

文章编号: 1003-8701(1999)04-0049-05

浅谈克隆技术及品种改良

母秋华

(中国人民解放军农牧大学农学农机系, 长春 130062)

摘要: 克隆技术一直是微生物制药、植物细胞工程、遗传转化的核心技术, 动物的克隆技术是在此基础上发展起来的, 克隆羊的诞生, 是动物也具有细胞全能性的例证。这项技术在品种改良、发展器官农场、生物反应器的利用方面存在着巨大的潜力, 标志着动物可进入无性繁殖的新阶段。

关键词: 克隆技术; 品种改良; 细胞工程; 遗传转化

中图分类号: S 188

文献标识码: A

生命科学特别是生物技术, 作为最有生命力的新兴领域, 在世界各国之间竞争十分激烈, 克隆技术又是生物技术的核心。半个世纪以来, 克隆技术在微生物、农作物、动物品种改良中有了长足的发展并存在着巨大潜力。

前不久, 英国“多利”克隆羊诞生后, 美国又宣布已人工克隆出罗猴(rhesus mankeys)。这些科学进展不但震动了科学界, 而且在社会各界及各国政府中也引起强烈反响。上述克隆技术在动物遗传操作上的进展是人类共同智慧的结晶。为了进一步掌握、应用克隆技术, 造福人类, 本文对克隆技术的发展和利用现状及一些问题进行了论述与展望。

1 克隆技术的发展

1.1 克隆(Clon 或 Clone)的定义

克隆又称为无性繁殖细胞系或无性繁殖系。是指在人工遗传操作条件下, 以一个细胞或个体以无性方式重复分裂或繁殖所产生的一群细胞或一群个体, 在不发生突变的情况下具有完全相同的遗传结构。克隆也就是 Clone 的译音, 简单的讲就是一种人工诱导的无性繁殖, 这种生物技术也叫做克隆技术。

1.2 克隆技术的发展

克隆技术又称为人工控制条件下的无性繁殖。早在 40 年代, 科学家就在微生物、微生物制药中发现了这一技术。克隆技术的发展是和细胞遗传学的发展紧密相关的。因为体细胞遗传学是主要研究体细胞特别是离体培养的高等动、植物等生物体细胞增殖、分化和个体发育遗传规律的。本世纪以来, 中外科学家在该领域的研究工作中做出了卓绝贡献^[1]。在遗传学的重大成果中就有多项重大发现与克隆技术的发展紧密相关(表 1)。

2 克隆技术的应用

近年来, 由于中外科学家的努力, 使细胞遗传学、微生物学、分子生物学都有了很大发

展,在这些领域内克隆技术的应用就显示出它独到的优越性和应用的广泛性。

表 1 细胞遗传学及 Clone 技术重要进展年代

发表年代	内 容	作 者
1902	细胞全能性的预见性提出	Haberlandt
1907	用淋巴液培养蛙的中枢神经片断,观察到了神经细胞的派生现象,发明了组织培养	R.G.Harrison
1918	证明有生命的胎可以刺激它部分形态建成,并导致分化(胚胎诱导),便命名为“组织原”	H.Spemann
1934	建立了离体蕃茄根尖的第一个活跃生长的无性系	White
1934	应用植物激素对重要作物的组织培养做出贡献	罗士伟、崔微
1940	筛选优良的青霉菌细胞系无性繁殖,进行 panleillin 的生物制药	Alexanden Fleming
1946	以亚洲瓢虫为杂交实验材料,提出了镶嵌显性理论	谈家桢
1952	记述了由霉体细胞杂交重组核,形成能繁殖的纯系	G.Pontecorro
1952	将囊胚细胞活性核移植到去核的蛙卵里,观察到移植的细胞核染色体的变化	R.Briggs
1953	发现 DNA 的双螺旋模式	J.O.Watson
1955	提出的抗体选择系统,被 Clone 选择系统所接受,导致单克隆克体的应用	W.C.Jerne
1956	将人的体细胞离体培养或 Clone	T.T.Puks
1960	首次成功地进行了哺乳动物的离体杂交	G.Borski
1961	发展了大肠杆菌的无细胞体系	M.W.Nirenberg
1962	报道了蛙的肠细胞核注入去核的蛙卵中,可发育为正常可育的蛙	J.B.Gurdon
1967	报道了被选择的 OB 噬菌体分子,经过 74 次转移复制的 RNA 分子只有原来长度的 1/5	S.Spergelman
1971	从游离的烟草叶片原生质体培养出再生植株	Takebs
1972	发现了兰细菌的核糖体 RNA 于裸藻叶绿体的 DNA 杂交成功,据这种遗传同源性提出叶源共生系统	G.H.Pigott
1973	将不同质粒的限制性内切片断在体外连接,构成了第一个有生物学机能的杂交细菌	S.N.Conen
1980	玉米花粉细胞通过花药培养形成能多次继代培养并再生绿苗的 Clone,提出高等植物选种微生物化	曹致义、吴甲林 母秋华

