



中国科学院教材建设专家委员会规划教材
科学出版社“十二五”规划教材

动物细胞工程

邓 宁 主编



 科学出版社

中国科学院教材建设专家委员会规划教材
科学出版社“十二五”规划教材

动物细胞工程

主 编 邓 宁

副主编 周 燕 张守全

编 者 (按姓氏笔画排序)

于苗苗 中国海洋大学

卫恒习 华南农业大学

王 宏 暨南大学

王敏强 烟台大学

邓 宁 暨南大学

史光华 中国合格评定国
家认可中心

朱 宏 哈尔滨师范大学

李佳楠 江汉大学

李树锋 东北农业大学

李登峰 宁波大学

杨志杰 甘肃农业大学

陈建华 福建师范大学

周 燕 华东理工大学

周世力 江汉大学

赵会敏 广西大学

唐 勇 暨南大学

唐业刚 武汉生物工程学院

黄金林 扬州大学

谢 浩 武汉理工大学

樊廷俊 中国海洋大学

魏 强 西北农林科技大学

张守全 华南农业大学

(国务院侨务办公室立项)

(彭磷基外招生人才培养改革基金资助)

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本教材是生物技术专业综合素质培养型系列教材之一,涵盖了动物细胞工程的基础知识、基本技术和最新的研究成果。主要内容包括细胞培养、细胞融合、干细胞、基因打靶、胚胎工程、体外受精、细胞核移植和动物克隆等,既有全面的基本理论,又有实用技术。全书共分11章,分别为动物细胞工程概论、动物细胞工程基础、动物细胞培养、动物细胞融合、单克隆抗体、干细胞、基因打靶与转基因动物、动物生殖细胞工程、动物胚胎工程、动物染色体工程和鱼类细胞工程。

本书适合作为生命科学、动物科学和海洋科学相关专业的本科、研究生教材和教师参考书。

图书在版编目(CIP)数据

动物细胞工程 / 邓宁主编. —北京:科学出版社,2014. 1

中国科学院教材建设专家委员会规划教材·科学出版社“十二五”规划教材

ISBN 978-7-03-039555-9

I. 动… II. 邓… III. 动物-细胞工程-高等学校-教材 IV. Q952

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第010028号

责任编辑:李植 周文翔 责任校对:张凤琴
责任印制:曹一义 / 封面设计:范璧合

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

骏杰印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年1月第一版 开本:787×1092 1/16

2014年1月第一次印刷 印张:19 1/2 插页:8

字数:478 000

定价:69.80元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

动物细胞工程是现代生物技术核心,是细胞生物学和分子生物学理论、方法和技术的综合体现。动物细胞工程技术领域内容新颖和丰富多彩,包涵了细胞培养、细胞融合、单克隆抗体、干细胞、基因打靶、转基因动物、胚胎工程、体外受精、细胞核移植和动物克隆等全新的技术。动物细胞工程的研究进展非常迅速,尤其是近年在基础理论、操作技术和生产应用等方面均取得了举世瞩目的成就,涌现出了大批杰出的研究成果和多位诺贝尔奖获得者。2012年获诺贝尔奖的 Shinya Yamanaka 和 John B. Gurdon 开创了细胞重编程并建立了 iPS 细胞技术。2010年获诺贝尔奖的 Robert Edwards 建立了试管婴儿技术,解决了不孕不育的难题。2007年获诺贝尔奖的 Martin J. Evans, Mario R. Capecchi 和 Oliver Smithies 开创了基因打靶和转基因动物新领域。1990年获诺贝尔奖的 Donnal Thomas 开创了干细胞移植治疗白血病的新技术,使白血病不再是不治之症。1986年获诺贝尔奖的 Milstein 和 Köhler 建立的单克隆抗体技术,开创了单克隆抗体药物新领域,成为当今最大的生物药物产业。

本书编委是来自17所高等院校的教师,均是活跃在教学、科研第一线的专业教师,具有丰富的教学、科研经验,熟练的操作技术和突出的研究成果,对动物细胞工程有深刻理解。本书既有全面的基本理论,又有丰富的实用技术,涵盖了动物细胞工程的基本理论、基本技术和最新研究成果。全书编写分别由:第一章,邓宁(暨南大学);第二章,李佳楠(江汉大学)和王敏强(烟台大学);第三章,周燕(华东理工大学)和黄金林(扬州大学);第四章,谢浩(武汉理工大学);第五章,唐勇和王宏(暨南大学);第六章,赵会敏(广西大学)和魏强(西北农林科技大学);第七章,李树锋(东北农业大学)和邓宁;第八章,王敏强和杨志杰(甘肃农业大学);第九章,张守全、卫恒习(华南农业大学)、陈建华(福建师范大学)和唐业刚(武汉生物工程学院);第十章,朱宏(哈尔滨师范大学);第十一章,于苗苗和樊廷俊(中国海洋大学)等教师完成。暨南大学生科院黄建芳和宋其芳老师承担了本书编写秘书工作。对他们付出的辛勤劳动深表谢意。

本书是编委们在长期从事动物细胞工程教学和研究基础上编著而成,是他们长期教学和科研工作的积累。编者付出了辛勤劳动和汗水。但动物细胞工程发展日新月异,新成果不断涌现,新技术和理论不断更新,尽管我们倾注了大量精力,难免存在不足,真诚希望同仁和读者对本书存在的问题进行指正。

值此成书之际,对科学出版社的同仁给予的信任和支持深表谢意,对各位编委的精诚合作所付出的辛勤劳动致以衷心的感谢。衷心感谢暨南大学教务处、生命科学技术学院及其他在本书编写过程中给予帮助和支持的人们。

