

· 综述 ·

鱼类细胞核移植研究进展及前景展望

沙珍霞¹, 陈松林¹, 刘洋^{1,2}, 唐启升¹

(1. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

2. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:细胞核移植技术是目前生物技术领域研究的热点之一,其科学意义和应用价值重大。本文介绍了中国 and 世界上鱼类细胞核移植的研究成果及其最新进展;综述了鱼类细胞核移植的基本程序、方法和影响因素,包括胞质受体的准备、核供体的制备、核移植和核质杂种的培养。并对鱼类细胞核移植的应用、现存问题及应用前景进行了讨论。

关键词:鱼类;细胞核移植

中图分类号:Q813.3

文献标识码:A

文章编号:1005-8737-(2003)04-0338-07

细胞核移植是一项精细的显微操作技术,即将一个二倍体的细胞核(含核周围少量的细胞质)移入另一个去核(或核已失活)或不去核的未受精卵中,在一定条件下,它能象受精卵一样分裂、分化、发育形成胚胎、幼体甚至到成体的技术。该技术有别于高等动物的有性生殖方式,属于用人工的、“非有性生殖”的方式完成的繁殖和发育过程^[1]。自 Spemann^[2]最早提出细胞核移植一词以来,动物细胞核移植研究首先于1939年在变形虫上取得成功^[3];1952年 Briggs 和 King^[4]将蛙的囊胚晚期或原肠早期的细胞核移入去核的同种蛙卵中,获得了正常发育的胚胎,开创了脊椎动物细胞核移植的先河;1997年 Dolly 羊的克隆成功^[5],使细胞核移植技术受到了广泛的关注,细胞核移植技术随后更多的被称为克隆技术,与此相关的科研方向成为各国科学家研究的热点。随着研究的深入、移核技术的成熟及相关理论的发展和新的仪器设备的应用,细胞核移植

已从单纯的理论研究走向了实际应用,并创造了可观的经济效益。

在鱼类细胞核移植方面,中国处于国际领先地位。1963年,童弟周等^[6]首次创建了鱼类细胞核移植技术的研究方法。此后的近40年时间里,国外只发表了4篇相关报道,即前苏联的 Gasaryan^[7]关于泥鳅的细胞核移植、日本的 Niwa^[8]及 Wakamatsu^[9]进行的青鳉细胞核移植和 Lee^[10]关于斑马鱼的细胞核移植,其余有关鱼类细胞核移植的成果都出自中国。本文就目前国内外鱼类细胞核移植的研究现状、动态进展及应用前景等分别加以介绍,

1 鱼类细胞核移植的研究成果

鱼类大多属体外受精和体外发育,产卵量多,卵比较大,胚体几近透明,易于观察和操作,并且产卵过程可人为控制,培养条件简单,是进行细胞核移植的良好材料。鱼类的细胞核移植研究大致可分为2个阶段,第1阶段(1963-1975年),多以小型鱼类为材料。主要从理论上探讨胚胎发育过程中细胞核和细胞质的功能以及它们的相互作用,所进行的皆是以不分化的囊胚细胞做核供体。第2阶段(1975年至今),有关研究主要集中在经济鱼类育种的应用方面,并使用鱼类成体组织已分化的培养细胞作为核供体;探讨鱼类体细胞发育潜能的问题,以及体

收稿日期:2003-02-25; 修订日期:2003-05-06.

基金项目:国家自然科学基金项目(30170740); 国家“八六三”高技术研究发展项目(2202AA629180).

作者简介:沙珍霞(1970-),女,助理研究员,硕士,主要从事鱼类生物技术研究. E-mail: shazx@ysfri.ac.cn

通讯作者:陈松林. Tel: 0532-5844606;

E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

细胞育种的新方向;创造有经济价值的细胞工程鱼(如鲫鲤移核鱼,草团移核鱼),并获得了一定的经济效益。所研究的范围涵盖了种内、种间、属间、亚科间、科间、目间甚至纲间十几种移核组合。有些组

合获得了成鱼(种内品种间、属间和亚科间),有些组合获得了幼鱼(亚科间、科间和目间),有些组合只获得了移核早期胚胎(目间和纲间)。具体文献资料如表1和表2所示。

表1 鱼类囊胚细胞核作为核供体移核成功的文献资料(按时间顺序)

Table 1 The references of successful nuclear transplantation using fish blastula cells as donor

