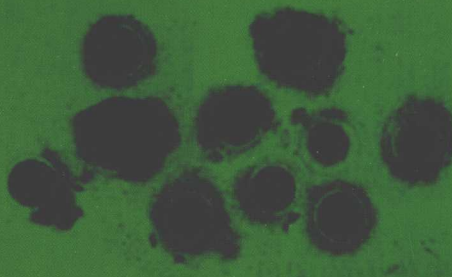


动物胚胎工程

徐兴军 张伟伟 等编著

DONGWU
PEITAI
GONGCHENG



东北林业大学出版社

动物胚胎工程

徐兴军 张伟伟 等编著

东北林业大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

动物胚胎工程/徐兴军, 张伟伟等编著. —哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2009. 6
ISBN 978-7-81131-471-7

I. 动… II. ①徐…②张… III. 动物学: 胚胎学 IV. Q954.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 093319 号

责任编辑: 任 俐

封面设计: 彭 宇



NEFUP

动物胚胎工程

Dongwu Peitai Gongcheng

徐兴军 张伟伟 等编著

东北林业大学出版社出版发行

(哈尔滨市和兴路 26 号)

黑 龙 江 省 教 育 厅 印 刷 厂 印 装

开 本 787 × 1092 1/16 印 张 18.75 字 数 432 千 字

2009 年 6 月 第 1 版 2009 年 6 月 第 1 次 印 刷

印数 1—1 000 册

ISBN 978-7-81131-471-7

定价: 30.00 元

前 言

随着科学技术的高度发展,建立在生命科学理论基础上的生物技术在人类生产生活中的作用越来越大。生物技术主要包括四个方面:基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。而胚胎工程(embryo biotechnology)就是细胞工程的重要组成部分,是动物育种、品种改良的有效途径,是细胞生物学和发育生物学研究生命本质的有效方式,是利用人工方法影响、改变动物胚胎品质发育和进程的一种生物技术。主要是对哺乳动物的胚胎进行某种人为的工程技术操作,然后让它继续发育,获得人们所需要的成体动物的新技术。实际上是动物细胞工程的拓展与延伸。在低等生物中,人们早已着手控制或改变其胚胎发育速度,研究各部分形成的机制,现在也应用于高等脊椎动物,特别是哺乳类动物中的家畜和野生动物。早在1891年,英国剑桥大学的赫普就在兔子身上首次成功地进行了受精卵的移植实验。到20世纪30年代,这项技术已在畜牧业上获得了越来越明显的效益。进入70年代,出现了专门从事受精卵移植的企业。高等动物的受精卵移植又叫“家畜胚胎移植”。它是将优良种畜的早期胚胎从供体母畜体中取出来,移到受体母畜输卵管或子宫中,“借腹怀胎”繁殖优良牲畜的技术。胚胎工程在此基础上发展起来。

现代动物胚胎工程的概念涵盖所有对动物配子和胚胎进行工程化操作技术方法,其技术体系主要包括四大部分:

第一部分是胚胎移植相关技术,包括超数排卵与胚胎移植技术、胚胎体外生产技术和胚胎移植前性别鉴定技术与动物性别控制技术、卵母细胞与胚胎的冷冻保存技术;

第二部分为动物克隆技术,包括胚胎分割技术、细胞核移植技术及胚胎嵌合技术体系;

第三部分为转基因动物技术;

第四部分为胚胎干细胞技术。

其中,前三类胚胎工程技术在动物生产领域具有重要的实践意义,而胚胎干细胞技术的主要研究意义在于发育生物学基础理论和人类医学组织工程。

本书内容除上述四大基本技术体系以外,还包括:绪论部分,主要是对动物胚胎工程技术的产生、发展及研究现状以及动物胚胎工程要解决的热点问题介绍;动物生殖生理的基本规律部分(如排卵、受精、胚胎早期发育),以明确胚胎的来源及其在动物繁殖过程中的地位与作用。

本书可以作为生物科学、生物技术、生物工程、生物化工、生物制药等相关专业本科生和研究生的教学用书,也可以作为该领域教学人员和科研人员的参考用书。

本书各章编写分工为:第一章:徐兴军;第二章:王维禹、袁成志、于天飞;第三章:徐兴军;第四章:张伟伟;第五章:徐兴军;第六章:于天飞、袁成志、王维禹。初稿形成后,由徐兴军、张伟伟对全书进行编排整理、加工完善。本书出版之前,特邀

请齐齐哈尔大学生命科学与工程学院邵淑丽教授审阅全书，邵淑丽教授对本书给予了充分肯定并提出了宝贵的修改意见。本书在编写过程中，得到了齐齐哈尔大学教务处、齐齐哈尔大学生命科学与工程学院有关领导、生物系主任张东向教授、生物科学专业主任杨晓杰教授和同事们的的大力支持。为此，我们向所有关心、支持本书编写、出版的同志们表示衷心的感谢。

