

* 专题评述 *

影响哺乳动物体细胞克隆效率因素的研究进展*

毕春明 文端成 陈大元**

中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080

摘要 动物克隆技术的低效率在很大程度上限制了它的应用. 克隆过程的多步骤决定了影响因素的多样性. 综述了体细胞核的重编程、供体细胞的选择、受体胞质、活化方法、培养条件等对克隆效率的影响, 对这些问题的认识将有利于对克隆机理的研究.

关键词 动物克隆重编程 供体细胞 受体胞质 活化

哺乳动物体细胞克隆技术经过几年的发展, 已经有了很大的突破, 相继诞生了绵羊^[1]、山羊^[2]、牛^[3]、猪^[4]、鼠^[5]、猫^[6]、兔^[7]等多种克隆动物, 为家畜良种繁育、濒危动物拯救、人类疾病的治疗等开辟了广阔的前景. 但目前的克隆效率很低, 后代出生率平均不超过3%, 且克隆动物出生后有很多异常, 这大大限制了它的应用.

目前体细胞克隆技术还有许多需要改进的方面, 本文主要讨论了体细胞核的重编程、供体细胞的选择、受体卵母细胞、活化方法、培养条件等对克隆效率的影响, 对这些问题的研究将有助于揭示克隆的机理.

1 体细胞核的重编程

体细胞与生殖细胞的重要区别是, 体细胞的基因组在发育过程中发生渐成性的调整(epigenetic modification), 即通过对DNA的甲基化, 使含有相同基因组DNA序列的不同类型的体细胞, 具有不同的结构和功能. DNA甲基化是指DNA序列中“C_pG岛”中的胞嘧啶发生甲基化. 位于基因启动子区域的“C_pG”甲基化与否, 决定了该基因是否表达. 生物体通过这种形式实现了含有相同DNA序列的体细胞表达不同的基因, 行使不同的功能. 核移植中重编程的重要过程, 是将已分化的体细胞

的DNA进行甲基化扭转, 并重新建立, 使其恢复为合子时的状态, 即表达胚胎发生过程中的基因. 人们认为大多数克隆胚胎无法完成发育是因为对体细胞的重编程不完全或失败. 检测克隆小鼠的胎盘、皮肤、肾脏细胞, 发现了甲基化异常或未甲基化, 说明核的重编程不彻底^[8].

重编程的一个重要指标是胚胎中印迹基因的表达. 印迹基因是指哺乳动物胚胎发育过程中, 特定遗传位点上母源和父源等位基因的差异表达. 印迹基因的正确表达对胚胎的正常发育很重要, 而对已分化体细胞功能的实现并非必需. 人们认为克隆动物发育过程中表现的体积大、胎盘大等异常与印迹基因的表达异常有关^[9]. 检测克隆小鼠发现了大范围的印迹基因异常^[10]. 但Inoue等^[11]检测克隆小鼠的印迹基因发现, 被检测的基因都处于正常表达范围. 由于只检测了个别基因, 不能说明所有的印迹基因表达都无异常.

有些基因的重编程是成功的. 现已发现, 在正常体细胞中处于非转录或转录状态的X染色体, 经核移植, 表现出活化或非活化状态. 说明基因组中与X染色体的失活、活化有关的基因重编程成功^[12]. 另一个例子是端粒酶基因. 体细胞的端粒由于多次分裂而变短, 但对克隆后代的端粒检测发现, 除“多莉”^[13]外, 克隆牛和小鼠的端粒与对照

