



## 我国鱼类细胞核移植研究的进展

Progress on research of nuclear transplantation of fish in China

楼允东 江涌

(上海水产大学, 200090)

Lou Yundong Jiang Yong

(Shanghai Fisheries University, 200090)

**关键词** 鱼类, 细胞核移植, 中国

**Key words** Fishes, Nuclear transplantation, China

细胞核移植是生物技术中的一朵奇葩,它是一种应用显微操作技术,将一种动物细胞的细胞核移入同种或异种动物的去核成熟卵内的精细技术。细胞核移植所得杂种称核质杂种。当初,人们进行细胞核移植的主要目的是利用它来研究胚胎发育过程中细胞内的细胞核和细胞质功能及两者之间的相互关系,探讨有关遗传、发育和细胞分化等方面的一些基本理论问题。后来发现,通过细胞核移植,即通过不同的细胞核和细胞质配合,还可培育出动物新品种。因此,细胞核移植的研究无论对于基础理论研究,还是探索动物育种新途径方面都具有重要的意义。

鱼类和两栖类是研究细胞核移植的极好材料,因为它们产卵数量多,卵的体积又大,且它们行体外受精和体外发育,胚胎操作较哺乳类简单。因此,自本世纪50年代开始,发育生物学家采用细胞核移植技术,以鱼类和两栖类为材料,进行了许多有关这方面的研究工作,并取得了卓越的成果,尤其是鱼类的细胞核移植。但在哺乳类尚处于试验阶段,直到最近才取得突破性进展,如克隆羊“多莉(Dolly)”的诞生。我国在用细胞核移植技术选育鱼类新品种方面是有特色的,处于国际领先地位。本文仅就这方面的情况作一简要评述。

### 1 鱼类细胞核移植研究的历史

早在1938年,德国著名胚胎学家Spemann就提出了细胞核移植的设想,但未能付诸实施<sup>[23]</sup>。直至1952年,美国的两位实验胚胎学家Briggs和King首先报道细胞核移植方法在两栖类蛙卵中获得成功<sup>[22]</sup>,以后美国、英国和日本的一些实验室均用两栖类卵进行细胞核移植的研究。

从本世纪60年代开始,我国已故著名生物学家童第周(1902~1979)及其研究组就创造性地把细胞核移植技术应用到硬骨鱼类,以研究细胞核和细胞质对发育的影响,并在金鱼(*Carassius auratus*)和中华鲢(*Rhodeus sinensis*)的同种核移植中首次获得成功,证明鱼类细胞核的发育情况和两栖类基本一致<sup>[17,18]</sup>。后来,吴尚勤等以3个具有不同遗传性状的金鱼品系为材料,用核移植的方法进行核质配合以观

收稿日期:1997-09-08

察细胞核和细胞质对性状表现的影响以及两者之间的相互作用。结果发现, 经过第 1 次移核所得的鱼, 其性状基本上与供体鱼相似, 受体细胞质对性状分化的影响不明显, 但经过多代核移植后, 由于细胞质的影响, 移核鱼中出现受体性状的个体越来越多, 而且这种表现型的改变还能遗传给下一代<sup>[4]</sup>。1973 年, 童第周等人进行了不同亚科间细胞核的移植, 得出了与两栖类不同的结果。他们将金鱼囊胚细胞的细胞核移植到鲫鱼的去核卵中, 所得胚胎基本上是稜鳉鱼的性状。反之, 将鲫鱼囊胚细胞的细胞核移植到金鱼的去核卵中, 结果所得到的胚胎, 有的性状象鲫鱼, 有的性状象金鱼, 属于中间类型, 很象两者的杂交种。表明除细胞核外, 细胞质对性状的遗传也有一定的影响<sup>[19]</sup>。1974 年~1976 年, 童第周与中国科学院水生生物研究所合作, 又进行了同科不同属的鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 与鲫鱼 (*Carassius auratus*) 之间的核质配合, 即把鲤鱼囊胚细胞的核移入鲫鱼的去核卵中, 结果获得了生长正常并能传代的鲤鱼细胞核和鲫鱼细胞质配合的杂种鱼—CyCa 杂种鱼。这种杂种鱼的形态性状, 有的象供体细胞核的鱼, 如口须和咽喉齿, 有的象受体细胞质的鱼, 如脊椎骨的数目, 有的则属于中间性状, 如侧线鳞的数目。由此得出结论认为, 在这种鲤细胞核和鲫细胞质配合的杂种鱼中, 细胞核和细胞质对遗传信息的表达都有影响<sup>[20]</sup>。后来, 严绍颐等又在鲤鲫鱼之间进行相反的组合, 即把鲫鱼囊胚细胞的核移入鲤鱼的去核卵中, 结果获得了鲫鱼细胞核和鲤鱼细胞质配合的杂种鱼—CaCy 杂种鱼, 并能养大成熟。从观察到的形态特征来看, 其口须、咽喉齿、侧线鳞数目和脊椎骨数目均相似于供体细胞核鱼。这与上面提到的 CyCa 杂种鱼的情况有所不同。是否这两种鱼的细胞核和细胞质在不同的配合情况下, 它们的核质相互作用有所不同, 这很值得深入研究<sup>[8]</sup>。