由于时间和经验不足，资料收集不够齐全，编写整理过程中难免有所遗漏、不尽完善和错误之处，我们真诚希望读者使用后多提宝贵意见。

编著者

2009年3月于齐齐哈尔

目 录

第一章 绪 论	(1)
第二章 动物的个体发育	(15)
第一节 卵子发生	(15)
第二节 精子发生	(17)
第三节 精子发生与卵子发生的比较	(18)
第四节 受 精	(20)
第五节 配子融合与阻止多精受精机制	(25)
第六节 卵子激活机制	(30)
第七节 卵 裂	(32)
第八节 囊胚期	(43)
第九节 原肠胚和胚胎细胞重组	(43)
第十节 三胚层与器官发生	(47)
第三章 动物胚胎移植	(49)
第一节 概 述	(49)
第二节 胚胎移植技术	(53)
第三节 胚胎移植技术在动物生产中的意义(胚胎移植的应用效果及发展前景)	(88)
第四章 动物克隆技术	(91)
第一节 胚胎分割	(92)
第二节 胚胎细胞核移植	(105)
第三节 体细胞核移植	(114)
第四节 动物克隆技术的应用及发展前景	(127)
第五章 动物转基因技术	(132)
第一节 转基因技术的概述	(132)
第二节 目的基因的导入方法	(138)
第三节 转基因动物	(157)
第四节 转基因动物技术的发展	(162)
第五节 转基因动物技术的应用	(166)
第六节 动物生物反应器	(174)
第七节 转基因动物研究中存在的问题及发展对策	(181)
第六章 动物干细胞技术	(187)
第一节 干细胞生物学的概念	(187)
第二节 胚胎干细胞	(190)

第三节	胚胎干细胞分离克隆的方法	(192)
第四节	胚胎干细胞系的建立	(200)
第五节	动物胚胎干细胞分离与克隆	(213)
第六节	PGCs 建立胚胎干细胞系的方法	(220)
第七节	胚胎干细胞分离克隆的影响因素	(227)
第八节	动物胚胎干细胞的应用前景	(231)
第九节	间充质干细胞	(238)
第十节	造血干细胞	(246)
第十一节	肝干细胞	(253)
第十二节	精原干细胞	(260)
第十三节	神经干细胞	(266)
参考文献		(272)

第一章 绪 论

一、动物胚胎工程简介

随着科学技术的高度发展，建立在生命科学理论基础上的生物技术在人类生产生活中的作用越来越大。生物技术主要包括四个方面：基因工程、细胞工程、酶工程和发酵工程。而胚胎工程（embryo biotechnology）就是细胞工程的重要组成部分，是动物育种、品种改良的有效途径，是细胞生物学和发育生物学研究生命本质的有效方式，是利用人工方法影响、改变动物胚胎品质发育和进程的一种生物技术。主要是对哺乳动物的胚胎进行某种人为的工程技术操作，然后让它继续发育，获得人们所需要的成体动物的新技术。实际上是动物细胞工程的拓展与延伸。在低等生物中，人们早已着手控制或改变其胚胎发育速度，研究各部分形成的机制，现在也应用于高等脊椎动物，特别是哺乳类动物中的家畜和野生动物。早在 1891 年，英国剑桥大学的赫普就在兔子身上首次成功地进行了受精卵的移植实验。到 20 世纪 30 年代，这项技术已在畜牧业上获得了越来越明显的效益。进入 20 世纪 70 年代，出现了专门从事受精卵移植的企业。高等动物的受精卵移植又叫“家畜胚胎移植”。它是将优良种畜的早期胚胎从供体母畜体中取出来，移到受体母畜输卵管或子宫中，“借腹怀胎”繁殖优良牲畜的技术。胚胎工程在此基础上发展起来。

动物胚胎工程主要包括以下内容：

1. 胚胎体外培养

胚胎体外培养是胚胎工程的基础。应用人工创造的环境，对获取的早期胚胎进行体外培养，以便观察其发育和人工干预某一发育过程的可能性。体外培养要求获得较多的受精卵或胚胎作供体。运用促性腺激素对卵巢发育作用的原理，在母畜发情周期的适当时期注入适量的促性腺激素，可以诱发母畜卵巢内较多的卵泡同时发育、成熟、排卵，这种技术称超数排卵技术，可使动物提供较多的胚胎以供实验。经过超数排卵冲取动物的受精卵，在人工合成培养基和适宜的气相环境、湿度、温度的条件下培养不同时间，观察其发育。

2. 胚胎移植

胚胎体外培养到一定发育阶段，必须移植到同步发情的母畜子宫内。解决同步发情的方法有两种：一是利用自然同期发情的母畜，此法在实践上较难办到；二是诱发同期发情，就是掌握发情规律，通过注射某些药物（如孕激素、雌激素等）诱发同期发情，这样可减少母畜的数量又能保证每天有一定数量的同期发情母畜作宿主。这不仅有利于家畜的优良品种速繁，而且有利于品种的培养和改良。这项技术包括同期发情、超数排卵、胚胎常温超低温保存和移植产仔技术。在我国、胚胎移植成功率达 50%，国外可达 70%。

3. 胚胎保存

一种方法是低温保存在 37°C 以下, 0°C 以上使胚胎细胞分裂暂停, 新陈代谢降低, 但并未停止, 保存时不必加入抗冻剂及一系列冷冻和解冻处理, 适于短期保存和近距离运输。再一种方法是超低温保存, 利用液氮 (-196°C)、液氦 (-269°C) 保存, 胚胎新陈代谢完全停止。该方法较复杂, 有一系列冷冻和解冻过程, 而且抗冻剂处理不当就会造成胚胎损伤和死亡。解冻后经检查鉴定正常的胚胎须立即放在 37°C 的磷酸盐缓冲液内等待移植。该法可长期保存及做远距离运输。对于保存的胚胎, 可以鉴别死活, 还可对其作出性别判断, 准确度达 60%。