2003-01-20 收稿, 2003-03-10 收修改稿

* 科学技术部攀登专项(95-专-08)和中国科学院知识创新工程重大项目(KSCX1-05-01)资助

** 联系人, E-mail: chendy@panda.ioz.ac.cn

相比无差别^[14,15]。即使用衰老的体细胞做供体,克隆后代的端粒长度也能复原^[16]。说明端粒酶基因也重编程成功。

大量实验说明核移植中体细胞重编程不完全。Rideout等^[10]认为,核移植后,体细胞的重编程有3种情况:(i)重编程失败,重构胚很快死亡;(ii)部分重编程,虽然启动胚胎发育,但胚胎会停滞在某一时期,导致发育失败;(iii)发生可信的重编程,得到克隆后代。但令人感兴趣的是,Ohgane等发现,出生后表型正常的克隆动物,甲基化却异常^[17]。说明体细胞中一定程度的甲基化异常并不危及生命,同时也说明即使表型正常的克隆动物,也不一定与其来源的动物具有一致的表型。

人们认为,在正常受精过程中,卵母细胞接受精子,相互识别,启动胚胎发育。而核移植中,导入卵母细胞的是已分化的体细胞,其基因组状态与精子有很大差异,卵母细胞对其“识别”时出现困难,从而导致重编程的不完全。也许选择合适的卵母细胞与体细胞的组合,可能在核移植机理还不清楚的情况下,能提高克隆的效率。

2 体细胞的选择

体细胞的选择是动物克隆中的重要步骤。实验表明,不同的细胞周期和细胞类型,会对克隆效率产生不同影响。

2.1 体细胞的细胞周期

不同细胞周期的细胞其DNA含量不同,核移植后将决定重构胚的倍性。

人们曾一度认为,经血清饥饿处于休眠期(G_0 期)的细胞,较易于重编程^[1]。早期许多克隆动物都来自 G_0 期细胞。后来发现,经血清饥饿的细胞,DNA发生碎片化,显示凋亡特征^[18,19]。人们认为,克隆胚胎的后期流产可能是由于DNA被破坏或DNA修复不当,而这些错误在胚胎发育过程中又不能得到恰当的纠正。

后来,人们用 G_1 期做供体进行克隆,并得到了后代^[20]。Edwards等^[21]比较了 G_1 期和 G_0 期细胞做供体的克隆牛,发现 G_1 期细胞克隆后代的出生率高于 G_0 期细胞的克隆后代。但Wells等的结果却相反, G_0 期细胞做供体克隆效率高于 G_1 期细胞的效率^[22]。这其中也许存在种的差异,也不排除由于技术手段及实验条件的不同造成的影响。

G_1 期细胞可通过药物处理得到。本实验室曾采用aphidicolin处理牛耳成纤维细胞。Aphidicolin是哺乳动物细胞中DNA多聚酶的抑制剂,可将细胞同步化于 G_1/S 检验点。将处理后的牛耳成纤维细胞用于核移植时,可明显提高重构胚的囊胚率(未发表数据)。因此,药物处理可作为核移植中细胞同步化的方法。

随着克隆技术的发展,含有四倍体DNA的 G_2/M 期细胞也被用于核移植。并得到了来自 G_2/M 期细胞的克隆鼠、牛和转基因克隆猪^[23~25]。说明处于 G_2/M 期的体细胞可支持重构胚发育至囊胚。但融合后极体的排放是关键,胚胎的发育率又比来自 G_0 和 G_1 期细胞的重构胚低。

2.2 体细胞的类型

已诞生的多种克隆动物来自不同类型的细胞,包括成纤维细胞、卵丘细胞、输卵管上皮细胞、皮肤细胞等,其克隆效率也有差异。猪的核移植中,来自胎儿成纤维细胞重构胚的囊胚率高于卵丘细胞为供体的重构胚^[26]。对已出生的克隆牛统计发现,大多数来自卵丘细胞和输卵管上皮细胞的个体,发育到成年并有生育能力。而来自皮肤细胞的10头克隆牛中,仅有2头发育到成年^[27,28]。这可能是由于不同类型的细胞重编程的难易程度不同。