邓 宁

2013年12月8日于广州

目 录

| | | | |
|--------------------------------|-------|---------------------------|-------|
| 第一章 动物细胞工程概论 | (1) | 第六章 干细胞 | (140) |
| 第一节 动物细胞工程的研究内容 | (1) | 第一节 胚胎干细胞 | (140) |
| 第二节 动物细胞工程在现代生物技术中的地位和作用 | (7) | 第二节 成体干细胞 | (151) |
| 第三节 动物细胞工程的发展历程 | (8) | 第三节 诱导多能干细胞 | (161) |
| 第四节 动物细胞工程的应用与展望 | (15) | 第四节 组织工程 | (164) |
| 第二章 动物细胞工程基础 | (19) | 第七章 基因打靶与转基因动物 | (168) |
| 第一节 动物细胞的结构与功能 | (19) | 第一节 基因打靶 | (168) |
| 第二节 生殖细胞与早期胚胎发育 | (24) | 第二节 转基因动物的制备 | (178) |
| 第三节 动物细胞工程基本研究方法 | (32) | 第三节 基因打靶技术与转基因动物的应用 | (185) |
| 第三章 动物细胞培养 | (43) | 第八章 动物生殖细胞工程 | (190) |
| 第一节 动物细胞体外培养及影响因素 | (44) | 第一节 精子和卵子的获取 | (190) |
| 第二节 动物细胞培养技术 | (65) | 第二节 X、Y精子的分离 | (197) |
| 第三节 动物细胞培养工程及生物反应器 | (84) | 第三节 体外受精 | (200) |
| 第四章 动物细胞融合 | (105) | 第四节 显微受精 | (215) |
| 第一节 细胞融合的生物学基础与分子机制 | (105) | 第五节 精子和卵子的冷冻保存 | (219) |
| 第二节 动物细胞融合技术 | (107) | 第九章 动物胚胎工程 | (224) |
| 第三节 动物细胞融合技术的应用 | (113) | 第一节 胚胎移植 | (224) |
| 第五章 单克隆抗体 | (118) | 第二节 胚胎分割 | (242) |
| 第一节 单克隆抗体制备基本原理 | (119) | 第三节 嵌合体动物 | (248) |
| 第二节 单克隆抗体制备的基本流程 | (120) | 第四节 早期胚胎的分子检测 | (252) |
| 第三节 新型单克隆抗体技术 | (130) | 第五节 细胞核移植 | (259) |
| 第四节 单克隆抗体的应用 | (136) | 第十章 动物染色体工程 | (268) |
| 参考文献 | | 第一节 动物多倍染色体技术 | (268) |
| 中英文词汇对照 | | 第二节 雌、雄核发育技术 | (272) |
| 彩图 | | 第三节 动物染色体结构的改造 | (275) |
| | | 第四节 染色体转移技术 | (276) |
| | | 第五节 人工染色体及应用 | (278) |
| | | 第十一章 鱼类细胞工程 | (284) |
| | | 第一节 鱼类细胞培养 | (284) |
| | | 第二节 鱼类繁殖与育种 | (292) |
| | | 第三节 转基因鱼 | (298) |

参考文献

中英文词汇对照

彩图

第一章 动物细胞工程概论

动物细胞工程(animal cell engineering)是以动物细胞、细胞器或早期胚胎为研究对象,应用细胞生物学和分子生物学的原理和方法,对其进行培养、繁殖、人工操作等,使其产生人们所需要的生物学特性,获得人类所需的生物产品、创造新的细胞类型或动物品种的一门综合科学。

动物细胞工程是在细胞培养、细胞融合和细胞拆合技术的基础上发展起来的,随着基因操作技术、分子生物学技术和干细胞工程技术的发展与成熟,动物细胞工程的理论和应用均获得了突破性的进展。当前,动物细胞工程所涉及的主要技术领域包括细胞培养技术、细胞融合技术、基因转移技术、核移植技术、体外受精技术和胚胎操作技术等(图 1-1)。细胞水平的细胞工程操作主要包括细胞培养、细胞融合、细胞基因重组、细胞器改造等,用于获得人类所需的各种改良细胞或工程细胞;

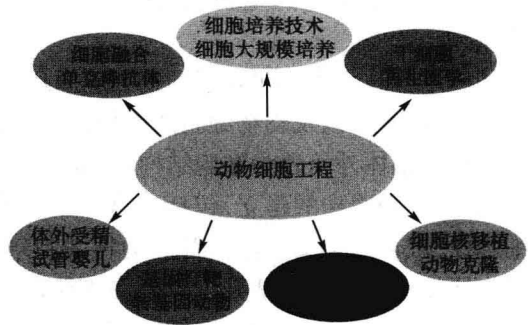


图 1-1 动物细胞工程涉及的主要技术领域

干细胞水平的细胞工程操作主要包括干细胞的分离培养、定向分化、基因改造与细胞重编程等,广泛用于基因打靶、转基因动物、动物克隆、再生医学等细胞工程领域。胚胎水平的细胞工程技术主要包括超数排卵、胚胎移植、胚胎分割、体外受精等技术,主要用于动物的繁殖与改良。动物细胞工程更多的是综合技术的运用与体现。例如,转基因动物和克隆动物不仅需要细胞培养、基因转移,还需要干细胞技术、细胞重编程技术、胚胎移植等各种综合技术。以制备为目的的细胞工程技术则主要包括动物细胞大规模培养技术和转基因动物技术制备动物生物反应器,用于生产疫苗、抗体药物或其他人类需要的各类生物工程产品。

动物细胞工程是生命科学和工程学相结合的一门科学,它被广泛应用于生命科学各基础学科领域,为生命科学提供从分子水平、细胞水平和整体水平探索生命的手段和方法,是物种改造、遗传育种、生物医药产业的支柱。伴随着干细胞与细胞重编程技术、克隆动物、转基因生物反应器等相继问世,动物细胞工程在生命科学、农业、医药、食品、环境保护等领域发挥着越来越重要的作用,为人类改造自然、创造新的细胞类型、产生新的生物品种、进行生物(药物等)工业化生产、保障人类健康等提供广阔的应用前景。

第一节 动物细胞工程的研究内容

动物细胞工程的主要研究内容包括:动物细胞培养技术、动物细胞融合、单克隆抗体技术、染色体工程、干细胞工程、基因打靶与转基因动物、生殖细胞工程、胚胎工程等。

一、动物细胞培养技术

细胞是生物形态结构和生命活动的基本单位,一切有机体均由细胞构成。细胞是代谢与功能的基本单位,其代谢体系表现为高度有序和自控。细胞是有机体生长与发育的基础,有机体生长与发育依赖于细胞的生长、增殖、分化、凋亡。细胞是遗传的基本单位,具有遗传全能性。在研究生命活动的机制和控制中,必然要通过细胞体外培养来研究细胞的生长、增殖、分化、功能及代谢等生命活动。动物细胞培养(animal cell culture)技术是指从机体中取出组织或细胞,或利用已建立的细胞系,在特定的人工条件下使细胞在培养容器中生长或生产生物制品的一门技术。当给细胞适宜的培养环境时,细胞就会生长和增殖。

细胞培养技术主要包含了动物细胞原代培养、动物细胞传代培养、细胞克隆化技术、细胞冻存、细胞复苏以及动物细胞的大规模培养技术等。

动物细胞体外培养为细胞结构和功能的研究及对细胞进行改造等创造了条件,特别是各种细胞系、细胞株的建立,包括正常动物细胞株、病毒或其他因子转化的细胞株、基因突变细胞株、融合的杂交细胞株等。动物细胞培养是细胞工程的基础,动物细胞培养为细胞或细胞器加工改造提供基础。只有在细胞培养的基础上,才能进一步开展细胞工程操作。如通过细胞融合产生新的杂交细胞、单克隆抗体制备;对细胞进行基因转移或改造获得新的细胞品系或细胞类型;对生殖细胞或早期胚胎进行基因操作等获得转基因动物;通过细胞核移植开展动物克隆等。所有细胞工程相关的技术都离不开细胞培养。

