

农民致富大讲堂系列丛书



动物克隆技术

刘海军 主编



天津科技翻译出版公司

动物克隆技术

主编 刘海军

审定 王文杰



天津科技翻译出版公司

图书在版编目(CIP)数据

动物克隆技术/刘海军主编. —天津:天津科技翻译出版公司,2010.3
(农民致富大讲堂系列丛书)
ISBN 978-7-5433-2563-0

I. ①动… II. ①刘… III. ①畜禽—无性系—遗传工程 IV. ①
S813.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2010)第 013221 号

出 版:天津科技翻译出版公司

出 版 人:蔡 颢

地 址:天津市南开区白堤路 244 号

邮政编码:300192

电 话:022-87894896

传 真:022-87895650

网 址:www.tsttpc.com

印 刷:高等教育出版社印刷厂

发 行:全国新华书店

版本记录:846×1092 32 开本 2.75 印张 47 千字

2010 年 3 月第 1 版 2010 年 3 月第 1 次印刷

定价:8.00 元

(如有印装问题,可与出版社调换)

丛书编委会成员名单

主 任 陆文龙

副 主 任 程 奕 蔡 颢

技术总监 孙德岭 王文杰

编 委 (按姓氏笔画排列)

王万立 王文生 王文杰 王正祥 王芝学

王继忠 刘书亭 刘仲齐 刘建华 刘耕春

孙德岭 张国伟 张要武 李千军 李家政

李素文 李 瑾 杜胜利 谷希树 陆文龙

陈绍慧 郭 郢 高贤彪 程 奕 蔡 颢

丛书前言

为响应国务院关于推进“高效富农、产业兴农、科技强农”政策的号召，帮助农民科学致富，促进就业，促进社会主义新农村建设和现代农业发展，我们组织编写了这套农民致富大型科普丛书——《农民致富大讲堂》。

本丛书立足中国北方农村和农业生产实际，兼顾全国农业生产的特点，以推广知识、指导生产、科学经营为宗旨，以多年多领域科研、生产实践经验为基础，突出科学性、实用性、新颖性。语言通俗易懂，图文并茂，尽量做到“看得懂、学得会、用得上”。本丛书涉及种植、养殖、农产品加工、农产品流通与经营、休闲农业、资源与环境等多个领域，使农民在家就可以走进专家的“课堂”，学到想要了解的知识，掌握需要的技能，解决遇到的实际难题。

参加本丛书编写的作者主要来自天津市农业科学院的专业技术人员，他（她）们一直活跃在农业生产第一线，从事农业产前、产中和产后各领域的科研、服务和技术推广工作，具有丰富的实践经验，对

农业生产中的技术需求和从业人群具有较深的了解。大多数作者曾编写出版过农业科普图书,有较好的科普写作经验。

本丛书的读者主要面向具有初中以上文化的农民、农业生产管理者、基层农业技术人员、涉农企业的从业者和到农村创业的大中专毕业生等。

由于本丛书种类多、范围广、任务紧,稿件的组织和编辑校对等工作中难免出现纰漏,敬请广大读者批评指正。

丛书的出版得到了天津市新闻出版局、天津市农村工作委员会和天津市科学技术委员会的大力支持与帮助,在此深表感谢!

《农民致富大讲堂》编委会

2009年8月

前 言

1997年2月27日,英国的《Nature》杂志报道了来自6岁绵羊乳腺细胞的克隆绵羊——“多莉”的诞生。“多莉”的亮相轰动了全世界,因为这是世界上第一只通过体细胞克隆得到的哺乳动物。“多莉”的诞生改写了过去一直认为高度分化的哺乳动物体细胞已失去了发育全能性的理论,是生物学史上的一个里程碑式的事件。十多年过去了,继“多莉”诞生之后,体细胞克隆又在多种动物上获得成功,公众对动物克隆这一生物领域的高技术仍然非常关注。

