

海洋动物细胞工程

CELL ENGINEERING IN MARINE ANIMAL

蔡健儿 相建海

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

海洋动物细胞工程的含义:应用现代生物学和先进的工程技术对海洋动物细胞或生殖细胞进行遗传操作或加工改造,生产出新的产品(医药、食品、化工和优良新品种)。细胞工程研究领域甚广且较早,但涉及海

洋方面的却起步较晚。当前最活跃最受人们关注的或今后可能发展的研究领域有如下几个方面。

收稿日期:1996年5月14日

1 染色体组工程(操作)

1.1 理论依据

1.1.1 染色体组操作细胞学依据 绝大多数动物的性别决定是由性染色体或存在于染色体内的性基因决定的。要改变性别,对染色体组进行操作是必要手段。为此,了解染色体组形成和变化的细胞学甚为必要。

海洋动物卵母细胞达到成熟,要经过二次成熟分裂,第一次成熟分裂由于同源染色体联合的结果,细胞中的染色体由 $2n$ 条单价体变成 n 条二价体,而DNA不复制,染色体数目却减少了一半,但每条染色体实际上由两条染色单体组成;第二次成熟分裂基本上与有丝分裂相同,分裂后每条染色体只由一条染色单体构成,细胞变成单倍体。诱导卵子形成什么样的三倍体或雌核发育都要依据成熟分裂的进程而行事。诱导三倍体的原理,是抑制受精卵不排放第一或第二极体,导致卵核染色体加倍,然后与单倍体精核结合形成了具有三套染色体组的三倍体。抑制第一极体排放($\bar{r}1pb$)称第一极体抑制型三倍体($3n-1pb$);抑制第二极体的($\bar{r}2pb$)称第二极体抑制型三倍体($3n-2pb$)。诱导雌核发育,首先将卵子予以激动,然后按诱导三倍体方法抑制第一或第二极体的排放,形成了两套染色体,其来源全由卵核提供,所以称雌核发育。

1.1.2 纯合度分析 $3n-1pb$ 型,由于正在分离的染色体又重新组合,遗传物质含有双亲的特性,杂合度较高;而 $3n-2pb$ 型,经过第一次成熟分裂,即将进行第二次成熟分裂时,由于受阻,姐妹染色单体又重新结合成为同祖结合,相对纯合度较高。因而一般说来,用于生产的诱导三倍体可应用 $3n-1pb$ 型为宜;而诱导雌核发育可应用 $\bar{r}2pb$ 这一时机为宜。

1.1.3 成熟分裂程序与受精的关系 成熟分裂的程度与受精有着密切的关系,不同动物之间有所差异。一般分为6种类型:(1)受精是在生发泡破裂之前,即处于初级卵母细胞时期,精子进入后才完成二次成熟分裂,例如海滨蛤、沙蚕等;(2)受精是在生发泡破裂之后,成熟分裂尚未进入中期,如对虾;(3)受精是在第一次成熟分裂中期,如贻贝、蛤、海鞘;(4)受精是在第二次成熟分裂中期,如绝大多数脊椎动物和文昌鱼等;(5)受精是在二次成熟分裂完成之后,如海胆、腔肠动物;(6)受精是在生发泡破裂之后任何时期,如海星。所以说,诱导时需要了解卵子属于哪一类型,然后选定诱导时机,诱导什么抑制型的三倍体或雌核发育。

1.2 多倍体诱导技术

1.2.1 诱导的目的 目前一般认为非偶数染色体组,染色体不能配套,性腺多不发育或发育不健全,导致吸收的能量转向体细胞的生长,使个体快速成长。这种个体往往具有较强的生命力,可作为养殖对象。

1.2.2 诱导方法 当前采用的方法有:高、低温休克法、静水压法、电脉冲法和化学药物(细胞松弛素B(CB)、秋水仙碱、咖啡因和生理环境调控法)处理。诱导时应注意三个基本因素:(1)处理起始时刻(受精后何时处理为宜);(2)处理强度(休克温度的高、低,压力的大小,电场强度和药物的浓度);(3)处理持续时间。鱼、虾、贝种类甚多,同一类的动物,三个因素基本上比较一致或相差不甚大,但有些相差甚远。故应视不同生物而定。

1.2.3 作用机理 初步认为,温度休克、静水压和咖啡因是破坏分裂器纺锤丝或使其变性,导致核分裂停止;CB是阻碍细胞表面收缩环的形成使细胞质分裂停止,另一说是破坏微管的形成使分裂不能进行;秋水仙碱是破坏纺锤体阻止中期染色体过渡到后期,致使不能分裂。

1.2.4 同源三倍体诱导 同种动物受精后的卵子,对其即将进行的成熟分裂予以抑制,尔后再恢复正常发育。抑制 $1pb$ 排放称同源 $3n-1pb$ 型;抑制 $2pb$ 的称同源 $3n-2pb$ 型。

