

生物实验室系列

小鼠胚胎操作实验手册

Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual

[美] 安德拉斯·纳吉
Andras Nagy

[美] 玛丽娜·格特森斯坦
Marina Gertsenstein

[美] 克里斯蒂娜·文特斯藤
Kristina Vintersten

[美] 理查德·贝林杰
Richard Behringer

著

(原著第三版)
THIRD EDITION

孙青原
陈大元 主译



Chemical Industry Press

3-62



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

小鼠胚胎操作实验手册

(原著第三版)

[美] 安德拉斯·纳吉

Andras Nagy

[美] 玛丽娜·格特森斯坦

Marina Gertsenstein

[美] 克里斯蒂娜·文特斯藤 著

Kristina Vintersten

[美] 里查德·贝林杰

Richard Behringer

孙青原 陈大元 主译



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

小鼠胚胎操作实验手册: 第3版/[美]纳吉
(Nagy, A)等著; 孙青原, 陈大元主译. —北京:
化学工业出版社, 2005.9

(生物实验室系列)

书名原文: Manipulating the Mouse Embryo:
a Laboratory Manual
ISBN 7-5025-7667-3

I. 小… II. ①纳…②孙…③陈… III. 鼠科-实验
胚胎学-指南 IV. Q959.837.03-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 109375 号

Manipulating the Mouse Embryo: a Laboratory Manual, third Edition/by
Andras Nagy, et al.

ISBN 0-87969-591-9

Copyright©2003 by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring
Harbor, New York. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by Cold
Spring Harbor Laboratory Press.

本书中文简体字版由 Cold Spring Harbor Laboratory Press 授权化学工业出
版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2003-4835

生物实验室系列

小鼠胚胎操作实验手册

(原著第三版)

[美] 安德拉斯·纳吉 [美] 玛丽娜·格特森斯坦 著
[美] 克里斯蒂娜·文特斯藤 [美] 里查德·贝林杰

孙青原 陈大元 主译

责任编辑: 郎红旗 周旭 邵桂林

责任校对: 陈静 宋玮

封面设计: 关飞

*

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)

购书咨询: (010) 64982530

(010) 64918013

购书传真: (010) 64982630

http:// www.cip.com.cn

*

新华书店北京发行所经销

北京永鑫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 35¼ 彩插 4 字数 931 千字

2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7667-3

定 价: 90.00 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

《小鼠胚胎操作实验手册》翻译人员

主译：孙青原 中国科学院动物研究所 博士 研究员

陈大元 中国科学院动物研究所 研究员

参加翻译人员（按姓氏笔画排序）

文端成 美国 The Rockefeller University 博士后

杨彩霞 法国 Institut National de la Recherche Agronomique 博士后

杨增明 东北农业大学 博士 教授

李永海 美国 Kansas State University 博士后

李光鹏 美国 Utah State University 博士 助理教授

陈 涛 美国 University of Texas Southwestern Medical Center 博士后

范衡宇 美国 University of Texas Southwestern Medical Center 博士后

周家喜 美国 Stowers Institute 博士后

郑瑞珍 中国科学院遗传与发育生物学研究所 研究员

钟志胜 美国 University of Missouri-Columbia 博士后

梁成光 中国科学院动物研究所 博士生

蒋满喜 美国 The Rockefeller University 博士后

谭景和 山东农业大学 博士 教授

谭慧宁 东北农业大学 博士生

霍立军 美国 Stower Institute 博士后

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化工出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

**谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的
科学工作者致以崇高的敬意！**

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

陆续出版的书目如下

- 发酵工程实验技术 (2004 年 3 月)
- 生物化学实验技术 (2005 年 5 月重印)
- 拟南芥实验手册 [影印] (2004 年 5 月)
- 现代生物科学仪器分析入门 (2005 年 6 月重印)
- 转基因动物技术手册 [译] (2004 年 9 月)
- RNAi——基因沉默指南 [译] (2004 年 10 月)
- PCR 最新技术原理、方法及应用 (2005 年 1 月)
- 生物安全柜应用指南 (2005 年 3 月)
- 分子生物学实验参考手册 [译] (2005 年 6 月)
- DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 (2005 年 6 月)
- 流式细胞术原理与科研应用简明手册 [译] (2005 年 7 月)
- 小鼠胚胎操作实验手册 (第三版) [译] (2005 年 11 月)
- 医学微生物学实验技术 (2005 年 11 月)
- PCR 技术实验指南 (第二版) [译]
- 基因表达分析手册 [译]
- 蛋白质与蛋白质组学实验指南 [译]
- 蛋白质纯化实验指南 [译]
- 分子生物学与蛋白质化学实验方法 [译]
- 酵母育种实验技术

序 言

自从冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory) 的第一次小鼠分子胚胎学课程开办到现在已有 20 年了, 这次课程也使得这本指南得以出版。在 1983 年, 利用受精卵原核注射产生转基因小鼠的工作刚刚完成, 当时这项技术离常规使用还很遥远。那时胚胎干细胞系也刚刚建立, 这些细胞的生殖系发育潜能及用途还有待证实。同源重组技术当时只是一个梦想。小鼠的大规模、多基因突变仅存在于一些先驱者的脑海中。此外, 小鼠的分子胚胎学仍处于萌芽时期。当我们对以往的工作进行回顾时, 会惊奇地发现我们目前在小鼠的发育遗传学和分子胚胎学领域已取得了很大的成绩。我们现在拥有一个由大家组建并注释的小鼠全基因组序列, 对所有的研究者开放。在这个数据库中, 可很容易地找到所需的基因组或 cDNA 克隆, 在订购后几天内便可拿到所需的克隆。通过设计, 可以将任何基因插入到小鼠的生殖系内, 也可将任何基因进行改造。染色体可以重新组建。用设计的各种奇妙颜色, 可使活的胚胎组织发射明亮的荧光。胚胎以及配子可以冷冻保存并存档。现在可以克隆小鼠。在利用小鼠阐明基本的生物学问题, 以及为人类生物学及疾病的研究提供新的生物医学思维方面, 具有无限广阔的前景。

在小鼠的发育遗传学及分子胚胎学领域不断进步及发展的同时, 这本《小鼠胚胎操作实验手册》也日臻完善。现在的第三版是建立在以往版本的坚实基础以及原来的编委们的努力之上的, 他们包括 Brigid Hogan、Frank Costantini、Liz Lacy 以及 Rosa Beddington。在这一版中, 已经进行了大量的重新编排, 并补充了自 1994 年第二版出版后出现的许多新内容。新增添的章节和实验方法包括小鼠克隆、细胞质内精子注射、人工授精、胚胎及配子的冷冻保存, 以及目前载体设计的指导。另外, 又增加了一些新的技术, 如利用电穿孔将外源 DNA 转入到小鼠胚胎。此外, 关于制备和分析转基因小鼠及嵌合体方面的内容也有大量的扩充。所有外科手术方面的内容都放在单独一章中。并且, 增加了观察活体胚胎及荧光蛋白等一些新报告基因的方法。