2.1 克隆技术的优点

①由于克隆的细胞或大分子重组后的细胞是在试管内保存的,它具有数量多、增殖快($10^6\sim10^8/4$ 周)的特点。有足够的数量供于选择,可提高选择效率。②不受时间空间的限制,携带方便。③可以在细胞水平上保存重要的基因型、种质及基因。避免了在自然条件下物种在有性世代交替保存资源的麻烦。④可以通过理化诱变及遗传操作选择优良突变体,不仅能诱发显性突变,也可活化稳定性变异。⑤无性系变异后代变异广泛,可以根据选种目标定向培育,减少了由于基因型重组带来后代不易稳定的困难。⑥无性系变异后代可以遗传且后代稳定速度快,一般 2~4 代即可稳定,从而缩短了育种年限。⑦可以借助于某些载体导入异源 DNA,而实现遗传转化和基因扩增。

2.2 克隆技术在基因工程上的应用

近年来,由于生物化学、分子生物学、微生物制药工业的飞速发展,导致了以克隆技术为核心的基因工程的兴起。Chaales 和 Jacobs(1975)认为,细菌的变种之间的 DNA 可以整合,在原核生物中 DNA 的转化可以引起遗传修饰。又有许多作者认为,植物的细胞对于类似的遗传修饰是敏感的,因而建立了 DNA 遗传转化技术。

2.2.1 质粒的克隆

1977 年,从少数几种植物肿瘤中提取出来的农杆菌,它带有几个基因的质粒,整合到宿主中的 DNA 时,可以导致结瘤。不久人们便发现质粒具有复制能力强、转移性强、可标记性的特点,同时具有稳妥可靠、操作简便的优点。

2.2.2 噬菌体(Chazom)

噬菌体是克隆 DNA 大片断时而应用的模型载体的克隆。

2.2.3 粘粒载体的克隆

由于粘粒中带有有一个复制起点(colel)和一个抗药标记(ampl),它能像质粒一样导入大肠杆菌进行增殖($10^5\sim10^8/4$ 周)。

2.3 作物体细胞无性系(克隆)的变异与品种改良

70 年代末,利用体细胞无性系(Clone)的变异进行农作物的品种改良,已成为细胞工程育种的一个重要组成部分。一些学者发现,从 Clone 再生系统的大量后代中可以产生有益的突变体,一旦从突变的细胞系中建立起优良的细胞系 Clone 就可以大量繁殖、复制出同型个体,因此,这项技术在我国发展非常迅速。据不完全统计,用无性繁殖(Clone)技术生产种苗的植物包括:木本植物 156 种,花卉园艺植物 165 种,花卉 38 种,草本水果 9 种,中草药及其它植物 67 种,禾本科植物 45 种。其中在育种上卓有成效的农作物不少于 30 种^[2~6]。从甘蔗、芹菜、水稻的体细胞无性系中已筛选出大面积应用的优良品种;高粱蔗、小黑麦、小麦、玉米、大豆等体细胞 Clone 后代也应用于育种与生产实践(表 2)。

