

青 ★ 年 ★ 科 ★ 学 ★ 家 ★ 文 ★ 库

THE SERIAL BOOKS WRITTEN
BY YOUNG SCIENTISTS

哺乳动物 胚胎工程

冯怀亮 著

青年科学家文库

哺乳动物胚胎工程

冯怀亮 著

吉林科学技术出版社

【吉】新登字 03 号

青年科学家文库

哺乳动物胚胎工程

冯怀亮 著

责任编辑:王宏伟

封面设计:杨玉中

出版 吉林科学技术出版社
发行

850×1168 毫米 32 开本 10.625 印张
插页 4 260 000 字

1994 年 7 月第 1 版 1994 年 7 月第 1 次印刷

印数:1—1140 册 定价:12.00 元

印刷:农牧大学印刷厂

ISBN 7—5384—1426—6/S·195

内 容 提 要

生物工程技术的蓬勃发展给当今科学研究带来了一场深刻的革命。作为生命科学前沿领域的胚胎学首当其冲地受到生物工程技术的影响,“哺乳动物胚胎工程”研究领域应运而生。哺乳动物胚胎工程技术揭开了当代胚胎学研究的崭新画卷。本书全面系统地阐述哺乳动物胚胎工程领域研究的最新理论和技术。全书分为上下两篇,共15章,主要包括:配子和受精生物学、早期胚胎发育、卵子和胚胎冷冻、胚胎分割、体外受精、性别控制、嵌合体、核移植、转基因、胚胎干细胞及胚胎工程新技术等,理论与技术并举,内容多为80年代中、后期国际上胚胎学研究的热点。因此,本书是一部全面了解哺乳动物胚胎工程知识及技术的理想参考书,适用于胚胎学、发育生物学、生殖生物学、分子生物学、生物化学、遗传学、畜牧兽医等生物学科各专业的科研工作者,也可供大专院校生物系、医学院校及农林畜牧院校师生参考。

《青年科学家文库》评审委员会

顾	问：	王大珩	杨振宁		
主	任	委	员：	高景德	
副	主	任	委	员：	高 潮
				刘东生	卢良恕
				丁石孙	鲍奕珊
委	员：	王寿仁	王泽九	石元春	叶耀先
		田光华	许 翔	杨芙清	吴 博
		何耀坤	张锐生	陆道培	陈运泰
		陈佳洱	陈章良	罗 伟	赵玉秋
		赵柏林	俞鸿儒	姜东华	顾方舟
		高为炳	阎隆飞	雷天觉	黎乐民

祖国的希望 未来的曙光

——寄语青年科技工作者

王大珩

翻开吉林科学技术出版社送来的《青年科学家文库》书目及作者名单，一个个自强好学，勇于探索创新的青年人仿佛就在眼前，使我欣慰，感到后生有望。所以在《文库》编辑出版之际，我很乐于借此机会，同广大青年科技工作者讲几句共勉的话。

这些年来，一大批在五星红旗下诞生，成长起来的年轻科技工作者崭露头角，在面向国民经济主战场的应用研究和在基础科学以及高技术研究等诸方面取得优异的成就，有的跻身国际领先地位，或达到国际先进水平，有的填补国内空白，这些成果对推动科学技术进步，发展国民经济起到了重要作用。为鼓励青年科技工作者的科学研究和发明创造，中国科学技术协会、中国科学院分别设立了青年科技奖和青年科学家奖，规定每两年评选一次。首届青年科技奖评出 94 名，首届青年科学家奖评出 25 名，他们是从全国数以百万计的青年科技工作者中层层遴选出的佼佼者。

