

克 隆

黄祥辉 张文华 朱红英

(华东师范大学生物学系 上海 200062)

1977年2月23日,英国《Nature》发表Wilmut等用绵羊乳腺上皮细胞成功克隆出绵羊多利的消息后,在全世界引起了很大的反响,克隆问题引起了人们的普遍关注^[1]。由于历史的原因,克隆的概念常被混淆。本文就克隆的概念、克隆所需的技术和克隆动物等问题,发表一些我们的见解。

一、克隆的概念

“clone”一词原为新拉丁语,来自希腊语“klon”^[2]。1903年,Webber在《Science》杂志的一篇题为“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、芽等无性繁殖所得到的品系,与“race”、“strain”等词相区别^[3]。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”。

clone一词提出后,为生物学界所接受,并应用到其他领域。在本世纪50年代所出版的辞典中,clone的含义已包括天然的无性繁殖系,如蚜虫孤雌生殖所产生的后代;植物无融合生殖所产生的后代;天然的和人工培养的单细胞(原生物除外)分裂所产生的后代^[4]。到70、80年代,clone一词又广泛用于整体的、细胞的和分子的克隆等三个水平^[5-7],意思是指产生性状完全一致的后代或相同的分子。

由于分子克隆的出现,克隆一词开始用作动词,并出现了动名词“cloning”^[5-7]。克隆用作动词含有人工复制的意思,如克隆分子,是指人工扩增生物大分子;克隆绵羊,是指人工复制某个绵羊个体。因为这是一种自然界不存在的产生新生命的方式,因此将这种方式称之为“克隆”比称之为“无性繁殖”更合适^[8]。目前国际上反对克隆人,实际上是反对复制人。

早在50年代,人们就已经证明植物体细胞具有全能性,通过单个体细胞的体外培养能获得完整植物^[9,10]。由于在植物细胞培养过程中常常会发生变异,很难获得性状完全一致的后代,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。

通过人工培养,单个动物细胞也能分裂,但也很难得到性状完全一致的细胞。因此,通过单个动物细胞培养获得的细胞,也不称作细胞克隆,而称之为细胞系或细胞株。

运用动物细胞融合和细胞培养技术生产单克隆抗体,但所建立的杂交瘤不称为克隆,而称为杂交瘤细胞株。因为单克隆抗体仅说明所产生的抗体只有一种,而不同于多克隆抗体有多种。克隆选择学说是由Burnet提出的一种免疫学重要理论^[11]。它是指生物体的细胞功能中具有产生各种抗体变异体的能力。当一个生物遇到一个新抗原时,能够制造对抗此抗原的抗体的细胞会受到刺激而分裂。在这里,强调的是产生抗体分子的克隆选择过程。

总之,现代意义作为动词用的克隆,是指一种生命或生命大分子的复制,是一种自然界不存在的,能产生性状完全一致的个体或分子的方式。

二、克隆所需的技术

克隆所需的技术包括细胞培养技术、细胞融合技术、细胞核移植技术,以及分子克隆中运用的借助于质粒和宿主细菌的DNA克隆技术和PCR技术。本文主要围绕细胞核移植技术作一些论述。

用于克隆动物的细胞核移植技术,严格地讲应该是细胞拆合技术。它是将一种细胞的细胞核植入另一种已去核的细胞中,构成重组细

胞的技术。在这里,前者称为供体细胞,后者称为受体细胞。

1939年,Commandon和Fonbrune最早在同种变形虫中进行核移植试验^[12]。结果表明,重组变形虫能生长,并能繁殖后代。1963年起,我国童第周等进行了大量的种间,属间,亚科间的鱼类核移植试验,其中所获得的鲤鲫鱼具有优良性状,并已在生产上大面积推广^[13,14]。但真正用于克隆动物的核移植试验是在非洲爪蟾中进行的。1966年,Gurdon和Uehlinger将非洲爪蟾蝌蚪的肠上皮细胞的细胞核移入用紫外线破坏核的同种动物的卵母细胞中,结果有1.5%的重组细胞发育成为成体^[15],即用体细胞克隆了非洲爪蟾。而用体细胞克隆哺乳动物的工作则是1986年获得成功的。1986,Willadsen用绵羊的八细胞胚胎细胞移植到去核绵羊卵母细胞中,重组细胞发育成绵羊成体^[16]。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^[17]。但用高度分化的体细胞克隆哺乳动物则是1997年由Wilmur等完成的^[18]。他们从已怀孕3个月的6岁“Finn Dorset”母羊(面部呈白色)的乳腺取上皮细胞,通过培养使之进入静息期,然后以其作供体细胞获得核,以“Scottish Blackface”母羊(面部呈黑色)去核的卵细胞作受体细胞,通过电脉冲使上述核、质融合成重组细胞。将重组细胞先植入母羊的已被结扎的输卵管中6天,使其发育成胚胎,然后将胚胎植入代孕母羊的子宫内,最后只有一只怀孕成功,产下一个后代,即多利(Dolly)羊。

核移植技术牵涉到卵细胞(或卵母细胞)去核的方法。通常是先用固定针在极体对侧固定细胞,然后用去核微吸管对准极体插入透明带,将核与极体及部分细胞质吸入管中。吸管拉出时,细胞膜被拉出并形成一桥,吸管脱离透明带,质膜被掐断,挤推出核、极体和细胞质,获得去核受体细胞(详见《科学》1997年第5期封底)^[8]。与上述“盲吸法”不同,也有人先用DNA荧光特异染料染色,然后在紫外光下去核,以提

高去核的成功率^[19]。此外,还能用紫外线照射,使核丧失功能,称之为功能性去核法。

重组细胞的获得通常采用细胞融合的技术。由于用仙台病毒诱导融合不稳定,近年来常采用电融合法。电融合是在一种非电解质溶液(0.3mol/L甘露醇)、两根平行细微电极所组成的融合小室中进行,由直流脉冲所诱发^[16]。电融合还具有激活重组细胞的作用。

三、克隆动物

克隆动物,实际上是用人工的方法使体细胞(胚胎细胞,已分化的体细胞)核移入去核卵细胞中,使之能象受精卵那样,继续分化发育成胚胎,并进而发育成性状与供核动物完全相同的个体的过程。受精卵之所以能发育成胚胎,是因为它的细胞核具有指导形成整个胚胎各部分组织的能力,即具有全能性。而高度分化的体细胞的细胞核只能表达组织专一性蛋白,而不具备全能性。因此,要使体细胞能发育成胚胎,必须使它具有下述特性:

1. 体细胞脱分化

体细胞脱分化(dedifferentiation),是使已分化的体细胞变成未分化的,全能的细胞的过程。已分化的植物体细胞,通过人工培养能很容易脱分化变成未分化的愈伤组织,进而再分化成胚胎及完整再生植株^[9,10]。Wilmur等人使成年个体的乳腺细胞实现了脱分化^[18]。在他们的实验中,非常关键的一步是使已分化的乳腺上皮细胞在细胞培养中逸出细胞周期,让它们处于G₀期(静息期)。方法是使培养液中的血清浓度从10%降低到0.5%,连续培养5天,实验结果表明,使细胞逸出细胞周期,确实是具有使体细胞脱分化的功效^[20]。

2. 启动体细胞基因表达的再程序化

胚胎发育是细胞中的基因在时空上进行系统而有序表达的过程。Wilmur等认为,要使脱分化的体细胞核移入卵细胞并发育成胚胎,还必须重新启动这种体细胞基因表达的再程序化(reprogramming)。因此,Wilmur等将脱分化

的绵羊乳腺细胞的核移入去核的卵细胞中,让卵细胞质中的因子与移入的核作用,使重组细胞分裂,分化成胚胎,进而发育成个体。用 DNA 微卫星分析(micosatellite analysis)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品种绵羊“Finn Dorset”相同^[18]。因此,多利羊确属体细胞克隆羊。但是,上述卵细胞质和移入的细胞核之间的相互作用必须配合得恰到好处,稍有差错便不能发育成胚胎^[8]。这或许是 Wilmut 等试验中,247 个被试重组细胞中只有 1 个发育成克隆羊的重要原因。

Wilmut 等^[18]的工作的重要生物学意义是证明了哺乳动物的已高度分化的体细胞也具有全能性。他们的动物克隆技术也具有很大的、潜在的经济意义。人类能利用这种技术繁殖优良品种哺乳动物和珍稀哺乳动物。还可以用已转入外源基因的成体动物的体细胞克隆该动物。一旦有了一群性别不同,又确定已转入所需要基因的动物后,即可通过它们的有性生殖繁衍大群后代,并用它们生产具有药用和保健价值的药物和食品,造福于人类。最近有报道,Wilmut 等已使用转基因动物的胚胎细胞克隆出“波利”羊。有理由相信,在不久的将来,哺乳动物体细胞克隆技术的潜在经济价值一定会得到实现。

参 考 文 献

[1] Wilmut 1,1997,文汇报,1997 年 3 月 7 日,钟

仁译。

- [2] Jaeger EC,1955,生物名称和生物学术语的词源,科学出版社,1979,p.122.
- [3] Webber HJ,1903,*Science*,**18**:501.
- [4] Kenneth JH,1953,*Dictionary of Scientific Terms*,Henderson (ed.),5th edition.
- [5] McGraw-Hill,1976,*Dictionary of the life Sciences*,Deniel N. Lapecles (ed.),McGrow-Hill,Inc.
- [6] Rieger R, Machaelis A, Green MM,1976,*Glossary of Genetics and Cttigebetucus*,4th edition, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg N. Y.
- [7] Maclean N,1987,*Dictionary of Genetics and Cell Biology*,New York University Press.
- [8] 丁小燕,1997,科学(上海),**49**(5):52-54.
- [9] Muir WH, Hildebradt AC, Riker AJ,1954,*Science*,**119**:877-879.
- [10] Steward FC,1958,*Am J Bot*,**45**:709-713.
- [11] 陈冀胜,1992,英汉生命科学辞典,科学技术文献出版社,P.122.
- [12] Command J. de Fonbrune F,1939,*CR Soc Biol (paris)*,**130**:744-748.
- [13] Tung TC, Wu SC, Tung YF et al.,1963,*Sci Sinica*,**14**:1244-1245.
- [14] Tung TC,1980,*Sci Sinica*,**23**(4):517-523.
- [15] Gurdon JB, Uehlinger V,1966,*Nature*,**210**:1240-1241.
- [16] Willadsen SM,1986,*Nature*,**320**:63-65.
- [17] 刘林,安民,1993,动物学杂志,**28**:55-60.
- [18] Wilmut 1, Schnieke AE, McWhir J, et al.,1997,*Nature*,**385**:810-813.
- [19] Prather RS,First NL,1990,*J Reprod Fert*,**40**:227-243.
- [20] 陈建华,洪黎民,1997,自然,**19**(3):170-172.

研究工作

玉米(*Zea mays L.*)中凋亡相关基因 c-myc 同源序列的检出及其染色体原位杂交定位*

宁顺斌 宋运淳** 王玲 杨征 刘立华

(武汉大学发育生物学研究中心 武汉 430072)

细胞凋亡(apoptosis)是细胞一种有步骤有活性的生理性自行消亡过程。正在凋亡的细胞形态上发生明显的变化,如胞质和核浓缩(condensation)、胞膜和核膜变皱(shrinkage)并起泡(blebbling)、核 DNA 断裂(fragmentation)

并降解(degradation)。不管是内源性因素还是

*国家自然科学基金和国家教委博士点基金资助项目。

**通信联系人。