1977 年~1981 年, 严绍颐等与长江水产研究所协作, 用细胞核移植的方法, 获得了亲缘关系更远的不同亚科间的核质杂种鱼, 即由草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 囊胚细胞核和团头鲂 (*Megalobrama amblycephala*) 去核卵配合而成的杂种鱼—CtMe 杂种鱼。这种杂种鱼的若干形态特征, 如体长/头长、体长/体高、体长/体宽、背鳍硬刺、腹棱、臀鳍条数、鳃耙数、咽喉齿、侧线鳞数和脊椎骨数等, 均与草鱼相似, 表明该 CtMe 核质杂种鱼的这些特征受草鱼细胞核的影响<sup>[9]</sup>。

上述硬骨鱼类细胞核的移植试验, 都是直接将未分化的囊胚细胞作为供体。陈宏溪等<sup>[7]</sup>通过细胞培养与细胞核移植相结合的方法, 研究将鱼类囊胚细胞经短期培养后产生的继代培养细胞和经短期培养过的成鱼肾脏细胞的核移植到去核卵内的发育潜能。结果将鲫鱼囊胚细胞经 385d 59 代连续继代培养, 再移植到同种鱼的去核卵中, 获得 1 尾存活 3 年之久的移核鱼, 但性腺未分化, 不育; 将短期培养 (12~37d) 的性成熟鱼肾细胞的核移植到同种鱼的去核卵中, 获得 1 尾接近性成熟 (IV 期) 的移核鱼 (♀)。研究表明鱼类囊胚细胞的继代培养细胞核和已分化的成鱼体细胞仍具有重新发育成完整个体的全能性, 为用细胞核移植方法进行鱼类体细胞育种的可能性提供了依据。张念慈等<sup>[12]</sup>以在体外培养 378d 传代 16 次的草鱼胚胎 (发育至 6~7 个体节) 细胞作供体, 移入青鱼 (*Mylopharyngodon piceus*) 成熟的未受精卵, 得到 3 个发育至尾芽期的胚胎和 1 个心跳期的胚胎; 以体外培养 360 余 d 传代 15 次的青鱼囊胚细胞作供体, 移至团头鲂的未受精卵内, 得到 6 个发育至体节出现期的胚胎。这些结果同样表明, 在体外长期培养鱼类体细胞, 移植入成熟卵后, 仍保持有多种遗传信息, 并能表达出相当强的指导胚胎发育的潜力。

从 70 年代起, 我国在鱼类细胞核移植方面的研究得到迅速发展, 并逐渐从理论研究走向实际应用。到目前为止, 我国已先后获得了属间移核鱼 2 种, 即鲤鲫移核鱼 (CyCa 杂种鱼) 和鲫鲤移核鱼 (CaCy 杂种鱼); 亚科间移核鱼 2 种, 即草团移核鱼 (CtMe 杂种鱼) 和团草移核鱼 (MeCt 杂种鱼); 以及目间移核鱼 1 种, 即罗非鱼鲤鱼移核鱼; 共 5 种。前 4 种所得移核鱼都能长大, 有的已成熟并能繁殖后代, 长势良好, 具有明显的杂种优势; 最后 1 种也得到过幼鱼。据笔者所知, 至今国外尚未见有鱼类细胞核移植成功的报道。