在此基础上，经过中国科协和中国科学院的推荐，吉林科学技术出版社编辑出版首届部分获奖者的著作，并

获得长白山学术著作出版基金的资助，这对广大青年科技工作者是很大的鼓舞。出版社关心青年科技工作者的成长是值得赞扬的。

当今，在激烈的国际竞争中，重要的是看一个国家的综合国力，而其中重要的一个方面是科学技术的进步，所以各国都把科学技术作为推动经济发展和社会进步的重要手段。我国是一个拥有十一亿人口的大国，经济还很落后，但是我们有志气、有能力振兴中华，立足于世界民族之林。实现这样的宏愿，要靠我们几代人的艰苦奋斗。中国科学技术的兴旺发达要靠我们老中青科技工作者团结合作，但归根到底要靠你们青年人。长江后浪推前浪，一代更比一代强。党和人民把国家的前途、民族的命运寄托在你们青年人身上，正如江泽民同志所说：“你们是祖国的希望所在，是中国未来的曙光。”

我们这些人都已年逾古稀，要你们接好班，要有理想、有志气。一个人也好，一个民族也好，都要有一点精神，要有使命感，要有民族自强心，要为国家、为民族争口气，奋发向上，勇于进取；作为优秀的青年科技人才，除业务上有突出成就外，还要有不计名利、无私奉献的高尚精神，现在尤其是要提倡这种精神，还要有求实的科学态度，尊重他人的劳动；你们还要发扬中华民族的美德，那就是要有集体主义精神，要团结协作，自力更生，艰苦奋斗，不折不扣地去拼搏，满怀希望，开拓未来！

1990年2月

序

研究和分析生物的生命现象是生物科学的主要任务。而十多年来，人们把囊括整个生物学、医学、农学、工程学等领域以及物理学、化学等相关学科的综合科学称为生命科学。生命科学的中心任务是阐明生命机制，提高生物的生产性能，最终有利于人类的生活和生存。它以高技术手段应用于产业，以生产有用的物质和部分或全部改变其生物体，统称为生物工程学。按照生物界的不同层次，生物工程学包括微生物生物工程、植物生物工程和动物生物工程。而哺乳动物胚胎生物工程或简称为哺乳动物胚胎工程是动物生物工程的重要组成部分。它主要应用工程的手段，在胚胎发育早期，胚胎和母体尚未建立更高级的物质交换关系之前，对配子或胚胎的发育规律进行人工干预，以改变其部分或全部结构和功能，从而达到生产物质的目的，但是这只有在阐明胚胎早期发育机制的基础上，才有可能利用其早期可塑性进行有利于人类的干预。因此，胚胎工程将以分子遗传、胚胎操纵和基因转移为突破口，对动物的生殖、育种和生产，产生革命性的影响。所以它既有其规律性的理论基础，又是应用性很强的边缘学科。主要内容包括生殖细胞、受精和早期胚胎发育以及以胚胎移核、体外受精、胚胎嵌合、胚胎性别鉴定、胚胎分割、胚胎干细胞、孤雌生殖等为主的显微操纵和以分子生物学为基础的基因重组利用技术。以胚胎分割而论，它不仅可以得到同卵双生同性别犊牛，而且可以避免异性双胎，结合性别鉴定多产母犊。体外受精可以产生试管动物，可利用良种动物卵巢多产优良动物胚胎个体，而且可以结合冷冻长期贮存优良动物胚胎，特别是濒危动物的遗传资

源。胚胎细胞核移植技术，在牛、羊、猪等家畜上均已成功。而且在今后五六年有可能应用于生产，它可以迅速克隆优良动物个体，如与胚胎干细胞、转基因技术结合，可以避免生殖系嵌合体的生成，大量传代定型的胚胎干细胞核，供实验、研究和生产之用。哺乳动物基因转移技术，虽然始于1980年，1985年才在家畜上应用，也有不少问题急待解决，但在改善动物的生产性能，提高饲料转化率、增重率，加速躯体生长、提高抗病能力，特别是为人类生产医药产品，如抗胰蛋白酶、凝血因子、酪蛋白和血红蛋白等方面，已经发挥出不可估量的作用。至于利用孤雌生殖生产纯系动物方面已经培养出世界上首例只有妈妈的牛犊。这是一些非常引人入胜的问题，颇具吸引力。从理论研究和生产需要方面，都应有这方面的书籍出版，《哺乳动物胚胎工程》的问世，将提供这方面的信息，无疑是一件十分可喜的事，虽然它可能有挂一漏万之嫌，但毕竟起了抛砖引玉的作用。冯怀亮博士，在这个领域中的某些方面，有独特的造诣，相信这本书的出版，将受到生物医学界、畜牧兽医领域有识之士的欢迎，为这些方面做出应有的贡献。

冯家骅

(中国科学院生物学部院士，复旦大学教授)

1993年8月10日，于上海

发展生物高科技

实现产业化。

景东书

一九九四年五月

谨此向

农牧大学九十周年献礼！

前 言

生物工程是一门综合性的科学技术，它运用生物学、分子生物学、生物化学，以及工程学等手段，直接或间接地利用生物体的细胞或其产物为人类服务。目前，生物工程按照生物界的不同层次，分为微生物工程、植物生物工程和动物生物工程。动物胚胎工程是动物生物工程的重要组成部分，由于本书主要介绍与哺乳动物胚胎有关的细胞工程和基因工程，故称之“哺乳动物胚胎工程”。

随着生物工程技术的蓬勃发展，哺乳动物胚胎工程领域也取得了令人瞩目的成就，尤其是近十余年来，已由原来的生物学理论研究逐渐扩大到生物医学和农业的实际应用方面。例如，应用胚胎工程技术，建立人类遗传疾病动物模型、动物个体表达系统（生物反应器）和无性动物繁殖体系，以及培育试管动物和试管婴儿等等。这些成就无疑极大地推动了生物医学和农业的发展，它为治疗人类遗传性疾病（4000余种），攻克人类的顽敌——癌症，以及优生、衰老方向的研究提供了一个全新的基础。在制造新型的实验动物、生产优良的家畜和资源保存等方面也有重要的应用前景。

在当今胚胎工程技术发展日新月异的时代，广大生物医学工作者迫切需要了解这方面的知识，但目前国内尚无一本全面系统的胚胎工程著作出版。因此，作者在多方面的鼓励和支持下，著述了这本《哺乳动物胚胎工程》，奉献读者。

哺乳动物胚胎工程是一个新的研究领域，发展迅速，内容广泛，加之科研和教学任务繁重，编写仓促，而作者的知识水平和实践经验又相当有限，虽作了一定努力，但难免出现文字、排列、

内容不切甚至错误等问题，诚恳希望读者批评指正，以利再版时修改。

在本书编写过程中，中国科学院生物学部院士谈家桢教授（复旦大学）为本书作了序，农牧大学校长景在新教授题了词，这是老一辈科学家和领导对青年科技工作者的殷切期望和热情鼓励。我的导师秦鹏春教授（东北农业大学）对书稿进行了校阅，并提出了不少宝贵意见。农牧大学领导、郝水教授（东北师范大学）、殷震教授、杨本升教授、李毓义教授、郭文场教授、李彦舫教授、王国元教授等给予了大力支持和鼓励，刘丽媛同志为本文绘制了插图，文兴豪、朱进、岳占碰、张仁成等同志为本书的编排和校稿做了大量工作，在此深表谢意。

冯怀亮

1994年3月

目 录

上篇 基础理论

1 哺乳动物的精子	1
1.1 精子的发生	1
1.2 附睾内精子的贮存和成熟	6
1.3 精子的形态结构	8
1.4 精子的化学组成及分子构型	15
1.5 雌性生殖道内的精子	17
1.6 异常精子和不育	19
2 哺乳动物的卵子	24
2.1 卵子的形成	24
2.2 排卵	27
2.3 卵子成熟发育中的基因活动和蛋白质合成	30
2.4 卵母细胞成熟发育的调控	35
2.5 卵母细胞与卵丘细胞间的关系	39
2.6 卵子的一般形态构造	41
2.7 卵子的超微结构	44
2.8 卵子的老化和异常	51
2.9 卵子的孤雌生殖	52
3 哺乳动物的受精	57
3.1 精子的获能及其变化	57
3.2 精子的顶体反应	61
3.3 精子的穿卵	68
3.4 精卵融合	75
3.5 精卵融合后的反应	80

4	哺乳动物的早期胚胎发育	85
4.1	胚胎的早期发育	85
4.2	早期胚胎的细胞分化	90
4.3	早期胚胎发育中基因的表达	98
4.4	早期胚胎发育中的酶活动	100
4.5	早期胚胎的死亡和免疫性丢失	101
4.6	胚胎与母体间的相互关系	103
4.7	早期胚胎发育的内环境	105
5	哺乳动物卵母细胞和胚胎保存	112
5.1	卵母细胞和胚胎保存的意义	112
5.2	卵母细胞和胚胎的低温保存	113
5.3	超低温保存的原理	116
5.4	卵母细胞的超低温保存	121
5.5	胚胎的超低温冷冻	125
6	哺乳动物胚胎移植及分割	130
6.1	胚胎移植研究简史	130
6.2	胚胎移植的意义	132
6.3	胚胎移植的生理学基础	134
6.4	胚胎移植的原则及条件	135
6.5	胚胎移植的基本技术程序	137
6.6	胚胎移植的效果和发展前景	140
6.7	胚胎分割	142
7	哺乳动物的体外受精	146
7.1	体外受精的历史和现状	146
7.2	卵母细胞的体外成熟	149
7.3	影响卵母细胞体外成熟的因素	152
7.4	精子的体外获能	156
7.5	卵母细胞的体外受精	158
7.6	精子的显微注射	161

7.7	体外受精胚胎的发育	163
7.8	体外受精的应用前景	166
8	哺乳动物性别控制	169
8.1	性别控制的发展历史	169
8.2	性别决定理论	170
8.3	精子的性别控制	171
8.4	胚胎的性别控制	174
8.5	结论	179
9	哺乳动物嵌合体	181
9.1	嵌合体的研究历史	181
9.2	嵌合体的标记	182
9.3	嵌合体的制作方法	183
9.4	嵌合体制作的局限性	185
9.5	嵌合体研究的现状	186
9.6	嵌合体的应用	188
10	哺乳动物胚胎细胞核移植	191
10.1	核移植的原理和意义	191
10.2	核移植的历史和现状	192
10.3	核移植技术程序	194
10.4	核移植中细胞核的构建和活化	198
10.5	影响核移植的因素	199
10.6	核移植技术的应用和前景	203
11	哺乳动物转基因	207
11.1	转基因的历史发展	207
11.2	转基因的方法	209
11.3	外源基因的整合	215
11.4	外源基因的表达	217
11.5	转基因的生理效应与遗传	221
11.6	基因转移的鉴定	223

11.7	转基因技术的应用和前景	223
11.8	转基因存在的困难和问题	228
11.9	转基因技术今后急待解决的问题	233
12	哺乳动物胚胎干细胞	235
12.1	ES 细胞的生物学特性	235
12.2	ES 细胞与胚胎细胞的关系	237
12.3	ES 细胞系的建立方法	237
12.4	ES 细胞研究的现状和问题	239
12.5	ES 细胞的应用和前景	241

下篇 实验技术

13	哺乳动物配子和胚胎的细胞学技术	245
13.1	精子的光学显微镜观察	245
13.2	卵子和胚胎的染色体检查	249
13.3	精子的电子显微镜观察	251
13.4	卵子和胚胎的电子显微镜观察	252
13.5	配子和胚胎的电镜细胞化学技术	253
13.6	胚胎的银染和放射自显影技术	256
13.7	配子和胚胎的免疫电镜技术	257
14	哺乳动物卵子和胚胎的分子生物学技术	258
14.1	卵子和胚胎的核酸分离	258
14.2	卵子和胚胎的电泳技术	260
14.3	卵子和胚胎的 cDNA 文库构建	264
15	哺乳动物胎胚工程应用技术	274
15.1	配子和胚胎的冷冻保存	274
15.2	胚胎的分割	278
15.3	胚胎嵌合	280