作者	文献	核供体	胞质受体	核质杂种发育最后阶段	组合类型	胞质杂种核倍性
童弟周等	科学通报 ^[6] , 1963	金鱼	金鱼 ¹	幼鱼	种内	2n
童弟周等	科学通报 ^[6] , 1963	鲫	鲫 ¹	幼鱼	种内	2n
童弟周等	动物学报 ^[11] , 1973	金鱼	鲫 ¹	幼鱼	亚科间	2n
童弟周等	动物学报 ^[11] , 1973	鲫	金鱼 ¹	幼鱼	亚科间	2n
Caesaryan et al.	Nature ^[7] , 1979	泥鳅	泥鳅 ¹	幼鱼	种内	2n
吴尚勳等	实验生物学报 ^[12] , 1980	金鱼	金鱼 ¹	成鱼	种内	2n
童弟周等	中国科学 ^[13] , 1980	鲤	鲫 ¹	成鱼	属间	2n
严绍颐等	中国科学(B) ^[14] , 1984	鲫	鲤 ¹	成鱼	属间	2n
严绍颐等	生物工程学报 ^[15] , 1985	草鱼	团头鲂 ¹	成鱼	亚科间	2n
严绍颐等	Cytoplasm Org Sys ^[16] , 1989	罗非鱼	鲤 ¹	幼鱼	目间	2n
余来宁等	淡水渔业 ^[17] , 1989	鲤	鲫 ²	成鱼	属间	2n
余来宁等	淡水渔业 ^[17] , 1989	草鱼	团头鲂 ²	幼鱼	亚科间	2n
余来宁等	淡水渔业 ^[17] , 1989	罗非鱼	金鱼 ²	囊胚	目间	2n
严绍颐等	Int. J. Dev. Biol. ^[18] , 1990	罗非鱼	金鱼 ¹	囊胚	目间	2n
严绍颐等	Int. J. Dev. Biol. ^[18] , 1990	金鱼	大鳞副泥鳅 ¹	幼鱼	科间	2n
严绍颐等	Int. J. Dev. Biol. ^[18] , 1990	大鳞副泥鳅	金鱼 ¹	幼鱼	科间	2n
严绍颐等	Int. J. Dev. Biol. ^[19] , 1991	罗非鱼	大鳞副泥鳅 ¹	幼鱼	目间	2n
严绍颐等	Int. J. Dev. Biol. ^[19] , 1991	斑马鱼	大鳞副泥鳅 ¹	幼鱼	科间	2n
许桂珍等	生物技术 ^[20] , 1997	鳊	团头鲂 ¹	幼鱼	亚科间	2n
李书鸿等	生物工程学报 ^[21] , 1998	小鼠	大鳞副泥鳅 ¹	囊胚	纲间	2n
Niwa et al	Dev Growth Differ ^[8] , 1999	斑马鱼	斑马鱼 ²	成鱼	种内	3n
李 荔等	高技术通讯 ^[22] , 2000	斑马鱼	斑马鱼 ²	幼鱼	种内	2n
胡 炜等	科学通报 ^[23] , 2001	斑马鱼	斑马鱼 ¹	幼鱼	种内	2n

注:1-胞质受体为去核未受精卵;2-胞质受体为未去核未受精卵。

表2 鱼类体细胞核作为核供体移核成功的文献资料

Table 2 The references of successful nuclear transplantation using fish somatic cells as donor

资料来源	核供体	胞质受体	组合类型	核质杂种发育最后阶段
吴尚勳等, 1982 ^[1]	鲤成体红细胞核	金鱼	属间	成体
陆仁后等, 1982 ^[24]	培养草鱼尾鳍四倍体化细胞	草鱼	种内	囊胚期 ¹
陆仁后等, 1982 ^[24]	培养草鱼尾鳍四倍体化细胞	泥鳅	科间	心跳期 ¹ , 肌肉效应期 ²
陈宏溪等, 1986 ^[25]	鲫囊胚继代培养细胞	鲫	种内	原肠期 ¹ , 成鱼 ²
陈宏溪等, 1986 ^[25]	鲫肾短期培养细胞	鲫	种内	囊胚期 ¹ , 成鱼 ²
陈宏溪等, 1986 ^[25]	金鱼肾短期培养细胞	鲫	种内	幼胚 ¹ , 仔鱼 ²
张念慈等, 1990 ^[26]	草鱼培养胚胎细胞	青鱼	属间	心跳期
张念慈等, 1990 ^[26]	草鱼囊胚培养细胞	团头鲂	亚科间	体节出现期
齐福印等, 1992 ^[27]	草鱼头肾细胞	鲫	亚科间	原肠期 ¹ , 胚孔封闭期 ²
林礼堂等, 1996 ^[28]	鲫头肾细胞	鲤	属间	原肠期 ¹ , 血液循环期 ²
林礼堂等, 1996 ^[28]	鲢头肾细胞	鲤	亚科间	原肠期 ¹ , 心跳期 ²
林礼堂等, 1996 ^[28]	尼罗非鲫头肾细胞	鲤	目间	原肠期 ¹ , 肌肉效应期 ²
Ki - Young Lee, 2002 ^[10]	斑马鱼胚胎长期培养细胞	斑马鱼	种内	成鱼