供体细胞的选择有重要的实际意义,这方面的系统研究将有助于对克隆机理的认识。

3 受体卵母细胞的选择

供体细胞经核移植导入卵母细胞以后,紧接着发生核质相互作用,核中的众多因子被来自卵母细胞的因子所取代。因此,卵母细胞的选择成为影响核移植效率的重要因素。

3.1 卵母细胞所处的时期

目前的动物克隆,大多数以MII期卵母细胞为受体^[1~7]。因为正常受精中正是此时的卵母细胞与精子结合,完成受精,启动胚胎的发育。此时的卵母细胞含有高的成熟促进因子(MPF)活性,体细胞导入后,形成类合子核,在MPF作用下,核膜破裂;经活化后,MPF活性下降,重构胚进入正常的有丝分裂。而且, MII期卵母细胞刚刚排出第一极体,其纺锤体位于邻近极体的位置,去核比较容易。

人们也曾尝试用其他时期的卵母细胞做受体。比较猪的MI, MII期卵母细胞为受体的核移植研

究发现: M I 期卵母细胞为受体, 重构胚可发育至囊胚, 但发育率远低于以 M II 期卵母细胞为受体的重构胚^[29]. 可能 M I 期的卵母细胞胞质组成与 M II 期的不同, 与重编程有关的因子存在于 M II 期卵中, 导致核的重编程不完全. Liu 等^[30]用牛的末期 II 卵母细胞为受体核移植发现, 与中期 II 卵母细胞比较, 末期 II 卵母细胞做受体, 融合率较低, 而发育率却较高. 用不同胞质周期的卵母细胞发育率不同, 可能由于随着卵母细胞胞质状态的不同, 采用的核移植程序, 包括融合方法、活化的时间和方法都应做适当的调整, 以适应不同的胞质组成. 而目前的核移植程序都是针对 M II 期胞质的, 这可能在一定程度上影响了其他时期的卵母细胞为受体的核移植结果.

Ono 等^[23]以同步于 M 期的小鼠胎儿成纤维细胞为供体核移植发现, 重构胚可发育至囊胚, 但无后代出生. 若在原核期, 将原核移入去核的 1-细胞受精卵中, 得到了两个核移植后代. 说明受精卵胞质比未受精卵的胞质更有利于核的重编程. 同时也说明, 染色质重编程所必须的因子在卵母细胞被活化后并未立即下降, 仍存在于第一个细胞周期, 而受精后的胞质环境诱导了支持发育的基因的表达.

3.2 卵母细胞的活化情况

用做受体的 M II 期卵母细胞有两种形式: 活化和未活化的形式. M II 期卵母细胞的重要特征是其含有较高的 MPF. 活化即是在核移植前, 模拟精子的作用, 经电流或活化剂刺激卵母细胞, 降低胞质内的 MPF 活性. 此时的卵母细胞, 可接受处于任何细胞周期的体细胞, 又称“万能受体”, 供体细胞导入后, 仍按原来的细胞周期继续重构胚的发育. 在克隆绵羊和山羊时用活化的卵母细胞做受体, 得到较理想的结果^[31,32]. 但小鼠和牛的核移植中, 若用活化的卵母细胞作受体, 重构胚发育效果不好^[33]. 这方面可能存在物种差异.

未活化的卵母细胞, 含有较高的 MPF 活性. 供体细胞导入后, 核膨胀, 形成类合子核. 在 MPF 作用下, 核膜破裂, 染色体凝集. 现在认为这一过程涉及染色体结构的调整和基因的重编程, 但未活化的受体不能接受 S 期供体细胞. 因为 MPF 会使正在复制的 DNA 碎片化, 导致发育失败.

3.3 卵母细胞的来源

不同来源的卵母细胞, 其质量会有所不同.

Bruggerhoff 等用两种品系的牛卵胞质做受体, 活体采卵发现, 在一段时间内, A 品系的采卵量、卵母细胞的质量及核移植的发育率都比 B 品系高. 同一时间内, A 品系中每只母体提供的卵经核移植后, 可移植的胚胎也比 B 品系的高, 显示了不同来源卵母细胞质量的差异^[34]. 在猪的研究中发现, 来自一种大母猪的卵经核移植后, 重构胚的分裂率和囊胚发育率都明显高于来自一种小母猪的卵^[35]. 这说明, 在供核相同的情况下, 受体胞质的组成影响核移植的效率. 卵胞质组成的不同主要体现在胞质内线粒体 DNA 的不同. 线粒体的调节作为一个重要的胞质因素, 参与了细胞核与胞质的合作, 不同的线粒体组成也许影响了重构胚的分裂及其后的继续发育.