4. 胚胎分割

胚胎发育到囊胚期以前没分化的细胞具有全能性。在这之前把一个胚胎的细胞分成 2 组或多组, 经过短暂培养使其修复、发育再一同或分别移到不同的代母中, 妊娠产多胎, 又称人工同卵多胎技术。这是一项成倍或数倍地增长经济遗传性状优秀动物的数量和迅速提高畜群生产质量的技术。分割方法包括用微手术刀和分离微针在显微镜下或显微操作仪下将一个胚胎分割成 2 份或多份, 经过培养再移植, 或者将一个具几个卵裂球的胚胎, 用机械或化学的方法使卵裂球分开, 对每一个卵裂球进行培养, 使其再分裂变成一个可移植的胚胎, 移植产仔。

5. 胚胎性别控制

对胚胎细胞性成分的检查, 确定胚胎本身性别的程序。鉴定后和已知性别的胚胎, 可以按照人的意愿, 将胚胎移入母体, 以产生幼仔或早期淘汰。性别鉴定胚胎的方法有: ①性染色体检查, 将胚胎取出一小部分, 经过体外培养用染色的方法寻找性染色体 Y, 具有这种染色体的是雄性。②H—Y 抗原法, 应用免疫荧光方法处理, 使雄性胚胎在荧光显微镜下发荧光。③应用 Y 染色体特异性 DNA 探针, 鉴定胚胎性别。④测定与 X 染色体相关联酶的活性。⑤Y 染色体性别决定 DNA 片段 (Sry - PCR) 法, 有此片段者为雄性, 无此片段虽有 Y 染色体也不能形成雄性。目前, 胚胎性别控制的成功率达 90%。

6. 胚胎干细胞

使胚胎某些细胞像干细胞一样不断增殖, 这样可以得到无数全能性细胞, 从而得到大量的胚胎。这些细胞可从囊胚期早期的内细胞群的细胞通过特殊处理和培养获得。

7. 转基因动物构建

将外源目的基因导入动物的受精卵中, 发育后移植产仔, 并可检出外源基因的表达。有表达的动物称为转基因动物。将基因导入受精卵的方法有: 将基因整合到反转录病毒上注入胚胎, 使之获取外源基因; 用显微注射方法直接注入到雄原核中; 将外源基因整合到精子体内使其与卵子受精。基因导入的目的是从遗传上提高家畜的生长性能、繁殖性能、饲料利用率和抗病性。

8. 体外受精

取未成熟卵子, 体外培养成熟或自输卵管中取排出的卵子与经过处理的精子在体内结合而发育成合子的过程。体外受精合子经过体外或异种动物体内培养, 移到同种母体内妊娠产仔, 称试管动物。

9. 胚胎嵌合

应用动物品系内、种内、种间或属间的两个或多个胚胎以聚合成或注入等方法嵌合在一起培养发育移植产仔的技术。其方法是：超数排卵采集胚胎；用物理学的方法，酶或酸处理曲调透明带；将两个或多个除去透明带的胚胎移到含有钙离子的 37℃ 的培养液中妊娠产仔；检查预定设计的标记物以判明是否为嵌合体，也可以应用卵裂球集合法，放入空透明带内培养发育移植产仔。

10. 性激素与生长因子

利用生物工程方法大规模高效率地生产对畜牧业有重要意义的促卵泡成熟素 (FSH) 和生长激素 (GH)。

多肽生长因子是一类调节细胞生理活性的多肽，是细胞间信息传递的物质基础。它们能促进细胞的生长与增殖；生长因子对胚胎发育和细胞分化有重要的调节作用，在医疗和畜牧业上有着广阔的应用前景。

11. 克隆动物

要克隆动物需解决两个问题：细胞核移植技术和已经分化的体细胞的逆转。以克隆绵羊多利为例简介一下其过程。从一只母羊体内取出一个卵细胞，去掉细胞核；再从其乳腺细胞中取出细胞核移入去核的卵细胞内。这样得到了一个拥有该羊全部核遗传物质的细胞。用某种方法使该细胞分裂到一定阶段移植入母体子宫内，最后分娩产生一只小绵羊即克隆羊。该成果证明即便是高级动物也可通过无性繁殖方式产生后代或者说复制自己，有性生殖不再是其繁殖的唯一手段。

12. 胚胎细胞核移植

用预先拉制的显微工具固定住桑葚期的胚胎，将吸管插入细胞内吸出核，将其注入预先去核的受精卵中，再移到另一个代母子宫中妊娠产仔。也可以用电脉冲方法使移核成功率提高。胚胎移核技术，近年来在兔、牛、山羊和猪上都已获得成功。核移植技术在研究两个原核的作用、核质关系和加速繁殖优良种畜方面，将起着巨大的作用。

从上述动物胚胎工程的诸多方面可以看出，哺乳动物胚胎工程的发展已进入相当先进阶段了。

二、动物胚胎工程研究现状与应用前景

(一) 动物胚胎工程研究现状

1. 动物胚胎移植和胚胎的体外生产

经过 100 多年的研究发展，胚胎移植技术已成为胚胎工程领域的基础技术和手段。超数排卵和胚胎移植 (MOET) 技术已成为快速扩大优秀种公畜和核心优良母畜的主要手段。一些发达国家，如美国、加拿大、法国、日本、英国、荷兰、澳大利亚、德国等已建立了完整的经营性奶牛胚胎移植公司，并向国外出售胚胎。MOET 育种计划在这些国家得到全面实行，遗传改良进展比预期提高了 10%。在商业化应用上，牛的胚胎一直开始最早，占的比例也最大。全球奶牛胚胎移植的总数逐年增加，根据国际胚胎移植学会 (IETS) 统计，2000 年全世界移植牛胚胎总数超过 52.85 万枚，头均可用胚约 6 枚，鲜胚受胎率 62%，冻胚 54%。目前世界上每年通过胚胎移植繁殖的牛已超过 35 万头。美国、法国等国家近年参加后裔测定的青年公牛中，80% 以上为胚胎移植的后代 (陈北亨等，1999)。