我们对那些慷慨帮助我们编撰本书的人致以诚挚的感谢, 他们提供了最新的方法、图片及数据图像, 并为我们提供了重要的及有用的专业信息。我们感谢 (以字母顺序) Kathryn Anderson、Gusztav Belteki、Sally Camper、Chris Cretekos、S. K. Dey、Mary Dickinson、Hao Ding、Scott Fraser、Yas Furuta、Joachim Gündel、Deborah Guris、Kat Hadjantonakis、Jody Haigh、Britt Hansen、C. C. Hui、Akira Imamoto、Ian Jackson、Nancy Jenkins、Randy Johnson、Elizabeth Jones、Andrea Jurisicova、Monica Justice、Akio Kobayashi、Rashmi Kothary、Tilo Kunath、Kin Ming Kwan、Carlisle Landel、Carol Cutler Linder、Chengyu Liu、Tom Lufkin、William Mansfield、Jim Martin、Andy McMahon、Jennifer Merriam、Lluis Montoliu、Nagy lab (2002 年 10 月)、Kazuhisa Nakashima、Atsuo Ogura、Noriko Osumi、Dmitry Ovchinnikov、Ginny Papaioannou、Anne Plueck-Becklas、Udo Ringeisen、Jaime Rivera、Liz Robertson、Merle Rosenzweig、Janet Rossant、Luis Gabriel Sanchez-Partida、Thom Saunders、Heike Schweizer、Jillian Shaw、Bill Shawlot、Michael Shen、Stanton Short、Davor Solter、Monika Szczygiel、Patrick Tam、

Maki Wakamiya、Paul Wassarman、Michael Wilson、Werner Wittke、Chris Wylie 和 Ryuzo Yanagimachi。我们也要感谢在冷泉港实验室出版社工作的很多人，他们帮助我们使这本书的出版成为现实。我们感谢 Mary Cozza、Pat Barker、Danny deBruin、Denise Weiss、Dave Crotty、Jan Argentine 以及执行主任 John Inglis。我们要特别感谢我们的编辑 Judy Cuddihy，感谢她的热心、极大的耐心、鼓励以及独创性的想法。最后，也是我们的希望，我们希望《小鼠胚胎操作实验手册》的这一新版本将帮助培养未来在小鼠发育遗传学和分子胚胎学领域的领导者和创新者。

A. 纳吉，M. 格特森斯坦，K. 文特斯藤，R. 贝林杰
(杨增明 译)

目 录

关于《小鼠胚胎操作实验手册》的网站.....	1
第1章 小鼠的发育遗传学和胚胎学：过去、现在和未来.....	3
1.1 引言	5
1.2 孟德尔遗传和连锁：小鼠遗传学的起源	5
1.3 实验室用小鼠的起源	6
1.4 自交系小鼠的创建和小鼠遗传学的其他资源.....	10
1.5 小鼠发育遗传学的起源.....	12
1.6 实验小鼠胚胎学的继承.....	14
1.7 小鼠基因组的操作.....	16
1.8 系统寻找小鼠中的新基因及发育过程中的突变体.....	17
参考文献	19
第2章 小鼠发育概要	29
2.1 小鼠的发育.....	31
2.1.1 生殖细胞系的起源.....	31
2.1.2 性别决定和分化.....	39
2.1.3 精子发生.....	39
2.1.4 卵子发生.....	41
2.1.5 排卵.....	44
2.1.6 孤雌发育.....	45
2.1.7 受精.....	46
2.1.8 卵母细胞和合子的细胞骨架组装.....	47
2.1.9 早期卵裂：从1-细胞胚胎到8-细胞未致密化桑葚胚	48
2.1.10 用RT-PCR和cDNA文库分析胚胎基因表达.....	50
2.1.11 胚胎细胞核的发育潜能	51
2.1.12 致密化和胚泡形成：最早的分化事件	52
2.1.13 滋养外胚层和内细胞团细胞系的分离	53
2.1.14 胚胎植入子宫	53
2.1.15 滋养外胚层及其衍生物	55
2.1.16 原始内胚层和外胚层分化：第二轮分化	57
2.1.17 小鼠胚胎中的细胞系标记分子	57
2.1.18 原始外胚层细胞系	57
2.1.19 原肠作用：中胚层和终末内胚层的形成	62
2.1.20 原肠作用的命运图谱	65
2.1.21 中胚层中区域多样性的产生	68
2.1.22 前部脏内胚层	68
2.1.23 原结	68
2.1.24 尾芽	70