4 去核方法

快速而准确的去核会避免孤雌发育, 缩短体外操作时间, 减少实验中的干扰因素, 对实验结果的统计有重要意义. 目前主要有 3 种去核方法.

4.1 盲去法

盲去法是较常用的去核方法. 利用刚排出极体的 M II 期卵母细胞, 其纺锤体还位于与第一极体相邻的位置, 用针吸取极体及其下方的 1/4~1/3 卵胞质, 即能将纺锤体和极体一起吸走. 这种方法简便、易行, 但在去掉卵母细胞周围的卵丘细胞时, 极体容易移位, 导致漏掉核或去核不彻底, 造成孤雌发育.

4.2 Hoechst33342 显示法

Hoechst33342 是一种 DNA 的活体荧光染料, 卵母细胞经 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Hoechst33342 染色后, 在紫外光激发下, 可清楚显示纺锤体, 从而准确去核. 但紫外光照射会对卵母细胞造成一定的损伤. 研究表明, 牛的卵母细胞经 Hoechst33342 染色后, 紫外光照射低于 10 s 时, 可以出生核移植后代; 而紫外光照射超过 30 s, 会破坏膜的完整性, 改变蛋白质的合成方式, 降低卵母细胞的质量, 进而影响实验结果^[36].

4.3 蔗糖显示法

与荧光染料标记相比, Wang 等^[37]发展的改变操作液中蔗糖浓度来显示纺锤体的方法更为可取. 将小鼠卵母细胞置于含 90 mmol/L 蔗糖的操作液中, 约 10 min 后, 纺锤体呈透明状, 且略微突起.

吸取这部分胞质,检测发现去核率达100%。Liu等做牛的核移植时,将操作液中的蔗糖浓度升高到0.3 mol/L时,卵母细胞的纺锤体也形成透明突起,去核率达95%,且吸取的胞质很少。与对照相比,这种方法得到的重构胚的分裂率、囊胚率和囊胚细胞数均无差异,说明这是一种安全的去核方法^[38]。牛和小鼠实验中所用蔗糖浓度的不同,可能与物种差异有关。

5 活化方法

采用未活化的卵母细胞作受体,核移植后,需要活化来模拟受精过程中精子对卵母细胞的作用,降低卵母细胞内的MPF活性,启动重构胚的有丝分裂。目前对活化方法的选择主要集中在活化时间和活化试剂上。

5.1 活化时间

融合后的活化时间主要有两种——即时活化和延迟活化。

Boquest等采用含有钙离子和不含钙离子的融合液,比较了重构胚即时活化和延迟活化的结果,他们发现,采用无钙融合液,融合后3h,用离子霉素和6-DMAP化学活化,分裂率高达93%,明显高于含钙离子的即时活化的组(67%),且有后代出生^[39]。在牛和小鼠的克隆中也发现延迟活化囊胚率高的现象^[33,31]。现在,人们普遍认为,延迟活化有利于核的重编程。

5.2 活化试剂

目前选用的活化剂主要有A₂₃₁₈₇、离子霉素、放线菌酮(CHX)、6-DMAP等。A₂₃₁₈₇和离子霉素是钙离子载体,可引起胞内钙离子浓度的升高,引发一系列的磷酸化和去磷酸化事件,最终导致MPF活性降低。放线菌酮可抑制蛋白质的合成,使钙信号所作用的下流蛋白分子的合成受到抑制。6-DMAP是蛋白激酶抑制剂,它本身不能灭活MPF,但能阻止第二极体的排出,促进单个原核的形成,保持正常的染色体倍性,是一种辅助活化剂。牛的核移植实验中,不同活化剂的组合有不同的发育率。在牛的核移植中,Galli等^[40]发现,离子霉素-6-DMAP活化比离子霉素-CHX活化有更高的发育率,而Booth^[41]却发现,牛的孤雌发育中用6-DMAP活化有较高的囊胚率,而核移植中CHX活化胚胎囊胚率较高。活化方法的选择,物种差异比