表 2 植物体细胞 Clone 育成新品系的部分农作物

品 名	特 点	年 代	作 者
甘 蔗	抗逆、高产、含糖量高	1980	曹吉恕
高粱蔗	生物学产量高、抗倒、含糖量多	1982	母秋华
玉 米	高配合力、抗倒伏的纯系	1982	母秋华
小黑麦	高产、抗病	1982	王敬驹
小 麦	高产、高抗逆	1984	朱至倩
水 稻	抗逆、高产、优质	1984	赵成章
水 稻	抗叶斑病	1986	凌定厚
胡 麻	抗叶斑病	1986	凌定厚
水 稻	抗白叶枯病	1986	孙立华
玉 米	多稳型饲料玉米	1987	施介春
芹 菜	抗镰刀菌萎蔫病	1987	Reppaport
野大麦	抗盐碱的细胞株系	1994	李彦舫
小 麦	抗赤霉病	1991	张 炎
大 豆	高产、抗食心虫	1993	母秋华
大 豆	高蛋白、高赖氨酸	1996	阿根廷
糜子蔗	高产、抗逆、含糖量高	1997	母秋华
水 稻	抗低温冷害	1993	金润洲
玉 米	抗盐突变系	1996	山东农大
玉 米	抗盐细胞系	1993	刘祥盛
羊 草	抗盐碱、高产	1992	王克平

2.4 动物克隆技术的应用

1907 年,R.G.Harrison 在做青蛙的神经细胞培养时发现了细胞的派生现象,从而发明了组织培养。几十年来,在动物的器官培养等项研究上取得了一定进展,但与微生物、植物相

比发展较慢。70 年代,我国科学家童弟周开创性的将鲤鱼的细胞核移植到鲫鱼的卵细胞中,并获得了嵌合体的后代。

1983 年,国内外一些科研单位开始用胚胎切割或用细胞核移植(nuclear transfer)进行优良家畜的无性繁殖,但由于受供体基因型或细胞来源的限制,应用范围不广。

1997 年,中外的动物克隆技术取得了突破性进展。

1997 年 2 月 23 日出版的英国自然杂志报道,英国爱丁堡罗斯林研究所的科学家,从一头成年母羊的乳腺中抽取细胞在实验室里进行培养,然后移到一个除去细胞核的卵子内,再将这个卵子细胞移入另一个雌性绵羊体内,让它在正常环境下发育,结果使用了 277 个乳腺细胞与去核的卵细胞融合,植入母羊子宫后只有 13 支母羊受孕,其中仅诞生了 1 只绵羊,取名为多利(Dolly)。

1997 年 3 月 2 日华盛顿邮报披露,1996 年 8 月,美国科学家从猴子身上取出细胞进行培养,克隆出 2 只罗猴。美国比弗顿的俄勒冈地区灵长目动物研究中心主任唐沃尔夫说:“我们只是想通过此试验能否复制出供研究用的遗传学上完全一样的猴子”。

1997 年 4 月,中国的科幻世界杂志报道,中国科学家已克隆出小白鼠^[7]。

3 动物克隆技术的展望与预警

3.1 动物克隆技术的展望

毫无疑问,动物克隆技术的应用是令人瞩目的科学创举。如同微生物、植物一样,分化了的细胞包括细胞核也具有全能性。它与传统的动物遗传工程相比有以下独到之处。

①经典的转基因动物操作方法是將遗传物质转入受精卵,受精卵则须在数小时内移入子宫。而罗斯林研究所克隆羊的技术可使体细胞象干细胞一样,以其细胞核中的遗传信息指令细胞繁殖、分化形成各种组织进而构建一个完整生命体。

②该项技术可在供体细胞进行操作之前进行离体保存。保存时间的延长意味着可对其进行更复杂的遗传修饰工作,如基因敲除(gene Rnock)、基因敲入(gene Knock in)、多基因加入(multiple gene additions)。

③可以提供大量的供体细胞,如大幅度提高供体细胞与卵细胞质融合与再生个体的技术可靠性,进而实现同源重组(homologous recombination),将对动物的品种改良有着巨大的应用价值。因为所需基因转移的成功率仅有百万分之一,病毒载体的基因插入不仅频率低且有很大的随机性,而同源重组可使目的基因的插入精确定位。

④利用克隆技术可以提高转基因动物的繁殖速度,筛选突变体。

⑤可以将入药用的蛋白基因转入动物,以便在动物的乳汁中得到有准确构象的药用蛋白。另外,可使转基因动物的器官拥有人类组织标记并去除动物组织标记,在医学上进行器官移植,因此可发展“器官农场”和“药用农场”(pharming)。Genzyme Transgenics 公司利用转基因山羊生产 RNase、因子 X、抗凝血酶Ⅲ、CD4 和单克隆抗体等。每只山羊可生产 1 kg/年的重组蛋白,这种“生物反应器”生产的营养物相当于数百倍微生物发酵的数量^[8]。