羊的胚胎移植最先开始于澳大利亚, 20 世纪 70 年代, 澳大利亚每年要进口 300 万美元的马海毛 (安哥拉山羊毛), 从而使安哥拉山羊处于一种不切实际的高价地位, 为胚胎移植提供了市场条件, 促进了澳大利亚安哥拉山羊胚胎移植的发展和应用。20 世纪 90 年代以后, 一些其他良种羊的胚胎也开始国际间的交易 (章孝荣, 2004)。

胚胎的体外生产技术体系集成活体采卵和体外受精、性别控制/性别鉴定、体外培养、胚胎冷冻、胚胎克隆等技术, 最终可获得大量优良遗传性状的已知性别胚胎, 用于胚胎移植。其中的各单项技术在发达国家已基本成熟, 投入商业化运作 (李勇等, 2004; 马云等, 2003; 张明等, 2003)。现在这些国家的许多实验室与胚胎移植公司、奶牛场合作, 正在开发将胚胎体外生产的 3 项关键技术, 即活体采卵和体外受精技术、胚胎克隆技术、胚胎性别鉴定技术进行集成, 用于大批量生产已知性别的胚胎。胚胎的体外生产技术体系主要在优良奶牛的快速繁育上有重要意义。

目前体外生产技术体系得到的胚胎普遍存在移植后妊娠率低、流产率和产后死亡率高、出生动物畸形率也较高等问题, 给产业化带来许多负面作用。国外正在致力于提高胚胎体外生产技术体系最终成功率的研究, 已在胚胎发育的基本原理和技术体系的完善方面积累了丰富的成果, 随着这些成果的应用, 胚胎体外生产技术体系可望在 2010 年前, 全面达到产业化阶段。

2. 体细胞克隆动物

随着体细胞克隆动物的成功 (Wilmut I 等, 1997), 利用胚胎分割和胚胎卵裂球细胞核移植克隆动物已不再是克隆动物研究和开发的重点。动物体细胞克隆指由一个细胞产生一个和亲代遗传性状一致、形态非常相像的动物。体细胞克隆已相继在牛 (Kato Y 等, 1998)、小鼠 (Wakayama T 等, 1998)、山羊 (郭继彤等, 2002; Keefer C L 等, 2000)、猪 (Polejaeva I A, 2000)、野牛 (Lanza R P 等, 2000)、马 (Galli C 等, 2003)、猫 (Shin T 等, 2002)、大鼠 (Zhou Q 等, 2003) 等动物上都取得成功。最近报道称孤雌克隆小鼠也能完成全程发育 (Kono T 等, 2004)。

体细胞克隆动物技术还不十分完善, 其整体成功率为 1% ~ 10%, 而且出生的克隆动物还有较高比率的异常表型。目前国外一方面正在致力于建立动物克隆的技术平台, 另一方面利用现有技术水平生产具有高附加值的转基因动物、优良种畜和保护濒危动物遗传资源。

多数研究认为, 导致克隆动物成功率低, 并且出现高异常率的主要原因是供体细胞核再程序化 (reprogramming) 的不完全, 因此实现体细胞核移植胚完全再程序化是建立动物克隆技术平台的关键。目前国外已经把提高克隆动物效率研究的重点转向这个方面。已有一些体细胞体外再程序化的方式建立起来, 经过这些处理, 体细胞的后生性遗传修饰和细胞核特性可以发生改变, 这样的细胞用作核供体, 可以显著提高动物克隆的成功率 (Sullivan E J, 2004)。此外, 也有大量的研究集中在卵母细胞去核、激活以及重构胚构建方式, 如徒手克隆 (hand-made cloning) (Tecirlioglu R T 等, 2004), 整体细胞注射 (Lee J 等, 2003) 等具体技术环节的改进以及新方式的开发上, 这些研究正在不断提高核移植技术的稳定性和克隆动物的成功率。

3. 转基因动物

动物生物反应器 (bioreactor) 是指利用转基因活体动物的某种能够高效表达外源

蛋白的器官或组织来进行工业化生产活性功能蛋白的技术, 这些蛋白一般是药用蛋白或营养保健蛋白。用于表达的生物反应器包括动物血液、泌尿系统、精囊腺、乳腺等, 还包括禽蛋和昆虫(例如家蚕)个体等。其中动物乳腺生物反应器是目前国际上唯一证明可以达到商业化生产水平的生物反应器。动物转基因技术也可用来生产异种器官移植动物。

动物乳腺有广泛表达外源基因的能力, 可以生产各种蛋白质和多肽, 从小分子肽到大分子蛋白质, 从分泌型蛋白到内膜蛋白、多聚蛋白、二价抗体等, 显示动物乳腺是一种很好的生物反应器, 在生产高附加值蛋白质方面有广泛用途。用动物乳腺生产重组蛋白质产品还有产品活性高、产量高、产品易于纯化、生产成本低等优势。据专家估计, 用细胞培养方法生产 1g 药物蛋白, 成本 800 ~ 5 000 美元, 而乳腺生物反应器方法只需 0.02 ~ 0.50 美元; 传统药物的研制生产周期是 15 ~ 20 年, 乳腺生物反应器方法一般为 5 年。生物反应器技术已成为当今生物工程技术的制高点和市场竞争热点。目前, 世界上有数十家公司正在致力于动物生物反应器的研究。估计目前共有 20 多种转基因动物药品处于临床前研究阶段, 主要有三家公司进行: Genzyme Transgenics, PPL Therapeutics, Pharming。据国外经济学家预计, 大约 2010 年之后, 转基因动物生产的药品就会鼎足于世界市场, 转基因动物生物反应器产业将成为最具有高额利润的新型工业, 届时世界上动物乳腺生物反应器的年产值将达到 500 亿美元。

