

克隆和动物克隆

张文化 朱红英 黄祥辉

(华东师范大学生物学系 上海 200062)

关键词 克隆 胚胎细胞克隆 已分化体细胞克隆 动物克隆

1997年2月23日,英国苏格兰爱丁堡罗斯林研究所 Wilmut 和 Campbell 领导的研究小组,用高度分化的乳腺细胞成功克隆绵羊的消息在英国《Nature》杂志发表后,在全世界引起轰动^[1]。由于哺乳动物的克隆成功,人的克隆已出现成功的可能,因此已引起全世界科学家和各国政府的严重关注。德国、西班牙、丹麦、澳大利亚政府已制定相关法律禁止人的克隆,美国、日本、英国政府宣布不资助这项研究。在我国,卫生部也已宣布禁止人的克隆。克隆问题一时成为我国科学界,特别是生物学界讨论的热门话题。什么是克隆?克隆绵羊是怎么回事?应该怎样正确评论克隆技术?本文试图对这些问题作些介绍。

1 克隆

克隆是英语词汇“Clone”的音译名。1903年,Webber 首先在一篇题为“新的园艺和农业术语”的论文中使用“Clon”术语,定义为用植物营养器官部分,如块茎、球茎、枝条、芽等培养所得到的品系^[2]。由于当时他在使用“Clon”术语时,指明词中的“O”读长音,故后来被写作为“Clone”。

克隆一词提出后,为生物学界所接受。克隆用作名词,最初是指天然或人工获得的无性繁殖系,如蚜虫孤雌生殖产生的后代;天然和人工培养的单细胞(原生动物的除外)分裂所产生的后代^[3]。到70~80年代,克隆一词已广泛用于分子的、细胞的和生物体的克隆等三个水平,意思是指产生性状完全一致的后代。

分子克隆,是指人工扩增生物大分子(如DNA克隆)。由于分子克隆词汇的出现,克隆

一词开始用作动词,并出现动名词“Cloning”。克隆用作动词含有人工复制的意思。

细胞克隆,是指人工复制细胞,即通过单细胞培养获得遗传性状与供体细胞完全一致的细胞。但是,目前人工培养单个动、植物细胞很难获得性状完全一致的细胞。因此,通过将单个细胞培养获得的细胞,一般不称之为克隆细胞,而称之为细胞株(Cell strain)或细胞系(Cell line)。

生物体克隆,是指用无性繁殖的方法,从体细胞得到遗传上与原来生物体完全相同的生物体,即人工复制生物体。在植物中,早在50年代人们就己能通过单个体细胞人工培养获得完整植株^[4]。由于在植物细胞培养过程中常会发生变异,很难获得性状与供体植物完全一致的后代,因此科学界将这些后代称之为再生植株,而不称之为克隆植物。但是在动物中,人们采用体细胞的细胞核移植到去核的卵细胞中的方法,能获得遗传性状与供核动物完全一致的后代。这种后代称之为克隆动物^[5]。

综上所述,现代意义的克隆是一种人工条件下生命的无性繁殖方式,或生命的复制方式。因为这是一种自然界本来不存在的产生新的生命的方式,因此将这种方式称之为“克隆”比称之为“无性繁殖”更合适^[6]。严格地说,克隆一词目前似乎只能用于分子克隆和动物克隆。

2 动物克隆

2.1 动物克隆的类型 高等动物的克隆,通常

第一作者介绍:张文化,男,45岁,讲师,学士;

投稿日期:1997-04-25,修回日期:1998-01-15

是用体细胞做供核材料,综合利用细胞培养技术、细胞融合技术、细胞核移植技术进行的。按照供核细胞的种类,动物克隆可分为胚胎细胞克隆和已分化体细胞克隆两种类型。

(1)胚胎细胞克隆 动物克隆,实际上是用人工的方法使体细胞能象受精卵那样,分化发育成胚胎,并进而发育成与供核动物性状完全相同的个体过程。受精卵之所以能发育成胚胎,首先是因为受精卵是一种未分化的细胞,它具备发育成个体的全能性;其次是受精卵的细胞质中具有启动细胞核基因表达程序化的因子。从八细胞胚胎分离出来的胚胎细胞,虽然基本上也是一种未分化的体细胞,但它不能直接发育成胚胎,这是因为启动基因表达程序化的因子,在合子形成时已被合子细胞核所吸收。因此,胚胎细胞克隆必须通过细胞核移植,从受体细胞(卵细胞)细胞质中获得重新启动表达再程序化的因子,胚胎细胞才可能发育成胚胎。