1.2.5 异源三倍体诱导 用种间杂交的受精卵抑制第一或第二极体,所育出的个体称为异源三倍体。远缘动物种间杂交往往难于成活,倘若将它的受精卵卵核染色体加倍,与精核结合后便形成了可继续发育的三倍体个体。

1.2.6 四-六倍体诱导 正常的受精卵在即将行第一次卵裂前,阻止其分裂,使精卵结合为二倍体的染色体加倍变成同源四倍体;四倍体若与二倍体互交,理论上便可得到100%三倍体。四倍体雌、雄交配时,抑制 $1pb$ 或 $2pb$ 可得六倍体;四倍体卵子同“失活”精子受精,得全雌二倍体。

1.3 雌核发育诱导技术

1.3.1 诱导的目的和原理 主要是用于纯系育种。2代的雌核发育品种相当于7~8代的传统选育品种的纯合度。因为雌核发育是由姐妹染色单体的再结合,在 F_1 很多基因座是同祖结合型,再进行1代雌核发育,纯合度就更高。可用于回交或种间杂交,建立杂种优势的良种。

其诱导原理:首先将成熟的卵子予以激动,然后将单倍体的卵核染色体加倍成为可育二倍体。

1.3.2 诱导方法 诱导的技术关键有二:(1)激

动卵子。方法有 a. 取细针沾血液刺激卵子, 可激发卵子发育。b. 弱电流刺激。c. 用“失活”精子受精激动, 但精核不与卵核结合。使精子“失活”可用 γ -射线、X-射线和紫外线破坏精核 DNA, 但仍具有受精能力。d. 使用染料激发, 如 Trypaflavine, 甲苯胺兰和硫氮杂苯等, 也可用诱变剂(EMS)使精子“失活”。e. 用 Ca^{2+} 离子载体 A23187 激发。f. 用远缘种的精子激动卵子。

(2) 卵子染色体加倍(参见诱导三倍体方法)。

1.3.3 雌核发育二倍体诱导 动物卵子受激动之后, 卵子即使能分裂, 但其染色体仍属单倍体不能成活, 故需要进行染色体加倍。一般抑制第二极体为好, 因同源染色体分出的姐妹染色单体重新结合, 在遗传上是完全同祖结合型。由于动物界性染色体构型不同(为 XY 型、ZW 型、XO 和 ZO 型)和性基因等几种类型, 诱导出的雌、雄比例会出现各种情况, 以 XY 型和 ZW 型为例: XY 型, 雄性是异型配子, 雌性为同型(XX), 雌核发育的结果, 全为雌性个体。欲大量繁殖, 需要将其转性为“假雄性”, 然后与正常雌性交配, 便可得大量全雌性个体。ZW 型, 雄配子为同型, 雌配子为异型。雌核发育后, 50% 为雌性(WW), 50% 为雄性(ZZ), 互交后便为全雌性。

1.3.4 全雌三倍体诱导 在诱导雌核发育的基础上, 性染色体为同型的, 可用雄性激素诱导使雌核发育的个体转性为“假雄性”, 而虾、蟹类用造雄腺诱导使其转性为假雄性, 然后这些假雄性与雌性交配得到受精卵再把它染色体加倍, 则可得全雌三倍体。

1.4 雄核发育诱导技术

海洋中有些动物雄性个体比雌性长得快且个体又大, 或者有的濒危珍稀动物, 可采用先把精子保存起来, 然后用雄核发育法使精子复制原种。用此法进行全雄培育很有意义。诱导方法: 用 γ -射线照射卵子使核基因“失活”, 再用正常精子或保存精子受精, 呈单倍体发育, 然后阻出第一次卵裂后, 恢复正常发育, 便可得到雄核发育二倍体。这种技术路线可用于性的控制和纯系制作。

2 发育工程

2.1 授精工程

2.1.1 精荚移植 海洋中某些虾类或蟹类, 繁殖方式为纳精繁殖, 即雌性腹部有个纳精囊, 雌雄交配时, 雄性精荚排至此囊之中, 待繁殖时排出精子与卵子受精。人们可利用这一特性将异种精荚或经加工处理后的精荚移植于其中, 便可培育出杂交种或雌核发育个体。

2.1.2 精子作载体授精技术 精子作为基因的载体, 借授精之机把外源基因带进卵子之中, 基因便会整合到细胞核之中。实验需要在一定的介质中使基因附在精子表面, 这种介质目前使用的是氯化钠和 PEG。这是细胞工程技术又一种转基因手段。

2.2 转性技术

2.2.1 激素诱导转性 利用雌性或雄性激素浸泡动物幼体或掺在饵料中予以饲喂, 可以改变动物原有的遗传型性别, 但只是功能上改变为雌性或雄性, 而遗传型的性决定并没有改变。