另外, 如以我国在鱼类方面所得的结果与国外在两栖类方面所得的结果作比较, 例如根据日本学者西岗报道, 蛙类种间细胞核移植成功率为 0.08%~0.12%<sup>[8]</sup>; 而我们在亲缘关系更远的鲤鲫移核鱼 (属间) 的成功率为 3.2%<sup>[20]</sup>, 鲫鲤移核鱼的成功率为 0.9%<sup>[8]</sup>, 草团移核鱼 (亚科间) 的成功率为 3.6%<sup>[9]</sup>, 其成功率都大大超过两栖类。

## 2 鱼类细胞核移植的技术要点

鱼类细胞核移植包括供体与受体的准备、去卵膜、挑去卵核、分离囊胚细胞和移核等 5 个程序, 其技术

细节已有详细介绍<sup>[1,10,13,21]</sup>,这里只论述有关要点以及若干改进之处。

### 2.1 供体与受体的准备

前已叙及,细胞核移植就是将一种动物细胞的核与同种或异种动物的细胞质(去核卵)的结合,前者为供体,后者为受体。供体通常为鱼类的囊胚细胞或成体细胞,受体则为成熟的卵细胞。受体卵一般可采用人工催产的方法得到。卵子在接受供体核前,先要被激活以获得发育能力,鱼卵挤入水中即被激活。而两栖类卵的激活可采用针刺的方法。

这里最关键的是两者在发育时间上要配合好,要求受体成熟卵刚产出时,正好供体受精卵发育至囊胚期,否则无法进行核移植。目前有3种解决供体与受体时间配合问题的有效方法:①超低温保存供体囊胚细胞<sup>[15]</sup>;②用温度控制供体受精卵的发育速度,以求达到供体与受体在时间上的良好配合<sup>[2]</sup>;③用成体细胞的核代替囊胚细胞的核作供体,不经体外培养直接移植到去核卵中<sup>[13,14]</sup>,或成体细胞(如肾细胞)经短期培养后再移植到去核卵中<sup>[7]</sup>。

### 2.2 去卵膜

移核前,鱼卵需先去膜,可用不锈钢钟表镊在解剖显微镜下仔细地剥去卵膜<sup>[1]</sup>或用 Holtfreter 氏液配制的 0.25%~0.5% 胰蛋白酶液软化卵膜,并在换液过程中辅以轻微的摇动,使卵子从容脱出<sup>[10]</sup>。

### 2.3 挑去卵核

在两栖类,大多数采用紫外线照射受体卵作为去核的方法,鱼卵则用极细的玻璃微针(针尖为 2~4 $\mu$ m),藉助第二极体为标志(卵核位于极体下方),在极体的近旁刺入卵内,再往外一挑,卵核即与少许细胞质一同流出。挑核处的伤口在 Holtfreter 氏液中很快愈合,此卵即可作为移核用的受体。

传统的细胞核移植,一直是把供体的囊胚细胞移入受体去核卵内,但余来宁等<sup>[6]</sup>进行了用不去核的卵作受体的鱼类细胞核移植试验,结果获得了 10 尾存活 7d 以上的仔鱼,其中 1 尾未去核鲤鲫移核鱼存活两年以上,达到性成熟。从形态特征、染色体和同工酶分析结果表明,不去核移植和去核移植都能获得二倍体核质杂种鱼,卵子中未被挑去的单倍体卵核在移核手术后的发育过程中被排斥掉了。因此细胞核移植可以省略去核程序。易咏兰等<sup>[10]</sup>也认为受体卵可不去核。去核与否,视要求而定。

### 2.4 供体细胞的制备

将发育至囊胚期的胚胎或组织器官加以机械地切割,置于细胞分离液或以它作溶剂配制而成的胰蛋白酶处理数分钟,分离成单个细胞或游离出细胞来;也可将囊胚细胞或分化的细胞离体后,经短期培养或继代培养后作供体,以短期培养的为佳。

### 2.5 移核

在细胞核移植操作中,最关键的是移核,因为细胞核很小且极脆弱,因此在作核移植时必须做到既不损伤细胞核,也不能伤害细胞质,只有这样才能保证移核卵正常发育。由于供体细胞的核极小,无法单独吸出,而且细胞核直接与液体接触即会受损伤而影响其发育能力,因些移核时实际上都是把核周围的少许细胞质一起注入受体去核卵内。所以,挑选合适的微吸管是移核技术中的重要一环,微吸管的内径要比供体细胞小而比细胞核大。

