努力提高我国农产品和医药品的数量与质量。

如何提高我国畜产品、医药品数量与质量呢?第一,必须采用现代细胞工程理论与技术,不断提高动物以及现代生物制药生产水平和产品质量,加快该领域理论与技术的研究、新产品开发和产品质量的改进。第二,深入研究农产品、医药品加工技术,进一步提高畜产品、医药品深加工水平。所以,加入WTO后,加速动物细胞工程理论与技术在养殖业、医药生产中的研究及应用,不但将会不断提高我国畜产品、医药品数量与质量,而且更有效地促进我国畜产品、医药品在国际市场上的竞争能力和出口份额。

二、动物细胞工程的主要内容

动物细胞工程是生物科学各分支学科中最具有基础性、理论性、创新性和实践性的分支学科,也是生物工程科学的核心理论和实践基础。

动物细胞工程理论宽广、机理复杂、技术多样、学科面广泛,影响深远。细胞工程学除与动物解剖学、组织学、胚胎学、生殖学、生理学、生物化学及分子生物学等学科关系密切外,也与动物营养学、微生物学、环境保护学、卫生学、药理学、食品学、放射性学、水学及大气学等学科有关。所以动物细胞工程是生物工程、生物制药、生物化工和生命科学等专业多学科相互交叉融合,理论与实践并重的重要学科。

它的主要内容包括动物人工授精技术、动物体外受精控制技术、动物性别控制技术、动物胚胎移植技术、动物发情鉴定和早期妊娠诊断技术、动植物细胞体外培养技术、动物克隆技术、转基因动物研究技术、干细胞克隆与定向分化技术以及动物细胞长期冷冻保存技术,全书重点强调理论的应用与可操作性。

三、本教材的主要特色

动物细胞工程既是一门生物工程生物制药、生物化工和生命科学等专业重要的理论性基础课,又是一门实践性很强的专业课,对于学生其他各学科的进一步学习以及今后的发展都有着直接关联。所以本教材的编写力求体现宽知识、深理论、重实践原则,更重要的是立足21世纪社会经济对生物制药、生物化工人才的需要。根据这些要求,本教材编写具有以下特点。