⑥可以无性繁殖相同基因缺陷型动物,作为新药筛选和研究动物遗传疾病的模型,可用于濒危物种的繁育、保存。

3.2 动物克隆技术的预警

所谓技术预警,是指在新技术研究、开发、推广和使用过程中可能产生的消极影响而提出的警示报告。

多利克隆羊的诞生,无疑是生命科学的进步,该项技术应用的潜力是巨大的。然而,任何生物的发展都会存在着正反两方面的问题,这项技术引起的轰动效应也有不同的反响。最强烈的反应是在欧美政界。欧洲委员会秘书长达尼尔·塔尔奇斯当即声明:“毫无疑问,此项技术是令人瞩目的科学创举,但是它是不能接受的,它需要更多的生物伦理规则”。美国总统克林顿也认为“多利的诞生‘乱了套’”。英国农业部已决定削减对苏格兰罗斯林研究所的资助。日本当局也作出类似的禁令。3月4日,美国政府发布命令,禁止将政府资金用于人体的无性繁殖试验。国际上也计划采取建立技术预警及安全领导机构,成立国际协作组织等措施。

生命科学家对克隆羊的反应近乎自然。半个世纪以来,动物的组织培养及基因工程一直是人类主攻的对象,克隆羊、猴,只不过是细胞(包括细胞核、细胞器及微小的遗传物质)全能性、可克隆性的部分实证。除对罗斯林研究所工作的祝贺和尊敬外,科学家们也提出不同的看法:①数量少、频率低,多利克隆羊只有一只,罗猴只有两只。而复制个体完全受供体细胞核的指令,没有受体细胞质的作用,缺少说服力的资料。②技术尚不成熟,比起微生物和植物来,克隆羊的技术及培养条件有些复杂,比现有的动物基因转移技术(微注射技术的成功率是10%~30%)手续繁杂且频率低。③离该项技术的实用化尚需很长时间,因为一些基因操作技术如同源重组本身就十分困难。④对起始材料的品种差异、遗传背景的研究尚缺少比较性。从我们对5种农作物和5种花卉克隆技术的成功率来看,Clone的形成存在着基因型的差异,特别是玉米。⑤对动物转基因、Clone后代在不同世代的遗传表现及生活力缺乏系统的研究。Spregelman 1967年发现,克隆的OB噬菌体经74次继代繁殖,复制RNA的长度只有原来的1/5。本课题组研究,玉米花粉克隆继代培养15次再生绿苗高度只有当代的3/4,结实率降低80%。高粱蔗体细胞克隆继代培养54次的再生绿苗虽然全部结实,但植株高度只有原来的1/2,穗长是原穗长的2/3,而分蘖多达27个,是原来的5倍。大豆的克隆后代也出现了株高变矮、分枝增多的体细胞变异。同时发现,玉米花粉克隆纯系对环境条件反应敏感,在灾害之年,抗病力较差。由此可见,对动、植物克隆技术的研究不应加以限制,而应该在正确指导思想和科学路线的指导下协作攻关,使它更加完善,进一步造福人类。

参 考 文 献

- [1] 孙勇如,等·遗传手册[M].1989,15—59.
- [2] 孙敬三,等·植物生物技术的品种改良[M].1980,20—25.
- [3] 刘艳芝等·体细胞无性系变异与作物品种改良[C].吉林省农业生物技术重点试验室论文集,1997,207—209.
- [4] Mu Qiuhua, et al·Screening of good somatic clone-derived plant lines of sorghum $\times$ sugarcane's progenes[J]. Genetic Manipulation in Crops·News letter. 1987, 15—21.
- [5] Mu Qiuhua·Establishment of pollen embryonic cell-clone of maize (*zea mays*) and their application in breeding[J]. Genetic Manipulation in Crops, 1988, 290—291.
- [6] 母秋华,等·大豆体细胞无性系(Clone)的变异与优良品系的筛选[J].大豆科学,1998(3):242—247.
- [7] 未 然·我们将复制一千个自己吗? [J]. 科幻世界,1997(4):34—36.
- [8] 张树康,等·略谈与克隆绵羊有关的若干技术问题及应用前景(N). 生物工程信息快报,1997(6):9—11.