1987 年, 美国科学家首先从转基因小鼠的乳汁中获得了人类 t-PA 蛋白(组织型纤溶酶原激活剂)。10 多年来, 已有数百种产品在小鼠乳腺获得高效表达, 其中数种重要医用产品已在大动物乳汁中生产出来, 即将投放市场, 如山羊乳腺表达抗凝血酶 III (AT III), t-PA 均达到 6 g/L, 绵羊乳腺表达抗胰蛋白酶 (AAT) 达到 35 g/L, 家兔乳腺表达葡萄糖苷酶达到 10 g/L, 猪乳腺表达蛋白 C 达到 1 g/L、第八因子 (F-VIII) 达到 3 g/L, 奶牛乳腺表达乳转铁蛋白达到 3.5 g/L。

动物乳腺可以生产绝大多数蛋白质, 但随着细胞大规模培养技术的日趋完善和基因治疗技术的发展, 临床上用量较小的细胞因子将不会再用动物乳腺生产, 而那些用量很大的产品, 如治疗性抗体、血清白蛋白、营养蛋白和工业蛋白将成为动物乳腺生产的主要产品。特别是抗体生产, 数年后将占到生物制品的 30% ~ 40%, 是一项很大的产业。

动物乳腺生物反应器存在的主要问题是生产转基因动物效率低和基因表达的“位置效应”影响。体细胞克隆动物的成功, 为生产转基因动物提供了一条新的有效途径。采用“体细胞基因打靶—体细胞克隆技术体系”, 可以很好地解决动物转基因效率低和基因表达方面的问题。体细胞易于获取、易于培养建系, 体外可操作性强, 可用多种方法导入外源基因, 并可在体外培养状态下进行转基因整合的筛选鉴定, 从而能够达到定点整合的效果。首先对培养的体细胞进行转基因改造并筛选, 然后用成功转染的细胞作为供核体进行克隆, 所获得的动物即为转基因动物。因此, 采用以体细胞克隆技术为核心的各种技术平台, 是未来生产动物乳腺反应器动物的希望和必然趋势。如果将目的基因定点整合到家畜体细胞的乳蛋白(或其他合适的)基因座后, 由转基因体细胞通过核移植技术生产的乳腺反应器动物, 能够充分利用天然乳蛋白基因固有的高效表达的调控机制。理论上消除了随机整合的位置效应, 目的基因只在乳腺高效表达, 是生产乳腺反应器动物的理想模式。利用该法已生产出许多转基因动物, 如能在乳腺表达人第九因

子的克隆绵羊 (Schnike A E 等, 1997), 引起人免疫反应主要抗原“基因敲除”的克隆猪 (Lai L 等, 2002; Dai Y 等, 2002)。这标志着利用克隆技术结合转基因技术生产珍贵蛋白和药物生物反应器动物, 生产动物模型付诸异种器官移植的目标已越来越近。美国、新西兰等国已有对牛乳腺特异表达的药物蛋白进行生物活性检测的报道, 基因敲除猪器官也已被用于猴子临床试验。

美国科学家利用异质体细胞克隆技术已经获得完成全程发育的南亚野牛的出生, 日本、美国、澳大利亚等国的一些克隆已灭绝动物的研究计划正在实施中。

(二) 动物胚胎工程应用前景

1. 动物胚胎移植和胚胎的体外生产

我国动物胚胎移植技术本身已经成熟, 现在的问题是成本太高, 有两个原因, 一是专业技术人员短缺, 二是所用试剂材料国产化率太低。因此大量培训胚胎移植专业技术人员和试剂材料的国产化是此后一个时期动物胚胎移植发展需要解决的主要问题。目前看来, 这一问题可通过市场机制逐步得到解决。

国家支持的重点应放在奶牛胚胎体外生产技术体系的研发和产业化推进上。由于我国人民生活水平的提高和消费结构的改变, 市场对奶制品的需求日益增高, 而我国奶牛的年均单产量与发达国家有明显差距, 良种奶牛的快速繁育是我国畜牧业目前急需解决的问题。因此, 胚胎体外生产技术体系的产业化开发对我国奶牛业的发展具有更加重要的意义。在发展战略上, 可将胚胎的体外生产技术体系主要用于加速改良“生产群”奶牛, 快速提高奶牛单产, 使中国母牛在数量上和质量上迅速赶上西方发达国家水平。在“育种群”, 由于数量要求不像生产群那么大, 可考虑以体内生产胚胎为主, 利用国内外顶尖公牛受精顶尖母牛, 体内生产胚胎再移植, 构建我国自己以顶尖母牛为主的育种群 (徐捷等, 2002)。

国家应设立专题进行奶牛胚胎体外生产技术体系的建立研究, 选择研究技术基础好的单位建立奶牛胚胎体外生产产业化基地。重点在活体采集的卵母细胞的质量控制问题、提高胚胎的体外培养效率、降低性别鉴定对胚胎的损伤等方面进行研究。通过这些研究, 将全面提高奶牛胚胎体外生产技术体系的最终成功率, 可在 2010 年前, 达到良种奶牛体外生产胚胎囊胚发育率 70% 以上、移植成功率 40% 左右的水平, 实现该项科技成果的产业化。