注:1-原代培养细胞核移植;2-继代培养细胞核移植。胞质受体均为去核未受精卵。

2 细胞核移植的基本操作程序

细胞核移植技术操作主要包括细胞质受体及核供体的处理和制备、移核、核质杂种的培养等步骤。

2.1 胞质受体的准备

鱼类细胞质受体为成熟的未受精卵细胞,通常采用人工催产的方法获得。受体卵遇水即被激活从而获得发育能力,在接受供体核之前,一般要去除卵膜和卵核。卵膜可用钟表镊子机械剥除;或用含0.2%~0.5%胰蛋白酶的 Holtfreter 培养液(胰蛋白酶的浓度及种类视卵膜的性质有所不同)软化卵膜,并在换液过程中轻微摇动,使裸卵脱出。在裸卵动物极的极体处用玻璃针挑出卵核或用射线照射使卵核失活,去核时必须小心操作,以免损伤细胞质。

亦有学者用未去核卵作受体进行细胞核移植。余来宁等^[17]用未去核卵作受体进行了鲤鲫属间细胞核移植实验,获得了二倍体达到性成熟的核质杂种鱼,认为在细胞核移植过程中可以省略去除受体卵核的过程。齐福印等^[27]采用略加改进的余来宁等^[17]未去核的方法得到正常的鳙团移核鱼。李荔等^[22]用斑马鱼未去核卵进行了种内细胞核移植,通过切片研究,证明受体卵的雌原核已经退化,囊胚期核移植胚的染色体为二倍体。而 Niwa^[8]则在青鳉同种不同品系的细胞核移植中以未去核卵作为胞质受体,得到了不育的三倍体成鱼。通过对移核鱼的葡萄糖磷酸变位酶和 DNA 含量及染色体计数均证明它们的细胞核是由移入的细胞核和未被去掉的卵原核合并成的三倍体。Gasaran 等^[7]以泥鳅未去核卵进行细胞核移植时,则得到了单倍体、二倍体、三倍体和四倍体等多种不同的核移植胚胎。胡炜等^[23]以不去核未受精卵进行异种细胞核移植,获得了多尾卵原核加倍的雌核发育斑马鱼、泥鳅和金鱼。因此,去核与否,应视鱼种和要求而定。但受体卵去核仍是目前细胞核移植研究领域所普遍接受和采用的技术准则^[23]。

2.2 核供体的制备

2.2.1 胚胎细胞作为核供体 用作核供体的胚胎细胞一般为发育良好的囊胚期细胞。鱼类囊胚细胞易于分散,将胚盘切下后,用吸管轻轻反复吹打也能使细胞分散^[27];或将囊胚期胚胎置于合适的分离液中处理数分钟,使细胞游离出来成为单个细胞。

2.2.2 体细胞或培养细胞作为核供体 作为核供体最常用的体细胞或培养细胞是肾细胞、肝细胞或

尾鳍细胞。培养细胞可以是胚胎细胞,也可以是分化的体细胞,短期培养细胞要优于继代培养细胞。

使用新鲜的供体细胞进行细胞核移植时,在发育时间上要与胞质受体配合好,即成熟受体卵刚刚产出,而供体细胞恰好在囊胚期,这往往限制核移植操作的时间。可用如下几种办法解决核供体的来源:(1)低温保存干卵,即将干卵(未接触水的)低温保存十几小时后再受精;(2)超低温保存囊胚期细胞。柳凌等^[30]发现,用打散后超低温保存的草鱼和鲢鱼囊胚细胞作核供体与刚分离的新鲜细胞无异,且24 h均可进行操作,不冷冻则每天最多只能操作2~3 h(4批卵),但低温保存后移核胚胎的成活率低于未冷冻的胚胎;(3)体细胞或培养细胞。吴尚勳等^[1]1982年首先报道了直接将鲤鱼成体细胞核移植到金鱼去核卵中,共移植5 106个鱼卵,最后获得3尾幼鱼,其中1尾发育到成鱼。陈宏溪等^[25]鲫鱼囊胚期细胞的继代培养细胞作核供体进行种内核移植,得到了存活3年的不育成鱼。