本书介绍了动物克隆的概念、发展历史及意义,以及胚胎克隆动物和体细胞克隆动物制作的一般方法和具体实例,尤其结合了近年来我们在波尔山羊克隆方面取得的成功经验,并对动物克隆技术存在的问题进行了分析。同时为了更好地理解动物克隆这种无性繁殖技术,本书对在自然情况下,哺乳动物的受精这一有性生殖过程也进行了概述。

本书尽量深入浅出地对动物克隆这一生物领域的高技术进行通俗的介绍,以使普通读者能对动物克隆技术有

较为清晰的了解。

本书在编写过程中,参考了大量国内外专家、学者的书刊资料,在此表示感谢。

编 者

2009 年 12 月

目 录

| | |
|------------------------------|------|
| 第一章 动物克隆的概念及发展史 | (1) |
| 一、动物克隆的概念 | (1) |
| 二、动物克隆的发展历史 | (3) |
| (一)两栖类动物的核移植试验 | (4) |
| (二)哺乳动物的胚胎细胞克隆 | (7) |
| (三)哺乳动物的体细胞克隆 | (9) |
| (四)哺乳动物的异种克隆 | (11) |
| (五)我国哺乳动物的克隆研究历史 | (13) |
| 三、动物克隆的意义 | (15) |
| 第二章 哺乳动物的有性生殖 | (19) |
| 一、细胞学基础 | (19) |
| (一)细胞膜 | (20) |
| (二)细胞质 | (20) |
| (三)细胞核 | (20) |
| 二、精子的发生和精子的形态 | (22) |
| (一)精子的发生 | (22) |
| (二)精子的形态和结构 | (25) |
| 三、卵子的发生 | (28) |
| (一)卵原细胞的增殖 | (28) |

| | |
|----------------------------|-------------|
| (二)卵母细胞的生长 | (29) |
| (三)卵母细胞的成熟 | (30) |
| (四)卵子的结构与形态 | (33) |
| 四、受精 | (35) |
| (一)精子穿越放射冠 | (36) |
| (二)精子穿越透明带 | (37) |
| (三)精子进入卵黄膜 | (38) |
| (四)原核形成 | (39) |
| (五)配子配合 | (39) |
| 五、胚胎的早期发育 | (40) |
| (一)桑葚胚 | (41) |
| (二)囊胚 | (42) |
| (三)原肠胚 | (42) |
| 第三章 动物克隆的技术程序 | (43) |
| 一、哺乳动物细胞核移植(克隆)的操作方法 | (45) |
| (一)供体细胞的准备 | (45) |
| (二)受体细胞的准备 | (46) |
| (三)细胞核移植 | (46) |
| (四)融合 | (48) |
| (五)激活处理 | (49) |
| (六)移核胚体外培养 | (50) |
| (七)重构胚的胚胎移植 | (50) |
| 二、克隆动物制作的具体实例 | (51) |
| (一)胚胎克隆动物的制作过程 | (51) |

| | |
|----------------------------|-------------|
| (二)体细胞克隆动物(绵羊)的制作过程 | (55) |
| (三)体细胞克隆动物(山羊)的制作过程 | (56) |
| (四)克隆小鼠的制作过程 | (59) |
| (五)克隆牛的制作过程 | (62) |
| (六)异种克隆大熊猫的制作过程 | (63) |
| 第四章 动物克隆存在的问题 | (65) |
| 一、动物克隆技术的效率 | (65) |
| 二、克隆动物的寿命 | (66) |
| 三、克隆动物的食品安全性 | (68) |

第一章 动物克隆的概念及 发展历史

一、动物克隆的概念

“克隆”一词是英文 clone 的音译,这一词来自于希腊文 klone,原意为树木的枝条繁育即插枝的意思。克隆是指通过无性繁殖(asexual reproduction)的方法从一个细胞或个体产生一组遗传上完全相同的细胞或个体。在自然界中,植物和低等动物的克隆较常见,如植物的插枝、嫁接和低等动物(如昆虫)的无性繁殖都属于克隆;自然条件下,哺乳动物繁殖后代是通过精、卵结合的有性生殖方式来实现的,而动物克隆是指通过无性生殖的方式直接获得与亲本具有相同遗传质后代的过程。在自然条件下,高等哺乳动物的同卵双胞胎实际上就是一种克隆。自然的哺乳动物克隆的发生率极低,且缺乏目的性,所以很少能够被用来为人类造福。因此,人们开始探索用人工的方法来进行高等动物克隆。