2.2.2 腺体切除术 海洋中某些虾类和蟹类, 在雄性生殖腺的某些部位有一种腺体, 称为促雄腺, 它对动物的雄性化起着重要作用。倘若这种腺体被破坏或切除, 原为雄性个体却变成雌性。

2.2.3 腺体移植术 将上述促雄腺体移植于雌性体内, 便可转化为雄性。

上述研究可为某些甲壳类动物全雌性化制种建立一条新的途径。

2.3 细胞核转移技术

2.3.1 核转移技术 先分离同种或异种的胚胎细胞或体细胞或血球, 然后用显微注射、电脉冲、激光或细胞融合等技术, 将其导入或融合到受体的卵细胞中, 并使其发育成个体。核转移目的, 了解核质在个体发育过程中相互作用的关系; 培育动物新品种。

2.3.2 超雄动物培育技术 以性染色体异型动物(XY δ)为材料, 受精卵通过人工手术去其卵核, 然后使精核染色体加倍, 可直接得到超雄动物(YY δ)。

3 细胞组装

3.1 非细胞体系核重建技术

在无细胞结构的条件下, 将构建细胞核的各种“原料”及有关细胞质成分, 人为地混合在一起, 并经过一定方式诱导, 使混合物自发地构建细胞核的技术。其生物学意义: (1) 重建核过程与各组分相互作用提供模式, 人们可有意改变拆卸与再组装; (2) 了解生命活动中的核质关系; (3) 调控细胞周期; (4) 可进行不同生物遗传物质的组装, 开辟一条新的细胞工程途径。

3.2 细胞内基因工程

通过转座子或细胞自身的重组机制在细胞内操作基因, 使基因在细胞内扩增, 获得基因表达的产物。细胞内扩增技术可用固定化培养技术, 使细胞附着于载体上培养。载体主要有这几种: 海藻酸钙、聚氨基甲酸酯泡沫、中空纤维反应器、陶瓷基质, 玻璃和海绵基质等等。为加速细胞贴壁, 需加细胞贴壁素。

3.3 影泡载体技术

细胞或脂质体在低渗条件下造成影泡, 开放膜孔, 根据需要让细胞器、酶或基因等生物大分子包封入影泡中, 然后与靶细胞融合, 将大分子导入靶细胞。

4 细胞培养和细胞融合

4.1 海洋动物细胞培养

动物细胞培养的目的: 主要分离病毒; 制作检测试剂或疫苗; 生产特定转基因细胞表达的产物; 探索体外人工生产珍珠等。培养的细胞多以鳃、肾、肝和生殖细胞以及某些贝类的外套膜为对象。培养方式: 采用当前较先进的技术——(1)无血清培养法, 主要选用配制血清代用品; (2)固定化培养技术, 即细胞附着于载体上培养。载体种类甚多, 主要有海藻酸钙、聚氨基甲酸酯泡沫、中空纤维反应器、陶瓷基质、玻璃和海绵基质等等。为加速细胞贴壁, 需加细胞贴壁素。此法优点: 一则扩增培养的空间; 二则便于产物的分离。

4.2 细胞融合

两个同种或不同种的细胞或生殖细胞通过化学、物理或生物方法使其彼此融合在一起, 称为细胞融合。其融合方法:

4.2.1 化学法 (1)聚乙二醇作介导。其作用性

质是使细胞膜去膜表面的结合水, 导致细胞融合。(2)粘合剂诱导。钙粘素或粘基素是细胞粘合剂, 它可以使细胞表面膜增加粘性, 促使细胞彼此相粘在一起, 然后逐渐融合。

4.2.2 物理法 (1)电脉冲介导。应视不同细胞对场强、脉宽、脉冲数等条件的要求有所不同。另一要素是电场介质十分重要, 一般选用甘露醇等等。(2)激光辐射诱导。其作用是破坏细胞表面膜结构, 导致细胞彼此融合。

4.2.3 生物法 (1)使用灭活仙台病毒作介导; (2)应用免疫抑制剂(如环孢菌素 A), 可防止细胞彼此相互排斥; (3)细胞介导免疫。动物经体内甲种细胞免疫之后, 取其细胞与甲种细胞进行融合。

5 动物细胞种质库

旨在用低温或超低温(-196℃)对动物配子(精子或卵子)、胚胎或幼体以及某些细胞进行保存作为种质的来源。目前在海洋鱼、虾和贝类的研究中, 都有成功的例子。所用的防冻剂, 一般用甘油、甲醇、糖类或二甲亚砜等。可单独使用, 也可混合用。浓度: 甘油、甲醇为5~15%; 二甲亚砜为10~20%为宜。均应视不同材料而定。保存剂用液氮为好, 干冰也可。