较明显,不同的动物,活化方法从电活化到化学活化,有不同的组合,需要根据物种不同作出调整。

6 重构胚的培养条件

核移植构建的重构胚需在体外培养到一定时期(多为囊胚)才移植到同期发情的受体中。人们认为克隆动物的某些异常可能与体外培养条件有关。

后代体大综合症(large offspring syndrome, LOS)是大多数克隆动物出生时的特征,人们认为这可能与体外培养条件有关。但将正常胚胎移植的后代和体内自然生殖的后代比较发现,8%的胚胎移植出生的后代比体内自然生殖的后代重^[42]。说明即使在体外培养的时间很短对后代的体重也会有影响。Yang等^[43]将正常的体内受精的胚胎在体外培养5d后移植,发现后代中部分出现体积增大。检测这些个体的印迹基因发现,IGF2R的表达异常。似乎说明印迹基因的表达容易受到体外培养条件的影响。

目前倾向于认为培养液中的血清和共培养影响了重构胚的发育。Jacobsen等^[44]发现,含血清、共培养的胚胎后代出生时的体重明显高于不含血清、非共培养的胚胎后代,且容易引起难产。这些结果表明,胚胎培养液中的血清及共培养可能是引起LOS的主要原因。但Chavette-Palmer等^[45]对克隆牛和正常牛后代的长期观察、比较发现,即使培养条件相同,核移植后代出生时的体重仍然比体外受精的后代重,可能核移植技术本身也是LOS的原因之一。

克隆胚胎与正常胚胎在培养条件的要求上有差异。Yang等^[46]培养小鼠的重构胚发现,1-细胞时,CZB培养液中加入葡萄糖是有好处的,而以往研究表明,正常的小鼠胚胎体外发育早期并不需要葡萄糖;公认的支持小鼠早期分裂的KSOM液却不支持1-细胞或2-细胞的克隆胚胎的发育。这些培养条件的差异表明,克隆胚胎在生理和代谢上发生了一定的改变,不能完全按照正常胚胎的要求来培养克隆胚胎,这也许也是克隆胚胎发育率低的一个原因。

7 种的差异

各种克隆动物的出生率虽然都不超过3%,但其难易程度有所不同。人们注意到,牛和鼠克隆后代的异常现象并未在克隆猪上出现,可能猪的克隆胚胎甲基化状态与受精卵相似^[47]。家兔作为一种常

规实验动物,直到最近才被克隆^[7]. 研究者认为,成功的关键是胚胎着床窗口期的把握. 这些都说明,物种间生理条件的不同,也是影响克隆效率的因素. 克隆效率较高的一个特例是日本黑牛,高达19%^[27]. 这一惊人的成功率提醒人们,对日本黑牛的研究也许会为提高动物的克隆效率提供有价值的信息.

8 展望

克隆技术发展到现在,仍有许多尚待解决的问题,尤其是核移植后发生的重编程情况,决定着胚胎的命运. 对这些问题的解答需要更深入地了解胚胎发育中的后成性编程(epigenetic programming)和重编程(epigenetic reprogramming)的分子机理,以寻找提高克隆效率和安全性的途径,使克隆技术的巨大应用价值得以实现.

