

成果与应用

克隆动物研究的四十年*

杜 森

(遗传与发育生物学研究所 北京 100080)

摘要 克隆(细胞核移植)是研究细胞核与细胞质的相互关系和细胞核的发育能力等发育生物学问题的最好方法之一。40年来,在童第周等著名科学家领导下研究室以鱼、蛙、鼠、兔和山羊等动物为材料,进行了一系列克隆研究工作,得到多种克隆动物。该项研究居国际前沿水平。

关键词 克隆,细胞核移植

在发育生物学领域,细胞核和细胞质在发育、分化、遗传过程中的相互关系和细胞发育分化的潜能性问题历来受到科学家的重视,而细胞核移植方法又是研究这些问题的主要手段之一。

1938年,德国科学家施丕曼(Spemann)首先在两栖类动物中进行了核移植的实验,得出的结论为:早期胚胎每个分裂球的发育分化能力是等同的。但由于当时技术条件的限制,未能进一步探讨。直至1952年美国科学家勃立基(Briggs)和金(King)首先用显微操作器将豹蛙囊胚时期的细胞移到已去掉细胞核的成熟卵母细胞内,获得了发育到期的幼蛙,说明囊胚期的细胞具有发育的全能性。之后,各国科学家在两栖类中进行了多项试验,包括不同胚层发育而来的不同组织器官的细胞发育潜能性的比较;正常细胞和不正常细胞(如癌细胞)发育潜能性的比较;不同分化程度的体细胞(红血球、已有功能的肠细胞、角化细胞等)发育能力的比较;不同种(两栖类)之间的核质杂交等,获得了内容丰富的诸多结果,证明了细胞质对外源细胞核在

发育、分化等过程中所起的重大影响。

著名科学家童第周教授领导的科研小组(包括叶毓芬、吴尚懋、严绍颐、陆德裕等教授),在50年代末、60年代初与中国科学院水生生物研究所、长江水产研究所、广西水产研究所等单位合作,对“异种核质杂交克隆鱼”进行了研究,其主导思想是从理论上研究核质关系,在实际应用(特别是鱼类品种改良)方面试图寻找一条新的途径。

动物的育种是以系统选育得到一种理想表型的品种,但是要保存这种表型是非常困难的,而且周期长。因此,提出了首先通过系统选育获得新表型,再通过无性生殖方式保存并繁殖这种新表型。他们在青鱼、草鱼、鲢鱼、鳙鱼、鲤鱼、鲫鱼和鳊鱼等不同组合进行核质杂交,最后获得两个比较成功的组合。一组是将鲤鱼的胚胎细胞核移入鲫鱼去核的卵质中,获得的核质杂种鱼的主要性状是细胞核型(即鲤鱼的性状),也有些性状是细胞质型(即鲫鱼的性状)和中间型。它们生长速度快,肌肉蛋白质含量较高,脂肪含量较低。这一组核质杂交鱼已

繁殖五代并已推广养殖达十几万亩的水面。该项目 1985 年获中国科学院科技进步奖二等奖。另一组是不同亚科间的草鱼胚胎细胞核移到鳊鱼去核卵细胞获得的核质杂种鱼, 性状主要是细胞核型的(草鱼), 但其抗病能力似乎比草鱼强。

后来, 以严绍颐教授为首的研究室又在不同科甚至不同纲的动物之间进行实验, 如将哺乳纲中的小鼠 16-细胞时期的分裂球移入鱼纲中的泥鳅的去核卵内, 也得到了核质杂交的囊胚。核质杂种卵的发育模式受细胞质类型的影响, 这充分说明核质杂交卵是受细胞质影响所致。

用细胞核移植的方法在鱼类中进行同种和异种之间的克隆研究, 是童第周教授独创的。特别在鱼类不同种之间的核移植能获得核质杂种鱼。该研究在国内外都得到了高度评价。前国际发育学会主席 Okada 曾给予这样的评价:“中国在鱼类遗传和胚胎研究方面有着悠久的历史, 已故童第周教授是将细胞核移植研究应用于鱼类的伟大先驱者……。用细胞核移植方法为鱼类胚胎学特别是在核质杂种鱼方面做出了很大贡献, 这些工作都是独创性的”^[1,2]。

80 年代初, 以陆德裕教授为首的研究室继承并发扬了童第周教授的主体学术思想——核质关系与细胞发育潜能性。在国内首先开展了以哺乳动物的小鼠、兔为材料, 用细胞工程方法(如胚胎切割、嵌合体的制备、哺乳动物细胞核移植、基因构建以及转基因动物制备等)进行了一系列工作。如用小鼠胚胎原始外胚层细胞获得嵌合体小鼠, 证明了原始外胚层细胞与内细胞团细胞和体外培养的胚胎细胞一样具有发育的全能性。不仅参与形成嵌合体中各种细胞的分化, 还参与生殖系统的发育, 并产生有功能的雌雄配子。二倍体胚胎与四倍体胚胎聚集而成的嵌合体实验, 有力地证明了细胞与细胞之间的关系, 即正常二倍体细胞可以挽救致死四倍体胚胎, 使其正常发育。这是世界首例。此外, 还在国内率先获得了由内细胞团而来的嵌合体兔等。由此引发了国内其它科研单位利用细胞工程方法对哺乳动物早期胚胎细胞发育能力进行较为广泛的研究。

