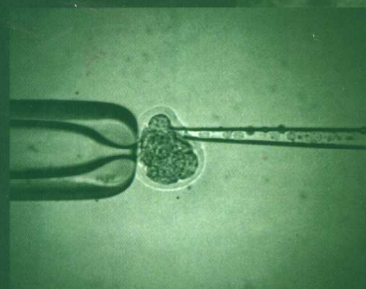


“十五”国家重点图书

现代生物技术丛书

# 动物细胞工程

徐永华 主编



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

“十五”国家重点图书

现代生物技术丛书

# 动物细胞工程

徐永华 主编

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

·北京·

(京) 新登字 039 号

**图书在版编目 (CIP) 数据**

动物细胞工程/徐永华主编. —北京: 化学工业出版社, 2003.6

(现代生物技术丛书)

ISBN 7-5025-4099-7

I. 动… II. 徐… III. 动物-细胞工程 IV. Q952

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 051301 号

---

现代生物技术丛书

**动物细胞工程**

徐永华 主编

责任编辑: 孟 嘉 郎红旗

责任校对: 蒋 宇

封面设计: 于 兵

\*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行  
现代生物技术与医药科技出版中心

(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

北京管庄永胜印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 16 $\frac{3}{4}$  字数 395 千字

2003 年 8 月第 1 版 2003 年 8 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-4099-7/Q·30

定 价: 35.00 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

## “现代生物技术丛书”编委会

**编委会主任** 焦瑞身

**编委会成员** (以姓氏汉语拼音为序)

郭礼和 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 研究员

贾士荣 中国农业科学院生物技术中心 研究员

焦瑞身 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所 研究员

伦世仪 江南大学 中国工程院院士 教授

俞俊棠 华东理工大学 教授

张树政 中国科学院微生物研究所 中国科学院院士 研究员

朱宝泉 上海医药工业研究院 研究员

## 本册主编与编写人员

**主 编** 徐永华

**编 写 人 员** (以姓氏汉语拼音为序)

常万存 山东省农业科学院 研究员

丛笑倩 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 研究员

费 俭 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 研究员

桂建芳 中国科学院武汉水生生物研究所 研究员

郭礼和 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 研究员

洪一江 南昌大学 教授

胡成钰 南昌大学 副教授

黄 芳 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 研究员

江万里 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 工程师

李振刚 中国科学技术大学 教授

- 施渭康 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学  
研究所 研究员
- 谢 弘 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学  
研究所 研究员
- 徐永华 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学  
研究所 研究员
- 叶 敏 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学  
研究所 研究员
- 周筱刚 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学  
研究所 工程师

## 序

建立在分子生物学、分子遗传学、生物化学、微生物学、细胞学以及化工、计算技术等基础之上的现代生物技术(生物工程),是20世纪后半期国际上突飞猛进的技术领域之一,它为人类保健、农牧业、食品工业、环境保护以及精细化工等产业的发展提供了前所未有的动力。展望新世纪,可以预料生物技术的前景更为光辉灿烂。本丛书将就该领域的研究动态逐个进行详细介绍,这里我们仅概述其突出进展与读者分享。鉴于各领域发展迅速和编者水平有限,丛书定有遗漏和不足之处,敬请读者指正。

### 一、基因组和后基因组学

人类基因组计划(HGP)正式启动于1990年,这是一个跨世纪、跨国界的最伟大的生命科学工程,经美、英、法、德、日、中6国的合作和努力,已于2001年完成全部序列测定。这一成就可以与原子弹计划和登月计划相媲美。它将对生命科学和人类健康产生巨大影响。应用各种技术,上千个与疾病相关的基因已被定位,并有近百个疾病基因被克隆。毫无疑问,这将为新药研究设计和疫苗制备提供依据,且已有多个物质进入临床试验。

与此同时,小家鼠、果蝇、线虫、拟南芥、水稻、啤酒酵母,以及多种真菌、细菌的基因组研究相继开展,其中拟南芥基因组的全序列测定业已完成。由于微生物的基因组远小于多细胞真核生物,且细菌和酵母基因中不存在内含子,因而便于分析,迄今已在酵母基因组中发现了一些与人类疾病基因同源的基因,研究这些基因在酵母中的生理功能,将有助于了解相关疾病的发病机理。

