



专 题

鱼类生殖细胞

徐红艳^①, 李名友^①, 桂建芳^{②*}, 洪云汉^{①*}^① 新加坡国立大学生物系, 新加坡 119260;^② 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072* 联系人, E-mail: dbshyh@nus.edu.sg; jfgui@inb.ac.cn

收稿日期: 2009-09-29; 接受日期: 2009-12-02

新加坡生物医学研究理事会基金(批准号: R-05-1-21-19-404, R-08-1-21-19-585 和 SBIC-SSCC C-002-2007)、新加坡教育部基金(批准号: R-154-000-285-112)、新加坡国立大学基金(批准号: R-154-000-153-720)和国家重点基础研究发展计划(批准号: 2004CB117406, 2010CB126301)项目资助

摘要 鱼类和其他大多数动物一样, 胚胎发育产生两大细胞系, 一个是生殖细胞系或种质系, 另一个是体细胞系. 生殖细胞系和体细胞系的分离发生在胚胎发育的早期, 其标志是形成生殖细胞系的祖细胞, 即原始生殖细胞(primordial germ cells, PGCs). PGC 形成后从其“出生地”进行“长途跋涉”迁移到性原基, 成为性原细胞, 即卵原细胞和精原细胞; 随后在经过配子生成的一系列发育过程后, 最终产生成熟的配子——卵子和精子. 生殖细胞发育的每个步骤都可能影响生物个体的生殖能力或育性. 巨大的生物学意义及其令人振奋的研究进展, 使“生殖细胞”日益成为科学研究的热点, 且作为特别议题出现在 *Science* 杂志 2007 年 4 月 20 日第 5823 期的封面上. 近 10 年见证了对生殖细胞的认知的长足进步, 这些都得益于对青鳉和斑马鱼等模式生物的研究. 生殖细胞已被准确地标记且分离以进行体外培养及移植, 这为濒临绝种的动物借助近缘物种进行生殖繁衍提供了技术基础, 譬如最近就有人成功地“借鲑鱼之腹”获得了虹鳉后代. 另外, 单倍体细胞体外培养已获成功, 如最近有研究人员获得了青鳉鱼单倍体胚胎干细胞, 而且把这种细胞的核移植到正常的卵子中, 其能像正常精子授精一样发育并产生可育的子代. 这种鱼其实最初是由嵌合卵发育而成, 也就是由正常减数分裂生成的单倍体卵母细胞核和植入的体外培养的有丝分裂单倍体细胞核组成的卵. 这种繁殖技术也被称作半克隆技术. 这条首次获得的半克隆青鳉鱼被命名为“霍莉”(Holly). 总之, 本文将从基础研究和繁殖技术两方面, 就生物界对鱼类生殖细胞研究和操作现状及未来研究方向进行小结与探讨.

关键词鱼类
生殖细胞
生殖质
生殖
繁殖技术
半克隆技术

进行两性生殖的多细胞动物都具有“生活史迥异”的两个细胞系, 即体细胞系和生殖细胞系. 体细胞系通常会发育形成身体, 以维持生物个体的生长发育, 从而最终是“必死”的. 而生殖细胞系则能发育

产生配子以维持物种遗传信息代代相传, 生生不息, 所以是“永生”的^[1].

在鱼类及许多其他的生物中, 生殖细胞在胚胎发育早期就已形成而且是由原原始生殖细胞(pPGC)

发育而来的。pPGC是生殖细胞的始祖而且能进行细胞不对称分裂,产生两个‘命运各异’的子细胞:其中一个为体细胞,而另一个仍为pPGC。但当两个子细胞“命运相同”且都能发育成生殖细胞时,其母细胞就成了原始生殖细胞(PGCs)。在生殖腺形成之前,PGC便已在胚胎的特定位置特化形成,随后PGC迁移穿过各种胚胎组织(体细胞组织)到达正在形成中的原始生殖腺,即性原基。因此严格来讲,PGC可相应地分为迁移前、迁移中和迁移后3种。一旦到达性原基,PGC便结合并协同周围体细胞形成一个完整的生殖腺。在某些物种的初始生殖腺,如老鼠的初始生殖腺中,PGC到达性原基后会停止有丝分裂且进入有丝分裂静止期即G0期。这些G0期生殖细胞通常也被称作生殖母细胞或性原细胞,在鱼类性成熟期间,生殖母细胞发育变成生殖干细胞(卵原细胞或精原细胞),在性成熟期间最终分化形成成熟的配子,即在雄性个体中形成精子,在雌性中形成卵子^[2]。

在研究早期,有人借用显微镜观察形态学的方法,观察分析了PGC的特有细胞结构——生殖质颗粒(nuage),并对多种鱼的生殖细胞进行了初步的考察^[3]。同时,Hamaguchi^[4]在细胞超微结构水平上,对生殖质颗粒在鱼类生殖细胞发育期间的形成进行了观察研究。这些开创性研究在10年前就得被归纳与总结^[2]。随后,其他一些鱼类生殖细胞特异基因也陆续被分离鉴定了(表1)。而且各种细胞和分子实验技术也在鱼类研究应运而生并得以发展,使得在过去10年里,科学界对生殖细胞的研究,无论是在理论知识的积累方面还是实践应用方面都取得了很大的进步。因此,本综述旨在总结科学界认识鱼类生殖细胞发育的一些主要的方法和成果,以及对鱼类生殖细胞操作的重大成就及突破。另外,还将探讨这些在鱼类生殖细胞研究中取得的重大发现及突破对推动各种动物,包括人类的生殖健康及繁殖工程有何特殊意义。

1 鱼类生殖细胞的基本特征及其研究方法

生殖细胞在发育早期,即PGC阶段,通常可通过一些组织学特征与体细胞区分开来。在研究早期,PGC就是通过其组织学特征加以鉴别的。PGC的显著特征是:细胞个体大(直径:10~12 μm)显著大于周围体细胞、细胞核大而圆的(直径:6~10 μm)、细胞质

较少(核质比较高)。尤其是PGC胞质内具有特征性的富含线粒体的亚细胞结构,这种亚细胞结构被称作“nuage”或生殖质颗粒。这种生殖质颗粒是一种无膜细胞胞质器,由各种RNA和蛋白质组成,其在电子显微镜下呈现为一种电子致密体^[4]。PGC的这些基本特征一致沿用至今,也得到了现代分子学研究的证实和扩充^[2]。最近,尤等人^[5]采用光学和电子显微镜对黑脊刺鲃(*Spinibarbus caldwelli*)的卵原细胞和各期卵母细胞中生殖质的形成过程进行观察。

在一些模式生物中如果蝇(*Drosophilidae melanogaster*)、斑马鱼(*Danio rerio*)和爪蟾(*Xenopus laevis*),对生殖质颗粒的研究主要集中于考察生殖质颗粒和PGC形成的关系即其在胚胎卵裂期的不对称分配,即生殖质颗粒主要被分配到pPGC或PGC。这些pPGC或PGC的发育方向在胚胎发育初始就已由母源遗传因子所决定。这些母源遗传因子都集中分布在卵母细胞和卵裂期胚胎的生殖质(Germ plasm, GP)(或生殖质颗粒)区域^[6]。也就是在胚胎发育早期,生殖质被不对称地分配到一些细胞中,这些细胞便最终发育形成PGC。因此,在这些生物中,PGC的形成发育是由母源因子主导的细胞自主发育的过程。

在哺乳动物中,GP只有在生殖细胞分化后期,如在精子生成或卵子生成时才可见,而其在生殖细胞形成过程是否起作用还不清楚。另外,最近的基因研究指出,在老鼠中,生殖质颗粒主要在出生后个体的精子生成过程中起作用,而不是在胚胎发育早期阶段起作用^[7]。而且哺乳动物生殖细胞是由胚外外胚层细胞分泌的信号分子诱导部分多能外胚层细胞发育形成的^[8]。这样,哺乳动物PGC的形成过程没有任何的母源因子的参与,仅依靠细胞间的交互作用,即细胞非自主的方式。

在许多生物中,卵母细胞在特定发育阶段会有巴氏小体(Balbani bodies, BB)^[9~11]。而且BB与生殖质颗粒似乎是不同的结构^[12]。不过BB也是与高尔基体、内质网及线粒体相联系的细胞亚结构。在爪蟾,生殖质颗粒也会聚集在BB里。在某些哺乳动物中,BB在早期卵母细胞,即胞囊和原始卵泡中出现,但是随后在成长的卵母细胞中解体^[10,12]。然而,迄今为止,在所有研究过的脊椎动物中,还没发现BB和生殖质颗粒之间有什么必然的关系^[13]。

生殖质颗粒是多分子复合体,即由RNA和蛋白质形成的核糖核酸蛋白质复合体(ribonu-cleoprotein,

RNP). 这些成份以细胞骨架形成的方式聚集在一起从而形成一种特殊的胞质结构. 但在果蝇、爪蟾和斑马鱼的生殖质颗粒形成过程中, 肌动蛋白和微管蛋白所起的作用是不同的. 在果蝇中, 生殖质颗粒(极质)成份的聚合需要一个完整的肌动蛋白和微管蛋白网络来共同完成, 然而肌动蛋白网络对爪蟾的生殖质的聚合却并非必要. 而有趣的是, 在斑马鱼中, 生殖质的聚合起始阶段需依赖于肌动蛋白的作用, 而随后的聚集形成则需要所谓的分裂沟——微管蛋白排列的作用^[14,15]. 因为如果细胞骨架受损了, 细胞分裂沟本身就无法形成^[14]. 所以虽然以肌动蛋白为主的细胞骨架在生殖质聚合形成早期起重要作用, 但是细胞骨架是否在斑马鱼的胚胎卵裂期, 在生殖质被分配且聚集到细胞分裂沟的过程中就直接行使其功能, 这还有待进一步的研究证实. 更有趣的是, 有