1980年,Willadsen 将从绵羊八细胞胚胎中分离的胚胎细胞,移入已去核的同种绵羊卵细胞中,经培养获得胚胎,再将胚胎植入代理母羊子宫中,首次获得了胚胎细胞克隆羊^[7](见图1)。此后,国际上用这种方法又相继克隆出牛、兔、猪、山羊、猴等哺乳动物。

(2)已分化的体细胞克隆 过去认为,已分化的体细胞是不能分化发育成胚胎的。但是,Wilmur 等^[5]用高度分化的乳腺上皮细胞克隆出“多利”绵羊。在这里,最重要的是要使已分化的细胞脱分化成为未分化的细胞^[8]。在他们的实验中,关键的一步是使已分化的乳腺细胞(来自面部呈白色的“Finn Dorset”绵羊)在细胞培养中逸出细胞周期,使它们处于Go期(静息期)。方法是使培养液中的血清浓度从1%降低到0.5%,连续培养5天。然后以其作供体细胞获得核,以面部呈黑色的“Scottish Blaceface”母绵羊去核卵细胞作受体细胞,通过电脉冲使上述核、质融合成融合细胞。将融合细胞先植入母羊的输卵管中6天,使其发育成胚胎,然后将胚胎植入代理母羊的子宫内,其中有一只怀孕成功,产下“多利”后代(见图2)。经

DNA 微卫星分析对 4 个多态性基因位点检测表明,“多利”羊的电泳图谱与供核“Finn Dorset”绵羊相同,证明“多利”羊为体细胞克隆羊^[5]。

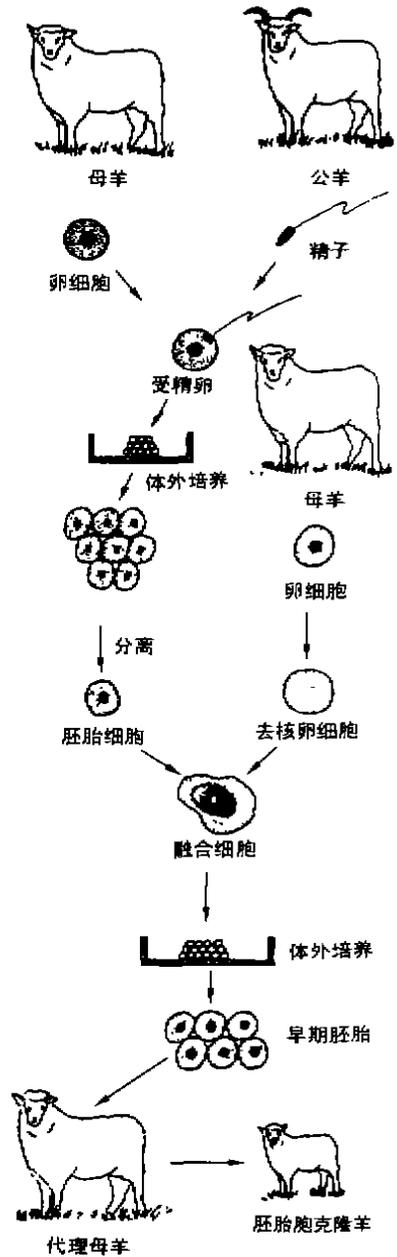


图1 胚胎细胞克隆示意图

与胚胎细胞克隆相比,已分化的体细胞克隆难度更大,Wilmur 等的工作^[5]具有重要的科学意义。

2.2 哺乳动物克隆研究概况 1986年以来,哺乳动物克隆研究取得了很大的成果,先后克隆

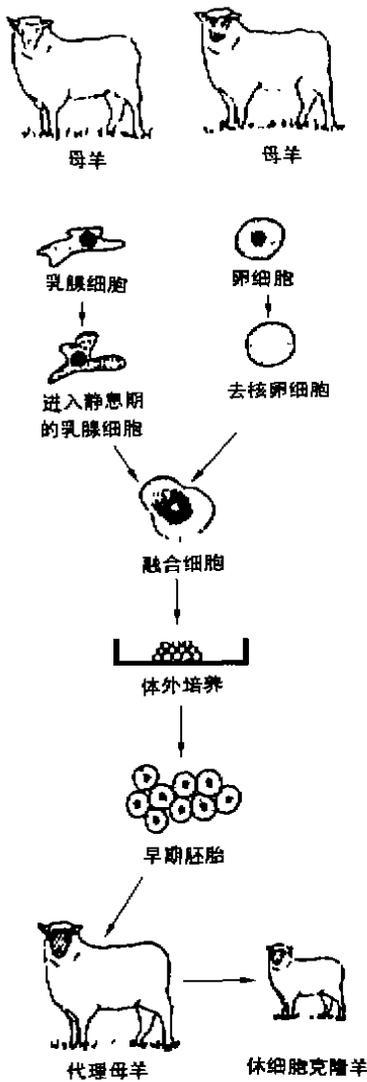


图 2 已分化体细胞克隆示意图

出绵羊、牛、兔、猪、山羊和猴等。

(1) 绵羊 1986年, Willadsen^[7]用早期胚胎细胞作供体, 首先获得了3只克隆绵羊, 其中有2只来自同一胚胎。1996年, Campbell等通过降低培养液血清的浓度, 使胚胎细胞逸出细胞周期进入G₀期, 再进行核移植, 获得克隆羊^[8]。这项研究为Wilmot^[5]等用乳腺上皮细胞克隆出“多利”绵羊奠定了基础。

(2) 牛 1987年, Prather等^[9]首先从早期胚胎细胞克隆出牛, 成功率为1%。1990年 Bondioli等^[10]用类似的方法获得了8头来自同一核供体胚胎的克隆牛, 并将成功率提高到

20%。据报道^[11], 我国华南师范大学和广西农业大学, 以及中国农科院也分别于1995年和1996年用胚胎细胞克隆出牛。

(3) 兔 Sticess和Robl^[12]于1988年率先从早期胚胎细胞克隆出兔, 成功率为3.7%。1990年, Collas和Robl^[13]对克隆技术进行了改进, 将成功率提高到10%。

(4) 猪 1989年, Prather等^[9]用四细胞胚胎细胞作核供体获得克隆猪, 成功率不到1%。

(5) 山羊 1991年, Zhong等^[14]用早期胚胎细胞作核供体克隆出山羊。1995年, 我国邹贤刚等^[15]用连续克隆胚胎细胞的方法, 在国际上首次获得一批继代细胞核移植克隆山羊, 其成功率为2.9%~3.85%。

(6) 猴 美国《华盛顿邮报》1997年3月2日报道, 美国俄勒冈州灵长类研究中心1996年8月用八细胞胚细胞克隆出2只恒河猴。

目前, 哺乳动物克隆的主要问题是成功率不高, 如用乳腺细胞克隆绵羊, 成功率仅为1/247。

2.3 动物克隆的生物学意义和经济意义 哺乳动物的体细胞克隆, 特别是哺乳动物的已高度分化的体细胞克隆具有重要的生物学意义。Wilmot^[5]的工作, 首先证明了哺乳动物的体细胞可以回复到原始未分化状态, 具有重新分化发育成个体的全能性。

哺乳动物体细胞克隆技术的经济意义在于: 人类能利用这种技术快速、大量繁殖优良品种动物和珍稀动物, 还能将各种具有重要经济性状的基因转入供体细胞, 然后克隆出具有新性状的经济动物。一旦克隆出雄性和雌性的这种转基因动物, 则可利用有性生殖手段大量繁殖这种转基因动物, 并以乳汁、蛋白质等形式生产特殊的, 甚至是名贵的药物、食品、造福于人类(见图3)。

1997年8月1日和12月19日出版的美国《Science》杂志, 介绍了英国罗斯林研究所用胚胎细胞克隆技术克隆出含有人基因(其表达产物为治疗人类疾病的药物, 和治疗血友病的蛋白质因子9)的绵羊“波利”和“莫利”, 以期望

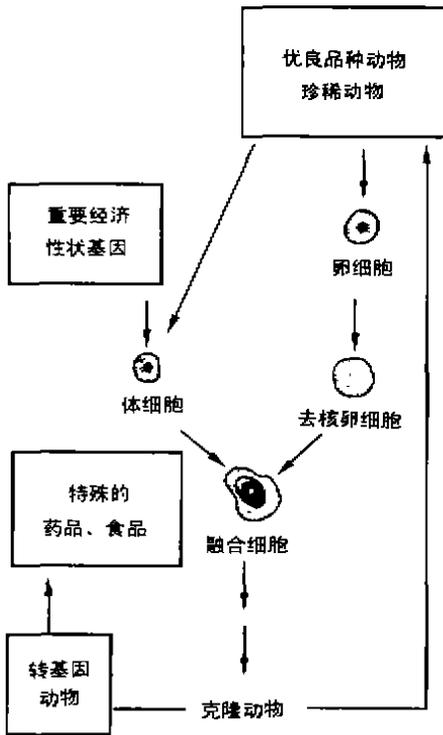


图3 体细胞克隆技术的经济意义示意图

从它们分泌的乳汁生产这些重要药物^[16]。用哺乳动物的乳腺,即用乳腺生物反应器生产药物,不仅能解决目的基因的表达问题,而且还不影响该动物体的正常生长发育。据测算,用哺乳动物细胞基因工程生产药用蛋白的成本,每克达 800~5 000 美元,而用乳腺生物反应器只需 0.05 美元。由此可见,哺乳动物体细胞克隆技术的经济意义将是巨大的。

参 考 文 献

1 Wilmut, I. 钟仁译. 克隆绵羊创造者维尔穆特答《自然》杂志问 文汇报(上海), 1997年3月7日

2 Webber, H. J. New terms for horticulture and agriculture. *Science*, 1903, 18: 501

3 Kenneth, J. H. Dictionary of scientific terms Henderson (ed), 5th edition, 1953 201

4 Mur, W. H, A. C. Hildebradt, A. J. Riker. Plant tissue cultures produced from single isolated plant cell. *Science*, 1954, 119: 877~878

5 Wilmut, I. A. E. Schruoke, J. McWhir et al. H. S. Campbell. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cell. *Nature*, 1997, 385: 810~813

6 丁小燕. 体细胞克隆与转基因动物. 科学(上海), 1997, 49: 52~54

7 Willadse, S. M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 1986, 320: 63~65

8 Campbell, K. H. S., J. McWhir, W. A. Ritchie, et al. *Wilmut*. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured. *Nature*, 1996, 380: 64~66

9 Prather, R. S. F. L. Barnes, M. M. Sims. Nuclear transplantation in the bovine embryo; assesment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol. Reprod*, 1987, 37: 859~866

10 Bondioli, K. R. M. E. Westhusin, C. R. Looney. Production of identical offspring by nuclear transfer. *Theriogenology*, 1990, 33: 165~174

11 魏新德. "克隆羊"突破了利用胚胎细胞进行细胞核移植的传统方式. 中国科学报, 1997年3月26日

12 Sticess, L., I. M. Robl. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod*. 1988, 39: 657~664

13 Collas, P., I. M. Robl. Factors affecting the efficiency of nuclear transplantation in the rabbit embryos. *Biol. Reprod*, 1990, 43: 877~884

14 Zhong, Y., W. Jianchen, W. Q. Jufen. Nuclear transplantation in goats. *Theriogenology*, 1991, 35: 289

15 邹贤刚, 李光三, 王玉阁等. 山羊 (*Capra hircus*) 胚胎细胞继代细胞核移植后其发育能力的研究. 科学能报, 1995, 40: 264~267

16 江世亮. 多利、波利与"动物药厂", 曾溢滔院士访谈录 文汇报, 1997年8月22日

欢迎订阅 2000 年《动物学杂志》

《动物学杂志》创刊于 1957 年。是全国核心期刊之一, 它的宗旨是以普及与提高相结合, 注重科学性和实用性的综合性学术刊物。主要刊登动物学科技能显示科研成果的学术论文, 新兴分支学科及新技术、新理论介绍等内容。辟有综合研究、动物的资源与管理研究、珍稀濒危动物研究等 10 余个栏目。适合从事动物学的科研、教学、技术、科学管理工作, 大专院校有关的学员、城乡动物饲养专业人员, 以及一切业余爱好者阅读。

该刊为双月刊, 16 开本, 64 页, 每期定价 9.00 元, 双月 20 日出版。国内外公开发行, 国内邮发代号: 2-422, 国外发行(Code No.) 代号: BM58、全国各地邮局(所)均可订阅。如未能在当地订到或错过征订时间者, 可直接到本刊编辑部订购, 不需另加邮费。

编辑部地址: 北京海淀区中关村路 19 号; 邮政编码: 100080; 联系电话: (010) 62624530