2. 体细胞克隆

体细胞克隆技术还不十分完善, 应用也刚刚开始, 但体细胞克隆技术的产业化已显示出其广阔的前景和商业潜力。2010 年前, 体细胞克隆技术在生产转基因动物上 (制作动物生物反应器、生产模型动物) 将具备产业化意义。到 2020 年, 体细胞克隆技术将应用于加速动物育种进程、扩繁濒危野生动物以及人类医学基础研究和临床。

在发展战略上, 国家应继续鼓励对动物克隆技术的各个具体环节进行研究完善, 这些研究应结合生产转基因动物进行, 如高附加值生物药物或生物产品的动物生物反应器 (牛羊) 生产、器官移植动物 (猪) 生产、病理模型动物 (大鼠) 生产。

在克隆技术的产业化方面, 目前的主要技术瓶颈是克隆胚基因再程序化的不完全。国外已在这方面进行了较深入的研究, 但还未取得关键性突破, 国内尚无公开报道。基础理论研究不够是我国同国外领先水平的主要差距之一, 创新不足, 缺乏新概念、新思

路、新技术路线。国家资助的重点应放在基础理论的攻关上。选择联合那些技术力量雄厚、研究基础好的实验室作为基地，加大资金投入的力度和连续性，着重进行细胞核再程序化的研究。一方面研究揭示体细胞克隆胚再程序化过程中的一些重要生理生化事件，搞清成熟促进因子（MPF）、核膜破裂（NEBD）和早熟染色体凝集（PCC）等在基因组再程序化中的作用，阐明基因组再程序化的机制；另一方面研究建立体细胞体外再程序化培养体系。这些研究结果和技术方案将能直接促进动物克隆技术获得突破，在国内形成拥有自主知识产权的高效动物克隆技术体系。细胞体外再程序化的研究最终还将建立源于体细胞的具备胚胎干细胞特性的细胞系，为细胞疗法提供充分的多潜能细胞资源库。

3. 转基因动物

“体细胞基因打靶—体细胞克隆技术体系”生产转基因动物是目前最有效率的转基因动物生产方法，转基因动物的生产可结合建立动物克隆技术平台的研究一起进行。国家对转基因动物的产业化推进研究可分阶段进行。针对目前和未来几年动物克隆技术能达到的成功率，国家投资策略应放在优先研究制造能够生产高附加值和战略价值的生物新材料（如“生物钢”）以及影响畜牧业发展的主要动物传染性疾病病原抗体的动物生物反应器，使该技术在向产业化完善的过程中即产生经济效益。进一步，随着该技术体系的基本成熟和转基因产品安全性问题的基本解决，可启动药用蛋白、保健蛋白等的开发研究。

此外，引起人类免疫排斥反应抗原基因敲除的猪是用于人类器官移植的理想器官供体，我国又是一个人口大国，器官移植的需求量很大，但我国尚未见到有关报道，应予启动。基因敲除猪的克隆及其上下游技术研究还将会开发出一系列拥有自主知识产权的技术，具有重大的社会和经济效益。

三、我国动物胚胎研究所取得的成就

（一）动物胚胎移植和胚胎的体外生产

我国牛、羊胚胎移植的发展过程分为三个阶段，即试验研究阶段（20世纪70年代初至80年代中）、发展提高阶段（20世纪80年代中至90年代中）和推广应用阶段（20世纪90年代中至现在）（桑润滋，2003），现已经全面进入产业化阶段。进入90年代以后，随着我国畜牧业的发展，需要大批良种，促进了胚胎移植技术在我国的应用。奶牛、肉牛、安哥拉山羊、牛、羊品种改良波尔山羊和良种绵羊的胚胎移植开始在畜牧生产中应用和育种中发挥巨大的作用。

1995年全国奶牛胚胎移植数量在1 000头左右。九五期间，我国许多省市应用胚胎移植技术建立了良种牛、羊生产体系，开始了牛、羊胚胎移植技术商品化。据不完全统计，此期间我国在肉牛超排供体545头次，获可用胚胎3 048枚；奶牛超排供体827头次，获可用胚胎4 786枚，同时引进肉牛和奶牛胚胎3 000余枚，牛的胚胎移植妊娠率平均为51%（主要是冻胚）（章孝荣，2004）。

十五期间，我国的牛、羊胚胎移植技术重点是实现产业化，应用该项技术进行牛、羊良种扩繁，建立核心群，改良低产品种。2000年全国奶牛胚胎移植数量达到5 000头。2002年起，农业部在北京、新疆、黑龙江、内蒙古、宁夏、陕西、山西、河北和

山东9省(区)实施“万枚高产奶牛胚胎移植富民工程”,极大地促进了奶牛胚胎移植的产业化进程,使我国奶牛胚胎移植数量突破10 000头。此项目选择遗传品质好、年产量达7 000kg以上的奶牛提供胚胎,截至2002年底,已完成奶牛胚胎移植15 757枚,完成总任务的105%,受胎率达到45%~52%;估计2003年生产母犊牛4 329头。这批高产奶牛投产后,可增加年奶产量3万t,年销售鲜奶收入将达45 000万元。同时项目还辐射带动9省(区)完成合同外牛胚胎移植7 822枚,达到了技术示范的目的。