“七五”之后, 该实验室主攻方向依然是核质关系和细胞发育分化的潜能性。所不同的是以哺乳动物为材料和以细胞核移植为主要手段。以细胞核移植克隆的方法与基因工程中转基因动物制备相结合, 是当前也是若干年内国内外研究的热点。在理论上, (1) 进一步探讨哺乳动物不同类型的细胞发育潜能性的差异, 即细胞质对来自各种不同类型的细胞对其发育的调控作用的程度有何影响? (2) 大家畜的胚胎干细胞至今未获成功, 因此许多工作受到限制。如同源重组基因打靶等工作。为此, 我们认为有必要在大家畜——牛、羊等动物中寻找一种“类干细胞”部分替代胚胎干细胞的功能, 这对乳腺生物反应器高表达转基因克隆动物的获得更为有效, 是比较关键的问题。(3) 进一步探讨基因转化过程中以及转基因动物在发育、分化、遗传等过程中, 其功能基因的整合表达的稳定性。

1989 年, 该实验室首先在国内用细胞工程的克隆技术对哺乳动物家兔进行细胞发育潜能性的研究。1991 年获得了克隆山羊。在此基础上, 为探索一条快速优良品种扩群的最佳途径和验证细胞核发育全能性的连续性, 提出连续克隆的方法。1993 年成功获得世界上第一批连续细胞核移植克隆山羊^[3], 该成果被评为全国十大科技新闻之一, 1995 年获中国科学院科技进步奖一等奖。该成果为今后优良品种特别是高产奶牛的扩群奠定了技术基础, 也证明了细胞核在传代过程中发育全能性的稳定和连续性。克隆动物的研究应该和转基因动物的制备相结合, 这一观点在理论上和在实际应用方面都将是一个突破。

1997 年, “多莉”羊问世后, 该实验室进行了不同类型的体细胞——颗粒细胞、成纤维细胞、胎儿成纤维细胞发育潜能性的比较^[4,5], 上述诸细胞不同发育时期对重构胚发育影响的比较以及对带有外源基因的体细胞和克隆动物的研究等, 均获得了克隆山羊。在理论上深入了解了多种不同体细胞发育的潜能性。在实际应用上为生产医用蛋白转基因动物的实用化提供了技术前提。2000 年, 该实验室用电脉冲的方法将外源基因 Neo 抗性基因(由 TK 启动子控制, 是一种在小鼠转基因和基因打靶

研究中用得非常广泛的筛选基因)转入山羊的胎儿成纤维细胞中,从中又选择一个 G418 抗性细胞株作为克隆的供核细胞,获得 7 只克隆山羊,经检测均是带有外源基因的转基因山羊,且其出生率也高于一般水平,为 5.5%^[6]。这些均属国内外前沿性工作,目前该实验室重点在探索胎儿成纤维细胞作为“类干细胞”进行功能基因转化和定点整合、基因打靶等工作,最终获得高表达的转基因动物,这为乳腺生物反应能获得高效医用蛋白的产物,这是当前国内外竞相争取实现的目标。

总之,发育遗传与细胞工程研究室一直遵循着童第周教授生前提倡的主体学术思想——细胞核和细胞质之间相互关系和细胞发育的潜能性的研究大方向,以及基础理论研究和实际应用相结合的方针,使研究工作始终保持在该领域的国际前沿。

参考文献

1 Yan S Y. Cloning in fish — nucleo — cytoplasmic hybrid. In-

ternational Union of Biological Scientists. Hong Kong: Educational and cultural Press Ltd, 1998.

2 严绍颐. 鱼类细胞核移植历史回顾与讨论. 生物工程学报, 2000, 16(5): 541—547.

3 Zou X G, Li G S, Wang Y G, et al. Potentiality of development of embryonic cell in goat (*capra hircus*) which bears scri-ally transplanted nucleus. Chinese Science Bulletin. 1995, 40 (12): 1 038—1 043.

4 Wang Y, Zou X, Liu J et al. Cloned goats (*Capra hircus*) from foetal fibroblast cell lines. Chinese Science Bulletin. 2000, 45: 34—37.

5 Zou X G, Cheng Y, Wang Y G et al. Production of cloned goat from the enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei or fused with cumulus cells. Cloning. 2001, 3(1): 31—37.

6 Zou X G, Wang Y G, Cheng Y et al. Generation of cloned goats (*Capra hircus*) from transfected foetal fibroblast cells, the effect of donor cell cycle. Molecular Development and Reproduction (submitted). 2001.

Studies on Animal Cloning in Forty Years

Du Mao

(Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, 100080 Beijing)

Animal cloning (nuclear—transplantation) is one of the best ways to study the nuclear—cytoplasm relationship and the nucleus developmental potentiality of cell in Developmental Biological field. For the last forty years, we have put our main efforts in fish, frog, mouse, rabbit and goat cloning. And many cloned animals in different species have been produced, which represents the research progresses in the world.

杜 淼 男,中国科学院遗传发育生物学研究所研究员。1957年毕业于山东大学生物系,从事发育生物学细胞工程研究。曾获1978年全国科学大会奖(第6位),1985年中国科学院科技进步奖二等奖(第2位)。1985年广西壮族自治区科技进步奖一等奖(第3位),1995年中国科学院科技进步奖一等奖(第1位)。