2.1.25	胚胎旋转	70
2.1.26	体节及其衍生物	70
2.1.27	侧板和间介中胚层以及它们的衍生物	74
2.1.28	四肢发生	76
2.1.29	神经化: 神经系统的发生	77
2.1.30	神经管区域多样化的发生	78
2.1.31	神经嵴	79
2.1.32	鳃弓和咽区的发生	82
2.1.33	肠的发育	83
2.1.34	畸胎瘤细胞和胚胎干细胞	83
2.1.35	胚胎大小的调节	84
2.1.36	基因印迹	85
2.1.37	X 染色体失活	86
2.1.38	胚外组织	87
2.1.39	胚外内胚层: 原始内胚层只形成脏内胚层和壁内胚层	88
2.1.40	脏内胚层中的基因表达	89
2.1.41	壁内胚层中的基因表达	91
2.1.42	胚外中胚层的分化	91
2.1.43	胎盘的结构与功能	91
2.2	成年小鼠	93
2.2.1	小鼠毛色及其遗传学	93
2.2.2	形态及行为突变	98
	参考文献	98
第3章	转基因小鼠和嵌合体小鼠的生产: 一般要点	119
3.1	实验鼠群的病原控制	121
3.2	提供供体和/或受体小鼠的育种群	123
3.3	自然交配的安排	123
3.4	诱导超数排卵	124
3.4.1	年龄和体重的影响	124
3.4.2	促性腺激素的剂量	125
3.4.3	促性腺激素的注射时间	125
3.4.4	超排小鼠的品系	126
3.4.5	种公鼠的繁殖性能	126
3.5	胚胎供体和受体的生产	126
3.5.1	配种提供 DNA 注射用合子的母鼠	126
3.5.2	提供制作 ES 细胞嵌合体用囊胚或卵裂期胚胎的母鼠	127
3.5.3	繁殖力正常的种公鼠	128
3.5.4	用于诱导母鼠假孕的不育公鼠	128
3.5.5	用作假孕受体的母鼠	129
3.6	基因工程小鼠的命名	130
3.7	实验方案 [腹腔内 (IP) 注射]	131
	参考文献	131

第4章 植入前胚胎的收集和体外培养	133
4.1 着床前胚胎的培养液	135
4.1.1 研究史	135
4.1.2 小鼠胚胎的培养液	136
4.1.3 胚胎培养液的关键成分	137
4.1.4 最新进展	139
4.2 体外胚胎培养的一般问题	141
4.2.1 培养液的准备	141
4.2.2 胚胎收集和培养	142
4.2.3 质量控制	143
4.3 胚胎培养液的准备	144
4.4 移卵管的组装	144
4.5 着床前胚胎的收集	146
4.6 实验方案	146
4.6.1 方案1 配制 M16 培养液	146
4.6.2 方案2 配制 M2 培养液	147
4.6.3 方案3 从浓储液制备 M2 和 M16 培养液	148
4.6.4 方案4 制备 KSOM 培养液	149
4.6.5 方案5 制备培养微滴	150
4.6.6 方案6 用玻璃毛细管控制移卵管	151
4.6.7 方案7 玻璃移液管的硅化	152
4.6.8 方案8 打开腹腔并定位雌性生殖器官	153
4.6.9 方案9 收集合子并利用透明质酸酶去掉卵丘细胞	153
4.6.10 方案10 收集 2-细胞到致密化的桑葚胚阶段的胚胎	156
4.6.11 方案11 囊胚的收集	159
参考文献	160
第5章 植入后胚胎的分离、培养和操纵	167
5.1 植入后胚胎的分离	169
5.1.1 早期胚胎着床点的观察	169
5.1.2 植入后胚胎的分离	169
5.1.3 胚外膜的剥离	169
5.1.4 植入后胚胎胚层的分离	170
5.1.5 胚层的重组和培养	170
5.1.6 从生殖嵴中分离生殖细胞	170
5.2 植入后胚胎的培养	171
5.2.1 胚胎的准备	171
5.2.2 植入后胚胎的滚筒式培养	171
5.2.3 植入后胚胎的静态式培养	171
5.2.4 用于摄取图像的植入后胚胎的静态式培养	172
5.3 植入后胚胎基因注射的电穿孔技术	172
5.4 实验方案	173
5.4.1 方案1 通过注射染料观察早期胚胎的着床点	173