广义讲动物的克隆技术包括卵裂球的分离、胚胎分割、孤雌生殖和细胞核移植。用卵裂球分离和胚胎分割技术只能从一个胚胎获得有限数量的克隆后代,目前通过这



两种技术从一个胚胎得到的后代数不超过4个,在生产实践和理论研究上意义有限;孤雌生殖在高等动物上只获得早期胚胎和早期妊娠,还未获得后代;而胚胎细胞和体细胞作供体进行的核移植可以从一个胚胎和一小块组织得到理论上无限个后代,因此动物的克隆主要指细胞核移植技术。

在哺乳动物中,细胞核移植是产生克隆动物最为有效的方法,目前受到人们广泛关注的克隆技术实际上就是指细胞核移植技术。核移植需要卵子的参与,由于遗传信息存在于细胞核中,通过显微操作的方法,把卵子的细胞核去掉,置换进我们需要的细胞核,这个细胞核可以是早期胚胎的卵裂球,也可以是动物的体细胞,移入的核在卵子的作用下,发生发育重编程,形成一个克隆胚胎,然后移植到受体母亲体内发育成一个新的个体,这个个体的遗传基因与提供细胞核的胚胎或个体是完全相同的。用胚胎细胞和体细胞作为供体细胞进行核移植,分别称为胚胎细胞核移植和体细胞核移植,产生的克隆动物分别称为胚胎克隆动物和体细胞克隆动物。此外,还有以胚胎干细胞作为供体核进行细胞核移植的,称为胚胎干细胞核移植,主要在小鼠上应用。

可以用一个较为形象的比喻来形容动物克隆。我们都知道“西游记”中有这样的描述:孙悟空拔下身上一撮毛,吹上一口气,就能变成无数个和他一模一样的孙悟空。如今克隆技术的发展使复制个体的幻想变成现实,只是我

们要复制的对象不是孙悟空,而是良种家畜或其他有特殊价值的动物个体。

二、动物克隆的发展历史

谈到动物克隆,不能不谈世界首例体细胞克隆哺乳动物——“多莉”绵羊,因为尽管此前动物克隆研究已有几十年的历史,但是真正使克隆这个词变得家喻户晓的却是因为“多莉”的诞生(见图 1-1)。



图 1-1 来自一只 6 岁多塞特母羊乳腺细胞的“多莉”
绵羊和代孕母羊(苏格兰黑脸绵羊)

1996 年 7 月 5 日,位于苏格兰爱丁堡市郊的罗斯林研究所(Roslin Institute)里诞生了一头大个头儿羊羔,实验室编号为 6LL3,她是用来自 6 岁母绵羊的乳腺细胞作为供体细胞进行核移植获得的,她的遗传基因与那只母羊完全一致。克隆羊项目小组主管伊恩·威尔默特(Inn Wil-



mut)以著名乡村歌手多莉·帕顿的名字命名这头羊。1997年2月27日,英国的《Nature》杂志报道了“多莉”的诞生,“多莉”的亮相轰动了全世界,因为这是世界上第一只通过体细胞克隆得到的哺乳动物。美国《科学》杂志把“多莉”的诞生评为当年世界十大科技进步的第一项。

尽管该技术的成功率极低,但“多莉”的诞生具有重大的科学意义,改写了过去一直认为高度分化的哺乳动物体细胞已失去了发育全能性的理论,是生物学史上的一个里程碑式的事件,有人喻为该研究是“生物原子弹”。由于克隆技术在畜牧业和人类医学等领域具有巨大的应用潜力,而被各国科学界列为重点研究的高科技领域。在“多莉”问世的10年时间内,克隆动物家族日益庞大,已获得了包括体细胞克隆绵羊、山羊、牛、猪、马、猫、狗等在内的10余种体细胞克隆动物。