今天,一个崭新的领域——生物信息学迅速发展,它将基因的结构、蛋白质功能以及物种的进化在基因信息的基础上统一起来。这一学科的发展,对基因组和后基因组学研究及对人类健康和农业发展将产生深远的影响。

### 二、基因工程(重组DNA技术)

体外DNA重组技术始于1972年,首先在大肠杆菌中获得成功,继而扩展到其他微生物,生产出了多种新型发酵产品。美国批准上市的基因工程产品有人类胰岛素、人类生长因子、白介素、干扰素、牛型生长激素疫苗等,并不断有新的品种进入临床应用。重组微生物的应用,也为高等生物作为表达外源基因的宿主提供了技术和经验,如哺乳动物细胞株、昆虫细胞株、转基因动物、转基因植物,都有可能作为生产需要糖基化的重组蛋白质的宿主。

我国基因工程研究起步较晚,自1986年“863”计划实施以来,生物技术药物的研究和产业化获得迅猛发展,至1998年已有14种基因工程药物、3个基因工程疫苗和数十个重组诊断试剂投放市场。

### 三、转基因作物及其他农业生物工程

农业生物技术中最重要的是转基因作物 (GMC)。近十年间 GMC 发展速度极快, 1996~2001 年全球 GMC 的种植面积增长了 30 倍。2000 年达 4 420 万公顷, 比 1999 年增长 11%, 2001 年又在 2000 年的基础上增长 19%, 达 5 260 万公顷。GMC 种植面积占相关作物全球种植面积的比例依次为: 大豆 46%、棉花 20%、油菜 11%、玉米 7%。

我国 GMC 的种植面积在 13 个国家中居第四位。国产转基因 Bt 抗虫棉的育成和推广, 开创了国内基因工程农业应用的成功范例, 仅 2001 年种植面积达 60 万公顷。抗虫棉的杀虫性强, 农药用量可减少 70%~80%, 既降低了用工成本, 又保护了环境。

继获得第一代 GMC (抗除草剂、抗虫、抗病等) 之后, 第二代转基因作物已呼之欲出, 重点是进一步改良作物品质, 提高其营养水平 (如“金稻米”等), 或以植物作为生物反应器生产医疗保健产品 (如口服疫苗等)。同时, 针对旱、涝、盐碱、低温等恶劣自然环境, 培育各类抗逆作物。

此外重组根瘤菌、重组联合固氮菌, 抗病杀虫重组微生物的开发和应用也取得了明显的成效。

### 四、克隆动物及转基因动物

动物体细胞克隆技术的发展为生产蛋白质类药物、器官移植、挽救珍稀濒危动物以及培育优良品种等奠定了基础。最近, Wilmut 等用山羊胚胎的核转入去核未受精的卵母细胞, 产生了克隆动物——Dolly 羊, 成为科学上的重大突破, 并在多种动物中得到重复。

转基因动物的成功引导了一种新型制药工业, 即利用转基因山羊、绵羊和乳牛的乳汁来生产治疗人类疾病的蛋白类药物。转基因动物发展的另一动向是克隆修饰的猪, 为人体器官移植提供外源器官, 以缓解临床上对人体器官的迫切需求。

体细胞克隆山羊在我国的上海市转基因研究中心及陕西的中国杨凌克隆动物基地都获得了成功。

### 五、细胞工程和组织工程

多年来我国植物组织培养和细胞工程研究在国际上是领先的。我国学者通过花药和花粉单细胞培养培育出烟草、水稻、小麦、大麦、油菜、甘蔗等作物的新品种、新品系, 种植面积逾 100 万公顷。脱病毒快速繁殖的主要作物有香蕉、马铃薯、甘蔗、木薯、香草兰、草莓、柑橘、苹果、葡萄、花卉和观赏植物。紫草、三七等植物细胞已可在发酵罐中大量培养。我国的传统中药涉及 5 000 种左右植物, 细胞培养是中药资源开发的一个重要方面。

我国学者在动物细胞工程方面也作出了重要贡献。例如亲缘关系远近不同的鱼类可进行各种核质组合, 在变种间、属间及科间都获得了具有独特性状的

核质重组鱼。

动物发育工程中另一重大进展是干细胞株的建立，这已成为国际上研究的热点。干细胞是指未充分分化、但具有再生为各种组织器官和个体潜在功能的细胞。血液干细胞能够分化、生成整个血液系统，用造血干细胞移植来治疗白血病和一些遗传血液病，是医学界正在探索的课题。最近，以色列科学家首次从胚胎干细胞培养出人类心脏组织，它可以正常跳动，并且有新生心脏组织的电特性和机械特性。波兰科学家用脐血干细胞成功地培育出了脑细胞，有可能被用于帕金森病、脑震荡等疾病的治疗和脑部损伤的修复。美国科学家最近成功地将胚胎干细胞分化成人类骨髓中的造血先驱细胞，并进一步培养成红血球、白血球和血小板。这些结果预示着人类有可能获得取之不尽的血源。我国科学家已成功地将干细胞体外培养成胃和肠黏膜组织，这是继利用干细胞原位培养皮肤组织全能修复之后，人类再生组织器官方面的又一重大成果。

## 六、环境生物工程

我国是环境污染较严重的国家，环境生物工程在防治各种污染中将起重要作用。众所周知，油轮海上倾油可引起大面积海域污染，国外虽采用“超级细菌”（含有多个降解烃类的质粒）进行海面浮油处理，但其效果尚有待改进。化学农药对土壤的污染虽可用具专一性降解能力的特种细菌处理，但作用也甚缓慢。相对而言，较为先进的方法是采用可被降解的生物农药。此外，河流、湖泊水域的污染防治、酸雨危害以及城市垃圾的处理等，也都是亟待解决的问题。

## 七、酶工程

酶工程是现代生物技术的重要组成部分，其特点是利用酶、含酶细胞器或细胞（微生物、植物、动物）作为生物催化剂来完成某些重要的化学反应。应用范围包括医药、食品、化学工业，诊断分析和生物传感器等。涉及的品种不少，诸如糖化酶、淀粉酶、洗涤用酶以及与 $\beta$ -内酰胺抗生素生产有关的青霉素酰化酶、7-ACA酰化酶等，其市场需求、生产规模和产值均很可观，并已产生巨大的经济效益。随着酶的大量应用，各种酶反应器和固定化技术应运而生，更进一步地推动了酶工程的发展。

当代酶工程发展的趋势之一是寻找耐极端条件的酶，如耐高温、耐酸碱、耐盐等。这些酶存在于嗜高温、嗜酸碱、嗜高盐的细菌中。近年来对这些细菌的研究进展迅速，这将为酶工业提供源源不断的新型酶类。

## 八、新型能源和清洁能源的开拓

随着化石能源逐年减少，再生能源的研制开发已备受国际关注。虽然我国石油和煤炭储量丰富，但从长远考虑，还需对这一课题予以重视。展望未来，新型能源，特别是清洁能源的开发很有必要。

氢气是无污染的清洁能源，燃烧后不产生二氧化碳、硫、氮氧化物等有害物质，国外的燃氢汽车已研制成功。产氢的微生物甚多，值得重视的是光合细



菌，该菌可利用工业废水产氢，同时具有农用肥效的作用。

巴西和美国是燃料乙醇生产技术和商业应用比较成熟的国家。作物秸秆、废报纸等生物材料是生产再生能源的最廉价原料，所生产的燃料乙醇成本可低到每加仑 1.10 美元，虽然仍高于每加仑 0.80~0.90 美元的汽油批发价，但随着技术的改进，生产成本将会逐步降低。

### 九、新型生物传感器的研制

要研制新型生物传感器，需要新型的酶和生物材料，这些酶需能耐高温、酸、碱或低温。已发现的这类特殊生物材料有嗜盐细菌的紫膜，这是一种光敏材料，可转化光子为 ATP。另一个例子是磁细菌细胞中的微小磁石 ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )，对细胞起导航作用。当代正竞相研制 DNA 芯片，以色列学者已用其建成简单的计算机。

生物传感器应用范围广泛，包括临床检测、免疫反应、反应罐过程检测、环保毒物检测等，不胜枚举。

### 十、生化工程

包括发酵工艺、过程检测与控制、反应模型建立、反应器的设计和应用，以及包括产品提取纯化、包装在内的下游加工工艺等方面，这是生物技术产业化的最后重要过程。

本丛书以应用生物技术为主，包括必要的基础知识和前景展望。丛书包括 15 个分册，即基因工程、蛋白质工程、酶工程、生物信息学、植物细胞工程、动物细胞工程、微生物工程、生物制药技术、高级生物传感器、环境生物工程、农业生物工程、糖生物工程、生物技术与疾病诊断——兼论基因治疗、组织工程、生物工程下游技术。

每册均由工作在第一线的专家撰写，概要阐述了国内外生物技术的进展和趋势。期望本丛书的出版能够对推动我国生物技术的研究开发及产业化作出微薄的贡献。

编者衷心寄语青年朋友，认识生物技术的光辉前景，祝愿你们以聪明才智为我国的生物技术作出创新贡献。

焦瑞身 贾士学

2002 年 1 月

## 前 言

《动物细胞工程》一书是“现代生物技术丛书”中的一个分册。在20世纪80年代化学工业出版社曾出版过一套《生物工程丛书》，其中包括一册《细胞工程》，内含植物细胞工程、动物细胞工程和微生物细胞工程三方面的内容。近20年生命科学的迅猛发展促进了生物工程的前进，在动物细胞工程方面呈现了蓬勃兴旺、创意盎然的局面，显示了在生命科学发展路程上的创新成就和对推动生物制药、保障人类健康等方面的突出贡献。因此，为总结动物细胞工程方面的创造性成果和促进其在新世纪中的进一步发展，专题编著一册《动物细胞工程》是十分必要的。

我们试图将动物细胞工程的基本原理、基本技术、成果应用和未来的发展系统全面地介绍给读者。本书第一章总论，概述动物细胞工程的发展、内容及其应用，反映了动物细胞工程发展的轨迹。第二、三、四章介绍动物细胞工程发展的基础——细胞培养和细胞融合的原理和基本技术，以及利用细胞融合产生杂交瘤和单克隆抗体的技术。分子生物学和基因工程技术的应用把动物细胞遗传物质的改造和分析提高到新的水平，本书第五、六章着重介绍了研究动物细胞基因表达系统和基因打靶的技术，反映了动物细胞工程在基因水平上改造和分析动物细胞基因结构与功能的最新手段及其成果。第七章介绍利用染色体载体转移基因和构建人工染色体的技术及其应用。干细胞生物学的发展开辟了细胞生长、分化研究的新的领域，并展示了其在医学上应用的重大意义，本书第八、九章介绍胚胎干细胞和组织干细胞的研究进展及其应用前景。第十、十一、十二章分别介绍了利用上述基本技术，对动物细胞进行遗传操作，产生转基因动物和胚胎以及鱼类细胞工程的最新进展。第十三章介绍了获得具有人类预期功能的细胞样结构的另一条途径：人造细胞研究概况。第十四章总结和分析了动物细胞工程的发展和展望。

动物细胞工程这一新兴的生物技术是在生命科学特别是细胞生物学飞速发展的基础上壮大起来的。随着人类基因组奥秘的揭示和功能基因组时代的到来，生命科学的发展与时俱进，新的发现日新月异，不断地给昨日的发现增添光辉，将昨日的偏见重新修正。特别是细胞生物学研究新成果的涌现为动物细胞工程的进一步发展拓展了无比广阔的天地。动物细胞工程这一新兴技术领域的内容如此之丰富。希望这本书能够达到编写的初衷，但限于我们的学术水平，本书难免疏漏和不足，期望专家、学者和同仁们批评指正。

在本书脱稿之际，要特别感谢焦瑞身先生的鼓励和支持。焦先生为推动生物工程在我国的发展，付出了巨大的努力，他为“现代生物技术丛书”的出版，为《动物细胞工程》一书的撰写指明了方向。我们还要感谢为本书不同章节的编写、制图、打印、校对等给予帮助的钱雪莹女士。

徐永华  
2003年6月

## 内 容 提 要

“现代生物技术丛书”是化学工业出版社重点策划、隆重推出的一套精品图书，已被国家新闻出版总署列为“十五”国家重点图书。该套书由我国著名生物技术专家焦瑞身先生担任编委会主任，各相关领域科研、教学、产业一线具有权威性的专家学者共同撰写。

本书系统全面地介绍了动物细胞工程的基本原理、基本技术、成果应用和未来的发展。在概述动物细胞工程的发展、内容及其应用之后，对细胞培养和细胞融合的原理和基本技术，以及利用细胞融合产生杂交瘤和单克隆抗体的技术等动物细胞工程发展的基础进行了介绍；着重阐述了动物细胞基因表达系统和基因打靶的技术、利用染色体载体转移基因和构建人工染色体的技术及其应用；并且基于干细胞生物学在医学上应用的重大意义，对胚胎干细胞和组织干细胞的研究进展进行了介绍；最后对利用上述基本技术，对动物细胞进行遗传操作，产生转基因动物和胚胎以及鱼类细胞工程的最新进展，以及人造细胞研究概况等进行了展开。

动物细胞工程已经展现出其对生物制药、保障人类健康等方面越来越多的贡献和作用，本书旨在提供读者动物细胞工程的基础理论、实验技术和技术应用，其丰富的内容可供细胞工程、基因工程、农业生物工程、医学生物工程等领域的科研人员，相关专业的大专院校师生参考。

## 敬 告 读 者

尊敬的读者：

首先感谢您对我社“现代生物技术丛书”的热情关注与支持。

目前该丛书已经出版了10个分册：《基因工程》、《植物细胞工程》、《动物细胞工程》、《微生物工程》、《酶工程》、《蛋白质工程》、《组织工程》、《环境生物工程》、《生物技术与疾病诊断——兼论人类基因治疗》和《生物工程下游技术》（第二版）。其余5个分册（如莽克强主编的第二版《农业生物工程》、朱宝泉主编的《生物制药技术》等）作为第二批明年亦将陆续出版，欢迎选购。

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

2003年8月

# 目 录

第一章 总论	1
第一节 细胞生物学的发展和细胞工程的兴起	1
第二节 动物细胞工程的发展和内容	2
一、动物细胞培养	2
二、细胞融合和单克隆抗体技术	2
三、细胞拆合、核移植和动物克隆	3
四、基因转移和转基因动物	4
五、干细胞工程和再生医学	6
第三节 动物细胞工程的应用	7
一、细胞融合和单克隆抗体的应用	7
二、转基因技术的应用	8
三、细胞治疗	9
参考文献	10
第二章 动物细胞培养	11
第一节 引言	11
一、细胞培养发展简史	11
二、细胞系、细胞株和克隆	12
三、二倍体和细胞的转化	13
第二节 细胞培养及其应用	13
一、培养细胞的种类	13
二、培养细胞的特征	14
三、人体细胞体外培养的一些新进展	14
四、细胞培养技术的一些新应用	16
第三节 细胞培养的基本技术	17
一、设备、试剂及培养基的选择和配制	17
二、细胞培养技术	20
三、细胞培养物在液氮中的保存和复苏	23
第四节 培养细胞的鉴定	24
一、细胞种属鉴定的方法	24
二、杂交瘤细胞的特殊鉴定	30
第五节 细胞培养实验室	31
一、实验室设计、装置和技术	32
二、生物安全防护级别	33
第六节 细胞污染的检验	34
一、细菌和真菌污染	35

二、支原体污染 .....	37
三、病毒污染 .....	40
四、原生动物污染 .....	45
第七节 其他同体外动物细胞有关的问题 .....	48
一、培养细胞的起源和特征 .....	48
二、各种细胞的特征性标志 .....	49
三、细胞特异性抗原 .....	49
四、具有特定性功能的细胞 .....	50
五、细菌内毒素问题 .....	50
附：人恶性肿瘤连续性细胞系（株）建系（株）标准的建议 .....	50
参考文献 .....	53
<b>第三章 细胞融合</b> .....	<b>55</b>
第一节 细胞融合的基本技术 .....	55
一、细胞融合的机理 .....	55
二、诱发细胞融合的融合剂和细胞融合方法 .....	56
第二节 融合细胞的筛选 .....	58
一、基于酶缺陷型细胞和药物抗性所建立的杂种筛选 .....	59
二、基于营养缺陷型细胞所建立的杂种筛选 .....	59
三、由温度敏感突变型细胞组成的杂种细胞的筛选 .....	59
四、具有所需性状杂种细胞的筛选 .....	60
第三节 融合细胞克隆化 .....	60
一、有限稀释法 .....	60
二、半固体培养基法 .....	60
三、显微操作法 .....	60
四、荧光激活分选法 .....	60
第四节 细胞融合的应用 .....	61
一、淋巴细胞杂交瘤 .....	61
二、基因定位 .....	61
三、遗传基因的缺陷互补 .....	62
四、分化功能的表达调控研究 .....	63
五、体细胞杂种的致瘤性分析 .....	63
六、制作疫苗 .....	64
七、核移植和克隆动物 .....	64
参考文献 .....	65
<b>第四章 淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体</b> .....	<b>66</b>
第一节 B淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体 .....	66
一、基本原理 .....	66
二、融合亲本的选择 .....	66
三、细胞融合的方法 .....	67
四、杂交细胞的选择 .....	67

第二节 单克隆抗体的特性和应用 .....	68
一、单克隆抗体的特性——亲和力和特异性 .....	68
二、B 淋巴细胞杂交瘤和单克隆抗体的应用 .....	69
第三节 人杂交瘤单克隆抗体和基因工程抗体 .....	71
一、人杂交瘤单克隆抗体 .....	71
二、基因工程抗体 .....	71
第四节 T 淋巴细胞杂交瘤 .....	74
一、建立 T 细胞杂交瘤的方法 .....	74
二、T 淋巴细胞杂交瘤的类型及其应用 .....	75
三、T 细胞杂交瘤的问题 .....	75
参考文献 .....	76
<b>第五章 外源基因在真核细胞中的表达</b> .....	<b>77</b>
第一节 外源基因在毕赤酵母中的表达 .....	77
一、毕赤酵母菌质粒电转化方法 .....	79
二、高拷贝插入的转化菌株筛选 .....	79
三、表达菌株的筛选 .....	79
第二节 杆状病毒和昆虫细胞表达系统 .....	80
第三节 哺乳动物细胞表达系统 .....	81
一、影响外源基因在哺乳动物细胞中转录和翻译的序列因素 .....	81
二、哺乳动物细胞的表达载体 .....	82
三、筛选标志基因 .....	83
四、外源基因在哺乳动物细胞中的表达方式 .....	83
五、外源 DNA 导入哺乳动物细胞的方法 .....	84
第四节 基因表达产物的检测 .....	88
参考文献 .....	89
<b>第六章 基因打靶</b> .....	<b>90</b>
第一节 胚胎干细胞的获得和培养 .....	90
一、基因打靶用 ES 细胞的建株 .....	91
二、ES 细胞的核型分析 .....	93
三、ES 细胞的扩增 .....	94
第二节 打靶载体的构建 .....	96
第三节 重组 ES 细胞的筛选 .....	97
一、饲养层细胞的准备 .....	97
二、ES 细胞的准备 .....	98
三、转染 ES 细胞 .....	98
四、挑取 ES 克隆 .....	99
五、96 孔板 ES 细胞备份与细胞冻存 .....	100
六、Southern 杂交 .....	100
第四节 嵌合体小鼠的制备 .....	101
一、ES 细胞的复苏 .....	101

二、ES 细胞的囊胚注射 .....	101
第五节 基因敲除小鼠的建立 .....	102
第六节 Cre-loxP 系统、FLP/FRT 系统和条件性基因敲除 .....	103
第七节 基因敲入 .....	106
第八节 大规模 ES 细胞突变库的建立 .....	107
参考文献 .....	108
<b>第七章 染色体工程</b> .....	<b>109</b>
第一节 染色体介导的基因转移 .....	109
一、染色体的分离技术 .....	110
二、染色体转移技术 .....	110
三、被转移的染色体片段的大小 .....	112
第二节 染色质介导的基因转移 .....	112
一、染色质作为转基因载体的提出 .....	112
二、(全) 染色质的分离 .....	114
三、活性染色质的制备 .....	114
四、活性染色质作为基因载体的特点与鉴定 .....	115
第三节 酵母人工染色体 .....	116
一、完整的染色体 DNA 的提取 .....	117
二、基因组 DNA 酶切大片段的获取 .....	117
三、YAC 载体臂的制备 .....	118
四、YAC 臂与目的 DNA 大片的连接 .....	119
五、YAC 重组体对酵母的转化 .....	119
六、YAC 基因库的保存 .....	120
七、YAC 基因库的鉴定 .....	120
八、目的基因 YAC 克隆的筛选 .....	121
九、目的基因 YAC 克隆的鉴定 .....	122
第四节 细菌人工染色体 .....	122
一、BAC 载体的结构 .....	123
二、BAC 基因组文库的构建 .....	124
第五节 哺乳类人工染色体 .....	125
参考文献 .....	127
<b>第八章 胚胎性干细胞</b> .....	<b>129</b>
第一节 概述 .....	129
一、胚胎性干细胞和发育 .....	129
二、干细胞分类 .....	130
第二节 ES 细胞和 EG 细胞培养建系技术 .....	131
一、饲养层细胞培养法 .....	132
二、无饲养层培养法 .....	132
三、胚胎细胞来源 .....	132
四、ES 细胞和 EG 细胞的培养过程 .....	133

五、ES 细胞和 EG 细胞系的特性和鉴定 .....	135
第三节 ES 细胞和 EG 细胞体外诱导分化 .....	138
一、基本原理 .....	138
二、ES 细胞和 EG 细胞定向诱导分化 .....	139
三、ES 细胞体外诱导分化的基本方法 .....	139
四、ES 细胞体外诱导分化的几种细胞 .....	140
第四节 诱导分化细胞的永生化 .....	142
第五节 ES 细胞和 EG 细胞技术学在医学中的应用 .....	143
一、哺乳类发育的体外模型 .....	143
二、介导改造动物的基因 .....	144
三、人体的基因和细胞治疗 .....	145
四、组织工程的种子细胞来源 .....	147
参考文献 .....	149
<b>第九章 成体干细胞</b> .....	<b>151</b>
第一节 概论 .....	151
第二节 成体干细胞分化的可塑性 .....	152
一、骨髓干细胞 .....	152
二、神经干细胞 .....	153
三、肝干细胞 .....	154
四、骨骼肌干细胞 .....	155
第三节 成体干细胞的体外培养和特性 .....	156
一、骨髓间质干细胞 .....	156
二、造血干细胞 .....	157
三、神经干细胞 .....	158
第四节 成体干细胞研究中的问题 .....	159
一、异质性 .....	159
二、干细胞所处环境 .....	160
三、可塑性的调控 .....	160
四、分化细胞的功能 .....	161
五、体外增殖 .....	161
第五节 成体干细胞在再生医学中的应用 .....	161
一、组织工程化皮肤 .....	162
二、组织工程化骨骼 .....	162
三、骨髓与组织工程 .....	162
参考文献 .....	163
<b>第十章 转基因动物</b> .....	<b>165</b>
第一节 转基因动物实验的常用方法 .....	166
一、DNA 显微注射法 .....	167
二、胚胎干细胞转导 .....	168
三、精子转导 .....	170



四、反转录病毒转导·····	171
五、细胞核移植·····	172
第二节 转基因动物技术·····	173
一、显微注射用 DNA 的制备·····	173
二、受精卵的超排和获取·····	175
三、受精卵的显微注射和移植·····	177
第三节 转基因小鼠的鉴定·····	178
一、转基因小鼠分析用组织 DNA 的制备·····	178
二、PCR 鉴定转基因小鼠·····	179
三、Southern 印迹杂交分析法鉴定转基因小鼠·····	180
第四节 纯合子转基因小鼠的建立·····	180
一、纯合子转基因小鼠的培育·····	180
二、纯合子转基因小鼠的鉴定·····	181
参考文献·····	182
<b>第十一章 胚胎工程</b> ·····	<b>183</b>
第一节 胚胎移植技术·····	183
一、同期发情和超数排卵·····	183
二、胚胎采集·····	184
三、胚胎的检查及鉴定·····	185
四、胚胎的移植·····	185
五、影响胚胎移植妊娠率的因素·····	186
第二节 胚胎冷冻保存技术·····	186
一、胚胎冷冻的原理·····	186
二、胚胎的冷冻方法·····	187
三、冷冻效果的鉴定·····	187
四、存在问题·····	188
第三节 胚胎分割技术·····	188
一、胚胎分割的理论依据·····	189
二、分割方法·····	189
三、胚胎分割时需要注意的问题·····	189
第四节 体外受精技术·····	190
一、卵母细胞的获取·····	191
二、卵母细胞的成熟培养·····	191
三、精子的获能·····	191
四、体外受精·····	192
五、受精卵的体外培养·····	192
六、存在问题·····	192
第五节 胚胎工程研究中的胚胎干细胞技术·····	192
一、分离培养胚胎干细胞的意义·····	193
二、哺乳动物 ES 细胞的生物学特性·····	193