动物细胞大规模培养为生物产品工业化生产提供基础。目前,国外用于生产单克隆抗体药物的细胞培养规模已经达到上万升。通过大规模培养 CHO 细胞或 HEK293 细胞可以实现基因工程产品的工业化生产,包括基因工程药物、单克隆抗体、疫苗、细胞因子、酶、激素等有价值的代谢产物或基因工程重组蛋白等。

动物细胞培养技术已经广泛应用于生命科学基础研究的各个领域,包括生物、农业、医学和药学等方面,在人类健康、医学、临床和生活等方面发挥了巨大的作用。动物细胞培养为细胞生物学、发育生物学、遗传学、免疫学、肿瘤生物学、神经生物学、动物学等学科的科学提供重要的细胞模型,对生命科学的发展起非常重要的作用。所以,细胞培养技术是动物细胞工程快速发展和应用的重要基础。

二、动物细胞融合

细胞融合(cell fusion)是指在自然条件下或用人工方法使两个或两个以上的细胞合并形成单个细胞的过程。人工方法实现的细胞融合又称为体细胞杂交(somatic hybridization)或细胞杂交(cell hybridization),是指在离体条件下将异种生物或同种生物不同类型的细胞通过生物、物理或化学的方法融合形成杂种细胞的技术。

细胞融合技术是细胞工程诞生的重要标志,也是细胞工程的核心技术。通过人工诱导细胞融合,不仅能产生同种细胞融合,也能产生种间细胞的融合,用于产生异种核质的杂种细胞,用以研究细胞的核质关系。细胞融合技术主要包括仙台病毒为融合剂介导的细胞融合技术、聚乙二醇(PEG)为细胞融合剂介导的细胞融合技术、细胞电融合技术和激光细胞

融合技术(laser induced cell fusion)。

细胞融合技术广泛应用于细胞生物学、免疫学、遗传学、病毒学和医学等不同领域的基础研究和实践应用。细胞融合技术在人类基因作图、单克隆抗体制备、动物克隆等生物医学领域的研究和实践中得到广泛应用,对于现代生物学和医学研究具有深远的影响。单克隆抗体技术是细胞融合的具体体现,最早建立单克隆抗体技术的Milstein 和 Köhler 因此获得了1986年诺贝尔生理学或医学奖(图1-2)。目前,单克隆抗体药物的快速发展为人类器官移植、癌症、自身免疫疾病、心血管病等疾病的治疗发挥了重要作用。

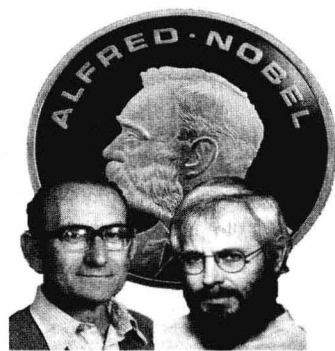


图1-2 单克隆抗体技术创始人 Cesar Milstein 和 Georges Köhler(1986年诺贝尔奖获得者)

三、干细胞技术

干细胞(stem cell)是具有自我更新和持续增殖能力以及一种或多种分化潜能的细胞。干细胞按照其来源主要分为胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES cell)、成体干细胞(somatic stem cell)、癌症干细胞(cancer stem cell, CSC)和诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS cell)。

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)是指来源于动物早期胚胎的原始生殖细胞或从囊胚的内细胞团(inner cell mass)分离的一类细胞,它具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性。无论在体外还是体内,胚胎干细胞都能被诱导分化为机体几乎所有的细胞类型。通过建立胚胎干细胞系并利用胚胎干细胞的发育多能性即环境因素对细胞分化发育的影响,定向诱导细胞分化为特定的细胞如肌细胞、神经细胞等,并作为细胞移植的新来源;胚胎干细胞为开展基因打靶、转基因动物和动物反应器提供基础。英国科学家马丁·埃文斯(Martin J. Evans)最早开展胚胎干细胞建系培养并用于转基因动物等研究而获得2007年诺贝尔生理学或医学奖(图1-3)。

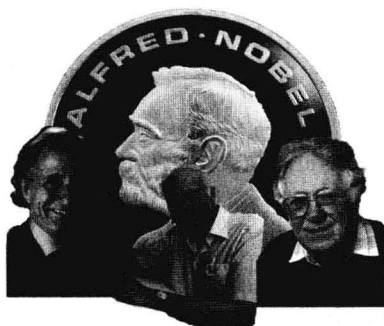


图1-3 胚胎干细胞建系的 Martin J. Evans 及基因打靶先驱 Mario R. Capecchi 和 Oliver Smithies(2007年诺贝尔奖获得者)

成体干细胞(somatic stem cell)是指存在于动物组织中的未分化细胞,可以定向分化成所在组织中的一种或多种细胞,维持或修改组织器官。成体干细胞可以在体外被某些细胞因子诱导分化,可变成与原组织不同的组织细胞类型,如肌肉匀浆中诱导发生的造血细胞,脂肪组织中诱导发生的神经元细胞等。通过成体干细胞的分离培养与干细胞移植,更新机体病变

的组织器官并恢复正常功能;利用成体干细胞作为基因治疗的靶细胞,研究体内有效活化组织干细胞的方法,增强其功能。通过成体干细胞分化和再生的特点,研制再生组织和器官,促进再生医学的发展,更好地促进人体健康。成体干细胞的应用研究是再生医学的一个重要组成部分,是很多疾病可供选择的治療手段,同时又是一个多学科交叉的领域,需要

分子和细胞生物学家、胚胎学家、病理学家、临床医生、生物工程师和伦理学家等共同参与。

癌症干细胞(cancer stem cell)是指肿瘤中具有自我更新能力并能产生异质性肿瘤细胞的一类细胞。癌症干细胞对肿瘤的存活、增殖、转移及复发有着重要作用。本质上,癌症干细胞通过自我更新和无限增殖维持着肿瘤细胞群的生命力;癌症干细胞的运动和迁徙能力使肿瘤细胞容易发生转移;癌症干细胞可以长时间处于休眠状态并具有较强的耐药作用,这也是导致肿瘤容易复发的重要原因。

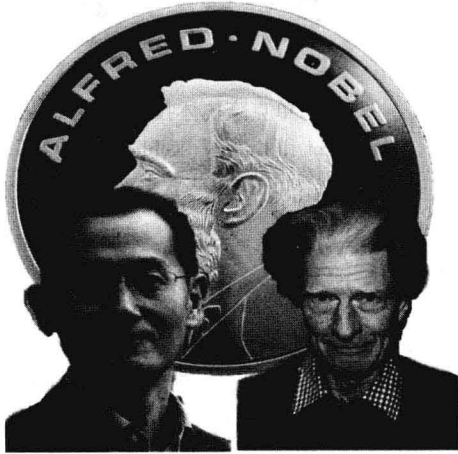


图 1-4 iPS 细胞创始人 Shinya Yamanaka 和细胞核移植与克隆技术的先驱 John B. Gurdon (2012 年诺贝尔奖获得者)

诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS cell)技术是指将人和动物已经分化的成体细胞经过诱导和重编程而转化成干细胞的过程。通常经过转基因等操作将 *Oct3/4*、*Sox2*、*c-Myc* 和 *Klf4* 等基因转入成体细胞中,诱导细胞重编程(reprogramming),使其失去原有的终末分化细胞功能,重新回到原始的多能干细胞状态的一门技术。诱导多能干细胞技术是最近发展起来的新技术,又称细胞分化诱导技术。日本东京大学的山中伸弥(Shinya Yamanaka)首次报道。这项技术成果在动物细胞工程发展史上具有里程碑式的意义。山中伸弥也因此获得 2012 年诺贝尔生理学或医学奖(图 1-4)。山中伸弥教授的发明为再生医疗开辟了一条崭新的道路,这项技术的成熟,将对生物学、医学、遗传学、细胞生物学、

发育生物学等相关学科的研究和应用产生重大影响。

干细胞技术主要包括动物干细胞的分离纯化、培养建系、基因改造、定向分化等技术。干细胞技术是在细胞培养技术的基础上发展起来的一项新技术,它是利用干细胞增殖、多向分化潜能及其增殖分化的高度有序性等生物学特性,通过体外培养、定向诱导分化或转基因操作等改变其生物学特性,用于细胞治疗、再生医学、转基因动物等医学、农业和科学研究的各个方面。干细胞具有分化为多种功能细胞的特性,使其在人类医学、基因治疗、发育调控等领域显现出了重要的科学意义和广泛的应用前景,因此越来越受到重视。干细胞技术目前被广泛用于生物学、临床治疗、再生医学、遗传学、发育生物学、细胞生物学、胚胎学、生殖学、神经生物学和育种学等诸多基础研究和应用研究领域。

四、基因打靶与转基因动物

基因打靶(gene targeting)技术是利用同源重组和胚胎干细胞技术定向改变生物遗传信息的技术,从而在突变的细胞或个体内研究基因、基因组的功能或者获得相关基因的突变体动物。基因打靶具有定位性强、打靶后新的基因具有随染色体 DNA 稳定遗传的特点,主要包括基因敲除、基因敲入、定点突变、缺失突变、染色体组大片段删除等。相关的技术主要包括基因打靶技术、转基因动物和动物生物反应器等。

基因敲除(knock-out)是使基因组中单个或多个基因或顺式元件缺失,从而致使其在突变体内丧失功能,用于研究体内这些基因组的作用与功能。基因敲入(knock-in)则是在个

体基因组中定点加入单个或多个基因,使之表达和发挥作用,用来研究其在体内的功能或者获得转基因动物。随着条件基因打靶技术的成熟,人们可以按照需要在特定的时间敲出或敲入目的基因,从而能够在体内实时地观察和研究相关基因的功能。

转基因动物(transgenic animal)是指借助生物、化学或物理的方法,将外源目的基因转入到动物早期胚胎细胞内,最终产生带有该目的基因的动物个体的技术。基因敲入是转基因动物的主要手段,在动物体内定点内转入人们所需要的基因并获得表达。

动物生物反应器(animal bioreactor)是一类转基因动物,利用动物的某种细胞、组织或器官作为生物产品生成的载体,生产人类需要的生物制品。一个动物体就相当于一个生物工厂。例如,利用乳腺生物反应器或血液生物反应器生产具有生物活性的人凝血因子、促红细胞生成素、抗胰蛋白酶、抗体药物等医用蛋白。根据人类的意图,利用转基因动物技术制作高表达的动物生物反应器,生产特定的转基因生物制品,具有很大的商业价值,将成为未来医药工业或食品生产的重要途径。

基因打靶技术是20世纪80年代发展起来的新技术,为生命科学、基因组学和疾病治疗等领域的研究提供了强大的工具。在生命科学研究领域,转入或剔除某一基因以研究其表达和调节生物学功能或研究其作用机制,已成为当前重要的研究技术手段。美国科学家马里奥·卡佩奇(Mario R. Capecchi)、奥利弗·史密西斯(Oliver Smithies)和英国科学家马丁·埃文斯(Martin J. Evans)因其在基因打靶技术的开创性研究成果及其对生命科学的卓越贡献而获得了2007年度诺贝尔生理学或医学奖(图1-3)。基因打靶技术和转基因动物技术被广泛地应用于生物学、农业、生物医学、免疫学等领域,也常用于动物的遗传育种的研究和生产,以期获得人类所需的转基因产品,如培育抗疾病的家畜品种,生产贵重药物或某种生物产品的动物生物反应器,制备转基因鱼、转基因蝴蝶等转基因动物。

五、动物胚胎工程

动物胚胎工程(animal embryo engineering)也称胚胎生物工程,是根据人们需求,对哺乳动物早期胚胎进行一定体外操作,经过改变后的重组胚胎,移植给受体获得目的动物的生殖方法。以胚胎工程技术为核心的生物育种体系主要包括胚胎移植技术、胚胎分割技术、嵌合体技术、胚胎冷冻技术、细胞核移植与动物克隆技术等。

细胞核移植(nuclear transfer)技术又被称为动物整体克隆技术,指将不同发育时期的胚胎或成体动物细胞核经显微手术和细胞融合的方法移植到去核成熟卵母细胞中,重新组成胚胎,经过人工活化和体外培养后,再移植入代孕母体内,使其发育为含有与核供体细胞相同遗传物质的个体。这样的个体所携带的遗传性状仅来自一个父亲或母亲个体,因而为无性繁殖。从遗传角度上讲,细胞核移植是个体的完全拷贝,故称之为克隆。通过细胞培养和显微操作(micromanipulation)技术,将一个细胞的细胞核用显微注射的方法放进另一个去除了胞核的激活的细胞内。前者为供体,可以是胚胎干细胞的核,也可以是体细胞的核;后者是受体,受体大多是动物的卵子。因卵子的体积较大,操作容易,而且通过发育可以把特征表现出来。因此,细胞核移植技术主要用于研究胚胎发育过程中细胞核和细胞质的功能及两者间的相互关系,探讨有关遗传、发育和细胞分化等方面的一些基本理论问题,并用于生产克隆动物。