人最近发现一个新的基因, 即*bucky ball(buc)*基因. 他们发现此基因是斑马鱼GP形成的一个必需因子, 因为*buc*基因的突变失活会破坏卵母细胞BB的形成, 同时会导致卵母细胞的胞质无法极化, 而*buc*基因的过度表达会诱导异位生殖细胞的形成^[16]. 另外, *Buc*是个进化变异蛋白, 那么, *buc*基因的同源物是否存在于其他的脊椎动物中, 而且它在不同物种的GP形成过程中, 行使的功能是否是相似甚至保守. 尽管在不同物种及生殖细胞发育的不同阶段, 生殖颗粒的形成及功能都不甚明了, 但不同物种包括哺乳类的生殖颗粒无论在形态上还是在分子组成上彼此都具有很大的相似性(表 1)^[8]. 这一点也正表明了在不同物种生殖细胞发育过程中生殖颗粒的功能的保守性. 事实上, 生殖颗粒的特征性RNA-蛋白复合体与细胞的一些基本生理活动有关, 包括RNA的代谢、

表 1 调控鱼类生殖细胞发育的相关基因

基因	产物	表达及功能	参考文献
生殖质和生殖细胞形成			
<i>vasa(vas)</i>	DEAD 盒 RNA 螺旋酶	生殖质的聚合, PGC 的形成及迁移, 核周蛋白	[17,18]
<i>Ziwi</i>	与 RNA 互作的蛋白	生殖细胞的维持	[19]
<i>tudors</i>	含 Tudor 域的蛋白	种间高度保守的生殖质成分	[20]
<i>germ cell-less</i>	核膜蛋白	PGC 的形成及转录抑制	[21]
<i>bucky ball</i>	斑马鱼新的基因	生殖质的聚合, BB 和 PGC 的形成	[16]
<i>dazl & boule</i>	RNA 结合蛋白	人类男性不育基因 <i>DAZ</i> 基因家族成员	[10,11,22]
<i>nanos 1~3</i>	结合 RNA 的锌指蛋白	青鳉鱼中存在 4 个 <i>nanos</i> 基因, <i>nanos2</i> 和 3 是生殖细胞标记基因, 而 <i>nanos1a</i> 和 b 不是	[23]
生殖细胞转录休止和存活			
<i>nanos1</i>	结合 RNA 的锌指蛋白	斑马鱼 <i>nanos</i> 基因为青鳉鱼 <i>nanos3</i> 的同源物, PGC 的迁移和存活及卵子的成熟	[24,25]
生殖细胞迁移			
<i>Staufen</i>	双链 RNA 结合蛋白	在斑马鱼, 通过调节 <i>vasa</i> 基因的翻译而作用于 PGC 的迁移过程	[26]
<i>dead end</i>	RNA 结合蛋白	在鱼类, PGC 的迁移及存活	[27,28]
<i>hmgcr</i>	羟甲基戊二酰辅酶 A 还原酶	吸引 PGC 迁移至中胚层	[29]
<i>quemao(qm)</i>	geranylgeranyl 基磷酸合成酶	吸引 PGC 迁移至中胚层	[29]
<i>Igf</i>	类胰岛素生长因子	参与调控 PGC 的迁移过程	[30]
<i>Pik3</i>	3-磷脂酰肌糖激酶	在斑马鱼中, 影响 PGC 的迁移速度	[31]
<i>sdf1a/cxcr4b</i>	基质驱化因子 1a/受体	PGC 的化学趋向性	[32,33]
<i>cyclopamine</i>	Hedgehog 信号阻滞子	通过其靶标分子 Smo, 影响 PGC 能动性 & 黏附性	[34]
<i>gai</i>	G 蛋白	PGC 的迁移	[31]
<i>ggt1</i>	geranylgeranyl 基转移酶	吸引 PGC 迁移至中胚层	[29]
<i>puf-A</i>	含 6-Puf 域的 RNA 结合蛋白	PGC 的形成及迁移	[35]

反转座子的调控及与线粒体的互作等^[7].

作为鱼类生殖细胞的第一个标记基因, 斑马鱼 *vasa* 基因的分离鉴定开创了鱼类生殖细胞研究的新纪元, 即应用分子生物技术研究生殖细胞代^[17]. 随后, *vasa* 基因在其他一些鱼类中也得以克隆分析^[36,37]. 因为 *Vasa* 蛋白序列在物种进化中高度保守, 因此可以用同一个 *Vasa* 蛋白抗体, 通过免疫组化的方法来检测许多不同物种的 *Vasa* 蛋白的表达情况. 举例来说, 用银鲫 *Vasa* 重组蛋白做抗原制备了抗银鲫 *Vasa* 的抗体 (α *Vasa*), 此抗体就能同时检测银鲫和其他几种鱼类的 *Vasa* 蛋白在雄性或雌性生殖细胞中的表达及分配情况^[38]. 值得一提的是, *Vasa* 蛋白在生殖细胞中特异表达且具有独特的分布模式, 即 *Vasa* 蛋白集中分布在生殖细胞的生殖质颗粒里, 这一点类似于青鳉鱼的情况^[39], 与老鼠 *Vasa* 蛋白的表达分布情况也很相似^[40].

目前, 在鱼类中得以鉴定分析的生殖细胞标记基因日益增多, 包括 *nanos*, *dnd*, *dazl*, *sdf1* 和 *cxcr* 等 (表 1). 并且通过原位杂交或免疫组化的方法可以很清楚地

检测到 PGC (图 1)^[11,38,27]. 然而, 如此前综述^[2]所提到, 底鳉 (*Fundulus heteroclitus*) 胚胎移植实验表明, 在胚盾发育中期, PGC 可能是由胚盾后部的细胞发育而来, 而非胚盾腹面和侧面的细胞, 尽管这些部位同样分布有表达 *vasa* 基因的细胞. 这种实验偏差证明了大部分而非所有被 *vasa* RNA 标记的细胞将会发育形成有功能的生殖细胞. 因此, *vasa* 基因的表达可能只是鉴定 PGC 的必要条件, 而非充分条件. 所以同时用多种基因来标记 PGs 将有助于避免实验偏差. 鉴于此要求, 用了几种生殖细胞标记基因来标记青鳉鱼 PGC^[24] (图 1(A)~(C)). 更为重要的是, 本研究组最近在青鳉鱼中成功发展了双色荧光原位杂交的方法. 这种方法能同时用两种生殖细胞特异基因来标记 PGC (图 1(D)~(E)), 从而能更清楚、准确地观察和追踪 PGC 的发育. 且双色荧光原位杂交有望进一步发展成多色荧光原位杂交法 (徐红艳、洪云汉, 未发表), 为在细胞和分子水平上更深入细致地研究生殖细胞的动态行为提供更加准确可靠的信息.

原位杂交观察的对象是固定后的死材料. 而转

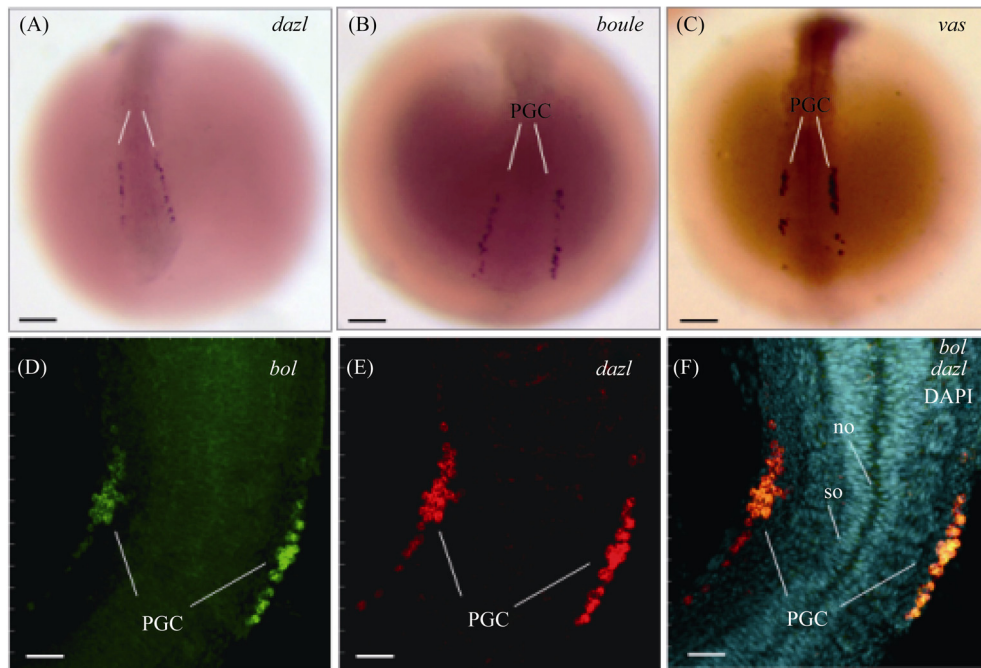


图 1 通过化学和荧光显色原位杂交的方法观察青鳉鱼 PGC

(A)~(C) 用 *Obol*, *Odazl* 及 *Olvas* 反义 RNA 探针进行原位杂交且信号用碱性磷酸酶化学法显色检测第 18 期胚胎 (红至紫色). 在第 18 期胚胎中, PGC 在胚胎体轴两侧呈簇分布. 顶面观, 前部朝左. 标尺: 100 μ m; (D)~(F) 用几种反义 RNA 探针进行原位杂交且信号用荧光化学法显色检测第 27 期胚胎. (D) *Obol* RNA 探针; (E) *Odazl* RNA 探针; (F) *Obol*, *Odazl* 及 DAPI 染核 (蓝色) 3 种信号的叠加.

So: 体节; no: 脊椎. (D)~(F) 胚胎头部朝上. 标尺: 50 μ m. 实验及照像方法参考文献^[11]

基因动物技术, 如利用组织和细胞特异性的启动子来驱动报告基因的特异性表达以实现组织和细胞的活体标记与识别, 则可以标记动物活体的PGC, 这一技术得到了愈来愈多的关注与应用。

如有人制备了PGC特异的半乳糖糖苷酶(LacZ)转基因老鼠和制备了携带被*OCT4*基因启动子驱动的绿色荧光蛋白(GFP)转基因老鼠^[41], 使得GFP在老鼠PGCs中特异表达。在鱼类, 已有人制备了VASgfp(绿色荧光蛋白)或VASrfp(红色荧光蛋白)转基因鳉鱼、青鳉鱼和斑马鱼以及NOSgfp青鳉鱼^[18]。

虽然这种生产转基因动物的技术为研究或操作活体生殖细胞提供了极大的方便^[42], 但仍然有其难以避免的局限性。通常, 一个外源基因会在受体染色体上随机整合而形成嵌合体, 而外源基因无法控制的随机整合通常会导致外源基因不可预知的表达; 同时, 在很多物种中很难鉴定并获得有功能的基因启动子。因此, 虽然动物转基因技术在过去 10 年里已经得以快速地发展, 但到目前为止, PGC标记的转基因鱼仍仅限于鳉鱼、青鳉鱼和斑马鱼等模式鱼。

同时, 近年来一个全新的快速标记活体PGC的技术在斑马鱼得以建立, 即把融合了生殖细胞特异基因 3'端未翻译区(3' untranslated region, 3'UTR)的报告基因信使RNA(mRNA)注射到早期胚胎^[24,43], 使报告基因在胚胎PGC中特异表达, 从而达到标记活体PGCs的目的。众所周知, RNA在细胞间或细胞内的分配定位是由其自身的顺式因子所决定的。这类顺式因子普遍存在于基因 3'UTR, 用于结合相应蛋白因子实现对该RNA分布、稳定性和转译的调控。例如, 斑马鱼*vasa*基因的 3'UTR就有一段保守序列, 在*gfp-vas* 3'UTR融合RNA中, 可使*gfp-vas* 3'UTR特异性地在斑马鱼甚至爪蟾的PGC中翻译表达。同样地, *gfp-nos* 3'UTR特异性的PGC分布和表达不仅见于斑马鱼, 也可直接应用到其他鱼类青鳉^[44,45]。同时, 基因 3'UTR使mRNA的稳定性在细胞间有差异, 是mRNA细胞特异性或细胞内区域化定位的另一重要机制。在果蝇中^[46], 有人已证实了mRNA的降解在Hsp83 RNA的定位过程起重要作用, 这种机制同样存在于*nanos* RNA的定位过程。与此类似, 斑马鱼*vasa*基因^[47]和*nanos1(nos1)*基因^[48]的mRNA在体细胞中会被降解, 而在含有GP的细胞中变得稳定且被翻译表达。

mRNA定位序列及定位机制的保守性使得鉴定生殖颗粒异基因且用其追踪鱼类活体PGC变得更方便可行^[49]。这种技术被称为RNA定点表达(localized RNA expression, LRE), 其运用的是体外合成RNA的定位表达, 而不是转基因品系的外源基因表达。LRE除了简单快速外, 还有另外的优势, 即多效性。来自某一物种的标记PGC的RNA通常可直接用于标记其他鱼类的PGC, 这一点在斑马鱼中得以证实^[44,45]。因此, LRE被广泛运用于标记PGC以研究胚胎发育过程中的细胞发育动态过程, 如细胞的迁移, 增殖及存活^[45,50]。总体说来, 这一实验技术的建立及应用, 使得鱼类生殖细胞生物学和繁殖技术的研究得到了长足的发展与提高。

显然, 转基因技术和 LRE 技术在标记鱼类 PGC 过程中, 各具优劣, 可互为补充。与转基因技术相比, LRE 具有周期短及用途广等优势。然而 LRE 的基本原理是注射到胚胎的 RNA 在不同细胞间存在稳定性及翻译表达的差异性, 从而使报告基因进行细胞特异表达。这种特异表达通常只有在 PGC 形成后才能体现出来, 而在 PGC 形成之初却很难被检测到。注射到每个胚胎的 RNA 量需要精确控制才能使一组供观察检测的材料具可比性; 每次实验注射的胚胎数量会有限, 且胚胎本身的个体差异性会影响到信号的相对强度(PGC 与体细胞相比)和绝对强度(如不同胚胎间的 PGC 相比)。迄今为止, LRE 多用来标记鱼类胚胎发育早期阶段的 PGC。而转基因鱼途径则可产生大量的 PGC 被标记的胚胎, 这些 PGC 的标记信号强度也会较为一致, 并能在生殖细胞发育过程中持续表达, 以便于观察生殖细胞在整个胚胎发育过程的形成、迁移和分化, 甚至在胚后发育阶段的分化及成熟。总之, 各种标记研究 PGC 方法的建立使得对生殖细胞发育的追踪研究变得更容易、更直接, 从而促进了参与生殖细胞发育过程的相关基因的功能研究。

2 基因功能分析的方法

一旦GP通过分子交互作用参与生殖细胞的形成和迁移过程, 这一神秘面纱在鱼类生殖细胞发育过程被揭开, 鱼类及其他GP的生物的生殖细胞的发育机制也就变得更容易理解了。有人最早报道了一种

实用的常规实验技术^[43], 通过在斑马鱼中进行生殖细胞移植使得合子致死突变被传递到下一代. 这一技术使受体生殖细胞完全由供体PGC取代, 从而研究合子突变的母源效应. 同时, 他们采用一种消减基因表达的方法(注射基因的反义morpholino寡核苷酸)以减少一个生殖质分子, *dead end(dnd)*基因的翻译表达, 他们发现减少*dnd*基因的翻译表达会阻滞PGC在形成后集中到胚盘深处, 从而导致PGC丧失能动性且随后无法进行主动迁移. 接着PGC便会死亡, 而体细胞发育不会受到影响^[43,51].

通常, 基因表达消减试剂应该达到序列高度特异的标准, 而且对胚胎要有最小的副作用(即最小非特异性作用). 目前, 有 3 种主要消减基因表达的方式, 包括phosphorothioate-linked DNA(S-DNA), short interfering RNA(siRNA)和Morpholino. 由于其具有高特异性、在许多生物体系中稳定及目标高度可预见性等特性, Morpholinos在疾病治疗和胚胎发育研究应用中占有绝对的优势. 另外鱼类的卵和胚胎易于操作, 其受精和胚胎发育都是体外进行的且透明可见. 如此一来, Morpholinos这一基因消减方法就很快在鱼类生殖细胞发育及其基因功能研究中得以应用并快速发展. 结合其他的分子细胞生物学技术, 如用生殖细胞特异分子标记活体PGC技术和细胞移植技术, 消减基因表达的技术被广泛应用于生殖细胞各发育阶段相关基因的功能研究, 也因此开辟了研究鱼类生殖细胞发育机制的新道路^[18,43,32,52].

3 生殖细胞的发育

3.1 鱼类 PGC 的形成

生殖细胞与体细胞的分离发生在胚胎发育早期. 不同生物的生殖细胞形成模式不同, 综合在所有模式生物中的研究, 研究者们认为生物界至少存在两种生殖细胞形成模式^[53], 即“先成论”和“后成论”模式. 在许多生物, 像果蝇中^[54](图 2)、线虫类和无尾两栖动物^[11]中, 生殖细胞在胚胎发育早期与体细胞的分离形成, 是由特异的胞质决定子决定的. 这些决定子定位在“极质”或“生殖质”中, 然后被分配到pPGC, 这些细胞必定能发育形成生殖细胞, 这就是所谓的“先成论”模式. 在有尾两栖动物^[55]和羊膜动物, 如鸡^[56]和老鼠^[8]中没有发现GP, 它们的生殖祖细胞是

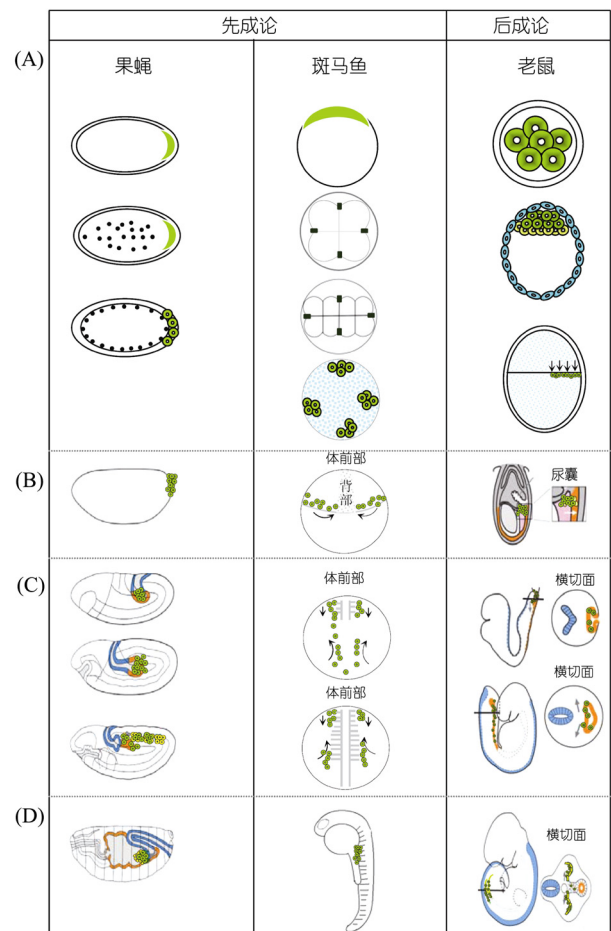


图 2 PGC 在果蝇、鱼类及老鼠 3 种模式动物中的形成和迁移过程

(A) PGC 的形成过程; (B) PGC 的迁移启动; (C) PGC 迁移穿过各种体细胞组织; (D) PGC 到达性原基. 生殖质和PGC均用绿色表示.

本图根据文献^[8,31,57]绘制而成

在胚胎发育早期由其他细胞诱导形成的, 这就是“后成论”模式^[8]

不同生物PGC的特化形成时间是完全不同的. 在老鼠胚胎中, 在八细胞时期胚胎中的所有细胞都是全能的. 直到 16 细胞期胚胎, 其内部细胞组成内细胞团(Inner cell mass, ICM), 其外部细胞形成滋养外胚层, 将会发育成胎盘. 胚胎着床后, ICM便进入多能性外胚层内发育. PGCs最早被发现于 6.5 天的胚胎(原肠早期), 其出现在最靠近胚外中胚层的外胚层区域^[57]. 在果蝇和线虫中, 生殖细胞在胚胎发育开始之前就已预先形成, 而在爪蟾中生殖细胞就在原肠开始的不久前形成^[58]. 关于鱼类PGC的发育, 生物

学家们已经在几种实验室模式鱼中进行了广泛的研究。早在 20 世纪初, 就有人采用光学显微镜观察研究PGC的形态特征, 以致发现不同鱼类的生殖细胞起源于不同的胚层, 甚至在同一物种, 不同的观察者也会得到不同的结论^[2], 因此仅通过形态观察很难准确界定鱼类PGC在胚胎发育过程中形成的确切时间及位置。其实, 唯一关于PGC特异区域定位的实验证据是由底鳉鱼胚盾移植实验所提供, 其实验结果表明在胚胎原肠中期, 生殖细胞的祖细胞定位于胚盾后部, 而不是胚盾的侧、腹部^[2]。直到鱼类第一个生殖细胞标记基因*vasa*基因在斑马鱼中得以分离鉴定, 生物学家们对鱼类生殖细胞的形成便有了新的见解。他们发现斑马鱼PGC的形成同样由母源生殖质决定子所决定, 与此同时, *vasa* RNA通常定位于 2 和 4 细胞期胚胎的分裂沟, 且在随后的早期卵裂胚胎中, *vasa* RNA仅被分配到 4 个细胞中, 直到 4000 细胞期的胚胎, *vasa* RNA阳性细胞数增加至 12~16 个细胞^[17], 这一现象说明鱼类生殖细胞与体细胞的分离在胚胎发育早期就已发生, 而且最早的那 4 个细胞就是pPGC。

就RNA的细胞分布而言, 青鳉鱼*vasa*与斑马鱼*vasa*在卵裂期胚胎中的表达极为不同, 青鳉鱼*vasa* RNA广泛地分布于胚胎的许多细胞中, 直到原肠期胚胎才表现为PGC特异分布^[36]。这种特征与PGC先成论形成模式不相符, 但就PGC被检测到时间而言, 青鳉鱼与底鳉鱼很相似。

如果说*vasa*基因及其同源物的早期表达位置确实能作为PGC形成时间和位置的标志, 那么, 青鳉鱼*vasa* RNA的分布模式则意味着在青鳉鱼中存在一种不同的PGC形成机制及不同的形成时间。否则, 这种*vasa* RNA分布差异将只能归因于*vasa*基因在真骨鱼类进化过程中的表达模式发生了变异。事实上, 青鳉鱼的*boule*和*dazl*的表达与其*vasa*的很相似, 即缺乏非对称性分布(图1)。另一方面, 青鳉PGC呈现的是细胞自主特化的方式, 即体现的是先成论的特征。为此, 是否可推测斑马鱼PGC的现成模式同样也适用于青鳉及其他鱼类; 或者, 在其他鱼类, 如青鳉中存在一种新的PGC形成模式。因此在其他鱼类, 包括青鳉中检测分析更多的GP基因的表达及功能将为研究鱼类PGC形成模式提供更多有价值的信息。

3.2 鱼类 PGCs 的迁移

(1) 迁移途径。在大多数动物胚胎的发育早期阶段, 其PGCs的起源位置与其性腺体细胞组织相距很远。因此, 这些细胞必须穿过各种体细胞组织, 经过“长途跋涉”到达生殖脊。目前关于PGC的迁移过程, 在老鼠、鸡、果蝇和斑马鱼等模式生物中研究得比较清楚^[54,61](图 2)。且研究结果显示PGC的迁移途径至少有两种: 其一是以鸡为代表的禽类依赖胚胎血液循环系统的迁移; 其二是依赖胚胎原肠形成的迁移途径。目前除了禽类以外的其他所有被研究过的生物几乎都采用后者。

最初只是利用组织学和形态学标准来进行鱼类PGC的迁移研究, 结果显示鱼类PGC(图2)与果蝇和老鼠的相似, 也是依赖胚胎原肠形成进行迁移的^[2], 而且最近利用现代分子标记、转基因及LRE标记技术对鱼类PGC迁移进行追踪研究也证实了这一点。斑马鱼PGC的迁移是研究鱼类PGC迁移的最好例证, 斑马鱼约含1000个细胞的胚胎有4个PGC, 并呈方形分布在胚胎细胞中, 但其相对于胚胎背腹轴是随机分布的。而一旦胚胎细胞增殖起始, 其PGC便在胚胎边缘区域形成对称的四簇细胞(约4000个细胞的胚胎)。随着胚胎发育的进行, PGC会顺次经过6个步骤的迁移而形成排列在胚盾两侧的细胞群, 这些细胞最终将到达性腺组织^[2,61]。在青鳉鱼, 也有人作了类似的PGC迁移示意图^[18]。

(2) 调控PGC迁移的分子或基因。随着如上所述的各种生物技术, 如标记活体PGC的技术及各种基因功能分析的方法在鱼类研究中的成功应用, 使科学家们在阐述鱼类生殖细胞迁移过程涉及的基因及信号通路方面取得了巨大进步。研究发现鱼类PGC的迁移依赖于某些生殖质组分及生殖质组分的完整性。例如, 消减某些特定生殖质成分如*nanos*^[24]和*dnd*^[28]的翻译表达, 会导致PGC无法正确迁移, 而发生迁移异位且最终死亡^[59], 青鳉鱼*vasa*基因是其PGC迁移过程中调控细胞自主移动的因子之一^[18]。

斑马鱼迁移PGC通常可进行被动转移和主动迁移。PGC的被动移动是靠胚胎的原肠作用进行的(如胚盘的下包内卷过程); 主动迁移则依赖于细胞自身的能动性, 这一点通过鉴别斑马鱼原肠胚PGC的伪足形成和动态变化而得以证实。在经过一系列细胞自主

活动后(在授精后4~5天之间), PGCs便由圆形的、不能动的细胞变成了具极性的且能迁移的细胞^[59]。尽管对PGC早期迁移起始活动的分子细胞基础仍不了解, 但至少有两个基因参与了PGCs迁移之前的起始步骤。其中一个编码3-磷脂酰肌糖激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)。抑制PI3K的表达, 会导致PGC的细胞极性减弱且伪足的稳定性差, 细胞移动变慢^[31]。另一个基因则是*dnd*, 是在脊椎动物中新发现的一个GP成分, 其编码一种核糖核酸结合蛋白, 这种蛋白是PGC伪足形成和能动性获得的必需因子, 因此Dead End也在PGC的迁移过程中起非常重要的作用^[28]。对鱼类PGC而言, 建立或维持细胞能动性似乎是种细胞自主调节过程, 因为PGC即使在进行体外细胞培养过程中仍具细胞能动性^[18,59]。所以鉴定及确定这些基因的目标RNA分子和生物化学功能将了解细胞拥有能动性和细胞起始主动迁移的分子机制提供极为有意义的新观念, 更可为在生殖细胞工程中操作控制细胞各种活动提供有力手段。

一旦迁移起始, PGC的定向迁移行为依赖于细胞的自主和非自主活动, 且在胚胎原肠形成过程中, PGC被转移至胚胎前部和侧部的中胚层边缘^[60]。随着胚胎体节的形成, 这些PGC继续朝中胚层边缘的中间区域迁移, 直到受精 24 h后的胚胎, 这些PGC呈线形排列于胚体体轴两侧至卵黄延伸前部末端(在第 8~10 体节之间)。同时, 与果蝇的类似, 鱼类PGC的迁移同样会受到一些化学趋化因子的引导, 这些化学趋化因子通过排斥和吸引细胞而起作用。最近有研究显示, 斑马鱼G蛋白偶联受体CXCR4b^[32,33]及其配体基质细胞趋化因子 1(chemotactic factor stromal cell-derived factor-1, SDF-1a)^[32], 引导PGC朝胚胎性原基进行定向迁移。显然, SDF-1a和CXCR4b绝非引导斑马鱼PGC定向迁移的唯一化学趋化配体-受体对, 因为PGCs在迁移过程中会途经许多大量表达SDF-1a的组织, 但避开其他一些同样大量表达SDF-1a的组织, 最终到达其目的地^[62]。因此, 在斑马鱼中必定还存在有其他的吸引子和排斥子来协助PGCs的定向迁移。最近, 有人报道了SDF-1 的另一个受体CXCR7, 此受体也是PGCs进行正确迁移的关键因子之一, 但其功能与CXCR4 的截然不同: CXCR4 转译SDF-1 的极性分布成引导PGC迁移的信

号, 然而CXCR7 则为一种具高亲和的诱导受体, 其通过调控细胞周围化学趋化子的分布形态而协助PGC的定向迁移^[63]。最近, 青鳉鱼PGCs的迁移机制同样得以研究报道。与斑马鱼相比, 青鳉鱼PGCs的迁移活动似乎是由SDF1a和SDF1b二者的联合作用所引导。在此过程中, SDF1 两个同源基因的表达模式只有部分重叠而且它们相互协作以使PGCs进行正确迁移^[45]。总之, 参与调节细胞迁移过程的趋化因子受体会有很多, 且在不同的生物体系, 这些趋化因子的作用也会是截然不同的。

此外, Thorpe等人^[29]发现了另一个PGCs迁移通路, 其与sdf-1/cxcr通路完全不同: 羟甲基戊二酰辅酶A还原酶(hydroxymethylglutaryl coenzyme reductase, HMGCoAR), 是胆固醇合成过程的关键酶, 其活性是为 geranylgeranyl 基转移酶 (geranylgeranyl transferase, GGT1)提供底物, 而GGT1 激起蛋白质的特异性戊烯化, 同时PGCs的正确迁移需要蛋白质的特异性戊烯化。因此抑制斑马鱼HMGCoA的表达会影响GGT1 的活性且随后会阻碍PGCs的正确迁移, 这一PGCs迁移通路同样在果蝇中也有报道^[64]。

同样, 在老鼠中, 生殖细胞在与体细胞分离形成后不久, 很快就变成可动的、能定向迁移的细胞, 且其定向迁移的起始需要中胚层表达的IFITM1 的排斥活性^[65]。另外, SDF-1 或CXCR4 失活的老鼠, 其生殖细胞不能与生殖脊体细胞合并形成完整的生殖腺^[66,67]。而且, 最近的研究显示, 在老鼠和鸡中, SDF-1 是在PGCs迁移的第二阶段而不是在其迁移的早期阶段行使功能, 即在PGCs完成其最后迁移步骤时SDF-1 才会起作用。也就是, PGCs在迁移穿过鸡胚血管内皮或老鼠肠上皮迁移至未来生殖腺的过程才需要SDF-1 的作用^[56]。与此不同的是, 鱼类SDF-1a在PGCs的整个迁移过程中都起引导作用^[32]。尽管在不同的物种中, SDF-1a作用于生殖细胞迁移的不同阶段, 但其在迁移过程中行驶的功能在物种间是进化保守的。因此, 对鱼类PGCs的研究发现将了解其他脊椎动物, 包括人类生殖细胞的迁移提供重要线索。更重要的是, 只有PGCs定向迁移至生殖脊原始体细胞, 并与之合并才能形成有功能的生殖腺。PGCs迁移失败的胚胎最终会发育为雄性不育个体^[51,68], 这意味着生殖细胞的迁移将为人类了解动物的繁殖能力赋予新

的见解。

(3) PGC为了解各种细胞迁移机制的理想模型。细胞迁移活动对许多生物学过程都是很重要的,包括器官形成、免疫反应、创伤修复以及肿瘤转移等。不同生物和不同细胞体系的细胞迁移过程,其潜在的分子机制会具有许多共同特征。普遍认为,来自模式生物或者细胞体系的研究能了解人类各种细胞迁移活动提供信息。就此而言,鱼类PGC的迁移活动为分析各种生物形态发育过程中发生的细胞迁移动力学作用提供了一个极好的研究体系。例如,趋化因子SDF-1为鱼类PGCs正确迁移所必需^[32,52]。而事实上,SDF-1同样是人类淋巴细胞和单核细胞迁移的一个诱导剂^[69]。除了调节器官形成和体内平衡等生物过程外,有证据显示SDF-1和CXCR4还参与肿瘤的致病和转移^[70]以及感染或炎症的发生过程^[71]。因此,正在进行的关于鱼类PGs迁移的研究,将会为更好地了解正常和非正常细胞迁移过程提供更有价值的信息。

4 生殖细胞与生殖方式

在较低的脊椎动物中存在着各种生殖方式,从完全单性生殖到典型的两性生殖。有些特殊的物种,如一种被称作“异育银鲫”(Carassius auratus gibelio)的欧洲鲫鱼就行驶一种较为独特的孤雌生殖方式,即“异精雌核发育”(alogynogenesis),这种鱼的种群组成一般以雌性个体为主,也含少数的雄性个体,且这些雄性个体也能产生精子并进行正常的两性生殖。然而,不同于纯粹的两性生殖也不同于纯粹的孤雌生殖动物,异育银鲫能在两性和单性两种生殖方式之间进行转换。其在自然条件下进行雌核发育,同样在用近缘物种如鲤鱼的精液对其卵子进行人工异精授精时,其卵也能进行雌核发育^[72]。令人惊异地是,在进行同源精子授精时,这种鱼也能进行正常的两性生殖,来自父本和母本的配子形成合子。但生物对某种生殖方式的选择最终依赖于生殖细胞的作用或行为方式,这样使得对这种独特鱼类生殖细胞的行为进行研究变得更为有意义。例如,我们克隆分析了一些生殖细胞标记分子且对这些标记分子的RNA和蛋白表达模式进行了研究,这些标记分子包括vasa^[38]和dazl^[10]。最近,我们在银鲫中还发现了一个新的卵

母细胞特异的组蛋白H2A变体^[73],这个发现是否为银鲫的特殊生殖方式和核染质结构之间的联系提供了新线索值得关注。

5 生殖细胞的操作技术

对生殖细胞发育的了解为生殖细胞工程提供了理论基础。其中一种细胞操作技术就是进行种系细胞移植(germ cell transplantation, GCT)。GCT技术首先在鸡^[74]和老鼠^[75]中被建立。最近,GCT已经被广泛运用于其他许多动物,包括一些家畜^[76],鸟类^[77]和鱼类^[68]。由于转基因鱼^[78]的易得性及鱼类本身的一些独特性,如其行体外受精、胚胎发育透明及发育时间短等特性,GCT技术很快就被成功地应用于鱼类研究而且得到了迅速发展及改良^[79,80]。

鱼类GCT首先在虹鳟鱼中得以报道,此实验是移植精巢细胞混合物到同基因型个体的未成熟性腺中,而在此过程中供体生殖细胞在受体中的精子生成效率很低^[81]。后来有人移植流式细胞仪筛选过的PGCs到胚胎或鱼苗的PGCs迁移通路中,这样供体生殖细胞的在受体精巢中的精子生成效率就得到了大大的提高^[82,83],且移植的同基因型或异基因型的精原细胞也都能与受体性腺相融合^[83,84]。最近,在大马哈鱼中的细胞移植实验研究,指明了通过腹腔注射使精原细胞成功移植到受体性原基的两个首要条件:(i)受体鱼苗的年龄会影响供体PGC或精原细胞的融合效率(colonization efficacy);(ii)只有A型精原细胞具有与受体性原基融合的能力^[82,84]。与此同时,鉴定各种动物,特别是哺乳类精原细胞膜标记分子以用于筛选富集精原细胞的研究也就变得越来越有意义了^[85]。同样Notch1似乎是鱼类精原细胞膜标记分子之一^[86]。

6 生殖细胞的体外培养

就基础生物学和生殖细胞工程研究而言,生殖细胞的体外培养具有很大的潜在意义。事实上,有很多研究者曾尝试过对哺乳动物、鸡和鱼的PGCs及成体生殖细胞进行体外培养。Matsui等人^[87]报道了老鼠PGC的培养,而且这些培养的细胞可形成胚胎生殖细胞。最近,鸡PGCs的体外培养也已经有人报道^[88]。

在鱼类中, 有人用流式细胞仪筛选分离了虹鳟PGCs并进行了短期的体外培养(表 2, 2000 年, Yashizaki 等). 最近, Fan等人^[89]制备了*vasa*基因启动子调控的红色荧光转基因斑马鱼, 且用流式细胞仪筛选分离了斑马鱼PGC并进行了为期 4 个月的体外培养. 这些研究证明了生物界已能够从多种脊椎动物包括鱼类分离PGC并进行体外培养.

大多数动物像鱼一样, 在其整个成体生活史, 精巢生殖细胞都能发育生成精子, 把遗传信息传递到下一代. 一旦启动精子生成过程, 精巢生殖干细胞或原始精原细胞便恢复增殖能力且发育成A型精原细胞, 也就是雄性生殖干细胞, 这些细胞能自我更新以

维持个体干细胞库或通过减数分裂过程分化形成成熟的精子^[90]. 因为动物成体精巢拥有生殖干细胞, 所以有很多人进行了精巢细胞, 包括精巢生殖细胞的分离培养实验. 为此精巢细胞培养也在老鼠模型中被广泛尝试, 且一些老鼠成体精巢细胞系已得以建立^[91]. 有人报道了经过病毒转染维持细胞高端粒酶活性, 而进行的老鼠精巢细胞培养且阐明了病毒转染对细胞体外稳定培养的必要性^[92]. 在青鳉鱼中, 本课题组在精巢生殖细胞的培养研究中取得了突破性进展, 成功证实了能从青鳉鱼成体精巢组织分离正常精原细胞且不需要进行高端粒酶转染就能进行体外稳定培养(表 2, 2004 年, Hong等人); 同样, 有课题

表 2 鱼类生殖细胞研究史上的重大事件^{a)}

年份	实验室	事件	论文发表
1982	Hamaguchi S	Microscopic study on PGC migration in medaka	Cell Tissue Res, 227(1): 139—151
1996	Hong Y	Development of embryonic stem cell(ES) lines from the medaka	Mech Dev, 60(1): 33—44
1997	Olsen L C	Isolation of zebrafish <i>vasa</i> and demonstration of <i>vasa</i> RNA as a germ cell marker in fish	Mech Dev, 66(1-2): 95—105 Development, 124(16): 3157—3165
1998	Hong Y	Production of ES cell-derived medakafish chimeras	PNAS, 95 (7): 3679—3684
2000	Yoshizaki G	Production of transgenic rainbow trout showing germ cell-specific expression of green fluorescent protein driven by the rainbow trout <i>vasa</i> promoter	Int J Dev Biol, 44(3): 323—326
2001	Raz E	Experimental perturbation of PGC development in zebrafish by using morpholino knockdown, demonstrating that nanos-related gene is essential for PGCs	Genes Dev, 15(21): 2877—2885
2002	Schier A F	Germline replacement by blastomere transplantation & production of maternal-zygotic mutant zebrafish	PNAS, 99 (23): 14919—14924
2002	Raz E	Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1	Cell, 111(5): 647—659
2002	Knaut H	An evolutionary conserved region in the <i>vasa</i> 3'UTR targets RNA translation to the germ cells in the zebrafish	Curr Biol, 12(6): 454—466
2002	Yoshizaki G	Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying <i>vas</i> : GFP	Biol Reprod, 67(4): 1087—1092
2002	Raz E	Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target	Development, 129(1): 25—36
2003	Yoshizaki G	Generation of live fry by PGC transplanyation in rainbow trout	Biol Reprod, 69(4): 1142—1149
2003	Raz E	dead end, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival	Curr Biol, 13(16): 1429—1434
2004	Hong Y	Establishment of a normal medakafish spermatogonial cell line	PNAS, 101(21): 8011—8016
2004	Yoshizaki G	Surrogate production of trout in salmon by transplantation of trout GFP-PGCs into young salmon	Nature, 430(7000): 629—630
2005	Raz E	Female-to-male sex reversal by PGC ablation	PNAS, 102(11): 4074—4079
2006	Yoshizaki G	Surrogate production of trout males and females by transplantation of testicular cell preparations into young salmon	PNAS, 103(8): 2725—2729
2007	Yoshizaki G	Production of “pure” trout offspring by transplantation of trout PGCs into young triploid salmon	Science, 317(5844): 1517
2009	Hong Y	Generation of the world's first semi-cloned animal called Holly in medaka by transplanting a haploid cell culture nucleus into a normal, non-nucleated egg	Science, 326(5951): 430—433

a) 进行鱼类生殖细胞研究的几个主要实验室的联系方式如下: Raz E: eraz@gwdg.de; Hong Y: dbshyh@nus.edu.sg; Yoshizaki G: goro@tokyo-u-fish.ac.jp

组建立了正常老鼠精原细胞培养体系^[93]。生殖细胞培养能为生殖细胞生物学提供体外研究体系, 且为生殖细胞移植提供坚实的细胞工具。为此, 已成功报道的鼠胚胎干细胞系通常用来制备生殖细胞转基因动物, 从而通过生殖细胞嵌合体的形成产生基因敲除老鼠模型。

鱼类胚胎干细胞的培养已在许多模式种进行了大量的尝试。到目前为止, 只有在青鳉鱼, 这一较低等脊椎动物的独特代表中获得了稳定的、可形成胚胎嵌合体的胚胎干细胞系^[94,95]。除此之外, Ma等人^[96]报道了体外短期培养斑马鱼胚胎干细胞, 而且这种短期培养细胞能嵌合生成生殖细胞。在几种模式鱼中取得的喜人进展激起了研究者在养殖鱼类中进行同样尝试的兴趣。为此, Chen等人^[97,98]报道了几种海水鱼胚胎干细胞样细胞系的建立。接下来的研究就是提高体外培养后的胚胎干细胞在受体胚胎中形成生殖细胞的能力。另外, 关于鱼类生殖细胞的研究分析数据能为胚胎干细胞介导的生殖细胞遗传过程提供直接的理论依据。广义上讲, 早期胚胎细胞或胚胎干细胞移植获得生殖细胞嵌合体在本质上属于GCT的一种形式, 因为早期胚胎细胞是一个未定的细胞集合, 其中就含有少量PGC; 而且胚胎干细胞也被认为具有形成生殖细胞的潜力^[99~101]。

7 生殖技术的革新

最近, 青鳉鱼单倍体胚胎干细胞系已被成功获得且被用来测试研究新的繁殖技术^[102]。在正常的繁殖过程中, 授精会使来自精子和卵子的两个减数分裂单倍体细胞核融合成合子核。为此人工模拟授精就是胞质注射精子已达到的精核和卵核相遇而融合的技术, 这项技术已被日益广泛地用于治疗某些男性不育症, 此类不育男性通常具有生殖细胞且能进行减数分裂但不能进行减数分裂后的变态成熟过程, 所以缺少有功能的、成熟的精子^[103]。此外, 通过把二倍体体细胞核移植入去核卵母细胞而生成的胚胎能产生可育后代, 这种技术已经在蛙类、鱼类及哺乳类中建立^[104~106]。这种技术为动物克隆、人类胚胎干细胞的获得及分析细胞核的再程序化等实验研究提供了有力工具^[104]。然而, 因为这种克隆技术的成功率低且涉及到产生的后代会只是细胞核捐献者的复制品等伦理问题, 所以关于克隆技术是否可用于辅助人类生殖, 这一点一直是一个具有争议的问题。

最近, 有人提出了一项新的生殖技术, 是通过制备嵌合卵来辅助缺少任何阶段生殖细胞的不育病人完成其生殖活动的辅助生殖技术^[107]。这项新的生殖技术, 也被称作半克隆技术, 是通过核移植技术使一个单倍体体细胞核与一个配子单倍体核在卵子中相融合成合子核。这种技术不仅保证了父母双方对后代遗传信息的贡献, 而且能像正常受精发育一样产生一个新的、不可预知的父母双方遗传特性的结合体。因为半克隆可育后代还没有获得^[108], 所以半克隆技术还只是一个设想。青鳉鱼单倍体胚胎干细胞系的获得使得能够首先以青鳉鱼为实验模型进行动物半克隆技术研究。把这些单倍体胚胎干细胞的核植入正常的、不去核的鱼卵中, 这些重组卵能像正常受精卵一样进行正常的胚胎发育。其中一个胚胎甚至发育成了能通过生殖细胞进行遗传传代的可育雌性个体。这条半克隆鱼被命名为“霍利”^[102]。霍利的诞生, 为单倍体胚胎干细胞核能模拟精子授精并产生后代, 提供了直接的理论依据和实验证据。有趣的是, 霍利是由嵌合卵发育而来, 这颗嵌合卵具有一个经过减数分裂的正常单倍体卵核和一个植入的体外培养的仅经过有丝分裂的单倍体细胞核。因此, 一个有丝分裂和减数分裂核重组的二倍体卵也能维持正常的胚胎发育, 这无疑为半克隆技术在生殖医学领域的应用提供了坚实的理论和实践基础。接下来的工作就是研究是否在其他脊椎动物也能建立单倍体干细胞系以用于进行动物半克隆。

8 展望

近来, 鱼类生殖细胞的研究已引起越来越多的关注且得到了迅速发展。促使其发生的原因有3个: (1) 有些品系, 如斑马鱼和青鳉鱼等模式生物可为各种实验分析和PGC发育动态过程生物图片的获得提供方便易得的胚胎学材料; (2) 鱼类是脊椎动物中最大的群体, 越来越多的种类受到了生存威胁且濒临灭绝, 同时生殖细胞的培养及移植, 为冰冻保存种质资源及通过“借腹生子”技术来繁殖保存这些珍稀种类提供了有力工具; (3) 同为脊椎动物, 鱼类和哺乳类包括人拥有许多共性。所以普遍认为从鱼类生殖细胞研究中获得的信息会对了解其他动物, 包括人类的繁衍或不育提供重要线索和新的见解。例如, 最近霍利的诞生就阐明了半克隆技术作为各个领域, 包括生殖医学领域的新型辅助生殖技术的可行性。由

此可以预见,无论是在基础理论还是在实践应用的研究领域,鱼类生殖细胞的研究都将为生物生殖细胞学和生殖工程学提供大量有用信息.

目前,在鱼类中研究生殖细胞发育相关基因的功能主要是靠基因消减技术.令人好奇的是,迄今为止所有被鉴定分析的鱼类GP基因似乎都与鱼类PGC的形成无关.而与此相反,这些基因大多数是果蝇PGC形成过程的必需因子,如*vasa*基因就因为果蝇PGC形成过程的必需因子之一,从而在其突变体分析中被分离鉴定.这种基因功能在PGC发育过程中

的差异或许是种间差异所致,也可能是实验技术不同所致,如基因功能的完全缺失(无效突变)与基因功能的消减(基因消减).由此,发展鱼类胚胎干细胞技术以制备基因敲除鱼,将是未来生物学研究领域的一个重要方向.而鱼类PGC的体外稳定培养将代表另一个重要的研究方向.在某些鱼类(如一些濒临绝种的鱼类),对其生殖细胞进行分离、冰冻保存并移植到生殖细胞缺失的鱼类受体(胚胎或性腺)以进行借体繁殖,这一技术将在发展可持续渔业及保护生物学等领域发挥其巨大的潜能.

致谢 感谢新加坡国立大学生物系邓娇蓉实验员在实验鱼养殖中提供的支持与帮助、新加坡国立大学生物系曾庆华实验员在实验材料准备及稿件编排过程中给予的支持与帮助.

参考文献

- 1 Ikenishi K. Germ plasm in *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila* and *Xenopus*. *Dev Growth Differ*, 1998, 40: 1—10[DOI]
- 2 Braat A K, Speksnijder J E, Zivkovic D. Germ line development in fishes. *Int J Dev Biol*, 1999, 43: 745—760
- 3 Gamo H. On the origin of germ cells and formation of gonad primordia in the medaka, *Oryzias latipes*. *Japanese J Zoo*, 1961, 13: 9
- 4 Hamaguchi S. A light- and electron-microscopic study on the migration of primordial germ cells in the teleost, *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Res*, 1982, 227: 139—151
- 5 尤永隆, 林丹军, 苏敏. 黑脊倒刺鲃卵子发生中生殖质的产生. *动物学报*, 2004, 50: 231—239
- 6 Strome S, Lehmann R. Germ versus soma decisions: lessons from flies and worms. *Science*, 2007, 316: 392—393[DOI]
- 7 Chuma S, Hosokawa M, Tanaka T, et al. Ultrastructural characterization of spermatogenesis and its evolutionary conservation in the germline: germinal granules in mammals. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 306: 17—23[DOI]
- 8 Saga Y. Mouse germ cell development during embryogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 2008, 18: 337—341[DOI]
- 9 Kosaka K, Kawakami K, Sakamoto H, et al. Spatiotemporal localization of germ plasm RNAs during zebrafish oogenesis. *Mech Dev*, 2007, 124: 279—289[DOI]
- 10 Peng J X, Xie J L, Zhou L, et al. Evolutionary conservation of Dazl genomic organization and its continuous and dynamic distribution throughout germline development in gynogenetic gibel carp. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 2009, 312: 855—871[DOI]
- 11 Xu H, Li Z, Li M, et al. Boule is present in fish and bisexually expressed in adult and embryonic germ cells of medaka. *PLoS One*, 2009, 4: e6097[DOI]
- 12 Pepling M E, Wilhelm J E, O'Hara A L, et al. Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 187—192[DOI]
- 13 Kobayashi H, Iwamatsu T. Development and fine structure of the yolk nucleus of previtellogenic oocytes in the medaka *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ*, 2000, 42: 623—631[DOI]
- 14 Knaut H, Pelegri F, Bohmann K, et al. Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. *J Cell Biol*, 2000, 149: 875—888[DOI]
- 15 Theusch E V, Brown K J, Pelegri F. Separate pathways of RNA recruitment lead to the compartmentalization of the zebrafish germ plasm. *Dev Biol*, 2006, 292: 129—141[DOI]
- 16 Bontems F, Stein A, Marlow F, et al. Bucky ball organizes germ plasm assembly in zebrafish. *Curr Biol*, 2009, 19: 414—422[DOI]
- 17 Yoon C, Kawakami K, Hopkins N. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development*, 1997, 124: 3157—3165
- 18 Li M, Hong N, Xu H, et al. Medaka vasa is required for migration but not survival of primordial germ cells. *Mech Dev*, 2009, 126: 366—381[DOI]
- 19 Houwing S, Kamminga L M, Berezikov E, et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell*, 2007, 129: 69—82[DOI]
- 20 Strasser M J, Mackenzie N C, Dumstrei K, et al. Control over the morphology and segregation of Zebrafish germ cell granules during

- embryonic development. *BMC Dev Biol*, 2008, 8: 58[DOI]
- 21 Li W, Deng F, Wang H, et al. Germ cell-less expression in zebrafish embryos. *Dev Growth Differ*, 2006, 48: 333—338[DOI]
- 22 Xu H, Li M, Gui J, et al. Cloning and expression of medaka *dazl* during embryogenesis and gametogenesis. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7: 332—338[DOI]
- 23 Aoki Y, Nakamura S, Ishikawa Y, et al. Expression and syntenic analyses of four *nanos* genes in medaka. *Zoolog Sci*, 2009, 26: 112—118[DOI]
- 24 Kopranner M, Thisse C, Thisse B, et al. A zebrafish *nanos*-related gene is essential for the development of primordial germ cells. *Genes Dev*, 2001, 15: 2877—2885
- 25 Draper B W, McCallum C M, Moens C B. *nanos1* is required to maintain oocyte production in adult zebrafish. *Dev Biol*, 2007, 305: 589—598[DOI]
- 26 Ramasamy S, Wang H, Quach H N, et al. Zebrafish *Staufen1* and *Staufen2* are required for the survival and migration of primordial germ cells. *Dev Biol*, 2006, 292: 393—406[DOI]
- 27 Liu L, Hong N, Xu H, et al. Medaka *dead end* encodes a cytoplasmic protein and identifies embryonic and adult germ cells. *Gene Expr Patterns*, 2009, 9: 541—548[DOI]
- 28 Weidinger G, Stebler J, Slanchev K, et al. *dead end*, a novel vertebrate germ plasm component, is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Curr Biol*, 2003, 13: 1429—1434[DOI]
- 29 Thorpe J L, Doitsidou M, Ho S Y, et al. Germ cell migration in zebrafish is dependent on HMGCoA reductase activity and prenylation. *Dev Cell*, 2004, 6: 295—302[DOI]
- 30 Schlueter P J, Sang X, Duan C, et al. Insulin-like growth factor receptor 1b is required for zebrafish primordial germ cell migration and survival. *Dev Biol*, 2007, 305: 377—387[DOI]
- 31 Dumstrei K, Mennecke R, Raz E. Signaling pathways controlling primordial germ cell migration in zebrafish. *J Cell Sci*, 2004, 117: 4787—4795[DOI]
- 32 Doitsidou M, Reichman-Fried M, Stebler J, et al. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell*, 2002, 111: 647—659[DOI]
- 33 Knaut H, Werz C, Geisler R, et al. A zebrafish homologue of the chemokine receptor *Cxcr4* is a germ-cell guidance receptor. *Nature*, 2003, 421: 279—282[DOI]
- 34 Mich J K, Blaser H, Thomas N A, et al. Germ cell migration in zebrafish is cyclopamine-sensitive but Smoothened-independent. *Dev Biol*, 2009, 328: 342—354[DOI]
- 35 Kuo M W, Wang S H, Chang J C, et al. A novel *puf-A* gene predicted from evolutionary analysis is involved in the development of eyes and primordial germ-cells. *PLoS One*, 2009, 4: e4980[DOI]
- 36 Shinomiya A, Tanaka M, Kobayashi T, et al. The *vasa*-like gene, *olvas*, identifies the migration path of primordial germ cells during embryonic body formation stage in the medaka, *Oryzias latipes*. *Dev Growth Differ*, 2000, 42: 317—326[DOI]
- 37 Yoshizaki G, Sakatani S, Tominaga H, et al. Cloning and characterization of a *vasa*-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol Reprod Dev*, 2000, 55: 364—371[DOI]
- 38 Xu H, Gui J, Hong Y. Differential expression of *vasa* RNA and protein during spermatogenesis and oogenesis in the gibel carp (*Carassius auratus gibelio*), a bisexually and gynogenetically reproducing vertebrate. *Dev Dyn*, 2005, 233: 872—882[DOI]
- 39 Aoki Y, Nagao I, Saito D, et al. Temporal and spatial localization of three germline-specific proteins in medaka. *Dev Dyn*, 2008, 237: 800—807[DOI]
- 40 Chuma S, Hiyoshi M, Yamamoto A, et al. Mouse Tudor Repeat-1 (MTR-1) is a novel component of chromatoid bodies/nuages in male germ cells and forms a complex with snRNPs. *Mech Dev*, 2003, 120: 979—990[DOI]
- 41 Yoshimizu T, Sugiyama N, De Felice M, et al. Germline-specific expression of the Oct-4/green fluorescent protein (GFP) transgene in mice. *Dev Growth Differ*, 1999, 41: 675—684[DOI]
- 42 Kobayashi T, Yoshizaki G, Takeuchi Y, et al. Isolation of highly pure and viable primordial germ cells from rainbow trout by GFP-dependent flow cytometry. *Mol Reprod Dev*, 2004, 67: 91—100[DOI]
- 43 Ciruna B, Weidinger G, Knaut H, et al. Production of maternal-zygotic mutant zebrafish by germ-line replacement. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 14919—14924[DOI]
- 44 Saito T, Fujimoto T, Maegawa S, et al. Visualization of primordial germ cells *in vivo* using GFP-*nos1* 3'UTR mRNA. *Int J Dev Biol*, 2006, 50: 691—699[DOI]
- 45 Herpin A, Rohr S, Riedel D, et al. Specification of primordial germ cells in medaka (*Oryzias latipes*). *BMC Dev Biol*, 2007, 7: 3[DOI]
- 46 Ding D, Parkhurst S M, Halsell S R, et al. Hsp83 RNA localization during *Drosophila oogenesis* and embryogenesis. *Mol Cell Biol*, 1993, 13: 3773—3781
- 47 Wolke U, Weidinger G, Kopranner M, et al. Multiple levels of posttranscriptional control lead to germ line-specific gene expression in the zebrafish. *Curr Biol*, 2002, 12: 289—294[DOI]
- 48 Mishima Y, Giraldez A J, Takeda Y, et al. Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Curr*

- Biol, 2006, 16: 2135—2142[DOI]
- 49 Rangan P, DeGennaro M, Lehmann R. Regulating gene expression in the *Drosophila* germ line. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2008, 73: 1—8
 - 50 Hashimoto Y, Maegawa S, Nagai T, et al. Localized maternal factors are required for zebrafish germ cell formation. Dev Biol, 2004, 268: 152—161[DOI]
 - 51 Weidinger G, Wolke U, Kopranner M, et al. Regulation of zebrafish primordial germ cell migration by attraction towards an intermediate target. Development, 2002, 129: 25—36
 - 52 Herpin A, Fischer P, Liedtke D, et al. Sequential SDF1a and b-induced mobility guides Medaka PGC migration. Dev Biol, 2008, 320: 319—327[DOI]
 - 53 Saffman E E, Lasko P. Germline development in vertebrates and invertebrates. Cell Mol Life Sci, 1999, 55: 1141—1163[DOI]
 - 54 Santos A C, Lehmann R. Germ cell specification and migration in *Drosophila* and beyond. Curr Biol, 2004, 14: R578—589[DOI]
 - 55 Maufroid J P, Capuron A P. A demonstration of cellular interactions during the formation of mesoderm and primordial germ cells in *Pleurodeles waltlii*. Differentiation, 1985, 29: 20—24[DOI]
 - 56 Stebler J, Spieler D, Slanchev K, et al. Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. Dev Biol, 2004, 272: 351—361[DOI]
 - 57 Albert M, Peters A H. Genetic and epigenetic control of early mouse development. Curr Opin Genet Dev, 2009, 19: 113—121[DOI]
 - 58 Wylie C. Germ cells. Cell, 1999, 96: 165—174[DOI]
 - 59 Blaser H, Eisenbeiss S, Neumann M, et al. Transition from non-motile behaviour to directed migration during early PGC development in zebrafish. J Cell Sci, 2005, 118: 4027—4038[DOI]
 - 60 Weidinger G, Wolke U, Kopranner M, et al. Identification of tissues and patterning events required for distinct steps in early migration of zebrafish primordial germ cells. Development, 1999, 126: 5295—5307
 - 61 Raz E. Primordial germ-cell development: the zebrafish perspective. Nat Rev Genet, 2003, 4: 690—700[DOI]
 - 62 Kunwar P S, Lehmann R. Developmental biology: germ-cell attraction. Nature, 2003, 421: 226—227[DOI]
 - 63 Mahabaleshwar H, Boldajipour B, Raz E. Killing the messenger: the role of CXCR7 in regulating primordial germ cell migration. Cell Adh Migr, 2008, 2: 69—70
 - 64 Van Doren M, Broihier H T, Moore L A, et al. HMG-CoA reductase guides migrating primordial germ cells. Nature, 1998, 396: 466—469[DOI]
 - 65 Tanaka S S, Yamaguchi Y L, Tsoi B, et al. IFITM/Mil/fragilis family proteins IFITM1 and IFITM3 play distinct roles in mouse primordial germ cell homing and repulsion. Dev Cell, 2005, 9: 745—756[DOI]
 - 66 Molyneaux K A, Zinszner H, Kunwar P S, et al. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. Development, 2003, 130: 4279—4286[DOI]
 - 67 Ara T, Nakamura Y, Egawa T, et al. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 5319—5323[DOI]
 - 68 Slanchev K, Stebler J, de la Cueva-Mendez G, et al. Development without germ cells: the role of the germ line in zebrafish sex differentiation. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 4074—4079[DOI]
 - 69 Kim C H, Broxmeyer H E. *In vitro* behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. Blood, 1998, 91: 100—110
 - 70 Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, et al. Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. Nature, 2003, 425: 307—311[DOI]
 - 71 Hernandez P A, Gorlin R J, Lukens J N, et al. Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease. Nat Genet, 2003, 34: 70—74[DOI]
 - 72 Gui J F, Liang S C, Zhu L F. Preliminary confirmation of gynogenetic reproductive mode in artificially multiple tetraploid allogynogenetic silver crucial carp. Chinese Science Bulletin, 1993, 38: 327—331
 - 73 Wu N, Yue H M, Chen B, et al. Histone H2A has a novel variant in fish oocytes. Biol Reprod, 2009, 81: 275—283[DOI]
 - 74 Tajima A, Naito M, Yasuda Y, et al. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). Theriogenology, 1993, 40: 509—519[DOI]
 - 75 Brinster R L, Zimmermann J W. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 11298—11302[DOI]
 - 76 Honaramooz A, Megee S O, Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. Biol Reprod, 2002, 66: 21—28[DOI]
 - 77 Kang S J, Choi J W, Kim S Y, et al. Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation. Biol Reprod, 2008, 79: 931—937[DOI]
 - 78 Yoshizaki G, Takeuchi Y, Sakatani S, et al. Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. Int J Dev Biol, 2000, 44: 323—326

- 79 Okutsu T, Yano A, Nagasawa K, et al. Manipulation of fish germ cell: visualization, cryopreservation and transplantation. *J Reprod Dev*, 2006, 52: 685—693[DOI]
- 80 Takeuchi Y, Higuchi K, Yatabe T, et al. Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe croaker, *Nibea mitsukurii* (*Perciformes, Sciaenidae*). *Biol Reprod*, 2009, 81: 1055—1063[DOI]
- 81 Nagler J J, Cloud J G, Wheeler P A, et al. Testis transplantation in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biol Reprod*, 2001, 64: 644—646[DOI]
- 82 Takeuchi Y, Yoshizaki G, Takeuchi T. Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biol Reprod*, 2003, 69: 1142—1149[DOI]
- 83 Saito T, Goto-Kazeto R, Arai K, et al. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol Reprod*, 2008, 78: 159—166[DOI]
- 84 Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, et al. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 2725—2729[DOI]
- 85 Fong C Y, Peh G S, Gauthaman K, et al. Separation of SSEA-4 and TRA-1-60 labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Stem Cell Rev Rep*, 2009, 5: 72—80[DOI]
- 86 Yano A, von Schalburg K, Cooper G, et al. Identification of a molecular marker for type A spermatogonia by microarray analysis using gonadal cells from pvasa-GFP transgenic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev*, 2009, 76: 246—254[DOI]
- 87 Matsui Y, Zsebo K, Hogan B L. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 1992, 70: 841—847[DOI]
- 88 van de Lavoie M C, Diamond J H, Leighton P A, et al. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 2006, 441: 766—769[DOI]
- 89 Fan L, Moon J, Wong T T, et al. Zebrafish primordial germ cell cultures derived from vasa: RFP transgenic embryos. *Stem Cells Dev*, 2008, 17: 585—597[DOI]
- 90 Brinster R L. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*, 2002, 296: 2174—2176[DOI]
- 91 Hofmann M C, Hess R A, Goldberg E, et al. Immortalized germ cells undergo meiosis *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 5533—5537[DOI]
- 92 Feng L X, Chen Y, Dettin L, et al. Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line. *Science*, 2002, 297: 392—395[DOI]
- 93 Guan K, Nayernia K, Maier L S, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature*, 2006, 440: 1199—1203[DOI]
- 94 Hong Y, Winkler C, Scharlt M. Pluripotency and differentiation of embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*). *Mech Dev*, 1996, 60: 33—44[DOI]
- 95 Hong Y, Winkler C, Scharlt M. Production of medakafish chimeras from a stable embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 3679—3684[DOI]
- 96 Ma C, Fan L, Ganassin R, et al. Production of zebrafish germ-line chimeras from embryo cell cultures. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 2461—2466[DOI]
- 97 Chen S L, Sha Z X, Ye H Q, et al. Pluripotency and chimera competence of an embryonic stem cell line from the sea perch (*Lateolabrax japonicus*). *Mar Biotechnol*, 2007, 9: 82—91[DOI]
- 98 Chen S L, Ren G C, Sha Z X, et al. Establishment of a continuous embryonic cell line from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* for virus isolation. *Dis Aquat Organ*, 2004, 60: 241—246[DOI]
- 99 易梅生, 洪旒, 李振东, 等. 青鲈干细胞及其应用. *中国科学: 生命科学*, 2010, 40: 115—123
- 100 Hong N, Li M, Zeng Z, et al. Accessibility of host cell lineages to medaka stem cells depends on genetic background and irradiation of recipient embryos. *Cell Mol Life Sci*, 2010, PMID: 20063174
- 101 洪云汉, 桂建芳, 陈松林, 等. 鱼类胚胎干细胞. *动物学报*, 2003, 49: 14
- 102 Yi M, Hong N, Hong Y. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 2009, 326: 430—433[DOI]
- 103 Ramasamy R, Ricci J A, Palermo G D, et al. Successful fertility treatment for Klinefelter's syndrome. *J Urol*, 2009, 182: 1108—1113[DOI]
- 104 Gurdon J B, Melton D A. Nuclear reprogramming in cells. *Science*, 2008, 322: 1811—1815[DOI]
- 105 Wakamatsu Y, Ju B, Pristayzhnyuk I, et al. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1071—1076[DOI]
- 106 Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 1996, 380: 64—66[DOI]
- 107 Tsai M C, Takeuchi T, Bedford J M, et al. Alternative sources of gametes: reality or science fiction? *Hum Reprod*, 2000, 15: 988—998[DOI]
- 108 Tesarik J. Reproductive semi-cloning respecting biparental embryo origin: embryos from syngamy between a gamete and a haploidized somatic cell. *Hum Reprod*, 2002, 17: 1933—1937[DOI]