受体细胞被吸入微吸管后应控制在管端,以免将它注入去核卵时带进过多的培养液。另外,微吸管刺入的深度以不超过去核卵胚盘高度的 1/2 为宜,切勿刺得太深,以免管口穿过胚盘而误入卵黄内。

整个移核操作应在一定时间内完成,通常不超过 30~40min(16~18℃)。时间过久,卵会变质,移核不易成功。如果卵子成熟度适中、去卵膜时卵子未受伤、挑卵核准确以及注入供体核的时间和部位合适,则移入细胞核后的卵子一般都能进行卵裂,有些卵子的卵裂与正常者无异,其中一部分可以发育至原肠胚,有的还可以长成幼鱼和成鱼,并能达到性成熟。

## 3 细胞核移植技术在育种上的应用

### 3.1 利用核移植获得核质杂种

前已叙及,我国利用鱼类囊胚细胞的核移植到不同属、不同亚科甚至不同目的去核卵内,得到 5 种核质杂种鱼。其中鲤鲫核质杂种鱼具有明显的生长优势,容易饲养,肌肉中蛋白质含量高,脂肪和水分含量

低,可食部分多,且味道鲜美,是一个很有应用价值的优良核质杂种鱼<sup>[10]</sup>。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<sup>[21]</sup>。草团核质杂种鱼曾得到过性成熟的雄鱼,并与正常草鱼(♀)回交得到生长良好的子代。初步观察表明,该核质杂种鱼的生长速度明显比团头鲂快,且没有象草鱼那样因感染疾病而死亡的例子<sup>[9]</sup>。另外,草鱼和团头鲂的有性杂交,由于亲缘关系较远,亲本之间相容性差,它们的杂交胚胎往往不正常,或在不同发育阶段致死,或即使能获得少数成鱼,它们也因性腺发育不良而不能繁殖后代形成杂种体系。而用细胞核移植的方法则能在远缘鱼类之间获得核质杂种鱼,且它们因能繁殖后代而有可能发展为新的鱼类g 隆,为用生物工程的方法培育鱼类新品种探索一条新途径。

### 3.2 鱼类雄核发育纯合二倍体的产生

刘汉勤等<sup>[3]</sup>将两个不同属的泥鳅,即大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)♀和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)♂杂交,然后用玻璃针挑去受精卵的雌核,得到泥鳅雄核发育单倍体胚胎。待单倍体发育至囊胚,再将其囊胚细胞核移入到大鳞副泥鳅的去核卵内,结果得到雄核发育纯合二倍体泥鳅。通过染色体鉴定( $2n=100$ ),肌肉LDH同工酶电泳和形态鉴别表明,实属泥鳅的特性,因此是真正的雄核发育纯合二倍体鱼。他们还分析了染色体加倍的机制,认为可能是当单倍体细胞核移植胚胎在发育过程中,将G<sub>2</sub>期细胞移入细胞质后,又进行了1次DNA合成才进行卵裂的。这种通过核质移植技术人工诱导雄核发育,然后通过染色体加倍而得到的纯合二倍体,对于纯化鱼类优良品种的性状,控制性状分离,保持纯种,提供选育种的原始材料是很有价值的。

### 3.3 鱼类多倍体育种

陆仁厚等<sup>[5]</sup>报道,将培养到第36代的草鱼尾鳍细胞Ct36经秋水仙素处理后约有71%左右细胞染色体加倍成为四倍化,再经过6次再培养以后四倍化细胞可上升到78%左右,建立了四倍化的草鱼细胞株GCC(4)。然后再将这种四倍化培养细胞移植到草鱼及泥鳅的去核卵内,有80%的草鱼卵发育到囊胚。在总数为342个泥鳅移核卵中有6个发育到肌肉效应期,其中1个发育到心跳期。说明这些经过长期培养、多次传代并经过秋水仙素诱变的细胞,仍然具有多种遗传信息和发育潜能,为解决鱼类远缘杂种不育和开辟鱼类多倍体育种新途径作了有益的探索。

### 3.4 鱼类染色体转移

基于鱼类早期囊胚细胞具有发育的全能性,因此,如果用囊胚细胞的融合来引进外来的染色体以及改造原有细胞的遗传组分,然后再把融合的囊胚细胞的核移植到去核的成熟卵里去,那么就有可能产生具有新的遗传性的个体。为此,郑瑞珍等<sup>[11]</sup>采用细胞核移植和体细胞杂交相结合的方法,先用β-丙内酯灭活的仙台病毒促使金鱼囊胚细胞融合,然后把融合的囊胚细胞移植到去核卵内,结果半数的移核卵能够发育,通过对11个移核胚胎的染色体分析,发现有9种不同的染色体数目,最少的仅65条,最多的高达230条,说明融合的囊胚细胞核移植到去核卵后,既能促使受体卵发育,又能使移核胚胎染色体普遍发生重排。因此利用这一技术有可能获得各种不同数量染色体的鱼类细胞群。如果把这些细胞群培养起来,对于开展鱼类细胞遗传学和基因定位研究是十分有用的。另外,根据对11个移核胚胎染色体的分析,其中9个胚胎有超二倍体的核型,说明有82%的胚胎染色体转移成功。因此,可以利用这一技术系统来研究鱼类外源染色体对发育的影响以及探索改良品种的可能性。

综上所述,核移植技术在鱼类育种上的应用还刚刚开始,要达到大规模实用阶段尚有较大的距离,但从已获得的初步成果来看,核移植技术是鱼类育种的一条潜在的新途径,人们可以期待不久的将来,定会取得突破性进展。

## 参 考 文 献

- [1] 中国科学院北京动物研究所细胞室. 鱼类细胞核移植技术. 动物学杂志, 1975, 2: 44~47
- [2] 方耀林等. 核质杂交试验中用温度控制供体胚胎发育的尝试. 动物学杂志, 1993, 28(6): 9~12
- [3] 刘汉勤等. 泥鳅雄核发育纯合二倍体的产生. 水生生物学报, 1987, 11(3): 241~246
- [4] 吴尚勤等. 不同品系金鱼间细胞核的多代移植. 实验生物学报, 1980, 13(1): 65~77

- [ 5] 陆仁厚等. 四倍化草鱼细胞株的获得、特性和移核实验的初步试探. 遗传学报, 1982, 9(5): 381~388
- [ 6] 余来宁等. 用未去核卵作受体的鱼类细胞核移植. 淡水渔业, 1989, 3: 3~7
- [ 7] 陈宏溪等. 鱼类培养细胞发育潜能的研究. 水生生物学报, 1986, 10(1): 1~7
- [ 8] 严绍颐等. 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. 中国科学(B 辑), 1984, 8: 729~732。
- [ 9] 严绍颐等. 硬骨鱼类的细胞核移植Ⅲ a. 不同亚科间的细胞核移植—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). 生物工程学报, 1985, 1(4): 15~26。
- [10] 易咏兰等. 鱼类细胞核的移植及其应用. 生物科学动态, 1988, 5: 12~17
- [11] 郑瑞珍等. 鱼类染色体转移—仙台病毒融合胚胎细胞细胞核移植的初步研究. 遗传, 1986, 8(3): 28~30
- [12] 张念慈等. 草鱼、青鱼体外培养细胞的属间、亚科间核移植. 水产学报, 1990, 14(4): 344~346
- [13] 林礼堂等. 硬骨鱼类体细胞的移植(1)鲫鱼体细胞核和鲤鱼卵细胞质配合的移植. 淡水渔业, 1991, 2: 9~11
- [14] 林礼堂等. 硬骨鱼类体细胞核移植的研究. 动物学研究, 1996, 17(3): 337~340
- [15] 柳凌等. 用超低温保存的囊胚细胞进行核移植试验. 淡水渔业, 1989, 4: 10~13
- [16] 童第周. 细胞质对细胞核的活动和遗传性状表现的作用. 遗传学报, 1978, 5: 1~7
- [17] 童第周等. 细胞核的移植. 动物学报, 1963a, 15(1): 151~167
- [18] 童第周等. 鱼类细胞核的移植. 科学通报, 1963b, 7: 60~61
- [19] 童第周等. 鱼类不同亚科间细胞核移植. 动物学报, 1973, 19(3): 201~209
- [20] 童第周等. 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. 中国科学, 1980, 4: 376~380
- [21] 楼允东等. 鱼类育种学. 百家出版社(沪), 1989. 209~217
- [22] Briggs R., T J. King. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's egg. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., 1952, 48: 455~463
- [23] Browder L W. Developmental Biology. Philadelphia, USA., 1980