动物克隆技术(animal cloning technology)即动物的无性繁殖技术,不经过雌雄两性配子

的结合过程,而是通过细胞培养和显微操作等系列技术,将动物的成体细胞或胚胎细胞,发育成与其自身基因型和表型完全相同、具有稳定的遗传和正常的繁殖能力的动物的过程。动物克隆技术是核移植技术的具体体现。根据细胞来源的不同,可分为体细胞克隆动物(somatic cell-cloned animal)和胚胎细胞克隆动物(embryonic cell-cloned animal)。1997年英国科学家威尔穆特(Ian Wilmut)教授将羊的乳腺细胞核移植到另一种羊的去核卵细胞中,首次诞生出克隆羊“多利”(Dolly),标志着这一技术的成熟。动物克隆技术在人类的临床医学治疗领域具有重要的研究和潜在的应用价值。如利用克隆技术即治疗性克隆(therapeutic cloning)产生人的早期胚胎,从中分离胚胎干细胞,用于人的疾病治疗。这项技术是目前生物工程领域最前沿的技术之一,备受社会的关注。各国政府都通过立法或声明明确禁止克隆人,即生殖性克隆(reproductive cloning)。但许多国家政府有条件地支持治疗性克隆,即通过克隆产生人的早期囊胚(blastocyst),分离胚胎干细胞,用于人类的疾病研究和临床治疗。动物克隆技术被广泛地用于生物学、生殖学、遗传学和育种学等研究领域,在拯救和保护濒危动物,尤其是珍贵遗传资源的保存及畜牧业生产中的应用方面展现了光明的前景。

嵌合体动物(chimeric animal)技术是指利用干细胞、转基因或胚胎操作等技术,使同一个动物体内存在不同基因型的细胞或组织的技术。如将一种动物卵裂细胞或干细胞注入另一动物的囊胚内,使其发育到成熟就形成具有两种动物来源的细胞或组织构成的嵌合体动物。嵌合体动物技术被广泛应用于转基因动物的培育、家畜的改良、人类疾病的实验动物模型、动物发育、分化、表达调控等机制的研究和培育生物反应器等。

从20世纪30年代起,胚胎工程技术就逐步成功地应用于畜牧业生产,尤其是在优良种畜的引进、品种的保存、种畜的迅速扩繁、品种的改良和濒危动物的保护等方面发挥了极其重要的作用,极大地提高了畜牧生产的科技水平,产生了巨大的经济效益和社会效益。胚胎工程技术被广泛用于生殖生物学、胚胎学、发育生物学、遗传育种学和生殖医学的研究应用,并成为这些研究领域的重要技术手段。

六、生殖细胞工程

生殖细胞工程(germ cell engineering)是按照一定的设计,通过对动物或人的生殖细胞进行实验操作,用人工的方法协助产生正常后代的技术,或为某种目的而保存生殖细胞的技术。以生殖细胞为研究对象,主要包括精子与卵子的采集和成熟、X精子和Y精子的分离、体外受精、显微受精和生殖细胞的冷冻保存等内容。

X精子与Y精子的区别在于X精子含有大的X染色体,携带着丰富的遗传密码,个头较大,行动迟缓,但寿命较长;Y精子含有Y染色体,携带较少的遗传密码,个头小巧玲珑,行动敏捷,但寿命比X精子短。两者的主要区别在于他们所含的遗传物质不同。

体外受精(*in vitro* fertilization, IVF)技术是指精子和卵子在体外模拟动物生殖道的环境中完成受精过程的技术。该技术主要包括卵母细胞的体外成熟培养、精子的体外获能、体外受精和受精卵的早期体外培养等技术环节。

显微受精(microfertilization)是指在体外环境中,通过显微操作仪将哺乳动物的精子注入卵母细胞,使两者在体外受精并继续发育的技术。该技术解除了卵透明带(zona pellucida, ZP)和卵质膜对精子的阻挡作用。显微受精是体外受精和显微操作相结合的技术,故又称为显微操作协助受精(micromanipulation assisted fertilization)。

随着实验胚胎学的发展和显微操作技术的日渐成熟以及人们对受精和胚胎发育机制的深入研究,人为地对受精和胚胎发育的干预成为可能。在现代生物技术中,把体外受精和胚胎移植到母体后获得的动物或婴儿称为试管动物(test-tube animal)或试管婴儿(test-tube baby)。试管婴儿之父罗伯特·爱德华兹(Robert Edwards)也因此获得2010年诺贝尔生理学或医学奖(图1-5)。体外受精技术成功于20世纪50年代,在最近20多年发展迅速,现已日趋成熟,成为一项重要而常规的繁殖技术。这一技术不仅对揭示哺乳动物雌雄配子间的相互作用和受精本质等具有重要的理论意义,而且在提高优良种公畜的利用率和治疗男性不育方面具有重要的实践意义,使传统的自然生殖方式发生革命性的改变,为提高畜牧业生产经济效益、保存动物遗传资源、保护珍稀野生动物的遗传资源等方面做出了巨大贡献,也给世界上不育或有遗传缺陷的夫妇带来了福音。

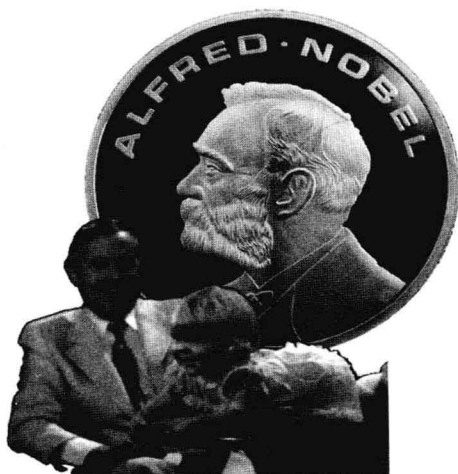


图1-5 试管婴儿之父 Robert Edwards(2010年诺贝尔获得者)和第一个试管婴儿

七、染色体工程

染色体工程(animal chromosome engineering)是按照人们的需要对生物的染色体进行操作,添加、削减或替换染色体,从而达到定向选育新品种或创造人工新物种的目的。染色体工程主要包括动物多倍染色体技术、雌雄核的发育、动物染色体的结构改造、染色体转移技术及人工染色体技术。染色体工程可用于动物新品种或品系的培育,在家畜遗传育种研究领域具有重要的科学和实用价值。如在绵羊的育种中,利用在自然条件下诱发的染色体突变所产生的绵羊的短腿性状。在水生动物的新品种培育上也得到了广泛的应用,获得了许许多多倍体高性能的新品种,如我国学者童第周在20世纪60年代就开展了大量的开创性研究工作。染色体工程虽然在20世纪70年代初才提出,但早在30年代,美国学者西尔斯(E. R. Sears)就已开始研究。染色体工程不仅在改良动植物的遗传基础培育新品种上受到重视,而且也是基因定位、染色体转移等基础研究的有效手段。