2003年2月14日,由于被检查出患有进行性肺病,6岁半的“多莉”被实施“安乐死”。按绵羊的标准它还是中年,它的疾病和死亡,再度引发对于克隆的争论。

(一)两栖类动物的核移植试验

在细胞分裂过程中,是否每次分裂都产生两个一样的子细胞?或者是两个不一样的子细胞?在胚胎发育过程中,是否每个卵裂球还具有产生一个完整胚胎的能力?也即细胞是否具有全能性(totipotency)。为了回答这一问题,1888年,Roux用热针破坏2-细胞蛙胚的一个卵裂球,

死亡的卵裂球留在原地不再分裂,而剩余的一个卵裂球却只发育成了半个胚胎,他们认为细胞分化是由于细胞分裂过程中丢失了某些遗传物质,所以分化不可逆转。不过,这一理论很快就被 Driesch 的海胆实验所否定。1892 年, Driesch 发现海胆胚胎两个分离的卵裂球都可以各自发育成为一个完整的胚胎,后来许多研究者通过蛙和蝾螈等动物的卵裂球分离实验都证实,只要方法得当,每个分离的卵裂球都可以单独发育成为一个完整个体。这些实验都证明了细胞的遗传物质并未随卵裂丢失,每个卵裂球中都含有发育为完整个体所需的遗传物质。Loeb 发现,用不同的盐溶液可以引发卵子的孤雌发育,用同样的方法处理受精卵时,可以引起受精卵的胞质突出,形成一个与受精卵相连接的单纯胞质体,当胚胎分裂时,在某些情况下,分裂的细胞核可以通过胞质桥而转移到突出的胞质中,出现核转移现象。德国胚胎学家 Spemann 从 Loeb 实验中获得启示,他用婴儿的头发将蝾螈的合子结扎,蝾螈合子的核在一端,另一端没有核,有核部分分裂,无核部分停止分裂。当有核部分分裂到 16-细胞时,将结扎的头发略微松开,使其中一个卵裂球的核通过胞质桥进入无核部分,此时原来无核的部分在获得了一个细胞核后又开始分裂,再将两部分彻底分开,第二个卵裂球也发育成一个完整的个体。Spemann 的这一实验说明,至少在 16-细胞期的细胞核还具有发育全能性。1938 年,Spemann 对这些结果进行总结和分析,并设想将分化程度更高的细胞核放入去核的



卵母细胞中,观察细胞核是否还能继续发育,验证是否遗传物质中所携带的信息在发育和分化中会丢失或失活。遗憾的是因当时技术条件所限,他本人未能将这一实验付诸实施。但这一假想实验的提出,却成了核移植技术的开端(见图 1-2)。

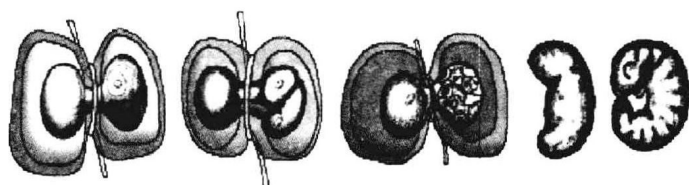


图 1-2 Spemann 的经典实验

1952 年美国科学家 Briggs 和 King 首次成功地完成了细胞核移植实验。他们将豹蛙(*Rana pipiens*)未分化的囊胚细胞核注入去核的卵母细胞中,构成一个新胚胎,这种重构胚经适当刺激后,部分可以发育为蝌蚪,而这些蝌蚪经过变态可以长成长蛙。这说明至少到囊胚期,细胞核还具有全能性。后来,他们发现,用分化程度越高的细胞进行核移植,重构胚能够发育到蝌蚪期的比例就越低,最后,重构胚甚至都不能正常分裂,因此,他们认为,细胞核的全能性随着细胞的分化而逐渐丧失。

几乎在同一个时期,瑞士胚胎学家 Fishberg 和他的合作者 Gurdon(1958)报道了用非洲爪蟾(*Xenopus*)的早期囊胚细胞进行核移植,重构胚不仅可以发育成蝌蚪,而且