2.3 移核

2.3.1 技术要点 在细胞核移植实验中,最关键的是移核技术。移核时,用微吸管将供体细胞吸入其中,微吸管的内径比细胞小但比细胞核大,使吸入的细胞破裂而细胞质不分散,紧包着细胞核,避免细胞核与液体接触受到损伤而影响发育能力。细胞吸入后,应停留在微吸管的尖端上,将微吸管头部刺入受体卵胚盘中心(胚盘高度的1/2处),把细胞核连同周围的少许细胞质轻轻注入其中。

2.3.2 移核时间的把握 核移植应在一定的时间内完成,受体卵激活后的去核时间、核移植的最佳操作时间都是极为重要的因素。操作时间过长,卵子胚盘举得很高,卵已变质,移核不易成功。根据鱼类胚胎发育的状况,操作时间控制在0.5 h内较为合适。

2.3.3 其他移核方式 除采用最传统的显微注射方法进行核移植外,电融合的方式也可用于鱼类细胞核移植。刘沛霖^[31]首次应用电融合技术开展了鱼类细胞核移植,大大简化了鱼类核移植的操作程序,提高了核移植的效率;易咏兰等^[32]以泥鳅和鲤的囊胚细胞为供体进行电融合,移核卵的囊胚最高比例为17.1%,鱼苗的最高比例为2%;李书鸿等^[33]重复泥鳅囊胚细胞和卵的同种电融合,得到了80%的融合率和20%的幼鱼孵化率。

2.4 核质杂种的培养

移核后的核质杂种胚胎经过了去膜、去核及外来核移入3次操作,同正常胚胎相比格外脆弱,在培养时要注意保证正常的生态要求,使外界条件利于胚胎的正常发育。一般是先将移核卵置于 Holtfreter 培养液中,发育至2~4细胞期时,转入1/2 Holtfreter 液中,发育到原肠期后,即可用曝气水培养。

3 鱼类细胞核移植的应用

3.1 在基础理论研究上的贡献

3.1.1 研究核质互作关系 童弟周等^[13]与中国科学院水生生物研究所合作,进行了鲤(核供体)和鲫(胞质受体)之间的核质配合,获得了正常生长并能传代的鲤鲫杂种鱼,这种杂种鱼的形态性状有的象核供体鱼,如口须和咽喉齿,有的象胞质受体鱼,如脊椎骨的数目,有的属于中间性状,如侧线鳞的数目。吴尚懃^[12]在不同品系金鱼间细胞核的多代核移植发现,经过1次核移植所得的鱼,后代性状与核供体基本相同,卵子胞质对性状分化的影响不明显;第2次核移植后,表现出胞质受体的尾鳍特征;第3次和第4次核移植后,胞质的影响更加显著。证明胞质的影响不仅可以改变表型,而且这种影响是可以累积的。由此得出结论:胞质和细胞核对遗传信息的表达都有影响,后代的表型是细胞核和胞质共同作用的结果,细胞核起了主导作用。

3.1.2 研究细胞核发育的全能性 在鱼类中,不仅在同种内,而且在远缘物种之间,用囊胚细胞核移植都能获得发育全能性的核质杂种鱼,但2种鱼亲缘关系越远,则成功率越小^[1]。证明细胞核发育全能性的最好方法是用已分化的体细胞作核供体进行核移植,看能否得到性成熟的核移植个体^[27]。陈宏溪等^[25]用性成熟的鲫短期培养肾细胞作核供体进行连续核移植,获得了1尾完全发育的性成熟成鱼。表明成鱼体细胞核仍具有发育全能性的潜能。余来宁等^[34]比较了草鱼不同胚胎时期的细胞核移植到不去核的未受精卵的发育潜能,结果发现随着供体细胞发育程度的升高,移核卵发育到原肠胚和仔鱼的能力逐渐降低,但只要经过适当的激活后,发育能力即可恢复。Wilmut^[5]以山羊乳腺细胞作为核供体成功的克隆了多利羊,有力的证明了已分化体细胞发育的全能性。但关于鱼类细胞核发育全能性的研究有待于进一步的深入研究。