第二节 动物细胞工程在现代生物技术中的地位和作用

生物工程是现代生物技术的核心,生物工程学又称生物工艺学或生物技术(biotechnology)。生物工程是以生命科学为基础,利用生物体系和生物工程学原理产生生物制品或创造新的生物品种的一门综合技术,也就是利用生物机体或其组成部分发展新工艺或制作新产品的一门科学技术。

以基因信息改变、细胞融合技术和干细胞技术等为核心的现代生物工程技术的创立和发展为生命科学注入了新的活力。现代生物工程是指人们运用现代生物科学、工程学和其他基础学科的知识,按照预先的设计,对生物进行控制和改造或模拟生物及其功能,用来发展商业性加工、产品生产和社会服务的新兴技术领域。现代生物工程的发展,也极大地促

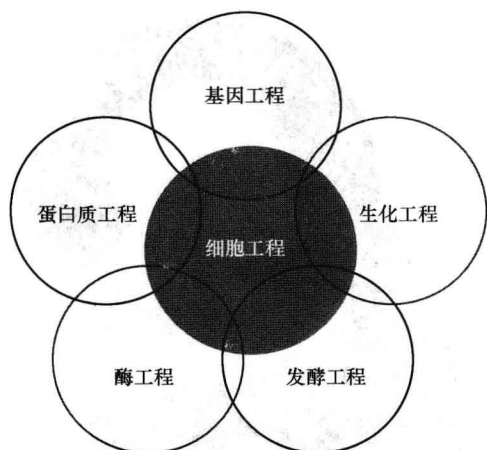


图 1-6 现代生物工程各组成的关系示意图

进了传统生物学科(动物学、植物学、遗传学、生理学、生物医学等)的快速发展。现代生物工程已经被广泛地应用于农业、环境、食品等领域,为这些行业带来了新的技术革命。

现代生物工程已经涉及生命科学的各个领域,现代生物工程主要包括基因工程、生化工程、发酵工程、酶工程、蛋白质工程和细胞工程。其中细胞工程、基因工程、发酵工程和酶工程被称为生物工程四大领域。现代生物工程技术之间紧密联系,彼此相互作用,相互涵盖,相互影响,很难严格区分他们之间的界限(图 1-6)。

动物细胞工程是生物工程学科的重要分支。在现代生物工程中,动物细胞工程是除了生化工程之外涉及面最广的技术,几乎涉及所有其他几大生物工程,是除基因工程之外最能代表生物工程发展的一门科学技术。现代生物工程所取得的很多里程碑式的成果,很多都是细胞工程领域的重大发现,均与动物细胞工程密切相关。所以,动物细胞工程可以看作是现代生物工程的主干,支撑着基因工程、蛋白质工程、发酵工程、生物产品、动物品种改良和育种等现代生物工程技术这棵大树。

第三节 动物细胞工程的发展历程

一、动物细胞培养与生物制品的规模化生产

动物细胞工程的形成最早开始于动物组织或细胞的体外培养,是在实验胚胎学的基础上发展起来的。

1859 年法国的 Valpain 最早尝试了蛙胚尾部组织的体外培养,并观察了组织在培养液中的生长和分化现象。这个实验虽然非常简单,却是最早建立的体外细胞培养技术。之后,各种不同组织来源的组织和细胞培养相继开展,学者们也不断地尝试一些新的培养方法。1885 年,鲁克斯(W. Roux)开展了鸡神经板细胞的培养,并首次提出了外植培养(explantation)和组织培养(tissue culture)的概念。

1907 年,美国学者哈里森(Ross G. Harrison)首次建立了悬滴培养法(图 1-7),开创了动物细胞培养的先河,被称为细胞培养之父。他在无菌的盖玻片上悬滴培养组织细胞,将蛙神经管区的组织移植到蛙的淋巴液凝块中,结果这个组织不仅在体外存活了 28 天,而且还从组织中长出了轴突。至此,动物细胞的培养模式系统基本建立,但无菌培养和培养基等成为当时细胞培养的主要问题。

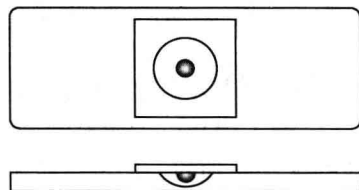


图 1-7 盖片悬滴培养法

1909 年,哈里森和卡尔(A. Carrel)进一步完善了组织和细胞培养技术,他们将外科手术的概念引入到细胞培养中,更加注重无菌培养体系,避免污染,并更换培养组织和细胞的培养液。他们以血浆和胚胎浸出液为培养基,培养鸡心肌组织,长达 34 年。卡尔在 1923 年还发明了卡

式培养瓶,用卡式培养瓶培养细胞,不仅可避免细胞污染,还扩大了组织和细胞的培养空间,培养的细胞量大幅提高。哈里森和卡尔在动物组织与细胞培养方面的工作具有里程碑的意义,为动物细胞培养建立了基本模式,也奠定了动物细胞培养的理论和技术基础。

1926年,Strengeway 创立了表玻璃培养法,为研究动物器官在体外的发育与功能做出贡献。至此,动物细胞培养技术基本建立。

1933年,Gey 建立了旋转培养技术,他们用旋转管培养了多种细胞系。通过这种方法,有效地避免了传统静置培养易导致培养细胞周围环境不均匀的问题。Gey 在 1952 年还建立了人宫颈癌 HeLa 细胞系(目前仍然被广泛地使用)。

1948年,K. Sanford 建立了体外单层细胞培养技术和细胞定量培养方法,并成功地从培养细胞中分离出单个细胞,为细胞系的建立和遗传性状完全相同的细胞株的建立奠定了基础。

1955年,H. Eagle 成功研制人工培养基,该培养基适于各种传代细胞系和特殊研究用,也是目前实验室普遍使用的细胞培养基。单层细胞在体外培养的成功以及人工培养基的出现,促进了细胞培养技术的快速发展和细胞培养应用范围的扩大,标志着现代细胞培养体系趋于成熟。

1962年,C. Telling 等采用悬浮培养法成功地培养了仓鼠肾细胞(baby hamster kidney cell, BHK cell),并在不锈钢发酵罐中悬浮培养 BHK21 细胞生产口蹄疫疫苗,开创了工业化大规模悬浮细胞培养技术。

1967年,荷兰的 van Wezel 用葡聚糖 Sephadex A50 微小颗粒培养贴壁细胞成功,开创了微载体(microcarrier)细胞培养技术。将贴壁依赖型细胞贴附在微载体上,悬浮在培养基中生长,从而实现了贴壁细胞的大规模培养,大大提升细胞的培养空间,也便于优化控制培养条件和实现产业化生产(图 1-8)。