据不完全统计,2003年我国共生产奶牛、肉牛胚胎30 000枚以上,由于SARS疫情影响了异地胚胎移植工作的进行,但全年共移植受体牛仍超过10 000头。

1995年,我国开始从国外引入波尔山羊,因其改良本地山羊效果显著,种羊供不应求,从而为山羊胚胎移植提供了市场条件。为满足种羊的需求,国内许多省、市、自治区,纷纷用胚胎移植技术迅速扩繁波尔山羊。据1999~2001年召开的3次全国养羊生产交流会不完全统计,波尔山羊超排头均可用胚胎大都在10枚以上;新鲜胚胎移植妊娠率在50%~70%;截至2001年,全国存栏波尔山羊约6 000只,除进口约3 000只外,其中2 000余只是应用胚胎移植技术迅速扩繁增加的。另据不完全统计,2002年波尔山羊超排2 000只左右,头均可用胚胎达十几枚,移植受体20 000只左右(桑润滋,2003)。2000年以后,肉用绵羊如萨福克、无角道赛特、特克赛尔、夏洛来及杜泊等胚胎移植数量也成规模开展起来,据不完全统计,至2002年,累计移植良种肉用绵羊受体超过10 000只以上。

据不完全统计,2003年全年我国共生产波尔山羊、良种肉用绵羊胚胎40 000枚左右,移植受体30 000只以上,肉用绵羊胚胎移植的比例大幅度提高。胚胎移植技术不仅在提高肉用羊供种能力方面发挥了巨大作用,而且也取得了显著的经济效益。

综上所述,我国家畜胚胎的体内生产和胚胎移植技术已成熟,广泛应用于优秀种畜的育种和良种家畜的快速繁育。目前,我国以生产和经营纯种奶牛、肉牛或胚胎,纯种羊或胚胎的企业和公司100多个,开展胚胎移植技术服务单位有几十个。

胚胎体外生产技术体系的开发及其产业化推进是目前我国胚胎工程领域重点解决的问题。我国家畜体外受精技术于20世纪80年代末期取得成功,90年代中期成熟。1989年,我国首例试管牛在内蒙古大学诞生。广西大学曾利用IVM—IVF—IVC—FC路线,生产了大批牛胚胎,并经过胚胎移植,获得了200余头试管黄牛犊;内蒙古大学在澳大利亚和加拿大的胚胎生产基地上,利用体外受精技术,生产了近4万枚胚胎,并在国内进行胚胎移植,获得了良种试管牛犊350余头(马云等,2003)。牛的活体采卵技术于90年代后期开始研究,采用的主要方法有:简易牛活体采卵器及盲采法、超声波法采卵及内窥镜法采卵,这些方法被证明均可用于牛的活体采卵。2001年,活体采卵、体外受精的牛胚胎移植后成功获得犊牛出生(江明生等,2004)。胚胎性别鉴定于20世纪90年代初取得突破,应用PCR技术扩增SRY序列进行牛胚胎性别鉴定获得成功,准确率为100%(曾溢滔等,1993)。90年代中期取得性别鉴定牛羊胚胎移植成功,性别鉴定符合率达到100%(李青旺等,2004)。我国在牛SRY基因的分子克隆及鉴定胚胎性别方面已达到国际先进水平。哺乳动物胚胎克隆技术的研究起始于20世纪80年代,西北农林科技大学于90年代中率先在国内取得胚胎克隆成功,山羊胚胎克隆已完成了5代(Zhang Y等,1998)。胚胎连续克隆的成功标志着胚胎克隆技术已趋成熟。

从上述总体情况来看,国内的单项技术水平与国外相当。在技术整体集成方面,我们与发达国家同时起步。西北农林科技大学已开展了奶牛胚胎体外生产技术体系的集成研究,采用活体采卵和体外受精技术生产已知遗传背景和已知性别的体外良种奶牛胚胎200多枚,移植后,有66头牛妊娠。

(二) 体细胞克隆

我国目前在牛和山羊等主要家畜上的克隆效率居国际同一水平。大鼠的克隆居国际领先水平。2000年6月,西北农林科技大学成功获得成年体细胞克隆山羊(郭继彤等,2002),标志着我国动物体细胞克隆技术的崛起。2001~2004年初,山东莱阳农学院、中科院动物所、中国农业大学等相继在山东、新疆等基地获得几十头体细胞克隆牛。2003年9月中科院动物所与法国科学家合作,发明了能够精确控制大鼠卵细胞自发活化的专利技术,历时两年试验后终于获得了成功,在国际上率先成功克隆出大鼠(Zhou Q等,2003)。这些成果表明我国在动物体细胞克隆的各项技术指标已达到国际先进水平,在一些技术方面居国际领先水平。在异种克隆方面,我国也有一些领先于国际水平的方面,例如中科院动物所和西北农林科技大学都获得大熊猫异质克隆囊胚。

国内在克隆胚再程序化的机理、实现体细胞再程序化效率的研究方面与国外尚有差距。西北农林科技大学已在两方面就如何提高再程序化效率进行了初步研究,一方面建立供核细胞的体外再程序化体系,使体细胞在移植前发生一定程度的核结构和基因活动的再程序化;二是提高卵母细胞成熟的质量,使其具备完全再程序化能力。研究表明这些处理有利于体细胞核移植胚的存活和囊胚发育。