参 考 文 献

- Wilmot I, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 1997, 385: 810
- Baguisi A, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nature Biotechnol*, 1999, 17: 456
- Kubota C, et al. Six cloned calves produced from adult fibroblast cells after long-term culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 990
- Polejaeva I A, et al. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, 2000, 407: 505
- Wakayama T, et al. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature*, 1998, 394: 303
- Shin T, et al. A cat cloned by nuclear transfer. *Nature*, 2002, 415: 859
- Chesne P, et al. Cloned rabbit produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature Biotech*, 2002, 20: 366
- Yanagimachi R. Cloning: Experience from the mouse and other animals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2002, 187: 241
- Rideout III W M, et al. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science*, 2001, 293: 1095
- Humphreys D, et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science*, 2001, 293: 95
- Inoue K, et al. Faithful expression of imprinted genes in cloned mice. *Science*, 2002, 295: 297
- Eggan K, et al. Hybrid vigor, fetal overgrowth and viability of mice derived by nuclear cloning and tetraploid embryo complementation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6209
- Shiels P G, et al. Analysis of telomere lengths in cloned sheep. *Nature*, 1999, 399: 316
- Bett D H, et al. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomere length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 1077
- Wakayama T, et al. Cloning of mice to six generations. *Nature*, 2000, 407: 318
- Lanza R P, et al. Extension of cell life-span and telomere length in animals cloned from senescent somatic cells. *Science*, 2000, 288: 665
- Ohgane J, et al. DNA methylation variation in cloned mice. *Genesis*, 2001, 30: 45
- Boquest A C, et al. Flow cytometric cell cycle analysis of cultured porcine fetal fibroblast cells. *Biol Reprod*, 1999, 60: 1013
- Lee C K, et al. Inhibition of apoptosis in serum starved porcine embryonic fibroblasts. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62: 106
- Kacinathan P, et al. Production of calves from G₁ fibroblasts. *Nature Biotech*, 2001, 19: 1176
- Edwards J L, et al. Development of cloned embryos reconstructed with serum fed or starved adult granulosa cells. In: Program of the 27th Annual Meeting of the International Embryos Transfer Society, 2001, Omaha, NE. 265
- Wells D N, et al. Coordination between donor cell type and cell cycle stage improves nuclear cloning efficiency in cattle. *Theriogenology*, 2003, 59(1): 45
- Ono Y, et al. Cloned mice from fibroblast cells arrested at metaphase by a serial nuclear transfer. *Biol Reprod*, 2001, 64: 44
- Tani T, et al. Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming. *Biol Reprod*, 2001, 64: 324
- Lai L, et al. Feasibility of producing porcine nuclear transfer embryos by using G₂/M-stage fetal fibroblast as donors. *Biol Reprod*, 2001, 65: 1558
- Uhm S J, et al. *In vitro* development of porcine enucleated oocytes reconstructed by the transfer of porcine fetal fibroblasts and cumulus cells. *Theriogenology*, 2000, 54: 559
- Kato Y, et al. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science*, 1998, 282: 2095
- Kato Y, et al. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil*, 2000, 120: 231
- Miyoshi K, et al. Development of porcine embryos reconstituted with somatic cells and enucleated metaphase I and II oocytes matured in a protein-free medium. *Dev Biol*, 2001, 1: 12
- Liu J L, et al. Effect of telophase enucleation on bovine somatic nuclear transfer. *Theriogenology*, 2000, 54: 989
- Liu L et al. Nuclear transfer in sheep embryos: The effect of cell-cycle coordination between nucleus and cytoplasm and the use of *in vitro* matured oocytes. *Mol Reprod Dev*, 1997, 47(3): 255
- Baguisi A, et al. Production of goats by somatic cell nuclear transfer. *Nat Biotechnol*, 1999, 17(5): 456
- Wakayama T, et al. Effect of cytokinesis inhibitors, DMSO and the timing of oocyte activation on mouse cloning using cumulus cell nuclei. *Reproduction*, 2001, 122: 49
- Bruggerhoff K, et al. Bovine somatic cell nuclear transfer using recipient oocytes recovered by ovum pick-up: Effect of maternal lin-