随着动物细胞培养技术的原理与方法日益成熟,细胞培养的规模也逐步扩大。目前,工业规模的细胞培养技术已经日臻完善,常见的细胞大规模培养技术包括无血清悬浮培养、微载体培养等。国外普遍已经采用几千到上万升规模的微载体反应器悬浮培养细胞用于疫苗和生物制品的生产,3万~5万升规模的动物细胞悬浮培养系统用于工业化单克隆抗体药物的生产等。

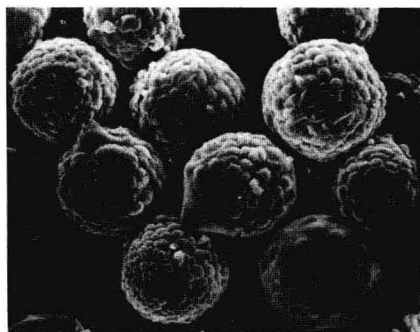


图 1-8 微载体培养(贴附在微载体上的贴壁细胞)

二、细胞融合与单克隆抗体技术

1938年 Marler 最先观察到脊椎动物肿瘤细胞的多核现象,随后的十几年时间里,在多种组织中发现了多核现象,尤其是像病毒感染的或病变的组织细胞中,多核细胞普遍存在。对多核细胞的观察是开展细胞融合技术的基础。在细胞培养过程中,在一定的情况下也会出现细胞融合现象。

日本学者冈田善雄(Okata) 1962年创立了人工细胞融合技术。他们通过仙台病毒(Sendal virus)成功诱导艾氏腹水癌细胞融合,形成多核细胞,为动物细胞融合技术的发展奠定了基础。1965年,英国的 Harris 和 Watkin 在利用灭活病毒诱导细胞融合上做了大量的工作,进一步诱导了小鼠细胞和人细胞的融合,形成了可以培养成活的杂种细胞。由此证

明了融合细胞具有存活能力。

1974年华裔加拿大学者高国楠(Kao)创立了聚乙二醇(polyethyleneglycol, PEG)化学融合法。当加入一定分子质量的PEG时,融合效率较病毒诱导法可提高1000倍以上,Kao经过研究发现PEG在融合过程中起着稳定和诱导凝集的作用。

1975年Milstein和Köhler将小鼠骨髓瘤细胞与羊红细胞免疫过的小鼠淋巴细胞融合形成杂种细胞,获得了既能在体外无限繁殖,又能产生特异性抗羊红细胞抗体的杂交瘤细胞,用克隆化得到的杂交瘤细胞株可制备高纯度的单克隆抗体。这一创新性的工作极大地促进了免疫学和抗体药物的发展。现在,用杂交瘤技术生产单克隆抗体被广泛地应用于生物医药、临床诊断、化验检测和实验研究等。他们也因其卓越的贡献而获得1984年诺贝尔生理学或医学奖(图1-2)。单克隆抗体的规模化生产标志着细胞融合技术的成熟。

1980年Zimmermann报道了细胞电融合技术。细胞电融合技术主要包括两个电过程:一是通过电介质电泳使细胞形成“串珠”,细胞彼此紧密接触;二是以瞬间直流高压电脉冲使细胞发生可逆电穿孔,相邻细胞的细胞质沟通,达到细胞融合。由于这一技术具有可使差异较大的细胞发生融合、在显微镜下能观察融合过程、物理刺激对细胞无毒性、融合率较聚乙二醇(PEG)法高等优点,引起了许多学者的兴趣。现已在动物细胞、植物细胞、细菌细胞、脂质体、质粒转化等方面有广泛的应用。

1987年德国R. Wiegand等用激光束技术成功地使骨髓瘤细胞与能分泌特异性抗体的小鼠B细胞融合,从而建立了激光细胞融合(laser induced cells fusion)技术。通过光镊(optical tweezers)所形成的光学势阱,把细胞拉向光学中心,钳住细胞,从而实现对细胞的远距离非接触捕获,采用高峰值密度的激光对两细胞接触区的质膜进行照射,质膜发生光击穿,产生微米数量级的微孔,导致细胞融合。激光细胞融合技术最突出的优点在于它的高度选择性,能够选择任意两个细胞进行细胞融合。1990年我国的张文迪用激光束成功诱导动物卵细胞融合。

人工诱导细胞融合技术的建立,极大地推动了生命科学的基础理论和应用研究。如单克隆抗体被广泛地应用于医药、农业、工业等领域,并促进了生命科学的发展,使人们在疾病诊断、治疗等方面达到新的高度。

三、干细胞与细胞重编程技术

小鼠畸胎瘤(teratocarcinoma)的体外培养开始了干细胞的早期研究。1958年,Stevens最早发现了畸胎瘤,他将小鼠早期胚胎移植到129小鼠的卵巢或肾脏的被膜下,得到了畸胎瘤干细胞。1981年Evens和Kaufman将小鼠延迟着床的早期胚胎体外培养,从囊胚中分离获得了小鼠的内细胞团(ICM),并从中培养出小鼠胚胎干细胞,首次建立了小鼠胚胎干细胞系。他以他们两人名字的第一个字母命名该细胞为EK细胞,从此开辟了哺乳动物胚胎干细胞研究的新纪元。Evens的这项杰出的工作为“基因打靶”技术提供了施展本领的空间,他也因此与另外两位基因打靶技术的先驱获得2007年诺贝尔生理学或医学奖(图1-3)。2006年日本学者山中伸弥(Shinya Yamanaka)等首次报道了诱导多能干细胞(iPS)。他们通过对小鼠的实验,发现了诱导人体表皮细胞使之具有胚胎干细胞特征的方法。此法诱导出的干细胞可转变为心脏和神经细胞,为研究治疗多种心血管疾病等提供了巨大帮助。这一研究成果因其免除了使用人体胚胎提取干细胞的限制,在全世界很快被广泛应用,山中伸弥也因此

获得 2012 年诺贝尔生理学或医学奖(图 1-4)。目前,胚胎干细胞的分离培养建系和克隆技术以及 iPS 细胞技术的日趋成熟与完善,为动物早期胚胎发育、组织细胞分化、基因表达调控、基因打靶和动物克隆、疾病的治疗等提供理想模型和解决方案。

成体干细胞是 21 世纪初生物学的伟大发现,它改变了干细胞传统的理念。成体干细胞的研究始于 20 世纪 60 年代人们对造血干细胞(hematopoietic stem cell, HSC)的研究。造血干细胞是目前研究最为清楚、应用最为成熟的成体干细胞,在移植治疗血液系统及其他系统恶性肿瘤、自身免疫病和遗传性疾病等方面均取得令人瞩目的进展,极大促进了这些疾病的治疗,同时也为其他类型成体干细胞的研究和应用奠定了坚实的基础。1967 年多纳尔托马斯(Donnall Thomas)完成了第一例骨髓干细胞移植,他因此于 1990 年获得诺贝尔生理学或医学奖,开创了干细胞治疗的新纪元(图 1-9)。近年来,干细胞研究成为再生医学研究领域的热点。干细胞移植技术的发展将改变传统的用药和手术治疗模式,成为治疗神经系统疾病、肝硬化、白血病、恶性肿瘤等难治性疾病的主要手段,给医疗领域带来深远的影响。