5.4.2	方案2	植入后胚胎的分离	174
5.4.3	方案3	胚外膜的剥离	177
5.4.4	方案4	植入后胚胎胚层的分离	181
5.4.5	方案5	胚层的重组与培养	183
5.4.6	方案6	自生殖嵴中分离生殖细胞	184
5.4.7	方案7	植入后胚胎的旋转式培养	186
5.4.8	方案8	植入后胚胎的静态式培养	190
5.4.9	方案9	用于摄取图像的植入后胚胎的静态式培养	191
5.4.10	方案10	电穿孔技术	193
参考文献			195
第6章 外科手术方法			197
6.1	概论		199
6.2	输精管及卵巢切除术		200
6.3	胚胎移植		200
6.3.1	输卵管内胚胎移植		200
6.3.2	子宫内胚胎移植		200
6.3.3	受体雌鼠		201
6.3.4	胚胎移植的技术要点		201
6.4	剖腹产手术和子鼠寄养		202
6.5	组织移植		202
6.6	活体组织检查		202
6.7	实验方案		202
6.7.1	方案1	制作不育雄鼠的输精管切除术	202
6.7.2	方案2	诱导胚泡延迟着床的卵巢摘除术	205
6.7.3	方案3	输卵管内胚胎移植	206
6.7.4	方案4	子宫内胚胎移植	209
6.7.5	方案5	剖腹产手术和子鼠寄养	211
6.7.6	方案6	肾囊下组织移植	212
6.7.7	方案7	ES细胞的皮下注射	214
6.7.8	方案8	肝脏的部分切除术	214
6.7.9	方案9	脾切除术	215
6.7.10	方案10	肾切除术	216
6.7.11	方案11	去势术	216
6.7.12	方案12	尾动脉采血	217
参考文献			218
第7章 转基因小鼠的制备			221
7.1	小鼠转基因技术的应用		223
7.2	原核显微注射法将基因导入小鼠基因组		224
7.3	转基因的构建		225
7.3.1	原核载体序列的影响		225
7.3.2	DNA构件的长度		226
7.3.3	两种或多种转基因的共注射		226

7.3.4	转基因与内源基因的差异性表达	226
7.3.5	调控序列的鉴定方法	227
7.3.6	报告基因	227
7.3.7	转基因构件中已知组织特异性调控序列的利用	227
7.3.8	转基因表达过程中 cDNA 的表达以及内含子的作用	228
7.3.9	利用“管家基因”启动子指导基因的专一性表达	228
7.3.10	影响基因转移效率的相关因素	228
7.3.11	大型 DNA 构件相关知识概述	229
7.4	DNA 的分离与纯化	229
7.4.1	概述	229
7.4.2	DNA 污染物及其去除方法	230
7.4.3	推荐使用的商业化质粒制备及 DNA 纯化试剂盒	231
7.4.4	从细菌培养物中提取标准大小的质粒 DNA	231
7.4.5	质粒 DNA 消化获得基因构件片段	232
7.4.6	凝胶分离	232
7.4.7	琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收	233
7.4.8	DNA 片段的纯化	233
7.5	显微注射用 DNA 的制备	233
7.5.1	DNA 质量的鉴定及其维持	233
7.5.2	注射用 DNA 浓度的测定	234
7.5.3	DNA 溶液需要过滤吗	235
7.5.4	DNA 的储存	235
7.6	操作器械以及合子的准备	235
7.6.1	小鼠品系的选择	235
7.6.2	合子的准备	235
7.6.3	固定针的制作	235
7.6.4	显微注射针的制作	236
7.6.5	显微操作设备的安装	238
7.7	显微注射	241
7.7.1	原核注射的时间	241
7.7.2	小鼠合子的显微注射	241
7.7.3	注射后的胚胎操作	241
7.8	转基因小鼠品系的建立及其维持	242
7.9	实验方案	242
7.9.1	方案 1 简便可靠的 DNA 分离与纯化方法	242
7.9.2	方案 2 利用 NucleoBond 系统从细菌培养物中分离 BAC DNA	244
7.9.3	方案 3 NucleoBond 制备的 BAC DNA 的纯化	244
7.9.4	方案 4 酵母 DNA 凝胶板的大规模制备	245
7.9.5	方案 5 利用过滤法纯化 YAC DNA	247
7.9.6	方案 6 标准大小 DNA 的注射缓冲液的配制	248
7.9.7	方案 7 BAC/YAC DNA 注射缓冲液的配制	249
7.9.8	方案 8 固定针的制作	249