(三) 转基因动物

我国是从1984年开始转基因动物研究的,并于同年获得了含人 β -珠蛋白基因的转基因小鼠。利用显微注射法,1985年和1986年又分别获得了含人生长激素(MT-hGH)基因的转基因泥鳅和小鼠。1987年获得含有大肠杆菌 *galk* 和 *gpt* 基因的转基因小鼠。以后又相继获得了含 HbgAg 乙型肝炎表面抗原基因的转基因兔、转基因猪、含 EPO 和 HbgAg 2 种基因乳腺特异性表达的转基因山羊、含人凝血因子 IX 的转基因山羊、含人血清白蛋白基因的转基因奶牛、乳腺表达“生物钢”蛋白基因的转基因老鼠(林雪玲等,2003)。

2003年3月,中国农业大学取得我国首例转基因体细胞克隆牛成功(龚国春等,2003)。同年10月,第二头转有人岩藻糖转移酶基因的体细胞克隆牛出生,这标志着我国已经成熟掌握了转基因体细胞克隆牛的技术体系,在该领域的研究跻身世界前列。2004年,利用精子载体法制备乳腺生物反应器的转基因兔模型获得成功,该项目由中国军事医学科学院主持,获得 F1 代转基因兔 184 只,通过鉴定发现,转基因阳性后代 89 只,阳性率 48.4%。

四、动物胚胎工程的发展趋势及要解决的热点问题

(一) 精液的冷冻保存

目前,牛和绵羊、山羊精液的冷冻保存技术比较成熟,尤其牛精液细管法程序生产已经普及。但猪的精液生产主要以常温为主(以 17℃ 保存),其冷冻保存还处于试验研究阶段。精液冷冻保存成功的其他物种还有鱼类、鼠、黑熊、大熊猫、黑猩猩、猕猴、

人等。

目前研制了一种精液冷冻新方法,该法通过冷冻仪改变玻璃化冷冻过程中热传导速度控制细胞内冰晶的扩散,其冷源为“超冷”液氮(-210°C),利用此法冷冻牛、马、猪、羊、禽和人的精液,解冻后精子活力可达到0.45~0.65之间(Amir等,2002)。

冷冻—解冻后精子超微结构损伤(如精子膜、顶体和精子核泡化、损伤或破裂)和冷冻—解冻后精子在雌性生殖道内寿命缩短及受精率低的问题仍待进一步研究。

(二) 卵母细胞的冷冻保存

利用冷冻保存技术建立“卵子库”,不仅可以解决目前卵母细胞来源短缺的问题,还可以使其他生物技术如体外受精、克隆和转基因动物生产不受时间和地域的限制,并且代替家畜的活体保种和濒危动物遗传种质资源保存。在人类医学上,卵母细胞的冷冻保存将会为那些由于病理或其他原因而造成不孕病人提供一个挽救生育的机会。

自Whittingham(1977)首次利用慢速冷冻法成功地保存小鼠卵母细胞并获得产仔以来,多种哺乳动物和人的卵母细胞冷冻保存研究逐步开展,小鼠(Kasai等,1979)、猴(DeMayo等,1985)、人(Trounson,1986;Chen,1986)、仓鼠(Todorow等,1989)、兔(Vincent等,1989)、牛(Lim等,1991)、猪(Rubinsky等,1992)、马(Hochi等,1995)等玻璃化冷冻保存相继试验成功。GV期牛卵母细胞用OPS法冷冻(Vajta等,1998)解冻后体外培养6h,受精后囊胚发育率高达25%,Vajta等(1998)采用OPS法冷冻保存牛成熟卵母细胞,解冻后的卵母细胞经体外受精,获得了13%的囊胚发育率,并且胚胎移植后获得了犊牛。山羊卵母细胞用冷冻环法冷冻解冻后存活率达到89%(Isabelle等,2003)。

但卵母细胞的冷冻保存仍存在着许多亟待解决的问题,如卵母细胞对低温的敏感性很强,使得冷冻保存后的卵母细胞其活力、受精率及其发育能力明显降低,哺乳动物中猪的卵母细胞尤为突出。因此,探讨卵母细胞冷冻保存损伤机理、控制冷冻解冻速度、降低抗冻剂浓度等研究将是新世纪研究的热点。在不久的将来,卵子冷冻技术将会进一步完善和规范化,使其与其他胚胎工程技术相结合,必将在畜牧业生产、生物技术以及人类医学等领域取得新的突破。

(三) 胚胎的冷冻保存

胚胎冷冻保存有常规冷冻法和玻璃化冷冻法。利用胚胎冷冻保存技术建立家畜和濒危动物“基因库”,可以免受各种灾害造成品种灭绝的危险。这对于胚胎组织学、发育生物学、遗传育种学和胚胎生物技术的基础理论研究具有重要价值,为组织和器官的冷冻保存提供充分的理论依据。

哺乳动物胚胎的冷冻保存研究开始于1972年,由Whittingham等人首先发明了慢速冷冻法(常规冷冻法),对小鼠的胚胎冷冻保存获得成功,解冻后移植产下了后代。1985年Rall等首次利用玻璃化冷冻法对小鼠8-细胞胚胎冷冻保存取得成功。此后,玻璃化冷冻法经Schefen等(1986),Nakagata(1987),Kasai等(1990),Zhu等(1993,1994),Szellid等(1994),Vincent等(1995),Saha等(1996),Dobinsky等(1997)研究者的不断改进,使这项技术日趋成熟,牛羊胚胎经玻璃化冷冻后已在生产中示范应用,有望在生产实际中得到进一步推广。

但胚胎冷冻保存目前仍存在着诸多问题,如对冷冻保存的机理的研究尚不十分清