- eage of oocyte donors. *Biol Reprod*, 2002, 66: 367
- 35 Kuhholzer B, et al. Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pigs. *Biol Reprod*, 2001, 64: 1695
- 36 Westhusin M W, et al. Viable embryos and normal calves after nuclear transfer into Hoechst stained enucleated demi-oocytes of cows. *J Reprod Fertil*, 1992, 95: 475
- 37 Wang M K, et al. *In vitro* fertilization of mouse oocyte reconstructed by transfer of metaphase II chromosomes results in live births. *Zygote*, 2001, 9: 9
- 38 Liu J L, et al. Hypertonic medium treatment for localization of nuclear material in bovine metaphase II oocytes. *Biol Reprod*, 2002, 66: 1342
- 39 Boquest A C, et al. Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells. *Biol Reprod*, 2002, 66: 1283
- 40 Galli C, et al. Comparison of microinjection (*piezo-electric*) and cell fusion for nuclear transfer success with different cell type in cattle. *Cloning Stem Cell*, 2002, 4: 189
- 41 Booth P J, et al. Effect of two activation treatments and age of blastomere karyoplasts on *in vitro* development of bovine nuclear transfer embryos. *Mol Reprod Dev*, 2001, 60: 377
- 42 Pace M M, et al. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol Reprod*, 2002, 67: 334
- 43 Young L E, et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics*, 2001, 27: 153
- 44 Jacobsen H, et al. Body dimensions and birth and organ weights of calves derived from *in vitro* produced embryos cultured with or without serum and oviduct epithelium cells. *Theriogenology*, 2000, 53: 1761
- 45 Chavatte-Palmer P, et al. Clinical, hormonal, and hematologic characteristics of bovine calves derived from nuclei from somatic cells. *Biol Reprod*, 2002, 66: 1596
- 46 Chung Y G, et al. Nuclear-cytoplasmic "tug of war" during cloning: Effect of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation cloned mouse embryos. *Biol Reprod*, 2002, 66: 1178
- 47 Kang Y K, et al. Typical demethylation events in cloned pig embryos. *J Biol Chem*, 2001, 276: 39980

我国古植物学家成功获取反应气候变化和全球碳循环的准确信息

兰州大学古生物学创新研究小组,在自然科学基金资助下,运用古植物解剖学、植物生理学和有机地球化学等多学科交叉的方法,历经3年的悉心分析,发现了百万年甚至上千万年前化石银杏与现代银杏之间的关系,将植物化石气孔参数和碳同位素特征有机地联系在一起,可以成功获取气候变化和全球碳循环的准确信息,银杏叶片的多学科分析能够敏感地反映大气CO₂浓度及其环境的变化.研究还证明:生长于中国和英国的现生银杏叶与中生代和第三纪化石银杏叶的碳同位素值很相似,这表明尽管经过了上千万年的演化,但银杏叶的碳吸收能力与水平衡功能并没有发生太大的变化,因此银杏叶化石是良好的古环境指标.

这项新的综合研究表明,化石植物叶片的气孔参数、碳同位素组成与大气CO₂浓度及其环境变化密切相关,活化石银杏的叶片准确记录了大气CO₂浓度变化的信息,它所反映的环境数据是目前所知精度最高的古大气CO₂浓度及其环境变化的测试指标,而且清楚反映出干旱环境和潮湿环境的变化.

该研究成果刊登在美国科学院主办的以自然科学为主的综合性学术刊物《PNAS》(美国科学院院报)上,引起了国内外同行的极大关注,荷兰Utrecht大学的古植物学家Wolfram Kuerschner评论:“这是一项极其重要的、新颖的独创性研究”.英国Sheffield大学的古植物学家David Beerling说:“这项研究激动人心,其突破性进展在古植物学领域具有创新性的意义”.这一最新研究成果采用多学科交叉的研究方法,把植物化石气孔参数、碳同位素组成与古大气CO₂浓度及其环境变化的研究带到一个崭新的高度.

(刘羽 姚玉鹏 蒋复初 王广才 供稿)