3.2 鱼类育种上的应用

3.2.1 获得有经济价值的核质杂种鱼 迄今为止,

我国利用鱼类囊胚细胞作供体进行的核移植,得到过5种属间、亚科间和目间核质杂种鱼。这种核质间的远缘无性杂交与有性杂交相比,具有后代可育和性状不分离的优点,并会出现类似于有性杂交的杂种优势,这在遗传育种和生产上是极其重要的。其中,鲤鲫核质杂种鱼具有明显的生长优势,营养价值高,是一个很有应用价值和推广前景的优良核质杂种鱼。目前,鲤鲫核质杂种鱼已繁殖多代,而通过有性杂交得到的鲤鲫杂种往往是雄性不育的^[35]。严绍颐等^[15]把草鱼囊胚细胞核移到团头鲂去核卵中,得到了占移卵总数3.6%的核质杂种鱼,饲养到性成熟的雄鱼,与正常草鱼卵回交得到生长良好的子代。可以说,细胞核移植已成为鱼类育种的一种重要方法,为生物工程法培育鱼类新品种探索一条新途径。

3.2.2 开展鱼类多倍体育种 陆仁后等^[24]用培养36代的继代草鱼尾鳍细胞经秋水仙素诱导,染色体加倍后,建立了四倍体化的草鱼细胞株GCC(4),将其细胞核移植到草鱼及泥鳅的去核卵内,在342粒泥鳅卵中有6个发育到肌肉效应期,1个发育到心跳期。这是鱼类体细胞育种的首次报道。虽未得到成鱼,但为解决远缘杂交不育和开辟鱼类多倍体育种新途径作出了有益的探索。

3.2.3 培育鱼类体细胞工程抗病新品种 余来宁等^[34]用电融合方法进行了以对草鱼出血热不敏感的肝培养细胞为供体、以草鱼未去核、未受精卵为受体的同种细胞核移植,在继代移核卵中得到了1尾1年龄的幼鱼,这是鱼类体细胞工程抗病育种的一个重大进展。

3.2.4 鱼类雄核发育纯合二倍体的建立 刘汉勤等^[36]将大鳞副泥鳅与泥鳅杂交,挑去受精卵的雌原核,得到雄核发育的单倍体胚胎并发育至囊胚期,取细胞核作供体移植到大鳞副泥鳅去核卵内,得到了雄核发育的纯合二倍体后代,其中2尾存活了7个多月。形态鉴定、染色体检测及同工酶分析,均证明为真正的雄核发育二倍体泥鳅。由于雄核二倍体是纯合的,只需两代雄核发育即可获得纯系。通过细胞核移植人工诱导雄核发育,再通过染色体加倍得到纯合二倍体,对于纯化优良品种形状,保持纯种,提供选育种原始材料是很有价值的。此外,还为生产单性鱼,研究鱼类性别控制提供了一条捷径。这也是获得转基因同质化鱼的一条途径^[27]。

4 现存的问题及发展前景

4.1 现存问题

鱼类细胞核移植虽经过近40年的发展,在移核技术、移核方法和实际应用方面都取得了一定进展,但普遍存在着以下问题:

(1)核质杂种鱼成活率低。目前发育到成鱼的核质杂种最高比例为3.6%,为草团移核鱼^[15];鲤鲫移核鱼成功率为3.2%^[15],鲫鲤移核鱼仅为0.9%^[14],实验结果随机性和偶然性大;难以重复;核质杂种有时会出现生理或免疫缺陷。影响鱼类移核成功的因素很多,如鱼类细胞核移植技术不够完善,操作者的熟练程度,供体和受体的质量、细胞周期的配合及其亲缘关系等。亲缘关系越近,核质矛盾越小,相容性越大,核移植的成功率越高。亲缘关系远的鱼类核移植成功率低,这极大的限制了细胞核移植技术在实际中的应用。

(2)鱼类细胞核移植技术的研究深度不够。如供体核与受体卵细胞周期时相差异对移核胚胎发育的影响等研究在鱼类上几乎处于空白状态,只有一些研究间接揭示了鱼类核移植成功率低的原因。朱洗等^[39]认为鱼类胚胎发育较快,30 min左右即进行第1次有丝分裂,因而供体核进入受体胞质再程序化时间过短,使供体核不能完全再程序化,致使核移植胚胎死亡。陈宏溪等^[25]和余来宁等^[34]发现继代核移植等延长了移入的供体核再程序化的时间,提高了培养细胞的发育能力。而两栖动物和哺乳动物在此问题的研究上相对深入。Gurdon^[37]认为供体核移入受体卵后,在卵细胞质作用下发生去分化,核基因活动被调节,即发生细胞核程序重编,有些基因被关闭,有些基因被打开,移入的核发生再程序化而重新开始发育。Wilmut等^[3]认为供体细胞核处于G₀期可提高核移植的成活率,而Cibelli^[38]等则认为供体细胞处于G₀期并非必要。哺乳动物细胞核移植研究发现,细胞核在M II卵细胞质中再程序化的时间较长,也能改善体细胞核移植胚胎的发育能力。