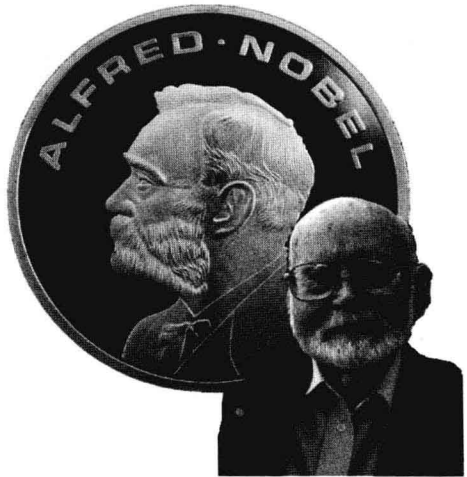


图 1-9 骨髓干细胞移植治疗白血病先驱
Donnall Thomas(1990 年诺贝尔奖获得者)

四、转基因动物与动物生物反应器

1974 年,Jaenish 和 Mintz 应用显微注射技术,通过反转录病毒转染小鼠着床前的胚胎,在世界上首次成功获得整合了猴病毒 SV40(simian virus 40)DNA 的转基因小鼠。

1977 年 John Gurdon 将不同来源的 mRNA 和 DNA 通过显微注射的方法转入到爪蟾卵内,观察到转入核酸的表达。1980 年,他将 SV40 基因和 HSV 的 TK 基因的重组质粒通过显微注射注入小鼠受精卵的原核中,获得了转基因小鼠。

1982 年 Palmiter 和 Brindter 将大鼠的生长激素基因显微注射到小鼠的受精卵中,获得的转基因小鼠能够分泌生长激素。这种小鼠的体重可达到正常成年小鼠体重的 2 倍,被称为“超级小鼠”(图 1-11A)。这一技术的成功,开创了转基因动物的时代,相继多种转基因动物,如牛、山羊、绵羊、猪、鸡、鱼等获得成功(图 1-10,彩图 1)。

1971 年,Brackett 等最早提出精子载体法转导基因。他们先让兔精子与 SV40 病毒 DNA 进行孵育,再与卵子受精,然后与非洲猿肾细胞融合,结果在融合细胞中发现了病毒,说明精子可以作为载体。直到 1988 年,这一技术才得到进一步证实。Lavitrano 等以精子为外源 DNA 的载体,通过体外受精将 pSV2CAT 导入小鼠受精卵并成功获得转基因小鼠。

1981 年,Evens 等建立了胚胎干细胞系技术,开始了胚胎干细胞转导外源基因的新方法,也开创了定点基因打靶新技术。虽然原核显微注射技术、精子转导技术和反转录病毒感染技术等均能获得转基因动物,但无法实现定点诱变。通过胚胎干细胞的同源重组,能够对 DNA 进行定点修饰。史密斯(Oliver Smithies)和卡佩基(Mario R. Capecchi)几乎同时

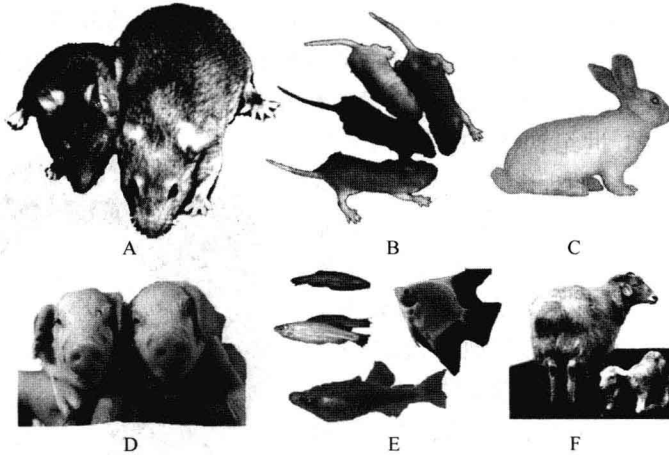


图 1-10 转基因动物

A. 转有大鼠生长素基因的“超级小鼠”;B. 转基因荧光小鼠;C. 转基因荧光家兔;
D. 转基因荧光猪;E. 转基因荧光鱼;F. 转基因克隆小绵羊

对“基因靶向”技术做出了奠基性贡献。他们创造了一套完整的“基因敲除”方法,把任意改变小鼠基因变为现实。该技术不仅可以研究单个基因在动物体内的功能,而且还为人类攻克某些遗传因素引发的疾病提供了药物试验的动物模型。这一技术使科学家能培育出有特定变异基因的小鼠,他们也因此获得 2007 年诺贝尔生理学或医学奖(图 1-3)。目前,随着转基因技术的日趋成熟,基因定点打靶技术与 iPS 细胞技术、体细胞克隆技术相结合,转基因技术将获得新的突破,可控转基因动物的研究将踏上一个新的台阶。

利用转基因动物建立的动物生物反应器用于生产人类所需的各种生物产品。1987 年 Gordon 等通过显微注射法获得了在乳腺中分泌人组织纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, tPA)的转基因小鼠,建立了乳腺生物反应器小鼠模型。1988 年 Simons 等研究获得的世界上第一只能从乳腺分泌凝血因子 IX 或 α_1 抗胰蛋白酶转基因绵羊,标志着大型乳腺生物反应器研究步入实用阶段。此后各种转基因动物生物反应器(如牛、绵羊、山羊、兔、鸡等)相继问世。1997 年英国学者 Wilmut 等通过基因打靶结合体细胞克隆技术成功建立表达凝血因子

F-IX 的转基因绵羊。2000 年,英国学者将人 AAT 基因定点整合到成纤维细胞 I 型胶原基因座,通过转基因细胞生产的转基因绵羊乳汁中 AAT 蛋白的含量高达 650mg/L。在我国,1992 年上海医学遗传所培育携带人体蛋白基因的中国首例转基因试管牛。2000 年,我国培育出转有人 α 抗胰蛋白酶基因的转基因山羊,可从转基因山羊奶中提取治疗慢性肺气肿、先天性肺纤维化囊肿等疾病的特效药物。

2001 年,美国科学家宣布培育出了世界首只转基因猴(图 1-11,彩图 2)。这是世界首次培育成功转基因灵长类动物,此项成果将为人类最终战胜糖尿病、乳腺癌、帕金森病和获得性免疫缺陷综合征等顽症提供帮助。



图 1-11 世界首只转基因猴“安迪”(Andi)