7.9.9 方案9 注射针的制作	250
7.9.10 方案10 显微操作步骤	251
7.9.11 方案11 小鼠合子的显微注射	253
7.10 常见问题排除指南	256
参考文献	260
第8章 囊胚来源的干细胞系的分离和培养	269
8.1 ES细胞系的获得	271
8.2 ES细胞的培养	272
8.2.1 支原体和小鼠抗体产物的检测	272
8.2.2 ES细胞的培养条件	273
8.2.3 培养基	274
8.2.4 血清	275
8.2.5 白血病抑制因子	276
8.2.6 胰蛋白酶/EDTA	276
8.3 饲养细胞	276
8.3.1 原代小鼠胚胎成纤维细胞	276
8.3.2 STO成纤维细胞	277
8.4 ES细胞染色体的计数	277
8.5 ES细胞在体外的分化	278
8.6 滋养层干细胞	278
8.7 实验方案	278
8.7.1 方案1 小鼠胚胎成纤维细胞的制备	278
8.7.2 方案2 由MEF或STO细胞制备饲养层细胞	280
8.7.3 方案3 ES细胞的传代	281
8.7.4 方案4 用冻存管冷冻和解冻ES细胞	282
8.7.5 方案5 用囊胚从头分离ES细胞	283
8.7.6 方案6 ES细胞染色体的计数	288
8.7.7 方案7 ES细胞分化为类胚体	290
8.7.8 方案8 培养TS细胞系	290
8.7.9 方案9 从囊胚分离TS细胞系	292
参考文献	294
第9章 基于胚胎干细胞的转基因和基因组改变的载体设计	297
9.1 元件总汇	299
9.1.1 基因组和基因元件	299
9.1.2 可筛选标记	299
9.1.3 报告基因	301
9.1.4 位点特异重组酶	301
9.1.5 可诱导系统	303
9.1.6 检测重组酶的报告子	303
9.2 ES细胞介导的转基因	303
9.3 基因打靶	305
9.4 基因和启动子诱捕	308

9.5	同源重组——置换	310
9.6	位点特异性重组介导的插入	311
9.7	可诱导位点特异染色体变异	313
9.8	产生纯合突变的 ES 细胞系	314
9.9	实验方案 (体外筛选以在小鼠中获得普遍性转基因表达)	315
	参考文献	317
第 10 章	向胚胎干细胞中导入外源 DNA	323
10.1	一般注意事项	325
10.2	向 ES 细胞基因组中导入的 DNA 的纯化	325
10.3	DNA 导入 ES 细胞的电转化以及筛选方法	325
10.4	ES 细胞克隆的挑取、平板传代以及冻存 ES 细胞系用于基因型分析	325
10.5	用培养于 96 孔组织培养板中的细胞快速准备 DNA	326
10.6	实验方案	327
10.6.1	方案 1 通过电转化向 ES 细胞中导入 DNA 以及筛选方法	327
10.6.2	方案 2 通过挑取的方法分离单个 ES 细胞克隆	329
10.6.3	方案 3 在 96 孔组织培养板中冻存 ES 细胞	330
10.6.4	方案 4 在 96 孔组织培养板中解冻 ES 细胞	331
10.6.5	方案 5 用培养于 96 孔组织培养板中的细胞快速准备 DNA	332
10.6.6	方案 6 用培养于 24 孔组织培养板中的细胞准备 DNA	333
10.6.7	方案 7 挑取克隆前对 ES 细胞克隆进行基因型分析	334
	参考文献	336
第 11 章	嵌合体的制作	337
11.1	总论	339
11.2	嵌合体的类型	341
11.2.1	二倍体胚胎-二倍体胚胎聚集的嵌合体	341
11.2.2	ES 细胞-二倍体胚胎聚集和注射的嵌合体	342
11.2.3	二倍体胚胎-四倍体胚胎聚集的嵌合体	342
11.2.4	ES 细胞-四倍体胚胎凝集和注射的嵌合体	343
11.3	ES 细胞注射嵌合体的产生	344
11.3.1	注射用囊胚的准备	344
11.3.2	注射用 ES 细胞的准备	345
11.3.3	注射针和固定针的制备	345
11.3.4	ES 细胞注射针针尖的制备	346
11.3.5	显微注射仪的组装	346
11.4	聚集嵌合体的制作	347
11.5	嵌合囊胚的移植	347
11.6	用 ES 细胞注射或聚集法所产生的嵌合小鼠的饲养	347
11.7	实验方案	348
11.7.1	方案 1 注射用 ES 细胞的制备	348
11.7.2	方案 2 Sutter 拉针仪 P-97 型有用参数的确定	349
11.7.3	方案 3 ES 细胞注射针尖的折断	350
11.7.4	方案 4 显微注射仪的组装	351

11.7.5	方案5	囊胚注射	352
11.7.6	方案6	制备凝集用的ES细胞	355
11.7.7	方案7	制备凝集板	356
11.7.8	方案8	去透明带	357
11.7.9	方案9	四倍体胚胎的产生	358
11.7.10		二倍体胚胎之间的聚集	360
11.7.11	方案11	把卵裂期的胚胎和囊胚期的内细胞团细胞分散成单个细胞	364
11.7.12	方案12	免疫外科手术分离囊胚的内细胞团	365
	参考文献		368
第12章	小鼠基因组变化及其特定序列的检测和分析		371
12.1	动物的标记		373
12.2	用于检测基因型或转基因特征的组织样品和DNA制备		374
12.3	检测和分析原核注射产生的转基因		375
12.4	检测和分析ES细胞介导的基因/基因组改变		376
12.5	小鼠染色体和核型		377
12.6	转基因表达分析		377
12.7	克隆转基因-宿主DNA连接		379
12.8	鉴别纯合转基因小鼠或胚胎		379
12.8.1	量化转基因剂量		380
12.8.2	量化转基因产物或表型		380
12.8.3	间期核的原位杂交		380
12.8.4	后代检测		380
12.8.5	用搭界探针进行Southern印迹分析		381
12.8.6	用搭界引物进行PCR分析		381
12.9	实验方案		381
12.9.1	方案1	从小鼠尾尖中提取高分子量DNA	381
12.9.2	方案2	从胚胎组织、卵黄囊和脐带等提取高分子量DNA	382
12.9.3	方案3	用于制备PCR模板的组织裂解	383
12.9.4	方案4	聚合酶链式反应	386
12.9.5	方案5	从ES细胞或其他培养细胞中制备Southern杂交用或PCR用DNA	387
12.9.6	方案6	小鼠细胞核型分析	388
	参考文献		390
第13章	小鼠孤雌生殖、原核移植和克隆		393
13.1	孤雌胚的制作		395
13.2	原核移植		395
13.3	小鼠克隆		395
13.4	实验方案		396
13.4.1	方案1	乙醇诱导的卵母细胞孤雌激活	396
13.4.2	方案2	小鼠胚胎的原核移植	396
13.4.3	方案3	小鼠克隆	402
	参考文献		409