(3)海水鱼类细胞核移植研究目前尚处于空白状态。这与海水鱼类的基础研究滞后于淡水鱼类有一定的关系。另外,海水鱼卵的结构特点使进行核移植的操作难度增大。

(4)鱼类细胞核移植检测手段有待于进一步完善。目前使用的检测依据主要是表型特征、蛋白质和同工酶技术及核型分析,这些手段都存在着缺陷。

移核胚胎在发育过程中,环境因素会影响表型特征;细胞在分化过程中,遗传物质可能会发生变化,包括DNA重排、基因扩增、基因转位及基因缺失等,供体核如果取自分化程度较高的细胞,核移植胚的遗传表型也可能发生变化,这使得利用表型检测的方法受到限制^[40]。蛋白质和同工酶检测到的基因座位十分有限,而且无法检测非编码基因序列,而可作为准确和灵敏检测手段的鱼类品系或个体特有的DNA分子标记所知甚少,因此寻找鱼类特异性的分子标记是细胞核移植检测的重要内容之一。

4.2 发展前景

(1)细胞核移植技术将缩短鱼类良种的培育时间,在育种方面发挥更大的作用。鱼类育种的单性发育技术日趋成熟^[41],若将细胞核移植技术和单性发育相结合,一个世代即可获得鱼类的纯系,与常规鱼类纯系建立的方法相比,育种时间至少可以缩短一个世代。这对于一些性成熟时间较长的名特优鱼类,意义尤为重大^[27]。

(2)细胞核移植和基因打靶技术相结合,可以制作出定点突变的转基因鱼类。自1985年转基因鱼首次在中国获得成功以来^[41],至今在世界上获得的十几种转基因鱼大多采用显微注射、精子携带等方法进行基因转移,这些方法普遍存在着外源基因随机整合、遗传稳定性差及易发生遗传病等缺陷。而通过胚胎干细胞介导的基因转移技术,则有可能实现外源基因的定点整合,制作出定点突变的转基因(Knock-in)或缺基因(Knock-out)鱼^[43]。目前,正-负选择程序及同源重组载体技术在鱼类上已经建立^[44],并且胚胎干细胞的研究已从模式鱼发展到了经济鱼类,本实验室首次建立了花鲈胚胎干细胞系^[45]。特别是Lee等^[10]在国际上首次将整合外源GFP基因的斑马鱼长期培养的胚胎细胞核移植到同种鱼的去核卵中,制作出了可成活的二倍体后代。这一重大进展为细胞核移植在鱼类基因工程育种上的应用奠定了良好基础。因此,细胞核移植和胚胎干细胞培养及基因打靶技术相结合,在鱼类基因工程育种上前景广阔。

(3)为鱼类种质保存提供新的技术手段,在保存和传播动物资源上发挥更大作用。将体细胞核移植技术用于挽救濒危动物,在哺乳动物上已有成功的先例,新西兰的科学家们利用这种技术成功的克隆了当地一头濒临灭绝的土种牛^[46];我国科学家把大熊猫的体细胞核移植到兔卵胞质中可以发育到囊

胚^[47]。在濒危鱼类保护方面,尚未有类似的报道。但如果在鱼类方面开展此类工作,条件比较成熟,因为在鱼类中已证明可获得具有发育全能性的核质杂种鱼,并且鱼类核质不亲和性较其他动物限制小。此外,如果细胞核移植技术和囊胚冷冻保存结合起来,可以将珍稀濒危鱼类的囊胚细胞长期冷冻保存,并作为核供体移植到其他鱼类的未受精卵内,从而增加濒危鱼类的资源量。

总之,随着鱼类细胞核移植技术的完善和发展,核移植技术在发育生物学、细胞生物学、分子生物学等领域将发挥越来越重要的作用,应用将越来越广泛。

参考文献:

- [1] 严绍颀. 鱼类细胞核移植的历史回顾与讨论[J]. 生物工程学报, 2000, 16(5): 541-547.
- [2] Spermann H. Embryonic development, induction [M]. New York: Hafner Publishing Co, 1938. 210-211.
- [3] Commandon J, de Fonbrune F. Greffe nuclear total, simple ou mutiple, chenye uneamibe[J]. C R Soc Bio (Paris), 1939, 130: 744-748.
- [4] Briggs R, King T J. Transplantation of living cell nuclei from blastula cells into enucleated frog eggs[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1952, 38: 455-463.
- [5] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cell [J]. Nature, 1997, 385: 810-813.
- [6] 童弟周, 吴尚勤, 叶毓芬, 等. 鱼类细胞核的移植[J]. 科学通报, 1963, 13(7): 60-61.
- [7] Gasaryan K G, Nauen Mong Hung, Meyfakn A A, et al. Nuclear transplantation in teleost *Misgurnus fossilis* [J]. Nature, 1979, 280: 585-587.
- [8] Niwa K, Ladygina T, Kinoshita M, et al. Transplantation of blastula nuclei to non-enucleated eggs in the medaka (*Gryzias latipes*) [J]. Develop Growth Differ, 1999, 41: 163-172.
- [9] Wakamatsu Y, Ju B S, Pristayzhnyuk I, et al. Fertile and diploid nuclear transplants derived from embryonic cells of a small laboratory fish, Medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(3): 1071-1076.
- [10] Ki-Young Lee, Haigen Huang, Bensheng Ju, et al. Cloned zebrafish by nuclear transfer from long-term cultured cells [J]. Nature, 2002, 20(8): 795-799.
- [11] 童弟周, 叶毓芬, 陆德裕, 等. 鱼类不同亚科间细胞核移植[J]. 动物学报, 1973, 19(3): 201-209.
- [12] 吴尚勤, 蔡难儿, 徐权汉. 不同品系金鱼间细胞核的多代移植[J]. 实验生物学报, 1980, 13(1): 65-74.
- [13] 童弟周. 硬骨鱼类的细胞核移植—鲤鱼细胞核和鲫鱼细胞质配合的杂种鱼[J]. 中国科学, 1980, 23(4): 517-523.
- [14] 严绍颀, 陆德裕, 杜森, 等. 硬骨鱼类的细胞核移植—鲫鱼细胞核和鲤鱼细胞质配合的杂种鱼[J]. 中国科学 (B辑), 1984, 8: 729-732.
- [15] 严绍颀, 陆德裕, 杜森, 等. 硬骨鱼类的细胞核移植Ⅲa—由草鱼细胞核和团头鲂细胞质配合而成的核质杂种鱼(英文)[J]. 生物工程学报, 1985, 1(4): 15-26.
- [16] Yan S Y. The nucleo-cytoplasmic interaction as revealed by nuclear transplantation in fish [A]. Cytoplasm organization system [C]. New York McGraw-Hill Pub. Co., 1989. 61-81.
- [17] 余来宁, 杨永铨, 柳凌, 等. 用未去核卵作受体的鱼类细胞核移植研究[J]. 淡水渔业, 1989, 3: 3-7.
- [18] Yan S Y, Tu M, Yang H Y, et al. Developmental incompatibility between cell nucleus and cytoplasm as revealed by nuclear transplantation experiments in teleost of different families and orders [J]. Int J Dev Biol, 1990, 34: 255-265.
- [19] Yan S Y, Mao Z R, Yang H Y, et al. Further investigation on nuclear transplantation in different orders in teleost: the combination of the nucleus of *Tilapia (Oreochromis nilotica)* [J]. Int J Dev Biol, 1991, 35: 429-435.
- [20] 许桂珍, 齐福印, 王思珍. 鳊团移核鱼的形态性状与个体生长[J]. 生物技术, 1997, 7(1): 13-16.
- [21] 李书鸿, 毛钟荣, 韩文, 等. 不同纲动物间的细胞核移植—将小鼠细胞核移到泥鳅细胞质中[J]. 生物工程学报, 1998, 14(3): 345-347.
- [22] 李荔, 张士瑞, 王锐, 等. 斑马鱼的克隆: 囊胚细胞核移入正常具核卵子的发育[J]. 高技术通讯, 2000, 7: 24-27.
- [23] 胡炜, 汪亚平, 陈尚萍, 等. 不同品系斑马鱼的细胞核移植[J]. 科学通报, 2001, 46(24): 2062-2065.
- [24] 陆仁后, 李燕腾, 易詠兰, 等. 四倍体化草鱼细胞株的获得、特性及核移植的初步探讨[J]. 遗传学报, 1982, 9(5): 381-388.
- [25] 陈宏溪, 易詠兰, 陈敏容, 等. 鱼类培养细胞核发育潜能的研究[J]. 水生生物学报, 1986, 10(1): 1-7.
- [26] 张念慈, 曹铮, 尹文林, 等. 草鱼、青鱼体外培养细胞的属间、亚科间核移植[J]. 水产学报, 1990, 14(4): 344-346.
- [27] 齐福印, 许桂珍. 鳊团移核鱼的遗传性状与个体生长[J]. 动物学报, 1997, 43(2): 211-213.
- [28] 林礼堂, 夏仕玲, 朱新平, 等. 硬骨鱼类细胞核移植的研究[J]. 动物学研究, 1996, 17(3): 337-340.
- [29] 刘同明, 吴清江. 硬骨鱼类细胞核移植的研究进展[J]. 生物技术通报, 2000, 6: 24-29.
- [30] 柳凌, 余来宁. 用超低温保存的囊胚细胞进行核移植试验[J]. 淡水渔业, 1989, 4: 10-13.
- [31] 刘沛霖, 易詠兰, 刘汉勤, 等. 鱼类细胞电融合的初步研究[J]. 水生生物学报, 1988, 12(1): 94-96.
- [32] 易詠兰, 刘沛霖, 刘汉勤, 等. 鱼类囊胚细胞和卵的电融合[J]. 水生生物学报, 1988, 12(2): 189-192.
- [33] Li S H, Yi Y L, Chen H K, et al. Electrofusion between blastula cells and unfertilized eggs in loach (*Paramisaurinus*) [J]. Devel Reprod Biol, 1993, 2(1): 50-61.

- [34] 余来宁, 左文功, 方耀林, 等. 用电融合结合继代移核方法构建抗病体细胞工程鱼[J]. 水产学报, 1996, 20(4): 314 - 318.
- [35] 楼允东, 刘明华, 杨先乐, 等. 鱼类育种学[M]. 上海: 百家出版社, 1989. 209 - 217.
- [36] 刘汉勤, 易咏兰, 陈宏溪. 泥鳅雄核发育纯合二倍体的产生[J]. 水生生物学报, 1987, 3: 241 - 246.
- [37] Gurdon T B. Nuclear transplantation in eggs and oocytes[J]. J Cell Sci, 1986, 4(suppl): 287 - 318.
- [38] Cibelli J B, Stice S L, Golueker P J, et al. cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts[J]. Science, 1998, 280: 1 256 - 1 258.
- [39] 朱 洗, 陈兆熙, 王幽兰, 等. 金鱼和鲮鱼卵球受精的细胞学研究[J]. 实验生物学报, 1960, 7(1): 29 - 46.
- [40] 陆长富, 卢光秀. 哺乳动物的核移植[J]. 1998, 遗传, 20(4): 34 - 38.
- [41] 朱作言, 许克圣, 谢岳峰, 等. 转基因鱼模型的建立[J]. 中国科学(B辑), 19892; 147 - 155.
- [42] Zhu Z, Li G, He L, et al. Novel gene transfer into the fertilized eggs of gold fish (*Carassius auratus* L, 1758)[J]. Agnew Ichthyol, 1985, 1: 31 - 34.
- [43] 陈松林, Hong Y H, Scharl M. 鱼类胚胎干细胞的研究进展[J]. 中国水产科学, 2000, 7(4): 95 - 98.
- [44] Chen S L, Hong Y H, Scharl M, et al. Development of positive - negative selection procedure for gene targeting in fish[J]. Aqu, 2002, 214: 67 - 79.
- [45] Chen S L, Sha Z X, Ye H Q, et al. Establishment of a pluripotent embryonic stem cell line from sea perch, *Lateolabrax japonicus*, blastula embryos[J]. Aqu, 2003, 218: 141 - 151.
- [46] 侯 健, 陈学进, 安晓荣, 等. 哺乳动物体细胞核移植研究进展及其应用前景[J]. 生物技术通报, 1999, 5: 16 - 19.
- [47] 陈大元, 孙青原, 刘冀琬, 等. 大熊猫供核体细胞在兔卵胞质中可去分化而支持重组胚的发育[J]. 中国科学(C辑), 1999, 29(3): 324 - 330.

Progress and prospect of nuclear transplantation in fish

SHA Zhen-xia¹, CHEN Song-lin¹, LIU Yang^{1,2}, TANG Qi-sheng¹

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;

2. Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266071, China)

Abstract: Presently, one of the hot spots in the fields of biotechnology is nuclear transplantation, which is of great importance in the field of bioscience. This review briefly introduces the progress of nuclear transplantation on fish. It describes the main methods and procedures used in nuclear transplantation, including preparation of cytoplasm receptor and nuclear, nuclear transplanting and culture of the cytoplasm-nuclear hybrid. Some problems existing in this area were discussed. The application of the methods at present and in the future was also summarized.

Key words: fish; nuclear transplantation

Corresponding author: CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn